



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1961001 B

(45) 授权公告日 2012.09.05

(21) 申请号 200580016137.5

(22) 申请日 2005.03.30

(30) 优先权数据

04290838.4 2004.03.30 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/003339 2005.03.30

(87) PCT申请的公布数据

W02005/095442 EN 2005.10.13

(73) 专利权人 古斯塔威罗斯研究所

地址 法国维勒瑞夫

专利权人 国家科研中心

巴黎第十一大学

(72) 发明人 M·勒纳尔 M·曼吉尼 T·海德曼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1281371 A, 2001.01.24, 全文.

(54) 发明名称

参与病毒蛋白的免疫抑制作用的调节的多肽序列

(57) 摘要

本发明涉及具有7至20个氨基酸残基的序列的多肽, 当该序列(免疫抑制调节序列)取代病毒

WO 0247720 A2, 2002.06.20, 全文.

EP 0377842 A1, 1990.07.18, 全文.

US 4822606 A, 1989.04.18, 全文.

Lelia Delamarre et.al. A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein aminoacids important for infectivity. Journal of Virology 71 1. 1997, 71(1), 259-266.

Arille R. Rosenberg et. al. Early assembly step of a retroviral envelope glycoprotein: analysis using a dominant negative assay. The Journal of Cell Biology 145 1. 1999, 145(1), 57-68.

Sandra Blaise et.al. Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. Journal of Virology 78 2. 2004, 78(2), 1050-1054.

Laurence Benit et.al. Identification, phylogeny, and evolution of Retroviral Elements Based on Their Envelope Genes. Journal of Virology 75 23. 2001, 75(23), 11709-11719.

Marianne Mangeney et. al. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immunorejection in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 25. 1998, 95(25), 14920-14925.

审查员 杨佳倩

权利要求书 3 页 说明书 42 页 附图 20 页

蛋白或其片段的同源序列时, 所述多肽能够调节所述病毒蛋白或其片段针对在其中表达该序列的宿主的免疫抑制性质, 所述多肽包含最小的下列共有氨基酸序列: $X_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X_2$ 其中, X_1 和 X_2 经选择用来影响所述免疫抑制性质, 和 Y_9 至 Y_{12} 表示可变的氨基酸残基。

1. 由 7 至 20 个氨基酸残基的序列组成的多肽,其由源自病毒基因的核酸编码,当所述多肽替代病毒蛋白或其片段的同源序列时,该多肽能够调节所述病毒蛋白或其片段抗在其中表达该多肽的宿主的免疫抑制性质,所述多肽由选自下列共有氨基酸序列的 7 至 20 个氨基酸的序列组成:

$\text{NY}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\text{LY}_4\text{LY}_5\text{LY}_6\text{Y}_7\text{Y}_8\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\text{Y}_{12}\text{CY}_{12}\text{X}_2$ 和

$\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\text{CY}_{12}\text{X}_2$

其中, X_1 和 X_2 经选择用来影响所述免疫抑制性质,

其中,所述多肽由选自下列的免疫抑制调节序列组成:

● SEQ ID NO :17、18、19、20、21、22、33、34、35、36、37、38 和 39,或者

● SEQ ID NO :24、25、26、45、46 和 47,或者

● SEQ ID NO :23、27、28、29、30、31、32、40、41、42、43、44、48、49、50、51、52、53 和 54。

2. 由野生型 ENV 蛋白的突变产生的经突变的 ENV 蛋白,所述野生型 ENV 蛋白包含下列序列:

$\text{NY}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\text{LY}_4\text{LY}_5\text{LY}_6\text{Y}_7\text{Y}_8\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\text{CY}_{12}\text{X}_2$

所述野生型 ENV 蛋白选自:

HERV ENV,其选自:

● 由 SEQ ID NO :82 组成的 HERV-FRD ENV,其中 X_1 是 Q427,和 X_2 是 A433,

● 由 SEQ ID NO :84 组成的 HERV-T ENV,其中 X_1 是 Q516,和 X_2 是 A522,

● 由 SEQ ID NO :86 组成的 HERV-R ENV,其中 X_1 是 E561,和 X_2 是 K567,

● 由 SEQ ID NO :88 组成的 HERV-V ENV,其中 X_1 是 Q381,和 X_2 是 V387,和

● 由 SEQ ID NO :90 组成的 HERV-R(b) ENV,其中 X_1 是 E391,和 X_2 是 L397。

或者,选自下列的 ENV 蛋白:

● 由 SEQ ID NO :92 组成的 HTLV-1 ENV,其中 X_1 是 Q389,和 X_2 是 A395,或

● 由 SEQ ID NO :94 组成的 HTLV-2 ENV,其中 X_1 是 Q385,和 X_2 是 A391,或

● 由 SEQ ID NO :96 组成的 FeLV ENV,其中 X_1 是 E527,和 X_2 是 A533,或

● 由 SEQ ID NO :98 组成的 PERV ENV,其中 X_1 是 E545,和 X_2 是 A551,或

● 由 SEQ ID NO :100 组成的 STLV-1 ENV,其中 X_1 是 Q 389,和 X_2 是 A395,或

● 由 SEQ ID NO :70 组成的 MoMLV ENV,其中 X_1 是 E551,和 X_2 是 A557,或

● 由 SEQ ID NO :72 组成的 MPMV ENV,其中 X_1 是 Q471,和 X_2 是 A477,或

● 由 SEQ ID NO :102 组成的 FV ENV,其中 X_1 是 E561,和 X_2 是 A567,

其中所述氨基酸 X_1 由 R 或 H 替代。

3. 权利要求 2 的经突变的 ENV 蛋白,其中氨基酸 X_1 由 R 或 H 替代,和氨基酸 X_2 由 F、M、Y 或 W 替代。

4. 权利要求 2 或 3 的经突变的 ENV 蛋白,其中所述经突变的 ENV 蛋白的序列选自:SEQ ID NO :120,SEQ ID NO :122,SEQ ID NO :124,SEQ ID NO :126,SEQ ID NO :128,SEQ ID NO :130,SEQ ID NO :146,SEQ ID NO :148,SEQ ID NO :104,SEQ ID NO :106,SEQ ID NO :108,SEQ ID NO :110,SEQ ID NO :112,SEQ ID NO :114,SEQ ID NO :150 和 SEQ ID NO :152。

5. 由野生型 ENV 蛋白的突变产生的经突变的 ENV 蛋白,所述野生型 ENV 蛋白包含下列序列:

$\text{NY}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\text{LY}_4\text{Y}_5\text{LY}_6\text{Y}_7\text{Y}_8\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\text{CY}_{12}\text{X}_2$

其中,氨基酸 X_1 由 E 或 Q 替代和氨基酸 X_2 由 A 替代,

其中, Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸,

所述经突变的 ENV 蛋白相对于野生型 ENV 蛋白具有增加的免疫抑制活性,

所述野生型 ENV 蛋白为由 SEQ ID NO:74 组成的 HERV-W ENV。

6. 权利要求 5 的经突变的 ENV 蛋白,其中经突变的 HERV-W ENV 的序列选自:SEQ ID NO:116,和 SEQ ID NO:118。

7. 编码权利要求 1 的多肽的核酸。

8. 编码权利要求 2 的蛋白质的核酸。

9. 编码权利要求 5 的蛋白质的核酸。

10. 核酸,其特征在于其由选自下列的序列表示:SEQ ID NO:103,SEQ ID NO:105,SEQ ID NO:107,SEQ ID NO:109,SEQ ID NO:111,SEQ ID NO:113,SEQ ID NO:115,SEQ ID NO:117,SEQ ID NO:119,SEQ ID NO:121,SEQ ID NO:123,SEQ ID NO:125,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:145,SEQ ID NO:147,SEQ ID NO:149,和 SEQ ID NO:151。

11. 真核或原核表达载体,其特征在于其包含权利要求 7 至 10 中任一项的核酸以及所述核酸的表达所必需的元件。

12. 权利要求 11 的真核或原核表达载体,其中所述载体是病毒载体。

13. 权利要求 12 的真核或原核表达载体,其中所述病毒载体是痘病毒载体、腺病毒载体、麻疹病毒载体或巨细胞病毒载体。

14. 权利要求 13 的真核或原核表达载体,其中所述痘病毒载体选自禽痘病毒、金丝雀痘病毒和经修饰的牛痘病毒 Ankara 载体。

15. 权利要求 12 至 14 中任一项的真核或原核表达载体,其中所述载体是金丝雀痘病毒载体。

16. 权利要求 12 的真核或原核表达载体,其包含编码经突变的 ENV 蛋白的核酸序列,所述经突变的 ENV 蛋白是经突变的 FeLV ENV。

17. 权利要求 16 的真核或原核表达载体,其包含编码经突变的 FeLV ENV 的核酸序列,该核酸序列由选自 SEQ ID NO:103 或 SEQ ID NO:105 的序列组成。

18. 权利要求 12 至 14 中任一项的真核或原核表达载体,其包含编码 GAG 蛋白的核酸,该 GAG 蛋白和所述经突变的 ENV 来源于相同病毒。

19. 权利要求 15 的真核或原核表达载体,其包含编码 GAG 蛋白的核酸,该 GAG 蛋白和所述经突变的 ENV 来源于相同病毒。

20. 权利要求 16 或 17 的真核或原核表达载体,其包含编码 GAG 蛋白的核酸,该 GAG 蛋白和所述经突变的 ENV 来源于相同病毒。

21. 一种重组细胞,其特征在于其包含权利要求 7 的核酸。

22. 一种重组细胞,其特征在于其包含权利要求 11 至 20 中任一项的真核或原核表达载体。

23. 药物或疫苗组合物,其包含与药学上可接受的媒介物一起的下列物质作为活性物质:

至少一种权利要求 1 的多肽。

24. 药物或疫苗组合物,其包含与药学上可接受的媒介物一起的下列物质作为活性物质:

至少一种权利要求 2、3 或 5 的经突变的 ENV 蛋白。

25. 药物或疫苗组合物,其包含与药学上可接受的媒介物一起的下列物质作为活性物质:

至少一种权利要求 7 至 10 中任一项的核酸。

26. 药物或疫苗组合物,其包含与药学上可接受的媒介物一起的下列物质作为活性物质:

至少一种权利要求 11 至 20 中任一项的真核或原核表达载体。

参与病毒蛋白的免疫抑制作用的调节的多肽序列

发明领域

[0001] 本发明涉及能够调节蛋白质,特别是来自抗原性蛋白质的免疫抑制性质的氨基酸序列。本发明也提供了从抗原性和免疫抑制性蛋白质衍生的多肽,相对于其所来源的蛋白质,其具有获得的经调节的免疫抑制性质,同时基本上保持所述蛋白质的抗原性质。

[0002] 本发明特别涉及病毒或逆转录病毒感染的领域,包括内源性逆转录病毒的领域,和提供设计用于对这些病毒或逆转录病毒易感的宿主的预防和/或治疗的药剂的手段,所述宿主包括动物或人宿主。

[0003] 本发明的多肽可以特别适合用于免疫原性组合物的产生和减毒病毒的生产,以用于这样的方法,所述方法用于预防和/或治疗病毒感染或其有害后果或用于预防和/或治疗诱导内源性逆转录病毒(ERV)表达的有害后果。

[0004] 发明背景

[0005] 感染剂,例如病毒,已演化出侵入其宿主和逃避宿主的免疫应答的机制和策略。许多出版物已证实了由下述病毒编码的蛋白质的免疫抑制性质:EB 人疱疹病毒 4 型(Suzuki 等人,1995. J. Exp. Med. 182,477-486;Qin 等人,1996 J. Immunol. 156,2316-2323)、摩-傅猴病毒(Blaise 等人,2001 J. Gen. Virol. 82,1597-1600)、莫洛尼鼠类白血病病毒(Mangeney 和 Heidmann,1998. Proc. Natl. Sci. USA. 95,14920-14925)和其他病毒(参见综述,Alcami 等人,2002 EMBOreports. 3(10),927-932)。这可通过这样的事实得以进一步确认,即被逆转录病毒感染通常和宿主的免疫系统的功能障碍相关。

[0006] 这些免疫抑制作用包括白细胞介素-2 依赖性淋巴细胞增殖的抑制、人天然杀伤细胞的细胞裂解活性的抑制和单核细胞介导的肿瘤细胞杀伤的抑制以及细胞因子合成的调控的抑制。

[0007] 体内检测表明失活的病毒,以及类似于逆转录病毒包膜蛋白的合成的多肽具有免疫抑制性质(Oostendorp 等人,1993 Crit. Rev. Oncol. Hematol. 14,189-206;Haraguchi 等人,1997 J. Leukocyte Biol. 61,654-666)。最近以来,Mangeney 等人(1998. Proc. Natl. Sci. USA. 95,14920-14925)显示,当来源于 C57BL/6 品系的表达逆转录病毒包膜蛋白的鼠类肿瘤细胞被注射入 Balb/c 小鼠(同种异体移植)时,形成肿瘤,然而不表达逆转录病毒包膜蛋白的相同细胞被排斥。通过在包膜蛋白中进行不同的缺失,鉴定了负责免疫抑制功能的被称为 ISU(对于“免疫抑制”)的结构域。

[0008] 首先在包膜糖蛋白的跨膜部分鉴定了 ISU 结构域。逆转录病毒的 env(包膜)基因编码这样的前体多肽,该前体多肽之后被切成两个蛋白质:表面糖蛋白(SU)和跨膜亚基(TM)。SU 蛋白负责识别和结合对于病毒的细胞受体。TM 部分参与将包膜复合物(SU 和 TM)锚定在靶细胞膜上,其直接负责细胞膜融合和病毒的进入。

[0009] 已阐明了许多病毒的 TM 亚基的结构,特别是莫洛尼鼠类白血病病毒(Mo-MuLV)、人免疫缺陷病毒 1(HIV-1)和 1 型人 T-细胞白血病病毒(HTLV-1)。还已在非逆转录病毒蛋白质例如流感病毒和埃博拉病毒的蛋白质中发现包膜蛋白中的高度保守的组织。

[0010] 还已在另一类蛋白质中发现了免疫抑制作用,所述另一类蛋白质是在 ERVs,特别

是 HERVs (人内源性逆转录病毒) 中表征的。HERVs 包含这样的元件, 所述元件是逆转录病毒起源的序列, 所述序列已散布入人基因组并表示祖先感染的原病毒残留物。因此, 可推断 HERVs 和逆转录病毒之间存在强相似性。这些 HERV 元件中的一些元件仍具有功能并且可编码活性蛋白质, 即病毒样蛋白质, 尽管其大部分具有累积的突变、缺失和 / 或截短。

[0011] 已提出这些功能性 HERVs 的作用, 包括保护免受逆转录病毒的感染 (Best 等人, 1997 Trends Microbiol. 5, 313-318) 或通过免疫抑制作用保护胎儿免受母体免疫系统的攻击 (Cianciolo 等人, 1985 Science 230, 453-455; Mangeney 和 Heidmann 1998 Proc. Natl. Sci. USA. 95, 14920-14925)。Mangeney 等人 (2001 J. Gen. Virology 82, 2515-2518) 鉴定了编码具有免疫抑制性质的包膜蛋白的 HERV。该出版物报道, 由 HERV-H 编码的蛋白质可使表达包膜的细胞逃避免疫应答和进行增殖, 而用空载体转染的相同细胞一般被接受移植的小鼠排斥。

[0012] 鉴定了编码功能性包膜蛋白的其他 ERVs, 特别是 HERVs, 其具有促融合 (fusogenic) 性质, 即, 能够在体外形成合胞体 (syncytia) (多核细胞): 它们包括 HERV-FRD 和 HERV-W (Blond 等人, 2000 J. Virol. 74, 3321-3329; Blaise 等人, 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. 22, 13013-13018)。此外, 体内实验已显示, 当和不能产生其自身包膜蛋白的 MoMLV 病毒颗粒一起共表达时, HERV-W 包膜蛋白可形成能够感染人细胞的功能性病毒颗粒 (Patience 等人, 1998 J. Virol. 72, 2671-2676)。总之, HERV-W 具有保守的其促融合性质和感染度。在 HERV-FRD 中已观察到类似的促融合和感染性质。

[0013] 依赖于不同的情形, 在哺乳动物特别是人中, 观察到的免疫抑制作用一方面可涉及有毒害的病毒感染, 另一方面可涉及肿瘤细胞的活跃的增殖。特别地, 肿瘤细胞的活跃的增殖是 ERV 病毒样蛋白质表达的结果。然而, 尽管需要更多的知识来完全理解免疫抑制的机制, 但这些免疫抑制蛋白质的鉴定为抗病毒感染、抗内源性逆转录病毒的表达的诱导或抗它们在宿主内的有害后果的治疗策略 (包括疫苗策略) 展现了新前景。

[0014] 特别地, 可将目前使用的疫苗分为以下类别:

[0015] - 由减毒的或弱化的、经修饰的病原体组成的活减毒疫苗 (细菌或病毒疫苗)。在给宿主施用后, 该经修饰的致病生物在宿主内复制并刺激免疫应答。单剂施用后, 该类型的疫苗一般产生长效免疫性, 但可能导致副作用, 即, 由所述病原体导致的轻度情况的疾病, 因而不应当给免疫系统变弱的人施用。

[0016] - 灭活的或被杀死的疫苗, 其由被杀死的或灭活的病原体组成, 特别是通过热和 / 或化学处理 (整个生物) 而产生的。这些经处理的病原体不能复制, 从而不能导致其通常产生的疾病。因此, 其是安全的, 从而甚至可将其给免疫系统变弱的宿主施用。然而, 其通常不如活疫苗有效, 因而要求多剂施用。

[0017] - 由病原生物的抗原部分组成的疫苗, 所述抗原部分包括完整的蛋白质或其抗原决定簇, 特别是通过重组技术、作为编码该抗原的基因表达的结果而获得的。可将表达的蛋白质给患者施用, 或可将编码该蛋白质的基因插入给宿主施用的表达载体。然而这样的疫苗通常不如活疫苗有效, 因而要求多剂。

[0018] 用于设计适合于这样的疫苗制剂的化合物的原则已转换为设计适合于通过免疫疗法治疗已形成的感染的化合物, 所述疫苗制剂能够在宿主中引起免疫应答以保护宿主免受由于病原体 (包括病毒、细菌或其他病原体) 造成的感染。然而, 这些化合物的功效未被

证明是充分有效的,特别是在抗病毒或抗病毒样的预防或免疫治疗领域。此外,化合物的使用仍产生许多与安全相关的问题。

[0019] 在一些逆转录病毒包膜蛋白用于免疫(作为疫苗成分或用于免疫疗法)时观察到的一个缺点在于其免疫抑制性质,该免疫抑制性质可阻碍或影响宿主的免疫应答功效。从而,因为这些蛋白质对免疫应答的潜在抑制性,不能将其以其天然的形式给患者施用。因此巨大的挑战是压制或调节这些蛋白质的免疫抑制性质,同时不改变其抗原性质和/或其与宿主细胞感染相关的性质。然而,对包膜蛋白复合物进行突变的努力已导致其融合功能和感染功能的强烈改变,从而导致其作为产生免疫应答的活性成分的价值改变(Delamarre 等人,1997 J. Virol. 71(1),259-266 ;Rosenberg 等人,1999 J. Cell Biol. 145,57-68)。

[0020] 鉴定蛋白质的免疫抑制性质的决定簇是本发明的一个目的,其包括鉴定参与蛋白质特别是病毒或病毒样蛋白质的免疫抑制性质的调节的多肽序列和氨基酸残基,它们基本上保持了所述免疫抑制蛋白质的其抗原性质。

[0021] 鉴定蛋白质的免疫抑制性质的这些决定簇和使用其设计具有经修饰的,即经调节的免疫抑制性质的多肽是本发明的另一个目的。

[0022] 本发明的另一目的是提供这样的多肽,其从抗原性和免疫抑制性蛋白质衍生,该多肽的特征在于经调节的免疫抑制性质,而同时保持起始蛋白质的抗原性质。

[0023] 提供下述手段也是本发明的一个目的,即该手段用于以减少的免疫系统改变的风险来促进抗病原生物特别是抗病毒的有效免疫应答,即细胞介导的免疫应答和/或体液免疫应答,其可保护免受这些病原生物特别是病毒的感染,或保护免受这些病原生物在宿主中的有害作用影响,或保护免受宿主中内源性逆转录病毒的表达有害后果影响。本发明还提供这样的手段,所述手段适合于通过免疫疗法治疗被病原生物包括病毒感染的患者,或适合于治疗病原生物有害作用包括恶性作用,或适合于治疗遭受与内源性病毒表达的诱导相关的病理学的患者,所述内源性病毒一般在宿主中是沉默的。

[0024] 发明概述

[0025] 在一个方面,本发明提供了这样的多肽,即当所述多肽替代病毒蛋白或其片段的同源序列时,该多肽能够调节所述蛋白或其片段针对在其中表达该多肽的宿主的免疫抑制性质,所述多肽具有最小的下列共有氨基酸序列:

[0026]
$$X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$$

[0027] 其中,X1 和 X2 经选择用于影响所述免疫抑制性质,Y 表示可变的氨基酸残基,3 和 1 分别表示在 X1 和 C 之间以及在 C 和 X2 之间的可变氨基酸残基的数目。

[0028] 所述最小共有序列被称为“免疫抑制调节序列”。

[0029] 在一个实施方案中,对应上述定义并包含免疫抑制调节序列的肽来源于病毒蛋白,包括来源于病毒样蛋白,尤其是逆转录病毒蛋白,特别是病毒或逆转录病毒的包膜蛋白或来自内源性逆转录病毒尤其是人内源性逆转录病毒(HERV)的包膜蛋白。

[0030] 在 Benit 等人(J Virol. December 2001,p. 11707-11719)的图 3 中已公开了病毒(包括 ERV)的几种包膜蛋白的氨基酸序列。

[0031] 已表征了在确定的蛋白质的环境中影响免疫抑制性质的特定的成对氨基酸残基,相应地已鉴定了具有想要的“免疫抑制调节”性质的序列,其可选自:

[0032] a) 参与了其中存在有它们的蛋白质的免疫抑制性质产生的序列,其包含:

[0033] $E-(Y)_3-C-(Y)_1-A$

[0034] $Q-(Y)_3-C-(Y)_1-A$;

[0035] 和 b) 当它们存在于免疫抑制性蛋白质中时,可改变例如减少或抑制免疫抑制性蛋白质的免疫抑制性质的序列,其包含:

[0036] $R-(Y)_3-C-(Y)_1-F$ 。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了从确定的抗原性和免疫抑制性蛋白质衍生的多肽,所述多肽包含由 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 表示的氨基酸序列(所谓的免疫抑制调节序列),其中在所述多肽中,Y表示可变的氨基酸残基,3和1分别表示在X1和C之间以及在C和X2之间的可变氨基酸残基Y的数目,X1和X2经选择用于给所述多肽提供改变的免疫抑制性质(相对于所述已确定的蛋白质的免疫抑制性质)。

[0038] 在一个特殊的实施方案中,具有抗原性质和免疫抑制性质的蛋白质由来源于病毒的基因编码,特别是由来自逆转录病毒的env基因编码。

[0039] 这样的蛋白质包含具有下列共有序列的免疫抑制序列决定簇: $E/Q-G-G-L/T/I-C-A/K/L/M/V/I-A$ 。其中X1(E/Q)和任选地X2(A)残基被替代的相同蛋白质可以没有免疫抑制性质,但仍保持其抗原性质。经修饰的免疫抑制调节序列的实例是 $R-G-G-L/T/I-C-A/K/L/M/V/I-F$,该序列改变了免疫抑制性质,特别是其可产生包含所述序列的非免疫抑制多肽。特殊的经修饰的免疫抑制调节序列选自:

[0040] RGGLCAF (SEQ ID NO :1)

[0041] RGGLCKF (SEQ ID NO :2)

[0042] RGGLCLF (SEQ ID NO :3)

[0043] RGGLCMF (SEQ ID NO :4)

[0044] RGGLCVF (SEQ ID NO :5)

[0045] RGGLCIF (SEQ ID NO :6)

[0046] RGGTCAF (SEQ ID NO :7)

[0047] RGGTCKF (SEQ ID NO :8)

[0048] RGGTCMF (SEQ ID NO :9)

[0049] RGGTCIF (SEQ ID NO :10)

[0050] RGGICAF (SEQ ID NO :11)

[0051] RGGICKF (SEQ ID NO :12)

[0052] RGGICLF (SEQ ID NO :13)

[0053] RGGICMF (SEQ ID NO :14)

[0054] RGGICVF (SEQ ID NO :15)

[0055] RGGICIF (SEQ ID NO :16)。

[0056] 在一个特殊的实施方案中,所述蛋白质还具有感染和/或融合性质。可以以不影响这些补充性质中的一个性质或不影响这两个补充性质的方式有利地进行免疫抑制调节序列的修饰,例如通过X1和任选地X2氨基酸残基的替代。

[0057] 在另一个方面,本发明涉及包含这样的多肽的组合物或表达这些多肽的重组病毒颗粒。这样的组合物或颗粒通过在注射了其的宿主中引起免疫应答,可用于病毒感染的预防或治疗,包括其有害效应的预防或治疗,或用于内源性病毒特别是HERV在宿主中表达的

后果的预防或治疗。它们也可以用于减毒病毒的制备。

[0058] 在另一个方面,本发明涉及这样的方法,该方法通过修饰免疫抑制调节序列的氨基酸组成来调节蛋白质的免疫抑制性质。

[0059] 附图简述

[0060] 图 1:包含 MoMLV 的 env 核酸或其衍生多肽的载体的示意图。

[0061] 这些载体包含的核酸编码 MoMLV 的野生型包膜蛋白 (envMoMLV) 或通过编码 X1 和 / 或 X2 的密码子的替代而获得的本发明的其衍生多肽。

[0062] 图 1A 表示 phCMV-envMoMLV 载体。

[0063] 图 1B 表示 pDFG-envMoMLV-iresHygro 载体。

[0064] 图 2:包含 MPMV 的 env 核酸或其衍生多肽的载体的示意图。

[0065] 这些载体包含的核酸编码 MPMV 的野生型包膜蛋白 (envMPMV) 或通过编码 X1 和 / 或 X2 的密码子的替代而获得的本发明的其衍生多肽。

[0066] 图 2A 表示 phCMV-envMPMV 载体。

[0067] 图 2B 表示 pDFG-envMPMV-iresHygro 载体。

[0068] 图 3:包含 HERV-W 的 HERV-W 核酸或其衍生多肽的载体的示意图。

[0069] 这些载体包含的核酸编码野生型包膜蛋白 W(envW) 或通过编码 X1 和 / 或 X2 的密码子的替代而获得的本发明的其衍生多肽。

[0070] 图 3A 表示 phCMV-envW 载体。

[0071] 图 3B 表示 pDFG-envW-iresHygro 载体。

[0072] 图 4:细胞-细胞融合测定法的示意图

[0073] 所使用的载体包含编码目的包膜蛋白 (SU 和 TM 亚基) 的核酸、CMV 启动子和聚腺苷酸元件 (pA)。

[0074] 图 5:建立表达包膜的肿瘤细胞和体内测定法的示意图。

[0075] 所使用的载体包含编码目的包膜蛋白 (env) 的核酸、潮霉素基因 (hygro) 和 IRES (内部核糖体进入位点)。白色框表示 LTRs,箭头记号表示转录的起始位点。

[0076] 图 6:感染性质测定的结果。

[0077] 编号 1 至 12 是指本说明书中所用的品系。该图展示了本发明的野生型 (wt) 或突变型包膜蛋白的感染结果。

[0078] 图 7:免疫抑制性质测定的结果。

[0079] 该图显示了当表达包膜的 MCA205 细胞被注射入同种异体的 balb/c 小鼠时,其免疫抑制性质测定的结果。在插图中是被注射入同系 C57B1/6 小鼠中的表达包膜蛋白的 MCA205 细胞的结果。实心条形表示 HERV-W 包膜蛋白,白色条形表示 MPMV 包膜蛋白,和阴影条形表示双突变体 (R44Q+F50A)HERV-W 包膜蛋白。

[0080] 图 8:HERV-W ENV 蛋白的 TM 亚基的结构设计。

[0081] 该结构设计显示免疫抑制调节序列的精氨酸 (X1) 和苯丙氨酸 (X2) 氨基酸残基的位置,和两个不参与这样的性质的氨基酸残基 (丙氨酸和苏氨酸) 的位置。

[0082] 图 9:不同病毒和 HERVs 的免疫抑制调节序列的实例。

[0083] 第 1 栏表示病毒或 HERVs 的通用名称,第 2 栏表示所述病毒或 HERVs 的来源,第 3 栏表示鉴定出的免疫抑制调节序列的核苷酸序列 (使用单字母表示氨基酸),最后一栏表

示包膜蛋白的登录号。X1 和 X2 氨基酸残基以粗体显示。

[0084] 图 10 :野生型包膜蛋白的核苷酸和氨基酸序列。

[0085] 在氨基酸序列中, X1 和 X2 的位置已用下划线标示。

[0086] A 和 B 表示 MoMLV 的包膜蛋白的核苷酸和蛋白质序列, C 和 D 表示 MPMV 的包膜蛋白的核苷酸和蛋白质序列, E 和 F 表示 HERV-W 的包膜蛋白 (envW) 的核苷酸和蛋白质序列。

[0087] 核苷酸序列 (A、C 和 E) 是包膜蛋白的编码序列, 其第 1 个密码子 (ATG) 为转录的第一个密码子, 和最后一个密码子 (TAG) 为终止密码子。

[0088] 对于蛋白质序列 (B、D 和 F), 使用首字母氨基酸代码。第 1 个 M 表示蛋白质的第 1 个甲硫氨酸, 符号 “*” 表示终止密码子。

[0089] 图 11A、图 11B 和图 11C :免疫抑制缺陷型 FV 包膜蛋白的体外特性。图 11A, 当在 MLV 病毒假模标本 (pseudotypes) 的表面上表达时, FV 野生 (wt) 包膜蛋白、E14R 突变型包膜蛋白、A20F 突变型包膜蛋白和 E14R+A20F 双突变型 (DM) 包膜蛋白的感染性, 使用 NIH 3T3 细胞作为靶。纵轴表示感染性 (ffu/ml)。图 11B, 野生型 (wt) 和双突变型 (DM) FV 包膜蛋白的体内免疫抑制活性 (横轴, 免疫抑制指数)。图 11C, 野生型 (黑圈) 和免疫抑制缺陷型 (灰圈) FV 病毒体的体外繁殖速率的比较, 使用 NIH 3T3 细胞作为靶。通过定量 RT-PCR 测定细胞上清液的病毒载量 (纵轴, RNA 拷贝数 /mL)。横轴表示感染后的天数。白圈表示对照。

[0090] 图 12A 和图 12B :受包膜蛋白驱动的免疫抑制的丧失对 FV 感染的体内影响。在注射野生型 FV (黑圈) 或非免疫抑制突变型 FV (灰圈) 后, 经辐射的 (图 12A) 和未经辐射的 (图 12B) Swiss 小鼠的血清病毒载量 (纵轴, RNA 拷贝数 /mL)。注射了 PBS 的小鼠的信号低于检测阈值 (白圈)。横轴表示感染后的天数。

[0091] 图 13 :经感染的小鼠中的 FV 的免疫学检测。在用野生型 FV (黑色的圈和线)、非免疫抑制突变型 FV (灰色的圈和线) 或 PBS (白圈和虚线) 注射的小鼠的血清中对针对 FV 包膜蛋白的 SU 亚基的 IgGs 进行定量 (纵轴, 任意单位)。线条表示 IgG 水平的几何平均值。横轴表示感染后的天数。

[0092] 图 14A 和图 14B :野生型和非免疫抑制突变型 FV 包膜蛋白的抗原性。图 14A, 在用 FV 包膜蛋白的重组 TM 亚基 (左边) 或经 UV 灭活的 FV 病毒颗粒 (右边) 注射的小鼠的血清中对针对 FV 包膜蛋白的 TM 亚基的 IgMs 和 IgGs 进行定量。黑色 :野生型 FV ;灰色 :非免疫抑制突变型 FV ;白色 :只有佐剂。在 5 只 (左) 或 14 只 (右) Swiss 小鼠上的平均值 $\pm$ 标准偏差。纵轴表示以任意单位 (a. u.) 表示的抗 -TM ELISA 信号。图 14B, 和图 14A 中相同, 但如实施例 1 中所述, 使用注射了 MoMLV (左) 和 HERV-W ENV (右) 的野生型 (wt) 或双突变型 (dm) 重组 TM 亚基的小鼠。横轴表示以 ng/mL 表示的 IgG 水平。

[0093] 图 15 :疫苗接种测定法。图 15 表示用经 UV 灭活的野生型或非免疫抑制双突变型弗罗德病毒 (FV)、用完整的非免疫抑制双突变型弗罗德病毒 (FV) 或只用 CpG 佐剂进行免疫的小鼠, 和用野生型 FV 进行攻击的小鼠的病毒载量 (纵轴, RNA 拷贝 /mL 血清)。在第 21 天的攻击之前的第 1 天、第 7 天和第 14 天进行免疫, 相应的病毒载量表示为灰点。攻击后 5 天的病毒载量表示为黑点。检测阈值以在 $2 \cdot 10^3$ RNA 拷贝 /mL 处的水平线表示。图的上方表示在攻击后 5 天具有低于检测水平的病毒载量的小鼠的数目和百分比。水平条表示病毒载量的几何平均值。

[0094] 图 16A、图 16B 和图 16C :基因抑制 (knockdown) 方法和测定法的基本原理。图 16A 表示抑制 ERV 表达的方法,使用 pSUPER 载体构建由 plncx 衍生的载体以在 H1-RNA 启动子控制下产生用于 RNA 干扰的短双链转录物。用这些表达载体转导 B16 细胞,将所述 B16 细胞接受 G418 筛选,将所得的 ERV^{KD} 和对照 B16 细胞经皮下注射入小鼠的胁腹中,监测其肿瘤生长。图 16B,由 ERV 和对照 (gfp) 载体产生的 dsRNA 的预测的结构;数字是指在各个被靶向的序列内的 nt 位置 (参见方法部分)。图 16C,ERV 基因抑制型细胞 (ERV^{KD}) 和对照细胞的上清液中的 Gag (抗 -Gag) 和 Env (抗 -Env) 表达的 Western 印迹分析。在图的两侧显示分子量。

[0095] 图 17A 和图 17B :基因抑制型细胞保存有转化表型。图 17A,使用软琼脂测定法的转化表型的体外分析。左图,将 ERV^{KD} (右侧平板) 和对照 B16 (左侧平板) 细胞 (2×10^3 或 2×10^4) 涂板在半固体层上并保持 4 周,然后对集落进行计数 (右图)。图 17B,使用无免疫能力的小鼠对转化表型进行的体内测定。将 ERV^{KD} 和对照 B16 细胞 (2×10^5) 经皮下注射入经 X 光辐射的 (5Gy) C57B1/6 小鼠 (左图) 或 SCID 小鼠 (右图) 的胁腹中 (2-5 个独立的实验,每组 5 只小鼠),通过测量作为时间 (横轴,注射后的天数) 的函数的肿瘤面积 (纵轴, mm^2) 来测定肿瘤生长。

[0096] 图 18A、图 18B 和图 18C :当 ERV 基因抑制时肿瘤细胞生长的抑制和增加的小鼠存活率。图 18A,被移植入具有免疫能力的 C57B1/6 小鼠 (每组 22 只小鼠;和图 17B 中的实验条件相同) 的对照 (黑点) 和 ERV^{KD} B16 细胞 (白点) 的肿瘤细胞生长。测量作为时间 (横轴,注射后的天数) 的函数的肿瘤面积 (纵轴, mm^2)。图 18B,作为时间 (横轴,注射后的天数) 的函数,移植了对照 (黑点) 和 ERV^{KD} B16 细胞 (白点) 的小鼠 (每组 10 只小鼠) 中的存活者的百分比 (纵轴)。图 18C,作为时间 (横轴,注射后的天数) 的函数,移植了经 MelARV env 转导的 ERV^{KD} B16 细胞 (灰点) 和 ERV^{KD} B16 细胞 (白点) 的小鼠中的存活者的百分比 (纵轴) (每组 10 只小鼠)。

[0097] 图 19 :用于 ERV 包膜蛋白检测的免疫染色。用 9B6 抗体 (针对 MelARV 包膜蛋白,来自 E. Gorelik, Cancer Res 1988 ;48 :4954-4958 的赠品) 标记对照、ERV^{KD} 和 ERV^{KD}+env B16 细胞,所述抗体用山羊抗小鼠 FITC 抗体 (Caltag, Burlingame, USA) 显示。使用 Facscalibur 血细胞计数器进行流式细胞术分析。将计数的数目 (纵轴) 表示为 ERV 包膜蛋白表达 (横轴) 的函数。

[0098] 图 20A 和图 20B :siRNA 的体内全身性施用减缓肿瘤细胞的进程。从 MWG Biotech 购买被靶向图 16B 中提到的 19nt ERV (白点) 和对照 (gfp) (黑点) 的合成的 siRNA。在先前的移植 (在小鼠的右胁腹内移植入 2×10^5 B16 细胞) 之后第 12 天,经腹膜内注射它们 ($50 \mu\text{l}$ PBS 中的 $3 \mu\text{g}$ siRNA)。图 20A,测量作为时间 (横轴,肿瘤注射后的天数) 的函数的肿瘤面积 (纵轴, mm^2),用箭头表示 siRNA 注射。图 20B,监测 (在两个独立的实验中每组 5 只小鼠) 作为时间 (横轴,肿瘤注射后的天数) 的函数的存活者的百分比 (纵轴)。

[0099] 发明详述

[0100] 本发明提供了具有 7 至 20 个氨基酸残基的序列的多肽,当所述多肽替代病毒蛋白或其片段的同源序列时,该多肽能够调节所述病毒蛋白或其片段针对在其中表达该多肽的宿主的免疫抑制性质,所述多肽包含最小的下列共有氨基酸序列:

[0101] $\text{X1}-(\text{Y})_3-\text{C}-(\text{Y})_1-\text{X2}$

[0102] 其中, X₁ 和 X₂ 经选择用于影响所述免疫抑制性质, Y 表示可变的氨基酸残基, 3 和 1 分别表示在 X₁ 和 C 之间以及在 C 和 X₂ 之间的可变氨基酸 Y 的数目。

[0103] 在本发明的所有序列中, 使用氨基酸的单字母代码。使用 X 和 Y 表示可变氨基酸残基, X 经测定为可影响确定的蛋白质的免疫抑制性质。

[0104] Y 表示可对于不同的多肽和在一个确定的多肽内变化的氨基酸残基。“(Y)₃”表示存在于 X₁ 残基和半胱氨酸残基 (C) 之间的 3 个氨基酸残基。所述 3 个氨基酸残基可以不同或相同, 其相互之间可独立地进行选择。序列中特殊氨基酸残基的标示, 如上述序列中的半胱氨酸一样, 是表示该氨基酸是不变的, 即, 其在所述序列中具有恒定的位置。

[0105] 任选地, 所述共有序列也可表示为下列:

[0106]
$$X_1 Y_9 Y_{10} Y_{11} C Y_{12} X_2$$

[0107] 其中 X₁ 表示 X₁, X₂ 表示 X₂, 和 Y₉ 至 Y₁₂ 表示任何氨基酸。如此处所用的, 氨基酸 Y₉ 至 Y₁₂ 是相同的或不同的。

[0108] 在本发明中, 除非另外指出, 表述“病毒”或“病毒的”应用于外源或内源性病毒或其组分。因此, “病毒蛋白”包括“病毒样蛋白”, 当描述内源性病毒, 尤其是 ERV, 特别是 HERV 的表达产物时, 其也可被称为所述的“病毒样蛋白”。

[0109] 本发明的多肽的上述共有序列称为“免疫抑制调节序列”, 其是指, 当其存在于具有 7 至 20 个氨基酸残基的多肽中时, 该多肽可用于调节蛋白质的免疫抑制性质, 所述蛋白质经鉴定具有这样的免疫抑制性质或, 经鉴定缺乏这样的性质, 尽管其包含具有序列 X₁-(Y)₃-C-(Y)₁-X₂ 的肽基元。

[0110] 更特别地, X 表示单个地或一起直接参与调节包含上述共有序列的蛋白质的免疫抑制性质的两个氨基酸残基 (X₁ 和 X₂)。其各自位于具有 7 个氨基酸残基的最小多肽的 N 末端和 C 末端。

[0111] 当在被移植入宿主的肿瘤细胞 (所述肿瘤细胞一般被所述宿主排斥) 中表达的蛋白质相反地可使这些肿瘤细胞增殖和逃避该宿主的免疫排斥时, 该蛋白被认为具有免疫抑制性质。

[0112] 测定蛋白质的免疫抑制活性的体内方法是图 5 中所示的由 Mangeney M. 和 Heidmann T., 1998 PNAS 或 Blaise 等人, 2001 使用的方法。通过已知的转染方法将野生型或经修饰的表达受试蛋白的核酸转染入肿瘤细胞系例如 MCA 205 或 C18.1 细胞系中。然后将表达受试蛋白的肿瘤细胞注射入特别是经皮下注射入宿主 (通常为小鼠) 中。在所述注射后, 测定肿瘤的形成或, 相反地其排斥, 并测量肿瘤面积。可使用高剂量的合成的肽进行体外测定, 但其是间接的并且不太能够令人信服, 因为只有当给具有完全免疫系统的动物施用而不是给细胞系施用时, 表述“免疫抑制”才是贴切的。

[0113] 如此处所用的, 表述“经修饰的核酸”是指改变被编码的多肽或蛋白质的氨基酸组成的任何基因改变例如核苷酸替代、缺失或插入。因此, 氨基酸序列可替代, 即取代存在于原始蛋白质中的同源序列。

[0114] 术语“同源序列” (该序列存在于就其免疫抑制性质的调节接受检测的蛋白中) 是指这样的序列, 该序列具有和为了测定而取代 (即, 替代) 其的序列相同的氨基酸序列, 即 X₁-(Y)₃-C-(Y)₁-X₂, 除了 X₁ 和 X₂ 残基外; X₁ 和 X₂ 中至少一个或可能两个经选择而与在原始序列中的其对应的氨基酸残基相异。因此, Y 氨基酸残基在要修饰的蛋白质的同源序列

与如上所定义的具有 7-20 个氨基酸残基的多肽的序列之间是保守的。

[0115] 图 9 中公开了各种病毒的这样的同源序列,并在图 3 中在 Benit L. 等人 (J.Virol. 第 75 卷, No. 23, December 2001, p. 11709-11719) 中的几种病毒的各种包膜的 TM 亚基的情形下举例说明了这些同源序列。

[0116] 选择 X1 和 X2 氨基酸残基以调节原始病毒蛋白的免疫抑制性质。如此处所用的,术语“调节”是指当在相同条件下检测时,和原始(即,非经修饰的)蛋白质的免疫抑制活性相比,经修饰的蛋白质的免疫抑制活性的增加或减少。

[0117] 本发明特别地涉及这样的“免疫抑制调节序列”,该序列可使经修饰的蛋白质的免疫抑制性质增加(和原始的免疫抑制性蛋白质相比)。调节优选地主要是指,宿主的免疫应答变得可检测了,和有利地变得足以消除病原因子或变得足以终止、稳定或逆转由宿主中的所述病原体感染而引起的或由宿主中的内源性病毒(特别是一般情况下沉默的 ERV,特别是 HERV)的表达所引起的有害后果。

[0118] 在一个特殊的实施方案中,调节导致降低原始蛋白质的免疫抑制性质。

[0119] 在一个特殊的实施方案中,其相应于在经修饰的,即衍生的蛋白中至少两倍的原始蛋白质免疫抑制性质的降低。

[0120] 具有 7 至 20 个氨基酸残基并包含序列 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 的上述本发明多肽是这样的,即 X1 和 / 或 X2 被选择用于调节蛋白质的免疫抑制性质,因此:

[0121] 在本发明的一个特殊实施方案中, X1 是碱性氨基酸残基, X2 是芳香族残基,或反之亦然。

[0122] 如此处所用的,“碱性”涉及碱性氨基酸。

[0123] 在本发明的另一个特述的实施方案中, X1 是碱性残基,或 X2 是芳香族残基,或反之亦然。

[0124] 本发明者已观察到,在原始免疫抑制性蛋白质中,当 X1 或 X2 残基中只有一个被修饰时, X1 和 X2 对免疫抑制性蛋白质的调节作用较低。

[0125] 因此,可以认为对在免疫抑制调节序列中的 X1 和 X2 都进行修饰是有利的。

[0126] 在本发明的另一个特殊的实施方案中,如下选择位于表示为 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 的氨基酸序列中的残基 X1 或 X2:当在 X1 选自 R、H 和 K 时,那么 X2 选自 F、W、Y 和 H,或当 X1 选自 F、W、Y 和 H 时, X2 选自 R、H 和 K。

[0127] 在本发明的另一个实施方案中, X1 是 R、H 或 K, X2 是 F,或反之亦然。

[0128] 在本发明的另一个实施方案中, X1 是 R, X2 是 F、W、Y 或 H。

[0129] 在本发明的另一个实施方案中, X1 和 X2 选自:

[0130] a. X1 是 E、K 或 Q, X2 是 A

[0131] b. X1 是 W, X2 是 I 或 V

[0132] c. X1 是 R, X2 是 F

[0133] d. X1 是 K, X2 是 F。

[0134] 本发明者已鉴定了免疫抑制调节序列中特殊的 X1 和 X2 残基对病毒包膜蛋白的免疫抑制性质的调节的影响。

[0135] 他们的观察数据使得能够考虑,当 X1 是谷氨酸 (E) 或谷氨酰胺 (Q) 和 X2 可以是丙氨酸 (A) 时,所得的包含本发明的共有序列的病毒包膜蛋白具有免疫抑制性质。相反地,

当 X1 是精氨酸 (R) 和 X2 是苯丙氨酸 (F) 时, 所得的具有本发明的共有序列的病毒包膜蛋白具有低的免疫抑制性质或无免疫抑制性质。有趣的是, 尽管在 E/A 对中可能存在范德华相互作用, 但在 R/F 对中, 在精氨酸的带正电荷的侧链和苯丙氨酸的 π 电子 (阴极) 之间可发生静电相互作用。

[0136] 因此, 在本发明的一个特殊实施方案中, 具有 7 至 20 个氨基酸残基的多肽具有适合给蛋白质提供低或无免疫抑制性质的免疫抑制调节序列 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$, 其中 X1 是 R 和 / 或 X2 是 F。

[0137] 在另一个实施方案中, X1 是 K 并且 X2 是 F, 给蛋白质提供了低或无免疫抑制性质。特别地, 这样的蛋白质具有低免疫抑制性质。

[0138] 再次说明, 在如上所描述并在实施例举例说明的测试中测定免疫抑制性质。

[0139] 可在病毒蛋白中, 特别是在病毒包膜蛋白中鉴定共有序列, $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 。特殊的包膜蛋白是包含两个亚基 (SU 和 TM 亚基) 的逆转录病毒的包膜蛋白。已在 MoMLV、弗罗德逆转录病毒、FeLV、HTLV-1、HTLV-2、STLV-1、GLV-X、痘病毒、MPMV 或 SSAV 中, 或在埃博拉或马尔堡病毒中, 或在内源性逆转录病毒例如 FRD、PyERV、PERV 或 HERV-T 中发现这样的共有序列。

[0140] 在各种蛋白中如此鉴定出的 Y 氨基酸残基使得可以确定特殊的本发明序列例如 E/Q-G-G-L/T/I-C-A/K/L/M/V/I-A 或 R-G-G-L/T/I-C-A/K/L/M/V/I-F。“/”表示该序列位置按照提供的指示接受几种类型的氨基酸残基。

[0141] 因此, 在一个特殊的实施方案中, 上述的本发明多肽包含可选自下列的最小序列:

[0142] QGGLCKA (SEQ ID NO:17)

[0143] QGGLCAA (SEQ ID NO:18)

[0144] QGGLCLA (SEQ ID NO:19)

[0145] QGGICLA (SEQ ID NO:20)

[0146] EGGLCAA (SEQ ID NO:21)

[0147] EGGLCVA (SEQ ID NO:22), 其中这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供免疫抑制性质, 或

[0148] RGGTCLF (SEQ ID NO:23)

[0149] KGGTCMF (SEQ ID NO:24)

[0150] KGRTCLF (SEQ ID NO:25)

[0151] KGGLCIF (SEQ ID NO:26)

[0152] RGGLCKF (SEQ ID NO:27)

[0153] RGGLCAF (SEQ ID NO:28)

[0154] RGGLCLF (SEQ ID NO:29)

[0155] RGGICLF (SEQ ID NO:30)

[0156] RGGLCVF (SEQ ID NO:31)

[0157] RGGTCVF (SEQ ID NO:32), 这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供低或无免疫抑制性质。

[0158] 更特别地, 在另一个实施方案中, 上述的本发明多肽包含可选自下列的最小序

列：

[0159] QGGLCKA (SEQ ID NO :17)

[0160] QGGLCAA (SEQ ID NO :18)

[0161] QGGLCLA (SEQ ID NO :19)

[0162] QGGICLA (SEQ ID NO :20)

[0163] EGGLCAA (SEQ ID NO :21)

[0164] EGGLCVA (SEQ ID NO :22), 其中这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供免疫抑制性质, 或

[0165] KGGTCMF (SEQ ID NO :24)

[0166] KGRTCLF (SEQ ID NO :25)

[0167] KGGLCIF (SEQ ID NO :26), 其中这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供低免疫抑制性质, 或

[0168] RGGTCLE (SEQ ID NO :23)

[0169] RGGLCKF (SEQ ID NO :27)

[0170] RGGLCAF (SEQ ID NO :28)

[0171] RGGLCLE (SEQ ID NO :29)

[0172] RGGICLF (SEQ ID NO :30)

[0173] RGGLCVF (SEQ ID NO :31)

[0174] RGGTCVF (SEQ ID NO :32), 这些免疫抑制调节序列基本上不给包含其的蛋白质提供免疫抑制性质。

[0175] 如此处所用的, “低免疫抑制性质” 涉及这样的多肽, 该多肽给包含其的蛋白质提供比 SEQ ID NO :17 至 22 所示的多肽更低的免疫抑制性质, 但给包含其的蛋白质提供比 SEQ ID NO :23 至和 27 至 32 所示的多肽更高的免疫抑制性质。特别地, 包含提供低免疫抑制性质的多肽的蛋白质比 HERV-W ENV R393Q F399A 双突变体 (例如 SEQ ID NO :118 所示的) 的免疫抑制性低。更特别地, 包含提供低免疫抑制性质的多肽的蛋白质的免疫抑制指数是正的, 但低于所述 HERV-W ENVR393Q F399A 双突变体的免疫抑制指数, 优选地低于所述 HERV-W ENVR393Q F399A 双突变体的免疫抑制指数的 50%。

[0176] 本发明的所有多肽由这样的核酸编码, 该核酸可通过所有已知的能使得所述多肽在宿主细胞中特别是在原核或真核细胞中表达的方法获得。作为例子, 可使用合适的探针和扩增技术, 从表达病毒的样品中分离核酸。也可通过化学方法合成核酸, 或者通过从存在的质粒或来自本发明的质粒的酶促消化获得核酸。

[0177] 此外, 本发明的多肽也可按照已充分建立的方法进行化学合成或半合成。

[0178] 特殊的 20 个氨基酸的多肽具有下列共有序列：

[0179] $(Y)_{13}-X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 。

[0180] 如上面所解释的, X1 和 X2 被选择用来影响受试的即原始的病毒免疫抑制性蛋白质的免疫抑制性质, 在所述蛋白质中, 插入了所述多肽, 包括通过如上所述在同源序列中的 X1 和 X2 残基的替代而得到的多肽, 其中 Y 表示可变氨基酸残基, 3 和 1 分别表示在 X1 和 C 之间以及在 C 和 X2 之间的可变氨基酸残基 Y 的数目, 和 13 表示多肽的 N 末端部分的氨基酸的数目。Y 残基在序列中可独立地相同或相异。

[0181] 各种蛋白质序列中的不变的氨基酸残基的鉴定使得可以鉴定出特殊的序列： $(Y)_2-N-(Y)_3-L-(Y)_2-L-(Y)_3-X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ ，即，从N端末端至C端末端：两个可变氨基酸残基，天氨酰胺(N)，三个可变氨基酸残基，亮氨酸(L)，两个可变氨基酸残基，亮氨酸(L)，三个可变氨基酸残基，X1残基，三个可变氨基酸残基，半胱氨酸(C)，一个可变氨基酸残基和X2残基。

[0182] 任选地，上述共有序列可如下表示：

[0183] $Y_{13}Y_{14}NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X_2$

[0184] 其中， X_1 和 X_2 分别与X1和X2相同，而 Y_1 至 Y_{14} 表示任何氨基酸。如此处所用的， Y_1 至 Y_{14} 可以相同或相异。

[0185] 在上面公开的测试中呈现调节病毒免疫抑制性蛋白质的免疫抑制性质的能力的特殊氨基酸序列可选自：

[0186] AQNRRGLDLLFWEQGGGLCKA (SEQ ID NO :33)

[0187] LQNCRC DLLFLSQGGGLCAA (SEQ ID NO :34)

[0188] LQNRRGLDMLTAAQGGGLCLA (SEQ ID NO :35)

[0189] LQNRRGLDLLTAEQGGICLA (SEQ ID NO :36)

[0190] LQNRRGLDILFLQEGGLCAA (SEQ ID NO :37)

[0191] LQNRRGLDLLFLKEGGLCAA (SEQ ID NO :38)

[0192] LQNRRGLDLLFLKEGGLCVA (SEQ ID NO :39)，其中，这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供免疫抑制性质，或

[0193] LQNRRALDLLTAERGGTCLE (SEQ ID NO :40)

[0194] LQNWALDLLTAKRGGTCLE (SEQ ID NO :41)

[0195] LQNWALDLLIAKRGGTCVF (SEQ ID NO :42)

[0196] LQNRRGLDLLTAERGGTCLE (SEQ ID NO :43)

[0197] LQNRRALDLLTAERGGICLE (SEQ ID NO :44)

[0198] LQNRRGLDLLTAEKGGLCIF (SEQ ID NO :45)

[0199] MQNRRALDLLTADKGGTCMF (SEQ ID NO :46)

[0200] AQNRQALDLLMAEKGRTCLE (SEQ ID NO :47)

[0201] AQNRRGLDLLFWERGGGLCKF (SEQ ID NO :48)

[0202] LQNCRC DLLFLSRGGGLCAF (SEQ ID NO :49)

[0203] LQNRRGLDMLTAAAGGLCLE (SEQ ID NO :50)

[0204] LQNRRGLDLLTAERGGICLE (SEQ ID NO :51)

[0205] LQNRRGLDILFLQRGGGLCAF (SEQ ID NO :52)

[0206] LQNRRGLDLLFLKRGGGLCAF (SEQ ID NO :53)

[0207] LQNRRGLDLLFLKRGGGLCVF (SEQ ID NO :54)，这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供低或无免疫抑制性质。

[0208] 根据优选的实施方案，在上述公开的测试中呈现调节病毒免疫抑制性蛋白质的免疫抑制性质的能力的特殊氨基酸序列可选自：

[0209] AQNRRGLDLLFWEQGGGLCKA (SEQ ID NO :33)

[0210] LQNCRC DLLFLSQGGGLCAA (SEQ ID NO :34)

[0211] LQNRRLDMLTAAQGGLCLA (SEQ ID NO :35)

[0212] LQNRRLDLLTAEQGGICLA (SEQ ID NO :36)

[0213] LQNRRLDILFLQEGGLCAA (SEQ ID NO :37)

[0214] LQNRRLDLLFLKEGGLCAA (SEQ ID NO :38)

[0215] LQNRRLDLLFLKEGGLCVA (SEQ ID NO :39), 其中, 这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供免疫抑制性质, 或

[0216] LQNRRLDLLTAEKGGLCIF (SEQ ID NO :45)

[0217] MQNRRLDLLTADKGGGTCMF (SEQ ID NO :46)

[0218] AQNRQALDLLMAEKGRTCLF (SEQ ID NO :47), 其中, 这些免疫抑制调节序列给包含其的蛋白质提供低免疫抑制性质, 或

[0219] LQNRRLDLLTAERGGTCLF (SEQ ID NO :40)

[0220] LQNRRLDLLTAKRGGTCLF (SEQ ID NO :41)

[0221] LQNRRLDLLIAKRGGTCVF (SEQ ID NO :42)

[0222] LQNRRLDLLTAERGGTCLF (SEQ ID NO :43)

[0223] LQNRRLDLLTAERGGICLF (SEQ ID NO :44)

[0224] AQNRRLDLLFWERGGLCKF (SEQ ID NO :48)

[0225] LQNCRLDLLFLSRGGLCAF (SEQ ID NO :49)

[0226] LQNRRLDMLTAARGGLCLF (SEQ ID NO :50)

[0227] LQNRRLDLLTAERGGICLF (SEQ ID NO :51)

[0228] LQNRRLDILFLQRGGLCAF (SEQ ID NO :52)

[0229] LQNRRLDLLFLKRGGLCAF (SEQ ID NO :53)

[0230] LQNRRLDLLFLKRGGLCVF (SEQ ID NO :54), 这些免疫抑制调节序列基本上不给包含其的蛋白质提供免疫抑制性质。

[0231] 本发明还涉及野生型病毒包膜 (ENV) 蛋白中第 1 个氨基酸的第 1 突变和任选地第 2 个氨基酸的第 2 突变用于生产经突变的 ENV 蛋白的用途, 所述经突变的 ENV 蛋白相对于所述野生型 ENV 蛋白具有经修饰的免疫抑制活性, 所述野生型病毒包膜蛋白基本上包含下列序列:

[0232] $\underline{NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X_2}$

[0233] 其中, 待突变的第 1 个氨基酸是 X_1 , 待突变的第 2 个氨基酸是 X_2 , 和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸。

[0234] 表述“野生型病毒包膜蛋白”涉及其中氨基酸 X_1 未被突变的包膜蛋白。特别地, 不排除包膜蛋白已产生其他的突变或修饰。

[0235] 表述“基本上包含”是指, 上述序列的四个恒定氨基酸 (用下划线表示) 中的至少两个存在于所述野生型病毒包膜中。两个氨基酸足以明确地确定 X_1 和 X_2 在包膜序列中的位置。有利地, 上述序列通常位于跨膜 (TM) 亚基中, 更优选地位于 TM 亚基的胞外域。

[0236] 如此处所用的, 氨基酸 Y_1 至 Y_{12} 相互之间独立地相异或相同。

[0237] 如此处所用的, 突变的 ENV 蛋白基本上具有下列序列:

[0238] $\underline{NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X'_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X'_2}$

[0239] 其中 X'_1 对应于突变的 X_1 , 和 X'_2 对应于突变的 X_2 。

[0240] 表述“经修饰的免疫抑制活性”是指，突变的 ENV 蛋白相对于对应的野生型 ENV 蛋白，具有增加的或减少的免疫抑制活性。特别地，突变的 ENV 蛋白可基本上失去了任何残留的免疫抑制活性。在另一种情况下，突变的 ENV 蛋白可具有免疫抑制活性，而对应的野生型 ENV 蛋白基本上无免疫抑制活性。可如上文和实施例中所述测量免疫抑制活性，例如通过使用免疫抑制指数方法来进行测量。

[0241] 有利地，具有经修饰的免疫抑制活性的突变的 ENV 蛋白具有许多应用，特别是治疗应用，其将在后面进行描述。

[0242] 在上述用途的优选实施方案中，负责突变的 ENV 蛋白的抗原性的结构基本上被保存。

[0243] 如此处所用的，表述“负责抗原性的结构”涉及这样的蛋白质结构，该结构易于和免疫系统的组分例如抗体或免疫细胞（特别是 T 细胞）的膜受体相互作用。

[0244] 根据本发明，和相应的野生型 ENV 蛋白相比，这些结构中的至少一个或多个在突变的 ENV 蛋白中呈现相同的构象。有利地，这意味着被引起的针对突变的 ENV 蛋白的免疫反应也会针对相应的野生型 ENV 蛋白。

[0245] 根据优选的实施方案，本发明还涉及野生型病毒包膜 (ENV) 蛋白中第 1 个氨基酸的第 1 突变和任选地第 2 个氨基酸的第 2 突变用于生产经突变的 ENV 蛋白的上述用途，所述经突变的 ENV 蛋白相对于所述野生型 ENV 蛋白具有减少的免疫抑制活性，所述野生型病毒包膜蛋白基本上包含下列序列：

[0246]
$$\underline{NY}_1Y_2Y_3\underline{LY}_4Y_5\underline{LY}_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}\underline{CY}_{12}X_2$$

[0247] 其中，待突变的第 1 个氨基酸是 X_1 ，待突变的第 2 个氨基酸是 X_2 ，和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸。

[0248] 在最优选的实施方案中，这样减少免疫抑制活性，从而在突变 ENV 蛋白中几乎看不到残留的活性。

[0249] 根据优选的实施方案，本发明还涉及野生型病毒包膜 (ENV) 蛋白中第 1 个氨基酸的第 1 突变和第 2 个氨基酸的第 2 突变用于生产经突变的 ENV 蛋白的上述用途，所述经突变的 ENV 蛋白相对于所述野生型 ENV 蛋白具有增加的免疫抑制活性，所述野生型病毒包膜蛋白基本上包含下列序列：

[0250]
$$\underline{NY}_1Y_2Y_3\underline{LY}_4Y_5\underline{LY}_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}\underline{CY}_{12}X_2$$

[0251] 其中，待突变的第 1 个氨基酸是 X_1 ，待突变的第 2 个氨基酸是 X_2 ，和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸。

[0252] 相对于对应的野生型 ENV，单独的 X_1 的突变足以修饰经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性。然而，有利地也突变 X_2 ，因为其确保相对于对应的野生型 ENV 蛋白，经突变的 ENV 蛋白的结构基本上得到了保留。

[0253] 在上述用途的一个优选的实施方案中，所述突变是替代。

[0254] 在上述用途的另一个优选的实施方案中， X_1 由 R 或 H 替代。

[0255] 在上述用途的另一个优选的实施方案中， X_2 由 F、M、Y 或 W 替代。

[0256] 在上述用途的另一个优选的实施方案中， X_1 是 E、K 或 Q，并且由 R 或 H 替代。

[0257] 在上述用途的一个优选的实施方案中，ENV 蛋白是 HERV-H ENV，和 X_1 是 K。

[0258] 在上述用途的另一个优选的实施方案中， X_2 是 A、V、L、I 或 K，并且由 F、M、Y 或 W

替代。

[0259] 在上述用途的一个特别优选的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV ENV, 特别地选自:

[0260] HERV-FRD ENV (SEQ ID NO:82), 其中 X_1 是 Q427, X_2 是 A433, 或

[0261] HERV-T ENV (SEQ ID NO:84), 其中 X_1 是 Q516, X_2 是 A522, 或

[0262] HERV-R ENV (SEQ ID NO:86), 其中 X_1 是 E561, X_2 是 K567, 或

[0263] HERV-V ENV (SEQ ID NO:88), 其中 X_1 是 Q381, X_2 是 V387, 或

[0264] HERV-R(b) ENV (SEQ ID NO:90), 其中 X_1 是 E391, X_2 是 L397。

[0265] HERV 涉及人内源性逆转录病毒, 其已在先前进行了描述。已发现 HERV ENV 蛋白在癌细胞中表达。上面列出的 HERV ENV 呈现免疫抑制活性并且可帮助携带其的癌细胞逃避免疫应答。这些 HERV 对本领域技术人员来说是熟知的, 并且特别地在 Benit 等人, J. Virol. 2001, 75:11709-11719 中进行了描述。很明显的是, 具有减少的免疫抑制活性的晚期 HERV ENV 蛋白有利于制备抑制由癌细胞表达的野生型 ENV 蛋白的活性的疫苗。

[0266] 在上述用途的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-FRD ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0267] SEQ ID NO:120,

[0268] SEQ ID NO:122。

[0269] SEQ ID NO:120 携带突变 Q427R。

[0270] SEQ ID NO:122 携带突变 Q427R+A433F。

[0271] 由 SEQ ID NO:120 或 122 表示的突变的 HERV-FRD ENV 与对应的野生型 HERV-FRD ENV 相比, 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0272] 在上述用途的另一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-V ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0273] SEQ ID NO:124,

[0274] SEQ ID NO:126。

[0275] SEQ ID NO:124 携带突变 Q381R。

[0276] SEQ ID NO:126 携带突变 Q381R+V387F。

[0277] 相对于对应的野生型 HERV-V ENV, 由 SEQ ID NO:124 或 126 表示的突变的 HERV-V ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0278] 在上述用途的另一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-T ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0279] SEQ ID NO:128,

[0280] SEQ ID NO:130。

[0281] SEQ ID NO:128 携带突变 Q516R。

[0282] SEQ ID NO:130 携带突变 Q516R+A522F。

[0283] 相对于对应的野生型 HERV-T ENV, 由 SEQ ID NO:128 或 130 表示的突变的 HERV-T ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0284] 在上述用途的另一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-R ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0285] SEQ ID NO:146,

[0286] SEQ ID NO :148。

[0287] SEQ ID NO :146 携带突变 E561R。

[0288] SEQ ID NO :148 携带突变 E561R+K567F。

[0289] 相对于对应的野生型 HERV-R ENV, 由 SEQ ID NO :128 或 130 表示的突变的 HERV-R ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0290] 在上述用途的另一个特别优选的实施方案中, ENV 蛋白选自:

[0291] HTLV-1ENV (SEQ ID NO :92), 其中 X_1 是 Q389, X_2 是 A395, 或

[0292] HTLV-2ENV (SEQ ID NO :94), 其中 X_1 是 Q385, X_2 是 A391, 或

[0293] FeLV ENV (SEQ ID NO :96), 其中 X_1 是 E527, X_2 是 A533, 或

[0294] PERV ENV (SEQ ID NO :98), 其中 X_1 是 E545, X_2 是 A551, 或

[0295] STLV-1ENV (SEQ ID NO :100), 其中 X_1 是 Q389, X_2 是 A395, 或

[0296] MoMLV ENV (SEQ ID NO :70), 其中 X_1 是 E551, X_2 是 A557, 或

[0297] MPMV ENV (SEQ ID NO :72), 其中 X_1 是 Q471, X_2 是 A477, 或

[0298] FV ENV (SEQ ID NO :102), 其中 X_1 是 E561, X_2 是 A567。

[0299] HTLV-1 和 2 涉及 1 型和 2 型人 T- 细胞白血病病毒。

[0300] FeLV 涉及猫白血病病毒。

[0301] PERV 涉及猪内源性逆转录病毒。

[0302] STLV-1 涉及 1 型猿猴 T- 细胞白血病病毒。

[0303] MoMLV 涉及莫洛尼鼠类白血病病毒。

[0304] MPMV 涉及摩 - 傅猴病毒。

[0305] FV 涉及小鼠弗罗德病毒。

[0306] 这些病毒对于本领域技术人员来说是熟知的, 并尤其在 Benit 等人, J. Virol. 2001, 75 :11709-11719 中进行了描述。帮助病毒逃避免疫应答的免疫抑制性 ENV 蛋白的存在特别有助于这些病毒的繁殖。很明显的是, 具有减少的免疫抑制活性的晚期病毒 ENV 蛋白有利于抑制由病毒表达的野生型 ENV 蛋白的活性。

[0307] 在上述用途的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 FeLV ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0308] SEQ ID NO :104,

[0309] SEQ ID NO :106。

[0310] SEQ ID NO :104 携带突变 E527R。

[0311] SEQ ID NO :106 携带突变 E527R+A533F。

[0312] 相对于对应的野生型 FeLV ENV, 由 SEQ ID NO :104 或 106 表示的突变的 FeLV ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0313] 在上述用途的另一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HTLV-1ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0314] SEQ ID NO :108,

[0315] SEQ ID NO :110。

[0316] SEQ ID NO :108 携带突变 Q389R。

[0317] SEQ ID NO :110 携带突变 Q389R+A395F。

[0318] 相对于对应的野生型 HTLV-1ENV, 由 SEQ ID NO:108 或 110 表示的突变的 HTLV-1 ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0319] 在上述用途的另一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HTLV-2 ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0320] SEQ ID NO:112,

[0321] SEQ ID NO:114。

[0322] SEQ ID NO:112 携带突变 Q385R。

[0323] SEQ ID NO:114 携带突变 Q385R+A391F。

[0324] 相对于对应的野生型 HTLV-2ENV, 由 SEQ ID NO:112 或 114 表示的突变的 HTLV-2ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0325] 在上述用途的另一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 PERV ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0326] SEQ ID NO:150,

[0327] SEQ ID NO:152。

[0328] SEQ ID NO:150 携带突变 E545R。

[0329] SEQ ID NO:152 携带突变 E545R+A551F。

[0330] 相对于对应的野生型 PERV, 由 SEQ ID NO:150 或 152 表示的突变的 PERV ENV 呈现出降低的免疫抑制活性。

[0331] 本发明还涉及野生型病毒包膜 (ENV) 蛋白中第 1 个氨基酸的第 1 突变和任选地第 2 个氨基酸的第 2 突变用于生产经突变的 ENV 蛋白的上述用途, 所述经突变的 ENV 蛋白相对于所述野生型 ENV 蛋白具有增加的免疫抑制活性, 所述野生型病毒包膜蛋白基本上包含下列序列:

[0332]
$$\text{NY}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\text{LY}_4\text{Y}_5\text{LY}_6\text{Y}_7\text{Y}_8\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\text{CY}_{12}\text{X}_2$$

[0333] 其中, 待突变的第 1 个氨基酸是 X_1 , 待突变的第 2 个氨基酸是 X_2 , 和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸。

[0334] 相对于对应的野生型 ENV, 单独的 X_1 的突变足以增加突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性。然而, 有利地也突变 X_2 , 因为其确保相对于对应的野生型 ENV 蛋白, 突变的 ENV 蛋白的结构基本上得到了保留。

[0335] 有利地, 根据本发明可能获得具有免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白, 而对应的野生型 ENV 蛋白基本上无这样的活性。这样的具有增加的免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白可用于抑制免疫系统, 例如在移植排斥或自身免疫疾病的情况下。

[0336] 在用于生产具有增加的免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白的上述用途的一个优选实施方案中, 所述突变是替代。

[0337] 在生产具有增加的免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白的上述用途的另一个优选实施方案中, X_1 由 E、K 或 Q 替代, X_2 由 A 替代。

[0338] 在生产具有增加的免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白的上述用途的另一个优选实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-W ENV, 其例如由 SEQ ID NO:74 表示, 突变的 HERV-W ENV 的序列优选地选自:

[0339] SEQ ID NO:116,

[0340] SEQ ID NO :118。

[0341] SEQ ID NO :116 携带突变 R393E/Q。

[0342] SEQ ID NO :118 携带突变 R393E/Q+F399A。

[0343] 相对于无免疫抑制活性的对应的野生型 HERV-W,由 SEQ ID NO :116 或 118 表示的突变的 HERV-W ENV 呈现出增加的免疫抑制活性。

[0344] 本发明也提供了从确定的抗原性和免疫抑制性蛋白质衍生的多肽,所述多肽包含由 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 表示的氨基酸序列(所谓的“免疫抑制调节序列”),其中在所述多肽中, Y 表示可变的氨基酸残基,3 和 1 分别表示在 X1 和 C 之间以及在 C 和 X2 之间的可变氨基酸残基 Y 的数目, X1 和 X2 经选择用来给所述多肽提供相对于所述确定的蛋白质的免疫抑制性质来说经改变的免疫抑制性质。

[0345] 此处所用的术语“衍生的”表示多肽中的氨基酸序列,特别是免疫抑制调节序列,相对所述确定的蛋白质的序列来说进行了修饰。因此,所述“确定的”蛋白质是这样的原始蛋白质,该蛋白质的修饰是调节其免疫抑制性质所必需的。可采用生物学或化学的方法,通过一个或几个氨基酸残基或序列的替代、缺失、添加、重组或插入,从确定的蛋白质衍生出本发明的多肽,条件是本发明的共有序列是这样的序列,即 X1 和 X2 经选择用来调节起始的确定的蛋白质的免疫抑制性质,从而条件是相对于在所述确定的免疫抑制性蛋白质中它们的原始相应残基,通过替代对 X1 和 / 或 X2 进行突变。在序列插入的情况下,免疫抑制调节序列可替代存在于确定的蛋白质中的同源序列,或可替代已知或可能参与和插入的序列的调节免疫抑制性质的功能相同的功能的序列,或可插入起始氨基酸序列中。在所有情况下,插入位点(在多肽的 C 末端部分)后的氨基酸序列的开放阅读框架是得到了保留。

[0346] 明显地,实际上可从或不从所述确定的蛋白质开始衍生本发明的多肽来施行本发明。因此,从生物学或化学角度上来看,所述确定的蛋白质是设计衍生多肽的参照而不是必需的起始材料。

[0347] 在本发明的特殊实施方案中,衍生的多肽具有比所述确定的起始多肽更低的免疫抑制性质,有利地已基本上丧失了所述免疫抑制性质,例如无免疫抑制性质。

[0348] 整个本发明中的表述“多肽”和“蛋白质”用来定义包含氨基酸序列的分子,无论其长度是多少(除非在本说明书中另外指出)。

[0349] 在特述的实施方案中,多肽或蛋白是多聚体,特别地是三聚体。

[0350] 此处所用的“确定的”是指这样的起始蛋白质,即从该起始蛋白质设计出即衍生出具有经调节的免疫抑制性质的本发明的多肽。该蛋白质可以是野生型蛋白质(例如从病毒株系,特别是逆转录病毒株系分离的),或可以是以前经修饰的蛋白质(例如,从宿主中的载体表达的)。从具有抗原性质和免疫抑制性质的蛋白质中选择这样的蛋白质。

[0351] 确定的蛋白具有上面定义的免疫抑制性质:当该确定的蛋白质在一般被接受移植的宿主排斥的肿瘤细胞中表达时,其可使肿瘤细胞增殖和逃避免疫排斥。

[0352] 第二,其是抗原蛋白质,即,其能够被在施用了其的宿主中形成的抗体识别。有利地,其能够在合适的已知条件下在施用了其的宿主中诱导免疫应答,因此所述抗原蛋白质有利地是免疫原性蛋白质。这包括所述宿主产生抗该蛋白质的表位的抗体。

[0353] 考虑到具有抗原性特别是免疫原性的蛋白质的这些想要的性质,和考虑到对于基本上保持这些抗原性特别是免疫原性的衍生多肽所必需的特性,用于衍生本发明多肽的确

定的蛋白质包括天然的或天然发生的蛋白质或其抗原性特别是免疫原性片段,条件是所述片段还具有免疫抑制性质。其还包括,相对于天然或天然发生的蛋白质经修饰的蛋白质,条件是所述经修饰的蛋白质具有抗原性质和免疫抑制性质。

[0354] 用作衍生本发明多肽的参照的确定的蛋白质可以是病毒蛋白质,即由感染因子例如病毒的核酸编码的蛋白质,或由病毒来源(例如内源性逆转录病毒,特别是 HERV)的核酸编码的蛋白质。特别的蛋白质是来源于逆转录病毒这一病毒亚类的蛋白质。在特殊的实施方案中,确定的蛋白质是包膜蛋白,即, env 基因的表达产物。

[0355] 此处使用的“核酸”是指以 DNA 或 RNA 形式存在的病毒核酸,包括细胞核酸例如基因组 DNA,互补 DNA,编码序列。所有本申请中提到的核酸可以是单链或双链的。

[0356] 如上所述选择 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 基元的 X1 和 X2 氨基酸残基。

[0357] 可如下定义从抗原性和免疫抑制性蛋白质衍生的并包含序列 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 的本发明的上述多肽:

[0358] 在本发明的一个特殊的实施方案中,X1 是碱性氨基酸残基并且 X2 是芳香族残基,或反之亦然。

[0359] 在本发明的另一个特殊的实施方案中,X1 是碱性残基或 X2 是芳香族残基,或反之亦然。

[0360] 本发明者已观察到,在原始免疫抑制性蛋白质中,当 X1 或 X2 残基中只有一个被修饰时,X1 和 X2 对蛋白质的免疫抑制性质的调节作用通常较低。

[0361] 因此,可以认为在免疫抑制调节序列中对 X1 和 X2 都进行修饰是有利的。

[0362] 在本发明的另一个特殊的实施方案中,如下选择位于表示为 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 的氨基酸序列中的残基 X1 或 X2:

[0363] 当 X 选自 R、H 和 K 时,那么 X2 选自 F、W、Y 和 H,或当 X1 选自 F、W、Y 和 H 时,X2 选自 R、H 和 K。

[0364] 在本发明的另一个实施方案中,X1 是 R、H 或 K,和 X2 是 F,或反之亦然。

[0365] 在本发明的另一个实施方案中,X1 是 R,和 X2 是 F、W、Y 或 H。

[0366] 本发明者尤其已鉴定出,从抗原性和免疫抑制性蛋白质衍生的多肽,和其从中衍生的蛋白质的免疫抑制性质相比,具有改变的免疫抑制性质,所述衍生是在特殊的令人关注的 X1 和 X2 分别是 R 和 F 或 K 和 F 时进行的。

[0367] 确定的蛋白质有利地可以是具有抗原性质和免疫抑制性质的病毒蛋白质,特别是逆转录病毒蛋白质,或病毒来源的蛋白质如 HERV 的蛋白质。

[0368] 同样,已知的天然发生的 HERV-W、H1、F(c)1 或 F(c)2 的低或无免疫抑制性包膜蛋白不是本发明的目的。

[0369] 在本发明的一个特殊的实施方案中,从抗原蛋白质衍生的多肽具有改变的免疫抑制性质,特别是降低的免疫抑制性质,而同时保持其抗原性质。

[0370] 在另一个特殊的实施方案中,这些蛋白除了具有抗原性质和免疫抑制性质外,还具有感染性质和/或融合性质。

[0371] 当确定的起始蛋白质还具有融合和感染性质时,例如对于病毒包膜蛋白所鉴定的那些,这些性质中的一种或两种性质都可在衍生的多肽中保留,但不是必需的。

[0372] 评价或测量融合和/或感染性质以确定原始的确定的蛋白质的这些性质是否在

本发明的衍生多肽中得到保持,这可对衍生的多肽是否已充分保持原始的确定的蛋白质的结构(特别是抗原性结构,例如免疫原性决定簇)提供有用的指征。

[0373] 当用编码所述蛋白质的核酸转染的细胞能够和其他可能不表达同一蛋白质的细胞形成合胞体(多核细胞)时,该蛋白质被认为具有融合性质。事实上,具有融合性质的蛋白质的强表达可能阻断了参与融合事件的所述蛋白质的受体的表达。因此,可通过表达所述具有融合性质的蛋白质的细胞与表达其受体的细胞之间的合胞体的形成来确定融合的能力。可借助于各种已知的方法(例如磷酸钙沉淀法)或用脂质体(例如Lipofectamine™)来转染细胞。

[0374] 当用某种蛋白质包被的假模标本能够感染细胞时,认为该蛋白质具有感染性质。此处使用的“假模标本”是指其中整合了来源于不同株系的 ENV 蛋白的病毒颗粒。目前使用 MLV 核心颗粒。在细胞系(例如 293T 细胞)中产生假模标本,在所述细胞系中共转染了编码感染性蛋白质的载体和一种或几种编码另一病毒株系的 GAG 和 POL 蛋白的载体。

[0375] 从病毒包膜蛋白(ENV)和优选地从逆转录包膜蛋白衍生具有此处描述的性质的特殊的多肽。这样的逆转录病毒 ENV 可选自下列逆转录病毒:MoMLV、弗罗德逆转录病毒、FeLV、HTLV-1、STLV-1 和 MPMV。其他令人关注的多肽是由病毒例如 HERV 来源的核酸编码的多肽。当涉及病毒时,埃博拉和马尔堡病毒具有可从中衍生本发明多肽的 ENV 蛋白。

[0376] 所述包膜蛋白可以是全部或部分的天然或天然发生的蛋白质,或来自其抗原性特别是免疫原性变体,包括其片段,即,就抗原性(特别是免疫原性)和免疫抑制性而言,为天然发生的病毒包膜蛋白的类似物。

[0377] 在上述的确定的蛋白质的氨基酸序列内,本发明者已鉴定出了参与免疫抑制的调控的特殊残基。被称为免疫抑制调节序列(其为蛋白质提供免疫抑制性质)的这样的序列是下列:E/Q-G-G-L/T/I-C-A/K/L/M/V/I-A,其中“/”表示该序列位置接受几种类型的氨基酸残基。因此,包含选自下列的序列的蛋白质是特殊的具有免疫抑制性质的确定的蛋白质:

[0378] QGGLCKA(SEQ ID NO:17)

[0379] QGGLCAA(SEQ ID NO:18)

[0380] QGGLCLA(SEQ ID NO:19)

[0381] QGGICLA(SEQ ID NO:20)

[0382] EGGLCAA(SEQ ID NO:21)

[0383] EGGLCVA(SEQ ID NO:22),

[0384] 可从所述确定的蛋白质中通过修饰对应于本发明的共有序列的 X1 和 X2 位置的末端 E/Q 和 / 或 A 残基来衍生本发明的多肽。

[0385] 如上所述,此处所用的术语“衍生的”表示,多肽的氨基酸序列,特别是免疫抑制调节序列,和确定的蛋白质的序列相比是经过修饰的以影响免疫抑制性质,特别是降低所述性质。这些改变的免疫抑制性质可以是根据上述氨基酸的特性而替代 X1 和 X2 残基的结果。

[0386] 这些改变的免疫抑制性质也可以是在选择出的蛋白质的许可位点处插入包含 X1-(Y)₃-C-(Y)₁-X2 序列的多肽的结果,其中 X1 和 X2 经选择用于改变免疫抑制性质。

[0387] 此处所用的“许可位点”是指基本上不改变蛋白质的抗原性质的位点。

[0388] 插入序列可取代同源序列或参与免疫抑制的序列。也可插入本发明的 7 至 20 个

氨基酸残基的多肽,而不删除来自确定的蛋白质的氨基酸残基。

[0389] 从上述确定的蛋白质衍生的、具有改变的免疫抑制性质的多肽包含这样的序列,该序列具有下列序列 R-G-G-L/T/I-C-A/K/L/M/V/I-F,特别是选自下列的序列:

[0390] RGGLCKF (SEQ ID NO :27)

[0391] RGGLCAF (SEQ ID NO :28)

[0392] RGGLCLF (SEQ ID NO :29)

[0393] RGGICLF (SEQ ID NO :30)

[0394] RGGLCVF (SEQ ID NO :31)。

[0395] 通过在经鉴定的天然发生的逆转录病毒 ENV 蛋白中对所述 X1 和 X2 残基进行突变已衍生出上面提供的序列。

[0396] 可对表达这样的蛋白质的病毒使用相同的策略,所述蛋白质展示出与 $X1-(Y)_3-C-(Y)_1-X2$ 相似的序列。特别地, Y 残基可以是和上述氨基酸残基相异的氨基酸残基 (Benit 等人, 2001)。

[0397] 此外,本申请的确定的 ENV 蛋白的结构,例如三维结构,显示出与其他病毒特别是与其他逆转录病毒具有相似的结构特征,尽管氨基酸序列不同。因此,在埃博拉或马尔堡病毒的蛋白质中已发现高度保守的 TM 结构组织,最可能和触发融合过程和病毒进入的共同机制相关。因此,可将相同的方法用于鉴定特殊的序列,该序列参与这样的病毒中的免疫抑制的调节。

[0398] 本发明还涉及由野生型 ENV 蛋白的突变产生的经突变的 ENV 蛋白,所述野生型 ENV 蛋白基本上具有下列序列:

[0399] $NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X_2$

[0400] 其中氨基酸 X_1 和任选地氨基酸 X_2 被突变,和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸,所述经突变的 ENV 蛋白相对于野生型 ENV 蛋白具有经修饰的免疫抑制活性,

[0401] 或其片段,条件是所述片段携带经突变的氨基酸 X_1 和任选地 X_2 ,所述片段具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述片段的抗原性结构基本上和其在经突变的 ENV 蛋白中所采用的结构相似,

[0402] 或通过至少一个氨基酸的插入、缺失或替代从经突变的 ENV 蛋白或其片段衍生的蛋白质,条件是所述衍生的蛋白质携带经突变的氨基酸 X_1 和 X_2 ,所述衍生的蛋白质具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述衍生的蛋白质的抗原性结构基本上和经突变的 ENV 蛋白或其片段的抗原性结构相似。

[0403] 如此处所用的,经突变的 ENV 蛋白基本上包含下列序列:

[0404] $NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X'_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X'_2$

[0405] 其中 X'_1 对应于突变的 X_1 ,和 X'_2 对应于突变的 X_2 。

[0406] 如此处所用的,本发明经突变的 ENV 蛋白的片段的长度特别地至少为 7 个氨基酸并且包含突变的氨基酸 X_1 。任选地,片段长度至少为 7 个氨基酸并且同时包含 X_1 和 X_2 。优选的本发明突变的 ENV 蛋白的片段特别地由 TM 亚基或 TM 亚基的胞外域构成。

[0407] 在本发明的一个优选的实施方案中,从突变的 ENV 蛋白衍生的上述蛋白质显示和所述突变的 ENV 蛋白具有至少 80% 的序列同一性,特别地至少 90% 的序列同一性。

[0408] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个优选的实施方案中,负责所述突变的 ENV

蛋白或其片段的抗原性的结构,相对于野生型 ENV 蛋白,基本上得到保存。

[0409] 根据优选的实施方案,本发明涉及由野生型 ENV 蛋白的突变产生的上述经突变的 ENV 蛋白,所述野生型 ENV 蛋白基本上包含下列序列:

[0410] $\underline{\text{NY}}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\underline{\text{LY}}_4\underline{\text{LY}}_5\underline{\text{LY}}_6\text{Y}_7\text{Y}_8\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\underline{\text{CY}}_{12}\text{X}_2$,

[0411] 其中,氨基酸 X_1 和任选地氨基酸 X_2 被突变,和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸,所述经突变的 ENV 蛋白相对于野生型 ENV 蛋白具有减少的免疫抑制活性,

[0412] 或其片段,条件是所述片段携带经突变的氨基酸 X_1 和任选地 X_2 ,所述片段具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述片段的抗原性结构基本上和其在经突变的 ENV 蛋白中所采用的结构相似,

[0413] 或通过至少一个氨基酸的插入、缺失或替代从经突变的 ENV 蛋白或其片段衍生的蛋白质,条件是所述衍生的蛋白质携带经突变的氨基酸 X_1 和 X_2 ,所述衍生的蛋白质具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述衍生的蛋白质的抗原性结构基本上和经突变的 ENV 蛋白或其片段的抗原性结构相似。

[0414] 根据优选的实施方案,本发明涉及由野生型 ENV 蛋白的突变产生的上述经突变的 ENV 蛋白,所述野生型 ENV 蛋白基本上包含下列序列:

[0415] $\underline{\text{NY}}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\underline{\text{LY}}_4\underline{\text{LY}}_5\underline{\text{LY}}_6\text{Y}_7\text{Y}_8\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\underline{\text{CY}}_{12}\text{X}_2$,

[0416] 其中,氨基酸 X_1 和氨基酸 X_2 被突变,和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸,所述经突变的 ENV 蛋白相对于野生型 ENV 蛋白具有减少的免疫抑制活性,

[0417] 或其片段,条件是所述片段携带经突变的氨基酸 X_1 和 X_2 ,所述片段具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述片段的抗原性结构基本上和其在经突变的 ENV 蛋白中所采用的结构相似,

[0418] 或通过至少一个氨基酸的插入、缺失或替代从经突变的 ENV 蛋白或其片段衍生的蛋白质,条件是所述衍生的蛋白质携带经突变的氨基酸 X_1 和 X_2 ,所述衍生的蛋白质具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述衍生的蛋白质的抗原性结构基本上和经突变的 ENV 蛋白或其片段的抗原性结构相似。

[0419] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个优选的实施方案中,所述突变是替代。

[0420] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的另一个优选的实施方案中, X_1 由 R 或 H 替代。

[0421] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的另一个优选的实施方案中, X_2 由 F、M、Y 或 W 替代。

[0422] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的另一个优选的实施方案中, X_1 是 E、K 或 Q,并且由 R 或 H 替代。

[0423] 在一个优选的实施方案中,上述突变的 ENV 蛋白或其片段是 HERV-H ENV,其中 X_1 是 K。

[0424] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的另一个优选的实施方案中, X_2 是 A、V、L、I 或 K,并且由 F、M、Y 或 W 替代。

[0425] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个特别优选的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV ENV,优选地选自:

[0426] HERV-FRD ENV (SEQ ID NO :82),其中 X_1 是 Q427, X_2 是 A433,或

[0427] HERV-T ENV (SEQ ID NO :84),其中 X_1 是 Q516, X_2 是 A522,或

- [0428] HERV-R ENV (SEQ ID NO :86), 其中 X_1 是 E561, X_2 是 K567, 或
- [0429] HERV-V ENV (SEQ ID NO :88), 其中 X_1 是 Q381, X_2 是 V387, 或
- [0430] HERV-R(b)ENV (SEQ ID NO :90), 其中 X_1 是 E391, X_2 是 L397。
- [0431] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-FRD ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0432] SEQ ID NO :120
- [0433] SEQ ID NO :122。
- [0434] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-V ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0435] SEQ ID NO :124
- [0436] SEQ ID NO :126。
- [0437] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-T ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0438] SEQ ID NO :128
- [0439] SEQ ID NO :130。
- [0440] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HERV-R ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0441] SEQ ID NO :146,
- [0442] SEQ ID NO :148。
- [0443] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个特别优选的实施方案中, ENV 蛋白选自 :
- [0444] HTLV-1ENV (SEQ ID NO :92), 其中 X_1 是 Q389, X_2 是 A395, 或
- [0445] HTLV-2ENV (SEQ ID NO :94), 其中 X_1 是 Q385, X_2 是 A391, 或
- [0446] FeLV ENV (SEQ ID NO :96), 其中 X_1 是 E527, X_2 是 A533, 或
- [0447] PERV ENV (SEQ ID NO :98), 其中 X_1 是 E545, X_2 是 A551, 或
- [0448] STLV-1ENV (SEQ ID NO :100), 其中 X_1 是 Q389, X_2 是 A395, 或
- [0449] MoMLV ENV (SEQ ID NO :70), 其中 X_1 是 E551, X_2 是 A557, 或
- [0450] MPMV ENV (SEQ ID NO :72), 其中 X_1 是 Q471, X_2 是 A477, 或
- [0451] FV ENV (SEQ ID NO :102), 其中 X_1 是 E561, X_2 是 A567。
- [0452] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 FeLV ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0453] SEQ ID NO :104
- [0454] SEQ ID NO :106。
- [0455] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HTLV-1ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0456] SEQ ID NO :108
- [0457] SEQ ID NO :110。
- [0458] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中, ENV 蛋白是 HTLV-2ENV, 突变的 ENV 蛋白的序列选自 :
- [0459] SEQ ID NO :112

[0460] SEQ ID NO :114。

[0461] 在上述突变的 ENV 蛋白或其片段的一个有利的实施方案中,ENV 蛋白是 PERV ENV,突变的 ENV 蛋白的序列选自:

[0462] SEQ ID NO :150,

[0463] SEQ ID NO :152。

[0464] 根据优选的实施方案,本发明涉及由野生型 ENV 蛋白的突变产生的上述经突变的 ENV 蛋白,所述野生型 ENV 蛋白基本上包含下列序列:

[0465] $\text{NY}_1\text{Y}_2\text{Y}_3\text{LY}_4\text{Y}_5\text{LY}_6\text{Y}_7\text{X}_1\text{Y}_9\text{Y}_{10}\text{Y}_{11}\text{CY}_{12}\text{X}_2$,

[0466] 其中,氨基酸 X_1 和任选地氨基酸 X_2 被突变,和 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸,所述经突变的 ENV 蛋白相对于野生型 ENV 蛋白具有增加的免疫抑制活性,

[0467] 或其片段,条件是所述片段携带经突变的氨基酸 X_1 和 X_2 ,所述片段具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述片段的抗原性结构基本上和其在经突变的 ENV 蛋白中所采用的结构相似,

[0468] 或通过至少一个氨基酸的插入、缺失或替代从经突变的 ENV 蛋白或其片段衍生的蛋白质,条件是所述衍生的蛋白质携带经突变的氨基酸 X_1 和 X_2 ,所述衍生的蛋白质具有和经突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性,和任选地所述衍生的蛋白质的抗原性结构基本上和经突变的 ENV 蛋白或其片段的抗原性结构相似。

[0469] 在上述具有增加的免疫抑制活性的突变的 ENV 蛋白或其片段的一个优选的实施方案中,所述突变是替代。

[0470] 在上述具有增加的免疫抑制活性的突变的 ENV 蛋白或其片段的一个优选的实施方案中, X_1 由 E、K 或 Q 替代, X_2 由 A 替代。

[0471] 在上述具有增加的免疫抑制活性的突变的 ENV 蛋白或其片段的一个优选的实施方案中,ENV 蛋白是 HERV-W ENV,例如由 SEQ ID NO :74 表示,突变的 HERV-W ENV 的序列选自:

[0472] SEQ ID NO :116

[0473] SEQ ID NO :118。

[0474] 本发明还涉及这样的蛋白质,该蛋白质的特征在于,其包含至少一个上述的多肽,或至少一个上述的突变的 ENV 蛋白或其片段,条件是当所述多肽来源于野生型 ENV 蛋白时,那么包含所述多肽的所述蛋白质和所述野生型 ENV 蛋白不同。

[0475] 本发明还涉及核酸,特别是多核苷酸,其编码本发明的多肽。在特殊的实施方案中,将这些核酸插入载体。所述重组载体可以是质粒、用于细菌转导的噬菌体或能够转化酵母的 YAC,或任何表达载体。

[0476] 此外,所述重组载体包含转录调控区(包括启动子),所述转录调控区使核酸能够在受控条件下进行诱导表达或条件表达,或如果合适,进行组成型表达。也可使用组织特异性转录区。此外,所述重组载体包含复制起始位点和/或标记基因。

[0477] 在本发明的一个特殊的实施方案中,载体还包含编码病毒 GAG 和/或 POL 蛋白的核酸或其足以表达功能性病毒蛋白的片段。任选地,载体可包含编码病毒辅助性蛋白,如 NEF、TAT 或其片段的核酸。

[0478] 可选择地,编码 GAG 和 POL 的序列可插入分开的载体中,包括插入和 ENV 表达载体

不同的载体中。

[0479] 在本发明的一个特殊的实施方案中,用编码本发明的多肽(其具有抗原性质,但同时具有相对于确定的蛋白质来说经改变的免疫抑制性质)的核酸或编码本发明的多肽(其具有感染、融合和抗原性质,但同时具有相对于确定的蛋白质来说经改变的免疫抑制性质)的核酸修饰原病毒基因组。

[0480] 本发明还涉及包含编码本发明多肽的核酸的细胞。

[0481] 在一个特殊的实施方案中,以这样的方式用本发明的多核苷酸转化细胞,该方式为:通过与同源的细胞序列重组或通过插入细胞基因组中来将多核苷酸整合入细胞基因组。也可通过本领域技术人员熟知的方法用本发明的载体转染细胞。可离体地,即在活生物体外的人工环境中进行转染或感染。

[0482] 在另一个实施方案中,在细胞中,通过导入包含在另外的载体中的其他核酸(特别是编码病毒 GAG 蛋白和/或 POL 蛋白的核酸)来补充含有编码本发明多肽的核酸的载体。

[0483] 这些细胞系用于生产重组病毒颗粒。在一个特殊的实施方案中,GAG 和 POL 多肽与 ENV 蛋白一样来源于相同的病毒株系。在另一个实施方案中,GAG 和 POL 多肽与 ENV 蛋白来源于不同的株系。

[0484] 产生的重组病毒颗粒包含编码功能性 POL 蛋白的核酸、编码功能性 GAG 蛋白的核酸和编码本发明的多肽的核酸。

[0485] 此外,ENV 蛋白可选自根据宿主的病毒兼嗜性 ENV 蛋白(即,其能够感染非该病毒起源的物种的细胞)或根据宿主的病毒亲嗜性 ENV 蛋白(即,其只能在该病毒起源的物种的细胞中复制)。

[0486] 为确保重组病毒颗粒是感染性的和复制型的,载体要包含各种选自如下的核酸序列:转录、表达和包壳的信号,例如 LTRs、cPPT、PPT3'、CTS、SA、SD、psi 序列和 RRE。然而,可删除这样的元件以产生非复制型病毒颗粒。此外,原病毒基因组包含编码辅助性蛋白的核酸。

[0487] 任选地,可制备颗粒以在宿主中表达用于药物应用的额外的化合物。

[0488] 本发明还涉及编码上述多肽、编码上述突变的 ENV 蛋白或编码上述蛋白的核酸。

[0489] 在一个优选的实施方案中,上述核酸的特征在于,其由选自下列的序列表示:

[0490] SEQ ID NO:103,

[0491] SEQ ID NO:105,

[0492] SEQ ID NO:107,

[0493] SEQ ID NO:109,

[0494] SEQ ID NO:111,

[0495] SEQ ID NO:113,

[0496] SEQ ID NO:115,

[0497] SEQ ID NO:117,

[0498] SEQ ID NO:119,

[0499] SEQ ID NO:121,

[0500] SEQ ID NO:123,

[0501] SEQ ID NO:125,

[0502] SEQ ID NO :127,

[0503] SEQ ID NO :129,

[0504] SEQ ID NO :145,

[0505] SEQ ID NO :147,

[0506] SEQ ID NO :149,和

[0507] SEQ ID NO :151。

[0508] 上述 SEQ ID NO :103 至 129 和 SEQ ID NO :147 至 151(奇数编号) 分别编码 SEQ ID NO :104 至 130 和 SEQ ID NO :146 至 152(偶数编号)。

[0509] 本发明还涉及真核或原核表达载体,其特征在于,其包含上述核酸以及表达所述核酸所必需的元件。

[0510] 在一个优选的实施方案中,上述真核或原核表达载体是病毒载体,特别是痘病毒载体,例如禽痘病毒、金丝雀痘病毒或 MVA(经修饰的牛痘病毒 Ankara) 载体、腺病毒载体、麻疹病毒载体或 CMV(巨细胞病毒) 载体。

[0511] 在另一个优选的实施方案中,上述真核或原核表达载体是病毒载体,特别是金丝雀痘病毒载体,其包含编码上述突变的 ENV 蛋白或其片段的核酸序列,特别是突变的 FeLV ENV,例如由 SEQ ID NO :103 或 SEQ ID NO :105 表示的,以及任选地包含编码来源于和所述突变的 ENV 来源相同的病毒的 GAG 蛋白的核酸。

[0512] 本发明还涉及重组细胞,其特征在于,其包含上述核酸或上述真核或原核表达载体。

[0513] 本发明还涉及包含本发明多肽的组合物,所述的本发明多肽相对于确定的蛋白质具有改变的免疫抑制性质,特别地其基本上保持其所衍生自的蛋白质的抗原性,尤其是免疫原性。

[0514] 相对于起始的确定的蛋白质,特殊的本发明组合物具有更低的免疫抑制性质,或甚至基本上无免疫抑制性质。

[0515] 其他组合物包含含有编码本发明多肽的核酸的多核苷酸或载体。在该情况下,可以依赖于其中施用(例如注射)了组合物的器官和依赖于所需的表达强度来选择组织特异性启动子。

[0516] 本发明的其他组合物包含重组病毒颗粒或病毒,所述重组病毒颗粒或病毒具有本发明的多肽和任选地在宿主中表达具有药用目的的其他化合物。

[0517] 本发明的多肽和组合物可用于设计药物的活性成分,从而具有这样的吸引人的性质,所述性质用于预防和 / 或治疗治疗感染特别是病毒感染,或用于治疗由于病毒感染造成的有害后果特别是恶性状况(包括肿瘤),或还用于预防和 / 或治疗与内源性病毒特别是 HERV 的表达相关的有害后果特别是恶性状况(包括肿瘤),所述内源性病毒通常在宿主内是沉默的。表述“治疗”包括用本发明的多肽和组合物获得的治疗性效果,也包括在患者中观察到的症状的减轻或患者病状的改善。

[0518] 在一个特殊的实施方案中,本发明的组合物还包含额外的活性化合物包括细胞因子,所述化合物用于预防或治疗感染,尤其是病毒感染,特别是逆转录病毒感染,或用于治疗由于通常情况下沉默的 ERV 表达造成的后果。

[0519] 当用于全身性或局部施用,特别是经注射施用时,组合物还包含药学上可接受的

赋形剂或媒介物 (carrier) 和 / 或载体 (vehicle)。

[0520] 可使用几种类型的组合物来引发抗本发明的抗原性多肽的免疫反应。

[0521] 第一,给宿主施用例如通过注射施用包含核酸的组合物(称作DNA免疫接种),所述核酸在体内表达本发明的多肽。DNA疫苗通常由包含真核细胞启动子、克隆位点、聚腺苷酸化序列、选择标记和细菌的复制起始位点的质粒载体组成。所有这些元件对于本领域技术人员是熟知的。已显示裸DNA的递送效率很差,因此需要一些媒介物来改善DNA至细胞内的递送。已开发出了两种类型的媒介物:病毒媒介物(腺病毒、慢病毒)或非病毒媒介物例如聚合物(特别是阳离子聚合物)、被包封的DNA(脂质体)或连接至金微颗粒的DNA。

[0522] 另一种类型的组合物包含具有相对于确定的蛋白质来说经改变的免疫抑制性质并具有抗原性质的本发明多肽。这样的组合物可以是免疫原性的,即其能够在施用了其的宿主中引发免疫应答。然而,因为蛋白质有时是非免疫原性的或免疫原性差的,因此可将佐剂和所述多肽一起施用,以引发或提高免疫应答。佐剂定义为增强与所述佐剂混合的抗原的免疫原性的任何物质。一些佐剂将可溶性的抗原转化成小颗粒,例如氢氧化铝凝胶、水包油乳状液或免疫刺激性复合物(ISCs)。另一类佐剂包含细菌的无菌成分例如细胞壁或多糖,弗氏佐剂。

[0523] 因此,包含具有抗原性质而同时具有相对于确定的蛋白质来说经改变的免疫抑制性质的多肽的组合物于在施用了其的宿主中引发免疫应答方面和于产生体液和 / 或细胞介导的免疫应答方面是非常吸引人的。

[0524] 事实上,施用例如注射不具有免疫抑制性质的多肽提供了比施用确定的蛋白质(具有免疫抑制性质)更有效的免疫反应,因为宿主的免疫系统是完全发挥作用的。

[0525] 在一个特殊的实施方案中,本发明的多肽具有抗原性、融合性和感染性,但还具有相对于确定的免疫抑制性蛋白质来说经改变的免疫抑制性质。

[0526] 有利地,本发明的经改变的免疫抑制性质对应于相对于原始起始蛋白质来说减少的免疫抑制性质。

[0527] 可在重组细胞系中构建用上述具有所述性质的多肽包被的病毒颗粒,所述重组细胞系用 gag-pol 载体和包含编码所述多肽的核酸的载体转染。

[0528] 任选地,这些病毒颗粒还表达治疗性或预防性目的的其他化合物。

[0529] 有趣地,这样的病毒颗粒能够感染和融合宿主的细胞,和整合非免疫抑制性包膜蛋白。包含这样的病毒颗粒的组合物引发有效的免疫反应,该免疫反应好于由整合了具有免疫抑制性质的确定的蛋白质的病毒颗粒所引发的免疫反应。事实上,所述包膜蛋白不能免疫抑制其宿主,从而导致最佳的免疫反应。另一个结果是,本来具有复制能力的病毒颗粒,由于不涉及 ENV 基因的重组事件的原因,将会使其在宿主中的繁殖受到限制,因为重组病毒颗粒不能逃避免疫应答。

[0530] 包含这样的病毒颗粒的组合物似乎是有效和安全的疫苗,所述病毒颗粒包被着具有融合和感染性质的抗原性包膜蛋白。

[0531] 有趣地,这样的病毒颗粒可以是复制型的(有功能的)或非复制型的。这可以对施用后颗粒在宿主中的驻留时间和对免疫应答的质量产生影响。

[0532] 可通过不同的途径将上述所有组合物注射入宿主,所述途径是:皮下(s.c)、皮内(i.d.)、肌肉(i.m.)或静脉内(i.v.)注射,口服施用和鼻内施用或吸入。

[0533] 本发明还涉及包含与药学上可接受的媒介物组合的活性物质的药物或疫苗组合物,所述活性物质为:

[0534] 至少一种上述的多肽,或

[0535] 至少一种上述的突变的 ENV 蛋白或其片段,或

[0536] 至少一种上述的核酸,或

[0537] 至少一种上述的原核或真核表达载体,或

[0538] 至少一种上述的重组细胞。

[0539] 如在下文中所描述的,这些药物组合物特别可用于治疗癌症、免疫病症或病毒疾病。

[0540] 本发明还涉及至少一种这样的蛋白质或编码所述蛋白质的核酸用于生产希望用于预防和/或治疗病毒疾病例如 HTLV 或 FeLV 感染的药物或疫苗的用途,所述蛋白质包含或由上述的具有减少的免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白或其片段构成。

[0541] 给个体施用具有减少的免疫抑制活性的经突变的 ENV 蛋白很可能能够保护所述个体免受相应的病毒的感染。事实上,所引发的抗经突变的 ENV 蛋白的免疫应答也抗相应的野生型 ENV 蛋白。如此处所显示的,该免疫应答有效地阻止了野生型 ENV 蛋白的免疫抑制活性和防止该病毒的免疫逃避。

[0542] 此外,突变的 ENV 蛋白还可能充当与病毒的野生型 ENV 竞争结合其天然受体的分子诱饵,从而抑制所述野生型 ENV 的活性。

[0543] 本发明还涉及至少一种这样的蛋白质或编码所述蛋白质的核酸用于生产希望用于预防和/或治疗癌症的药物或疫苗的用途,所述蛋白质包含或由上述突变的 HERV ENV 蛋白或其片段构成。

[0544] 如此处所显示的,阻断由癌细胞表达的 HERV ENV 蛋白的活性防止了这些细胞的免疫逃避。同样,有效地引发的抗具有减少的免疫抑制活性的经突变的 HERV ENV 蛋白的免疫应答也抗由癌细胞表达的野生型 HERV ENV,从而防止了其使这些癌细胞能够免疫逃避。

[0545] 此外,突变的 ENV 蛋白还可能充当与由癌细胞表达的野生型 ENV 竞争结合其天然受体的分子诱饵,从而抑制所述野生型 ENV 的活性。

[0546] 本发明还涉及至少一种这样的蛋白质或编码所述蛋白质的核酸用于生产希望用于预防和/或治疗要求抑制免疫系统的病理学(例如自身免疫疾病、过敏或移植排斥)的药物或疫苗的用途,所述蛋白质包含或由上述突变的 ENV 蛋白或其片段构成。

[0547] 如此处所用的,移植排斥也包括移植物抗宿主疾病(GVHD)。

[0548] 本发明还涉及至少一种上述多肽或上述包含所述多肽的蛋白质或编码所述多肽或所述蛋白质的核酸的用途,所述用途是生产希望用于预防和/或治疗癌症、病毒疾病或要求抑制免疫系统的病理学(例如自身免疫疾病、过敏或移植排斥)的药物。

[0549] 上述多肽和包含其的蛋白质可具有几种应用。当其来源于野生型免疫抑制性 ENV 蛋白时,它们可直接用于抑制免疫系统。否则,无论其来源于免疫抑制 ENV 蛋白还是来源于非免疫抑制 ENV 蛋白,它们都可用作希望与由癌细胞或病毒表达的相应野生型 ENV 蛋白的天然受体结合的诱饵,从而阻止所述野生型 ENV 蛋白的活性。

[0550] 本发明还涉及至少一种蛋白质或编码所述蛋白质的核酸用于生产希望用于预防和/或治疗癌症、病毒疾病或要求抑制免疫系统的病理学(例如自身免疫疾病、过敏或移植

排斥) 的药物或疫苗的用途, 所述蛋白质包含或由下列部分构成:

[0551] - 基本上包含下列序列的免疫抑制性 ENV 蛋白:

[0552] $NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X_2$,

[0553] 其中氨基酸 Y_1 至 Y_{12} 表示任何氨基酸, 氨基酸 X_1 表示 E、K 或 Q, 和任选地氨基酸 X_2 表示 A,

[0554] - 或其片段, 条件是所述片段携带 X_1 和任选地 X_2 , 和所述片段具有和所述 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性。

[0555] - 或通过至少一个氨基酸的插入、缺失或替代从所述 ENV 蛋白或其片段衍生的蛋白质, 条件是所述衍生的蛋白质携带氨基酸 X_1 和任选地 X_2 , 和所述衍生的蛋白质具有和突变的 ENV 蛋白的免疫抑制活性相似的免疫抑制活性。

[0556] 在至少一种包含或由免疫抑制性 ENV 蛋白构成的蛋白质用于生产希望用于预防和/或治疗癌症、病毒疾病或要求抑制免疫系统的病理学(例如自身免疫疾病、过敏或移植排斥) 的药物或疫苗的上述用途的一个优选的实施方案中, 所述免疫抑制性 ENV 蛋白基本上包含下列序列:

[0557] $NY_1Y_2Y_3LY_4Y_5LY_6Y_7Y_8X_1Y_9Y_{10}Y_{11}CY_{12}X_2$,

[0558] 所述 ENV 蛋白选自:

[0559] HERV-T ENV, 例如由 SEQ ID NO:84 表示, 或

[0560] HERV-R ENV, 例如由 SEQ ID NO:86 表示, 或

[0561] HERV-V ENV, 例如由 SEQ ID NO:88 表示, 或

[0562] HERV-R(b) ENV, 例如由 SEQ ID NO:90 表示, 或

[0563] HTLV-1 ENV, 例如由 SEQ ID NO:92 表示, 或

[0564] HTLV-2 ENV, 例如由 SEQ ID NO:94 表示, 或

[0565] FeLV ENV, 例如由 SEQ ID NO:96 表示, 或

[0566] PERV ENV, 例如由 SEQ ID NO:98 表示, 或

[0567] STLV-1 ENV, 例如由 SEQ ID NO:100 表示, 或

[0568] FV ENV, 例如由 SEQ ID NO:102 表示。

[0569] 关于上述多肽, 这些蛋白质和其片段可具有几种应用。它们可直接用于抑制免疫系统或作为希望与由癌细胞或病毒表达的相应野生型 ENV 蛋白的天然受体结合的诱饵。

[0570] 本发明还涉及用于生产抗体的方法, 其包括:

[0571] a. 以调节免疫抑制作用但保持融合、感染和免疫抑制性质的方式修饰核苷酸免疫抑制调节序列,

[0572] b. 表达所述经修饰的基因,

[0573] c. 纯化经修饰的多肽,

[0574] d. 将所述经修饰的多肽注射入动物中以诱导免疫应答,

[0575] e. 纯化产生的、抵抗所述经修饰的多肽的抗体。

[0576] 本发明还提供了调节抗原性和免疫抑制性蛋白质的免疫抑制性质而同时保持其抗原性质的方法, 所述方法包括:

[0577] a. 在编码所述抗原性和免疫抑制性质的核酸序列中鉴定编码免疫抑制调节序列的核酸序列, 所述免疫抑制调节序列编码上述共有氨基酸序列,

[0578] b. 鉴定编码在上述序列 $X1-(Y)_3-C(Y)_1-X2$ 中的影响免疫抑制性质的氨基酸 X1 和 X2 的密码子,

[0579] c. 以使得到的蛋白质保持其抗原性质但同时具有经修饰的免疫抑制性质的方式对编码所述两个氨基酸的密码子进行修饰,

[0580] d. 表达获得的经修饰的核酸序列, 该核酸序列编码具有经修饰的免疫抑制性质的所述抗原性蛋白质。

[0581] 调节还具有感染和融合性质的抗原性和免疫抑制性蛋白质的免疫抑制性质而同时保持其融合、感染和抗原性质的特殊方法包括:

[0582] a. 鉴定 env 基因的免疫抑制调节序列, 其编码和上述氨基酸序列相似的氨基酸序列,

[0583] b. 以这样的方式修饰编码影响免疫抑制性质的氨基酸的密码子, 即, 使得到的蛋白质保持其融合、感染和抗原性质但同时已修饰了其免疫抑制性质。

[0584] 本发明还提供了制备减毒的病毒的方法, 其包括:

[0585] a. 以这样的方式修饰编码病毒的抗原性和免疫抑制性蛋白质的基因, 即调节所述蛋白质的免疫抑制性质但同时保持其抗原性质,

[0586] b. 在重组细胞系中表达所述经修饰的基因, 以生产整合了经修饰的原病毒基因组的减毒重组病毒颗粒。

[0587] 本发明还涉及制备减毒的病毒的方法, 其包括:

[0588] a. 以这样的方式修饰编码还具有融合和感染性质的抗原性和免疫抑制性病毒 ENV 蛋白的基因, 即调节所述病毒 ENV 蛋白的免疫抑制性质但同时保持其融合、感染和抗原性质,

[0589] b. 在重组细胞系中表达所述经修饰的基因, 以生产整合了经修饰的原病毒基因组的减毒重组病毒颗粒。

[0590] 本发明还更一般地涉及非免疫抑制性或低免疫抑制性多肽用于制备适合于预防或治疗病毒疾病或恶性状态或肿瘤疾病的免疫原性组合物的用途。

[0591] 因此可使用天然发生的不具有免疫抑制性质或具有低免疫抑制性质的蛋白质; 它们包括 HERV-W 或 HERV-H。

[0592] 本发明涉及上述多肽或者上述突变的蛋白质或蛋白质用于制备选自下列的 ENV 蛋白的配体的用途:

[0593] - 多克隆或单克隆抗体或其片段, 例如 Fab 或 $F(ab)'_2$ 片段,

[0594] - scFv 多肽,

[0595] - 适体 (aptamers),

[0596] - 结合肽。

[0597] 这样的配体和用于制备其的方法对本领域技术人员来说是熟知的。

[0598] 本发明还涉及针对上述突变的 ENV 蛋白、或上述包含其的蛋白质或多肽的抗体或其片段、scFv 多肽、适体或结合肽, 条件是所述抗体或其片段、scFv 多肽、适体或结合肽不结合相应的野生型 ENV 蛋白。

[0599] 本发明还涉及上述多肽或上述蛋白质用于筛选可能调节病毒或肿瘤细胞的免疫抑制活性的化合物的用途。

[0600] 本发明还涉及上述抗体或其片段、scFv 多肽、适体或结合肽用于筛选可能调节病毒或肿瘤细胞的免疫抑制活性的化合物的用途。

[0601] 在上述多肽、上述蛋白质、或者上述抗体或其片段、scFv 多肽、适体或结合肽的上述用途的一个优选实施方案中，要筛选的化合物是肽，特别是包含 5 至 30 个氨基酸的肽，例如来源于组合肽文库的肽。

[0602] 实施例

[0603] 实施例 1

[0604] 方法：

[0605] 小鼠和细胞系

[0606] 用于这些测试的细胞系是：

[0607] -293T, 胚胎肾细胞 (ATCC CRL11268),

[0608] -HeLa, 人上皮样癌细胞 (ATCC CCL2),

[0609] -MCA205, 甲基胆蒽诱导的鼠纤维肉瘤细胞 (Shu 和 Rosenberg, 1985),

[0610] -NIH 3T3, 小鼠成纤维细胞。

[0611] 将细胞培养在含补充有 10% 胎牛血清、链霉素 (100 μ g/ml) 和青霉素 (100 单位/ml) 的 DMEM 中。

[0612] 为了测试经修饰的蛋白质的免疫抑制作用，使用从 Janvier (Laval, France) 获得的 8 至 12 周龄的 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠。

[0613] 构建

[0614] 以前 (Blaise 等人, 2003) 曾描述了表达 HERV-W 和 HERV-T 的包膜的载体 (phCMV-envW 和 phCMV-envT)。简而言之，它们包含启动子 (人巨细胞病毒早期启动子)、兔 β -球蛋白内含子和聚腺苷酸化序列。在载体的 EcoRI 位点之间插入 HERV-W env 的 cDNA (图 3A)。

[0615] 通过 PCR 使用下列引物从 pTMO 载体 (Brody 等人, 1994) 重新获得 MPMV 的包膜基因：

[0616] Atacatctcgagaccggtccaactagaaccatgaacttcaattatcattttcatctgga (SEQ ID NO : 55) 和

[0617] Atacatacgcgtctatgttaagggtcaaataatgagccacc (SEQ ID NO : 56)，其用 XhoI 和 MluI (下划线标示) 消化，

[0618] 并将所述包膜基因克隆入用相同酶消化的 phCMV-envT 中。获得包含并表达 MPMV 的包膜基因的 phCMV-envMPMV 表达载体 (图 2A)。将这些载体用于细胞-细胞融合测定法和用于产生假模标本。

[0619] 按照用 Swiss-Model 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 产生的 HERV-W 的 TM 亚基模型结构 (图 8) 和作为模板的莫洛尼鼠类白血病病毒 TM 亚基的结构 (Protein Data Bank ID : 1MOF(1), <http://www.resb.org/pdf/>) 来对在下列构建的描述中的氨基酸位置 * 进行编号。因此当在以 NCBI 序列登录号公开的相应包膜的 SU-TM 前体中进行鉴定时，按照该编号方案的位点 44 和 50 表示下列位置：

[0620]

包膜	位置 *36	位置 *44	位置 *47	位置 *50	NCBI 序列登录号
HERV-W	A385	R393	T396	F399	AF072503 ⁽²⁾
MPMV	G463	Q471	I474	A477	AF033815 ⁽³⁾
MoMLV	G543	E551	L554	A557	AF033811 ⁽³⁾

[0621] NCBI URL :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/>

[0622] (1) Fass D, Harrison SC, Kim PS. Nat Struct Biol. 1996 May ;3(5) :465-9 ;

[0623] (2) Blond, J. L. , Beseme, F. , Duret, L. , Bouton, O. , Bedin, F. , Perron, H. , Mandrand, B. 和 Mallet, F. J. Virol. 73(2) ,1175-1185(1999) ;

[0624] (3) Petropoulos, C. J. Appendix 2 :Retroviral taxonomy, protein structure, sequences and genetic maps, in RETROVIRUSES :757, Coffin, J. M. (Ed.) ;Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA(1997)。

[0625] 如前面 (Kunkel 等人, 1987) 所述使用作为模板的单链尿嘧啶化 DNA 和诱变寡核苷酸 (以斜体标示突变) 进行 pHCMV-envW 的定点诱变, 所述诱变寡核苷酸还沉默地引入了限制位点 (下划线标示) 以更容易进行筛选 :

[0626] A36G :tagtccttcaaatcg **ccgcgggt** ttagacttgctaa (SEQ ID NO :57),

[0627] R44Q :a **caa** ggggggtacctgtttatttttaggggaaga (SEQ ID NO :58),

[0628] T47I :ccgctgaaagagggggg **catatg** tttatttttagggga (SEQ ID NO :59),

[0629] F50A :aaccgctgaaagaggggggtacctgttta **gct** ttaggggaaga (SEQ ID NO :60),

[0630] R44Q/F50A :aaccgctgaa **caa** ggggggtacctgttta **gct** ttaggggaaga (SEQ ID NO :61)。

[0631] 以相同的方法进行 pHCMV-envMPMV 的定点诱变, 除了使用将沉默地引入 XhoI 的反义引物 (cttcggcgtctctcgcagagacgccgaag) (SEQ ID NO :62) 连接至下列诱变引物的 PCR 片段 :

[0632] Silent :caaacagaagaggattagatctacttacagc (SEQ ID NO :63),

[0633] Q44R :tacttacagcagag **aga** ggaggtatctgcttag (SEQ ID NO :64),

[0634] A50F :gggaggtatctgctta **ttt** ttacaggaaaaatgtt (SEQ ID NO :65),

[0635] Q44R/A50F :

[0636] acttacagcagag **aga** ggaggtatctgctta **ttt** ttacaggaaaaatg (SEQ ID NO :66),

[0637] 而不是使用合成的寡核苷酸。

[0638] 通过 pDFG-envW 的 BstBI-BsrGI 和 BsrGI-BstEII 片段与 pHCMV-envW 的 BstEII-BstBI 片段的三连接来构建 pDFG-envW 的突变型衍生物。

[0639] 通过将 pHCMV-envMPMV 的 AgeI-MluI 片段连接入用相同的酶消化的 pDFG-MoTMTAg 载体来构建 pDFG-envMPMV 和其突变型衍生物 (图 2B)。pDFG 质粒是包含 LTRs、剪接位点 (SD 和 SA)、psi 序列和 IRES (内部核糖体进入位点) 元件以及选择基因 (抗生素抗性基因) 的包膜表达载体。在表达包膜的肿瘤细胞中和在体内测定法中使用这些载体 (图 1B、2B 和 3B)。

[0640] 融合性质:细胞-细胞融合测定法

[0641] 使用 Lipofectamine (Invitrogen, 5×10^5 个细胞使用 $2 \mu\text{g}$ DNA) 转染 HeLa 细胞。在用相应的表达载体 (图 1A, 2A 和 3A) 转染后 24 小时, 测量包膜糖蛋白的融合活性。为显现合胞体, 用甲醇固定细胞, 并按照厂商说明书通过加入 May-Grünwald 和 Giemsa 溶液 (Sigma) 对其进行染色。表示细胞群体中融合事件的百分比的融合指数定义为 $[(N-S)/T] \times 100$, 其中 N 是合胞体中的细胞核的数目, S 是合胞体的数目, T 是经计数的细胞核的总数 (图 4)。使用不表达包膜蛋白的 pHCMV 载体作为阴性对照。

[0642] 感染性质:感染性测定法

[0643] 使用磷酸钙法, 用表达包膜糖蛋白 (野生型或突变的) 的 $1.75 \mu\text{g}$ CMV-gag-pol-MoMLV、 $1.75 \mu\text{g}$ MFG-nls-lacZ 和 $0.55 \mu\text{g}$ pHCMV 载体 (图 1A, 2A 和 3A) 共转染 7.5×10^5 个 293T 细胞。MFG-nls-lacZ 载体包含 MoMLV LTRs、psi 序列、NLS (核定位信号) 和 LacZ 基因。2 天后回收包含假模标本 (具有来自另一病毒株系的包膜蛋白的 MoMLV 的病毒体) 的上清液, 过滤, 在培养基中进行系列稀释, 并在 $4 \mu\text{g/mL}$ Polybrene 存在的情况下在 96 孔培养板中用于感染 4×10^3 HeLa 细胞。2 天后固定平板, 用 X-gal 染色 1 小时, 并对表达 β -半乳糖苷酶的被感染的细胞的转化灶计数以确定假模标本滴度 (每 ml 上清液的感染性颗粒的数目)。使用不表达包膜蛋白的 pHCMV 载体作为阴性对照。

[0644] 免疫抑制性质:表达包膜的肿瘤细胞和体内测定的建立。

[0645] 使用磷酸钙法, 通过用 $1.75 \mu\text{g}$ CMV-gag-pol-MoMLV 和 $0.55 \mu\text{g}$ CMV-envAmpho 瞬时共转染入 7.5×10^5 293T 细胞来包装 pDFG 逆转录病毒表达载体 ($1.75 \mu\text{g}$)。2 天后回收上清液, 过滤, 并在 $4 \mu\text{g/mL}$ Polybrene 存在的情况下用于感染 5×10^5 MCA205 肿瘤细胞, 如 Mangeney & Heidmann, 1998 中所述。将细胞在选择性培养基 (400 单位 / mL 的潮霉素) 上维持 2 周。为进行体内测定法, 用胰蛋白酶处理肿瘤细胞, 离心, 并以 1×10^7 细胞 / mL 的浓度重悬浮在 PBS 中。将 $100 \mu\text{L}$ 各悬浮液经皮下注射入 3 只 C57/BL6 和 8 至 10 只 BALB/c 小鼠的剃修过的右肋腹中。通过触诊确定肿瘤的产生, 和通过测量垂直肿瘤直径确定肿瘤面积 (mm^2) (图 5)。免疫抑制指数定义为 $i = (S_{\text{env}} - S_{\text{无}}) / S_{\text{无}}$, 其中 S_{env} 是由表达包膜蛋白的肿瘤达到的最大面积, $S_{\text{无}}$ 是由不表达包膜蛋白的肿瘤 (阴性对照) 达到的最大面积。

[0646] 结果

[0647] 1- 各种野生型包膜蛋白的感染性质的确定

[0648] 在 NIH 3T3 细胞 (MoMLV) 或 HeLa 细胞 (HERV-W 和 MPMV) 中测试包膜蛋白的感染性。图 6 显示, 3 种野生型包膜蛋白 (第 1、5 和 9 行) 能够支持感染。

[0649] 2- 各种野生型包膜蛋白的免疫抑制作用的确定

[0650] 在被注射入同种异体 balb/c 或同系 C57B1/6 小鼠中的 MCA205 中测试 MPMV 逆转录病毒和 HERV-W 的免疫抑制作用。图 7 显示, 和表达 HERV-W 的肿瘤 (白色条形) 相比, 表达 MPMV 的肿瘤 (黑色条形) 较大。虽然本发明者确证了 MPMV 包膜的免疫抑制作用, 但同时显示 HERV-W 不能免疫抑制同种异体宿主。

[0651] 总之, 就促融合性和感染度来说 MPMV 和 HERV-W 的包膜蛋白具有相同的性质, 但它们的免疫抑制性质不同。

[0652] 3- 用于鉴定具有改变的免疫抑制性质的包膜蛋白的策略

[0653] 基于 HERV-W 和 MPMV 的不同性质, 发明者尝试鉴定氨基酸序列中的可参与免疫抑

制的调节的结构域。

[0654] 以前在几个出版物中表征了推定的 17 个氨基酸的免疫抑制结构域 (ISU), 该结构域存在于结晶的亚结构域 (TM 结构域) 的氨基酸 30 和氨基酸 47 之间, 在 MoMLV 中这两个氨基酸分别是两个亮氨酸 (Blaise 等人, 2001 J Virol. 82, 1597-1600)。

[0655] 使用两步骤策略; 第一步骤是以这样的方式修饰包膜蛋白, 即能够使衍生的蛋白质 (即, 经修饰的蛋白) 保持相应的未修饰的蛋白质的融合和感染性质。一旦鉴定了这样的经修饰的包膜蛋白, 就测试其免疫抑制作用并与未修饰的蛋白质的免疫抑制作用比较。

[0656] 4- 经修饰的 HERV-W 的研究

[0657] 一个困难在于, 之前的修饰 TM 亚基的氨基酸组成的尝试已导致 SU-TM 的缔合丧失和已改变了感染性。例如, MPMV 免疫抑制结构域的亮氨酸 30 至苏氨酸 40 的缺失完全消除了包膜蛋白的感染性 (Brody 等人, 1992 J Virol 66, 3466-3475; Brody 等人, 1994 Virology 202, 673-683)。

[0658] 尽管这些不成功的尝试, 本发明者研究了 ISU 结构域的氨基酸组成和其可能的对该结构域的结构的影响, 并获得了在体内观察到的参与免疫抑制性质的所述 ISU 结构域的新定义。他们还确定, 蛋白质的氨基酸序列中的一些位置和这些位置上的氨基酸残基的性质一起对免疫抑制作用是至关重要的。

[0659] 本发明者特别地在非免疫抑制性包膜蛋白, 即 HERV-W Env 蛋白的氨基酸序列中设计一些修饰, 例如通过用相应的 MPMV 的残基替代确定的残基, 以使其具有免疫抑制性。

[0660] a. 感染性质

[0661] HERV-W 包膜的 A36G 和 T47I 替代不修饰包膜蛋白的感染度、促融合性和免疫抑制作用 (表 1)。这两个氨基酸似乎不是这些功能的决定子。相反地, R44Q 或 F50A 替代强烈地改变包膜蛋白的感染和融合性质 (表 1, 和图 6, 第 2 和 3 行)。

[0662] 构建包含 R44Q 和 F50A 替代的双突变体。令人惊奇地, 该双突变体保持与野生型多肽相似的融合和感染性质 (表 1 和图 6, 第 4 行)。

[0663] 该结果和使用在 MoMLV 的包膜中发现的一些同源位置进行的该经修饰的包膜蛋白的设计 (图 8) 表明, 由于这两个氨基酸在包膜蛋白的 TM 亚基的结构中的各自位置和其性质的原因, 它们相互之间可发生相互作用。该可能的相互作用可解释该成对突变的补偿性行为。这是未预料到的, 因为以前的尝试没有鉴定出这样的氨基酸。

[0664] b. 免疫抑制性质

[0665] 另一个结果, 和上述的一样令人惊奇, 产生于免疫抑制作用的研究。事实上, 虽然以肿瘤的大小来看, 野生型 HERV-W 包膜蛋白不是免疫抑制性的, 但 HERV-W 的双突变体比野生型 MPMV 包膜蛋白更具有免疫抑制性 (表 1 和图 7, 白色条形)。

[0666] 此外, 本发明者还鉴定了序列中的两个氨基酸位置, 其中一个在以前没有作为 ISU 结构域的形成部分被报道过 (位置 50), 经显示, 这两个氨基酸位置一起参与调节 HERV-W 包膜蛋白的免疫抑制作用。

[0667] 表 1: 获得的关于经修饰的 HERV-W 包膜蛋白的融合、感染和免疫抑制性质的结果。

[0668]

突变体	融合性	感染性	免疫抑制性
-----	-----	-----	-------

野生型	$55.0 \pm 3.7\%$	800 ± 200	-0.30 ± 0.06
R44Q	$32.5 \pm 1.3\%$	< 10	-0.12 ± 0.30
F50A	$5.6 \pm 3.0\%$	< 10	-0.16 ± 0.14
R44Q+F50A	$53.0 \pm 2.8\%$	947 ± 542	0.61 ± 0.10
A36G	$54.5 \pm 4.5\%$	3950 ± 2250	-0.02 ± 0.01
T47I	$50.5 \pm 1.2\%$	300 ± 80	-0.25 ± 0.04
阴性对照	$3.2 \pm 1.2\%$	< 10	0.00 ± 0.00

[0669] 5- 经修饰的逆转录病毒包膜蛋白的研究

[0670] 为确认这样的事实,即这些氨基酸残基属于免疫抑制的决定子,筛选在位置 44(E 或 Q) 和 50(F) 处包含相似氨基酸的其他逆转录病毒。已鉴定了这些逆转录病毒中的几个,并将其公开于图 9 中:莫洛尼鼠类白血病病毒 (MoMLV)、弗罗德病毒、猫白血病病毒 (FeLV)、1 型人 T- 细胞嗜淋巴细胞性病毒 (HTLV-1) 和 1 型猿猴 T- 细胞嗜淋巴细胞性病毒 (STLV-1)。

[0671] 在其中的两个,MPMV 和 MoMLV 病毒中,氨基酸残基 44 和 50 被在 HERV-W 中发现的相应氨基酸替代。制备下列构建体:E44R、A50F 和 E44R/A50F (MoMLV),以及 Q44R、A50F 和 Q44R/A50F (MPMV)。

[0672] a. 感染性质

[0673] 有趣地,在 MoMLV 中,单一突变体丧失了其感染性(表 2 和图 6,第 6 和第 7 行),而双突变体具有和野生型蛋白质相同的性质(表 2 和图 6,第 8 行)。

[0674] 在 MPMV 中,在突变体和野生型之间观察到稍微不同,但只有双突变体表现出和野生型蛋白质严格一致的性质(表 3 和图 6,第 10 至 12 行)。

[0675] b. 免疫抑制性质

[0676] 在 MoMLV 中,具有 E44R 替代的蛋白质或双突变体 (E44R+A50F) 在体内都具有降低的其免疫抑制性质(表 2)。

[0677] 在 MPMV 中,具有 Q44R 替代的蛋白质或双突变体 (Q44R+A50F) 在体内都具有降低的其免疫抑制性质(表 3)。

[0678] 表 2:获得的关于经修饰的 MoMLV 包膜蛋白 (MoMLV 不具有促融合性) 的感染和免疫抑制性质的结果。

[0679]

突变体	感染性	免疫抑制性
wt	$4.59 \pm 1.97 \cdot 10^5$	0.60 ± 0.20
E44R	$6.97 \pm 3.98 \cdot 10^4$	0.03 ± 0.01

A50F	$< 10^1$	n/d
E44R+A50F	$4.34 \pm 2.11 \cdot 10^5$	0.00 ± 0.01
阴性对照	$< 10^1$	-0.00 ± 0.00

[0680] n/d :未确定的

[0681] 表 3 :获得的关于经修饰的 MPMV 包膜蛋白的融合、感染和免疫抑制性质的结果。

[0682]

突变体	融合性	感染性	免疫抑制性
wt	$47.8 \pm 3.0\%$	$3.3 \pm 0.4 \cdot 10^4$	0.45 ± 0.09
Q44R	$29.8 \pm 6.4\%$	$3.6 \pm 0.5 \cdot 10^3$	-0.32 ± 0.12
A50F	$37.2 \pm 5.9\%$	$8.9 \pm 2.7 \cdot 10^3$	0.01 ± 0.01
Q44R+A50F	$52.6 \pm 3.4\%$	$2.8 \pm 1.0 \cdot 10^4$	-0.27 ± 0.06
阴性对照	$5.1 \pm 2.2\%$	$< 10^1$	0.00 ± 0.00

[0683] 总之,所有这些结果使得可以得出下列结论:

[0684] 第一,单一突变似乎足以修饰逆转录病毒免疫抑制包膜蛋白的免疫抑制性质。事实上,用精氨酸替代位置 44 处的谷氨酰胺或谷氨酸降低了突变体的免疫抑制行为。然而,融合和感染性质,即使没有被消除,也被强烈地降低了(MPMV)。

[0685] 第二,当和相应的野生型包膜蛋白相比时,双突变体(在位置 44 和 50 处)具有降低的免疫抑制性质。有趣地,MPMV 双突变体具有和野生型蛋白质一样有效的融合性质,和高感染性质。这样的蛋白质在生产病毒颗粒和活疫苗中的重要性是很有前景的。

[0686] 实施例 2

[0687] 方法

[0688] 小鼠和细胞系:

[0689] 从 Janvier(Laval,France) 获得的 10 周龄的 Swiss 小鼠(允许 FV 的)。将细胞系 293T(ATCC CRL11268)、HeLa(ATCC CCL2)、NIH/3T3(ATCC CRL-1658)和 MCA205(REF)培养在补充有 10%胎牛血清、链霉素($100 \mu\text{g/ml}$)和青霉素($100 \text{ 单位}/\text{ml}$)的 DMEM 中。

[0690] 构建:

[0691] 使用质粒 p57(Oliff 等人, J Viro1 33,475-86(1980))和 pET28(+)(Novagen)。

[0692] 与构建 phCMV-envMPMV(实施例 1)的方法一样,使用作为 PCR 模板的 p57 和引物 16 和 17 来构建 phCMV-envFV。通过将两种 PCR 产物(第一种用 ClaI 消化,第二种用 AvrII 消化)插入 ClaI/AvrII 打开的载体来构建突变型衍生物。使用针对 E14R 突变(对应于全长 ENV 的 E561R 突变)的磷酸化的引物对 1-2 和 3-4、针对 A20F 突变(对应于全长 ENV 的 A567F 突变)的引物对 1-5 和 3-6 以及针对 E14R+A20F 突变的引物对 1-2 和 4-6 来产生这些片段。通过将 phCMV-envFV 的 AgeI/MluI 片段插入用相同的酶消化的 pDFG-MoTMTag 中

来构建 pDFG-envFV 和其突变型衍生物。通过将双突变体 phCMV-envFV 的 BstZ11I/BsmI 片段插入用相同的酶消化的 p57 中来构建双突变体 p57。

[0693] 通过将用作为模板的 phCMV-envFV 和引物对 7-8 产生的、并用 NcoI 和 XhoI 消化的 PCR 片段插入用相同酶消化的 pET28(+)-b 中,来构建 FV 包膜蛋白的 SU 亚基的细菌表达载体。

[0694] 通过将用作为模板的野生型或双突变型 phCMV-envFV 和引物对 7-8 或 9-10 产生的、并用 NcoI 和 XhoI 消化的 PCR 片段插入用相同酶消化的 pET28(+)-b 中,来构建 FV 包膜蛋白的 SU 亚基和 TM 亚基的细菌表达载体。

[0695]	序列	SEQ ID
[0696]	1 CAACCTTACCAACCCTGATAAACTCAAGA	SEQ ID NO :131
[0697]	2 CAGTCCTCCTCTTTTATAGGAACAACAGGTCTAGGC	SEQ ID NO :132
[0698]	3 TGTGCTGCCCTAAAAGAAGAATGTTGTT	SEQ ID NO :133
[0699]	4 GGACTAAAGCCTGGACTACTGAGATCCTG	SEQ ID NO :134
[0700]	5 CAGTCCTCCTCTTTTATAGGAACAACAGGT	SEQ ID NO :135
[0701]	6 TGTGCTTTCCTAAAAGAAGAATGTTGTTTCTAT	SEQ ID NO :136
[0702]	7 ATACATCCATGGCGTGTTCAACGCTCCCAAAATCCCCTA	SEQ ID NO :137
[0703]	8 ATACATCTCGAGTTCTCTTTTATGTCTATAGGATTTTCAAAC	SEQ ID NO :138
[0704]	9 ATACATCCATGGCTGCCGTACAAGATGATCTCA	SEQ ID NO :140
[0705]	10 ATACATCTCGAGATCTCTTACTAGGCCTGTATGGTCAGC	SEQ ID NO :141

[0706] 病毒的产生、定量和灭活:

[0707] 使用磷酸钙转染试剂盒 (Invitrogen),用 4 μ g p57 DNA 转染 7.5×10^5 293T 细胞。48 小时后,在 4 μ g/mL Polybrene 存在的情况下使用细胞上清液感染 5×10^5 NIH/3T3 细胞,将感染的细胞再培养 4 天。从细胞上清液中收集病毒颗粒,通过超速离心进行浓缩,在 PBS 中重悬浮,和冷冻。通过在 30 分钟的时间内将 PBS 中的病毒悬浮液暴露于 0.5mW/cm² UV 光来进行灭活。

[0708] 免疫抑制测定法:用包膜基因表达载体或空载体转导 MCA205 细胞,并将其移植入同种异体小鼠中,在所述小鼠中其产生短暂的肿瘤,如实施例 1 中所述。将免疫抑制指数计算为 $(A_{env} - A_{无}) / A_{无}$,其中 A_{env} 和 $A_{无}$ 分别是用表达包膜基因和空盒的细胞获得的平均肿瘤面积。

[0709] 细胞-细胞融合和感染性测定法:

[0710] 如实施例 1 中所述,使用 phCMV-envFV 和它们的突变型衍生物作为包膜表达载体进行细胞-细胞融合和感染性测定法。

[0711] 病毒载量测定法:

[0712] 使用 RNAeasy microkit (QIAGEN) 从 2 μ l 浓缩的病毒或 20 μ l 细胞上清液或血清中提取 RNA,使用 MoMuLV 反转录试剂盒 (Applied) 和随机六核苷酸序列作为引物对所述 RNA 进行逆转录,使用 PlatinumSYBR Green qPCR 试剂盒 (Invitrogen) 以及引物 CTCAGGGAGCAGCGGGA (SEQ ID NO :142) 和 TAGCTTAAGTCTGTTCCAGGCAGTG (SEQ ID NO :143) 通过实时 PCR 对 cDNA 进行定量。

[0713] 重组蛋白:

[0714] 使用 pET28(+)-b(Novagen) 作为表达载体在 BL21 (DE3) 大肠杆菌 (E. coli) 细胞 (Stratagene) 中产生重组蛋白。SU 亚基以内含体的形式产生,野生型和突变型 TM 亚基以可溶性的物质产生。按照厂商说明书在 HiTrap Chelating HP 柱 (Amersham) 上纯化它们。在 Superdex75HR10/30 柱 (Amersham) 上进一步纯化 TM 亚基以分离主要的三聚体形式,它们的 LPS 含量使用 LAL QCL-1000 试剂盒 (Cambrex) 进行定量,并通过加入大肠杆菌 LPS (株系 0111:B4, Sigma) 调整至 5 μ g/mg 蛋白。

[0715] 小鼠免疫:

[0716] 用 100 μ g 重组 TM 亚基或 1.5×10^{10} RNA 拷贝的完整的或经 UV 灭活的 FV 病毒颗粒注射小鼠三次,每隔一周一次。全身性地添加 100 μ g CpG (硫代磷酸酯寡核苷酸 TCCATGACGTTCTGACGTT (SEQ ID NO:144)) 作为佐剂。在最后一次免疫后 4 天收集血清。用 10^6 RNA 拷贝的野生型 FV 攻击用灭活的病毒颗粒免疫的小鼠,5 天后收集攻击后的血清。

[0717] 免疫学 FV 检测:

[0718] 使用 pET28(+)-b(Novagen) 作为表达载体在 BL21 (DE3) 大肠杆菌细胞 (Stratagene) 中以内含体的形式产生重组 SU 亚基,按照厂商说明书在 HiTrap Chelating HP 柱 (Amersham) 上进行纯化,并以 2 μ g/ml 的浓度用于包被 MaxiSorp 微量培养板 (Nunc)。使用缀合至 HRP 的抗小鼠 IgG 抗体 (Amersham) 和作为显色剂的 OPD (Sigma) 对系列稀释的血清中的 IgG 水平进行定量。

[0719] 结果

[0720] 1. 包膜蛋白诱导的免疫抑制的丧失导致感染性逆转录病毒的完全免疫排斥:

[0721] 实施例 1 中显示了基因的、双突变产生的免疫抑制与感染性之间的脱离,这种脱离展现了这样的可能性,即产生丧失其包膜蛋白的免疫抑制活性但仍保持复制能力和感染性的完整逆转录病毒。

[0722] 选择弗罗德白血病病毒 (FV) 作为模型,因为小鼠基因组不包含能够影响该病毒的体内检测的相关内源性逆转录病毒。

[0723] FV 包膜的关键性残基被合胞素 -1 (Syncytin-1) 的残基取代 (HERV-W ENV),对于 MPMV 包膜,检测到双突变 E14R+A20F (其相应于全长 ENV 的 E561R+A567F 突变) 逆转了免疫抑制性而未改变感染性 (图 11A 和 11B)。在 FV 分子克隆 57 中野生型包膜基因被其非免疫抑制性突变体替代,和在体外产生各类型的逆转录病毒颗粒。如通过细胞上清液中病毒 RNA 的定量 RT-PCR 测定法所测量的,病毒产量相似。

[0724] 如所预期的,在体外感染测定法中,在 NIH/3T3 细胞中两种病毒类型都显示相同的繁殖动力学 (图 11C),当其被体内注射入经 5 戈瑞辐射的、无免疫能力的小鼠中时也是类似的 (图 12A)。

[0725] 在正常的小鼠中,在初级感染期 (primo-infection phase) (在病毒注射后第 7 天,图 12A-12B) 期间,野生型 FV 首先在所有小鼠中产生高度病毒血症。该时期过后,形成了持久性感染,小鼠能够以各种程度控制病毒复制,如用非同类系的、远交的小鼠所预期的。4 个月后,80% 的经感染的小鼠显示了红白血病综合征,血细胞比容水平低于 35%。

[0726] 相反地,早在甚至注射非常高剂量的病毒拷贝 (10^6 RNA 拷贝, 10^2 ID₅₀) 后 14 天,也没有检测到突变的非免疫抵制性 FV 具有任何病理学迹象。值得注意的是,在用野生型 FV 感染的小鼠中持久地检测到针对 FV 包膜蛋白的 IgG,但在用双突变型 FV 感染的小鼠中只是

短暂地检测到该 IgG (图 13), 这表明突变的病毒被完全清除。

[0727] 总之, 本实验证明, 包膜驱动的免疫抑制对 FV 感染是必需的, 因为其缺乏可导致对进入的病毒的完全免疫排斥。

[0728] 2. 免疫抑制阴性重组包膜蛋白和灭活的病毒颗粒的增加的免疫原性:

[0729] 作为病毒进入靶细胞的关键性元件, 每种疫苗制剂以重组蛋白、以其片段或以由缺陷型病毒载体携带的基因的形式系统性地包含逆转录病毒包膜蛋白。人们可能怀疑包膜蛋白介导的免疫抑制会抑制被引发以抵抗包含 ISU 的免疫原的应答, 从而降低其疫苗功效。

[0730] 为检验该假说, 产生两种类型的包含 ISU 的免疫原: 1) 相应于野生型或突变型 FV 包膜蛋白的胞外域的重组蛋白, 该重组蛋白在大肠杆菌中以可溶的 (从而正确折叠) 三聚体形式产生, 其在纯化时展现一致的行为; 2) 野生型和突变型 FV 颗粒, 所述颗粒是完整的或经暴露于 UV 光而灭活的, 以保持其包膜蛋白的天然结构。将这些免疫原以三次注射入 Swiss 小鼠中以产生强的再次体液应答。

[0731] 如图 14A 中所图示说明的, 只有突变型非免疫抑制性包膜蛋白产生这样的具有高 IgG 水平的应答。在每一种情况下, 从用野生型或突变型 TM 亚基包被的平板获得的信号经定量检测是相同的, 表明小鼠血清中的抗-TM 抗体不是优先地针对 ISU 自身的, 而是针对 TM 亚基内的其他表位的。

[0732] 因此, 引入 FV 包膜蛋白的双突变不将其 ISU 转变为高效的表位。此外, 由野生型包膜蛋白产生的 IgM 水平远比由其非免疫抑制性突变型对应物 (counterpart) 产生的水平高。这些结果表明, FV 包膜蛋白的免疫抑制结构域直接抑制免疫系统, 和表明该作用不要求病毒进入靶细胞和在靶细胞中复制, 甚至也不需要除了单独的 TM 亚基外的任何其他病毒组分。

[0733] 图 14B 用 MoMLV ENV 和 HERV-W ENV 进一步确认了这些结果。几乎没有引发抗 MoMLV ENV 的野生型重组 TM 亚基的 IgG 应答, 而非免疫抑制性双突变体 (参见实施例 1) 显示强 IgG 应答。此外, 如所预期的, 看到了抗天然地缺乏免疫抑制活性的 HERV-W ENV 的 TM 亚基的 IgG 应答, 而免疫抑制性双突变体 (参见实施例 1) 只引发轻微的 IgG 应答。

[0734] 3. 包膜蛋白诱导的免疫抑制的丧失提高了灭活的病毒颗粒的疫苗功效:

[0735] 人们可能会猜想, 该 ISU 的抗原性抑制作用可能降低包含免疫抑制性包膜蛋白的任何疫苗制剂的功效, 从而, 特异性的、双突变诱导的该作用的破坏可能提高疫苗的功效。

[0736] 为检验该假说, 用完整的野生型 FV 攻击用野生型和双突变型灭活的病毒颗粒或用完整的双突变型病毒颗粒免疫的小鼠。然后在攻击后 5 天, 在峰值病毒血症测定血清病毒载量 (图 15)。

[0737] 在所有用野生型灭活的 FV 免疫的小鼠中可检测到病毒, 然而其几何平均病毒载量比只用佐剂免疫的对照小鼠低 50 倍, 这表明用野生型颗粒进行的免疫提供了显著但不完全的保护作用。相反地, 用灭活的非免疫抑制性双突变型 FV 免疫的 14 只小鼠中的 6 只的病毒载量低于该测定法的检测阈值, 并且与只用佐剂免疫的小鼠相比, 几何平均病毒载量减少了 7500 倍。此外, 用完整的非免疫抑制性双突变型 FV 免疫的 14 只小鼠中的 12 只的病毒载量低于检测阈值, 并且几何平均病毒载量也低于检测阈值。

[0738] 这些结果显示, 通过保持包膜蛋白的规范功能从而保持其结构的突变来破坏免疫

抑制提高了基于这样的蛋白质的疫苗制剂的功效。

[0739] 实施例 3

[0740] 方法

[0741] 小鼠和细胞系：

[0742] 从 Janvier (France) 获得 8-12 周龄的 C57BL/6 和 SCID 小鼠。将 B16 (C57BL/6 来源的鼠黑色素瘤细胞系, EACC 94042254) 和 293T (人胚胎肾细胞, ATCC CRL11268) 培养在补充有 10% 热失活的胎牛血清和抗生素的 DMEM 中。

[0743] 构建：

[0744] 构建从 plncx (Miller 和 Rosman, Biotechniques 1989 ;7 :989-90) 和 pSUPER (Brummelkamp 等人, Science 2002 ;296 :550-3) 载体衍生的 plncxH1 表达载体, 以产生针对 Me1ARV (被靶向 gag 序列内的基因组转录物 ;从起始密码子开始, nt 位置 1220-1238)、或针对作为对照的绿色荧光蛋白转录物 (从起始密码子开始, nt 位置 215-233) 的短转录物。通过首先将退火的 64- 聚体寡核苷酸 (图 1B 中的序列) 插入在 BglIII 和 HindIII 位点被打开的 pSUPER 中, 然后将来自这些构建体的 BamHI-HindIII 片段引入至在对应位点打开的 plncx 中来获得它们。使用在包膜 5' - 末端的包含 AgeI 的引物和包膜 3' - 末端的包含 XhoI 的引物产生 RT-PCR 产物, 通过将所述 RT-PCR 产物引入 (或不引入) 在相同位点被打开的包含潮霉素的 pDFG 载体 (Mangeney 和 Heidmann, Proc Natl Acad Sci USA 1998 ;95 :14920-14925) 来构建用于 Me1ARV 包膜蛋白 (pDFG Me1ARVenv) 和对照 (pDFG 无) 的表达载体。

[0745] ERV^{KD} B16 肿瘤细胞的建立：

[0746] 用 plncxH1 载体 (1.75 μ g) 和 MLV 蛋白的表达载体 (对于兼嗜性 MLV 包膜载体为 0.55 μ g, 和对于 MLV gag 和 pol 载体为 1.75 μ g, 参见, Blaise 等人, J Virol 2004 ;78 :1050-1054) 共转染 7.5×10^5 293T 细胞。转染后 36 小时, 收集病毒上清液以感染 B16 肿瘤细胞 (2.5ml 上清液含 5×10^5 个细胞, 用 8 μ g/ml 的 Polybrene)。将细胞在选择性培养基 (1mg/ml 新霉素) 中维持 3 周。在一些实验中, 使用相同的方案另外将 pDFG Me1ARVenv 表达载体 (或对照, pDFG 无) 导入细胞, 并用 300 单位 /ml 的潮霉素选择感染的细胞。

[0747] Me1ARV 蛋白的表达：

[0748] 通过 Western 印迹分析进行 Me1ARV 表达的分析。收集 10^7 个细胞的上清液, 在 100xg 下离心 10 分钟, 过滤并通过在 SW41 Beckman rotor 中超速离心 (150,000xg, 1 小时, 4°C) 进行浓缩。在裂解缓冲液中重悬浮沉淀, 将其接受 SDS-PAGE, 用抗 -Env mAb (Ciancolo 等人, J Exp Med 1984 ;159 :964-969) 和抗 -Gag 山羊血清 (Viromed Biosafety Labs) 进行印迹反应和显示。

[0749] 体外转化测定法：

[0750] 将对照 -B16 细胞和 ERV^{KD}-B16 细胞都涂布在软琼脂上以测定无贴壁依赖性生长的效率。将细胞 (2×10^3 或 2×10^4) 涂布在 5ml 的 0.33% 在 DMEM (具有 10% 的胎牛血清) 中的琼脂之中, 所述 0.33% 在 DMEM 中的琼脂覆盖在 0.5% 在 DMEM (补充有 10% 的胎牛血清) 中的琼脂的固体层上。维持培养物 4 周, 用 INT 溶液 (Sigma-Aldrich) 对集落进行染色, 然后计数。

[0751] 体内肿瘤进程：

[0752] 为进行体内测定法,用 PBS 洗涤肿瘤细胞 3 次,刮取细胞而不用胰蛋白酶进行消化,经皮下接种于小鼠的右肋腹的经剃修的区域。通过触诊确定肿瘤的形成,和通过测量垂直肿瘤直径来确定肿瘤面积。

[0753] 同系 C57BL/6 小鼠中的 CD4⁺CD25⁺T 细胞纯化和过继转移:

[0754] 从 17 天前移植了 2×10^5 B16 细胞的 C57BL/6 小鼠的脾脏新鲜分离出 CD4⁺CD25⁺ 细胞。按照厂商说明书,使用 MACS 磁珠(小鼠调节 T 细胞分离试剂盒,Miltenyi Biotech)通过阴性和阳性选择的两步骤法纯化细胞。将 5 万个纯化的淋巴细胞以静脉内的方式转移入首次用于实验的(naive)C57BL/6 小鼠中。在同一天用 2×10^5 个对照-B16 细胞或 ERV^{KD}-B16 细胞在右肋腹中攻击受者小鼠。

[0755] 结果

[0756] 1. 基因抑制 ERV 不修饰 B16 黑色素瘤细胞的转化表型。

[0757] 基于产生短双链 RNA(dsRNA) 的稳定载体进行 RNA 干扰法,所述短双链 RNA 针对 Me1ARV 元件的病毒基因组和作为对照的无关 GFP 基因。在图 16A-16B 中图解说明了该方法的原理和所用的质粒的结构。图 16C 清楚地显示,ERV 特异性 dsRNA 载体在经转导的 B16 细胞(ERV^{KD}B16 细胞)中几乎完全消除了 ERV 的表达,与转导了对照的细胞(对照 B16 细胞)相比,Env 和 Gag 病毒蛋白的量有 > 10 倍的减少。作为下一步骤,在体外和体内对 ERV^{KD} 和对照 B16 细胞的转化表型进行测定。在体外,在涂布在半固体培养基(软琼脂测定法)上后,测量无贴壁依赖性生长率。如图 17A 中所图解说明的,ERV^{KD} B16 细胞系产生与对照 B16 细胞相似数目的集落。在体内,在移植入经 X 射线辐射的小鼠或 SCID 小鼠后,分析两个细胞群体的生长速率。如图 17B 中所图解说明的,两个细胞群体都具有转化表型,具有相似的生长速率。总之,这些结果显示,基因抑制 Me1ARV 内源性逆转录病毒对黑色素瘤细胞的转化状态没有影响。

[0758] 2. 基因抑制 ERV 可抑制 B16 肿瘤细胞的体内生长和增加具有免疫能力的宿主的存活率。

[0759] 为考察肿瘤细胞是否可在体内通过 ERV 依赖性机制压制抗肿瘤应答,本发明者通过用对照和 ERV^{KD} B16 细胞注射 C57BL/6 具有免疫能力的小鼠来研究 Me1ARV 的基因抑制对肿瘤进程的影响。如图 18A 中所图解说明的,如所预期的,对照 B16 细胞的生长在绝大多数动物中导致大肿瘤,而 ERV^{KD} B16 细胞产生有限大小的肿瘤并且只在少数的移植小鼠中产生。动物存活的程度也清楚地验证了肿瘤细胞生长上的差异(图 18B):刚到第 70 天就有 90% 的移植了对照 B16 细胞的小鼠被其肿瘤杀死,而 80% 的移植了 ERV^{KD} B16 细胞的小鼠仍然存活并且无肿瘤(在第 130 天仍如此)。为了鉴定参与观察到的效应的 Me1ARV 基因,将单独 Me1ARV env 基因的表达载体(缺少被 dsRNA 靶向的序列)导回入 ERV^{KD} B16 细胞中。然后将所得的双转导的 ERV^{KD}+env(或对照)B16 细胞移植入 C57BL/6 小鼠。如图 18C 中所图解说明的,这导致了基因抑制效应的部分逆转,到第 70 天时已有 50% 的移植了表达 Env 的细胞的小鼠死亡。该逆转表明,env 基因至少部分地负责肿瘤免疫逃避。逆转的部分效应很可能这样来解释,即当由外源载体来表达时,Env 蛋白的表达较低(图 19)。

[0760] 顺着该线索,有趣的是,使用被靶向 Me1ARV 的合成的 siRNA 进行第一系列实验,所述合成的 siRNA 在移植 B16 细胞后 12 天经腹膜内注射入小鼠中,这一系列实验实际上导致与用对照 siRNA 注射的小鼠相比出现 1/3 的肿瘤生长抑制(图 20A),和如在补充的图 20B

中所图解说明的,导致存活延长上的可重复的增加。

[0761] 本数据证明,通过表达 ERV 的包膜,肿瘤能够压制免疫系统,和阻断 ERV 的表达导致增强的肿瘤排斥。

[0762] 值得注意的是,在人中,可在几种肿瘤类型例如精原细胞瘤和黑色素瘤中观察到 ERV env 基因的表达,其在正常组织中主要局限于胎盘和睾丸。已显示,这样的 HERV ENV 蛋白具有免疫抑制性。因此,抑制这些 ENV 蛋白的表达或活性是增强抗表达 ENV 的肿瘤的免疫应答的有前景的方法。可例如通过由预防性或治疗性免疫接种引发的免疫应答或通过直接结合肿瘤 ENV 蛋白的化合物来进行这样的肿瘤 ENV 蛋白的活性的抑制,所述免疫接种是用本发明的其免疫抑制活性被消除的经突变的 ENV 蛋白来进行的。

phCMV-envMoMLV → 图解图谱

DNA 序列 5859 bp GGGGCGCTCTA ... TCCACCGCGG 环状

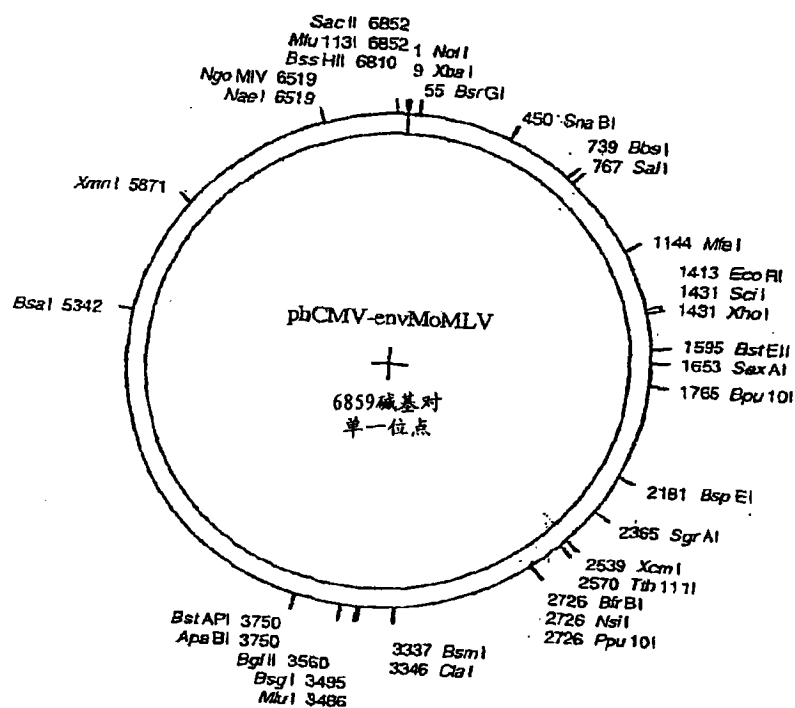


图 1A

pDFG-envMoMLV-iresHygro -> 图解图谱

DNA 序列 11787 bp GGATTAGTCCAA ... ACCGGATCCGCG 环状

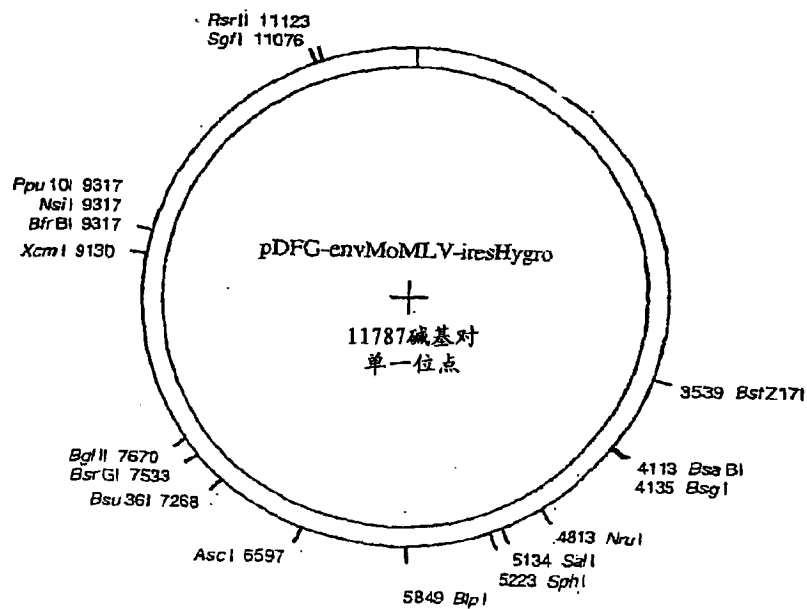


图 1B

phCMV-envMPMV -> 图解图谱

DNA 序列 6589 bp GCGGCGCGTCTA ... TCCACCGCGGTC 环状

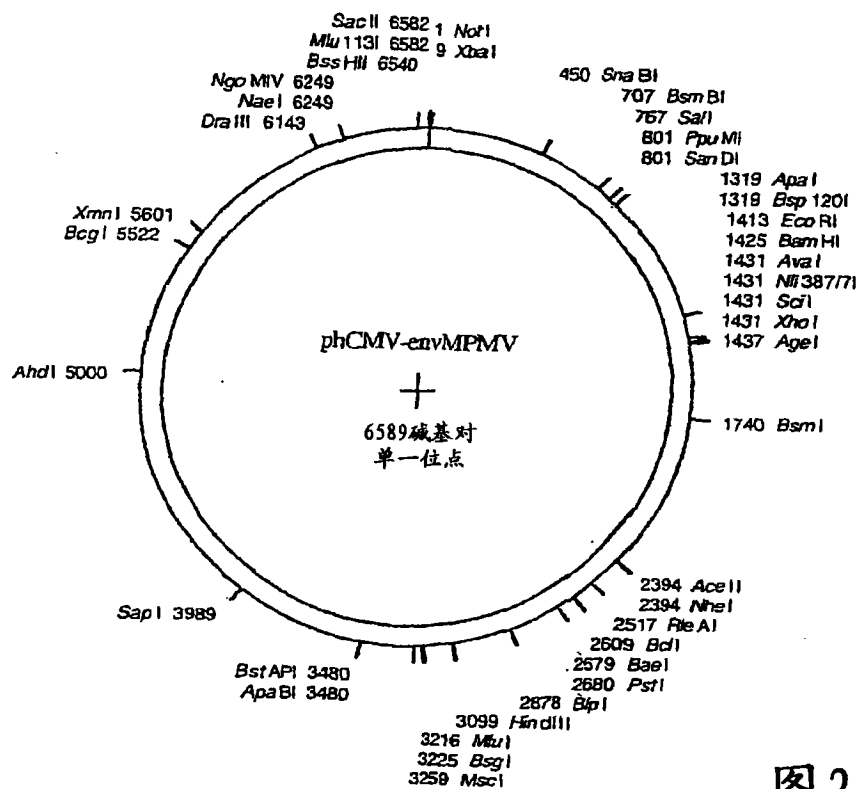


图 2A

pDFG-envMPMV-iresHygro -> 图解图谱

DNA 序列 11293 bp GCATCCGCGGA ... GGAGACAATACC 环状

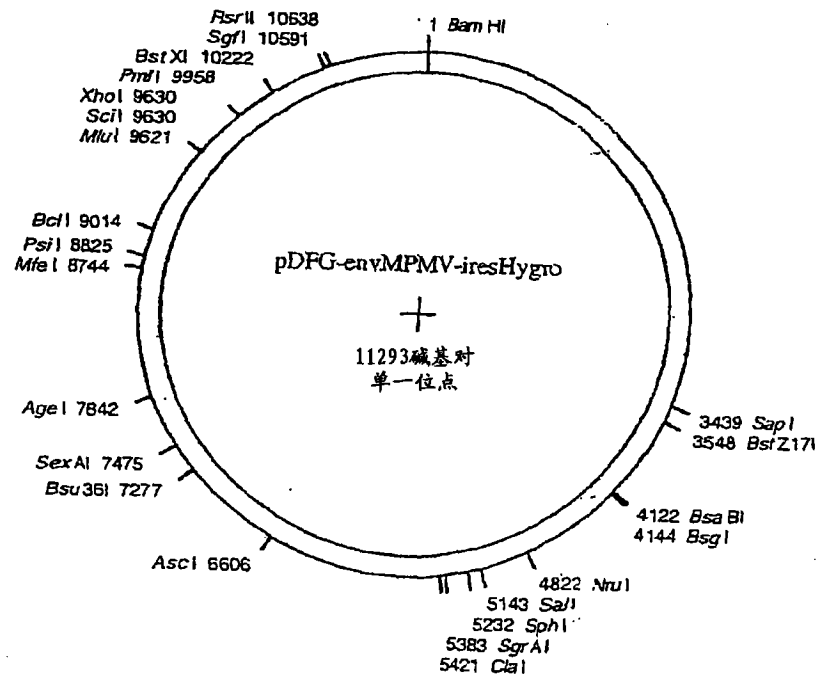


图 2B

phCMV-EnvW -> 图解图谱

DNA 序列 6570 bp GCGGCGGCTCTA ... TCCACGGCGGTG 环状

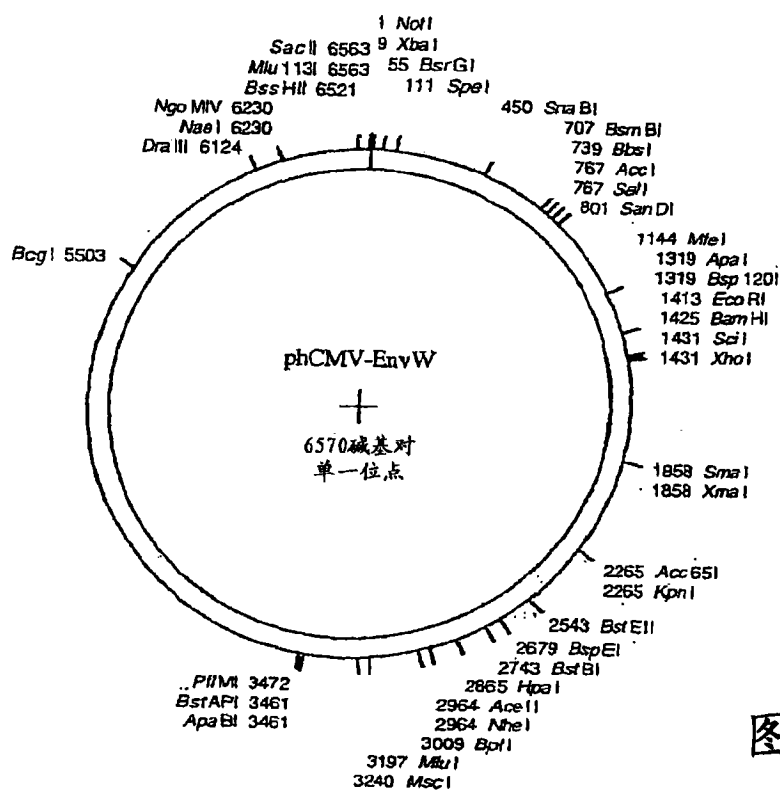


图 3A

pDFG-envW-iresHygro → 图解图谱

DNA 序列 11363 bp GGATCCGCGGGA ... GGAGACAATACC 环状

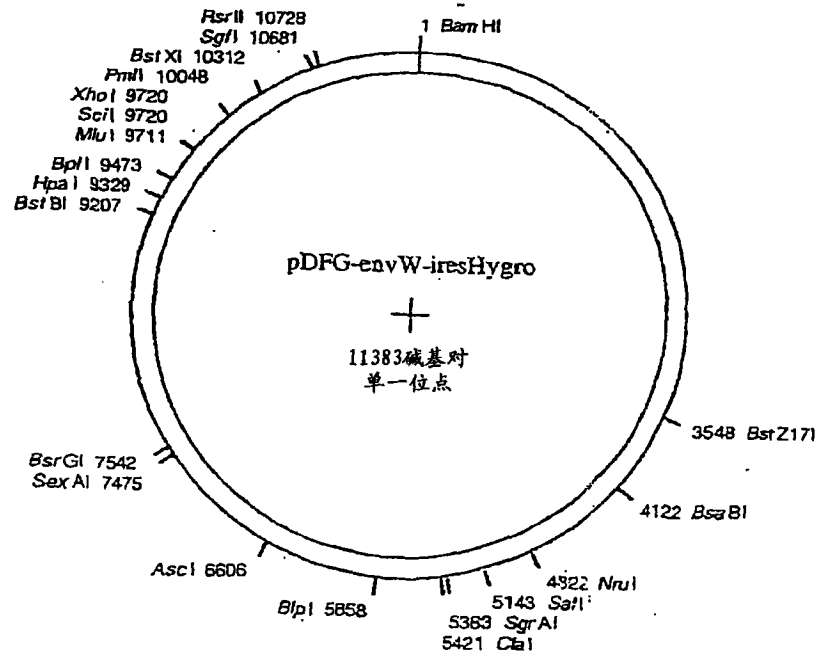


图 3B

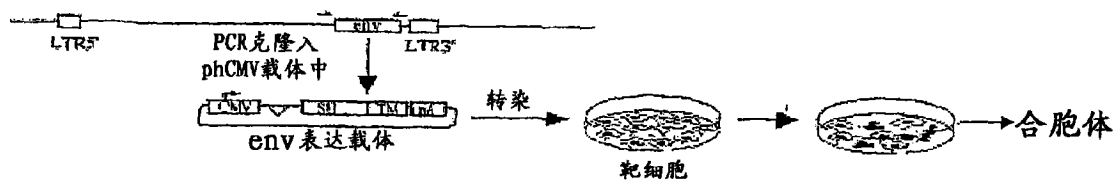


图 4

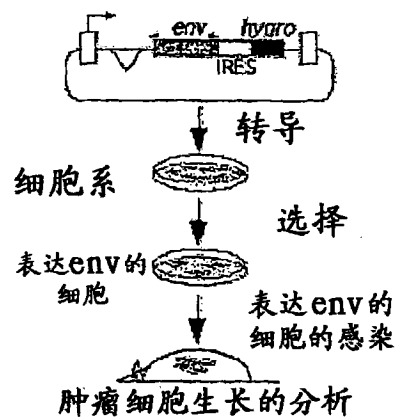


图 5

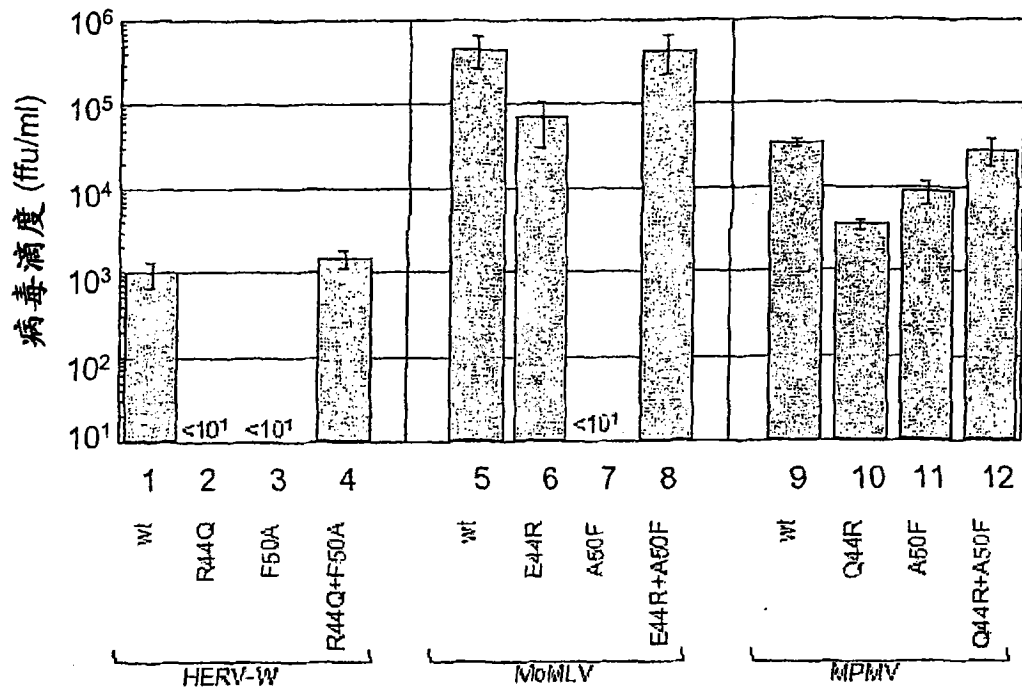


图 6

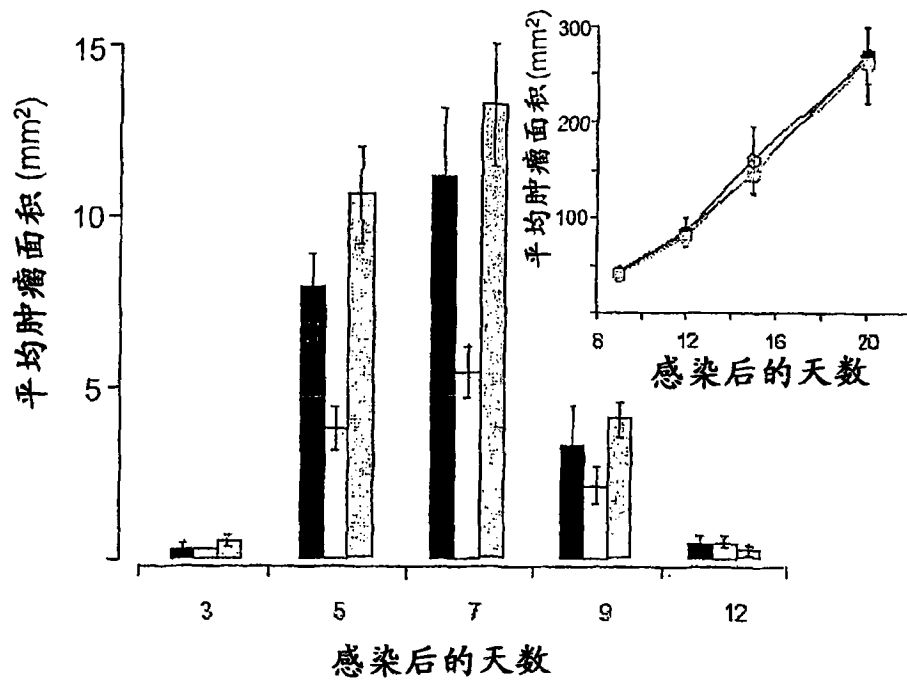


图 7

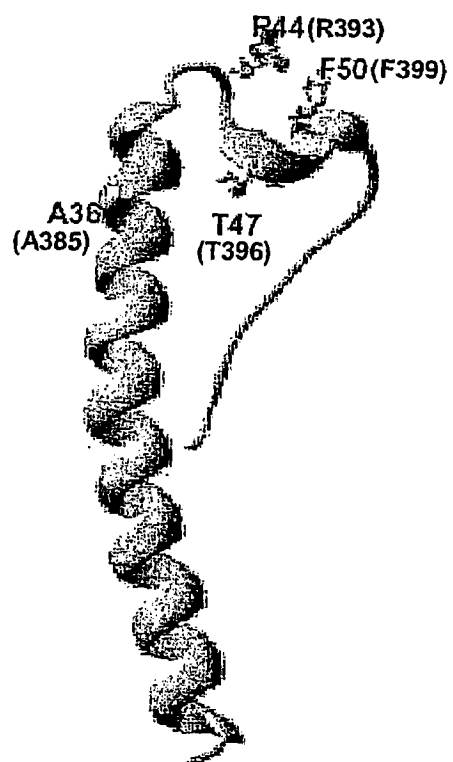


图 8

名称	来源	核苷酸序列	登录号
HERV-T	人内源性	LQNCRCIDLLFLSQGGLCAA	AC 078 899
HTLV-1	人逆转录病毒	AQNRRLDILLFWEQGGLCCKA	AY 324 800
STLV-1	猿猴逆转录病毒	AQNRRLDILLFWEQGGLCCKA	AY 324 800
HERV-FRD	人内源性	LQNRRLDMLTAAQGGGLCLA	AL 136 139
MPMV	人逆转录病毒	LQNRRLDILLTAEQGGICLA	AF 033 815
Fowlpox	痘病毒	LQNRRLDILLTAEQGGICLA	NC 002 188
MoMLV	人逆转录病毒	LQNRRLDILLFLKEGGLCCKA	AF 033 811
Friend	人逆转录病毒	LQNRRLDILLFLKEGGLCCKA	M 90 673
PyERV	蟒蛇内源性	LQNRRLDILLFLKEGGLCCKA	AF 500 297
PERV	猪内源性	LQNRRLDILLFLKEGGLCCKA	AY 364 236
FelV	猫白血病毒	LQNRRLDILLFLQEGGLCAA	M 18248
SSAV	猿猴肉瘤相关病毒	LQNRRLDILLFLKEGGLCCKA	J 02396
GLV-X	长臂猿白血病毒X	LQNRRLDILLFLKEGGLCCKA	U 60065
EBOLA	线状病毒	ILNRKAIDFLLQRWGGTCHI	EVU 31033
Marburg	线状病毒	LINRHAIDFLLTRWGGTCKV	MVIRPR
HERV-W	人内源性	LQNRRLDILLTAEQGGTCLF	AF 072 503
HERV-W	人内源性	LQNRRLDILLTAKRGGTCLF	
HERV-W	人内源性	LQNRRLDILLIAKRGGTCVF	
HERV-H1	人内源性	LQNRRLDILLTAEKGGLCIF	AJ 289 709
HERV-F(c)1	人内源性	MQNRRLDILLTADKGGTCMF	AL 354 685
HERV-F(c)2	人内源性	AQNRQALDILLMAEKGRITCLF	AC 016 222

图9

图10

A. 编码env MoMLV的核苷酸序列

ATGGCGCGTTCAACGCTCTCAAAACCCCTTAAAAATAAGGTTAACCCGCG
AGGCCCCCTAATCCCCTTAATTCTTCTGATGCTCAGAGGGGTGAGTACTG
CTTCGCCCCGGCTCCAGTCCTCATCAAGTCTATAATATCACCTGGGAGGTA
ACCAATGGAGATCGGGAGACGGTATGGGCAACTTCTGGCAACCACCCTCT
GTGGACCTGGTGGCCTGACCTTACCCAGATTTATGTATGTTAGCCCACC
ATGGACCATCTTATTGGGGGCTAGAATATCAATCCCCTTTTTCTTCTCCC
CCGGGGCCCCCTTGTTGCTCAGGGGGCAGCAGCCCAGGCTGTTCCAGAGA
CTGCGAAGAACCCTTTAACCTCCCTCACCCCTCGGTGCAACACTGCCTGGA
ACAGACTCAAGCTAGACCAGACAACCTCATAAATCAAATGAGGGATTTTAT
GTTTGCCCCGGGCCCCACCGCCCCCGAGAATCCAAGTCATGTGGGGGTCC
AGACTCCTTCTACTGTGCCTATTGGGGCTGTGAGACAACCGGTAGAGCTT
ACTGGAAGCCCTCCTCATCATGGGATTTTCATCAGAGTAAACAACAATCTC
ACCTCTGACCAGGCTGTCCAGGTATGCAAAGATAATAAGTGGTGCAACCC
CTTAGTTATTTCGGTTTACAGACGCCGGGAGACGGGTACTTCTTGACCA
CAGGACATTACTGGGGCTTACGTTTGTATGTCTCCGGACAAGATCCAGGG
CTTACATTTGGGATCCGACTCAGATACCAAATCTAGGACCCCGCGTCCC
AATAGGGCCAAACCCCGTTCTGGCAGACCAACAGCCACTCTCCAAGCCCA
AACCTGTTAAGTCGCCTTCAGTCACCAAACCACCCAGTGGGACTCCTCTC
TCCCCTACCCAACCTCCACCGGCGGGAACGGAAAATAGGCTGCTAAACTT
AGTAGACGGAGCCTACCAAGCCCTCAACCTCACCAGTCCTGACAAAACCC
AAGAGTGCTGGTTGTGTCTAGTAGCGGACCCCCCTACTACGAAGGGGTT
GCCGTCCTGGGTACCTACTCCAACCATACTCTGCTCCAGCCAACCTGCTC
CGTGGCCTCCCAACACAAGTTGACCCTGTCCGAAGTGACCGGACAGGGAC
TCTGCATAGGAGCAGTTCCCAAAACACATCAGGCCCTATGTAATACCACC
CAGACAAGCAGTCGAGGGTCTATTATCTAGTTGCCCCTACAGGTACCAT
GTGGGCTTGTAGTACCGGGCTTACTCCATGCATCTCCACCACCATACTGA
ACCTTACCACTGATTATTGTGTTCTTGTGCAACTCTGGCCAAGAGTCACC
TATCATTCCCCCAGCTATGTTTACGGCCTGTTTGAGAGATCCAACCGACA
CAAAAGAGAACCGGTGTGTTAACCTGGCCCTATTATTGGGTGGACTAA
CCATGGGGGGAATTGCCGCTGGAATAGGAACAGGGACTACTGCTCTAATG
GCCACTCAGCAATTCAGCAGCTCCAAGCCGAGTACAGGATGATCTCAG
GGAGGTTGAAAAATCAATCTCTAACCTAGAAAAGTCTCTCACTTCCCTGT
CTGAAGTTGTCTACAGAATCGAAGGGGCTAGACTTGTTATTTCTAAAA
GAAGGAGGGCTGTGTGCTGCTCTAAAAGAAGAATGTTGCTTCTATGCGGA
CCACACAGGACTAGTGAGAGACAGCATGGCCAAATTGAGAGAGAGGCTTA
ATCAGAGACAGAACTGTTTGAGTCAACTCAAGGATGGTTTGAGGGACTG
TTTAACAGATCCCCTTGGTTTACCACCTTGATATCTACCATTATGGGACC
CCTCATTTGACTCCTAATGATTTTGCTCTTCGGACCCTGCATTCTTAATC
GATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTT
TTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAG

B. env MoMLV的蛋白质序列

MARSTLSKPLKNKVNPRGPLIPLILLMLRGVSTASPGSSPHQVYNITWEV
TNGDRETVWATSGNHPLWTWWPDLTPDLCMLAHHGPSYWGLEYQSPFSSP
PGPPCCSGGSSPGCSRDC EEPLTSLTPRCNTAWNRLKLDQTHKSNEGFY

VCPGPHRPRESKSCGGPDSFYCAYWGCETTGRAYWKPSSSWDFITVNNNL
TSDQAVQVCKDNKWCNPLVIRFTDAGRRVTSWTTGHWGLRLYVSGQDPG
LTFGIRLRYQNLGPRVPIGPNVLADQQPLSKPKPVKSPSVTKPPSGTPL
SPTQLPPAGTENRLLNLVDGAYQALNLTSPDKTQECWLCVLVAGPPYYEGV
AVLGTYSNHTSAPANCSVASQHKLTLEVTGQGLCIGAVPKTHQALCNTT
QTSSRGSYYLVAPTGTMWACSTGLTPCISTTILNLTDDYCVLVELWPRVT
YHSPSYVYGLFERSNRHKREPVSLTLALLLGGGLTMGGIAAGIGTGTTALM
ATQQFQQLQAAVQDDLREVEKSI SNLEKSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLK
EGGLCAALKEECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLNQRQKLFESTQGWFEGL
FNRSPWF T T L I S T I M G P L I V L I M I L L F G P C I L N R L V Q F V K D R I S V V Q A L V
LTQQYHQLKPIEYEP*

C. 编码 env MPMV 的核苷酸序列

ATGAACTTCAATTATCATTTTCATCTGGAGCTTAGTGATACTATCTCAAAT
ATCTCAAAGTTCAAGCCGGTTTTTGGAGATCCGCGTGAAGCCCTGGCAGAAA
TACAACAAAAACATGGTAAACCTTGTGACTGTGCTGGAGGATATGTTTCC
TCCCCACCGATTAACTCTCTTACAACCTGTTTCTTGCTCTACTCATACTGC
TTATTACAGTGACAACTCCCTAAAATGGCAGTGTGTGTCAACTCCACTA
CCCCTAGCAATACACATATAGGAAGTTGTCCCGGTGAATGCAACACGATC
TCATATGATTCTGTACATGCCTCTTGCTATAACCACTATCAACAATGTAA
CATTGGTAATAAAACATATCTCACTGCCACTATAACTGGAGATAGAATC
CTGCCATTGGTGACGGGAATGTCCCTACAGTACTAGGGACTAGTCACAAC
CTCATTACAGCAGGCTGTCCCAATGGTAAAAAGGGCCAAGTGGTCTGTTG
GAATAGCCGACCTTCTGTTTATATCTGATGGAGGAGGGCCTCAAGATA
AGGCCCGCGACATTATAGTAAATAAAAAAGTTTGAGGAATTGCACAGGTCG
CTGTTCCCGAACTTTCTTACCATCCTCTGGCCTTGCCCCGAAGCCCGTGG
TAAAGAAAAAATTGACGCACACACTCTTGATCTCCTTGCCACTGTACATA
GTTTACTCAATGCTTCCCAACCCAGTTTAGCCGAAGATTGCTGGCTGTGC
TTACAGTCAGGAGATCCCGTTCCTCTTGCCCTGCCCTATAATGATACACT
CTGCTCTAACTTTGCCTGTTTATCTAATCACTCCTGCCCTTTAACCECCC
CTTTTTTAGTACAGCCCTTTAACTTCACTGATTCCAATTGCCTTTACGCT
CATTATCAAAACAACTCATTGACATAGATGTAGGTCTAGCTAGCTTTAC
TAATTGCTCTAGCTATTATAACGTTTCTACAGCCTCCAAACCCTCTAATT
CCCTATGCGCCCCAAACAGCTCGGTTTTTGTATGCGGTAACAATAAGGCA
TACACTTATCTACCCACAAATTGGACGGGAAGTTGTGTACTTGCTACTCT
TTTGCCCGATATAGACATCATTCAGGTAGTGAGCCTGTCCCCATTCCAG
CTATTGATCATTTTTTTAGGCCAAAGCCAAAAGAGCAATCCAATTATCCCC
CTGTTTCGTAGGGTTAGGTATAACTACTGCAGTATCTACTGGGGCTGCTGG
TCTAGGGGTTTCCATCACTCAATATACAAAATTATCTCATCAACTAATAT
CAGATGTTCAAGCTATTTCTAGCACTATACAGATCTCCAAGATCAGGTA
GACTCTCTAGCAGAAGTAGTACTGCAAAACAGAAGAGGATTAGATCTACT
TACAGCAGAGCAGGGAGGTATCTGCTTAGCCTTACAGGAAAAATGTTGTT
TCTACGCCAATAAATCTGGAATCGTCAGAGACAAGATTAAAAACCTACAA
GACGACTTAGAAAGACGCCGAAGACAACTGATCGACAACCCATTTTGGAC
CAGTTTTTCATGGATTCCCTCCCTTATGTTATGCCCTATTAGGCCCTTTGC
TTTGCTTATTGCTTGTGTTATCTTTCCGTCCAATTATTTTCAACAAGCTT
ATGACCTTTATTAAACATCAAATTGAGAGCATCCAGGCCAAACCTATACA
AGTCCATTATCATCGCCTTGAACAAGAAGACAGTGGTGGCTCATATTTGA
CCTTAACATAG

D. env MPMV的蛋白质序列

MNFNYHFIWSLVILSQISQVQAGFGDPREALAEIQQKHGKPCDCAGGYVS
SPPINSLTTVSCSTHTAYSVINSLKWQCVSTPTTPSNTHIGSCPGECONTI
SYDSVHASCYNHYYQQCNIGNKTYLTATITGDRTPAIGDGNVPTVLGTSHN
LITAGCPNGKKQVVCWNSRPSVHISDGGGPQDKARDII VNKKFEEELHRS
LFPELSYHPLALPEARKEKIDAHTLDLLATVHSLNLNASQPSLAEDCWLC
LQSGDPVPLALPYNDTLCNFACLSNHSCPLTPPFLVQPFNFTDSNCLYA
HYQNSFDIDVGLASFNTCSYYNVSTASKPSNSLCAPNSSVFVCGNNKA
YTYLPTNWTGSCVLATLLPDIDII PGSEPVPIPAIDHFLGKAKRAIQILIP
LFVGLGITTA VSTGAAGLGV SITQYTKLSHQLISDVQAISSTIQDLQDQV
DSLAEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQEKCCFYANKSGIVRDKIKNLQ
DDLERRRRQLIDNPFWTSFHGFLPYVMPLLGPLLCLLLVL SFGPIIFNKL
MTFIKHQIESIQAKPIQVHYHRLQEEDSGGSYLTLT*

E. 编码 env HERV-W (env W) 的核苷酸序列

ATGGCCCTCCCTTATCATATTTTTCTCTTTACTGTTCTTTTACCCCTCTTT
CACTCTCACTGCACCCCTCCATGCCGCTGTATGACCAGTAGCTCCCTT
ACCAAGAGTTTCTATGGAGAATGCAGCGTCCCGGAAATATTGATGCCCA
TCGTATAGGAGTCTTTCTAAGGGAACCCACCTTCACTGCCACACCCA
TATGCCCCGCAACTGCTATCACTCTGCCACTCTTTGCATGCATGCAAATA
CTCATTATTGGACAGGAAAAATGATTAATCCTAGTTGTCCTGGAGGACTT
GGAGTCACTGTCTGTTGGACTTACTTCACCCAACTGGTATGTCTGATGG
GGGTGGAGTTCAAGATCAGGCAAGAGAAAAACATGTAAAAGAAGTAATCT
CCCAACTCACCCGGGTACATGGCACCTCTAGCCCCTACAAAGGACTAGAT
CTCTCAAAACTACATGAAACCCTCCGTACCCATACTCGCCTGGTAAGCCT
ATTTAATACCACCCTCACTGGGCTCCATGAGGTCTCGGCCCAAACCCCTA
CTAACTGTTGGATATGCCTCCCCCTGAACTTCAGGCCATATGTTTCAATC
CCTGTACCTGAACAATGGAACAACCTTCAGCACAGAAATAAACACCACTTC
CGTTTTAGTAGGACCTCTTGTTCCTCAATCTGGAAATAACCCATACCTCAA
ACCTCACCTGTGTAAATTTAGCAATACTACATACACAACCAACTCCCAA
TGCATCAGGTGGGTAACTCCTCCACACAAATAGTCTGCCTACCCTCAGG
AATATTTTTTGTCTGTGGTACCTCAGCCTATCGTTGTTTGAATGGCTCTT
CAGAATCTATGTGCTTCTCTCATTTCTTAGTGCCCCCTATGACCATCTAC
ACTGAACAAGATTTATACAGTTATGTCATATCTAAGCCCCGCAACAAAAG
AGTACCCATTCTTCCCTTTTGTATAGGAGCAGGAGTGCTAGGTGCACTAG
GTACTGGCATTGGCGGTATCACACCTCTACTCAGTTCTACTACAAACTA
TCTCAAGAACTAAATGGGGACATGGAACGGGTGCGCGACTCCCTGGTCAC
CTTGCAAGATCAACTTAACTCCCTAGCAGCAGTAGTCCTTCAAATCGAA
GAGCTTTAGACTTGCTAACCGCTGAAAGAGGGGAACCTGTTTATTTTAA
GGGGAAGAATGCTGTTATTTATGTTAATCAATCCGGAATCGTCACTGAGAA
AGTTAAAGAAATTCGAGATCGAATACAACGTAGAGCAGAGGAGCTTCGAA
ACACTGGACCCTGGGGCCTCCTCAGCCAATGGATGCCCTGGATTCTCCCC
TTCTTAGGACCTCTAGCAGCTATAATATTGCTACTCTCTTTGGACCCTG
TATCTTTAACCTCCTTGTTAACTTTGTCTCTTCCAGAATCGAAGCTGTAA
AACTACAAATGGAGCCCAAGATGCAGTCCAAGACTAAGATCTACCGCAGA
CCCCTGGACCGGCCTGCTAGCCACGATCTGATGTTAATGACATCAAAGG
CACCCCTCCTGAGGAAATCTCAGCTGCACAACCTCTACTACGCCCAATT

CAGCAGGAAGCAGTTAG

F. env HERV-W (env W) 的蛋白质序列

MALPYHIFLFTVLLPSFTLTAPPPCRCMTSSSPYQEFLLWRMQRPGNIDAP
SYRSLSKGTPTFTAHTHMPRNCYHSATLCMHANTHYWTGKMINPSCPGGL
GVTVCWTYFTQTGMSDGGGVQDQAREKHVKEVISQLTRVHGTSSPYKGLD
LSKLHETLRTHTRLVSLFNTTTLTGLHEVSAQNPTNCWICLPLNFRPYVSI
PVPEQWNNFSTEINTTSVLVGPLVSNLEITHTSNLTCVKFSNTTYTTNSQ
CIRWVTPPTQIVCLPSGIFVFCGTSAYRCLNGSSSESMCFLSFLVPPMTIY
TEQDLYSYVISKPRNKRVPILPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYKL
SQELNGDMERVADSLVTLQDQLNSLAADVVLQNRRLDLLTAERGGTCLFL
GEECCYYVNQSGIVTEKVKEIRDRIQRRAEELRNTGPWGLLSQWMPWILP
FLGPLAAIILLLLFGPCIFNLLVNFVSSRIEAVKLQMEPKMQSKTKIYRR
PLDRPASPRSDVNDIKGTPPEEISAAQPLLRPNASAGSS*

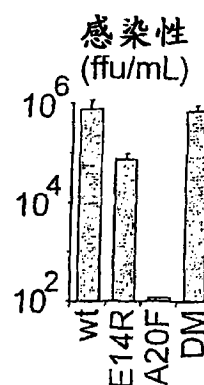


图 11A

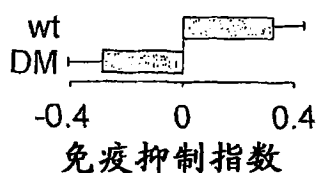


图 11B

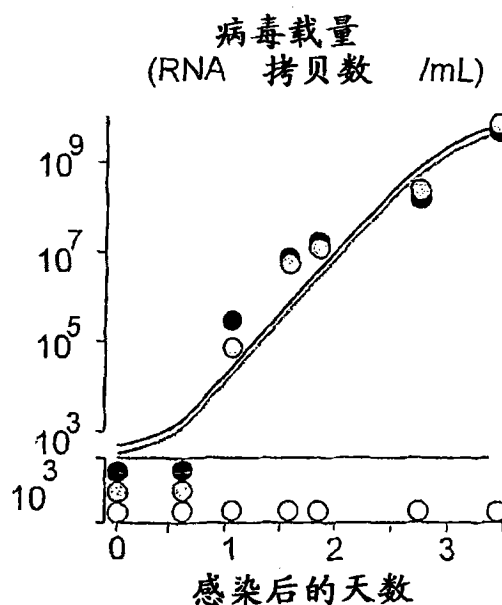


图 11C

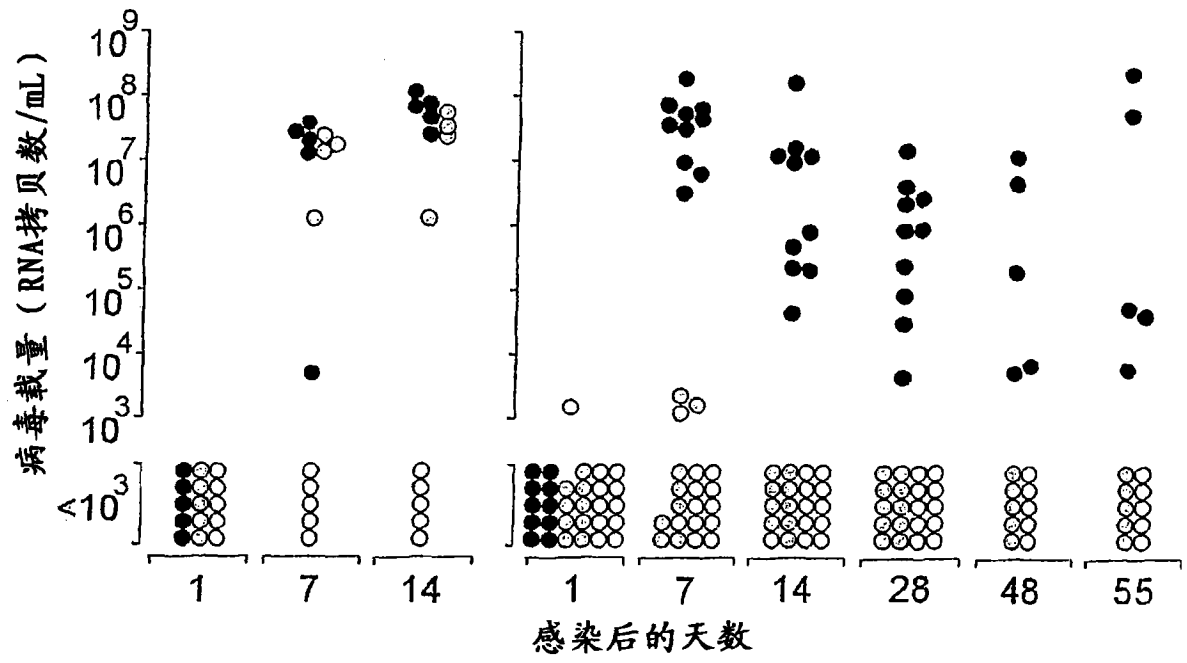


图 12A

图 12B

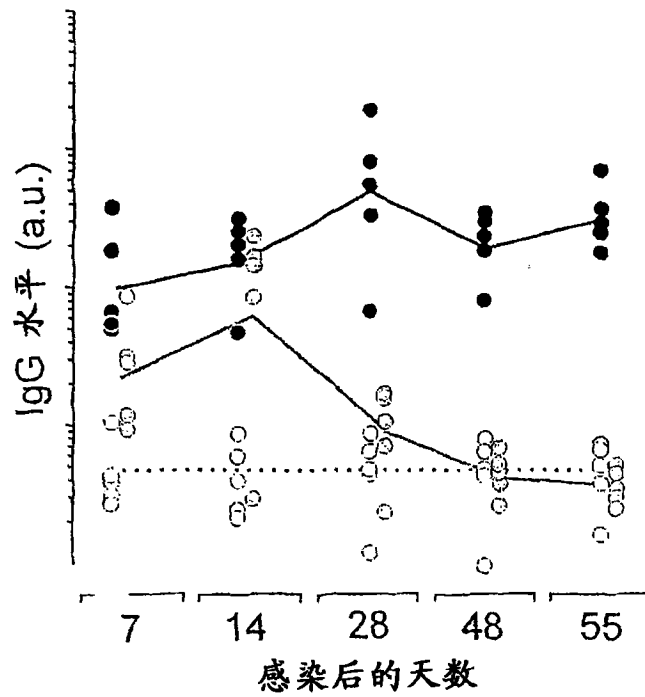


图 13

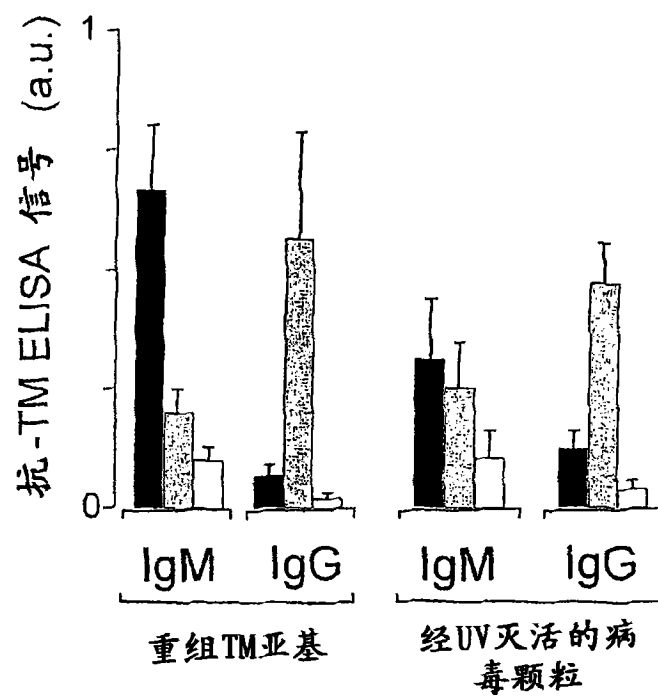


图 14A

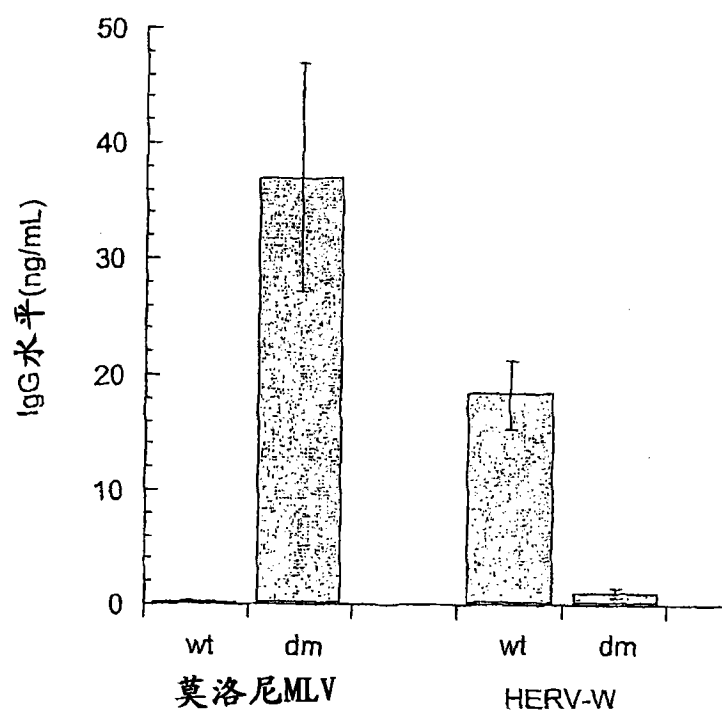


图 14B

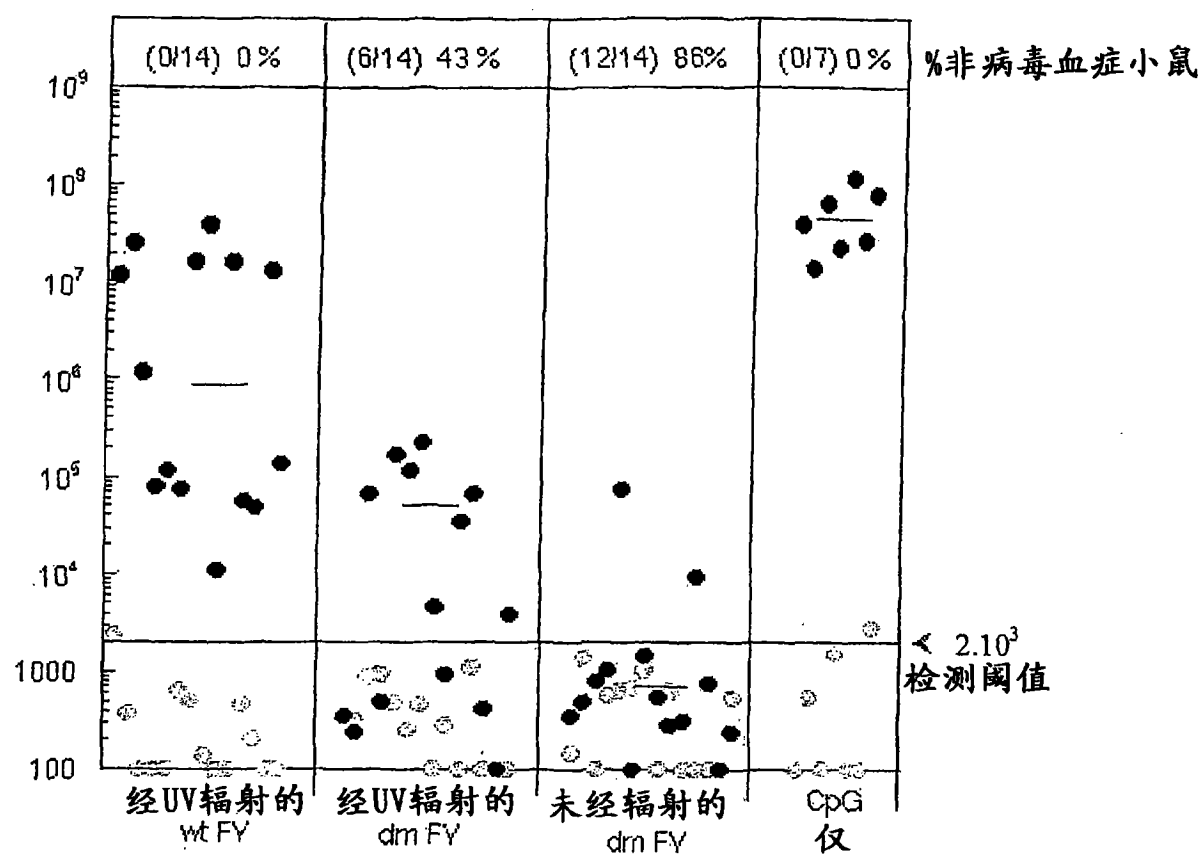


图 15

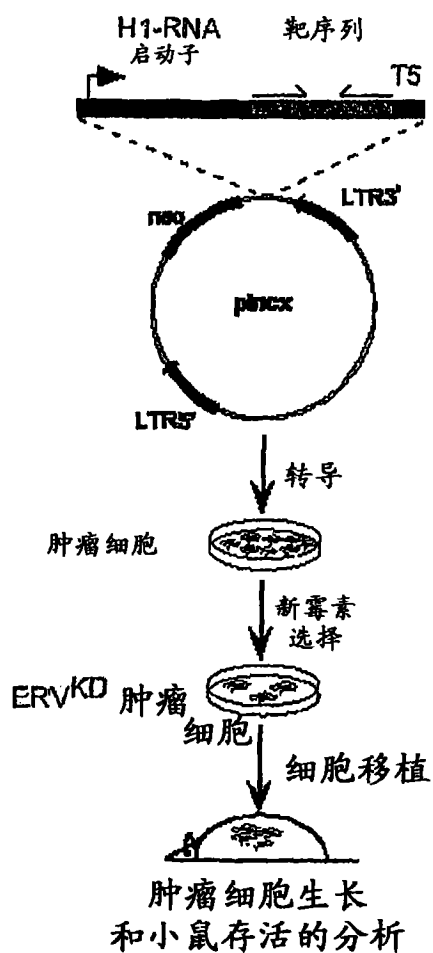


图 16A

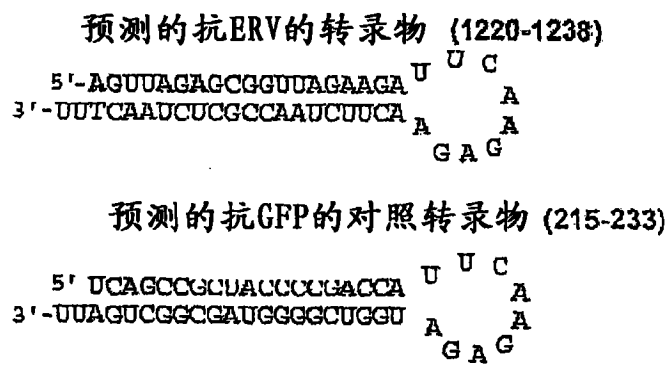


图 16B

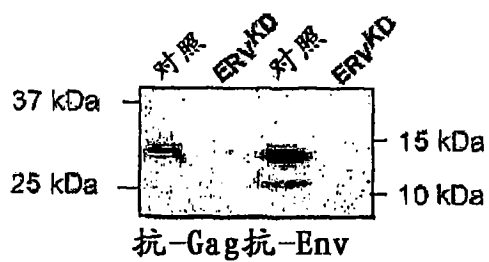


图 16C

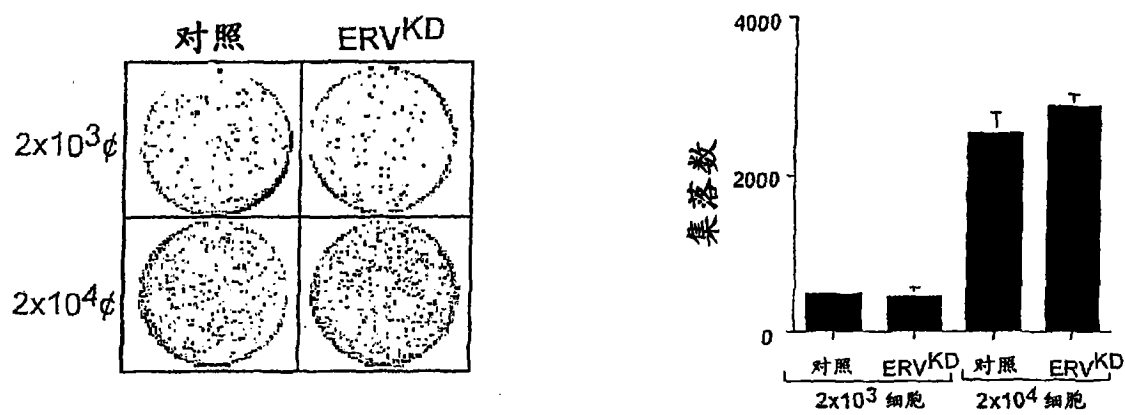


图 17A

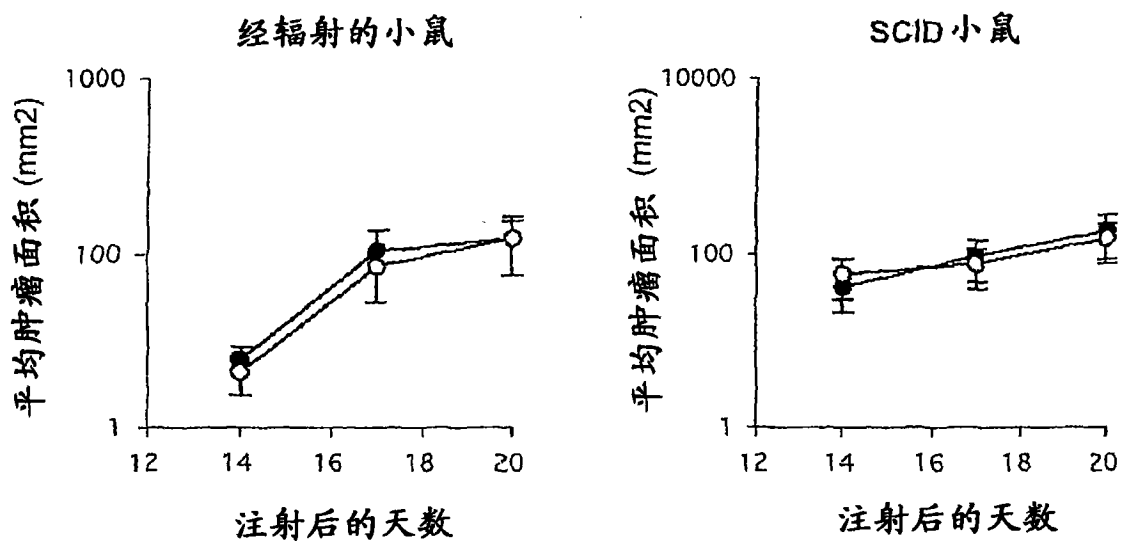


图 17B

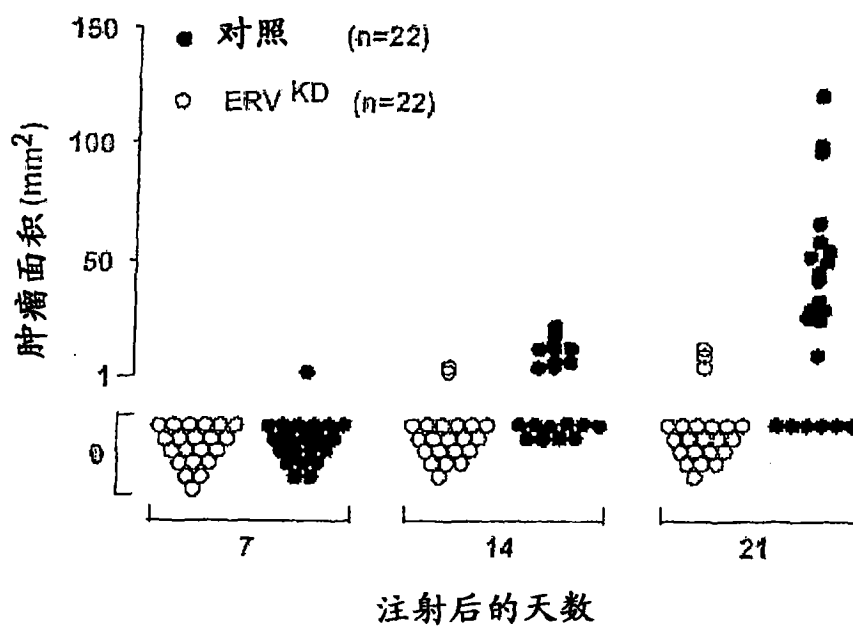


图 18A

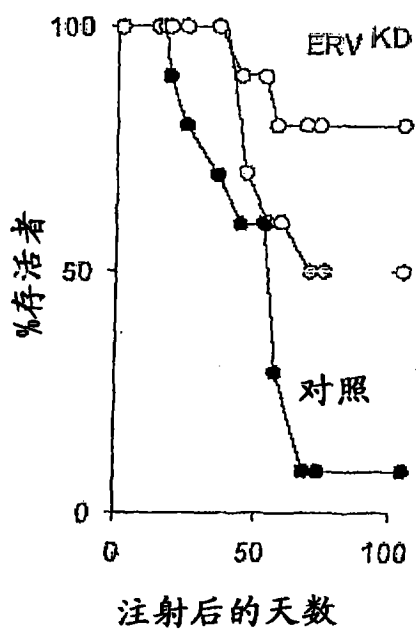


图 18B

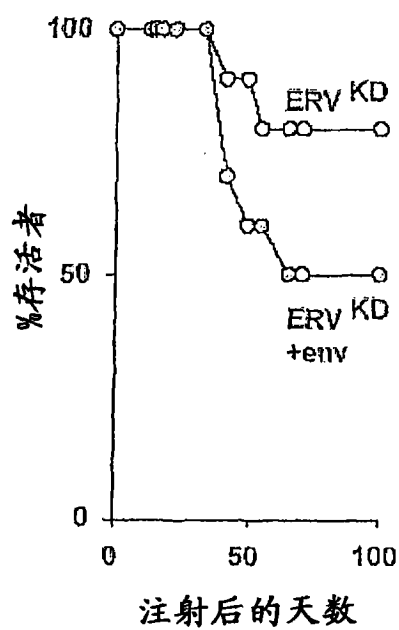


图 18C

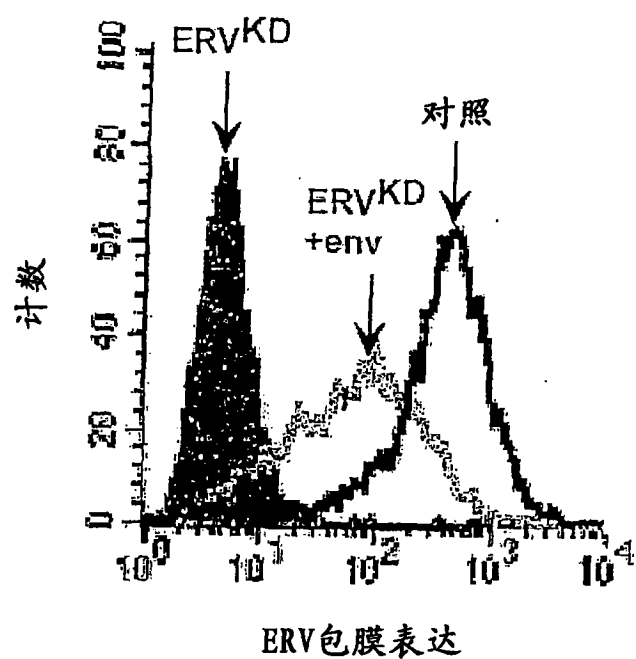


图 19

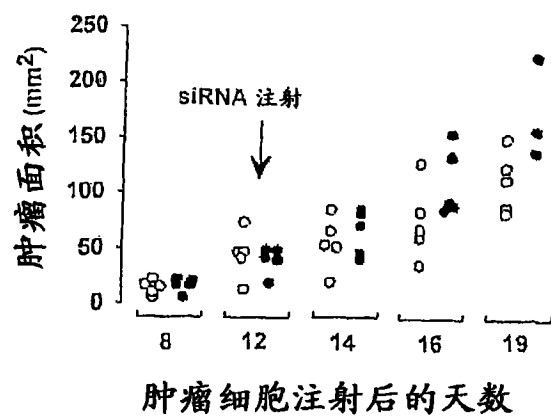


图 20A

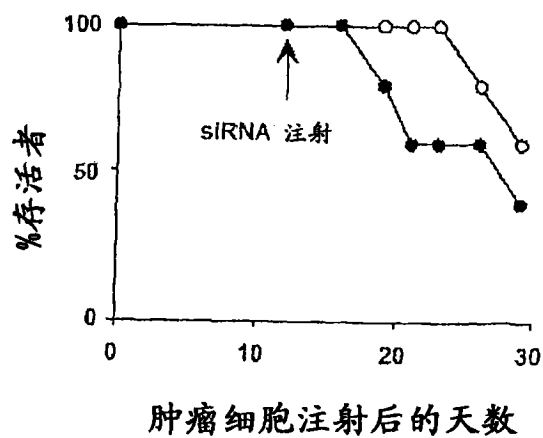


图 20B