(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117202929 A
(43)申请公布日 2023.12.08

(21)申请号 202180045562.6

(22)申请日 2021.04.28

(30)优先权数据
2020901334 2020.04.28 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2021/050385 2021.04.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/217206 EN 2021.11.04

(71)申请人 昆士兰医学研究所理事会
地址 澳大利亚昆士兰州

(72)发明人 R·卡纳 V·达萨里

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.
A61K 39/245(2006.01)

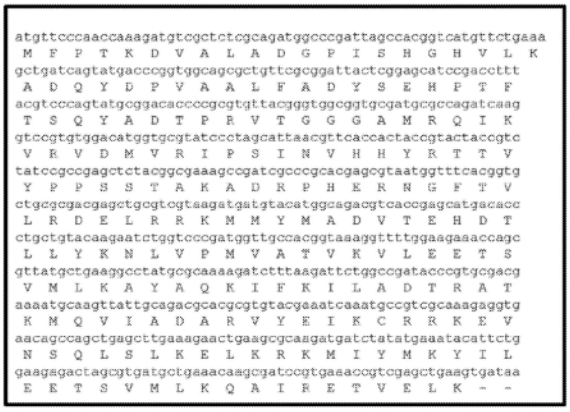
权利要求书2页 说明书36页 附图20页

(54)发明名称

人巨细胞病毒多表位疫苗组合物

(57)摘要

本发明公开了人疱疹病毒免疫治疗。更具体而言,公开了包含一种或多种含有源自多种人巨细胞病毒抗原的多个表位的重组蛋白质、CMV包膜糖蛋白和TLR激动剂的组合物。



CN 117202929 A

1.药物组合物,其包含:

(a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

(b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

(c)TLR9激动剂。

2.权利要求1的药物组合物,其中该组合物能够在对个体施用时能够诱导或引发体液免疫反应和细胞介导的免疫反应,如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

3.权利要求1的药物组合物,其中该一种或多种分离的蛋白质是或包含多表位蛋白质,该多表位蛋白质包含来自该两种或更多种不同CMV抗原的多个表位中的两个或多个。

4.权利要求3的药物组合物,其中该多表位蛋白质包含位于至少两个所述表位之间的间插氨基酸序列,其中该间插氨基酸序列包含蛋白酶体释放氨基酸序列。

5.权利要求4的药物组合物,其中该蛋白酶体释放氨基酸或氨基酸序列包含AD、K和/或R。

6.前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述表位是HLA I类特异性HLA-A1、-A2、-A3、-A11、-A23、-A24、-A26、-A29、-A30、-B7、-B8、-B18、-B27、-B35、-B38、-B40、-B41、-B44、-B51、-B57、-B58和/或-CW6限制性的。

7.前述权利要求中任一项的药物组合物,其中所述表位源自pp50、pp65、pp150、DNAse和/或IE-1。

8.权利要求7的药物组合物,其中所述表位具有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-20、表1中所示的氨基酸序列、其片段、变体或衍生物、及其任何组合。

9.权利要求8的药物组合物,其中该一种或多种分离的蛋白质包含SEQ ID NOS:1-20中所示的表位氨基酸序列中的每一个。

10.前述权利要求中任一项的药物组合物,其中该一种或多种分离的蛋白质包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其片段、变体或衍生物。

11.前述权利要求中任一项的药物组合物,其中该一种或多种分离的蛋白质包含二十(20)个或更少的表位。

12.前述权利要求中任一项的药物组合物,其进一步包含可药用载体、稀释剂或赋形剂。

13.前述权利要求中任一项的药物组合物,其中该CMV包膜蛋白是或包含CMV糖蛋白B或其片段、变体或衍生物。

14.前述权利要求中任一项的药物组合物,其中该TLR9激动剂是或包含CpG ODN1018和/或CpG ODN2006。

15.疫苗,其包含前述权利要求中任一项的药物组合物,用于引发针对CMV的保护性免疫反应。

16.在个体中治疗或预防CMV感染的方法,所述方法包括对个体施用治疗有效量的药物组合物的步骤,该药物组合物包含:

(a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

(b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

(c)TLR9激动剂;

从而在该个体中预防或治疗CMV感染。

17.在个体中引发对CMV抗原的免疫反应的方法,所述方法包括对该个体施用治疗有效量的药物组合物的步骤,该药物组合物包含:

(a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

(b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

(c)TLR9激动剂;

从而在所述个体中引发免疫反应。

18.权利要求17的方法,其中该免疫反应是或包括体液免疫反应和细胞介导的免疫反应,如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

19.权利要求17或18的方法,其在所述个体中引发针对CMV或CMV感染的保护性免疫反应。

20.在个体中诱导针对CMV感染的免疫的方法,所述方法包括对该个体施用治疗有效量的药物组合物的步骤,该药物组合物包含:

(a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

(b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

(c)TLR9激动剂;

从而在该个体中诱导针对CMV感染的免疫。

21.权利要求16至20中任一项的方法,其中该个体是人。

22.权利要求16至21中任一项的方法,其中该药物组合物是权利要求1至14中任一项的药物组合物。

23.分离的蛋白质,其包含SEQ ID NO:1-20中所示的每一个表位氨基酸序列或其片段、变体或衍生物。

24.权利要求23的分离的蛋白质,其中该分离的蛋白质包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其片段、变体或衍生物。

25.分离的核酸,其编码权利要求23或权利要求24的分离的蛋白质。

人巨细胞病毒多表位疫苗组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2020年4月28日提交的题为“药物组合物”的澳大利亚临时申请No.2020901334的优先权,其全部内容在此以其整体引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及人疱疹病毒免疫治疗。具体而言,本发明涉及疫苗组合物,其包含一种或多种重组蛋白、CMV包膜糖蛋白和TLR激动剂,其中该一种或多种重组蛋白包含源自多种人巨细胞病毒(CMV)抗原的多个表位,其在用于免疫治疗时能够引发保护性和持久的体液和细胞介导的免疫反应,而不限于此。

背景技术

[0004] 健康个体中的原发性CMV通常无症状,建立潜伏状态,偶尔重新激活并从黏膜表面脱落。在一些情况下,原发性CMV感染伴有单核细胞增多症样疾病的临床症状,类似于EB病毒引起的症状。有两种重要的临床情况,其中CMV会导致显著的发病率和死亡率。这包括先天性原发性感染和免疫抑制成人中的原发性病毒或病毒重新激活。

[0005] 最近对CMV的免疫学、病理学和分子生物学的理解表明,针对CMV相关疾病的保护是由体液和细胞免疫介导的,因此,理想的CMV疫苗需要诱导体液和细胞反应。不幸的是,最近的CMV疫苗开发尝试显示出有限的成功。这些CMV疫苗策略已将糖蛋白B(gB)、pp65和IE-1评估为潜在靶点,并已通过多种递送平台递送,包括减毒CMV Towne毒株(Jacobson,Sinclair等2006)、编码全长抗原和表位的重组病毒载体((Bernstein,Reap等2009,Zhong和Khanna 2009,La Rosa,Longmate等2017)、DNA(Wloch,Smith等2008)、致密体((Pepperl-Klindworth,Frankenberg等2002)、亚单位(Drulak,Malinoski等2000)疫苗、以及最近源自AD169株的条件复制缺陷型CMV疫苗(Adler,Lewis等2019)。多年来,人们一直认为,为了引发保护性CD8细胞毒性T细胞反应,病毒抗原必须以核酸形式(例如,使用病毒载体递送系统或DNA质粒)而不是作为外源递送的蛋白质进行递送,以便所表达的多肽被正确处理并呈递给T细胞。然而,这些疫苗递送平台中的大多数,尤其是减毒活疫苗和基于病毒载体的疫苗,已经引发了一些监管问题,例如,感知的长期理论健康风险和预先存在的免疫力(Lee,Markham等人,2012)。

[0006] 因此,仍然需要用于预防CMV感染和重新激活的疫苗制剂,以克服现有技术疫苗的一个或多个缺陷(包括其免疫原性和安全性问题)。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明通过使用能够引发持久和保护性免疫反应的安全递送技术,满足了开发疱疹病毒(尤其是CMV)免疫治疗的需求。本发明旨在降低发育中胎儿和免疫受损个体(例如实体器官和造血干细胞移植的受体以及晚期HIV疾病患者)的CMV相关损伤的风险。

[0009] 本发明令人惊讶地源于这样的发现,即对个体施用以下疫苗组合物可以引发持久的保护性体液和细胞免疫反应,所述疫苗组合物包含:含有多种人CMV抗原的多表位蛋白、

CMV包膜糖蛋白和激活toll样受体的CpG寡核苷酸。

[0010] 因此,本发明一般涉及药物组合物及其使用方法,该药物组合物包含一种或多种分离的蛋白质、CMV包膜蛋白和TLR激动剂,其中该一种或多种分离的蛋白质包括来自两种或更多种不同的CMV抗原的多个表位,如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位。

[0011] 在第一方面,本发明涉及药物组合物,其包含:

[0012] (a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

[0013] (b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

[0014] (c)TLR9激动剂。

[0015] 在一个实施方案中,该组合物能够在对个体施用时诱导或引发体液免疫反应和细胞介导的免疫反应,例如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。在这方面,该多个表位中的一个或多个可以是或包含CTL表位。

[0016] 适宜地,该一种或多种分离的蛋白质是或包含多表位蛋白质,该多表位蛋白质包含源自两种或更多种不同CMV抗原的多个表位中的两个或更多个。该多表位蛋白质可以进一步包含间插氨基酸或氨基酸序列。在一个实施方案中,该多表位蛋白质包含介于至少两个所述表位之间的间插氨基酸或氨基酸序列,其包含蛋白酶体释放氨基酸或氨基酸序列,如AD、K和/或R。

[0017] 适宜地,选择表位以提供对人群的广泛覆盖。在某些实施方案中,所述表位是以下HLAI类特异性限制性表位:HLA-A1、-A2、-A3、-A11、-A23、-A24、-A26、-A29、-A30、-B7、-B8、-B18、-B27、-B35、-B38、-B40、-B41、-B44、-B51、-B57、-B58和/或-CW6。更特别地,所述表位可以是HLAI类特异性HLA-A1、-A2,-A3、-A11、-A23、-A24、-B7、-B18、-B27、-B35、-B40、-B44、-B57、-B58和/或-CW6限制性的。

[0018] 适宜地,选择表位以靶向CMV感染的一个或多个阶段,如感染、复制和/或包装。在一个实施方案中,所述表位源自pp50、pp65、pp150、DNAse和/或IE-1。更特别地,所述表位可以具有选自表1中所示(即SEQ ID NO:1-20)的氨基酸序列、其片段、变体或衍生物,或其任何组合。在一个具体实施方案中,该一种或多种分离的蛋白质包含表1中所示的表位氨基酸序列(即SEQ ID NOS:1-20)中的每一个。在这方面,该一种或多种分离的蛋白质可适宜地包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或其片段、变体或衍生物。

[0019] 表1

[0020] CMVPOLY20PL-NH 表位序列和 HLA 限制性

表位序列	HLA 限制	HCMV 抗原
FPTKDVALAD*	HLA B35	pp65

GPISHGHVLKAD	HLA A11	pp65
QYDPVAALFAD	HLA A24	pp65
YSEHPTFTSQYAD	HLA A1	pp65
TPRVTGGGAMR	HLA B7	pp65
QIKVRVDMVR	HLA B8	IE-1
IPSINVHHYR	HLA B35	pp65
TTVYPPSSTAKAD	HLA A3	pp150
RPHERNGFTVLR	HLA B7	pp65
DELRRKMMYMAD	B8/B18/B44	IE-1

[0021]

VTEHDTLLYK	HLA A1	pp50
NLVPMVATVK	HLA A2	pp65
VLEETSVMLK	HLA A2	IE-1
AYAQKIFKILAD	A23/A24	pp65
TRATKMQVIAD	CW6	pp65
ARVYEIKCRR	HLA B27	DNAse
KEVNSQLSLK	HLA B40	IE-1
ELKRKMIYMK	HLA B8	IE-1
YILEETSVMLK	HLA A2	IE-1
QAIRETVELK	B57/B58	pp65

[0022] 下划线的氨基酸显示蛋白酶体释放序列

[0023] 在具体实施方案中,该一种或多种分离的蛋白质包含二十(20)个或以下表位。

[0024] 适宜地,CMV包膜蛋白选自糖蛋白B(gB)、糖蛋白H(gH)、糖蛋白L(gL)、糖蛋白M(gM)、糖蛋白N(gN)、糖蛋白O(gO)、其变体、片段或衍生物,及其任何组合。在一个具体实施方案中,CMV包膜蛋白是或包含CMV糖蛋白B,或其片段、变体或衍生物。

[0025] 适宜地,TLR9激动剂包含CpG ODN1018和/或CpG ODN2006。在一个具体实施方案中,TLR90激动剂是或包含CpG ODN1018。在一些实施方案中,TLR9激动剂不是MPL、CpG ODN1826、CpG ODN2006、CpG ODN2216和/或CpG ODN2336。

[0026] 适宜地,本方面的药物组合物还可以包含可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0027] 在一些实施方案中,除了TLR9激动剂之外,该药物组合物还包含一种或多种免疫刺激分子或佐剂。

[0028] 适宜地,本方面的药物组合物是适用于预防性或治疗性处理或防止个体中与CMV感染相关的疾病、病症或病况的免疫原性组合物。

[0029] 在第二方面,本发明提供包含第一方面的药物组合物的疫苗,用于引发针对CMV或CMV感染的保护性免疫反应。

[0030] 在第三方面,本发明涉及在个体中治疗或预防CMV感染的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的药物组合物的步骤,该药物组合物包含:

[0031] (a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

[0032] (b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

[0033] (c)TLR9激动剂;

[0034] 从而在该个体中预防或治疗CMV感染。

[0035] 在第四方面,本发明提供在个体中引发对CMV抗原的免疫反应的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的药物组合物的步骤,该药物组合物包含:

[0036] (a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

[0037] (b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

[0038] (c)TLR9激动剂;

[0039] 从而在该个体中引发免疫反应。

[0040] 在一个实施方案中,所述免疫反应是或包括体液免疫反应和/或细胞介导的免疫反应,如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

[0041] 本方面的方法适宜地在个体中引发针对CMV或CMV感染的保护性免疫反应。

[0042] 在第五方面,本发明涉及在个体中诱导针对CMV感染的免疫的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的药物组合物的步骤,该药物组合物包含:

[0043] (a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

[0044] (b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

[0045] (c)TLR9激动剂;

[0046] 从而在该个体中诱导针对CMV感染的免疫。

[0047] 本方面的方法适宜地诱导针对CMV感染的保护性免疫反应。

[0048] 在另一个实施方案中,本方法适宜地诱导针对CMV感染的体液免疫反应和/或细胞介导的免疫反应,如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

[0049] 适宜地,根据上述三个方面,所述个体是哺乳动物。更优选地,所述个体是人。

[0050] 对于第三、第四和第五方面的方法,所述药物组合物适宜地是第一方面的药物组合物。

[0051] 在第六方面,本发明涉及分离的蛋白质,其包含SEQ ID NO:1-20中所示的表位氨基酸序列中的每一个或其片段、变体或衍生物。

[0052] 适宜地,该分离的蛋白质包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其片段、变体或衍生物、基本上由其组成或由其组成。

[0053] 在具体实施方案中,该分离的蛋白质用于上述三个方面的方法。

[0054] 在第七方面,本发明提供编码第六方面的分离的蛋白质的分离核酸。

[0055] 在第八方面,本发明涉及包含第七方面的分离的核酸的遗传构建体。

[0056] 在第九方面,本发明涉及包含第七方面的分离的核酸和/或第八方面的遗传构建体的宿主细胞。

[0057] 在第十方面,本发明提供产生第六方面的分离的蛋白质的方法,其包括以下步骤:(i)培养第九方面的宿主细胞;和(ii)从步骤(i)中培养的该宿主细胞分离所述分离的蛋白质。

[0058] 本文所用的不定冠词“一种”和“一个”在本文中用于指代或涵盖单数或复数元件或特征,不应视为意指或定义“一个”或“单个”元件或特征。例如,“一种”蛋白质包括一个蛋白质、一个或多个蛋白质、或多数个蛋白质。

[0059] 除非上下文另有要求,否则术语“包含”、“含有”和“包括”或类似术语旨在意指非排他性包含,使得所列举的元件或特征列表不仅包括所陈述或列出的元件或特征,而且还可以包括其他未列出或陈述的元件或特征。

[0060] 在氨基酸序列(如分离的蛋白质)的上下文中,“基本上由…组成”是指,所述氨基酸序列连同N端或C端的一个、两个或三个附加氨基酸。

[0061] 附图简述

[0062] 为了更容易地理解本发明并使其发挥实际效果,将参考附图描述本发明的优选实施方案,这些实施方案仅是举例说明性质。

[0063] 图1:编码CMVpoly20PL-NH蛋白质的核苷酸和氨基酸序列

[0064] 图2:CMVpoly20PL-NH蛋白质表达、细胞裂解、包涵体洗涤和蛋白质纯化的SDS-PAGE凝胶分析:将编码CMVpoly20PL-NH的DNA序列克隆到IPTG诱导型质粒pJexpress 404中,并转化到化学感受态大肠杆菌BL21-codonPlus(DE3)RP宿主中进行蛋白质表达。通过加入1mM/mL IPTG4小时来进行CMVpoly20PL-NH蛋白质表达。蛋白质诱导4小时后,通过在SDS-PAGE上分析未诱导的(ui)和诱导的(ind)样品来测定表达水平(A)。为了测定CMVpoly20PL-NH的溶解度,裂解细胞,在SDS-PAGE凝胶上分析上清液和沉淀级分(B)。由于蛋白质存在于包涵体(IB)中,用TE缓冲液洗涤它们,然后用含有100mM NaH2PO4、10mM Tris、4M尿素pH 7.5的缓冲液洗涤三次(W1至W3),将蛋白质溶解在100mM NaH_2PO_4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 5.5缓冲液中,然后在SDS-PAGE上分析上清液(sup)和沉淀级分(C)。IB溶解后,使用SP-Sepharose和Q-Sepharose色谱技术纯化CMVpoly20PL-NH蛋白质,相对于25mM甘氨酸pH 3.8缓冲液透析所纯化的蛋白质,并使其通过Mustang E膜(D&E)。

[0065] 图3:CMVpoly20PL-NH的蛋白质完整质量分析:用2%乙腈和0.1%甲酸将蛋白质样品稀释至约0.25ug/uL的浓度。将样品(5μL)注入柱中。蛋白质在柱上脱盐,并使用线性溶剂梯度(A:99.9%水+0.1%甲酸;B:99.9%乙腈+0.1%甲酸)从柱上洗脱。洗脱液在Q Exactive上进行正离子电喷雾MS分析,以17500分辨率从600m/z扫描到3800m/z。蛋白质ESI光谱相对于蛋白质液相色谱洗脱谱取平均值。通过Thermo protein Decolvolution2.0软件对多电荷蛋白质谱进行解卷积。

[0066] 图4:CMVpoly20PL-NH体外免疫原性评估:为了确定CMVpoly蛋白质的免疫原性,用不含血清的RPMI培养基洗涤对数期培养物中的T1(HLA A2)细胞,然后用25μg CMVpoly20PL-NH蛋白质脉冲处理1小时。洗涤CMVpoly20PL-NH脉冲处理的T1细胞,然后在含

有10％ FCS的RPMI中孵育过夜。在过夜孵育后,洗涤细胞并使细胞暴露于CMV HLAA2限制性表位NLVPMVATV(NLV)特异性CD8+T细胞,使用比例为1CD8+T细胞:1APC和4CD8+T淋巴细胞:1APC,孵育4小时。通过ICS分析测定细胞内IFN-g表达。阳性和阴性对照分别为用和不用NLV肽脉冲处理的T1细胞。

[0067] 图5:在人HLAA24转基因小鼠中评价单独用CpG 1018或用多种形式MPLA配制的CMV疫苗的免疫原性:通过将CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)蛋白质与PHAD(25μg)和CpG 1018(50μg)(G1V)、3D-PHAD(25μg)和CpG 1018(50μg)(G2V)、3D(6-酰基)-PHAD(25μg)和CpG 1018(50μg)(G3V)、或单独CpG 1018(50μg)(G4V)混合,制备CMV疫苗制剂。作为阳性对照,我们将CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)蛋白质与MPL(25μg)和CpG 1826(50μg)配制在一起(G5V);作为阴性对照,我们配制了单独佐剂(G6C至G10C)。在第0天皮下免疫人HLAA24转基因小鼠,在第21天用相同的疫苗制剂(V)或单独佐剂(C)加强,然后在第28天处死,以使用ICS测定评估CMV特异性CD4+和CD8+T细胞反应,并使用ELISA评估体液免疫反应(A)。在第28天,制备脾细胞,然后用相应的CMV CD8+T细胞肽(HLA A24限制肽QYD和AYA)或用由224种肽(各15个氨基酸,其中11个氨基酸重叠)组成的CMV gB肽混合物(pepmix)在布雷菲尔德菌素A(brefeldin A)存在下进行刺激,并使用ICS测定法测定产生IFN-γ的CMV特异性CD4+T和CD8+T细胞。(B)显示在HLA A24转基因小鼠中用CMV CD8+T细胞肽刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的离体百分比。在第28天,用HLA A24限制性肽刺激来自接种小鼠和对照小鼠的脾细胞,然后培养10天。第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(C)显示在体外用CMV HLAA24限制性CD8+T细胞肽刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的百分比,(D)显示来自用CMV疫苗制剂免疫的HLA A24小鼠的体外扩增的CMV特异性CD8+T细胞中IFN-γ、TNF-α、CD107a和IL-2细胞因子的表达。(E和F)显示用CMV疫苗或单独佐剂免疫后产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T和CD8+T细胞的离体百分比。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0068] 图6:人HLAA24转基因小鼠中CMV特异性体液免疫反应的评估:在第0天用CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)蛋白质与PHAD(25μg)和CpG 1018(50μg)(G1V)、3D-PHAD(25μg)和CpG 1018(50μg)(G2V)、3D(6-酰基)-PHAD(25μg)和CpG 1018(50μg)(G3V)、单独CpG1018(50μg)(G4V)、MPL(25μg)和CpG1826(50μg)(G5V)、或单独佐剂(G6C至G10C)接种人HLA A24转基因小鼠,在第21天对小鼠进行尾部采血,并给予加强剂量。然后在第28天处死小鼠以使用ELISA评估体液免疫反应。(A和B)显示在第21天(初次免疫)和第28天(加强)A24转基因小鼠的血清样品中的CMV gB特异性抗体滴度,(C)显示在从HLAA24小鼠获得的合并血清样品中第21天和第28天的CMV gB特异性抗体同种型(IgM、IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3)的丰度。

[0069] 图7:用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂接种多种HLA转基因小鼠后评价CMV特异性CD8+T细胞反应。在第0天用与CpG1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫多种人HLA转基因小鼠(HLA A1、HLA2、HLA A24、HLA B8和HLA B35)。在第21天,对小鼠进行尾部采血并用相同的疫苗制剂加强。在第28天,处死小鼠以评估多种人HLA转基因小鼠中的CMV特异性CD8+T细胞免疫反应(A)。在第28天,处死小鼠并制备脾细胞,然后用相应的CMV CD8+T细胞肽(HLA A1-VTE&YSE;HLA A2-NLV、VLE&YIL;HLA A24-QYD&AYA;HLAB8-QIK、ELR&ELK;HLAB35-FPT&IPS)在布雷菲尔德菌素A存在下刺激,并使

用ICS测定法测量产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞。(B)显示在用CMV CD8+T细胞肽刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的离体百分比。在体外刺激的脾细胞中评价CMV特异性CD8+T细胞反应。免疫后,用相应的CMV CD8+T细胞肽体外刺激脾细胞,并将细胞培养10天。第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(C)显示在体外用CMV CD8+T细胞肽刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的百分比。(D)显示代表性FACS图,呈现了来自一只HLA转基因小鼠的产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞(离体和体外扩增)的比例。(E)显示来自用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂免疫的HLA转基因小鼠的离体和体外扩增的CMV特异性CD8+T细胞的IFN-γ、TNF-α、CD107a和IL-2细胞因子表达。误差条表示平均值±SEM。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0070] 图8:用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂接种多种HLA转基因小鼠后评价CMV gB-特异性CD4+T反应。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA转基因小鼠(HLAA1、HLA2、HLA A24、HLAB8和HLA B35)。在第21天,对小鼠进行尾部采血并用相同的疫苗制剂加强。在第28天,处死小鼠以评估在多种人HLA转基因小鼠中的CMV gB特异性CD4+和CD8+T细胞免疫反应(A)。在第28天,处死小鼠并制备脾细胞,然后用由224种肽(各15个氨基酸,其中11个氨基酸重叠)组成的CMV gB肽混合物在布雷菲尔德菌素A存在下刺激,并使用ICS测定法测量产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞。(A)显示在多种HLA转基因小鼠中用CMV-gB肽混合物刺激后产生IFN-γ的CD4+T细胞的离体百分比。在体外刺激的脾细胞中评价CMV gB特异性CD4+和CD8+T细胞反应。免疫后,用由224种肽(15个氨基酸,11个氨基酸重叠)组成的CMV-gB肽混合物体外刺激脾细胞,并将细胞培养10天。第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(B)显示用CMV-gB肽混合物体外刺激后产生IFN-γ的CMV-gB特异性CD4+T细胞的百分比。(C)显示代表性FACS图,呈现了来自一只HLA转基因小鼠的产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞(离体和体外扩增)的比例。(D)显示离体和体外扩增的CMV gB特异性CD4+T细胞的IFN-γ、TNF-α、CD107a和IL-2细胞因子表达。(E)显示来自用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂免疫的所有HLA转基因小鼠的体外扩增的CMV gB特异性CD8+T细胞的单独IFN-γ表达(条形图)或IFN-γ、TNF-α、CD107a和IL-2细胞因子表达(饼图)或FACS图。误差条表示平均值±SEM。*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0071] 图9:在多种人HLA转基因小鼠中评估CMV特异性体液免疫反应。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PLNH(30μg)免疫人HLA转基因小鼠(HLAA1、HLA2、HLAA24、HLAB8和HLAB35)。在第21天,对小鼠进行尾部采血并用相同的疫苗制剂加强。在第28天,处死小鼠以使用ELISA评估CMV gB特异性体液免疫反应。(A和B)显示第21天(初次免疫)所有人HLA转基因小鼠的血清样品中的CMV gB特异性抗体滴度,以及合并血清样品中的CMV gB特异性抗体同种型(IgM、IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3)的丰度。(C和D)显示第28天所有人HLA转基因小鼠的血清样品中的CMV gB特异性抗体滴度,以及合并血清样品中CMV gB特异性抗体同种型(IgM、IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3)的丰度。(E和F)显示免疫人HLA转基因小鼠后诱导的50%中和抗体滴度,中和成纤维细胞的AD 169感染和成人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)的TB40/E感染。在第28天,分别合并各组的血清,系列稀释,并与CMV AD169或TB40/E株预孵育。用经血清处理的病毒感染MRC-5或ARPE19细胞,并使用IE-1/IE-2微量中和测定法测定病毒感染性。误差条表示平均值±SEM。

[0072] 图10:HLAA24转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV特异性免疫。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLAA24转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来评估CMV特异性T细胞和体液免疫反应。

[0073] 图11:HLA A24转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV特异性CD8+T细胞免疫:在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gG(5μg)和CMVpoly20 PL-NH(30μg)免疫人HLAA24转基因小鼠。第21和42天对小鼠进行尾部采血,并在第21、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来评估人HLA A24转基因小鼠中的CMV特异性CD8+T细胞免疫反应。在处死当天,制备脾细胞,然后用相应的CMV CD8+T细胞肽(HLA A24-QYD&AYA)在布雷菲尔德菌素A存在下刺激,并使用ICS测定法测定产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞。在体外刺激的脾细胞中评价CMV特异性CD8+T细胞反应。免疫后,用相应的CMV CD8+T细胞肽(HLA A24-QYD&AYA)体外刺激脾细胞,并将细胞培养10天。第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(A和B)显示离体和在体外用CMV CD8+T细胞肽刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的百分比。(C)显示CMV特异性CD8+T细胞的SPICE(simplified presentation of incredibly complex evaluation)分析,呈现由IFNγ^{+}/TNF^{+}/$IL2^{+}$细胞因子的各种组合组成的反应的比例。弧形表示产生各细胞因子的CMV特异性CD8+T细胞的比例:IFNγ(红色)、TNF(绿色)和IL2(蓝色)。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0074] 图12:HLAA24转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV gG特异性CD4+T细胞免疫。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A24转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来评估CMV gB特异性CD4+T细胞免疫反应。在处死当天,制备脾细胞,然后用由224种肽(15个氨基酸,11个氨基酸重叠)组成的CMV gB肽混合物在布雷菲尔德菌素A存在下刺激,并使用ICS测定法测量产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞。体外刺激后评价CMV gB特异性CD4+T细胞反应。免疫后,用由224种肽(15个氨基酸,11个氨基酸重叠)组成的CMV-gB肽混合物体外刺激脾细胞,并将细胞培养10天。第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(A和B)显示离体和体外刺激后产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞的百分比。(C)显示CMV特异性CD4+T细胞的SPICE分析,呈现由IFNγ^{+}/TNF^{+}/$IL2^{+}$细胞因子的各种组合组成的反应的比例。弧形表示产生各细胞因子的CMV特异性CD4+T细胞的比例:IFNγ(红色)、TNF(绿色)和IL2(蓝色)。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0075] 图13:HLAA24转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久的生发中心B细胞反应:在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A24基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来评估人HLA A24转基因小鼠中的生发中心B细胞反应免疫反应。在处死当天,

从脾脏和淋巴结制备单细胞悬液,然后用PE缀合的抗B220、FITC缀合的抗GL7和APC缀合的抗CD95抗体染色。在FACS上分析细胞以确定生发中心B细胞的频率。(A)显示在第28、42、49、84、133、203和217天,用CMV疫苗或单独CpG 1018接种的人HLA A24转基因小鼠脾脏中生发中心B细胞的频率。(B)显示第28和49天一只接种小鼠和对照小鼠的代表性FACS图。(C)显示在第28、42、49、84、133、203和217天,用CMV疫苗或单独CpG 1018接种的人HLA A24转基因小鼠淋巴结中生发中心B细胞的频率。(D)显示第28和49天一只接种小鼠和对照小鼠的代表性FACS图。

[0076] 图14:HLAA24转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久的CMV gB特异性抗体分泌性B细胞反应:在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A24转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来评估CMV gB特异性抗体分泌性B细胞免疫反应。在处死当天,制备脾细胞,然后使用ELISpot测定评估其分泌gB特异性抗体的能力。A和B显示在离体和记忆B细胞ELISpot分析后,第28、42、49、84、133、203和217天,用CMV疫苗制剂(V)或CpG 1018(C)对照免疫的小鼠中每3x 10^5个脾细胞中分泌抗体的B细胞的数量。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0077] 图15:HLAA24转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV gB特异性抗体反应。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A24转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来用ELISA评估CMV gB特异性抗体反应。在处死当天,采集血清样品,并使用ELISA进行分析,以测定gB特异性抗体滴度。(A)显示在第21、28、42、49、84、133、203和217天,用CMV疫苗(V)或单独CpG 1018(C)免疫的人HLAA24转基因小鼠的血清样品中CMV gB特异性抗体滴度的线图。(B)显示在第21、28、42、49、84、133、203和217天,用CMV疫苗制剂或安慰剂免疫后诱导的CMV gB特异性免疫球蛋白同种型(在合并的血清样品中)(IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3)的丰度。(C和D)显示在第21、28、42、49、84、133、203和217天,用CMV疫苗制剂或安慰剂免疫后诱导的50%中和抗体滴度。通过对成纤维细胞中的CMV AD169株和ARPE 19细胞中的CMV TB40/E株进行IE-1染色来测量中和抗体反应。(E和F)显示流式细胞术分析,呈现用CMV疫苗或安慰剂免疫后诱导的与CMV AD169株感染的成纤维细胞结合的gB特异性抗体的频率。

[0078] 图16:HLA A1转基因小鼠中确认由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV特异性免疫:在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A1转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第49和84天处死小鼠,以进行纵向分析来评估CMV特异性T细胞免疫反应和体液免疫反应。

[0079] 图17:HLA A1转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV特异性CD8+T细胞免疫。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLAA1转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第49、84、203和217天处死小鼠,以进行纵向

分析来评估CMV特异性CD8+T细胞免疫反应。在处死当天,制备单细胞悬浮液,然后用相应的CMV CD8+T细胞肽(HLA A1-VTE&YSE)在布雷菲尔德菌素A存在下刺激,并使用ICS测定法测量产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞。在体外刺激后评价CMV特异性CD8+T细胞反应。免疫后,用相应的CMV CD8+T细胞14肽(HLA A1-VTE&YSE)体外刺激脾细胞,并将细胞培养10天。第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(A和B)显示离体后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的百分比。(C)显示在体外用CMV CD8+T细胞肽刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的百分比。(D)显示CMV特异性CD8+T细胞分泌多种细胞因子(CD107a$^+$、IFNγ$^+$、TNF$^+$或IL2$^+$)的能力,其在体外用CMV CD8+T细胞肽刺激后通过流式细胞术和细胞内细胞因子染色测量。饼图显示在第49、84、203和217天,产生4种细胞因子(浅蓝色)、3种细胞因子(红色)、2种细胞因子(绿色)和1种细胞因子(紫色)的CMV特异性CD8+T细胞的百分比。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05。ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0080] 图18:HLAA1转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV gB特异性CD4+T细胞免疫。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A1转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第49和84天处死小鼠,以进行纵向分析来评估CMV gB特异性CD4+T细胞免疫反应。在处死当天,制备脾细胞,然后用由224种肽(15个氨基酸,11个氨基酸重叠)组成的CMV gB肽混合物在布雷菲尔德菌素A存在下刺激,并使用ICS测定法测量产生IFN-γ的CMV特异性CD4+T细胞。在体外刺激的脾细胞中评价CMV gB特异性CD4+T细胞反应。免疫后,用由224种肽(15个氨基酸,11个氨基酸重叠)组成的CMV gB肽混合物体外刺激脾细胞,并将细胞培养10天。在第10天,使用ICS测定评估T细胞特异性。(A和B)显示离体后产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞的百分比。(C)显示CMV gB肽混合物体外刺激后产生IFN-γ的CMV特异性CD4+T细胞的百分比。(D)显示CMV特异性CD4+T细胞分泌多种细胞因子(CD107a$^+$、IFNγ$^+$、TNF$^+$或IL2$^+$)的能力,通过在体外用CMV gB肽混合物刺激脾细胞后使用流式细胞术和细胞内细胞因子染色进行测量。饼图表示在第49、84、203和217天,产生4种细胞因子(浅蓝色)、3种细胞因子(红色)、2种细胞因子(绿色)和1种细胞因子(紫色)的CMV特异性CD4+T细胞的百分比。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05;**,P<0.01,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0081] 图19:HLAA1转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久生发中心和抗体分泌性B细胞反应:在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A1转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第49和84天处死小鼠,以进行纵向分析来评估疫苗诱导的生发中心B细胞和CMV gB30特异性抗体分泌性B细胞反应。在处死当天,从脾脏制备单细胞悬液,然后用PE缀合的抗B220、FITC缀合的抗GL7和APC缀合的抗CD95抗体染色。在FACS上分析细胞以确定生发中心B细胞的频率。(A和B)显示在第49、84、204和217天,用CMV疫苗(V)或单独CpG 1018(C)接种的人HLA A1转基因小鼠脾脏中生发中心B细胞的频率。(B)显示在第49和84天一只接种的小鼠和对照小鼠的代表性FACS图。(C和D)显示离体B细胞ELISpot分析,在第49、84、203和217天,用CMV疫苗制剂(V)或CpG 1018(C)对照免疫的小鼠中每3x 10^5个脾细胞中分泌抗体的B细胞的数量。为了确定分泌抗体的记忆B细胞,用重组小鼠IL2和R848体外刺激脾细胞4天,然后测量其分泌CMV gB特异性抗体的能力。(E和

F)显示记忆B细胞ELISpot分析,在第49、84、203和217天,用CMV疫苗制剂(V)或CpG 1018(C)对照免疫的小鼠中每3x 10^5个脾细胞中分泌抗体的B细胞的数量。误差条表示平均值±SEM*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001,****,P<0.0001,ns=不显著(通过Student t检验确定)。

[0082] 图20:HLAA1转基因小鼠中评估由CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久CMV gB特异性抗体反应。在第0天,用与CpG 1018(50μg)配制的CMV gB(5μg)和CMVpoly20PL-NH(30μg)免疫人HLA A1转基因小鼠。在第21和42天对小鼠进行尾部采血,并在第21、42和210天用相同的疫苗制剂加强。在第49、84、203和217天处死小鼠,以进行纵向分析来使用ELISA评估CMV gB特异性抗体反应。在处死当天,采集血清样品并使用ELISA进行分析,以测定gB特异性抗体滴度。(A)显示在第21、28、42、49、84、203和217天,用CMV疫苗(V)或单独CpG 1018(C)免疫的人HLAA1转基因小鼠的血清样品中CMV gB特异性抗体滴度的线图。(B)显示在第21、28、42、49、84、203和217天,用CMV疫苗制剂或安慰剂免疫后诱导的CMV gB特异性免疫球蛋白(在合并的血清样品中)同种型(IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3)的丰度。

[0083] 序列简述

[0084] SEQ ID NO:1=表1中pp65表位(HLAB35)的氨基酸序列(黑色为表位序列;FPTKDVAL)。

[0085] SEQ ID NO:2=表1中pp65表位(HLAA11)的氨基酸序列(黑色为表位序列;GPISHGHVLK)。

[0086] SEQ ID NO:3=表1中pp65表位(HLAA24)的氨基酸序列(黑色为表位序列;QYDPVAALF)。

[0087] SEQ ID NO:4=表1中pp65表位(HLAA1)的氨基酸序列(黑色为表位序列;YSEHPTFTSQY)。

[0088] SEQ ID NO:5=表1中pp65表位(HLAB7)的氨基酸序列(黑色为表位序列;TPRVTGGGAM)。

[0089] SEQ ID NO:6=表1中IE-1表位(HLA B38)的氨基酸序列(黑色为表位序列;QIKVRVDMV)。

[0090] SEQ ID NO:7=表1中pp65表位(HLAB35)的氨基酸序列(黑色为表位序列;IPSINVHHY)。

[0091] SEQ ID NO:8=表1中pp150表位(HLAA3)的氨基酸序列(黑色为表位序列;TTVYPPSSTAK)。

[0092] SEQ ID NO:9=表1中pp65表位(HLAB7)的氨基酸序列(黑色为表位序列;RPHERNGFTVL)。

[0093] SEQ ID NO:10=表1中IE-1表位(HLA B8/B18/B44)的氨基酸序列(黑色为表位序列;DELRRKMMYM)。

[0094] SEQ ID NO:11=表1中pp50表位(HLAA1)的氨基酸序列(黑色为表位序列;VTEHDTLLY)。

[0095] SEQ ID NO:12=表1中pp65表位(HLAA2)的氨基酸序列(黑色为表位序列;NLVPMVATV)。

[0096] SEQ ID NO:13＝表1中IE-1表位(HLAA2)的氨基酸序列(黑色为表位序列;VLEETSVML)。

[0097] SEQ ID NO:14＝表1中pp65表位(HLA A23/A24)的氨基酸序列(黑色为表位序列;AYAQKIFKIL)。

[0098] SEQ ID NO:15＝表1中pp65表位(HLACW6)的氨基酸序列(黑色为表位序列;TRATKMQVI)。

[0099] SEQ ID NO:16＝表1中DNAse表位(HLAB27)的氨基酸序列(黑色为表位序列;ARVYEIKCR)。

[0100] SEQ ID NO:17＝表1中IE-1表位(HLA B40)的氨基酸序列(黑色为表位序列;KEVNSQLSL)。

[0101] SEQ ID NO:18＝表1中IE-1表位(HLAB8)的氨基酸序列(黑色为表位序列;ELKRKMIYM)。

[0102] SEQ ID NO:19＝表1中IE-1表位(HLAA2)的氨基酸序列(黑色为表位序列;YILEETSVML)。

[0103] SEQ ID NO:20＝表1中pp65表位(HLAB57/B58)的氨基酸序列(黑色为表位序列;QAIRETVEL)。

[0104] SEQ ID NO:21＝图1中CMVpoly20PL-NH多表位蛋白的氨基酸序列。

[0105] SEQ ID NO:22＝图1中CMVpoly20PL-NH多表位蛋白的核苷酸序列。

[0106] 发明详述

[0107] 本发明至少部分基于这样的意外发现,包括含有多个CMV表位的分离的蛋白质、CMV包膜蛋白和TLR9激动剂的基于蛋白质的疫苗,在对个体施用时,可在其中引发保护性和持久的免疫反应。在这方面,本发明的疫苗制剂有利地诱导产生长寿命生发中心B细胞、长期可持续的CMV特异性CD4+和CD8+T细胞、抗体分泌性B细胞反应和中和抗体反应。

[0108] 在一个方面,本发明涉及药物组合物,其包含:

[0109] (a)包含多个表位的一种或多种分离的蛋白质,其中该多个表位源自两种或更多种不同的CMV抗原;

[0110] (b)CMV包膜蛋白或其片段、变体或衍生物;和

[0111] (c)TLR激动剂,如TLR9激动剂。

[0112] “分离的”是指从其自然状态移除或以其他方式进行了人为操纵的物质。分离的物质可以基本上或实质上不含通常在其自然状态下伴随其的成分,或者可以被操纵,使得其与通常在其天然状态下伴随的成分一起处于人工状态。

[0113] 在本发明的上下文中,“外源”蛋白质或多表位蛋白质是在随后对其施用的动物外部产生的蛋白质。有效地,外源蛋白质被施用于动物或可施用于动物,而不是在将编码该蛋白质的核酸或遗传构建体递送到动物之后由动物原位(例如由动物的细胞或组织)产生或表达。优选的外源蛋白质是在分离的宿主细胞如细菌宿主细胞中离体产生的重组蛋白质。

[0114] “蛋白质”是指包含本领域众所周知的天然和/或非天然氨基酸、D-或L-氨基酸的氨基酸聚合物。

[0115] “肽”是具有不超过五十(50)个氨基酸的蛋白质。

[0116] “多肽”是具有超过五十(50)个氨基酸的蛋白质。

[0117] 本文所述的分离的蛋白质,包括其片段、变体和衍生物,可以通过本领域已知的任何手段产生,包括但不限于化学合成、重组DNA技术和蛋白水解裂解以产生肽片段。

[0118] 化学合成包括固相和液相合成。虽然此类方法为本领域公知,但可参考SYNTHETIC VACCINES Ed.Nicholson(Blackwell Scientific Publications)的第9章和CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds.Coligan等,(John Wiley&Sons,Inc.NY USA1995-2008)的第15章中提供的化学合成技术的实例。在这方面,还可以参考国际公开WO 99/02550和国际公开WO 97/44544。

[0119] 本领域技术人员可以使用标准流程方便地制备重组蛋白质,例如,如Sambrook等,MOLECULAR CLONING.A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press,1989),尤其是第16和17节中;CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Ausubel等编辑,(John Wiley&Sons,Inc.NY USA1995-2008),尤其是第10和16章中;以及CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Coligan等编辑,(John Wiley&Sons,Inc.NY USA1995-2008),尤其是第1、5和6章中所述。通常,重组蛋白制备包括在适宜的宿主细胞中表达编码该蛋白质的核酸。

[0120] 本文所用的术语“表位”是指能够特异性结合免疫球蛋白或其片段或T细胞受体的任何蛋白质决定簇。

[0121] 在具体实施方案中,该表位是或包含细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位。“CTL表位”是肽或该肽的氨基酸序列,其能够刺激或激活细胞毒性T淋巴细胞,以识别在适当的MHC I类分子环境中呈递该表位的靶细胞。靶细胞的识别可包括或导致细胞因子产生(例如IFN-γ、IL-2、MIP-1β和/或TNF)、细胞表面标记物(例如CD107a)表达变化和/或靶细胞的裂解和/或杀伤。鉴于此,本文所述的组合物能够在对个体施用后诱导或引发细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

[0122] 在另一个实施方案中,所述分离的蛋白质(包括多表位蛋白质)可进一步包含一个或多个CD4+辅助T细胞表位和/或B细胞表位。

[0123] 在其他实施方案中,所述分离的蛋白质(包括多表位蛋白质)可进一步包含一个或多个HLAII类限制性CTL表位。

[0124] 此外,应当理解,药物组合物的组成表位的具体数量和/或类型可以容易地改变,同时保持广泛的HLAI类限制性免疫原性。

[0125] 通常,尽管不是排他性地,表位(如CTL表位)包含相应CMV抗原的、源自相应CMV抗原的、获自相应CMV抗原的、或基于相应CMV抗原的7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。

[0126] 本领域技术人员将理解,可以定制选择包含在药物组合物中的表位,以适合任何群体、种族或其他个体群组。

[0127] 在药物组合物中包含特定表位的其他标准包括:(i)具有最小或没有序列变体;(ii)选自最小亚型的HLA;和(iii)在健康血清阳性中具有高频率的CTL反应。

[0128] 分离的蛋白质(包括本文所述的多表位蛋白质)优选包含源自多种不同CMV蛋白抗原的多个CMV表位。优选地,表位是选自pp50、pp65、pp150、DNAse、IE-1及其任何组合的CMV抗原的表位。

[0129] 适宜地,该一种或多种分离的蛋白质(包括多表位蛋白质)包含经选择以提供广泛的人群覆盖度的表位,如CTL表位。在人类中,这些包括HLA I类特异性HLA A1、-A2、-A3、-

A11、-A23、-A24、-A26、-A29、-A30、-B7、-B8、-B18、-B27、-B35、-B38、-B40、-B41、-B44、-B51、-B57、-B58和-CW6。在某些实施方案中,表位是表1中所示的HLA I类特异性限制性的。因此,在一个实施方案中,表位是选自HLA-A1、-A2、-A3、-A11、-A23、-A24、-B7、-B8、-B18、-B27、-B35、-B40、-B44、-B57、-B58和-CW6的一种或多种HLA I类特异性限制性的。

[0130] 在一个具体实施方案中,分离的蛋白质(包括多表位蛋白质)包含选自表1(SEQ ID NO:1-20)的多个HLA I类限制性表位。在一个具体实施方案中,该一种或多种分离的蛋白质或多表位蛋白质包含SEQ ID NOS:1-20中所示的表位氨基酸序列中的每一个、或其片段、变体或衍生物。

[0131] 在一些实施方案中,该多个表位包含总计三十(30)个或更少(例如,30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10等或其中的任何范围)表位。在其他实施方案中,该多个表位包含总计二十(20)个或更少(例如,20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10等或其中的任何范围)表位。

[0132] 还将理解,除表1中提供的那些之外,还可以使用其他CMV表位,如国际公开WO 03/000720和国际公开号WO2014/059489中所述的那些。

[0133] 在具体实施方案中,药物组合物的一种或多种分离的蛋白质包括多种分开的分离蛋白质,其中每种分离的蛋白质仅包含所述多个表位中的一个。然而,还将理解,本发明设想包括这样的一种或多种分离的蛋白质,其包含衍生自相同或不同CMV抗原的多个表位中的两个或更多个;并进一步包括或不包括这样的一种或多种分离的蛋白质,其仅包含所述多个表位中的一个。

[0134] 因此,所述一种或多种分离的蛋白质可以是或包含分离的多表位(polyepitope或polytope)蛋白质。例如,分离的"CMV多表位"或分离的"CMV多表位蛋白质"。在这方面,该多表位蛋白质适宜地包含来自两种或更多种不同CMV抗原的多个表位中的两个或多个,如下文所述。

[0135] 除表位外,多表位蛋白质还可以包含间插氨基酸或氨基酸序列。间插氨基酸或氨基酸序列可以存在于至少两个表位氨基酸序列之间,或者存在于每两个相邻表位氨基酸序列之间。

[0136] 适宜地,间插氨基酸或氨基酸序列相对于表位氨基酸序列进行放置或定位,以使得能够进行蛋白酶体加工、以及将蛋白酶体产生的单个表位肽运输到内质网(ER)中,随后被HLA-I分子呈递。

[0137] 在一个实施方案中,间插氨基酸或氨基酸序列是蛋白酶体释放氨基酸或氨基酸序列。蛋白酶体释放氨基酸或氨基酸序列的非限制性实例是或包含AD、K或R。

[0138] 在一种形式中,在多表位蛋白质的每个相应表位的羧基端,蛋白酶体释放氨基酸序列与CMV表位连接或结合。

[0139] 一旦施用,包含间插氨基酸或氨基酸序列的多表位蛋白质被加工,如通过蛋白酶体途径加工。这导致经加工的CMV表位的HLAI类依赖性呈递,呈递给CD8+细胞毒性T细胞。

[0140] 对于多表位蛋白质,可以基于表位疏水性来包含具体表位,其中安排各单表位的顺序,使得疏水性沿着多表位蛋白的长度均匀分布,以帮助细胞间移动。

[0141] 可包含在本方面的药物组合物中的全长、连续多表位蛋白质的一个实施方案,如SEQ ID NO:21所示。还应理解,包含CMV表位的其他多表位蛋白质可以包含在本方面的药物

组合物中,如国际公开号WO2014/059489中所述的那些,在此以其整体引入作为参考。

[0142] 适宜地,本方面的药物组合物还包含一种或多种CMV包膜蛋白。可以理解,病毒包膜蛋白通常参与病毒与靶细胞的结合和/或感染性病毒进入靶细胞。术语"CMV包膜蛋白"是指嵌入在包围CMV病毒核衣壳的膜中的蛋白质。

[0143] 在一些具体实施方案中,CMV包膜蛋白是CMV包膜糖蛋白。CMV包膜糖蛋白代表了有吸引力的疫苗候选物,因为它们在病毒表面表达,可以引发保护性病毒中和体液免疫反应。示例性CMV包膜糖蛋白包括糖蛋白B(gB)、糖蛋白H(gH)、糖蛋白L(gL)、糖蛋白M(gM)、糖蛋白N(gN)和糖蛋白O(gO)。在一个具体实施方案中,CMV包膜蛋白是或包含糖蛋白B。

[0144] gB的片段、变体和衍生物,如上文所述和本领域已知的那些,也被认为适合包含在本方面的药物组合物中。作为实例,CMV糖蛋白B蛋白可包括修饰的胞外结构域或修饰的内切蛋白水解切割位点。此外,CMV gB可以截短,例如C端截短,包括缺失其跨膜和/或胞质结构域。CMV gB变体可以包括天然存在的(例如,等位基因、毒株特异性)变体、直向同源物(例如,来自不同疱疹病毒)和合成变体,如使用诱变技术在体外产生的。适宜地,在对个体施用时,gB的这类片段、变体和衍生物能够引发免疫反应,如细胞介导的免疫反应和/或体液免疫反应。在这方面,gB的片段、变体和衍生物适宜包含一个或多个T细胞表位和/或B细胞表位。

[0145] 基于以上,还将理解,在不脱离本发明概念的情况下,可对本文所述的一种或多种分离的蛋白质(包括多表位蛋白质)和/或CMV包膜蛋白进行进一步修饰、变化和/或衍生。

[0146] 氨基酸序列的变异可以是CMV表位或CMV包膜蛋白中天然存在的序列变异的结果。

[0147] 在本领域中很好地理解,一些氨基酸可以改变为具有广泛相似性质的其他氨基酸,而不改变分离的蛋白质的活性性质(保守取代)。通常,进行保守取代,以保持或至少最小程度地改变氨基酸性质,如电荷、亲水性、疏水性和/或侧链尺寸或"大小"(bulkiness)。

[0148] 氨基酸取代的引入可以在肽合成期间或通过诱变编码核酸而容易地达到。核酸诱变方法的非限制性实例可见于CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Ausubel等,上引文的第9章,Stemmer,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA91 10747,Shafikhani等,1997,Biotechniques 23 304,Jenkins等,1995,EMBO J.14 4276-4287和Zaccolo等,1996,J.Mol.Biol.25558,以及试剂盒如QuickChange™位点定向诱变试剂盒(Stratagene)和Diversify™随机诱变试剂盒(Clontech)。

[0149] 通常,本发明设想与单独或组合的组成表位序列或CMV包膜蛋白具有至少75%、优选至少80%、更优选至少85%或甚至更优选至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的蛋白质变体。在其他实施方案中,这可以包括CMV表位或CMV包膜蛋白的一(1)、二(2)或三(3)个氨基酸残基的保守变异或取代。

[0150] 术语"序列同一性"在本文中以其最广泛的含义使用,包括在使用标准算法进行适当比对时,考虑到序列在比较窗内相同的程度,精确氨基酸匹配的数量。序列同一性可以使用计算机算法来确定,如GAP、BESTFIT、FASTA和BLAST家族程序,如Altschul等,1997,Nucl.Acids Res.25 3389所公开。序列分析的详细讨论可见于CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Ausubel等编辑(John Wiley&Sons Inc NY,1995-1999)的第19.3单元中。

[0151] 本文所用的"衍生物"是,如本领域所理解,已例如通过与其他化学部分缀合或复

合、通过翻译后修饰(例如磷酸化、乙酰化等)、糖基化修饰(例如添加、移除或改变糖基化)、脂质化和/或包含附加的氨基酸序列而改变的分子,如蛋白质、其片段或变体。

[0152] 附加的氨基酸序列可以包括产生融合蛋白的融合配偶体氨基酸序列。作为实例,融合配偶体氨基酸序列可以帮助检测和/或纯化分离的融合蛋白。非限制性实例包括金属结合(例如多组氨酸)融合配偶体、麦芽糖结合蛋白(MBP)、蛋白A、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、荧光蛋白序列(例如GFP)、表位标签如myc、FLAG和血凝素标签。

[0153] 其他附加的氨基酸序列可以是载体蛋白序列,如白喉类毒素(DT)或其片段,或CRM蛋白片段,如国际公开WO2017/070735中所述。

[0154] 本发明设想的其他衍生物包括但不限于侧链修饰、在肽或蛋白质合成过程中掺入非天然氨基酸和/或其衍生物、以及使用交联剂和对本发明的分离的蛋白质施加构象约束的其他方法。

[0155] 在这方面,本领域技术人员可参考CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE,Coligan等编辑(John Wiley&Sons NY 1995-2008)的第15章,了解与蛋白质化学修饰相关的更广泛的方法。

[0156] 本方面的药物组合物适宜地包含一种或多种TLR激动剂用于对个体施用。

[0157] 本文所用的术语“TLR激动剂”是指,能够直接作为配体或间接通过产生内源性或外源性配体,引起通过TLR信号传导途径的信号发放反应的分子。TLR受体的激动剂配体可以是TLR受体的天然配体或其功能等同变体,该变体保持与TLR受体结合并在其中诱导共刺激信号的能力。TLR激动剂也可以是针对TLR受体的激动剂抗体或其功能等同变体,其能够特异性结合TLR受体,更具体地,结合该受体的胞外域,并诱导由此受体和相关蛋白控制的一些免疫信号。结合的特异性可以针对人TLR受体、或针对不同物种的人同源TLR受体。

[0158] 在一些具体实施方案中,所述一种或多种TLR激动剂包括TLR4激动剂和/或TLR9激动剂。更特别地,该TLR激动剂是或包含TLR9激动剂。

[0159] 示例性TLR4激动剂是脂多糖(LPS)或LPS的衍生物或组分。这些包括源自明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota)的单磷酰脂质A(MPL®)和合成TLR4激动剂,如氨基烷基葡糖胺磷酸酯(AGP)和磷酸化六酰基二糖(PHAD)及其衍生物(例如3D-PHAD、3D(6-酰基)-PAD)。优选的TLR4激动剂是MPL。

[0160] TLR9识别区分微生物DNA和哺乳动物DNA的特定非甲基化CpG寡核苷酸(ODN)序列。CpG ODN寡核苷酸在特定序列环境中包含非甲基化CpG二核苷酸(CpG基序)。这些CpG基序在细菌DNA中的出现频率是哺乳动物DNA中的20倍。已经描述了三种类型的刺激性ODN:A型、B型和C型。

[0161] TLR9激动剂的非限制性实例包括CpG ODN1018、CpG ODN2006、CpG ODN2216、CpG ODN1826和CpG ODN2336,但不限于此。在一些实施方案中,TLR9激动剂是或包含CpG ODN1018和/或CpG ODN2006。在一个优选实施方案中,TLR9激动剂是CpG ODN1018。

[0162] 在一些具体实施方案中,TLR激动剂不是MPL、CpG ODN1826、CpG ODN2006、CpG ODN2216和/或CpG ODN2336。

[0163] 适宜地,药物组合物还包含可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0164] “可药用载体、稀释剂或赋形剂”是指可安全用于全身施用的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。取决于具体的给药途径,可以使用本领域公知的多种载体。这些载体可

以选自糖类、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、藻酸、磷酸缓冲盐溶液、乳化剂、等渗盐水,和盐,如无机酸盐,包括盐酸盐、溴化物和硫酸盐,有机酸,如乙酸、丙酸和丙二酸,以及无热原水。

[0165] 描述可药用载体、稀释剂和赋形剂的有用参考文献是Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.N.J.USA,1991),其在此引入作为参考。

[0166] 通过上述内容可以理解,本发明的药物组合物可以包含"免疫学可接受的载体、稀释剂或赋形剂"。

[0167] 有用的载体为本领域公知,且包括例如:甲状腺球蛋白;白蛋白如人血清白蛋白;破伤风、白喉、百日咳、假单胞菌、大肠杆菌、葡萄球菌和链球菌的毒素、类毒素、或毒素的任何突变交叉反应物质(CRM);聚氨基酸如聚(赖氨酸:谷氨酸);流感;轮状病毒VP6、细小病毒VP1和VP2;乙型肝炎病毒核心蛋白;乙型肝炎病毒重组疫苗等。备选地,可以使用载体蛋白或其他免疫原性蛋白的片段或表位。例如,可以使用细菌毒素、类毒素或CRM的T细胞表位。在这方面,可以参考美国专利号5785973,其在此引入作为参考。

[0168] "免疫学可接受的载体、稀释剂或赋形剂"在其范围内包括水、碳酸氢盐缓冲液、磷酸缓冲盐溶液或盐水和/或本领域公知的佐剂。如本领域所理解,"佐剂"是指由一种或多种增强疫苗组合物的免疫原性和功效的物质组成的组合物。

[0169] 因此,除了TLR激动剂之外,本文所述的药物组合物、免疫原性组合物和/或疫苗还可以包含一种或多种用于对个体施用的其他免疫刺激分子或佐剂。

[0170] 适宜的免疫刺激分子和佐剂包括但不限于:其他TLR激动剂、脂多糖及其衍生物如MPL、弗氏完全或不完全佐剂、角鲨烷和角鲨烯(或其他植物或动物来源的油);嵌段共聚物;去垢剂,如Tween®-80;Quil®A,矿物油如Drakeol或Marcol,植物油如花生油;棒杆菌来源的佐剂,如小棒状杆菌(Corynebacterium parvum);丙酸杆菌来源的佐剂,如疮疱丙酸杆菌(Propionibacterium acne);牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis)(Bacille Calmette和Guerin或BCG);百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)抗原;破伤风类毒素;白喉类毒素;表面活性物质,如十六胺、十八胺、十八烷基氨基酸酯、溶血卵磷脂、二甲基二十八烷基溴化铵、N,N-二十八烷基-N′,N′双(2-羟乙基-丙二胺)、甲氧基十六烷基甘油和pluronic多元醇;多胺如吡喃、硫酸葡聚糖、聚IC卡波姆;肽,如胞壁酰二肽和衍生物、二甲基甘氨酸、促吞噬肽(tuftsin);油乳剂;以及矿物凝胶,如磷酸铝、氢氧化铝或明矾;白介素,如白介素2和白介素12;单核因子,如白介素1;肿瘤坏死因子;干扰素,如γ干扰素;组合,如皂苷-氢氧化铝或Quil-A氢氧化铝;脂质体;ISCOM®和 ISCOMATRIX®佐剂;分枝杆菌细胞壁提取物;合成糖肽,如胞壁酰二肽或其他衍生物;阿夫立定(Avridine);脂质A衍生物;硫酸葡聚糖;DEAE葡聚糖单独或与磷酸铝一起使用;羧基聚乙烯,如Carbopol'EMA;丙烯酸共聚物乳剂,如Neocryl A640(例如美国专利号5047238);油包水乳剂,如Montanide ISA 720;脊髓灰质炎病毒、牛痘病毒或动物痘病毒蛋白;或其混合物。

[0171] 关于亚单位疫苗,这种疫苗的一个实例可以用ISCOM配制,如国际公开WO97/445444中所述。

[0172] 油包水制剂形式的疫苗的实例包括Montanide ISA 720,如国际公开WO97/445444中所述。

[0173] 任何适宜的方法都可用于产生疫苗组合物。示例性方案包括例如New Generation Vaccines(1997,Levine等,Marcel Dekker,Inc.New York,Basel,Hong Kong)中所述的那些,其在此引入作为参考。

[0174] 任何安全的给药途径都可用于向患者提供本发明的组合物。例如,可以利用口服、直肠、胃肠外、舌下、口腔、静脉内、关节内、肌内、真皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、侧脑室内和经皮施用。

[0175] 剂型包括片剂、分散剂、悬浮剂、注射剂、溶液剂、糖浆剂、锭剂、胶囊剂、栓剂、气雾剂、透皮贴剂等。这些剂型还可以包括注射或植入专门为此目的而设计的受控释放装置,或者修改成以这种方式另外起作用的其他形式的植入物。治疗剂的受控释放可以通过例如用疏水性聚合物(包括丙烯酸树脂、蜡、高级脂肪醇、聚乳酸和聚乙醇酸以及某些纤维素衍生物,如羟丙基甲基纤维素)包被治疗剂来实现。此外,可通过使用其他聚合物基质、脂质体和/或微球来实现受控释放。

[0176] 优选的药物组合物是引发体液免疫反应和/或细胞介导的免疫反应的“免疫原性组合物”,从而预防和/或治疗CMV感染或对这种免疫治疗有反应的CMV相关疾病、病症或病况,而不一定引发保护性免疫反应。

[0177] 在一个优选的形式中,该免疫原性组合物可以是用于在人个体中引发保护性的基于B淋巴细胞和/或CD8+CTL的免疫反应的疫苗,该免疫反应保护免受CMV感染,或治疗现有的CMV感染或CMV相关疾病、病症或病况。在具体实施方案中,该免疫原性组合物在个体中引发持久的免疫反应,在施用后保护个体免受CMV感染超过约6个月(例如,6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个月等或其中的任何范围)。

[0178] 本文中广泛使用的术语“免疫”、“接种”和“疫苗”是指引发针对CMV的保护性免疫反应的方法和/或组合物,由此至少部分地预防或最小化随后的CMV感染。

[0179] 因此,此类组合物可递送用于在对个体施用时产生至少部分免疫,优选保护性免疫,或产生对CMV感染(无论是新的、现存的或潜伏的CMV感染)的免疫反应,优选保护性免疫反应,但不限于此。

[0180] “保护性免疫”是指这样的免疫水平,在该免疫水平上动物(如人个体)对一种或多种抗原具有充足的反应性以导致快速结合和/或消除该抗原,从而至少部分改善或预防随后的CMV感染。

[0181] “保护性免疫反应”是指,足以预防或减少动物(如人个体)当前和/或未来CMV感染的严重程度、症状、方面或特征的免疫反应水平。

[0182] 术语“免疫反应”是指个体(例如人)的免疫系统对抗原或抗原决定簇的任何反应。示例性免疫反应包括体液免疫反应(例如,产生抗原特异性抗体)和细胞介导的免疫反应(如,产生抗原特异性T细胞)。用于评估免疫反应的测定试验是本领域已知的,并且可以包括体内测定试验,如用于测量抗体反应和延迟型超敏反应的测定试验。作为实例,用于测量抗体反应的测定试验可以测量B细胞功能以及B细胞/T细胞相互作用。对于抗体反应测定试验,可以在抗原攻击后比较血液中的抗体滴度。体外测定试验可以包括测定免疫细胞分裂、或为其他细胞分裂提供帮助、或释放淋巴因子和其他因子、表达激活标记物和裂解靶细胞的能力。免疫细胞,如T淋巴细胞,也可以使用有丝分裂原或特异性抗原在体外测试其增殖能力。也可以测试来自培养的免疫细胞的上清液,以定量免疫细胞分泌特定淋巴因子的能

力。此外,免疫细胞可以从培养物中取出,并测试其表达激活抗原的能力。这可以通过任何适宜的方法来进行,非限制性实例包括使用结合激活抗原的抗体或配体以及使用结合编码激活抗原的RNA的探针。

[0183] 术语“体液免疫反应”是指刺激抗体(包括中和抗体)产生。体液免疫反应也指伴随抗体产生的辅助蛋白和事件,包括T辅助细胞激活和细胞因子产生、亲和力成熟以及记忆细胞产生。

[0184] 术语“细胞介导的免疫反应”是指由淋巴细胞提供的免疫防御,例如由致敏的T淋巴细胞提供的防御,所述致敏T淋巴细胞直接裂解表达外来抗原的细胞并分泌细胞因子(如IFN-γ),该细胞因子可调节巨噬细胞和自然杀伤(NK)细胞的效应子功能并增强T细胞的扩增和分化。

[0185] 如将在实施例中更详细地描述,本方面的药物组合物在多种人HLA转基因小鼠中高度有效地产生CMV特异性CD4+和CD8+T细胞反应、B细胞反应和中和抗体反应。此外,该药物组合物能够诱导产生长寿命的CMV特异性生发中心B细胞。已经提出,由本发明的药物组合物产生的免疫反应的这些功能特性,对于所产生的体液免疫反应和细胞免疫反应的有效性和持久性以及由此对于随后的病毒清除而言,非常重要。

[0186] 通常,本文所述的药物组合物、免疫原性组合物、疫苗和/或预防或治疗方法,可采用任何安全的给药途径,以向患者提供本发明的组合物。例如,可以利用口服、直肠、胃肠外、舌下、口腔、静脉内、关节内、肌内、真皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、侧脑室内、透皮等施用方式。例如,肌内和皮下注射适用于施用免疫原性组合物、蛋白质疫苗和DNA疫苗。

[0187] 将理解,本方面的药物组合物可用于治疗性和/或预防性处理动物(优选人)中的CMV相关疾病、病症或病况。在具体实施方案中,本文所述的药物组合物用于:(a)治疗或预防个体中的CMV感染;(b)在个体中引发对CMV抗原的免疫反应;和/或(c)在个体中诱导针对CMV感染的免疫。

[0188] 在人类中,CMV感染可导致单核细胞增多症样综合征,伴有持续发热和/或轻度肝炎。在某些高危人群中,疾病可以更为严重,例如在怀孕期间的未出生婴儿的感染期,在从事儿童工作的人中,以及在免疫功能低下者中,如老年人、器官移植受体和感染人类免疫缺陷病毒(HIV)的人中。CMV也可以与某些癌症如胶质瘤有关。因此,本发明提供(优选在人类中)预防性或治疗性处理CMV感染的药物组合物和/或方法。

[0189] 因此,在相关方面,本发明提供在个体中引发免疫反应的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的本文所述的药物组合物的步骤,从而在该个体中引发免疫反应。

[0190] 适宜地,该方法在该个体中引发或增强免疫反应,以在该个体中预防或治疗CMV相关疾病、病症或病况,如CMV感染。更具体而言,该药物组合物的施用适宜地在该个体中引发针对CMV或CMV感染的保护性免疫反应。

[0191] 在一个实施方案中,该免疫反应是或包括体液免疫反应和/或细胞介导的免疫反应,如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

[0192] 在另一方面,提供在个体中诱导针对CMV感染的免疫的方法,该方法包括对个体施用治疗有效量的所述第一方面的药物组合物的步骤,从而在该个体中诱导针对CMV感染的免疫。

[0193] 本方面的方法适宜地诱导针对CMV感染的保护性免疫反应。为此,对CMV或CMV感染

的免疫反应或免疫,适宜地防止个体罹患CMV相关疾病、病症或病况。

[0194] 在另一个实施方案中,本方法适宜地诱导针对CMV感染的体液免疫反应和/或细胞介导的免疫反应,如细胞毒性T淋巴细胞免疫反应。

[0195] 在另一方面,本发明涉及在个体中治疗或预防CMV感染的方法,该方法包括对该个体施用治疗有效量的所述第一方面的药物组合物的步骤,从而在该个体中预防或治疗CMV感染。

[0196] 本文所使用的"治疗"是指,在CMV感染(包括CMV相关疾病、病症或病况)开始发展后,改善其病征或症状的治疗干预。关于CMV相关疾病、病症或病况,术语"改善"是指,治疗的任何可观察到的有益作用。治疗无需对个体绝对有益。可以使用本领域普通技术人员已知的任何方法或标准来确定有益作用。

[0197] 本文中,"预防"是指在CMV感染或CMV相关疾病、病症或病况的症状、方面或特征出现之前开始的行动过程(例如施用本发明的药物组合物),以预防或减少该症状、方面和特征。应当理解,这种预防无需对个体绝对有益。"预防性"处理是指,为了降低出现CMV感染或CMV相关疾病、病症或病况的症状、方面或特征的风险,对没有显示出CMV感染或CMV相关疾病、病症或病况的病征或仅表现出早期病征的个体进行的处理。

[0198] 术语"治疗有效量"描述指定活性剂,如本文所述的药物组合物,的量,其足以在用该活性剂治疗的个体中达到所希望的效果。例如,这可以是包含本文所述的分离的蛋白、CMV包膜蛋白和TLR激动剂的组合物的量,该量是减少、减轻和/或预防CMV相关疾病、病症或病况(包括CMV感染)所必需的。在一些实施方案中,"治疗有效量"足以减少或消除CMV感染或CMV相关疾病、病症或病况的症状。在其他实施方案中,"治疗有效量"是足以达到所希望的生物学效果的量,例如,足以在个体中引发保护性免疫反应以抑制或预防CMV感染的量。

[0199] 理想情况下,活性剂的治疗有效量是足以诱导所希望的结果而不会在个体中产生实质性细胞毒性作用的量。用于减少、减轻和/或预防CMV相关疾病、病症或病况(如CMV感染)的活性剂的有效量,将取决于所治疗的个体、任何相关疾病、病症和/或病况的类型和严重程度(例如,CMV相关疾病、病症或病况的类型和/或CMV的毒株)、以及治疗组合物的施用方式。

[0200] 在本发明的上下文中,"CMV相关疾病、病症或病况"是指任何CMV感染,包括由巨细胞病毒感染引起的任何临床病理,如上文所述的那些。

[0201] "施用"是指通过特定选择的途径将本文公开的组合物引入个体体内。任何安全的给药途径和剂型,如上文所述的那些,均可用于向患者提供本发明的组合物。

[0202] 本文中广泛使用的术语"患者"、"个人"和"个体"用于本文中公开的治疗或组合物的任何哺乳动物受体的上下文中。因此,本文公开的方法和组合物可具有医学和/或兽医学应用。在一个优选形式中,该哺乳动物是人。

[0203] 在另一个方面,本发明涉及分离的蛋白质,其包含SEQ ID NO:1-20中所示的表位氨基酸序列中的每一个或其片段、变体或衍生物。因此,该分离的蛋白可以是或包含分离的多表位蛋白质,如上文所述。

[0204] 除了表位氨基酸序列之外,该分离的蛋白质还可以包含间插氨基酸或氨基酸序列,如上文所述的那些。适宜地,该间插氨基酸或氨基酸序列相对于表位氨基酸序列放置或定位,以使得能够进行蛋白酶体加工,并将蛋白酶体产生的各单表位肽运输到内质网(ER)

中,用于随后被HLA-I分子呈递。

[0205] 此外,将理解,在该分离的蛋白质中,组成表位(即,SEQ ID NO:1-20)的具体排列或顺序,如SEQ ID NO:21中所示,可以容易地改变,同时保持广泛的HLA I类限制性免疫原性。

[0206] 还将理解,除了SEQ ID NOs:1-20中提供的那些之外,本方面的分离的蛋白质还可以包含其他表位氨基酸序列,如国际公开WO 03/000720和国际公开号WO2014/059489中所述的那些。

[0207] 适宜地,该分离的蛋白质包含SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列或其片段、变体或衍生物、或基本上由其组成或由其组成。

[0208] 在具体实施方案中,该分离的蛋白质用于本文先前描述的方法。为此,该分离的蛋白质可适合包含在药物组合物中,如上文所述。

[0209] 本方面的分离的蛋白质,包括其片段、变体和衍生物,可以通过本领域已知的任何手段生产,包括但不限于化学合成、重组DNA技术和蛋白水解裂解以生产肽片段。

[0210] 还在另一方面,本发明涉及编码上述方面的分离的蛋白质的分离的核酸。

[0211] 本文中所用的术语“核酸”指单链或双链mRNA、RNA、cRNA、RNAi、siRNA和DNA,包括cDNA、线粒体DNA(mtDNA)和基因组DNA。

[0212] “多核苷酸”是指具有八十(80)个或更多个连续核苷酸的核酸,而“寡核苷酸”具有少于八十(80)个连续核苷酸。“引物”通常是单链寡核苷酸,优选具有15-50个连续核苷酸,其能够与互补核酸“模板”退火,并通过DNA聚合酶(如Taq聚合酶、RNA依赖性DNA聚合酶或Sequence™)的作用以模板依赖的方式延伸。“探针”可以是单链或双链寡核苷酸或多核苷酸,例如,为了在Northern印迹或Southern印迹中检测互补序列而适当地标记。

[0213] 在一些实施方案中,该分离的核酸包含SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列或其片段、变体或衍生物、或由其组成或基本上由其组成。

[0214] 还考虑分离的核酸的片段和变体。

[0215] 本发明还提供该分离的核酸的变体和/或片段。变体可包含与编码本发明的分离的蛋白质的任何核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:22)具有至少70%、至少75%、优选至少80%、至少85%、更优选至少90%、91%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核苷酸序列同一性的核苷酸序列。

[0216] 片段可以包含存在于本文公开的任何核苷酸序列中的至多5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95-99%的连续核苷酸或由其组成。

[0217] 片段可以包含存在于本文公开的任何核苷酸序列中的至多20、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650或660个连续核苷酸或由其组成。

[0218] 本发明还考虑已经修饰,例如通过利用密码子序列冗余性而修饰,的核酸。在更具体的实例中,可以修饰密码子使用以优化核酸在特定生物体或细胞类型中的表达。

[0219] 本发明进一步提供修饰的嘌呤(例如肌苷、甲基肌苷和甲基腺苷)和修饰的嘧啶(例如硫尿苷和甲基胞苷)在本发明的分离核酸中的应用。

[0220] 本领域技术人员将很好地理解,本发明的分离的核酸可以使用标准方案方便地制备,该标准方案如CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(Ausubel等编辑John

Wiley&Sons NY,1995-2008)的第2章和第3章中所述的那些。

[0221] 还在另一个实施方案中,互补核酸在高严格性条件下与本发明的核酸杂交。

[0222] “杂交”在本文中用于表示至少部分互补的核苷酸序列配对,以产生DNA-DNA、RNA-RNA或DNA-RNA杂合体。包含互补核苷酸序列的杂交序列通过碱基配对发生。

[0223] 本文所用的“严格性”是指,杂交过程中的温度和离子强度条件、以及存在或不存在某些有机溶剂和/或去垢剂。严格性越高,杂交核苷酸序列之间所需的互补性水平就越高。

[0224] “严格条件”是指只有具有高百分比的互补碱基的核酸才能杂交的条件。

[0225] 严格条件为本领域公知,如Ausubel等,上引文的第2.9和2.10章中所述,其在此引入作为参考。熟练的技术人员还将认识到,可以操作多种因素以优化杂交的特异性。通过优化最终洗涤的严格性,可用于确保高度杂交。

[0226] 互补核苷酸序列可通过印迹技术鉴定,印迹技术包括将核苷酸固定在基质(优选合成膜,如硝酸纤维素)上的步骤、杂交步骤和检测步骤,通常使用标记探针或其他互补核酸进行。Southern印迹用于鉴定互补DNA序列;Northern印迹用于鉴定互补RNA序列。斑点印迹和狭缝印迹可用于鉴定互补的DNA/DNA、DNA/RNA或RNA/RNA多核苷酸序列。此类技术为本领域技术人员公知,并已在Ausubel等,上引文中的第2.9.1至2.9.20页中描述。根据此类方法,Southern印迹涉及通过凝胶电泳根据大小分离DNA分子,将大小分离的DNA转移到合成膜上,以及使膜结合的DNA与互补核苷酸序列杂交。在鉴定cDNA或基因组DNA文库中的互补核酸时,例如通过斑块或菌落杂交的过程,使用替代的印迹步骤。Sambrook等,MOLECULAR CLONING.ALaboratory Manual(Cold Spring Harbor Press,1989)的第8-12章中描述了此流程的其他典型实例。

[0227] 用于检测与固定化核酸杂交的标记核酸的方法是本领域的从业者所熟知的。此类方法包括放射自显影、化学发光、荧光和比色检测。

[0228] 核酸还可以使用核酸序列扩增技术分离、检测和/或进行重组DNA技术操作。

[0229] 适宜的核酸扩增技术,包括热和等温方法,为本领域技术人员所熟知,并包括聚合酶链式反应(PCR);链置换扩增(SDA);滚圈复制(RCR);基于核酸序列的扩增(NASBA)、Q-β复制酶扩增、重组酶聚合酶扩增(RPA)和解旋酶依赖性扩增,但不限于此。

[0230] 本文所用的“扩增产物”是指通过核酸扩增产生的核酸产物。

[0231] 核酸扩增技术可以包括特定的定量和半定量技术,如qPCR、实时PCR和竞争性PCR,如本领域公知。

[0232] 还在另一方面,本发明提供包含前述方面的分离的核酸的遗传构建体。

[0233] 在具体实施方案中,该遗传构建体包含有效链接或连接到一种或多种其他遗传成分的分离核酸。遗传构建体可适用于分离的核酸的治疗性递送或在宿主细胞中重组产生本发明的分离的蛋白质。

[0234] 广义地说,遗传构建体可以是本领域熟知的质粒、噬菌体、黏粒、酵母或细菌人工染色体的形式,或包含其遗传成分。遗传构建体可适用于在细菌或其他宿主细胞中维持和繁殖分离的核酸,用于通过重组DNA技术操作和/或表达本发明的核酸或所编码的蛋白质。

[0235] 出于宿主细胞表达的目的,遗传构建体是表达构建体。适宜地,表达构建体包含与表达载体中的一个或多个附加序列有效连接的本发明的核酸。“表达载体”可以是自我复制

的染色体外载体,如质粒,或者可以是整合到宿主基因组中的载体。

[0236] “有效连接”是指,所述附加核苷酸序列(一个或多个)相对于本发明的核酸放置,优选以启动、调节或以其他方式控制转录。

[0237] 调节核苷酸序列通常适用于用于表达的宿主细胞。本领域已知多种类型的合适的表达载体和合适的调节序列用于多种宿主细胞。

[0238] 通常,该一个或多个调节核苷酸序列可包括但不限于启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子序列。

[0239] 本发明设想了本领域已知的组成型、抑制型或诱导型启动子。

[0240] 表达构建体还可以包含编码融合配偶体的附加核苷酸序列(通常由表达载体提供),使得重组蛋白表达为融合蛋白。

[0241] 表达构建体还可以包含编码选择标记如amp^R、neo^R或kan^R的附加核苷酸序列,但不限于此。

[0242] 在具体实施方案中,表达构建体可以是质粒DNA的形式,适宜地包含可在动物细胞中起作用的启动子(例如CMV、A-crystallin或SV40启动子)。在其他实施方案中,核酸可以是病毒构建体的形式,如腺病毒、痘苗、慢病毒或腺相关病毒载体。

[0243] 在另一方面,本发明涉及用本文所述的核酸分子或遗传构建体转化的宿主细胞。

[0244] 适合用于表达的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。例如,适宜的宿主细胞可以包括但不限于哺乳动物细胞(例如HeLa、Cos、NIH-3T3、HEK293T、Jurkat细胞)、酵母细胞(例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae))、与或不与杆状病毒表达系统一起使用的昆虫细胞(例如Sf9、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni))、植物细胞(例如莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii)、三角褐指藻(Phaeodactylum tricornutum))或细菌细胞,如大肠杆菌。将遗传构建体引入宿主细胞(无论是原核细胞还是真核细胞)在本领域是众所周知的,例如,如CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Ausubel等编辑,(John Wiley&Sons,Inc.1995-2015)中尤其是第9和16章中所述。

[0245] 本发明的相关方面提供产生本文所述分离的蛋白质的方法,其包括以下步骤:(i)培养前述方面的宿主细胞;和(ii)从步骤(i)中培养的该宿主细胞分离所述分离的蛋白质。

[0246] 在这方面,本领域技术人员可以使用标准方案(如上文提供的那些)方便地制备重组蛋白质。

[0247] 为了易于理解本发明并将其付诸实践,现在将通过以下非限制性实施例的方式来描述具体实施方案。

实施例

[0248] 本实施例研究了包含多表位蛋白质连同CMV糖蛋白B和TLR9激动剂CpG 1018的疫苗制剂的免疫原性,该多表位蛋白质包含源自五种不同CMV抗原的二十(20)个不同表位,涵盖了广范围的HLA分子。

[0249] 材料和方法

[0250] CMVpoly20PL-NH蛋白质的表达和纯化

[0251] 用CMVpoly20PL-NH表达载体(pJ404-Atum Bio)转化化学感受态大肠杆菌BL21

codonPlus(DE3)RP细胞(Agilent Technologies)。将转化的细胞接种在补充有氨苄青霉素100μg/mL的Luria Bertani(LB)琼脂(LB-Amp)上,并在37℃下培养过夜。挑取分离的菌落,并接种到10ml含有100μg/ml氨苄青霉素的terrific肉汤(TB-Amp肉汤)中,并在37℃和200rpm的摇床中培养过夜。将少量过夜培养的培养物接种到50mL TB-Amp肉汤中并培养12小时。将50mL培养物中的约1%培养物转移到3L TB-Amp肉汤中,将培养物培养至600nm OD达到0.6。通过加入1mM/mL IPTG进行CMVpoly20PL-NH诱导。使这些细胞再生长4小时,并通过在12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上分析未诱导和诱导的样品来测定蛋白质表达水平。

[0252] 在诱导阶段结束时,通过以13000rpm离心15分钟收获大肠杆菌培养物,将细胞沉淀重悬在补充有蛋白酶抑制剂混合物(Roche,Mannheim,德国)的100mL裂解缓冲液(25mM Tris pH 7.5,5mM EDTA,0.5%TritonX100,0.5mg/mL溶菌酶)中,并在冰上孵育30分钟,然后使用超声仪进行细胞裂解。超声处理在冰上进行6x 8分钟循环(1秒开/关),每两个循环之间暂停10分钟。将裂解物以13000rpm离心30分钟,并在SDS-PAGE凝胶上分析上清液和沉淀级分。

[0253] 在SDS-PAGE分析之后,发现蛋白质以包涵体(IB)的形式存在于沉淀中,并且从每3L的诱导培养物获得约2克(湿重)沉淀。所有IB洗涤、溶解和纯化阶段均在冷室中进行。为了消除宿主蛋白质污染物,用2x 600mLTE缓冲液(25mM Tris和5mM EDTApH 7.5-3x 200mL洗涤)洗涤约500mg IB。为了获得均匀的悬液,将IB悬浮在TE缓冲液中,超声处理10分钟(1秒开/关循环),然后将溶液在4℃下搅拌孵育30分钟。在每次洗涤结束时,以13000rpm离心30分钟。TE缓冲液洗涤后,用2x 200mL100mM NaH2PO4、10mM Tris、4M尿素pH 7.5缓冲液按上文所述洗涤IB。离心后,在SDS-PAGE凝胶上分析从所有洗涤获得的上清液,以检查CMVpoly20PL-NH蛋白质损失。最后,在4℃下搅拌48小时,将IB溶解在300mL 100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 5.5缓冲液中。通过以13000rpm离心30分钟来澄清可溶性蛋白质,并在SDS-PAGE凝胶上分析所有样品。澄清的上清液用于CMVpoly20PL-NH纯化。

[0254] 为了纯化CMVpoly20PL-NH蛋白质,用10柱体积的蒸馏水、5柱体积的1M NaOH洗涤7mL SP-Sepharose基质(GE healthcare),用蒸馏水中和,用5柱体积的1M NaCl再生,然后用5柱体积的100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 5.5缓冲液平衡。将可溶性蛋白质与平衡的基质在500mL Duran瓶中4℃下混合45分钟。然后将浆液转移到柱中并收集FT。用20柱体积的洗涤缓冲液(100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 6.5)洗涤出未结合的蛋白质和杂质。为了洗脱结合的蛋白,将洗脱缓冲液(100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 7.5)加载到柱上并孵育2小时,然后将蛋白质洗脱在6x 7mL级分中。再次将洗脱缓冲液(100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 7.5)加载到柱上,再孵育2小时,再将蛋白质洗脱在6x 7mL级分中。在SDS-PAGE上分析从所有纯化阶段获得的样品。将所有纯化的蛋白质级分合并在一起并浓缩至最终体积为50mL。

[0255] 为了从纯化的CMVpoly20PL-NH蛋白质去除宿主DNA和内毒素污染,用10柱体积的蒸馏水、5柱体积的1M NaOH洗涤HiSereen Q-FF Sepharose(5mL-GE healthcare),用蒸馏水中和,用5柱体积的1M NaCl再生,然后用5柱体积的100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH7.5缓冲液平衡。将浓缩的CMVpoly20PL-NH蛋白质上样到Q-FF上,并收集流穿

液。为了回收未洗脱的蛋白质,用2柱体积的100mM NaH2PO4、10mM Tris、2.5mM DTT、8M尿素pH 7.5缓冲液洗涤柱。在SDS-PAGE凝胶上分析不同纯化阶段的所有样品。SDS-PAGE分析后,将流穿和洗涤液合并在一起;蛋白质样品的pH值从7.5降至3.8。使用SnakeSkin透析管10000MWCO(Thermo Scientific,Rockford,USA)在4℃下用25mM甘氨酸缓冲液pH 3.8透析CMVpoly20PL-NH蛋白质过夜。透析后浓缩蛋白质并使其通过Mustang E膜(PALL Corporation,NY,USA)以进一步去除内毒素污染物,使用0.22μm膜过滤器对蛋白质进行过滤除菌,然后使用BIO-RAD Bradford蛋白测定试剂盒和280nm处的UV吸光度估计总蛋白,将纯化的蛋白质保存在-70℃。

[0256] 蛋白质完整质量分析

[0257] 蛋白质完整质量分析在澳大利亚蛋白质组分析设施进行。简言之,用2%乙腈和0.1%甲酸将蛋白质样品稀释至约0.25μg/μL的浓度,然后将样品(5μL)注入柱(Waters,XBridge BEH300 C4 3.5μm 2.1x 100mm)。蛋白质在柱上脱盐,并使用线性溶剂梯度(A:99.9%水+0.1%甲酸;B:99.9%乙腈+0.1%甲酸)从柱上洗脱。蛋白质电喷雾电离质谱,相对于蛋白质LC洗脱谱,取平均值。通过Thermo Protein Decolvolution 2.0软件对多电荷蛋白质谱进行解卷积。

[0258] 体外免疫原性评估

[0259] 为了确定CMVpoly20PL-NH蛋白质的免疫原性,用不含血清的RPMI培养基洗涤表达人白细胞抗原A2(HLAA2)的对数期T1细胞,然后用25μg CMVpoly20PL-NH蛋白质脉冲处理1小时。洗涤经CMVpoly20PL-NH脉冲处理的T1细胞,然后在含有5%FCS的RPMI中孵育过夜。在过夜孵育后,将细胞洗涤并暴露于CMV HLA A2限制性表位NLVPMVATV特异性CD8+T细胞,其比例为1CD8+T细胞:1APC和4CD8+T淋巴细胞:1APC,孵育4小时。通过ICS分析确定胞内IFN-g表达。经和未经NLVPMVATV肽脉冲处理的T1细胞,被用作阳性和阴性对照。

[0260] 流式细胞术分析。

[0261] 使用脾细胞进行胞内细胞因子染色(ICS)测定,以评估IFN-γ和多种细胞因子。通过FACS分析测定生发中心B细胞反应。接种疫苗后,将脾细胞用0.2μg/mL HLA匹配的CMV CD8+T细胞肽(HLA A1-VTE&YSE;HLA A2-NLV、VLE&YIL;HLA A24-QYD&AYA;HLA B8-QIK、ELR&ELK;HLA B35-FPT&IPS)刺激以测定CMV特异性CD8+T细胞反应,或用0.2μg/mL gB肽混合物(gB重叠肽-15个氨基酸,具有11个氨基酸重叠)在GolgiPlug®(BD PharMingen)存在下刺激6小时以检测CMV特异性CD4+T细胞反应,将细胞洗涤两次,然后与APC缀合的抗CD3、FITC缀合的抗CD4和PerCP缀合的抗CD8孵育。使用BD Cytofix/Cytoperm试剂盒固定和透化细胞,然后与PE缀合的抗IFN-γ孵育。为了评估多种细胞因子的表达,细胞用PerCP缀合的抗CD8和BV786抗CD4表面标记物染色,然后在细胞内用PE缀合的抗IFN-γ、PE-Cy7缀合的抗TNF、FITC缀合的CD017a和APC缀合的抗IL2染色。为了评估生发中心B细胞反应,用PE缀合的抗B220、FITC缀合的抗GL7和APC缀合的抗CD95对来自接种小鼠的脾细胞或淋巴结细胞进行染色。在BD FACSCanto II上获取细胞,并使用FlowJo软件(Tree Star)分析数据。使用SPICE(Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations)软件5.1版,分析CMV特异性CD4+和CD8+T细胞产生的多种细胞因子。

[0262] 评价用多种佐剂组合配制的CMV疫苗的免疫原性

[0263] 所有小鼠研究均由QIMR Berghofer动物伦理委员会批准。所有人HLA转基因小鼠

(HLA A1、HLA A2、HLA A24、HLA B8和HLA B35)均在QIMR Berghofer的无病原体环境下繁育和维持。这些转基因小鼠缺乏表达小鼠MHC I类分子,并且包含通常表达的人类HLA I类分子的转基因。为了评价对CMVpoly20PL-NH多肽和CMV糖蛋白B(gB)的免疫原性反应,用三种不同形式的单磷酰脂质A(合成)(Avanti Polar Lipids)和非甲基化CpG寡脱氧核苷酸1018(CpG 1018)(TriLink BioTechnologies)佐剂配制蛋白质。用含有以25μg PHAD和50μg CpG 1018、25μg 3D-PHAD和50μg CpG 1018、25μg 3D(6-酰基)-PAD和50μg CpG 1018或50μg单独CpG 1018配制的30μg CMVpoly20PL-NH和5μg gB蛋白质的CMV疫苗制剂,以100μL体积在尾底部皮下(s.c.)免疫6至8周龄小鼠。用以25μg MPL和50μg CpG 1826或单独佐剂配制的30μg CMVpoly20PL-NH和5μg gB蛋白质,免疫小鼠,作为阳性和阴性对照。在第21天对小鼠进行尾部采血,并给予加强剂量。然后在第28天处死小鼠并评估免疫反应。对照组小鼠注射单独佐剂。为了评估CMV疫苗诱导的免疫反应的长期持久性,在第0天,用以50μg CpG 1018配制的含有30μg CMVpoly20PL-NH和5μg gB蛋白质的CMV疫苗制剂,免疫HLA A24和HLA A1人HLA转基因小鼠,然后在第21、42和210天加强。对照组小鼠注射单独CpG1018佐剂。在第28、42、49、84、133、203和217天处死小鼠,以评估长期CMV特异性免疫反应。

[0264] 细胞内细胞因子染色评估IFN-γ、多种细胞因子、生发中心B细胞或T滤泡辅助细胞反应

[0265] 接种疫苗后,脾细胞用0.2μg/mL HLA匹配的CMV CD8+T细胞肽(HLA A1-VTE&YSE;HLAA2-NLV、VLE&YIL;HLA A24-QYD&AYA;HLA B8-QIK、ELR&ELK;HLA B35-FPT&IPS)刺激以测定CMV特异性CD8+T细胞反应,或用0.2μg/mL gB肽混合物(gB重叠肽-15个氨基酸,具有11个氨基酸重叠)在GolgiPlug®(BD PharMingen)存在下刺激6小时以检测CMV特异性CD4+T细胞反应,将细胞洗涤两次,然后与APC缀合的抗CD3、FITC缀合的抗CD4和PerCP缀合的抗CD8孵育。使用BD Cytofix/Cytoperm试剂盒固定和通透细胞,然后与PE缀合的抗IFN-γ孵育。为了评估多种细胞因子的表达,细胞用PerCP缀合的抗CD8和BV786抗CD4表面标记物染色,然后在细胞内用PE缀合的抗IFN-γ、PE-Cy7缀合的抗TNF、FITC缀合的CD017a和APC缀合的抗IL2染色。为了评估生发中心B细胞反应,用PE缀合的抗B220、FITC缀合的抗GL7和APC缀合的抗CD95对来自接种小鼠的脾细胞或淋巴结细胞进行染色。在BD FACSCanto II上获取细胞,并使用FlowJo软件(Tree Star)分析数据。

[0266] 接种后CMV特异性CD4+和CD8+T细胞的体外扩增

[0267] 接种疫苗后,从免疫小鼠分离出5x 10^6个脾细胞,并用0.2μg/mL匹配的CMV CD8+T细胞肽或gB肽混合物(gB重叠肽-15个氨基酸,具有11个氨基酸重叠)刺激,然后将细胞在37℃、10%CO_2下在24孔板中培养10天。培养物在第3和6天以及第10天补充重组IL-2,并使用ICS测定评估T细胞特异性。

[0268] 小鼠IgG ELISpot测定

[0269] 为了测量离体gB特异性抗体分泌细胞,用70%乙醇处理PVDF ELISpot板(Millipore)。用蒸馏水洗涤平板五次,用100μL/孔CMV gB蛋白(25μg/mL)或抗IgG抗体(15μg/mL)包被,并在4℃下孵育过夜。用含有10%血清的DMEM封闭平板,一式三份加入来自每只小鼠的300000个细胞/孔,然后在37℃、5%CO_2的湿润培养箱中孵育18小时。取出细胞并洗涤平板。加入与HRP缀合的检测抗体抗IgG(MABTECH),并在室温下孵育2小时。洗涤平板;加入链霉抗生物素蛋白-ALP并在室温下孵育1小时,然后洗涤平板,并用含有BCIP/NBT

(Sigma-Aldrich)的底物溶液处理,直到显色。通过用水洗涤平板终止显色,并使平板保持干燥过夜。为了测量记忆B细胞反应,用R484和重组小鼠IL-2的混合物在24孔板中激活脾细胞(5x 10^5)5天,然后按上文所述进行ELISpot。在ELISpot读板仪中计数斑点数目。

[0270] ELISA

[0271] 通过酶联免疫吸附测定(ELISA)评价血清总抗gB抗体和抗体同种型滴度。简言之,用50μL重组HCMV gB蛋白质(2.5μg/mL gB蛋白质稀释在碳酸盐缓冲液中)预包被96孔板,并在4℃过夜孵育平板。用含有0.05%吐温20的磷酸缓冲盐溶液(PBST)洗涤平板,然后用5%脱脂奶封闭。加入系列稀释的血清样品(第21天或第28天),并在室温下孵育2小时。用PBST洗涤后,将平板用HRP缀合的绵羊抗小鼠Ig抗体(以测定总抗体反应)或HRP缀合的山羊抗小鼠IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3抗体(Southern Biotech)(以测定抗体同种型)孵育1小时。洗涤这些平板,并用3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液孵育10分钟,然后通过加入1N HCl终止显色。使用ELISA读板仪测量450nm OD。

[0272] 微量中和测定试验

[0273] 测定了对CMV AD169和TB40/E毒株的中和活性。将人成纤维细胞MRC-5或成人视网膜色素上皮(ARPE-19)细胞接种在96孔平底板中。第二天,将来自接种CMV疫苗制剂的小鼠的血清样品系列稀释,添加到于96孔U型底平板中,板中包含稀释在D0(无血清的DMEM)中的标准数量的病毒颗粒(每孔1000p.f.u.),并在37℃和5%CO_2下孵育2小时。测试中还包括不含血清的病毒作为阳性对照,不含病毒的血清作为阴性对照。然后将血清/CMV混合物添加到MRC-5或ARPE-19细胞中,并在37℃和5%CO_2下孵育2小时。孵育后,弃去混合物,用含有10%FCS的DMEM(D10)轻轻洗涤细胞五次,并向每个孔中加入终体积200ml R10,然后在37℃和5% CO_2下孵育16-18小时。将细胞用100mL冷甲醇固定,并用Peroxidase Block(Dako)孵育,然后在室温下用小鼠抗CMV IE-1/IE2 mAb(Chemicon)孵育3小时。然后每孔用50ml HRP缀合的山羊抗小鼠Ig(在PBS中1:200稀释)在室温下孵育细胞3小时。每孔用20μL二氨基联苯胺加底物(Dako)在室温下染色细胞10分钟,并计数染色为深棕色的阳性细胞核。将中和滴度计算为对IE-1/IE-2表达性细胞核产生50%抑制的血清稀释度的倒数。

[0274] 在CMV感染的成纤维细胞测定试验中CMV gB特异性抗体结合细胞相关gB

[0275] 人成纤维细胞系MRC-5细胞在T75瓶中生长至50%汇合。细胞在37℃和5% CO_2下以2.0的感染复数(MOI)感染CMV AD169毒株2小时。感染后,洗涤细胞,并用含有10% FCS的DMEM孵育48小时,以使细胞-细胞免于病毒。用PBS洗涤感染的细胞,然后用胰蛋白酶-EDTA解离细胞。洗涤细胞,计数,然后以10^6个活细胞/mL重悬。用细胞微量紫染色细胞,并在室温下孵育20分钟。洗涤细胞,然后用4%多聚甲醛在室温下固定10分钟。将细胞洗涤两次,20000/孔接种在96孔V形底平板中,通过离心沉淀细胞,并弃去上清液。用CMV疫苗或安慰剂免疫后第21、28、42、49、84、133、203和217天从HLAA24人转基因小鼠获得小鼠血清样品,将之合并,然后稀释至1:512。将稀释的血清样品添加到MRC-5细胞中,并在37℃和5% CO_2下孵育2小时。洗涤细胞,然后在4℃下用抗小鼠AF488IgG(H+L)染色30分钟。在BD FACSCanto II上获取细胞,并使用FlowJo软件(Tree Star)分析数据。从活的AF 488阳性细胞的百分比计算与CMV感染的成纤维细胞结合的CMV gB特异性抗体的百分比。

[0276] 结果

[0277] CMVpoly20PL-NH蛋白质构建体设计、蛋白质表达、纯化方法开发、蛋白质表征和体

外免疫原性评价

[0278] CMV特异性免疫反应不限于先前所理解的gB、pp65和IE-1抗原,而是针对超过70%的CMV可读框(Elkington,Walker等2003,Elkington,Shoukry等2004,Manley,Luy等2004,Sylwester,Mitchell等2005)。因此,能够诱导广泛的病毒特异性免疫反应的疫苗可能提供更有效的针对病毒相关病理的保护作用。因此,为了靶向广泛的免疫显性CMV抗原,本发明人设计了一种新型多价疫苗,该疫苗由CMV糖蛋白B(gB)和多表位(CMVPol20PL-NH)重组蛋白与人相容性佐剂组成,这是因为多价疫苗可能比单价疫苗提供更长时间的免疫。此疫苗制剂中使用的CMV gB由胞外和胞内结构域组成,是中和抗体及CD4+和CD8+T细胞反应的主要靶标。另一种蛋白质是CMVpoly20PL-NH,其设计为编码来自CMV的五种高度保守的免疫显性抗原(pp65、IE-1、pp150、pp50和DNAse)的多个HLA I类限制性CD8+T细胞表位。该多表位序列经设计,使得每个表位的羧基端连接蛋白酶体释放氨基酸序列(AD或K或R)(表1)。在我们之前的研究中,我们已经显示蛋白酶体释放氨基酸序列通过增强多表位蛋白质的蛋白酶体加工来提高CD8+T细胞表位的免疫原性(Dasari,Smith等2014)。基于大肠杆菌密码子利用,将CMVpoly20PL-NH构建体的氨基酸序列翻译为DNA序列(图1),合成构建了CMV多表位编码序列,并将其克隆到表达质粒中在异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导型启动子下。将合成设计的CMVpoly20PL-NH构建体转化到化学感受态大肠杆菌DH5α细胞中,随后分离并纯化质粒。

[0279] 将CMVpoly20PL-NH表达载体转化到大肠杆菌BL21 codonPlus(DE3)RP蛋白表达宿主中。将CMVpoly20PL-NH表达载体转化到大肠杆菌中后,使用IPTG诱导CMVpoly20PL-NH蛋白质的表达。在诱导阶段结束时,收获大肠杆菌培养物并进行分析以确定蛋白质表达水平。从该分析获得的数据显示,CMVpoly20PL-NH表达载体产生了高水平的CMVpoly20PL-NH蛋白质(图2A)。为了纯化CMVpoly20PL-NH蛋白质,进行细胞裂解,并使用SDS-PAGE分析细胞裂解物的上清液和沉淀级分。由于线性CD8+T细胞表位的高疏水性性质,CMVpoly20PL-NH蛋白质以包涵体(IB)的形式聚集(图2B)。为了去除宿主细胞蛋白质和DNA污染,用TE缓冲液洗涤IB(图2C),然后溶解。使用SP-Sepharose柱以分批模式纯化可溶性蛋白质,将从SP-Sepharose柱洗脱的CMVpoly20PL-NH蛋白质上样到Q-Sepharose柱上以去除宿主DNA和内毒素污染物,然后将纯化的CMVpoly20PL-NH蛋白质对25mM甘氨酸pH3.8缓冲液透析,然后在SDS-PAGE上分析所有样品(图2D和E)。为了进一步去除残余内毒素污染物,将透析的蛋白质滤过Mustang E^{TM} 0.22μm膜。从这些实验获得的数据显示,使用细菌表达系统可以成功地表达CMVpoly20PL-NH蛋白质并将其纯化至均一。为了确认CMVpoly20PL-NH蛋白质的身份,我们进行了蛋白质完整质量分析,纯化多肽的CMVpoly20PL-NH的质量与通过氨基酸序列预测的理论分子量一致(图3)。为了测定CMVpoly20PL-NH蛋白质的免疫原性,将人淋巴母细胞系(LCL)用CMVpoly20PL-NH蛋白质脉冲处理过夜,然后使用胞内IFN-γ分析评估其激活CMV特异性CD8+T细胞的能力。与用NLV表位脉冲处理的LCL相比,来自CMVpoly20PL-NH的HLA A2限制性pp65表位NLVPMVATV(称为NLV)被更有效地加工并呈递给NLV特异性CD8+T细胞(图4)。

[0280] CMV疫苗制剂开发和人HLAA24转基因小鼠中的免疫原性评价

[0281] 最近对CMV的免疫学、病理学和分子生物学的理解表明,针对CMV相关疾病的保护是由体液和细胞免疫介导的,因此,理想的CMV疫苗需要诱导体液和细胞反应。不幸的是,最近开发CMV疫苗的尝试显示出有限的成功。这些CMV疫苗策略已将糖蛋白B(gB)、pp65和IE-1

评估为潜在靶点,并已通过多种递送平台递送,包括减毒CMV Towne毒株(Jacobson,Sinclair等2006)、编码全长抗原和表位的重组病毒载体((Bernstein,Reap等2009,Zhong和Khanna 2009,La Rosa,Longmate等2017)、DNA(Wloch,Smith等2008)、致密体((Pepperl-Klindworth,Frankenberg等2002)、亚单位(Drulak,Malinoski等2000)疫苗、以及最近源自AD169毒株的条件复制缺陷型CMV疫苗(Adler,Lewis等2019)。多年来,人们一直认为,为了引发保护性CD8细胞毒性T细胞反应,病毒抗原必须以核酸形式(例如,使用病毒载体递送系统或DNA质粒)递送而不是作为外源递送的蛋白质递送,以使得所表达的多肽被适当处理并呈递给T细胞。然而,这些疫苗递送平台中的大多数,尤其是减毒活疫苗和基于病毒载体的疫苗,已经引发了一些监管担忧,如感知的长期理论健康风险和预先存在的免疫力(Lee,Markham等人,2012)。为了克服免疫原性和安全性问题,我们开发了一种新的多价疫苗平台技术,使用人相容性佐剂系统,针对在CMV感染和复制的不同阶段表达的六种抗原,产生CMV特异性中和抗体反应、CD4+和CD8+T细胞反应。

[0282] 为了产生针对CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质的强健免疫反应,我们用单独CpG 1018或三种不同形式的MPLA(PHAD、3D-PHAD和3D(6-酰基)-PHAD)配制这两种蛋白质。在第0天用不同的CMV疫苗制剂免疫人HLA 24转基因小鼠,这些小鼠在第21天进行尾部采血,并用相同的制剂加强。在第28天处死免疫的小鼠以评价CMV特异性免疫反应(图5A)。与单独佐剂对照组相比,用以PHAD和CpG 1018、3D-PHAD和CpG 1018、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG 1018或MPL和CpG 1826配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质免疫,产生了强烈的离体IFN-γ分泌性CMV特异性CD8+T细胞反应(对HLA A24限制性QYD和AYA肽特异)(图5B)。然而,在用以3D-PHAD和CpG 1018或单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH免疫的小鼠中,观察到IFN-γ分泌性CD8+T细胞反应的显著增强(图5B)。此外,由于人HLA转基因小鼠中的CD8+T细胞数量较低,我们通过离体扩增疫苗诱导的CMV特异性CD8+T细胞,进一步确认了所有疫苗制剂的免疫原性。有趣的是,体外扩增后,在用以PHAD和CpG 1018、3D-PHAD和CpG 1018、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG 1018或MPL和CpG 1826配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质免疫的小鼠中,观察到产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞增加了至少20倍(图5C)。除了IFN-γ分泌,我们还评估了疫苗诱导的CMV特异性CD8+T细胞分泌多种细胞因子的能力,因为多功能T细胞在控制CMV感染中发挥着关键作用(Crough,Beagley等2012,Gibson,Barysauskas等2015)。自使用以PHAD和CpG 1018、3D-PHAD和CpG 1028、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG 1018或MPL和CpG 1826配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质接种的小鼠,获得脾细胞,体外扩增后,导致大量CMV特异性CD8+T细胞表达2或3种介质(IFN-γ、TNF或IL-2)(图5D)。在下一组实验中,用以PHAD和CpG 1018、3D-PHAD和CpG 1018、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG 1016或MPL和CpG 1826配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质免疫小鼠,并评估其诱导gB特异性抗体以及CD4+和CD8+T细胞反应的能力。离体分析显示,与单独佐剂对照相比,所有疫苗制剂都诱导了强烈的CMV gB特异性CD4+和CD8+T细胞反应;然而,在用以3D-PHAD和CpG 1018或单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质接种的小鼠中观察到gB特异性CD4+和CD8+T细胞反应的显著增强(图5E和5F)。随后,本发明人评价了用(以PHAD和CpG 1018、3D-PHAD和CpG 1018、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG1018、MPL和CpG 1826或单独佐剂配制的)CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质接种的小鼠的血清样品中的gB特异性抗体反应。以PHAD和CpG 1018、3D-PHAD和CpG 1018、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG 1016或MPL和

CpG 1826配制的gB和CMVpoly20PL-NH,在初次免疫后(第21天)诱导gB特异性抗体滴度,并且与从单独佐剂免疫的小鼠获得的血清相比,在第28天的加强剂量后,所有组中的这些滴度都进一步增加(图6A和6B)。还评价了血清样品中的抗gB抗体的同种型。以PHAD和CpG1018、3D-PHAD和CpG 1018、3D(6-酰基)-PHAD、单独CpG 1018或MPL和CpG 1826配制的CMV gB与CMVpoly20PL-NH的组合,诱导了CMV gB特异性抗体反应,其包括多种同种型,包括IgM、IgG1(Th2样Ig同种型)和IgG2b、IgG2a、IgG3(Th1样Ig同种型)(图6C)。总之,这些结果证明,相比具有3D-PHAD和CpG 1018或3D(6-酰基)-PHAD的制剂,以3D-PHAD和CpG 1018或单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质可以产生强健的CMVpoly20PL-NH特异性CD8+T细胞反应以及gB特异性CD4+和CD8+T细胞和抗体反应。因为在以3D-PHAD和CpG 1018或单独CpG 1018配制时针对CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质产生的免疫反应没有显著差异,所以在随后的实验中,我们用以单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质来测试CMV疫苗诱导的免疫反应的免疫原性和持久性。

[0283] 在多种HLA转基因小鼠中扩展临床前评估以CpG 1018佐剂配制的CMV疫苗

[0284] 尽管在人HLA A24转基因小鼠中观察到针对CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质的强健免疫反应,但评估gB和CMVpoly20PL-NH在其他人HLA转基因小鼠中的免疫原性很重要。多种HLA转基因小鼠在评价多种人HLAI类分子限制性的CMVpoly20PL-NH蛋白质CD8+T细胞表位的免疫原性方面提供了更大的优势。为了评估CMV gB和CMVpoly20PL-NH蛋白质的免疫原性,在第0天,用以单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH(疫苗组)或单独CpG(对照组),免疫人HLA A1、A2、A24、B8和B35转基因小鼠。在第21天对小鼠进行尾部采血,并在第28天处死(图7A)。与在人HLA A24转基因小鼠中看到的免疫原性数据一致,离体分析清楚地揭示,与单独CpG 1018免疫的小鼠相比,使用单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH在所有人HLA转基因小鼠中诱导了显著更高的CMV特异性CD8+T细胞反应(HLA A1、A2、A24、B8和B35表位限制性)(图7B和7D)。通过用相应的肽体外刺激接种的小鼠的脾细胞并将其培养10天,进一步确认了这些离体免疫反应。有趣的是,离体刺激导致CMV特异性CD8+T细胞反应的显著扩大。具体而言,与体外刺激后的离体反应相比,观察到分泌IFN-γ的CD8+T细胞增加了40至200倍(图7C和7D)。此外,以单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH还诱导了多功能CMV特异性CD8+T细胞,32%至59%离体扩增的和69%至98%体外扩增的CMV特异性CD8+T细胞分泌至少两种细胞因子(IFN-γ、TNF或IL-2)(图7E)。以用单独CpG 1018免疫的小鼠相比,以单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH还在HLAA1、A24、B8和B35小鼠中诱导了显著更高的产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞(图8A和8C)。与离体反应相比,用gB肽混合物体外扩增后,后续分析揭示在HLA-A1、A2、A24、B8和B35转基因小鼠中产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞的扩增增加了20至90倍(图8B和8C)。值得注意的是,离体和体外扩增分析显示,以单独CpG 1018配制的CMV gB和CMVpoly20PL-NH还在所有HLA转基因小鼠中诱导了多功能gB特异性CD4+T细胞反应,尤其是至少43%的离体和62%的gB特异性CD4+T细胞分泌至少两种细胞因子(IFN-γ、TNF或IL2)(图8D)。此外,CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018制剂进一步证明了其在HLAA1、A24和B35小鼠中诱导CMV gB特异性CD8+T细胞反应的能力,这些gB特异性CD8+T细胞中的很大一部分能够分泌两种或更多种细胞因子(图8E)。为了确认CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018制剂除了引起强烈的CMV特异性细胞免疫反应之外是否也能够促进强健的抗体反应,我们使用ELISA评估了所有人

HLA转基因小鼠的血清抗gB抗体滴度。CMVpoly20PL-NH、gB和CpG 1018制剂在所有人转基因小鼠中在初次免疫后(第21天)诱导了gB特异性抗体滴度,但与HLA A2、A24和B35转基因小鼠相比,在HLA A1和B8转基因小鼠中观察到较低的抗体滴度,初次施用21天后的主要抗体同种型为IgG2b(Th1样Ig同种型)(图9A和9B)。然而,第28天的加强剂量在所有人HLA转基因小鼠中均导致了gB特异性抗体滴度的显著增强(图9A和9B),主要抗体同种型为Th2样IgM和IgG1以及Th1样IgG2b和IgG3。在随后的分析中,我们在微量中和测定试验中测试了这些抗体的功能。与单独CpG 1018免疫的小鼠相比,用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018制剂免疫的所有人HLA转基因小鼠的血清诱导了针对HCMV AD169毒株的强烈中和抗体反应,但是HLA A24中的中和抗体滴度显著高于其他人HLA转基因小鼠(图9E)。

[0285] 然后,本发明人探索了CMV疫苗在所有人HLA转基因小鼠中诱导中和抗体反应对抗ARPE-19细胞中不同CMV毒株TB40/E的能力(图9F)。尽管与AD 169毒株相比,总体中和抗体滴度较低,但与从用安慰剂免疫的小鼠获得的血清相比,用CMV疫苗免疫后从所有人HLA转基因小鼠获得的血清均表现出了对TB40/E毒株的强中和活性。有趣的是,与HLA A2和B8小鼠相比,HLA A1、B35和A24小鼠展示了更高的中和抗体滴度。总之,这些观察结果表明,用gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018配制的CMV疫苗能够在多种人HLA转基因小鼠中诱导针对多种CMV毒株(AD169和TB40/E)的强烈中和抗体反应,这被视为确定CMV疫苗有效性的综合方法。

[0286] 评估CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导的长期持久免疫

[0287] 以前的CMV疫苗的主要问题之一是疫苗诱导的免疫的持久性和低有效性。事实上,持久的疫苗诱导的免疫反应在最大限度地阻止疫苗对多种病原体的效力降低方面发挥着关键作用(Amanna,Carlson等,2007)。因此,非常重要的是,测试CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂诱导的免疫反应的长期持久性以及为维持针对CMV的持续免疫反应所需的加强剂量数。为了测试长期持久免疫,我们在第21天用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂(疫苗组)或单独CpG 1018(对照组)免疫人HLA A24转基因小鼠,在第28和42天加强。为了召回疫苗诱导的预先存在的CMV特异性免疫反应,在第210天对一个亚组的小鼠进行第三次加强。我们通过纵向(第28、42、48、84、133、203和217天)测量CMVpoly20PL-NH特异性CD4+T细胞反应、gB特异性CD4+和CD8+T细胞、B细胞和抗体反应,监测了接种的HLA A24转基因小鼠中的CMV特异性免疫反应(图10)。

[0288] 体外分析表明,与用单独CpG 1018接种相比,CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂诱导了显著更高的产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞反应,并且在所有时间点都保持了这些强健的免疫反应。有趣的是,与其他时间点相比,在第28、49和217天,每次后续接种,都导致了产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的显著增加(图11A)。第210天的第三次加强剂量进一步导致产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞反应的迅速增加。用CMV HLA A24限制性肽体外刺激脾细胞后,观察到产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞的类似趋势(D133除外),特别是与离体相比,观察到产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞增加了至少20倍(图11B)。有趣的是,在离体和体外用CMV肽刺激脾细胞后,发现在所有时间点,CMV特异性CD8+T细胞都展示了其分泌多种细胞因子的能力(图11C)。除了第42天的离体和体外扩增外,更大比例的细胞能够分泌IFN-γ(红弧)和TNF(绿弧)。此外,从第49天到第217天,相当数量的离体CMV特异性CD8+T细胞也展示了其分泌IFN-γ(红弧)、TNF(绿弧)和IL-2(蓝弧)三种细胞

因子的能力。

[0289] 此外,与单独CpG 1018免疫相比,CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂还诱导了产生IFN-γ的CMV gB-特异性CD4+T细胞的显著更高频率。第28、49和84天,每一次后续接种,都导致产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞的离体显著增加,反应在第133和203天略有下降并趋于平台,但在第三次加强后,观察到产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞反应迅速增加(图12A)。此外,尽管在第133和203天,产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞频率较低,但在用gB肽混合物体外刺激脾细胞后,在所有时间点都诱导了产生IFNγ的CMV gB特异性CD4+T细胞反应的更大扩增(图12B)。

[0290] 除IFN-γ外,CMV特异性CD4+T细胞还在离体和体外扩增后显示出其分泌多种细胞因子(IFN-γ、TNF和IL-2)的能力(图12C)。具体而言,从第28天到第217天,用gB肽混合物离体刺激后,大量CMV gB特异性CD4+T细胞能够产生三种细胞因子,IFN-γ(红弧)、TNF(绿弧)和IL-2(蓝弧)或IFN-γ(红弧)和TNF(绿弧)。体外扩增后,CMV gB特异性CD4+T细胞主要分泌IFN-γ和TNF(第28、42、49、84、203和217天)或TNF和IL-2(第133天)。总之,这些结果表明,用gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018配制的CMV疫苗能够诱导持久的CMV特异性CD4+和CD8+T细胞反应,并且这些细胞中高百分比的能够同时分泌多种细胞因子。

[0291] 生发中心(GC)在诱导记忆B细胞和长寿命浆细胞以分泌长期血清免疫所需的高亲和力抗体方面发挥着重要作用((McHeyzer-Williams和McHeyzer-Williams 2005)。因此,我们验证了CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂在接种和对照小鼠的脾脏中诱导生发中心B细胞反应增加的能力。我们发现,在用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂接种的小鼠脾脏中,在第28、49和84天诱导了显著更高比例的生发中心B细胞($B220^{+}GL7^{+}Fas^{+}$),随后下降并趋于平台(图13A和13B);然而,用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂接种的小鼠的淋巴结在第49和84天显示出适度增加(图13C和13D)。此外,通过ELISpot分析对CMV gB特异性IgG分泌性浆细胞进行的评估表明,与单独CpG 1018免疫相比,CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂诱导了显著更高和可持续的B浆细胞反应。我们还通过离体多克隆刺激静息B细胞,评估了长期记忆B细胞反应,发现与离体相比,分泌gB特异性IgG的B细胞反应显著增加并持续。有趣的是,离体和记忆B细胞分析显示,第三次免疫导致了分泌IgG的gB特异性B细胞数量快速增加(图14A和14B)。此外,为了确认CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂是否也能够诱导针对gB蛋白的强烈抗体反应,我们测试了来自接种和对照小鼠的血清样品。与单独CpG 1018免疫的小鼠相比,用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂免疫的小鼠血清显示出显著更高的CMV gB特异性抗体滴度,并且抗体滴度在第28和49天随着每一个加强剂量而增加,但在第203天显示适度下降。然而,gB特异性抗体滴度在第三次加强后达到峰值(图15A)。

[0292] 此外,抗体反应的进一步表征揭示,用gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018配制的CMV疫苗可以诱导持久的gB特异性多种抗体Th1和Th2样Ig同种型(IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3)。在第28天第一次加强、第49天第二次加强和第217天第三次加强后,观察到抗体滴度进一步增强(图15B)。尽管抗体滴度在第21、42、84、133和203天的时间点较低,但在整个研究期间,CMV gB特异性抗体浓度保持在可检测水平。我们进一步在微量中和测定试验中表征了这些抗体,以测定其中和成纤维细胞的CMV AD 169毒株感染和ARPE-19细胞的CMV TB40/E毒株感染的能力。与安慰剂相比,CMV疫苗免疫诱导了针对CMV AD169和TB40/E毒株

的强烈中和抗体反应。与ELISA抗体滴度相似,在第28天第一次加强、第49天第二次加强和第217天第三次加强后,中和抗体滴度更高。最后,在最近的出版物中,已经显示,血清IgG与细胞相关的gB结合是疫苗效力的免疫相关因素(参见Jenks等,Sci.Transl.Med.12,eabb3611(2020))。因此,在随后的分析中,我们测定小鼠血清抗体结合CMV AD169感染的成纤维细胞的能力。我们发现,与安慰剂相比,来自用gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018配制的CMV疫苗免疫的小鼠的血清抗体在所有时间点都表现出了与感染CMV AD 169毒株的成纤维细胞上的细胞相关gB的强结合。然而,与第21、42、84和133天相比,第28、49和217天的加强剂量后结合强度更高。总之,这些数据表明,用gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018配制的CMV疫苗展示了其诱导持久和定性CMV特异性体液免疫反应和细胞免疫反应的潜力。

[0293] 在HLAA1转基因小鼠中确认CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂诱导长期持久的免疫反应

[0294] 除了人HLA A24转基因小鼠外,我们还在人HLA A1转基因小鼠中测试了CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂诱导的免疫反应的长期持久性。在第21天用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂(疫苗组)或单独CpG 1018(对照组)免疫人HLAA1转基因小鼠,在第28、42和210天加强,并通过纵向(在第49、84、203和217天)测量CMVpoly20PL-NH特异性CD4+T细胞反应、gB特异性CD4+和CD8+T细胞、B细胞和抗体反应,来监测接种的人HLA A1转基因小鼠中的CMV特异性免疫反应(图16)。类似于在人HLA A24转基因小鼠中观察到的结果,与用单独CpG 1018免疫的小鼠相比,CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂诱导了显著更高频率且可持续的产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞(图17A和17B),并且在体外刺激和扩增疫苗诱导的抗原特异性细胞后,产生IFN-γ的CMV特异性CD8+T细胞显著增加(图17C)。有趣的是,CMV特异性CD8+T细胞同时分泌多种细胞因子,大部分细胞能够分泌2种细胞因子(IFN-γ和TNF)(图17D)。此外,我们还观察到在离体(图18A和18B)和体外刺激(图18C)后,产生IFN-γ的CMV gB特异性CD4+T细胞反应的更高频率。体外扩增后,高比例的CMV gB特异性CD4+T还显示出其同时分泌两种细胞因子(IFN-γ和TNF)的能力(图18D)。对生发中心B细胞和分泌抗原特异性IgG的血浆B细胞的进一步评估表明,与用单独CpG 1018免疫的小鼠相比,CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG1018疫苗制剂在第49天诱导了显著更高比例的生发中心B细胞($B220^{+}GL7^{+}Fas^{+}$),并且显著更高和可持续的血浆和记忆B细胞反应(图19A-19F)。最后,为了确认CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018制剂诱导gB特异性抗体反应的能力,我们测试了来自接种和对照小鼠的血清样品。与对照小鼠相比,来自用CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018免疫的小鼠的血清显示显著更高的gB特异性抗体滴度,并且在第28、49和217天的加强剂量后抗体滴度明显有增加趋势(图20A)。CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗还诱导了多种抗体Th1样(IgG2a、IgG2b和IgG3)和Th2样(IgM和IgG1)同种型(图20B)。

[0295] 总之,这些结果表明,由CMV gB和CMVpoly20PL-NH重组蛋白质以及CpG 1018佐剂组成的新型多价CMV疫苗制剂,可以在多种人HLA转基因小鼠中诱导强健的CMV特异性CD4+、CD8+和中和抗体反应。由于此疫苗制剂是基于重组蛋白质和人相容性佐剂开发的制剂,故克服了与全病毒或重组病毒载体相关的安全性问题,并提高疫苗诱导的免疫反应的持久性,因此它将在预防性和治疗性临床环境如先天性CMV感染、移植和胶质母细胞瘤中具有更广泛的临床意义。CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018在多种人HLA转基因小鼠中具有高度

的免疫原性;该CMV疫苗产生的免疫反应的一个最显著特征是诱导了长寿命的生发中心B细胞和长期可持续的CMV特异性CD4+、CD8+T细胞、抗体分泌性B细胞反应和中和抗体反应。有趣的是,在每次加强免疫后,CMV特异性CD4+、CD8+和B细胞反应的诱导逐渐增加。此外,此疫苗制剂中靶向的抗原(gB、pp65、IE1、pp50、pp150和DNAse)在CMV感染的所有阶段(包括感染、复制和包装)中都发挥着关键作用。这些抗原在大多数CMV血清阳性的健康个体和移植患者中被广泛识别,并且已知在发展保护性免疫中发挥重要作用。所有这些特性使得CMV gB、CMVpoly20PL-NH和CpG 1018疫苗制剂与现有制剂相比是更优的候选疫苗。

[0296] 参考文献

[0297] Adler,S.P.,N.Lewis,A.Conlon,M.P.Christiansen,M.Al-Ibrahim,R.Rupp,T.M.Fu,O.Bautista,H.Tang,D.Wang,A.Fisher,T.Culp,R.Das,K.Beck,G.Tamms,L.Musey和V.S.Group(2019)."Phase 1Clinical Trial of a Conditionally Replication-Defective Human Cytomegalovirus(CMV)Vaccine in CMV-Seronegative Subjects."J Infect Dis 220(3):411-419.

[0298] Amanna,I.J.,N.E.Carlson和M.K.Slifka(2007)."Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens."N Engl J Med 357(19):1903-1915.Bernstein,D.I.,E.A.Reap,K.Katen,A.Watson,K.Smith,P.Norberg,R.A.Olmsted,A.Hoeper,J.Morris,S.Negri,M.F.Maughan和J.D.Chulay(2009)."Randomized,double-blind,Phase 1trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers."Vaccine 28(2):484-493.

[0299] Crough,T.,L.Beagley,C.Smith,L.Jones,D.G.Walker和R.Khanna(2012)."Ex vivo functional analysis,expansion and adoptive transfer of cytomegalovirus-specific T-cells in patients with glioblastoma multiforme."Immunol Cell Biol 90(9):872-880.Dasari,V.,C.Smith,A.Schuessler,J.Zhong和R.Khanna(2014)."Induction of innate immune signatures following polyepitope protein-glycoprotein B-TLR4&9agonist immunization generates multifunctional CMV-specific cellular and humoral immunity."Hum Vaccin Immunother 10(4):1064-1077.

[0300] Drulak,M.W.,F.J.Malinoski,S.A.Fuller,S.S.Stewart,S.Hoskin,A.M.Duliege,R.Sekulovich,R.Burke和S.Winston(2000)."Vaccination of seropositive subjects with CHIRON CMV gB subunit vaccine combined with MF59 adjuvant for production of CMV immune globulin."Viral Immunol 13(1):49-56.

[0301] Elkington,R.,N.H.Shoukry,S.Walker,T.Crough,C.Fazou,A.Kaur,C.M.Walker和R.Khanna(2004)."Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by human CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H."Eur J Immunol 34(11):3216-3226.

[0302] Elkington,R.,S.Walker,T.Crough,M.Menzies,J.Tellam,M.Bharadwaj和R.Khanna(2003)."Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers."J Virol 77(9):5226-5240.

[0303] Gibson,L.,C.M.Barysauskas,M.McManus,S.Dooley,D.Lilleri,D.Fisher,T.Srivastava,D.J.Diamond和K.Luzuriaga(2015)."Reduced frequencies of polyfunctional CMV-specific T cell responses in infants with congenital CMV infection."J Clin Immunol 35(3):289-301.

[0304] Jacobson,M.A.,E.Sinclair,B.Bredt,L.Agrillo,D.Black,C.L.Epling,A.Carvidi,T.Ho,R.Bains,V.Girling和S.P.Adler(2006)."Safety and immunogenicity of Towne cytomegalovirus vaccine with or without adjuvant recombinant interleukin-12."Vaccine 24(25):5311-5319.

[0305] La Rosa,C.,J.Longmate,J.Martinez,Q.Zhou,T.I.Kaltcheva,W.Tsai,J.Drake,M.Carroll,F.Wussow,F.Chiuppesi,N.Hardwick,S.Dadwal,I.Aldoss,R.Nakamura,J.A.Zaia和D.J.Diamond(2017)."MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults."Blood 129(1):114-125.

[0306] Lee,S.W.,P.F.Markham,M.J.Coppo,A.R.Legione,J.F.Markham,A.H.Noormohammadi,G.F.Browning,N.Ficorilli,C.A.Hartley和J.M.Devlin(2012)."Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses."Science 337(6091):188.

[0307] Manley,T.J.,L.Luy,T.Jones,M.Boeckh,H.Mutimer和S.R.Riddell(2004)."Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+cytotoxic T-cell response in natural infection."Blood 104(4):1075-1082.

[0308] McHeyzer-Williams,L.J.和M.G.McHeyzer-Williams(2005)."Antigen-specific memory B cell development."Annu Rev Immunol 23:487-513.

[0309] Pepperl-Klindworth,S.,N.Frankenberg和B.Plachter(2002)."Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles."J Clin Virol 25Suppl 2:S75-85.

[0310] Sylwester,A.W.,B.L.Mitchell,J.B.Edgar,C.Taormina,C.Pelte,F.Ruchti,P.R.Sleath,K.H.Grabstein,N.A.Hosken,F.Kern,J.A.Nelson和L.J.Picker(2005)."Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+and CD8+T cells dominate the memory compartments of exposed subjects."J Exp Med 202(5):673-685.

[0311] Wloch,M.K.,L.R.Smith,S.Boutsaboualoy,L.Reyes,C.Han,J.Kehler,H.D.Smith,L.Selk,R.Nakamura,J.M.Brown,T.Marbury,A.Wald,A.Rolland,D.Kaslow,T.Evans和M.Boeckh(2008)."Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects."J Infect Dis 197(12):1634-1642.

[0312] Zhong,J.和R.Khanna(2009)."Ad-gBCMVpoly:A novel chimeric vaccine strategy for human cytomegalovirus-associated diseases."J Clin Virol.

[0313] 在说明书通篇中,目的是描述本发明的优选实施方案,而非将本发明限制于任何一个实施方案或特征的具体集合。因此,本领域技术人员将理解,在本公开的指引下,在不脱离本发明的范围的情况下,可以在所示例的具体实施方案中进行多种修改和改变。

[0314] 本文提及的所有计算机程序、算法、专利和科学文献在此以其整体引入作为参考。

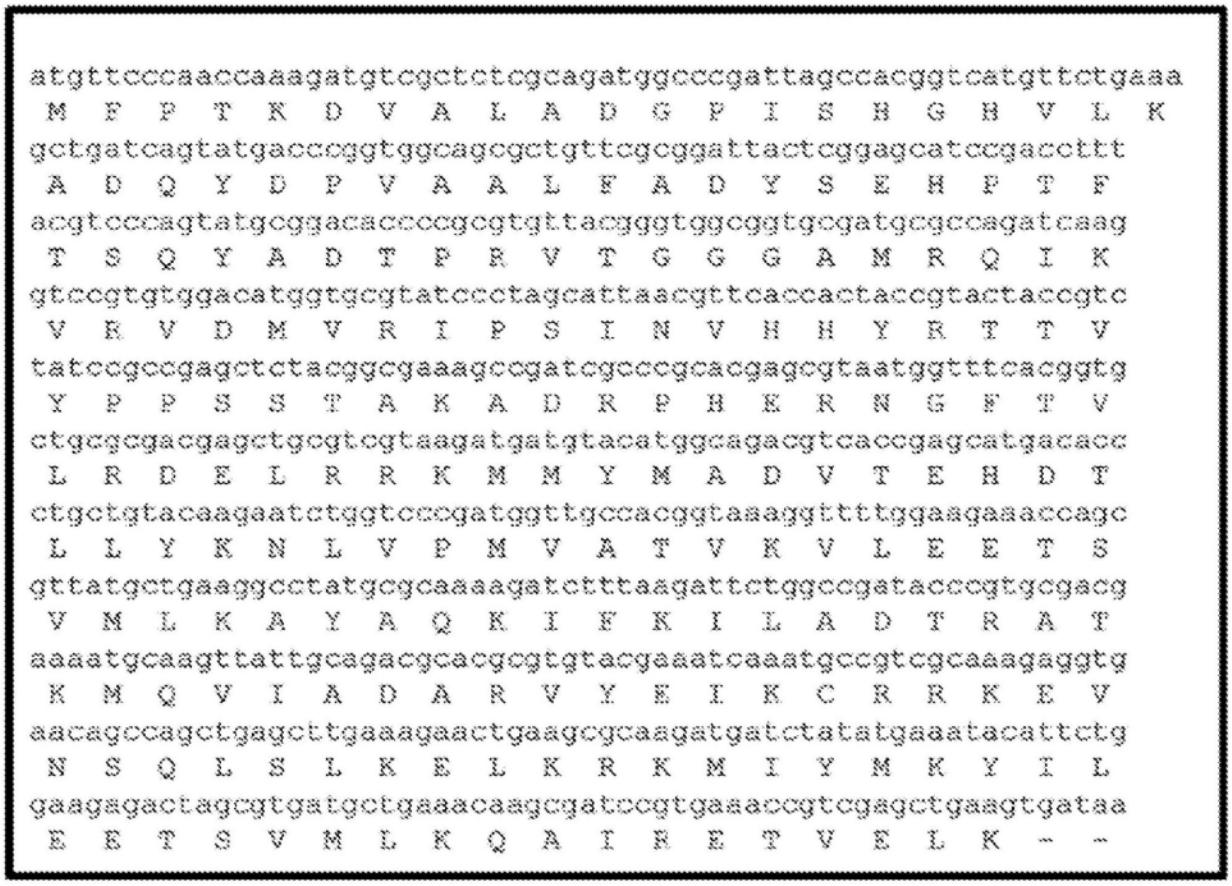

atgttcccaaccaaagatgtcgctctcgcagatggcccgattagccacggtcatgttctgaaa
M F P T K D V A L A D G P I S H G H V L K
gctgatcagtatgacccggtggcagcgctgttcgcggattactcggagcatccgacctttt
A D Q Y D P V A A L F A D Y S E H P T F
acgtcccagtatgcggacaccccgcgtgttacgggtggcggtgcgatgcgccagatcaag
T S Q Y A D T P R V T G G G A M R Q I K
gtccgtgtggacatggtgcgtatccctagcattaacgttcaccactaccgtactaccgtc
V R V D M V R I P S I N V H H Y R T T V
tatccgccgagctctacggcgaaagccgatcgcccgcacgagcgtaatggtttcacggtg
Y P P S S T A K A D R P H E R N G F T V
ctgcgcgacgagctgcgtcgtaagatgatgtacatggcagacgtcaccgagcatgacacc
L R D E L R R K M M Y M A D V T E H D T
ctgctgtacaagaatctggtcccgatggttgccacggtaaaggttttggaagaaaccagc
L L Y K N L V P M V A T V K V L E E T S
gttatgctgaaggcctatgcgcaaaagatctttaagattctggccgataccgtgcgacg
V M L K A Y A Q K I F K I L A D T R A T
aaaatgcaagttattgcagacgcacgcgtgtacgaaatcaaatgccgtcgcaaagaggtg
K M Q V I A D A R V Y E I K C R R K E V
aacagccagctgagcttgaaagaactgaagcgcaagatgatctatatgaaatacattctg
N S Q L S L K E L K R K M I Y M K Y I L
gaagagactagcgtgatgctgaaacaagcgatccgtgaaaccgtcgagctgaagtgataa
E E T S V M L K Q A I R E T V E L K - -

图1

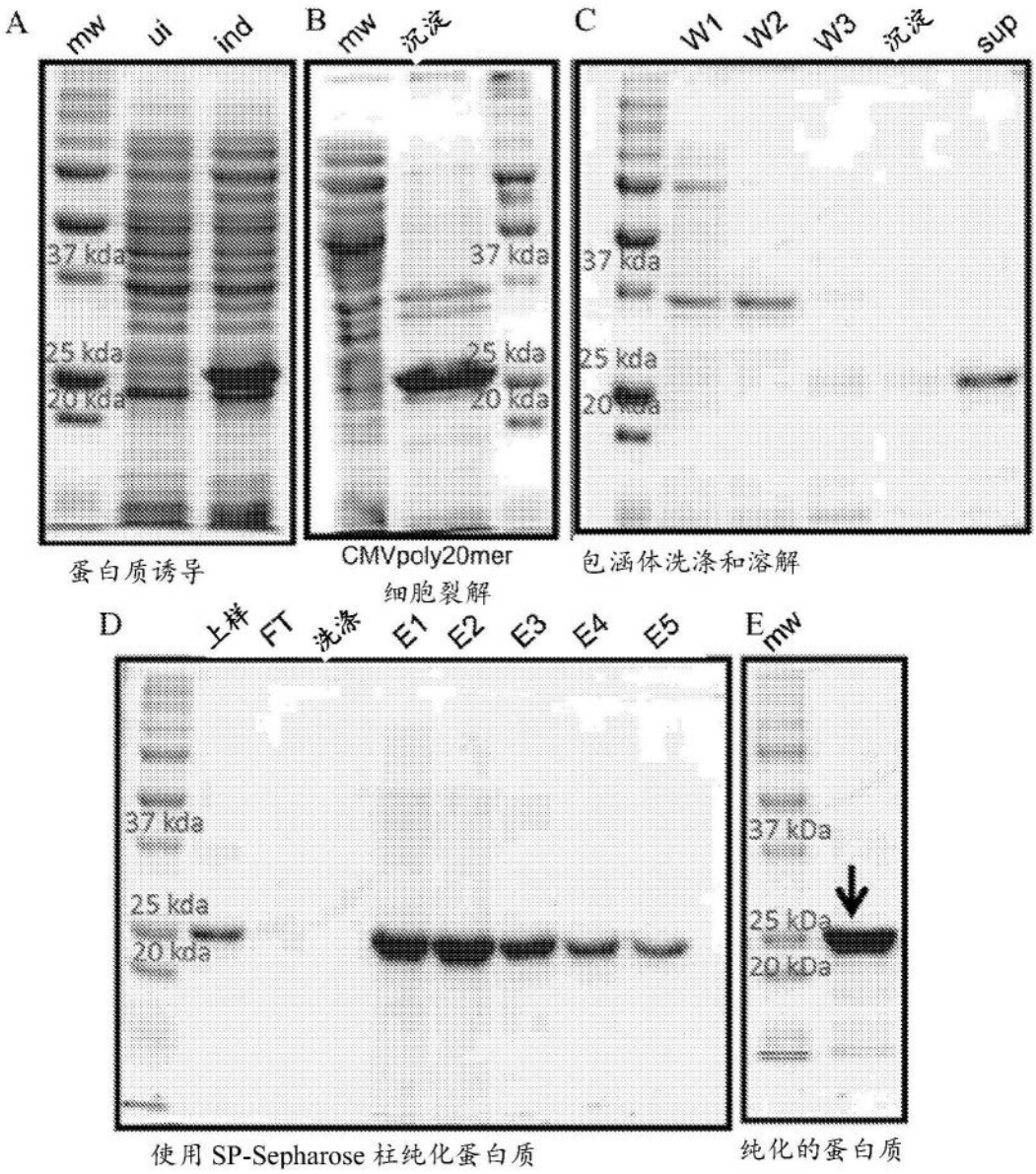

A
mw
ui
ind
37 kda
25 kda
20 kda
蛋白质诱导
B
mw
沉淀
37 kda
25 kda
20 kda
CMVpoly20mer
细胞裂解
C
W1
W2
W3
沉淀
sup
37 kda
25 kda
包涵体洗涤和溶解
D
上样
FT
洗涤
E1
E2
E3
E4
E5
37 kda
25 kda
20 kda
使用 SP-Sepharose 柱纯化蛋白质
E
mw
37 kDa
25 kDa
20 kDa
纯化的蛋白质

图2

理论 pI/Mw(平均值)用于用户输入的序列

```
    10        20        30        40        50        60
MFPTKDVALA DGPISHGHVL KADQYDPVAA LFADYSEHPT FTSQYADTPR VTGGGAMRQI

    70        80        90       100       110       120
KVRVDMVRIP SINVHHYRTT VYPPSSTAKA DRPHERNGFT VLRDELRRKM MYMADVTEHD

   130       140       150       160       170       180
TLLVKNLVPM VATVKVLEET SVMLKAYAQK IFKILADTRA TKMQVIADAR VYEIKCRRKE

   190       200       210
VNSQLSLKEL KRKMIYMKYI LEETSVMLKQ AIRETVELK *
```

理论 pI/Mw: 9.50 / 25152.36

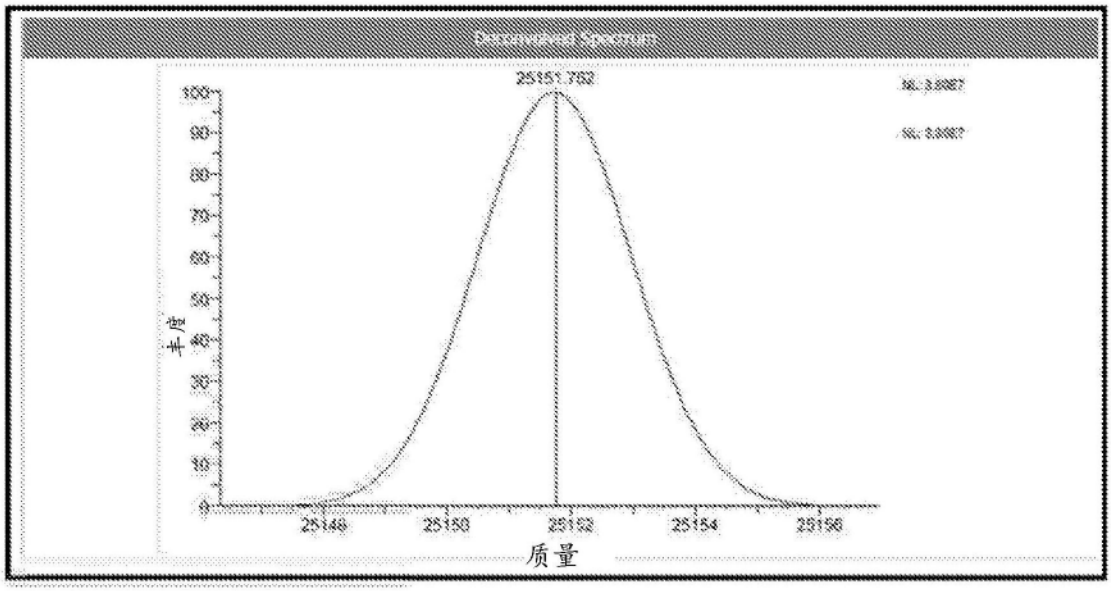


图3

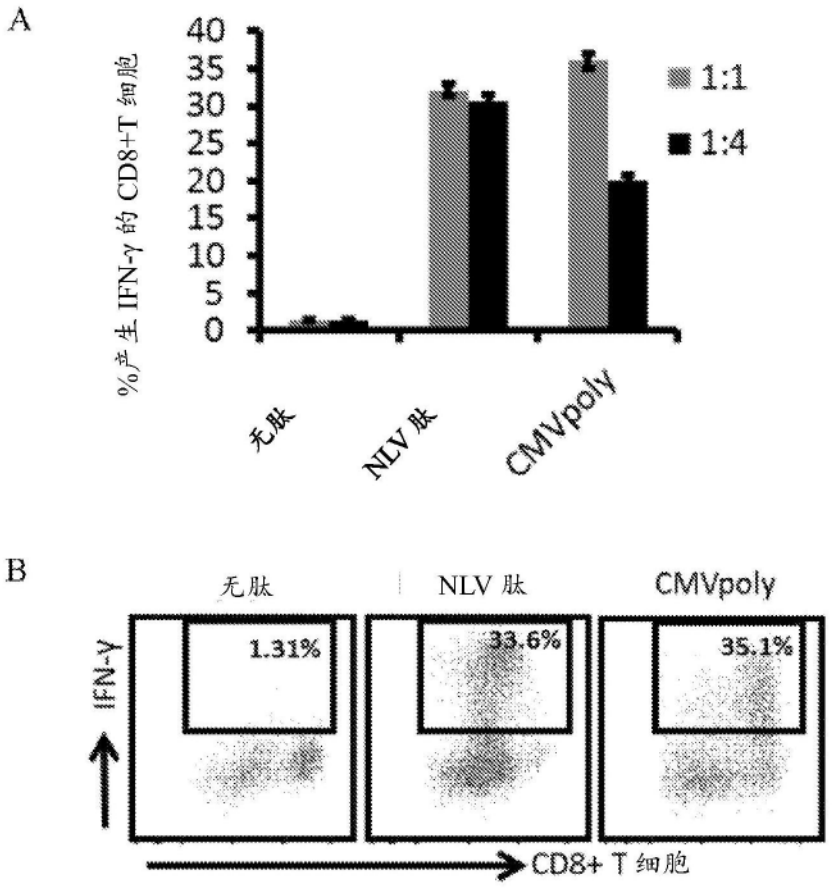

A
%产生 IFN-γ 的 CD8+T 细胞
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1:1
1:4
无肽
NLV 肽
CMVpoly
B
无肽
NLV 肽
CMVpoly
IFN-γ
1.31%
33.6%
35.1%
CD8+ T 细胞

图4

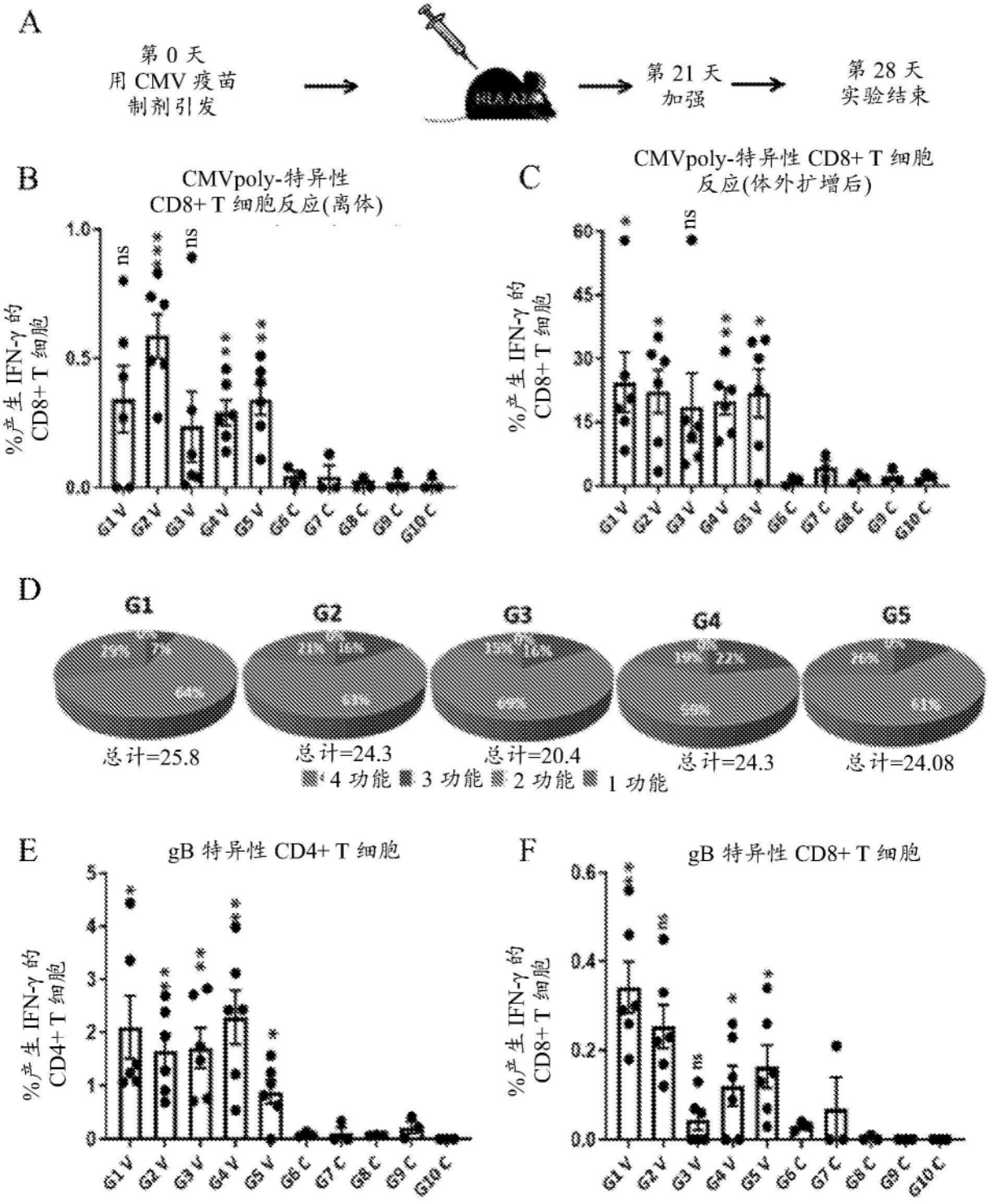

A
第 0 天
用 CMV 疫苗
制剂引发
第 21 天
加强
第 28 天
实验结束
B
CMVpoly-特异性
CD8+ T 细胞反应(离体)
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞
C
CMVpoly-特异性 CD8+ T 细胞
反应(体外扩增后)
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞
D
G1
G2
G3
G4
G5
总计=25.8
总计=24.3
总计=20.4
总计=24.3
总计=24.08
4 功能 3 功能 2 功能 1 功能
E
gB 特异性 CD4+ T 细胞
%产生 IFN-γ 的
CD4+ T 细胞
F
gB 特异性 CD8+ T 细胞
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞

图5

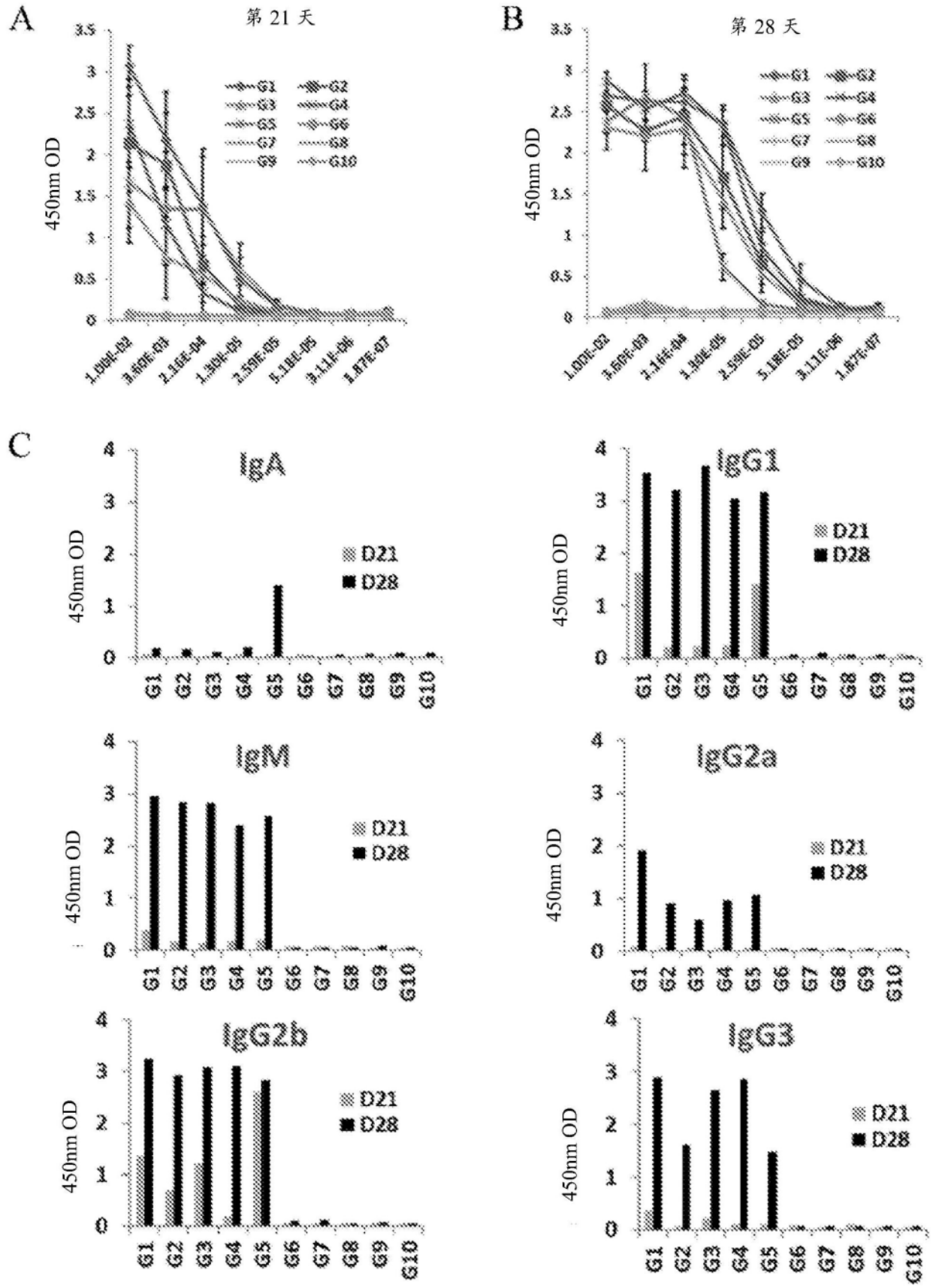

A
第 21 天
450nm OD
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
B
第 28 天
C
IgA
IgG1
IgM
IgG2a
IgG2b
IgG3
D21
D28

图6

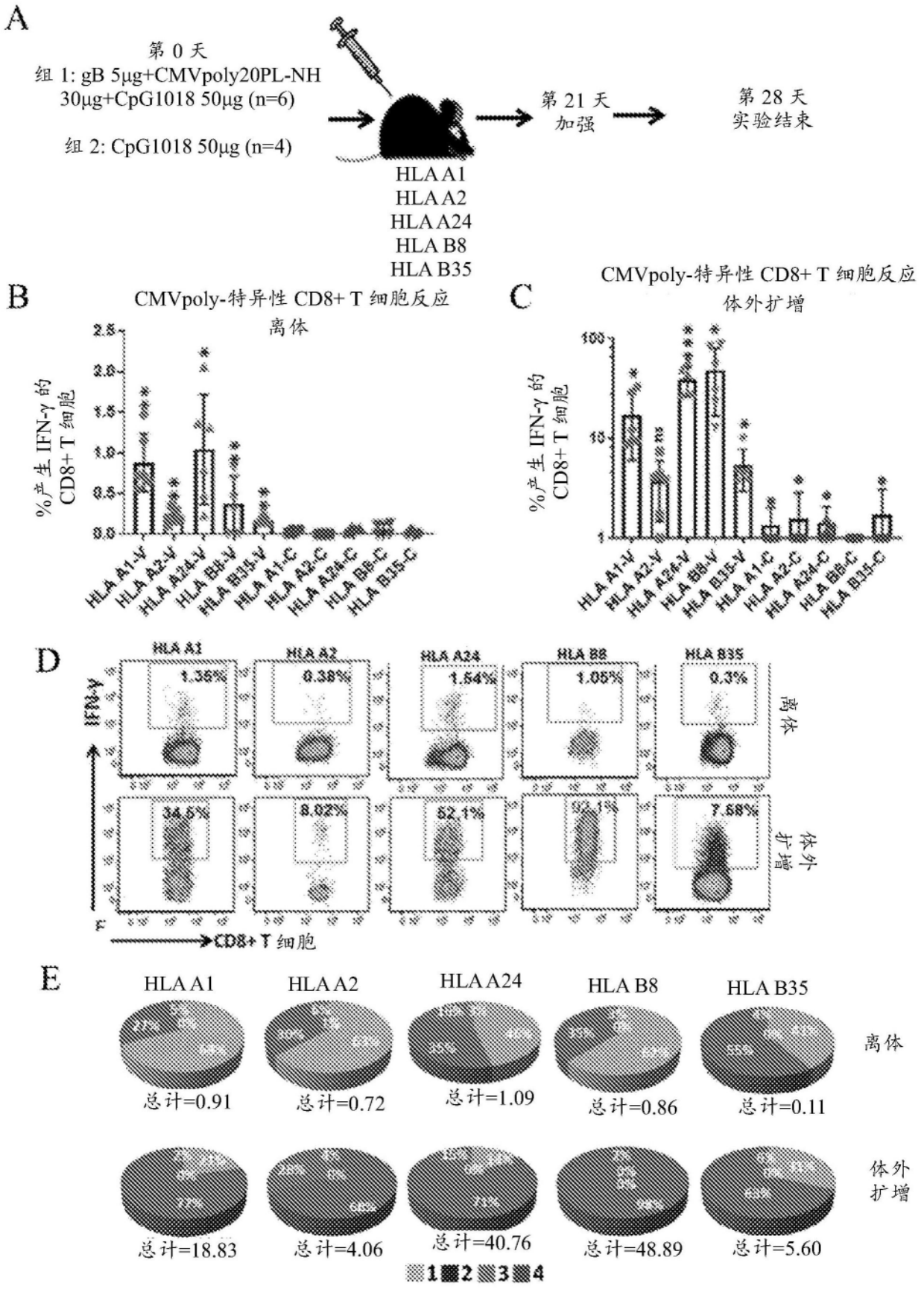

A
第 0 天
组 1: gB 5μg+CMVpoly20PL-NH 30μg+CpG1018 50μg (n=6)
组 2: CpG1018 50μg (n=4)
第 21 天 加强
第 28 天 实验结束
HLA A1
HLA A2
HLA A24
HLA B8
HLA B35
B
CMVpoly-特异性 CD8+ T 细胞反应
离体
%产生 IFN-γ 的 CD8+ T 细胞
HLA A1-V
HLA A2-V
HLA A24-V
HLA B8-V
HLA B35-V
HLA A1-C
HLA A2-C
HLA A24-C
HLA B8-C
HLA B35-C
C
CMVpoly-特异性 CD8+ T 细胞反应
体外扩增
%产生 IFN-γ 的 CD8+ T 细胞
D
HLA A1
HLA A2
HLA A24
HLA B8
HLA B35
1.36%
0.38%
1.54%
1.05%
0.3%
34.6%
8.02%
52.1%
92.1%
7.68%
离体
体外扩增
IFN-γ
CD8+ T 细胞
E
HLA A1
HLA A2
HLA A24
HLA B8
HLA B35
总计=0.91
总计=0.72
总计=1.09
总计=0.86
总计=0.11
总计=18.83
总计=4.06
总计=40.76
总计=48.89
总计=5.60
离体
体外扩增
1 2 3 4

图7

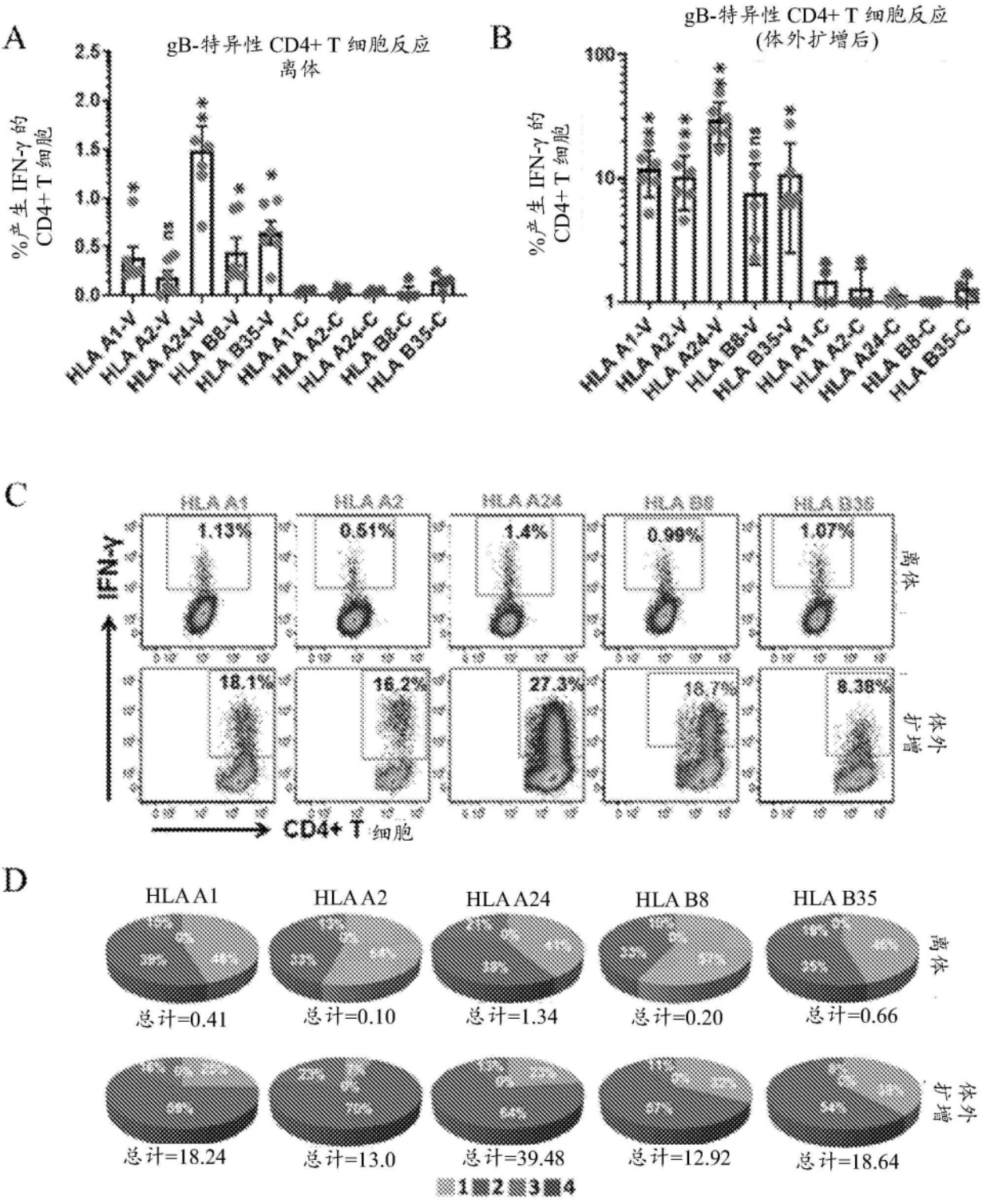

A
gB-特异性 CD4+ T 细胞反应
离体
%产生 IFN-γ 的 CD4+ T 细胞
HLA A1-V
HLA A2-V
HLA A24-V
HLA B8-V
HLA B35-V
HLA A1-C
HLA A2-C
HLA A24-C
HLA B8-C
HLA B35-C
B
gB-特异性 CD4+ T 细胞反应
(体外扩增后)
%产生 IFN-γ 的 CD4+ T 细胞
C
HLA A1
HLA A2
HLA A24
HLA B8
HLA B35
1.13%
0.51%
1.4%
0.99%
1.07%
18.1%
16.2%
27.3%
18.7%
8.38%
离体
体外扩增
IFN-γ
CD4+ T 细胞
D
HLA A1
HLA A2
HLA A24
HLA B8
HLA B35
总计=0.41
总计=0.10
总计=1.34
总计=0.20
总计=0.66
总计=18.24
总计=13.0
总计=39.48
总计=12.92
总计=18.64
1 2 3 4

图8

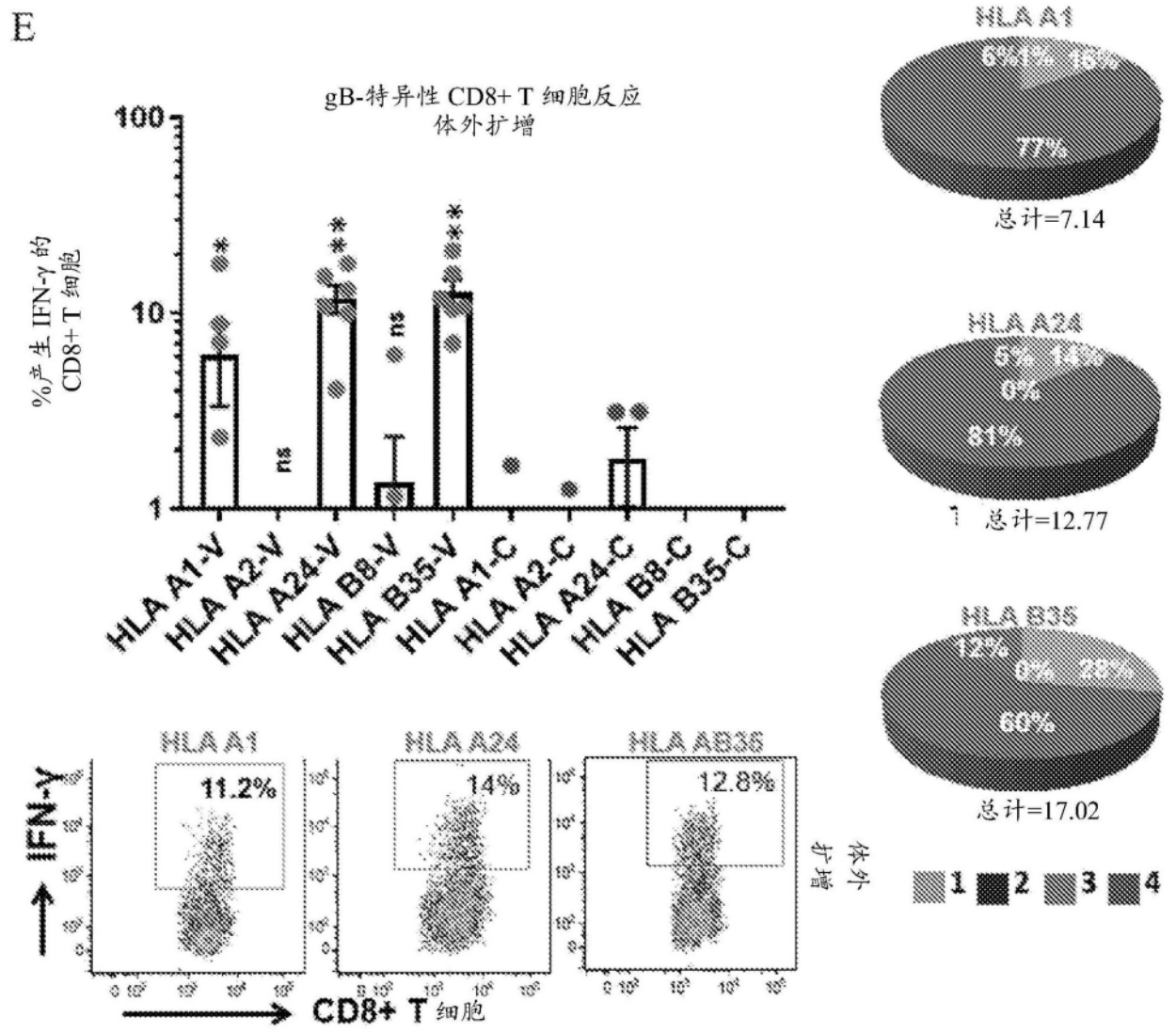

E
gB-特异性 CD8+ T 细胞反应
体外扩增
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞
100
10
1
HLA A1-V
HLA A2-V
HLA A24-V
HLA B8-V
HLA B35-V
HLA A1-C
HLA A2-C
HLA A24-C
HLA B8-C
HLA B35-C
HLA A1
6%1% 16%
77%
总计=7.14
HLA A24
6% 14%
0%
81%
总计=12.77
HLA B35
12%
0% 28%
60%
总计=17.02
1 2 3 4
HLA A1
11.2%
HLA A24
14%
HLA AB36
12.8%
IFN-γ
CD8+ T 细胞
体外扩增

图8(续)

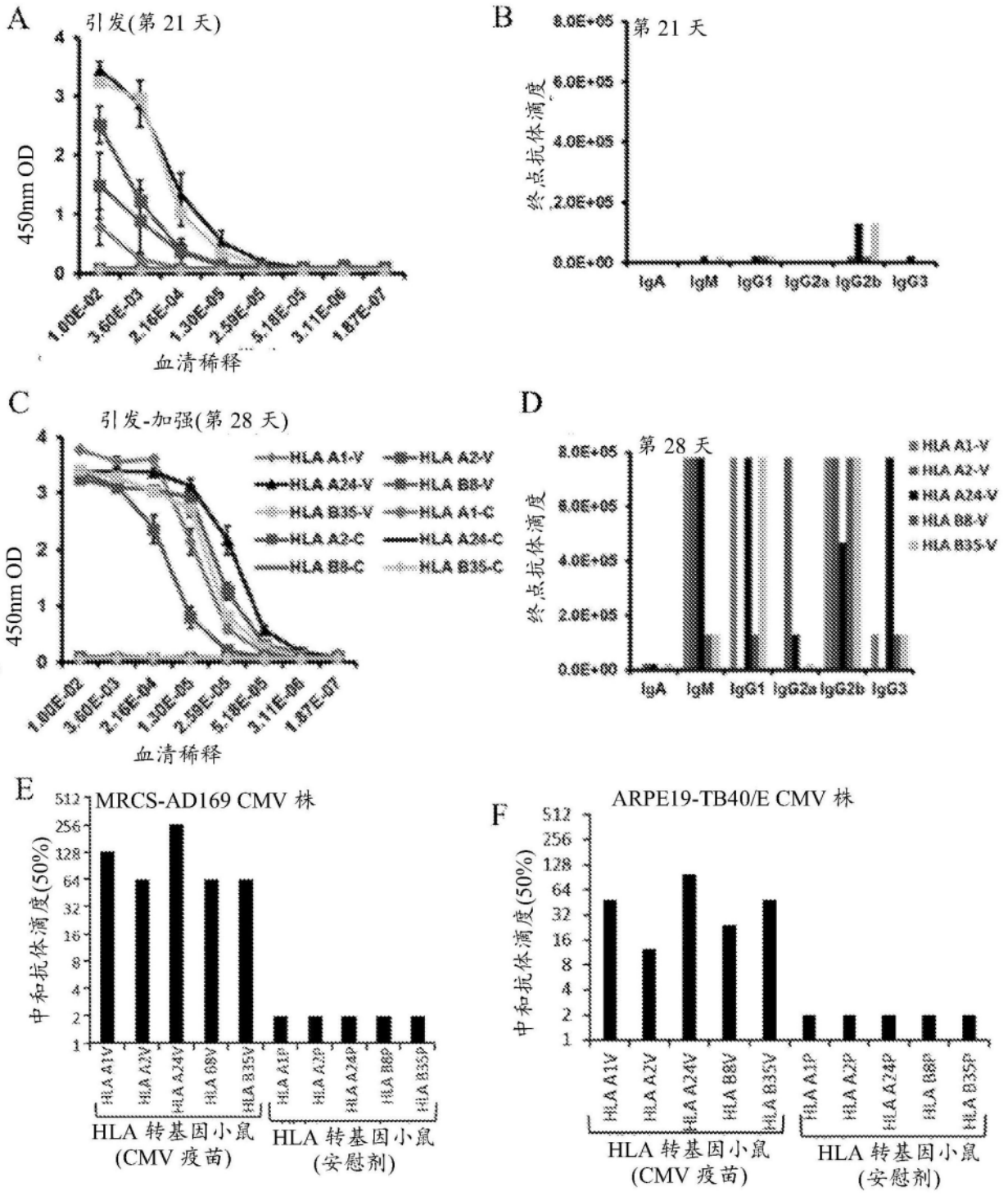

A
引发(第 21 天)
450nm OD
血清稀释
1.00E-02
3.50E-03
2.16E-04
1.30E-05
2.59E-05
5.19E-05
3.11E-06
1.87E-07
B
第 21 天
终点抗体滴度
IgA
IgM
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG3
C
引发-加强(第 28 天)
HLA A1-V
HLA A2-V
HLA A24-V
HLA B8-V
HLA B35-V
HLA A1-C
HLA A2-C
HLA A24-C
HLA B8-C
HLA B35-C
D
第 28 天
E
MRCS-AD169 CMV 株
中和抗体滴度(50%)
HLA A1V
HLA A2V
HLA A24V
HLA B8V
HLA B35V
HLA A1P
HLA A2P
HLA A24P
HLA B8P
HLA B35P
HLA 转基因小鼠
(CMV 疫苗)
HLA 转基因小鼠
(安慰剂)
F
ARPE19-TB40/E CMV 株

图9

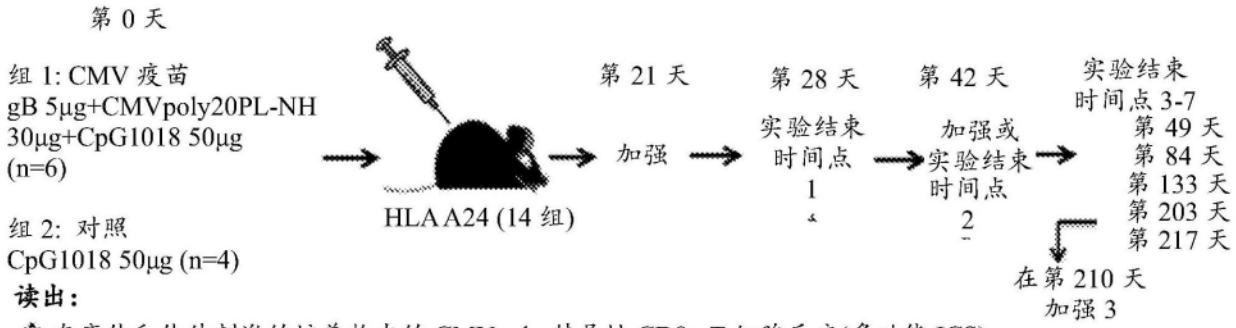

第 0 天
组 1: CMV 疫苗
gB 5μg+CMVpoly20PL-NH
30μg+CpG1018 50μg
(n=6)
组 2: 对照
CpG1018 50μg (n=4)
HLA A24 (14 组)
第 21 天
加强
第 28 天
实验结束
时间点
1
第 42 天
加强或
实验结束
时间点
2
实验结束
时间点 3-7
第 49 天
第 84 天
第 133 天
第 203 天
第 217 天
在第 210 天
加强 3
读出:
❖ 在离体和体外刺激的培养物中的 CMVpoly 特异性 CD8+ T 细胞反应(多功能 ICS)
❖ gB 特异性 CD4+ T 细胞和抗体反应(ELISA, ELISPOT 和中和抗体反应)

图10

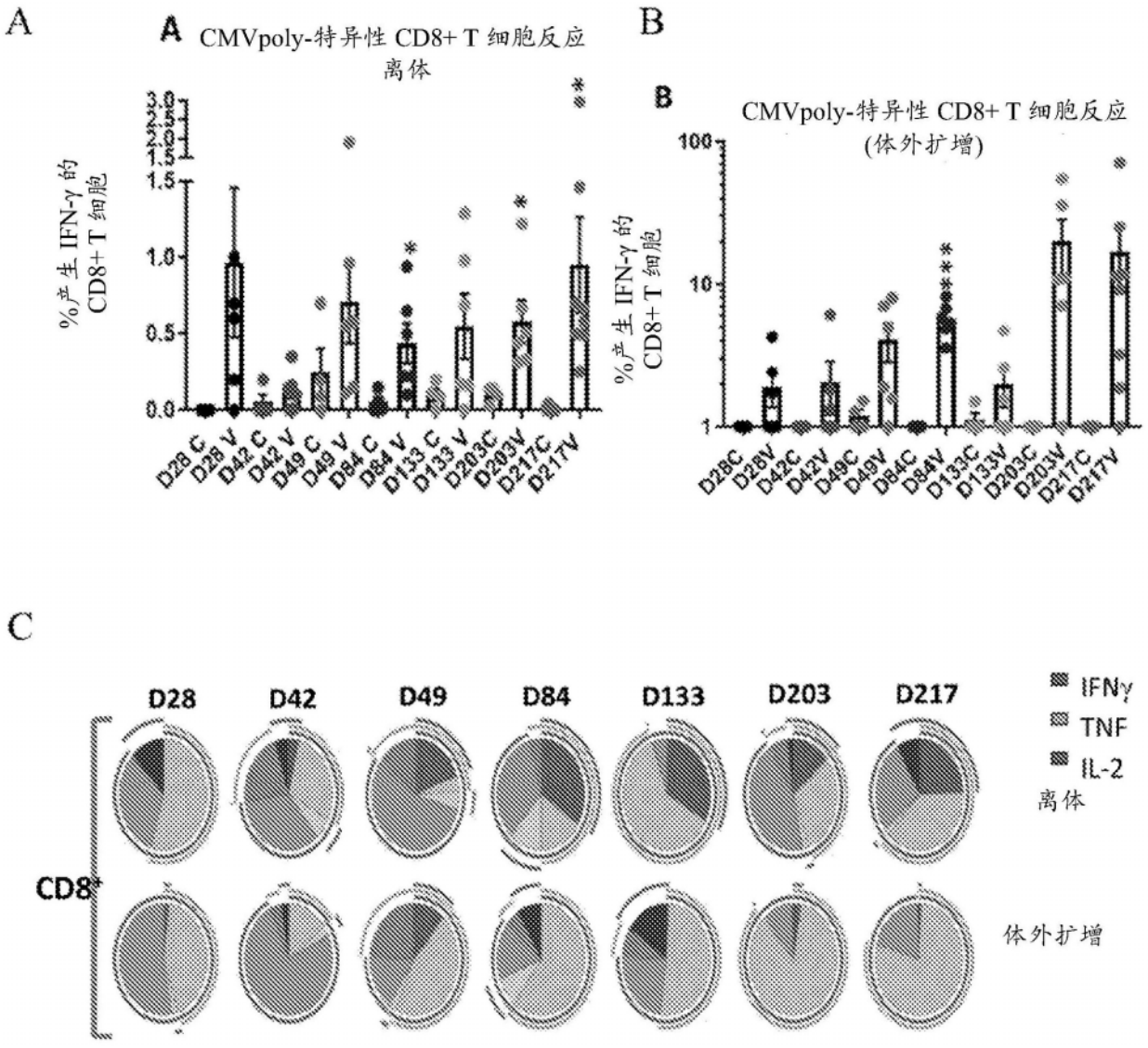

A
A CMVpoly-特异性 CD8+ T 细胞反应
离体
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞
D28 C
D28 V
D42 C
D42 V
D49 C
D49 V
D84 C
D84 V
D133 C
D133 V
D203C
D203V
D217C
D217V
B
B CMVpoly-特异性 CD8+ T 细胞反应
(体外扩增)
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞
C
D28
D42
D49
D84
D133
D203
D217
IFNγ
TNF
IL-2
CD8+
离体
体外扩增

图11

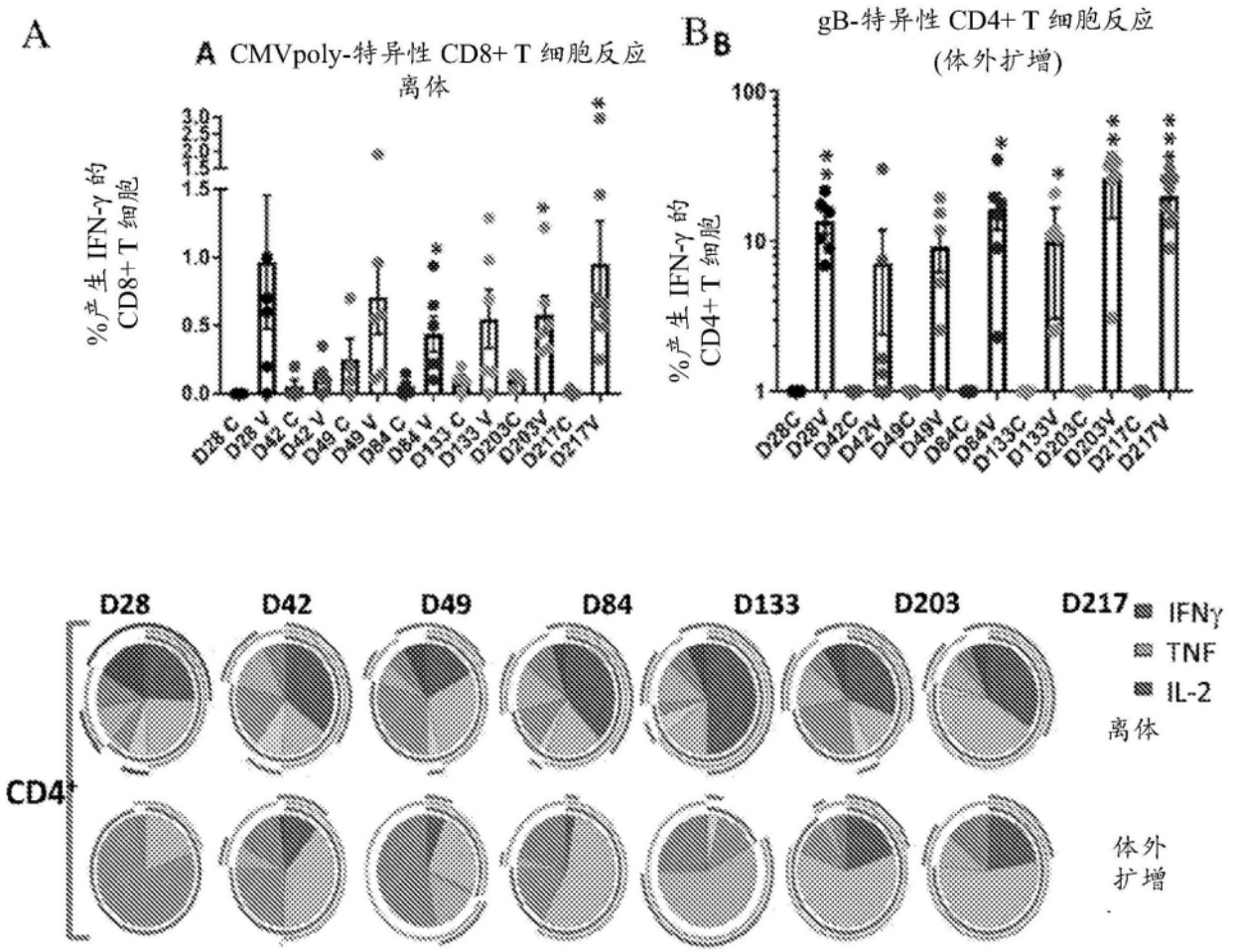

A
A CMVpoly-特异性 CD8+ T 细胞反应
离体
%产生 IFN-γ 的
CD8+ T 细胞
D28 C
D28 V
D42 C
D42 V
D49 C
D49 V
D84 C
D84 V
D133 C
D133 V
D203C
D203V
D217C
D217V
B
gB-特异性 CD4+ T 细胞反应
(体外扩增)
%产生 IFN-γ 的
CD4+ T 细胞
D28C
D28V
D42C
D42V
D49C
D49V
D84C
D84V
D133C
D133V
D203C
D203V
D217C
D217V
D28
D42
D49
D84
D133
D203
D217
IFNγ
TNF
IL-2
CD4+
离体
体外
扩增

图12

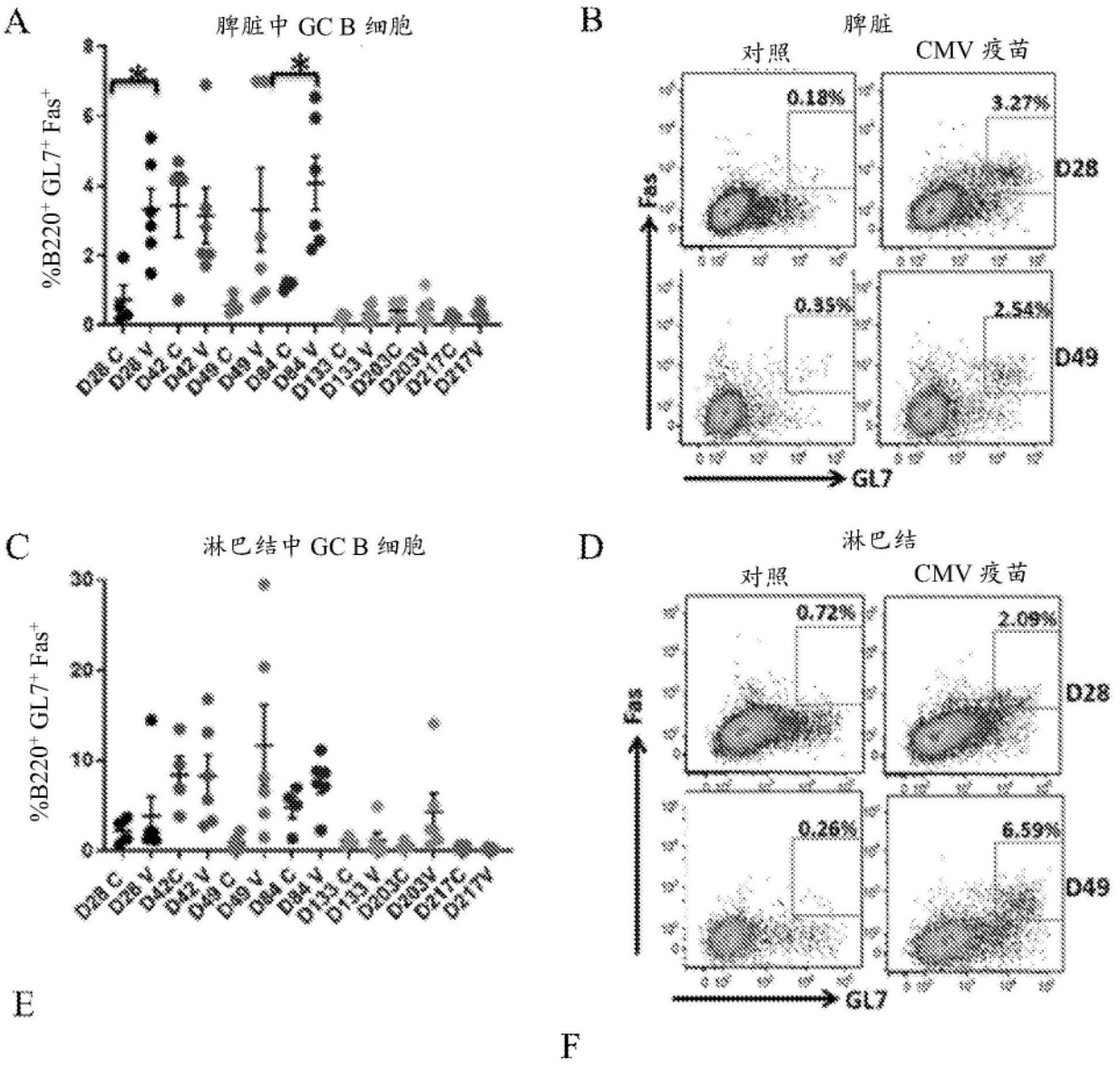

A
脾脏中 GC B 细胞
%B220+ GL7+ Fas+
D28 C
D28 V
D42 C
D42 V
D49 C
D49 V
D84 C
D84 V
D133 C
D133 V
D203C
D203V
D217C
D217V
B
脾脏
对照
CMV 疫苗
0.18%
3.27%
0.35%
2.54%
D28
D49
Fas
GL7
C
淋巴结中 GC B 细胞
%B220+ GL7+ Fas+
D
淋巴结
对照
CMV 疫苗
0.72%
2.09%
0.26%
6.59%
D28
D49
Fas
GL7
E
F

图13

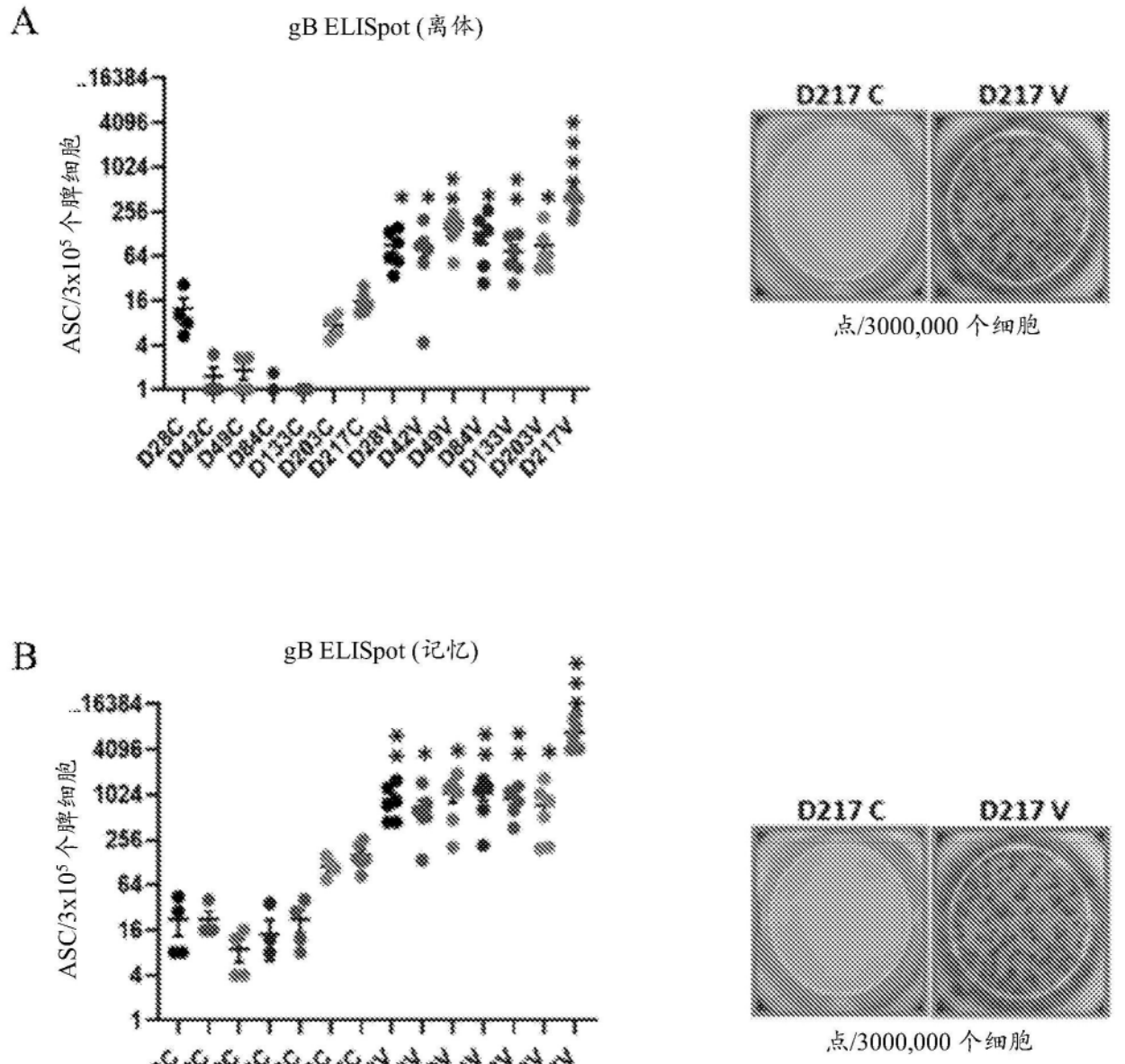

A
gB ELISpot (离体)
ASC/3x10^5 个脾细胞
16384
4096
1024
256
64
16
4
1
D28C
D42C
D49C
D84C
D133C
D203C
D217C
D28V
D42V
D49V
D84V
D133V
D203V
D217V
D217 C
D217 V
点/3000,000 个细胞
B
gB ELISpot (记忆)
ASC/3x10^5 个脾细胞
16384
4096
1024
256
64
16
4
1
D28C
D42C
D49C
D84C
D133C
D203C
D217C
D28V
D42V
D49V
D84V
D133V
D203V
D217V
D217 C
D217 V
点/3000,000 个细胞

图14

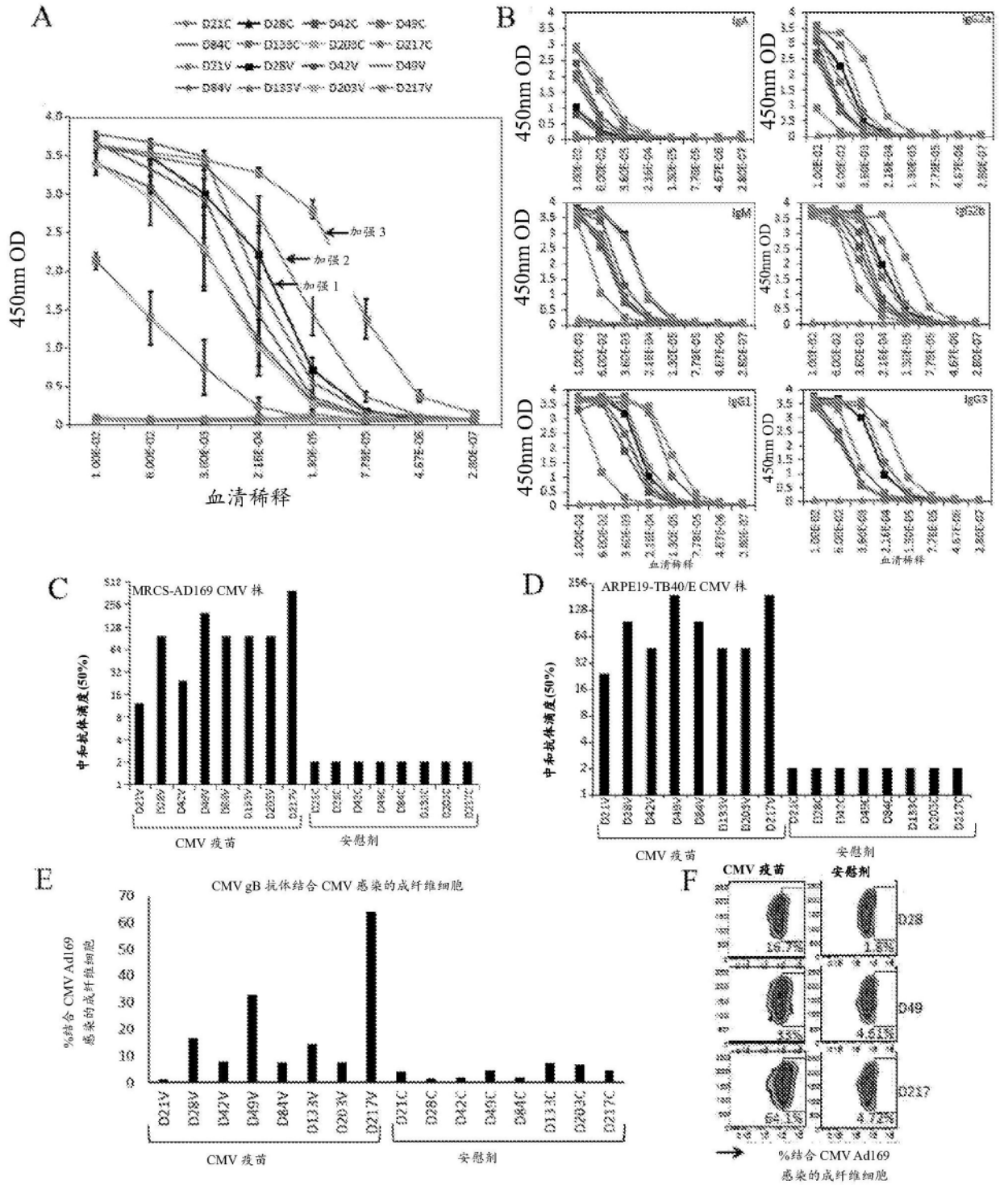
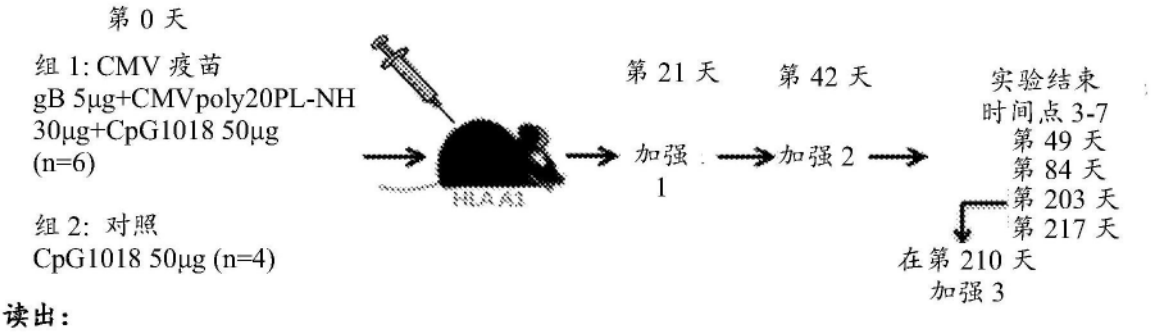

A
D21C D28C D42C D49C
D84C D133C D203C D217C
D21V D28V D42V D49V
D84V D133V D203V D217V
450nm OD
加强 3
加强 2
加强 1
血清稀释
B
IgA
IgG2a
IgM
IgG2b
IgG1
IgG3
450nm OD
血清稀释
C
MRCS-AD169 CMV 株
中和抗体滴度(50%)
CMV 疫苗
安慰剂
D
ARPE19-TB40/E CMV 株
中和抗体滴度(50%)
CMV 疫苗
安慰剂
E
CMV gB 抗体结合 CMV 感染的成纤维细胞
%结合 CMV Ad169 感染的成纤维细胞
CMV 疫苗
安慰剂
F
CMV 疫苗
安慰剂
D28
D49
D217
%结合 CMV Ad169 感染的成纤维细胞

图15



读出：

- ❖ 在离体和体外刺激的培养物中的 CMVpoly 特异性 CD8+ T 细胞反应(多功能 ICS)
- ❖ gB 特异性 CD4+ T 细胞和抗体反应(ELISA, ELISPOT 和中和抗体反应)

图16

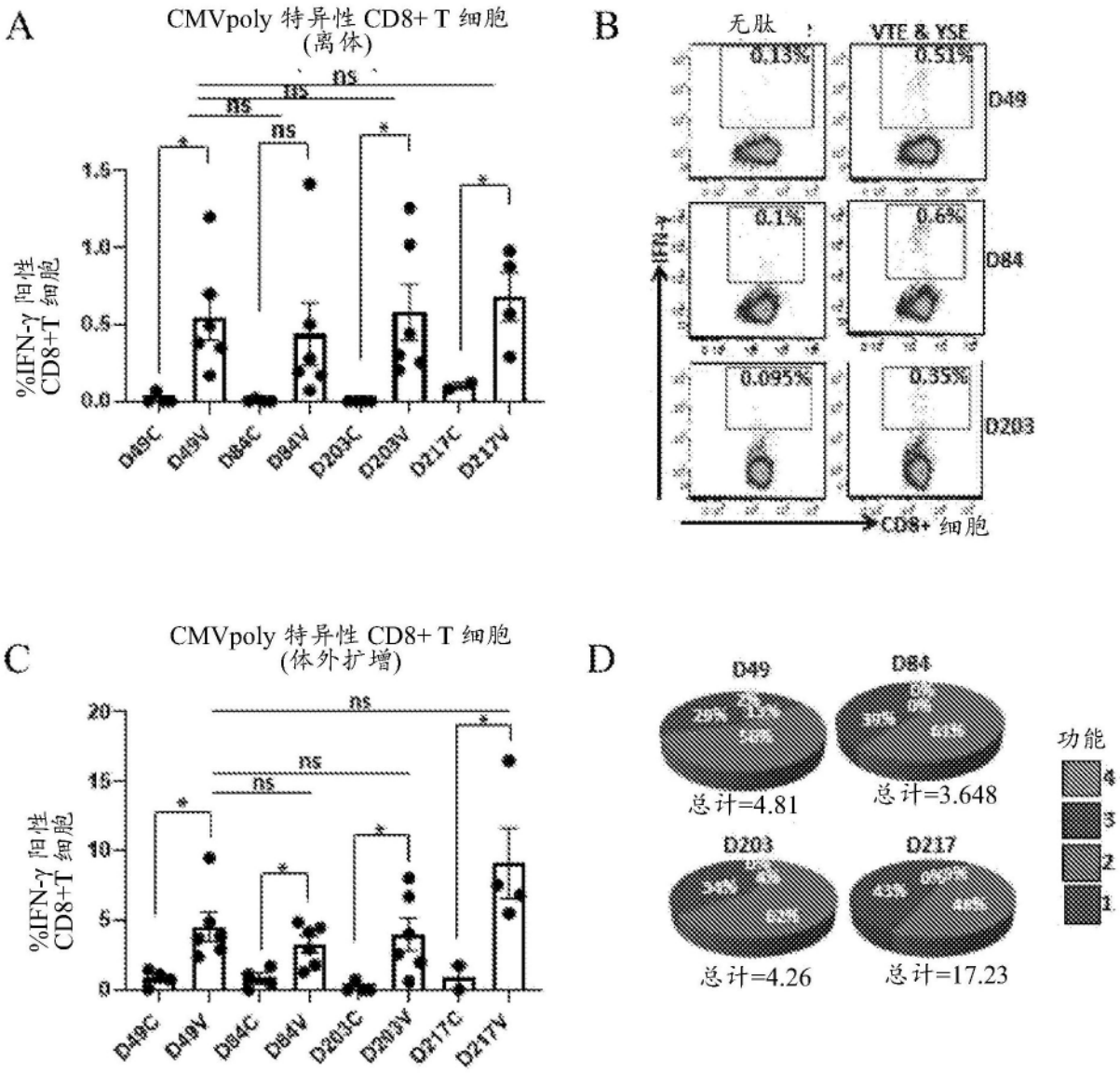

A
CMVpoly 特异性 CD8+ T 细胞
(离体)
%IFN-γ 阳性
CD8+T 细胞
ns
*
D49C
D49V
D84C
D84V
D203C
D203V
D217C
D217V
B
无肽
VTE & YSE
0.13%
0.51%
D49
0.1%
0.6%
D84
0.095%
0.35%
D203
IFN-γ+
CD8+ 细胞
C
CMVpoly 特异性 CD8+ T 细胞
(体外扩增)
%IFN-γ 阳性
CD8+T 细胞
D
D49
D84
D203
D217
总计=4.81
总计=3.648
总计=4.26
总计=17.23
功能
4
3
2
1

图17

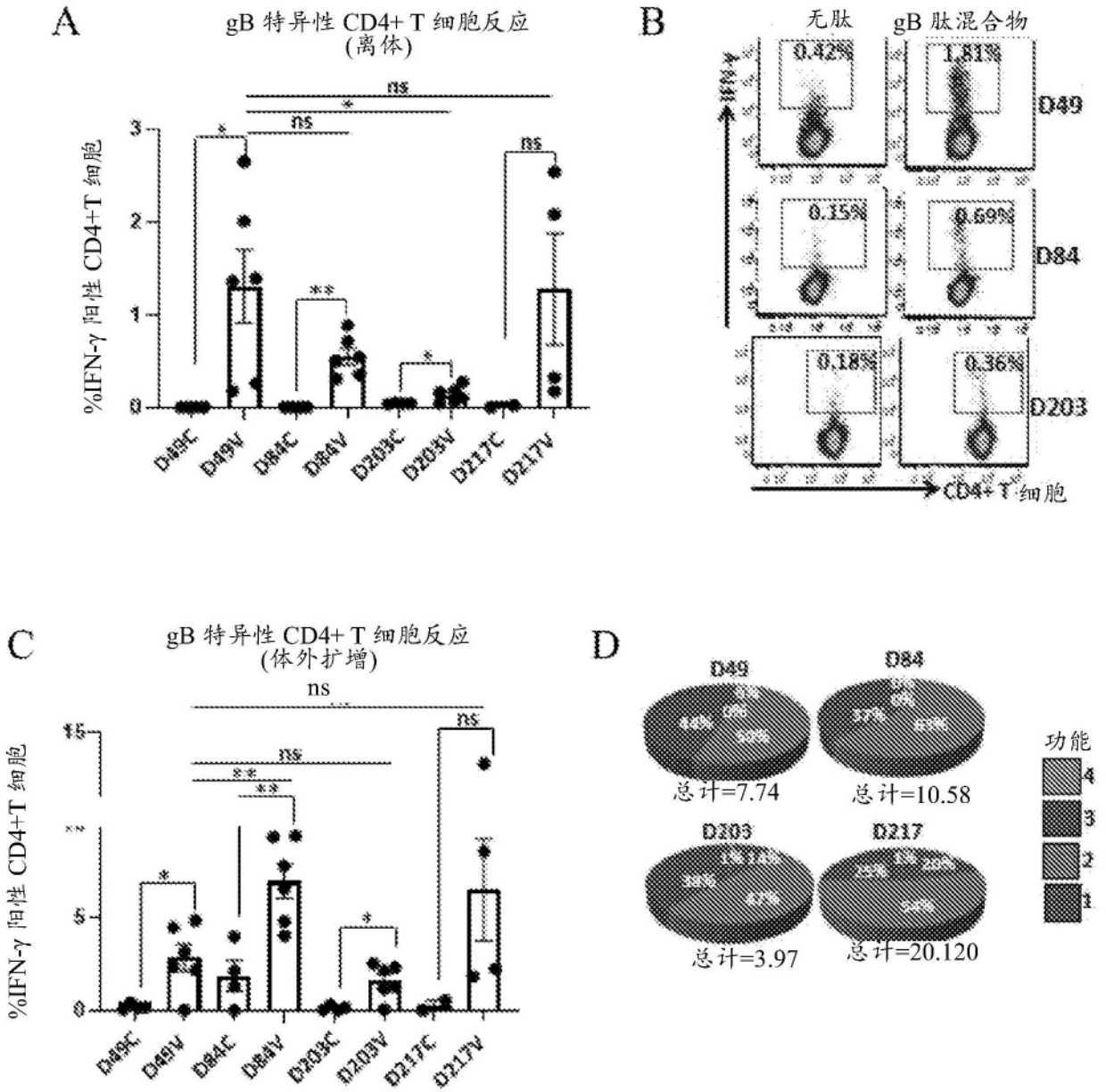

A
gB 特异性 CD4+ T 细胞反应
(离体)
%IFN-γ 阳性 CD4+T 细胞
ns
*
**
D49C
D49V
D84C
D84V
D203C
D203V
D217C
D217V
B
无肽
gB 肽混合物
0.42%
1.81%
0.15%
0.69%
0.18%
0.36%
D49
D84
D203
CD4+ T 细胞
C
gB 特异性 CD4+ T 细胞反应
(体外扩增)
%IFN-γ 阳性 CD4+T 细胞
D
D49
D84
D203
D217
总计=7.74
总计=10.58
总计=3.97
总计=20.120
功能
4
3
2
1

图18

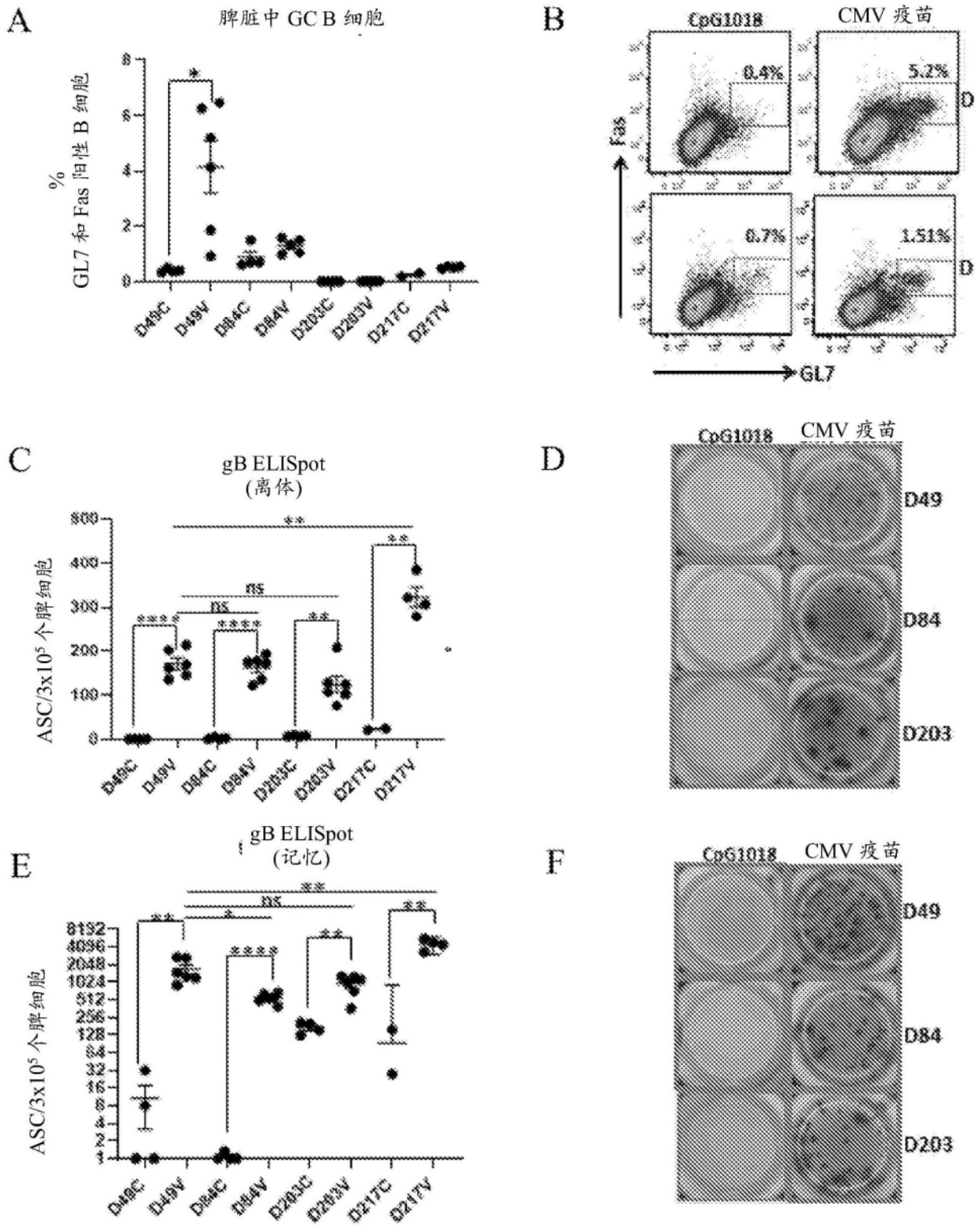

A
脾脏中 GC B 细胞
% GL7 和 Fas 阳性 B 细胞
D49C
D49V
D84C
D84V
D203C
D203V
D217C
D217V
B
CpG1018
CMV 疫苗
0.4%
5.2%
0.7%
1.51%
D
D
Fas
GL7
C
gB ELISpot
(离体)
ASC/3x10⁵ 个脾细胞
ns
D
CpG1018
CMV 疫苗
D49
D84
D203
E
gB ELISpot
(记忆)
ASC/3x10⁵ 个脾细胞
F
CpG1018
CMV 疫苗
D49
D84
D203

图19

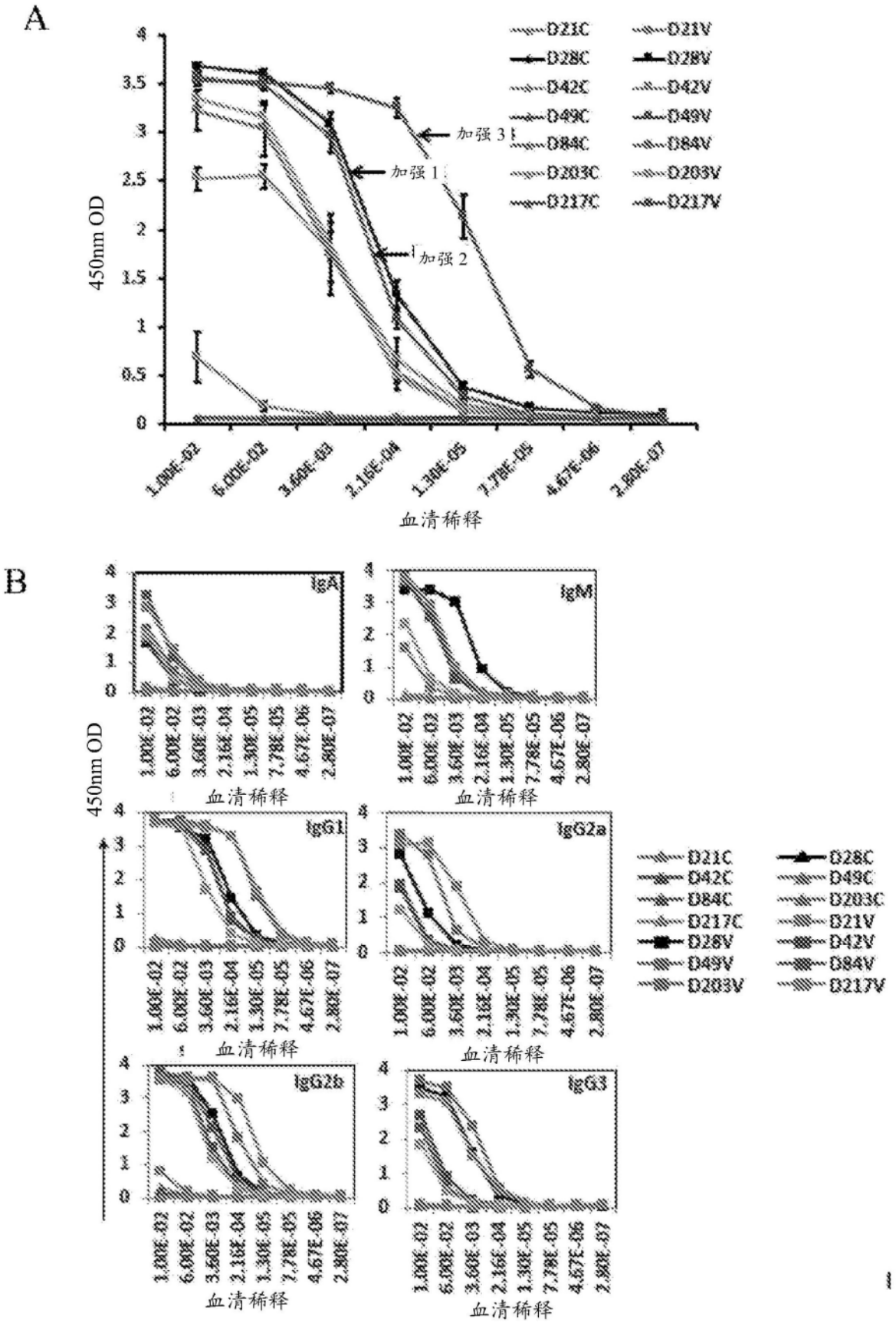

A
D21C
D28C
D42C
D49C
D84C
D203C
D217C
D21V
D28V
D42V
D49V
D84V
D203V
D217V
加强 3
加强 1
加强 2
450nm OD
血清稀释
B
IgA
IgM
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG3
450nm OD
血清稀释

图20