(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113950334 B
(45)授权公告日 2025.01.28

(21)申请号 202080042152.1
(22)申请日 2020.06.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113950334 A
(43)申请公布日 2022.01.18
(30)优先权数据
62/858,764 2019.06.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/036480 2020.06.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/247858 EN 2020.12.10
(73)专利权人 俄勒冈健康与科学大学
地址 美国俄勒冈州
(72)发明人 克劳斯·J·弗吕
路易斯·J·皮克
本杰明·J·布尔维茨
斯克特·G·汉森 约拿·B·萨夏
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 张珊珊
(51)Int.Cl.
A61K 39/29(2006.01)
(56)对比文件
US 2018133321 A1,2018.05.17
WO 0116163 A2,2001.03.08
Yuxia Zhang等.Hepatitis B virus core antigen epitopes presented by HLA-A2 single-chain trimers induce functional epitope-specific CD8+ T-cell responses in HLA-A2.1/Kb transgenic mice.Immunology.2007,第121卷(第1期),摘要、第108页右栏第2段至第109页左栏第1段、图4.
审查员 马忠强

权利要求书1页 说明书23页
序列表5页 附图8页

(54)发明名称

乙型肝炎病毒特异性T细胞应答

(57)摘要

本公开内容涉及产生用于治疗或预防乙型肝炎病毒感染的免疫应答的方法。本公开内容还涉及产生用于治疗或预防乙型肝炎病毒感染的MHC-E和/或MHC-II限制性CD8+T细胞的方法。

CN 113950334 B

1.用于在对象中产生针对HBV的免疫应答的表达HBV抗原的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物,其中所述乙型肝炎抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

2.表达HBV抗原的CMV载体在制备用于在对象中产生针对HBV的免疫应答之药物中的用途,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物,其中所述乙型肝炎抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

3.表达HBV抗原的CMV载体在制备用于治疗慢性HBV感染之药物中的用途,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物,其中所述乙型肝炎抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

4.权利要求2或3所述的用途,其中所述乙型肝炎抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)。

5.权利要求2或3所述的用途,其中所述乙型肝炎抗原是TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

6.权利要求2或3所述的用途,其中至少10%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

7.权利要求6所述的用途,其中至少20%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

8.权利要求6所述的用途,其中至少30%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

9.权利要求6所述的用途,其中至少40%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

10.权利要求6所述的用途,其中至少50%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

11.权利要求6所述的用途,其中至少60%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

12.权利要求6所述的用途,其中至少75%由所述CMV载体引发的CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物的限制。

乙型肝炎病毒特异性T细胞应答

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年6月7日提交的美国临时申请No.62/858,764的权益,其在此通过引用整体并入。

[0003] 关于联邦政府资助的研究与开发的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号R01 AI117802、R01 AI129703、R01 AI140888和P51OD011092的政府支持下完成的。政府对本发明享有某些权利。

[0005] 以电子方式提交的序列表的引用

[0006] 与本申请一起提交的以电子方式提交的ASCII文本文件的序列表(名称4153_011PC01_Seqlisting_ST25;大小:4,288字节;和创建日期:2020年6月5日)的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0007] 慢性乙型肝炎病毒感染(Chronic hepatitis B virus infection,CHB)是一个重大的全球健康问题,其影响全世界2.47亿个体,并且每年导致887,000例死亡。虽然可获得有效的预防性疫苗,但有10至15%的个体对疫苗接种应答不充分,并且未得到针对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染的保护(Joint Committee on Vaccination and Immunisation.Hepatitis B.In Immunisation Against Infectious Disease,3rd ed.p.468.)。CHB可导致进行性肝功能障碍、肝硬化,以及在某些情况下的肝细胞癌。针对CHB有多种治疗选择,包括PEG化的IFNα和逆转录酶抑制剂(Bhattacharya,D.,和C.L.Thio.2010.Review of hepatitis B therapeutics.Clin.Infect.Dis.51:1201-1208.),但这些治疗很少是治愈性的(Zhang et al.2016.HBsAg seroclearance or seroconversion induced by peg-interferon alpha and lamivudine or adefovir combination therapy in chronic hepatitis B treatment:a meta-analysis and systematic review.Rev Esp Enferm Dig 108:263-270.)。

[0008] 以下事实支持开发针对CHB的细胞免疫治疗策略:90至95%的急性HBV感染成人发动广泛的、高度功能性的HBV特异性T细胞应答并随后清除感染(Maini et al.1999.Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+)T cells associated with the control of infection.Gastroenterology 117:1386-1396;Phillips et al.2010.CD8(+)T cell control of hepatitis B Virus replication:direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions.J.Immunol.184:287-295;Fisicaro et al.2009.Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection.Gut 58:974-982.)。相比之下,进展为CHB的患者表现出聚焦范围窄、频率低、功能衰竭的HBV特异性T细胞应答(Bedoletti,A.,和C.Ferrari.2016.Adaptive immunity in HBV infection.J.Hepatology 64:S71-S83;Rehermann,B.,和A.Bertoletti.2015.Immunological aspects of antiviral therapy

of chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infections.Hepatology 61:712-721;Kurktschiev et al.2014.Dysfunctional CD8+ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction.J.Exp.Med.211:2047-2059.)。因此,目前正在开发中的许多免疫治疗策略都关注于增强HBV特异性T细胞免疫。

[0009] 目前正在研究的免疫治疗旨在利用免疫系统来更好地靶向HBV感染的肝细胞,并且包括用模式识别受体激动剂、检查点抑制剂阻断剂、治疗性疫苗和过继性T细胞治疗进行的免疫刺激(Gill,U.S.,和P.T.F.Kennedy.2017.Current therapeutic approaches for HBV infected patients.J.Hepatology 67:412-414.)。HBV免疫治疗面临的一个常见障碍是T细胞免疫耐受(Zong et al.2019.Breakdown of adaptive immunotolerance induces hepatocellular carcinoma in HBsAg-tg mice.Nature Communications 10:221;Kong et al.2014.γδT cells drive myeloid-derived suppressor cell-mediated CD8+ T cell exhaustion in hepatitis B virus-induced immunotolerance.J.Immunol.193:1645-1653;Milich,D.R.2016.The Concept of Immune Tolerance in Chronic Hepatitis B Virus Infection Is Alive and Well.Gastroenterology151:801-804.)。尚未完全理解免疫耐受的最初触发因素,其将成功清除急性HBV病毒血症的患者与未能如此的患者区分开来。然而,这可能部分是肝的免疫耐受环境的结果。因此,为了通过免疫治疗成功清除CHB,必须克服T细胞免疫耐受。不幸的是,迄今为止还没有免疫治疗持续地实现这一目标,并且由于缺乏生理相关的CHB动物模型使得该实际情况已恶化。

[0010] 针对CHB的基于T细胞的免疫治疗必须提供T细胞耗竭的持久逆转或持续的病毒抑制。鉴于在CHB患者中难以逆转已建立的HBV特异性T细胞的功能障碍,增强HBV特异性T细胞免疫的最有效的方式可以是通过治疗性疫苗接种或过继性T细胞治疗来产生或赋予完全独特的一组T细胞应答。不幸的是,产生这样的从头应答受到患者特异性HLA表达和这些分子在肝细胞表面所呈递的HBV肽的限制。相比之下,如果普遍表达的,对天然的、急性HBV特异性免疫应答没有贡献的非常规MHC-Ib T细胞限制元件可在肝细胞表面呈递HBV抗原,则其可被靶向以引发一组完全不同的在HBV感染中通常不存在的T细胞应答。因此,全球迫切需要开发针对HBV的治愈性治疗。

[0011] 发明概述

[0012] 本公开内容涉及在对象中产生针对乙型肝炎病毒(HBV)的免疫应答的方法,所述方法包括以有效引发针对HBV抗原的CD8+ T细胞应答的量向对象施用表达HBV抗原的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL1 30、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物。在一个实施方案中,所述HBV抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0013] 本公开内容还涉及在对象中治疗慢性HBV感染的方法,所述方法包括以有效引发针对HBV抗原的CD8+ T细胞应答的量向对象施用表达HBV抗原的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物。在一个实施方案中,所述HBV抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0014] 本公开内容还涉及用于在对象中产生针对HBV的免疫应答的表达HBV抗原的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物。在一

个实施方案中,所述HBV抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0015] 本公开内容还涉及用于在对象中治疗慢性HBV感染的表达HBV抗原的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物。在一个实施方案中,所述HBV抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0016] 本公开内容还涉及表达HBV抗原的CMV载体在制备用于在对象中产生针对HBV的免疫应答之药物中的用途,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物。在一个实施方案中,所述HBV抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0017] 本公开内容还涉及表达HBV抗原的CMV载体在制备用于治疗慢性HBV感染之药物中的用途,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物。在一个实施方案中,所述HBV抗原是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0018] 在一个实施方案中,所述乙型肝炎病毒抗原是乙型肝炎病毒核心、包膜、表面、X或聚合酶抗原。在一些实施方案中,乙型肝炎病毒抗原与PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性。在一些实施方案中,乙型肝炎病毒抗原与TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性。

[0019] 在另一个实施方案中,至少10%由所述CMV载体引发的CD8+ T细胞受MHC-E或其直系同源物或者MHC-II或其直系同源物的限制。在另一个实施方案中,至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少75%由所述CMV载体引发的CD8+ T细胞受MHC-E或其直系同源物或者MHC-II或其直系同源物的限制。在另一个实施方案中,少于10%由所述CMV载体引发的CD8+ T细胞受MHC Ia类或其直系同源物的限制。在另一个实施方案中,一些受MHC-E限制的CD8+ T细胞识别与至少90%用所述载体免疫的其他对象共有的肽。在一些实施方案中,受MHC-E限制的CD8+ T细胞识别MHC-E超表位(supertope)。在一些实施方案中,MHC-E超表位与PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性。在一些实施方案中,MHC-E超表位与TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性。

[0020] 本公开内容还涉及产生识别MHC-E-HBV抗原肽复合物的CD8+ T细胞的方法,所述方法包括:(a)以有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8+ T细胞组的量向第一对象施用包含表达HBV抗原的核酸的重组CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物;(b)从所述CD8+ T细胞组中鉴定第一CD8+ TCR,其中所述第一CD8+ TCR识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合物;(c)从第二对象中分离一种或更多种CD8+ T细胞;以及(d)用表达载体转染所述一种或更多种CD8+ T细胞,其中所述表达载体包含编码第二CD8+ TCR的核酸序列和有效连接至所述编码第二CD8+ TCR的核酸序列的启动子,其中所述第二CD8+ TCR包含所述第一CD8+ TCR的CDR3α和CDR3β,从而产生识别MHC-E/HBV抗原

肽复合物的CD8+ T细胞。

[0021] 本公开内容还涉及产生识别MHC-E-HBV抗原肽复合物的CD8+ T细胞的方法,所述方法包括:(a)从第一对象中分离第一CD8+ T细胞组,其中所述第一对象已被以有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8+ T细胞组的量施用了包含表达HBV抗原的核酸的重组CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,或其直系同源物;(b)从所述第一CD8+ T细胞组中鉴定第一CD8+ TCR,其中所述第一CD8+ TCR识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合物;(c)从第二对象中分离第二CD8+ T细胞组;以及(d)用表达载体转染所述第二CD8+ T细胞组,其中所述表达载体包含编码第二CD8+ TCR的核酸序列和有效连接至所述编码第二CD8+ TCR的核酸序列的启动子,其中所述第二CD8+ TCR包含所述第一CD8+ TCR的CDR3α和CDR3β,从而产生识别MHC-E/HBV抗原肽复合物的CD8+ T细胞。

[0022] 在一个实施方案中,所述重组CMV载体是重组人CMV载体或重组恒河猴CMV载体。在另一个实施方案中,所述乙型肝炎病毒抗原是乙型肝炎病毒核心、包膜、表面或聚合酶抗原。在一些实施方案中,乙型肝炎病毒抗原与PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性。在一些实施方案中,乙型肝炎病毒抗原与TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性。

[0023] 在一个实施方案中,所述第一CD8+ T细胞识别特定的MHC-E超表位。在另一个实施方案中,所述第二CD8+ T细胞识别特定的MHC-E超表位。在一些实施方案中,所述MHC-E超表位是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)或TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,所述MHC-E超表位是PSVRDLLDTASALYR(SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,所述MHC-E超表位是TALRQAILCWGELMT(SEQ ID NO:18)。

[0024] 在另一个实施方案中,所述第一CD8+ TCR通过DNA或RNA测序鉴定。在另一个实施方案中,所述编码第二CD8+ TCR的核酸序列与编码第一CD8+ TCR的核酸序列相同。

[0025] 在一个实施方案中,所述第一对象是人或非人灵长类。在另一个实施方案中,所述对象是非人灵长类并且所述第二对象是人,并且其中所述第二CD8+ TCR是包含所述第一CD8+ TCR的非人灵长类CDR3α和CDR3β的嵌合非人灵长类-人CD8+ TCR。在另一个实施方案中,所述第二CD8+ TCR包含所述第一CD8+ TCR的非人灵长类CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β。在另一个实施方案中,所述第二CD8+ TCR包含所述第一CD8+ TCR的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β。在另一个实施方案中,所述编码第二CD8+ TCR的核酸序列与编码第一CD8+ TCR的核酸序列相同。在另一个实施方案中,所述第二CD8+ TCR是嵌合CD8+ TCR。在另一个实施方案中,所述第二CD8+ TCR包括所述第一CD8+ TCR的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β。

[0026] 在一个实施方案中,向所述第一对象施用所述CMV载体包括向所述第一对象静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述CMV载体。在另一个实施方案中,还向所述第二对象施用转染的CD8+ T细胞以治疗或预防HBV感染。

[0027] 本公开内容还涉及通过本文中所述的方法产生的CD8+ T细胞。

[0028] 本公开内容还涉及在对象中治疗或预防乙型肝炎感染的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用本文中所述的CD8+ T细胞。本公开内容还涉及用于在有此需要的对象中

治疗或预防乙型肝炎感染的方法的CD8+ T细胞。本公开内容还涉及CD8+ T细胞在制备用于在有此需要的对象中治疗或预防乙型肝炎感染的方法之药物中的用途。

[0029] 附图简述

[0030] 图1A示出了用表达HBV核心、表面和聚合酶抗原的毒株68-1RhCMV(RhCMV/HBV 68-1)接种的四只恒河猴(Rhesus macaques,RM)的HBV抗原特异性CD8+ T细胞应答的频率。图1B示出了针对HBV核心抗原(HBcAg)的单个肽的CD8+ T细胞应答。每个HBcAg 15聚体(15-mer)由框(box)表示,其按照所示出的颜色编码以表示MHC限制。图1C示出了在添加HBcAg肽之后从接种的RM中分离的CD8+ T细胞针对用HLA-E或Mamu-E转染的K562细胞的应答。

[0031] 图2A示出了MHC-E特异性抗体4D12对经MHC转染的细胞系的染色。将4D12染色与匹配的IgG同种型对照进行比较。另外,将细胞用泛MHC-I特异性抗体W6/32染色。图2B示出了肝灌注和平板接种之后一天人和RM原代肝细胞的4D12染色。小鼠IgG1同种型用于控制原代肝细胞的非特异性抗体结合。图2C示出了来自图2B中MHC-E+原代肝细胞的百分比的量化。图2D示出了在感染HBV之后四天时,人供体原代肝细胞的表面MHC-I、MHC-E或MHC-II以及胞内HBcAg的共染色。图2E示出了来自图2D中HBV+原代肝细胞的百分比的量化。

[0032] 图3A示出了RM1和RM2与来自两个不相关的RM供体(RM8和RM9)的未感染(naïve)HBV或感染HBV的PH一起孵育之后,来自所述RM1和RM2的脾细胞和经CD8β分选的效应物中受MHC-I、MHC-II和MHC-E限制的HBV特异性CD8+ T细胞的百分比。应答T细胞通过对CD3、CD8和IFN-γ染色来鉴定。应答CD8+ T细胞的MHC限制通过以下MHC阻断剂来鉴定:W6/32抗体(泛MHC-I)、VL9肽(MHC-E)、CLIP(MHC-II)或HLA-DR抗体(MHC-II)。图3B示出了来自与人供体(HD1和HD2)的未感染HBV或感染HBV的原代肝细胞一起孵育的RM1和RM2的脾细胞和经CD8β分选的效应物中受MHC-I、MHC-II和MHC-E限制的HBV特异性CD8+ T细胞的百分比。应答CD8+ T细胞通过CD3、Cd8和IFN-γ鉴定。应答CD8+ T细胞的MHC限制也通过以下MHC阻断剂来鉴定:W6/32抗体(泛MHC-I)、VL9肽(MHC-E)、CLIP(MHC-II)或HLA-DR抗体(MHC-II)。

[0033] 图4为示出了在全球HBV毒株中HBV核心抗原中结合MHC-E的超表位的保守性的条形图。涵盖所有已知HBV基因型的6,203个全基因组HBV序列被翻译,并针对核心蛋白7(图4A)和核心蛋白14(图4B)将氨基酸进行了比对。

具体实施方式

[0034] I.术语

[0035] 除非另外指出,否则技术术语均按照常规用法使用。

[0036] 在本文中引用或在申请数据表中列出的所有出版物、专利、专利申请、互联网站点和登录号/数据库序列(包括多核苷酸和多肽序列二者),包括2019年6月7日提交的美国临时专利申请No.62/858,764,均在此出于所有目的通过引用整体并入,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请、互联网站点或登录号/数据库序列被具体且单独地被指示为如此通过引用并入。

[0037] 除非上下文另有要求,否则在本说明书和权利要求书通篇,词语“包括”及其变体例如“包含”和“含有”将被解释为开放的、包容性的含义,即“包括,但不限于”。“由……组成”将意指排除本文中公开的其他成分和实质性方法步骤的超过痕量的要素。术语“基本上由……组成”将权利要求书的范围限制为指定的材料或步骤,或者不实质影响所要求保护

的发明的基本特征的那些。例如,基本上由本文中所限定的要素组成的组合物不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物,以及可药用载体,例如磷酸缓冲盐水、防腐剂等。类似地,当蛋白质包括占至多20%蛋白质长度并且不实质影响蛋白质活性(例如,改变蛋白质的活性不超过50%)的另外的氨基酸时,蛋白质基本上由特定氨基酸序列组成。由每个过渡术语限定的实施方案均在本发明的范围内。

[0038] 尽管与本文中描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本公开内容的实践或测试,但下文描述了合适的方法和材料。另外,材料、方法和实例仅是举例说明性的并且不旨在是限制性的。为了便于查阅本公开内容的多个实施方案,提供了以下对特定术语的解释。

[0039] 抗原:如本文中所用,术语"抗原"或"免疫原"可互换使用,是指能够在对象中诱导免疫应答的物质,通常是蛋白质。该术语还指在以下含义中具有免疫活性的蛋白质:一旦施用于对象(直接施用或通过向对象施用编码蛋白质的核苷酸序列或载体),蛋白质能够引起针对该蛋白质的体液和/或细胞类型免疫应答。

[0040] 抗原特异性T细胞:识别特定抗原的CD8+ 或CD4+淋巴细胞。通常来说,抗原特异性T细胞与由MHC分子呈递的特定抗原,但不与相同MHC呈递的其他抗原特异性结合。

[0041] 施用:如本文中所用,术语"施用"意指通过任何有效途径向对象提供或给予药剂,例如包含有效量的包含外源抗原的CMV载体的组合物。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如皮下、肌内、皮内、腹膜内和静脉内)、经口、舌下、经直肠、经皮、鼻内、经阴道和吸入途径。

[0042] 有效量:如本文中所用,术语"有效量"是指足以产生期望应答(例如降低或消除病症或疾病的体征或症状或者诱导针对抗原的免疫应答)的药剂的量,所述药剂例如包含异源抗原的CMV载体或者识别MHC-E/异源抗原来源的肽复合物、MHC-II/异源抗原来源的肽复合物或MHC-I/异源抗原来源的肽复合物的经转染的CD8+ T细胞。在一些实例中,"有效量"是治疗(包括预防)任何病症或疾病的一种或更多种症状和/或潜在原因的量。有效量可以是治疗有效量,包括阻止特定疾病或病症的一种或更多种体征或症状(例如与传染病相关的一种或更多种体征或症状)发展的量。

[0043] 异源抗原:如本文中所用,术语"异源抗原"是指不是来源于CMV的任何蛋白质或其片段。异源抗原可以是来源于HBV的任何抗原。

[0044] 免疫原性肽:包含等位基因特异性基序或其他序列(例如N端重复序列)的肽,以使得该肽将结合MHC分子并诱导针对来源于其的免疫原性肽的抗原的细胞毒性T淋巴细胞("cytotoxic T lymphocyte,CTL")应答或B细胞应答(例如抗体产生)。

[0045] 在一个实施方案中,使用序列基序或其他方法(例如本领域已知的神经网络或多项式判定)来鉴定免疫原性肽。通常来说,使用算法确定肽的"结合阈值",以选择具有赋予它们以某个亲和力结合的高可能性并且将具有免疫原性的得分的那些。算法是基于对特定位置的特定氨基酸的MHC结合的作用、特定位置的特定氨基酸的抗体结合的作用或含基序肽中特定替换的结合的作用。在免疫原性肽的上下文中,"保守残基"是以比在肽的特定位置随机分布将预期的显著更高的频率出现的残基。在一个实施方案中,保守残基是MHC结构可提供与免疫原性肽的接触点的残基。

[0046] 突变:如本文中所用,术语"突变"是指核酸或多肽序列与正常、共有或"野生型"序

列的任何差异。突变体是包含突变的任何蛋白质或核酸序列。另外,具有突变的细胞或生物体也可被称为突变体。一些类型的编码序列突变包括点突变(单个核苷酸或氨基酸的差异);沉默突变(不导致氨基酸变化的核苷酸差异);缺失(其中缺少一个或更多个核苷酸或氨基酸的差异,直至并包括基因的整个编码序列的缺失);移码突变(其中一些不可被3整除的核苷酸的缺失导致氨基酸序列改变的差异)。导致氨基酸差异的突变也可被称为氨基酸替换突变。氨基酸替换突变可通过氨基酸序列中特定位置处相对于野生型的氨基酸变化来描述。

[0047] 核苷酸序列或核酸序列:术语“核苷酸序列”和“核酸序列”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)序列,包括但不限于信使RNA(mRNA)、DNA/RNA杂合体或合成核酸。核酸可以是单链的,或者部分或完全双链的(双链体)。双链体核酸可以是同源双链体或异源双链体。

[0048] 有效连接:如本文中所用的术语“有效连接”,当第一核酸序列以对第二核酸序列有影响的方式放置时,第一核酸序列与第二核酸序列有效连接。有效连接的DNA序列可以是连续的,或者其可以相距一定距离起作用。

[0049] 启动子:如本文中所用,术语“启动子”可以是指指导核酸转录的许多核酸控制序列中的任一个。通常来说,真核启动子包括转录起始位点附近的必要核酸序列,例如在聚合酶II型启动子的情况下,TATA元件或被一种或更多种转录因子识别的任何其他特定DNA序列。通过启动子进行的表达还可受到增强子或阻遏元件的调节。启动子的许多实例是可获得的并且是本领域普通技术人员公知的。包含有效连接至编码特定多肽的核酸序列的启动子的核酸可被称为表达载体。

[0050] 重组体(Recombinant):如本文中所用,提及核酸或多肽时术语“重组体”是指具有非天然存在的序列或者具有通过将两个或更多个否则是分隔开的序列片段进行人工组合制备的序列的核酸或多肽,例如包含异源抗原的CMV载体。这种人工组合通常通过化学合成,或者更常见地通过人工操作分离的核酸片段,例如通过遗传工程技术来实现。重组多肽还可以是指已经使用重组核酸制备的多肽,所述重组核酸包括转移至不是多肽天然来源的宿主生物体的重组核酸(例如,编码形成包含异源抗原的CMV载体之多肽的核酸)。

[0051] 可药用载体:如本文中所用,使用的“可药用载体”是常规的。Remington′s Pharmaceutical Sciences,by E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,19th Edition,1995描述了适用于本文中公开的组合物的药物递送的组合物和制剂。通常,载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体,其包括药学和生理学可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为载剂。对于固体组合物(例如粉末、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的非毒性固体载体可包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性载体之外,待施用的药物组合物可包含少量非毒性辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0052] 多核苷酸:如本文中所用,术语“多核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的聚合物。多核苷酸由四个碱基构成;腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶/尿嘧啶(RNA中使用尿嘧啶)。来自核酸的编码序列指示由核酸编码的蛋白质的序列。

[0053] 多肽:术语“蛋白质”、“肽”、“多肽”和“氨基酸序列”在本文中可互换使用,是指任

何长度的氨基酸残基的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,其可包含经修饰的氨基酸或氨基酸类似物,并且其可被氨基酸以外的化学部分中断。该术语还涵盖经天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或者任何其他操作或修饰,例如与标记或生物活性组分的缀合。

[0054] 蛋白质的直系同源物的典型特征在于拥有大于75%的序列同一性,其是在使用设置为默认参数的ALIGN与特定蛋白质的氨基酸序列进行全长比对来计数的。当通过该方法评估时,与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质将显示出提高的同一性百分比,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%或至少98%的序列同一性。另外,可在所公开的肽的特定结构域的全长上比较序列同一性。

[0055] 序列同一性/相似性:如本文中所用,两个或更多个核酸序列或者两个或更多个氨基酸序列之间的同一性/相似性以序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以以同一性百分比来衡量;百分比越高,序列同一性越高。序列相似性可以以百分比同一性或相似性(考虑到保守氨基酸替换)来衡量;百分比越高,序列相似性越高。具有显著量的序列同一性并且彼此功能相同或相似的多肽或其蛋白质结构域(例如,在不同物种中发挥相同功能的蛋白质或者不改变蛋白质的功能或其尺寸(magnitude)的蛋白质的突变形式)可被称为“同源物”。

[0056] 用于进行比较的序列比对方法是本领域公知的。多种程序和比对算法描述于:Smith&Waterman,Adv Appl Math2,482(1981);Needleman&Wunsch,J Mol Biol 48,443(1970);Pearson&Lipman,Proc Natl Acad Sci USA 85,2444(1988);Higgins&Sharp,Gene 73,237-244(1988);Higgins&Sharp,CABIOS 5,151-153(1989);Corpet et al.,Nuc Acids Res 16,10881-10890(1988);Huang et al.,Computer App Biosci 8,155-165(1992);和Pearson et al.,Meth Mol Bio 24,307-331(1994)。另外,Altschul et al.,J Mol Biol 215,403-410(1990)提出了对序列比对方法和同源性计算的详细考虑因素。

[0057] NCBI基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)(Altschul et al.,(1990)同上)可从数个来源获得,包括国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI,National Library of Medicine,Building 38A,Room 8N805,Bethesda,MD 20894)和互联网上,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。另外的信息可在NCBI网站上找到。

[0058] BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。如果两个比较的序列共享同源性,则指定的输出文件会将这些同源性区域显示为经比对的序列。如果两个比较的序列不共享同源性,则指定的输出文件将不会显示经比对的序列。

[0059] 一旦比对,通过计算两条序列中存在相同核苷酸或氨基酸残基的位置的数量来确定匹配的数量。序列同一性百分比是通过将匹配数量除以鉴定序列所示的序列长度或除以铰接(articulated)长度(例如来自鉴定序列所示的序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基),然后将所得值乘100来确定的。例如,当与具有1154个核苷酸的测试序列比对时,具有1166个匹配的核酸序列与测试序列具有75.0%的同一性(1166÷1554*100=75.0)。将序列同一性百分比值舍入至最接近的十分之一。例如,75.11、75.12、75.13和75.14向下舍入为75.1,而75.15、75.16、75.17、75.18和75.19向上舍入为75.2。长度值将始终是整数。在另一

个实例中,包含与来自以下鉴定序列的20个连续核苷酸比对的20个核苷酸区域的靶序列包含与该鉴定序列共享75%序列同一性的区域(即,15÷20*100=75)。

[0060] 对于大于约30个氨基酸的氨基酸序列的比较,使用设置为默认参数的默认BLOSUM62矩阵(空位存在罚分为11,且每个残基空位罚分为1)来使用Blast 2序列功能。同源物的典型特征在于:在使用NCBI Basic Blast 2.0将氨基酸序列与数据库(例如nr数据库、swissprot数据库和专利序列数据库)进行gapped blastp的全长比对中具有计数为至少70%的序列同一性。用blastn程序搜索的查询用DUST过滤(Hancock&Armstrong,Comput Appl Biosci 10,67-70(1994.))其他程序使用SEG。另外,可进行手动比对。当通过该方法评估时,具有甚至更大相似性的蛋白质将显示出提高的同一性百分比,例如与蛋白质具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。

[0061] 当比对短肽(少于约30个氨基酸)时,使用Blast 2序列功能进行比对,使用设置为默认参数的PAM30矩阵(开放空位9,扩展空位1罚分)。当通过该方法评估时,与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质将显示出提高的同一性百分比,例如与蛋白质具有至少约60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。当比较少于整条序列的序列同一性时,同源物通常将在10至20个氨基酸的短窗口内具有至少75%的序列同一性,并且取决于其与参考序列的同一性可具有至少85%、90%、95%或98%的序列同一性。用于经这样的短窗口确定序列同一性的方法描述于NCBI网站。

[0062] 两个核酸分子密切相关的一个迹象是两个分子在严格条件下彼此杂交,如上所述。然而,由于遗传密码的简并性,不显示出高度同一性的核酸序列仍可编码相同或相似(保守)的氨基酸序列。可使用这种简并性做出核酸序列的改变以产生全部都编码实质相同的蛋白质的多个核酸分子。例如,这样的同源核酸序列可与编码蛋白质的核酸具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。

[0063] 对象:如本文中所用,术语“对象”是指活的多细胞脊椎动物生物体,其是包括人和非人哺乳动物的类别。

[0064] 超表位:如本文中所用,术语“超表位”或“超表位肽”是指无论MHC单倍型如何,在超过约90%的人群中被T细胞识别的表位或肽,即在存在或不存在给定MHC-I、MHC-II或MHC-E等位基因的情况下。

[0065] 治疗:如本文中所用,术语“治疗”是指改善疾病或病理状况的体征或症状的干预。如本文中所用,提及疾病、病理状况或症状时术语“治疗”(“treatment”、“treat”和“treating”)也指治疗的任何可观察到的有益效果。有益效果可通过以下证实:例如通过易感对象中疾病的临床症状的延迟发作、疾病的一些或所有临床症状的严重程度降低、疾病更慢的进展、疾病复发次数的降低、对象的整体健康或福祉的改善,或者通过本领域公知的对特定疾病具有特异性的其他参数。预防性治疗是对未表现出疾病体征或仅表现出早期体征的对象施用的治疗,目的是降低发生病理的风险。治疗性治疗是在疾病的体征和症状已经发生之后对对象施用的治疗。

[0066] 疫苗:可施用于哺乳动物(例如人)以赋予针对疾病或其他病理状况的免疫(例如主动免疫)的免疫原性组合物。疫苗可以预防性或治疗性地使用。因此,疫苗可用于降低发生疾病(例如肿瘤或病理性感染)的可能性或者降低疾病或病症的症状的严重程度、限制疾病或病症(例如肿瘤或病理性感染)的进展或者限制疾病或病症(例如肿瘤)的复发。在一些

具体实施方案中,疫苗是表达HBV抗原的复制缺陷型CMV。

[0067] 载体:可将特定序列的核酸分子并入载体中,然后将载体引入宿主细胞,从而产生经转化的宿主细胞。载体可包含允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可包含一种或更多种可选择标志物基因和本领域已知的其他遗传元件,包括指导核酸表达的启动子元件。载体可以是病毒载体,例如CMV载体。病毒载体可由野生型或减毒病毒(包括复制缺陷病毒)构建。

[0068] II.用于治疗和预防乙型肝炎感染的方法

[0069] 本文中公开了用于治疗或预防乙型肝炎病毒感染的方法。该方法涉及向对象施用有效量的包含至少一种异源抗原的至少一种重组CMV载体,其中至少一种异源抗原包含来源于乙型肝炎病毒的抗原。

[0070] 来源于乙型肝炎病毒的抗原可来源于病毒病原体的任何部分。乙型肝炎抗原包括但不限于核心蛋白、包膜蛋白、表面蛋白、X蛋白和聚合酶蛋白。

[0071] 在一些实施方案中,CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,因为编码UL128、UL130、UL146和UL147或其同源物或其直系同源物(感染其他物种的CMV同源基因)的核酸序列中存在突变。突变可以是导致活性蛋白质缺乏表达的任何突变。这样的突变可包括点突变、移码突变、少于全部编码蛋白质的序列的缺失(截短突变)、或全部编码蛋白质的核酸序列的缺失,或任何其他突变。

[0072] 在另一些实例中,CMV载体不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白,因为载体中存在包含抑制UL128、UL130、UL146和UL147蛋白表达的反义或RNAi序列(siRNA或miRNA)的核酸序列。突变和/或反义和/或RNAi可以以任何组合使用以产生缺乏活性UL128、UL130、UL146和UL147的CMV载体。

[0073] 在一些实施方案中,由该载体引发的CD8+ T细胞应答的特征在于具有针对由MHC-E呈递的HBV表位的至少10%的CD8+ T细胞。在另一些实例中,至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%、至少90%或至少95%的CD8+ T细胞受MHC-E限制。在一些实施方案中,受MHC-E限制的HBV特异性CD8+ T细胞识别由至少90%的用该载体免疫接种的其他对象共有的肽。在一些实施方案中,CD8+ T细胞针对由MHC-E呈递的HBV超表位。在一些实施方案中,由该载体引发的CD8+ T细胞应答的特征在于具有针对由MHC-II呈递的表位的至少10%的CD8+ T细胞。在另一些实例中,至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%、至少90%或至少95%的CD8+ T细胞受MHC-II限制。在一些实施方案中,受MHC-II限制的HBV特异性CD8+ T细胞识别由至少90%用该载体免疫接种的其他对象共有的HBV肽。在一些实施方案中,HBV特异性CD8+ T细胞针对由MHC-II呈递的HBV超表位。

[0074] 在一些实施方案中,该方法还包括从由CMV载体引发的CD8+ T细胞中鉴定CD8+ T细胞受体,其中CD8+ T细胞受体识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合体。在一些实施方案中,CD8+ T细胞受体通过RNA或DNA测序来鉴定。在一些实施方案中,该方法还包括识别HBV的MHC-E超表位的CD8+ T细胞受体。

[0075] 在一些实施方案中,该方法还包括从由CMV载体引发的CD8+ T细胞中鉴定CD8+ T细胞受体,其中CD8+ T细胞受体识别MHC-II/HBV抗原来源的肽复合体。在一些实施方案中,CD8+ T细胞受体通过RNA或DNA测序来鉴定。在一些实施方案中,该方法还包括识别HBV的

MHC-II超表位的CD8+ T细胞受体。

[0076] 本文中还公开了产生识别MHC-E-HBV肽复合体的CD8+ T细胞的方法。该方法涉及以有效产生识别MHC-E/HBV肽复合体的CD8+ T细胞组的量向第一对象(或动物)施用CMV载体。在一些实施方案中,CMV载体包含编码至少一种HBV抗原的第一核酸序列并且不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白或其直系同源物。在一些实施方案中,HBV抗原可以是乙型肝炎病毒核心、包膜、表面或聚合酶抗原。

[0077] 该方法还包括:从CD8+ T细胞组中鉴定第一CD8+ T细胞受体,其中第一CD8+ T细胞受体识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合体。在一些实施方案中,第一CD8+ T细胞受体通过DNA或RNA测序来鉴定。在一些实施方案中,该方法可还包括用表达载体转染一种或更多种CD8+ T细胞,其中表达载体包含编码第二CD8+ T细胞受体的核酸序列和与编码该T细胞受体的核酸序列有效连接的启动子,其中第二CD8+ T细胞受体包含第一CD8+ T细胞受体的CDR3α和CDR3β,从而产生识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合体的一种或更多种经转染的CD8+ T细胞。用表达载体转染的一种或更多种CD8+ T细胞可从第一对象或第二对象中分离。

[0078] 在一些实施方案中,该方法还包括从由CMV载体引发的CD8+ T细胞中鉴定CD8+ T细胞受体,其中CD8+ T细胞受体识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合体。在一些实施方案中,CD8+ T细胞受体通过RNA或DNA测序来鉴定。在一些实施方案中,该方法还包括识别MHC-E超表位的HBV特异性CD8+ T细胞受体。

[0079] 还公开了通过包括以下步骤的过程制备的识别MHC-E-HBV肽复合体的经转染的CD8+ T细胞:(1)以有效产生识别MHC-E/HBV肽复合体的CD8+ T细胞组的量向第一对象施用CMV载体,其中重组CMV载体包含至少一种HBV抗原;(2)从CD8+ T细胞组中鉴定第一CD8+ T细胞受体,其中第一CD8+ T细胞受体识别MHC-E/HBV抗原来源的肽复合体;(3)从第一对象或第二对象中分离一种或更多种CD8+ T细胞;以及(4)用表达载体转染从第一或第二对象中分离的一种或更多种CD8+ T细胞,从而产生识别MHC-E-HBV肽复合体的经转染的T细胞。CMV载体包含编码至少一种HBV抗原的第一核酸序列并且不表达活性UL128、UL130、UL146和UL147蛋白或其直系同源物。表达载体包含编码第二CD8+ T细胞受体的核酸序列和与编码第二CD8+ T细胞受体的核酸序列有效连接的启动子,其中第二CD8+ T细胞受体包含第一CD8+ T细胞受体的CDR3α和CDR3β。乙型肝炎抗原可以是乙型肝炎病毒核心、包膜、表面或聚合酶抗原。

[0080] 在一些实施方案中,由CMV载体引发的CD8+ T细胞应答的特征在于具有针对由MHC-II呈递的HBV表位的至少10%的CD8+ T细胞。在另一些实例中,至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%、至少90%、至少95%或至少95%的CD8+ T细胞受MHC-II限制。在一些实施方案中,受MHC-II限制的CD8+ T细胞识别由至少90%用载体免疫接种的其他对象共有的HBV肽。在一些实施方案中,CD8+ T细胞针对由MHC-II呈递的HBV超表位。

[0081] 在一些实施方案中,该方法还包括从由CMV/HBV载体引发的CD8+ T细胞中鉴定CD8+ T细胞受体,其中CD8+ T细胞受体识别MHC-II/HBV抗原来源的肽复合体。在一些实施方案中,CD8+ T细胞受体通过RNA或DNA测序来鉴定。在一些实施方案中,该方法还包括识别MHC-II限制性HBV超表位的CD8+ T细胞受体。

[0082] 当用作表达载体时,人或动物CMV载体在选择的对象例如人中是先天非致病性的。

在一些实施方案中,CMV载体已被修饰以使其在选择的对象中成为非致病性的(不能在宿主内或宿主间传播)。

[0083] 如本文中所述,HBV抗原可以是任何HBV蛋白或其片段。

[0084] 本文中公开的重组CMV载体可来源于人巨细胞病毒载体、恒河猴巨细胞病毒载体或食蟹猴载体。

[0085] 本文中公开的重组CMV载体可用作包含重组CMV病毒或载体和可药用载体或稀释剂的免疫原性组合物、免疫组合物或疫苗组合物。包含重组CMV病毒或载体(或其表达产物)的免疫组合物引发局部或全身的免疫应答。应答可以但不必是保护性的。包含重组CMV病毒或载体(或其表达产物)的免疫原性组合物同样引发可以但不必是保护性的局部或全身免疫应答。疫苗组合物引发局部或全身保护性应答。因此,术语“免疫组合物”和“免疫原性组合物”包括“疫苗组合物”(因为前两个术语可以是保护性组合物)。

[0086] 本文中公开的重组CMV载体可用于在对象中诱导免疫应答的方法,其包括向对象施用包含重组CMV病毒或载体和可药用载体或稀释剂的免疫原性组合物、免疫组合物或疫苗组合物。

[0087] 本文中公开的CMV载体可用于包含重组CMV病毒或载体和可药用载体或稀释剂的治疗性组合物中。本文中公开的CMV载体可通过将包含编码HBV抗原的序列的DNA插入CMV基因组的必需或非必需区域来制备。该方法可还包括从CMV基因组中缺失一个或更多个区域。该方法可包括体内重组。因此,该方法可包括在存在包含侧翼是与CMV基因组部分同源的DNA序列的异源DNA的供体DNA的情况下,在细胞相容培养基中用CMV DNA转染细胞,由此将异源DNA引入到CMV的基因组中,并且随后任选地回收通过体内重组修饰的CMV。该方法可还包括切割CMV DNA以获得经切割的CMV DNA,将异源DNA与经切割的CMVDNA连接以获得杂合CMV-异源DNA,用杂合CMV-异源DNA转染细胞,并且随后任选地回收通过存在的HBV DNA修饰的CMV。由于理解了体内重组,因此该方法还提供了包含编码对CMV来说是外来物的多肽的非天然存在于CMV中之供体DNA的质粒,供体DNA在另外与CMV基因组的必需或非必需区域共线的CMV DNA的区段内,以使得来自CMV必需或非必需区域的DNA侧翼有供体DNA。当期望时,可将HBV DNA插入到CMV中以产生使该DNA及其表达产生稳定整合的任何方向的重组CMV。

[0088] 重组CMV载体中编码HBV抗原的DNA可还包含启动子。启动子可来自任何来源,例如疱疹病毒,包括内源性巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)启动子,例如人CMV(HCMV)、恒河猴CMV(RhCMV)、鼠或其他CMV启动子。启动子也可以是非病毒启动子,例如EF1α启动子。启动子可以是包含用由病毒提供的反式激活蛋白反式激活的区域的截短的转录活性启动子,并且来自截短的转录活性启动子的全长启动子的最小启动子区域是衍生的。启动子可由对应于最小启动子和上游调节序列的DNA序列缔合构成。最小启动子由CAP位点加ATA框(基本转录水平的最小序列;未调节的转录水平)构成;“上游调节序列”由上游元件和增强子序列构成。此外,术语“截短的”表示全长启动子不完全存在,即全长启动子的一些部分已被除去。并且,截短的启动子可来源于疱疹病毒,例如MCMV或HCMV,例如HCMV-IE或MCMV-IE。基于碱基对,来自全长启动子的尺寸可降低多至40%,并且甚至多至90%。启动子也可以是经修饰的非病毒启动子。关于HCMV启动子,参考美国专利No.5,168,062和5,385,839。关于用质粒DNA转染细胞从此用于表达,参考Feigner et al.(1994),J Biol.Chem.269,2550-2561。并且,关于直接注射质粒DNA作为针对多种感染性疾病的疫苗接种的简单且有效的方法,参考

Science,259:1745-49,1993。因此,在本公开内容的范围内载体可通过直接注射载体DNA来使用。

[0089] 还公开了可插入到包含截短的转录活性启动子的重组病毒或质粒中的表达盒。表达盒还可包含功能性截短的聚腺苷酸化信号;例如截短的但仍有功能性的SV40聚腺苷酸化信号。考虑到自然界提供了更大的信号,截短的聚腺苷酸化信号是功能性的确实出人意料。截短的聚腺苷酸化信号解决了重组病毒(例如CMV)的插入尺寸限制问题。表达盒还可包含与其所插入的病毒或系统相关的HBV DNA;并且该DNA可以是如本文中所述的HBV DNA。

[0090] 关于用于疫苗或免疫组合物的HBV抗原,也参见Stedman's Medical Dictionary(第24版,1982,例如,疫苗的定义(针对用于疫苗制剂中的抗原列表);可使用这样的抗原或来自那些抗原的目的表位。关于HBV抗原,本领域技术人员可根据肽或多肽的氨基酸和相应DNA序列的知识,以及特定氨基酸的性质(例如,尺寸、电荷等)和密码子字典,选择抗原及其编码DNA,而无需过度的实验。示例性抗原包括但不限于乙型肝炎病毒核心、包膜、表面、X或聚合酶抗原。

[0091] 确定HBV抗原的T表位的一种方法涉及表位作图。异源抗原的重叠肽通过寡肽合成来产生。随后针对单个肽与由天然蛋白质引发的抗体结合或诱导T细胞或B细胞活化的能力对单个肽进行测试。这种方法在T细胞表位作图方面特别有用,因为T细胞识别与MHC分子复合的短线性肽。

[0092] 对HBV抗原的免疫应答通常如下产生:仅当蛋白质被切割成较小的肽并且以位于另一个细胞的表面的称为"主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)"的复合体呈递时,T细胞才识别该蛋白质。MHC复合体有两类——I类和II类,并且每一类均由许多不同的等位基因构成。不同的物种和个体对象具有不同类型的MHC复合等位基因;据说其具有不同的MHC类型。一种类型的MHC I类分子被称为MHC-E(人中的HLA-E,RM中的Mamu-E,小鼠中的Qa-1b)。

[0093] 值得注意的是,包含编码HBV抗原的序列的DNA本身可包含用于驱动CMV载体中表达的启动子,或者DNA可限于异源抗原的编码DNA。该构建体可相对于内源性CMV启动子以这样的方向放置,以使其与该启动子有效连接并因此被表达。此外,可进行编码异源抗原的DNA的多拷贝或使用强或早期启动子或者早期和晚期启动子,或者其任何组合,以扩增或提高表达。因此,编码异源抗原的DNA可相对于CMV内源性启动子适当地定位,或者那些启动子可易位以与编码异源抗原的DNA一起插入到另一个位置。编码多于一种异源抗原的核酸可包装在CMV载体中。

[0094] 还公开了包含所公开的CMV载体的药物组合物和其他组合物。可配制这样的药物组合物和其他组合物以用于本领域已知的任何施用过程。这样的药物组合物可通过肠胃外途径(皮内、肌内、皮下、静脉内或其他)。施用也可通过黏膜途径,例如经口、经鼻、经生殖器等。

[0095] 所公开的药物组合物可根据药物领域技术人员公知的标准技术来制备。考虑到这样的因素如特定患者的品种或物种、年龄、性别、重量和病症以及施用途径,这样的组合物可以以医学领域技术人员公知的剂量和技术来施用。组合物可单独施用,或者可与其他CMV载体或其他免疫、抗原或疫苗或治疗性组合物共施用或顺序施用。这样的其他组合物可包含纯化的天然抗原或表位或者来自通过重组CMV或另一个载体系统的表达的抗原或表位;

并且在考虑上述因素的情况下进行施用。

[0096] 组合物的一些实例包括用于经孔(orifice)例如经口、经鼻、经肛门、经生殖器例如经阴道等施用的液体制剂,例如混悬剂、糖浆剂或酏剂;以及用于肠胃外、皮下、皮内、肌内或静脉内施用(例如注射施用)的制剂,例如无菌混悬液或乳剂。在这样的组合物中,重组体可与合适的载体、稀释剂或赋形剂例如无菌水、生理盐水、葡萄糖等混合。

[0097] 抗原组合物、免疫组合物或疫苗组合物通常可包含佐剂和一定量的CMV载体或表达产物以引发期望的响应。在人应用中,明矾(磷酸铝或氢氧化铝)是常用的佐剂。皂苷及其纯化组分Quil A、弗氏完全佐剂和其他用于研究和兽医应用的佐剂具有毒性,这限制了其在人疫苗中的潜在用途。也可使用化学限定的制剂,例如胞壁酰二肽、单磷酰脂A、磷脂缀合物例如由Goodman-Snitkoff et al.,J Immunol.147:410-415(1991)描述的那些,如由Miller et al.,JExp.Med.176:1739-1744(1992)描述的将蛋白质封装在蛋白脂质体内,以及将蛋白质封装在脂质囊泡例如Novasome脂质囊泡中(Micro Vescular Systems,Inc.,Nashua,N.H.)。

[0098] 组合物可包装在单一剂型中以用于通过肠胃外(例如,肌内、皮内或皮下)施用或经孔施用,例如经舌(例如,经口)、胃内、经黏膜包括口内、肛门内、阴道内等施用的免疫接种。同样,有效剂量和施用途径由组合物的性质、表达产物的性质、如果直接使用重组CMV时的表达水平以及已知因素例如宿主的品种或物种、年龄、性别、重量、病症和性质,以及LD_{50}和其他已知且不需要过度实验的筛选过程来确定。表达的产物的剂量可从数微克至数百微克,例如5至500μg。CMV载体可以以任何合适的量进行施用以实现在这些剂量水平上的表达。在一些非限制性实例中:CMV载体可以以至少10^2pfu的量施用;因此,CMV载体可以以至少该量施用;或在约10^2pfu至约10^7pfu的范围内。其他合适的载体或稀释剂可以是有或无防腐剂的水或缓冲盐水。CMV载体可以是冻干的以用于在施用时进行重悬,或者可以在溶液中。"约"可意指在限定值的1%、5%、10%或20%内。

[0099] 应当理解,本公开内容的蛋白质和编码其的核酸可与本文所示和所述的确切序列不同。因此,本公开内容考虑了对所示序列的缺失、添加、截短和替换,只要该序列根据本公开内容的方法起作用即可。在这方面,替换在性质上通常是保守的,即在氨基酸家族内发生的那些替换。例如,氨基酸通常分为以下四个家族:(1)酸性--天冬氨酸和谷氨酸;(2)碱性--赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(3)非极性--丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸;以及(4)不带电荷的极性--甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被归类为芳香族氨基酸。可以合理地预测,用异亮氨酸或缬氨酸单独替换亮氨酸,或反之亦然;用谷氨酸替换天冬氨酸,或反之亦然;用丝氨酸替换苏氨酸,或反之亦然;或者用结构相关的氨基酸类似保守替换氨基酸将不会对生物活性产生重大影响。因此,具有与所述蛋白质基本相同的氨基酸序列但具有基本上不影响蛋白质的免疫原性的少量氨基酸替换的蛋白质在本公开内容的范围内。

[0100] 本公开内容的核苷酸序列可以是密码子优化的,例如密码子可以优化以用于人细胞。例如,任何病毒或细菌序列均可如此改变。许多病毒,包括HIV和其他慢病毒,使用大量稀有密码子,并且通过改变这些密码子以对应于期望对象中常用的密码子,可如Andreetal.,J Virol.72:1497-1503,1998中所述实现异源抗原的增强表达。

[0101] 编码CMV载体和其中包含的糖蛋白的功能和/或抗原性等同变体和衍生物的核苷酸序列被考虑在内。这些功能等同变体、衍生物和片段显示出保留抗原活性的能力。例如,不改变编码的氨基酸序列,以及导致氨基酸残基的保守替换、一个或几个氨基酸的缺失或添加、以及氨基酸残基被氨基酸类似物替换的DNA序列的变化是不会显著影响编码多肽的性质的变化。保守的氨基酸替换物是甘氨酸/丙氨酸;缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸;天冬酰胺/谷氨酰胺;天冬氨酸/谷氨酸;丝氨酸/苏氨酸/甲硫氨酸;赖氨酸/精氨酸;和苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸。在一个实施方案中,变体与目的抗原、表位、免疫原、肽或多肽具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同源性或同一性。

[0102] 序列同一性或同源性通过在比对时比较序列以使得重叠和同一性最大化而序列空位最小化来确定。特别地,序列同一性可使用多种数学算法中的任何一种来确定。用于比较两个序列的数学算法的一个非限制性实例是如Karlin&Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1993;90:5873-5877中修改的Karlin&Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1990;87:2264-2268的算法。

[0103] 用于序列比较的数学算法的另一个实例是Myers&Miller,CABIOS1988;4:11-17的算法。这样的算法被并入ALIGN程序(2.0版),该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可使用PAM120权重残基表,空位长度罚分12和空位罚分4。用于识别局部序列相似性区域和比对的另一种可用的算法是如Pearson&Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988;85:2444-2448中所述的FASTA算法。

[0104] 根据本公开内容,有利地使用WU-BLAST(Washington University BLAST)2.0版软件。用于数个UNIX平台的WU-BLAST2.0版可执行程序可从ftp://blast.wustl.edu/blast/executables下载。该程序基于WU-BLAST 1.4版,该版本又基于公共领域NCBI-BLAST 1.4版(Altschul&Gish,1996,Local alignment statistics,Doolittle ed.,Methods in Enzymology 266:460-480;Altschul et al.,Journal of Molecular Biology 1990;215:403-410;Gish&States,1993;Nature Genetics 3:266-272;Karlin&Altschul,1993;Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877;其全部通过引用并入本文)。

[0105] 本公开内容的多种重组核苷酸序列和抗体和/或抗原是使用标准重组DNA和克隆技术制备的。这样的技术是本领域技术人员公知的。例如,参见“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook et al.1989)。

[0106] 本公开内容的核苷酸序列可插入到“载体”中。术语“载体”是本领域技术人员广泛使用和理解的,并且本文中使用的术语“载体”与本领域技术人员理解的含义一致使用。例如,本领域技术人员通常使用术语“载体”来指允许或促进将核酸分子从一种环境转移到另一种环境或者允许或促进对核酸分子进行操作的载剂。

[0107] 可根据本公开内容使用允许本公开内容的病毒表达的任何载体。在某些实施方案中,所公开的病毒可在体外使用(例如使用无细胞表达系统)和/或在体外生长的培养细胞中使用,以产生编码的异源抗原(例如病原体特异性抗原、HIV抗原、乙型肝炎抗原、和抗体),其随后可用于多种应用,例如产生蛋白质疫苗。对于这样的应用,可使用允许病毒在体外和/或培养的细胞中表达的任何载体。

[0108] 对于待表达的公开的异源抗原,异源抗原的蛋白质编码序列应与指导蛋白质转录和翻译的调节序列或核酸控制序列“有效连接”。如本文所用,当编码序列和核酸控制序列或启动子以这样的方式共价连接以使编码序列的表达或转录和/或翻译置于核酸控制序列的影响或控制之下时,编码序列与核酸控制序列或启动子被称为“有效连接”。“核酸控制序列”可以是任何核酸元件,例如但不限于启动子、增强子、IRES、内含子和指导与其有效连接的核酸序列或编码序列的表达的本文所述的其他元件。术语“启动子”在本文中用于指一组转录控制模块,其聚集在RNA聚合酶II的起始位点周围,并且当与本公开内容的蛋白质编码序列有效连接时导致编码蛋白质的表达。本公开内容的转基因的表达可在组成型启动子或诱导型启动子的控制下,所述启动子仅在暴露于一些特定外部刺激例如但不限于抗生素(例如四环素)、激素(例如蜕皮激素)或重金属时启动转录。启动子也可以是特定细胞类型、组织或器官特异性的。许多合适的启动子和增强子是本领域已知的,并且任何这样的合适的启动子或增强子均可用于本公开内容转基因的表达。例如,合适的启动子和/或增强子可选自真核启动子数据库(Eukaryotic Promoter Database,EPDB)。

[0109] 根据本公开内容使用的载体可包含合适的基因调节区,例如启动子或增强子,从而可表达本公开内容的抗原。

[0110] 本文中所述的CMV载体可包含可阻止宿主间传播的突变,从而使病毒无法感染免疫受损或可因CMV感染而面临并发症的其他对象。本文中所述的CMV载体还可包含导致呈递免疫显性和非免疫显性表位以及非典型MHC限制的突变。然而,本文中所述的CMV载体中的突变不影响该载体再感染先前已感染CMV的对象的能力。这样的CMV突变描述于例如美国专利公开2013-013676S、2010-0142S23、2014-014103S和PCT申请公开WO 2014/13S209,其全部通过引用并入本文。

[0111] 公开的CMV载体可在体内施用,例如在目的是产生免疫原性应答,包括CD8+ 免疫应答,包括特征在于高百分比的CD8+ T细胞应答受MHC-E或MHC-II(或其同源物或直系同源物)限制的免疫应答。例如,在一些实例中,可期望在实验室动物(例如恒河猴)中使用公开的CMV载体,用于使用RhCMV的免疫原性组合物和疫苗的临床前测试。在另一些实例中,期望在人对象中使用公开的CMV载体,例如在使用HCMV的免疫原性组合物的临床试验中以及实际临床应用。

[0112] 对于这样的体内应用,公开的CMV载体作为还包含可药用载体的免疫原性组合物的组分来施用。在一些实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物可用于刺激针对包括病原体特异性抗原在内的异源抗原的免疫应答,并且可用作针对病原体特异性抗原的预防性或治疗性疫苗的一种或更多种组分以用于预防、改善或治疗病原感染。本公开内容的核酸和载体特别可用于提供基因疫苗,即用于将编码本公开内容抗原的核酸递送至对象(例如人)的疫苗,以使得抗原随后在对象中表达以引发免疫应答。

[0113] 用于动物(包括人)的免疫接种计划(或方案)是公知的并且可容易地针对特定对象和免疫原性组合物确定。因此,免疫原可向对象施用一次或更多次。优选地,在免疫原性组合物的单独施用之间存在设定的时间间隔。虽然每个对象的间隔不同,但通常为10天至数周,并且通常为2周、4周、6周或8周。对于人,间隔通常为2至6周。在本公开内容的一个特别有利的实施方案中,间隔更长,有利地为约10周、12周、14周、16周、18周、20周、22周、24周、26周、28周、30周、32周、34周、36周、38周、40周、42周、44周、46周、48周、50周、52周、54

周、56周、58周、60周、62周、64周、66周、68周或70周。免疫接种方案通常具有免疫原性组合物的1至6次施用,但可具有少至一次或两次或四次。诱导免疫应答的方法还可包括施用具有免疫原的佐剂。在一些情况下,每年、两年或其他长间隔(5至10年)加强免疫可补充初始免疫接种方案。本方法还包括多种初免-加强(prime-boost)方案。在这些方法中,一次或更多次初免免疫接种后,接着进行一次或更多次加强免疫接种。每次免疫接种的实际免疫原性组合物可相同或不同,并且免疫原性组合物的类型(例如,包含蛋白质或表达载体)、途径和免疫原的制剂也可变化。例如,如果表达载体用于初免和加强步骤,则其可以是相同或不同的类型(例如DNA或细菌或病毒表达载体)。一种有用的初免-加强方案提供两次初免免疫接种,间隔四周,随后在最后一次初免免疫接种之后的第4周和第8周进行两次加强免疫接种。对于本领域技术人员来说也应该是显而易见的是,存在多种排列和组合,包括使用本公开内容的DNA、细菌和病毒表达载体以提供初免和加强方案。CMV载体可重复使用,同时表达来源于不同病原体的不同抗原。

[0114] 实施例

[0115] 实施例1:RHCMV/HBV接种的恒河猴针对HBV抗原发动MHC-E限制性CD8+ T细胞应答

[0116] 被改造为表达抗原靶点的RhCMV毒株68-1载体引发广泛的受非经典分子MHC-E、通常参与NK细胞信号传导的单态MHC Ib类分子、或MHC-II限制的效应-记忆CD8+ T细胞应答。表达猿猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus,SIV)抗原的RhCMV疫苗载体在用高致病性毒株SIVmac239反复进行低剂量直肠内和阴道内攻击之后保护50%的RM。

[0117] 在此,确定了RhCMV/HBV诱导的、非常规限制的CD8+ T细胞应答是否识别HBV感染的肝细胞。靶向这些独特的CD8+ T细胞限制性分子将构成治疗HBV感染的新范式,并且考虑到人和猕猴的MHC-E的极端保守性,理论上可普遍应用于所有患者(Wu et al.2018.The Role of MHC-E in T Cell Immunity Is Conserved among Humans,RheSuS Macaques, and Cynomolgus Macaques.J.Immunol.200:49-60)。

[0118] 用表达HBV基因型D血清型ayw核心、表面和/或聚合酶抗原的毒株68-1RhCMV接种四只恒河猴(RM)。基因型D、血清型ayw HBV核心、聚合酶和S Ag基因片段是通过PCR从先前描述的质粒(Frank Chisari,Scripps Research Institute)中分离的。从质粒pCDNA3-POL/ENV(Kakimi,K.et al.2002.Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins:implications for immunotherapy of persistent viral infections..J.Virol.76:8609-8620)获得的聚合酶的N端333个氨基酸被C端HA表位标记并通过PCR介导的诱变与从质粒pCMV-S2/S(Michel,M.L.,et al.1995.DNA-mediated immunization to the hepatitis B Surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B Viral infection in humans.Proe.Natl.Acad.Sci.USA 92:5307-5311.)获得的S Ag的C端228个氨基酸融合以产生融合S/PolN(左正向引物:59-CATCGAGCTAGCACCATGGAGAACATCACATCAGG-39(SEQ ID NO:1),左反向引物:59-GTGTTGATAGGATAGGGGAATGTATACCCAAAGAC-39(SEQ ID NO:2);右正向引物:59-GTCTTTGGGTATACATTCCCCTATCCTATCAACAC-39(SEQ ID NO:3),右反向引物:59-GGAATCGTCGACTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAGATTGACGATAAGGGAGAGGCAG-39(SEQ ID NO:4))。

[0119] 将最终的PCR产物平端克隆到pJet载体(Thermo Fisher Scientific)中作为细菌

人工染色体(bacterial artificial chromosome,BAC)重组工程的模板,或平端克隆到pORI中以评价表达。从质粒pCDNA3-POL/ENV(Kakimi,K.et al.2002.Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections.J.Virol.76:8609-8620)获得的聚合酶的C端416个氨基酸是通过PCR介导的诱变标记的HA表位并插入pORI中(正向引物:59-GTGGTACCCTCGAGGATTGGGGACCCTGCGCTGAACATGGAG-39(SEQ ID NO:5),反向引物:59-TCAGTCGACCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAC-39(SEQ ID NO:6))。编码核心蛋白的基因从质粒pCDNA-CORE(22)中PCR扩增并插入pORI中(正向引物:59-CTGCTAGCATGGACATTGACCCTTATAAAGAATTTGG-39(SEQ ID NO:7),反向引物:59-CTAGGTACCACATTGAGATTCCCGAGATTGAG-39(SEQ ID NO:8))。随后使用KpnI和SalI将C端聚合酶片段插入核心蛋白下游以产生融合蛋白HBV核心和聚合酶的C端(核心/PolC)。KpnI位点在两种蛋白质之间添加了2-氨基酸(GT)接头。为了产生68-1RhCMV/核心/PolC和68-1RhCMV/S/PolN,使用经修饰的半乳糖激酶(galK)选择系统替代68-1RhCMV BAC(Chang,W.L.W.,et al.2003.Cloning of thefull-length rhesus cytomegalovirus genome as an infectious and self-excisable bacterial artificial chromosome for analysis of viral pathogenesis.J.Virol.77:5073-5083)中的pp71编码Rh110基因,这是允许DNA修饰而无需引入不需要的异源序列的两步法(Warming,S.et al.2005.Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection.Nucleic Acids Res.33:e36)。最近证明,Rh110替代可用于引发稳健的Ag应答,同时减弱68-1RhCMV载体(Marshall,E.E.,et al.2019.Enhancing safety of cytomegalovirus-based vaccine vectors by engaging host intrinsic immunity.Sci.Transl.Med.11:eaaw260310.1126/scitranslmed.aaw2603)。

[0120] 为了缺失Rh110,将包含68-1RhCMV BAC的感受态SW105细菌用包含与Rh110具有50-bp侧翼同源性的galK/卡那霉素盒的PCR产物进行电穿孔。在30℃下将细菌平板接种在卡那霉素/氯霉素卢里亚-贝尔塔尼琼脂(Luria Bertani agar)上用于阳性选择。为了用HBV融合基因替代galK/卡那霉素盒,将包含与Rh110具有相同侧翼同源性的HBV S-PolN融合或HBV核心-PolC融合的PCR产物进行电穿孔,并且将细菌平板接种在具有甘油作为碳源的2-脱氧-半乳糖(DOG)氯霉素基本培养基平板上用于阴性选择。用于同源重组的PCR引物如下:Rh110 S/PolN正向:59-GATCACGTCATTGACACCGGCCTCCCACCAGCTCTCACATTCTCCGCATCACCATGGAGAACATCACATCAGGAT-39(SEQ ID NO:9),Rh110S/PolN反向:59-CAAAATATTATTACATGGTACGCAATTTATTGTCTATTTTCGTTATTTGTTTATTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTAT-39(SEQ ID NO:10)和Rh110核心/PolC正向:59-GATCACGTCATTGACACCGGCCTCCCACCAGCTCTCACATTCTCCGCATCACCATGGACATTGACCCTTATAAAGAAT-39(SEQ ID NO:11),Rh110核心/PolC反向:59-CAAAATATTATTACATGGTACGCAATTTATTGTCTATTTTCGTTATTTGTTTATCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTAT-39(SEQ ID NO:12)。

[0121] 为了产生68-1RhCMV/核心蛋白,从pCDNA-CORE中扩增了HBV核心蛋白基因,并通过PCR引入了N端FLAG标签(正向引物:59-CTGCTAGCATGGATTACAAGGATGACAAGGACATCGACCCTTATAAAGAATTTGG-39(SEQ ID NO:13);反向引物:59-CTAGTCGACACATTGAGATTCCCGAGATTGAG-39)(SEQ ID NO:14)。

[0122] 将扩增产物克隆到EF1a启动子的下游pORI中。通过同源重组使用与Rh211区域具有50-bp同源性的引物(正向引物:59-GGGAAATCACGTCATCAGGCTGGGTAGTCAACATGGGCATACGAAACTTGCCCGAATAGATGCTCTCACTTAACGGCTGACATG-39(SEQ ID NO:15),反向引物:59-CCAGAATGTGCTCTACTTTTTGGCCAGCGGGTTGGATGATTTCGCGCGTCATGGACTGCTTCACTGTAGCTTAGTACGTTAAAC-39(SEQ ID NO:16))

[0123] 将该表达盒与侧翼为翻转酶识别靶位点的Kan抗性盒一起插入到68-1RhCMV的Rh211区域中。将PCR片段电穿孔到包含RhCMV 68-1BAC的EL250细菌中,以用于体内重组并针对Kan抗性选择重组体。通过温度诱导的翻转酶重组除去Kan抗性盒。所得的BAC通过限制性消化、重组位点的PCR分析和Illumina MiSeq测序仪上的下一代测序进行分析。该序列分析显示了在PCR扩增期间引入的S/PolN中的两个点突变,导致SAg中A118T和T125M的氨基酸交换。BAC DNA是使用碱裂解、苯酚/氯仿提取和异丙醇沉淀进行纯化的,并且病毒是通过使用表达端粒化pp71的恒河猴成纤维细胞(Warming,S.et al.2005.Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection.Nucleic Acids Res.33:e36)或原代恒河猴成纤维细胞的Lipofectamine 2000(按照制造商的方案;Thermo Fisher Scientific)转染BAC DNA来重建的。HBV Ag的表达通过用68-1RhCMV/表面/PolN或RhCMV/核心/PolC感染端粒化RM成纤维细胞来确定。在完全细胞病变作用下收获细胞并在SDS样品缓冲液中进行裂解。用包含HA标记的HBV蛋白的pORI表达质粒转染(Lipofectamine 2000)的293T细胞作为阳性对照。在电泳分离之后,用抗HA Ab MMS-101P(Covance MMS)进行免疫印迹。

[0124] 两只RM(RM1、RM2)用68-1RhCMV/表面/PolN和68-1RhCMV/核心/PolC载体二者进行接种,并且另外两只RM(RM3、RM4)用在EF1a启动子下表达HBV核心的基于68-1RhCMV的载体进行接种。针对每种Ag的CD8+ T细胞应答是通过ICS使用对应于每种Ag的重叠15聚体肽的合并物来纵向监测的。在经疫苗接种的RM的血液中观察到针对这些抗原的纵向CD8+ T细胞应答(图1A)。

[0125] 这些动物中HBV核心(HBcAg)特异性CD8+ T细胞应答的MHC限制通过用特异性阻断如前所述的MHC-I、MHC-II和MHC-E呈递的试剂进行胞内细胞因子染色来表征(Hansen et al.2016.Broadly targeted $CD8^+$ T cell responses restricted by major histocompatibility complex E.Science 351:714-720;Hansen,et al.2013.Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms.Science 340:1237874-1237874.)。发现与表达SIV或结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)抗原的毒株68-1RhCMV载体相似,毒株68-1RhCMV/HBV载体引发了靶向广泛HBcAg肽阵列的HBV特异性、MHC-E和MHC-II限制性CD8+ T细胞应答(图1B)。

[0126] 为了进一步确定引起观察到的CD8+ T细胞应答的RhCMV/HBV的MHC-E限制,用经转导以表达单个人(HLA)或恒河猴(Mamu)MHC-E等位基因的K562细胞(MHC-空)刺激来自RhCMV/HBV疫苗接种的RM的脾细胞,并用通过图1B中的阻断被鉴定为MHC-E限制的三种单独的HBcAg 15聚体肽中的一种进行脉冲。仅表达MHC-E的细胞可将HBcAg 15聚体呈递至这些CD8+ T细胞。HBcAg特异性CD8+ T细胞识别在HLA-E和Mamu-E二者背景下呈递的其同源抗原(图1C)。这些结果表明在RhCMV/HBV疫苗接种的RM中存在MHC-E限制的HBV特异性CD8+ T细胞,并且进一步支持高度功能保守性灵长类MHC-E分子。

[0127] 实施例2:HBV感染的原代肝细胞在体外表达MHC-E

[0128] 接下来,确定原代肝细胞是否表达MHC-E。从三只不相关的RM和三个不相关的人供体(HD)中分离原代肝细胞(PH)。为了分离RM原代肝细胞,将RM肝的单叶用200mL预灌注培养基(0.5mM EGTA(Bio-World,目录号:40120128-1)、10IU/mL肝素(Fresenius Kabi,目录号:C504730)、具有钙和镁的HBSS(Fisher Scientific,目录号:24-020-117))进行灌注,随后通过200mL无钙和镁的HBSS(Fisher Scientific,目录号:SH3003103)除去剩余的EGTA。接下来将加热至42℃的100mL胶原酶培养基(DMEM/F12(Gibco,目录号:11320-082)、1mM氯化钙(Sigma-Aldrich,目录号:C5670-100G)、20mM HEPES(HyClone,目录号:SH30237.01)、1mg/mL胶原酶IV(Sigma-Aldrich,目录号:C9722-50MG))灌注到叶中并丢弃。随后在42℃下使用75至150mL/分钟的速率使150ml胶原酶培养基通过肝叶再循环30分钟至1小时,这取决于肝叶的尺寸。胶原酶灌注之后,用手术刀将肝切片,用剩余的胶原酶培养基冲洗,并通过滤茶器过滤培养基。PH在洗涤培养基(DMEM/F12、2%牛生长血清(HyClone,目录号:SH3054103)、23mM HEPES缓冲液、0.6mg/ml葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺(HyClone,目录号:SH3003401)、1x抗生素/抗真菌剂(HyClone,目录号:SV3007901)和0.1mg/mL庆大霉素(Life Technologies,目录号:15750-060))中在室温下洗涤三次,并且在每次洗涤之间以50x g离心3分钟。在第三次洗涤旋转之前,将PH通过70μM的滤器以确保单细胞悬液。随后使用PH培养基作为稀释剂(DMEM/F12、10%牛生长血清、23mM HEPES缓冲液、0.6mg/ml葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺、1x抗生素/抗真菌剂和0.1mg/mL庆大霉素)将PH悬浮在50mL锥形瓶中的20mL的36%等张percoll(GE Healthcare,目录号:17-0891-01)中,并以200x g离心7分钟。随后将纯化的PH沉淀在室温PH培养基中重悬并计数。使用0.01%乙酸(Serva,目录号:47254)中的0.2mg/mL胶原蛋白R制备肝细胞的胶原蛋白板,在板上放置至少20分钟之后立即用1mL HBSS洗涤,随后在12孔板中以每孔2×10^5PH进行平板接种。将板放置在37℃、5%CO2中。第二天,将孔用HBSS洗涤两次并在补充有1.8%DMSO的1ml PH培养基(包含DMSO的原代肝细胞培养基;PH-DMSO)中培养以用于实验的剩余部分。

[0129] 人供体原代肝细胞(HD PH)是从鼠的人源化肝中分离的并购自Yecuris,Inc.。人源化小鼠是用从具有以下人口统计特征的已故患者中收集的冷冻保存的原代肝细胞来产生的:HD1(13岁,女性,西班牙裔,HBV未感染);HD2(13岁,女性,高加索人,HBV未感染);HD3(27岁,男性,高加索人,HBV未感染)。

[0130] RM和HD PH MHC呈递由通过W6/32克隆的大量MHC-I、通过HLA-DR染色的MHC-II和通过4D12克隆的MHC-E的表面表达来确定。先前已证明4D12特异性染色Mamu-E而不是经典的Mamu-Ia分子。所有三个人供体共享一个HLA-A和一个HLA-C等位基因(表1)。因此,在继续之前,已确定MHC-E特异性4D12克隆仅染色HLA-E而不是三个HD之间共享的HLA-A或HLA-C分子(图2A)。通过染色检查MHC-E的表达,并且来自两个物种的大部分原代肝细胞均表达MHC-E(图2B和2C)。

[0131] 表1.HD PH的MHC基因型

[0132]

	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C
HD1	02:17	02:01	40:02	50:01	03:05	06:02
HD2	01:01	02:01	15:XX*	37:XX*	03:03	06:02
HD3	02:01	02:01	57:01	27:05	02:02	06:02

[0133] XX*表示未确定的等位基因。

[0134] 为了确定HBV感染是否影响MHC-E在原代肝细胞表面的表达,从同一HBV感染的人供体中收集原代肝细胞。在平板接种分离的恒河猴原代肝细胞之后一天,将在肝特异性TTR启动子下表达人NTCP(MOI 10)的无复制能力腺病毒血清型5添加至培养物2天。在第二天,用1ml PH-DMSO培养基重新喂养细胞。在腺病毒转导之后的第四天,将原代肝细胞在1ml HBSS中洗涤两次,并用MOI为100的包含HBV的培养基(包含4%PEG6000的PH-DMSO,Sigma-Aldrich,目录号:81253-250G)覆盖并孵育过夜。第二天早上,将孔用1ml HBSS洗涤三次,并随后在1ml原代肝细胞-DMSO中培养以用于实验的剩余部分。

[0135] 在平板接种之后一天,将人供体原代肝细胞用MOI为100的包含HBV的培养基(包含4%PEG6000的PH-DMSO,Sigma-Aldrich,目录号:81253-250G)覆盖并孵育过夜。第二天早上,将孔用1ml HBSS洗涤三次,并随后在1ml原代肝细胞-DMSO中培养以用于实验的剩余部分。

[0136] 人供体原代肝细胞的HBV感染通过在细胞染色之前测量上清液中HBV包膜抗原(HBeAg)的水平来确定。在HBV感染之后第4天,将原代肝细胞与MHC标志物(MHC-I、MHC-E和MHC-II)以及胞内HBcAg共染色,因为这是可检测到胞内HBcAg的第一个时间点。在HBV感染和HBV未感染PH二者上均观察到使用4D12抗体的强染色,表明MHC-E表达的高水平(图2D和2E)。相比之下,在所有三个人供体的原代肝细胞样品中,HLA-DR表达很少或缺失,这与先前发表的结果一致(Senaldi et al.1991.Class I and class II major histocompatibility complex antigens on hepatocytes:importance of the method of detection and expression in histologically normal and diseased livers.J.Clin.Pathol.44:107-114.)。在评估表面MHC水平之前对原代肝细胞进行离体操作可能诱导这些细胞的一部分失去MHC-E表达。然而,综合起来,这些结果显示HBV感染的原代肝细胞表达MHC-E,并且MHC-E可代表潜在的HBV特异性CD8+ T细胞限制要素。

[0137] 实施例3:来自RHCMV/HBV接种的恒河猴的MHC-E限制性CD8+ T细胞识别HBV感染的同种异体和异种原代肝细胞

[0138] MHC研究显示了在人供体和恒河猴原代肝细胞上MHC-E表达的高水平,无论HBV感染如何。因此考虑到灵长类中MHC-E的高度功能保守性,假定来自RhCMV/HBV接种的恒河猴的CD8+ T细胞识别同种异体的HBV感染的恒河猴原代肝细胞。为了支持该假定,来自RM1和RM2的CD8+ T细胞(大量脾细胞和经纯化的CD8β+T细胞)识别来自两个不相关恒河猴供体的HBV感染的原代肝细胞,但对HBV未感染原代肝细胞无应答(图3A)。

[0139] 为了更全面地确定识别HBV感染的原代肝细胞靶标的CD8+ T细胞的MHC限制,使用图1所示的MHC特异性阻断剂进行了一系列识别实验。

[0140] 在HBV感染之前,收集一个孔的原代肝细胞并染色作为基线。从感染之后第二天开始,将每个HBV感染的和HBV未感染的原代肝细胞的孔用0.5%胰蛋白酶-EDTA(Fisher Scientific,目录号:SH30236.01)进行收集,并在冰冷的FACS缓冲液(PBS,Fisher Scientific,目录号:SH30256FS,具有10%胎牛血清)中洗涤两次。将细胞与抗HLA-E抗体(克隆:4D12,Origene,目录号:LS-C179742)一起在4℃下孵育30分钟,在冰冷的FACS缓冲液中洗涤两次,并与F(ab)2-山羊抗小鼠IgG(HL)-APC(Invitrogen,目录号:A10539)一起在4℃下孵育30分钟。随后将细胞在冰冷的PBS中洗涤两次,并与泛MHC-I-PerCP-Cy5.5(克隆:

W6/32,Biolegend Inc.,目录号:311419)、抗HLA-DRAlexa 700(克隆:L243(BD Biosciences,目录号:560743)和活/死可固定黄色(Invitrogen,目录号:L-34959)一起在4℃下孵育30分钟。将细胞在FACS缓冲液中洗涤并使用Foxp3/转录因子染色缓冲液组(eBioscience,目录号:00-5523-00)在室温下固定一小时。在固定之前,所有洗涤旋转均以350xg进行3分钟。在固定之后,将细胞悬浮在透化缓冲液(eBioscience,目录号:00-8333-56)中。在固定之后的所有洗涤旋转均以830xg进行3分钟。使用Lightning-Link R-PE试剂盒(Innova Biosciences,目录号:703-0005)将原代肝细胞与缀合R-藻红蛋白(PE)的乙型肝炎病毒核心抗原抗体(克隆:13A9,Fisher Scientific,目录号:MA1-7606)在4℃下孵育一小时。将细胞在透化缓冲液中洗涤三次,并且随后在Becton-Dickenson LSR-II上进行收集。分析在FlowJo X(TreeStar Inc.)上进行。在所有分析中,对大型复杂PH的光散射特征进行门控之后,评估特定的MHC和HBV标志物。

[0141] HBV特异性CD8+ T细胞应答在来自RhCMV/HBV疫苗接种的RM的脾的单核细胞制剂中通过流式细胞术ICS进行测量。简而言之,将脾细胞或分离的CD8β+T细胞与HBV感染或HBV未感染的原代肝细胞靶标以及共刺激分子CD28和CD49d(BD Biosciences)孵育1小时,随后添加布雷菲德菌素A(Sigma-Aldrich)孵育另外8小时。无原代肝细胞靶标共培养的共刺激作为背景对照。应答的MHC限制是在与靶原代肝细胞共培养之前通过在存在泛抗MHC-I抗体(25μg/ml;克隆:W6-32)、VL9肽(20uM)、CLIP肽(MHC-II相关的恒定链,第89至100位氨基酸;10μg/ml)或抗HLA-DR抗体(10μg/ml;克隆:L243)的情况下在室温下预孵育PH靶标1小时来确定的。将经刺激的细胞固定、透化和染色,并在LSR-II仪器(BD Biosciences)上进行流式细胞术分析。分析是使用FlowJo X软件(Tree Star,Inc.)进行的。在所有分析中,对小淋巴细胞的光散射特征进行门控之后,对CD3+群进行渐进式门控,并且随后是CD4-/CD8+ T细胞亚群。CD8+ T细胞群的抗原特异性应答频率通常通过胞内IFN-γ的表达来确定。

[0142] 在HBV感染(MOI=100)之后第6天收集HBV感染或HBV未感染靶标,与阻断剂W6/32抗体(泛MHC-I)、VL9肽(MHC-E)、CLIP(MHC-II)或HLA-DR抗体(MHC-II)一起孵育,并且随后与脾细胞或分离的CD8β+T细胞共培养过夜。共培养之后,CD8+ T细胞在胞内进行IFN-γ和TNF-α染色,以评估对靶标的识别。将识别HBV感染的RM PH的CD8+ T细胞用W6/32抗体和VL9肽进行阻断,但未用CLIP或HLA-DR进行阻断,表明对HBV感染的靶标的应答全部是受MHC-E限制的(图3A)。

[0143] 因为MHC-E在灵长类中功能保守,所以假定来自RhCMV/HBV接种的RM的CD8+ T细胞也识别HBV感染的HD原代肝细胞。为了测试该假定,通过将来自相同RhCMV/HBV接种的恒河猴(RM1和RM2)的脾细胞和纯化的CD8+ T细胞与HBV感染的人供体原代肝细胞一起孵育,进行了类似的识别实验。如所假定的,这些CD8+ T细胞识别HBV感染的异种人供体原代肝细胞(图3B)。如上文针对恒河猴原代肝细胞靶标共培养实验所述,识别HBV感染的人供体原代肝细胞的CD8+ T细胞通过MHC-E结合VL9肽进行完全阻断。总之,这些结果明确显示,HBV感染的原代肝细胞在MHC-E背景中呈递HBV抗原,表明该途径可用于将CD8+ T细胞靶向HBV感染的细胞。

[0144] 接下来,检查了HBV核心抗原中两种15聚体肽,核心蛋白7(PSVRDLLDTASALYR;SEQ ID NO:17)和核心蛋白14(TALRQAILCWGELMT;SEQ ID NO:18)MHC-E结合超表位的保守性。从乙型肝炎病毒数据库中检索出跨越所有已知HBV基因型的6,203个全基因组HBV序列,进行

翻译,并针对核心蛋白7(图4A)和核心蛋白14(图4B)进行氨基酸序列比对。在测定的所有动物中产生MHC-E限制性CD8+ T细胞应答的两种15聚体肽中存在高保守性(超表位)。重要的是,在两个不高度保守的位置(第3位核心蛋白7和第15位核心蛋白14),在全球HBV毒株中在该位置仅有一种另外的显性氨基酸。因此,超过98%的已知全球序列在这些位置表达两种氨基酸中的一种。

[0145] 这些结果确定了全新的针对HBV的CD8+ T细胞应答组,这为开发创新的HBV治疗铺平了道路。虽然MHC-E限制性CD8+ T细胞应答已在用CMV、EBV和HCV的天然病毒感染中进行鉴定(Joosten et al.2016.Characteristics of HLA-E Restricted T-Cell Responses and Their Role in Infectious Diseases.Journal of Immunology Research 2016:1-11),但是尚未发表针对HBV的MHC-E限制性CD8+ T细胞应答的报道。因此,尚不清楚HBV感染的肝细胞是否在MHC-E的背景下呈递HBV抗原。这些结果显示MHC-E确实在HBV感染的细胞的表面上呈递HBV抗原,并且来自完全不同的灵长类物种的CD8+ T细胞可识别这些MHC-E:肽复合体。

[0146] 除了代表完全独特类型的针对HBV的CD8+ T细胞应答之外,在HBcAg内靶向的表位的广度表明用CMV/HBV载体进行治疗性疫苗接种将引发广泛靶向的CD8+ T细胞应答。虽然这种广泛的靶向性先前已显示出针对SIV、结核分枝杆菌和疟疾,但其可针对HBV特别有效,因为绝大多数HBV基因组几乎完全由无塑性重叠阅读框构成。总之,这些结果首次显示MHC-E限制性CD8+ T细胞可用于治疗慢性HBV感染,无论是通过治疗性疫苗接种还是过继性免疫治疗。

[0001] 序列表

[0002] <110> OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY

[0003] <120> 乙型肝炎病毒特异性T细胞应答

[0004] <130> 4153.011PC01

[0005] <150> 62/858,764

[0006] <151> 2019-06-07

[0007] <160> 18

[0008] <170> PatentIn 3.5版

[0009] <210> 1

[0010] <211> 35

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 左反向引物

[0015] <400> 1

[0016] catcgagcta gcaccatgga gaacatcaca tcagg 35

[0017] <210> 2

[0018] <211> 35

[0019] <212> DNA

[0020] <213> 人工序列

[0021] <220>

[0022] <223> 右正向引物

[0023] <400> 2

[0024] gtgttgatag gataggggaa tgtataccca aagac 35

[0025] <210> 3

[0026] <211> 35

[0027] <212> DNA

[0028] <213> 人工序列

[0029] <220>

[0030] <223> 右反向引物

[0031] <400> 3

[0032] gtctttgggt atacattccc ctatcctatc aacac 35

[0033] <210> 4

[0034] <211> 67

[0035] <212> DNA

[0036] <213> 人工序列

[0037] <220>

[0038] <223> 左正向引物

[0039] <400> 4

[0040] ggaatcgtcg actcaagcgt aatctggaac atcgtatggg taaagattga cgataaggga 60

[0041] gaggcag 67

[0042] <210> 5

[0043] <211> 42

[0044] <212> DNA

[0045] <213> 人工序列

[0046] <220>

[0047] <223> 正向引物

[0048] <400> 5

[0049] gtggtaccct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg ag 42

[0050] <210> 6

[0051] <211> 40

[0052] <212> DNA

[0053] <213> 人工序列

[0054] <220>

[0055] <223> 反向引物

[0056] <400> 6

[0057] tcagtcgacc taagcgtaat ctggaacatc gtatgggtac 40

[0058] <210> 7

[0059] <211> 37

[0060] <212> DNA

[0061] <213> 人工序列

[0062] <220>

[0063] <223> 正向引物

[0064] <400> 7

[0065] ctgctagcat ggacattgac ccttataaag aatttgg 37

[0066] <210> 8

[0067] <211> 32

[0068] <212> DNA

[0069] <213> 人工序列

[0070] <220>

[0071] <223> 反向引物

[0072] <400> 8

[0073] ctaggtacca cattgagatt cccgagattg ag 32

[0074] <210> 9

[0075] <211> 75

[0076] <212> DNA

[0077] <213> 人工序列

[0078] <220>

[0079] <223> Rh110 S/PolN 正向

[0080] <400> 9

[0081] gatcacgtca ttgacaccgg cctcccacca gctctcacat tctccgcatc accatggaga 60

[0082] acatcacatc aggat 75

[0083] <210> 10

[0084] <211> 79

[0085] <212> DNA

[0086] <213> 人工序列

[0087] <220>

[0088] <223> Rh110 S/PolN 反向

[0089] <400> 10

[0090] caaaatatta ttacatggta cgcaatttat tgtctatttt cgttatttgt ttattcaagc 60

[0091] gtaatctgga acatcgtat 79

[0092] <210> 11

[0093] <211> 78

[0094] <212> DNA

[0095] <213> 人工序列

[0096] <220>

[0097] <223> Rh110 核心/PolC 正向

[0098] <400> 11

[0099] gatcacgtca ttgacaccgg cctcccacca gctctcacat tctccgcatc accatggaca 60

[0100] ttgaccctta taaagaat 78

[0101] <210> 12

[0102] <211> 79

[0103] <212> DNA

[0104] <213> 人工序列

[0105] <220>

[0106] <223> Rh110 核心/PolC 反向

[0107] <400> 12

[0108] caaaatatta ttacatggta cgcaatttat tgtctatttt cgttatttgt ttatctaagc 60

[0109] gtaatctgga acatcgtat 79

[0110] <210> 13

[0111] <211> 55

[0112] <212> DNA

[0113] <213> 人工序列

[0114] <220>

[0115] <223> 正向引物

[0116] <400> 13

[0117] ctgctagcat ggattacaag gatgacaagg acatcgaccc ttataaagaa tttgg 55

[0118] <210> 14

[0119] <211> 32

[0120] <212> DNA

[0121] <213> 人工序列

[0122] <220>

[0123] <223> 反向引物

[0124] <400> 14

[0125] ctagtcgaca cattgagatt cccgagattg ag 32

[0126] <210> 15

[0127] <211> 84

[0128] <212> DNA

[0129] <213> 人工序列

[0130] <220>

[0131] <223> 正向引物

[0132] <400> 15

[0133] gggaaatcac gtcatcaggc tgggtagtca acatgggcat acgaaacttg cccgaataga 60

[0134] tgctctcact taacggctga catg 84

[0135] <210> 16

[0136] <211> 84

[0137] <212> DNA

[0138] <213> 人工序列

[0139] <220>

[0140] <223> 反向引物

[0141] <400> 16

[0142] ccagaatgtg ctctactttt tggccagcgg gttggatgat ttcgcgcgtc atggactgct 60

[0143] tcactgtagc ttagtacgtt aaac 84

[0144] <210> 17

[0145] <211> 15

[0146] <212> PRT

[0147] <213> 人工序列

[0148] <220>

[0149] <223> 抗原

[0150] <400> 17

[0151] Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg

[0152] 1 5 10 15

[0153] <210> 18

[0154] <211> 15

[0155] <212> PRT

[0156] <213> 人工序列

[0157] <220>

[0158] <223> 抗原

[0159] <400> 18

[0160] Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr

[0161] 1 5 10 15

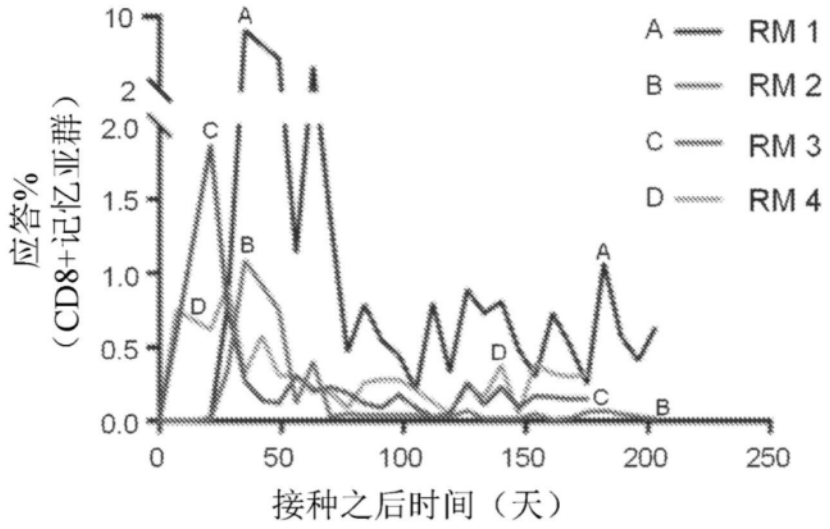

10
2
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
应答%
（CD8+记忆亚群）
0
50
100
150
200
250
接种之后时间（天）
A
B
C
D
A RM 1
B RM 2
C RM 3
D RM 4

图1A

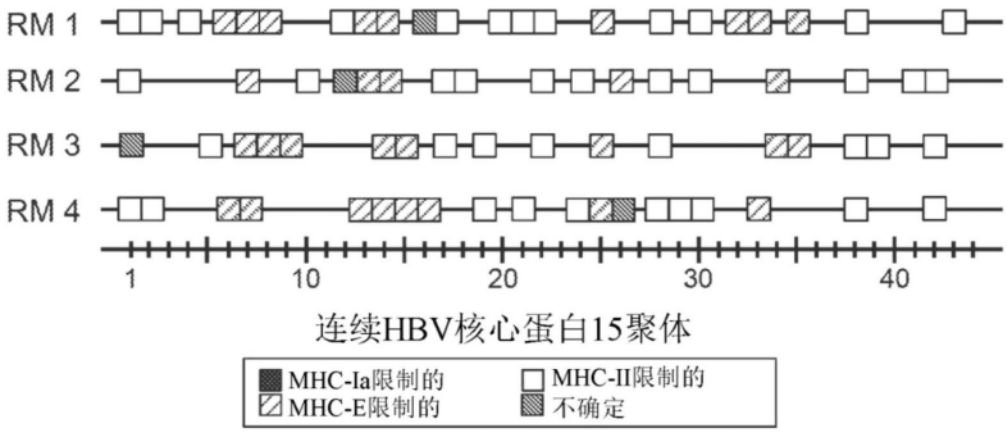

RM 1
RM 2
RM 3
RM 4
1
10
20
30
40
连续HBV核心蛋白15聚体
MHC-Ia限制的
MHC-II限制的
MHC-E限制的
不确定

图1B

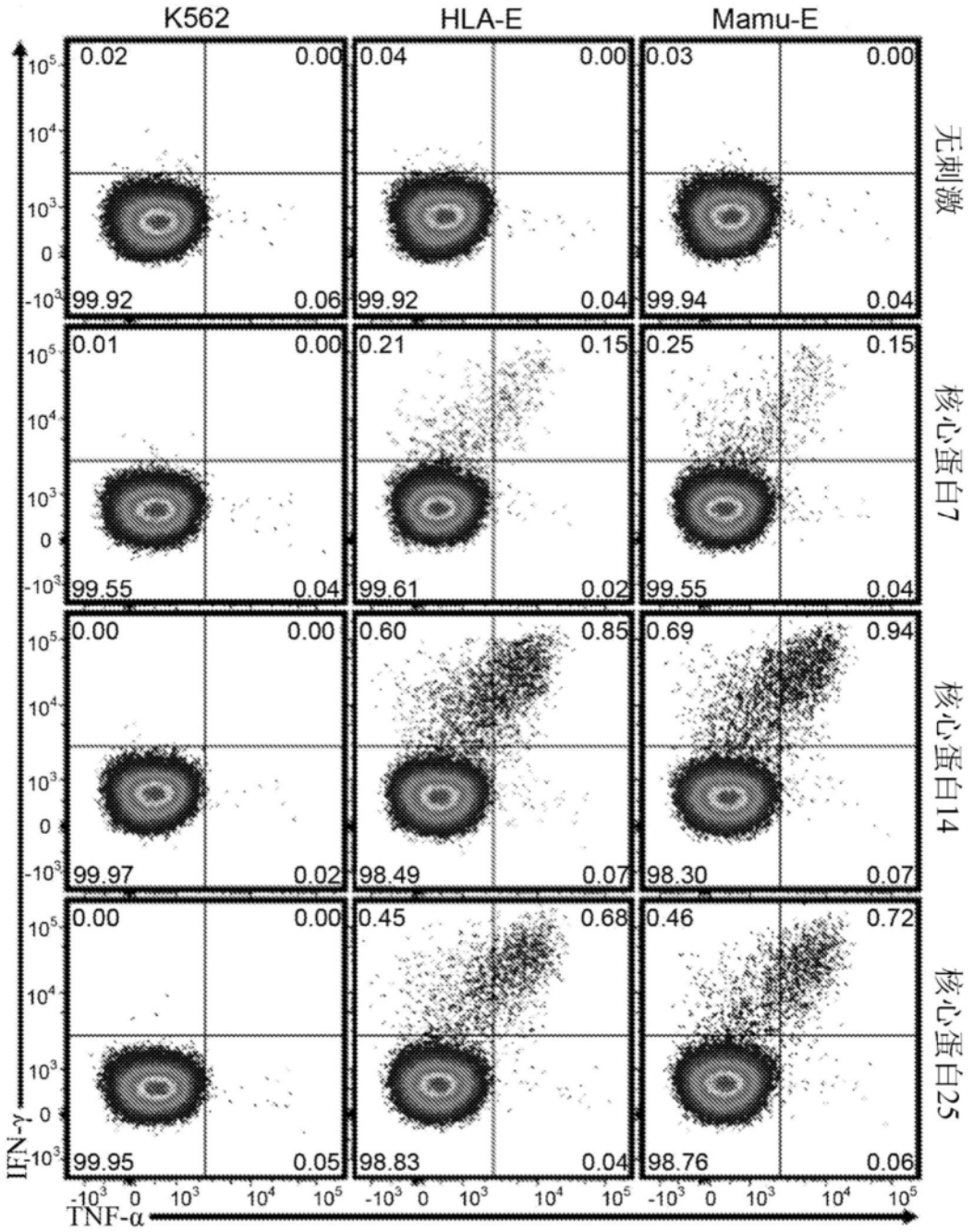

K562
HLA-E
Mamu-E
无刺激
核心蛋白7
核心蛋白14
核心蛋白25
0.02
0.00
99.92
0.06
0.04
0.00
99.92
0.04
0.03
0.00
99.94
0.04
0.01
0.00
99.55
0.04
0.21
0.15
99.61
0.02
0.25
0.15
99.55
0.04
0.00
0.00
99.97
0.02
0.60
0.85
98.49
0.07
0.69
0.94
98.30
0.07
0.00
0.00
99.95
0.05
0.45
0.68
98.83
0.04
0.46
0.72
98.76
0.06
IFN-γ
TNF-α
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵

图1C

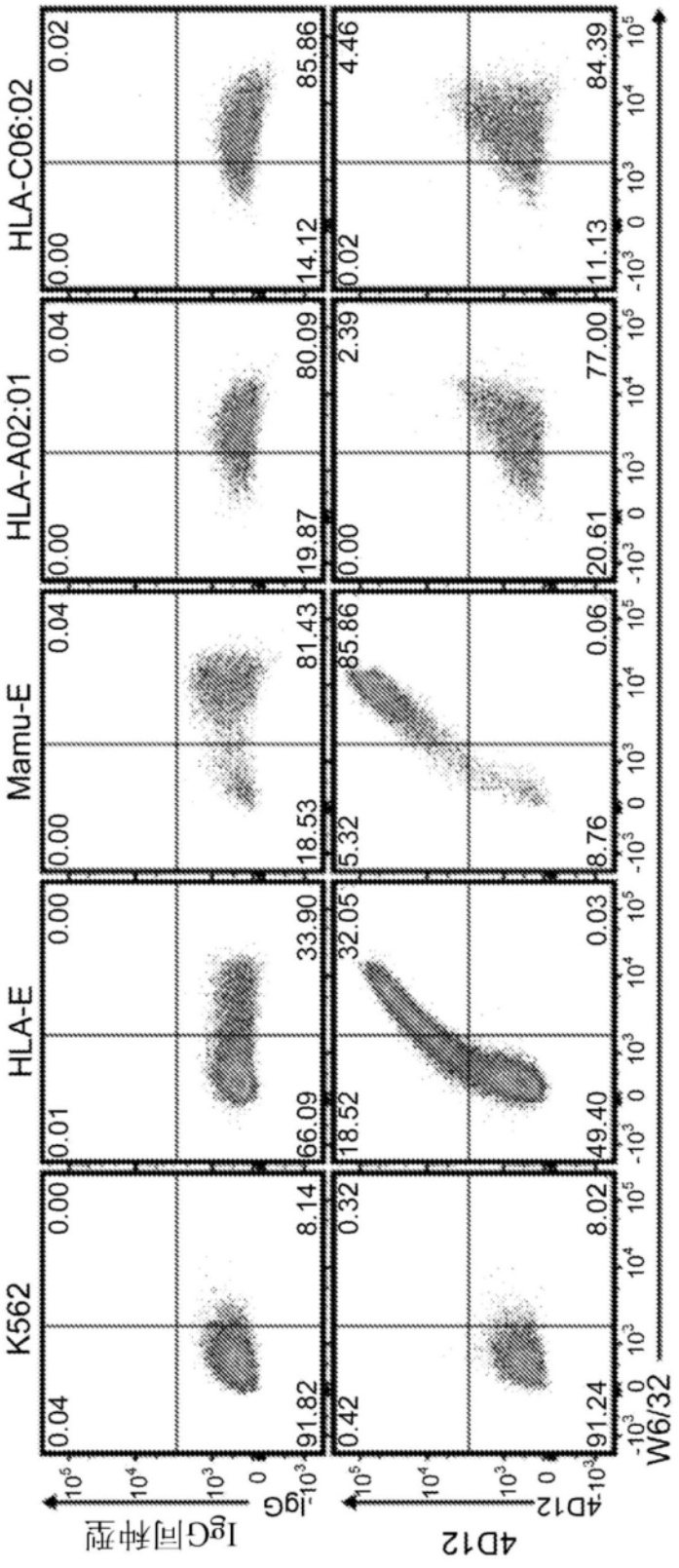

K562
HLA-E
Mamu-E
HLA-A02:01
HLA-C06:02
IgG同种型
4D12
W6/32
IgG
4D12
0.04
91.82
0.00
8.14
0.42
91.24
0.32
8.02
0.01
66.09
0.00
33.90
18.52
49.40
32.05
0.03
0.00
18.53
0.04
81.43
5.32
8.76
85.86
0.06
0.00
19.87
0.04
80.09
0.00
20.61
2.39
77.00
0.00
14.12
0.02
85.86
0.02
11.13
4.46
84.39

图2A

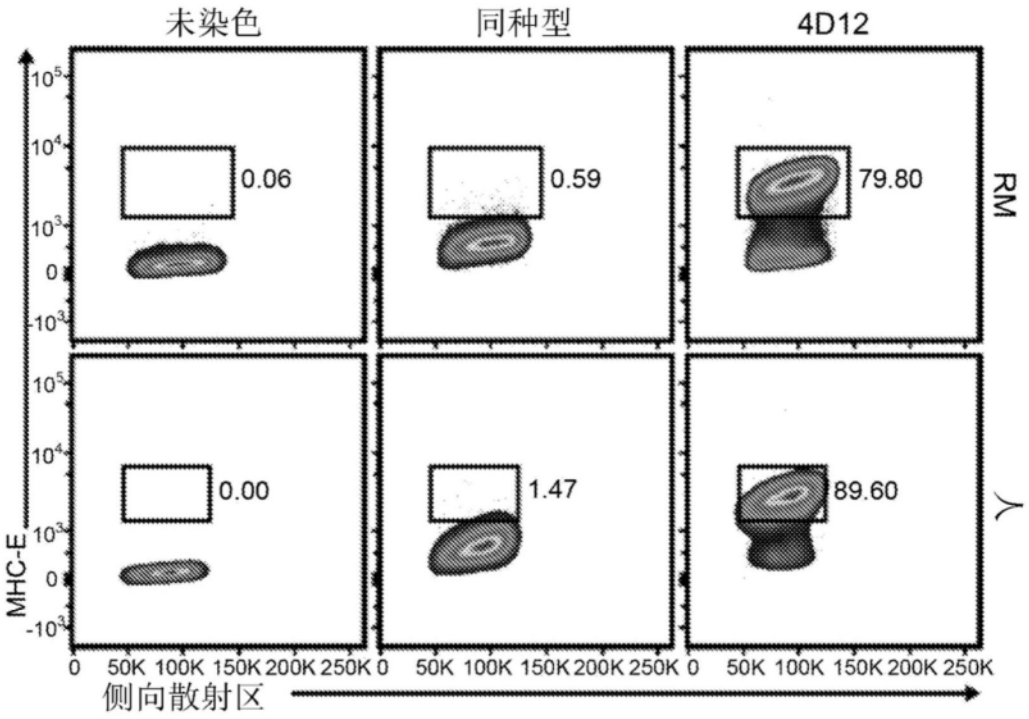

未染色
同种型
4D12
RM
人
MHC-E
0.06
0.59
79.80
0.00
1.47
89.60
0 50K 100K 150K 200K 250K
侧向散射区

图2B

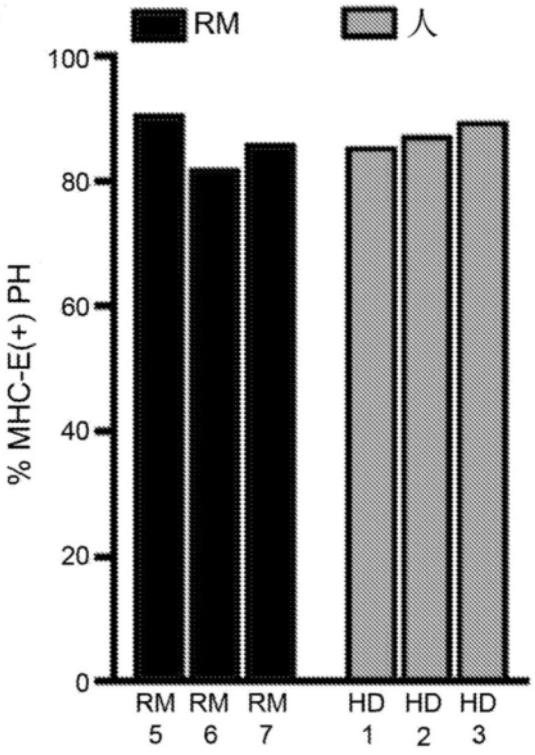

RM
人
% MHC-E(+) PH
100
80
60
40
20
0
RM 5
RM 6
RM 7
HD 1
HD 2
HD 3

图2C

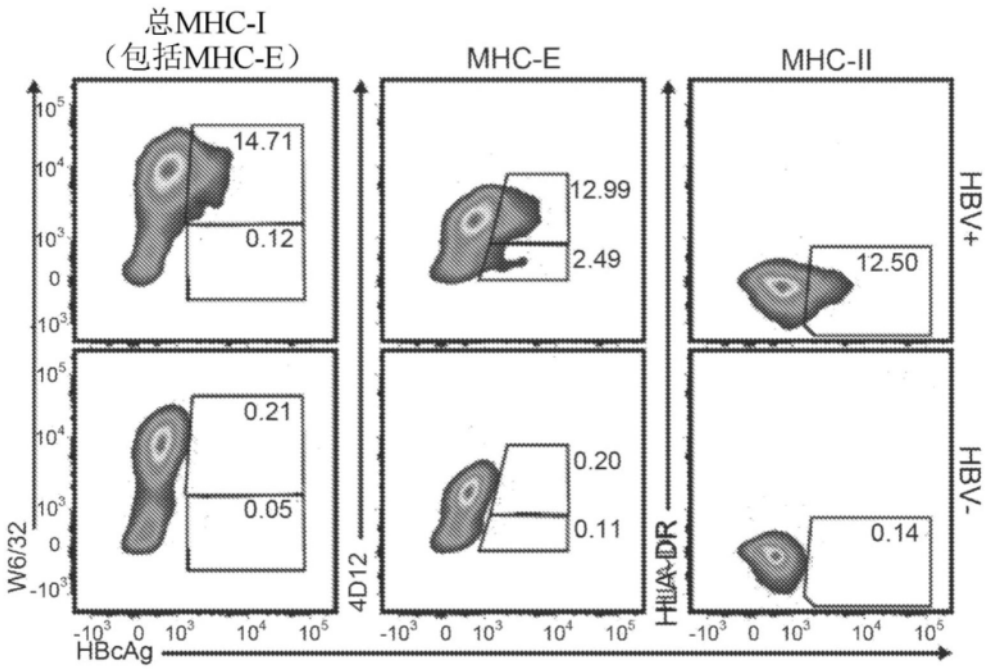

总MHC-I
（包括MHC-E）
MHC-E
MHC-II
14.71
0.12
12.99
2.49
12.50
0.21
0.05
0.20
0.11
0.14
HBV+
HBV-
W6/32
4D12
HLA-DR
HBcAg

图2D

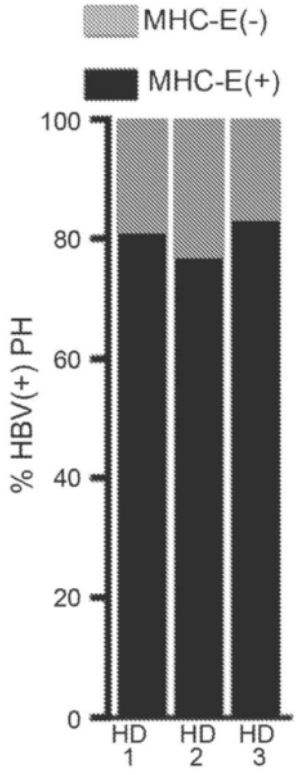

MHC-E(-)
MHC-E(+)
% HBV(+) PH
HD 1
HD 2
HD 3

图2E

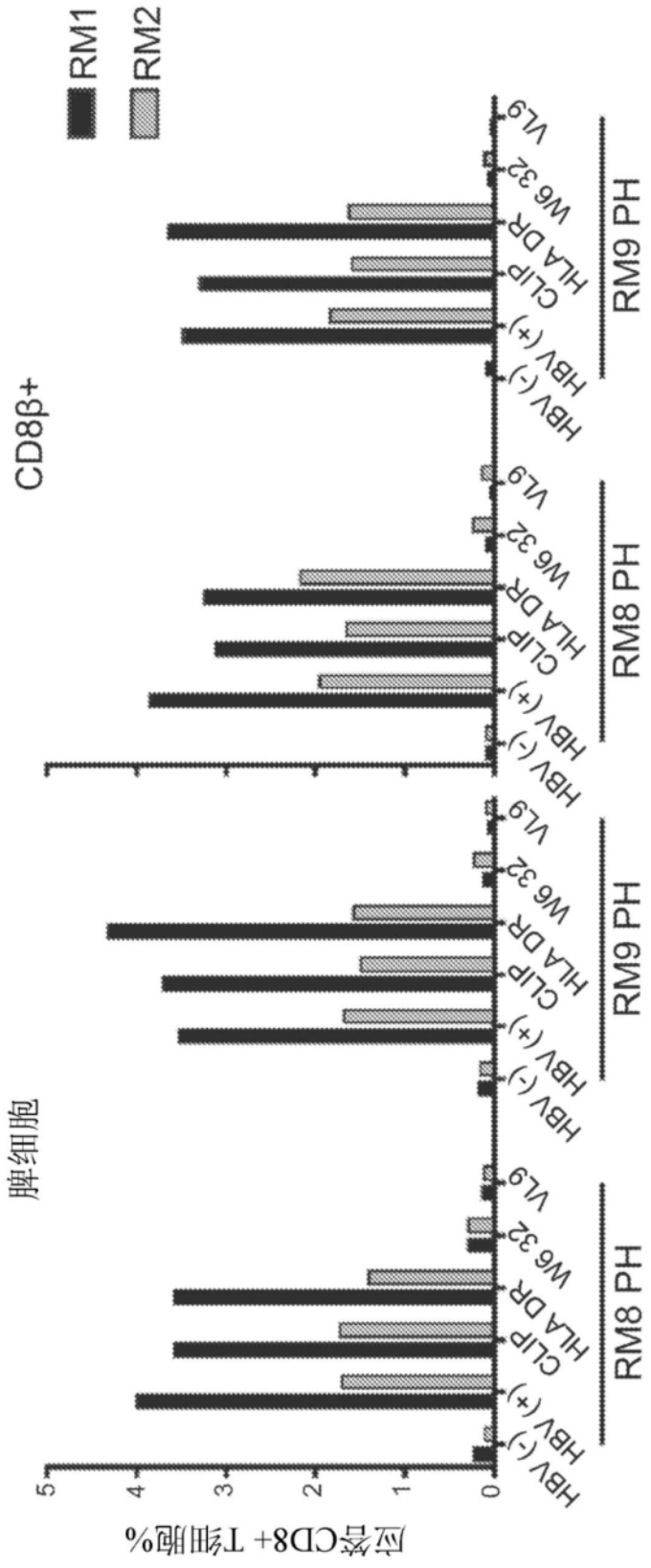

RM1
RM2
CD8β+
脾细胞
应答CD8+ T细胞%
0
1
2
3
4
5
HBV (-)
HBV (+)
CLIP
HLA DR
W6 32
VL9
RM8 PH
RM9 PH
RM8 PH
RM9 PH

图3A

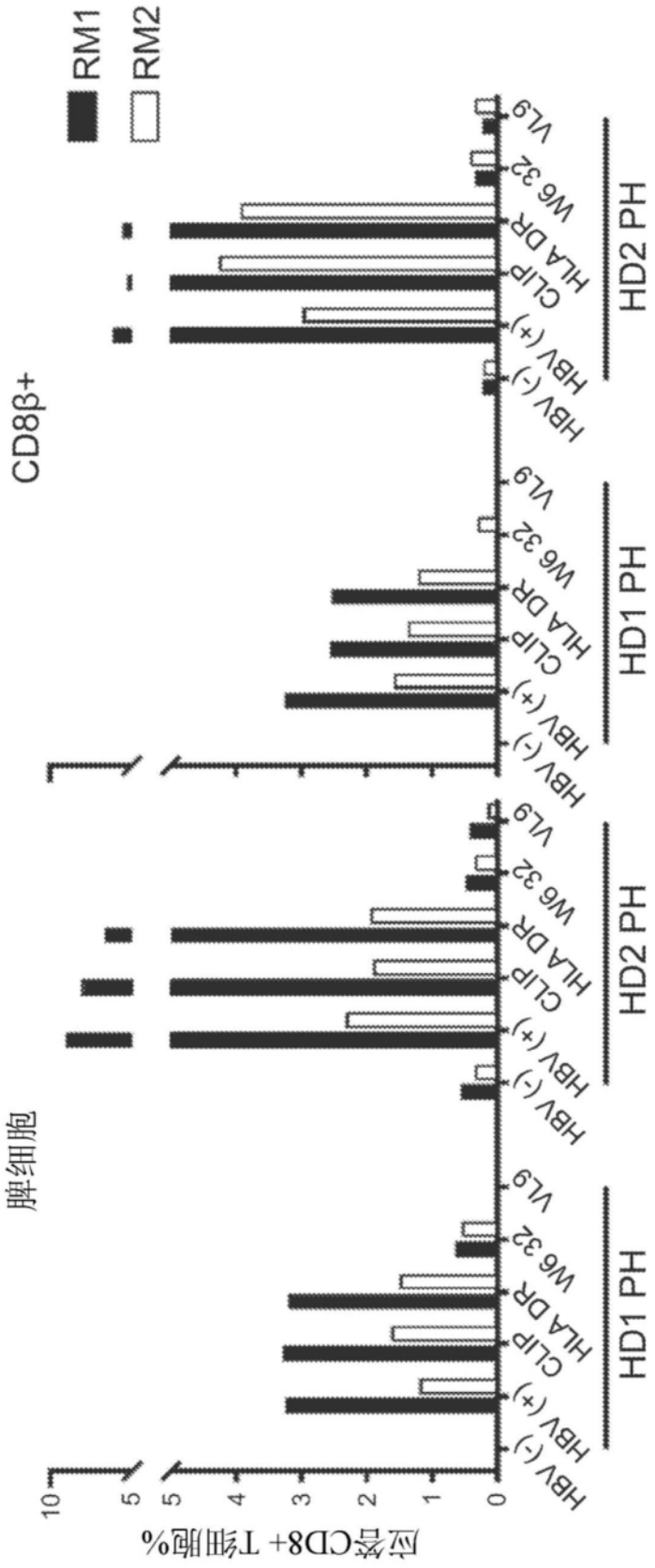

RM1
RM2
CD8β+
脾细胞
应答CD8+ T细胞%
10
5
5
4
3
2
1
0
HBV (-)
HBV (+)
CLIP
HLA DR
W6 32
VL9
HD1 PH
HD2 PH

图3B


A
在HBV基因型中保守的%
100
80
60
40
20
0
P S V R D L L D T A S A L Y R
核心蛋白7

图4A


B
在HBV基因型中保守的%
100
80
60
40
20
0
T A L R Q A I L C W G E L M T
氨基酸位置
核心蛋白14

图4B