



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111344009 A

(43)申请公布日 2020.06.26

(21)申请号 201880072392.9

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22)申请日 2018.09.11

代理人 封新琴

(30)优先权数据

17306179.7 2017.09.13 EP

(51)Int.Cl.

A61K 39/245(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 31/12(2006.01)

2020.05.08

A61K 39/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/074369 2018.09.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/052975 EN 2019.03.21

(71)申请人 赛诺菲巴斯德

地址 法国里昂

(72)发明人 P·乔克斯 R·杜马斯

J·海恩斯勒 S·皮雄

F·皮拉斯-杜斯

权利要求书2页 说明书46页

序列表9页 附图12页

(54)发明名称

人巨细胞病毒免疫原性组合物

(57)摘要

本发明涉及一种免疫原性组合物，其包含HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和诱导Th1的佐剂。它进一步涉及供用作HCMV疫苗的免疫原性组合物。

1. 一种免疫原性组合物,其包含:
  - HCMV gB抗原;
  - HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原;和
  - 诱导Th1的佐剂,
2. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述诱导Th1的佐剂与包含相同HCMV gB抗原和相同HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59相比在小鼠中诱导更低的IgG1:IgG2a,c比率,和/或更高的INF- $\gamma$ 水平,和/或更低的IL-5水平。
3. 根据权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述诱导Th1的佐剂包含:
  - TLR-4激动剂;或
  - 重均分子量Mw的范围为350至650kDa的聚丙烯酸聚合物盐。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述诱导Th1的佐剂包含:
  - 选自下组的TLR-4激动剂:脂多糖、单磷酰基脂质A (MPL)、3-脱氧酰基化的单磷酰基脂质A (3D-MPL)、吡喃葡萄糖基脂质佐剂 (GLA)、第二代脂质佐剂 (SLA)、通过非糖类骨架连接的磷脂二聚体和氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯,或其衍生物;或
  - 重均分子量Mw的范围为350至650kDa的聚丙烯酸聚合物盐。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述诱导Th1的佐剂包含TLR-4激动剂。
6. 根据权利要求5所述的免疫原性组合物,其中所述TLR4激动剂与递送系统如水性纳米悬浮液、磷酸钙、脂质体、病毒颗粒、ISCOM、微米粒子和纳米粒子或乳液组合。
7. 根据权利要求6所述的免疫原性组合物,其中所述递送系统是水包油乳液。
8. 根据权利要求5-7中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述TLR-4激动剂选自E6020 (CAS号:287180-63-6) 和GLA (CAS号1246298-63-4) TLR-4激动剂。
9. 根据权利要求1-4中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述诱导Th1的佐剂包含重均分子量Mw的范围为350至650kDa的直链或支链聚丙烯酸聚合物盐。
10. 根据权利要求9所述的免疫原性组合物,其中所述直链或支链聚丙烯酸聚合物盐是PAA225000。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述HCMV gB抗原在内切蛋白水解切割位点处包含一个或若干个突变。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述HCMV gB抗原是全长gB多肽、缺少至少一部分跨膜域的全长gB多肽、缺少基本上全部跨膜域的全长gB多肽、缺少至少一部分胞内域的全长gB多肽、缺少基本上全部胞内域的全长gB多肽或缺少基本上跨膜域和胞内域二者的全长gB多肽。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述HCMV gB抗原是gBdTm。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中在所述HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原中,所述gH抗原缺少至少一部分跨膜域,优选所述gH抗原缺少基本上全部跨膜域。
15. 根据权利要求14所述的免疫原性组合物,其中所述gH包含由UL75基因编码的全长gH的胞外域。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述HCMV gB和所述HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物是唯一的HCMV抗原。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的免疫原性组合物,其用作HCMV疫苗。

18. 根据权利要求17的用于所述用途的免疫原性组合物,其中所述疫苗增加中和抗体水平和/或持久性。

## 人巨细胞病毒免疫原性组合物

[0001] 本发明涉及一种免疫原性组合物，其包含HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和诱导Th1的佐剂。它进一步涉及供用作HCMV疫苗的免疫原性组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 人巨细胞病毒(HCMV)是一种普遍存在的病毒，其属于疱疹病毒科。该病毒由衣壳中含有的线性双链的脱氧核糖核酸(DNA)组成，该衣壳由被膜包围，并包裹在脂质双层中，该脂质双层在其表面上携带糖蛋白刺突。像此病毒科的其它成员一样，HCMV拥有潜伏期和重新激活的特征。HCMV具有感染许多细胞并在其中潜伏的能力。

[0004] 在具有免疫活性的宿主中，大多数HCMV感染是无症状的或非常轻微的一些非特异性症状如疲劳、不适、中度发烧、淋巴结病、肝肿大或肝酶轻微升高。然而，在大约10%的既往健康个体中观察到异嗜阴性的单核细胞增多症。

[0005] 相反，在子宫内感染的新生儿和被AIDS免疫抑制的成人中或在实体器官或骨髓移植的背景下，临床表现可能非常严重。

[0006] HCMV感染的患病率随年龄增长而增加，并受社会经济因素的影响。血清学调查已显示，发展中国家和发达国家的较低社会经济群体中的患病率较高。对于育龄妇女，HCMV血清反应阳性妇女的比例范围为从发达国家上等收入群体中的约50%到低收入群体中的80%以上。近二十年内在不同西欧国家中对包括不同年龄段、女性和男性在内的一般人群进行的调查在全局上显示，幼儿和青少年的HCMV血清阳性率的范围在40%-50%，而在年龄较大的受试者(40岁及以上)中，HCMV血清阳性率高于80%。

[0007] HCMV在受感染个体的分泌物中长期散布，所述分泌物包括尿液、唾液、乳、精液、生殖器分泌物；因此，HCMV或水平传播(从儿童到儿童、从孩子到父母以及性伴侣之间通过亲密接触)或通过胎盘或在出生时通过体液接触和母乳喂养从母亲到胎儿或婴儿之间垂直传播或通过暴露于血液制品或移植器官传播。

[0008] HCMV是发达世界中先天性感染的最常见原因。先天性感染是指在新生儿出生之前从母亲传播至胎儿的感染。在美国，每年估计有8000名婴儿因先天性HCMV感染而致残，包括智力迟钝、失明和感觉神经性耳聋。

[0009] 在先天性感染的新生儿中，有5%至10%的婴儿在出生时具有主要表现，如小头畸形、脉络膜视网膜炎、颅内钙化、肝脾肿大、肝炎、黄疸、直接高胆红素血症、血小板减少症、瘀点和贫血。在这些具有有症状的先天性HCMV疾病的新生儿中，婴儿早期的死亡率为大约10%，在幸存者中，50-90%将具有后遗症，如智力迟钝、脑瘫、感觉神经性听力损失或视力障碍。

[0010] 许多先天性HCMV感染的婴儿在出生时是无症状的。随访研究显示，大约15%的出生时无症状且在新生儿时期通过病毒学筛查被鉴定为HCMV血清反应阳性的婴儿将有后遗症，如听力损失或中枢神经系统异常。

[0011] 总体而言，每年在欧洲和在美国出生的大约17,000名婴儿将具有永久性后遗症。

[0012] 与在妊娠后期发生原发性感染相比，在妊娠的第一孕期发生原发性感染的先天性

HCMV感染更频繁且更严重。总体而言,妊娠期间原发性HCMV感染与40%的传播至胎儿的风险有关。

[0013] 目前没有预防或治疗妊娠期间的母系HCMV感染或先天性HCMV感染的有效手段。

[0014] HCMV还是器官和骨髓移植接受者以及AIDS患者中的重要病毒病原体。HCMV血清反应阴性实体器官移植接受者中与HCMV相关的发病率接近60%。在实体器官移植中,当血清反应阴性患者从HCMV阳性供体接受移植时,该疾病最为严重。相反地,在骨髓或干细胞移植中,在接受来自血清反应阴性供体的细胞的HCMV血清反应阳性受试者中该疾病最为严重,这显示HCMV感染的起源是内源性感染的再活化。

[0015] HCMV在大约15%的同种异体移植接受者中引起肺炎、肝炎、胃肠道疾病、骨髓抑制和视网膜炎。除这些直接的终末器官疾病外,HCMV还已经与间接作用相关,如移植排斥、加速动脉粥样硬化和可导致细菌或真菌感染的免疫抑制。

[0016] 因此,在医学研究所疫苗优先报告中,HCMV疫苗的开发被视为主要的公共卫生目标(Kathleen R,Stratton,Jane S,Durch,Lawrence RS.Editors committee to study priorities for Vaccine Development Division of Health Promotion and Disease Prevention Institute of Medicine.In:Vaccines for the 21st century:A tool for decision making.Washington D.C.:National Academy Press;2000)。已经描述了许多候选疫苗,但是到目前为止,没有一种被许可(Plotkin等,Vaccines,第6版,Ed.Elsevier,2013,Schleiss等,Cytomegalovirus vaccines,第1032–1041页)。

[0017] 具有MF59佐剂的巨细胞病毒糖蛋白B疫苗在移植接受者的2期随机化安慰剂对照的试验中显示出有希望的结果(Griffiths等,Lancet,2011,377 (9773) :1256–63)。一项育龄妇女中的2期安慰剂对照的、随机化、双盲试验,与安慰剂相较,评估了由重组HCMV包膜糖蛋白B和MF59佐剂组成的相同疫苗。结果显示,在预防原发性HCMV的HCMV获得中有50%的功效。然而,免疫原性结果显示,由gB/MF59制剂诱导的中和抗体(Ab)的水平在施用第3剂量后一个月达到峰值水平,然后迅速下降(Pass等,The New England Journal of Medicine,2009,360:1191–9)。

[0018] 因此,需要改善HCMV疫苗效力,特别是寻找一种通过诱导持续的免疫应答而增加中和抗体水平并诱导长期保护的疫苗。还需要寻找一种更特别地诱导更广泛的免疫应答的HCMV疫苗。

[0019] 发明描述

[0020] 出乎意料地,本发明的发明人现已经发现了符合这些要求的新的免疫原性组合物。

[0021] 本发明因此涉及一种免疫原性组合物,其包含HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和诱导Th1的佐剂。

[0022] 特别地,所述诱导Th1的佐剂包含:

[0023] -TLR-4激动剂;或

[0024] -重均分子量Mw的范围为350至650kDa的聚丙烯酸聚合物盐。

[0025] 在一个实施方案中,所述诱导Th1的佐剂包含TLR-4激动剂。

[0026] 特别地,所述TLR4激动剂与递送系统如水性纳米悬浮液、磷酸钙、脂质体、病毒颗粒、ISCOM、微米粒子和纳米粒子或乳液组合。

- [0027] 更特别地,所述递送系统是水包油乳液。
- [0028] 特别地,所述TLR-4激动剂选自E6020 (CAS号:287180-63-6) 和GLA (CAS号1246298-63-4) TLR-4激动剂。
- [0029] 在一个实施方案中,所述诱导Th1的佐剂包含重均分子量Mw的范围为350至650kDa的直链或支链聚丙烯酸聚合物盐,特别是PAA225000。
- [0030] 特别地,所述HCMV gB抗原在内切蛋白水解切割位点处包含一个或若干个突变。
- [0031] 仍特别地,所述HCMV gB抗原是全长gB多肽、缺少至少一部分跨膜域的全长gB多肽、缺少基本上全部跨膜域的全长gB多肽、缺少至少一部分胞内域的全长gB多肽、缺少基本上全部胞内域的全长gB多肽或缺少基本上跨膜域和胞内域二者的全长gB多肽。
- [0032] 更特别地,所述HCMV gB抗原是gBdTm。
- [0033] 特别地,在所述HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原中,所述gH抗原缺少至少一部分跨膜域,优选地所述gH抗原缺少基本上全部跨膜域。
- [0034] 更特别地,所述gH包含由UL75基因编码的全长gH的胞外域。
- [0035] 仍特别地,在根据本发明的免疫原性组合物中,所述HCMV gB和所述HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物是唯一的HCMV抗原。
- [0036] 本发明进一步涉及根据本发明的免疫原性组合物供用作HCMV疫苗。
- [0037] 特别地,所述疫苗增加中和抗体水平和/或持久性。
- [0038] 免疫原性组合物
- [0039] 如先前所提及的,根据本发明的免疫原性组合物包含:
- [0040] -HCMV gB抗原;
- [0041] -HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原;和
- [0042] -诱导Th1的佐剂。
- [0043] “HCMV”用于人巨细胞病毒,并且是人巨细胞病毒的任何株。
- [0044] 术语“包含(comprising)”/“包含(comprises)”/“包含(comprise)”/“包含(comprised)”分别涵盖“包括(including)”/“包括/includes)”/“包括(include)”/“包括(included)”以及“组成(consisting)”/“组成(consists)”/“组成(consist)”/“组成(consisted)”,例如“包含”X的组合物,可分别仅由X组成,或可包括额外的内容,例如X+Y。
- [0045] 如本文所用的“抗原”具有本领域技术人员已知的一般含义。特别地,它指含有引发免疫应答的一个或多个表位(线性、构像或二者)的任何分子。
- [0046] 在本发明的上下文中,抗原进一步包括具有对天然序列的修饰(如缺失、添加和取代)的蛋白质,只要该蛋白质维持足够的免疫原性。这些修饰可以是故意的,例如通过定点诱变,或者可以是偶然的,如在抗原在宿主细胞中表达期间发生的突变。抗原还可以是由共有序列编码的蛋白质或其片段。
- [0047] 可以用于根据本发明的免疫原性组合物中的一种或多种抗原特别是HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原。
- [0048] HCMV gB抗原
- [0049] 根据本发明的HCMV gB抗原是诱导中和抗体的全长gB多肽或gB衍生的多肽。
- [0050] gB是由HCMV基因组的UL55基因编码的。天然形式的gB(或gp130)的大小取决于开放阅读框(ORF)的大小,其可能会根据毒株而略有不同。例如,AD169毒株的ORF,其为2717bp

长,编码906个氨基酸的全长gB,然而Towne毒株的ORF编码907个氨基酸的全长gB。这两个毒株的蛋白质序列描述于US 2002/0102562(图2),其通过提述以其整体并入。天然形式的gB含有通常为23至25个氨基酸长的氨基酸信号序列,随后是在残基精氨酸460和丝氨酸461之间含有内切蛋白水解切割位点的细胞外域,随后是跨膜域和胞内域。通常,由于细胞中发生的翻译后机制,全长gB的氨基酸信号序列被消除。将会很好地理解,用于本发明目的的合适的全长gB涵盖HCMV毒株Towne和AD169二者以及其它等效毒株的全长gB。已经描述了几种诱导中和抗体的抗原域。值得注意的是,它包括位于gp 130的氨基酸残基461-680的域,该域细分为两个不连续的域,在残基461-619的域以及残基620-680的域(US 5,547,834)。它还包括位于氨基酸残基560-640的抗原域1(AD-1)(Schoppel K.等,Virology,1996,216:133-45)或位于氨基酸残基65-84(Axelsson F等,Vaccine,2007,26:41-6)或氨基酸残基27-84(Burke HG等,PLoS pathogens,2015,11:e1005227)的抗原域2(AD-2)。因此,在其氨基酸序列中包含与一个或多个上述引用的抗原域同源的序列的多肽也适用于本发明的目的。术语“与.....同源的序列”意指其中与被认为源自Towne或AD169毒株的天然gB的抗原域的氨基酸序列(其描述于US 2002/0102562)至少80%同一性的氨基酸序列。通常,序列同源性基于至少90%的序列同一性,甚至更具体地,序列同源性是完全的(100%的序列同一性)。

[0051] 如本文所用的,第一序列与第二序列具有至少x%同一性意指当两个序列经由全局比对进行最佳比对时,x%代表第一序列中与第二序列的匹配氨基酸相同的氨基酸数目,相对于第二个氨基酸序列的总长度。当x为最大值时,两个序列均进行最佳比对。比对和同一性百分比的确定可以手动进行,也可以使用全局比对算法(例如Needleman和Wunsch算法,其被描述于Needleman和Wunsch,J.Mol Biol.,48,443-453(1970))自动进行,具有例如用于多肽序列比较的以下参数:比较矩阵:BL0SUM62,其来自Henikoff和Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,89,10915-10919(1992),缺口罚分:8和缺口长度罚分:2;和针对多核苷酸序列比较的以下参数:比较矩阵:匹配=+10,错配=0;缺口罚分:50和缺口长度罚分:3。

[0052] 可以与上述参数一起使用的程序可从美国威斯康星州麦迪逊市的遗传学计算机集团(Genetics Computer Group,Madison WI)作为“缺口”程序公开获得。前述参数分别是用于肽比较的默认参数(连同对于末端缺口无罚分)和用于核酸比较的默认参数。

[0053] 适用于本发明的目标的gB衍生的肽或多肽是gp 55,如US 5,547,834中所描述的。它衍生自内切蛋白水解切割位点处的gB切割;其氨基酸序列对应于丝氨酸残基461-C末端的氨基酸序列。也可使用截短形式的gp 55,如消除了全部或部分跨膜序列和消除了全部或部分胞内C端域的gp 55(例如,具有与天然gB的残基461-646的氨基酸序列同源的序列的肽),或消除了全部或部分胞内C端域的gp 55(例如,具有与天然gB的残基461-680的氨基酸序列同源的序列的肽)。此类截短形式的gp 55也描述于US 5,547,834,其通过提述以其整体并入。

[0054] 也可以使用全长gB的突变形式,其在内切蛋白水解切割位点处携带一个或若干个突变,使得后者无效。具体地,该一个或多个突变位于gp130的序列的残基457-460,且更具体地,位于精氨酸460和/或赖氨酸459和/或精氨酸457处。在此方面,全长gB的突变形式携带整个细胞外域,其中所有域都是中和抗体的靶标。此类突变形式可继发性地被消除全部或部分跨膜序列和/或被消除全部或部分胞内C端域,以便当它们作为重组蛋白产生时允许

其在宿主中分泌并易于它们的下游纯化。只要基本上所有作为中和抗体的靶标的域均为保守的，此类gB衍生物是优选的。

[0055] 因此，在本发明的一个方面中，所述HCMV gB在内切蛋白水解切割位点包含一个或若干个突变，且特别地，所述HCMV gB另外选自下组：全长HCMV gB、缺少至少一部分跨膜域的全长HCMV gB、缺少基本上全部跨膜域的全长gB多肽、缺少至少一部分胞内域的全长gB多肽、缺少基本上全部胞内域的全长HCMV gB和基本上缺少跨膜域和胞内域二者的全长HCMV gB多肽。

[0056] 表述“缺少基本上全部胞内域”或“缺少基本上全部跨膜域”意指对应于所述域的氨基酸序列的至少80%被缺失。

[0057] 在本发明的上下文中，“缺少至少一部分域”意指缺少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%但缺少少于80%的所述域。

[0058] 在一个实施方案中，所述HCMV gB抗原是gB的胞外域，即，缺失了全部跨膜序列和全部胞内C端域的全长gB。“胞外域”是跨膜锚定蛋白的一部分，其跨膜延伸超出膜进入细胞外空间。

[0059] 根据本发明的HCMV gB抗原还可含有其它突变和/或缺失和/或添加。例如，HCMV gB抗原可在位于细胞外域中的融合环1 (FL1) 域和融合环2 (FL2) 域中的至少一个中含有至少一个氨基酸缺失或取代，如在EP2627352中所述的。可替换地或另外，它可含有前导序列的至少一部分的缺失，如在EP2627352中所述的。根据本发明的HCMV gB抗原还可包含产生疏水性表面1内 (氨基酸残基154–160和236–243) 的糖基化位点的突变，如在W02016092460中所述的。特别地，所述糖基化位点是包含N-X-S/T/C基序的N-糖基化位点，其中X是任何氨基酸残基(但优选不是脯氨酸)。HCMV gB抗原可包含产生糖基化位点的突变，其中所述糖基化位点(1)在疏水性表面2内 (氨基酸残基145–167和230–252)；或(2)位于距融合环1 (FL1) (氨基酸残基155–157) 和/或融合环2 (FL2) (氨基酸残基240–242) 20埃内的残基，如在W02016092460中所述的。HCMV gB抗原可在C端包含长度为至少12个残基的异源序列，如在W02016092460中所述的。特别地，gB蛋白质可为融合蛋白质，其中异源序列被融合在胞外域的C端。

[0060] 基于相关病毒(单纯疱疹病毒1 (HSV-1) gB和爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) gB的gB蛋白(其是同源三聚体)的3D晶体学结构，天然HCMV gB已被假定为同源三聚体 (Heldwein等, Science, 2006, 313: 217–220; Backovic等, PNAS, 2009, 106 (8) : 2880–2885)。根据本发明的HCMV gB抗原可以是三聚体(天然形式)，和/或六聚体(三聚体天然形式的二聚体)，和/或十二聚体(六聚体的二聚体)形式。特别地，根据本发明的免疫原性组合物的HCMV gB抗原部分基本上不是单体形式，更特别地不是单体形式。表述“基本上不是单体形式”意指少于20%，特别是少于10%，特别是少于5%的HCMV gB抗原是单体形式。

[0061] 根据实施方案，所述gB抗原包含与SEQ ID N0:1具有至少80%同一性的氨基酸序列。特别地，所述gB抗原包含与SEQ ID N0:1具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性、至少99%同一性或甚至100%同一性的氨基酸序列，所述SEQ ID N0:1为：

[0062] SSTRGTSATHSHSSHTSAAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVNNTKYPYRV  
CSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEGMVVYKRNIVAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYV

APPMWEIHHINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWLRYRET  
CNLNCMVTITTARSKYPYHFFATSTGVDVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYTIVSDFGRPNSALETHRL  
VAFLERADSVISWDIQCDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAI  
NKLQQIFNTSYNQTYEKYGNVSFETTGGLVVFWQGIKQKSLVELERLANRSSNLTHNTTQTSTDGNNATHLSNM  
ESVHNLVYAQLQFTYDTLRGYINRALAQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAARFMGDVLGLA  
SCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCSRPVIFNFANSSYVQYGQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSA  
YEYDVYLFKRMIDLSSI STVDSMIALDIDPLENTDFRVELYSQKELRSSNVFDLEEIMREFNSYKQRVKYVEDKR  
LCMQPLQNLFPYLVSADGTTVTSQNTKDTSQAPPSEESVYNSGRKGPGPPSSDASTAAPPYTN EQAYQMLLALV  
RLDAEQRAQQNGTDSLQGTQDKGQKPNNLDRLRHKNGYRHLKDSDEEENV。

[0063] 在一个优选的实施方案中,所述gB抗原包含与SEQ ID NO:1具有100%同一性的氨基酸序列。

[0064] 在本发明的上下文中特别合适的HCMV gB抗原是全长gB的截短形式,其消除了全部或部分C端域和/或消除了全部或部分跨膜序列且其中切割位点是无效的。特别优选的gB的截短形式对应于US 6,100,064中描述的gB,被称为gBdTM,US 6,100,064通过提述以其整体并入。在US 6,100,064中,假设信号序列的长度为24个氨基酸,且氨基酸位置相应地指示在图10上。发明人已经发现此信号序列的长度实际上是25个氨基酸。因此在US 6,100,064的图10中,指示为Ser-1的C端(即信号序列的C端)的所有氨基酸位置必须从1减少。因此,gBdTM在切割位点处携带三个突变(精氨酸432被苏氨酸取代,赖氨酸434被谷氨酰胺取代且精氨酸435被苏氨酸取代;考虑到重编号的位置)以及氨基酸残基缬氨酸676-精氨酸751(考虑到重编号的位置)的跨膜区中的缺失,使得细胞外域直接与胞质域连接。此类gB衍生的多肽更易于纯化,因为它是通过在分泌形式下表达此产物的重组细胞产生的。当所得形式衍生自gB Towne毒株时,它为缺失了其信号序列和其跨膜区的806个氨基酸长的多肽。

[0065] 本文所述的HCMV gB蛋白质或由此衍生的肽或多肽可通过本领域技术人员公知的任何方法合成。此类方法包括常规化学合成(在固相中(R.B.Merrifield,J.Am.Chem.Soc.,85(14),2149-2154(1963)),或在液相中,从组成性氨基酸或其衍生物进行的酶合成(K.Morihara,Trends in Biotechnology,5(6),164-170(1987)),无细胞蛋白质合成(Katzen等,Trends in Biotechnology,23(3),150-156(2005)),以及通过重组技术的生物产生方法。

[0066] 例如,可使用重组宿主细胞的生物产生过程获得HCMV gB抗原。在此类过程中,表达盒(其含有编码如本文所述的HCMV gB抗原的核酸)被转化入宿主细胞,在能够使相应的蛋白质表达的条件下培养该宿主细胞。然后,由此产生的蛋白质可被回收并纯化。用于蛋白质纯化的方法是技术人员已知的。可以通过单独或组合使用的方法从裂解物和细胞提取物中或从培养基上清液中纯化所获得的重组蛋白,所述方法如分级、色谱方法、使用特异性单克隆或多克隆抗体的免疫亲和方法等。特别地,从培养基上清液中纯化所获得的重组蛋白。

[0067] HCMV gB蛋白或由此衍生的肽或多肽通常是通过重组DNA技术获得的,且根据本领域技术人员已知的方法纯化的。可具体使用通过提述以其整体并入的US 6,100,064和US 2002/0102562中所述的方法。

[0068] 例如,根据本发明的gB抗原是重组糖蛋白,其在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养物中产生。如US 6,100,064中所述,可诱变来自HCMV的Towne毒株的gB基因以去除分子的切割位

点和跨膜部分,从而促进在细胞培养物中的分泌。分泌的分子是806个氨基酸的多肽,保留了19个潜在的N-连接的糖基化位点,也称为gBdTm。纯化过程涉及亲和色谱和离子交换色谱步骤。

[0069] HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原

[0070] 根据本发明的免疫原性组合物的另一抗原部分是HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原。

[0071] 所述五聚体复合物通过五个组分之间的二硫键和非共价相互作用而组装,以形成能够呈现构象表位的功能性复合物(Ciferri等,PNAS,2015,112(6):1767-1772;Wen等,Vaccine,2014,32(30):3796-3804)。

[0072] 所述复合物已经被描述且是本领域技术人员已知的。它特别描述于Ryckman等(Journal of Virology,January 2008,p.60-70)和专利申请WO2014/005959中。所述HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物可特别地包含修饰的HCMV gH多肽,其中所述多肽缺少至少一部分跨膜(TM)域。在一些实施方案中,所述gH多肽可保留天然TM域的一部分,但不足以使蛋白质停留在脂质双层中。在一个优选的实施方案中,所述gH多肽缺少基本上全部跨膜域。在一个更优选的实施方案中,所述gH多肽缺少全长天然TM域。

[0073] 因此,所述gH多肽可含有至多10个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)的天然gH TM域。

[0074] 在本发明的上下文中,“缺少至少一部分域”意指缺少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%但缺少少于80%的该域。

[0075] 表述“缺少基本上全部胞内域”或“缺少基本上全部跨膜域”意指对应于所述域的氨基酸序列的至少80%被缺失。

[0076] 可替换地或除缺少一部分或全部的TM域之外,所述多肽可缺少HCMV gH的一部分或基本上全部或全部胞内域。

[0077] 在一个优选的实施方案中,所述gH多肽缺少基本上全部胞内域。在更优选的实施方案中,所述gH多肽缺少全长天然胞内域。

[0078] 在一个优选的实施方案中,所述gH多肽缺少全部TM域和全部胞内域。

[0079] 在一个实施方案中,所述gH包含由UL75基因编码的全长gH的胞外域。

[0080] HCMV糖蛋白H(gH),其由UL75基因编码,是一种病毒体糖蛋白,其对于感染性至关重要,并且在α、β和γ疱疹病毒的成员中是保守的。它与gL形成稳定的复合物,并且此复合物的形成促进gH的细胞表面表达。基于HSV-2和EBV gH/gL复合物的晶体结构,gH的gL亚基和N端残基在结构的一端(“头部”)形成球形域,其与gB的相互作用以及激活膜融合有关。gH的C端域,其靠近病毒膜(“尾部”),也与膜融合有关。在一个实施方案中,本文所述的五聚体复合物中的gH多肽包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的氨基酸序列。特别地,gH抗原包含与SEQ ID NO:2具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性、至少99%同一性或甚至100%同一性的氨基酸序列,所述SEQ ID NO:2为:

[0081] RYGAEAVSEPLDKAFHLLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNNSLRNSTVVRNAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQQRLNTYALVSKDLASYRSFSQQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSPHVMPPQTTPHGWTESHTSGLHRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSIDDD

TPMLLIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDSALLRNSFHYAVDVLSGRQCMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTPPRTLLLPTAVDLAKRALWTPNQITDITSVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMLVHTTEREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHEYLSLDYTPCSSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPATVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCPLGESFSALTSEHVSYVVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQTDSQTKCELTRNMHTHSITAALNISLENCAFQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMLLKNGTVLEVTDVVVDATDSR。

[0082] 在一个优选的实施方案中,所述gH多肽包含与SEQ ID NO:2具有100%同一性的氨基酸序列。

[0083] HCMV糖蛋白L(gL)是由UL115基因编码的。gL被认为是病毒复制必不可少的,并且gL的所有已知功能性质均与它和gH的二聚化直接相关。gL/gH复合物是病毒膜和质膜融合所需的,所述融合导致病毒进入宿主细胞。

[0084] 根据一个实施方案,本文所述的五聚体复合物中的gL多肽包含与SEQ ID NO:3具有至少80%同一性的氨基酸序列。特别地,所述gL抗原包含与SEQ ID NO:3具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性、至少99%同一性或甚至100%同一性的氨基酸序列,所述SEQ ID NO:3为:

[0085] AAVSVAAPTAEKVPAECPELTRRCLLGEVFQGDKYESWLRPLVNVTRGDGPLSQLIRYRPVTPEAANSVLLDEAFLDTLALLYNNPQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYERSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTNRAVRLPVSTAPEGITLFYGLYNAVKEFCLRHQQLDPPLLRLHDKYAGLPPELKQTRVNLPKAHSRYGPQAVDAR。

[0086] 在一个优选的实施方案中,所述gL多肽包含与SEQ ID NO:3具有100%同一性的氨基酸序列。

[0087] 根据实施方案,本文所述的五聚体复合物中的UL128多肽包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的氨基酸序列。特别地,所述UL128抗原包含与SEQ ID NO:4具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性、至少99%同一性或甚至100%同一性的氨基酸序列,所述SEQ ID NO:4为:

[0088] EECCEFINVNHPPERCYDFKMCNRTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIVTTMTHSLTRQVVHNKLTS CNYNPPLYLEADGRIRCGKVNDKAQYLLGAAGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYLESVKHKRLDVCRAKMGYMLQ。

[0089] 在一个优选的实施方案中,所述UL128多肽包含与SEQ ID NO:4具有100%同一性的氨基酸序列。

[0090] UL130是UL131A-128基因座的中央和最大基因(214个密码子)。基因的概念翻译预测一个长(25个氨基酸)的N端信号序列,该信号序列位于亲水性蛋白之前,该亲水性蛋白在推定的趋化因子结构域(氨基酸46至120)内包含两个潜在的N连接的糖基化位点(Asn85和Asn118)和靠近唯一C端区的末端的另外的N-糖基化位点(Asn201)。预测UL130缺少TM域。

[0091] 已报道,它是一种腔糖蛋白,从感染的细胞中分泌不足,但以高尔基成熟的形式并入病毒体膜中(Patrone,等:“人巨细胞病毒UL130 Protein Promotes Endothelial Cell Infection through a Producer Cell Modification of the Virion.”,Journal of Virology 79 (2005) :8361-8373)。

[0092] 根据一个实施方案,本文所述的五聚体复合物中的UL130多肽包含与SEQ ID NO:5

具有至少80%同一性的氨基酸序列。特别地,所述UL130抗原包含与SEQ ID N0:5具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性、至少99%同一性或甚至100%同一性的氨基酸序列,所述SEQ ID N0:5为:

[0093] SPWSTLTANQNPSPLWSKLTYSKPHDAATFYCPFIYPSPPRSPLQFSGFQRVLTGPECRNETLYLLYN  
REGQTLVERSSTWVKVIWYLSGRNQTILQRMPRTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAHMVPKQTKLRFVVNDGTRY  
QMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTEANNQTYTFCTHPNLIV。

[0094] 在一个优选的实施方案中,所述UL130多肽包含与SEQ ID N0:5具有100%同一性的氨基酸序列。

[0095] UL131,也称为UL131A,不仅在内皮细胞中而且在上皮细胞中对于HCMV复制均需要UL131功能。根据一个实施方案,本文所述的五聚体复合物中的UL131A多肽包含与SEQ ID N0:6具有至少80%同一性的氨基酸序列。特别地,所述UL131A抗原包含与SEQ ID N0:6具有至少85%同一性、至少90%同一性、至少95%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性、至少99%同一性或甚至100%同一性的氨基酸序列,所述SEQ ID N0:6:

[0096] QCQRETAEKNDYYRVPHYWDACSRALPDQTRYKYVEQLVDLTLNYHYDASHGLDNFDVLKRINVTEVS  
LLISDFRRQNRRGGTNKRTTFNAAGSLAPHARSLEFSVRLFAN。

[0097] 在优选的实施方案中,UL131多肽包含与SEQ ID N0:6具有100%同一性的氨基酸序列。

[0098] SEQ ID N0:2至6来自毒株BE/28/2011 (Genbank ID KP745669, Kremkow等, 2015)。

[0099] 在本发明的免疫原性组合物的五聚体复合物抗原部分中,gH、gL和UL128可通过二硫键连接,但UL130和UL131A可通过非共价相互作用并入五聚体复合物中。例如,UL130蛋白和/或UL131A蛋白通过非共价相互作用并入五聚体复合物中。此外,UL130蛋白和/或UL131A蛋白可通过非共价相互作用相互连接。

[0100] 五聚体复合物的一系列构象表位是已知的。例如,Macagno (Macagno等: "Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize humancytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex.", Journal of Virology 84 (2010) :1005-13) 分离了一组人单克隆抗体,所述抗体中和内皮细胞、上皮细胞和骨髓细胞的HCMV感染。在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物的五聚体复合物抗原部分拥有一个或多个由Macagno (2010) 鉴定的构像表位。

[0101] 五聚体复合物抗原的每种蛋白质可包含突变,如插入、缺失和取代,只要这些突变对使用蛋白质作为抗原无害。此外,此类突变不应阻止蛋白质形成根据本发明的五聚体复合物的能力。可通过进行蛋白质纯化并通过非还原性PAGE、Western印迹和/或大小排阻色谱术分析蛋白质来测试形成本发明的五聚体复合物的能力。如果蛋白质形成复合物的一部分,则它们都可存在于天然PAGE凝胶上的单个谱带中和/或存在于大小排阻色谱图中的单个峰中。

[0102] 所述五聚体复合物的表达可根据本领域技术人员已知的方法来实现。可提及例如在Hofmann等 (Biotechnology and Bioengineering, 2015) 中描述的方法。

[0103] 供在本发明的上下文中使用的合适的表达系统是本领域技术人员已知的,并且有许多详细描述于Doyle (Doyle编, High Throughput Protein Expression and

Purification:Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology).Humana出版社,2008)。通常,可使用适合于维持、繁殖和表达核酸分子以在所需宿主中产生多肽的任何系统或载体。可通过多种众所周知的常规技术中的任何一种将适当的核苷酸序列插入表达系统中,如,例如Sambrook (Sambrook, J. Molecular Cloning:A Laboratory Manual.3rd.Cold Spring Harbor Laboratory出版社,2000)中所述的技术。通常,可将编码基因置于调控元件如启动子和任选的操纵子的控制下,使得编码期望的肽的DNA序列在转化的宿主细胞中转录成RNA。适当的表达系统的实例包括,例如,染色体、附加体和病毒衍生的系统,包括例如衍生自以下的载体:细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件,病毒如杆状病毒如专利申请W02015170287中所述的杆状病毒、乳多空病毒(papova viruses)如SV40、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病毒和逆转录病毒或其组合,如衍生自质粒和噬菌体遗传元件(包括粘粒和噬菌粒)的那些。人类人工染色体(HAC)也可用于递送比质粒中含有和表达的更大的DNA片段。

[0104] 为了以等摩尔方式同时表达HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的五个不同重组蛋白,存在几种可能性。本发明免疫原性组合物的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原部分的第一种可能性(1)是在相同或相似调控元件(启动子、增强子、剪接信号、终止信号……)的控制下和任选的细胞系选择的选择系统下构建含有全部五个ORF的单个载体。载体可含有5个表达盒(例如,如在Albers等,J.Clin.Invest.,2015,125 (4):1603-1619;或在Cheshenko等,Gene Ther.,2001,8 (11):846-854中所述的),或者可将5个组成(gH、gL、UL128、UL130和UL131)融合到具有元件的单个ORF中,所述元件触发适当多蛋白成熟为HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的5个蛋白(例如如Szymczak-Workman等,Cold Spring Harb.Protoc.,2012,2012 (2):199-204中所述的自切割序列)。在第二种情况下,假设所有切割均正确进行,确保了等摩尔性。本发明的免疫原性组合物的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原部分的另一种可能性(2)是构建各自表达HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的一种组分和任选的细胞系选择的选择系统的五个载体。五个载体在靶细胞系中共转染。也可以设计可能性(1)和可能性(2)之间的任何中间系统,以最小化所需的载体的数目,并将每个载体维持在合理的大小(例如,小于12kb)。

[0105] 合适的表达系统包括微生物,如用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的细菌;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如,杆状病毒,如专利申请W02015170287中所述的)感染或转染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒、CaMV;烟草花叶病毒,TMV)或用细菌表达载体(例如,Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。也可采用无细胞翻译系统来产生蛋白质。

[0106] 合适的植物细胞遗传表达系统的实例包括美国专利5,693,506;美国专利5,659,122;美国专利5,608,143和Zenk (1991) :"Chasing the enzymes of secondary metabolism:Plant cell cultures as a pot of goal.Phytochemistry,30 (12),pp 3861-3863.Zess NaukUMK Tornu,13:253-256中所述的那些。特别地,可使用可分离原生质体并进行培养以产生完整再生植物的所有植物,从而回收包含转移的基因的完整植物。实际上,所有植物均可从培养的细胞或组织中再生,包括但不限于甘蔗、甜菜、棉花、水果和其他树木、豆类和蔬菜的所有主要种类。

[0107] HEK293细胞由于其通过多种技术(包括磷酸钙和聚乙烯亚胺(PEI)方法)的高转染性而适用于根据本发明的五聚体复合物的HCMV蛋白的瞬时表达。HEK293的有用细胞系是表达EBV的EBNA1蛋白的细胞系,如293-6E (Loignon等, "Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells.", BMC Biotechnology 8 (2008) :65)。已显示转化的HEK293细胞将高水平的蛋白质分泌入生长培养基,因而允许直接从生长培养基纯化此类蛋白质复合物。

[0108] CHO细胞是特别合适的哺乳动物宿主,其用于工业产生HCMV蛋白,特别是用于工业上产生本发明免疫原性组合物的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原部分。

[0109] 可通过本领域已知的多种方法进行转染,所述方法包括使用磷酸钙、电穿孔或通过将阳离子脂质与材料混合以产生脂质体,该脂质体与细胞膜融合并将其运载物沉积在内部。

[0110] 用于纯化来自细胞上清液或来自包涵体的重组蛋白的方法是本领域已知的。特别地,根据本发明的免疫原性组合物的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原部分可通过大小排阻色谱术进行纯化。

[0111] 特别地,根据本发明的免疫原性组合物不包含HCMV病毒。

[0112] 特别地,根据本发明的免疫原性组合物是如本文所述的的免疫原性组合物,其中HCMV gB和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物是唯一的HCMV抗原。

### [0113] 诱导Th1的佐剂

[0114] 如本文所用,“佐剂”具有本领域技术人员通常已知的含义。特别地,它是指调节抗原的免疫原性的试剂或物质。“调节免疫原性”包括增强由抗原生成的免疫应答的量级和/或持续时间。更具体地,佐剂还可根据它们在抗原的存在下诱导的免疫应答的类型进行分类。可用于根据本发明的免疫原性组合物中的一种或多种佐剂是诱导Th1的佐剂。

[0115] “诱导Th1的”佐剂可定义为增强对抗原或抗原的组合的Th1应答的佐剂。

[0116] 免疫应答可大体上分为两大类,即体液或细胞介导的免疫应答(传统上分别以抗体和细胞效应物保护机制为特征)。这些应答类别被称为Th1型应答(细胞介导的反应)和Th2型免疫应答(体液应答)。在小鼠中,Th1型应答通常以IgG2a或IgG2c亚型的抗体(取决于小鼠品系)的生成为特征,而在人类中,它们可能对应于IgG1和IgG3型抗体。Th2型免疫应答的特征在于生成广泛的免疫球蛋白同种型,包括小鼠IgG1、IgA和IgM。Th1型和Th2型免疫应答的特征还在于细胞因子分泌的不同模式(Mosmann等, Annual Review of Immunology, 1989, 7:145-173; Constant等, Annual Review of Immunology, 1997, 15:297-322)。Th1型免疫应答与T淋巴细胞的IFN- $\gamma$  和/或IL-2细胞因子的产生增加有关,而Th-2型免疫应答与IL-4、IL-5、IL-6、IL-13和/或IL-10细胞因子的产生增加有关。Th1型和Th2型免疫应答的区别不是绝对的。实际上,受试者将支持被描述为主要是Th1或主要是Th2的免疫应答。传统上,疫苗接种或感染后的免疫应答的Th1:Th2平衡的最佳指标包括在用抗原刺激后体外直接测量T淋巴细胞的Th1或Th2细胞因子的产生,和/或测量(至少在小鼠中)抗原特异性抗体应答的lgG1:lgG2a,c比率。

[0117] 同样,在根据本发明的免疫原性组合物的范围内,主要诱导Th1型免疫应答的佐剂被认为是诱导Th1的佐剂。优选地,可用于根据本发明的免疫原性组合物中的佐剂主要诱导Th1型免疫应答。

[0118] 如先前所提及的,这可通过测量小鼠中IgG1:IgG2a,c比率来确定。INF-γ的增加是主要Th1应答的另外指标。优选地,也观察到IL-5的产生降低。

[0119] 优选地,用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59诱导更偏向Th1的应答概貌。

[0120] MF59是基于角鲨烯的水包油型乳液,其描述于专利申请W090/14837、美国专利号6,299,884和6,451,325以及Ott等,"MF59--Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach (Powell,M.F.和Newman,M.J.编) Plenum出版社,纽约,1995,第277-296页)中。

[0121] 特别地,可用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更低的IgG1:IgG2a,c比率。

[0122] 更特别地,可用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更高的INF-γ水平。

[0123] 甚至更特别地,可用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更低的IL-5水平。

[0124] 仍甚至更特别地,可用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更低的IgG1:IgG2a,c比率和更高的INF-γ水平。

[0125] 特别地,可用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更低的IgG1:IgG2a,c比率和更低的IL-5水平。

[0126] 更特别地,可用于根据本发明的包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的免疫原性组合物中的诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更低的IgG1:IgG2a,c比率、更高的INF-γ水平和更低的IL-5水平。

[0127] 特别地,根据本发明的免疫原性组合物是免疫原性组合物,其包含:

[0128] -HCMV gB抗原;

[0129] -HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原;和

[0130] -诱导Th1的佐剂,

[0131] 其中所述诱导Th1的佐剂比包含相同的HCMV gB抗原和相同的HCMV gH/gL/UL128/

UL130/UL131五聚体复合物抗原的组合物中的MF59在小鼠中诱导更低的IgG1:IgG2a,c比率,和/或更高的INF- $\gamma$ 水平和/或更低的IL-5水平。

[0132] 特别地,根据本发明的诱导Th1的佐剂包含:

[0133] -TLR-4激动剂;或

[0134] -重均分子量Mw的范围为350至650kDa的直链或支链聚丙烯酸聚合物盐。

[0135] 特别地,根据本发明的免疫原性组合物是免疫原性组合物,其包含:

[0136] -HCMV gB抗原;

[0137] -HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原;和

[0138] -诱导Th1的佐剂,

[0139] 其中所述诱导Th1的佐剂包含:

[0140] -选自下组的TLR-4激动剂:脂多糖、单磷酰基脂质A (MPL)、3-脱氧酰基化的单磷酰基脂质A (3D-MPL)、吡喃葡萄糖基脂佐剂 (GLA)、第二代脂质佐剂 (SLA)、通过非糖类骨架连接的磷脂二聚体和氨基烷基氨基葡萄糖昔磷酸酯 (aminoalkyl glucosaminide phosphate) 或其衍生物;或

[0141] -重均分子量Mw的范围为350至650kDa的聚丙烯酸聚合物盐。

[0142] 在一个实施方案中,所述诱导Th1的佐剂包含TLR-4激动剂。

[0143] TLR (toll样受体) 激动剂应理解为意指天然的TLR配体,TLR配体模拟物,合成的或化学的TLR配体,细胞或颗粒,其包括病原体相关分子模式、微生物病原体、细菌、病毒和病毒样颗粒。

[0144] TLR4 (toll样受体4型) 是一种由免疫系统的抗原呈递细胞表达的受体。它参与了针对革兰氏-细菌感染的早期防御机制。革兰氏-细菌的脂多糖 (LPS) 是TLR4的天然配体;它激活受体,触发触发一系列生化事件,特别是Nf- $\kappa$ B转录因子的激活以及促炎性细胞因子的产生。化合物刺激TLR4途径的能力可通过本领域技术人员已知的方法来评价,如在例如Journal of Biological Chemistry, (2001), 第276 (3) 期,第1873-1880页中所述的。

[0145] TLR4激动剂的实例包括单磷酰基脂质A (MPL) 或其衍生物,特别是如GB2211502或US4912094中所述的3-脱氧酰基化的单磷酰基脂质A (3D-MPL) 或其衍生物,磷酸化的六酰基二糖,也称为吡喃葡萄糖基脂佐剂或GLA (CAS号1246298-63-4) 或其衍生物,第二代脂质佐剂 (SLA) (如在Carter等,Clin.Transl.Immunology, 2016, 5 (11) :e108或EP2437753或US9480740中的脂质佐剂) 或其衍生物,氨基烷基氨基葡萄糖昔磷酸盐 (AGP) 如在W0 98/50399或W0 01/034617中所述的AGP或其衍生物,特别是US 6,113,918中所述的RC529或其衍生物,以及如US 2003/0153532或US 2005/0164988中所述的通过非糖类骨架连接的化学化合物或磷脂二聚体(同二聚体或杂二聚体)或其衍生物,特别是在US 2003/0153532中以下列名称鉴定和例示的化合物:ER803022 (CAS号:287180-56-7)、ER803058 (CAS号:287180-57-8)、ER803732 (CAS号:287106-29-0)、ER803789 (CAS号:287180-61-4)、ER804053 (CAS号:287180-62-5)、ER804057 (CAS号:287180-63-6)、ER804058 (CAS号:287180-65-8)、ER804059 (CAS号:287180-64-7)、ER 8044442 (CAS号:287180-78-3)、ER 804764 (CAS号:287180-87-4)、ER111232 (CAS号:287180-48-7)、ER112022 (CAS号:287180-46-5)、ER112048 (CAS号:287106-02-9)、ER112065 (CAS号:287180-49-8)、ER112066 (CAS号:287180-50-1)、ER113651 (CAS号:287180-51-2)、ER118989 (CAS号:287180-52-3)、ER119327 (CAS号:287180-54-5) 和

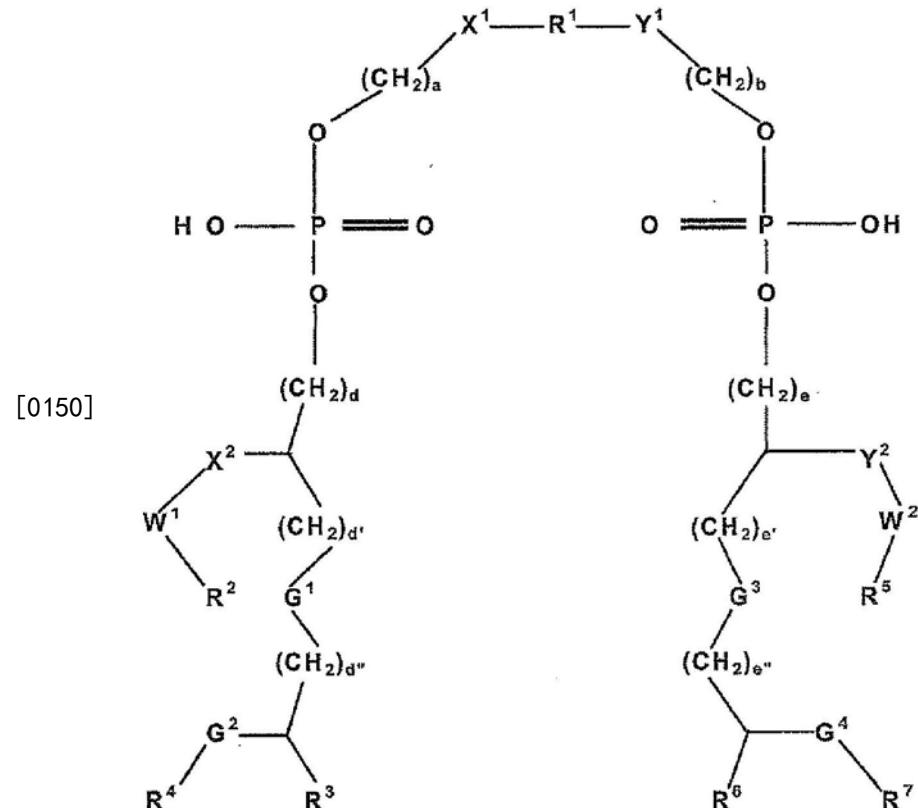
ER119328 (CAS号: 287180-55-6), 或其衍生物。这些化合物通常具有一个或几个不对称的碳。当这些化合物具有一个或几个不对称的碳时, 它们可作为光学异构体的混合物或以特定异构体的形式使用。

[0146] 特别地, 所述TLR-4激动剂选自通过非糖类骨架连接的磷脂二聚体和GLATLR-4激动剂。

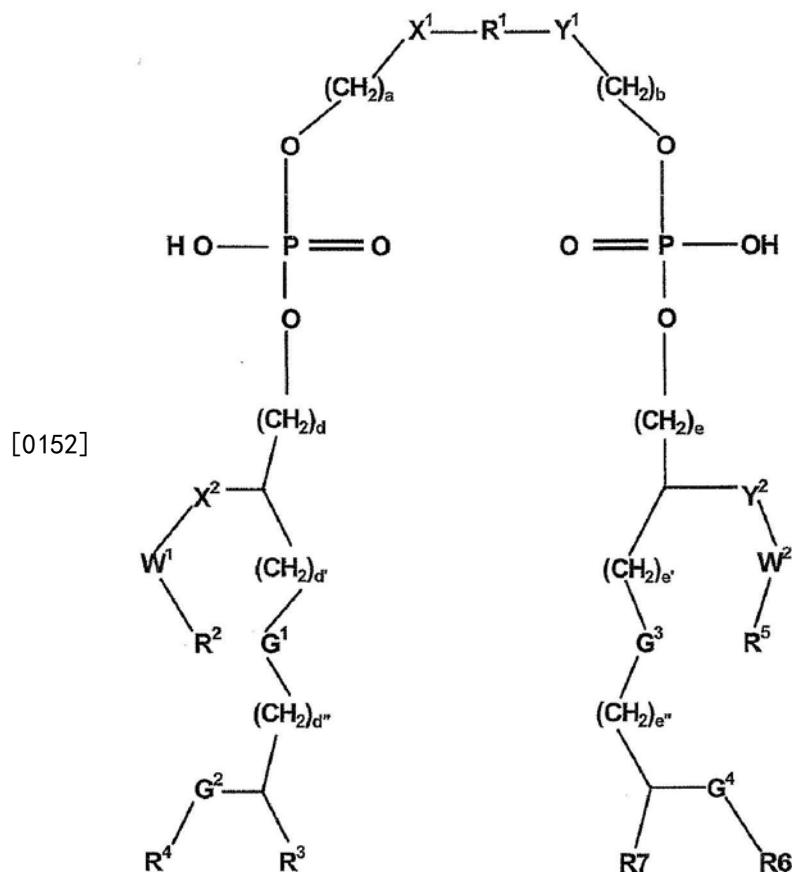
[0147] 特别地, 所述TLR4激动剂是通过非糖类骨架连接的磷脂二聚体。

[0148] 特别地, 所述TLR4激动剂是通过式I、II、III或IV的非糖类骨架连接的化学化合物或磷脂二聚体。

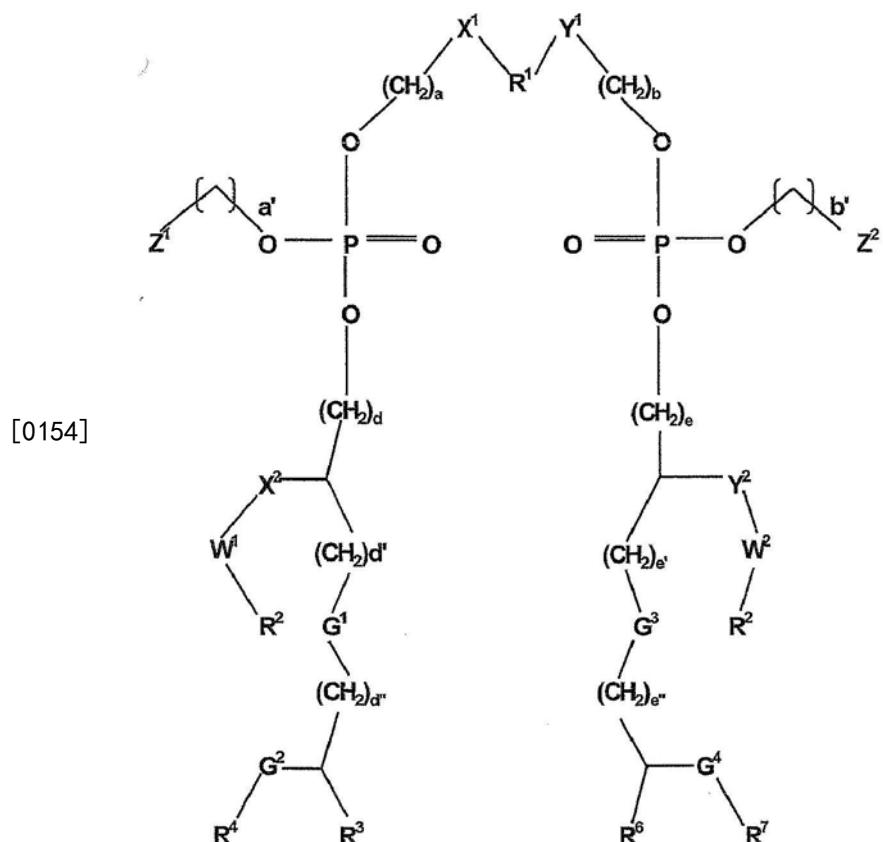
[0149] 通过式I的非糖类骨架连接的化合物或磷脂二聚体



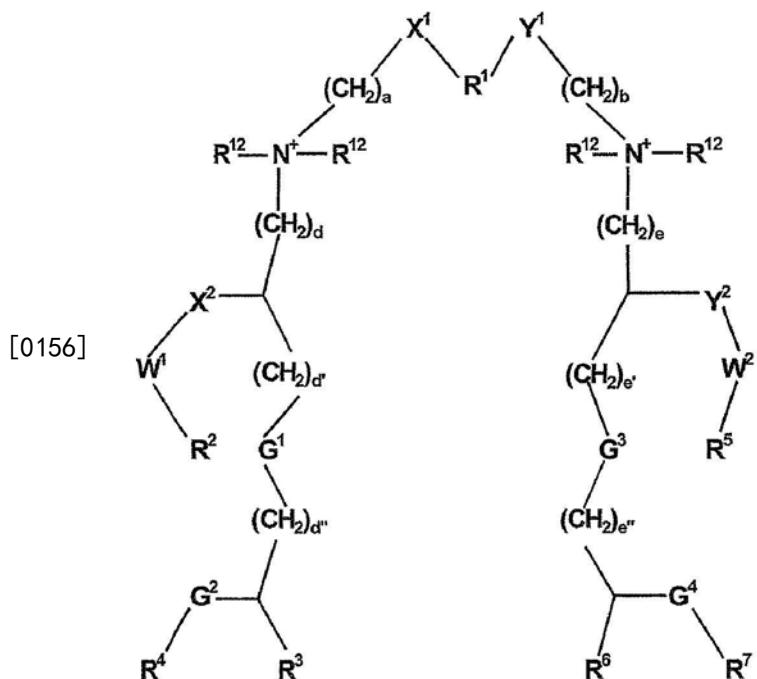
[0151] 通过式II的非糖类骨架连接的化合物或磷脂二聚体



[0153] 通过式III的非糖类骨架连接的化合物或磷脂二聚体



[0155] 通过式IV的非糖类骨架连接的化合物或磷脂二聚体



[0157] 其中,对于式I、II、III或IV中的每一个,R<sup>1</sup>选自由以下组成的组:

[0158] a) C (0) ;

[0159] b) C (0) - (C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub>烷基) -C (0) ,其中所述C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>烷基任选地被羟基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>亚烷基二氧基、(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 氨基或(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 芳基取代,其中所述(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 芳基的所述芳基部分任选地被C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基、(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 氨基、(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基) 氨基、(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 氨基(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基) 、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 氨基(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基) 、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 氨基-C (0) -(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) -C (0) OH或-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) 氨基-C (0) -(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基) -C (0) -(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) 烷基取代;

[0160] c) 包含C<sub>2</sub>-C<sub>15</sub>直链或支链的烷基,其任选地被羟基或烷氧基取代;和

[0161] d) -C (0) - (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>亚芳基) -C (0) -,其中所述亚芳基任选地被羟基、卤素、硝基或氨基取代;

[0162] a和b独立地为0、1、2、3或4;

[0163] d、d'、d''、e、e' 和 e'' 独立地为0、1、2、3或4;

[0164] X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自下组:空位(null)、氧、NH和N (C (0) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基)) 和N (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基);

[0165] W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>独立地选自下组:羰基、亚甲基、砜和亚砜;

[0166] R<sup>2</sup>和R<sup>5</sup>独立地选自下组:

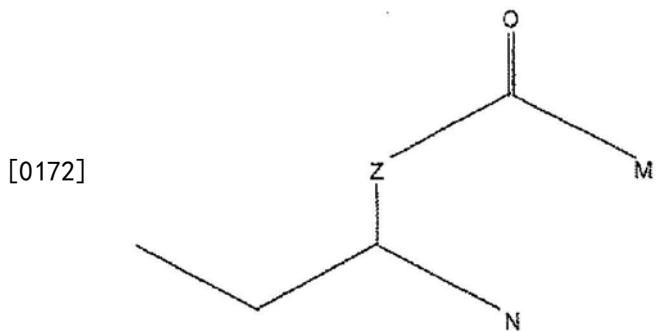
[0167] a) C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷基,其任选地被氧化、羟基或烷氧基取代;

[0168] b) C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烯基或二烯基,其任选地被氧化、羟基或烷氧基取代;

[0169] c) C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷氧基,其任选地被氧化、羟基或烷氧基取代;

[0170] d) NH- (C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷基),其中所述烷基基团任选地被氧化、羟基或烷氧基取代;和

[0171] e)



[0173] 其中Z选自下组:O和NH,且M和N独立地选自下组:包含C<sub>2</sub>—C<sub>20</sub>直链或支链的烷基、烯基、烷氧基、酰氧基、烷基氨基和酰基氨基;

[0174] R<sup>3</sup>和R<sup>6</sup>独立地选自下组:C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷基或烯基,其任选地被氧化或氟代取代;

[0175] R<sup>4</sup>和R<sup>7</sup>独立地选自下组:C(0) — (C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷基或烯基)、C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷基、C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烷氧基和C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链或支链烯基;其中所述烷基、烯基或烷氧基基团可独立地或任选地被羟基、氟代或C<sub>1</sub>—C<sub>5</sub>烷氧基取代;

[0176] G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub>和G<sub>4</sub>独立地选自下组:氧、亚甲基、氨基、硫醇、-C(0) NH—、-NHC(0) —和-N(C(0)(C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>烷基))—;

[0177] 或G<sup>2</sup>R<sup>4</sup>或G<sup>4</sup>R<sup>7</sup>可一起为氢原子或羟基;

[0178] 且其中,对于式III:

[0179] a' 和b' 独立地为2、3、4、5、6、7或8,优选为2;

[0180] Z<sup>1</sup>选自下组:-OP(0)(OH)<sub>2</sub>、-P(0)(OH)<sub>2</sub>、-OP(0)(OR<sup>8</sup>)(OH),其中R<sup>8</sup>是C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>烷基链、-OS(0)<sub>2</sub>OH、-S(0)<sub>2</sub>OH、-CO<sub>2</sub>H、-OB(OH)<sub>2</sub>、-OH、-CH<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>和-NR<sup>9</sup><sub>3</sub>,其中R<sup>9</sup>是C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>烷基链;

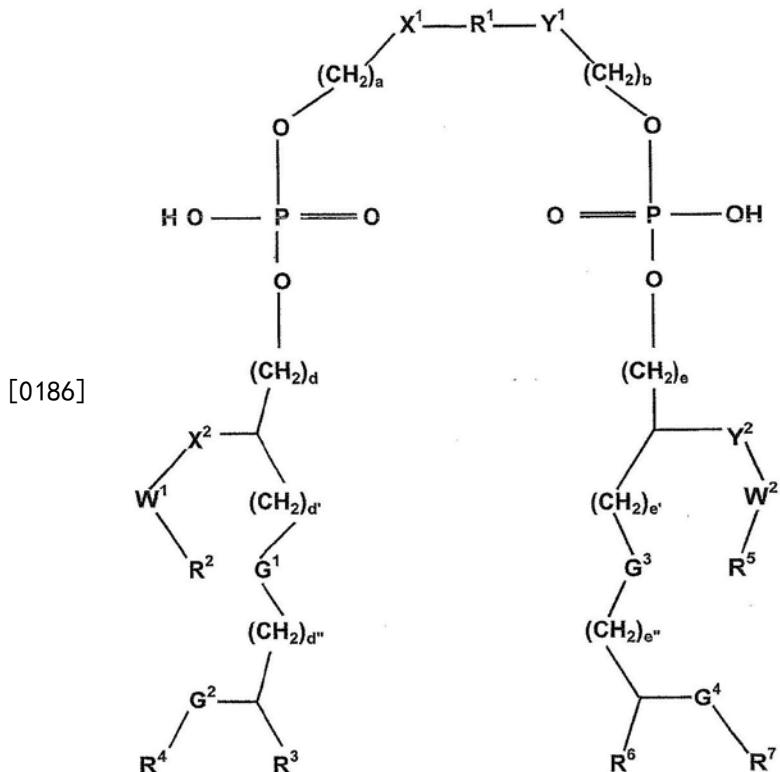
[0181] Z<sup>2</sup>选自下组:-OP(0)(OH)<sub>2</sub>、-P(0)(OH)<sub>2</sub>、-OP(0)(OR<sup>10</sup>)(OH),其中R<sup>10</sup>是C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>烷基链、-OS(0)<sub>2</sub>OH、-S(0)<sub>2</sub>OH、-CO<sub>2</sub>H、-OB(OH)<sub>2</sub>、-OH、-CH<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>和-NR<sup>11</sup>,其中R<sup>11</sup>是C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>烷基链;

[0182] 且其中,对于式IV:

[0183] R<sup>12</sup>是H或C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>烷基链;

[0184] 或式I、II、III或IV的通过非糖类骨架连接的化合物或磷脂二聚体的药学上可接受的盐。

[0185] 特别地,根据本发明的TLR4激动剂是式I的通过非糖类骨架连接的化学化合物或磷脂二聚体,



[0187] 或通过非糖类骨架连接的此化合物或磷脂二聚体的药学上可接受的盐。

[0188] 优选地，

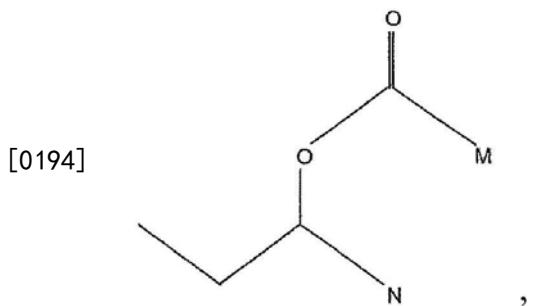
[0189] R<sup>1</sup>是C(0)或C(0)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(0), n是1、2、3或4,

[0190] a、b、d、d'、d''、e、e'和e''独立地为1或2,

[0191] X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>是NH,

[0192] W<sub>1</sub>和W<sub>2</sub>是C(0),

[0193] R<sup>2</sup>和R<sup>5</sup>独立地选自下组:任选地被氧化取代的C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub>直链烷基、NH-(C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub>直链烷基)和



[0195] 其中M和N独立地为C<sub>2</sub>至C<sub>20</sub>直链烷基或烯基,

[0196] R<sub>3</sub>和R<sub>6</sub>是C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>直链烷基,

[0197] R<sub>4</sub>和R<sub>7</sub>选自下组:氢、C(0)-(C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>直链烷基)或C(0)(C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>直链烯基),

[0198] G<sub>1</sub>和G<sub>3</sub>是氧或-NH(CO)-,

[0199] G<sub>2</sub>和G<sub>4</sub>是氧。

[0200] 特别地,根据本发明的TLR4激动剂是通过非糖类骨架连接的对称磷脂二聚体(同二聚体)。更特别地,通过非糖类骨架连接的对称磷脂二聚体是三酰基磷脂的二聚体。更特别地,所述TLR-4激动剂是E6020(CAS号:287180-63-6)。

[0201] 特别地,所述TLR-4激动剂是GLA (CAS号1246298-63-4)。

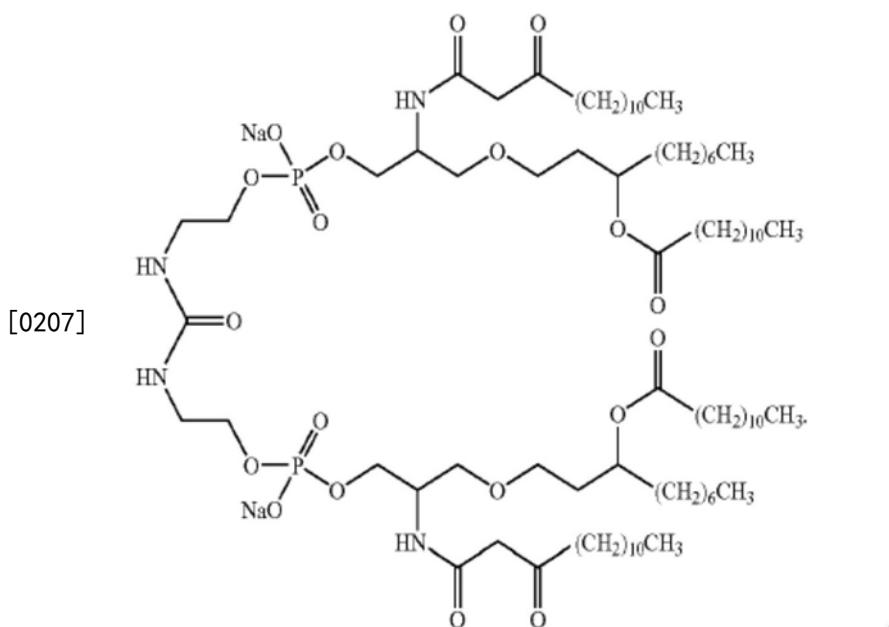
[0202] 这些TLR4激动剂本身也可与递送系统(如磷酸钙、脂质体、病毒颗粒、ISCOM、微米粒子和纳米粒子或乳液)组合。

[0203] 如此,特别地,根据本发明的TLR4激动剂与递送系统(如水性纳米悬浮液、磷酸钙、脂质体、病毒颗粒、ISCOM、微米粒子和纳米粒子或乳液)组合。

[0204] 此类递送系统先前已经进行了描述并且是本领域技术人员已知的。

[0205] 特别地,所述TLR-4激动剂选自E6020 (CAS号:287180-63-6) 和GLA (CAS号1246298-63-4) TLR-4激动剂。

[0206] 作为与递送系统组合的TLR4激动剂的合适制剂的实例,可引用包含化合物ER 804057 (现被称为E6020) (CAS号:287180-63-6) 作为TLR4激动剂的水包油乳液,ER 804057是具有以下化学式的化合物的二钠盐:



[0208] E6020的四个不对称的碳均呈R构型(R,R,R,R)。这样的乳液可以例如通过如WO 2004/060396中所述的微流化技术或通过如WO 2007/080308中所述的相转化温度过程(PIT法)获得。

[0209] 如此,特别地,根据本发明的TLR4激动剂与水包油乳液,更特别与基于鲨烯的水包油乳液组合。

[0210] 适用于本发明目的的水包油乳液包含可代谢的油(其中油的体积占乳液总体积的0.5至20% (v/v),特别是1至10% (v/v),更特别是1至5% (v/v)),水溶液(其中水溶液的体积占总体积的80至99.5% (v/v),特别是90至99% (v/v))和一种或多种乳化剂(其中乳化剂的总量占乳液的总量的0.001至5% (w/w),特别是0.001至2% (w/w),且更特别是0.01至2% (w/w))。可代谢的油通常是具有约6至约30个碳原子的油,包括但不限于烷烃、烯烃、炔烃及其相应的酸和醇、其醚和酯,及其混合物。该油基本上可为任何可以将被施用所述乳液组合物的人受试者的身体代谢并且对该受试者基本上没有毒性的植物油、鱼油、动物油或合成制备的油。可代谢的油可为具有20-40个碳的不饱和烃,或具有20-40个碳原子的支链多不饱和烃,例如萜类。通常优选被称为鲨烯,2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-

二十四碳己烯的不饱和萜类及其饱和类似物角鲨烷。鱼油，包括鲨烯和角鲨烷，可以容易地从商业来源获得，或者可通过本领域已知的方法获得。常用的另一种油是生育酚。当组合物包含生育酚时，可使用任何 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 或 $\xi$ 生育酚，但是优选 $\alpha$ 生育酚。在制药科学中使用了大量合适的乳化剂（也称为表面活性剂、洗涤剂等），只要它们足够无毒，它们中的许多有益于本发明的乳液的组合物。有许多专门设计用于且常用于生物学环境的乳化剂。例如，Sigma Chemical列出了许多生物洗涤剂（表面活性剂）。此类表面活性剂被分为四种基本类型：阴离子型、阳离子型、两性离子型和非离子型。

[0211] 阴离子洗涤剂的实例包括藻酸、辛酸、胆酸、1-癸磺酸、脱氧胆酸、1-十二烷磺酸和N-月桂酰肌氨酸和牛磺胆酸。

[0212] 阳离子洗涤剂包括十二烷基三甲基溴化铵、苯扎氯铵、苄基二甲基十六烷基氯化铵，十六烷基吡啶鎓氯化物、甲基苄基氯化铵和4-甲基吡啶十二烷基硫酸盐。

[0213] 两性离子洗涤剂的实例包括3-[（3-胆酰胺基丙基）-二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐（通常缩写为CHAPS）、3-[（胆酰胺基丙基）二甲基铵基-2-羟基-1-丙烷基磺酸盐（通常缩写为CHAPSO）、N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙烷磺酸盐、磷脂酰胆碱和溶血- $\alpha$ -磷脂酰胆碱。

[0214] 非离子型洗涤剂的实例包括癸酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、二甘醇单戊醚、正十二烷基 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖昔、泊洛沙姆、脂肪醇的环氧乙烷缩合物（例如，以商品名Lubrol出售的那些）、脂肪酸聚氧乙烯醚（特别是C12-C20脂肪酸）、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯（例如，以商品名Tween<sup>®</sup>出售的）和脱水山梨糖醇脂肪酸酯（例如，以商品名Span<sup>®</sup>出售的）。

[0215] 一组特别有用的表面活性剂是基于脱水山梨醇的非离子表面活性剂。这些表面活性剂通常通过使山梨糖醇脱水以得到1,4-脱水山梨糖醇，然后使1,4-脱水山梨糖醇与一种或多种当量的脂肪酸反应而制备。脂肪酸取代的部分可进一步与环氧乙烷反应，以得到第二组表面活性剂。

[0216] 通常通过使1,4-脱水山梨糖醇与脂肪酸如月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸或类似的长链脂肪酸反应以得到1,4-脱水山梨糖醇单酯、1,4-脱水山梨糖醇倍半酯或1,4-脱水山梨糖醇三酯而制得脂肪酸取代的脱水山梨糖醇表面活性剂。这些表面活性剂中的一些的通用名称包括，例如，脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、脱水山梨醇倍半油酸酯和脱水山梨醇三油酸酯。这些表面活性剂可以SPAN<sup>®</sup>或ARLACEL<sup>®</sup>名称商购获得。SPAN<sup>®</sup>和ARLACEL<sup>®</sup>表面活性剂是亲脂性的，且通常通常可溶于或分散于油中。它们也可溶于大多数有机溶剂。它们通常在水中不溶但可分散。通常，这些表面活性剂具有1.8-8.6的亲水亲脂平衡（HLB）数。此类表面活性剂可通过本领域已知的手段容易地制备或可商购获得。

[0217] 一组相关的表面活性剂包含聚氧乙烯脱水山梨糖醇单酯和聚氧乙烯脱水山梨糖醇三酯。通常通过将环氧乙烷加成到1,4-脱水山梨糖醇单酯或三酯中来制备这些材料。聚氧乙烯的添加将亲脂性脱水山梨糖醇单酯或三酯表面活性剂转化成通常可溶于或分散于水中并在不同程度上溶于有机液体的亲水性表面活性剂。可将TWEEN<sup>®</sup>表面活性剂与例如相关的脱水山梨糖醇单酯或三酯表面活性剂组合以促进乳液稳定性。TWEEN<sup>®</sup>表面活性剂通常具有9.6-16.7的HLB值。TWEEN<sup>®</sup>表面活性剂可从许多制造商商购获得，例

如,注册商标为ATLAS®表面活性剂的ICI America's公司,Wilmington,DEL。

[0218] 可单独使用或与SPAN®、ARLACEL®和/或TWEEN®表面活性剂连同使用的另一组非离子表面活性剂是通过环氧乙烷与长链脂肪酸反应制得的聚氧乙烯脂肪酸。最常获得的这类表面活性剂是名称为MYRJ®的固体,是硬脂酸的聚氧乙烯衍生物。与TWEEN®表面活性剂一样,MYRJ®表面活性剂具有亲水性,且可溶于或可分散于水中。可将表面活性剂与例如TWEEN®表面活性剂或与TWEEN®/SPAN®或与ARLACEL®表面活性剂混合物混合,用于形成乳液。MYRJ®表面活性剂可通过本领域已知的方法制得或可从ICI America's公司商购获得。

[0219] 另一组基于聚氧乙烯的非离子表面活性剂是衍生自月桂醇、乙酰醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪酸醚。通常如上所述通过将环氧乙烷加成到脂肪醇中来制备这些材料。这些表面活性剂的商品名为BRIJ®;根据表面活性剂中聚氧乙烯部分的大小,BRIJ®表面活性剂可为亲水性或亲脂性的。虽然这些化合物的制备可从本领域获得,但它们也可容易地从如ICI America's公司等商业资源获得。

[0220] 可用于实践本发明的其它非离子表面活性剂是,例如:聚氧乙烯、多元醇脂肪酸酯、聚氧乙烯醚、聚氧丙烯脂肪醚、含有聚氧乙烯的蜂蜡衍生物、聚氧乙烯羊毛脂衍生物、聚氧乙烯脂肪甘油酯、甘油脂肪酸酯或其它聚氧乙烯酸醇或12-22个碳原子的长链脂肪酸的醚衍生物。优选地,聚氧乙烯烷基醚选自下组:鲸蜡硬脂醇聚醚-12(以商品名Eumulgin® B1出售)、鲸蜡硬脂醇聚醚-20(Eumulgin® B2)、硬脂醇聚醚-21(Eumulgin® S21)、鲸蜡醇聚醚-20(Simulsol® 58或Brij® 58)、鲸蜡醇聚醚-10(Brij® 56)、硬脂醇聚醚-10(Brij® 76)、硬脂醇聚醚-20(Brij® 78)、油醇聚醚-10(Brij® 96或Brij® 97)和油醇聚醚-20(Brij® 98或Brij® 99)。归属于每个化学名称的数字对应于化学式中的环氧乙烷单元的数目。在特定方面中,聚氧乙烯烷基醚是由Cognis公司以商品名Eumulgin™B1提供的BRIJ® 56或聚氧乙烯(12)鲸蜡硬脂基醚。在特别合适的HLB小于9的基于脱水山梨糖醇酯和二缩甘露醇酯(mannide ester)的表面活性剂中,可提及以名称Dehymuls SMOTM或Span® 80出售的脱水山梨糖醇单油酸酯。在基于二缩甘露醇酯的表面活性剂中,可提及由Sigma公司或由Seppic公司以名称Montanide 80™出售的二缩甘露醇单油酸酯。

[0221] 可在本发明的组合物的乳液部分中组合两种或更多种表面活性剂。

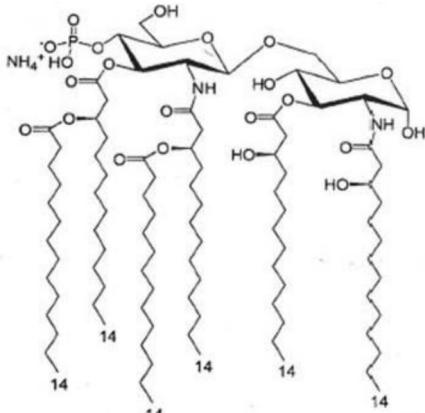
[0222] 本发明组合物的O/W乳液部分的水溶液是缓冲的盐水或无杂质的水。因为本发明的组合物旨在用于肠胃外施用,所以优选配制用作疫苗的最终缓冲溶液,以使张力(即渗透压)与正常生理液基本相同,以防止施用后组合物由于组合物和生理液之间的离子浓度不同而膨胀或快速吸收。还优选缓冲盐水以维持与正常生理条件相容的pH。同样,在某些情况下,可能有必要将pH值维持在特定水平,以确保gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的稳定性,如果它们存在于O/W乳液中的话。

[0223] 本文可使用任何生理上可接受的缓冲液,但优选磷酸盐缓冲液。其它可接受的缓冲液如乙酸盐、tris、碳酸氢盐、碳酸盐、柠檬酸盐等可用作磷酸盐缓冲液的替代物。水性组分的pH将优选为6.0-8.0。

[0224] 本发明的组合物的O/W乳液部分可包含补充组分,其可在制备O/W乳液时添加或在一旦制备出O/W乳液时添加。

[0225] 可以给出AF04的实例,AF04是含有E6020的基于鲨烯的水包油(O/W)乳液,其根据WO 2007/080308中所述的方法获得。

[0226] GLA (CAS号1246298-63-4) TLR-4激动剂是具有以下化学式的化合物:



[0227]

[0228] GLA可在例如Avanti Polar的目录中以名称699800购得(Avanti Polar Lipids公司,Alabaster,USA)。

[0229] 特别地,GLA与递送系统(如磷酸钙、脂质体、病毒颗粒、ISCOM、微米粒子和纳米粒子或乳液)组合。优选地,GLA与水包油乳液,更特别地,基于鲨烯的水包油乳液组合。

[0230] 可以给出GLA-SQEM的实例,GLA-SQEM是一种含有GLA的基于鲨烯的水包油(O/W)乳液。

[0231] 在下表1中,提到了用于获得100mL浓度为10%角鲨烯的GLA-SQEM的不同原料的量。最终乳液在22.5mM磷酸铵中含有4% (v/v) 的鲨烯(34mg/ml) 和100μg/mL的GLA。

[0232] 表1

以10%角鲨烯制备	质量% (w/v)	用于100 mL的量	参考
<b>水相(90%):</b>			
25 mM磷酸铵pH 6.1 qsp 90ml		87.7 mL	
泊洛沙姆188(普朗尼克F68)	0.09	90.0 mg	来自SIGMA的P5556
甘油	2.25	2.25 g	来自VWR Prolabo的24388238 Normapur
<b>油相(10%)</b>			
鲨烯10% v/v (85.6 mg/ml)	8.56	10.0 mL	来自SOPHIM的1208076, 再蒸馏以去除过氧化物
二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)	1.9	1.90 g	来自Avanti Polar Lipids的850345P
GLA	0.025	25.0 mg	来自Avanti Polar Lipids的699800P

[0234] 通过在55-60°C的水浴中超声处理来制备油相。然后,将水相添加到油相上(称重)。在Ultra Turrax T25(IKA)上以9500转/分匀浆化后,在2次30秒循环期间获得预乳液。然后,在55psi的气压(1450-1600bar的匀浆化压力)下,在20次通过过程中对Emulsiflex C3进行微流化处理。然后将乳液在25mM磷酸铵缓冲液中稀释为2.5倍,以获得最终的4%鲨

烯的GLA-SQEM乳液。用10毫升注射器和Acrodisc 0.8–0.2 $\mu\text{m}$  Supor膜过滤器(PALL n° PN4187)在约40°C无菌过滤乳液。

[0235] 其它合适的包含TLR4激动剂的佐剂是AS01或AS02, AS01包含脂质体制剂中的3D-MPL和QS21, AS02包含在水包油乳液中配制的3D-MPL和QS21 (Garçon等, Exp. Rev. of Vaccines, 2007, 6 (5) :723–739, EP0671948)。

[0236] 在一个实施方案中,所述诱导Th1的佐剂包含重均分子量Mw的范围为350至650kDa的直链或支链聚丙烯酸聚合物盐。

[0237] 所述聚合物是直链或直链聚丙烯酸聚合物,但不是交联的聚合物。

[0238] “聚丙烯酸聚合物”意指仅由丙烯酸单元组成的聚合物。因此,以盐的形式的所述聚丙烯酸聚合物盐仅由对应于丙烯酸的盐的单元组成,或者仅由对应于丙烯酸的游离酸形式的单元和对应于丙烯酸的盐的单元组成。

[0239] 直链或直链聚丙烯酸聚合物是通过仅丙烯酸作为单体的聚合而获得的。在大多数情况下,聚合是通过使用氧化剂作为引发剂或催化剂的自由基聚合来进行的。最常用的氧化剂是过硫酸盐(过氧二硫酸盐),例如过硫酸钠或过硫酸钾。例如,Macromolecules 2011, 44, 5928–5936中描述了分支的聚丙烯酸聚合物。当根据本发明的聚合物是直链的时,其Mark Houwink斜率高于或等于0.7(Yan J.K., Pei J.J., Ma H.L., Wang Z.B. 2015. Effects of ultrasound on molecular properties, structure, chain conformation and degradation kinetics of carboxylic curdlan. Carb. Polymers. 121, 64–70)。

[0240] 聚丙烯酸聚合物盐可为固体形式(沉淀或粉末)或优选为液体制剂。液体制剂将包括聚丙烯酸聚合物盐和水溶液。优选地,此类制剂的pH在5.5至8.0的范围内。可通过在水溶液中并入碱(像NaOH)来获得此pH。水溶液可为用缓冲液如磷酸盐缓冲液、TRIS(2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇)、Hepes(酸4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸盐)、组氨酸或柠檬酸盐缓冲液获得的经缓冲的水溶液。液体制剂也可包含一种或若干种额外的盐,如NaCl。

[0241] 特别地,所述直链或支链聚丙烯酸聚合物盐仅由对应于丙烯酸的盐的单元组成或仅由对应于丙烯酸的游离酸形式的单元和对应于丙烯酸的盐的单元组成。

[0242] 有利地,所述聚丙烯酸聚合物盐包含小于0.005%,优选小于0.001% w/w的氧化剂,基于所述聚丙烯酸聚合物盐的总干重;和/或包含小于0.005%,优选小于0.001% w/w的过硫酸盐,基于所述聚丙烯酸聚合物盐的总干重。

[0243] 在一个更特别的实施方案中,所述聚丙烯酸聚合物是具有Na<sup>+</sup>的盐。

[0244] 在一个特定的实施方案中,所述聚丙烯酸聚合物盐的多分散指数低于或等于约4,优选低于或等于约2.5。

[0245] 在一个特定的实施方案中,所述聚丙烯酸聚合物盐的重均分子量Mw的范围为380至620kDa,多分散指数指数低于或等于4;或重均分子量Mw的范围为400至600kDa,多分散指数低于或等于4;或重均分子量Mw的范围为380至620kDa,多分散指数低于或等于2.5;或重均分子量Mw的范围为400至600kDa,多分散指数低于或等于2。

[0246] 有利地,所述聚丙烯酸聚合物盐包含少于0.005% w/w的游离酸形式或盐形式的丙烯酸单体,基于所述聚丙烯酸聚合物盐的总干重。

[0247] 根据一个有利的实施方案,所述聚丙烯酸聚合物盐是pH的范围为5.5至8.0的液体制剂。

[0248] 根据一个有利的实施方案,所述聚丙烯酸聚合物盐在缓冲的水溶液中,特别是在具有磷酸缓冲液,或TRIS、Hepes、组氨酸或柠檬酸缓冲液的缓冲水溶液中。

[0249] 根据一个有利的实施方案,所述聚丙烯酸聚合物盐经渗滤和灭菌。

[0250] 当对聚丙烯酸聚合物盐或聚丙烯酸聚合物盐的液体制剂进行渗滤时,在渗滤之后进行灭菌。

[0251] 根据本发明,重均分子量Mw通过大小排阻色谱法获得。有利地,在大小排阻色谱柱之后将使用三个检测器:直角光散射检测器、折射率检测器和四毛细管差分粘度计。优选使用已知浓度的一组聚丙烯酸聚合物的折射率检测器测定用于测定Mw的dn/dc。过硫酸盐的含量和游离酸形式或盐形式的丙烯酸单体的含量可通过带电导检测的高效阴离子交换色谱法测定。

[0252] 制备此类聚合物的过程包括例如以下连续步骤:

[0253] a) 制备聚丙烯酸聚合物的溶液,

[0254] b) 纯化聚丙烯酸聚合物的溶液,以消除杂质,和

[0255] c) 对经纯化的聚丙烯酸聚合物溶液进行灭菌。

[0256] 储存此类聚合物盐溶液的过程包括例如上述制备过程,然后是将所得聚合物储存在溶液中的步骤。

[0257] 特别地,所述重均分子量Mw的范围为350至650kDa的直链或支链聚丙烯酸聚合物盐为PAA225000。

[0258] 可以以浓缩溶液的形式从Polysciences Europe (Eppelheim, 德国) 获得名称为PAA225000的产品(Ref. 18613, 钠盐)。可用水稀释以获得20mg/ml的浓度,并在室温的搅拌下维持12小时。可用HCl将pH值调节至7.55,并且可使用2kDa截止透析盒在室温下对150mM NaCl水溶液(3个连续水浴)进行透析(Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, 法国)。然后可将溶液通过0.22μm PVDF膜过滤,用于灭菌。然后可测量聚合物盐的分子量,其为488 550Da。其Mn可为129070Da,其IP可为3.8。

[0259] 然后可将聚合物以在150mM NaCl水溶液中包含20mg/ml聚合物的溶液的形式保存在+4°C。然后可将此溶液与用无菌水浓缩10倍的PBS 1C混合,以得到包含2mg/ml聚合物盐的盐溶液。

[0260] 任何其它诱导Th1的佐剂均可用于本发明的组合物中。作为已知主要诱导Th1型免疫应答的佐剂的实例,可列举以下佐剂:包含皂昔的佐剂或佐剂的组合物如W08809336或US5057540中所述的佐剂或佐剂的组合物,特别是QS21及其合成或半合成类似物,TLR3激动剂如PolyI:C及其衍生物,TLR5激动剂如鞭毛蛋白及其衍生物,TLR7激动剂或TLR7/8激动剂如咪唑喹啉及其衍生物如EP1318835中所述的TLR7激动剂或TLR7/8激动剂,TLR8激动剂如Motolimod,也称为VTX-2337(如Lu等,Clin Cancer Res,2012,18 (2) :499-509中所述的)及其衍生物或由Dynavax开发的TLR8激动剂,TLR9激动剂如CpG寡脱氧核苷酸及其衍生物如Vollmer等,Expert Opin.Biol.Ther.,2005,5 (5) :673-682中所述的,特别是ISS1018或CpG 7909,RIG-I样受体(RLR)激动剂如RIG-I激动剂,特别是5'三磷酸RNA或来自Kineta的小分子量激动剂,或干扰素基因刺激因子(STING)激动剂,特别是环二核苷酸(例如,c-di-AMP、c-di-GMP、c-di-GAMP),如Payne等,Dev Biol Stand.1998,92:79-87中所述的聚[二(羧基苯氧基)膦腈](poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene],PCPP),如Dar A等,Vet

Immunol Immunopathol., 2012, 146 (3-4) :289-95中所述的聚[二(羧基亚乙基苯氧基钠)]-磷腈(poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)]phosphazene, PECP)或卡波姆。

[0261] 这些诱导Th1的佐剂可与递送系统(如水性纳米悬浮液、磷酸钙、脂质体、病毒颗粒、ISCOM、微米粒子和纳米粒子、乳液)组合。

[0262] 根据本发明的免疫原性组合物的佐剂和抗原可与任何药学上可接受的媒介物一起配制。在本发明的上下文中,表述“药学上可接受的媒介物”是指对于向人类施用而言是生理上可接受的同时保留了根据本发明的免疫原性组合物的生理活性的媒介物,即其诱导免疫应答的能力。一个示例性药学上可接受的媒介物是生理盐水缓冲液。其它生理上可接受的媒介物是本领域技术人员已知的,且描述于,例如Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版),A.Gennaro编,1990,Mack Publishing Company,Easton,Pa中。如本文所述,免疫原性组合物可任选地含有近似生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、人血清白蛋白、必需氨基酸、非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、蔗糖、D-海藻糖脱水物、山梨糖醇、三(羟甲基)氨基甲烷和/或尿素。此外,疫苗组合物可任选地包含药学上可接受的添加剂,包括,例如,稀释剂、粘合剂、稳定剂和防腐剂。

[0263] 免疫原性组合物的pH通常为5.5-8,且更优选6.5-7.5(例如,约7)。可通过使用缓冲液(例如Tris缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、Hepes缓冲液或组氨酸缓冲液)来维持稳定的pH。因此,免疫原性组合物通常包含缓冲液。免疫原性组合物相对于人可以是等渗的。免疫原性组合物还可包含一种或几种其它盐,如NaCl。

[0264] 可通过常规灭菌技术对免疫原性组合物进行灭菌,或者可进行无菌过滤。所得的水溶液可以包装并以液体形式存储或冻干,在施用前将冻干的制剂与无菌水性载剂重构。在优选的实施方案中,如WO2009109550中所述,经由造粒过程将免疫原性组合物包装并以微丸形式储存。每个微丸可包含gB抗原、gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和任选地具有水包油乳液的诱导Th1的佐剂。可替换地,gB抗原、gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和任选地具有水包油乳液的诱导Th1的佐剂可单独或以任何组合被包含在不同的微丸中,这些微丸可以在水重构之前或之后混合以获得本发明的组合物。

[0265] 如果产物之间不存在不相容性,则通常将本发明的免疫原性组合物的佐剂和抗原部分混合在一起,或者可在即将向受试者施用之前即刻添加佐剂。

[0266] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物被制备成HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和诱导Th1的佐剂的即用型混合物。

[0267] 在另一实施方案中,可在即将向受试者施用之前即刻制备本发明的免疫原性组合物。因此,本发明提供了包括准备混合的各种组分的试剂盒。该试剂盒允许HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原、诱导Th1的佐剂以及任选的水包油乳液分开保存,直至使用时。

[0268] 在试剂盒中,这些组分在物理上彼此分开,并且可以以多种方式实现这种分开。例如,它们可在分开的容器中,如小瓶中。在某些安排中,所有组分均分开保存,直到使用时。优选地,gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原在相同容器中,且诱导Th1的佐剂和任选的水包油乳液在另一容器中。然后可混合小瓶的内容物,例如,通过去

除一个小瓶的内容物并将其添加到另一小瓶中,或者通过分别去除所有小瓶的内容物并将它们在新的容器中混合来进行混合。在一个实例中,一种或多种试剂盒组分在一个或多个注射器中,而另一组分在容器中如小瓶。可使用注射器(例如,用针头)将其内容物并入另一容器中用于混合,然后将混合物抽回至注射器中。注射器中的混合的内容物然后可被施用至受试者,通常通过新的无菌针头施用。在另一安排中,试剂盒组分被共同地但分开地保持在同一注射器中。当注射器被致动时(例如,在向患者施用期间),腔室的内容物被混合。此安排避免了在使用时需要单独的混合步骤。试剂盒组分通常为水性形式。在一些安排中,一种或多种组分为干燥形式(例如,冻干形式或作为微丸),而其它组分为水性形式。可混合组分以使干燥的组分再活化并得到用于向患者施用的水性组合物。一种或多种冻干组分可位于小瓶内或注射器中。干燥的组分可包括稳定剂,如甘露醇、蔗糖或十二烷基麦芽糖昔,以及其混合物,例如乳糖/蔗糖混合物、蔗糖/甘露醇混合物等。在一些安排中,所有组分均为干燥形式(例如,冻干形式或作为微丸),其被保持在同一容器中或分开地保持在几个容器中,并且试剂盒含有另一容器,所述容器含有用于重构疫苗的水溶液。

[0269] 因此,本发明提供一种试剂盒,其包含:(i)包含HCMV gB抗原和HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原的第一试剂盒组分,和(ii)包含诱导Th1的佐剂和任选地包含水包油乳液的第二试剂盒组分;以及此类试剂盒用于预防HCMV感染的用途。

[0270] 在优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合物可作为HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和诱导Th1的佐剂的即用型混合物在一个小瓶/注射器中获得。

[0271] 可经由任何适当的途径来施用根据本发明的本发明免疫原性组合物,如通过粘膜施用(例如,鼻内或舌下)、肠胃外施用(例如,肌内、皮下、经皮或皮内途径)或口服施用。如本领域技术人员所理解的,本发明的疫苗被适当地配制为与预期的施用途径相容。

[0272] 根据本发明的免疫原性组合物可单独施用或与合适的药物载体一起施用,并可为固体或液体形式,如片剂、胶囊剂、粉剂、溶液剂、混悬剂或乳剂。

[0273] 为了用作气雾剂,可将溶液或悬浮液中的根据本发明的免疫原性组合物与合适的推进剂例如烃类推进剂如丙烷、丁烷或异丁烷与常规佐剂一起包装在加压气雾剂容器中。本发明的材料还可以以非加压形式例如在喷雾器或雾化器中施用。

#### [0274] 用途

[0275] 如先前所提及的,本发明还涉及如本文所述的免疫原性组合物供用作HCMV疫苗。

[0276] 特别地,根据本发明的HCMV疫苗是亚单位疫苗。

[0277] 本发明还涉及在有需要的患者中预防HCMV感染的方法,该方法包括施用免疫学有效量的根据本发明的免疫原性组合物。

[0278] 如先前所述使用“HCMV”,并且HCMV感染特别可涉及妊娠期间的母系HCMV感染或先天性感染。

[0279] 特别地,所述疫苗/免疫原性组合物增加中和抗体水平和/或持久性。更特别地,所述包含HCMV gB抗原、HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和诱导Th1的佐剂的疫苗/免疫原性组合物比包含相同的HCMV gB抗原、相同的HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体复合物抗原和MF59佐剂的疫苗/免疫原性组合物诱导更高的中和抗体水平和/或持久性。

[0280] 如本文所用，“疫苗”意指经施用以诱导将保护或治疗受试者免于疾病，特别是由于试剂引起的疾病的免疫应答的免疫原性组合物。本发明的疫苗旨在用作防护性(预防性)疫苗，用于在感染之前向受试者施用，目的是预防初次(和/或复发)感染。在先天性HCMV感染的特定情况下，本发明旨在用作针对青春期女孩和妊娠前的育龄妇女的预防性疫苗，以防止HCMV从母亲垂直传播至胎儿或婴儿。

[0281] 根据本发明的免疫原性组合物包含免疫学有效量的本文所述的抗原和佐剂。“免疫学有效量”是当施用至受试者时有效引发针对所用抗原的免疫应答的量。该量可以根据待治疗的受试者的健康和身体状况、其年龄、受试者的免疫系统产生抗体的能力、所期望的保护程度、疫苗的配方、治疗医生对医疗情况的评价而变化。该量可以由本领域技术人员通过常规方法确定。

[0282] 本文提到的“受试者”以与“患者”相似的方式使用，且是指人类，特别是育龄妇女(16-45岁)和青春期女孩(11-15岁)，无论其CMV血清状况如何，以及男性、儿童或实体器官或干细胞移植的患者候选人。特别地，所述患者或受试者易感染HCMV。

[0283] 如本文所述的“中和抗体”具有本领域技术人员已知的含义，并且旨在涵盖直接中和其靶标的抗体，例如，通过阻止病毒进入宿主细胞以及通过阻止病毒从一个细胞到另一个细胞的传染。中和抗体是能够保护免于其靶标的功能性抗体。在本申请的实验部分中提供了可用于确定中和抗体水平的增加和/或持久性的方法的一些说明。

[0284] 根据本发明的疫苗可通过通常用于施用疫苗的任何途径来施用。将使用导致诱导预期的免疫应答的方案。通常，免疫时间表包括若干次次施用。所施用的免疫原性组合物的量足以产生期望的免疫应答，并由本领域技术人员确定。

[0285] 根据本发明的疫苗可以以多剂量施用。例如，根据本发明的疫苗可以以一剂、两剂或三剂施用。当根据本发明的疫苗以三剂施用时，第一剂和第三剂优选间隔约十二个月施用。例如，本发明的疫苗可以以第一剂量、第二剂量和第三剂量施用，其中所述第二剂量将在所述第一剂量后约一至三个月施用，并且其中所述第三剂量将在所述第一剂量后约六至十二个月施用。可替换地，这三剂可以在零个月、在约一到两个月(例如，约一个半月)和约六个月时施用。

[0286] 根据本发明的疫苗可以以两剂施用。优选地，第一剂量和第二剂量大约间隔约1、3、6、8或9个月施用。

[0287] 根据本发明的疫苗可以以单剂量施用。

[0288] 任选地，可以使用根据本发明的疫苗的加强施用，例如在初次免疫后六个月至十年之间，例如六个月、一年、三年、五年或十年(即，在施用初次免疫方案中安排的最后剂量后)。

[0289] 本文引用的所有参考文献，包括期刊文章或摘要、公开的专利申请、已发布的专利或任何其他参考文献，均通过提述整体地并入本文，包括引用的参考文献中呈现的所有数据、表格、图形和文本。

[0290] 在本发明的范围内，必须理解“供使用的免疫原性组合物”等同于“使用免疫原性组合物”，并且特别地，“用作疫苗的免疫原性组合物”等同于“将免疫原性组合物用作疫苗”和“将免疫原性组合物用于制备旨在用作疫苗的药物”。

[0291] 通过以下附图和实施例将进一步说明本发明。

[0292] 附图

[0293] 图1:研究时间表

[0294] 图2:通过在具有补体(系列A)和不具有补体(系列B)的情况下对上皮细胞的血清中和测定来测量血清中对HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP毒株特异的中和抗体滴度的动力学,该血清是在第20天至第257天从在第0、20和227天用2 $\mu$ g的不具有佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0295] 图3:通过在具有补体(系列A)和不具有补体(系列B)的情况下对上皮细胞以及在具有补体(系列C)和不具有补体(系列D)的情况下对成纤维细胞的血清中和测定来测量血清中对HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP毒株特异的中和抗体滴度,该血清是在第34天从在第0天和第20天用2 $\mu$ g的不具有佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0296] 图4:通过在具有补体(系列A)和不具有补体(系列B)的情况下对上皮细胞以及在具有补体(系列C)和不具有补体(系列D)的情况下对成纤维细胞的血清中和测定来测量血清中对HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP毒株的中和抗体滴度,该血清是在第208天从在第0天和第20天用2 $\mu$ g的不具有佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0297] 图5:通过在具有补体(系列A)和不具有补体(系列B)的情况下对上皮细胞以及在具有补体(系列C)和不具有补体(系列D)的情况下对成纤维细胞的血清中和测定来测量血清中对HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP毒株的中和抗体滴度,该血清是在第257天从在第0天、第20天和第227天用2 $\mu$ g的不具有佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0298] 图6:通过ELISA测量血清中的对CMV-gB(系列A)或对CMV-五聚体(系列B)特异的抗gB IgG1和IgG2c抗体滴度,该血清是在第34、208和257天从在第0天、第21天和第227天用2 $\mu$ g的不具有佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0299] 图7:计算第34、208和257天时的每个组的在第0、21和227天分别用2 $\mu$ g的具有MF59或不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠的平均IgG1/IgG2c抗体比率。

[0300] 图8:在用重组CMV-gB(系列A)或CMV-五聚体(系列B)体外刺激后在第34、208和257天监测的脾细胞中的分泌IL-5和IFN- $\gamma$ 细胞因子的细胞频数(分泌细胞因子的细胞/ $10^6$ 个脾细胞),所述脾细胞来自在第0、20和227天用2 $\mu$ g的无佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠。

[0301] 图9:在第34、208和257天时来自小鼠的分泌抗体的成浆细胞的对CMV-gB(系列A)或CMV-五聚体(系列B)特异的IgG1和IgG2c百分比,所述小鼠在第0、20和227天用2 $\mu$ g的无佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫。

[0302] 图10:在第34、208和257天时来自小鼠的分泌抗体的B记忆细胞的对CMV-gB(系列A)或CMV-五聚体(系列B)特异的IgG1和IgG2c百分比,所述小鼠在第0、20和227天用2 $\mu$ g的无佐剂或具有不同佐剂的CMV-gB和五聚体免疫。

[0303] 图11:通过在存在补体的情况下,对上皮细胞ARPE-19或成纤维细胞MRC-5的血清中和测定法测量的血清中对HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP毒株特异的中和抗体滴度,该血清是在D20时从在D0用不同剂量的与PAA佐剂配制的CMV-gB和CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0304] 图12:通过在存在补体的情况(12A)下或缺少补体的情况(12B)下,对上皮细胞

ARPE-19的血清中和测定法测量的血清中对HCMV BAD-rUL131-Y4GFP毒株特异的中和抗体滴度，该血清是在D35从在D0和D21用不同剂量的与PAA佐剂配制的CMV-gB和CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体免疫的小鼠中收集的。

[0305] 图13:在用CMV-gB、CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体(系列A)或CMV-五聚体肽池(系列B)离体刺激后,通过ELISPOT测定法测量的在D35从在D0和D21用3 $\mu$ g的CMV-gB和3 $\mu$ g的与PAA佐剂配制的CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体免疫的小鼠中收集的脾细胞中的小鼠脾细胞中IFN- $\gamma$ 细胞因子产生细胞的定量。

## 实施例

[0306] 表2

[0307] 缩写词表

首字母缩略词/缩写	名称/描述
CMV	巨细胞病毒
D	天
ELISA	酶联免疫吸附测定
EU	ELISA单位
IFNg	$\gamma$ 干扰素
Ig	免疫球蛋白
IL	白介素
IM	肌肉内
IP	腹膜内

首字母缩略词/缩写	名称/描述
M	月
N/A	不可用
SN	血清中和
W	周

[0310] 实施例1

[0311] 材料和方法

[0312] 材料

[0313] 实施例中测试的产品

[0314] 在表3中描述了产品。在D0、D20和D227,通过肌肉内(IM)途径(后腿、四头肌)以50 $\mu$ l的体积免疫雌性7周龄C57BL/6J小鼠。

[0315] 表3

产品名称	浓度	来源或组合物
五聚体CMV	1mg/ml	Native Antigen公司, 英国牛津
gB (CMV)	685.5μg/ml	如在US 6,100,064中所述获得的gBdTM, 其为806 AA长的多肽
PAA225000 (PAA)	8 mg/ml PAA 225000	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstrasse, 德国
MF59	4%鲨烯	每mL的量: 鲨烯 39.0 mg 聚山梨酯80 4.7 mg Sorban三油酸酯 4.7 mg 柠檬酸钠, 脱水物 2.65 mg 柠檬酸, 一水合物 0.17 mg 注射用水q.s.p. 1 mL
AF04	5%鲨烯, 0.04 mg/ml E6020	根据WO 2007/080308中所述的过程获得的。
GLA-SQEM	4%鲨烯, 0.1 mg/ml GLA	GLA, 其来自 Avanti Polar Lipids 公司, Alabaster, USA GLA-SQEM是根据本发明的说明书中上述过程获得的

[0316]

[0317] 方法

[0318] 组定义

[0319] 下表4中描述了研究组。将小鼠随机分配至以下7个组之一。每组区分为3个亚组，即A=>A1、A2和A3，取决于需要小鼠安乐死来收集脾脏的时间点分析(第34、208和257天)，如图1的研究时间表所示。包括三十五只小鼠/组，如下：亚组1和2为10只小鼠/亚组，以及亚组3为15只小鼠，以补偿可能在八个月内发生的并发死亡。对于对照组，亚组A1、A2和A3中仅包括5只小鼠/亚组，对于组B，包括仅5只小鼠/亚组B1和B2，对于亚组B3包括10只小鼠。

[0320] 表4

组别	亚组 (小鼠数目)	测试的产品					
		活性物质		佐剂		施用途径	
		名称	剂量	名称	剂量		
A (15)	A1 (5)	PBS	-	-	-	在D0、D21时 IM 50 μl	在D0、D21、 M7时IM50 μl
	A2 (5)						
	A3 (5)						
B (20) [0321]	B1 (5)	gB+  + 五聚体	2 μg	-	-	在D0、D21时 IM 50 μl	在D0、D21、 M7时IM50 μl
	B2 (5)						
	B3 (10)						
C (35)	C1 (10)	gB  + 五聚体	2 μg	MF59	2% 鲨烯	在D0、D21时 IM50 μl	在D0、D21、 M7时IM50 μl
	C2 (10)						
	C3 (15)		2μg				
	D1 (10)						在D0、D21时 IM 50 μl

	D (35)	D2 (10) D3 (15)	gB + 五聚体	2 μg 2 μg	PAA	200 μg	在D0、D21、M7时IM50 μl
[0322]	E (35)	E1 (10)	gB + 五聚体	2 μg 2 μg	AF04	1 μg E6020, 2.5% 鲨烯	在D0、D21时 IM 50 μl
		E2 (10)					在D0、D21、 M7时IM50 μl
		E3 (15)					
[0323]	F (35)	F1 (10)	gB + 五聚体	2 μg 2 μg	GLA-SQEM	2.5 μg GLA, 2% 鲨烯	在D0、D21时 IM 50 μl
		F2 (10)					
		F3(15)					在D0、D21、 M7时IM50 μl

[0323] 生物采样和分析测试

[0324] • 生物采样

[0325] 在麻醉下从所有动物收集血液样品。麻醉是通过以200μl的体积经由腹膜内途径施用Imalgene® (1.6mg氯胺酮) 和Rompun (0.32mg甲苯噻嗪) 进行的。在含有凝块激活因子和血清分离器(BD Vacutainer SST ref 367783)的小瓶中收集了大约1mL的血液。在+4℃过夜后，在20分钟过程中以3000rpm离心血液，收集血清并将其储存在-20℃直至分析。

[0326] 对于细胞应答测定,在无菌条件下收集脾脏,并在脾脏取样后尽快分离脾细胞。

[0327] • 分析测试

[0328] 血清中和测定

[0329] 此技术用于滴定存在于CMV-gB+五聚体+佐剂免疫的动物的血清中的功能性中和抗体。根据巨细胞病毒感染MRC5成纤维细胞和ARPE-19细胞(人上皮细胞)的能力,含有针对CMV-gB和/或CMV-五聚体的特异性功能抗体的血清可以抑制细胞的病毒感染。

[0330] 简言之,在微中和(MN)测定前一天,将 $2.5 \times 10^4$ 个MRC5成纤维细胞或ARPE-19细胞分配到96孔深色平板中。在D0,将血清在56°C热灭活30分钟。将血清样品在DMEM/F12 1% FBS中从1/10到1/10240连续两倍稀释,并与4.21log FFU/ml的BADrUL131-Y4 CMV病毒株(由Thomas Shenk提供,如在Wang等,J.Virol.,2005,79(16):10330-10338中描述的,在ARPE-19或MRC5细胞上分别滴定4.89或4.71log FFU/ml)于37°C在5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中温育60分钟。然后将血清/病毒混合物转移到MRC5或ARPE-19细胞上,并在5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中于37°C温育。对于MRC5细胞,温育进行3天;对于ARPE细胞,温育进行4天。

[0331] 在D3或D4,去除培养上清液后,在室温用100μl的PBS中1%甲醛固定细胞1小时。然后用PBS洗涤板3次,并在室温下风干,然后在Microvision荧光板读数器上进行分析,以计数每个孔中的感染的细胞。

[0332] 作为对照,每块板上存在两个细胞对照孔(无病毒)和六个具有感染了一半的病毒稀释液的细胞的孔,其中病毒稀释液含有4.21log FFU/mL。这六个孔的平均值定义了血清中和的阈值,确定为特异信号值的50%。中和终点滴度定义为最后一次稀释的倒数,该倒数低于计算的50%特异信号值。将每个单独血清的中和滴度(μPRNT50)定义为诱导感染的细胞减少50%的最终稀释度,即诱导感染的细胞低于计算的50%特异信号值的最终稀释度。计算每组的几何平均中和抗体滴度。

[0333] ELISA测定

[0334] 根据以下程序,通过机器人ELISA测定法滴定针对CMV-gB抗原或针对CMV-五聚体抗原的血清IgG1和IgG2c抗体。

[0335] 在4°C用1μg/孔的0.05M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)(Sigma)中的CMV-gB或CMV-五聚体包被Dynex 96孔微孔板过夜。然后在37°C用150μL/孔的PBS吐温牛奶(PBS pH 7.1, 0.05%吐温20, 1% (w/v) 脱脂奶粉(DIFCO))封闭板至少1小时。所有接下来的温育均以100μL的终体积进行,随后用PBS pH 7.1、0.05%吐温20洗涤3次。在PBS-吐温牛奶中(从1/1000或1/10000开始)对血清样品进行系列两倍稀释,然后将其添加到孔中。在37°C温育板90分钟。洗涤后,将在PBS-吐温-牛奶中以1/2000稀释的山羊抗小鼠IgG1或IgG2c过氧化物酶缀合抗体(Southern Biotech)添加至孔中,并在37°C温育板90分钟。进一步洗涤板,并在黑暗中于20°C与100μL/孔的即用型四甲基联苯胺(TMB)底物溶液(TEBU)温育30分钟。用100μL/孔的HCl 1M(Prolabo)终止反应。

[0336] 用酶标仪(VersaMax-Molecular Devices)测量450nm-650nm处的光密度(OD)。使用CodUnit软件计算IgG1或IgG2c抗体滴度,滴定曲线(参考小鼠超免疫血清置于每块板上)上的OD值范围为0.2至3.0。用任意ELISA单位(EU)表示的此参考的IgG1或IgG2c滴度对应于倒数稀释度的log10,给出1.0的OD。抗体检测的阈值为10个ELISA单位(1.01log10)。所有最终滴度均以log10(Log)表示。

[0337] 使用各个算术值计算IgG1/IgG2c比率，并计算每个组的各个IgG1/IgG2c比率的几何平均值。

[0338] FLLUOROSPOT

[0339] 荧光连接的免疫斑点(FLUOROSPOT)用于检测和计数分泌IFN- $\gamma$ 和IL-5细胞因子的单个细胞。

[0340] 在D0,用25 $\mu$ L的35%乙醇将96孔IPFL底微孔板(Multiscreen)的膜预润湿1分钟。然后去除乙醇,并用200 $\mu$ L的PBS 1X洗涤每个孔两次。然后分别以1/100和1/50稀释的大鼠抗小鼠IFN- $\gamma$ 或大鼠抗小鼠IL-5抗体(10 $\mu$ g/ml, Pharmingen)包被微孔板,并在4℃温育过夜。

[0341] 在D1,用PBS洗涤板,然后在37℃用RPMI 10%FBS封闭至少2小时。洗涤板后,在鼠IL-2(10U/ml)的存在下,将5x10<sup>5</sup>个新鲜分离的脾细胞/孔与CMV-gB抗原(0.1 $\mu$ g/ml)、CMV-五聚体(0.1 $\mu$ g/ml)或作为阳性对照的伴刀豆球蛋白A(Con A, 2.5 $\mu$ g/mL)温育过夜。

[0342] 在D2,用PBS 1X-BSA 0.1% (200 $\mu$ L/孔)洗涤板6次。在洗涤步骤后,在黑暗中在室温,以1 $\mu$ g/ml将100 $\mu$ L/孔的生物素化抗小鼠IFN- $\gamma$ 或抗小鼠IL5抗体添加到PBS1X-BSA 0.1%中,持续2小时。再次用PBS 1X-BSA 0.1% (200 $\mu$ L/孔)洗涤板3次。然后,将100 $\mu$ L/孔的链霉亲和素-PE以PBS 1X-BSA 0.1%中1 $\mu$ g/ml于室温在黑暗中温育1小时。

[0343] 用PBS 1X-BSA 0.1% (200 $\mu$ L/孔)进一步洗涤板6次。将板在黑暗中于5℃±3℃保存直至读数。

[0344] 用自动FLUOROSPOT酶标仪(Microvision)计数每个斑点,其对应于分泌IFN- $\gamma$ 或IL5的细胞(IFN- $\gamma$  SC或IL5 SC)。结果表示为每10<sup>6</sup>个脾细胞分泌IFN- $\gamma$ 或IL-5的细胞的数目。

[0345] IgG、IgG1和IgG2c FLUOROSPOT测定

[0346] 荧光连接的免疫斑点(FLUOROSPOT)用于检测和计数单个分泌抗体(而不考虑抗原特异性(IgG1、IgG2c或总IgG))的B细胞。

[0347] 在D0,用25 $\mu$ L的35%乙醇将96孔IPFL底微孔板(Multiscreen)的膜预润湿1分钟。然后去除乙醇,并用200 $\mu$ L的PBS 1X洗涤两次每个孔。然后用分别以1/68、1/100和1/100稀释的CMV-gB抗原(10 $\mu$ g/ml, 赛诺菲)、CMV-五聚体(10 $\mu$ g/ml, NAC)或总IgG抗体(10 $\mu$ g/ml, KPL)包被微板,并在4℃温育过夜。

[0348] 在D1,用PBS洗涤板,然后在37℃用RPMI 10%FBS包被板至少2小时。

[0349] 在板洗涤后,对于CMV-gB抗原或CMV-五聚体将5x10<sup>5</sup>个新鲜分离的脾细胞/孔,且对于总IgG抗体将2.5.10<sup>5</sup>个新鲜分离的脾细胞/孔,温育5小时。

[0350] 5小时后,将板用PBS 1X洗涤3次并在4℃储存过夜。

[0351] 在D2,用PBS 1X-BSA 0.1% (200 $\mu$ L/孔)洗涤板6次。洗涤步骤后,在室温,在黑暗中,分别以4、2或0.5 $\mu$ g/ml在PBS1X-BSA 0.1%中添加100 $\mu$ L/孔的抗小鼠IgG1 PE或抗小鼠IgG2c FITC或抗小鼠总IgG抗体,持续2小时。再次用PBS 1X-BSA 0.1% (200 $\mu$ L/孔)洗涤板6次。在黑暗中在5℃±3℃储存板直至读数。

[0352] 用自动FLUOROSPOT酶标仪(Microvision)计数每个斑点,其对应于分泌抗体的细胞(ASC)(IgG1 ASC、IgG2c ASC或总IgG ACS)。结果表示为每10<sup>6</sup>个脾细胞的分泌抗体的细胞的数目。

[0353] 结果

[0354] 体液应答

[0355] D20-D257对ARPE-19上皮细胞的中和抗体应答的纵向分析

[0356] 从第20天至第257天(即,在第20、34、62、90、118、153、187、226和257天)每月从亚组3的所有动物中收集的单个中间血清样品中,通过血清中和测定法来监测针对BADrUL131-Y4 CMV病毒株的对上皮细胞(ARPE-19)的中和活性。在材料和方法部分详述了血清中和技术,且原始数据示于表5a-b中。

[0357] 表5a-b

组别	血清	ARPE	ARPE	ARPE	ARPE	ARPE	ARPE	ARPE	ARPE	ARPE
		D20	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
		+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C
A PBS	GMT	24	16	25	29	23	21	17	22	16
五聚体:										
B 2 µg gB:	GMT	33	133	212	183	191	136	164	90	1026
2 µg										
五聚体: 2 µg										
C gB: 2 µg MF59: 2.3% 蜜蜡	GMT	220	3625	3516	3748	3562	2034	2973	1058	6792
五聚体: 2 µg										
D gB: 2 µg PAA: 200 µg	GMT	879	15990	11598	10962	10724	10266	8681	5792	37166
五聚体: 2 µg										
E AF04: 1µg E6020, 2.5% 蜜蜡	GMT	383	12648	9288	7833	9048	5653	4494	3559	17936
五聚体: 2 µg										
F GLA-SQEM: 2.5µg GLA, 2% 蜜蜡	GMT	976	30755	20844	15957	17068	11231	11156	8505	35897
五聚体: 2 µg										

[0359] a-亚组3-中间物-存在补体情况下的血清中和ARPE

组别	血清	ARPE								
		D20	M1	-	M2	-	M3	-	M4	-
		- C	C	C	C	C	C	C	C	+C
A PBS	GMT	30	16	18	13	71	22	12	12	13
B 五聚体: 2 µg	GMT	32	94	138	170	109	122	92	65	815

	<u>gB: 2 µg</u>										
	五聚体:										
	2 µg										
C	gB: 2 µg	GMT	74	2020	1973	1928	1264	1174	1028	655	5449
	MF59:										
	2.3%鲨烯										
	五聚体: 2 µg										
D	gB: 2 µg	GMT	83	3297	4890	3768	3589	3289	3580	2201	28657
	PAA: 200 µg										
[0361]	[0361] 五聚体: 2 µg										
	gB: 2 µg										
E	AF04:	GMT	91	3734	3354	3918	2728	2344	2359	1274	11910
	1µg E6020,										
	2.5%鲨烯										
	五聚体: 2 µg										
	gB: 2 µg										
F	GLA-SQEM:	GMT	106	8048	7446	7774	5392	4812	3459	2883	9150
	2.5µg GLA,										
	2%鲨烯										
[0362]	[0362] b-亚组3-中间物-在无补体情况下的血清中和ARPE										
[0363]	[0363] 几何平均滴度(GMT)以及各个中和滴度如图2所示。										
[0364]	[0364] M1=D34,M2=D62,M3=D90,M4=D118,M5=D153,M6=D187,M7=D226,M8=D257。										
[0365]	[0365] 在基于上皮的中和测定中,在存在和缺少补体的情况下,检测相似的动力学中和抗体滴度图谱,分别如图2系列A和B所示。										
[0366]	[0366] 对于施用无佐剂的CMV-gB和五聚体的组,在存在或缺少补体的情况下,在第20天检测到低中和抗体应答(GMT=33和32,其分别在有或无补体的情况下),然后中和抗体应答增加至第62天,在第62天-226天,达到平稳期,GMT的范围分别为90至212或65至170。分别在存在或缺少补体的情况下,在第226天的第3次注射加强了如在第257天检测的中和抗体滴度,GMT=1026或815。										
[0367]	[0367] 对于所有具有佐剂的组(MF59、PAA、AF04和GLA-SQEM),在第20天(即,在第一次注射后20天)在存在或缺少补体的情况下检测的中和抗体滴度,对于施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体的组C3,GMT分别为220或74,且对于施用了其它佐剂制剂的组D3至F3,GMT分别为≥383和≥83。在存在或缺少补体的情况下,在第34天(即,在第2次注射后14天),所有具有佐剂的组在2次注射后呈现出应答的峰值,GMT的范围分别为3 625至30 755或2 020至8 048。										
[0368]	[0368] 在6个月的时间内(在第34天-第226天),在存在或缺少补体的情况下,基于上皮的中和抗体滴度分别略有降低至范围为1 058至8 505或655至2883的滴度。类似地,在存在或缺少补体的情况下,在第226天的第3次注射加强了如在第257天检测到的中和抗体滴度,GMT范围分别为6 792(即,对于MF59-)至37 166(即,对于PAA-)或5 449(即,对于MF59-)至28 657(即,对于具有佐剂-PAA的组)。										
[0369]	[0369] 为了比较具有不同佐剂的组,即SPA09、AF04和GLA-SQEM与MF59参考,对第34天-第226天的重复的中和抗体滴度进行了具有2个固定因素(组和时间)的统计混合模型。										

[0370] 关于表6中所呈现的组比较,在存在补体的情况下,在施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度并不显著优于在施用了不具有佐剂的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度,然而所有其它具有佐剂的组(即,PAA、AF04和GLA-SQEM)显著优于在施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度(所有p-值<0.001)。

[0371] 在不存在补体的情况下,在施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度并不显著优于在施用了不具有佐剂的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度。在施用了具有佐剂AF04的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度并不显著优于在施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度,然而所有其它具有佐剂的组(即PAA和GLA-SQEM)显著优于在施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度(所有p-值≤0.009)。在施用了具有佐剂AF04的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度显著优于在施用了不具有佐剂的CMV-gB和五聚体的小鼠中获得的中和抗体滴度(所有p-值<0.001)。

[0372] 表6

ARPE-19中和测定 比较	在存在补体的情况下		在缺少补体的情况下	
	P-值*		P-值*	
(B3) 不带有佐剂 vs (C3) MF59	1.000 (NS)		1.000 (NS)	
(D3) PAA vs (C3) MF59	<0.001 (S)		0.009 (S)	
	x4.2		x2.4	
	<0.001 (S)		0.077 (NS)	
	x2.8			
(E3) AF04 vs (C3) MF59	<0.001 (S)		<0.001 (S)	
	x6.6		x4.0	
(F3) GLA-SQEM vs (C3) MF59				

[0373] [0374] 在第34天-226天的估计的重复中和抗体滴度内不同组的统计比较(优越性检验,\*具有Dunnet调整的p-值,NS:不显著,或S:显著优势,当显著时,倍数以斜体表示)。

[0375] 在第34天(M1)、第208天(M7)和第257天(M8)时对上皮细胞(ARPE-19)和成纤维细胞(MRC-5)的详细的中和抗体应答

[0376] 通过各个血清样品的血清中和测定来监测针对BADrUL131-Y4 CMV病毒株的对上皮细胞(ARPE-19)和成纤维细胞(MRC-5)的中和活性,所述血清样品是分别在第34天(第二次免疫后2周)、第208天(初次接种疫苗系列后7个月)和第257天(在M7时加强注射后1个月)时从来自亚组1、2和3的所有动物中收集的。在材料和方法部分详述了血清中和技术,且原始数据示于表7a-f中。

[0377] 表7a-f

	组别	血清	ARPE J34 +C	ARPE J34 -C
	<b>A</b> PBS	GMT	12	12
	<b>B</b> 五聚体: 2 $\mu$ g gB: 2 $\mu$ g	GMT	46	43
	五聚体: 2 $\mu$ g			
[0378]	<b>C</b> gB: 2 $\mu$ g MF59 : 2.3% 鲨烯	GMT	4168	1934
	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>D</b> gB: 2 $\mu$ g PAA: 200 $\mu$ g	GMT	14698	3862
	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>E</b> gB: 2 $\mu$ g AF04: 1 $\mu$ g E6020, 2.5% 鲨烯	GMT	7179	2919
	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>F</b> gB: 2 $\mu$ g GLA-SQEM: 2.5 $\mu$ g GLA, 2% 鲨烯	GMT	13302	3146
[0379]	a-亚组2-血清中和ARPE D234 (D208)			
	组别	血清	ARPE M7 +C	ARPE M7 -C
	<b>A</b> PBS	GMT	14	17
	<b>B</b> 五聚体: 2 $\mu$ g gB: 2 $\mu$ g	GMT	46	51
[0380]	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>C</b> gB : 2 $\mu$ g MF59 : 2.3% 鲨烯	GMT	3739	1834
	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>D</b> gB: 2 $\mu$ g PAA: 200 $\mu$ g	GMT	4484	2230
	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>E</b> gB: 2 $\mu$ g AF04: 1 $\mu$ g E6020, 2.5% 鲨烯	GMT	6101	2718
[0381]	五聚体: 2 $\mu$ g			
	<b>F</b> gB: 2 $\mu$ g GLA-SQEM: 2.5 $\mu$ g GLA, 2% 鲨烯	GMT	7719	1758
[0382]	b-亚组2-血清中和ARPE M7 (D208)			

	组别	血清	ARPE M8 +C	ARPE M8 -C
	A PBS	GMT	16	13
	B 五聚体: 2 μg gB: 2 μg	GMT	1026	815
	C 五聚体: 2 μg gB: 2 μg MF59 : 2.3% 鲨烯	GMT	6792	5449
[0383]	D 五聚体: 2 μg gB: 2 μg PAA: 200 μg	GMT	37166	28657
	E 五聚体: 2 μg gB: 2 μg AF04: 1μg E6020, 2.5% 鲨烯	GMT	17936	11910
	F 五聚体: 2 μg gB: 2 μg GLA-SQEM: 2.5μg GLA, 2% 鲨烯	GMT	8505	9150
[0384]	c-亚组3-血清中和ARPE M8 (D257)			
	组别	血清	MRC5 D34 +C	MRC5D34 -C
	A PBS	GMT	5	5
	B 五聚体: 2 μg gB: 2 μg	GMT	8	5
[0385]	C 五聚体: 2 μg gB: 2 μg MF59 : 2.3% 鲨烯	GMT	636	71
	D 五聚体: 2 μg gB: 2 μg PAA: 200 μg	GMT	2699	84
	E 五聚体: 2 μg gB: 2 μg AF04: 1μg E6020, 2.5% 鲨烯	GMT	1477	153
[0386]	F 五聚体: 2 μg gB: 2 μg GLA-SQEM: 2,5μg GLA, 2% 鲨烯	GMT	3131	146
[0387]	d-亚组1-血清中和MRC5-D34			

	组别	血清	MRC5 M7 +C	MRC5 M7 -C
	A PBS	GMT	5	5
	B 五聚体: 2 μg gB: 2 μg	GMT	5	5
	C 五聚体: 2 μg gB: 2 μg MF59 : 2.3% 鲨烯	GMT	147	27
[0388]	D gB: 2 μg PAA: 200 μg	GMT	500	39
	E 五聚体: 2 μg gB: 2 μg AF04: 1μg E6020, 2.5% 鲨烯	GMT	451	48
	F 五聚体: 2 μg gB: 2 μg GLA-SQEM: 2.5μg GLA, 2% 鲨烯	GMT	913	14
[0389]	e-亚组2-血清中和MRC5 M7 (D208)			
	组别	血清	MRC5 M8 +C	MRC5 M8 -C
	A PBS	GMT	5	5
	B 五聚体: 2 μg gB: 2 μg	GMT	29	15
[0390]	C 五聚体: 2 μg gB : 2 μg MF59 : 2.3% 鲨烯	GMT	695	151
	D 五聚体: 2 μg gB: 2 μg PAA: 200 μg	GMT	6645	536
	E 五聚体: 2 μg gB: 2 μg AF04: 1μg E6020, 2.5% 鲨烯	GMT	1977	438
[0391]	F 五聚体: 2 μg gB: 2 μg GLA-SQEM: 2.5μg GLA, 2% 鲨烯	GMT	6152	427
[0392]	f-亚组3-血清中和MRC5 M8 (D257)			
[0393]	几何平均滴度(GMT)以及各个中和滴度示于图3、图4和图5中。			
[0394]	在基于对上皮和基于对成纤维细胞的中和测试中均观察到了相似的中和抗体概貌, 在存在或不存在补体的情况下, 在基于对上皮的中和测试中监测到的中和滴度较高, 其中GMT分别至少高5倍或11倍。			

[0395] 在第34天,即第2次注射后14天后,在用不具有佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中未检测到中性抗体滴度或检测到低抗体滴度(分别对于MRC-5,GMT≤8,对于ARPE-19细胞,GMT≤46)。对于所有具有佐剂的CMV-gB和五聚体的组,均观察到显著的佐剂作用,与不具有佐剂的组比较,无论是存在或缺少补体的情况,对于MRC-5,SN滴度增加为14倍直至337倍,对于ARPE-19细胞,SN滴度增加为44倍直至319倍。

[0396] 关于在存在补体的情况下对ARPE-19上皮细胞的中和抗体滴度(图3,系列A),在PAA和GLA-SQEM的情况下观察到的中和抗体滴度明显高于MF59的佐剂作用(至少3到4.2倍高,优越性检验,单侧Dunnet调整,所有p值<0.001),而在AF04情况下观察不到(仅1.7倍高,p\_值=0.08)。

[0397] 相反,关于在缺少补体的情况下对ARPE-19细胞的中和抗体滴度(图3,系列B),与MF59相比,PAA、AF04和GLA-SQEM佐剂略微增加中和抗体的滴度(与MF59诱导的中和抗体滴度相比,中和抗体滴度增加为1.5到2倍),但观察到的差异不是统计学上显著的(所有p\_值>0.091)。

[0398] 关于在存在补体的情况下对MRC-5成纤维细胞的中和抗体滴度(图3,系列C),在所有测试的佐剂PAA、AF04和GLA-SQEM中均观察到佐剂作用,中和抗体滴度显著高于MF59(至少2.3至6倍高,优越性检验,单侧Dunnet调整,所有p\_值≤0.002)。

[0399] 最后,关于在缺少补体的情况下对MRC-5成纤维细胞中和抗体滴度(图3,系列D),未显示由PAA、AF04和GLA-SQEM诱导的中和抗体滴度显著高于用MF59获得的中和抗体滴度(p\_值>0.093)。在第208天(图4),即在第2次注射后7个月,在用不具有佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中未检测到中和抗体滴度或检测到低的中和抗体滴度(分别地,对于MRC-5,GMT≤5,对于ARPE-19,GMT≤50)。在具有佐剂的亚组2中,与第34天检测到的滴度相比,未表现出对ARPE-19上皮细胞的中和滴度的显著降低(来自亚组1的小鼠),无论存在或缺少补体,然而证实了对MRC-5成纤维细胞的中和抗体滴度的显著降低(在存在补体的情况下降低为1/2.3至1/5.4,所有p\_值≤0.016;在缺少补体的情况下降低为1/3至1/10,所有p\_值<0.001)。

[0400] 关于在存在或缺少补体的情况下对ARPE-19上皮细胞的中和抗体滴度(图4,系列A和B),在测试的佐剂和MF59基准之间未检测到显著差异。关于在存在补体的情况下对MRC-5成纤维细胞的中和抗体滴度(图4,系列C),由PAA和GLA-SQEM诱导的中和抗体滴度诱导显著高于由MF59诱导的中和抗体滴度(至少3.4至11.9倍高,优越性检验,单侧Dunnet调整,所有p\_值≤0.015)。

[0401] 最后,关于在缺少补体的情况下对MRC-5成纤维细胞的中和抗体滴度(图4,系列D),由PAA和AF04诱导的中和抗体滴度显著高于由MF59诱导的中和抗体滴度(增加为2至4.4倍,优越性检验,单侧Dunnet调整,所有p\_值≤0.019)。

[0402] 在第257天(图5),即在第3次注射后30天,与在第34天检测到的对ARPE-19细胞的滴度相比,用无佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中的中和抗体滴度显著增加(分别有和无补体情况下对ARPE-19细胞的GMT=1062或815)。相反,用无佐剂的CMV-gB和五聚体免疫的小鼠中的中和抗体滴度保持低的对MRC-5成纤维细胞的滴度(分别在有和无补体的情况下对MRC-5成纤维细胞的GMT=29或15)。

[0403] 在除MF59以外的所有具有佐剂的亚组3中,无论哪种细胞类型和是否存在或缺少

补体,在第3次注射后第257天检测到的中和抗体滴度均显著高于第2次注射后第34天检测到的中和抗体滴度(所有p\_值≤0.002)。

[0404] 在第257天,关于与MF59参考的佐剂比较,无论哪种细胞类型和是否存在或缺少补体,除GLA-SQEM之外,所有佐剂(即PAA和AF04)比MF59诱导更高的中和抗体滴度(优越性检验,单侧Dunnet调整,所有p-值≤0.05)。至于GLA-SQEM,诱导的补体依赖性中和抗体滴度显著高于由MF59诱导的滴度(在ARPE-19或MRC-5细胞中分别为5.3或8.9倍高,优越性检验,单侧Dunnet调整,所有p\_值<0.001),然而在缺少补体的情况下,无论哪种细胞类型,诱导的中和作用均没有显著差异。

[0405] 在D208,即第2次注射后多至7个月,包含gB+五聚体+AF04或PAA或GLA-SQEM的组合物比包含gB+五聚体+MF59的组合物产生更高的中和抗体水平,显示出抗体功能的更佳持久性。在D257,在加强后1个月,测量的中和抗体增加反映了记忆应答,并且包含gB+五聚体+AF04或PAA或GLA-SQEM的组合物比包含gB+五聚体+MF59的组合物显示出更高的滴度。

[0406] 所有这些结果表明,包含gB+五聚体+AF04或PAA或GLA-SQEM的免疫原性组合物比包含gB+五聚体+MF59的组合物产生更高的中和抗体水平和持久性。

#### [0407] IgG1和IgG2c抗体应答

[0408] 在各个血清样品中通过ELISA测定了由在无或有不同佐剂情况下施用的CMV gB和五聚体抗原引发的CMV gB特异性和五聚体特异性IgG1和IgG2c抗体应答,所述血清样品是分别在第34天(在第2次免疫后2周)、第208天(在初次接种疫苗系列后7个月)和第257天(在M7时加强注射后1个月)从来自亚组1、2和3的所有动物中收集的。平均ELISA抗体滴度(log 10EU)示于图6中。在材料和方法部分中详述了ELISA技术。

[0409] 关于IgG1和IgG2c抗体应答,无论所分析的时间点如何,无论gB或五聚体的CMV抗原特异性如何,都可获得相似的图谱。

[0410] 关于IgG1抗体滴度,与无佐剂的组相比,所有测试的佐剂显著增加IgG1抗体滴度。无论抗原和时间点如何,当与MF59相比时,对于AF04未显示出显著差异。对于PAA,在第3次加强注射后第34和208天(而非第257天)观察到了比MF59显著更低的IgG1滴度的佐剂作用(降低为至少1/2.4,所有p-值≤0.045,差异检验,单侧Dunnet调整)。相较于MF59参考,GLA-SQEM在所有测试的时间点诱导显著更低的gB IgG1滴度(降低为至少1/2.5,所有p-值≤0.033,差异检验,单侧Dunnet调整),以及在第208天和第257天诱导较低的抗五聚体IgG1滴度(降低为至少1/2.7,所有p-值≤0.005,差异检验,单侧Dunnet调整)。至于IgG2c抗体滴度,与无佐剂的组相比,所有测试的佐剂显著增IgG2c抗体滴度。对于所有测试的佐剂,即PAA、AF04和GLA-SQEM,无论时间点如何,对于特异于gB或五聚体的IgG2c均观察到佐剂效应,其IgG2c滴度显著高于MF59(至少11倍高;所有p-值<0.001,差异检验,单侧Dunnet调整)。

#### [0411] ELISA IgG1/IgG2c比率

[0412] 为了评价Th2/Th1方向,计算了所有具有佐剂的组的IgG1/IgG2c比率,并在图7中进行了详述。

[0413] 如图7所示,计算的CMV-五聚体的IgG1/IgG2c比率低于计算的CMV-gB的IgG1/IgG2c比率,并且无论时间点如何都保持恒定。无论时间点如何,鲨烯乳液MF59显示出Th2偏的应答概貌,对于CMV-gB,IgG1/IgG2比率≥85,或者对于CMV-五聚体,IgG1/IgG2比率≥

18. 对于所有其它测试的佐剂, 获得了比MF59低的IgG1/IgG2c比率, 对于AF04, 对gB特异的IgG1/IgG2c比率 $\geq 7.1$ , 且对五聚体特异的IgG1/IgG2c比率 $\geq 2.1$ , 对于PAA和GLA-SQEM, IgG1/IgG2c比率低于或等于2.4或0.8(分别为对gB特异和五聚体特异的IgG1/IgG2c比率), 这表明比MF59更偏向Th1的应答概貌, 以及AF04、PAA和GLA-SQEM是诱导Th1的佐剂。

[0414] 细胞应答

[0415] • 通过FLUOROSPOT监测的分泌IL5和IFN- $\gamma$  细胞因子的细胞

[0416] 通过对脾细胞的FLUOROSPOT测量分泌IL5和IFN- $\gamma$  的细胞频数, 该脾细胞是分别在第34天(第二次免疫后2周)、第208天(初次接种疫苗系列后7个月)和第257天(在M7时加强注射后1个月)时从来自亚组1、2和3的所有动物中收集的。在FLUOROSPOT测定期间, 每个脾细胞悬液均用0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 重组CMV-gB或CMV-五聚体离体刺激过夜。

[0417] 在材料和方法部分中详述了FLUOROSPOT技术。

[0418] 如图8中所示, 在第34天, CMV-gB刺激后(系列A), 除具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体组(几何平均值为60个分泌IL-5的细胞/ $10^6$ 个脾细胞)外, 在所有组中均未检测到分泌IL-5的细胞(SC)频数或检测到低频数(几何平均值<22个分泌IL-5的细胞/ $10^6$ 个脾细胞)。类似地, 在所有组中均未检测到分泌IFN- $\gamma$  的细胞频数或检测到很少的细胞频数(几何平均值<20个分泌IFN- $\gamma$  的细胞/ $10^6$ 个脾细胞)。

[0419] 相反, 在CMV-五聚体刺激后, 检测到高细胞因子分泌的细胞频数(图8, 系列B)。关于分泌IL-5的细胞, 在施用了MF59的小鼠中检测到高IL-5SC频数(444个IL-5SC/ $10^6$ 个脾细胞)。在施用了PAA和GLA-SQEM的组中检测到的IL-5分泌显著低于在MF59情况下获得的IL-5分泌( $p$ -值 $\leq 0.002$ , 差异检验, 单侧Dunnet调节), 而在AF04的情况下未记录到显著差异。

[0420] 关于分泌IFN- $\gamma$  的细胞频数, 所有测试的佐剂, 即PAA、AF04和GLA-SQEM, 与MF59相比, 记录了IFN- $\gamma$  产量显著增加为8倍多至29倍(所有 $p$ -值 $\leq 0.001$ , 差异检验, 单侧Dunnet调整)。

[0421] 如图8所示, 在第208天, 无论刺激抗原为何, 分泌IL-5和IFN- $\gamma$  的细胞频数均是低的。

[0422] 在第257天, 相较于第34天, IL-5和IFN- $\gamma$  应答在CMV-gB和CMV-五聚体刺激后是增加的, 然而Th1/Th2概貌是保守的。关于分泌IL-5的细胞, 在施用了MF59的小鼠中检测到高IL-5SC频数(在CMV-gB或五聚体刺激后分别为268和2284个IL-5SC/ $10^6$ 个脾细胞)。

[0423] 施用了PAA、AF04和GLA-SQEM的组中检测到的IL-5分泌显著低于在MF59情况下获得的IL-5分泌( $p$ -值 $\leq 0.003$ , 差异检验, 单侧Dunnet调整)。

[0424] 关于分泌IFN- $\gamma$  的细胞频数, 与MF59相比, 所有测试的佐剂(即PAA、AF04和GLA-SQEM)均记录到IFN- $\gamma$  SC频数显著增加(所有 $p$ -值 $\leq 0.001$ , 差异检验, 单侧Dunnet调整)。

[0425] 总之, 所有测试的佐剂均比MF59诱导出更偏向Th-1的总体应答概貌, 这与IgG1/IgG2c比率所指示的趋势一致。

[0426] 总之, 与IgG1/IgG2c比率指示的趋势一致, 所有测试的佐剂均诱导了偏向Th-1的总体细胞应答概貌, 而MF59诱导了偏向Th2的总体细胞应答概貌。

[0427] • 通过ELISPOT监测的分泌IgG1和IgG2c抗体的成浆细胞

[0428] 通过对脾细胞的离体FLUOROSPOT来测量分泌IgG1和IgG2c抗体的成浆细胞频数, 该脾细胞是分别在第34天(第二次免疫后2周)、第208天(初次接种疫苗系列后7个月)和第

257天(在M7时加强注射后1个月)时从来自亚组1、2和3的所有动物中收集的。在ELISPOT测定期间中,每个脾细胞悬液均沉积在用重组CMV-gB或CMV-五聚体包被的孔中,以捕获存在于成浆细胞表面的IgG1或IgG2c特异性抗体。根据总分泌IgG的细胞来计数并报告分泌IgG1和IgG2c CMV-gB以及五聚体特异性抗体的细胞;计算IgG1或IgG2c占总IgG的百分比。在材料和部分中详述了FLUOROSPOT技术。

[0429] 如图9中所示,在第34天的分泌IgG1抗体的细胞(ASC)频数的平均值的范围是3.8%-20.12%,所有测试的佐剂之间均无显著差异。关于IgG2c ASC频数,当小鼠被施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体时,检测出低%。相反,具有佐剂PAA、AF04和GLA-SQEM的CMV-gB和五聚体比MF59诱导显著更高的IgG2c ASC的%(所有p\_值<0.001,差异检验,单侧Dunnet调整),无论抗原特异性是CMV-gB或CMV-五聚体。

[0430] 正如所预期的,对于在第208天检测到的ASC,应答是低的,这指示在初次接种疫苗系列后6个月,在小鼠脾脏中检测到低的循环成浆细胞率。

[0431] 第3次注射后第30天(第257天),ASC频数,对CMV-gB或CMV-五聚体特异的IgG1或IgG2c,与第208天相比有所增加。同样,在第257天的IgG1 ASC频数的平均值的范围是3.1%-9%,所有测试的佐剂之间均无显著差异。关于IgG2c ASC频数,当小鼠被施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体时,检测到低%。相反,具有佐剂PAA、AF04和GLA-SQEM的CMV-gB和五聚体比MF59诱导显著更高的IgG2c ASC的%(所有p\_值<0.001,差异检验,单侧Dunnet调整),无论抗原特异性是CMV-gB或CMV-五聚体。

[0432] • 通过FLUOROSPOT监测的分泌IgG1和IgG2c抗体的B记忆细胞

[0433] 通过在第34天、第208天和第257天对在用IL-2和R848体外刺激后培养4天的激活的和富集的B细胞脾细胞的FLUOROSPOT来测量分泌IgG1和IgG2c抗体的细胞频数。在材料和方法部分中详述了FLUOROSPOT技术。

[0434] 如图10中所示,在第34天的分泌IgG1抗体的细胞(ASC)频数的平均值的范围是1.24%-4.68%,所有测试的佐剂之间均无显著差异且关于CMV-gB或CMV-五聚体的抗原特异性具有类似的概貌。关于IgG2c ASC频数,当小鼠被施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体时,检测出低%。相反,带有佐剂PAA、AF04和GLA-SQEM的CMV-gB和五聚体比MF59诱导显著更高的IgG2c ASC的%(所有p\_值<0.001,差异检验,单侧Dunnet调整),无论抗原特异性是CMV-gB或CMV-五聚体。

[0435] 关于在第208天检测到的ASC,主要针对CMV-五聚体特异的IgG1 ASC,检测到B记忆细胞,其%范围为1.6%至3.24%,这与所测试的佐剂无关。关于IgG2c ASC频数,当小鼠被施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体时,检测出低%。相反,具有佐剂PAA、AF04和GLA-SQEM的CMV-gB和五聚体比MF59诱导显著更高的IgG2c ASC的%(所有p\_值<0.001,差异检验,单侧Dunnet调整)。

[0436] 第3次注射后30天(在第257天),IgG1 ASC频数的平均值的范围是1.1%-3.75%,所有测试的佐剂之间均无显著差异。

[0437] 关于IgG2c ASC频数,当小鼠被施用了具有佐剂MF59的CMV-gB和五聚体时,检测出低%。相反,具有佐剂PAA和GLA-SQEM的CMV-gB和五聚体比MF59诱导显著更高的IgG2c ASC的%(所有p\_值<0.001,差异检验,单侧Dunnet调整),无论抗原特异性是CMV-gB或CMV-五聚体。

[0438] 这些结果显示,包含gB+五聚体+PAA或AF04或GLA-SQEM的组合物比包含gB+五聚体+MF59的组合物具有更高的记忆应答水平。同样清楚的是,这种较高的记忆细胞频数(已知是保护持久性的中介物)保持了主要Th1型应答概貌。

[0439] 实施例2

[0440] 两种抗原的互补作用

[0441] 在实验研究的设计中,发明人研究了在PAA佐剂的存在下两种抗原的组合剂量范围作用。为此,在PAA佐剂存在下,10只雌性C57/B16J小鼠的11个组在第0天和第22天通过肌肉内途径接受剂量范围为0至5 $\mu$ g CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体(其具有或不具有剂量范围为1.2至5 $\mu$ g的CMV-gB)。通过ELISA评估对gB和gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体(IgG1/IgG2c亚类)特异的抗体应答,以及在D22(在有补体的情况下,针对ARPE-19上皮细胞)和在D35(在有或无补体的情况下,针对MRC5成纤维细胞和ARPE-19上皮细胞)通过中和测定来评估抗体应答。在体外用gB和五聚体重组蛋白和五聚体肽池刺激后,在D35通过IFN- $\gamma$  ELISPOT评估细胞应答。

[0442] 监测的对上皮细胞ARPE-19或成纤维细胞MRC-5的中和活性表现出相似概貌,对上皮细胞记录的中和滴度高于对成纤维细胞的中和滴度(ARPE-19的滴度为MRC-5细胞的2至5倍高)。

[0443] 在第20天,(图11),即在第1次施用后20天,在幼兔补体的存在下抑制上皮细胞和成纤维细胞二者感染的中和抗体滴度增加,这取决于gB和gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体的施用剂量。当gB浓度增加时,证实了更高的中和滴度增加。如图11中所示,雷达图是根据gB剂量而不是五聚体剂量定向的。因此,对于监测的对上皮细胞和成纤维细胞的中和活性(对于上皮细胞,p=0.014,对于成纤维细胞p=0.006),观察到在gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体的顶部添加gB具有显著的线性效应。

[0444] 总之,在存在补体的情况下,在五聚体顶部添加gB允许增加对上皮细胞和成纤维细胞两者的SN滴度。

[0445] 在第35天,即在第2次施用后14天,无论gB或gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体的施用的剂量为何,检测到在存在幼兔补体的情况下抑制上皮细胞和成纤维细胞感染的高中和抗体滴度。检测到的中和活性处于平台,对五聚体和gB均无显著的剂量作用(所有p-值 $\geq$ 0.240)(图12A)。

[0446] 在第35天,还监测了在不存在幼兔补体的情况下抑制上皮细胞和成纤维细胞感染的补体独立的中和活性。

[0447] 如图12B中所示,在缺少补体的情况下,雷达图是根据五聚体剂量而非gB剂量定向的,因此,当gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体剂量增加时,补体独立的中和抗体滴度显著增加。未证明gB的显著剂量效应,而对于gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体渐增剂量却证明了显著的线性和平方效应(对ARPE-19和MRC-5细胞的中和滴度,p $\leq$ 0.009)。

[0448] 总之,在缺少补体的情况下,在gB顶部添加五聚体允许增加对上皮细胞和成纤维细胞两者的SN滴度。

[0449] 因此,两种抗原的互补作用由它们各自对中和抗体应答质量的作用来证明。关于功能性体液应答(即补体依赖的和独立的中和抗体)的分析,已证明两种抗原的组合为病毒中和提供了扩展的作用方式。CMV-gB允许在存在补体的情况下增加对上皮细胞和成纤维细

胞的中和抗体滴度，且CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体允许实现对上皮细胞和成纤维细胞的补体独立的中和抗体。

[0450] 而且，在诱导的细胞应答中也注意到了CMV-gB和CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体组合的这种增宽性质。如图13系列A中所示，在施用了配制有PAA佐剂的CMV-gB和CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体的小鼠的脾细胞中检测到特异性IFN- $\gamma$ 细胞应答。在用CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131重组五聚体离体刺激后检测到比CMV-gB重组蛋白更高的特异性IFN- $\gamma$ 细胞应答。为了定义CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体内的细胞表位，还用15-肽池离体刺激了施用了配制有PAA佐剂的CMV-gB和CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131五聚体的小鼠中的脾细胞，该15-肽池涵盖构成五聚体的每个单独蛋白质(即，gH、gL、UL128、UL130和UL131)的序列。如图13系列B中所示的，对于涵盖构成五聚体的每个单独蛋白质(除了UL128)的所有肽池检测到持续的特异性IFN- $\gamma$ 细胞应答，其中对于大多数测试的小鼠，检测到UL128的IFN- $\gamma$ 细胞应答低。

[0451] 总之，在gB顶部添加五聚体允许通过扩大细胞表位的数目来增加IFN- $\gamma$ 细胞应答。

## 序列表

<110> 赛诺菲巴斯德(Sanofi Pasteur)

<120> 人巨细胞病毒免疫原性组合物

<130> BET17L3240

<160> 6

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 806

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> gB抗原

<400> 1

Ser Ser Thr Arg Gly Thr Ser Ala Thr His Ser His His Ser His

1 5 10 15

Thr Thr Ser Ala Ala His Ser Arg Ser Gly Ser Val Ser Gln Arg Val

20 25 30

Thr Ser Ser Gln Thr Val Ser His Gly Val Asn Glu Thr Ile Tyr Asn

35 40 45

Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr

50 55 60

Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe

65 70 75 80

Glu Arg Asn Ile Val Cys Thr Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu

85 90 95

Asp Glu Gly Ile Met Val Val Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr

100 105 110

Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr

115 120 125

Ala Tyr Ile His Thr Thr Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val

130 135 140

Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile His His Ile Asn Ser His Ser Gln Cys

145 150 155 160

Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val Ile Ala Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr

165 170 175

His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Thr Met Gln Leu Met Pro Asp Asp

180 185 190

Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp

195	200	205
His Ser Arg Gly Ser Thr Trp Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn		
210	215	220
Cys Met Val Thr Ile Thr Thr Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe		
225	230	235
Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp Val Val Asp Ile Ser Pro Phe Tyr Asn		
245	250	255
Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe		
260	265	270
Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn		
275	280	285
Ser Ala Leu Glu Thr His Arg Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp		
290	295	300
Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln		
305	310	315
Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu		
325	330	335
Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser		
340	345	350
Lys Lys Gln Glu Val Asn Met Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg		
355	360	365
Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn		
370	375	380
Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Thr Gly		
385	390	395
Gly Leu Val Val Phe Trp Gln Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu		
405	410	415
Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg Ser Ser Leu Asn Leu Thr His Asn Thr		
420	425	430
Thr Gln Thr Ser Thr Asp Gly Asn Asn Ala Thr His Leu Ser Asn Met		
435	440	445
Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp		
450	455	460
Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala		
465	470	475
Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser		
485	490	495
Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile		
500	505	510

Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr  
 515 520 525  
 Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu  
 530 535 540  
 Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala  
 545 550 555 560  
 Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile  
 565 570 575  
 Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys  
 580 585 590  
 Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe  
 595 600 605  
 Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile  
 610 615 620  
 Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu  
 625 630 635 640  
 Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu  
 645 650 655  
 Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val  
 660 665 670  
 Glu Asp Lys Arg Leu Cys Met Gln Pro Leu Gln Asn Leu Phe Pro Tyr  
 675 680 685  
 Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser Gly Asn Thr Lys Asp  
 690 695 700  
 Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser  
 705 710 715 720  
 Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala  
 725 730 735  
 Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu Leu Ala Leu Val  
 740 745 750  
 Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu  
 755 760 765  
 Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln Lys Pro Asn Leu Leu  
 770 775 780  
 Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His Leu Lys Asp Ser  
 785 790 795 800  
 Asp Glu Glu Glu Asn Val  
 805

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 694

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; gH多肽

&lt;400&gt; 2

Arg	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ala	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Asp	Lys	Ala	Phe	His
1						5				10					15
Leu	Leu	Leu	Asn	Thr	Tyr	Gly	Arg	Pro	Ile	Arg	Phe	Leu	Arg	Glu	Asn
						20			25					30	
Thr	Thr	Gln	Cys	Thr	Tyr	Asn	Asn	Ser	Leu	Arg	Asn	Ser	Thr	Val	Val
						35			40					45	
Arg	Glu	Asn	Ala	Ile	Ser	Phe	Asn	Phe	Phe	Gln	Ser	Tyr	Asn	Gln	Tyr
						50			55			60			
Tyr	Val	Phe	His	Met	Pro	Arg	Cys	Leu	Phe	Ala	Gly	Pro	Leu	Ala	Glu
						65			70		75			80	
Gln	Phe	Leu	Asn	Gln	Val	Asp	Leu	Thr	Glu	Thr	Leu	Glu	Arg	Tyr	Gln
						85			90			95			
Gln	Arg	Leu	Asn	Thr	Tyr	Ala	Leu	Val	Ser	Lys	Asp	Leu	Ala	Ser	Tyr
						100			105			110			
Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gln	Asp	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln
						115			120			125			
Pro	Thr	Thr	Val	Pro	Pro	Pro	Ile	Asp	Leu	Ser	Ile	Pro	His	Val	Trp
						130			135			140			
Met	Pro	Pro	Gln	Thr	Thr	Pro	His	Gly	Trp	Thr	Glu	Ser	His	Thr	Thr
						145			150		155			160	
Ser	Gly	Leu	His	Arg	Pro	His	Phe	Asn	Gln	Thr	Cys	Ile	Leu	Phe	Asp
						165			170			175			
Gly	His	Asp	Leu	Leu	Phe	Ser	Thr	Val	Thr	Pro	Cys	Leu	His	Gln	Gly
						180			185			190			
Phe	Tyr	Leu	Ile	Asp	Glu	Leu	Arg	Tyr	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Thr	Glu
						195			200			205			
Asp	Phe	Phe	Val	Val	Thr	Val	Ser	Ile	Asp	Asp	Asp	Thr	Pro	Met	Leu
						210			215			220			
Leu	Ile	Phe	Gly	His	Leu	Pro	Arg	Val	Leu	Phe	Lys	Ala	Pro	Tyr	Gln
						225			230		235			240	
Arg	Asp	Asn	Phe	Ile	Leu	Arg	Gln	Thr	Glu	Lys	His	Glu	Leu	Leu	Val
						245			250			255			
Leu	Val	Lys	Lys	Asp	Gln	Leu	Asn	Arg	His	Ser	Tyr	Leu	Lys	Asp	Pro

260	265	270
Asp Phe Leu Asp Ala Ala Leu Asp Phe Asn Tyr Leu Asp Leu Ser Ala		
275	280	285
Leu Leu Arg Asn Ser Phe His Arg Tyr Ala Val Asp Val Leu Lys Ser		
290	295	300
Gly Arg Cys Gln Met Leu Asp Arg Arg Thr Val Glu Met Ala Phe Ala		
305	310	315
Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Ala Ala Ala Arg Gln Glu Glu Ala Gly Ala		
325	330	335
Gln Val Ser Val Pro Arg Ala Leu Asp Arg Gln Ala Ala Leu Leu Gln		
340	345	350
Ile Gln Glu Phe Met Ile Thr Cys Leu Ser Gln Thr Pro Pro Arg Thr		
355	360	365
Thr Leu Leu Leu Tyr Pro Thr Ala Val Asp Leu Ala Lys Arg Ala Leu		
370	375	380
Trp Thr Pro Asn Gln Ile Thr Asp Ile Thr Ser Leu Val Arg Leu Val		
385	390	395
Tyr Ile Leu Ser Lys Gln Asn Gln Gln His Leu Ile Pro Gln Trp Ala		
405	410	415
Leu Arg Gln Ile Ala Asp Phe Ala Leu Lys Leu His Lys Thr His Leu		
420	425	430
Ala Ser Phe Leu Ser Ala Phe Ala Arg Gln Glu Leu Tyr Leu Met Gly		
435	440	445
Ser Leu Val His Ser Met Leu Val His Thr Thr Glu Arg Arg Glu Ile		
450	455	460
Phe Ile Val Glu Thr Gly Leu Cys Ser Leu Ala Glu Leu Ser His Phe		
465	470	475
Thr Gln Leu Leu Ala His Pro His His Glu Tyr Leu Ser Asp Leu Tyr		
485	490	495
Thr Pro Cys Ser Ser Gly Arg Arg Asp His Ser Leu Glu Arg Leu		
500	505	510
Thr Arg Leu Phe Pro Asp Ala Thr Val Pro Ala Thr Val Pro Ala Ala		
515	520	525
Leu Ser Ile Leu Ser Thr Met Gln Pro Ser Thr Leu Glu Thr Phe Pro		
530	535	540
Asp Leu Phe Cys Leu Pro Leu Gly Glu Ser Phe Ser Ala Leu Thr Val		
545	550	555
Ser Glu His Val Ser Tyr Val Val Thr Asn Gln Tyr Leu Ile Lys Gly		
565	570	575

Ile Ser Tyr Pro Val Ser Thr Thr Val Val Gly Gln Ser Leu Ile Ile  
 580 585 590  
 Thr Gln Thr Asp Ser Gln Thr Lys Cys Glu Leu Thr Arg Asn Met His  
 595 600 605  
 Thr Thr His Ser Ile Thr Ala Ala Leu Asn Ile Ser Leu Glu Asn Cys  
 610 615 620  
 Ala Phe Cys Gln Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Asp Asp Thr Gln Gly Val  
 625 630 635 640  
 Ile Asn Ile Met Tyr Met His Asp Ser Asp Asp Val Leu Phe Ala Leu  
 645 650 655  
 Asp Pro Tyr Asn Glu Val Val Val Ser Ser Pro Arg Thr His Tyr Leu  
 660 665 670  
 Met Leu Leu Lys Asn Gly Thr Val Leu Glu Val Thr Asp Val Val Val  
 675 680 685  
 Asp Ala Thr Asp Ser Arg  
 690  
 <210> 3  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> gL多肽  
 <400> 3  
 Ala Ala Val Ser Val Ala Pro Thr Ala Ala Glu Lys Val Pro Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Glu Leu Thr Arg Arg Cys Leu Leu Gly Glu Val Phe Gln Gly  
 20 25 30  
 Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr Gly Arg  
 35 40 45  
 Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr Pro Glu  
 50 55 60  
 Ala Ala Asn Ser Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln Leu Arg Ala Leu Leu Thr Leu Leu  
 85 90 95  
 Ser Ser Asp Thr Ala Pro Arg Trp Met Thr Val Met Arg Gly Tyr Ser  
 100 105 110  
 Glu Cys Gly Asp Gly Ser Pro Ala Val Tyr Thr Cys Val Asp Asp Leu  
 115 120 125

Cys Arg Gly Tyr Asp Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Glu Arg Ser Ile Phe  
 130 135 140

Thr Glu His Val Leu Gly Phe Glu Leu Val Pro Pro Ser Leu Phe Asn  
 145 150 155 160

Val Val Val Ala Ile Arg Asn Glu Ala Thr Arg Thr Asn Arg Ala Val  
 165 170 175

Arg Leu Pro Val Ser Thr Ala Ala Pro Glu Gly Ile Thr Leu Phe  
 180 185 190

Tyr Gly Leu Tyr Asn Ala Val Lys Glu Phe Cys Leu Arg His Gln Leu  
 195 200 205

Asp Pro Pro Leu Leu Arg His Leu Asp Lys Tyr Tyr Ala Gly Leu Pro  
 210 215 220

Pro Glu Leu Lys Gln Thr Arg Val Asn Leu Pro Ala His Ser Arg Tyr  
 225 230 235 240

Gly Pro Gln Ala Val Asp Ala Arg  
 245

<210> 4

<211> 144

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> UL128多肽

<400> 4

Glu Glu Cys Cys Glu Phe Ile Asn Val Asn His Pro Pro Glu Arg Cys  
 1 5 10 15

Tyr Asp Phe Lys Met Cys Asn Arg Phe Thr Val Ala Leu Arg Cys Pro  
 20 25 30

Asp Gly Glu Val Cys Tyr Ser Pro Glu Lys Thr Ala Glu Ile Arg Gly  
 35 40 45

Ile Val Thr Thr Met Thr His Ser Leu Thr Arg Gln Val Val His Asn  
 50 55 60

Lys Leu Thr Ser Cys Asn Tyr Asn Pro Leu Tyr Leu Glu Ala Asp Gly  
 65 70 75 80

Arg Ile Arg Cys Gly Lys Val Asn Asp Lys Ala Gln Tyr Leu Leu Gly  
 85 90 95

Ala Ala Gly Ser Val Pro Tyr Arg Trp Ile Asn Leu Glu Tyr Asp Lys  
 100 105 110

Ile Thr Arg Ile Val Gly Leu Asp Gln Tyr Leu Glu Ser Val Lys Lys  
 115 120 125

His Lys Arg Leu Asp Val Cys Arg Ala Lys Met Gly Tyr Met Leu Gln  
     130                        135                        140  
 <210> 5  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> UL130多肽  
 <400> 5

Ser Pro Trp Ser Thr Leu Thr Ala Asn Gln Asn Pro Ser Pro Leu Trp  
   1                      5                              10                      15  
 Ser Lys Leu Thr Tyr Ser Lys Pro His Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys  
   20                      25                              30  
 Pro Phe Ile Tyr Pro Ser Pro Pro Arg Ser Pro Leu Gln Phe Ser Gly  
   35                      40                              45  
 Phe Gln Arg Val Leu Thr Gly Pro Glu Cys Arg Asn Glu Thr Leu Tyr  
   50                      55                              60  
 Leu Leu Tyr Asn Arg Glu Gly Gln Thr Leu Val Glu Arg Ser Ser Thr  
   65                      70                              75                      80  
 Trp Val Lys Lys Val Ile Trp Tyr Leu Ser Gly Arg Asn Gln Thr Ile  
   85                      90                              95  
 Leu Gln Arg Met Pro Arg Thr Ala Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Val  
   100                     105                             110  
 Gln Ile Ser Val Glu Asp Ala Lys Ile Phe Gly Ala His Met Val Pro  
   115                     120                             125  
 Lys Gln Thr Lys Leu Leu Arg Phe Val Val Asn Asp Gly Thr Arg Tyr  
   130                     135                             140  
 Gln Met Cys Val Met Lys Leu Glu Ser Trp Ala His Val Phe Arg Asp  
   145                     150                             155                     160  
 Tyr Ser Val Ser Phe Gln Val Arg Leu Thr Phe Thr Glu Ala Asn Asn  
   165                     170                             175  
 Gln Thr Tyr Thr Phe Cys Thr His Pro Asn Leu Ile Val  
   180                     185

<210> 6  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> UL131A多肽

<400> 6  
Gln Cys Gln Arg Glu Thr Ala Glu Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Val Pro  
1 5 10 15  
His Tyr Trp Asp Ala Cys Ser Arg Ala Leu Pro Asp Gln Thr Arg Tyr  
20 25 30  
Lys Tyr Val Glu Gln Leu Val Asp Leu Thr Leu Asn Tyr His Tyr Asp  
35 40 45  
Ala Ser His Gly Leu Asp Asn Phe Asp Val Leu Lys Arg Ile Asn Val  
50 55 60  
Thr Glu Val Ser Leu Leu Ile Ser Asp Phe Arg Arg Gln Asn Arg Arg  
65 70 75 80  
Gly Gly Thr Asn Lys Arg Thr Thr Phe Asn Ala Ala Gly Ser Leu Ala  
85 90 95  
Pro His Ala Arg Ser Leu Glu Phe Ser Val Arg Leu Phe Ala Asn  
100 105 110

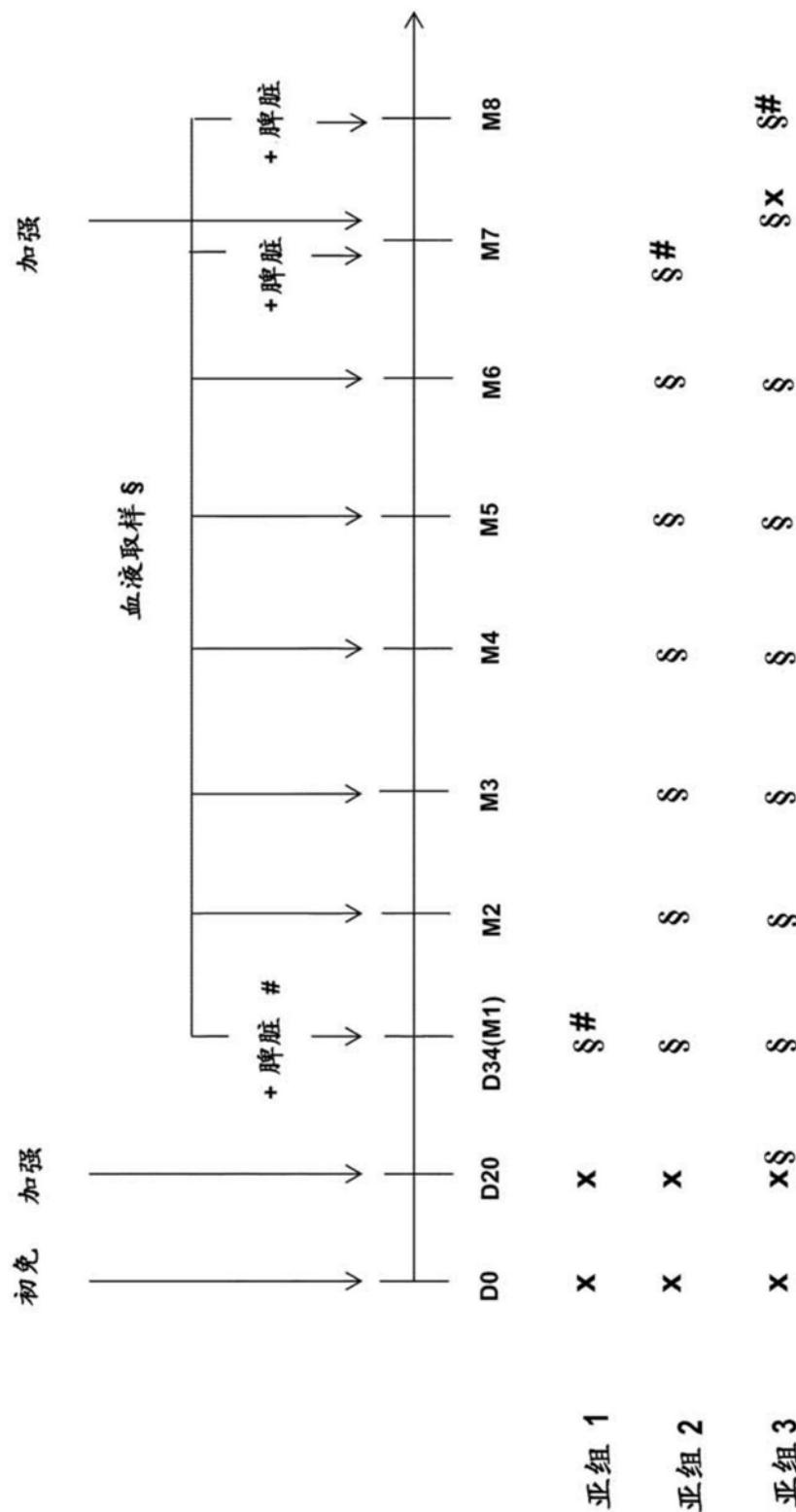


图1

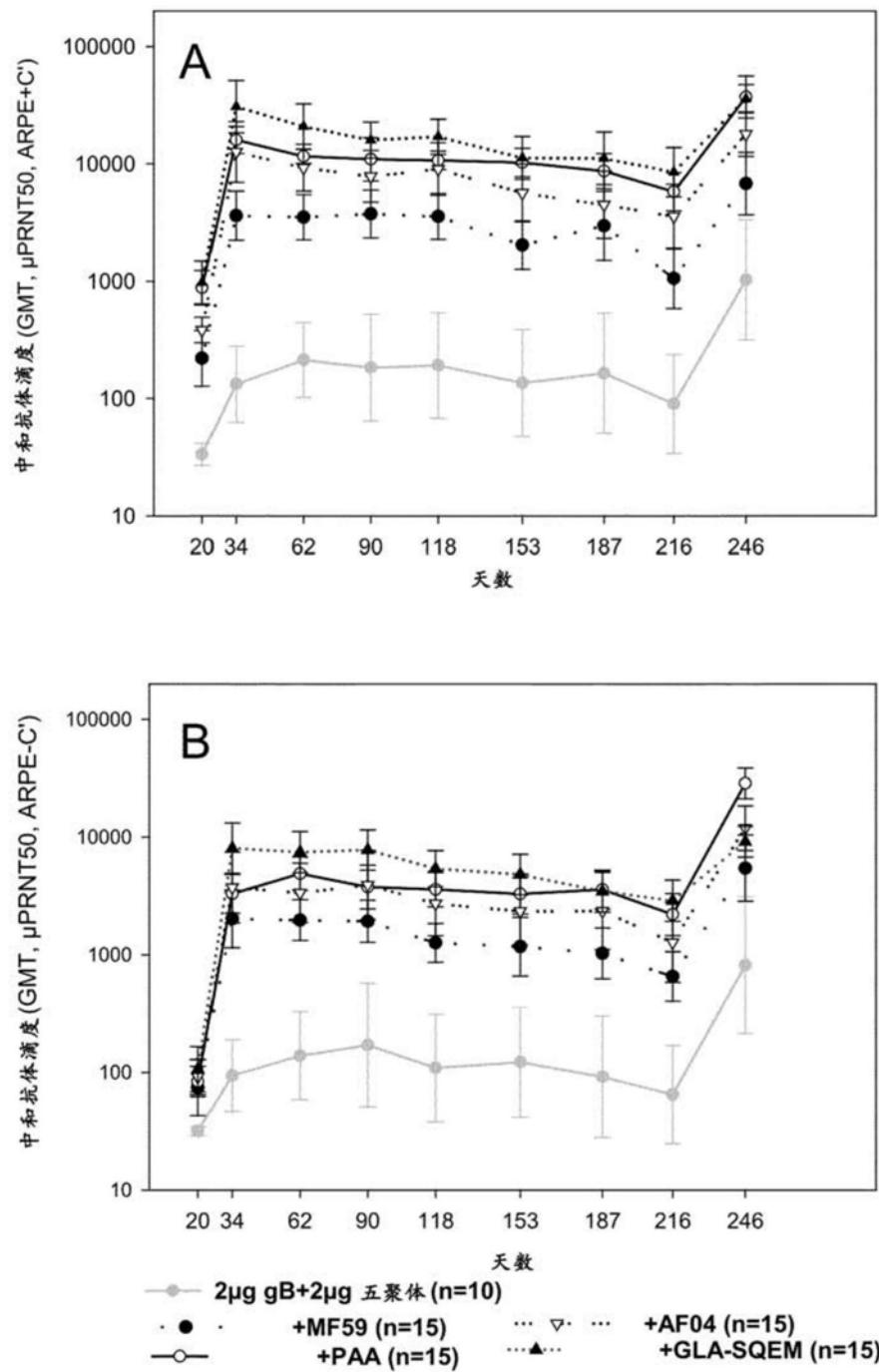


图2

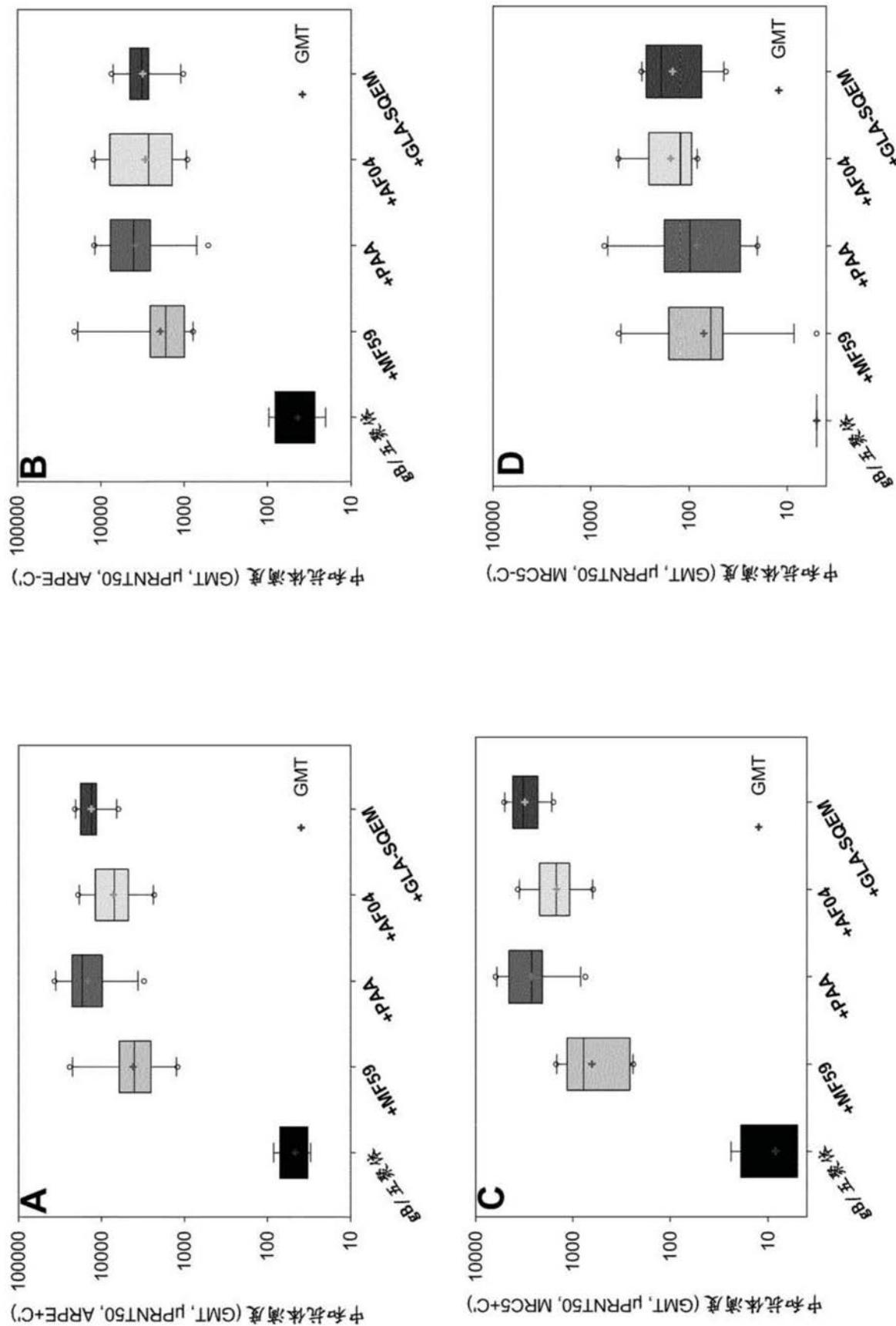


图3

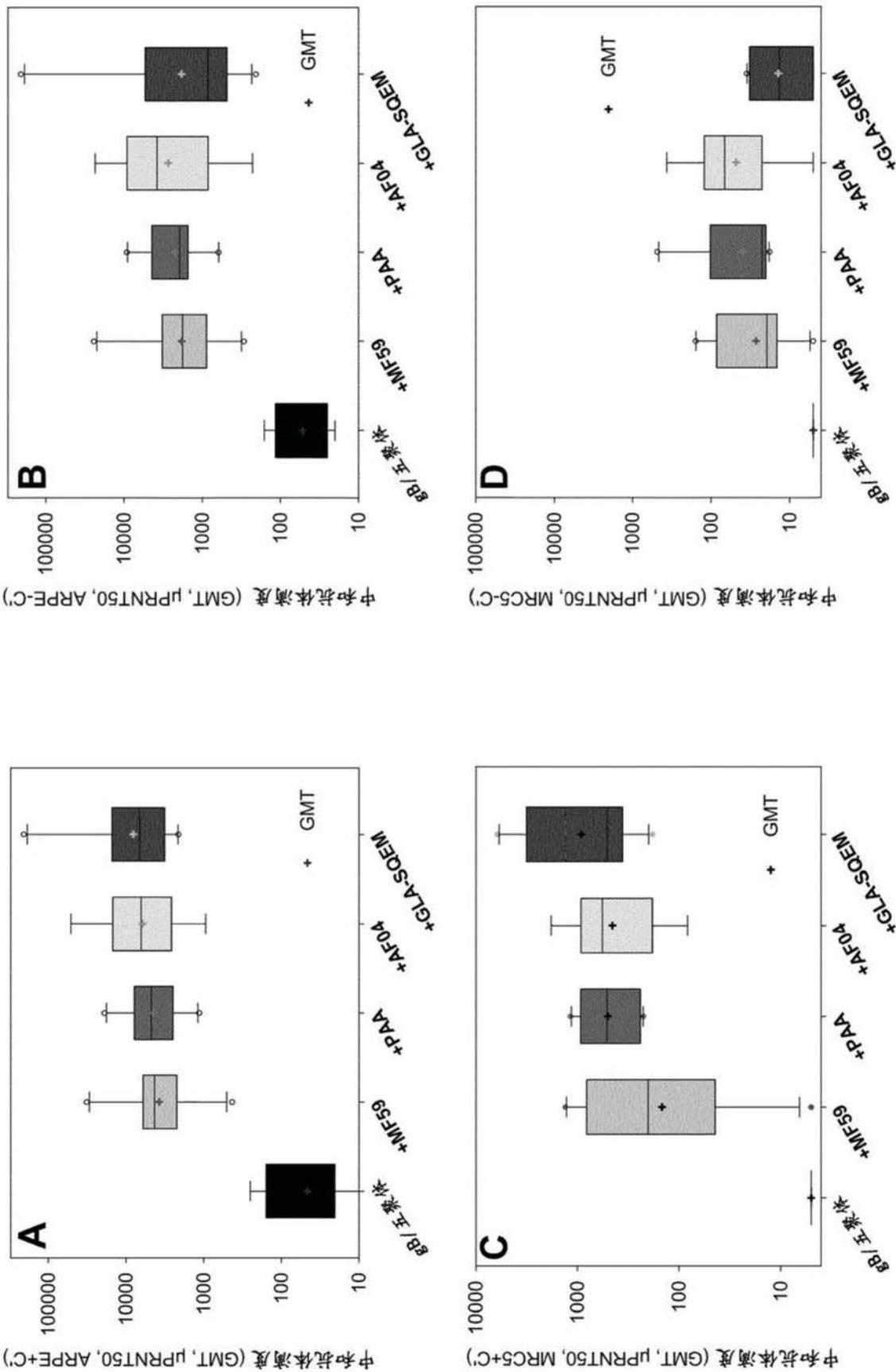


图4

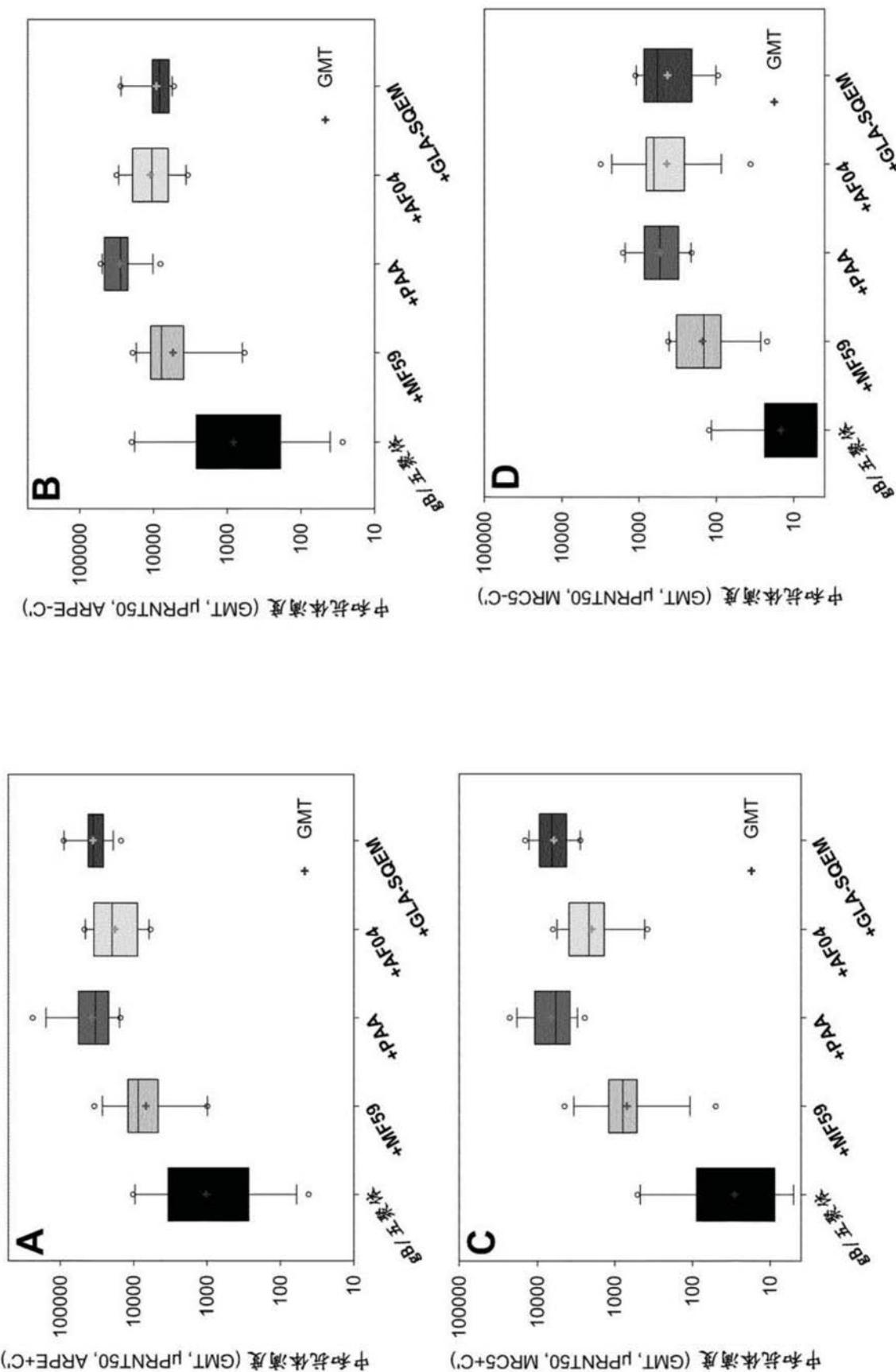


图5

A 制剂	第34天		第208天		第257天	
	IgG1滴度 (log10 EU)	IgG2c滴度 (log10 EU)	IgG1滴度 (log10 EU)	IgG2c滴度 (log10 EU)	IgG1滴度 (log10 EU)	IgG2c滴度 (log10 EU)
PBS	1.00	1.00	1.00	1.39	1.11	1.27
gB和五聚体	4.48	1.83	4.24	1.51	5.49	2.75
+MF59	6.10	4.00	5.45	3.52	6.18	4.13
+PAA	5.50	5.55	4.87	4.81	6.14	5.92
+AF04	6.00	5.14	5.48	4.49	6.17	5.29
+GLA-SQEM	5.70	5.32	4.93	4.76	5.74	5.57

B 制剂	第34天		第208天		第257天	
	IgG1滴度 (log10 EU)	IgG2c滴度 (log10 EU)	IgG1滴度 (log10 EU)	IgG2c 滴度 (log10 EU)	IgG1滴度 (log10 EU)	IgG2c 滴度 (log10 EU)
PBS	1.00	1.00	1.00	1.14	1.00	1.08
gB和五聚体	3.89	1.39	3.39	1.67	4.76	2.50
+MF59	5.48	4.22	4.75	3.45	5.62	4.04
+PAA	4.88	5.34	4.36	4.68	5.58	5.73
+AF04	5.64	5.30	4.84	4.32	5.53	5.22
+GLA-SQEM	5.44	5.55	4.14	4.65	5.18	5.62

图6

佐剂	时间点	MF59	PAA	AF04	GLA-SQEM
gB的 IgG1/ IgG2c比率	D34	124	0.9	7.1	2.4
	D208	85	1.2	9.7	1.5
	D257	110	1.7	7.7	1.5
五聚体的 IgG1/IgG2c 比率	D34	18	0.3	2.2	0.8
	D208	20	0.5	3.2	0.3
	D257	30	0.7	2.1	0.4

图7

A 配制剂	第34天		第208天		第257天	
	IL-5	IFN- $\gamma$	IL-5	IFN- $\gamma$	IL-5	IFN- $\gamma$
PBS	1.00	2.00	1.00	1.00	5.00	2.00
gB和五聚体	22.00	5.00	2.00	2.00	125.00	6.00
+MF59	60.00	10.00	21.00	1.00	268.00	3.00
+PAA	5.00	15.00	9.00	1.00	38.00	11.00
+AF04	13.00	9.00	7.00	1.00	15.00	7.00
+GLA-SQEM	13.00	12.00	2.00	1.00	3.00	63.00

B 配制剂	第34天		第208天		第257天	
	IL-5	IFN- $\gamma$	IL-5	IFN- $\gamma$	IL-5	IFN- $\gamma$
PBS	1.00	2.00	1.00	2.00	6.00	4.00
gB和五聚体	251.00	7.00	140.00	1.00	3077.00	66.00
+MF59	444.00	26.00	277.00	1.00	2284.00	52.00
+PAA	82.00	462.00	108.00	16.00	330.00	848.00
+AF04	170.00	722.00	38.00	117.00	546.00	645.00
+GLA-SQEM	40.00	299.00	23.00	45.00	38.00	1405.00

图8

A 佐剂	第34天		第208天		第257天	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
gB+五聚体	0.46	0.00	0.00	0.00	0.71	0.04
+MF59	12.37	0.63	0.58	0.09	3.95	0.42
+PAA	6.63	14.76	0.40	2.59	6.88	9.87
+AF04	20.12	12.24	0.57	0.30	7.42	2.87
+GLA-SQEM	4.03	3.26	0.35	1.11	2.44	4.62

B 佐剂	第34天		第208天		第257天	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
gB+五聚体	0.08	0.08	0.00	0.00	0.41	0.04
+MF59	7.02	0.95	0.34	0.11	3.54	0.32
+PAA	3.80	5.00	0.24	0.81	4.58	5.25
+AF04	12.03	15.00	0.64	0.55	9.00	3.81
+GLA-SQEM	7.15	4.00	0.08	1.67	3.11	5.59

图9

A	第34天		第208天		第257天		
	佐剂	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
gB+五聚体		0.03	0.00	0.10	0.05	0.43	0.03
+MF59		4.29	0.34	0.99	0.09	1.33	0.12
+PAA		1.64	3.66	0.83	1.24	2.43	3.38
+AF04		2.62	1.53	0.78	0.50	1.79	0.65
+GLA-SQEM		1.54	3.81	0.58	0.57	1.24	2.17

B	第34天		第208天		第257天		
	佐剂	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
gB+五聚体		0.04	0.00	0.33	0.03	0.55	0.06
+MF59		4.68	0.75	1.88	0.08	1.91	0.18
+PAA		1.83	2.04	3.24	0.71	3.69	3.45
+AF04		2.57	1.69	1.62	0.55	3.75	1.15
+GLA-SQEM		1.99	3.63	1.36	1.79	2.42	2.58

图10

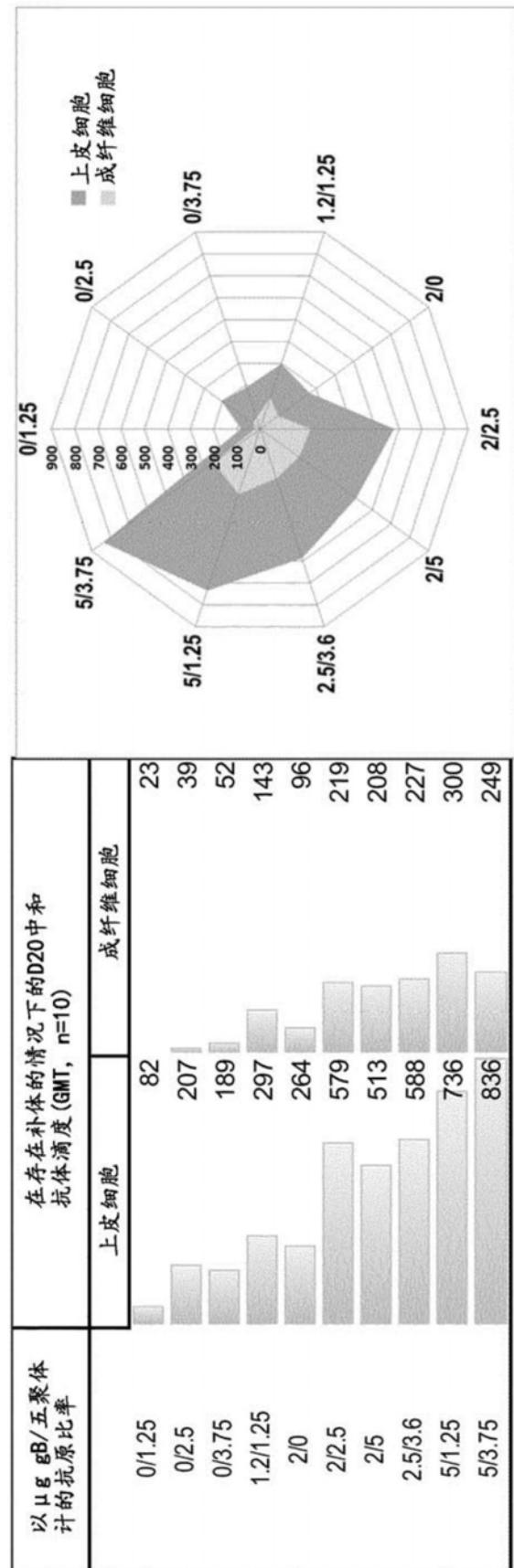
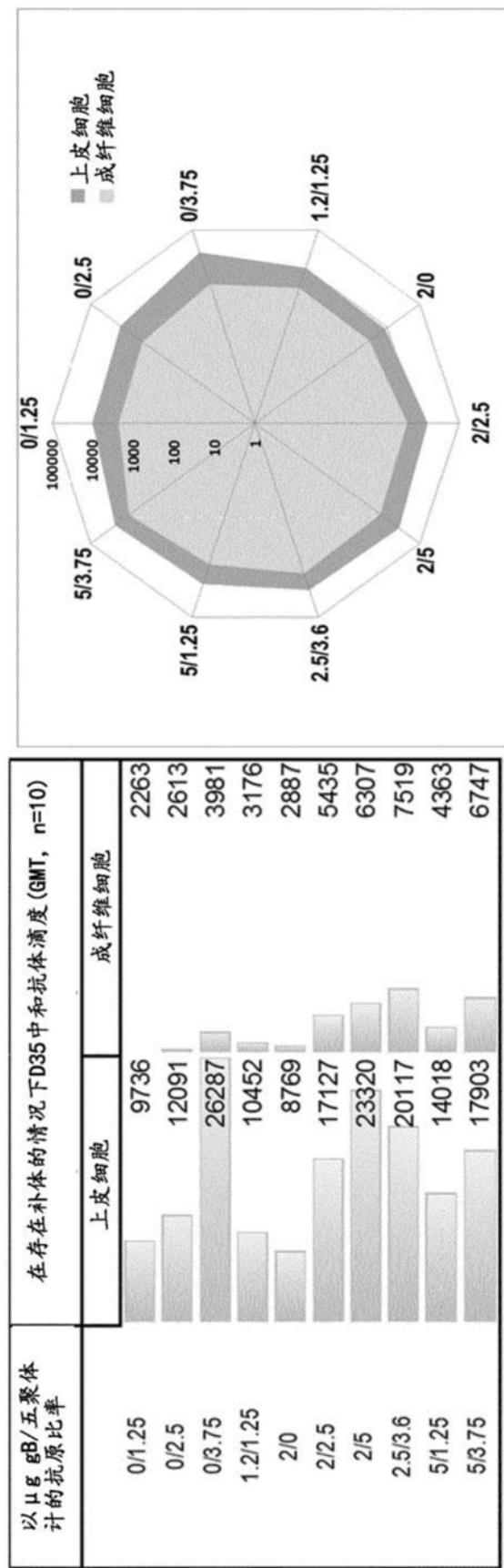


图 11



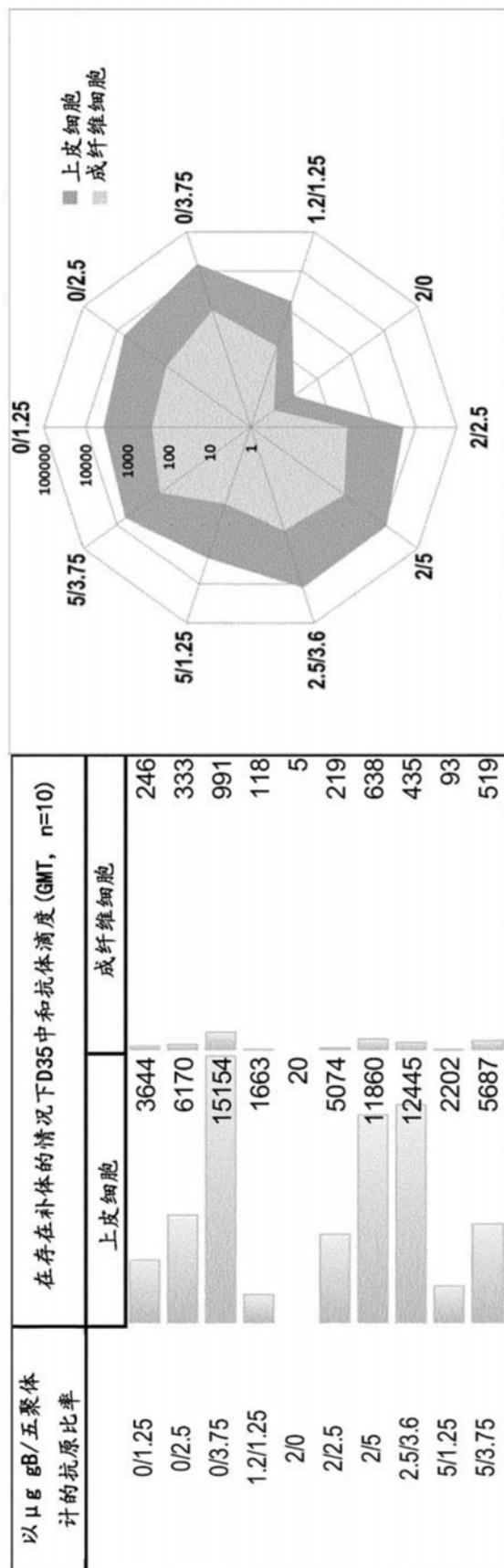


图12B

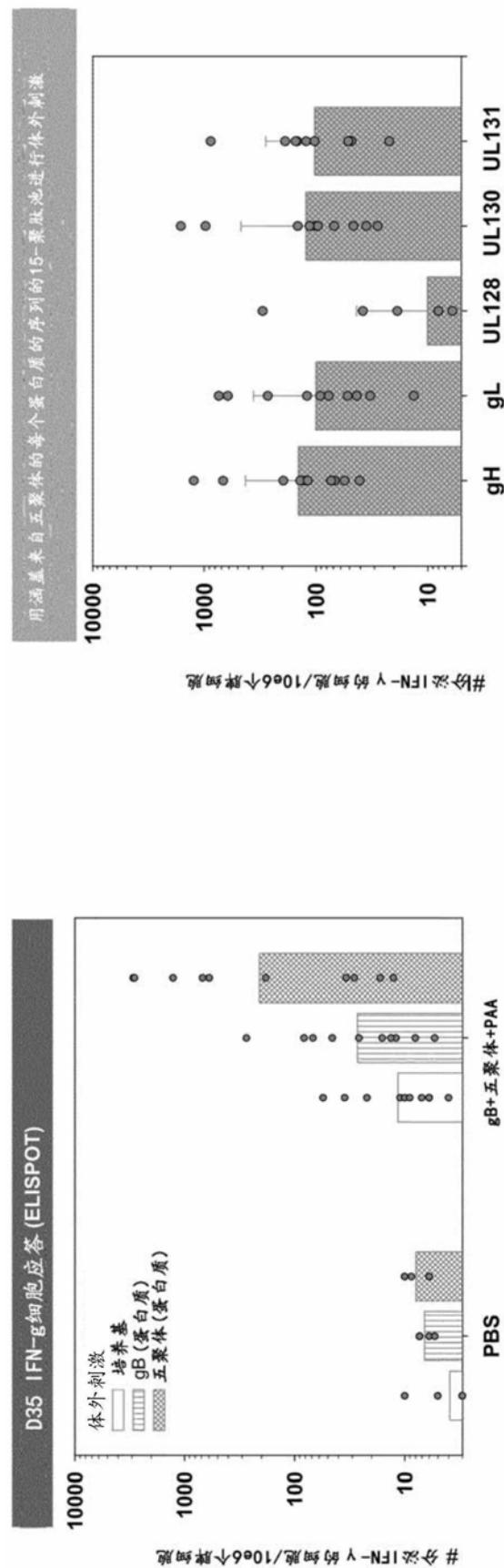


图13