



(12) 发明专利申请

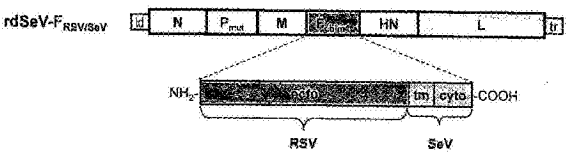
(10) 申请公布号 CN 105473724 A
(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201480039671. 7 *A61K 39/155*(2006. 01)
(22) 申请日 2014. 06. 10 *C12N 5/10*(2006. 01)
(30) 优先权数据
13002972. 1 2013. 06. 10 EP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016. 01. 12
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/001576 2014. 06. 10
(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/198408 EN 2014. 12. 18
(71) 申请人 阿姆瓦克股份公司
地址 瑞士楚格
(72) 发明人 M·威甘德 C·考弗曼
(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 罗菊华
(51) Int. Cl.
C12N 15/86(2006. 01)
C12N 7/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书16页
序列表2页 附图10页

(54) 发明名称
呼吸道合胞病毒半活疫苗

(57) 摘要
本发明涉及呼吸道合胞病毒 (RSV) 半活疫苗,其包含表达嵌合 RSV/SeV F 蛋白的基因组复制缺陷型仙台病毒 (SeV) 载体。此外,本发明涉及用于产生本发明的基因组复制缺陷型 SeV 载体的方法,及其在治疗 RSV 感染和 RSV 感染相关疾病中的用途。



1. 一种包含核酸的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体,所述核酸在磷蛋白(P)基因中被修饰以编码缺乏氨基酸2-77的突变P蛋白,其中所述核酸还编码嵌合F蛋白,所述嵌合F蛋白包含呼吸道合胞病毒(RSV)F胞外域或其免疫原性片段或突变体、SeV F跨膜结构域或其功能性片段或突变体、以及任选地SeV F胞质结构域或其任何片段或突变体。

2. 权利要求1的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述RSV胞外域对应于RSV F蛋白的氨基酸1-524,和/或所述SeV跨膜结构域对应于SeV F蛋白的氨基酸500-523,和/或所述SeV胞质结构域对应于SeV F蛋白的氨基酸524-565。

3. 权利要求1或2的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述嵌合F蛋白基本上缺乏胞质结构域。

4. 权利要求1-3中任一项的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述核酸还编码可溶性RSV F蛋白或其免疫原性片段或突变体。

5. 权利要求4的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述可溶性RSV F蛋白是RSV F蛋白的胞外域或其免疫原性片段或突变体。

6. 权利要求1-3中任一项的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述核酸不编码可溶性RSV F蛋白或其免疫原性片段或突变体。

7. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求1-6中任一项的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体、根据权利要求1-6中任一项的基因组复制缺陷型SeV载体的核酸或其互补体、和/或编码根据权利要求1-6中任一项的基因组复制缺陷型SeV载体的核酸或编码该核酸的互补体的DNA分子。

8. 一种用于产生根据权利要求1-6中任一项的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体的方法,其包括:

(i)培养根据权利要求7的宿主细胞,和

(ii)从细胞培养物中收集基因组复制缺陷型SeV载体。

9. 一种疫苗,其包含根据权利要求1-6中任一项的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体和一种或多种药学可接受的载体。

10. 权利要求9的疫苗,其还包含佐剂。

11. 权利要求1-6中任一项的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体,其用于治疗哺乳动物中的RSV感染或感染相关疾病。

12. 根据权利要求11定义的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述哺乳动物是人受试者。

13. 根据权利要求11或12定义的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述人受试者是人类婴儿或儿童、老年人、人免疫妥协的个体、移植接受者或患有慢性疾病的个体,所述人类婴儿或儿童包括早产的人类婴儿或处于RSV感染的住院治疗风险中的人类婴儿。

14. 根据权利要求11-13中任一项定义的基因组复制缺陷型SeV载体,其中肠胃外、局部或粘膜施用所述疫苗。

15. 根据权利要求14定义的基因组复制缺陷型SeV载体,其中所述肠胃外施用是通过皮下、静脉内、腹膜内或肌内注射进行的。

呼吸道合胞病毒半活疫苗

发明领域

[0001] 本发明涉及呼吸道合胞病毒(RSV)半活疫苗,其包含表达嵌合RSV/SeV F蛋白的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体。此外,本发明涉及用于产生本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的方法,及其在RSV感染和RSV感染相关疾病的治疗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 现今使用的许多病毒疫苗(包括麻疹疫苗和一些流感疫苗)基于减毒病毒,并产生良好和长效的预防性体液和细胞免疫应答(Amanna等人,N.Engl.J.Med.357:1903-1915,2007)。这样的减毒活疫苗通过降低所使用病毒的毒力但仍使其保持存活(或“活的”)进行制备。

[0004] 然而,活疫苗的安全不断被讨论,因为它们还与遗传不稳定性和残留毒力相关(Ehrenfeld等人,Expert.Rev.Vaccines 8:899-905,2009)。如对于Sabin脊髓灰质炎疫苗所见的减毒突变的可能逆转(Salk,D.和Salk,J.,Vaccine 2:59-74,1984;Kew等人,Annu.Rev.Microbiol.59:587-635,2005),或者寻找减毒的正确平衡(其例如使减毒呼吸道合胞病毒(RSV)活疫苗的开发复杂化(Luong等人,Vaccines 27:5667-5676,2009)),例证了活疫苗的缺陷。

[0005] 考虑到使用活疫苗存在的局限性,病毒载体已作为有力和确定的方法出现,具有与减毒活疫苗相似的免疫原性特征(Abdulhaqq等人,Immunol.Res.42:219-232,2008;Liniger等人,Vaccine 27:3299-3305,2009;Zhan等人,Vaccine 26:3480-3488,2008;Slobod等人,Vaccine 22:3182-3186,2004)。然而,减毒活病毒载体通常面临与长期使用的减毒活疫苗相似的安全性担忧。

[0006] 在过去受到疫苗开发者显著关注的病毒组是非节段负链RNA病毒(NNSV)组。这些病毒具有非常期望的安全特征谱,因为它们含有RNA基因组且仅在宿主细胞的细胞质中复制,从而排除整合到宿主基因组内以引起插入诱变的任何可能性。此外,尚未观察到重组事件(Bukreyev等人,J.Virol.80:10293-10306,2006)。NNSV包含四个科,其中弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如水疱性口炎病毒(VSV)和狂犬病病毒(RV))和副粘病毒科(Paramyxoviridae)(例如仙台病毒(SeV)和人副流感病毒(hPIV))的成员已优先用于开发候选病毒载体疫苗(Schmidt等人,J.Virol.75:4594-4603,2001;Bukreyev等人,J.Virol.80:10293-10306,2006)。

[0007] 使用NNSV作为疫苗主链,已开发了各种病毒疫苗载体候选物。例如,通过将人副流感病毒2型(hPIV2)的HN和F蛋白(其胞质结构域替换为人副流感病毒3型(hPIV3)的相应胞质结构域)掺入基于hPIV3的病毒载体内,来产生hPIV2/hPIV3病毒疫苗载体(Tao等人,J.Virol.74:6448-6458,2000)。此外,描述了牛/人减毒PIV3疫苗载体,其在牛PIV3(bPIV3)主链中表达hPIV3的F蛋白(Haller等人,J.Virol.74:11626-35,2000)。还已知的是表达人PIV3的F和NH蛋白以及人RSV的全长天然F蛋白的基于牛PIV3的疫苗候选物,其被发现在非洲绿猴中保护不受RSV感染(Tang等人,J.Virol.79:11198-11207,2004)。

[0008] 本领域已知的另一种候选病毒载体疫苗基于基因复制缺陷型仙台病毒(SeV)

(Wiegand等人, J. Virol. 81:13835-13844, 2007; WO 2006/084746 A1)。如最近所显示的, 这种载体还能够表达基因(Bossow等人, Open Virol. J. 6:73-81, 2012)。然而, 关于其复制缺陷性质和遗传稳定性, 基于复制缺陷型SeV的病毒疫苗载体的体内安全仍有待证明。此外, 由于其复制缺陷, 体外基因表达相较于有复制能力的仙台载体的表达是降低的(Bossow等人, Open Virol. J. 6:73-81, 2012)。因此, 重组改造以在体内导致期望的有效体液和/或细胞免疫应答的方式有效表达和展示所选免疫原性肽或蛋白质至免疫系统的复制缺陷型仙台载体是有挑战性的任务。

[0009] 一种公知的但难以治疗的致病性病毒是呼吸道合胞病毒(RSV)。RSV是全世界幼儿和老年人中严重呼吸性疾病的主因(Collins P.L.和Crowe J.E.Jr, Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, in: Fields Virology, Eds. Knipe D.M. and Howley P., Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, Wolters Kluwer Business, 2007:1601-1646)。RSV还是慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者中的主要病原体(Hacking, D.和Hull, J., J. Infect. 45:18-24, 2002)。然而, 尽管近期进行了显著的RSV疫苗开发努力, 但现今仍无法获得针对该病原体的疫苗。

[0010] 因此, 仍存在对于可有效用于治疗患有RSV感染和RSV感染相关疾病的患者特别是儿童和老年人的安全RSV疫苗的迫切需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明通过提供表达嵌合RSV/SeV F(融合)蛋白的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体(在下文中被称为“本发明的基因组复制缺陷型SeV载体”或“本发明的rdSeV载体”)而实现了上文提出的需要。本发明的rdSeV载体可以有效地大量产生, 并且引发针对RSV的强体液和细胞免疫应答, 同时是安全的。它因此非常适合用作“半活”RSV疫苗, 即, 格外有效(类似“活疫苗”)且还是特别安全(类似“死疫苗”)的疫苗。

[0013] 在第一个方面, 本发明提供了包含核酸的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体, 所述核酸在磷蛋白(P)基因中被修饰以编码缺乏氨基酸2-77的突变P蛋白, 其中该核酸还编码嵌合F蛋白, 其包含呼吸道合胞病毒(RSV)F胞外域或其免疫原性片段或突变体、SeV F跨膜结构域或其功能性片段或突变体、以及任选地SeV F胞质结构域或其任何片段或突变体。

[0014] 在另一个方面, 本发明提供了宿主细胞, 其包含本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体、本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的核酸或其互补体、和/或编码本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的核酸或编码该核酸的互补体的DNA分子。

[0015] 在本发明的其它方面, 提供了用于产生本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体的方法, 其包括(i)培养本发明的宿主细胞, 和(ii)从细胞培养物中收集基因组复制缺陷型SeV载体。

[0016] 根据另一个方面, 本发明提供了包含本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体和一种或多种药学可接受的载体的疫苗。

[0017] 在另外一个方面, 本发明涉及本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体在治疗哺乳动物中的RSV感染或RSV感染相关疾病中的用途, 所述哺乳动物特别是人受试者, 更特别是人类婴儿或儿童、老年人、人免疫妥协的个体、移植接受者或患有慢性疾病的个体。

[0018] 本发明的优选实施方案示于所附从属权利要求中。

[0019] 附图简述

[0020] 当与附图结合阅读时,前述概述以及下述详述和实施例将得到更好理解。

[0021] 图1是显示本发明的表达嵌合RSV/SeV F蛋白的基因组复制缺陷型SeV载体(指定为“rdSeV-F_{RSV/SeV}”载体)的基因组结构的图示。SeV F的胞外域替换为其RSV衍生的对应物,从而导致下述嵌合F(“F_{chim1}”)蛋白:RSV胞外域(“ecto”;RSV F的氨基酸1-524)、SeV跨膜结构域(“tm”;SeV F的氨基酸500-523)和胞质结构域(“cyto”;SeV F的氨基酸524-565)。在“P_{mut}”ORF中,前76个氨基酸被删除(P Δ 2-77)以获得复制缺陷型疫苗载体。

[0022] 图2是显示本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的变体(指定为“rdSeV-F_{RSV/SeV}-Δ CT”)的基因组结构的图示。该变体等同于图1中所示的rdSeV-F_{RSV/SeV},但缺乏整个胞质结构域,除了N末端前两个氨基酸(SeV F的氨基酸524-525)以外。在“P_{mut}”ORF中,前76个氨基酸被删除(P Δ 2-77)以获得复制缺陷型疫苗载体。

[0023] 图3是显示比较基因组复制缺陷型SeV载体(指定为“rdSeV-sF_{RSV}”)的基因组结构的图示,所述载体表达RSV的可溶性F(sF)蛋白。RSV F胞外域的ORF(RSV F的氨基酸1-524)作为另外的转录单位(“sF_{RSV}”)插入P基因的下游。在“P_{mut}”ORF中,前76个氨基酸被删除(P Δ 2-77)以获得复制缺陷型疫苗载体。

[0024] 图4是显示本发明的基因组复制缺陷型SeV载体(rdSeV-F_{RSV/SeV})的生产效率的条形图。rdSeV-F_{RSV/SeV}载体在由表达质粒稳定转染的VPN细胞中产生,所述表达质粒含有编码SeV P和N蛋白的基因。两种载体在不同传代水平(“P”)上的不同生产运行以比较(P1-1、P1-2、P2-1、P2-2、P3-1)进行,并且在生产期间的不同时间点,例如在第8-11天(“d8-11”)、第11-12天(“d11-12”)等等,获得来自细胞培养上清液的样品。随后测定所获得的样品的载体滴度(pfu/ml)。

[0025] 图5是显示rdSeV-F_{RSV/SeV}(黑色条)及其变体(白色条)的生产效率的条形图,所述变体缺乏整个胞质结构域,除了N末端前两个氨基酸之外(指定为“rdSeV-F_{RSV/SeV}-Δ CT”)。在第3天(“d2-3”)、第4天(“d3-4”)和第5天(“d4-5”)时,测定以pfu/ml表示的细胞培养上清液的载体滴度。

[0026] 图6是显示对于rdSeV-sF_{RSV}、rdSeV-F_{RSV/SeV}、活RSV和PBS,在鼻内(i.n.)施用(黑色条)和肌内(i.m.)施用(白色条)后,RSV特异性血清IgG水平的条形图。血清样品在末次免疫接种后14天抽取,并且通过ELISA测定RSV特异性IgG抗体的存在。

[0027] 图7是显示在用rdSeV-sF_{RSV}、rdSeV-F_{RSV/SeV}、活RSV和PBS接种的小鼠的鼻洗涤物(NW)中,RSV特异性IgA(粘膜抗体)应答(ng/ml)的条形图。NW样品在末次免疫接种后14天收集,并且通过ELISA测定RSV特异性IgA抗体的存在。

[0028] 图8是显示在用rdSeV-sF_{RSV}、rdSeV-F_{RSV/SeV}、活RSV和PBS接种的小鼠的支气管肺泡灌洗液(BAL)中,RSV特异性IgA(粘膜抗体)应答(ng/ml)的条形图。BAL样品在末次免疫接种后14天收集,并且通过ELISA测定RSV特异性IgA抗体的存在。

[0029] 图9是显示在用rdSeV-sF_{RSV}、rdSeV-F_{RSV/SeV}、活RSV和PBS鼻内(i.n.)(黑色条)和肌内(i.m.)(白色条)感染小鼠后,在血清中的中和抗体滴度的条形图。血清样品在末次免疫接种后14天抽取,并且通过ELISA测定RSV特异性IgG抗体的存在。

[0030] 图10是显示在用rdSeV-sF_{RSV}、rdSeV-F_{RSV/SeV}、活RSV和PBS鼻内(i.n.)和肌内(i.m.)接种后,再刺激的脾细胞的IFN-γ 表达(ng/ml)的条形图。脾细胞用灭活的RSV(白色

条)或作为阳性对照的伴刀豆球蛋白A(灰色条)进行再刺激。作为阴性对照,使用未受刺激的脾细胞(黑色条)。

[0031] 图11是显示通过rdSeV-sFRSV(◆)、rdSeV-FRSV/SeV(■)、活RSV(x)和PBS(•)的鼻内应用刺激的小鼠RSV特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的裂解活性(CTL应答)的图。细胞毒性活性(特异性释放%)使用RSV感染的P815细胞(MOI 0.1)进行测量。将脾细胞以80:1、40:1和20:1的比加入P815靶细胞中。

[0032] 图12是显示通过rdSeV-sFRSV(◆)、rdSeV-FRSV/SeV(■)、活RSV(x)和PBS(•)的肌内应用刺激的小鼠RSV特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的裂解活性(CTL应答)的图。细胞毒性活性(特异性释放%)使用RSV感染的P815细胞(MOI 0.1)进行测量。

[0033] 发明详述

[0034] 依照本发明,本发明的基因组复制缺陷型SeV载体不仅提供优良的安全特征谱,还出人意料地显示出以非常有效的方式刺激免疫系统以赋予针对RSV感染的有效保护的能力。具体地,发现本发明的基因组复制缺陷型SeV载体可以经由鼻内途径方便地施用,以高效地诱导在粘膜免疫中起关键作用的局部IgA抗体,和全身性IgG抗体包括中和抗体,以及细胞介导的保护性免疫应答。

[0035] 本发明的另一个令人惊讶的发现是本发明的基因组复制缺陷型SeV载体可以使用对于人类使用合格的细胞高效地大量产生。这允许本发明的病毒疫苗载体的成本效益产生,这对于商业疫苗是最重要的。此外,本发明的基因组复制缺陷型SeV载体可以以简单和重现性方式产生,并且由于其小基因组尺寸,允许恒定和可靠的序列监督。

[0036] 在第一个方面,本发明提供了基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体。该载体包含在磷蛋白(P)基因中被修饰以编码缺乏氨基酸2-77的突变P蛋白的核酸。该核酸还编码特异性嵌合RSV/SeV F蛋白。如本文使用的,“仙台病毒载体”或“SeV载体”是包含病毒基因组的感染性病毒。即,本发明的重组rdSeV载体可以用于感染细胞和细胞系,特别是用于感染活动物包括人,以诱导针对RSV感染的免疫应答。

[0037] 在本发明的上下文内,术语“核酸”以最广泛的含义使用,并且涵盖单链(ss)DNA、双链(ds)DNA、cDNA、(-)-RNA、(+)-RNA、dsRNA等等。然而,当核酸是本发明的rdSeV载体的部分且包括在本发明的rdSeV载体内时,核酸是负链RNA((-)-ssRNA)。在这种情况下,核酸通常对应于本发明的rdSeV的基因组。此外,如本文使用的,术语“编码”指核酸充当用于合成另一种核酸(例如mRNA、负链RNA((-)-ssRNA)或正链RNA(+)-ssRNA)和/或用于合成寡肽或多肽(“蛋白质”)的模板的固有特性。即,如果转录和翻译导致蛋白质在细胞或其它生物系统中的产生,则蛋白质被“编码”。

[0038] 充当本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的主链的SeV可以是任何已知的SeV毒株。合适的例子包括但不限于Sendai Fushimi毒株(ATCC VR105)、Sendai Harris毒株、Sendai Cantell毒株或Sendai Z毒株。本发明的rdSeV的特征还在于是复制缺陷的(复制缺陷型)。这通过在磷蛋白(P)基因中修饰SeV主链以删除N末端76个氨基酸(P蛋白的PΔ2-77)来实现,如先前所描述的(Bossow等人,Open Virol.J.6:73-81,2012;WO 2006/084746A1)。所得到的SeV/PΔ2-77载体是复制缺陷型的(即不能在非辅助细胞系中合成新的基因组模板)但仍有转录能力的(即能够初级转录和基因表达),如先前显示的(Bossow等人,Open Virol.J.6:73-81,2012)。

[0039] 不受任何具体理论束缚,认为P蛋白(进行病毒转录和病毒复制的病毒RNA依赖性RNA聚合酶(vRdRp)的必需组分)中的缺失使vRdRp的复制和转录活性分开。虽然这导致复制能力的完全丧失,但SeV/P Δ 2-77载体仍能够进行初级转录,包括早期和晚期初级转录。“早期初级”转录指受感染的宿主细胞中的第一转录事件,其中病毒RNA基因组通过最初包括在SeV病毒颗粒中的vRdRp分子进行转录。“晚期初级转录”指其中蛋白质从头合成起始并且转录通过新合成的vRdRp越来越多地进行的时期。

[0040] 依照本发明,由本发明的rdSeV载体的核酸编码的嵌合RSV/SeV蛋白质包含(i)呼吸道合胞病毒(RSV)F蛋白的胞外域或其免疫原性片段或突变体,(ii)SeV F蛋白的跨膜结构域或其功能性片段或突变体,以及任选地(iii)SeV F蛋白的胞质结构域或其任何片段或突变体。

[0041] 如本文使用的,术语“包含”旨在涵盖开放式术语“包括”和封闭式术语“由……组成”两者。因此,本发明的rdSeV载体的核酸可以还编码其它异源蛋白或嵌合蛋白,从而导致例如二价病毒载体疫苗(例如针对RSV和hPIV)。

[0042] 在本发明内,SeV的上述跨膜结构域和/或胞质结构域可分别对应于SeV F蛋白的氨基酸500-523和524-565。RSV胞外域可对应于RSV F蛋白的氨基酸1-524。因此,嵌合RSV/SeV F蛋白可以包含590个氨基酸,其中氨基酸1-524定义RSV胞外域,氨基酸525-548定义SeV跨膜结构域,并且氨基酸549-590定义SeV胞质结构域。该590个氨基酸的嵌合RSV/SeV F蛋白的缺失变体和突变体也在本发明的范围内,其中胞外域、跨膜结构域和胞质结构域的“片段”和“突变体”如下定义。

[0043] 优选地,RSV胞外域具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列(RSV毒株ATCC VR-26(长链)F蛋白的胞外域;GenBank登录号AY911262,翻译AAX23994),或是其免疫原性片段或突变体。优选地,SeV跨膜结构域具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列(SeV毒株Fushimi F蛋白的跨膜结构域;GenBank登录号U06432,翻译AAC54271),或是其功能性片段或突变体。优选地,SeV胞质结构域具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列(SeV毒株Fushimi F蛋白的胞质结构域;GenBank登录号U06432,翻译AAC54271),或是其任何片段或突变体。

[0044] 还优选RSV胞外域、SeV跨膜结构域和SeV胞质结构域如上定义,除了SEQ ID NO:1中所示的RSV胞外域的氨基酸序列含有选自下述的一个或多个优选所有的点突变:Glu66Gly、Val76Glu、Asn80Lys、Thr101Ser和Ser211Asn,和/或SEQ ID NO:3中所示的SeV胞质结构域的氨基酸序列含有单个点突变Gly34Arg。特别优选地,嵌合RSV/SeV F蛋白具有如由SEQ ID NO:1-3所定义的氨基酸序列,或如由含有上述所有六个点突变的SEQ ID NO:1-3所定义的氨基酸序列。

[0045] 在本发明的上下文中,术语“片段”指通过氨基末端和/或羧基删除生成的多肽或蛋白质结构域的部分。优选地,氨基末端和/或羧基删除不长于10或5个氨基酸,特别是1、2或3个氨基酸。如本文使用的,术语“免疫原性”意指RSV胞外域的片段或突变体,其仍能够引发体液和/或细胞免疫应答。优选地,在使其与具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的跨膜结构域和具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的胞质结构域融合后,免疫原性片段或突变体引发体液和/或细胞免疫应答,其程度等于或高于通过由SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列所定义的全长嵌合RSV/SeV F蛋白实现的程度的10%、20%、40%、60%或80%。如本文使用的,术语“功能性”意指跨膜结构域片段或突变体,其与跨膜结构域是功能等价的,即,仍能够将嵌合

RSV/SeV F蛋白锚定至膜的片段或突变体。

[0046] 在本发明内,SeV胞质结构域(有时也被称为“胞质尾区”)的片段可以短至一个氨基酸或二至五个氨基酸。在这种情况下,各自的嵌合RSV/SeV F蛋白可以被称为“基本上缺乏”胞质结构域。如本文使用的,术语“基本上缺乏”还指完全缺乏SeV胞质结构域的嵌合RSV/SeV F蛋白。如下文实施例中证实的,缺乏整个SeV胞质结构域除了第一个和第二个N末端氨基酸(例如SEQ ID NO:3的氨基酸1和2)之外的嵌合RSV/SeV F蛋白的变体出人意料地被发现允许极高的生产效率,甚至高于用具有全长SeV胞质结构域的RSV/SeV F蛋白实现的生产效率。因此,因为胞质结构域看起来是可有可无的,所以含有胞质结构域的任何片段(部分)或基本上缺乏胞质结构域的嵌合RSV/SeV F蛋白涵盖在本发明中。

[0047] 如本文使用的,术语“突变体”指突变的多肽或蛋白质结构域,其中突变并不限于特定类型的突变。特别地,突变包括单个氨基酸置换,一个或多个氨基酸的缺失包括N末端、C末端和内部缺失,以及一个或多个氨基酸的插入包括N末端、C末端和内部插入,及其组合。所插入和/或缺失的氨基酸的数目可以是1至10,特别是1至5。另外,1至20、特别是1至10、更特别是1至5个氨基酸可以被突变为(置换为)另一种氨基酸。此外,术语“突变体”还可以涵盖突变的胞外域、突变的跨膜结构域和突变的胞质结构域,其分别与SEQ ID NO:1(RSV毒株ATCC VR-26(长链)F蛋白的胞外域)、SEQ ID NO:2(SeV毒株Fushimi F蛋白的跨膜结构域)和SEQ ID NO:3(SeV毒株Fushimi F蛋白的胞质结构域)中所示的氨基酸序列是至少75%、优选至少85%、更优选至少95%和最优选至少97%等同的。

[0048] 用作主链的SeV以及跨膜和胞质结构域所来源于的SeV可以是相同或不同的。然而,因为本发明的rdSeV一般通过将SeV主链的SeV F胞外域替换为相应的RSV F胞外域(或其免疫原性片段或突变体)进行构建,所以嵌合F蛋白的SeV部分通常来源于用作本发明的rdSeV载体的主链的SeV。

[0049] 用于用作嵌合RSV/SeV F蛋白的主链和/或用于构建嵌合RSV/SeV F蛋白的合适SeV毒株包括Sendai Fushimi毒株(ATCC VR-105)、Sendai Harris毒株、Sendai Cantell毒株和Sendai Z毒株。类似地,RSV胞外域可以来源于来自任何重组或天然存在的RSV毒株(优选人SeV毒株,例如A2、长或B毒株)的RSV F蛋白。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,除了嵌合RSV/SeV F蛋白之外,本发明的基因组复制缺陷SeV载体的核酸还编码可溶性RSV F蛋白。在本发明的含义内的“可溶性F蛋白”是缺乏将F蛋白定位至膜的任何氨基酸段的F蛋白,并且特别指缺乏跨膜结构域和胞质结构域两者的F蛋白。因此,可溶性RSV F蛋白可以是RSV F蛋白的胞外域或其免疫原性片段或突变体。术语“片段”、“免疫原性”和“突变体”具有与上文定义相同的含义。

[0051] 在优选实施方案中,可溶性RSV F蛋白对应于RSV F蛋白的氨基酸1-524或其免疫原性片段或突变体。在特别优选的实施方案中,可溶性RSV F蛋白是具有SEQ ID NO:1中所示序列的RSV ATCC VR-26毒株(长链)F蛋白的胞外域或其免疫原性片段或突变体。

[0052] 如果需要编码可溶性RSV F蛋白的异源基因(在下文中被称为“sF转基因”)的高表达,则优选将序列插入病毒负链RNA基因组的3'区。原因是负链RNA病毒如SeV最有效转录在其负链RNA基因组的3'末端处的转录单位。进一步下游的基因的转录水平逐步降低,其是被称为转录梯度的现象。这允许通过将其插入病毒基因组中的不同位点处来调节异源转基因的表达水平。在本发明内,优选将sF转基因插入在P(即 P_{mut} ; P Δ 2-77)基因和M基因之间。

[0053] sF转基因可以作为转录盒插入,所述转录盒包含与转录起始序列、转录终止子和优选地翻译信号可操作地连接的编码可溶性RSV F蛋白的核酸序列。sF转基因还可以与mRNA稳定元件可操作地连接。例如,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)可以插入sF转基因的3'UTR和/或5'UTR区内,以便稳定其mRNA并延长其表达。

[0054] 编码可溶性RSV F蛋白的sF转基因的掺入允许以两种不同方式呈递RSV抗原,即作为将RSV抗原展示为埋入病毒包膜中的结构载体组分的嵌合RSV/SeV F表面蛋白,以及作为可溶性RSV F蛋白。因此,可溶性RSV F蛋白的额外表达可以帮助诱导更有效和广泛的免疫应答,包括免疫系统的体液和细胞武器。

[0055] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的rdSeV载体的核酸不编码可溶性RSV F蛋白或其任何片段或突变体。此外,在本发明的上下文内,优选本发明的rdSeV载体不编码非本文详述的嵌合RSV/SeV F蛋白或其片段或突变体的嵌合F蛋白或其片段或突变体,并且优选还不编码可溶性RSV F蛋白或其任何片段或突变体。另外,本文详述的嵌合RSV/SeV F蛋白优选是由本发明的rdSeV表达的唯一异源蛋白。

[0056] 除上文描述的修饰之外,本发明的SeV载体还可以包括其它修饰。特别地,它可以被修饰以携带在一种或多种病毒基因中的另外突变。例如,本发明的rdSeV载体可以另外含有在编码病毒包膜蛋白质的至少一种基因中的一种或多种突变。这些突变可以通过如本领域已知的重组技术引入,并且可以导致不同效应,例如改变病毒细胞特异性。

[0057] 本发明的rdSeV载体还可因病毒P蛋白中的N末端缺失而具有在C、W和/或V开放阅读框(ORF)中的一种或多种突变,因为C、W和V ORF与P基因的N末端ORF重叠。此外,本发明的rdSeV载体可以另外具有C'基因的备选起始密码子ACG的缺失。C'基因编码已知在受感染细胞中显示出抗IFN应答活性的非结构蛋白。发现C'基因的起始密码子的缺失导致在受感染的靶细胞中异源基因产物的表达水平增加。

[0058] 在第二个方面,本发明提供了宿主细胞,其包含本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体、本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的核酸或其互补体、和/或编码本发明的基因组复制缺陷型SeV载体的核酸或编码该核酸的互补体的DNA分子。

[0059] 在本发明的含义内的“互补体”意指与核酸的序列互补的核苷酸序列(即“反义”核酸)。在这点上,注意到所述核酸一般对应于本发明的rdSeV的基因组。即,核酸的互补体一般对应于本发明的rdSeV的反基因组。

[0060] 宿主细胞可以是援救细胞(或“病毒生成细胞”)或辅助细胞(或“扩增细胞”)。援救细胞用于本发明的rdSeV载体的初始产生。援救细胞通常为真核细胞,特别是哺乳动物细胞,其通常表达异源DNA依赖性和/或RNA依赖性RNA聚合酶例如T7RNA聚合酶或同源的细胞RNA聚合酶II。编码异源DNA依赖性RNA聚合酶的基因可以整合到援救细胞的基因组内或存在于表达质粒中。

[0061] 援救细胞必须还表达功能性SeV P蛋白以及SeV N和L蛋白,以使得可以装配本发明的rdSeV载体。这些病毒蛋白质的表达通常通过用一种或多种表达质粒转染援救细胞来实现,所述表达质粒携带各自的P、N和L基因。用于本文的合适援救细胞是BSR-T7细胞,其含有在其基因组中稳定整合的T7RNA聚合酶的基因,并且已用具有SeV P、N和L蛋白的基因的表达质粒转染(Buchholz等人,J.Virol.73:252-259,1999)。

[0062] 为了最初产生本发明的rdSeV载体,将编码本发明的rdSeV的核酸或其反义核酸的

DNA分子转染到援救细胞内。细胞转染可以依照本领域已知的程序进行,例如如由制造商描述的用FuGENE 6或FuGENE HD(Roche)试剂化学转染或通过电穿孔转染。被转染的DNA分子通常为携带本发明的rdSeV的核酸的cDNA的质粒。因为DNA分子通常通过援救细胞的异源DNA依赖性RNA聚合酶进行转录,所以DNA分子优选还包括与病毒基因组序列可操作地连接的转录信号,例如T7启动子,以及终止子序列。它还可以包括在其3'末端处的核酶序列,其允许在病毒序列的3'末端处切割转录物。DNA分子进一步优选适合于在原核辅助细胞(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*))和/或在真核辅助细胞特别是哺乳动物辅助细胞中扩增。在援救细胞中包装重组病毒基因组和随后在细胞表面上装配病毒颗粒后,新生成的rdSeV载体经由从细胞出芽进行释放,并且可以用于另一轮辅助细胞感染。

[0063] 辅助细胞(HP)用于扩增最初在援救细胞中装配的SeV载体,并且通常来源于哺乳动物细胞,例如Vero细胞或HEK-293细胞。这些辅助细胞表达P蛋白以及任选地N和/或L蛋白。相应的P、N和L基因可以整合到辅助细胞的基因组中,或者存在于一种或多种表达质粒中。示例性合适的细胞系是来源于组成性表达SeV P蛋白的HEK-293细胞(Willenbrink等人, *J. Virol.* 68:8413-8417, 1994)的细胞系。根据本发明,辅助细胞优选进行遗传修饰以表达病毒P和N蛋白,而不表达病毒L蛋白,因为令人惊讶地发现这种P/N共表达导致最高的病毒生产率。

[0064] 在第三个方面,本发明提供了用于产生本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体的方法,其包括下述步骤:

[0065] (i)培养本发明的宿主细胞,和

[0066] (ii)从细胞培养物中收集基因组复制缺陷型SeV载体。

[0067] 用于产生基因组复制缺陷型SeV载体的方法是本领域已知的,并且在例如Wiegand等人, *J. Virol.* 81:13835-13844(2007), Bossow等人, *Open Virol. J.* 6:73-81(2012)和WO 2006/084746 A1中描述。在培养步骤(i)中,宿主细胞在合适的培养基中在允许基因组复制和转录的条件下进行培养,使得形成本发明的基因组复制缺陷型SeV。用于培养细胞的培养基可以是适合于生长宿主细胞的任何常规培养基,例如补充有10%热灭活FCS的DMEM(Invitrogen)。宿主细胞可以是如上定义的援救细胞或辅助细胞。在收集步骤(ii)中,所形成的本发明的SeV载体通过本领域已知的方法进行回收。

[0068] 依照优选实施方案,用于产生本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体的方法包括下述步骤:

[0069] (a)将DNA分子引入第一宿主细胞内,其中所述DNA分子编码本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体的核酸或其互补体,

[0070] (b)培养第一宿主细胞,以生成基因组复制缺陷型SeV载体,

[0071] (c)从第一细胞培养物中收集基因组复制缺陷型SeV载体,

[0072] (d)用步骤(c)中获得的基因组复制缺陷型SeV载体感染第二宿主细胞,

[0073] (e)培养第二宿主细胞,以扩增基因组复制缺陷型SeV载体,

[0074] (f)从第二细胞培养物中收集基因组复制缺陷型SeV载体。

[0075] 第一宿主细胞优选为如上所述的援救细胞(病毒生成细胞),并且第二宿主细胞优选为如上所述的辅助细胞(扩增细胞)。步骤(a)中将DNA分子引入第一宿主细胞内可以通过本领域已知的转染方法进行。培养和收集步骤可以如上定义地进行。

[0076] 在第四个方面,本发明涉及包含本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体和一种或多种药学可接受的载体的疫苗。

[0077] 如本文使用的,术语“疫苗”指含有活性组分的试剂或组合物,所述活性组分在受试者中有效诱导针对某一病原体或疾病的治疗程度的免疫。本发明的疫苗是“半活”疫苗,其指不是活疫苗(因为它是复制缺陷型的),但也不是灭活(或被杀死的)疫苗(因为它仍能够进行初级转录和基因表达)的疫苗。本发明的半活疫苗是格外有效(类似“活疫苗”)且还是特别安全(类似“死疫苗”)的。

[0078] 在本发明的背景下,本发明的疫苗的剂型并无特定限制,并且可以是溶液、悬浮液、冻干材料或适合于预期用途的任何其它形式。例如,疫苗可以是肠胃外制剂(例如用于注射或输注的水性或非水性溶液或分散体)或适合于局部或粘膜施用的制剂的形式。

[0079] 疫苗一般包括有效量的本发明的rdSeV。在本发明内,术语“有效量”指足以实现有利或所需治疗结果的化合物的量。治疗有效量可以在一个或多个施用、应用或剂量中施用,并且不旨在限制于特定制剂或施途径。

[0080] 还包括在疫苗中的是一种或多种药学可接受的载体。如本文使用的,术语“药学可接受的”指这样的化合物或物质,其在合理医学判断的范围内,适合于与哺乳动物特别是人的组织接触,而无过量毒性、刺激、过敏反应和其它问题并发症。如本文使用的,术语“载体”涉及疫苗组合物中需要、要求或期望的稀释剂、佐剂、赋形剂、媒介物或者其它化合物或物质。合适的载体特别是适合于肠胃外、粘膜或局部施用的载体,包括用于注射和输注的无菌水性和非水性溶液或分散体,如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(2000)中讨论的。

[0081] 特别地,疫苗可以包含一种或多种佐剂。如本文使用的,术语“佐剂”指增强抗原的免疫原性但其不一定是免疫原性的试剂。合适的佐剂包括但不限于1018ISS,铝盐,**Amplivax**[®],AS 15,BCG,CP-870、893,CpG7909,CyaA,dSLIM,鞭毛蛋白或来源于鞭毛蛋白的TLR5配体,FLT3配体,GM-CSF,IC30,IC31,咪喹莫特(**ALDARA**[®]),瑞喹莫德,ImuFact IMP321,白细胞介素例如IL-2、IL-13、IL-21,IFN- α 或- β 或其聚乙二醇化衍生物,IS Patch,ISS,ISCOMATRIX,ISCOM,JuvImmune,LipoVac,MALP-2或其天然或合成衍生物,MF59,单磷脂脂质A,Montanide IMS 1312,Montanide ISA 206,Montanide ISA 50V,Montanide ISA-51,油包水和水包油乳状液,OK-432,OM-174,OM-197-MP-EC,ONTAK和OspA。

[0082] 另外,疫苗可以包括一种或多种另外的活性物质,其与本发明的rdSeV载体共施用。另外,药物组合物可以含有另外的药学可接受的物质,例如药学可接受的赋形剂例如增溶剂、表面活性剂、张力调节剂及类似物。

[0083] 在第五个方面,本发明涉及本发明的基因组复制缺陷型仙台病毒(SeV)载体用于治疗哺乳动物中的RSV感染或RSV感染相关疾病。

[0084] 如本文使用的,术语“治疗”意指疾病的治疗性治疗和预防性治疗(或预防)。依照本发明,“治疗”优选意指预防性治疗或预防。在本发明的含义内的“治疗”一般涉及施用有效量的本发明的rdSeV载体。优选地,本发明的rdSeV以如本文描述的疫苗组合物的形式施用。

[0085] 待治疗的哺乳动物优选是人受试者。特别重要的目标群是人类婴儿和儿童,特别

是早产的人类婴儿或处于RSV感染的住院治疗风险中的人类婴儿。其它重要的目标群包括老年人、人免疫妥协的个体、移植接受者尤其是器官移植接受者、以及患有慢性疾病的个体。慢性疾病可以是例如癌症、慢性肝炎、缺血性心脏病、慢性肾衰竭、慢性呼吸系统疾病(例如哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺动脉高血压)、慢性移植物抗宿主病(GVHD)和自身免疫疾病(例如红斑狼疮、溃疡性结肠炎、炎性肠病(IBD)、克罗恩氏病)。

[0086] RSV感染包括与RSV相关的所有类型的呼吸道感染。RSV感染相关疾病优选选自中耳炎、细支气管炎、嗜酸性粒细胞增多症、肺炎、哮喘和慢性阻塞性肺疾病(COPD)。

[0087] 合适的施用途径包括但不限于肠胃外、粘膜和局部施用。肠胃外施用可以通过皮下、静脉内、腹膜内或肌肉注射进行。粘膜施用可以包括施用至气道表面,例如通过微滴施用至鼻表面或舌下施用,或者通过雾化颗粒至鼻表面或其它气道通道表面的吸入施用。

[0088] 如下文实施例中证实的,当鼻内施用时,本发明的基因组复制缺陷型SeV载体有效引发粘膜免疫应答。因此,尽管本发明的基因组复制缺陷型SeV载体或疫苗可以经由任何传统途径进行施用,但它优选例如经由鼻或经口(胃内)途径粘膜施用。特别优选的是鼻内施用。

[0089] 施用方案并无特别限制,并且包括例如每天一次,每两周一次,每月一次,每隔一个月一次,每第三个月、第六个月或第九个月一次以及一年一次或单次应用施用方案。施用至患者的病毒载体的治疗有效剂量取决于施加模式,疾病类型,患者的重量、年龄、性别和健康状态等等。根据需要,施用可以是单次或多次的。本发明的疫苗还可以与来自其它病原体的抗原一起共施用作为多价疫苗。

[0090] 本发明现在通过下述非限制性实施例进行进一步的举例说明。

实施例

[0091] 在下述实施例中,评估了本发明的复制缺陷型仙台病毒载体(在下文中被称为“rdSeV-FRSV/SeV”载体)的遗传稳定性和安全性、生产效率和免疫原性。结果显示rdSeV-FRSV/SeV载体不仅是安全的,还显示出足以在小鼠模型中诱导显著的血清IgG、粘膜IgA和细胞毒性T细胞应答的实质水平的嵌合RSV/SeV基因表达。另外,可以诱导针对RSV的高水平的中和抗体。这些特征使得本发明的基因组复制缺陷型SeV载体成为针对RSV感染和RSV感染相关疾病的非常有希望的病毒载体疫苗候选物。

[0092] 材料与amp;方法

[0093] 下述材料与amp;方法在实施例1-5中使用。

[0094] 细胞和病毒:

[0095] 来自美国典型培养物中心(Rockville,MD,USA)的Vero(ATCC CCL-81)、HEp-2(ATCC CCL-23)和P815细胞(ATCC TIB-64)维持在补充有5%热灭活的胎牛血清(FBS; Invitrogen)、100μg/ml链霉素和100U/ml青霉素的伊格尔最小必需培养基或RPMI (Invitrogen,Milan,意大利)中。辅助细胞系“P-HC”(“扩增细胞”)来源于表达SeV磷蛋白(蛋白P)的Vero细胞(Wiegand等人,J.Virol.81:13835-13844,2007),并且辅助细胞系“VPN”来源于表达质粒编码的SeV磷蛋白(蛋白P)和核蛋白(蛋白N)的Vero细胞。BSR-T7细胞(“援救细胞”)(Buchholz等人,J.Virol.73:251-259,1999)由Klaus-K.Conzelmann (Munich)友情提供。RSV A型(长链,ATCC VR-26)在37°C下在HEp-2细胞上进行培养。基于来

源于仙台病毒毒株D52(ATCC VR-105)的重组SeV载体的所有疫苗候选物(rdSeV-FRSV/SeV、rdSeV-FRSV/SeV-ΔCT、rdSeV-sFRSV)均在33°C下进行培养。

[0096] 基因组载体设计:

[0097] 对于构建本发明的病毒载体,通过重叠PCR技术(Horton等人,Gene 77:61-68, 1989),将含有RSV或SeV F基因的cDNA的质粒分别用作构建嵌合RSV/SeV F ORF的模板。经由特异性引物设计,引入含有限制性酶SalI和XhoI的特异性序列的在3'和5'末端处的非重叠区。将序列验证的嵌合ORF插入亚基因组质粒构建体内,所述亚基因组质粒构建体包含从野生型基因组的P基因内的SanDI限制位点(基因组核苷酸位置2714)直至L基因内的SanDI限制位点(基因组核苷酸位置9131)的仙台病毒基因组。该基因组片段以F ORF由SalI和XhoI的限制位点侧接的方式进行修饰。在嵌合F ORF插入中间克隆载体后,rdSeV-FRSV/SeV的全长基因组经由来自克隆载体的SanDI片段转移到先前制备的rdSeV的全长构建体内进行制备。遵循“六规则(rule of six)”(Calain等人,J.Virol.67:4822-4830,1993),将所得到的重组SeV基因组指定为“rdSeV-FRSV/SeV”(编码嵌合RSV/SeV F蛋白的复制缺陷型SeV),并且通过限制性分析和测序进行验证。

[0098] 通过将来自编码可溶形式的RSV F蛋白(作为P和M基因之间的另外转基因)的重组仙台载体(如通过Voges等人(Voges等人,Cell.Immunol.247:85-94,2007)描述的)的亚基因组EcoRI片段转移到复制缺陷型仙台载体(如WO 2006/084746A1中描述的)内,来生成表达可溶性RSV F蛋白的rdSeV-sFRSV载体。遵循“六规则”(Calain等人,J.Virol.67:4822-4830,1993),将所得到的重组SeV基因组指定为“rdSeV-sFRSV”(表达RSV可溶性F蛋白的复制缺陷型SeV载体),并且通过限制性分析和测序进行验证。

[0099] 病毒援救、繁殖和滴定:

[0100] 如Wiegand等人,J.Virol.81:13835-13844,2007中所述(稍作修改),从经转染的BSR-T7细胞中回收重组病毒。FuGENE6(Roche)以2.0μl/μg DNA用作转染试剂。复制缺陷型SeV病毒从上清液中收获,并且在稳定表达SeV P蛋白的辅助细胞系(“P-HC”)中扩增。这种P-HC系用于所有实验中,除了与病毒生产效率有关的实验(参见图4)之外,其中疫苗载体rdSeV-FRSV/SeV在稳定表达仙台病毒P和N蛋白的VPN辅助细胞系(Wiegand等人,J.Virol.81:13835-13844,2007)中产生。病毒如先前描述的(Wiegand等人,J.Virol.81:13835-13844,2007)进行滴定,并且滴度作为细胞感染单位/毫升(ciu/ml)(等价于荧光噬斑形成单位)给出。不同SeV载体的完整性通过RT-PCR和测序进行验证。

[0101] 蛋白质印迹分析:

[0102] 收集来自模拟感染或者用PIV3、RSV或rdPIRV感染的Vero细胞的提取物,并且通过SDS-PAGE进行分离。在印迹到硝酸纤维素膜上后,用针对PIV3HN和F蛋白的小鼠单克隆抗体(Chemicon,Milan,意大利)以及山羊抗RSV抗体(Meridian Life Science,Saco,ME)检测蛋白质。

[0103] 动物和免疫接种

[0104] 每个实验重复至少三次,以确保结果的重复性。4-6周龄的雌性BALB/c小鼠购自Charles River Laboratories(Milan,意大利)。6只小鼠的四组进行鼻内或肌肉免疫接种。小鼠接受在20μl体积内的 1.2×10^6 pfu/剂量的rdSeV-FRSV/SeV、或 1.2×10^7 pfu/剂量的rdSeV-FRSV/SeV-sF、或 1.0×10^5 pfu/剂量的活RSV或磷酸盐缓冲液(PBS)。鼻内施用分成10μl/鼻孔。

每组接种三次,即在第0天(初次)、第21天(第一次加强)和第42天(第二次加强)时。在第56天时,如其它地方描述的(Cusi等人,Vaccine 20:3436-3442,2000),将小鼠处死用于收集支气管肺泡灌洗液(BAL)、鼻洗涤物(NW)、血清和脾细胞。根据欧洲议会指南(European Parliament directive)2010/63/EU(The European Parliament and the council of the European Union,Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes,Official Journal of the European Union 2010(9月22日),L276:33-79),所有动物实验均符合所有相关机构方针。

[0105] ELISA:

[0106] IgG和IgA抗体通过酶联免疫吸附测定法进行测量。对于病毒特异性IgG和IgA抗体的测定,如先前描述的(Cusi等人,Vaccine 20:3436-3442,2000),将灭活的人RSV A型(Experteam,Venice,意大利)的纯化病毒粒子(1 μ g/ml)用作抗原。结果表示为来自三次不同实验的两次测定的平均值 $\pm$ SD。差异通过曼怀二氏秩和检验进行测定。

[0107] 中和测定法:

[0108] 病毒中和测定法对于RSV在96孔微板中在Hep-2细胞上进行。简言之,将免疫接种的小鼠血清的连续两倍稀释物加入等体积的含有在50 μ l中的100TCID₅₀的RSV中,并且在37 $^{\circ}$ C下温育90分钟,随后将5 $\times$ 10³细胞加入每个孔中。四天后检查致细胞病变效应(CPE)的存在。抗体滴度评估为导致CPE的50%降低的最高稀释度。测定法执行两次。 <4 的抗体滴度视为阴性的。

[0109] 细胞因子和细胞毒性测定法:

[0110] 通过Fycoll-Hypaque(Pharmacia Biotech,Uppsala,瑞典)梯度,收集从免疫接种的小鼠中抽取的脾细胞以及淋巴细胞。在RPMI1640加上10%FCS中的2 $\times$ 10⁵未分级细胞在200 μ l的总体积中与10 μ g/ml纯化的灭活病毒或5 μ g/ml伴刀豆球蛋白A(Sigma,Milan,意大利)一起培养。对照孔仅接受细胞悬浮液。在培养48小时后,收获无细胞上清液且分析IFN- γ 的存在。将样品贮存于-80 $^{\circ}$ C下。测定法如先前描述的(Cusi等人,Vaccine 20:3436-3442,2002)执行。

[0111] 为了评价细胞毒性,合并来自相同组的每只小鼠的脾细胞(1 $\times$ 10⁶细胞/ml),并且在RPMI(5%FCS、100U/ml链霉素、100mg/ml青霉素)中培养六天。随后,使细胞与50单位/ml重组IL-2(Peprotech,Rocky Hill,NJ/USA)一起在24孔板中温育两天,随后用灭活的PIV3或RSV(10 μ g/ml)刺激另外三天。在第5天时,由PIV3或RSV(MOI 5)感染的P815细胞代表的靶细胞用100 μ Ci Na₂Cr⁵¹O₄(Amersham,Aylesbury,UK)在室温下标记60分钟。将在100 μ l完全培养基中的靶细胞(0.5 $\times$ 10⁴)加入96孔平底测定平板(Corning Costar Corp.,USA)中的每个孔中。随后将脾细胞悬浮于100 μ l RPMI培养基(Invitrogen,Milan,意大利)中,并且以80:1、40:1和20:1的比加入靶细胞中。

[0112] 使平板在37 $^{\circ}$ C下温育6小时,并且收获上清液用于使用收获器框架(Skatron Inc.,Sterling,VA/USA)进行 γ 计数。未感染的P815靶细胞用作对照,而MHC I类CTL细胞毒性限制针对P815感染细胞进行测试,并且在执行测定法之前,暴露于抗MHC I类mAb(H-2K^d/H-2D^d)(Pharmingen,Milan,意大利)。测量一式三份完成,并且计算标准差。实验重复至少三次。

[0113] 特异性裂解百分比如下计算:100 $\times$ [(实验释放-自发释放)/(最大释放-自发释

放)]]。由向其中加入100 μ l完全培养基代替效应细胞的孔测定自发释放。在用2.5% TritonX-100处理靶细胞后获得总的可释放放射性。

[0114] 统计分析

[0115] 正态分布数据,并且使用StatView统计软件(Abacus Concepts,Berkeley,加拿大),通过非参数曼怀二氏检验进行分析。 <0.05 的概率(P)值视为统计上显著的。

[0116] 实施例1

[0117] 本发明的复制缺陷型SeV载体的生成

[0118] 使用反向遗传学技术,构建命名为“rdSeV-F_{RSV/SeV}”(表达嵌合RSV/SeV F蛋白的复制缺陷型SeV载体)的针对人RSV的SeV疫苗载体。除了胞质和跨膜结构域之外,SeV F ORF替换为其RSV对应物,以获得嵌合RSV/SeV F表面蛋白(图1)。另外,为了开发安全的疫苗载体,SeV主链通过删除N末端76个氨基酸(P Δ 2-77)而在磷蛋白(P)基因中进行修饰。如先前所示,具有缺失P Δ 2-77的SeV载体不能在非辅助细胞系中合成新的基因组模板,但它仍能够初级转录和基因表达(Bossow等人,Open Virol.J.6:73-81,2012)。rdSeV-F_{RSV/SeV}可以由cDNA成功援救,并且使用辅助细胞系“P-HC”进行扩增。

[0119] 实施例2

[0120] 复制缺陷型SeV载体的遗传稳定性

[0121] 在本实施例中,使用被称为“rdPIRV”(复制缺陷型PIV3/RSV SeV载体)的特异性复制缺陷型SeV构建体,评估基因组复制缺陷型SeV载体的遗传稳定性。尽管该构建体不在所附权利要求的范围内,但就稳定性而言对于该构建体获得的结果也视为对于本发明的基因组复制缺陷型SeV载体有效。

[0122] 使用上文描述的和/或本领域已知的技术,将rdPIRV载体进行遗传改造,以表达可溶性RSV F蛋白以及嵌合RSV/SeV F和HN表面蛋白。简言之,将RSV F胞外域编码序列作为另外的转录单位(表达为可溶性蛋白(sF))插入,如先前所成功采用的(Voges等人,Cell.Immunol.247:85-94,2007)。除了胞质和跨膜结构域之外,SeV F和HN ORF替换为其PIV3对应物。此外,为了开发安全的疫苗载体,SeV主链通过删除N末端76个氨基酸(P Δ 2-77)而在磷蛋白(P)基因中进行修饰。

[0123] rdPIRV可以由cDNA成功援救,并且使用辅助细胞系进行扩增。该载体不能在非辅助细胞系中合成新的基因组模板,但它仍能够初级转录和基因表达,如通过PIV3F和HN以及RSV sF蛋白质表达的蛋白质印迹分析证实的(数据未显示)。此外,十次连续传代后的序列分析揭示无突变。

[0124] 这些结果证实复制缺陷型SeV/P Δ 2-77疫苗载体和从而本发明的复制缺陷型SeV载体的结构完整性和序列稳定性。

[0125] 实施例3

[0126] 复制缺陷型SeV载体的安全性

[0127] 另外,用实施例2中所述的rdPIRV载体执行关于复制缺陷型SeV载体的安全性特别是对于在体内的复制缺陷性和对不同组织的生物分布的研究。再次,就安全性而言关于rdPIRV载体获得的结果视为同样适用于本发明的基因组复制缺陷型SeV载体。

[0128] 两组BALB/C小鼠(n=4)用 1×10^5 ciu的rdPIRV或经修饰的有复制能力的表达EGFP(增强型绿色荧光蛋白)以促进其检测的SeV(SeV-E wt)进行鼻内(i.n.)接种。在三天后,将

小鼠处死,并且收集肺样品和血样。通过计数细胞培养物上的EGFP阳性病灶,来定量组织匀浆物和血液中存在的病毒(检测极限:20ciu/肺、脾或500 μ l血液)。

[0129] 在检查的任何动物组织中无法检测到rdPIRV的病毒颗粒。仅当使用SeV-E wt时,可在肺(高达 3.2×10^4 ciu/肺)而不是血液(数据未显示)中检测到病毒颗粒。另外,将从rdPIRV免疫接种的小鼠中抽取的肺匀浆物覆盖到Vero细胞上,以验证任何复制重组SeV的不存在。无法检测到病毒,从而证实该疫苗载体在体内是复制缺陷的(数据未显示)。没有动物发生任何疼痛或重量减轻的体征。

[0130] 总之,这些数据证实:(i)在P基因中氨基酸2-77的缺失使得载体不能在体内产生子代基因组;(ii)有复制能力的SeV传播局限于呼吸道。这些结果还适用于本发明的复制缺陷型SeV载体,其因此视为对人的施用是特别安全的。

[0131] 实施例4

[0132] 生产效率

[0133] 商业疫苗的生产效率对于这样的产品的市场潜力具有巨大影响。因此,评价了本发明的基因组复制缺陷型SeV载体(rdSeV-FRSV/SeV载体)的生产效率,并且与缺乏胞质结构域的变体rdSeV-FRSV/SeV- Δ CT的生产效率进行比较。

[0134] 在第一项研究中,将用编码SeV P和N蛋白的基因稳定转染的VPN辅助细胞用本发明的rdSeV-FRSV/SeV载体进行感染。分析载体的不同传代(P1、P2、P3)。对于传代P1和P2,还执行两次分开的生产运行(P1-1、P1-2、P2-1、P2-2)。在不同时间点(例如在第8-11天(“d8-11”)、第11-12天(“d11-12”)等等),对从细胞培养上清液中获得样品就其载体滴度进行分析。

[0135] 如由图4可见的,病毒滴度在所有传代水平和生产运行上均显著很高,并且在以后传代(P2和P3)中显著增加。总之,这些结果证实由于同时存在来自两种不同病毒的两种表面蛋白(F和HN)而引起出人意料高的生产效率。该发现是令人惊讶的,因为预期在附着融合和出芽过程期间存在强干扰。

[0136] 在第二项研究中,rdSeV-FRSV/SeV的生产效率与其编码缺乏胞质尾区的嵌合F蛋白的变体(“rdSeV-FRSV/SeV- Δ CT”)(参见图2)相比较。这种变体在rdSeV-FRSV/SeV在辅助细胞系“P-HC”上的连续传代期间自发生成。所产生的载体颗粒的后续序列分析揭示F基因的K551(Lys-551)密码子中的无义突变导致提前终止密码子。因此,仅SeV F胞质结构域的前两个氨基酸(即氨基酸524和525)在该变体中得到保留,其因此(基本上)缺乏其胞质尾区。

[0137] 在自发生成的不含胞质尾区的变体在细胞培养中的后续传代期间,观察到缺失变体与非突变病毒(rdSeV-FRSV/SeV)的比率增加。基于该出人意料观察,随后借助于在非突变病毒(即rdSeV-FRSV/SeV)和突变的变体(即rdSeV-FRSV/SeV- Δ CT)的细胞培养物中的比较生产运行进行验证:突变型病毒可以扩增至显著更高的滴度。简言之,细胞用0.1的相同MOI进行感染,并且培养五天。在不同时间点,即在第3天(“d2-3”)、第4天(“d3-4”)和第5天(“d4-5”)时,测定细胞培养上清液的载体滴度。

[0138] 如由图5可见的,早在第3天时,rdSeV-FRSV/SeV- Δ CT的滴度比rdSeV-FRSV/SeV的滴度高5倍。在第4天和第5天时,分别地,rdSeV-FRSV/SeV- Δ CT的滴度比rdSeV-FRSV/SeV的滴度高甚至超过10倍。该发现完全是出人意料的,因为现有技术教导SeV F蛋白的胞质尾区在病毒装配中起关键作用(参见Stone,R.和Takimoto,T.,PLoS ONE8(4):e61281.doi:10.1371/

journal.pone.0061281, 2013)。因此,如果有的话,技术人员将预期获得减少的生产效率。然而,令人惊讶地发现缺失突变体rdSeV-F_{RSV/SeV}-ΔCT显示出极佳的生产效率,甚至比表达全长嵌合RSV/SeV F蛋白的rdSeV-F_{RSV/SeV}的生产效率好得多。

[0139] 上述结果显示本发明的rdSeV载体可以以高度有效的方式产生。另外,嵌合RSV/SeV蛋白的胞质结构域的缺失导致甚至更高的生产能力。

[0140] 实施例5

[0141] 复制缺陷型SeV载体的免疫原性

[0142] 特异性抗体应答(IgG和IgA):

[0143] 为了评估rdSeV-F_{RSV/SeV}诱导特异性免疫应答的能力,将它的免疫原性与(i)图3中所示的表达可溶性RSV F蛋白的复制缺陷型SeV载体(“rdSeV-sF_{RSV}”)(ii)作为阳性对照的RSV的长链毒株(ATCC VR-26)(“活RSV”)和(iii)作为阴性对照的磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行比较。此外,评估两个不同的施用途径,即鼻内(i.n.)和肌肉(i.m.)。将相同剂量的每种载体经由两个施用途径进行应用。

[0144] 小鼠用如上所述的rdSeV-sF_{RSV}、rdSeV-F_{RSV/SeV}、活RSV和PBS进行i.n.和i.m.感染。如图6中所示,在i.n.和i.m.施用后,用rdSeV-F_{RSV/SeV}免疫接种的小鼠发展比rdSeV-sF_{RSV}强得多的针对RSV的IgG抗体应答。因此,与编码RSV F抗原单独作为另外的转基因从而导致其可溶性蛋白质构象相比较,编码RSV F抗原作为结构蛋白看起来是有利的。

[0145] 还观察到rdSeV-F_{RSV/SeV}的鼻内施用导致在鼻洗涤物(参见图7)和支气管肺泡灌洗液(参见图8)中显著更强的粘膜抗体(IgA)诱导。通过rdSeV-F_{RSV/SeV}的这种IgA抗体强诱导是本发明的SeV载体的非常有利的特性,因为它代表在遇到经由呼吸道吸收的呼吸系统病原体如RSV后的第一道强力防线。

[0146] rdSeV-F_{RSV/SeV}还能够诱导高水平的针对RSV的中和抗体。相比之下,如由图9可见的,在i.n.以及i.m.施用后,通过rdSeV-sF_{RSV}诱导的中和抗体水平显著更低。这显示rdSeV-F_{RSV/SeV}能够诱导针对RSV的良好的中和免疫应答,其在引发有力的免疫应答中被视为是重要的。

[0147] 特异性T细胞应答(IFN-γ 表达和CTL应答):

[0148] 为了验证本发明的复制缺陷型SeV载体是否能够诱导RSV特异性T细胞应答,评估了IFN-γ 的诱导。如由图10可见的,在用灭活的RSV体外再刺激后,通过脾细胞产生了相关水平的IFN-γ,指示强壮的T辅助1(Th1)应答,其被视为指示特异性细胞毒性T细胞的诱导。特别地,IFN-γ 的产生在用rdSeV-F_{RSV/SeV} i.n.免疫接种的小鼠中高于在接受rdSeV-sF_{RSV}的小鼠中的产生。

[0149] 此外,研究了用rdSeV-F_{RSV/SeV}的i.n.或i.m.免疫接种是否能够引发针对RSV的细胞毒性T细胞应答。特异性细胞裂解通过免疫接种的小鼠的脾细胞相对于用RSV感染的靶细胞进行揭示(参见图11和图12)。用rdSeV-F_{RSV/SeV}接种的小鼠显示比rdSeV-sF_{RSV}更强的针对RSV的CTL应答,指示编码RSV F蛋白作为结构蛋白(即嵌合RSV/SeV表面蛋白F)的疫苗载体能够有效刺激特异性细胞介导的免疫应答。

[0150] 总之,上文实施例中呈现的结果显示本发明的rdSeV载体能够高效地刺激不同的免疫应答。考虑到本发明的rdSeV是基因组复制缺陷的并且因此与野生型SeV相比在感染期间存在少得多的RNA模板的事实,所诱导的免疫应答的程度是不可预期的。另外,所诱导的

免疫应答的质量指示可以刺激适应性免疫系统的不同武器,包括血清抗体、粘膜抗体和特异性细胞T细胞。

[0151] 此外,基于其天然感染途径,本发明的rdSeV载体完美适合于粘膜应用,从而使得IgA应答能够作为针对RSV的第一道强力防线,如上所示。强IgA应答连同细胞应答一起对于疫苗针对呼吸系统病原体例如RSV的功效是至关重要的。

[0152] 此外,本发明的rdSeV载体可以以出人意料的有效方式产生。高生产效率对于作为疫苗的商业化而言是高度重要且期望的特征。因此,本发明的rdSeV载体是针对RSV的非常有希望的疫苗候选物。

序列表

<110> AmVac AG

<120> 呼吸道合胞病毒半活疫苗

<130> 109818P485PC

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 524

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RSV毒株ATCC VR-26 F蛋白的胞外域

<400> 1

[0001]

```

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
1      5      10      15
Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20     25     30
Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35     40     45
Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50     55     60
Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Asn
65     70     75     80
Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85     90     95
Met Gln Ser Thr Thr Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100    105    110
Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
115    120    125
Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130    135    140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145    150    155    160
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165    170    175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180    185    190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195    200    205
Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210    215    220
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225    230    235    240
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245    250    255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260    265    270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275    280    285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290    295    300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305    310    315
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325    330    335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340    345    350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355    360    365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370    375    380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385    390    395    400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405    410    415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420    425    430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp

```

```

      435      440      445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
      450      455      460
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465      470      475      480
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
      485      490      495
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
      500      505      510
Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn
      515      520

```

<210> 2
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SeV毒株Fushimi (V52) F蛋白的跨膜结构域

[0002]

```

<400> 2
Thr Val Ile Thr Ile Ile Val Val Met Val Val Ile Leu Val Val Ile
1      5      10      15
Ile Val Ile Val Ile Val Leu Tyr
      20

```

<210> 3
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220> 结构域
 <223> SeV毒株Fushimi (V52) F蛋白的胞质结构域

```

<400> 3
Arg Leu Lys Arg Ser Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro
1      5      10      15
Arg Asp Thr Tyr Thr Leu Glu Pro Lys Ile Arg His Met Tyr Thr Asn
      20      25      30
Gly Gly Phe Asp Ala Met Ala Glu Lys Arg
      35      40

```

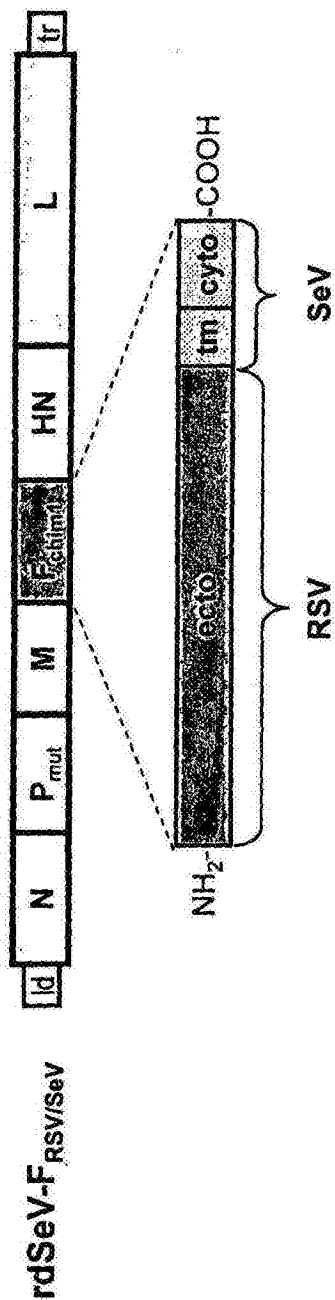


图1

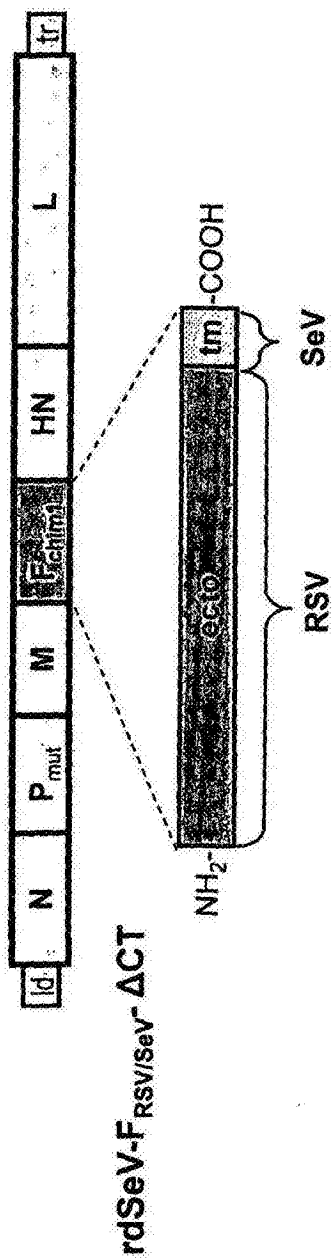


图2

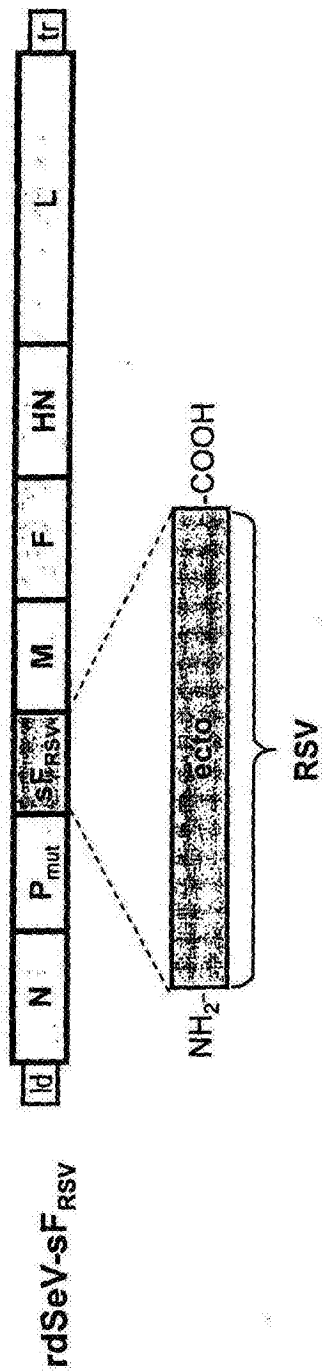


图3

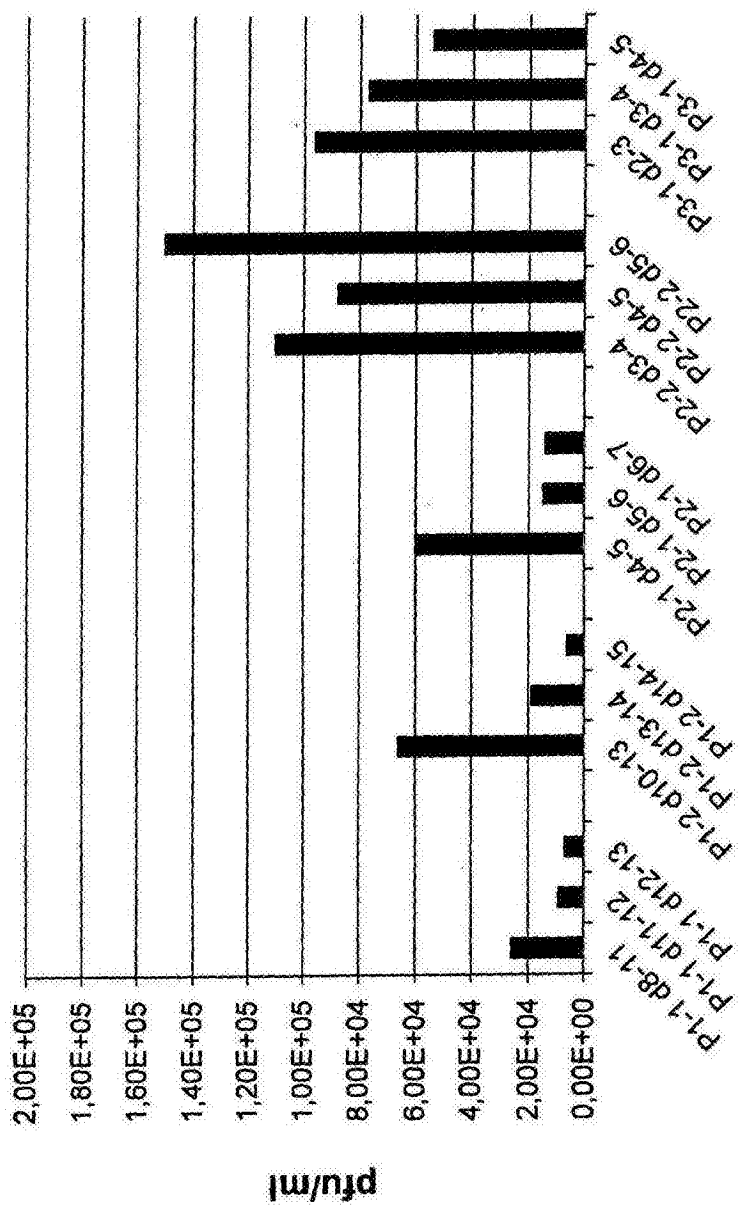


图4

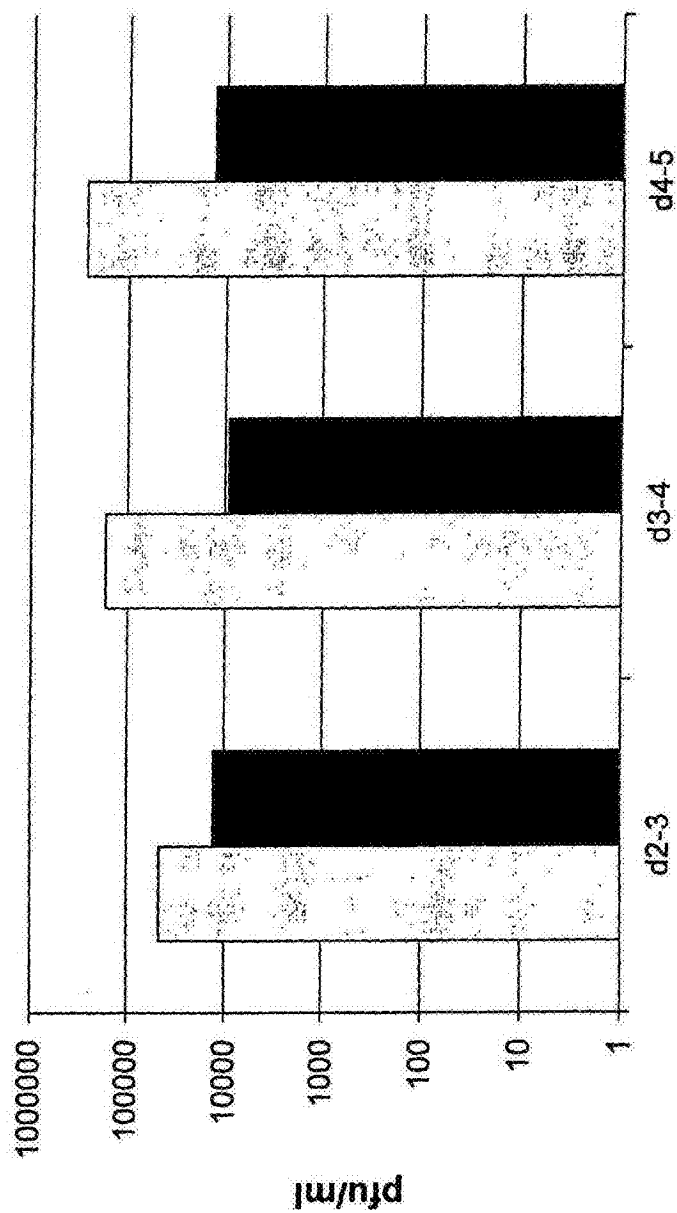


图5

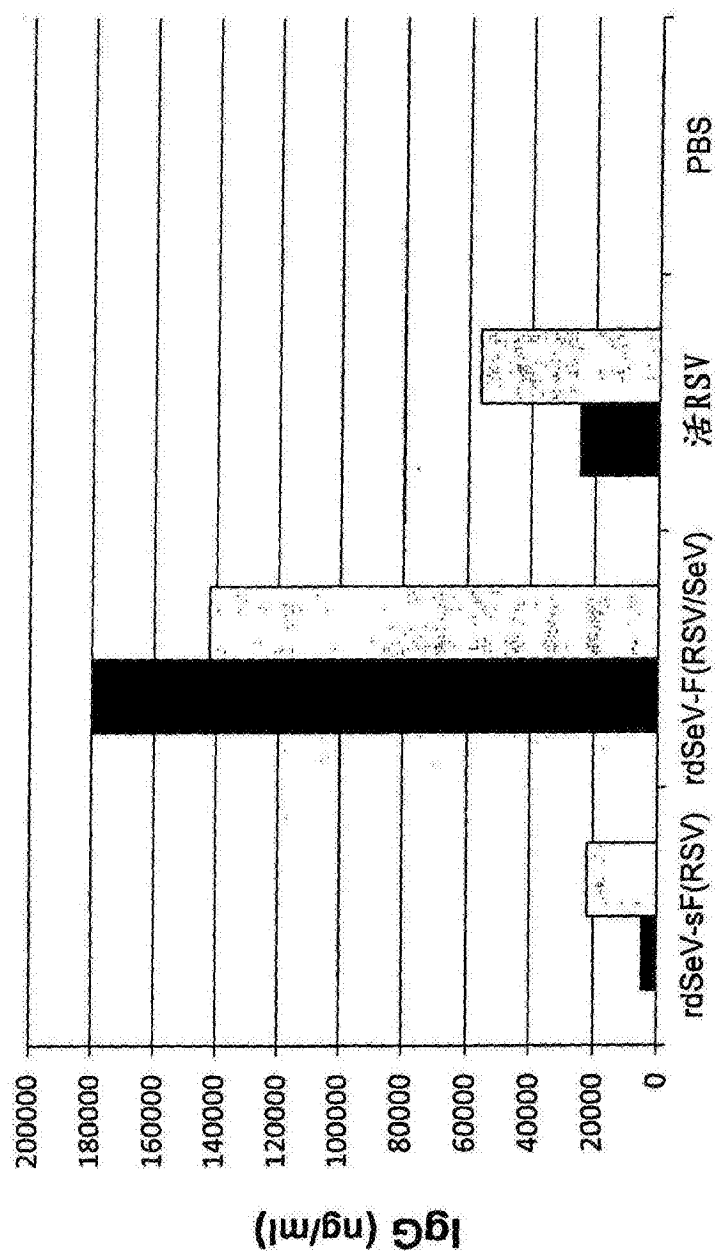


图6

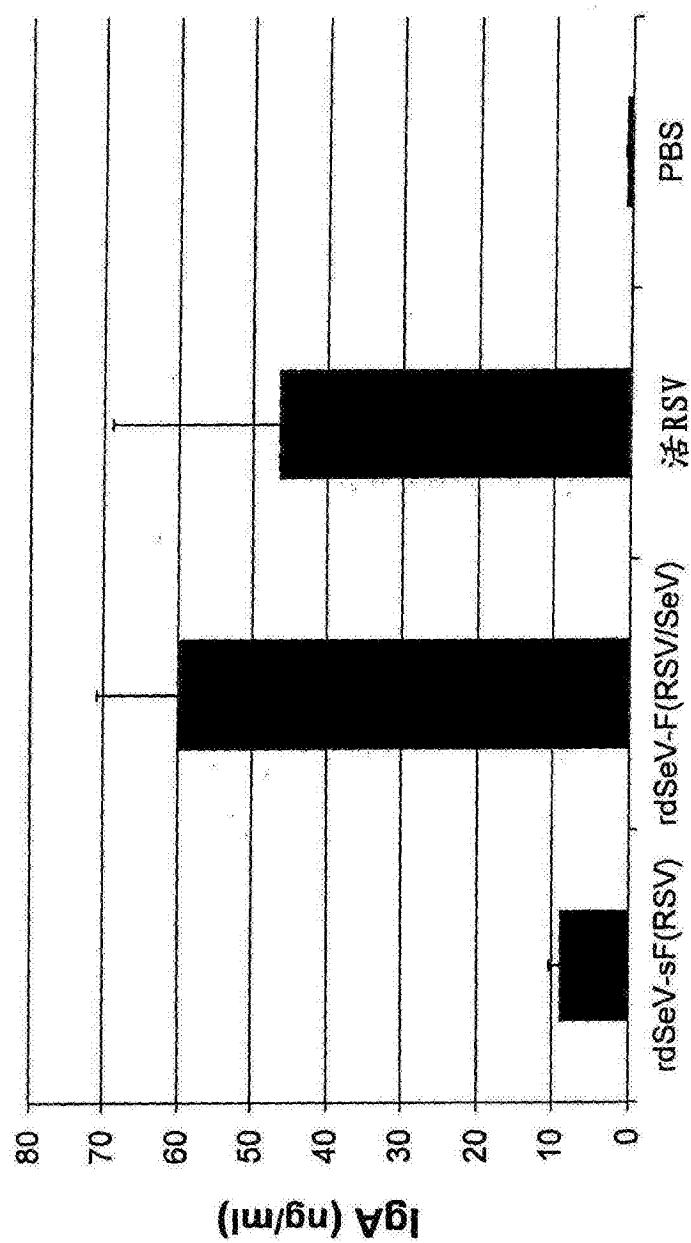


图7

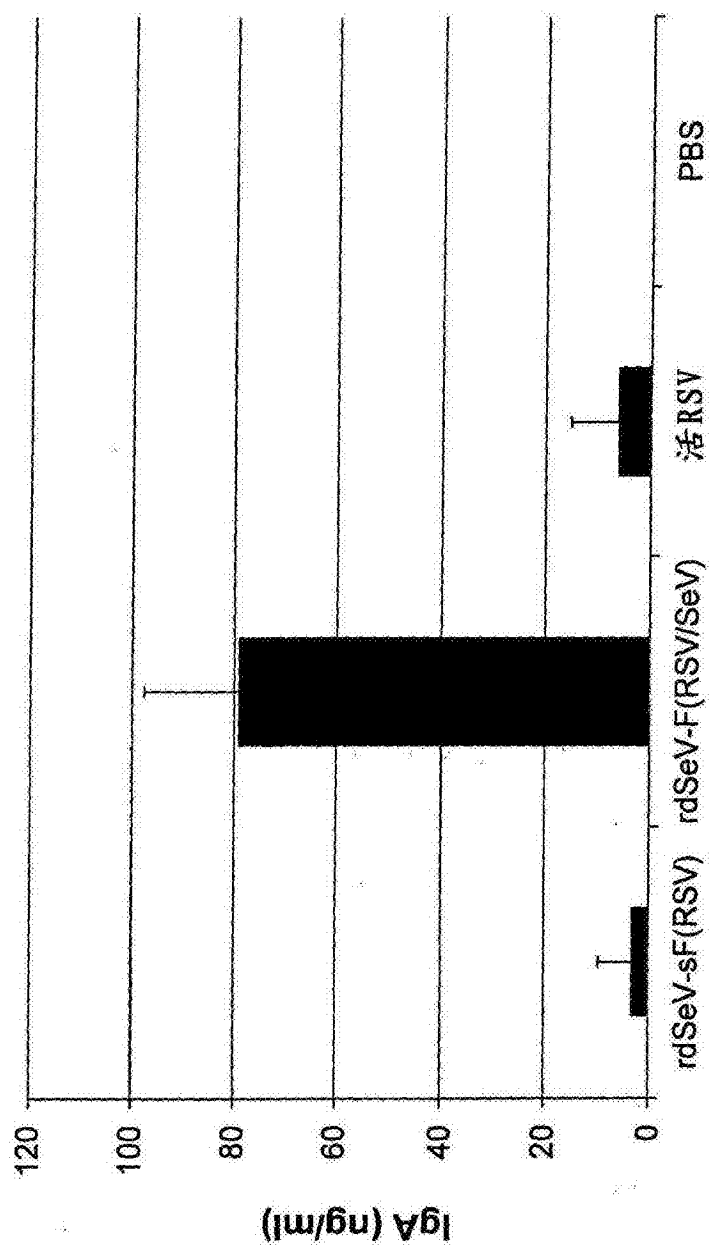


图8

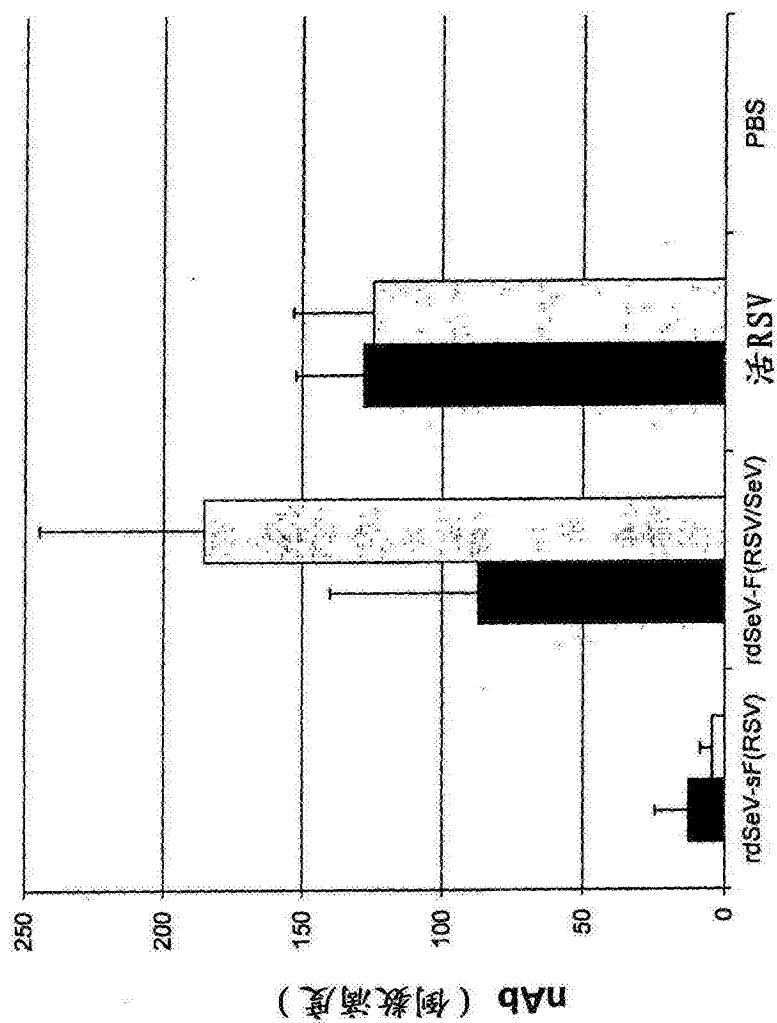


图9

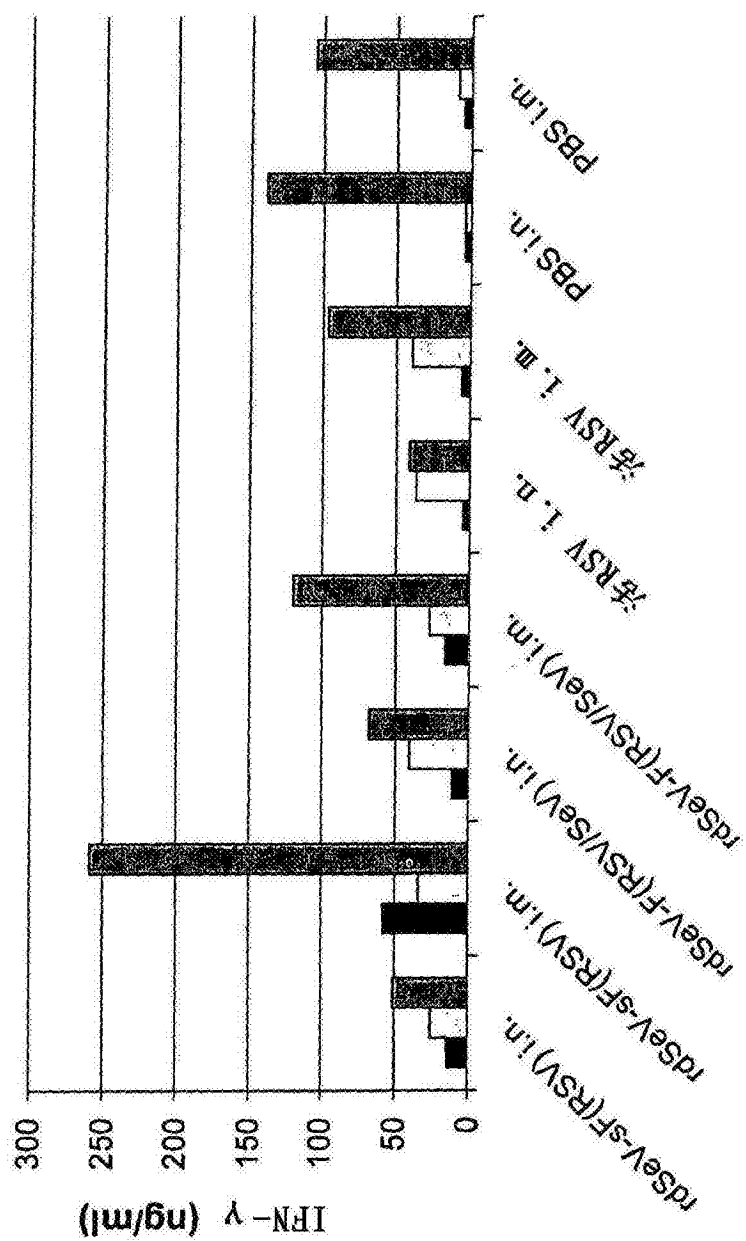


图10

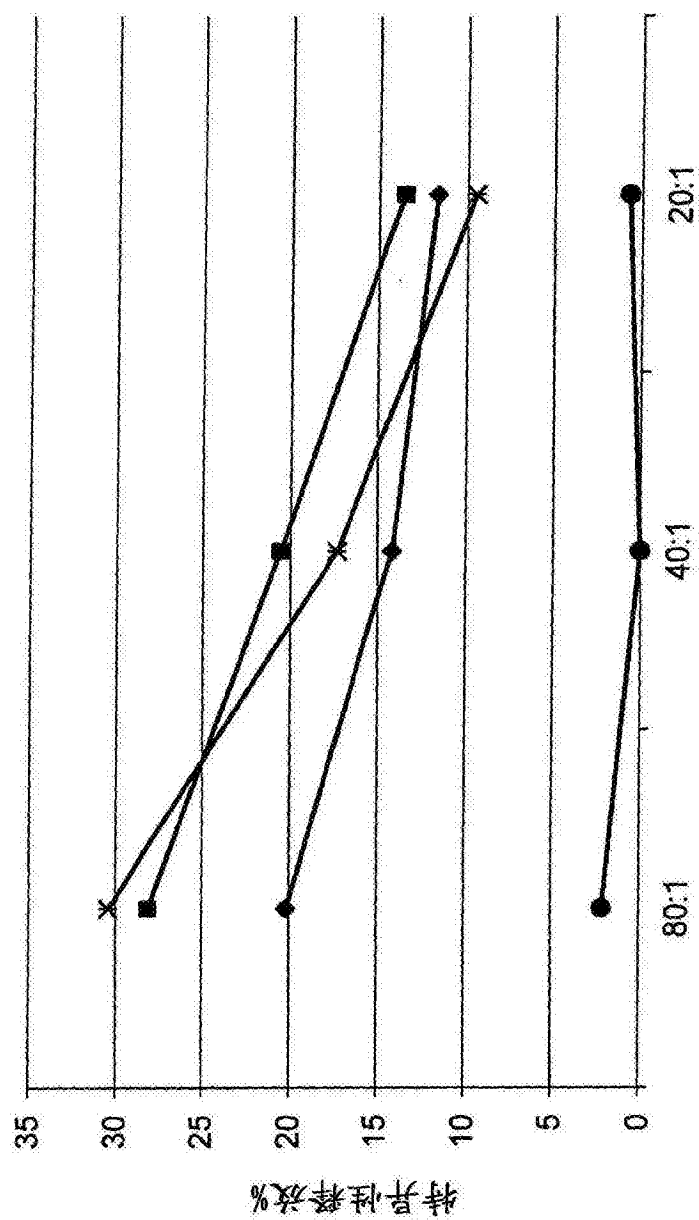


图11

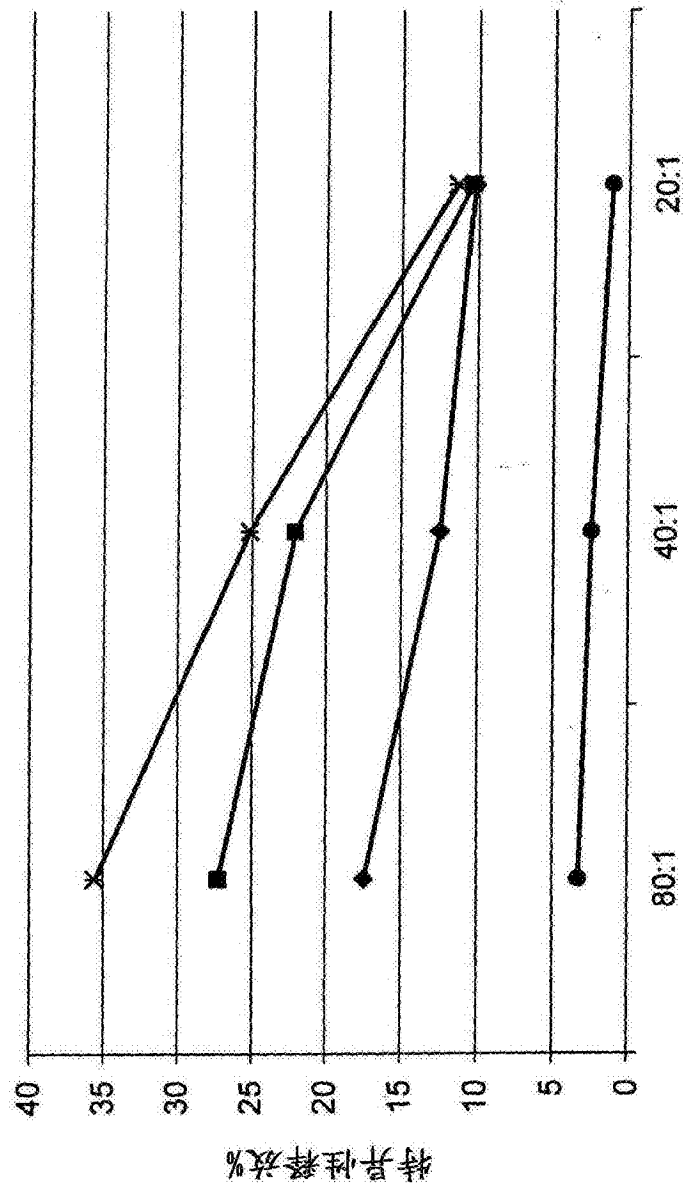


图12