



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103370411 B

(45) 授权公告日 2016.05.04

(21) 申请号 201180067429.7

A61K 39/235(2006.01)

(22) 申请日 2011.12.14

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/422,954 2010.12.14 US

WO 2006040330 A2, 2006.04.20,

WO 2009092113 A2, 2009.07.23,

WO 2006037038 A1, 2006.04.06,

US 2010303857 A1, 2010.12.02,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.08.13

Thomas W.Geisbert 等. "Recombinant

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/064944 2011.12.14

adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35

vaccine vectors bypass immunity to Ad5

and protect nonhuman primates against

ebolavirus challenge". 《Journal of

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2012/082918 EN 2012.06.21

Virology》. 2011, 第 85 卷 (第 9 期), 第

4222-4233 页.

(73) 专利权人 美国卫生和人类服务部

地址 美国马里兰州

专利权人 克鲁塞尔荷兰公司

审查员 刘贺

(72) 发明人 N·J·沙利文 G·J·纳贝尔

C·亚仕都 C·程 M·G·帕乌

J·古迪斯米茨

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

C12N 7/01(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书21页

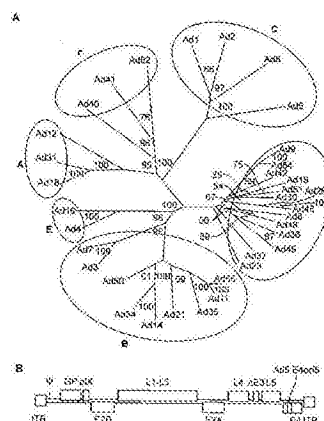
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

腺病毒血清型 26 和血清型 35 线状病毒疫苗

(57) 摘要

本发明提供编码线状病毒抗原的重组腺病毒载体(血清型 26 和血清型 35)。所述腺病毒载体可以用于诱导针对线状病毒感染的保护性免疫应答。



1. 重组腺病毒载体在制备在对象中诱导针对线状病毒抗原的免疫应答的疫苗中的用途,其中所述疫苗包含

初免组合物,所述初免组合物包含重组腺病毒载体,所述重组腺病毒载体包含编码线状病毒抗原性蛋白的核酸和腺病毒 26 衣壳蛋白;以及

加强组合物,所述加强组合物包含重组腺病毒载体,所述重组腺病毒载体包含编码线状病毒抗原性蛋白的核酸和腺病毒 35 衣壳蛋白。

2. 权利要求 1 的用途,其中肌肉内给药所述腺病毒载体。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述包含腺病毒 26 衣壳蛋白的腺病毒载体是 rAd26 载体,并且所述包含腺病毒 35 衣壳蛋白的腺病毒载体是 rAd35 载体。

4. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白是糖蛋白。

5. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白来自埃博拉病毒。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述埃博拉病毒是 Zaire 亚型。

7. 权利要求 6 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白由 SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列编码。

8. 权利要求 5 的用途,其中所述埃博拉病毒是 Sudan 亚型。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白由 SEQ ID NO:2 所示的多核苷酸序列编码。

10. 权利要求 8 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白由 SEQ ID NO:3 所示的多核苷酸序列编码。

11. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白来自马尔堡病毒。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述线状病毒抗原性蛋白由 SEQ ID NO:4 所示的多核苷酸序列编码。

腺病毒血清型 26 和血清型 35 线状病毒疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及用于诱导针对线状病毒感染的保护性免疫的腺病毒载体。

背景技术

[0002] 复制缺陷型腺病毒载体 (rAd) 是细胞免疫应答的强力诱导物,因此能够用作基因疫苗的有用载体,尤其是对于慢病毒和线状病毒以及其他一些非病毒病原体 (Shiver, et al., (2002) *Nature* 415(6869):331-5; (Hill, et al., *Hum Vaccin* 6(1):78-83.; Sullivan, et al., (2000) *Nature* 408(6812):605-9; Sullivan et al., (2003) *Nature* 424(6949):681-4; Sullivan, et al., (2006) *PLoS Med* 3(6):e177; Radosevic, et al., (2007); Santra, et al., (2009) *Vaccine* 27(42):5837-45)。作为人疫苗,基于腺病毒的疫苗具有多个优势,因为在 GMP 条件下能够将它们生产至很高的效价,并且经证实它们在人是安全的并具有免疫原性 (Asmuth, et al., *J Infect Dis* 201(1):132-41; Kibuuka, et al., *J Infect Dis* 201(4):600-7; Koup, et al., *PLoS One* 5(2):e9015.; Catanzaro, et al., (2006) *J Infect Dis* 194(12):1638-49; Harro, et al., (2009) *Clin Vaccine Immunol* 16(9):1285-92)。然而,由于 rAd5 具有显著的引发广泛抗体以及 CD8+T 细胞应答的能力,大部分最初的疫苗工作都是利用 rAd5 来实施,但人中预先存在的对 rAd5 的免疫性可能会限制有效性 (Catanzaro, (2006); Cheng, et al., (2007) *PLoS Pathog* 3(2):e25.; McCoy, et al., (2007) *J Virol* 81(12):6594-604.; Buchbinder, et al., (2008) *Lancet* 372(9653):1881-93)。rAd5 这个性质可能会限制其在许多目前正在研发的疫苗中的临床应用,包括埃博拉病毒 (EBOV) 和马尔堡病毒 (MARV)。

[0003] 为了避免预先存在的对 rAd5 的免疫性的问题,目前正在研究一些替代的载体。这其中包括来源于罕见人血清型的腺病毒载体,以及来源于其他动物的载体,例如黑猩猩 (Vogels, et al., (2003) *J Virol* 77(15):8263-71; Abbink, et al., (2007) *J Virol* 81:4654-63; Santra, (2009))。相比而言,对动物来源的腺病毒载体应用的研究还处于初期,而人腺病毒却拥有其优势:具有良好表征的生物学特性和对人细胞的趋向性,以及证实的可制造性 (Vogels, et al., (2007) *J Gen Virol* 88(Pt11):2915-24.)。这些载体的免疫原性以及它们作为疫苗的潜力已经在动物模型中得到证实,主要是以与外源性载体构成的初免-加强 (prime-boost) 组合 (Abbink, et al., 2007; Shott et al., (2008) *Vaccine* 26:2818-23)。

[0004] 腺病毒血清型阳性频率是群体依赖性的 (Mast, et al., (2010) *Vaccine* 28(4):950-7),但在测试的 51 种人腺病毒的大组中, Ad35 和 Ad11 最少被来自于 6 个地域位置的血清中和的 (Vogels, et al., 2003)。据证实, rAd35 疫苗在小鼠、非人灵长类以及人中具有免疫原性,并且能够避免对 Ad5 的免疫性 (Barouch, et al., (2004) *J Immunol* 172(10):6290-7; Nanda, et al., (2005) *J Virol* 79(22):14161-8; Ophorst, et al., (2006) *Infect Immun* 74(1):313-20; Thorner, et al., (2006) *J Virol* 80(24):12009-16.; Rodriguez, et al., (2009) *Vaccine* 27(44):6226-33)。在适合于生产临

床级别疫苗的细胞系上, rAd35 载体生长至高效价 (Havenga, et al., (2006) J Gen Virol 87(Pt8):2135-43), 并且已经配制成注射剂型以及稳定的可吸入性粉末 (Jin, et al., Vaccine 28(27):4369-75)。这些载体对人树状细胞表现出有效的转导 (de Gruijl, et al., (2006) J Immunol 177(4):2208-15; Lore, et al., (2007) J Immunol 179(3):1721-9), 因此具有介导高水平抗原递送和呈递的能力。来自 D 亚群的 Ad26 是由于其具有能够避免 Ad5 预先存在免疫性的能力而选择的另一种腺病毒。尽管在某些成年群体中, Ad26 的血清型阳性率非常显著, 但 Ad26 中和抗体效价保持明显低于 Ad5 中和抗体效价 (Abbink, et al., 2007; Mast, et al., 2010)。研究显示, rAd26 能够在 Ad5E1- 补充细胞系中生长至高效价, 该细胞系适合于大规模生产临床级别的这些载体 (Abbink, et al., 2007), 并且据证实该载体能够在初免-加强疫苗策略中诱导体液和细胞介导的免疫应答 (Abbink, et al., 2007; Liu, et al., (2009) Nature 457(7225):87-91)。

发明内容

[0005] 本发明基于, 至少部分基于下述发现: rAd35 和 rAd26 载体当单独接种以及异源初免-加强组合时产生针对线状病毒感染的保护性免疫应答。

[0006] 因此, 本发明提供分离的重组腺病毒载体, 其包含编码线状病毒抗原的核酸, 其中所述腺病毒载体包含腺病毒 26 衣壳蛋白 (例如, rAd26 载体) 或腺病毒 35 衣壳蛋白 (例如, rAd35 载体)。典型地, 所述腺病毒载体是复制缺陷型的。

[0007] 线状病毒抗原性蛋白通常是来自埃博拉病毒或马尔堡病毒的糖蛋白。埃博拉病毒可以是任何种, 例如 Zaire 或 Sudan/Gulu。编码合适的线状病毒抗原的示例性核酸如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示。

[0008] 本发明还提供编码本发明的重组腺病毒载体的分离的核酸分子。所述核酸通常包含表达盒, 其包含与编码线状病毒抗原性蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的 CMV 启动子。编码线状病毒抗原性蛋白的多核苷酸序列可以是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。

[0009] 本发明进一步提供包含本发明的分离的腺病毒载体的免疫原性组合物。所述免疫原性组合物可以进一步包含佐剂。

[0010] 本发明还提供在患者中诱导针对线状病毒抗原的免疫应答的方法。所述方法包括向所述患者给药免疫有效量的本发明的腺病毒载体。通常, 以肌肉内方式给药腺病毒载体。

[0011] 在一些实施方案中, 载体作为初免 (priming) 接种然后作为加强 (boosting) 接种来给药。例如, 初免接种可以是给药包含腺病毒 26 衣壳蛋白的腺病毒载体, 而加强接种可以是给药包含腺病毒 35 衣壳蛋白的腺病毒载体。

[0012] 定义

[0013] “腺病毒衣壳蛋白”是指腺病毒衣壳上的蛋白 (例如 Ad26 或 Ad35), 其涉及决定特定腺病毒的血清型和 / 或趋向性。腺病毒衣壳蛋白一般包括纤维蛋白、五邻体蛋白和 / 或六邻体蛋白。如本文中使用的, “Ad26 衣壳蛋白”或“Ad35 衣壳蛋白”可以是例如嵌合衣壳蛋白, 其包括 Ad26 或 Ad35 衣壳蛋白的至少一部分。在特定的实施方案中, 衣壳蛋白是完整的 Ad26 衣壳蛋白或 Ad35 衣壳蛋白。在特定的实施方案中, 六邻体、五邻体和纤维蛋白是 Ad26 衣壳蛋白或 Ad35 衣壳蛋白。

[0014] 术语“佐剂”和“免疫刺激物”在本文中可以互换使用, 其定义为导致免疫系统刺

激的一种或多种物质。在本文中,佐剂用来增强对本发明的腺病毒载体的免疫应答。

[0015] 术语“对应于”,当用于序列中氨基酸残基的位置时,表示当多条序列最佳比对时,这些序列中的相应位置。

[0016] 在两个或更多个核酸或多肽序列(例如,本发明的腺病毒的衣壳蛋白以及编码它们的核酸)的上下文中,术语“相同”或“相同性”百分比是指当为最高一致性比较或比对时,两条或更多条序列或亚序列是相同的或具有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸是相同的,如使用下面的序列比较算法之一进行测量或通过肉眼检查。

[0017] “分离的”核酸分子或腺病毒载体是从其天然环境分离得到的核酸分子(例如,DNA或RNA)或病毒。例如,为本发明的目的,包含在载体中的重组DNA分子认为是分离的。分离的DNA分子的其他实例包括维持在异源宿主细胞中的重组DNA分子或溶液中的(部分或基本上)纯化的DNA分子。分离的RNA分子包括本发明的DNA分子体内或体外的RNA转录物。本发明的分离的核酸分子还包括合成产生的此类分子。

[0018] “可操作地连接”表示两个或更多个的DNA片段连接在一起,使得它们为了预期的目的而一致地行使功能。例如,在正确的阅读框中将编码序列可操作地连接到启动子上,以使得在启动子中起始转录,继续通过编码片段直至终止子。

[0019] “多核苷酸”通常是从5'至3'端读码的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基单链或双链聚合物。多核苷酸包括RNA和DNA,可以从天然来源分离,体外合成或从天然和合成的分子的组合制备。当该术语用于双链分子时,其用来表示总长度,可以理解为与术语“碱基对”等同。

[0020] “多肽”是通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物,无论天然或合成产生的。小于约50个氨基酸残基的多肽一般称为“寡肽”。

[0021] 本文中的术语“启动子”在本领域中所认可的含义是指含有DNA序列的基因的一部分,所述DNA序列提供RNA聚合酶的结合以及可操作地连接的编码序列的转录起始。启动子序列一般发现于基因的5'非编码区。

[0022] “蛋白”是包含一条或多条多肽链的大分子。蛋白也可以包含非肽类组分,如碳水化合物基团。碳水化合物和其他非肽类取代基由产生蛋白的细胞添加到该蛋白上,并且会随着细胞类型而变化。本文根据蛋白的氨基酸骨架结构来对蛋白进行定义,取代基如碳水化合物基团通常没有特别指出,但是仍然可能存在。

[0023] 本发明的涉及两个核酸或多肽的文本中(例如,腺病毒衣壳蛋白或线状病毒抗原),短语“基本上相同”是指当两条或更多条序列或亚序列以最大一致性进行对比和比对时,它们具有至少60%、更优选65%、甚至更优选70%、还更优选75%、甚至更优选80%、最优选90-95%的核苷酸或氨基酸残基相同性,如使用下面的序列比较算法之一进行测量或通过肉眼检查。优选地,序列在至少长约50个残基的区域中是基本相同的,更优选至少100个残基的区域,最优选这些序列的至少约150个残基的区域是基本相同的。在最优选的实施方案中,这些序列在整个编码区的长度上是基本相同的。

[0024] 对于序列比较,通常一条序列作为参考序列,将测试序列与之比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入到计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。基于指定的程序参数,序列比较算法计算测试序列相对于参考序列的序列相同性百分数。

[0025] 可以对比较的序列进行优化比对,例如,利用 Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981) 的本地同源性算法、Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970) 的同源性比对算法、Pearson&Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA85:2444(1988) 的相似性检索方法、计算机实施的这些算法 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA), 或者由肉眼检查 (通常见 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel))。

[0026] 适合用于确定序列相同性和序列相似性百分比的算法实例有 BLAST 和 BLAST2.0 算法, 分别在 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 and Altschuel et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 中有所描述。实施 BLAST 分析的软件公众可从国家生物技术信息中心获得。该算法涉及通过确定查询序列中长度为 W 的短字段来首先确定高得分序列对 (HSP), 当其与数据库序列中相同长度的字段比对时, 能够匹配或者满足一些正数值阈值分数 T。T 是指邻近字段评分阈值 (Altschul et al, 上文)。将这些初始邻近字段查询结果作为开始搜索的种子, 来找出含有它们的更长的 HSP。只要累积比对得分能够增加, 命中的字段就一直沿着每条序列向两端延伸。对于核苷酸序列, 用参数 M (一对匹配残基的奖分, 总是 >0) 和 N (未匹配残基的罚分, 总是 <0) 来计算累积得分。对于氨基酸序列, 则使用打分矩阵来计算累积得分。当发生下述情况时, 命中字段在两端的延伸就停止: 变量 X 使得累积得分从其所达到的最高值下跌时; 由于一个或多个负分残基比对的积累, 使得累计得分到达零或以下; 或者到达每条序列的末端。BLAST 算法的参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏性和速度。BLASTN 程序 (用于核苷酸序列) 使用的默认字段长度 (W) 为 11, 期望值 (E) 为 10, M=5, N=-4, 两条链都进行比对。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用的默认字段长度 (W) 为 3, 期望值 (E) 为 10, 以及使用 BLOSUM62 打分矩阵 (见 Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:10915(1989))。

[0027] 除了计算序列相同性百分比, BLAST 算法还对两条序列之间的相似性进行统计分析 (见例如 Karlin&Altschul, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA90:5873-5787(1993))。BLAST 算法提供的一种相似性量度是最小和概率 (P(N)), 它提供两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配是偶然发生的概率的指示。例如, 如果在测试核酸和参考核酸的比对中最小和概率小于约 0.1、更优选小于约 0.01、最优选小于约 0.001 时, 认为核酸序列与参考核酸序列是相似的。

[0028] 本发明的两条核酸序列或多肽基本上相同的另一标志是由第一核酸编码的多肽与第二核酸编码的多肽具有免疫交叉反应性, 如下所述。因此, 多肽通常与第二多肽基本上相同, 例如, 两条多肽的差异仅在于保守取代。如下所述, 两条核酸序列基本上相同的另一标志是这两个分子能够在严格条件下互相杂交。

[0029] 在本发明的衣壳蛋白或线状病毒的文本中, 术语“基本上相似”表示在 10-20 个氨基酸比较窗口中, 多肽包括与参考序列具有至少 90%、优选至少 95% 序列相同性的序列。通过比较窗口中比较两条最优比对的序列来确定序列相同性的百分比, 其中为了使两条序列进行最优比对, 当与参考序列 (其并不包含添加或缺失) 进行比较时, 多核苷酸序列在比较窗口中的部分可以包含添加或缺失 (即, 间隙)。确定位置的数目, 在该位置上两条序列

都具有相同的核酸碱基或氨基酸残基,以此产生匹配位置的数目;将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数,并将结果乘以 100,以此产生序列相同性的百分比,通过上述步骤来计算百分比。

附图说明

[0030] 图 1:腺病毒遗传分类和载体构造。(A) 系统进化树,其显示腺病毒六邻体序列的关系。标示不同的亚类 A-F,并且人腺病毒血清型 26 和 35 高亮显示。该进化树使用 ClustalX 包 (Larkin et al., 2007) 的邻近-连接方法构建并用 Phylip Phylogeny Inference 包版本 3.68 作图。置信值在内部分支中表示,是 1000 次引导 (bootstrap) 的百分数。(B) 重组 Ad26 和重组 Ad35 载体基因组的示意图。两个载体都具有完整的 E1 缺失,并包含表达盒,其含有 CMV 启动子控制下的 EBOV 糖蛋白基因。在 E3 区进行进一步的缺失,并且相应的 E4orf6 序列被 Ad5E4orf6 序列所替代,以促进这些疫苗载体在诸如 PER C6® 细胞的 Ad5E1 互补细胞系中复制。

[0031] 图 2:rAd35-GP (使用 Ad35BSU. Ebo. GP (Z) FL. wt) 疫苗诱导的免疫应答和 EBOV 攻毒。(A) rAd35-GP 接种 Ad5-天然(naïve) (灰色柱) 和 Ad5-免疫 (黑色柱) 的食蟹猕猴 (cynomolgus macaque),接种后 3 周,用 ELISA 测定的血浆样品中抗-EBOV GP IgG 的量。EC90 抗体效价的测定方法如“方法”中所描述。(B, C) 对于 IL-2 (CD4) 或 TNF- α (CD8),通过 ICS 在记忆细胞亚群中计数抗原特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞应答的频率,并且在 PBMC 疫苗接种后 3 周的刺激后通过流式细胞进行分析。(D) 用 1000PFU ZEBOV 对 rAd35-GP 接种的 (蓝色, Ad5-天然;红色, Ad5-免疫) 和对照猕猴 (黑色) 进行感染性攻毒之后血浆 AST 肝酶水平。

[0032] 图 3:rAd35-GP 在猕猴中 (使用 Ad35BSU. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad35BSU. Ebo. GP (S/G) FL) 诱导的免疫应答的剂量应答。(A) 用每种 rAd35-GP 载体 (Ad35BSU. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad35BSU. Ebo. GP (S/G) FL) 的 10^{10} 或 10^{11} 个病毒颗粒接种后 3 周,从猕猴获得的血浆中 GP-特异性 ELISA IgG 抗体效价 (EC90)。(B, C) 抗原特异性的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞频率,如图 2 中的 ICS 来评价。灰色柱, 10^{10} 个病毒颗粒 rAd35-GP;黑色柱, 10^{11} 个病毒颗粒 rAd35-GP。(D, E) 用 1000PFU ZEBOV 攻毒后的血浆 AST 肝酶水平。蓝色, 10^{10} 个 rAd35-GP 病毒颗粒;红色, 10^{11} 个 rAd35-GP 病毒颗粒,以及黑色,对照。

[0033] 图 4:rAd26-GP 载体在食蟹猕猴中 (使用 Ad26. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G) FL. wt) 诱导抗原特异性抗体和 T 淋巴细胞应答的能力。(A) ELISA IgG 抗体效价 (EC90),以及 (B, C) GP-特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的频率,(D) 显示两个独立的研究中食蟹猕猴个体的血浆 AST 肝酶。研究 1 对象接受疫苗的剂量为每种 rAd26-GP 载体 (Ad26. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G) FL. wt) 10^{10} 或 10^{11} 个 rAd26-GP 病毒颗粒,研究 2 对象接受疫苗的剂量为每种 rAd26-GP 载体 (Ad26. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G) FL. wt) 10^{12} 个病毒颗粒。

[0034] 图 5:rAd26-GP 接种的猕猴 (利用 Ad26. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G) FL. wt) 的 Kaplan-Meier 生存曲线。在两个独立的攻毒实验中,用 1000PFU ZEBOV 感染未接种对照和 rAd26-GP 接种 4 周后的动物,如图 4 所述。小图 A:黑线显示未接种的对象,深蓝色线显示 Ad26 接种的对象,标示了接种剂量。小图 B:示出一组接种 rAd-35 的对象 (淡蓝

色)与剂量为每种 rAd26-GP 载体 (Ad26. Ebo. GP (Z)FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G)FL. wt) 10^{11} 个病毒颗粒的 Ad26 之间的效力比较。小图 C:历史上的 Ad5- 接种的猕猴 (红色) 的生存与用每种 rAd26-GP 载体 (Ad26. Ebo. GP (Z)FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G)FL. wt) 10^{12} 个病毒颗粒接种的对象的比较。

[0035] 图 6 :rAd26-GP/rAd35-GP 接种之后,初免和加强免疫应答之间的比较 (使用 Ad26. Ebo. GP (Z)FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP (S/G)FL. wt, 然后使用 Ad35BSU. Ebo. GP (Z)FL. wt 和 Ad35BSU. Ebo. GP (S/G)FL. wt)。(A)rAd35-GP 接种的 Ad5- 天然 (灰色柱) 和 Ad5- 免疫 (黑色柱) 的食蟹猕猴,接种后 3 周,用 ELISA 测定的血浆样品中抗 -EBOV GP IgG 的量。EC90 抗体效价的测定方法如“方法”中所描述。(B,C) 对于 IL-2(CD4) 或 TNF- α (CD8),通过 ICS 在记忆细胞亚群中计数抗原特异性 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞应答的频率,并且在 PBMC 疫苗接种后 3 周的刺激后通过流式细胞进行分析。(D,E)EBOV 攻毒结果。用 1000PFU ZEBOV 对 rAd26-GP/rAd35-GP 接种的猕猴进行感染性攻毒后的 (D) 血浆 AST 肝酶水平和 (E)Kaplan-Meier 存活曲线 (蓝色, rAd26-GP/rAd35-GP ;红色, Ad5-GP ;黑色,未接种的对照)。

具体实施方式

[0036] 本发明基于,至少部分基于下述发现 :rAd35 和 rAd26 载体单独接种以及异源性初免 - 加强组合时产生针对线状病毒感染的保护性免疫应答。特别地,本发明提供的证据表明异源性初免 - 加强组合 (特别是 Ad26 初免,然后 Ad35 加强) 令人惊讶地产生有效的保护性免疫应答。在本发明的时候还不能预测这些初免 - 加强组合令人惊讶的有效性。因此,本发明提供表达线状病毒抗原的重组腺病毒载体 (rAd35 或 rAd26)。所述腺病毒载体可以配制成疫苗形式以单独或在初免 - 加强组合中诱导针对线状病毒的保护性免疫。

[0037] 线状病毒抗原

[0038] 埃博拉病毒和与其在遗传上相关的马尔堡病毒是与在北美洲、欧洲和非洲的人和灵长类中爆发的高致死性出血热有关的线状病毒 (Peters, C. J. et al. in:Fields Virology, eds. Fields, B. N. et al. 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Peters, C. J. et al. 1994Seminar Virol5:147-154)。尽管已经定义了几种亚型,但是这些病毒的遗传结构相似,各自包含 7 个线性排列的基因。在这些病毒蛋白中,包膜糖蛋白以两种交替形式存在,50-70 千道尔顿 (kDa) 的分泌蛋白 (sGP) 和 130kDa 的跨膜糖蛋白,其通过 RNA 编辑产生,介导病毒的进入 (Peters, C. J. et al. in:Fields Virology, eds. Fields, B. N. et al. 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996; Sanchez, A. et al. 1996PNAS USA93:3602-3607)。其他的结构基因产物包括核蛋白 (NP)、基质蛋白 VP24 和 VP40、推定非结构蛋白 VP30 和 VP35 以及病毒聚合酶 (综述于 Peters, C. J. et al. in:Fields Virology, eds. Fields, B. N. et al. 1161-1176, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996)。

[0039] 核酸分子可以编码任何线状病毒种的结构基因产物。埃博拉病毒有 5 个种 : Zaire (模式种,本文中也称为 ZEBOV)、Sudan (本文中也称为 SEBOV)、Reston、Bundibugyo 和 Ivory Coast。马尔堡病毒则只有一个种 (本文中也称为 MARV)。

[0040] 本发明的载体中所表达的特定抗原并不是本发明的关键方面。可以用本发明的腺病毒载体表达的蛋白包括各种各样的线状病毒抗原的抗原决定簇。在典型和优选的实施方案中,本发明的载体包含编码病毒糖蛋白 (GP) 的跨膜形式的核酸。在其他实施方案中,本

发明的载体可以编码病毒糖蛋白 (SGP) 的分泌形式,或病毒核蛋白 (NP)。

[0041] 本领域技术人员应当理解,编码线状病毒抗原性蛋白的核酸可以被修饰,例如,本文所列举的核酸分子可以被突变,只要修饰的表达蛋白能够引发针对病原体或疾病的免疫应答。因此,本文所用的术语“线状病毒抗原性蛋白”是指包括上述线状病毒蛋白的至少一个抗原决定簇的蛋白。该术语涵盖线状病毒抗原(即,线状病毒的基因产物),以及包含一个或多个线状病毒抗原决定簇的重组蛋白。

[0042] 在一些具体实施方案中,可以对蛋白进行突变以减少其对细胞的毒性(见,例如 WO/2006/037038)。本发明还包括疫苗,所述疫苗包含核酸分子的组合。例如但不限于编码 Zaire、Sudan 和 Ivory Coast 埃博拉病毒株的 GP、SGP 和 NP 的核酸分子可以通过任意组合而组合在一个疫苗组合物中。

[0043] 腺病毒载体

[0044] 如上文所述,暴露于特定腺病毒会导致针对特定腺病毒血清型的免疫应答,这可以影响腺病毒疫苗的有效性。本发明提供包含衣壳蛋白的腺病毒载体,所述衣壳蛋白来自两个罕见的血清型:Ad26 和 Ad35。在典型的实施方案中,所述载体是 rAd26 或 rAd35 病毒。

[0045] 因此,本发明的载体包含 Ad26 或 Ad35 衣壳蛋白(例如,纤维蛋白、五邻体蛋白或六邻体蛋白)。本领域技术人员应当理解,无需将整个 Ad26 或 Ad35 衣壳蛋白用于本发明的载体。因此,本发明的载体中可以使用包含 Ad26 或 Ad35 衣壳蛋白的至少一部分的嵌合衣壳蛋白。本发明的载体还可以包含衣壳蛋白,其中纤维蛋白、五邻体蛋白和六邻体蛋白各自源自不同的血清型,只要至少一种衣壳蛋白源自 Ad26 或 Ad35。在优选实施方案中,纤维蛋白、五邻体蛋白和六邻体蛋白各自源自 Ad26 或者各自源自 Ad35。

[0046] 本领域技术人员应当理解,源自多种血清型的元件可以组合在一个重组腺病毒载体中。因此,可以产生嵌合腺病毒,其组合来自不同血清型的期望性质。因此,在一些实施方案中,本发明的嵌合腺病毒可以组合不存在 Ad26 和 Ad35 血清型的预先存在的免疫性与诸如温度稳定性、组装、锚定、生产率、重定向或改进的感染性、DNA 在靶细胞中的稳定性等特征。

[0047] 在某些实施方案中,本发明的重组腺病毒载体主要或全部源自 Ad35 或 Ad26(即,载体是 rAd35 或 rAd26)。在一些实施方案中,腺病毒是复制缺陷型的,例如由于其含有基因组 E1 区中的缺失。对于本发明的源自 Ad26 或 Ad35 的腺病毒载体,通常可以将腺病毒的 E4-*orf6* 编码序列与腺病毒人亚族 C(例如 Ad5)的 E4-*orf6* 交换。这使得此类腺病毒在已知的表达 Ad5 的 E1 基因的互补细胞系中增殖,例如 293 细胞、PER.C6 细胞等(见,例如 Havenga et al, 2006, J Gen Virol 87:2135-43; WO03/104467)。在某些实施方案中,腺病毒是血清型 35 的人腺病毒,其具有 E1 区中的缺失,编码抗原的核酸已经被克隆入该区域,并且具有 Ad5 的 E4_{orf6} 区。在某些实施方案中,腺病毒是血清型 26 的人腺病毒,其具有 E1 区中的缺失,编码抗原的核酸已经被克隆入该区域,并且具有 Ad5 的 E4_{orf6} 区。对于 Ad35 腺病毒,通常保留腺病毒中 E1B55K 开放阅读框的 3' 端,例如直接在 pIX 开放阅读框上游的 166bp,或者包括这个区域的片段,例如直接在 pIX 起始密码子上游的 243bp 片段,由 5' 端的 Bsu36I 限制性位点标记,由于 pIX 基因的启动子部分地残留在该区域中,因此这会提高腺病毒的稳定性(见,例如 Havenga et al, 2006, 上文; WO2004/001032)。

[0048] 制备重组腺病毒载体的方法在本领域中是众所周知的。rAd26 载体的制备描述在

下述文献中,例如 W02007/104792 和 Abbink et al., (2007) Virol81(9):4654-63。Ad26 的示例性基因组序列可在 GenBank 登录号 EF153474 以及 W02007/104792 的 SEQ ID NO:1 中找到。rAd35 载体的制备描述在下述文献中,例如美国专利 No. 7, 270, 811 和 Vogels et al., (2003) J Virol77(15):8263-71。Ad35 的示例性基因组序列可在 GenBank 登录号 AC_000019 中找到。

[0049] 通常,本发明的载体利用包含整个重组腺病毒基因组的核酸来产生(例如,质粒、粘粒或杆状病毒载体)。因此,本发明还提供编码本发明的腺病毒载体的分离的核酸分子。本发明的核酸分子可以通过克隆或合成生产获得的 RNA 形式或 DNA 形式。DNA 可以是双链或单链的。

[0050] 本发明的腺病毒载体通常是复制缺陷型的。在这些实施方案中,通过缺失或失活病毒的复制关键区域如 E1 区来使得病毒复制缺陷。这些区域可以基本上被缺失或失活,例如,通过插入所关注的基因(通常连接到启动子上)。在一些实施方案中,本发明的载体可以包含其他区域中的缺失,例如 E2、E3 或 E4 区,或者连接到启动子的异源基因的插入。对于 E2- 和 / 或 E4- 突变的腺病毒,通常使用 E2- 和 / 或 E4 互补细胞系来生产重组腺病毒。腺病毒 E3 区中的突变不需要通过细胞系来补充,因为 E3 并不是复制所必需的。

[0051] 通常使用包装细胞系来生产足量的本发明的腺病毒载体。包装细胞是包含在复制缺陷型载体中被缺失或失活的基因的细胞,因此允许病毒在细胞中复制。合适的细胞系包括例如 PER.C6、911、293 和 E1A549。

[0052] 如上所述,各种各样的线状病毒抗原都可以在本发明的载体中表达。如果需要,可以将编码线状病毒抗原性蛋白的异源基因密码子优化以确保在接受治疗的宿主中(例如,人)正常表达。密码子优化是本领域中广泛应用的技术。异源基因一般克隆到腺病毒基因组的 E1 和 / 或 E3 区。

[0053] 异源线状病毒基因可以在(即,可操作地连接到)腺病毒衍生的启动子(例如,主晚期启动子)或者可以在异源启动子的控制下。合适的异源启动子的实例包括 CMV 启动子和 RSV 启动子。优选地,启动子位于表达盒内所关注的异源基因的上游。

[0054] 如上所述,本发明的腺病毒载体包含本领域技术人员公知的各种各样的线状病毒抗原。表 1 提供了本发明的示例性载体的概要。

[0055] 表 1:

[0056]

载体名称	源质粒插入的 VRC 数目	插入序列	描述
Ad5.Ebo.GP(Z)FL.wt	6001	SEQ ID NO: 1	ZEBOV GP 野生型
Ad5.Ebo.GP(S/G)FL.wt	6610	SEQ ID NO: 3	SEBOV GP 野生型
Ad5.Mar.GP(A)FL	6712	SEQ ID NO: 4	MARV Angola 密码子优化
Ad26.Ebo.GP(Z)FL.wt	6001	SEQ ID NO: 1	ZEBOV GP 野生型
Ad26.Ebo.GP(S/G)FL.wt	6610	SEQ ID NO: 3	SEBOV GP 野生型
Ad26.Mar.GP(A)FL	6712	SEQ ID NO: 4	MARV Angola 密码子优化
Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt	6001	SEQ ID NO: 1	ZEBOV GP 野生型
Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL	6611	SEQ ID NO: 2	SEBOV GP 密码子优化
Ad35BSU.Mar.GP(A)FL	6712	SEQ ID NO: 4	MARV Angola 密码子优化

[0057] 免疫原性组合物

[0058] 可以根据本领域公知的方法将纯化或部分纯化的本发明腺病毒载体配制成疫苗（也称为“免疫原性组合物”）。这样的组合物可以包含佐剂以增强免疫应答。制剂中各组分最佳比例可由本领域技术人员根据公知技术确定。

[0059] 免疫原性组合物的制备和使用是本领域技术人员公知的。液体药物组合物一般含有液体载体如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。还可以含有生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖类溶液，或者二元醇如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0060] 所述组合物适合于单独给药或系列给药。当系列给药时，首次（初免）给药后进行接种以增强免疫应答，通常称为加强接种。本发明的组合物可以用作加强组合物，其使用各种不同的初免组合物通过抗原进行初免，或者作为初免组合物。因此，本发明的一方面提供一种在个体中初次诱导和 / 或加强对抗原的免疫应答的方法。例如，在一些优选实施方案中，用本发明的一种腺病毒载体（例如，rAd26）进行初免给药，然后用第二腺病毒载体（例如，rAd35）进行加强接种。

[0061] 加强组合物的给药时间本领域技术人员公知的。通常在初免组合物给药后数周或数月后给药加强组合物，例如，约 2-3 周或 4 周、或 8 周、16 周或 20 周、24 周、或 28 周、或 32

周,或者一至两年。

[0062] 本发明的组合物可以包含其他线状病毒抗原,或者初免或加强接种可以包含其他抗原。与本发明的载体组合使用的其他抗原并不是本发明的关键点,并且可以是例如线状病毒抗原、表达它们的核酸、病毒样颗粒(VLP)或现有技术的病毒载体。此类病毒载体包括,例如其他腺病毒载体、牛痘病毒载体、禽类痘病毒(avipox)载体如鸟痘或金丝雀痘、疱疹病毒载体、水泡性口炎病毒载体或甲病毒载体。本领域技术人员应当理解,本发明的免疫原性组合物可以包含多种抗原和载体。

[0063] 各自的初免和加强组合物(但是,使用许多加强组合物)中的抗原不必相同,但是应当共享抗原决定簇。

[0064] 如上所述,本发明的免疫原性组合物可以包含佐剂。根据本发明,适合于共给药的佐剂应当是那些潜在安全,耐受性好并且在人中有有效的佐剂,包括 QS-21、Detox-PC、MPL-SE、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjuver、PG-026、GSK-I、GcMAF、B-aletine、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、倍他非丁、明矾和 MF59。

[0065] 可给药的其他佐剂包括凝集素、生长因子、细胞因子和淋巴因子,如 α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生生长因子(PDGF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(gMCSF)、肿瘤坏死因子(TNF)、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 和 IL-12 或它们的编码核酸。

[0066] 如上所述,本发明的组合物可以包含药学可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员公知的其他材料。这些材料应当是无毒的,并且不会干扰活性成分的有效性。载体或其他材料的确切性质可以取决于给药途径,例如口服、静脉内、皮肤或皮下、粘膜内(例如,肠)、鼻内、肌肉内或腹膜内途径。一般通过肌肉内给药。

[0067] 免疫原性组合物的肌肉内给药可以利用针注射腺病毒载体悬浮液来实现。另一种方式是使用无针注射装置来给药组合物(例如,使用 Biojector(TM))或包含疫苗的冻干粉末。

[0068] 对于静脉内、皮肤或皮下注射,或者在病患处注射,腺病毒载体应当为肠胃外可接受的水溶液形式,其是无热原的并具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域技术人员可以利用,例如等渗媒介物如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸林格注射液来很好地制备合适的溶液。也可以根据需要包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。也可以使用缓释制剂。

[0069] 通常情况下,给药具有预防性目的以在感染或症状发展前产生针对线状病毒抗原的免疫应答。根据本发明,可以治疗或预防的疾病和病症包括那些免疫应答可以发挥保护性或治疗性作用的疾病和病症。在其他实施方案中,可以给药腺病毒载体以用于暴露后预防。

[0070] 向对象给药包含腺病毒载体的免疫原性组合物,以在所述对象中产生抗线状病毒免疫应答。足以诱导可检测的免疫应答的组合物的量定义为“免疫有效剂量”。如下所示,本发明的免疫原性组合物诱导体液和细胞介导的免疫应答。在典型的实施方案中,免疫应答是保护性免疫应答。

[0071] 给药的 actual 给药量、频率和时间过程取决于接受治疗的性质和严重程度。治疗处方如剂量的决定等由全科医师和其他医生或者兽医的情况下兽医的职责范围,通常

要考虑到待治疗的病症、个体患者的疾病状况、递送位点、给药方法以及医生公知的其他因素。上述技术和操作的实例记载于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980。

[0072] 生产腺病毒载体以及将此类颗粒任选配制成组合物后,可以向个体给药腺病毒载体,特别是人或其他灵长类。可以向人或其他哺乳动物给药,例如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、绵羊、山羊、猪、马、牛、驴、猴子、狗或猫。向非人哺乳动物递送不需要以治疗为目的,而是可以用于实验内容,例如用于研究针对腺病毒载体的免疫应答的机制。

[0073] 在一个示例性方案中,给药腺病毒载体(例如,肌肉内)的范围是约 $100 \mu\text{l}$ –约 10ml 含有浓度为约 10^4 – 10^{12} 个病毒颗粒/ml 的盐水溶液。向人对象给药腺病毒载体的量通常为一次给药约 10^9 –约 10^{12} 个病毒颗粒(vp),更典型地约 10^{10} –约 10^{12} vp。如上所述,可进行初始接种,然后进行加强接种。如果需要,组合物可以在试剂盒、包或配药器中呈现,其可以包含一个或多个含有活性成分的单位剂型。试剂盒,例如可以包含金属或塑料箔,例如泡眼 (blister) 包装。试剂盒、包或配药器可以配有给药说明。

[0074] 根据待治疗的疾病状况,本发明的组合物可单独给药或与其他治疗组合,同时进行或顺序地进行。

[0075] 实施例

[0076] 提供下面的实施例来详细说明而非限制所要求保护的发明

[0077] 取决于需要即时免疫性还是长期免疫性,无论是单次接种或是初免–加强免疫都有不同的优势,当优化免疫方案时,都必需考虑到这些优势。EBOV 和其他线状病毒倾向于突然发生,并迅速地在医疗设施匮乏的人群中蔓延。因此,在这些情况下,短疫苗方案是期望的。出于这个原因,在非人灵长类中已经开发出用包含 EBOV 糖蛋白 (GP) 和核蛋白 (NP) 基因的 rAd5 载体单次接种 (Sullivan, et al., 2006)。据证实,这些疫苗在一个月内引发强烈的免疫应答 (Sullivan, et al., 2003),这可能是由于插入物 (insert) 的高水平表达以及 Ad5 对于树状细胞的趋向性。另一方面,长期保护性免疫可能需要初免–加强疫苗方案,其包含两个或更多个能够诱导长期 T 细胞记忆的给药。因此,我们设计了一系列实验来测试使用 rAd35 和 rAd26 载体的单独接种和初免–加强免疫组合的免疫原性和效能,并在这里呈现这些研究的结果。

[0078] 材料和方法

[0079] 产生 rAd 埃博拉疫苗

[0080] 如之前所述的方法 (Abbink, et al., 2007),构建、生长和纯化表达 EBOV GP 的低血清阳性率 E1/E3–缺失的 rAd26 和 rAd35 疫苗载体。用同样的方法构建、生长和纯化不表达 EBOV GP 的 Ad5 载体,并且在每个实验所示的选定动物中,将该载体用于诱导对 Ad5 的免疫性。将跨越 Zaire (SEQ ID NO:1) 和 Sudan/Gulu (SEQ ID NO:2) 种的开放阅读框的 EBOV GP 插入物克隆入质粒,其处于人 CMV 启动子和 SV40 多聚腺苷酸化序列的转录控制下,所述质粒包含 Ad 基因组的左侧部分,包括左侧 ITR 和包装信号。将该质粒与含有剩余 Ad 序列 (E3–缺失) 的粘粒共转染 PER.C6[®] 细胞,产生 E1/E3–缺失复制缺陷型 Ad26 或 Ad35 疫苗载体。为了促进 rAd26 和 rAd35 载体在 PER.C6[®] 细胞中的复制,天然 E4orf6 区被 Ad5E4orf6 序列替代 (Havenga, et al., 2006)。噬斑纯化 rAd 病毒,将其中的一个噬斑扩大培养至约

2. 4L 的生产规模。用两步氯化铯梯度超速离心法来纯化 rAd EBOV 载体。将纯化的 rAd EBOV 按单次使用等份保存在低于 -65°C 下。测量 260nm 处的光密度来测定病毒颗粒效价 (Maizel, et al., 1968 Virology 36(1):115-25)。用 911 细胞, 通过 TCID₅₀ 来评价感染性 (Fallaux, et al., (1996) Hum Gene Ther 7(2):215-22)。通过感染 A549 细胞然后用蛋白印迹分析培养裂解物来评价腺病毒介导的 EBOV GP 表达。通过 PCR 确认纯化的载体, 用 DNA 测序检查整个转基因区域, 包括侧翼序列。

[0081] 系统发育分析

[0082] 用全长腺病毒六邻体氨基酸序列构建系统树。用 Clustal X 程序 (Larkin, et al., (2007) Bioinformatics 23(21):2947-8) 对氨基酸序列进行比对, 并用 Clustal X 邻近连接方法构建系统树, 并且该系统发育树进行 1000 次自引导。使用 Phylip Phylogeny Inference 包版本 3.68 的 Drawtree 程序绘制和可视化系统树。

[0083] 动物攻毒研究和安全性

[0084] 所实施的动物实验完全符合所有相关的联邦指南和 NIH 政策。用于所有研究中的食蟹猕猴 (*Macaca fascicularis*) 为 3-5 岁龄, 体重 2-3kg, 从 Covance 中获得。将猴子单独喂养, 并且按照实验动物的保养和使用指南 (DHEW 编号 NIH86-23) 中的建议规律地给予充分的供给。在采血或接种前用氯胺酮麻醉动物。这项研究的每个疫苗组包含 3 只食蟹猕猴, 并且每个对照组包含一只猕猴。EBOV 接种后四周, 将动物转移至 Maximum Containment 实验室 (BSL-4) 以进行感染, 通过肌肉内途径将 1000PFU 靶剂量的 Zaire EBOV 递送至后大腿。ZEBOV 攻毒储备物从 1995 年在前扎伊尔 (Zaire) 爆发的人致死病例制备的。将动物保留在那里直至研究结束。而在 BSL-4 设施中, 对猴子每天至少进行一次喂养和检查。

[0085] 在 USAMRIID 的 BSL-4 生物控制室中所实施的动物研究经过 USAMRIID 机构的动物护理和使用委员会批准。所实施的动物研究符合动物福利法和其他有关动物和动物实验的联邦法规和规章的规定, 并坚持国家研究理事会 (National Research Council) 1996 年的实验动物的护理和使用指南所规定的原则。所使用的设施是完全由实验室动物护理国际评估和认证协会所认可。

[0086] 动物免疫

[0087] 对象接受肌肉内接种的部位是双侧三角肌, 根据每个实验中所指明的剂量和载体用针和注射器进行接种。如每个实验中所示, 用 10^{11} PFU 的空 Ad5 载体对选定的动物进行预免疫, 以诱导 Ad5 免疫性。在 EBOV 接种之前, 在这些动物中建立 Ad5ELISA 抗体效价。

[0088] 抗 EBOV GP IgG ELISA

[0089] 用 100 μl 抗原 / 孔 包被 聚氯乙 烯 ELISA 板 (Dynatech, Vienna, VA 或 Nunc, Rochester, NY), 并且 4°C 下温育过夜。后续温育在室温下进行。通过磷酸钙介导的瞬时转染的 293T 细胞来生产跨膜缺失的 EBOV GP (EBOV GP ΔTM), 以其充当抗原。抗原包被后, 用含有吐温 20 的 PBS 洗涤平板 6 次。将测试血清稀释为 7 个系列浓度, 从 1:50 至 1:50000, 并且添加到抗原包被的孔中, 保持 60 分钟。将平板洗涤 6 次, 然后与检测抗体、偶联至辣根过氧化物的山羊抗 - 人 IgG (H+L; Chemicon/Millipore, Billerica, MA) 一起温育。将 Sigma 快速邻苯二胺二盐酸盐 (Sigma, St. Louis, MO) 底物添加到孔中, 并测定光密度 (450nm)。每次分析时都运行每个动物的接种前血清样本。每次分析时都运行来自具有已知 Zaire EBOV GP IgG 应答的单个动物的阳性对照血清样品。扣除背景的 ELISA 效价表

示为 EC90, 倒数的光学密度值, 它代表抗原结合减少 90% 的稀释度。

[0090] 细胞内细胞因子染色

[0091] 将来自食蟹猕猴的全血样品在 Ficoll 上进行密度梯度离心以分离外周血单核细胞 (PMBC)。于 37℃ 下, 在 100 μ l 含有 10% 热失活胎牛血清的 RPMI 培养基中, 用抗 CD-28 (克隆 CD28.2) 和抗 CD49d (克隆 L25) 抗体 (BD Biosciences)、布雷菲德菌素 A (Brefeldin-A) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 以及 DMSO 或者跨越整个 Zaire EBOV GP 开放阅读框的肽混合物 (pool) 将约 1×10^6 个细胞刺激 6 小时。所述肽以对于每个肽 2.5 μ g/ml 的终浓度在新鲜灭菌的 DMSO 中重建的, 是 11 个氨基酸重叠的 15 聚体 (mer)。对于每个样品等分物, 将等份用 SEB 刺激作为阳性对照。6 小时刺激之后, 用针对谱系标志物的抗体混合物将 PMBC 染色 (CD3-Cy7-APC, 克隆 SP34-2 (BD Biosciences)、CD4-QD605 克隆 M-T477 (BD Biosciences)、CD8-TRPE 克隆 RPA-T8、CD95Cy5-PE, 克隆 DX2 (BD Biosciences)、CD45RA QD655, 克隆 5H3), 在室温下保持 20 分钟。根据之前描述 (Koup et al. 2010, Priming Immunization with DNA Augments Immunogenicity of Recombinant Adenoviral Vectors for Both HIV-1 Specific Antibody and T-Cell Responses. PLoS One 5(2):e9015. doi:10.1371/journal.pone.0009015) 的标准步骤将 CD45RA QD655 和 CD8-TRPE 抗体偶联。洗涤 2 次后, 用 Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) 固定和透化细胞, 然后用针对细胞因子 TNF α -APC 的抗体克隆 MAb11 (BD Biosciences) 和 IL-2PE 的克隆 MQ17H12 (BD Biosciences) 进行染色。包含成活力染料 ViViD (Invitrogen) 以允许区分活细胞和死细胞 (Perfetto, et al., (2006) J Immunol Methods 313(1-2):199-208)。用 LSR II 细胞仪 (BD Biosciences) 获取样品, 收集高达 1000000 个事件, 并且用 FlowJo 9.1 和 SPICE 5.0 软件 (Tree Star) 进行分析。细胞因子阳性细胞定义为 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞记忆亚群内的百分比。记忆亚群定义为 CD45RA[±]/CD95⁺ 或 CD28[±]/CD95⁺。在后一种情况中, 使用 CD28Alexa488 (克隆 28.2, BioLegend) 来代替未偶联的 CD28mAb 进行刺激。

[0092] 血清生物化学

[0093] 对于攻毒研究, 在 Zaire EBOV 感染后的第 0、3、6、10、14 和 28 天从 NHP 采集血液。将血液样品收集至含 EDTA 的管中, 利用基于激光的血液分析仪 (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) 测定白细胞总数计数、白细胞分类、红细胞计数、血小板计数、血细胞比容值、总血红蛋白、平均细胞体积、平均血细胞 (corpuscular) 体积以及平均红细胞血红蛋白浓度。用 Piccolo Point-Of-Care 血液分析仪 (Abaxis, Sunnyvale, CA, USA) 检测血液中天冬氨酸转氨酶 (AST) 的浓度。

[0094] EBOV 的检测

[0095] 通过在 Vero 细胞上进行噬斑分析来实施病毒效价检测。简单地说, 将 10 倍递增稀释的血浆样品吸附在 Vero 单层上, 做两个孔的重复 (每孔 0.2ml), 因此检测的极限是 25pfu/ml。

[0096] 统计学

[0097] 使用 GraphPad Prism 软件中的双尾 T 检验来对抗 GP ELISA IgG 效价和 T 细胞记忆亚群产生的胞内细胞因子进行比较。

[0098] 结果

[0099] 腺病毒系统发生和载体构建

[0100] EBOV 的 rAd5 基因疫苗在猕猴体内提供了强效的保护性免疫,并且在人临床试验中也已经证实是安全的以及具有免疫原性 (Asmuth, et al.; Kibuuka, et al.; Harro, et al., 2009)。猕猴和人中的研究已经表明,载体引导的预先存在的免疫性会限制基于病毒载体的疫苗的效力 (McCoy, et al., 2007; Buchbinder, et al., 2008)。由于血清阳性率数据表明全世界范围内的大部分人群都经历过 Ad5 自然感染,因此我们对用作疫苗载体的其他腺病毒进行了评价 (图 1A)。Ad35, B 组和 Ad26, D 组与 rAd5, 组 C 是遗传隔离的,所以我们假设源自这些血清型的疫苗载体在灵长类中对于 Ad5 免疫性是较不敏感的。尽管 Ad35 和 Ad26 载体使用的受体与 Ad5 并不相同,但是它们证实源自单核细胞的树状细胞的有效转导,并能够避免小鼠中的 Ad5 免疫性。因此,将来自 EBOV 的 Zaire 或 Sudan/Gulu 种的 GP 插入物克隆入 rAd35 和 rAd26 载体的 E1 区,并处于人 CMV 启动子的转录控制下 (图 1B)。两个载体基因组在 E1 基因中都是缺失的,以使得它们是复制缺陷型的并降低其在接种对象中的潜在重组。

[0101] rAd35 接种以及在猕猴中诱导免疫应答

[0102] 初始的研究用编码 Zaire 埃博拉病毒的 GP (ZEBOV), GP (Z) 的单一 EBOV 种疫苗来实施,以测试 rAd35 载体在 Ad5 天然的猕猴中诱导免疫应答的能力,并且还评价在预先存在对 Ad5 的免疫性时的载体效力。将六只食蟹猕猴 (三只是 Ad5- 天然的并且三只是 Ad5- 免疫的) 每只用 10^{10} 个 rAd35-GP (Z) (Ad35BSU. Ebo. GP (Z) FL. wt) 颗粒用针注射进行肌肉内接种。接种后三周,评价获得自个体对象的外周血样品中的抗原-特异性抗体和 T- 细胞应答。在所有对象中均诱导了通过 ELISA 评价的针对 EBOV-GP (Z) 的抗体,这证实 rAd35-GP (Z) 载体成功介导了靶细胞的体内转导以及有效的抗原呈递 (图 2A)。Ad5- 天然和 Ad5- 免疫的对象产生的血清抗体效价范围是约 1:700 至 1:3000。这些抗体水平在对含有 GP (Z) 插入物的基于 Ad5 的疫苗所观察到的范围内,并且超过最小值 (1:500),其与这个猕猴 Ad 疫苗模型中针对 EBOV 感染的免疫保护 (Sullivan, 2009) 相关。虽然在所有疫苗中都诱导了明显的抗体效价,然而没有对象超过阈值效价 (约 1:3500),其预示在猕猴中给药 Ad5-GP 疫苗载体后产生 100% 的保护。然而,值得注意的是,Ad5- 天然与 Ad5- 免疫对象抗体效价的比较表明,这些组中引发的平均效价没有显著差异 (分别是 1:1600 比 1:1800),这意味着在之前暴露于 Ad5 的对象中, rAd35 载体是有效的疫苗。

[0103] 用跨越 EBOV GP (Z) 开放阅读框的重叠肽刺激对象 PMBC 后,对 TNF- α (CD8⁺) 或 IL-2 (CD4⁺) 进行胞内细胞因子染色 (ICS) 以评价细胞免疫应答。利用 CD45RA 和 CD95 对淋巴细胞进行表面染色以评价 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的记忆亚群中的抗原特异性应答 (图 2B-C)。如对抗体应答所观察到的,用 rAd35 载体接种的猕猴产生针对 EBOV-GP 的细胞免疫,并且抗原特异性 T- 细胞的频率不受 Ad5 免疫状态的影响。对象的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞的细胞应答的量级等级次序与抗体应答相似,尽管一个对象 V3 的抗原-特异性 T 细胞的频率低于可检测水平。之前在猕猴中的研究显示,基于 rAd5 的疫苗载体诱导的 CD8⁺ T 细胞频率高于 CD4⁺ 应答。在本研究中, rAd35- 接种的对象以相似的频率产生 GP- 特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞。然而,考虑到测试的对象数量相对较少,可能没有显示出差异 (如果存在的话)。所有这些结果表明, rAd35-GP 在食蟹猕猴中是有免疫原性的,并且在具有预先存在的对 Ad5 的免疫性的对象中,诱导抗原特异性体液和细胞介导的免疫应答的载体效力并没有降低。

[0104] 用 ZEBOV 对 rAd35 接种的猕猴进行攻毒

[0105] 我们接着测试了 rAd35-GP 的接种是否提供针对高剂量 ZEBOV 感染性攻毒的保护。在对上面所示的免疫应答的评价一周后,通过肌肉内注射将 6 只 rAd35-GP 接种和 1 只天然的食蟹猕猴暴露于 1000PFU 的 ZEBOV 的 1995Kikwit 种。感染性攻毒后定期测量肝酶,因为这些标志物的上升是猕猴中产生 EBOV 感染的特征。在急性感染期内,每 3-4 天评价天冬氨酸转氨酶 (AST) 的循环水平,通过第 10-14 天 (图 2D),直至 28 天持续 (follow up) 期的最后一天 (未显示)。在所有对象中,感染后的 3 天内血浆 AST 保持基线水平,这意味着紧随感染性 EBOV 攻毒之后,肝功能保持正常。EBOV 暴露之后第 6 天,未接种的对照对象表现出酶水平的 10 倍增加,这意味着在该对象中的活性感染。Ad5-天然 /rAd35-接种组中的两只对象 (V1, V3) 的血液样品也表现出 AST 的急剧上升,而这一组中的第三对象 V2 在恢复 (resolution) 到基线水平之前的单个时间点表现出轻微的上升。类似地,Ad5-免疫 /rAd35-接种组的三只对象中的两只 (V4, V5) 表现出 AST 上升,尽管比未接种的对照低很多,而一只对象 V6 对于这一感染参数保持正常。总体来说,Ad5-天然对象中的 AST 水平高于 Ad5-免疫接种的对象。值得一提的是,对于这个临床观察保持正常的每个对象在其各自的疫苗组中,表现出最高的攻毒前抗原-特异性 CD8⁺和抗体应答。血浆病毒血症水平 (图 2E) 证实所有表现出 AST 上升的动物中的 EBOV 感染。

[0106] 本实验的结果表明,当以 10^{10} 个颗粒 / 对象的剂量给药时, rAd35 具有免疫原性。疫苗产生保护性免疫应答,但是这个剂量和方案对于所有对象的一致性保护是次最优的。在疫苗组中,保护性免疫与最高量级的抗原特异性抗体和 CD8⁺T 细胞应答相关。

[0107] rAd35-GP 诱导保护性免疫的剂量应答效果

[0108] 通常以 10^{10} - 10^{12} 个颗粒的剂量范围向猕猴给药基于 rAd 的载体。之前有关 rAd5-GP 的结果表明 10^{10} 个病毒颗粒是食蟹猕猴针对 EBOV 感染达到 100% 保护的最小剂量 (Sullivan, 2006)。由于上述研究是以这一剂量范围的下限来实施并且没有产生一致的保护,因此当与 rAd5 载体相比时,用 rAd35 载体实现的甚至稍微更低的体内抗原表达可能产生次最优的免疫应答。因此,我们提出给药更高的疫苗剂量能否引发更大程度的免疫保护。本实验中的疫苗还包括表达 Sudan EBOV 种的 GP (S/G) 的 rAd35, 以与包含 Sudan 和 Zaire 种的 GP 的 rAd5 疫苗的历史数据进行有效性比较。在本研究中,用 10^{10} 或 10^{11} 个颗粒的 Ad35BSU. Ebo. GP (Z) FL. wt 和 Ad35BSU. Ebo. GP (S/G) FL 的每一种对食蟹猕猴 (n=3/ 每组) 进行接种,在前面实验中的接种后 3 周测量免疫应答。

[0109] 在所有对象中都产生了 GP- 特异性抗体 (图 3A), 这是预期的结果,因为疫苗剂量等于或高于之前实验中所使用的疫苗剂量。然而,在本实验中,两只用 10^{10} 个颗粒接种的对象 (V8, V9) 中的效价分别是 1:340 和 1:1500, 水平接近或低于之前在 Ad5-GP 接种的对象中观察到的预期保护最小截止点 (Sullivan, et al., 2009)。观察到的最大抗体效价为 1:2900 (对象 V10), 这与图 2 中所示的 rAd35 对象中所观察到的最大效价相同。 10^{11} 剂量组的平均抗体效价更高 (1:1500 比 1:700), 但差异未达到统计学显著 ($p=0.02$)。在较低剂量组中,观察到一个对象的效价接近 rAd5-GP 疫苗的免疫保护截止点 (对象 V11, 1:540)。

[0110] 接种后的三周,两个剂量组中都存在 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞应答。CD4⁺或 CD8⁺T 细胞应答中都没有明显的剂量应答。由于对象中的细胞免疫应答动力学不同,尤其是远系繁殖的动物中,并且应答量度不是随时间而是随抗体水平积累,因此在单一时间点上有时难以捕捉组趋势。在每个个体中,CD4⁺细胞的抗原特异性 T- 细胞频率高于 CD8⁺细胞,但是当与

第一个实验的结果组合时,在这些实验中,对 rAd35-GP 载体诱导的 CD4⁺或 CD8⁺没有占据优势的趋势。

[0111] 在评价免疫应答后一周,通过肌肉内注射将所有 6 只接种的猕猴和 1 只未接种的对象暴露于 1000PFU 的 ZEBOV,观察产生感染的迹象。EBOV 感染的出血表现通常导致感染的猕猴出现面部和四肢的斑丘疹,对象通常也会减少食物的摄入和脱水。对于两只未接种的对象,最早的症状在 EBOV 暴露后第 6 天出现,每只动物在第 7 天时表现出全部的一系列症状(数据未显示)。表 2 显示两个 rAd35 研究的感染性攻毒的结果以及未存活者的死亡天数。未接种的对象在第 9 和 8 天时死于感染的致死作用(分别是实验 1 和 2)。死亡的接种的对象与对照未接种的对象类似,只不过它们的平均存活比对照长两天,这表明疫苗接种的潜在部分免疫益处,虽然最终还是观察到死亡率。在不考虑疫苗剂量的情况下,与接受 GP(Z) 加上 GP(S/G) 的对象相比,只接受 rAd35-GP(Z) 的对象的存活者的数目更高,但是在两个攻毒实验中,任何疫苗组之间的存活率差异并不显著。

[0112] 表 2

[0113]

实验	对象 ID	疫苗组	症状	结果
1	V1	天然/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d6	第 7 天 死亡
	V2	天然/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	厌食 d6	存活
	V3	天然/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d6	第 8 天 死亡
	V4	免疫/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	疹 d7, 厌食 d6, 脱水 d7	第 8 天 死亡
	V5	免疫/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	皮疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d7	第 9 天 死亡
	V6	免疫/ Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 10^{10}	厌食 d6	存活
2	V7	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 和 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 每个为 10^{10}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d6	第 6 天 死亡
	V8	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 和 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 每个为 10^{10}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d9	第 10 天 死亡
	V9	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 和 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 每个为 10^{10}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d6	第 6 天 死亡
	V10	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 和 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 每个为 10^{11}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d7	第 7 天 死亡
	V11	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 和 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 每个为 10^{11}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d7	第 7 天 死亡
	V12	Ad35BSU.Ebo.GP(Z)FL.wt 和 Ad35BSU.Ebo.GP(S/G)FL 每个为 10^{11}	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d6	第 8 天 死亡

[0114]

1	C1	无	疹 d6, 厌食 d6, 脱水 d6	第 9 天 死亡
2	C2	无	疹 d7, 厌食 d6, 脱水 d6	第 8 天 死亡

[0115] 总之,使用单独的 GP(Z) 或者与 GP(S/G) 组合的 rAd35 作为疫苗载体的研究显示,抗原递送和呈递足以产生抗原特异性免疫应答,但是水平低于绝对免疫保护所需的水平。较低的保护性免疫与抗体水平有关,在一些动物中检测到该抗体水平与使用 rAd5 载体得到临界 (marginal) 保护所显示的一致。

[0116] rAd26-GP 疫苗的免疫原性和针对 EBOV 感染的保护效力

[0117] 接着我们评价基于 Ad26 的重组疫苗, D 组腺病毒的产生针对 EBOV 感染的保护性免疫的能力。这种血清型使用与 Ad35 相同的细胞受体 (CD46), 但是据显示, 当用作初免疫苗载体时, 产生略高的免疫应答 (Liu, et al., 2009)。对于这些研究, 在两个独立的感染性攻毒实验中, 在三个数量级的范围内实施剂量递增。在第一研究中, 对于每个载体 Ad26. Ebo. GP(Z)FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP(S/G)FL. wt, 我们测试的疫苗剂量为 10^{10} 或 10^{11} 个颗粒, 并且在第二研究中, 我们使用的剂量各自为 10^{12} 个颗粒。第一研究在 Ad5- 免疫食蟹猕猴中的测试疫苗以评价 rAd26 是否与 rAd35 一样能够在预先存在对 Ad5 免疫性时引发抗原特异性免疫应答。将每组 4 只 Ad5- 免疫食蟹猕猴通过肌肉内注射进行接种, 三周后获取血样样品, 以评价针对 EBOVGP 的循环体液和细胞免疫应答 (图 4A)。平均循环抗 GP 抗体效价在各剂量组中表现出剂量应答, 10^{10} 疫苗为 1:700, 并且接受 10^{11} 颗粒的对象为 1:4500 ($p=0.06$)。 10^{10} 剂量组的四只对象中的三只的平均效价仅刚刚高于 rAd5- 接种对象的免疫保护的最小阈值 (1:500), 而对象 V16 只产生了临界抗体应答 1:100, 其远低于 Ad5-GP 疫苗的预期保护截止点。相比之下, 用 rAd26 疫苗接种 10^{11} 个颗粒接种的对象 V19 产生非常高的抗体效价 1:10500, 超出与完全免疫保护相关的水平 (1:3500) 近三倍, 而该疫苗组的其他对象却只表现出中等效价, 其并不确定地预期存活结果。在研究 2 中, 四只对象接受 10^{12} 个颗粒的每种 rAd26 载体, 并且产生的抗体应答与 10^{11} 剂量组非常类似, 大部分的对象效价在 1:1000-1:4000 之间。该组的平均抗 -GP 抗体效价是 1:3000。

[0118] 如在 rAd35 的研究中那样, 通过 ICS 测量 T 细胞免疫应答 (图 4B, C), 在研究 1 中也倾向于剂量应答, 但 10^{10} 和 10^{11} 剂量组之间的差异并不显著 ($CD4^+$ 和 $CD8^+$ 分别为 $p=0.12$ 和 0.26)。接受 10^{10} 个颗粒的 rAd26-GP 的接种者的平均抗原特异性 $CD4^+$ T 细胞频率为 0.14%, 而更高疫苗剂量的则为 0.24%, 并且在较低剂量组中的一个接种者对象 V14 没有可检测到的 $CD4^+$ 应答 (图 4B)。rAd26 疫苗并没有使细胞免疫应答向 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 优势方向倾斜; $CD8^+$ 频率 0.13% 和 0.25% (分别是 10^{10} 和 10^{11} 剂量) 基本上与 $CD4^+$ 应答的幅度是镜像的。对于 $CD8^+$ T 细胞的情况, 在低剂量组中有两只对象 V13 和 V14 检测不到抗原特异性应答 (图 4B, C)。在 rAd26 研究 2 中, 平均抗原特异性 $CD8^+$ 频率 (0.34%) 高于 $CD4^+$ 应答频率 (0.08%), 但是这种明显倾向于 $CD8^+$ 应答的情况主要是由一个对象 V24 造成的, 其具有非常高的 $CD8^+$ 频率和很低的 $CD4^+$ 应答。否则, 整个细胞免疫应答与在 rAd26 研究 1 中观察到的相似。

[0119] 在每个 rAd26 疫苗研究中接种 4 周后, 通过 IM 注射 1000PFU 的 ZEBOV 来实施感染性 EBOV 攻毒, 并且对肝酶水平进行测量以监测疾病 (图 4D)。未接种对象在感染后的第 3

至 6 天之间表现出肝损伤表现。所有接受最低剂量的 rAd26 疫苗,即 10^{10} 颗粒的对象都表现出相似的疾病迹象,虽然 AST 水平上升速率较慢。从这个临床指标预计,这个组中的所有对象都在 ZEBOV 攻毒后的第 8 天死于感染的致死作用(图 5A)。在该组的一些对象中,抗体和 T 细胞应答很低或检测不到。在 Ad26 研究 1 中,两个剂量组(10^{10} 和 10^{11})之间免疫应答量级的差异通常反映在存活率上,在用 10^{11} 个颗粒的 rAd26-GP 接种的对象中,存活结果更高,4 个中的 2 个产生了保护($p=0.01$)。当与剂量匹配时, 10^{11} 个颗粒的 Ad26 更具有优势,这不仅在于较低的剂量,还在于提供比 rAd35-GP 更大的保护。最后,在这些研究所测试的任何疫苗方案中,以 10^{12} 个颗粒的剂量给予 rAd26 产生了最大存活数目(4 个中的 3 个),并且免疫保护水平与之前观察到的用 rAd5 载体所获得的并没有显著差异($p=0.32$,图 5C);然而,获得这个存活率所使用的 rAd26 的剂量高于 rAd5 使用的剂量,分别是 10^{12} 比 10^{10} ,这表明在这个动物模型中,这些载体之间存在潜在的效力差异。

[0120] 用 rAd26 和 rAd35 载体进行异源性初免-加强

[0121] rAd26-GP-介导的免疫保护的剂量应答特征以及使用 10^{12} 个载体颗粒的高存活结果表明,这个载体有效地诱导 GP-抗原表达。由于已经证实对于 EBOV 和其他病原体,在非人和人对象中,异源性初免-加强免疫接种方法能够比单一接种免疫引发更强效的免疫性(Sullivan Nature2000;Sampra et al Vaccine27(2009)5837-5845;Koup, et al, PLoS One2010;Geisbert et al., (2010) Virol84(19):10386-94),因此我们询问 rAd26-GP 免疫应答是否也能用异源载体来加强,以提高针对 EBOV 感染的保护。将 4 只食蟹猕猴用 10^{11} 个颗粒的 Ad26. Ebo. GP(Z)FL. wt 和 Ad26. Ebo. GP(S/G)FL. wt 的每一种进行接种。一个月后,所有对象接受相同剂量的 Ad35BSU. Ebo. GP(Z)FL. wt 和 Ad35BSU. Ebo. GP(S/G)FL 进行加强免疫。在进行加强免疫之前以及加强免疫 3 周后对免疫应答进行评价。图 6A 显示,初免有效地诱导针对 EBOV-GP(Z) 的抗体应答。个体对象产生的针对 GP 的 EC90 抗体效价范围是 1:2700 至 1:7100,并且该组的平均效价为 1:4000,这与之前测试 10^{11} rAd26 作为单独接种疫苗的研究中所观察到的应答一致(1:4500)。这项研究包括与单一对象相比较,其用 10^{10} 个颗粒的 rAd5-GP(Z) 和 rAd-GP(S/G) 的每一种接种,其接种后抗体效价为 1:6800。用 10^{11} 个颗粒的 rAd35-GP 载体对 rAd26-GP-初免的对象进行后续接种,使得大部分接种者的抗原-特异性抗体水平增强约一个数量级,平均效价为 1:32000,除了对象 V27,其初免后抗体效价特别地高。有趣的是,加强免疫所产生的效价在对象中更平均,对象的标准差略低于 10%,相比之下,初免后的效价的标准差则是 54%。

[0122] 向 rAd26-接种的猕猴给药 rAd35-GP 也显著地增强细胞免疫应答(图 6B,C)。除了一个对象 V25,在所有对象中增强了 $CD4^+$ T 细胞;所有对象在 rAd35-GP 给药后平均增加为 2 倍,加强免疫使得对象 V27 中的应答能够被测量到,其在加强之前的应答是不可检测的。最后,加强后的 $CD4^+$ T 细胞频率与 rAd5-GP 接种所产生的相当。 $CD8^+$ T 细胞的加强效果最大,并且在这个细胞区室(compartment)中,所有对象都表现出加强效果,两个对象(V27 和 V28)中产生的应答超过 rAd5-GP 接种所产生的应答。通过 ICS 测量的初次免疫后的平均 GP-特异性 $CD8^+$ T 细胞频率是 0.09%,并且用 rAd35-GP 二次接种 3 周后增加 4.7 倍至 0.41%。

[0123] 总之,上述免疫原性结果表明,rAd35-GP 载体有效地对 rAd26-GP 初免的猕猴进行加强。加强后针对 GP 的抗体被诱导达到的平均水平比 rAd5-GP 接种的灵长类中预期 100% 免疫保护的水平高几乎一个对数级(log)(Sullivan, et al., 2009)。重要的是, rAd35-GP

加强使得 CD8⁺T 细胞频率大大增强,据证实这也与针对 EBOV 感染的免疫保护相关。因此,在免疫应答评价后一周(加强后 4 周),通过肌肉内注射将所有接种的对象和一个未接种的对照猕猴暴露于 1000PFU 的 ZEBOV。对照对象表现出 EBOV 感染的特征性临床症状,并在攻毒后的第 6 天死于致死作用(图 6C, D)。相比之下,所有接种的对象的循环 AST 水平保持正常(图 6C),并且在研究结束时,在总体病理学评价中均未表现出出血性疾病的证据(未显示)。所有 4 个接种对象在感染性攻毒之后都存活,并且在整个 28 天的随访(following up)期间内都保持无症状,直至研究结束。这些结果显示,将 rAd26/rAd35 载体作为异源性初免-加强免疫方案给药提供针对 ZEBOV 感染的一致性免疫保护,并证实该方法为实现联合疫苗的加成或协同效果的潜在效用。

[0124] 讨论

[0125] 腺病毒用作疫苗载体很好地对各种病毒细菌和寄生虫抗原进行递送(Lasaro et al., (2009) Mol Ther 17(8):1333-9)。rAd5 载体在小鼠、非人灵长类和人中特别地产生强效的抗原特异性免疫应答,正如当 EBOV-GP 为靶抗原时我们已经观察到的那样。然而,临床前和人临床研究表明,如果个体针对载体具有高水平的免疫性,则基于 rAd-5 的载体的效力在之前已经暴露于 Ad5 的个体中可能会受到影响。本研究的目的是确定在天然和 Ad5 免疫的对象中都能够递送 EBOV GP 抗原的 rAd 载体。如血清阳性对象的流行率和 / 或低水平的中和抗体所示,由于预先存在的针对任何病毒载体的免疫性都可能限制其有效性,我们将注意力集中在相对罕见地感染人的病毒。在当前的研究中,选择罕见的人腺病毒血清型 Ad35 和 Ad26 来进行疫苗开发。

[0126] 猕猴的 rAd35-GP 接种在个体对象中产生的抗原特异性抗体和 T 细胞应答在之前使用 rAd5 作为递送载体时所观察到的范围之内。所有 rAd35 接种者的平均抗 -GP 抗体效价(不考虑剂量)1:1400 低于用 10¹⁰ 的 rAd5-GP 接种的所有历史对象的平均值(1:11000, n=17),这初步表明,如果抗体效价和 rAd35 的相关性与 rAd5EBOV 疫苗相同,则两个血清型之间的载体效力可能会有差别。在感染性攻毒之前,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞应答在大部分对象中是可检测的,尽管其绝对幅度不能与 rAd5 接种者相比,所述 rAd5 接种者在没有用于分析连接控制的 PBMC 样品的情况下并未包括在这些研究中。

[0127] 用 rAd35 载体接种在 rAd5-天然或 rAd5 免疫的对象中有效地诱导抗原特异性抗体和 T 淋巴细胞免疫应答,这表明罕见血清型载体基因组足够远离普通血清型以抵抗异源性载体导致的免疫性。载体性能的这种特征对于避免预先存在的免疫性是重要的,所述预先存在的免疫性不仅来源于天然病毒感染,还可来源于初免接种或针对其他病原体接种中使用的异源载体。确实, rAd35-GP 接种在用 rAd26-GP 初免疫的猕猴中提供细胞介导和抗体应答的有效提高。这个结果是很有趣的,因为它证实载体在诱导次级免疫应答和初级免疫应答的效力上有明显差别;从初免疫后观察到的应答幅度并不能预期 rAd35-GP 增强免疫应答的能力。这些数据可能表明, rAd35 和其他 rAd 载体在某些群体或活化状态的靶树状细胞中有更高的转导效率,正如 Lindsay et al., J Immunol 185(3):1513-21 最近所表明的那样,在这种情况下,在次级免疫应答期间其可以更为充分和更易于得到。

[0128] 经证实,作为针对 EBOV 感染的单一疫苗, rAd26 要比 rAd35 更有效,在测试的最高剂量下,其介导的接种猕猴存活率达到 75%。rAd26-GP 疫苗证实诱导保护性免疫的明显剂量应答,这表明抗原表达的轻微提高能够增加基于 rAd26 疫苗产生针对高剂量 EBOV 攻毒的

一致性保护的效力,例如本文所用的那些。有趣的是,相比起在匹配剂量(10^{11} 个颗粒)下的 rAd35-GP, rAd26-GP 所提供的较高等度的保护与较高的 ELISA 抗-GP 效价相关,分别是 1:4500 比 1:1400。这些数据强调了这种可能性,即除了在 rAd5-GP 疫苗的载体组中所观察到的, rAd 血清型中的攻毒前抗体效价也可以充当针对 ZEBOV 感染的保护的免疫相关物(correlate)。载体组中诱导抗体应答效力的顺序预示保护的等级顺序。

[0129] 本文的研究测试单独比较和联合使用的疫苗载体,并且证实了替代性血清型 rAd 用作灵长类疫苗载体的效用。这些结果表明,这些疫苗在初免-加强组合中可能是最有用的。

[0130] 由于通过异源性初免-加强实现高幅度的抗原特异性应答,因此已经提出用 DNA 通过 rAd 初免可以最佳地实现长期免疫 (Santra, et al., (2005). J Virol 79(10):6516-22)。由于 DNA 需要多次初免,而且并不能像 rAd 载体那样诱导快速保护,所以异源性 rAd 初免-加强可以提供最优的机会来在诱导快速和长期持续的保护性免疫之间产生平衡。

[0131] 应当理解,本文所描述的实例和实施方案仅仅用于说明目的,并且向本领域技术人员提示了据此得到的各种修饰或改变,其包含在本申请的精神和范围以及所附权利要求书的范围之内。本文所引用的全部文献、专利和专利申请整体援引加入本文用于所有目的。

[0001]

序列表

<110> N·J·沙利文
G·J·纳贝尔
C·亚仕都
C·程
M·G·帕乌
J·古迪斯米茨
美国卫生和人类服务部
克鲁塞尔荷兰公司

<120> 腺病毒血清型 26 和血清型 35 线状病毒疫苗

<130> 77867-827790

<140> WO PCT/US11/64944

<141> 2011-12-14

<150> US 61/422,954

<151> 2010-12-14

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 2302
<212> DNA
<213> Ebola virus

<220>
<223> Ebola virus (EBOV) transmembrane envelope glycoprotein (GP)
Zaire type species (ZEBOV) wild type filovirus antigen

<400> 1
cgtcgtcgac acgtgtgate agatategcg gccgetctag accagggcct ggategatec 60
aacaaacaaa tgggcgltac aggaataatg cagtlacctc gigaicgall caagaggaca 120
tcattcttctc ttggggtaat tatccitttc caaagaacat ttteccatcc acttggagtc 180
atecacataa gcacattaca ggttagtgat gtcgacaaac tagtttgctg tgacaaactg 240
tcatecacaa atcaattgag atcagttgga ctgaatctcg aagggaatgg agtggcaact 300
gacgtgccat ctgcaactaa aagatggggc ttcaggtecg gtgtcccaac aaaggtagtc 360
aattatgaag ctggtgatg ggctgaaaac tgetacaate ttgaaatcaa aaaacctgac 420
ggagtgagtg gtctaccagc agcggcagac gggattcggg gcttcccccg gtgccggtat 480
gtgcacaaag tatcaggaac gggaccgtgt gccggagact ttgecttcca taaagagggt 540
getttcttcc tgtatgatcg acttgettcc acagttatct accaggaac gacttctget 600
gaaggtgtcg ttgcatttct gatactgccc caagctaaaga aggacttctt cagctcacac 660
cccttgagag agccgggtcaa tgcaacggag gacccttcta gtggctacta ttctaccaca 720
attagatata aggetaaccg ttttggaace aatgagacag agtacttggt cgaggttgac 780
aatttgacct acgtccaact tgaatcaaga tteacaccac agtttctgct ccagctgaat 840
gagacaatat atacaagtgg gaaaaggagc aataccaagg gaaaactaat ttggaaggtc 900
aaccgccaaa ttgatacaac aatcggggag tgggccttct gggaactaa aaaaaacctc 960
actagaaaaa ttgcagtgga agagtgtct tteacagttg tatcaaacgg agccaaaaac 1020
atcagtggtc agagtccggc gegaacttct tccgaecagg ggaccaacac aacaactgaa 1080
gaccacaaaa tcatggcttc agaaaattcc tctgcaatgg ttcaagtgc cagtcaagga 1140
agggaagctg cagtgtcgca tetaacaacc ctgtccacaa tctccacgag tccccaatcc 1200
ctcacaaaca aaccaggtcc ggacaacagc acccataata caccctgtga taaacttgac 1260
atctctgagg caactcaagt tgaacaacat caccgcagaa cagacaacga cagcacagcc 1320
tccgacactc cctctgccac gaccgcagcc ggaccccaaa aagcagagaa caccaacagc 1380
agcaagagca ctgacttctt ggaacccgcc accacaacaa gtcccaaaaa ccacagcgag 1440
accgctggca acaacaacac tcatcaccaa gataccggag aagagagtgc cagcagcgag 1500
aagctaggct taattaccaa tactattgct ggagtgcgag gactgatcac aggcgggaga 1560
agaactcgaa gagaagcaat tgtcaatget caaccctaat gcaaccctaa ttacattac 1620
tggactactc aggatgaagg tgetgcaatc ggactggcct ggataccata ttccgggcca 1680
gcagccgagg gaatttcat agaggggcta atgcacaatc aagatgggtt aatctgtggg 1740
ttgagacaga tggccaacga gacgactcaa gctcttcaac tgttctgtag agccacaact 1800
gagctacgca cctttteaat cetcaaccgt aaggcaattg atttcttget gcagcgatgg 1860
ggcggcacat gccacattct gggaccggac tgetgtatcg aaccacatga ttggaccagg 1920
aacataacag acaaaaattga tcagattatt catgattttg ttgataaaaac ccttccggac 1980
caggggggaca atgacaattg gtggacagga tggagacaat ggataccggc aggtatttga 2040
gttacaggcg ttgtaattgc agttatcgct ttattctgta tatgcaaat ttgtcttttag 2100
ttttcttcca gattgcttca tggaaaagct cagcctcaaa tcaatgaaac caggatttaa 2160
ttatatggat tacttgaatc taagattact tgacaaatga taatataata cactggagct 2220
ttaaacatag ccaatgtgat tctaactcct ttaaaactcac agttaatcat aaacaagggt 2280

[0002]

tgagggtaccg agctcgaatt ga 2302

<210> 2

<211> 2031

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Ebola virus (EBOV) transmembrane envelope glycoprotein (GP) Sudan/Gulu type species (SEBOV) codon optimized filovirus antigen

<400> 2

```
atggagggcc tgagcctget gcagctgccc agggacaagt tcaggaagag cagcttcttc 60
gtgtgggtga tcctctgtt ccagaaggcc ttccagatgc ccctgggcgt ggtgaccaac 120
agcacccttg aggtgaccga gatcgaccag ctggtgtgca aggaccacct ggccagcacc 180
gaccagctga agagcgtggg cctgaacctg gagggcagcg gcgtgagcac cgacatcccc 240
agcgccacca agagggtggg cttcaggagc ggcgtgcctc ccaagggtgtt gactatcgag 300
gccggcgagt ggcccgagaa ctgtacaaac ctggagatca agaagccccga cggcagcgag 360
tgcttgcttc ctctctctga cggcgtgagg ggtctcccca ggtgcaggta cgtgcacaag 420
gcccgaggca ccggcccttg ccccgcgagc tacgccttcc acaaggacgg cgccttcttc 480
ctgtacgaca ggcctggccag caccgtgac tacaggggcg tgaacttcgc cgaggcggtg 540
atcgcttctc tgatcctggc caagcccaag gagaccttcc tgcagagccc tccatcagg 600
gaggccgtga actacaccga gaacaccagc agctactacg ccaccagcta tctagagtac 660
gagatcgaga acttcggcgc ccagcacagc accacctgtt tcaagatcga caacaacacc 720
ttcgtgagge tggacagccc ccacacccct cagtctctgt tccagctgaa cgacaccatc 780
cacttgcccc agcagctgag caacaccacc ggcaggtcga tctggacctt ggacgccaac 840
ataaacgcgc acatcggcga gtgggcttcc tgggagaaca agaagaacct gacgagcag 900
ctgaggggag aggagctgag cttcgaggcc ctgagcctga acgagaccga ggacgacgac 960
ggcgccagca gcaggatcac caaggcagag atcagcgaca gggccaccag gaagtacagc 1020
gacctgtgtc ccaagaacag ccccgccatg gtgcccctgc acatccccga ggccgagacc 1080
accttgcccc ccagaaacag caccgagggc aggtgaaacac ccaggagacc 1140
atacccgaga ccgcggccac catcatcggc accaacggca accaatgca gatcagcacc 1200
atcggcatac ggcccagcag cagccagatc cccagcagca gcccaccacc cgcctctagc 1260
cccgaggccc agacccccc caccacacc agcggaccca gcgtgatggc caccgaggag 1320
cccaccaccc ctcccggcag cagccccgga cccaccaccg agggccctac cctgaccacc 1380
cctgagacaa tcaccaccgc cgtgaagacc gtgctgcccc aggagagcac cagcaaccgc 1440
ctgatcaca gcaccgtgac cggcatcctg ggcagcctgg gcctgaggaa gaggagcagg 1500
aggcagacca acaccaaggc caccggcaag tgeaacccca acctgcacta ctggaccgcc 1560
caggagcagc acaacgcgc cggcatcgcc tggattccct acttcggccc cggcgccgag 1620
ggcatctaca ccgagggcct gatgcacaac cagaacgccc tgggtgtcgg cctgaggcag 1680
ctggccaaag agaccacca ggccctgcag ctgttcttga gggccaccac cgagctgagg 1740
acctacacca tctgaacag gaaggccatc gacttcttgc tgaggagggt gggcgccacc 1800
tgcaggatc tgggccccga ctgtgcatc gagccccacg actggaccaa gaacatcacc 1860
gacaagatca accagatcat ccagacttc atcgacaacc ctctgcccac ccaggacaac 1920
gacgacaact ggtggaccgg ctggcggcag tggatacctg ccggcatcgg caccaccggc 1980
atcatcatcg ccatcatcgc tctgtgtgct gtgtgcaagc tgetgtgctg a 2031
```

<210> 3

<211> 2028

<212> DNA

<213> Ebola virus

<220>

<223> Ebola virus (EBOV) transmembrane envelope glycoprotein (GP) Sudan/Gulu type species (SEBOV) wild type filovirus antigen

<400> 3

```
atgggggggc ttgacctact ccaattgccc agggacaaat ttgggaaaag ctctttcttt 60
gtttgggtga tcattctatt ccaaaaggcc ttttccatgc ctttgggtgt tgtgactaac 120
agcactttag aagtaacaga gattgaccag ctagtctgca aggatcatct tgcattctact 180
gaccagctga aatcagtttg tctcaacctc gaggggagcg gactatctac tgatatccca 240
tctgcaacaa agcgttgggg cttcagatct ggtgttcttc ccaagggtgtt cagctatgaa 300
gggggagaaat ggctgaaaa ttgtacaaat cttgaaataa agaagccgga cgggagcgaa 360
tgcttaacccc caccgcaga ttgtgtcaga ggttttccaa ggtgcgccta ttttcaaaaa 420
gcccaggaa cgggcccctg cccaggtgac tacgccttcc acaaggatgg agctttcttc 480
ctctatgaca ggttggcttc aactglaatl tacagaggag tcaattttgc tgagggggta 540
attgcattct tgatattggc taaacaaaaa gaaacgttcc ttcagtcacc cccatttcga 600
gaggcagtaa actacactga aaatacatca agttattatg ccacatccia cttggagtat 660
gaaatcgaaa attttggtgc tcaacactcc acgacctttt tcaaaattga caataatct 720
ttgttctgct tggacaggcc ccacacgcct cagtctcttt tccagctgaa tgataccatt 780
cacttccacc aacagttgag taatacaact gggagaactaa tttggacact agatgctaatt 840
atcaatgctg atattggtga atgggctttt tgggaaaaata aaaaaaatct ctccgaacaa 900
ctacgtggag aagagctgtc ttctgaagct ttatcgtcga acgagacaga agacgatgat 960
ggcgcatcgt cgagaattac aaagggaaga atctccgacc gggccaccag gaagtattcg 1020
gacctgtgtc caaagaattc ccttgggatg gttccattgc acataccaga aggggaaaca 1080
acattgcctg ctcagaattc gacagaaggt cgaagagtag gtgtgaacac tcaggagacc 1140
```

[0003]

```

attacagaga cagctgcaac aattatagge actaacggca accatatgca gatctccacc 1200
atcgggataa gaccgagctc cagccaaatc cggagtccct caccgaccac ggcaccaagc 1260
cctgaggctc agacccccac aacccacaca tcaggtecat cagtgatggc caccgaggaa 1320
ccaaccaacac caccgggaag ctcccccggc ccaacaacag aagcaccacac tctcaccacc 1380
ccagaaaata taacaacagc ggtaaaaact gtcctgccac aggagtccac aagcaacggt 1440
ctaataactt caacagtaac agggattctt gggagtcttg gcttcgaaa acgcagcaga 1500
agacaaacta acaccaaaagc caegggtaa tgcaatccca acttacacta ctggactgca 1560
caagaacaac ataagtctgc tgggattgcc tggatccctg actttggacc ggggtgggaa 1620
ggcattatata ctgaaggcct gatgcataac caaaatgect tagtctgttg acttaggcaa 1680
cttgcaaatg aaacaactca agctctgcag cttttcttaa gagccacaac ggagctgcgg 1740
acataatacca tactcaatag gaaggccata gatttccttc tgcgacgatg gggcgggaca 1800
tgcaggatcc tgggaccaga ttgttgcatt gagecacatg attggacaaa aaacatcact 1860
gataaaaata accaaatcat ccatgatttc atcgacaacc ccttacctaa tcaggataat 1920
gatgataatt ggtggacggg ctggagacag tggatccctg caggaatagg cattactgga 1980
attattattg caattattgc tcttctttgc gtttgcgaag tgctttgc 2028

```

<210> 4

<211> 2043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic Marburg virus (MARV) transmembrane envelope
glycoprotein (GP) Angola type species codon optimized filovirus
antigen

<400> 4

```

atgaagacca cctgcctget gatcagcctg atcctgatcc agggcgtgaa gaccctgccc 60
atcctggaga tcgccagcaa catccagccc cagaacgtgg acagcgtgtg cagcggcacc 120
ctgcagaaga ccgaggacgt gcacctgatg ggcttcaccc tgagcggcca gaagggtgcc 180
gacagccctc tggaggccag caagaggtgg gccttcaggg ccggcgtgcc cccaagaac 240
gtggagtaca ccgaggggcga ggaggccaag acctgetaca acatcagcgt gaccgacccc 300
agcggaaga ccttgetgct ggaccctccc accaaccatca ggactaccc taagtgcagg 360
accatccacc acatccaggg ccagaaccct cagccccagg gcctgcctct gcacctgttg 420
ggcgctttct tctgtacga caggatcgcc agcaccacca tgtacagagg aaaagtgttc 480
acagagggaa acatcgetgc talgatctgt aacaagaccg tgcataagat gatcttcage 540
agacagggac agggatatag acatatgaac ctgacatcca caaacaagta ctggacaagc 600
agcaacggaa cacagacaaa cgatacagga tgttttgaa cactgcagga atacaactcc 660
accaagaacc agacatgtgc ccctagcaag aagcctctgc ctctgcctac agctcactct 720
gaagtgaagc tgacatccac aageacagat gccacaaage tgaacacaa acatcctaata 780
agcgacgacg aggatctgac aacaagcgga tccggatccg gagaacagga acctataaca 840
acaagcgacg ctgctacaaa acagggactg tcttcacaaa tgcctcctac acctagccct 900
cagcctagea caccctcagea gggaggcaac aacacaaacc attcccaggg agtggtgaca 960
gaacctggaa agacaaacac aacagcccag cctageatgc ctctcctaa cacaacaaca 1020
atcagcacia acaacacctc caagcacaat ctgagcacac ctacgtgcc tattcagaat 1080
gccaccaact acaacacaca gtccacagcc cctgaaaacg aacagacctc cgcctcttc 1140
aaaacaaccc tcttgcctac agaaaaccct acaacagcca agagcacaaa cagcacaaag 1200
agcctacaa caacagtgc taacacaaca aacaagtata gcacaagccc tagccttaca 1260
cctaattcca cagctcagca tctgggtgat tttagaagaa agagaaacat cctgtggaga 1320
gaaggagata tgttcccttt tctggatgga ctgatcaacg ctctatcaga ttttgatctt 1380
gtgcctaaca caaagacaat ctttgatgaa agcagcagca gcggagcctc cgccgaagaa 1440
gatcagcatg cctcccctaa cateagcctg acactgagct attttcctaa ggtgaacgaa 1500
aacacagccc attccggaga aaacgaaaac gattgtgatg ccgaactgag aatctggagc 1560
gtgcaggaag atgatctggc cgccggactg agctggatcc ctttttttg gcccggaatt 1620
gaaggactgt acaccgccgg cctgatcaag aaccagaaca acctggtgtg caggtgagg 1680
aggctggcca accagaccgc caagagcctg gagetgctgc tgagggtgac caccgaggag 1740
aggaccttca gctgatcaa caggcacgcc atcgacttcc tgctggctag gtggggcggc 1800
acctgaagg tctgggccc cgactgtctg atcgcatcg aggacctgag caggaacatc 1860
agcgagcaga tcgaccagat caagaaggac gacgagaagg agggcacggg ctggggcctg 1920
ggcggaagt ggtggaccag cgactgggga gtgtgacaa acctgggaat cctgctgctg 1980
ctgagcattg ccgtgctcat tgcctgttcc tgtatctgta gaatctttac caagtacatc 2040
gga 2043

```

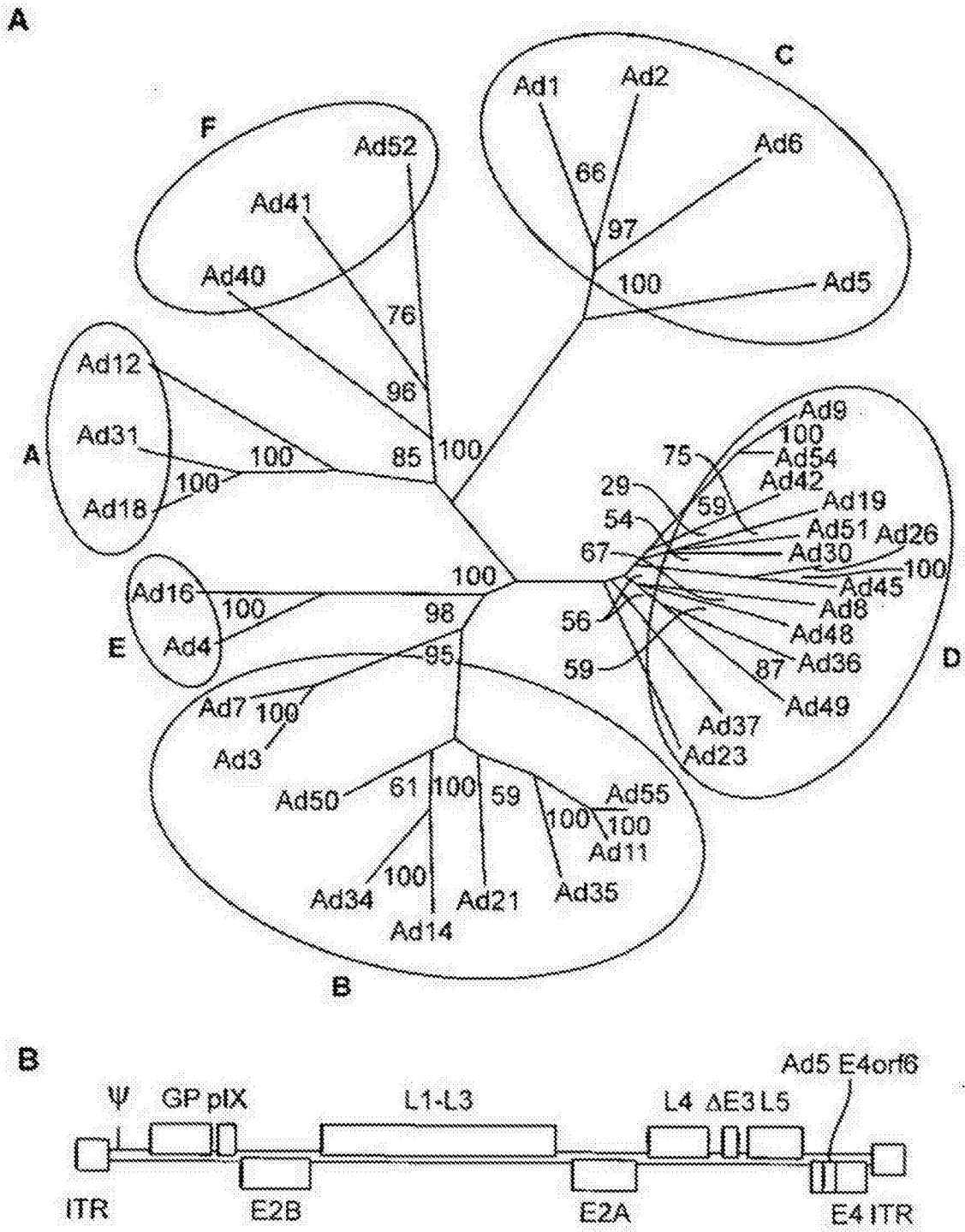


图 1

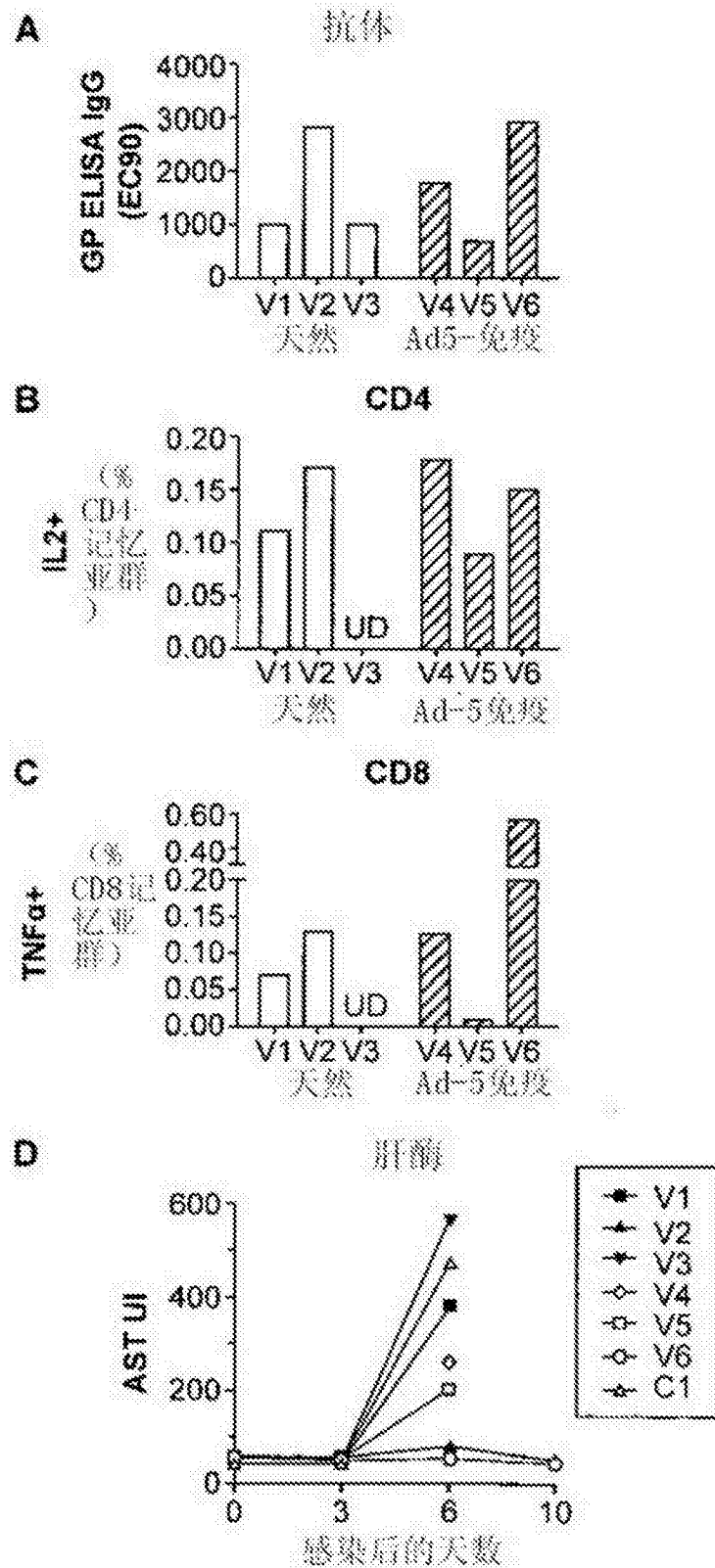


图 2

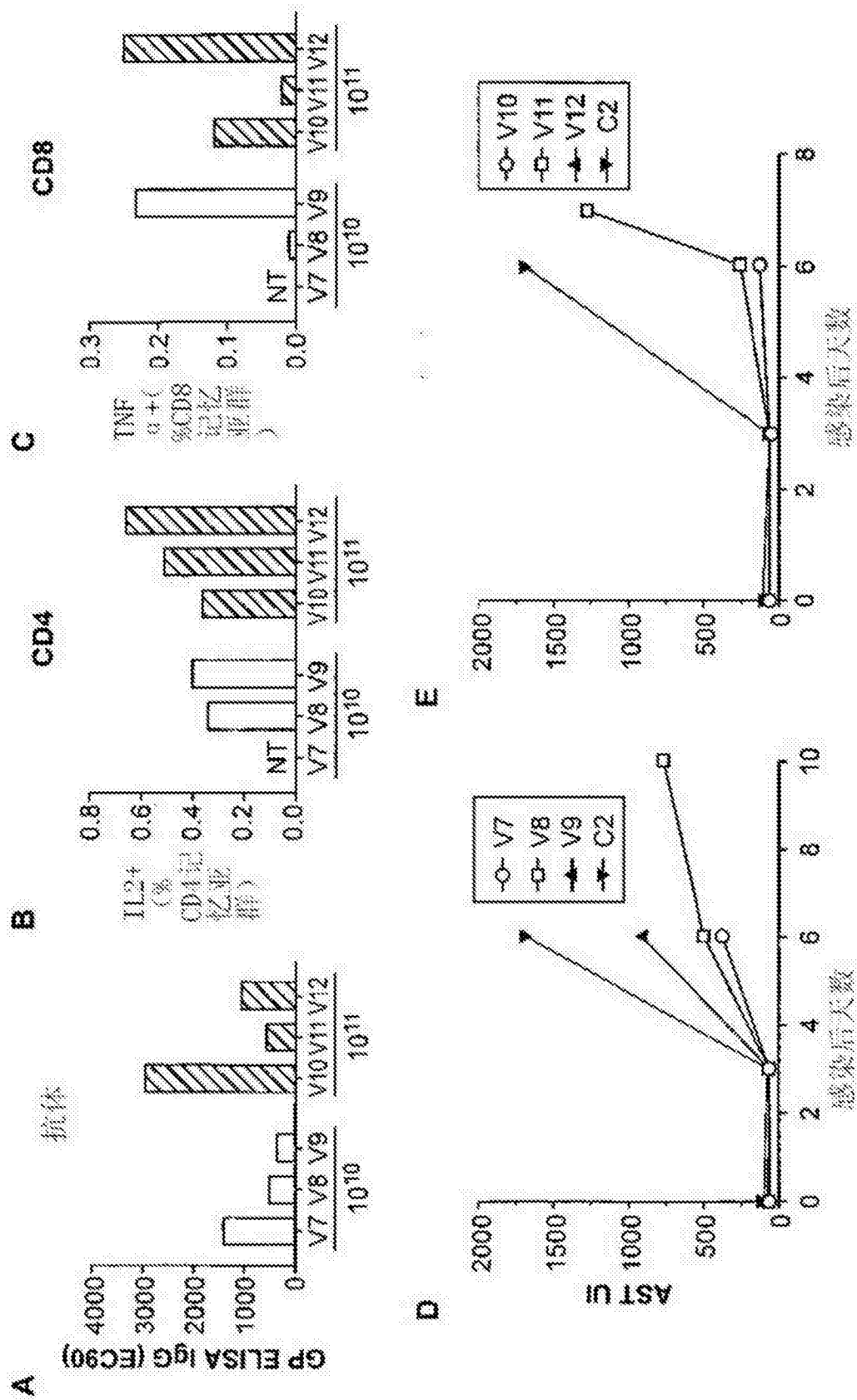


图 3

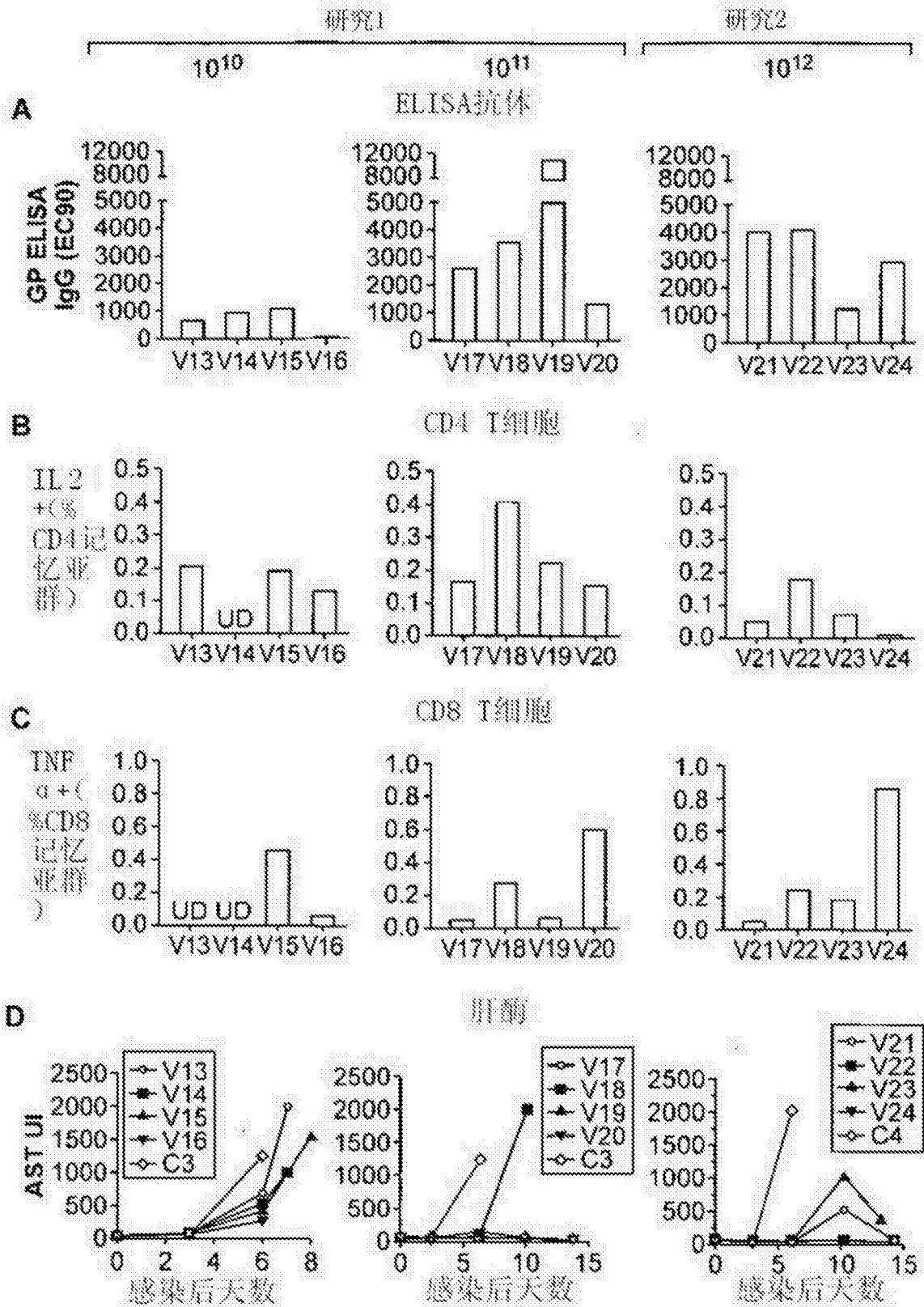


图 4

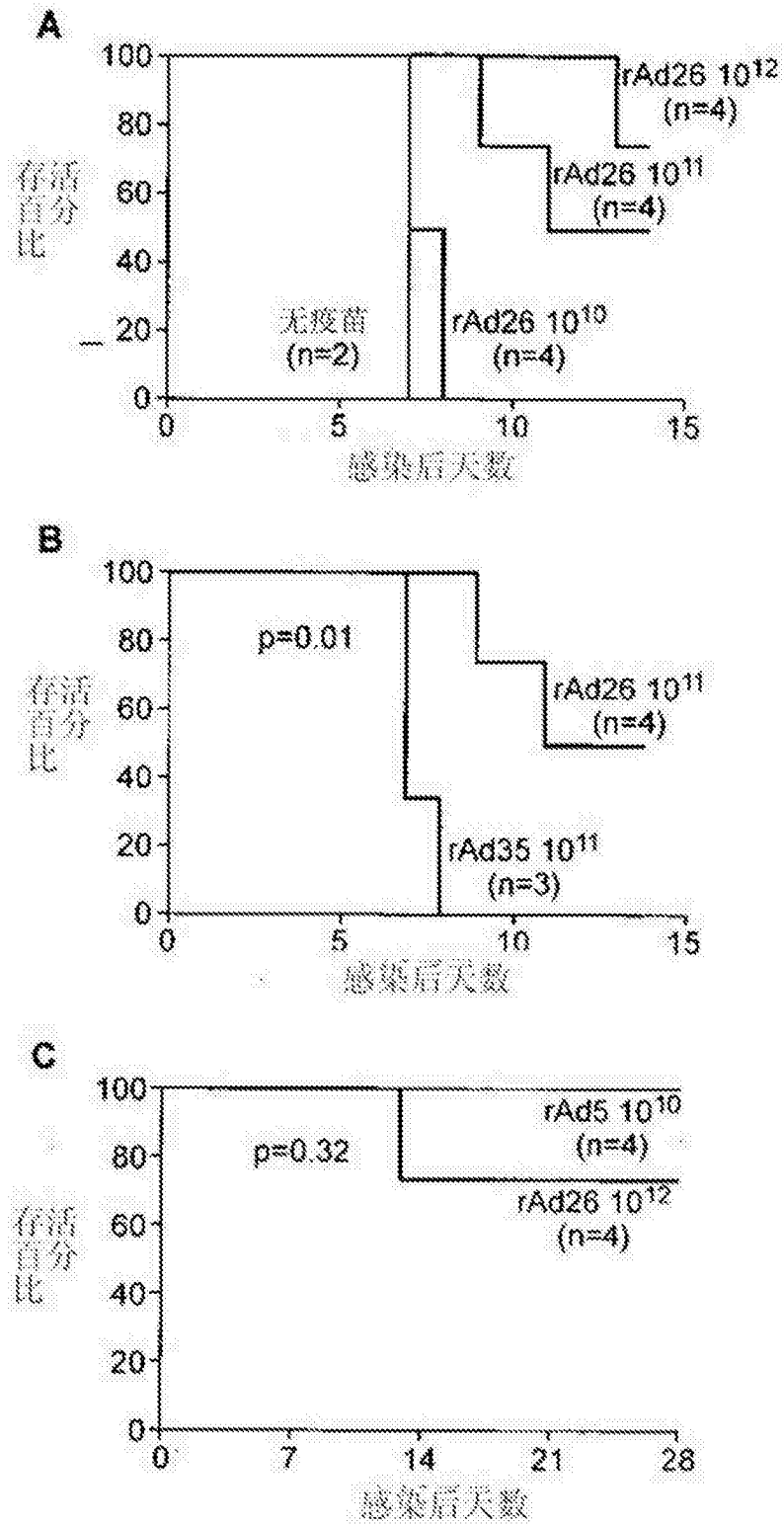


图 5

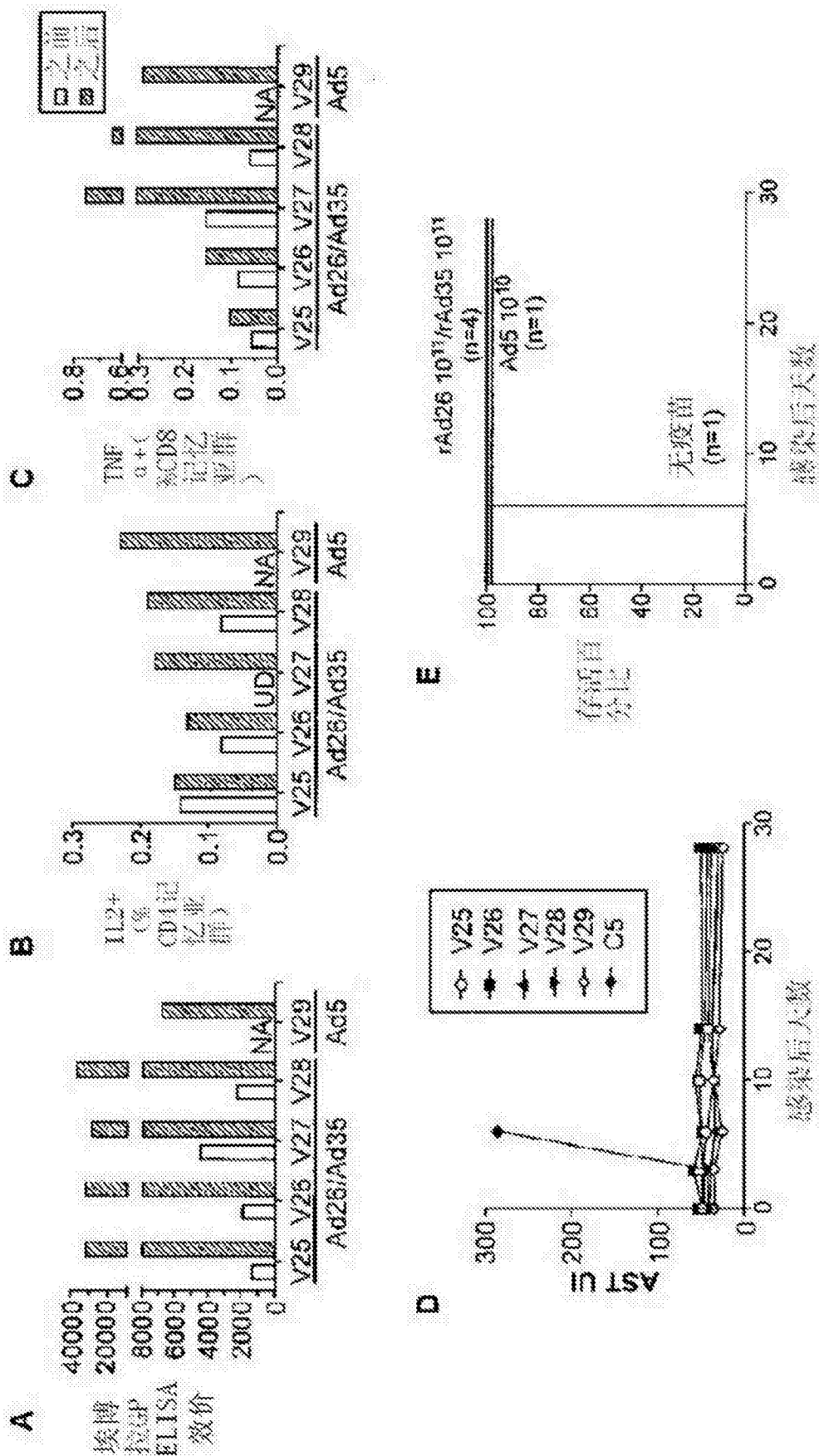


图 6