(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119630419 A
(43)申请公布日 2025.03.14

(21)申请号 202380050959.3
(22)申请日 2023.06.29
(30)优先权数据
22181968.3 2022.06.29 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/067805 2023.06.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/003239 EN 2024.01.04
(71)申请人 巴法里安诺迪克有限公司
地址 丹麦海勒鲁普
(72)发明人 罗宾·施泰格瓦尔德
J·梅迪纳埃切韦尔斯 A·海泽科
S·温尼尔 A·沃克曼
于尔根·豪斯曼
(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
专利代理师 杨媛章
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)

权利要求书4页 说明书49页 附图10页

(54)发明名称

重组修饰的saRNA(VRP)和痘苗病毒安卡拉(MVA)初免-加强方案

(57)摘要

本发明提供了用于在人中诱导针对免疫原的保护性免疫的组合物、疫苗和方法。所述保护性免疫反应是通过使用saRNA,特别是VRP载体作为初免以及MVA用于加强来获得的。具体而言,本发明涉及基因工程(重组)VRP和MVA载体,其包含至少一个编码传染性病毒,诸如EBV的抗原决定簇的异源核苷酸序列。

CN 119630419 A

1.一种疫苗组合,其包含

(c)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

(d)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

2.根据权利要求1所述的疫苗组合,其中所述第一组合物用于引发免疫反应并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

3.根据权利要求1所述的疫苗组合,其中所述第二组合物用于引发免疫反应并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是传染病抗原或肿瘤相关抗原。

5.根据权利要求4所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是传染病抗原。

6.根据权利要求5所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是病毒抗原。

7.根据权利要求6所述的疫苗组合,其中所述病毒抗原来源于爱泼斯坦-巴尔病毒(“EBV”)。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是EBV的任何结构蛋白和非结构蛋白。

9.根据权利要求8所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A和BRLF1/BZLF1融合物。

10.根据权利要求9所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4编码。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的疫苗组合,其中所述saRNA是VRP,优选基于甲病毒,更优选基于VEEV,并且甚至更优选基于TC83。

12.根据权利要求1-10中任一项所述的疫苗组合,其中所述MVA是MVA-BN。

13.根据权利要求11所述的疫苗组合,其中所述第一组合物中的所述VRP包含编码选自由gp350、gH和gL组成的组的抗原蛋白的核酸。

14.根据权利要求13所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3编码。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的疫苗组合,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第一组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

16.根据权利要求1-14中任一项所述的疫苗组合,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第二组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的疫苗组合,其中所述加强组合物包含两个或更多个剂量的所述加强组合物的所述载体。

18.一种药盒,其包含:

(c)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋

白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

(d)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

19.根据权利要求18所述的药盒,其中所述第一组合物用于引发免疫反应并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

20.根据权利要求18所述的药盒,其中所述第二组合物用于引发免疫反应并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

21.根据权利要求18-20中任一项所述的药盒,其中所述抗原蛋白是传染病抗原或肿瘤相关抗原。

22.根据权利要求21所述的药盒,其中所述疾病相关抗原是传染病抗原。

23.根据权利要求22所述的药盒,其中所述传染病抗原是病毒抗原。

24.根据权利要求23所述的药盒,其中所述病毒抗原来源于爱泼斯坦-巴尔病毒("EBV")。

25.根据权利要求18-24中任一项所述的药盒,其中所述抗原蛋白是EBV的任何结构蛋白和非结构蛋白。

26.根据权利要求25所述的药盒,其中所述抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A和BRLF1/BZLF1融合物。

27.根据权利要求26所述的药盒,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4编码。

28.根据权利要求18-27中任一项所述的药盒,其中所述saRNA是VRP,优选基于甲病毒,更优选基于VEEV,更优选基于TC83。

29.根据权利要求18-27中任一项所述的药盒,其中所述MVA是MVA-BN。

30.根据权利要求28所述的药盒,其中所述第一组合物中的所述VRP包含编码选自由gp350、gH和gL组成的组的抗原蛋白的核酸。

31.根据权利要求30所述的药盒,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3编码。

32.根据权利要求18-31中任一项所述的药盒,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第一组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

33.根据权利要求18-31中任一项所述的药盒,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第二组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

34.根据权利要求18-33中任一项所述的药盒,其中所述加强组合物包含两个或更多个剂量的所述加强组合物的所述载体。

35.根据权利要求1-14中任一项所述的疫苗组合、根据权利要求15-17中任一项所述的供使用的疫苗组合、根据权利要求18-31中任一项所述的药盒、根据权利要求32-34中任一项所述的供使用的药盒,其中用于产生所述重组病毒的所述MVA是MVA-BN病毒或其衍生物,其具有在鸡胚成纤维细胞(CEF)细胞中体外生殖复制的能力,但是不具有在人角质形成细

胞系HaCat、人骨肉瘤细胞系143B、人胚肾细胞系293和人宫颈腺癌细胞系HeLa中生殖复制的能力。

36.根据权利要求1-14中任一项所述的疫苗组合、根据权利要求15-17中任一项所述的供使用的疫苗组合、根据权利要求18-31中任一项所述的药盒、根据权利要求32-34中任一项所述的供使用的药盒,其中用于产生所述重组病毒的所述MVA是MVA-BN,其以登录号V00083008保藏在欧洲动物细胞培养物保藏中心(ECACC)。

37.根据权利要求1-14中任一项所述的疫苗组合或根据权利要求18-31中任一项所述的药盒在制造用于治疗和/或预防传染病的药物组合物或药剂中的用途。

38.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-14所述的疫苗组合以及药学上可接受的载剂、稀释剂和/或添加剂。

39.一种在受试者中诱导针对病毒的免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

(c)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

(d)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述第一组合物用于引发免疫反应并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

41.根据权利要求39所述的方法,其中所述第二组合物用于引发免疫反应并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

42.根据权利要求39-41中任一项所述的方法,其中所述疾病相关抗原是传染病抗原或肿瘤相关抗原。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述疾病相关抗原是传染病抗原。

44.根据权利要求43所述的方法,其中所述传染病抗原是病毒抗原。

45.根据权利要求44所述的方法,其中所述病毒抗原来源于爱泼斯坦-巴尔病毒(“EBV”)。

46.根据权利要求39-45中任一项所述的方法,其中所述抗原蛋白是EBV的任何结构蛋白和非结构蛋白。

47.根据权利要求46所述的方法,其中所述抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A和BRLF1/BZLF1融合物。

48.根据权利要求47所述的方法,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4编码。

49.根据权利要求39-48中任一项所述的方法,其中saRNA是VRP,优选基于甲病毒,更优选基于VEEV,更优选基于TC83。

50.根据权利要求39-48所述的方法,其中所述MVA是MVA-BN。

51.根据权利要求49所述的方法,其中所述第一组合物中的所述VRP包含编码选自由gp350、gH和gL组成的组的抗原蛋白的核酸。

52.根据权利要求51所述的方法,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和

SEQ ID NO:3编码。

53.根据权利要求39-52中任一项所述的方法,其中在施用所述初免组合物之后1-12周施用所述加强组合物。

54.根据权利要求39-53中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用所述加强组合物两次或更多次。

重组修饰的saRNA(VRP)和痘苗病毒安卡拉(MVA)初免-加强方案

发明领域

[0001] 本发明涉及用于在受试者中增强免疫反应的方法和组合物,其包含自扩增RNA(saRNA),特别是重组修饰的甲病毒复制子(VRP)和针对人受试者的传染病,诸如EBV的基于痘苗病毒安卡拉(MVA)的疫苗。本发明还涉及疫苗接种方法,特别是采用两种病毒载体组合物的异源初免-加强疫苗接种方案。更具体地说,本发明涉及用于异源初免-加强疫苗接种方案的重组VRP和重组MVA。本发明还涉及其产品、方法及用途,例如适用于在受试者中诱导保护性免疫反应。

背景技术

[0002] 许多疫苗需要多次免疫接种才能成功,这并不罕见。对于儿童来说,可能需要高达五次免疫接种,例如白喉、破伤风和百日咳(DTP)疫苗,在出生后前六个月期间给予三次,随后在生命第二年给予第四剂,并在四至六岁之间给予最后一次加强剂。尽管如此,即使对于已经接受完整免疫接种系列的成年人,有些疫苗仍需要额外加强,例如破伤风-白喉(Td)疫苗,对此建议在人的一生中每10年加强一次。虽然尚不完全清楚为什么一些疫苗需要比其他疫苗更多的免疫接种,但人们普遍认为,多次免疫接种(即“初免-加强”)对于最成功的疫苗也是至关重要的。此原则适用于减毒活疫苗(例如口服脊髓灰质炎疫苗)、灭活疫苗(例如甲型肝炎疫苗)、重组蛋白亚单位疫苗(例如乙型肝炎疫苗)和多糖疫苗(例如b型流感嗜血杆菌疫苗)。对于这些疫苗,初免-加强是“同源的”,因为在早期初免免疫接种中给予的疫苗与后续加强免疫接种中使用的疫苗相同。

[0003] 在过去十年中,研究表明,可使用相同的抗原,以“异源”初免-加强形式,采用不匹配的疫苗递送方法进行初免-加强免疫接种。最有趣和最出乎意料的发现是,在许多情况下,异源初免-加强比“同源”初免-加强方法更有效。诸如DNA疫苗和基于病毒载体的疫苗的新型疫苗接种方法的快速进展无疑进一步扩大了异源初免-加强疫苗接种的范围(Excler JL,Plotkin S.The prime-boost concept applied to HIV preventive vaccines.Aids.1997;11(增刊A):S127-S137;Ramshaw IA,Ramsay AJ.The prime-boost strategy:exciting prospects for improved vaccination.Immunol Today.2000;21:163-165;Lu S.Combination DNA plus protein HIV vaccines.Springer Semin Immunopathol.2006;28:255-265)。

[0004] 1992年的一份具有里程碑意义的《科学》报告首次在非人灵长类动物模型中使用异源初免-加强免疫接种技术(Hu SL,Abrams K,Barber GN,Moran P,Zarling JM,Langlois AJ,Kuller L,Morton WR,Benveniste RE.Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160.Science.1992;255:456-459.First major report on the use of heterologous prime-boost vaccination approach,in the context of AIDS vaccine development)。在此研究中,首先用表达SIVmne gp160抗原的重组痘苗病毒对食蟹猴进行免疫接种,并且

然后用杆状病毒感染细胞中产生的gp160蛋白进行加强。动物受到了SIVmne病毒静脉注射攻击的保护,这成为早期HIV疫苗开发工作中最有希望的保护结果之一。

[0005] 上述研究的首席科学家Shiu-Lok Hu和他的合作者此前在啮齿动物中证明,用活重组病毒进行初免并用亚单位重组蛋白进行加强比单独使用任何一种免疫原进行免疫接种更有效(Hu SL,Klaniecki J,Dykers T,Sridhar P,Travis BM.Neutralizing antibodies against HIV-1BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1(BRU)envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160.AIDS Res Hum Retroviruses.1991;7:615-620)。

[0006] 在一项单独的研究中,Girard等人还报道,在用重组痘苗病毒初免并用重组HIV-1蛋白或合成肽的混合物多次加强的黑猩猩中,抗体滴度显著增加(Girard M,Kieny MP,Pinter A,Barre-Sinoussi F,Nara P,Kolbe H,Kusumi K,Chaput A,Reinhart T,Muchmore E,等人Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus.Proc Natl Acad Sci U S A.1991;88:542-546)。此外,大约在同一时间,在可能是首次对异源初免-加强免疫接种进行人体测试中,巴黎皮埃尔和玛丽居里大学的Daniel Zagury给自己接种了一种含HIV-1Env基因的重组痘苗病毒,并且后来又使用重组Env蛋白进行了加强(Zagury D,Bernard J,Cheynier R,Desportes I,Leonard R,Fouchard M,Reveil B,Ittele D,Lurhuma Z,Mbayo K,等人A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1induced by a candidate vaccine against AIDS.Nature.1988;332:728-731)。其他非HIV领域的早期工作包括Eckhart Wimmer团队进行的小动物研究,他们使用合成肽和灭活脊髓灰质炎病毒进行初免-加强免疫接种(Emini EA,Jameson BA,Wimmer E.Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides.Nature.1983;304:699-703)。

[0007] 最初使用异源初免-加强免疫接种方法开发HIV-1疫苗的努力基于以下原理:

[0008] 重组包膜(Env)糖蛋白虽然能够引发分离特异性的中和抗体反应,但不能引发细胞毒性T细胞反应,并且在另一方面,用表达HIV-1抗原的重组痘苗进行免疫接种可引发良好的T细胞反应,但不能引发高水平的保护性抗体。因此,包括这两种疫苗的组合免疫接种可能比单独使用任一种免疫原更有效(Hu SL,Klaniecki J,Dykers T,Sridhar P,Travis BM.Neutralizing antibodies against HIV-1BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1(BRU)envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160.AIDS Res Hum Retroviruses.1991;7:615-620)。

[0009] 此声明为使用异源初免-加强免疫接种确立了一条关键原则,即引发体液和细胞介导的免疫反应。现代免疫学已经证实,这种平衡的免疫反应不仅对于保护免受病毒感染很重要,而且对于保护免受其他类型的病原体也很重要。传统疫苗,尤其是灭活疫苗和亚单位疫苗,在引发T细胞反应方面效果不佳。这一要求对于HIV疫苗开发来说更为重要。理想的HIV疫苗应该能够产生“消除性(sterilizing)抗体”,以防止病毒建立感染,一旦HIV-1整合到宿主外周血单核细胞(PBMCs)的基因组中,这种感染就更难消除。

[0010] 同时,T细胞免疫反应在控制感染规模中起着关键作用,可能影响宿主的长期死亡

率和发病率。

[0011] 在过去的几年中,在针对多种病原体的疫苗研究中,使用异源初免-加强方法已经获得了显著的发展势头。这一趋势已呈现出几个明显特征。

[0012] 首先,由于其他疫苗接种方法失败,通常使用异源初免-加强方法来解决一些最具挑战性的疫苗开发目标,包括疟疾和结核病。其目的是集中于某些关键抗原并引发涉及不同T细胞免疫反应亚群的高质量免疫反应。编码血小板反应蛋白相关粘附蛋白的DNA初免-MVA加强疫苗部分保护健康的未感染疟疾的成人免受恶性疟原虫子孢子攻击(Dunachie SJ,Walther M,Epstein JE,Keating S,Berthoud T,Andrews L,Andersen RF,Bejon P,Goonetilleke N,Poulton I,等人A DNA prime-modified vaccinia virus ankara boost vaccine encoding thrombospondin-related adhesion protein but not circumsporozoite protein partially protects healthy malaria-naive adults against Plasmodium falciparum sporozoite challenge.Infect Immun.2006;74:5933-5942)。此研究还强调了抗原选择对于免疫保护的重要性,事实是,同样的组合疫苗接种如果使用环子孢子蛋白代替血小板反应蛋白相关粘附蛋白,则不会产生此类保护作用。

[0013] 对于结核病疫苗开发,在接受重组卡介苗(BCG)初免,随后接受腺病毒35载体加强(其表达由Ag85A、Ag85B和TB104组成的融合蛋白)的恒河猴中引发了定性和定量不同的细胞免疫反应(Magalhaes I,Sizemore DR,Ahmed RK,Mueller S,Wehlin L,Scanga C,Weichold F,Schirru G,Pau MG,Goudsmit J,等人rBCG induces strong antigen-specific T cell responses in rhesus macaques in a prime-boost setting with an adenovirus 35tuberculosis vaccine vector.PLoS ONE.2008;3:e3790)。可选地,也可使用BCG作为DNA疫苗初免后的加强。在一项在小牛中进行的研究中,用Ag85B、MPT64和MPT83抗原进行DNA初免,随后用BCG进行加强,能够引发更高的免疫反应,并且比单独使用BCG能更好地保护免受牛分枝杆菌的攻击(Cai H,Yu DH,Hu XD,Li SX,Zhu YX.A combined DNA vaccine-prime,BCG-boost strategy results in better protection against Mycobacterium bovis challenge.DNA Cell Biol.2006;25:438-447).

[0014] 其次,精心设计的异源初免-加强方法可扩大免疫反应的范围。当小鼠用表达ESAT6的DNA疫苗初免,并随后接受呈重组蛋白形式的相同抗原作为加强时,Th1型细胞因子的产生显著增加,IgG2与IgG1的比率也显著增加(Wang QM,Sun SH,Hu ZL,Yin M,Xiao CJ,Zhang JC.Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting.Vaccine.2004;22:3622-3627)。在另一项鼠研究中,用表达单纯疱疹病毒2型(HSV-2)的gD抗原的DNA疫苗进行初免,所述抗原优先诱导Th1型细胞免疫反应,并用重组gD蛋白进行加强,所述蛋白主要诱导Th2偏向性反应,导致抗体、T细胞增殖和Th1细胞因子产生显著增强(Sin JI,Bagarazzi M,Pachuk C,Weiner DB.DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2gD vaccine model.DNA Cell Biol.1999;18:771-779)。

[0015] 第三,初免-加强疫苗方法也可提高现有疫苗的有效性。一个实例是在动物中使用DNA初免,其提高抗体反应水平,之后接受灭活狂犬病疫苗加强(Biswas S,Reddy GS,Srinivasan VA,Rangarajan PN.Preexposure efficacy of a novel combination DNA

and inactivated rabies virus vaccine.Hum Gene Ther.2001;12:1917-1922)。类似地,DNA初免可增加待用针对炭疽的重组PA抗原免疫接种的动物的高免疫血清的滴度和寿命(Herrmann JE,Wang S,Zhang C,Panchal RG,Bavari S,Lyons CR,Lovchik JA,Golding B,Shiloach J,Lu S.Passive immunotherapy of Bacillus anthracis pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization.Vaccine.2006;24:5872-5880)。添加DNA初免,与仅接受重组蛋白的组相比,使用获得许可的乙肝表面蛋白疫苗加强的小鼠能够在研究组中产生更强且更均匀的抗体反应。还观察到脾细胞中IL-12和IFN-γ分泌增多(Xiao-wen H,Shu-han S,Zhen-lin H,Jun L,Lei J,Feng-juan Z,Ya-nan Z,Ying-jun G.Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting.Vaccine.2005;23:1649-1656)。

[0016] 最后,初免-加强方法可在解决对公共卫生有广泛影响的疫苗问题方面具有重要的实际应用。在未感染流感病毒的动物模型中,已证明异源一次性DNA初免和一次性灭活流感疫苗加强比两次施用使用单独DNA或灭活流感疫苗的同源初免-加强具有更高的免疫原性(Wang S,Parker C,Taaffe J,Solorzano A,Garcia-Sastre A,Lu S.Heterologous HA DNA vaccine prime--inactivated influenza vaccine boost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses.Vaccine.2008;26:3626-3633)。这一发现对于准备应对禽流感大流行可非常有用。流感疫苗开发面临的关键问题之一是传统流感疫苗生产能力有限且周期长。禽流感疫苗通常需要免疫接种两次。目标人群首先可在任何意外的流感大流行爆发之前接受禽流感DNA疫苗初免,这将大大减少流感大流行爆发时所需的疫苗量。这种方法也可用于其他形式的流感,包括人流感病毒和猪流感病毒。在现有的三价流感疫苗中添加新的疫苗株将需要大量额外的资源和时间。多价DNA初免可以低得多的成本覆盖广泛的潜在未来病毒株。

[0017] 与其他新型疫苗形式类似,异源初免-加强方法也被研究作为癌症的潜在治疗。使用最近鉴定的前列腺六跨膜上皮抗原(STEAP),与单独的任一种疫苗方式相比,异源DNA初免和委内瑞拉马脑炎(Venezuelan equine encephalitis)病毒样复制子颗粒(VRP)加强能够引发针对STEAP的更好的免疫反应,包括INF-γ、TNF-α和IL-12。这种疫苗接种方案诱导小鼠体内已建立的31天肿瘤生长的适度但显著的延迟(Garcia-Hernandez Mde L,Gray A,Hubby B,Kast WM.In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate:a candidate antigen for treating prostate cancer.Cancer Res.2007;67:1344-1351)。

[0018] 一个基本但仍然神秘的问题是,为什么即使使用相同的疫苗组分,异源初免-加强比同源初免-加强更有效。研究这个问题的一种方式是确定异源初免-加强疫苗施用顺序的重要性。使用牛分枝杆菌模型证明,对新生牛犊进行BCG和编码Hsp65、Hsp70和Apa的DNA疫苗的初免-加强疫苗接种顺序对于增强针对牛结核病的保护并不重要(Skinner MA,Wedlock DN,de Lisle GW,Cooke MM,Tascon RE,Ferraz JC,Lowrie DB,Vordermeier HM,Hewinson RG,Buddle BM.The order of prime-boost vaccination of neonatal calves with Mycobacterium bovis BCG and a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins Hsp65,Hsp70,and Apa is not critical for enhancing protection against

bovine tuberculosis.Infect Immun.2005;73:4441-4444)。在不同的模型中,使用鼠HSV-2gD抗原进行DNA初免-蛋白质加强,很明显DNA初免至关重要,因为反向蛋白质初免-DNA加强方案产生的抗体水平与同源蛋白质-蛋白质疫苗接种后的抗体水平相似,并且无法进一步增强Th细胞增殖反应或细胞因子产生(Sin JI,Bagarazzi M,Pachuk C,Weiner DB.DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2gD vaccine model.DNA Cell Biol.1999;18:771-779)。在使用丙型肝炎E2作为模型抗原的甚至更详细分析中发现,与使用相同疫苗的反向腺病毒初免-DNA加强或同源初免-加强相比,DNA初免-腺病毒载体加强可引发最高水平的Th1 CD4+T细胞反应。更有趣的是,DNA初免-腺病毒载体加强方案引发针对三种E2特异性表位的CTL反应,但其他三种可能的初免-加强组合均未引发CTL反应,并且其中一个表位是免疫优势的(Park SH,Yang SH,Lee CG,Youn JW,Chang J,Sung YC.Efficient induction of T helper 1CD4+T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost.Vaccine.2003;21:4555-4564.•The order of prime-boost with DNA and adenovirus vector vaccines is important for the induction of cell mediated immune responses against HCV E2 antigen)。

[0019] 在2008年于南非开普敦举行的艾滋病疫苗会议上由华盛顿大学西雅图分校的Shiu-lok Hu博士介绍的一项广泛的非人灵长类动物研究中,痘苗病毒载体或DNA初免,随后进行蛋白质加强,比使用DNA或各种病毒载体疫苗进行加强产生了更好的抗体反应。这两种异源初免-加强方案(包括蛋白质加强组分,但不包括任何其他组合)能够在约40%的免疫接种动物中引发更好的中和抗体和针对$SHIV_{sf162.p4}$高剂量直肠内攻击的消除性免疫,并保护动物免于外周CD4+T细胞耗竭。

[0020] 一些研究表明,DNA初免能够提高基于蛋白质的疫苗引发的抗体反应的亲合力(Richmond JF,Lu S,Santoro JC,Weng J,Hu SL,Montefiori DC,Robinson HL.Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting.J Virol.1998;72:9092-9100;Wang S,Arthos J,Lawrence JM,Van Ryk D,Mboudjeka I,Shen S,Chou TH,Montefiori DC,Lu S.Enhanced immunogenicity of gp120 protein when combined with recombinant DNA priming to generate antibodies that neutralize the JR-FL primary isolate of human immunodeficiency virus type 1.J Virol.2005;79:7933-7937)。由于DNA疫苗在体内产生抗原,因此使用DNA疫苗进行初免可能会引发对抗原敏感构象结构域具有特异性的记忆B细胞。在一项兔子研究中,使用DNA初免-蛋白加强方法(而非单独的重组gp120蛋白疫苗)递送原始HIV-1gp120抗原能够引发构象依赖性CD4结合位点抗体,这对于中和HIV-1疫苗具有潜在重要意义(M,Wang S,Crooks ET,Jiang P,Montefiori DC,Binley J,Lu S.Improved induction of antibodies against key neutralizing epitopes by human immunodeficiency virus type 1gp120 DNA prime-protein boost vaccination compared to gp120 protein-only vaccination.J Virol.2008;82:7369-7378.•Including a DNA priming immunization was able to elicit conformation sensitive antibody responses when compared to protein alone HIV-1Env

vaccine)。

[0021] 通过包括可能进一步促进或增强疫苗效果的其他因素,可进一步提高异源初免-加强的免疫原性。例如,包括质粒细胞因子和集落刺激因子可增强DNA初免-病毒载体加强HIV-1疫苗的免疫原性(Barouch DH,McKay PF,Sumida SM,Santra S,Jackson SS,Gorgone DA,Lifton MA,Chakrabarti BK,Xu L,Nabel GJ,等人Plasmid chemokines and colony-stimulating factors enhance the immunogenicity of DNA priming-viral vector boosting human immunodeficiency virus type 1vaccines.J Virol.2003;77:8729-8735)。可通过使用基于微粒的制剂,随后使用蛋白质加强来增强DNA疫苗初免的效力(Otten GR,Schaefer M,Doe B,Liu H,Srivastava I,Megede J,Kazzaz J,Lian Y,Singh M,Ugozzoli M,等人Enhanced potency of plasmid DNA microparticle human immunodeficiency virus vaccines in rhesus macaques by using a priming-boosting regimen with recombinant proteins.J Virol.2005;79:8189-8200)。然而,尚不清楚使用不同的佐剂作为蛋白质疫苗的加强是否会产生任何影响。

[0022] 异源初免-加强疫苗接种使用传统和新型免疫接种方法,提供了引发独特免疫反应的机会,从而提高了免疫原性和/或保护性。研究表明,异源初免-加强可采取多种形式,并且初免-加强的施用顺序可能很重要,尽管这可能是抗原依赖性的,并且可能受宿主物种和要实现的免疫反应类型的影响。未来的研究需要更多地关注异源初免-加强疫苗接种背后的机制,并解决与双组分疫苗相关的实际问题,包括疫苗成本和任何目前尚未鉴定的安全问题。

[0023] 目前对改进疫苗的需求仍未得到满足,这些疫苗可引发针对不同病毒的免疫反应,并采用异源初免-加强疫苗接种方案。

发明内容

[0024] 本发明发现,复制无能载体的各种初免-加强组合可产生针对传染病,尤其是EBV感染的有效免疫保护。

[0025] 因此,本发明的一个总体方面涉及一种疫苗组合,其包含

[0026] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0027] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0028] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0029] 在另一方面,本发明涉及一种药盒,其包括:

[0030] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0031] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0032] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0033] 在另一方面,本发明涉及一种在受试者中诱导针对病毒的免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用:

[0034] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0035] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0036] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0037] 在某些实施方案中,第一组合物用于引发免疫反应并且第二组合物用于增强所述免疫反应,反之亦然。

[0038] 在某些实施方案中,本发明涉及一种重组修饰的痘苗病毒(MVA)载体和VRP载体,其包含编码引起传染病的病毒的两个或更多个抗原决定簇的核苷酸序列。

[0039] 在一个优选实施方案中,抗原蛋白是EBV的结构蛋白和非结构蛋白中的任一种。在一个优选实施方案中,抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A、BRLF1/BZLF1融合物。

[0040] 在另一个实施方案中,VRP是VEEV TC83并且MVA是MVA-BN。

[0041] 在又一实施方案中,第一组合物中的VRP载体包含编码选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3组成的组的抗原蛋白的核酸。

[0042] 在又一实施方案中,第二组合物中的MVA载体包含编码选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4组成的组的抗原蛋白的核酸。

[0043] 在又一方面,本发明涉及一种疫苗组合,其包含

[0044] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0045] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0046] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0047] 用于产生针对传染病的保护性免疫反应,其中第一组合物用于引发所述免疫反应并且第二组合物用于增强所述免疫反应,反之亦然。

[0048] 加强组合物可包含两个或更多个剂量的加强组合物的载体。

[0049] 在另外的方面,本发明涉及包含以下的疫苗组合或药盒的用途

[0050] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA载体,所述saRNA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0051] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0052] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0053] 用于制造治疗和/或预防传染病的药物组合物或药剂。

[0054] 在再一方面,本发明涉及一种包含疫苗组合的药物组合物,所述疫苗组合包含

[0055] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA载体,所述saRNA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0056] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0057] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物和药学上可接受的载剂、稀释剂和/或添加剂。

[0058] 本发明的这些和其他目的将结合本发明的详细描述进行进一步详细描述。

附图说明

[0059] 并入本说明书并且构成本说明书的一部分的附图例示本发明的若干实施方案,并且连同描述一起用来解释本发明的原理。

[0060] 图1A示出了MVA-mBN443的结构和遗传组织。图1B示出了VRP-BN011的结构和遗传组织。UTR＝VEEV的5'或3'非翻译区;nsp＝非结构蛋白的编码区,SUBG PROM＝VEEV的亚基因组启动子;EBV gp350多聚体:EBV gp350＝爱泼斯坦巴尔病毒糖蛋白gp350氨基酸2-434,C末端融合有GCN4多聚化结构域;T2A ＝2a肽序列;RKRR＝弗林蛋白酶切割位点;P2A＝2a肽序列;gH＝EBV的糖蛋白H;gL＝EBV的糖蛋白L

[0061] 图2示出了每组的Gp350特异性IgG反应。动物(n＝3)在第1天和第29天用如图例中相应的颜色代码所概述和表1中所述的初免-加强方案肌肉内施用两次。在施用前(剂量前)以及第29天和第43天收集血液。使用多重ELISA测试血清。在此图中,gp350特异性IgG浓度的几何平均值和几何标准差以EU表示。

[0062] 图3示出了每组的中和抗体。动物(n＝3)在第1天和第29天用如图例中相应的颜色代码所概述和表1中所述的初免-加强方案肌肉内施用两次。在施用前(剂量前)以及第29天和第43天收集血液,并且使用基于流式细胞术的中和测试对血清进行测试。在此图中,示出了几何平均值和几何标准差。

[0063] 图4示出了每组的Gp350特异性T细胞反应。动物(n＝3)在第1天和第29天用如图例中相应的颜色代码所概述和表1中所述的初免-加强方案肌肉内施用两次。在施用前(剂量前)以及第8天和第36天收集血液,并且使用ELISPOT分析对PBMC进行测试。在此图中,示出了每$1x10^6$ PBMC中斑点形成单位(SFU)的平均数和平均值的标准误差(SEM)。

[0064] 图5示出了加强两周后脾细胞的IFN-γELISPOT反应。在第0天用TNE(缓冲液对照)、MVA-EBV或VRP-EBV对小鼠进行肌肉内(IM)免疫接种,并在第21天用相同的同源或异源测试品进行加强。加强2周后,分离脾细胞并在ELISPOT测定中用三种gp350肽(EBV肽#1(MEAALLVCQYTIQSL);EBV gp350肽#25(LGAGELALTMRSKKL)和EBV肽#26(ELALTMRSKKLPINV))再刺激。对IFN-γ阳性斑点进行计数。所有计数均减去背景(媒剂对照刺激)。条形代表平均值±SEM;

[0065] 图6示出了加强免疫接种五天后血液中的OVA特异性CD8 T细胞反应。在第0天用TNE(缓冲液对照)、MVA-OVA或VRP-OVA对小鼠进行皮下(SC)免疫接种,并在第21天用相同的同源或异源测试品进行加强。加强五天后,抽取血液并使用SIINFEKL-dextramer通过流式细胞术分析测定OVA特异性CD8 T细胞。条形代表平均值±SEM。N＝每组5只小鼠。

[0066] 图7示出了加强免疫接种四周后脾中的OVA特异性CD8 T细胞反应。在第0天用TNE(缓冲液对照)、MVA-OVA或VRP-OVA对小鼠进行皮下(SC)免疫接种,并在第21天用相同的同源或异源测试品进行加强。加强免疫接种四周后分离脾细胞并用OVA257-264肽或OVA55-62肽再刺激6h。通过流式细胞术检测产生细胞因子的细胞。条形代表平均值±SEM。N＝每组5只小鼠。

[0067] 图8示出了异源VRP/MVA免疫接种后OVA特异性血清总IgG滴度。在第0天用TNE(缓冲液对照)、MVA-OVA或VRP-OVA对小鼠进行皮下(SC)免疫接种,并在第21天用相同的同源或

异源测试品进行加强。在第14天和第35天抽取血液并分离血清。通过ELISA测定OVA特异性总IgG滴度。条形代表平均值±SEM。N＝每组5只小鼠。

[0068] 图9示出了加强两周后脾细胞的IFN-γELISPOT反应。在第0天用TNE(缓冲液对照)、MVA-EBV或SFV-VRP-EBV对小鼠进行肌肉内(IM)免疫接种,并在第21天用相同的同源或异源测试品进行加强。加强2周后,分离脾细胞并在ELISPOT测定中用三种gp350肽(EBV肽#1(MEAALLVCQYTIQSL);EBV gp350肽#25(LGAGELALTMRSKKL)和EBV肽#26(ELALTMRSKKLPINV))再刺激。对IFN-γ阳性斑点进行计数。所有计数均减去背景(媒剂对照刺激)。条形代表平均值±SEM;

[0069] 序列的简要描述

[0070] SEQ ID NO:1绘示了gp350多聚体的核酸序列(1455个核苷酸)。

[0071] SEQ ID NO:2绘示了gH的核酸序列(2121个核苷酸)。

[0072] SEQ ID NO:3绘示了gL的核酸序列(414个核苷酸)。

[0073] SEQ ID NO:4绘示了由BZLF1-BRLF1序列制成的融合基因的核酸序列(2283个核苷酸)。

[0074] SEQ ID NO:5绘示了EBNA3A的核酸序列(2892个核苷酸)。

[0075] SEQ ID NO:6绘示了一个loxPV位点的DNA序列。

[0076] SEQ ID NO:7绘示了Pr13.5长启动子的核酸序列。

[0077] SEQ ID NO:8绘示了PrS启动子的核酸序列。

[0078] SEQ ID NO:9绘示了PrH5m启动子的核酸序列。

[0079] SEQ ID NO:10绘示了Pr1328启动子的核酸序列。

[0080] SEQ ID NO:11绘示了2A肽(T2A)的核酸序列。

[0081] SEQ ID NO:12绘示了2A肽(P2A)的核酸序列。

[0082] SEQ ID NO:13绘示了接头GCN4的核酸序列。

具体实施方式

[0083] 从现有技术的教导和实现中不可能预料到,以saRNA,特别是VRP作为初免疫苗接种以及以MVA作为加强疫苗接种进行的异源初免-加强方案在gp350特异性IgG和中和抗体方面具有高度免疫原性,而以MVA或VRP进行的同源疫苗接种,或施用Ad作为加强疫苗的免疫原性作用最小。

[0084] 异源初免-加强方案将产生免疫反应,保护非人灵长类动物免受病毒感染,特别是EBV。当然,根据本发明人生成的数据及其观察结果来看,可合理且可信地得出结论:所述疫苗方案也将在人中诱导免疫反应,并且不仅专门针对EBV,还针对由其他疾病相关抗原(包括传染病抗原或肿瘤相关抗原)引起的其他疾病。事实上,FDA接受非人灵长类动物模型作为证据,证明在这些非人灵长类动物中赋予保护的疫苗同样适用于人。

[0085] 特别地,本发明人还发现,包含VRP作为初免疫苗接种的免疫接种方案比使用MVA作为初免疫苗接种产生更高的gH/gL/gp42复合物和gH特异性IgG反应。对gH/gL/gp42或gH预先存在免疫的NHP进行一次MVA或VRP疫苗接种仅加强gH/gL/gp42复合物和gH特异性IgG反应,而第二施用则没有或仅有很少的附加加强作用。

[0086] 因此,本发明提供了用于产生赋予针对传染病抗原或肿瘤相关抗原(例如EBV)的

保护的免疫反应的疫苗或疫苗组合,以及可用于制造针对所述抗原的疫苗的疫苗或疫苗组合。

[0087] 定义

[0088] 在下面详细描述本发明之前,应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为这些可能会有所不同。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并非旨在限制本发明的范围,本发明的范围只受所附权利要求限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有如由本领域普通技术人员普遍理解的相同的含义。

[0089] 必须注意,除非上下文另外明确指出,否则如在本文中使用,单数形式“一(a/an)”和“所述”包括多个指示物。因此,例如,提及“结构蛋白”包括一种或多种结构蛋白,并且提及“所述方法”包括提及本领域普通技术人员已知的可修改或替代本文所述方法的等效步骤和方法。

[0090] 除非另有说明,在一系列要素之前的术语“至少”应理解为是指所述系列中的每个要素。本领域技术人员仅使用常规实验将承认或能够确定,许多实施方案等同于本文中描述的本发明的具体实施方案。此类等效物意图由本发明涵盖。

[0091] 当术语“约”与数值结合使用时,其意图是涵盖一定范围内的数值,所述范围内的数值的下限比所示数值小5%,并且上限比所示数值大5%,除非上下文另有明确说明。

[0092] 如本文所用,多个列举的要素之间的连接术语“和/或”被理解为包括单独的和组合的选项。例如,在两个要素由“和/或”连接的情况下,第一个选项是指第一个要素在没有第二个要素的情况下的适用性。第二个选项是指第二个要素在没有第一个要素的情况下的适用性。第三个选项是指第一个和第二个要素在一起的适用性。这些选项中的任一个都被理解为落入所述含义内,并且因此满足本文所用术语“和/或”的要求。超过一个选项的同时适用性也被理解为落入所述含义内,且因此满足术语“和/或”的要求。

[0093] 在整个说明书和下面的权利要求书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”和诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”的变型应理解为包含规定的整数或步骤或整数或步骤的组但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤的组。当在本文中使用时,术语“包含”可用术语“含有”或“包括”来替代,或者有时在本文中使用时用术语“具有”来替代。任何上述术语(包含、含有、包括、具有),尽管不太优选,但无论何时在本发明的一个方面或实施方案的上下文中使用,都可用术语“由.....组成”替代。

[0094] 当在本文中使用时,“由...组成”排除了在权利要求要素中未指明的任何要素、步骤、或成分。当在本文中使用时,“基本上由……组成”不排除不会实质影响权利要求书的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0095] 术语“抗原”包括特定化合物、组合物或物质的所有相关表位。术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上B细胞和/或T细胞单独或与另一种蛋白质,诸如例如主要组织相容性复合物(“MHC”)蛋白或T细胞受体结合响应的位点。表位可由邻接氨基酸或通过蛋白质的二级和/或三级折叠并置的非邻接氨基酸形成。由邻接氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包含至少5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸,但一般少于20个氨基酸,具有独特的空间构象。确定表位的空间构象的方法包括,例如,X射线晶体学和二维核磁共振。参见例如“Epitope Mapping

Protocols"in Methods in Molecular Biology,第66卷,Glenn E.Morris,编(1996)。

[0096] 抗原可以是组织特异性(或组织相关)抗原或疾病特异性(或疾病相关)抗原。这些术语并不互相排斥,因为组织特异性抗原也可以是疾病特异性抗原。组织特异性抗原在有限数量的组织中表达。组织特异性抗原包括例如前列腺特异性抗原("PSA")。疾病特异性抗原与疾病过程同时表达,其中抗原表达与特定疾病的发展相关或可预测特定疾病的发展。疾病特异性抗原包括例如与某些类型的乳腺癌相关的HER-2,或与前列腺癌相关的PSA。疾病特异性抗原可以是被T细胞或B细胞识别的抗原。

[0097] 源自已经历特征性结构分化丧失的特定身体组织的恶性生长通常伴有细胞分裂能力增强、周围组织侵袭和转移能力。肿瘤可能是良性的或恶性的。例如,前列腺癌是起源于前列腺组织或源自前列腺组织的恶性赘生物,卵巢癌是起源于卵巢组织或源自卵巢组织的恶性赘生物,结肠癌是起源于结肠组织或源自结肠组织的恶性赘生物,并且肺癌是起源于肺组织或源自肺组织的恶性赘生物。残留癌症是指给予受试者治疗以减少或根除癌症之后,所述受试者体内残留的癌症。转移性癌症是指在身体除原始(原发)癌症起源部位(转移性癌症来源于所述部位)以外的一个或多个部位的癌症。

[0098] "保守"变体是具有一个或多个氨基酸取代的变体蛋白质或多肽,所述氨基酸取代不会显著影响或降低蛋白质或其抗原表位的活性或抗原性。通常保守取代是其中将特定的氨基酸用具有相同或相似化学特征的另一个氨基酸取代的那些。例如,用另一种碱性氨基酸(诸如精氨酸或谷氨酰胺)替换碱性氨基酸(诸如赖氨酸)是一种保守替代。术语保守变体还包括使用取代的氨基酸代替未取代的亲本氨基酸,前提是针对取代的多肽产生的抗体也与未取代的多肽发生免疫反应,和/或取代的多肽保留未取代的多肽的功能。非保守取代是用具有不同化学特征的氨基酸替换特定氨基酸,并且通常会降低蛋白质或其抗原表位的活性或抗原性。

[0099] 保守取代的具体、非限制性实例包括以下实例:

[0100]

原始残基	保守取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0101] “疾病相关抗原”与特定疾病过程同时表达,其中抗原表达与所述疾病相关或可预测所述疾病的发展。疾病相关抗原包括例如与某些类型的乳腺癌相关的HER-2,或与前列腺癌相关的前列腺特异性抗原(“PSA”)。疾病相关抗原可以是被T细胞或B细胞识别的抗原。一些与疾病相关抗原也可能是组织特异性的。组织特异性抗原在有限数量的组织中表达。组织特异性抗原包括例如前列腺特异性抗原PSA。

[0102] 疾病相关抗原可以是例如肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原。

[0103] 术语“肿瘤抗原”是指仅在肿瘤组织上表达、与肿瘤组织相关或在肿瘤组织中过表达的抗原。示例性肿瘤抗原包括但不限于5-α-还原酶、α-胎蛋白(“AFP”)、AM-1、APC、April、B黑色素瘤抗原基因(“BAGE”)、β-连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、Brachyury、CA-125、胱天蛋白酶-8(“CASP-8”,也称为“FLICE”)、组织蛋白酶、CD19、CD20、CD21/补体受体2(“CR2”)、CD22/BL-CAM、CD23/F_cεRII、CD33、CD35/补体受体1(“CR1”)、CD44/PGP-1、CD45/白细胞共同抗原(“LCA”)、CD46/膜辅因子蛋白(“MCP”)、CD52/CAMPATH-1、CD55/衰变加速因子(“DAF”)、CD59/保护素、CDC27、CDK4、癌胚抗原(“CEA”)、c-myc、环氧合酶-2(“cox-2”)、在结肠直肠癌基因中缺失(“DCC”)、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法尼基转移酶、成纤维细胞生长因子8a(“FGF8a”)、成纤维细胞生长因子8b(“FGF8b”)、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、G黑色素瘤抗原基因家族(“GAGE-family”)、胃泌素17、胃泌素释放激素、神经节苷脂2(“GD2”)/神经节苷脂3(“GD3”)/神经节苷脂-单唾液酸-2(“GM2”)、促性腺激素释放激素(“GnRH”)、UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2[GlcNAc:Man(α1-6)]β1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V(“GnT V”)、GP1、gp100/Pmel17、gp-100-in4、gp15、gp75/酪氨酸相关蛋白-1(“gp75/TRP-1”)、人绒毛膜

促性腺激素(“hCG”)、乙酰肝素酶、Her2/neu、人乳腺肿瘤病毒(“HMTV”)、70千道尔顿热休克蛋白(“HSP70”)、人端粒酶逆转录酶(“hTERT”)、胰岛素样生长因子受体-1(“IGFR-1”)、白介素-13受体(“IL-13R”)、诱导型一氧化氮合酶(“iNOS”)、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、黑色素瘤抗原编码家族(“MAGE家族”,至少包括MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3和MAGE-4)、乳腺珠蛋白、MAP17、Melan-A/黑色素瘤抗原被T细胞识别-1(“MART-1”)、间皮素、MIC A/B、MT-MMPs、粘蛋白、睾丸特异性抗原NY-ESO-1、骨连接蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、血小板源性生长因子(“PDGF”)、μPA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、前列腺特异性抗原(“PSA”)、前列腺特异性膜抗原(“PSMA”)、前列腺酸性磷酸酶(“PAP”)、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX-家族、STAT3、STn、TAG-72、转化生长因子-α(“TGF-α”)、转化生长因子-β(“TGF-β”)、胸腺素-β-15、肿瘤坏死因子-α(“TNF-α”)、TP1、TRP-2、酪氨酸酶、血管内皮生长因子(“VEGF”)、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶(“GST”)。

[0104] 术语“病毒抗原”是指来源于任何疾病相关致病病毒的抗原。示例性的疾病相关病毒抗原包括但不限于来源于以下病毒的抗原:腺病毒、虫媒病毒、星状病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、巨细胞病毒(“CMV”)、登革热病毒(dengue virus)、埃博拉病毒(Ebola virus)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus,“EBV”)、口蹄疫病毒、瓜纳瑞托病毒(Guanarito virus)、亨德拉病毒(Hendra virus)、1型单纯疱疹病毒(“HSV-1”)、2型单纯疱疹病毒(“HSV-2”)、6型人疱疹病毒(“HHV-6”)、8型人疱疹病毒(“HHV-8”)、甲型肝炎病毒(“HAV”)、乙型肝炎病毒(“HBV”)、丙型肝炎病毒(“HCV”)、丁型肝炎病毒(“HDV”)、戊型肝炎病毒(“HEV”)、人免疫缺陷病毒(“HIV”)、流感病毒、日本脑炎病毒、胡宁病毒(Junin virus)、拉沙病毒(Lassa virus)、马丘波病毒(Machupo virus)、马尔堡病毒(Marburg virus)、麻疹病毒、人偏肺病毒、传染性软疣病毒、腮腺炎病毒、新城疫病毒、尼帕病毒(Nipha virus)、诺如病毒(Norovirus)、诺瓦克病毒(Norwalk virus)、人乳头瘤病毒(“HPV”)、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒(“RSV”)、鼻病毒、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒(Sabia virus)、严重急性呼吸综合征病毒(“SARS”)、水痘带状疱疹病毒、天花病毒、西尼罗病毒(West Nile virus)和黄热病病毒。

[0105] 术语“细菌抗原”是指来源于任何疾病相关致病病毒的抗原。示例性细菌抗原包括但不限于来源于以下细菌的抗原:炭疽杆菌(Bacillus anthracis)、百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、流产布鲁氏菌(Brucella abortus)、犬布鲁氏菌(Brucella canis)、羊布鲁氏菌(Brucella melitensis)、猪布鲁氏菌(Brucella suis)、鼻疽伯克霍尔德氏菌(Burkholderia mallei)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(Burkholderia pseudomallei)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、鹦鹉热衣原体(Chlamydophila psittaci)、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、破伤风梭菌(Clostridium tetani)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diptheriae)、粪肠球菌(Enterococcus faecalis)、屎肠球菌(Enterococcus faecium)、大肠杆菌(Escherichia coli)、产肠毒素大肠杆菌、致病性大肠杆菌、大肠杆菌)157:H7、土拉

弗朗西斯菌(Francisella tularensis)、嗜血杆菌流感(Haemophilus influenza)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、问号钩端螺旋体(Leptospira interrogans)、单核细胞增多性李斯特菌(Listeria monocytogenes)、麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitides)、绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、立克次体(Rickettsia rickettsia)、伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、宋内志贺氏菌(Shigella sonnei)、葡萄球菌尿素(Staphylococcus aureus)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)、梅毒螺旋体(Treponema pallidum)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)和鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis)。

[0106] 术语“真菌抗原”是指来源于任何疾病相关致病真菌的抗原。示例性真菌抗原包括但不限于来源于以下真菌的抗原:棒曲霉(Aspergillus clavatus)、黄曲霉(Aspergillus flavus)、烟曲霉(Aspergillus fumigatus)、构巢曲霉(Aspergillus nidulans)、黑曲霉(Aspergillus niger)、土曲霉(Aspergillus terreus)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、白色念珠菌(Candida albicans)、都柏林念珠菌(Candida dubliniensis)、光滑念珠菌(Candida glabrata)、近平滑念珠菌(Candida parapsilosis)、皱褶念珠菌(Candida rugosa)、热带念珠菌(Candida tropicalis)、白色隐球菌(Cryptococcus albidus)、格特隐球菌(Cryptococcus gattii)、劳伦隐球菌(Cryptococcus laurentii)、新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、犬小孢子菌(Microsporum canis)、卡氏肺孢子菌(Pneumocystis carinii)、耶氏肺孢子菌(Pneumocystis jirovecii)、申克孢子丝菌(Sporothrix schenckii)、卡塔鲁姆菌(Stachbotrys chartarum)、须癣(Tinea barbae)、头癣(Tinea captitis)、体癣(Tinea corporis)、体癣股癣(Tinea cruris)、面癣(Tinea faciei)、隐名癣(Tinea incognito)、黑癣(Tinea nigra)、花斑癣(Tinea versicolor)、红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)和断发毛癣菌(Trichophyton tonsurans)。

[0107] 术语“寄生虫抗原”是指来源于任何疾病相关致病寄生虫的抗原。示例性的寄生虫抗原包括但不限于来源于以下寄生虫的抗原:海鞘虫属物种(Anisakis spp.)、巴贝斯虫属物种(Babesia spp.)、浣熊蛔虫(Baylisascaris procyonis)、隐孢子虫属物种(Cryptosporidium spp.)、卡耶塔环孢子虫(Cyclospora cayetanensis)、裂头绦虫属物种(Diphyllobothrium spp.)、麦地那龙线虫(Dracunculus medinensis,)、溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica)、十二指肠贾第鞭毛虫(Giardia duodenalis)、肠贾第鞭毛虫(Giardia intestinalis)、蓝氏贾第鞭毛虫(Giardia lamblia)、利什曼原虫属物种(Leishmania sp.)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、曼氏血吸虫(Schistosoma mansoni)、埃及血吸虫(Schistosoma haematobium)、日本血吸虫(Schistosoma japonicum)、带绦虫属物种(Taenia spp.)、刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)、旋毛虫(Trichinella spiralis)和克氏锥虫(Trypanosoma cruzi)。

[0108] “爱泼斯坦-巴尔病毒”、“EBV”、“人疱疹病毒4”和“HHV-4”可互换使用,指的是致癌人疱疹病毒。EBV是急性传染性单核细胞增多症(AIM,也称为腺热)的病因。它还与特定形式的癌症相关,诸如霍奇金淋巴瘤。伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、鼻咽癌以及与人免疫缺陷病毒(HIV)相关的疾患,诸如毛状白斑和中枢神经系统淋巴瘤。EBV感染免疫系统的B细胞和上皮细胞。一旦病毒的初始裂解性感染得到控制,EBV就会潜伏在个体的B细胞中,并伴随个体的一生,这是由于其复杂的生命周期,包括交替的潜伏期和裂解期。

[0109] “EBV感染的症状”包括急性传染性单核细胞增多症(AIM,也称为腺热)和/或EBV相关癌症的存在。“EBV相关癌症”是指至少部分由EBV感染引起和/或加重的癌症,诸如霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、伯基特淋巴瘤、鼻咽癌、宫颈癌、毛状白斑和中枢神经系统淋巴瘤。

[0110] 当涉及分子时,术语“抗原”、“免疫原”、“抗原性的”、“免疫原性的”、“抗原活性的”和“免疫学活性的”是指能够诱导特定的体液和/或细胞介导的免疫反应的任何物质。在特定实施方案中,抗原包含至少一部分或一个胞外结构域。

[0111] “EBV抗原”是指来自EBV的抗原,诸如“gB、gH、gL和gp350/220”以及肿瘤相关EBV抗原。

[0112] 术语“EBV包膜糖蛋白”包括gp350、gB、gp42、gH、gL、gM、gN、BMRF2、BDLF2、BDLF3、BILF1、BILF2和BARF1。术语“T细胞抗原”是指EBNA1、EBNA2、EBNA3a、EBNA3b、EBNA3c、EBNA-前导蛋白和LMP2。

[0113] 术语“gp350/220”是主要的EBV包膜蛋白。EBVgp350/220与B细胞上的补体受体2型(CR2)CD21和/或(CR1)CD35之间的相互作用是细胞附着和启动潜伏感染所需要的(SEQ ID NO:1)

[0114] 术语“gH”是指人疱疹病毒4的糖蛋白gp85前体,并以SEQ ID NO:2,NCBI参考序列:YP_401700.1为例。

[0115] 术语“gL”和“BKRF2”可互换使用,并以SEQ ID NO:3,NCBI参考序列:YP_001129472.1为例。

[0116] 术语“BZLF1-BRLF1融合物”是指EBV早期基因的转录激活因子,并以SEQ ID NO:4为例。

[0117] “EBNA-3A”以SEQ ID NO:5,NCBI参考序列:YP_401677.1为例。

[0118] “肿瘤相关EBV抗原”是与感染EBV的受试者的肿瘤相关的EBV抗原。示例性肿瘤相关EBV抗原包括EBNA1、LMP1、LMP2和BARF1,这些抗原描述于以下文献中:Lin等人“CD4 and CD8 T cell responses to tumor-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients.”Cancer Immunol Immunother.2008年7月;57(7):963-75;Kohrt等人“Dynamic CD8 T cell responses to tumor-associated Epstein-Barr virus antigens in patients with Epstein-Barr virus-negative Hodgkin's disease,”Oncol Res.2009;18(5-6):287-92;Parmita等人,“Humoral immune responses to Epstein-Barr virus encoded tumor associated proteins and their putative extracellular domains in nasopharyngeal carcinoma patients and regional controls,”J Med Virol.2011年4月;83(4):665-78。

[0119] “佐剂”意指增强抗原性的媒介物。佐剂可包括:(1)抗原吸附于其上的矿物质(明

矾、氢氧化铝和/或磷酸盐)的悬浮液;(2)油包水乳剂,其中抗原溶液在矿物油中乳化(弗氏不完全佐剂),有时包含杀死的分枝杆菌(弗氏完全佐剂),以通过抑制抗原降解和/或引起巨噬细胞流入来进一步增强抗原性;(3)免疫刺激物质,包括但不限于寡核苷酸,诸如例如包括CpG基序的那些寡核苷酸,也可用作佐剂(例如参见美国专利号6,194,388;和美国专利号6,207,646);和(4)纯化或重组蛋白质,诸如共刺激分子(例如,B7-1、ICAM-1、LFA-3和GM-CSF)。

[0120] 如本文所用,“影响免疫反应”包括受试者对本发明的重组MVA或VRP和/或包含重组MVA和VRP的组合物和/或疫苗产生的蛋白质和/或多肽的体液和/或细胞免疫反应的发展。“体液”免疫反应,此术语在本领域中是众所周知的,是指包含抗体的免疫反应,而“细胞”免疫反应,此术语在本领域中是众所周知的,是指包含T淋巴细胞和其他白细胞的免疫反应,尤其是由HLA限制性的细胞溶解T细胞,即“CTL”引起的免疫原特异性反应。当加工后的免疫原(即肽片段)与主要组织相容性复合物结合时,就会发生细胞免疫反应。

[0121] 如本文所用,术语“甲病毒”具有本领域的常规含义,并且包括委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、西部马脑炎病毒(WEEV)和东部马脑炎病毒(EEEV)的各种种类。如本文所用的“马脑炎病毒(EEV)”包括VEEV、WEEV和EEEV及其毒株和分离株。

[0122] 本文使用的术语“表达”、“表达”、“表达”等可互换使用,仅表示转录以及感兴趣序列的转录和翻译两者。因此,当提到以DNA形式存在的核苷酸序列的表达时,由此表达产生的产物可以是RNA(仅由要表达的序列的转录产生),也可以是多肽序列(由要表达的序列的转录和翻译两者产生)。因此,术语“表达”还包括RNA和多肽产物均由所述表达产生并一起保留在相同共享环境中的可能性。例如,mRNA翻译成多肽产物后仍然存在的情况就是这种情况。

[0123] 如本文所用,术语“表达盒”定义为通常用于克隆和/或转化的载体或重组病毒的一部分。表达盒通常由a)一个或多个编码序列(例如,开放阅读框(ORF)、基因、编码蛋白质和/或抗原的核酸)和b)控制一个或多个编码序列表达的序列(例如,启动子)组成。另外,表达盒可包括3’非翻译区(例如,转录终止子,诸如痘苗转录终止子)。“表达盒”可与术语“转录单元”互换使用。

[0124] “制剂”是指含有活性药物或生物成分(例如本发明的重组MVA)以及一种或多种附加组分的组合物。术语“制剂”在本文中与术语“药物组合物”、“疫苗组合物”和“疫苗制剂”可互换使用。制剂可以是液体或固体(例如冻干的)。

[0125] 术语“基因”广泛用于指与生物功能相关的任何多核苷酸片段。因此,基因包括基因组序列中的内含子和外显子,或仅包括cDNA或病毒RNA中的编码序列和/或其表达所需的调控序列。例如,基因也指表达mRNA或功能性RNA或者编码特定蛋白质的核酸片段,并且其包括调控序列。

[0126] 如本文所用,“异源”基因、核酸、抗原或蛋白质被理解为不存在于野生型痘病毒基因组(例如MVA或MVA-BN)中的核酸或氨基酸序列。本领域技术人员理解,“异源基因”当存在于痘病毒,诸如MVA或MVA-BN中时,将以如下的方式掺入痘病毒基因组中:在将重组痘病毒施用于宿主细胞后,其表达为对应的异源基因产物,即“异源抗原”和/或“异源蛋白质”。通常通过将异源基因与允许在痘病毒感染细胞中表达的调控元件可操作地连接来实现表达。优选地,调控元件包括天然的或合成的痘病毒启动子。

[0127] 术语“免疫原性组合物”或“免疫学组合物”涵盖引发针对从MVA表达的感兴趣抗原的免疫反应的组合物。术语“疫苗或疫苗组合物”涵盖任何诱导针对感兴趣抗原的保护性免疫反应或有效保护免受感兴趣抗原的组合物,例如在施用或注射到动物或人体内后引发针对抗原的保护性免疫反应或提供针对从MVA载体表达的抗原的有效保护。所述组合物可单独施用或者可与其他组合物或治疗组合物依序施用,从而提供组合组合物、两种或更多种(优选三种、四种、五种或六种)组合物的混合物或多价混合物。

[0128] 术语“核酸”、“核苷酸序列”、“核酸序列”和“多核苷酸”可互换使用,并且是指线性或分支的、单链或双链的RNA或DNA,或它们的杂合体。术语还涵盖RNA/DNA杂合体。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包括修饰的核苷酸,诸如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物、尿嘧啶、其他糖和连接基团(诸如氟核糖和硫醇盐)以及核苷酸分支。核苷酸序列可在聚合后被进一步修饰,诸如通过与标记组分缀合。此定义中包含的其他类型的修饰为加帽、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、以及引入将多核苷酸附着到蛋白质、金属离子、标记组分、其他多核苷酸或固体支持物上的手段。多核苷酸可通过化学合成获得,或者来源于微生物。

[0129] 术语“开放阅读框”(ORF)是指可翻译成氨基酸的核苷酸序列。通常,这样的ORF含有起始密码子,后续区域通常长度为3个核苷酸的倍数,但在给定的阅读框中不含有终止密码子(TAG、TAA、TGA、UAG、UAA或UGA)。通常,ORF是自然产生的,或者是人工构建的,即通过基因技术手段。ORF编码一种蛋白质,其中可翻译成的氨基酸形成肽连接链。如本文所用,术语“必需ORF”意指当通过实验将例如MVA部分或全部缺失时,MVA病毒复制、生长或复制和生长都会减少(例如,与未缺失的MVA相比,突变体中的ORF至少减少15倍)的ORF。确定MVA病毒复制和病毒生长的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,方法描述于Vaccinia Virus and Poxvirology,Methods and Protocols,第269卷Stuart N.Isaacs编(Humana Press(2004),参见例如,第8章,Growing Poxviruses and determining Virus Titer,Kotwal and Abrahams)。可通过GFP荧光测定MVA的病毒生长率,如例如Orubu等人(2012)PLOS One 7:e40167中所述,使用例如CEF细胞,或如Hornemann等人(2003),Journal of Virology 77:8394-8407中所述的方法。

[0130] 如本文所用,“可操作地连接”意指所描述的组分是相关的,允许它们以它们预期的方式发挥作用,例如转录待表达的核酸的启动子。当第一核酸序列被置于与第二核酸序列的功能性关系中时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子被置于可指导编码序列转录的位置,则启动子与编码序列可操作地连接。一般来说,可操作连接的DNA序列是邻接的,并且在必要时接合两个蛋白质编码区,在同一个阅读框中。

[0131] 关于本文所述的核酸序列的“序列同源性或同一性百分比(%)”定义为在比对序列并引入空位(如果需要的话)以实现最大百分比的序列同一性之后,并在不将任何保守取代视为序列同一性的部分的情况下,候选序列中与参考序列(即,其所源自的核酸序列)中的核苷酸相同的核苷酸的百分比。为了测定核苷酸序列同一性或同源性百分比的比对可通过本领域技术范围内的多种方式实现,例如,使用公开获得的计算机软件,诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括实现在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0132] 例如,Smith和Waterman,(1981),Advances in Applied Mathematics2:482-489局部同源算法提供了核酸序列的适当比对。此算法可通过使用由Dayhoff,Atlas of Protein Sequences and Structure,M.O.Dayhoff编,第5增刊3:353-358,National Biomedical Research Foundation,Washington,D.C.,USA开发,并且由Gribskov(1986),Nucl.Acids Res.14(6):6745-6763标准化的评分矩阵而应用于氨基酸序列。确定序列同一性百分比的此算法的示例性实施由遗传学计算机组(Madison,Wis.)在“BestFit”实用应用程序中提供。此方法的默认参数在Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual,第8版(1995)(可从Genetics Computer Group,Madison,Wis.获得)中描述。在本发明的上下文中确立同一性百分比的优选方法是使用由University of Edinburgh拥有版权、由John F.Collins和Shane S.Sturrok开发并由IntelliGenetics,Inc.(Mountain View,Calif)分发的MPSRCH程序包。从这套软件包中,可采用Smith-Waterman算法,其中默认参数用于评分表(例如,空位开放罚分为12,空位扩展罚分为一且空位为六)。从生成的数据中,“Match”值反映了“序列同一性”。这同样适用于“氨基酸同一性百分比(%)”,但需作必要的修改。用于计算序列之间的百分比同一性或相似性的其他合适的程序在本领域中通常是已知的,例如,另一种比对程序是使用默认参数的BLAST。例如,可使用以下默认参数来使用BLASTN和BLASTP:遗传密码=标准;过滤器=无;股=两个;截止值=60;期望值=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高分数;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+Swiss protein+Spupdate+PIR。这些程序的详情可在下列网址中找到:http://http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/。

[0133] 术语“药物”、“药物组合物”和“药剂”在本文中可互换使用,指用于预防或治疗疾病的物质和/或物质的组合。

[0134] “药学上可接受的”意指载剂或赋形剂在所采用的剂量和浓度下不会在被施用的受试者中引起任何不想要的或有害的影响。

[0135] “药学上可接受的载剂”描述于以下文献中,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,by E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第15版(1975);Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro,编,Mack Publishing Company(1990);Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins,S.Frokjaer and L.Hovgaard,编,Taylor&Francis[2000];和Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,A.Kibbe,编,Pharmaceutical Press(2000)。他们描述了使用适合于施用本文所公开的载体和组合物的常规药学上可接受的载剂的组合物和制剂。一般来说,所用载剂的性质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媒介物,所述可注射流体包括药学上和生理学上可接受的流体,诸如水、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(诸如粉末、丸剂、片剂或胶囊),常规的无毒固体载剂包括例如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。药物组合物也可含有少量无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂、pH缓冲剂等,诸如例如乙酸钠或山梨醇单月桂酸酯。

[0136] 如本文所用,“预防(prevent/preventing/prophylax)”疾病或感染意指防止此类疾病在受试者(例如,人或动物)中发生。

[0137] 术语“初免-加强疫苗接种”是指使用靶向特定抗原的疫苗的第一次初免注射,随

后每隔一段时间注射一次或多次相同疫苗的加强注射的疫苗接种策略。初免-加强疫苗接种可以是同源的或异源的。同源初免-加强疫苗接种使用包含相同的用于初免注射和一次或多次加强注射的免疫原和载体的疫苗。异源初免-加强疫苗接种使用包含相同的用于初免注射和一次或多次加强注射的免疫原但不同的用于初免注射和一次或多次加强注射的载体的疫苗。例如,同源初免-加强疫苗接种可使用包含表达相同的用于初免注射和一次或多次加强注射的核酸的重组MVA载体,所述核酸表达甲病毒抗原。相反,异源初免-加强疫苗接种可使用包含用于初免注射的表达一种甲病毒蛋白的核酸的重组MVA载体,和表达初免注射中不包含的第二种甲病毒蛋白的另一种重组MVA载体,反之亦然。异源初免-加强疫苗接种还涵盖各种组合,诸如例如在初免注射中使用编码免疫原的质粒并在一次或多次加强注射中使用编码相同免疫原的重组MVA,或者在初免注射中使用重组蛋白质免疫原并在一次或多次加强注射中使用编码相同蛋白质免疫原的重组MVA载体。

[0138] 如本文所用,术语“启动子”表示位于要表达的核酸序列上游的核酸(通常是DNA)的调控区,其含有特定DNA序列元件,这些元件可被例如负责从被启动基因的编码区合成RNA的蛋白质转录因子和聚合酶识别和结合。由于启动子通常紧邻所讨论的基因,因此启动子中的位置是相对于转录起始位点指定的,DNA转录从所述位点开始针对特定基因进行(即,上游位置是从-1开始倒数的负数,例如-100是上游100个碱基对的位置)。因此,启动子序列可包含直至位置-1的核苷酸。然而,来自位置+1的核苷酸不是启动子的一部分,即,在这方面必须注意翻译起始密码子(ATG或AUG)不是启动子的一部分。因此,SEQ ID NO:7或8是包含本发明启动子的多核苷酸。如本文所用的“天然痘病毒启动子”是指痘病毒基因组的内源启动子。“合成痘病毒启动子”意指指导待由痘病毒(例如,CEF细胞中的MVA)表达的核酸转录的重组工程化启动子。术语“26S启动子”是本领域技术人员众所周知的,并且是指甲病毒26S RNA的亚基因组启动子,其通常包含在单个开放阅读框(例如VEEV的衣壳-E3-E2-6K-E1的开放阅读框)中。编码EEV(例如VEEV)的结构蛋白的mRNA通常从复制中间体和26S亚基因组RNA启动子转录。

[0139] 术语“蛋白质”、“肽”、“多肽”和“多肽片段”在本文中可互换使用以指任意长度的氨基酸残基的聚合物。聚合物可以是直链或分支的,其可包含修饰的氨基酸或氨基酸类似物,并且可被氨基酸以外的化学部分中断。这些术语还涵盖已被天然修饰或通过介入修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰(诸如与标记组分或生物活性组分缀合)。

[0140] 当术语“重组”应用于核酸、载体(例如MVA)等时,是指由两个或多个原本异源的核酸序列区段的人工组合而制成的核酸、载体或,或者是指包含两个或多个原本异源的核酸序列区段的这种人工组合的核酸、载体或。人工组合最常见通过使用成熟的基因工程技术对分离的核酸区段进行人工操纵来完成。一般而言,如本文所述的“重组”MVA是指通过标准基因工程方法产生的MVA,即,本发明的MVA因此是基因工程或基因修饰的MVA。术语“重组MVA”因此包括在其基因组中具有稳定整合的重组核酸,优选呈转录单元形式的MVA (例如MVA-BN)。转录单元可包括启动子、增强子、终止子和/或沉默子。本发明的重组MVA可在诱导调控元件后表达异源抗原决定簇、多肽或蛋白质(抗原)。

[0141] 如本文所用,术语“保护性免疫”或“保护性免疫反应”意指疫苗接种的受试者能够控制所完成的疫苗接种所针对的病原体的感染。通常,发展出“保护性免疫反应”的受试者

只会发展出轻微至中度的临床症状,甚至不会出现任何症状。在没有对策的情况下,感染预计会致命,但对某种病原体具有“保护性免疫反应”或“保护性免疫”的受试者不会因感染所述病原体而死亡。

[0142] 如本文所用的术语“参考样品”是指以与感兴趣的样品基本相同的方式进行分析并且其信息与感兴趣的样品的信息进行比较的样品。因此,参考样品提供了允许评价从感兴趣的样品获得的信息的标准。除交换、缺失或添加的一个组分外,参考样品可能与感兴趣的样品相同。

[0143] 术语EEV的“结构蛋白”是指由EEV(例如,如本文所述的WEEV、VEEV或EEEV中的任一种)的RNA编码的结构蛋白/多蛋白。结构蛋白通常由病毒产生,为五种蛋白,即C、E3、E2、6k和E1的结构多蛋白,并且在文献中通常表示为C-E3-E2-6k-E1。E3和6k也被描述为两种糖蛋白E2和E1的膜易位/运输信号。如本文所用的编码“结构蛋白”的核苷酸序列意指编码病毒基因组衣壳化(例如包装)所需的,并且包括衣壳蛋白、E1糖蛋白和E2糖蛋白的蛋白质的核苷酸序列。EEV的“结构多蛋白”是指EEV的多蛋白C-E3-E2-6k-E1。

[0144] 如本文所用的与特定启动子相关的术语“转录水平”或“蛋白质水平”是指在某一时间点存在于体内或样品中的基因/核酸产物的量。转录或蛋白质水平(例如,作为mRNA的核酸转录或从mRNA翻译的蛋白质量)可例如借助例如如由本发明的重组MVA编码的基因/多核苷酸表达的mRNA或蛋白质来确定、测量或量化。基因表达可导致蛋白质的产生,通过RNA聚合酶转录基因以产生含有相同蛋白质编码信息的信使RNA(mRNA),以及核糖体翻译mRNA以产生蛋白质。术语“转录(transcribed)”或“转录(transcription)”是指使用DNA作为模板,通过RNA聚合酶将基因的DNA序列复制到mRNA中的过程。术语“翻译(translated)”或“翻译(translation)”是指使用mRNA中包含的信息作为蓝图合成蛋白质的过程。例如,可通过将样品中存在的感兴趣的mRNA或蛋白质的量与同一样品或参考样品(例如,同时从同一样品中取出)中同一类别的基因产物总量(mRNA或总蛋白质)进行标准化来量化转录或蛋白质水平。转录可借助本领域已知的任何方法测量或检测,例如,用于间接检测和测量感兴趣的基因产物的方法,其通常经由将感兴趣的基因产物与针对感兴趣的基因产物的一种或多种不同的分子或检测手段(例如,引物、探针、抗体、蛋白质支架)结合而起作用。此类方法包括例如RT-PCR和/或定量PCR。蛋白质水平的测定可通过本领域技术人员已知的任何手段测量或检测,例如蛋白质印迹法、ELISA或质谱法。

[0145] 如本文所用,“转录终止子”由参与RNA聚合酶特定终止RNA转录物的DNA序列组成。包含MVA RNA聚合酶的痘苗病毒终止新生RNA中RNA信号(DNA水平上的UUUUUNU、TTTTTNT或T5NT)下游的转录(Earl等人(1990),J.Virol.64:2448-2451)。“转录终止子”在文献中有时被称为“终止信号”,并因此可互换使用。

[0146] 如本文所用,疾病的“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指预防、减轻、改善、部分或完全缓解或治愈疾病,例如EEV引起的疾病。治疗可以是以下一种或多种:减轻疾病的严重程度、限制或预防所治疗疾病的特征症状的发展、抑制所治疗疾病的特征症状的恶化、限制或预防先前患有所述疾病的受试者的疾病复发,以及限制或预防受试者的症状复发。

[0147] 如本文所用,与疫苗或重组MVA组合的“三价”意指疫苗或重组MVA具有针对三种不同病毒的价态,并产生针对那些不同病毒的抗原(例如,结构蛋白或结构多蛋白)的保护性

免疫反应。因此,在本发明的三价MVA疫苗的背景下,三价意指针对三种不同病毒的价态,这些病毒的抗原由MVA疫苗或包含表达编码抗原(例如VEEV、WEEV和EEEV的结构蛋白或结构多蛋白)的核酸的重组MVA的疫苗编码。三价的另一个实例(也涵盖在三价的含义中)是三种不同的病毒是不同的病毒株,例如,除了VEEV或EEEV毒株之外,还有两种WEEV毒株,诸如例如71V-1658和Fleming。在后一种情况下,本发明的重组MVA例如包含编码WEEV 71V-1658、WEEV Fleming和EEEV毒株(例如EEEV V105-00210)的蛋白质(例如结构蛋白、结构多蛋白、包膜蛋白)的核苷酸序列。相比之下,“单价”意指疫苗或重组MVA仅针对特定物种的一种病毒具有效价,诸如仅针对VEEV、仅针对WEEV或仅针对EEEV,并且仅针对一种病毒的一种结构蛋白或结构多蛋白产生保护性免疫反应。但其并不排除针对几种密切相关的病毒亚型产生保护性免疫反应。因此,“二价”意指疫苗或重组MVA针对两种病毒具有效价。

[0148] “载体”是指包含待在体外或体内递送至靶细胞的异源多核苷酸的重组DNA或RNA质粒或病毒。异源多核苷酸可包含用于预防或治疗目的的感兴趣的序列,并且可任选地呈表达盒的形式。如本文所用,载体不需要能够在最终靶细胞或受试者中复制。所述术语包括克隆载体和病毒载体。

[0149] 如本发明上下文中所用的术语“病毒复制子”用于指包含49S病毒基因组RNA的部分的RNA或DNA,这些部分对于转录以及对于运输RNA的细胞质扩增以及对于异源核酸序列的亚基因组RNA表达至关重要。因此,复制子编码并表达病毒RNA细胞质扩增所必需的病毒非结构蛋白。

[0150] 在本发明的上下文中,术语“病毒”或“重组病毒”是指包含病毒基因组的传染性或非传染性病毒。在这种情况下,本文提到的核酸、启动子、重组蛋白和/或表达盒是相应重组病毒的病毒基因组的一部分。将重组病毒基因组包装起来,并且获得的重组病毒可用于感染细胞和细胞系,特别是用于感染包括人在内的活体动物。

[0151] 术语“$TCID_{50}$”是“组织培养感染剂量”的缩写,指在接种的50%细胞培养物中产生病理变化的病原体的量,以$TCID_{50}$/ml表示。用于确定$TCID_{50}$的方法是本领域技术人员众所周知的。其例如描述于例如WO 03/053463的实施例2中。

[0152] 如本文所用的术语“受试者”是活的多细胞脊椎动物,包括例如人、非人哺乳动物和(非人)灵长类动物。术语“受试者”可与术语“动物”互换使用。

[0153] 自扩增RNA

[0154] 目前有两种不同类型的合成RNA疫苗:常规mRNA和自扩增RNA (saRNA)。多项临床前和临床试验已经研究了使用常规mRNA策略(也称为非复制或非扩增mRNA)针对传染病和癌症。体外转录的编码病毒抗原的mRNA已被探索作为疫苗,而编码治疗性蛋白质(诸如抗体或免疫调节剂)的mRNA已被考虑用于免疫疗法。化学修饰核苷酸的掺入、序列优化和不同纯化策略可提高mRNA翻译的效率并降低内在的免疫原性。然而,抗原表达与疫苗接种期间成功递送的常规mRNA转录物的数量成正比。因此,要实现足够的表达以达到保护或免疫调节的目的,可能需要大剂量或重复施用。saRNA疫苗是来源于自复制的单链RNA病毒的基因工程复制子,解决了这一限制。它们可作为病毒复制子颗粒(VRP)来递送,其中saRNA包装到病毒颗粒中,或者作为体外转录后产生的完全合成的saRNA。为了产生复制缺陷的VRP,在产生过程中以反式形式提供包膜蛋白作为有缺陷的辅助构建体。因此,所得VRP在第一次感染后缺乏形成传染性病毒颗粒的能力,并且只有RNA能够进一步扩增。VRP可能来源于正义RNA病

毒和负义RNA病毒,但后者更为复杂,并且需要反向遗传学来拯救VRP。与基因疗法一样,使用病毒载体进行疫苗开发也存在一些相关问题。这些问题包括载体本身的免疫原性,它可引发不合需的免疫反应并阻止使用相同载体进行后续加强施用。对病毒载体的预先存在的免疫也可能使疫苗无效。与减毒活疫苗一样,具有复制能力的甲病毒载体也存在病毒再活化的威胁。为了避免这种情况,saRNA疫苗可以与常规mRNA疫苗类似的方式产生和递送。常用于saRNA疫苗设计的正义甲病毒基因组包括委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus,SINV)和塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus,SFV)。甲病毒复制酶基因编码RNA依赖性RNA聚合酶(RdRP)复合物,其可原位扩增合成转录物。抗原或治疗序列作为单独的实体以高水平表达,并且不需要对免疫原进行进一步的蛋白水解加工。由于其自复制活性,saRNA可以比常规mRNA疫苗更低的浓度递送以实现相当的抗原表达。

[0155] 如上所述,saRNA构建体历史上是由α病毒传递的,诸如委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、塞姆利基森林病毒(SFV)或辛德毕斯病毒。这些saRNA构建体包含四种非结构蛋白、一个亚基因组启动子和感兴趣的基因(替换病毒结构蛋白)。通过缺失病毒结构蛋白,RNA无法产生传染性病毒。非结构蛋白被递送到细胞质后,形成RNA依赖性RNA聚合酶(RDRP),其可复制基因组RNA (整个RNA链)和亚基因组RNA(感兴趣的基因)。四种非结构蛋白中的每一种均在RDRP的形成过程中发挥作用,这是一个复杂且多阶段的过程。这种RNA复制导致的抗原表达比非复制型mRNA更高。

[0156] EEV病毒、蛋白质和核苷酸序列

[0157] EEV是属于披膜病毒(Togaviridae)科的甲病毒。EEV是本领域众所周知的小型有包膜正链RNA病毒。病毒核衣壳被宿主衍生的脂质膜包围,其中嵌入E1和E2异二聚体的包膜蛋白三聚体。核衣壳由包围单链RNA基因组的衣壳蛋白(C)组成。EEV病毒的RNA基因组(49S RNA)长约11-12kb,并且包含5'帽和3'聚腺苷酸化尾,并且进入细胞后立即翻译。基因组的5'区域编码四种非结构蛋白(NSP1、NSP2、NSP3和NSP4)。基因组的3'区编码五种结构蛋白(C、E3、E2、6k、E1),所述结构蛋白以26S亚基因组RNA的结构多蛋白形式表达。编码结构蛋白的mRNA由复制中间体和26S亚基因组启动子转录。蛋白酶切割多蛋白产生成熟的结构蛋白C、E3、E2、6k、E1。核衣壳(C)蛋白具有自身蛋白水解活性,其在核糖体经过C与E3蛋白编码序列之间的连接处后不久,即可将C蛋白从前体蛋白中切割下来。随后,包膜糖蛋白E2和E1由蛋白水解切割衍生,并形成异二聚体。E2最初以前体pE2的形式出现在受感染的细胞中,所述前体由E3和E2组成。在糖基化并经过内质网和高尔基体后,E3在切割位点被弗林样蛋白酶活性从E2中切割下来。

[0158] 减毒活疫苗已经用于美国军队和实验室工作人员中,并且福尔马林灭活疫苗可用于马匹。

[0159] 一种此类减毒活疫苗是TC-83,最初由美国陆军开发用于疫苗用途(Pittman等人,1996)。TC-83是通过在豚鼠心脏细胞中连续传代特立尼达驴(Trinidad Donkey)VEEV毒株而产生的(Alevizatos等人,1967)。E2和5′非翻译区的点突变是TC-83减毒表型的原因(Kinney等人,1993)。TC-83被认为可有效预防人疾病,但15-37.5%的疫苗接受者会发展出发热症状(Berge等人,1961;McKinney等人,1963;Alevizatos等人,1967;Pittman等人,1996),并且只有82%的疫苗接种者在疫苗接种后发生血清转化。5-8年内斑块减少中和滴度保持≥1:20的概率为60%。由于TC-83仅可用作研究用疫苗,并且适用人群有限,因此无

法进行额外研究来评价所述疫苗在人体中随时间推移的免疫原性。这项研究感兴趣的是,在鼻腔感染VEEV-TC-83疫苗株后,C57BL/6(WT)小鼠发展出脑部播散性感染且感染滴度较高,但无死亡(Hart等人,1997;Steele等人,1998;Julander等人,2008;Taylor等人,2012)。

[0160] 应理解,上述任何WEEV、EEEV和/或VEEV的任何组合也涵盖于如本文所述的任何实施方案中。

[0161] 修饰的痘苗病毒安卡拉(MVA)

[0162] 人造减毒修饰的痘苗病毒安卡拉("MVA")是通过在鸡胚成纤维细胞中对尿囊绒毛膜痘苗病毒安卡拉(CVA)株进行超过570次连续传代而产生的(有关综述可参见Mayr,A.,等人Infection 3,6-14(1975))。由于这些长期传代,所得MVA病毒的基因组与其前身CVA相比,缺失了约27千碱基的基因组序列,且因此被描述为高度限制复制到禽类细胞的宿主细胞(Meyer,H.等人,J.Gen.Virol.72,1031-1038(1991),Meisinger等人J.Gen.Virol 88,3249-3259(2007))。在多种动物模型中表明,所得MVA与具有完全复制能力的的起始材料相比无毒(Mayr,A.和Danner,K.,Dev.Biol.Stand.41:225-34(1978))。

[0163] 在本发明的实践中有用的MVA病毒可包括但不限于MVA-572(1994年1月27日作为ECACC V94012707保藏);MVA-575(2000年12月7日作为ECACC V00120707保藏)、MVA-I721(在Suter等人,Vaccine 2009中引用)、NIH克隆1(2003年3月27日作为ATCC®PTA-5095保藏)和MVA-BN(2000年8月30日以编号V00083008保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC))。

[0164] 更优选地,根据本发明使用的MVA包括MVA-BN和MVA-BN衍生物。MVA-BN已在国际PCT公布WO 02/042480中进行了描述。如本文所述,"MVA-BN衍生物"是指任何表现出与MVA-BN基本相同的复制特征但在其基因组的一个或多个部分中表现出差异的病毒。

[0165] MVA-BN以及MVA-BN衍生物不能复制,意味着不能在体内和体外进行生殖复制。更具体地说,在体外,MVA-BN或MVA-BN衍生物已被描述为能够在鸡胚成纤维细胞(CEF)中进行生殖复制,但不能在人角质形成细胞系HaCat(Boukamp等人(1988)J.Cell Biol.106:761-771)、人骨骨肉瘤细胞系143B(ECACC保藏号91112502)、人胚肾细胞系293(ECACC保藏号85120602)和人宫颈腺癌细胞系HeLa(ATCC保藏号CCL-2)中进行生殖复制。另外,MVA-BN或MVA-BN衍生物在Hela细胞和HaCaT细胞系中的病毒扩增率比MVA-575小至少两倍,更优选地小三倍。MVA-BN和MVA-BN衍生物的这些特性的测试和测定描述于WO 02/42480(美国专利申请号2003/0206926)和WO 03/048184(美国专利申请号2006/0159699)中。

[0166] 如先前段落中所述的术语在体外人细胞系中"不能进行生殖复制"或"无生殖复制的能力"例如描述于WO 02/42480中,其还教导了如何获得具有如上所述的所需特性的MVA。所述术语适用于使用WO 02/42480或美国专利第6,761,893号中所述的测定在感染后4天具有小于1的体外病毒扩增率的病毒。

[0167] 病毒在如先前段落中所述的体外人细胞系中的扩增或复制通常表示为由受感染细胞产生的病毒(输出)与最初用于感染细胞的病毒量(输入)的比率,称为"扩增率"。"1"的扩增率定义了一种扩增状态,其中从受感染细胞产生的病毒量与最初用于感染细胞的量相同,意味着受感染细胞允许病毒感染和繁殖。相反,小于1的扩增率,即与输入水平相比输出减少,表明缺乏繁殖复制,且因此病毒减弱。

[0168] 将位点集成到MVA中

[0169] 可将编码一种或多种蛋白质的核苷酸序列插入到病毒或病毒载体的任何合适部

分,特别是重组MVA的病毒基因组中。重组MVA的合适部分是MVA基因组的非必需部分。MVA基因组的非必需部分可以是MVA基因组的基因间区或已知缺失位点1-6。可选地或另外,重组MVA的非必需部分可以是MVA基因组的编码区,其对于病毒生长是非必需的。然而,插入位点不限于MVA基因组中的这些优选插入位点,因为在本发明的范围内可将如本文所述的启动子、表达盒和/或编码一种、两种、三种或更多种蛋白质的核苷酸插入病毒基因组的任何位置,只要有可能获得能在至少一个细胞培养系统中扩增和繁殖的重组体,诸如鸡胚成纤维细胞(CEF细胞)即可。优选地,编码一种、两种、三种或更多种蛋白质的核苷酸序列可插入到MVA的一个或多个基因间区(IGR)中。术语"基因间区"优选指位于MVA病毒基因组的两个相邻开放阅读框(ORF)之间,优选在MVA病毒基因组的两个必需ORF之间的那些病毒基因组部分。在某些实施方案中,IGR选自IGR 07/08、IGR 44/45、IGR 64/65、IGR 88/89、IGR 136/137和IGR 148/149。在某些实施方案中,重组MVA的少于5、4、3或2个IGR包含编码一种或多种蛋白质的核苷酸序列。包含编码一种或多种蛋白质的核苷酸序列的MVA的插入位点数量可以是1、2、3、4、5、6、7或更多。在某些实施方案中,核苷酸序列插入4个、3个、2个或更少的插入位点。优选地,使用两个插入位点,优选地是IGR 44/45和IGR 88/89。在某些实施方案中,使用三个插入位点。优选地,重组MVA包含插入到2或3个插入位点的至少2、3、4、5、6或7个基因。

[0170] 另外或可选地,核苷酸序列可地插入到一个或多个已知缺失位点,即MVA基因组的缺失位点I、II、III、IV、V或VI中术语"已知缺失位点"是指MVA基因组的以下部分:通过相对于衍生MVA的亲本病毒,特别是亲本绒毛尿囊痘苗病毒安卡拉(CVA)的基因组在第516代表征的CEF细胞上连续传代而缺失,例如,如Meisinger-Henschel等人(2007),Journal of General Virology 88:3249-3259中所述。在某些实施方案中,重组MVA的少于5、4、3或2个已知缺失位点包含编码如本文所述的一种、两种、三种或更多种蛋白质的核苷酸序列。

[0171] 本文提供的重组MVA病毒可通过本领域中已知的常规方法产生。获得重组MVA或将外源编码序列插入至MVA基因组中的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,标准分子生物学技术,诸如DNA克隆、DNA和RNA分离、蛋白质印迹分析、RT-PCR和PCR扩增技术的方法描述于Molecular Cloning,A laboratory Manual第2版(J.Sambrook等人,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))中,并且处理和操纵病毒的技术描述于Virology Methods Manual(B.W.J.Mahy等人(编),Academic Press(1996))中。同样,关于MVA的处理、操纵和基因工程的技术和专门知识描述于以下文献中:Molecular Virology:A Practical Approach(A.J.Davison和R.M.Elliott(编),The Practical Approach Series,IRL Press at Oxford University Press,Oxford,UK(1993)(参见例如第9章:Expression of genes by Vaccinia virus vectors))和Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Son,Inc.(1998)(参见例如第16章,第IV部分:"Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector"))。

[0172] 对于本文公开的各种重组MVA病毒的产生,可应用本领域技术人员所知的不同方法。可将待插入至病毒中的DNA序列置于大肠杆菌质粒构建体中,其中插入了与MVA的DNA区段同源的DNA。另外,可将待插入的DNA序列与启动子连接。启动子-基因键联可定位在质粒构建体中,使得启动子-基因键联的两端侧接与DNA序列同源的DNA,所述DNA序列侧接含有非必需基因座的MVA DNA区域。所得质粒构建体可通过在大肠杆菌中的繁殖进行扩增并分

离。可将含有待插入的DNA基因序列的分离质粒转染到例如鸡胚胎成纤维细胞(CEF)细胞培养物中,同时用MVA感染培养物。质粒中的同源MVA DNA与病毒基因组之间的重组可分别产生由于外源DNA序列的存在而修饰的MVA。

[0173] 根据一个优选的实施方案,合适的细胞培养物的细胞,例如CEF细胞可被MVA感染。随后可用包含一个或多个外源或异源基因的第一质粒载体转染受感染的细胞,优选在表达控制元件的转录控制下。如上所阐述,质粒载体还包含能够引导外源序列插入至MVA基因组的所选部分中的序列。任选地,质粒载体还含有一个盒,所述盒包含与痘病毒启动子可操作地连接的标记和/或选择基因。合适的标记或选择基因是例如编码绿色荧光蛋白、β-半乳糖苷酶、新霉素-磷酸核糖基转移酶或其他标记的基因。选择或标记盒的使用简化了产生的重组MVA的鉴定和分离。

[0174] 然而,重组MVA也可通过PCR技术进行鉴定。随后,另一细胞可用如上所述获得的重组MVA感染,并用包含一个或多个第二外源或异源基因的第二载体转染。如果将此基因引入至MVA基因组的不同插入位点中,则第二载体在引导一个或多个第二外源基因整合到MVA基因组中的MVA同源序列方面也不同。在发生同源重组后,可分离包含两个或更多个外来或异源基因的重组病毒。对于将额外的外源基因引入至重组病毒中,感染和转染的步骤可通过使用在先前步骤中分离的重组病毒进行感染和通过使用包含另外一个或多个外源基因的另外的载体进行转染来重复。

[0175] 可选地,如上所述的感染和转染步骤是可互换的,即,可首先用包含外源基因的质粒载体转染合适的细胞,并且然后用MVA进行感染。作为另一替代方案,也可将每个外源基因引入至不同的病毒中,用所有获得的重组病毒共感染细胞,并筛选包括所有外源基因的重组体。第三种替代方案是在体外连接DNA基因组和外源序列,并使用辅助病毒重建重组的痘苗病毒DNA基因组。第四种替代方案是在大肠杆菌或另一种细菌物种中,在作为细菌人工染色体(BAC)克隆的痘苗病毒基因组与线性外源序列之间进行同源重组,所述线性外源序列侧接有与侧接痘苗病毒基因组中的所需整合位点的序列同源的DNA序列。

[0176] 抗原蛋白的表达

[0177] 在某些实施方案中,编码如本文所述例如EBV病毒的蛋白质(疾病相关抗原)的一个、多个或所有核苷酸序列的表达处于一个或多个痘病毒启动子的控制之下。根据本发明的启动子可以是任何合成的或天然的痘病毒启动子。在某些实施方案中,痘病毒启动子是Pr13.5启动子、PrHyb启动子、Pr7.5启动子、杂合早期/晚期启动子、PrS启动子、PrS5E启动子、Pr1328、PrH5m、合成或天然的早期或晚期启动子,或牛痘病毒ATI启动子。合适的启动子进一步描述于WO 2010/060632、WO 2010/102822、WO 2013/189611和WO 2014/063832中。

[0178] 编码疾病相关抗原的核酸能够可操作地连接至表达控制序列。与编码序列可操作地连接的表达控制序列被接合,以使得编码序列的表达在与表达控制序列相容的条件下实现。表达控制序列包括但不限于适当的启动子、增强子、转录终止子、编码蛋白质的开放阅读框开头处的起始密码子、内含子的剪接信号和框内终止密码子。合适的启动子包括但不限于SV40早期启动子、逆转录病毒LTR、腺病毒主要晚期启动子、人CMV立即早期I启动子和各种痘病毒启动子,包括但不限于以下痘苗病毒或MVA衍生启动子:30K启动子、I3启动子、sE/L启动子、Pr7.5K、40K启动子、C1启动子、PrSynIIm启动子、PrLE1启动子、PrH5m启动子、PrS启动子、杂合早期/晚期启动子、PrS5E启动子、PrA5E启动子和Pr4LS5E启动子;牛痘病毒

ATI启动子,或以下禽痘衍生启动子:Pr7.5K启动子、I3启动子、30K启动子或40K启动子。

[0179] 在某些实施方案中,痘病毒启动子选自由以下组成的组:PrS启动子(SEQ ID NO:8)、Pr1328(SEQ ID NO:10)、PrH5m(SEQ ID NO:9.)和Pr13.5启动子(SEQ ID NO:7)。

[0180] 抗原决定簇/蛋白质

[0181] 术语“抗原决定簇”或“抗原蛋白”是指刺激宿主免疫系统产生抗原特异性免疫反应的任何分子,无论是细胞反应还是体液抗体反应。抗原决定簇可包括在宿主中仍然引发免疫反应并且形成抗原的一部分的蛋白质、多肽、抗原蛋白片段、抗原和表位,蛋白质、多肽、抗原蛋白片段、抗原和表位的同源物或变体,包括例如糖基化的蛋白质、多肽、抗原蛋白片段、抗原和表位,以及编码此类分子的核苷酸序列。因此,蛋白质、多肽、抗原蛋白片段、抗原和表位不限于特定的天然核苷酸或氨基酸序列,而是涵盖与天然序列相同的序列以及对天然序列的修饰,诸如缺失、添加、插入和取代。

[0182] 术语“表位”是指抗原上B细胞和/或T细胞单独或与另一种蛋白质,诸如例如主要组织相容性复合物(“MHC”)蛋白或T细胞受体结合响应的位点。表位可由邻接氨基酸或通过蛋白质的二级和/或三级折叠并置的非邻接氨基酸形成。由邻接氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包含至少5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸,但一般少于20个氨基酸,具有独特的空间构象。确定表位的空间构象的方法包括,例如,X射线晶体学和二维核磁共振。参见例如“Epitope Mapping Protocols”in Methods in Molecular Biology,第66卷,Glenn E.Morris,编(1996)。

[0183] 优选地,同源物或变体在核苷酸或氨基酸序列水平上与所参考的蛋白质、多肽、抗原蛋白片段、抗原和表位具有至少约50%、至少约60%或65%、至少约70%或75%、至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常至少约90%、91%、92%、93%或94%、并且甚至更通常至少约95%、96%、97%、98%或99%、最通常至少约99%的同一性。

[0184] 在一些实施方案中,异源核酸编码抗原结构域或抗原蛋白片段而不是整个抗原蛋白。这些片段可以是足以具有抗原性或免疫原性的任何长度。片段可为至少8个氨基酸长,优选10-20个氨基酸,但可更长,诸如例如至少50、100、200、500、600、800、1000、1200、1600、2000个氨基酸长,或其间的任意长度。

[0185] 在一些实施方案中,至少一个编码抗原蛋白片段或其免疫原性多肽的核酸片段被插入到本发明的病毒载体中。在另一个实施方案中,编码不同抗原蛋白的约2-6种不同核酸被插入到一个或多个病毒载体中。在一些实施方案中,可使用各种蛋白质的多个免疫原性片段或亚单位。例如,可从载体表达来自单个蛋白质的不同位点或来自同一毒株的不同蛋白质或来自不同毒株的蛋白质直系同源物的几种不同表位。

[0186] 免疫原性组合物和疾病相关抗原

[0187] 在一个方面,本文提供了免疫原性组合物,其包含重组痘病毒,诸如例如包含编码异源疾病相关抗原的核酸序列的修饰的痘苗病毒安卡拉(MVA)以及编码所述抗原的VRP。

[0188] 在某些实施方案中,异源疾病相关抗原是传染病抗原或肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,异源疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原选自由以下组成的组的:5-α-还原酶、α-胎蛋白(“AFP”)、AM-1、APC、April、B黑色素瘤抗原基因

(“BAGE”)、β-连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、Brachyury、CA-125、胱天蛋白酶-8(“CASP-8”,也称为“FLICE”)、组织蛋白酶、CD19、CD20、CD21/补体受体2(“CR2”)、CD22/BL-CAM、CD23/$F_c\varepsilon$RII、CD33、CD35/补体受体1(“CR1”)、CD44/PGP-1、CD45/白细胞共同抗原(“LCA”)、CD46/膜辅因子蛋白(“MCP”)、CD52/CAMPATH-1、CD55/衰变加速因子(“DAF”)、CD59/保护素、CDC27、CDK4、癌胚抗原(“CEA”)、c-myc、环氧合酶-2(“cox-2”)、在结肠直肠癌基因中缺失(“DCC”)、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法尼基转移酶、成纤维细胞生长因子8a(“FGF8a”)、成纤维细胞生长因子8b(“FGF8b”)、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、G黑色素瘤抗原基因家族(“GAGE-family”)、胃泌素17、胃泌素释放激素、神经节苷脂2(“GD2”)/神经节苷脂3(“GD3”)/神经节苷脂-单唾液酸-2(“GM2”)、促性腺激素释放激素(“GnRH”)、UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2[GlcNAc:Man(α1-6)]β1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V(“GnT V”)、GP1、gp100/Pme117、gp-100-in4、gp15、gp75/酪氨酸相关蛋白-1(“gp75/TRP-1”)、人绒毛膜促性腺激素(“hCG”)、乙酰肝素酶、Her2/neu、人乳腺肿瘤病毒(“HMTV”)、70千道尔顿热休克蛋白(“HSP70”)、人端粒酶逆转录酶(“hTERT”)、胰岛素样生长因子受体-1(“IGFR-1”)、白介素-13受体(“IL-13R”)、诱导型一氧化氮合酶(“iNOS”)、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、黑色素瘤抗原编码家族(“MAGE家族”,至少包括MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3和MAGE-4)、乳腺珠蛋白、MAP17、Melan-A/黑色素瘤抗原被T细胞识别-1(“MART-1”)、间皮素、MIC A/B、MT-MMPs、粘蛋白、睾丸特异性抗原NY-ESO-1、骨连接蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、血小板源性生长因子(“PDGF”)、μPA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、前列腺特异性抗原(“PSA”)、前列腺特异性膜抗原(“PSMA”)、前列腺酸性磷酸酶(“PAP”)、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX-家族、STAT3、STn、TAG-72、转化生长因子-α(“TGF-α”)、转化生长因子-β(“TGF-β”)、胸腺素-β-15、肿瘤坏死因子-α(“TNF-α”)、TP1、TRP-2、酪氨酸酶、血管内皮生长因子(“VEGF”)、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶(“GST”)。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是brachyury。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是PSA。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是CEA。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是MUC-1。在某些实施方案中,肿瘤相关抗原是CEA和MUC-1。

[0189] 在某些实施方案中,异源疾病相关抗原是传染病抗原。在某些实施方案中,传染病抗原是病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原。

[0190] 在某些实施方案中,传染病抗原是病毒抗原。在某些实施方案中,病毒抗原来源于选自由以下组成的组的病毒:腺病毒、虫媒病毒、星状病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、巨细胞病毒(“CMV”)、登革热病毒、埃博拉病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(“EBV”)、口蹄疫病毒、瓜纳瑞托病毒、亨德拉病毒、1型单纯疱疹病毒(“HSV-1”)、2型单纯疱疹病毒(“HSV-2”)、6型人疱疹病毒(“HHV-6”)、8型人疱疹病毒(“HHV-8”)、甲型肝炎病毒(“HAV”)、乙型肝炎病毒(“HBV”)、丙型肝炎病毒(“HCV”)、丁型肝炎病毒(“HDV”)、戊型肝炎病毒(“HEV”)、人免疫缺陷病毒(“HIV”)、流感病毒、日本脑炎病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、传染性软疣病毒、腮腺炎病毒、新城疫病毒、尼帕病毒、诺如病毒、诺瓦克病毒、人乳头瘤病毒(“HPV”)、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒(“RSV”)、鼻病毒、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒、严重急性呼吸综合征病毒(“SARS”)、水痘带状疱疹病毒、天花病毒、西尼罗病毒和黄热病病毒。

[0191] 在某些实施方案中,传染病抗原是细菌抗原。在某些实施方案中,细菌抗原选自由来源于以下细菌的抗原组成的组:炭疽杆菌、百日咳博德特氏菌、伯氏疏螺旋体、流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、鼻疽伯克霍尔德氏菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、产肠毒素大肠杆菌、致病性大肠杆菌、大肠杆菌)157:H7、土拉弗朗西斯菌、嗜血杆菌流感、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋体、单核细胞增多性李斯特菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、绿假单胞菌、立克次体、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌、葡萄球菌尿素、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、梅毒螺旋体、霍乱弧菌和鼠疫耶尔森菌。在某些实施方案中,细菌抗原来源于炭疽杆菌。

[0192] 在某些实施方案中,传染病抗原是真菌抗原。在某些实施方案中,真菌抗原选自由来源于以下真菌的抗原组成的组:棒曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉、皮炎芽生菌、白色念珠菌、都柏林念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、皱褶念珠菌、热带念珠菌、白色隐球菌、格特隐球菌、劳伦隐球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、犬小孢子菌、卡氏肺孢子菌、耶氏肺孢子菌、申克孢子丝菌、卡塔鲁姆菌、须癣、头癣、体癣、体癣股癣、面癣、隐名癣、黑癣、花斑癣、红色毛癣菌和断发毛癣菌。

[0193] 在某些实施方案中,传染病抗原是寄生虫抗原。在某些实施方案中,寄生虫抗原选自由来源于以下寄生虫的抗原组成的组:海鞘虫属物种、巴贝斯虫属物种、浣熊蛔虫、隐孢子虫属物种、卡耶塔环孢子虫、裂头绦虫属物种、麦地那龙线虫、溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫、肠贾第鞭毛虫、蓝氏贾第鞭毛虫、利什曼原虫属物种、恶性疟原虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、日本血吸虫、带绦虫属物种、刚地弓形虫、旋毛虫和克氏锥虫。

[0194] 爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)

[0195] 爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV;也称为人疱疹病毒4,HHV-4)是一种人疱疹病毒。有包膜的dsDNA病毒通过唾液或生殖器分泌物经由口腔途径传播,并且可感染上皮细胞和B细胞,在那里病毒进入由裂解期和潜伏期组成的两阶段生命周期,这两个阶段由复杂的调控来协调。裂解期发生在年轻的、先前未感染的青少年身上时,可导致传染性单核细胞增多症(腺热)。传染性单核细胞增多症是晚期癌症发展的风险因素。EBV与特定形式的癌症相关,诸如霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、胃癌和鼻咽癌。此外,还有证据表明EBV与自身免疫性疾病之间存在联系。

[0196] 非重组和重组痘病毒的产生方法

[0197] 获得重组痘病毒,诸如MVA或将外源编码序列插入痘病毒(例如MVA)基因组中的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,标准分子生物学技术,诸如DNA克隆、DNA和RNA分离、蛋白质印迹分析、RT-PCR和PCR扩增技术的方法描述于Molecular Cloning,A laboratory Manual第2版(J.Sambrook等人,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))中,并且处理和操纵病毒的技术描述于Virology Methods Manual(B.W.J.Mahy等人(编),Academic Press(1996))中。类似地,痘病毒的处理、操纵和基因工程的技术和专门知识描述于以下文献中:Molecular Virology:APractical Approach(A.J.Davison和R.M.Elliott(编),The Practical Approach Series,IRL Press at Oxford University

Press,Oxford,UK(1993),参见例如第9章:Expression of genes by Vaccinia virus vectors);Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Son,Inc.(1998),参见例如第16章,第IV小节:Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector);和Genetic Engineering,Recent Developments in Applications,Apple Academic Press(2011),Dana M.Santos,参见例如,第3章:Recombinant-mediated Genetic Engineering of a Bacterial Artificial Chromosome Clone of Modified Vaccinia Virus Ankara(MVA))。重组MVA的构建和分离也描述于以下文献中:Methods and Protocols,Vaccinia Virus and Poxvirology,ISBN 978-1-58829-229-2(Staib等人),Humana Press(2004),参见例如第7章。

[0198] 本领域技术人员已知用于产生和纯化病毒基材料(诸如病毒载体和/或病毒)的方法。所述方法包括感染合适的细胞培养物(例如,鸡胚成纤维细胞(CEF细胞)或细胞系,诸如DF-1、鸭、MDCK、鹌鹑或鸡衍生的细胞系和EB66细胞)以及随后在本领域技术人员众所周知的合适条件下扩增病毒。尽管优选使用无动物材料(例如细胞培养基)的方法,但是无血清培养条件(例如培养基)以及含血清的培养方法均可用于病毒产生。术语“无血清”培养基是指任何不含来自动物或人来源的血清的细胞培养基。如本文所用,“无动物”是指未在生物体的动物细胞中产生或不由在生物体的动物细胞产生的任何化合物或化合物集合(用于生产和纯化病毒基材料的细胞或细胞系除外)。本领域技术人员已知合适的细胞培养基,这些培养基包含盐、维生素、缓冲液、能量源、氨基酸和其他物质。适用于无血清培养CEF细胞的培养基的实例是培养基199(Morgan、Morton和Parker;Proc Soc.Exp.Biol.Med.1950年1月;73(1):1-8;尤其可从Life Technologies获得)或VP-SFM(Invitrogen Ltd.),其是优选的。例如,在WO 2004/022729中描述了用于在CEF细胞中培养病毒和扩增病毒的无血清方法。病毒材料的产生和纯化的上游和下游过程在WO 2012/010280中有示例性描述。适用于纯化本申请的病毒的进一步方法描述于WO 03/054175、WO 07/147528、WO 2008/138533、WO 2009/100521和WO 2010/130753中。Leon等人描述了在鸭胚衍生细胞(诸如但不限于EB66细胞)中繁殖和纯化重组痘病毒的合适方法(Leon等人(2016),The EB66 cell line as a valuable cell substrate for MVA-based vaccines production,Vaccine 34:5878-5885)。

[0199] 用于产生saRNA的方法

[0200] 常规和合成saRNA疫苗基本上以相同的方式产生。简而言之,编码DNA依赖性RNA聚合酶启动子(通常来源于T7、T3或SP6噬菌体)和RNA疫苗候选物的mRNA表达质粒(pDNA)被设计为体外转录的模板。基因合成平台的灵活性是一个关键优势。对于常规mRNA疫苗,抗原序列或免疫调节序列被5′和3′非翻译区(UTR)侧接。poly(A)尾可从pDNA模板的3’端掺入,也可在体外转录后酶促添加。saRNA疫苗pDNA模板含有额外的甲病毒复制子基因和保守序列原件。非结构蛋白1、2、3和4(nsP1-4)对于复制子活性至关重要,因为所述非结构蛋白形成RdRP复合物。体外转录通常在线性化的pDNA模板或线性DNA片段上进行,通常使用T7 DNA依赖性RNA聚合酶,从而产生多个RNA转录物的副本。5’端被加帽,以实现高效翻译。这通常可通过与合成帽类似物的共转录加帽或通过转录后酶促加帽来完成。RNA的5′端加帽并纯化后,即可进行配制和递送。对于saRNA,通常优选采用与帽类似物共转录加帽的步骤,因为5’帽与常规mRNA不同。

[0201] 然后对RNA产物进行纯化,其可包括去除呈双链dsRNA形式的体外转录副产物的步骤。这些副产物可通过例如双链特异性酶促RNA酶或采用具有特定dsRNA亲和力的材料的色谱法来去除。可使用进一步的色谱或其他纯化步骤来提高RNA产物的纯度和质量,例如亲和纯化、过滤。亲和纯化还可包括polyA特异性树脂,以富集全长和聚腺苷酸化RNA并去除不完整的较短副产物。

[0202] 疫苗和药物组合物

[0203] 由于本文所述的重组MVA病毒的复制受到严格限制,并因此具有高度减毒性,所述病毒是治疗包括人甚至免疫功能低下人在内的多种哺乳动物的理想候选病毒。因此,本文提供了用于在活体动物(包括人)中诱导免疫反应的药物组合物和疫苗。另外还提供了包含编码EBV糖蛋白抗原决定簇的核苷酸序列的重组MVA载体,其用于治疗和/或预防EBV引起的疾病。

[0204] 所述疫苗优选包含本文所述的任何重组MVA病毒,其以溶液形式配制,浓度范围为10^4至$10^9$$TCID_{50}$/ml、$10^5$至5x$10^8$ $TCID_{50}$/ml、10^6至$10^8$$TCID_{50}$/ml或$10^7$至$10^8$$TCID_{50}$/ml。人的优选疫苗接种剂量包括$10^6$至$10^9$$TCID_{50}$,包括$10^6$$TCID_{50}$、$10^7$$TCID_{50}$或$10^8$$TCID_{50}$的剂量。

[0205] 本文提供的药物组合物通常可包含一种或多种药学上可接受的和/或批准的载剂、添加剂、抗生素、防腐剂、佐剂、稀释剂和/或稳定剂。此类辅助物质可以是水、盐水、甘油、乙醇、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。合适的载剂通常是大的、缓慢代谢的分子,诸如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集体等。

[0206] 对于疫苗的制备,本文提供的重组MVA病毒可转化为生理上可接受的形式。这可基于用于针对天花的疫苗接种的痘病毒疫苗的制备经验来实现,如H.Stickl等人,Dtsch.med.Wschr.99:2386-2392(1974)所述。

[0207] 例如,纯化的病毒可在-80℃下储存,滴度为5×$10^8$$TCID_{50}$/ml,配制于约10mM Tris、140mM NaCl pH 7.4中。对于疫苗注射剂的制备,例如,10^2-10^8或10^2-10^9个病毒颗粒可在安瓿(优选玻璃安瓿)中在2%蛋白胨和1%人白蛋白存在下,在100ml的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中冻干。可选地,疫苗注射剂可通过逐步冷冻干燥制剂中的病毒来生产。此制剂可含有额外的添加剂,诸如甘露醇、葡聚糖、糖、甘氨酸、乳糖、聚乙烯吡咯烷酮或其他助剂,诸如适用于体内施用的抗氧化剂或惰性气体、稳定剂或重组蛋白(例如人血清白蛋白)。然后将玻璃安瓿密封并且可在4℃与室温之间储存数月。然而,只要不需要,安瓿优选在低于-20℃的温度下储存。

[0208] 对于疫苗接种或治疗而言,可将冻干物溶解于水溶液,优选生理盐水或Tris缓冲液中,并且全身或局部施用,即肠胃外、皮下、静脉内、肌肉内、鼻内或熟练从业者已知的任何其他施用途径。施用模式、剂量和施用次数可由本领域技术人员按照已知方式进行优化。然而,最常见的情况是患者在第一针疫苗接种后约一个月至六周接种疫苗第二针。

[0209] 使用异源初免-加强方案的组合疫苗

[0210] 本文所述的组合疫苗和方法可用作异源初免-加强方案的一部分。在异源初免-加强中,进行第一次初免疫苗接种,随后进行一次或多次后续加强疫苗接种。

[0211] 根据本发明的MVA和VRP重组病毒载体还可用于异源初免-加强方案,其中一次或多次初始初免疫苗接种用如本文所定义的MVA或VRP载体进行,并且一次或多次后续加加强疫苗接种用初免疫苗接种中未使用的痘病毒载体进行,例如,如果在初免加强中给予本文

定义的MVA载体,则后续加强疫苗接种将是VRP载体,反之亦然。

[0212] 在一个优选实施方案中,初免疫苗接种用VRP载体进行,并且加强疫苗接种用MVA进行。因此,本发明的一个方面涉及一种组合疫苗,其包含:

[0213] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的VRP载体,所述VRP载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0214] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0215] 其中所述第一组合物是初免组合物并且所述第二组合物是加强组合物,优选地其中所述加强组合物包含两个或更多个剂量的所述加强组合物的载体。

[0216] 包含重组MVA和saRNA (VRP)病毒的疫苗和药盒

[0217] 本文还提供了包含本文所述的一种或多种重组VRP和/或MVA的疫苗和药盒。所述药盒可包括一个或多个装有重组MVA或VRP的容器或小瓶,以及向处于传染病风险中的受试者施用重组MVA和VRP的说明书。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,说明书指出重组MVA以单剂量或多(即2、3、4等)剂量施用于受试者。在某些实施方案中,说明书指出重组MVA或VRP病毒在第一次(初免)和第二次(加强)施用中施用于未感染或非未感染受试者。优选地,药盒包括至少两个用于初免/加强免疫接种的小瓶,所述小瓶包含如本文所述的重组VRP,用于在第一个小瓶/容器中进行第一次接种(“初免接种”),以及用于在第二个和/或其他小瓶/容器中进行至少第二次和/或第三次和/或进一步接种(“加强接种”),所述小瓶/容器包含重组MVA。

[0218] 本发明的其他实施方案将由考虑本文公开的本发明的说明书和实施而为本领域技术人员显而易知。意图在于,仅将本说明书和实施例理解为示例性,其中本发明的真实范围和精神由所附权利要求书来指示。

[0219] 实施方案

[0220] 实施方案1是一种疫苗组合,其包含

[0221] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0222] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0223] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0224] 实施方案2是根据实施方案1所述的疫苗组合,其中所述第一组合物用于引发免疫反应并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

[0225] 实施方案3是根据实施方案1所述的疫苗组合,其中所述第二组合物用于引发免疫反应并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

[0226] 实施方案4是根据实施方案1-3中任一项所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是传染病抗原或肿瘤相关抗原。

[0227] 实施方案5是根据实施方案4所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是传染病抗原。

[0228] 实施方案6是根据实施方案5所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原。

[0229] 实施方案7是根据实施方案6所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是病毒抗原。

[0230] 实施方案8是根据实施方案7所述的疫苗组合,其中所述病毒抗原来源于选自由以下组成的组的病毒:腺病毒、虫媒病毒、星状病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、巨细胞病毒(“CMV”)、登革热病毒、埃博拉病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(“EBV”)、口蹄疫病毒、瓜纳瑞托病毒、亨德拉病毒、1型单纯疱疹病毒(“HSV-1”)、2型单纯疱疹病毒(“HSV-2”)、6型人疱疹病毒(“HHV-6”)、8型人疱疹病毒(“HHV-8”)、甲型肝炎病毒(“HAV”)、乙型肝炎病毒(“HBV”)、丙型肝炎病毒(“HCV”)、丁型肝炎病毒(“HDV”)、戊型肝炎病毒(“HEV”)、人免疫缺陷病毒(“HIV”)、流感病毒、日本脑炎病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、传染性软疣病毒、腮腺炎病毒、新城疫病毒、尼帕病毒、诺如病毒、诺瓦克病毒、人乳头瘤病毒(“HPV”)、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒(“RSV”)、鼻病毒、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒、严重急性呼吸综合征病毒(“SARS”)、水痘带状疱疹病毒、天花病毒、西尼罗病毒和黄热病病毒。

[0231] 实施方案9是根据实施方案6所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是细菌抗原。

[0232] 实施方案10是根据实施方案9所述的疫苗组合,其中所述细菌抗原来源于选自由以下组成的组的细菌:炭疽杆菌、百日咳博德特氏菌、伯氏疏螺旋体、流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、鼻疽伯克霍尔德氏菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、产肠毒素大肠杆菌、致病性大肠杆菌、大肠杆菌)157:H7、土拉弗朗西斯菌、嗜血杆菌流感、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋体、单核细胞增多性李斯特菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、绿假单胞菌、立克次体、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌、葡萄球菌尿素、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、梅毒螺旋体、霍乱弧菌和鼠疫耶尔森菌。

[0233] 实施方案11是根据实施方案6所述的疫苗组合,其中所述传染病抗原是真菌抗原。

[0234] 实施方案12是根据实施方案11所述的疫苗组合,其中所述真菌抗原来源于选自由以下组成的组的真菌:棒曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉、皮炎芽生菌、白色念珠菌、都柏林念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、皱褶念珠菌、热带念珠菌、白色隐球菌、格特隐球菌、劳伦隐球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、犬小孢子菌、卡氏肺孢子菌、耶氏肺孢子菌、申克孢子丝菌、卡塔鲁姆菌、须癣、头癣、体癣、体癣股癣、面癣、隐名癣、黑癣、花斑癣、红色毛癣菌和断发毛癣菌。

[0235] 实施方案13是根据实施方案6所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是寄生虫抗原。

[0236] 实施方案14是根据实施方案13所述的疫苗组合,其中所述寄生虫抗原来源于选自由以下组成的组的寄生虫:海鞘虫属物种、巴贝斯虫属物种、浣熊蛔虫、隐孢子虫属物种、卡耶塔环孢子虫、裂头绦虫属物种、麦地那龙线虫、溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫、肠贾第鞭毛虫、蓝氏贾第鞭毛虫、利什曼原虫属物种、恶性疟原虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、日本血吸虫、带绦虫属物种、刚地弓形虫、旋毛虫和克氏锥虫。

[0237] 实施方案15是根据实施方案4所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是肿瘤相关抗原。

[0238] 实施方案16是根据实施方案15所述的疫苗组合,其中所述肿瘤相关抗原选自由以下组成的组:5-α-还原酶、α-胎蛋白(“AFP”)、AM-1、APC、April、B黑色素瘤抗原基因

(“BAGE”)、β-连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、Brachyury、CA-125、胱天蛋白酶-8(“CASP-8”,也称为“FLICE”)、组织蛋白酶、CD19、CD20、CD21/补体受体2(“CR2”)、CD22/BL-CAM、CD23/$F_c\varepsilon$RII、CD33、CD35/补体受体1(“CR1”)、CD44/PGP-1、CD45/白细胞共同抗原(“LCA”)、CD46/膜辅因子蛋白(“MCP”)、CD52/CAMPATH-1、CD55/衰变加速因子(“DAF”)、CD59/保护素、CDC27、CDK4、癌胚抗原(“CEA”)、c-myc、环氧合酶-2(“cox-2”)、在结肠直肠癌基因中缺失(“DCC”)、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法尼基转移酶、成纤维细胞生长因子8a(“FGF8a”)、成纤维细胞生长因子8b(“FGF8b”)、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、G黑色素瘤抗原基因家族(“GAGE-family”)、胃泌素17、胃泌素释放激素、神经节苷脂2(“GD2”)/神经节苷脂3(“GD3”)/神经节苷脂-单唾液酸-2(“GM2”)、促性腺激素释放激素(“GnRH”)、UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2[GlcNAc:Man(α1-6)]β1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V(“GnT V”)、GP1、gp100/Pme117、gp-100-in4、gp15、gp75/酪氨酸相关蛋白-1(“gp75/TRP-1”)、人绒毛膜促性腺激素(“hCG”)、乙酰肝素酶、Her2/neu、人乳腺肿瘤病毒(“HMTV”)、70千道尔顿热休克蛋白(“HSP70”)、人端粒酶逆转录酶(“hTERT”)、胰岛素样生长因子受体-1(“IGFR-1”)、白介素-13受体(“IL-13R”)、诱导型一氧化氮合酶(“iNOS”)、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、黑色素瘤抗原编码基因1(“MAGE-1”)、黑色素瘤抗原编码基因2(“MAGE-2”)、黑色素瘤抗原编码基因3(“MAGE-3”)、黑色素瘤抗原编码基因4(“MAGE-4”)、乳腺珠蛋白、MAP17、Melan-A/黑色素瘤抗原被T细胞识别-1(“MART-1”)、间皮素、MIC A/B、MT-MMPs、粘蛋白、睾丸特异性抗原NY-ESO-1、骨连接蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、血小板源性生长因子(“PDGF”)、μPA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、前列腺特异性抗原(“PSA”)、前列腺特异性膜抗原(“PSMA”)、前列腺酸性磷酸酶(“PAP”)、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX-家族、STAT3、STn、TAG-72、转化生长因子-α(“TGF-α”)、转化生长因子-β(“TGF-β”)、胸腺素-β-15、肿瘤坏死因子-α(“TNF-α”)、TP1、TRP-2、酪氨酸酶、血管内皮生长因子(“VEGF”)、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶(“GST”)。

[0239] 实施方案17是根据实施方案1-8中任一项所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白是EBV的任何结构蛋白和非结构蛋白。

[0240] 实施方案18是根据实施方案17所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A和BRLF1/BZLF1融合物。

[0241] 实施方案19是根据实施方案18所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4编码。

[0242] 实施方案20是根据实施方案1-19中任一项所述的疫苗组合,其中所述saRNA是VRP,优选是VEEV,更优选是TC83。

[0243] 实施方案21是根据实施方案1-19中任一项所述的疫苗组合,其中所述MVA是MVA-BN。

[0244] 实施方案22是根据实施方案20所述的疫苗组合,其中所述第一组合物中的所述VRP包含编码选自由gp350、gH和gL组成的组的抗原蛋白的核酸。

[0245] 实施方案23是根据实施方案22所述的疫苗组合,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3编码。

[0246] 实施方案24是根据实施方案1-23中任一项所述的疫苗组合,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第一组合物用于引发所述免疫反应,并且

所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

[0247] 实施方案25是根据实施方案1-23中任一项所述的疫苗组合,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第二组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

[0248] 实施方案26是根据实施方案1-25中任一项所述的疫苗组合,其中所述加强组合物包含两个或更多个剂量的所述加强组合物的载体。

[0249] 实施方案27是一种药盒,其包括:

[0250] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0251] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0252] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0253] 实施方案28是根据实施方案27所述的药盒,其中所述第一组合物用于引发免疫反应并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

[0254] 实施方案29是根据实施方案27所述的药盒,其中所述第二组合物用于引发免疫反应并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

[0255] 实施方案30是根据实施方案27-29中任一项所述的药盒,其中所述抗原蛋白是传染病抗原或肿瘤相关抗原。

[0256] 实施方案31是根据实施方案30所述的药盒,其中所述疾病相关抗原是传染病抗原。

[0257] 实施方案32是根据实施方案31所述的药盒,其中所述传染病抗原是病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原。

[0258] 实施方案33是根据实施方案32所述的药盒,其中所述传染病抗原是病毒抗原。

[0259] 实施方案34是根据实施方案33所述的药盒,其中所述病毒抗原来源于选自由以下组成的组的病毒:腺病毒、虫媒病毒、星状病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、巨细胞病毒(“CMV”)、登革热病毒、埃博拉病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(“EBV”)、口蹄疫病毒、瓜纳瑞托病毒、亨德拉病毒、1型单纯疱疹病毒(“HSV-1”)、2型单纯疱疹病毒(“HSV-2”)、6型人疱疹病毒(“HHV-6”)、8型人疱疹病毒(“HHV-8”)、甲型肝炎病毒(“HAV”)、乙型肝炎病毒(“HBV”)、丙型肝炎病毒(“HCV”)、丁型肝炎病毒(“HDV”)、戊型肝炎病毒(“HEV”)、人免疫缺陷病毒(“HIV”)、流感病毒、日本脑炎病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、传染性软疣病毒、腮腺炎病毒、新城疫病毒、尼帕病毒、诺如病毒、诺瓦克病毒、人乳头瘤病毒(“HPV”)、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒(“RSV”)、鼻病毒、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒、严重急性呼吸综合征病毒(“SARS”)、水痘带状疱疹病毒、天花病毒、西尼罗病毒和黄热病病毒。

[0260] 实施方案35是根据实施方案32所述的药盒,其中所述传染病抗原是细菌抗原。

[0261] 实施方案36是根据实施方案35所述的药盒,其中所述细菌抗原来源于选自由以下组成的组的细菌:炭疽杆菌、百日咳博德特氏菌、伯氏疏螺旋体、流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、鼻疽伯克霍尔德氏菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭

菌、白喉棒状杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、产肠毒素大肠杆菌、致病性大肠杆菌、大肠杆菌)157:H7、土拉弗朗西斯菌、嗜血杆菌流感、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋体、单核细胞增多性李斯特菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、绿假单胞菌、立克次体、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌、葡萄球菌尿素、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、梅毒螺旋体、霍乱弧菌和鼠疫耶尔森菌。

[0262] 实施方案37是根据实施方案32所述的药盒,其中所述传染病抗原是真菌抗原。

[0263] 实施方案38是根据实施方案37所述的药盒,其中所述真菌抗原来源于选自由以下组成的组的真菌:棒曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉、皮炎芽生菌、白色念珠菌、都柏林念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、皱褶念珠菌、热带念珠菌、白色隐球菌、格特隐球菌、劳伦隐球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、犬小孢子菌、卡氏肺孢子菌、耶氏肺孢子菌、申克孢子丝菌、卡塔鲁姆菌、须癣、头癣、体癣、体癣股癣、面癣、隐名癣、黑癣、花斑癣、红色毛癣菌和断发毛癣菌。

[0264] 实施方案39是根据实施方案32所述的药盒,其中所述传染病抗原是寄生虫抗原。

[0265] 实施方案40是根据实施方案39所述的药盒,其中所述寄生虫抗原来源于选自由以下组成的组的寄生虫:海鞘虫属物种、巴贝斯虫属物种、浣熊蛔虫、隐孢子虫属物种、卡耶塔环孢子虫、裂头绦虫属物种、麦地那龙线虫、溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫、肠贾第鞭毛虫、蓝氏贾第鞭毛虫、利什曼原虫属物种、恶性疟原虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、日本血吸虫、带绦虫属物种、刚地弓形虫、旋毛虫和克氏锥虫。

[0266] 实施方案41是根据实施方案30所述的药盒,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

[0267] 实施方案42是根据实施方案41所述的药盒,其中所述肿瘤相关抗原选自由以下组成的组:5-α-还原酶、α-胎蛋白(“AFP”)、AM-1、APC、April、B黑色素瘤抗原基因(“BAGE”)、β-连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、Brachyury、CA-125、胱天蛋白酶-8(“CASP-8”,也称为“FLICE”)、组织蛋白酶、CD19、CD20、CD21/补体受体2(“CR2”)、CD22/BL-CAM、CD23/$F_c\varepsilon$RII、CD33、CD35/补体受体1(“CR1”)、CD44/PGP-1、CD45/白细胞共同抗原(“LCA”)、CD46/膜辅因子蛋白(“MCP”)、CD52/CAMPATH-1、CD55/衰变加速因子(“DAF”)、CD59/保护素、CDC27、CDK4、癌胚抗原(“CEA”)、c-myc、环氧合酶-2(“cox-2”)、在结肠直肠癌基因中缺失(“DCC”)、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法尼基转移酶、成纤维细胞生长因子8a(“FGF8a”)、成纤维细胞生长因子8b(“FGF8b”)、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、G黑色素瘤抗原基因家族(“GAGE-family”)、胃泌素17、胃泌素释放激素、神经节苷脂2(“GD2”)/神经节苷脂3(“GD3”)/神经节苷脂-单唾液酸-2(“GM2”)、促性腺激素释放激素(“GnRH”)、UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2[GlcNAc:Man(α1-6)]β1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V(“GnT V”)、GP1、gp100/Pme117、gp-100-in4、gp15、gp75/酪氨酸相关蛋白-1(“gp75/TRP-1”)、人绒毛膜促性腺激素(“hCG”)、乙酰肝素酶、Her2/neu、人乳腺肿瘤病毒(“HMTV”)、70千道尔顿热休克蛋白(“HSP70”)、人端粒酶逆转录酶(“hTERT”)、胰岛素样生长因子受体-1(“IGFR-1”)、白介素-13受体(“IL-13R”)、诱导型一氧化氮合酶(“iNOS”)、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、黑色素瘤抗原编码基因1(“MAGE-1”)、黑色素瘤抗原编码基因2(“MAGE-2”)、黑色素瘤抗原编码基因3(“MAGE-3”)、黑色素瘤抗原编码基因4(“MAGE-4”)、乳腺珠蛋白、MAP17、Melan-A/黑色素瘤

抗原被T细胞识别-1(“MART-1”)、间皮素、MIC A/B、MT-MMPs、粘蛋白、睾丸特异性抗原NY-ESO-1、骨连接蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、血小板源性生长因子(“PDGF”)、μPA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、前列腺特异性抗原(“PSA”)、前列腺特异性膜抗原(“PSMA”)、前列腺酸性磷酸酶(“PAP”)、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX-家族、STAT3、STn、TAG-72、转化生长因子-α(“TGF-α”)、转化生长因子-β(“TGF-β”)、胸腺素-β-15、肿瘤坏死因子-α(“TNF-α”)、TP1、TRP-2、酪氨酸酶、血管内皮生长因子(“VEGF”)、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶(“GST”)。

[0268] 实施方案43是根据实施方案27-34中任一项所述的药盒,其中所述抗原蛋白是EBV的任何结构蛋白和非结构蛋白。

[0269] 实施方案44是根据实施方案43所述的药盒,其中所述抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A和BRLF1/BZLF1融合物。

[0270] 实施方案45是根据实施方案44所述的药盒,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4编码。

[0271] 实施方案46是根据实施方案27-45中任一项所述的药盒,其中所述saRNA是VRP,优选是VEEV,更优选是TC83。

[0272] 实施方案47是根据实施方案27-45中任一项所述的药盒,其中所述MVA是MVA-BN。

[0273] 实施方案48是根据实施方案46所述的药盒,其中所述第一组合物中的所述VRP包含编码选自由gp350、gH和gL组成的组的抗原蛋白的核酸。

[0274] 实施方案49是根据实施方案48所述的药盒,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3编码。

[0275] 实施方案50是根据实施方案27-49中任一项所述的药盒,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第一组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

[0276] 实施方案51是根据实施方案27-49中任一项所述的药盒,其用于产生针对传染病或肿瘤相关疾病的保护性免疫反应,其中所述第二组合物用于引发所述免疫反应,并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

[0277] 实施方案52是根据实施方案1-51中任一项所述的药盒,其中所述加强组合物包含两个或更多个剂量的所述加强组合物的载体。

[0278] 实施方案53是根据实施方案1-23中任一项所述的疫苗组合、根据实施方案24-26中任一项所述的供使用的疫苗组合、根据实施方案27-49中任一项所述的药盒、根据实施方案50-52中任一项所述的供使用的药盒,其中用于产生所述重组病毒的所述MVA是MVA-BN病毒或其衍生物,其具有在鸡胚成纤维细胞(CEF)细胞中体外生殖复制的能力,但是不具有在人角质形成细胞系HaCat、人骨肉瘤细胞系143B、人胚肾细胞系293和人宫颈腺癌细胞系HeLa中生殖复制的能力。

[0279] 实施方案54是根据实施方案1-23中任一项所述的疫苗组合、根据实施方案24-26中任一项所述的供使用的疫苗组合、根据实施方案27-49中任一项所述的药盒、根据实施方案50-52中任一项所述的供使用的药盒,其中用于产生所述重组病毒的所述MVA是MVA-BN,其以登录号V00083008保藏在欧洲动物细胞培养物保藏中心(ECACC)。

[0280] 实施方案55是根据实施方案1-23中任一项所述的疫苗组合或根据实施方案27-49

中任一项所述的药盒在制造用于治疗和/或预防传染病的药物组合物或药剂中的用途。

[0281] 实施方案56是一种药物组合物,其包含根据实施方案1-23所述的疫苗组合以及药学上可接受的载剂、稀释剂和/或添加剂。

[0282] 实施方案57是一种在受试者中诱导针对病毒的免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用:

[0283] (a)第一组合物,所述第一组合物包含免疫有效量的saRNA,所述saRNA包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;和

[0284] (b)第二组合物,所述第二组合物包含免疫有效量的MVA载体,所述MVA载体包含编码抗原蛋白的核酸,以及药学上可接受的载剂;

[0285] 其中所述组合物之一是初免组合物,并且另一种组合物是加强组合物。

[0286] 实施方案58是根据实施方案57所述的方法,其中所述第一组合物用于引发免疫反应并且所述第二组合物用于加强所述免疫反应。

[0287] 实施方案59是根据实施方案57所述的方法,其中所述第二组合物用于引发免疫反应并且所述第一组合物用于加强所述免疫反应。

[0288] 实施方案60是根据实施方案57-59中任一项所述的方法,其中所述疾病相关抗原是传染病抗原或肿瘤相关抗原。

[0289] 实施方案61是根据实施方案60所述的方法,其中所述疾病相关抗原是传染病抗原。

[0290] 实施方案62是根据实施方案61所述的方法,其中所述传染病抗原是病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原。

[0291] 实施方案63是根据实施方案62所述的方法,其中所述传染病抗原是病毒抗原。

[0292] 实施方案64是根据实施方案63所述的方法,其中所述病毒抗原来源于选自由以下组成的组的病毒:腺病毒、虫媒病毒、星状病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、巨细胞病毒(“CMV”)、登革热病毒、埃博拉病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(“EBV”)、口蹄疫病毒、瓜纳瑞托病毒、亨德拉病毒、1型单纯疱疹病毒(“HSV-1”)、2型单纯疱疹病毒(“HSV-2”)、6型人疱疹病毒(“HHV-6”)、8型人疱疹病毒(“HHV-8”)、甲型肝炎病毒(“HAV”)、乙型肝炎病毒(“HBV”)、丙型肝炎病毒(“HCV”)、丁型肝炎病毒(“HDV”)、戊型肝炎病毒(“HEV”)、人免疫缺陷病毒(“HIV”)、流感病毒、日本脑炎病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、传染性软疣病毒、腮腺炎病毒、新城疫病毒、尼帕病毒、诺如病毒、诺瓦克病毒、人乳头瘤病毒(“HPV”)、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒(“RSV”)、鼻病毒、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒、严重急性呼吸综合征病毒(“SARS”)、水痘带状疱疹病毒、天花病毒、西尼罗病毒和黄热病病毒。

[0293] 实施方案65是根据实施方案62所述的方法,其中所述传染病抗原是细菌抗原。

[0294] 实施方案66是根据实施方案65所述的方法,其中所述细菌抗原来源于选自由以下组成的组的细菌:炭疽杆菌、百日咳博德特氏菌、伯氏疏螺旋体、流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、鼻疽伯克霍尔德氏菌、类鼻疽伯克霍尔德氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、产肠毒素大肠杆菌、致病性大肠杆菌、大肠杆菌)157:H7、土拉弗朗西斯菌、嗜血杆菌流感、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋

体、单核细胞增多性李斯特菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、绿假单胞菌、立克次体、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌、葡萄球菌尿素、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、梅毒螺旋体、霍乱弧菌和鼠疫耶尔森菌。

[0295] 实施方案67是根据实施方案62所述的方法,其中所述传染病抗原是真菌抗原。

[0296] 实施方案68是根据实施方案67所述的方法,其中所述真菌抗原来源于选自由以下组成的组的真菌:棒曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉、皮炎芽生菌、白色念珠菌、都柏林念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、皱褶念珠菌、热带念珠菌、白色隐球菌、格特隐球菌、劳伦隐球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、犬小孢子菌、卡氏肺孢子菌、耶氏肺孢子菌、申克孢子丝菌、卡塔鲁姆菌、须癣、头癣、体癣、体癣股癣、面癣、隐名癣、黑癣、花斑癣、红色毛癣菌和断发毛癣菌。

[0297] 实施方案69是根据实施方案62所述的方法,其中所述传染病抗原是寄生虫抗原。

[0298] 实施方案70是根据实施方案69所述的方法,其中所述寄生虫抗原来源于选自由以下组成的组的寄生虫:海鞘虫属物种、巴贝斯虫属物种、浣熊蛔虫、隐孢子虫属物种、卡耶塔环孢子虫、裂头绦虫属物种、麦地那龙线虫、溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫、肠贾第鞭毛虫、蓝氏贾第鞭毛虫、利什曼原虫属物种、恶性疟原虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫、日本血吸虫、带绦虫属物种、刚地弓形虫、旋毛虫和克氏锥虫。

[0299] 实施方案71是根据实施方案60所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

[0300] 实施方案72是根据实施方案71所述的方法,其中所述肿瘤相关抗原选自由以下组成的组:5-α-还原酶、α-胎蛋白(“AFP”)、AM-1、APC、April、B黑色素瘤抗原基因(“BAGE”)、β-连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、Brachyury、CA-125、胱天蛋白酶-8(“CASP-8”,也称为“FLICE”)、组织蛋白酶、CD19、CD20、CD21/补体受体2(“CR2”)、CD22/BL-CAM、CD23/F_cεRII、CD33、CD35/补体受体1(“CR1”)、CD44/PGP-1、CD45/白细胞共同抗原(“LCA”)、CD46/膜辅因子蛋白(“MCP”)、CD52/CAMPATH-1、CD55/衰变加速因子(“DAF”)、CD59/保护素、CDC27、CDK4、癌胚抗原(“CEA”)、c-myc、环氧合酶-2(“cox-2”)、在结肠直肠癌基因中缺失(“DCC”)、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法尼基转移酶、成纤维细胞生长因子8a(“FGF8a”)、成纤维细胞生长因子8b(“FGF8b”)、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、G黑色素瘤抗原基因家族(“GAGE-family”)、胃泌素17、胃泌素释放激素、神经节苷脂2(“GD2”)/神经节苷脂3(“GD3”)/神经节苷脂-单唾液酸-2(“GM2”)、促性腺激素释放激素(“GnRH”)、UDP-GlcNAc:R_1Man(α1-6)R_2[GlcNAc:Man(α1-6)]β1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V(“GnT V”)、GP1、gp100/Pme117、gp-100-in4、gp15、gp75/酪氨酸相关蛋白-1(“gp75/TRP-1”)、人绒毛膜促性腺激素(“hCG”)、乙酰肝素酶、Her2/neu、人乳腺肿瘤病毒(“HMTV”)、70千道尔顿热休克蛋白(“HSP70”)、人端粒酶逆转录酶(“hTERT”)、胰岛素样生长因子受体-1(“IGFR-1”)、白介素-13受体(“IL-13R”)、诱导型一氧化氮合酶(“iNOS”)、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、黑色素瘤抗原编码基因1(“MAGE-1”)、黑色素瘤抗原编码基因2(“MAGE-2”)、黑色素瘤抗原编码基因3(“MAGE-3”)、黑色素瘤抗原编码基因4(“MAGE-4”)、乳腺珠蛋白、MAP17、Melan-A/黑色素瘤抗原被T细胞识别-1(“MART-1”)、间皮素、MIC A/B、MT-MMPs、粘蛋白、睾丸特异性抗原NY-ESO-1、骨连接蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、血小板源性生长因子

(“PDGF”)、μPA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、前列腺特异性抗原(“PSA”)、前列腺特异性膜抗原(“PSMA”)、前列腺酸性磷酸酶(“PAP”)、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX-家族、STAT3、STn、TAG-72、转化生长因子-α(“TGF-α”)、转化生长因子-β(“TGF-β”)、胸腺素-β-15、肿瘤坏死因子-α(“TNF-α”)、TP1、TRP-2、酪氨酸酶、血管内皮生长因子(“VEGF”)、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶(“GST”)。

[0301] 实施方案73是根据实施方案57-64中任一项所述的方法,其中所述抗原蛋白是EBV的任何结构蛋白和非结构蛋白。

[0302] 实施方案74是根据实施方案73所述的方法,其中所述抗原蛋白选自gp350、gH、gL、EBNA3A和BRLF1/BZLF1融合物。

[0303] 实施方案75是根据实施方案74所述的方法,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:4编码。

[0304] 实施方案76是根据实施方案57-75中任一项所述的方法,其中saRNA是VRP,优选是VEEV,更优选是TC83。

[0305] 实施方案77是根据实施方案57-75所述的方法,其中所述MVA是MVA-BN。

[0306] 实施方案78是根据实施方案76所述的方法,其中所述第一组合物中的所述VRP包含编码选自由gp350、gH和gL组成的组的抗原蛋白的核酸。

[0307] 实施方案79是根据实施方案78所述的方法,其中所述抗原蛋白由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3编码。

[0308] 实施方案80是根据实施方案57-79中任一项所述的方法,其中在施用所述初免组合物之后1-12周施用所述加强组合物。

[0309] 实施方案81是根据实施方案57-81中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用所述加强组合物两次或更多次。

[0310] 现在将详细参考本发明的示例性实施方案,附图中例示了示例性实施方案的实例。

[0311] 实施例

[0312] 以下详细实施例意图帮助更好地理解本发明。但本发明并不受实施例的限制。本发明的其他实施方案将由考虑本文公开的本发明的说明书和实施而为本领域技术人员显而易知。

[0313] 实施例1:材料和方法

[0314] 重组MVA、VRP(甲病毒复制子颗粒)和腺病毒的构建

[0315] 以下章节描述了重组MVA、Ad和VRP的构建,其包含一个或多个表达爱泼斯坦-巴尔病毒EBV糖蛋白和/或其他EBV蛋白的抗原决定簇的异源核酸。本文所述的所有其他构建体都是使用类似方法制成的。

[0316] MVA-mBN443B(MVA-BN-EBV)的构建

[0317] MVA-BN-EBV(MVA-mBN443B)基于修饰的痘苗安卡拉-巴伐利亚北欧(MVA-BN®)载体,并且编码非结构蛋白EBNA3A和早期反式激活因子BRLF1/BZLF1的融合物以及结构糖蛋白(gp)gH和gL以及具有用于多聚体形成的柔性接头和GCN4多聚化结构域的截短可溶形式的gp350(氨基酸2-434)。对核苷酸序列进行密码子优化并合成,包括启动子序列和克隆所需序列。如果相应的插入位点,即基因间区域(IGR 44/45和IGR 88/89)经由同源重组靶

向插入,则将个别EBV基因克隆到具有与周围MVA序列同源的序列的转移质粒中。

[0318] VRP-BN011(基于甲病毒复制子颗粒的重组疫苗)的构建

[0319] 重组甲病毒复制子颗粒VRP-BN011是编码三种EBV抗原的多价重组VRP。VRP-BN011由来源于VEEV TC83减毒株的复制子组成,所述复制子表达具有用于多聚体形成的GCN4多聚化结构域的可溶性截短gp350(氨基酸2-434)、gH和gL蛋白。其基础是VEEV的TC83疫苗株的序列,其中VEEV病毒外壳cap-env多蛋白序列被缺失并被EBV的所列基因替换。三个EBV基因编码在一个多蛋白上,个别序列之间有2A肽。T2A和P2A肽序列插入三个EBV编码序列(无终止密码子的EBV gp350-GCN4和gH)之间,以产生单独的蛋白质,从而在延长的蛋白质链中诱导缺失的肽键。此外,在gH编码序列的下游插入一个弗林蛋白酶切割位点,以将P2A序列与成熟gH蛋白的C末端切断。对序列进行密码子优化病合成,包括克隆所需序列。VRP原液通过用三个质粒(CMV启动子驱动的包装质粒,编码cap或env和CMV启动的重组复制子(质粒上带有EBV基因))转染HEK293T细胞来制备。收获上清液并应用于蔗糖垫纯化。通过感染Vero细胞,并且随后使用dsRNA特异性小鼠单克隆抗体(J2,Jena Bioscience)对双链RNA(dsRNA)复制中间体进行染色,在几个稀释步骤中对VRP原液进行滴定,并通过FACS进行分析。

[0320] AdC68gp350(基于腺病毒载体的重组疫苗)的构建

[0321] 腺病毒载体(AdC68)表达具有用于多聚体形成的柔性接头和多聚化结构域的截短可溶形式的EBV gp350蛋白(AdC68gp350)。

[0322] Luminex多重酶联免疫吸附试测定(ELISA)

[0323] 通过多重ELISA对NHP血清样品中针对EBV抗原gp350、gH/gL/gp42复合物和gH特异性的IgG抗体进行量化。出于此目的,将Luminex磁性微球根据制造商的说明(xMAP®抗体偶联试剂盒,Luminex)与gp350蛋白、gH/gL复合物或gH蛋白偶联。由于每个微球都是唯一可寻址的,因此可在同一个孔中对同一样品同时进行多个免疫测定。简而言之,为了检测针对EBV抗原gp350、gH/gL/gp42复合物和gH血清特异性的NHP IgG抗体,将其与抗原偶联微球一起孵育。根据预期的抗体水平测试不同的血清稀释度(1:200-1:20000)。另外,分析中还包括一个标准品(人血清,从BioIVT购买,批号BRH1079042)。洗涤步骤后,将检测试剂(检测抗体:山羊F(ab')2抗人IgG-Fc,PE缀合,预吸收,Abcam,目录号98596)与抗体结合微球一起孵育。额外的洗涤步骤后,分别使用Luminex®200™系统和Luminex Xponent 3.1软件对多重ELISA板进行测量和分析。

[0324] 中和测试

[0325] 通过基于流式细胞术的中和测试对NHP血清样品中的EBV特异性中和抗体进行量化。简而言之,制备2倍系列稀释的测试血清,并向每个血清稀释液中添加限定量的EBV。1小时后,将血清-病毒混合物添加到Ramos细胞中。受感染的Ramos细胞表达EBV蛋白。第二天,用DAPI和单克隆EBV特异性抗体对细胞进行染色。使用LSR Fortessa流式细胞仪分析EBV阳性细胞的百分比。含有中和抗体的血清样品会导致EBV阳性细胞百分比降低。相反,不含中和抗体的血清样品显示出抗EBV染色细胞的最高百分比。未感染的“仅细胞”孔用于设置EBV阳性的门。使用GraphPad Prism软件利用EBV阳性细胞的百分比来计算IC50滴度。

[0326] 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0327] 测定了血清中OVA特异性IgG。ELISA是通过用5μg/ml OVA包被96孔板,随后用含有

5% FCS/0.05% Tween20的PBS封闭来进行的。使用HRP缀合抗体,随后用TMB底物检测IgG。在450nm处测量吸光度。使用线性回归分析测定ELISA滴度并计算Log10滴度。

[0328] 实施例2:实验设计

[0329] 本分析的目的是评价和比较不同的初免-加强疫苗接种方案诱导的血清EBV特异性IgG和中和抗体,所述方案使用MVA-BN-EBV、VRP-BN011和AdC68gp350,肌肉内施用给食蟹猴(食蟹猕猴)两次,间隔四周。

[0330] 十二只雌性食蟹猴在给药阶段的第1天和第29天经由肌肉注射(在右大腿)施用三种不同的疫苗。6周后进行终末尸检。

[0331] 表1总结了相应疫苗施用的主要研究设计。为了确定抗体的免疫原性,分别使用多重ELISA和基于流式细胞术的测定测定了EBV抗原gp350的EBV特异性IgG以及EBV中和抗体。对剂量前、第二次施用前和施用后两周(第29天、第43天)的非人灵长类动物(NHP)血清样品进行了分析。

[0332] 表1:主要研究设计和小组分配。

[0333]

组号	测试项目				施用途径	雌性数量	尸检后6周
	剂量/第一次施用第1天	剂量体积	剂量/第二次施用第29天	剂量体积			
1	MVA-BN-EBV ($5x10^8$ $TCID_{50}$)	0.5 mL	MVA-BN-EBV ($5x10^8$ $TCID_{50}$)	0.5 mL	IM	3	3
2	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	MVA-BN-EBV ($5x10^8$ $TCID_{50}$)	0.5 mL	IM	3	3
3	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	IM	3	3
4	VRP-BN011 ($6.86x10^9$ TU)	2 mL	AdC68gp350 ($1x10^{11}$ vp)	0.5 mL	IM	3	3

[0334] 实施例3:结果和结论

[0335] 在后续章节中,使用了以下缩写:

[0336] AdC68gp350 腺病毒载体(AdC68)表达具有用于多聚体形成的柔性接头和多聚化结构域的截短可溶形式的EBV gp350蛋白

EBV 爱泼斯坦-巴尔病毒

[0337] ELISA 酶联免疫吸附测定

[0338] GCN4 基于酵母蛋白GCN4衍生的亮氨酸拉链的多聚化结构域

[0339] gH EBV的糖蛋白H

[0340] gH/gL/gp42复合物 EBV gH/gL/gp42复合物

[0341] gL EBV的糖蛋白L

[0342] gp350 EBV糖蛋白350(此处使用了包含氨基酸2-434的可溶型式)

[0343] Inf.U 感染单位

[0344] IgG 免疫球蛋白G

[0345] IC50 半数最大抑制浓度

[0346] IM 肌肉内

[0347] LLOQ 量化下限

[0348] MVA-BN 修饰的痘苗安卡拉-巴伐利亚北欧

[0349] MVA-BN-EBV 编码非结构蛋白EBNA3A和早期转录激活因子BRLF1/BZLF1的融合物以及结构糖蛋白(gp)gH和gL以及具有用于多聚体形成的柔性接头和多聚化结构域的截短可溶形式的gp350(氨基酸2-434)的MVA-BN载体

[0350] NHP 非人灵长类动物

[0351] SOP 标准操作程序

[0352] VRP-BN011 含有VEEV-TC83衍生的复制子的重组VRP-BN,所述复制子编码用VEEV-TC83衍生的包膜和衣壳蛋白进行包装的具有用于形成多聚体的柔性接头和GCN4多聚化结构域的EBV可溶性gp350(氨基酸2-434)、gH和gL

[0353] TU 转导单位

[0354] 实施例4:NHP中的Gp350特异性IgG抗体反应

[0355] EBV gp350特异性组几何平均浓度(GM)绘示于表2和图2中。量化下限(LLOQ)定义为40EU。低于40EU的血清样品报告为阴性,为20EU,对应于LLOQ的一半。

[0356] 所有组(第1至4组)的剂量前血清样品均为阴性。

[0357] 在第29天(首次施用后4周),几乎所有组的NHP均已检测到通过多重ELISA测定的完全血清转化。在第1组(MVA/MVA)中,三只动物中只有一只产生了可测量的gp350特异性IgG。在第29天,第2组(VRP/MVA)和第4组(VRP/Ad)测得的gp350特异性IgG浓度最高,GM分别为3563、3891和3731。

[0358] 在第43天(第二次施用后2周),也观察到第1组(MVA/MVA)的完全血清转化。与第29天的相应抗体浓度相比,第二次施用使第3组(VRP/VRP)的gp350特异性抗体反应加强到4倍,并且使第2组(VRP/MVA)的gp350特异性抗体反应加强到7倍。第2组的gp350特异性IgG反应最高,GM为26.626(个体浓度范围为14.406至71453),其次是第3组(VRP/VRP)和第4组(VRP/Ad),GM分别为4800(个体浓度范围为1180至15.032)和GM为6090(个体浓度范围为5179至7225)。

[0359] 这些结果表明,VRP在与Ad或MVA的异源组合作为加强疫苗接种时强烈增加了gp350特异性抗体反应,并且MVA或VRP的同源组合在gp350特异性抗体诱导方面具有最小的免疫原性作用。

[0360] 表2:多重ELISA测定的gp350特异性IgG抗体浓度总结

[0361]

	组 1			组 2			组 3			组 4		
	MVA/MVA			VRP/MVA			VRP/VRP			VRP/Ad		
时间	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]
剂量前	0	20	3	0	20	3	0	20	3	0	20	3
第 29 天	100	40	3	100	3891	3	100	1110	3	100	3731	3
第 43 天	100	2072	3	100	26626	3	100	4800	3	100	6090	3

[0362] [1]:%血清转化率,[2]:几何平均浓度,[3]:NHP数量

[0363] 实施例5:NHP中的EBV特异性中和抗体反应

[0364] 通过基于流式细胞术的中和测试在每组所有剂量前、第29天和第43天血清样品中测量了EBV特异性中和抗体反应。中和组几何平均浓度(GM)绘示于表3和图3中。LLOQ定义为半数最大抑制浓度(IC50)为30。IC50低于30的血清样品的报告结果为阴性,IC50为15,对应于LLOQ的一半。

[0365] 所有组(第1至4组)的剂量前血清样品均为阴性。

[0366] 在第29天(首次施用后4周),第2组(VRP/MVA)和第3组(VRP/VRP)的三只动物中有两只测得血清转化率,并且第4组(VRP/Ad)检测到100%血清转化率。第1组(MVA/MVA)的动物此时未发生血清转化。总体而言,第29天时,所有血清转化动物的中和抗体浓度(与相应初免疫苗接种无关)都很低(GM<50)。

[0367] 在第43天(第二次施用后2周),除第1组(MVA/MVA)外,所有组均观察到完全血清转化,其中三只动物中只有两只发展出可测量的中和抗体。

[0368] 第二次施用使第2组(VRP/MVA)的中和抗体水平加强到14倍。加强作用最不显著的是第1组(MVA/MVA;3倍)、第3组(VRP/VRP;4倍)和第4组(VRP/Ad;4倍)。第2组(VRP/MVA)测得的最高中和浓度为GM 605(个体浓度范围为372至1572)。第4组(VRP/Ad)、第3组(VRP/VRP)和第1组(MVA/MVA)的中和抗体水平最低,分别是GM为176(个体浓度范围为145至219)、GM为118(个体浓度范围为31至256)和GM为49(个体浓度范围为15至214)。

[0369] 这些结果与通过多重ELISA测量的gp350特异性IgG反应相关:VRP强烈加强了异源初免-加强组合中的中和抗体反应。使用MVA或VRP的同源初免-加强方案的免疫原性最低。

[0370] 表3:中和抗体总结

[0371]

	组 1			组 2			组 3			组 4		
	MVA/MVA			VRP/MVA			VRP/VRP			VRP/Ad		
时间	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]	%[1]	GM[2]	N[3]
剂量前	0	15	3	0	15	3	0	15	3	0	15	0
第 29 天	0	15	3	67	42	3	67	29	3	100	48	100
第 43 天	67	49	3	100	605	3	100	118	3	100	176	100

[0372] [1]:%血清转化率,[2]:几何平均浓度,[3]:NHP数量

[0373] 综上所述,以VRP为初免疫苗接种、MVA为加强疫苗接种的异源初免-加强免方案在gp350特异性IgG和中和抗体方面具有较高的免疫原性,而MVA或VRP同源疫苗接种方案的免疫原性作用最小。独立于候选疫苗的单次疫苗接种不足以诱导强烈的中和抗体反应。

[0374] 实施例6:NHP中的EBV特异性T细胞反应

[0375] 通过ELISPOT在每组所有剂量前、第29天和第43天血液PBMC样品中测量了EBV特异性T细胞反应。每$1x10^{6}$个PBMC的斑点形成单位(SFU)绘示于图4中。

[0376] 除第4组外,各组(第1至3组)的剂量前血清样品均低于LLOQ。

[0377] 首次施用后第8天,所有4组均显示出可检测到的Gp350特异性T细胞反应,并且各组之间没有明显差异。第二次疫苗接种没有进一步增强第1组(MVA/MVA)、第3组(VRP/VRP)和第4组(VRP/Ad)中的Gp350特异性T细胞反应,但第2组(VRP/MVA)除外,其显示每$1x10^{6}$个PBMC的SFU进一步增加(图4)。这些数据表明,VRP/MVA异源免疫接种不仅在抗体诱导方面表现出色,而且还能产生最高的EBV特异性T细胞反应。

[0378] 实施例7:小鼠中的EBV特异性T细胞反应

[0379] 为了评估T细胞免疫原性,在第0天和第21天使用同源或异源组合的MVA-EBV或VRP-EBV对小鼠进行初免/加强免疫接种(见表4)。实验在加强2周后终止。

[0380] 表4:小鼠VRP-EBV/MVA-EBV初免/加强研究设计

[0381]

初免(第 0 天)	加强(第 21 天)
PBS	PBS
MVA-EBV	MVA-EBV
VRP-EBV	MVA-EBV
VRP-EBV	VRP-EBV

[0382] 在此实验之前,已使用肽库筛选方法鉴定了Gp350内的免疫优势肽。其中3种肽(称为肽1、肽25和肽26)已被鉴定在免疫接种后能被T细胞高效识别(数据未示出)。因此,在以下报告的实验中,这三种肽用于ELISPOT和6h再刺激测定。图5显示MVA/MVA或VRP/VRP的同源免疫接种几乎没有诱导对EBV的T细胞反应。与此相反,用VRP,随后用MVA进行异源免疫接种,大大增加了SFU/1x10^6个脾细胞的数量,指示词免疫接种方案具有强烈的EBV特异性T细胞诱导作用。值得注意的是,肽25和26相对于肽1具有优势。

[0383] 实施例8:小鼠中的OVA特异性T细胞反应

[0384] 为了研究VRP与MVA平台异源组合的优势是否也延伸至EBV以外的其他抗原,设置了另一项实验。在本实验中,选择模型抗原卵清蛋白(OVA)并且使用MVA-OVA和VRP-OVA用于免疫接种(见表5)。为了评估T细胞免疫原性,在第0天和第21天使用同源或异源组合的MVA-OVA或VRP-OVA对小鼠进行初免/加强免疫接种(见表5)。实验在加强2周后终止。

[0385] 表5:小鼠VRP-OVA/MVA-OVA初免/加强研究设计

[0386]

初免(第 0 天)	加强(第 21 天)
PBS	PBS
MVA-OVA	MVA-OVA
VRP-OVA	VRP-OVA

[0387]

VRP-OVA	MVA-OVA

[0388] 主要读出是加强免疫接种五天后外周血中的CD8 T细胞反应,并在小鼠处死当天(加强后4周)对脾细胞进行针对OVA优势和亚优势表位的肽再刺激。

[0389] 加强五天后,当将各组分为同源治疗和异源治疗时,异源治疗显示出最强烈的反应(图6)。此时,VRP-OVA同源治疗显示出比同源MVA-OVA治疗(MVA/MVA)更高的反应趋势,但这并不具有统计学意义。相比之下,用MVA-OVA免疫接种加强初始VRP-OVA免疫接种后,与MVA/MVA治疗和VRP/VRP治疗相比,加强5天后血液中OVA特异性CD8 T细胞的扩增显著更强(图6)。

[0390] 加强四周后,在脾细胞中测试了早期记忆反应。为此,用OVA257-264SIINFEKL肽以及OVA55-62亚优势肽再刺激脾细胞。如图7所示,VRP-OVA初免免疫接种与MVA-OVA加强免疫接种的组合对OVA257-264肽和OVA55-62肽均产生了最强的反应。

[0391] 有趣的是,虽然所有治疗组合都可自行诱导OVA257-264肽特异性反应,但对亚优势OVA55-62肽的反应仅在异源组合组中可检测到。这表明,将VRP-OVA初免免疫接种与MVA-OVA加强免疫接种相结合,不仅可产生更强的免疫反应,而且可产生更广泛的免疫反应,这是同源治疗本身很难实现的。

[0392] 实施例9:小鼠中的OVA特异性CD8 T细胞反应

[0393] 此外,还测试了VRP-OVA和MVA-OVA平台的同源或异源组合诱导的OVA特异性抗体

产生。为了评估抗体免疫原性,在第0天和第21天使用同源或异源组合的MVA-OVA或VRP-OVA对小鼠进行初免/加强免疫接种(见表5)。初免和加强免疫接种后14天,分别于第14天和第35天在血清中测量抗体产生。如图8所示,用VRP-OVA免疫接种的小鼠获得了最高的总IgG滴度和第14天的完全血清转化,而MVA-OVA免疫接种的小鼠显示出稍弱的抗体反应。加强免疫接种(第35天)后,所有治疗组的OVA特异性抗体水平均升高并显示完全血清转化,但是,使用MVA-OVA免疫接种加强VRP-OVA初免免疫接种具有明显益处。

[0394] 综上所述,VRP-OVA初免免疫接种与MVA-OVA加强免疫接种的结合增强了外周血中抗原特异性CD8+T细胞扩增,并且增加了对优势和亚优势OVA表位的抗原特异性CD8+T细胞定性反应。在抗体诱导方面也观察到了异源VRP/MVA免疫接种的益处。

[0395] 实施例10:小鼠中的Gp350特异性T细胞反应

[0396] 到目前为止,上述实验都是使用基于委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)的VRP进行的。然而,VRP也可基于其他甲病毒。因此,产生了基于塞姆利基森林病毒(SFV)的VRP,以研究这种类型的VRP是否也能有效诱导免疫反应,或者它是否比基于VEEV的VRP更具免疫原性。为此,测试了表达EBV抗原gp350、gH和gL的基于SFV的VRP(SFV-VRP-EBV)的免疫原性。

[0397] 为了评估T细胞免疫原性,在第0天和第21天使用同源或异源组合的MVA-EBV或SFV-VRP-EBV对小鼠进行初免/加强免疫接种(见表6)。实验在加强2周后终止。

[0398] 表6:小鼠SFV-VRP-EBV/MVA-EBV初免/加强研究设计

[0399]

初免(第 0 天)	加强(第 21 天)
PBS	PBS
MVA-EBV	MVA-EBV
SFV-VRP-EBV	MVA-EBV
SFV-VRP-EBV	SFV-VRP-EBV

[0400] 在此实验之前,已使用肽库筛选方法鉴定了Gp350内的免疫优势肽。其中3种肽(称为肽1、肽25和肽26)已被鉴定在免疫接种后能被T细胞高效识别(数据未示出)。因此,在以下报告的实验中,这三种肽用于ELISPOT和6h再刺激测定。图9显示MVA/MVA的同源免疫接种几乎没有诱导对EBV的T细胞反应。与此相反,SFV-VRP引发了对EBV的高EBV特异性T细胞反应(图9)。重要的是,用SFV-VRP,随后用MVA进行异源免疫接种,大大增加了SFU/1x10^6个脾细胞的数量,指示词免疫接种方案具有强烈的EBV特异性T细胞诱导作用。值得注意的是,肽25和26相对于肽1具有优势。

[0401] 总之,基于委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)或塞姆利基森林病毒(SFV)的VRP异源免疫接种是对疫苗编码抗原特异的T细胞的有效诱导剂。

[0402] 序列

[0403] SEQ ID NO:1gp350多聚体的核酸序列(1455个核苷酸)。

[0404] atggaagcagctctgctcgtgtgccagtacaccatccagagcctgatccacctgacaggagaggatcctggcttcttcaacgtggaaatcccagagtttcccttctaccctacctgcaacgtgtgcacagccgacgtgaacgtgaccatcaacttcgacgttggaggcaagaagcaccagctggacctggatttcggacagctgacacctcacaccaaggctgtgtatcagcctagaggagcctttggtggcagcgagaacgccaccaacctgtttctgctggaactgcttggagctggcgagctcgcactgaccatgagaagcaagaaactgcccatcaatgtgaccacaggcgaggaacagcaggtgtccctggaaagcgtggacgtgtactttcaagacgtgttcggcaccatgtggtgccaccacgccgagatgcagaaccctg

tgtacctgatcccagagacagtgccctacatcaagtgggacaactgcaacagcaccaacatcacagccgtcgtgag
agctcagggactggatgtgacactgcctctgagcctgcctaccagtgcccaggacagcaacttcagcgtgaagacc
gagatgctgggcaacgagatcgacatcgagtgcatcatggaagatggcgagatcagccaggtgctgcctggcgaca
acaagttcaacatcacatgcagtggctacgagagccacgtgccatctggaggcatcctgaccagcacaagcccagt
ggccacacccatccctggcacaggctacgcctacagcctgagactgacacccagacccgtgtccagattcctgggc
aacaacagcatcctgtacgtgttctactctggcaacggacccaaggcctctggtggcgattactgtatccagagca
acatcgtgttcagcgacgagatccctgccagccaggacatgccaaccaataccaccgacatcacctacgtgggaga
caatgccacctacagcgtgcccatggtcacctccgaggacgccaacagccctaatgtgaccgtgacagccttctgg
gcatggcctaacaacaccgagacagacttcaagtgcaagtggaccctgacctctggcacacctagtggctgcgaga
atatcagcggagccttcgccagcaaccggaccttcgatatcaccgtgtctggccttggcacagctcccaagaccct
gatcatcaccaggactgccaccaatgccacaaccacaacccacaaagtgatcttcagcaaggctcctgagagcacc
acaactagtcctacactgcctaagcccagcacacctcctggcagctcttgtggaggcatgaaagtgaagcagctgg
tggacaaggtggaagaactgctgagcaagaactaccacctcgtgaatgaggtggcacggctcgtgaagctcgtggg
agaaagaggtggctgatag

[0405] SEQ ID NO:2gH的核酸序列(2121个核苷酸)。

[0406] atgcagctgctgtgcgtgttctgcctggtgctgctgtgggaagtgggagctgccagcctgagcgaagt
gaagctgcacctggacatcgagggccacgccagccactacaccatcccttggacagagctgatggccaaggtgcct
ggactgtctcctgaagctctgtggcgagaagccaacgtgaccgaggatctggcttccatgctgaaccggtacaagc
tgatctacaagaccagcggaaccctgggaatcgctctggcagagcctgtggatatccctgctgtgtctgagggcag
catgcaggtggacgccagcaaagtgcacccaggagtgatcagcggactgaatagtcctgcctgtatgctgagcgct
cctctggaaaagcagctgttctactacatcggcaccatgctgcctaacaccagaccccacagctacgtgttctacc
agctgcggtgccacctgagctacgtcgctctgagcatcaacggagacaagttccagtacaccggagctatgaccag
caagttcctgatgggtacctacaagagagtgaccgagaagggagacgaacacgtgctgagcctggtgttcggcaag
accaaggacctgcctgacctgagaggacccttcagctaccctagcctgacaagcgctcagagcggagactacagcc
tcgtgatcgtgaccaccttcgtgcactacgccaacttccacaactacttcgtgcccaacctgaaggacatgttcag
cagagccgtgaccatgacagctgccagctacgccagatacgtgctgcagaaactggtgctgctggaaatgaaggga
ggatgcagagagcctgagctggacaccgagacactgacaaccatgttcgaggtgtccgtggccttcttcaaagtgg
gacacgctgtgggagagacaggcaatggctgtgtggacctgagatggctggccaagagcttcttcgagctgaccgt
gctgaaggatatcattggcatctgctacggagccaccgtgaagggcatgcagagctacggactggaaagactggca
gctatgctgatggctaccgtgaagatggaagaactgggacacctcaccacagagaagcaggaatacgctctgagac
tggccaccgtgggctatcctaaagctggagtgtactccggactgatcggtggagctacaagcgtgctgctgagtgc
ctacaaccgacaccctctgttccagcctctgcacaccgtgatgagagagacactgttcatcggaagccacgtggtg
ctgcgagagctgagactgaatgtgaccacacagggacctaacctggctctgtatcagctgctgagcaccgctctgt
gtagcgctctggagatcggagaggtgctgagaggactggctctgggcacagagagcggactgttcagcccttgcta
cctgagcctgagattcgacctgaccagagacaagctgctgtccatggctcctcaggaagccacactggatcaggca
gccgtgtccaacgctgtggatggctttctgggacgactgtcactggaaagagaggacagggacgcctggcatctgc
ctgcctataagtgcgtggaccgactggacaaggtgctgatgatcattcccctgatcaatgtgaccttcatcatcag
ctccgaccgagaggtgcgaggcagtgccctgtatgaagccagcaccacatacctgagcagcagcctgttcctgagc
cctgtgatcatgaacaagtgcagccagggagctgtggctggagagcctagacagatccccaagatccagaacttca

cccgaacccagaagtcctgcatcttctgtggcttcgctctgctgtcctacgacgagaaagagggactggaaaccac
cacctacatcaccagccaggaagtgcagaacagcatcctgtccagcaattacttcgacttcgacaacctgcatgtg
cactacctgctgctgaccacaaacggcacagtgatggaaatcgctggactgtacgaggaacgagctcatgtggtgc
tggccatcatcctgtactttatcgcctttgctcttgggatcttcctggtgcacaagatcgtgatgttcttcctgtga

[0407] SEQ ID NO:3gL的核酸序列(414个核苷酸)。

[0408] atgagagccgtgggagtgttcctggccatctgcctcgtgaccatcttcgtgctgcccacctggggtaa
ctgggcttacccttgttgccacgtgacccagctgagagcccagcatctgctggcactggagaacatcagcgacatc
tacctggtgtccaaccagacctgcgacggcttcagcctggcatccctgaacagtcccaagaacggcagcaatcagc
tcgtgatctccagatgtgccaacggactgaacgtggtgtccttcttcatctccatcctgaagcggagcagcagcgc
tctgacaggccacctgagagagctgctgaccaccctggaaaccctgtacggcagcttcagcgtggaagatctgttc
ggagccaacctgaacagatacgcctggcacagaggaggctga

[0409] SEQ ID NO:4BZLF1-BRLF1的核酸序列(2283个核苷酸)。

[0410] atgagcctggtgtccgactactgcaacgtgctgaacaaagagttcacagctggcagcgtggaaatcac
tctgcggagctacaagatctgcaaggccttcatcaacgaggccaaggctcatggcagagaatggggtggactgatg
gccaccctgaacatctgcaatttctgggctatcctgcggaacaacagagtgagacggagagccgagaacgctggca
atgatgcctgctctatcgcctgtcctatcgtgatgagatacgtgctggaccacctgatcgtcgtgaccgaccggtt
cttcatccaagctcccagcaatagagtgatgattcctgccaccatcggcacagccatgtacaagctgctgaagcac
agtagagtgagagcctacacctacagcaaggtgctgggagtggacagagcagccatcatggctagtggcaaacagg
tggtggaacacctgaaccggatggagaaagagggactgctgagcagcaagttcaaggccttctgcaagtgggtgtt
cacctaccctgtgctggaagagatgttccagaccatggtgtccagcaagacaggacacctgaccgacgacgtgaaa
gatgtgagagctctgatcaagacactgcccagagccagctacagctctcacgcaggtcagagaagctacgtgtcag
gcgtgctgcctgcatgtctgctgtccaccaagagcaaggctgtggaaacacccatcctggtgtctggagccgacag
aatggacgaagaactgatgggcaacgacggtggagccagccatacagaggccagatactctgagtctggccagttc
cacgccttcaccgacgagctggaaagcctgcctagccctaccatgcctctgaaacctggagcccagtctgccgact
gtggcgatagctcctcttcaagcagtgacagtggcaacagcgataccgagcagagcgagagagaagaggctagagc
cgaagctcctagactgagagcacccaagagcagaagaaccagcagacccaacagaggacagacaccctgtccttct
aacgctgcagagcctgagcagccttggattgctgccgtgcaccaggaaagcgacgagagacctatcttcccacatc
ccagcaagccaaccttcctgatgttcgatcctgctcctgaggcaggctctgccatctccgatgtgttcgagggacg
ggaagtgtgccagcccaagcggatcagacccttccatcctcctggaagcccttgggctaacagacctctgccagcc
tctcttgctccaacacctacaggacctgtgcacgagcctgtgggcagcctgacaccagctccagtgcctcagcctc
tggatccagctcctgccgtgacacctgaggccagccatctgctggaagatcccgacgaagagacaagccaggcagt
gaaggccctgagagagatggctgatacagtgatcccacagaaagaagaggcagccatttgtggccagatggacctg
tctcaccctccacctagaggccacctggatgagctgaccacaaccctggaatccatgaccgaggacctgaacctgg
acagccctctgactcccgagctgaacgagatcctggacacctttctgaacgacgagtgcctgctgcacgccatgca
catcagcaccggagacagcatcttcgacaccagcctgttcatgatggaccctaacagcaccagcgaggacgtgaag
ttcactcccgacccttaccaggtgcccttcgtgcaggccttcgatcaggccaccgagaatgcctgcagaagtgcct
acaagcaggacgaccagcactacagagagcctgagcctctgcctcagggacagctgacagcctaccacgtgtcaca
gcctgcacccgagaacgcctaccaggcctatgctgcacctcagctgtttcccgtgtccgacatcacccagaaccaa
cagaccaaccaggctggaggcgaagctcctcagcctggcgataatagcaccgtgcagacagctgcagctgtggtgt

ttgcttgccctggagctaatcagggtcagcagctggcagatattggcgtgccacagccagcacctgtggctgctcc
tgccagaaggaccagaaagcctcagcaacccgagagcctggaagagtgcgacagcgaactggaaatcaagcggagc
gagaacgacagactggaactgctgctgaaacagatgtgtcccagcctggacgtggactccatcatccctagaacac
ccgactgataa

[0411] SEQ ID NO:5EBNA3A的核酸序列(2892个核苷酸)。

[0412] atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgacaa
ggacagacctggaccacctgccctggacgacaacatggaagaggaagttcccagcaccagcgtggtgcaggaacag
gtgtcagctggcgactgggagaacgtgctgatcgagctgagcgacagcagcagcgagaaagaggctgaggacgcac
atctggaacctgctcagaaaggcaccgtggaccatgatgctggaggctctgctccagccagacctatgctgcctcc
tcagcctgatctgcctggcagagaggccatcctgagaagattcccactggacctgcggaccctgctgcaggctatt
ggagcagctgccacacggatcgacaccagagccatcgaccagttcttcggcagccagatcagcaacaccgagatgt
acattatgtacgccatggccatcagacaggccattagggatcaggccaaatggaggctgcagacactggctgcagg
ctggccgatgggttaccaggcctacagcagctggatgtacagctacaccgaccaccagaccacacccaccttcgtg
catctgcaagcagcagctggagctactggagggagaagatgccacgtgacattcagtgctggcaccttcaagctgc
ccagatgcacacctggagacagacagtggctgtacgtgcagtctagcgtgggcaacatcgtgcagagctgcaaccc
tcggtacagcatcttcttcgactacatggccattcaccggtctctgaccaagatctgggaagaggtgctgacacca
gaccagagagtgtcctttatggaattcctgggcttcctgcagcggaccgacctgagctacatcaagagcttcgtgt
ccgacgctctgggcaccaccagcatccagactccctggatcgacgacaaccctagcacagaaacagctcaggcttg
gaacgcaggcttcctgagaggcagagcctacggcatcgacctgctgagaacagagggagagcatgtggaaggagct
accggtgaaaccagagaggaaagcgaggacaccgagagcgacggagacgacagactgctgctgatgaccgagcaag
gcaaagaagtgctggagaaggccagaggctccacctacggcacacctagacctcctgtgcccaagcctagacctga
ggtgccacagagcgacgagacagccacatctcacggctctgcccaggtgcctgagccacctacaattcatctggca
gctcagggcatggcctacccactgcatgaacagcacggcatggctccttgtcctgtggctcaggcacctcctacac
ctctgcctcctgtgtctcctggcgatcagctgcctggcgtgttcagcgacggaagagtggcctgtgctcctgttcc
tgcacctgcaggaccaattgtgagaccttgggagcctagcctgacacaggctgcaggacaggcctttgctccggtg
agacctcagcacatgcctgtggaacctgtgccagtgcctaccgttgccctggaaagacccgtgtaccctaagcctg
tgaggccagctccacccaagattgccatgcagggacctggtgagacaagtggcatttggaggcctgctccttggac
acccaatccacctagaagcccttcgcagatgagcgtgctgagagccgaggcacaagtgaagcaggccagcgtggaa
gtgcagccacctcagctgactcaggtgtcacctcagcagcccatggagggacctctggtacctgagcagcagatgt
ttcctggtgctccttttcagccaggtggctgatgtcgtgagggctcctggcgtgccagctatgcagccacagtactt
cgacctgcctctgatccagcccatcagccagggagcaccagtggctcctctgagagcctctatgggacctgtgcct
ccagtgccagcaacccagcctcagtatttcgatatccctctgaccgagcctatcaatcagggagcctctgcagcac
acttcctgccacagcagcctatggagggaccactggtgcctgaacaatggatgttcccaggagctgctctgagcca
gtctgtgagaccaggcgtggcacagagccagtactttgatctgcctctgacacagccaatcaaccacggagcacct
gctgctcactttctgcaccaacctccaatggaaggtccttgggtaccagagcagtggatg tttcagggagctcct
cctagccagggcaccgatgtggtgcagcatcagctggacgctctgggctacacactgcacggactgaatcatccag
gtgtgccagtgtctccagccgttaatcagtaccacctgagccaggctgccttcggcctgcccattgatgaggatga
gagcggagagggcagcgacacatctgagccttgcgagatccacggcagaccctgtcctcaggcaccagaatggcca
gttcaggaagaaggaggccaggacgccaccgagattcacggaaggcctagacccagaactcctgagtggccagtgc

agggagagggtggacagaatgtggctggtcctgagactagacgggtggtggtgtctgctgtggtgcacatgtgtca
ggacgacgagttccctgacctgcaggatcctcctgatgaggccggagggggtggctctggtgggggagggtccggc
ggaggcggttcagctgtgggccaggacacgcaggaggtcatcgtggtgccacactccttgccctttaaggtggtgg
tgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctcccttatcatcctcatcatgctttggcagaagaa
gccacgttgataa

[0413] SEQ ID NO:6一个loxPV位点的核酸序列。

[0414] ATAACTTCGTATAGGATACTTTATACGAAGTTAT

[0415] SEQ ID NO:7Pr13.5长启动子的核酸序列。

[0416] taaaaatagaaactataatcatataatagtgtaggttggtagtattgctcttgtgactagagactttag
ttaaggtactgtaaaaatagaaactataatcatataatagtgtaggttggtagta

[0417] SEQ ID NO:8PrS启动子的核酸序列。

[0418] aaaaattgaaattttatttttttttttttggaatataa

[0419] SEQ ID NO:9PrH5m启动子的核酸序列。

[0420] taaaaattgaaaataaatacaaaggttcttgagggttgtgttaaattgaaagcgagaaataatcataa
ataatttcattatcgcgatatccgttaagtttgtatcgta

[0421] SEQ ID NO:10Pr1328启动子的核酸序列。

[0422] tatattattaagtgtggtgtttggtcgatgtaaaatttttgtcgataaaaattaaaaaataacttaat
ttattattgatctcgtgtgtgtacaaccgaaatc

[0423] SEQ ID NO:11 2A肽(T2A)的核酸序列。

[0424] AGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCT

[0425] SEQ ID NO:12 2A肽(P2A)的核酸序列。

[0426] GGATCCGGCGCCACCAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGATGTGGAAGAGAATCCAGGCCCT

[0427] SEQ ID NO:13柔性接头和GCN4多聚化结构域的核酸序列

[0428] CCTAAGCCCAGCACACCTCCTGGCAGCTCTTGTGGAGGCATGAAAGTGAAGCAGCTGGTGGACAAGGTG
GAAGAACTGCTGAGCAAGAACTACCACCTCGTGAATGAGGTGGCACGGCTCGTGAAGCTCGTGGGAGAAAGAGGTGG
C

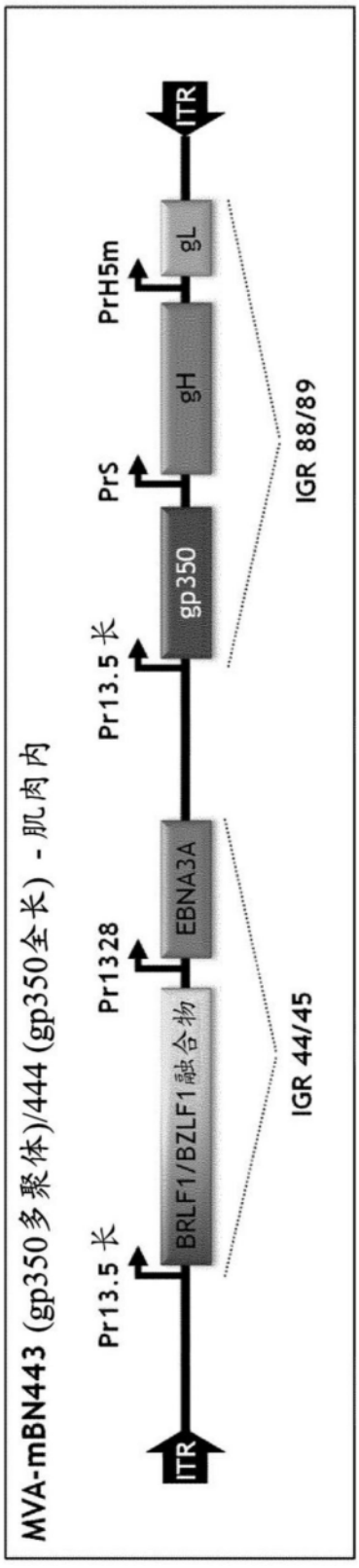

MVA-mBN443 (gp350多聚体)/444 (gp350全长) - 肌肉内
ITR
Pr13.5 长
BRLF1/BZLF1融合物
Pr1328
EBNA3A
Pr13.5 长
gp350
PrS
gH
PrH5m
gL
ITR
IGR 44/45
IGR 88/89

图1A

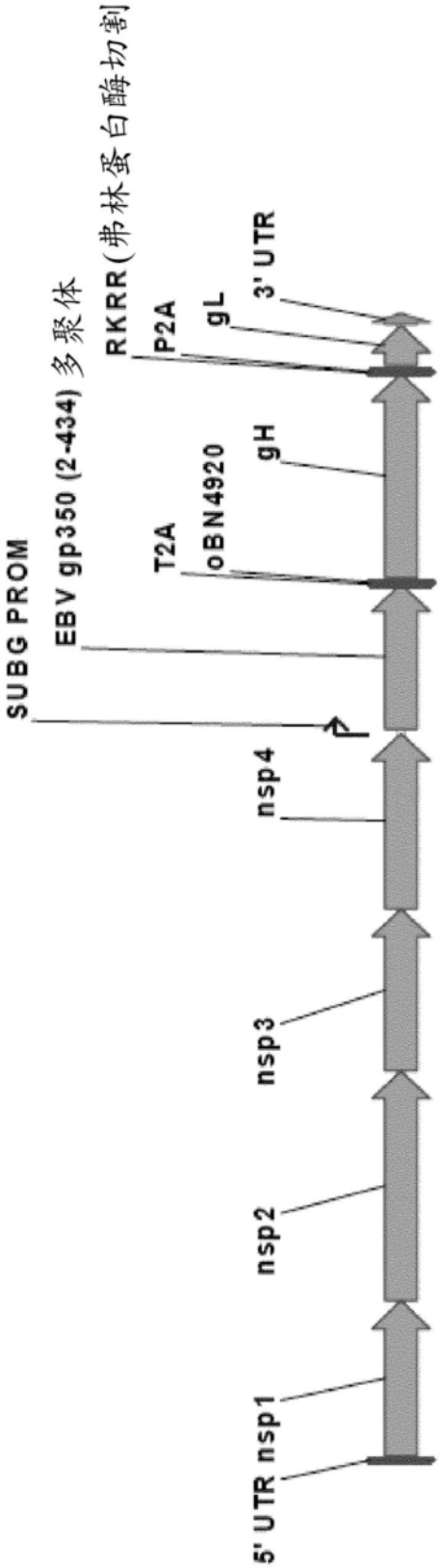

5' UTR
nsp1
nsp2
nsp3
nsp4
SUBG PROM
EBV gp350 (2-434) 多聚体
RKRR(弗林蛋白酶切割)
P2A
gL
3' UTR
T2A
oBN4920
gH

图1B

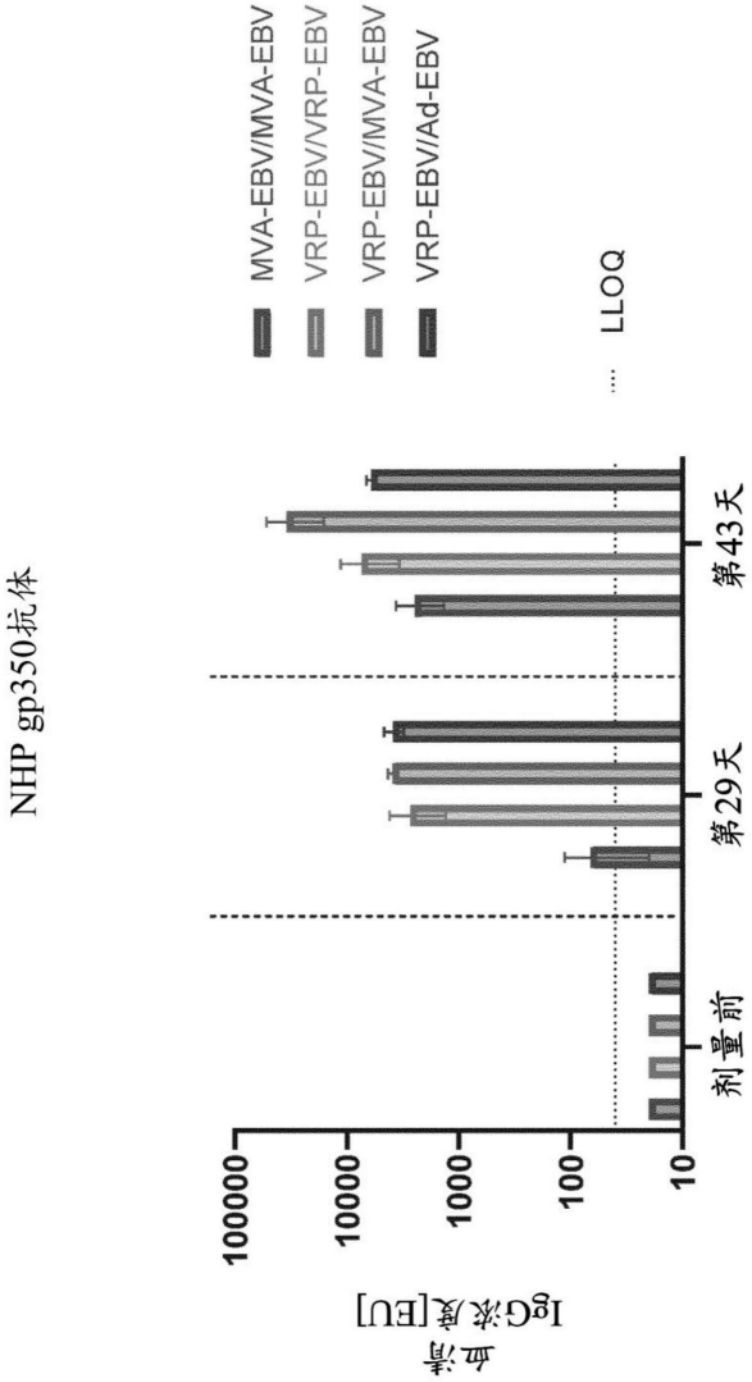

NHP gp350抗体
血清
IgG浓度[EU]
100000
10000
1000
100
10
剂量前
第29天
第43天
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/VRP-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/Ad-EBV
LLOQ

图2

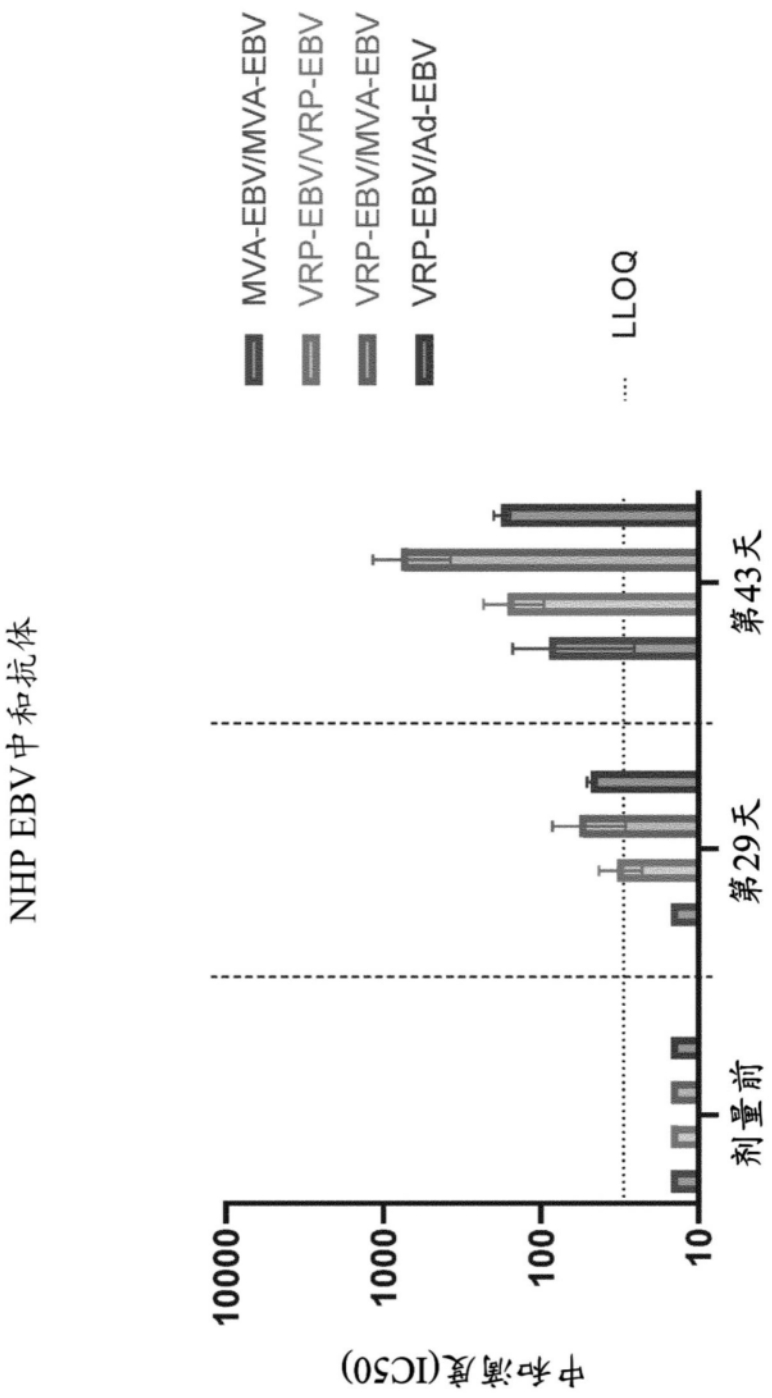

NHP EBV中和抗体
中和滴度(IC50)
10000
1000
100
10
剂量前
第29天
第43天
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/VRP-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/Ad-EBV
LLOQ

图3

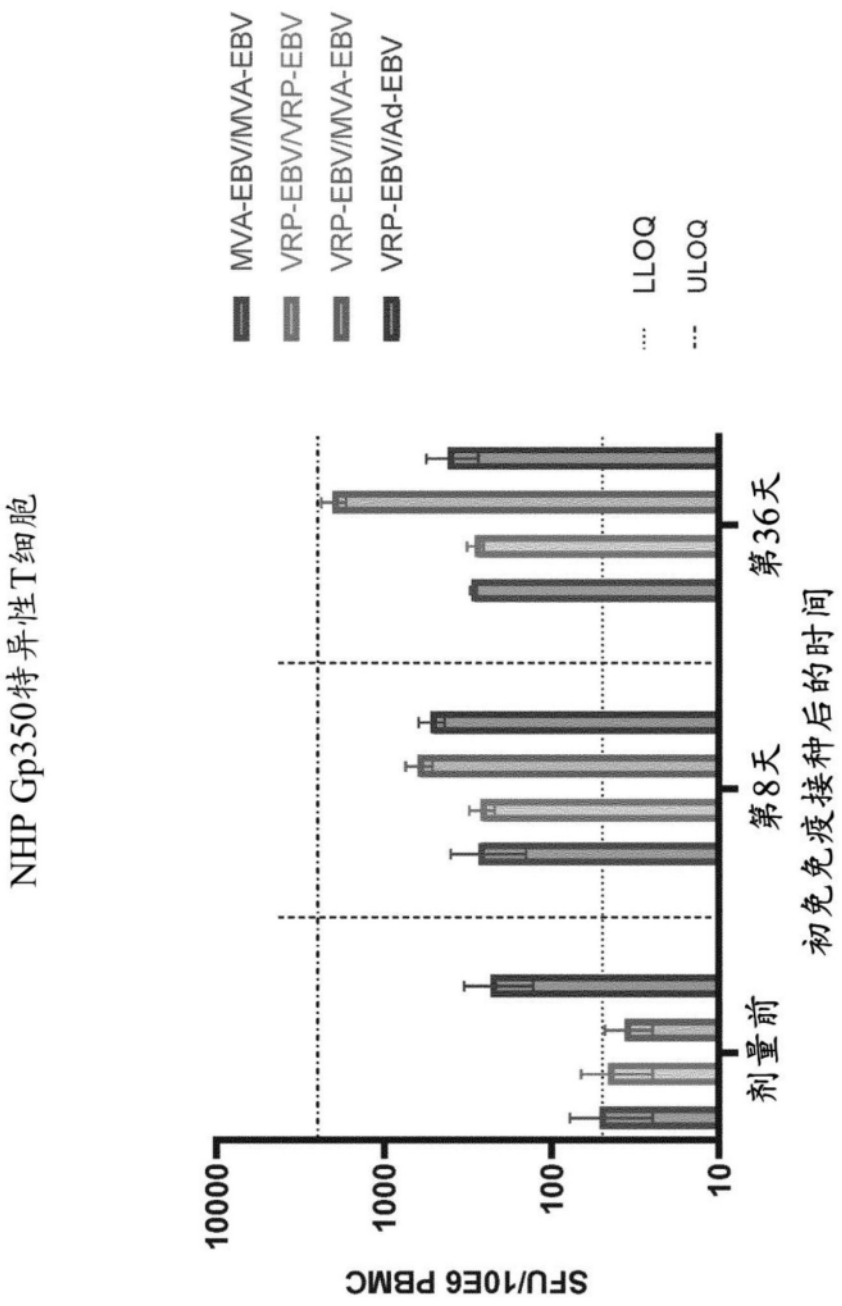

NHP Gp350特异性T细胞
SFU/10E6 PBMC
10000
1000
100
10
剂量前
第8天
第36天
初免免疫接种后的时间
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/VRP-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/Ad-EBV
LLOQ
ULOQ

图4

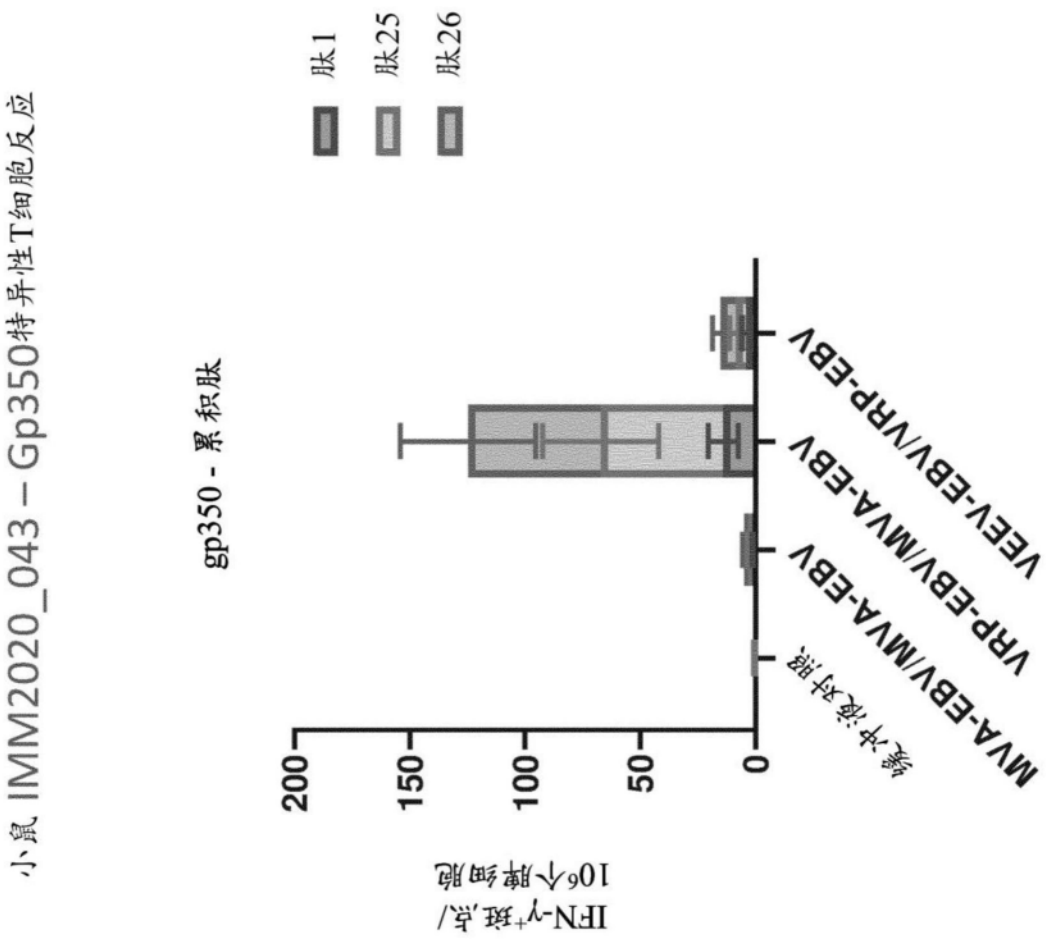

小鼠 IMM2020_043 – Gp350特异性T细胞反应
肽1
肽25
肽26
gp350 - 累积肽
IFN-γ+斑点/
10⁶个脾细胞
200
150
100
50
0
缓冲液对照
MVA-EBV/MVA-EBV
VRP-EBV/MVA-EBV
VEEV-EBV/VRP-EBV

图5

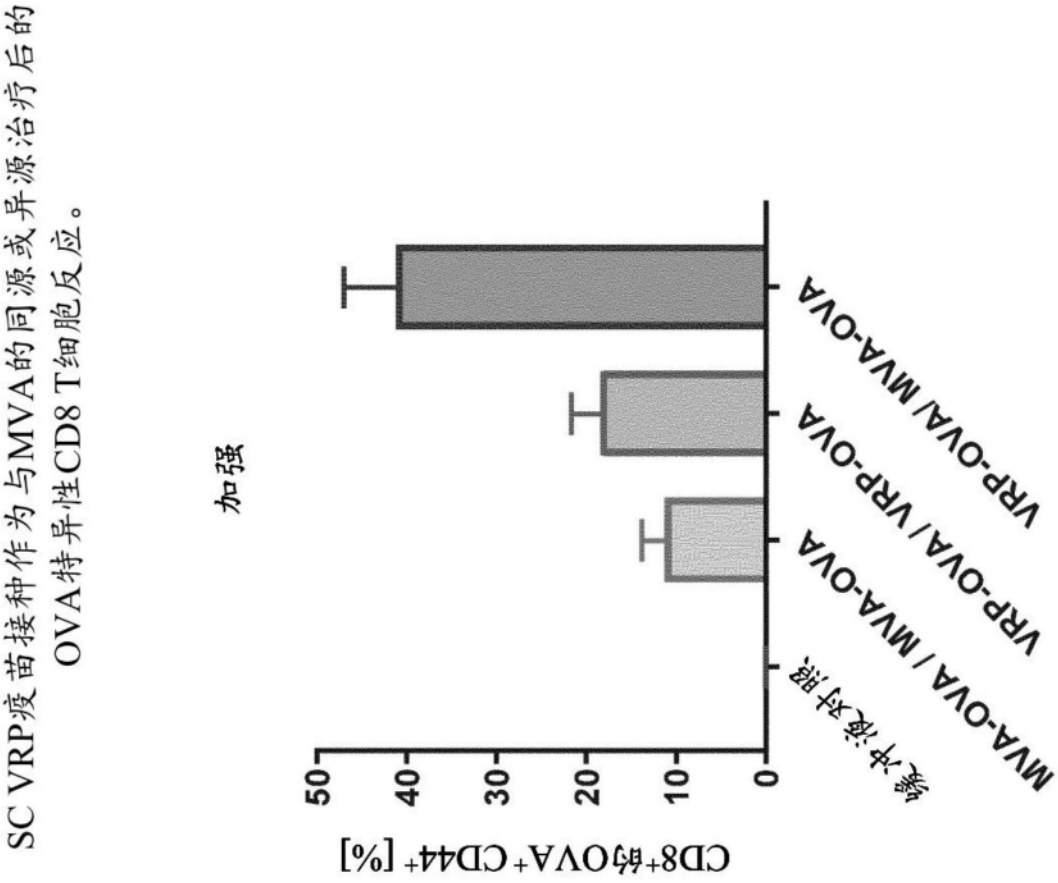
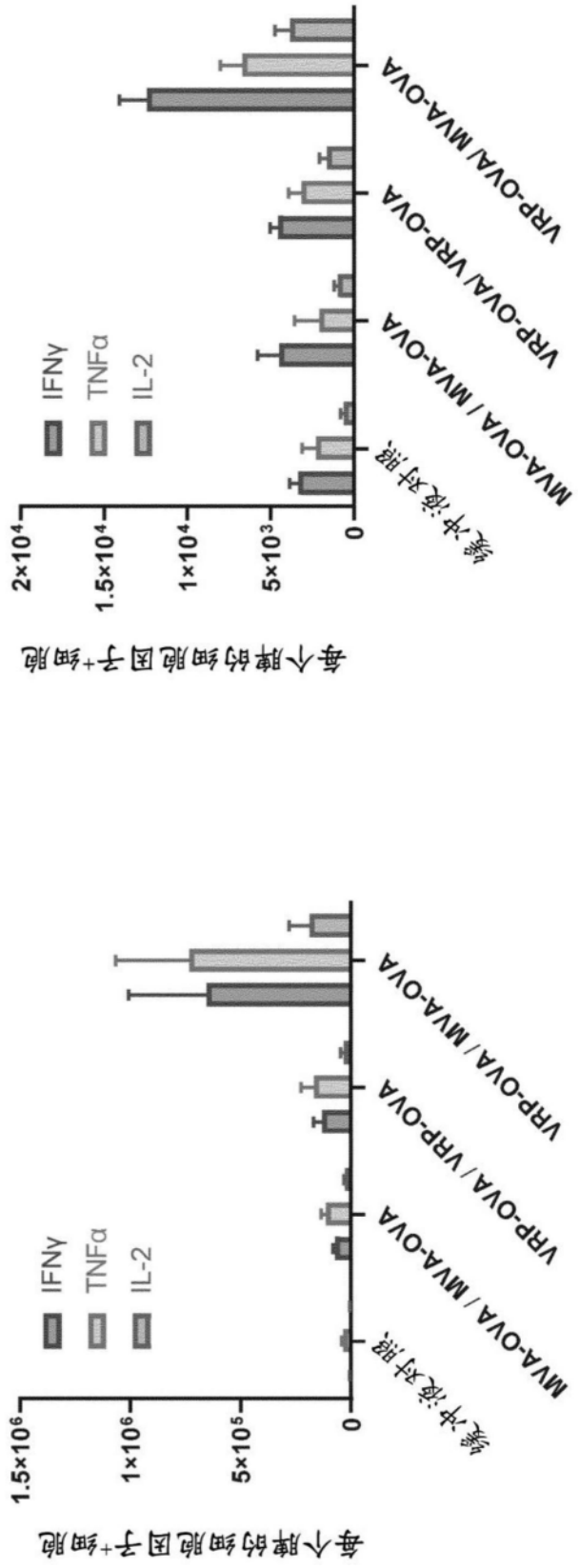

SC VRP疫苗接种作为与MVA的同源或异源治疗后的
OVA特异性CD8 T细胞反应。
加强
CD8+的OVA+ CD44+ [%]
50
40
30
20
10
0
缓冲液对照
MVA-OVA / MVA-OVA
VRP-OVA / VRP-OVA
VRP-OVA/ MVA-OVA

图6



SC VRP疫苗接种作为与MVA的同源或异源治疗后的OVA特异性CD8 T细胞反应。

图7

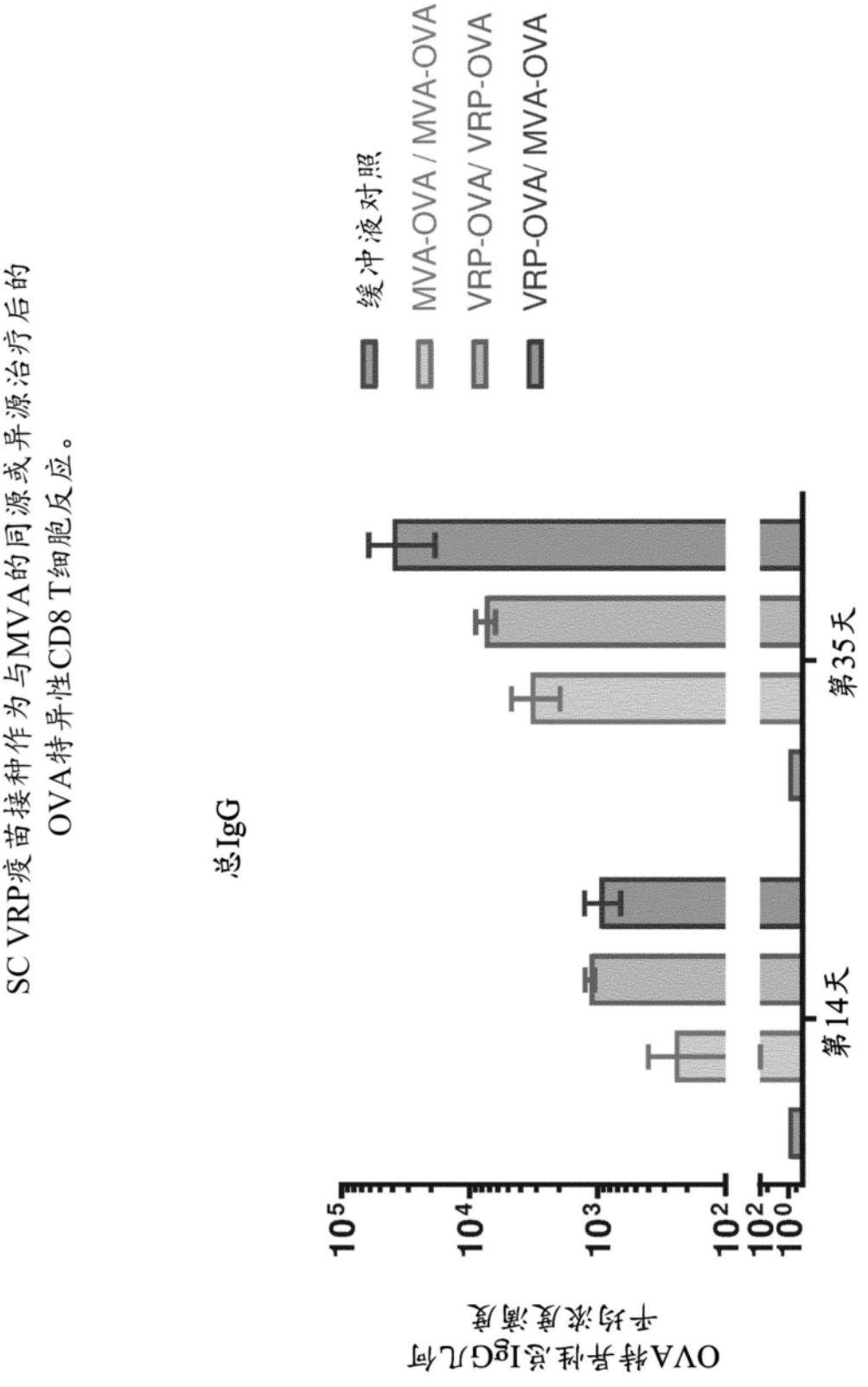

SC VRP疫苗接种作为与MVA的同源或异源治疗后的
OVA特异性CD8 T细胞反应。
总IgG
缓冲液对照
MVA-OVA / MVA-OVA
VRP-OVA/ VRP-OVA
VRP-OVA/ MVA-OVA
OVA特异性,总IgG几何
平均滴度滴度
10^5
10^4
10^3
10^2
10^2
10^0
第14天
第35天

图8

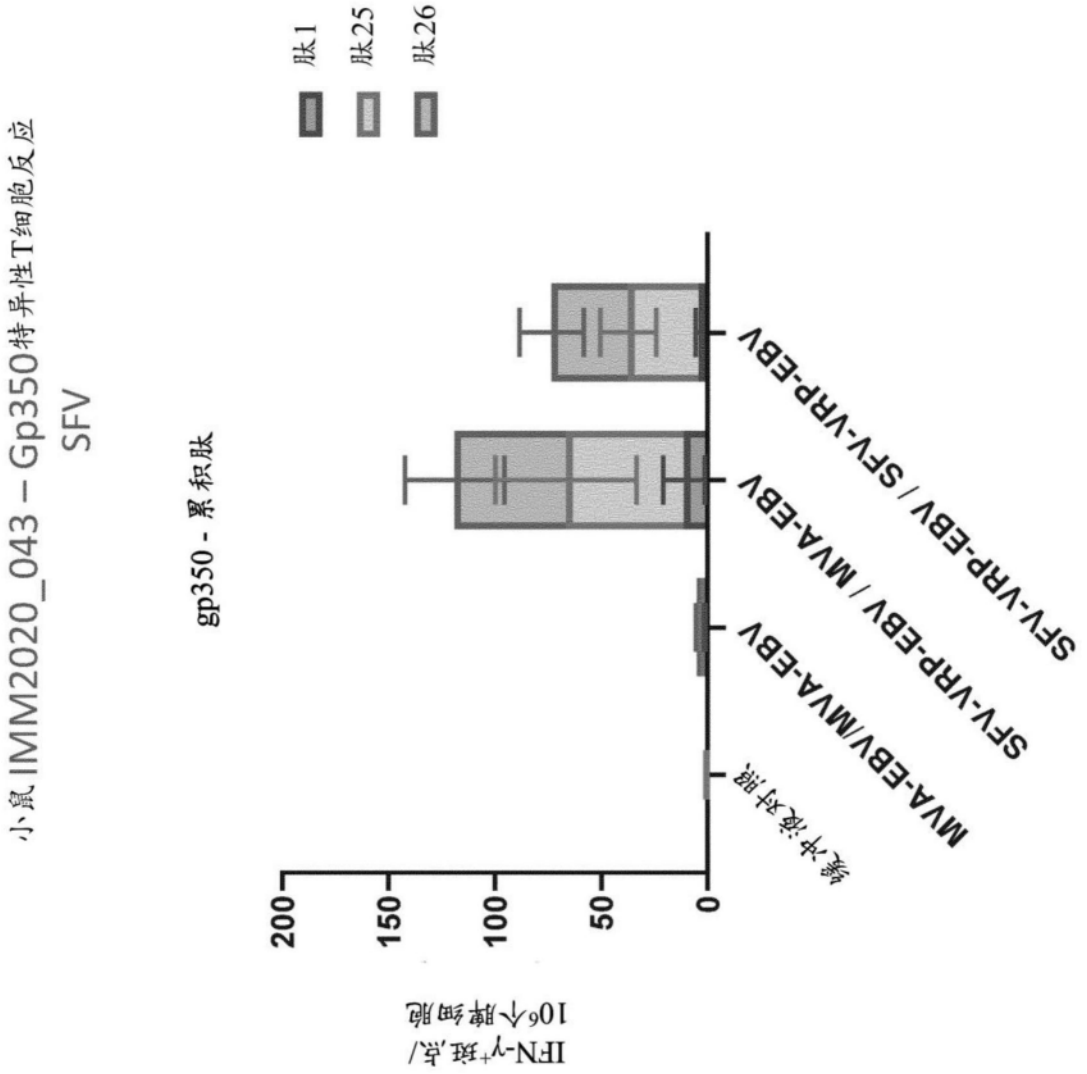

小鼠 IMM2020_043 – Gp350特异性T细胞反应
SFV
肽1
肽25
肽26
gp350 - 累积肽
IFN-γ+斑点/
10⁶个脾细胞
200
150
100
50
0
缓冲液对照
MVA-EBV/MVA-EBV
SFV-VRP-EBV / MVA-EBV
SFV-VRP-EBV / SFV-VRP-EBV

图9