



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1874787 B

(45) 授权公告日 2012.09.19

(21) 申请号 200480031744.4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2004.08.27

A61K 39/29 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

10339927.5 2003.08.29 DE

(56) 对比文件

JP 2001-294599 A, 2001.10.23, 权利要求,
说明书第 6-17 段.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2006.04.27

审查员 吴立

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/EP2004/009590 2004.08.27

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/023297 DE 2005.03.17

(73) 专利权人 莱因新生物技术工艺和产品有限

公司

地址 德国杜塞尔多夫

(72) 发明人 K·梅尔贝尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 2 页 说明书 14 页

序列表 5 页 附图 11 页

(54) 发明名称

预防 / 治疗 HBV 感染和 HBV 介导疾病的组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含至少 2 种乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、其片段和 / 或编码它们的核酸的组合物, 其中 HBsAg 在 S 区和 / 或前 S1 区的 HBV 基因型不同并且组合物不包含 HBV 核心抗原 (HBcAg) 或编码该抗原的核酸; 以及涉及药物组合物, 特别是包含那些用于预防 / 治疗 HBV 感染或 HBV 介导疾病的组合物的疫苗。本发明还涉及制备用于治疗性治疗乙型肝炎的患者特异性药物的方法。

1. 包含至少 2 种乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、其含有 T 细胞表位的片段和 / 或编码它们的核酸的组合物在制备用于治疗性或预防性治疗 HBV 感染或 HBV 介导的疾病的药物中的用途,其中,每一种 HBsAg 为其中的所有 HBsAg 具有相同基因型的颗粒形式,而且每一种 HBsAg 在 HBsAg S 区和 / 或前 S1 区具有不同的乙型肝炎病毒 (HBV) 基因型,并且组合物不包含 HBV 核心抗原 (HBcAg) 或编码该抗原的核酸,其中所述至少 2 种 HBsAg 的片段具有至少 10 个共同的氨基酸,但彼此有至少一个氨基酸不同,且所述至少 2 种 HBsAg 的片段包含因所述至少 2 种 HBsAg 的不同 HBV 基因型而导致的修饰的 T 细胞表位。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于组合物包含至少 2 种 HBsAg 和 / 或至少 2 种其片段。

3. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于 HBsAg 的片段包含至少 20 个氨基酸。

4. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于 HBsAg 的片段包含至少 50 个氨基酸。

5. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于片段包含 HBsAg 的“A 决定簇”。

6. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于第一种和第二种片段具有至少 20 个共同的氨基酸,但彼此有至少一个氨基酸不同。

7. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于组合物包含至少 2 种编码 HBsAg 或其片段的核酸。

8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的用途,其特征在于所述基因型选自:A、B、C、D、E、F、G 或 H。

9. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的用途,其特征在于组合物包含至少 3 种不同的 HBsAg、其片段和 / 或编码它们的核酸。

10. 根据权利要求 9 所述的用途,其特征在于组合物包含至少 5 种不同的 HBsAg、其片段和 / 或编码它们的核酸。

11. 根据权利要求 1-10 中任意一项所述的用途,其特征在于组合物包含全部已知 HBV 基因型的 HBsAg、其片段和 / 或编码它们的核酸。

12. 根据权利要求 1-11 中任意一项所述的用途,其特征在于编码 HBsAg 或其片段的核酸存在于载体中并处于适于 HBsAg 在哺乳动物细胞中表达的启动子的控制下。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其特征在于载体选自:质粒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、麻疹病毒和逆转录病毒。

14. 根据权利要求 13 所述的用途,其特征在于启动子选自组成型启动子和可诱导型启动子。

15. 根据权利要求 1-14 中任意一项所述的用途,其特征在于 HBV 感染是慢性迁延性乙型肝炎。

16. 根据权利要求 1-14 中任意一项所述的用途,其特征在于 HBV 介导的疾病是急性慢性乙型肝炎感染、肝硬化或原发性肝细胞癌。

17. 根据权利要求 1-16 中任意一项所述的用途,其特征在于组合物通过肌内、皮下、真皮内、静脉内、粘膜或口服施用。

18. 至少一种 HBsAg、其包含至少 10 个氨基酸且含有 T 细胞表位的片段或编码 HBsAg 的核酸在制备用于治疗性治疗乙型肝炎患者的药物中的用途,其中所述 HBsAg 的 HBV 基因型与患者所感染的 HBV 基因型不同。

19. 根据权利要求 18 所述的用途,其特征在于基因型通过 PCR 方法确定。

预防 / 治疗 HBV 感染和 HBV 介导疾病的组合物

[0001] 本发明涉及包含至少两种乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、其片段和 / 或编码它们的核苷酸的组合物,其中 HBsAg 在 HBsAg S 区和前 S1 区的乙型肝炎病毒 (HBV) 基因型不同并且组合物不包含 HBV 核心抗原 (HBcAg) 和编码该抗原的核酸;本发明涉及包含这些组合物的药物组合物,特别是疫苗以及它们在预防和治疗 HBV 感染和 HBV 介导疾病中的用途。本发明还涉及制备用于治疗性治疗肝炎的患者特异性药物的方法以及诊断 HBV 基因型的试剂盒。

[0002] 全世界有超过 2.5 亿人感染乙型肝炎病毒 (HBV)。这些感染者的大部分表现出病理性结果,包括慢性肝功能不全、肝硬化和肝细胞癌 (HCC)。对于为何一些人发展成急性 HBV 感染而另一些人没有发展成急性 HBV 感染的原因了解甚少。临床资料以及与其它慢性病毒感染的类似性强调了细胞介导的免疫反应在控制病毒感染中的重要性,特别是包括细胞毒 T 淋巴细胞的免疫反应。细胞毒 T 细胞反应的诱导是消除急性 HBV 感染和预防慢性 HBV 感染的关键因素。病毒基因组还编码包膜蛋白前 S1、前 S2 和 S 抗原 (HBsAg)、聚合酶和核心蛋白 (HBcAg)。

[0003] 慢性乙型肝炎是慢性迁延性和慢性活动性进程的肝脏进行性炎症。慢性迁延性肝炎表现为限定在肝脏中的具有增加形成纤维组织的扩大的门区浸润;在临床上迁延性肝炎的病征维持数年 (长达 10 年),大约 80% 的病例为 HBsAg 阳性。发病机制可能是基于细胞免疫系统功能不全和持续性病毒感染。

[0004] 乙型肝炎的小表面抗原 (HBsAg) 是一个 226 个氨基酸的蛋白质 (p24/gp27 或 S 蛋白),它是一个重要的 HBV 抗原,其自身装配在 20-30nm 的脂蛋白颗粒中,其中 100-150 个亚单位通过多重分子间和分子内二硫键交联起来。来自不同亚型和基因型的 HBV 株的 S 蛋白的变异性是有限的。四个稳定 HBsAg 亚型 adw、ayw、adr 和 ayr 涉及邻近免疫显性“a- 决定簇” (包含残基 124-147 的亲水区) 的位置 122 和 160 的单一氨基酸互换。这些亚型先前未曾确定在 HBV 感染中具有任何生物学或发病机制上的差异。

[0005] 从慢性 HBsAg 携带者血浆获得的疫苗于 1982 年在联邦德国第一次获得批准。自那次以后,疫苗可以通过遗传技术生产并且用于危险人群的主动免疫。在接种前为血清反应阴性的人群中有 95% 的人在一年后表现出免疫反应。所使用的所有乙型肝炎疫苗包含高浓度的纯化 HBsAg 蛋白质 (对应于乙型肝炎病毒的非感染性外壳) 并且不含病毒 DNA 或者是福尔马林灭活的。

[0006] 先有技术的缺点是:在进行免疫的人群中有至少 5% 为不表现出免疫反应的“非反应者”。此外,迄今为止在已知的疫苗中没有一个能够治疗慢性迁延性肝炎。

[0007] WO 01/40279 和 WO 01/38498 描述了基于乙型肝炎病毒基因型 G 的疫苗,但是两个专利的说明书没有提到不同基因型的组合。

[0008] Michel 等,PNAS 92(1995),5307-5311 和 Mancini 等,PNAS 93(1996),12496-12501 涉及基于 HBsAg 的 DNA 疫苗。文件中没有提到不同 HBV 基因型的 HBsAg 的组合。

[0009] 因此本发明基于提供预防 / 治疗 HBV 感染或 HBV 介导疾病改进手段的问题。本发

明还基于提供治疗性治疗肝炎的患者特异性药物的问题。本发明进一步的目标是提供诊断 HBV 感染的改良试剂盒。

[0010] 通过提供包含至少两种乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、其片段和 / 或编码它们的核酸的组合物来解决本发明潜在的问题,其中 HBsAg 在 HBsAgS 区和 / 或前 S 区的乙型肝炎病毒 (HBV) 基因型不同并且组合物不包含 HBV 核心抗原 (HBcAg) 或编码该抗原的核酸。

[0011] 本发明基于以下令人惊奇的发现:在肝中组成型表达 HBsAg 亚型 ayw 的转基因小鼠可以当作评价针对慢性 HBV 感染的特异免疫治疗方案的效率的潜伏期模型。此种小鼠因为持续性抗原血症而产生大量 HBsAg,并且它们基本上耐受 HBsAg。一方面,本发明人现在已经用其 HBsAg 基因型恰恰为转基因小鼠基因型 (ayw) 的疫苗免疫了 HBsAg 转基因小鼠,另一方面,用包含与转基因小鼠基因型不同的 HBsAg 基因型的疫苗免疫了 HBsAg 转基因小鼠。尽管用对应于其自身 HBsAg 的 HBsAg 抗原重复免疫转基因小鼠,却没有观察到细胞毒 T 细胞反应。相反,用不同于其自身基因型的 HBsAg 基因型免疫转基因小鼠导致产生针对 HBsAg 的基因型特异和交叉反应的细胞毒 T 细胞反应。这表明天然存在的 HBsAg 变体可以通过引发交叉反应性 T 细胞免疫而打破“耐受”。细胞毒 T 细胞免疫的活化导致 HBsAg ayw 抗原的降低并因此导致产生了相当于 HBV 被有效控制的急性肝炎的肝特异性病症和综合征。由于 HBsAg ayw 抗原的氨基酸序列与 HBsAg adw2 抗原的氨基酸序列仅在少数位置不同,因此所观察到的免疫反应特别明显。本发明已经证实,甚至 T 细胞表位内的氨基酸的少量保守交换会导致针对该表位的 T 细胞反应的变化。

[0012] 对蛋白质抗原的 T 细胞反应的特异性和有效性在多种水平受到控制,特别的决定性因素为:(i) 表位 (或抗原肽) 的蛋白水解释放;(ii) 抗原肽对主要组织相容性复合物 (MHC) 的递呈糖蛋白的亲性和;(iii) 对同一抗原不同表位的竞争性发展的 T 细胞反应的负面干扰。蛋白质抗原的天然变体 (通过表位或表位侧翼中关键序列的单个氨基酸交换或者通过新表位的产生) 以下列四种方式诱导 T 细胞反应:

[0013] (i) 来自蛋白质的抗原肽的更有效蛋白水解加工 (释放);

[0014] (ii) 抗原肽与递呈 MHC 分子的高亲和性结合;

[0015] (iii) 通过与 (i) 和 / 或 (ii) 中提到的过程相类似的过程消除能够减弱表位免疫原性的免疫显性表位 (免疫显性表位抑制了对同一蛋白质抗原不同表位的反应);

[0016] (iv) 产生新表位。

[0017] 在本发明上下文中已经证明 HBsAg 天然变体 (通过基因型所表现出来的) 对其所刺激的 T 细胞反应具有相对广谱的特异性。

[0018] 与本发明有关的术语“HBV 基因型”意思是指乙型肝炎病毒基因组的全部。HBV 基因型优选通过全部测序和系统发生分析确定。当前已知 8 个标准基因型。该 8 个基因型彼此的核苷酸变化为 8%;见 Bartholomeusz, Rev. Med. Viro1. 13(2003), 1-14。优选地, HBV 基因型 A 具有参考核酸序列 Genbank X02763 或者 HBV 基因型 A_{afn} 具有参考核酸序列 Genbank AF297621。对于 HBV 基因型 Ba, 参考核酸序列为 Genbank D00330 并且对于基因型 Bj 参考核酸序列为 AB073858。对于 HBV 基因型 C, 参考核酸序列为 Genbank AY206389, 并且对于基因型 C_{aus}, 参考核酸序列为 Genbank AB048704。对于基因型 D, 参考核酸序列为 Genbank X02496。基因型 E 的参考核酸序列为 X75657。基因型 F 的参考核酸序列为 X69798。基因型 G 的参考核酸序列为 AF160501 并且基因型 H 的参考核酸序列为 AY090454。

[0019] 关于上面提到的基因型,在基因型和亚型之间存在一定的相关性,如下:基因型 A 与亚型 adw2、ayw1 相关;基因型 B 与 adw2、ayw1 相关;基因型 C 与 adw2、adrq+、adrq-、ayr、adr 相关;基因型 D 与 ayw2、ayw3、ayw4 相关;基因型 E 与 ayw4 相关;基因型 F 与 adw4q-、adw2 和 ayw4 相关;基因型 G 与 adw2 相关且基因型 H 与 adw4 相关。

[0020] 通过借助于单特异抗体例如抗 d、抗 y、抗 r、抗 a(w) 的血清学方法确定感染患者的 HBV 亚型。可以以琼脂凝胶扩散测试形式或者放射免疫分析法形式实现确定;(“HBs Antigen Subtypes”,由 Couroucé, A. M., Holland, P. V., Muller, J. Y. 和 Soulier, J. P. 出版, *Bibliotheca Haematologica* no. 42, S. Karger, Basel, 1976)。

[0021] 还可以通过对来自患者血清的编码 HBsAg 的 DNA 进行测序来确定亚型。然后从所确定核酸序列得到 HBsAg 的氨基酸序列。然后通过如 Magnus, L. O. 和 Norder, H. (“Subtypes, Genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene” *Intervirology*, 38(1-2):24-34) 所描述的位置 122 和 160 的氨基酸来确定亚型。

[0022] 与本发明有关的表述“乙型肝炎病毒表面抗原”(HBsAg) 指 HBV 的小表面抗原或者 S 蛋白 (p24/gp27)。HBsAg 还可以包括前 S1 蛋白结构域。优选地, HBsAg 由 S 蛋白和 / 或前 S1 蛋白结构域组成。

[0023] 关于 HBsAg 的编号,使用了依据 Kidd-Ljunggren 等人 *J. Gen. Virol.* 83(2002), 1267-1280 的系统。

[0024] 根据本发明的术语“片段”包括 HBsAg 的片段。片段优选包含至少 5 个氨基酸并且包含 T 细胞表位,优选至少 10 个、特别地至少 20 个、更加特别地至少 50 个氨基酸。依照优选实施方案,组合物包含至少 2 种 HBsAg 或 2 种其片段。此种组合物特别适宜用作基于多肽的疫苗。特别是在组合物包含来自不同 HBV 基因型 HBsAg 的 2 种片段的情况下,第一种和第二种片段共同具有至少 10 个氨基酸、优选 20 个氨基酸但是彼此之间至少有一个氨基酸不同。

[0025] 如上所提到,本发明基于这样一种认识,即不同基因型所产生抗原 (HBsAg) 中甚至十分小的差异会导致产生这样一种修饰 T 细胞表位,所述的修饰 T 细胞表位彼此之间仅稍稍不同但能够导致 T 细胞反应极大变化。因此彼此之间至少一个氨基酸差异的两种片段可以通过与已知 HBsAg 基因型的简单序列比较容易地检测。彼此间至少一个氨基酸不同的适宜片段可以用于本发明的组合物中。片段优选包含至少一个 T 细胞表位,特别是人 T 细胞表位。确定 T 细胞表位的方法是已知的,例如 Lauer 等, *J. Virol.* 76(2002), 6104-6113。

[0026] 依据优选的实施方案,组合物包含至少 2 种 HBsAg 和 / 或至少 2 种其片段。

[0027] 优选地还提供了至少包含第一种 HBsAg 或其片段和编码第二种 HBsAg 或其片段的核酸的组合物,其中第一种和第二种 HBsAg 的 HBV 基因型不同。

[0028] 依据进一步优选的实施方案,组合物至少包含编码 2 种 HBsAg 的 2 种核酸,其中 HBsAg 的 HBV 基因型不同。核酸还可以是编码如上所定义片段的核酸。核酸可以是病毒 DNA 或合成 DNA,合成 DNA 应当理解为包括含有修饰核苷间键的那些 DNA 序列。核酸还可以是 RNA 分子,所述 RNA 分子对于通过重组载体系统方式的表达是必需的。此外,依据本发明混合 DNA/RNA 分子也考虑作为核酸。

[0029] 依据优选实施方案,基因型选自已知基因型 A、B、C、D、E、F、G 和 H。关于各个参考

核酸序列可以参照上面定义部分。通常,通过与参考核酸序列具有8%核苷酸变异的方式确定基因型,也就是说与参考核酸序列具有至少92%同一性的核酸也被理解为与所定义一致的基因型。相对于参考核酸序列具有至少95%、特别是98%同一性是特别优选的。相对于参考核酸序列的“同一性”在这里可以借助于已知方法进行确定。一般使用具有考虑特殊需求的算法的特殊计算机程序。

[0030] 首先,使用确定同一性的优选方法产生了被比较序列间的最大一致性。确定同一性的计算机程序包括但不限于包括GAP在内的GCG程序包(Deveroy, J等, *Nucleic Acid Research* 12(1984),387;Genetics ComputerGroup University of Wisconsin, Medicine(WI));和BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul, S.等, *J. Mol. Biol.* 215(1990), 403-410)。BLASTX程序可以从国立生物技术信息中心(NCBI)或其它来源(BLAST手册, Altschul, S.等, NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894;Altschul, S.等;见上)获得。同样可以使用已知的Smith-Waterman算法确定同一性。

[0031] 用于核酸比较的优选参数包括下列:

[0032] Needleman和Wunsch算法, *J. Mol. Biol.* 48(1970),443-453

[0033] 比较矩阵:

[0034] 匹配= +10

[0035] 错配= 0

[0036] 开口罚分:50

[0037] 开口长度罚分:3

[0038] 同样GAP程序也适宜使用上面的参数。在核酸序列比较中上面的参数是默认参数。算法、开口罚分、开口延伸罚分和比较矩阵的另外实例包括程序手册Wisconsin软件包(版本9,1997年9月)中的那些实例。对其的选择取决于所进行的比较,同样还取决于比较是否在序列对(当使用GAP或Best Fit时)或者序列和大的序列数据银行(当使用FASTA或BLAST时)之间进行。

[0039] 依据上述算法的92%的一致性代表着与本发明序列具有92%的同一性。同样适用于更高的同一性。

[0040] 优选地,根据本发明的组合物的特征在于:变体编码其活性基本上相当于参考核酸序列所编码聚合酶活性的聚合酶和/或变体编码其免疫反应性基本上相当于参考核酸序列所编码HBsAg免疫反应性的HBsAg。

[0041] 聚合酶活性在这里可以依据Kim等人 *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999;47(2):301-308确定。HBsAg免疫反应性可以通过商业可得的抗原ELISA确定。“基本上通过参考核酸所编码HBsAg的免疫反应性”意思是指抗体同参考HBsAg的结合基本上与抗体同变体所编码HBsAg的结合亲和性相同。

[0042] 根据优选实施方案,组合物包含至少3种、优选至少5种不同HBsAg、其片段和/或编码它们的核酸。

[0043] 特别优选地,组合物包含所有已知HBV基因型的HBsAg、其片段和/或编码它们的核酸。

[0044] 根据本发明组合物的进一步优选的实施方案,编码HBsAg或其片段的核酸存在于适于HBsAg在哺乳动物细胞(优选人细胞)表达的启动子控制下的载体中。如果组合物包

含至少 2 种编码 HBsAg 或其片段的核酸,则这些核酸可以存在于同一载体(二元载体)中或者分别位于彼此不同的载体中。适宜载体例如质粒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、麻疹病毒和逆转录病毒。载体一般包括影响载体在所转染哺乳动物细胞中复制的复制源。

[0045] 适宜启动子可以是组成型启动子和可诱导型启动子。优选启动子为来自 CMV 和 SC-40 的启动子。

[0046] 上述组合物可以通过简单混合各个成分得到,因此可以十分简单地制备。适宜溶剂和载体取决于组合物(多肽和/或核酸)的性质。原则上,优选包含水的系统。可以合成制备或通过重组制备 HBsAg 或其片段。所制备多肽可通过色谱方法纯化。

[0047] 备选地,可以通过重组表达系统中编码 HBsAg 或其片段的至少 2 种核酸的共表达而得到组合物。本领域技术人员熟知多种表达系统和方法;优选地使用酵母作为宿主细胞,特别优选地使用多形汉逊酵母(*Hansenulapolymorpha*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。核酸可以存在于一个载体中或者分别存在于彼此分开的两个载体中。适宜载体和启动子如上所述。

[0048] 根据本发明的另一方面,制备了包含本发明组合物和可药用载体的药用组合物。可药用载体是本领域技术人员已知的。实例为铝盐、磷酸钙、添加或不添加多糖的 HBsAg 冻干物、水包油乳剂、聚丙交酯共甘醇酸酯。如果此种载体本身不具有佐剂作用,则它们可以与另外的佐剂如脂质 A 模拟物、免疫刺激性核苷酸或细菌毒素混合。

[0049] 根据本发明的药物组合物优选为疫苗。根据本发明,药物组合物、尤其是疫苗适宜治疗性治疗 HBV 感染或 HBV 介导疾病。药物组合物、尤其是疫苗还适宜预防性治疗 HBV 感染或 HBV 介导疾病。HBV 感染尤其是慢性迁延性乙型肝炎感染。HBV 介导疾病可以是急性慢性乙型肝炎感染。另外的 HBV 介导疾病为肝硬化和原发性肝细胞癌。疫苗适合施用于临床不明显 HBV 携带者,即未患有真正意义上的疾病但具有将来发展成 HBV 介导疾病的高危险性的携带者。

[0050] 药物组合物可以肌内、皮下、真皮内、静脉内、粘膜或口服施用,但是此种施用仅仅为优选的并且不是对施用方式的限制。

[0051] 药物组合物包含剂量范围为 0.1-1000 μ g HBsAg 或其片段、优选 2.5-40 μ g HBsAg 或其片段的至少 2 种 HBsAg 或其片段。

[0052] 当药物组合物包含编码 HBsAg 或其片段的核酸时,它们存在的剂量范围为 10-1000 μ g 编码 HBsAg 或其片段的核酸。

[0053] 本发明的另一方面提供了制备用于治疗性治疗乙型肝炎的药物的方法,其包括以下步骤:

[0054] a) 确定患者所感染 HBV 的基因型;和

[0055] b) 提供包含至少一种 HBV 基因型的 HBsAg、HBsAg 片段或编码 HBsAg 或其片段的核酸的药物,其中 HBV 基因型不同于根据 a)

[0056] 所确定的患者内 HBV 的基因型。

[0057] 如上所述,本发明的重要的认可是:在慢性迁延性肝炎潜伏期模型中,已经通过使用来自与转基因动物基因型不同的 HBV 基因型的 HBsAg 处理转基因动物实现了治疗效果。

[0058] 通过以下方法可以确定基因型:对全 HBV 基因组或者至少编码 HBsAg 的部分进行测序以及系统发生分析、限制性片段长度多态性(RFLP)、多重 PCR。

[0059] 以本身已知的方式通过配制至少一种 HBsAg、其片段或者编码 HBsAg 或其片段的核酸实现药物供应。

[0060] 根据另一方面,本发明提供了诊断 HBV 感染基因型的试剂盒。试剂盒包含至少 2 种 HBsAg 特异性结合物,其特征在于 2 种 HBsAg 特异性结合物是对不同 HBV 基因型特异的。至少 2 种 HBsAg 特异性结合物可以是 HBsAg 基因型特异性引物和 / 或特异性抗体。引物长度为 10-30 个核苷酸并且与各个基因型的已知 HBsAg 序列互补。抗体可以通过以下步骤得到的抗体,例如免疫实验动物(例如具有对应于目的 HBsAg 基因型的各个 HBsAg 的小鼠)、以本身已知的方式制备杂交瘤和筛选亚型特异性单克隆抗体。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1:HBsAg 变体。(A) 显示了乙型肝炎小表面抗原 (HBsAg) ayw (1) (对应于基因型 D) 和 adw2 (2) (对应于基因型 A) 的氨基酸序列。(B) 来自 HBsAg ayw 和 adw2 的 K^b 限制性表位序列。表位 1 ($S_{208-215}$) 仅由加工外源性 HBsAg 的细胞递呈,而表位 2 ($S_{190-197}$) 仅由加工内源性 HBsAg 的细胞递呈。

[0063] 图 2:将表位 1 或表位 2 特异性细胞毒性 T 细胞系 (CTL) 转移入 HBs 转基因 (HBs-tg) 宿主导致暂时性肝脏损伤。从 pCI/ S_{ayw} DNA 免疫的 B6 小鼠取出脾细胞并且用同系基因 RBL5 细胞在体外再刺激,其中 RBL5 细胞已经用 $K^b/S_{208-215}$ 结合肽 1 (ILSPFLPL) 或 $K^b/S_{190-197}$ 结合肽 2 (VWLSVIWM) 负载或用 ConA 刺激。以每只小鼠 5×10^6 个 $CD8^+CTL$ 的量静脉 (i. v.) 注射入 HBs-tg 小鼠并且测定平均血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平。

[0064] 图 3:免疫小鼠肝脏和脾脏内存在 HBsAg 特异性 $CD8^+T$ 细胞的间接体内证明。通过单次注射 $100 \mu g$ pCI/ S_{ayw} DNA 肌内免疫 C57BL/6 小鼠。在免疫后 12 天证明特异性 $CD8^+T$ 细胞的存在。用 $K^b/S_{208-215}$ 结合肽 1 (ILSPFLPL) 或者 $K^b/S_{190-197}$ 结合肽 2 (VWLSVIWM) 体外再次刺激分离肝脏单核细胞 (MNC) 和脾细胞 4 小时 (在布雷菲尔德菌素 A 存在的情况下)。显示了每组 4-6 只小鼠的 $CD8^+IFN \gamma^+T$ 细胞 / $10^5 CD8^+T$ 细胞的平均频率 $\pm$ 标准差 (来自彼此独立的两个实验)。

[0065] 图 4:在 HBs-tg 小鼠中 HBsAg 特异性 $CD8^+T$ 细胞对表位 1 的反应。用编码 HBsAg 亚型 ayw (pCI/ S_{ayw}) 或 adw2 (pCI/ S_{adw2}) 的 DNA 疫苗或者用阴性对照载体 pCI (没有插入片段的载体) 肌内免疫在其肝脏中表达 HbsAg_{ayw} 的 HBs-tg 小鼠三次 (免疫间隔为 4 周)。在最后一次免疫后 12 天从免疫小鼠中取出脾细胞并用 RBL5 细胞体外再次刺激 4 小时 (在布雷菲尔德菌素 A 存在的情况下),其中 RBL5 细胞是用 ayw ($RBL5/S_{ayw}^P$) 或 adw2 ($RBL5/S_{adw2}^P$) 亚型的 HBsAg 颗粒再刺激或者用 HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) 或 HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL) 的 $K^b/S_{208-215}$ 结合肽 1 再刺激。显示了每组 4-6 只小鼠脾脏 $IFN \gamma^+CD8^+T$ 细胞 / $10^5 CD8^+T$ 细胞的平均数量 $\pm$ 标准差 (来自彼此独立的两个实验)。

[0066] 图 5:在 HBs-tg 小鼠中 HBsAg 特异性 $CD8^+T$ 细胞对表位 1 的反应。从如图 4 的图例中所描述的已免疫小鼠中取出脾脏细胞,并且用同系基因 RBL5/ S_{ayw} 或 RBL5/ S_{adw2} 转染子或者 HBsAg_{ayw} (VWLSVIWM) 或 HBsAg_{adw2} (VWLSAIWM) 的 $K^b/S_{190-197}$ 结合肽 2 再刺激。显示了每组 4 只小鼠脾脏 $IFN \gamma^+CD8^+T$ 细胞 / $10^5 CD8^+T$ 细胞的平均数量 $\pm$ 标准差。

[0067] 图 6: $S_{208-215}$ 特异性 $CD8^+T$ 细胞在所免疫 HBs-tg 小鼠肝脏中存在的证明。用编码 HBsAg_{adw2} 的 DNA 疫苗 (pCI/ S_{adw2}) 免疫转基因 HBs-tg 小鼠三次 (免疫间隔为 4 周)。在最后一次注射后 12 天从所免疫小鼠中取出肝脏和脾脏细胞并且用 $K^b/S_{208-215}$ 结合肽 ILSPFLPL

体外再刺激。显示了每组 4 只小鼠脾脏 $\text{IFN } \gamma^+ \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞 / $10^5 \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞的平均数量 $\pm$ 标准差。

[0068] 图 7 :用 pCI/S_{adw2}DNA 疫苗免疫的 HBs-tg 小鼠肝脏组织病理学。在 B6 小鼠 (A,B) 中没有观察到病理性的肝脏组织学。HBs-tg 小鼠 (C, D) 表现为中等的细胞增大并且细胞质表现出毛玻璃的外观 (D)。肝细胞的细胞核表现为中等程度的多形性。门管周浸润罕见。用 pCI/S_{adw2}DNA 重复免疫引起严重的肝脏组织形态学改变 (E-I), 这种改变与急性病毒性肝炎引起的改变相一致。位于小叶实质 (F) 和门管周区 (G) 的炎性细胞浸润包括 Kupfer 细胞、淋巴细胞和少量多形核粒细胞。肝细胞出现水肿并且常常具有固缩核, 这是凋亡早期阶段的征兆 (F, 箭头)。嗜酸小体 (H, 箭头), 即凋亡的肝细胞普遍或者常常被病灶炎性细胞浸润包围。许多肝细胞表现出明显的空泡化 (I, 箭头)。对福尔马林固定并且用石蜡包埋的组织用 H E 染色。原始放大倍数 :A、C 和 E 为 10 倍 ;B、D 和 F 为 40 倍 ;G-I 为 63 倍。

[0069] 图 8 :HBs-tg 小鼠中 HBsAg 特异性血清抗体反应的诱导。用编码 HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) 或 HBsAg_{ayw} (pCI/S_{ayw}) 的 DNA 疫苗肌内免疫 B6 小鼠和转基因 HBs-tg 小鼠, 3 周后用相同的疫苗加强免疫。在最后一次注射后 4 周, 测试血清样品中的 HBsAg 抗原 (A) 或者 HBsAg 特异性抗体 (B)。显示了每组 4-6 只小鼠的平均抗体滴度 (mIU/ml) 和血清 HBsAg 水平 (ng/ml) $\pm$ 标准差。

[0070] 图 9 :在正常 B6 和 HBs_{ayw}-tg 小鼠中, HBsAg 特异性 $\text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞对表位 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) 和表位 2 (S₁₉₀₋₁₉₇) 的反应。用亚型 ayw 或 adw2 的 HBsAg 蛋白质颗粒 (S^P) 肌内免疫动物三次 (免疫间隔为 21 天)。每个蛋白质疫苗与作为佐剂的 CpG 寡核苷酸 (ODN) 或者 RC-529 混合。PBS 用作阴性对照。在最后一次免疫后 12 天从动物中取出脾脏, 然后将分离的脾细胞用预先用 HBsAg 特异性肽负载的 RBL5 细胞体外再刺激 4 小时 (在布雷菲尔德菌素 A 存在的情况下)。为了实现该目的, 使用了 HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) 或 HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL) 的 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ 结合肽 1 或者 HBsAg_{ayw} (VWLSVIWM) 或 HBsAg_{adw2} (VWLSAIWM) 的 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ 结合肽 2。显示了每组 4-6 只小鼠脾脏 $\text{IFN } \gamma^+ \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞 / $10^5 \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞的平均数量 $\pm$ 标准差 (来自彼此独立的两个实验)。

[0071] 图 10 :HBs_{ayw}-tg 小鼠中 HBsAg 特异性 $\text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞对表位 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) 的反应。

[0072] A. 用编码单独的 HBsAg 亚型 ayw (pCI/S_{ayw}) 或三种亚型 ayw (pCI/S_{ayw})、adw2 (pCI/S_{adw2}) 和 adr (pCI/S_{adr}) 的 DNA 疫苗或者阴性对照载体 pCI (没有插入片段的载体) 肌内免疫在其肝脏中表达 HBsAg_{ayw} 的 HBs-tg 小鼠 3 次 (免疫间隔为 4 周)。在最后一次免疫后 12 天从动物中取出脾脏。将分离的脾细胞用预先用 HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) 或 HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL) 的 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ 结合肽 1 负载的 RBL5 细胞体外再刺激 4 小时 (在布雷菲尔德菌素 A 存在的情况下)。显示了每组 4-6 只小鼠脾脏 $\text{IFN } \gamma^+ \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞 / $10^5 \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞的平均数量 $\pm$ 标准差 (来自彼此独立的两个实验)。

[0073] B. 用亚型 ayw 的 HBsAg 蛋白质颗粒 (S^P) 或亚型 ayw、adw2 和 adr 的 HBsAg 蛋白质颗粒混合物肌内免疫 HBs_{ayw}-tg 小鼠三次 (免疫间隔为 21 天)。每个蛋白质疫苗与作为佐剂的 CpG 寡核苷酸 (ODN) 或者 RC-529 (仅显示了与亚型混合物的混合) 混合。PBS 用作阴性对照。在最后一次免疫后 12 天从动物中取出脾脏。将分离的脾细胞用预先用 HBsAg_{ayw} (ILSPFLPL) 或 HBsAg_{adw2} (IVSPFIPL) 的 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ 结合肽 1 负载的 RBL5 细胞体外再刺激 4 小时 (在布雷菲尔德菌素 A 存在的情况下)。显示了每组 4-6 只小鼠脾脏 $\text{IFN } \gamma^+ \text{CD8}^+ \text{T}$ 细胞 / $10^5 \text{CD8}^+ \text{T}$ 细

胞的平均数量 ± 标准差（来自彼此独立的两个实验）。

[0074] 图 11 :HBs-tg 小鼠中 HBsAg 特异性血清抗体反应的诱导。

[0075] 用亚型 ayw 或 adw2 的 HBsAg 蛋白质颗粒疫苗 (S^p) 或亚型 ayw、adw2 和 adr 的 HBsAg 蛋白质颗粒混合物疫苗肌内免疫 B6 小鼠和转基因 HBs-tg 小鼠, 3 周后用相同的疫苗加强免疫。蛋白质疫苗包含作为佐剂的添加物 CpG 寡核苷酸 (ODN)。在加强免疫注射后 4 周, 测试血清样品中的 HBsAg 抗原 (A) 和 HBsAg 特异性抗体 (B)。显示了每组 4-6 只小鼠的平均抗体滴度 (mIU/ml) 和血清 HBsAg 水平 (ng/ml) ± 标准差。

[0076] 本发明将在以下更加详细地描述实施例。然而实施例不是旨在限制本发明。

[0077] 实施例：

[0078] 材料和方法

[0079] 概述

[0080] 正在研究的 HBV 亚型 adw2 对应于基因型 A。HBV 亚型 ayw 对应于基因型 D。HBV 亚型 adr 对应于基因型 C。

[0081] 小鼠

[0082] 将 C57BL/6Jbom(B6) 小鼠 (H-2^b) 置于标准的无病原体条件下。

[0083] C57BL/6J-TgN(Alb1HBV)44Bri 转基因 (HBs-tg) 小鼠、HBsAg_{ayw} (由具有保藏号 V01460J02203 的 HBV 序列编码) 从 Jackson 实验室 (BarHarbour, ME) 得到。使用 8-16 周龄的雌性和雄性小鼠。

[0084] 细胞、重组 HBsAg 颗粒和抗原性 HBsAg 肽

[0085] 所使用的 H-2^b 细胞系 RBL5 描述于 [10]。制备了表达相似数量 HBsAg_{ayw} 和 HBsAg_{adw2} 的稳定 RBL5 转染子 (数据未显示)。亚型 ayw、adw2 和 adr 的重组体 HBsAg 颗粒从 Rhein Biotech GmbH(Düsseldorf, 德国) 得到。如所述 [3] 纯化在多形汉逊酵母宿主 RB10 株中制备的 HBsAg 颗粒。合成的 K^b 结合 S₂₀₈₋₂₁₅ILSPFLPL(ayw) 或 IVSPFIPL(亚型 adw2) 肽和 K^b 结合 S₁₉₀₋₁₉₇VWLSVIWM(ayw) 或 VWLSAIWM(adw2) 肽从 JeriniBioTools(Berlin, 德国) 获得。将肽以 10mg/ml 的浓度溶于 DMSO 溶液并在使用前用培养基稀释。

[0086] 质粒和 DNA 免疫

[0087] 如所述 [4 ;5] 将 HBsAg_{ayw}、HBsAg_{adw2} 和 HBsAg_{adr} 克隆入 pCI(Promega) 和 BMGneo 载体。作为 DNA 疫苗, 使用了表达 HBsAg_{ayw}、HBsAg_{adw2} 和 HBsAg_{adr} 同样好的质粒 pCI/S_{ayw}、pCI/S_{adw2}、pCI/S_{adr}。从来自用这些质粒瞬时转染细胞中对 HBsAg 进行的免疫沉淀证明了这一点 (数据未显示)。因此, HBsAg 表位免疫原性的不同不能解释为由 DNA 疫苗所表达 HBsAg 的量不同或者转染子不同。对于肌内核酸免疫, 如所述 [4] 将包含 1 μg/μl 质粒 DNA 的 50 μl PBS (磷酸缓冲盐溶液) 注射入每一胫骨前肌。通过注射包含 1 μg/μl pCI/S_{ayw}、1 μg/μl pCI/S_{adw2} 和 1 μg/μl pCI/S_{adr} 的 50 μl PBS 实现 HBsAg 亚型混合物免疫。

[0088] 用 HBsAg 蛋白质颗粒免疫

[0089] 向每只小鼠皮下注射 5 μg HBsAg 蛋白质颗粒和溶于 100 μl PBS (磷酸缓冲盐溶液) 的 30 μg CpG 寡核苷酸 (ODN1826, MWG Biotech, Ebersberg, 德国) 或 8 μg RC-529 (Corixa Corp. Settle, WA, 美国)。对于用 HBsAg 亚型混合物进行免疫, 在一次中皮下注射 5 μg HBsAg_{ayw}、5 μg HBsAg_{adw2} 和 5 μg HBsAg_{adr} 蛋白质颗粒以及溶于 100 μl PBS 的 30 μg CpG 寡核苷酸佐剂或 8 μg RC-529。

[0090] 特异性脾脏和肝脏 CD8⁺-T 细胞频率的确定

[0091] 脾细胞悬液 [1] 和肝脏 NPC (非实质) 细胞制备描述于 [6 ;7]。将脾细胞和肝脏 NPC (1×10^6 /ml) 在具有 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ HBsAg 衍生肽或 HBsAg 表达转染子 (10^6 /ml) 或 HBsAg 颗粒负载的细胞的 RPMI-1640 培养基孵育 1 小时。然后加入 $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的布雷菲尔德菌素 A (BFA) (目录号 15870 ;Sigma) 并且将培养物进一步孵育 4 小时。收获细胞并且用抗 CD8mAb 对其表面进行染色,然后固定、透性处理和细胞质 IFN γ 染色。通过 FACS 分析确定 CD8⁺IFN γ ⁺CTL 的频率。显示了 10^5 个脾脏或肝脏 T 细胞中 CD8⁺IFN γ ⁺T 细胞的平均值。

[0092] 特异性 CD8⁺T 细胞系的转移

[0093] 从用 pCI/S_{ayw} DNA 疫苗免疫的 B6 小鼠脾脏获得 CD8⁺T 细胞系。使用经 K^b/S₂₀₈₋₂₁₅ 结合肽 1 (ILSPFLPL) 或 K^b/S₁₉₀₋₁₉₇ 结合肽 2 (VWLSVIWM) 负载的同系基因 RBL5 细胞体外再刺激脾细胞。在体外刺激大约 2 周的细胞系中,超过 80% 的 CD8⁺T 细胞具有预期的表位特异性,这如特异性 IFN γ 表达测试所证明。洗涤细胞并且用这些细胞系的 5×10^6 个细胞静脉内注射。对照细胞是从 ConA 刺激 3 天的培养物分离的非特异性 CD8⁺T 母细胞 (blast)。

[0094] 血清中转氨酶、HBsAg 和抗 HBsAg 抗体的确定

[0095] 通过在注射后一定时间点自尾静脉抽取血液从各个免疫小鼠或对照小鼠中重复获得血清抗体。使用 Reflotron®测试 (目录号 745138 ;RocheDiagnostics GmbH) 测定血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性。通过商业 ELISA AUSZYME II 测试 (ABBOTT Laboratories, Wiesbaden, 德国) 测定转基因小鼠血清中的 HBsAg 浓度。使用商业 IMx AUSAB 测试 (目录号 7A39-20 ;Abbott, Wiesbaden, 德国) 测定抗 HBsAg 抗体。

[0096] 使用 6 份标准血清定量抗体水平。将测试血清稀释以致于所测定的 OD 值在标准血清 1 和 6 的数值之间。用血清稀释倍数乘以所测定抗体水平 (mIU/ml) 得到此处所示数值。所给出的血清滴度对应于 4 只单个小鼠的平均值 $\pm$ 标准差。

[0097] 组织学

[0098] 薄的肝脏组织切片 ($< 3\text{mm}$) 用 4% 福尔马林 (pH 7.0) 固定 24 小时并且用石蜡包裹。将 $2 \mu\text{m}$ 厚的石蜡切片用苏木精 - 伊红 (H&E) 染色。

[0099] HBsAg 肽与 K^b 的结合

[0100] 如所述 [8,9],在 $3 \mu\text{M}$ 人 $\beta 2\text{m}$ 存在的条件下,将亲和纯化的 MHC I 类分子 K^b 与浓度递增的测试肽和限定浓度 (大约 2nM) 放射性标记的 VSVNP 52-59 指示肽于 18°C 孵育 48 小时。然后,通过 Sephadex G50 柱凝胶过滤 [8] 确定肽与 MHC I 类分子的结合。放射性标记的 VSV NP 52-59 肽位于排斥体积 (MHC 结合肽) 和内含体积 (inclusion volume) (游离肽)。这可以通过 γ 放射光谱学测定,并且确定结合 MHC 分子的测试肽相对于测试肽总量的比例。确定了达到指示肽结合 50% 抑制所需要的测试肽浓度 (IC₅₀ 值)。IC₅₀ 值越低,则测试肽的结合越好。为了防止配体耗尽,在所有结合实验中使用的 MHC 体积足以实现至多 15-25% 结合。在这些条件下,IC₅₀ 值接近于解离常数 (K_d)。所有结合实验均作为抑制实验进行。

[0101] 实施例 1 :表位 1 或表位 2 特异性 K^b 限制性 CD8⁺T 细胞系过继转移入 HBs-tg B6 小鼠导致肝脏损伤

[0102] 从使用 pCI/S_{ayw} 质粒 DNA 免疫的 B6 小鼠脾脏产生对 HBsAg 表位 1 或表位 2 (图 1B) 特异性的短期 CD8⁺T 细胞。在这些细胞中有 $> 95\%$ 的细胞为 CD8⁺,并且在这些 CD8⁺T 细胞

中有 > 80% 的细胞能诱导表达 IFN γ 。将这些细胞系的 5×10^6 个细胞过继转移入在肝脏中从转基因表达 HBsAg_{ayw} 的同类系 B6 宿主中导致急性肝损伤,如通过血清转氨酶的短期且极大升高所示(图 2)。在转移后 5-6 天,血清转氨酶水平恢复正常,此时在宿主中检测不到 CD8⁺T 细胞。转移相同数量的多克隆(丝裂原刺激的)CD8⁺T 母细胞没有表现出肝损伤。因此,可以确定(i)在 HBs-tg 小鼠中特异性 CD8⁺T 细胞诱导肝损伤(如在 [2] 中所述);(ii)在表达转基因的肝脏中出现了通过内源或外源 HBsAg 加工产生的 HBsAg 表位;和(iii)过继转移进入的 CD8⁺T 细胞被迅速地从转基因宿主中去除。所转移的 CD8⁺T 细胞具有不同的 HBsAg 特异性,因此可以进入肝脏并被原位活化,但是不能被稳定吸引。

[0103] 实施例 2:在脾脏和肝脏中观察到识别 HBsAg 表位 1 和 2 的 K^b 限制性 CTL

[0104] 开展了关于疫苗所致敏 HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞是否能够进入正常或表达转基因 HBsAg(HBs-tg) 的 B6 小鼠肝脏的研究(图 3)。从预先用 pCI/S_{ayw} 疫苗免疫 12-15 天的 B6 小鼠中分离脾细胞和非实质肝细胞(NPC)。从来自正常 B6 小鼠的脾脏和肝脏 CD8⁺T 细胞群中发现了表位 1 或表位 2 特异性的 CD8⁺T 细胞(图 3A)。虽然在肝脏 CD8⁺T 细胞群中 HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞的频率高,但是它们的绝对值比脾脏中的小(数据未显示)。相反,在用编码 HBsAg_{ayw} 的 DNA 疫苗免疫的 HBsAg_{ayw}tgB6 小鼠中没有 CD8⁺T 细胞反应(图 3B)。用 DNA 疫苗三次加强免疫注射(间隔为 3 周)和用 HBsAg 抗原颗粒及寡核苷酸佐剂重复免疫均不能在 HBs-tg 小鼠中产生 HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞免疫(数据未显示)。因此,使用小鼠所耐受的不同 HBsAg 变体进行接种的方案不能引发有效的抗病毒 CD8⁺T 细胞免疫。

[0105] 实施 3:K^b 限制性 T 细胞对 HBsAg_{ayw} 和 HBsAg_{adw2} 变体的反应

[0106] 具有 226 个氨基酸的 HBV 株 HBsAg_{ayw} 和 HBsAg_{adw2} 蛋白质不同之处在于 16 个氨基酸残基(相应的氨基酸同一性为 93%)。所使用的 HBsAg_{ayw} 蛋白质的序列与 HBs-tg B6 小鼠所表达的转基因编码的 HBsAg_{ayw} 的序列相同。所选择的 HBsAg_{ayw} 和 HBsAg_{adw2} 的 K^b 结合表位 1 和 2 的序列不同之处分别在于表位内的 1 个和 2 个氨基酸残基,但是它们的侧翼序列是相同的(图 1A, 1B)。HBsAg_{ayw} 和 HBsAg_{adw2} 的 S₂₀₈₋₂₁₅ 表位 1 存在 2 个位置的不同:adw2 中位置 2 上的缬氨酸(V)被亮氨酸(L)取代,并且位置 6 上的异亮氨酸(I)被亮氨酸(L)取代(图 1B)。表位 1 的 K^b 结合亲和力相当低;与表位的 HBsAg_{ayw} 变体相比,表位 1 的 HBsAg_{adw2} 变体表现出更高的 K^b 结合亲和力(表 1)。相反,表位 2 的 K^b 结合亲和力高(表 1)。

[0107] 表 1:免疫原性 HBsAg 表位对 K^b 的结合亲和力

	表位	HBsAg 变体	肽序列	K ^b 结合 (nm)
[0108]	1	ayw	<u>I</u> LSP <u>F</u> L <u>L</u> PL	3400
	1	adw2	<u>I</u> VSP <u>F</u> I <u>L</u> PL	773
	2	ayw	VWLSVIWM	54

[0109] 用 pCI/S_{ayw} 或 pCI/S_{adw2} DNA 疫苗免疫的 B6 小鼠表现出对 K^b 结合表位 1 的 CD8⁺T 细胞反应,这是在对已经用 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 颗粒或者用 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 抗原肽 S₂₀₈₋₂₁₅ 负载的致敏脾脏 CD8⁺T 细胞进行间接体内再刺激 5 小时后观察到的(图 4A, 组 2, 3)。表位 1 的 ayw 和 adw2 变体交叉反应,因为(i)通过 pCI/S_{ayw} 或 pCI/S_{adw2} 能够使表位 1 特异

性 CTL 致敏;和(ii)已经用 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 颗粒或者已经用肽 ILSPFLPL(ayw) 或肽 IYSPFIPL(adw2) 负载的细胞向致敏 CD8⁺T 细胞递呈表位 1。因此,8-mer 表位 1 内的 2 个替代不能表现出有效的表位加工、K^b 结合或递呈。

[0110] 已经用 pCI/S_{ayw} DNA 疫苗致敏的 CD8⁺T 细胞识别 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 的表位 2(S₁₉₀₋₁₉₇) (图 5A;组 2)。这可以通过使用负载肽的细胞或者表达 HBsAg_{ayw} 的转染子间接体内再刺激 5 小时后得到证明。致敏 CD8⁺T 细胞不识别表达内源性 HBsAg_{adw2} 的转染子。用 pCI/S_{adw2} DNA 疫苗免疫不能使表位 2 特异性 T 细胞致敏 (图 5A, 组 3)。用 pCI/S_{adw2} (而不是 pCI/S_{ayw}) DNA 疫苗致敏的 CD8⁺T 细胞能够识别转染子所递呈的表位 / 限制特异性未知的 adw2 特异性表位 (图 5, 组 3)。因此第 5 位氨基酸的替换 (将疏水的缬氨酸 V 交换成疏水的丙氨酸 A) 抑制表位 2 的产生, 但是不抑制由 K^b 分子的递呈 [1]。

[0111] 实施例 4:交叉反应性 K^b 限制性 CD8⁺T 细胞对 HBsAg 表位 1 的反应在 HBs-tg B6 小鼠中致敏

[0112] HBs-tg B6 小鼠在肝脏中从转基因表达 HBsAg_{ayw}。HBs-tg 小鼠用 HBsAg_{ayw} (pCI/S_{ayw}) 或 HBsAg_{adw2} (pCI/S_{adw2}) 免疫 (图 4, 5B)。使用 pCI/S_{ayw} DNA 疫苗重复免疫 HBs-tg B6 小鼠没有得到 CD8⁺T 细胞反应 (图 4, 5B, 组 2)。相反, 使用 pCI/S_{adw2} DNA 疫苗免疫 HBs-tg B6 小鼠则产生了对 HBsAg 的 CD8⁺T 细胞反应 (图 4B, 组 3)。这种交叉反应性的 CD8⁺T 细胞反应识别已经用 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 颗粒或者用表位 1 的肽形式的 ayw 或 adw2 变体负载的细胞 (图 4B, 组 3)。这些 CD8⁺T 细胞不识别 RBL5/S_{ayw} 转染子或者 K^b 结合表位 2S₁₉₀₋₁₉₇ (图 5B, 组 3)。CD8⁺T 细胞表现出对由 RBL5/S_{adw2} 转染子 (而非 RBL5/S_{ayw} 转染子) 递呈的未确定决定簇的亚型特异性反应 (图 5B, 组 3)。这显示 HBsAg 的天然变体能够通过交叉反应性 T 细胞免疫的致敏而“打破耐受”。

[0113] 对于特异性 CD8⁺T 细胞群是否存在于已经用 pCI/S_{adw2} 免疫的转基因小鼠的产生抗原的肝脏中开展了研究。在已经用 pCI/S_{adw2} 免疫的 HBs-tg B6 小鼠的脾脏和肝脏 NMC 中, 特异性 CD8⁺T 细胞反应性可以存在数月的时间阶段 (图 6)。因此, 与过继转移的 CD8⁺T 细胞 (图 2) 相比, 疫苗致敏的抗 HBV 特异性 CD8⁺T 细胞已经进入和表现出稳定吸引进入生产抗原的靶器官中达至少 3 个月。

[0114] 实施例 5:表现出对 HBsAg 表位 1 具有特异性 CD8⁺T 细胞反应性的已免疫 HBs-tg 小鼠肝脏的组织学

[0115] HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞在产生 HBsAg 的肝脏中诱导炎性反应。未处理的 B6 小鼠表现出正常肝脏组织学 (图 7A, B)。来自 HBs-tg B6 小鼠的肝细胞增大并且表现精细颗粒、浅色嗜酸性胞质, 这是在人 HBV 感染病例中观察到的“毛玻璃肝细胞”的特征 (图 7C, D)。没有观察到炎性细胞浸润。

[0116] 已经用 pCI/S_{adw2} (而非 pCI/S_{ayw}) DNA 疫苗免疫的 HBs-tg 小鼠表现出严重的肝脏组织病理学 (图 7E)。在实质 (图 7F) 和门管周 (图 7G) 区发现的炎性细胞浸润主要由单核细胞组成 (图 7F)。大量小的淋巴样细胞分布于实质和门管周区。局部化的炎性细胞群围绕着凋亡肝细胞 (图 7H)。与未处理 HBs-tg 小鼠相比, 免疫的 HBs-tg 小鼠肝细胞的增大和水肿更甚。一些小的细胞核表现出浓缩的染色质和核周晕 (图 7F, 箭头), 这表明处于凋亡早期。此外, 可观察到多数 Councilman 小体、正在凋亡的肝细胞 (图 7H, 箭头)。一些肝细胞出现核液泡化 (图 7, 箭头)。没有出现明显的胆汁郁积。

[0117] 实施例 6 :HBs-tg 小鼠中 HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞的致敏与抗原血症的降低相关

[0118] 未处理 HBs-tg 小鼠表现出 30-50ng/ml 的 HBsAg 血清水平 (图 8A)。在 HBsAg_{adw2} 免疫后发展出对表位 1 具有交叉反应性的 CD⁺T 细胞的小鼠表现出降低的抗原血症 (抗原水平范围为 5-15ng/ml),而在 HBsAg_{ayw} 免疫后未发展出任何 HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞免疫的动物中抗原血症水平没有变化 (图 8A)。因此,在免疫的转基因小鼠中抗原血症的部分控制与特异性 CD8⁺T 细胞的出现相关。

[0119] 实施例 7 :在已经使用 HBsAg_{adw2} 免疫的 HBs-tg 小鼠中出现了抗 HBsAg 血清抗体

[0120] 除了 T 细胞免疫以外,抗 HBsAg 体液免疫在监测抗原血症中也起着作用。在疫苗免疫的正常和转基因小鼠中观察到抗 HBsAg 血清抗体的存在。用 pCL/S_{ayw} 或 pCL/S_{adw2} DNA 疫苗免疫正常 (非转基因) B6 小鼠和同系基因 HBs-tg B6 小鼠两次。在最后一次免疫 2 周后,使用能够确定 HBsAg 不同亚型的 ImxAUSAB 测试 (Abbott) 确定对 HBsAg 特异性的血清抗体滴度。在已经用 pCL/S_{ayw} 或 pCL/S_{adw2} 质粒 DNA 免疫的非转基因小鼠中发展出高水平的抗 HBsAg 血清抗体,而 HBs-tg 小鼠仅在用 pCL/S_{adw2} (而非 pCL/S_{ayw}) 质粒 DNA 免疫后表现出抗 HBsAg 的血清抗体反应 (图 8B)。在用 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 颗粒免疫的小鼠中观察到相似的抗体反应 (数据未显示)。亚型特异性 ELISA (使用 HBsAg_{ayw} 或 HBsAg_{adw2} 颗粒包被的板) 表明:在正常小鼠中,由所有疫苗产生的 > 95% 的抗体反应是针对 HBsAg “a” 决定簇的;在 HBs-tg 小鼠中, > 90% 的抗体反应是针对 adw2 特异性决定簇的 (数据未显示)。

[0121] 实施例 8 :在用 HBsAg 蛋白质颗粒免疫的 HBs-tg B6 小鼠中针对 HBsAg 表位 1 的交叉反应性 K^b 限制性 CD8⁺T 细胞反应的有效致敏

[0122] 使用亚型 ayw 或者 adw2 的 HBsAg 蛋白质颗粒免疫正常 B6 小鼠导致针对 K^b 结合表位 1 (S₂₀₈₋₂₁₅) 的 CD8⁺T 细胞介导的免疫反应 (图 9A)。因此可以看出,不论疫苗的性质如何 (蛋白质颗粒或者 DNA),具有不同序列的表位能够引发交叉反应性 T 细胞反应。与使用 DNA 疫苗免疫 (图 5) 相类似,使用亚型 ayw 的 HBsAg 蛋白质颗粒接种 B6 小鼠引发了针对 HBsAg K^b 限制性表位 2 (S₁₉₀₋₁₉₇) 的 CD8⁺T 细胞反应,而使用亚型 adw2 的 HBsAg 蛋白质颗粒接种则不能引发这种反应 (图 9A)。

[0123] 使用相当于亚型 ayw 或者亚型 adw2 的 HBsAg 蛋白质颗粒疫苗免疫 HBs_{ayw}-tg 小鼠。用 HBsAg_{ayw} 蛋白质疫苗重复免疫后没有产生 CD8⁺T 细胞反应,而用异源 HBsAg_{ayw} 蛋白质抗原免疫则产生了针对表位 1 的 HBsAg 特异性 CD8⁺T 细胞反应 (图 9B)。因此,表明 HBsAg 的天然变体能够通过交叉反应性 T 细胞反应的引发和通过蛋白质亚单位接种打破存在的耐受。

[0124] 实施例 9 :在用 HBsAg 天然变体混合物免疫的 HBs-tg B6 小鼠中针对 HBsAg 表位 1 的交叉反应性 K^b 限制性 CD8⁺T 细胞反应的有效致敏

[0125] 使用编码三种 HBsAg 亚型 ayw (pCI/S_{ayw})、adw2 (pCI/S_{adw2}) 和 adr (pCI/S_{adr}) 的 DNA 疫苗 (图 10A) 以及含有亚型 ayw、adw2 和 adr 混合物的 HBsAg 蛋白质颗粒 (图 10B) 免疫 HBs_{ayw}-tg 小鼠。在用 DNA 和蛋白质颗粒免疫后,HBsAg 天然变体混合物均引发了针对表位 1 的交叉反应性 K^b 限制性 CD⁺T 细胞反应。

[0126] 实施例 10 :在用 HBsAg 天然变体混合物免疫之后,HBs-tg 小鼠中抗原血症降低

[0127] 在未处理 HBs-tg 小鼠中,观察到 30-50ng/ml 的血清抗原水平。在用异源性 HBsAg 疫苗 (HBsAg_{adw2}) 或者天然 HBsAg 变体混合物 (HBsAg_{ayw}+HBsAg_{adw2}+HBsAg_{adr}) 免疫之后发展出针对表位 1 的交叉反应性 CD8⁺T 细胞反应的动物中,抗原血症降低了 (HBsAg 水平为 5-17ng/

m1)。在单独用同源性 HBsAg_{ayw} 免疫并且因此不能够产生 HBsAg 特异性 T 细胞免疫的动物中,血清抗原数量没有变化。使用 HBsAg 天然变体的混合物免疫相应地导致抗原血症降低。

[0128] 实施例 11:用 HBsAg 天然变体的混合物免疫之后,HBs-tg 小鼠中抗 HBsAg 血清抗体的诱导

[0129] 在用 HBsAg_{ayw}、HBsAg_{adw2}、HBsAg_{adr} 以及三种亚型的混合物免疫之后,正常 B6 小鼠出现明显的抗体反应(未显示)。

[0130] 研究了免疫之后 HBs-tg 小鼠中 HBsAg 特异性血清抗体的形成。HBs-tg 小鼠仅在用天然 HBsAg 变体混合物或者用异源亚型 adw2 免疫之后才出现血清抗体反应。在用同源性亚型 ayw 免疫之后没有诱导抗 HBsAg 反应。亚型特异性 ELISA(使用 HBsAg_{ayw} 和 HBsAg_{adw2} 蛋白质颗粒包被的微量滴定板)表明在 HBs-tg 小鼠中 > 90% 的 HBsAg 特异性抗体反应针对 adw2 特异性决定簇(数据未显示)。

[0131] 参考文献

[0132] 1. Schirmbeck, R., Boehm, W., Fissolo, N., Melber, K. 和 Reimann, J., Different immunogenicity of H-2K^b-restricted epitopes in natural variants of the hepatitis B surface antigen. Eur. J. Immunol. 2003. in press :xx-yy.

[0133] 2. Ando, K.-I., Guidotti, L. G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missale, G., Moriyama, T., Schreiber, R. D., Schicht, H. J., Huang, S. N. 和 Chisari, F. V., Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. J. Immunol. 1994. 152 :3245-3253.

[0134] 3. S. Schaefer, M. Piontek, S. J. Ahn, A. Papendieck, Z. Janowicz, I. Timmermans 和 G. Gellissen. 2002. Recombinant hepatitis B vaccines-disease characterization and vaccine production. in Hansenula polymorpha-Biology and Applications. G. Gellissen(编)175-210 页, Wiley-VCH, Weinheim, 德国.

[0135] 4. Schirmbeck, R., Boehm, W., Ando, K.-I., Chisari, F. V. 和 Reimann, J., Nucleic acid vaccination primes hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. J. Virus. 1995. 69 :5929-5934.

[0136] 5. Boehm, W., **Kuhröber**, A., Paier, T., Mertens, T., Reimann, J. 和 Schirmbeck, R., DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection. J. Immunol. Methods 1996. 193 :29-40.

[0137] 6. Trobonjaca, Z., **Leithäuser**, F., Moller, P., Schirmbeck, R. 和 Reimann, J., Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN γ release by liver NKT-cells. J. Immunol. 2001. 167 : 1413-1422.

[0138] 7. Trobonjaca, Z., Kroger, A., Stober, D., **Leithäuser**, F., Moller, P., Hauser, H., Schirmbeck, R. 和 Reimann, J., Activating immunity in the liver. II. IFN- β attenuates NK cell-dependent liver injury triggered by liver NKT-cell activation. J. Immunol. 2002. 168 :3763-3770.

[0139] 8. Buus, S., Stryhn, A., Winther, K., Kirkby, N. 和 Pedersen, L. O.,

Receptor-ligand interactions measured by an improved spun column chromatography technique. A high efficiency and high throughput size separation method. *Biochim. Biophys. Acta* 1995. 1243 :453-460.

[0140] 9. Olsen, A. C., Pedersen, L. O., Hansen, A. S., Nissen, M. H., Olsen, M., Hansen, P. R., Holm, A. 和 Buus, S., A quantitative assay to measure the interaction between immunogenic peptides and purified class I major histocompatibility complex molecules. *Eur. J. Immunol.* 1994. 24 :385-392.

[0141] 10. T. van-Hall, J. van-Bergen, P. A. van-Veelen, M. Kraakman, L. C. Heukamp, F. Koning, C. J. Melief, F. Ossendorp 和 R. Offringa. 2000. Identification of a novel tumor-specific CTL epitope presented by RMA, EL-4, and MLB-2 lymphomas reveals their common origin. *J. Immunol.* 165 :869-877.

序列表

<110> 莱因新生物技术工艺和产品有限公司

<120> 预防 / 治疗 HBV 感染和 HBV 介导疾病的组合物

<130>PCT-2069HVTF

<140>

<141>

<150>DE10339927.5

<151>2003-08-29

<160>7

<170>PatentIn 版本 2.1

<210>1

<211>226

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 adw2/ 基因型 A 的 HBsAg 多肽

<400>1

Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln
1				5				10					15		
Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
				20				25					30		
Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Val	Cys
				35				40					45		
Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr	Ser
				50				55					60		
Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe
				65				70					75		80
Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Ile	Val
				85											
Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly

100	105	110
Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala		
115	120	125
Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp		
130	135	140
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys		
145	150	155
Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu		
165	170	175
Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu		
180	185	190
Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile		
195	200	205
Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val		
210	215	220
Tyr Ile		
225		

<210>2

<211>226

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 ayw/ 基因型 D 的 HBsAg 多肽

<400>2

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
35 40 45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60
Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu leu Val
85 90 95

Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly		
100						105						110					
Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala		
115						120						125					
Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp		
130						135						140					
Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys		
145						150						155				160	
Phe	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu		
165						170						175					
Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu		
180						185						190					
Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ile		
195						200						205					
Leu	Ser	Pro	Phe	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val		
210						215						220					
Tyr Ile																	
225																	

<210>3

<211>8

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 adw2 HBsAg 表位 190-197

<400>3

Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met

1

5

<210>4

<211>8

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 ayw HBsAg 表位 190-197

<400>4

Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met

1

5

<210>5

<211>8

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 adw2 HBsAg 表位 208-215

<400>5

Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu

1

5

<210>6

<211>8

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 ayw HBsAg 表位 208-215

<400>6

Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu

1

5

<210>7

<211>225

<212>PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<223>HBV 亚型 adr/ 基因型 C 的 HBsAg 多肽

<400>7

Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln

1

5

10

15

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

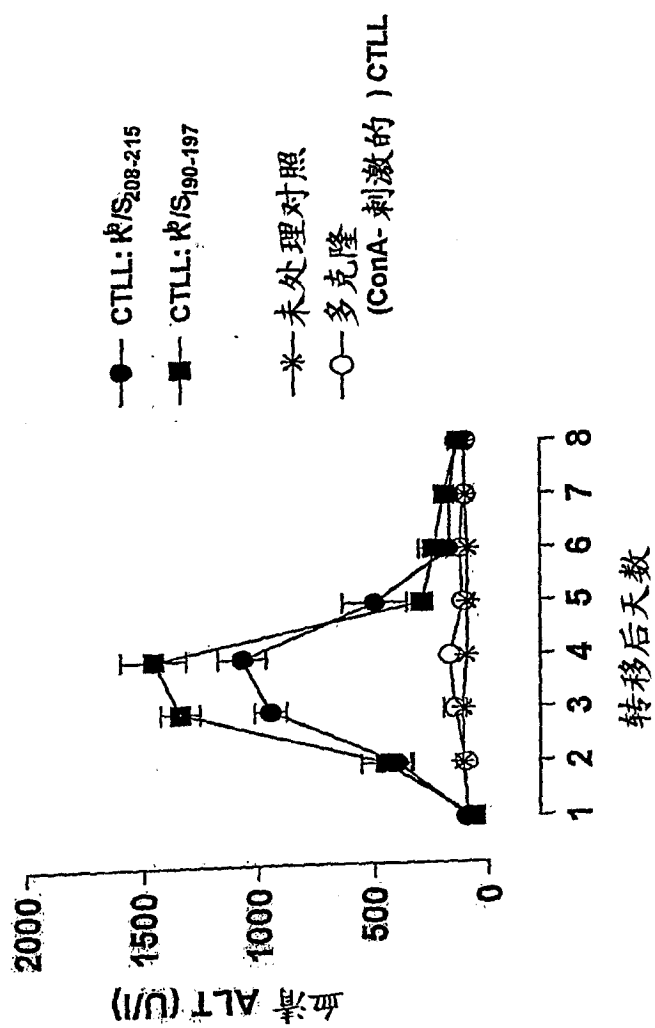


图 2

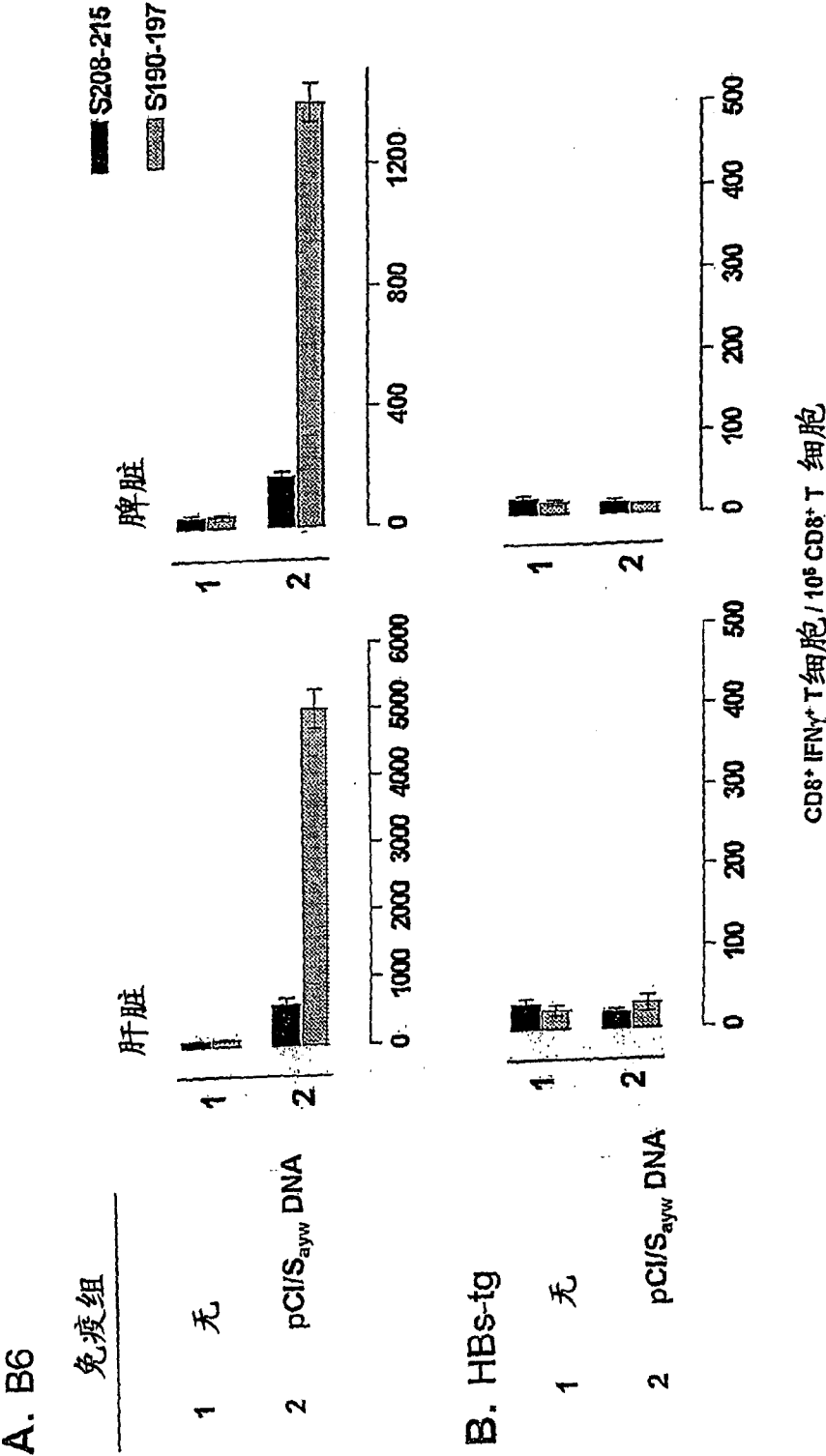
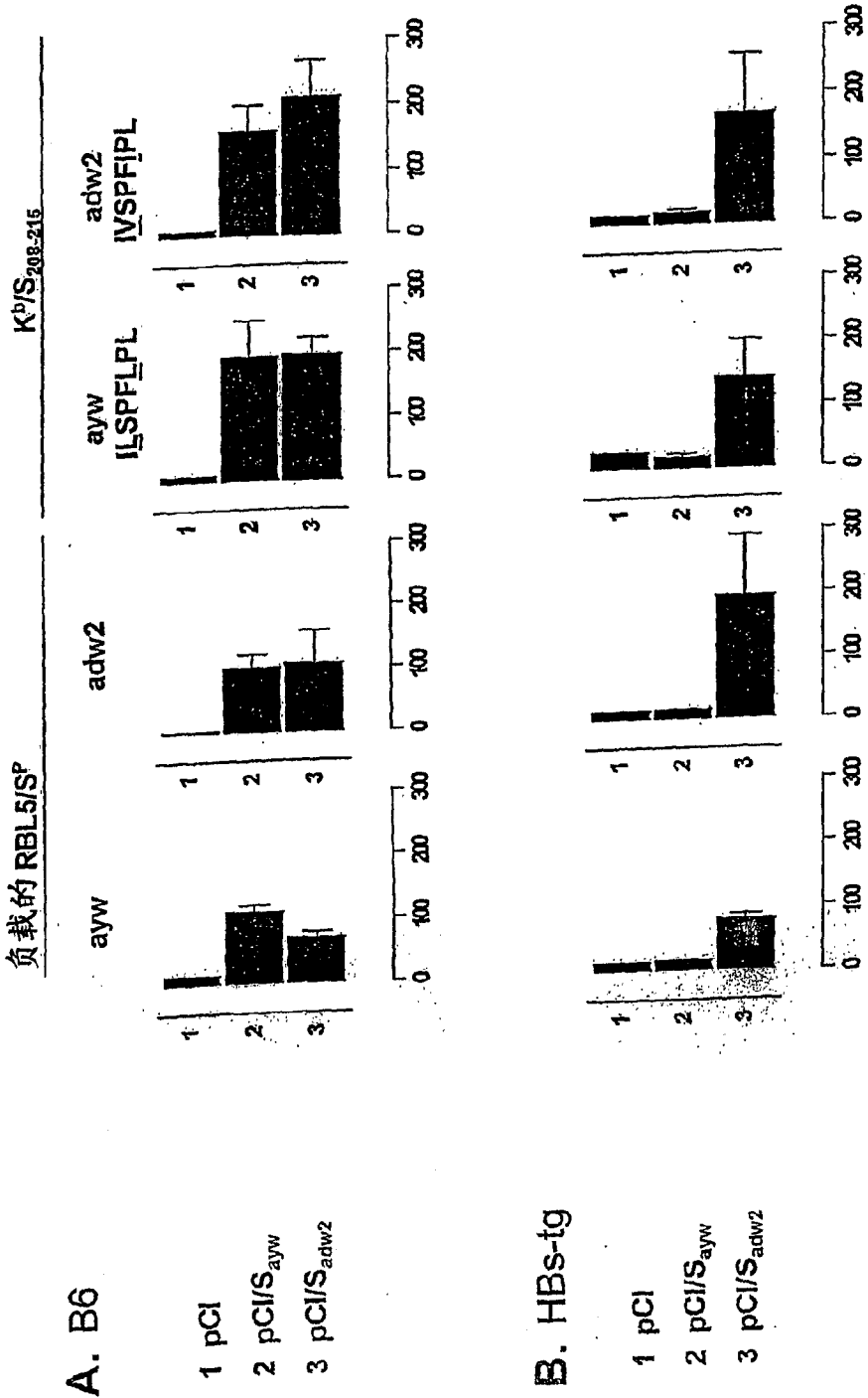
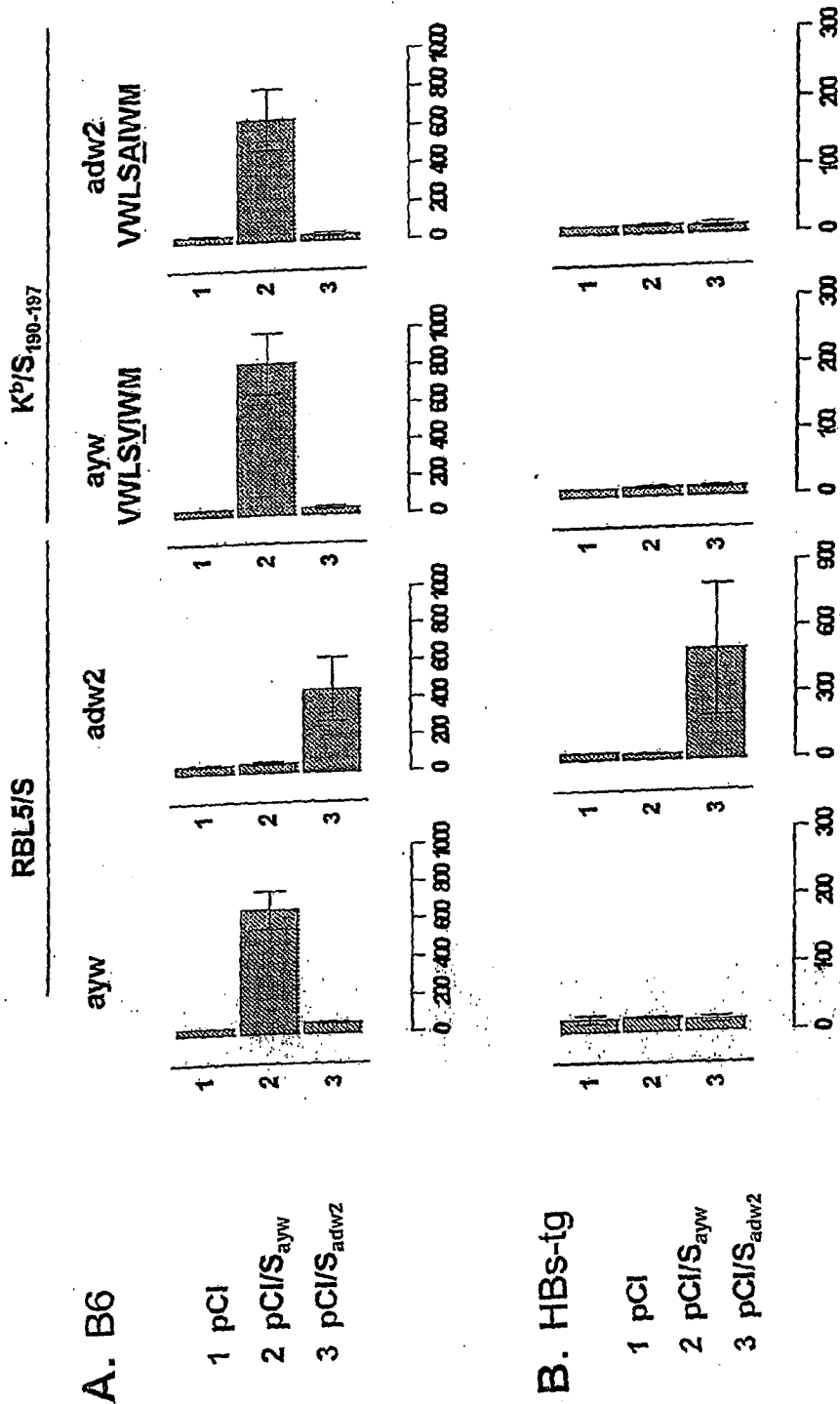


图 3



CD8⁺ IFN γ ⁺ T 细胞 / 10⁵ CD8⁺ 脾脏 T 细胞

图 4



CD8⁺ IFN- γ ⁺ T 细胞 / 10⁵ CD8⁺ 脾脏 T 细胞

图 5

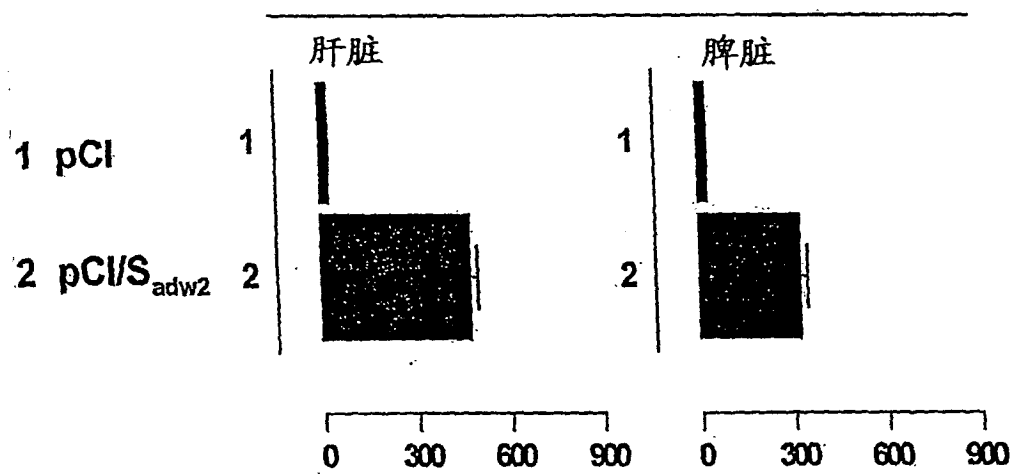


图 6

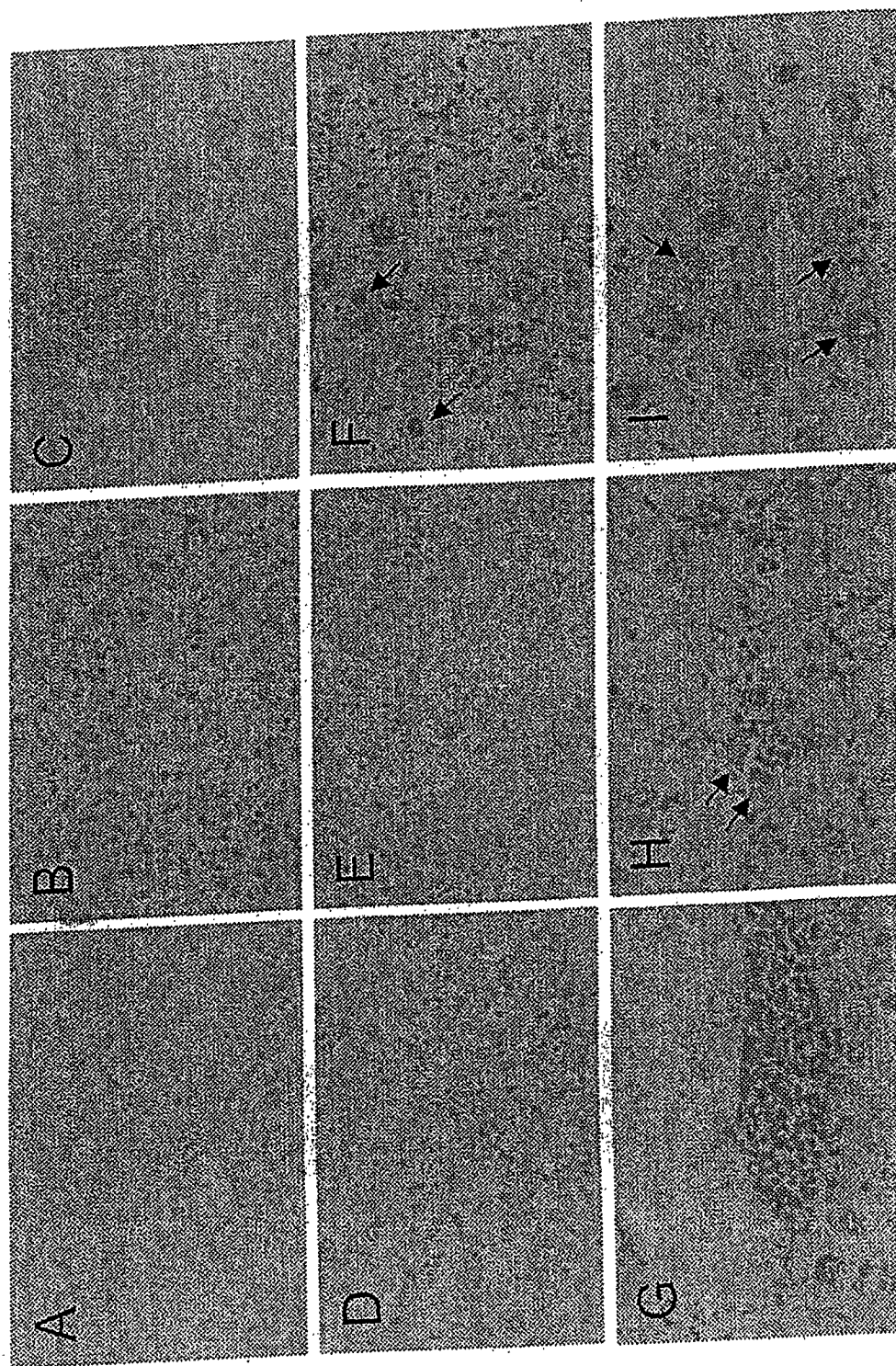


图7

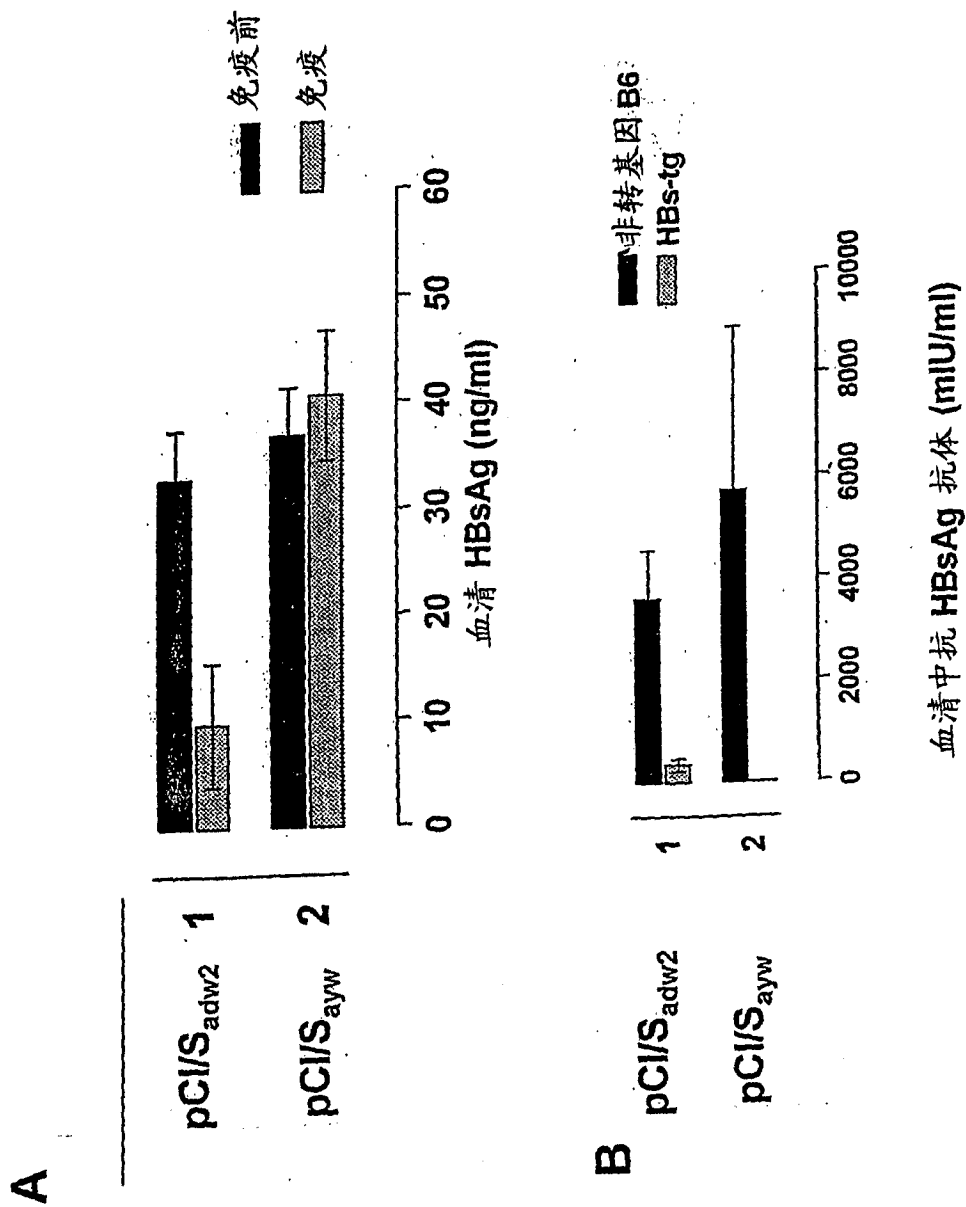


图 8

用以下表位负载的RBL5 细胞再刺激

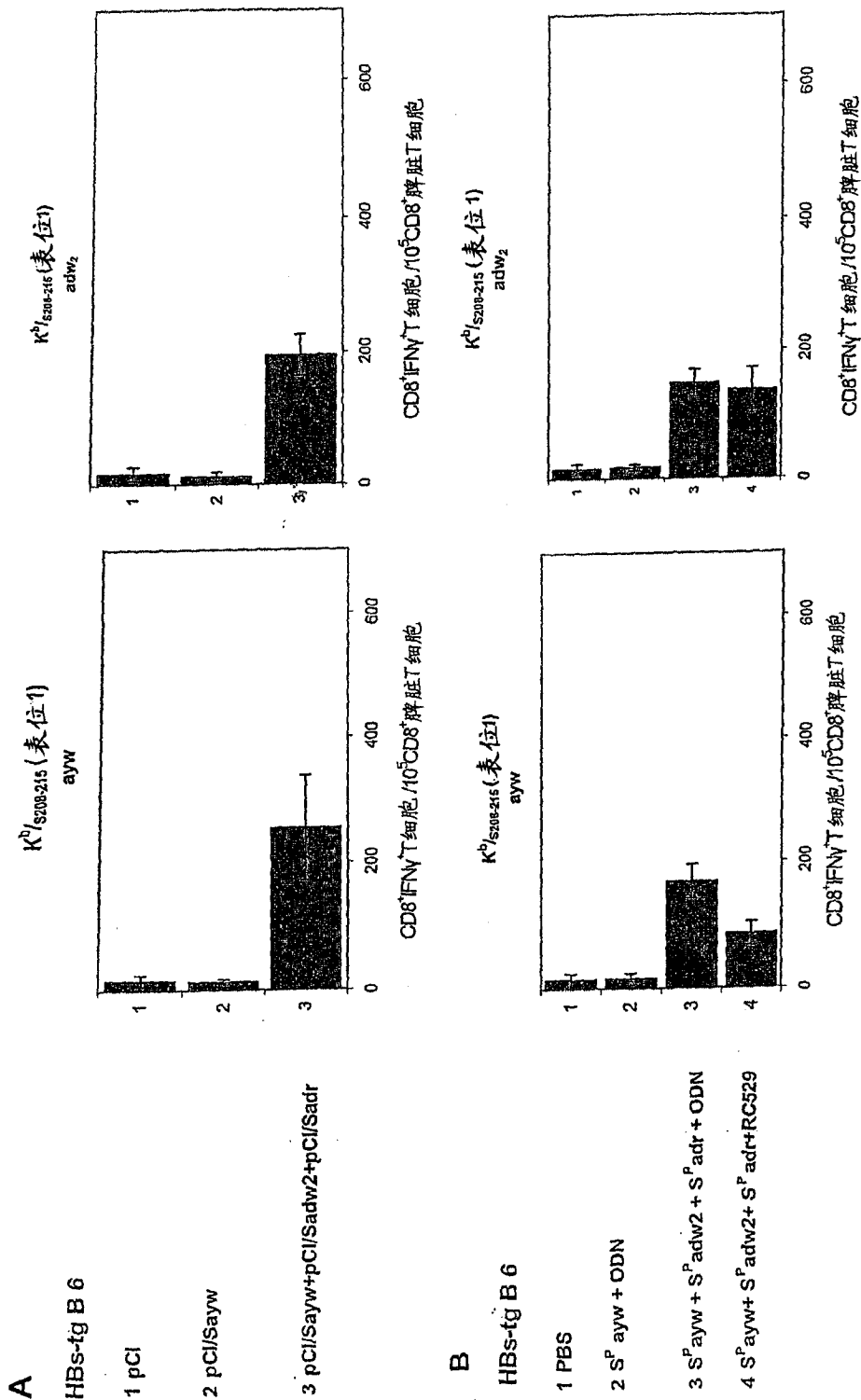
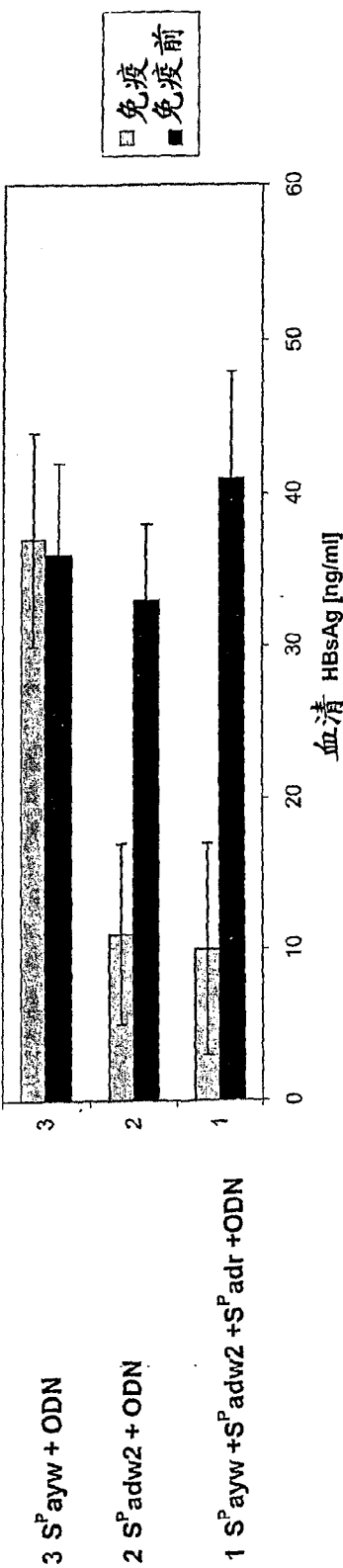


图 10

A



B

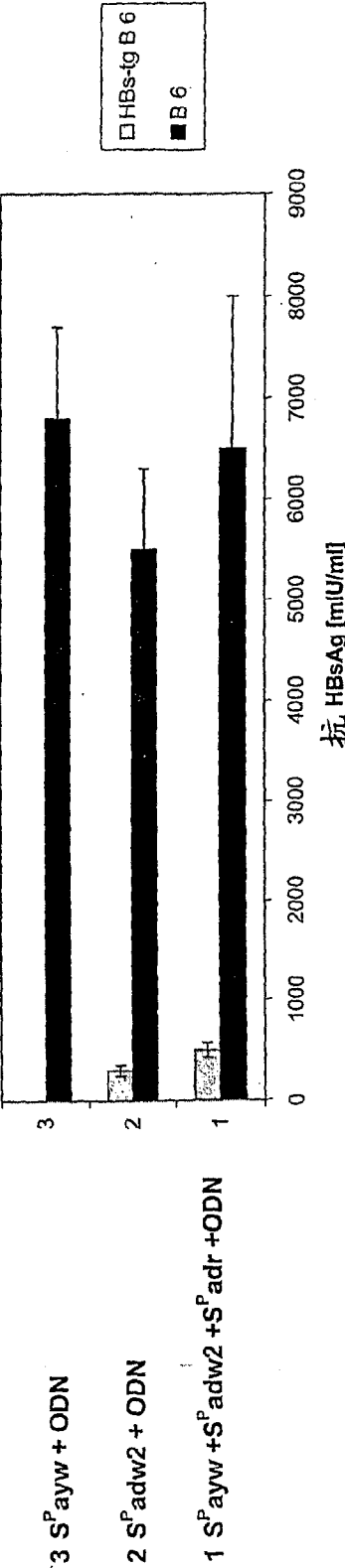


图 11