



(21)申請案號：111140493

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 25 日

(51)Int. Cl. :

C12N15/86 (2006.01)C12N15/52 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)A61K39/12 (2006.01)

A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2021/10/25美國63/271,675

2022/10/04美國63/413,188

(71)申請人：美商吉恩維沃公司 (美國) GENVIVO, INC. (US)

美國

(72)發明人：費雪勞席德賈克琳 FISCHER-LOUGHEED, JACQUELINE (US)；史堤爾布

雷德佛德 H STEELE, BRADFORD H. (US)；羅瑟西利亞 ROH, CECILIA

(US)；強森羅伯特 G JOHNSON, ROBERT G. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無申請專利範圍項數：84 項圖式數：21共 129 頁

(54)名稱

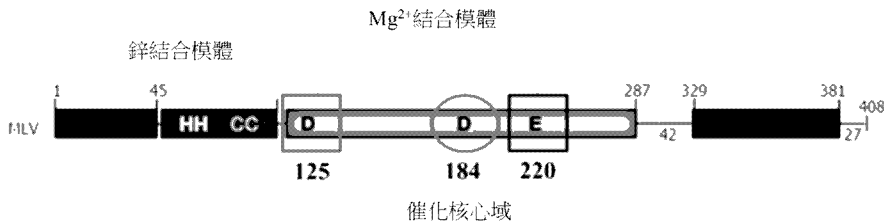
用於治療劑或疫苗遞送之組合物及方法

(57)摘要

本文描述用於遞送治療劑或疫苗之組合物。本文亦描述使用本文所描述之組合物遞送治療劑或疫苗之方法。

Described herein are compositions for delivering a therapeutic or vaccine. Also described herein are methods for using the compositions described herein for delivering a therapeutic or a vaccine.

指定代表圖：



【圖1】



【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療劑或疫苗遞送之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THERAPEUTIC OR
VACCINE DELIVERY

【中文】

本文描述用於遞送治療劑或疫苗之組合物。本文亦描述使用本文所描述之組合物遞送治療劑或疫苗之方法。

【英文】

Described herein are compositions for delivering a therapeutic or vaccine. Also described herein are methods for using the compositions described herein for delivering a therapeutic or a vaccine.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療劑或疫苗遞送之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR THERAPEUTIC OR
VACCINE DELIVERY

【技術領域】

【0001】 本文描述用於遞送治療劑(therapeutic)或疫苗之組合物。
本文亦描述使用本文所描述之組合物遞送治療劑或疫苗之方法。

【先前技術】

【0002】 使用諸如病毒載體之遺傳物質遞送治療劑已作為現代醫療之基礎之一出現。然而，此類遺傳物質可導致非所需促進細胞分裂作用。舉例而言，逆轉錄病毒載體可整合至細胞之基因體中，因此將此類細胞轉型成癌細胞。此類問題之一種補救措施為使用基於RNA之媒劑來遞送遺傳物質。

【發明內容】

【0003】 使用基於RNA之媒劑可為複雜且費力的。另外，基於RNA之媒劑易於降解且可呈現短半衰期。用於遞送治療劑之其他基於DNA之媒劑(例如非病毒DNA)面臨包括以下之挑戰：運輸媒劑且使其靶向目標細胞的效率，以及個體中免疫反應或毒性之誘導。因此，仍需要一種用於遞送治療劑之媒劑。

【0004】 在一些態樣中，本文描述一種重組逆轉錄病毒載體，其包含編碼突變整合酶的第一核酸序列及編碼至少一種有效負載的第二核酸序

列，當相較於野生型整合酶時，該突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個突變；且該至少一種有效負載包含抗原。在一些實施例中，突變整合酶缺乏逆轉錄病毒整合活性。在一些實施例中，抗原包含病原體多肽或其片段或癌症多肽或其片段。在一些實施例中，癌症多肽或其片段與癌細胞或腫瘤微環境相關。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含病毒多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含細菌多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含真菌多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含原生生物多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含原生動物多肽或其片段。在一些實施例中，病毒多肽或其片段包含冠狀病毒多肽或其片段。在一些實施例中，冠狀病毒多肽或其片段包含嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome；SARS-CoV)多肽或其片段、SARS-CoV-2多肽或其片段或中東呼吸道症候群(Middle East Respiratory Syndrome；MERS-CoV)多肽或其片段。在一些實施例中，冠狀病毒多肽或其片段包含SARS-CoV-2多肽或其片段。在一些實施例中，SARS-CoV-2多肽或其片段包含刺突蛋白或其片段。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段為全長刺突蛋白。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段為截短刺突蛋白。在一些實施例中，截短刺突蛋白包含刺突蛋白之N端域或刺突蛋白之S2域。在一些實施例中，截短刺突蛋白包含刺突蛋白之N端域及刺突蛋白之S2域。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段為重組刺突蛋白。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段包含至少一個修飾。在一些實施例中，該至少一個修飾包含密碼子最佳化。在一些實施例中，密碼子最佳化使該至少一種有效負載在人類細胞中之表現最佳化或使其增加。在一些實施例中，該至少一個修

飾包含至少一個胺基酸突變。在一些實施例中，該至少一個胺基酸突變消除刺突蛋白中之裂解位點。在一些實施例中，裂解位點為弗林蛋白酶(furin)裂解位點。在一些實施例中，弗林蛋白酶裂解位點包含**SEQ ID NO: 21**或**SEQ ID NO: 22**中之胺基酸殘基682-685、胺基酸殘基679-682或胺基酸殘基811。在一些實施例中，裂解位點為絲胺酸蛋白酶裂解位點。在一些實施例中，絲胺酸蛋白酶裂解位點包含**SEQ ID NO: 21**或**SEQ ID NO: 22**中之胺基酸殘基986及987；或983及984。在一些實施例中，該至少一個胺基酸突變包含**SEQ ID NO: 21**或**SEQ ID NO: 22**中之胺基酸殘基814、889、896、939、682-685、679-682、811、986、987、983、984或其組合處的胺基酸取代。在一些實施例中，該至少一個胺基酸突變包含**SEQ ID NO: 21**或**SEQ ID NO: 22**中之胺基酸殘基814、889、896及939處的胺基酸取代。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段包含訊號肽。在一些實施例中，訊號肽為分泌肽。在一些實施例中，訊號肽包含**SEQ ID NO: 13**之胺基酸序列：**MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHFRR**。在一些實施例中，分泌肽包含與IgE Fc受體 α 至少70%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，病毒多肽或其片段包含流感多肽或其片段。在一些實施例中，流感多肽或其片段包含A型流感多肽或其片段、B型流感多肽或其片段、C型流感多肽或其片段或D型流感多肽或其片段。在一些實施例中，流感多肽或其片段為A型流感多肽或其片段。在一些實施例中，A型流感多肽或其片段包含神經胺糖酸酶(NA)或其片段或血球凝集素(HA)或其片段。在一些實施例中，A型流感多肽或其片段包含血球凝集素(HA)或其片段。在一些實施例中，血球凝集素(HA)或其片段為全長血球凝集素(HA)。在一些實施

例中，血球凝集素(HA)或其片段為截短血球凝集素(HA)。在一些實施例中，截短血球凝集素(HA)包含柄域(Stalk domain)。在一些實施例中，血球凝集素(HA)或其片段為重組血球凝集素(HA)。在一些實施例中，血球凝集素(HA)或其片段包含至少一個修飾。在一些實施例中，該至少一個修飾包含密碼子最佳化。在一些實施例中，密碼子最佳化使該至少一種有效負載在人類細胞中之表現最佳化或使其增加。在一些實施例中，該至少一個修飾包含至少一個胺基酸突變。在一些實施例中，該至少一個修飾包含血球凝集素(HA)或其片段，該血球凝集素(HA)或其片段包含A型流感之M2蛋白之胞外域(M2e)的胺基酸序列：**SEQ ID NO: 14**：**MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD**。在一些實施例中，重組逆轉錄病毒載體編碼至少一種套膜蛋白。在一些實施例中，該至少一種套膜蛋白包含至少一種 α 病毒套膜蛋白。在一些實施例中，該至少一種 α 病毒套膜蛋白包含至少一種辛德比斯病毒(Sindbis virus)套膜蛋白。在一些實施例中，該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白包含E3蛋白、E2蛋白、6K蛋白、E1蛋白或其組合。在一些實施例中，該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白包含至少一個突變。在一些實施例中，該至少一個突變增加該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白與人類細胞之間的結合親和力。在一些實施例中，人類細胞為樹突狀細胞。在一些實施例中，該至少一個突變為E2蛋白之E160G。在一些實施例中，催化核心域之Mg²⁺結合模體中之至少一個突變包含D125A、D184A或其組合。在一些實施例中，重組逆轉錄病毒載體包含至少一個經修飾之非轉譯區(UTR)。在一些實施例中，該至少一個經修飾之UTR包含5'-UTR。在一些實施例中，該至少一個經修飾之UTR包含3'-UTR。在一些實施例中，該至少一個經修飾之UTR包含5'-UTR及3'-

UTR。

【0005】 在一些態樣中，本文描述一種重組病毒，其包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體。在一些實施例中，重組病毒為重組辛德比斯病毒。在一些實施例中，重組辛德比斯病毒包含E2蛋白之E160G突變。

【0006】 在一些態樣中，本文描述一種細胞，其包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體或本文所描述之重組病毒。在一些實施例中，細胞表現至少一種有效負載。在一些實施例中，細胞分泌至少一種有效負載。在一些實施例中，細胞表現且分泌至少一種有效負載。在一些實施例中，細胞表現至少一種有效負載至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。在一些實施例中，細胞分泌至少一種有效負載至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。在一些實施例中，細胞表現且分泌至少一種有效負載至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。

【0007】 在一些態樣中，本文描述一種醫藥組合物，其包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體、本文所描述之重組病毒或包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體或本文所描述之重組病毒的細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種額外活性成分。在一些實施例中，該至少一種額外活性成分包含佐劑。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

【0008】 在一些態樣中，本文描述一種治療或預防個體之疾病或病狀之方法，其包含向個體投與本文所描述之重組逆轉錄病毒載體、本文所描述之重組病毒、包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體或本文所描述之重組病毒的細胞或本文所描述之醫藥組合物，其中包含抗原之至少一種有效負載在個體中誘導免疫反應，從而治療或預防個體的疾病或病狀。在一

些實施例中，免疫反應包含誘導靶向抗原之中和抗體，從而在個體中產生針對抗原之免疫性。在一些實施例中，免疫反應包含誘導靶向抗原之免疫球蛋白抗體，從而在個體中產生針對抗原之免疫性。在一些實施例中，免疫球蛋白抗體包含IgG抗體、IgM抗體、IgA抗體、IgD抗體、IgE抗體或其組合。在一些實施例中，免疫球蛋白抗體包含IgG抗體。在一些實施例中，該至少一種有效負載在個體中表現至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。在一些實施例中，該至少一種有效負載在個體中分泌至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。在一些實施例中，相較於由表現低於一天、三天、五天或九天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現至少一天、至少三天、至少五天或至少九天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現低於一天、三天、五天或九天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由分泌至少一天、至少三天、至少五天或至少九天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，免疫反應在個體中持續至少三個月、至少四個月、至少五個月、至少六個月、至少12個月或更長。

【0009】 在一些態樣中，本文描述一種包含核酸構築體之重組逆轉錄病毒載體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶之聚核苷酸序列，其中相較於野生型整合酶，該突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含第一突變。在一些實施例中，第一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，胺基酸選自由以下組成

之群：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。

在一些實施例中，胺基酸包含苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，胺基酸包含丙胺酸(A)。在一些實施例中，第一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，胺基酸包含組胺酸(H)。在一些實施例中，第一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，胺基酸包含絲胺酸(S)。在一些實施例中，第一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。在一些實施例中，第一突變包含D125A突變。在一些實施例中，第一突變包含D184A突變。在一些實施例中，第一突變包含E220A突變。在一些實施例中，突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中進一步包含第二突變。在一些實施例中，第二突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，第二突變包含選自由以下組成之群的胺基酸：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，第二突變包含苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，第二突變包含丙胺酸(A)。在一些實施例中，第二突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，第二突變包含組胺酸(H)。在一些實施例中，第二突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，第二突變包含絲胺酸(S)。在一些實施例中，第二突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。在一些實施例中，第一突變包含D125A突變，且第二突變包含D184A突變。在一些實施例中，第一突變包含D184A突變，且第二突變包含E220A突變。在一些實施例中，第一突變包含D125A突變，且第二突變包含E220A突變。在一些實施例中，突變整合

酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中進一步包含第三突變。在一些實施例中，第三突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，第三突變包含選自由以下組成之群的胺基酸：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，第三突變包含苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，第三突變包含丙胺酸(A)。在一些實施例中，第三突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，第三突變包含組胺酸(H)。在一些實施例中，第三突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，第三突變包含絲胺酸(S)。在一些實施例中，第三突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。在一些實施例中，第一及第二突變各自包含將天冬胺酸(D)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸，且第三突變包含將麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，重組逆轉錄病毒載體為鼠白血病病毒(murine leukemia virus；MLV)，其中第一突變選自由以下組成之群：D125A、D184A及E220A。在一些實施例中，突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中進一步包含第二突變，其中第二突變選自由以下組成之群：D125A、D184A及E220A。在一些實施例中，突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中進一步包含第三突變，其中第一突變包含D125A，第二突變包含E220A，且第三突變包含D184A。在一些實施例中，突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中進一步包含第三突變，其中第一突變包含D125A，且第二突變包含D184A。

【0010】 在一些態樣中，本文描述一種包含核酸構築體之重組逆轉錄病毒載體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶之聚核苷酸序列，其中相

較於野生型整合酶，該突變整合酶由催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中之單一突變組成。在一些實施例中，單一突變由將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸組成。在一些實施例中，單一突變包含選自由以下組成之群之胺基酸：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，單一突變包含苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，單一突變包含丙胺酸(A)。在一些實施例中，單一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，單一突變包含組胺酸(H)。在一些實施例中，單一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，單一突變包含絲胺酸(S)。在一些實施例中，單一突變包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 1**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，單一突變包含D125A突變。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 2**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，單一突變包含D184A突變。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 3**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，單一突變包含E220A突變。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 4**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。

【0011】 在一些態樣中，本文描述一種包含核酸構築體之重組逆轉錄病毒載體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶之聚核苷酸序列，其中較於野生型整合酶，該突變整合酶由催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中之兩

個突變組成。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者由將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸組成。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含選自由以下組成之群之胺基酸：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含丙胺酸(A)。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含組胺酸(H)。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含絲胺酸(S)。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 1**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，兩個突變中之至少一者包含D125A突變、D184A突變或E220A突變。在一些實施例中，兩個突變由D125A突變及D184A突變構成。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 5**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，兩個突變由D125A突變及E220A突變構成。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 6**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，兩個突變包含D184A突變及E220A突變。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 7**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。

【0012】 在一些態樣中，本文描述一種包含核酸構築體之重組逆轉錄病毒載體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶之聚核苷酸序列，其中相較於野生型整合酶，該突變整合酶由催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中之三個突變組成。在一些實施例中，三個突變中之至少一者由將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸組成。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含選自由以下組成之群之胺基酸：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含丙胺酸(A)。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含組胺酸(H)。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含絲胺酸(S)。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含將天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 1**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，三個突變中之至少一者包含D125A突變、D184A突變或E220A突變。在一些實施例中，三個突變包含D125A突變、D184A突變或E220A突變。在一些實施例中，三個突變包含D125A突變、D184A突變及E220A突變。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 8**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之肽序列。在一些實施例中，核酸構築體進一步編碼有效負載。在一些實施例中，有效負載包含細胞介素。在一些實施例中，細胞介素包含介白

素-7。在一些實施例中，細胞介素包含介白素-12。在一些實施例中，細胞介素包含干擾素。在一些實施例中，干擾素包含IFN- α 。在一些實施例中，有效負載包含胸苷激酶。在一些實施例中，胸苷激酶包含突變胸苷激酶。在一些實施例中，有效負載包含抗原。在一些實施例中，抗原包含病毒蛋白。在一些實施例中，病毒蛋白包含SARS-CoV-2蛋白。在一些實施例中，病毒蛋白包含流感蛋白。在一些實施例中，抗原包含病原體蛋白。

【0013】 在一些態樣中，本文描述一種治療個體之疾病或病狀之方法，其包含向個體投與治療有效量之包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體的醫藥組合物。

【0014】 在一些態樣中，本文描述一種對個體進行疫苗接種之方法，其包含向個體投與包含本文所描述之重組逆轉錄病毒載體的醫藥組合物。

【圖式簡單說明】

【0015】 本專利申請案含有至少一個彩製圖式。在申請且支付必要費用後，專利局將提供具有彩色圖式之本專利或專利申請案之複本。

【0016】 圖1繪示突顯形成催化核心域中之 Mg^{2+} 結合模體之三聯體D125、D184及E220之MLV整合酶的示意性表示。HH-CC模體涉及鋅結合域。HH-CC模體為發現於鋅指蛋白中之 Zn^{2+} 離子螯合位點之特定類型。

【0017】 圖2繪示D184A突變體之定序結果。

【0018】 圖3繪示D125A/E220A突變體之定序結果。

【0019】 圖4繪示用7種不同突變體產生之載體之物理效價。

【0020】 圖5繪示在7種不同突變體情況下之vTK/GCV細胞殺死活

性。

【0021】 圖6A繪示藉由西方墨點法偵測之早期vTK表現。

【0022】 圖6B繪示自第2至14天，D184A突變之例示性西方墨點表現分析。

【0023】 圖7繪示在第2、4及7天，在7種不同突變體情況下之相對整合qPCR (relative integration qPCR)。

【0024】 圖8繪示在第10、14及21天，在7種不同突變體情況下之相對整合qPCR。

【0025】 圖9繪示由整合酶缺陷型*gagpol*細胞株產生之逆轉錄病毒載體之vTK/GCV細胞殺死活性。

【0026】 圖10繪示整合酶缺陷型載體細胞株之vTK/GCV細胞殺死活性。

【0027】 圖11繪示整合酶缺陷型BC6載體殖株之病毒載體效價及vTK/GCV細胞殺死活性。

【0028】 圖12A至圖12C繪示在wtGP (圖12A)與整合酶缺陷型突變體(圖12B)之間，各種癌細胞株之vTK/GCV細胞殺死活性。圖12C繪示在wtGP與整合酶缺陷型突變體之間，藉由qPCR進行之載體之相對整合。

【0029】 圖13繪示包含編碼SARS-CoV-2之刺突蛋白或其片段之核酸序列之重組逆轉錄病毒載體的例示性示意圖。上：編碼SARS-CoV-2全長刺突蛋白(具有修飾之Wuhan序列)之逆轉錄病毒載體之圖。中：編碼具有N端域(NTD)及S2域之SARS-CoV-2刺突蛋白片段(具有修飾之Wuhan序列)之逆轉錄病毒載體的圖。下：編碼SARS-CoV-2全長刺突蛋白(具有修飾之奧密克戎(Omicron) BA.2序列)之逆轉錄病毒載體之圖。

【0030】 圖14A繪示作為本文所描述之逆轉錄病毒載體或慢病毒載體(lentivector)之有效負載之全長刺突蛋白轉殖基因的存在。

【0031】 圖14B繪示作為本文所描述之逆轉錄病毒載體或慢病毒載體之有效負載之NTD及S2轉殖基因的存在。

【0032】 圖14C繪示作為本文所描述之逆轉錄病毒載體或慢病毒載體之有效負載之奧密克戎BA.2轉殖基因(全長刺突蛋白)的存在。

【0033】 圖15繪示辛德比斯病毒套膜中E160G突變之存在。

【0034】 圖16A繪示自逆轉錄病毒載體轉導之A375細胞分泌之刺突蛋白的西方墨點。「IDRV1」表示編碼突變整合酶(具有D184A突變之整合酶)之逆轉錄病毒載體。每天呈現積聚的蛋白質。

【0035】 圖16B繪示自逆轉錄病毒載體轉導之A375細胞分泌之S2蛋白的西方墨點。「IDRV1」表示編碼突變整合酶(具有D184A突變之整合酶)之逆轉錄病毒載體。每天呈現積聚的蛋白質。

【0036】 圖16C繪示自逆轉錄病毒載體轉導之A375細胞分泌之全長刺突蛋白及S2蛋白的西方墨點。逆轉錄病毒載體亦表現本文所描述之突變整合酶(IDRV2：D125A突變及D184A突變)。每天呈現積聚的蛋白質。

【0037】 圖17A繪示來自用表現具有修飾之奧密克戎變體序列及野生型整合酶或IDRV2 (IDRV2：D125A突變及D184A突變)之逆轉錄病毒載體轉導的A375細胞之胞內全長刺突蛋白的西方墨點。

【0038】 圖17B繪示來自用由單株生產細胞株產生之逆轉錄病毒載體轉導的A375細胞之胞內及分泌的全長刺突蛋白的西方墨點。

【0039】 圖18A繪示在測試細胞用本文所描述之逆轉錄病毒載體轉導之後，藉由西方墨點法偵測之奧密克戎刺突蛋白的表現。

【0040】 圖18B繪示藉由免疫細胞化學(ICC)染色偵測之奧密克戎刺突蛋白之表現。亮斑顯示細胞核染色，且灰色顯示奧密克戎刺突蛋白之特異性核周及質膜染色。

【0041】 圖18C繪示藉由質膜級份中之抗S2抗體偵測之還原及非還原刺突蛋白的西方墨點。亦顯示探測質膜標記鈣黏素之相同樣品的西方墨點。

【0042】 圖19繪示作為通用流感疫苗之包含編碼M2e及HA4900 (具有修飾之HA柄)之核酸之逆轉錄病毒載體的圖。

【0043】 圖20繪示作為本文所描述之逆轉錄病毒載體或慢病毒載體之有效負載之M2e及HA4900 (流感)轉殖基因的存在。

【0044】 圖21A繪示在測試細胞用本文所描述之逆轉錄病毒載體轉導之後，藉由西方墨點法偵測之HA蛋白的表現。

【0045】 圖21B繪示藉由免疫細胞化學(ICC)染色偵測之HA蛋白之表現。亮斑顯示細胞核染色，且灰色顯示HA蛋白之特異性染色。

【0046】 本發明之新穎特徵在所附申請專利範圍中細緻闡述。將參考以下闡述說明性實施例之實施方式(detailed description)而獲得對本發明之特徵及優勢之較佳理解。

【實施方式】

交互參考

【0047】 本申請案主張2021年10月25日申請之美國臨時申請案第63/271,675號及2022年10月4日申請之美國臨時申請案第63/413,188號之權益，其全部內容以引用之方式併入本文中。

參考文獻併入

【0048】 本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案在本文中均以引用之方式併入本文中，其程度如同各個別公開案、專利或專利申請案專門且單獨地指示為以全文引用之方式併入一般。在以引用之方式併入之公開案及專利或專利申請案與說明書中所含之揭示內容相抵觸的情況下，說明書意欲替代及/或優於任何此類矛盾材料。

概述

【0049】 在一些態樣中，本文描述一種包含至少一個胺基酸突變之載體。在一些態樣中，載體為包含至少一個胺基酸突變之重組逆轉錄病毒載體(或逆轉錄載體)，其中該至少一個胺基酸突變係在由重組逆轉錄病毒載體編碼之整合酶中，因此產生突變整合酶。在一些態樣中，包含至少一個胺基酸突變之突變整合酶為功能異常的，且可能不再將重組逆轉錄病毒載體整合至宿主細胞之基因體中。在一些實施例中，載體包含核酸構築體，該核酸構築體包含編碼突變逆轉錄酶之至少一種聚核苷酸序列。在一些態樣中，突變逆轉錄酶包含至少一個胺基酸突變，其中突變逆轉錄酶可能不再將載體轉換為DNA以用於插入宿主細胞之基因體中。在一些實施例中，載體包含核酸構築體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶及突變逆轉錄酶兩者之至少一種聚核苷酸序列。

【0050】 在一些態樣中，重組逆轉錄病毒載體包含核酸構築體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶之聚核苷酸序列，其中相較於野生型整合酶，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變。圖1繪示顯示至少一個突變在整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中之位置的例示性載體圖。在實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含一個、兩個、三個或更多

個胺基酸突變。在一些態樣中，包含突變整合酶之載體亦可編碼有效負載。在一些實施例中，有效負載包含治療劑。在一些實施例中，本文所描述之載體包含含有編碼抗原之有效負載之重組逆轉錄病毒載體，其中抗原可刺激先天性免疫(例如作為疫苗)。在一些實施例中，抗原包含病原體多肽或其片段或癌症多肽或其片段。在一些實施例中，癌症多肽或其片段與癌細胞或腫瘤微環境相關。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含病毒多肽或其片段。在一些實施例中，病毒多肽或其片段包含冠狀病毒多肽或其片段。在一些實施例中，病毒多肽或其片段包含流感多肽或其片段。

【0051】 在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含細菌多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含真菌多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含原生生物多肽或其片段。在一些實施例中，病原體多肽或其片段包含原生動物多肽或其片段。

【0052】 在一些實施例中，有效負載包含抗原，其中抗原可誘發免疫反應，因此對投與載體之個體進行疫苗接種。在一些態樣中，本文描述一種藉由向個體投與載體(例如本文所描述之重組逆轉錄病毒載體)治療個體之疾病或病狀的方法，其中載體遞送作為載體之有效負載的治療劑。在一些態樣中，本文描述一種藉由向個體投與載體(例如本文所描述之重組逆轉錄病毒載體)對個體進行疫苗接種之方法，其中載體遞送作為有效負載的抗原。抗原接著可觸發針對抗原之先天性免疫反應，因此對個體進行疫苗接種。

載體

【0053】 在一些態樣中，本文描述一種包含核酸構築體之載體，諸如重組逆轉錄病毒載體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶的至少一種聚

核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含核酸構築體，該核酸構築體包含編碼突變逆轉錄酶之至少一種聚核苷酸序列。在一些實施例中，載體包含核酸構築體，該核酸構築體包含編碼突變整合酶及突變逆轉錄酶兩者之至少一種聚核苷酸序列。

【0054】 在一些實施例中，相較於包含**SEQ ID NO: 1**之多肽序列之野生型整合酶，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 1**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致之多肽序列。**圖2**及**圖3**繪示本文所描述之例示性突變整合酶之多肽序列與野生型整合酶多肽序列的比對。**圖4**繪示，當將載體整合至宿主基因體中功能異常時，本文所描述之突變整合酶不會改變病毒效價。**圖5**及**圖9至圖12**繪示，包含突變整合酶之載體可遞送有效負載(本文所描述之胸苷激酶)以用於在前藥(GCV)存在下殺死細胞。**圖6**繪示，有效負載(胸苷激酶，vTK)之表現不會被突變整合酶改變。**圖7**及**圖8**繪示，在宿主細胞與載體接觸之後，包含突變整合酶之載體不會整合至宿主基因體中，持續至少21天。

【0055】 在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個、至少兩個、至少三個或更多胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶包含一個、兩個、三個或更多胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶包含一個胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶包含兩個胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶包含三個胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個、至少兩個、至少三個或更多胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含一個、兩個、三個或更多個胺基酸

突變。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含一個胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含兩個胺基酸突變。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含三個胺基酸突變。

【0056】 在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，具有疏水性側鏈之胺基酸選自由以下組成之群：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為丙胺酸(A)。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸，其中正電荷側鏈為組胺酸(H)。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電

荷側鏈之胺基酸，其中正電荷側鏈為絲胺酸(S)。在一些實施例中，突變整合酶包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。

【0057】 在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有疏水性側鏈之胺基酸。在一些實施例中，具有疏水性側鏈之胺基酸選自由以下組成之群：纈胺酸(V)、丙胺酸(A)、白胺酸(L)、異白胺酸(I)及苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為苯丙胺酸(F)。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為丙胺酸(A)。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有正電荷側鏈之胺基酸，其中正電荷側鏈為組胺酸(H)。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸。在一些實施例

中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為具有極性電荷側鏈之胺基酸，其中正電荷側鏈為絲胺酸(S)。在一些實施例中，突變整合酶在突變整合酶之催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個胺基酸突變，其中該至少一個胺基酸突變包含將野生型整合酶之天冬胺酸(D)或麩胺酸(E)改變為半胱胺酸(C)。

【0058】 在一些實施例中，突變整合酶包含單一突變。在一些實施例中，突變整合酶在野生型整合酶之位置125處包含單一突變。在一些實施例中，突變整合酶在野生型整合酶之位置125處包含單一突變，包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D125A突變。在一些實施例中，包含含有D125A突變之取代之單一突變之突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 2**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含含有D125A突變之取代之單一突變之突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 2**的多肽序列。

【0059】 在一些實施例中，突變整合酶在野生型整合酶之位置184處包含單一突變。在一些實施例中，突變整合酶在野生型整合酶之位置184處包含含有天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)的單一突變，D184A突變。在一些實施例中，包含含有D184A突變之取代之單一突變之突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 3**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含含有D184A突變之取代之單一突變之突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 3**的多肽序列。

【0060】 在一些實施例中，突變整合酶在野生型整合酶之位置220處包含單一突變。在一些實施例中，突變整合酶在野生型整合酶之位置

220處包含含有麩胺酸(E)取代為丙胺酸(A)之單一突變，E220A突變。在一些實施例中，包含含有E220A突變之取代之單一突變的突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 4**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含含有E220A突變之取代之單一突變之突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 4**的多肽序列。

【0061】 在一些實施例中，突變整合酶包含兩個突變。在一些實施例中，突變整合酶包含兩個突變，其中第一突變在野生型整合酶之位置125處包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D125A突變；且第二突變在野生型整合酶之位置184處包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D184A突變。在一些實施例中，包含含有D125A突變之取代及D184A突變之取代之兩個突變的突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 5**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含含有D125A突變之取代及D184A突變之取代之兩個突變的突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 5**的多肽序列。

【0062】 在一些實施例中，突變整合酶包含兩個突變，其中第一突變在野生型整合酶之位置125處包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D125A突變；且第二突變在野生型整合酶之位置220處包含麩胺酸(E)取代為丙胺酸(A)，E220A突變。在一些實施例中，包含含有D125A突變之取代及E220A突變之取代之兩個突變的突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 6**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含含有D125A突變之取代及E220A突變之取代之兩個突變的突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 6**的多肽序列。

【0063】 在一些實施例中，突變整合酶包含兩個突變，其中第一突

變在野生型整合酶之位置184處包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D184A突變；且第二突變在野生型整合酶之位置220處包含麩胺酸(E)取代為丙胺酸(A)，E220A突變。在一些實施例中，包含含有D184A突變之取代及E220A突變之取代之兩個突變的突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 7**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含含有D184A突變之取代及E220A突變之取代之兩個突變的突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 7**的多肽序列。

【0064】 在一些實施例中，突變整合酶包含三個突變。在一些實施例中，突變整合酶包含三個突變，其中第一突變在野生型整合酶之位置125處包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D125A突變；第二突變在野生型整合酶之位置184處包含天冬胺酸(D)取代為丙胺酸(A)，D184A突變；且第三突變在野生型整合酶之位置220處包含麩胺酸(E)取代為丙胺酸(A)，E220A突變。在一些實施例中，包含三個突變之突變整合酶包含與**SEQ ID NO: 8**至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或更高一致的多肽序列。在一些實施例中，包含三個突變之突變整合酶包含呈**SEQ ID NO: 8**之多肽序列。

【0065】 在一些實施例中，包含至少一個胺基酸突變之載體使整合酶功能異常。在一些實施例中，突變整合酶可能無法再將載體(例如重組逆轉錄病毒載體)引入包含載體之宿主細胞的基因體中。在一些實施例中，包含突變整合酶之載體編碼至少一種治療劑或至少一種抗原。在一些實施例中，至少一種治療劑包含細胞介素。在一些實施例中，細胞介素包含介白素或干擾素。在一些實施例中，載體編碼至少一個介白素次單元。在一些實施例中，載體編碼至少兩個介白素次單元，其中該至少兩個介白

素次單元相同或不同。在一些實施例中，載體編碼一個介白素次單元。在一些實施例中，載體編碼兩個介白素次單元。在一些實施例中，載體編碼兩個不同介白素次單元。在一些實施例中，載體編碼兩個或更多個不同介白素次單元。在一些實施例中，載體包含用於表現介白素、介白素之次單元或其組合之至少一個起始密碼子。在一些實施例中，載體包含用於表現兩個介白素、介白素之兩個次單元或其組合之至少兩個起始密碼子。在一些實施例中，載體包含各自用於表現介白素次單元之兩個密碼子。介白素之非限制性實例可包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-36、IL-37、IL-38、IL-39、IL-40或IL-41。在一些實施例中，介白素包含IL-7。在一些實施例中，介白素包含IL-12。

【0066】 在一些實施例中，包含突變整合酶之載體編碼包含干擾素之治療劑。在一些實施例中，干擾素包含IFN α 、IFN β 、IFN γ 或其組合。

【0067】 在一些實施例中，載體包含至少一個用於表現至少一種聚核苷酸之啟動子。舉例而言，載體包含用於表現至少一種編碼本文所描述之介白素(例如P40次單元及P35次單元)之聚核苷酸的CMV啟動子。在一些態樣中，啟動子包含肌肉特異性啟動子(諸如HSA (人類骨骼 α -肌動蛋白啟動子)、基於肌肉肌酸激酶(MCK)基因啟動子(諸如CK6或MHCK7啟動子)；肌間線蛋白基因啟動子(DES)；組成性人類啟動子EF-1 α (延長因子1 α)。啟動子之其他實例可包括：逆轉錄病毒LTR；SV40啟動子；勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus；RSV)啟動子；組蛋白啟動子；polIII啟動

子、 β -肌動蛋白啟動子；誘導性啟動子，諸如MMTV啟動子、金屬硫蛋白啟動子；熱衝擊啟動子；腺病毒啟動子；白蛋白啟動子；ApoAI啟動子；B19小病毒啟動子；人類血球蛋白啟動子；病毒胸苷激酶啟動子，諸如單純疱疹病毒胸苷激酶啟動子；逆轉錄病毒LTR；人類生長激素啟動子及MxIFN誘導性啟動子。在一些實施例中，啟動子為組織特異性啟動子。在一些實施例中，組織特異性啟動子選自包括以下之群組：酪胺酸酶相關啟動子(TRP-1及TRP-2)、DF3強化子(對於乳房細胞)、SLPI啟動子(在許多類型之癌瘤中表現之分泌性白細胞蛋白酶抑制劑)、TRS (組織特異性調節序列)、 α -胎蛋白啟動子(分別對正常肝細胞及轉型的肝細胞具有特異性)、癌胚抗原啟動子(用於胃腸道、肺、乳房及其他組織之轉型細胞中)、酪胺酸羥化酶啟動子(對於黑色素細胞)、用於神經母細胞瘤中之膽鹼乙醯基轉移酶或神經元特異性烯醇酶啟動子、用於膠質纖維母細胞瘤之調節序列、酪胺酸羥化酶啟動子、c-erb B-2啟動子、PGK啟動子、PEPCK啟動子、乳清酸性啟動子(乳房組織)及酪蛋白啟動子(乳房組織)及脂肪細胞P2啟動子。在一些實施例中，啟動子為病毒特異性啟動子(例如逆轉錄病毒啟動子以及其他，諸如HIV啟動子)、肝炎、疱疹(例如EBV)。在一些實施例中，啟動子為原生HSV-TK啟動子。在一些實施例中，啟動子為用於靶向感染病毒、細菌、真菌或寄生蟲之特定細胞或組織的細菌、真菌或寄生蟲(例如瘧疾)特異性啟動子。在一些態樣中，載體包含用於編碼用於純化、成像或表現控制目的之標籤(諸如His標籤或Flag標籤)的核酸序列。

【0068】 在一些實施例中，載體(例如本文所描述之重組逆轉錄病毒載體)包含至少一個經修飾之非轉譯區(UTR)。在一些實施例中，至少一

個UTR為位於有效負載之核酸序列之5'端之5'-UTR。在一些實施例中，至少一個UTR為位於有效負載之核酸序列之3'端之3'-UTR。在一些實施例中，至少一個UTR包含位於有效負載之核酸序列之5'端及3'端的5'-UTR及3'-UTR。在一些實施例中，相較於當有效負載側接野生型UTR時，該至少一個經修飾之UTR增加有效負載的表現。

【0069】 在一些態樣中，載體為病毒載體，諸如逆轉錄病毒載體。病毒載體及尤其逆轉錄病毒載體已成為最廣泛用於將基因插入哺乳動物(例如人類)細胞中之方法。在一些實施例中，其他病毒載體衍生自慢病毒、痘病毒、單純疱疹病毒I、腺病毒、腺相關病毒或辛德比斯病毒(Sindbis virus)。病毒載體之非限制性實例可包括逆轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體(AAV)、痘載體、小病毒載體、桿狀病毒載體、麻疹病毒載體或單純疱疹病毒載體(HSV)。在一些情況下，重組逆轉錄病毒載體包括 γ -逆轉錄病毒載體，諸如衍生自莫洛尼鼠類白血病毒(Moloney Murine Leukemia Virus；MoMLV、MMLV、MuLV或MLV)或鼠類幹細胞病毒(Murine Stem cell Virus；MSCV)基因體之載體。在一些情況下，重組逆轉錄病毒載體亦包括慢病毒載體，諸如衍生自人類免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus；HIV)基因體之彼等者。在一些情況下，AAV載體包括AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9血清型。在一些情況下，病毒載體為嵌合病毒載體，包含來自兩種或更多種病毒之病毒部分。在其他情形下，病毒載體為重組病毒載體。

【0070】 在一些實施例中，重組逆轉錄病毒載體包含至少一個修飾，其中重組逆轉錄病毒載體可編碼用於增加將病毒靶向細胞類型之效率

的至少一個胺基酸突變。舉例而言，重組辛德比斯逆轉錄病毒載體可編碼辛德比斯病毒之E2蛋白中之E160G突變，其中E160G突變增加將辛德比斯病毒對樹突狀細胞之靶向。在此類實施例中，對樹突狀細胞之靶向可藉由使樹突狀細胞與由重組逆轉錄病毒載體編碼之抗原接觸增加免疫反應及疫苗接種之功效。

【0071】 在一些態樣中，本文描述一種重組逆轉錄病毒載體，其包含編碼本文所描述之突變整合酶的第一核酸序列及編碼至少一種有效負載的第二核酸序列。在一些實施例中，當相較於野生型整合酶時，突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個突變。舉例而言，至少一種突變可包括D125A突變、D184A突變或D125及D184A突變兩者的組合。在一些實施例中，至少一種有效負載包含抗原。在一些實施例中，抗原在細胞中誘導免疫反應。在一些實施例中，抗原包含病原體多肽。在一些實施例中，病原體多肽包括衍生自以下之多肽：細菌病原體、肺泡病原體、阿米巴(amoebal)病原體、真菌病原體、原蟲病原體、線蟲病原體、扁形動物病原體、病毒病原體或其組合。**表1**提供如上文所描述之此類病原體之非限制性實例清單，其可充當用於併入逆轉錄病毒載體中之編碼病原體源性多肽之核苷酸序列之設計的基礎，該逆轉錄病毒載體用於轉導及作為抗原有效負載由轉導的細胞最終表現。

表1.用於獲得包含病原體多肽之抗原之病原體的例示性清單

病原體		
類別	屬	成員
細菌	李斯特菌(Listeria)	單核球增多性李斯特菌(Listeria monocytogenes)
	博德氏桿菌(Bordetella)	支氣管敗血性博德氏桿菌 (Bordetella brionchiseptica)
		百日咳博德氏桿菌(Bordatella pertussis)
		副百日咳博德氏桿菌1 (Bordatella parapertussis 1)
		副百日咳博德氏桿菌2
	立克次體(Rickettsia)	落磯山熱立克次體(Rickettsia rickettsii)
		痘立克次體(Rickettsia akari)
		康氏立克次體(Rickettsia conorii)
		西伯利亞立克次體(Rickettsia sibirica)
		澳洲立克次體(Rickettsia australis)
		貓立克次體(Rickettsia felis)
		日本立克次體(Rickettsia japonica)
		非洲立克次體(Rickettsia africae)
		霍氏立克次體(Rickettsia hoogstraalii)
		普氏立克次體(Rickettsia prowazekii)
		傷寒立克次體(Rickettsia typhi)
	東方體(Orientia)	恙蟲病東方體(Orientia tsutsugamushi)
		東方東方體(Orientia chuto)
	魚立克次體(Piscireckettsia)	鮭魚立克次氏體(Piscirickettsia salmonis)
	棒狀桿菌 (Corynebacterium)	白喉棒狀桿菌(Corynebacterium diptheria)
		潰瘍棒狀桿菌(Corynebacterium ulcerans)
	鏈球菌(Streptococcus)	金黃色鏈球菌(Streptococcus aureus)
		化膿性鏈球菌(Streptococcus pyroenes)
		肺炎鏈球菌(Streptococcus pneumoniae)
		無乳鏈球菌(Streptococcus agalactiae) (B組鏈球菌)
	梭菌(Clostridium)	肉毒桿菌(Clostridium botulinum)
		產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)
		艱難梭菌(Clostridium difficle)
		破傷風梭菌(Clostridium tetani)
	疏螺旋體(Borrelia)	土耳其疏螺旋體(Borrelia turcica)
		皮革疏螺旋體(Borrelia coriaceae)
		宮本疏螺旋體(Borrelia miyamotoi)
		梅氏疏螺旋體(Borrelia mayonii)
		美洲疏螺旋體(Borrelia americana)
		蘭氏疏螺旋體(Borrelia lancei)
		鸚疏螺旋體(Borrelia turdi)
		狸貓疏螺旋體(Borrelia tanukii)
		加州疏螺旋體(Borrelia californiensis)

		庫氏疏螺旋體(Borrelia kurtenbachii)
		長江疏螺旋體(Borrelia yangtzensis)
		瓦萊疏螺旋體(Borrelia valaisiana)
		阿氏疏螺旋體(Borrelia afzelii)
		斯皮爾曼疏螺旋體(Borrelia spielmanii)
		海事疏螺旋體(Borrelia maritima)
		盧西塔尼亞疏螺旋體(Borrelia lusitaniae)
		加林疏螺旋體(Borrelia garinii garinii)
		巴伐利亞加林疏螺旋體(Borrelia garinii bavariensis)
		日本疏螺旋體(Borrelia japonica)
		中國疏螺旋體(Borrelia sinica)
		布氏疏螺旋體(Borrelia burgdorferi)
		比塞特疏螺旋體(Borrelia bissetii)
		卡羅萊納州疏螺旋體(Borrelia carolinensis)
	鉤端螺旋體(Leptospira)	亞歷山大鉤端螺旋體(Leptospira alexanderi)
		博氏鉤端螺旋體(Leptospira borgpetersenii)
		問號鉤端螺旋體(Leptospira interrogans)
		克氏鉤端螺旋體(Leptospira kirchneri)
		馬約特島鉤端螺旋體(Leptospira mayottensis)
		野口鉤端螺旋體(Leptospira noguchii)
		聖地羅西鉤端螺旋體(Leptospira santorosai)
		韋氏鉤端螺旋體(Leptospira weilii)
	分枝桿菌(Mycobacterium)	結核分枝桿菌(Mycobacterium tuberculosis)
		非洲分枝桿菌(Mycobacterium africanum)
		劍羚分枝桿菌(Mycobacterium orygis)
		牛分枝桿菌(Mycobacterium bovis)
		田鼠分枝桿菌(Mycobacterium microti)
		卡氏分枝桿菌(Mycobacterium canetti)
		山羊分枝桿菌(Mycobacterium caprae)
		鰭足分枝桿菌(Mycobacterium pinnipedii)
		狐獾分枝桿菌(Mycobacterium suricattae)
		貓鼬分枝桿菌(Mycobacterium mungi)
	弧菌(Vibrio)	創傷弧菌(Vibrio vulnificus)
		霍亂弧菌(Vibrio cholerae)
	芽孢桿菌(Bacillus)	炭疽桿菌(Bacillus anthracis)
	新立克次體(Neorickettsia)	里氏新立克次體(Neorickettsia risticii)
	變形桿菌(Proteus)	豪氏變形桿菌(Proteus hauseri)
		奇異變形桿菌(Proteus mirabilis)
		產黏變形桿菌(Proteus myxofaciens)
		彭納變形桿菌(Proteus penneri)
		普通變形桿菌(Proteus vulgaris)
	沙雷氏菌(Serratia)	黏質沙雷氏菌(Serratia marcescens)
		普利茅斯沙雷氏菌(Serratia plymuthica)

		液化沙雷氏菌(<i>Serratia liquefaciens</i>)
		深紅沙雷氏菌(<i>Serratia rubidaea</i>)
		氣味沙雷氏菌(<i>Serratia odorifera</i>)
		居泉沙雷氏菌(<i>Serratia fonticola</i>)
	耶氏桿菌(<i>Yersinia</i>)	鼠疫耶氏桿菌(<i>Yersinia pestis</i>)
		小腸大腸炎耶氏桿菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)
		假性結核病耶氏桿菌(<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)
		魯氏耶氏桿菌(<i>Yersinia Ruckerii</i>)
	克留氏菌(<i>Klebsiella</i>)	產氣克留氏菌(<i>Klebsiella aerogenes</i>)
		肉芽腫克留氏菌(<i>Klebsiella granulomatis</i>)
		格里蒙克留氏菌(<i>Klebsiella grimontii</i>)
		華西克留氏菌(<i>Klebsiella huaxiensis</i>)
		凱氏克留氏菌(<i>Klebsiella kielensis</i>)
		密歇根克留氏菌(<i>Klebsiella michiganensis</i>)
		米氏克留氏菌(<i>Klebsiella milletis</i>)
		產酸克留氏菌(<i>Klebsiella oxytoca</i>)
		肺炎克留氏菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
		類肺炎克留氏菌(<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>)
		似肺炎克留氏菌(<i>Klebsiella similipneumoniae</i>)
		類變棲克留氏菌(<i>Klebsiella quasivariicola</i>)
		塞內加爾克留氏菌(<i>Klebsiella senegalensis</i>)
		類固醇克留氏菌(<i>Klebsiella steroids</i>)
		變棲克留氏菌(<i>Klebsiella variicola</i>)
	腸桿菌(<i>Enterobacter</i>)	陰溝腸桿菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)
		致癌腸桿菌(<i>Enterobacter cancerogenous</i>)
		產氣腸桿菌(<i>Enterobacter aerogenes</i>)
		霍氏腸桿菌(<i>Enterobacter hormaechei</i>)
	多桿菌(<i>Pluralibacter</i>)	哲哥維多桿菌(<i>Pluralibacter gergoviae</i>)
	檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter</i>)	異型檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter diversus</i>)
		弗氏檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter freundii</i>)
		無丙二酸檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter amalonaticus</i>)
		布氏檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter braakii</i>)
		法氏檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter farmeri</i>)
		克氏檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter koseri</i>)
		塞氏檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter sedlakii</i>)
		烏克曼檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter werkmanii</i>)
	沙門氏菌(<i>Salmonella</i>)	楊氏檸檬酸桿菌(<i>Citrobacter Youngae</i>)
		邦戈沙門氏菌(<i>Salmonella bongori</i>)
		腸道腸沙門氏菌亞種(<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>)
		豬霍亂沙門菌(<i>Salmonella choleraesuis</i>)
		都柏林沙門氏菌(<i>Salmonella dublin</i>)
		腸炎沙門氏菌(<i>Salmonella enteritidis</i>)

		雞沙門氏菌(Salmonella gallinarum)
		哈達爾沙門氏菌(Salmonella hadar)
		海德堡沙門氏菌(Salmonella heidelberg)
		嬰兒沙門氏菌(Salmonella infantis)
		副傷寒沙門氏菌(Salmonella paratyphi)
		傷寒沙門氏菌(Salmonella typhi)
		鼠傷寒沙門氏菌(Salmonella typhimurium)
	志賀氏菌(Shigella)	鮑氏志賀氏菌(Shigella boydii)
		痢疾志賀氏菌(Shigella dysenteriae)
		福氏志賀氏菌(Shigella flexneri)
		宋內氏志賀氏菌(Shigella sonnei)
	埃希氏菌(Escherichia)	艾伯特埃希氏菌(Escherichia albertii)
		大腸桿菌(Escherichia coli)
		費格森埃希氏菌(Escherichia fergusonii)
		赫氏埃希氏菌(Escherichia hermannii)
		旱獺埃希氏菌(Escherichia marmotae)
		傷口埃希氏菌(Escherichia vulneris)
肺泡	瘧原蟲(Plasmodium)	鎌狀瘧原蟲(Plasmodium falciparum)
		諾氏瘧原蟲(Plasmodium knowlesi)
		間日瘧原蟲(Plasmodium vivax)
		沃氏卵形瘧原蟲(Plasmodium ovale wallikeri)
		柯氏卵形瘧原蟲(Plasmodium ovale curtisi)
		三日瘧原蟲(Plasmodium malariae)
	弓形蟲(Toxoplasma)	剛地弓形蟲(Toxoplasma gondii)
阿米巴 (Amoeba)	變形蟲(Naegleria)	變形纖毛蟲(Naegleria fowleri)
	內阿米巴(Entamoeba)	痢疾內阿米巴(Entamoeba histolytica)
真菌	芽生菌(Blastomyces)	皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)
		吉氏芽生菌(Blastomyces gilchristi)
		螺旋芽生菌(Blastomyces helicus)
		佩氏芽生菌(Blastomyces percursor)
		埃贊齊芽生菌(Blastomyces emzantsi)
	球孢子菌(Coccidioides)	粗球孢子菌(Coccidioides immitis)
		波薩達西球孢子菌(Coccidioides posadasii)
	組織胞漿菌(Histoplasma)	莢膜組織胞漿菌(Histoplasma capsulatum)
	肺囊蟲(Pneumocystis)	傑氏肺囊蟲(Pneumocystis jirovecii)
	籃狀菌(Talaromyces)	馬爾尼菲籃狀菌(Talaromyces marneffeii)
	孢子絲菌(Sporothrix)	申克氏孢子絲菌(Sporothrix schenckii)
原生動物 (Protozoa)	利什曼原蟲(Leishmania)	埃塞俄比亞利什曼原蟲(Leishmania aethiopica)
		亞馬遜利什曼原蟲(Leishmania amazonensis)
		阿拉比卡利什曼原蟲(Leishmania arabica)
		奇博爾德利什曼原蟲(Leishmania archibaldi)
		阿里斯特德西利什曼原蟲(Leishmania aristadesi)
		巴西利什曼原蟲(維安納) (Leishmania (Viannia)

		braziliensis)
		恰氏利什曼原蟲(Leishmania chagasi)
		杜氏利什曼原蟲(Leishmania donovani)
		豚鼠利什曼原蟲(蒙迪尼亞)(Leishmania (Mundinia) enriettii)
		福拉蒂尼利什曼原蟲(Leishmania forattinii)
		加納姆利什曼原蟲(Leishmania garnhami)
		沙鼠利什曼原蟲(Leishmania gerbili)
		圭亞那利什曼原蟲(維安納)(Leishmania (Viannia) guyanensis)
		嬰兒利什曼原蟲(Leishmania infantum)
		克里克利什曼原蟲(Leishmania killicki)
		萊森利什曼原蟲(維安納)(Leishmania (Viannia) lainsoni)
		碩大利什曼原蟲(Leishmania major)
		巨型利什曼原蟲(蒙迪尼亞)(Leishmania (Mundinia) macropodum)
		馬提尼克利什曼原蟲(蒙迪尼亞)(Leishmania (Mundinia) martiniquensis)
		墨西哥利什曼原蟲(Leishmania mexicana)
		納伊夫利什曼原蟲(維安納)(Leishmania (Viannia) naiffi)
		巴拿馬利什曼原蟲(維安納)(Leishmania (Viannia) panamensis)
		秘魯利什曼原蟲(維安納)(Leishmania (Viannia) peruviana)
		皮華諾利什曼原蟲(Leishmania pifanoi)
		肖氏利什曼原蟲(維安納)(Leishmania (Viannia) shawi)
		狼蛛利什曼原蟲(Leishmania tarentolae)
		熱帶利什曼原蟲(Leishmania tropica)
		突雷尼利什曼原蟲(Leishmania turanica)
		沃爾頓利什曼原蟲(Leishmania waltoni)
		委內瑞拉利什曼原蟲(Leishmania venezuelensis)
	錐蟲(Trypanosoma)	布氏錐蟲(Trypanosoma brucei)
		羅得西亞錐蟲(Trypanosoma rhodesiense)
		馬疫錐蟲(Trypanosoma equiperdum)
		間日錐蟲(Trypanosoma vivax)
		剛果錐蟲(Trypanosoma congolense)
		克氏錐蟲(Trypanosoma cruzi)
		路易斯錐蟲(Trypanosoma lewisi)
		羊錐蟲(Trypanosoma melophagium)
		納比亞錐蟲(Trypanosoma nabiasi)
		蘭格爾錐蟲(Trypanosoma rangeli)

		泰勒錐蟲(Trypanosoma theileri)
		特奧多爾錐蟲(Trypanosoma theodori)
		克氏錐蟲(Trypanosoma cruzi)
		馬里內拉克氏錐蟲(Trypanosoma cruzi marinkellei)
		迪奧尼西奧錐蟲(Trypanosoma dionisii)
		歐尼錐蟲(Trypanosoma erneyi)
		利文斯敦錐蟲(Trypanosoma livingstonei)
		沃瓦錐蟲(Trypanosoma wauwau)
		柯氏錐蟲(Trypanosoma conorhini)
		蘭格爾錐蟲(Trypanosoma rangeli)
	賈第蟲(Giardia)	十二指腸賈第蟲(Giardia duodenalis)
線蟲	蟠尾絲蟲(Onchocerca)	人蟠尾絲蟲(Onchocerca volvulus)
扁形動物	條蟲(Taenia)	有鉤條蟲(Taenia solium) (豬肉)
		無鉤條蟲(Taenia saginata) (牛肉)
	裂頭條蟲 (Diphyllbothrium)	廣節裂頭條蟲(Diphyllbothrium latum)
		樹枝狀裂頭條蟲(Diphyllbothrium dendriticum)
		聶氏 / 克氏裂頭條蟲 (Diphyllbothrium nihonkainense/klebanovskii)
	住血吸蟲(Schistoma)	班福德住血吸蟲(Schistosoma bomfordi)
		牛住血吸蟲(Schistosoma bovis)
		居拉松住血吸蟲(Schistosoma curassoni)
		達特住血吸蟲(Schistosoma datta)
		愛德華住血吸蟲(Schistosoma edwardiense)
		幾內亞住血吸蟲(Schistosoma guineensis)
		埃及血吸蟲(Schistosoma haematobium)
		哈氏住血吸蟲(Schistosoma harinasutai)
		河馬住血吸蟲(Schistosoma hippopotami)
		不明住血吸蟲(Schistosoma incognitum)
		印度住血吸蟲(Schistosoma indicum)
		剛果住血吸蟲(Schistosoma intercalatum)
		日本血吸蟲(Schistosoma japonicum)
		基氏住血吸蟲(Schistosoma kisumuensis)
		利珀住血吸蟲(Schistosoma leiperi)
		馬來住血吸蟲(Schistosoma malayensis)
		曼森住血吸蟲(Schistosoma mansoni)
		瑪氏住血吸蟲(Schistosoma margrebowiei)
		馬特住血吸蟲(Schistosoma mattheei)
		湄公住血吸蟲(Schistosoma mekongi)
		卵形住血吸蟲(Schistosoma ovuncatum)
		鼻住血吸蟲(Schistosoma nasale)
		羅丹住血吸蟲(Schistosoma rodhaini)
		中華住血吸蟲(Schistosoma sinensium)
		梭形住血吸蟲(Schistosoma spindale)

		土耳其斯坦住血吸蟲(Schistosoma turkestanicum)
節肢動物	疥蟎(Sarcoptes)	人疥蟎(Sarcoptes scabiei)
病毒	肝病毒(Hepatovirus)	A型肝炎
	正肝炎DNA病毒(Orthohepadnavirus)	B型肝炎
	δ病毒(Deltavirus)	意大利δ病毒(Deltavirus italiense) [HDV-1]
		日本δ病毒(Deltavirus japonense) [HDV-2]
		秘魯δ病毒(Deltavirus peruense) [HDV-3]
		臺灣δ病毒(Deltavirus taiwanense) [HDV-4]
		衣物δ病毒(Deltavirus togense)[HDV-5]
		汽車δ病毒(Deltavirus carense) [HDV-6]
		喀麥隆δ病毒(Deltavirus cameroonense) [HDV-7]
		塞內加爾δ病毒(Deltavirus senegalense)[HDV-8]
	正肝炎病毒(Orthoherpesvirus)	A型正肝炎病毒(E型肝炎)
	α病毒(Alphavirus)	奧拉病毒(Aura virus)
		巴馬森林病毒(Barmah Forest virus)
		比巴魯病毒(Bebaru virus)
		卡因瓜病毒(Caaingua virus)
		卡巴斯歐病毒(Cabassou virus)
		屈公病毒(Chikungunya virus)
		東部馬腦炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)
		埃拉特病毒(Eilat virus)
		沼澤地病毒(Everglades virus)
		摩根堡病毒(Fort Morgan virus)
		蓋塔病毒(Getah virus)
		高地J病毒(Highlands J virus)
		馬達里亞加病毒(Madariaga virus)
		馬雅羅病毒(Mayaro virus)
		米德爾堡病毒(Middelburg virus)
		莫索達斯佩德拉斯病毒(Mosso das Pedras virus)
		穆坎布病毒(Mucambo virus)
		恩杜穆病毒(Ndumu virus)
		奧-奈氏病毒(O'nyong'nyong virus)
		皮春納病毒(Pixuna virus)
		尼格羅河病毒(Rio Negro virus)
		羅斯河病毒(Ross River virus)
		鮭魚胰臟疾病病毒(Salmon pancreas disease virus)
		勝利基森林病毒(Semliki Forest virus)
		辛德比斯病毒
		南方象海豹病毒(Southern elephant seal virus)
		圖那特病毒(Tonate virus)
		特羅卡拉病毒(Trocar virus)

		烏納病毒(Una virus)
		委內瑞拉馬腦炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus)
		西部馬腦炎病毒(Western equine encephalitis virus)
		瓦塔羅阿病毒(Whataroa virus)
	粒外彈狀病毒 (Novirhabdovirus)	感染性造血性壞死病毒(類鮭魚粒外彈狀病毒)
	γ逆轉錄病毒屬 (Gammaretrovirus)	貓白血病病毒
	原始小病毒 (Protoparvovirus)	貓泛白血球減少症病毒
		犬小病毒
		貂腸炎病毒
	δ逆轉錄病毒 (Deltaretrovirus)	牛白血病病毒
		人類T細胞嗜淋巴球病毒
	β冠狀病毒/埃貝冠狀病毒 (Betacoronavirus/Embecovirus)	牛冠狀病毒
		人類冠狀病毒OC43
		中國家鼠冠狀病毒HKU24
		人類冠狀病毒HKU1
		鼠類冠狀病毒
	β冠狀病毒/薩貝冠狀病毒 (Sarbecovirus)	田鼠冠狀病毒2JL14
		嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒1
		嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒2
		蝙蝠SARS樣冠狀病毒WIV1
	β冠狀病毒/莫貝冠狀病毒 (Merbecovirus)	蝙蝠冠狀病毒RaTG13
		中東呼吸道症候群相關冠狀病毒
		家蝠屬蝙蝠冠狀病毒HKU5
	β冠狀病毒/諾貝冠狀病毒 (Nobecovirus)	竹蝠屬蝙蝠冠狀病毒HKU4
		幻像蝙蝠(Eidolon bat)冠狀病毒C704
		果蝠屬(Rousettus)蝙蝠冠狀病毒GCCDC1
	β冠狀病毒/嘿貝冠狀病毒 (Hibbecovirus)	果蝠屬蝙蝠冠狀病毒HKU9
		蝙蝠Hp-β冠狀病毒Zhejiang2013
	副黏病毒(Paramyxovirus)	西水羅角副黏病毒(Sosuga pararubulavirus)
	亨尼帕病毒(Henipavirus)	亨德拉亨尼帕病毒(Hendra hinipivirus)
		尼帕病毒(Nipah virus)
	沙粒狀病毒(Arenavirus)	拉沙病毒(Lassa virus)
	埃博拉病毒(Ebolavirus)	埃博拉病毒(Ebola virus)
		本迪布焦病毒(Bundibugyo virus)
		蘇丹病毒(Sudan virus)
		塔依森林病毒(Tai Forest virus)
		萊斯頓病毒(Reston virus)
		邦巴利病毒(Bombali virus)
	馬堡病毒(Marburgvirus)	馬堡病毒(Marburgh virus)

		拉溫病毒(Ravn virus)
黃病毒(Flavivirus)		西尼羅河病毒(West Nile virus)
		茲卡病毒(Zika virus)
		登革熱病毒(dengue virus)
		黃熱病病毒(yellow fever virus)
		日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)
		C型肝炎
		蜱傳腦炎病毒(Tick-borne encephalitis virus) (及子類型)
輪狀病毒(Rotavirus)		A型輪狀病毒
		B型輪狀病毒
		C型輪狀病毒
		D型輪狀病毒
		F型輪狀病毒
		G型輪狀病毒
		H型輪狀病毒
		I型輪狀病毒
		J型輪狀病毒
單純病毒(Simplexvirus)		單純疱疹病毒(Herpes simplex virus) 1
		單純疱疹病毒2
		獼猴疱疹病毒(Cercopithecine herpesvirus)
水痘病毒(Varicellovirus)		牛α疱疹病毒1
		牛α疱疹病毒5
		非洲羚羊(Bubaline) α疱疹病毒1
		犬α疱疹病毒1
		山羊α疱疹病毒1
		獼猴α疱疹病毒9
		鹿α疱疹病毒1
		鹿α疱疹病毒2
		鹿α疱疹病毒3
		馬α疱疹病毒1
		馬α疱疹病毒3
		馬α疱疹病毒4
		馬α疱疹病毒8
		馬α疱疹病毒9
		貓α疱疹病毒1
		人類α疱疹病毒3
		獨角鯨α疱疹病毒1
		海豹α疱疹病毒1
		豬α疱疹病毒1
	淋巴濾泡病毒 (Lymphocryptovirus)	人類γ疱疹病毒4 (埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus))
	巨細胞病毒	人類β疱疹病毒5

(Cytomegalovirus)	
蛛猴病毒(Rhadinovirus)	卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)
	鼠γ疱疹病毒4
腸病毒(Enterovirus)	A型腸病毒(包括子類型A71)
	B型腸病毒(包括B型柯薩奇(coxsackie)病毒子類型)
	C型腸病毒(包括脊髓灰白質炎病毒(poliovirus) 1、2及3)
	A型鼻病毒(Rhinovirus A)
	B型鼻病毒
	C型鼻病毒
α流感病毒	A型流感病毒
βδ流感病毒	B型流感病毒
γ流感病毒	C型流感病毒
δ流感病毒	D型流感病毒
伊沙病毒(Isavirus)	感染性鮭魚貧血病毒
誇蘭加病毒(Quarantavirus)	約翰斯頓環礁病毒(Johnston Atoll Virus)
	誇蘭菲爾病毒(Quarantil virus)
托高土病毒(Thogotovirus)	托里托高土病毒(Dhori thogotovirus)
	托高土托高土病毒(Thogoto thogotovirus)
麻疹病毒(Morbilivirus)	麻疹麻疹病毒(Measles morbilivirus)
	犬麻疹病毒(犬瘟熱)
	鯨麻疹病毒
	貓麻疹病毒
	綿羊牛瘟
	海豹麻疹病毒
	牛瘟麻疹病毒
風疹病毒(Rubivirus)	風疹風疹病毒(Rubivirus rubellae)
	魯特風疹病毒(Rubivirus rubeetense)
	斯特雷風疹病毒(Rubivirus strellense)
正腮腺炎病毒(Orthorubulavirus)	流行性正腮腺炎病毒(Mumps orthorubulavirus)
間質肺炎病毒(Metapneumovirus)	禽間質肺炎病毒
	人類間質肺炎病毒
正肺病毒(Orthopneumovirus)	人類正肺病毒
α乳頭瘤病毒(Alphapapillomavirus)	人類α乳頭瘤病毒(L1基因之所有子類型)
β乳頭瘤病毒(Betapapillomavirus)	人類β乳頭瘤病毒(L1基因之所有子類型)
γ乳頭瘤病毒(Gammapapillomavirus)	人類γ乳頭瘤病毒(L1基因之所有子類型)
δ乳頭瘤病毒	溫帶牛δ乳頭瘤病毒(L1基因之所有子類型)

	(Deltapapillomavirus)	
	ε乳頭瘤病毒 (Epsilonpapillomavirus)	溫帶牛ε乳頭瘤病毒(L1基因之所有子類型)
	ξ乳頭瘤病毒 (Xipapillomavirus)	溫帶牛ξ乳頭瘤病毒(L1基因之所有子類型)
	慢病毒	人類免疫缺乏病毒1
		人類免疫缺乏病毒2
	正漢坦病毒 (Orthohantavirus)	安第斯山脈(Andes)正漢坦病毒
		淺間(Asama)正漢坦病毒
		阿西卡拉(Asikkala)正漢坦病毒
		巴尤(Bayou)正漢坦病毒
		黑溪運河(Black Creek Canal)正漢坦病毒
		鮑(Bowe)正漢坦病毒
		布魯日(Bruges)正漢坦病毒
		卡諾德爾加迪托(Cano Delgadito)正漢坦病毒
		高平(Cao Bang)正漢坦病毒
		喬克羅(Choclo)正漢坦病毒
		大別山(Dabieshan)正漢坦病毒
		多布拉瓦-貝爾格萊德(Dobrava-Belgrade)正漢坦病毒
		埃爾莫羅峽谷(El Moro Canyon)正漢坦病毒
		福貢(Fugong)正漢坦病毒
		扶松(Fusong)正漢坦病毒
		漢坦(Hantaan)正漢坦病毒
		濟州(Jeju)正漢坦病毒
		肯克美(Kenkeme)正漢坦病毒
		哈巴羅夫斯克(Khabarovsk)正漢坦病毒
		內格拉(Laguna Negra)正漢坦病毒
		瀘西(Luxi)正漢坦病毒
		地圖(Maporal)正漢坦病毒
		蒙塔諾(Montano)正漢坦病毒
		訥科克利(Necocli)正漢坦病毒
		牛弓(Oxbow)正漢坦病毒
		展望山(Prospect Hill)正漢坦病毒
		普馬拉(Puumala)正漢坦病毒
		羅賓那(Robina)正漢坦病毒
		洛克波特(Rockport)正漢坦病毒
		桑加索(Sangassou)正漢坦病毒
		賽維斯(Seewis)正漢坦病毒
		首爾(Seoul)正漢坦病毒
		辛農布雷(Sin Nombre)正漢坦病毒
		塔特納萊(Tatenale)正漢坦病毒
		泰國(Thailand)正漢坦病毒

		提格雷(Tigray)正漢坦病毒
		圖拉(Tula)正漢坦病毒
		牙克石(Yakeshi)正漢坦病毒
	正痘病毒(Orthopoxvirus)	阿巴提諾獼猴痘病毒(Abatino macacapox virus)
		阿赫梅塔病毒(Akhmeta virus)
		阿拉斯加痘病毒(Alaskapox virus)
		駱駝痘病毒(Camelpox virus)
		牛痘病毒(Cowpox virus)
		鼠痘病毒(Ectromelia virus)
		猴痘病毒(Monkeypox virus)
		浣熊痘病毒(Raccoonpox virus)
		臭鼬痘病毒(Skunkpox virus)
		沙鼠痘病毒(Taterapox virus)
		天花病毒(Variola virus)
		田鼠痘病毒(Volepox virus)
	狂犬病毒(Lyssavirus)	阿拉萬狂犬病毒(Aravan lyssavirus)
		澳大利亞蝙蝠狂犬病毒
		博克洛(Bokeloh)蝙蝠狂犬病毒
		杜文海格狂犬病毒(Duvenhage lyssavirus)
		歐洲蝙蝠1狂犬病毒
		歐洲蝙蝠2狂犬病毒
		甘諾魯瓦(Gannoruwa)蝙蝠狂犬病毒
		伊爾庫特狂犬病毒(Irkut lyssavirus)
		苦盞狂犬病毒(Khujand lyssavirus)
		馬達加斯加(Madagascar)蝙蝠狂犬病毒
		狂犬病狂犬病毒(Rabies lyssavirus)
		拉各斯(Lagos)蝙蝠狂犬病毒
		莫科拉狂犬病毒(Mokola lyssavirus)
		希莫尼(Shimoni)蝙蝠狂犬病毒
		西高加索(West Caucasian)蝙蝠狂犬病毒
		生駒狂犬病毒(Ikoma lyssavirus)
		萊里達(Lleida)蝙蝠狂犬病毒
	哺乳動物沙狀病毒(Mammarenavirus)	淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus)
	哺乳動物腺病毒(Mastadenovirus)	A型人類腺病毒(Human adenovirus A)
		B型人類腺病毒
		C型人類腺病毒
		D型人類腺病毒
		E型人類腺病毒
		F型人類腺病毒
		G型人類腺病毒

【0072】 在一些實施例中，抗原包含病毒多肽。在一些實施例中，病毒多肽包含本文所描述之冠狀病毒多肽。在一些實施例中，冠狀病毒多肽包含SARS-CoV-2多肽。在一些實施例中，SARS-CoV-2多肽包含刺突蛋白或其片段。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段為全長刺突蛋白。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段為截短刺突蛋白。在一些實施例中，截短刺突蛋白包含刺突蛋白之N端域或刺突蛋白之S2域。在一些實施例中，截短刺突蛋白包含刺突蛋白之N端域及刺突蛋白之S2域。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段為重組刺突蛋白。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段包含至少一個修飾。在一些實施例中，該至少一個修飾包含至少一個胺基酸突變。在一些實施例中，該至少一個胺基酸突變消除刺突蛋白中之裂解位點，諸如弗林蛋白酶裂解位點或絲胺酸蛋白酶裂解位點。在一些實施例中，弗林蛋白酶裂解位點包含**SEQ ID NO: 21** (全長刺突蛋白)或**SEQ ID NO: 22** (奧密克戎突變體刺突蛋白)中之胺基酸殘基682-685、胺基酸殘基679-682或胺基酸殘基811。

【0073】 在一些實施例中，絲胺酸蛋白酶裂解位點包含**SEQ ID NO: 21** (全長刺突蛋白)或**SEQ ID NO: 22** (奧密克戎突變體刺突蛋白)中之胺基酸殘基986及987；或983及984。在一些實施例中，該至少一個胺基酸突變在**SEQ ID NO: 21** (全長刺突蛋白)或**SEQ ID NO: 22** (奧密克戎突變體刺突蛋白)中之胺基酸殘基814、889、896、939、682-685、679-682、811、986、987、983、984或其組合處包含胺基酸取代。在一些實施例中，該至少一個胺基酸突變在**SEQ ID NO: 21** (全長刺突蛋白)或**SEQ ID NO: 22** (奧密克戎突變體刺突蛋白)中之胺基酸殘基814、889、896及939處包含胺基酸取代。在一些實施例中，刺突蛋白或其片段包含訊號

肽。在一些實施例中，訊號肽包含**SEQ ID NO: 13**之胺基酸序列：**MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHFRR**。在一些實施例中，訊號肽為包含與IgE Fc受體 α 至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%一致之胺基酸序列的分泌肽。在一些實施例中，分泌肽為IgE Fc受體 α 。

【0074】 在一些實施例中，病毒多肽包含流感多肽。在一些實施例中，流感多肽包含A型流感多肽、B型流感多肽、C型流感多肽或D型流感多肽。在一些實施例中，流感多肽為A型流感多肽。在一些實施例中，A型流感多肽包含神經胺糖酸酶(NA)或其片段或血球凝集素(HA)或其片段。在一些實施例中，A型流感多肽包含血球凝集素(HA)或其片段。在一些實施例中，血球凝集素(HA)或其片段為全長血球凝集素(HA)。在一些實施例中，血球凝集素(HA)或其片段為截短血球凝集素(HA)。在一些實施例中，截短血球凝集素(HA)包含柄域。在一些實施例中，血球凝集素(HA)或其片段為包含至少一個修飾之重組血球凝集素(HA)。在一些實施例中，該至少一個修飾包含至少一個胺基酸突變。在一些實施例中，該至少一個修飾包含血球凝集素(HA)或其片段，該血球凝集素(HA)或其片段包含A型流感之M2蛋白之胞外域(M2e)的胺基酸序列：**SEQ ID NO: 14**：**MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD**。

【0075】 在一些實施例中，重組逆轉錄病毒載體編碼至少一種套膜蛋白。在一些實施例中，由重組逆轉錄病毒載體編碼之套膜為雙嗜性套膜。在一些實施例中，重組逆轉錄病毒載體編碼至少一種套膜蛋白以用於製造雙嗜性套膜。在一些實施例中，該至少一種套膜蛋白包含至少一種 α 病毒套膜蛋白。在一些實施例中，至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白，其中

該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白包含E3蛋白、E2蛋白、6K蛋白、E1蛋白或其組合。在一些實施例中，該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白包含至少一個突變。在一些實施例中，該至少一個突變增加至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白與人類細胞(諸如樹突狀細胞)之間的結合親和力。在一些實施例中，該至少一個突變為E2蛋白之E160G。

【0076】 在一些實施例中，載體編碼用於靶向細胞表面標記(例如與疾病或病狀相關之細胞之細胞表面上表現的抗原)之靶向部分，諸如抗體。在一些實施例中，細胞表面標記為腫瘤相關抗原，諸如Her2。在一些實施例中，靶向部分包含抗體、奈米抗體(例如單鏈可變片段或scFv)或其組合。在一些實施例中，靶向部分在病毒套膜之表面上表現，其中本文所描述之載體囊封於病毒套膜中。在一些實施例中，靶向部分增加載體對與疾病或病狀(諸如癌症或病灶)相關之細胞或微環境之靶向或遞送。

【0077】 在一些實施例中，載體編碼非介白素酶。在一些態樣中，載體編碼可將核苷劑轉化為用於殺死與本文所描述之疾病或病狀相關之細胞之細胞毒性藥物的酶。在一些實施例中，酶包含具有核酸核苷酸作為受質之激酶。在一些實施例中，激酶為胸苷激酶，其中胸苷激酶為使天然核苷受質以及核苷類似物磷酸化之補救路徑酶。一般而言，可藉由向表現病毒胸苷激酶之細胞投與核苷類似物(諸如更昔洛韋或阿克洛韋)，治療上採用病毒胸苷激酶，其中病毒胸苷激酶使核苷類似物磷酸化，從而產生能夠殺死細胞之毒性產物。本發明之病毒胸苷激酶可由廣泛多種病毒胸苷激酶來製備。在一些實施例中，病毒胸苷激酶突變體衍生自疱疹病毒科胸苷激酶，包括例如靈長類動物疱疹病毒及非靈長類動物疱疹病毒(諸如鳥疱疹病毒)兩者。合適的疱疹病毒之代表性實例包括例如1型單純疱疹病毒

(Herpes Simplex Virus ; HSV)、2型單純疱疹病毒、水痘帶狀疱疹病毒、
 狢猴疱疹病毒、貓1型疱疹病毒、假狂犬病病毒、馬1型疱疹病毒、牛1型
 疱疹病毒、火雞疱疹病毒、Marek氏病病毒、狢疱疹病毒或埃-巴二氏病
 毒(Epstein-Barr virus)。

【0078】 在一些態樣中，本文所描述之胸苷激酶可為突變胸苷激
 酶，其中突變胸苷激酶包含至少一個胺基酸突變。在一些態樣中，突變胸
 苷激酶為相較於以下HSV1-TK之野生型胺基酸序列包含至少一個胺基酸
 突變的突變1型單純疱疹病毒胸苷激酶(HSV1-TK)：
 MASYPGHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQQEATEVRPEQKM
 PTLLRVYIDGPHGMGKTTTTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYWRVLG
 ASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAAVVM TSAQITMGMPYAVTDAVL
 APHIGGEAGSSHAPPPALTLIFDRHP IAALLCYPAARYLMGSMTPQAV
 LAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAI
 RRVYGLLANTVRYLQCGGSWREDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGP
 RPHIGDTLFTLFRAPPELLAPNGDLYNVFAWALDVLAKRLR (SEQ ID
 NO: 11)。在一些態樣中，突變HSV1-TK包含與HSV1-TK胺基酸序列(例
 如SEQ ID NO: 11)具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、
 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、
 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列一致性之
 胺基酸序列。在一些實施例中，突變HSV-1-TK包含核輸出序列(nuclear
 export sequence ; NES)。在一些態樣中，NES包含LQKKLEELELDG
 (SEQ ID NO: 12)之胺基酸序列。

【0079】 疱疹病毒可容易地獲自市售來源，諸如美國菌種中心

(American Type Culture Collection) (「ATCC」, Rockville, Md.)。疱疹病毒亦可分離自天然存在之過程(例如感染的動物)。

【0080】 在一些實施例中，相較於HSV1-TK之野生型胺基酸序列(**SEQ ID NO: 11**)，突變HSV1-TK在胺基酸殘基25、26、32、33、167、168或其組合處包含至少一個胺基酸突變。在一些實施例中，突變包含用極性、非極性、鹼性或酸性胺基酸取代野生型胺基酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在胺基酸殘基167、168或兩者處突變。在一個實例中，序列在胺基酸殘基167處突變。在另一實例中，序列在胺基酸殘基168處突變。在另一實例中，序列在胺基酸殘基167及168處突變。胺基酸殘基167可突變為組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸及苯丙胺酸。胺基酸殘基168可突變為組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在胺基酸殘基25及/或26處突變。在一些實施例中，胺基酸殘基25及/或26可突變為選自由以下組成之群之胺基酸：甘胺酸、絲胺酸及麩胺酸酯。在一些實施例中，突變HSV1-TK在胺基酸殘基32及/或33處突變。胺基酸殘基32及/或33可突變為選自由以下組成之群之胺基酸：甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸及天冬胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在胺基酸殘基25、26、32及/或33處突變。胺基酸殘基25、26、32及/或33可突變為選自由以下組成之群之胺基酸：甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸及天冬胺酸。

【0081】 在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25及/或26；及167，其中在胺基酸殘基25及/或26處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例

中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25及/或26；及168，其中在胺基酸殘基25及/或26處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25及/或26；及167及/或168，其中在胺基酸殘基25及/或26處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167及/或168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。

【0082】 在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：32及/或33；及167，其中在胺基酸殘基32及/或33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：32及/或33；及168，其中在胺基酸殘基32及/或33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：32及/或33；及167及/或168，其中在胺基酸殘基32及/或33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167及/或168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。

【0083】 在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25、26、32及33；及167，其中在胺基酸殘基25、26、32及33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基

167處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25、26、32及33；及168，其中在胺基酸殘基25、26、32及33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25、26、32及33；及167及/或168，其中在胺基酸殘基25、26、32及33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167及/或168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。

【0084】 在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25及26或32及33；及167，其中在胺基酸殘基25及26或32及33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25及26或32及33；及168，其中在胺基酸殘基25及26或32及33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25及26或32及33；及167及/或168，其中在胺基酸殘基25及26或32及33處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167及/或168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。

【0085】 在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25、26、32及/或33中之任何一或多者；及167，其中在胺基酸殘基

25、26、32及/或33中之任何一或多者處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25、26、32及/或33中之任何一或多者；及168，其中在胺基酸殘基25、26、32及/或33中之任何一或多者處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，突變HSV1-TK在以下胺基酸殘基處突變：25、26、32及/或33中之任何一或多者；及167及/或168，其中在胺基酸殘基25、26、32及/或33中之任何一或多者處之突變包含甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、麩胺酸或天冬胺酸；及在胺基酸殘基167及/或168處之突變包含組胺酸、離胺酸、半胱胺酸、絲胺酸或苯丙胺酸。

【0086】 在一些實施例中，除編碼突變HSV1-TK以外，載體可編碼PiT-2、PiT-1、mCat-1（鼠類陽離子受體-1；親嗜性莫洛尼(Moloney) MLV之目標)或由 γ 逆轉錄病毒使用之其他受體。

【0087】 在一些實施例中，相較於野生型HSV1-TK，突變HSV1-TK包含增加的將核苷劑轉化為細胞毒性藥物之酶活性。在一些實施例中，相較於將相同核苷劑(例如前藥)轉化為細胞毒性藥物之野生型HSV1-TK之酶活性，突變HSV1-TK使將核苷劑轉化為細胞毒性藥物之酶活性增加至少0.1倍、0.2倍、0.3倍、0.4倍、0.5倍、1.0倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍或更多。

【0088】 在一些實施例中，突變HSV1-TK增加能產生此現象之用於殺死與疾病或病狀相關之細胞的旁路作用。如本文所用，「旁路作用

(bystander effect)」係指HSV1-TK陽性細胞(例如與本文所描述之載體接觸之細胞)在於HSV1-TK陽性細胞中誘導HSV1-TK之表現之後，藉以發揮對於相鄰HSV1-TK陰性細胞之殺死作用的現象。在一些實施例中，相較於由野生型HSV1-TK陽性細胞誘導之旁路作用，突變HSV1-TK使旁路作用增加至少0.1倍、0.2倍、0.3倍、0.4倍、0.5倍、1.0倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍或更多。

疫苗接種

【0089】 在一些實施例中，本文描述一種載體(例如重組病毒載體)，其包含本文所描述之突變整合酶。在一些實施例中，突變整合酶防止將載體插入包含載體之宿主細胞之基因體中。在一些實施例中，載體包含突變逆轉錄酶，其中突變逆轉錄酶防止將載體轉化為DNA以插入細胞之基因體中。在一些實施例中，載體包含突變整合酶及突變逆轉錄酶兩者。包含突變整合酶及/或突變逆轉錄酶之此類載體尤其可適用於對有需要之個體進行疫苗接種，其中由載體編碼之抗原可在個體中表現延長時段。抗原之延長表現可誘導針對抗原之足夠免疫反應，因此針對疾病或病狀對個體進行疫苗接種。在一些實施例中，抗原之表現可為誘導性的，其中抗原僅在需要時表現(從而對個體進行疫苗接種)。舉例而言，抗原之表現可當針對抗原之免疫性減弱時誘導，從而產生增強疫苗接種。

【0090】 在一些情況下，抗原可包括病毒蛋白之多肽序列。在一些實施例中，抗原可為冠狀病毒之病毒蛋白。在一些實施例中，冠狀病毒可嚴重急性呼吸道症候群相關病毒(SARS-CoV)。在一些實施例中，SARS-CoV為SARS-CoV-2。在一些實施例中，抗原決定基可為選自以下之病毒蛋白：ORF1a、ORF1ab、刺突蛋白(S蛋白)、3a、3b、套膜蛋白(E蛋

白)、基質蛋白(M蛋白)、p6、7a、7b、8b、9b、核蛋白殼(N蛋白)、ORF14、Nsp1 (前導蛋白)、Nsp2、Nsp3、Nsp4、Nsp5 (3C樣蛋白酶)、Nsp6、Nsp7、Nsp8、Nsp9、Nsp10 (生長因子樣蛋白)、Nsp12 (RNA依賴性RNA聚合酶或RdRp)、Nsp13 (RNA 5'-三磷酸酶)、Nsp14 (3'-至-5'核酸外切酶)、Nsp15 (核糖核酸內切酶)及Nsp16 (2'-O-核糖甲基轉移酶)、其一部分或其組合。

【0091】 在一些實施例中，抗原可包括流感病毒之病毒蛋白之多肽序列。在一些實施例中，流感病毒選自由以下組成之屬：A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒及D型流感病毒。在其他實施例中，A型流感病毒具有子類型H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9或H6N1。在其他實施例中，流感病毒包含B/山形(Yamagata)/16/88樣譜系或B/維多利亞(Victoria)/2/87樣譜系之B型流感病毒。在其他實施例中，流感病毒包含A/加利福尼亞(California)/04/2009樣譜系或A/布里斯班(Brisbane)/59/2007樣譜系之A型流感病毒。在一些實施例中，流感可為流感病毒之任何病毒株或流感病毒株內之任何血清型。在一些情況下，流感病毒包含任何組合病毒表面醣蛋白血球凝集素(H或HA)及神經胺糖酸酶(N或NA)。在一些實施例中，抗原包含含有血球凝集素(HA)柄(保守區)域之經修飾之流感蛋白。在一些實施例中，HA柄包含至少一個修飾。HA柄修飾之非限制性實例可包括：頭部移除；甘胺酸連接子環；Cys內橋；跨膜移除；環融合肽；GCN4位置；或Cys間橋。在一些實施例中，抗原包含具有以下之胺基酸序列之A型流感之M2蛋白的胞外域(M2e)：MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 14)。

【0092】 在一些實施例中，抗原可包括病原體蛋白質，諸如其他病毒蛋白質、細菌蛋白質、寄生蟲蛋白質、真菌蛋白質或其組合之多肽序列。在一些實施例中，抗原可包括腫瘤抗原，諸如Her2，其中個體隨後針對癌症進行免疫接種。

治療方法

【0093】 在一些實施例中，本文揭示使用本文所描述之載體之方法。在一些實施例中，該方法包含藉由向個體投與本文所描述之載體或包含載體之醫藥組合物治療有需要之個體的疾病或病狀。在一些實施例中，該方法包含使細胞與載體接觸且隨後向個體投與細胞。在一些實施例中，與載體接觸之細胞為自體細胞。舉例而言，細胞可首先自個體分離且視情況在與載體接觸之前培養或擴增。在一些實施例中，由載體編碼之介白素(例如IL-12、IL-7或干擾素之P40或P35)或HSV1-TK之表現可在向個體投與細胞之前，在細胞中驗證。

【0094】 在一些實施例中，該方法包含向個體投與兩種或更多種載體，其中該兩種或更多種載體中之第一者編碼本文所描述之介白素(例如IL-12、IL-7或干擾素之P40或P35)，且該兩種或更多種載體中之第二者編碼本文所描述之胸苷激酶(例如突變HSV1-TK)。在一些實施例中，該方法包含首先使細胞與兩種或更多種載體接觸且隨後向個體投與細胞。在實施例中，介白素(例如IL-12、IL-7或干擾素之P40或P35)及胸苷激酶(例如突變HSV1-TK)係由相同載體編碼。在一些實施例中，投與係藉由任何合適的投與模式，包括全身性投與(例如靜脈內、吸入等)。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，疾病或病狀為癌症或病灶。在一些實施例中，疾病或病狀為代謝疾病。

【0095】 在一些實施例中，載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物將介白素遞送至與疾病或病狀相關之細胞或微環境。在一些實施例中，相較於向個體直接投與介白素，遞送介白素之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物降低個體中之毒性(例如藉由與疾病或病狀不相關之細胞的細胞死亡降低或熱腫瘤基因之表現降低確定)。在一些實施例中，相較於由向個體直接投與介白素誘導之毒性，藉由本文所描述之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物遞送介白素之毒性降低至少0.1倍、0.2倍、0.5倍、1.0倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍、50.0倍或更多。

【0096】 在一些實施例中，載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物將IL-12遞送至與疾病或病狀相關之細胞或微環境。在一些實施例中，相較於向個體直接投與IL-12，遞送IL-12 (呈P40次單元及P35次單元或呈重組IL-12)之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物降低個體中之毒性(例如藉由與疾病或病狀不相關之細胞的細胞死亡降低或熱腫瘤基因之表現降低確定)。在一些實施例中，相較於由向個體直接投與IL-12誘導之毒性，藉由本文所描述之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物遞送IL-12或IL-7之毒性降低至少0.1倍、0.2倍、0.5倍、1.0倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍、50.0倍或更多。

【0097】 在一些實施例中，由載體編碼之IL-12由細胞表現或分泌。在一些實施例中，由細胞表現或分泌之IL-12可刺激個體中之先天性免疫傳訊或反應。在一些實施例中，該方法包含用表現或分泌的介白素(例如IL-12之P40或P35)刺激內源性細胞介素(例如IFN- γ)產生以用於治療

疾病或病狀。熱腫瘤基因表現可指觸發內源性免疫反應之基因產物(諸如本文所描述之細胞介素)之表現。因此，熱腫瘤基因之表現可導致藉由內源性免疫反應殺死與疾病或病狀相關之細胞(例如癌症或腫瘤細胞)。

【0098】 在一些實施例中，相較於向個體直接投與介白素，遞送介白素之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物增加治療個體之疾病或病狀的功效(例如藉由腫瘤細胞之細胞死亡增加或熱腫瘤基因之表現增加確定)。在一些實施例中，相較於藉由向個體直接投與介白素治療疾病或病狀之功效，藉由用本文所描述之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物遞送介白素治療疾病或病狀之功效增加至少0.1倍、0.2倍、0.5倍、1.0倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍、50.0倍或更多。

【0099】 在一些實施例中，相較於向個體直接投與IL-12，遞送IL-12 (呈P40次單元及P35次單元或呈重組IL-12)之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物增加治療個體之疾病或病狀的功效(例如藉由腫瘤細胞之細胞死亡增加或熱腫瘤基因之表現增加確定)。在一些實施例中，相較於藉由向個體直接投與IL-12或IL-7治療疾病或病狀之功效，藉由用本文所描述之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物遞送IL-12治療疾病或病狀之功效增加至少0.1倍、0.2倍、0.5倍、1.0倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍、50.0倍或更多。

【0100】 在一些實施例中，在一段時間期間投與載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物至少一次(例如每2天、一週兩次、每週一次、每週、每月三次、每月兩次、每月一次、每2個月、每3個月、每4個月、每5個月、每6個月、每7個月、每8個月、每9個月、每10

個月、每11個月、一年一次)。在一些實施例中，在一段時間期間投與組合物兩次或更多次(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100次)。

【0101】 在一些態樣中，本文描述一種藉由對個體進行疫苗接種治療或預防個體之疾病或病狀之方法，該方法包含向個體投與本文所描述之重組逆轉錄病毒載體、由本文所描述之逆轉錄病毒載體編碼的重組病毒、藉由本文所描述之逆轉錄病毒載體轉導的細胞或本文所描述之醫藥組合物。在一些實施例中，由逆轉錄病毒載體編碼之至少一種有效負載包含抗原，該抗原在個體中誘導免疫反應，從而藉由對個體進行疫苗接種治療或預防個體的疾病或病狀。在一些實施例中，免疫反應包含誘導靶向抗原之中和抗體，從而在個體中產生針對抗原之免疫性。在一些實施例中，免疫反應包含誘導靶向抗原之免疫球蛋白抗體，從而在個體中產生針對抗原之免疫性。在一些實施例中，免疫球蛋白抗體包含IgG抗體、IgM抗體、IgA抗體、IgD抗體、IgE抗體或其組合。在一些實施例中，免疫球蛋白抗體包含IgG抗體。

【0102】 在一些實施例中，至少一種有效負載在個體中表現且分泌至少12小時、至少一天、至少兩天、至少三天、至少四天、至少五天、至少六個天、至少七天、至少八天、至少九天、至少10天、至少11天、至少12天或更長持續時間。在一些實施例中，至少一種有效負載在個體中表現或分泌至少12小時、至少一天、至少兩天、至少三天、至少四天、至少五天、至少六天、至少七天、至少八天、至少九天、至少10天、至少11天、至少12天或更長持續時間。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低

於12小時之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少12小時之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於一天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少一天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於兩天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少兩天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於三天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少三天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於四天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少四天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於五天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少五天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於六天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少五天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、

至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於七天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少七天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於八天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少八天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，相較於由表現或分泌低於九天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現或分泌至少八天之至少一種有效負載誘導之免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。在一些實施例中，免疫反應在個體中持續至少一個月、至少兩個月、至少三個月、至少四個月、至少五個月、至少六個月、至少12個月、至少兩年、至少三年或更長。

【0103】 在一些實施例中，藉由各種形式及途徑，包括例如經口或局部投與，投與治療有效量之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物。在一些實施例中，載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物可藉由以下來投與：支氣管灌洗、舌下、腫瘤內、非經腸、靜脈內、皮下、肌肉內、皮內、腹膜內、腦內、蛛膜下、眼內、胸骨內、經眼、內皮、局部、鼻內、肺內、經直腸、動脈內、鞘內、吸入、病灶內、皮內、硬膜外、囊內、囊下、心內、經氣管、表皮下或脊柱內投與，例如注射或輸注。在一些實施例中，可藉由經由上皮或黏膜皮膚內層吸收(例如口腔黏膜、經直腸及腸黏膜投與)投與組合物。在一些實施例中，經由多投與途徑遞送載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組

病毒或醫藥組合物。

【0104】 在一些實施例中，藉由靜脈內輸注投與載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物。在一些實施例中，藉由緩慢連續輸注較長時段，諸如超過24小時，投與載體、包含載體之細胞或包含載體之醫藥組合物。在一些態樣中，可以局部方式，例如經由將藥劑直接注射至器官中，視情況以儲槽或持續釋放調配物或植入形式，投與載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物。

【0105】 在一些實施例中，該方法包含在個體已治療後，監測個體中介白素(諸如IL-12)之表現。在一些態樣中，該方法包含監測IL-12之表現量，其中當個體中IL-12表現達到預定臨限值時，可向該個體投與介白素抑制劑。

【0106】 在一些實施例中，本文所提供之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物可結合至少一種額外治療劑投與，例如抗病毒療法、化學療法、抗生素、細胞療法、細胞介素療法或抗炎劑。在一些實施例中，該至少一種額外治療劑包含核苷劑(例如前藥)。前藥之非限制性實例可包括：針對胸苷激酶之FHBG (9-[4-氟-3-(羥甲基)丁基]鳥嘌呤)、FHPG (9-([3-氟-1-羥基-2-丙氧基]甲基)鳥嘌呤)、FGCV (氟更昔洛韋(fluoroganciclovir))、FPCV (氟噴昔洛韋(fluoropenciclovir))、FIAU (1-(2'-去氧-2'-氟-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基)-5-碘尿嘧啶)、FEAU (氟-5-乙基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶)、FMAU (氟-5-甲基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶)、FHOMP (6-((1-氟-3-羥基丙-2-基氧基)甲基)-5-甲基嘧啶(methylpyrimidine)-2,4(1H,3H)-二酮)、更昔洛韋、纈更昔洛韋(valganciclovir)、阿克洛韋、伐昔洛韋(valaciclovir)、噴昔洛韋、在N-

1(HHG-5-FEP)或5-(2-羥乙基)取代及5-(3-羥丙基)取代之嘧啶衍生物處具有4-羥基-3-(羥甲基)丁基側鏈的放射性標記嘧啶，其攜帶2,3-二羥丙基、阿克洛韋-、更昔洛韋-及噴昔洛韋-樣側鏈；針對氧化還原酶之異環磷醯胺；針對VZV-TK之6-甲氧基嘌呤阿糖；針對胞嘧啶脫胺酶之5-氟胞嘧啶；針對 β -葡萄糖醛酸苷酶之小紅莓；針對硝基還原酶之CB 1954；及針對羧胺酶A之N-(氰乙醯基)-L-苯丙胺酸或N-(3-氯丙醯)-L-苯丙胺酸。在一些實施例中，核苷劑包含更昔洛韋、顯更昔洛韋、阿克洛韋、發昔洛韋或噴昔洛韋。

【0107】 在一些實施例中，本文所提供之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物可在出現疾病或病狀之前、期間或之後投與。在一些實施例中，載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物可用作預防劑(prophylactic)且可向個體連續投與。在一些實施例中，載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物可在與疾病或病狀相關之症狀發作之前向個體投與。

【0108】 本發明之藥劑(例如載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物)之實際劑量水準可變化，以便獲得一量之藥劑以達成針對特定個體、組合物及投與模式的所需治療反應而對於個體(例如免疫接種之個體或治療之個體)無毒性。所選擇之劑量水準可視多種藥物動力學因素而定，包括所採用之本發明之特定組合物之活性；投與途徑；投與時間；分泌速率；治療持續時間；與所採用之特定組合物組合使用的其他藥物、化合物及/或材料；所治療之患者的年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史；及醫學技術中熟知之類似因素。

【0109】 可調節給藥方案以提供最佳所需反應(例如治療及/或預防

反應)。舉例而言，可投與單一彈丸注射(bolus)，可隨時間推移投與若干分次劑量，或劑量可如由治療情形之緊急狀態所指示而按比例減少或增加。為了易於投與及劑量均一性，將非經腸組合物調配成單位劑型為尤其有利的。如本文所用，單位劑型係指物理離散單元，其適合作為用於個體(例如免疫接種之個體或治療之個體)之單位劑量；各單元含有計算結合所需醫藥學載劑產生所需治療作用之預定量的活性劑。本發明之單位劑型之規格可藉由以下情況確定且直接取決於以下情況：(a)活性劑之獨特特徵及欲達成之特定治療作用，及(b)混配用於治療個體敏感性之此類活性劑之技術中的固有限制。可參考環狀聚核糖核苷酸或抗體或其抗原結合片段之血漿濃度或局部濃度確定劑量。可參考線性聚核糖核苷酸或抗體或其抗原結合片段之血漿濃度或局部濃度確定劑量。

【0110】 在一些實施例中，本文所描述之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物可呈適合於單次投與精確劑量之單位劑型。在單位劑型中，調配物可分成含有適當量之組合物的單位劑量。在單位劑型中，調配物可分成含有適當量之一或多種線性聚核糖核苷酸、抗體或其抗原結合片段及/或治療劑的單位劑量。單位劑量可呈含有離散量之調配物之封裝形式。非限制性實例為封裝可注射劑、小瓶及安瓿。本文揭示之水性懸浮液組合物可封裝在不可再封閉的單劑量容器中。可使用可再封閉的多劑量容器，例如與防腐劑組合或不與防腐劑組合。本文揭示之用於注射之調配物可以單位劑型存在，例如在安瓿中或在具有防腐劑之多劑量容器中。

【0111】 載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物之劑量較佳處於循環濃度之範圍內，包括具有很少或沒有毒性之

ED50。劑量可視所採用劑型及所利用投與途徑而在此範圍內變化。治療有效劑量可首先利用細胞培養分析來估計。可在動物模型中調配劑量，以達成循環血漿濃度範圍，包括在細胞培養物中確定之IC50（亦即，達成半最大感染或半最大抑制之測試化合物之濃度）。此類資訊可用於更準確地確定適用於人類之劑量。可例如藉由RT-qPCR或ddPCR方法量測血漿中之含量。

【0112】 可以多種方式確定待向需要治療之個體投與之本文所揭示之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物的有效量或治療有效量。藉助於實例，該量可基於動物模型中之病毒效價或功效。或者，臨床試驗中使用之給藥方案可用作一般指南。

【0113】 在一些實施例中，日劑量可以單一劑量或在一天之不同小時處分數份投與。在一些實施例中，可能需要較高劑量，且當獲得最佳初始反應時可隨著時間推移降低。在一些實施例中，治療可持續數天、數週或數年，或可間隔進行，其中具有中間休息期。在一些實施例中，劑量根據個體可接受之其他治療調節。然而，治療方法絕不受限於逆轉錄病毒粒子之特定濃度或範圍，且可根據所治療之各個體及使用之各衍生物而變化。可能需要劑量之個性化以達成對既定個體之最大作用。在一些實施例中，向所治療之個體投與之劑量視個體之年齡、疾病之嚴重程度或階段及對於療程之反應而變化。在一些實施例中，用於確定劑量之臨床參數包括但不限於腫瘤尺寸、針對特定惡性病之臨床測試中使用之腫瘤標記之含量的改變。在一些實施例中，治療醫師確定待用於既定個體之治療有效量。在一些實施例中，本文揭示之療法視需要經常投與且持續由治療醫師判斷需要的時段。

【0114】 在一些實施例中，向需要治療之個體投與多個療程(例如第一及第二療程)。在一些實施例中，靜脈內投與第一及/或第二療過程。在其他實施例中，第一及/或第二療程經由動脈內輸注投與，包括但不限於經由肝動脈、腦動脈、冠狀動脈、肺動脈、胯動脈、腹腔動脈、胃動脈、脾動脈、腎動脈、性腺動脈、鎖骨下動脈、椎骨動脈、腋動脈、肱動脈、橈動脈、尺動脈、頸動脈、股動脈、腸系膜下動脈及/或腸系膜上動脈輸注。動脈內輸注可使用血管內程序、經皮程序或開放性手術途徑實現。在一些實施例中，第一及第二療程可依序投與。在又其他實施例中，第一及第二療程可同時投與。在另其他實施例中，視情況選用之第三療程可與第一及第二療程依序或同時投與。

【0115】 在一些實施例中，本文所揭示之載體、包含載體之細胞或醫藥組合物可以在累積基礎上，以高劑量，結合所投與之療程依序或同時投與。舉例而言，在一些實施例中，可在累積基礎上向有需要之患者全身性投與(例如靜脈內投與)療程。可全身性投與第一療程。或者，可以定位方式，例如動脈內投與第一療程，例如，有需要之患者可在累積基礎上經由動脈內輸注投與。

【0116】 在又其他實施例中，有需要之個體可接受全身性及動脈內輸注投與高劑量之載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物的組合，依序或同時。舉例而言，首先可在累積基礎上，向有需要之患者全身性投與載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物，隨後在所投與的遞送之累積基礎上，額外的動脈內輸注療程，例如肝動脈輸注。

【0117】 亦可向需要治療之個體全身性或定位投與(例如動脈內輸

注，諸如肝動脈輸注)遞送載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物的療程，持續限定時段。在一些實施例中，該時段可為至少一天、至少兩天、至少三天、至少四天、至少五天、至少六天、至少七天、至少一週、至少兩週、至少三週、至少四週、至少五週、至少六週、至少七週、至少八週、至少2個月、至少三個月、至少四個月、至少五個月、至少六個月、至少七個月、至少八個月、至少九個月、至少十個月、至少十一個月、至少一年、至少兩年、至少三年、至少四年或至少五年。投與亦可以長期方式進行，亦即持續不定的或無限期時段。

【0118】 載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物之投與亦可以週期性方式進行，例如一天至少一次、一天至少兩次、一天至少三次、一天至少四次、一天至少五次。載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物之遞送之週期性投與可視遞送時間以及投與模式而定。舉例而言，非經腸投與可一天僅進行一次，歷經延長時段，而載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物之遞送之經口投與可一天進行超過一次，其中載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物之遞送的投與進行較短時段。

【0119】 在一個實施例中，允許個體在第一療程與第二療程之間休息1至2天。在一些實施例中，允許個體在第一療程與第二療程之間休息2至4天。在其他實施例中，允許個體在第一與第二療程之間休息至少2天。在又其他實施例中，允許個體在第一與第二療程之間休息至少4天。在另其他實施例中，允許個體在第一與第二療程之間休息至少6天。在一些實施例中，允許個體在第一與第二療程之間休息至少1週。在又其他實施例中，允許個體在第一與第二療程之間休息至少2週。在一個實施例中，允

許個體在第一與第二療程之間休息至少一個月。在一些實施例中，允許個體在第二療程與視情況選用之第三療程之間休息至少1-7天。在又其他實施例中，允許個體在第二療程與視情況選用之第三療程之間休息至少1-2週。

【0120】 在一些實施例中，投與載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物，以增加與本文所描述之疾病或病狀(例如癌症或病灶)相關之細胞或微環境中介白素(例如IL-12之P40或P35)及胸苷激酶(例如突變HSV1-TK)的局部濃度。在一些實施例中，經由增加治療載體之局部濃度的動脈內輸注將載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物投與至特定器官系統。在又其他實施例中，瘤內投與載體、包含載體之細胞、由載體編碼之重組病毒或醫藥組合物。視目標病灶之位置而定，在一些實施例中，對肝動脈進行導管插入術，之後分別輸注至胰十二指腸、右肝及中肝動脈中，以便局部靶向肝病灶。在一些實施例中，經由導管插入術或其他定位遞送系統，實現將多肽或遞送載體定位分配至其他器官系統，包括肺、胃腸、腦、生殖、脾或其他限定器官系統。在一些實施例中，經由任何其他可用的動脈源實現動脈內輸注，包括但不限於經由以下進行輸注：肝動脈、腦動脈、冠狀動脈、肺動脈、胯動脈、腹腔動脈、胃動脈、脾動脈、腎動脈、性腺動脈、鎖骨下動脈、椎骨動脈、腋動脈、肱動脈、橈動脈、尺動脈、頸動脈、股動脈、腸系膜下動脈及/或腸系膜上動脈。在一些實施例中，使用血管內程序、經皮程序或開放性手術途徑實現動脈內輸注。

醫藥組合物

【0121】 本文描述一種醫藥組合物，其包含用於對個體進行免疫接

種之治療劑(例如本文所描述之載體或包含載體之細胞)或抗原。在一些態樣中，與本文所描述之載體接觸之細胞活體內或活體外表現介白素(例如IL-12或IL-7之P40或P35)或胸苷激酶(例如突變HSV1-TK)。在一些態樣中，細胞獲自個體；在活體外環境中擴增；及投回個體以用於治療個體之疾病或病狀或對個體進行免疫接種。在一些實施例中，至少一種載體或與本文所描述之至少一種載體接觸之細胞可調配成疫苗。在一些實施例中，本文所描述之至少一種載體調配成RNA疫苗。在一些實施例中，所描述之至少一種載體調配成mRNA疫苗，其中抗原係由作為載體之有效負載之mRNA編碼。在一些實施例中，醫藥組合物包含由本文所描述之載體編碼之重組病毒。舉例而言，醫藥組合物可包含用於靶向樹突狀細胞之經修飾之辛德比斯病毒。在一些實施例中，疫苗包含本文所描述之至少兩種載體，其中該至少兩種載體可編碼不同有效負載。在一些實施例中，載體包含本文所描述之突變整合酶，其中載體可能不再插入細胞之基因體中。在一些實施例中，載體包含突變逆轉錄酶，其中載體之核酸(例如RNA)可能不再轉化為DNA且隨後插入細胞之基因體中。在一些實施例中，載體包含突變整合酶及突變逆轉錄酶兩者。在一些態樣中，細胞獲自並非來自該個體之來源。在一些態樣中，細胞獲自細胞株。在一些實施例中，將細胞調配成醫藥組合物。在一些實施例中，醫藥組合物包含本文所描述之核苷劑。

【0122】 在一些態樣中，醫藥組合物包含醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。在一些態樣中，本文所描述之醫藥組合物包括至少一種除本文所描述之細胞外的額外活性劑。在一些態樣中，該至少一種額外活性劑為化學治療劑、細胞毒性劑、細胞介素、生長抑制劑、抗激素劑、抗

血管生成劑或檢查點抑制劑。

【0123】 在一些態樣中，醫藥組合物包含用於加強免疫反應之佐劑以用於對有需要之個體進行疫苗接種。在一些實施例中，佐劑可包含止痛佐劑。在一些實施例中，佐劑可包含無機化合物，諸如明礬、氫氧化鋁、磷酸鋁或氫氧化磷酸鈣。在一些實施例中，佐劑可包含礦物油或石蠟油。在一些實施例中，佐劑可包含細菌產物，諸如滅活百日咳博德特氏菌、牛分枝桿菌或類毒素。在一些實施例中，佐劑可包含非細菌有機物，如角鯊烯。在一些實施例中，佐劑可包含使用諸如清潔劑(Quil A)之遞送系統。在一些實施例中，佐劑可包含植物皂素，諸如來源於皂樹、大豆或美遠志(Polygala senega)之皂素。在一些實施例中，佐劑可包含弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)或弗氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)。在一些實施例中，佐劑可包含基於食物之油，如花生油。

【0124】 在實踐本文提供之治療或使用方法中，向患有待治療之疾病或病狀(例如癌症病灶)之哺乳動物投與治療有效量之本文所描述之醫藥組合物。在一些態樣中，哺乳動物為人類。治療有效量可視疾病之嚴重程度、個體之年齡及相對健康狀況、所用治療劑之效能及其他因素而廣泛變化。治療劑及(在一些情況下)本文所描述之組合物可單獨使用或與一或多種治療劑作為混合物之組分組合使用。

【0125】 本文所描述之醫藥組合物可藉由適當投與途徑向個體投與，包括但不限於支氣管灌洗、舌下靜脈內、動脈內、經口、非經腸、經頰、局部、經皮、經直腸、肌肉內、皮下、骨內、經黏膜、吸入或腹膜內投與途徑。本文所描述之組合物可包括但不限於水性液體分散液、自乳化型分散液、固溶體、脂質體分散液、氣溶膠、固體劑型、散劑、立即釋放

調配物、控制釋放調配物、速融調配物、錠劑、膠囊、丸劑、延遲釋放調配物、緩釋調配物、脈衝釋放調配物、多微粒調配物及混合立即與控制釋放調配物。

【0126】 可以習知方式，諸如(僅藉助於實例)，藉助於習知混合、溶解、造粒、糖衣藥丸製造、水磨、乳化、囊封、包覆或壓縮製程，製造包括治療劑之醫藥組合物。

【0127】 醫藥組合物可包括至少一呈游離酸或游離鹼形式或呈醫藥學上可接受之鹽形式之外源性治療劑作為活性成分。另外，本文所描述之方法及組合物包括使用N-氧化物(適當時)、結晶形式、非晶形相以及具有相同類型之活性之此等化合物的活性代謝物。在一些態樣中，治療劑以非溶劑化形式或以與醫藥學上可接受之溶劑，諸如水、乙醇及其類似者的溶劑化形式存在。治療劑之溶劑化形式亦視為揭示於本文中。

【0128】 在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物包括一或多種抑制微生物活性之防腐劑。合適的防腐劑包括含汞物質，諸如硼酸苯汞及硫柳汞；經穩定之二氧化氯；及四級銨化合物，諸如氯化烷基二甲基苄基銨、溴化十六烷基三甲基銨及氯化鯨蠟基吡鎔。

【0129】 在一些態樣中，本文所描述之醫藥組合物受益於抗氧化劑、金屬螯合劑、含硫醇化合物及其他一般穩定劑。此類穩定劑之實例包括但不限於：(a)約0.5%至約2% w/v甘油、(b)約0.1%至約1% w/v甲硫胺酸、(c)約0.1%至約2% w/v單硫甘油、(d)約1 mM至約10 mM EDTA、(e)約0.01%至約2% w/v抗壞血酸、(f) 0.003%至約0.02% w/v聚山梨醇酯80、(g) 0.001%至約0.05% w/v聚山梨醇酯20、(h)精胺酸、(i)肝素、(j)硫酸葡聚糖、(k)環糊精、(l)戊聚糖聚硫酸鹽及其他類肝素、(m)二價陽離

子，諸如鎂及鋅；或(n)其組合。

【0130】 本文所描述之醫藥組合物可調配成任何合適的劑型，包括但不限於水性口服分散液、液體、凝膠、糖漿、酏劑、漿液、懸浮液、固體口服劑型、氣溶膠、控制釋放調配物、速融調配物、起泡調配物、凍乾調配物、錠劑、散劑、丸劑、糖衣藥丸、膠囊、延遲釋放調配物、緩釋調配物、脈衝式釋放調配物、多微粒調配物及混合型立即釋放與控制釋放調配物。在一個態樣中，如本文所論述之治療劑，例如治療劑，調配成適合於肌肉內、皮下或靜脈內注射之醫藥組合物。在一個態樣中，適合於肌肉內、皮下或靜脈內注射之調配物包括生理學上可接受之無菌水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液及供復水為無菌可注射溶液或分散液用之無菌散劑。適合的水性及非水性載劑、稀釋劑、溶劑或媒劑之實例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、十六醇聚氧乙烯醚及其類似者)、其適合混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯(諸如油酸乙酯)。可例如藉由使用包衣(諸如卵磷脂)，在分散液之情況下藉由維持所需粒徑，及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。在一些態樣中，適合於皮下注射之調配物亦含有添加劑，諸如防腐劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。防止微生物之生長可藉由各種抗細菌劑及抗真菌劑(諸如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸及其類似者)來確保。在一些情況下，需要包括等張劑，諸如糖、氯化鈉及其類似者。可注射醫藥形式之延長吸收可藉由使用延遲吸收之藥劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來實現。

【0131】 對於靜脈內注射或滴液或輸注，本文所描述之醫藥組合物調配於水溶液中，較佳地於生理學上相容之緩衝液，諸如漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液中。

對於經黏膜投與，在調配物中使用適於待滲透之障壁的滲透劑。對於其他非經腸注射，適當調配物包括水性或非水性溶液，較佳具有生理學上相容之緩衝劑或賦形劑。

【0132】 非經腸注射可涉及彈丸注射或連續輸注。注射用醫藥組合物可以添加有防腐劑之單位劑型(例如，於安瓿或多劑量容器中)呈現。本文所描述之醫藥組合物可呈於油性或水性媒劑中之無菌懸浮液、溶液或乳化液的適合於非經腸注射之形式，且可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。在一個態樣中，活性成分呈在使用之前用合適的媒劑(例如無菌無熱原水)復原之粉末形式。

【0133】 對於藉由吸入進行之投與，調配治療劑以供用作氣溶膠、霧化劑或散劑。本文所描述之醫藥組合物宜以來自加壓包裝或噴霧器之氣溶膠噴霧表現形式之形式，使用合適的推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合適氣體)來遞送。在加壓氣溶膠之情況下，劑量單位可藉由提供遞送所計量之量的閥來確定。用於吸入器或吹入器之諸如(僅藉助於實例)明膠之膠囊及藥筒可經調配含有本文所描述之治療劑與合適的散劑基質(諸如乳糖或澱粉)之散劑混合物。包括組合物之調配物製備呈於鹽水中之溶液，採用苯甲醇或此項技術中已知之其他合適的防腐劑、碳氟化合物及/或其他溶解或分散劑。較佳地，此等組合物及調配物使用醫藥學上可接受之合適的無毒成分製備。合適的載劑之選擇視所需經鼻劑型之確切性質而定，例如溶液、懸浮液、軟膏或凝膠。除活性成分之外，經鼻劑型一般含有大量水。視情況存在少量其他成分，諸如pH調節劑、乳化劑或分散劑、防腐劑、界面活性劑、膠凝劑或緩衝劑及其他穩定劑及增溶劑。較佳地，經鼻劑型應與鼻分泌物等張。

【0134】 在另一態樣中，劑型包括微囊封調配物。在一些態樣中，微囊封材料中存在一或多種其他相容材料。材料之非限制性實例包括pH調節劑、侵蝕促進劑、消泡劑、抗氧化劑、調味劑及載劑材料，諸如黏合劑、懸浮劑、崩解劑、填充劑、界面活性劑、增溶劑、穩定劑、潤滑劑、潤濕劑及稀釋劑。

【0135】 用於經口投與之液體調配物劑型為視情況選用之水性懸浮液，其係選自包括但不限於以下之群：醫藥學上可接受之水性口服分散液、乳液、溶液、酞劑、凝膠及糖漿。除治療劑之外，液體劑型視情況包括添加劑，諸如：(a)崩解劑；(b)分散劑；(c)潤濕劑；(d)至少一種防腐劑；(e)增黏劑；(f)至少一種甜味劑及(g)至少一種調味劑。在一些態樣中，水性分散液進一步包括晶體形成抑制劑。

【0136】 在一些態樣中，本文所描述之醫藥組合物可為自乳化藥物遞送系統(self-emulsifying drug delivery systems；SEDDS)。乳液為一種不可混溶相通常以液滴形式於另一者中之分散液。一般而言，藉由劇烈機械分散形成乳液。與乳液或微乳液相對，SEDDS當添加至過量水中時無需任何外部機械分散或攪拌，自發地形成乳液。SEDDS之優點在於僅需溫和混合將液滴分配於整個溶液中。另外，視情況在即將投與之前添加水或水相，此確保不穩定或疏水性活性成分的穩定性。因此，SEDDS提供用於經口及非經腸遞送疏水性活性成分的有效遞送系統。在一些態樣中，SEDDS提供疏水性活性成分之生物可利用性方面的改良。

【0137】 使用此項技術中已知之多種調配物投與經頰調配物。另外，本文所描述之經頰劑型可進一步包括亦用以將劑型黏附至頰黏膜之生物可消化(可水解)聚合物載劑。對於經頰或舌下投與，組合物可採用以習

知方式調配之錠劑、口含錠或凝膠形式。

【0138】對於靜脈內注射，醫藥組合物視情況調配於水性溶液，較佳生理學上相容之緩衝液，諸如漢克氏溶液、林格氏溶液或生理鹽水緩衝液中。對於經黏膜投與，在調配物中使用適於待滲透之障壁的滲透劑。對於其他非經腸注射，適當調配物包括水性或非水性溶液，較佳具有生理學上相容之緩衝劑或賦形劑。

【0139】非經腸注射視情況涉及彈丸注射或連續輸注。注射用調配物視情況以添加有防腐劑之單位劑型(例如，於安瓿或多劑量容器中)呈現。在一些態樣中，本文所描述之組合物呈適於非經腸注射之形式，如於油性或水性媒劑中之無菌懸浮液、溶液或乳液，且含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。用於非經腸投與之組合物包括呈水溶性形式之調節頸動脈體之活性之藥劑的水溶液。另外，視情況適當時製備調節頸動脈體之活性之藥劑之懸浮液，例如油性注射懸浮液。

【0140】習知調配物技術包括以下方法中之一者或組合：(1)乾混、(2)直接壓錠、(3)研磨、(4)乾式或非水性造粒、(5)濕式造粒或(6)熔融。其他方法包括例如噴霧乾燥、盤塗佈、熔融造粒、造粒、流體化床噴霧乾燥或塗佈(例如沃斯特塗佈(Wurster coating))、切向塗佈、頂部噴霧、製錠、擠壓及其類似者。

【0141】在一些態樣中，可提供醫藥組合物，其包括治療劑及至少一種分散劑或懸浮劑之粒子，以用於向個體經口投與。該等調配物可為供懸浮用之散劑及/或顆粒，且在與水混合時，獲得實質上均勻的懸浮液。

【0142】在一些態樣中，醫藥組合物可包括用於活體內或離體應用之促進載體結合及/或進入細胞的藥劑。某些醫藥組合物可包含聚陽離子

藥劑，其用於在向患者、個體或向來源於患者或個體之細胞投與之前，與本文所描述之載體一起共投與或與其預調配。此類聚陽離子藥劑可包括但不限於凝聚胺、硫酸魚精蛋白或重組人類纖維結合蛋白。

【0143】 此外，醫藥組合物視情況包括一或多種pH調節劑或緩衝劑，包括酸，諸如乙酸、硼酸、檸檬酸、乳酸、磷酸及鹽酸；鹼，諸如氫氧化鈉、磷酸鈉、硼酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、乳酸鈉及三羥基甲胺基甲烷；及緩衝劑，諸如檸檬酸鹽/右旋糖、碳酸氫鈉及氯化銨。以將組合物之pH維持在可接受範圍內所需之量包括此類酸、鹼及緩衝劑。

【0144】 另外，醫藥組合物視情況包括使醫藥組合物之滲透壓達到可接受範圍所需之量的一或多種鹽。此類鹽包括具有鈉、鉀或銨陽離子及氯、檸檬酸根、抗壞血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氫根、氫根、硫酸根、硫代硫酸根或亞硫酸氫根陰離子之鹽；合適的鹽包括氯化鈉、氯化鉀、硫代硫酸鈉、亞硫酸氫鈉及硫酸銨。

【0145】 在一個實施例中，本文所描述之水性懸浮液及分散液保持呈均質狀態至少4小時。在一個實施例中，水性懸浮液藉由物理攪動持續少於1分鐘再懸浮於均質懸浮液中。在再一實施例中，不需要攪動來維持均質水性分散液。

【0146】 用於經鼻投與之氣溶膠調配物通常為設計成以液滴或噴霧劑形式向鼻腔通道投與之水溶液。鼻用溶液可類似於鼻分泌物，此係因為其通常為等張性的且略微緩衝以維持約5.5至約6.5之pH，儘管可另外使用此範圍之外的pH值。調配物中亦可包括抗微生物劑或防腐劑。

【0147】 可設計吸入用氣溶膠調配物及吸入劑，以使得當藉由經鼻或經口呼吸道途徑投與時將藥劑或藥劑之組合攜載至個體之呼吸樹中。可

例如藉由噴霧器投與吸入溶液。包含精細粉末狀或液體藥物之吸入劑或吸入劑可作為溶液之醫藥氣溶膠或藥劑或藥劑之組合於推進劑中之懸浮液遞送至呼吸系統，例如以有助於分配。推進劑可為液化氣體，包括鹵碳，例如，碳氟化合物，諸如氟化氯化烴、氫氯氟碳化物及氫氯碳化物以及烴及烴醚。氣溶膠調配物亦可包括其他組分，例如乙醇、異丙醇、丙二醇以及界面活性劑，或諸如油及清潔劑之其他組分。此等組分可用於使調配物穩定及/或潤滑閥組分。

套組

【0148】 在一些態樣中，本文描述用於使用本文所描述之載體之套組。在一些實施例中，套組可用於治療個體之疾病或病狀。在一些實施例中，套組可用於對個體進行接種疫苗。在一些態樣中，套組包含除載體或包含載體之細胞以外的材料或組分的集合(*assemblage*)。在一些態樣中，套組包含用於分析所合成及/或由本文所描述之細胞釋放或表現之生物分子(例如包括載體、細胞、IL-12、突變HSV1-TK、抗原(諸如刺突蛋白或HA蛋白)或其組合之治療劑)之單位之數目的組分。在一些態樣中，套組包含用於進行分析，諸如酶聯結免疫吸附分析(*enzyme-linked immunosorbent assay*；ELISA)、單分子陣列(*Simoa*)、PCR及qPCR之組分。該套組中經組態之組分之確切性質視其預定目的而定。舉例而言，套組可出於治療個體之本文揭示之疾病或病狀(例如癌症或病灶)之目的而組態。在一些態樣中，套組尤其係出於治療哺乳動物個體之目的而組態。在一些態樣中，套組尤其係出於治療人類個體之目的而組態。在一些態樣中，套組尤其係出於對哺乳動物個體疫苗接種之目的而組態。在一些態樣中，套組尤其係出於對人類個體進行疫苗接種之目的而組態。

【0149】套組中可包括使用說明書。在一些態樣中，套組包含關於向有需要之個體投與本文所描述之載體、細胞或醫藥組合物的說明書。在一些態樣中，套組包含關於進一步工程改造載體或細胞以表現生物分子(例如包括IL-12、突變HSV1-TK或抗原之治療劑)的說明書。在一些態樣中，套組包含解凍或另外恢復細胞之生物活性之說明書，其可在儲存或運輸期間保持。在一些態樣中，套組包含關於量測所保持細胞之存活力以確保用於其預期目的之功效(例如在用於治療個體時之治療功效)的說明書。

【0150】視情況，套組亦含有其他適用組分，諸如稀釋劑、緩衝劑、醫藥學上可接受之載劑、注射器、導管、施加器、移液或量測工具、繃帶材料或其他適用用品。可向醫師提供套組中組裝之材料或組分，其以保持其可操作性及效用的任何適宜及合適的方式儲存。舉例而言，組分可呈溶解、脫水或凍乾形式；其可在室溫、冷藏或冷凍溫度下提供。組分通常含於合適的包裝材料中。

【0151】使用絕對或順序術語，例如「將」、「將不」、「應」、「不應」、「必須」、「必須不」、「首先」、「最初」、「接下來」、「隨後」、「在...之前」、「在...之後」、「最後(lastly)」及「最終(finally)」並不意謂限制本文揭示之本發明實施例之範疇但作為例示性的。

【0152】如本文所用，除非上下文另外清楚地指示，否則單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」意欲亦包括複數形式。此外，就實施方式及/或申請專利範圍中使用術語「包括(including)」、「包括(includes)」、「具有(having)」、「具有(has)」、「具有(with)」或其變化形式之程度而言，此類術語意欲以類似於術語「包含(comprising)」之

方式為包括性的。

【0153】如本文所用，片語「至少一個(種)」、「一或多個(種)」及「及/或」為開放式表述且在操作中為連接性及分離性的。舉例而言，表述「A、B及C中之至少一者」、「A、B或C中之至少一者」、「A、B以及C中之一或多者」、「A、B或C中之一或多者」及「A、B及/或C」中之各者意謂僅A、僅B、僅C、A及B一起、A及C一起、B及C一起，或A、B及C一起。

【0154】如本文所用，「或」可指「及」、「或」或「及/或」且可排他性地及包括性地使用。舉例而言，術語「A或B」可指「A或B」、「A而非B」、「B而非A」及「A及B」。在一些情況下，上下文可指示特定含義。

【0155】本文所描述之任何系統、方法、軟體及平台為模組化的。因此，諸如「首先」及「其次」之術語未必暗示優先順序、重要次序或動作之次序。

【0156】術語「約」當涉及數值或數值範圍時意謂所提及之數值或數值範圍為實驗可變性內(或統計實驗誤差內)之近似值，且數值或數值範圍可例如在所陳述數值或數值範圍之1%至15%之間變化。在實例中，術語「約」係指所陳述數值或值之 $\pm 10\%$ 。

【0157】術語「增加(increased)」、「增加(increasing)」或「增加(increase)」在本文中一般用於意謂發生統計學上顯著量之增加。在一些態樣中，術語「增加(increased)」或「增加(increase)」意謂相較於參考含量增加至少10%，例如相較於參考含量、標準或對照，增加至少約10%、至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至

少約60%、或至少約70%、或至少約80%、或至少約90%或直至且包括100%增加或10-100%之間的任何增加。「增加」之其他實例包括相較於參考含量，增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或更多倍。

【0158】 術語「降低(decreased)」,「降低(decreasing)」或「降低(decrease)」在本文中一般用於意謂降低統計學上顯著量。在一些態樣中,「降低(decreased)」或「降低(decrease)」意謂相較於參考含量降低至少10%,例如相較於參考含量降低至少約20%、或至少約30%、或至少約40%、或至少約50%、或至少約60%、或至少約70%、或至少約80%、或至少約90%或直至且包括100%降低(例如相較於參考含量,不存在含量或不可偵測含量)或10-100%之間的任何降低。在標記或症狀之情形下,此等術語意謂此類含量之統計學上顯著降低。降低可為例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或更高,且較佳降至無既定疾病之個體之正常範圍內認可的含量。

【0159】 如本文所用,「核酸」係指含有至少兩個共價連接之核苷酸或核苷酸類似物次單元的聚核苷酸。核酸一般為去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或DNA或RNA之類似物。核酸一般為單股、雙股或其混合物。出於本文之目的,除非另外規定,否則核酸為雙股的,或其自上下文顯而易見。

【0160】 如本文所用,「DNA」意欲包括所有類型及大小之DNA分子,包括含有經修飾之核苷酸及核苷酸類似物的cDNA、質體及DNA。

【0161】 如本文所用,「核苷酸」包括核苷單-、二-及三磷酸。核苷酸亦包括經修飾之核苷酸,諸如但不限於硫代磷酸酯核苷酸及去氫嘌呤

核苷酸以及其他核苷酸類似物。

【0162】如本文所用，術語「聚核苷酸」意謂任何長度之核苷酸之聚合形式，且包括核糖核苷酸及去氧核糖核苷酸。此類術語亦包括單股及雙股DNA，以及單股及雙股RNA。該術語亦包括經修飾之聚核苷酸，諸如甲基化或加帽的聚核苷酸。

【0163】如本文所用，術語「個體」係指其中引入大DNA分子之動物、植物、昆蟲及鳥類。包括高等生物體，諸如哺乳動物及鳥類，包括人類、靈長類動物、嚙齒動物、牛、豬、兔、山羊、綿羊、小鼠、大鼠、天竺鼠、貓、狗、馬、雞及其他。個體可能患有或可能未患疾病或病狀。

【0164】如本文所用，「向個體投與」為藉以將一或多種遞送劑及/或大核酸分子一起或分別引入或應用於個體，以使得個體中存在之目標細胞最終與藥劑及/或大核酸分子接觸的程序。

【0165】如本文所用，「遞送載體」或「遞送媒劑」或「治療載體」或「治療系統」係指含有且運輸外源核酸分子至目標細胞或組織的病毒及非病毒粒子兩者。病毒媒劑包括但不限於逆轉錄病毒、腺病毒、慢病毒、疱疹病毒及腺相關病毒。非病毒媒劑包括但不限於微米粒子、奈米粒子、病毒顆粒及脂質體。如本文所用，「靶向(Targeted)」係指使用與遞送媒劑相關之配體且將媒劑靶向至細胞或組織。配體包括但不限於抗體、受體及膠原蛋白結合域。

【0166】如本文所用，「遞送」可與「轉導」互換使用，係指藉以將外源核酸分子轉移至細胞中以使得其定位於細胞內之方法。核酸之遞送為與核酸之表現不同的方法。

【0167】如本文所用，「表現」係指藉以將核酸轉譯成多肽或轉錄

成RNA之方法，該RNA例如可轉譯成多肽或蛋白質。若核酸衍生自基因體DNA，則表現包括(在選擇適當真核宿主細胞或生物體時) mRNA之剪接。對於待在宿主細胞中表現之異源核酸而言，其最初必須遞送至細胞中，且接著一旦在細胞中，最終駐存於細胞核中。在一些態樣中，表現獨立於基因整合進行。

【0168】 如本文所用，「療程(therapeutic course)」係指在限定時段內週期性或定時投與本文揭示之載體。此類時段為至少一天、至少兩天、至少三天、至少五天、至少一週、至少兩週、至少三週、至少一個月、至少兩個月或至少六個月。投與亦可以長期方式進行，亦即持續不定的時段。週期性或定時投與包括一天一次、一天兩次、一天三次或其他組定時投與。

【0169】 如本文所用，術語「共投與」、「與...組合投與」及其文法等效物或其類似者意欲涵蓋向單一患者投與所選擇治療劑，且意欲包括其中藉由相同或不同投與途徑或在相同或不同時間投與藥劑之治療方案。在一些實施例中，如本申請案中所揭示之治療劑將與其他藥劑一起共投與。此等術語涵蓋向動物投與兩種或更多種藥劑，以使得藥劑及/或其代謝物兩者均同時存在於動物中。其包括以單獨組合物之形式同時投與、以單獨組合物之形式在不同時間投與及/或以存在兩種藥劑之組合物之形式投與。因此，在一些實施例中，治療劑及其他藥劑係以單一組合物形式投與。在一些實施例中，治療劑及其他藥劑摻合於組合物中。在其他實施例中，治療劑及其他藥劑係以單獨劑量在不同時間投與。

【0170】 如本文所用，術語「突變胸苷激酶」不僅係指本文所描述之特定蛋白質(以及編碼此等蛋白質之核酸序列)，且係指其衍生物，其可

包括原始蛋白質之保留生物活性之各種結構形式。

【0171】如本文所用，術語「突變」或「經另一核苷酸置換」意謂在某一位置之核苷酸在該位置處經除未突變或先前突變序列中出現之外的核苷酸置換。亦即，在一些情況下，可在不同核苷酸中進行特定修飾。在一些實施例中，進行置換，以使得相關剪接供體及/或受體位點不再存在於基因中。

【0172】如本文所用，「極性胺基酸」係指胺基酸殘基Asn (N)、Cys (C)、Gln (Q)、Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)或Tyr (Y)。

【0173】如本文所用，「非極性胺基酸」係指胺基酸殘基Ala (A)、Ile (I)、Leu (L)、Met (M)、Phe (F)、Pro (P)、Trp (W)或Val (V)。

【0174】如本文所用，「鹼性胺基酸」係指胺基酸殘基Arg (R)、His (H)或Lys (K)。

【0175】如本文所用，「酸性胺基酸」係指胺基酸殘基Asp (D)或Glu (E)。

【0176】如本文所描述，「佐劑」係指與抗原組合促進對抗原之後天性免疫反應之物質。「免疫刺激化合物」係指與先天免疫系統特異性地相互作用以起始最終引起發展免疫反應(例如B細胞、T細胞)之後天性組分之「危險訊號」的物質。免疫刺激化合物包括病原體相關分子模式(pathogen-associated molecular pattern; PAMP)，諸如天然存在或合成的dsRNA、脂多醣及CpG DNA。免疫刺激化合物為各種先天性免疫受體之促效劑，該等先天性免疫受體包括Toll樣受體(Toll-like receptor; TLR)、NOD樣受體、RIG-1或MDA-5受體、C型凝集素受體或STING路徑。

【0177】 雖然本文已顯示及描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將明白，此等實施例僅藉助於實例提供。不希望本發明受本說明書中所提供之具體實例的限制。儘管已參考前述說明書描述本發明，但本文實施例之描述及說明並不意欲以限制性意義來解釋。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現將想到大量變化形式、變化及替代。此外，應理解，本發明之所有態樣不限於本文所闡述之取決於各種條件及變數之具體描繪、組態或相對比例。應理解，本文所描述之本發明實施例的各種替代方案可用於實踐本發明。因此，經審慎考慮，本發明亦應涵蓋任何此類替代方案、修改、變化或等效物。預期以下申請專利範圍界定本發明之範疇，且藉此涵蓋在此等申請專利範圍及其等效物之範疇內之方法及結構。

實例

【0178】 以下說明性實例表示本文所描述之刺激、系統及方法之實施例且不意謂以任何方式限制。

實例1.產生整合酶缺陷型載體

【0179】 逆轉錄病毒之病毒週期之簡化版本：在酶逆轉錄酶(RT)已產生逆轉錄病毒RNA基因體之cDNA之後，其緊接著產生與病毒酶整合酶結合之雙股DNA。整合酶為攜帶病毒DNA且催化其整合至宿主基因體中之關鍵酶。整合酶為*gagpol*基因之一部分，該其轉譯成聚合蛋白質序列，該聚合蛋白質序列由病毒蛋白酶加工，得到7種蛋白質。整合酶(INT)為在Gag-Pol之C端的408 aa蛋白質(表2)。

表2. MLV Gag-pol聚合蛋白質表示

蛋白質ID	MLV Gag-Pol聚合蛋白質產生7種蛋白質		viralProt裂解	
			長度	POS
	GAG		POL	
基質蛋白p15	MA			1737 2-1728
RNA結合磷蛋白p12		p12		130 2-131
蛋白殼蛋白p30			CA	84 132-215
核蛋白殼p10-Pol				263 216-478
蛋白酶			NC	56 479-534
逆轉錄核糖核酸酶H				125 535-659
(RTribonuclease H)			PR	
整合酶				
			RT	671 660-1330
				INT
			408	1331-1738
			殘基	

【0180】 關於整合酶缺陷型逆轉錄病毒載體之比較研究已確定其整合酶及不同域之結構。圖1繪示形成對於整合酶功能關鍵之Mg²⁺結合模體的D、D及E胺基酸三聯體。

【0181】 另外，採用比較研究以用於確定可在逆轉錄酶(RT)中突變以產生逆轉錄酶缺陷型逆轉錄病毒載體的胺基酸殘基。採用兩種途徑：RT酶之活性位點處的三個胺基酸突變；及本文所描述之有效負載載體上之RT結合區上的鹼基突變(人工引子結合位點(artificial Primer Binding site；aPBS))。

產生7種突變整合酶序列

【0182】 引入鹼基取代以改變MLV之gagpol基因之整合酶催化核心域序列中之胺基酸。藉由用設計成將單鹼基突變引入野生型gagpol (wtGP)序列載體pGP340-VKS中之引子進行定點誘變(使用Q5定點誘變套組，NEB)，將單鹼基突變引入催化核心域中。所產生之第一突變體為D184A (圖2)。密碼子中單個鹼基改變，自GAC至GCC。(在gagpol基因之鹼基4541處之點突變)。相同程序用於產生單一突變體D125A (GAC至GcG)及E220A (GAG至GcG) (引子設計；圖3)。在繼續進行以產生雙重突

變體之前，藉由定序(Laragen, Inc., CA)確認單一突變。經由用所選引子，對先前獲得且定序之單一突變體進行第二輪定點誘變，產生雙重突變體。藉由對雙重突變體D184A/E220A進行第三輪定點突變誘發，產生三重突變體。藉由限制酶消化分析所有載體，且藉由定序(Laragen, Inc., CA)確認突變。**表3**示出本文所描述之七種例示性突變*gagpol*序列。**表4**示出跨越野生型整合酶(**SEQ ID NO: 1**)之胺基酸位置106至胺基酸位置287之整合酶片段的多肽序列，以及七種突變整合酶(**SEQ ID NO: 2-8**)。改變密碼子之最後兩個鹼基，自GAT至GCC（在*gagpol*基因之鹼基4541及附近之點突變）。在突變D184A及E220A中使用單點突變，分別將GAC轉化為GCC及將GAG轉化為GCG。

表3. 所構築之7種突變體：Gag-Pol之3個點突變、3個雙重突變體、1個三重突變體

	Gag-Pol序列	<i>gagpol</i> 整合酶催化核心域中之突變
野生型	GP340-VKS	無
單一	D125A	GAT至GCC
	D184A	GAC至GCC
	E220A	GAA至GCC
雙重	D125A/D184A	D125A突變引入mutGP-D 184A中
	D184A/E220A	E220A突變引入mutGP-D 184A中
	D125A/E220A	D125A突變引入rautGP-E220A中
三重	D125A/D184A/E220A	D125A突變引入雙重 mutGP-D 184A-E220A中

表4.野生型及突變整合酶之多肽序列

整合酶類型	SEQ ID NO	胺基酸位置106-287之整合酶之多肽序列
野生型	1	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIDFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTDNGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVE RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT

整合酶類型	SEQ ID NO	胺基酸位置106-287之整合酶之多肽序列
D125A	2	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIAFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTDNGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVE RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT
D184A	3	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIDFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTANGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVE RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT
E220A	4	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIDFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTDNGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVA RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT
D125A及D184A	5	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIAFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTANGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVE RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT
D125A及E220A	6	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIAFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTDNGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVA RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT
D184A及E220A	7	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIDFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTANGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVA RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT
D125A、D184A及E220A	8	AVKQG TRVRGHRPGT HWEIAFTEIK PGLYGYKYLL VFIDTFSGWI EAFPTKKETA KVVTK KLEE IFPRFGMPQV LGTANGPAFV SKVSQTVADL LGIDWKLHCA YRPQSSGQVA RMNRT IKETL TKLTLATGSR DWVLLLPLAL YRARNTPGPH GLTPYEILYG APPPLVNFPD PDMTR VT

與野生型Gag-pol產生之粒子之比較

【0183】 用各整合酶缺陷型載體(使用用套膜質體及有效負載/報導子質體進行之293T細胞之三重轉染)產生病毒上清液，且將特性與用wtGP載體製造之粒子進行比較。獲得類似效價(圖4)，表明整合酶突變不會干擾產生病毒粒子所需要之Gag-pol的其他功能。

隨著時間推移之感染力及有效負載表現

【0184】 用病毒載體上清液轉導常規目標細胞株A375 (人類黑色素瘤)。視覺(GFP有效負載)、藉由FACS (對於vTK)或有效負載活性(有效負載中之螢光素酶報導基因)或vTK活性(GCV誘導之細胞殺死分析)分析有效負載之表現。結果表明，突變不會干擾病毒套膜產生。有效負載蛋白質表現量表明，整合酶突變不會干擾有效負載表現量(藉由反映有效負載vTK表現及活性之細胞殺死以及藉由西方墨點法(對於vTK蛋白)檢查；圖5及圖6)。有效負載蛋白質表現之時序表明，歸因於突變使整合酶功能異常，有效負載基因無法整合至宿主基因體中，且因此有效負載蛋白質表現量隨著時間推移降低(細胞殺死分析中GCV敏感性丟失，圖5；西方墨點法中vTK蛋白帶強度減弱，圖6)。藉由相對整合qPCR證實隨著時間推移丟失vTK基因整合，從而確認突變使整合酶無效(圖7及圖8)。在小心評估針對所產生之各突變整合酶序列記錄的特徵之後，選擇單一突變體(D184A)及雙重突變體(D125A-D184A)。

產生製造載體整合酶缺陷型之細胞株

【0185】 為了促進在各整合酶缺陷型載體之情況下產生封裝細胞株，將具有所選擇整合酶突變之gagpol序列選殖至gagpol載體構築體中且定序。表現套膜之293T封裝細胞株用整合酶缺陷型gagpol逆轉錄病毒載

體轉型且測試。

測試封裝細胞株

【0186】藉由用本文所描述之載體轉染所有三個封裝細胞株，將整合酶缺陷型封裝株與wtGP進行比較。所獲得之效價在類似範圍(表5)。以2e7個載體基因體/mL，使用病毒載體上清液轉導常規目標細胞株A375，以便追蹤vTK表現及觀察來自整合酶缺陷型粒子之非整合。vTK之表現由細胞殺死分析反映，其中細胞在轉導後既定時間時暴露於GCV。在轉導後第3天，wtGP、mutGP-D184A及mutGP-D125A/D184A之細胞殺死百分比分別為79%、59%及69%。在第7天，在用整合酶缺陷型粒子轉導之細胞中，細胞殺死活性大致減少80%，在第23天幾乎達到零。

表5.具有整合酶缺陷型突變體之載體之效價

用GMSTK轉染之ENV-GP封裝株	載體基因體/mL
Env-G8/wtGP + GMSTK	7.26E+07
Env-G8/mutGP D184A + GMSTK	5.74E+07
Env-G8/mutGP-D 125A-D184A + GMSTK	7.80E+07

產生製造整合酶缺陷型載體之細胞株

【0187】套膜及整合酶缺陷型表現gagpol之293T封裝細胞株用本文所描述之有效負載載體轉型，以產生製造整合酶缺陷型載體之細胞株，隨後單細胞選殖，因為有效負載序列未攜帶藥物選擇標記。

【0188】藉由引入表現鼠類GMCSF之逆轉錄病毒載體，亦使用具有D184A載體之相同整合酶缺陷型封裝細胞株用於臨床前研究，隨後細胞選殖。

整合酶缺陷型D184A載體株

【0189】第一輪選殖引起選擇4個陽性殖株(BC6、BF6、H6、C8)。藉由在轉導後不同時間將細胞暴露於GCV之細胞殺死分析，比較由

此等製造細胞株產生之病毒上清液在轉導的A375細胞中隨著時間推移之效價及vTK表現(表6；圖10)。

表6.整合酶缺陷型-D184A逆轉錄病毒載體GMSTK細胞株之病毒載體效價

IDRV-D184A GMSTK殖株	載體基因體/mL
BC6	1.22E-09
BF6	4.15E-08
C8	1.69E-08
H6	1.53E-09

【0190】 基於效價、vTK表現圖譜、細胞生長及形態，選擇殖株BC6用於第二輪選殖。基於效價及轉導的A375細胞之細胞殺死水準，自所測試之18者中選出第二殖株BC6-C3及BC6-E12 (圖11)。將殖株BC6-C3擴增且調適成懸浮液。

具有鼠類GMCSF之整合酶缺陷型D184A載體株

【0191】 第一輪選殖引起選擇4個感染性殖株(表7)。總之，挑選殖株G7為最佳者，其中效價為1.25E+09載體基因體/mL且整合20 psi序列複本。

表7. mGMSTK整合酶缺陷型細胞株之病毒載體效價

IDRV-D184A mGMSTK殖株	載體基因體/mL
2D9	4.64E+08
2G5	4.34E+08
G7	4.87E+08
2D6	6.49E+06

整合酶缺陷型載體在所測試之各種癌細胞株中誘發有效負載之表現

【0192】 用整合酶缺陷型載體測試一系列癌細胞株。當細胞用整合酶缺陷型逆轉錄病毒載體成功轉導時，對於所測試之大部分株而言，有效負載之表現在D7-D14之間消失，藉由WB、GCV細胞殺死分析及相對整合qPCR所證實。圖12A至圖12C繪示來自wtGP載體(圖12A)及整合酶缺陷型突變載體(圖12B)，各種癌細胞株之vTK/GCV細胞殺死活性。圖12C繪

示在用wtGP載體及整合酶缺陷型突變載體處理之細胞中，藉由qPCR之載體有效負載的相對整合。

實例2. SARS-CoV-2抗原之表現

【0193】整合酶缺陷型逆轉錄病毒載體 (integrase-defective retroviral vector ; IDRV)可用整合酶缺陷型Gagpol及所關注之任何有效負載基因產生。IDRV系統之此類暫態蛋白質表現提供潛在疫苗用途。設計及產生三種SARS-CoV-2疫苗有效負載。用三種質體之暫態轉染進行測試：疫苗有效負載、IDRV1 (D184A)或IDRV2 (D125A/D184A) Gagpol，及雙嗜性套膜或靶向抗原呈現樹突狀細胞之經修飾之辛德比斯套膜。圖13繪示包含編碼SARS-CoV-2之刺突蛋白或其片段之核酸序列之重組逆轉錄病毒載體的例示性示意圖。上：編碼SARS-CoV-2全長刺突蛋白(具有修飾之Wuhan序列)之逆轉錄病毒載體之圖。中：編碼具有N端域(NTD)及S2域之SARS-CoV-2刺突蛋白片段(具有修飾之Wuhan序列)之逆轉錄病毒載體的圖。下：編碼SARS-CoV-2全長刺突蛋白(具有修飾之奧密克戎BA.2序列)之逆轉錄病毒載體之圖。

【0194】第一疫苗為包含編碼基於具有修飾之Wuhan株之全長刺突蛋白之核酸序列的逆轉錄病毒載體。核酸序列針對在人類細胞中之表現進行密碼子最佳化。在N端添加分泌性前導序列(IgEpsilon Fc受體 α)。殘基682至685處之弗林蛋白酶裂解位點自RRAR修飾為SRAG，此可使刺突蛋白穩定。殘基986及987處之絲氨酸蛋白酶裂解位點經修飾為脯氨酸，此使刺突蛋白結構之融合前形狀穩定。

【0195】第二疫苗為包含編碼基於具有修飾之SARS-CoV-2 Wuhan株之N端域及S2蛋白之核酸序列的逆轉錄病毒載體。核酸序列針對在人類

細胞中之表現進行密碼子最佳化。在S2之N端添加分泌性前導序列(IgEpsilon Fc受體 α)。殘基682至685處之弗林蛋白酶裂解位點自RRAR修飾為SRAG，以使刺突蛋白肽穩定。殘基K986及V987處之絲胺酸蛋白酶裂解位點經修飾為脯胺酸，以使結構之融合前形狀穩定。

【0196】 第三疫苗為包含編碼具有修飾之奧密克戎BA.2株之刺突蛋白之核酸序列的逆轉錄病毒載體。核酸序列針對人類進行密碼子最佳化。殘基679至682處之弗林蛋白酶裂解位點自RRAR修飾為SRAG，以使刺突蛋白肽穩定。移除K811A處之額外弗林蛋白酶裂解位點。殘基K983及V984處之絲胺酸蛋白酶裂解位點經修飾為脯胺酸，以使刺突蛋白結構之融合前形狀穩定。殘基F814、A889、A896及A939處之額外四個殘基經修飾為脯胺酸。將訊號肽添加至N端，其中訊號肽為組織纖維蛋白溶酶原活化因子之前肽 (SEQ ID NO: 13 : MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHFRR)。

【0197】 在一些態樣中，疫苗組合物可由辛德比斯病毒封裝及表現。在一些情況下，辛德比斯病毒可為經修飾之辛德比斯病毒。辛德比斯套膜。在 α 病毒物種中之一者辛德比斯病毒(Sindbis virus; SB)中，套膜基因編碼四種組分E3、E2、6K及E1 (自N端至C端)。其以蛋白分解方式分離且形成均三聚體。SB套膜之獨特特徵在於，此等四個次單元具有其自身功能。E3在E2域成熟後解離；E2域充當結合分子；且藉由E1調節融合，而6K之功能不明確。病毒粒子之結合及融合在兩個分開的動作中，此使得修飾E2而不影響E1結構及功能成為可能。此處，E2處之殘基160突變以藉由使包含本文所描述之有效負載之逆轉錄病毒載體假模式化而靶向人類樹突狀細胞。包含E160G突變之經修飾之辛德比斯套膜在Laragen

(Culver City, CA)藉由桑格定序(Sanger sequencing)確認。E160G突變將使重組逆轉錄病毒載體靶向注射部位處之抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞)(圖15)。

【0198】所有轉殖基因如上文所描述設計且在 Genscript (Piscataway, NJ)合成。在Genscript藉由桑格定序確認序列。表現轉殖基因之質體用適當限制酶消化且插入本文所描述之有效負載逆轉錄病毒載體及慢病毒載體中(例如圖14A至圖14C)。在Primordium Labs (Arcadia, CA)定序所有最終質體。

【0199】藉由鈣/磷酸鹽暫態轉染方法，用野生型gagpol或具有雙嗜性套膜及全長刺突蛋白有效負載或NTD-S2有效負載之IDRV1 (D184A) gagpol，產生逆轉錄病毒載體。A375細胞均以1E+08載體基因體/mL，用逆轉錄病毒載體轉導，且其培養上清液藉由西方墨點法檢查。結果(圖16A及圖16B)表明具有IDRV1之分泌刺突蛋白之穩定表現，儘管表現量低於在野生型gagpol之情況。NTD-S2有效負載顯示類似結果。用IDRV2 (D125AD184A gagpol)載體重複進行實驗，且獲得類似結果，如圖16C中所示。兩種有效負載均顯示在上清液中穩定表現。亦藉由用刺突蛋白之奧密克戎突變體以及野生型gagpol或IDRV2 gagpol進行暫態轉染方法產生逆轉錄病毒載體。藉由西方墨點法檢查來自逆轉錄病毒載體轉導的A375細胞之胞內刺突蛋白，且結果表明高含量之全長刺突蛋白表現，如圖17A中所示。

【0200】使用全長刺突蛋白有效負載慢病毒載體產生具有經充分密碼子最佳化之雙嗜性套膜及野生型gagpol的製造細胞株，且選殖細胞株。表8顯示細胞株殖株物理效價，其藉由對萃取之載體RNA中之Psi序列進行

RT-qPCR（逆轉錄酶定量PCR）來量測。結果表明在9.6E+07載體基因體/mL下，製造細胞株之可接受的效價。

表8.製造細胞株之逆轉錄病毒載體(Retroviral vector；RV)效價(載體基因體/mL)

樣品	載體基因體/mL
T80 293T/GPwt/EnvG8/刺突蛋白3B7	4.78E+06
T80 293T/GPwt/EnvG8/刺突蛋白3D7	9.62E+07
T80 293T/GPwt/EnvG8/刺突蛋白1C9	9.61E+07

【0201】 在A375黑色素瘤細胞上測試由細胞株殖株產生之重組逆轉錄病毒載體。在轉導之後，藉由西方墨點法檢查細胞及上清液之刺突蛋白、S2區域之表現。結果證明，在轉導的細胞中產生全長刺突蛋白且其自細胞分泌出，如**圖17B**中所示。

【0202】 藉由用wtGP及雙嗜性套膜暫時共轉染293T獲得具有編碼奧密克戎突變體刺突蛋白之有效負載的重組逆轉錄病毒載體。藉由RT-qPCR所測定，效價為4.81E+07載體基因體/mL。產生表現IDRV2及雙嗜性套膜之製造細胞株，以產生奧密克戎突變體有效負載逆轉錄病毒載體粒子。藉由RT-qPCR量測，兩個例示性殖株之效價分別為1.63E+08載體基因體/mL及4.67E+07載體基因體/mL。當測試細胞用奧密克戎突變體刺突蛋白逆轉錄病毒載體轉導時，藉由西方墨點法在細胞溶解物及改良性培養基(細胞培養上清液)中均偵測到刺突蛋白(**圖18A**)。奧密克戎突變體刺突蛋白之免疫細胞化學染色表明刺突蛋白之表現且存在於測試細胞之核周及質膜區域中(**圖18B**)。奧密克戎逆轉錄病毒載體轉導的A375細胞藉由簡單離心方法分離，且使質膜級份及非膜可溶性蛋白質進行西方墨點法(**圖18C**)。刺突蛋白區別地存在於質膜級份以及質膜標記鈣黏素中。

【0203】 為了確定最佳暫態轉染條件，可藉由暫態轉染方法檢查變

化量之各種有效負載、野生型及IDRV gagpol以及套膜。可用樹突狀細胞檢查表現辛德比斯E160G之逆轉錄病毒載體(圖15)。所關注之疫苗之有效負載可以大規模作為逆轉錄病毒載體產生，諸如在CS10燒瓶中，且接著進行管柱純化。可進行兩種類型之動物研究。可在常規BALB/c及C57Bl/6J小鼠中，藉由4種不同途徑(肌肉內、舌下、鼻內及皮內)檢查純化的逆轉錄病毒載體以用於抗體產生。可測試IgM及IgG產生。在第一動物研究之結果之後，可在用真實病毒刺激之動物中檢查純化的逆轉錄病毒載體。舉例而言，正常表現ACE受體之倉鼠可用COVID病毒刺激且用奧密克戎突變體逆轉錄病毒載體處理。

實驗方法

【0204】 所有轉殖基因如上文所描述設計且在Genscript合成。在Genscript藉由桑格定序確認序列。表現轉殖基因之質體用適當限制酶消化且插入本文所描述之有效負載逆轉錄病毒載體中(例如圖14A至圖14C)。在Primordium Labs (Arcadia, CA)定序所有最終質體。將有效負載、野生型gagpol或IDRV及套膜暫時轉染至293T細胞中。使用表現具有修飾之全長雙嗜性套膜及完全選殖(殖株G8)且穩定表現野生型gagpol之封裝293T細胞株平台來產生全長刺突蛋白製造細胞株。進一步單獨選殖細胞株。對於西方墨點法而言，A375細胞以具有8 µg/mL凝聚胺之適當稀釋液用逆轉錄病毒載體轉導3天。在4-20% TGX (Bio-Rad)膠上，在135V下運行樣品75分鐘。在轉移至PVDF膜(Thermo)且在室溫下用於1X TBST (Tris緩衝鹽水，0.1% Tween 20，Santa Cruz)中之3% BSA (牛血清白蛋白，Sigma)阻斷1小時之後，將墨點與在0.5 mg/mL下之來自R&D Systems (MAB1080100)之抗S2抗體一起在4°C下一起培育隔夜。次日，

在用1X TBST洗滌三次之後，將墨點與在1:2000稀釋下之鹼性磷酸酶結合的抗兔抗體在室溫下一起培育1小時，且在另一系列洗滌之後，用NBT/BCIP受質(Millipore)顯影。

實例3.流感抗原之表現

【0205】 圖19繪示包含用於編碼M2e與具有修飾之血球凝集素(HA)柄(保守區)域之有效負載的本文描述之逆轉錄病毒載體。核酸序列針對人類進行密碼子最佳化。A型流感之M2蛋白之胞外域(M2e)具有以下之胺基酸序列：MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO: 14)。具有修飾之額外HA柄包括：頭部移除；甘胺酸連接子環；Cys內橋；跨膜移除；環融合肽；GCN4位置；及Cys間橋。圖20繪示作為本文所描述之逆轉錄病毒載體或慢病毒載體之有效負載之M2e及HA4900 (流感)轉殖基因的存在。

【0206】 具有編碼M2e及HA4900之有效負載之重組逆轉錄病毒載體係由用wtGP及雙嗜性套膜暫時共轉染之293T產生，且藉由RT-qPCR來量測載體效價。編碼逆轉錄病毒載體之流感抗原呈現 $1.56E+08$ 載體基因體/mL。藉由由製造單株細胞株產生之RT-qPCR來量測之流感抗原載體粒子效價在兩個例示性殖株中量測為 $1.94E+08$ 載體基因體/mL及 $1.74E+07$ 載體基因體/mL。製造細胞株表現IDRV2及雙嗜性套膜。當測試細胞用此類逆轉錄病毒載體轉導時，藉由西方墨點法偵測細胞溶解物中之HA蛋白(血球凝集素) (圖21A)。HA蛋白之免疫細胞化學染色表明HA蛋白之表現且位於測試細胞之核周區域中(圖21B)。

【0207】 儘管出於清楚及理解起見已相當詳細地描述本發明，但熟習此項技術者藉由閱讀本發明將明確，在不脫離本發明之真實範疇之情況

下可對形式及細節做出各種變化。舉例而言，上文所描述之所有技術及裝備可以各種組合使用。本申請案中引用的所有公開案、專利、專利申請案及/或其他文獻均出於所有目的以全文引用的方式併入本文中，引用的程度就如同個別地且單獨地指示將各個別公開案、專利、專利申請案及/或其他文獻出於所有目的以引用的方式併入一般。

例示性胺基酸序列

SEQ ID NO	胺基酸序列				
21	MFVFLVLLPL	VSSQCVNLTT	RTQLPPAYTN	SFTRGVYYPD	KVFRSSVLHS
	TQDLFLPFFS				
	NVTWFHAIHV	SGTNGTKRFD	NPVLPFNDGV	YFASTEKSNI	IRGWIFGTTL
	DSKTQSL LIV				
	NNATNVVIKV	CEFQFCNDPF	LGVYYHKNNK	SWMESEFRVY	SSANNCTFEY
	VSQPFLMDLE				
	GKQGNFKNLR	EFVFKNIDGY	FKIYSKHTPI	NLVRDLPQGF	SALEPLVDLP
	IGINITRFQT				
	LLALHRSYLT	PGDSSSGWTA	GAAAYYVGYL	QPRTFLLKYN	ENGTITDAVD
	CALDPLSETK				
	CTLKSFTVEK	GIYQTSNFRV	QPTESIVRFP	NITNLCPFGE	VFNATRFASV
	YAWNKRKRISN				
	CVADYSVLYN	SASFSTFKCY	GVSPTKLNDL	CFTNVYADSF	VIRGDEV RQI
	APGQTGKIAD				
	YNYKLPDDFT	GCVIAWNSNN	LDSKVGGNYN	YLYRLFRKSN	LKPFERDIST
	EIYQAGSTPC				
	NGVEGFNCYF	PLQSYGFQPT	NGVGYQPYRV	VVLSFELLHA	PATVCGPKKS
	TNLVKNKCVN				
	FNFNGLTGTG	VLTESNKKFL	PFQQFGRDIA	DTTDAVRDPQ	TLEILDITPC
	SFGGVSVITP				
	GTNTSNQVAV	LYQDVNCTEV	PVAIHADQLT	PTWRVYSTGS	NVFQTRAGCL
	IGA EHVNN SY				
	ECDIPIGAGI	CASYQTQ TNS	PRRARSVASQ	SIIAYTMSLG	AENSVAYSNN
	SIAIPTNFTI				
	SVTTEILPVS	MTKTSVDCTM	YICGDSTEC S	NLLLQYGSFC	TQLNRALTGI
	AVEQDKNTQE				
	VFAQVKQIYK	TPPIKDFGGF	NFSQILPDPS	KPSKR SFIED	LLFNKVTLAD
	AGFIKQYGDC				
	LG DIAARDLI	CAQKFNGLT V	LPPLLTD EMI	AQYTSALLAG	TITSGWTFGA
	GAALQIPFAM				
	QMAYRFNGIG	VTQNVLYENQ	KLIANQFNSA	IGKIQDSLSS	TASALGKLQD
	VVNQNAQALN				
	TLVKQLSSNF	GAISSVLNDI	LSRLDKVEAE	VQIDRLITGR	LQSLQTYVTQ
	QLIRAAEIRA				
	SANLAATKMS	ECVLGQSKRV	DFCGKGYHLM	SFPQSAPHGV	VFLHVTYVPA
	QEKNF TTAPA				
	ICHDGKAHFP	REGVFVSNGT	HWFVTQRNFY	EPQIITTDNT	FVSGNCDVVI
	GIVNNTVYDP				
	LQPELDSFKE	ELDKYFKNHT	SPDVDLGDIS	GINASVVNIQ	KEIDRLNEVA
	KNLNESLIDL				
	QELGKYEQYI	KWPWYIWLGF	IAGLIAIVMV	TIMLCCMTSC	CSCLKGCCSC

SEQ ID NO	胺基酸序列				
	GSCCKFDEDD SEPVLKGVKL HYT				
22	MFVFLVLLPL	VSSQCVNLIT	RTQSYTNSFT	RGVYYPDKVF	RSSVLHSTQD
	LFLPFFSNVT	WFHAIHVSQT	NGTKRFDNPV	LPFNDGVYFA	STEKSNIIRG
	WIFGTTLDSK	TQSLIVNNA	TNVVIKVCEF	QFCNDPFLDV	YYHKNNKSWM
	ESEFRVYSSA	NNCTFEYVSQ	PFLMDLEGKQ	GNFKNLREFV	FKNIDGYFKI
	YSKHTPINLG	RDLPQGFSAL	EPLVDLPFIGI	NITRFQTLLA	LHRSYLTPGD
	SSSGWTAGAA	AYYVGYLQPR	TFLKYNENG	TITDAVDCAL	DPLSETKCTL
	KSFTVEKGIY	QTSNFRVQPT	ESIVRFPNIT	NLCPFDEVFN	ATRFASVYAW
	NRKRISNCVA	DYSVLYNFAP	FFAFKCYGVS	PTKLNDLCFT	NVYADSFVIR
	GNEVSQIAPG	QTGNIADYNY	KLPDDFTGCV	IAWNSNKLDS	KVGGNYNYLY
	RLFRKSNLKP	FERDISTEII	QAGNKPCNGV	AGFNCYFPLR	SYGFRPTYGV
	GHQPYRVVVL	SFELLHAPAT	VCGPKKSTNL	VKNKCVNFNF	NGLTGTGVLT
	ESNKKFLPFQ	QFGRDIADTT	DAVRDPQTLE	ILDITPCSFG	GVSVITPGTN
	TSNQVAVLYQ	GVNCTEVPVA	IHADQLTPTW	RVYSTGSNVF	QTRAGCLIGA
	EYVNNSYECD	IPIGAGICAS	YQTQTKSHRR	ARSVASQSII	AYTMSLGAEN
	SVAYSNNZIA	IPNFTISVT	TEILPVSMTK	TSVDCTMYIC	GDSTECNLL
	LQYGSFCTQL	KRALTGIAVE	QDKNTQEVFA	QVKQIYKTPP	IKYFGGFNFS
	QILPDPSKPS	KRSFIEDLLF	NKVTLADAGF	IKQYGDCLGD	IAARDLICAQ
	KFNGLTVLPP	LLTDEMIAQY	TSALLAGTIT	SGWTFGAGAA	LQIPFAMQMA
	YRFNGIGVTQ	NVLYENQKLI	ANQFNSAIGK	IQDSLSTAS	ALGKLQDVVN
	HNAQALNTLV	KQLSSKFGAI	SSVLNDILSR	LDKVEAEVQI	DRLITGRLQS
	LQTYVTQQLI	RAAEIRASAN	LAATKMSECV	LGQSKRVDFC	GKGYHLMSPF
	QSAPHGVVFL	HVTYVPAQEK	NFTTAPAICH	DGKAHFPREG	VFVSNGTHWF
	VTQRNFYEPQ	IITDNTFVS	GNCDVVIGIV	NNTVYDPLQP	ELDSFKEELD
	KYFKNHTSPD	VDLGDISGIN	ASVVNIQKEI	DRLNEVAKNL	NESLIDLQEL
	GKYEQYIKWP	WYIWLGFIAQ	LIAIVMVTIM	LCCMTSCCSC	LKGCCSCGSC
	CKFDEDDSEP	VLKGVKLHYT			

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組逆轉錄病毒載體，其包含編碼突變整合酶之第一核酸序列及編碼至少一種有效負載之第二核酸序列，當相較於野生型整合酶時，該突變整合酶在催化核心域之 Mg^{2+} 結合模體中包含至少一個突變；且該至少一種有效負載包含抗原。

【請求項2】

如請求項1之重組逆轉錄病毒載體，其中該突變整合酶缺乏逆轉錄病毒整合活性。

【請求項3】

如請求項1之重組逆轉錄病毒載體，其中該抗原包含病原體多肽或其片段或癌症多肽或其片段。

【請求項4】

如請求項1之重組逆轉錄病毒載體，其中該癌症多肽或其片段與癌細胞或腫瘤微環境相關。

【請求項5】

如請求項3之重組逆轉錄病毒載體，其中該病原體多肽或其片段包含病毒多肽或其片段。

【請求項6】

如請求項3之重組逆轉錄病毒載體，其中該病原體多肽或其片段包含細菌多肽或其片段。

【請求項7】

如請求項3之重組逆轉錄病毒載體，其中該病原體多肽或其片段包含

真菌多肽或其片段。

【請求項8】

如請求項3之重組逆轉錄病毒載體，其中該病原體多肽或其片段包含原生生物多肽或其片段。

【請求項9】

如請求項3之重組逆轉錄病毒載體，其中該病原體多肽或其片段包含原生動物多肽或其片段。

【請求項10】

如請求項5之重組逆轉錄病毒載體，其中該病毒多肽或其片段包含冠狀病毒多肽或其片段。

【請求項11】

如請求項10之重組逆轉錄病毒載體，其中該冠狀病毒多肽或其片段包含嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome；SARS-CoV)多肽或其片段、SARS-CoV-2多肽或其片段或中東呼吸道症候群(Middle East Respiratory Syndrome；MERS-CoV)多肽或其片段。

【請求項12】

如請求項11之重組逆轉錄病毒載體，其中該冠狀病毒多肽或其片段包含該SARS-CoV-2多肽或其片段。

【請求項13】

如請求項12之重組逆轉錄病毒載體，其中該SARS-CoV-2多肽或其片段包含刺突蛋白或其片段。

【請求項14】

如請求項13之重組逆轉錄病毒載體，其中該刺突蛋白或其片段為全

長刺突蛋白。

【請求項15】

如請求項13之重組逆轉錄病毒載體，其中該刺突蛋白或其片段為截短刺突蛋白。

【請求項16】

如請求項15之重組逆轉錄病毒載體，其中該截短刺突蛋白包含該刺突蛋白之N端域或該刺突蛋白之S2域。

【請求項17】

如請求項16之重組逆轉錄病毒載體，其中該截短刺突蛋白包含該刺突蛋白之N端域及該刺突蛋白之S2域。

【請求項18】

如請求項17之重組逆轉錄病毒載體，其中該刺突蛋白或其片段為重組刺突蛋白。

【請求項19】

如請求項13至18中任一項之重組逆轉錄病毒載體，其中該刺突蛋白或其片段包含至少一個修飾。

【請求項20】

如請求項19之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個修飾包含密碼子最佳化。

【請求項21】

如請求項20之重組逆轉錄病毒載體，其中該密碼子最佳化使該至少一種有效負載在人類細胞中之表現最佳化或使其增加。

【請求項22】

如請求項19之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個修飾包含至少一個胺基酸突變。

【請求項23】

如請求項21之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個胺基酸突變消除該刺突蛋白中之裂解位點。

【請求項24】

如請求項23之重組逆轉錄病毒載體，其中該裂解位點為弗林蛋白酶(furin)裂解位點。

【請求項25】

如請求項24之重組逆轉錄病毒載體，其中該弗林蛋白酶裂解位點包含SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22中之胺基酸殘基682-685、胺基酸殘基679-682或胺基酸殘基811。

【請求項26】

如請求項25之重組逆轉錄病毒載體，其中該裂解位點為絲胺酸蛋白酶裂解位點。

【請求項27】

如請求項26之重組逆轉錄病毒載體，其中該絲胺酸蛋白酶裂解位點包含SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22中之胺基酸殘基986及987；或983及984。

【請求項28】

如請求項24之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個胺基酸突變包含SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22中之胺基酸殘基814、889、896、939、682-685、679-682、811、986、987、983、984或其組合處的胺基

酸取代。

【請求項29】

如請求項28之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個胺基酸突變包含**SEQ ID NO: 21**或**SEQ ID NO: 22**中之胺基酸殘基814、889、896及939處的胺基酸取代。

【請求項30】

如請求項13至29中任一項之重組逆轉錄病毒載體，其中該刺突蛋白或其片段包含訊號肽。

【請求項31】

如請求項30之重組逆轉錄病毒載體，其中該訊號肽為分泌肽。

【請求項32】

如請求項30之重組逆轉錄病毒載體，其中該訊號肽包含**SEQ ID NO:13**之胺基酸序列：
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHFRR。

【請求項33】

如請求項31之重組逆轉錄病毒載體，其中該分泌肽包含與IgE Fc受體 α 至少70%一致之胺基酸序列。

【請求項34】

如請求項5之重組逆轉錄病毒載體，其中該病毒多肽或其片段包含流感多肽或其片段。

【請求項35】

如請求項34之重組逆轉錄病毒載體，其中該流感多肽或其片段包含A型流感多肽或其片段、B型流感多肽或其片段、C型流感多肽或其片段或D

型流感多肽或其片段。

【請求項36】

如請求項35之重組逆轉錄病毒載體，其中該流感多肽或其片段為該A型流感多肽或其片段。

【請求項37】

如請求項36之重組逆轉錄病毒載體，其中該A型流感多肽或其片段包含神經胺糖酸酶(NA)或其片段或血球凝集素(HA)或其片段。

【請求項38】

如請求項37之重組逆轉錄病毒載體，其中該A型流感多肽或其片段包含該血球凝集素(HA)或其片段。

【請求項39】

如請求項37之重組逆轉錄病毒載體，其中該血球凝集素(HA)或其片段為全長血球凝集素(HA)。

【請求項40】

如請求項37之重組逆轉錄病毒載體，其中該血球凝集素(HA)或其片段為截短血球凝集素(HA)。

【請求項41】

如請求項40之重組逆轉錄病毒載體，其中該截短血球凝集素(HA)包含柄域(Stalk domain)。

【請求項42】

如請求項37之重組逆轉錄病毒載體，其中該血球凝集素(HA)或其片段為重組血球凝集素(HA)。

【請求項43】

如請求項38至42中任一項之重組逆轉錄病毒載體，其中該血球凝集素(HA)或其片段包含至少一個修飾。

【請求項44】

如請求項43之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個修飾包含密碼子最佳化。

【請求項45】

如請求項44之重組逆轉錄病毒載體，其中該密碼子最佳化使該至少一種有效負載在人類細胞中之表現最佳化或使其增加。

【請求項46】

如請求項43之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個修飾包含至少一個胺基酸突變。

【請求項47】

如請求項43之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個修飾包含該血球凝集素(HA)或其片段，該血球凝集素(HA)或其片段包含A型流感之M2蛋白之胞外域(M2e)的胺基酸序列：**SEQ ID NO:14**：**MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD**。

【請求項48】

如前述請求項中任一項之重組逆轉錄病毒載體，其中該重組逆轉錄病毒載體編碼至少一種套膜蛋白。

【請求項49】

如請求項48之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一種套膜蛋白包含至少一種 α 病毒套膜蛋白。

【請求項50】

如請求項49之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一種 α 病毒套膜蛋白包含至少一種辛德比斯病毒(Sindbis virus)套膜蛋白。

【請求項51】

如請求項50之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白包含E3蛋白、E2蛋白、6K蛋白、E1蛋白或其組合。

【請求項52】

如請求項51之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白包含至少一種突變。

【請求項53】

如請求項52之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一種突變增加該至少一種辛德比斯病毒套膜蛋白與人類細胞之間的結合親和力。

【請求項54】

如請求項53之重組逆轉錄病毒載體，其中該人類細胞為樹突狀細胞。

【請求項55】

如請求項53或54之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一種突變為該E2蛋白之E160G。

【請求項56】

如前述請求項中任一項之重組逆轉錄病毒載體，其中該催化核心域之該Mg²⁺結合模體中之至少一種突變包含D125A、D184A或其組合。

【請求項57】

如前述請求項中任一項之重組逆轉錄病毒載體，其中該重組逆轉錄病毒載體包含至少一個經修飾之非轉譯區(UTR)。

【請求項58】

如請求項57之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個經修飾之UTR包含5'-UTR。

【請求項59】

如請求項57之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個經修飾之UTR包含3'-UTR。

【請求項60】

如請求項57之重組逆轉錄病毒載體，其中該至少一個經修飾之UTR包含5'-UTR及3'-UTR。

【請求項61】

一種重組病毒，其包含如前述請求項中任一項之重組逆轉錄病毒載體。

【請求項62】

如請求項61之重組病毒，其中該重組病毒為重組辛德比斯病毒。

【請求項63】

如請求項62之重組病毒，其中該重組辛德比斯病毒包含該E2蛋白之E160G突變。

【請求項64】

一種細胞，其包含如請求項1至60中任一項之重組逆轉錄病毒載體或如請求項61至63中任一項之重組病毒。

【請求項65】

如請求項64之細胞，其中該細胞表現該至少一種有效負載。

【請求項66】

如請求項64之細胞，其中該細胞分泌該至少一種有效負載。

【請求項67】

如請求項64之細胞，其中該細胞表現且分泌該至少一種有效負載。

【請求項68】

如請求項64之細胞，其中該細胞表現該至少一種有效負載至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。

【請求項69】

如請求項64之細胞，其中該細胞分泌該至少一種有效負載至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。

【請求項70】

如請求項64之細胞，其中該細胞表現且分泌該至少一種有效負載至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。

【請求項71】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至60中任一項之重組逆轉錄病毒載體、如請求項61至63中任一項之重組病毒或如請求項64至70中任一項之細胞。

【請求項72】

如請求項71之醫藥組合物，其包含至少一種額外活性成分。

【請求項73】

如請求項72之醫藥組合物，其中該至少一種額外活性成分包含佐劑。

【請求項74】

如請求項71之醫藥組合物，其包含至少一種醫藥學上可接受之賦形

劑。

【請求項75】

一種治療或預防個體之疾病或病狀之方法，其包含向該個體投與如請求項1至60中任一項之重組逆轉錄病毒載體、如請求項61至63中任一項之重組病毒、如請求項64至70中任一項之細胞或如請求項71至74中任一項之醫藥組合物，其中包含該抗原之該至少一種有效負載在該個體中誘導免疫反應，從而治療或預防該個體的該疾病或病狀。

【請求項76】

如請求項75之方法，其中該免疫反應包含誘導靶向該抗原之中和抗體，從而在該個體中產生針對該抗原的免疫性。

【請求項77】

如請求項75之方法，其中該免疫反應包含誘導靶向該抗原之免疫球蛋白抗體，從而在該個體中產生針對該抗原的免疫性。

【請求項78】

如請求項77之方法，其中該免疫球蛋白抗體包含IgG抗體、IgM抗體、IgA抗體、IgD抗體、IgE抗體或其組合。

【請求項79】

如請求項78之方法，其中該免疫球蛋白抗體包含IgG抗體。

【請求項80】

如請求項75之方法，其中該至少一種有效負載在該個體中表現至少一天、至少三天、至少五天或至少九天。

【請求項81】

如請求項75之方法，其中該至少一種有效負載在該個體中分泌至少

一天、至少三天、至少五天或至少九天。

【請求項82】

如請求項80之方法，其中相較於由表現低於一天、三天、五天或九天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由表現至少一天、至少三天、至少五天或至少九天之該至少一種有效負載誘導之該免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。

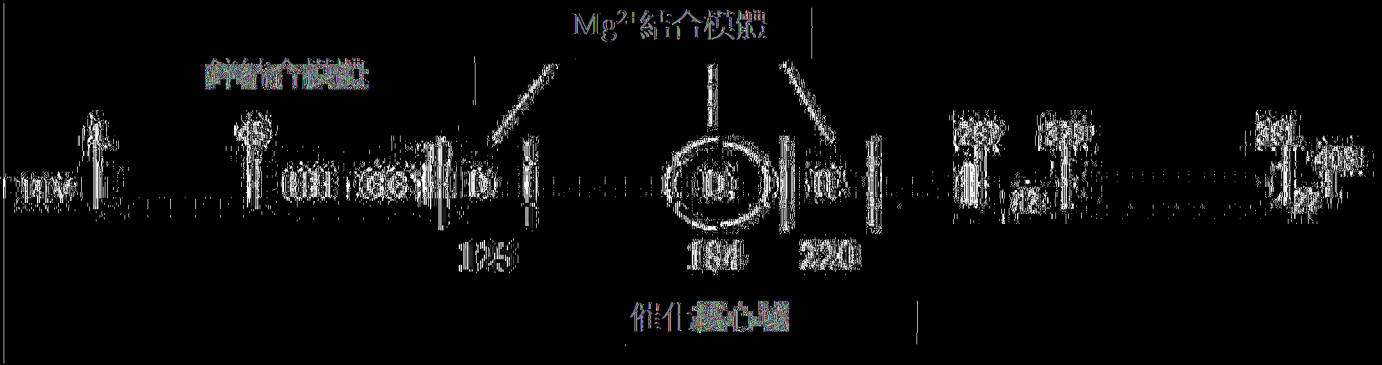
【請求項83】

如請求項81之方法，其中相較於由表現低於一天、三天、五天或九天之相當的有效負載誘導之免疫反應的持續時間，由分泌至少一天、至少三天、至少五天或至少九天之該至少一種有效負載誘導之該免疫反應的持續時間增加至少10%、至少20%、至少50%、至少100%、至少5倍、至少10倍或更多。

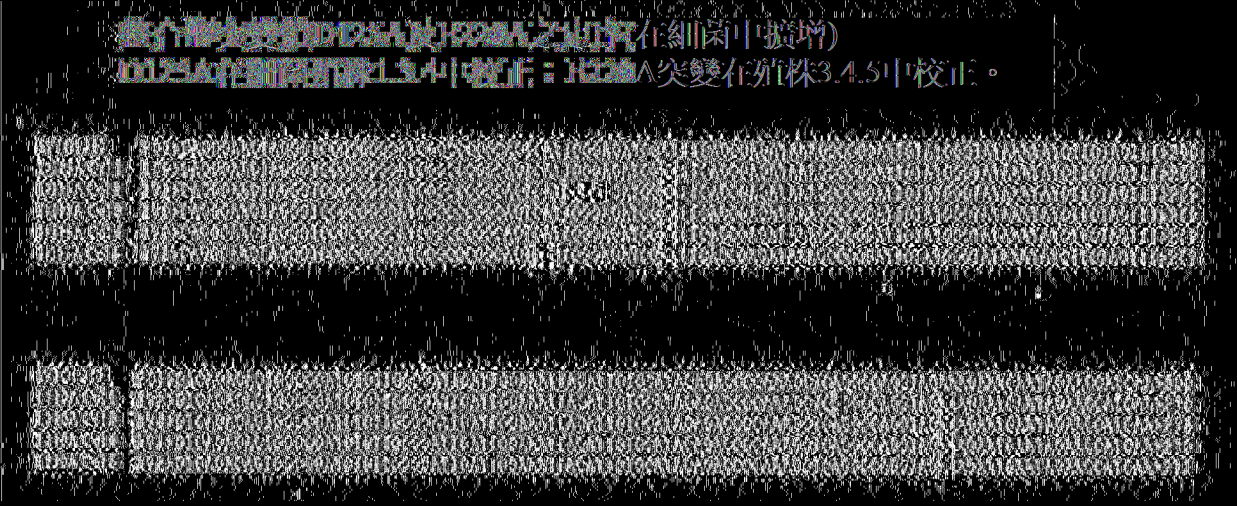
【請求項84】

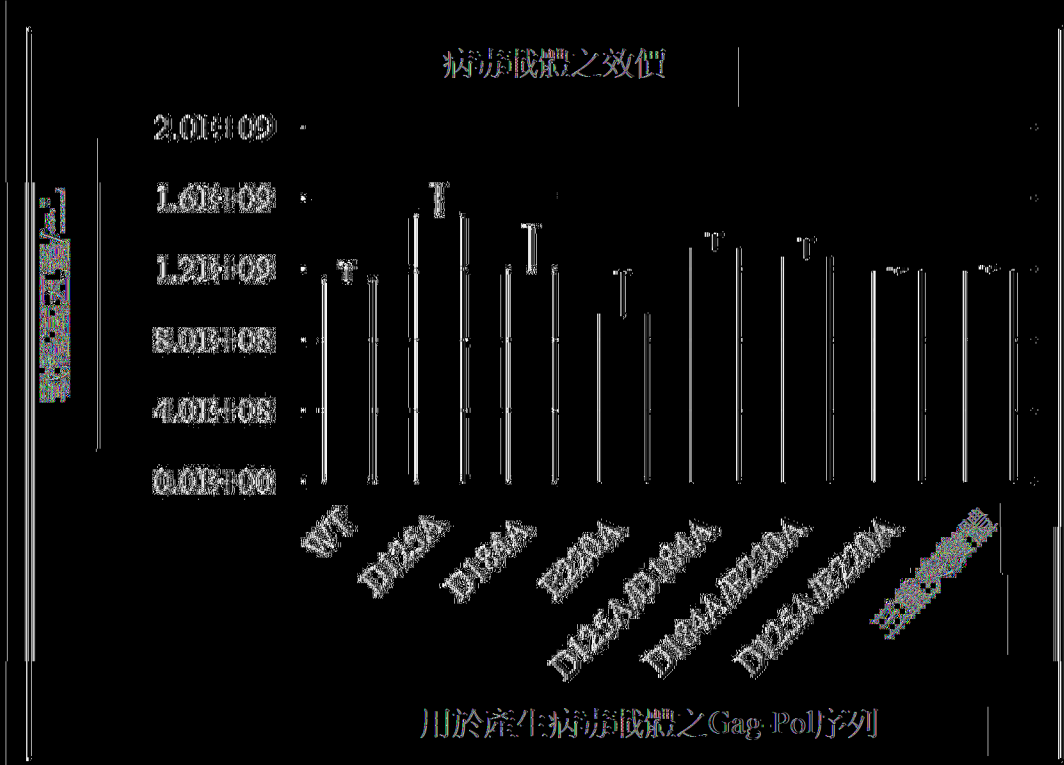
如請求項75至83中任一項之方法，其中該免疫反應在該個體中持續至少三個月、至少四個月、至少五個月、至少六個月、至少12個月或更長。

(發明圖式)

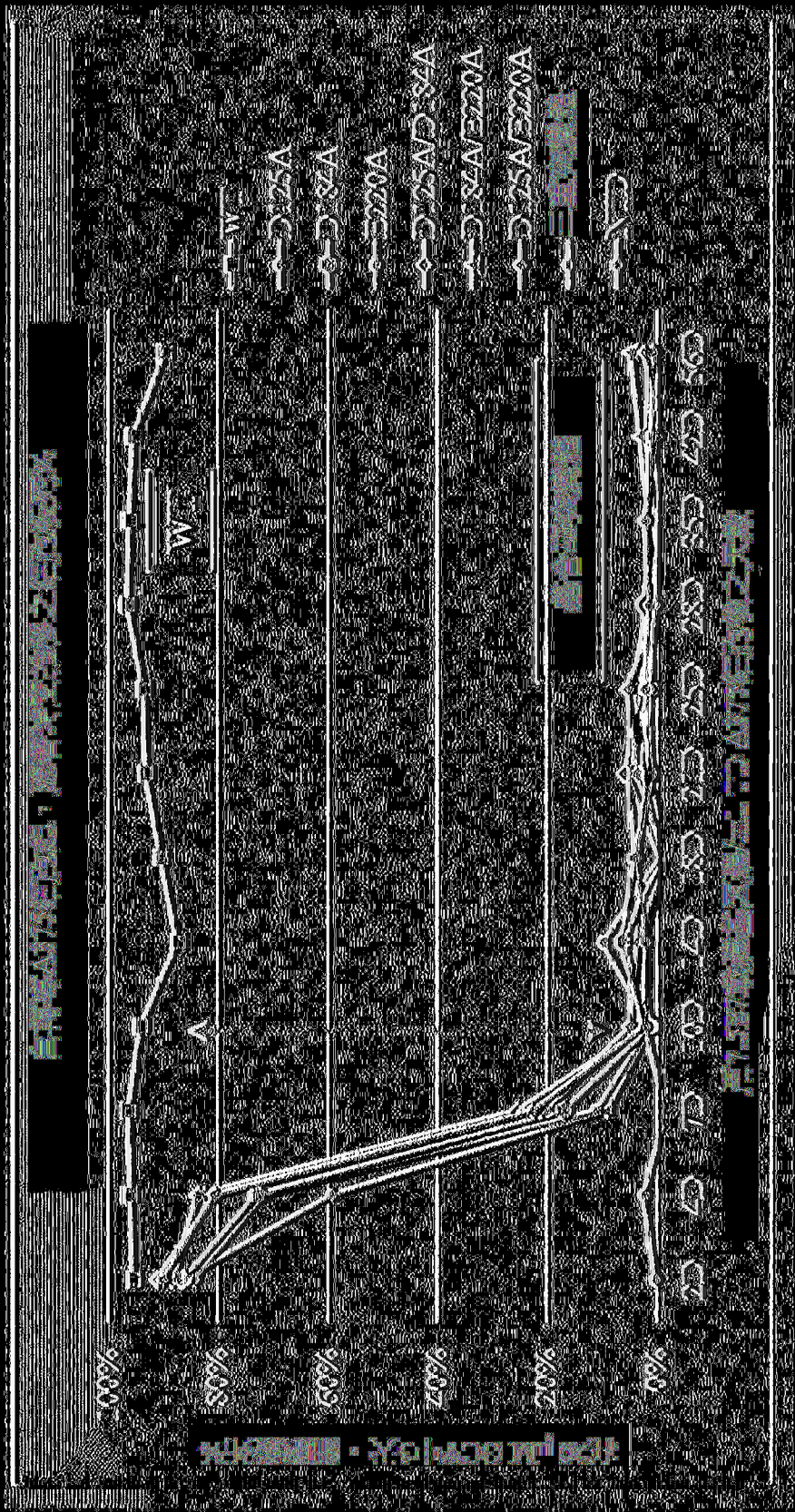


(圖1)

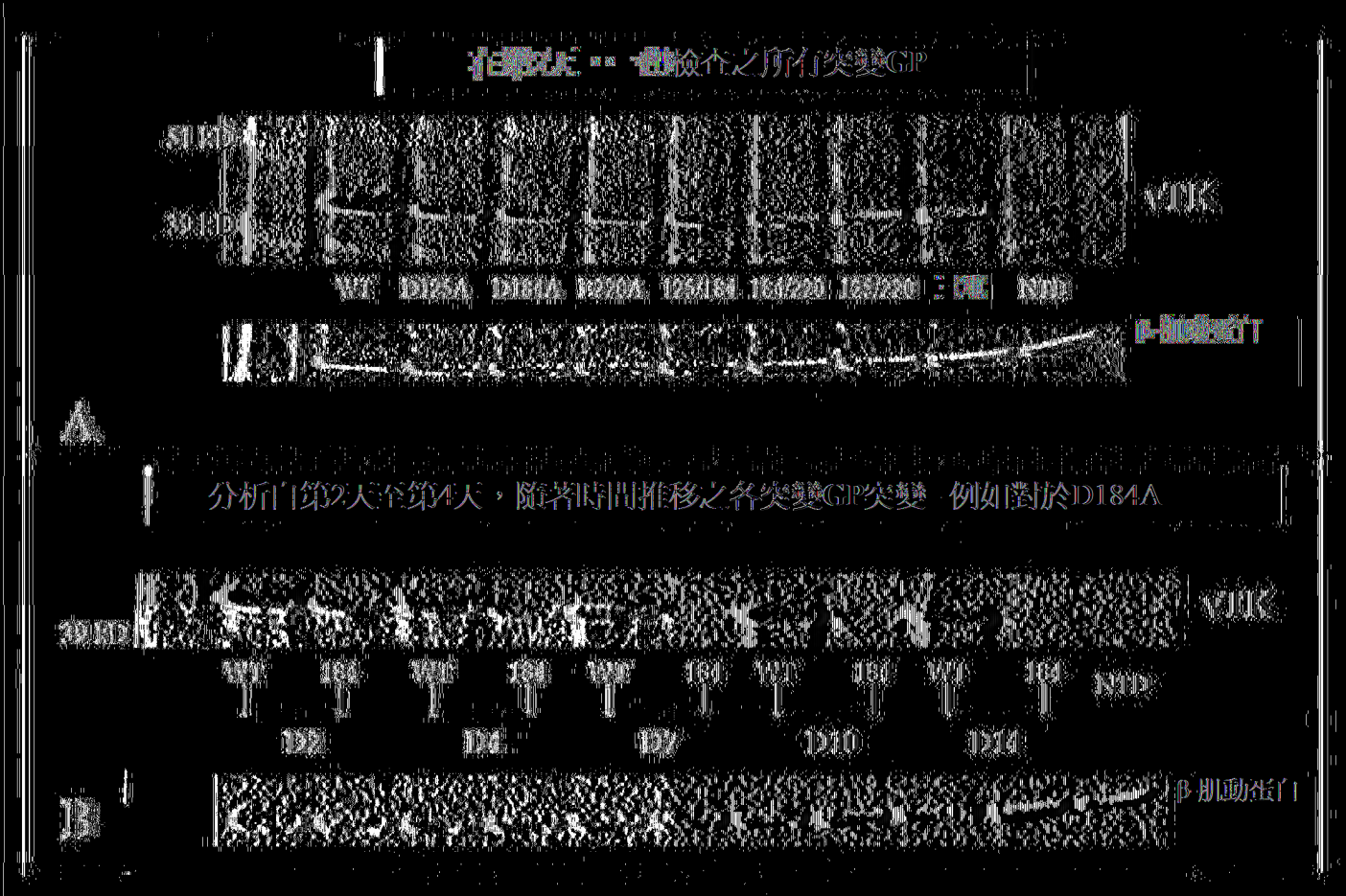

$$|(\frac{1}{2}, \frac{1}{2})_3\rangle$$



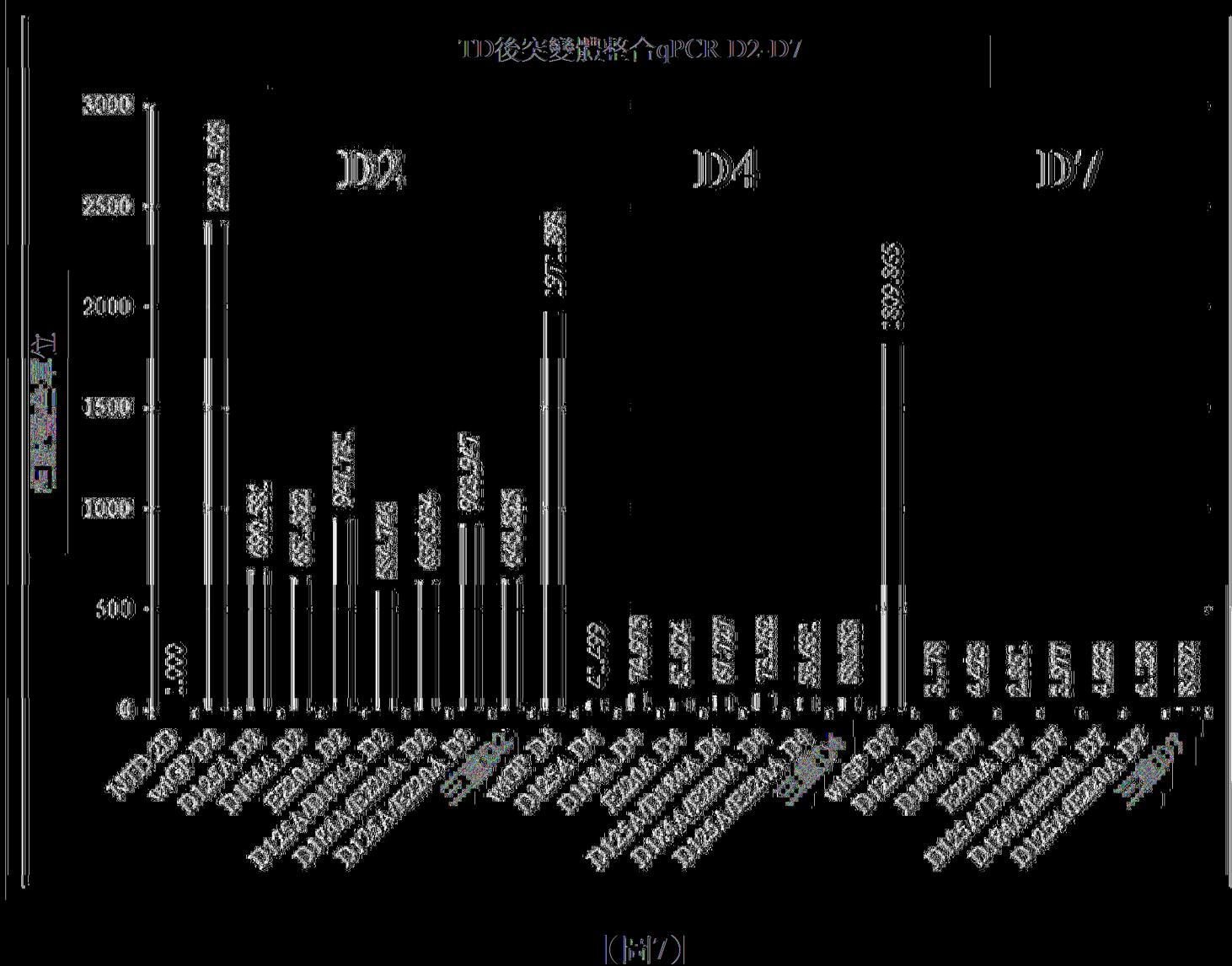
[(圖4)]



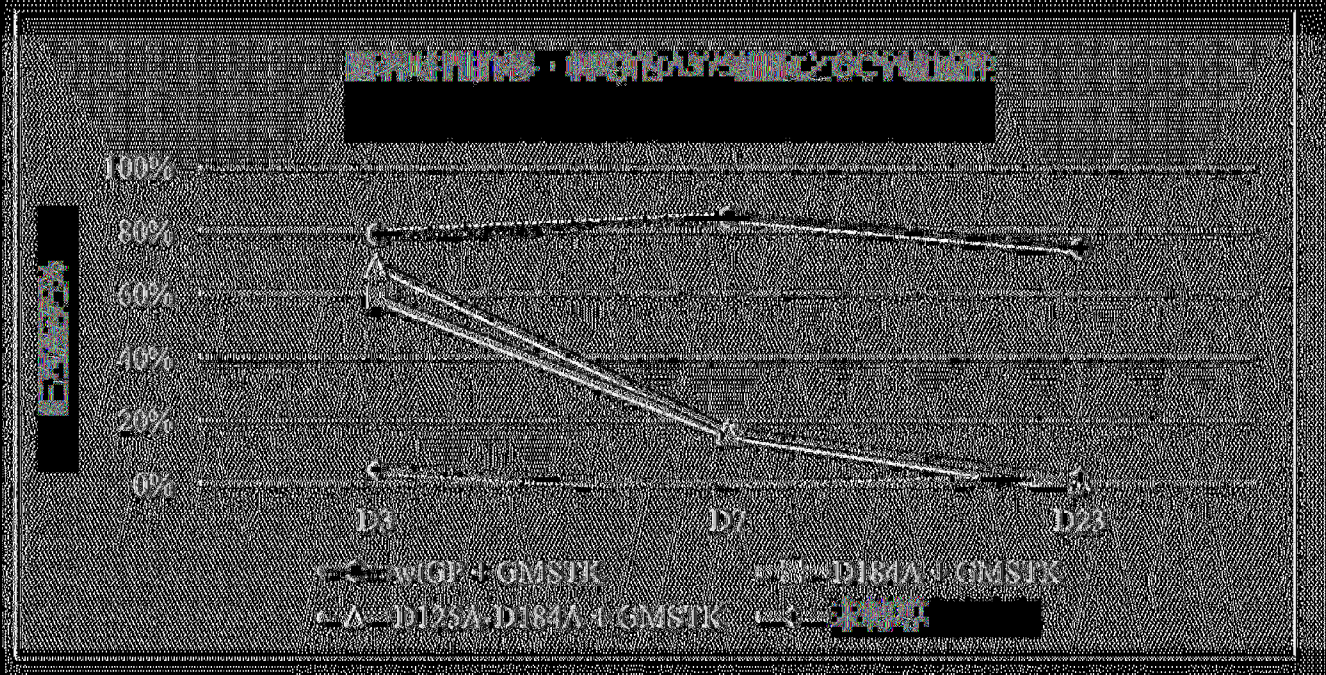
111



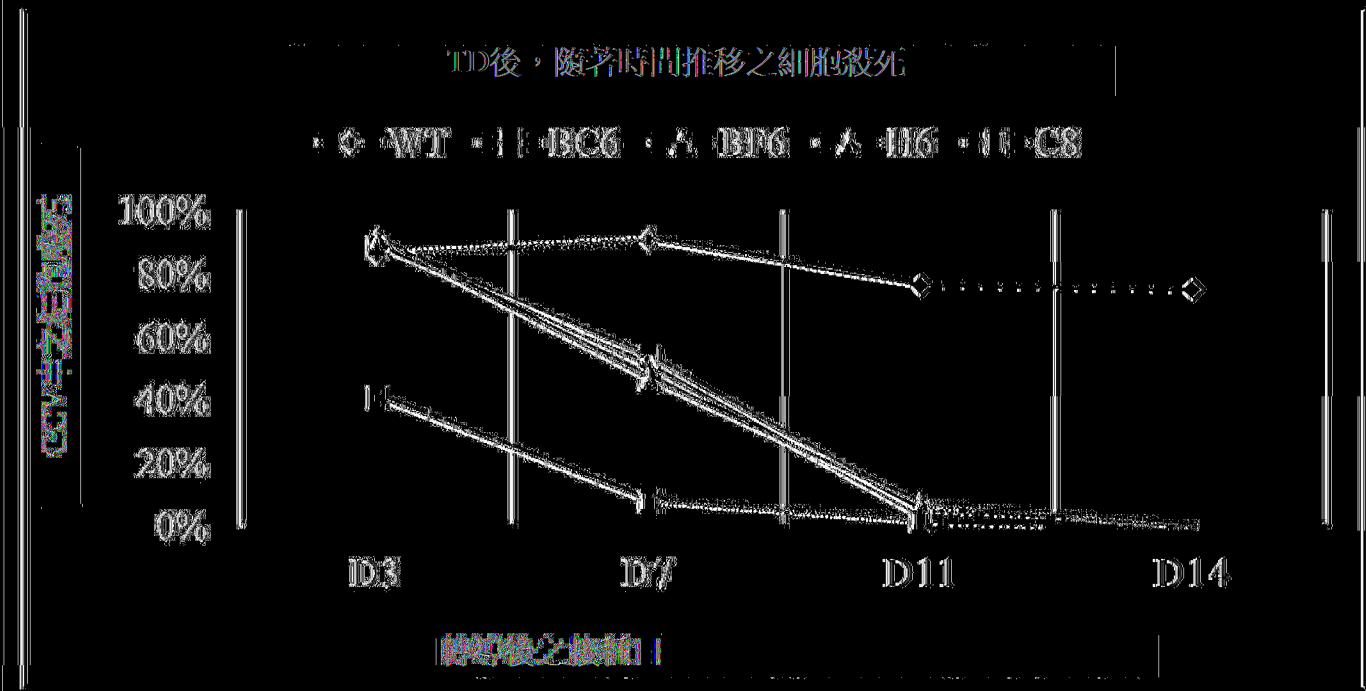
(圖6)



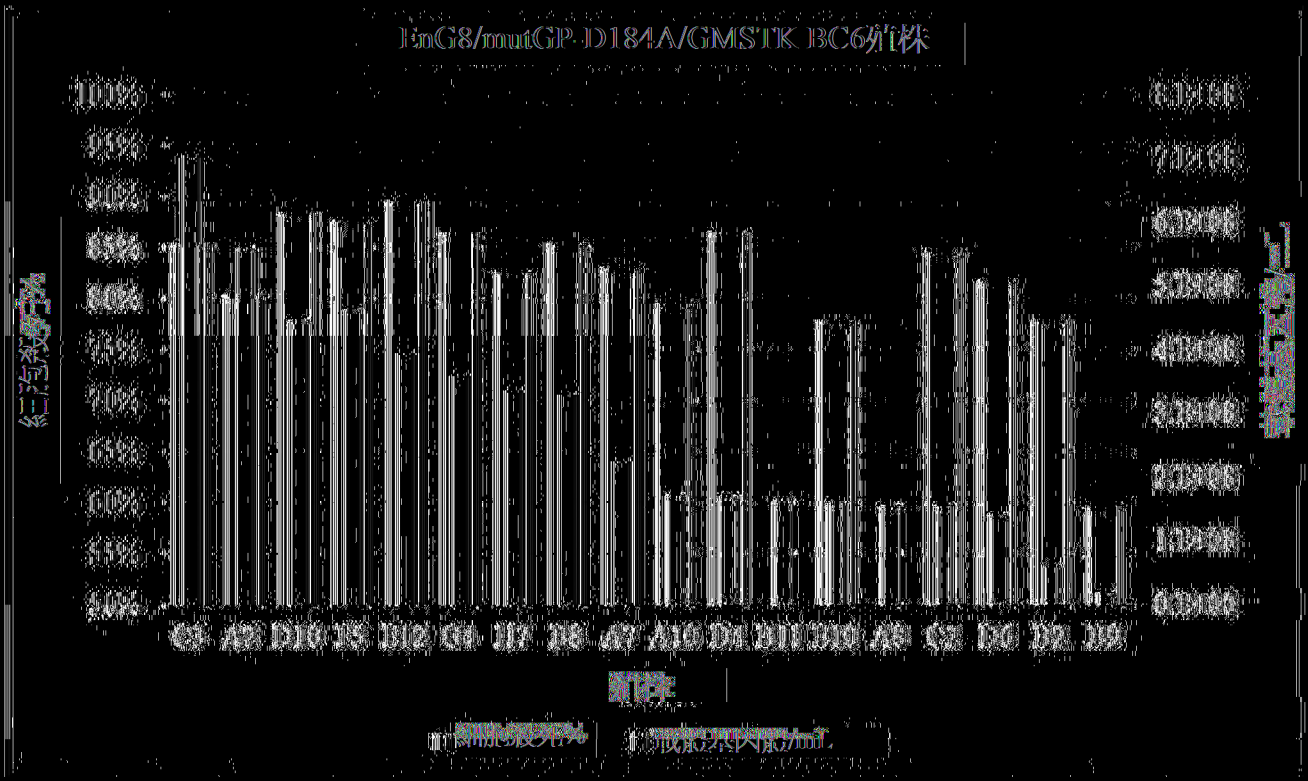

$$|(\hat{1} \hat{4} | 8)$$



(圖9)



[(圖10)]



(圖11)

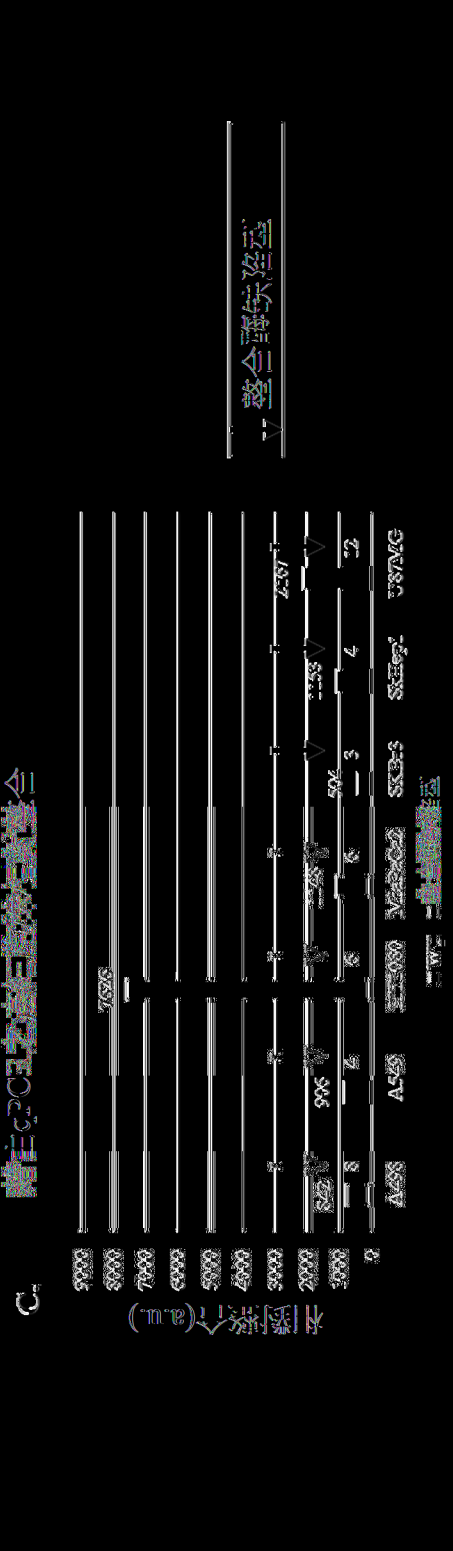


圖 10

圖 11



FIG. 1

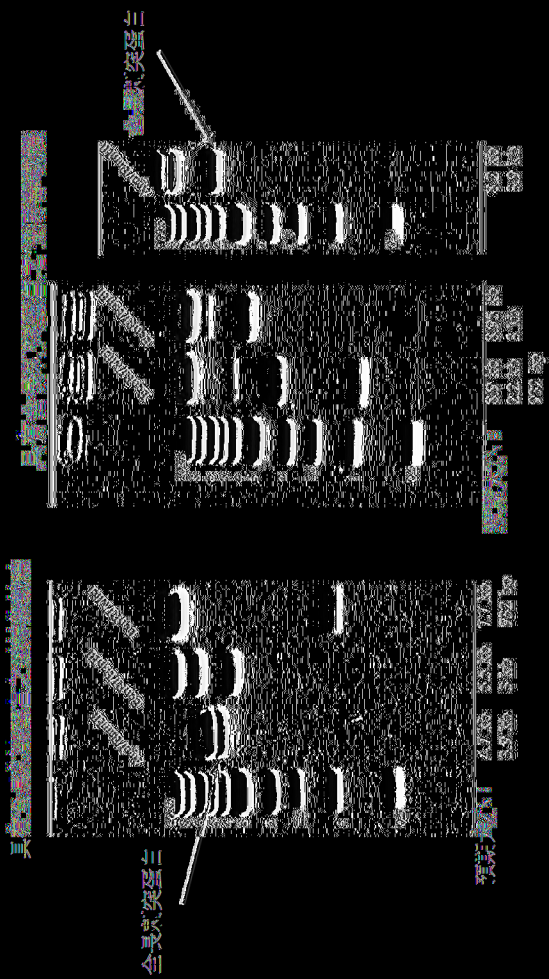


圖14A

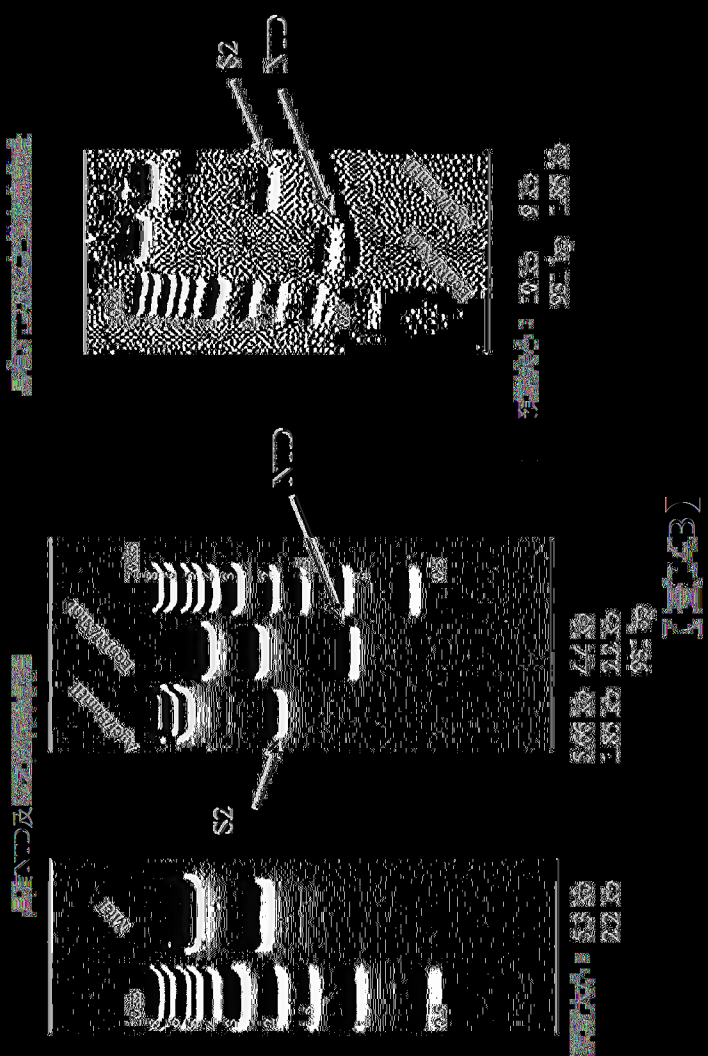


圖14B

具有異密序之A2轉變體之慢凍載體

具有異密序之A2轉變體之逆轉錄載體

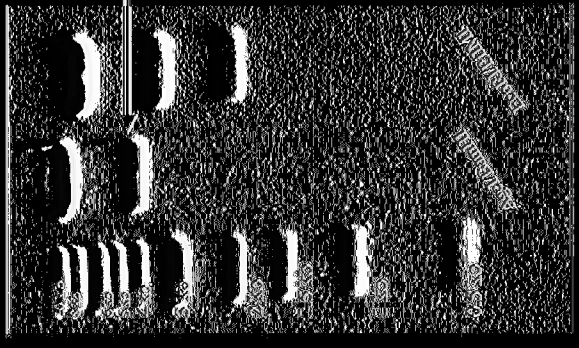
圖 10

圖 11

全長異密序
載體



預期大小: 47 bp, 19 bp



預期大小: 81 bp, 19 bp

[圖 10]

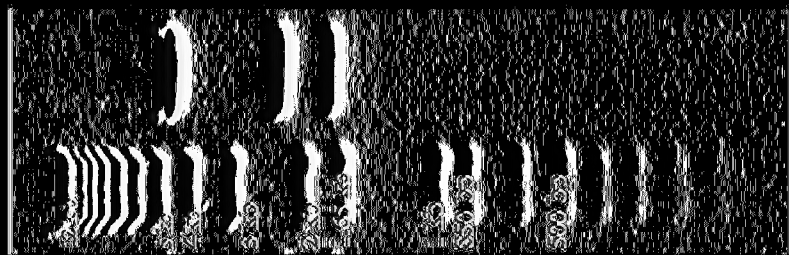
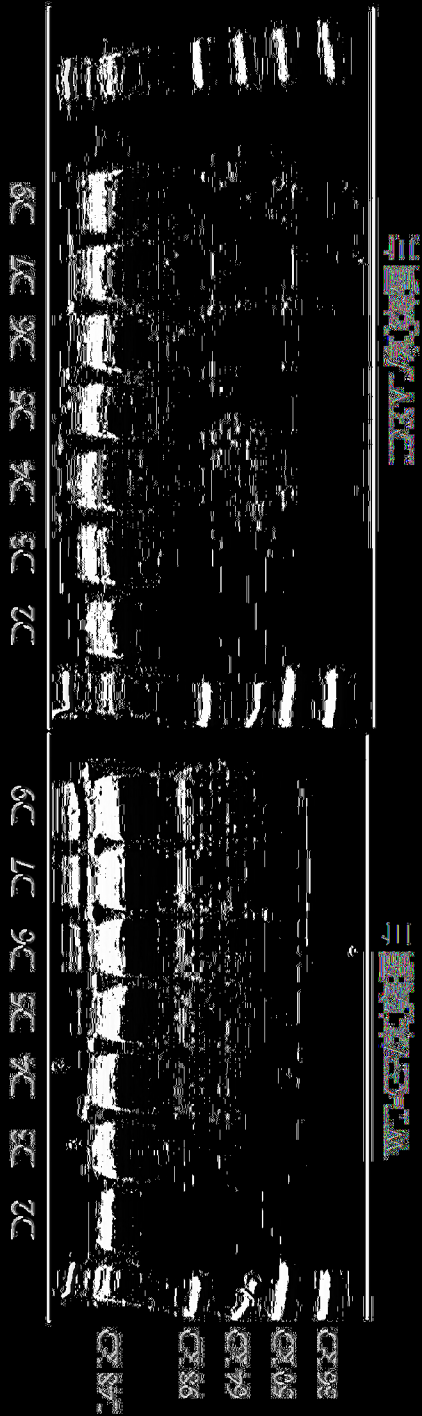
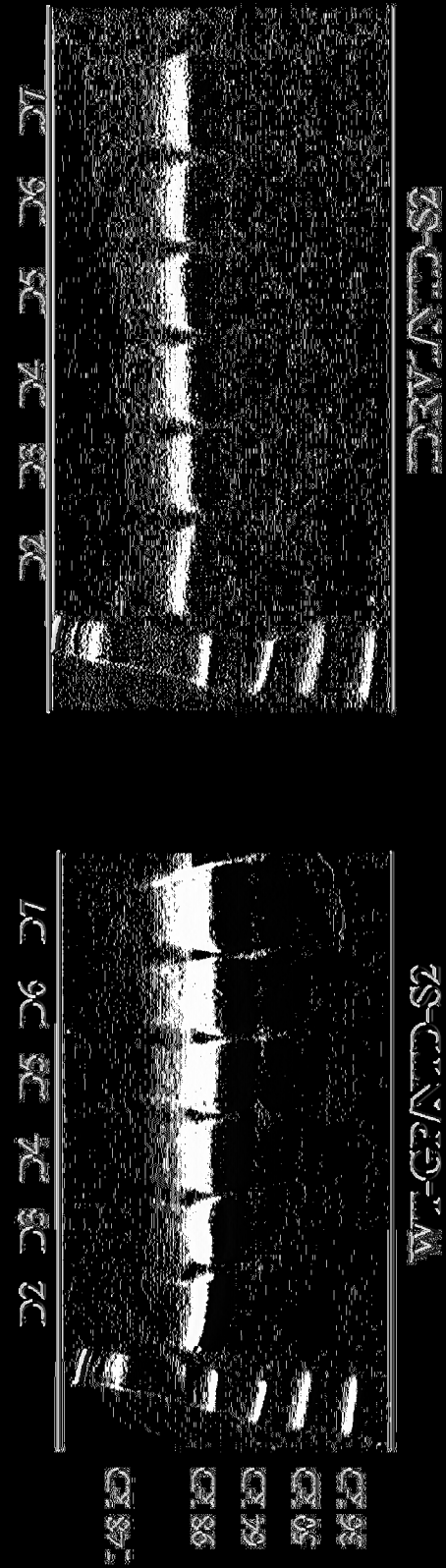


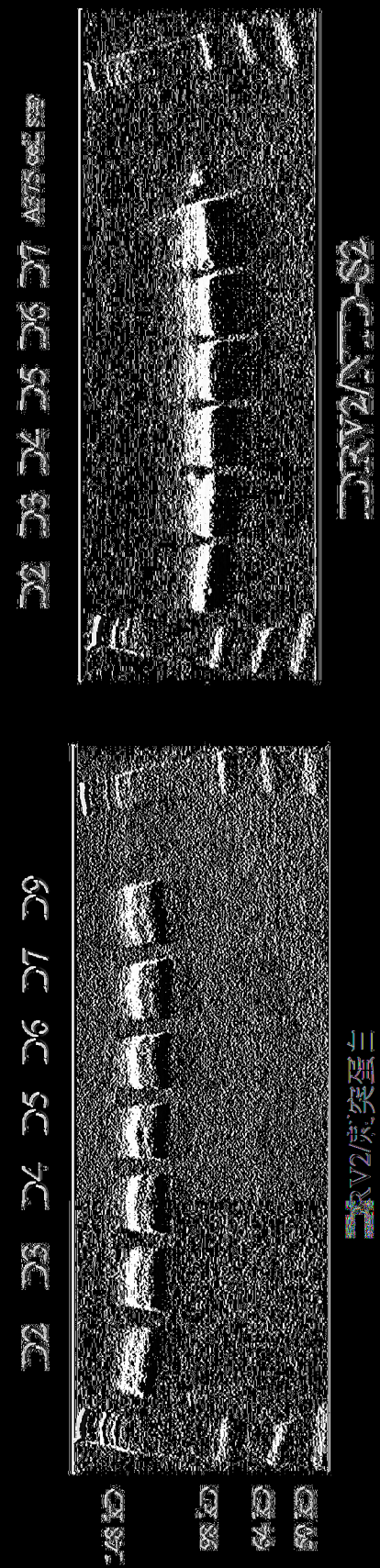
表 4.4.3 2.2.2 5.7.8



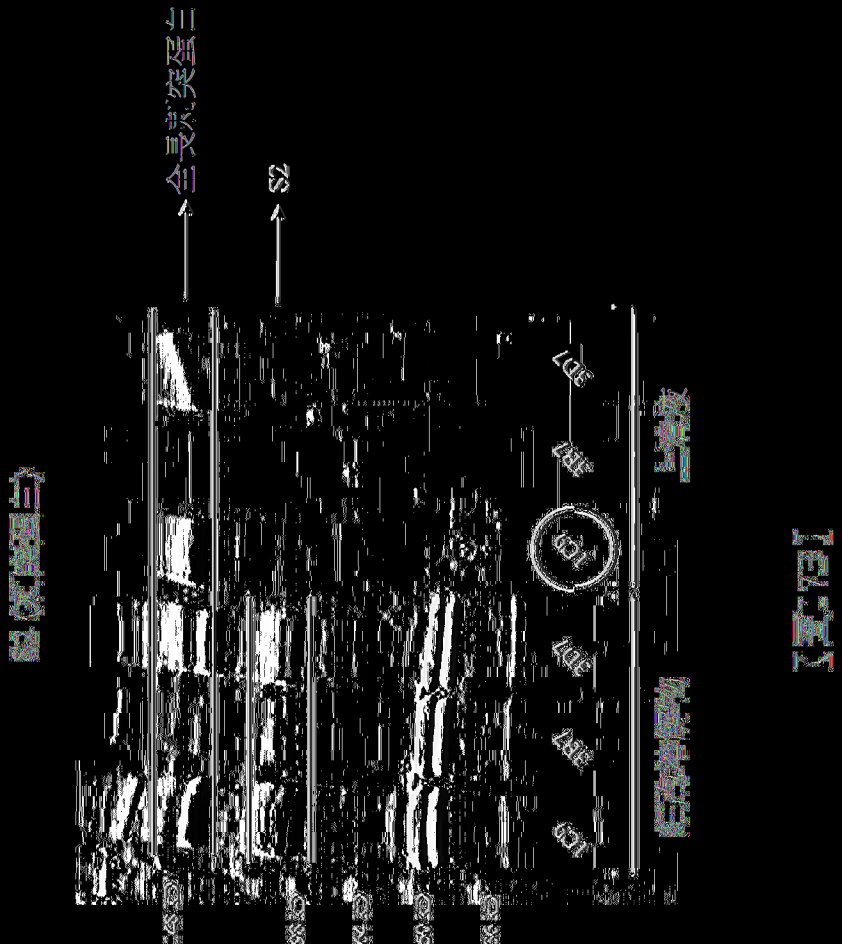
[圖 6A]

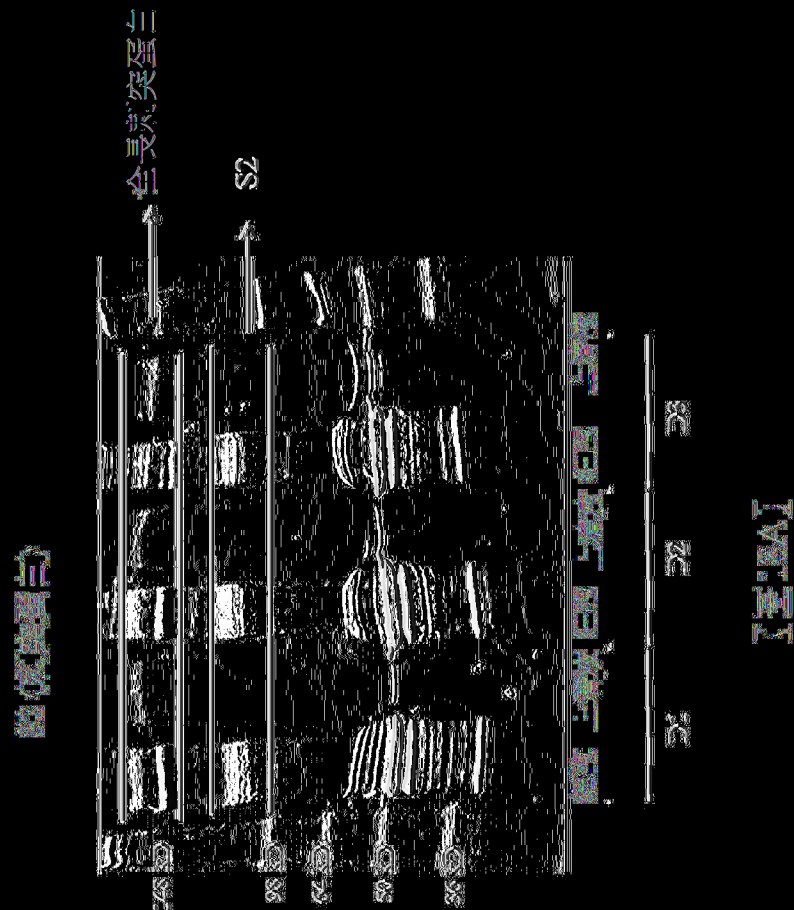


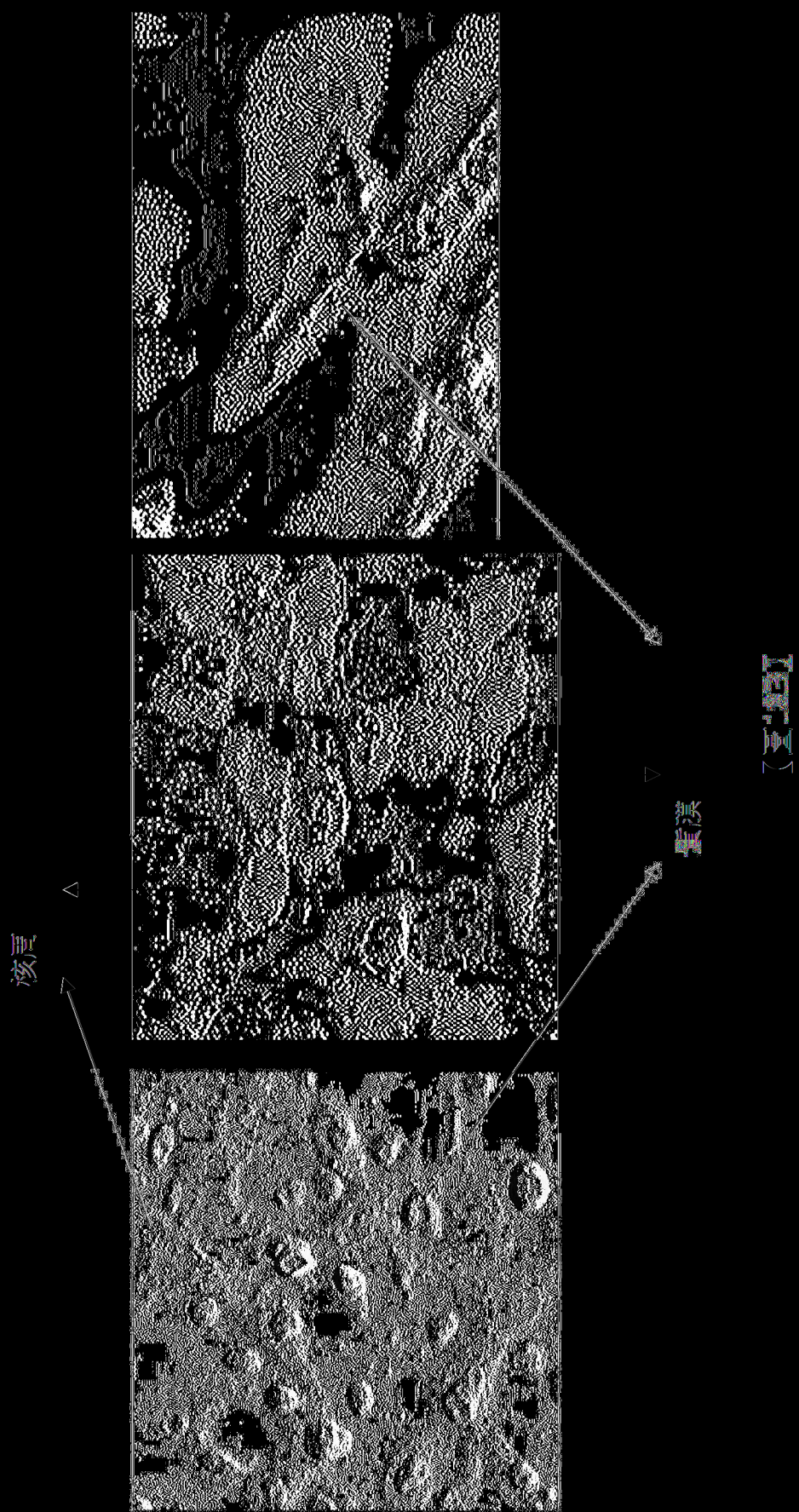
[圖 6B]

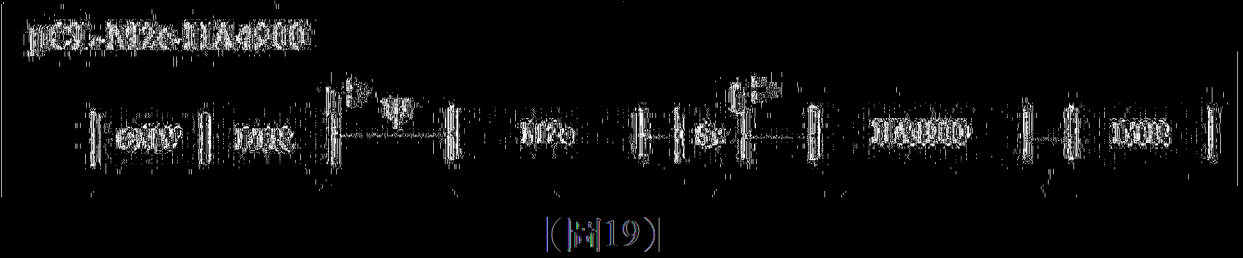


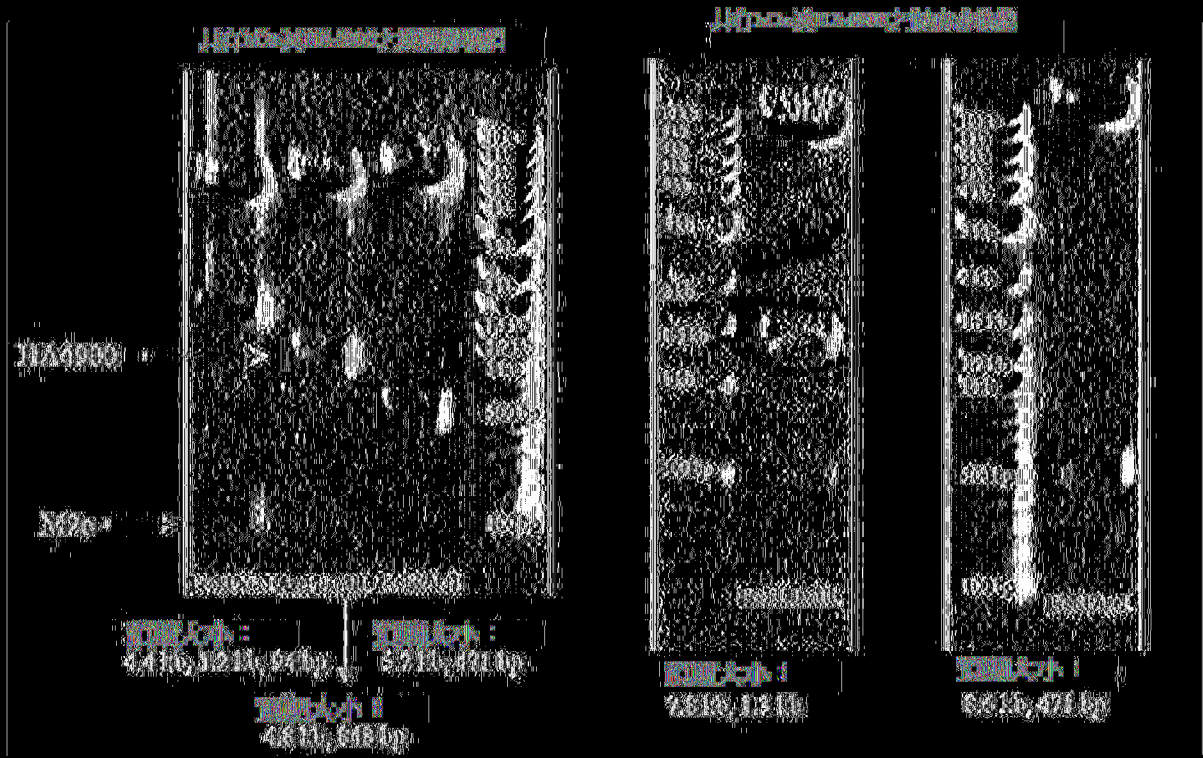
[圖 6C]







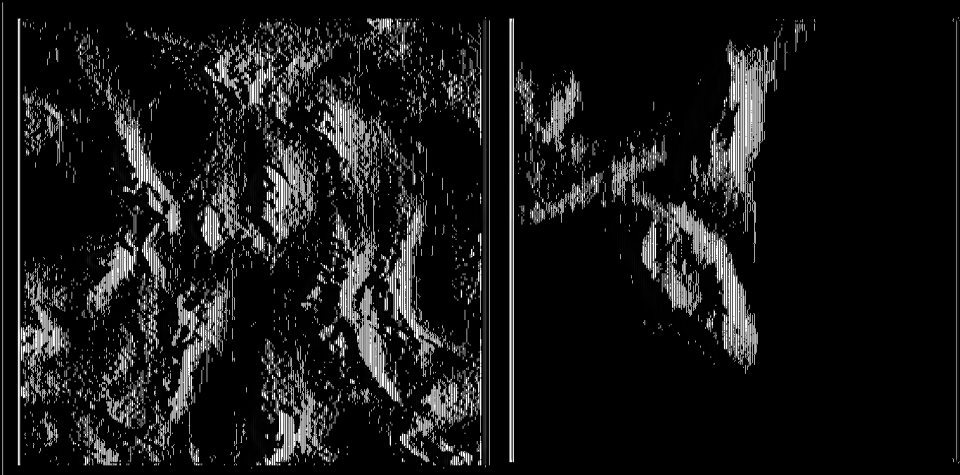




(圖20)



[(圖)21A]



[(圖)21B]