



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108064304 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201680014682.9

斯克特·汉森 约纳·萨夏

(22)申请日 2016.02.10

丹尼尔·马卢利

(30)优先权数据

62/114,203 2015.02.10 US

62/196,520 2015.07.24 US

62/220,703 2015.09.18 US

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 刘振佳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.08

(51)Int.Cl.

C12N 15/86(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/017373 2016.02.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/130693 EN 2016.08.18

(71)申请人 俄勒冈健康与科学大学

地址 美国俄勒冈州

(72)发明人 克劳斯·弗吕 路易斯·皮克

权利要求书7页 说明书40页 附图54页

(54)发明名称

可用于产生非典型CD8⁺ T细胞应答的方法和组合物

(57)摘要

公开了诱导对异源抗原之CD8⁺T细胞应答的方法,其中所述CD8⁺T细胞的至少10%受MHC-E限制。所述方法包括用不表达UL128和UL130蛋白的CMV载体进行免疫接种。还公开了包含编码异源蛋白抗原、UL40蛋白和US28蛋白的核酸但不表达活性UL128和UL130蛋白的重组CMV载体。还公开了包含编码异源蛋白抗原的核酸但不表达活性UL40蛋白、UL128蛋白、UL130蛋白和任选地US28蛋白的重组CMV载体。还公开了包含编码异源蛋白抗原的核酸但不表达活性US28蛋白、UL128蛋白、UL130蛋白和任选地UL40蛋白的重组CMV载体。

1. 巨细胞病毒 (CMV) 载体, 其包含:

- (1) 编码至少一种异源抗原的第一核酸序列;
- (2) 编码至少一种活性UL40蛋白或者其直系同源物或同源物的第二核酸序列; 以及
- (3) 编码至少一种活性US28蛋白或者其直系同源物或同源物的第三核酸序列;

其中所述CMV载体不表达活性UL128蛋白或其直系同源物, 并且不表达活性UL130蛋白或其直系同源物。

2. 权利要求2所述的CMV载体, 其中所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原。

3. 权利要求2所述的CMV载体, 其中所述宿主自身抗原是来自于T细胞受体 (TCR) 之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

4. 权利要求2所述的CMV载体, 其中所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体: 人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。

5. 权利要求2所述的CMV载体, 其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关: 急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌 (RCC) 和生殖细胞肿瘤。

6. 权利要求1至5中任一项所述的CMV载体, 其中由于在编码UL128或UL130或者其直系同源物的核酸序列中存在一个或更多个突变, 所述CMV载体不表达活性UL128或UL130蛋白或者其直系同源物。

7. 权利要求6所述的CMV载体, 其中编码UL128或UL130或者其直系同源物的核酸序列中的所述一个或更多个突变选自: 点突变、移码突变、截短突变和编码所述蛋白之全部核酸序列的缺失。

8. 权利要求1至7中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体还包含第四核酸序列, 其中所述第四核酸序列包含抑制UL128或UL130或者其直系同源物表达的反义序列或RNAi序列。

9. 权利要求1至8中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体还包含编码病毒蛋白的一个或更多个病毒基因中的至少一个失活突变, 所述病毒蛋白对于体内生长是必需的、非必需的或增强性的。

10. 权利要求9所述的CMV载体, 其中所述至少一个失活突变选自: 点突变、移码突变、截短突变和编码所述病毒蛋白之全部核酸序列的缺失。

11. 权利要求9或10所述的CMV载体, 其中所述至少一个失活突变在UL82 (pp71) 中。

12. 权利要求9至11中任一项所述的CMV载体, 其中所述至少一个失活突变在US11中。

13. 权利要求1至12中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体是人CMV (HCMV) 或恒河猴CMV (RhCMV) 载体。

14. 在对象中产生对至少一种异源抗原之免疫应答的方法, 所述方法包括向所述对象施用在所述对象中有效引起对第一异源抗原的CD8⁺T细胞应答之量的权利要求1至13中任一项所述的CMV载体。

15. 权利要求14所述的方法, 其中由所述CMV载体引起的CD8⁺T细胞的至少10%受MHC-E

或其直系同源物限制。

16. 权利要求15所述的方法,其中由所述CMV载体引起的CD8⁺T细胞的至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%、至少90%、至少95%或至少95%受MHC-E或其直系同源物限制。

17. 权利要求15或16所述的方法,其还包括鉴定来自自由所述CMV载体引起的CD8⁺T细胞的CD8⁺TCR,其中所述CD8⁺TCR识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物。

18. 权利要求17所述的方法,其中通过DNA或RNA测序鉴定所述CD8⁺TCR。

19. 权利要求14至18中任一项所述的方法,其中所述对象先前已暴露于CMV。

20. 权利要求14至19中任一项所述的方法,其中所述对象是人或非人灵长类。

21. 权利要求14至20中任一项所述的方法,其中施用所述CMV载体包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述CMV载体。

22. 权利要求14至21中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用第二CMV载体,其中所述第二CMV载体包含编码至少一种异源抗原的核酸序列。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述第二CMV载体表达活性UL128蛋白。

24. 权利要求22或23所述的方法,其中所述第二CMV载体表达活性UL130蛋白。

25. 权利要求22至24中任一项所述的方法,其中所述第二CMV载体的所述至少一种异源抗原是病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原。

26. 权利要求25所述的方法,其中所述宿主自身抗原是来自于TCR之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

27. 权利要求25所述的方法,其中所述第二CMV载体的所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌。

28. 权利要求25所述的方法,其中所述第二CMV载体的所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关:急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

29. 权利要求22至24中任一项所述的方法,其中所述第一CMV载体和所述第二CMV载体的所述至少一种异源抗原是相同抗原。

30. 权利要求22至29中任一项所述的方法,其中所述第二CMV载体是HCMV或RhCMV载体。

31. 权利要求22至30中任一项所述的方法,其中施用所述第二CMV载体包括静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述第二CMV载体。

32. 权利要求22至31中任一项所述的方法,其中所述第二CMV载体在所述第一CMV载体之前、与其同时或之后施用。

33. CMV载体,其包含编码至少一种异源抗原的核酸序列,其中所述CMV载体:

- (1) 不表达活性UL128蛋白或其直系同源物;
- (2) 不表达活性UL130蛋白或其直系同源物;并且
- (3) 不表达选自UL40或US28的活性蛋白质或其直系同源物。

34. 权利要求33所述的CMV载体,其中所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原。

35. 权利要求34所述的CMV载体,其中所述宿主自身抗原是来自于TCR之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

36. 权利要求34所述的CMV载体,其中所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌。

37. 权利要求34所述的CMV载体,其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关:急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

38. 权利要求33至37中任一项所述的CMV载体,其中由于在编码UL128、UL130、UL40或US28或者其直系同源物的核酸序列中存在一个或更多个突变,所述载体不表达活性UL128、UL130、UL40或US28蛋白或者其直系同源物。

39. 权利要求38所述的CMV载体,其中编码UL128、UL130、UL40或US28蛋白或者其直系同源物的核酸序列中的所述一个或更多个突变选自:点突变、移码突变、截短突变和编码所述蛋白之全部核酸序列的缺失。

40. 权利要求33至39中任一项所述的CMV载体,其还包含第二核酸序列,其中所述第二核酸序列包含抑制UL128、UL130、UL40或US28或者其直系同源物表达的反义序列或RNAi序列。

41. 权利要求33至40中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体还包含编码病毒蛋白的一个或更多个病毒基因中的至少一个失活突变,所述病毒蛋白对于体内生长是必需的、非必需的或增强性的。

42. 权利要求41所述的CMV载体,其中所述至少一个失活突变选自:点突变、移码突变、截短突变和编码所述病毒蛋白之全部核酸序列的缺失。

43. 权利要求41或42所述的CMV载体,其中所述至少一个失活突变在UL82(pp71)中。

44. 权利要求41至43中任一项所述的CMV载体,其中所述至少一个失活突变在US11中。

45. 权利要求33至44中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体是人CMV(HCMV)或恒河猴CMV(RhCMV)载体。

46. 在对象中产生对至少一种异源抗原之免疫应答的方法,所述方法包括向所述对象施用在所述对象中有效引起对所述至少一种异源抗原的CD8⁺T细胞应答之量的权利要求33至45中任一项所述的CMV载体。

47. 权利要求46所述的方法,其中由所述CMV载体引起的CD8⁺T细胞的少于1%受MHC-E限制。

48. 权利要求46或47所述的方法,其中由所述CMV载体引起的CD8⁺T细胞的多于10%被由单个或多个MHC-II等位基因呈递的肽刺激。

49. 权利要求46至48中任一项所述的方法,其中所述对象先前已暴露于CMV。

50. 权利要求46至49中任一项所述的方法,其中所述对象是人或非人灵长类。

51. 权利要求46至50中任一项所述的方法,其中施用所述CMV载体包括静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述第一CMV载体。

52. 权利要求46至51中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用第二CMV载体,其

中所述第二CMV载体包含编码至少一种异源抗原的核酸序列。

53. 权利要求52所述的方法,其中所述第二CMV载体表达活性UL128蛋白。

54. 权利要求52或53所述的方法,其中所述第二CMV载体表达活性UL130蛋白。

55. 权利要求52至54中任一项所述的方法,其中所述第二载体的所述至少一种异源抗原是病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原。

56. 权利要求55所述的方法,其中所述宿主自身抗原是来自于TCR之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

57. 权利要求55所述的方法,其中所述第二CMV载体的所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌。

58. 权利要求55所述的方法,其中所述第二CMV载体的所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关:急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

59. 权利要求52至54中任一项所述的方法,其中所述第一CMV载体和所述第二CMV载体的所述至少一种异源抗原是相同抗原。

60. 权利要求52至59中任一项所述的方法,其中所述第二CMV载体是HCMV或RhCMV载体。

61. 权利要求52至60中任一项所述的方法,其中施用所述第二CMV载体包括静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述第二CMV载体。

62. 权利要求52至61中任一项所述的方法,其中所述第二CMV载体在所述第一CMV载体之前、与其同时或之后施用。

63. 产生识别MHC-E-肽复合物之CD8⁺T细胞的方法,所述方法包括:

(1) 向对象施用有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8⁺T细胞组之量的权利要求1至13中任一项所述的CMV载体;

(2) 鉴定来自所述CD8⁺T细胞组的第一CD8⁺TCR,其中所述第一CD8⁺TCR识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物;

(3) 从所述对象中分离一种或更多种CD8⁺T细胞;以及

(4) 用表达载体转染所述一种或更多种CD8⁺T细胞,其中所述表达载体包含编码第二CD8⁺TCR的核酸序列和与编码所述第二CD8⁺TCR的核酸序列可操作地连接的启动子,其中所述第二CD8⁺TCR包含所述第一CD8⁺TCR的CDR3 α 和CDR3 β ,从而产生识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物的一种或更多种经转染CD8⁺T细胞。

64. 权利要求63所述的方法,其中通过DNA或RNA测序鉴定所述第一CD8⁺TCR。

65. 权利要求63或64所述的方法,其中所述第二CD8⁺TCR包含所述第一CD8⁺TCR的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

66. 权利要求65所述的方法,其中编码所述第二CD8⁺TCR的核酸序列与编码所述第一CD8⁺TCR的核酸序列相同。

67. 权利要求63至66中任一项所述的方法,其中向所述对象施用所述CMV载体包括向所述对象静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述CMV载体。

68. 权利要求63至67中任一项所述的方法,其中所述对象先前已暴露于CMV。

69. 权利要求63至68中任一项所述的方法,其中所述对象是人或非人灵长类。

70. 权利要求63至69中任一项所述的方法,其中所述CMV载体的所述至少一种异源抗原包含肿瘤抗原。

71. 权利要求70所述的方法,其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关:急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

72. 权利要求70或71所述的方法,其还包括向所述对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以治疗癌症。

73. 权利要求63至69中任一项所述的方法,其中所述CMV载体的所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原。

74. 权利要求73所述的方法,其中所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌。

75. 权利要求73或74所述的方法,其还包括向所述对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以治疗病原体感染。

76. 权利要求63至69中任一项所述的方法,其中所述CMV载体的所述至少一种异源抗原包含宿主自身抗原或组织特异性抗原。

77. 权利要求76所述的方法,其中所述宿主自身抗原是来自于TCR之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

78. 权利要求76或77所述的方法,其还包括向所述对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以治疗自身免疫性疾病或病症。

79. 权利要求76或77所述的方法,其还包括向所述对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以诱导对所述宿主自身抗原或组织特异性抗原的自身免疫应答。

80. 产生识别MHC-E肽复合物之CD8⁺T细胞的方法,所述方法包括:

(1) 向第一对象施用有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8⁺T细胞组之量的权利要求1至13中任一项所述的CMV载体;

(2) 鉴定来自所述CD8⁺T细胞组的第一CD8⁺TCR,其中所述第一CD8⁺TCR识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物;

(3) 从第二对象中分离一种或更多种CD8⁺T细胞;以及

(4) 用表达载体转染所述一种或更多种CD8⁺T细胞,其中所述表达载体包含编码第二CD8⁺TCR的核酸序列和与编码所述第二CD8⁺TCR的核酸序列可操作地连接的启动子,其中所述第二CD8⁺TCR包含所述第一CD8⁺TCR的CDR3 α 和CDR3 β ,从而产生识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物的一种或更多种经转染CD8⁺T细胞。

81. 权利要求80所述的方法,其中通过DNA或RNA测序鉴定所述第一CD8⁺TCR。

82. 权利要求80或81所述的方法,其中所述第一对象是人或非人灵长类。

83. 权利要求80至82中任一项所述的方法,其中所述第二对象是人或非人灵长类。

84. 权利要求80至83中任一项所述的方法,其中所述第一对象是非人灵长类且所述第二对象是人,并且其中所述第二CD8⁺TCR是包含所述第一CD8⁺TCR的非人灵长类CDR3 α 和CDR3 β

β的嵌合非人灵长类-人CD8⁺TCR。

85. 权利要求84所述的方法,其中所述第二CD8⁺TCR包含所述第一CD8⁺TCR的非人灵长类CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β。

86. 权利要求80至83中任一项所述的方法,其中所述第二CD8⁺TCR包含所述第一CD8⁺TCR的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β。

87. 权利要求86所述的方法,其中编码所述第二CD8⁺TCR的核酸序列与编码所述第一CD8⁺TCR的核酸序列相同。

88. 权利要求80至83中任一项所述的方法,其中所述第二CD8⁺TCR是嵌合CD8⁺TCR。

89. 权利要求88所述的方法,其中所述第二CD8⁺TCR包含所述第一CD8⁺TCR的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β。

90. 权利要求80至89中任一项所述的方法,其中向所述第一对象施用所述CMV载体包括向所述第一对象静脉内、肌内、腹膜内或经口施用所述CMV载体。

91. 权利要求80至90中任一项所述的方法,其中所述第一对象先前已暴露于CMV。

92. 权利要求80至91中任一项所述的方法,其中所述至少一种异源抗原包含肿瘤抗原。

93. 权利要求92所述的方法,其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关:急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

94. 权利要求92或93所述的方法,其还包括向所述第二对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以治疗癌症。

95. 权利要求80至91中任一项所述的方法,其中所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原。

96. 权利要求95所述的方法,其中所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌。

97. 权利要求95或96所述的方法,其还包括向所述第二对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以治疗病原体感染。

98. 权利要求80至91中任一项所述的方法,其中所述至少一种异源抗原包含宿主自身抗原或组织特异性抗原。

99. 权利要求98所述的方法,其中所述宿主自身抗原是来自于TCR之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

100. 权利要求98或99所述的方法,其还包括向所述第二对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以治疗自身免疫性疾病或病症。

101. 权利要求98或99所述的方法,其还包括向所述对象施用所述经转染CD8⁺T细胞以诱导对所述宿主自身抗原或组织特异性抗原的自身免疫应答。

102. 通过权利要求63至101中任一项所述的方法产生的CD8⁺T细胞。

103. 权利要求102所述的CD8⁺T细胞,其中所述CMV载体的所述至少一种异源抗原包含肿瘤抗原。

104. 权利要求103所述的CD8⁺T细胞,其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症相关:急性髓

细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌 (RCC) 和生殖细胞肿瘤。

105. 权利要求102所述的CD8⁺T细胞,其中所述CMV载体的所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原。

106. 权利要求105所述的CD8⁺T细胞,其中所述病原体特异性抗原来自于选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌。

107. 权利要求102所述的CD8⁺T细胞,其中所述CMV载体的所述至少一种异源抗原包含宿主自身抗原或组织特异性抗原。

108. 权利要求107所述的CD8⁺T细胞,其中所述宿主自身抗原是来自于TCR之可变区的抗原或来自于B细胞受体之可变区的抗原。

109. 治疗癌症的方法,所述方法包括向对象施用权利要求103或104所述的CD8⁺T细胞。

110. 治疗病原体感染的方法,所述方法包括向对象施用权利要求105或106所述的CD8⁺T细胞。

111. 治疗自身免疫性疾病或病症的方法,所述方法包括向对象施用权利要求107或108所述的CD8⁺T细胞。

112. 诱导对宿主自身抗原或组织特异性抗原之自身免疫应答的方法,所述方法包括向对象施用权利要求107或108所述的CD8⁺T细胞。

可用于产生非典型CD8⁺ T细胞应答的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年2月10日提交的美国临时申请No.62/114,203、2015年7月24日提交的美国临时申请No.62/196,520、以及2015年9月18日提交的美国临时申请No.62/220,703的优先权权益,其各自通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 总体来说,本领域是在免疫接种中使用CMV载体。更具体地,本领域是产生以非典型MHC限制性为特征的CD8⁺免疫应答。更具体地,本领域是产生具有受MHC-E限制之受体的T细胞,包括CD8⁺。

[0004] 政府支持声明

[0005] 本发明是在由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号P01 AI094417的美国政府支持下产生的。美国政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0006] 表达猿猴免疫缺陷病毒(Simian Immunodeficiency Virus,SIV)蛋白的恒河猴巨细胞病毒(RhCMV)疫苗载体(RhCMV/SIV)提供了针对病原性SIV的防护(Hansen,S.G.等,Nat Med 15,293(2009);Hansen,S.G.等,Nature 473,523(2011);二者均通过引用并入本文)。这种防护与其他T细胞疫苗的根本区别在于其极高的效力以及几乎瞬时起效,约50%的疫苗接种者(vaccinee)在显著平缓且缩短的病毒血症急性期后表现出对病毒复制的完全控制。尽管RhCMV保护的恒河猴显示病毒血症的周期性低水平“尖峰(blip)”,但是未观察到CD4⁺记忆T细胞耗竭,未发生SIV特异性抗体应答,并且随后,随着时间的推移病毒核酸变得几乎不可量化,同时能够复制的病毒从受保护动物的组织中消失。这些事件在自发的SIV原种对照者(elite controller)和DNA致敏(prime)/Ad5加强疫苗接种的(boostvaccinated)对照者中并不发生(Hansen,S.G.等,Nature 502,100(2013)中,通过引用并入本文)。鉴于RhCMV诱导的CD8⁺T细胞在经RhCMV/SIV疫苗接种的恒河猴中介导这种保护作用中的中心作用,定义这些T细胞的功能特性对于理解其对RhCMV/SIV载体诱导之SIV复制控制的机制性贡献至关重要。理解这些性质可进而导致表达异源抗原之巨细胞病毒(CMV)疫苗载体的新用途。

发明内容

[0007] 本文中公开了在对象中产生对至少一种异源抗原之免疫应答的方法。所述方法包括向所述对象施用有效量的CMV载体。所述CMV载体包含编码所述至少一种异源抗原的第一核酸、编码至少一种活性UL40蛋白或者其同源物或直系同源物的第二核酸序列、以及编码至少一种US28蛋白或者其同源物或直系同源物的第三核酸序列。所述CMV载体不表达活性UL128蛋白或其直系同源物,并且不表达活性UL130蛋白或其直系同源物,并且由所述载体产生的CD8⁺T细胞的至少10%受MHC-E或其同源物限制。在一些实施方案中,所述第三核酸

序列编码二至五种活性 US28蛋白或者其同源物或直系同源物。所述异源抗原可以是任何抗原,包括来自于例如以下的病原体特异性抗原:人类免疫缺陷病毒(HIV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、单纯疱疹病毒、乙型或丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒(papillomavirus)、疟原虫属(Plasmodium)寄生虫和结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)。在另一些实例中,所述异源抗原可以是肿瘤抗原,包括例如与以下相关的肿瘤抗原:急性髓细胞性白血病(acute myelogenous leukemia)、慢性髓细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia)、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia)、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphoblastic leukemia)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)和生殖细胞肿瘤(germ cell tumor)。在另一些实例中,所述异源抗原可以是组织特异性抗原或宿主自身抗原,包括例如来自于T细胞受体(TCR)之可变区的抗原、来自于B细胞受体之可变区的抗原、精子抗原或卵抗原。在另一些实例中,所述载体不编码(1)活性UL40蛋白(或其直系同源物)和/或活性US28蛋白(或其直系同源物), (2)活性 UL128蛋白(或其直系同源物),以及(3)活性UL130蛋白(或其直系同源物),产生MHC-II“超表位(supertope)”限制性CD8⁺ T细胞而非 HLA-E限制性CD8⁺ T细胞。

[0008] 本文中公开了人或动物巨细胞病毒载体,其包含编码(1)至少一种异源蛋白抗原的第一核酸序列,(2)编码至少一种活性UL40蛋白或者其同源物或直系同源物的第二核酸序列,以及(3)编码至少一种活性US28 蛋白或者其同源物或直系同源物的第三核酸序列。所述载体不表达活性 UL128和UL130蛋白或其直系同源物。在一些实施方案中,所述第三核酸序列编码二至五种活性US28蛋白或者其同源物或直系同源物。

[0009] 还公开了人或动物巨细胞病毒载体,其(1)不表达活性UL128蛋白(或其直系同源物),(2)不表达活性UL130蛋白(或其直系同源物),并且(3)不表达活性UL40蛋白(或其直系同源物)和/或活性US28蛋白(或其直系同源物)。

[0010] 本文中公开了产生识别MHC-E-肽复合物之CD8⁺ T细胞的方法。所述方法包括向第一对象施用有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8⁺ T 细胞组之量的CMV载体,其编码(1)至少一种异源抗原,(2)至少一种活性UL40蛋白(或其直系同源物或同源物),以及(3)至少一种活性 US28基因(或其直系同源物或同源物)。所述CMV载体不编码活性 UL128和UL130蛋白或其直系同源物。在一些实施方案中,所述CMV 载体编码二至五种活性US28蛋白或者其直系同源物或同源物。所述异源抗原可以是任何抗原,包括病原体特异性抗原、肿瘤抗原、自身抗原或组织特异性抗原。在一些实施方案中,所述自身抗原是来自于T或B细胞受体之可变区的抗原。在一些实施方案中,该方法还可包括鉴定所述CD8⁺ T细胞组的第一CD8⁺ T细胞受体,其中所述第一CD8⁺ TCR识别来自于 MHC-E/异源抗原的肽复合物。在一些实施方案中,通过DNA或RNA 测序鉴定所述第一CD8⁺ T细胞受体。在一些实施方案中,该方法还可包括用表达载体转染从第一对象或第二对象分离的一种或更多种T细胞,其中所述表达载体包含编码第二CD8⁺ T细胞受体的核酸序列和与编码所述第二CD8⁺ T细胞受体的核酸序列可操作地连接的启动子,其中所述第二CD8⁺ T细胞受体包含所述第一CD8⁺ T细胞受体的CDR3 α 和CDR3 β ,从而产生识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物的一种或更多种经转染CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,该方法还可包括向第一或第二对象施用所述经转染CD8⁺ T

细胞以治疗疾病,例如癌症、病原体感染 (pathogenic infection) 或自身免疫性疾病或病症。在一些实施方案中,该方法还可包括向第一或第二对象施用所述经转染CD8⁺ T细胞以诱导对宿主自身抗原或组织特异性抗原的自身免疫应答。

[0011] 还公开了通过包括以下步骤的方法制备的识别MHC-E-肽复合物的经转染CD8⁺ T细胞: (1) 向第一对象施用有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8⁺ T细胞组之量的CMV载体,其中所述CMV载体包含编码至少一种异源抗原的第一核酸序列、编码至少一种活性UL40蛋白或者其直系同源物或同源物的第二核酸序列、以及编码至少一种活性US28蛋白或者其直系同源物或同源物的第三核酸序列,并且其中所述CMV载体不表达活性UL128和UL130蛋白或其直系同源物; (2) 鉴定所述CD8⁺ T细胞组的第一CD8⁺ T细胞受体,其中所述第一CD8⁺ T细胞受体识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物; (3) 从所述第一对象或第二对象分离一种或更多种CD8⁺ T细胞;以及 (4) 用表达载体转染从所述第一或第二对象分离的所述一种或更多种CD8⁺ T细胞,其中所述表达载体包含编码第二CD8⁺ T细胞受体的核酸序列和与编码所述第二CD8⁺ T细胞受体的核酸序列可操作地连接的启动子,其中所述第二CD8⁺ T细胞受体包含所述第一CD8⁺ T细胞受体的CDR3 α 和CDR3 β ,从而产生识别MHC-E-肽复合物的经转染T细胞。所述异源抗原可以是任何抗原,包括病原体特异性抗原或肿瘤抗原。在一些实施方案中,所述CMV载体的第三核酸序列编码二至五种活性US28蛋白或者其直系同源物或其同源物。本文中公开了治疗疾病(例如癌症、病原体感染或自身免疫性疾病或病症)的方法,所述方法包括向第一或第二对象施用识别MHC-E-肽复合物的经转染CD8⁺ T细胞。

[0012] 附图简述

[0013] 使用彩色可以更好地理解本文中所包括的一些图表 (graph) 和曲线图 (plot), 这在专利申请公开中不可用。申请人考虑原始公开内容的所有原始公开的图像和图表 (无论是否为彩色) 部分, 并且保留在以后的诉讼程序 (proceedings) 中呈现本文中所描述附图的彩色图表和曲线图的权利。

[0014] 图1A是来自经毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的恒河猴 (Rh22034 或Rh21826) 的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的一组流式细胞术图。如实施例1中所讨论的, RhCMV毒株68-1不表达来自Rh13、Rh60、Rh157.5和157.4 (分别为HCMV RL11、UL36、UL128和UL130) 开放阅读框的基因产物。使用流式细胞术细胞内细胞因子染色 (intracellular cytokine staining, ICS) 检测在与用所示肽脉冲的指定的抗原呈递细胞一起孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 产生 (每个象限中所示CD8⁺ T细胞的应答频率) 来评价PBMC的肽特异性CD8⁺ T细胞识别。亲本MHC-I阴性K562细胞用作阴性对照并且还被转染以表达指定的MHC-I分子, 而自体B淋巴母细胞样细胞系 (B-lymphoblastoid cellline, BLCL) 用作阳性对照。

[0015] 图1B是来自经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴 (Rh22034和Rh21826) 的PBMC中CD8⁺ T细胞的一组流式细胞术图 (左图) 和柱状图 (右图), 示出了在与用经Gag₂₇₃₋₂₈₇ (SIVmac239Gag 15聚体#69) 脉冲的抗原呈递细胞 (自体BLCL或仅表达Mamu-E的K562 转染子) 一起孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 产生 (每个象限中所示CD8⁺ T细胞的应答频率)。在没有额外肽 (无阻断) 或者在Mamu-E结合肽 Rh67₈₋₁₆VL9 (Rh67VL9) 或Mamu-A * 002:01结合肽Gag₇₁₋₇₉GY9 (SIVgag GY9) 的存在下, 将抗原呈递细胞与指定的Gag 15聚体 (Gag 15-met) 一起孵育。右图是肽阻断条件对CD8⁺ T细胞的IFN- γ 和/或 TNF- α 产生的比

较,所述CD8⁺ T细胞来自与经Gag₂₇₃₋₂₈₇ (SJVmac239Gag 15聚体#69) 脉冲的自体BLCL或Mamu-E转染子一起孵育的四只经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴。数据相对于不用肽阻断所观察到的应答进行归一化。

[0016] 图1C是来自经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴 (Rh22034和Rh21826) 的PBMC中CD8⁺ T细胞的一组流式细胞术图 (左图) 和柱状图 (右图), 示出了在与用经Gag₄₇₇₋₄₉₁ (SIVmac239Gag 15聚体#120) 脉冲的抗原呈递细胞 (自体BLCL或仅表达Mamu-E的K562转染子) 一起孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 产生 (每个象限中所示 CD8⁺ T细胞的应答频率)。在没有额外肽 (无阻断) 或者在Mamu-E结合肽Rh67₈₋₁₆VL9 (Rh67VL9) 或Mamu-A * 002:01结合肽Gag₇₁₋₇₉GY9 (SIVgag GY9) 的存在下, 将抗原呈递细胞与指定的Gag 15聚体一起孵育。右图是肽阻断条件对CD8⁺ T细胞的IFN- γ 和/或TNF- α 产生的比较, 所述CD8⁺ T细胞来自与经Gag₄₇₇₋₄₉₁ (SIVmac239Gag 15聚体#120) 脉冲的自体BLCL或Mamu-E转染子一起孵育的四只经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴。数据相对于不用肽阻断所观察到的应答进行归一化。

[0017] 图2A是说明了以下的表: 在用毒株68-1 RhCMV/gag载体 (n=6)、毒株68-1.2 RhCMV/gag载体 (n=9)、MVA/gag载体 (n=7) 疫苗接种的恒河猴中以及在SIVmac239感染的恒河猴 (n=8) 中, 使用流式细胞术 ICS检测125个连续的15聚体Gag肽 (具有11个氨基酸重叠) 的识别来对CD8⁺ T细胞对SIVmac239Gag的应答进行表位作图 (epitope-mapped)。如实施例1所讨论的, RhCMV毒株68-1.2中恢复了Rh60、Rh157.5和Rh157.4 (分别为HCMV UL36、UL128和UL130) 的表达。使导致高于背景CD8⁺ T细胞应答的肽进行MHC-I (mAb W6/32)、MHC-E (Rh67VL9) 和MHC-II (mAb G46-6) 阻断, 并分类为MHC-I阻断 (白色填充框)、完全MHC-E阻断 (灰色填充框)、部分 MHC-E阻断 (水平阴影线 (hatch) 填充框)、MHC-II阻断 (黑色填充框) 或不确定 (垂直阴影线填充框)。右侧指出了每只恒河猴中潜在包含在这些反应性肽中的独立MHC-E阻断表位的最小数目 (参见方法)。注意, 恒河猴22063和22624用来自于BAC的RhCMV/gag疫苗接种, 而恒河猴21826、22034、22436和22607用来自于非BAC的RhCMVgag (L) 疫苗接种。

[0018] 图2B是来自经MamuA1 * 001:01+毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的PBMC中CD8⁺ T细胞的一组流式细胞术图, 示出了在与用Gag₆₉₋₈₃ (Gag#18) 肽单独脉冲 (无阻断) 或者在MHC-E结合Rh67₈₋₁₆ VL9或Mamu-A * 01结合Gag₁₈₁₋₁₈₉CM9肽的存在下与抗原呈递细胞 (自体BLCL或仅表达MamuA1 * 001:01或Mamu-E的K562转染子) 一起孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 产生 (每个象限中所示CD8⁺ T细胞的应答频率)。

[0019] 图2C是来自经与如图2B所述的抗原呈递细胞一起孵育的 MamuA1 * 001:01-毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的PBMC 中CD8⁺ T细胞的一组流式细胞术图。

[0020] 图3A是一组两幅图, 示出了生产性SIV感染 (CD4⁻Gag p27⁺) 或未感染 (CD4⁺Gagp27⁻) 的CD4⁺ T细胞靶标的表面上的本体 (bulk) 表面MHC-I (通过mAb W6/32测量)。在左图上示出了代表性流式细胞术图, 而右图示出了来自总共16只不相关恒河猴的SIV感染的与未感染的 CD4⁺ T细胞中本体MHC-I染色的平均荧光强度 (mean fluorescent intensity, MFI)。

[0021] 图3B是一组两幅图, 示出了生产性SIV感染 (CD4⁻Gag p27⁺) 或未感染 (CD4⁺Gagp27⁻) 的CD4⁺ T细胞靶标的表面上的MHC-E (通过 mAb 4D12测量)。在左图上示出了代表

性流式细胞术图,而右图示出了来自总共16只不相关恒河猴的SIV感染的与未感染的CD4⁺T细胞中 MHC-E染色的MFI。

[0022] 图3C是示出了响应于Gag₂₇₃₋₂₈₇ (69) 或Gag₄₇₇₋₄₉₁ (120) 肽刺激的 MHC-E限制性CD8⁺T细胞的表型的图。通过检查表达每种标志物的 IFN- γ 和/或TNF- α 产生细胞的数目来计算百分比。

[0023] 图4A是分离自用毒株68-1 RhCMV/gag、MVA/gag、毒株68-1.2 RhCMV/gag疫苗接种的或者用SIV感染的恒河猴的CD8⁺T细胞的一组代表性流式细胞术图,示出了在与单独的经自体SIVmac239感染的CD4⁺T细胞(无阻断)或者在MHC-II结合II类相关恒定链肽(MHC-II binding Class II-associated invariant chain peptide,CLIP)加泛MHC-I阻断mAb W6/32(W6/32+CLIP)或Rh67₈₋₁₆VL9加CLIP(VL9+CLIP)的存在下孵育后CD8⁺T细胞的IFN- γ 和/或TNF- α 产生。

[0024] 图4B是对于来自用毒株68-1 RhCMV/gag (n=5)、MVA/gag (n=6)、毒株68-1.2 RhCMV/gag (n=4) 疫苗接种或用SIV感染(n=6)的恒河猴的CD8⁺T细胞之图4A所示的识别和阻断实验的归一化应答频率进行比较的柱状图。

[0025] 图4C是一组流式细胞术图,说明了MHC-E限制性Gag₄₇₇₋₄₉₁Gag #120表位(上排)或Mamu-A*001:01限制性Gag₁₈₁₋₁₈₉CM9表位(下排)特异的CD8⁺T细胞系(CL)对SIV感染细胞的识别。在指出的阻断条件的存在下将CL与未感染或SIV感染的CD4⁺T细胞(来自 Rh22607)一起孵育。

[0026] 图5(左图)示出了来自用表达SIVgag的Rh67(UL40)缺失的68-1 RhCMV接种的恒河猴的PBMC中CD8⁺T细胞的百分比,示出了在指定时间点与对应于SIVgag的重叠肽一起孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 产生。中间的图示出了来自相同动物的PBMC中的CD8⁺T细胞不响应于 Mamu-E限制性肽Gag₂₇₃₋₂₈₇(Gag69)或Gag₄₇₇₋₄₉₁(Gag120)。右图示出了来自响应于MHC-II限制性肽(Gag53和Gag73)的同一动物的PBMC中CD8⁺T细胞的百分比。MHC-II肽对应于所谓的超表位,即这些肽被许多不同的MHC-II等位基因呈递,并因此在大多数动物中引起应答。

[0027] 图6是说明了以下的表:在用缺少Rh67的毒株68-1 RhCMV/gag载体(n=3)疫苗接种的恒河猴中,使用流式细胞术ICS检测125个连续的 15聚体Gag肽(具有11个氨基酸重叠)的识别来对CD8⁺T细胞对 SIVmac239Gag的应答进行表位作图。对导致高于背景CD8⁺T细胞应答的肽进行MHC-I(mAb W6/32)、MHC-E(Rh67VL9)和MHC-II(mAb G46-6)阻断,并分类为MHC-I阻断(白色填充框)、MHC-E阻断(灰色填充框)和MHC-II阻断(黑色填充框)。注意,所有肽都受MHC-II限制,表明需要Rh67来引起HLA-E特异性CD8⁺T细胞应答。

[0028] 图7A是示出了通过用单个Mamu-D分子转染的细胞系的MHC-II、MHC-Ia、MHC-E或MHC-F表面染色的一组图。

[0029] 图7B是示出了指定的恒河猴(rhesus macaque, RM)个体的基因分型的表。将个体通过Roche/454焦磷酸测序进行Mamu-A、Mamu-B和 Mamu-E基因分型。灰色阴影表示选择用于MHC-I转染子产生的等位基因。如果列出多个等位基因,则产生粗体表示的等位基因。

[0030] 图7C是一组两幅图,其中将一个MHC-Ia或MHC-Ib等位基因转染到亲本(MHC-I阴性)细胞系(分别为.221细胞或K562)中。将细胞用交叉反应性人MHC-I单克隆抗体(W6/32)在室温下染色15分钟以评估 MHC-I表达。将细胞用补充有10%胎牛血清的1×PBS洗涤1次,

用2%多聚甲醛固定,收集在LSRII流式细胞仪上,并用FlowJo进行分析。表达MHC-I的B淋巴瘤细胞样细胞(BLCL)用作阳性对照,而MHC-I 阴性亲本细胞系用作阴性对照。

[0031] 图8A是示出了来自Rh22607的Gag 120的限制性测定的代表性流式数据(flow data)的一组图。

[0032] 图8B是示出了以下的表:来自4只指定的RM(#s 21826、22436、22034和22607;图7B中所示Mamu-I等位基因)的PBMC与用指定的 SIVgag肽脉冲的自体B淋巴瘤细胞样细胞系(BLCL)、MHC-I-null.221 或K562细胞或者指定的单一Mamu-I转染子一起孵育,并随后通过流式细胞术ICS分析CD8⁺T细胞应答(参见图1)。从第二列开始,导致高于背景(无肽)的CD8⁺T细胞应答的组合用+符号(灰色框)表示;不导致高于背景的CD8⁺T细胞应答的组合用-符号(空白框)表示。在第一列中,在每只RM中表达的Mamu-I等位基因以灰色框显示;未表达的等位基因以空白框显示。

[0033] 图9是MHC-I与MHC-E阻断研究的一组流式细胞术图。来自(左) 经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴或(B) 经毒株68-1.2 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的PBMC中CD8⁺T细胞的代表性流式细胞术图,示出了在与上方指出的Gag 15聚体肽一起并且在左侧指出的阻断条件下孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 生产(每个象限中所示CD8⁺T细胞的应答频率)。

[0034] 图10A是一组流式细胞术图,示出了用Gag₂₇₃₋₂₈₇(SIVmac239 Gag 15 聚体#69)刺激来自经毒株68-1RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的 PBMC并且进行流式细胞术ICS。通过IFN- γ 和TNF- α 鉴定响应于这些 MHC-E结合的Gag肽的CD8⁺T细胞,并随后与PBMC中的其余细胞对于指定标志物的表达进行比较。黑色数字表示PBMC中对于指定标志物为阳性的细胞的总体百分比,而灰色数字表示阳性的IFN- γ 和TNF- α 产生细胞的百分比。

[0035] 图10B是一组流式细胞术图,示出了用Gag₄₇₇₋₄₉₁(SIVmac239Gag 15 聚体#120)刺激来自经毒株68-1RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的 PBMC并且进行流式细胞术ICS。通过IFN- γ 和TNF- α 鉴定应答于这些 MHC-E结合的Gag肽的CD8⁺T细胞,并随后与PBMC中的其余细胞对于指定标志物的表达进行比较。黑色数字表示PBMC中对于指定标志物为阳性的细胞的总体百分比,而灰色数字表示阳性的IFN- γ 和TNF- α 产生细胞的百分比。

[0036] 图11共同示出了毒株68-1 RhCMV/SIVgag引起的CD8⁺T细胞的 MHC限制性。

[0037] 图11A是示出了来自经代表性毒株68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴(四只类似地分析的Rh22034)的PBMC的流式细胞术细胞内细胞因子染色(ICS)分析之结果的一组图。用脉冲到指定的MHC-I转染子或对照细胞的表面上的指定的15聚体肽表位刺激来自经疫苗接种恒河猴的PBMC,通过用流式细胞术ICS测定检测IFN- γ 和/或TNF- α 产生来确定CD8⁺T细胞识别(每个象限中所示设门CD8⁺T细胞的应答频率)。亲本MHC-I阴性.221和K562细胞用作阴性对照,而自体B淋巴瘤细胞样细胞(BLCL)用作阳性对照。所测试的MHC-I分子包括二者由Rh22034 表达的那些。

[0038] 图11B是示出了来自类似于图11A那些不由Rh22034表达的另外的恒河猴和人MHC-E分子的流式细胞术ICS分析之结果的一组图。

[0039] 图11C是示出了将如上所述用相同的毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的恒河猴(4只类似地分析的代表)处理的RM的PBMC之表型分析的一组图,所述PBMC用SIVgag₂₇₃₋₂₈₇(69)或SIVgag₄₇₇₋₄₉₁(120) 脉冲的自体BLCL刺激,并且通过流式细胞术ICS测定

对应答性CD3⁺淋巴细胞 (IFN- γ 和TNF- α 产生性的;左图中示出门 (gate)) 进行表型分析,在每个图中,指定门内的应答细胞和非应答细胞分别以灰色和黑色表示 (每个图中所示矩形区域内其相对%以相同颜色指示)。

[0040] 图11D是以下结果的一组图,其中将单一MHC-E转染子与典型 MHC-E结合肽 VMAPRTLLL (VL9) 或对照非MHC-E结合肽 (SIVgag GY9) 一起预孵育,然后用指定的SIVgag 15聚体肽表位进行脉冲。使用来自经毒株68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴的PBMC以及以下 MHC-E转染子如上所述进行流式细胞术ICS测定:对于SIVgag₂₇₃₋₂₈₇ (69)、SIVgag₃₈₅₋₃₉₉ (97) 和SIVgag₄₃₃₋₄₄₇ (109) 为Mamu-E * 02:04,对于SIVgag₂₅₇₋₂₇₁ (65) 和SIVgag₄₇₇₋₄₉₁ (120) 为Mamu-E * 02:011。

[0041] 图12共同示出了MHC-E限制性受限于由 Δ Rh157.5/.4 RhCMV载体引起的CD8⁺ T细胞应答。

[0042] 图12A是示出了以下的表:在用指定的SIVgag表达病毒载体疫苗接种或者用SIVmac239本身感染的恒河猴 (所示每组n=6) 中,使用流式细胞术ICS检测125个连续的15聚体Gag肽 (具有11个氨基酸重叠) 的识别来对SIVgag的CD8⁺ T细胞应答进行表位作图。导致高于背景 CD8⁺ T细胞应答的肽用框表示,其中框的填充指示通过用抗泛MHC-I mAb W6-32、MHC E阻断肽VL9和MHC-II阻断肽CLIP阻断确定的 MHC限制性。MHC-Ia限制性、MHC-E限制性和MHC-II限制性为基于>90%的应答分别被单独W6-32 (白色填充框)、单独W6-32和VL9 (灰色填充框) 以及单独CLIP (黑色填充框) 所阻断,不符合这些标准的应答标记为不确定 (垂直阴影线填充框)。在右侧示出了对于每只恒河猴,这些MHC限制性类别中独立表位的最小数目。

[0043] 图12B是示出了如上所述在用表达这些蛋白质的毒株68-1 RhCMV 载体疫苗接种的恒河猴中对于SIVpo1和结核分枝杆菌蛋白Ag85B、ESAT-6和RpfA的CD8⁺ T细胞应答进行表位作图的表。

[0044] 图12C是一组图 (右)、另一组图 (中) 和柱状图 (右),示出了分离自用毒株68-1 RhCMV/gag、MVA/gag、毒株68-1.2 RhCMV/gag载体疫苗接种或者用SIV感染的恒河猴的CD8⁺ 细胞对SIV感染的CD4⁺ 细胞识别的分析。左侧的流式图示出了在CD8⁺ T细胞与自体SIVmac239感染的CD4⁺ T细胞单独 (无阻断) 或者在泛MHC-I阻断mAb W6/32加MHC-II结合CLIP肽 (抗MHC-I+CLIP) 或MHC-E结合肽VL9加 CLIP (VL9+CLIP) 的存在下孵育后的IFN- γ 和TNF- α 产生。所有图在活的CD3⁺、CD8⁺细胞上进行设门。右侧的柱状图示出了来自所有研究的恒河猴的结果。

[0045] 图13A是示出了在用毒株68-1 RhCMV/gag与常规病毒载体 (后者包括MVA/gag (n=11)、Ad5/gag (n=3) 和经电穿孔的DNA/gag+IL-12 (n=4)) 疫苗接种的个体恒河猴中,或者在具有受控的SIVmac239感染的恒河猴 (血浆病毒载量<10,000拷贝/ml;n=12) 中,由循环CD8⁺ T细胞识别的不同MHC E (灰色) 和MHC-Ia (黑色) 限制性SIVgag表位的总数的比较的图。水平条表示中位值。

[0046] 图13B是示出了在用表达每种指定的抗原的毒株68-1 RhCMV/gag 载体疫苗接种的个体恒河猴 (注意,在施用RhCMV/gag的CMV未感染 (**naïve**) 恒河猴中评估RhCMV IE1应答) 中,由循环CD8⁺ T细胞识别的MHC E限制性表位的密度 (每100个氨基酸的蛋白质长度的表位数) 的比较的图。水平条表示每组的中位值。

[0047] 图13C是分析42只经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴中125个重叠的(11个氨基酸重叠)、连续的SIVgag15聚体肽的MHC-E 限制性SIVgag表位特异性CD8⁺ T细胞应答的宽度的柱状图。注意, 109/12515聚体(87%)在至少1只恒河猴中被MHC-E限制性CD8⁺ T 细胞识别。

[0048] 图13D(左)是基于在经毒株68-1 RhCMV载体疫苗接种的恒河猴中由CD8⁺ T细胞识别的11种最佳MHC-E限制性SIVgag 9聚体肽表位,通过字母高度指示给定位置处每种氨基酸的频率(相对于其在 SIVmac239Gag中的背景频率,参见方法)的序列LOGO。序列LOGO 根据Lampen MH等,53,126-131(2013)(其通过引用并入本文)在TAP 缺陷背景中从HLA-E洗脱的551种肽中的富集(灰色填充字母或阴影线字母)或代表性不足(underrepresentation)(白色填充字母)进行着色。551种Lampen等的肽中在第2位和C末端锚定位置富集的氨基酸是我们的11种最佳SIVgag肽中罕见的(右图),而显著代表性不足的那些被富集。响应于每种最佳肽的毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的恒河猴的百分比被记作“识别频率”。

[0049] 图14是示出在所有经毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的恒河猴中 SIVgag₂₇₆₋₂₈₄和SIVgag₄₈₂₋₄₉₀表位被CD8⁺ T细胞识别的图。在120只经毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的RM中,使用流式细胞术ICS确定对指定的SIVgag 9聚体肽的CD8⁺ T细胞应答,使用CD3⁺/CD8⁺ T细胞中 TNF- α 和/或IFN- γ 的肽特异性诱导作为应答读出(read-out)。所有的恒河猴在背景减除之后表现出对这些超表位的可检出的应答。所示的应答频率已经记忆校正以反映具有CD8⁺、CD95^高记忆亚群的表位应答细胞的频率。水平条表示中位值。

[0050] 图15共同示出了表达单一MHC-I分子的经转染的细胞系的验证,所述MHC-I分子对应于由4只经毒株68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴表达的MHC-I分子。

[0051] 图15A是示出了以下结果的表,其中通过Roche/454焦磷酸测序对4 只经毒株68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴进行Mamu-A、Mamu-B和Mamu-E基因分型。灰色阴影指示选择用于MHC-I转染子产生的等位基因。当列出多个等位基因时,产生了表达粗体所示同质异型体(allomorph)的转染子。

[0052] 图15B是一组两幅图,示出了单一MHC-I分子的表达。将MHC-Ia 或MHC-Ib等位基因转染到亲本(MHC-I阴性)细胞系(.221细胞或 K562细胞)中,并用泛MHC-I单克隆抗体(W6/32)染色。表达MHC-I 的B淋巴母细胞样细胞(BLCL)用作阳性对照,而MHC-I阴性亲本细胞系用作阴性对照。

[0053] 图16A和16B共同示出了对4只恒河猴中RhCMV/SIVgag诱导的 CD8⁺ T细胞应答的MHC-Ia和MHC-Ib特异性的综合分析。

[0054] 图16A是示出使用来自Rh22034的PBMC之SIVgag₄₃₃₋₄₄₇(109) 应答的MHC限制性分析的代表性流式细胞术ICS图的一组图。所示的 TNF- α 与IFN- γ 的流式图在CD3⁺、CD8⁺淋巴细胞上进行设门,每个象限中的细胞分数如图所示。

[0055] 图16B是示出了以下的表,来自4只指定的恒河猴(MHC分型示于图15A中)的PBMC,所述PBMC与用指定的SIVgag肽脉冲(并洗涤) 的自体B淋巴母细胞样细胞(BLCL)、MHC-I-阴性.221或K562细胞或者单一Mamu-I转染子一起孵育,并随后通过流式细胞术ICS分析CD8⁺ T 细胞应答。从第二列开始,导致高于背景(无肽)CD8⁺ T细胞应答的组合用+符号(灰色框)表示;不导致高于背景的CD8⁺ T细胞应答的组合用-符号(空白框)表示。在第一列中,在每只RM中表达的MHC-I等位基因以灰色框表示;未表达的等位基因以空白框显示(Mamu-F *

01:01 的表达未知)。

[0056] 图17是示出以下的表:能够将SIVgag肽呈递至毒株68-1 RhCMV/SIVgag引起的CD8⁺ T细胞的经典MHC-Ia同质异型体不是这些T细胞应答的限制性MHC等位基因。将一组20只经毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的恒河猴对于Mamu-A1 * 001:01和 Mamu-A1 * 002:01的存在进行MHC分型,并且测试SIVgag₆₉₋₈₃ (18)、SIVgag₁₂₉₋₁₄₃ (33)和SIVgag₁₉₇₋₂₁₁ (50)特异性的CD8⁺ T细胞应答。注意,经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴中对这三种表位特异的CD8⁺ T细胞的检测不依赖于经疫苗接种动物中Mamu-A1 * 001:01或Mamu-A1 * 002:01的存在。

[0057] 图18A和18B共同示出,毒株68-1 RhCMV/SIVgag引起的CD8⁺ T 细胞识别恒河猴和人MHC-E分子两种背景下的肽。

[0058] 图18A是示出了以下的一组图:使用流式细胞术ICS检测在与指定的MHC-E转染子和对照抗原呈递细胞上脉冲(并洗涤)的指定的Gag 15 聚体肽一起孵育后的IFN- γ 和/或TNF- α 产生(每个象限中所示CD8⁺ T 细胞的应答频率)来评估来自经毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的恒河猴[Rh21826:SIVgag₈₉₋₁₀₃ (23)、SIVgag₁₂₉₋₁₄₃ (33)、SIVgag₂₅₇₋₂₇₁ (65)、SIVgag₄₇₃₋₄₈₇ (119);Rh22034:SIVgag₆₁₋₇₅ (16)、SIVgag₆₉₋₈₃ (18)、SIVgag₂₇₁₋₂₈₇ (69)、SIVgag₃₈₅₋₃₉₉ (97)、SIVgag₄₇₇₋₄₉₁ (120);Rh22436:SIVgag₁₉₇₋₂₁₁ (30)、SIVgag₁₉₇₋₂₁₁ (50)]的PBMC的肽特异性CD8⁺ T细胞识别(参见图11)。注意,所有12个MHC-E限制性15聚体肽表位可有效地呈递至Mamu-E同质异型体和HLA-E二者上的毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体引起的CD8⁺ T细胞。

[0059] 图18B是由图18A中所示的转染子所表达的人和恒河猴MHC-E分子的 α 1和 α 2区域的氨基酸比对,其中关键的B和F口袋残基用灰色阴影表示。与结合肽相互作用的所有B和F口袋残基在HLA-E * 01:03、Mamu-E * 02:04和Mamu-E * 02:11之间是保守的,而Mamu-E * 02:20的这些残基中存在替换,这是本文研究的MHC-E分子最大区别。虽然与其他同质异型体相比,在B和F口袋残基中存在替换,但是Mamu-E * 02:20 能够结合并呈递相同的肽。

[0060] 图19是示出了以下的图,毒株68-1 RhCMV/SIVgag引起的超表位特异性CD8⁺ T细胞显示出常规CD8a⁺ T细胞表型。该图总结了4只经 68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴(Rh21826、Rh22034、Rh22436、Rh22607)中响应于SIVgag₂₇₃₋₂₈₇ (69)或SIVgag₄₇₇₋₄₉₁ (120)肽刺激的 MHC-E限制性CD8⁺ T细胞的表型分析。该图示出了表达指定表型的肽响应性CD3⁺ T细胞(IFN- γ ⁺和TNF- α ⁺)的百分比(参见图11C中的流式细胞图)。

[0061] 图20A是在用指定的SIVgag 15聚体肽表位脉冲之前,与典型 MHC-E-结合肽VMAPRTLLL (VL9)或对照肽一起预孵育的单一 MHC-E转染子的一组图。使用来自经毒株68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴(对于SIVgag₈₉₋₁₀₃ (23)、SIVgag₁₂₉₋₁₄₃ (33)、SIVgag₁₉₇₋₂₁₁ (50)和SIVgag₄₇₃₋₄₈₇ (119)应答为Rh21826;对于SIVgag₆₁₋₇₅ (16)和SIVgag₆₉₋₈₃ (18)应答为Rh22034;对于SIVgag₁₁₇₋₁₃₁ (30)应答为Rh22436)的PBMC 如图11所述进行流式细胞术ICS。使用以下MHC-E转染子:对于 SIVgag₆₉₋₈₃ (18)和SIVgag₈₉₋₁₀₃ (23) 应答为Mamu-E * 02:04;对于 SIVgag₆₁₋₇₅ (16)、SIVgag₁₁₇₋₁₃₁ (30)、SIVgag₁₂₉₋₁₄₃ (33)、SIVgag₁₉₇₋₂₁₁ (50)和SIVgag₄₇₃₋₄₈₇ (119) 应答为Mamu-E * 02:11)。使用20 μ M终浓度的以下对照肽:对于SIVgag₈₉₋₁₀₃ (23)、SIVgag₁₁₇₋₁₃₁ (30)和SIVgag₁₂₉₋₁₄₃ (33) 应答为Mamu-A1 * 002:01结合肽SIVgag₇₁₋₇₉ (GY9),且对于 SIVgag₆₉₋₈₃ (18)、SIVgag₁₉₇₋₂₁₁ (50)和SIVgag₄₇₃₋₄₈₇ (119) 应答为 Mamu-A1 * 001:01结

合肽SIVgag₁₈₁₋₁₈₉ (CM9)。这些数据与图11D中的数据一起表明VL9肽有效阻断12种不同MHC-E呈递的15聚体肽表位的CD8⁺ T细胞识别。

[0062] 图20B是这样的图,其中指定的抗原呈递细胞与升高浓度的VL9一起预孵育,然后用SIVgag₄₇₇₋₄₉₁ (120) SIVgag 15聚体或最佳 Mamu-A1 * 001:01限制性Gag-CM9或Tat-SL8脉冲。然后将这些抗原呈递细胞与指定的效应物一起孵育用于如图20A所述的流式细胞术ICS分析。Rh22436是经68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的RM,而Rh27002是 SIV感染的。注意,升高浓度的VL9肽逐渐阻断表达MHC-E的抗原呈递细胞活化来自经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的 SIVgag₄₇₇₋₄₉₁ (120) 特异性CD8⁺ T细胞的能力,但对Gag-CM9或Tat-SL8特异性的常规MHC-Ia限制性CD8⁺ T细胞没有影响。

[0063] 图21示出了使用通过流式细胞术ICS的TNF- α 和/或IFN- γ 的肽特异性CD8⁺ T细胞表达作为应答读出的8个另外的MHC-E限制性15肽表位的形式截短分析(formal truncation analysis)。首先确定对亲本15聚体的氨基末端和羧基末端截短物的CD8⁺ T细胞应答,以确定核心表位的最佳肽长度以及氨基和羧基末端(上图,灰色阴影表示最高刺激性的氨基和羧基末端截短肽的末端氨基酸)。然后,通过分析组成每个15聚体的7个连续的9聚体来确认这种截短方法所暗示的最佳9聚体(下图)。每个下图中灰色阴影的9聚体表示每个亲本15聚体的最佳表位。

[0064] 图22A和22B共同示出MHC-E限制性CD8⁺ T细胞对人和恒河猴 MHC-E转染子上脉冲的最佳9聚体的剂量响应。将Mamu-E * 02:04、Mamu-E * 02:20和HLA-E * 01:03转染子用指定浓度的最佳SIVgag 9聚体肽表位SIVgag₄₇₆₋₄₈₄、SIVgag₂₅₉₋₂₆₇、SIVgag₂₇₆₋₂₈₄或SIVgag₄₈₂₋₄₉₀(参见图4)脉冲,洗涤,并且与来自3-4只经68-1 RhCMV/SIVgag疫苗接种的恒河猴的PBMC组合用于流式细胞术ICS确定应答性CD8⁺ T细胞(IFN- γ ⁺和/或TNF- α ⁺)的频率。

[0065] 图22A是示出了Rh22607中对SIVgag₄₇₆₋₄₈₄的剂量响应的代表性分析的一组图。

[0066] 图22B是示出了响应于SIVgag₄₇₆₋₄₈₄、SIVgag₂₅₉₋₂₆₇、SIVgag₂₇₆₋₂₈₄、SIVgag₄₈₂₋₄₉₀的CD8⁺ T细胞的剂量响应(平均值 \pm SEM应答频率)的一组图,其应答频率相对于在用10 μ M肽剂量脉冲的转染子中观察到的响应进行归一化。

[0067] 图23是RhCMV载体毒株68-1、68-1.2和 Δ Rh157.4/.568-1.2之间的基因组差异图。在RhCMV的低传代分离物中,Rh157.5 (UL128)、Rh157.4 (UL130)和Rh157.6 (UL131A)基因以相反取向编码在第2链上。在组织培养中连续传代期间,RhCMV 68-1获得独特的成纤维细胞适应性。Rh157.5 (UL128) ORF以及Rh157.4 (UL130) ORF外显子2的大部分缺失并且相邻的基因组区域反转,导致介导病毒进入非成纤维细胞的五聚体受体复合物的丧失。毒株68-1 RhCMV的成纤维细胞适应也导致在Rh61/Rh60 (UL36)基因中插入另外的胸苷,这导致移码突变和提前终止密码子(pre-mature stop codon)。在RhCMV 68-1.2中,通过将来自RhCMV毒株180.92的Rh157.5 (UL128)和Rh157.4 (UL130)外显子2插入到RhCMV 68.1的Rh157.4 (UL130)第一外显子之后,恢复了功能性五聚体复合物,并且Rh61/Rh60 (UL36)突变恢复为野生型构型。为了确保由毒株68-1 RhCMV载体引起的CD8⁺ T细胞的非常规MHC限制性可归因于Rh157.5/.4 (UL128/UL130)缺失(以及因此缺少功能性五聚体复合物),通过从Rh157.6 (UL131A)终止密码子上游50bp开始直到Rh157.5 (UL128)终止密码子同源重组使Rh157.5 (UL128)和Rh157.4 (UL130)从毒株68-1.2中特异性重新缺失,留下Rh61/Rh60 (UL36)修复未受损。因此,这种 Δ Rh157.5/.4 (Δ UL128/UL130)毒株68-1.2 RhCMV载体与不同于经修复

毒株68-1.2 RhCMV载体的原始毒株68-1 载体之间共有的表型特征可直接归因于 Rh157.5/.4 (UL128/UL130) 缺失。

[0068] 图24共同示出了由毒株68-1与毒株68-1.2 RhCMV/gag载体引起的 CD8⁺ T细胞对 MHC-E与MHC-Ia的差别利用。

[0069] 图24A示出了在具有和不具有泛抗-MHC-I阻断mAb W6-32或 MHC-E阻断VL9肽的情况下,由毒株68-1 (Rh157.4/.5缺失) RhCMV/gag 载体引起的MHC-I依赖性、SIVgag表位特异性CD8⁺ T细胞的代表性流式细胞术应答图(在设门的CD3⁺、CD8⁺ T细胞上的IFN- γ 与TNF- α)。

[0070] 图24B示出了在具有和不具有用泛抗-MHC-I阻断mAb W6-32或 MHC-E阻断VL9肽阻断的情况下,由毒株68-1.2 (Rh157.4/.5-未受损) RhCMV/gag载体引起的MHC-I依赖性、SIVgag表位特异性CD8⁺ T细胞的代表性流式细胞术应答图(在设门的CD3⁺、CD8⁺ T细胞上的IFN- γ 与TNF- α)。注意,VL9肽仅阻断由毒株68-1 RhCMV载体引起的所有 MHC-I依赖性应答。

[0071] 图25是由RhCMV/gag载体(毒株68.1和68-1.2)、MVA/gag载体和受控的SIV感染引起的表位特异性CD8⁺ T细胞应答的限制性分析。如图12A所述,在用指定的SIVgag表达病毒载体疫苗接种或者用 SIVmac239本身感染(SIVmac239对照者恒河猴)的另外的恒河猴(在来自图12A所示每组的6只动物)中,使用流式细胞术ICS检测125个连续15聚体gag肽(具有11个氨基酸重叠)的识别来对SIVgag的CD8⁺ T细胞应答进行表位作图。导致高于背景CD8⁺ T细胞应答的肽用框表示,其中框的填充指示通过用抗泛MHC-I mAb W6-32、MHC-E阻断肽VL9和MHC-II阻断肽CLIP阻断确定的MHC限制性。MHC-Ia限制性、MHC-E限制性和MHC-II限制性分别为基于>90%的应答被单独W6-32(白色填充框)、单独W6-32和VL9(灰色填充框)以及单独CLIP(黑色填充框)所阻断,不符合这些标准的应答标记为不确定(垂直阴影线填充框)。对于每只恒河猴,在右侧示出了这些MHC限制性类别中独立表位的最小数目。注意,被来自经毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴的CD8⁺ T细胞识别的所有可评价表位受MHC-II或MHC-E非常规限制性。相比之下,毒株68-1.2 RhCMV/gag和MVA/gag载体引起的所有应答是常规MHC-Ia限制性的。在SIV对照者恒河猴中鉴定的绝大多数SIVgag表位特异性CD8⁺ T细胞应答也是MHC-Ia限制性的,但是这 12只动物中的4只表现出明确为MHC-II限制性的一个表位特异性应答(179个总应答中的4个应答=2.2%),表明MHC-II限制性CD8⁺ T细胞可鉴定为对于感染的常规免疫应答的次要组分。

[0072] 图26是示出了天然(野生型)RhCMV感染以及用毒株68-1 RhCMV/gag载体初次和二次感染中,对RhCMV立即早期1(IE1)蛋白的CD8⁺ T细胞应答的表位作图的图。在1)用野生型(克隆循环) RhCMV天然感染的恒河猴(上图),2)用毒株68-1 RhCMV/gag载体疫苗接种的RhCMV未感染恒河猴(中图),和3)用毒株68-1 RhCMV/gag 载体超感染(superinfected)的天然野生型RhCMV感染的恒河猴(下图)中,使用流式细胞术ICS检测137个连续15聚体IE1肽(具有11个氨基酸重叠)的识别来对RhCMV IE1的CD8⁺ T细胞应答进行表位作图。导致高于背景CD8⁺ T细胞应答的肽由框表示,其中框的填充指示通过用抗泛MHC-I mAb W6-32、MHC E阻断肽VL9和MHC-II阻断肽CLIP 阻断所确定的MHC限制性。MHC-Ia限制性、MHC-E限制性和MHC-II 限制性为基于>90%的应答分别被单独W6-32(白色填充框)、单独W6-32 和VL9(灰色填充框)以及单独CLIP(黑色填充框)所阻断,不符合这些标准的应答标记为不确

定(垂直阴影线填充框)。对于每只恒河猴,在右侧示出了这些MHC限制性类别中独立表位的最小数目。注意,天然感染的恒河猴中的IE1表位特异性应答完全是MHC-Ia限制性的,而在仅用毒株68-1 RhCMV/gag载体感染的恒河猴中,这些应答更宽并且完全是非常规限制性的(约1:1比例的MHC-II限制性表位和MHC-E限制性表位)。用毒株68-1 RhCMV/gag载体超感染的天然RhCMV感染的恒河猴显示出常规(MHC-Ia)和非常规(MHC-II和/或MHC-E)限制性的IE1-表位特异性CD8⁺ T细胞的预期混合物。

[0073] 图27A是恒河猴中MHC-E特异性mAb 4D12的特异性的验证。直方图示出了通过泛MHC-I mAb W6/32(上排)与MHC-E特异性mAb 4D12(下排)的单一MHC-Ia或MHC-Ib转染子的表面染色。注意,将所有Mamu-Ia和Mamu-E同质异型体转染到表达人β2-微球蛋白的鼠细胞系RMA-S中。恒河猴BLCL用作阳性对照,而亲本RMA-S细胞系用作阴性对照(浅灰色直方图)。注意,4D12对Mamu-E转染子的反应性的限制性。

[0074] 图27B示出了通过用mAb W6/32染色确定的总MHC-I的表面表达。

[0075] 图27C示出了在相同培养物中的生产性SIV感染的和未感染的CD4⁺ T细胞上如通过用mAb 4D12染色确定的总MHC-I的表面表达,其中SIV感染的细胞通过Gag Ag的细胞内表达和CD4下调(Gag⁺/CD4^低)识别,而未感染的细胞通过缺少Gag反应性和高水平的表面CD4表达(Gag⁻/CD4^高)识别。左图示出了代表性流式细胞术直方图。右图描述了来自总共16只不相干恒河猴的SIV感染的CD4⁺ T细胞与未感染的CD4⁺ T细胞中总MHC-I或特异性MHC-E染色的MFI。通过配对T检验确定P值。

[0076] 图28是对SIVgag的MHC-Ia限制性CD8⁺ T细胞应答的群体水平分析。常规MHC-Ia限制性SIVgag表位特异性CD8⁺ T细胞应答的宽度的分析跨越用常规SIVgag表达疫苗(11个MVA/gag、3个Ad5/gag、4个DNA/gag+IL-12)疫苗接种的或者用SIVmac239感染(平台期病毒载量<10,000拷贝/ml;n=12)的30只恒河猴中的125个重叠(11个氨基酸)、连续SIVgag 15聚体肽。星号(*)表示包含Mamu-A1*001:01限制性免疫显性SIVgag₁₈₁₋₁₈₉(CM9)表位的Gag-4515聚体肽。对于MHC-Ia 同质异型体,用于该组的猴的选择很大程度上无偏倚,除了优先选择 Mamu-A1*001:01(30只恒河猴中的19只表达),其占响应于Gag4515聚体的猴的高频率。除了具有人工提高的应答频率的Gag45肽,与由毒株68-1 RhCMV/gag载体引起的MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答(19个表位具有≥40%识别频率,包括2个通用超表位)相比,具有与任何其他 Gag 15聚体反应的MHC-I限制性CD8⁺ T细胞的猴的频率相当低(仅2个15聚体,具有40%识别,且没有一个>40%)(图3C)。然而,除了一个以外,全部125个连续的SIVgag 15聚体在至少一只恒河猴中被 MHC-Ia限制性CD8⁺ T细胞识别,并且除了13个以外,全部SIVgag 15聚体在2只或更多只恒河猴中被靶向。相比之下,42只恒河猴中通过毒株68-1 RhCMV/gag载体引起的MHC-E限制性CD8⁺ T细胞无法识别125个SIVgag 15聚体中的16个。因此,尽管由毒株68-1 RhCMV载体引起的MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答对于功能性单型限制性元件显著广泛,但它们并不像整个多型性MHC-Ia分子群体支持的应答那样广泛,可能是由于MHC-Ia限制性抗原呈递系统的进化优势。

[0077] 图29是一组三幅图。左图示出了用Rh214至Rh220缺失的表达SIVgag的68-1 RhCMV接种的恒河猴的PBMC中CD8⁺ T细胞的百分比,示出了在指定时间点与对应于SIVgag的重叠肽一起孵育后的IFN-γ和/或TNF-α产生。基因区域Rh214至Rh220编码与人巨细胞病毒(HCMV) US28具有同源性的5个基因:Rh214、Rh215、Rh216、Rh218、Rh220(D.Maloulideng,J

Virology 86, 8959 (2012); 其通过引用并入本文)。中间的图示来自相同动物的PBMC中的CD8⁺ T细胞不响应于Mamu-E限制性肽Gag₂₇₃₋₂₈₇ (Gag69) 或Gag₄₇₇₋₄₉₁ (Gag120)。右图示来自相同动物的PBMC中响应于MHC-II限制性肽 (Gag53和Gag73) 的CD8⁺ T细胞的百分比。MHC-II肽对应于所谓的超表位, 即这些肽被许多不同的MHC-II等位基因呈递, 并因此在大多数动物中引起应答。

[0078] 图30是说明了以下的表: 在用缺少Rh214-222的毒株68-1 RhCMV/gag载体 (n=3) 疫苗接种的恒河猴中, 使用流式细胞术ICS检测125个连续的15聚体Gag肽 (具有11个氨基酸重叠) 的识别来对CD8⁺ T细胞对SIVmac239Gag的应答进行表位作图。对导致高于背景CD8⁺ T细胞应答的肽进行MHC-I (mAb W6/32)、MHC-E (Rh67VL9) 和MHC-II (mAb G46-6) 阻断, 并分类为MHC-I阻断 (白色填充框)、MHC-E阻断 (灰色填充框)、MHC-II阻断 (黑色填充框) 或不确定 (阴影线填充框)。注意, 所有肽都受MHC-II限制, 这表明需要Rh214-222来引起HLA-E特异性CD8⁺ T细胞应答。

[0079] 发明详述

[0080] 本发明提供了新的重组CMV载体, 其包括但不限于包含编码至少一种异源蛋白抗原、至少一种活性UL40蛋白和至少一种US28蛋白的核酸但不表达活性UL128和UL130蛋白的重组CMV载体。本发明还提供了重组CMV载体, 其包括但不限于包含编码至少一种异源抗原的核酸但不表达 (1) 活性UL40蛋白和/或活性US28蛋白、(2) 活性UL128蛋白和 (3) 活性UL130蛋白的重组CMV载体。还提供了使用新的重组CMV载体的方法, 例如在对象中产生对至少一种异源抗原之免疫应答的方法、产生识别MHC-E-肽复合物之CD8⁺ T细胞的方法、以及治疗疾病的方法。

[0081] I. 定义

[0082] 除非另有说明, 否则按照常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可见于: Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press 出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等. (编辑), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 以及Robert A. Meyers (编辑), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCR Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0083] 本文中引用的所有出版物、专利、专利申请、互联网网站和登录号/数据库序列 (包括多核苷酸和多肽序列二者) 均通过引用整体并入本文用于所有目的, 其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请、互联网网站或登录号/数据库序列被具体且单独地指明如此通过引用并入。

[0084] 除非另有说明, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。除非上下文另外明确指出, 否则没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。类似地, 除非上下文另外明确指出, 否则词语“或”旨在包括“和”。还应理解, 对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值是近似值, 并且提供用于描述。尽管与本文中所述相似或等同的方法和材料可用于本公开内容的实践或测试中, 但是以下描述了合适的方法和材料。术语“包含”意指“包括”。此外, 材料、方法和实例仅是举例说明性的并不旨在限制。为了便于审阅本公开内容的多个实施方案, 提供了具体术语的以下说明:

[0085] 抗原:本文中使用的术语“抗原”或“免疫原”可互换使用,是指能够在对象中诱导免疫应答的物质,通常为蛋白质。该术语还指以下意义上的免疫活性蛋白质:一旦施用于对象(直接地或通过向对象施用编码所述蛋白质的核苷酸序列或载体)就能够引起通常针对所述蛋白质的体液和/或细胞类型的免疫应答。

[0086] 施用:通过任何有效途径向对象提供或给予药剂,例如包含有效量的含有异源抗原的HCMV载体的组合物。示例性施用途包括但不限于注射(例如皮下、肌肉、皮内、腹膜内和静脉内)、经口、舌下、经直肠、透皮、鼻内、经阴道和吸入途径。

[0087] 癌症:其中异常细胞不受控制地分裂并且能够侵袭其他组织的疾病或病症。癌细胞可通过血液和淋巴系统扩散到其他身体部位。癌症是用于许多疾病的术语。人有超过100种不同类型的癌症。大多数癌症以其来源的器官命名。例如,在结肠中开始的癌症可称为结肠癌。然而,癌症的特征(特别是关于癌症对治疗性化合物的敏感性的特征)不限于癌症来源的器官。癌细胞是来自于任何癌症的任何细胞,无论是体外还是体内。

[0088] 癌症还包括以异常或不受控制的细胞生长为特征的恶性肿瘤。经常与癌症相关的其他特征包括转移,干扰相邻细胞的正常功能,以异常水平释放细胞因子或其他分泌产物,以及抑制或加剧炎性或免疫应答,侵入周围或远端组织或器官(例如淋巴结)等。

[0089] “转移性疾病”或“转移”是指已经离开初始肿瘤部位并例如通过血流或淋巴系统迁移至身体其他部位的癌细胞。癌症的“病理状况(pathology)”包括损害对象健康的所有现象。这包括但不限于异常或不可控制的细胞生长、转移、干扰相邻细胞的正常功能,以异常水平释放细胞因子或其他分泌产物,抑制或加剧炎性或免疫应答,瘤形成(neoplasia),癌前病变(premalignancy),恶性肿瘤,侵入周围或远端组织或器官(例如淋巴结)等。

[0090] 有效量:本文中使用的术语“有效量”是指药剂(例如包含异源抗原的CMV载体或识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物的经转染CD8⁺ T细胞)的量,其足以产生期望的应答,例如减轻或消除病症或疾病的体征或症状,或者诱导对抗原的免疫应答。在一些实例中,“有效量”是治疗(包括预防)任何障碍或疾病的一种或更多种症状和/或潜在病因的量。有效量可以是治疗有效量,其包括防止特定疾病或病症的一种或更多种体征或症状(例如与感染性疾病、癌症或自身免疫病相关的一种或更多种体征或症状)发生的量。

[0091] 突变:突变是与正常、共有或“野生型”序列在核酸或多肽序列中的任何差异。突变体是包含突变的任何蛋白质或核酸序列。此外,具有突变的细胞或生物体也可称为突变体。

[0092] 一些类型的编码序列突变包括点突变(个别核苷酸或氨基酸的差异);沉默突变(不导致氨基酸变化的核苷酸差异);缺失(其中一个或多个核苷酸或氨基酸丢失直至并包括基因的整个编码序列缺失的差异);移码突变(不可被3整除的多个核苷酸缺失导致氨基酸序列改变的差异)。导致氨基酸差异的突变也可称为氨基酸替换突变。氨基酸替换突变可通过相对于氨基酸序列中特定位置处的野生型的氨基酸变化来描述。

[0093] 本文中使用的“失活突变”是病毒基因中的任何突变,其最终导致病毒蛋白质的功能降低或功能完全丧失。

[0094] 核苷酸序列或核酸序列:术语“核苷酸序列”和“核酸序列”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)序列,包括但不限于信使RNA(mRNA)、DNA/RNA杂交体或合成核酸。核酸可以是单链或者部分或完全双链(双链体)。双链体核酸可以是同源双链体或异源双链体。

[0095] 重组:重组核酸或多肽是具有不是天然存在的序列或者具有通过将序列的两个或更多个区段人工组合(否则其将是分开的)制备的序列的那些,例如包含异源抗原和/或通过一个或更多个基因的突变使复制缺陷的CMV载体。这种人工组合通常通过化学合成或更常见地通过例如通过基因工程技术对核酸的分离区段进行人工操作来完成。重组多肽还可以指使用重组核酸(包括转移到不是多肽的天然来源的宿主生物体的重组核酸(例如,编码形成包含异源抗原的CMV载体的多肽的核酸))制备的多肽。

[0096] 复制缺陷:本文中使用的复制缺陷CMV是一旦在宿主细胞中,不经历病毒复制或者复制其基因组并因此产生病毒粒子的能力显著受限的病毒。在另一些实例中,复制缺陷病毒是传播缺陷的(dissemination-deficient),即它们能够复制其基因组,但不能感染另一细胞,因为病毒颗粒不从受感染细胞释放或者因为释放非感染性病毒颗粒。在另一些实例中,复制缺陷病毒是扩散缺陷的(spread-deficient),即感染性病毒不从受感染的宿主分泌,因此病毒不能在宿主之间扩散。在一些实施方案中,复制缺陷CMV是包含导致缺少病毒复制所必需的一个或更多个基因(“必需基因”)或最佳复制所需的一个或更多个基因(“增强基因”)之表达的突变的CMV。本领域中已经描述了CMV必需基因和增强基因(特别是US 2013/0136768,其通过引用并入本文)并且在本文中公开。

[0097] 可药用载体:可药用载体的使用是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第19版, 1995描述了适合于本文中公开的组合物的药物递送的组合物和制剂。一般来说,载体的性质将取决于所采用的具体施用模式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体作为载剂,所述可注射流体包括药学和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如散剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规无毒固体载体可包括例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体之外,待施用的药物组合物可包含少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0098] 多核苷酸:本文中使用的术语“多核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的聚合物。多核苷酸由四种碱基构成:腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶/尿嘧啶(尿嘧啶用于RNA)。来自核酸的编码序列指示由核酸编码的蛋白质的序列。

[0099] 多肽:术语“蛋白质”、“肽”、“多肽”和“氨基酸序列”在本文中可互换使用,是指任何长度的氨基酸残基的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,其可包含经修饰的氨基酸或氨基酸类似物,并且其可被氨基酸以外的化学部分中断。该术语还涵盖已经自然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物:例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰(例如与标记或生物活性组分缀合)。

[0100] 序列同一性/相似性:两个或更多个核酸序列或者两个或更多个氨基酸序列之间的同一性/相似性以序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以用同一性百分比来测量;百分比越高,序列越一致。序列相似性可以用同一性或相似性百分比(其考虑保守氨基酸替换)来测量;百分比越高,序列越相似。具有显著量的序列同一性并且彼此功能也相同或相似的多肽或其蛋白质结构域(例如,在不同物种中具有相同功能的蛋白质,或者不改变蛋白质的功能或其大小的蛋白质的突变体形式)可称为“同源物”。

[0101] 用于比较的序列比对方法是本领域中公知的。多种程序和比对算法描述于:

Smith&Waterman, *Adv Appl Math* 2,482 (1981); Needleman& Wunsch, *J Mol Biol* 48,443 (1970); Pearson&Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA* 85,2444 (1988); Higgins&Sharp, *Gene* 73,237-244 (1988); Higgins &Sharp, *CABIOS* 5,151-153 (1989); Corpet等, *Nuc Acids Res* 16, 10881-10890 (1988); Huang等, *Computer App Biosci* 8,155-165 (1992); 以及Pearson等, *Meth Mol Bio* 24,307-331 (1994)。此外, Altschul等, *J Mol Biol* 215,403-410 (1990) 提出了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0102] NCBI局部序列比对检索基本工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) (Altschul等, (1990), 同上) 可从许多来源获得, 包括国家生物信息中心 (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) 以及互联网上, 用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。更多信息可以在NCBI 网站找到。

[0103] BLASTN用于比较核酸序列, 而BLASTP用于比较氨基酸序列。如果两个所比较的序列具有同源性, 则指定的输出文档将这些同源区域显示为比对的序列。如果两个所比较的序列不具有同源性, 则指定的输出文档将不显示比对的序列。

[0104] 一经比对, 通过对在两个序列中存在相同核苷酸或氨基酸残基的位置的数目进行计数来确定匹配数。百分比序列同一性通过将匹配数除以所鉴定序列中所列出的序列的长度或计算的长度(例如来自所鉴定序列中所列出的序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基), 然后将所得值乘以100 来计算。例如, 当与具有1154个核苷酸的测试序列进行比对时, 具有1166 个匹配的核酸序列与测试序列具有75.0%的同一性 ($1166 \div 1554 * 100 = 75.0$)。百分比序列同一性值舍入到最接近的十分位。例如, 75.11、75.12、75.13和75.14被舍入到75.1, 而75.15、75.16、75.17、75.18和75.19被进入到75.2。长度值将始终为整数。在另一个实例中, 包含20个核苷酸区域的靶序列与来自鉴定序列的20个连续核苷酸如下排列, 它包含的区域与鉴定序列具有75%序列同一性(即 $15 \div 20 * 100 = 75$)。

[0105] 对于大于约30个氨基酸的氨基酸序列的比较, 采用使用设置为默认参数(间隙存在代价为11, 且每个残基间隔代价为1)的默认BLOSUM62 矩阵的Blast 2序列函数。同源物的通常特征在于使用NCBI Basic Blast 2.0用氨基酸序列的计数全长比对具有至少70%的序列同一性, 用数据库(例如nr数据库、swissprot数据库和专利序列数据库)进行有间隙的blastp。用DUST (Hancock&Armstrong, *Comput Appl Biosci* 10,67-70 (1994)) 过滤用blastn程序搜索到的查询。其他程序使用SEG。此外, 可以进行手动比对。具有甚至更大相似性的蛋白质当通过该方法评估时会显示出提高的同一性百分比, 例如与蛋白质具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。

[0106] 当比对短肽(少于约30个氨基酸)时, 采用设置为默认参数(开放间隙9, 延伸间隙1罚分)的PAM30矩阵使用Blast 2序列函数进行比对。与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质当通过该方法评估时会显示出提高的百分比同一性, 例如与蛋白质具有至少约60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。当对小于完整序列进行序列同一性比较时, 同源物通常在10-20个氨基酸的短窗口上具有至少75%的序列同一性, 并且根据它们与参考序列的同一性可具有至少85%、90%、95%或98%的序列同一性。在NCBI网站上描述了在这样的短窗口上确定序列同一性的方法。

[0107] 两个核酸分子密切相关的一个指示是这两个分子在如上所述的严格条件下彼此

杂交。尽管如此,由于遗传密码的简并性,不显示高度同一性的核酸序列可编码相同或相似(保守的)氨基酸序列。可使用这种简并性来进行核酸序列的变化以产生全部编码基本上相同蛋白质的多个核酸分子。这样的同源核酸序列可例如与编码蛋白质的核酸具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。

[0108] 对象:本文中使用的术语“对象”是指活的多细胞脊椎动物生物体(包括人和非人哺乳动物的一大类)。

[0109] 治疗:本文中使用的术语“治疗”是指改善疾病或病理状况的体征或症状的干预。提及疾病、病理状况或症状本文中使用的术语“治疗”(“treatment”、“treat”和“treating”)也指治疗的任何可观察到的有益效果。有益效果可通过例如以下证明:通过易感对象中疾病的临床症状的延迟发作,疾病的一些或全部临床症状的严重性降低,疾病的较慢进展,疾病的复发次数降低,对象的整体健康或健康状态的改善,或者本领域中公知的特定疾病特异性的其他参数。预防性治疗是向不显示疾病的体征或者只显示早期体征的对象施用的治疗,其目的是降低发生病理状况的风险。治疗性治疗是在疾病的体征和症状发生之后向对象施用的治疗。

[0110] II. 重组CMV载体及其使用方法

[0111] 本文中公开了能够重复感染生物体的人或动物巨细胞病毒(CMV)载体。所述CMV载体包含编码异源蛋白抗原的核酸序列,并且缺少活性UL128和UL130蛋白或其直系同源物(感染其他物种的CMV的同源基因)的表达。异源抗原可以是任何抗原,包括来自于例如HIV、SIV、单纯疱疹病毒、乙型或丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫属寄生虫和结核分枝杆菌的病原体特异性抗原。在另一些实例中,异源抗原可以是肿瘤抗原,包括例如与急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤相关的肿瘤抗原。在一些实例中,CMV载体还缺少活性UL40蛋白(或其直系同源物)和/或活性US28蛋白(或其直系同源物)。在另一些实例中,异源抗原可以是组织特异性抗原或宿主自身抗原,包括例如来自于T细胞受体之可变区的抗原、来自于B细胞受体之可变区的抗原、精子抗原或卵抗原。

[0112] 在一些实例中,由于在编码UL128、UL130或UL40(或其直系同源物)的核酸序列中存在突变,所述载体不表达活性UL128、UL130、US28或UL40蛋白。突变可以是导致缺少活性UL128、UL130、US28或UL40蛋白表达的任何突变。这样的突变可包括点突变、移码突变、少于编码蛋白质的全部序列的缺失(截短突变)、或编码蛋白质之全部核酸序列的缺失、或任何其他突变。

[0113] 在另一些实例中,由于载体中存在包含抑制UL128、UL130或UL40蛋白(或其直系同源物)表达的反义或RNAi序列(siRNA或miRNA)的核酸序列,载体不表达活性UL128、UL130、US28或UL40蛋白(或其直系同源物)。可以以任何组合使用突变和/或反义和/或RNAi以产生缺少活性UL128、UL130、US28或UL40(或其直系同源物)的CMV载体。

[0114] CMV载体可包含本领域中已知提供不同免疫应答的另外的失活突变,例如失活US11突变或失活UL82(pp71)突变,或任何其他失活突变。CMV载体还可包含编码本领域中已知对于体内病毒传播(即从细胞扩散到细胞)必需的或增强体内病毒传播的病毒蛋白质的一种或更多种病毒基因中的至少一个失活突变。这样的失活突变可以由点突变、移码突变、

截短突变或编码病毒蛋白之全部核酸序列的缺失引起。失活突变包括病毒基因中最终导致病毒蛋白质的功能降低或功能完全丧失的任何突变。

[0115] 本文中公开了在对象中产生对异源抗原之 $CD8^+$ T细胞应答的方法。所述方法包括向对象施用有效量的CMV载体。在一个实施方案中, CMV载体的特征在于具有编码至少一种异源抗原的核酸序列, 以及不表达活性UL128蛋白(或其直系同源物)、不表达活性UL130蛋白(或其直系同源物)、并且表达至少一种活性UL40蛋白和至少一种活性US28蛋白的核酸序列。所述至少一种活性UL40蛋白和至少一种活性US28蛋白可以是UL40和US28的直系同源物或同源物。由这种载体引起的 $CD8^+$ T细胞应答的特征在于具有至少10%的针对由MHC-E呈递的表位的 $CD8^+$ T细胞。在另一些实例中, 至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%、至少90%、至少95%或至少95%的 $CD8^+$ T细胞受MHC-E限制。在一些实施方案中, CMV载体表达二至五种活性US28蛋白或者其直系同源物或同源物。在一些实施方案中, 所述方法还包括鉴定来自自由CMV载体引起的 $CD8^+$ T细胞的 $CD8^+$ T细胞受体, 其中所述 $CD8^+$ T细胞受体识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物。在一些实施方案中, 通过RNA或DNA测序鉴定 $CD8^+$ T细胞受体。在另一个实施方案中, CMV载体的特征在于具有不表达活性UL128、UL130和UL40蛋白的核酸序列, 并且这种载体可用于与HLA-E限制性 $CD8^+$ T细胞(由包含完整US28和UL40的一种或更多种另外的载体引起)一起, 或在没有HLA-E限制性 $CD8^+$ T细胞(由缺少功能性UL40或US28蛋白的一种或更多种另外的载体引起)的情况下引起识别MC-II超表位的 $CD8^+$ T细胞。在另一个实施方案中, CMV载体的特征在于具有不表达活性UL128、UL130和UL28蛋白的核酸序列, 并且这种载体可用于与HLA-E限制性 $CD8^+$ T细胞(由包含完整US28和UL40的一种或更多种另外的载体引起)一起, 或者在没有HLA-E限制性 $CD8^+$ T细胞(由缺少功能性UL40或US28蛋白的一种或更多种另外的载体引起)的情况下引起识别MC-II超表位的 $CD8^+$ T细胞。在另一个实施方案中, CMV载体的特征在于具有不表达活性UL128、UL130、UL28和UL40蛋白的核酸序列, 并且这种载体可用于与HLA-E限制性 $CD8^+$ T细胞(由包含完整US28和UL40的一种或更多种另外的载体引起)一起, 或者在没有HLA-E限制性 $CD8^+$ T细胞(由缺少功能性UL40或US28蛋白的一种或更多种另外的载体引起)的情况下引起识别MC-II超表位的 $CD8^+$ T细胞。

[0116] 本文中公开了产生识别MHC-E-肽复合物之 $CD8^+$ T细胞的方法。该方法包括向第一对象(或动物)施用编码至少一种异源抗原和活性UL40蛋白或者其同源物或直系同源物的CMV载体, 以产生识别MHC-E/肽复合物的 $CD8^+$ T细胞组。所述CMV载体不编码活性UL128和UL130蛋白或其直系同源物, 并且所述异源抗原可以是任何抗原, 包括病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原。在一些实施方案中, 宿主自身抗原是来自于T细胞受体或B细胞受体之可变区的抗原。该方法还包括: 鉴定 $CD8^+$ T细胞组的第一 $CD8^+$ T细胞受体, 其中所述第一 $CD8^+$ T细胞受体识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物; 并用表达载体转染所述一种或更多种 $CD8^+$ T细胞, 其中所述表达载体包含编码第二 $CD8^+$ T细胞受体的核酸序列和与编码T细胞受体的核酸序列可操作地连接的启动子, 其中所述第二 $CD8^+$ T细胞受体包含第一 $CD8^+$ TCR的CDR3 α 和CDR3 β , 从而产生识别MHC-E肽复合物的一种或更多种经转染 $CD8^+$ T细胞。用于用表达载体转染的一种或更多种 $CD8^+$ T细胞可以从第一对象或第二对象分离。在一些实施方案中, 该方法还可包括向第一或第二对象施用所述一种或更多种经转染T细胞以治疗疾病(例如癌症、病原体感染或自身免疫性疾病或病症)。在一些实

施方案中,该方法还可包括向第一或第二对象施用所述一种或更多种经转染T细胞以诱导对组织特异性抗原或宿主自身抗原的自身免疫应答。

[0117] 还公开了通过包括以下步骤的方法制备的识别MHC-E-肽复合物的经转染CD8⁺ T细胞: (1) 向第一对象施用有效产生识别MHC-E/肽复合物的CD8⁺ T细胞组之量的CMV载体,其中所述CMV载体包含编码至少一种异源抗原的第一核酸序列,并且还包含编码活性UL40蛋白的第二核酸序列,并且其中所述CMV载体不表达活性UL128和UL130蛋白或其直系同源物; (2) 鉴定所述CD8⁺ T细胞组的第一CD8⁺ T细胞受体,其中所述第一CD8⁺ T细胞受体识别来自于MHC-E/异源抗原的肽复合物; (3) 从所述第一对象或第二对象分离一种或更多种CD8⁺ T细胞;以及 (4) 用表达载体转染从第一或第二对象分离的所述一种或更多种CD8⁺ T细胞,其中所述表达载体包含编码第二CD8⁺ T细胞受体的核酸序列和与编码第二T细胞受体的核酸序列可操作地连接的启动子,其中第二CD8⁺ T细胞受体包含第一CD8⁺ T细胞受体的CDR3 α 和CDR3 β ,从而产生识别MHC-E-肽复合物的经转染T细胞。所述异源抗原可以是任何抗原,包括病原体特异性抗原、组织特异性抗原、宿主自身抗原或肿瘤抗原。在一些实施方案中,通过RNA或DNA测序鉴定第一CD8⁺ T细胞受体。本文中公开了治疗疾病(例如癌症、病原体感染或者自身免疫性疾病或病症)的方法,所述方法包括向第一或第二对象施用识别MHC-E肽复合物的经转染T细胞。本文中公开了诱导对宿主自身抗原或组织特异性抗原的自身免疫应答的方法,所述方法包括向第一或第二对象施用识别MHC-E肽复合物的经转染T细胞。

[0118] 在另一些实例中,所述方法涉及向对象施用有效量的第二CMV载体,所述第二CMV载体包含编码第二异源抗原的核酸序列。该第二载体可以是任何CMV载体,包括具有活性UL128蛋白(或其同源物或直系同源物)和/或活性UL130蛋白(或其同源物或直系同源物)的CMV载体。所述第二CMV载体可包含第二异源抗原。所述第二异源抗原可以是任何异源抗原,包括与第一CMV载体中的异源抗原相同的异源抗原。所述第二CMV载体可以相对于第一CMV载体的施用在任何时间施用,包括在施用第一CMV载体之前、与其同时或之后。这包括在第一个载体之前或之后的任何的月数、天数、小时数、分钟数或秒数施用第二载体。

[0119] 当用作表达载体时,人或动物CMV载体在所选对象(例如人)中是天生非病原性的。在一些实施方案中,已经修饰了CMV载体以使其在所选对象中非病原性(不能在宿主之间扩散)。

[0120] 异源抗原可以是不是来自于CMV的任何蛋白质或其片段,包括癌抗原、病原体特异性抗原、模型抗原(例如溶菌酶、匙孔咸血蓝蛋白(keyhole-limpet hemocyanin, KLH)或卵清蛋白)、组织特异性抗原、宿主自身抗原或任何其他抗原。

[0121] 病原体特异性抗原可以来自于任何人或动物病原体。病原体可以是病毒病原体、细菌病原体或寄生虫,并且抗原可以是来自于病毒病原体、细菌病原体或寄生虫的蛋白质。寄生虫可以是生物体或由生物体引起的疾病。例如,寄生虫可以是原生动生物体、引起疾病的原生动生物体、蠕虫(helminth)生物体或蠕虫(worm)、由蠕虫生物体引起的疾病、体外寄生虫(ectoparasite)或由体外寄生虫引起的疾病。

[0122] 抗原可以是来自于癌症的蛋白质。癌症包括但不限于急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、

肾细胞癌(RCC) 和生殖细胞肿瘤。

[0123] 抗原可以是宿主自身抗原。宿主自身抗原包括但不限于来自于T细胞受体之可变区或来自于B细胞受体之可变区的抗原。抗原可以是组织特异性抗原。组织特异性抗原包括但不限于精子抗原或卵抗原。

[0124] 本文中公开的CMV载体可用作包含重组CMV病毒或载体以及可药用载体或稀释剂的免疫原性、免疫或疫苗组合物。包含重组CMV病毒或载体(或其表达产物)的免疫组合物引起局部或全身性免疫应答。应答可以是但不一定是保护性的。包含重组CMV病毒或载体(或其表达产物)的免疫原性组合物同样引起局部或全身性免疫应答,其可以是但不一定是保护性的。疫苗组合物引起局部或全身性保护性应答。因此,术语“免疫组合物”和“免疫原性组合物”包括“疫苗组合物”(因为前两个术语可以是保护性组合物)。

[0125] 本文中公开的CMV载体可用于在对象中诱导免疫应答的方法中,所述方法包括向对象施用包含重组CMV病毒或载体和可药用载体或稀释剂的免疫原性、免疫或疫苗组合物。为了本说明书的目的,术语“对象”包括所有动物,包括非人灵长类和人,而“动物”包括人以外的所有脊椎动物物种;并且“脊椎动物”包括所有脊椎动物,包括动物(如本文中使用的“动物”)和人。此外,当然,“动物”的一个子集是“哺乳动物”,为了本说明书的目的,其包括除人之外的所有哺乳动物。

[0126] 本文中公开的CMV载体可用在包含重组CMV病毒或载体和可药用载体或稀释剂的治疗组合物中。本文中公开的CMV载体可以通过将包含编码异源抗原的序列的DNA插入CMV基因组的必需或非必需区域来制备。所述方法还可包括从CMV基因组中缺失一个或更多个区域。所述方法可包括体内重组。因此,所述方法可包括在供体DNA的存在下在细胞相容性培养基中用CMV DNA转染细胞,所述供体DNA包含侧翼为与CMV基因组的一部分同源的DNA序列的异源DNA,从而将异源DNA引入到CMV的基因组中,并且任选地然后回收通过体内重组修饰的CMV。所述方法还可包括切割CMV DNA以获得经切割的CMV DNA,将异源DNA连接至经切割的CMV DNA以获得杂交CMV-异源DNA,用杂交CMV-异源DNA转染细胞,以及任选地然后回收通过异源DNA的存在而修饰的CMV。由于包含了体内重组,因此所述方法还提供了包含编码CMV外源多肽的非天然存在于CMV中的供体DNA的质粒,所述供体DNA在CMV DNA的区段内,否则所述区段将与CMV基因组的必需或非必需区域共线,使得来自CMV必需或非必需区域的DNA在供体DNA的侧翼。可将异源DNA插入到CMV中以产生任何取向的重组CMV,其在期望时产生该DNA的稳定整合及其表达。

[0127] 在重组CMV载体中编码异源抗原的DNA也可包含启动子。启动子可以来自任何来源,例如疱疹病毒,包括内源CMV启动子,如HCMV、RhCMV、鼠CMV(MCMV)或其他CMV启动子。启动子也可以是非病毒启动子,例如EF1 α 启动子。启动子可以是截短的转录活性启动子,其包含由病毒提供的反式激活蛋白反式激活的区域和截短的转录活性启动子所来源的全长启动子的最小启动子区。启动子可以由对应于最小启动子的DNA序列和上游调节序列的缔合构成。最小启动子由CAP位点加TATA框(基本转录水平的最小序列;不受调节的转录水平)构成;“上游调节序列”由上游元件和增强子序列构成。此外,术语“截短的”表示全长启动子不完全存在,即全长启动子的某些部分已被除去。并且,截短的启动子可以来自于例如MCMV或HCMV的疱疹病毒,例如HCMV-IE或MCMV-IE。基于碱基对,大小可从全长启动子降低达到至多40%,甚至至多90%。启动子也可以是经修饰的非病毒启动子。关于HCMV启动子,参考

美国专利No. 5,168,062和5,385,839。关于用质粒DNA转染细胞用于由其进行表达,参考Felgner等(1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561。而且,关于直接注射质粒DNA作为简单且有效的针对多种传染病接种疫苗的方法,参考Science, 259:1745-49, 1993。因此,可通过直接注射载体DNA来使用载体在本发明的范围内。

[0128] 还公开了可插入重组病毒或质粒的表达盒,所述表达盒包含截短的转录活性启动子。表达盒还可包含功能性截短的多聚腺苷酸化信号;例如截短的但是仍有功能性的SV40聚腺苷酸化信号。考虑到本质上提供了更大信号,确实出人意料的是截短的聚腺苷酸化信号是功能性的。截短的多聚腺苷酸化信号解决重组病毒(例如CMV)的插入大小限制问题。表达盒还可包含相对于其所插入的病毒或系统异源的DNA;并且所述DNA可以是本文中所述的异源DNA。

[0129] 关于用于疫苗或免疫组合物的抗原,还参见Stedman's Medical Dictionary(第24版,1982,例如,疫苗的定义(疫苗制剂中使用的抗原的列表);可使用来自这些抗原的目标抗原或表位。关于异源抗原,本领域技术人员可根据肽或多肽的氨基酸以及相应DNA序列的知识以及特定氨基酸的性质(例如,大小、电荷等)和密码子词典来选择异源抗原及其编码DNA,而无需过度的实验。

[0130] 确定抗原的T表位的一种方法涉及表位作图。通过寡肽合成产生异源抗原的重叠肽。然后测试各肽与由天然蛋白质引起的抗体结合或诱导T细胞或B细胞活化的能力。这种方法在T细胞表位作图时特别有用,因为T细胞识别与MHC分子复合的短线性肽。

[0131] 一般来说,如下产生对异源抗原的免疫应答:只有当蛋白质被切割成较小肽并且在位于另一细胞表面的“主要组织相容性复合物(MHC)”的复合物中呈递时,T细胞才识别蛋白质。有两类MHC复合物-I类和 II类,且每类由许多不同等位基因组成。不同物种和个体对象具有不同类型的MHC复合物等位基因;称其具有不同的MHC类型。一类MHC I类分子称为MHC-E(人中为HLA-E, RM中为Mamu-E,小鼠中为 Qa-1b)。

[0132] 应注意,包含编码异源抗原之序列的DNA本身可包含用于在CMV载体中驱动表达的启动子,或者所述DNA可以限于异源抗原的编码DNA。该构建体可以相对于内源性CMV启动子以这样的取向放置,使其可操作地与启动子连接并由此表达。此外,可以进行编码异源抗原的DNA的多个拷贝或使用强或早期启动子或者早期和晚期启动子或其任何组合以增强或提高表达。因此,编码异源抗原的DNA可以相对于CMV内源性启动子适当定位,或者那些启动子可以与编码异源抗原的DNA一起被移位以被插入到另一位置。编码多于一种异源抗原的核酸可以包装在CMV载体中。

[0133] 还公开了包含所公开的CMV载体的药物和其他组合物。可以配制这样的药物和其他组合物以便以本领域已知的任何施用方法使用。这样的药物组合物可以通过肠胃外途径(皮内、肌内、皮下、静脉内等)。施用也可以通过黏膜途径,例如经口、经鼻、经生殖器等。

[0134] 所公开的药物组合物可以根据药学领域技术人员公知的标准技术来制备。这样的组合物可以以医学领域技术人员公知的剂量和技术施用,考虑例如特定患者的品种或物种、年龄、性别、体重和病症以及施用途径等因素。组合物可以单独施用,或者可与其他CMV载体或其他免疫、抗原性或疫苗或治疗组合物共施用或依次施用。这样的其他组合物可包含纯化的天然抗原或表位或者由重组CMV或其他载体系统表达的抗原或表位,并且在考虑上述因素的情况下施用。

[0135] 组合物的实例包括用于孔口(例如,经口、经鼻、经肛门、经生殖器(例如经阴道)等)施用的液体制剂,例如混悬剂、糖浆剂或酞剂;以及用于胃肠外、皮下、皮内、肌内或静脉内施用(例如,注射施用)的制剂,例如无菌混悬剂或乳剂。在这样的组合中,重组体可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂(例如无菌水、生理盐水、葡萄糖等)混合。

[0136] 抗原性、免疫或疫苗组合物通常可包含佐剂和一定量的CMV载体或表达产物以引起期望的应答。在人类应用中,明矾(alum)(磷酸铝或氢氧化铝)是典型的佐剂。皂苷及其纯化组分Quil A、Freund完全佐剂以及用于研究和兽医应用的其他佐剂具有毒性,这限制了其在人疫苗中的潜在用途。也可使用化学上定义的制剂,例如胞壁酰二肽、单磷酸脂质A、磷脂缀合物,例如由Goodman-Snitkoff等,J.Immunol.147:410-415(1991)所述的那些,蛋白质包封在蛋白脂质体内,如Miller等,J.Exp.Med. 176:1739-1744(1992)所述,以及蛋白质包封在脂质囊泡例如Novasome 脂质囊泡中(Micro Vesicular Systems,Inc.,Nashua,N.H.)。

[0137] 组合物可以包装在单一剂型中,用于通过肠胃外(即,肌内、皮内或皮下)施用或孔口施用(例如经舌(perlingual)(例如,经口)、胃内、黏膜(包括口腔内、肛门内、阴道内等))施用。此外,有效剂量和施用途径由组合物的性质、由表达产物的性质、如果直接使用重组CMV则由表达水平,以及由已知因素(例如宿主的品种或物种、年龄、性别、体重、病症和性质,以及LD₅₀和已知的并且不需要过度实验的其他筛选程序)确定。表达产物的剂量可以从几到几百微克变化,例如5至500 μ g。CMV载体可以以任何合适的量施用以在这些剂量水平下实现表达。在一些非限制性实例中:CMV载体可以以至少10²pfu的量施用;因此,CMV载体可以以至少该量施用;或在约10²pfu至约10⁷pfu范围内。其他合适的载体或稀释剂可以是具有或没有防腐剂的水或缓冲盐水。CMV载体可以是冻干的,用于在施用时重悬,或可以在溶液中。“约”可以意指在限定值的1%、5%、10%或20%内。

[0138] 应理解,本发明的蛋白质及其编码核酸可以不同于本文中所示和所述的精确序列。因此,本发明考虑所示序列的缺失、添加、截短和替换,只要序列根据本发明的方法起作用即可。在这方面,替换将通常在性质上是保守的,即在氨基酸家族内发生的那些替换。例如,氨基酸通常分为四个家族:(1)酸性-天冬氨酸和谷氨酸;(2)碱性-赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性-丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;以及(4)不带电荷极性的-甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时被分类为芳香族氨基酸。可以合理地预期,在以下情况下不会对生物活性产生重大影响:用异亮氨酸或缬氨酸独立地替换亮氨酸,或反之亦然;用谷氨酸替换天冬氨酸,或反之亦然;用丝氨酸替换苏氨酸,或反之亦然;或用结构相关氨基酸进行氨基酸的类似保守替换。因此,与所述蛋白质具有基本相同的氨基酸序列,但是不具有实质上影响蛋白质免疫原性的小的氨基酸替换的蛋白质也在本公开内容的范围内。

[0139] 本发明的核苷酸序列可以进行密码子优化,例如密码子可被优化用于人细胞。例如,可如此改变任何病毒或细菌序列。许多病毒(包括HIV和其他慢病毒)使用大量的稀有密码子,并且通过将这些密码子改变以使其符合期望对象中常用的密码子,可以实现异源抗原的增强表达,如Andre等,J.Virol.72:1497-1503,1998中所述。

[0140] 考虑编码CMV载体和包含在其中的糖蛋白的功能和/或抗原性等同变体和衍生物的核酸序列。这些功能等同变体、衍生物和片段显示出保留抗原活性的能力。例如,不改变

所编码氨基酸序列的DNA序列的变化以及导致氨基酸残基的保守替换、一个或几个氨基酸缺失或添加、以及氨基酸残基被氨基酸类似物替换将不会显著影响所编码多肽的性质。保守氨基酸替换为甘氨酸/丙氨酸；缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸；天冬酰胺/谷氨酰胺；天冬氨酸/谷氨酸；丝氨酸/苏氨酸/甲硫氨酸；赖氨酸/精氨酸；以及苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸。在一个实施方案中，变体与目标抗原、表位、免疫原、肽或多肽具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同源性或同一性。

[0141] 可通过比对时比较序列来确定序列同一性或同源性，以使重叠和同一性最大化，同时使序列空位最小化。特别地，可以使用许多数学算法中的任一种来确定序列同一性。用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是Karlin&Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1990;87:2264-2268 的算法，在Karlin&Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1993;90: 5873-5877中进行了改进。

[0142] 用于比较序列的数学算法的另一个实例是Myers&Miller,CABIOS 1988;4:11-17的算法。将这样的算法并入作为GCG序列比对软件包一部分的ALGER程序(2.0版本)中。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时，可以使用PAM120权重残基表，空位长度罚分为12，且空位罚分为4。用于鉴定局部序列相似性和比对的区域的另一种可用算法是如 Pearson&Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988;85:2444-2448中描述的FASTA算法。

[0143] 根据本发明有利地使用的方法是WU-BLAST(Washington University BLAST)2.0版软件。可从ftp://blast.wustl.edu/blast/executables下载适用于多个UNIX平台的WU-BLAST 2.0版可执行程序。该程序基于 WU-BLAST 1.4版本，后者进而又基于公共领域NCBI-BLAST 1.4版(Altschul&Gish,1996,Local alignment statistics,Doolittle编辑,Methods in Enzymology 266:460-480;Altschul等.(1990),同上;Gish& States,1993; Nature Genetics 3:266-272;Karlin&Altschul,Proc.Natl. Acad.Sci.USA 90:5873-5877(1993);所有这些均通过引用并入本文)。

[0144] 使用标准重组DNA和克隆技术制备本发明的多种重组核苷酸序列和抗体和/或抗原。这样的技术是本领域技术人员公知的。参见例如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”，第二版(Sambrook等. 1989)。

[0145] 本发明的核苷酸序列可以插入“载体”中。术语“载体”是本领域技术人员广泛使用和理解的，并且如本文中所使用的术语“载体”与本领域技术人员所理解的含义一致使用。例如，本领域技术人员通常使用术语“载体”用于指允许或促进将核酸分子从一个环境转移到另一个环境或者允许或促进核酸分子操作的载剂。

[0146] 可以根据本发明使用允许表达本发明的病毒的任何载体。在某些实施方案中，所公开的病毒可以体外使用(例如使用无细胞表达系统)和/或在体外生长的培养细胞中以产生编码的异源抗原(例如，病原体特异性抗原、HIV抗原、肿瘤抗原和抗体)，其然后可用于多种应用，例如生产蛋白质疫苗。对于这样的应用，可以使用允许在体外和/或培养的细胞中表达病毒的任何载体。

[0147] 对于待表达的所公开异源抗原，异源抗原的蛋白质编码序列应该与指导蛋白质的转录和翻译的调节或核酸控制序列“可操作地连接”。如本文中使用的，当编码序列和核酸

控制序列或启动子以一定方式共价连接,使得编码序列的表达或转录和/或翻译处于核酸控制序列的影响下或控制下时,认为其是“可操作地连接”。“核酸控制序列”可以是任何核酸元件,例如但不限于启动子、增强子、IRES、内含子以及指导与其可操作地连接的核酸序列或编码序列之表达的本文中所述的其他元件。术语“启动子”在本文中用于指围绕RNA聚合酶II的起始位点聚集的一组转录控制模块,并且当其与本发明的蛋白质编码序列可操作地连接时,导致所编码蛋白质的表达。本发明转基因的表达可以在组成型启动子或诱导型启动子的控制下,后者仅在暴露于某些特定的外部刺激(例如但不限于抗生素如四环素,激素如蜕皮素,或重金属)时才启动转录。启动子也可以是特定细胞类型、组织或器官特异性的。许多合适的启动子和增强子是本领域已知的,并且任何这样的合适的启动子或增强子可用于表达本发明的转基因。例如,合适的启动子和/或增强子可选自真核启动子数据库(Eukaryotic Promoter Database, EPDB)。

[0148] 本公开内容涉及表达异源蛋白抗原的重组病毒载体。在一些实例中,抗原是HIV抗原。有利地,HIV抗原包括但不限于在美国公开No. 2008/0199493 A1和2013/0136768A1中讨论的HIV抗原,二者均通过引用并入本文。HIV、核酸或其免疫原性片段可用作HIV蛋白质抗原。例如,可以使用美国公开No. 2008/0199493 A1和2013/0136768 A1中讨论的HIV核苷酸。HIV抗体识别的任何抗原也可用作HIV蛋白质抗原。蛋白质抗原也可以是SIV抗原。例如,可以使用美国公开No. 2008/0199493 A1和2013/0136768 A1中讨论的SIV抗原。

[0149] 根据本发明使用的载体可包含合适的基因调节区(例如启动子或增强子),使得可表达本发明的抗原。

[0150] 在对象体内表达本发明的抗原,例如以便产生针对HIV-1抗原的免疫应答和/或针对HIV-1的保护性免疫,应选择适合于在对象中表达并且对于体内使用安全的表达载体。在一些实例中,可期望在实验动物中表达抗体和/或抗原,例如用于本发明的HIV-1免疫原性组合物和疫苗的临床前测试。在另一些实例中,可以在人对象中表达抗原,例如在本发明的免疫原性组合物和疫苗的临床试验和实际临床应用中。

[0151] 本文中描述的CMV载体可包含可防止宿主间扩散的突变,从而使得病毒不能感染免疫受损的或其他由于CMV感染而可能面临并发症的对象。本文中所述的CMV载体还可包含导致存在免疫显性和非免疫显性表位以及非典型MHC限制性的突变。然而,本文中所述的CMV载体中的突变不影响载体重新感染先前已被CMV感染的对象的能力。这样的CMV突变描述于例如美国专利公开2013-0136768、2010-0142823、2014-0141038、以及PCT申请公开W0 2014/138209中,其全部均通过引用并入本文。

[0152] 所公开的CMV载体可以在体内施用,例如其目的是产生免疫原性应答,包括CD8⁺免疫应答,包括特征在于高百分比的CD8⁺ T细胞应答被MHC II类和/或MHC-E(或其同源物或直系同源物)限制的免疫应答。例如,在一些实例中,可能期望在实验室动物(例如恒河猴)中使用所公开的CMV载体,用于使用RhCMV的免疫原性组合物和疫苗的临床前测试。在另一些实例中,期望在人对象中使用所公开的CMV载体,例如在使用HCMV的免疫原性组合物的临床试验中和用于实际临床应用。

[0153] 对于这样的体内应用,所公开的CMV载体作为还包含可药用载体的免疫原性组合物的组分施用。本发明的免疫原性组合物可用于刺激针对异源抗原(包括病原体特异性抗原)的免疫应答,并可用作针对HIV-1的预防性或治疗性疫苗的一种或更多种组分以用于预

防、改善或治疗AIDS。本发明的核酸和载体特别地可用于提供基因疫苗,即,用于将编码本发明抗原的核酸递送至对象(例如人)的疫苗,使得抗原然后在对象中表达以引起免疫应答。

[0154] 用于动物(包括人)的免疫接种安排(或方案)是已知的,并且对于特定对象和免疫原性组合物可以容易地确定。因此,免疫原可以向对象施用一次或更多次。优选地,在免疫原性组合物的分开施用之间存在设定的时间间隔。尽管该间隔对于每个对象而言是不同的,但通常为10天至数周,并且通常为2、4、6或8周。对于人,间隔通常为2至6周。在本发明的一个特别有利的实施方案中,间隔更长,有利地为约10周、12周、14周、16周、18周、20周、22周、24周、26周、28周、30周、32周、34周、36周、38周、40周、42周、44周、46周、48周、50周、52周、54周、56周、58周、60周、62周、64周、66周、68周或70周。免疫接种方案通常具有免疫原性组合物的1至6次施用,但可以具有少至1或2或4次。诱导免疫应答的方法还可包括施用与免疫原一起的佐剂。在一些情况下,每年、每两年或其他长时间间隔(5至10年)的加强免疫接种可以补充初始免疫方案。本发明的方法还包括多次致敏-加强方案。在这些方法中,一次或更多次致敏免疫接种接着一次或更多次加强免疫接种。每次免疫接种的实际免疫原性组合物可以相同或不同,免疫原性组合物的类型(例如,含有蛋白质或表达载体)、途径和免疫原的制剂也可以变化。例如,如果表达载体用于致敏和加强步骤,则其可以是相同或不同类型(例如,DNA或者细菌或病毒表达载体)。一种可用的致敏-加强方案提供间隔4周的两致敏免疫接种,接着是在最后一次致敏免疫接种后的第4周和第8周进行两次加强免疫接种。对于本领域技术人员来说还很明显的是,在使用本发明的DNA、细菌和病毒表达载体来提供致敏和加强方案中涵盖多种排列和组合。可重复使用CMV载体,同时表达来自于不同病原体的不同抗原。

实施例

[0155] 以下实施例举例说明了所公开的方法。根据本公开内容,本领域技术人员将认识到,所公开方法的这些实施例和其他实施例的变化将是可能的,而无需过度的实验。

[0156] 实施例1.通过缺少UL128和UL130但含有UL40和US28基因的恒河猴巨细胞病毒疫苗载体诱导MHC-E限制性CD8⁺ T细胞。

[0157] 先前已经证明,RhCMV/SIV载体驱动替代的SIV特异性CD8⁺ T细胞应答,其完全不同于常规疫苗形式产生的典型应答,且甚至不同于SIV感染本身(Hansen, S.G.等, Science 340, 1237874 (2013), 其通过引用并入本文)。

[0158] 尽管已经确定了RhCMV/SIV诱导的CD8⁺ T细胞应答以MHC-II 限制性CD8⁺ T细胞群体的存在为主,但限制其余CD8⁺ T细胞(被泛 MHC-I阻断抗体W6/32抑制的那些)的分子仍然是未知的。

[0159] 特别地,施用68-1 RhCMV/gag载体在经每种RhCMV/gag载体疫苗接种的恒河猴中引起靶向SIVmac239Gag₂₇₃₋₂₈₇ (Gag 15聚体#69)和 Gag₄₇₇₋₄₉₁ (Gag 15聚体#120)“超表位”的MHC-I限制性CD8⁺ T细胞,而不管MHC-Ia的表达。这意味着功能保守的“非经典”(即非多态)MHC-Ib分子的参与。本文中描述了这些CD8⁺ T细胞的限制性MHC-I 等位基因的鉴定。由具有强的RhCMV/gag诱导的CD8⁺ T细胞应答的4只经毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的恒河猴的组群中开发表达单一“经典”(即多态)MHC-Ia或非经典MHC-Ib等位基因的MHC-I转染子组

(图7)。使用先前描述的MHC限制性测定(Hansen等,Science(2013),同上),确定了靶向Gag₂₇₃₋₂₈₇和Gag₄₇₇₋₄₉₁超表位的CD8⁺ T细胞在MHC-E的情况下识别这些表位(图1A)。

[0160] MHC-E(人中的HLA-E、恒河猴中的Mamu-E、以及小鼠中的Qa-1^b)是在体内几乎每个有核细胞中表达的高度单型、非经典MHC-Ib分子,其在免疫系统细胞中特别地高表达(N.Lee等,Proc Natl Acad Sci USA 95, 5199(1998)和S.Coupelet等,Blood 109,2806(2007),二者都通过引用并入本文)。与目前鉴定的超过8,500个HLA I类等位基因(J.Robinson等, Nucleic Acids Res 41,D1222(2013);其通过引用并入本文)相反,仅存在两个HLA-E分子,其在位于肽结合槽外部的一个氨基酸处变化,并因此可能是功能上相同的(R.K.Strong等,J Biol Chem 278,5082(2003);其通过引用并入本文)。MHC-E的这种高度单型性质可能解释了每个经 RhCMV/gag免疫接种的恒河猴如何能够独立于每个动物中存在的 MHC-Ia等位基因而靶向相同的Gag MHC-I超表位。

[0161] MHC-E也被鉴定为在经RhCMV/gag疫苗接种的恒河猴中其余 MHC-I阻断的CD8⁺ T细胞的限制性等位基因(图1A)。虽然MHC-E的结构与经典MHC-Ia分子的结构相似,但是在正常的生理条件下,MHC-E仅重复地结合并呈递来自于MHC-Ia分子的前导序列的单个9聚体肽用于呈递至NK细胞。然而,在细胞应激的条件下,例如在病毒感染期间,MHC-E结合一组完全独立的高度多样化的CD8⁺ T细胞表位,其结合基序与主要MHC-Ia前导肽的结合基序不匹配(Lampen等,同上,和C.C. Oliviera等,J E. xp Med 207,207(2010);二者均通过引用并入本文)。MHC-E脱离前导肽并随后将替代肽库(repertoire)呈递至CD8⁺ T细胞的能力表明,替代的MHC-I限制性CD8⁺ T细胞应答主要(如果不是全部的话)由于通过MHC-E的呈递。

[0162] 最近已经发现HLA-E限制性CD8⁺ T细胞针对多种人病原体,包括 CMV(G.Pietra等,Proc Natl Acad Sci USA 100,10896(2003);其通过引用并入本文);EBV(Jorgensen PB等,PLoS One 7,e46120(2012);其通过引用并入本文);伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)(R. Salerno-Goncalves等,J Immunol 173,5852(2004);其通过引用并入本文);以及结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)(A.S.Heinzel等, J Exp Med 196,1473(2002)和SA Joosten等.PLoS Pathol 6,e1000782(2010);二者均通过引用并入本文)。然而,没有报道HIV/SIV特异性 MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答,并且目前不存在诱导针对任何异源抗原的这些非经典限制性CD8⁺ T细胞的疫苗平台。

[0163] 使用MHC“阻断”肽确认了来自动物的MHC限制性数据,所述 MHC“阻断”肽以高亲和力与特异性MHC同质异型体结合,因此对于该 MHC分子的结合槽胜过其他肽。为了保护其感染的宿主细胞免受NK细胞介导的裂解,HCMV编码糖蛋白UL40(RCMV同源物为Rh67),其包含来自于经典MHC-Ia前导序列的精确的9聚体肽(VMAPRTL LLL, Rh67₈₋₁₆VL9)。VL9肽以极高的亲和力特异性地结合MHC-E肽结合槽(P.Tomasec等,Science 287,1031(2000);其通过引用并入本文)。将抗原呈递细胞与来自于Rh67的VL9肽预孵育以阻断Gag₂₇₃₋₂₈₇和Gag₄₇₇₋₄₉₁肽与MHC-E的结合,或与不相关的Mamu-A*002:01(A*02)结合的 Gag₇₁₋₇₉GY9肽的结合。MHC-E高亲和力结合肽Rh67₈₋₁₆VL9的存在完全抑制了表达单个MHC-E等位基因的自体BLCL和转染子二者上的 Gag₂₇₃₋₂₈₇和Gag₄₇₇₋₄₉₁超表位的CD8⁺ T细胞识别,这证实了MHC-E作为 MHC-I超表位应答的呈递等位基因(图1B和1C)。

[0164] 将MHC-E对由RhCMV/gag载体引起的总体Gag特异性CD8⁺ T细胞应答的贡献与常规改良牛痘安卡拉(Modified Vaccinia Ankara)(MVA/gag)载体和天然SIV感染进行了比

较。将使用MHC-I或MHC-II 特异性的阻断单克隆抗体 (mAb) 以及阻断Rh67₈₋₁₆VL9肽的MHC-E的流式细胞术ICS来评估在25只恒河猴组群中 (6只用毒株68-1 RhCMV/gag免疫接种、9只用毒株68-1.2 RhCMV/gag免疫接种、7只用 MVA/gag免疫接种、以及8只经SIV感染的恒河猴) 发现的每个表位特异性应答的限制性。仅在用毒株68-1 RhCMV/gag免疫接种的恒河猴中发现MHC-E阻断的CD8⁺ T细胞应答。此外,在用毒株68-1 RhCMV/gag 免疫接种的恒河猴中观察到的每个MHC-I阻断应答由MHC-E呈递 (图 2A、8和9)。在用毒株68-1.2 RhCMV/gag载体免疫接种的恒河猴中没有观察到MHC-E限制性CD8⁺ T细胞。

[0165] 考虑到两种CMV毒株之间的最小差异,经毒株68-1.2 RhCMV/gag 载体疫苗接种的恒河猴中缺少MHC-E限制性CD8⁺ T细胞是出人意料的。在作为细菌人工染色体 (BAC) 克隆之前在成纤维细胞上体外培养期间,RhCMV 68-1失去了表达来自Rh13、Rh60、Rh157.5和Rh157.4 (分别为HCMV RL11、UL36、UL128和UL130) 开放阅读框的基因产物的能力 (D.Malouli等,J Virol 86,8959 (2012) 和W0 2014/138209;其通过引用并入本文)。其中,在RhCMV 68-1.2毒株中Rh60、Rh157.5和 Rh157.4的表达恢复 (A.E.Lilja,T.Shenk,Proc Natl Acad Sci U S A 105, 19950 (2008);其通过引用并入本文),表明这些基因产物中的一种或组合的存在足以抑制MHC-E上CD8⁺ T细胞的致敏。可以排除Rh60作为介导这种抑制作用的基因,因为其存在于来自于非BAC的RhCMV/gag (L) 载体中 (Hansen,S,G等,Science 328,102 (2010);其通过引用并入本文),其诱导MHC-E限制性CD8⁺ T细胞 (图2A)。因此,CMV中不存在基因Rh157.5和Rh157.4 (HCMV中为UL128-130) 对于诱导MHC-E限制性CD8⁺ T细胞是必需的。

[0166] 观察到某些应答的不完全的VL9阻断 (参见图2A中Rh22607中的 Gag 15聚体#18)。实际上,虽然每个RhCMV/gag诱导的、W6/32阻断的CD8⁺ T细胞应答在MHC-E的情况下识别肽,但是在经典MHC-Ia等位基因的情况下识别了这些不完全VL9-阻断的肽,例如在Rh22607中由 Mamu-A*001:01 (A*01) 呈递的Gag₆₉₋₈₃ (Gag 15聚体#18) (图8B)。为了更加接近地理解这种双重呈递,进行了肽阻断研究。这些表明,尽管 Mamu-A*01结合的Gag₁₈₁₋₁₈₉CM9肽的存在足以抑制Mamu-A*01转染子上Gag₆₉₋₈₃的呈递,并且来自于Rh67的VL9肽的存在抑制MHC-E转染子上Gag₆₉₋₈₃的呈递,但是需要这两种肽来完全阻断来自Mamu-A*01⁺恒河猴的自体BLCL上Gag₆₉₋₈₃的呈递 (图2B)。相比之下,相同的Gag₆₉₋₈₃表位的呈递被来自Mamu-A*01恒河猴的BLCL上单独Rh67₈₋₁₆VL9肽的存在完全阻断,强调了MHC-E作为这些肽的主要限制性等位基因 (图 2C)。然而,鉴于MHC-E限制性CD8⁺ T细胞在MHC-E或经典MHC-Ia 分子的情况下响应于同源肽的能力,这些细胞的TCR可能直接识别MHC 结合肽本身或与保守的MHC结构基序结合。出乎意料地,能够结合特异性肽表位的MHC等位基因的存在不足以产生靶向所述表位的CD8⁺ T细胞应答 (图8),这指示在确定每个经RhCMV免疫接种的恒河猴中靶向的特异性表位组中存在另外的免疫调节层。

[0167] 接下来,确定了MHC-E限制性CD8⁺ T细胞参与针对SIV的免疫应答。HIV和SIV通过Nef介导的来自细胞表面的经典MHC I类分子的下调来逃避CD8⁺ T细胞识别 (O.Schwartz等,Nat Med 2,338 (1996);K.L. Collins等,Nature 391,397 (1998);二者均通过引用并入本文)。相比之下,Nef不能下调HLA-E,且其表面表达实际上随HIV感染而提高 (J.Natterman等,Antivir Ther 10,95, (2005);其通过引用并入本文)。首先,确定了生产性SIV感染的CD4⁺ T细胞表面上Mamu-E的命运。使用泛 MHC-I mAb W6/32和Mamu-E特异性mAb

4D12,证明了与HIV感染期间的HLA-E相似,SIV感染期间Mamu-E表面表达显著提高(图3A和3B)。因此,MHC-E限制性CD8⁺ T细胞可能是特别有效的,因为它们不受Nef介导的其限制性MHC-I分子下调的影响。MHC-E与CD8⁺ T细胞表面上表达的TCR $\alpha\beta$ 和CD94/NKG2复合物二者相互作用(V.M. Brahd等,Nature 391,795(1998);其通过引用并入本文)。

[0168] 特别地,高NKG2C表达由CMV感染驱动,且NKG2C受体的参与触发与MHC-E相互作用的NK和T细胞的活化(S.Lopez-Verges等,Proc Natl Acad Sci U S A 108,14725(2011)和M.Guma等,Eur J Immunol 35,2071(2005);二者均通过引用并入本文)。为了研究在经毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的恒河猴中MHC-E限制性CD8⁺ T细胞利用NKG2C受体以介导MHC-E诱导的活化的可能性,检查这些细胞的表面表型,并且发现了很少(如果有的话)NKG2A/NKG2C表达(图3C和10)。此外,MHC-E限制性CD8⁺ T细胞表现出常规CD3⁺、CD8 $\alpha\beta$ ⁺、TCR γ δ ⁻、NKG2A/C⁻表型,表明这些T细胞通过CD8稳定化TCR $\alpha\beta$ 相互作用识别MHC-E结合的肽。

[0169] 接下来,将经68-1 RhCMV/SIV免疫接种的恒河猴中存在的MHC-E 限制性CD8⁺ T细胞特异性识别自体、SIV感染的CD4⁺ T细胞的能力与用MVA/gag或毒株68-1.2 RhCMV/gag免疫接种或用SIV感染的恒河猴中发现的经典MHC-I限制性CD8⁺ T细胞的能力进行比较。从所有经处理的恒河猴中分离的CD8⁺ T细胞强烈识别自体SIV感染的CD4⁺ T细胞,并且这种识别通过添加泛MHC-I阻断mAb W6/32和MHC-II结合CLIP 肽被完全阻断(图4A和4B)。相比之下,在除了从经毒株68-1 RhCMV/SIV免疫接种的恒河猴中分离的CD8⁺ T细胞以外,当MHC-E 阻断Rh67₈₋₁₆VL9肽替换MHC-I阻断mAb W6/32时,经感染细胞的CD8⁺ T细胞识别完全恢复。这表明MHC-E限制性CD8⁺ T细胞识别SIV感染的细胞。

[0170] 为了更准确地检查MHC-E结合的、来自于SIV的表位是否存在于经感染细胞的表面,产生Gag₄₇₇₋₄₉₁ (Gag#120)超表位特异性、MHC-E 限制性CD8⁺ T细胞系。测试该系响应于自体SIV感染的CD4⁺ T细胞的能力。为了比较,还评估了经典MHC限制性(Mamu-A * 001:01限制性) Gag₁₈₁₋₁₈₉CM9CD8⁺ T细胞系。这两种Gag特异性CD8⁺ T细胞系均特异性识别SIV感染的细胞,并且当靶标与泛MHC-I阻断mAb W6/32预孵育时,识别被阻断。相比之下,当靶标与MHC-E结合肽Rh67₈₋₁₆VL9 预孵育时,仅MHC-E限制性CD8⁺ T细胞系不能识别SIV感染的细胞(图4C)。总之,这些数据表明MHC-E限制性CD8⁺ T细胞特异性识别经感染细胞表面的来自于SIV的肽表位。

[0171] 毒株68-1载体诱导在非经典MHC-E分子情况下识别肽抗原的CD8⁺ T细胞。这样的CD8⁺ T细胞代表了用于疫苗开发的新的细胞免疫应答,并且考虑到MHC-E的独特的免疫生物学,其可以是特别有效。与从HIV 感染的细胞表面下调的经典HLA分子相比,HLA-E表达上调,并且 MHC-E表达的提高发生在病毒入口处感染的前24小时内(J.Natterman 等,Antivir Ther 10,95(2005)和L.Shang等,J Immunol 193,277(2014);二者均通过引用并入本文)。在人群中仅存在两种功能相同的HLA-E等位基因(R.K.Strong等,J Biol Chem 278,5082(2003);其通过引用并入本文)。因此,特异性诱导MHC-E限制性T细胞的疫苗平台可导致真正通用的CD8⁺ T细胞疫苗,每个经疫苗接种的个体具有不受HIV Nef介导的免疫逃避影响的相同T细胞应答。事实上,如本文中所公开的,MHC-E 限制性CD8⁺ T细胞由毒株68-1 RhCMV载体强烈引起,其在恒河猴中显示出针对SIV的无与伦比的保护(Hansen等(2009),同上;Hansen等.(2011),同上;Hansen等.Nature(2013),同上)。因此,诱导针对经典和非经典表位二者之应答的HIV疫苗可提供有效阻断病毒复制以及随后钝化病毒传播所

需的必要广度的T细胞应答。

[0172] 如上所述, HCMV编码包含以极高亲和力结合MHC-E肽结合槽的9聚体肽(VMAPRTLLL, Rh67₈₋₁₆VL9)的糖蛋白UL40(RCMV同源物为Rh67)(P. Tomasec等, Science 287, 1031 (2000); 其通过引用并入本文)。由于体外数据表明VL9竞争与来自抗原的肽结合, 所以考虑了使Rh67(UL40)从RhCMV 68-1的基因组中缺失将进一步提高体内HLA-E限制性CD8⁺T细胞之频率的可能性。为了检查这种可能性, 使Rh67(UL40)从68-1 RhCMV/gag载体中缺失。将所得重组病毒接种到天然感染有RhCMV的动物中。在接种后第0、7、14、21、28和42天, 获得PBMC, 并通过使用特异性肽的细胞内细胞因子染色来测量应答于总SIVgag以及MHC-E的CD8⁺T细胞的频率。如图5所示, 在接种后第14天开始可检测到对总SIVgag的SIVgag应答。此外, CD8⁺T细胞响应于MHC-II限制性“超表位”肽Gag53和Gag73。然而, 与我们的预期相反, 对于HLA-E特异性超表位的T细胞应答没有提高。事实上, 未检测到对于该实验中检查的任一HLA-E肽(Gag69和Gag120)的应答。因此, 该出人意料的结果表明, 缺少UL40和UL128和UL130的载体诱导MHC-II限制性CD8⁺T细胞, 包括MHC-II限制性超表位, 但不诱导MHC-E限制性CD8⁺T细胞。因此, MHC-E限制性CD8⁺T细胞的诱导需要存在UL40, 并且不存在UL128和UL130。

[0173] 为了确定除了Rh67(UL40)之外, RhCMV是否还编码对于通过缺少UL128-130的RhCMV诱导HLA-E和/或MHC-II限制性T细胞应答所需的其他基因, 使对于体外生长非必需的基因区域从RhCMV 68-1中缺失, 并且监测恒河猴接种后的T细胞应答。虽然大多数缺失突变体不影响T细胞特异性, 但是观察到基因区域Rh214-Rh220的缺失消除了RhCMV 68-1引起MHC-E限制性应答的能力, 但仍然观察到MHC-II限制性CD8⁺T细胞应答(图29和30)。由于Rh214-Rh220区域编码与HCMV US28同源(即, 其同源物)的5个拷贝的基因: Rh214、Rh215、Rh216、Rh218和Rh220(也分别称为RhUS28.4、RhUS28.3、RhUS28.2、RhUS28.1和RhUS28.5, M.E. Penfold等, J Virol 77:10404 (2003), 其通过引用并入本文), 该结果是出乎意料的。基于一系列先前描述的标准, 认为先前预测的开放阅读框Rh217和Rh219并不代表功能性基因(D. Malouli等, J Virol 86, 8959 (2012), 其通过引用并入本文)。HCMV US28编码结合CC-趋化因子的G蛋白偶联受体(J.L. Gao和P.M. Murphy J Biol Chem 269:28539 (1993)), 并证实了五种RhCMV同源物中至少一种的趋化因子结合(M.E. Penfold等, J Virol 77:10404 (2003))。然而, 未预料到对于诱导MHC-E限制性T细胞应答需要US28。因此, 该出人意料的结果表明, 缺少US28、UL128和UL130的载体诱导MHC-II限制性CD8⁺T细胞, 包括MHC-II限制性超表位, 但不诱导MHC-E限制性CD8⁺T细胞。因此, MHC-E限制性CD8⁺T细胞的诱导需要存在US28和UL40, 并且不存在UL128和UL130。

[0174] 材料和方法:

[0175] 恒河猴: 在本实施例中报道的实验中, 使用总计46只专用饲养(purpose-bred)的印度遗传背景的雄性或雌性恒河猴(RM)(Macaca mulatto), 其中包括9只用毒株68-1 RhCMV/gag疫苗接种的RM, 用毒株68-1.2 RhCMV/gag疫苗接种的RM, 1只用Rh67缺失的68-1 RhCMV/gag接种的RM, 7只用MVA/gag疫苗接种的RM, 19只具有SIV感染的未疫苗接种的RM, 以及6只天然感染有RhCMV的集落循环毒株(colony-circulating strain)的未疫苗免疫接种的RM。所有RM经俄勒冈国家灵长类研究中心机构动物护理和使用委员会(Oregon National Primate Research Center Institutional Animal Care and Use Committee)

的批准,并按照美国国家卫生研究院实验动物护理和使用指南(US National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)的标准使用。在这些实验中使用的RM没有1型猕猴疱疹病毒(cercopithecine herpesvirus 1)、D型猿猴逆转录病毒和1型猿猴T淋巴细胞病毒。将选择的RM通过深度测序进行MHC-I基因分型。简言之,通过使用高保真Phusion™聚合酶(New England Biolabs)和一对通用MHC-I特异性引物在以下热循环条件下通过PCR扩增cDNA来产生Mamu I类序列的扩增子:98℃3分钟,(98℃5秒,57℃1秒,72℃20秒)23个循环,以及72℃5分钟。每个PCR引物包含独特的10bp多重标识符(Multiplex Identifier,MID)标签以及用于454 Sequencing™的衔接子序列(5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG-MID-GCTACGTGGACGACACG-3';5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAG-MID-TCGCTCTGGTTGTAGTAGC-3')。所得的扩增子跨越外显子2中190bp的高度多态性区域。使用AMPure XP磁珠(Beckman Coulter Genomics)纯化初级cDNA-PCR产物。根据制造商的说明书,用Genome Sequencer FLX仪器(Roche/454Life Sciences)进行乳化PCR(emulsion PCR)和焦磷酸测序程序。使用Labkey 数据库并结合Geneious-Pro®生物信息学软件(Biomatters Ltd.)进行数据分析以进行序列组装。

[0176] RhCMV/SIV载体:先前已经详细描述了来自于毒株68-1的 RhCMV/SIV的构建、表征和施用(Hansen等.(2009),同上;Hansen等.(2011),同上;Hansen等.Nature(2013),同上;Hansen等.Science(2013),同上;Hansen等.(2010),同上)。本研究中使用的所有重组病毒均来自于毒株RhCMV 68-1BAC。由于组织培养适应,RhCMV 68-1构建体含有分别编码HCMV UL128和UL130的同源物的ORF 157.5和大部分ORF Rh157.4的缺失(Hansen,S.G.等,J Virol 77,6620(2003);其通过引用并入本文)。

[0177] 为了产生缺少UL40表达的载体,通过BAC重组使ORF Rh67从 RhCMV 68-1中缺失。简言之,通过同源重组用含有FRT-侧翼的卡那霉素抗性基因的PCR片段代替Rh67,然后使用FLP重组酶切除KanR基因。在恒河猴成纤维细胞中回收病毒,并表征抗原表达和Rh67(UL40)损失。

[0178] 为了产生具有完整UL128-130表达的载体,将SIVgag表达盒插入到 RhCMV 68-1.2的Rh211中,这是其中Rh61/Rh60(UL36)、Rh157.4(UL130)和Rh157.5(UL128)已被修复的重组病毒(A.E.Lilja和T. Shenk,Proc Natl Acad Sci U.S.A.105,19950(2008);其通过引用并入本文)。通过限制性消化表征和证实所有的重组病毒,并对抗原插入片段(包括其侧翼区)进行序列验证。通过免疫印迹证实SIV抗原的表达。另外,通过RT-PCR验证临近基因表达。

[0179] 其他疫苗

[0180] 通过在MH5(一种早期/晚期痘苗启动子)的控制下将密码子优化的全长SIVmac239gag基因插入MVA穿梭载体pLW44中来构建MVA/gag,以产生重组质粒pJV7。pLW44内的侧翼序列通过同源重组将重组构建体定向插入胸苷激酶基因座。用pJV7转染鸡胚胎成纤维细胞,然后用MVA 毒株1974感染以产生表达SIVmac239gag的重组病毒(通过免疫印迹证实SIVgag表达)。对重组病毒进行噬斑纯化(plaque-purified),并在大规模培养中扩增。将病毒原液通过24-40%蔗糖梯度纯化,然后通过36%蔗糖垫沉淀,然后将沉淀悬浮于pH 9.0的1mM Tris-Cl中。对于MVA/gag 疫苗接种,通过肌肉注射向RM施用10⁸噬斑形成单位的这种载体。

[0181] 抗原和抗原呈递细胞:从NIH AIDS Reagent Program获得包含 SIVgag蛋白的连续15聚体肽(重叠11个氨基酸)。通过Genscript (Piscataway, NJ) 进行这些蛋白质中特异性9-14聚体肽的合成。所有肽通过其包含的氨基酸从n末端的位置来标识(例如, Gag_{xx-yy})。连续的 15聚体也由其从n末端15聚体开始的位置命名(例如, Gag₁₋₁₅是15mer #1; Gag₅₋₁₉是15mer#2等)来指定。除非另有说明,否则这些肽以2 μ g/ml 用于T细胞测定。如先前所述(Hansen等, Science (2013), 同上), 通过用狒狒疱疹病毒 (Herpesvirus papio) 感染恒河猴PBMC来产生自体B 淋巴母细胞样细胞系(BLCL)。通过将每个等位基因连接到pCEP4 KpnI/NotI或HindIII/NotI限制性位点来产生Mamu I类分子的哺乳动物表达载体。将质粒克隆到DH5 α 大肠杆菌(Life Technologies, Grand Island, NY) 中, 确认序列, 并使用Nucleofector II/Kit C (Lonza, Allendale NJ) 电穿孔到MHC-I阴性K562、721.221或RMA-S中(K.S. Anderson等, J Immunol 151, 3407 (1993); 其通过引用并入本文) 细胞。将转染子维持药物选择(潮霉素B), 并通过用泛MHC-I抗体克隆W6/32染色来常规地证实MHC-I的表面表达。在T细胞测定的整个使用中, 使用AIIPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) 提取来自MHC-I转染子的mRNA, 使用在外显子2内的高度多态性区域侧翼的引物对通过RT-PCR扩增, 并确认序列。将MHC-I转染子和BLCL用终浓度为10 μ M的目标Gag肽脉冲90分钟, 然后用温热PBS洗涤三次, 并且用温热的R10洗涤一次以除去未结合的肽, 然后与新鲜分离的PBMC以10:1的效应物:靶标比例组合。为了稳定Mamu-E表面表达, 将Mamu-E转染子在用于测定前在 27 $^{\circ}$ C下孵育3小时, 并在肽孵育期间保持在27 $^{\circ}$ C, 直到与效应物组合。如下产生自体SIV感染的靶细胞:用CD4微珠和LS柱(Miltenyi Biotec) 从PBMC中分离CD4⁺ T细胞, 用IL-2(供应商)、葡萄球菌肠毒素B(供应商)以及抗CD3(NHP Reagent Resource)、抗CD28和抗CD49d mAb (BD Biosciences)的组合活化, 用蔗糖纯化的SIVmac239进行离心接种 (spinoculation), 然后培养3至4天。在用于T细胞测定之前, 如先前所述使用CD4微珠和LS柱(Miltenyi Biotec) 纯化SIV感染的靶细胞(J. B. Sacha等, J Immunol 178, 2746 (2007); 其通过引用并入本文)。感染的细胞制备物在富集后为>95%的CD4⁺ T细胞和>50%的SIV感染, 并以 40:1 (PBMC和分离的CD8⁺ T细胞) 或8:1 (T细胞系效应物)的效应物:靶标比例使用。在这些实验中, 未感染的活化的CD4⁺ T细胞用作阴性对照APC(来自SIV⁺RM的未感染的靶标用替诺福韦(NIH AIDS Reagent Program, 浓缩)培养。为了评估本体MHC-I和MHC-E, 如上所述产生SIV感染的CD4⁺ T细胞但是不进行感染后纯化, 并对表面 MHC-I(克隆W6/32)、MHC-E(克隆4D12; 抗小鼠IgG1 M1-14D12)、CD3、CD4和细胞内SIV Gag p27衣壳进行染色。

[0182] T细胞测定:用Ficoll-Paque (GE Healthcare) 从血液获得用于免疫测定的单个核细胞制备物。使用CD8微珠和LS柱(Miltenyi Biotec) 从 PBMC获得纯化的CD8⁺ T细胞(>90%纯度)。通过用经辐照、经肽脉冲的BLCL刺激PBMC并随后在含有IL-2(供应商)的培养基中培养, 每周进行重复刺激来制备表位特异性T细胞系。通过流式细胞术ICS测量SIV特异性CD8⁺ T细胞应答。简言之, 将效应T细胞(单个核细胞、分离的CD8⁺ T细胞或T细胞系)与抗原(肽、经肽脉冲的APC或经SIV 感染的CD4⁺ T细胞)和CD28和CD49d的共刺激单克隆抗体(mAb) (BD Biosciences) 孵育1小时, 然后添加布雷菲德菌素A (Brefeldin A) (Sigma-Aldrich) 再孵育8小时。不存在抗原(无肽、未脉冲的APC或未感染的靶标)的共刺激作为背景对照。在使用MHC-I转染子作为APC 的限制性测定中, 在经肽脉冲的MHC-I阴性亲本细胞系K562或721.221 细胞的存在下的共刺激作为另外的阴性对照。当指明时, 将单个核细胞

或抗原呈递细胞与以下阻断试剂一起预孵育1小时:抗MHC-I mAb(克隆 W6/32;10 μ g/ml), CLIP肽(MHC-II相关恒定链,氨基酸89-100;2 μ g/ml),MHC-E结合肽VL9(VMAPRTLLL;20 μ M), Mamu-A1 * 001:01 结合肽CM9(CTPYDINQM;20 μ M)或Mamu-A1 * 002:01结合肽GY9(GSENLKSLY;20 μ M)。如先前所述将经刺激的细胞固定、透化并染色(Sacha等,The Journal of Immunology,178,2746-2754(2007);其通过引用并入本文),并且在LSR-II仪(BD Biosciences)上进行流式细胞术分析。使用FlowJo软件(Tree Star)进行分析,首先在小淋巴细胞上设门,然后在CD3⁺、随后CD4⁻/CD8a⁺ T细胞亚群上进行递进设门(progressive gating)。由TNF- α 和IFN- γ 的细胞内表达确定所得 CD4⁻/CD8a⁺群的抗原特异性应答频率。对于表位解卷积(deconvolution)实验,使用严格的应答标准来防止假阳性。在这些研究中,如果在至少2个独立测定中,聚集为CD69⁺、TNF- α ⁺和IFN- γ ⁺的事件频率>0.05%,背景<0.01,则认为对于给定的15聚体肽的应答为阳性的。图2A和6所示,将单个肽应答分类为被阻断是基于相对于同种型对照通过阻断>90%的抑制。定义部分阻断。认为不符合这些标准的应答是不确定的。单个肽应答必须已经(1)被抗MHC-I克隆W6/32和MHC-E结合肽VL9二者所阻断,并且(2)不被CLIP阻断,则认为被阻断MHC-E限制。

[0183] 抗体

[0184] 以下缀合的Ab用于这些研究:a)来自BD Biosciences,L200(CD4;AmCyan)、SP34-2(CD3;PacBlu)、SK1(CD8a;TruRed,AmCyan)、25723.11(IFN γ ;APC,FITC)、6.7(TNF;APC), b)来自Beckman Coulter,L78(CD69;PE)。

[0185] 实施例2-在MHC-E情况下目标肽特异性CD8⁺ T细胞的产生

[0186] 在经典的多态性MHC-Ia分子情况下识别来自于抗原的目标肽的T细胞受体可用于转染自体T细胞,以用于疾病(例如癌症或感染性疾病)的免疫治疗。这种方法的主要障碍是人群中MHC-Ia的多样性,其将给定TCR的使用限制于MHC-Ia匹配的患者。通过产生在非经典、非多态性MHC-E分子情况下识别来自于抗原的目标肽(例如,来自于肿瘤抗原的肽和来自于病原体的肽),MHC匹配变得过时,并且所得到TCR可用于所有患者。

[0187] 在自然界中识别MHC-E/肽复合物的CD8⁺ T细胞很稀少,并且目前还没有可靠的方法来产生针对目标抗原(例如肿瘤抗原、来自于病原体的抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原)的此类T细胞。本文中描述的方法基于以下发现:缺少基因Rh157.5和Rh157.4(HCMV UL128和UL130的同源物)的恒河猴巨细胞病毒(RhCMV)以蛋白质序列的每30至40个氨基酸约1个肽表位的频率在恒河猴中引起MHC-E-限制性CD8⁺ T细胞。通过将目标抗原插入到UL128和UL130缺失的RhCMV中,可以产生针对由MHC-E呈递的各肽的CD8⁺ T细胞。识别MHC-E/肽的TCR可以通过许多方法中的任何一种来鉴定,但是通常依赖于通过PCR从单细胞、克隆扩增的单细胞的cDNA对 α 和 β 链直接测序,或者CD8⁺ T细胞特异性肽库的深度测序。或者,可通过首先产生单细胞、克隆扩增的单细胞或CD8⁺ T细胞特异性的肽库的全转录组文库来通过扩增RNA模板间接产生所述序列。可以通过cDNA末端的快速扩增(rapid amplification of cDNA end,RACE)或者在mRNA上进行的RNA模板5'端的切换机制(switching mechanism at 5'end of RNA template,SMART)方案来产生可变序列特异性的肽。锚定在侧翼恒定区域或类似地来自单个肽反应性CD8⁺细胞的全转录组文库的PCR,可以对其各自的TCR可变区直接测序或深度测序。可以进一步合成或克隆来自单个肽反应CD8⁺ T细胞或肽反应CD8⁺ T细胞库的TCR序列的 α 和 β 链的经验证组合。然后将所得的TCR构

建体转染到T细胞中,所述T细胞进而可作为治疗(例如,癌症治疗或感染性疾病治疗)施用于患者。克隆和转染 TCR可变区的方法还在Barsov EV等,PLoS One 6,e23703(2011)中讨论,其通过引用并入本文。

[0188] 实施例3-受主要组织相容性复合物E限制的广泛靶向的CD8⁺ T细胞应答

[0189] 主要组织相容性复合物(MHC)-E是具有有限的多态性的高度保守、普遍存在的非经典MHC-Ib分子,其主要通过与NKG2/CD94受体相互作用来参与NK细胞反应性的调节。在这里,在所有测试的蛋白质抗原中,用Rh157.5/.4基因缺失的RhCMV载体致敏恒河猴独特地转移了MHC-E 功能,以将高度多样性肽表位呈递至CD8 α / β ⁺ T细胞,每100个氨基酸约4个不同的表位。由于MHC-E在HIV/SIV和其他持续性病毒感染的细胞上被上调以逃避NK细胞活性,MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答具有利用病原体免疫逃避适应的可能性,可能会使这些非常规应答非常有效的能力。

[0190] 针对细胞内病原体的适应性细胞免疫是识别被感染细胞表面上高度多态性MHC-Ia分子呈递的来自于短(8-10聚体)病原体之肽表位的CD8⁺ T细胞的主要责任(Neefjes J等,Nat Rev Immunol 11,823(2011)和 Nikolich-Zugich J等,Microbes Infect 6,501(2004);二者均通过引用并入本文)。MHC-Ia同质异型体在其肽结合性质方面差异很大,并因此由病原体特异性CD8⁺ T细胞靶向的特定的来自于病原体的肽主要由被感染个体表达的有限数目的MHC-Ia同质异型体的肽结合特异性决定(Yewdell JW,Immunity 25,533(2006);其通过引用并入本文)。因此,被响应于相同病原体的CD8⁺ T细胞识别的表位在个体之间是高度多样的。这种识别异质性是重要的,因为由CD8⁺ T细胞应答靶向的表位的性质对于个体清除或控制多种细胞内病原体的能力可具有巨大的影响,特别是具有突变免疫逃避的高内在能力的病原体(如HIV)(Nikolich Zugich (2004),同上,以及Goulder,P.J.和Watkins,D.I.Nat Rev Immunol 8,619(2008),其通过引用并入本文)。从进化的观点看,这种MHC-Ia多态性介导的应答多样性允许大群体幸免于在新出现的病原体,因为有很大可能性至少有一些群体成员具有支持有效的CD8⁺ T细胞应答的MHC-Ia同质异型体(Nikolich-Zugich(2004),同上和Prugnolle F等,Curr Biol 15, 1022(2005);其通过引用并入本文)。另一方面,这种生物学不可避免地导致群体中的某些个体对给定的病原体高度敏感,即使当接种疫苗,这阻碍了基于CD8⁺ T细胞应答开发普遍有效的疫苗的努力(Goulder和 Watkins(2008),同上,以及Picker,LJ等,Ann Rev Med 63,95(2012);其通过引用并入本文)。

[0191] 最近报道,基于毒株68-1(成纤维细胞适应的)RhCMV的SIV靶向疫苗载体显著违背了MHC-Ia限制性CD8⁺ T细胞识别的上述原则(Hansen等,Science(2013),同上),并提供了在CD8⁺ T细胞靶向疫苗接种中MHC-Ia依赖性应答多样性的潜在解决方案。在恒河猴中,RhCMV/SIV载体对高度致病性SIV攻击提供了强烈的保护,导致了严格控制和最终清除感染(Hansen等(2011),同上,以及Hansen等Nature(2013),同上)。尽管响应于表达相同SIV蛋白的常规疫苗3倍多的表位,但这些载体引起与常规MHC-Ia限制性CD8⁺ T细胞完全不重叠的SIV特异性CD8⁺ T细胞应答。这种缺少表位重叠一部分由以下发现解释:许多这些表位受MHC-II分子而非MHC-Ia的限制,后者是CD8⁺ T细胞的罕见但并非前所未有的表位识别模式(Hansen等,Science(2013),同上)。毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体还引起识别多种MHC-I依赖性表位的CD8⁺ T细胞(例如,被抗MHC-I抗体完全阻断的应答),所述表位是大部分或甚

至所有MHC不同的恒河猴中常见的,MHC-Ia限制性CD8⁺ T 细胞应答的前所未有的交叉识别程度。事实上,在先前的报道(Hansen 等,Science (2013),同上)中,42只经毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体免疫接种的猴中的42只靶向了SIV gag蛋白中的两个表位(SIVgag₂₇₆₋₂₈₄和SIVgag₄₈₂₋₄₉₀),并且对于这两种9聚体表位的CD8⁺应答已经在用这种载体接种的120只猴中的120只中有记录(图14)。

[0192] 为了理解这种非常普遍的MHC-I依赖性识别的基础,选择4只经毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的猴进行详细的MHC-I限制性分析。这些恒河猴显示出对SIVgag的稳健、非常规的MHC-I依赖性CD8⁺ T细胞应答,包括对SIVgag₂₇₆₋₂₈₄和SIVgag₄₈₂₋₄₉₀超表位的应答以及10种其他常见应答。在每只猴子中对表达的MHC-I基因(经典MHC-Ia和非经典MHC-Ib二者)(Wiseman,R.W.等,Nat Med 15,1322(2009);其通过引用并入本文)进行测序,分别构建单一表达这些MHC-I分子的MHC-I转染子组(图15)。然后将这些单一MHC-I分子转染子用于流式细胞术细胞内细胞因子染色(ICS)测定,以将表位15聚体肽呈递给来自这些猴的68-1 RhCMV/SIVgag载体诱导的CD8⁺ T细胞(分别使用亲本MHC-I阴性和自体B淋巴细胞系作为阴性和阳性对照)(图 11A、11B和16)。显著地,经典MHC-Ia同质异型体能够仅向这些T细胞呈递12种表位肽中的3种(Mamu-A1*001:01:SIVgag₆₉₋₈₃(18)和 SIVgag₁₉₇₋₂₁₁(50); Mamu-A1*002:01:SIVgag₁₂₉₋₁₄₃(33)),并且猴中这些同质异型体的表达不追踪这些表位特异性CD8⁺ T细胞应答(例如,许多缺少这些同质异型体的猴仍然能够识别这3种肽;图17)。然而,当由非经典MHC-E分子呈递时,所有12种表位肽刺激来自所有猴的CD8⁺ T细胞,并且实际上,所有肽被表达3种不同恒河猴MHC-E同质异型体的转染子(Mamu-E02:04、Mamu-E02:11和Mamu-E02:20)呈递,而不论应答是源于表达这些等位基因的猴以及表达人形式的该分子的转染子(HLA-E*01:03)(图11A、11B、16和18)。

[0193] 已知MHC-E强烈地结合典型VMAPRTL(LVI)L肽和来自于 MHC-Ia前导序列的位置3-11的其他紧密相关的9聚体肽,用于呈递至 NK细胞上的NKG2A(和在较少程度上为NKG2C)分子(Lee,N.等,J Immunol 160,4951(1998);Braud,V.M.等,Nature 391,795(1998); Sullivan,L.C.等,Tissue Antigens 72,415(2008);以及van Hall,T.等, Microbes Infect 12,910(2010);其全部通过引用并入本文)。当细胞表达正常水平的MHC-Ia时,这种高度保守的相互作用向NK细胞递送主要抑制性信号。然而,在通过病毒感染或肿瘤转化干扰MHC-Ia生物合成后,这种抑制信号降低,促使NK细胞响应于病毒感染的细胞或肿瘤细胞而活化(Lodoen,M.B.和Lanier,L.L Nat Rev Microbiol 3,59(2005),以及Wieten L等, Tissue Antigens 84,523(2014);二者均通过引用并入本文)。尽管CD8⁺ T细胞的亚群也可表达NKG2A和/或NKG2C(Arlettaz L等,Eur J Immunol 34,3456(2004);其通过引用并入本文),MHC-E依赖性毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体引起的CD8⁺ T细胞的表型分析显示,绝大多数应答细胞是缺少NKG2A和NKG2C二者表达的CD8 α / β ⁺、TCR γ / δ ⁻T细胞(图11C和19)。此外,在特异性肽加载之前,MHC-E转染子或PBMC与典型MHC-E结合的VMAPRTLLL(VL9)肽的预孵育特异性阻断所有12种肽的CD8⁺ T细胞识别(图11D和20),这表明这些肽的T细胞识别不是由与加载肽的MHC-E结合的NKG2A/C介导的,而是反映MHC-E限制性表位呈递至抗原特异性T细胞。实际上,所研究的每一种亲本15聚体可被截短至相对于亲本15聚体在经不同毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的猴中常见的最佳9聚体肽(图21)(Hansen等,Science (2013),同上)。当以小于1nM的剂量对Mamu-E 转染子脉冲时,这些最佳9聚体可以从这些猴

中触发CD8⁺ T细胞(图22),其功能性活性与经典MHC-Ia限制性表位的T细胞识别相当(O'Connor DH等,Nat Med 8,493(2002);其通过引用并入本文)。总之,这些数据强烈地表明,由毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体引起的非常规的MHC-I 依赖性CD8⁺ T细胞是主要受MHC-E限制的SIVgag特异性CD8⁺ T细胞,但是在某些情况下也可识别常规MHC-Ia同质异型体上的其特异性肽。

[0194] 先前已经在HCMV、丙型肝炎病毒、结核分枝杆菌和肠沙门菌 (*Salmonella enterica*)感染中鉴定了MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答,所述应答通常涉及与典型MHC-Ia前导序列肽结构相关但是对于宿主是外源的表位(Sullivan(2008),同上;van Hall(2010),同上;Pietra G等, J Biomed Biotechnol 2010,907092(2010);以及Caccamo N等,Eur J Immunol 45,1069(2015);其均通过引用并入本文)。为了确定在不同环境中MHC-E限制对SIVgag的应答的程度,使用高亲和力MHC-E结合肽VL9的阻断(与抗MHC-II CLIP肽和抗MHC I mAb W6/32的阻断结合)对用毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体(Rh157.5/.4基因缺失)、毒株68-1.2 RhCMV/SIVgag载体(Rh157.5/.4-未受损)、 Δ Rh157.5/.4毒株68-1.2 RhCMV/SIVgag载体(其中Rh157.5/.4基因被特异性重新缺失;图23)和改良牛痘安卡拉(MVA)/SIVgag载体疫苗接种的猴以及用SIV本身感染的猴(图12、24和25)中所有SIVgag表位特异性CD8⁺ T细胞应答进行限制性分类。该分析显示,经毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体和 Δ Rh157.5/.4毒株68-1.2 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的猴中基本上所有 SIVgag表位特异性应答被CLIP肽或者被抗MHC-I mAb W6/32和VL9 肽二者阻断>90%,证明由Rh157.5/.4缺陷的RhCMV引起的非常规T 细胞应答有效地完全为MHC-II或MHC-E限制性CD8⁺ T细胞。

[0195] 相比之下,经MVA/SIVgag载体疫苗接种的和毒株68-1.2(表达 Rh157.5/.4) RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的恒河猴中的SIVgag特异性 CD8⁺ T细胞应答被mAb W6/32而非VL9肽所阻断,表明经典的MHC-Ia 限制性。对于经SIV感染的恒河猴中98%的CD8⁺ T细胞应答也是如此, 4种MHC-II限制性CD8⁺ T细胞应答除外。Rh157.5/.4缺陷的RhCMV 载体引起MHC-E和MHC-II限制性CD8⁺ T细胞的能力不限于SIVgag 特异性应答。利用编码SIVpo197-441、结核分枝杆菌蛋白质(Ag85B、ESAT6和RpfA)以及内在的RhCMV蛋白(例如立即早期1(IE1)蛋白)的毒株68-1(Rh157.5/.4缺陷)RhCMV载体观察到了MHC-E和 MHC-I限制性抗原特异性CD8⁺ T细胞应答的类似混合物(图12B和26)。

[0196] 先前已经报道,由毒株68-1 RhCMV/SIV载体引起的CD8⁺ T细胞识别自体SIV感染的CD4⁺ T细胞,并且该识别被抗MHC-I mAb W6/32和 MHC-II阻断CLIP肽部分地阻断(Hansen等,Science(2013),同上)。为了确定MHC-E限制性对该识别的MHC-I组分的贡献,想知道高亲和力MHC-E结合VL9肽是否可代替mAb W6/32阻断这些应答。该实验表明,MHC-II阻断CLIP肽和mAb W6/32或VL9肽的组合完全阻断了这些应答,而通过由MVA/SIVgag载体或毒株68-1.2 RhCMV/gag载体疫苗接种或SIV感染引起的SIVgag特异性CD8⁺ T细胞的经SIV感染的自体细胞识别对CLIP+VL9肽组合不敏感(图12)。总之,这些数据证实了毒株68-1 RhCMV载体独特地引起了MHC-II或MHC-E限制性的CD8⁺ T细胞应答,并且这种不常见免疫生物学是RhCMV Rh157.5/.4基因缺失的特异性结果,所述基因是HCMV UL128/UL130基因的直系同源物并且编码参与非成纤维细胞的CMV感染的五聚体受体复合物的2种成分(Lilja AE和Shenk T,Proc Natl Acad Sci U.S.A.105,19950(2008);其通过引用并入本文)。此外,这些数据证实,由这些MHC-E限制性CD8⁺ T 细胞识别的至少一些表位天然地由被SIV

(异源(非CMV)病原体)感染的细胞加工和呈递。

[0197] 在42只经毒株68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的猴中,确定了每只动物20个不同的CD8⁺ T细胞识别的MHC-E限制性SIVgag 15聚体表位的中位值,其宽度超过了分别通过常规疫苗或SIV感染引起的 SIVgag特异性CD8⁺ T细胞应答中确定的中位值11和14.5个不同的 MHC-1a限制性SIVgag特异性表位(图13A)。在所有毒株68-1 RhCMV 载体引起的CD8⁺ T细胞应答中,MHC-E限制性表位的密度(每100个氨基酸的蛋白质长度约4个独立的MHC-E限制性表位)类似,而不论所分析的抗原的性质(图13B)。特别地,在相同的42只经68-1 RhCMV/SIVgag载体疫苗接种的恒河猴中,125个重叠的SIVgag 15聚体肽中的109个(87%)被至少一只恒河猴中的MHC-E限制性CD8⁺ T细胞识别(图13C)。尽管先前已经表明MHC-E比典型前导序列肽结合更广泛的肽(van Hall(2010),同上,以及Lampen等,同上),但是所观察到的表位多样性的程度和宽度非常出人意料,尤其是考虑到MHC-E的有限多态性以及观察到迄今测试的所有MHC-E限制性表位的呈递独立于这种有限的序列多态性以及Mamu-E与HLA-E之间的序列差异(图 11B、18和22)。这些数据表明,MHC-E介导的表位呈递(例如,MHC-E 肽结合)比以前所认为的甚至更加多样化。与此一致,11种最佳MHC-E 限制性SIVgag 9聚体表位的序列分析显示仅一个表位(Gag₂₇₃₋₂₈₇超表位) 具有典型(位置2处M:位置9处L)的MHC-E结合基序,而其余10 种最佳表位不仅缺少该基序,而且与以前表征的MHC-E结合肽组(Lampen等,同上)没有统计学显著的重叠(图13D)。实际上,另一个SIVgag₄₈₂₋₄₉₀超表位显示出被认为是抗MHC-E肽结合基序,在位置2 和9两处具有赖氨酸(图13D)。表位肽加载和结合MHC-E的分子机制在以下中讨论:Hansen,S.G.等,"Broadly targeted CD8⁺ T cell responses restricted by major histocompatibility complex E",*Science*,2016年1月21日电子公开,其通过引用并入本文。

[0198] HCMV和RhCMV二者分别编码具有在UL40和Rh67基因内策略性嵌入的典型VL9肽的蛋白质(Prod'homme,V.等,*J Immunol* 188,2794 (2012)和Richards,R.等,*J Virol* 85, 8766(2011);二者均通过引用并入本文)。显示UL40的VL9肽通过TAP非依赖性机制加载于新生的MHC-E 链上,并因此在病毒介导的TAP抑制和HCMV US2-11基因产物介导的突出的MHC-Ia下调的情况下,发挥稳定并且上调经HCMV感染的细胞中的MHC-E表达的作用(Lodoen& Lanier(2005),同上,以及 Prod'homme(2012),同上)。RhCMV Rh67也具有类似的功能(Richards(2011),同上)。因此,认为MHC-E上调是逃避NK细胞对缺少MHC-Ia 表达之感染细胞的应答的关键病毒策略。然而,这种逃避策略将具有增强病毒感染的细胞中MHC-E表达的结果,这提高了向MHC-E限制性T 细胞加载和呈递新肽的机会。在这方面,典型MHC-E结合VL9肽可作为促进MHC-E的稳定高表达和递送至可促进肽交换的内体区室的分子伴侣(chaperone),类似于恒定链相关的CLIP肽和MHC-II。与这种肽交换机制一致,已经在结核分枝杆菌吞噬溶酶体中直接证明了MHC-E肽加载(Grotzke JE等,*PLoS Pathog* 5,e1000374(2009);其通过引用并入本文)。

[0199] CMV不是唯一上调MHC-E表达的细胞内病原体。丙型肝炎也编码上调MHC-E表达的MHC-E结合肽(Natterman J等,*Am J Pathol* 166, 443(2005);其通过引用并入本文),并且HIV和SIV二者通过与MHC-Ia 下调一致的未表征机制上调MHC-E(Natterman J等,*Antivir Ther* 10, 95(2005);其通过引用并入本文)(图27)。这种常见的适应性表明,对于这些和可能的其他细胞内病原体,上调MHC-E以抵抗NK细胞应答的进化压力超过了对MHC-E限制性

CD8⁺ T细胞提高的敏感性的潜在风险,可能是因为MHC-E限制性CD8⁺ T细胞在这些病原体感染期间致敏较差。MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答是现在哺乳动物免疫系统的如此小成分的原因不清楚,尤其是鉴于本报道中发现这种应答可能非常多样且广泛(尽管在群体水平上多样性和广泛性可能低于多态性MHC-Ia;图 28)。然而,Rh157.5/.4基因缺失的RhCMV载体能够绕过MHC-E限制性CD8⁺ T细胞致敏的内在约束。尽管实现这种绕过的机制仍有待阐明,但这些载体强烈地引起广泛、多样且MHC-Ia单体型依赖性CD8⁺ T细胞应答的能力为开发利用MHC-E上调的MHC-E限制性CD8⁺ T细胞靶向疫苗提供了机会,这是许多高度适应性持久性病原体的免疫逃避策略的固有弱点。此外,由于有限的MHC-E多态性,MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答靶向疫苗将在所有或大多数疫苗接种者中引起大致类似的应答,潜在地为所有个体提供效力,而不管MHC基因型如何。进化可能具有不利的MHC-E作为现代哺乳动物中CD8⁺ T细胞的主要限制性分子代替多态性MHC-Ia系统,但是如果HCMV载体能够在人中概括恒河猴中 Rh157.5/.4基因缺失的HCMV载体的生物学(或者如果作为替代地,可以开发基于非CMV的策略来引起广泛靶向的MHC-E限制性CD8⁺ T细胞应答),疫苗学家可以能够复活这种休眠的基于MHC-E的适应性免疫系统以利用病原体尚未适应于有效逃避的新免疫应答攻击病原体。

[0200] 材料和方法:

[0201] 疫苗:1)表达SIV Gag和5'-Pol的毒株68-1 RhCMV载体,2)表达SIV Gag的毒株68-1.2 RhCMV载体,3)表达SIV Gag的MVA和腺病毒5(Ad5)载体,以及4)SIV Gag编码DNA+IL-12疫苗的构建、表征和施用先前已经报道(Hansen等,Science(2013),同上;Hansen等(2011),同上;Hansen等Nature(2013),同上;以及Hansen等(2009),同上)。表达由MCMV IE启动子驱动并插入在Rh211的5'区域的结核分枝杆菌基因产物RpfA、RpfC和RpfD的融合蛋白的毒株RhCMV 68-1由Aeras(Rockville,MD,USA)提供。还通过同源重组构建了基于毒株68-1.2 RhCMV/gag的Rh157.5(UL128)-Re157(UL130)双缺失突变体。为了实现这一目的,设计靶区域侧翼的重组引物(正向诱变引物5'-AAAACCTATAATCAACAACCTCTATACCTTTGTTTTGCTGATGCTA TTGCGT-3'和反向诱变引物5'-ATTTTTTCGATAAAAAATCACAGCAAACATACTG GTTTTACACACTTTAT-3')。由于在RhCMV中Rh157.6(UL131A)和Rh157.4(UL130)开放阅读框(ORF)重叠,因此以保留Rh157.6(UL131A) ORF的末端加另外50bp的方式构建缺失以确保所编码蛋白质的表达。使用正向引物结合位点(5'-GAAAAGTGCCACCTGCAGAT-3')和反向引物结合位点(5'-CAGGAACACTTAACGGCTGA-3'),将小型质粒R6K-kan-F5用于扩增侧翼为替代的(F5)FRT位点(其将添加到诱变引物的3'末端)的卡那霉素抗性盒。如别处公布的(Muyrers JP等,Nucleic Acids Res 27, 1555(1999);其通过引用并入本文),进行大肠杆菌菌株SW105内的E/T同源重组(Warming S等,Nucleic Acids Res 33,e36(2005);其通过引用并入本文)。通过用缺失基因和相邻基因特异性的引物对病毒DNA和被感染细胞的cDNA进行聚合酶链反应来证实靶ORF的成功缺失。通过用ΔRh157.5(UL128)-Rh57.4(UL130)68-1.2 RhCMV/gag载体感染的原代恒河猴成纤维细胞的免疫印迹分析证实SIVmac239gag转基因的表达。参见图23,描绘了毒株68-1、68-1.2和ΔRh157.5/Rh157.4(ΔUL128/UL130)RhCMV载体之间的基因组差异。

[0202] 恒河猴:在本实施例中报道的实验中,使用总计207只专用饲养的印度遗传背景的雄性或雌性恒河猴(Macaca mulatto),其中88只还在先前的报道中进行了研究(Hansen等,

Science (2013), 同上)。这些恒河猴包括:用表达SIVgag、SIV5'-pol、TB-ESAT-6/Ag85B或TB-RpfA/RpfC/RpfD插入片段的毒株68-1 RhCMV载体疫苗接种的159只恒河猴(62只先前有报道);用毒株68-1.2 RhCMV/gag载体疫苗接种的9只恒河猴(6只先前有报道);用 Δ Rh157.5/.4缺失的毒株68-1.2 RhCMV/gag载体疫苗接种的4只恒河猴(先前没有报道);分别用表达SIVgag的MVA/gag、Ad5/gag和DNA/gag+IL-12疫苗接种的11、3和4只恒河猴(分别是3只、全部和全部先前有报道);具有受控的SIVmac239感染的13只未疫苗接种的恒河猴(平台期血浆病毒载量 $<10,000$ 拷贝/ml;6只先前有报道);以及用RhCMV的ONCMC集落循环毒株自然感染的4只未疫苗接种的恒河猴(全部在前期有报道)。所有恒河猴经俄勒冈国家灵长类研究中心机构动物护理和使用委员会的批准,并按照美国国家卫生研究院实验动物护理和使用指南的标准使用。在这些实验中使用的恒河猴没有I型猕猴疱疹病毒、D型猴逆转录病毒和I型猿猴T淋巴细胞病毒。如所述(Wiseman (2009), 同上),将选择的恒河猴通过深度测序进行MHC-I基因分型。简言之,通过使用高保真PhusionTM聚合酶(New England Biolabs)和一对通用MHC-I特异性引物在以下热循环条件下通过PCR扩增cDNA来产生Mamu I类序列的扩增子:98 $^{\circ}$ C 3分钟,(98 $^{\circ}$ C 5秒,57 $^{\circ}$ C 1秒,72 $^{\circ}$ C 20秒)23个循环,以及72 $^{\circ}$ C 5分钟。每个PCR引物包含独特的10bp多重标识符(MID)标签以及用于454SequencingTM的衔接子序列(5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAG-MID-GCTACGTGGACGACACG-3';5'-GCCTGCCAGCCCCTCAG-MID-TCGCTCTGGTTGTAGTAGC-3')。产生的扩增子跨越外显子2中190bp的高度多态性区域。使用AMPure XP磁珠(Beckman Coulter Genomics)纯化初级cDNA-PCR产物。根据制造商的说明书,用Genome Sequencer FLX仪器(Roche/454Life Sciences)进行乳化PCR和焦磷酸测序程序。使用Labkey数据库并结合**Gencious-Pro**[®]生物信息学软件(Biomatters Ltd.)进行数据分析以进行序列组装。

[0203] 抗原和抗原呈递细胞:基于SIVmac239Gag和Pol序列(Genbank 登录号#M33262)、毒株68-1 RhCMV IE-1序列(Genbank登录号 #AY186194)或Erdman毒株结核分枝杆菌Ag85B、ESAT-6和RpfA序列(分别为Genbank登录号#BAL65871.1;BAL68013;和BAL64766.1),通过Intavis AG进行这些蛋白质中包含SIVgag和pol、RhCMV IEI和TB Ag85B、ESAT-6和RpfA蛋白的连续15聚体肽(重叠11个氨基酸)以及特异性9-14聚体肽的合成。所有肽通过其包含的氨基酸从N末端的位置来标识(例如,Gag_{xx-yy})。连续的15聚体也由其从N末端15聚体开始的位置命名(例如,Gag1-15(1)是15聚体#1;Gag5-19(2)是15聚体#2等)来指定。除非另有说明,否则这些肽以2 μ g/ml用于T细胞测定。如先前所述(Hansen等,Science (2013), 同上),通过用狒狒疱疹病毒感染恒河猴PBMC来产生自体B淋巴母细胞样细胞系(BLCL)。通过将每个等位基因连接到pCEP4KpnI/NotI或HindIII/NotI限制性(Ulbrecht M等,J Immunol 164,5019(2000);其通过引用并入本文)位点来产生Mamu I类分子的哺乳动物表达载体。将质粒克隆到DH5 α 大肠杆菌(E.coli)(Life Technologies)中,确认序列,并使用Nucleofector II/Kit C(Lonza)电穿孔至MHC-I阴性K562、721.221或RMA-S细胞中(Anderson KS等,J Immunol151,3407(1993);其通过引用并入本文)。将转染子维持药物选择(潮霉素B),并通过用泛MHC-I抗体克隆W6/32染色来常规地证实MHC-I的表面表达。在T细胞测定中的整个使用中,使用AIIPrep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen)提取来自MHC-I转染子的mRNA,使用在外显子2内的高度多态性区域侧翼的引物对通过RT-PCR扩增,并确认序列。将MHC-I转染子和BLCL用终浓度为10 μ M的目标肽脉冲90分钟,然后用温热PBS洗涤三

次,并且用具有10%胎牛血清的温热RPMI 1640培养基洗涤一次,以除去未结合的肽,然后与新鲜分离的PBMC以 10:1的效应物:靶标比例组合。为了稳定Mamu-E表面表达,将Mamu-E转染子在用于测定前在27°C下孵育3小时,并在整个肽孵育期间保持在 27°C,直到与效应物组合。如下产生自体SIV感染的靶细胞:用CD4微珠和LS柱(Miltenyi Biotec)从PBMC中分离CD4⁺ T细胞,用IL-2(NIH AIDS Reagent Program)、葡萄球菌肠毒素B(Toxin Technologies Inc.)以及抗CD3(NHP Reagent Resource)、抗CD28和抗CD49d mAb(BD Biosciences)的组合激活,并用蔗糖纯化的SIVmac239进行离心接种,然后培养3至4天。在用于T细胞测定之前,如先前所述使用CD4微珠和LS柱(Miltenyi Biotec)纯化SIV感染的靶细胞(Sacha JB等,J Immunol 178,2746(2007);其通过引用并入本文)。被感染的细胞制备物在富集后为>95%的CD4⁺ T细胞和>50%的SIV感染,并以40:1(PBMC和分离的CD8⁺ T细胞)或8:1(T细胞系效应物)的效应物:靶标比例使用。在这些实验中,未感染的活化的CD4⁺ T细胞用作阴性对照APC(来自SIV+RM的未感染的靶标用替诺福韦(NIH AIDS Reagent Program)培养。为了评估总MHC-I和MHC-E表达,如上所述产生SIV感染的 CD4⁺ T细胞但不进行感染后纯化,并对表面MHC-I(克隆W6/32), MHC-E(克隆4D12;抗小鼠IgG1克隆M1-14D12)、CD3和CD4,随后细胞内SIV Gag进行染色。

[0204] T细胞测定:如先前所述(Hansen等,Science(2013),同上),通过流式细胞术ICS测量来自血液的单个核细胞制备物中的SIV-、RhCMV-和TB-特异性CD8⁺ T细胞应答。简言之,将单个核细胞或分离的CD8⁺ T细胞与抗原(肽、经肽脉冲的BLCL或MHC-Ia或MHC-E转染子或SIV感染的自体CD4⁺ T细胞)和共刺激分子CD28和CD49d(BD Biosciences)一起孵育1小时,然后添加布雷菲德菌素A(Sigma-Aldrich)再孵育8小时。没有抗原的共刺激作为主要背景对照。通过在以下阻断剂的存在下将分离的单个核细胞、抗原呈递细胞或SIV感染的CD4⁺细胞在室温下预孵育1小时(在添加肽或者将效应物和靶细胞组合和根据标准ICS测定孵育之前)来确定应答的MHC缔合(MHC-Ia、MHC-E、MHC-II):1) 泛抗MHC-I mAb W6/32(10mg/ml),2) MHC-II阻断CLIP肽(MHC-II 相关恒定链,第89-100位氨基酸;20μM),和3) MHC-E阻断VL9肽(VMAPRTLLL;20μM),单独或组合。在一些实验中,使用 Mamu-A1*001:01结合肽CM9(CTPYDI NQM;20μM)或 Mamu-A1*002:01结合肽GY9(GSEN LKSLY;20μM)作为阻断对照。如先前所述(Hansen等Science(2013),同上)将经刺激的细胞固定、透化并染色,并在LSR-II仪器(BD Biosciences)上进行流式细胞术分析。使用FlowJo软件(Tree Star)进行分析。在所有分析中,在小淋巴细胞的光散射特征设门后之后在CD3⁺群体和随后的CD4⁺/CD8⁺ T细胞亚群上进行递进设门。由CD69以及TNF-α和IFN-γ任一或二者的细胞内表达常规确定CD8⁺ T细胞群的抗原特异性应答频率。对于表位解卷积实验,使用严格的应答标准来防止假阳性。在这些研究中,如果在至少2个独立测定中,聚集为CD69⁺、TNF-α⁺和IFN-γ⁺的事件的频率>0.05%,背景<0.01,则认为对于给定的15聚体肽的应答为阳性的。将单个肽应答分类为被阻断的是基于相对于同种型对照阻断>90%的抑制。认为不符合这些标准的应答是不确定的。单个肽应答必须被抗MHC-I克隆W6/32和 MHC-E结合肽VL9二者所阻断,并且不被CLIP阻断,则被认为是被阻断MHC-E限制。依据以下标准从通过测试连续15聚体肽鉴定的阳性应答中评估最小独立表位数:相同限制性类型的单一阳性肽=1个独立表位;相同限制性类型的2个相邻阳性肽=1个独立表位;相同限制性类型的3个相邻阳性肽=2个独立表位;相同限制性类型的4个相邻阳性肽=2个独立表位;以及相同限制性类型的5个相

邻阳性肽=3个独立表位。

[0205] 抗体:这些研究中使用了以下缀合的抗体:a)来自BD Biosciences, L200 (CD4; AmCyan)、SP34-2 (CD3;PacBlu)、SK1 (CD8a;TruRed, AmCyan)、25723.11 (IFN- γ ;APC、FITC)、6.7 (TNF;APC)、MAb11 (TNF;Alexa700), b)来自Beckman Coulter, L78 (CD69;PE)、2ST8.5H7 (CD8 β ;PE)、z199 (NKG2A/C或CD159a/c;PE), c)来自Biolegend, W6/32 (泛MHC-I, PE)、OKT-4 (CD4;PE-Cy7)、B1 (TCR γ/δ ;Alexa647), d)来自Miltenyi Biotec, M-T466 (CD4; APC), e)来自eBiosciences, M1-14D12 (小鼠IgG1;PE-Cy7)。在这些研究中使用以下未缀合的抗体: a)来自Advanced Bioscience Laboratories, 4324 (SIV Gag p27), b)来自LSBio, 4D12 (HLA-E), c) W6/32 (泛MHC-I)。LIVE/DEAD可固定的黄色死细胞染色 (LIVE Technologies) 用于评估细胞生存力。

[0206] 表位序列分析:使用Los Alamos HIV数据库工具Analyze Align (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ANALYZEALIGN/analyze_align.html) 产生序列LOGO, 所述工具基于WebLogo3 {Crooks, 2004#150}。使用Composition Profiler Tool (<http://cprofiler.org/cgi-bin/profiler.cgi>) (Vacic V等, BMC Bioinform 8, 211 (2007); 其通过引用并入本文) 计算在恒河猴中识别的11种最佳MHC-E 9聚体表位的以及来自Lampen等 (同上) 公开的TAP缺陷细胞的551种HLA-E洗脱肽的每个位置中氨基酸的统计学富集和代表性不足。将11种最佳肽中每个位置的氨基酸组成与用于疫苗的插入毒株SIVmac239Gag (GenBank登录号#M33262) 中发现的氨基酸频率进行比较。为了将11种最佳肽的每个位置组成与先前公开的在TAP缺陷环境中从HLA-E洗脱的肽进行比较, 使用Lampen等先前公开的全组551种洗脱肽。Lampen等中的肽的长度不等, 为8至13个氨基酸; 9是最常见的长度。他们已使用基序搜索算法来探索其洗脱组中的315种9聚体的氨基酸富集和代表性不足 (Lampen等中图2), 因为不论长度如何, 位置2和C末端位置是最感兴趣的, 采用略微不同的方法来探索其已公开的数据, 并表征了其全部551种洗脱肽的比对形式。在位置8之后根据需要添加空位以维持比对, 以实现包括所有肽在内的第二位置和经比对C端的评估。基于SwissProt 51, 对于每个比对位置将其数据与在天然蛋白质中发现的氨基酸频率进行比较 (Bairoch A等, Nucleic Acids Res 33, D154 (2005); 其通过引用并入本文)。

[0207] 基于经毒株68-1 RhCMV载体疫苗接种的恒河猴中被CD8⁺ T细胞识别的11种最佳MHC-E限制性SIVgag 9聚体表位, 图13D中所示的序列LOGO通过字母高度指出了给定位置中每种氨基酸的频率 (相对于其在SIVmac239Gag中的背景频率)。根据在Lampen等的TAP缺陷环境中从HLA-E洗脱的551种肽的富集 (灰色填充框或阴影线框) 或代表性不足 (白色填充框), 对图13D中的序列LOGO进行着色。如图13D的右图所示, 551种Lampen等的肽中在第2位和C末端锚定位置中富集的氨基酸在我们的11种最佳SIVgag肽中是罕见的, 而显著代表性不足的那些被富集。

[0208] 应理解, 本文中描述的实施例和实施方案仅用于举例说明的目的, 且本领域技术人员将提出鉴于它们的多种修改和改变, 并且包括在本申请的精神和范围内。

[0209] 本文中引用的所有出版物、专利、专利申请、互联网网站和登录号/数据库序列 (包括多核苷酸和多肽序列二者) 均通过引用整体并入本文用于所有目的, 其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请、互联网网站或登录号/数据库序列被具体且单独地指出如此通过引用并入本文。

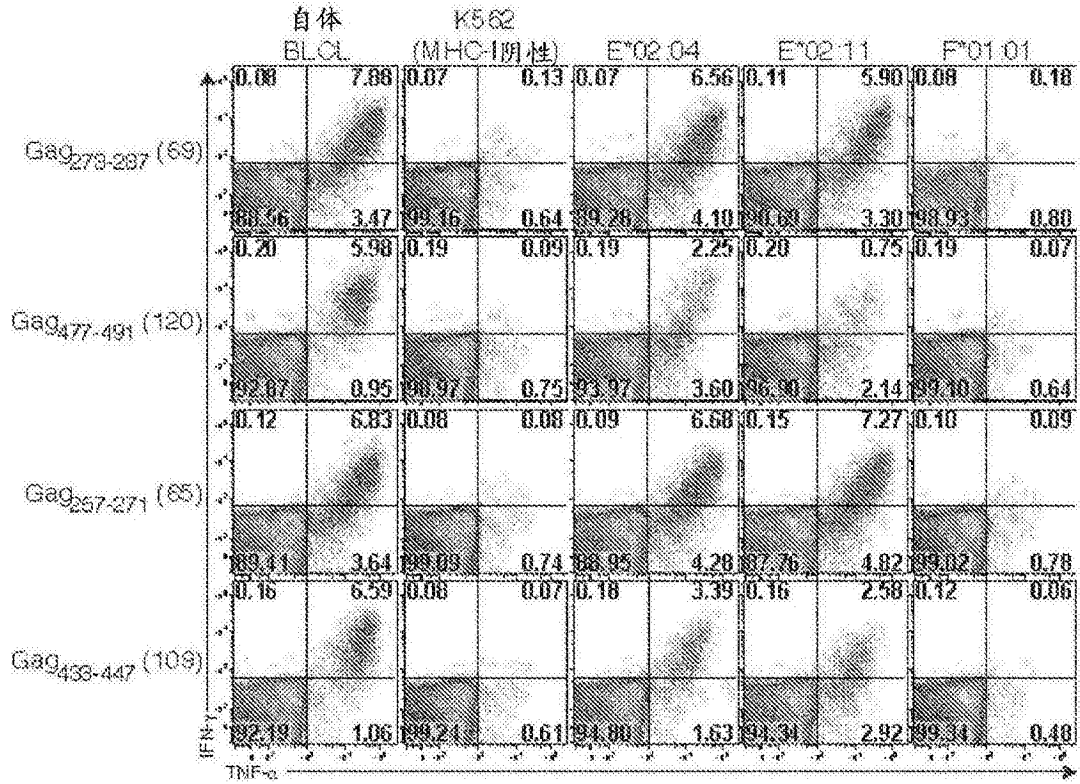


图1A

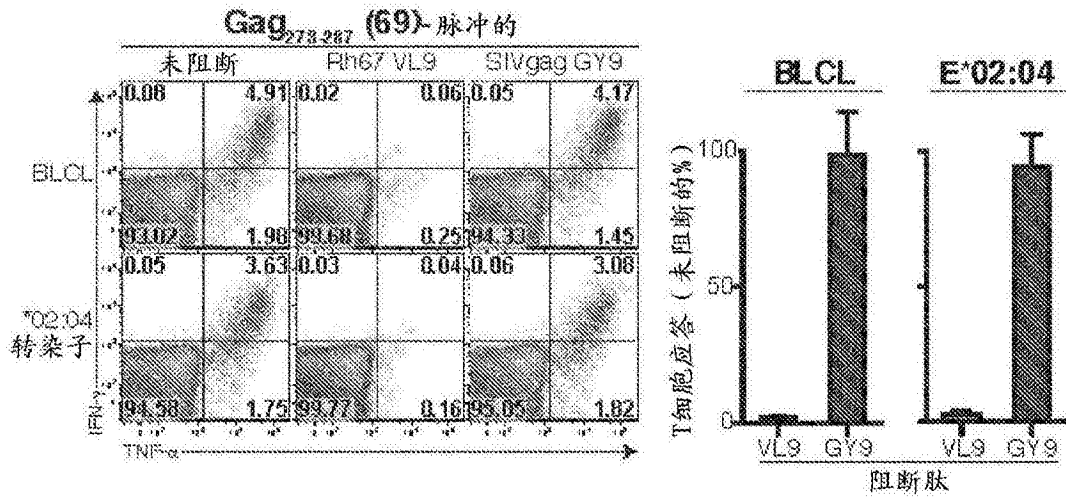


图1B

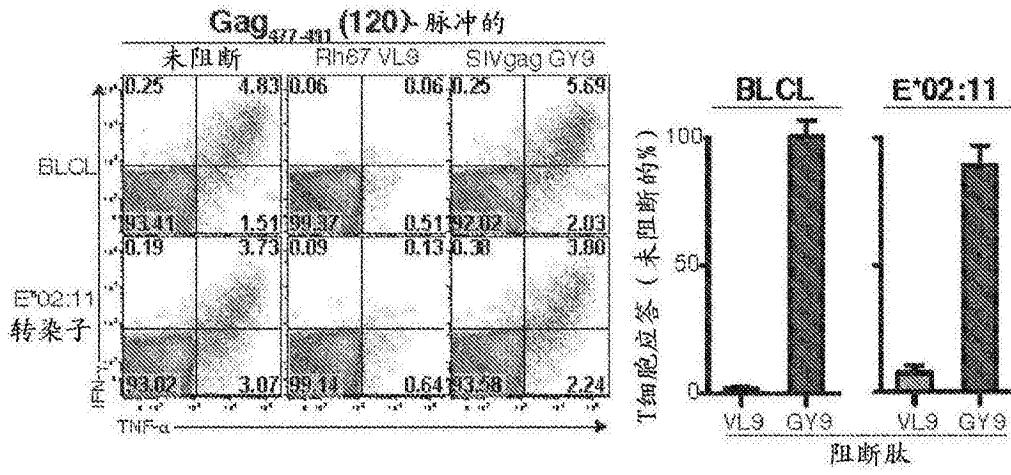


图1C

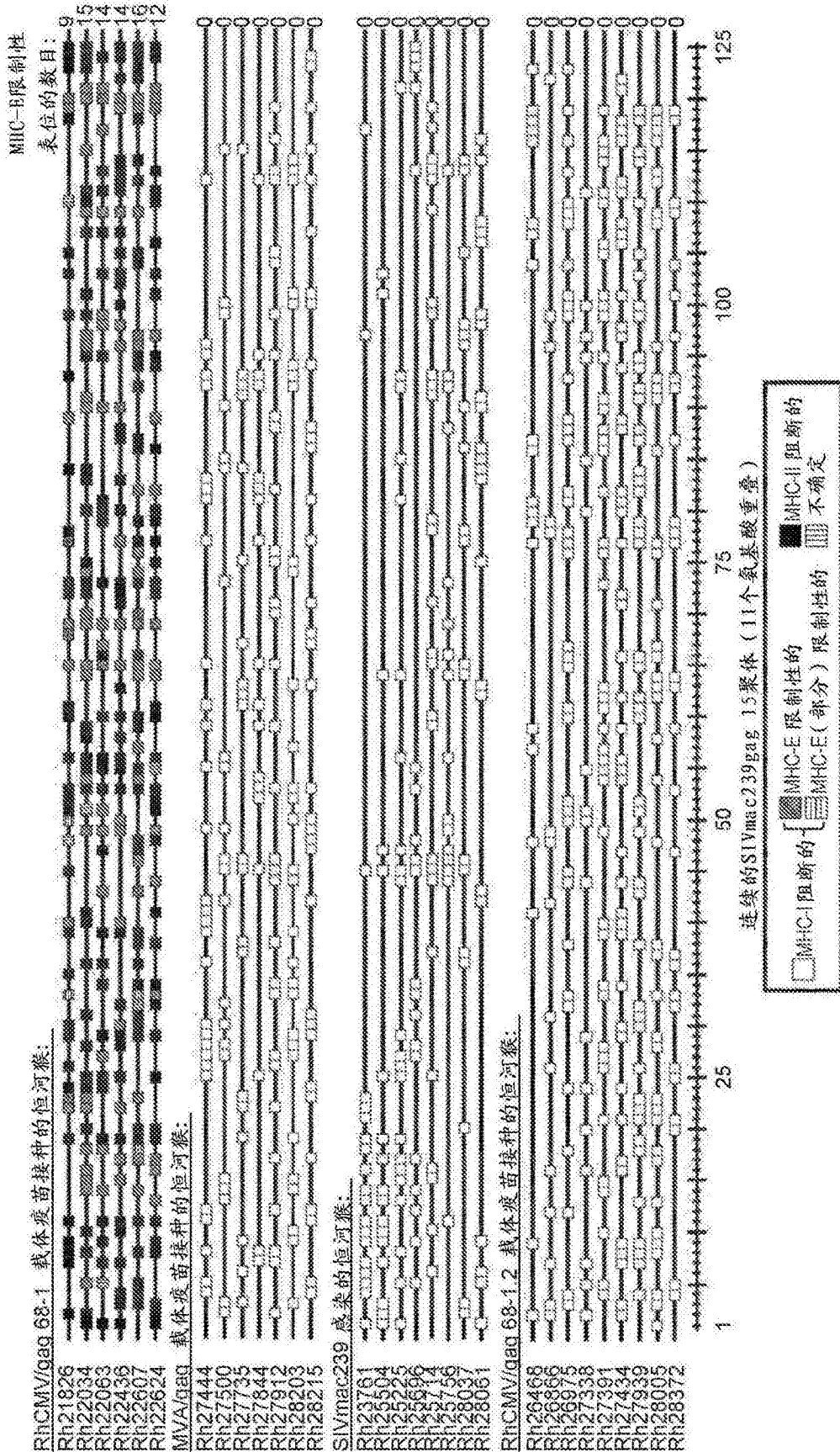


图2A

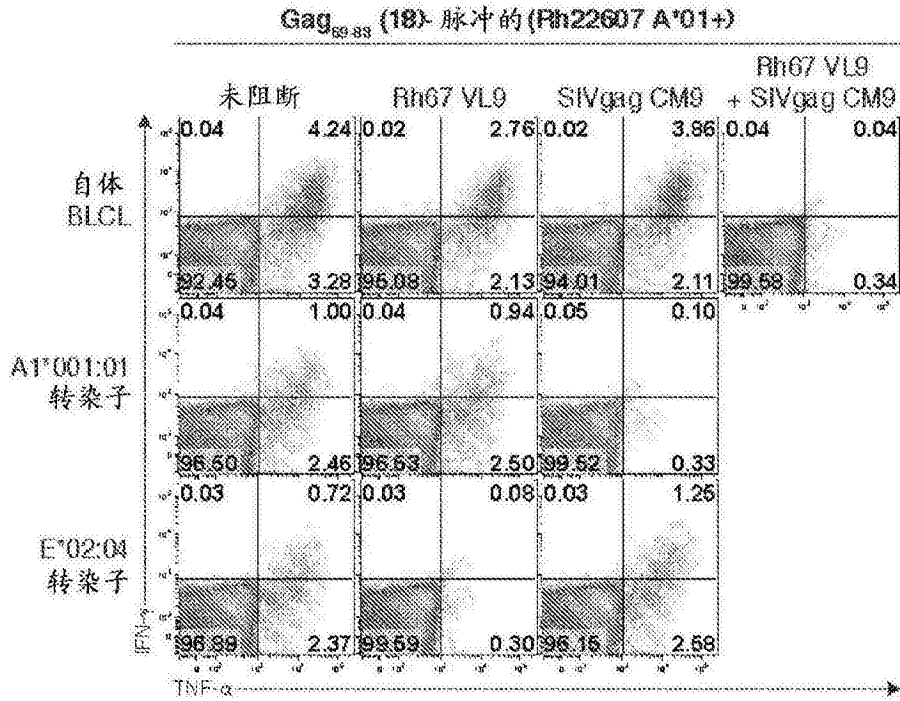


图2B

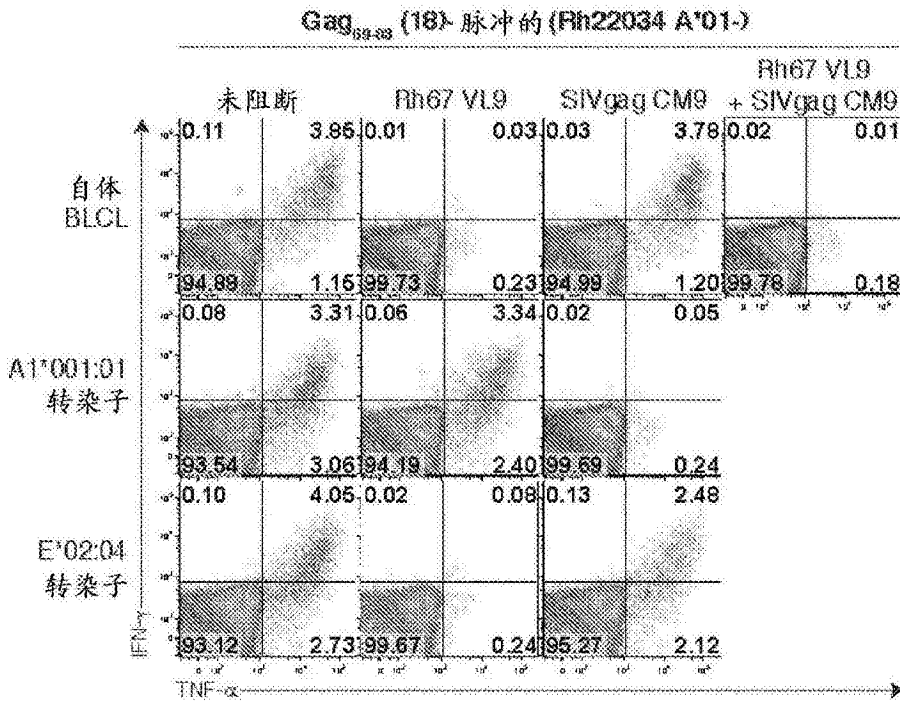


图2C

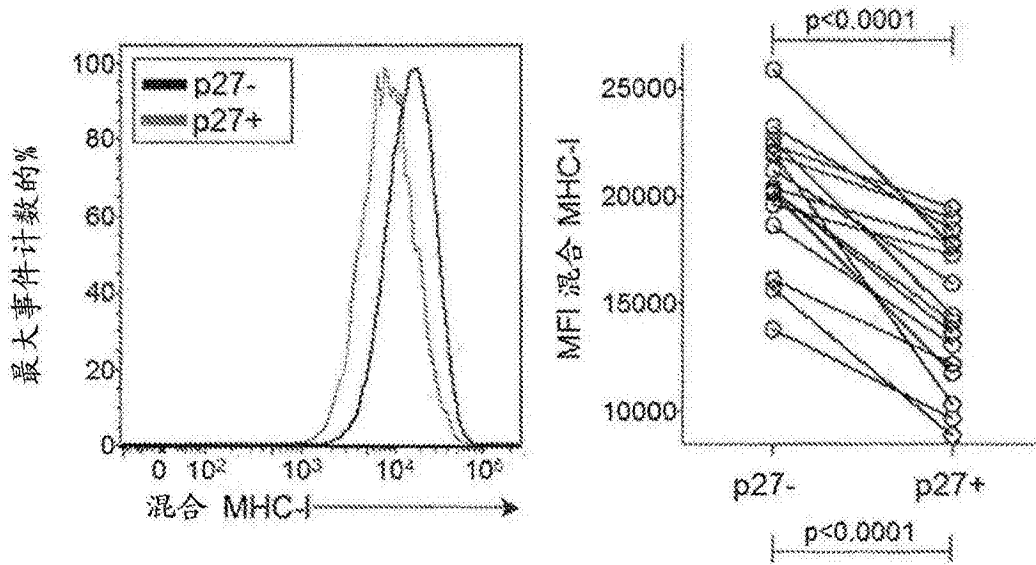


图3A

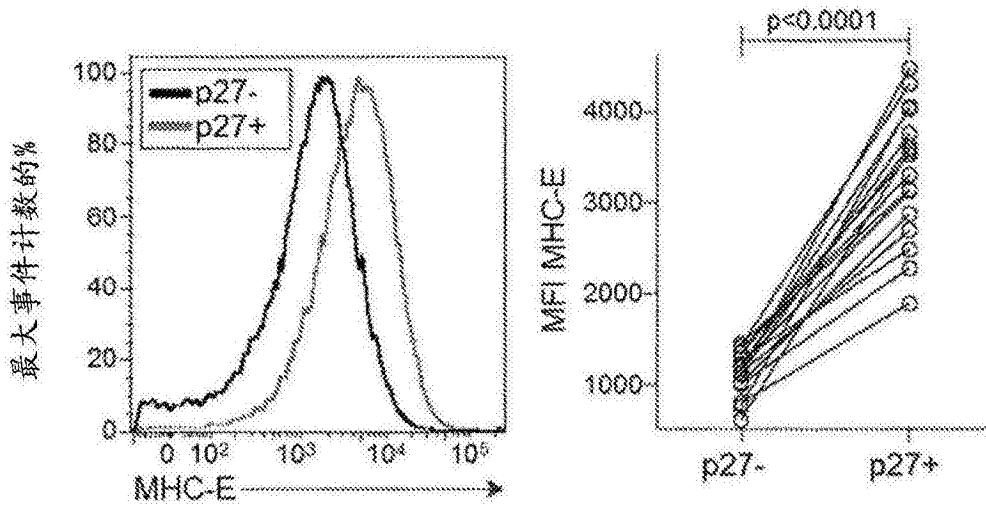


图3B

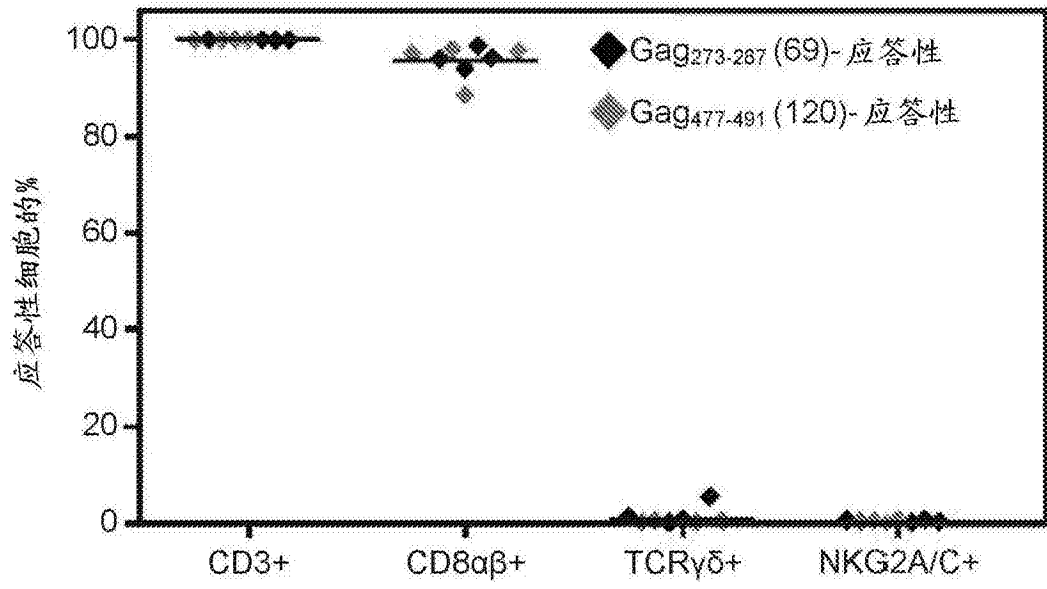


图3C

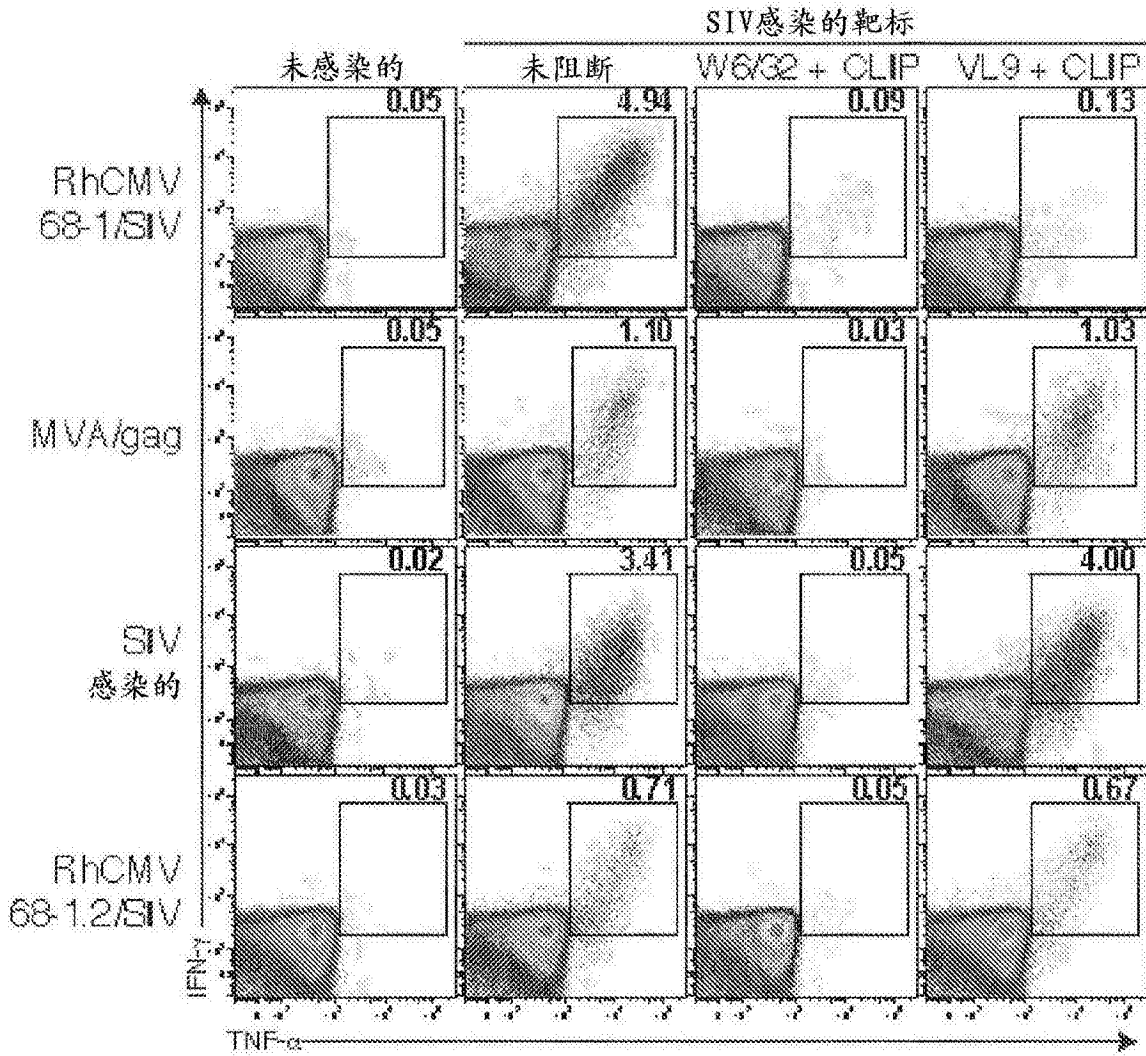


图4A

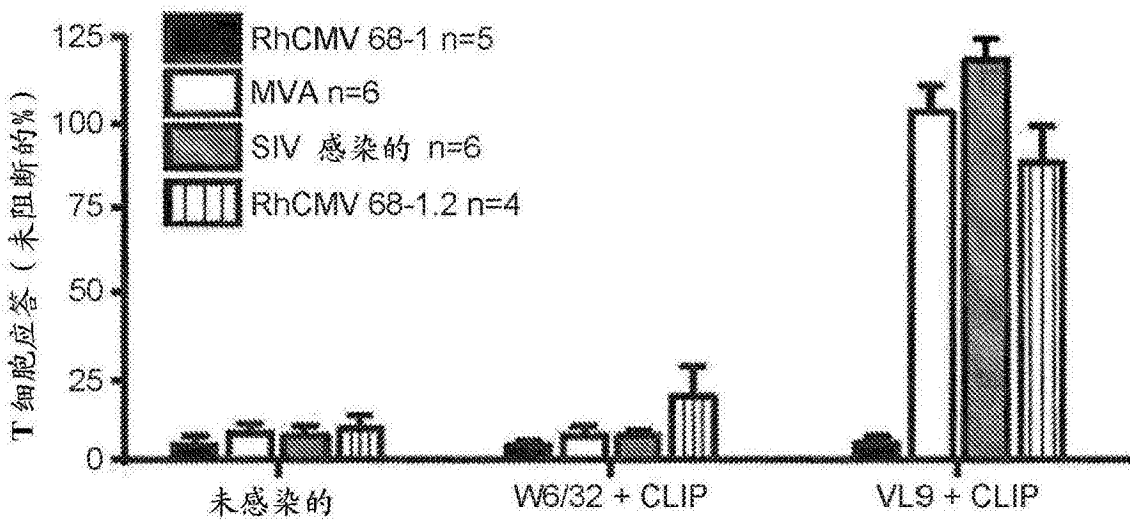


图4B

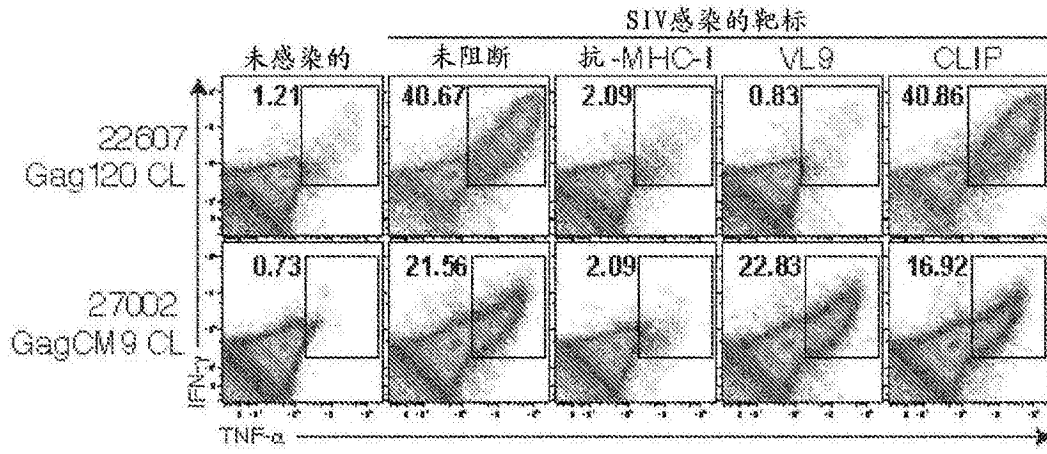


图4C

Rh67缺失; 毒株68-1 RhCMV/gag (UL128/UL130缺失) 疫苗:

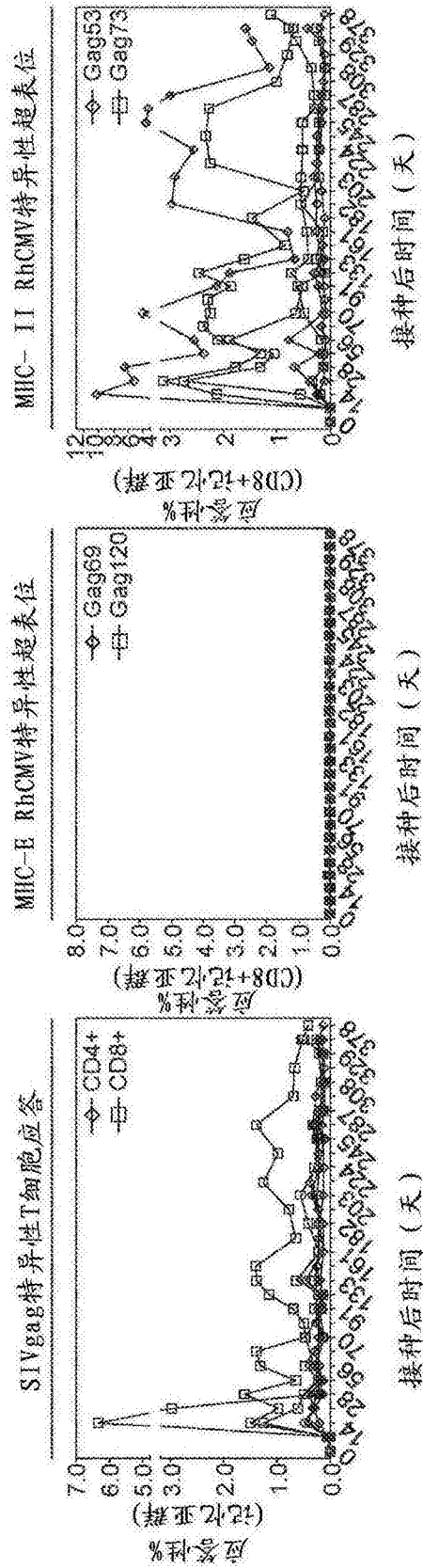


图5

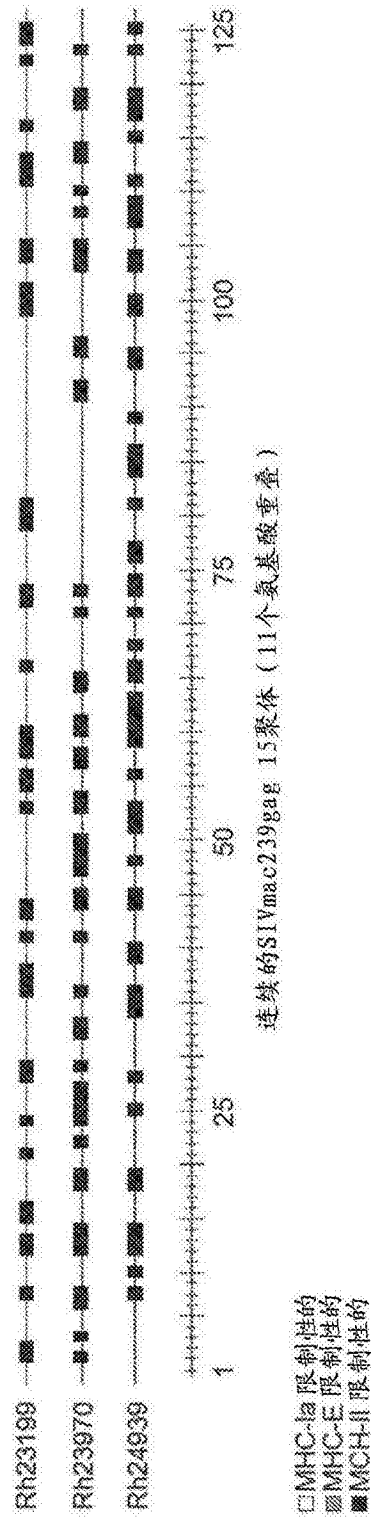


图6

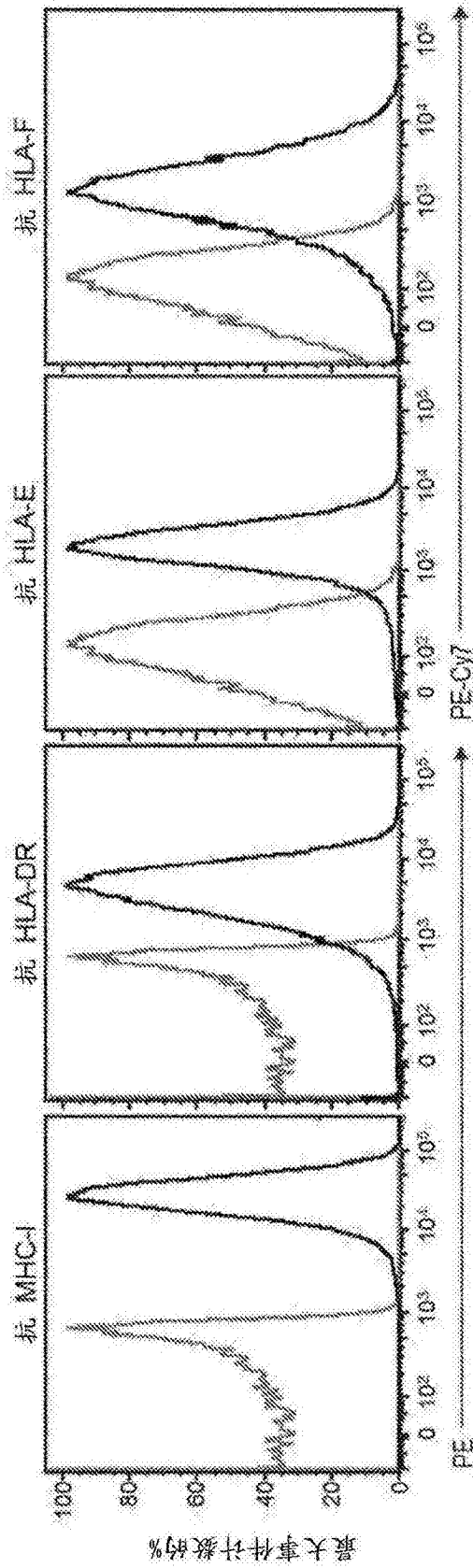


图7A

恒河猴

	21826	22034	22436	22607
A1*001:01	X			X
A1*002:01	X	X	X	X
A1*012:01			X	
A1*023:01		X		
A2*05:11; A2*05:28; A2*05:32:01; A2*05:32:02; A2*05:45			X	
A2*05:04:01; A2*05:04:03; A2*05:10; A2*05:14				X
A3*13:02	X	X	X	X
A4*14:03:01; A4*14:09		X		
B*001:01:01		X		X
B*007:02		X		X
B*012:01	X			X
B*017:01	X			
B*021:01		X		
B*022:01	X			
B*028:01		X		
B*029:01	X			
B*030:01	X			
B*030:05		X		X
B*031:01	X			
B*041:01			X	
B*046:01:02		X		
B*046:01			X	
B*055:01			X	
B*057:01	X			X
B*058:02			X	
B*060:02	X			
B*061:01	X			
B*064:01			X	
B*068:03		X		
B*072:01; B*072:02; Mm-B*nov121		X		X
B*074:01	X			X
B*082:02				X
Mm-B*nov037	X			
Mm-B*nov113		X		
E*02:01:02; E*02:10; E*02:11	X			X
E*02:01	X	X	X	X
E*02:09	X			
E*02:12:01; E*02:12:02		X		
E*02:20	X			X

产生的转染子

Mamu I类等位基因

图7B

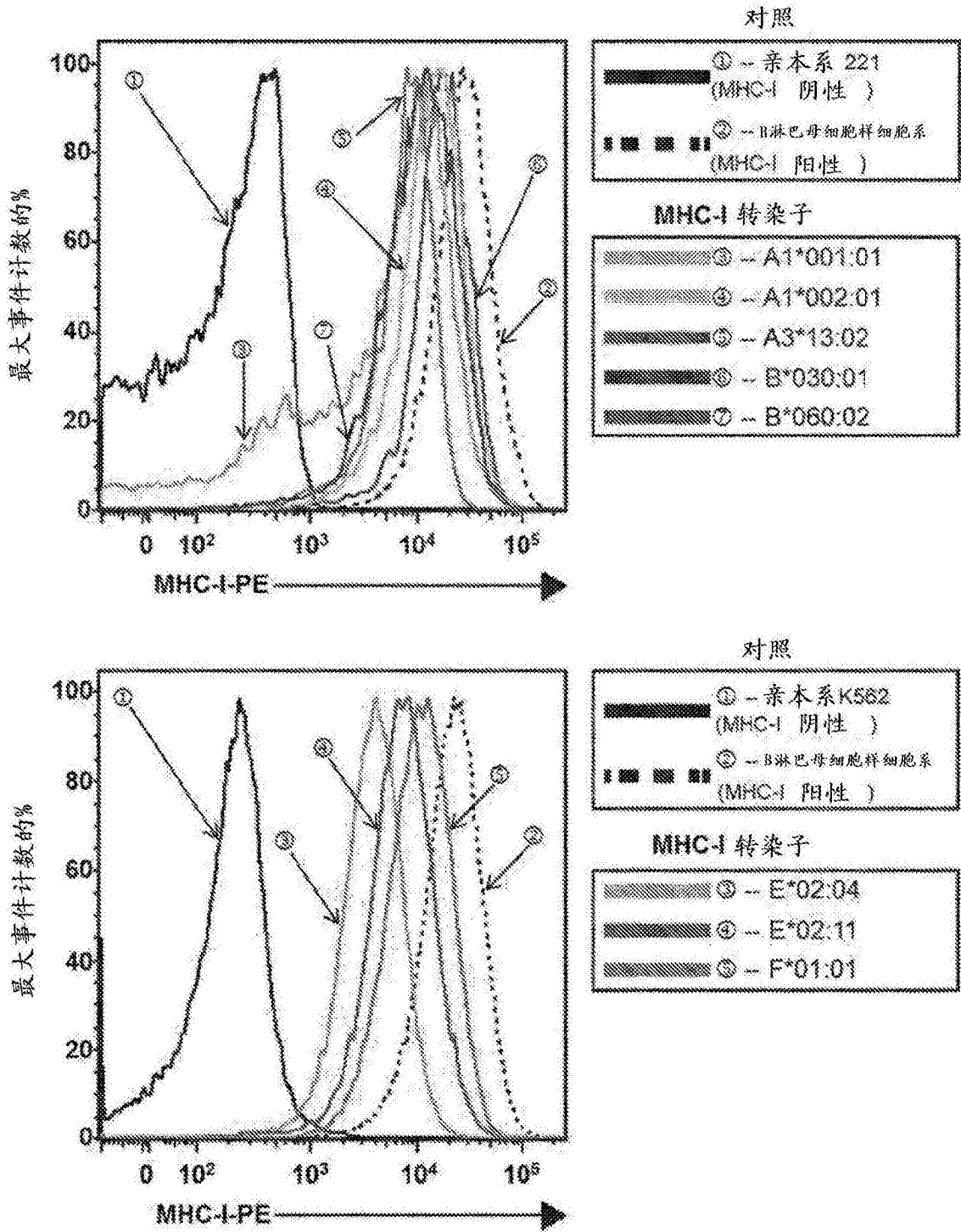


图7C

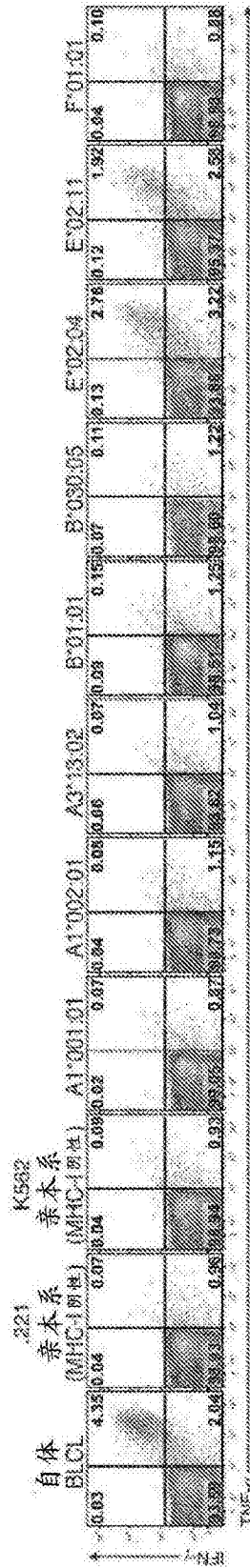


图8A

	Gagasan (18)	Gagasan (23)	Gagasan (33)	Gagasan (50)	Gagasan (65)	Gagasan (85)	Gagasan (97)	Gagasan (109)	Gagasan (119)	Gagasan (128)
21826										
B.L.C.										
Z1										
K562										
E*02.11										
F*01.01										
22034										
B.L.C.										
Z1										
K562										
E*02.11										
F*01.01										
22436										
B.L.C.										
Z1										
K562										
E*02.11										
F*01.01										
22607										
B.L.C.										
Z1										
K562										
E*02.11										
F*01.01										

图8B

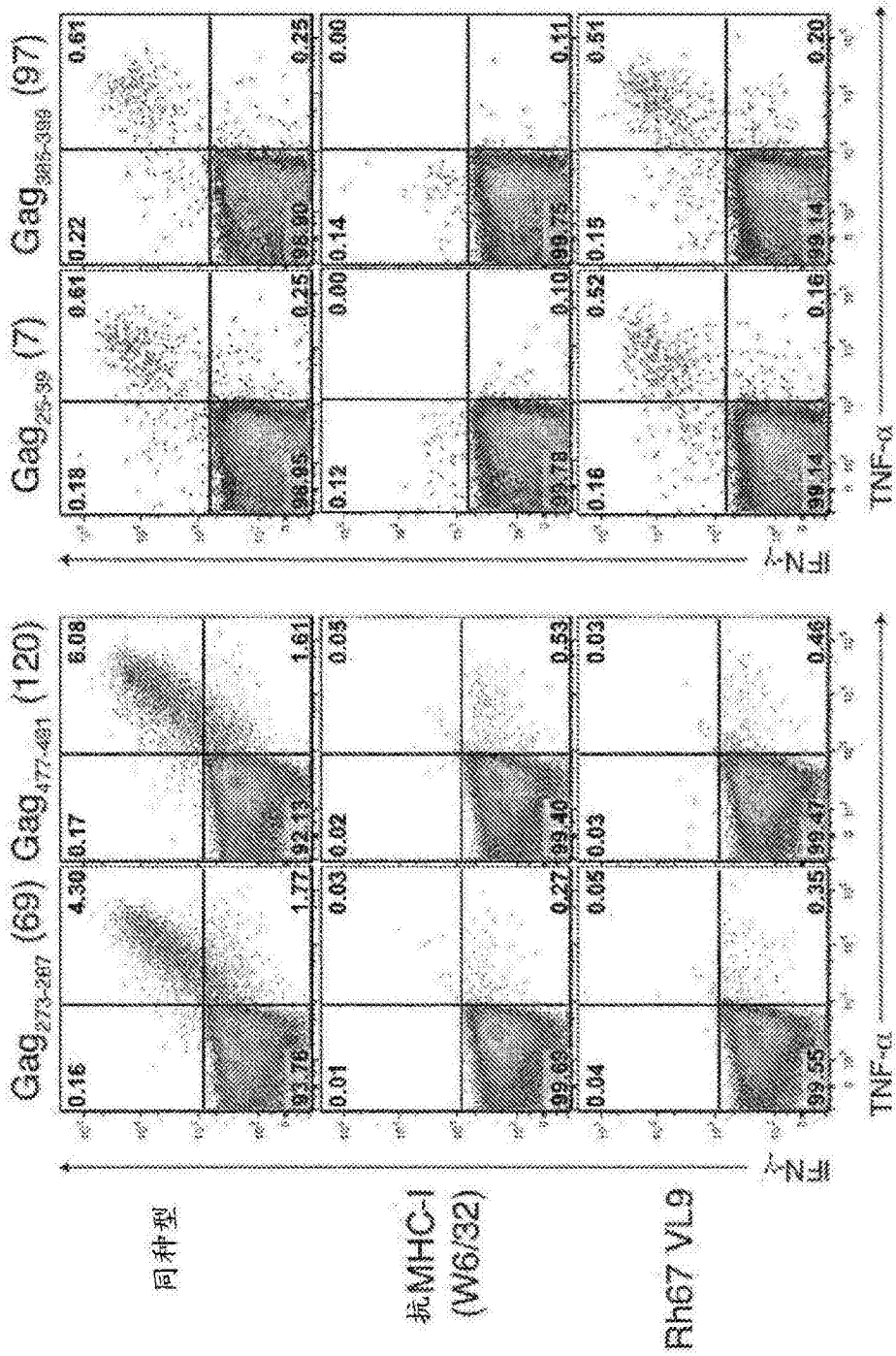


图9

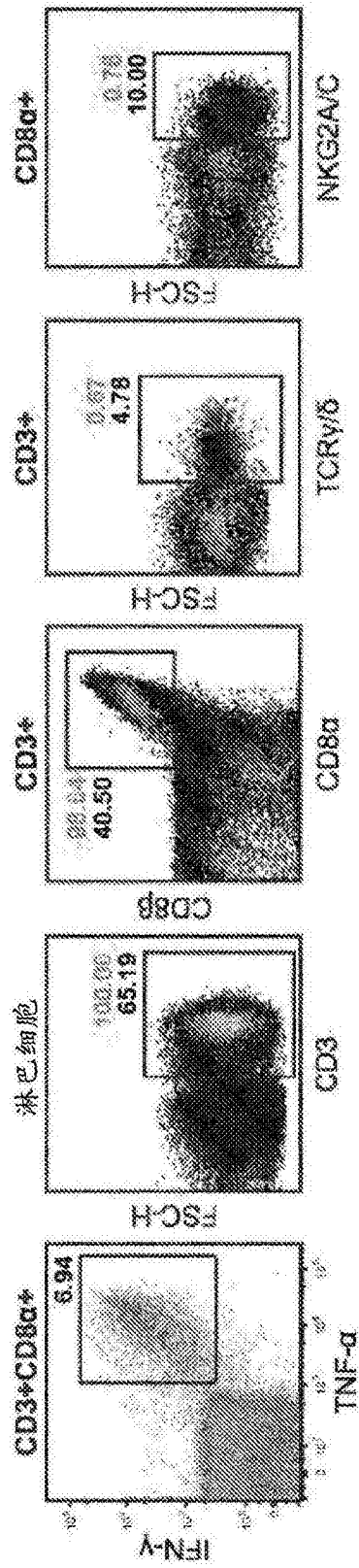


图10A

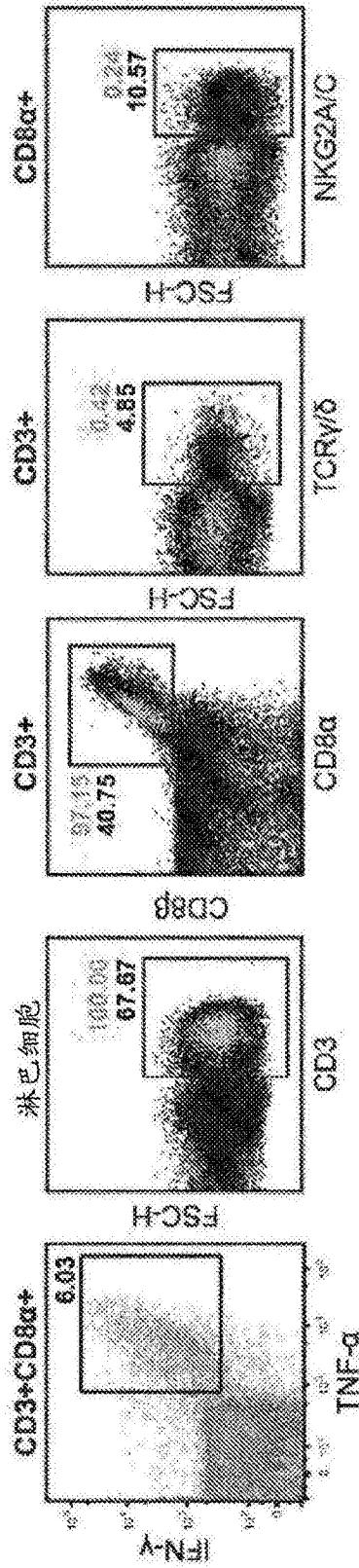


图10B

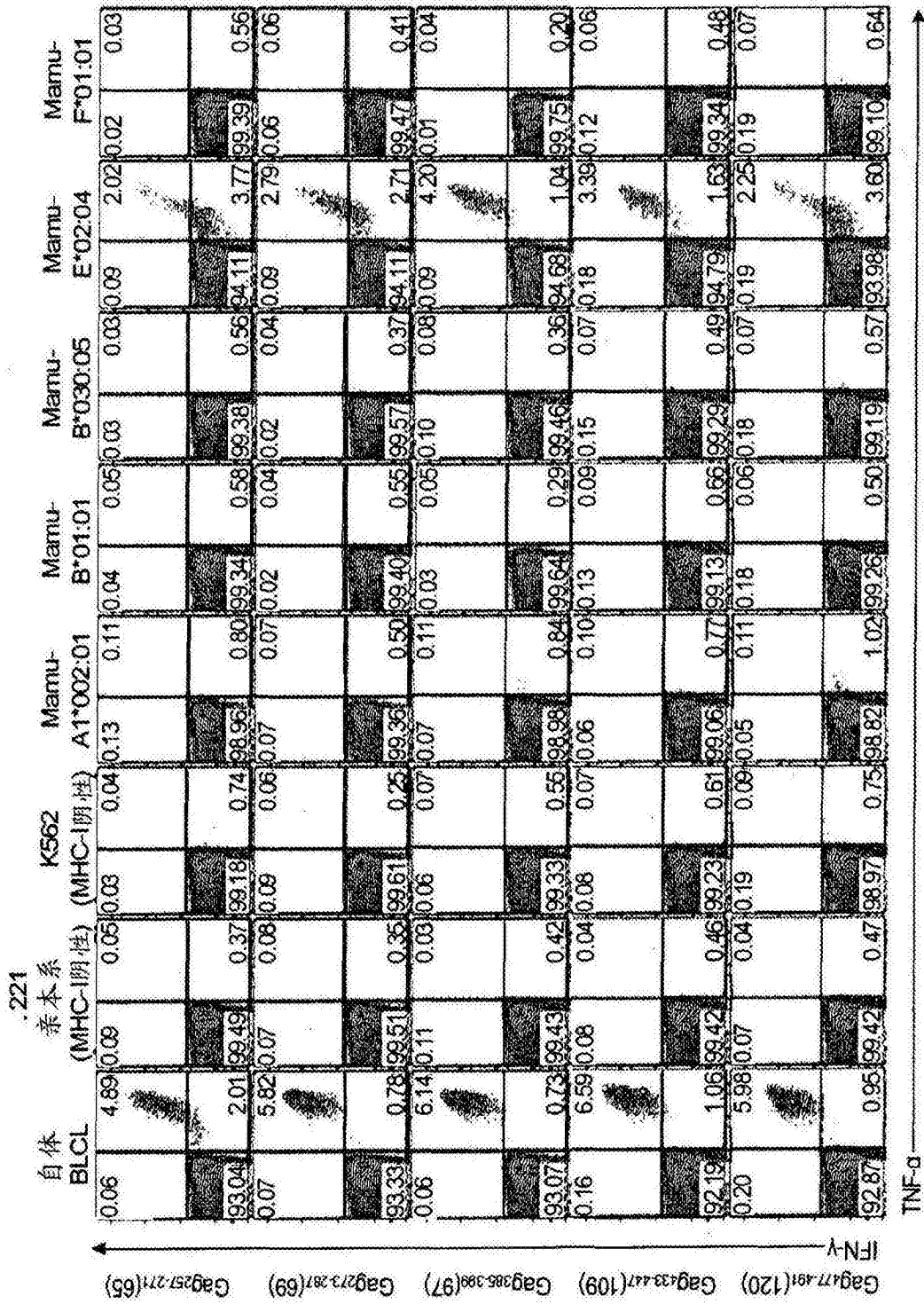


图11

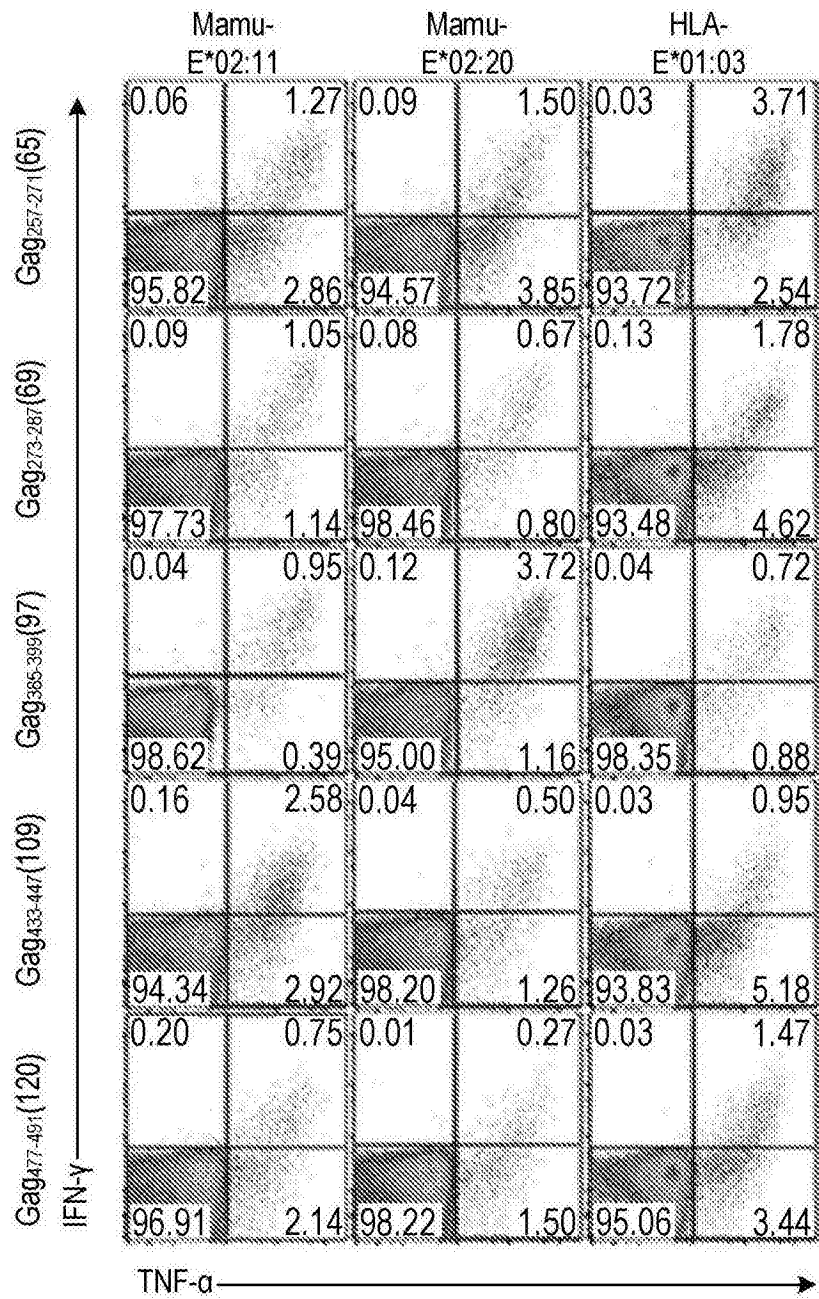


图11B

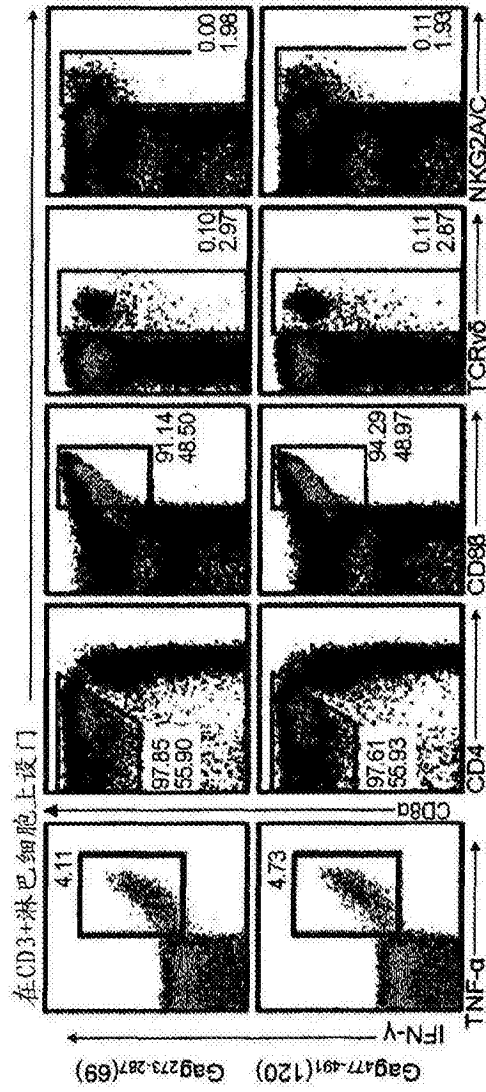


图11C

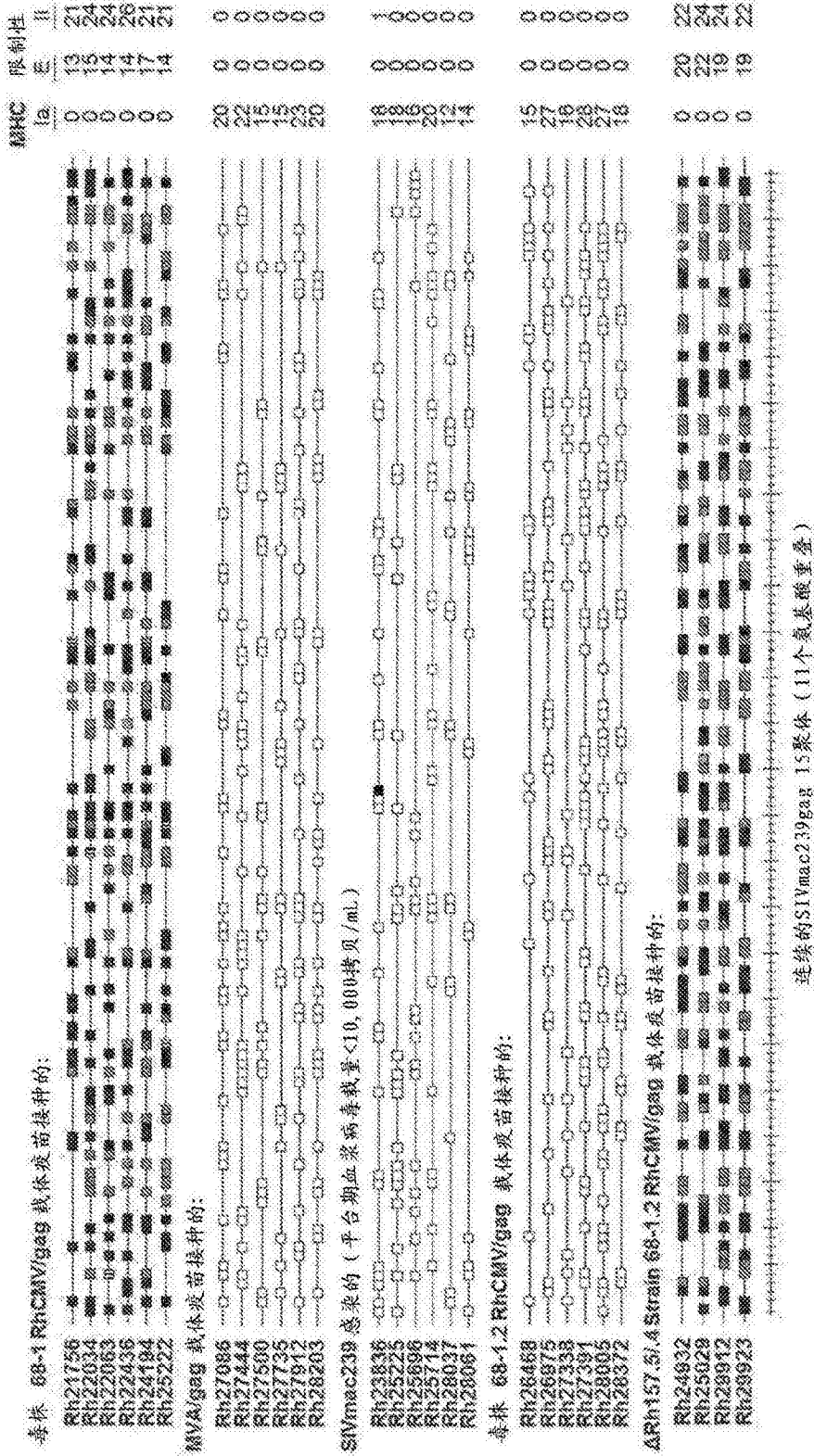


图12A

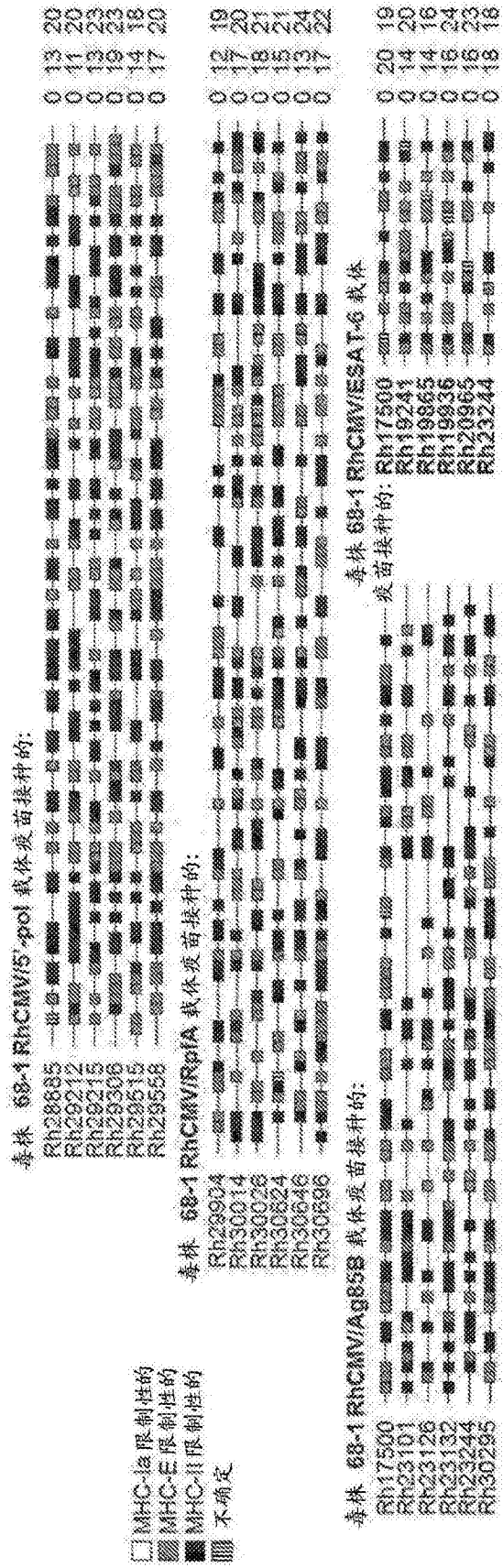


图12B

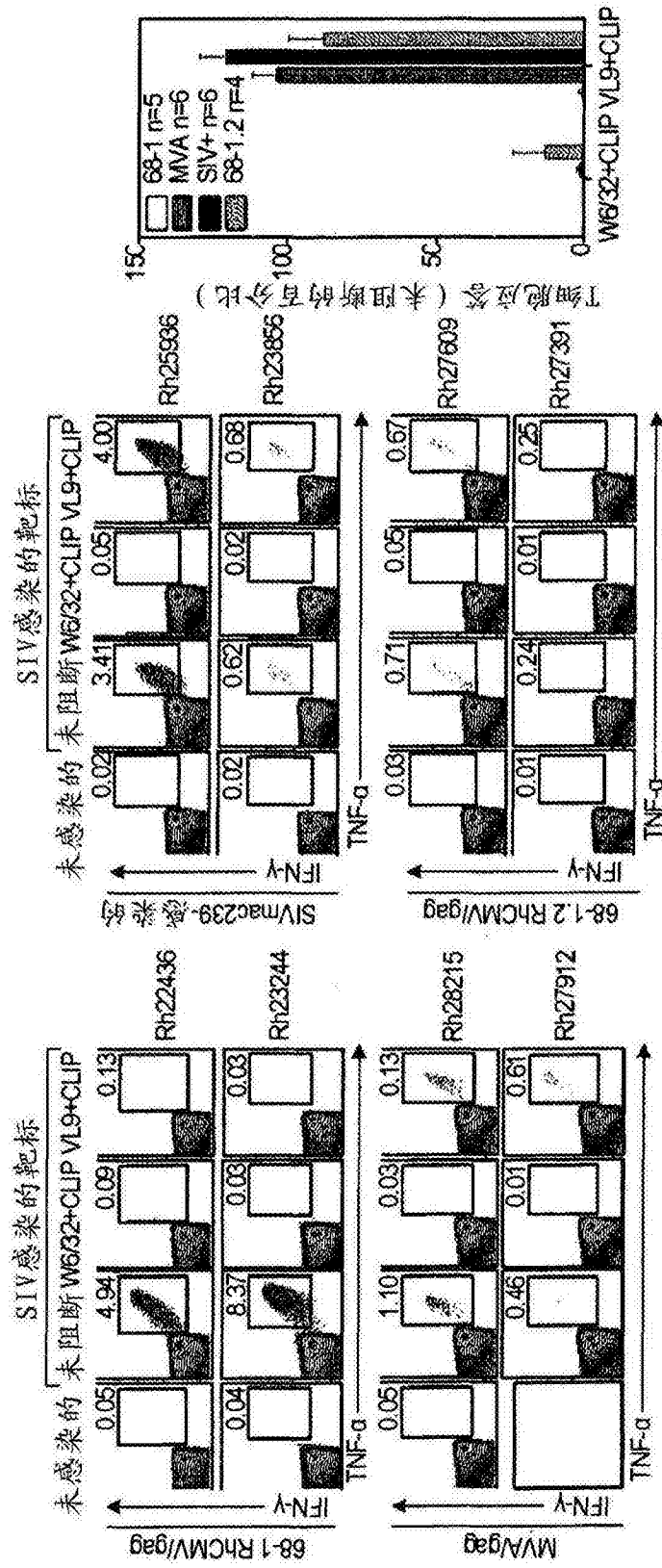


图12C

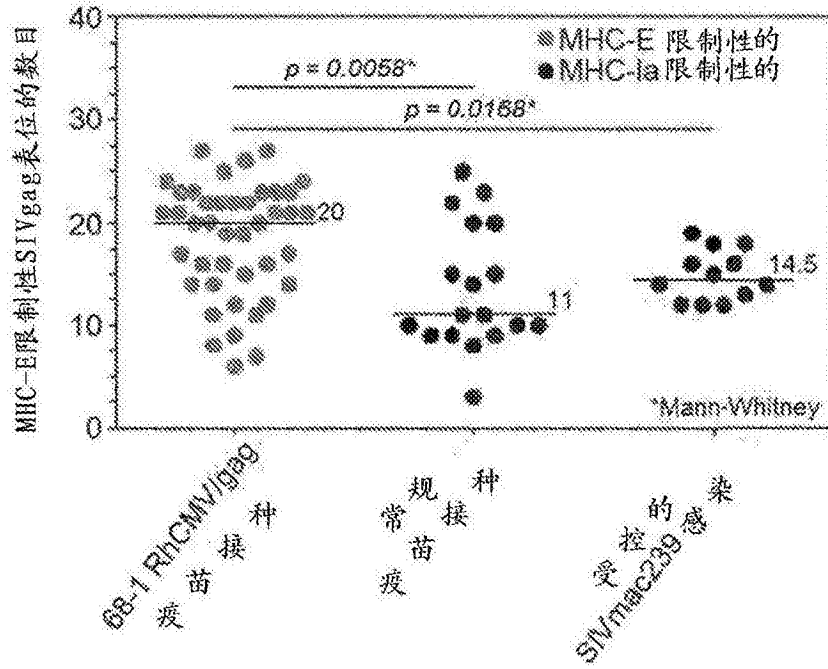


图13A

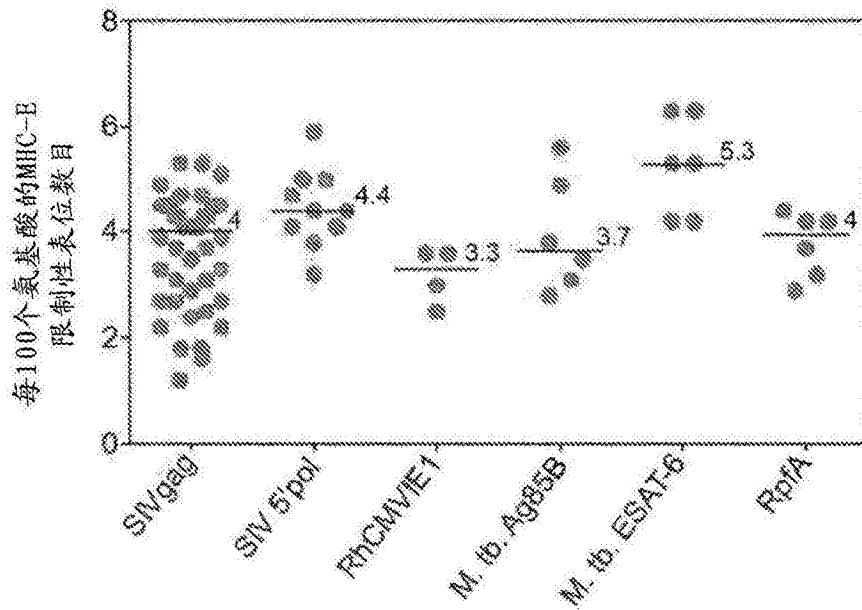


图13B

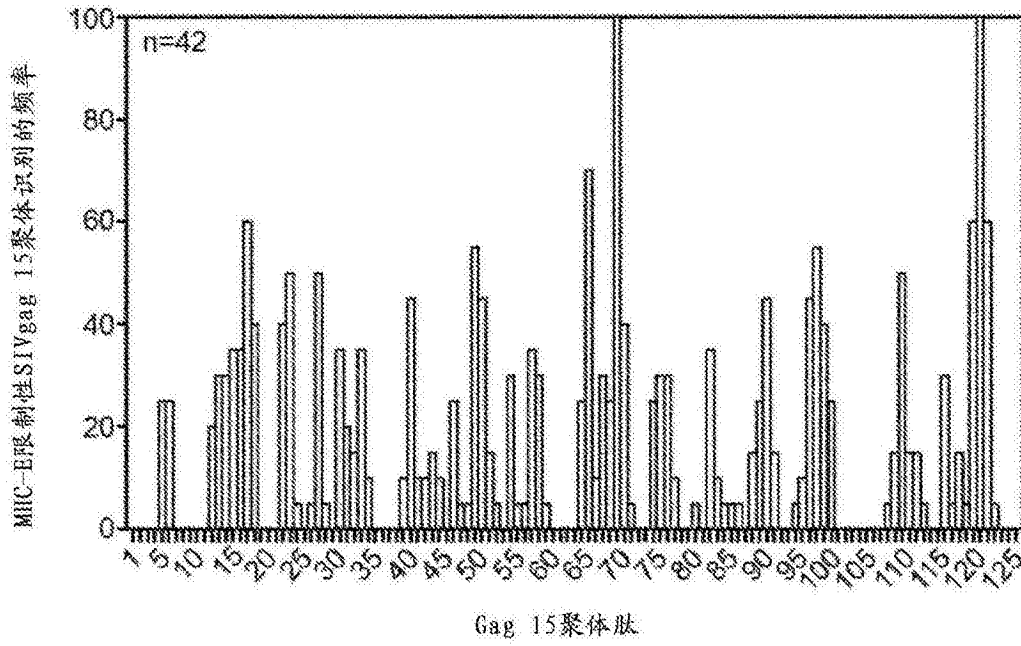


图13C

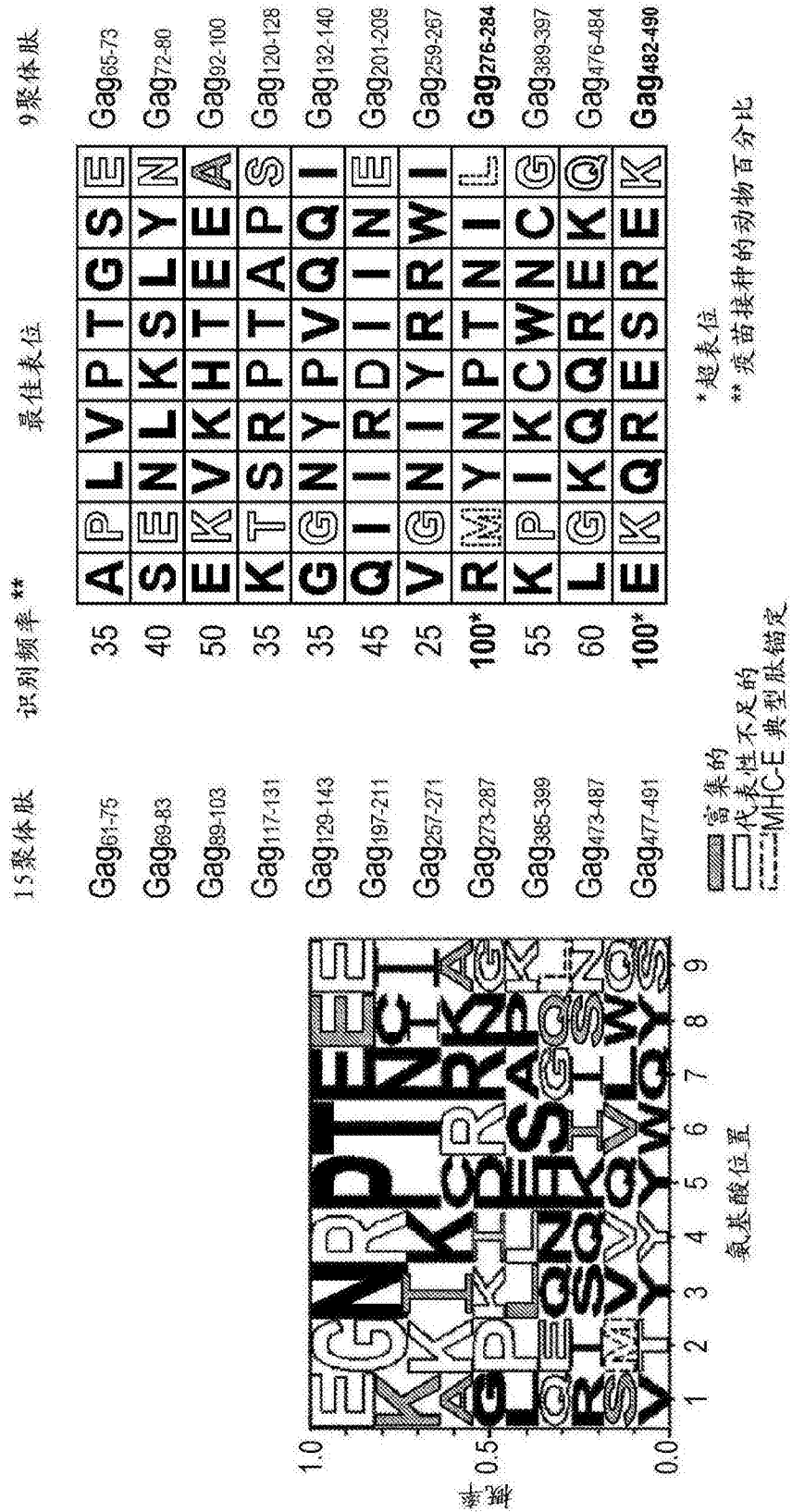


图13D

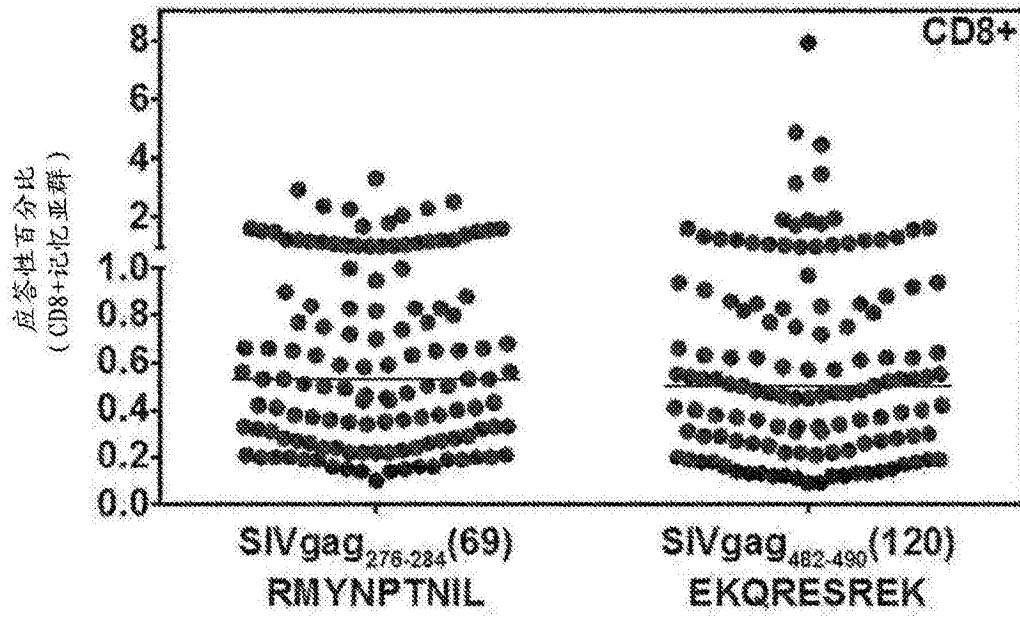


图14

恒河猴

	21826	22034	22436	22607
A1*001:01	X			X
A1*002:01	X	X	X	X
A1*012:01			X	
A1*023:01		X		
A2*05:01; A2*05:11; A2*05:28; A2*05:32:01; A2*05:32:02; A2*05:45			X	
A2*05:04:01; A2*05:04:03; A2*05:10; A2*05:14				X
A3*13:02	X	X	X	X
A4*14:03:01; A2*14:09		X		
B*001:01:01		X		X
B*007:02		X		X
B*012:01	X			X
B*17:01	X			
B*021:01		X		
B*022:01	X			
B*028:01		X		
B*029:01	X			
B*030:01	X			
B*030:05		X		X
B*031:01	X			
B*041:01			X	
B*046:01:02		X		
B*049:01			X	
B*055:01			X	
B*057:01	X			X
B*058:02			X	
B*060:02	X			
B*061:01	X			
B*064:01			X	
B*068:03		X		
B*072:01; B*072:02; Mm-B*nov121		X		X
B*074:01	X			X
B*082:02				X
Mm-B*nov037	X			
Mm-B*nov113		X		
E*02:01:02 E*02:10 E*02:11	X			X
E*02:04 E*02:09	X	X	X	X
E*02:12:01; E*02:12:02		X		
E*02:20	X			X

产生的转染子

图15A

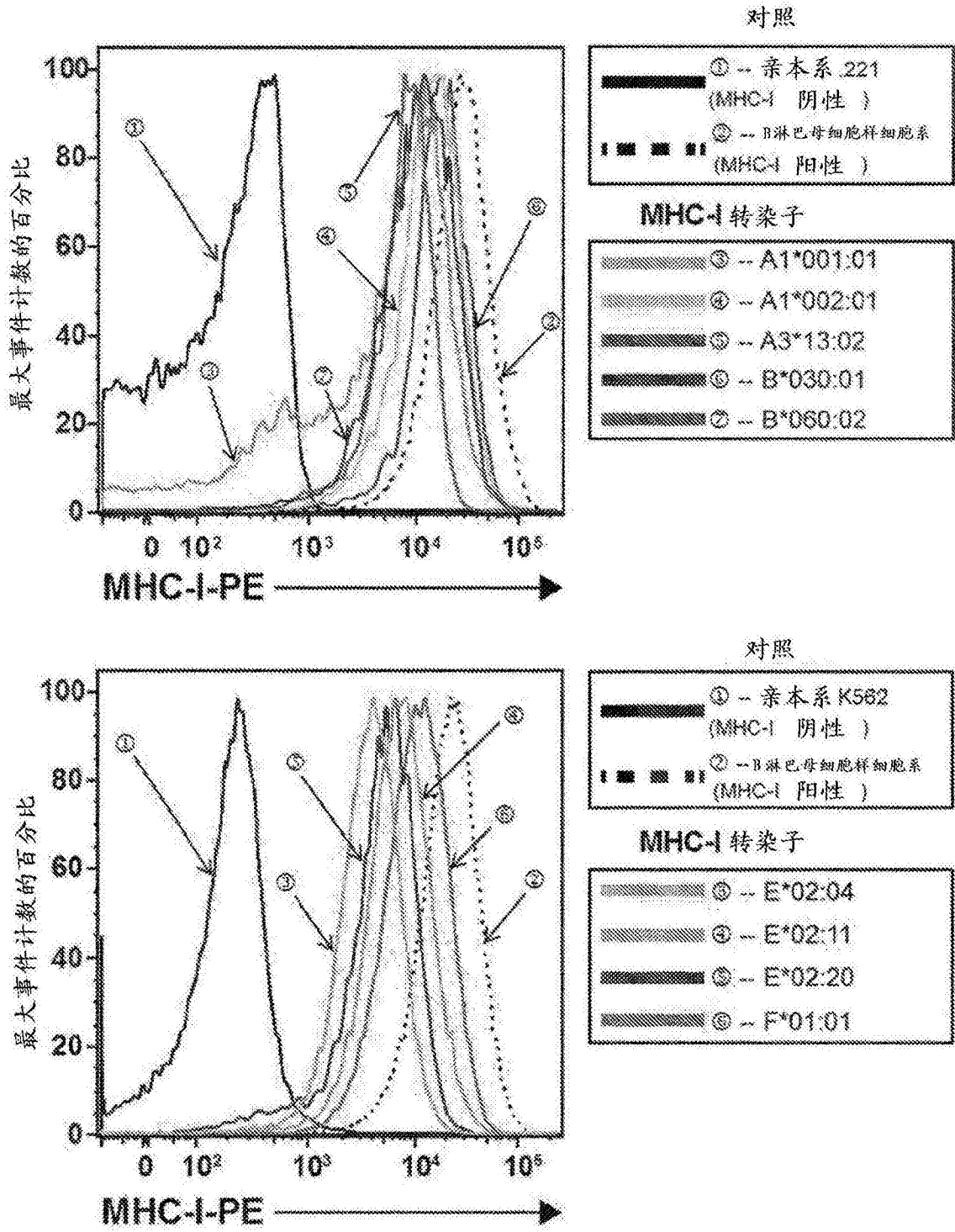


图15B

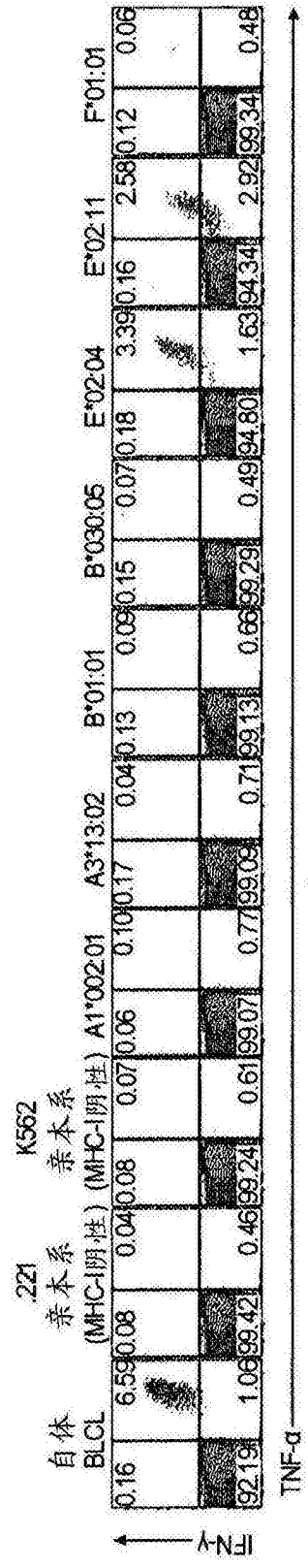


图16A

	Gag _{51:75} (16)	Gag _{88:88} (18)	Gag _{98:108} (23)	Gag _{117:131} (30)	Gag _{128:143} (33)	Gag _{187:211} (50)	Gag _{251:271} (65)	Gag _{279:287} (69)	Gag _{385:389} (97)	Gag _{432:447} (109)	Gag _{473:487} (119)	Gag _{477:481} (120)
Rh21826	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BLCL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
221	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K562	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1*001:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1*002:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3*13:02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B*029:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B*030:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E*02:04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E*02:11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F*01:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	Gag _{51:75} (16)	Gag _{88:88} (18)	Gag _{98:103} (23)	Gag _{117:131} (30)	Gag _{128:143} (33)	Gag _{187:211} (50)	Gag _{251:271} (65)	Gag _{279:287} (69)	Gag _{385:389} (97)	Gag _{432:447} (109)	Gag _{473:487} (119)	Gag _{477:481} (120)
Rh22034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BLCL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
221	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K562	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1*002:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A3*13:02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B*001:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B*030:05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E*02:04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E*02:11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F*01:01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

图16B

Rh22436	Gag ₆₁₋₇₅ (16)	Gag ₈₉₋₈₃ (18)	Gag ₉₉₋₁₀₃ (23)	Gag ₁₁₇₋₁₃₁ (30)	Gag ₁₂₉₋₁₄₃ (33)	Gag ₁₉₇₋₂₁₁ (50)	Gag ₂₅₇₋₂₇₁ (65)	Gag ₂₇₃₋₂₈₇ (69)	Gag ₃₈₅₋₃₉₉ (97)	Gag ₄₃₃₋₄₄₇ (109)	Gag ₄₇₃₋₄₈₇ (119)	Gag ₄₇₇₋₄₉₁ (120)
BLCL	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1*002:01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3*13:02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*048:01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E*02:04	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
E*02:11	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
F*01:01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rh22607	Gag ₆₁₋₇₅ (16)	Gag ₈₉₋₈₃ (18)	Gag ₉₉₋₁₀₃ (23)	Gag ₁₁₇₋₁₃₁ (30)	Gag ₁₂₉₋₁₄₃ (33)	Gag ₁₉₇₋₂₁₁ (50)	Gag ₂₅₇₋₂₇₁ (65)	Gag ₂₇₃₋₂₈₇ (69)	Gag ₃₈₅₋₃₉₉ (97)	Gag ₄₃₃₋₄₄₇ (109)	Gag ₄₇₃₋₄₈₇ (119)	Gag ₄₇₇₋₄₉₁ (120)
BLCL	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1*001:01	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1*002:01	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A3*13:02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*001:01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*030:05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E*02:04	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
E*02:11	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
F*01:01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图16B(续)

恒河猴:	A1*001:01	A1*002:01	Gag ₈₃₋₈₁ (18)	Gag ₁₇₉₋₁₄₃ (33)	Gag ₁₉₇₋₂₁₁ (55)
Rh22607	-	-	+	+	-
Rh21826	+	+	-	+	+
Rh25565	-	-	+	+	+
Rh25545	-	-	-	-	-
Rh22034	-	+	+	-	-
Rh28819	-	+	+	-	-
Rh28808	-	+	-	+	+
Rh22436	-	+	-	-	+
Rh24194	-	+	-	-	+
Rh27517	-	-	+	+	-
Rh22063	-	-	+	-	-
Rh27473	-	-	+	-	-
Rh27715	-	-	+	-	-
Rh29483	-	-	+	-	-
Rh25222	-	-	-	+	+
Rh29208	-	-	-	+	+
Rh29212	-	-	-	+	+
Rh22624	-	-	-	+	-
Rh29482	-	-	-	-	+
Rh21756	-	-	-	-	-

图17

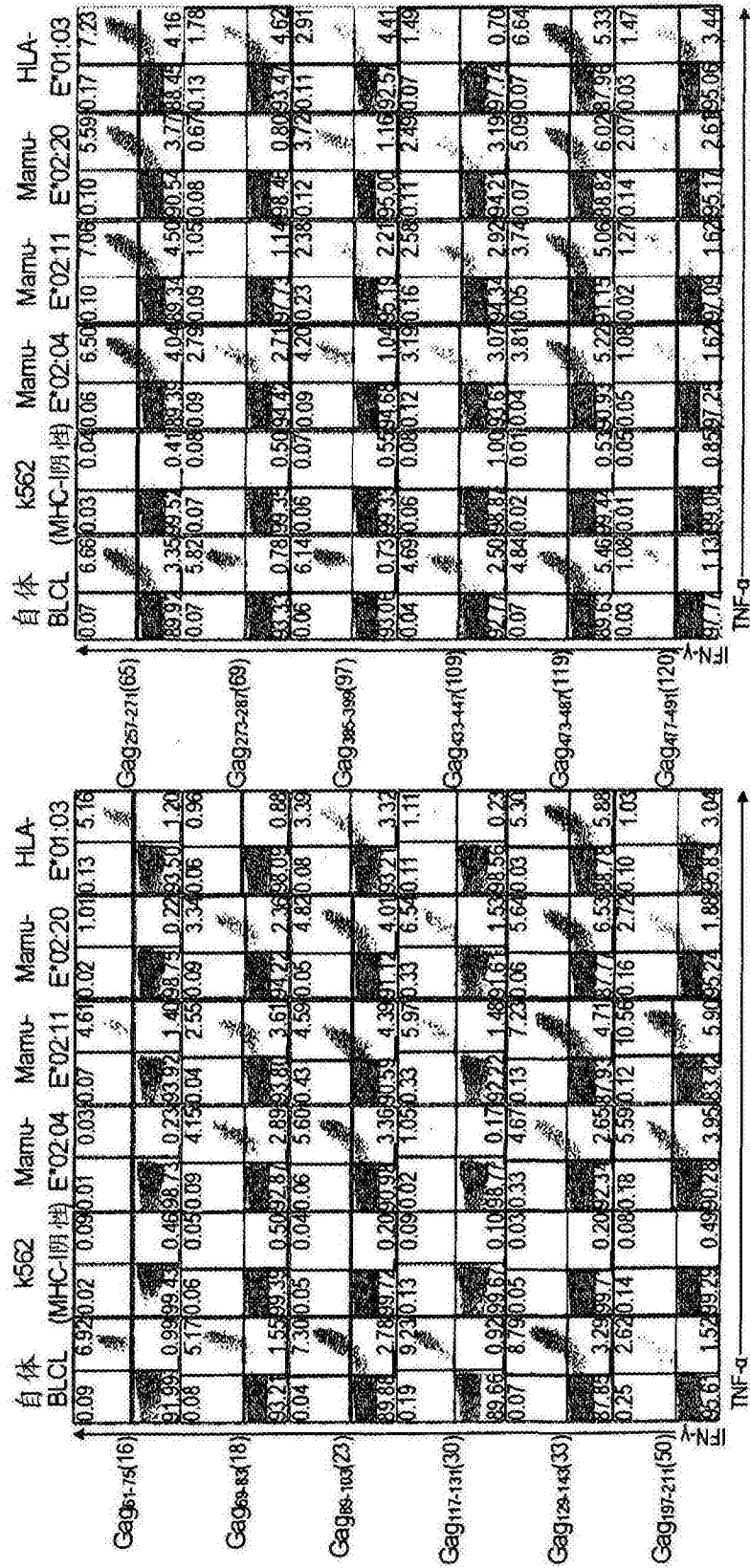


图18A

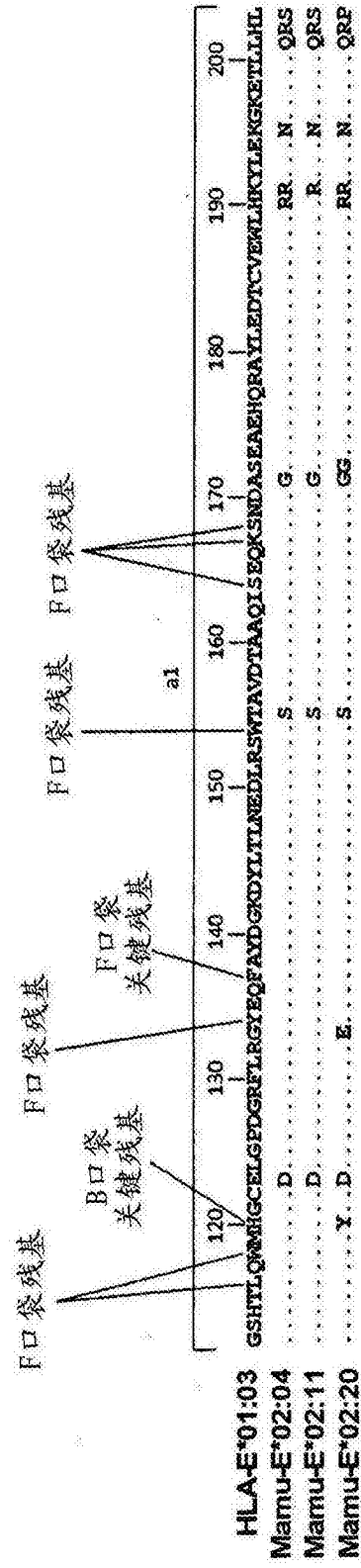
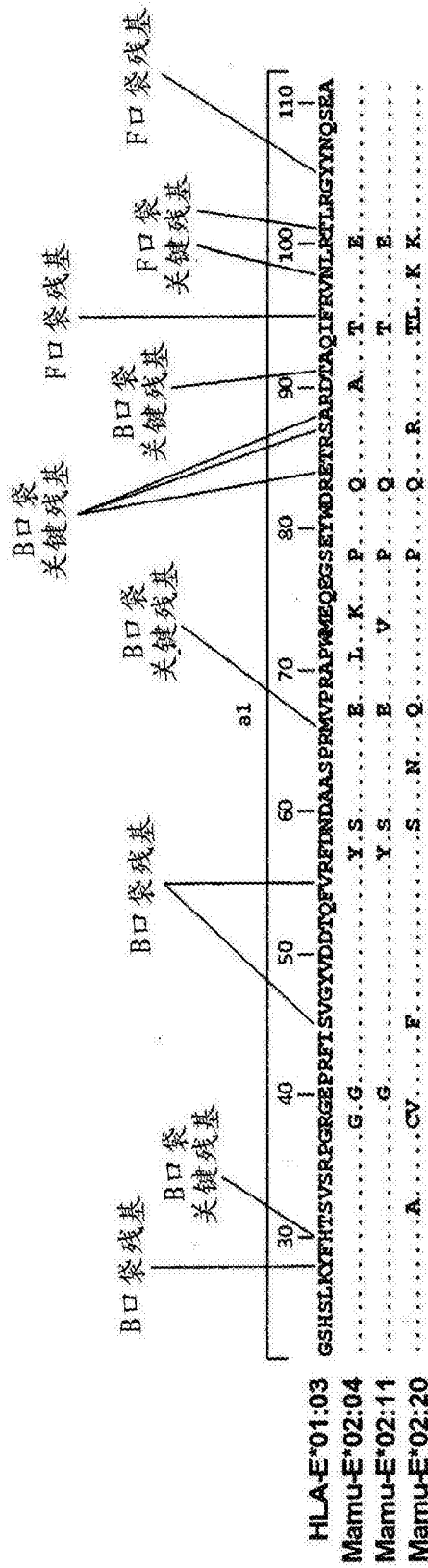


图18B

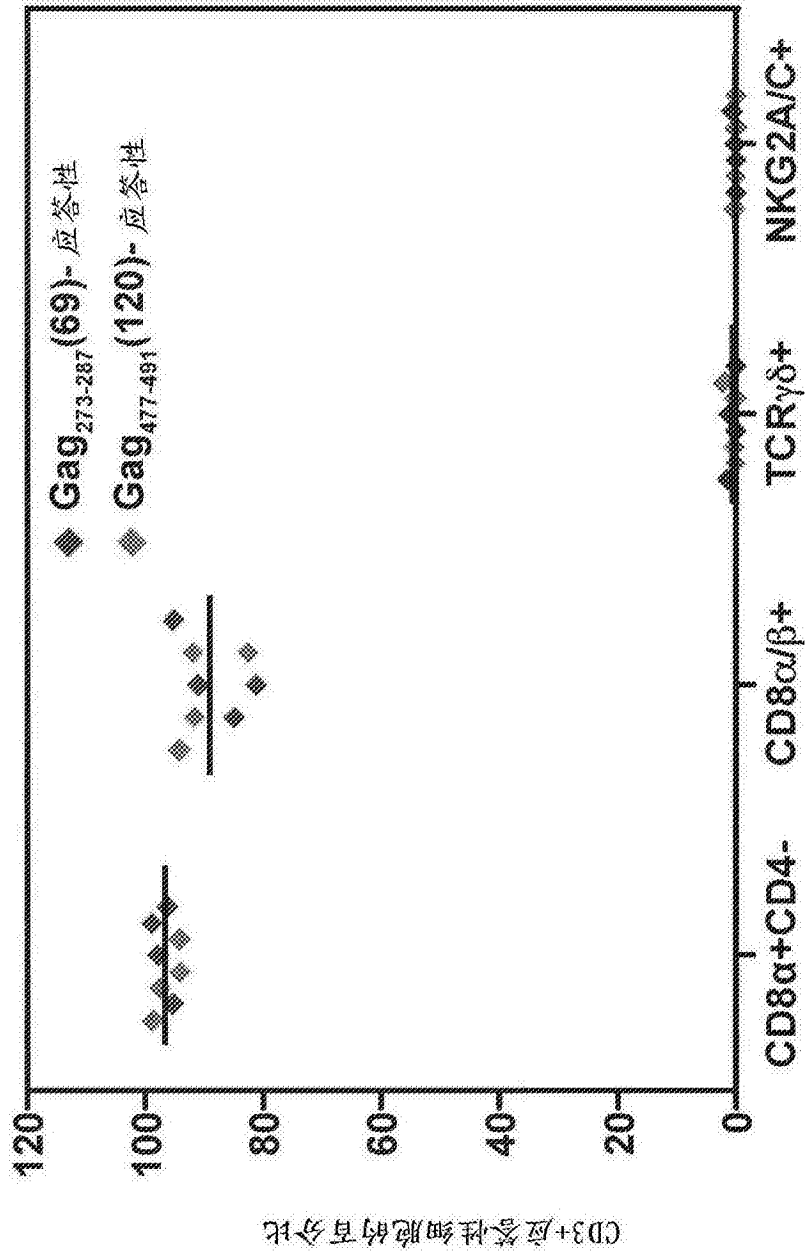


图19

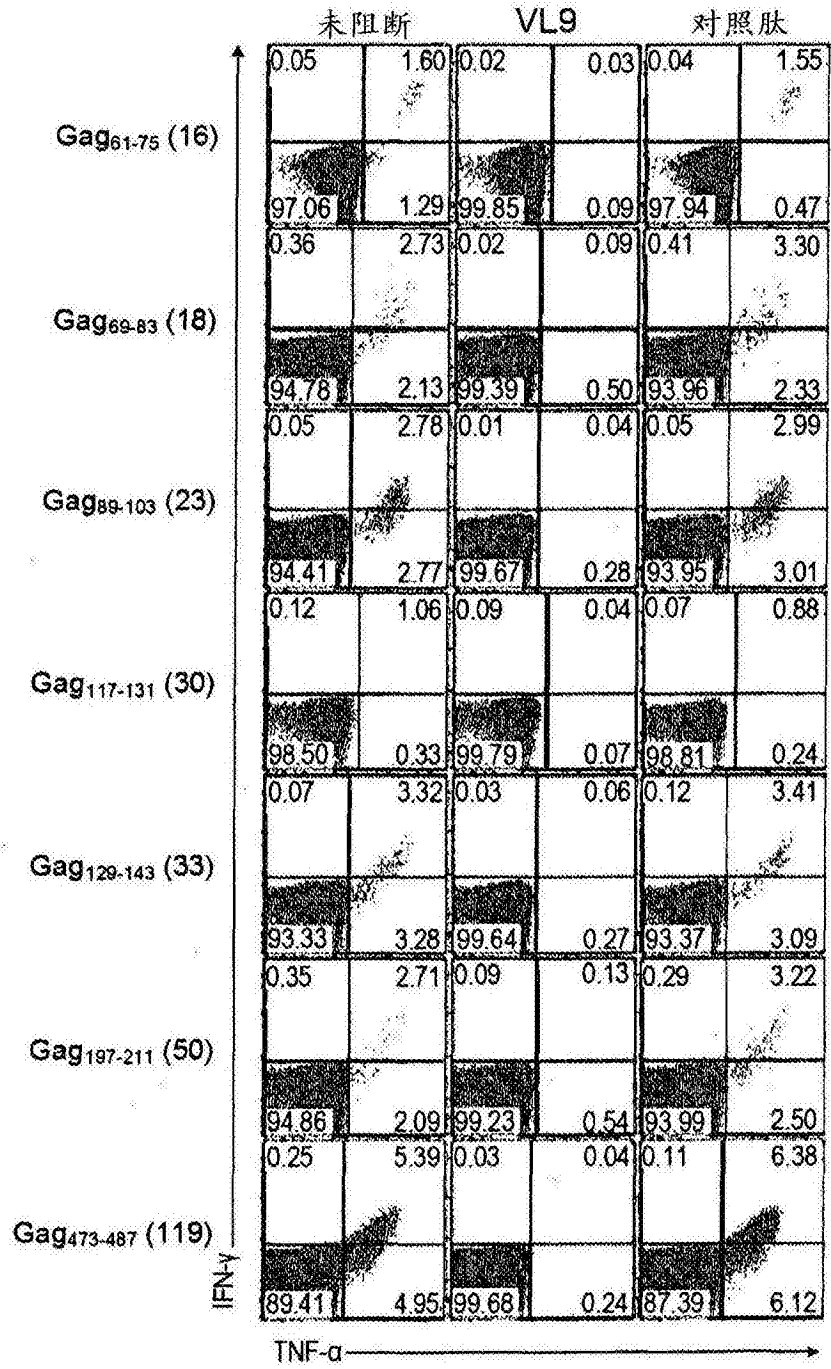
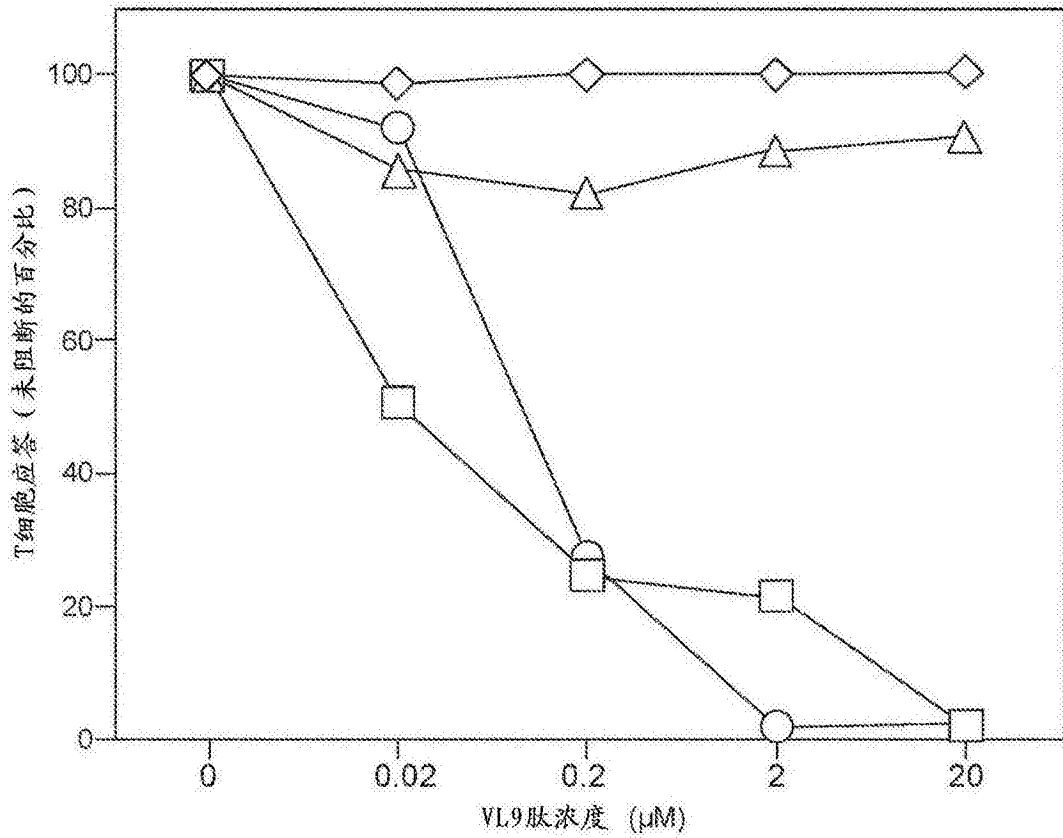


图20A



- Rh22436 PBMC/Gag₄₇₇₋₄₉₁(120)-脉冲的 BLCL
- Rh22436 PBMC/Gag₄₇₇₋₄₉₁(120)-脉冲的 Mamu-E*02:11
- △ Rh27002 PBMC/Gag₁₈₁₋₁₈₉(CM9)-脉冲的 Mamu-A1*001:01 转染子
- ◇ TatSL8 细胞系 /Tat₂₈₋₃₅(SL8)-脉冲的 Mamu-A1*001:01 转染子

图20B

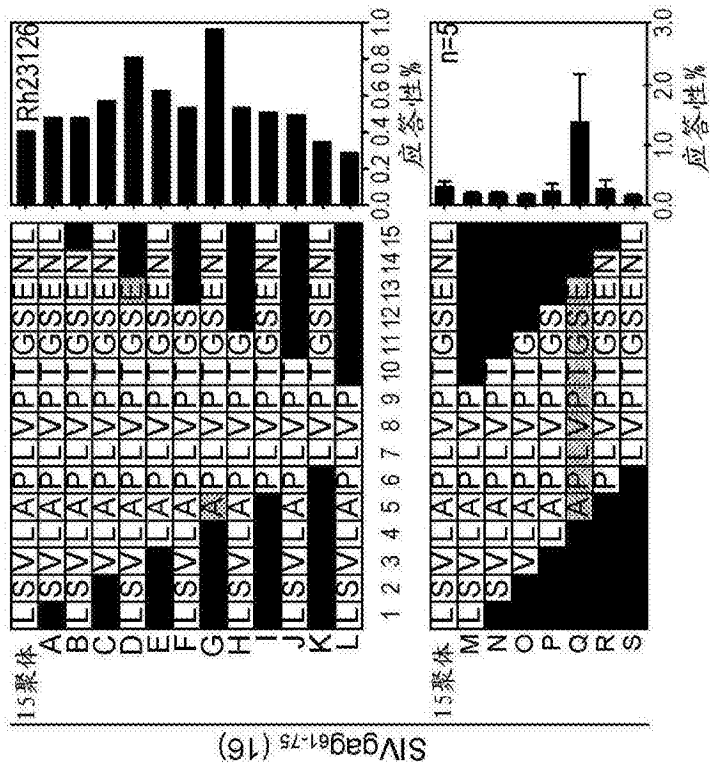
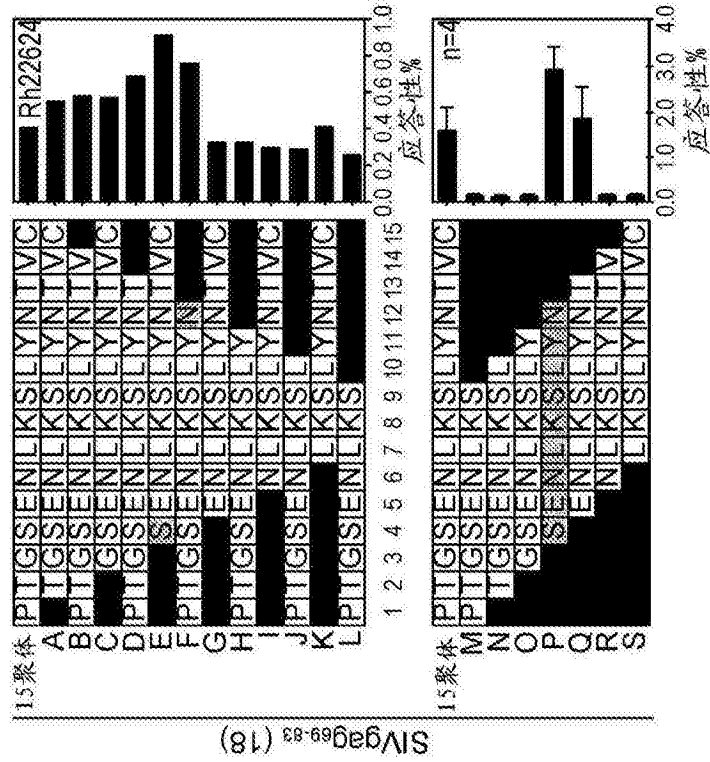


图21

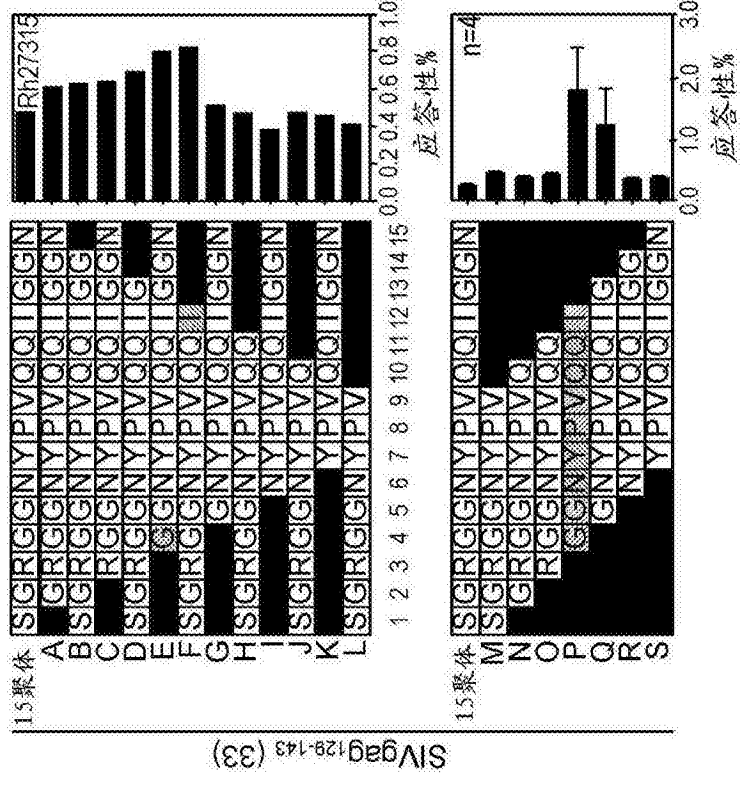
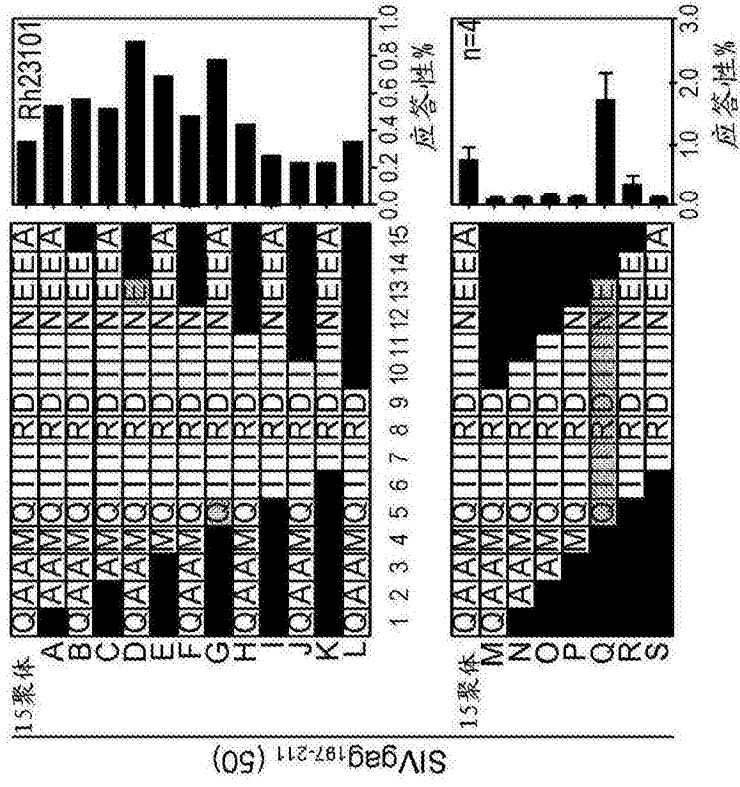


图21 (续)

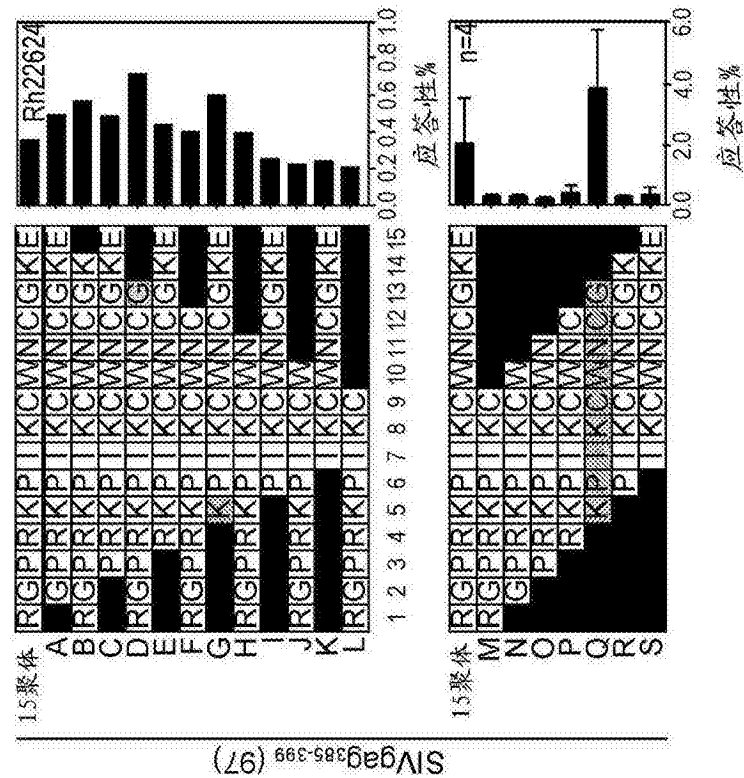
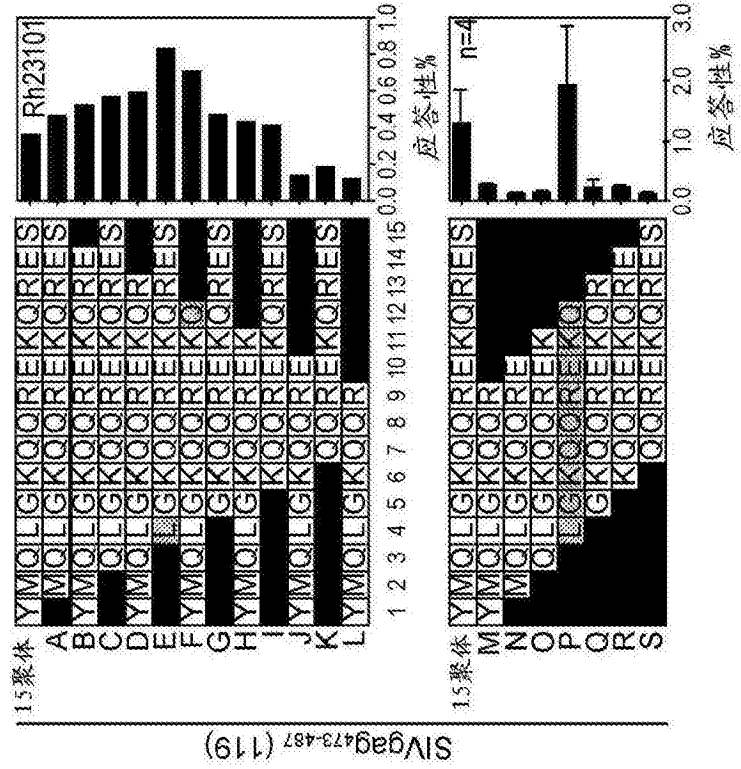


图21 (续)

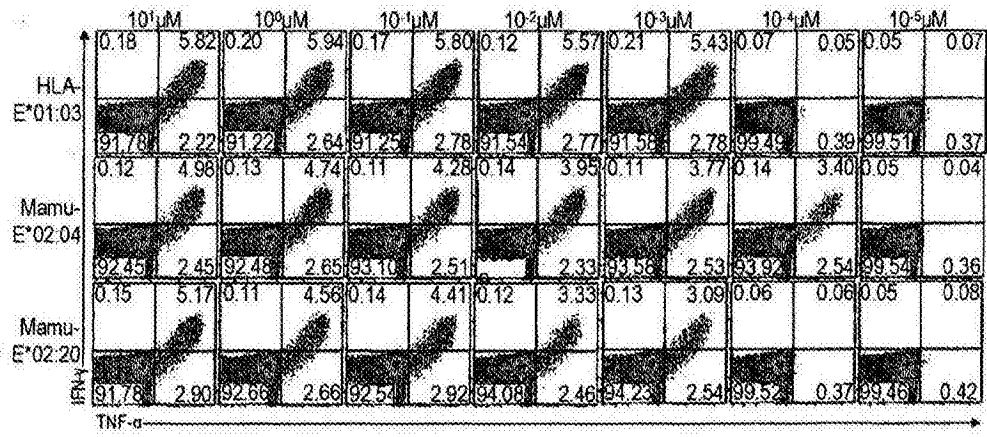


图22A

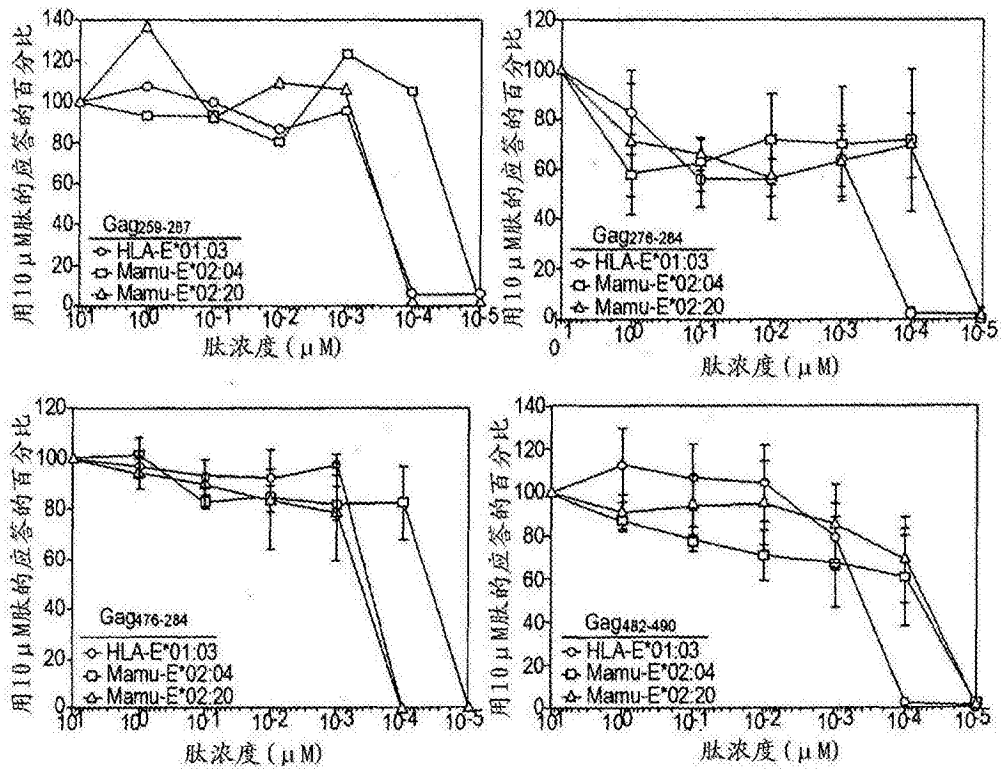


图22B

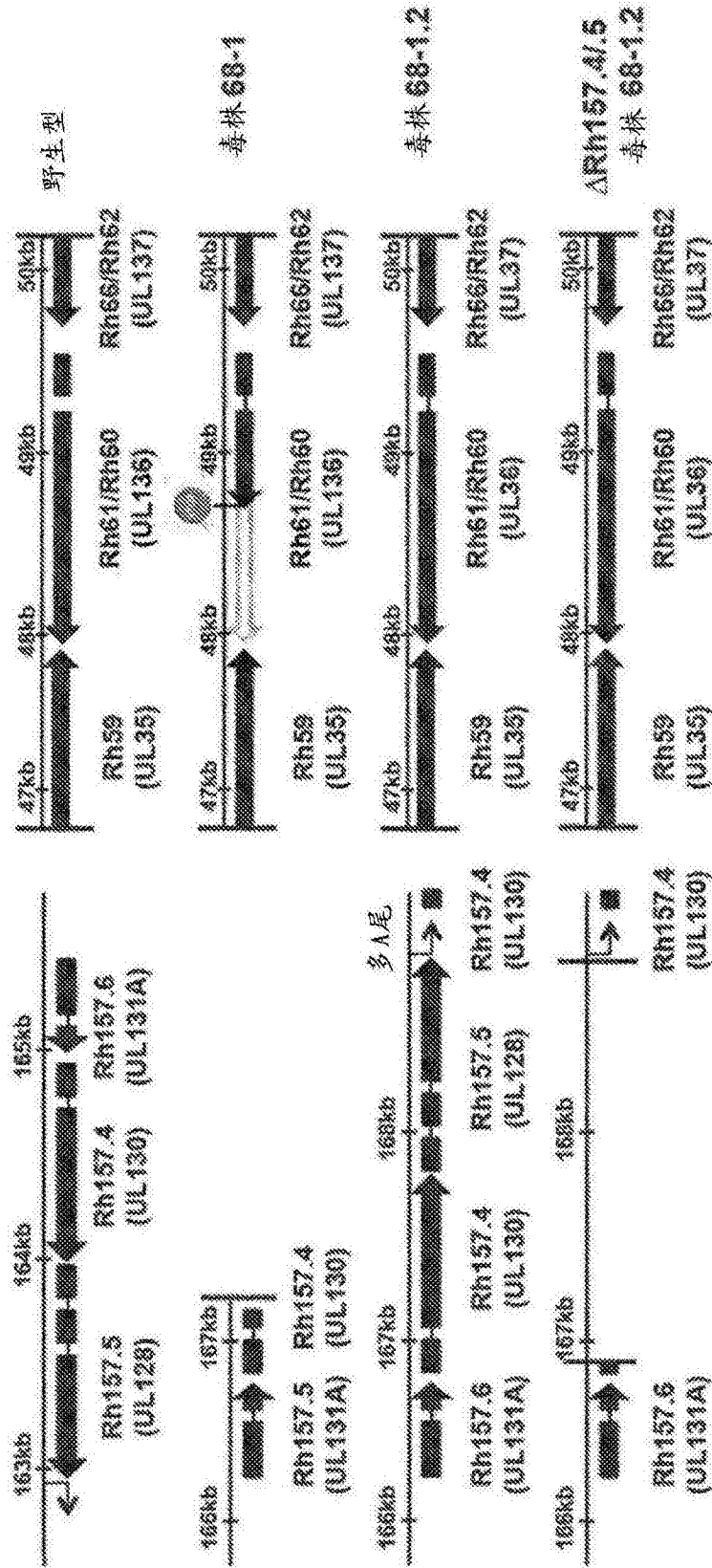


图23

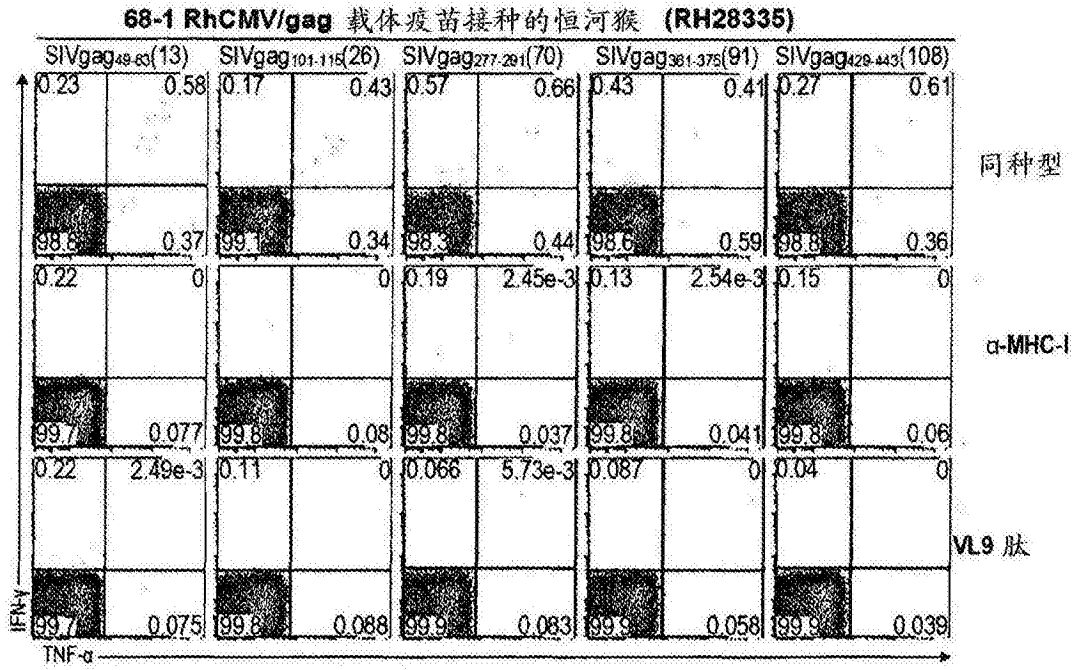


图24A

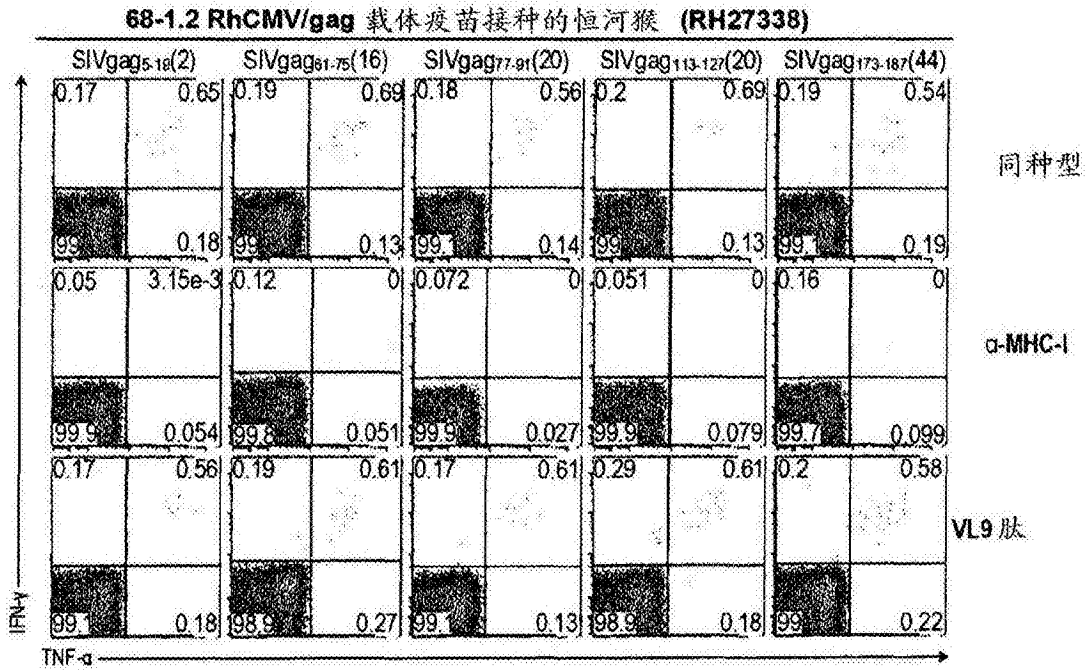


图24B

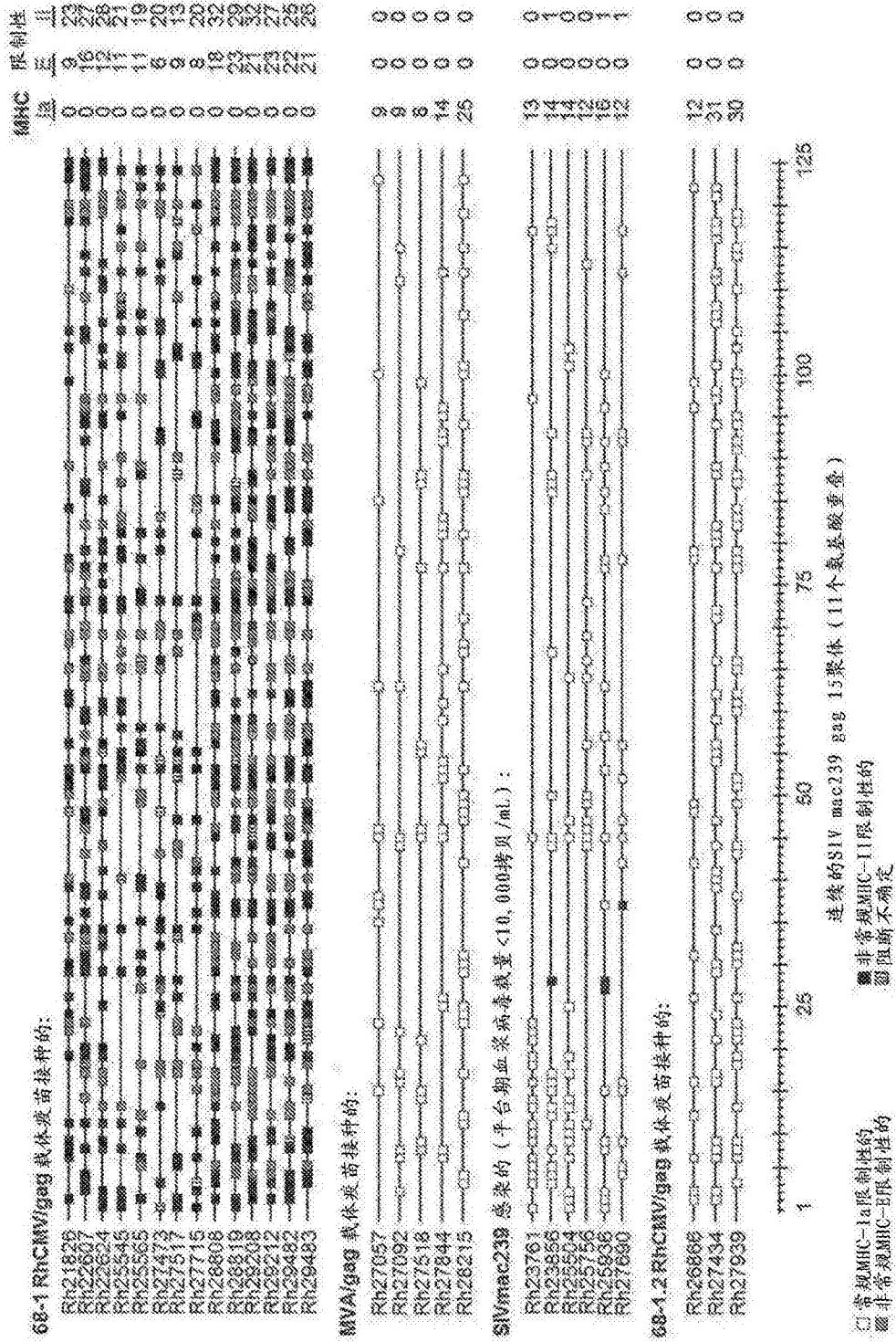


图25

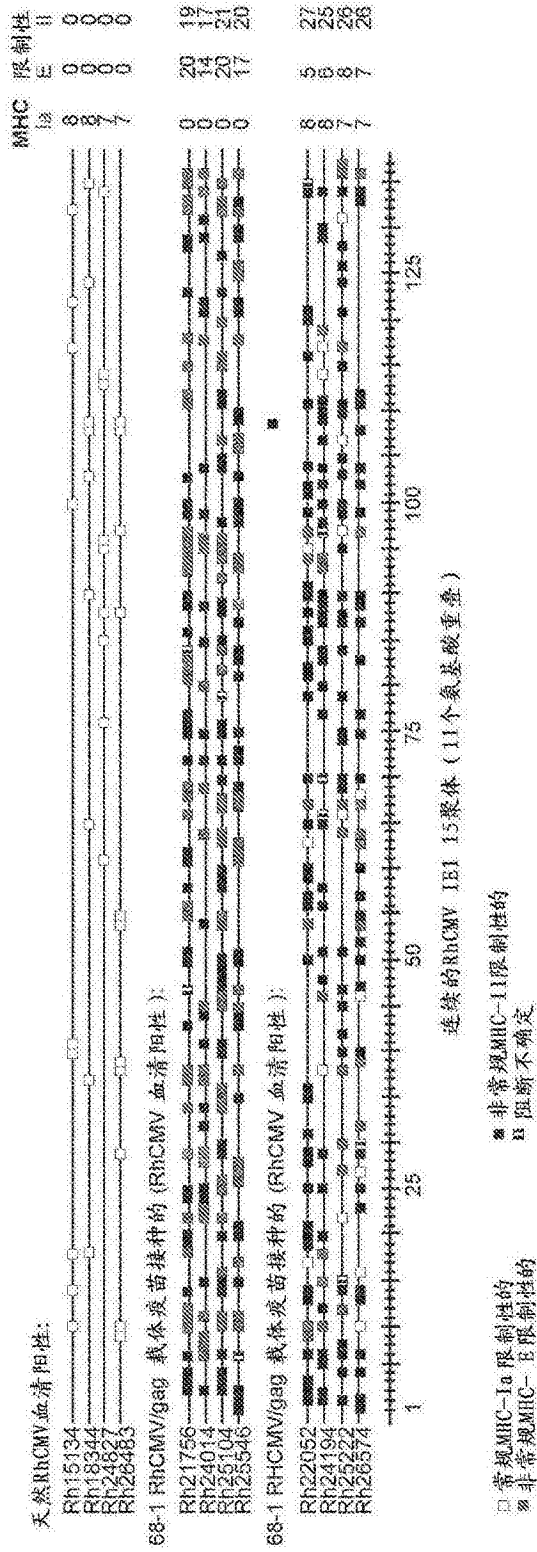


图 26

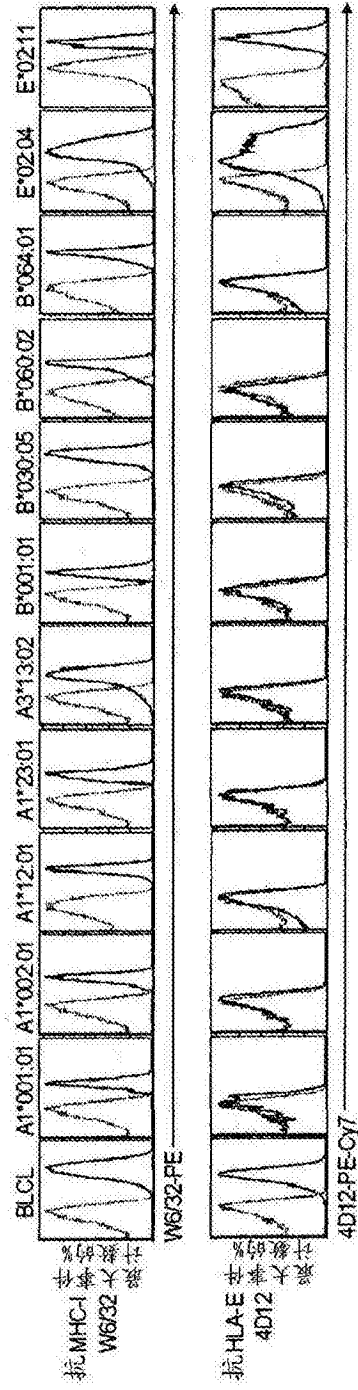


图27A

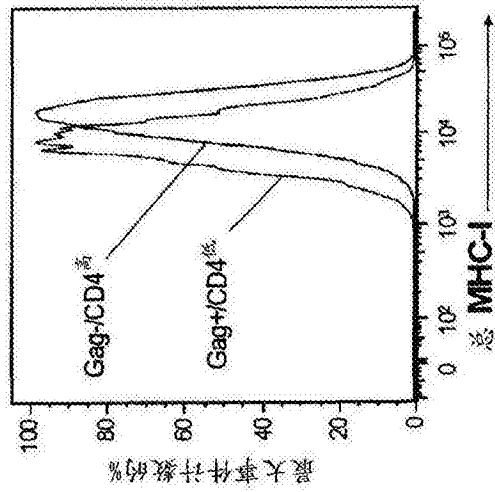


图27B

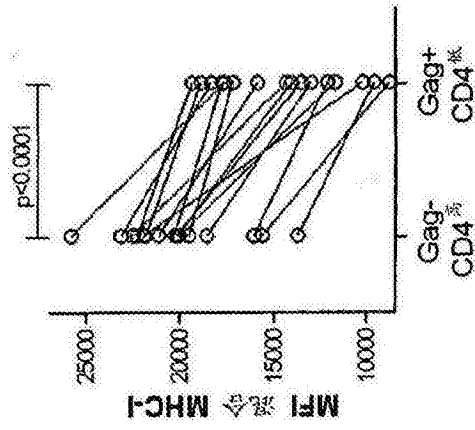


图27C

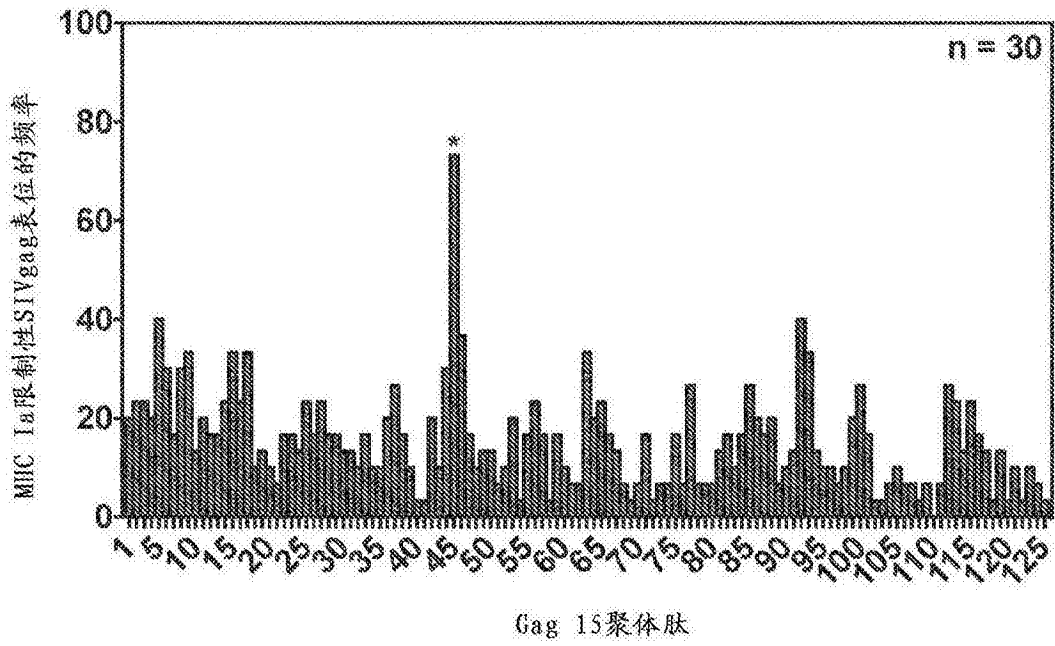


图28

毒株 68-1 Δ Rh214-220 (Δ US28) RhCMV/SIVgag 载体疫苗接种的恒河猴:

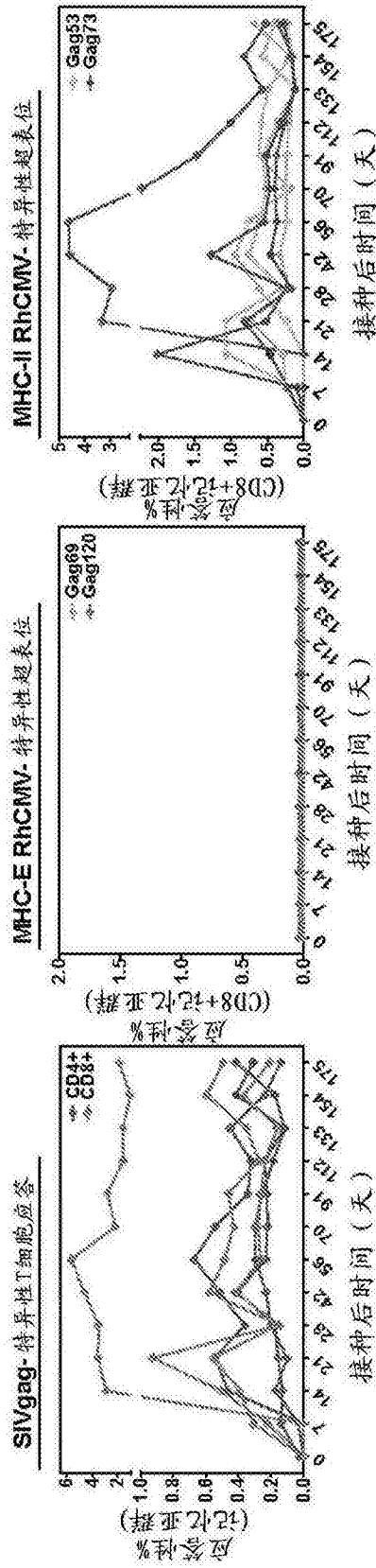


图29

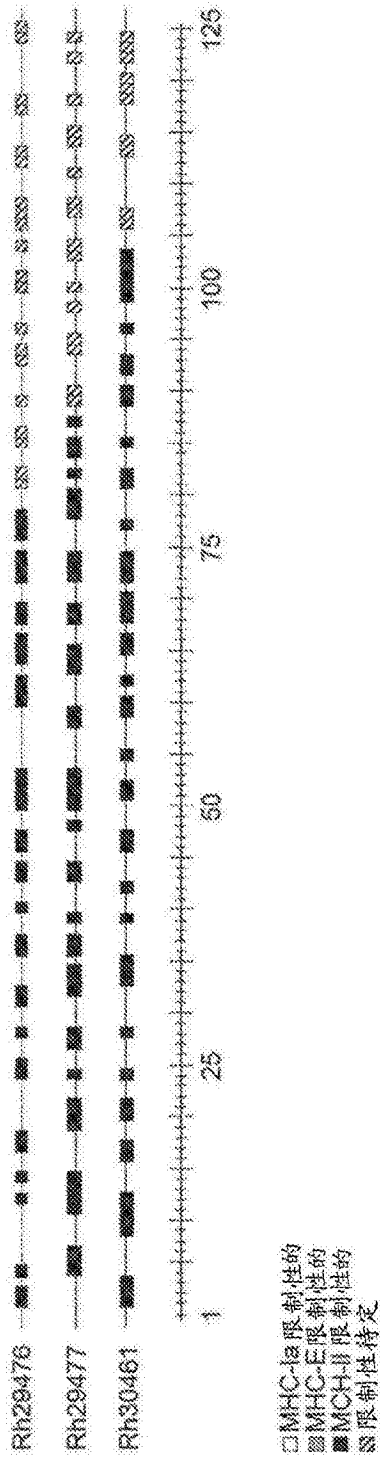


图30