201726165

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201726165 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：106101305 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 01 月 13 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/145 (2006.01)* *C12N15/44 (2006.01)*
C12N15/861 (2006.01)

(30)優先權：2016/01/15 美國 62/279,267
2016/02/12 美國 62/294,840

(71)申請人：依圖比克斯公司 (美國) ETUBICS CORPORATION (US)
美國

(72)發明人：瓊斯 法蘭克R JONES, FRANK R. (US) ；布蘭特 約瑟夫 BALINT, JOSEPH (US) ；蓋比許 伊莉莎白 GABITSCH, ELIZABETH (US) ；賴奇曼 依維特 LATCHMAN, YVETTE (US) ；萊斯 雅卓安 RICE, ADRIAN (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：11 共 77 頁

(54)名稱

用於流感疫苗接種之方法及組合物

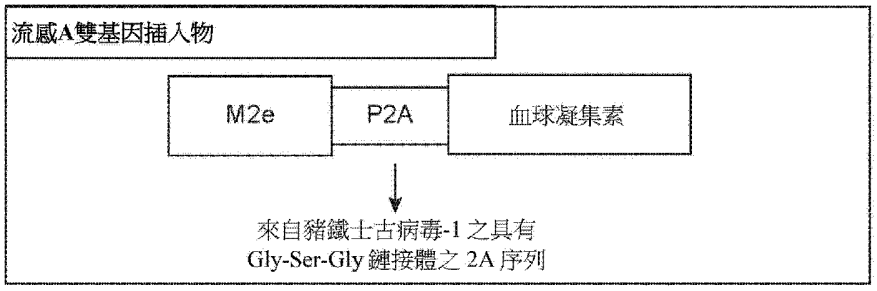
METHODS AND COMPOSITIONS FOR INFLUENZA VACCINATION

(57)摘要

本發明闡述用於構築及產生基於重組腺病毒之載體疫苗之方法，該載體疫苗含有多個流感抗原基因用於產生針對 A 及 B 型流感病毒之廣譜免疫反應且允許在對腺病毒具有既存免疫性之個體中進行多次疫苗接種。

Methods for constructing and producing a recombinant adenovirus based vector vaccine containing multiple influenza antigen genes for use in generating broad based immune responses against influenza A and B viruses and that allows for multiple vaccinations in individuals with preexisting immunity to adenovirus are described.

指定代表圖：



[圖1B]

【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於流感疫苗接種之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INFLUENZA VACCINATION

【技術領域】

【先前技術】

疫苗藉由訓練免疫系統識別並破壞有害物質及病變細胞來幫助身體抵禦疾病。疫苗主要分成兩種類型，預防性及治療性疫苗。預防性疫苗係給予健康人群以防止特定疾病之發展，而治療性疫苗(亦稱為免疫療法)係給予已診斷患有疾病之人群以幫助阻止疾病增加及傳播或作為預防性藥。

目前正開發病毒疫苗以幫助抵禦傳染病及癌症。該等病毒疫苗係藉由在宿主之細胞內誘導與疾病相關之一小部分基因表現進行運轉，此進而增強宿主之免疫系統以鑑別並破壞病變細胞。同樣地，病毒疫苗之臨床反應係取決於疫苗獲得高位準免疫原性且具有持續長期表現之能力。

業內需要開發對複雜性疾病(例如傳染病)具有增強之治療反應之方法及組合物。

【發明內容】

在各個態樣中，本發明提供組合物，其包含：複製缺陷型腺病毒載體，該病毒載體包含在E2b基因區中具有缺失；及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸序列。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原係A型流感病毒之靶標抗原。在其

他態樣中，A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原係A型流感病毒及B型流感病毒共有之靶標抗原。

在一些態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E1區中之缺失。在其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3區中之缺失。在再其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E4區中之缺失。在一些態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3及E4區中之缺失。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含選自由以下組成之群之病毒的抗原：H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7及其組合。在其他態樣中，B型流感靶標抗原包含選自B型流感/山形株(Yamagata)及B型流感/維多利亞株(Victoria)病毒之病毒的抗原。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：基質蛋白M2、基質蛋白M2之M2e部分、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及其組合。在一些態樣中，B型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白及其組合。

在一些態樣中，該缺失包含一對鹼基對。在其他態樣中，該缺失包含至少20對、至少30對、至少40對、至少50對、至少60對、至少70對、至少80對、至少90對、至少100對、至少110對、至少120對、至少130對、至少140對或至少150對鹼基對。

在再其他態樣中，該缺失包含多於150對、多於160對、多於170對、

多於180對、多於190對、多於200對、多於250對或多於300對鹼基對。

在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個A型流感靶標抗原之核酸。在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼複數種A型流感靶標抗原之核酸。在其他態樣中，腺病毒載體包含編碼至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個B型流感靶標抗原之核酸。在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼複數種B型流感靶標抗原之核酸。

在其他態樣中，腺病毒載體進一步包含增加A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之表現的元件。在一些態樣中，該元件包含至少1個元件、至少2個元件、至少3個元件、至少4個元件或至少5個元件。在一些態樣中，該元件包含內部核糖體結合位點。在一些態樣中，該元件包含組成型啟動子。在其他態樣中，該元件包含誘導型啟動子。

在其他態樣中，該元件包含轉錄增強子。在一些態樣中，該轉錄增強子係勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)增強子。在一些態樣中，該元件不含迴文序列。

在一些態樣中，該腺病毒載體進一步包含編碼增加A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之免疫原性之蛋白質的核酸序列。在一些態樣中，腺病毒載體不為空殼載體。在一些態樣中，組合物或複製缺陷型腺病毒載體進一步包含編碼共刺激分子之核酸序列。在其他態樣中，共刺激分子包含B7、ICAM-1、LFA-3或其組合。在再其他態樣中，共刺激分子包含B7、ICAM-1及LFA-3之組合。在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸序列。在一些實施例中，組

合物包含至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於5×10^{10}個VP。在其他實施例中，組合物包含至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{12}個VP。

在各個態樣中，本發明提供在有需要之個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與根據上述組合物中之任一者之組合物。

在各個態樣中，本發明提供在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與第一腺病毒載體，其包含：複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；向該個體投與第二腺病毒載體，其包含：(a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及(b)編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；由此產生針對一或多種A及B型流感靶標抗原之免疫反應。

在各個態樣中，本發明提供在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含：(a) 向該個體投與第一載體，其包含：(i) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及(ii) 編碼第一A型流感靶標抗原及第一B型流感靶標抗原之核酸；及(b) 隨後向該個體投與第二載體，其包含：(i) 步驟(a)之該複製缺陷型腺病毒載體，及(ii) 編碼第二A型流感靶標抗原及第二B型流感靶標抗原之核酸，其中該第二載體之該第二A型流感靶標抗原與該第一載體之該第一A型流感靶標抗原相同或不同，且其中該第二載體之該第二B型流感靶標抗原與該第一載體之該第一B型流感靶標抗原相同或不同；由此產生針對該第一靶標抗原及該第二靶標抗原之免疫反應。

在各個態樣中，本發明提供在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B

型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含：向該個體投與包含以下各項之腺病毒載體：複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失；及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體再投與給該個體至少一次；由此產生針對該等A及B型流感靶標抗原之免疫反應。

在各個態樣中，本發明提供構築通用流感疫苗載體之方法，其包含將編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸插入於複製缺陷型腺病毒載體中，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含選自由以下組成之群之病毒的抗原：H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7及其組合。在一些態樣中，B型流感靶標抗原包含選自B型流感/山形株及B型流感/維多利亞株病毒之病毒的抗原。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：基質蛋白M2、基質蛋白M2之M2e部分、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及其組合。在其他態樣中，B型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白及其組合。

在一些態樣中，個體對腺病毒具有既存免疫性。在一些態樣中，腺病毒載體不為空殼載體。

在其他態樣中，第一載體不為空殼載體。在其他態樣中，第二載體不為空殼載體。在再其他態樣中，第一及第二腺病毒載體不為空殼載體。在一些態樣中，個體對腺病毒5具有既存免疫性。

在一些態樣中，該第一及該第二載體之該等第一及第二靶標抗原係源自同一感染性有機體。在其他態樣中，該第一及該第二載體之該等第一及第二靶標抗原係源自不同的感染性有機體。在一些態樣中，該A型流感靶標抗原及該B型流感靶標抗原係不同的靶標抗原。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原係A型流感病毒之靶標抗原。在一些態樣中，A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原係A型流感病毒及B型流感病毒共有之靶標抗原。

在一些態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E1區中之缺失。在其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3區中之缺失。在再其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E4區中之缺失。在再其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3及E4區中之缺失。

在一些態樣中，該缺失包含一對鹼基對。在其他態樣中，該缺失包含至少20對、至少30對、至少40對、至少50對、至少60對、至少70對、至少80對、至少90對、至少100對、至少110對、至少120對、至少130對、至少140對或至少150對鹼基對。

在再其他態樣中，該缺失包含多於150對、多於160對、多於170對、多於180對、多於190對、多於200對、多於250對或多於300對鹼基對。

在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個A及B型流感靶標抗原之核酸序列。

在一些態樣中，腺病毒載體進一步包含用以增加A及B型流感型流感靶標抗原之表現的元件。在一些態樣中，該元件包含至少1個元件、至少2

個元件、至少3個元件、至少4個元件或至少5個元件。在一些態樣中，該元件包含內部核糖體結合位點。在其他態樣中，該元件包含組成型啟動子。在一些態樣中，該元件包含誘導型啟動子。在其他態樣中，該元件包含轉錄增強子。在其他態樣中，該轉錄增強子係勞斯肉瘤病毒(RSV)增強子。在一些態樣中，該元件不含迴文序列。

在一些態樣中，腺病毒載體進一步包含編碼增加A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之免疫原性之多肽的核酸序列。在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含M且B型流感靶標抗原包含BM2。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者包含血球凝集素。在一些態樣中，血球凝集素包含HA1結構域。在一些態樣中，本文中之血球凝集素包含HA2結構域。在其他態樣中，本文中之血球凝集素包含莖部結構域。在一些態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者包含神經胺糖酸苷酶。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者包含核蛋白(NP)。在其他態樣中，A型流感靶標抗原包含基質蛋白M1。在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含基質蛋白M2。在其他態樣中，A型流感靶標抗原包含基質蛋白M2e。在一些態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者係由與編碼BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1、基質蛋白M2或其任一組合之序列具有至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、99.5%或100%序列一致性之核酸序列編碼。在一些實施例中，該方法包含投與至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於5×10^{10}個VP。在其他實施例中，方法包含投與至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{12}個VP。

在本文所述方法及/或組合物之上下文中所論述之實施例可關於本文所述之任何其他方法或組合物來採用。因此，關於一種方法或組合物之實施例同樣可適用於其他方法及組合物。

其他目標、特徵及優點將自以下詳細說明變得顯而易見。然而，應理解，儘管詳細闡述及特定實例指示具體實施例，但其僅以說明之方式給出，此乃因熟習此項技術者自此詳細闡述將易於明瞭各種歸屬於本發明之精神及範圍內之改變及修改。

【圖式簡單說明】

圖**1**圖解說明本發明之多個基因構築體之示意圖。

圖**1A**圖解說明含有A型流感之基質1 (M1)蛋白、核蛋白(NP)蛋白、血球凝集素(HA)之三基因插入物及欲用於插入Ad5 [E1-, E2b-]中之每一蛋白質間之Gly-Ser-Gly鏈接體。

圖**1B**圖解說明含有兩個由分別源自豬鐵士古病毒-1 (***Porcine teschovirus-1***)及明脈扁刺蛾β四體病毒(***Thosea asigna*** virus)之單一「自裂解」 2A肽分開之抗原基因序列之Ad5 [E1-, E2b-]。

圖**2**圖解說明流感M1、NP及HA抗原在單一基於Ad5 [E1-, E2b-]之平臺中之西方墨點法(Western blotting)表現。

圖**3**圖解說明展示在利用遞增劑量之Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗而非利用Ad5 [E1-, E2b-]-無效空白對照載體免疫接種之後產生針對HA抗原之抗體反應之圖表。值係平均值+/- SEM。

圖**4**圖解說明展示在利用遞增劑量之Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗而非利用Ad5 [E1-, E2b-]-無效空白對照載體免疫接種之後產生針對M1、NP及HA抗原之細胞介導免疫(CMI)反應之圖表，如藉由ELISpot分

析針對分泌IFN之脾細胞所測定。ELISpot反應之特異性係藉由與不相關SIV-Nef及SIV-Vif肽混合物缺少脾細胞反應性來顯示。值係平均值+/-SEM。

圖**5**係展示在利用遞增劑量之Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗而非利用Ad5 [E1-, E2b-]-無效空白對照載體免疫接種之後產生針對M1、NP及HA抗原之細胞溶解性T淋巴球(CTL)反應之圖表，如藉由ELISpot分析針對分泌顆粒酶B之脾細胞所測定。ELISpot反應之特異性係藉由與不相關SIV-Nef及SIV-Vif肽混合物缺少脾細胞反應性來顯示。值係平均值+/-SEM。

圖**6**圖解說明展示在時間進程(縱向)研究中在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗免疫接種一次(紅色線；1組)、兩次間隔2週(藍色線；2組)、兩次間隔1個月(綠色線；3組)或兩次間隔2個月(橙色線；4組)之後產生針對NP及HA抗原之CMI反應之圖表，如藉由ELISpot分析針對分泌IFN-γ之脾細胞所測定。值係平均值+/-SD。箭頭指示疫苗接種時間。

圖**7**圖解說明在時間進程(縱向)研究中在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗免疫接種一次(紅色線；1組)、兩次間隔2週(藍色線；2組)、兩次間隔1個月(綠色線；3組)或兩次間隔2個月(橙色線；4組)之後產生針對HA抗原之抗體(Ab)反應之圖表。值係平均值+/-SD。箭頭指示疫苗接種時間。

圖**8**圖解說明在小鼠中利用Ad5 [E1-, E2b-]流感疫苗進行免疫接種之後血清中A型流感或B型流感HA抗體反應之量化，如藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)所測定。

圖**8A**圖解說明A型流感HA抗體反應之量化。

圖**8B**圖解說明B型流感HA抗體反應之量化。

圖**9**圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化在來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之重刺激脾細胞中表現IFN-γ之效應物T淋巴球所量測。

圖**9A**圖解說明表現IFN-γ之CD8+脾細胞之百分比。

圖**9B**圖解說明表現IFN-γ之CD4+脾細胞之百分比。

圖**10**圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之分泌細胞介素之重刺激脾細胞所量測。

圖**10A**圖解說明分泌IFN-γ之脾細胞之量化。

圖**10B**圖解說明分泌IL-2之脾細胞之量化。

圖**11**圖解說明與利用對照(無效)疫苗相比在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/InfA-HA疫苗免疫接種之小鼠中經60天之時期挑戰研究之存活曲線。

【實施方式】

交叉參考

本申請案主張2016年1月15日提出申請之美國臨時專利申請案第62/279,267號及2016年2月12日提出申請之美國臨時專利申請案第62/294,840號之權利，其整體內容以引用的方式併入。

政府權益聲明

本發明係根據國立衛生研究院(National Institutes of Health, NIH)、國立過敏與傳染病研究院(National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, NIAID)授予之研究補助金RO1AI111364在政府支持下完成。政

府可享有本發明之某些權益。

以下段落更詳細的闡述本發明之不同態樣。除非明確指示相反情況，否則本發明之每一態樣可與本發明之任何一或多個其他態樣組合。具體而言，指示較佳或有利之任何特徵可與指示較佳或有利之任何一或多個其他態樣組合。

如本文中所用，除非另外指示，否則冠詞「一」意指一或多者，除非另有明確規定的除外。

如本文中所用，除非另外指示，否則諸如「含有(contain, containing)」、「包括(include, including)」及諸如此類之術語意指「包含」。

如本文中所用，除非另外指示，否則術語「或」可為連接詞或反義連接詞。

如本文中所用，除非另外指示，否則任何實施例可與任何其他實施例組合。

如本文中所用，除非另外指示，否則本文之一些本發明實施例涵蓋數值範圍。本發明之各種態樣可以範圍格式呈現。應理解，呈範圍格式之說明僅出於方便及簡潔之目的，且不應理解為對本發明範圍之硬性限制。因此，範圍之描述應視為特定揭示所有可能之子範圍以及彼範圍內之個別數值，如同明確寫出一般。舉例而言，諸如1至6之範圍描述應視為特定揭示諸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子範圍以及彼範圍內之個別數值，例如1、2、3、4、5及6。無論範圍之寬度如何，此均適用。當範圍存在時，範圍包括範圍終點。

術語「腺病毒」或「Ad」係指來自腺病毒科之無外套膜之DNA病毒

之群。除人類宿主外，該等病毒可在(但不限於)鳥類、牛、豬及犬類物種中發現。涵蓋來自腺病毒科之四個屬(例如，禽類腺病毒屬、哺乳類腺病毒屬、鳥類腺病毒屬及唾液酸酶腺病毒屬)之任一者之腺病毒作為E2b缺失之病毒載體或含有本文所述之其他缺失之載體之基礎的用途。另外，在每一物種中發現若干血清型。Ad亦係關於任一該等病毒血清型之基因衍生物，包括(但不限於)同源或異源DNA序列之基因突變、缺失或轉位。

「輔助腺病毒」或「輔助病毒」係指一種Ad，該Ad可以提供特定宿主細胞無法提供之病毒功能 (宿主可提供Ad基因產物，例如E1蛋白質)。此病毒係以反式方式提供第二病毒或輔助依賴性病毒(例如，空殼或無病毒基因的病毒、或缺失特定區(例如E2b)或本文所述之其他區之病毒)中所缺乏之功能(例如，蛋白質)；無法勝任複製之第一病毒可以說是「幫助」第二、輔助依賴性病毒，藉此使得在細胞中產生第二病毒基因體。

如本文中所用，術語「無效腺病毒5型(Ad5無效)」係指不含用於表現之任何異源核酸序列之非複製Ad。

如本文中所用，術語「第一代腺病毒」係指具有早期區1 (E1)缺失之Ad。在其他情形中，亦可缺失非必需早期區3 (E3)。

如本文中所用，術語「空殼」或「無病毒基因」係指已缺失所有病毒編碼區之腺病毒載體。

如本文中所用，術語「轉染」係指將外源核酸引入真核細胞中。轉染可藉由此項技術中已知之各種方式完成，包括磷酸鈣-DNA共沈澱、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、聚凝胺介導之轉染、電穿孔、顯微注射、脂質體融合、脂轉染、原生質體融合、反轉錄病毒感染及基因槍法(biolistics)。

術語「穩定轉染」或「穩定地轉染」係指將外源核酸DNA或RNA引入並整合於經轉染細胞之基因體中。術語「穩定轉染子」係指已將外源DNA穩定整合於基因體DNA中之細胞。

術語「報導基因」指示編碼報導分子(包括酶)之核苷酸序列。「報導分子」可在各種檢測系統之任一者中檢測，包括(但不限於)基於酶之檢測分析(例如，ELISA以及基於酶之組織化學分析)、螢光、放射性及發光系統。

在一個實施例中，可採用大腸桿菌(E. coli) β-半乳糖苷酶基因(可自Pharmacia Biotech, Pistacataway, N.J.購得)、綠色螢光蛋白(GFP) (可自Clontech, Palo Alto, Calif.市售購得)、人類胎盤鹼性磷酸酶基因、氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)基因或此項技術中已知之其他報導基因。

如本文中所用，術語「編碼...之核酸分子」、「編碼...之DNA序列」及「編碼...之DNA」係指去氧核糖核苷酸沿去氧核糖核酸股之順序或序列。該等去氧核糖核苷酸之順序決定胺基酸沿肽(蛋白質)鏈之順序。核酸序列由此編碼胺基酸序列。

如本文中所用，術語「異源核酸序列」係指系接至或經操縱變得系接至在自然界並不系接或在自然界系接至不同位置之核酸序列的核苷酸序列。異源核酸可包括在其引入之細胞中天然發現之核苷酸序列，或異源核酸相對於天然序列可含有一些修飾。

術語「轉基因」係指引入至測試個體之細胞或基因體中之天然或異源核酸序列或融合同源或異源核酸序列之任何基因編碼區。在本發明中，轉基因係攜載於用於將轉基因引入至個體之細胞之任何病毒載體上。

如本文中所用，術語「第二代腺病毒」係指自病毒缺失(移除) E1、

E2、E3且在某些實施例中E4 DNA基因序列之所有或部分之Ad。

如本文中所用，術語「個體」係指任何動物，例如哺乳動物或有袋動物。個體包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物(例如，恒河猴或其他類型之獼猴)、小鼠、豬、馬、驢、牛、綿羊、大鼠及任何種類之家禽。

在某些態樣中，可提供使用允許多次疫苗接種以產生針對流感病毒之廣泛反應性免疫反應的腺病毒載體產生疫苗之方法，該疫苗產生針對各種流感病毒之免疫反應。

一個態樣提供在個體中產生針對多種流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與腺病毒載體，其包含：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼多種流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體重投與給該個體至少一次；由此產生針對該等流感靶標抗原之免疫反應。

另一態樣提供在個體中產生針對多種流感靶標抗原之免疫反應之方法，其中該個體對腺病毒具有既存免疫性，該方法包含：向該個體投與包含以下之腺病毒載體：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼多種流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體重投與給該個體至少一次；由此產生針對該等流感靶標抗原之免疫反應。

在其他態樣中，靶標抗原包含源自A及B型流感病毒蛋白之抗原。就此而言，流感蛋白質可源自任何A及B型流感病毒，包含(但不限於)H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、B型流感/山形株及B型流感/維多利亞株。在某些實施例中，流感

病毒蛋白可為任何流感蛋白質，包含(但不限於) BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及基質蛋白M2。

開發通用流感疫苗之需要及免疫反應之重要性.

大流行流感爆發係全球公共衛生之主要威脅。人類對該等病毒病毒株具有極少或不具有免疫性之突然出現及爆炸性傳播而言，此種大流行係存在可能性的。該等病毒株中有許多會造成需要住院治療之嚴重或危及生命之疾病。預防嚴重流感之最有效途徑係對易感群體進行疫苗接種。習用流感疫苗藉由誘導針對高度可變表面醣蛋白血球凝集素(HA)之抗體(Ab)發揮作用，且主要地藉由降低病毒感染力及在感染個體中之傳播起作用。在鑑別出可能的大流行病毒株之後，此類型之疫苗目前花費至少6-12個月來製備及發送分配，此時間太長。此經2009 H1N1大流行已凸顯，在2010年4月鑑別出新出現的病毒時，直至10月才有足夠的疫苗用於群體免疫接種。此明白顯示與此同時病毒在傳播且對疫苗之需要。此表明對可迅速生產、尤其用於需要誘導針對流感之細胞及體液免疫反應二者之保護效應的疫苗之高危群體的流感疫苗之需求。

流感抗原

在某些實施例中，流感抗原(例如血球凝集素、核蛋白及基質組份)可用於(例如)包含腺病毒載體之疫苗組合物或組合物中。

舉例而言，可使用血球凝集素抗原。保護免於自然流感感染之主要相關物係血清及黏膜中特定針對HA之Ab的含量。季節性流感疫苗獲得批准係基於針對HA之體液反應的誘導，如藉由血球凝集抑制(HAI)分析所量測。HA抗原似乎在柄區域中含有與流感亞型交叉反應之保守抗原表位

(Nabel GJ Trans Am Clin Climatol Assoc. 2012;123:9-15)。

在某些態樣中亦可使用M2蛋白及核蛋白(NP)。研究已顯示，流感M2蛋白及核蛋白(NP)亦含有當用於實驗性疫苗(包括採用Ad5載體之彼等)中時可提供寬範圍之流感亞型獨立性保護的保守區(Epstein SL等人，Vaccine. 2005 23:5404-10；Tompkins SM等人，Emerg Infect Dis. 2007 13:426-35；Price GE等人，PLoS One. 2010 5(10):e13162；Osterhaus A Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2011 366(1579):2766-73)。

疫苗接種策略已使用NP作為抗原以誘導免疫反應，此乃因其在流感病毒亞型中係良好地保守(Altstein AD等人，Arch Virol. 2006 151:921-31；Saha S等人，Virology. 2006 354:48-57；Goodman AG等人，PloS One. 2011 6(10):e25938)。

此外，已研究將M2蛋白(M2e)內之高度保守膜外部結構域作為A型流感疫苗開發之有吸引力靶標(Tompkins SM等人，Emerg Infect Dis. 2007 13:426-35；Neirynck S等人，Nat Med. 1999 5:1157-63；Roose K等人，Drug News Perspect. 2009 22:80-92；Turley CB等人，Vaccine. 2011 29:5145-52)。針對M2e之體液反應可抑制流感感染，其係藉由潛在地涉及Ab依賴性細胞介導之細胞毒性及/或觸發補體級聯、導致細胞溶解之機制(El Bakkouri K等人，J Immunol. 2011 186:1022-31)。一個研究小組(Zhou D等人，Mol Ther. 2010 18:2182-9)從黑猩猩血清型C68 (AdC68)或C6 (AdC6)開發出E1缺失腺病毒(Ad)載體，其以串聯方式表現融合至H1N1 NP之三個來自A型流感病毒(H1N1、H5N1及H7N2)之不同菌株之M2e序列。表現M2e及NP之Ad疫苗在小鼠中會引起針對該三個M2e序列之強健NP特異性$CD8^+$ T-細胞反應及適度抗體反應。感興趣的

是，經疫苗接種之幼齡小鼠在利用高劑量不同流感病毒挑戰之後會被保護免於死亡。B型流感病毒突變緩慢且在B型流感病毒株中其BM2蛋白含有高度保守區，此係用於廣效型疫苗之理想候選物(Hiebert SW.、Williams MA, Lamb RA Virology. ***1986*** 155***:***747***-51***)。誘導針對保守流感組份(例如BM2、M2、NP及同義HA)之體液及CMI反應二者以保護免於異源流感病毒之能力在開發廣泛反應性流感疫苗中保持巨大潛力。

在開發新通用流感疫苗中，利用所有該等以上態樣以利用A及B型流感之高度保守及交叉反應抗原開發多株交叉反應性流感疫苗。

腺病毒載體

在某些態樣中，腺病毒載體可用於遞送流感抗原之組合物及方法中。

重組Ad5 [E1-, E2b-]載體疫苗平臺係新的，其在早期基因2b (E2b)區中具有去除病毒DNA聚合酶(pol)及/或前末端蛋白(pTP)基因之其他缺失，並在E.C7人類細胞株中繁殖(Amalfitano A, Begy CR, Chamberlain JS Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 93:3352-6；Amalfitano A, Chamberlain JS Gene Ther. 1997 4:258-63；Amalfitano A等人，J Virol. 1998 72:926-33；Seregin SS及Amalfitano A Expert Opin Biol Ther. 2009 9:1521-31)。與現有Ad5 [E1-]載體之7 kb容量相比，該載體具有高達12 kb之擴增基因攜載/選殖容量，此足以允許併入多個基因(Amalfitano A等人，J Virol. 1998 72:926-33；Seregin SS及Amalfitano A Expert Opin Biol Ther. 2009 9:1521-31)。E2b區之其他缺失賦予有利的免疫性質，例如誘發針對特定抗原之強效免疫反應，同時最小化對Ad5病毒蛋白之免疫反應。

重要地，癌症及傳染病之臨床前及臨床研究表明，基於Ad5 [E1-, E2b-]之載體誘導針對載體化抗原之強效CMI及Ab反應，即使在存在Ad5免疫性之情況下(Osada T等人，Cancer Gene Ther. 2009 16:673-82；Gabitzsch ES等人，Vaccine. 2009 27:6394-8；Gabitzsch ES等人，Immunol Lett. 2009 122:44-51；Gabitzsch ES等人，Cancer Immunol Immunother. 2010 59:1131-5；Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2011 29:8101-7；Jones FR等人，Vaccine 2011 29:7020-6；Gabitzsch ES, Jones FR J Clin Cell Immunol. 2011 S4:001. doi:10.4172/2155-9899. S4-001；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2012 30:7265-70；Wieking BG等人，Cancer Gene Ther. 2012 19:667-74；Morse MA等人，Cancer Immunol Immunother. 2013 62:1293-1301；Balint等人，Cancer Immunol Immunother. 2015 64:977-87；Rice AE等人，Cancer Gene Ther. 2015 22:454-62；Gabitzsch ES等人，Oncotarget 2015年9月7日 紙本期刊出版前之電子版)。

高級重組腺病毒血清型5 (Ad5)載體平臺給予開發用於流感之新穎寬交叉反應性疫苗之機會。此載體可直接藉由皮下注射用於將定義流感抗原暴露於誘導強效免疫反應之抗原呈現細胞(APC)來遞送。重要地，Ad5重組載體係以游離方式複製且並未將基因體插入至宿主細胞基因體中，由此確保不會存在基因整合及極重要細胞基因功能之破壞(Imler JL Vaccine. 1995 13:1143-51；Ertl HC, Xiang Z J Immunol. 1996 156:3579-82；Amalfitano, A Curr Opin Mol Ther. 2003 5:362-6)。

不幸地，目前基於Ad5之載體面臨之主要挑戰係存在對Ad5之既存免疫性。大多數人展現中和針對使用最廣泛之人類疫苗亞型之Ad5的Ab，其

中三分之二的人具有針對Ad5之淋巴細胞增殖性反應(Chirmule N等人，Gene Ther. 1999 6:1574-83)。此免疫性阻止了使用目前早期基因1 (E1)區缺失之Ad5載體(Ad5 [E1-])作為流感疫苗之平臺。Ad5免疫性抑制免疫作用、且尤其利用重組Ad5載體之再免疫作用，且同樣妨礙針對第二疾病抗原之疫苗的免疫作用。克服既存Ad5載體免疫性之問題一直係很熱門的研究主題。然而，使用其他Ad血清型或甚至非人類形式之Ad可直接導致改變重要趨化介素及細胞介素之產生、基因失調，且具有顯著不同的生物分佈及組織毒性(Appledorn DM等人，Gene Ther. 2008 15:885-901；Hartman ZC等人，Virus Res. 2008 132:1-14)。即使該等途徑成功進行初始免疫，但由於誘導針對Ad亞型之免疫反應而使隨後疫苗接種成為問題。為幫助避免Ad免疫屏障及規避目前載體Ad5 [E1-]之不利條件，構築如上所述經改良Ad5載體平臺。

而且，與目前Ad5 [E1-]載體相比，Ad5 [E1-, E2b-]載體在注射後前24至72小時期間展現減少之發炎(Nazir SA, Metcalf JP J Investig Med. 2005 53:292-304；Schaack J Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 101:3124-9；Schaack J Viral Immunol. 2005 18:79-88)。缺少Ad5 [E1-, E2b-]晚期基因表現致使受感染細胞更不易遭受抗-Ad5活性且允許其產生並表現轉基因達延長時期(Gabitzsch ES, Jones FR J Clin Cell Immunol. 2011 S4:001. doi:10.4172/2155-9899. S4-001；Hodges BL J Gene Med. 2000 2:250-9)。減少之針對Ad5 [E1-, E2b-]病毒蛋白之發炎反應及所產生之既存Ad5免疫性之迴避可增加Ad5 [E1-, E2b-]感染APC細胞之能力，此導致接種物之更大免疫作用。此外，增加之其他細胞類型之感染可提供強效$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞反應所需之高位準抗原呈現，此導致記憶T細胞發

育。如此看來，E2b區之缺失賦予有利的免疫性質，例如誘發針對特定抗原之強效免疫反應，同時最小化針對Ad5蛋白質之免疫反應，即使在存在既存Ad5免疫性之情況下。

已在癌症(結腸直腸癌、乳癌及HPV) (Osada T等人，Cancer Gene Ther. 2009 16:673-82；Gabitzsch ES等人，Cancer Immunol Immunother. 2010 59:1131-5；Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35；Wieking BG等人，Cancer Gene Ther. 2012 19:667-74；Rice AE等人，Cancer Gene Ther. 2015 22:454-62；Gabitzsch ES等人，Oncotarget 2015年9月7日，紙本期刊出版前之電子版)及傳染病(HIV、SIV及H1N1流感) (Gabitzsch ES等人，Vaccine. 2009 27:6394-8；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2011 29:8101-7；Jones FR等人，Vaccine 2011 29:7020-6；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2012 30:7265-70)之動物模型中報告，即使在Ad5高免疫性之存在下亦誘導針對所表現抗原基因之強效免疫反應。尤其相關者係利用新Ad5 [E1-, E2b-]-CEA (癌胚抗原)平臺疫苗用於晚期結腸直腸癌患者之免疫療法之研究。儘管存在既存Ad5免疫性，但仍誘導CEA導向之CMI反應；治療係充分耐受的，安全地投與且未觀察到嚴重不良效應(Morse MA等人，Cancer Immunol Immunother. 2013 62:1293-1301；Balint等人，Cancer Immunol Immunother. 2015 64:977-87)。

結果證實基於重組Ad5 [E1-, E2b-]平臺之疫苗克服既存及/或Ad5載體誘導之免疫性且誘導顯著保護性免疫反應。該等研究確定，新的基於Ad5 [E1-, E2b-]載體之疫苗1) 與目前Ad5 [E1-]載體相比，可誘導顯著較高之CMI反應；2)可利用所設計之多種免疫方案以誘導強效CMI反應，3)

可在具有既存Ad5免疫性之動物中誘導顯著抗原特異性CMI反應，及4)可在具有高既存Ad5免疫性程度之動物中誘導顯著抗腫瘤反應或保護免於傳染病。

在某些實施例中，新Ad5 [E1-, E2b-]重組平臺之創新屬性可用於開發廣泛交叉反應性流感疫苗。此可藉由將表現來自A及B型流感菌株之HA、BM2、M2及NP蛋白之保守及交叉反應性抗原的多個轉基因併入重組Ad5 [E1-, E2b-]平臺中來實現並利用為新的通用流感疫苗。

某些態樣係關於用於產生針對流感靶標抗原之免疫反應的方法及腺病毒載體。具體而言，某些態樣可提供經改良之基於Ad之疫苗，使得可達成針對多於一個抗原靶標之多次疫苗接種。重要地，疫苗接種可在存在針對Ad之既存免疫性之情形下實施Ad及/或投與先前已利用本文所述之腺病毒載體或其他腺病毒載體進行多次免疫之個體。腺病毒載體可多次投與個體以誘導針對各種A及B型流感抗原之免疫反應，包含(但不限於)產生針對A及B型流感病毒之廣譜(broad based)抗體及細胞介導免疫反應。

某些態樣提供E2b缺失腺病毒載體之用途，例如彼等闡述於美國專利第6,063,622號；第6,451,596號；第6,057,158號及第6,083,750號(所有均以其整體引用的方式併入本文中)中者。如'622專利中所述，為進一步削弱病毒蛋白表現以及降低產生複製勝任Ad (RCA)之頻率，在某些態樣中係提供在E2b區中含有缺失之腺病毒載體。該等E2b缺失之腺病毒載體之繁殖需要表現缺失E2b基因產物之細胞株。

在其他態樣中，可提供包裝細胞株；例如，源自HEK-203細胞株之E.C7 (正式地稱為C-7)(Amalfitano A等人 Proc Natl Acad Sci USA 1996 93:3352-56；Amalfitano A等人 Gene Ther 1997 4:258-63)。

此外，E2基因產物DNA聚合酶及前末端蛋白可與E1基因產物一起以組成型方式表現於E.C7或類似細胞中。基因區段自Ad基因體轉移至生產細胞株具有直接益處：(1) 增加重組DNA聚合酶及前末端蛋白缺失之腺病毒載體之攜載容量，此乃因DNA聚合酶及前末端蛋白之組合編碼序列理論上可缺失接近4.6 kb；及，(2) 降低之RCA產生之可能性，此乃因兩個或兩個以上獨立重組事件將不需要產生RCA。

因此，E1、Ad DNA聚合酶及前末端蛋白表現細胞株可使得腺病毒載體能夠以接近13 kb之攜載容量繁殖，而不需要污染性輔助病毒(Mitani等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 92:3854；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-259；Amalfitano and Parks Curr Gene Ther 2002 2:111-133)。

此外，當缺失對病毒生命週期甚為關鍵之基因(例如，E2b基因)時，進一步削弱Ab對其他病毒基因蛋白質之複製或表現。此將降低病毒感染細胞之免疫識別，且允許外源轉基因表現之延長持續時間。

然而，E1、DNA聚合酶及前末端蛋白缺失載體之重要屬性包括其不能表現來自E1及E2b區之個別蛋白質以及預計缺乏大多數病毒結構蛋白之表現。舉例而言，Ad之主要晚期啟動子(MLP)負責晚期結構蛋白L1至L5之轉錄(Doerfler, In Adenovirus DNA, The Viral Genome and Its Expression (Martinus Nijhoff Publishing Boston, 1986)。藉助在基因體複製之前使MLP最低程度地活躍，高毒性Ad晚期基因僅在發生病毒基因體複製之後才主要自MLP轉錄及轉譯(Thomas及Mathews Cell 1980 22:523)。晚期基因轉錄之此順式依賴性活化通常係DNA病毒之特徵，例如在多瘤及SV-40之生長中。DNA聚合酶及前末端蛋白係絕對為Ad複製

所需的(不像E4或蛋白IX蛋白)且因此其缺失對腺病毒載體晚期基因表現及彼表現在細胞(例如APC)中之毒性效應極其有害。

在某些實施例中，預期使用之腺病毒載體包括具有Ad基因體之E2b區及E1區中之缺失但不具有Ad基因體之任何其他區之缺失之E2b缺失腺病毒載體。在另一實施例中，預期使用之腺病毒載體可包括具有Ad基因體之E2b區中之缺失及E1及E3區中之缺失但無其他區之缺失之E2b缺失腺病毒載體。在其他實施例中，預期使用之腺病毒載體可包括具有Ad基因體之E2b區中之缺失及E1、E3中之缺失且部分或完全移除E4區但無其他缺失之腺病毒載體。

在另一實施例中，預期使用之腺病毒載體包括具有Ad基因體之E2b區中之缺失及E1及E4區中之缺失但無其他缺失之腺病毒載體。在額外實施例中，預期使用之腺病毒載體可包括具有Ad基因體之E2a、E2b及E4區中之缺失但無其他缺失之腺病毒載體。

在一個實施例中，本文使用之腺病毒載體包含具有E2b區之E1及DNA聚合酶功能缺失但無其他缺失之載體。在其他實施例中，本文使用之腺病毒載體具有E2b區之E1及前末端蛋白功能缺失且無其他缺失。

在另一實施例中，本文使用之腺病毒載體具有E1、DNA聚合酶及前末端蛋白功能缺失，且無其他缺失。在一個具體實施例中，本文預期使用之腺病毒載體缺失E2b區及E1區之至少一部分，但並非「空殼」腺病毒載體。就此而言，載體可缺失E2b區之DNA聚合酶及前末端蛋白功能二者。

如本文所用，術語「E2b缺失」係指特定DNA序列以使得阻止至少一個E2b基因產物之表現及/或功能之方式突變。因此，在某些實施例中，「E2b缺失」係指特定DNA序列自Ad基因體缺失(去除)。E2b缺失或「在

E2b區內含有缺失」係指在Ad基因體之E2b區內缺失至少一個鹼基對。因此，在某些實施例中缺失多於一對鹼基對，且在其他實施例中缺失至少20對、30對、40對、50對、60對、70對、80對、90對、100對、110對、120對、130對、140對或150對鹼基對。在另一實施例中，缺失Ad基因體之E2b區內之多於150對、160對、170對、180對、190對、200對、250對或300對鹼基對。E2b缺失係阻止至少一種E2b基因產物之表現及/或功能的缺失，且因此涵蓋編碼E2b特異性蛋白多個部分之外顯子內的缺失以及啟動子及前導序列內之缺失。在某些實施例中，E2b缺失係阻止E2b區之DNA聚合酶及前末端蛋白中之一者或二者之表現及/或功能的缺失。在其他實施例中，「E2b缺失」係指Ad基因體之此區中DNA序列中之一或多個點突變，使得一或多個所編碼蛋白無功能。該等突變包括替換為導致胺基酸序列變化之不同殘基以導致非功能性蛋白質之殘基。

如熟悉此項技術者在閱讀本揭示內容時應理解，可缺失Ad基因體之其他區。，因此，如本文所用，Ad基因體特定區中之「缺失」係指特定DNA序列以使得阻止由彼區編碼之至少一個基因產物之表現及/或功能之方式突變。在某些實施例中，特定區中之「缺失」係指特定DNA序列以使得阻止由彼區編碼之功能(例如，DNA聚合酶之E2b功能或前末端蛋白功能)之表現及/或功能之方式自Ad基因體缺失(去除)。特定區內之「缺失」或「含有缺失」係指Ad基因體之彼區內缺失至少一對鹼基對。因此，在某些實施例中缺失多於一對鹼基對，且在其他實施例中至少20對、30對、40對、50對、60對、70對、80對、90對、100對、110對、120對、130對、140對或150對鹼基對自特定區缺失。在另一實施例中，缺失Ad基因體之彼區內多於150對、160對、170對、180對、190對、200對、

250對或300對鹼基對。

該等缺失係使得由該區編碼之基因產物的表現及/或功能可受到阻止。因此，缺失涵蓋編碼蛋白質多個部分之外顯子內之缺失以及啟動子及前導序列內之缺失。在其他實施例中，Ad基因體特定區中之「缺失」係指Ad基因體之此區中DNA序列中之一或多個點突變，使得一或多個所編碼蛋白無功能。該等突變包括替換為導致胺基酸序列變化之不同殘基以導致非功能性蛋白質之殘基。

包含一或多個缺失之腺病毒載體可使用此項技術中已知之重組技術產生(參見例如Amalfitano等人，J. Virol. 1998 72:926-33；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-59)。如此項技術者將認識到，所用腺病毒載體可使用組成性表現E2b基因產物及可已經缺失之任何必須基因之產物之適當包裝細胞株成功生長至高效價。在某些實施例中，可使用組成性表現E1及DNA聚合酶蛋白以及Ad-前末端蛋白之HEK-293衍生細胞。在一個實施例中，已使用E.C7細胞成功生長腺病毒載體之高效價儲存株(參見例如Amalfitano等人，J. Virol. 1998 72:926-33；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-59)。

為使自繁殖腺病毒載體缺失關鍵基因，由靶向基因編碼之蛋白質必須首先與E1蛋白一起共表現於HEK-293細胞或類似細胞。因此，僅可利用彼等當組成性共表現時無毒之蛋白質(或誘導性表現之毒性蛋白)。已展現E1及E4基因於HEK-293細胞中之共表現(利用誘導型而非組成型啟動子) (Yeh等人，J. Virol. 1996 70:559；Wang等人，Gene Therapy 1995 2:775；及Gorziglia等人，J. Virol. 1996 70:4173)。E1及蛋白IX基因(病毒體結構蛋白)已經共表現(Caravokyri及Leppard J. Virol. 1995

69:6627)，且亦已闡述E1、E4及蛋白IX基因之共表現(Krougliak及Graham Hum. Gene Ther. 1995 6:1575)。E1及100k基因已如同E1及蛋白酶基因一樣成功表現於反式互補細胞株中(Oualikene等人，Hum Gene Ther 2000 11 :1341-53；Hodges等人，J. Virol 2001 75:5913-20)。

共表現E1及E2b基因產物用於生長高效價E2b缺失Ad粒子之細胞株闡述於美國專利第6,063,622號中。E2b區編碼Ad基因體複製絕對需要之病毒複製蛋白(Doerfler, 如上，及Pronk等人，Chromosoma 1992 102:S39-S45)。有用細胞株組成性表現大約140 kDa Ad- DNA聚合酶及/或大約90 kDa前末端蛋白。具體而言，期望具有E1、DNA聚合酶及前末端蛋白之高含量、組成性共表現而無毒性之細胞株(例如，E.C7)用於繁殖用於多次疫苗接種之Ad。該等細胞株允許繁殖E1、DNA聚合酶及前末端蛋白缺失之腺病毒載體。

重組Ad可使用此項技術中已知之技術繁殖。舉例而言，在某些實施例中，將含有E.C7細胞之組織培養板用腺病毒載體病毒儲存株以適當MOI (例如，5)感染並在37.0℃下培育40-96 h。收穫受感染細胞，重新懸浮於10 mM Tris-Cl (pH 8.0)中並進行音波處理，且病毒藉由兩輪氯化銫密度離心來純化。在某些技術中，含有病毒之帶經Sephadex CL-6B管柱(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)脫鹽，添加蔗糖或甘油，並將等份試樣儲存於-80℃下。在一些實施例中，病毒將置於經設計以增強其穩定性之溶液中(例如，A195) (Evans等人，J Pharm Sci 2004 93:2458-75)。量測儲存株之效價(例如，藉由在SDS溶解之後量測病毒等份試樣在260 nm下之光學密度)。在另一實施例中，可將包容整個重組E2b缺失腺病毒載體之線性或環狀質體DNA轉染至E.C7或類似細胞中，並在37.0℃下培

育直至出現病毒生產之跡象為止(例如，細胞病變效應)。然後來自該等細胞之條件培養基可用於感染更多E.C7或類似細胞，以在純化之前擴大所產生病毒之量。

純化可藉由兩輪氯化銫密度離心或選擇性過濾來完成。在某些實施例中，可藉由管柱層析使用市售產品(例如，來自Puresyn, Inc., Malvem, PA之Adenopure)或定製層析管柱來純化病毒。

在某些實施例中，重組Ad包含足夠病毒以確保欲感染之細胞遭遇相當數量之病毒。因此，可提供重組Ad之儲存株、具體而言重組Ad之無RCA之儲存株。儲存株之製備及分析已為此項技術熟知。病毒儲存株之效價相差較大，此主要取決於病毒基因型及用於製備其之方案及細胞株。病毒儲存株可具有至少約10^6、10^7或10^8 pfu/ml之效價，且許多該等儲存株可具有更高效價，例如至少約10^9、10^{10}、10^{11}或10^{12} pfu/ml。

異源核酸

腺病毒載體亦包含編碼期望針對其以產生免疫反應之若干所關注靶標抗原、其片段或融合體之異源核酸序列。在一些實施例中，腺病毒載體包含編碼可調節免疫反應之若干蛋白質、其融合體或其片段之異源核酸序列。因此，某些態樣提供包含異源核酸序列之第二代E2b缺失腺病毒載體。

同樣地，某些態樣提供編碼若干所關注之流感靶標抗原核酸序列，在本文中亦稱為多核苷酸。同樣地，某些態樣提供編碼來自本文進一步闡述之任何源靶標抗原之多核苷酸、包含該等多核苷酸之載體及利用該等表現載體轉型或轉染之宿主細胞。術語「核酸」及「多核苷酸」在本文中基本上可互換。如熟習此項技術者亦將認識到，多核苷酸可係單股(編碼或

反義)或雙股，且可為DNA (基因體、cDNA或合成)或RNA分子。RNA分子可包括含有內含子且以一對一方式對應於DNA分子之HnRNA分子及不含內含子之mRNA分子。其他編碼或非編碼序列可(但不需要)存在於多核苷酸內，且多核苷酸可(但不需要)鏈接至其他分子及/或支撐材料。如本文所用，經分離多核苷酸意指多核苷酸實質上遠離其他編碼序列。舉例而言，本文所用之經分離DNA分子不含大比例之不相關編碼DNA，例如大的染色體片段或其他功能基因或多肽編碼區。當然，此係指初始分離之DNA分子，且並不排除隨後在實驗室中以重組方式添加至區段之基因或編碼區。

如熟習此項技術者將瞭解，多核苷酸可包括表現或可適於表現本文所述靶標抗原、抗原片段、太及諸如此類之基因體序列、基因體外及質體編碼序列及較小工程化基因區段。該等區段可自然分離，或藉由人工以合成方式修飾。

多核苷酸可包含自然序列(即，編碼靶標抗原多肽/蛋白質/表位或其一部分之內源性序列)，或可包含編碼此一序列之變體或衍生物之序列。在某些實施例中，本文所述之多核苷酸序列編碼本文所述之靶標抗原蛋白。在一些實施例中，多核苷酸代表經最佳化用於在特定細胞類型(即，人類細胞系)中表現之新穎基因序列，其可實質上不同於天然核苷酸序列或變體但編碼類似蛋白質抗原。

在其他相關實施例中，可提供與編碼本文所述蛋白質(例如，所關注靶標抗原)之自然序列實質上一致之多核苷酸變體，例如使用本文所述之方法(例如，使用標準參數之BLAST分析，如下文所述)，彼等與編碼多肽之天然多核苷酸相比包含至少70%序列一致性、具體而言至少75%直至

99%或更高序列一致性。熟習此項技術者應認識到，藉由計及密碼子簡併、胺基酸相似性、閱讀框定位及諸如此類，該等值可適當調整以確定由兩個核苷酸序列所編碼蛋白質之相應一致性。

在某些態樣中，多核苷酸變體將含有一或多個取代、添加、缺失及/或插入，具體而言使得由變體多核苷酸所編碼多肽之表位的免疫原性或使得異源性靶標蛋白之免疫原性相對於由天然多核苷酸序列編碼之多肽並未實質上減弱。如本文其他地方所述，多核苷酸變體可編碼靶標抗原之變體、或其片段(例如，表位)，其中變體多肽或其片段(例如，表位)與抗原特異性抗血清及/或T細胞株或純系反應之傾向相對於天然多肽並未實質上減弱。術語「變體」應理解為涵蓋異種基因起源之同源性基因。

某些態樣可提供包含至少約5個至多達1000個或更多個、以及其間之中間長度之編碼多肽(包括本文所述之靶標蛋白抗原)之連續核苷酸或由其組成之多核苷酸。將易於理解，「中間長度」在此上下文中意指所引證值之間之任何長度，例如16、17、18、19等；21、22、23等；30、31、32等；50、51、52、53等；100、101、102、103等；150、151、152、153等；包括200-500之所有整數；500-1,000，及諸如此類。本文所述之多核苷酸序列可在一端或兩端藉由在編碼本文所述之多肽(例如表位或異源性靶標蛋白)之自然序列中未發現之額外核苷酸延伸。此額外序列可在所揭示序列之任一端或在所揭示序列之兩端由1個至多達20個核苷酸或更多個組成。

在某些實施例中，多核苷酸或其片段(無論自身編碼序列之長度如何)可與其他DNA序列組合，例如啟動子、表現控制序列、多腺苷酸化信號、額外限制酶位點、多選殖位點、其他編碼區段及諸如此類，使得其整

個長度可有相當大變化。因此，預期可採用幾乎任何長度之核酸片段，其中總長度可受限於製備之容易度及在預期重組DNA方案中之用途。舉例而言，總長度為約1000對、2000對、3000對、4000對、5000對、6000對、7000對、8000對、9000對、10,000對、約500對、約200對、約100對、約50對鹼基對長度及諸如此類(包括所有中間長度)之說明性多核苷酸區段預期可用於許多實施方案中。

當比較多核苷酸序列時，當如下文所述針對最大相關性進行比對時，若兩個序列中之核苷酸序列相同，則稱兩個序列係「一致的」。兩個序列之間之比較可藉由在比較窗上比較序列來實施以鑑別並比較局部區之序列相似性。如本文所用，「比較窗」係指至少約20個連續位置、通常30個至約75個、40個至約50個之區段，其中，在兩個序列進行最佳比對後，可將序列與具有同樣數目之連續位置的參考序列相比較。

用於比較之序列最佳比對可使用Lasergene生物資訊軟體套件(DNASTAR, Inc., Madison, WI)中之Megalign程式使用預設參數實施。此程式體現了如下參考文獻中所述之若干比對方案：Dayhoff MO (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff MO (編輯) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 第5卷, 增刊3, 第345-358頁；Hein J Unified Approach to Alignment and Phylogenes, 第626-645頁(1990)；Methods in Enzymology 第183卷, Academic Press, Inc., San Diego, CA；Higgins DG and Sharp PM CABIOS 1989 5:151-53；Myers EW及Muller W CABIOS 1988 4:11-17；Robinson ED Comb. Theor 1971 11A 05；Saitou N, Nei M Mol.

Biol. Evol. 1987 4:406-25；Sneath PHA and Sokal RR Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973)；Wilbur WJ and Lipman DJ Proc. Natl. Acad., Sci. USA 1983 80:726-30)。

或者，用於比較之序列最佳比對可藉由以下實施：Smith及Waterman , Add. APL. Math 1981 2:482之局部一致性演算法、Needleman及Wunsch J. Mol. Biol. 1970 48:443之一致性比對演算法、Pearson及Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988 85:2444之相似性檢索方法、該等演算法之電腦實施方案(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI中之GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA及TFASTA)或檢查。

適於確定序列一致性%及序列相似性演算法之一個實例係BLAST及BLAST2.0演算法，該等分別闡述於Altschul等人，Nucl. Acids Res. 1977 25:3389-3402, 及Altschul等人，J. MoI. Biol. 1990 215:403-10中。BLAST及BLAST 2.0可用於利用本文所述之參數確定多核苷酸之序列一致性%。用於實施BLAST分析之軟體藉助國家生物技術信息中心(National Center for Biotechnology Information)可公開得到。在一個說明性實例中，對於核苷酸序列，可使用參數M (一對匹配殘基之獎賞得分；總是 >0)及N (失配殘基之懲罰得分；總是<0)計算累積得分。當累積比對得分自其最大所得值減少數量X時；當由於一或多個負得分殘基比對之積累而導致累積得分達到零或以下時；或當到達序列任一端點時，在每一方向中單詞擊中(word hit)之延伸終止。BLAST演算法參數W、T及X決定了比對的敏感性及速度。BLASTN程式(對於核苷酸序列而言)使用11之

字長(W)及10之期望值(E)作為預設值及BLOSUM62評分矩陣(參見Henikoff及Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 89:10915)比對、50之(B)、10之期望值(E)、M=5、N=-4並比較兩條鏈。

在某些態樣中，「序列一致性%」係藉由在至少20個位置之比較窗中比較兩個最佳比對序列來確定，其中為對兩個序列進行最佳比對，比較窗中之多核苷酸序列部分與參照序列(其不包含添加或缺失)相比可包含20%或更低、通常5%至15%或10%至12%之添加或缺失(即缺口)。百分比係藉由以下計算：確定兩個序列中出現相同核酸殘基之位置數目以產生匹配位置數目，匹配位置數目除以參照序列(即，窗大小)中之總位置數目且將結果乘以100以產生序列一致性%。

彼等熟習此項技術者將明瞭，由於遺傳密碼之簡併，存在許多編碼所關注具體抗原或其片段之核苷酸序列，如本文所述。該等多核苷酸中之一些與任何天然基因之核苷酸序列具有最小同源性。儘管如此，在某些態樣中特別預期由於密碼子使用之不同而有所變化之多核苷酸。此外，亦預期包含本文所提供多核苷酸序列之基因的等位基因。等位基因係由於一或多個突變(例如核苷酸之缺失、添加及/或取代)而改變之同源性基因。所得mRNA及蛋白質可(但不需要)具有改變之結構或功能。等位基因可使用標準技術(例如，雜交、擴增及/或數據庫序列比較)來。

因此，在另一實施例中，採用誘變途徑(例如位點特異性誘變)用於製備本文所述之靶標抗原序列或其片段之變體及/或衍生物。藉由此途徑，多肽序列中之特定修飾可藉助編碼其之潛在多核苷酸的誘變來進行。該等技術提供用以製備及測試序列變體之直接途徑，例如併入一或多個上述考慮因素、藉由將一或多個核苷酸序列變化引入多核苷酸中。

位點特異性誘變允許藉助使用編碼期望突變之DNA序列的特定寡核苷酸序列以及足夠數量之毗鄰核苷酸產生突變體，以提供足夠大小及序列複雜性之引子序列以在橫越缺失接合處之兩側上形成穩定雙鏈體 突變可用於所選多核苷酸序列中以改良、改變、降低、修飾或以其他方式變化多核苷酸自身之性質、及/或改變所編碼多肽之性質、活性、組成、穩定性或一級序列。

編碼多肽之多核苷酸區段或片段可容易地藉由(例如)如通常所實踐使用自動化寡核苷酸合成器藉由化學方式直接合成片段來製備。而且，片段可藉由實施核酸複製技術(例如美國專利第4,683,202號之PCR™技術)、藉由將所選序列引入重組載體中用於重組生產及藉由彼等熟習分子生物學技術者通常已知之重組DNA技術(參見例如，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY, NY)來獲得。

為表現本文所述之期望靶標抗原多肽或其片段、或包含以上任一者之融合蛋白，將編碼多肽或功能等效物之核苷酸序列使用此項技術中已知之重組技術插入至本文其他地方所述之適當Ad中。適當腺病毒載體含有用於轉錄及轉譯所插入編碼序列及任何期望鏈接體之必需元件。可使用熟習此項技術者熟知之方法來構築含有編碼所關注多肽之序列及適當轉錄及轉譯控制元件之該等腺病毒載體。該等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內基因重組。該等技術闡述於(例如) Amalfitano等人，J. Virol. 1998 72:926-33；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-259；Sambrook J等人，(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.及Ausubel FM等人，(1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.

N.Y.中。

可利用各式各樣載體/宿主系統，以容納及產生多核苷酸序列。該等包括(但不限於)微生物，例如經重組噬菌體、質體或黏接質體DNA載體轉型之細菌；經酵母載體轉型之酵母；經病毒載體(例如，桿狀病毒)感染之昆蟲細胞系統；經病毒載體(例如，花椰菜嵌紋病毒，CaMV；煙草嵌紋病毒，TMV)或細菌載體(例如，Ti或pBR322質體)轉型之植物細胞系統；或動物細胞系統。

腺病毒載體中存在之「控制元件」或「調控序列」係載體之彼等非轉譯區(增強子、啟動子、5'及3'非轉譯區)，該等非轉譯區會與宿主細胞蛋白相互作用以實施轉錄及轉譯。該等元件之強度及特異性會有所變化。端視所用之載體系統及宿主而定，可使用任何數量之適宜轉錄及轉譯元件，包括組成型及誘導型啟動子。舉例而言，編碼所關注多肽之序列可連接至由晚期啟動子及三聯前導序列組成之Ad轉錄/轉譯複合體。插入病毒基因體之非必需E1或E3區中可用於獲得能夠在感染宿主細胞中表現多肽之有活力病毒(Logan J及Shenk T (1984) Proc. Natl. Acad. Sci 1984 87:3655-59)。此外，轉錄增強子(例如，勞斯肉瘤病毒(RSV)增強子)可用於增加在哺乳動物宿主細胞中之表現。

特定起始信號亦可用於達成編碼所關注多肽之序列的更有效轉譯。該等信號包括ATG起始密碼子及毗鄰序列。在其中編碼多肽之序列、其起始密碼子及上游序列插入適當表現載體之情形中，可不需要額外轉錄或轉譯控制信號。然而，在其中僅插入編碼序列或其一部分之情形中，應提供包括ATG起始密碼子在內之外源性轉譯控制信號。此外，起始密碼子應位於正確閱讀框中以確保整個插入物之轉譯。外源性轉譯元件及起始密碼子

可具有天然及合成二者之不同起源。表現效率可藉由包括對於所用之具體細胞系統而言適當之增強子(例如文獻中所述之彼等)來增強(Scharf D.等人，Results Probl. Cell Differ. 1994 20:125-62)。亦可併入用於轉錄或轉譯之特定終止序列以達成編碼所選多肽之序列的有效轉譯。

此項技術中已知使用特定針對產物之多株或單株抗體用於檢測及量測多核苷酸編碼之產物(例如，所關注靶標抗原)之表現的各種方案。實例包括酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)劑螢光活化細胞分選(FACS)。利用單株抗體對既定多肽上之兩個非干擾表位之反應性的雙位點、基於單株之免疫分析可用於一些應用，但亦可採用競爭性結合分析。該等及其他分析闡述於Hampton R等人，(1990；Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul. Minn.)及Maddox DE等人，J. Exp. Med. 1983 758:1211-16)中以及其他地方。腺病毒載體可包含編碼若干所關注流感抗原之核酸序列。

在某些實施例中，將增加期望靶標抗原之表現的元件併入本文所述腺病毒載體之核酸序列中。該等元件包括內部核糖體結合位點(IRES；Wang及Siddiqui Curr. Top. Microbiol. Immunol 1995 203:99；Ehrenfeld及Semler Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1995 203:65；Rees等人，Biotechniques 1996 20:102；Sugimoto等人，Biotechnology 1994 2:694)。IRES增加轉譯效率。同樣，其他序列可增強表現。對於一些基因而言，序列尤其在5'端抑制轉錄及/或轉譯。該等序列通常係可形成髮夾結構之迴文序列。欲遞送核酸中之任何該等序列可經缺失或不缺失。

轉錄物或經轉譯產物之表現含量可經分析以證實或確定影響表現之序列。轉錄含量可藉由任一已知方法分析，包括北方墨點雜交(Northern

blot hybridization)、RNase探針保護及諸如此類。蛋白質含量可藉由任一已知方法分析，包括ELISA。如此項技術者將認識到，包含異源核酸序列之腺病毒載體可使用此項技術中已知之重組技術產生，例如彼等闡述於以下中者：Maione等人，Proc Natl Acad Sci USA 2001 98:5986-91；Maione等人，Hum Gene Ther 2000 1:859-68；Sandig等人，Proc Natl Acad Sci USA, 2000 97:1002-07；Harui等人，Gene Therapy 2004 11:1617-26；Parks等人，Proc Natl Acad Sci USA 1996 93:13565-570；DelloRusso等人，Proc Natl Acad Sci USA 2002 99:12979-984；Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY, NY)。

如上所述，腺病毒載體包含編碼若干所關注流感靶標蛋白或抗原之核酸序列。就此而言，載體可含有編碼1至4種或更多種所關注之不同靶標抗原之核酸。靶標抗原可為全長蛋白或可為其片段(例如，表位)。腺病毒載體可含有編碼來自所關注之一種靶標蛋白之多個片段或表位的核酸序列，或可含有一或多個來自所關注之許多不同靶標流感抗原蛋白之片段或表位。

在某些實施例中，免疫原性片段結合至MHC I型或II型分子。如本文所用，若該結合可可使用此項技術中已知之任何分析檢測，則稱免疫原性片段「結合至」MHC I型或II型分子。舉例而言，多肽結合至MHC I型之能力可藉由監測促進^{125}I標記之β2-微球蛋白(β2m)併入MHC I型/β2m/肽異源三聚體複合物之能力間接評估(參見Parker等人，J. Immunol. 752:163, 1994)。或者，可採用此項技術中已知之功能肽競爭分析。多肽之免疫原性片段通常可使用熟知技術鑑別，例如彼等匯總於Paul, Fundamental Immunology, 第3版, 243-247 (Raven Press, 1993)及其中引用之參考文獻

中者。鑑別免疫原性片段之代表性技術包括針對與抗原特異性抗血清及/或T細胞株或純系反應之能力篩選多肽。具體靶標多肽之免疫原性片段係以並不實質上低於全長靶標多肽之反應性(例如，在ELISA及/或T細胞反應性分析中)之位準與該等抗血清及/或T細胞反應之片段。換言之，免疫原性片段在該等分析內可以類似或高於全長多肽反應性之位準反應。該等篩選通常可使用彼等熟習此項技術者熟知之方法實施，例如彼等闡述於Harlow及Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988中者。

靶標抗原包括(但不限於)源自A及B型流感病毒中之任一者的抗原。靶標抗原可包括藉由本文所述之感染性流感病毒中之任一者產生之蛋白質，例如(但不限於)病毒抗原蛋白，即，B型流感M2蛋白、血球凝集素、基質蛋白M1、基質蛋白M2、核蛋白及神經胺糖酸苷酶。如本文所用，「感染物」係能夠感染宿主之任何活的生物體。感染物包括(例如)任何種類之A及B型流感病毒。

腺病毒載體亦可包括編碼增加靶標抗原免疫原性之蛋白質的核酸序列。就此而言，利用含有此一蛋白質之腺病毒載體免疫接種後產生之蛋白質可係融合蛋白，其包含融合至增加所關注靶標抗原之免疫原性之蛋白質的所關注靶標抗原。

使用方法

腺病毒載體可用於許多疫苗設置用於產生針對本文所述之一或多種靶標抗原之免疫反應。由於腺病毒載體可用於在對Ad具有既存免疫性之個體中產生免疫反應且可用於包括使用腺病毒載體進行多輪免疫接種之疫苗接種方案、不可能使用上一代腺病毒載體之方案之意外發現，故腺病毒

載體特別重要。

通常，產生免疫反應包含誘導體液反應及/或細胞介導反應。在某些實施例中，期望增加針對所關注靶標抗原之免疫反應。同樣地，「產生免疫反應」或「誘導免疫反應」包含任何統計顯著改變，例如，一或多種細胞(T細胞、B細胞、抗原呈現細胞、樹突細胞、嗜中性球及諸如此類)數量或該等免疫細胞中之一或多者之活性(CTL活性、HTL活性、細胞介素分泌、細胞介素分泌輪廓之改變等)之增加。

熟習此項技術者將易於明瞭有許多方法可供用於確立免疫反應中是否發生變化。用於檢測免疫反應中之變化(例如，細胞數量、細胞介素表現、細胞活性)之許多方法已為此項技術中已知且在本發明之上下文中可使用。說明性方法闡述於以下中：Current Protocols in Immunology, 由以下編輯：John E. Coligan、Ada M. Kruisbeek、David H. Margulies、Ethan M. Shevach、Warren Strober (2001 John Wiley & Sons, NY, NY) Ausubel等人，(2001 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY)；Sambrook等人，(1989 Molecular Cloning, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)；Maniatis等人，(1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)以及其他。在此上下文中可使用之說明性方法包括細胞內細胞介素染色(ICS)、ELISpot、增殖分析、細胞毒性T細胞分析(包括鉻釋放或等效分析)、及使用許多聚合酶鏈反應(PCR)或基於RT-PCR之分析的基因表現分析。

在某些實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標抗原特異性CTL活性與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍、至少、

大約或至多1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或源自其之任何範圍或數值。在另一實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標特異性CTL活性與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍。在其他實施例中，產生免疫反應包含靶標抗原特異性細胞介導免疫活性與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍，如藉由ELISpot分析量測細胞介素分泌(例如，干擾素-γ (IFN-γ)、介白素-2 (IL-2)、腫瘤壞死因子-α (TNF-α)、顆粒酶或其他細胞介素)來量測。

在其他實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標特異性抗體產生與適當對照相比增加1.5倍與5倍之間。在另一實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標特異性抗體產生與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍。

因此，某些態樣可提供產生針對所關注流感病毒靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與包含以下之腺病毒載體：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼該等靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體重投與給該個體至少一次；由此產生針對該等靶標抗原之免疫反應。在某些實施例中，可提供其中所投與載體不為空殼載體之方法。

在其他實施例中，可提供在個體中產生針對流感病毒靶標抗原之免疫反應之方法，其中該個體對Ad具有既存免疫性，該方法藉由以下實施：向該個體投與包含以下之腺病毒載體：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼該等靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體再投與給該個體至少一次；由此產生針對流感病毒靶標抗原之免疫反應。

關於針對Ad之既存免疫性，此可使用此項技術中已知之方法測定，例如基於抗體之分析以測試Ad抗體之存在。此外，在某些實施例中，方法可包括首先確定個體對Ad具有既存免疫性，然後投與本文所述之E2b缺失腺病毒載體。

在某些態樣中，可提供產生針對流感靶標抗原(例如本文其他地方所闡述之彼等)之免疫反應的方法。

在具體態樣中，可提供產生針對A及B型流感病毒(例如本文其他地方所闡述之彼等)之免疫反應的方法。

如本文其他地方所述，腺病毒載體包含編碼來自產生針對其之免疫反應之任一或多種感染物之一或多種所關注靶標抗原之核酸序列。舉例而言，靶標抗原可包括(但不限於)病毒抗原蛋白，即B型流感M2蛋白、血球凝集素、基質蛋白M1、基質蛋白M2、核蛋白及神經胺糖酸苷酶。

對於投與，腺病毒載體儲存株可與任何適當緩衝劑、生理上可接受之載劑、賦形劑或諸如此類組合。在某些實施例中，適當數量之腺病毒載體粒子係於適當緩衝劑(例如，無菌PBS)中投與。

在某些情況中，可期望非經腸、經靜脈內、經肌內或甚至經腹膜內遞送本文所揭示之腺病毒載體組合物。在某些實施例中，呈游離鹼或醫藥上可接受之鹽之活性化合物之溶液可於適當混有表面活性劑(例如羥丙基纖維素)之水中製備。亦可於甘油、液體聚乙二醇及其混合物及於油中製備懸浮液。在其他實施例中，E2b缺失腺病毒載體可以丸劑形式遞送，藉由吞嚥或藉由栓劑遞送。

適用於注射用途之說明性醫藥形式包括無菌水溶液或懸浮液及用於臨時製備無菌可注射水溶液或懸浮液之無菌粉末(例如，參見美國專利第

5,466,468號)。在所有情形中，形式必須無菌且在調配物易於上拉並推動穿過注射器之意義上必須係流體。其在製造及儲存之條件下必須穩定且必須經保藏以對抗微生物(例如，細菌、黴菌及真菌)之污染作用。載劑可為溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、乙二醇及液體聚乙二醇及諸如此類)、其適宜混合物及/或植物油。可藉由(例如)使用塗層(例如卵磷脂)、在分散液之情形中藉由維持所需粒徑及/或藉由使用表面活性劑維持適當流動性。可藉由各種抗細菌及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯(parabens)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及諸如此類)促進防止微生物作用。在許多情形中，其可包括等滲劑，例如，糖或氯化鈉。可藉由在組合物中使用延遲吸收之藥劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)使得可注射組合物延長吸收。

在一個實施例中，對於於水溶液中非經腸投與，溶液應適當緩衝(若需要)且首先利用足夠鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑等滲。該等具體水溶液尤其適用於靜脈內、肌內、皮下及腹膜內投與。就此而言，可採用之無菌水性介質將為熟習此項技術者根據本發明而得知。舉例而言，可將1個劑量溶於1 ml等滲NaCl溶液中或添加至1000 ml皮下灌注流體或在建議注射位點注射(參見例如「Remington's Pharmaceutical Sciences」 第15版，第1035-1038頁及第1570-1580頁)。必然將發生劑量之一些變化，此取決於所治療個體之病況。而且，對於人類投與，製劑可需要符合無菌、發熱性及一般安全及純度標準，如由FDA生物標準辦公室(Office of Biology standards)所要求。

載劑可進一步包含任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、塗料、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等滲及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮

液、膠體及諸如此類。該等介質及試劑用於醫藥活性物質之用途在此項技術中已熟知。除任何習用介質或藥劑與活性成份不相容以外，涵蓋其於治療組合物中之使用。補充性活性成份亦可併入組合物中。片語「醫藥上可接受」係指當投與人類時不會產生過敏或類似不良反應之分子實體或組合物。

本文所述治療組合物之投與途徑及頻率以及劑量將在個體與個體間及疾病與疾病間而變，且可使用標準技術容易地確立。一般而言，醫藥組合物及疫苗可藉由注射(例如，皮內、肌內、靜脈內或皮下)、經鼻內(例如，藉由吸入)、以丸劑形式(例如吞嚥、用於陰道或直腸遞送之栓劑)來投與。在某些實施例中，1個與3個間之劑量可經6週時期投與且此後可週期性給予進一步加強疫苗接種。

適宜劑量係當腺病毒載體如上所述投與時能夠如本文其他地方所述促進靶標抗原免疫反應之量。在某些實施例中，免疫反應高於基礎(即，為經治療)位準至少10-50%。該反應可藉由量測患者中之靶標抗原抗體或藉由能夠在活體外殺死流感感染細胞之細胞溶解性效應細胞之疫苗依賴性產生或此項技術中已知用於監測免疫反應之其他方法來監測。

一般而言，適當劑量及治療方案提供足以提供預防移益處之量的腺病毒載體。保護性免疫反應通常可使用標準增殖、細胞毒性或細胞介素分析來評估，其可使用在免疫接種(疫苗接種)之前及之後自患者獲得之試樣來實施。

儘管一個優點係尤其在對Ad具有既存免疫性之個體中利用相同腺病毒載體投與多次疫苗接種之能力，但腺病毒疫苗亦可作為初免及加強方案之一部分投與。混合模式初免及加強接種方案可導致增強之免疫反應。

因此，一個態樣係藉由投與質體疫苗至少一次利用質體疫苗(例如包含所關注靶標抗原之質體載體)對個體進行初免、允許經過預定時間長度、且然後藉由投與腺病毒載體進行加強之方法。可採用多次初免，例如1-3，但可使用更多次。初免與加強間之時間長度可自約6個月至1年之間變化，但可使用其他時間框。

在某些實施例中，組合物或複製缺陷型病毒載體進一步包含編碼共刺激分子之核酸序列。在某些實施例中，共刺激分子包含B7、ICAM-1、LFA-3或其組合。在具體實施例中，共刺激分子包含B7、ICAM-1及LFA-3之組合。在某些態樣中，組合物進一步包含編碼位於同一複製缺陷型病毒載體中之複數個共刺激分子之複數個核酸序列。在某些態樣中，組合物進一步包含編碼位於單獨的複製缺陷型病毒載體中之複數個共刺激分子之複數個核酸序列。

在具體態樣中，包含複製缺陷型病毒載體之組合物包含編碼本文所述流感病毒靶標抗原之核酸序列且進一步包含一或多個編碼B7、ICAM-1、LFA-3或其組合之核酸序列。

在一些實施例中，本發明提供含有至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{10}個VP之劑量之包含靶標抗原之複製缺陷型腺病毒載體之組合物。在其他實施例中，本發明提供含有至少1×10^{8}個VP且不多於5×10^{11}個VP之劑量之包含靶標抗原之複製缺陷型腺病毒載體之組合物。在一些實施例中，本發明提供含有至少1×10^{8}個VP且不多於1×10^{12}個VP之劑量之包含靶標抗原之複製缺陷型腺病毒載體之組合物。在具體實施例中，本發明提供以至少1×10^{8}個VP且不多於1×10^{10}個VP之劑量投與複製缺陷型腺病毒載體之方法。在其他實施例中，本發明提供以至少1×10^{8}個VP且不多

於5×10^{11}個VP之劑量投與複製缺陷型腺病毒載體之方法。在一些實施例中，本發明提供以至少1×10^{8}個VP且不多於1×10^{12}個VP之劑量投與複製缺陷型腺病毒載體之方法。

在其他實施例中，本文所述之疫苗或醫藥組合物可包含至少個、大約或至多10^{3}個、10^{4}個、10^{5}個、10^{6}個、10^{7}個、10^{8}個、10^{9}個、10^{10}個、10^{11}個、10^{12}個、10^{13}個、10^{14}個、10^{15}個、10^{16}個、10^{17}個、10^{18} 個、10^{19}個、10^{20}個病毒粒子或可源自其之任何數量或範圍。在具體實施例中，本文所述之疫苗或醫藥組合物可包含至少個、大約或至多10^{9}個、10^{10}個、10^{11}病毒粒子或可源自其之任何數量或範圍。

在某些實施例中，本文所述之疫苗或醫藥組合物可以預定間隔投與，例如至少、大約或至多每小時、每天、每週、每兩週、每三週、每一個月、每二個月、每三個月、每一季度、每二季度、每三季度、每年或每十年1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、30次、40次、50次、100次、120次、130次、140次、150次之間隔或可源自其之任何間隔或範圍。

上述各個實施例可組合以提供其他實施例。本說明書中所提及及/或申請資料表單中所列示之所有美國專利、美國專利申請公開案、美國專利申請案、外國專利、外國專利申請案及非專利出版物均以其整體引用的方式併入本文中，其併入程度如同每一個別公開案、專利或專利申請案均特定且個別地指示以引用的方式併入一般。

實施例之態樣可進行修改、必要時採用各個專利、申請案及公開案之概念以提供其他實施例。

可根據以上詳細說明對實施例作出該等及其他變化。一般而言，在以下申請專利範圍中，所用術語不應解釋為將申請專利範圍限於說明書及申請專利範圍中所揭示之特定實施例，而應解釋為包括所有可能實施例以及該等申請專利範圍授權之等效物之全部範圍。因此，申請專利範圍並不受限於揭示內容。

實例

藉由參考以下實驗實例進一步詳細闡述本發明。除非另有說明，否則該等實例僅出於說明目的而提供，且並不意欲具有限制性。因此，本發明決不應理解為限於以下實例，而應理解為涵蓋因本文所提供之教示而變得明瞭之任何及所有變化形式。

實例**1**

構築多個流感抗原基因用於插入**Ad5 [E1-, E2b-]**載體中

此實例闡述構築多個流感抗原基因用於插入Ad5 [E1-, E2b-]載體中。為產生含有多種流感抗原之Ad5 [E1-, E2b-]，個別流感抗原基因序列將由分別源自豬鐵士古病毒-1及明脈扁刺蛾β四體病毒之「自裂解」 2A肽隔開(參見圖**1A**) (de Felipe P及Ryan M Traffic 2004 5(8), 616-26；Holst J等人，Nature Immunol. 2008 9:658–66；Kim JH等人，PloS One, 2011 6(4), e18556. doi:10.1371/journal.pone.0018556)。隨著2A肽轉譯於核糖體上，2A肽之最後兩個殘基間絕不會形成肽鍵，此使得在一次核糖體傳遞過程(pass)中明確表現蛋白質。使用兩個2A肽序列隔開三個基因將導致三種蛋白質之接近化學計量表現。同樣地，可構築由分別源自豬鐵士古病毒-1及明脈扁刺蛾β四體病毒之單一「自裂解」 2A肽隔開之含有兩個抗原基因序列之Ad5 [E1-, E2b-] (圖**1B**)。

實例**2**

流感蛋白質在用**Ad5 [E1-, E2b]-M1/NP/HA**細胞感染後之表現

此實例闡述流感蛋白質在用Ad5 [E1-, E2b]-M1/NP/HA細胞感染後之表現。A549細胞利用含有基質1 (M1)蛋白、核蛋白(NP)及血球凝集素(HA)之Ad5 [E1-, E2b]載體感染。藉由西方墨點法(Western blotting)證實M1、NP及HA之表現。如圖**2**中所示，可構築並產生含有來自A型流感(Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA)之基因插入物之所有三種(3) 血球凝集素(HA)、核蛋白(NP)及基質1 (M1)蛋白之基於Ad5 [E1-, E2b-]之平臺。如實例**3**及實例**4**中所示，此疫苗在小鼠中具有免疫原性，其誘導HA、NP及M1導向之免疫反應。

實例**3**

針對**Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA**免疫接種之抗體反應

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後針對流感血球凝集素(HA)抗原之抗體反應。將每組五隻小鼠以1×10^{8}、1×10^{9}或1×10^{10}個病毒粒子(VP) Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA之劑量以每週一次時間間隔經皮下免疫接種兩次。對照小鼠以相同劑量注射Ad5-無效(空載體)。在最後一次免疫接種(疫苗接種)後兩週自個別小鼠獲得血清並使用定量酶聯免疫吸附分析(ELISA)評價抗HA抗體之存在(Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35)。如圖**3**中所示，在Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫小鼠中以劑量依賴性方式產生抗HA抗體反應，但在注射Ad5-無效(空載體)之對照小鼠中未產生。

實例**4**

針對**Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA**免疫接種之細胞介導免疫**(CMI)**反應

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後針對流感抗原之細胞介導免疫(CMI)反應。將每組五隻小鼠以1×10^{8}、1×10^{9}或1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA之劑量以每週一次時間間隔經皮下免疫接種兩次。對照小鼠以相同劑量注射Ad5-無效(空載體)。在最後一次免疫接種(疫苗接種)後兩(2)週自個別小鼠獲得脾臟並採用ELISpot分析針對IFN-γ分泌脾細胞評價CMI (Gabitzsch ES等人，Cancer Immunol Immunother. 2010 59:1131-35；Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35；Jones FR等人，Vaccine 2011 29:7020-26)。如圖**4**中所示，在Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫小鼠中產生CMI反應，但在注射Ad5-無效(空載體)之對照小鼠中未產生。

實例**5**

針對**Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA**免疫接種之細胞毒性**T**淋巴球**(CTL)**反應

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後針對流感抗原之細胞毒性T淋巴球(CTL)反應。CTL反應係藉由利用ELISpot分析量測顆粒酶B分泌來定量。

將每組五隻小鼠以1×10^{8}、1×10^{9}或1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA之劑量以每週一次時間間隔經皮下免疫接種兩次。對照小鼠以相同劑量注射Ad5-無效(空載體)。在最後一次免疫接種(疫苗接種)後兩(2)週自個別小鼠獲得脾臟並採用ELISpot分析針對分泌顆粒酶B之脾細胞評價細胞溶解性T淋巴球(CTL)活性。如圖**5**中所示，在Ad5 [E1-, E2b-]-

M1/NP/HA免疫小鼠中產生CTL反應，但在注射Ad5-無效(空載體)之對照小鼠中未產生。

實例**6**

針對**Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA**免疫接種之**CMI**反應的時程評估

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後在各個時間點針對流感抗原之細胞介導免疫(CMI)反應。將每組小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種一次(1組)、兩次間隔2週(2組)、兩次間隔1個月(3組)及兩次間隔2個月(4組)。在免疫接種(疫苗接種)後之各個時間點自個別小鼠獲得脾臟並藉由採用ELISpot分析針對分泌IFN-γ之脾細胞評價針對NP及HA之CMI反應。如圖**6**中所示，CMI反應在最後一次免疫接種後一週通常最高且此後然後下降。

實例**7**

含有**m1**蛋白、**NP**蛋白及血球凝集素之**Ad5 [E1-, E2b-]**載體的投與

此實例闡述在不同時間點注射含有m1蛋白、np蛋白及血球凝集素之Ad5 [E1-, E2b-]載體以產生針對流感血球凝集素抗原之抗體反應。將每組小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種一次(1組)、兩次間隔2週(2組)、兩次間隔1個月(3組)及兩次間隔2個月(4組)。在免疫接種(疫苗接種)後之各個時間點自個別小鼠獲得血清並藉由定量ELISA技術評價抗HA抗體之存在。如圖**7**中所示，在免疫接種後58至85天觀察到抗HA抗體反應之峰值，此後抗體反應稍微降低。

實例**8**

針對組合**Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e**與**Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA**免

疫接種之抗體反應

此實例闡述在用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之後針對A型流感(InfA)及B型流感(InfB)抗原之抗體反應。Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e係以1×10^{10}個病毒粒子(VP)之劑量投與且Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗係以1×10^{10}個VP之劑量投與。

將每組五隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)作為陰性對照、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-A型流感(InfA)-血球凝集素(HA)/基質2e (M2e)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA或含有1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e及1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-B型流感(InfB)-HA之疫苗混合物以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後2週，如先前所述使用定量ELISA分析來自個別小鼠之血清的針對A型流感-HA或B型流感-HA之抗體的存在(Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35)。

圖**8**圖解說明在小鼠中利用Ad5 [E1-, E2b-]流感疫苗進行免疫接種之後血清中A型流感或B型流感HA抗體反應之量化，如藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)所測定。圖**8A**圖解說明A型流感HA抗體反應之量化。圖**8B**圖解說明B型流感HA抗體反應之量化。

在利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA之混合物疫苗接種之小鼠中檢測到針對A及B型流感二者之抗體，但在注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠中未檢測到。該等反應係特異性的，此乃因僅利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e免疫接種之小鼠並未產生針對B型流感-HA之抗體且僅利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfB免疫接種之小鼠並未

產生針對A型流感-HA之抗體。

實例**9**

在重刺激脾細胞中細胞介導免疫**(CMI)**反應之流式細胞分析

此實例闡述在源自利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠的脾細胞利用HA型流感、M2型流感、B型流感HA肽離體重刺激後細胞介導免疫反應之流式細胞分析。

將每組五隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-A型流感(InfA)-血球凝集素(HA)/基質2e (M2e)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA或含有1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e及1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-B型流感(InfB)-HA之疫苗混合物以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後2週，來自個別小鼠之脾臟在暴露於特定肽混合物之後藉由流式細胞術分析CMI活性，如由干擾素γ (IFN-γ)表現CD8+ (A)及/或CD4+ (B) T細胞所證明。

圖**9**圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化在來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之重刺激脾細胞中表現IFN-γ之效應物T淋巴球所量測。圖**9A**圖解說明表現IFN-γ之CD8+脾細胞之百分比。圖**9B**圖解說明表現IFN-γ之CD4+脾細胞之百分比。

在利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA之混合物疫苗接種之小鼠中檢測到針對A及B型流感二者之CMI反應，但在注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠中未檢測到。儘管觀察到針對流

感HA抗原之背景反應，但在免疫接種小鼠中觀察到顯著($P<0.05$ Mann-Whitney測試)較高CMI反應。該等反應係特異性的，此乃因來自疫苗免疫接種小鼠之T細胞在暴露於介質或不相關抗原(SIV-nef)肽混合物之後並不產生CMI反應。

實例**10**

在重刺激脾細胞中細胞介導免疫**(CMI)**反應之**ELISpot**分析

此實例闡述在源自利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠的脾細胞利用HA型流感、M2型流感、B型流感HA肽離體重刺激後細胞介導免疫反應之ELISpot分析。

將每組5隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-A型流感(InfA)-血球凝集素(HA)/基質2e (M2e)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA或含有1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e及1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-B型流感(InfB)-HA之疫苗混合物以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後2週，來自個別小鼠之脾臟在暴露於特定肽混合物之後使用ELISpot分析針對分泌干擾素-γ (IFN-γ) (A)或IL-2 (B)之斑點形成細胞數(SFC)分析CMI活性。

圖**10**圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之分泌細胞介素之重刺激脾細胞所量測。圖**10A**圖解說明分泌IFN-γ之脾細胞之量化。圖**10B**圖解說明分泌IL-2之脾細胞之量化。

在利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA

之混合物疫苗接種之小鼠中檢測到針對A及B型流感二者之CMI反應，但在注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠中未檢測到。該等反應係特異性的，此乃因來自疫苗免疫接種小鼠之脾臟細胞在暴露於不相關抗原(SIV-nef)肽混合物之後並不產生CMI反應。

實例**11**

利用基於**Ad5 [E1-, E2b-]**之流感疫苗的挑戰研究

此實例闡述利用基於Ad5 [E1-, E2b-]之流感疫苗的挑戰研究。將每組十隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)或含有如申請案之圖**1B**中所構築之1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/InfA-HA之疫苗以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後三十(30)天，小鼠利用H1N1流感病毒菌株(A型流感菌株/加利福尼亞州(California)/07/2009)進行挑戰且在挑戰後評價存活。

圖**11**圖解說明與利用對照(無效)疫苗相比在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/InfA-HA疫苗免疫接種之小鼠中經60天之時期挑戰研究之存活曲線。

疫苗接種小鼠提供完全保護免於病毒挑戰，與此相比注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠經歷僅20%存活且此差異係明顯的(Log Rank Mantel-Cox測試, P=0.0003)。

儘管本文已顯示及闡述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者應命苦該等實施例僅以實例的方式提供。現在熟習此項技術者將發現若干改變、變化及取代而不背離本發明。應瞭解，在實踐本發明中可採用本文所述本發明之實施例之各種替代。期望以下申請專利範圍界定本發明之範圍且因此涵蓋在該等申請專利範圍之範圍內之方法及結構及其等效物。

201726165
專利案號：106101305
申請日：106/01/13
IPC分類：A61K 39/145 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於流感疫苗接種之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INFLUENZA VACCINATION

【中文】

本發明闡述用於構築及產生基於重組腺病毒之載體疫苗之方法，該載體疫苗含有多個流感抗原基因用於產生針對A及B型流感病毒之廣譜免疫反應且允許在對腺病毒具有既存免疫性之個體中進行多次疫苗接種。

【英文】

Methods for constructing and producing a recombinant adenovirus based vector vaccine containing multiple influenza antigen genes for use in generating broad based immune responses against influenza A and B viruses and that allows for multiple vaccinations in individuals with preexisting immunity to adenovirus are described.

【指定代表圖】

圖1B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種組合物，其包含：

包含在E2b基因區中缺失之複製缺陷型腺病毒載體；及

編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸序列。

【第2項】

如請求項1之組合物，其中該A型流感靶標抗原係A型流感病毒之靶標抗原。

【第3項】

如請求項1之組合物，其中該A型流感靶標抗原及該B型流感靶標抗原係A型流感病毒及B型流感病毒共有之靶標抗原。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之組合物，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E1區中之缺失。

【第5項】

如請求項4之組合物，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3區中之缺失。

【第6項】

如請求項4之組合物，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E4區中之缺失。

【第7項】

如請求項4之組合物，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3及E4區中之缺失。

【第8項】

如請求項1至7中任一項之組合物，其中該A型流感靶標抗原包含選自由以下組成之群之病毒的抗原：H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7及其組合。

【第9項】

如請求項1至8中任一項之組合物，其中該B型流感靶標抗原包含選自B型流感/山形株(Yamagata)及B型流感/維多利亞株(Victoria)病毒之病毒的抗原。

【第10項】

如請求項1至9中任一項之組合物，其中該A型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：基質蛋白M2、基質蛋白M2之M2e部分、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及其組合。

【第11項】

如請求項1至10中任一項之組合物，其中該B型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白及其組合。

【第12項】

如請求項1至11中任一項之組合物，其中該缺失包含鹼基對。

【第13項】

如請求項12之組合物，其中該缺失包含至少20對、至少30對、至少40對、至少50對、至少60對、至少70對、至少80對、至少90對、至少100對、至少110對、至少120對、至少130對、至少140對或至少150對鹼基

對。

【第14項】

如請求項13之組合物，其中該缺失包含多於150對、多於160個對、多於170對、多於180對、多於190對、多於200對、多於250對或多於300對鹼基對。

【第15項】

如請求項1至14中任一項之組合物，其中該腺病毒載體包含編碼至少1種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種或至少10種A型流感靶標抗原之核酸。

【第16項】

如請求項1至15中任一項之組合物，其中該腺病毒載體包含編碼複數種A型流感靶標抗原之核酸。

【第17項】

如請求項1至16中任一項之組合物，其中該腺病毒載體包含編碼至少1種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種或至少10種B型流感靶標抗原之核酸。

【第18項】

如請求項1至17中任一項之組合物，其中該腺病毒載體包含編碼複數種B型流感靶標抗原之核酸。

【第19項】

如請求項1至18中任一項之組合物，其中該腺病毒載體進一步包含用以增加該A型流感靶標抗原、該B型流感靶標抗原或二者之表現的元件。

【第20項】

如請求項19之組合物，其中該元件包含至少1個元件、至少2個元件、至少3個元件、至少4個元件或至少5個元件。

【第21項】

如請求項19或20之組合物，其中該元件包含內部核糖體結合位點。

【第22項】

如請求項19或20之組合物，其中該元件包含組成型啟動子。

【第23項】

如請求項19或20之組合物，其中該元件包含誘導型啟動子。

【第24項】

如請求項19或20之組合物，其中該元件包含轉錄增強子。

【第25項】

如請求項24之組合物，其中該轉錄增強子係勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus，RSV)增強子。

【第26項】

如請求項19至25中任一項之組合物，其中該元件不含迴文序列。

【第27項】

如請求項1至26中任一項之組合物，其中該腺病毒載體進一步包含編碼增加該A型流感靶標抗原、該B型流感靶標抗原或二者之免疫原性之蛋白質的核酸序列。

【第28項】

如請求項1至27中任一項之組合物，其中該腺病毒載體不為空殼載體。

【第29項】

如請求項1至28中任一項之組合物，其中該組合物或該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含編碼共刺激分子之核酸序列。

【第30項】

如請求項29之組合物，其中該共刺激分子包含B7、ICAM-1、LFA-3或其組合。

【第31項】

如請求項30或31之組合物，其中該共刺激分子包含B7、ICAM-1及LFA-3之組合。

【第32項】

如請求項1至31中任一項之組合物，其中該腺病毒載體包含編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸序列。

【第33項】

如請求項1至32中任一項之組合物，其中該組合物包含至少1×10^{8}個病毒粒子(viral particles；VP)且不多於5×10^{11}個VP。

【第34項】

如請求項1至32中任一項之組合物，其中該組合物包含至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{12}個病毒粒子VP。

【第35項】

一種在有需要之個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與如請求項1至34中任一項之組合物。

【第36項】

一種在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫

反應之方法，其包含向該個體投與包含以下各項之第一腺病毒載體：

複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；向該個體投與包含以下各項之第二腺病毒載體：

(a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及

(b) 編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；由此產生針對一或多種A及B型流感靶標抗原之免疫反應。

【第37項】

一種在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含：

(a) 向該個體投與包含以下各項之第一載體：

(i) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及

(ii) 編碼第一A型流感靶標抗原及第一B型流感靶標抗原之核酸；及

(b) 隨後向該個體投與包含以下各項之第二載體：

(i) 步驟(a)之該複製缺陷型腺病毒載體，及

(ii) 編碼第二A型流感靶標抗原及第二B型流感靶標抗原之核酸，其中該第二載體之該第二A型流感靶標抗原與該第一載體之該第一A型流感靶標抗原相同或不同，且其中該第二載體之該第二B型流感靶標抗原與該第一載體之該第一B型流感靶標抗原相同或不同；由此產生針對該第一靶標抗原及該第二靶標抗原之免疫

反應。

【第38項】

一種在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含：向該個體投與包含以下各項之腺病毒載體：複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失；及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體再投與給該個體至少一次；由此產生針對該等A及B型流感靶標抗原之免疫反應。

【第39項】

一種構築通用流感疫苗載體之方法，其包含將編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸插入於複製缺陷型腺病毒載體中，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失。

【第40項】

如請求項36至39中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原包含選自由以下組成之群之病毒的抗原：H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7及其組合。

【第41項】

如請求項36至40中任一項之方法，其中該B型流感靶標抗原包含選自B型流感/山形株及B型流感/維多利亞株病毒之病毒的抗原。

【第42項】

如請求項36至41中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：基質蛋白M2、基質蛋白M2之M2e部分、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及其組合。

【第43項】

如請求項36至42中任一項之方法，其中該B型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白及其組合。

【第44項】

如請求項36至43中任一項之方法，其中該個體對腺病毒具有既存免疫性。

【第45項】

如請求項36至44中任一項之方法，其中該腺病毒載體不為空殼載體。

【第46項】

如請求項36至45中任一項之方法，其中第一載體不為空殼載體。

【第47項】

如請求項36至46中任一項之方法，其中第二載體不為空殼載體。

【第48項】

如請求項36至47中任一項之方法，其中該等第一及第二腺病毒載體不為空殼載體。

【第49項】

如請求項36至48中任一項之方法，其中該個體對腺病毒5具有既存免疫性。

【第50項】

如請求項36至49中任一項之方法，其中該第一及該第二載體之該等第一及第二靶標抗原係源自同一感染性有機體。

【第51項】

如請求項36至50中任一項之方法，其中該第一及該第二載體之該等第一及第二靶標抗原係源自不同的感染性有機體。

【第52項】

如請求項36至51中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原及該B型流感靶標抗原係不同的靶標抗原。

【第53項】

如請求項36至52中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原係A型流感病毒之靶標抗原。

【第54項】

如請求項36至53中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原及該B型流感靶標抗原係A型流感病毒及B型流感病毒共有之靶標抗原。

【第55項】

如請求項36至54中任一項之方法，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E1區中之缺失。

【第56項】

如請求項36至55中任一項之方法，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3區中之缺失。

【第57項】

如請求項36至56中任一項之方法，其中該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E4區中之缺失。

【第58項】

如請求項36至57中任一項之方法，其中該複製缺陷型腺病毒載體進

一步包含在E3及E4區中之缺失。

【第59項】

如請求項36至58中任一項之方法，其中該缺失包含鹼基對。

【第60項】

如請求項59之方法，其中該缺失包含至少20對、至少30對、至少40對、至少50對、至少60對、至少70對、至少80對、至少90對、至少100對、至少110對、至少120對、至少130對、至少140對或至少150對鹼基對。

【第61項】

如請求項60之方法，其中該缺失包含多於150對、多於160對、多於170對、多於180對、多於190對、多於200對、多於250對或多於300對鹼基對。

【第62項】

如請求項36至61中任一項之方法，其中該腺病毒載體包含編碼至少1種、至少2種、至少3種、至少4種、至少5種、至少6種、至少7種、至少8種、至少9種或至少10種A及B型流感靶標抗原之核酸序列。

【第63項】

如請求項36至62中任一項之方法，其中該腺病毒載體進一步包含用以增加該A型流感及B型流感靶標抗原之表現的元件。

【第64項】

如請求項63之方法，其中該元件包含至少1個元件、至少2個元件、至少3個元件、至少4個元件或至少5個元件。

【第65項】

如請求項63之方法，其中該元件包含內部核糖體結合位點。

【第66項】

如請求項63之方法，其中該元件包含組成型啟動子。

【第67項】

如請求項63之方法，其中該元件包含誘導型啟動子。

【第68項】

如請求項63之方法，其中該元件包含轉錄增強子。

【第69項】

如請求項68之方法，其中該轉錄增強子係勞斯肉瘤病毒(RSV)增強子。

【第70項】

如請求項63至69中任一項之方法，其中該元件不含迴文序列。

【第71項】

如請求項36至70中任一項之方法，其中該腺病毒載體進一步包含編碼增加該A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之免疫原性之多肽的核酸序列。

【第72項】

如請求項36至71中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原包含M，且該B型流感靶標抗原包含BM2。

【第73項】

如請求項36至72中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原、該B型流感靶標抗原或二者包含血球凝集素。

【第74項】

如請求項73之方法，其中該血球凝集素包含HA1結構域。

【第75項】

如請求項73之方法，其中在本文中該血球凝集素包含HA2結構域。

【第76項】

如請求項73之方法，其中在本文中該血球凝集素包含莖部結構域。

【第77項】

如請求項36至76中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原、該B型流感靶標抗原或二者包含神經胺糖酸苷酶。

【第78項】

如請求項36至77中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原、該B型流感靶標抗原或二者包含核蛋白(nucleoprotein；NP)。

【第79項】

如請求項36至78中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原包含基質蛋白M1。

【第80項】

如請求項36至79中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原包含基質蛋白M2。

【第81項】

如請求項36至80中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原包含基質蛋白M2e。

【第82項】

如請求項36至81中任一項之方法，其中該A型流感靶標抗原、該B型流感靶標抗原或二者係由與編碼BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖

部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1、基質蛋白M2或其任一組合之序列具有至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、99.5%或100%序列一致性之核酸序列編碼。

【第83項】

如請求項36至82中任一項之方法，其中該方法包含投與至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於5×10^{11}個VP。

【第84項】

如請求項36至82中任一項之方法，其中該方法包含投與至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{12}個VP。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於流感疫苗接種之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INFLUENZA VACCINATION

【技術領域】

【先前技術】

疫苗藉由訓練免疫系統識別並破壞有害物質及病變細胞來幫助身體抵禦疾病。疫苗主要分成兩種類型，預防性及治療性疫苗。預防性疫苗係給予健康人群以防止特定疾病之發展，而治療性疫苗(亦稱為免疫療法)係給予已診斷患有疾病之人群以幫助阻止疾病增加及傳播或作為預防性藥。

目前正開發病毒疫苗以幫助抵禦傳染病及癌症。該等病毒疫苗係藉由在宿主之細胞內誘導與疾病相關之一小部分基因表現進行運轉，此進而增強宿主之免疫系統以鑑別並破壞病變細胞。同樣地，病毒疫苗之臨床反應係取決於疫苗獲得高位準免疫原性且具有持續長期表現之能力。

業內需要開發對複雜性疾病(例如傳染病)具有增強之治療反應之方法及組合物。

【發明內容】

在各個態樣中，本發明提供組合物，其包含：複製缺陷型腺病毒載體，該病毒載體包含在E2b基因區中具有缺失；及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸序列。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原係A型流感病毒之靶標抗原。在其

他態樣中，A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原係A型流感病毒及B型流感病毒共有之靶標抗原。

在一些態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E1區中之缺失。在其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3區中之缺失。在再其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E4區中之缺失。在一些態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3及E4區中之缺失。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含選自由以下組成之群之病毒的抗原：H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7及其組合。在其他態樣中，B型流感靶標抗原包含選自B型流感/山形株(Yamagata)及B型流感/維多利亞株(Victoria)病毒之病毒的抗原。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：基質蛋白M2、基質蛋白M2之M2e部分、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及其組合。在一些態樣中，B型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白及其組合。

在一些態樣中，該缺失包含一對鹼基對。在其他態樣中，該缺失包含至少20對、至少30對、至少40對、至少50對、至少60對、至少70對、至少80對、至少90對、至少100對、至少110對、至少120對、至少130對、至少140對或至少150對鹼基對。

在再其他態樣中，該缺失包含多於150對、多於160對、多於170對、

多於180對、多於190對、多於200對、多於250對或多於300對鹼基對。

在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個A型流感靶標抗原之核酸。在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼複數種A型流感靶標抗原之核酸。在其他態樣中，腺病毒載體包含編碼至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個B型流感靶標抗原之核酸。在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼複數種B型流感靶標抗原之核酸。

在其他態樣中，腺病毒載體進一步包含增加A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之表現的元件。在一些態樣中，該元件包含至少1個元件、至少2個元件、至少3個元件、至少4個元件或至少5個元件。在一些態樣中，該元件包含內部核糖體結合位點。在一些態樣中，該元件包含組成型啟動子。在其他態樣中，該元件包含誘導型啟動子。

在其他態樣中，該元件包含轉錄增強子。在一些態樣中，該轉錄增強子係勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)增強子。在一些態樣中，該元件不含迴文序列。

在一些態樣中，該腺病毒載體進一步包含編碼增加A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之免疫原性之蛋白質的核酸序列。在一些態樣中，腺病毒載體不為空殼載體。在一些態樣中，組合物或複製缺陷型腺病毒載體進一步包含編碼共刺激分子之核酸序列。在其他態樣中，共刺激分子包含B7、ICAM-1、LFA-3或其組合。在再其他態樣中，共刺激分子包含B7、ICAM-1及LFA-3之組合。在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸序列。在一些實施例中，組

合物包含至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於5×10^{10}個VP。在其他實施例中，組合物包含至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{12}個VP。

在各個態樣中，本發明提供在有需要之個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與根據上述組合物中之任一者之組合物。

在各個態樣中，本發明提供在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與第一腺病毒載體，其包含：複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；向該個體投與第二腺病毒載體，其包含：(a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及(b)編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；由此產生針對一或多種A及B型流感靶標抗原之免疫反應。

在各個態樣中，本發明提供在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含：(a) 向該個體投與第一載體，其包含：(i) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及(ii) 編碼第一A型流感靶標抗原及第一B型流感靶標抗原之核酸；及(b) 隨後向該個體投與第二載體，其包含：(i) 步驟(a)之該複製缺陷型腺病毒載體，及(ii) 編碼第二A型流感靶標抗原及第二B型流感靶標抗原之核酸，其中該第二載體之該第二A型流感靶標抗原與該第一載體之該第一A型流感靶標抗原相同或不同，且其中該第二載體之該第二B型流感靶標抗原與該第一載體之該第一B型流感靶標抗原相同或不同；由此產生針對該第一靶標抗原及該第二靶標抗原之免疫反應。

在各個態樣中，本發明提供在個體中產生針對A型流感靶標抗原及B

型流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含：向該個體投與包含以下各項之腺病毒載體：複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失；及編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體再投與給該個體至少一次；由此產生針對該等A及B型流感靶標抗原之免疫反應。

在各個態樣中，本發明提供構築通用流感疫苗載體之方法，其包含將編碼A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原之核酸插入於複製缺陷型腺病毒載體中，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含選自由以下組成之群之病毒的抗原：H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7及其組合。在一些態樣中，B型流感靶標抗原包含選自B型流感/山形株及B型流感/維多利亞株病毒之病毒的抗原。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：基質蛋白M2、基質蛋白M2之M2e部分、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及其組合。在其他態樣中，B型流感靶標抗原係來自選自由以下組成之群之蛋白質的抗原：BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白及其組合。

在一些態樣中，個體對腺病毒具有既存免疫性。在一些態樣中，腺病毒載體不為空殼載體。

在其他態樣中，第一載體不為空殼載體。在其他態樣中，第二載體不為空殼載體。在再其他態樣中，第一及第二腺病毒載體不為空殼載體。在一些態樣中，個體對腺病毒5具有既存免疫性。

在一些態樣中，該第一及該第二載體之該等第一及第二靶標抗原係源自同一感染性有機體。在其他態樣中，該第一及該第二載體之該等第一及第二靶標抗原係源自不同的感染性有機體。在一些態樣中，該A型流感靶標抗原及該B型流感靶標抗原係不同的靶標抗原。

在一些態樣中，A型流感靶標抗原係A型流感病毒之靶標抗原。在一些態樣中，A型流感靶標抗原及B型流感靶標抗原係A型流感病毒及B型流感病毒共有之靶標抗原。

在一些態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E1區中之缺失。在其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3區中之缺失。在再其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E4區中之缺失。在再其他態樣中，該複製缺陷型腺病毒載體進一步包含在E3及E4區中之缺失。

在一些態樣中，該缺失包含一對鹼基對。在其他態樣中，該缺失包含至少20對、至少30對、至少40對、至少50對、至少60對、至少70對、至少80對、至少90對、至少100對、至少110對、至少120對、至少130對、至少140對或至少150對鹼基對。

在再其他態樣中，該缺失包含多於150對、多於160對、多於170對、多於180對、多於190對、多於200對、多於250對或多於300對鹼基對。

在一些態樣中，腺病毒載體包含編碼至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個或至少10個A及B型流感靶標抗原之核酸序列。

在一些態樣中，腺病毒載體進一步包含用以增加A及B型流感型流感靶標抗原之表現的元件。在一些態樣中，該元件包含至少1個元件、至少2

個元件、至少3個元件、至少4個元件或至少5個元件。在一些態樣中，該元件包含內部核糖體結合位點。在其他態樣中，該元件包含組成型啟動子。在一些態樣中，該元件包含誘導型啟動子。在其他態樣中，該元件包含轉錄增強子。在其他態樣中，該轉錄增強子係勞斯肉瘤病毒(RSV)增強子。在一些態樣中，該元件不含迴文序列。

在一些態樣中，腺病毒載體進一步包含編碼增加A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者之免疫原性之多肽的核酸序列。在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含M且B型流感靶標抗原包含BM2。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者包含血球凝集素。在一些態樣中，血球凝集素包含HA1結構域。在一些態樣中，本文中之血球凝集素包含HA2結構域。在其他態樣中，本文中之血球凝集素包含莖部結構域。在一些態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者包含神經胺糖酸苷酶。

在其他態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者包含核蛋白(NP)。在其他態樣中，A型流感靶標抗原包含基質蛋白M1。在一些態樣中，A型流感靶標抗原包含基質蛋白M2。在其他態樣中，A型流感靶標抗原包含基質蛋白M2e。在一些態樣中，A型流感靶標抗原、B型流感靶標抗原或二者係由與編碼BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1、基質蛋白M2或其任一組合之序列具有至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、99.5%或100%序列一致性之核酸序列編碼。在一些實施例中，該方法包含投與至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於5×10^{10}個VP。在其他實施例中，方法包含投與至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{12}個VP。

在本文所述方法及/或組合物之上下文中所論述之實施例可關於本文所述之任何其他方法或組合物來採用。因此，關於一種方法或組合物之實施例同樣可適用於其他方法及組合物。

其他目標、特徵及優點將自以下詳細說明變得顯而易見。然而，應理解，儘管詳細闡述及特定實例指示具體實施例，但其僅以說明之方式給出，此乃因熟習此項技術者自此詳細闡述將易於明瞭各種歸屬於本發明之精神及範圍內之改變及修改。

【圖式簡單說明】

圖1圖解說明本發明之多個基因構築體之示意圖。

圖1A圖解說明含有A型流感之基質1 (M1)蛋白、核蛋白(NP)蛋白、血球凝集素(HA)之三基因插入物及欲用於插入Ad5 [E1-, E2b-]中之每一蛋白質間之Gly-Ser-Gly鏈接體。

圖1B圖解說明含有兩個由分別源自豬鐵士古病毒-1 (*Porcine teschovirus-1*)及明脈扁刺蛾β四體病毒(*Thosea asigna* virus)之單一「自裂解」 2A肽分開之抗原基因序列之Ad5 [E1-, E2b-]。

圖2圖解說明流感M1、NP及HA抗原在單一基於Ad5 [E1-, E2b-]之平臺中之西方墨點法(Western blotting)表現。

圖3圖解說明展示在利用遞增劑量之Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗而非利用Ad5 [E1-, E2b-]-無效空白對照載體免疫接種之後產生針對HA抗原之抗體反應之圖表。值係平均值+/- SEM。

圖4圖解說明展示在利用遞增劑量之Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗而非利用Ad5 [E1-, E2b-]-無效空白對照載體免疫接種之後產生針對M1、NP及HA抗原之細胞介導免疫(CMI)反應之圖表，如藉由ELISpot分

析針對分泌IFN之脾細胞所測定。ELISpot反應之特異性係藉由與不相關SIV-Nef及SIV-Vif肽混合物缺少脾細胞反應性來顯示。值係平均值+/-SEM。

圖5係展示在利用遞增劑量之Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗而非利用Ad5 [E1-, E2b-]-無效空白對照載體免疫接種之後產生針對M1、NP及HA抗原之細胞溶解性T淋巴球(CTL)反應之圖表，如藉由ELISpot分析針對分泌顆粒酶B之脾細胞所測定。ELISpot反應之特異性係藉由與不相關SIV-Nef及SIV-Vif肽混合物缺少脾細胞反應性來顯示。值係平均值+/-SEM。

圖6圖解說明展示在時間進程(縱向)研究中在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗免疫接種一次(紅色線；1組)、兩次間隔2週(藍色線；2組)、兩次間隔1個月(綠色線；3組)或兩次間隔2個月(橙色線；4組)之後產生針對NP及HA抗原之CMI反應之圖表，如藉由ELISpot分析針對分泌IFN-γ之脾細胞所測定。值係平均值+/-SD。箭頭指示疫苗接種時間。

圖7圖解說明在時間進程(縱向)研究中在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA疫苗免疫接種一次(紅色線；1組)、兩次間隔2週(藍色線；2組)、兩次間隔1個月(綠色線；3組)或兩次間隔2個月(橙色線；4組)之後產生針對HA抗原之抗體(Ab)反應之圖表。值係平均值+/-SD。箭頭指示疫苗接種時間。

圖8圖解說明在小鼠中利用Ad5 [E1-, E2b-]流感疫苗進行免疫接種之後血清中A型流感或B型流感HA抗體反應之量化，如藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)所測定。

圖8A圖解說明A型流感HA抗體反應之量化。

圖8B圖解說明B型流感HA抗體反應之量化。

圖9圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化在來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之重刺激脾細胞中表現IFN-γ之效應物T淋巴球所量測。

圖9A圖解說明表現IFN-γ之CD8+脾細胞之百分比。

圖9B圖解說明表現IFN-γ之CD4+脾細胞之百分比。

圖10圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之分泌細胞介素之重刺激脾細胞所量測。

圖10A圖解說明分泌IFN-γ之脾細胞之量化。

圖10B圖解說明分泌IL-2之脾細胞之量化。

圖11圖解說明與利用對照(無效)疫苗相比在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/InfA-HA疫苗免疫接種之小鼠中經60天之時期挑戰研究之存活曲線。

【實施方式】

交叉參考

本申請案主張2016年1月15日提出申請之美國臨時專利申請案第62/279,267號及2016年2月12日提出申請之美國臨時專利申請案第62/294,840號之權利，其整體內容以引用的方式併入。

政府權益聲明

本發明係根據國立衛生研究院(National Institutes of Health, NIH)、國立過敏與傳染病研究院(National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, NIAID)授予之研究補助金RO1AI111364在政府支持下完成。政

府可享有本發明之某些權益。

以下段落更詳細的闡述本發明之不同態樣。除非明確指示相反情況，否則本發明之每一態樣可與本發明之任何一或多個其他態樣組合。具體而言，指示較佳或有利之任何特徵可與指示較佳或有利之任何一或多個其他態樣組合。

如本文中所用，除非另外指示，否則冠詞「一」意指一或多者，除非另有明確規定的除外。

如本文中所用，除非另外指示，否則諸如「含有(contain, containing)」、「包括(include, including)」及諸如此類之術語意指「包含」。

如本文中所用，除非另外指示，否則術語「或」可為連接詞或反義連接詞。

如本文中所用，除非另外指示，否則任何實施例可與任何其他實施例組合。

如本文中所用，除非另外指示，否則本文之一些本發明實施例涵蓋數值範圍。本發明之各種態樣可以範圍格式呈現。應理解，呈範圍格式之說明僅出於方便及簡潔之目的，且不應理解為對本發明範圍之硬性限制。因此，範圍之描述應視為特定揭示所有可能之子範圍以及彼範圍內之個別數值，如同明確寫出一般。舉例而言，諸如1至6之範圍描述應視為特定揭示諸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子範圍以及彼範圍內之個別數值，例如1、2、3、4、5及6。無論範圍之寬度如何，此均適用。當範圍存在時，範圍包括範圍終點。

術語「腺病毒」或「Ad」係指來自腺病毒科之無外套膜之DNA病毒

之群。除人類宿主外，該等病毒可在(但不限於)鳥類、牛、豬及犬類物種中發現。涵蓋來自腺病毒科之四個屬(例如，禽類腺病毒屬、哺乳類腺病毒屬、鳥類腺病毒屬及唾液酸酶腺病毒屬)之任一者之腺病毒作為E2b缺失之病毒載體或含有本文所述之其他缺失之載體之基礎的用途。另外，在每一物種中發現若干血清型。Ad亦係關於任一該等病毒血清型之基因衍生物，包括(但不限於)同源或異源DNA序列之基因突變、缺失或轉位。

「輔助腺病毒」或「輔助病毒」係指一種Ad，該Ad可以提供特定宿主細胞無法提供之病毒功能 (宿主可提供Ad基因產物，例如E1蛋白質)。此病毒係以反式方式提供第二病毒或輔助依賴性病毒(例如，空殼或無病毒基因的病毒、或缺失特定區(例如E2b)或本文所述之其他區之病毒)中所缺乏之功能(例如，蛋白質)；無法勝任複製之第一病毒可以說是「幫助」第二、輔助依賴性病毒，藉此使得在細胞中產生第二病毒基因體。

如本文中所用，術語「無效腺病毒5型(Ad5無效)」係指不含用於表現之任何異源核酸序列之非複製Ad。

如本文中所用，術語「第一代腺病毒」係指具有早期區1 (E1)缺失之Ad。在其他情形中，亦可缺失非必需早期區3 (E3)。

如本文中所用，術語「空殼」或「無病毒基因」係指已缺失所有病毒編碼區之腺病毒載體。

如本文中所用，術語「轉染」係指將外源核酸引入真核細胞中。轉染可藉由此項技術中已知之各種方式完成，包括磷酸鈣-DNA共沈澱、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、聚凝胺介導之轉染、電穿孔、顯微注射、脂質體融合、脂轉染、原生質體融合、反轉錄病毒感染及基因槍法(biolistics)。

術語「穩定轉染」或「穩定地轉染」係指將外源核酸DNA或RNA引入並整合於經轉染細胞之基因體中。術語「穩定轉染子」係指已將外源DNA穩定整合於基因體DNA中之細胞。

術語「報導基因」指示編碼報導分子(包括酶)之核苷酸序列。「報導分子」可在各種檢測系統之任一者中檢測，包括(但不限於)基於酶之檢測分析(例如，ELISA以及基於酶之組織化學分析)、螢光、放射性及發光系統。

在一個實施例中，可採用大腸桿菌(E. coli) β-半乳糖苷酶基因(可自Pharmacia Biotech, Pistacataway, N.J.購得)、綠色螢光蛋白(GFP) (可自Clontech, Palo Alto, Calif.市售購得)、人類胎盤鹼性磷酸酶基因、氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)基因或此項技術中已知之其他報導基因。

如本文中所用，術語「編碼...之核酸分子」、「編碼...之DNA序列」及「編碼...之DNA」係指去氧核糖核苷酸沿去氧核糖核酸股之順序或序列。該等去氧核糖核苷酸之順序決定胺基酸沿肽(蛋白質)鏈之順序。核酸序列由此編碼胺基酸序列。

如本文中所用，術語「異源核酸序列」係指系接至或經操縱變得系接至在自然界並不系接或在自然界系接至不同位置之核酸序列的核苷酸序列。異源核酸可包括在其引入之細胞中天然發現之核苷酸序列，或異源核酸相對於天然序列可含有一些修飾。

術語「轉基因」係指引入至測試個體之細胞或基因體中之天然或異源核酸序列或融合同源或異源核酸序列之任何基因編碼區。在本發明中，轉基因係攜載於用於將轉基因引入至個體之細胞之任何病毒載體上。

如本文中所用，術語「第二代腺病毒」係指自病毒缺失(移除) E1、

E2、E3且在某些實施例中E4 DNA基因序列之所有或部分之Ad。

如本文中所用，術語「個體」係指任何動物，例如哺乳動物或有袋動物。個體包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物(例如，恒河猴或其他類型之獼猴)、小鼠、豬、馬、驢、牛、綿羊、大鼠及任何種類之家禽。

在某些態樣中，可提供使用允許多次疫苗接種以產生針對流感病毒之廣泛反應性免疫反應的腺病毒載體產生疫苗之方法，該疫苗產生針對各種流感病毒之免疫反應。

一個態樣提供在個體中產生針對多種流感靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與腺病毒載體，其包含：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼多種流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體重投與給該個體至少一次；由此產生針對該等流感靶標抗原之免疫反應。

另一態樣提供在個體中產生針對多種流感靶標抗原之免疫反應之方法，其中該個體對腺病毒具有既存免疫性，該方法包含：向該個體投與包含以下之腺病毒載體：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼多種流感靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體重投與給該個體至少一次；由此產生針對該等流感靶標抗原之免疫反應。

在其他態樣中，靶標抗原包含源自A及B型流感病毒蛋白之抗原。就此而言，流感蛋白質可源自任何A及B型流感病毒，包含(但不限於)H3N2、H9N1、H1N1、H2N2、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、B型流感/山形株及B型流感/維多利亞株。在某些實施例中，流感

病毒蛋白可為任何流感蛋白質，包含(但不限於) BM2蛋白、血球凝集素、血球凝集素莖部、神經胺糖酸苷酶、核蛋白、基質蛋白M1及基質蛋白M2。

開發通用流感疫苗之需要及免疫反應之重要性.

大流行流感爆發係全球公共衛生之主要威脅。人類對該等病毒病毒株具有極少或不具有免疫性之突然出現及爆炸性傳播而言，此種大流行係存在可能性的。該等病毒株中有許多會造成需要住院治療之嚴重或危及生命之疾病。預防嚴重流感之最有效途徑係對易感群體進行疫苗接種。習用流感疫苗藉由誘導針對高度可變表面醣蛋白血球凝集素(HA)之抗體(Ab)發揮作用，且主要地藉由降低病毒感染力及在感染個體中之傳播起作用。在鑑別出可能的大流行病毒株之後，此類型之疫苗目前花費至少6-12個月來製備及發送分配，此時間太長。此經2009 H1N1大流行已凸顯，在2010年4月鑑別出新出現的病毒時，直至10月才有足夠的疫苗用於群體免疫接種。此明白顯示與此同時病毒在傳播且對疫苗之需要。此表明對可迅速生產、尤其用於需要誘導針對流感之細胞及體液免疫反應二者之保護效應的疫苗之高危群體的流感疫苗之需求。

流感抗原

在某些實施例中，流感抗原(例如血球凝集素、核蛋白及基質組份)可用於(例如)包含腺病毒載體之疫苗組合物或組合物中。

舉例而言，可使用血球凝集素抗原。保護免於自然流感感染之主要相關物係血清及黏膜中特定針對HA之Ab的含量。季節性流感疫苗獲得批准係基於針對HA之體液反應的誘導，如藉由血球凝集抑制(HAI)分析所量測。HA抗原似乎在柄區域中含有與流感亞型交叉反應之保守抗原表位

(Nabel GJ Trans Am Clin Climatol Assoc. 2012;123:9-15)。

在某些態樣中亦可使用M2蛋白及核蛋白(NP)。研究已顯示，流感M2蛋白及核蛋白(NP)亦含有當用於實驗性疫苗(包括採用Ad5載體之彼等)中時可提供寬範圍之流感亞型獨立性保護的保守區(Epstein SL等人，Vaccine. 2005 23:5404-10；Tompkins SM等人，Emerg Infect Dis. 2007 13:426-35；Price GE等人，PLoS One. 2010 5(10):e13162；Osterhaus A Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2011 366(1579):2766-73)。

疫苗接種策略已使用NP作為抗原以誘導免疫反應，此乃因其在流感病毒亞型中係良好地保守(Altstein AD等人，Arch Virol. 2006 151:921-31；Saha S等人，Virology. 2006 354:48-57；Goodman AG等人，PloS One. 2011 6(10):e25938)。

此外，已研究將M2蛋白(M2e)內之高度保守膜外部結構域作為A型流感疫苗開發之有吸引力靶標(Tompkins SM等人，Emerg Infect Dis. 2007 13:426-35；Neirynck S等人，Nat Med. 1999 5:1157-63；Roose K等人，Drug News Perspect. 2009 22:80-92；Turley CB等人，Vaccine. 2011 29:5145-52)。針對M2e之體液反應可抑制流感感染，其係藉由潛在地涉及Ab依賴性細胞介導之細胞毒性及/或觸發補體級聯、導致細胞溶解之機制(El Bakkouri K等人，J Immunol. 2011 186:1022-31)。一個研究小組(Zhou D等人，Mol Ther. 2010 18:2182-9)從黑猩猩血清型C68 (AdC68)或C6 (AdC6)開發出E1缺失腺病毒(Ad)載體，其以串聯方式表現融合至H1N1 NP之三個來自A型流感病毒(H1N1、H5N1及H7N2)之不同菌株之M2e序列。表現M2e及NP之Ad疫苗在小鼠中會引起針對該三個M2e序列之強健NP特異性$CD8^+$ T-細胞反應及適度抗體反應。感興趣的

是，經疫苗接種之幼齡小鼠在利用高劑量不同流感病毒挑戰之後會被保護免於死亡。B型流感病毒突變緩慢且在B型流感病毒株中其BM2蛋白含有高度保守區，此係用於廣效型疫苗之理想候選物(Hiebert SW.、Williams MA, Lamb RA Virology. *1986* 155:747-*51*)。誘導針對保守流感組份(例如BM2、M2、NP及同義HA)之體液及CMI反應二者以保護免於異源流感病毒之能力在開發廣泛反應性流感疫苗中保持巨大潛力。

在開發新通用流感疫苗中，利用所有該等以上態樣以利用A及B型流感之高度保守及交叉反應抗原開發多株交叉反應性流感疫苗。

腺病毒載體

在某些態樣中，腺病毒載體可用於遞送流感抗原之組合物及方法中。

重組Ad5 [E1-, E2b-]載體疫苗平臺係新的，其在早期基因2b (E2b)區中具有去除病毒DNA聚合酶(pol)及/或前末端蛋白(pTP)基因之其他缺失，並在E.C7人類細胞株中繁殖(Amalfitano A, Begy CR, Chamberlain JS Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 93:3352-6；Amalfitano A, Chamberlain JS Gene Ther. 1997 4:258-63；Amalfitano A等人，J Virol. 1998 72:926-33；Seregin SS及Amalfitano A Expert Opin Biol Ther. 2009 9:1521-31)。與現有Ad5 [E1-]載體之7 kb容量相比，該載體具有高達12 kb之擴增基因攜載/選殖容量，此足以允許併入多個基因(Amalfitano A等人，J Virol. 1998 72:926-33；Seregin SS及Amalfitano A Expert Opin Biol Ther. 2009 9:1521-31)。E2b區之其他缺失賦予有利的免疫性質，例如誘發針對特定抗原之強效免疫反應，同時最小化對Ad5病毒蛋白之免疫反應。

重要地，癌症及傳染病之臨床前及臨床研究表明，基於Ad5 [E1-, E2b-]之載體誘導針對載體化抗原之強效CMI及Ab反應，即使在存在Ad5免疫性之情況下(Osada T等人，Cancer Gene Ther. 2009 16:673-82；Gabitzsch ES等人，Vaccine. 2009 27:6394-8；Gabitzsch ES等人，Immunol Lett. 2009 122:44-51；Gabitzsch ES等人，Cancer Immunol Immunother. 2010 59:1131-5；Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2011 29:8101-7；Jones FR等人，Vaccine 2011 29:7020-6；Gabitzsch ES, Jones FR J Clin Cell Immunol. 2011 S4:001. doi:10.4172/2155-9899. S4-001；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2012 30:7265-70；Wieking BG等人，Cancer Gene Ther. 2012 19:667-74；Morse MA等人，Cancer Immunol Immunother. 2013 62:1293-1301；Balint等人，Cancer Immunol Immunother. 2015 64:977-87；Rice AE等人，Cancer Gene Ther. 2015 22:454-62；Gabitzsch ES等人，Oncotarget 2015年9月7日 紙本期刊出版前之電子版)。

高級重組腺病毒血清型5 (Ad5)載體平臺給予開發用於流感之新穎寬交叉反應性疫苗之機會。此載體可直接藉由皮下注射用於將定義流感抗原暴露於誘導強效免疫反應之抗原呈現細胞(APC)來遞送。重要地，Ad5重組載體係以游離方式複製且並未將基因體插入至宿主細胞基因體中，由此確保不會存在基因整合及極重要細胞基因功能之破壞(Imler JL Vaccine. 1995 13:1143-51；Ertl HC, Xiang Z J Immunol. 1996 156:3579-82；Amalfitano, A Curr Opin Mol Ther. 2003 5:362-6)。

不幸地，目前基於Ad5之載體面臨之主要挑戰係存在對Ad5之既存免疫性。大多數人展現中和針對使用最廣泛之人類疫苗亞型之Ad5的Ab，其

中三分之二的人具有針對Ad5之淋巴細胞增殖性反應(Chirmule N等人，Gene Ther. 1999 6:1574-83)。此免疫性阻止了使用目前早期基因1 (E1)區缺失之Ad5載體(Ad5 [E1-])作為流感疫苗之平臺。Ad5免疫性抑制免疫作用、且尤其利用重組Ad5載體之再免疫作用，且同樣妨礙針對第二疾病抗原之疫苗的免疫作用。克服既存Ad5載體免疫性之問題一直係很熱門的研究主題。然而，使用其他Ad血清型或甚至非人類形式之Ad可直接導致改變重要趨化介素及細胞介素之產生、基因失調，且具有顯著不同的生物分佈及組織毒性(Appledorn DM等人，Gene Ther. 2008 15:885-901；Hartman ZC等人，Virus Res. 2008 132:1-14)。即使該等途徑成功進行初始免疫，但由於誘導針對Ad亞型之免疫反應而使隨後疫苗接種成為問題。為幫助避免Ad免疫屏障及規避目前載體Ad5 [E1-]之不利條件，構築如上所述經改良Ad5載體平臺。

而且，與目前Ad5 [E1-]載體相比，Ad5 [E1-, E2b-]載體在注射後前24至72小時期間展現減少之發炎(Nazir SA, Metcalf JP J Investig Med. 2005 53:292-304；Schaack J Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 101:3124-9；Schaack J Viral Immunol. 2005 18:79-88)。缺少Ad5 [E1-, E2b-]晚期基因表現致使受感染細胞更不易遭受抗-Ad5活性且允許其產生並表現轉基因達延長時期(Gabitzsch ES, Jones FR J Clin Cell Immunol. 2011 S4:001. doi:10.4172/2155-9899. S4-001；Hodges BL J Gene Med. 2000 2:250-9)。減少之針對Ad5 [E1-, E2b-]病毒蛋白之發炎反應及所產生之既存Ad5免疫性之迴避可增加Ad5 [E1-, E2b-]感染APC細胞之能力，此導致接種物之更大免疫作用。此外，增加之其他細胞類型之感染可提供強效$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞反應所需之高位準抗原呈現，此導致記憶T細胞發

育。如此看來，E2b區之缺失賦予有利的免疫性質，例如誘發針對特定抗原之強效免疫反應，同時最小化針對Ad5蛋白質之免疫反應，即使在存在既存Ad5免疫性之情況下。

已在癌症(結腸直腸癌、乳癌及HPV) (Osada T等人，Cancer Gene Ther. 2009 16:673-82；Gabitzsch ES等人，Cancer Immunol Immunother. 2010 59:1131-5；Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35；Wieking BG等人，Cancer Gene Ther. 2012 19:667-74；Rice AE等人，Cancer Gene Ther. 2015 22:454-62；Gabitzsch ES等人，Oncotarget 2015年9月7日，紙本期刊出版前之電子版)及傳染病(HIV、SIV及H1N1流感) (Gabitzsch ES等人，Vaccine. 2009 27:6394-8；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2011 29:8101-7；Jones FR等人，Vaccine 2011 29:7020-6；Gabitzsch ES等人，Vaccine 2012 30:7265-70)之動物模型中報告，即使在Ad5高免疫性之存在下亦誘導針對所表現抗原基因之強效免疫反應。尤其相關者係利用新Ad5 [E1-, E2b-]-CEA (癌胚抗原)平臺疫苗用於晚期結腸直腸癌患者之免疫療法之研究。儘管存在既存Ad5免疫性，但仍誘導CEA導向之CMI反應；治療係充分耐受的，安全地投與且未觀察到嚴重不良效應(Morse MA等人，Cancer Immunol Immunother. 2013 62:1293-1301；Balint等人，Cancer Immunol Immunother. 2015 64:977-87)。

結果證實基於重組Ad5 [E1-, E2b-]平臺之疫苗克服既存及/或Ad5載體誘導之免疫性且誘導顯著保護性免疫反應。該等研究確定，新的基於Ad5 [E1-, E2b-]載體之疫苗1) 與目前Ad5 [E1-]載體相比，可誘導顯著較高之CMI反應；2)可利用所設計之多種免疫方案以誘導強效CMI反應，3)

可在具有既存Ad5免疫性之動物中誘導顯著抗原特異性CMI反應，及4)可在具有高既存Ad5免疫性程度之動物中誘導顯著抗腫瘤反應或保護免於傳染病。

在某些實施例中，新Ad5 [E1-, E2b-]重組平臺之創新屬性可用於開發廣泛交叉反應性流感疫苗。此可藉由將表現來自A及B型流感菌株之HA、BM2、M2及NP蛋白之保守及交叉反應性抗原的多個轉基因併入重組Ad5 [E1-, E2b-]平臺中來實現並利用為新的通用流感疫苗。

某些態樣係關於用於產生針對流感靶標抗原之免疫反應的方法及腺病毒載體。具體而言，某些態樣可提供經改良之基於Ad之疫苗，使得可達成針對多於一個抗原靶標之多次疫苗接種。重要地，疫苗接種可在存在針對Ad之既存免疫性之情形下實施Ad及/或投與先前已利用本文所述之腺病毒載體或其他腺病毒載體進行多次免疫之個體。腺病毒載體可多次投與個體以誘導針對各種A及B型流感抗原之免疫反應，包含(但不限於)產生針對A及B型流感病毒之廣譜(broad based)抗體及細胞介導免疫反應。

某些態樣提供E2b缺失腺病毒載體之用途，例如彼等闡述於美國專利第6,063,622號；第6,451,596號；第6,057,158號及第6,083,750號(所有均以其整體引用的方式併入本文中)中者。如'622專利中所述，為進一步削弱病毒蛋白表現以及降低產生複製勝任Ad (RCA)之頻率，在某些態樣中係提供在E2b區中含有缺失之腺病毒載體。該等E2b缺失之腺病毒載體之繁殖需要表現缺失E2b基因產物之細胞株。

在其他態樣中，可提供包裝細胞株；例如，源自HEK-203細胞株之E.C7 (正式地稱為C-7)(Amalfitano A等人 Proc Natl Acad Sci USA 1996 93:3352-56；Amalfitano A等人 Gene Ther 1997 4:258-63)。

此外，E2基因產物DNA聚合酶及前末端蛋白可與E1基因產物一起以組成型方式表現於E.C7或類似細胞中。基因區段自Ad基因體轉移至生產細胞株具有直接益處：(1) 增加重組DNA聚合酶及前末端蛋白缺失之腺病毒載體之攜載容量，此乃因DNA聚合酶及前末端蛋白之組合編碼序列理論上可缺失接近4.6 kb；及，(2) 降低之RCA產生之可能性，此乃因兩個或兩個以上獨立重組事件將不需要產生RCA。

因此，E1、Ad DNA聚合酶及前末端蛋白表現細胞株可使得腺病毒載體能夠以接近13 kb之攜載容量繁殖，而不需要污染性輔助病毒(Mitani等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 92:3854；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-259；Amalfitano and Parks Curr Gene Ther 2002 2:111-133)。

此外，當缺失對病毒生命週期甚為關鍵之基因(例如，E2b基因)時，進一步削弱Ab對其他病毒基因蛋白質之複製或表現。此將降低病毒感染細胞之免疫識別，且允許外源轉基因表現之延長持續時間。

然而，E1、DNA聚合酶及前末端蛋白缺失載體之重要屬性包括其不能表現來自E1及E2b區之個別蛋白質以及預計缺乏大多數病毒結構蛋白之表現。舉例而言，Ad之主要晚期啟動子(MLP)負責晚期結構蛋白L1至L5之轉錄(Doerfler, In Adenovirus DNA, The Viral Genome and Its Expression (Martinus Nijhoff Publishing Boston, 1986)。藉助在基因體複製之前使MLP最低程度地活躍，高毒性Ad晚期基因僅在發生病毒基因體複製之後才主要自MLP轉錄及轉譯(Thomas及Mathews Cell 1980 22:523)。晚期基因轉錄之此順式依賴性活化通常係DNA病毒之特徵，例如在多瘤及SV-40之生長中。DNA聚合酶及前末端蛋白係絕對為Ad複製

所需的(不像E4或蛋白IX蛋白)且因此其缺失對腺病毒載體晚期基因表現及彼表現在細胞(例如APC)中之毒性效應極其有害。

在某些實施例中，預期使用之腺病毒載體包括具有Ad基因體之E2b區及E1區中之缺失但不具有Ad基因體之任何其他區之缺失之E2b缺失腺病毒載體。在另一實施例中，預期使用之腺病毒載體可包括具有Ad基因體之E2b區中之缺失及E1及E3區中之缺失但無其他區之缺失之E2b缺失腺病毒載體。在其他實施例中，預期使用之腺病毒載體可包括具有Ad基因體之E2b區中之缺失及E1、E3中之缺失且部分或完全移除E4區但無其他缺失之腺病毒載體。

在另一實施例中，預期使用之腺病毒載體包括具有Ad基因體之E2b區中之缺失及E1及E4區中之缺失但無其他缺失之腺病毒載體。在額外實施例中，預期使用之腺病毒載體可包括具有Ad基因體之E2a、E2b及E4區中之缺失但無其他缺失之腺病毒載體。

在一個實施例中，本文使用之腺病毒載體包含具有E2b區之E1及DNA聚合酶功能缺失但無其他缺失之載體。在其他實施例中，本文使用之腺病毒載體具有E2b區之E1及前末端蛋白功能缺失且無其他缺失。

在另一實施例中，本文使用之腺病毒載體具有E1、DNA聚合酶及前末端蛋白功能缺失，且無其他缺失。在一個具體實施例中，本文預期使用之腺病毒載體缺失E2b區及E1區之至少一部分，但並非「空殼」腺病毒載體。就此而言，載體可缺失E2b區之DNA聚合酶及前末端蛋白功能二者。

如本文所用，術語「E2b缺失」係指特定DNA序列以使得阻止至少一個E2b基因產物之表現及/或功能之方式突變。因此，在某些實施例中，「E2b缺失」係指特定DNA序列自Ad基因體缺失(去除)。E2b缺失或「在

E2b區內含有缺失」係指在Ad基因體之E2b區內缺失至少一個鹼基對。因此，在某些實施例中缺失多於一對鹼基對，且在其他實施例中缺失至少20對、30對、40對、50對、60對、70對、80對、90對、100對、110對、120對、130對、140對或150對鹼基對。在另一實施例中，缺失Ad基因體之E2b區內之多於150對、160對、170對、180對、190對、200對、250對或300對鹼基對。E2b缺失係阻止至少一種E2b基因產物之表現及/或功能的缺失，且因此涵蓋編碼E2b特異性蛋白多個部分之外顯子內的缺失以及啟動子及前導序列內之缺失。在某些實施例中，E2b缺失係阻止E2b區之DNA聚合酶及前末端蛋白中之一者或二者之表現及/或功能的缺失。在其他實施例中，「E2b缺失」係指Ad基因體之此區中DNA序列中之一或多個點突變，使得一或多個所編碼蛋白無功能。該等突變包括替換為導致胺基酸序列變化之不同殘基以導致非功能性蛋白質之殘基。

如熟悉此項技術者在閱讀本揭示內容時應理解，可缺失Ad基因體之其他區。，因此，如本文所用，Ad基因體特定區中之「缺失」係指特定DNA序列以使得阻止由彼區編碼之至少一個基因產物之表現及/或功能之方式突變。在某些實施例中，特定區中之「缺失」係指特定DNA序列以使得阻止由彼區編碼之功能(例如，DNA聚合酶之E2b功能或前末端蛋白功能)之表現及/或功能之方式自Ad基因體缺失(去除)。特定區內之「缺失」或「含有缺失」係指Ad基因體之彼區內缺失至少一對鹼基對。因此，在某些實施例中缺失多於一對鹼基對，且在其他實施例中至少20對、30對、40對、50對、60對、70對、80對、90對、100對、110對、120對、130對、140對或150對鹼基對自特定區缺失。在另一實施例中，缺失Ad基因體之彼區內多於150對、160對、170對、180對、190對、200對、

250對或300對鹼基對。

該等缺失係使得由該區編碼之基因產物的表現及/或功能可受到阻止。因此，缺失涵蓋編碼蛋白質多個部分之外顯子內之缺失以及啟動子及前導序列內之缺失。在其他實施例中，Ad基因體特定區中之「缺失」係指Ad基因體之此區中DNA序列中之一或多個點突變，使得一或多個所編碼蛋白無功能。該等突變包括替換為導致胺基酸序列變化之不同殘基以導致非功能性蛋白質之殘基。

包含一或多個缺失之腺病毒載體可使用此項技術中已知之重組技術產生(參見例如Amalfitano等人，J. Virol. 1998 72:926-33；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-59)。如此項技術者將認識到，所用腺病毒載體可使用組成性表現E2b基因產物及可已經缺失之任何必須基因之產物之適當包裝細胞株成功生長至高效價。在某些實施例中，可使用組成性表現E1及DNA聚合酶蛋白以及Ad-前末端蛋白之HEK-293衍生細胞。在一個實施例中，已使用E.C7細胞成功生長腺病毒載體之高效價儲存株(參見例如Amalfitano等人，J. Virol. 1998 72:926-33；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-59)。

為使自繁殖腺病毒載體缺失關鍵基因，由靶向基因編碼之蛋白質必須首先與E1蛋白一起共表現於HEK-293細胞或類似細胞。因此，僅可利用彼等當組成性共表現時無毒之蛋白質(或誘導性表現之毒性蛋白)。已展現E1及E4基因於HEK-293細胞中之共表現(利用誘導型而非組成型啟動子) (Yeh等人，J. Virol. 1996 70:559；Wang等人，Gene Therapy 1995 2:775；及Gorziglia等人，J. Virol. 1996 70:4173)。E1及蛋白IX基因(病毒體結構蛋白)已經共表現(Caravokyri及Leppard J. Virol. 1995

69:6627)，且亦已闡述E1、E4及蛋白IX基因之共表現(Krougliak及Graham Hum. Gene Ther. 1995 6:1575)。E1及100k基因已如同E1及蛋白酶基因一樣成功表現於反式互補細胞株中(Oualikene等人，Hum Gene Ther 2000 11 :1341-53；Hodges等人，J. Virol 2001 75:5913-20)。

共表現E1及E2b基因產物用於生長高效價E2b缺失Ad粒子之細胞株闡述於美國專利第6,063,622號中。E2b區編碼Ad基因體複製絕對需要之病毒複製蛋白(Doerfler, 如上，及Pronk等人，Chromosoma 1992 102:S39-S45)。有用細胞株組成性表現大約140 kDa Ad- DNA聚合酶及/或大約90 kDa前末端蛋白。具體而言，期望具有E1、DNA聚合酶及前末端蛋白之高含量、組成性共表現而無毒性之細胞株(例如，E.C7)用於繁殖用於多次疫苗接種之Ad。該等細胞株允許繁殖E1、DNA聚合酶及前末端蛋白缺失之腺病毒載體。

重組Ad可使用此項技術中已知之技術繁殖。舉例而言，在某些實施例中，將含有E.C7細胞之組織培養板用腺病毒載體病毒儲存株以適當MOI (例如，5)感染並在37.0℃下培育40-96 h。收穫受感染細胞，重新懸浮於10 mM Tris-Cl (pH 8.0)中並進行音波處理，且病毒藉由兩輪氯化銫密度離心來純化。在某些技術中，含有病毒之帶經Sephadex CL-6B管柱(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)脫鹽，添加蔗糖或甘油，並將等份試樣儲存於-80℃下。在一些實施例中，病毒將置於經設計以增強其穩定性之溶液中(例如，A195) (Evans等人，J Pharm Sci 2004 93:2458-75)。量測儲存株之效價(例如，藉由在SDS溶解之後量測病毒等份試樣在260 nm下之光學密度)。在另一實施例中，可將包容整個重組E2b缺失腺病毒載體之線性或環狀質體DNA轉染至E.C7或類似細胞中，並在37.0℃下培

育直至出現病毒生產之跡象為止(例如，細胞病變效應)。然後來自該等細胞之條件培養基可用於感染更多E.C7或類似細胞，以在純化之前擴大所產生病毒之量。

純化可藉由兩輪氯化銫密度離心或選擇性過濾來完成。在某些實施例中，可藉由管柱層析使用市售產品(例如，來自Puresyn, Inc., Malvem, PA之Adenopure)或定製層析管柱來純化病毒。

在某些實施例中，重組Ad包含足夠病毒以確保欲感染之細胞遭遇相當數量之病毒。因此，可提供重組Ad之儲存株、具體而言重組Ad之無RCA之儲存株。儲存株之製備及分析已為此項技術熟知。病毒儲存株之效價相差較大，此主要取決於病毒基因型及用於製備其之方案及細胞株。病毒儲存株可具有至少約10^6、10^7或10^8 pfu/ml之效價，且許多該等儲存株可具有更高效價，例如至少約10^9、10^{10}、10^{11}或10^{12} pfu/ml。

異源核酸

腺病毒載體亦包含編碼期望針對其以產生免疫反應之若干所關注靶標抗原、其片段或融合體之異源核酸序列。在一些實施例中，腺病毒載體包含編碼可調節免疫反應之若干蛋白質、其融合體或其片段之異源核酸序列。因此，某些態樣提供包含異源核酸序列之第二代E2b缺失腺病毒載體。

同樣地，某些態樣提供編碼若干所關注之流感靶標抗原核酸序列，在本文中亦稱為多核苷酸。同樣地，某些態樣提供編碼來自本文進一步闡述之任何源靶標抗原之多核苷酸、包含該等多核苷酸之載體及利用該等表現載體轉型或轉染之宿主細胞。術語「核酸」及「多核苷酸」在本文中基本上可互換。如熟習此項技術者亦將認識到，多核苷酸可係單股(編碼或

反義)或雙股，且可為DNA (基因體、cDNA或合成)或RNA分子。RNA分子可包括含有內含子且以一對一方式對應於DNA分子之HnRNA分子及不含內含子之mRNA分子。其他編碼或非編碼序列可(但不需要)存在於多核苷酸內，且多核苷酸可(但不需要)鏈接至其他分子及/或支撐材料。如本文所用，經分離多核苷酸意指多核苷酸實質上遠離其他編碼序列。舉例而言，本文所用之經分離DNA分子不含大比例之不相關編碼DNA，例如大的染色體片段或其他功能基因或多肽編碼區。當然，此係指初始分離之DNA分子，且並不排除隨後在實驗室中以重組方式添加至區段之基因或編碼區。

如熟習此項技術者將瞭解，多核苷酸可包括表現或可適於表現本文所述靶標抗原、抗原片段、太及諸如此類之基因體序列、基因體外及質體編碼序列及較小工程化基因區段。該等區段可自然分離，或藉由人工以合成方式修飾。

多核苷酸可包含自然序列(即，編碼靶標抗原多肽/蛋白質/表位或其一部分之內源性序列)，或可包含編碼此一序列之變體或衍生物之序列。在某些實施例中，本文所述之多核苷酸序列編碼本文所述之靶標抗原蛋白。在一些實施例中，多核苷酸代表經最佳化用於在特定細胞類型(即，人類細胞系)中表現之新穎基因序列，其可實質上不同於天然核苷酸序列或變體但編碼類似蛋白質抗原。

在其他相關實施例中，可提供與編碼本文所述蛋白質(例如，所關注靶標抗原)之自然序列實質上一致之多核苷酸變體，例如使用本文所述之方法(例如，使用標準參數之BLAST分析，如下文所述)，彼等與編碼多肽之天然多核苷酸相比包含至少70%序列一致性、具體而言至少75%直至

99%或更高序列一致性。熟習此項技術者應認識到，藉由計及密碼子簡併、胺基酸相似性、閱讀框定位及諸如此類，該等值可適當調整以確定由兩個核苷酸序列所編碼蛋白質之相應一致性。

在某些態樣中，多核苷酸變體將含有一或多個取代、添加、缺失及/或插入，具體而言使得由變體多核苷酸所編碼多肽之表位的免疫原性或使得異源性靶標蛋白之免疫原性相對於由天然多核苷酸序列編碼之多肽並未實質上減弱。如本文其他地方所述，多核苷酸變體可編碼靶標抗原之變體、或其片段(例如，表位)，其中變體多肽或其片段(例如，表位)與抗原特異性抗血清及/或T細胞株或純系反應之傾向相對於天然多肽並未實質上減弱。術語「變體」應理解為涵蓋異種基因起源之同源性基因。

某些態樣可提供包含至少約5個至多達1000個或更多個、以及其間之中間長度之編碼多肽(包括本文所述之靶標蛋白抗原)之連續核苷酸或由其組成之多核苷酸。將易於理解，「中間長度」在此上下文中意指所引證值之間之任何長度，例如16、17、18、19等；21、22、23等；30、31、32等；50、51、52、53等；100、101、102、103等；150、151、152、153等；包括200-500之所有整數；500-1,000，及諸如此類。本文所述之多核苷酸序列可在一端或兩端藉由在編碼本文所述之多肽(例如表位或異源性靶標蛋白)之自然序列中未發現之額外核苷酸延伸。此額外序列可在所揭示序列之任一端或在所揭示序列之兩端由1個至多達20個核苷酸或更多個組成。

在某些實施例中，多核苷酸或其片段(無論自身編碼序列之長度如何)可與其他DNA序列組合，例如啟動子、表現控制序列、多腺苷酸化信號、額外限制酶位點、多選殖位點、其他編碼區段及諸如此類，使得其整

個長度可有相當大變化。因此，預期可採用幾乎任何長度之核酸片段，其中總長度可受限於製備之容易度及在預期重組DNA方案中之用途。舉例而言，總長度為約1000對、2000對、3000對、4000對、5000對、6000對、7000對、8000對、9000對、10,000對、約500對、約200對、約100對、約50對鹼基對長度及諸如此類(包括所有中間長度)之說明性多核苷酸區段預期可用於許多實施方案中。

當比較多核苷酸序列時，當如下文所述針對最大相關性進行比對時，若兩個序列中之核苷酸序列相同，則稱兩個序列係「一致的」。兩個序列之間之比較可藉由在比較窗上比較序列來實施以鑑別並比較局部區之序列相似性。如本文所用，「比較窗」係指至少約20個連續位置、通常30個至約75個、40個至約50個之區段，其中，在兩個序列進行最佳比對後，可將序列與具有同樣數目之連續位置的參考序列相比較。

用於比較之序列最佳比對可使用Lasergene生物資訊軟體套件(DNASTAR, Inc., Madison, WI)中之Megalign程式使用預設參數實施。此程式體現了如下參考文獻中所述之若干比對方案：Dayhoff MO (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff MO (編輯) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 第5卷, 增刊3, 第345-358頁；Hein J Unified Approach to Alignment and Phylogenes, 第626-645頁(1990)；Methods in Enzymology 第183卷, Academic Press, Inc., San Diego, CA；Higgins DG and Sharp PM CABIOS 1989 5:151-53；Myers EW及Muller W CABIOS 1988 4:11-17；Robinson ED Comb. Theor 1971 11A 05；Saitou N, Nei M Mol.

Biol. Evol. 1987 4:406-25；Sneath PHA and Sokal RR Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973)；Wilbur WJ and Lipman DJ Proc. Natl. Acad., Sci. USA 1983 80:726-30)。

或者，用於比較之序列最佳比對可藉由以下實施：Smith及Waterman , Add. APL. Math 1981 2:482之局部一致性演算法、Needleman及Wunsch J. Mol. Biol. 1970 48:443之一致性比對演算法、Pearson及Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988 85:2444之相似性檢索方法、該等演算法之電腦實施方案(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI中之GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA及TFASTA)或檢查。

適於確定序列一致性%及序列相似性演算法之一個實例係BLAST及BLAST2.0演算法，該等分別闡述於Altschul等人，Nucl. Acids Res. 1977 25:3389-3402, 及Altschul等人，J. MoI. Biol. 1990 215:403-10中。BLAST及BLAST 2.0可用於利用本文所述之參數確定多核苷酸之序列一致性%。用於實施BLAST分析之軟體藉助國家生物技術信息中心(National Center for Biotechnology Information)可公開得到。在一個說明性實例中，對於核苷酸序列，可使用參數M (一對匹配殘基之獎賞得分；總是 >0)及N (失配殘基之懲罰得分；總是<0)計算累積得分。當累積比對得分自其最大所得值減少數量X時；當由於一或多個負得分殘基比對之積累而導致累積得分達到零或以下時；或當到達序列任一端點時，在每一方向中單詞擊中(word hit)之延伸終止。BLAST演算法參數W、T及X決定了比對的敏感性及速度。BLASTN程式(對於核苷酸序列而言)使用11之

字長(W)及10之期望值(E)作為預設值及BLOSUM62評分矩陣(參見Henikoff及Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 89:10915)比對、50之(B)、10之期望值(E)、M=5、N=-4並比較兩條鏈。

在某些態樣中，「序列一致性%」係藉由在至少20個位置之比較窗中比較兩個最佳比對序列來確定，其中為對兩個序列進行最佳比對，比較窗中之多核苷酸序列部分與參照序列(其不包含添加或缺失)相比可包含20%或更低、通常5%至15%或10%至12%之添加或缺失(即缺口)。百分比係藉由以下計算：確定兩個序列中出現相同核酸殘基之位置數目以產生匹配位置數目，匹配位置數目除以參照序列(即，窗大小)中之總位置數目且將結果乘以100以產生序列一致性%。

彼等熟習此項技術者將明瞭，由於遺傳密碼之簡併，存在許多編碼所關注具體抗原或其片段之核苷酸序列，如本文所述。該等多核苷酸中之一些與任何天然基因之核苷酸序列具有最小同源性。儘管如此，在某些態樣中特別預期由於密碼子使用之不同而有所變化之多核苷酸。此外，亦預期包含本文所提供多核苷酸序列之基因的等位基因。等位基因係由於一或多個突變(例如核苷酸之缺失、添加及/或取代)而改變之同源性基因。所得mRNA及蛋白質可(但不需要)具有改變之結構或功能。等位基因可使用標準技術(例如，雜交、擴增及/或數據庫序列比較)來。

因此，在另一實施例中，採用誘變途徑(例如位點特異性誘變)用於製備本文所述之靶標抗原序列或其片段之變體及/或衍生物。藉由此途徑，多肽序列中之特定修飾可藉助編碼其之潛在多核苷酸的誘變來進行。該等技術提供用以製備及測試序列變體之直接途徑，例如併入一或多個上述考慮因素、藉由將一或多個核苷酸序列變化引入多核苷酸中。

位點特異性誘變允許藉助使用編碼期望突變之DNA序列的特定寡核苷酸序列以及足夠數量之毗鄰核苷酸產生突變體，以提供足夠大小及序列複雜性之引子序列以在橫越缺失接合處之兩側上形成穩定雙鏈體 突變可用於所選多核苷酸序列中以改良、改變、降低、修飾或以其他方式變化多核苷酸自身之性質、及/或改變所編碼多肽之性質、活性、組成、穩定性或一級序列。

編碼多肽之多核苷酸區段或片段可容易地藉由(例如)如通常所實踐使用自動化寡核苷酸合成器藉由化學方式直接合成片段來製備。而且，片段可藉由實施核酸複製技術(例如美國專利第4,683,202號之PCR™技術)、藉由將所選序列引入重組載體中用於重組生產及藉由彼等熟習分子生物學技術者通常已知之重組DNA技術(參見例如，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY, NY)來獲得。

為表現本文所述之期望靶標抗原多肽或其片段、或包含以上任一者之融合蛋白，將編碼多肽或功能等效物之核苷酸序列使用此項技術中已知之重組技術插入至本文其他地方所述之適當Ad中。適當腺病毒載體含有用於轉錄及轉譯所插入編碼序列及任何期望鏈接體之必需元件。可使用熟習此項技術者熟知之方法來構築含有編碼所關注多肽之序列及適當轉錄及轉譯控制元件之該等腺病毒載體。該等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內基因重組。該等技術闡述於(例如) Amalfitano等人，J. Virol. 1998 72:926-33；Hodges等人，J Gene Med 2000 2:250-259；Sambrook J等人，(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.及Ausubel FM等人，(1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.

N.Y.中。

可利用各式各樣載體/宿主系統，以容納及產生多核苷酸序列。該等包括(但不限於)微生物，例如經重組噬菌體、質體或黏接質體DNA載體轉型之細菌；經酵母載體轉型之酵母；經病毒載體(例如，桿狀病毒)感染之昆蟲細胞系統；經病毒載體(例如，花椰菜嵌紋病毒，CaMV；煙草嵌紋病毒，TMV)或細菌載體(例如，Ti或pBR322質體)轉型之植物細胞系統；或動物細胞系統。

腺病毒載體中存在之「控制元件」或「調控序列」係載體之彼等非轉譯區(增強子、啟動子、5'及3'非轉譯區)，該等非轉譯區會與宿主細胞蛋白相互作用以實施轉錄及轉譯。該等元件之強度及特異性會有所變化。端視所用之載體系統及宿主而定，可使用任何數量之適宜轉錄及轉譯元件，包括組成型及誘導型啟動子。舉例而言，編碼所關注多肽之序列可連接至由晚期啟動子及三聯前導序列組成之Ad轉錄/轉譯複合體。插入病毒基因體之非必需E1或E3區中可用於獲得能夠在感染宿主細胞中表現多肽之有活力病毒(Logan J及Shenk T (1984) Proc. Natl. Acad. Sci 1984 87:3655-59)。此外，轉錄增強子(例如，勞斯肉瘤病毒(RSV)增強子)可用於增加在哺乳動物宿主細胞中之表現。

特定起始信號亦可用於達成編碼所關注多肽之序列的更有效轉譯。該等信號包括ATG起始密碼子及毗鄰序列。在其中編碼多肽之序列、其起始密碼子及上游序列插入適當表現載體之情形中，可不需要額外轉錄或轉譯控制信號。然而，在其中僅插入編碼序列或其一部分之情形中，應提供包括ATG起始密碼子在內之外源性轉譯控制信號。此外，起始密碼子應位於正確閱讀框中以確保整個插入物之轉譯。外源性轉譯元件及起始密碼子

可具有天然及合成二者之不同起源。表現效率可藉由包括對於所用之具體細胞系統而言適當之增強子(例如文獻中所述之彼等)來增強(Scharf D.等人，Results Probl. Cell Differ. 1994 20:125-62)。亦可併入用於轉錄或轉譯之特定終止序列以達成編碼所選多肽之序列的有效轉譯。

此項技術中已知使用特定針對產物之多株或單株抗體用於檢測及量測多核苷酸編碼之產物(例如，所關注靶標抗原)之表現的各種方案。實例包括酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)劑螢光活化細胞分選(FACS)。利用單株抗體對既定多肽上之兩個非干擾表位之反應性的雙位點、基於單株之免疫分析可用於一些應用，但亦可採用競爭性結合分析。該等及其他分析闡述於Hampton R等人，(1990；Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul. Minn.)及Maddox DE等人，J. Exp. Med. 1983 758:1211-16)中以及其他地方。腺病毒載體可包含編碼若干所關注流感抗原之核酸序列。

在某些實施例中，將增加期望靶標抗原之表現的元件併入本文所述腺病毒載體之核酸序列中。該等元件包括內部核糖體結合位點(IRES；Wang及Siddiqui Curr. Top. Microbiol. Immunol 1995 203:99；Ehrenfeld及Semler Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1995 203:65；Rees等人，Biotechniques 1996 20:102；Sugimoto等人，Biotechnology 1994 2:694)。IRES增加轉譯效率。同樣，其他序列可增強表現。對於一些基因而言，序列尤其在5'端抑制轉錄及/或轉譯。該等序列通常係可形成髮夾結構之迴文序列。欲遞送核酸中之任何該等序列可經缺失或不缺失。

轉錄物或經轉譯產物之表現含量可經分析以證實或確定影響表現之序列。轉錄含量可藉由任一已知方法分析，包括北方墨點雜交(Northern

blot hybridization)、RNase探針保護及諸如此類。蛋白質含量可藉由任一已知方法分析，包括ELISA。如此項技術者將認識到，包含異源核酸序列之腺病毒載體可使用此項技術中已知之重組技術產生，例如彼等闡述於以下中者：Maione等人，Proc Natl Acad Sci USA 2001 98:5986-91；Maione等人，Hum Gene Ther 2000 1:859-68；Sandig等人，Proc Natl Acad Sci USA, 2000 97:1002-07；Harui等人，Gene Therapy 2004 11:1617-26；Parks等人，Proc Natl Acad Sci USA 1996 93:13565-570；DelloRusso等人，Proc Natl Acad Sci USA 2002 99:12979-984；Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY, NY)。

如上所述，腺病毒載體包含編碼若干所關注流感靶標蛋白或抗原之核酸序列。就此而言，載體可含有編碼1至4種或更多種所關注之不同靶標抗原之核酸。靶標抗原可為全長蛋白或可為其片段(例如，表位)。腺病毒載體可含有編碼來自所關注之一種靶標蛋白之多個片段或表位的核酸序列，或可含有一或多個來自所關注之許多不同靶標流感抗原蛋白之片段或表位。

在某些實施例中，免疫原性片段結合至MHC I型或II型分子。如本文所用，若該結合可可使用此項技術中已知之任何分析檢測，則稱免疫原性片段「結合至」MHC I型或II型分子。舉例而言，多肽結合至MHC I型之能力可藉由監測促進^{125}I標記之β2-微球蛋白(β2m)併入MHC I型/β2m/肽異源三聚體複合物之能力間接評估(參見Parker等人，J. Immunol. 752:163, 1994)。或者，可採用此項技術中已知之功能肽競爭分析。多肽之免疫原性片段通常可使用熟知技術鑑別，例如彼等匯總於Paul, Fundamental Immunology, 第3版, 243-247 (Raven Press, 1993)及其中引用之參考文獻

中者。鑑別免疫原性片段之代表性技術包括針對與抗原特異性抗血清及/或T細胞株或純系反應之能力篩選多肽。具體靶標多肽之免疫原性片段係以並不實質上低於全長靶標多肽之反應性(例如，在ELISA及/或T細胞反應性分析中)之位準與該等抗血清及/或T細胞反應之片段。換言之，免疫原性片段在該等分析內可以類似或高於全長多肽反應性之位準反應。該等篩選通常可使用彼等熟習此項技術者熟知之方法實施，例如彼等闡述於Harlow及Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988中者。

靶標抗原包括(但不限於)源自A及B型流感病毒中之任一者的抗原。靶標抗原可包括藉由本文所述之感染性流感病毒中之任一者產生之蛋白質，例如(但不限於)病毒抗原蛋白，即，B型流感M2蛋白、血球凝集素、基質蛋白M1、基質蛋白M2、核蛋白及神經胺糖酸苷酶。如本文所用，「感染物」係能夠感染宿主之任何活的生物體。感染物包括(例如)任何種類之A及B型流感病毒。

腺病毒載體亦可包括編碼增加靶標抗原免疫原性之蛋白質的核酸序列。就此而言，利用含有此一蛋白質之腺病毒載體免疫接種後產生之蛋白質可係融合蛋白，其包含融合至增加所關注靶標抗原之免疫原性之蛋白質的所關注靶標抗原。

使用方法

腺病毒載體可用於許多疫苗設置用於產生針對本文所述之一或多種靶標抗原之免疫反應。由於腺病毒載體可用於在對Ad具有既存免疫性之個體中產生免疫反應且可用於包括使用腺病毒載體進行多輪免疫接種之疫苗接種方案、不可能使用上一代腺病毒載體之方案之意外發現，故腺病毒

載體特別重要。

通常，產生免疫反應包含誘導體液反應及/或細胞介導反應。在某些實施例中，期望增加針對所關注靶標抗原之免疫反應。同樣地，「產生免疫反應」或「誘導免疫反應」包含任何統計顯著改變，例如，一或多種細胞(T細胞、B細胞、抗原呈現細胞、樹突細胞、嗜中性球及諸如此類)數量或該等免疫細胞中之一或多者之活性(CTL活性、HTL活性、細胞介素分泌、細胞介素分泌輪廓之改變等)之增加。

熟習此項技術者將易於明瞭有許多方法可供用於確立免疫反應中是否發生變化。用於檢測免疫反應中之變化(例如，細胞數量、細胞介素表現、細胞活性)之許多方法已為此項技術中已知且在本發明之上下文中可使用。說明性方法闡述於以下中：Current Protocols in Immunology, 由以下編輯：John E. Coligan、Ada M. Kruisbeek、David H. Margulies、Ethan M. Shevach、Warren Strober (2001 John Wiley & Sons, NY, NY) Ausubel等人，(2001 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY)；Sambrook等人，(1989 Molecular Cloning, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)；Maniatis等人，(1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)以及其他。在此上下文中可使用之說明性方法包括細胞內細胞介素染色(ICS)、ELISpot、增殖分析、細胞毒性T細胞分析(包括鉻釋放或等效分析)、及使用許多聚合酶鏈反應(PCR)或基於RT-PCR之分析的基因表現分析。

在某些實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標抗原特異性CTL活性與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍、至少、

大約或至多1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或源自其之任何範圍或數值。在另一實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標特異性CTL活性與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍。在其他實施例中，產生免疫反應包含靶標抗原特異性細胞介導免疫活性與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍，如藉由ELISpot分析量測細胞介素分泌(例如，干擾素-γ (IFN-γ)、介白素-2 (IL-2)、腫瘤壞死因子-α (TNF-α)、顆粒酶或其他細胞介素)來量測。

在其他實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標特異性抗體產生與適當對照相比增加1.5倍與5倍之間。在另一實施例中，產生免疫反應包含使投與腺病毒載體之個體中之靶標特異性抗體產生與對照相比增加約1.5至20倍或更多倍。

因此，某些態樣可提供產生針對所關注流感病毒靶標抗原之免疫反應之方法，其包含向該個體投與包含以下之腺病毒載體：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼該等靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體重投與給該個體至少一次；由此產生針對該等靶標抗原之免疫反應。在某些實施例中，可提供其中所投與載體不為空殼載體之方法。

在其他實施例中，可提供在個體中產生針對流感病毒靶標抗原之免疫反應之方法，其中該個體對Ad具有既存免疫性，該方法藉由以下實施：向該個體投與包含以下之腺病毒載體：a) 複製缺陷型腺病毒載體，其中該腺病毒載體在E2b區中具有缺失，及b) 編碼該等靶標抗原之核酸；及將該腺病毒載體再投與給該個體至少一次；由此產生針對流感病毒靶標抗原之免疫反應。

關於針對Ad之既存免疫性，此可使用此項技術中已知之方法測定，例如基於抗體之分析以測試Ad抗體之存在。此外，在某些實施例中，方法可包括首先確定個體對Ad具有既存免疫性，然後投與本文所述之E2b缺失腺病毒載體。

在某些態樣中，可提供產生針對流感靶標抗原(例如本文其他地方所闡述之彼等)之免疫反應的方法。

在具體態樣中，可提供產生針對A及B型流感病毒(例如本文其他地方所闡述之彼等)之免疫反應的方法。

如本文其他地方所述，腺病毒載體包含編碼來自產生針對其之免疫反應之任一或多種感染物之一或多種所關注靶標抗原之核酸序列。舉例而言，靶標抗原可包括(但不限於)病毒抗原蛋白，即B型流感M2蛋白、血球凝集素、基質蛋白M1、基質蛋白M2、核蛋白及神經胺糖酸苷酶。

對於投與，腺病毒載體儲存株可與任何適當緩衝劑、生理上可接受之載劑、賦形劑或諸如此類組合。在某些實施例中，適當數量之腺病毒載體粒子係於適當緩衝劑(例如，無菌PBS)中投與。

在某些情況中，可期望非經腸、經靜脈內、經肌內或甚至經腹膜內遞送本文所揭示之腺病毒載體組合物。在某些實施例中，呈游離鹼或醫藥上可接受之鹽之活性化合物之溶液可於適當混有表面活性劑(例如羥丙基纖維素)之水中製備。亦可於甘油、液體聚乙二醇及其混合物及於油中製備懸浮液。在其他實施例中，E2b缺失腺病毒載體可以丸劑形式遞送，藉由吞嚥或藉由栓劑遞送。

適用於注射用途之說明性醫藥形式包括無菌水溶液或懸浮液及用於臨時製備無菌可注射水溶液或懸浮液之無菌粉末(例如，參見美國專利第

5,466,468號)。在所有情形中，形式必須無菌且在調配物易於上拉並推動穿過注射器之意義上必須係流體。其在製造及儲存之條件下必須穩定且必須經保藏以對抗微生物(例如，細菌、黴菌及真菌)之污染作用。載劑可為溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、乙二醇及液體聚乙二醇及諸如此類)、其適宜混合物及/或植物油。可藉由(例如)使用塗層(例如卵磷脂)、在分散液之情形中藉由維持所需粒徑及/或藉由使用表面活性劑維持適當流動性。可藉由各種抗細菌及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯(parabens)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及諸如此類)促進防止微生物作用。在許多情形中，其可包括等滲劑，例如，糖或氯化鈉。可藉由在組合物中使用延遲吸收之藥劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)使得可注射組合物延長吸收。

在一個實施例中，對於於水溶液中非經腸投與，溶液應適當緩衝(若需要)且首先利用足夠鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑等滲。該等具體水溶液尤其適用於靜脈內、肌內、皮下及腹膜內投與。就此而言，可採用之無菌水性介質將為熟習此項技術者根據本發明而得知。舉例而言，可將1個劑量溶於1 ml等滲NaCl溶液中或添加至1000 ml皮下灌注流體或在建議注射位點注射(參見例如「Remington's Pharmaceutical Sciences」 第15版，第1035-1038頁及第1570-1580頁)。必然將發生劑量之一些變化，此取決於所治療個體之病況。而且，對於人類投與，製劑可需要符合無菌、發熱性及一般安全及純度標準，如由FDA生物標準辦公室(Office of Biology standards)所要求。

載劑可進一步包含任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、塗料、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等滲及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮

液、膠體及諸如此類。該等介質及試劑用於醫藥活性物質之用途在此項技術中已熟知。除任何習用介質或藥劑與活性成份不相容以外，涵蓋其於治療組合物中之使用。補充性活性成份亦可併入組合物中。片語「醫藥上可接受」係指當投與人類時不會產生過敏或類似不良反應之分子實體或組合物。

本文所述治療組合物之投與途徑及頻率以及劑量將在個體與個體間及疾病與疾病間而變，且可使用標準技術容易地確立。一般而言，醫藥組合物及疫苗可藉由注射(例如，皮內、肌內、靜脈內或皮下)、經鼻內(例如，藉由吸入)、以丸劑形式(例如吞嚥、用於陰道或直腸遞送之栓劑)來投與。在某些實施例中，1個與3個間之劑量可經6週時期投與且此後可週期性給予進一步加強疫苗接種。

適宜劑量係當腺病毒載體如上所述投與時能夠如本文其他地方所述促進靶標抗原免疫反應之量。在某些實施例中，免疫反應高於基礎(即，為經治療)位準至少10-50%。該反應可藉由量測患者中之靶標抗原抗體或藉由能夠在活體外殺死流感感染細胞之細胞溶解性效應細胞之疫苗依賴性產生或此項技術中已知用於監測免疫反應之其他方法來監測。

一般而言，適當劑量及治療方案提供足以提供預防移益處之量的腺病毒載體。保護性免疫反應通常可使用標準增殖、細胞毒性或細胞介素分析來評估，其可使用在免疫接種(疫苗接種)之前及之後自患者獲得之試樣來實施。

儘管一個優點係尤其在對Ad具有既存免疫性之個體中利用相同腺病毒載體投與多次疫苗接種之能力，但腺病毒疫苗亦可作為初免及加強方案之一部分投與。混合模式初免及加強接種方案可導致增強之免疫反應。

因此，一個態樣係藉由投與質體疫苗至少一次利用質體疫苗(例如包含所關注靶標抗原之質體載體)對個體進行初免、允許經過預定時間長度、且然後藉由投與腺病毒載體進行加強之方法。可採用多次初免，例如1-3，但可使用更多次。初免與加強間之時間長度可自約6個月至1年之間變化，但可使用其他時間框。

在某些實施例中，組合物或複製缺陷型病毒載體進一步包含編碼共刺激分子之核酸序列。在某些實施例中，共刺激分子包含B7、ICAM-1、LFA-3或其組合。在具體實施例中，共刺激分子包含B7、ICAM-1及LFA-3之組合。在某些態樣中，組合物進一步包含編碼位於同一複製缺陷型病毒載體中之複數個共刺激分子之複數個核酸序列。在某些態樣中，組合物進一步包含編碼位於單獨的複製缺陷型病毒載體中之複數個共刺激分子之複數個核酸序列。

在具體態樣中，包含複製缺陷型病毒載體之組合物包含編碼本文所述流感病毒靶標抗原之核酸序列且進一步包含一或多個編碼B7、ICAM-1、LFA-3或其組合之核酸序列。

在一些實施例中，本發明提供含有至少1×10^{8}個病毒粒子(VP)且不多於1×10^{10}個VP之劑量之包含靶標抗原之複製缺陷型腺病毒載體之組合物。在其他實施例中，本發明提供含有至少1×10^{8}個VP且不多於5×10^{11}個VP之劑量之包含靶標抗原之複製缺陷型腺病毒載體之組合物。在一些實施例中，本發明提供含有至少1×10^{8}個VP且不多於1×10^{12}個VP之劑量之包含靶標抗原之複製缺陷型腺病毒載體之組合物。在具體實施例中，本發明提供以至少1×10^{8}個VP且不多於1×10^{10}個VP之劑量投與複製缺陷型腺病毒載體之方法。在其他實施例中，本發明提供以至少1×10^{8}個VP且不多

於5×10^{11}個VP之劑量投與複製缺陷型腺病毒載體之方法。在一些實施例中，本發明提供以至少1×10^{8}個VP且不多於1×10^{12}個VP之劑量投與複製缺陷型腺病毒載體之方法。

在其他實施例中，本文所述之疫苗或醫藥組合物可包含至少個、大約或至多10^{3}個、10^{4}個、10^{5}個、10^{6}個、10^{7}個、10^{8}個、10^{9}個、10^{10}個、10^{11}個、10^{12}個、10^{13}個、10^{14}個、10^{15}個、10^{16}個、10^{17}個、10^{18} 個、10^{19}個、10^{20}個病毒粒子或可源自其之任何數量或範圍。在具體實施例中，本文所述之疫苗或醫藥組合物可包含至少個、大約或至多10^{9}個、10^{10}個、10^{11}病毒粒子或可源自其之任何數量或範圍。

在某些實施例中，本文所述之疫苗或醫藥組合物可以預定間隔投與，例如至少、大約或至多每小時、每天、每週、每兩週、每三週、每一個月、每二個月、每三個月、每一季度、每二季度、每三季度、每年或每十年1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、30次、40次、50次、100次、120次、130次、140次、150次之間隔或可源自其之任何間隔或範圍。

上述各個實施例可組合以提供其他實施例。本說明書中所提及及/或申請資料表單中所列示之所有美國專利、美國專利申請公開案、美國專利申請案、外國專利、外國專利申請案及非專利出版物均以其整體引用的方式併入本文中，其併入程度如同每一個別公開案、專利或專利申請案均特定且個別地指示以引用的方式併入一般。

實施例之態樣可進行修改、必要時採用各個專利、申請案及公開案之概念以提供其他實施例。

可根據以上詳細說明對實施例作出該等及其他變化。一般而言，在以下申請專利範圍中，所用術語不應解釋為將申請專利範圍限於說明書及申請專利範圍中所揭示之特定實施例，而應解釋為包括所有可能實施例以及該等申請專利範圍授權之等效物之全部範圍。因此，申請專利範圍並不受限於揭示內容。

實例

藉由參考以下實驗實例進一步詳細闡述本發明。除非另有說明，否則該等實例僅出於說明目的而提供，且並不意欲具有限制性。因此，本發明決不應理解為限於以下實例，而應理解為涵蓋因本文所提供之教示而變得明瞭之任何及所有變化形式。

實例1

構築多個流感抗原基因用於插入Ad5 [E1-, E2b-]載體中

此實例闡述構築多個流感抗原基因用於插入Ad5 [E1-, E2b-]載體中。為產生含有多種流感抗原之Ad5 [E1-, E2b-]，個別流感抗原基因序列將由分別源自豬鐵士古病毒-1及明脈扁刺蛾β四體病毒之「自裂解」 2A肽隔開(參見**圖1A**) (de Felipe P及Ryan M Traffic 2004 5(8), 616-26；Holst J等人，Nature Immunol. 2008 9:658–66；Kim JH等人，PloS One, 2011 6(4), e18556. doi:10.1371/journal.pone.0018556)。隨著2A肽轉譯於核糖體上，2A肽之最後兩個殘基間絕不會形成肽鍵，此使得在一次核糖體傳遞過程(pass)中明確表現蛋白質。使用兩個2A肽序列隔開三個基因將導致三種蛋白質之接近化學計量表現。同樣地，可構築由分別源自豬鐵士古病毒-1及明脈扁刺蛾β四體病毒之單一「自裂解」 2A肽隔開之含有兩個抗原基因序列之Ad5 [E1-, E2b-] (**圖1B**)。

實例2

流感蛋白質在用Ad5 [E1-, E2b]-M1/NP/HA細胞感染後之表現

此實例闡述流感蛋白質在用Ad5 [E1-, E2b]-M1/NP/HA細胞感染後之表現。A549細胞利用含有基質1 (M1)蛋白、核蛋白(NP)及血球凝集素(HA)之Ad5 [E1-, E2b]載體感染。藉由西方墨點法(Western blotting)證實M1、NP及HA之表現。如**圖2**中所示，可構築並產生含有來自A型流感(Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA)之基因插入物之所有三種(3) 血球凝集素(HA)、核蛋白(NP)及基質1 (M1)蛋白之基於Ad5 [E1-, E2b-]之平臺。如**實例3**及**實例4**中所示，此疫苗在小鼠中具有免疫原性，其誘導HA、NP及M1導向之免疫反應。

實例3

針對Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種之抗體反應

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後針對流感血球凝集素(HA)抗原之抗體反應。將每組五隻小鼠以1×10^{8}、1×10^{9}或1×10^{10}個病毒粒子(VP) Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA之劑量以每週一次時間間隔經皮下免疫接種兩次。對照小鼠以相同劑量注射Ad5-無效(空載體)。在最後一次免疫接種(疫苗接種)後兩週自個別小鼠獲得血清並使用定量酶聯免疫吸附分析(ELISA)評價抗HA抗體之存在(Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35)。如**圖3**中所示，在Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫小鼠中以劑量依賴性方式產生抗HA抗體反應，但在注射Ad5-無效(空載體)之對照小鼠中未產生。

實例4

針對Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種之細胞介導免疫(CMI)反應

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後針對流感抗原之細胞介導免疫(CMI)反應。將每組五隻小鼠以1×10^{8}、1×10^{9}或1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA之劑量以每週一次時間間隔經皮下免疫接種兩次。對照小鼠以相同劑量注射Ad5-無效(空載體)。在最後一次免疫接種(疫苗接種)後兩(2)週自個別小鼠獲得脾臟並採用ELISpot分析針對IFN-γ分泌脾細胞評價CMI (Gabitzsch ES等人，Cancer Immunol Immunother. 2010 59:1131-35；Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35；Jones FR等人，Vaccine 2011 29:7020-26)。如**圖4**中所示，在Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫小鼠中產生CMI反應，但在注射Ad5-無效(空載體)之對照小鼠中未產生。

實例5

針對Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種之細胞毒性T淋巴球(CTL)反應

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後針對流感抗原之細胞毒性T淋巴球(CTL)反應。CTL反應係藉由利用ELISpot分析量測顆粒酶B分泌來定量。

將每組五隻小鼠以1×10^{8}、1×10^{9}或1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA之劑量以每週一次時間間隔經皮下免疫接種兩次。對照小鼠以相同劑量注射Ad5-無效(空載體)。在最後一次免疫接種(疫苗接種)後兩(2)週自個別小鼠獲得脾臟並採用ELISpot分析針對分泌顆粒酶B之脾細胞評價細胞溶解性T淋巴球(CTL)活性。如**圖5**中所示，在Ad5 [E1-, E2b-]-

M1/NP/HA免疫小鼠中產生CTL反應，但在注射Ad5-無效(空載體)之對照小鼠中未產生。

實例6

針對Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種之CMI反應的時程評估

此實例闡述在利用含有M1蛋白、NP蛋白及HA蛋白之Ad5 [E1-, E2b-]載體進行多次免疫接種之後在各個時間點針對流感抗原之細胞介導免疫(CMI)反應。將每組小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種一次(1組)、兩次間隔2週(2組)、兩次間隔1個月(3組)及兩次間隔2個月(4組)。在免疫接種(疫苗接種)後之各個時間點自個別小鼠獲得脾臟並藉由採用ELISpot分析針對分泌IFN-γ之脾細胞評價針對NP及HA之CMI反應。如**圖6**中所示，CMI反應在最後一次免疫接種後一週通常最高且此後然後下降。

實例7

含有m1蛋白、NP蛋白及血球凝集素之Ad5 [E1-, E2b-]載體的投與

此實例闡述在不同時間點注射含有m1蛋白、np蛋白及血球凝集素之Ad5 [E1-, E2b-]載體以產生針對流感血球凝集素抗原之抗體反應。將每組小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/HA免疫接種一次(1組)、兩次間隔2週(2組)、兩次間隔1個月(3組)及兩次間隔2個月(4組)。在免疫接種(疫苗接種)後之各個時間點自個別小鼠獲得血清並藉由定量ELISA技術評價抗HA抗體之存在。如**圖7**中所示，在免疫接種後58至85天觀察到抗HA抗體反應之峰值，此後抗體反應稍微降低。

實例8

針對組合Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA免

疫接種之抗體反應

此實例闡述在用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之後針對A型流感(InfA)及B型流感(InfB)抗原之抗體反應。Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e係以1×10^{10}個病毒粒子(VP)之劑量投與且Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗係以1×10^{10}個VP之劑量投與。

將每組五隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)作為陰性對照、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-A型流感(InfA)-血球凝集素(HA)/基質2e (M2e)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA或含有1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e及1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-B型流感(InfB)-HA之疫苗混合物以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後2週，如先前所述使用定量ELISA分析來自個別小鼠之血清的針對A型流感-HA或B型流感-HA之抗體的存在(Gabitzsch ES等人，Cancer Gene Ther. 2011 18:326-35)。

圖8圖解說明在小鼠中利用Ad5 [E1-, E2b-]流感疫苗進行免疫接種之後血清中A型流感或B型流感HA抗體反應之量化，如藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)所測定。**圖8A**圖解說明A型流感HA抗體反應之量化。**圖8B**圖解說明B型流感HA抗體反應之量化。

在利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA之混合物疫苗接種之小鼠中檢測到針對A及B型流感二者之抗體，但在注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠中未檢測到。該等反應係特異性的，此乃因僅利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e免疫接種之小鼠並未產生針對B型流感-HA之抗體且僅利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfB免疫接種之小鼠並未

產生針對A型流感-HA之抗體。

實例9

在重刺激脾細胞中細胞介導免疫(CMI)反應之流式細胞分析

此實例闡述在源自利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠的脾細胞利用HA型流感、M2型流感、B型流感HA肽離體重刺激後細胞介導免疫反應之流式細胞分析。

將每組五隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-A型流感(InfA)-血球凝集素(HA)/基質2e (M2e)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA或含有1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e及1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-B型流感(InfB)-HA之疫苗混合物以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後2週，來自個別小鼠之脾臟在暴露於特定肽混合物之後藉由流式細胞術分析CMI活性，如由干擾素γ (IFN-γ)表現CD8+ (A)及/或CD4+ (B) T細胞所證明。

圖9圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化在來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之重刺激脾細胞中表現IFN-γ之效應物T淋巴球所量測。**圖9A**圖解說明表現IFN-γ之CD8+脾細胞之百分比。**圖9B**圖解說明表現IFN-γ之CD4+脾細胞之百分比。

在利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA之混合物疫苗接種之小鼠中檢測到針對A及B型流感二者之CMI反應，但在注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠中未檢測到。儘管觀察到針對流

感HA抗原之背景反應，但在免疫接種小鼠中觀察到顯著($P<0.05$ Mann-Whitney測試)較高CMI反應。該等反應係特異性的，此乃因來自疫苗免疫接種小鼠之T細胞在暴露於介質或不相關抗原(SIV-nef)肽混合物之後並不產生CMI反應。

實例10

在重刺激脾細胞中細胞介導免疫(CMI)反應之ELISpot分析

此實例闡述在源自利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠的脾細胞利用HA型流感、M2型流感、B型流感HA肽離體重刺激後細胞介導免疫反應之ELISpot分析。

將每組5隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-A型流感(InfA)-血球凝集素(HA)/基質2e (M2e)、1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA或含有1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e及1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-B型流感(InfB)-HA之疫苗混合物以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後2週，來自個別小鼠之脾臟在暴露於特定肽混合物之後使用ELISpot分析針對分泌干擾素-γ (IFN-γ) (A)或IL-2 (B)之斑點形成細胞數(SFC)分析CMI活性。

圖10圖解說明細胞介導免疫反應，如藉由量化來自已經Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e疫苗與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA疫苗之組合免疫接種之小鼠之分泌細胞介素之重刺激脾細胞所量測。**圖10A**圖解說明分泌IFN-γ之脾細胞之量化。**圖10B**圖解說明分泌IL-2之脾細胞之量化。

在利用Ad5 [E1-, E2b-]-InfA-HA/M2e與Ad5 [E1-, E2b-]-InfB-HA

之混合物疫苗接種之小鼠中檢測到針對A及B型流感二者之CMI反應，但在注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠中未檢測到。該等反應係特異性的，此乃因來自疫苗免疫接種小鼠之脾臟細胞在暴露於不相關抗原(SIV-nef)肽混合物之後並不產生CMI反應。

實例11

利用基於Ad5 [E1-, E2b-]之流感疫苗的挑戰研究

此實例闡述利用基於Ad5 [E1-, E2b-]之流感疫苗的挑戰研究。將每組十隻小鼠利用1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-無效(空載體)或含有如申請案之**圖1B**中所構築之1×10^{10}個VP Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/InfA-HA之疫苗以2週時間間隔免疫接種兩次。第二次免疫接種之後三十(30)天，小鼠利用H1N1流感病毒菌株(A型流感菌株/加利福尼亞州(California)/07/2009)進行挑戰且在挑戰後評價存活。

圖11圖解說明與利用對照(無效)疫苗相比在利用Ad5 [E1-, E2b-]-M1/NP/InfA-HA疫苗免疫接種之小鼠中經60天之時期挑戰研究之存活曲線。

疫苗接種小鼠提供完全保護免於病毒挑戰，與此相比注射Ad5 [E1-, E2b-]-無效之對照小鼠經歷僅20%存活且此差異係明顯的(Log Rank Mantel-Cox測試, P=0.0003)。

儘管本文已顯示及闡述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者應命苦該等實施例僅以實例的方式提供。現在熟習此項技術者將發現若干改變、變化及取代而不背離本發明。應瞭解，在實踐本發明中可採用本文所述本發明之實施例之各種替代。期望以下申請專利範圍界定本發明之範圍且因此涵蓋在該等申請專利範圍之範圍內之方法及結構及其等效物。