



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104334188 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201380012141.9

(22)申请日 2013.03.21

(30)优先权数据

12160682.6 2012.03.22 EP

61/614,429 2012.03.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/055935 2013.03.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/139911 EN 2013.09.26

(73)专利权人 克鲁塞尔荷兰公司

地址 荷兰莱顿

(72)发明人 K·拉多塞维奇

J·H·H·V·屈斯泰 J·维林加

M·N·维佐约阿特莫佐

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路

(51)Int.Cl.

A61K 39/155(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

(56)对比文件

CN 102174536 A,2011.09.07,

CN 101072879 A,2007.11.14,

Rebekka Kohlmann. "Protective efficacy

and immunogenicity of an adenoviral

vector vaccine encoding the codon-

optimized F protein of respiratory

syncytial virus".《J. Virol.》.2009,第83卷

(第23期),12601-12610.

审查员 刘芳

权利要求书1页 说明书22页

序列表4页 附图30页

(54)发明名称

抗RSV疫苗

(57)摘要

本发明提供一种抗呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗,该疫苗包含血清型(26)重组人类腺病毒,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其免疫活性部分的核酸。

1. 一种抗呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗,其包含血清型26重组人类腺病毒,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸。
2. 如权利要求1所述的疫苗,其中该重组腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸,该RSV F蛋白质由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。
3. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗,其中该编码RSV F蛋白质的核酸是针对在人类细胞中的表达进行密码子优化。
4. 如权利要求1或2所述的疫苗,其中该编码RSV F蛋白质的核酸由SEQ ID NO:2的核酸序列组成。
5. 如权利要求1或2所述的疫苗,其中该重组人类腺病毒的腺病毒基因组的E1区中具有缺失、E3区中具有缺失或E1区与E3区中均具有缺失。
6. 如权利要求1或2所述的疫苗,其中该重组腺病毒的基因组在5'末端包含序列CTATCTAT。
7. 如前述权利要求中任一项所述的疫苗在制备用于预防受试者中的RSV感染的药物中的用途。
8. 如权利要求7所述的用途,其中所述药物是经肌肉内投与。
9. 如权利要求7或8所述的用途,其中所述药物是投与该受试者一次以上。
10. 如权利要求7或8所述的用途,其中所述药物用于与包含血清型35重组人类腺病毒的疫苗联合施用,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸。
11. 如权利要求7或8所述的用途,其中向该受试者单次投与所述药物。
12. 如权利要求7或8所述的用途,其中所述药物用于与RSV F蛋白质联合施用。
13. 包含血清型26重组人类腺病毒的组合物在制备用于减少受试者的RSV感染和/或复制的药物中的用途,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸,通过肌肉内注射向该受试者投与所述药物。
14. 一种经分离的宿主细胞,其包含血清型26重组人类腺病毒,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸。
15. 一种制造抗呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗的方法,其包含提供包含编码RSV F蛋白质的核酸的血清型26重组人类腺病毒,使所述重组腺病毒在宿主细胞培养物中增殖,分离并纯化该重组腺病毒,并将该重组腺病毒调配于医药学上可接受的组合物中。
16. 一种经分离的重组核酸,其形成血清型26重组人类腺病毒的基因组,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸。

抗RSV疫苗

[0001] 本发明是关于医药领域。更具体地,本发明是关于抗RSV疫苗。

[0002] 发明背景

[0003] 在1950年代发现呼吸道合胞病毒(RSV)之后,该病毒很快即成为公认的与人类下呼吸道感染及上呼吸道感染相关的病原体。据估计,全世界每年出现64,000,000例RSV感染,导致160,000例死亡(WHO急性呼吸道感染,2009年9月更新)。最严重的疾病尤其在早产儿、老年人及免疫功能降低的个体中出现。在2岁以下儿童中,RSV为最常见的呼吸道病原体,占因呼吸道感染而住院治疗的约50%,且住院治疗的峰值出现在2-4月龄。据报道,几乎所有儿童至两岁为止均受到RSV感染。终生反复感染归结于无效的自然免疫。老年人中RSV疾病负担、死亡率及发病率水平仅次于非泛流行性A型流感感染所引起的那些。

[0004] RSV为副黏液病毒,属于肺病毒亚科。RSV的基因组编码多种蛋白质,包括称为RSV糖蛋白(G)及RSV融合(F)蛋白质的膜蛋白,这些膜蛋白为中和抗体的主要抗原标靶。融合蛋白质前体(F0)的蛋白质裂解产生经由二硫桥键连接的两个多肽F1及F2。抗F1蛋白质的融合介导部分的抗体可阻止细胞中的病毒吸收且因此具有中和作用。除作为中和抗体的标靶外,RSV F含有细胞毒性T细胞抗原决定基(Pemberton等人,1987,J.Gen.Virol.68:2177-2182)。

[0005] RSV感染的治疗选项包括抗RSV的F蛋白质的单克隆抗体。与此类单克隆抗体相关的高成本及医院配置中对投药的要求排除了其大规模用于危险群体预防的用途。因此,需要一种RSV疫苗,其优选地可用于小儿群体以及老年人。

[0006] 尽管历经50年研究,但仍无获准的抗RSV疫苗。疫苗开发的一个主要障碍为在1960年代使用福尔马林不活化(formalin-inactivated,FI)RSV疫苗的临床试验中遗留的疫苗增强疾病。FI-RSV接种疫苗的儿童未受到保护以免于自然感染,且受感染儿童遭受比未接种疫苗的儿童更严重的疾病,包括两例死亡。此现象称为‘增强疾病’。

[0007] 自使用FI-RSV疫苗的试验以来,已实行多种方法来产生RSV疫苗。尝试包括RSV的传统活减毒冷继代病毒株或温度敏感性突变病毒株、(嵌合)蛋白亚单位疫苗、肽疫苗及由重组病毒载体表达的RSV蛋白质。虽然此等疫苗中的一些疫苗展示具前途的临床前数据,但因安全性问题或缺乏功效而尚无疫苗获准供人类使用。

[0008] 腺病毒载体用于制备多种疾病的疫苗,包括与RSV感染相关的疾病。以下段落提供已描述的基于腺病毒的RSV候选疫苗的实例。

[0009] 在一种方法中,已将RSV.F插入4型、5型及7型复制胜任型腺病毒的非必需E3区中。棉鼠鼻内(i.n.)施用 10^7 pfu的免疫接种具有适度免疫原性,且保护下呼吸道免受RSV攻击,但不保护上呼吸道免受RSV攻击(Connors等人,1992,Vaccine 10:475-484;Collins,P.L.,Prince,G.A.,Camargo,E.,Purcell,R.H.,Chanock,R.M.及Murphy,B.R.Evaluation of the protective efficacy of recombinant vaccinia viruses and adenoviruses that express respiratory syncytial virus glycoproteins.Vaccines 90:Modern Approaches to New Vaccines including prevention of AIDS(Brown,F.,Chanock,R.M.,Ginsberg,H.及Lerner,R.A.编)Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1990,

第79-84页)。黑猩猩的后续经口免疫接种具有不良免疫原性(Hsu等人,1992,J Infect Dis.66:769-775)。

[0010] 在其他研究中(Shao等人,2009,Vaccine 27:5460-71;US2011/0014220),带有编码RSV-B1病毒株的F蛋白质的跨膜截短(rAd-F0 Δ TM)或全长(rAd-F0)型式的核酸的两种重组复制胜任不能型腺病毒5载体经工程改造且经由鼻内途径给予BALB/c小鼠。动物经鼻内初打 10^7 pfu且在28天后鼻内加打相同剂量。虽然抗RSV-B1抗体中和RSV-Long及RSV-A2病毒株且与其交叉反应,但使用此等载体的免疫接种仅部分防止RSV B1攻击复制。使用rAd-F0 Δ TM的(部分)保护略高于使用rAd-F0。

[0011] 在另一研究中,观测到使用表达野生型RSV F(FG-Ad-F)的复制缺陷型(基于Ad5)FG-Ad腺病毒的 10^{11} 个病毒粒子对BALB/c小鼠进行鼻内免疫接种与对照组相比肺病毒效价仅减小 $1.5 \log_{10}$ (Fu等人,2009,Biochem.Biophys.Res.Commun.381:528-532)。

[0012] 在其他研究中,观测到鼻内施用的表达RSV A2的F蛋白质的密码子优化可溶性F1片段(氨基酸155-524)的基于Ad5的复制缺陷型腺病毒载体(10^8 PFU)与对照小鼠相比可减少BALB/c小鼠肺中的RSV攻击复制,但由肌肉内(i.m.)途径免疫接种的小鼠未展现出抗攻击的任何保护(Kim等人,2010,Vaccine 28:3801-3808)。

[0013] 在其他研究中,使用基于Ad5且带有密码子优化全长RSV F(AdV-F)或可溶性形式的RSF F基因(AdV-Fsol)的腺病毒载体以 1×10^{10} OPU(光学粒子单位; 1×10^{10} OPU的剂量相当于 2×10^8 GTU(基因转导单位))的剂量对BALB/c小鼠免疫接种两次。在鼻内免疫接种之后,此等载体大大减少肺内病毒负荷,但在皮下(s.c.)或肌肉内施用后仅部分减少肺内病毒负荷(Kohlmann等人,2009,J Virol 83:12601-12610;US 2010/0111989)。

[0014] 在其他研究中,观测到肌肉内施用的表达RSV A2病毒株的定序F蛋白质cDNA的基于Ad5的复制缺陷型重组腺病毒载体(10^{10} 个粒子单位)与对照小鼠相比可仅部分减少BALB/c小鼠肺中的RSV攻击复制(Krause等人,2011,Virology Journal 8:375-386)。

[0015] 除了在许多情况下并不完全有效以外,在临床评估下供小儿使用的RSV疫苗及在临床前评估下的大多数疫苗为鼻内疫苗。鼻内策略的最重要优势在于直接刺激局部呼吸道免疫性且不存在相关的疾病增强。实际上,一般用于鼻内投药的例如基于腺病毒的RSV候选疫苗的功效与肌肉内投药相比似乎较佳。然而,鼻内接种疫苗亦在不到6个月大的婴儿中引起安全性问题。在所有年龄层中,鼻内疫苗最常见的不良反应为流鼻涕或鼻充血。新生儿为强制型鼻腔呼吸者且因此必须经鼻呼吸。因此,头几个月大的婴儿鼻充血可干扰哺乳,且在极少情况下可导致严重呼吸问题。

[0016] 已鉴别超过50种不同人类腺病毒血清型。其中,过去已研究最广泛地用作基因载体的血清型5腺病毒(Ad5)。然而,不同血清型的重组腺病毒载体可产生关于诱导免疫反应及保护的不同结果。举例而言,WO 2012/021730描述编码F蛋白质的血清型7猴腺病毒载体及血清型5人类腺病毒载体与血清型28人类腺病毒载体相比提供较佳抗RSV保护。此外,观测到基于人类或非人类腺病毒血清型的载体的差异免疫原性(Abbink等人,2007,J Virol 81:4654-4663;Colloca等人,2012,Sci Transl Med 4,115ra2)。Abbink等人得出结论:在不存在抗Ad5免疫性的情况下,所研究的所有稀少血清型人类rAd载体不如rAd5载体有效。另外,近来已描述,虽然具有埃博拉病毒(Ebolavirus,EBOV)糖蛋白(gp)转基因的rAd5保护100%非人类灵长类动物,但具有EBOV gp转基因的rAd35及rAd26仅提供部分保

护,且此等载体需要异源初打-加打策略来获得抗埃博拉病毒攻击的完全保护(Geisbert等人,2011,J Virol 85:4222-4233)。因此,事前不可能仅基于另一腺病毒血清型的数据预测重组腺病毒疫苗的功效。

[0017] 此外,对于RSV疫苗,需要在适当疾病模型(诸如棉鼠)中进行实验以判定疫苗候选物是否足以有效防止RSV在鼻道及肺中复制且同时为安全的,亦即不导致增强疾病。这些候选疫苗优选地应在这些模型中极其有效,甚至在肌肉内投药时仍如此。

[0018] 因此,仍需要不导致增强疾病的有效疫苗及接种抗RSV疫苗的方法。本发明旨在提供此类疫苗及以安全且有效的方式接种抗RSV疫苗的方法。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明的发明人惊讶地发现包含编码RSV F蛋白质的核苷酸序列的血清型26重组腺病毒(Ad26)为明确建立的棉鼠模型中极有效的抗RSV疫苗,且与先前关于编码RSV F的Ad5所述的数据相比具有改良的功效。据证实,即使单次投与、甚至肌肉内投与编码RSV F的Ad26仍足以提供抗攻击性RSV复制的完全保护。

[0021] 本发明提供一种抗呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗,该疫苗包含血清型26重组人类腺病毒,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸。

[0022] 在某些实施例中,重组腺病毒包含编码RSV F蛋白质的核酸,该RSV F蛋白质包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0023] 在某些实施例中,编码RSV F蛋白质的核酸是针对在人类细胞中的表达进行密码子优化。

[0024] 在某些实施例中,编码RSV F蛋白质的核酸包含SEQ ID NO:2的核酸序列。

[0025] 在某些实施例中,重组人类腺病毒的腺病毒基因组的E1区中具有缺失、E3区中具有缺失或E1区与E3区中均具有缺失。

[0026] 在某些实施例中,重组腺病毒具有在5'末端包含序列CTATCTAT的基因组。

[0027] 本发明另外提供一种对受试者接种抗RSV疫苗的方法,该方法包含向该受试者投与本发明的疫苗。

[0028] 在某些实施例中,疫苗经肌肉内投与。

[0029] 在某些实施例中,将本发明的疫苗投与受试者一次以上。

[0030] 在某些实施例中,对受试者接种抗RSV疫苗的方法另外包含向该受试者投与包含血清型35重组人类腺病毒的疫苗,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸。

[0031] 在某些实施例中,对受试者接种抗RSV疫苗的方法另外包含向该受试者投与RSV F蛋白质(优选地调配成医药组合物,因此为蛋白质疫苗)。

[0032] 在某些实施例中,接种疫苗的方法由向受试者单次投与疫苗组成。

[0033] 本发明亦提供一种减少例如受试者鼻道及肺中RSV感染和/或复制的方法,其包含通过肌肉内注射向该受试者投与包含血清型26重组人类腺病毒的组合,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸。在投与疫苗时,此方法将减少由受试者中的RSV感染引起的不良影响,且因此有助于保护受试者免受这些不良影响。在某些实施例中,可基本上预防RSV感染的不良影响,亦即降至使其临床上不相关的低水平。重组腺病毒可呈本发明的疫苗形式,包括上文所述的实施例。

[0034] 本发明亦提供一种包含血清型26重组人类腺病毒的经分离的宿主细胞,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸。

[0035] 本发明另外提供一种制造抗呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗的方法,其包含提供包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸的血清型26重组人类腺病毒,使所述重组腺病毒在宿主细胞培养物中增殖,分离并纯化该重组腺病毒,并将该重组腺病毒调配于医药学上可接受的组合物中。这方面的重组人类腺病毒亦可为上述实施例中所述的任何腺病毒。

[0036] 本发明亦提供一种形成血清型26重组人类腺病毒的基因组的经分离的重组核酸,该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸。腺病毒亦可为如上述实施例中所述的任何腺病毒。

[0037] 附图简要说明

[0038] 图1展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26(A)及rAd35(B)的载体免疫接种时,在免疫接种后2周及8周,小鼠的抗重迭F的氨基酸1-252的F肽及抗重迭F的氨基酸241-574的F肽的细胞免疫反应。

[0039] 图2展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体免疫接种时,在免疫接种后2周及8周,小鼠的抗RSV抗体反应。

[0040] 图3展示在使用 10^{10} vp的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体免疫接种时,在免疫接种后8周,小鼠的抗RSV IgG2a抗体反应与抗RSV IgG1抗体反应的比率的结果。

[0041] 图4展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26(A)及rAd35(B)的载体免疫接种时,在免疫接种后2周及8周,小鼠的抗RSV Long的病毒中和能力。

[0042] 图5展示在使用具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种时,在初次免疫接种后6周及12周,小鼠的抗(A)重迭F的氨基酸1-252的F肽及抗(B)重迭F的氨基酸241-574的F肽的细胞免疫反应。

[0043] 图6展示在使用具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种时,在第一次免疫接种后的不同时间点,小鼠的抗RSV抗体反应。

[0044] 图7展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种时,在第一次免疫接种后的不同时间点,小鼠血清中抗RSV Long的病毒中和能力。

[0045] 图8展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种时,在第一次免疫接种后的不同时间点,小鼠的抗RSV B1的病毒中和能力。

[0046] 图9展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种后,在攻击后5天,棉鼠的A)RSV肺效价及B)RSV鼻效价。

[0047] 图10展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种后,在第一次免疫接种后A)28天及B)49天诱导的病毒中和效价。

[0048] 图11展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行初打-加打免疫接种后,在处死当天棉鼠肺部的组织病理学检查。

[0049] 图12展示在经由不同途径投与不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行单次剂量免疫接种后,在攻击后5天,棉鼠的A)RSV肺效价及B)RSV鼻效价。

[0050] 图13展示在经由不同途径投与不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行单次剂量免疫接种后,在第一次免疫接种后28天及49天诱导的病毒中和效价。

[0051] 图14展示在处死当天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26及rAd35的载体进行单次剂量免疫接种(i.m.)后,在处死当天棉鼠肺部的组织病理学检查。

[0052] 图15展示包含具有编码RSV F的序列的Ad35及Ad26基因组左端的质粒图谱:

[0053] A.pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat,及B.pAdApt26.RSV.F(A2)nat

[0054] 图16展示在第0天或第28天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次剂量免疫接种后,在攻击后5天,棉鼠的A)RSV肺效价及B)RSV鼻效价。第49天进行攻击。

[0055] 图17展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的rAd26进行单次剂量免疫接种后,在如图16所述的免疫接种后49天诱导的病毒中和效价。

[0056] 图18展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的rAd26进行单次剂量免疫接种后,在免疫接种后的时间内诱导的病毒中和效价

[0057] 图19展示在使用源于经 10^{10} Ad-RSV F或无转基因(Ad-e)免疫接种的棉鼠的血清对抗RSV Long及RSV Bwash之后49天的VNA效价。PB:初打-加打。

[0058] 图20展示在第0天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次剂量免疫接种后,在使用RSV A2或RSV B15/97攻击后5天,棉鼠的RSV肺效价。

[0059] 图21展示在第0天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次剂量免疫接种后,在使用RSV A2或RSV B15/97攻击后5天,棉鼠的RSV鼻效价。

[0060] 图22展示在第0天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次剂量免疫接种后,在初打后的不同时间点,棉鼠血清中的VNA效价。

[0061] 图23展示在第0天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次剂量免疫接种后,在使用标准剂量(10^5)或高剂量(5×10^5)RSV A2攻击后5天,棉鼠的RSV肺效价。

[0062] 图24展示在第0天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次剂量免疫接种后,在使用标准剂量(10^5)或高剂量(5×10^5)RSV A2攻击后5天,棉鼠的RSV鼻效价。

[0063] 图25展示在第0天及第28天使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体的单次免疫接种或初打-加打免疫接种进行免疫接种后,在攻击后5天,棉鼠的RSV肺效价,其中在免疫接种后210天进行攻击。

[0064] 图26展示在单次剂量免疫接种及初打-加打免疫接种后,在免疫接种后140天,棉鼠的VNA效价

[0065] 图27展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次免疫接种或初打-加打免疫接种后,在攻击后2天,处死的棉鼠肺部的组织病理学检查。点表示中位数及第25百分位数与第75百分位数的须(whisker)。

[0066] 图28展示在使用不同剂量的具有RSV F基因的基于rAd26的载体进行单次免疫接种或初打-加打免疫接种后,在攻击后6天,处死的棉鼠肺部的组织病理学检查。点表示中位数及第25百分位数与第75百分位数的须。

[0067] 图29展示在使用具有RSV F基因的rAd26(Ad26.RSV.F)免疫接种,继而使用Ad26.RSV.F或使用辅助型RSV F蛋白质(post-F)加打后诱导的病毒中和效价。

[0068] 图30展示在使用Ad26.RSV.F免疫接种,继而使用Ad26.RSV.F加打或使用辅助型

RSV F蛋白质(post-F)加打后,IgG2a及IgG1抗体的诱导及其比率。

[0069] 图31展示在使用Ad26.RSV.F免疫接种,继而使用Ad26.RSV.F或使用辅助型RSV F蛋白质(post-F)加打后,脾细胞产生IFN-g的情况。

[0070] 本发明的详细描述

[0071] 如本文中所用,关于腺病毒的术语‘重组’暗指其已经人工修饰,例如其已改变其中主动克隆的末端和/或其包含异源基因,亦即其并非天然存在的野生型腺病毒。

[0072] 如本领域中所惯用,本文中的序列自5’至3’方向提供。

[0073] “腺病毒衣壳蛋白”是指在测定特定腺病毒的血清型和/或向性时所涉及的腺病毒衣壳上的蛋白质。腺病毒衣壳蛋白通常包括纤维蛋白、五邻体蛋白和/或六邻体蛋白。本发明的具有(或‘基于’)特定血清型的腺病毒通常包含该特定血清型的纤维蛋白、五邻体蛋白和/或六邻体蛋白,且优选地包含该特定血清型的纤维蛋白、五邻体蛋白及六邻体蛋白。此等蛋白质通常由重组腺病毒的基因组编码。具有特定血清型的重组腺病毒可任选地包含和/或编码来自其他腺病毒血清型的其他蛋白质。因此,作为非限制性实例,包含Ad26的六邻体、五邻体及纤维的重组腺病毒视为基于Ad26的重组腺病毒。

[0074] 重组腺病毒是‘基于’如本文中所述的腺病毒,至少在序列上源于野生型。此可通过使用野生型基因组或其部分作为起始物质进行分子克隆来实现。亦可使用野生型腺病毒基因组的已知序列以通过DNA合成重新产生基因组(的部分),DNA合成可由DNA合成和/或分子克隆领域中的商业性服务公司(例如GeneArt、Invitrogen、GenScripts、Eurofins)使用常规程序来进行。

[0075] 普通技术人员应了解,许多不同聚核苷酸及核酸可由于遗传密码的简并性而编码相同多肽。亦应了解,普通技术人员可使用常规技术进行不会影响由此处所述的聚核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,从而反映欲表达多肽的任何具体宿主生物体的密码子使用。因此,除非另有规定,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此呈简并型式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质及RNA的核苷酸序列可包括内含子。

[0076] 在一个优选的实施例中,编码RSV F蛋白质或其片段的核酸是针对在哺乳动物细胞(诸如人类细胞)中的表达进行密码子优化。密码子优化方法为已知的且先前已有描述(例如WO 96/09378)。RSV F蛋白质的特定密码子优化序列的一个实例描述于EP 2102345B1的SEQ ID NO:2中。

[0077] 在一个实施例中,RSV F蛋白质来自RSV A2病毒株且具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一个尤其优选的实施例中,编码RSV F蛋白质的核酸包含SEQ ID NO:2的核酸序列。发明人已发现,此实施例产生稳定表达且此实施例的疫苗甚至在肌肉内投与单次剂量之后仍在鼻道及肺中提供抗RSV复制的保护。

[0078] 如本文中所述的术语“片段”是指具有氨基端和/或羧基端和/或内部缺失,但剩余氨基酸序列与RSV F蛋白质序列(例如RSV F蛋白质的全长序列)中的相应位置相同的肽。应了解,出于诱导免疫反应及一般出于接种疫苗的目的,蛋白质无须为全长的,亦无须具有所有其野生型功能,且该蛋白质的片段同等适用。实际上,如可溶性F1或F的RSV F蛋白质片段已显示如同全长F一般可有效诱导免疫反应(Shao等人,2009,Vaccine 27:5460-71; Kohlmann等人,2009,J Virol 83:12601-12610)。将对应于氨基酸255-278或412-524的F蛋白质片段并入主动免疫接种中会诱导中和抗体及抗RSV攻击的某种保护(Sing等人,2007,

Viol. Immunol. 20, 261-275; Sing等人, 2007, Vaccine 25, 6211-6223)。

[0079] 本发明的片段为免疫活性片段, 且通常包含RSV F蛋白质的至少15个氨基酸或至少30个氨基酸。在某些实施例中, 其包含RSV F蛋白质的至少50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500或550个氨基酸。

[0080] 普通技术人员亦应了解, 可例如使用常规分子生物学程序, 例如通过氨基酸取代、缺失、添加等对蛋白质作出改变。一般而言, 可在不损失多肽的功能或免疫原性的情况下应用保守氨基酸取代。此可根据普通技术人员熟知的常规程序而容易地检查。

[0081] 术语“疫苗”是指含有有效诱导受试者的抗特定病原体或疾病的治疗程度的免疫性的活性组分的试剂或组合物。在本发明中, 疫苗包含有效量的编码RSV F蛋白质的重组腺病毒或其抗原片段, 其引起抗RSV F蛋白质的免疫反应。这提供一种为受试者预防因RSV感染及复制而导致住院治疗的严重下呼吸道疾病且减少因RSV感染及复制而引起的并发症(诸如肺炎及细支气管炎)的频率的方法。因此, 本发明亦提供一种为受试者预防或减少由RSV引起的严重下呼吸道疾病、预防或减少(例如缩短)由RSV引起的住院治疗、和/或降低由RSV引起的肺炎或细支气管炎的频率和/或严重程度的方法, 其包含通过肌肉内注射向该受试者投与包含血清型26重组人类腺病毒的组合物, 该重组人类腺病毒包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸。本发明的术语“疫苗”意指其为医药组合物, 且因此通常包括医药学上可接受的稀释剂、运载剂或赋形剂。其可能包含或可能不包含其他活性成分。在某些实施例中, 其可为另外包含诱导免疫反应(例如抗RSV的其他蛋白质和/或抗其他感染物)的其他组分的组合疫苗。

[0082] 本发明的载体为重组腺病毒, 亦称为重组腺病毒载体。重组腺病毒载体的制备在本领域中为熟知的。

[0083] 在某些实施例中, 本发明的腺病毒载体缺乏病毒复制所需的腺病毒基因组E1区(例如E1a区和/或E1b区)的至少一个必需基因功能。在某些实施例中, 本发明的腺病毒载体缺乏非必需E3区的至少一部分。在某些实施例中, 载体缺乏E1区的至少一个必需基因功能及非必需E3区的至少一部分。腺病毒载体可为“多重缺乏”的, 意谓腺病毒载体的腺病毒基因组的两个或两个以上区中各自缺乏一或多个必需基因功能。举例而言, 前述E1缺乏或E1、E3缺乏腺病毒载体可另外缺乏E4区的至少一个必需基因和/或E2区(例如E2A区和/或E2B区)的至少一个必需基因。

[0084] 腺病毒载体、其构建方法及其增殖方法在本领域中为熟知的且描述于以下文献中: 例如美国专利第5,559,099号、第5,837,511号、第5,846,782号、第5,851,806号、第5,994,106号、第5,994,128号、第5,965,541号、第5,981,225号、第6,040,174号、第6,020,191号及第6,113,913号, 及Thomas Shenk, “Adenoviridae and their Replication”, M.S.Horwitz, “Adenoviruses”, 分别在第67章及第68章, Virology, B.N.Fields等人编, 第3版, Raven Press, Ltd., New York(1996), 及本文中所提及的其他参考文献。腺病毒载体的构建通常涉及使用标准分子生物学技术, 诸如以下文献中所述的技术: 例如Sambrook等人, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989), Watson等人, Recombinant DNA, 第2版, Scientific American Books(1992), 及Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY(1995), 及本文中所提及的其他参考文献。

[0085] 根据本发明,腺病毒为血清型26人类腺病毒。本发明的基于此血清型的疫苗以及基于Ad35的疫苗令人惊讶地似乎比先前技术中所述的基于Ad5的疫苗更有效,这是因为先前技术中所述的那些疫苗在单次肌肉内投与后无法提供抗RSV攻击复制的完全保护(Kim等人,2010,Vaccine 28:3801-3808;Kohlmann等人,2009,J Virol 83:12601-12610;Krause等人,2011,Virology Journal 8:375)。本发明的血清型另外一般在人类群体中具有低血清流行率和/或低原有中和抗体效价。在临床试验中评估具有不同转基因的此血清型的重组腺病毒载体及Ad35重组腺病毒载体,且迄今显示具有极佳安全型态。rAd26载体的制备描述于例如WO 2007/104792及Abbink等人,(2007)Virol 81(9):4654-63中。Ad26的例示性基因组序列见于GenBank保藏号EF 153474及WO 2007/104792的SEQ ID NO:1中。rAd35载体的制备描述于例如美国专利第7,270,811号、WO 00/70071及Vogels等人,(2003)J Virol 77(15):8263-71中。Ad35的例示性基因组序列见于GenBank保藏号AC_000019及WO 00/70071的图6中。

[0086] 本发明的重组腺病毒可为复制胜任型或复制缺陷型。

[0087] 在某些实施例中,腺病毒例如由于其在基因组的E1区中含有缺失而为复制缺陷型。如普通技术人员所知,在腺病毒基因组缺失必需区的情况下,由此等区编码的功能必须反式(in trans)提供,优选地由生产细胞提供,亦即当腺病毒缺失部分或整个E1、E2和/或E4区时,此等区必须存在于生产细胞中,例如整合于其基因组中或呈所谓的辅助腺病毒或辅助质粒形式。腺病毒亦可在并非复制所必需的E3区中具有缺失,且因此无须补充此种缺失。

[0088] 可使用的生产细胞(有时在本领域中及本文中亦称为‘包装细胞’或‘补充细胞’或‘宿主细胞’)可为可使所需腺病毒增殖的任何生产细胞。举例而言,重组腺病毒载体的增殖是在补充腺病毒中的缺陷的生产细胞中进行。这些生产细胞优选地在其基因组中具有至少腺病毒E1序列,且由此能够补充E1区缺失的重组腺病毒。可使用任何补充E1的生产细胞,诸如由E1永生化的人类视网膜细胞,例如911或PER.C6细胞(参见美国专利5,994,128),E1转化的羊水细胞(参见EP专利1230354)、E1转化的A549细胞(参见例如WO 98/39411、美国专利5,891,690)、GH329:HeLa(Gao等人,2000,Human Gene Therapy 11:213-219)、293及其类似细胞。在某些实施例中,生产细胞为例如HEK293细胞、或PER.C6细胞、或911细胞、或IT293SF细胞及其类似细胞。

[0089] 对于非亚群C E1缺乏型腺病毒,诸如Ad35(亚群B)或Ad26(亚群D),优选地将此等非亚群C腺病毒的E4-orf6编码序列与亚群C腺病毒(诸如Ad5)的E4-orf6交换。这使得这些腺病毒可在表达Ad5的E1基因的熟知补充细胞株(诸如293细胞或PER.C6细胞)中增殖(参见例如Havenga等人,2006,J.Gen.Virol.87:2135-2143;WO 03/104467,以全文引用的方式并入本文中)。在某些实施例中,可使用的腺病毒为血清型35人类腺病毒,其在已克隆编码RSV F蛋白质抗原的核酸的E1区中具有缺失,且具有Ad5的E4orf6区。在某些实施例中,本发明的疫苗组合物中的腺病毒为血清型26人类腺病毒,其在已克隆编码RSV F蛋白质抗原的核酸的E1区中具有缺失,且具有Ad5的E4orf6区。

[0090] 在替代性实施例中,无须将(例如Ad5的)异源E4orf6区置于腺病毒载体中,取而代之的是在表达E1与兼容E4orf6的细胞株,例如表达Ad5的E1与E4orf6的293-ORF6细胞株中使E1缺乏型非亚群C载体增殖(参见例如Brough等人,1996,J Virol 70:6497-501,其描述

293-ORF6细胞的产生;Abrahamsen等人,1997,J Virol 71:8946-51及Nan等人,2003,Gene Therapy10:326-36,各自描述使用此种细胞株产生缺失E1的非亚群C腺病毒载体)。

[0091] 可替代地,可使用表达来自欲增殖的血清型的E1的补充细胞(参见例如WO 00/70071、WO 02/40665)。

[0092] 对于在E1区中具有缺失的亚群B腺病毒(诸如Ad35),优选地保留腺病毒中E1B 55K开放阅读框的3'末端,例如在pIX开放阅读框上游紧邻的166bp或包含其的片段,诸如在pIX起始密码子上游紧邻的243bp片段(在Ad35基因组中在5'末端由Bsu36I限制性位点标记),这是因为此片段由于pIX基因的启动子部分地存在于此区域中而增加腺病毒的稳定性(参见例如Havenga等人,2006,J.Gen.Virol.87:2135-2143;WO 2004/001032,以引入的方式并入本文中)。

[0093] 本发明的腺病毒中的“异源核酸”(在本文中亦称为‘转基因’)为非天然存在于腺病毒中的核酸。其是例如通过标准分子生物学技术引入腺病毒中。在本发明中,异源核酸编码RSV F蛋白质或其片段。可将其例如克隆于腺病毒载体缺失的E1或E3区中。转基因一般可操作地连接于表达控制序列。此可例如通过将编码这个或这些转基因的核酸置于启动子的控制下来完成。可添加其他调控序列。许多启动子可用于一个或多个转基因的表达且为普通技术人员所知。适用于在真核细胞中获得表达的启动子的非限制性实例为CMV启动子(US 5,385,839),例如CMV即刻早期启动子,例如包含来自CMV即刻早期基因增强子/启动子的核苷酸-735至+95。聚腺苷酸化信号,例如牛生长激素聚A信号(US 5,122,458),可存在于这个或这些转基因之后。

[0094] 在某些实施例中,本发明的重组Ad26载体包含以下核苷酸序列作为5'端核苷酸:CTATCTAT。此等实施例为有利的,因为这些载体与具有原始5'端序列(一般为CATCATCA)的载体相比在产生过程中显示改良的复制,从而产生具有改良的均质性的腺病毒批次(亦参见专利申请案第PCT/EP 2013/054846号及US 13/794,318,题为‘Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends’,以Crucell Holland B.V.的名义于2012年3月12日申请),其以全文引用的方式并入本文中。因此,本发明亦提供编码RSV F蛋白质或其一部分的重组腺病毒批次,其中该腺病毒为血清型26人类腺病毒,且其中该批次中基本上所有(例如至少90%)腺病毒包含具有末端核苷酸序列CTATCTAT的基因组。

[0095] 根据本发明,RSV的F蛋白质可源于天然存在的RSV或重组RSV的任何病毒株,优选地源于人类RSV病毒株,诸如A2、Long或B病毒株。在其他实施例中,序列可为基于复数个RSV F蛋白质氨基酸序列的共同序列。在本发明的一个实例中,RSV病毒株为RSV-A2病毒株。

[0096] 根据本发明,RSV的F蛋白质可为RSV的全长F蛋白质或其片段。在本发明的一个实施例中,编码RSV的F蛋白质的核苷酸序列编码RSV的全长F蛋白质(F0),诸如SEQ ID NO:1的氨基酸。在本发明的一个实例中,编码RSV的F蛋白质的核苷酸序列具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列。可替代地,编码RSV的F蛋白质的序列可为与SEQ ID NO:2的核苷酸序列至少约80%、优选地超过约90%、更优选地至少约95%一致的任何序列。在其他实施例中,可使用诸如WO 2012/021730的SEQ ID NO:2、4、5或6中所提供的密码子优化序列。

[0097] 在本发明的另一实施例中,核苷酸序列可替代地可编码RSV的F蛋白质的片段。片段可由氨基端及羧基端中的一或两者缺失而产生。缺失程度可由普通技术人员确定以例如获得重组腺病毒的较佳产率。所选择的片段将包含F蛋白质的免疫活性片段,亦即将引起受

试者的免疫反应的部分。此可易于使用计算机仿真(in silico)、活体外和/或活体内方法来确定,所有方法均为普通技术人员所常用。在本发明的一个实施例中,片段为RSV的跨膜编码区截短的F蛋白质(F0 Δ TM,参见例如US 20110014220)。F蛋白质的片段亦可为F蛋白质的F1域或F2域。F的片段亦可为含有中和抗原决定基及T细胞抗原决定基的片段(Sing等人,2007,Viol.Immunol.20,261-275;Sing等人,2007,Vaccine 25,6211-6223)。

[0098] 如本发明中所用,关于数值的术语‘约’意谓值 $\pm 10\%$ 。

[0099] 在某些实施例中,本发明提供制造抗呼吸道合胞病毒(RSV)疫苗的方法,其包含提供包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸的血清型26重组人类腺病毒,使所述重组腺病毒在宿主细胞培养物中增殖,分离并纯化该重组腺病毒,并将该重组腺病毒引入医药学上可接受的组合物中。

[0100] 可根据熟知方法制备重组腺病毒且在宿主细胞中增殖,这些方法需要经腺病毒感染的宿主细胞的细胞培养。细胞培养可为任何类型的细胞培养,包括黏附细胞培养,例如细胞附着于培养容器或微载体表面;以及悬浮培养。

[0101] 大多数大规模悬浮培养以分批制程或补料分批制程操作,因为这些制程最易于操作及扩大规模。如今,基于灌注原理的连续制程变得更常见且亦适合(参见例如W0 2010/060719及W0 2011/098592,两者以引入的方式并入本文中,其描述适用于获得并纯化大量重组腺病毒的方法)。

[0102] 培养生产细胞以增加细胞及病毒数目和/或病毒效价。完成细胞培养以使其能够代谢和/或生长和/或分裂和/或产生本发明的相关病毒。此可通过如普通技术人员所熟知的方法来实现,且包括(但不限于)例如在适当培养基中为细胞提供营养物。适合培养基为普通技术人员所熟知,且一般可自商业来源大量获得或根据标准方案定制。可使用分批系统、补料分批系统、连续系统及其类似系统在培养皿、滚瓶或生物反应器中进行培养。适用于培养细胞的条件为已知的(参见例如Tissue Culture,Academic Press,Kruse及Paterson编(1973),及R.I.Freshney,Culture of animal cells:A manual of basic technique,第四版(Wiley-Liss Inc.,2000,ISBN 0-471-34889-9))。

[0103] 腺病毒通常应暴露于培养物中允许吸收病毒的适当生产细胞。通常,最佳搅拌介于约50rpm与300rpm之间,通常为约100-200rpm,例如约150rpm;典型DO为20%-60%,例如40%;最佳pH值介于6.7与7.7之间;最佳温度介于30℃与39℃之间,例如34℃-37℃;且最佳MOI介于5与1000之间,例如约50-300。腺病毒通常自发感染生产细胞,且生产细胞与rAd粒子的接触足以感染这些细胞。一般而言,将腺病毒种子储备物(seed stock)添加至培养物中以起始感染,随后腺病毒在生产细胞中增殖。此均为普通技术人员所常用。

[0104] 在感染腺病毒后,病毒在细胞内部复制且由此扩增,该过程在本文中称为腺病毒增殖。腺病毒感染最终导致经感染的细胞溶解。腺病毒的溶胞特征因此可允许两种不同模式的病毒产生。第一模式为在细胞溶解之前收集病毒,采用外部因子溶解细胞。第二模式为在所产生的病毒(几乎)完全溶解细胞之后收集病毒上清液(参见例如美国专利6,485,958,其描述在未由外部因子溶解宿主细胞的情况下收集腺病毒)。优选地采用外部因子主动溶解细胞以便收集腺病毒。

[0105] 可用于主动溶解细胞的方法为普通技术人员所知,且已例如在W0 98/22588第28-35页中论述。就此而言适用的方法为例如冷冻-解冻、固体剪切、高渗和/或低渗溶解、液体

剪切、音波处理、高压挤压、清洁剂溶解、上述方法的组合及其类似方法。在本发明的一个实施例中，使用至少一种清洁剂溶解细胞。使用清洁剂溶解的优势在于其为一种简易方法且容易调整规模。

[0106] 可使用的清洁剂及其使用方式一般为普通技术人员所知。若干实例例如在WO 98/22588第29-33页中论述。清洁剂可包括阴离子型清洁剂、阳离子型清洁剂、两性离子型清洁剂及非离子型清洁剂。清洁剂的浓度可例如在约0.1%至5%(w/w)范围内变化。在一个实施例中，所用清洁剂为Triton X-100。

[0107] 可采用核酸酶移除污染性(亦即主要来自生产细胞)核酸。适用于本发明的例示性核酸酶包括Benzonase[®]、Pulmozyme[®]或本领域中常用的任何其他DNase和/或RNase。

在优选的实施例中，核酸酶为Benzonase[®]，其通过水解特定核苷酸之间的内部磷酸二酯键而迅速水解核酸，从而降低细胞溶解产物的黏度。Benzonase[®]可在商业上获自Merck KGaA(代码W214950)。所采用核酸酶的浓度优选地在1至100个单位/毫升的范围内。可替代地，或除核酸酶处理之外，亦可在腺病毒纯化期间使用选择性沉淀剂(诸如溴化度米芬(domiphen bromide))选择性地沉淀宿主细胞DNA而与腺病毒制剂分离(参见例如US 7,326,555;Goerke等人,2005,Biotechnology and bioengineering,第91卷:12-21;WO 2011/045378;WO 2011/045381)。

[0108] 自生产细胞培养物收集腺病毒的方法已详尽地描述于WO 2005/080556中。

[0109] 在某些实施例中，进一步纯化所收集的腺病毒。可分若干步骤进行腺病毒纯化，包含净化、超滤、透滤或层析分离，如在例如以引入的方式并入本文中的WO 05/080556中所述。可通过过滤步骤进行净化，自细胞溶解产物移除细胞碎片及其他杂质。使用超滤来浓缩病毒溶液。使用超滤器进行透滤或缓冲液交换为移除及交换盐、糖及其类似物的方式。普通技术人员已知如何发现各纯化步骤的最佳条件。以全文引用的方式并入本文中的WO 98/22588亦描述产生及纯化腺病毒载体的方法。这些方法包含使宿主细胞生长，用腺病毒感染这些宿主细胞，收集并溶解这些宿主细胞，浓缩粗溶解产物，交换该粗溶解产物的缓冲液，用核酸酶处理该溶解产物，及使用层析进一步纯化病毒。

[0110] 纯化优选地采用至少一个层析步骤，如在例如WO 98/22588第61-70页中所论述。已描述用于进一步纯化腺病毒的许多制程，其中层析步骤包括于制程中。普通技术人员应了解此等制程，且可改变采用层析步骤的确切方式以使制程优化。举例而言，可由阴离子交换层析步骤纯化腺病毒，参见例如WO 2005/080556及Konz等人,2005,Hum Gene Ther 16:1346-1353。已描述许多其他腺病毒纯化方法且在普通技术人员的可达范围内。产生及纯化腺病毒的其他方法揭示于例如(WO 00/32754;WO 04/020971;US 5,837,520;US 6,261,823;WO 2006/108707;Konz等人,2008,Methods Mol Biol 434:13-23;Altaras等人,2005,Adv Biochem Eng Biotechnol 99:193-260)中，所有文献均以引入的方式并入本文中。

[0111] 为投与人类，本发明可采用包含rAd及医药学上可接受的运载剂或赋形剂的医药组合物。在本发明情形中，术语“医药学上可接受”意谓运载剂或赋形剂在所用剂量及浓度下不会对所投与的受试者产生任何不当或有害影响。这些医药学上可接受的运载剂及赋形剂在本领域中为熟知的(参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版，A.R.Gennaro编，Mack Publishing Company[1990];Pharmaceutical Formulation

Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer 及 L. Hovgaard 编, Taylor & Francis [2000]; 及 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, A. Kibbe 编, Pharmaceutical Press [2000])。经纯化的 rAd 优选地以无菌溶液形式调配及投药, 但亦可利用冻干制剂。无菌溶液是通过无菌过滤或通过本领域中本身已知的其他方法来制备。接着, 将溶液冻干或填充于药物剂量容器中。溶液的 pH 值一般在 pH 3.0 至 9.5 的范围内, 例如 pH 5.0 至 7.5。rAd 通常呈具有适合医药学上可接受的缓冲液的溶液形式, 且 rAd 的溶液亦可含有盐。任选地可存在稳定剂, 诸如白蛋白。在某些实施例中, 添加清洁剂。在某些实施例中, 可将 rAd 调配成可注射制剂。此等调配物含有有效量的 rAd, 呈无菌液体溶液、液体悬浮液或冻干型式, 且任选地含有稳定剂或赋形剂。亦可雾化腺病毒疫苗以供鼻内投药(参见例如 WO 2009/117134)。

[0112] 举例而言, 腺病毒可储存于亦用于腺病毒世界标准(Adenovirus World Standard; Hoganson 等人, Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing 2002年3月, 第43-48页)的缓冲液中: 20mM Tris pH 8、25mM NaCl、2.5% 甘油。另一适合投与人类的适用调配缓冲液为 20mM Tris、2mM MgCl₂、25mM NaCl、10% w/v 蔗糖、0.02% w/v 聚山梨醇酯-80。显然, 可使用许多其他缓冲液, 且适用于经纯化的(腺)病毒制剂的储存及医药投与的调配物的若干实例可例如见于欧洲专利第 0853660 号、美国专利 6,225,289 及国际专利申请案 WO 99/41416、WO 99/12568、WO 00/29024、WO 01/66137、WO 03/049763、WO 03/078592、WO 03/061708 中。

[0113] 在某些实施例中, 包含腺病毒的组合物另外包含一或多种佐剂。本领域中已知的佐剂进一步增强对所施用的抗原决定子的免疫反应, 且包含腺病毒及适合佐剂的医药组合物在例如以引入的方式并入本文中的 WO 2007/110409 中揭示。术语“佐剂”及“免疫刺激剂”在本文中可互换使用, 且定义为刺激免疫系统的一或多种物质。在此情形中, 佐剂用于增强对本发明的腺病毒载体的免疫反应。适合佐剂的实例包括铝盐, 诸如氢氧化铝和/或磷酸铝; 油-乳液组合物(或水包油组合物), 包括角鲨烯-水乳液, 诸如 MF59(参见例如 WO 90/14837); 皂素调配物, 诸如 QS21 及免疫刺激复合物(ISCMS)(参见例如 US 5,057,540; WO 90/03184、WO 96/11711、WO 2004/004762、WO 2005/002620); 细菌或微生物衍生物, 其实例为单磷酸脂 A(MPL)、3-O-去酰化 MPL(3dMPL)、含 CpG 基元的寡核苷酸、ADP 核糖基化细菌毒素或其突变体, 诸如大肠杆菌热不稳定肠毒素 LT、霍乱毒素 CT 及其类似物。亦可使用载体编码的佐剂, 例如通过使用编码 C4 结合蛋白(C4bp)的寡聚域与相关抗原的融合体的异源核酸(例如 Solabomi 等人, 2008, Infect Immun 76:3817-23)。在某些实施例中, 本发明的组合物包含铝作为佐剂, 例如呈氢氧化铝、磷酸铝、磷酸铝钾或其组合的形式, 浓度为每一剂量 0.05-5mg(例如 0.075-1.0mg)的铝含量。

[0114] 在其他实施例中, 组合物不包含佐剂。

[0115] 根据本发明, 亦可与本发明的疫苗组合投与其他活性组分。这些其他活性组分可包含例如其他 RSV 抗原或包含编码此等抗原的核酸的载体。这些载体可为非腺病毒载体或腺病毒载体, 其中腺病毒载体可为任何血清型。其他 RSV 抗原的一个实例包括 RSV G 蛋白质或其免疫活性部分。举例而言, 鼻内施用的表达 G 糖蛋白可溶性核心域(氨基酸 130 至 230)的基于 Ad5 的重组复制缺陷型腺病毒载体 rAd/3xG 在鼠类模型中具有保护性(Yu 等人, 2008, J Virol 82:2350-2357), 但当肌肉内施用其不具保护性, 由此等数据显而易见, RSV G 为用

于诱导保护性反应的适合抗原。其他活性组分亦可包含非RSV抗原,例如来自其他病原体,诸如病毒、细菌、寄生虫及其类似物。其他活性组分的投与可例如通过独立投与或通过投与本发明的疫苗与其他活性组分的组合产品来进行。在某些实施例中,其他非腺病毒抗原(除RSV.F之外)可在本发明的载体中编码。在某些实施例中,因此可能需要表达来自单一腺病毒的一种以上蛋白质,且在这些情况下,更多编码序列例如可连接形成来自单一表达盒的单一转录物或可存在于在腺病毒基因组的不同部分克隆的两个独立表达盒中。

[0116] 腺病毒组合物可投与受试者,例如人类受试者。在一次投与期间向受试者提供的腺病毒的总剂量可如普通技术人员所知而变化,且一般介于 1×10^7 个病毒粒子(vp)与 1×10^{12} vp之间,优选地介于 1×10^8 vp与 1×10^{11} vp之间,例如介于 3×10^8 vp与 5×10^{10} vp之间,例如介于 10^9 vp与 3×10^{10} vp之间。

[0117] 可使用标准投药途径投与腺病毒组合物。非限制性实施例包括非经肠投药,诸如通过例如皮内、肌肉内等注射,或皮下、经皮或经黏膜投药,例如鼻内、经口及其类似途径。鼻内投药一般已视为抗RSV疫苗的优选途径。活的鼻内策略的最重要优势在于直接刺激局部呼吸道免疫性且不存在相关疾病增强。目前在临床评估下供小儿使用的唯一疫苗为活鼻内疫苗(Collins及Murphy. Vaccines against human respiratory syncytial virus, Perspectives in Medical Virology 14:Respiratory Syncytial Virus(Cane,P.编), Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 第233-277页)。鼻内投药亦为本发明的适合优选途径。然而,根据本发明尤其优选地是肌肉内投与疫苗,因为令人惊讶地发现肌肉内投与本发明的疫苗在棉鼠鼻及肺中产生抗RSV复制的保护,与先前报导的基于其他腺病毒血清型的肌肉内RSV疫苗不同。肌肉内投药的优势在于其简单且完善,且不具有6个月以下的婴儿鼻内施用的安全性问题。在一个实施例中,通过肌肉内注射将组合物投与例如手臂三角肌或大腿股外侧肌中。普通技术人员已知投与组合物(例如疫苗)以诱导对疫苗中的这个或这些抗原的免疫反应的多种可能性。

[0118] 如本文中所用的受试者优选地为哺乳动物,例如啮齿动物,例如小鼠、棉鼠,或非人类灵长类动物,或人类。受试者优选地为人类受试者。受试者可为任何年龄,例如约1个月大至100岁,例如约2个月大至约80岁,例如约1个月大至约3岁、约3岁至约50岁、约50岁至约75岁等。

[0119] 亦可提供本发明的一或多种腺病毒疫苗的一或多次加打投药。若进行加打接种疫苗,则此种加打接种疫苗通常将在组合物第一次投与受试者(在这些情况下称为‘初打接种疫苗’)之后,在一周与一年之间、优选地两周与四个月之间的时刻投与同一受试者。在替代性加打方案中,亦可在初打接种疫苗之后向受试者投与不同载体,例如不同血清型的一或多种腺病毒,或其他载体,诸如MVA或DNA或蛋白质。举例而言,可向受试者投与本发明的重组腺病毒载体作为初打,且加打包含RSV F蛋白质的组合物。

[0120] 在某些实施例中,投药包含初打及至少一次加打投药。在其某些实施例中,初打投药使用包含编码RSV F蛋白质或其片段的核酸的rAd35(‘rAd35-RSV.F’),且加打投药使用本发明的包含编码RSV F蛋白质的核酸的rAd26(‘rAd26-RSV.F’)。在其其他实施例中,初打投药使用rAd26-RSV.F且加打投药使用rAd35-RSV.F。在其他实施例中,初打与加打投药均使用rAd26.RSV.F。在某些实施例中,初打投药使用rAd26-RSV.F且加打投药使用RSV F蛋白质。在所有此等实施例中,可提供使用相同或其他载体或蛋白质的其他加打投药。加打RSV

F蛋白质可尤其有利的实施例包括例如50岁或50岁以上的危险群体(例如患有COPD或哮喘)的年长受试者,或例如60岁或60岁以上或65岁或65岁以上的健康受试者。

[0121] 在某些实施例中,投药包含单次投与本发明的重组腺病毒,而无其他(加打)投药。这些实施例鉴于单次投药方案与初打-加打方案相比复杂性及成本降低而为有利的。在本文的实例中,在单次投与本发明的重组腺病毒载体而无加打投药后,在棉鼠模型中已观测到完全保护。

[0122] 在以下实例中进一步说明本发明。这些实例不以任何方式限制本发明。其仅用以阐明本发明。

[0123] 实例

[0124] 实例1.制备腺病毒载体

[0125] 将RSV F基因克隆于Ad35及Ad26的E1区中:

[0126] 通过Genart使编码A2病毒株的原生RSV融合(F)蛋白质的RSV.F(A2)nat基因(Genbank AC083301.1)针对人类表达进行基因优化且加以合成。紧邻ATG起始密码子之前包括Kozak序列(5'GCCACC 3'),且在RSV.F(A2)nat编码序列末端添加两个终止密码子(5'TGA TAA 3')。将RSV.F(A2)nat基因经由HindIII及XbaI位点插入pAdApt35BSU质粒及pAdApt26质粒中。所得质粒pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat及pAdApt26.RSV.F(A2)nat描绘于图15中。F蛋白质的氨基酸序列及编码该氨基酸序列的密码子优化序列分别作为SEQ.ID.NO:1及2提供于表1中。

[0127] 细胞培养:

[0128] 将PER.C6细胞(Fallaux等人,1998,Hum Gene Ther 9:1909-1917)维持于含10%胎牛血清(FBS)且补充有10mM MgCl₂的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)中。

[0129] 腺病毒产生、感染及继代:

[0130] 在PER.C6细胞中通过单一同源重组产生所有腺病毒,且如先前所述而产生(关于rAd35:Havenga等人,2006,J.Gen.Virol.87:2135-2143;关于rAd26:Abbink等人,2007,J.Virol.81:4654-4663)。简言之,根据制造商(Life Technologies)所提供的用法说明,使用脂质体(Lipofectamine),以Ad载体质粒转染PER.C6细胞。为补救带有RSV.F(A2)nat转基因表达盒的Ad35载体,使用pAdApt35BSU.RSV.F(A2)nat质粒及pWE/Ad35.pIX-rITR.dE3.5orf6黏质粒,而对于带有RSV.F(A2)nat转基因表达盒的Ad26载体,使用pAdApt26.RSV.F(A2)nat质粒及pWE.Ad26.dE3.5orf6黏质粒。在完整CPE后一天收集细胞,冷冻-解冻,以3,000rpm离心5分钟且在-20℃下储存。接着,对病毒进行空斑纯化且在多孔24组织培养板的单孔上培养的PER.C6中扩增。在使用T25组织培养瓶及T175组织培养瓶培养的PER.C6中进行进一步扩增。使用T175粗溶解产物中的3至5ml接种含有PER.C6细胞的70%汇合层的20×T175三层组织培养瓶。使用两步CsCl纯化方法纯化病毒。最后,将病毒以等分试样储存于-85℃下。

[0131] 实例2.使用血清型26及35重组腺病毒活体内诱导抗RSV F免疫性

[0132] 此为查明血清型重组腺病毒(Ad26)及血清型35重组腺病毒(Ad35)诱导BALB/c小鼠的抗RSV的糖蛋白F抗原的免疫性的实验。

[0133] 在此研究中,将动物分配于具有5只小鼠的实验组中。用单次剂量的带有全长RSV

F基因的Ad26或Ad35(Ad26-RSV.F或Ad35-RSV.F)或无转基因的Ad26或Ad35(Ad26e或Ad35e)对动物免疫接种。肌肉内给予在 10^{10} 至 10^8 个病毒粒子(vp)范围内的rAd的三个10倍连续稀释液。作为对照,一组3只动物接受空载体Ad26e且一组接受空载体Ad35e。

[0134] ELISPOT分析用于测定脾脏中F蛋白质特异性IFN γ 分泌T细胞的相对数目,且基本上如Radošević等人(Clin Vaccine Immunol.2010;17(11):1687-94)所述来进行。为在ELISPOT分析中刺激脾细胞,使用由跨越RSVF(A2)蛋白质整个序列的11氨基酸重迭15聚肽组成的两个肽库。计算每 10^6 个细胞的斑点形成单位(SFU)的数目。

[0135] 为测定抗体效价,使用ELISA分析。为此,用25 μ g/ml RSV Long完整不活化抗原(Virion Serion,目录号BA113VS)涂布ELISA板(Thermo Scientific)。将稀释的血清样品添加至板中,且使用经生物素标记的抗小鼠IgG(DAKO,目录号E0413),由辣根过氧化物酶(PO)结合的抗生物素蛋白链菌素(SA)检测来测定抗RSV的IgG抗体。使用来自50倍稀释的未处理血清的 $1.5 \times OD$ 信号作为截止,通过线性内插法计算效价。使用用于定量类的经PO标记的抗小鼠IgG1及经PO标记的抗小鼠IgG2a(Southern Biotechnology Associates,目录号1070-05及1080-05)测定小鼠血清中RSV特异性IgG1及IgG2a抗体的效价。

[0136] 通过微量中和分析来测定抗体的病毒中和活性(VNA),基本上如Johnson等人(J Infect Dis.1999年7月;180(1):35-40)所述来进行。在感染前一天,将RSV易感VERO细胞接种于96孔细胞培养板中。在感染当天,使连续稀释的血清及对照与1200pfu的RSV(Long或B1)混合且在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。随后,将病毒/抗体混合物转移至含有VERO细胞单层的96孔板中。三天后,用80%冰冷丙酮固定单层且使用抗F单克隆抗体测定RSV抗原。中和效价表示为使得仅病毒对照孔的OD450减少50%(IC₅₀)的血清稀释度(log₂)。

[0137] 在初打后第2周及第8周,处死动物且如上所述监测细胞反应及体液反应。

[0138] 图1展示所有剂量的Ad26-RSV.F(图1A)及Ad35-RSV.F(图1B)均有效诱导良好细胞免疫反应且反应随着时间推移而稳定。使用Ad26-RSV.F或Ad35-RSV.F未观测到载体剂量对于T细胞反应的显著差异。

[0139] 图2展示如上所述的相同实验中的抗体效价。两种载体均诱导ELISA效价的极其明显的时间依赖性及剂量依赖性增加(图2)。抗F效价自第2周至第8周明显增加,对于 10^{10} 剂量为显著的。第8周,Ad26-RSV.F或Ad35-RSV.F载体之间不存在效价差异。

[0140] 测定F特异性IgG的子类分布(IgG1相对IgG2a)以评估Th1相对Th2反应的平衡。如使用福尔马林不活化RSV所见,偏斜的Th2/Th1反应使动物易显现疫苗增强的RSV疾病。如图3所示,Ad26-RSV.F与Ad35-RSV.F的IgG2a/IgG1比率均高于1。此强烈指示腺病毒载体Ad26-RSV.F及Ad35-RSV.F展现Th1类型反应而非Th2类型反应。

[0141] 图4展示用于抗体效价的相同血清的病毒中和效价(VNA)。使用Ad26-RSV.F及rAd35-RSV.F免疫接种会诱导中和抗体效价。给予 10^{10} vp的小鼠在初打后两周与八周之间VNA效价大大增加。第八周,给予 10^{10} vp的小鼠的Ad26-RSV.F载体与Ad35-RSV.F载体之间的效价不存在差异。

[0142] 由此等免疫接种实验显而易见,具有RSV.F转基因的Ad35载体及Ad26载体诱导强烈的抗RSV.F细胞反应及体液反应。

[0143] 实例3.使用编码RSV.F的重组腺病毒载体,在异源初打-加打后抗RSV.F的免疫性

[0144] 设计此研究以查明基于源于两种不同血清型的腺病毒载体的初打-加打方案诱导

抗RSV.F免疫性的能力。

[0145] 此研究涉及将BALB/c小鼠分配于具有8只小鼠的实验组中。通过肌肉内注射 10^{10} 个带有基于/源于RSV A2的RSV.F基因的野生型序列的病毒粒子(Ad-RSV.F或Ad35-RSV.F)或无转基因的病毒粒子(Ad26e或Ad35e)对动物免疫接种。一组动物首周使用Ad26-RSV.F初打且在第4周使用Ad35-RSV.F或Ad35e加打。另一组动物使用Ad35-RSV.F初打且在第4周使用Ad26-RSV.F或Ad26e加打。小鼠对照组使用Ad35e初打且在第4周使用Ad26e加打。在初打后第6周及第12周,在各时间点处死8只动物且使用普通技术人员熟知且如上所述的免疫分析来监测细胞反应及体液反应。

[0146] 图5展示在第一次免疫接种后6周及12周的细胞反应。在初打后6周(及加打后2周),量测Ad26-RSV.F与Ad35-RSV.F对于T细胞反应的显著加强作用,且T细胞反应的量值与初打-加打中使用Ad26-RSV.F或Ad35-RSV.F免疫接种的顺序无关。在初打后12周(加打后8周),在仅接受初打的动物及接受初打-加打的动物中,与rAd35-RSV.F初打的动物相比,使用Ad26-RSV.F初打的小鼠已维持较高水平的F特异性T细胞。总之,在使用rAd26-RSV.F或rAd35-RSV.F(初打或初打-加打)免疫接种的所有动物中,F特异性淋巴细胞(SFU)的数目较高且稳定至少12周。

[0147] 图6展示在使用腺病毒载体初打-加打接种疫苗后的不同时间点的体液反应。完全同等地初打Ad35.RSV.F及Ad26.RSV.F,且展示由Ad26.RSV.F或rAd35.RSV.F诱导的对于B细胞反应的显著加强作用。此外,异源初打-加打中B细胞反应的量值与Ad35.RSV.F及Ad26.RSV.F免疫接种的顺序无关,且加打后ELISA效价保持稳定12周。

[0148] 图7展示在初打-加打免疫接种后的不同时间点的病毒中和抗体效价。完全同等地初打Ad35.RSV.F载体与Ad26.RSV.F载体以获得明显VNA效价,如对于ELISA效价所观测的情况。此外,异源初打-加打后VNA效价的增加与Ad35.RSV.F及Ad26.RSV.F免疫接种的顺序无关。Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F对于VNA效价的加强作用在两个时间点均显著且在第6周已达到最大。仅使用Ad.RSV.F初打的组在第12周的VNA效价与第6周相比增加。腺病毒载体构建体中的RSV F序列源于RSV A2分离株。本申请中所述的中和分析是基于属于RSV亚群A的RSV Long病毒株,证实由F(A2)诱导的抗体能够交叉中和不同RSV A病毒株亚型。

[0149] 由于RSV F蛋白质在RSV分离株中完全保守,故测试经Ad-RSV.F载体免疫接种的动物的血清是否能够交叉中和原型RSV B病毒株分离株RSV B1。如图8所示,经免疫接种的小鼠的血清亦能够交叉中和B1病毒株。交叉中和RSV B1的能力并不依赖于仅初打组中所用的载体或使用Ad26.RSV.F载体及Ad35.RSV.F载体进行初打-加打免疫接种的顺序。

[0150] 总之,此等数据显示在初打-加打方案中,使用Ad26.RSV.F及Ad35.RSV.F连续免疫接种诱导强体液反应及细胞反应,且体液免疫反应包括中和RSV A亚型与RSV B亚型的分离株的能力。

[0151] 实例4.在棉鼠模型中使用重组腺病毒载体活体内诱导抗RSV感染的保护

[0152] 进行此实验以查明基于源于两种不同血清型的腺病毒载体的初打-加打方案诱导棉鼠的抗RSV攻击复制的保护的能力。棉鼠(刚毛棉花鼠, *Sigmodon hispidus*)易受RSV引起的上呼吸道及下呼吸道感染且发现感染容许度为小鼠品系的至少50倍(Niewiesk等人, 2002, Lab. Anim. 36(4):357-72)。此外,棉鼠已成为评估RSV候选疫苗、抗病毒剂及抗体的功效及安全性的初级模型。在棉鼠模型中得到的临床前数据促进开发两种抗体调配物(

RespiGam®及Synagis®)用于临床试验,而无需非人类灵长类动物中的中间研究。

[0153] 该研究将棉鼠录入实验组中,每组8只棉鼠。通过肌肉内注射 10^9 个病毒粒子(vp)或 10^{10} vp的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F)或无转基因的腺病毒载体(Ad26e或Ad35e)对动物免疫接种。动物在28天后加打相同vp剂量的相同载体(同源初打-加打)或其他腺病毒血清型(异源初打-加打);除仅施用1次剂量(10^{10})之外,据此使用Ad-e载体对对照组免疫接种。对照组由6只动物组成。经RSV A2(10^4 个空斑形成单位(pfu))鼻内感染的动物用作抗攻击复制的保护的阳性对照,众所周知的是,经RSV病毒初次感染会防止二次攻击复制(Prince.Lab Invest 1999,79:1385-1392)。此外,福尔马林不活化RSV(FI-RSV)充当疫苗增强组织病理学疾病的对照。在第二次(加打)免疫接种后三周,经鼻内使用 1×10^5 pfu的空斑纯化RSV A2攻击棉鼠。作为对照,一组棉鼠未经免疫接种但接受攻击病毒,且另一对照组未经免疫接种且不受攻击。在感染后5天(RSV攻击病毒达成峰值效价的时间点)处死棉鼠(Prince.Lab Invest 1999,79:1385-1392),且通过病毒空斑滴定来测定肺RSV效价及鼻RSV效价(Prince等人1978,Am J Pathology 93,711-791)。

[0154] 图9展示在未经免疫接种的对照以及接受无转基因的腺病毒载体的动物中观测到肺中及鼻中的高RSV病毒效价,分别为 $5.3+/-0.13 \log_{10}$ pfu/g及 $5.4+/-0.35 \log_{10}$ pfu。相比之下,在接受使用Ad26.RSV.F和/或Ad35.RSV.F载体的初打-加打免疫接种的动物的肺及鼻组织中不可检测到攻击病毒,与剂量或方案无关。

[0155] 此等数据清楚地证实基于Ad35的载体与基于Ad26的载体在棉鼠模型中均产生抗RSV攻击复制的完全保护。此种情况令人惊讶,因为已知编码RSV F的基于Ad5的腺病毒载体在肌肉内投与后在动物模型中不能诱导完全保护。

[0156] 在实验过程中,在免疫接种之前(第0天)、在加打免疫接种之前(第28天)、在攻击当天(第49天)及在处死当天(第54天)获取血液样品。如Prince(Prince等人1978,Am J Pathology 93,711-791)所述,在基于空斑分析的病毒中和分析(VNA)中针对全身性RSV特异性中和抗体的诱导来测试血清。中和效价表示为与仅病毒对照孔相比使得空斑减少50%(IC₅₀)的血清稀释度(log₂)。

[0157] 图10展示对照动物在第28天及第49天不具有病毒中和抗体,而在动物使用Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F载体初打后诱导高VNA效价。在加打免疫接种后观测到VNA效价适度增加。初次感染RSV A2病毒产生相当适度的VNA效价,其随着时间推移而逐渐增加。

[0158] 为评估在使用RSV A2攻击后Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F疫苗是否可能使疾病恶化,在感染后5天进行肺的组织病理学分析。收集肺,用福尔马林灌注,切片且用苏木精(hematoxylin)及伊红(eosin)染色以供组织学检查。根据Prince(Prince等人Lab Invest 1999,79:1385-1392)所公布的准则,以盲法进行组织病理学评分,且对以下参数进行评分:细支气管周炎、血管周炎、间质性肺炎及肺泡炎。图11展示此实验的肺病理学评分。在RSV攻击后,经FI-RSV免疫接种的动物与基于先前公开的研究所预期的虚拟免疫接种的受攻击动物相比显示关于所检查的所有组织病理学参数的组织病理学评分提高(Prince等人Lab Invest 1999,79:1385-1392)。经Ad26.RSV.F及Ad35.RSV.F免疫接种的动物与经rAd-e免疫或虚拟免疫接种的动物相比组织病理学得分类似,但经rAd-RSV.F免疫接种的动物的血管周炎似乎略轻。因此,与FI-RSV疫苗不同,Ad26.RSV.F及Ad35.RSV.F疫苗不会导致增强疾病。

[0159] 所有接种疫苗策略产生抗RSV攻击复制的完全保护,诱导强病毒中和抗体,且未观测到增强病变。

[0160] 实例5.使用不同投药途径在单次免疫接种后rAd载体的保护功效

[0161] 此研究用以查明投药途径对于由编码RSV.F的Ad26或Ad35载体诱导的保护功效的影响。疫苗经肌肉内或经鼻内投与。

[0162] 在第0天已接受 1×10^9 或 1×10^{10} 个病毒粒子(vp)的带有转基因RSV F的Ad26或Ad35(Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F)或无转基因的Ad26或Ad35(Ad26-e或Ad35-e)的棉鼠在第49天经 10^5 RSV pfu攻击且在第54天处死。

[0163] 图12展示测定肺攻击病毒及鼻攻击病毒的实验结果。在未经免疫接种或经无转基因的腺病毒载体免疫接种的大鼠的肺及鼻中检测到高RSV病毒效价,分别为 $4.9 \pm 0.22 \log_{10}$ pfu/g及 $5.4 \pm 0.16 \log_{10}$ pfu。相比之下,接受Ad35-RSV.F或Ad26-RSV.F的动物的肺及鼻中不存在攻击病毒的复制,与投药途径及剂量无关。

[0164] 此等数据令人惊讶地证实编码RSV F蛋白质的基于Ad26及基于Ad35的载体各自在棉鼠攻击实验中提供完全保护,与载体的投药途径无关。此种情况出乎意料,因为所公开的基于腺病毒的RSV疫苗(其基于其他血清型)中无一者已证实在肌肉内接种疫苗后具有完全保护。

[0165] 在实验期间,在免疫接种之前(第0天)、免疫接种后4周(第28天)及攻击当天(第49天)获取血液样品。在中和测试中针对RSV特异性抗体的诱导来测试血清(图13)。在免疫接种之前,在任何棉鼠中均未检测到病毒中和抗体。所有腺病毒载体免疫接种策略与投药途径无关,明显诱导高VNA效价,其随着时间推移而保持稳定。此等数据令人惊讶地证实编码RSV F蛋白质的基于Ad26及基于Ad35的载体各自在棉鼠免疫接种实验中提供病毒中和抗体的高效价,与载体的投药途径无关。

[0166] 为评估在经RSV A2攻击后Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F疫苗的单次免疫接种是否可能导致疫苗增强疾病,在感染后5天进行肺的组织病理学分析(图14)。与经rAd-e免疫接种或虚拟免疫接种的动物相比,使用rAd26.RSV.F或rAd35.RSV.F的单次免疫接种在经rAd26.RSV.F或rAd35.RSV.F免疫接种的动物中产生类似的免疫病理学评分,如上述初打-加打免疫接种实验中所观测。显然,未观测到疾病恶化,与使用FI-RSV初打的动物形成对比。经rAd载体免疫接种的动物的组织病理学评分与虚拟感染的动物相当。

[0167] 总之,所有单次剂量接种疫苗策略均产生抗RSV攻击复制的完全保护,诱导强病毒中和抗体,且不展示增强病变。

[0168] 实例6.具有变体(诸如RSV F的片段)或具有替代性启动子的载体显示类似免疫原性

[0169] 已使用表达野生型RSV F的载体进行上述实例。已在rAd35中构建F的其他截短或修饰形式,从而提供腺病毒载体中RSV F片段的实施例。F的此等截短或修饰形式包括缺少细胞质域及跨膜区(亦即仅保留胞外域片段)的RSV-F截短形式,及细胞质域及跨膜区截短且胞外域中具有另一内部缺失且添加三聚化域的RSV-F片段形式。此等载体与具有全长F蛋白质的rAd35.RSV.F相比未改良反应。

[0170] 另外,已构建具有驱使野生型RSV F表达的不同替代性启动子的其他rAd35载体。

[0171] 已在小鼠模型中比较RSV.F的修饰形式及启动子变体的免疫原性且与表达野生型

F的Ad35.RSV.F相比。具有此等F变体或启动子变体的所有Ad35载体均显示与Ad35.RSV.F相同数量级的反应。

[0172] 实例7.在棉鼠模型中在重组腺病毒载体活体内免疫接种后抗RSV感染的短期保护

[0173] 此实验确定在棉鼠模型中由表达RSV-F蛋白质的腺病毒载体迅速发起保护的潜力。为此目的,在第0天或第21天,通过单次肌肉内注射 10^7 、 10^8 或 10^9 个病毒粒子(vp)的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F)或无转基因的腺病毒载体(Ad26e)对棉鼠免疫接种。经RSV A2(10^4 个空斑形成单位(pfu))鼻内感染的动物用作抗攻击复制的保护的阳性对照,众所周知的是,经RSV病毒初次感染防止二次攻击复制(Prince.Lab Invest 1999,79:1385-1392)。在免疫接种后七周(第49天)或四周,使用 1×10^5 pfu的空斑纯化RSV A2经鼻内攻击棉鼠。在感染后5天(RSV攻击病毒达成峰值效价的时间点)处死棉鼠(Prince.Lab Invest 1999,79:1385-1392),且通过病毒空斑滴定来测定肺RSV效价及鼻RSV效价(Prince等人1978,Am J Pathology 93,711-791)。图16A及图16B展示在接受无转基因的腺病毒载体的动物中观测到肺中及鼻中的高RSV病毒效价,分别为 $4.8 \pm 0.11 \log_{10}$ pfu/g及 $5.1 \pm 0.32 \log_{10}$ pfu/g。相比之下,接受Ad26.RSV.F载体免疫接种的动物的肺及鼻组织中不可检测到攻击病毒,与免疫接种与攻击之间的时间无关。此实验清楚指示表达RSV-F的Ad26迅速发起抗攻击病毒复制的保护。第0天、第28天及攻击当天(第49天),自经免疫接种的棉鼠获取血液样品。在中和测试中针对RSV特异性抗体的诱导来测试血清(图17)。使用腺病毒载体免疫接种诱导剂量依赖性VNA效价。图18展示对照动物在第28天及第49天不具有病毒中和抗体,但在使用 10^7 至 10^9 vp Ad26.RSV.F免疫接种后28天或49天在动物中诱导高VNA效价。初次感染RSV A2病毒产生相当适度的VNA效价,其随着时间推移而逐渐增加。此实验清楚指示表达RSV-F的Ad26迅速发起抗攻击病毒复制的保护。

[0174] 实例8.在棉鼠模型中在重组腺病毒载体活体内免疫接种后抗RSV亚群A及亚群B感染的保护

[0175] RSV病毒株可分成两个亚群:亚群A及亚群B。此亚型分类是基于高变G糖蛋白抗原性的差异。F蛋白质的序列高度保守,但亦可归入上述亚群A及亚群B中。实例3描述经Ad-RSV.F载体免疫接种的小鼠的血清亦能够活体外交叉中和B1病毒株。图19清楚展示源于经Ad26.RSV-FA₂免疫接种的棉鼠的棉鼠血清在免疫接种后第49天展示抗RSV-A Long(亚群A)及Bwash(亚群B,ATCC编号1540)的高VNA效价。接着,使用在 10^6 至 10^8 vp范围内的低腺病毒载体剂量在棉鼠中测定抗亚群A或B攻击的活体内保护。为此目的,将棉鼠分配于实验组中,每组8只棉鼠。第0天,通过肌肉内注射 10^6 、 10^7 或 10^8 个病毒粒子(vp)的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F)或无转基因的腺病毒载体(Ad26e)对动物免疫接种。第49天,使用 10^5 pfu RSV-A2(RSV-A病毒株)或RSV-B 15/97(RSV-B病毒株)鼻内攻击动物。图20展示在接受无转基因的腺病毒载体的动物中观测到肺中及鼻中的高RSV病毒效价。相比之下,在接受Ad26.RSV.F免疫接种的动物的肺及鼻组织中不可检测到攻击病毒或检测到有限攻击病毒。当使用RSV-A2或RSV-B 15/97攻击时,对于保护仅观测到较小差异。Ad26.RSV.FA₂当使用 10^8 及 10^7 vp剂量时展示抗肺攻击复制的完全保护,且在 10^6 vp Ad26.RSV.FA₂时展示格外的失效(breakthrough)。关于抗鼻攻击病毒复制的保护可见类似趋势,不过所有动物在 10^6 及 10^7 vp Ad26.RSV.FA₂时观测到部分失效,但低于对照组(图21)。在实验期间,在攻击当天(第49天)获取血液样品。在中和测试中针对RSV特异性抗体的诱导来测试血清(图22)。此

实例证实 10^6 至 10^8 vp Ad26.RSV的低剂量腺病毒载体显示抗RSV A2的VNA效价的剂量反应。在免疫接种之前,在任何棉鼠中均未检测到病毒中和抗体。

[0176] Ad26.RSV.F被证实比Ad35.RSV.F略佳,因为后者在 10^8 vp剂量下在鼻攻击实验中显示一些失效。

[0177] 实例9.在棉鼠模型中在重组腺病毒载体活体内免疫接种后抗高攻击剂量的RSV-A2的保护

[0178] 此实例确定与 1×10^5 pfu RSV-A2的标准剂量相比,抗 5×10^5 pfu的高攻击剂量的保护。该研究将棉鼠录入实验组中,每组8只棉鼠。第0天,通过单次肌肉内注射 10^7 或 10^8 个病毒粒子(vp)的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F)或无转基因的腺病毒载体(Ad26e)对动物免疫接种。经RSV A2(10^4 个空斑形成单位(pfu))鼻内感染的动物用作抗攻击复制的保护的阳性对照。在感染后5天处死棉鼠,且通过病毒空斑滴定来测定肺RSV效价及鼻RSV效价。图23展示在接受无转基因的腺病毒载体的动物中,较高攻击剂量比标准攻击剂量诱导较高肺病毒负荷。接受 10^7 或 10^8 vp Ad26.RSV.F载体免疫接种的动物在肺中受到抗较高及标准RSV攻击效价的完全保护。图24展示接受 10^8 vp Ad26.RSV.F载体免疫接种的动物在鼻中受到抗较高及标准RSV攻击效价的完全保护,而接受 10^7 vp Ad26.RSV.F载体免疫接种的动物受到抗较高及标准RSV攻击效价的部分保护。

[0179] 实例10.在棉鼠模型中在重组腺病毒载体活体内免疫接种后抗RSV-A2及RSV-B15/97的长期保护

[0180] 此实例确定在棉鼠模型中在重组腺病毒载体活体内免疫接种后抗RSV-A2及RSV-B15/97的保护的持久性。该研究将棉鼠录入实验组中,每组6只棉鼠。通过肌肉内注射 10^8 个病毒粒子(vp)或 10^{10} vp的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F)或无转基因的腺病毒载体(Ad26e或Ad35e)对动物免疫接种。动物在28天后加打相同vp剂量的相同载体(Ad26.RSV.F)(同源初打-加打)或Ad35.RSV.F腺病毒(异源初打-加打);除仅施用1次剂量(10^{10})之外,据此使用Ad-e载体对对照组免疫接种。一些组未接受加打免疫接种。对照组由6只动物组成。经RSV A2及B15/97(10^4 个空斑形成单位(pfu))鼻内感染的动物用作抗攻击复制的保护的阳性对照。在第一次免疫接种后210天进行攻击。

[0181] 图25展示在接受无转基因的腺病毒载体的动物中观测到肺中及鼻中的高RSV病毒效价。相比之下,在接受Ad26.RSV.F和/或Ad35.RSV.F免疫接种的动物的肺组织中不可检测到攻击病毒。在接受Ad26.RSV.F和/或Ad35.RSV.F免疫接种的动物的鼻组织中不可检测到RSV-A2攻击病毒。使用RSV-B15/97攻击在接受Ad26.RSV.F和/或Ad35.RSV.F免疫接种的动物(接受Ad26.RSV.F初打,继而加打 10^{10} vp Ad35.RSV.F的动物除外)的鼻组织中诱导有限病毒复制。图26展示在免疫接种后140天的病毒中和抗体效价。仅初打 10^8 及 10^{10} vp剂量的腺病毒载体或使用 10^8 及 10^{10} vp剂量进行初打-加打免疫接种显示在免疫接种后VNA效价的剂量反应可持续至少4.5个月。此外,所观测的效价高于通过初次鼻内免疫接种产生的中和效价。观测到Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F对于VNA效价的明显加强作用。

[0182] 总之,此实例在使用单次剂量或两次剂量的Ad26.RSV.F或Ad35.RSV.F免疫接种后展示持久VNA效价,且肺及鼻中抗同源病毒攻击的长期完全保护与肺中抗异源病毒攻击的长期完全保护及鼻中抗异源病毒攻击的部分保护组合。

[0183] 实例11.在棉鼠模型中在重组腺病毒载体活体内免疫接种后不存在疫苗增强免疫

病变

[0184] 为评估在使用RSV A2攻击后Ad26.RSV.F疫苗是否可能使疾病恶化,在感染后2天及6天进行肺的组织病理学分析。在攻击后两天,即刻反应(包括肺部嗜中性白血球浸润)达到峰值,而诸如淋巴细胞浸润的亚急性变化在感染后第6天达到峰值(Prince等人,J Virol,1986,57:721-728)。该研究将棉鼠录入实验组中,每组12只棉鼠。通过肌肉内注射 10^8 个病毒粒子(vp)或 10^{10} vp的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F)或无转基因的腺病毒载体(Ad26e)对动物免疫接种。动物在28天后加打相同vp剂量的相同载体(Ad26.RSV.F)(同源初打-加打);除仅施用1次剂量(10^{10})之外,据此使用Ad-e载体对对照组免疫接种。对照组由12只动物组成。经RSV A2(10^4 个空斑形成单位(pfu))鼻内感染的动物用作抗攻击复制的保护的阳性对照。经FI-RSV免疫接种的动物用作增强疾病的对照。收集肺,用福尔马林灌注,切片且用苏木精及伊红染色以供组织学检查。根据Prince(Prince等人Lab Invest 1999,79:1385-1392)所公布的准则,以盲法进行组织病理学评分,且对以下参数进行评分:细支气管周炎、血管周炎、间质性肺炎及肺泡炎。此实验第2天的肺病理学评分描绘于图27中且第6天的肺病理学评分描绘于图28中。在RSV攻击后,经FI-RSV免疫接种的动物与基于先前公开的研究所预期的虚拟免疫接种及攻击的动物相比显示在第2天及第6天所检查的所有组织病理学参数的组织病理学评分提高。第2天经Ad26.RSV.F载体免疫接种的所有组中的组织病理学得分与虚拟免疫接种的动物相当,且在攻击后第6天得分始终低于虚拟免疫接种及攻击(Ad26.e)的动物。因此,与FI-RSV疫苗不同,Ad26.RSV.F疫苗不会导致增强疾病。

[0185] 实例12.初打Ad26.RSV.F且加打重组F蛋白质在小鼠模型中产生向Th1偏斜的反应

[0186] 在此实例中,查明在初打Ad26.RSV.F后的免疫反应是否可通过加打辅助型重组RSV F蛋白质来增强。为此目的,将小鼠分配于实验组中,每组7只小鼠。第0天,通过肌肉内注射 10^{10} 个病毒粒子(vp)的带有全长RSV F(A2)基因的腺病毒载体(Ad26.RSV.F)或PBS对动物免疫接种。第28天,动物肌肉内加打相同剂量的相同载体或辅助型RSV F蛋白质(全长;融合后构形:post-F)(以2种剂量:5 μ g及0.5 μ g)。图29清楚展示源于经Ad26.RSV-F_{A2}免疫接种且加打辅助型RSV F的小鼠的血清在免疫接种后12周展示抗RSV-A Long(亚群A)的高VNA效价。图30展示经Ad26.RSV-F_{A2}免疫接种且加打辅助型RSV F蛋白质的小鼠的血清中的IgG2a/IgG1比率。高比率指示Th1平衡的反应,而低比率指示向Th2偏斜的反应。显然,经Ad26.RSV.F免疫接种且加打Ad26.RSV.F或RSV F蛋白质的动物产生高IgG2a/IgG1比率,而经FI-RSV或RSV F蛋白质免疫接种的对照小鼠(无腺病毒载体情形)诱导低比率。由于RSV疫苗强烈需要向Th1偏斜的反应以避免在攻击后增强疾病及诱导强T细胞记忆,故当施用Ad26.RSV.F初打时,可将蛋白质免疫接种的Th2偏斜反应向Th1反应引导。图31展示源于经Ad26.RSV-F_{A2}免疫接种且加打辅助型RSV F蛋白质的小鼠的脾脏中的细胞反应。可清楚观测到加打辅助型RSV F蛋白质亦将大大增强细胞反应。

[0187] 表1.序列

[0188] SEQ ID NO:1:RSV融合蛋白质(Genbank AC083301.1)氨基酸序列:
MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKKNCNGTDAKIK
LIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGFLGLGVGSAIASGVAV
SKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL

EITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGV
IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVD
IFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQ
EGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILL
SLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAPSN

[0189] SEQ ID NO:2: 编码RSV融合蛋白质的密码子优化RSV.F(A2)_{nat}基因
ATGGAAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCGGCCA
GAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGCGGACCGGCT
GGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAAAGAACAAGTGCAACGGCACCAGCGCCAAAATCAAG
CTGATCAAGCAGGAAGTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCAC
CAACAACCGGGCCAGACGGGAGCTGCCCCGGTTCATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAAAGACCAACGTGACCC
TGAGCAAGAAGCGGAAGCGGGCGTTCCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATTGCTAGCGGAGTGGCTGTG
TCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTG
CCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCA
TCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACAGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTG
GAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCT
GCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGC
AGCAGAGCTACTCCATCATGTCCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCCCGTACGGCGTG
ATCGACACCCCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCT
GACCCGGACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCAGCGTGTCAATTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGG
TGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCAGCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGAC
ATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGG
CGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGACCCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCA
ACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGCGTGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAACAG
GAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCCCTGGTGTTCGCCAGCGACGAGTT
CGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGC
ACAATGTGAATGCCGTGAAGTCCACCACCAATATCATGATCACCACAATCATCATCGTGATCATCGTCATCCTGCTG
TCCCTGATCGCCGTGGGCTGCTGCTGTAAGTGAAGGCCCGGTCCACCCCTGTGACCCTGTCCAAGGACCAGCTGAG
CGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAC

序列表

<110> 克鲁塞尔荷兰公司
 K·拉多塞维奇
 M·N·维佐约阿特莫佐
 J·H·H·V·屈斯泰
 J·维林加
 <120> 抗 RSV 疫苗
 <130> 0200 EP P00 PRI
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> respiratory syncytial virus

<220>
 <221> RSV F protein (A2 strain)
 <222> (1)..(574)

<400> 1

[0001]

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly 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 Lys Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Ile Lys Leu Ile Lys
 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 Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala 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 Val 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 Ser 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	
[0002]	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	
	305 310 315 320	
	Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Gln 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	

[0003]

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 Asn Val Asn Ala Val Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 2

<211> 1722

<212> DNA

<213> respiratory syncytial virus

<220>

<221> codon optimized sequence encoding RSV F protein (A2 strain)

<222> (1).. (1722)	
<400> 2	
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttegccca gggccagaa caccaccgag gaattctacc agagcacctg tagcgccgtg	120
tccaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggatca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgagcaaca tcaaaaagaa caagtgcac gccaccgacg ccaaaatcaa gtgatacaag	240
caggaaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgtgat gcagagcacc	300
cccgccacca acaaccgggc cagacgggag ctgccccgtt tcatgaacta caccctgaac	360
aacgcaaaa agaccaacgt gacctgagc aagaagcgga agcgccggtt cctgggcttc	420
ctgtggggcg tgggcagcgc cattgttagc ggagtggctg tgtctaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgaag tgaacaagat caagtcgcgc ctgtgagca ccaacaagc cgtgggtgcc	540
ctgagcaacg gcgtgtccgt gctgaccagc aaggtgtctg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagacagtg	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggtg ctggaaatca cccgcgagtt cagcgtgaac	720
gccggcgtga cccccccgt gtccacctac atgtgacca acagcgagct gctgagcctg	780
[0004] atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc	840
gtgcggcagc agagctactc catcatgtcc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg	900
gtgcagctgc cctgttacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc	960
ctgtgacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccggac cgaccgggac	1020
tggtactgcg ataatgccgg cagcgtgtca ttctttccac aagccgagac atgcaagggtg	1080
cagagcaacc gggigtcttg cgacaccatg aacagcctga cctgcccag cgagggtgaac	1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacctaaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc	1200
gacgtgtcca gtccgtgat caccctcctg ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc	1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac	1320
tacgtgtcca acaagggcgt ggacaccgtg tccgtgggca acacctgta ctacgtgaac	1380
aaacaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc	1440
ctggtgttcc ccagcgacga gttagacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac	1500
cagagccctg ccttcatcag aaagagcgac gagctgtctc acaatgtgaa tgcctggaag	1560
tccaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcatcgtcat cctgtgttcc	1620
ctgategccg tgggectgct gtgttactgc aagcccggtt cccccctgt gacctgttcc	1680
aaggaccagc tgagcggcat caacaatata gcctttctcca ac	1722

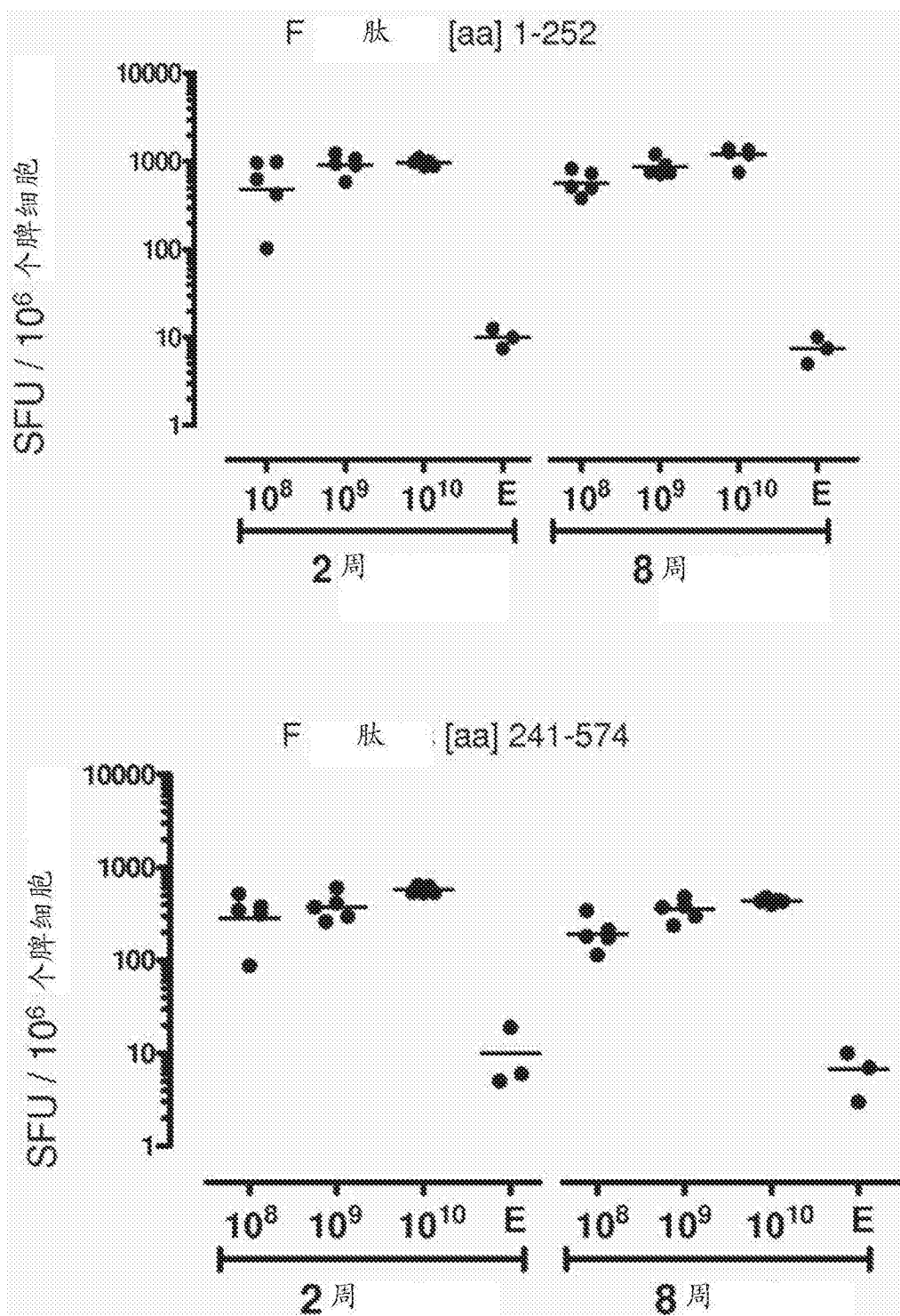


图1A

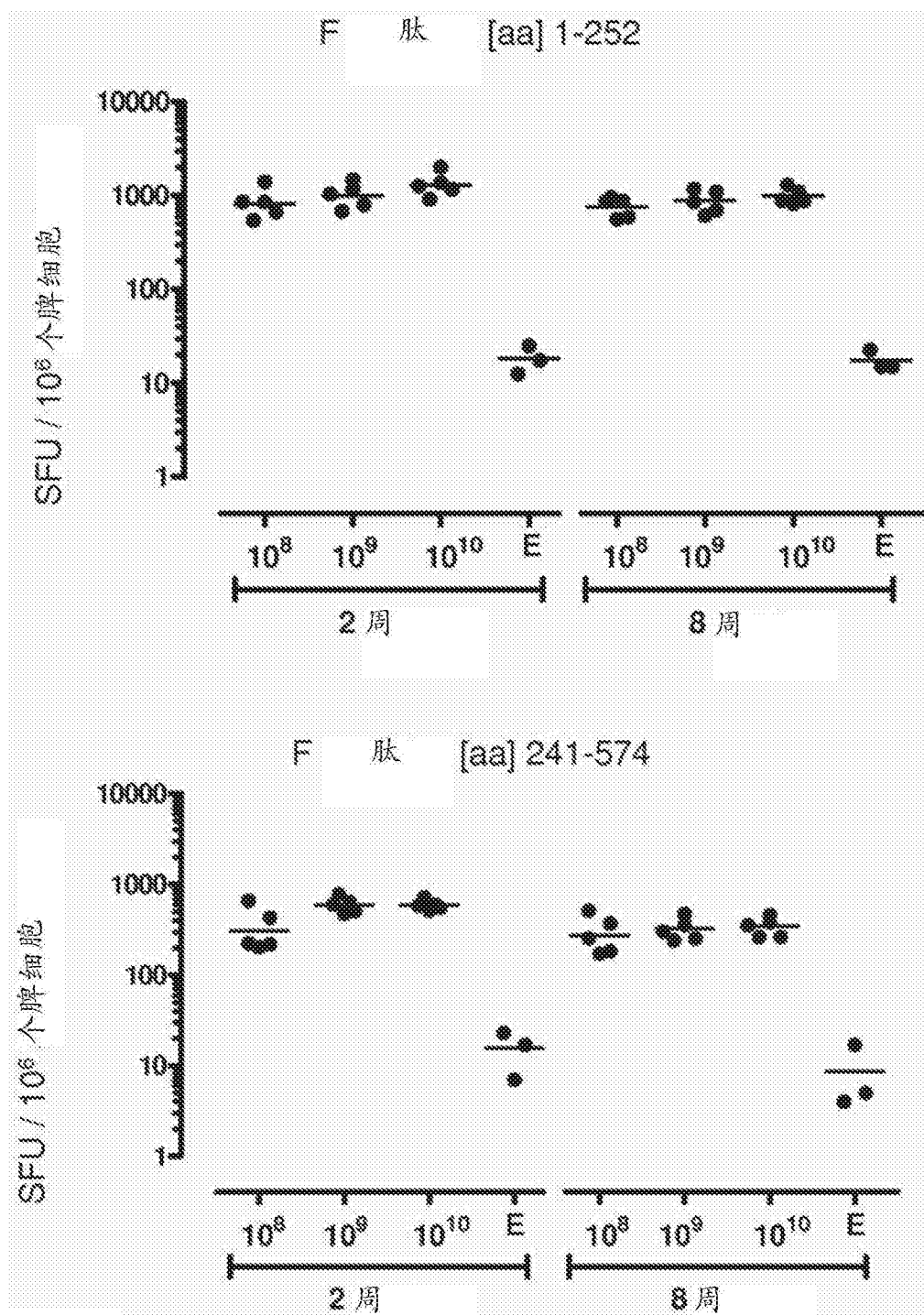


图1B

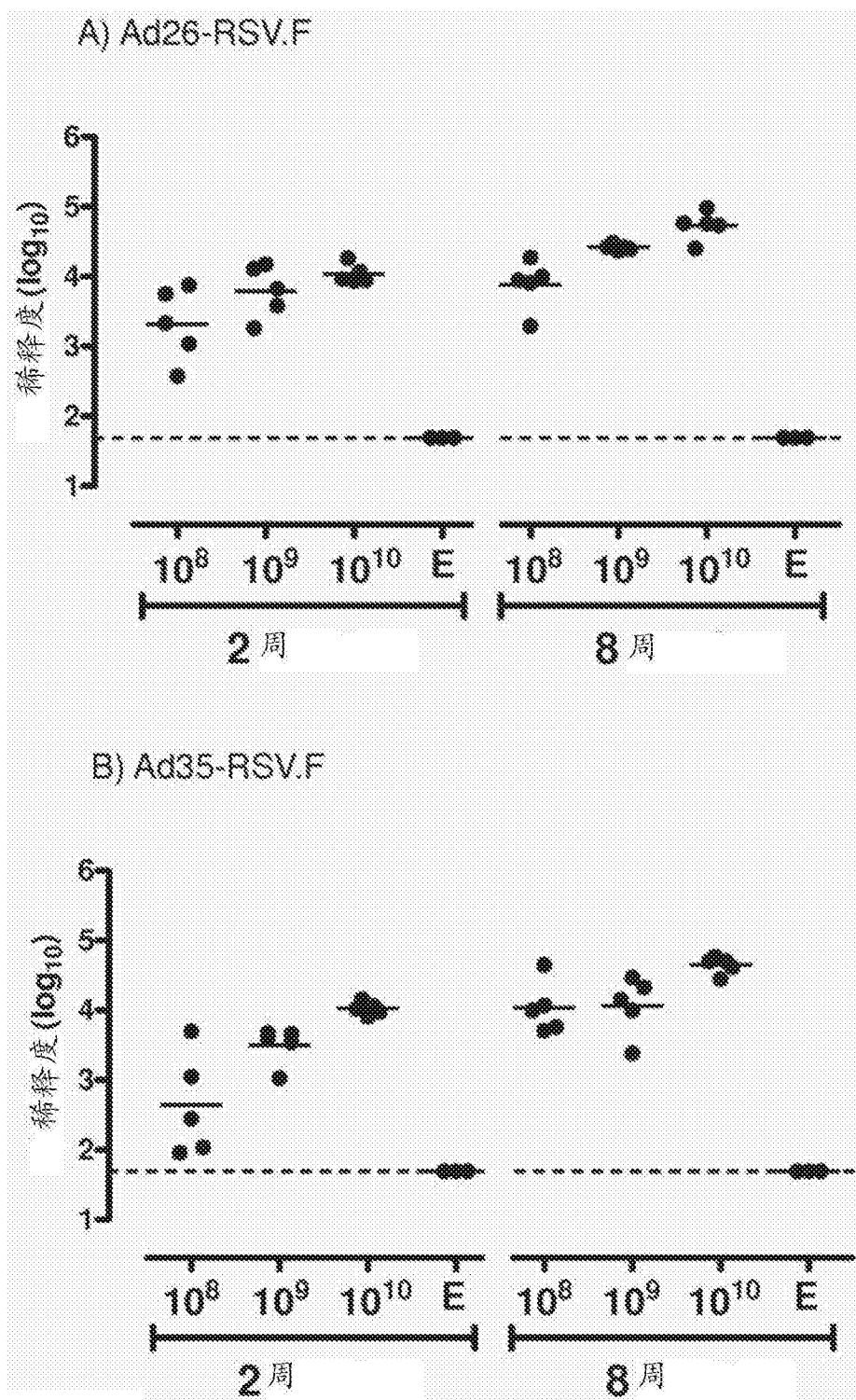


图2

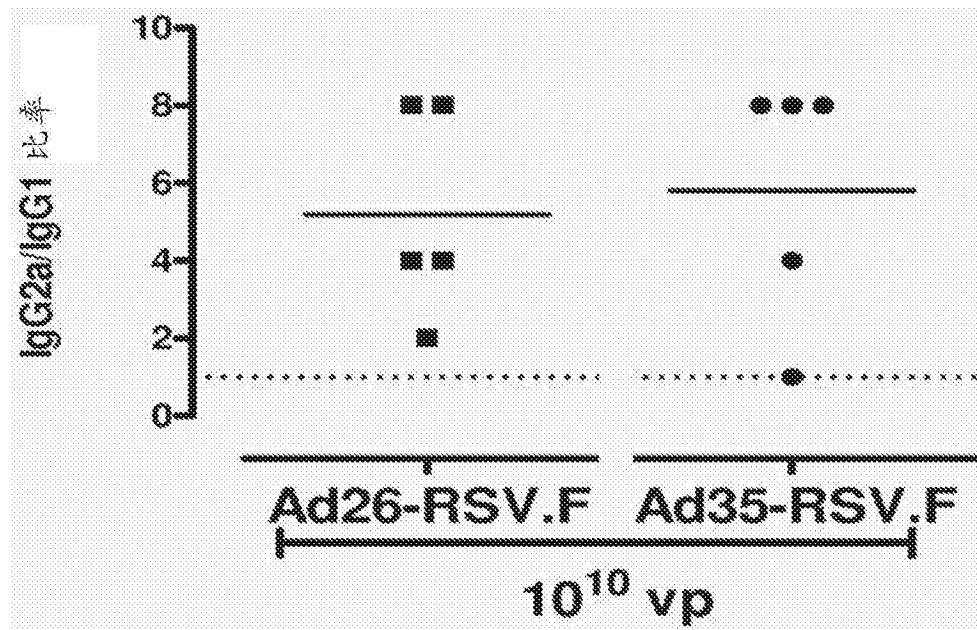


图3

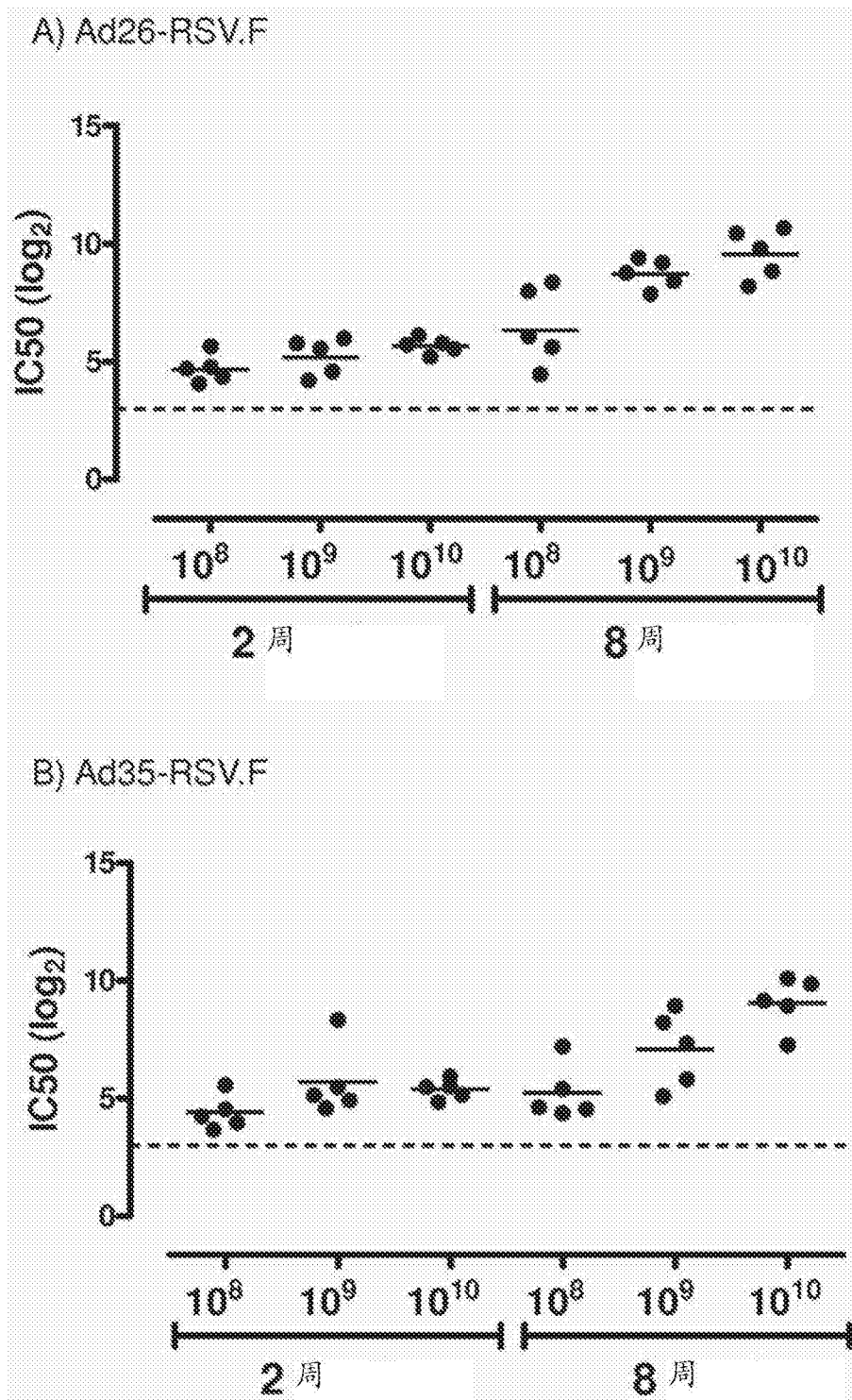


图4

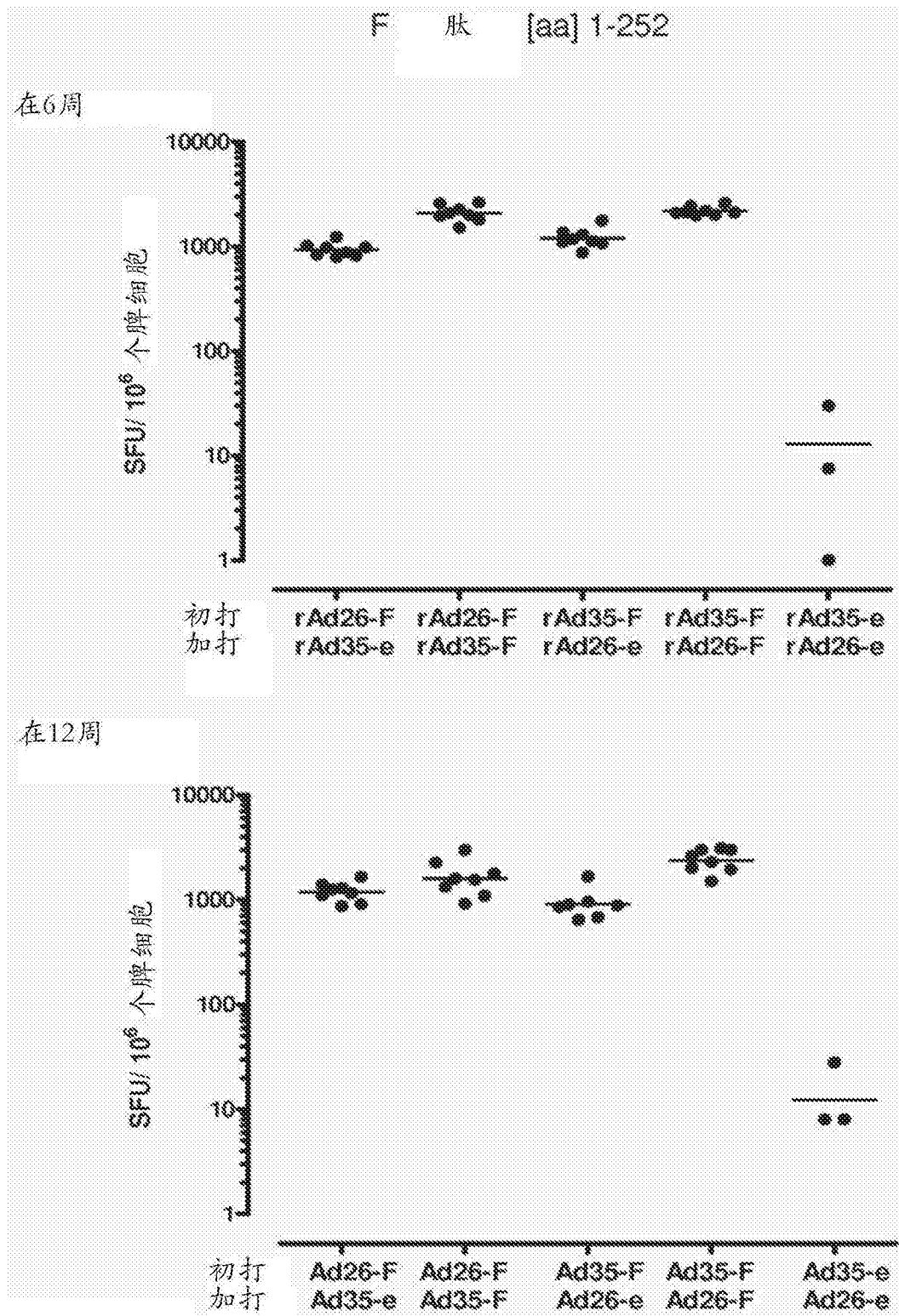


图5A

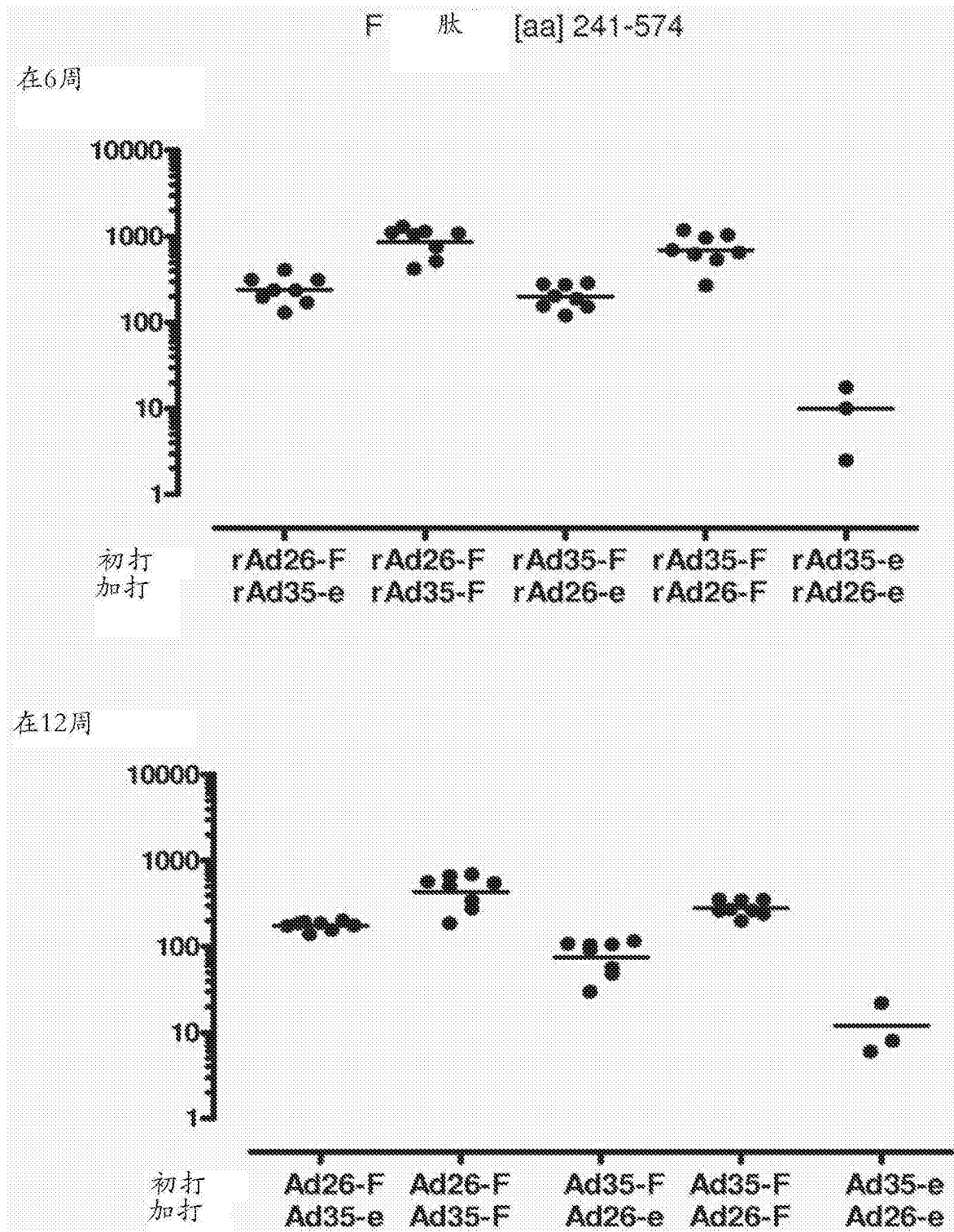


图5B

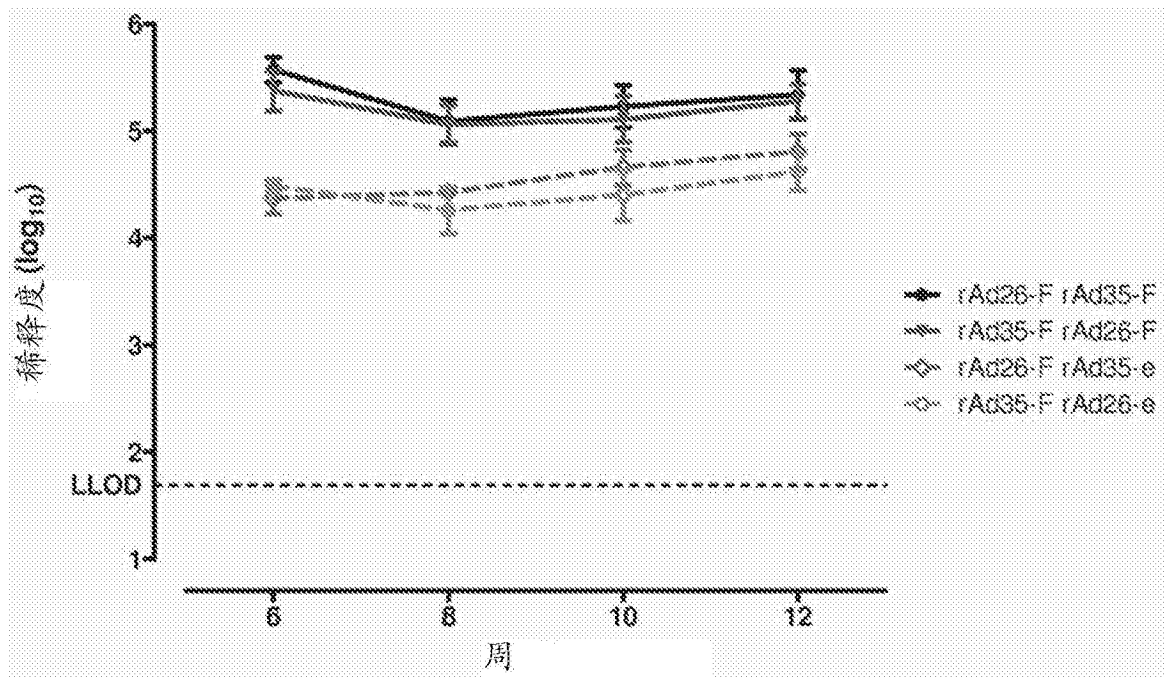


图6

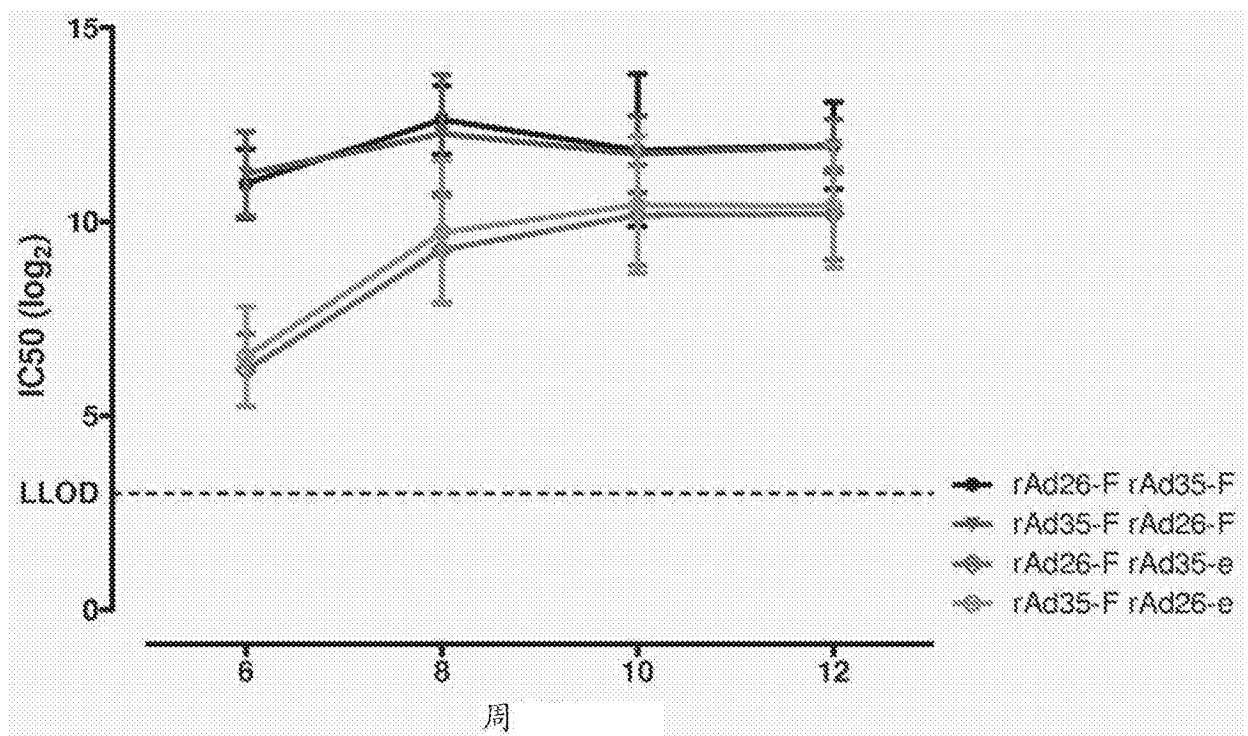


图7

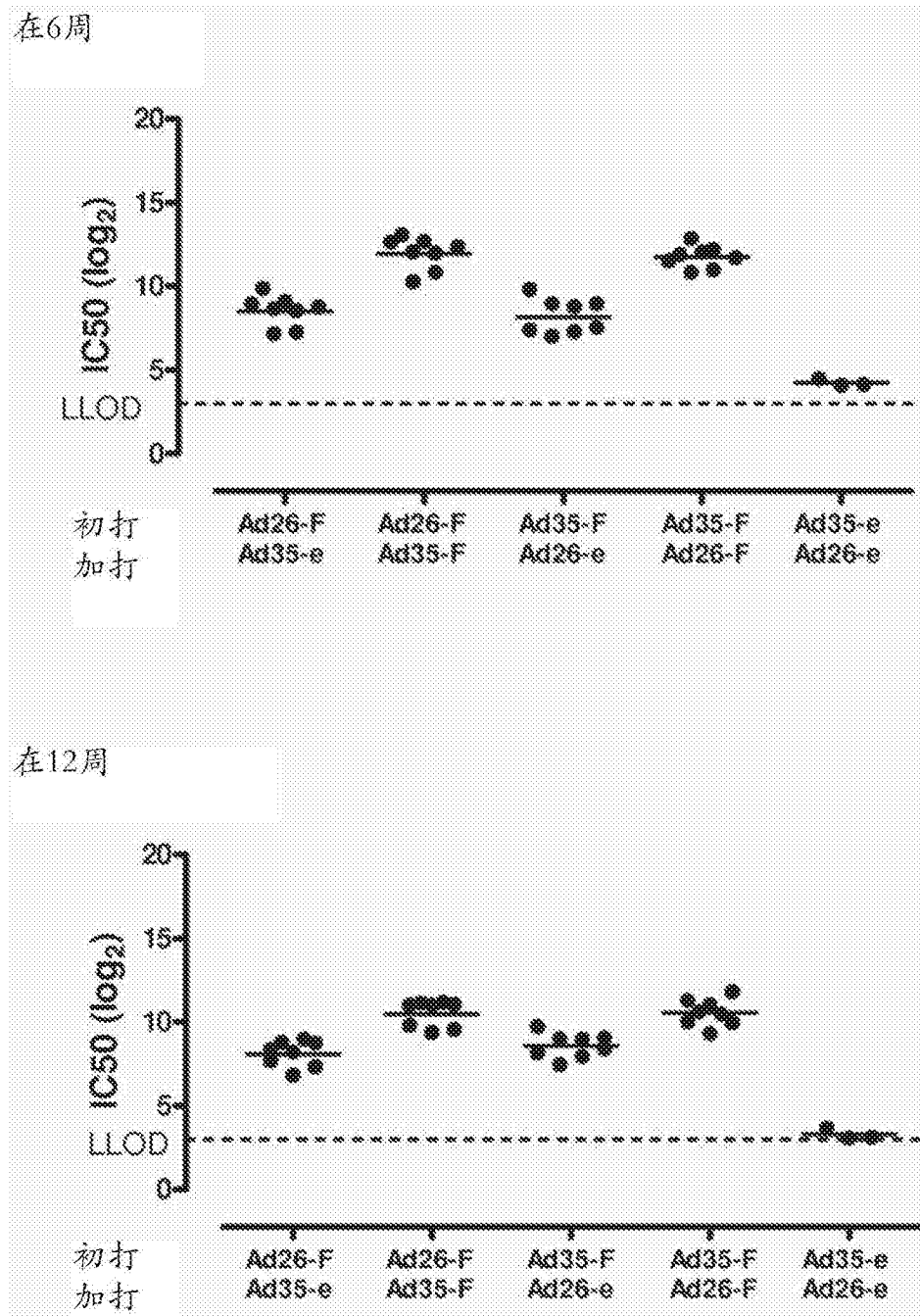


图8

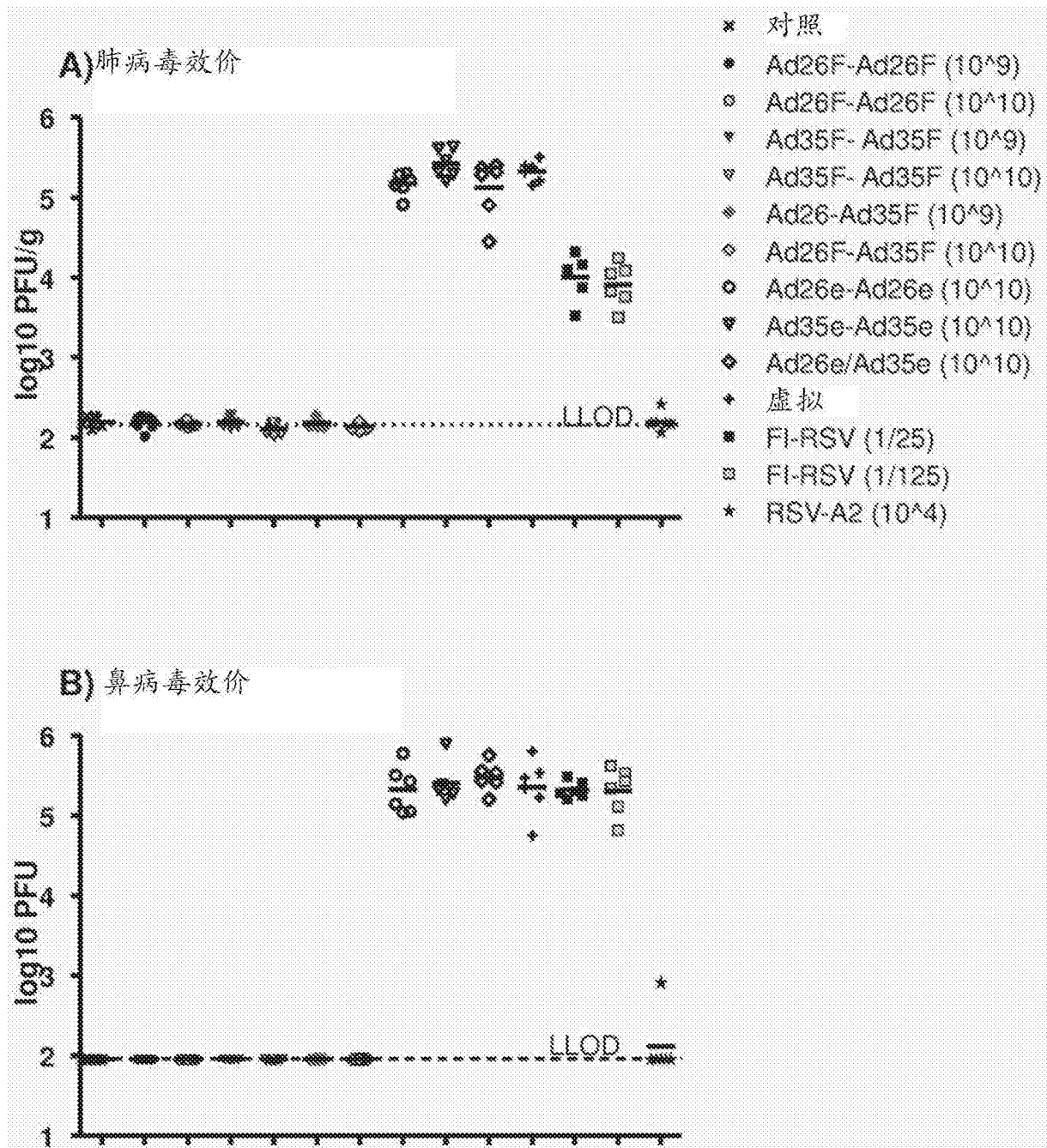


图9

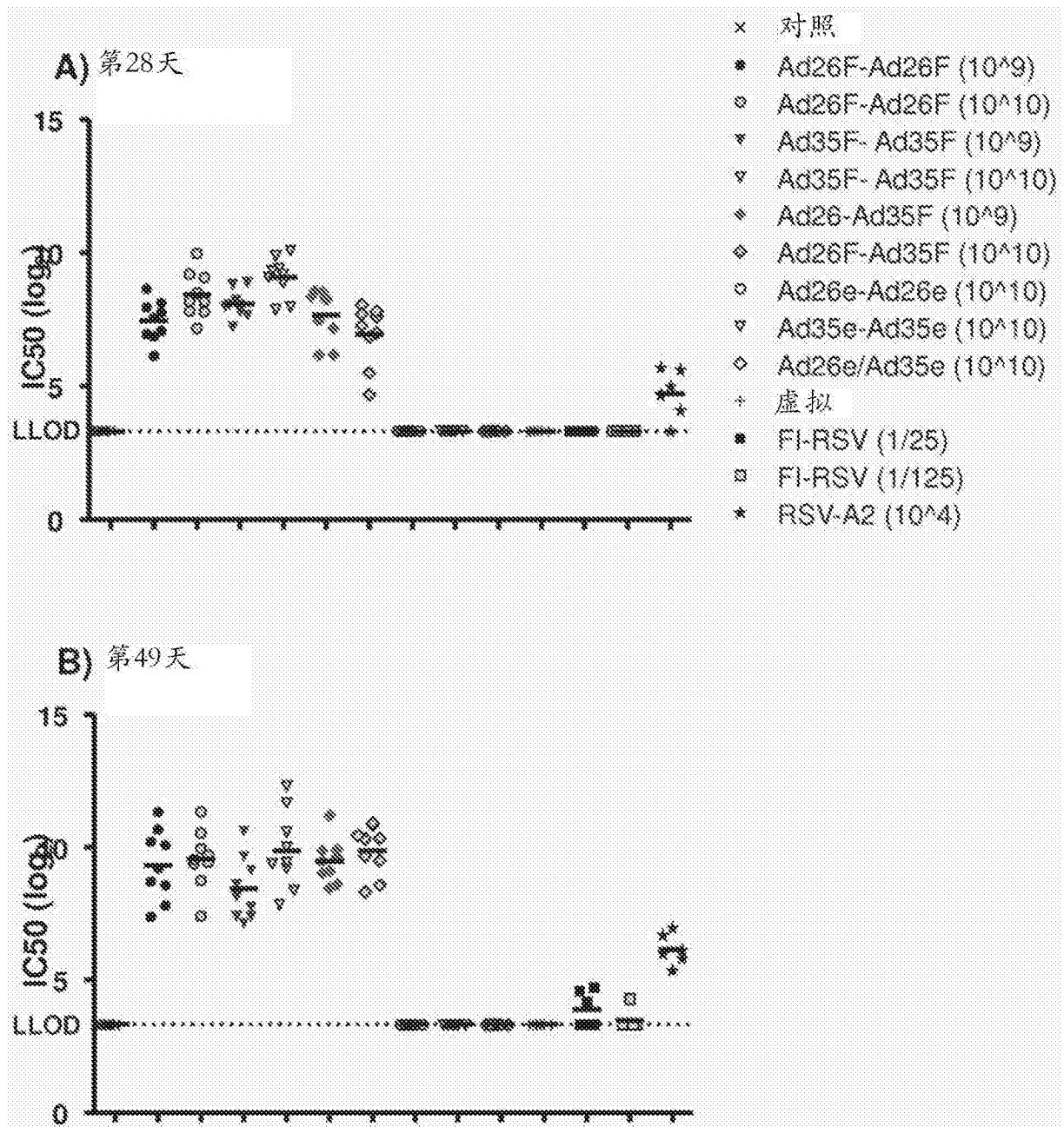


图10

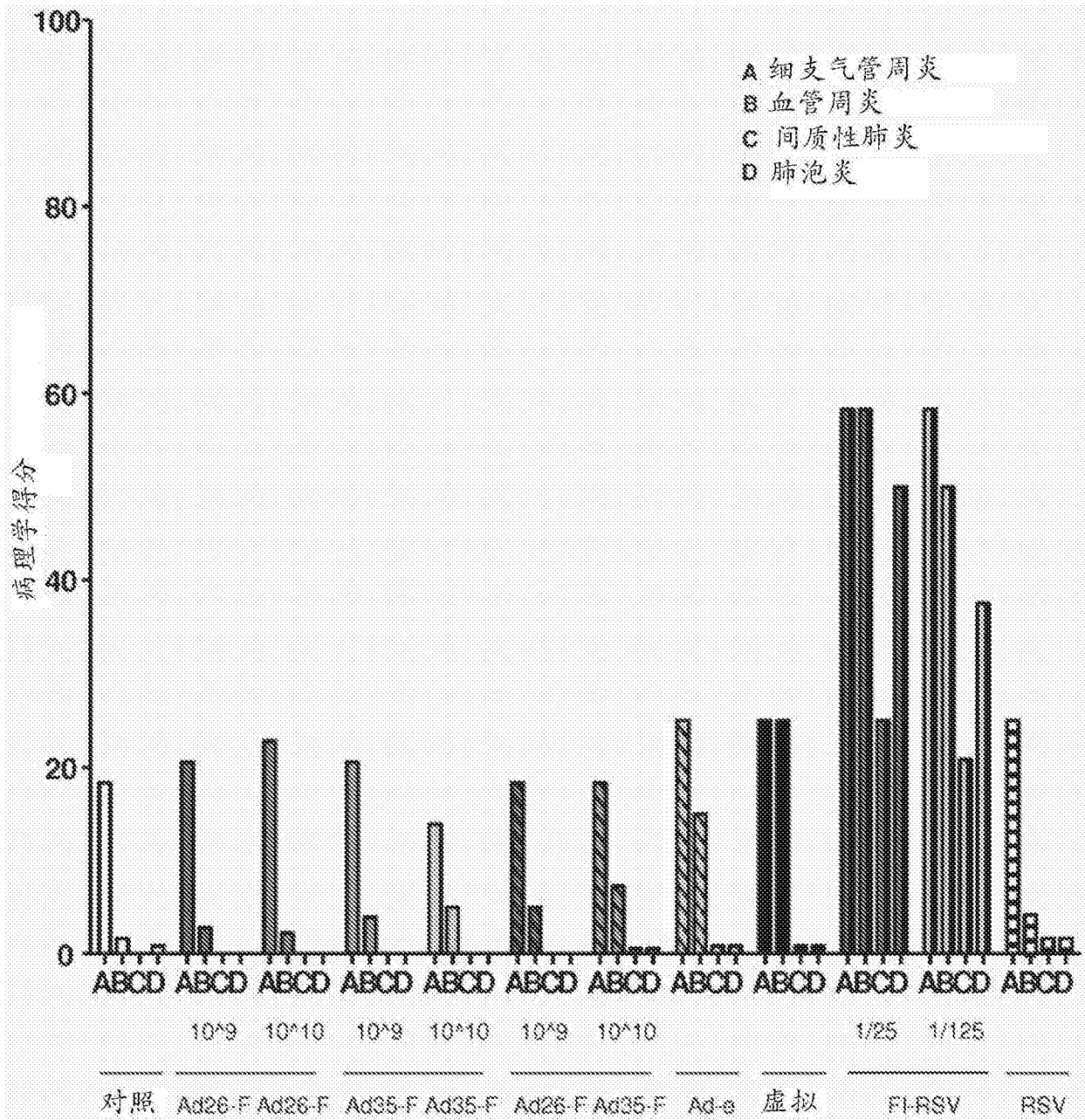


图11

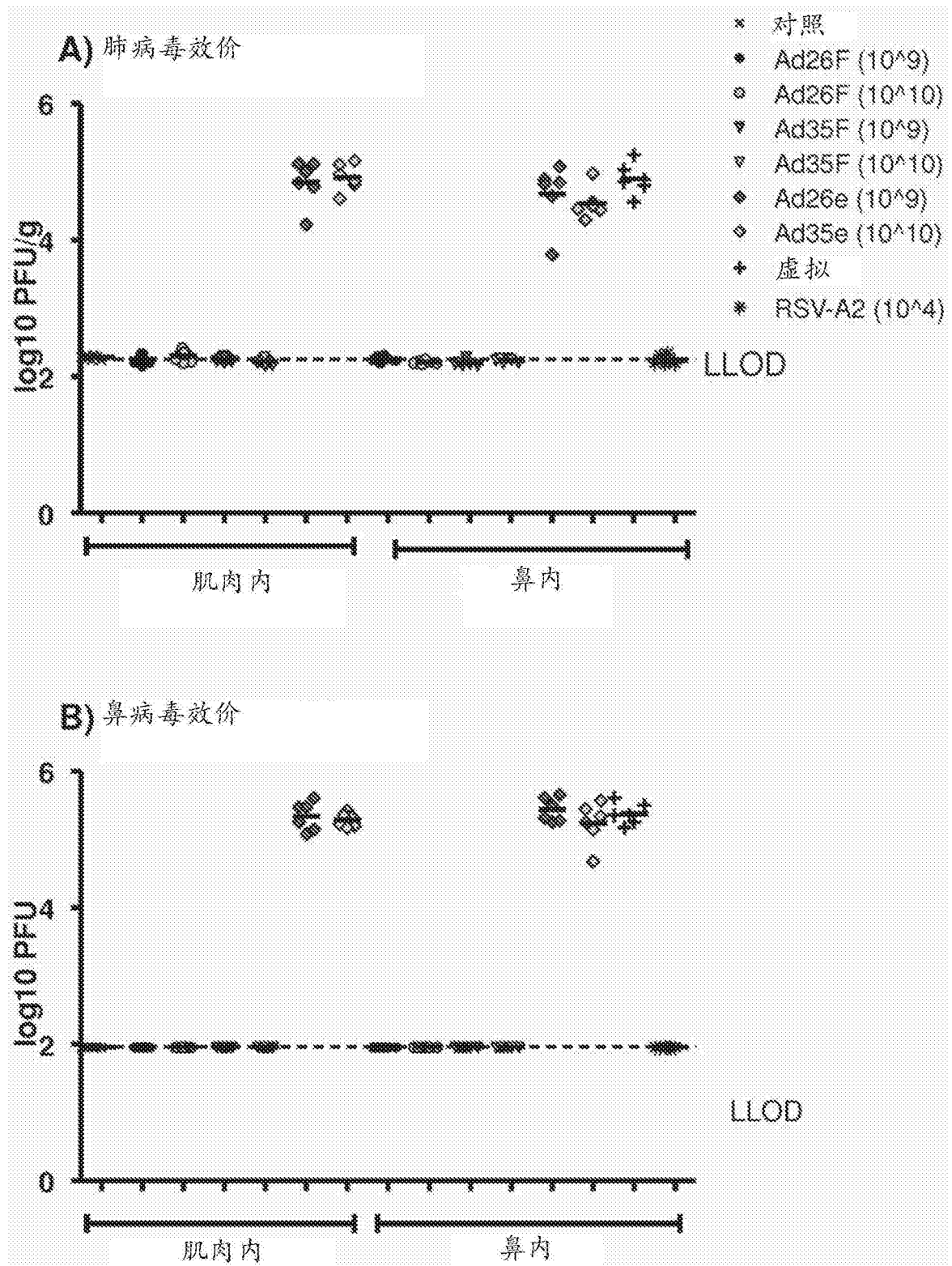


图12

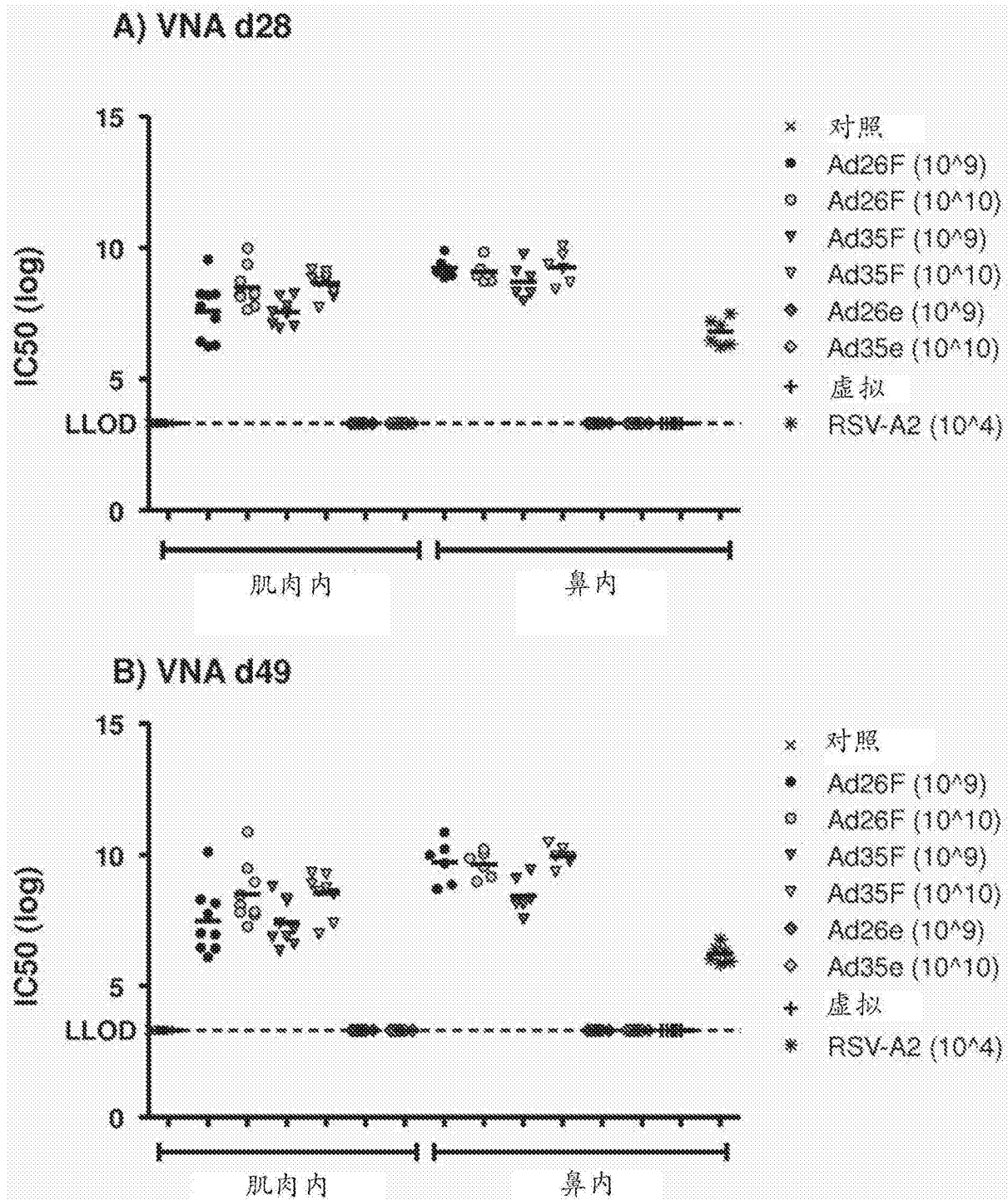


图13

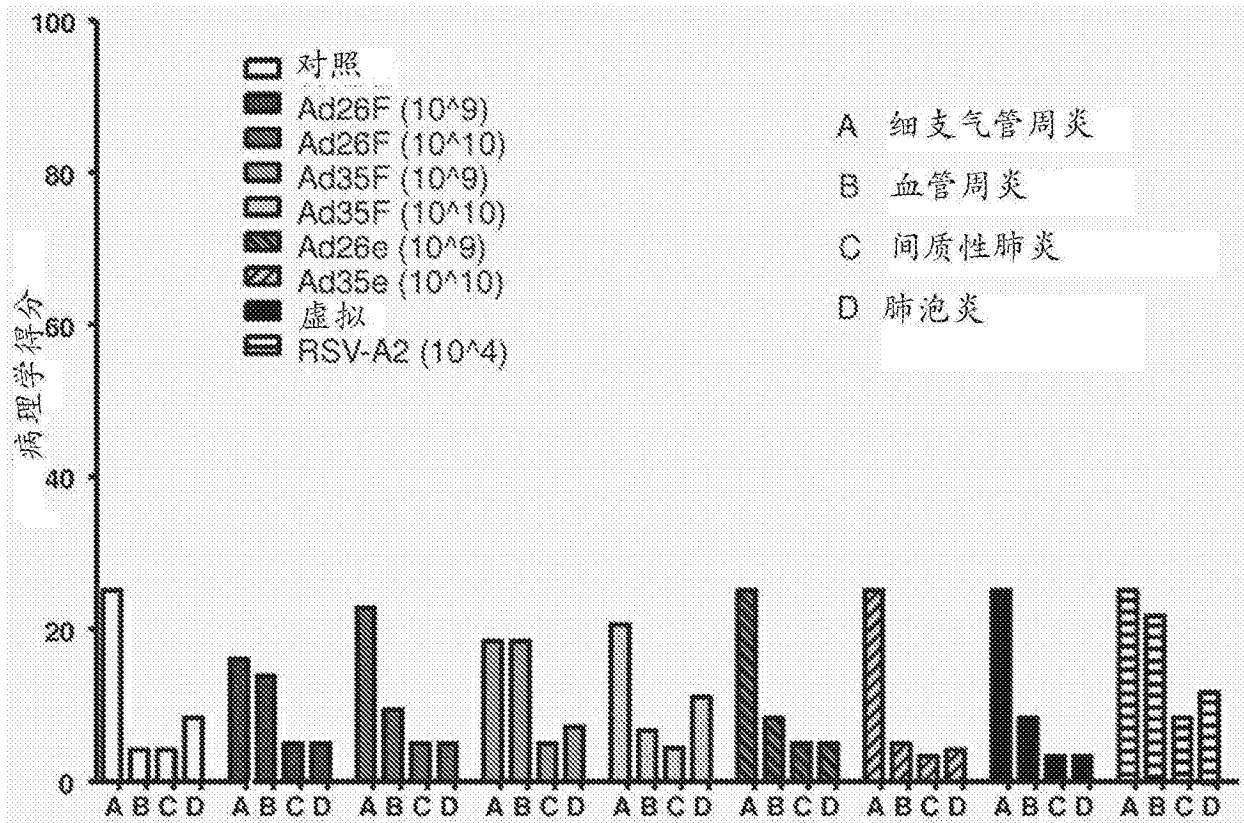


图14

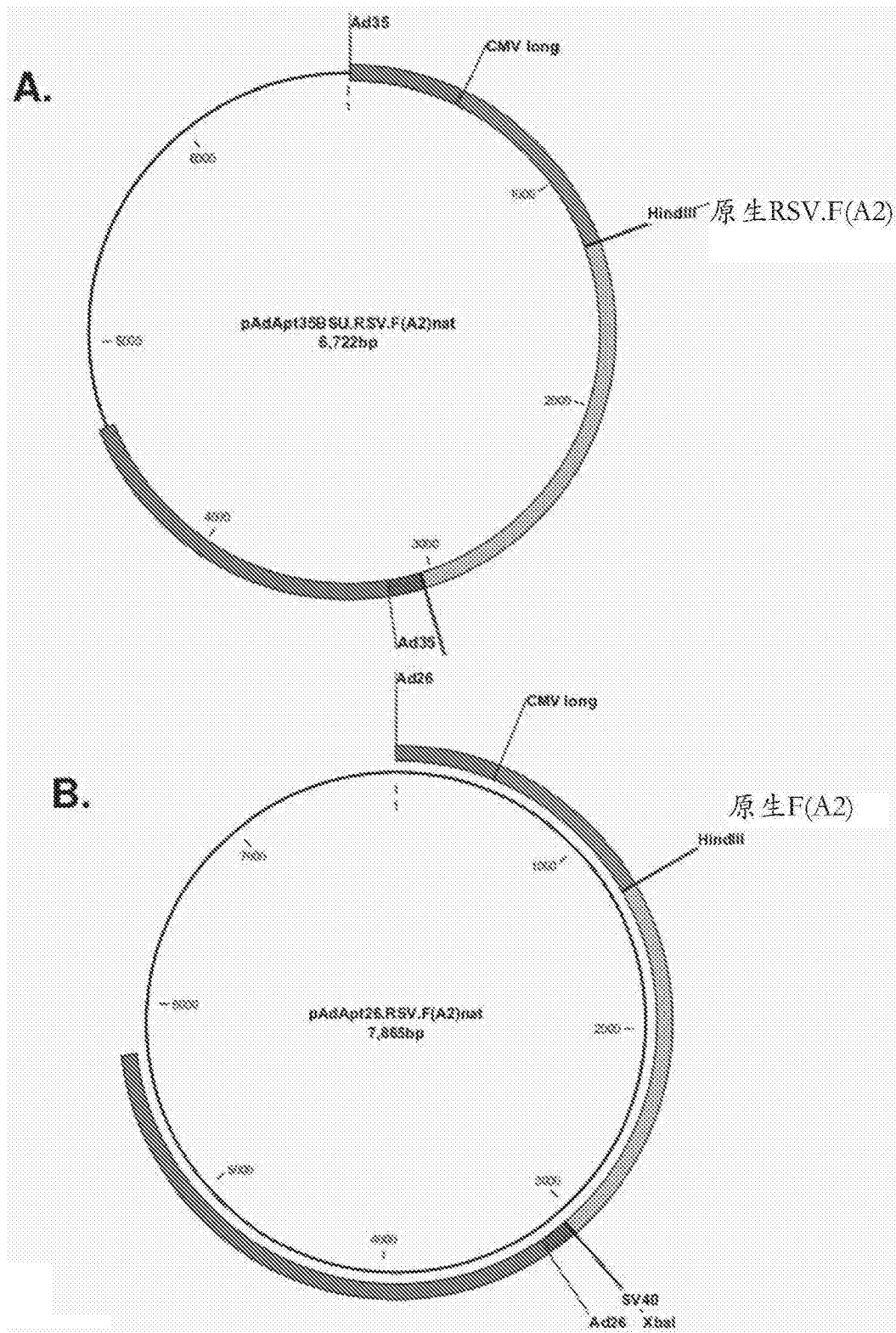


图15

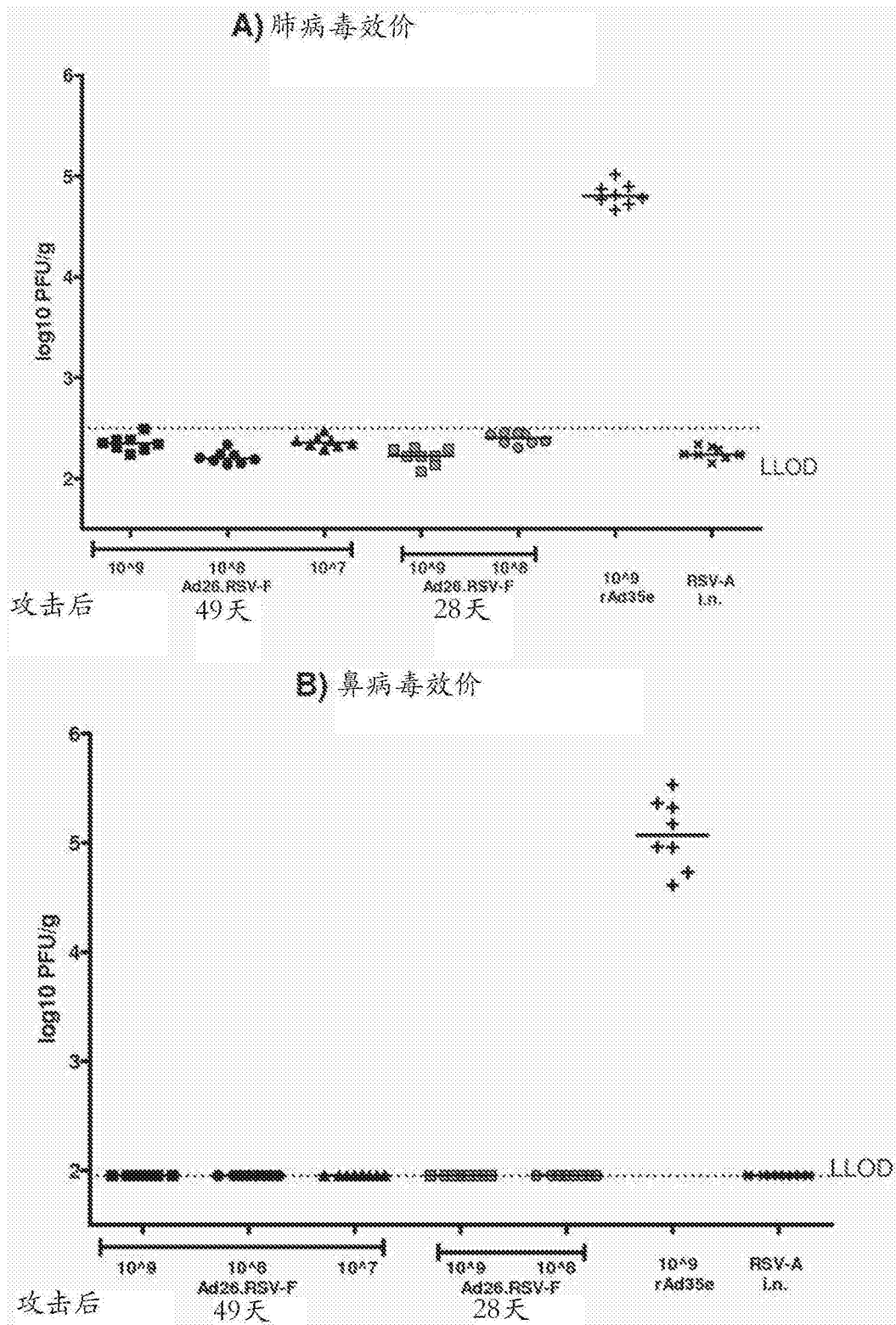


图16

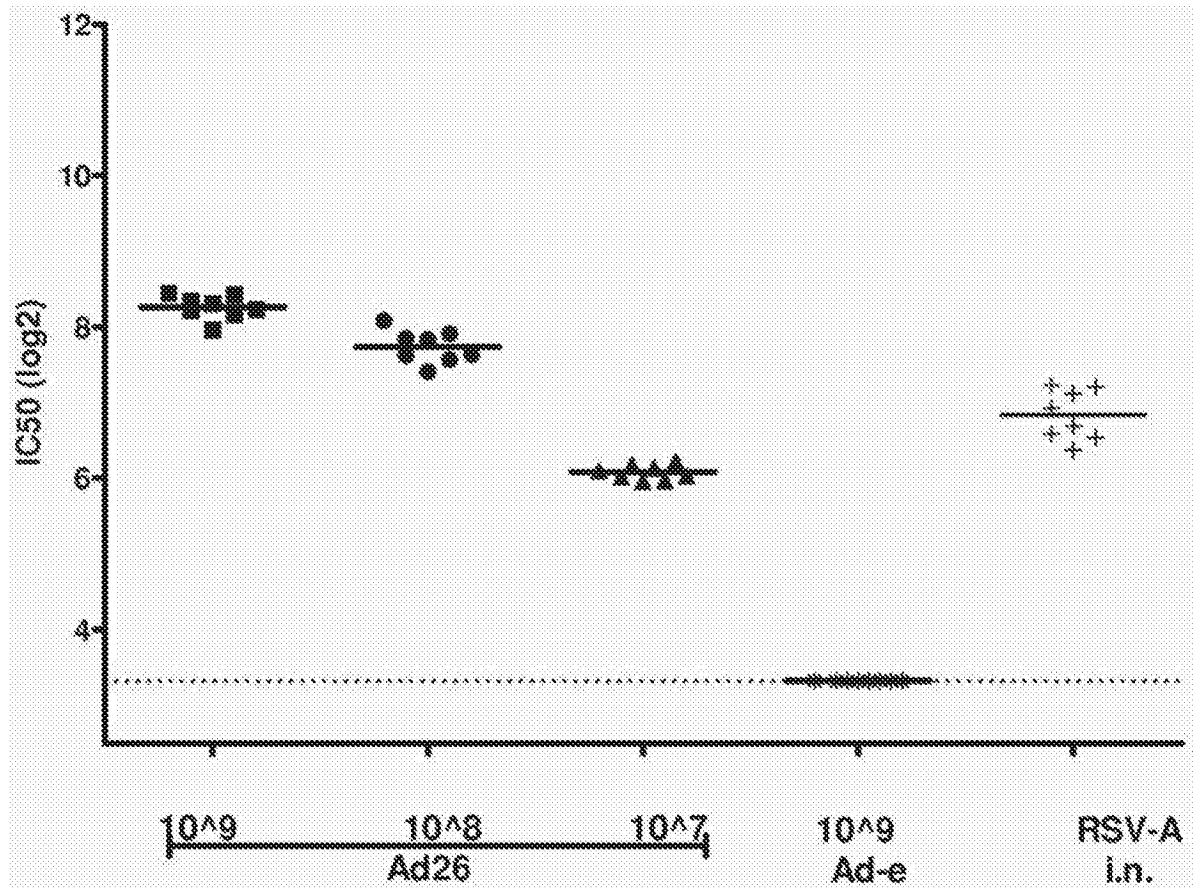


图17

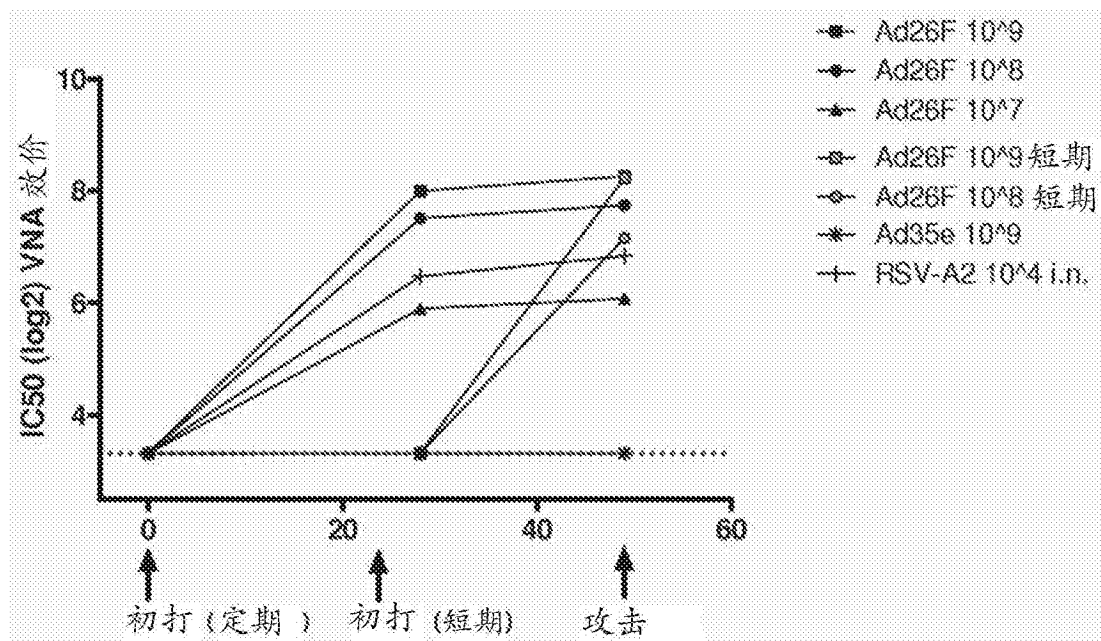


图18

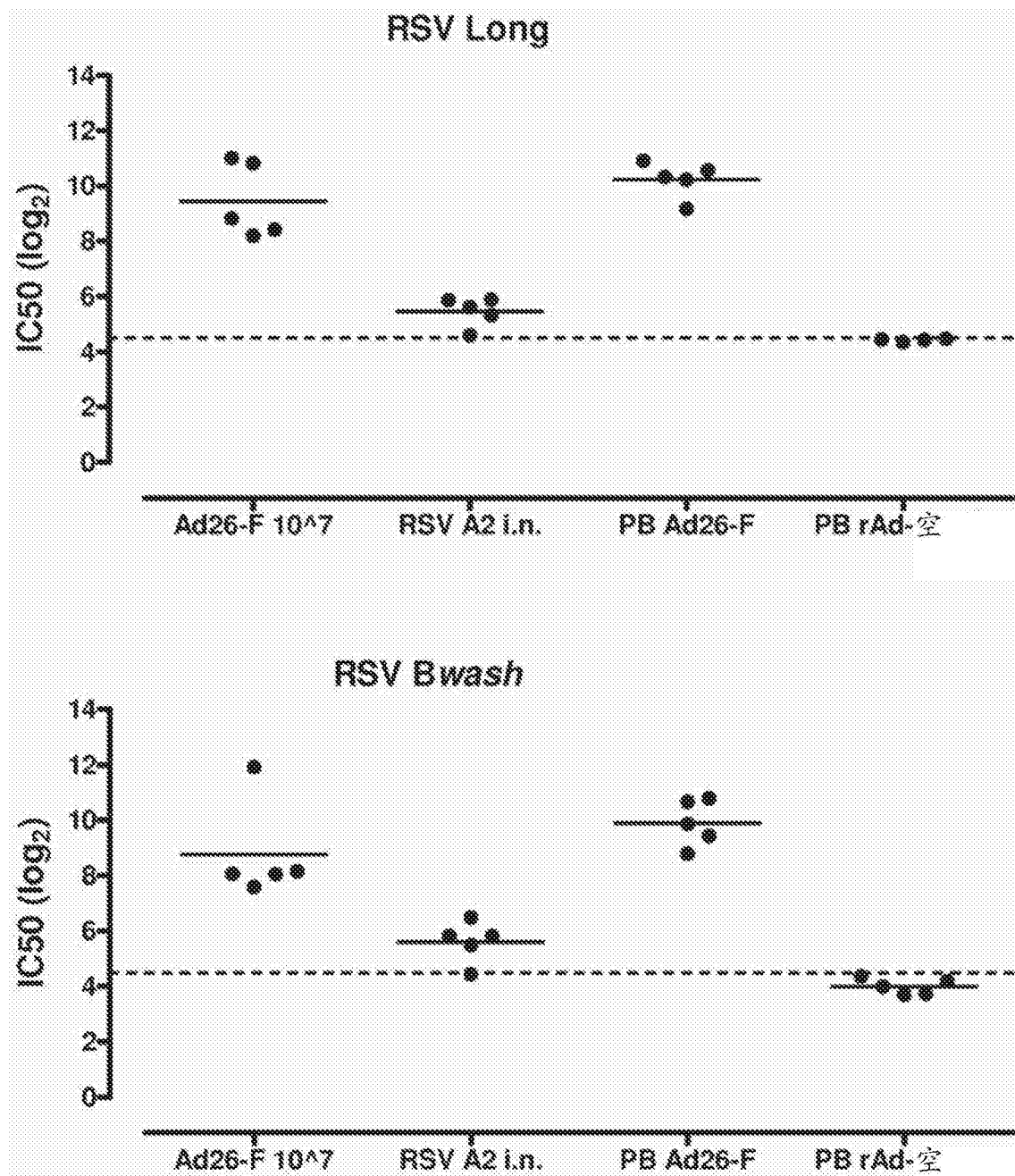


图19

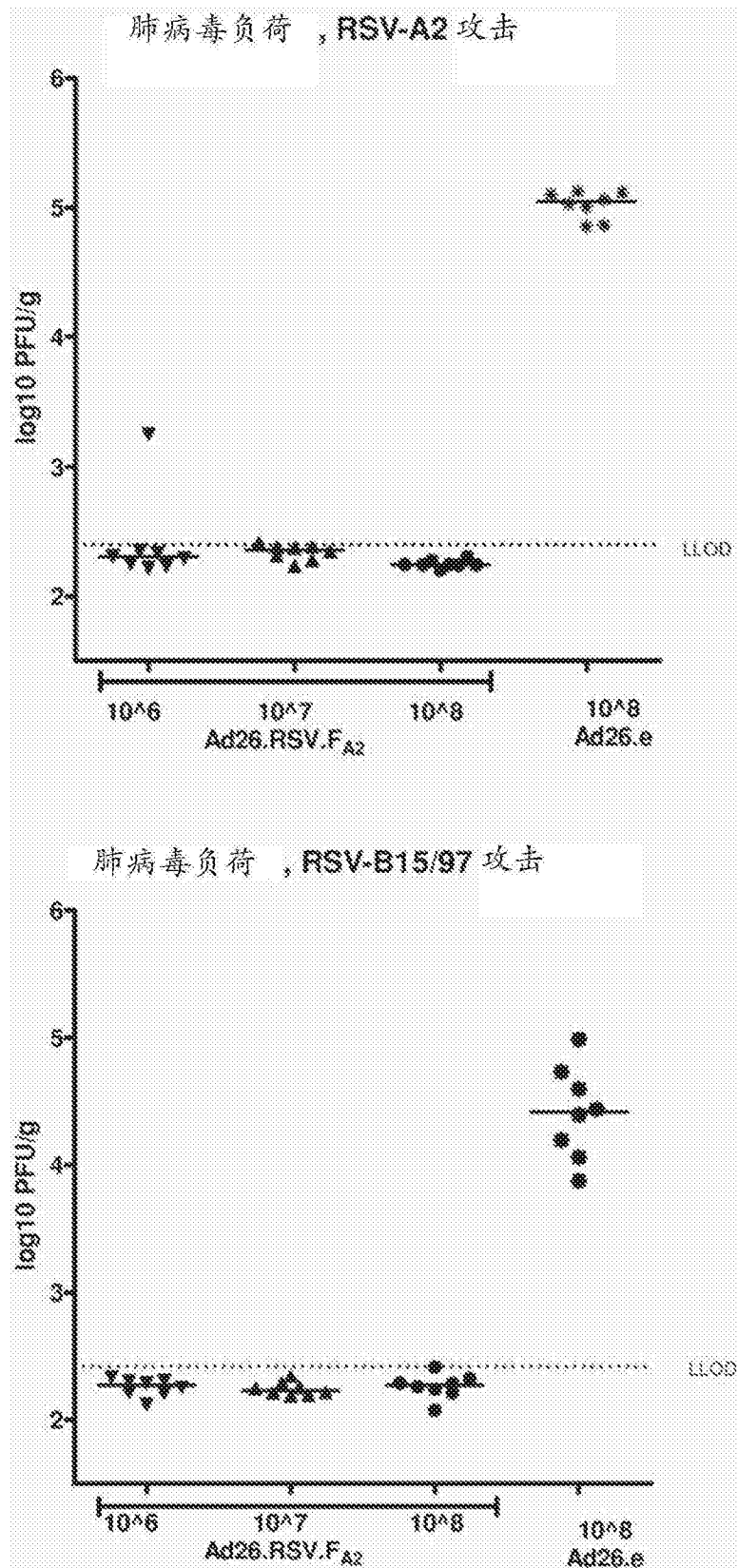


图20

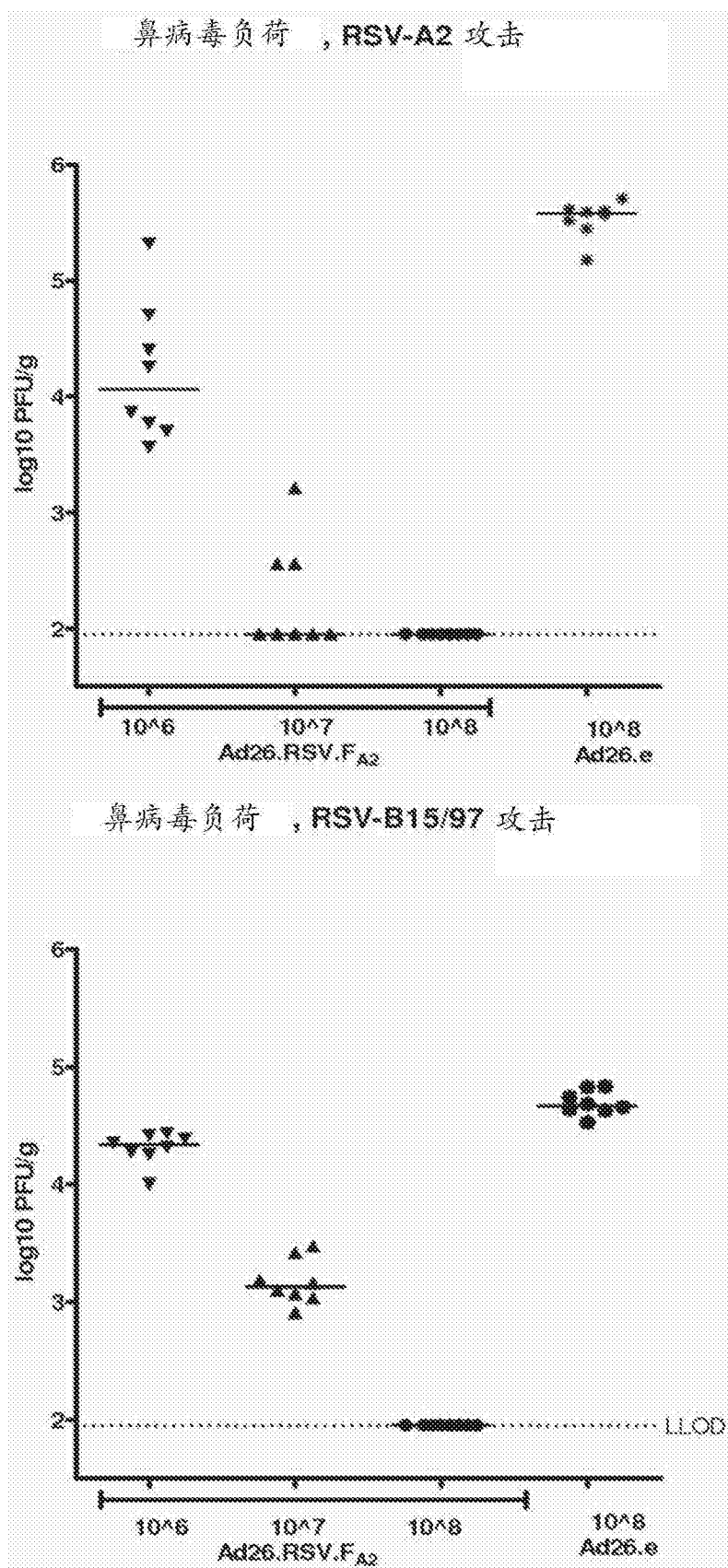


图21

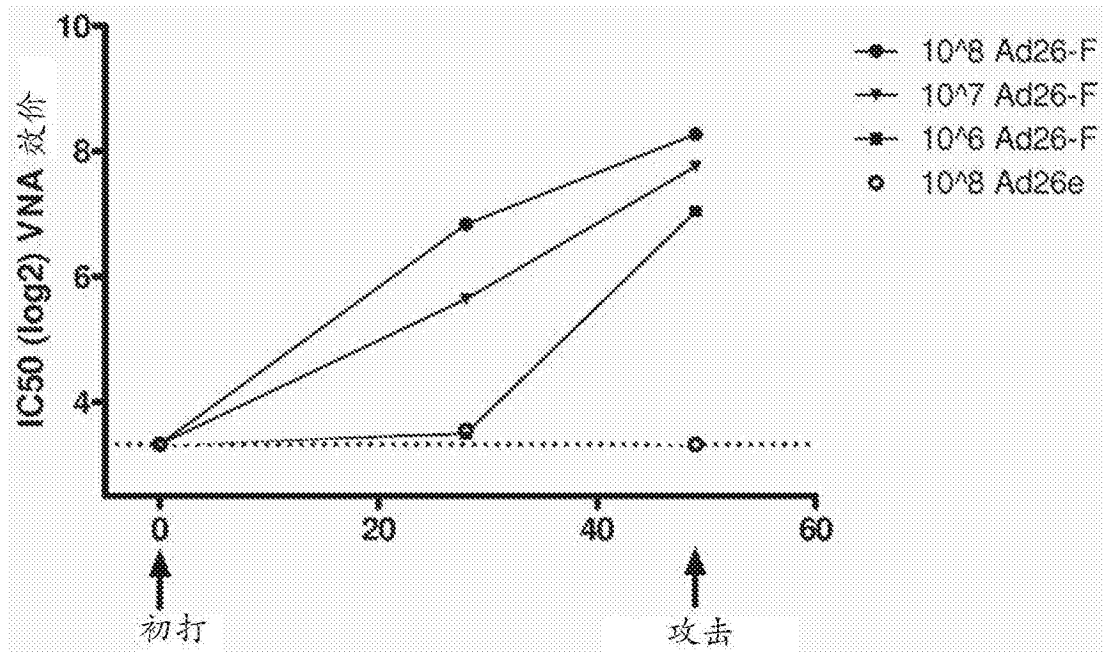


图22

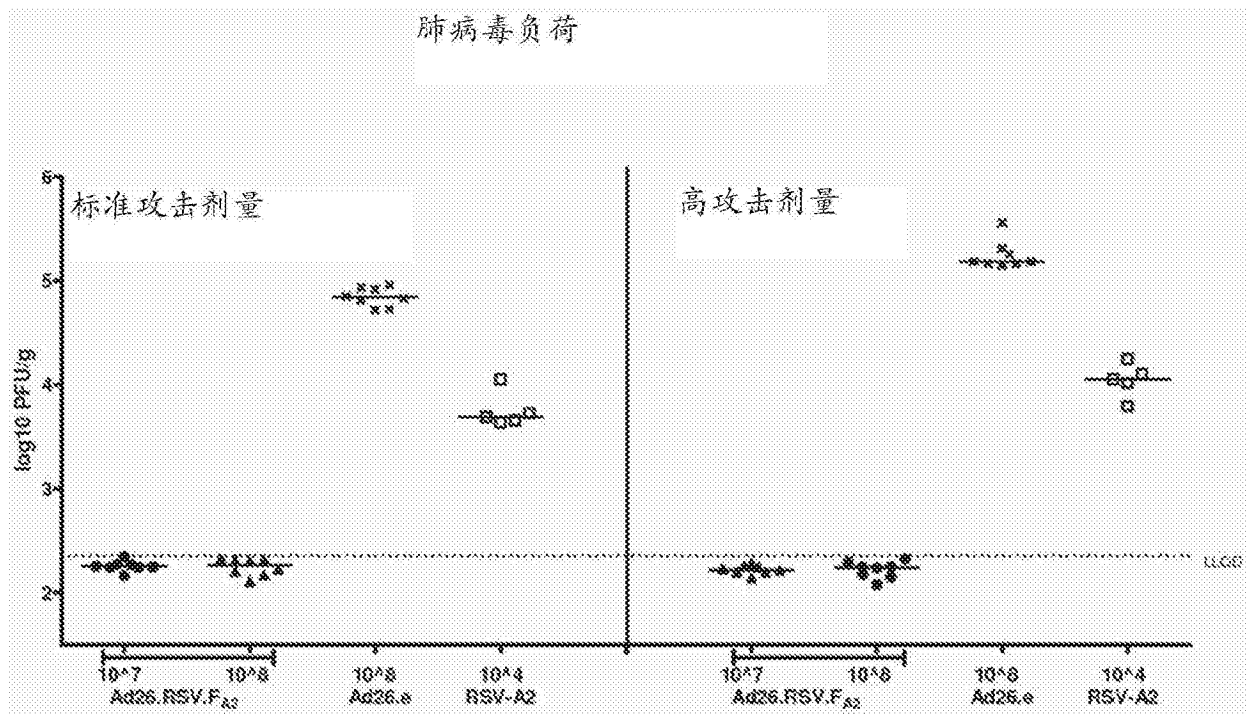


图23

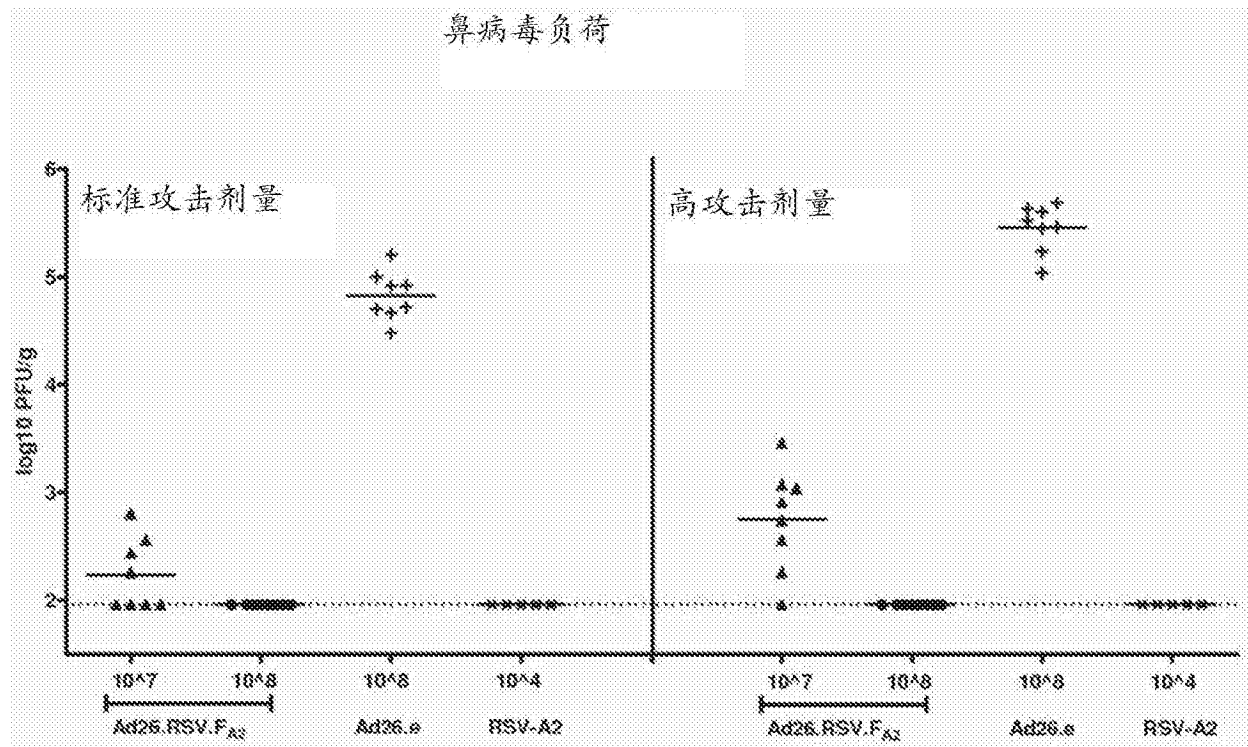


图24

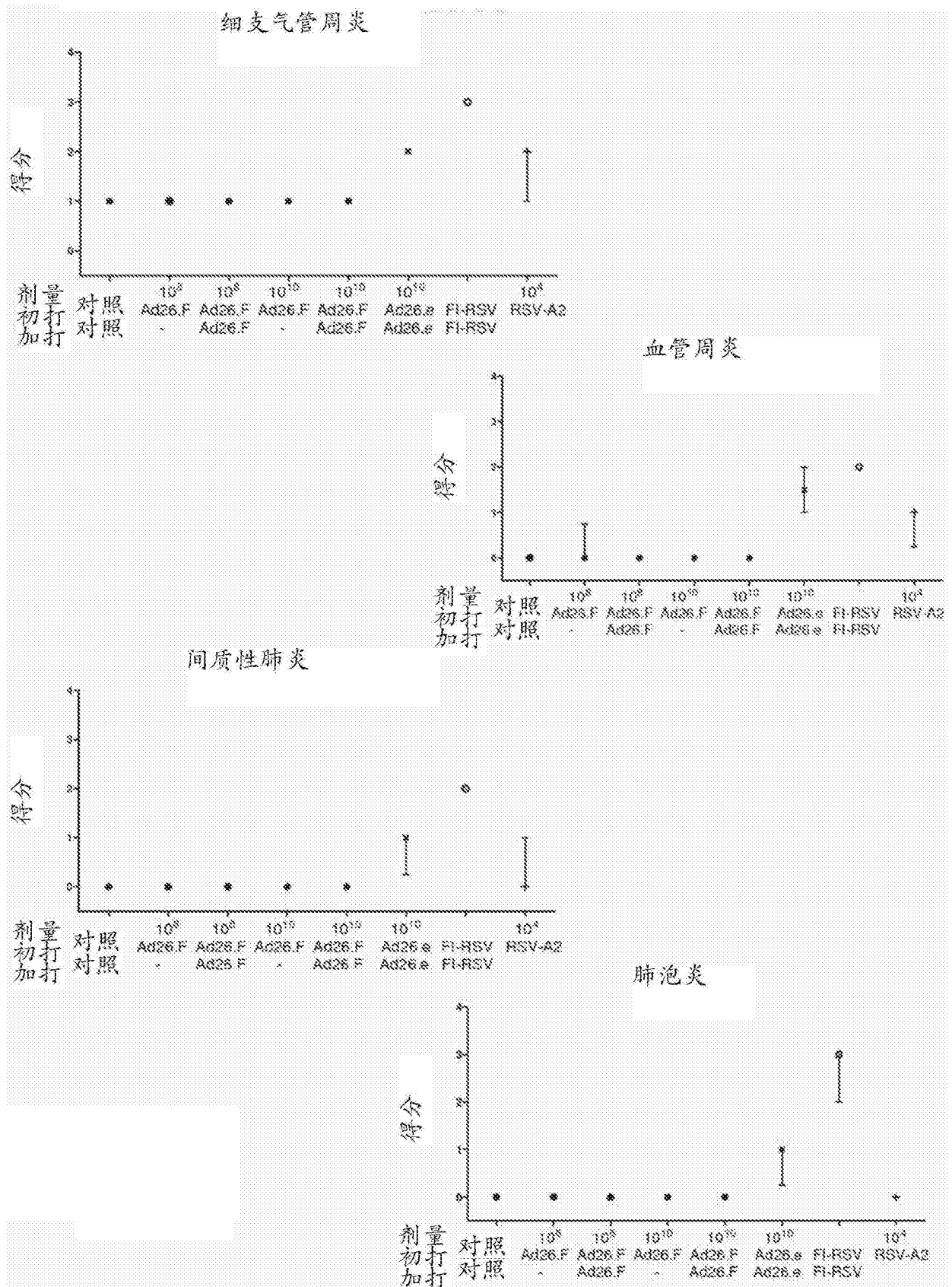


图28

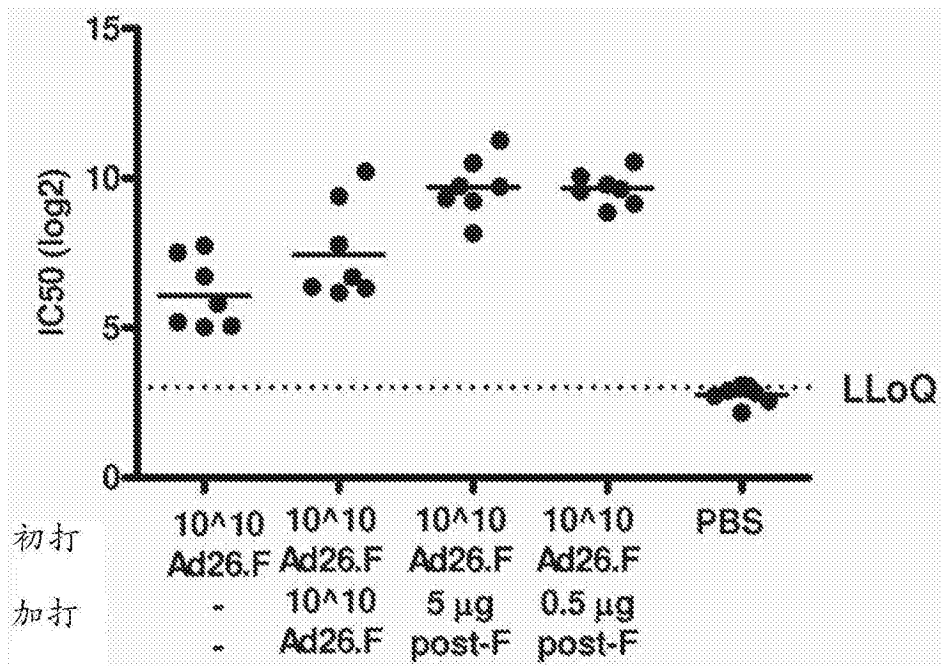


图29

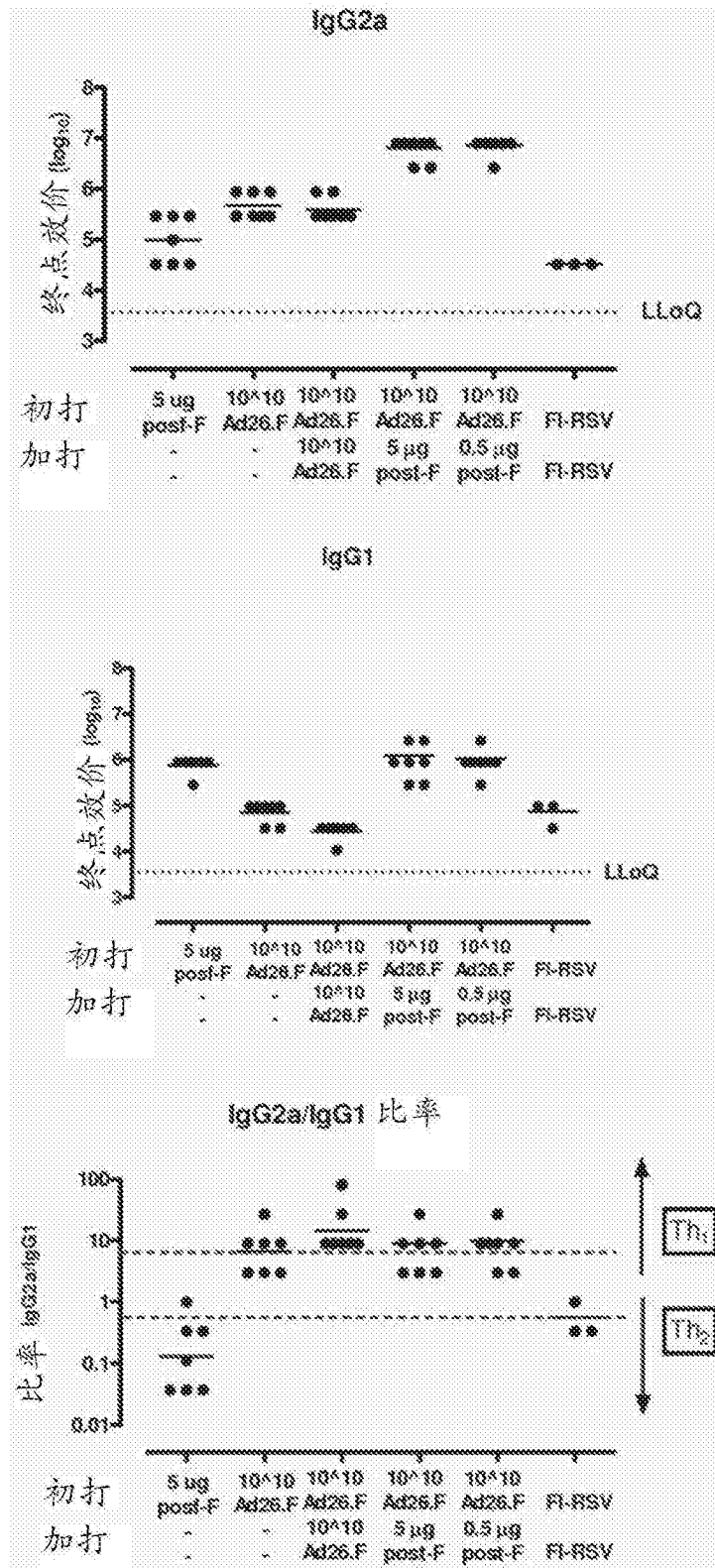


图30

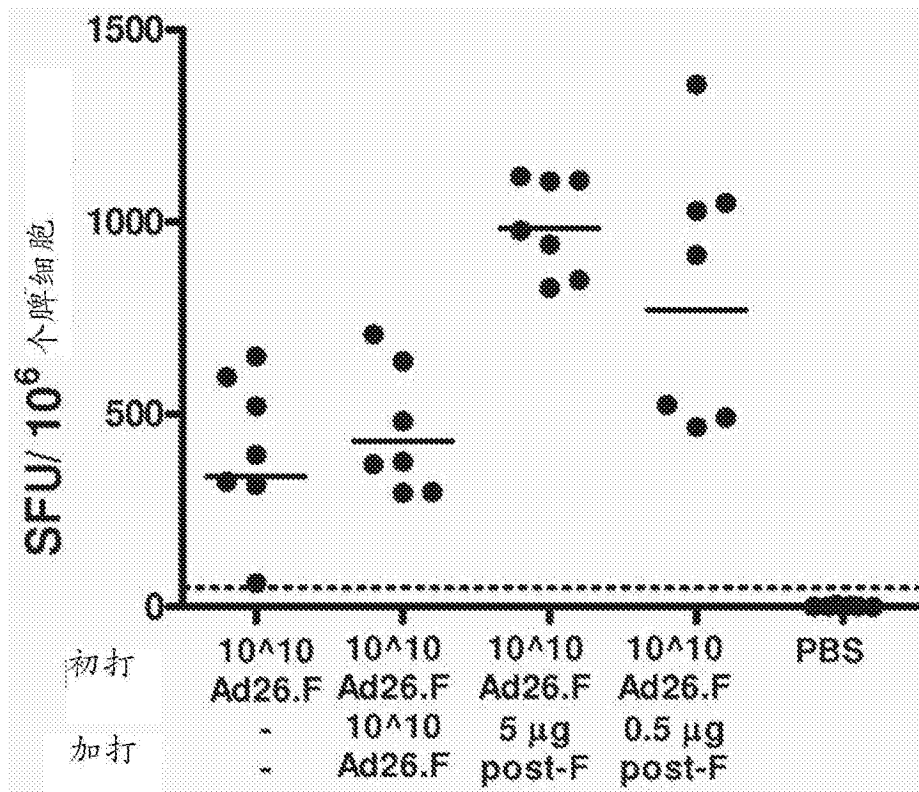


图31