



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102438658 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 02

(21) 申请号 201080020498. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 13

A61K 48/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/00 (2006. 01)

61/160, 285 2009. 03. 13 US

C12N 15/86 (2006. 01)

61/166, 769 2009. 04. 05 US

C12N 7/01 (2006. 01)

61/167, 088 2009. 04. 06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/027262 2010. 03. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02010/105251 EN 2010. 09. 16

(71) 申请人 莱蒂恩公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 博诺·卓普里克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 9 页 说明书 15 页 附图 22 页

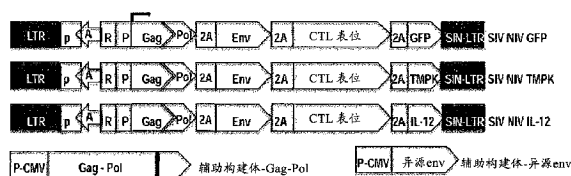
(54) 发明名称

非整合型逆转录病毒载体疫苗

(57) 摘要

本发明涉及非整合型、非复制型逆转录病毒载体, 当向动物宿主施用时在宿主中引起免疫反应。载体转导宿主中的细胞, 在那里它们产生病毒样颗粒 (VLP), 所述病毒样颗粒在从细胞释放时在宿主中刺激另外的免疫反应。载体是非整合型、非复制型逆转录病毒载体, 包括长末端重复序列、包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。还公开了制造和使用所述载体的方法。

NIV 构建体



p = Psi

A = AS

R = RRE

CTL 表位 = VPx/Vpr/Vif/Nef*/Tat/Rev/CTL

1. 一种非整合型、非复制型逆转录病毒载体,所述非整合型、非复制型逆转录病毒载体包括长末端重复序列、包装序列、和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。

2. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述载体由不含有整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因的辅助构建体包装。

3. 如权利要求 1 所述的载体,所述载体还包括逆转录病毒 pol 基因,所述逆转录病毒 pol 基因包括不编码功能性整合酶蛋白的突变的整合酶序列。

4. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述结构蛋白由逆转录病毒 gag 基因所编码,所述载体还包括逆转录病毒 pol 基因,所述逆转录病毒 pol 基因包括不编码功能性整合酶蛋白的突变的整合酶序列。

5. 如权利要求 1 所述的载体,其中当所述多核苷酸序列在被所述载体转导的细胞中表达时,所述结构蛋白自组装为病毒样颗粒 (VLP)。

6. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述载体包括自我失活型 (SIN) 载体。

7. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述病毒选自慢病毒、流感病毒、肝炎病毒、甲病毒、丝状病毒和黄病毒组成的组。

8. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述病毒选自 HIV-1、SIV、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型肝炎病毒、依波拉病毒、马尔堡病毒和登革热病毒组成的组。

9. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述结构蛋白是所述病毒的衣壳。

10. 如权利要求 9 所述的载体,其中所述结构蛋白还包括所述病毒的包膜。

11. 如权利要求 10 所述的载体,其中所述衣壳蛋白和所述包膜蛋白来源于单一类型的病毒。

12. 如权利要求 10 所述的载体,其中所述衣壳蛋白来自一种类型的病毒,所述包膜蛋白来自另一种类型的病毒。

13. 如权利要求 10 所述的载体,其中所述衣壳蛋白来自一种类型的病毒,所述包膜蛋白来自多种类型的病毒。

14. 如权利要求 13 所述的载体,其中所述多种类型的包膜蛋白来源于同一类型病毒的不同株系。

15. 如权利要求 10 所述的载体,其中所述包膜蛋白来源于不同病毒类型的不同株系。

16. 如权利要求 1 所述的载体,所述载体包括编码异源蛋白的异源多核苷酸序列。

17. 如权利要求 16 所述的载体,其中所述异源蛋白是异源包膜蛋白。

18. 如权利要求 16 所述的载体,其中所述异源包膜蛋白是能够用逆转录病毒载体假型包装的任何包膜蛋白。

19. 如权利要求 1 所述的载体,所述载体包括编码抗原、免疫调节蛋白、RNAi 或能够诱导细胞死亡的多肽的异源多核苷酸序列。

20. 如权利要求 16 所述的载体,其中所述异源蛋白是哺乳动物中疾病进程所涉及的因子。

21. 如权利要求 19 所述的载体,其中所述抗原来自病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。

22. 如权利要求 16 所述的载体,其中所述异源蛋白是肿瘤抗原。

23. 如权利要求 22 所述的载体,其中所述肿瘤抗原是细胞膜蛋白。

24. 如权利要求 16 所述的载体,其中所述异源蛋白是免疫调节蛋白。
25. 如权利要求 24 所述的载体,其中所述免疫调节蛋白是细胞因子或抗体。
26. 如权利要求 25 所述的载体,其中所述细胞因子选自由白介素、干扰素和肿瘤坏死因子组成的组。
27. 如权利要求 25 所述的载体,其中所述细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。
28. 如权利要求 19 所述的载体,其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK、TK 或 dCK。
29. 如权利要求 19 所述的载体,其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK。
30. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述多核苷酸序列是密码子优化的或密码子简并的,其中所述密码子选择为从天然型改变的。
31. 如权利要求 1-30 中任一项所述的载体,其中所述载体是 γ 逆转录病毒载体。
32. 如权利要求 31 所述的 γ 逆转录病毒载体,其中所述载体从鼠白血病病毒或猫白血病病毒构建。
33. 如权利要求 32 所述的载体,其中所述鼠白血病病毒是莫洛尼鼠白血病病毒。
34. 如权利要求 1-30 中任一项所述的载体,其中所述逆转录病毒载体是慢病毒载体。
35. 如权利要求 34 所述的载体,其中所述慢病毒载体是 HIV 载体或 SIV 载体。
36. 如权利要求 35 所述的载体,其中所述载体是 HIV-1 载体。
37. 如权利要求 34 所述的载体,其中所述病毒选自由慢病毒、流感病毒、肝炎病毒、丝状病毒和黄病毒组成的组。
38. 如权利要求 34 所述的载体,其中所述病毒选自由 HIV-1、SIV、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型肝炎病毒、依波拉病毒、马尔堡病毒和登革热病毒组成的组。
39. 如权利要求 34 所述的载体,其中所述结构蛋白选自由 HIV gag 蛋白、流感基质蛋白和肝炎核心蛋白组成的组。
40. 如权利要求 34 所述的载体,其中所述结构蛋白由 HIV gag 基因所编码。
41. 如权利要求 40 所述的载体,所述载体还包括逆转录病毒 pol 基因,所述逆转录病毒 pol 基因包括不编码功能性整合酶蛋白的突变的整合酶序列。
42. 如权利要求 34 所述的载体,所述载体还包括编码联合 HIV 分化体或株系的主要 CTL 表位的多肽的多核苷酸序列。
43. 如权利要求 34 所述的载体,所述载体包括编码异源蛋白的异源多核苷酸序列。
44. 如权利要求 43 所述的载体,其中所述异源蛋白是异源包膜蛋白。
45. 如权利要求 44 所述的载体,其中所述异源包膜蛋白是能够用慢病毒载体假型包装的任何包膜蛋白。
46. 如权利要求 34 所述的载体,其中所述异源包膜蛋白包括与所述病毒衣壳蛋白来自不同病毒的包膜蛋白。
47. 如权利要求 46 所述的载体,其中所述病毒选自由慢病毒、流感病毒、肝炎病毒、丝状病毒和黄病毒组成的组。
48. 如权利要求 47 所述的载体,其中所述病毒衣壳蛋白包括 HIV 衣壳蛋白。
49. 如权利要求 48 所述的载体,其中所述病毒选自由 HIV-1、SIV、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型肝炎病毒、依波拉病毒、马尔堡病毒和登革热病毒组成的组。

50. 如权利要求 34 所述的载体,所述载体包括编码抗原、免疫调节蛋白、RNAi 或能够诱导细胞死亡的基因的异源多核苷酸序列。

51. 如权利要求 43 所述的载体,其中所述异源蛋白是哺乳动物中的疾病进程中涉及的因子。

52. 如权利要求 50 所述的载体,其中所述抗原来自病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。

53. 如权利要求 43 所述的载体,其中所述异源蛋白是肿瘤抗原。

54. 如权利要求 53 所述的载体,其中所述肿瘤抗原是细胞膜蛋白。

55. 如权利要求 43 所述的载体,其中所述异源蛋白是免疫调节蛋白。

56. 如权利要求 50 所述的载体,其中所述免疫调节蛋白是细胞因子或抗体。

57. 如权利要求 56 所述的载体,其中所述细胞因子选自由白介素、干扰素和肿瘤坏死因子组成的组。

58. 如权利要求 56 所述的载体,其中所述细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。

59. 如权利要求 34 所述的载体,所述载体包括不能编码功能性蛋白的整合酶基因。

60. 如权利要求 59 所述的载体,其中所述整合酶基因编码在氨基酸 D64、D116 和 E152 中的至少一处具有突变的整合酶蛋白。

61. 如权利要求 60 所述的载体,其中所述突变的整合酶蛋白包括 D64 突变。

62. 如权利要求 60 所述的载体,所述载体还包括抗 Pol 反义序列。

63. 如权利要求 62 所述的载体,其中所述序列长约 800 个核苷酸。

64. 如权利要求 59 所述的载体,其中所述载体包括自我失活型 (SIN) 载体。

65. 如权利要求 64 所述的载体,所述载体还包括编码抗原、免疫调节蛋白、RNAi 或能够诱导细胞死亡的多肽的异源多核苷酸序列。

66. 如权利要求 65 所述的载体,其中所述抗原来自病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。

67. 如权利要求 43 所述的载体,其中所述异源蛋白是肿瘤抗原。

68. 如权利要求 67 所述的载体,其中所述肿瘤抗原是细胞膜蛋白。

69. 如权利要求 43 所述的载体,其中所述异源蛋白是免疫调节蛋白。

70. 如权利要求 69 所述的载体,其中所述免疫调节蛋白是细胞因子或抗体。

71. 如权利要求 70 所述的载体,其中所述细胞因子选自由白介素、干扰素和肿瘤坏死因子组成的组。

72. 如权利要求 70 所述的载体,其中所述细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。

73. 如权利要求 65 所述的载体,其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK、TK 或 dCK。

74. 如权利要求 65 所述的载体,其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK。

75. 如权利要求 64 所述的载体,所述载体还包括用于选自由以下组成的组的至少一种基因的至少一种高度活性的启动子:Gag、Env、Rev、Tat、Vpu、Vpr 和 Nef。

76. 如权利要求 75 所述的载体,其中所述启动子选自由 EF-1 α 、CMV 和 MND 组成的组。

77. 如权利要求 64 所述的载体,所述载体还包括编码联合不同的 HIV 分化体或株系的主要 CTL 表位的多肽的多核苷酸序列。

78. 如权利要求 59 所述的载体,其中所述载体是 HIV 载体,所述多核苷酸序列是 HIV gag 序列。

79. 一种哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞包括如权利要求 35 所述的载体。
80. 如权利要求 79 所述的哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞包括猿猴细胞。
81. 如权利要求 80 所述的哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞包括人类细胞。
82. 一种质粒,所述质粒包括逆转录病毒长末端重复序列、逆转录病毒包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。
83. 如权利要求 82 所述的质粒,其中所述逆转录病毒序列是慢病毒序列。
84. 如权利要求 83 所述的质粒,其中所述慢病毒序列是 HIV 序列。
85. 一种包装细胞,所述包装细胞包括如权利要求 82-84 中任一项所述的质粒和辅助构建体,所述辅助构建体不含有整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因。
86. 如权利要求 85 所述的包装细胞,其中所述细胞包括哺乳动物细胞。
87. 如权利要求 86 所述的包装细胞,其中所述哺乳动物细胞包括猿猴细胞。
88. 如权利要求 86 所述的包装细胞,其中所述哺乳动物细胞包括人类细胞。
89. 一种生产细胞,所述生产细胞包括如权利要求 82-84 中任一项所述的质粒和辅助构建体,所述辅助构建体不含有整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因。
90. 如权利要求 89 所述的生产细胞,其中所述细胞包括哺乳动物细胞。
91. 如权利要求 90 所述的生产细胞,其中所述哺乳动物细胞包括猿猴细胞。
92. 如权利要求 90 所述的生产细胞,其中所述哺乳动物细胞包括人类细胞。
93. 一种生产细胞,所述生产细胞包括如权利要求 34 所述的载体。
94. 如权利要求 93 所述的生产细胞,其中所述细胞包括哺乳动物细胞。
95. 如权利要求 94 所述的生产细胞,其中所述哺乳动物细胞包括猿猴细胞。
96. 如权利要求 94 所述的生产细胞,其中所述哺乳动物细胞包括人类细胞。
97. 一种非复制型、非整合型逆转录病毒载体,所述非复制型、非整合型逆转录病毒载体由如权利要求 89 所述的生产细胞所产生。
98. 一种制造包装细胞的方法,所述方法包括利用如权利要求 82-84 中任一项所述的质粒转染哺乳动物细胞。
99. 一种制造生产细胞的方法,所述方法包括利用如权利要求 82-84 中任一项所述的质粒转染哺乳动物细胞。
100. 一种产生非复制型、非整合型逆转录病毒载体的方法,所述方法包括在培养基中培养如权利要求 89 所述的生产细胞并回收由所述细胞产生的载体。
101. 一种在哺乳动物中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在哺乳动物中引起免疫反应的量向哺乳动物递送如权利要求 1-30 中任一项所述的逆转录病毒载体。
102. 如权利要求 101 所述的方法,其中所述载体是皮下递送或肌肉内递送的。
103. 如权利要求 101 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
104. 如权利要求 101 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
105. 如权利要求 101 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
106. 如权利要求 101 所述的方法,其中所述逆转录病毒载体在哺乳动物中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的包括所述病毒的结构蛋白的 VLP,以在哺乳动物中引起进一步的免疫反应。
107. 如权利要求 106 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。

108. 如权利要求 106 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
109. 如权利要求 106 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
110. 一种在哺乳动物中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在哺乳动物中引起免疫反应的量向哺乳动物递送如权利要求 34 所述的慢病毒载体。
111. 如权利要求 110 所述的方法,其中所述载体是皮下递送或肌肉内递送的。
112. 如权利要求 110 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
113. 如权利要求 110 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
114. 如权利要求 110 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
115. 如权利要求 110 所述的方法,其中所述逆转录病毒载体在哺乳动物中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的包括所述病毒的结构蛋白的 VLP,以在哺乳动物中引起进一步的免疫反应。
116. 如权利要求 115 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
117. 如权利要求 115 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
118. 如权利要求 115 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
119. 一种药物组合物,所述药物组合物包括药学上可接受的运载体中的如权利要求 1-30 中任一项所述的载体。
120. 如权利要求 119 所述的组合物,其中所述运载体是包括乳糖、蔗糖或海藻糖的等渗缓冲液。
121. 如权利要求 120 所述的组合物,所述组合物还包括佐剂。
122. 如权利要求 121 所述的组合物,其中所述佐剂包括明矾、脂质、水、缓冲剂、肽、多核苷酸、聚合物或油中的一种或多种。
123. 一种药物组合物,所述药物组合物包括药学上可接受的运载体中的如权利要求 35 所述的载体。
124. 如权利要求 123 所述的药物组合物,所述药物组合物包括来源于一种 HIV 株系的至少一种载体和来源于另一种 HIV 株系的至少一种载体。
125. 一种在哺乳动物中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在哺乳动物中引起免疫反应的量向哺乳动物递送如权利要求 123 所述的药物组合物。
126. 如权利要求 125 所述的方法,其中所述载体是皮下递送的或肌肉内递送的。
127. 如权利要求 125 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
128. 如权利要求 125 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
129. 如权利要求 125 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
130. 如权利要求 125 所述的方法,其中所述逆转录病毒载体在哺乳动物中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的包括所述病毒的结构蛋白的 VLP,以在哺乳动物中引起进一步的免疫反应。
131. 如权利要求 130 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
132. 如权利要求 130 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
133. 如权利要求 130 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
134. 一种 VLP,所述 VLP 包括病毒的结构蛋白。
135. 如权利要求 134 所述的 VLP,其中所述结构蛋白包括所述病毒的衣壳。

136. 如权利要求 135 所述的 VLP, 其中所述结构蛋白还包括所述病毒的包膜。
137. 如权利要求 135 所述的 VLP, 所述 VLP 包括异源包膜蛋白。
138. 如权利要求 134 所述的 VLP, 其中所述 VLP 包括来自单一类型的病毒的衣壳蛋白和包膜蛋白。
139. 如权利要求 134 所述的 VLP, 其中所述 VLP 包括来自一种类型的病毒的衣壳蛋白和来自多种类型的病毒的包膜蛋白。
140. 如权利要求 134 所述的 VLP, 其中所述多种类型的包膜蛋白来源于同一类型的病毒的不同株系。
141. 如权利要求 134 所述的 VLP, 其中所述包膜蛋白来源于不同病毒类型的不同株系。
142. 如权利要求 134 所述的 VLP, 其中所述衣壳是 HIV 衣壳。
143. 如权利要求 142 所述的 VLP, 所述 VLP 还包括 HIV 基质。
144. 如权利要求 143 所述的 VLP, 所述 VLP 还包括 HIV 核衣壳。
145. 如权利要求 134-144 中任一项所述的 VLP, 所述 VLP 还包括选自由抗原、免疫调节蛋白或能够诱导细胞死亡的多肽组成的组的异源多肽。
146. 如权利要求 145 所述的载体, 其中所述抗原来自病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。
147. 如权利要求 145 所述的载体, 其中所述抗原是肿瘤抗原。
148. 如权利要求 147 所述的载体, 其中所述肿瘤抗原是细胞膜蛋白。
149. 如权利要求 145 所述的载体, 所述载体包括免疫调节蛋白。
150. 如权利要求 149 所述的载体, 其中所述免疫调节蛋白是细胞因子或抗体。
151. 如权利要求 150 所述的载体, 其中所述细胞因子选自由白介素、干扰素和肿瘤坏死因子组成的组。
152. 如权利要求 150 所述的载体, 其中所述细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。
153. 如权利要求 145 所述的载体, 其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK、TK 或 dCK。
154. 如权利要求 145 所述的载体, 其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK。
155. 一种 VLP, 所述 VLP 通过包括利用如权利要求 34 所述的载体在体内感染哺乳动物细胞的步骤的方法产生。
156. 如权利要求 155 所述的 VLP, 其中所述哺乳动物细胞是人类细胞。
157. 一种 HIV VLP, 所述 HIV VLP 通过由利用如权利要求 35 所述的载体在体内感染哺乳动物细胞的步骤组成的方法产生。
158. 如权利要求 157 所述的 VLP, 其中所述哺乳动物细胞是人类细胞。
159. 一种非整合型、非复制型慢病毒载体, 所述非整合型、非复制型慢病毒载体包括 HIV 长末端重复序列、HIV 包装序列和与 HIV gag 基因可操作地连接的异源启动子。
160. 如权利要求 159 所述的载体, 所述载体还包括 HIV env 基因和 HIV pol 基因, 所述 pol 基因包括不编码功能性整合酶蛋白的突变的整合酶序列。
161. 如权利要求 160 所述的载体, 所述载体还包括异源的 env 基因。
162. 如权利要求 161 所述的载体, 其中所述异源的 env 基因选自由 VSV-G env 基因、甲型流感病毒 env 基因、乙型流感病毒 env 基因、丙型肝炎病毒 env 基因、依波拉病毒 env 基

因、马尔堡病毒 env 基因和登革热病毒 env 基因组成的组。

163. 如权利要求 161 所述的载体,所述载体还包括编码抗原、免疫调节蛋白、RNAi 或能够诱导细胞死亡的多肽的异源多核苷酸序列。

164. 如权利要求 163 所述的载体,其中所述抗原来自病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。

165. 如权利要求 163 所述的载体,其中所述抗原是肿瘤抗原。

166. 如权利要求 165 所述的载体,其中所述肿瘤抗原是细胞膜蛋白。

167. 如权利要求 163 所述的载体,其中所述免疫调节蛋白是抗体。

168. 如权利要求 163 所述的载体,其中所述免疫调节蛋白是细胞因子。

169. 如权利要求 168 所述的载体,其中所述细胞因子选自白介素、干扰素和肿瘤坏死因子组成的组。

170. 如权利要求 168 所述的载体,其中所述细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。

171. 如权利要求 163 所述的载体,其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK、TK 或 dCK。

172. 如权利要求 163 所述的载体,其中所述能够诱导细胞死亡的多肽包括 TMPK。

173. 一种在人类中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在人类中引起免疫反应的量向人类递送如权利要求 159-172 中任一项所述的载体。

174. 如权利要求 173 所述的方法,其中所述载体在人类中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的 VLP 以在人类中引起进一步的免疫反应。

175. 一种药物组合物,所述药物组合物包括药学上可接受的运载体中的如权利要求 159-172 中任一项所述的载体。

176. 如权利要求 175 所述的组合物,其中所述运载体是包括乳糖、蔗糖或海藻糖的等渗缓冲液。

177. 如权利要求 176 所述的组合物,所述组合物还包括佐剂。

178. 如权利要求 177 所述的组合物,其中所述佐剂包括明矾、脂质、水、缓冲剂、肽、多核苷酸、聚合物或油中的一种或多种。

179. 如权利要求 179 所述的药物组合物,所述药物组合物包括来源于一种 HIV 株系的至少一种载体和来源于另一种 HIV 株系的至少一种载体。

180. 一种在人类中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在人类中引起免疫反应的量向人类递送如权利要求 175-179 中任一项所述的药物组合物。

181. 如权利要求 180 所述的方法,其中所述药物组合物中的载体在人类中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的 VLP 以在人类中引起进一步的免疫反应。

182. 一种生产细胞,所述生产细胞包括权利要求 35 所述的载体。

183. 如权利要求 182 所述的生产细胞,其中所述细胞包括哺乳动物细胞。

184. 如权利要求 183 所述的生产细胞,其中所述哺乳动物细胞包括猿猴细胞。

185. 如权利要求 183 所述的生产细胞,其中所述哺乳动物细胞包括人类细胞。

186. 一种在哺乳动物中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在哺乳动物中引起免疫反应的量向哺乳动物递送如权利要求 35 所述的慢病毒载体。

187. 如权利要求 186 所述的方法,其中所述载体是皮下递送或肌肉内递送的。

188. 如权利要求 186 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
189. 如权利要求 186 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
190. 如权利要求 186 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
191. 如权利要求 186 所述的方法,其中所述逆转录病毒在哺乳动物中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的包括所述病毒的结构蛋白的 VLP 以在哺乳动物中引起进一步的免疫反应。
192. 如权利要求 191 所述的方法,其中所述哺乳动物是实验室动物。
193. 如权利要求 191 所述的方法,其中所述哺乳动物是非人灵长类。
194. 如权利要求 191 所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。
195. 一种药物组合物,所述药物组合物包括药学上可接受的运载体中的如权利要求 34 所述的载体。
196. 如权利要求 195 所述的组合物,其中所述运载体是包括乳糖、蔗糖或海藻糖的等渗缓冲液。
197. 如权利要求 196 所述的组合物,所述组合物还包括佐剂。
198. 如权利要求 197 所述的组合物,其中所述佐剂包括明矾、脂质、水、缓冲剂、肽、多核苷酸、聚合物或油中的一种或多种。
199. 一种非整合型、非复制型 HIV SIN 载体,所述非整合型、非复制型 HIV SIN 载体包括 HIV LTR、HIV 包装序列和与 HIV gag 序列和 HIV pol 序列可操作地连接的异源启动子,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列。
200. 如权利要求 199 所述的载体,其中所述启动子选自 CMV 启动子、EF1- α 启动子、MND 启动子和 PGK 启动子组成的组。
201. 如权利要求 199 所述的载体,其中所述异源启动子与编码 gp120/41 包膜蛋白的 HIV env 序列可操作地连接。
202. 如权利要求 199 所述的载体,其中所述载体用异源包膜蛋白假型包装。
203. 如权利要求 202 所述的载体,其中所述异源包膜蛋白选自 VSV-G 包膜蛋白和登革热病毒包膜蛋白组成的组。
204. 一种包装细胞,所述包装细胞包括第一构建体和第二构建体,所述第一构建体包括 HIV LTR 序列、HIV 包装序列、与 HIV gag 序列和 HIV pol 序列可操作地连接的异源启动子、和与 HIV env 序列可操作地连接的第二异源启动子,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列;所述第二构建体包括编码异源包膜蛋白的多核苷酸序列。
205. 一种生产细胞,所述生产细胞包括第一构建体和第二构建体,所述第一构建体包括 HIV LTR 序列,HIV 包装序列、与 HIV gag 序列和 HIV pol 序列可操作地连接的异源启动子、和与 HIV env 序列可操作地连接的第二异源启动子,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列;所述第二构建体包括编码异源包膜蛋白的多核苷酸序列。
206. 一种在人类中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在人类中引起免疫反应的量递送如权利要求 199-203 中任一项所述的载体。
207. 如权利要求 206 所述的方法,其中所述载体在人类中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的 VLP 以在人类中引起进一步的免疫反应。
208. 一种非整合型、非复制型 HIV SIN 载体,所述非整合型、非复制型 HIV SIN 载体包

括 HIV LTR、HIV 包装序列和与编码丙型肝炎病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。

209. 如权利要求 208 所述的载体,其中所述启动子选自由 CMV 启动子、EF1- α 启动子、MND 启动子和 PGK 启动子组成的组。

210. 如权利要求 208 所述的载体,其中所述载体用异源包膜蛋白假型包装。

211. 如权利要求 208 所述的载体,其中所述异源包膜蛋白选自由 VSV-G 包膜蛋白或登革热病毒包膜蛋白组成的组。

212. 一种包装细胞,所述包装细胞包括第一构建体、第二构建体和第三构建体,所述第一构建体包括 HIV LTR 序列、HIV 包装序列和与编码丙型肝炎病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子;所述第二构建体包括 HIV gag 序列和 HIV pol 序列,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列;所述第三构建体包括编码异源包膜蛋白的多核苷酸序列。

213. 一种生产细胞,所述生产细胞包括第一构建体、第二构建体和第三构建体,所述第一构建体包括 HIV LTR 序列、HIV 包装序列和与编码丙型肝炎病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子;所述第二构建体包括 HIV gag 序列和 HIV pol 序列,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列;所述第三构建体包括编码异源包膜蛋白的多核苷酸序列。

214. 一种在人类中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在人类中引起免疫反应的量递送如权利要求 208-211 中任一项所述的载体。

215. 如权利要求 214 所述的方法,其中所述载体在人类中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足够量的 VLP 以在人类中引起进一步的免疫反应。

216. 一种非整合型、非复制型 HIV SIN 载体,所述非整合型、非复制型 HIV SIN 载体包括 HIV LTR、HIV 包装序列和与编码登革热病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。

217. 如权利要求 216 所述的载体,其中所述启动子选自由 CMV 启动子、EF1- α 启动子、MND 启动子和 PGK 启动子组成的组。

218. 一种包装细胞,所述包装细胞包括第一构建体和第二构建体,所述第一构建体包括 HIV LTR 序列、HIV 包装序列和与编码登革热病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子;所述第二构建体包括 HIV gag 序列和 HIV pol 序列,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列。

219. 一种生产细胞,所述生产细胞包括第一构建体和第二构建体,所述第一构建体包括 HIV LTR 序列、HIV 包装序列和与编码登革热病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子;所述第二构建体包括 HIV gag 序列和 HIV pol 序列,其中所述 pol 序列包括不编码功能性整合酶蛋白的整合酶序列。

220. 一种在人类中引起免疫反应的方法,所述方法包括以足以在人类中引起免疫反应的量递送如权利要求 216 或 217 所述的载体。

221. 如权利要求 220 所述的方法,其中所述载体在人类中转导细胞,所述被转导的细胞产生并释放足量的 VLP 以在人类中引起进一步的免疫反应。

非整合型逆转录病毒载体疫苗

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 3 月 13 日提交的美国临时专利申请第 61/160,285 号、于 2009 年 4 月 5 日提交的第 61/166,769 号和于 2009 年 4 月 6 日提交的第 61/167,088 号的利益和优先权,其均以其整体在此通过引用并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及疫苗且尤其涉及非整合型、复制缺陷型逆转录病毒载体,当向动物宿主施用其在宿主中诱导免疫反应。本发明的载体还转导宿主中的细胞,在那里它们产生病毒样颗粒 (VLP),所述病毒样颗粒在宿主中刺激另外的免疫反应。

[0004] 背景

[0005] 逆转录病毒载体是本领域中的技术人员熟知的。它们是来源于感染型但非复制型的逆转录病毒的包膜病毒粒子颗粒。它们含有一种或多种可表达的多核苷酸序列。因此,它们能够穿透靶宿主细胞并将可表达的序列运输到该细胞中,在那里使其表达。因为它们经工程化成为非复制型,被转导的细胞不产生另外的载体或感染型逆转录病毒。

[0006] 逆转录病毒是属于逆转录病毒科 (Retrovirida) 的包膜 RNA 病毒。感染宿主细胞后,通过逆转录酶将 RNA 转录为 DNA。然后 DNA 通过整合酶被掺入细胞的基因组中,且此后作为宿主细胞的 DNA 的部分进行复制。逆转录病毒科包括 α 逆转录病毒属 (Alpharetrovirus)、 β 逆转录病毒属 (Betaretrovirus)、 γ 逆转录病毒属 (Gammaretrovirus)、 δ 逆转录病毒属 (Deltaretrovirus)、 ϵ 逆转录病毒属 (Epsilonretrovirus)、慢病毒属 (Lentivirus) 和泡沫病毒属 (Spumavirus)。

[0007] 来源于 γ 逆转录病毒属的逆转录病毒载体是本领域中熟知的且多年来用于向细胞递送基因。这样的载体包括由鼠白血病病毒构建的载体,比如莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney murine leukemia virus),或猫白血病病毒。

[0008] 来源于慢病毒的慢病毒载体也是本领域中熟知的。它们具有超越逆转录病毒载体的优点:能够将它们的基因组整合到非分裂细胞的基因组中。慢病毒包括人免疫缺陷病毒 (HIV)、猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)、牛免疫缺陷病毒、马传染性贫血病病毒、猫免疫缺陷病毒、美洲狮慢病毒、山羊关节炎脑炎病毒和绵羊脱髓鞘性脑白质炎 / 羊慢性进行性肺炎病毒。

[0009] 这些载体作为外源抗原在动物宿主中产生免疫反应。本发明利用该反应以在哺乳动物中产生所期望的免疫。本发明的非整合型载体 (NIV) 是自加强型 (self-boosting) 疫苗。逆转录病毒载体颗粒不仅自身作为疫苗起作用,而且因为其编码从其非整合型基因组产生的 VLP,其在进入细胞后还产生抗原性 VLP。这提供了第二轮免疫刺激。

[0010] VLP 不是病毒。它们仅由外部的病毒壳组成且不具有任何病毒遗传物质。因此,它们不能复制。许多病毒的衣壳蛋白的表达导致它们自发组装成与它们所来源的天然病毒相似的超分子的、高度重复的、二十面体或杆样颗粒,但无病毒遗传物质。因此,VLP 代表刺激天然免疫反应和适应性免疫反应二者的非复制型、非感染型颗粒抗原递送系统。作为颗粒,它们提供了关键的“危险信号”,其对于产生有效且持久(多重免疫后)的免疫反应是重要

的。VLP 在结构上可以有很大不同,由单个或多个衣壳蛋白组成,具有或没有脂质包膜。最简单的 VLP 是非包膜的且仅通过一个主要的衣壳蛋白的表达来组装,如来源于嗜肝 DNA 病毒、乳头瘤病毒、细小病毒或多瘤病毒的 VLP 所示。

[0011] NIV 与 VLP 相似,但它们还含有遗传信息,它们进入细胞后,所述遗传信息能够表达构成 VLP 的蛋白。因此,不仅 NIV 自身是 VLP 疫苗(在颗粒中包括核心和抗原),而且向宿主动物施用之后进入细胞中后,病毒遗传信息有效地进入核而并不整合。其在此处表达高水平蛋白,该蛋白可随后组装以在其体内产生 VLP 颗粒,增强了免疫原性作用。这不仅导致强的初级免疫反应,且导致可产生持久性免疫的持续免疫反应。

[0012] NIV 疫苗的另一个优点是产生免疫反应所需的量小。因为颗粒在从机体中的细胞中产生后被扩增,产生免疫反应所需的初始物质的量非常小,显著提高了该疫苗的经济性。

[0013] 用于预防 AIDS 的疫苗已成为一个有挑战性的目标。已显示蛋白亚基疫苗是无效的。尽管活的、减毒的 HIV 已在动物研究中显示出前景,它们的病原性妨碍了它们进一步的开发。病毒载体还用来进行候选 HIV 疫苗的开发。最值得注意的是最近在人类临床试验中失败的默克的基于腺病毒载体的 AIDS 疫苗。该疫苗不仅无法在感染的受试者中减少 HIV 传播或病毒复制,并且先前已暴露于用来产生该疫苗的腺病毒株系的接种个体对 HIV 感染的易感性具有明显提高。虽然失败的原因是未知的,先前的动物研究已证明抗载体免疫产生免疫反应的分支(bifurcation),降低了多次注射后疫苗的效力。

[0014] 本发明的 NIV 作为 AIDS 疫苗应该是非常有前景的。非整合型 HIV 载体将具有常规 HIV 载体的所有特性,但基因组将作为游离体在非分裂细胞中维持足以产生 VLP 的一段时间,且将在细胞分裂后被稀释。HIV NIV 颗粒自身将是疫苗。此外,其将转导细胞、表达 HIV 蛋白、并进一步产生更多的 HIV VLP 以增强疫苗的作用。因为 NIV 颗粒将仅经历一轮复制且仅产生无任何遗传物质的 VLP,它们将模拟 HIV 感染,而没有活病毒暴露后有害的后遗症。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及非整合型、非复制型逆转录病毒载体,当向动物宿主施用时其在宿主中引起免疫反应。载体转导宿主中的细胞,在那里它们产生病毒样颗粒(VLP),当其从细胞释放时,在宿主中刺激另外的免疫反应。逆转录病毒载体包括长末端重复序列、包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。在一个实施方案中,逆转录病毒载体是慢病毒载体。本发明还包括药物组合物,该药物组合物包括药学上可接受的运载体(carrier)中的一种或多种本发明的载体。

[0017] 本发明包括用来构建和产生载体的质粒、辅助构建体和生产细胞。质粒包括逆转录病毒长末端重复序列、逆转录病毒包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。在一个实施方案中,逆转录病毒序列是慢病毒序列。在该实施方案的一方面,慢病毒序列是 HIV 序列。包装细胞包括本发明的质粒与不含有整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因的辅助构建体。在一个实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。生产细胞包括本发明的质粒和不含有整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因的辅助构建体。在一个实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。

[0018] 本发明的载体和药物组合物用作疫苗。因此,本发明包括在哺乳动物中引起免疫反应的方法,所述方法通过以足以在哺乳动物中引起免疫反应的量向哺乳动物递送载体或

药物组合物而进行。载体转导哺乳动物中的细胞之后,细胞产生并释放包括病毒的结构蛋白的 VLP,在哺乳动物中引起进一步的免疫反应。VLP 包括靶病毒的结构蛋白。病毒是本发明的载体可对其产生形成 VLP 的自组装结构蛋白的任何病毒。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示了本发明的 NIV 中的一些的实施例。LTR:长末端重复序列。Psi:包装序列(前导序列加 Gag 序列的片段)。AS:靶向高度保守的天然整合酶基因序列(或其它序列)的 300bp 以防止与 wt-HIV 重组的任选的反义序列;RRE:rev 响应元件。P:用来驱动抗原表达的启动子(可能为 CMV、SFFV 或 Tet-O 启动子)。Gag-Pol:密码子优化的 Gag 和蛋白酶基因(避免移码区中的密码子优化)、缺陷的整合酶和任选地缺陷的逆转录酶,后者可任选地从构建体缺失,如果需要的话,从某些类型的构建体缺失。2A:2A 裂解序列允许每种蛋白在翻译后裂解;已证明了一个慢病毒载体中三个 2A 的使用。Env:密码子优化的 SIV 的天然包膜序列;不同的包膜株系可用来扩大免疫反应。CTL 表位是编码来自靶病毒的任何蛋白的复合的 CTL 表位和/或体液表位的多核苷酸序列。对于 HIV 这可以是蛋白 Vpx/Vpr/Vif/Nef*/Tat/Rev/:多肽序列的任何组合;每个多肽作为序列上匹配的密码子优化的序列而存在;不需要单独地表达这些蛋白;Nef* 基因序列已在激酶结构域被突变;CTL 序列是在单一多肽序列中将所有主要表位联合(consolidate)的多肽序列;完整的 Vpx 在多蛋白的 N 末端插入以协助其掺入 VLP 颗粒中。GFP:用来体外和体内标记细胞的绿色荧光蛋白基因。TMPK:安全基因的例子;使 3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)磷酸化导致胱天蛋白酶-3(caspase-3)激活和凋亡的胸苷酸激酶(TMPK)(其它可使用的诸如 TK、dCK 等)。IL-12:用来促进记忆 T 细胞反应的白介素 12 基因;其它细胞因子、蛋白和/或 RNAi 可被使用。SIN-LTR:自我失活型(self-inactivating)LTR,其在逆转录(RT 在病毒粒子中被辅助构建体(helper)作为蛋白来提供)期间被双重复制。P-CMV:巨细胞病毒启动子。Gag-Pol:表达用于病毒粒子形成和 RT 的所有结构蛋白和酶促蛋白,但为整合酶阴性的辅助质粒(黑条);已将 Gag-Pol 进行密码子简并以限制与 SIV NIV 中 Psi 序列的序列相似性。异源 env:例如,VSV-g、登革热病毒 E 蛋白、HA、gp120、黄病毒 Env 蛋白、能够利用慢病毒载体进行假型包装(pseudotyping)的任何异源 env。

[0021] 图 2 显示了用于产生以下 NIV 的 NIV 辅助质粒构建体,所述 NIV 表达不是逆转录病毒载体核心蛋白的核心蛋白。其表达逆转录病毒的 Gag 蛋白和 Pol 基因,但表达缺陷型的整合酶分子。辅助构建体不局限于特定的质粒,且可以具有其它变化形式,包括其它 HIV 蛋白。辅助构建体还可整合到细胞系中从而结果为包装细胞系。如果包装细胞系含有载体,则这将会得到生产细胞系。

[0022] 图 3 显示了登革热病毒 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子(SCMV)驱动登革热病毒核心蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶(PGK)启动子驱动登革热病毒包膜蛋白的表达,其可以是单一的 ORF 或由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔的多个 ORF。转录后调控元件(PRE)任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0023] 图 4 显示了丙型肝炎病毒 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子(SCMV)驱动丙型肝炎病毒核心蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶(PGK)启动子驱动丙型肝炎病毒 E1 或 E2 包膜蛋白的表达。

转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0024] 图 5 显示了丙型肝炎病毒 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动丙型肝炎病毒核心蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的丙型肝炎病毒 E1 和 E2 包膜蛋白的表达。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0025] 图 6 显示了乙型肝炎病毒 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动丙型肝炎病毒核心蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的乙型肝炎病毒 E1 或 E2 包膜蛋白的表达。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0026] 图 7 显示了流感病毒 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动流感病毒核心 (至少 M1 但任选地还有 M2) 蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的丙型流感病毒 HA 和 NA 包膜蛋白的表达。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0027] 图 8 显示了流感病毒 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动流感病毒核心 (至少 M1 但任选地还有 M2) 蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动株系由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的且株系不同的多种流感病毒 HA 包膜蛋白的表达。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0028] 图 9 显示了肿瘤抗原 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动流感病毒核心 (至少 M1 但任选地还有 M2) 蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动肿瘤抗原的表达,所述肿瘤抗原优选地为由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的膜蛋白。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0029] 图 10 显示了细菌抗原 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动流感病毒核心 (至少 M1 但任选地还有 M2) 蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动通过与 HA 跨膜结构域融合产生嵌合蛋白而锚定到包膜中的细菌抗原的表达。每个抗原由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0030] 图 11 显示了肿瘤抗原 NIV 疫苗构建体 2,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动流感病毒核心 (至少 M1 但任选地还有 M2) 蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的肿瘤抗原和细胞因子的表达。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0031] 图 12 显示了 HIV NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和蛋白酶核心蛋白的表达。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动由 2A 或 IRES 序列 (未显示) 分隔的 HIV

包膜蛋白和 CTL 表位多肽（编码 HIV 基因组上的主要 CTL 表位）的表达。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0032] 图 13 显示了 HIV/AIDS NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动 HIV 包膜蛋白的表达。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0033] 图 14 显示了 HIV/AIDS NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动由 2A 或 IRES 序列（未显示）分隔的 HIV 包膜蛋白和 CTL 表位多肽（编码 HIV 基因组上的主要 CTL 表位）的表达。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0034] 图 15 显示了 HIV/AIDS NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动由 2A 或 IRES 序列（未显示）分隔的 HIV 包膜蛋白和细胞因子（例如 IL12）的表达。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0035] 图 16 显示了 HIV/AIDS NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动 HIV 包膜蛋白、CTL 表位多肽（编码 HIV 基因组上的主要 CTL 表位）、细胞因子（例如 GCSF）和细胞死亡诱导基因（例如 TMPK）的表达，其均由 2A 或 IRES 序列（未显示）分隔。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0036] 图 17 显示了丙型肝炎 NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动丙型肝炎病毒 E1 和 E2 包膜蛋白的表达，其均由 2A 或 IRES 序列（未显示）分隔。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0037] 图 18 显示了肿瘤抗原 NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动肿瘤抗原蛋白的表达，如果为多个肿瘤抗原蛋白，其均由 2A 或 IRES 序列（未显示）分隔。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0038] 图 19 显示了登革热病毒 NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达，其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶（PGK）启动子驱动登革热病毒 E 蛋白的表达，如果为多个登革热病毒 E 蛋白，其均由 2A 或 IRES 序列（未显示）分隔。转录后调控元件（PRE）任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0039] 图 20 显示了疟疾 NIV 疫苗构建体，其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子（SCMV）驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心

蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动疟疾抗原蛋白的表达,所述疟疾抗原蛋白可以是嵌合的(例如 HA 跨膜-疟疾 Ag),如果为多个疟疾抗原蛋白,其均由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0040] 图 21 显示了疟疾 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动疟疾抗原蛋白和细胞因子的表达,其均由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔,所述疟疾抗原蛋白可以是嵌合的(例如 HA 跨膜-疟疾 Ag)。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0041] 图 22 显示了细菌 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动细菌抗原蛋白的表达,所述细菌抗原蛋白可以是嵌合的(例如 VSV-G 跨膜-细菌 Ag),如果所述细菌抗原蛋白为多个,其均由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0042] 图 23 显示了一般 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动感兴趣的抗原蛋白和(靶标病原体)CTL 表位的表达,其均由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0043] 图 24 显示了一般 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动感兴趣的抗原蛋白和细胞因子的表达,其均由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0044] 图 25 显示了一般 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动感兴趣的抗原蛋白和调节疫苗免疫原性的 shRNAi 的表达。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 polyA 远端插入。

[0045] 图 26 显示了一般 NIV 疫苗构建体,其包括具有 psi 包装序列的 5' LTR、RRE 元件和任选地一些非编码 Tat 序列。巨细胞病毒启动子 (SCMV) 驱动 HIV Gag 蛋白和 Pol 核心蛋白的表达,其中整合酶是突变的和非功能性的。磷酸葡萄糖激酶 (PGK) 启动子驱动感兴趣的抗原蛋白、CTL 表位和细胞因子的表达,其均由 2A 或 IRES 序列(未显示)分隔。转录后调控元件 (PRE) 任选地在包膜 ORF 和 poly A 远端插入。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明涉及非整合型、非复制型逆转录病毒载体,当向动物宿主施用时在宿主中引起免疫反应。载体转导宿主中的细胞,它们在那里产生病毒样颗粒 (VLP),当其从细胞

释放时在宿主中刺激另外的免疫反应。

[0048] 逆转录病毒载体包括长末端重复序列、包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。病毒是需要针对其在哺乳动物中产生免疫反应的病毒。因此,逆转录病毒载体是针对该靶病毒的疫苗。在一个实施方案中,结构蛋白由逆转录病毒 gag 基因编码。载体由不含有整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因的辅助构建体包装。可选地,载体含有逆转录病毒 pol 基因,该基因包括不编码功能性整合酶蛋白的突变的整合酶基因。这样的突变的整合酶基因和含有它们的构建体可通过本领域中已知的技术来制备。在一个实施方案中,载体是自我失活型 (SIN) 的载体,其在 3' LTR 的 U3 区域具有失活性缺失。在一个实施方案中,载体是 γ 逆转录病毒载体。在另一个实施方案中,它们是慢病毒载体。在一个特定的实施方案中,慢病毒载体是 HIV 载体。如本文所用的,术语“HIV”包括人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 和人类免疫缺陷病毒 2 (HIV-2) 的所有分化体 (clade) 和 / 或株系。

[0049] 载体转导宿主细胞之后,表达编码病毒的结构蛋白的多核苷酸序列并产生结构蛋白。载体包括足够用于结构蛋白自组装成 VLP 的数目和类型的多核苷酸序列。在一个实施方案中,结构蛋白包括病毒衣壳蛋白,且 VLP 是病毒衣壳。在另一个实施方案中,对于具有包膜的那些靶病毒,结构蛋白还包括病毒包膜蛋白,且 VLP 包括病毒衣壳和病毒包膜。

[0050] 针对其产生结构蛋白的病毒可以是针对其本发明的载体可产生形成 VLP 的自组装结构蛋白的任何病毒。这些包括慢病毒、其它逆转录病毒、流感病毒、肝炎病毒、丝状病毒 (filoviruse) 和黄病毒。一般而言,这些包括来自以下的科的病毒:腺病毒科 (Adenoviridae)、沙粒病毒科 (Arenaviridae)、星状病毒科 (Astroviridae)、杆状病毒科 (Baculoviridae)、布尼病毒科 (Bunyaviridae)、杯状病毒科 (Caliciviridae)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、丝状病毒科 (Filoviridae)、黄病毒科 (Flaviridae)、肝 DNA 病毒科 (Hependnaviridae)、疱疹病毒科 (Herpesviridae)、正粘病毒科 (Orthomyoviridae)、副粘病毒科 (Paramyxoviridae)、微小病毒科 (Parvoviridae)、乳多空病毒科 (Papovaviridae)、小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)、痘病毒科 (Poxviridae)、呼肠孤病毒科 (Reoviridae)、逆转录病毒科 (Retroviridae)、弹状病毒科 (Rhabdoviridae) 和披膜病毒科 (Togaviridae)。在特定的实施方案中,病毒选自 HIV-1、HIV-2、SIV、甲型流感病毒、乙型流感病毒、甲型、乙型和丙型肝炎病毒、依波拉病毒 (Ebola virus)、马尔堡病毒 (Marburg virus)、西尼罗病毒和登革热病毒组成的组。因此,本发明的逆转录病毒载体在转导宿主动物的细胞之后产生具有上述病毒以及针对其可以这种方式来产生 VLP 的任何其它病毒的抗原特性的 VLP。这允许它们用作疫苗。

[0051] 由载体中的多核苷酸序列编码的衣壳蛋白和包膜蛋白可来自相同的或不同的病毒。例如,衣壳蛋白和包膜蛋白来源于单一类型的病毒;衣壳蛋白来自一种类型的病毒,包膜蛋白来自另一种类型的病毒;或衣壳蛋白来自一种类型的病毒且包膜蛋白来自多种类型的病毒。多种类型的包膜蛋白可来源于同一类型病毒的不同株系,或它们可来源于不同病毒类型的不同株系。

[0052] 在一个实施方案中,载体含有编码异源蛋白的异源多核苷酸序列。即,蛋白不是载体所来源的天然逆转录病毒的部分。载体还可含有编码不同的异源蛋白的两个或多个不同的异源序列。在载体多核苷酸序列在宿主细胞中表达之后,这些蛋白是 VLP 的部分。

[0053] 异源蛋白可以是能够用逆转录病毒载体假型包装的任何包膜蛋白。熟知的例子是 VSV-G 蛋白。其它例子包括丙型肝炎病毒包膜蛋白 E1 和 / 或 E2 和登革热病毒 E 蛋白、杆状病毒包膜蛋白、HIV 包膜蛋白、双嗜性逆转录病毒包膜蛋白、甲病毒 (alphavirus) 包膜蛋白、黄病毒包膜蛋白和来自病毒的任何其它包膜蛋白。该病毒包膜蛋白可以是嵌合蛋白, 因为其含有一种蛋白的跨膜结构域和第二蛋白的胞外结构域。同样, 本发明不局限于单一蛋白的表达, 而可包括多个蛋白。例如, 对于流感病毒, 除 M1 蛋白之外表达了血凝素包膜蛋白和神经氨酸酶包膜蛋白以生成 VLP。任何蛋白组合可以是相关的, 无论其来自相同的病毒或不同的病毒。

[0054] 异源多核苷酸也可编码抗原、免疫调节蛋白、RNAi 或能够诱导细胞死亡的多肽。其可编码哺乳动物中疾病进程中涉及的任何因子。这些蛋白可作为单一蛋白或作为嵌合体来生成。

[0055] 抗原可以是任何蛋白或其部分。其可以来源于病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。其还可以是肿瘤抗原, 比如来源于癌细胞的细胞膜蛋白。

[0056] 免疫调节蛋白是免疫系统调控中涉及的或具有调节免疫反应的作用的任何蛋白。在一个实施方案中, 其为细胞因子, 比如白介素、干扰素、或肿瘤坏死因子。在一方面, 细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。

[0057] 能够诱导细胞死亡的多肽是当细胞暴露于某些化学药品, 比如某些药物时直接或间接杀死细胞的细胞中的多肽。例子是本领域中的技术人员已知的且包括胸苷激酶 (TK)、脱氧胞苷激酶 (dCK) 和经修饰的哺乳动物和人类胸苷酸激酶 (TMPK), 其于 2006 年 11 月 14 日提交的于 2009 年 3 月 19 日以 US 2009/0074733A1 公开的美国专利申请第 11/559,757 号中公开, 其全部内容在此通过引用并入。

[0058] NIV 还可包括通常为 shRNA (在 NIV 于细胞中表达其基因组后在细胞内表达) 形式的 RNAi 序列 (还包括反义序列、核酶等的任何基因抑制序列)。这些序列被表达以: 抑制产生 VLP 的细胞的野生型病毒感染、或增强对疫苗的免疫反应、提高 VLP 蛋白的产生、改变 VLP 的糖基化 (例如通过靶向其糖基化中涉及的蛋白而使表面蛋白去糖基化) 或经由靶向凋亡基因通路或细胞存活基因通路而提高或降低细胞的寿命。

[0059] 在一个实施方案中, 多核苷酸序列是密码子优化的。密码子优化是本领域中熟知的。其包括密码子选择的改变从而产生较高水平的蛋白。而且, 密码子优化可用来简并密码子选择以用于特定的目的。一个这样的例子是关于野生型病毒简并密码子选择而使 NIV 没有机会与感染产生 VLP 的相同的细胞的野生型病毒重组。

[0060] 如上所述, 逆转录病毒载体包括慢病毒载体。在提供本文所包含的教导的条件下, 这些载体可通过本领域中的技术人员已知的技术从任何慢病毒来构建。在一个实施方案中, 慢病毒载体是从 HIV-1 或 HIV-2 或其组合而构建的 HIV 载体。在另一个实施方案中, 其为从 SIV 而构建的 SIV 载体。所有这些载体具有以上所讨论的逆转录病毒载体的特性。当然, 它们来源于所讨论的特定的慢病毒而非其它逆转录病毒。

[0061] 技术人员将认识到, 与其它逆转录病毒载体诸如 γ 逆转录病毒载体相比, 慢病毒构建体, 尤其是涉及 HIV 或 SIV 的那些构建体中存在某些差异。例如, 为产生 AIDS 疫苗, 载体将优选地包括 HIV gag 基因以在被载体转导的细胞中表达 HIV 结构蛋白。完整的 gag 基因将表达 HIV 衣壳蛋白、核衣壳蛋白和基质蛋白。此外, HIV 载体将优选地包括 HIV env 基

因而使 VLP 含有包膜蛋白。载体还可以是假型包装的,例如用 VSV-G 或登革热病毒 E 蛋白假型包装。然后它们可用来在 HIV 蛋白仅感染 CD4T 细胞时获得非 CD4 细胞的转导。优选地,其还将是 SIN 载体。载体还可包括编码联合不同 HIV 分化体或株系的主要细胞毒性 T- 淋巴细胞 (CTL) 和体液 B 细胞表位的多肽的核苷酸序列。在一个实施方案中,这是图 1 中所示的 Vpx/Vpr/Vif/Nef*/Tat/Rev/CTL 多肽序列。

[0062] 在一个实施方案中, HIV 载体优选地含有 pol 多核苷酸序列,其中已缺失了整合酶基因或其中的整合酶基因已通过野生型核苷酸中的一些的缺失或修饰而被突变。因此,其不能编码功能性蛋白。在该实施方案的一方面,经修饰的整合酶基因编码在氨基酸 D64、D116 和 E152 中的至少一处具有突变的整合酶蛋白。在一个特定的方面,突变是 D64 突变。

[0063] HIV 载体还可包括抗 -Pol 反义序列。在一方面,序列长约 800 个核苷酸。

[0064] 非局限本发明的性质地, HIV 可表达多种蛋白组合以具有它们的免疫原性作用。它们可表达来自逆转录病毒 (包括慢病毒和逆转录病毒科的其它病毒) 的核心蛋白和其它蛋白、或来自作为疫苗靶标的病毒的核心蛋白。在使用逆转录病毒核心蛋白和其它蛋白的情况下,逆转录病毒的整合酶应该优选地为失活的。然而,还可能的是载体的整合可通过其它方式来阻止,包括 LTR 的 att (连接) 位点的破坏。可选地和优选地,使用靶病毒的核心蛋白 (例如对于流感病毒为 M1 蛋白和可能地为 M2 蛋白;对于登革热病毒为 pM 蛋白等)。如果 HIV 编码靶病毒的核心蛋白,应该利用辅助构建体包装 HIV 来产生 HIV。该辅助构建体应至少含有逆转录和整合所需的逆转录病毒 Gag 酶和 Pol 酶,且必须是整合酶缺陷型的。HIV 可任选地用异源包膜蛋白来假型包装以协助颗粒的转导从而其可然后表达对于靶病毒为天然型的 VLP。

[0065] 本发明还包括药物组合物。该组合物包括在药学上可接受的运载体中的本发明的一种或多种载体。所述运载体是本领域中的技术人员已知的。一个例子是包括乳糖、蔗糖或海藻糖的等渗缓冲液。该组合物还可包括一种或多种佐剂。所述运载体也是本领域中的技术人员已知的。例子包括以下中的一种或多种:明矾、脂质、水、缓冲剂、肽、多核苷酸、聚合物和 / 或油。

[0066] 在提供本文所包含的教导的条件下,本发明的载体通过本领域中技术人员已知的技术来构建。用于产生逆转录病毒载体的技术在以下中公开:美国专利第 4,405,712 号、第 4,650,746 号、第 4,861,719 号、第 5,672,510 号、第 5,686,279 号和第 6,051,427 号,其全部公开内容在此通过引用并入。用于产生慢病毒载体的技术在以下中公开:以 US 2008/0254008A1 公开的美国专利申请第 11/884,639 号,和美国专利第 5,994,136 号、第 6,013,516 号、第 6,165,782 号、第 6,294,165B1 号、第 6,428,953B1 号、第 6,797,512B1 号、第 6,863,884B2 号、第 6,924,144B2 号、第 7,083,981B2 号和第 7,250,299B1 号,其全部公开内容在此通过引用并入。

[0067] 包膜载体颗粒可来自另一个病毒种类的工程化的或天然的病毒包膜蛋白来假型包装,所述另一个病毒种类包括非逆转录病毒和非慢病毒,其改变了天然逆转录病毒或慢病毒的宿主范围和感染性。包膜多肽展示于病毒表面上且牵涉在病毒颗粒对宿主细胞的识别和感染中。宿主范围和特异性可通过修饰或替换包膜多肽来改变,例如,通过不同的 (异源的) 病毒种类表达的或另外经修饰的包膜蛋白。参见,例如, Yee 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9564-9568, 1994, 其全部内容在此通过引用并入。疱疹性口腔炎

病毒 (VSV) 蛋白 G (VSV-G) 因为其宽泛的物种和组织嗜性及其对载体颗粒赋予生理稳定性和高感染性的能力已被广泛应用。参见,例如, Yee 等人, *Methods Cell Biol.*, (1994) 43 : 99-112, 其全部内容在此通过引用并入。可使用的包膜多肽的例子包括,例如,登革热病毒、HIV gp120 (包括天然形式和经修饰的形式)、莫洛尼鼠白血病毒 (MoMuLV 或 MMLV)、Harvey 鼠肉瘤病毒 (HaMuSV 或 HSV)、鼠乳腺肿瘤病毒 (MuMTV 或 MMTV)、长臂猿白血病毒 (GaLV 或 GALV)、劳斯肉瘤病毒 (RSV)、肝炎病毒、流感病毒、Moloka 病毒、狂犬病毒、丝状病毒 (例如,依波拉病毒和马尔堡病毒,诸如 GP1/GP2 包膜,包括 NP_066246 和 Q05320)、双嗜性病毒、甲病毒等。其它的例子包括,例如,来自披膜病毒科、弹状病毒科、逆转录病毒科、痘病毒科、副粘病毒科和其它包膜病毒科的包膜蛋白。其它来自病毒的包膜的例子在位于网址 ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/viruses.html 的以下数据库中列出。某些包膜蛋白的使用允许逆转录病毒载体转导除 CD4T 细胞外的细胞,比如树突细胞和其它抗原呈递细胞。

[0068] 本发明包括用来构建和产生本发明的载体的质粒、辅助构建体和生产细胞。质粒包括逆转录病毒长末端重复序列、逆转录病毒包装序列和与共同编码病毒的结构蛋白的一种或多种多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子。在一个实施方案中,逆转录病毒序列是慢病毒序列。在该实施方案的一方面,慢病毒序列是 HIV 序列。

[0069] 包装细胞包括本发明的质粒和不含整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因的辅助构建体。在一个实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一方面,其为猿猴细胞。在另一方面,其为人类细胞。例子包括已知的细胞系如 293 细胞、PER. C6 细胞、干细胞系、胚胎细胞系或新生细胞系、来源于脐带的细胞、或任何人类或哺乳动物的细胞系。包装细胞通过利用本发明的质粒和适当的辅助构建体 (如果需要的话) 转染人类或哺乳动物的细胞或细胞系来生成。

[0070] 生产细胞包括本发明的质粒和不含整合酶基因或含有非功能性的整合酶基因的辅助构建体。在一个实施方案中,细胞是人类或哺乳动物细胞。在一方面,其为猿猴细胞。在另一方面,其为人类细胞。细胞的例子包括前一段落中提到的那些。生产细胞通过利用本发明的质粒及适当的辅助构建体转染哺乳动物细胞或细胞系来生成。培养这些细胞且这些细胞持续地或批量地产生载体。如果使用 VSV-G, 可仅在有限的时间诱导细胞产生镶嵌 VSV-G 的颗粒 (VSV-G decorated particles), 因为当该蛋白表达至高水平时对细胞具有毒性。通过已知技术从上清液中回收载体。组成型地产生包膜疫苗载体颗粒的生产细胞系可利用除天然 VSV-G 蛋白外的包膜蛋白来产生。

[0071] 本发明的载体和药物组合物用作疫苗。因此,本发明包括在哺乳动物中引起免疫反应的方法,所述方法通过以足以在哺乳动物中引起免疫反应的量向哺乳动物递送载体或药物组合物。载体和组合物通过疫苗领域中已知的方法来递送。例如,它们可通过皮下或肌肉递送,比如通过注射。载体在哺乳动物中转导细胞后,细胞产生并释放包括病毒的结构蛋白的 VLP, 在哺乳动物中引起进一步的免疫反应。在一个实施方案中,哺乳动物是实验动物。例如,其可以是啮齿类动物、比如小鼠、大鼠或豚鼠、狗或猫或非人灵长类。在另一个实施方案中,哺乳动物是人类。

[0072] VLP 包括病毒的结构蛋白。病毒是本发明的载体可针对其产生形成 VLP 的自组装结构蛋白的任何病毒。这些包括慢病毒、其它逆转录病毒、流感病毒、肝炎病毒、丝状病

毒、黄病毒或来源于本申请中以上所述的科的任何病毒。在特定的实施方案中,病毒选自 HIV-1、SIV、季节性和流行性流感病毒包括甲型流感病毒株系和乙型流感病毒株系、甲型、乙型或丙型肝炎病毒、虫媒病毒感染包括西尼罗病毒、依波拉病毒、巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒、狂犬病毒、冠状病毒感染包括 SARS、人乳头瘤病毒、轮状病毒、单纯疱疹病毒、马尔堡病毒和登革热病毒。结构蛋白包括病毒的核心蛋白。它们还可包括病毒的包膜蛋白。

[0073] 核心蛋白和包膜蛋白可来自相同的或不同的病毒。例如,衣壳蛋白和包膜蛋白来源于单一类型的病毒;衣壳蛋白来自一种类型的病毒,包膜蛋白来自另一种类型的病毒;或衣壳蛋白来自一种类型的病毒,包膜蛋白来自多种类型的病毒。多种类型的包膜蛋白可来源于同种类型的病毒的不同株系,或它们可来源于不同病毒类型的不同株系。在 HIV 或 SIV 的情况下,结构蛋白是衣壳蛋白和 / 或核衣壳蛋白和 / 或基质蛋白中的一种或多种。

[0074] 包膜蛋白是能够用逆转录病毒载体假型包装并成为 VLP 的部分的任何蛋白。例子包括 VSV-G 蛋白和丙型肝炎病毒包膜蛋白 E1 和 E2、流感病毒 HA 和 NA 蛋白、登革热病毒包膜蛋白、罗斯河病毒包膜蛋白、塞姆利基森林病毒包膜蛋白、辛德比斯病毒包膜蛋白、HIV 或 SIV 包膜蛋白、Mokola 病毒包膜蛋白和逆转录病毒双嗜性包膜蛋白。这些包膜蛋白可来源于任何病毒,或可作为嵌合的或新型的包膜蛋白从头合成。

[0075] 如上所述,载体可包括编码抗原、免疫调节蛋白、RNAi、或能够诱导细胞死亡的多肽的异源多核苷酸序列。在所述情况中,VLP 将包括抗原、免疫调节蛋白、RNAi 序列或能够诱导细胞死亡的多肽。

[0076] 抗原可以是任何蛋白或其部分。其可来源于病毒、细菌、寄生虫或其它病原体。其还可以是肿瘤抗原,比如来自瘤细胞的细胞膜蛋白。其还可以是不在细胞膜上的肿瘤抗原。在所述情况下,该肿瘤抗原或者与跨膜结构域整合从而其在颗粒的表面上被表达,或者在细胞内单独地表达而不与任何其它蛋白连接。肿瘤抗原还可与提高肿瘤抗原的免疫原性的其它蛋白或肽序列连接。这样的序列是本领域中已知的且它们通常经 TLR 通路刺激天然免疫。

[0077] 免疫调节蛋白是上调、下调或调节宿主针对 HIV 疫苗的靶抗原的免疫反应的任何蛋白。在一个实施方案中,其为细胞因子,比如白介素、干扰素、或肿瘤坏死因子。在一方面,细胞因子是 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 G-CSF。其它可掺入的调节免疫反应的细胞因子的例子存在于 www.ncbi.nlm.nih.gov 上。免疫调节蛋白并不仅局限于细胞因子。它们可以是诸如配体的其它蛋白或作为配体发挥作用的蛋白片段。它们还可包括靶向细胞上靶蛋白上的配体结合位点的抗体。抗体和配体的一个例子是 CTLA-4 抗体和 CD-40L 蛋白。其它例子存在于本领域中且一些可在 www.ncbi.nlm.nih.gov 上发现。

[0078] 能够诱导细胞死亡的多肽是当细胞暴露于某些化学药品,诸如某些药物时,细胞中直接或间接杀死细胞的多肽。如上所述,例子包括,胸苷激酶 (TK)、脱氧胞苷激酶 (dCK) 和修饰的哺乳动物和人类胸苷酸激酶 (TMPK)。其它能够诱导细胞死亡的多肽可在 www.ncbi.nlm.nih.gov 上发现。

[0079] 在一个优选的实施方案中,本发明的载体是 HIV SIN 载体,其包括 HIV LTR、HIV 包装序列和与 HIV gag 序列和 HIV pol 序列可操作地连接的异源启动子,比如 CMV 启动子、EF1- α 启动子、MND 启动子、PGK 启动子。pol 序列含有不编码功能性整合酶蛋白 (整合酶阴性) 的整合酶序列。可选地,整合酶序列可以是已被缺失的。在一方面,异源启动子还与

编码 gp120/41 包膜蛋白的 HIV env 序列可操作地连接。在另一方面,该载体用表达包膜蛋白的第二类型的辅助构建体假型包装,以协助转导入更大量诸如抗原呈递细胞的细胞中,所述包膜蛋白例如 VSV-G 包膜蛋白、Mokola 病毒包膜蛋白、双嗜性逆转录病毒包膜蛋白或登革热病毒包膜蛋白。载体通过包装细胞或生产细胞来产生,且含有以下的构建体:第一构建体是表达 HIV 的 GagPol(整合酶阴性)结构蛋白和酶促(蛋白酶和逆转录酶)蛋白的载体构建体,且在同一载体构建体上利用第二启动子,(任何株系的或来自多个株系或分化体的)HIV gp120/41;第二构建体(第二类型的辅助构建体)从异源启动子表达以上所描述的异源 env 蛋白中的一种,且优选地仅被表达至足以假型包装并促进 NIV 转导入细胞增高的水平,所述细胞优选地为抗原呈递细胞(例如,树突细胞)。

[0080] 在另一个优选的实施方案中,本发明的载体是 HIV SIN 载体,其包括 HIV LTR、HIV 包装序列和与编码丙型肝炎病毒结构蛋白和包膜蛋白的多核苷酸序列可操作地连接的异源启动子,比如 CMV 启动子、EF1- α 启动子、MND 启动子或 PGK 启动子。在一方面,除表达 GagPol(整合酶阴性)蛋白的第一辅助构建体之外使用第二辅助构建体。该第二辅助构建体表达可用 NIV 假型包装的病毒的包膜蛋白,以协助转导入更大量诸如抗原呈递细胞的细胞中,所述包膜蛋白比如 VSV-G 包膜蛋白、Mokola 病毒包膜蛋白、双嗜性逆转录病毒包膜蛋白或登革热病毒包膜蛋白。这些假型包装包膜蛋白不应在载体中被编码,因为在体内利用 NIV 转导细胞之后,如果它们在 VLP 产生期间表达时将分散(distract)免疫反应。

[0081] 在一方面,不使用表达假型包膜蛋白的第二辅助载体,尤其是如果靶病毒的包膜能够用 NIV 假型包装并允许 NIV 转导抗原呈递细胞时。对于登革热病毒包膜蛋白正是如此。因此,表达假型包装包膜蛋白的第二辅助构建体将不是登革热病毒 NIV 疫苗所需。已知登革热病毒包膜蛋白能够用基于 HIV 的慢病毒载体假型包装,所述慢病毒载体能够有效地转导抗原呈递细胞,如树突细胞。对于将作为疫苗靶标的许多其它病毒是如此的;然而,并非所有情况均如此,并且在非如此的情况下将优选地使用表达假型包装包膜蛋白的第二辅助构建体以在施用疫苗之后协助 NIV 转导抗原呈递细胞。应注意的是,从所有辅助构建体(第一类型——结构蛋白,和第二类型——包膜蛋白)表达的蛋白不在载体中被编码,且因此除首次导入疫苗外注射之后将没有抗原性。持续的免疫反应由机体中 NIV 产生的 VLP 生成,且由于它们是完全(在一些情况下几乎完全)天然的,免疫反应被训练为对靶病毒是高度特异性的。

[0082] 以下的实施例示出了本发明的某些方面,且不应被解释为对本发明的范围的限制。

实施例

[0083] 本实施例显示了非整合型慢病毒载体疫苗的构建。由于以上背景章节中所述的原因,来源于 HIV 的 NIV 作为 AIDS 疫苗应该是特别有前景的。作为证明效力和原则证明的方法,将首先开发 SIV NIV,并随后转变为 HIV 形式。

[0084] 该疫苗通过使用导入到生产细胞中的质粒来产生——NIV 质粒,其含有所有相关的抗原;和两个辅助构建体,第一个辅助构建体表达 Gag、突变的 Pol 和 VSV-G(用于引发),第二个辅助构建体仅表达 Gag 和突变的 Pol(用于加强)。参见图 1。所得的复制缺陷型 NIV 颗粒将用作疫苗来转导细胞并表达 HIV 蛋白和产生 NIV VLP 以激活免疫系统。该特征

将模拟 HIV 感染, 且不具有活病毒暴露之后的后遗症。

[0085] 原型 NIV 将含有以下的安全特征以使其安全用于一般人群中。这些载体将被工程化以消除回复突变或与野生型 HIV 有害重组的任何可能性:

[0086] (a) NIV 是非复制型的且仅能够转导细胞和表达 HIV 蛋白和 HIV 样颗粒 (VLP), 但除这一轮外不能复制, 因为其缺失了复制所需的必需蛋白和顺式激活元件 (如以下更加详细描述)。

[0087] (b) NIV 将利用突变体整合酶辅助构建体来产生。因此, 当载体基因组进入非分裂细胞并持续存在于其中时, 其为非整合型。将使用整合酶基因内的三个突变的组合。可选地, 突变体载体连接位点可以单独地使用或与突变体整合酶组合使用。

[0088] (c) HIV gag、env 和其它 HIV 蛋白以密码子优化 / 简并的方式来表达以消除它们的顺式激活元件并提高蛋白表达。

[0089] (d) 载体将另外地含有抗 -Pol 反义序列以在可能共感染 wt-HIV 的细胞中防止与辅助构建体重组并抑制 wt-HIV 复制。反义序列将长约 800 个碱基并靶向 Pol 基因, Pol 基因为 HIV 的高度保守区域。

[0090] (e) 载体将优选地含有密码子简并的突变体 Pol 序列, 或不含任何 Pol 序列, 从而, 如果将与 wt-HIV 发生重组时, 结果将是非功能性的病毒; 突变体 Pol (突变体整合酶) 基因功能在产生过程中将仅由辅助构建体表达。

[0091] (f) NIV 3' LTR 将从启动子和增强子区中缺失从而结果是自我失活型 (SIN) 载体; 因此在接种疫苗的个体细胞中将不存在天然的 LTR。(逆转录过程中 3' LTR 为双拷贝的, 导致了缺失 LTR 的增强子 / 启动子的双拷贝。)

[0092] (g) 载体中人类安全基因 (例如, 人类突变体 TMPK, 人类 TK 基因的一种类型) 的存在将允许被转导的细胞通过口服施用 AZT 被消除, 如果需要的话。

[0093] 基本的和优化的 NIV 的抗原性特征如下:

[0094] (a) NIV, 作为 HIV, 将不会在重复注射过程中诱导非 HIV 免疫反应, 因为 NIV 对于接种疫苗靶向的病毒不是异源性载体。

[0095] (b) 使用高度活性的启动子 (例如 EF-1 α 、CMV、MND) 表达密码子优化的 HIV 基因 (Gag、Env、Rev、Tat、Vpu、Vpr、Nef, 但优选地非 Pol) 或这些蛋白的变体, 将导致高水平的 HIV 蛋白表达。

[0096] (c) 通过表达所有这些蛋白, NIV 还将从转导的细胞中产生 HIV VLP, 可能提高了疫苗的免疫原性。

[0097] (d) 为了引发, 利用 VSV-G 对 NIV 进行假型包装, 从而转导树突细胞和其它细胞类型以持续地表达 HIV 蛋白。

[0098] (e) 用于加强的 NIV 将使用替代的包膜假型, 或优选地不使用假型 (仅天然 gp120/41 包膜) 以靶向通常被 wt-HIV 靶向的细胞。

[0099] (f) NIV 可任选地表达联合 HIV 株系 (或分化体) 的主要 CTL 表位的多肽。

[0100] (g) NIV 可任选地表达可增强 / 调节疫苗的免疫原性或持续性的基因 (例如, IL-12 或 IL-15) 或抑制性因子 (例如, miRNA/RNAi)。

[0101] (h) 可开发 HIV 疫苗载体株系的混合物; 需要评估抗原性竞争。

[0102] 实验

[0103] 将开发 NIV 并显示其在体外的表达。然后这些 NIV 将用于非人灵长类中的免疫原性检验。将使用 SIV239Mac 模型系统。

[0104] (1) 设计表达 SIV 蛋白的 SIV NIV。将 SIV 239Mac 用作载体的骨架序列。可合成完整的 NIV 并将其克隆到稳定的质粒骨架中。EF1 α 或 CMV 启动子表达密码子优化的 SIV Gag、Env、Tat、Rev、Vif、Vpr、Vpx 和 Nef。还开发不含编码辅助蛋白的基因的 NIV。还可将靶向整合酶基因的反义序列克隆到 NIV 中。还可类似地合成辅助构建体,其表达 Pol 基因和任选地具有多种突变的突变体整合酶基因。辅助构建体将表达 Gag- 突变体 -Pol (整合酶阴性的) 基因且将表达或不表达 VSV-G 或登革热病毒 E 蛋白。

[0105] (2) 合成表达 SIV 蛋白的 SIV NIV。利用本领域中已知的方法合成载体和辅助质粒 DNA 构建体。

[0106] (3) 制造 SIV NIV。可将载体和辅助构建体转染到 293 细胞中,浓缩 NIV 载体颗粒并进行纯化。因为 SIV 和 HIV 颗粒的相似性,产生、浓缩和纯化方法将非常相似。

[0107] (4) 在 CEM 细胞中检验 SIV NIV 的转导和 HIV 蛋白的表达。可利用 SIV NIV 颗粒来转导 CEM 细胞以证明转导和 HIV 蛋白的表达。转导利用将包括在 NIV 中的独特的序列,通过拷贝数来监测。利用该序列使用定量 PCR 测定来测量载体的转导效率。通过蛋白质印迹和 FACS 分析来确证蛋白表达。

[0108] (5) 在猕猴细胞中检验 SIV NIV 的转导和 HIV 蛋白的表达。通过以上所描述的方法在原代猕猴 PBL 中检验 NIV 的转导和蛋白表达。

[0109] (6) 证明 NIV 的安全性。可通过多种方法来证明 SIV NIV 的安全性。首先,过滤用 SIV NIV 转导的 CEM 细胞的上清液,然后将所述上清液传代到未经实验的 CEM 细胞上以检验可复制病毒的存在。相似地,然后在 CEM 细胞上对来自用 NIV 转导的原代细胞的上清液进行可复制病毒的检验。为分析整合入基因组的频率,将从细胞中分离基因组 DNA 并进行定量 PCR。如果显示整合发生,将通过反向 PCR 来绘制整合位点。

[0110] (7) 证明 SIV NIV 的抗 SIV 作用。SIV NIV 将被工程化以表达靶向 wt-SIV 的抗 Pol 反义序列。可设计并检验其它反义序列。通过用 wt-SIV 攻击转导的 CEM 细胞将确定 NIV 的抗 SIV 作用,且抑制 wt-SIV 复制的水平将通过 p27ELISA 测定来测量。

[0111] (8) GLP 条件下 SIV NIV 的工艺开发和制造。可将用于基于 GMP HIV 的慢病毒载体的制造和产生的现有工艺适应于 GLP 条件下的 SIN NIV 的产生。已将切向流过滤和离子交换层析的组合成功地用于基于 HIV 的慢病毒载体的浓缩和纯化。制造之后,在进行动物研究之前将对 GLP NIV 物质进行一些检验。

[0112] (9) 在非人灵长类中证明 SIV NIV 的免疫原性。将利用 SIV NIV GLP 物质注射动物并检验免疫原性。将用 10^7 、 10^8 或 10^9 的感染单位皮下注射印度起源的恒河猴,每组 3 只。血浆病毒血症通过 RT-PCR 来定量;如以下所描述的还将评估动物中可复制的病毒的存在。免疫反应将通过以下来评估:1) 利用对应于所有 SIV 蛋白的重叠肽池进行 PBMC 的干扰素- γ ELISPOT 测定;2) 利用用 Gag 或 Env 肽池刺激的 PBMC 进行的胞内细胞因子染色测定,评估 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ T 细胞中 4 种效应功能 (IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 的分泌,和 CD107a 的上调);和 3) 利用 gp140ELISA、SIVmac251 和 SIVmac239 的中和进行 SIV 特异性抗体的分析。假如观察到免疫原性,将在首次接种疫苗 6 个月后用单一的、高直肠内剂量的 SIVmac239 来攻击动物,然后进行血浆病毒血症、总的和中枢记忆 CD4 $^{+}$ T 细胞反应的保留、和 SIV 特异性

体液和细胞免疫反应,如上所述。

[0113] (10) 在非人灵长类中证明 SIV NIV 的安全性。通过从不同组织采集活检组织和通过 PCR 进行 SIV NIV DNA 的存在的测定来确定 SIV NIV 的生物分布。为检验推定的可复制慢病毒 (RCL), 从利用 SIV NIV 疫苗接种的非人灵长类中分离 PBL 并与 CEM 细胞共培养以确定 RCL 的存在。将通过具有适当的阳性对照和阴性对照的 p27 测定和 / 或 qPCR 对共培养的细胞测定 SIV 的存在。还将分离基因组 DNA 以确定 SIV NIV 整合的频率。如果发生整合, 整合的位点将通过反向 PCR 来绘制。

[0114] 总结

[0115] SIV Δ Nef 仍为迄今开发的最有效的候选 HIV 疫苗。虽然并不确切地知道其与免疫性的关联, HIV 蛋白的持续表达表现为是重要的。而且, 已知 HIV 蛋白从诸如腺病毒载体的异源载体的表达, 可能是有问题的并导致显著的抗载体免疫反应。本实施例示出了非复制型 HIV 载体, 其不整合, 但可从被转导的细胞高水平地表达 HIV 抗原 (和 VLP)。NIV 应具有超越表达 HIV 蛋白的异源载体的优点, 因为将没有使免疫系统从产生 HIV 特异性免疫反应中分散和分支的非 HIV 蛋白的表达。用 NIV 进行重复接种可能产生与 SIV Δ Nef 相似的作用, 但没有用减毒病毒时观察到的安全问题。

[0116] 可将相似的实验方法适应于用于其它疾病的疫苗的开发。构建体可能含有本申请中已描述的形式。利用以上所描述的方法合成或克隆且然后制造这些构建体。然后在动物模型中检验载体的安全性和免疫原性。对于靶向除 HIV 外的感染的疫苗, NIV 能够表达对于引发感兴趣的病毒的病原体而言为新生的核心蛋白和其它病毒蛋白。因为蛋白完全来自感兴趣的病原性病毒, 由该 NIV 产生的 VLP 将不会分散免疫反应。

[0117] 参考文献

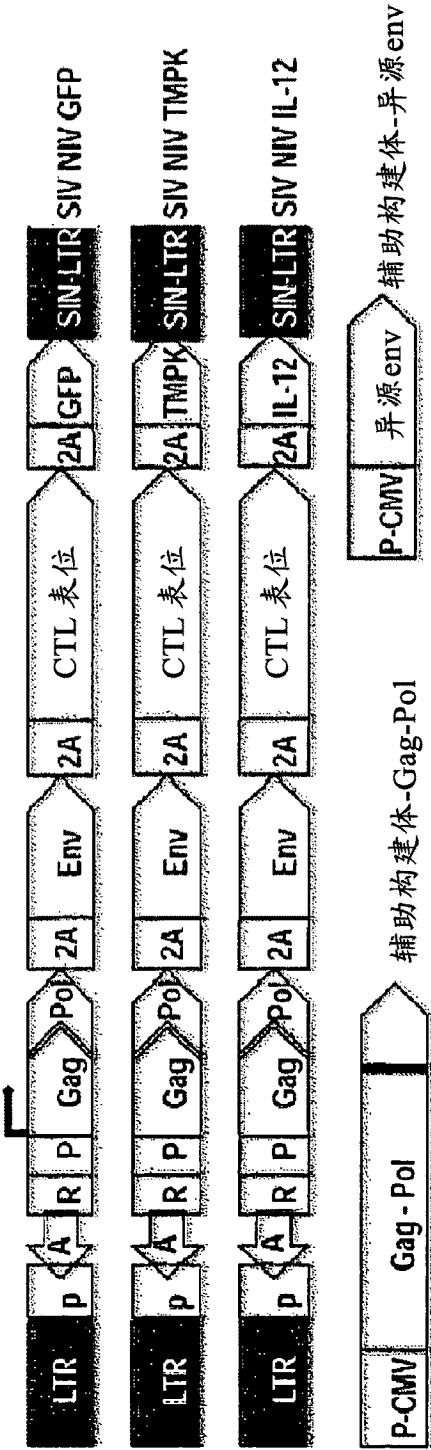
[0118] Braun SE, Lu XV, Wong FE, Connole M, Qiu G, Chen Z, Slepushkina T, Slepushkin V, Humeau LM, Dropulic B, Johnson RP, Potent inhibition of simian immunodeficiency virus (SIV) replication by an SIV-based lentiviral vector expressing antisense Env (表达反义 Env 的基于 SIV 的慢病毒载体对猿猴免疫缺陷病毒 (SIV) 复制的有效抑制), *Hum. Gene Ther.* 2007 Jul. 18 (7) :653-64。

[0119] 虽然已连同其某些实施方案描述了本发明, 且已为示例的目的列出了许多细节, 对于本领域中的技术人员明显的是, 本发明允许另外的实施方案, 且本文所描述的某些细节可有很大变化而不偏离本发明的基本原理。

[0120] 参考文献

[0121] 所有出版物, 包括已授予的专利和公开的专利申请, 和通过 url 地址或登录号识别的所有数据条目以其整体通过引用并入本文。

NIV 构建体



p = Psi
A = AS
R = RRE
CTL 表位 = VPx/Vpr/Vif/Nef*/Tat/Rev/CTL

图 1

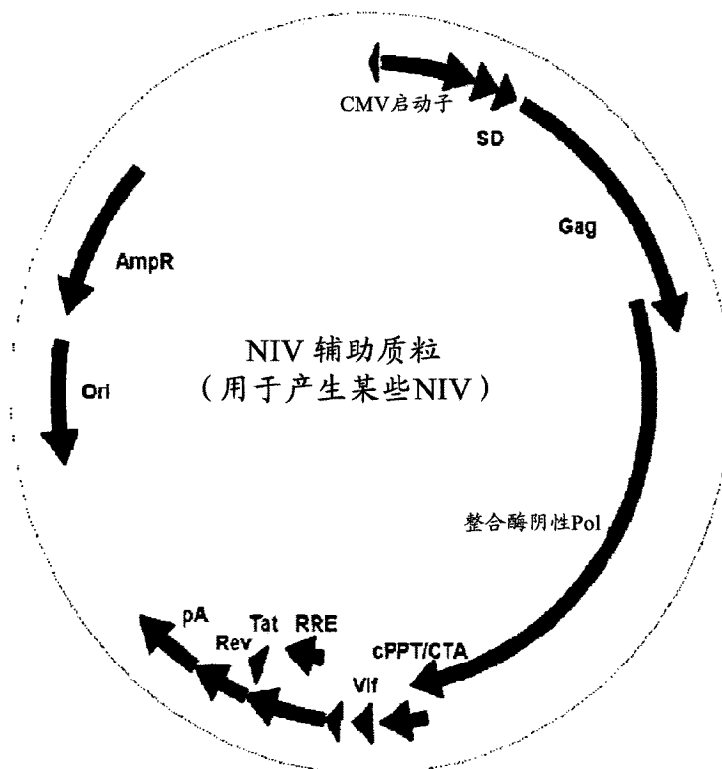


图 2

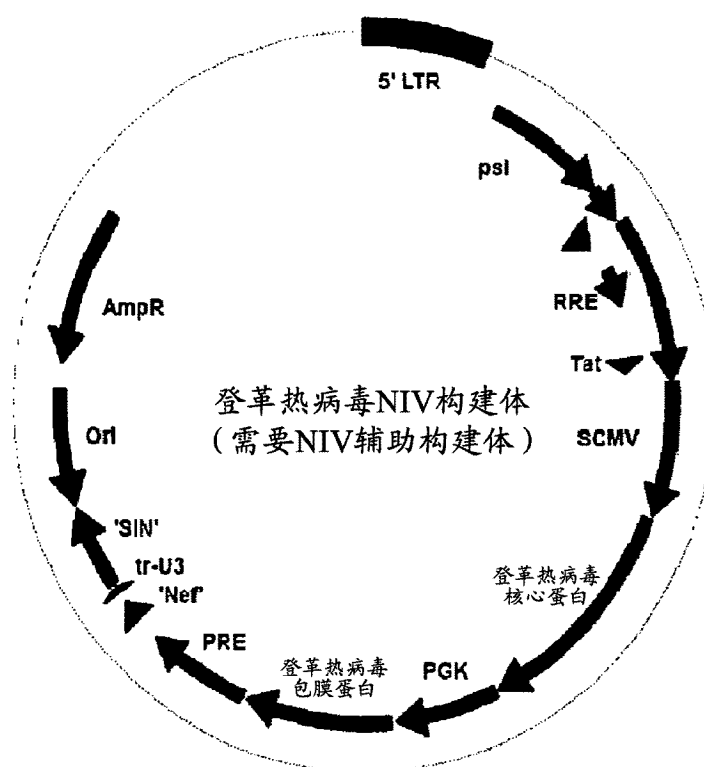


图 3

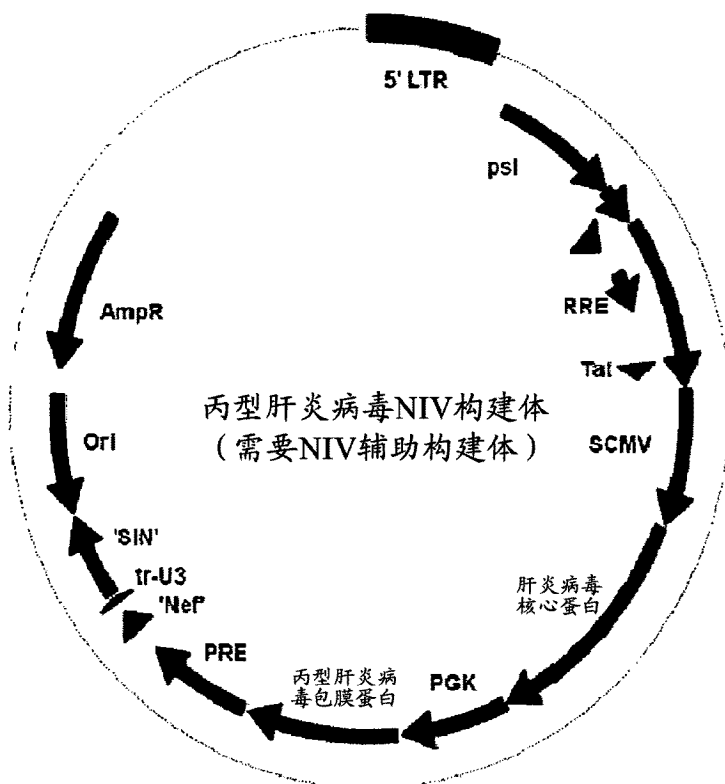


图 4

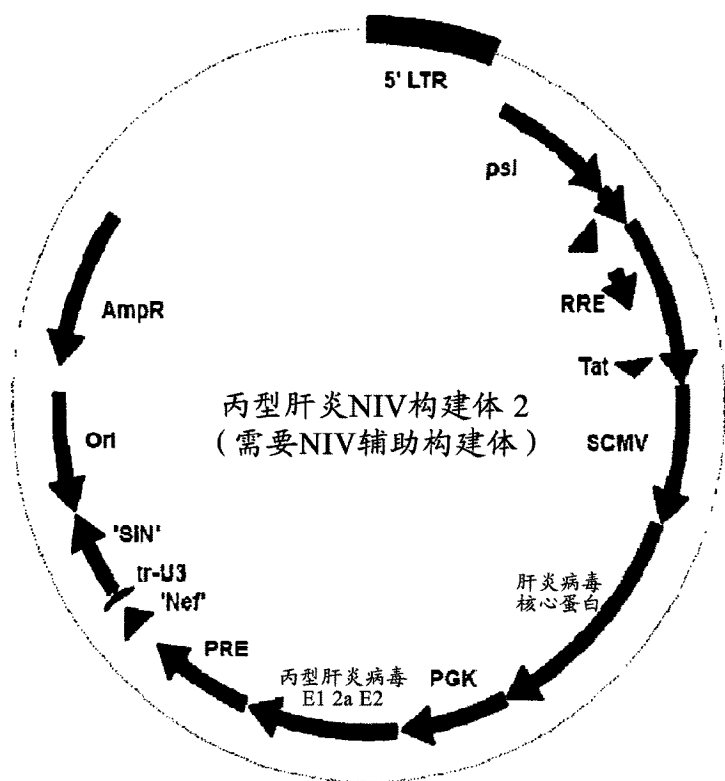


图 5

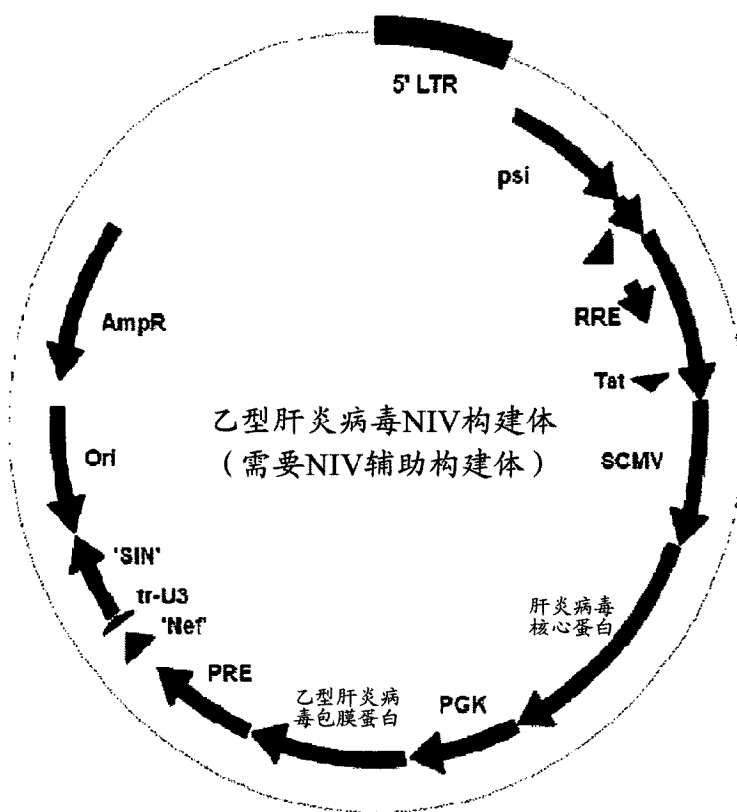


图 6

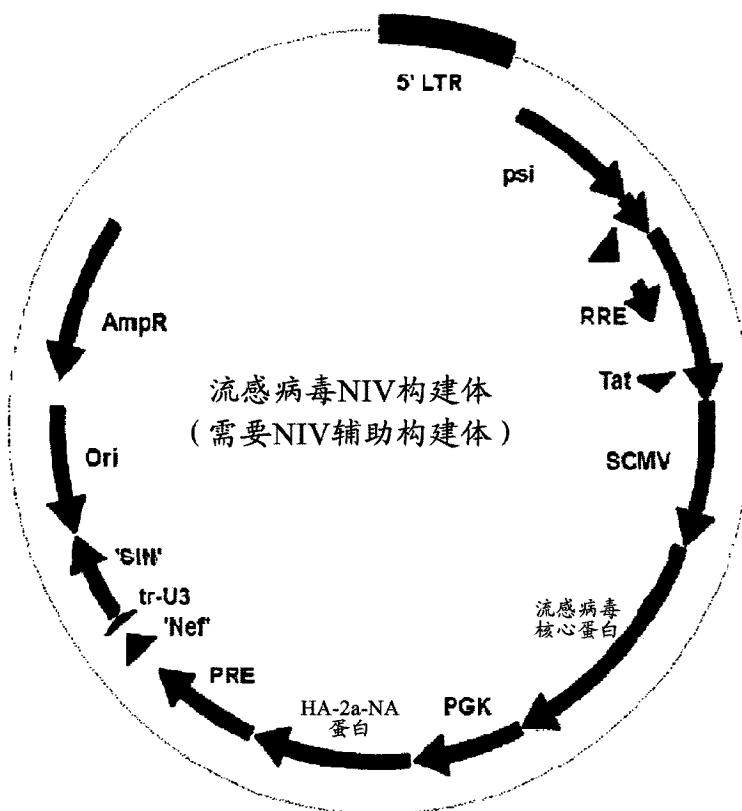


图 7

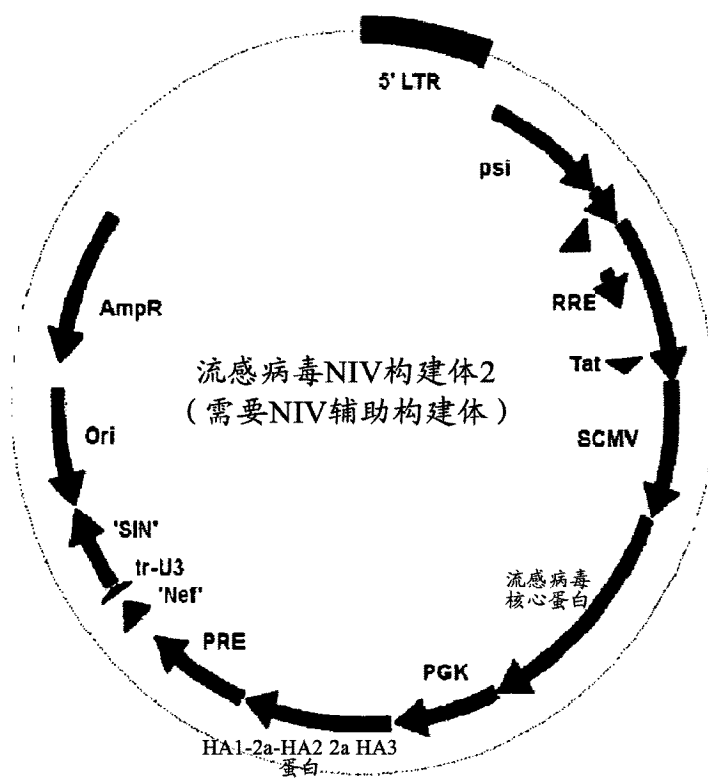


图 8

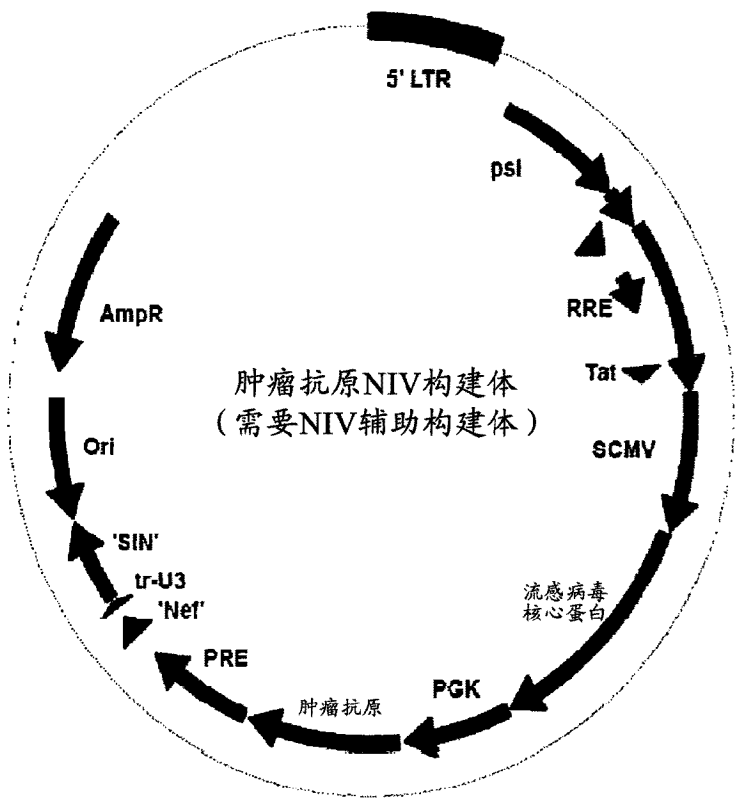


图 9

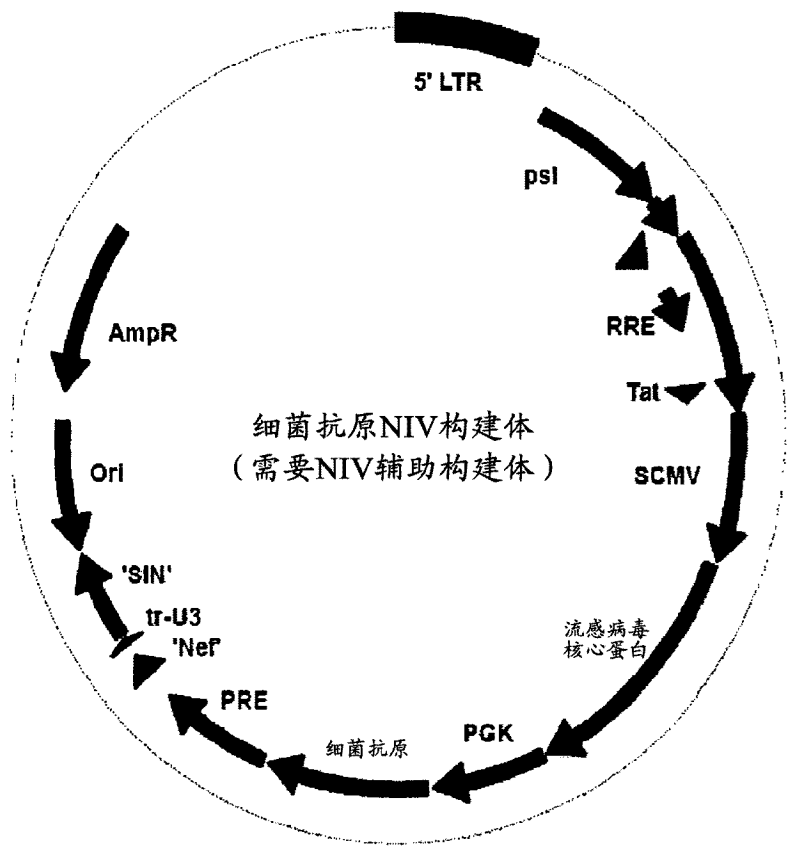


图 10

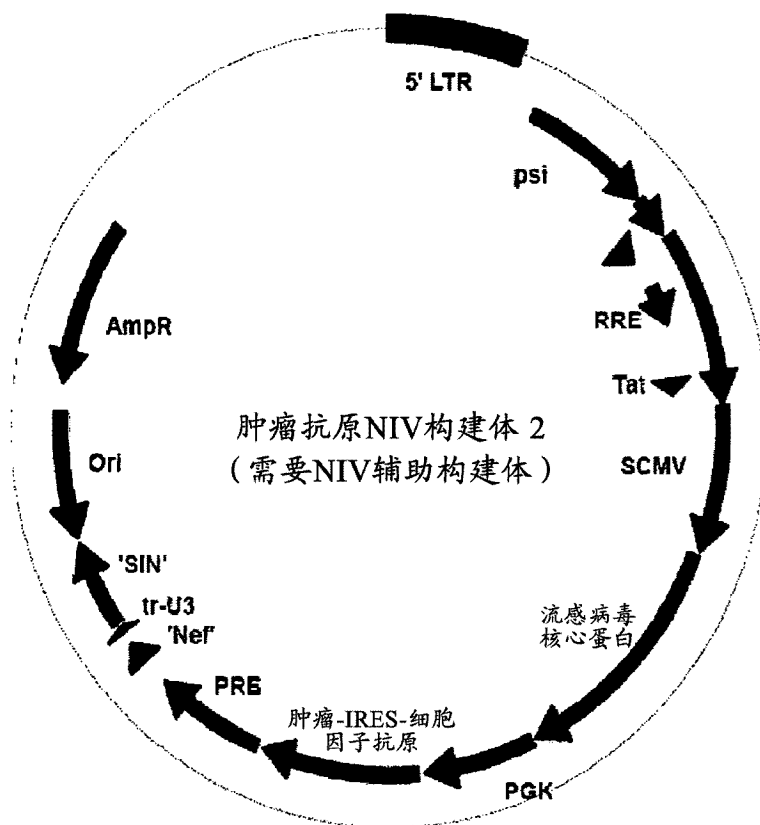


图 11

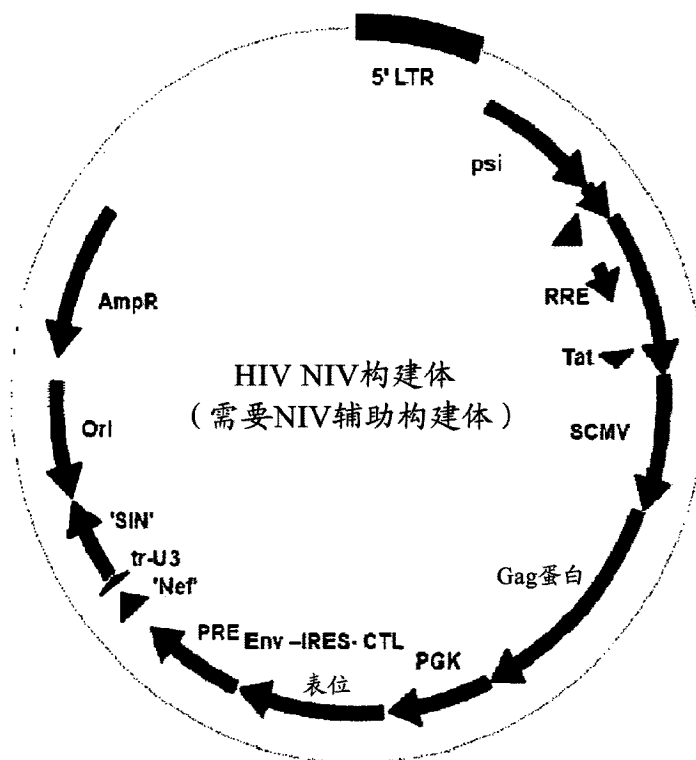


图 12

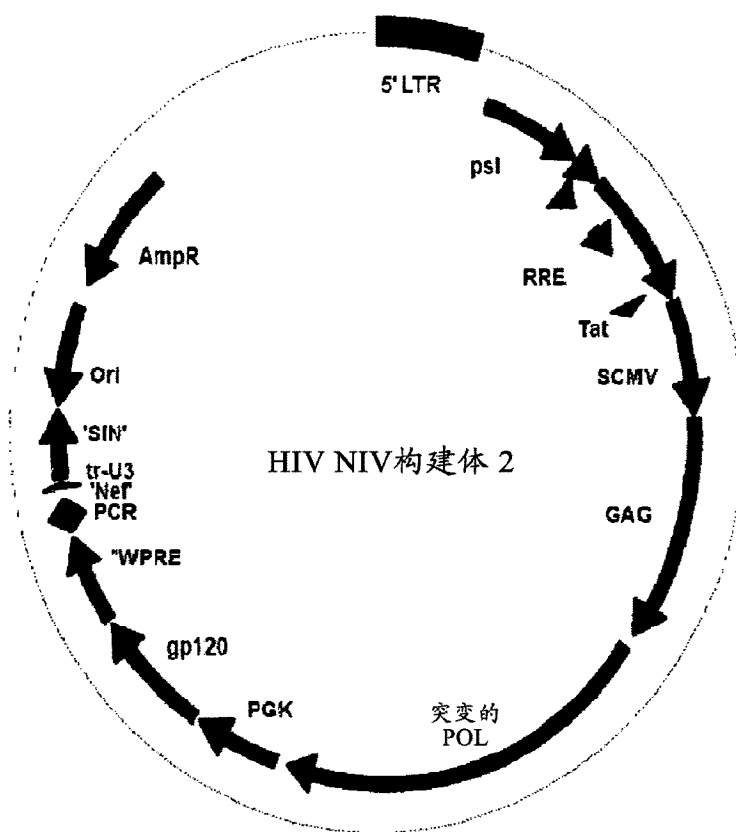


图 13

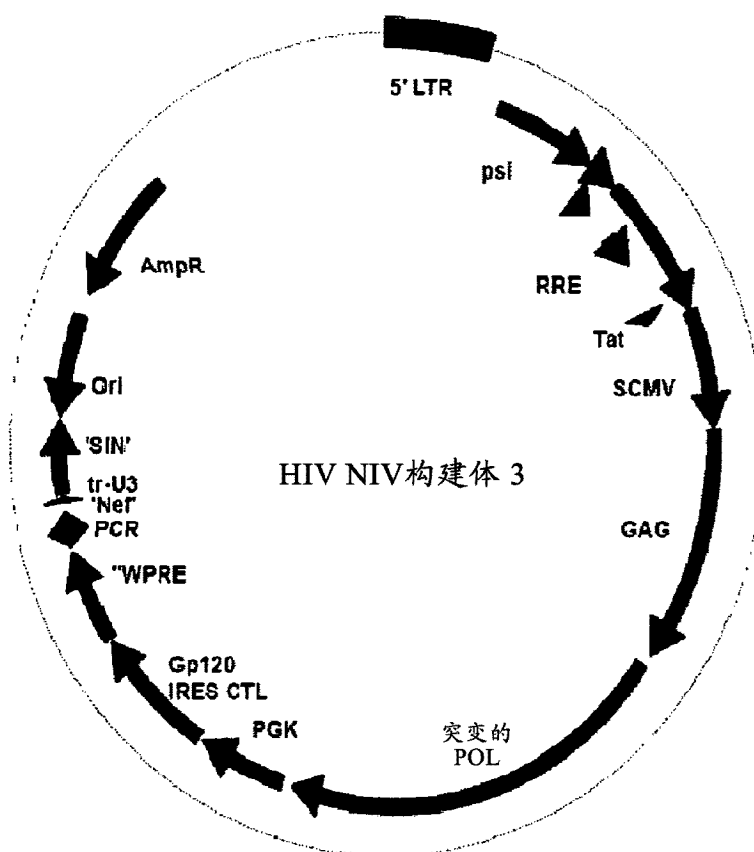


图 14

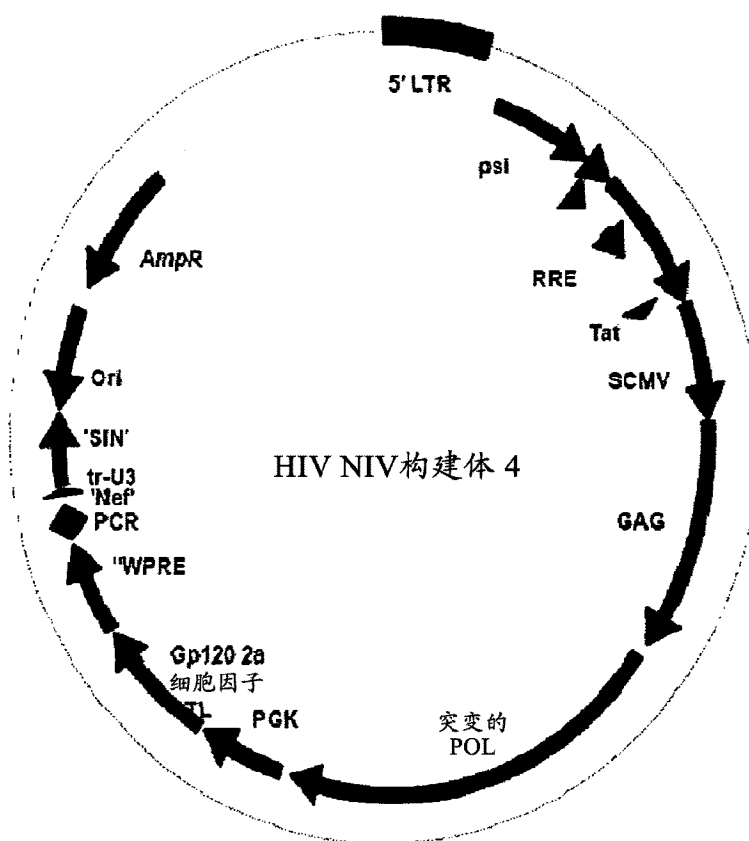


图 15

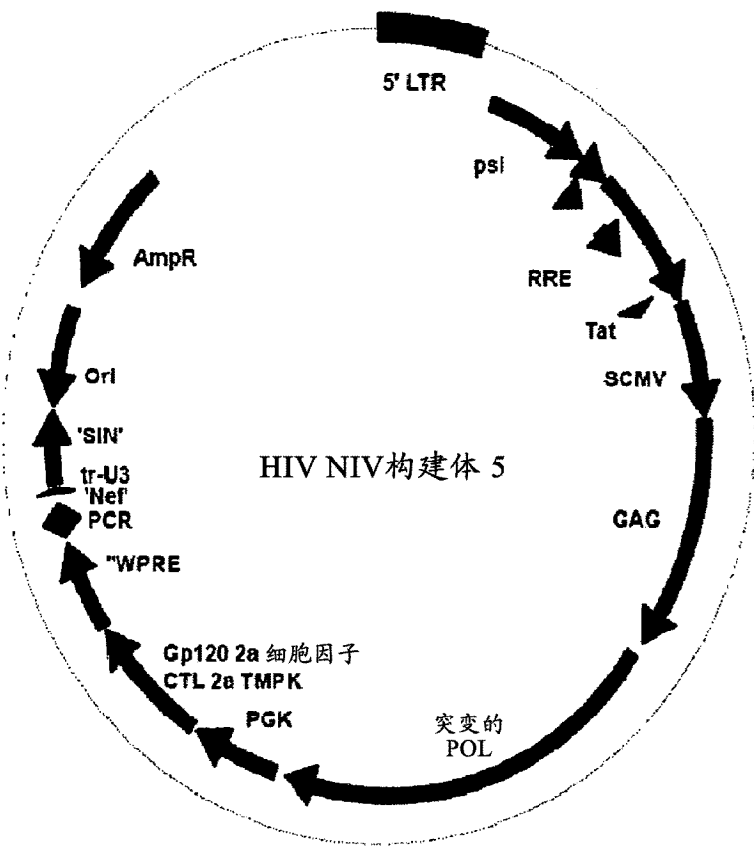


图 16

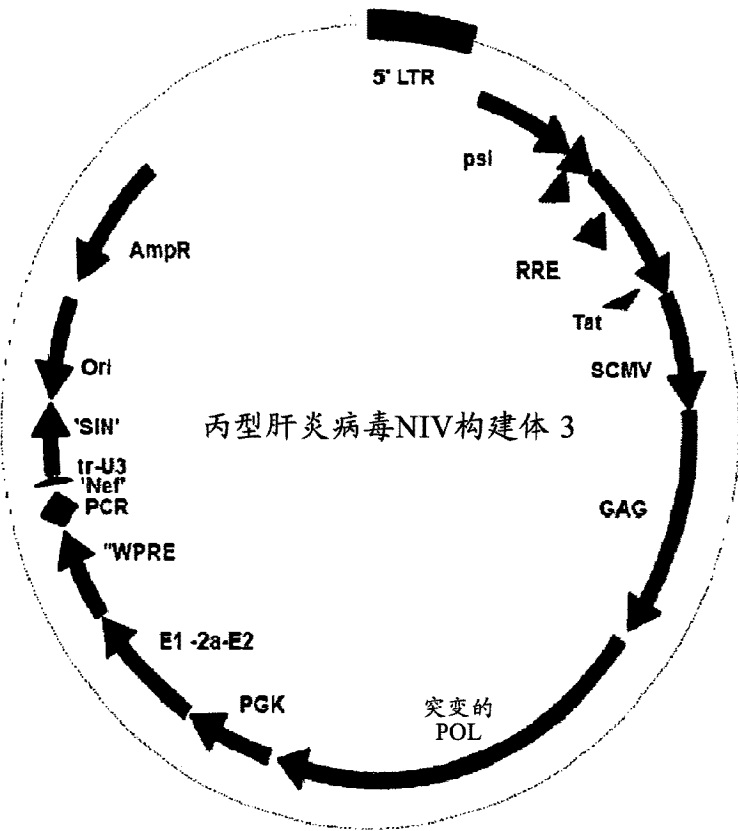


图 17

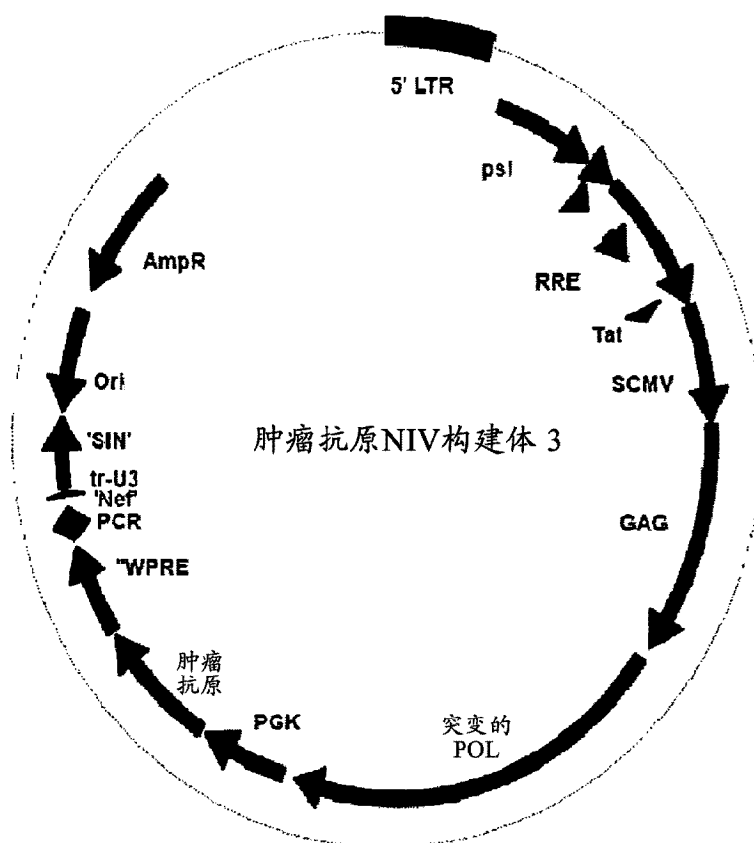


图 18

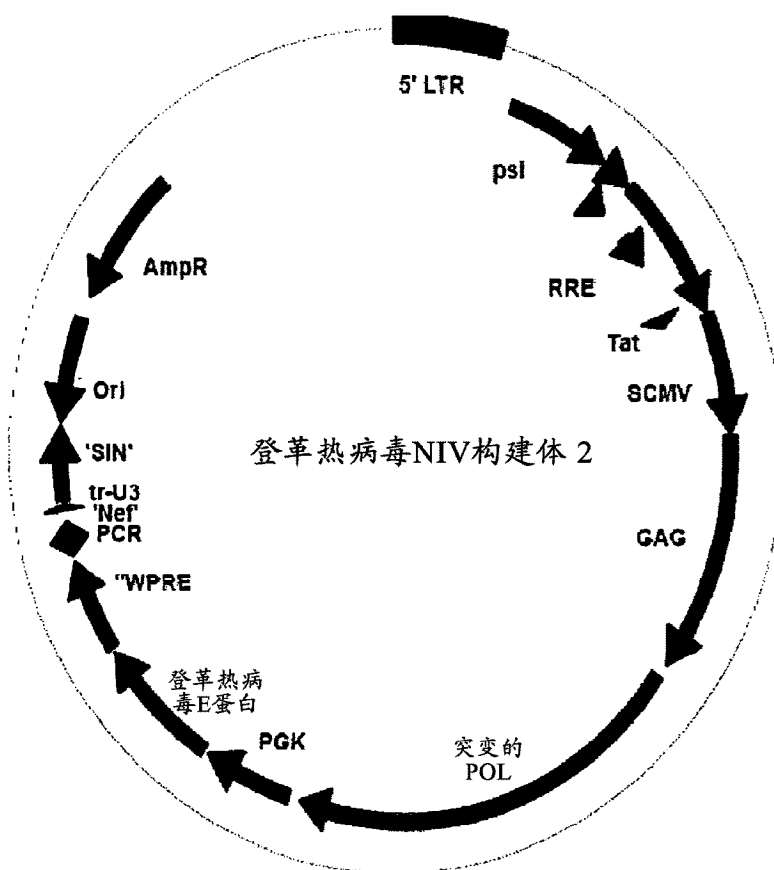


图 19

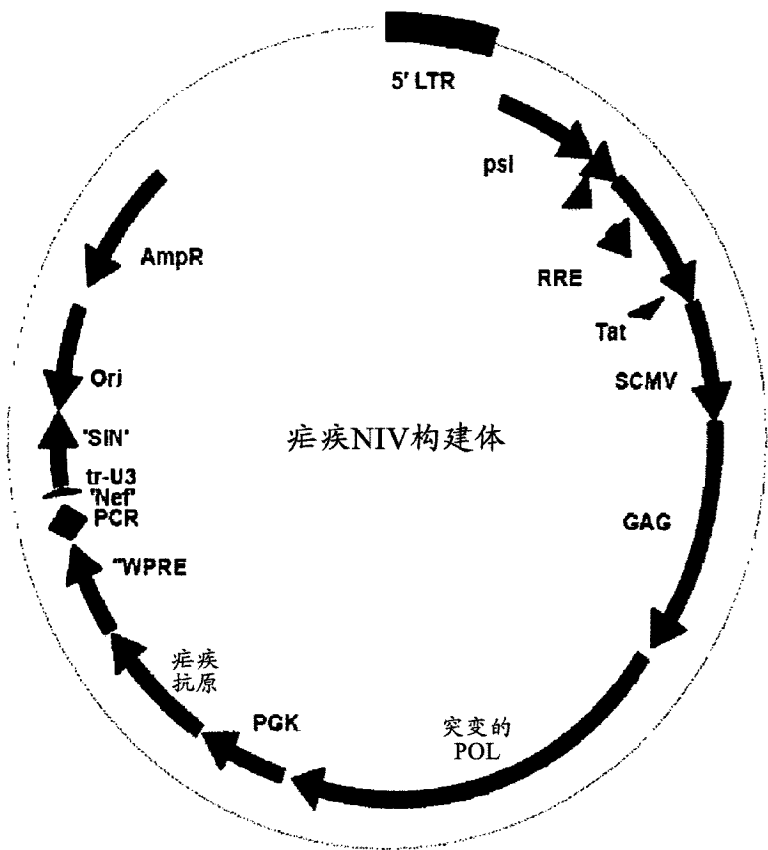


图 20

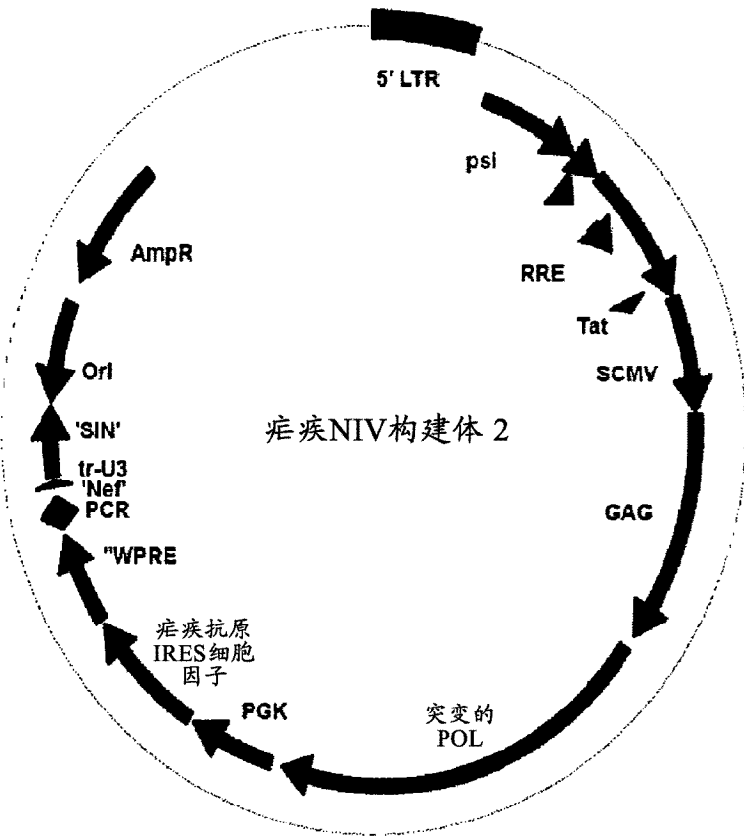


图 21

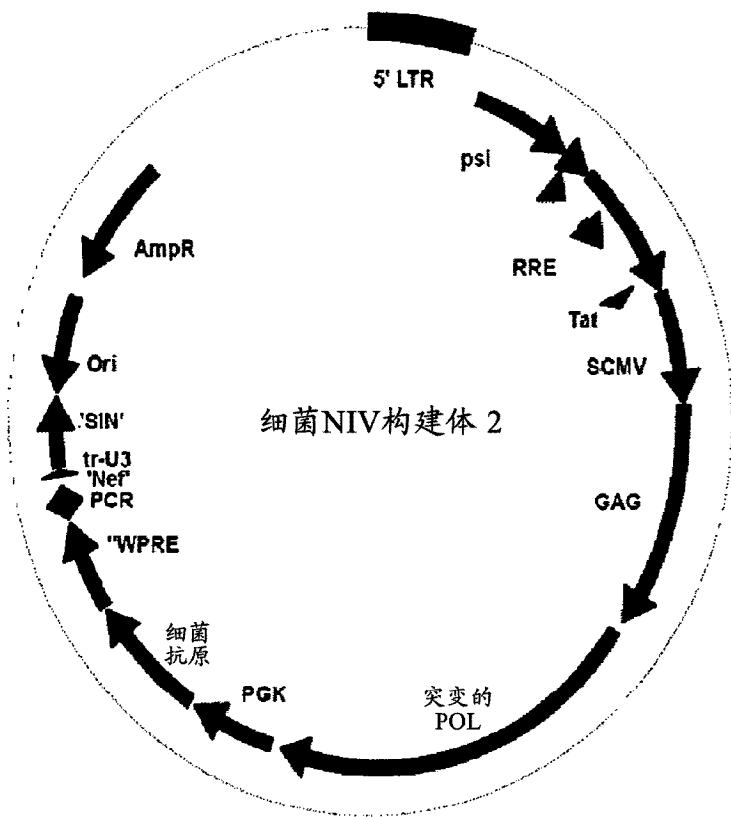


图 22

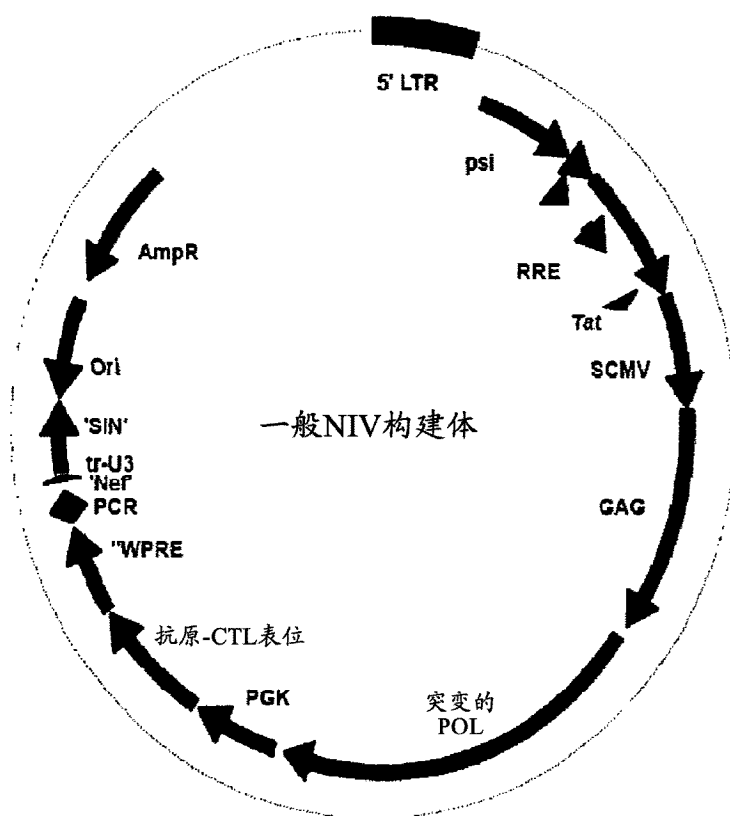


图 23

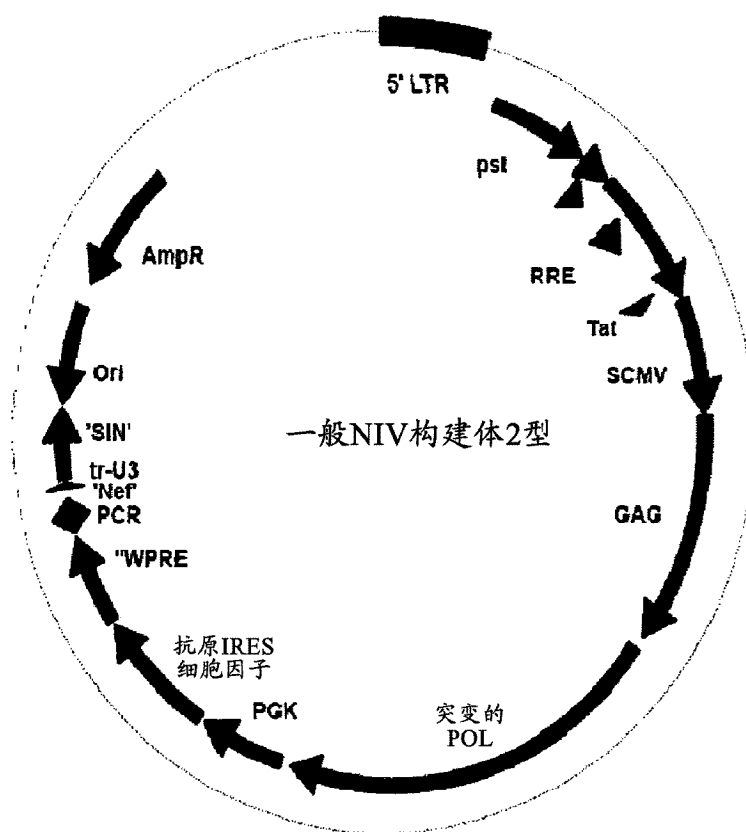


图 24

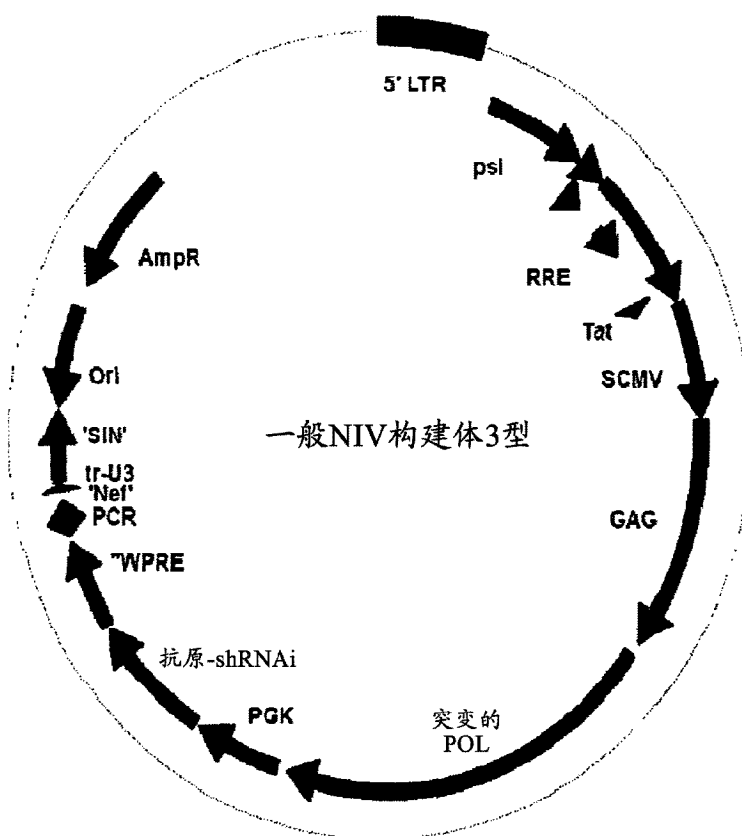


图 25

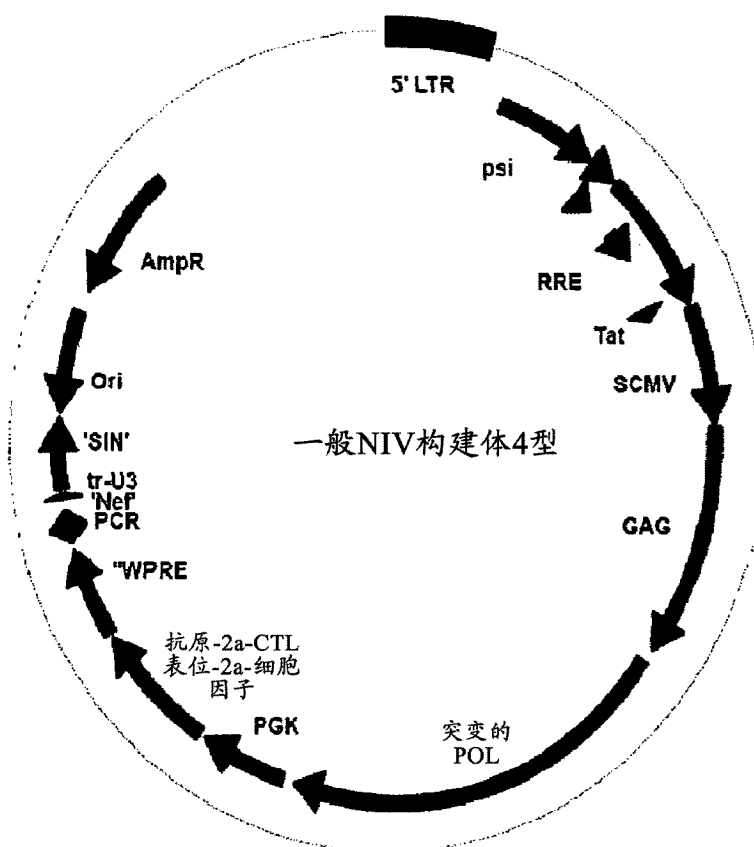


图 26