



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117425668 A

(43) 申请公布日 2024.01.19

(21) 申请号 202280022066.3

尼可拉·克劳德·保罗·萨克斯

(22) 申请日 2022.03.15

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

公司 31300

2021-042666 2021.03.16 JP

专利代理师 汤国华

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2023.09.15

C07K 14/165 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 15/50 (2006.01)

PCT/JP2022/011707 2022.03.15

C12N 15/13 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 16/10 (2006.01)

W02022/196699 JA 2022.09.22

A61P 31/14 (2006.01)

(71) 申请人 国立大学法人大阪大学

A61P 11/00 (2006.01)

地址 日本国大阪府吹田市山田丘1番1号

A61K 39/215 (2006.01)

申请人 弘泰生物科技股份有限公司

A61K 35/26 (2006.01)

(72) 发明人 山崎晶 陆修远 细野裕贵

权利要求书4页 说明书46页

石塚茂宜 山下和男

序列表15页 附图9页

(54) 发明名称

SARS-CoV-2病毒特异性滤泡辅助性T细胞

Tfh

(57) 摘要

本发明提供一种SARS-CoV-2病毒特异性滤泡辅助性T细胞。本发明基于发现的不同患者共有的刺突(S)蛋白特异性公共TfhTCR (Public TfhTCR),首次确定SARS-CoV-2病毒特异性公共TCR及其MHC以及抗原性表位,由此促进高效的免疫应答,特别是产生中和抗体的B细胞的应答。例如,本发明提供一种含有用于诱导滤泡性T细胞的SARS-CoV-2病毒特异性表位的组合物。

1. 一种含有用于诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的组合物。

2. 根据权利要求1所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

4. 一种含有用于诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的组合物。

5. 根据权利要求1~4任意一项所述的组合物,所述组合物优先诱导滤泡性T细胞。

6. 根据权利要求1~5任意一项所述的组合物,所述组合物诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。

7. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白序列或其部分。

8. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X_2 为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X_5 为T,

X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T,

X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G,

X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G,

X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

9. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L或G,

X_2 为A、V、I、L或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y或F,

X_5 为T,

X_6 为S或T,

X_7 为A、L、I、V或G,

X_8 为L、A、I、V或G,

X_9 为L、A、I、V或G。

10. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

11. 根据权利要求1~6任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含

有20个氨基酸。

13. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

14. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的序列,至少为9个氨基酸长度。

15. 根据权利要求1~7任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、38、39、40、41、42或43所示的序列构成。

16. 根据权利要求1~15任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

17. 根据权利要求1~16任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

18. 一种用于向HLA提呈SARS-CoV-2蛋白或其部分的多肽。

19. 根据权利要求18所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

20. 根据权利要求18或19所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X_2 为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X_5 为T,

X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T,

X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G,

X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G,

X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

21. 根据权利要求18或19所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L或G,

X_2 为A、V、I、L或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y或F,

X_5 为T,

X_6 为S或T,

X_7 为A、L、I、V或G,

X_8 为L、A、I、V或G,

X₉为L、A、I、V或G。

22. 根据权利要求18~21任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

23. 根据权利要求18~22任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

24. 根据权利要求18~23任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

25. 根据权利要求18~24任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

26. 根据权利要求18~25任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。

27. 根据权利要求18~25任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

28. 一种特异地结合于与SARS-CoV-2蛋白或其部分相互作用的TCR的抗体。

29. 根据权利要求28所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

30. 根据权利要求28或29所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X₁为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X₂为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X₃为Q,

X₄为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X₅为T,

X₆为S、Y、G、N、Q、C、F或T,

X₇为A、L、I、V、P、W、F、M或G,

X₈为L、A、I、V、P、W、F、M或G,

X₉为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

31. 根据权利要求28或29所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X₁为I、V、A、L或G,

X₂为A、V、I、L或G,

X₃为Q,

X₄为Y或F,

X₅为T,

X₆为S或T,

X₇为A、L、I、V或G,

X₈为L、A、I、V或G,

X₉为L、A、I、V或G。

32. 根据权利要求28~31任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

33. 根据权利要求28~32任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

34. 根据权利要求28~33任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

35. 根据权利要求28~34任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

36. 根据权利要求28~35任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。

37. 根据权利要求28~35任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

38. 一种含有SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的组合物,其用于强化针对SARS-CoV-2的免疫获得。

39. 根据权利要求38所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

40. 根据权利要求38或39所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

41. 根据权利要求38~40任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

42. 根据权利要求38~41任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

SARS-CoV-2病毒特异性滤泡辅助性T细胞Tfh

技术领域

[0001] 本发明涉及一种SARS-CoV-2病毒特异性滤泡辅助性T细胞(Tfh)。

背景技术

[0002] 对于针对作为COVID-19大流行起因的SARS-CoV-2病毒的后天性免疫应答仍存在很多的未知点。为此,理解对于SARS-CoV-2感染的后天性免疫应答将成为预测长期免疫、为疫苗设计提供信息的关键。

发明内容

发明概要

解决问题的技术手段

[0003] 本发明人在不同患者中发现了基于刺突(S)蛋白的共同氨基酸序列,并发现该序列与特异的公共TfhTCR(Public TfhTCR)相关。本发明人通过将TCR α 和 β 链进行重组,证实了由经常发现的等位基因DRB1*15:01/15:02提呈的S₈₆₄₋₈₈₂肽是T细胞表位。本发明人发现该TCR克隆型在世界上的人群之中被广泛检出,在感染SARS-CoV-2时,在各个个体中的检出频率大幅增加。

[0004] 因此,本发明提供以下内容。

[0005] [1]一种含有用于诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的组合物。

[2]根据上述任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[3]根据上述任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[4]一种含有用于诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的组合物。

[5]根据上述任意一项所述的组合物,所述组合物优先诱导滤泡性T细胞。

[6]根据上述任意一项所述的组合物,所述组合物诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。

[7]根据上述任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白序列或其部分。

[8]根据上述任意一项所述的组合物,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X₁为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X₂为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X₃为Q,

X₄为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X₅为T,

X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T，
 X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G，
 X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G，
 X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[9]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列，其中，

X_1 为I、V、A、L或G，
 X_2 为A、V、I、L或G，
 X_3 为Q，
 X_4 为Y或F，
 X_5 为T，
 X_6 为S或T，
 X_7 为A、L、I、V或G，
 X_8 为L、A、I、V或G，
 X_9 为L、A、I、V或G。

[10]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[11]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

[12]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

[13]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[14]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的序列，至少为9个氨基酸长度。

[15]根据上述任意一项所述的组合物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的序列构成。

[16]根据上述任意一项所述的组合物，所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[17]根据上述任意一项所述的组合物，所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[18]一种用于向HLA提呈SARS-CoV-2蛋白或其部分的多肽。

[19]根据上述任意一项所述的多肽，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

[20]根据上述任意一项所述的多肽，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列，其中，

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X_2 为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X_5 为T,

X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T,

X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G,

X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G,

X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[21]根据上述任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L或G,

X_2 为A、V、I、L或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y或F,

X_5 为T,

X_6 为S或T,

X_7 为A、L、I、V或G,

X_8 为L、A、I、V或G,

X_9 为L、A、I、V或G。

[22]根据上述任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[23]根据上述任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

[24]根据上述任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

[25]根据[18]~[24]任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[26]根据上述任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。

[27]根据上述任意一项所述的多肽,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

[28]一种特异地结合于与SARS-CoV-2蛋白或其部分相互作用的TCR的抗体。

[29]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

[30]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X₂为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X₃为Q,

X₄为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X₅为T,

X₆为S、Y、G、N、Q、C、F或T,

X₇为A、L、I、V、P、W、F、M或G,

X₈为L、A、I、V、P、W、F、M或G,

X₉为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[31]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X₁为I、V、A、L或G,

X₂为A、V、I、L或G,

X₃为Q,

X₄为Y或F,

X₅为T,

X₆为S或T,

X₇为A、L、I、V或G,

X₈为L、A、I、V或G,

X₉为L、A、I、V或G。

[32]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[33]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

[34]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

[35]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[36]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。

[37]根据上述任意一项所述的抗体,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

[38]一种含有SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的组合物,其用于强化针对SARS-CoV-2的免疫获得。

[39]根据上述任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[40]根据上述任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[41]根据上述任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[42]根据上述任意一项所述的组合物,所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

本发明进一步提供以下要项。

[A1]一种诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的方法,其含有对受试者给药SARS-CoV-2蛋白或其部分,或者其功能性等效物的工序。

[A2]根据上述任意一项所述的方法,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[A3]根据上述任意一项所述的方法,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[A4]一种诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的方法,其含有对受试者给药SARS-CoV-2蛋白或其部分,或者其功能性等效物的工序。

[A5]根据上述任意一项所述的方法,其特征在于,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分,或者其功能性等效物优先诱导滤泡性T细胞。

[A6]根据上述任意一项所述的方法,其特征在于,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分,或者其功能性等效物诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。

[A7]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

[A8]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X_2 为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y、G、S、T、N、Q、C或F,

X_5 为T,

X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T,

X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G,

X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G,

X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[A9]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L或G,

X_2 为A、V、I、L或G,

X_3 为Q,

X_4 为Y或F,

X_5 为T,

X_6 为S或T,

X_7 为A、L、I、V或G,

X_8 为L、A、I、V或G,

X_9 为L、A、I、V或G。

[A10]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[A11]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

[A12]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

[A13]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[A14]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。

[A15]根据上述任意一项所述的方法,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

[A16]根据上述任意一项所述的方法,所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[A17]根据上述任意一项所述的方法,所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[A18]SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物在制造诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的药品中的应用。

[A19]根据上述任意一项所述的应用,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[A20]根据上述任意一项所述的应用,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[A21]SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物在制造诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的药品中的应用。

[A22]根据上述任意一项所述的应用,其特征在於,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分,或者其功能性等效物优先诱导滤泡性T细胞。

[A23]根据上述任意一项所述的应用,其特征在於,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分,或者其功能性等效物诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。

[A24]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

[A25]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G,

X_2 为A、V、I、L、P、W、F、M或G,

X_3 为Q,
 X_4 为Y、G、S、T、N、Q、C或F,
 X_5 为T,
 X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T,
 X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G,
 X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G,
 X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[A26]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列,其中,

X_1 为I、V、A、L或G,
 X_2 为A、V、I、L或G,
 X_3 为Q,
 X_4 为Y或F,
 X_5 为T,
 X_6 为S或T,
 X_7 为A、L、I、V或G,
 X_8 为L、A、I、V或G,
 X_9 为L、A、I、V或G。

[A27]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[A28]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

[A29]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

[A30]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[A31]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。

[A32]根据上述任意一项所述的应用,所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

[A33]根据上述任意一项所述的应用,所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[A34]根据上述任意一项所述的应用,所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[A35]一种用于诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物。

[A36]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[A37]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[A38]一种用于诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物。

[A39]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物优先诱导滤泡性T细胞。

[A40]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物诱导HLA型特异性滤泡性T细胞。

[A41]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有SARS-CoV-2表达的刺突蛋白的序列或其部分。

[A42]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列，其中，

X_1 为I、V、A、L、P、W、F、M或G，

X_2 为A、V、I、L、P、W、F、M或G，

X_3 为Q，

X_4 为Y、G、S、T、N、Q、C或F，

X_5 为T，

X_6 为S、Y、G、N、Q、C、F或T，

X_7 为A、L、I、V、P、W、F、M或G，

X_8 为L、A、I、V、P、W、F、M或G，

X_9 为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[A43]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号5的序列，其中，

X_1 为I、V、A、L或G，

X_2 为A、V、I、L或G，

X_3 为Q，

X_4 为Y或F，

X_5 为T，

X_6 为S或T，

X_7 为A、L、I、V或G，

X_8 为L、A、I、V或G，

X_9 为L、A、I、V或G。

[A44]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[A45]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号1所示的氨基酸序列。

[A46]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分最多含有20个氨基酸。

[A47]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[A48]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列，至少为9个氨基酸长度。

[A49]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述SARS-CoV-2蛋白或其部分由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

[A50]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[A51]根据上述任意一项所述的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物，所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[A52]一种强化针对SARS-CoV-2的免疫获得的方法，其含有给药SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的工序。

[A53]根据上述任意一项所述的方法，所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[A54]根据上述任意一项所述的方法，所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[A55]根据上述任意一项所述的方法，所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[A56]根据上述任意一项所述的方法，所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[A57]SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞在制造强化针对SARS-CoV-2的免疫获得的药品中的应用。

[A58]根据上述任意一项所述的应用，所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[A59]根据上述任意一项所述的应用，所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[A60]根据上述任意一项所述的应用，所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[A61]根据上述任意一项所述的应用，所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序

列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[A62]一种用于强化针对SARS-CoV-2的免疫获得的SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞。

[A63]根据上述任意一项所述的滤泡性T细胞,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性。

[A64]根据上述任意一项所述的滤泡性T细胞,所述滤泡性T细胞对SARS-CoV-2具有特异性。

[A65]根据上述任意一项所述的滤泡性T细胞,所述滤泡性T细胞为公共滤泡性T细胞。

[A66]根据上述任意一项所述的滤泡性T细胞,所述滤泡性T细胞具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。

[0006] 在本发明中,可预期上述1或多个特征除了明确指示的组合之外,还可以进一步地被组合提供。本领域技术人员根据需要阅读并理解以下的详细说明,可认识到本发明的进一步的实施方式和有利点。

发明的效果

[0007] 本发明基于在不同患者体内发现了对共有刺突(S)蛋白具有特异性的公共TfhTCR(Public TfhTCR),提供一种含有用于诱导滤泡性T细胞的SARS-CoV-2病毒特异性表位的组合物及特异性滤泡辅助性T细胞(Tfh)。

附图说明

[0008] [图1]图1表示已鉴定的、自于COVID-19患者的Tfh细胞中表达的TCR的图。来自于患者的PBMC的18661个T细胞的UMAP可视图。各点对应单细胞,使用不同颜色区分细胞种类。使用标准的Tfh细胞标志CD200、ICOS、CD40LG、PDCD1、CXCL13以及CXCR5,将UMAP可视图中表示的Tfh簇进行标记。

[图2]图2表示克隆1和克隆2的TCR CDR3序列的对比分析图。

[图3-1]图3表示从患者的Tfh细胞中克隆的TCR对来自于SARS-CoV-2蛋白的肽具有反应性的图。表达克隆型1/2(分别为克隆1以及克隆2)TCR的T细胞杂交瘤,在来自于对应的供体(donor)的抗原提呈细胞(APC)的存在下(A)或APC未存在下(B),经20小时,不刺激(填充曲线图)或使用未活化病毒(相当于S蛋白1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、重组S蛋白(recombinant S protein)(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、S肽库(peptide pool)和M+N肽库(二者均为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /肽)(空白曲线图)进行刺激,针对CD69的表达进行分析(图3A及B)。

[图3-2]图3表示从患者的Tfh细胞中克隆的TCR对来自于SARS-CoV-2蛋白的肽具有反应性的图。在同一起源的APC的存在下,经20小时,使用S肽库#1以及#2(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /肽)刺激克隆1和2(图3C)。在同一起源的APC的存在下,经20小时,使用S肽库#2以及S肽库

PepTivator (注册商标) (二者均为 $0.3\mu\text{g}/\text{ml}/\text{肽}$) 刺激克隆1和2 (图3C),接着染色CD69 (图3D)。在来自于不同供体的APC的存在下,经20小时,使用S肽库#2 ($1\mu\text{g}/\text{ml}/\text{肽}$) 刺激克隆1和2,接着对CD69的表达进行分析 (图3E)。

[图4]图4表示肽库的覆盖范围的相对位置的图。

[图5-1]图5表示已鉴定的、根据S蛋白应答性TCR识别的HLA以及S蛋白肽的图。在来自于具有相同DP或与原始个体的DR/DQ等位基因的其他供体PBMC的APC的存在下,使用S肽库#2 ($0.3\mu\text{g}/\text{ml}/\text{肽}$) 刺激表达克隆型1/2 (分别为克隆1和克隆2) 的TCR的T细胞杂交瘤 (图5A)。在表达该HLA的HEK 293T细胞的存在下,使用S肽库#2 ($0.3\mu\text{g}/\text{ml}/\text{肽}$) 刺激克隆1和2 (图5B)。

[图5-2]图5表示已鉴定的、根据S蛋白应答性TCR识别的HLA以及S蛋白肽的图。在通过NetMHC预测的、含有克隆1和2的表位的S蛋白的一部分上,具有可通过DRB1*15:01提呈的肽 (红:强结合肽,灰:弱结合肽) (图5C)。合成的2种强力结合肽的序列 (图5D)。在来自于不同起源的APC的存在下,经20小时,不刺激 (填充曲线图) 或使用S肽库#2 ($0.3\mu\text{g}/\text{ml}/\text{肽}$) 以及单一肽 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) (空白曲线图) 刺激克隆1和2,接着染色CD69 (图5E)。

[图6-1]图6为 $S_{864-882}$,其为在健康组和恢复期的COVID-19患者中被广泛识别的SARS-CoV-2特异性肽。将表达克隆型1/2 (分别为克隆1和克隆2) TCR的T细胞杂交瘤,与APC以及来自HCoV-OC43 S蛋白 ($0.3\mu\text{g}/\text{ml}/\text{肽}$) 的肽库共同培养 (图6A)。针对 $S_{864-882}$ 人冠状病毒的对应区域的SARS-CoV-2的序列对比分析 (图6B)。根据NetMHC4.0Server预测的肽 $S_{864-882}$ 的对DRB1*15:01以及*15:02的结合能力 (红:强结合肽,灰:弱结合肽) (图6C)。

[图6-2]图6为 $S_{864-882}$,其为在健康组和恢复期的COVID-19患者中被广泛识别的SARS-CoV-2特异性肽。在具有DRB1*15:02的APC的存在下,使用单一肽刺激克隆1和2,对CD69表达进行分析 (图6D)。健康供体和恢复期的COVID-19患者的公开数据库中的克隆型1/2的分布。上图表示两组中具有克隆型1/2个体的百分比;下图表示两组的各个个体中克隆型1/2的增加 (图6E)。

[图7]图7表示在通过SARS-CoV-2 $S_{864-882}$ 肽刺激CD4阳性细胞以及通过EBV感染永生化的来自患者的B细胞的混合物时,与未刺激的情况相比,培养基中的IL-21浓度较高。

[图8-1]图8表示使用由将序列号13的氨基酸序列的各个氨基酸替换为丙氨酸后的氨基酸序列构成的多肽,对重组了TCR $\alpha\beta$ 对的细胞进行刺激的结果。

[图8-2]图8表示使用由将序列号13的氨基酸序列的各个氨基酸替换为丙氨酸后的氨基酸序列构成的多肽,对重组了TCR $\alpha\beta$ 对的细胞进行刺激的结果。

[图9]图9表示使用由序列号44~56的氨基酸序列构成的多肽,对重组了TCR $\alpha\beta$ 对的细胞进行刺激的结果。

[图10-1]图10表示公共Tfh的TCR α 对其识别的表位的图。(A)将在样品库的多个供体中检出的克隆型表示作为A列。基于包含大流行前的健康供体的群组 (cohort) ($n=27$) 和健康供体 ($n=786$) 以及恢复期的COVID-19患者 ($n=1,413$) 的数据集 (K列和I列) 的公开数据库,计算克隆型的产生。在含有不同TCR α 或TCR β 序列的克隆型的情况下,使用集中的不同序列计算克隆型的发生 (K列和I列)。以COVID-19/健康正常 (C/H) (J列,左侧) 表示扩增倍率。按照TCR β 的扩增大小顺序将克隆型排列。*表示在恢复患者中克隆型明显扩增 ($p<0.05$) (J列,右侧)。

[图10-2]图10表示公共Tfh的TCR α 对其识别的表位的图。(B)将(A)中罗列的各克隆型的TCR对在受体细胞内重组,在表达共有HLA的HEK 293T细胞或自身APC的存在下进行测试。通过表面CD3表达,所示受体细胞上成对的TCR的表达如曲线图所示。着色:TCR对重组的受体细胞。无色:母细胞。热图(heatmap)表示GFP受体的活动情况。克隆型1和6对S肽库无应答。克隆型8的TCR $\alpha\beta$ 未在细胞表面表达。(C)在SARS-CoV-2S蛋白(PDB code:6XR8)的3D结构中,用红色着重表示(B)中记载的表位的位置。基于来自可通过GISAID的数据得到的CoV-GLUE的数据,计算与Wuhan-Hu-1相比较而被定义的突变频率(突变率)。

具体实施方式

[0009] 以下,一边展示最佳实施方式,一边说明本发明。本说明书的全篇中,单数形式的语言表达,只要没有特别说明,就应该理解为也包含其复数形式的概念。因此,单数形式的冠词(例如,英语的“a”、“an”、“the”等)只要没有特别说明,就应该理解为也包含其复数形式的概念。此外,在本说明书中使用的用语,只要没有特别说明,就应该理解为按照该领域下通常使用的词义进行使用。因此,只要没有其他的定义,本说明书中使用的所有的专业用语以及科学技术用语具有与本发明所属的领域的技术人员通常理解的意思相同的词义。出现矛盾时,本说明书(含定义)优先。

[0010] 以下,在本说明书中,对特别使用的用语定义和/或基本的技术内容进行适当说明。

(定义等)

本说明书中“滤泡性T细胞”是指控制B细胞的成熟与活化、抗体产生、具有共有TCR的辅助性T细胞,也称滤泡辅助性T细胞。滤泡性T细胞作为与滤泡辅助性T细胞意思相同的T细胞在本说明书中可互换使用。

[0011] 本说明书中“SARS-CoV-2”是指冠状病毒中的1种被称为重症急性呼吸综合征冠状病毒2的,引起COVID-19的起因病毒。

[0012] 本说明书中“特异地”是指抗体或其片段、或者含有这些的细胞,相较于任意的其他靶点更高亲和性地识别并结合某个靶点。

[0013] 本说明书中“SARS-CoV-2表达的分子序列或其部分”是指由作为冠状病毒中的1种、即重症急性呼吸综合征冠状病毒2具有的核酸表达的蛋白或核酸或其部分。本发明的肽为SARS-CoV-2基因中含有的特定的氨基酸序列,由通常的氨基酸构成的肽。从多个患者取得的滤泡性T细胞的T细胞受体可识别该肽,故被诱导的T细胞表现性特殊。DRB15:01/02为日本人中较多((15-20%)的HLA等位基因,也有报道其为SARS-CoV-2感染风险等位基因。因此,当以SARS-CoV-2感染者为母体时,较多的人成为本发明的SARS-CoV-2特异性滤泡性T细胞的对象。

[0014] 在本发明中,“刺突蛋白”是指病毒表达的1种被称为包膜蛋白的蛋白,有时也被省略为S。具体地“刺突蛋白”是指排列在病毒的包膜表面的突起状蛋白质,为病毒糖蛋白,有时也作为多聚体存在。具有包膜的病毒在对宿主细胞的吸附侵入中发挥必不可少的作用。例如,在仙台病毒中,存在由血凝素-神经氨酸酶(HN)糖蛋白和融合糖蛋白(F)构成的2种刺突蛋白。在流感病毒中,存在由血凝素(三聚体)(HA)和神经氨酸酶(四聚体)(NA)糖蛋白的2种刺突蛋白。在SARS病毒中,刺突糖蛋白作为刺突蛋白而存在。在扎伊尔型埃博拉出血热病

毒中,长度约10nm的突起状的EboZ包膜蛋白作为刺突蛋白而存在。

[0015] 本说明书中,“表位”也作为抗原决定基被知晓,其为通过B细胞或T细胞等免疫系统识别的分子或部位。在本发明中使用时,“表位”为可与如本说明书记载的结合部位(例如抗体或其抗原结合片段)结合的分子。表位通常由氨基酸或糖侧链等分子的化学活性表面基团构成,通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0016] 本说明书中,“提呈表位至HLA的探针”是指用于将表位提呈至HLA的探针,可通过使用该探针进行检测,根据与该探针结合的细胞的有无,调查有无确立的免疫系统。虽为探针,也存在HLA和表位肽二者合为一体作为多肽的情况,也可以为非一体的、肽装载于HLA上的情况。

[0017] 本说明书中,“与TCR特异性结合”是指与T细胞受体(TCR)特异性结合。

[0018] 本说明书中,“强化免疫获得”是指促进针对抗原的固有免疫以及获得性免疫等免疫的获得,例如可举出促进由滤泡性T细胞控制的B细胞的成熟和活化、抗体产生等。

[0019] 本说明书中,“防御抗体”是指主动免疫或被动免疫中观察的针对感染病原体的免疫,特别是承担阻止病毒感染功能的抗体。

[0020] 本说明书中,“公共滤泡性T细胞”是指控制B细胞的成熟和活化、抗体产生的、具有在个体之间共有的TCR的辅助性T细胞。公共滤泡辅助性T细胞和公共Tfh细胞按相同意义互换使用。

[0021] 本说明书中,“可启动地连接”是指核酸编码的多肽与元件连接,从而在启动子等元件的控制下以显示多肽生物活性的状态表达。

[0022] 本说明书中,“病毒抗原”是指激起免疫反应的对象病毒的一部分或全部,一种在投放给宿主时引起免疫反应的物质。可以使用肽或其整体(裂解物)等。或者,可以形成病毒样粒子(VLP)后使用。作为病毒抗原的对象,例如可举出:鼻病毒、腺病毒、冠状病毒、RS病毒、流感病毒、副流感病毒、肠道病毒等。

[0023] 作为本发明的对象之一的冠状病毒科,是诺如病毒(Noroviruses)所属的最大病毒科,其中包含冠状病毒科、动脉病毒科(Arteriviridae)、海洋病毒科(Mesoniviridae)、罗尼病毒科(Roniviridae)等。冠状病毒进一步地分为 α 、 β 、 γ 、 δ 冠状病毒,其中, α 、 β 冠状病毒引起10~30%的人的气管、肠道感染。

[0024] 冠状病毒属的病毒为被包膜(envelope)包裹的RNA病毒。其直径约为100~160nm,遗传物质在所有RNA病毒中最多。病毒粒子表面存在3个糖蛋白,分别为刺突(棘突糖)蛋白(S,Spike Protein,受体结合部位、细胞溶解与抗原);小包膜糖蛋白(E,Envelope Protein Envelope Protein,较小的与细胞膜结合的蛋白质);膜糖蛋白(M,Membrane Protein Membrane Protein,负责营养物质的跨膜运输、新型病毒的出芽和病毒包膜的形成)。作为少数的种类,存在血凝素糖蛋白(HE蛋白,Haemagglutinin(Hemagglutinin)-esterase)。病毒主要通过刺突蛋白(S蛋白)和宿主细胞受体的结合,来介导病毒的侵入,并决定病毒的组织或宿主。冠状病毒S蛋白S1亚单元的N端结构域(S1-NTD)和C端结构域(S1-CTD)均可作为受体结合域(RBD)。普遍认为S1-NTD与糖受体结合,S1-CTD与蛋白受体结合。

[0025] 作为引起感染人体的感冒样综合征的病毒而被熟知的冠状病毒,可以举出以下这些:HCov-HKU1、HCov-OC43、SARS-CoV、MERS-CoV以及SARS-CoV-2等。

[0026] 冠状病毒的核酸为非节段单链(正链)RNA,长27-31kDa,RNA病毒中最长的核糖核

酸RNA, RNA链在5'端存在“防止”甲基化的结构,在3'端存在Poly(A)“尾部”结构。该结构非常类似于真核生物的mRNA。由于基因RNA自身是发挥翻译作用的重要结构基础,因而省去了RNA-DNA-RNA的转录过程。冠状病毒的RNA和RNA之间的重组率非常高,病毒发生变异也具有这样高的重组率。重组后的RNA序列发生变化,并由此对核酸编码的氨基酸序列产生变化,构成蛋白质的氨基酸根据这种变化其抗原性也产生变化,因此疫苗的开发受到限制。

[0027] 作为蛋白质,除刺突(突起,S)蛋白之外,还可使用包膜(E)蛋白、核衣壳蛋白(N)、跨膜蛋白(M)等。除这些之外,存在于ORF1a的PLPro(编码M蛋白酶等)、3CLPro、RdRp(RNA依赖性RNA聚合酶)、Hel(解旋酶)等也编码(Lam, T. T., Shum, M. H., Zhu, H. et al. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* (2020); Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 26, 450-452 (2020).), 所以也可以使用这些。作为树突状细胞,也可以使用使S蛋白结合的ACE2失活或除去ACE2的树突状细胞。或者,也可以使用AI系统“Cascade Eye”, 构筑COVID-19的通路图,使用已确认的与感染症状相关的重要分子、基因。或者也可以使用网址“bioRxiv”中公开的研究结果,解析已确认的数千种SARS-CoV-2的基因序列,使用世界上人们最常见的100个对于HLA等位基因(多种免疫型)的表位(可成为疫苗靶点的表位)(Artificial intelligence predicts the immunogenic landscape of SARS-CoV-2: toward universal blueprints for vaccine designs; Brandon Malone, Boris Simovski, Clement Moline, Jun Cheng, Marius Gheorghe, Hugues Fontenelle, Ioannis Vardaxis, Simen Tennoe, Jenny-Ann Malmberg, Richard Stratford, Trevor Clancy; bioRxiv 2020.04.21.052084; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.21.052084>)。

[0028] 还应当考虑HLA限制性。细胞毒性(Killer)T细胞识别SARS冠状病毒(SARS-CoV)感染细胞,通过杀伤该细胞,清除感染细胞时,确认了细胞毒性T细胞识别的来自SARS-CoV抗原的肽和HLA I类分子的复合体,可以使用这样的分类信息。在SARS-CoV中,作为来自S、M以及N抗原的肽,确认了26种与约20~30%的人类所具有的HLA-A2(A*0201)分子相结合的抗原肽,可将该方法用于确认本发明的树突状细胞制剂的用于日本人群组的抗原肽。对HLA-A2(A*0201)转基因小鼠在免疫这些合成肽之后,确认出6种能够诱导细胞毒性T细胞产生免疫应答的肽,可以使用它们。使用相同的方法和HLA-A24(A*2402) Tgm, 确认了23种来自SARS-CoV抗原的肽,所述肽能与日本人群中表达频率最高的、60%日本人所具有的HLA-A24(A*2402)分子结合,可将该方法用于确认本发明的树突状细胞制剂的用于日本人群组的抗原肽(Chen, Y.-Z., Liu, G., Senju, S., Wang, Q., Irie, A., Haruta, M., ... Nishimura, Y. (2010). Identification of SARS-COV Spike Protein-Derived and HLA-A2-Restricted Human CTL Epitopes by Using a New Muramyl Dipeptide-Derivative Adjuvant. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 165-177. <https://doi.org/10.1177/039463201002300115>)。使用这些信息,能够确认与有助于清除SARS-CoV-2的细胞毒性T细胞识别的HLA-A2(A*0201)或HLA-A24(A*2402)(针对HLA型,若为日本人之外,则选择该人种特有的HLA型)结合的病毒抗原,使用通过从表达这些HLA的人ES细胞中诱导分化树突状细胞的方法制造的本发明的树突状细胞疫苗时,可期待其抗原特异性地活化细胞毒性T细胞,预防细胞因子风暴等引起的重症。本发明使用的代表性抗原肽可以是HLA限制性,或者也可以是非HLA限制性,在限制性的情况下,即使为单一肽等也可

应对,在非限制性的情况下,优选使用重叠的多个肽或电转染病毒核酸。

[0029] 需要说明的是,T细胞大致分为以下2种,即CD8+T细胞和CD4+T细胞。此2种T细胞识别的抗原本质上不同。CD8+T细胞识别与被称为I类的HLA (MHC) 结合的、代表性地由9个氨基酸组成的肽。另一种CD4+T细胞识别与被称为II类的MHC结合的肽。与HLA (MHC) II类结合的肽的长度,作为示例,可认为是15~24个(不限于此)氨基酸。HLA (MHC) I类分子在全部体细胞均有表达,结合并提呈自身细胞产生的蛋白质片段。HLA (MHC) II类分子仅限巨噬细胞、树突状细胞等抗原提呈细胞、B细胞等细胞中表达。与一般的体细胞不同,抗原提呈细胞从外界摄取蛋白质分解后,与HLA (MHC) I类、II类分子结合进行提呈。因此,CD8+T细胞主要识别体细胞上的内源性HLA (MHC) I类限制性抗原,CD4+T细胞识别抗原提呈细胞上的外来性HLA (MHC) II类限制性抗原。在人体中,MHC I类为HLA A、B、C,MHC II类为HLA DR、DQ、DP。

[0030] 本说明书中,“药品(组合物)”的剂型没有特别限定,可以为固体状、半固体状或液体制剂的任意一种,也可以根据其使用目的选择剂型。当制作细胞制剂时,通常作为液体制剂进行提供,但也可以冷冻或冻干后提供。作为药品组合物的剂型,例如,可举出在第十七修正或第十八修正《日本药局方制剂总则》或各国的同等文件中记载的剂型。

[0031] 本说明书中,“疫苗”是指含有抗原或细胞,给药于机体内后可产生抗体的因子,可增强细胞免疫能力的因子,或可产生相关因子的物质。抗原是指选择的物质,用于在人等脊椎动物中诱发对该物质的免疫应答的组合物。

[0032] 本说明书中,“治疗”是指疾病或者症状的治愈或改善、或者症状的抑制。可使用以下参数判断治疗,入院到出院的时间;在适当时间点的8阶段顺序尺度;在适当时间点的早期预警评分(NEWS Score);从NEWS Score的分配时间(Day1)开始至适当的时间点为止的平均变化量;适当时间点的SOFA评分;受试者中COVID-19病毒RNA量的转变(核酸扩增法的检查)或抗体量的转变;氧气供给(例如非侵袭性换气或高流量吸氧、侵袭性机械换气或体外式膜型人工肺(ECMO)或其他方法)(参照实施例等)。重症率的减轻也属于治疗的范畴。在成为这样的状态时,防止此种疾病或病症恶化,优选维持现状,更优选减轻,进一步优选消退,包含可发挥对患者的疾病或疾病伴随的1种以上的症状的改善效果或预防效果。事先进行诊断后进行适当的治疗称为“伴随诊断”或“定制治疗”,用于此的诊断药物有时也被称为“伴随药物”。

[0033] 本说明书中,“预防”是指将疾病或症状的出现防患于未然。

[0034] 本说明书中,“处置”是指对疾病或症状的所有处置,包含治疗和预防。

[0035] 本说明书中,“诊断”是指确定与受试者的疾病、病症、状态(例如COVID-19)等相关的各种参数,判定该疾病、病症、状态的现状或未来。通过使用本发明的方法、装置、系统,可以检查体内的状态,使用该信息可以选择各种参数,例如受试者中的疾病、病症、状态、待给药的治疗或预防的药物或方法等各种参数。本说明书中,狭义的“诊断”是指诊断现状,广义的“诊断”包含“早期诊断”、“预测诊断”、“事前诊断”等。本发明的诊断方法,原则上,可以利用来自身体的物质,由于能够无需医生等医务工作者实施诊断,因此在工业生产上有用。本说明书中,为明确能够无需医生等医务工作者实施诊断,有时也特别地将“预测诊断、事前诊断或诊断”称为“辅助”。

[0036] 本说明书中,“受试者(人)”是指作为本发明的诊断或检测、或者治疗等对象的受试对象(例如,人等生物或从生物提取的细胞、血液、血清等)。

[0037] 本说明书中,“试料”是指从受试者等获得的任意物质,包含例如血清等。本领域技术人员能够以本说明书的记载为基础选择适当且优选的试料。

[0038] 本说明书中,“试剂盒(kit)”是指通常分为两个以上的区域,提供应提供的部分(例如,检查剂、诊断剂、治疗剂、抗体、标记、说明书等)的单元。以提供出于稳定性等原因,不应当混合提供,而是优选在使用前混合使用的组合物为目的时,优选为这种试剂盒形态。这样的试剂盒优选具备记载有如何使用提供部分(例如,检查剂、诊断剂、治疗剂)或如何处理试剂的指南或说明书。本说明书中,试剂盒作为药物试剂盒使用时,在试剂盒中通常包含记载检查剂、诊断剂、治疗剂、抗体等的使用方法的指南等。

[0039] 本说明书中,“指南”记载有向医生或其他使用者说明本发明的使用方法的内容。该指南记载了本发明的检测方法、诊断剂的使用或药品给予给药等说明内容。此外,在指南中,也可以记载作为给药部位,经口服、经食道给药(例如通过注射等)的说明内容。该指南按照实施本发明的国家的监督机关(例如日本的厚生劳动省,美国的食品药品监督管理局(FDA)等)规定的样式进行制作,并明确记载表明已得到其监管机构的批准。指南为所谓的药品说明书(package insert),通常以纸介质提供,但不限定,例如也可以以电子媒体(例如,通过网络提供的主页、电子邮件)的形式提供。

[0040] 本说明书中,“功能性等效物”是指对于作为对象的原始实体,目的功能相同,但结构不同的任意实体。因此,“SARS-CoV-2病毒的蛋白”或其部分的功能性等效物,虽非为SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分自身,但应理解为SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分的变异体或改性体(例如氨基酸序列改性体),包含具有SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分具备的生物功能的物质,以及在发挥功能的时间点,能够变化为SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分自身,或SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分的变异体或者改性体的物质(例如包含可编码SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分自身、或者SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分的变异体或改性体的核酸以及含有该核酸的载体、细胞等)。本说明书中,SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分的功能性等效物,即使无特别说明,也应理解为可与SARS-CoV-2病毒的蛋白质或其部分相同地使用。通过检索数据库等,可以检索到功能性等效物。本说明书中,“检索”是指通过电子或生物学或者其他方法,使用某种核酸碱基序列,找到具有特定功能和/或性质的其他核酸碱基序列。作为电子检索,可举出:BLAST(Altschul et al., J.Mol.Biol.215:403-410(1990))、FASTA(Pearson&Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 85:2444-2448(1988))、Smith and Waterman法(Smith and Waterman,J.Mol.Biol.147:195-197(1981))以及Needleman and Wunsch法(Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443-453(1970)),但不限定于这些。作为生物学检索,可举出:严格杂交(Stringent hybridization)、将DNA基因贴附在尼龙膜等上的微阵列或贴附在玻璃板上的微阵列(微阵列分析)、PCR以及原位杂交(In situ hybridization),但不限定于这些。本说明书中,本发明使用的基因也应包含通过这样的电子检索、生物学检索确定的对应基因。

[0041] 本说明书中,“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”以及“肽”在本说明书中以相同意思使用,为任意长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以为直链也可以有分支,也可以为环状。氨基酸可以为天然的也可以为非天然的,也可以为改性的氨基酸。该用语还包含组装成多个多肽链的复合体。该用语还包含天然或人工改性的氨基酸聚合物。作为这样的改性,包含有二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或其他任意操作或改性(例如与标记成分的结合体化)。

此定义中,还包含例如含有1或2个以上氨基酸的类似物的多肽(例如含有非天然氨基酸等)、肽状化合物(例如类肽)以及在该领域公知的其他改性。本说明书中,“氨基酸”为具有氨基和羧基的有机化合物的总称。本发明的实施方式涉及的抗体含有“特定氨基酸序列”时,该氨基酸序列中的任意氨基酸均可受到化学修饰。此外,该氨基酸序列中的任意氨基酸均可形成盐或溶剂化物。此外,该氨基酸序列中的任意氨基酸均可为L型或D型。在这些情况下,本发明的实施方式涉及的蛋白质也可称为含有上述“特定的氨基酸序列”。作为蛋白质含有的氨基酸在机体内受到的化学修饰,已知有例如N端修饰(例如乙酰化、豆蔻酰化(myristoylation)等)、C端修饰(例如酰胺化、糖基磷脂酰肌醇加成等)或侧链修饰(例如磷酸化、糖链加成等)等。只要是满足本发明的目的,氨基酸可为天然或非天然。

[0042] 本说明书中,“多聚核苷酸”、“寡聚核苷酸”以及“核酸”以相同意思使用,为任意长度的核苷酸的聚合物。该用语还包含“寡聚核苷酸衍生物”或“多聚核苷酸衍生物”。“寡聚核苷酸衍生物”或“多聚核苷酸衍生物”是指含有核苷酸的衍生物或者核苷酸之间的结合与通常不同的寡聚核苷酸或多聚核苷酸,可互换使用。作为这样的寡聚核苷酸具体地可例举出:2'-O-甲基核糖核苷酸、寡聚核苷酸中的磷酸二酯键转化为硫代磷酸酯键的寡聚核苷酸衍生物、寡聚核苷酸中的磷酸二酯键转化为N3'-P5'氨基磷酸酯键的寡聚核苷酸衍生物、寡聚核苷酸中的核糖和磷酸二酯键转化为肽核酸键的寡聚核苷酸衍生物、寡聚核苷酸中的尿嘧啶被C-5丙炔基尿嘧啶替换的寡聚核苷酸衍生物、寡聚核苷酸中的尿嘧啶被C-5噻唑尿嘧啶替换的寡聚核苷酸衍生物、寡聚核苷酸中的胞嘧啶被C-5丙炔基胞嘧啶替换的寡聚核苷酸衍生物、寡聚核苷酸中的胞嘧啶被吩噻嗪修饰胞嘧啶(phenoxazine-modified cytosine)替换的寡聚核苷酸衍生物、DNA中的核糖被2'-O-丙基核糖替换的寡聚核苷酸衍生物以及寡聚核苷酸中的核糖被2'-甲氧基乙氧基核糖替换的寡聚核苷酸衍生物等。除非另有说明,否则还预期特定的核酸序列还包括与明确显示的序列相同的、保守改性的改性体(例如简并密码子取代物)和互补序列。具体地,通过制作1个及其以上的选定(或全部)的密码子的第3个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列,能够获得简并密码子取代物(Batzer et al.,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka et al.,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);Rossolini et al.,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。本说明书中,“核酸”还可与基因、cDNA、mRNA、寡聚核苷酸以及多聚核苷酸互换使用。本说明书中,“核苷酸”可以为天然的也可以为非天然的。

[0043] 本说明书中,“基因”是指规定遗传特征的因子,“基因”有时指“多聚核苷酸”、“寡聚核苷酸”以及“核酸”。

[0044] 本说明书中,基因的“同源性”是指2个以上的基因序列的相互对应的同一性的程度,通常具有“同源性”是指同一性或类似性的程度较高。因此,某2个基因的同源性越高,其序列的同一性或类似性越高。2种基因是否具有同源性可通过序列的直接比较或核酸的严格条件下的杂交法调查得出。直接比较2个基因序列时,在其基因序列之间DNA序列代表性至少50%相同,优选至少70%相同,更优选至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同时,则这些基因具有同源性。因此,本说明书中“同源体”或“同源基因产物”表示发挥与本说明书记载的复合体蛋白质构成要素相同的生物功能的其他物种,优选为哺乳动物中的蛋白质。这样的相同体还被称为“直系同源基因产物”。可理解为只要与本发明的目的一致,也可使用同源体、同源基因产物、直系同源基因产物等。

[0045] 氨基酸可在本说明书中通过其一般已知的三字符符号或IUPAC-IUB生化营养委员会推荐的单字符符号来提及。核苷酸也可以用一般公认的单字母代码来指代。在本说明书中,氨基酸序列以及碱基序列的类似性、同一性以及同源性的比较可使用序列分析用工具BLAST,使用默认参数算出。同一性的检索可使用例如NCBI的BLAST 2.2.28(2013.4.2发行或也可使用更近发行的)进行。本说明书中的同一性的值通常为使用上述BLAST,在默认的条件下进行序列比对时的值。然而,根据参数的变更,出现更高值时,以最高的值作为同一性的值。在多个区域评价同一性时,以其中最高的值为同一性的值。类似性是除同一性以外,还计算了类似的氨基酸的数值。

[0046] 本发明的其中1种实施方式中“数个”例如可以为8、7、6、5、4、3或2个,也可以为这些任意的值以下。已知1或数个氨基酸残基的缺失、加成、插入或接受其他氨基酸的取代的多肽可维持其生物活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Sep; 81(18): 5662-5666., Zoller et al., Nucleic Acids Res. 1982 Oct 25; 10(20): 6487-6500., Wang et al., Science. 1984 Jun 29; 224(4656): 1431-1433.)。可以通过采用缺失等适当的方法,测定活性,判断是否为功能性等效物。

[0047] 本发明的其中1种实施方式中“90%以上”例如可以为90、95、96、97、98、99或100%以上,也可以在这些任意的2个值的范围内。上述“同源性”也可以根据该技术领域公知的方法,计算2个或数个氨基酸序列中相同的氨基酸数的比例来确定。在计算比例前,重排待比较的氨基酸序列群的氨基酸序列,如果需要使相同氨基酸的比例最大化,则向部分氨基酸序列中导入间隙。用于重排的方法、比例的计算方法、比较方法以及与这些相关的电脑程序(例如BLAST、GENETYX等)在该技术领域一直以来为大众所知。本说明书中“同源性”除非另有说明,就可以用根据NCBI的BLAST测定的值表示。在使用BLAST比较氨基酸序列时的算法中,可按照默认设定使用Blastp。将测定结果以相似性(Positives)或一致性(Identities)数值化表示。

[0048] 本发明的物质可以为纯化后的物质,本说明书中“纯化后的”物质或生物因子(例如核酸或蛋白质等)是指除去该物质或生物因子中天然伴随的至少一部分因子后的物质。因此,通常在纯化后的生物因子中该生物因子的纯度,比该生物因子通常存在的状态要高(即被浓缩)。在本说明书中使用的用语“纯化后的”指存在优选至少为75重量%,更优选至少为85重量%,更进一步优选至少为95重量%,其次最优选至少为98重量%的同类型的生物因子。本发明中使用的物质或生物因子优选“纯化后的”物质。本发明中使用的“分离的”物质或生物因子(例如核酸或蛋白质等)是指实质上地去除该物质或生物因子中天然伴随的因子。本说明书中使用的用语“分离的”,因根据其目的而变动,故不一定以纯度表示,必要时表示存在优选至少为75重量%,更优选至少为85重量%,更进一步优选至少为95重量%,其次最优选至少为98重量%的同类型的生物因子。本发明中使用的物质优选为“分离的”物质或生物因子。

[0049] 本说明书中“对应”氨基酸或核酸或者其部分是指:某种多肽分子或多聚核苷酸分子(例如编码刺突蛋白的多聚核苷酸等)中,与作为比较基准的多肽或多聚核苷酸中的所定的氨基酸或核苷酸或者其部分具有或预测具有相同功能的氨基酸或核苷酸,特别地在酶分子中,指存在于活性部位中相同位置的对催化活性有相同贡献的氨基酸;在复合分子中指对应的部分(例如硫酸乙酰肝素等)。例如作为反义分子,可以为对应该反义分子的特定部

分的直系同源中的相同部分。对应的氨基酸可以为半胱氨酸化、谷胱甘肽化、S-S键形成、氧化(例如甲硫氨酸侧链的氧化)、甲酰化、乙酰化、磷酸化、糖链加成、豆蔻酸化等处理后的特定的氨基酸。或者,对应的氨基酸可以为负责二聚化的氨基酸。这样的“对应的”氨基酸或核酸只要为一系列的区域或结构域即可。因此,在这种情况下,在本说明书中称为“对应的”区域或结构域。这样的对应的区域或结构域,在本说明书中设计复合分子时是有用的。

[0050] 例如,变异激烈的病毒,例如,即使为SARS-CoV-2等病毒时,在向对应的病毒蛋白的一部分导入变异时,可以确定本发明例举的序列号13对应的肽序列。

[0051] 本说明书中“对应”基因(例如多聚核苷酸序列或分子)是指,在某物种中,与作为比较基准的物种中所定的基因具有或预测具有相同功能的基因(例如多聚核苷酸序列或分子),存在多个具有如此功能的基因时,被认为在进化学上具有相同起源。因此,对应某个基因的基因可以为该基因的直系同源。所以,变异前的SARS-CoV-2的S蛋白可以分别在变异种的SARS-CoV-2中发现对应的S蛋白。这样的对应基因可以使用本领域中公知的技术鉴定。因此,例如,某些动物(例如小鼠)中的对应基因可以通过使用序列号1或序列号2等序列作为查询序列来检索包含该动物序列的数据库来找到对应基因的参考基因(例如S蛋白等)。

[0052] 本说明书中“片段”是指相对于全长的多肽或多聚核苷酸(长度为n),具有1~n-1的序列长度的多肽或多聚核苷酸。根据其目的,片段的长度可以进行适当变更,例如,作为该长度的下限,对于多肽,可以列举3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50及其以上的氨基酸,这里没有特别列举的整数表示的长度(例如11)也可适当作为下限。另外,对于多聚核苷酸,可以列举5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100及其以上的核苷酸,这里没有特别列举的整数表示的长度(例如11等)可以作为下限。在本说明书中,应当理解为,例如如果全长起标记或靶分子的作用,则只要该片段本身也具有标记或靶分子的功能,则此类片段也纳入本发明的范围。

[0053] 根据本发明,用语“活性”在本说明书中指最广义的分子的功能,可以参考功能性等效物的评价。虽未做出限定,但活性大概包含分子的生物功能、生化功能、物理功能或化学功能。活性可包含例如:酶活性、与其他分子相互作用的能力以及活化、促进、使稳定化、阻断、抑制或不稳定化其他分子的功能的能力、稳定性、定位于特定细胞内位置的能力。在适当时,该用语还涉及最广义的蛋白质复合体的功能。

[0054] 本说明书中“生物功能”是指当提及某基因或与其相关的核酸分子或者多肽时,该基因、核酸分子或多肽在机体内可具有的特定的功能,对此,例如可举出:特异性抗体的生成、酶活性、赋予抗性等,但不限于于这些。

[0055] 本说明书中,生物功能可根据“生物活性”发挥出来。本说明书中“生物活性”是指某因子(例如多聚核苷酸、蛋白质等)在机体内可具有的活性,包含发挥各种功能(例如激发滤泡性T细胞的能力)的活性,也包含例如与某分子的相互作用引起的其他分子活化或失活的活性。2个因子相互作用时,其生物活性可以为该二分子间的结合或由此产生的生物变化,例如使用抗体使一个分子沉淀时,另一个分子也共沉淀,可认为两分子相结合。因此,可举出观察这样的共沉淀作为一种判断方法。还比如当某因子为酶时,其生物活性包含其酶活性。而在其他例子中,当某因子为配体时,还包含针对该配体对应的受体的结合。这样的生物活性,可根据该领域中公知的技术进行测定。因此,“活性”是指显示结合(直接或间接的任意一种)或揭示结合的、影响应答(即具有对多种暴露或刺激产生应答的可测定影响)

的各种可测定的指标,例如可举出:与本发明的多肽或多聚核苷酸直接结合的化合物的亲和性,或例如几种刺激后或现象后的上游或下游的蛋白质的量或其他类似的功能的量度。

[0056] 本说明书中基因、多聚核苷酸、多肽等的“表达”是指,该基因等在体内接受一定的作用,变化成其他形态。优选基因、多聚核苷酸等经转录及翻译,变化成多肽的形式,转录后制作mRNA也是表达的其中一种形态。因此,本说明书中“表达产物”包含这样的多肽或蛋白或mRNA。更优选地,这种多肽的形式可以是经过翻译后处理的多肽。

[0057] 作为本发明的功能性等效物,可以使用在氨基酸序列中插入、取代或缺失,或者在其一端或两端加成1个或多个氨基酸的之物。本说明书中,“在氨基酸序列中插入、取代或缺失,或者在其一端或两端加成1个或多个氨基酸”是指通过定点诱变法等公知的技术方法,或通过依靠天然变异,通过天然产生的多个数量的氨基酸的取代等进行改性。改性氨基酸序列可以为插入、取代或缺失或者在其一端或两端加成例如1~30个氨基酸,优选为1~20个,更优选为1~9个,进一步优选为1~5个,特别优选为1~2个氨基酸。改性氨基酸序列可以为优选该氨基酸序列在S蛋白的氨基酸序列中具有1个或多个(优选为1或数个或者1、2、3或4个)保守性取代(conservative substitution)的氨基酸序列。此处的“保守性取代”是用另一种化学上相似的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基,而不会实质性地改变蛋白质功能。例如,可举出:某些疏水性残基被另一个疏水性残基取代,某些极性残基被具有相同电荷的另一个极性残基取代。能够进行这种取代的功能上相似的氨基酸在本领域中是已知的。举出具体例时,作为非极性(疏水性)氨基酸,可举出:丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸等。作为极性(中性)氨基酸,可举出:甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等。作为带正电荷(碱性)氨基酸,可举出:精氨酸、组氨酸、赖氨酸等。此外,作为带有负电荷(酸性)氨基酸,可举出:天冬氨酸、谷氨酸等。

[0058] 本说明书中“抗原”(antigen)是指可被抗体分子特异性结合的任意基质。

本说明书中“免疫原”(immunogen)是指可产生抗原特异性免疫应答并启动淋巴球活化的抗原。本说明书中“表位”或“抗原决定基”是指与抗体或淋巴球受体结合的抗原分子中的部位。决定表位的方法为该领域中公知的方法,提供核酸或氨基酸的一级序列,本领域技术人员就可使用这样公知的惯用技术确定这种表位。

[0059] 本说明书中“药品(组合物)”的剂型没有特别限定,可以为固体状、半固体状或液体状制剂的任意一种,可根据其使用目的进行选择。当制作细胞制剂时,通常作为液状制剂提供,但也可以冷冻或冻干后提供。作为药品组合物的剂型,例如,可举出在第十七修正《日本药局方制剂总则》或各国的同等文件中记载的剂型。作为有效剂量,例如,考虑作为抗原肽脉冲树突状细胞,经腋窝或鼠经淋巴结附近皮下给药 5×10^6 个细胞,也可以为 1×10^6 个、 2×10^6 个、 3×10^6 个、 4×10^6 个、 5×10^6 个、 6×10^6 个、 7×10^6 个、 8×10^6 个、 9×10^6 个、 1×10^7 个等,不受此限定。

[0060] 本说明书中“药剂”、“剂”或“因子”(在英语中均相当于agent),广义上可交换使用,只要是能够实现所需目的的任何物质或其他要素(例如光、放射能、热、电气等的能量)均可。作为这样的物质,例如,可举出:蛋白质、多肽、寡肽、肽、多聚核苷酸、寡聚核苷酸、核苷酸、核酸(例如包含cDNA、基因DNA的那样的DNA、mRNA的那样的RNA)、多糖、寡糖、脂、有机低分子(例如激素、配体、信息传递物质、有机低分子、通过组合化学合成的分子、可作为药

品使用的低分子(例如低分子配体等)等)、这些物质的复合分子,但不限定于这些。

[0061] 本说明书中的“有效成分”是指本发明的组合物中为获得满足目的的治疗、预防或抑制等的效果而以所需剂量含有的成分,只要效果不会损害到所需水平,也可以含有其他成分。此外,本发明的药品、组合物等也可以制剂化。此外,本发明的药品、组合物等的给药途径可以是口服或非口服的任意,可根据制剂的形状进行适当设定。

[0062] 本说明书中“疫苗”是指包含抗原或细胞,给药于机体内后可产生抗体的因子,可增强细胞免疫能力的因子,或可产生相关因子的物质。抗原是指选择的物质,用于在人等脊椎动物中诱发对该物质的免疫应答的组合物。疫苗的有效成分为细胞时称为细胞疫苗。

[0063] 在本说明书中“佐剂”是指能够增强、加速或延长疫苗免疫原诱发的免疫应答的物质。

[0064] 本说明书中,氨基酸的“保守性取代”是指用具有相似生理化学性质侧链的不同氨基酸残基替换氨基酸残基。例如,保守性取代在具有疏水侧链的氨基酸残基(如丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸等)之间,具有中性亲水侧链的氨基酸残基(如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等)之间,具有酸性侧链的氨基酸残基(例如天冬氨酸、谷氨酸等)之间,具有碱性侧链的氨基酸残基(例如精氨酸、组氨酸、赖氨酸等)之间或具有芳香族侧链的氨基酸残基(例如色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等)之间进行。正如本领域已知的那样,保守性取代通常不会引起蛋白质构象的显著变化,因此可以保持蛋白质的生物活性。

[0065] (优选实施方式)

以下说明本发明的优选实施方式。为更好地理解本发明而提供以下的实施方式,本发明的范围并非仅限于以下记载。由此可见,本领域技术人员参酌本说明书中的记载,可以在本发明的范围内做出适当的改变。此外,本发明的以下实施方式可单独使用或将它们组合使用。

[0066] 本发明大致涉及用于诱导滤泡性T细胞的含有SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的组合物或其相关技术。在此滤泡性T细胞可对SARS-CoV-2具有反应性。

[0067] 滤泡性T细胞即使是对SARS-CoV-2以外的冠状病毒也具有反应性,可以对SARS-CoV-2具有特异性,也可仅对SARS-CoV-2具有反应性。

[0068] 作为一种实施方式,本发明提供一种含有用于诱导滤泡性T细胞的SARS-CoV-2病毒特异性表位的组合物。在此,该表位可以仅对SARS-CoV-2病毒具有反应性,也可对其他病毒(例如其他种类的冠状病毒)具有反应性。

[0069] 作为一种实施方式,本发明提供一种含有用于诱导滤泡性T细胞的SARS-CoV-2病毒特异性表位的组合物。在一部分的实施方式中,滤泡性T细胞可以为公共滤泡性T细胞。被认为因V(D)J重组为随机程序,故个体间难以共有TCR,但多个个体对同一抗原表位产生应答时,共有相同TCR的公共T细胞应答在免疫应答的各处被广泛观察到。由于本发明首次确定SARS-CoV-2病毒特异性的公共TCR及其MHC以及抗原性表位,由此能促进高效的免疫应答、特别是产生中和抗体的B细胞的应答,因此非常地有益。

[0070] 作为一种实施方式,SARS-CoV-2病毒特异性表位,可含有SARS-CoV-2病毒表达的分子或其部分。在特定的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可含有SARS-CoV-2病毒表达的刺突蛋白或其部分。在一部分的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位,可含有序

列号1所示的氨基酸序列。在特定的实施方式中,在一部分的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位由序列号1所示的氨基酸序列构成。本发明的表位优选为非B细胞抗原的表位,最大为20mer左右。本发明的表位优选为无结构(二级结构、三级结构等)。

[0071] 在其他实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分,也可含有序列号5的序列,

X_1 可以为任意的氨基酸,
 X_2 可以为任意的氨基酸,
 X_3 可以为Q或其保守性取代氨基酸,
 X_4 可以为任意的氨基酸,
 X_5 可以为T或其保守性取代氨基酸,
 X_6 可以为任意的氨基酸,
 X_7 可以为任意的氨基酸,
 X_8 可以为任意的氨基酸,
 X_9 可以为任意的氨基酸。

[0072] 在一部分的实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分,也可含有序列号5的序列,

X_1 可以为任意的氨基酸,
 X_2 可以为任意的氨基酸,
 X_3 可以为Q,
 X_4 可以为任意的氨基酸,
 X_5 可以为T,
 X_6 可以为任意的氨基酸,
 X_7 可以为任意的氨基酸,
 X_8 可以为任意的氨基酸,
 X_9 可以为任意的氨基酸。

[0073] 在其他实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分,也可含有序列号5的序列,

X_1 可以为I或其保守性取代氨基酸,
 X_2 可以为A或其保守性取代氨基酸,
 X_3 可以为Q或其保守性取代氨基酸,
 X_4 可以为Y或其保守性取代氨基酸,
 X_5 可以为T或其保守性取代氨基酸,
 X_6 可以为S或其保守性取代氨基酸,
 X_7 可以为A或其保守性取代氨基酸,
 X_8 可以为L或其保守性取代氨基酸,
 X_9 可以为L或其保守性取代氨基酸。

[0074] 在一部分的实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分,也可含有序列号5的序列,

X_1 可以为I或其保守性取代氨基酸,

X₂可以为A或其保守性取代氨基酸，
 X₃可以为Q，
 X₄可以为Y或其保守性取代氨基酸，
 X₅可以为T，
 X₆可以为S或其保守性取代氨基酸，
 X₇可以为A或其保守性取代氨基酸，
 X₈可以为L或其保守性取代氨基酸，
 X₉可以为L或其保守性取代氨基酸。

[0075] 在其他实施方式中，本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分，也可含有序列号5的序列，

X₁可以为I、V、A、L、P、W、F、M或G，
 X₂可以为A、V、I、L、P、W、F、M或G，
 X₃可以为Q，
 X₄可以为Y、G、S、T、N、Q、C或F，
 X₅可以为T，
 X₆可以为S、Y、G、N、Q、C、F或T，
 X₇可以为A、L、I、V、P、W、F、M或G，
 X₈可以为L、A、I、V、P、W、F、M或G，
 X₉可以为L、A、I、V、P、W、F、M或G。

[0076] 在一部分的实施方式中，本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分，也可含有序列号5的序列，

X₁可以为I、V、A、L或G，
 X₂可以为A、V、I、L或G，
 X₃可以为Q，
 X₄可以为Y或F，
 X₅可以为T，
 X₆可以为S或T，
 X₇可以为A、L、I、V或G，
 X₈可以为L、A、I、V或G，
 X₉可以为L、A、I、V或G。

[0077] 在一部分的实施方式中，作为保守性取代的优选示例，可举出以下记载的群内的氨基酸的替换。

A群：亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、甲硫氨酸、O-甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸；

B群：天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸；

C群：天冬酰胺、谷氨酰胺；

D群：赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸；

E群：脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸；

F群：丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸；

G群: 苯丙氨酸、酪氨酸。

[0078] 在一部分的实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分,含有序列号6、序列号7、序列号8、序列号9、序列号10、序列号11或序列号12的序列。

[0079] 在一部分的实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分,含有序列号13所示的氨基酸序列或直接由其构成。

[0080] 在一部分的实施方式中,本发明的滤泡性T细胞可以具有序列号2和序列号3、序列号2和序列号4、序列号14和序列号15、序列号16和序列号15、序列号17和序列号18、序列号19和序列号20、序列号21和序列号20、序列号22和序列号23、序列号2和序列号24、序列号25和序列号26、序列号27和序列号28、序列号29和序列号28、序列号30和序列号31、序列号32和序列号33、序列号34和序列号35或序列号36和序列号37的TCR $\alpha\beta$ 对。这些TCR对,是相较于健康人群,在恢复的COVID19患者中显著增加的克隆型中被发现的TCR对,其全部均为在公共滤泡性T细胞中发现。因此,SARS-CoV-2感染时增加的这些克隆型或其TCR对,有助于从SARS-CoV-2感染的轻症中恢复。

[0081] 在一部分的实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分也可含有序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列,至少为9个氨基酸长度。这些氨基酸序列,是相较于健康人群,在恢复的COVID19患者中显著增加的克隆型识别的氨基酸序列。因此,通过靶向SARS-CoV-2感染时增加的这些的克隆型所识别的氨基酸序列,有助于从SARS-CoV-2感染的轻症中恢复。

[0082] 在一部分的实施方式中,本发明的SARS-CoV-2蛋白或其部分可以由序列号13、序列号38、序列号39、序列号40、序列号41、序列号42或序列号43所示的氨基酸序列构成。

[0083] 在一部分的实施方式中,本发明的滤泡性T细胞可以为公共滤泡性T细胞。

[0084] 本发明的肽可以为功能性等效物,也可以为原始序列中导入适当变异的肽。

[0085] 在本发明的某情形下,本发明的组合物或药品可以作为核酸药品提供。在一种实施方式中,使用本发明的核酸药品,进行基因疗法或基因治疗时,为恢复或改性基因和/或基因的表达,可以向细胞的基因中导入多聚核苷酸,例如可以使用将正常基因依靠各种病毒载体等可导入人体细胞内的载体或其他递送系统进行导入的治疗方法等。载体的导入方法可根据载体、宿主的种类等需要进行适当选择,使用表达载体作为本发明的组合物的有效成分时,例如,可通过将AAV载体等注射进体内而实现导入。

[0086] 在某情形下,本发明提供一种诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的方法,其包含向受试者给药SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的工序。

[0087] 在某情形下,本发明提供一种诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的方法,其包含向受试者给药SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物的工序。

[0088] 在某情形下,本发明提供一种SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物在制造用于诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的药品中的应用。

[0089] 在某情形下,本发明提供一种SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物在制造用于诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的药品中的应用。

[0090] 在某情形下,本发明提供一种用于诱导SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物。

[0091] 在某情形下,本发明提供一种用于诱导至少1种冠状病毒反应性滤泡性T细胞的

SARS-CoV-2蛋白或其部分、或者其功能性等效物。

[0092] <探针>

在其他情形下,本发明提供一种用于将SARS-CoV-2病毒特异性表位提呈给HLA的多肽。这些多肽可作为探针使用,作为多肽,HLA与表位肽可以一体化,也可以是非一体的、肽装载于HLA上。

[0093] 在一种实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有SARS-CoV-2病毒表达的分子或其部分。在特定的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有SARS-CoV-2病毒表达的刺突蛋白或其部分。在一部分的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有序列号1所示的氨基酸序列。在特定的实施方式中,一部分的实施方式的SARS-CoV-2病毒特异性表位由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[0094] 在其他情形下,本发明提供一种可与SARS-CoV-2病毒特异性表位相互作用的TCR特异地结合的抗体。在一种实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有SARS-CoV-2病毒表达的分子或其部分。在特定的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有SARS-CoV-2病毒表达的刺突蛋白或其部分。在一部分的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有序列号1所示的氨基酸序列。在特定的实施方式中,一部分的实施方式的SARS-CoV-2病毒特异性表位由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[0095] <TCR-T细胞疗法>

在特定的实施方式中,本发明提供一种包含SARS-CoV-2病毒特异性滤泡性T细胞的、用于强化对SARS-CoV-2病毒免疫获得的组合物。在一种实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有SARS-CoV-2病毒表达的分子或其部分。在特定的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有SARS-CoV-2病毒表达的刺突蛋白或其部分。在一部分的实施方式中,SARS-CoV-2病毒特异性表位可以含有序列号1所示的氨基酸序列。在特定的实施方式中,一部分的实施方式的SARS-CoV-2病毒特异性表位由序列号1所示的氨基酸序列构成。

[0096] 在某情形下,本发明提供一种强化针对SARS-CoV-2免疫获得的方法,其含有给药SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞的工序。

[0097] 在某情形下,本发明提供一种SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞在制造用于强化对SARS-CoV-2免疫获得的药品中的应用。

[0098] 在某情形下,本发明提供一种用于强化针对SARS-CoV-2免疫获得的SARS-CoV-2反应性滤泡性T细胞。

[0099] 可使用经由化学合成、基因工程学、微生物等进行制造的方法等各种方法制备本发明的肽等。

[0100] 本领域技术人员从本发明以及该技术领域中的知识,能够理解制备抗原的各种方法。通常,抗原在体外或体内均可制备。抗原可在体外作为肽或多肽制备,接着将其制成个体化的新生物疫苗或免疫原性组合物,给药至对象。如本说明书中进一步详细地所记载的,涉及的体外制备可根据本领域技术人员公知的各种方法进行,例如肽合成或从各种细菌、真核生物或病毒重组表达系的任意一种中的DNA或RNA分子表达肽/多肽,以及继续纯化表达的肽/多肽等。或者,抗原可以通过将编码抗原的分子(例如,DNA、RNA、病毒表达系统等)引入受试者并在引入后表达编码的抗原来体内产生。本说明书中,当涉及药物组合物和联合疗法的递送方法时还进一步记载抗原的体外和体内制备方法。

[0101] 体外肽/多肽合成

蛋白质或肽可以通过本领域技术人员已知的任何技术制造,包括通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,来自天然供给源的蛋白质、体外翻译或分离肽,或者化学合成蛋白质或肽。对应于各种基因的核苷酸和蛋白质、多肽和肽序列已经公开,可以参考本领域技术人员已知的计算机化数据库。其中一种涉及的数据库为位于美国国立卫生研究所(National Institutes of Health)网页的国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的基因库(Genbank)以及GenPept数据库。可使用本说明书公开的技术方法或为按照本领域技术人员所公知的方法增加和/或表达已知的基因的编码区。或者,为本领域技术人员所公知的各种市售的蛋白质、多肽以及肽制备物。

[0102] 可以使用不含有杂菌或动物性物质的试剂,容易地化学合成出肽(Merrifield RB:“固相肽合成I.四肽的合成(Solid phase peptide synthesis.I.The synthesis of a tetrapeptide)”.J.Am.Chem.Soc.85:2149-54,1963)。在特定的实施方式中,抗原肽的制备按照以下步骤进行:(1)通过合成均匀且使用裂解条件的多通道机器进行平行固相合成;(2)通过RP-HPLC柱的汽提塔(column stripping)进行纯化;以及肽之间的无交换再清洗;接着(3)经由最有信息价值的、有限的一组测定进行分析。对于单个患者的一组肽,可以定义药物生产管理和质量控制标准(GMP)的足迹,因此只需要不同患者的肽合成之间的套件切换程序。

[0103] 或者,也可以使用编码本发明的抗原肽的核酸(例如多聚核苷酸),在体外制作抗原肽。多聚核苷酸例如可以为DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA、单链和/或双链的任意的多聚核苷酸,或者为天然的或有稳定形态的多聚核苷酸,例如具有硫代磷酸酯(phosphorothiate)骨架的多聚核苷酸等,或者它们的组合,只要是编码肽则可包含或不包含内含子。在一种实施方式中,使用体外翻译制作肽。存在本领域技术人员可使用的多种示例系统(例如Retic Lysate IVT kit、Life Technologies、Waltham,MA)。

[0104] 还可制备具有多肽表达能力的表达载体。对于各种细胞型的表达载体在本技术领域是公知的,无需进行过度试验即可选择。通常,DNA以合乎表达的方向以及正确的阅读框,插入至质粒等表达载体。根据需要,DNA可以连接至可被期待宿主(例如细菌)识别的适合的调节控制转录及翻译的核苷酸序列,但这种控制通常可用于表达载体。接着,可使用标准的技术手段将载体导入用于克隆的宿主细菌(例如参考Sambrook et al.(1989)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.)。

[0105] 也预期含有分离多聚核苷酸的表达载体以及含有表达载体的宿主细胞。抗原肽可以编码所期望的抗原肽的RNA或cDNA分子的形态提供。本发明的一种以上的抗原肽可通过单一表达载体提供。

[0106] (药品)

本发明可作为药品提供。在包含于药品或药品组合物时,可称为药剂等。

[0107] 给药本发明的组合物、多肽等时,口服给药时可配制成片剂、颗粒剂、细粒剂、散剂、胶囊剂等各种形状的剂型,也可以含有制剂中通常使用的黏合剂、填充剂、成形剂、润滑剂、崩解剂、湿润剂之类的添加剂。此外,除这些之外,口服给药时,制剂可以配制成口服液剂、悬浊剂、乳剂、糖浆剂等液体状态,也可以配制成使用时再溶解的干燥状态。

[0108] 非口服给药时,可以配制成容纳在单位剂量安瓿或多剂量容器或试管内的状态,此外,也可含有稳定剂、缓冲剂、保存剂、渗透剂等添加剂。此外,非口服给药中的制剂也可以配制成在使用时,使用适当的载体(灭菌水等)再溶解的粉体。

[0109] 本发明的组合物可含有药学上容许添加的盐,药学上容许添加的盐例如可以使用无机酸盐(盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐以及硫酸盐等)或有机酸盐(醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐以及苯甲酸盐等)。

[0110] 医药组合物中的药学上容许添加的盐可进一步含有液体(水、生理盐水、甘油及乙醇)。进一步在组合物中可存在助剂(湿润剂、乳化剂或pH缓冲剂等)。载体可将药物组合物配制成用于被受试者摄取的片剂、丸剂、糖衣片剂、液剂、凝胶剂、糖浆剂、浆剂及悬浊剂。

[0111] 本发明的范围是以几种给药形式存在的组合物,作为该形态,可举出用于非口服给药(例如,注射或注入(例如大剂量瞬时给药或连续注入))的适合的形态,但不限制于这些。注射或注入生成物时,可以以油性或水性载体中的混悬液、溶液或乳液的形态提供,可含有调剂剂(悬浊剂、稳定剂和/或分散剂)。或为可用于使用适当的灭菌液在使用前恢复原状的干燥状态。

[0112] 一旦经调和,本发明的组合物可以直接给药于受试者。在一种实施方式中,组合物适用于对哺乳类(例如人受试者)给药。

[0113] 本发明的药品组合物可以通过任何数量的途径(可举出口服、静脉内、肌肉内、动脉内、骨髓内、腹膜内、鞘内、心(脑)室内(intraventricular)、经皮、经皮肤、局部、皮下、鼻腔内、经肠道、舌下、阴道内或直路的途径,但不限定于这些)。无针注射器也可用于本发明的药品组合物的给药。典型的治疗组合物可制备为作为液体的溶液或混悬液的任何一种可注射的形式。可制备出在注射前的液体载体中的溶液或混悬液中适合的固体形态。

[0114] 组合物的直接递送通常可通过皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内的注射实现,或递送至组织间质空间。组合物可给药于病变组织。给药处理可以为单次给药的计划或多次给药的计划。药品提供关于给药次数的指示(例如,是否每天、每周、每月递送等)。此外,次数或用量还可取决于症状的重症度。

[0115] 本发明的组合物可以以各种形式制备。例如,组合物可以配制为液体溶液或混悬液,作为可注射药物。可以配制为适用于注射前的液体载体中的溶液或混悬液的固体形式(用于使用含有防腐剂的灭菌水恢复原状的冻干组合物(例如Synagis(注册商标)和Herceptin(注册商标)))。该组合物可以配制为用于局部给药,例如作为软膏、霜剂或粉末。该组合物可配制为例如,作为片剂或胶囊剂、作为喷雾剂或作为糖浆剂(任选地调味),用于口服给药。该组合物可配制为例如,作为细粉末或使用喷雾,作为吸入剂用于肺部给药。该组合物可配制为栓剂或阴道栓剂。该组合物可配制为例如,作为滴剂用于经鼻、耳或眼睛的给药。该组合物可以为组合的组合物被设计成在向受试者给药前恢复原状的试剂盒的形态。例如,可以以冻干抗体具备灭菌水或灭菌缓冲液的试剂盒的形态提供。

[0116] (预防方法、疫苗)

本发明可作为疫苗提供。

[0117] 在一部分的实施方式中,本发明的药品组合物是用于对人施用以增强免疫力的疫苗组合物。疫苗组合物可以进一步含有1个或多个的佐剂。作为疫苗组合物中可含有的佐剂,本说明书中提供以下示例。在一部分的实施方式中,疫苗组合物可以包含细胞疫苗。在

列举的实施方式中,作为适当的佐剂示例,可举出:(1) (含有或不含有胞壁多肽或细菌细胞壁构成要素等其他特定的免疫刺激性物质) 水包油型乳液制剂,例如MF59(商标) (含有5%角鲨烯、0.5%吐温80以及0.5%山梨糖醇酐三油酸酯) 以及SAF (含有10%角鲨烯、0.4%吐温80、5%Pluronic(注册商标) 嵌段聚合物L121以及苏氨酸(thr-)MDP)、(2) 皂苷佐剂,例如QS21、STIMULON(商标) (CambridgeBioscience、Worcester、MA)、Abisco(注册商标) (Isconova、Sweden) 或Iscomatrix(注册商标) (CommonwealthSerumLaboratories、Australia)、(3) 弗氏完全佐剂(CFA) 以及弗氏不完全佐剂(IFA)、(4) 含有胞嘧啶未甲基化的CpG基序,即含有至少1个的CG二核苷酸的寡聚核苷酸(例如Krieg、Vaccine(2000) 19:618~622;Krieg、Curr Opin Mol Ther(2001) 3:15~24;W098/40100、W098/55495、W098/37919以及W098/52581) 以及(5) 含有铝盐(明矾、磷酸铝、氢氧化铝等) 的金属盐、(6) 皂苷及水包油型乳液(例如W099/11241)。

(通用技术)

[0118] 本说明书中使用的分子生物学技术、生化学技术、微生物学技术为该领域公知惯用的技术,例如记载于Current Protocols in Molecular Biology(<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471142727>) 以及Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) (<http://www.molecularcloning.com>) 等,其相关部分(可能全部) 在此作为参考。

[0119] 本说明书中“或”是在可以采用文本中所列举的项目中的“至少1个以上”时使用。“或者”也同样。本说明书中写明“2个值”的“范围内”时,该范围包含2个值自身。

[0120] 本说明书中引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献,其全部各自按其具体记载的相同程度作为本说明书的参考而被援引。

[0121] 以上,为容易地理解本发明而展示优选的实施方式进行了说明。以下基于实施例说明本发明,但上述的说明及以下的实施例,仅出于列举的目的提供,并非以限定本发明的目的提供。因此,本发明的范围不受本说明书的具体记载的实施方式,也不受实施例的限制,而仅由权利要求书的范围限定。

[实施例]

[0122] 本实施例中,基于赫尔辛基宣言,在获得受试者必要的知情同意后,遵守大学规定的伦理规定进行了下述实验。除实施例中记载的试剂之外,使用的试剂也可使用从和光纯药公司、Sigma-Aldrich公司等其他试剂公司购入的试剂。

[0123] (实施例1:公共Tfh及表位的确定1)

本实施例中,使用单一细胞库的RNA测序平台(10x Genomics公司的Chromium),分析SARS-CoV-2特异性细胞子集及其克隆型。

[0124] (外周血单核细胞(PBMC) 的分离与血浆采集)

从包含健康供体和恢复期的COVID-19患者在内的6名个体体内,制备外周血单核细胞(PBMC)。参加者信息及使用的重症程度分类如表1和2所示。制备按以下进行。将总血液收集进肝素涂层管,1500rpm下离心分离10分钟,分离为细胞部分和血浆。从细胞沉淀上除去血浆,保存至-80℃。接着,通过密度梯度沉降将PBMC分离,使用ACK溶解缓冲液溶解红细胞。将分离的PBMC通过STEM-CELLBANKER(Zenoaq Resource) 冷冻保存至-80℃。

表1:参加者的特征[表1]

	COVID19亲本	未暴露
	N = 5	N = 1
年龄 (岁)	A-B (Median = C, IQR = D)	31
性别		
男性 (%)	E% (F/G)	100% (1/1)
女性 (%)		N/A
国籍		
日本 (%)		100% (1/1)
日本以外 (%)		N/A
峰值重症程度 ^a		
轻症	N/A	N/A
中等症状I	20% (1/5)	N/A
中等症状II	20% (1/5)	N/A
重症	60% (3/5)	N/A

a日本COVID-19临床实践指南版本2.2

表2:日本国内COVID-19疾病重症程度分类[表2]

	经动脉血氧饱和度 (SpO ₂)	临床症状及疾病状态
轻症	SpO ₂ ≥ 96%	无呼吸症状 咳嗽, 无呼吸困难
中等症状I	93% < SpO ₂ < 96%	通过胸部X光或计算机断层摄影观察的呼吸困难或异常显影
中等症状II	SpO ₂ ≤ 93%	需要供氧
重症		ICU水平的治疗或需要人工呼吸机

[0125] 将冷冻保存的PBMC解冻,使用添加了5%人AB血清的RPMI1640培养基清洗PBMC。使用含有1μg/ml的S蛋白、重组S蛋白(1μg/ml)、S肽库(1μg/ml/肽)或M+N肽库(1μg/ml)的失活SARS-CoV-2刺激5×10⁵个PBMC。(失活SARS-CoV-2病毒由盐田先生和中山先生(大阪大学微生物病研究所)提供。按记载于Amanat F, et al. bioRxiv.2020的方法制备重组SARS-CoV-2S蛋白。PepMix SARS-CoV-2(刺突糖蛋白)(含有库#1及#2)从JPT Peptide Technologies购入。PepTivator SARS-CoV-2Prot_M以及_N从Miltenyi Biotec购入)。在37℃下,接着使用人用抗体CD3(HIT3a)、CD69(FN50)、CD137(4B4-1)以及TotalSeq(商标)-C井字标签(全部从BioLegend公司购入)染色20小时。使用细胞分选仪SH-800S(SONY)将CD3+CD69+或CD3+CD137+细胞排序,按以下记载,通过单细胞VDJ-RNA-seq分析,分析RNA表达以及TCR序列。

[0126] (基于单细胞(single cell base)的转录组及TCR库分析)

使用以下试剂,进行单细胞的捕捉和文库的制备。Chromium Single Cell 5' Library&Gel Bead Kit,PN-1000165;Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit,PN-1000120;Chromium Single Index Kit T Set A,PN-1000213;Chromium Single Cell 5' Feature Barcode Library Kit,PN-1000080;Single Index Kit N Set A,PN-1000212;

Chromium single-cell V(D)J浓缩试剂盒、人T细胞、PN-1000005。将含有约 2×10^4 个细胞的单细胞混悬液加载于Chromium微流控芯片,按制造商的指南,使用Chromium控制器(10X Genomics)生成单细胞凝胶珠状乳液(Gel Beads-in-emulsion)。接着,使用Veriti热循环仪Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific)将来自各样品的带条形码细胞的RNA在凝胶珠状乳液内进行逆转录。为扩增cDNA而使用14个样品,按照制造商的操作说明书进行用于生成单细胞文库的后续所有步骤。接着,在进行TCR文库的cDNA浓缩以及文库构建的同时,将约50ng的cDNA用于14个循环的基因表达文库扩增。文库的片段尺寸通过Agilent 2100生物分析仪Bioanalyzer(Agilent)确认。文库以双端模式(read1:28bp;read2:91bp)使用Illumina NovaSeq6000进行测序。原始数据(raw read)通过Cell Ranger 3.1.0(10XGenomics)进行处理。通过使用Seurat R包进行基因表达聚类分析(gene expression-based clustering)(v3.1,Hafemeister,C.,Satija,R.Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression.Genome Biol 20,296(2019).<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1874-1>)。简而言之,将线粒体含量超过10%的细胞、测出基因低于200或超过4000的细胞视为偏离值(分别为即将死亡的细胞、空液滴、内嵌双细胞(doublet)),使用过滤器将其排除。使用SeuratSCTransform函数进行归一化,由于是同时处理所有的样品,因此不实行批量效果校正地统合数据。用CLR归一化的HashTagUMI计数进行HashTag oligo解复用,使用Python脚本,借由液滴条形码,将克隆型与基因表达数据匹配。为进行下游分析,仅保持单一Hashtag与 β 链克隆型分配的细胞。

[0127] (批量(Bulk)TCR测序)

使用QIAzol溶解 $1 \sim 3 \times 10^5$ 个PBMC,接着,使用SMARTer技术(Takara Bio)合成全长cDNA,使用TRAC/TRBC特异性引物,扩增TCR α 以及 β 基因的可变区。在对可变区扩增子测序后,使用MiXCR软件(Bolotin,D.,Poslavsky,S.,Mitrophanov,I.et al.MiXCR:software for comprehensive adaptive immunity profiling.Nat Methods 12,380-381(2015).<https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>),将克隆型(定义为TR(A/B)V以及TR(A/B)J基因以及互补决定区(CDR)3)分配于读取的各配对中。针对各 α/β 克隆型,将该克隆的读取比例分别除以 α/β 链的读取总数,以此定义扩增,出于绘图和统计分析的目的将比例变换为 \log_{10} 。

[0128] 通过UMAP plot绘图和单细胞基因表达,在表达CD200、PDCD1、ICOS、CXCL13、CD40LG等Tfh相关基因的细胞中确认了循环Tfh簇(cluster)的建立(图1A)。进一步地,在Tfh簇内,特定了120对的TCR(表3)。

[表 3-1]

TRBV	CDR3 β 氨基酸	TRB J	TRAV	CDR3 α 氨基酸	TRA J	CLUS TER	患者	刺激	4-1BB 表达水平	IFN γ 表达水平	CD69 表达水平	Seurat 条形码 (barcode)
TRBV2 0-1	CSASPGLN ¹ TD ² TQ	TRB J2-3	TRAV8-3	CAVLTGGY ¹ NKLI ² F	TRA J4	47605	健康对照	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_TGGTTAGAGC GCCTTG
TRBV2 0-1	CSASGTGEV ¹ GEL	TRB J2-2	TRAV4	CLVARGGY ¹ QKV ² TF	TRA J13	48063	健康对照	M+N 肽库	低/阴性	低/阴性	高	DBL_AACTCCCCGTC CTGCTT
TRBV3 0	CAWKQGWTE ¹ AFF	TRB J1-1	TRAV8-4	CAVSDLYG ¹ NNR ² LAF	TRA J7	25270	健康对照	S 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_AGGCGTCGTC GCTCTC
TRBV7-7	CASSTSGNTG ¹ ELF ² F	TRB J2-2	TRAV8-4	CAVSDSGAG ¹ SY ² QLTF	TRA J28	35098	健康对照	失活病毒	高	中	中	DBL_ATGTGTGAGG AGTACC
TRBV7-6	CASSLTGLPI ¹ YNE ² QFF	TRB J2-1	TRAV25	CAGLGAGN ¹ MLT ² F	TRA J39	22074	健康对照	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_TTGCCGTCAT GTCCTC
TRBV2 0-1	CSATDRAN ¹ YGY ² T ³ F	TRB J1-2	TRAV35	CAASGINAG ¹ KST ² F	TRA J27	47996	健康对照	M+N 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_TGTTCCGGTC CTCCAT
TRBV2 7	CASSSPGQ ¹ GAYN ² EQFF	TRB J2-1	TRAV2	CAVGPFG ¹ NKF ² YF	TRA J21	22783	健康对照	M+N 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_CATCGAACAC GGTAGA
TRBV6-5	CASRTVNTE ¹ AFF	TRB J1-1	TRAV25	CAISGNAR ¹ LME ²	TRA J31	27505	健康对照	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	中	DBL_CCAATCCAGT GGTAGC
TRBV1 8	CASSLGQV ¹ YE ² QY ³ F	TRB J2-7	TRAV26-2	CILRESKAG ¹ NMLTF ²	TRA J39	45929	健康对照	S 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_CCAGCGATCT ATCCCG

[表 3-2]

TRBV2	CATEAGETQYF	TRB J2-5	TRAV1-2	CAVRALTGGGN KLTF	TRA J10	28997	健康对照	S 肽库	中	低/阴性	低/阴性	DBL_TGCGCAGGTT GCTCCT
TRBV5-1	CASSLVSDEYEQYF	TRB J2-7	TRAV17	CATDEGDYKLS F	TRA J20	43708	健康对照	M+N 肽库	低/阴性	高	低/阴性	DBL_CTCTCTAGCAC TGCCAG
TRBV6-5	CASSQTTGVVEQ YF	TRB J2-7	TRAV8-4	CAVSDRIKAAG NKLTF	TRA J17	37974	健康对照	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_GCTTCCATCG TAGGAG
TRBV2 0-1	CSARAFEGELFF	TRB J1-4	TRAV12-2	CAVRRTDYKLS F	TRA J20	26900	健康对照	M+N 肽库	中	低/阴性	低/阴性	DBL_TCGGGACCAC TTACGA
TRBV9	CASSVWSSGGNE QFF	TRB J2-1	TRAV17	CATEGSGYSTLT F	TRA J11	11503	患者 #1	S 肽库	低/阴性	低/阴性	高	DBL_TGAGAGGTTCC GCATCT
TRBV1 2-4	CASSLGLQGNQP QHF	TRB J1-5	TRAV17	CASRASGRLLTF	TRA J58	20367	患者 #1	S 肽库	高	低/阴性	低/阴性	DBL_AACGTTGCAC AAGACG
TRBV2 0-1	CSAKTSGRGETQ YF	TRB J2-5	TRAV13-2	CAENSGGSNYK LTF	TRA J53	47690	患者 #1	S 肽库	高	低/阴性	低/阴性	DBL_GGCTCGACAC CTATCC
TRBV6-5	CASSISGLNQPPQ HF	TRB J1-5	TRAV12-3	CAMSAGSGTYK YIF	TRA J40	20204	患者 #1	S 肽库	中	低/阴性	低/阴性	DBL_GCGGTTTGTA AACCTC
TRBV1 9	CASSIRSSYEQYF	TRB J2-7	TRAV27	CAGVGGGSQGN LIF	TRA J42	46110	患者 #1	M+N 肽库	低/阴性	高	低/阴性	DBL_CACATTTGTA GCTCCG
TRBV2	CASSPGQNSPL HF	TRB J1-6	TRAV8-4	CAVSAASARQLT F	TRA J22	30803	患者 #1	S 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DBL_ATTGGACGTA GCGCAA
TRBV1 1-2	CASSWDGDN SPL HF	TRB J1-6	TRAV3	CAVRDKTGRRA LTF	TRA J5	30866	患者 #1	S 肽库	高	低/阴性	低/阴性	DBL_TAAAGAGAGTG TAATGA

[表 3-3]

TRBV7-7	CASSLYGGELFF	TRB J2-2	TRAV36 /DV7	CAVDSGTYKYIF	TRA J40	40982	患者 #2	重组 S蛋白	中	低/阴性	低/阴性	DB2_GTAGGCCCAA TGGTCT
TRBV3-1	CASSHDRAEQYF	TRB J2-7	TRAV30	CGTEIGTDKLIK	TRA J34	26138	患者 #2	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CACTCCAGTA TAGGGC
TRBV9	CASERTSGNGE QFF	TRB J2-1	TRAV12 -2	CAVSPPGGSYIP TF	TRA J6	11505	患者 #2	重组 S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GATCTAGCAT TCCTGC
TRBV3-1	CASSPRAGAGGE LFF	TRB J2-2	TRAV38 -1	CAFMYNNND MRF	TRA J43	14496	患者 #2	M+N 肽库	低/阴性	高	低/阴性	DB2_AGCTCTCGTT GACGTT
TRBV2 4-1	CATSRTGGTAE QYF	TRB J2-7	TRAV5	CAERGAAGNKL TF	TRA J17	8497	患者 #2	重组 S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CGTGTCTTCT TGTACT
TRBV5-4	CASSLGAGGPYN EQFF	TRB J2-1	TRAV9-2	CALTLGNQFY F	TRA J49	22442	患者 #2	重组 S蛋白	中	低/阴性	低/阴性	DB2_ACCGTAATCG CTAGCG
TRBV2 0-1	CSASRGAGWMET QYF	TRB J2-5	TRAV12 -1	CVVNRGSNYKL TF	TRA J53	48660	患者 #2	失活病毒	低/阴性	中	中	DB2_CTAATGGTCCG CGTAGC
TRBV2 8	CASSLPPRQSGE SPLHF	TRB J1-6	TRAV14 /DV4	CAMREGRTGGF KTIF	TRA J9	7178	患者 #2	S 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_GAAGCAGCAA GCGCTC
TRBV5-1	CASSSSVSVEQY F	TRB J2-7	TRAV38 -1	CAFVSTGANSK LTF	TRA J56	36273	患者 #2	失活病毒	低/阴性	高	低/阴性	DB2_GACGTGCTCA GCTGGC
TRBV1 9	CASSIAGAKQFF	TRB J2-1	TRAV12 -2	CAFEHGSNTG KLIF	TRA J37	45762	患者 #3	M+N 肽库	高	低/阴性	低/阴性	DB2_GAGCAGAAG GCATTGG
TRBV1 1-2	CASSRTEYQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNMNYGGS QGNLIF	TRA J42	29298	患者 #3	S 肽库	中	低/阴性	中	DB2_GAGCAGACAT GCATGT

[表 3-4]

TRBV5-1	CASSSVQMNT AFF	TRB J1-1	TRAV22	CAVEGSGTYKYI F	TRA J40	14219	患者 #3	重组 S 蛋白 失活病毒	高	低/阴性	低/阴性	DE2_GCATACAGTG TGAATA
TRBV2-7	CASSVTGVSRL QFF	TRB J2-1	TRAV21	CAVNQRSYDKV IF	TRA J50	21747	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DE2_GCCAAATAGT TGTCGT
TRBV6-6	CASNNRAGNTIY F	TRB J1-3	TRAV3	CAVRDPGSGAR QLTF	TRA J22	39348	患者 #3	失活病毒	中	高	低/阴性	DE2_GCGACCATCA AACCGT
TRBV5-1	CASSLPGAWNTE AFF	TRB J1-1	TRAV23	CAASYGGATNK LIF	TRA J32	14278	患者 #3	重组 S 蛋白 失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DE2_GCTTGAATCC CGACTT
TRBV5-6	CASSQAYEQYF	TRB J2-7	TRAV36	CAVAVQGAQKL VF	TRA J54	29063	患者 #3	失活病毒	低/阴性	高	中	DE2_TGTATTCAGG TGACCA
TRBV9-0-3	CASSVGVGSDTQ YF	TRB J2-3	TRAV12	CAVRAVGDKIIF	TRA J30	36451	患者 #3	S 肽库 重组 S 蛋白	中	低/阴性	低/阴性	DE2_GGCTGGTAGT ATGACA
TRBV1-2-5	CAISEGVNLLG NQPQHF	TRB J1-5	TRAV35	CAGGVTGTASK LTF	TRA J44	1470	患者 #3	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DE2_GGTGAAGGTT AAGAAC
TRBV3-0	CASGLVASPGAGE LFF	TRB J2-2	TRAV12	CAVKKSWASYD KVIF	TRA J50	8006	患者 #3	失活病毒	中	低/阴性	低/阴性	DE2_GTCATTTGTC TGCCAG
TRBV2-4-1	CAWSVLSGRPPFG GGANLTF	TRB J2-6	TRAV23	CAASKYNTDKL IF	TRA J34	1261	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DE2_GTGCAGCCAG TCTTCC
TRBV1-8	CATSDLSGNQPPQ HF	TRB J1-5	TRAV21	CALKGSDYKLS F	TRA J20	30566	患者 #3	失活病毒	低/阴性	高	中	DE2_GTTAAGCGTG AACCTT
TRBV2-5-1	CASSPDSTDTQYF TF	TRB J2-3	TRAV21	CALKGSDYKLS F	TRA J20	45926	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DE2_TCATTACAGA AGGTTT
TRBV2-5-1	CASSESNDNYGY TF	TRB J1-2	TRAV21	CALKGSDYKLS F	TRA J20	40481	患者 #3	S 肽库	中	高	低/阴性	DE2_TGAGCCGGTA GAGCTG

[表 3-5]

TRBV5-1	CASLTGVRDGE QFF	TRB J2-1	TRAV25	CAGPLGSNFGN EKLTF	TRA J48	10652	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CTGTTTACAA GTCTAC
TRBV7-6	CASSITEGGYTF	TRB J1-2				31840	患者 #3	重组 S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_TTAAACTCCAA GTTCTG
TRBV7-8	CASSLGGVRADT QYF	TRB J2-3	TRAV9-2	CASDPSAGNRR KLIW	TRA J38	18009	患者 #3	重组 S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	高	高	DB2_TTCTTAGAGT TCGCAT
TRBV1-5	CATSQDRVGSPL HF	TRB J1-6	TRAV9-2	CALSGSGSARQ LTF	TRA J22	30315	患者 #3	重组 S蛋白	高	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_TTTGGTTTCAT CGGTTA
TRBV5-1	CASSLPGAWNTE AFF	TRB J1-1	TRAV3	CAVRDPGSGAR QLTF	TRA J22	14278	患者 #3	重组 S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_GGAATAATCA GCGATT
TRBV1-3	CASSLVQVGRRY NEQFF	TRB J2-1				5459	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	高	DB2_CTGAAACCAT GTCGAT
TRBV2-0-1	CSASLARGQGNS PLHF	TRB J1-6	TRAV12-1	CVVNYFNKFY F	TRA J21	48327	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_GCTCTGTAGG TTACCT
TRBV7-3	CASSRAGGTVDI QYF	TRB J2-3	TRAV2	CAANNAGNMLT F	TRA J39	17392	患者 #3	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB2_CTCGTACTCG CTTAGA
TRBV7-8	CASSDRGPGTG ELFF	TRB J2-2	TRAV12-3	CAMKRGGSQG NLIF	TRA J42	23585	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_CTCTACGCAT GCATGT
TRBV1-2-3	CASSIWDILAKNI QYF	TRB J2-4	TRAV29-DV5	CAAPGYQKVTF	TRA J13	22111	患者 #3	M+N 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	中	低/ 阴性	DB2_AAAGTAGCAA TAACGA
TRBV1-8	CASSPPGLMNT E	TRB J1-1	TRAV8-1	CAVNAGGNRL AF	TRA J7	39092	患者 #3	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_AAAGTAGGTA CGAAAT

[表 3-6]

TRBV1 2-5	CASGLFRTGSLEK LFF	TRB J1-4	TRAV6	CALGSNARLMF	TRA J31	14643	患者 #3	肽库 M+N	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_ACGGAGAGTA ATCACCC
TRBV1 8	CASSPGQGDYQY F	TRB J2-3	TRAV13 -1	CASLRNARNL MF	TRA J31	45925	患者 #3	重组 S蛋白	低/ 阴性	中	低/ 阴性	DB2_ATAAGAGGTG TCCTCT
TRBV5- 6	CASSPLGRSYGYT F	TRB J1-2	TRAV5	CAESLLDGQKL LF	TRA J16	40230	患者 #3	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	高	DB2_ATTGGACTCG CCATAA
TRBV1 5	CATSRDPGHEQY YF	TRB J2-5	TRAV3	CAVSALYNTDK LIF	TRA J34	9815	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CAAACCAAGTA TGAAAC
TRBV5- 1	CASSRMTGSTDY QYF	TRB J2-3	TRAV12 -1	CVVNPCHARLMF	TRA J31	16197	患者 #3	S 肽库	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB2_CAAAGAAAAGTG CGGTAA
TRBV2 0-1	CSADRGLAGSTDY TQYF	TRB J2-3	TRAV9- 2	CALIPNARNLM F	TRA J31	47295	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB2_CACACTCGTG AGGGTT
TRBV5- 1	CASNLRQAGDTE AFF	TRB J1-1	TRAV13 -1	CAASKQGTGFQ KLVF	TRA J8	14285	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CAGATCATCT GACCTC
TRBV1 1-2	CASSQTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNRGSSYKLI F	TRA J12	29298	患者 #3	重组 S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_CAGGTGCTCT CCGGTT
TRBV1 1-3	CASSLRGYEQYF	TRB J2-7	TRAV38 -1	CAFMKHVDSGA GSYQLTF	TRA J28	31105	患者 #3	M+N 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_ACGCCGATCT CGTATT
TRBV1 1-2	CASSLRGRNIQYF	TRB J2-4	TRAV26 -1	CIVKKTGGGN KLTf	TRA J10	44828	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CATTCCGAGT CATCCA
TRBV6- 2	CASSSTSGSTYPT EQFF	TRB J2-1	TRAV13 -1	CAASISNTGNQF YF	TRA J49	2571	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	中	DB2_CATTCCGAGT ACGCCC
TRBV1 1-2	CASSLDPVSETQY F	TRB J2-5	TRAV26 -1	CIVKKTGGGN KLTf	TRA J10	38007	患者 #3	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB2_CGTTCTGTCA TCTGTT

[表 3-7]

TRBV7-9	CASSLGDGSGNTIY F	TRB J1-3	TRAV8-4	CAVINSGGYQK VTF	TRA J13	36754	患者 #3	肽库 M+N	中	低/阴性	低/阴性	DB2_CTCGTACCAG GGTACA
TRBV2-8	CASSLAEGGHGN TIYF	TRB J1-3	TRAV8-4	CAVRAGTASKLT F	TRA J44	50955	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CGGAGTCTCG GCGGTT
TRBV6-1	CASSVYGYTF	TRB J1-2	TRAV29/DV5	CAASRLGTASKL TF	TRA J44	26565	患者 #3	失活病毒	中	低/阴性	低/阴性	DB2_CGGAGTCCAG CCAGAA
TRBV7-9	CASSLVGEQYF	TRB J2-7				29162	患者 #3	重组 S蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CGTCTACAGA GTACCG
TRBV1-8	CASSRSLGLMNT EAF	TRB J1-1				15086	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CCCTCCTAGA GCAATT
TRBV4-2	CASSQADRGESP LHF	TRB J1-6	TRAV8-4	CAVSDRGSARQ LTF	TRA J22	19609	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CCAGCGAAGC TAACTC
TRBV1-4	CASSRTSGWTD QYF	TRB J2-3	TRAV8-3	CAVGARTGRRR LTF	TRA J5	8189	患者 #3	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB2_CCAATCCGTT CACGGC
TRBV2-8	CASSTMSGVETQ YF	TRB J2-5	TRAV19	CALSANTGRRR LTF	TRA J5	37164	患者 #3	S 肽库	中	低/阴性	低/阴性	DB2_CGCCAAGCAT ATACGC
TRBV5-4	CASRAAGTGAWG YTF	TRB J1-2	TRAV38	CAFMYNNND MRF	TRA J43	20875	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_GCTTGAAAAGG CTAGCA
TRBV5-5	CASSRGLAGIPTG ELFF	TRB J2-2	TRAV29/DV5	CAASPNNRDK IIF	TRA J30	5395	患者 #4	M+N 肽库	高	中	低/阴性	DB3_GCACATACAT AGGATA
TRBV2-0-1	CSARLLGGQASY EQYF	TRB J2-7	TRAV8-3	CQKLLF	TRA J16	47226	患者 #4	M+N 肽库	中	中	低/阴性	DB3_GGAGCAACAA ACGTGG
TRBV6-1	CASSEFGTGEQFF	TRB J2-1	TRAV26	CIVRVKGGGSN YKLT	TRA J53	42080	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_GGCGCATCAC ATCCAA

[表 3-8]

TRBV6-2	CASTRGVTDYQY F	TRB J2-3	TRAV36/DV7	CADLTQGGSEK LVF	TRA J57	45445	患者 #4	肽库 M+N	低/阴性	低/阴性	高	DB3_GGCTGGTGTA GTGAAT
TRBV2	CASSPHDYEQFF	TRB J2-1	TRAV22	CAVKGLGSTGN QFYF	TRA J49	27381	患者 #4	肽库 M+N	低/阴性	低/阴性	中	DB3_GGGTTGCTCC GTACAA
TRBV2 0-1	CSALPAGGRNEQ YF	TRB J2-7	TRAV36/DV7	CAVASQGGSEK LVF	TRA J57	47821	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	高	DB3_GTAGGCCAGA TGTTAG
TRBV1 1-2	CASSPTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12-1	CVNRRGSSYKLI F	TRA J12	29298	患者 #4	S 肽库	低/阴性	高	低/阴性	DB3_GTCACAAAGTG AAAGAG
TRBV7-2	CASSLDGARSYN EQFF	TRB J2-1	TRAV21	CAVGSNYQLIW	TRA J33	23764	患者 #4	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	中	DB3_TAGTGGTCAG CGATCC
TRBV5-1	CASAVGGLTNEK LFF	TRB J1-4	TRAV20	CAVGFQGGSEK LVF	TRA J57	10942	患者 #4	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_TACGGTAAGG AGCGAG
TRBV1 0-3	CAITRDTDGYTF	TRB J1-2	TRAV12-1	CVVNNARLMF	TRA J31	41543	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_TACTTGTGTA GTACCT
TRBV1 2-3	CASSLVTGSTAEAF F	TRB J1-1	TRAV12-3	CAMSRPGAGSY QLTF	TRA J28	34575	患者 #4	重组 S 蛋白	高	低/阴性	低/阴性	DB3_TAGCCGGCAT GGGACA
TRBV7-3	CASSLAGGSTDY QYF	TRB J2-3	TRAV2	CASHNAGNMLT F	TRA J39	17390	患者 #4	S 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_TCAGGTAGTG GCAAAC
TRBV7-2	CASSPMGDSADT QYF	TRB J2-3	TRAV8-1	CAVNAGRRLT F	TRA J5	17435	患者 #4	S 肽库	低/阴性	低/阴性	中	DB3_TCCACACGTG ATGCCC
TRBV2 5-1	CASSPGSGHNEQ FF	TRB J2-1	TRAV9-2	CALSGGWDSGY STLTF	TRA J11	34790	患者 #4	重组 S 蛋白	低/阴性	高	低/阴性	DB3_TGACGGCCAA GTACCT

[表 3-9]

TRBV1 1-2	CASSLGIDEQFF	TRB J2-1	TRAV23 /DV6	CAAKGGSQGNL IF	TRA J42	27964	患者 #4	MH 肽库	中	高	低/ 阴性	DB3_TGCACCTAGC AATATG
TRBV4 3	CASSQERVSGYE QYF	TRB J2-7	TRAV13 -1	CAASISGSARQL TF	TRA J22	16803	患者 #4	S 肽库	中	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GCACATACAG ACGCAA
TRBV2 0-1	CSARDIGGGTSPL HF	TRB J1-6	TRAV23 /DV6	CAATSATSQTYK YIF	TRA J40	19940	患者 #4	S 肽库	中	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_TTCTACAAAGT AGATGT
TRBV1 1-2	CASSPTYEQYF	TRB J2-7	TRAV12 -1	CVVNRGSSYKLI F	TRA J12	29298	患者 #4	S 肽库	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB3_TACAGTGCAG GAATCG
TRBV5 1	CASSAMVGQETQ YF	TRB J2-5	TRAV13 -1	CALGDSGYALN F	TRA J41	35856	患者 #4	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GAGTCCGCAG ACGCAA
TRBV2	CASRKADRRQGLI RSYEQYF	TRB J2-7	TRAV1 2	CARGKPGANNL FF	TRA J36	1220	患者 #4	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	高	DB3_CGATTGAAGG ATATAC
TRBV6 5	CASRPEKRSNTI YF	TRB J1-3	TRAV9 2	CALSPSILYGGQ NFVF	TRA J26	15305	患者 #4	S 肽库	中	高	中	DB3_GAAGCAGCAC CAGCAC
TRBV1 1-3	CASSLGGQETQY F	TRB J2-5	TRAV9 2	CAPHTGGTSYG KLTF	TRA J52	31107	患者 #4	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	高	DB3_TTTGGTTGTT CGCGAC
TRBV2	CASSAHRGDEKL FF	TRB J1-4	TRAV12 -1	CVVNNPNAGN MLTF	TRA J39	32292	患者 #4	重组 蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_ACGAGGAGTA GCGTGA
TRBV4 3	CASSQERVSGYE QYF	TRB J2-7	TRAV13 -1	CAASISGSARQL TF	TRA J22	16803	患者 #4	S 肽库	高	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_AGCATACAGT TAACGA
TRBV4 3	CASSQDIGESPLH F	TRB J1-6	TRAV8 3	CAVTSQTYKYIF	TRA J40	30270	患者 #4	失活 病毒	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB3_AGTGTACACAG CTTAAC
TRBV1 1-2	CASSSPGTSQGTG TGELFF	TRB J2-2	TRAV8 3	CAVGARWQGNQ FYF	TRA J49	781	患者 #4	S 肽库	中	高	低/ 阴性	DB3_CAACTAGCAT TCCTCG

[表 3-10]

TRBV4-2	CASSAQEGTEA FF	TRB J1-1	TRAV17	CATGSGYSTLTF	TRA J11	32454	患者 #4	重组 S 蛋白	低/阴性	高	低/阴性	DB3_CATGGCGAGC AGCGTA
TRBV2-0-1	CSARSPRGAYE QYF	TRB J2-7				48449	患者 #4	S 肽库	低/阴性	低/阴性	高	DB3_CGATGGCTCA GCGATT
TRBV5-4	CASSFGGPTSVEQ YF	TRB J2-7	TRAV12-1	CVVEDTGRRAL TF	TRA J5	15992	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	高	DB3_CGCCAAGAGC CAGTTT
TRBV6-1	CASTPDKEYNQP QHF	TRB J1-5	TRAV10	CVVSGNTGGFK TIF	TRA J9	19544	患者 #4	M+N 肽库	低/阴性	低/阴性	高	DB3_CCTCAGTGT CAGTAC
TRBV1-9	CASSMRAGEGGE TQYF	TRB J2-5				51817	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_CGCGTTTTCT GGAGCC
TRBV2	CASRPQNGGYT F	TRB J1-2				31602	患者 #4	S 肽库	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_CGGAGCTAGA TCCCAT
TRBV1-2-4	CASRPDRNSPL HF	TRB J1-6	TRAV9-2	CALSQNTGGFK TIF	TRA J9	20424	患者 #4	失活病毒	低/阴性	低/阴性	高	DB3_CGTAGCGGTT TGGCGC
TRBV3-0	CAWSPLGSGDEK LFF	TRB J1-4	TRAV9-2	CALSGQAGTALI F	TRA J15	24920	患者 #4	S 肽库	中	低/阴性	低/阴性	DB3_CGTCCATTCTG TACGGC
TRBV5-1	CASSLRQGGTGE LFF	TRB J2-2				13710	患者 #4	重组 S 蛋白	低/阴性	低/阴性	低/阴性	DB3_CTACACCTCG TTTAGG
TRBV1-1-2	CASSLGTEETQYF	TRB J2-5	TRAV30	CGTERTGGTSY GKLTFF	TRA J52	44725	患者 #4	M+N 肽库	高	高	低/阴性	DB3_CTACGTCCAT CTCCCA
TRBV6-5	CASSYSGGGRSPL HF	TRB J1-6	TRAV1-2	CAVKMDSSYKLI F	TRA J12	20677	患者 #4	M+N 肽库	中	低/阴性	低/阴性	DB3_TTTGTACAT GCCITC

[表 3-11]

TRBV2 8	CASSGQKLAKNI QYF	TRB J2-4	TRAV27	CAGPRGSNYKL TF	TRA J53	21951	患者 #5	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GAGCAGAGTA CTTAGC
TRBV4- 1	CASSPGGQGRYQ PQHF	TRB J1-5	TRAV9- 2	CALSTNAGKST F	TRA J27	50390	患者 #5	重组 S蛋白	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_CAGCGACGTT ATTCTC
TRBV7- 3	CASSSTGGQETQ YF	TRB J2-5	TRAV13 -1	CAAFQGAQKLV F	TRA J54	38135	患者 #5	失活 病毒	低/ 阴性	高	低/ 阴性	DB3_AGTCTTTTCAC CGAAAG
TRBV1 9	CASSPGRQVEAF F	TRB J1-1	TRAV8- 3	CARIGYSTLTF	TRA J11	34375	患者 #5	失活 病毒	中	高	低/ 阴性	DB3_GCAGCCATCA TGTCCC
TRBV3- 1	CASSPTLGGASYE QYF	TRB J2-7	TRAV29 /DV5	CAARATYSGAG SYQLTF	TRA J28	51305	患者 #5	M+N 肽库	高	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_ACTGCTCGTC TCCACT
TRBV1 1-3	CASSLHPGGQYE EQYF	TRB J2-7	TRAV13 -1	CAASRAGTALIF	TRA J15	31056	患者 #5	失活 病毒	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_TGCCCTAAGA GTAATC
TRBV6- 1	CASITDSAARPQ HF	TRB J1-5	TRAV12 -1	CVVNMRSNTG KLIF	TRA J37	38619	患者 #5	重组 S蛋白	低/ 阴性	中	低/ 阴性	DB3_CTGCGGATCT ATCCTA
TRBV5- 4	CASSRTSLADPNE QFF	TRB J2-1	TRAV5	CAAEADAGNML TF	TRA J39	22454	患者 #5	S 肽库	低/ 阴性	低/ 阴性	低/ 阴性	DB3_GGTGAAGCAA GAGGCT

在这些之中,检测出了患者间共有的TCR $\alpha\beta$ 对。将这些TCR $\alpha\beta$ 对指定作为来自于共有使用分别相同的V α 、J α 、V β 以及J β 的患者Ts-017及Ts-018的克隆1和2。进一步地,已知克

克隆1和2的CDR3 α 序列一致,CDR3 β 除1个氨基酸外均相同(表4及图2)。克隆1、2虽然来自于不同的受试者,但从序列的类似性推定其可识别相同表位。此外,均由Tfh簇确定,该表位可认为是能容易诱导Tfh的表位。

[表4]

	TRBV	CDR3 β	TRBJ	TRAV	CDR3 α	TRAJ	供体
克隆1	TRBV11-2	CASSQTYEQYF	TRBJ2-7	TRAV12-1	CVVNRGSSYKLIF	TRAJ12	患者#3
克隆2	TRBV11-2	CASSPTYEQYF	TRBJ2-7	TRAV12-1	CVVNRGSSYKLIF	TRAJ12	患者#4
克隆2	TRBV11-2	CASSPTYEQYF	TRBJ2-7	TRAV12-1	CVVNRGSSYKLIF	TRAJ12	患者#4

[0129] 针对患者Ts-018,克隆2作为共有完全相同的TCR序列的2个不同的条形码细胞测出。为调查TCR、克隆1和2的抗原特异性,分别将TCR α 链和 β 链转染进TCR缺陷T细胞杂交瘤中,建立TCR重组CD3+细胞(图1B)。

[0130] 在使用来自对应的各患者的由爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)转化的B细胞的存在下,使用各种抗原刺激这些TCR转染子。克隆1和2虽然对重组S蛋白和S肽库产生应答,但不M+N肽库产生应答。这与在单细胞分析中明确的初期抗原特异性一致(图3A)。

[0131] 因在没有抗原提呈细胞的存在下活化被排除,确认活化是借由MHC分子引起(图3B)。

[0132] 因在S₁₋₆₄₃以及S₆₃₃₋₁₂₇₃肽分别成库的2个药瓶#1(S₁₋₆₄₃)和#2(S₆₃₃₋₁₂₇₃)中,仅后者的肽库刺激了克隆1和2,故抗原肽包含于S蛋白的633-1273的位置(图3C)。

[0133] 然而,含有对应于304-338、421-475、492-519、683-707、741-770、785-802以及885-1273位置的175个肽的其他可利用的SARS-CoV-2S肽库(PepTivator(注册商标))(图4)不活化克隆1和2(图3D)。

[0134] 如这些结果所示,克隆1和克隆2的抗原表位位于S蛋白的氨基酸633-682、708-740、771-784或803-884的位置(图4)。

[0135] 然后,确定约束克隆1和2的HLA等位基因,以进一步减少表位肽的候选数量。

[0136] 发现从患者Ts-017和Ts-018二者提取的抗原提呈细胞(APC)可以活化克隆1和2。这表明了APC可以相互替换(图3E)。因此,分别以DRB1*15:01、DPA1*02:02-DPB1*05:01、DQA1*01:02-DQB1*06等、Ts-017和Ts-018之间共有的MHC II类等位基因作为HLA的候选。接着,为调查克隆1和2的S蛋白的识别,单独转染这些等位基因。

[0137] 结果表明,克隆1和2的二者仅在DRA*01:01和DRB1*15:01的存在下,对S肽库#2产生应答,由于DRA为单态性(monomorphism),故应答性由DRB1*15:01决定(图5B)。

[0138] 于是,使用NetMHC服务器软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>)检索可预测与DRA-DRB1*15:01结合的候选肽(图5C)。

[0139] 预测出2个强结合子(Binder)(S₈₂₈₋₈₄₆以及S₈₆₄₋₈₈₂)作为S蛋白的缩小区域内的候选(图5D)。接着,合成2个肽,刺激克隆1和2,其结果确定了以肽S₈₆₄₋₈₈₂作为克隆1和2二者的表位(图5E)。

[0140] 以上表明,克隆1和2的TCR在CDR3内的1个氨基酸(89位的脯氨酸与谷氨酰胺)不同,但双方的TCR识别相同MHC分子提呈的相同表位,因其来自不同供体,故表明克隆1和2为

公共克隆。该表位与对应人冠状病毒 (HCoV) -OC43的氨基酸序列的同源性较低。

[0141] 实际上,在表达DRA-DRB1*15:01的APC的存在下,克隆1和2均对来自HCoV-OC43S蛋白的肽库及所有蛋白质完全不产生应答(图6A)。进一步地,包含重症急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)以及中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-CoV)的其他HCoV均不含有相同的表位(图6B),因此表明与克隆1/2相关的人冠状病毒发生交叉反应的可能性低。

[0142] 接着,调查DRB1*15:01以外的MHC II类等位基因是否能够提呈克隆1/2识别的该抗原肽。

[0143] 其结果,也预测出S₈₆₄₋₈₈₂作为对DRB1*15:02及15:01的强结合子(图6C)。进一步地,DRB1*15:01和*15:02之间的氨基酸序列同一性为99.6%。因此,推测DRB1*15:02也是负责表位识别的某等位基因,并测试了具有DRB1*15:02但不具有DRB1*15:01的来自其他个体的APC。其结果可知,DRB1*15:02在S₈₆₄₋₈₈₂肽的存在下可刺激克隆1和2二者(图6D)。

[0144] (实施例2:表位的特定)

为进一步特定表位序列,合成了含有S₈₆₄₋₈₈₂肽及其周边肽的13种多肽(序列号44~56),调查是否会被克隆1/2识别。具体过程如下。按以下步骤制作在实施例1中发现的表克隆1/2(TCR-017或TCR-018)的细胞。合成克隆1/2(TCR-017或TCR-018)cDNA序列,分别克隆到逆转录病毒载体pMX-IRES-rat CD2以及pMX-IRES-human CD8中,将2个载体使用PEI MAX(Polysciences)一同转染进Phoenix包装细胞。使用含有逆转录病毒的上清液,对具有NFAT-GFP报告基因的小鼠T细胞杂交瘤进行感染,重组TCR $\alpha\beta$ 对。在来自患者Ts-018的APC的存在下,使用1 μ g/ml的合成肽刺激该细胞,刺激20小时后,通过GFP或CD69的表达评价T细胞的激活。由此可知,其结果如图9所示,序列号13的序列为激活所必需。

[0145] (实施例3:公共Tfh及表位的确定2)

考虑到日本人群组中的DRB1*15:02(10.6%)以及*15:01(7.7%)的频率(<http://hla.or.jp/>),如果存在这些克隆型,预计在18.3%的口中,克隆1和2能够对这些肽产生应答。本实施例中,在6人中的2人(33%)中确认了克隆1和2。

[0146] 接着,调查SARS-CoV-2大流行前的日本献血者样品中的克隆2/3的克隆型的产生,可知27人中9人具有克隆1/2的TCR β 克隆型。这与本实施例的比例一致。

[0147] 接着,考虑到克隆1/2是表现出Tfh特征的SARS-CoV-2特异性T细胞,为促进防御型体液免疫,假定克隆1/2在感染时为克隆增殖,按以下方法进行调查。

[0148] 由于DRB1*15:01/15:02在世界上并非是少数的等位基因(参考<http://www.allelefrequencies.net/tools/Report.aspx>),因此调查了在美国市民公开数据库(应对COVID-19事件的免疫应答反应;ImmuneRace、<https://immunerace.adaptivebiotech.com/>)中,健康个体(n=786)以及从COVID-19康复的个体(n=1,413)中的克隆1/2的克隆型的产生频率。在健康的群组和从COVID-19康复的群组中,各检出约17%和24%的克隆型(图5E上)。特别地,表明了各个体之间的该型克隆型的频率,相较于健康组的对照,在COVID-19恢复组中明显增加(p=0.0028),故表明该S蛋白特异性克隆在感染时,于不同个体中克隆式扩增(图4E下)。有趣的是,恢复的患者中克隆1/2的克隆型的产生频率比世界上的DRB1*15:01或15:02的等位基因频率(11.3%)大,故认为克隆1/2有可能识别其他HLA等位基因提呈的来自其他SARS-CoV-2的表位。

[0149] 接着,从来自SARS-COV-2的抗原刺激的健康供体和恢复的COVID患者分离的外

周血中筛选活化标记阳性T细胞,制成Tfh簇。在该Tfh簇中发明人确定的1735对TCR之中,相较于健康的群组,确定了恢复的COVID-19患者中明显增加的10个Tfh克隆型(图10)。应当注意到的是,这样的克隆型中的一半都是根据单细胞TCR测序,在样本库内的多名患者中实际测出的,实施例1中发现的TCR-017/018为第5个大幅增加的克隆型。

[0150] 为高效地确定这些克隆型的表位,确立了快速表位确定平台(图10B)。

[0151] 用于确定T细胞克隆型的表位的快速表位确定平台的流程如下。合成了覆盖了SARS-CoV-2S蛋白的全长的、约300种11个氨基酸重叠的15-mer肽,成库于多个96孔板。通过调查哪个肽活化克隆型,以确定每个克隆型的表位。

[0152] 通过使用该平台,确定了源自其他的COVID-19增加的Tfh克隆型表位(图10B)。其结果可知,在恢复的患者中明显增加的公共Tfh克隆型优先识别S表位(图10A、B)。确定的所有表位位于变异率较低的S蛋白的保守三聚体形成界面内的2个主要的热点(图10C),且这些克隆型的供体具有抗RBD及中和抗体。这些结果表明,保守S蛋白的表位特异性公共Tfh克隆型,在SARS-CoV-2感染中扩大,有助于从轻症中恢复。

[0153] (实施例4:SARS-CoV-2S₈₆₄₋₈₈₂肽的外周血单核细胞(PBMC)的再刺激试验)

使从实验参加者获得的PBMC 1.0×10^5 cells细胞悬浮在RPMI1640培养基(5%人血清,添加青霉素penicillin/链霉素streptomycin)中,添加SARS-CoV-2S₈₆₄₋₈₈₂肽至其浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$,在96孔板(U型底)培养(第0天)。

[0154] 接着,在第4天以及第7天添加人IL-2至浓度为10IU/ml。进行适当的培养基的更换(Passage)。

[0155] 在第10天,使用细胞分选仪SH-800S(SONY)将细胞进行如下分选。使用CD3、CD4抗体以及PI进行染色,按照FSC SSC设门(gating)、PI阴性门(negative gating)、CD3阳性门(positive gating)、CD4阳性细胞(positive cells)的顺序进行分选。此时,使用CXCR5、CD45RA、PD-1抗体进行染色,同时也进行FCM解析。

[0156] 使分选获得的CD4阳性细胞 2.0×10^4 cells以及经EBV感染永生化的来自患者的B细胞 3.0×10^3 cells悬浊在RPMI1640培养基(5%人血清)50 μl 中,使用96孔板(U型底)进行多孔培养。其中半数在培养基中加入SARS-CoV-2S₈₆₄₋₈₈₂肽至浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0157] 24小时后,回收培养基的上清液,使用ELISA进行IL-21浓度测定。测定结果如图7所示。

[0158] 测定结果是,比较SARS-CoV-2S₈₆₄₋₈₈₂肽的刺激或未刺激的两种情况,可知培养基中的IL-21浓度较高。IL-21为从滤泡性T细胞产生的特征性细胞因子。从该结果表明,通过SARS-CoV-2S₈₆₄₋₈₈₂肽的刺激,从初始样品的PBMC中优先诱导出滤泡性T细胞。

[0159] (实施例5:基于丙氨酸扫描的氨基酸序列的精确筛查)

制作将序列号13的氨基酸序列的各氨基酸分别替换为丙氨酸的氨基酸序列(原本为丙氨酸时,替换为甘氨酸),调查其能否被克隆1/2识别。具体如下。使用含有所示变异的 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的S867-881肽,在来自患者Ts-018的APC存在下对实施例2中制作的TCR $\alpha\beta$ 重组细胞进行刺激,刺激20小时后,通过GFP或CD69表达评价T细胞的激活。其结果如图8所示,当替换Q或者T时,序列将变得不被识别。

[0160] 需要说明的是,本发明不限于上述实施例,在本发明的主旨范围内,可具有多种变换形态的实施方式。

[0161] (备注)

如上所述,使用本发明的优选实施方式列举了本发明,但本发明不应解释为限定于该实施方式。本发明可理解为应当仅根据专利权利要求范围来解释其范围。本领域技术人员可以从本发明的具体优选实施方式的记载中,根据本发明的记载和技术常识来实施等价的范围。应当理解,在此引用的专利、专利申请和文献的内容应当作为参考并入本说明书,其内容本身具体如本文所述。本申请基于向日本专利局于2021年3月16日提交的专利申请2021-42666主张优先权,其内容作为本申请地参考其内容被援引。

[工业上的利可利用性]

[0162] 本发明可在疫苗开发、细胞疗法等领域使用。

[序列表的非关键文字]

[0163] 序列号1 ($S_{864-882}$ 的具体表位部位的氨基酸序列)

序列号2 (克隆1和2的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号3 (克隆1的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号4 (克隆2的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号5 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号6 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号7 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号8 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号9 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号10 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号11 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号12 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号13 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)

序列号14 (图10A的克隆1-1的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号16 (图10A的克隆1-2的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号15 (图10A的克隆1-2的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号17 (图10A的克隆2的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号18 (图10A的克隆2的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号19 (图10A的克隆3-1的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号20 (图10A的克隆3-1的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号21 (图10A的克隆3-2的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号22 (图10A的克隆4的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号23 (图10A的克隆4的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号24 (图10A的克隆5-2的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号25 (图10A的克隆6的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号26 (图10A的克隆6的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号27 (图10A的克隆7-1的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号28 (图10A的克隆7-1的CDR3 β 的氨基酸序列)

序列号29 (图10A的克隆7-2的CDR3 α 的氨基酸序列)

序列号30 (图10A的克隆8的CDR3 α 的氨基酸序列)
序列号31 (图10A的克隆8的CDR3 β 的氨基酸序列)
序列号32 (图10A的克隆9的CDR3 α 的氨基酸序列)
序列号33 (图10A的克隆9的CDR3 β 的氨基酸序列)
序列号34 (图10A的克隆10-1的CDR3 α 的氨基酸序列)
序列号35 (图10A的克隆10-1的CDR3 β 的氨基酸序列)
序列号36 (图10A的克隆10-2的CDR3 α 的氨基酸序列)
序列号37 (图10A的克隆10-2的CDR3 β 的氨基酸序列)
序列号38 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)
序列号39 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)
序列号40 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)
序列号41 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)
序列号42 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)
序列号43 (滤泡性T细胞表位的氨基酸序列)
序列号44 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号45 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号46 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号47 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号48 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号49 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号50 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号51 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号52 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号53 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号54 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号55 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)
序列号56 (SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列)

<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa可以为任何天然存在的氨基酸
<400> 7
Ile Xaa Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu
1 5
<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa可以为任何天然存在的氨基酸
<400> 8
Ile Ala Gln Xaa Tyr Thr Ser Ala Leu Leu
1 5 10
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列
<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa可以为任何天然存在的氨基酸
<400> 9
Ile Ala Gln Tyr Thr Xaa Ala Leu Leu
1 5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 克隆4的CDR3 α 的氨基酸序列

<400> 22

Cys Ala Val Ser Asp Gln Gly Arg Asp Asp Lys Ile Ile Phe

1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 克隆4的CDR3 β 的氨基酸序列

<400> 23

Cys Ser Ala Arg Asp Trp Arg Glu Glu Thr Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 克隆5-2的CDR3 β 的氨基酸序列

<400> 24

Cys Ala Ser Ser Pro Thr Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 克隆6的CDR3 α 的氨基酸序列

<400> 25

Cys Ala Glu Asn Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Lys Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 克隆6的CDR3 β 的氨基酸序列

<400> 26

Cys Ser Ala Lys Thr Ser Gly Arg Gly Glu Thr Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 克隆7-1的CDR3 α 的氨基酸序列

<400> 27

Cys Ala Ala Thr Leu Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 克隆7-1的CDR3 β 的氨基酸序列

<400> 28

Cys Ala Ser Ser Ser Arg Glu Asp Thr Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 克隆7-2的CDR3 α 的氨基酸序列

<400> 29

Cys Ala Ala Thr Ser Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(artificial sequence)

<220>

<223> 克隆8的CDR3 α 的氨基酸序列

<400> 30

Cys Ala Ala Ser Pro Pro Ser Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile

1	5	10	15
Phe			
<210> 31			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (artificial sequence)			
<220>			
<223> 克隆8的CDR3 β 的氨基酸序列			
<400> 31			
Cys Ser Val Tyr Arg Gly Leu Asp Glu Lys Leu Phe Phe			
1	5	10	
<210> 32			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (artificial sequence)			
<220>			
<223> 克隆9的CDR3 α 的氨基酸序列			
<400> 32			
Cys Ala Leu Ser Gly Gly Asn Arg Asp Asp Lys Ile Ile Phe			
1	5	10	
<210> 33			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (artificial sequence)			
<220>			
<223> 克隆9的CDR3 β 的氨基酸序列			
<400> 33			
Cys Ser Ala Arg Asp Trp Arg Gly Glu Thr Gln Tyr Phe			
1	5	10	
<210> 34			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (artificial sequence)			
<220>			
<223> 克隆10-1的CDR3 α 的氨基酸序列			
<400> 34			
Cys Ala Ala Gln Tyr Ala Leu Asn Phe			
1	5		
<210> 35			

<220>

<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列

<400> 39

Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val
1 5 10 15

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列

<400> 40

Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列
T cell)

<400> 41

Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列
T cell)

<400> 42

Lys Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg
1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2滤泡辅助性T细胞的表位的氨基酸序列
T cell)

<400> 43

Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser
1 5 10

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列

<400> 44

Leu Pro Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列

<400> 45

Pro Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列

<400> 46

Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列

<400> 47

Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 48

Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 49

Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 50

Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr
 1 5 10 15
 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 51

Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile
 1 5 10 15
 <210> 52

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 52
 Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 53
 Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser
 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 54
 Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列
 <400> 55
 Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp
 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> SARS-CoV-2蛋白的一部分的氨基酸序列

<400> 56

Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr
1 5 10 15

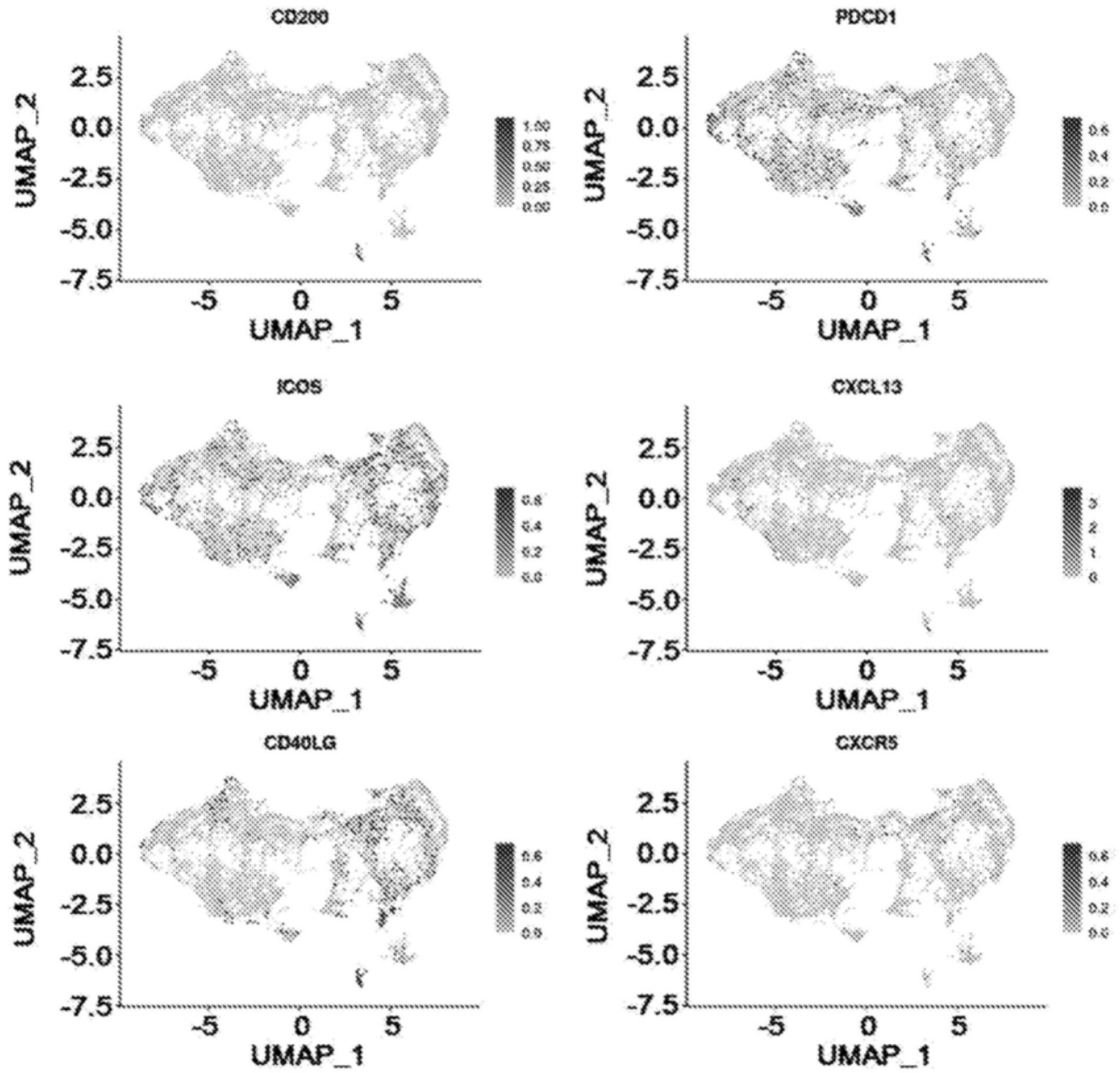


图1

克隆1	TRAV12-1	TGTGTGGTGAACCGGGGAGCAGCTATAAATTGATCTTC	TRAJ12
		C V V N R G S S Y K L I F	
克隆2	TRAV12-1	TGTGTGGTGAACAGAGGTAGCAGCTATAAATTGATCTTC	TRAJ12
		C V V N R G S S Y K L I F	
克隆1	TRBV11-2	TGTGCCAGCAGTCAACCTACGAGCAGTACTTC	TRBJ2-7
		C A S S Q T Y E Q Y F	
克隆2	TRBV11-2	TGTGCCAGCAGCCCTACCTACGAGCAGTACTTC	TRBJ2-7
		C A S S P T Y E Q Y F	

图2

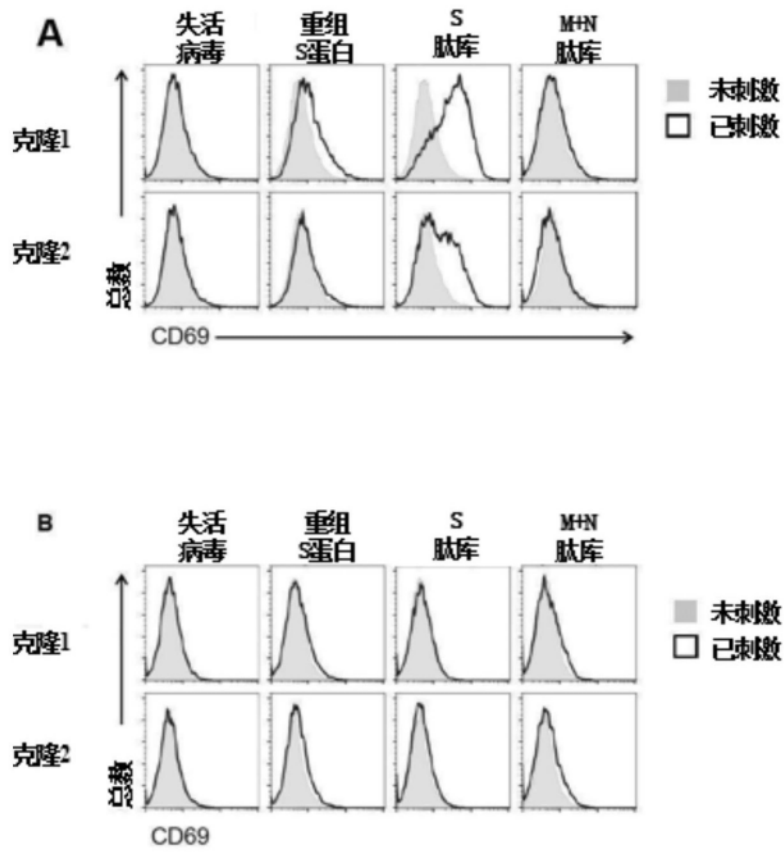


图3-1

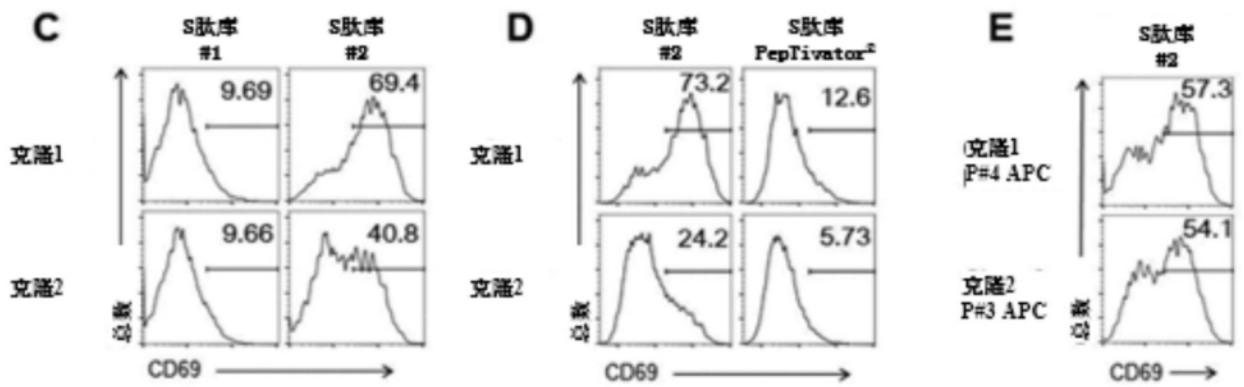


图3-2



图4

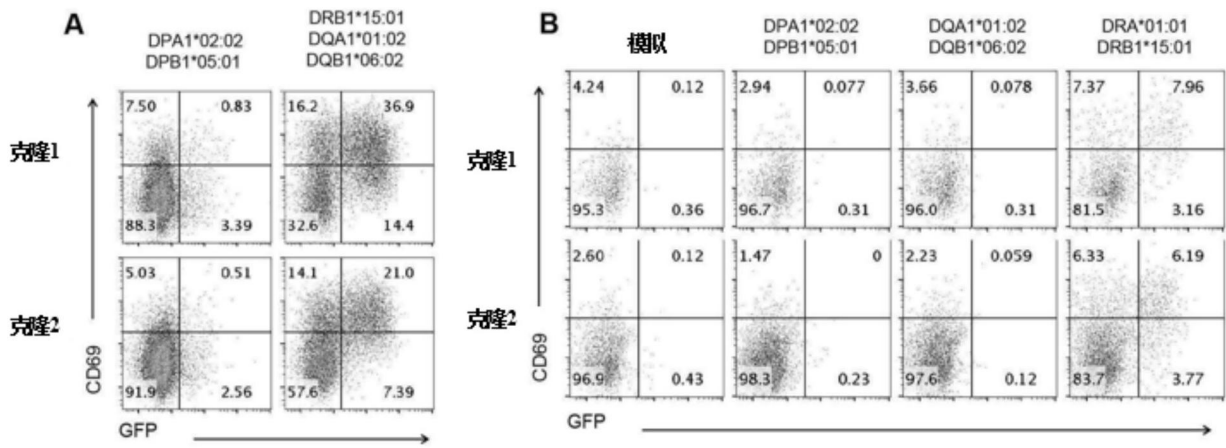


图5-1

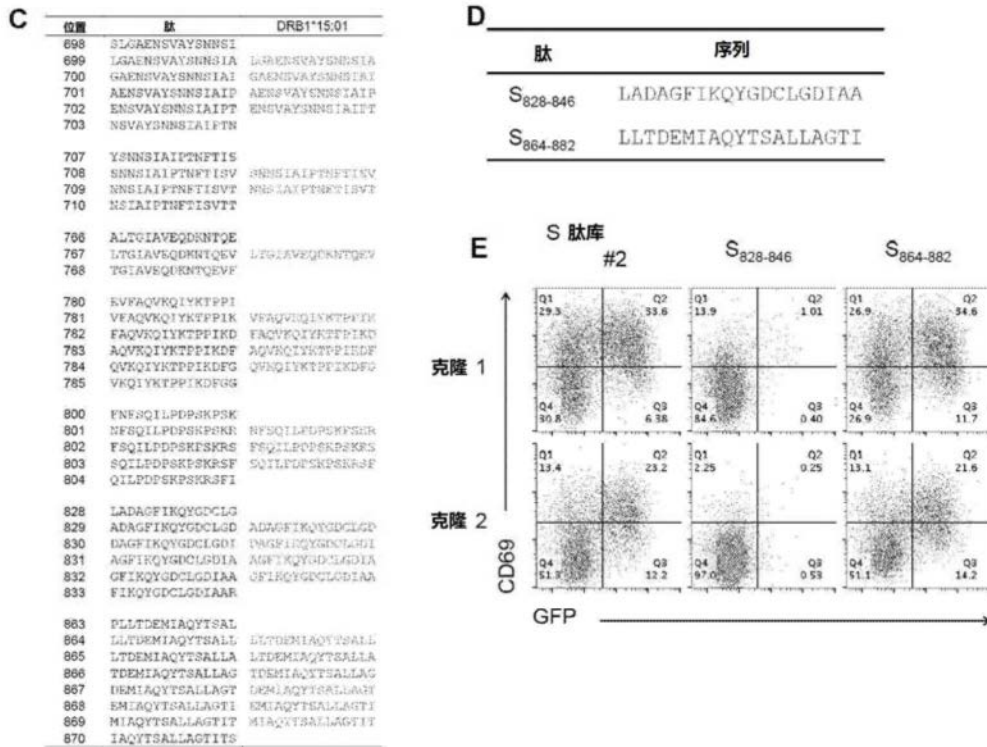


图5-2

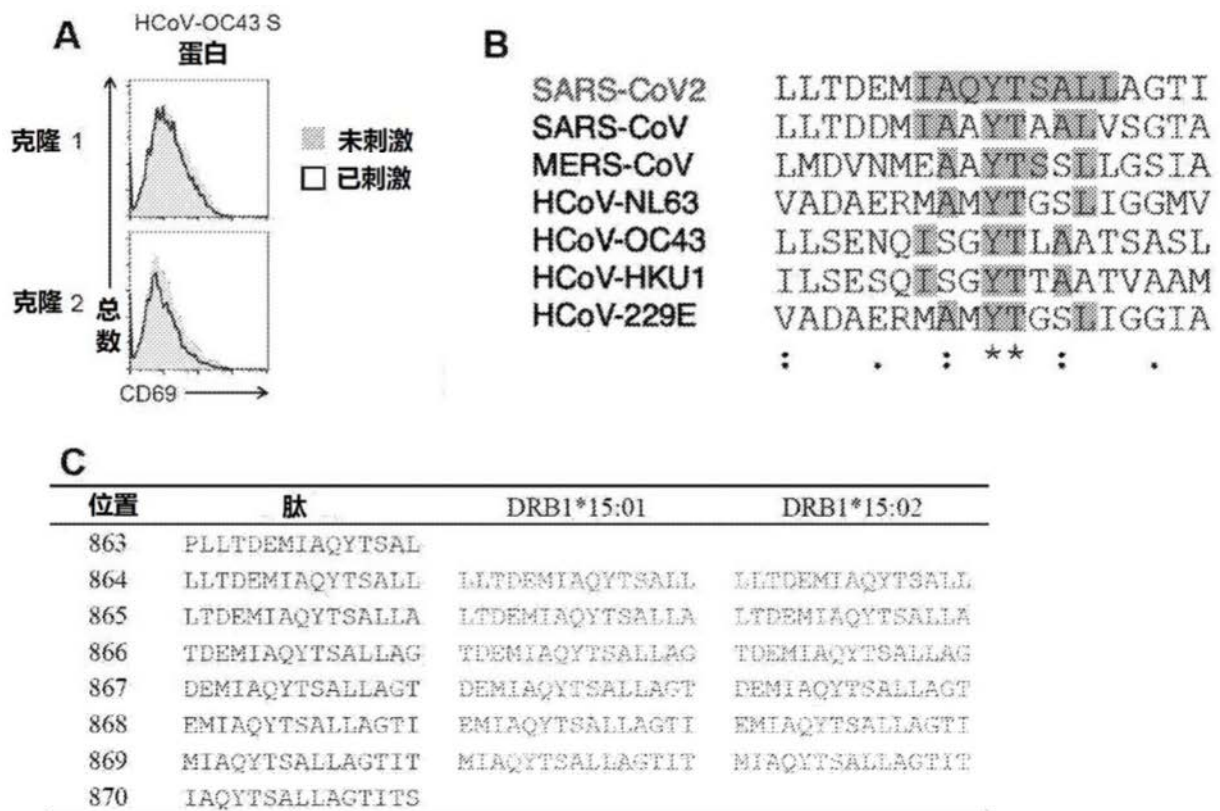


图6-1

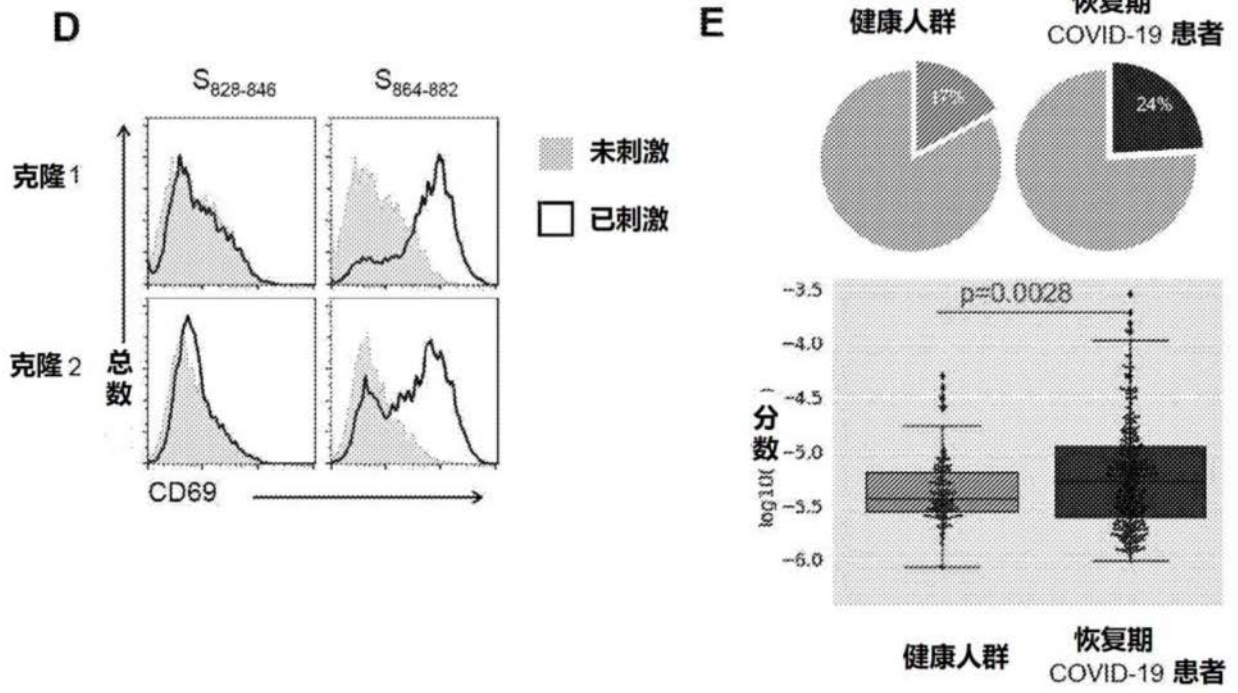


图6-2

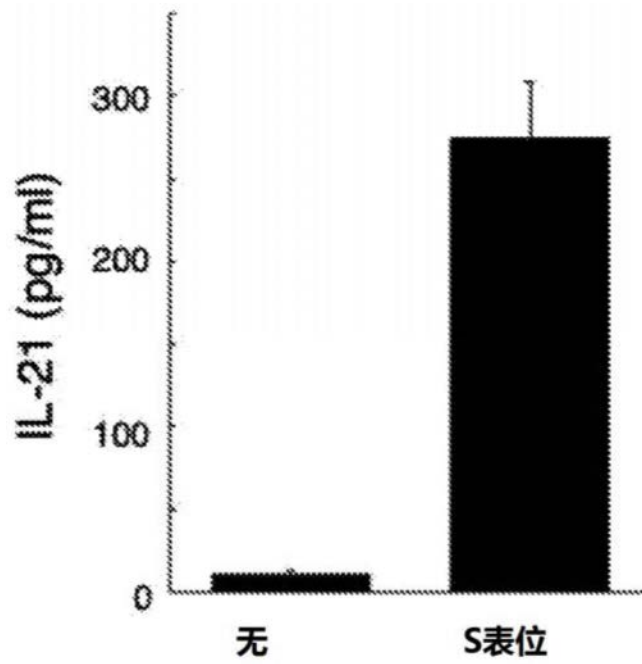


图7

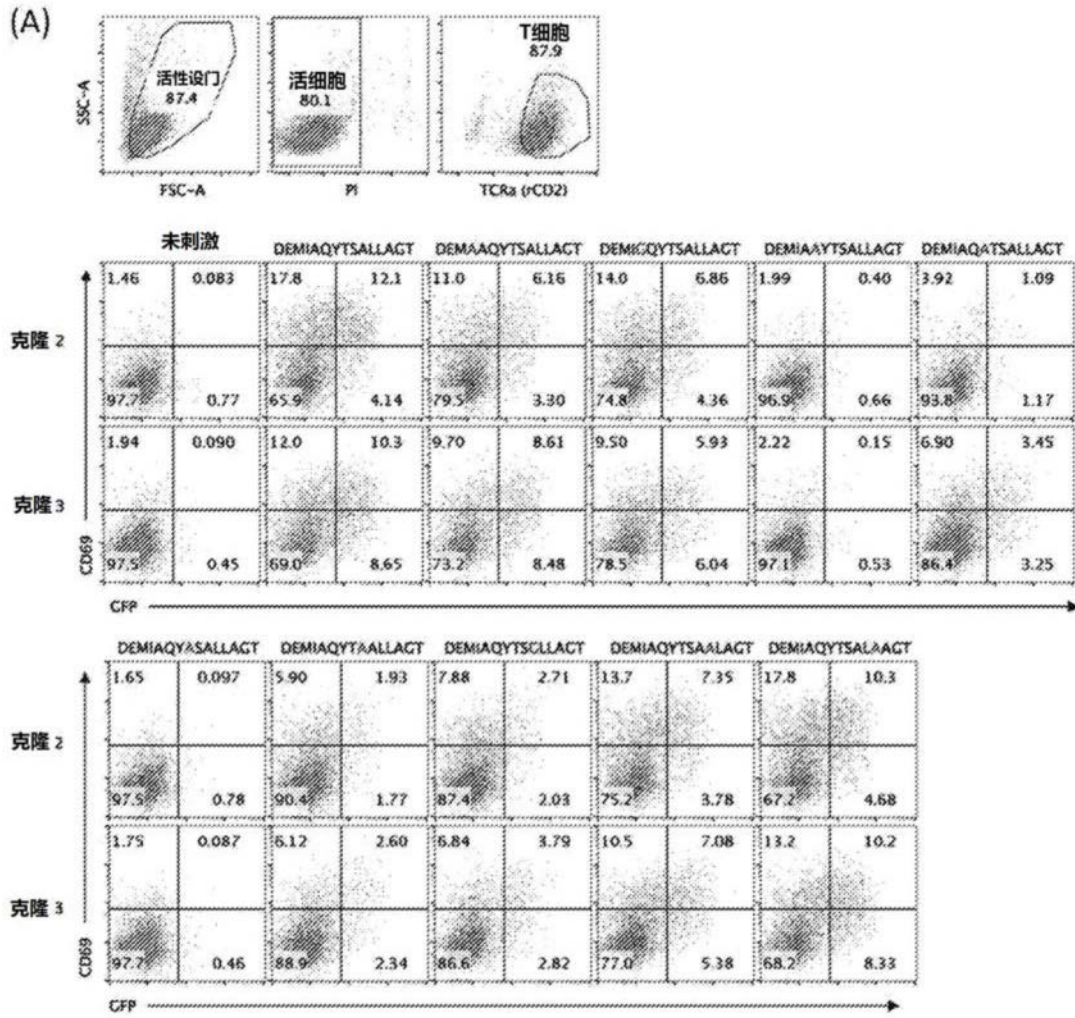


图8-1

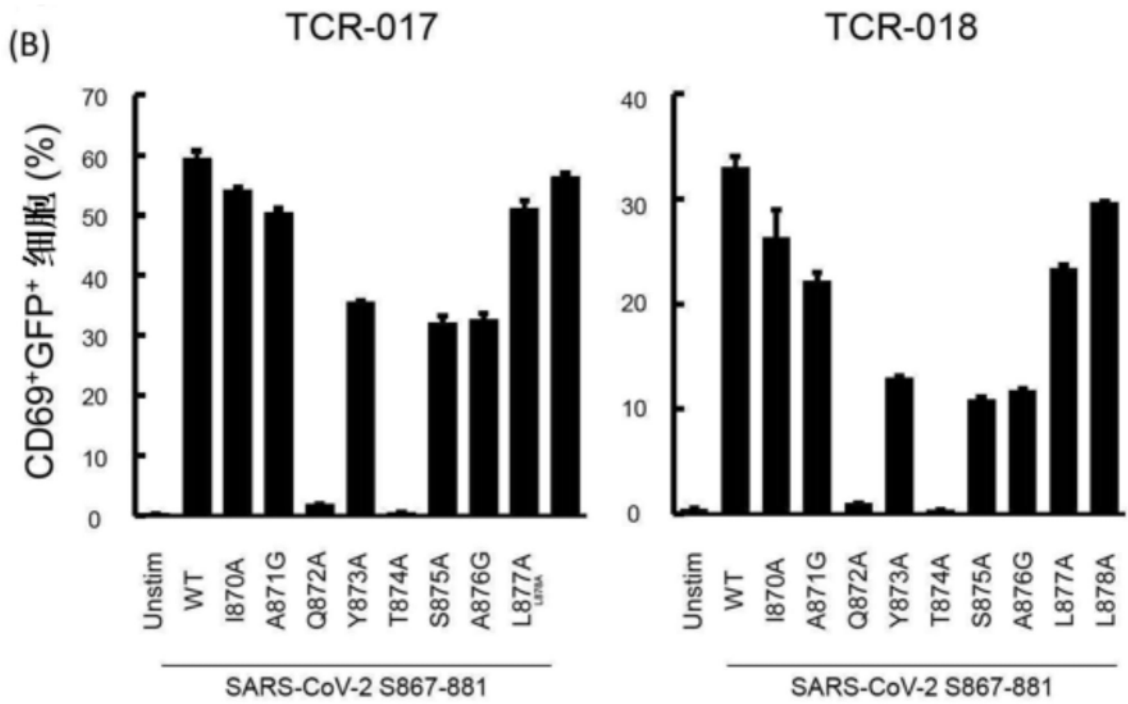


图8-2

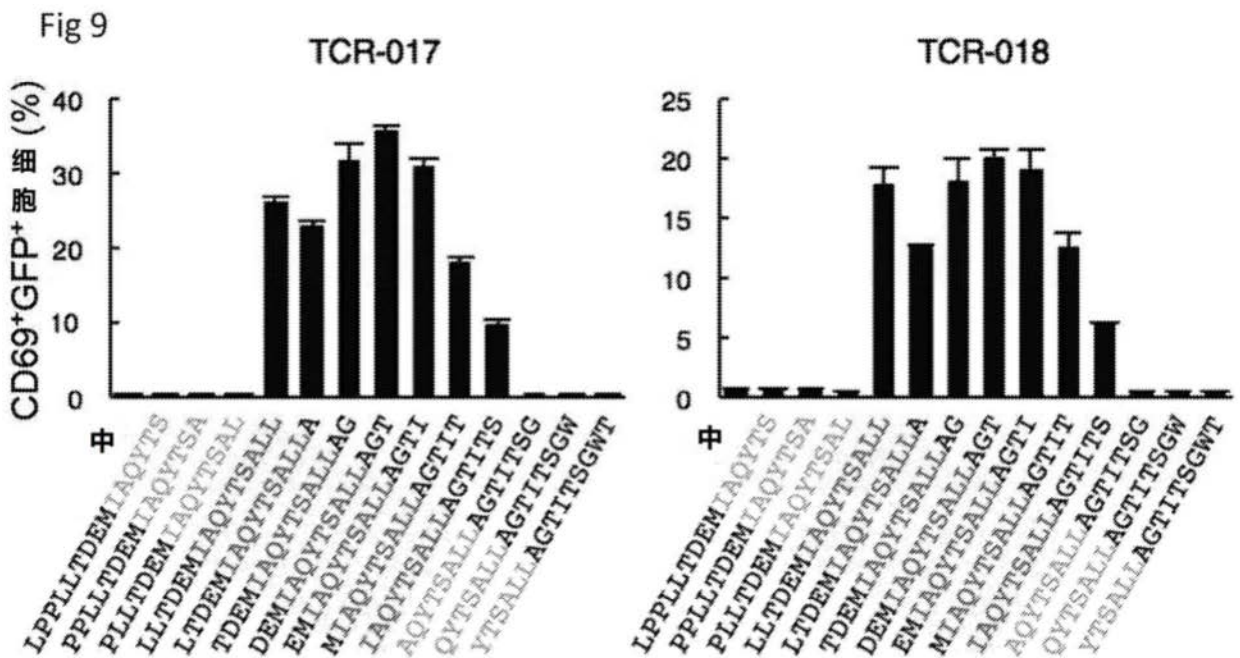


图9

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K			
											克隆型	供体	TRBV
1#	Ts-018	7-3	CASSLAGSSTDTQYF	2-3	8-2	CVVSRFGSKLFF	10	14.5	21.9	2.3	2.4e-8*	14.8	25.9
	Ts-009	7-3	CASGQAGSSTDTQYF	2-3	2	CALAKACMLTF	39						
2	Ts-009	6-1	CASSGASRQQRK	1-5	12-1	CVVRRGSASLIF	3	3.1	13.8	5.9	5.0e-7*	11.1	3.7
3#	Ts-018	20-1	CSARKPTQYF	2-5	12-3	CMTYSGSYKVTF	13	6.0	15.1	2.0	0.0001*	22.2	18.5
	Ts-025	20-1	CENRQVYKQYF	2-5	12-3	CMTFSSGIDKQYF	13						
4	Ts-025	20-1	CSARQWREKQYF	2-5	8-4	CAVSPQSDDLIF	30	2.0	16.6	3.0	0.0003*	3.7	0.0
5#	Ts-017	11-2	CASSQYEQYF	2-7	12-1	CVNRRSSRLIF	12						
(TCR-017/018)	Ts-018	11-2	CASSPYEQYF	2-7	12-1	CVNRRSSYLIF	12	17.1	24.1	1.4	0.003*	14.8	33.3
6	Ts-002	20-1	CSAKTSGRQYF	2-5	13-2	CARNSGSRKILF	53	1.5	8.8	2.6	0.006*	96.3	0.0
7#	Ts-010	7-9	CASSRQYF	2-3	23	CMTLNSGRSSQYF	28						
	Ts-013	7-9	CASSRQYF	2-3	23	CMTSYGAGKQYF	28	1.7	3.1	3.1	0.01*	7.4	3.7
8	Ts-013	29-1	CSVYGLDRLKLF	1-4	23	CASPSYGSQKILF	42	0.3	0.1	2.7	0.02*	0.0	0.0
9	Ts-025	20-1	CSARKRQYF	2-5	9-2	CALSGRKRKILF	30	1.9	10.3	1.9	0.02*	7.4	3.7
10#	Ts-013	11-2	CASSHTGRYEQYF	2-7	13-1	CACQYALNF	41						
	Ts-025	11-2	CASSLQSRRYEQYF	2-7	13-1	CACQYALNF	41	1.5	2.6	2.0	0.03*	0.0	3.7

图10-1

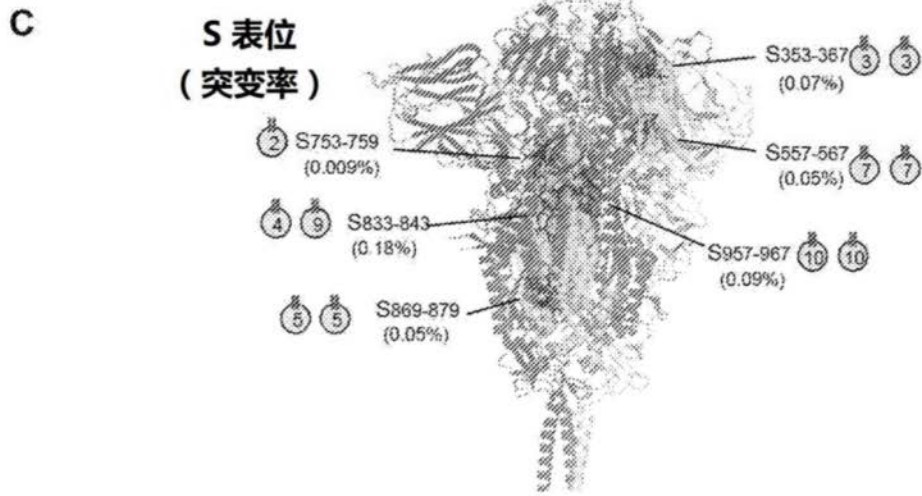
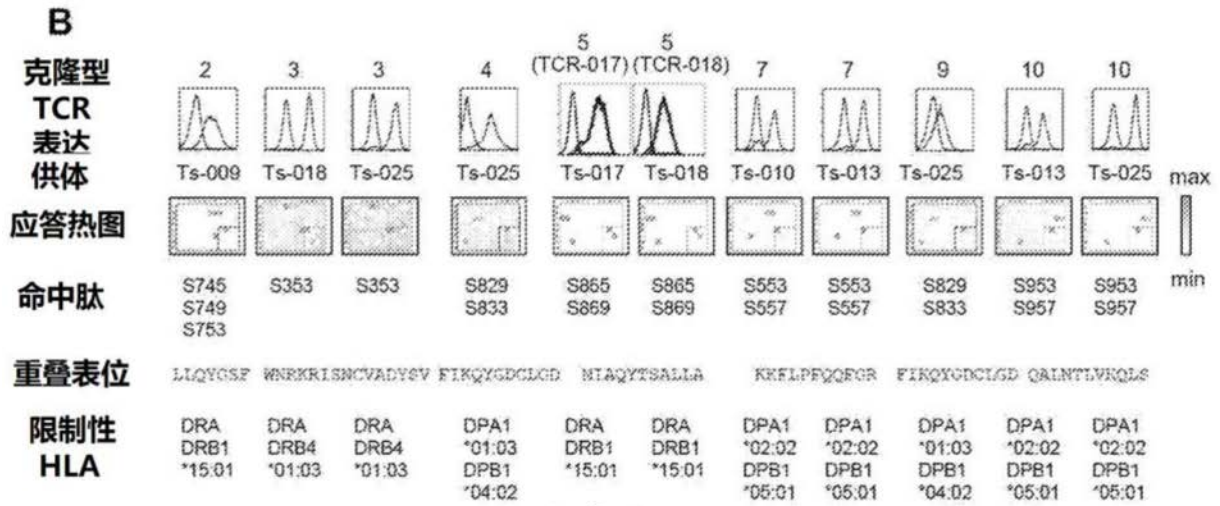


图10-2