



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104412108 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201380036258.0

(22)申请日 2013.05.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104412108 A

(43)申请公布日 2015.03.11

(30)优先权数据

61/647,764 2012.05.16 US

61/679,387 2012.08.03 US

61/714,158 2012.10.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/041364 2013.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/173590 EN 2013.11.21

(73)专利权人 免疫设计公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 小托马士·W.·杜宾斯基

南西·A.·胡思肯

史考特·H.·罗宾斯

玛格莉特·D.·莫瑞

(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 许静 黄灿

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

C07K 14/005(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

(56)对比文件

W0 03086308 A2,2003.10.23,

W0 2010135747 A1,2010.11.25,

CN 101516396 A,2009.08.26,

Brian R.Bowman等.Structure of the herpesvirus major capsid protein.《The EMBO Journal》.2003,第22卷(第4期),

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书46页

序列表33页 附图20页

(54)发明名称

用于HSV-2的疫苗

(57)摘要

本发明提供了重组HSV-2蛋白和诸如佐剂等先天免疫系统激动剂的组合物作为疫苗。蛋白质包括包膜糖蛋白和不同于包膜糖蛋白的结构蛋白,例如衣壳蛋白或被膜蛋白。所述疫苗是用于HSV-2血清阳性或血清阴性受试者。

1. 一种三价免疫原性组合物,其包含:

(a) 一种2型单纯疱疹病毒 (HSV-2) UL19多肽的免疫原性片段,其中所述UL19的免疫原性片段具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列,且其中所述免疫原性片段缺乏SEQ ID NO:4的第1-450位氨基酸中的至少75%并且缺乏SEQ ID NO:4的第1055-1374位氨基酸中的至少75%,或其免疫原性变体,所述免疫原性变体在所述免疫原性片段全长上保持至少95%氨基酸同一性;HSV-2的糖蛋白D (gD2),其中所述gD2包含SEQ ID NO:2或3中所示的氨基酸序列,或其包含SEQ ID NO:2或3中的至少15个连续氨基酸的免疫原性片段;及UL25,其中所述UL25包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列,或其包含SEQ ID NO:5中的至少15个连续氨基酸的免疫原性片段;

(b) 吡喃葡萄糖基脂佐剂 (Glucopyranosyl Lipid Adjuvant; GLA); 以及

(c) 药学上可接受的载体。

2. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中所述GLA呈水包油乳液形式或呈水溶液形式。

3. 如权利要求2所述的三价免疫原性组合物,其中所述水包油乳液包含角鲨烯。

4. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中所述UL19的免疫原性片段具有SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中所述UL19的免疫原性片段融合至异源肽。

6. 如权利要求5所述的三价免疫原性组合物,其中所述异源肽是标签或标记序列。

7. 如权利要求6所述的三价免疫原性组合物,其中所述标签是组氨酸标签,其任选地包含裂解序列。

8. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中所述UL25包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列;或其在SEQ ID NO:5的全长上保持至少95%氨基酸同一性且能够诱导针对SEQ ID NO:5中所示的UL25蛋白的免疫反应的变体;或其包含SEQ ID NO:5中的至少15个连续氨基酸的免疫原性片段。

9. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中所述gD2包含SEQ ID NO:2或3中所示的氨基酸序列;或其在SEQ ID NO:2或3的全长上保持至少95%氨基酸同一性且能够诱导针对SEQ ID NO:2或3中所示的gD2蛋白的免疫反应的变体;或其包含SEQ ID NO:2或3中的至少15个连续氨基酸的免疫原性片段。

10. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中所述UL25包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列;或其在SEQ ID NO:5的全长上保持至少95%氨基酸同一性且能够诱导针对SEQ ID NO:5中所示的UL25蛋白的免疫反应的变体;或其包含SEQ ID NO:5中的至少15个连续氨基酸的免疫原性片段;且其中所述gD2包含SEQ ID NO:2或3中所示的氨基酸序列;或其在SEQ ID NO:2或3的全长上保持至少95%氨基酸同一性且能够诱导针对SEQ ID NO:2或3中所示的gD2蛋白的免疫反应的变体;或其包含SEQ ID NO:2或3中的至少15个连续氨基酸的免疫原性片段。

11. 如权利要求1所述的三价免疫原性组合物,其中gD2融合至异源肽;或UL25融合至异源肽;或此两者。

12. 一种如权利要求2及3中任一项所述的组合物的用途,其是用于制造用于在受试者

中产生免疫反应的医药品。

13. 如权利要求12所述的用途, 其中所述医药品是用于经真皮内、经粘膜、肌肉内、皮下、舌下、直肠或阴道的途径施用。

14. 如权利要求12所述的用途, 其中所述医药品与第二、第三或第四组合物组合使用, 且其中所述第二、第三及第四组合物如权利要求2及3中任一项所定义。

15. 如权利要求13所述的用途, 其中所述医药品与第二、第三或第四组合物组合使用, 且其中所述第二、第三及第四组合物如权利要求2及3中任一项所定义。

用于HSV-2的疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求美国临时专利申请号61/647,764 (2012年5月16日提交)、61/679,387 (2012年8月3日提交) 以及61/714,158 (2012年10月15日提交) 的权益, 所有这些临时专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 参考序列表

[0004] 本专利申请的序列表单独以文件名“47733_SeqListing.txt”提供。此文件(其形成于2013年5月16日, 并且由45,969字节组成)的内容以其全文并入。

技术领域

[0005] 用于单纯疱疹病毒-2感染的疫苗以及相关方法和组合物。

背景技术

[0006] HSV-2 (单纯疱疹病毒-2) 是疱疹病毒科的一个成员, 疱疹病毒科是一组DNA病毒, 其往往引起皮肤损害(例如水痘和热病性疱疹) 并且特征在于潜伏性和复发性感染。HSV-2是生殖器溃疡的主要原因, 生殖器溃疡可表现为充满流体的小水泡的群集, 所述充满流体的小水泡破裂并且形成含人痛苦的疮, 需要数周来治愈。其它症状可包括发热、全身不适感、肌肉疼痛、排尿痛苦、阴道分泌物以及腹股沟区域淋巴结肿大、疼痛。产生复发是有可能的。病毒可在受感染受试者的一生中存在于神经细胞中, 并且不定期重新激活, 从而形成皮肤溃疡。甚至在不存在实际溃疡的情况下, 病毒也可产生并且在个体之间传播。其目前是不可治愈的。

[0007] 生殖器疱疹是最普遍的性传播疾病。在美国, 超过16%的人口或六个人中约一人感染HSV-2, 其中对女性(女性约20%而男性12%) 和非洲裔美国人(总体约40%而非洲裔美国人女性将近50%) 造成不成比例的负担。(Morbidity and Mortality Weekly Report, 59:456-459, 2010年4月23日)。在美国总共约5000万人受感染, 其中约80%未意识到其感染, 但仍可能是感染的。在世界上其它地方, HSV-2也达到流行病比例。WHO小组估计2003年世界范围内53600万人受感染, 并且以每年约2300万出现新的感染(Looker等, Bull World Health Organ. 86:805-812, 2008)。尽管发病率因区域不同而不同, 但大体上发病率随年龄增加而增加, 并且与在男性中相比在女性中更高。此外, 发展中国家的HSV-2发病率高于发达国家, 例外为北美, 其具有高HSV-2发病率; 以及南亚, 其具有相对低的HSV-2发病率。最高发病率发现在撒哈拉以南非洲, 其中几乎80%的女性和45%的男性感染HSV-2。其它区域(值得注意的是东亚和东南亚) 接近此水平。除性传播之外, HSV-2可典型地在分娩时从女性传播至婴儿。伴随在成人美国人口的HSV-2流行性, 新生儿感染的发生率也已显著增加。在美国每年出现约1,800例新生儿HSV感染, 这是比新生儿HIV感染更高的病例数。

[0008] HSV-2感染的健康暗示是摇摆不定的。尽管绝大多数感染个体是无症状的, 但病毒仍可传播。那些具有症状者忍受其生殖器和肛门区域的令人痛苦的疮并且往往具有流感样症状, 诸如发热和腺体肿胀。不幸的是, 那些首次发作HSV-2者在单单第一年内就很可能再

发作若干次(典型地四次或五次)。不管症状的严重性如何,得知感染往往造成压力并且可负面影响生活质量(Rosenthal等,Sex Transm Infect.82:154,2006;Crosby等Sex Health,5:279-283,2008)。在感染HSV-2的婴儿中,因HSV感染造成的新生儿脑炎的死亡率甚至在治疗的情况下还>15%,并且在HSV-2感染婴儿中在幸存案例中神经病学发病率又是30-50%。伴随着HSV-2的高发病率,存在一种很明显的认识:HSV-2感染基本上增加了HIV-1感染和传播的危险。来自非洲的资料显示HSV-2感染可使HIV传播的危险增至高达七倍并且新感染的HIV病例中高达一半是直接归因于HSV-2感染。总的说来,在HSV-2感染个体中HIV感染的相对危险性增至超过两倍。HSV-2对HIV感染的协同作用比任何其它性传播感染更大,这加强了对能够使当前HSV-2流行性的影响减到最低程度的有效公众健康策略的需要。

[0009] 尽管广泛使用药理学干涉,在成人和儿科群体中HSV-2发病率仍逐渐增加。在感染早期以高剂量给予诸如阿昔洛韦(acyclovir)等抗病毒药物可减少HSV传播,但这并不阻止神经元神经节的潜伏性感染。抗病毒治疗具有许多缺点,包括作为副作用的恶心、呕吐、皮疹以及肾功能减退,并且应谨慎使用,因为它们可能产生畸形并且对发育中的胚胎具毒性。此外,不管早期干涉如何,连续抑制性施用伐昔洛韦(valcyclovir)使HSV传播减至小于50%。即使此水平的影响是可接受的,但考虑高成本和80%受感染者未意识到其状态,所述方法是不切实际的。诸如局部杀微生物剂等抗病毒药物替代物在临床上未经证实,并且物理屏障(例如避孕套)具有边际“现实世界”功效。由于这些原因,接种对与HSV-2感染斗争并且减小其健康影响来说必不可少。

[0010] 首株HSV疫苗在二十世纪二十年代产生,并且从那时起,已试验过多种疫苗途径,全部无效。包括全病毒、灭活病毒、减毒活病毒、修饰型活病毒以及细胞培养物衍生的亚单位的常规历史悠久的疫苗类型大部分是不成功的或功效低(Stanberry,Herpes 11(增刊3)161A-169A,2004)。随着重组DNA技术的出现,已产生重组亚单位疫苗。这些疫苗包含一种或两种与佐剂组合的包膜糖蛋白。糖蛋白是有吸引力的候选物,主要因为它们是和抗体的目标并且它们在HSV-2株中高度保守。在最近十年间,对两种候选疫苗的广泛临床试验(一个由Chiron发起并且另一个由GlaxoSmithKline发起)皆因功效不够而停止。Chiron的疫苗包含与佐剂MF59组合的两种HSV-2糖蛋白的截短形式gD2和gB2。所述疫苗最多提供针对HSV-2的暂时保护,不过产生抗体对HSV-2的高效价(Stanberry,同前)。GlaxoSmithKline(GSK)研发并且测试了一种类似疫苗;然而其仅含有单一糖蛋白gD2以及明矾和MPL作为佐剂。在八年的研究和临床试验之后,GSK于2010年10月宣布其失败。疫苗在预防血清阴性女性(已似乎有益的早期临床试验中仅有的组)感染方面不成功。

发明内容

[0011] 在本公开的一个实施方案中,提供一种选自以下的HSV-2多肽的免疫原性片段:(a) UL19多肽的免疫原性片段,其缺乏SEQ ID NO:4的第1-450位氨基酸的至少75%并且缺乏SEQ ID NO:4的第1055-1374位氨基酸的至少75%;(b) SEQ ID NO:12中所示的序列;(c) (a)或(b)的免疫原性变体,其在至少15个连续氨基酸上保持至少85%氨基酸同一性;(d) (a)或(b)的免疫原性片段;以及(e) (a)、(b)、(c)或(d)的嵌合融合体。在另一个实施方案中,提供一种编码以上所提到的多肽的分离的多核苷酸。

[0012] 本公开还提供药物组合物。在一个实施方案中,提供一种包含以下的免疫原性药

物组合物：(i) 选自以下的HSV-2多肽的免疫原性片段：(a) UL19多肽的免疫原性片段，其缺乏SEQ ID NO:4的第1-450位氨基酸的至少75%并且缺乏SEQ ID NO:4的第1055-1374位氨基酸的至少75%；(b) SEQ ID NO:12中所示的序列；(c) (a) 或 (b) 的免疫原性变体，其在至少15个连续氨基酸上保持至少85%氨基酸同一性；(d) (a) 或 (b) 的免疫原性片段；以及(e) (a)、(b)、(c) 或 (d) 的嵌合融合体；(ii) 任选地，激活先天免疫的试剂；以及(iii) 药学上可接受的载体。

[0013] 在另一个实施方案中，提供以上所提到的组合物，其进一步包含UL25或其免疫原性片段。在另一个实施方案中，组合物进一步包含gD2或其免疫原性片段。

[0014] 在本公开的另一个实施方案中，提供以上所提到的组合物，其中所述试剂是佐剂。在一个实施方案中，所述佐剂是GLA。在另一个实施方案中，GLA呈水包油乳液或水溶液形式。在某些实施方案中，水包油乳液包含角鲨烯。

[0015] 在本公开的另一个实施方案中，提供一种用于治疗受试者的HSV-2感染的方法，其包括向受试者施用以上所提到的组合物。在另一个实施方案中，提供一种在受试者中产生免疫反应的方法，其包括向受试者施用以上所提到的组合物。在另一个实施方案中，提供一种用于针对HSV-2对受试者进行免疫的方法，其包括向受试者施用以上所提到的组合物。根据公开的各种实施方案，提供一种以上所提到的方法，其中施用途径是真皮内、经粘膜、肌肉内、皮下、舌下、直肠或阴道施用。在另一个实施方案中，提供一种以上所提到的方法，其进一步包括向受试者施用如权利要求3-8中任一项所述的第二、第三或第四组合物。

[0016] 所要求的发明是针对适用于预防或治疗受试者（优选地人类，在一个实施方案中人类是女性，而在另一个实施方案中人类是男性）的HSV-2（单纯疱疹病毒2）感染的组合物和方法。组合物包含(i) HSV-2的包膜糖蛋白或HSV-2包膜糖蛋白的免疫原性片段，(ii) HSV-2结构蛋白或HSV-2结构蛋白的免疫原性片段，其中结构蛋白不是包膜糖蛋白中的一种，(iii) 激活受试者的先天免疫的试剂以及(iv) 药学上可接受的载体。在某些实施方案中，包膜糖蛋白是gD2并且组合物具有gD2，或者在一个替代实施方案中，具有衍生自gD2的免疫原性片段。在一些实施方案中，结构蛋白是UL47、ICP0、ICP4、ICP47、UL5、UL8、UL15、UL19、UL25、UL30、UL32、UL46、UL39 (ICP10)、UL7、UL40、UL54以及UL26中的一种或多种，并且如果存在免疫原性片段，那么其衍生自UL47、ICP0、ICP4、ICP47、UL5、UL8、UL15、UL19、UL25、UL30、UL32、UL46、UL39 (ICP10)、UL7、UL40、UL54和/或UL26。应了解，从一种疱疹病毒到另一种疱疹病毒蛋白质的精确序列可不同，并且因此对HSV-2蛋白的所有提及均涵盖可获自任何天然存在的HSV-2的任何所述蛋白质。在其它实施方案中，存在UL19与UL25两者或UL19（例如SEQ ID NO.12，一种类型的上域片段）和UL25的片段或全蛋白与片段的混合物，例如全长UL25与例如SEQ ID NO.12的UL19的片段、任选地与UL47或其片段的混合物。有时，激活先天免疫的试剂是佐剂。具体地说，佐剂可以是GLA或另一种MALA佐剂。在一个实施方案中，免疫原性药物组合物包含gD2、GLA或另一种MALA佐剂以及两种或三种选自以下的抗原：全长UL25、UL19以及UL47或其片段；以及药学上可接受的载体。在相关实施方案中，免疫原性药物组合物包含MALA佐剂（优选地具有图1结构式的GLA）、gD2、UL25、UL19上域片段以及药学上可接受的载体；任选地所述组合物进一步包含一种或多种其它HSV-2结构蛋白或其片段。

[0017] 在一些实施方案中，组合物包含HSV-2的包膜糖蛋白的抗原部分以及药学上可接

受的载体。术语“免疫原性片段”和“免疫片段”以及“抗原部分”在本文中可互换使用,用于命名引发抗体反应或细胞毒性反应并且保持全长蛋白的特异性(与其交叉反应性)的蛋白质片段或部分。在某些实施方案中,抗原部分结合于中和抗体。在某些实施方案中,抗原部分来自gD2或gB2,而在其它实施方案中,抗原部分无论来自gD2、gB2或另一种包膜糖蛋白,均包含至少一部分并且任选地所有前导序列。在任一实施方案中,抗原部分包含来自包膜糖蛋白的两个或更多个线性表位或包含两个或更多个不连续表位。在任一实施方案中,组合物进一步包含激活先天免疫的试剂。所述试剂可以是佐剂,诸如如在例如美国公布号2009/0181078中所公开的GLA。

[0018] 所述方法可用于治疗HSV-2感染或用于产生免疫反应,其可预防或改善HSV-2感染。适合用于所述方法的受试者包括是HSV-2血清阳性的受试者以及是HSV-2血清阴性的受试者。在所述方法中,向受试者施用本文所描述的组合物中的一种。

[0019] 本发明的一些示例性陈述阐述如下,使用标识(xy),其中x和y各表示字母,标识表示实施方案,或者当在一个实施方案内标示超过一个(xy)时表示实施方案的群组。(AA)一种免疫原性药物组合物,其包含(i) HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;(ii) 不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;(iii) 激活先天免疫的试剂;以及(iv) 药学上可接受的载体。(AB) 组合物(AA),其中HSV-2的包膜糖蛋白是gD2,并且组合物包含gD2。(AC) 组合物(AA),其中组合物包含gD2的免疫片段。(AD) (AA)、(AB) 以及(AC) 中的任何一种或多种的组合物,其中HSV-2的结构蛋白是一种或多种选自以下的蛋白质:UL47、ICP0、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26。(AE) 组合物(AA),其中HSV-2的结构蛋白是UL19。(AF) 组合物(AB),其中HSV-2的结构蛋白是UL19。(AG) 组合物(AA),其中HSV-2的结构蛋白是UL19的免疫片段,例如SEQ ID NO.12。(AH) 组合物(AB),其中HSV-2的结构蛋白是UL47的免疫片段。(AI) 组合物(AA),其中HSV-2的结构蛋白是UL25。(AJ) 组合物(AB),其中HSV-2的结构蛋白是UL25。(AK) 组合物(AA),其中HSV-2结构蛋白是UL25的免疫片段。(AL) 组合物(AB),其中HSV-2的结构蛋白是ICP0。(AM) 组合物(AA),其中HSV-2的结构蛋白是UL47。(AN) 组合物(AB),其中HSV-2的结构蛋白是UL47的片段。(AO) 组合物(AA),其中不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白是UL47,并且是其免疫片段。(AP) 组合物(AB),其中不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白是UL47,并且是其免疫片段。(AQ) (AA)、(AB)、(AC)、(AD)、(AE)、(AF)、(AG)、(AH)、(AI)、(AJ)、(AK)、(AL)、(AM)、(AN)、(AO)、(AP) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含不同于HSV-2的包膜糖蛋白的第二HSV-2的结构蛋白或其免疫片段。(AR) 组合物(AQ),其中不同于HSV-2的包膜糖蛋白的第二HSV-2的结构蛋白选自UL19、UL25以及UL47,其中第二结构蛋白与所述结构蛋白不同。(AS) 组合物(AR),其包含第二结构蛋白。(AT) 组合物(AR),其包含第二结构蛋白的免疫片段。(AU) (AE)、(AF)、(AG) 和/或(AH) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL25。(AV) (AE)、(AF)、(AG) 和/或(AH) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL25的免疫片段。(AW) (AE)、(AF)、(AG) 和/或(AH) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL47。(AX) (AE)、(AF)、(AG) 和/或(AH) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL47的免疫片段。(AY) (AI)、(AJ)、(AK) 和/或(AL) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL19。(AZ) (AI)、(AJ)、(AK) 和/或(AL) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL19的免疫片段,例如SEQ ID NO 12。(BA) (AI)、(AJ)、(AK) 和/或(AL) 中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL47。(BB) (AI)、(AJ)、(AK) 和/或

(AL)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL47的免疫片段。(BC) (AM)、(AN)、(AO)和/或(AP)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL19。(BD) (AM)、(AN)、(AO)和/或(AP)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL19的免疫片段。(BE) (AM)、(AN)、(AO)和/或(AP)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL25。(BF) (AM)、(AN)、(AO)和/或(AP)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL25的免疫片段。(BG) (AA)、(AB)、(AC)、(AD)、(AE)、(AF)、(AG)、(AH)、(AI)、(AJ)、(AK)、(AL)、(AM)、(AN)、(AO)、(AP)、(AQ)、(AR)、(AS)、(AT)、(AU)、(AV)、(AW)、(AX)、(AY)、(AZ)、(BA)、(BB)、(BC)、(BD)、(BE)以及(BF)中的任何一种或多种的组合物,其中所述试剂是佐剂。(BH)选自(BG)的组合物,其中佐剂是GLA或另一种MALA佐剂,并且(BG)中的选项各自或每一种独立地被挑选作为本发明的不同实施方案。(BI)组合物(AA),其包含gD2;UL25;UL19;GLA或另一种MALA佐剂;以及药学上可接受的载体。(BJ)组合物(AA),其包含gD2、UL25以及UL19的免疫片段。(BK)组合物(AA),其包含gD2、UL19以及UL25的免疫片段。(BL) (BI)、(BJ)以及(BK)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL47。(BM) (BI)、(BJ)以及(BK)中的任何一种或多种的组合物,其进一步包含UL47的免疫片段。(BN)一种用于治疗受试者的HSV-2感染的方法,其包括向受试者施用(AA)、(AB)、(AC)、(AD)、(AE)、(AF)、(AG)、(AH)、(AI)、(AJ)、(AK)、(AL)、(AM)、(AN)、(AO)、(AP)、(AQ)、(AR)、(AS)、(AT)、(AU)、(AV)、(AW)、(AX)、(AY)、(AZ)、(BA)、(BB)、(BC)、(BD)、(BE)、(BF)、(BG)、(BH)、(BI)、(BJ)、(BK)、(BL)以及(BM)中的任何一种或多种的组合物。(BO)一种用于在受试者中产生对HSV-2的免疫反应的方法,其包括向受试者施用(AA)、(AB)、(AC)、(AD)、(AE)、(AF)、(AG)、(AH)、(AI)、(AJ)、(AK)、(AL)、(AM)、(AN)、(AO)、(AP)、(AQ)、(AR)、(AS)、(AT)、(AU)、(AV)、(AW)、(AX)、(AY)、(AZ)、(BA)、(BB)、(BC)、(BD)、(BE)、(BF)、(BG)、(BH)、(BI)、(BJ)、(BK)、(BL)、(BM)以及(BN)中的任何一种或多种的组合物。(BQ)方法(BO),其中受试者是HSV-2血清阳性并且HSV-1血清阳性的。(BR)方法(BO),其中受试者是HSV-2血清阳性并且HSV-1血清阴性的。

[0020] 在一个实施方案中,提供一种组合物,其包含HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;两种同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;激活先天免疫的试剂;以及药学上可接受的载体。示例性组合物是包含以下成分的组合物:gD2、UL25以及SEQ ID NO.12 (UL19的片段)以及单磷酸脂质A (MALA) 佐剂,例如GLA。除gD2特异性抗体反应之外,用此组合物接种可引起与用活病毒进行后续感染相对应的加强的HSV-2抗原特异性CD4和CD8效应因子和记忆T细胞。值得注意的是,用此组合物进行预防性免疫可大大地或完全地针对C57BL/6小鼠中致死性阴道内HSV-2感染进行保护,其中生殖器粘膜与背根神经节两者中为消除性免疫。此组合物可使通过事先用减毒HSV-2株感染所诱导的CD4与CD8T细胞两者增加。与此一致,当作用于豚鼠的复发性HSV-2损害的治疗时,此组合物可降低复发性损害的频率。

[0021] 还提供试剂盒。在一些试剂盒中,存在包含药物组合物的小瓶,所述药物组合物包含HSV-2包膜糖蛋白的抗原部分以及药学上可接受的载体。

[0022] 在参考以下详细描述和随附图式之后,本发明的这些和其它方面以及实施方案将变得很明显。

附图说明

[0023] 图1A-B呈现GLA的图式(用于实施例中的佐剂)以及具有表面活性剂磷脂酰胆碱和普卢兰尼克F68(Pluronic F68)的示例性油滴的示意图。

[0024] 图2示出了gD2特异性CD4T细胞反应。数据是在用包含如所指示的不同水平的重组蛋白和GLA的二价疫苗以28天时间间隔将Balb/c小鼠(4只/组)壁内免疫两次之后获得。这些图表是关于IL-2、TNF- α 以及IFN- γ 的细胞内产生的流式细胞术分析的结果。

[0025] 图3示出了在引发后D25天(加强后D4)分析的针对OVA257肽的脾CD8T细胞反应;重组OVA=5 μ g;SE=2%;慢病毒s.c.递送;重组OVA i.m.递送。

[0026] 图4是显示加强之后4天测量的细胞因子阳性CD8T细胞百分比的图表。在第0天进行引发并且在第21天进行加强。柱HA1,d0HBSS,d21,PBS;HA2,d0,LV-OVA,d21,PBS;HA3,d0LV-OVA,d21LV-OVA;HA4,d0LV-OVA,d2120 μ g GLA-SE;HA5,d0LV-OVA,d21OVA+SE;HA6,d0LV-OVA,d21OVA+20 μ g GLA-SE;HA7,d0LV-OVA,d21,4 μ g OVA+GLA-SE;HA8,d0LV-OVA,d21OVA+0.8 μ g GLA-SE。

[0027] 图5A-B示出了在用与5 μ g GLA-SE组合的5 μ g重组gD、UL19或UL25蛋白经由引发/加强免疫方案(d0引发/d21加强)对C57BL/6小鼠组(5只/组)进行免疫之后获得的数据。在加强后第4天,通过在用事先确定为含有关于相应重组蛋白免疫原的CD4表位的15-mer肽进行离体再刺激之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-2的细胞内染色来测量脾CD4T细胞反应。A)指示了在用相应重组蛋白免疫原免疫的小鼠中各15-mer肽的CD4T细胞反应的代表性ICS点状图。B)描绘了各组的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。

[0028] 图6A-B示出了在用在等摩尔基础(分别0.8、3.3以及1.4 μ g蛋白质)上与5.5 μ g GLA-SE组合调配并且以组合形式递送的重组gD、UL19以及UL25蛋白经由引发/加强方案(d0引发/d21加强)对一组五只C57BL/6小鼠进行免疫之后获得的数据。在加强后第4天,通过在用事先确定为含有关于各重组蛋白免疫原的CD4T细胞表位的15-mer肽离体再刺激之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-12的细胞内染色来测量脾CD4T细胞反应。将来自各肽库的缺少CD4T细胞表位的个别肽包括在内作为阴性对照。A)描绘了各组的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。B)在三价疫苗内各重组蛋白免疫原的IgG1亚类抗原特异性抗体的血清终点效价(定义为>2倍背景值的最高血清稀释度的倒数)。

[0029] 图7A-B示出了当用与5 μ g GLA-SE组合递送的5 μ g重组UL19蛋白经由引发(d0)或引发加强(d0引发/d21加强)免疫方案对各组C57BL/6小鼠(5只/组)进行免疫时获得的数据。在最后一次免疫后第4天或第10天,通过在用事先确定为含有关于UL19的CD4T细胞表位的15-mer肽离体再刺激之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-12的ICS来测量脾CD4T细胞反应。A)指示了在用相应重组蛋白免疫原免疫的小鼠中UL19 15-mer肽297的CD4T细胞反应的代表性ICS点状图。描绘了各组的细胞因子阳性DC4T细胞百分比。B)描绘了各组对UL19 15-mer250或297作出反应的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。

[0030] 图8A-B示出了当用单独或与5 μ g SE或GLA-SE组合递送的5 μ g重组UL19蛋白经由引发(d0)或引发加强(d0引发/d21加强)免疫方案对各组C57BL/6小鼠(5只/组)进行免疫时获得的数据。在最后一次免疫后第5天或第10天,通过在用事先确定为含有关于UL19的CD4T细胞表位的15-mer肽离体再刺激之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-12的ICS来测量脾CD4T细胞反应。A)指示了在用相应重组蛋白免疫原免疫的小鼠中UL19 15-mer肽297的CD4T细胞反应的代表性ICS点状图。描绘了各组的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。B)描绘了各组对

UL19 15-mer250或297作出反应的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。

[0031] 图9A-C示出了当用在等摩尔或等质量基础上调配的重组蛋白经由引发加强(d0引发/d21加强)免疫方案对各组C57BL/6小鼠(5只/组)进行免疫时获得的数据。递送的总蛋白是5 μ g或15 μ g。在最后一次免疫后第5天,通过在使用事先确定为含有CD4T细胞表位的15-mer肽离体再刺激之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-12的细胞内染色来测量脾CD4T细胞反应。A)描绘了对gD肽作出反应的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。B)描绘了对UL19肽作出反应的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。C)描绘了对UL25肽作出反应的细胞因子阳性CD4T细胞百分比。

[0032] 图10示出了当用以100 μ l(50 μ l/腿)肌肉内递送的与4 μ g GLA-SE、单独SE或PBS媒介物组合的4 μ g重组gD蛋白经由引发/加强免疫方案(d0引发/d21加强)对各组BALB/c小鼠(5只/组)进行免疫时获得的数据。通过ELISA测量IgG、IgG1以及IgG2a同型抗原的HSV-2gD2特异性抗体。

[0033] 图11示出了当用三价疫苗或对照疫苗物品对各组的五个C57BL/6小鼠进行单次肌肉内免疫时获得的数据,所述三价疫苗由与5 μ g GLA-SE组合的重组gD2、UL19ud以及UL25各5 μ g组成。在免疫后第6天,通过在使用gD2、UL19或UL25肽进行脾细胞培养5小时的离体再刺激之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-2的细胞内细胞因子染色(ICS)来测量抗原特异性脾CD4和CD8T细胞反应。A)对gD2、UL19ud或UL25肽作出反应的CD4T细胞的频率和细胞因子表型。B)对UL19肽作出反应的CD8T细胞的频率和细胞因子表型。C)在早期用具有GLA-SE的三价疫苗免疫4周并且用减毒HSV-2胸苷激酶缺乏型(TK-)病毒进行皮下激发的小鼠中对UL19肽作出反应的CD8T细胞的频率。

[0034] 图12显示当用二价疫苗对各组的十只C57BL/6小鼠相隔28天进行两次肌肉内免疫时获得的数据,所述二价疫苗由与5 μ g GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2和UL19ud各5 μ g组成。用单独5 μ g GLA-SE免疫的小鼠充当阴性对照。第二次免疫后22天,将小鼠用毒性持久的乙酸甲羟孕酮处理并且接着在六天后用50xLD₅₀剂量的野生型HSV-2阴道内激发。每天监测小鼠的生殖器损害形成和存活率。感染后第1天、第3天以及第5天,收集阴道拭子用于通过PCR定量HSV-2DNA。感染后约2个月,从幸存小鼠收获背根神经节并且通过PCR定量潜伏性HSV-2DNA。如图12中图片A所描绘,与用单独gD2和UL19ud或单独GLA-SE免疫的小鼠相比,用gD2和UL19ud加上GLA-SE免疫的小鼠的损害形成显著降低并且存活率增加。同样地,如图12中图片B所描绘,用gD2和UL19ud加上GLA-SE免疫的10只小鼠中9只到第5天不具有可检测的HSV-2DNA,然而在任一对照组中的小鼠在5天中均在阴道中显示持续水平的HSV-2。如图12中图片C所描绘,尽管在仅GLA-SE组中存在三只幸存鼠,但是这3只小鼠中2只在背根神经节中显示显著水平的潜伏性HSV-2,用gD2和UL19ud加上GLA-SE免疫的小鼠在神经节中显示极少到不显示可检测的HSV-2。

[0035] 图13显示当将C57BL/6小鼠(5只/组)用次致死剂量的减毒HSV-2胸苷激酶缺乏型(TK-)病毒皮下感染接着用三价疫苗免疫28天后时获得的数据,所述三价疫苗由与5 μ g GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2、UL19ud以及UL25各5 μ g组成。对照组包括用单独GLA-SE或单独媒介物处理的感染小鼠以及用单独媒介物处理的未感染小鼠。免疫后六天,在用UL19肽刺激之后通过ICS测量UL19特异性CD8(上部图片)和CD4(下部图片)T细胞反应。

[0036] 图14显示当用次致死剂量的HSV-2株333病毒阴道内感染豚鼠(7只/组)并且接着

在感染后第13天和第27天用三价疫苗处理时获得的数据,所述三价疫苗由与5 μ g GLA-SE组合的gD2、UL19ud以及UL25各5 μ g组成。用单独GLA-SE处理的感染豚鼠充当阴性对照。每天监测动物的阴道损害并且对各损害日分配以得分0-4。将各组的日损害得分取平均值并且描绘随时间变化的曲线。

[0037] 图15显示当用三价疫苗对各组的十只C57BL/6小鼠相隔28天进行两次肌肉内免疫时获得的数据,所述三价疫苗由与5 μ g GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2、UL19ud (参见SEQ ID NO:12) 以及UL25各5 μ g组成。用单独5 μ g GLA-SE免疫的小鼠充当阴性对照。其它对照组由在激发之后24小时开始用5 μ g GLA-SE和1毫克/ml的阿昔洛韦(aciclovir; ACV)/饮用水免疫的小鼠组成。第二次免疫后二十二天,将小鼠用药性持久的乙酸甲羟孕酮处理并且接着在六天后用50xLD₅₀剂量的野生型HSV-2阴道内激发。每天监测小鼠的生殖器损害形成(图片A)和存活率(图片B)。

[0038] 图16:示出了用三价gD2、UL19ud (SEQ ID NO:12) 以及UL25疫苗免疫的小鼠的阴道HSV-2DNA水平(关于各组小鼠的描述参见图15)。在感染后第1天、第3天以及第5天收集阴道拭子,用于通过PCR定量HSV-2DNA。

具体实施方式

[0039] 本公开提供用于治疗或用于预防包括HSV-1和HSV-2感染的单纯疱疹病毒感染的免疫原性药物组合物和方法。所述组合物包含免疫原性HSV-2病毒蛋白或病毒蛋白的免疫原性部分,诸如片段或肽;以及至少一种激活先天免疫系统的试剂,优选地TLR4激动剂,例如如本文所描述的MALA佐剂。病毒蛋白(以及片段和肽)包含至少一种包膜糖蛋白以及至少一种、两种、三种或四种不同于包膜糖蛋白的结构蛋白。或者,病毒蛋白(以及片段和肽)包含至少一种抗原表位并且可包含包膜蛋白的前导肽的一部分或全部。可使用免疫原性片段。适用于组合物中的一些特定试剂包括佐剂,其为增强对抗原的免疫反应的物质。蛋白质和片段典型地是通过重组技术产生,其中蛋白质或片段在所培养的细胞中表达。肽还可以是化学合成的。

[0040] A. 作为疫苗组分的HSV-2蛋白

[0041] HSV-2 (2型单纯疱疹病毒) 是一种包膜病毒。其基因组在75种不同蛋白质上表达。所述蛋白质中许多是结构蛋白并且用于形成衣壳和被膜,而另外一些是包膜的一部分。主要衣壳蛋白包括由开放阅读框(如果常用名称不同于ORF名称,那么括号中为蛋白质名称) UL6、UL18 (VP23)、UL19 (VP5)、UL35 (VP26) 以及UL38表达的蛋白质;主要被膜蛋白包括UL7、UL11、UL13、UL14、UL16、UL17、UL21、UL25、UL36、UL37、UL41、UL46 (VP11/12)、UL47 (VP13/14)、UL48 (VP16)、UL49、UL51以及US11;主要包膜蛋白包括UL1 (糖蛋白L (gL))、UL10 (gM)、UL20、UL22 (gH)、UL27 (gB)、UL43、UL44 (gC)、UL49A (gN)、UL53 (gK)、US4 (gG)、US5、(gJ)、US6 (gD)、US7 (gI) 以及US8 (gE)。(其它蛋白质名称可已用于文献中。) 示例性HSV-2基因组序列可见于基因库登录号NC 001798.1 (更新日期2010年4月23日下午2:16, 2011年1月10日录入;以全文并入)。应了解,通常使用的蛋白质名称可不同于基因名称,例如UL19编码VP5,但在本文中提及基因名称等同于提及所编码的蛋白质。还应了解,从一种疱疹病毒到另一种疱疹病毒蛋白质的确切序列可不同,并且因此对HSV-2蛋白的所有提及(结构或包膜或非包膜) 涵盖可获自任何天然存在的HSV-2的任何所述蛋白质。许多序列是已知的并且存放于数

据库中。编码具有替代序列的HSV-2蛋白的核酸可容易地分离或用适当的寡核苷酸探针或引物(例如具体地说在严格条件下与参考序列杂交者)扩增自一种或多种HSV-2(例如存放的HSV-2或临床分离物)。在所述群组的编码例如UL蛋白的HSV-2蛋白的核酸内,所述群组的一种核酸将在严格条件下与所述群组内的另一种核酸的补体杂交。

[0042] 术语“严格条件”是指使得探针将优先与其目标子序列并且在更低程度上与或根本不与其它序列杂交的条件。在诸如南方和北方杂交等核酸杂交实验的情形中,“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”具序列依赖性,并且在不同环境参数下不同。核酸杂交的详尽指导可见于Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, 第I部分, 第2章, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier (New York, 1993) 中。在某些实施方案中, 高度严格杂交和洗涤条件是比特定序列在特定离子强度和pH值下的热力学熔点(T_m) 低约5°C。 T_m 是使得50%的目标序列与完全匹配的探针杂交的温度(在特定离子强度和pH值下)。在某些实施方案中, 非常严格条件等于特定探针的 T_m 。

[0043] 用于在南方或北方墨点法的过滤器上具有超过100个互补残基的互补核酸的杂交的严格杂交条件的实例是50%福尔马林加上1mg肝素, 在42°C下, 并且进行杂交过夜。高度严格洗涤条件的实例是0.15M NaCl, 在72°C下持续约15分钟。严格洗涤条件的实例是在65°C下0.2x SSC洗涤15分钟(关于SSC缓冲液的描述参见Sambrook等)。高严格洗涤的前面可以是用于去除背景探针信号的低严格洗涤。具有例如超过100个核苷酸的双链分子的中等严格洗涤的实例是1x SSC, 45°C, 15分钟。具有例如超过100个核苷酸的双链分子的低严格洗涤的实例是4-6x SSC, 40°C, 15分钟。一般来说, 与在特定杂交分析中关于无关探针所观测相比2倍(或更高)的信噪比指示检测到特异性杂交。

[0044] 因为在病毒进入宿主细胞中时涉及一种或多种包膜蛋白, 所以包膜蛋白的抗体可中和病毒, 即预防由病毒感染或再感染。在不希望坚持机械理论的情况下, 对那些为细胞进入所必需的包膜蛋白中的一种或多种引发抗体是用于获得中和抗体的一种方法。包含全病毒、典型地灭活病毒的疫苗天然地呈现包膜蛋白以免疫细胞。对于包含个别病毒蛋白的疫苗, 用于获得中和抗体反应的一种策略是在疫苗中包括一种或多种包膜蛋白或免疫原性蛋白质片段或免疫原性肽或这些的某种组合。

[0045] HSV-2编码14或更多种包膜相关蛋白质, 其中至少一些涉及细胞进入, 包括但不限于gB、gD、gH以及gL。gD似乎特异性结合于细胞上的HSV-2受体, 而gB以及杂二聚物gH/gL似乎介导膜融合。因此, 这四种包膜糖蛋白是作为免疫原包括于疫苗中的优良选择, 因为对这些包膜糖蛋白所引发的抗体可包括中和抗体。或者或此外, 参与病毒流出的包膜糖蛋白也是作为免疫原以包括于疫苗中的候选者。

[0046] 大部分不同于包膜蛋白的HSV-2的结构蛋白可见于衣壳和被膜中。被膜占据衣壳与包膜之间的空隙。发现在被膜中存在约20种病毒蛋白。被膜蛋白对于多种病毒功能来说是重要的, 包括免疫调节、病毒组装以及最终释放。衣壳蛋白形成包围病毒体的核酸基因组的结构。VP5 (UL19的产物) 是主要衣壳蛋白。往往对结构蛋白和多种HSV蛋白引发细胞反应(Hosken等, *J Virol* 180:5509-5515, 2006)。一般来说, 细胞反应涉及CD4与CD8T细胞两者, 它们是在对抗HSV感染中起作用的细胞类型。

[0047] 本文所公开的免疫原性药物组合物(例如疫苗)包含两种或更多种结构蛋白作为

免疫原,所述两种或更多种结构蛋白中的一种是包膜糖蛋白而其中另一种不同于包膜糖蛋白。尽管可使用任一种结构蛋白,但可通过生产容易性、调配成药物组合物的能力、有关蛋白质结构的信息以及高表达水平来指导选择。因为T细胞反应典型地是MHC限制性的,所以疫苗一般含有对最多数目的MHC类型起反应的蛋白质或肽,并且它还可以含有多种蛋白质或肽以增加将作出反应的个体的数目。

[0048] 免疫原性药物组合物优选地是无菌的、不含或基本上不含其它病毒污染物并且不含或基本上不含诸如LPS等致热物质。所述组合物用作疫苗。

[0049] 用于在疫苗中作为免疫原的包膜和非包膜结构蛋白典型地是全长的,但还可以是前体蛋白、片段或融合蛋白的一部分。全长蛋白是指一种成熟蛋白;例如在包膜蛋白的情况下,成熟蛋白是可见于包膜中的形式(例如缺少前导肽)。前体蛋白(前蛋白)是进行任何加工之前的初期转化蛋白或部分加工蛋白。作为融合蛋白的一部分,HSV-2蛋白可呈现前体或全长蛋白或蛋白质片段形式。蛋白质的片段应具免疫原性,含有一个或多个引发免疫反应的表位。

[0050] 在一些实施方案中,本文所公开的免疫原性药物组合物(例如疫苗)包含(i) HSV-2的 α 组基因产物或其免疫片段;和/或(ii) HSV-2的 $\beta 1$ 组基因产物或其免疫片段;和/或(iii) HSV-2的 $\beta 2$ 组基因产物或其免疫片段;和/或(iv) HSV-2的 $\gamma 1$ 组基因产物或其免疫片段;和/或(v) HSV-2的 $\gamma 2$ 组基因产物或其免疫片段作为免疫原。 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 以及 $\gamma 2$ 基因是本领域中熟知的。参见例如Herpesviruses and Their Replication, FUNDAMENTAL VIROLOGY, 第29章,1986。

[0051] 因此,本文中术语“免疫原”的任何使用均指全部群组的多肽,即:(a) 全长抗原,(2) 抗原的免疫原性片段,(3) 全长抗原的免疫原性变体或免疫原性片段的变体,(4) 其包含不同多肽的部分的嵌合融合体,以及(5) 其缀合物。在各种实施方案中,用于疫苗中的包膜和非包膜结构蛋白包括包含能够诱导对蛋白质具特异性的免疫反应的其免疫原性片段或其变体中的任一种的多肽。

[0052] 举例来说,免疫原性变体在抗原的至少10个连续氨基酸上保持至少90%氨基酸同一性,或在抗原的至少15个连续氨基酸上保持至少85%氨基酸同一性(例如包膜蛋白或非包膜结构蛋白)。其它实例包括在抗原的至少50个连续氨基酸上或在抗原的至少100个连续氨基酸上至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一个实施方案中,免疫原性变体在特定抗原的全长上具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施方案中,变体是天然存在的变体。

[0053] 作为另一个实例,免疫原性片段和其变体包含抗原的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、48或50个连续氨基酸。免疫原性片段可包含许多以上所提到数目之间的连续氨基酸,使得例如免疫原性片段在免疫原性多肽的约6-10、10-15、15-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100或更多个连续氨基酸之间。

[0054] 选择往往称为肽的短片段以与MHC分子复合以便结合于T细胞受体并且通常长达约30个氨基酸长,或长达约25个氨基酸长,或长达约20个氨基酸长,或长达约15个氨基酸

长,长达约12个氨基酸长,长达约9个氨基酸长,长达约8个氨基酸长。一般来说,较短的肽与MHC I类分子结合或缔合而较长的肽与MHC II类分子结合或缔合。适合的肽可使用许多生物信息学程序中的任一种来预测并且使用熟知方法来测试。在本文中也称为“肽”的短片段典型地是15-100个氨基酸长;较长片段典型地是100个氨基酸到全长,不过肽(短片段)和较长片段的长度范围不是固定的。

[0055] 如本文所公开,适合的蛋白质包括前体蛋白、成熟蛋白、片段、融合蛋白以及肽。在组合物中,蛋白质可以相同形式或以这些形式的混合物形式存在。举例来说,包膜糖蛋白可以呈现成熟蛋白形式并且结构蛋白呈片段形式,或者包膜糖蛋白可呈现片段形式并且结构蛋白呈片段形式。对于糖蛋白的细胞产生,信号肽可以是前体蛋白的一部分。信号肽包括糖蛋白D天然序列或本领域中已知的其它序列。还可能需要使用没有跨膜或胞内区或两者的蛋白质。

[0056] 如本文所论述,选择包膜糖蛋白中含有一个或多个结合于中和抗体的表位的一个或多个部分(也称为片段)。含有表位的部分可通过分析诸如中和抗体对细胞病毒感染的抑制来鉴别。简言之,将HSV-2包膜糖蛋白的重叠部分与中和抗体(例如来自受感染动物或人类的血清)混合,将混合物添加至HSV-2和受纳细胞系中。如果一个部分具有结合于抗体的表位,那么细胞系将感染HSV-2。如果所述部分不具有表位,那么细胞系将不感染。

[0057] 包含免疫原性HSV-2多肽的至少一个免疫原性片段的组合物可用作免疫原。在一些实施方案中,通过本文所描述的重组表达载体编码免疫原性片段。免疫原性片段可由免疫原性多肽的至少6、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个连续氨基酸组成。免疫原性片段可包含许多以上所提到数目之间的连续氨基酸,使得例如免疫原性片段在免疫原性多肽的约6-10、10-15、15-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100或更多个连续氨基酸之间。免疫原性片段可包含充足数目的连续氨基酸从而形成线性表位,和/或可包含充足数目的连续氨基酸从而允许片段以与衍生片段的全长多肽相同(或充分类似)的三维构象折叠,以呈现非线性表位(本领域中也称为构象表位)。用于评估免疫原性片段是否折叠成类似于全长多肽的构象的分析包括例如蛋白质与对天然或未折叠表位具特异性的单克隆或多克隆抗体反应的能力、其它配体结合功能的保持以及多肽片段经蛋白酶消化的敏感性或耐性(参见例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY(2001))。因此,举例来说,当片段结合特异性结合于全长多肽的抗体的能力以及结合水平与全长多肽基本上相同(即与示例性或野生型全长抗原的免疫原性相比结合水平已保持到统计学、临床和/或生物学充足程度)时,多肽片段的三维构象充分类似于全长多肽。

[0058] 在诸如上文所描述的分析等分析中所筛选的片段通常是短的。一般来说,候选片段的长度长达约40个氨基酸长,或长达约25个氨基酸长,或长达约20个氨基酸长,或长达约15个氨基酸长,或长达约12个氨基酸长,或长达约9个氨基酸长,或长达约8个氨基酸长。用于筛选的片段典型地是重叠的。举例来说,一组片段可包含20个氨基酸长片段,其重叠16个氨基酸(即每4个氨基酸错开)。典型地,重叠组在未加工糖蛋白的N端开始,即含有前导序列,并且在胞外域的C端氨基酸处结束。

[0059] 选择结合于中和抗体的片段并且可将其用于如本文所公开的药物组合物中。片段可“按原样使用”或进一步工程改造或与其它片段组合。对于足够大并且复杂性足以具免疫

原性的片段,其可用于药物组合物。小于约1000MW的片段不大可能具免疫原性,不过复杂性也可以在片段是否具免疫原性中发挥作用。举例来说,由单一氨基酸重复单元组成的均聚物不管其大小如何均是不良免疫原,然而2个或3个氨基酸的共聚物可以是良好免疫原。谷氨酸和赖氨酸的共聚物需要是至少约30-40,000MW以具免疫原性。具有芳香族侧链的氨基酸增加免疫原性,使得仅具有约4000MW的包含酪氨酸和苯基丙氨酸的片段可以具免疫原性。过短或复杂性不足以具免疫原性的片段可缀合至载体蛋白,诸如KLH(钥孔戚血蓝素)、卵白蛋白、牛血清白蛋白或其它对接受药物组合物的受试者来说外来的蛋白质,或者所述片段可联接在一起以形成免疫原性蛋白。片段是否具免疫原性可在动物中测定。举例来说,可以引发-加强方案向动物施用片段,并且在例如ELISA中使用在加强之后7-10天抽取的血清来分析片段的抗体。可检测信号指示片段具免疫原性。更高信号是合乎需要的。用于免疫原性的其它分析是普通技术人员熟知的。

[0060] 在一些实施方案中,用于组合物中的片段是合成长肽。“合成长肽”(SLP)是指离体制造并且长度短至约25个氨基酸并且长至约100个氨基酸的蛋白质序列。SLP应足够长以由树突状细胞吸收并加工以便与MHC I类或II类分子一起呈现于其细胞表面。SLP是衍生自蛋白质的肽,需要针对所述蛋白质的免疫反应。在一个实施方案中,免疫反应是T细胞反应。蛋白质可以是已知抗原或在一些蛋白质的情况下其可以是候选抗原。

[0061] SLP包含至少一个CD4表位或至少一个CD8表位或至少一个CD4和至少一个CD8表位。CD4表位是指结合于II类MHC的氨基酸序列,而CD8表位是指结合于I类MHC的氨基酸序列。表位序列衍生自免疫原的氨基酸序列;在体内,简言之,免疫原由抗原加工细胞(例如树突状细胞)吸收或合成并且降解成肽,其与MHC分子缔合并以MHC-肽复合物形式呈现于细胞表面上。与MHC I类分子复合的肽与T细胞抗原受体和CD8+T细胞上的CD8相互作用,这些肽称为CD8表位;与MHC II类分子复合的肽与T细胞抗原受体和CD4+T细胞上的CD4相互作用,这些肽称为CD4表位。激活的CD8+T细胞变成细胞毒性T细胞,其识别并且杀死展示MHC I类-CD8表位的靶细胞。往往,靶细胞是感染或肿瘤细胞。激活的CD4+T细胞变成辅助性T细胞,并且取决于其亚型,帮助B细胞产生抗体或激活天然杀伤细胞、吞噬细胞以及CD8+T细胞。CD4+T细胞与CD8+T细胞两者的激活有助于综合的细胞免疫反应。

[0062] 如上文所公开,SLP应足够长以由树突状细胞吸收并加工并且与MHC分子一起呈现于其细胞表面上。与MHC I类分子复合的肽的长度通常是8-11个氨基酸,而与MHC II类分子复合的肽的长度通常是13-17个氨基酸,不过更长或更短的长度不罕见。因此,SLP将典型地是至少25个氨基酸长并且长至100个氨基酸长(例如至少30aa、至少35aa、至少40aa、至少45aa、至少50aa、至少55aa、至少60aa、至少65aa、至少70aa、至少75aa、至少80aa、至少85aa、至少90aa、至少95aa)。SLP的长度通常将是长约45aa或约50aa。

[0063] 表位可具有已知序列或未知序列。过多的蛋白质已确定了CD4和CD8表位的位置。对于包含这些表位中的一个或多个的SLP,长度将典型地是约45aa。此外,表位可在N端并且在C端侧以约15aa形成侧翼。侧翼序列典型地是使表位序列在天然蛋白质中形成侧翼的序列。如上文所论述,SLP可包含多于一个表位,多个表位可以全部是CD4或CD8表位或是CD4与CD8表位的混合物。此外,表位可依次重叠(关于包含重叠表位的一些示例性SLP参见实施例1)。所用SLP的总数目可使得所有已知CD4和CD8表位均得以表示。

[0064] SLP可通过多种方法中的任一种来合成(关于合成法的一般论述参见Corradin等,

Sci Translational Med 2:1,2010)。自动化肽合成器可商购获得,并且许多公司提供合成服务(例如Abbiotec、American Peptide Company、AnaSpec、Bachem、Covance Research Products、Invitrogen)。合成之后,典型地通过HPLC将肽纯化,不过诸如离子交换色谱和凝胶过滤色谱等替代纯化方法可以使用。可接受的纯度是如通过分析型HPLC所评估至少90%或至少95%或至少98%。

[0065] 当蛋白质尚未确定CD4表位或CD8表位或两者的位置时,可合成一组包含整个蛋白质序列的SLP。各SLP将典型地是约50aa,并且连续SLP可以约25aa依次重叠。或者或此外,可使用算法和计算机程序来预测将结合于MHC I类和II类分子的序列。所述程序是可轻易获得的,例如RANKPEP (Reche等,Human Immunol 63:701,2002)、EpiPredict (Jung等,Biologicals 29:179,2001)以及MHCpred (Guan等Nucl Acids Res 31:3621,2003以及Guan等,Appl Bioinformatics 5:55,2006)、EpiMatrix (EpiVax,Inc.)。

[0066] 可按最佳生产的需要对SLP的序列进行调节。举例来说,位于衍生自天然序列的肽的末端的一个或多个氨基酸可省略,以改善溶解度或稳定性,或增加或降低总体费用。作为一个特定实例,具有高含量的疏水性氨基酸的肽序列可能难以溶解。作为指导,疏水性含量理想地小于50%。含有半胱氨酸、甲硫氨酸或色氨酸残基;尤其多个Cys、Met或Trp残基的肽可能难以合成。另一种氨基酸(标准或不标准氨基酸,诸如羟基脯氨酸、 γ -氨基丁酸、正亮氨酸)的取代可改善合成效率或纯度。设计SLP时的其它考虑因素包括 β -片形成的程度、N端氨基酸(例如N端Gln可环化)、使邻近Ser和Pro残基减到最少。

[0067] 尤其适用于包括于药物组合物中的一些结构蛋白包括UL19 (SEQ ID NO.4)、UL19上域片段 (SEQ ID No.12)、UL25 (SEQ ID NO.5) 以及UL47 (SEQ ID NO.6)。病毒蛋白的结构可见于NCBI的MMDB (分子模型化数据库)中。分子结构信息是可获得的:UL25 (MMDB ID:37706,Bowman等J.Virol.80:2309,2006,以全文并入)、VP5 (UL19的产物) (MMDB ID:26005,Bowman等,EMBO J.22:757-765,2003,以全文并入)、VP13/14 (UL47的产物) (MMDB ID:6022) 以及包膜蛋白gD2 (MMDB ID:36244,Krummenacher等EMBO J24:4144-4153,2005,以全文并入)、ICP34.5以及许多其它HSV-2蛋白。此外,病毒蛋白的一些T细胞表位是已知的 (Koelle等,J Virol 74:10930-10938,2000;Muller等,J Gen Virol 90:1153-1163,2009;Koelle等,J Immunol166:4049-4058,2001;BenMohamed等,J Virol 77:9463-9473,2003;美国专利号6,855,317;P.C.T.公布号WO 2004/009021,所有的参考文献以全文并入)。

[0068] 这些物质中的任一种的免疫原性片段、变体以及融合蛋白均是蛋白质,具体地说涵盖尤其UL19、UL19上域片段、UL25以及UL47以用于本文的免疫原性组合物中。因此,本公开包括SEQ ID NO:4、5、6或12中的任一种的片段或变体,其在其至少10个连续氨基酸上保留至少90%氨基酸同一性,或在其至少15个连续氨基酸上保留至少85%氨基酸同一性。作为另一个实例,本公开包括包含所述序列的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、48或50个连续氨基酸或在所述序列的约6-10、10-15、15-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100或更多个连续氨基酸之间的免疫原性片段。本公开还包括在序列的至少50个连续氨基酸上或在序列的至少100个连续氨基酸上具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的变体。在一些实施方案中,变体是天然存在的变体,优选地是在严格条件下与编码

SEQ ID NO:4、5、6或12中的任一种的多核苷酸杂交的变体。

[0069] 如本文所公开,非包膜结构蛋白(例如如SEQ ID No.9和10中所阐述的UL19肽以及如SEQ ID NO.11中所阐述的UL25肽)和包膜蛋白(例如gD2(SEQ ID No.7和8)的免疫原性片段(包括肽)可使用或可以是衍生自蛋白质的较长序列(即片段)的一部分。如本文所用的肽是指氨基酸的短序列,通常至少15个残基并且通常至多约100个残基,或约20个残基至约80个残基,或约30个残基至约70个残基。如本文所用的片段是指小于全长蛋白的任何长度的多肽并且通常是至少100个氨基酸长,不过片段的尺寸范围可与肽的尺寸范围重叠(例如约50个残基长的片段)。具体地说,UL19上域片段丢失了UL19的第1-450位残基和第1055-1374位残基的至少75%、80%、85%、90%、95%或全部。因此,上域片段可例如在第337-451位残基中的任一者处开始,并且在第1055-1294位残基中的任一者处结束(并且至少缺乏SEQ ID NO:4的第1-336位和第1295-1374位氨基酸)。举例来说,UL19片段可以是约第451位残基至约1054(SEQ ID NO:12)。UL19上域片段可包含SEQ ID NO:12的约50、100、150、200、250、300、350、400、450或500个氨基酸或更多。

[0070] 此外,本文中的肽和片段可融合至异源肽。异源肽的实例包括来自其它蛋白质的序列(例如在UL19的情况下,UL19上域片段可融合至来自不是UL19的另一种蛋白质的序列)或标签序列,诸如六组氨酸,其通常会位于N端或C端。因此,本文所描述的免疫原性片段或变体可融合至增强免疫原性的另一种肽、充当标签或标记的另一种肽或来自另一种HSV-2结构蛋白的另一种肽。因此,免疫原性多肽可包含由HSV-2结构蛋白的指定片段组成的片段。在一个实例中,免疫原性多肽包含由SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:12的片段组成的UL19的片段,其任选地融合至非UL19肽。在另一个实例中,免疫原性多肽包含由在SEQ ID NO:12的50个连续氨基酸上至少80%或90%同一的氨基酸序列组成的肽,其任选地融合至非UL19肽。

[0071] 出人意料地,本文中的实例显示UL19上域片段具有引发保护性抗体HSV-2感染的能力,从而使得UL19蛋白的其余部分不必作为免疫原。这个出人意料发现是偶然的,因为表达全长UL19的尝试已证明具挑战性。举例来说,全长UL19在大肠杆菌(E.coli)中和其它表达系统表达以及可溶性全长UL19的后续纯化已证明是困难的。

[0072] 典型地,药物组合物中的蛋白质将不同于前体蛋白,因为在真核细胞中的表达将典型地产生成熟蛋白,其缺少前导序列(也称为信号肽)。gD的前导序列涵盖约第1-25位的残基。gB的前导序列涵盖约第1-22位的残基。糖蛋白D(SEQ ID No.2)是393氨基酸蛋白并且具有跨越约第26-340位残基的胞外区、跨越约第341-361位残基的跨膜区以及跨越约第362-393位残基的胞质区,以及许多位于第119、146、287位残基处的N-键联糖基化位点(UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q69467,条目中的型式49和序列中的型式1)。示例性gD片段(本文中替代地称为gD2)包含显示于SEQ ID NO.3中的序列。

[0073] 在一些实施方案中,来自包膜糖蛋白的抗原片段和免疫原性片段可包含部分或全部的前导序列,其有时称为信号肽。前导序列通常是约15-20个氨基酸,并且在正常细胞代谢过程中,其可能由细胞设备裂解掉,然而,在完整病毒体中糖蛋白中的一些可具有前导序列。前导序列通常在N端具有一些极性氨基酸并且内部氨基酸通常是疏水性的。如上文所论述,已确定HSV-2包膜糖蛋白中的一些的前导序列。对于其它HSV-2包膜糖蛋白,可使用计算机程序来预测信号肽。这些程序中的一些包括SIG-Pred (bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_

analysis/Signal.html)、PrediSi (www.predisi.de)、OCTOPUS (octopus.cbr.su.se) 以及 sigcleave (emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/sigcleave.html)。

[0074] 多种技术可用于抑制在用于本文所描述的组合物中的含有前导序列的抗原片段或免疫原性片段的细胞产生期间信号肽的裂解。举例来说,在裂解位点形成侧翼的一个或多个氨基酸可改变成不同氨基酸,从而使得序列不被细胞设备识别或裂解。对于此方法,根据本领域中已知的裂解位点设计变化:甘氨酸不优先用于所述位置中的任一种,酪氨酸很少可见于在裂解位点之后的最前几个位置中,然而脯氨酸往往可见于除+1位置外的许多裂解位点中,并且谷氨酰胺通常可见于+1残基处(Zhang和Henzel,Protein Sci.13:219,2004)。所提出的序列可用预测程序评估以确定是否有可能抑制裂解。如果裂解有可能,那么作出其它改变并且对新提出的序列进行再评估。用于抑制信号肽裂解的其它技术包括在识别序列和裂解序列处添加一个或多个氨基酸、N端添加信号肽以及识别序列以使得所添加的信号肽优先裂解以及在缺少用于裂解信号肽的机制的宿主细胞中产生。

[0075] 在某些实施方案中,片段包含HSV-2糖蛋白,其包括前导序列。在其它实施方案中,片段包含HSV-2糖蛋白的一部分,其包括前导序列到跨膜域的起点。在其它实施方案中,片段包含HSV-2糖蛋白的一部分,其包括前导序列并且在胞外域内结束。在其它实施方案中,片段包含HSV-2糖蛋白的非连续部分,其中所述部分中的一者包含位于前导序列中的抗原表位。在其它实施方案中,片段包含HSV-2糖蛋白的非连续部分,其中所述部分包含表位或者其包含来自不同HSV-2糖蛋白的部分,其中所述部分包含表位。

[0076] 糖蛋白B(SEQ ID NO.1)具有跨越约第23-771位残基的胞外区、跨越约第772-792位残基的跨膜区以及跨越约第793-904位残基的胞质区,以及许多位于第82、136、393、425、486、671位残基处的N-键联糖基化位点(UniProtKB/Swiss-Prot登录号P08666,条目中的型式60和序列中的型式2)。糖蛋白K是一种在其N端具有30氨基酸前导序列的338氨基酸蛋白(Ramaswamy and Holland,Virology 186:579-587,1992)。糖蛋白C具有经预测的第27位氨基酸前导序列,糖蛋白E具有经预测的第23位氨基酸前导序列,并且糖蛋白L具有经预测的第16位氨基酸前导序列(Signal Peptide Resource,proline.bic.nus.edu.sg,2011年10月06日录入)。

[0077] 蛋白质或蛋白质片段优选地是免疫原性的。“免疫原”能够诱导免疫反应。在至少一些血清阳性受试者中,免疫原性肽序列通常由T细胞(例如CD4或CD8T细胞)识别。肽序列可通过通常使用一系列重叠肽来筛选衍生自完整序列的肽来识别。多种分析可用于确定T细胞是否识别并且对应于一种肽。举例来说,铬释放细胞毒性分析(Kim等,J Immunol 181:6604-6615,2008,其分析方案并入本文中)、ELISPOT分析(一种细胞内细胞因子染色分析)以及MHC多聚体染色(Novak等J Clin Invest 104:R63-R67,1999;Altman等,Science 274:94-96,1996)是适合的分析之中的。在一些情况下,片段包含免疫优势肽序列。已针对HSV-2糖蛋白和结构蛋白识别了一些免疫优势表位(例如Kim等J Immunol 181:6604-6615,2008;Chentoufi等,J Virol.82:11792-11802,2008;Koelle等,Proc Natl Acad Sci USA 100:12899-12904,2003;所有参考文献均以全文形式并入本文中)。免疫原性肽还可以通过生物信息学软件来预测(Flower,Methods in Molecular Biology第409卷,2007)。一些示例性程序和数据库包括FRED(Feldhahn等Bioinformatics 15:2758-9,2009)、SVMHC(Dönnies和Kohlbacher,Nucleic Acids Res 34:W1940197,2006)、AntigenDB(Ansari等,Nucleic

Acids Res 38:D847-853,2010)、TEPITOPE (Bian and Hammer Methods 34:468-475, 2004)。

[0078] 可并入HSV-2蛋白中的任一种(包括前体蛋白、成熟蛋白以及片段,包括肽)作为融合蛋白的一部分。融合伴侣可以是HSV-2蛋白或非HSV-2蛋白序列中的任一种。一些常见的使用融合蛋白的原因是为改善所得蛋白质的表达或帮助其纯化。举例来说,可将适合于表达系统的宿主细胞的信号肽序列连接至HSV-2蛋白或可连接用于蛋白质纯化的标签序列,并且随后如果还并入了裂解序列,那么进行裂解。可融合来自蛋白质中的一种或多种的多个肽表位,或者可融合来自蛋白质中的一种或多种的片段。举例来说,可连接结构蛋白或结构蛋白的片段,诸如融合蛋白VP13/14 (UL47) 和主要衣壳蛋白 (UL19) 或UL25和UL47或UL25以及UL19。融合蛋白的片段可以呈任何顺序(这是对于UL19和UL47的融合体来说),任一种蛋白质均可位于N端。类似地,多个肽表位可以呈任何顺序。

[0079] HSV-2蛋白(包括前体蛋白、片段以及融合蛋白)的制造通常是通过在培养细胞中表达或通过化学合成来实现。(“HSV-2蛋白”在本文中用于包括所有这些形式。)短片段通常是使用机械加工(许多是可商购获得的)或人工地化学合成的。如果通过细胞来产生,那么多种适合的表达系统(原核与真核系统两者)是熟知的并且可以使用。常常使用并且适合于产生蛋白质的宿主细胞包括大肠杆菌、酵母、昆虫以及哺乳动物。表达载体和宿主细胞是可商购获得的(例如Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)或可构建的。示例性载体包含启动子和编码所关注的蛋白质的序列的克隆位点,使得启动子和序列可操作地连接。可存在其它元件,诸如分泌信号序列(有时称为前导序列)、标签序列(例如hexa-His)、转录终止信号、复制起点(尤其如果载体是染色体外复制)以及编码可选产物的序列。用于转染宿主细胞的方法和程序也是熟知的。

[0080] 收集所表达的蛋白质并且“按原样”使用或更典型地进行分析以及进一步纯化。用于测定纯度或量的典型程序包括凝胶电泳、西方墨点法、质谱法以及ELISA。蛋白质的活性通常是在诸如实施例中所描述的生物分析中进行评估。必要或需要时,可将蛋白质进一步纯化。许多纯化方法是熟知的并且包括尺寸色谱法、阴离子或阳离子交换色谱法、亲和色谱法、沉淀以及免疫沉淀。蛋白质的预期用途典型地将决定纯化程度,其中用于人类中可能需要最高水平的纯度。

[0081] B. 激活先天免疫的试剂

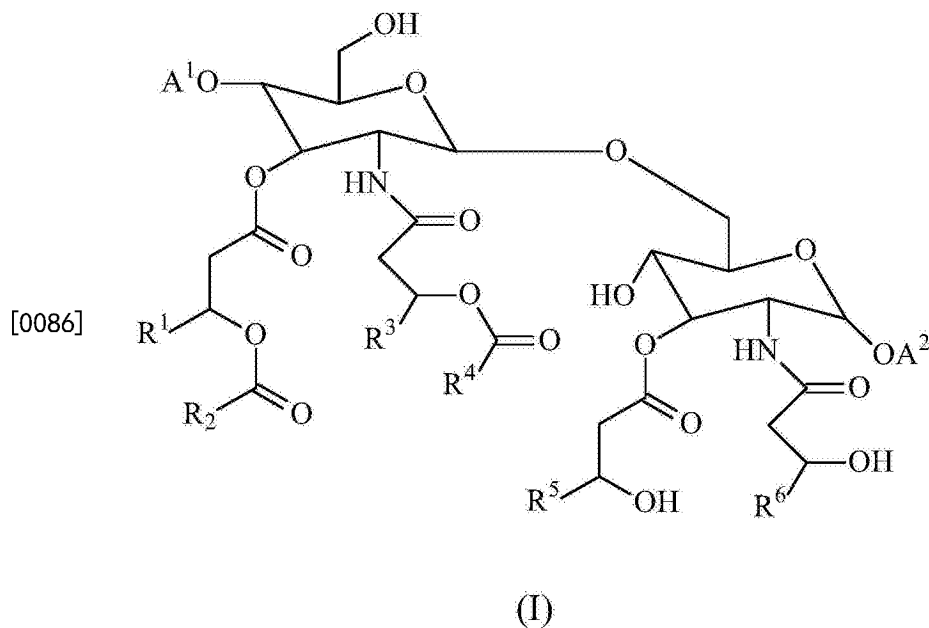
[0082] 先天免疫系统包含以非特异性方式针对由其它有机体引起的感染提供防御的细胞。先天免疫是即刻防御,但其针对将来的激发不持久或具保护性。在先天免疫中通常发挥作用的免疫系统细胞是吞噬细胞,诸如巨噬细胞和树突状细胞。先天免疫系统以多种方式与适应性(也称为后天)免疫系统相互作用。先天免疫系统的细胞可参与抗原呈现于适应性免疫系统的细胞,包括表达激活其它细胞的淋巴因子、放出吸引可对侵入物具特异性的细胞的趋化性分子以及分泌补充和激活适应性免疫系统的细胞的细胞因子。本文所公开的免疫原性药物组合物包括激活先天免疫的试剂,以提高组合物的有效性。

[0083] 许多类型的试剂均可激活先天免疫。像细菌和病毒等有机体可激活先天免疫,正如有机体的组分、诸如2'-5'寡腺苷酸(2'-5' oligo A)等化学品、细菌内毒素、RNA双链、单链RNA以及其它分子。许多试剂通过Toll样受体(TLR)分子家族起作用。使TLR参与还会引起细胞因子和趋化因子的产生并且使得与后天免疫的发展有关的组分树突状细胞激活和成

熟。TLR家族可对多种试剂作出反应,所述多种试剂包括脂蛋白、肽葡聚糖、鞭毛蛋白、咪唑啉、CpG DNA、脂多糖以及双链RNA (Akira等Biochemical Soc Transactions 31:637-642,2003)。这些类型的试剂有时称为病原体(或微生物)相关分子模式。

[0084] 在一个方面中,一种或多种佐剂包括于组合物中,以提供激活先天免疫的试剂。佐剂是并入抗原或与抗原同时施用并且增加免疫反应的物质。已提出多种机制来解释不同佐剂如何工作(例如抗原药性持久剂;树突状细胞、巨噬细胞激活剂)。在不希望受理论限制的情况下,一种机制涉及激活先天免疫系统,从而引起趋化因子和细胞因子的产生,这进而又激活适应性(后天)免疫反应。具体地说,一些佐剂通过TLR激活树突状细胞。因此,佐剂是一种类型的激活先天免疫系统的试剂,其可用于针对HSV-2的疫苗中。佐剂也可以其它方式发挥作用以增强后天免疫反应。优选地,佐剂是TLR4激动剂。

[0085] 一种可用于本文所描述的组合物中的佐剂是一元酸脂质A (MALA) 型分子。示例性MALA是如例如Ulrich J.T.和Myers,K.R.,“Monophosphoryl Lipid A as an Adjuvant”第21章,Vaccine Design,the Subunit and Adjuvant Approach,Powell,M.F.和Newman,M.J.编著Plenum Press,NY 1995中所描述的MPL®佐剂。另一种示例性MALA由化学式(I)描述:



[0087] 其中部分A¹和A²独立地选自氢、磷酸酯、磷酸盐、羧酸酯、羧酸盐、硫酸酯、硫酸盐、亚硫酸酯、亚硫酸盐、天冬氨酸酯、天冬氨酸盐、丁二酸酯、丁二酸盐、羧甲基磷酸酯以及羧甲基磷酸盐。钠和钾是磷酸盐和羧酸盐的示例性反离子。A¹和A²中的至少一种是氢。部分R¹、R²、R³、R⁴、R⁵以及R⁶独立地选自具有3至23个碳的烃基,优选地直链烷基,由C₃-C₂₃表示。为增加清楚性,应解释的是,当部分“独立地选自”具有多个成员的指定群组时,应了解,针对第一部分所选择的成员不以任何方式影响或限制对针对第二部分所选择的成员的选择。与R¹、R³、R⁵以及R⁶相连的碳原子是不对称的,并且因此可以R或S立体化学存在。在一个实施方案中,所有那些碳原子均呈R立体化学形式,而在另一个实施方案中,所有那些碳原子均呈S立体化学形式。

[0088] “烃基”或“烷基”是指完全由氢和碳形成的化学部分,其中碳原子的布置可以是直

链或支链、非环状或环状并且相邻碳原子之间的键结可全部是单键,即用于提供饱和烃基,或者在任何两个相邻碳原子之间可存在双键或三键,即用于提供不饱和烃基,并且烃基中碳原子的数目在3个与24个碳原子之间。烃基可以是烷基,其中代表性直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等,包括十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等;而支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烃基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等;而不饱和环状烃基包括环戊烯基和环己烯基等。不饱和烃基在相邻碳原子之间含有至少一个双键或三键(如果烃基是非环状的那么分别称为“烯基”或“炔基”,而如果烃基是至少部分环状的,那么分别称为环烯基和环炔基)。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等;而代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。举例来说,“C6-11烷基”意指如上文所定义的烷基,其分别含有6-11个碳原子。

[0089] 式(I)佐剂可通过本领域中已知的合成方法获得,例如PCT国际公布号W0 2009/035528中所公开的合成方法,该专利以引用的方式并入本文中;以及W0 2009/035528中所识别的出版物,其中那些出版物各自也以引用的方式并入本文中。某些佐剂还可以在商业上获得。优选佐剂是如Avanti Polar Lipids,Alabaster AL的目录中所识别的产物号699800,其中R1、R3、R5以及R6是十一烷基并且R2和R4是十三烷基。

[0090] 在本发明的各种实施方案中,佐剂具有式(I)化学结构,但部分A1、A2、R1、R2、R3、R4、R5以及R6选自A1是磷酸酯或磷酸盐并且A2是氢;并且R1、R3、R5以及R6选自C7-C15烷基;并且R2和R4选自C9-C17烃基。在本发明的一个优选实施方案中,用于本文中的实例中的GLA具有图1中所阐述的结构式,其中R1、R3、R5以及R6是十一烷基并且R2和R4是十三烷基。

[0091] 上文所描述的MALA佐剂是用于本文所描述的免疫原性药物组合物中的优选佐剂类别。然而,在调配免疫原性药物组合物时,以下佐剂中的任一种还可以单独或与MALA佐剂组合使用。

[0092] 佐剂可以是明矾,其中此术语是指铝盐,诸如磷酸铝(AlPO_4)和氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)。当明矾用作佐剂或用作共佐剂时,在免疫原性药物组合物的一次剂量中,明矾可以约100至1,000 μg 或200至800 μg 或300至700 μg 或400至600 μg 的量存在。如果式(1)佐剂与明矾共调配,那么式(1)佐剂典型地以小于明矾的量的量存在,在式(1)佐剂的各种方面,以重量计相对于明矾的重量以0.1-1%或1-5%或1-10%或1-100%存在。在本发明的一个方面中,组合物排除明矾的存在。

[0093] 佐剂可以是具有疫苗佐剂性质的乳液。所述乳液包括水包油乳液。弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant; IFA)是一种所述佐剂。另一种适合的水包油乳液是MF-59TM佐剂,其含有角鲨烯,聚氧化乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(也称为TweenTM 80表面活性剂)以及去水山梨糖醇三油酸酯。角鲨烯是一种天然有机化合物,起初获自鲨鱼肝油,不过还可购自工厂来源(主要是植物油),包括苋菜籽、米糠、小麦胚芽以及橄榄。其它适合的乳液佐剂是MontanideTM佐剂(Seppic Inc., Fairfield NJ),包括作为基于矿物油的佐剂的MontanideTM ISA 50V、MontanideTM ISA 206以及MontanideTM IMS 1312。当矿物油可存在于佐剂中时,在一个实施方案中,本发明的组合物的油组分全部是可代谢油。

[0094] 佐剂可以是AS02TM佐剂或AS04TM佐剂。AS02TM佐剂是一种水包油乳液,其含有MPLTM佐剂与QS-21TM佐剂两者(在本文中其它地方所论述的皂苷佐剂)。AS04TM佐剂含有MPLTM佐剂和明矾。佐剂可以是Matrix-MTM佐剂。

[0095] 佐剂可以是诸如衍生自皂树树种的树皮的那些皂苷,或修饰型皂苷、籽、例如美国专利号5,057,540;5,273,965;5,352,449;5,443,829;并且5,560,398。产品QS-21TM佐剂由Antigenics, Inc. Lexington出售,MA是示例性皂苷,其含有可用于式(1)佐剂的共佐剂。与皂苷相关的是ISCOMTM家族的佐剂,其起初由IscoTec (Sweden) 研发并且典型地由衍生自皂树的皂苷或合成类似物、胆固醇以及磷脂形成,所有均形成蜂巢状结构。

[0096] 佐剂可以是充当佐剂的细胞因子,参见例如Lin R.等Clin. Infec. Dis. 21 (6) : 1439-1449 (1995); Taylor, C.E., Infect. Immun. 63 (9) : 3241-3244 (1995); 以及Egilmez, N.K., 第14章, Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, John Wiley & Sons, Inc. (2007)。在各种实施方案中,细胞因子可以是例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF); 参见例如Change D.Z.等Hematology 9 (3) : 207-215 (2004); Dranoff, G. Immunol. Rev. 188: 147-154 (2002); 以及美国专利5,679,356; 或者干扰素, 诸如I型干扰素, 例如干扰素- α (IFN- α) 或干扰素- β (IFN- β); 或II型干扰素, 例如干扰素- γ (IFN- γ), 参见例如Boehm, U.等Ann. Rev. Immunol. 15: 749-795 (1997); 以及Theofilopoulos, A.N.等Ann. Rev. Immunol. 23: 307-336 (2005); 白介素, 具体地说包括白介素-1 α (IL-1 α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-2 (IL-2); 参见例如Nelson, B.H., J. Immunol. 172 (7) : 3983-3988 (2004); 白介素-4 (IL-4)、白介素-7 (IL-7)、白介素-12 (IL-12); 参见例如Portielje, J.E., 等, Cancer Immunol. Immunother. 52 (3) : 133-144 (2003) 以及Trinchieri, G. Nat. Rev. Immunol. 3 (2) : 133-146 (2003); 白介素-15 (IL-15)、白介素-18 (IL-18); 胎肝酪氨酸激酶3配体 (Flt3L) 或肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

[0097] 佐剂可以是未甲基化CpG二核苷酸, 其任选地缀合至本文所描述的抗原。

[0098] 可在本文所描述的方法的实践中用作共佐剂的免疫增效剂的实例包括: MPLTM; MDP和衍生物; 寡核苷酸; 双链RNA; 替代性病原体相关分子模式 (PAMPS); 皂苷; 小分子免疫增效剂 (SMIP); 细胞因子; 以及趋化因子。

[0099] 在各种实施方案中, 共佐剂是MPLTM佐剂, 其可从GlaxoSmithKline商购获得(起初由Ribi ImmunoChem Research, Inc. Hamilton, MT研发)。参见例如Ulrich and Myers, 第21章, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell和Newman编著 Plenum Press, New York (1995)。与MPLTM佐剂相关并且也适合在本文所描述的组合物和方法中用作共佐剂的是AS02TM佐剂和AS04TM佐剂。AS02TM佐剂是水包油乳液, 其含有MPLTM佐剂与QS-21TM佐剂(一种本文在其它地方论述的皂苷佐剂) 两者。AS04TM佐剂含有MPLTM佐剂和明矾。MPLTM佐剂是从明尼苏达沙氏杆菌R595的脂多糖 (LPS) 通过用弱酸和碱水解来处理LPS随后对修饰型LPS进行纯化来制备。

[0100] 当以组合形式使用两种佐剂时, 可选择两种佐剂的相对量以实现所要的相对于单独的抗原含有佐剂的组合物性能。举例来说, 可选择佐剂组合以增强抗原的抗体反应和/或增强受试者的先天免疫系统反应。激活先天免疫系统引起趋化因子和细胞因子的产生, 这进而又可激活适应性(后天)免疫反应。激活适应性免疫反应的重要结果是形成记忆免疫细胞, 使得当宿主再遭遇抗原时, 免疫反应更快出现并且通常质量更好。

[0101] 佐剂可在其与HSV-2蛋白组合之前预调配。在一个实施方案中,佐剂可以小于0.2 μ m的稳定水悬浮液形式提供,并且可进一步包含至少一种选自以下的组分:磷脂、脂肪酸、表面活性剂、去垢剂、皂苷、含氟脂质(fluorodated lipid)等。佐剂可在水包油乳液中调配,其中佐剂并入油相中。用于人类时,油优选地是可代谢的。油可以是任何植物油、鱼油、动物油或合成油;油不应接受者具毒性并且能够通过代谢转化。坚果(诸如花生油)、籽以及谷物是植物油的常见来源。特别适合的代谢油包括角鲨烯(2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯),其为一种发现于许多不同油中的不饱和油并且以高量存在于鲨鱼肝油中。角鲨烯是胆固醇的生物合成中的中间物。此外,水包油乳液典型地包含抗氧化剂,诸如 α -生育酚(维生素E,US 5,650,155,US 6,623,739)。可添加稳定剂,诸如甘油三酯、赋予等张性的成分以及其它成分。使用角鲨烯的示例性水包油乳液称为“SE”并且包含角鲨烯、甘油、磷脂酰胆碱或卵磷脂或其它嵌段共聚物作为表面活性剂,其与 α -toceraphol一起含于磷酸铵缓冲液(pH 5.1)中。

[0102] 产生水包油乳液的方法是本领域技术人员熟知的。通常,所述方法包括使油相与诸如以下表面活性剂混合:磷脂酰胆碱、泊洛沙姆(poloxamer)、嵌段共聚物或TWEEN80®溶液,随后使用均质器均质化。举例来说,包括使混合物一次、二次或更多次穿过注射器针头的方法适合用于均质化小量液体。同样地,在微流化仪中进行的乳化方法(M110S微流体机器,最大50个通道,在6巴的最高输入压力(约850巴输出压力)下持续2分钟的时间)可适合于产生较小或大量的乳液。此适应可通过包括测量所得乳液直到实现具有所要直径的油滴的制剂的常规实验来实现。还可以使用用以产生乳液的其它设备或参数。乳液组合物和其制备方法的公开内容可见于例如美国专利号5,650,155;5,667,784;5,718,904;5,961,970;5,976,538;6,572,861;以及6,630,161中。

[0103] C. 药物组合物和用途

[0104] 1. 制剂

[0105] 所要求的药物组合物包含HSV-2糖蛋白或其免疫原性片段、不同于包膜糖蛋白的HSV-2结构蛋白或其免疫原性片段、作为先天免疫系统激动剂的试剂以及药学上可接受的载体。组合物可包含超过一种糖蛋白(或片段)、超过一种结构蛋白(或片段)或超过一种试剂。

[0106] 在一些方面中,药物组合物包含HSV糖蛋白的抗原部分、药学上可接受的载体以及任选地作为先天免疫系统激动剂的试剂。组合物可包含超过一种糖蛋白部分和一种或超过一种试剂。载体可任选地具有佐剂性质,例如一些乳液载体具有佐剂性质。虽然在本文中所论述的HSV糖蛋白主要来自HSV-2,但是还可以使用来自HSV-1的糖蛋白。

[0107] 在某些实施方案中,糖蛋白或结构蛋白或两者可以是前体蛋白、成熟蛋白、片段、融合蛋白或肽。糖蛋白和结构蛋白元件可以是相同或不同融合蛋白的一部分。类似地,如果存在超过一种糖蛋白或超过一种结构蛋白,那么其可以是单一融合蛋白的一部分或分开的融合蛋白的一部分。如果存在超过一种糖蛋白或超过一种结构蛋白,那么超过一种蛋白质中的每一种均可以是前体蛋白、成熟蛋白、片段等,即例如两种糖蛋白可包含片段和肽或例如相同糖蛋白的两个不同片段或例如不同糖蛋白的两个片段。

[0108] 各疫苗剂量中蛋白质或免疫片段各自的量典型地在约0.5 μ g至约50 μ g范围内或是约0.5 μ g、约1.0 μ g、约2 μ g、约5 μ g、约10 μ g、约15 μ g、约20 μ g、约30 μ g、约40 μ g、约50 μ g、约75 μ g、

约100 μ g或约150 μ g或约200 μ g或约250 μ g或将被确定针对HSV-2提供功效的任何其它适合的量。蛋白质或免疫片段可以多种比率存在,包括等摩尔比率,其提供等表位表示;以及等质量比率,其提供等质量的各个体蛋白质。约20%内(例如0.8:1.2)或约10%内(例如0.9:1.1)或约5%内(例如0.95:1.05)的等量的等摩尔和等质量仍视为等摩尔或等质量。剂量将典型地由组合物的药理学活性、目的(治疗性或预防性)以及受试者的大小和病状来决定。

[0109] 蛋白质可以溶液形式提供,但还可以是成粉状的(干燥的),在此情况下使用者添加必要的液体。典型地,还将存在添加剂,诸如缓冲液、稳定剂、张力剂、表面活性剂、防腐剂、载体以及其它非活性成分。添加剂典型地是药学上可接受的并且生物相容的。优选地,添加剂、免疫原、试剂等基本上不含其它内毒素、毒性化合物以及可引起不需要的副作用的污染物。制剂可根据施用途而变。举例来说,用于通过壁内注射施用的制剂通常将是等张的并且水性的,而用于经口施用的制剂可以缓释形式封装或含有调味品。用于气溶胶施用的形成物通常将在压力下包装并且含有推进剂。

[0110] 可以是佐剂的试剂可以溶液、成粉状的或乳化形式提供,通常呈稳定水包油乳液形式。在一个实施方案中,试剂可以小于0.2 μ m的稳定水悬浮液形式提供,并且可进一步包含至少一种选自以下的组分:磷脂、脂肪酸、表面活性剂、去垢剂、皂苷、含氟脂质等。所述稳定水性制剂可以是胶束制剂。在另一个实施方案中,试剂可以是以气溶胶化为粉末或液体制剂形式的方式调配。

[0111] 这些制剂中的任一种还可以包含缓冲液、稳定剂、防腐剂、载体或其它非活性成分。添加剂典型地是药学上可接受的并且生物相容的。可存在超过一种试剂,并且试剂中的一种、一些或所有还可以是佐剂或共佐剂。此外,还可以提供不同时是试剂的佐剂或共佐剂。还可以存在抗原药性持久剂,诸如油或至少一些油乳液。

[0112] 诸如GLA或另一种MALA佐剂等的佐剂试剂的量典型地是约0.5 μ g、约1 μ g、约2 μ g、约2.5 μ g、约5 μ g、约7.5 μ g、约10 μ g、约15 μ g、约20 μ g或约25 μ g。诸如SE等乳液可以约0.1%、约0.5%、约1.0%、约1.5%、约2%、约2.5%、约3%、约4%、约5%、约7.5%或约10%存在。

[0113] 试剂和蛋白质可提供于分开的容器中并且现场混合或预混合。此外,蛋白质可存在于分开的容器中或在单一容器中合并。试剂和蛋白质可以浓缩形式提供并且配有稀释剂。适合的稀释剂包括生理盐水和PBS。容器可以是小瓶、安瓿、管子、多孔装置的孔、储存器、注射器或任何其它种类的容器。容器可以试剂盒形式提供。如果容器中的一个或多个包含成粉状成分,那么也可在试剂盒中提供或由使用者提供用于复水的液体。各容器中或添加至各容器的溶液的量与施用途和各容器中有多少剂量相称。通过注射给出的疫苗典型地是约0.1ml至约2.0ml,而经口给出的疫苗可以是较大的体积,例如约1ml至约10ml。适合的体积还可以根据受试者的大小和年龄而变化。

[0114] 2. 施用

[0115] 组合物可用于治疗受试者的HSV-2感染。如本文所用,“治疗”是可为治疗性或预防性的临床干涉。在治疗性应用中,药物组合物或药物是向怀疑具有或已知具有HSV-2感染的受试者施用。组合物是以足以产生(诱导)可治愈或至少部分阻止疾病和其并发症的症状的免疫反应的量给出。在预防性应用中,药物组合物或药物是以足以诱导免疫反应的量向容易受到HSV-2感染或以其它方式具有HSV-2感染危险的受试者施用,所述免疫反应将抑制感染或降低疾病危险或延迟其发作或改善感染的一种或多种影响。足够实现此目的的量定义

为治疗或药学有效剂量。所述量可作以单次剂量形式施用或可根据使用其有效的方案来施用。所述量可治愈疾病但典型地是为改善疾病的症状或实现对疾病或病症发展的预防而施用。

[0116] 在治疗和预防方案中,试剂通常是以若干剂量施用直到已实现充足的免疫反应。典型地,监测免疫反应并且如果免疫反应开始减弱,那么给出重复剂量。治疗不需要完全消除疾病,它也不需要完全预防受试者变得患有疾病或病症。在一些实施方案中,仅施用单次剂量。更经常的,将施用多次剂量。通常,第一剂量称为“引发”剂量,而第二和后续剂量称为“加强”剂量。多次剂量可由两次施用、三次施用、四次施用以及有时五次或更多次施用组成。理想地,所述次数是一次或两次施用。当提供多次施用时,第二次和后续施用的时间通常将是最后一次施用之后至少两周,并且可以是最后一次施用之后至少一个月、两个月、三个月、六个月或1年。理想地,监测免疫反应以确定多次剂量是否将是有利的。多次剂量可含有相等量的免疫原和激动剂或可含有不同量的这些成分。举例来说,加强剂量可包含较低量的免疫原。此外,各剂量之间的添加剂可不同。

[0117] 在一些实施方案中,向受试者施用的引发组合物是活减毒HSV-2病毒并且向受试者施用的加强组合物是本文所要求或描述的任何组合物。在一些实施方案中,向受试者施用的引发组合物是本文所要求和描述的任何组合物并且向受试者施用的加强组合物是活减毒HSV-2病毒。

[0118] 无论用作预防剂或治疗剂,施用均优选地引起对HSV-2的免疫反应。免疫反应可以是体液(抗体介导的)反应或细胞(典型地,不过不排除他地T细胞介导的)反应或两者。免疫受试者还可以具有激活单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、树突状细胞以及其它先天免疫细胞类型。关于免疫反应的分析在本文中有描述并且是普通技术人员所熟知的。

[0119] 疫苗是以足以实现有益治疗反应(例如用以改善、减轻、治愈或部分改善疾病或感染的症状的有效免疫反应)(治疗有效剂量)或预防反应(例如预防感染或疾病症状)的剂量施用。有益治疗反应的指示物是在任何给定发作中疱疹损害较少或平均损害的数目较低或频繁发作较少。其它指示物包括损害较小、损害治愈得更快速、习惯于较小的痛。其它指示物是出现HSV-2疫苗组分的抗体(具体地说存在HSV-2包膜糖蛋白的抗体,例如gD2的抗体)并且特别是出现中和抗体。存在许多用以检测和定量抗体的熟知程序,包括ELISA和病毒感染抑制(中和)分析。在一种实现方式中,如下进行ELISA分析:通过用gD2蛋白质涂布多孔板的孔,将gD2特异性抗体从血清捕获到板上,用标记抗人抗体检测gD2特异性抗体,随后读出标记。标记可以是放射性的,但更通常是酶,诸如辣根过氧化物酶,其将底物转化成可以比色法检测的物质。示例性HSV中和分析是基于噬菌斑分析,其中中和抗体是通过抑制噬菌斑形成来检测。其它指示物包括对HSV-2起反应的CD8或CD4T细胞的量或功能或频率增加、病毒流出减少、病毒传播至性伴侣减少以及有症状的损害的大小或频率或两者降低。

[0120] 关于T细胞功能的分析包括IFN- γ ELISPOT和ICS(细胞内细胞因子染色)。检测干扰素- γ 的ELISPOT分析广泛用于量化对候选疫苗的CD4和CD8T细胞反应。ELISPOT分析是基于ELISA的原理,所述ELISA检测抗原诱导的由固定抗体俘获并且通过酶偶联第二抗体显现的细胞因子的分泌。ICS是常规地用于借助于在用激动剂(诸如T细胞表面分子的抗体或结合MHC类别分子的肽)刺激之后的细胞因子表达来定量细胞毒性T细胞的方法。ICS和ELISPOT的示例性程序描述如下。

[0121] 要接受疫苗的受试者包括HSV-2血清阳性与HSV-2血清阴性个体两者。对于血清阳性个体,疫苗意在是治疗性的。对于血清阴性个体,疫苗意在是保护性的。在一些情况下,受试者是HSV-1血清阳性的,而在其它情况下,是HSV-1血清阴性的,与HSV-2状态无关。换句话说,受试者可包括HSV-1血清阳性/HSV-2血清阳性、HSV-1血清阴性/HSV-2血清阳性、HSV-1血清阳性/HSV-2血清阴性、HSV-1血清阴性/HSV-2血清阴性的受试者。此外,受试者包括人类和可由HSV-2感染的其它哺乳动物受试者。

[0122] 疫苗可通过诸如以下的任何适合递送途径进行施用:真皮内、经粘膜(例如鼻内、经口)、肌肉内、皮下、舌下、直肠以及阴道递送。其它递送途径是本领域中熟知的。

[0123] 肌肉内途径对于所述组合物来说是一种适合的途径。适合的壁内传送装置包括针和注射器、无针注射装置(例如Biojector, Bioject, OR USA)或笔式注射器装置,诸如用于在家中自我注射以递送胰岛素或肾上腺素的注射器装置。真皮内和皮下递送是其它适合的途径。适合的装置包括注射器和针、具有短针的注射器以及喷射注射装置。

[0124] 组合物可通过例如鼻内等经粘膜途径施用。许多鼻内传送装置是可获得的并且本领域中熟知的。喷雾器是一种所述装置。经口施用可简单到只为受试者提供溶液来吞咽。

[0125] 疫苗可在单一位点或在多个位点施用。如果在多个位点,那么在各位点处施用途径可相同,例如在不同肌肉中注射;或者可不同,例如在肌肉中注射和鼻内喷雾。此外,疫苗可在单一时间点或多个时间点施用。一般来说,如果在多个时间点施用,那么已确定剂量之间的时间以改善免疫反应。

[0126] 重组表达载体、病毒载体以及病毒样粒子

[0127] 在一个实施方案中,提供重组表达载体,其包含编码至少一种HSV2免疫原的多核苷酸序列,所述至少一种HSV2免疫原诱导对免疫原和对其相应指定抗原的免疫反应。为获得免疫原的有效转录和转译,在各载体中的编码多核苷酸序列包括至少一种更详细描述于本文中的适当表达控制序列(也称为调节表达序列或特征)(例如启动子、增强子、前导子),其可操作地连接至编码多核苷酸序列。因此,提供这些重组表达载体以在任何适当的宿主细胞中直接表达免疫原或直接共表达至少两种免疫原,所述任何适当的宿主细胞已用重组表达载体或含有重组表达载体的载体粒子转化、转导或转染。

[0128] 本文所描述的重组表达载体可编码一种或多种HSV-2免疫原(即至少一种、至少两种、至少三种免疫原等),所述免疫原更详细描述于本文中。在特定实施方案中,HSV-2的至少一种、两种或三种或更多种免疫原可由重组表达载体编码。举例来说,免疫原可以是HSV-2蛋白,诸如UL19(例如UL19上域片段或其免疫原性片段或变体)和/或gD(或其免疫原性片段或变体)和/或UL47(或其免疫原性片段或变体),或者可以是HSV-2蛋白的另一种免疫原性片段或区域。

[0129] A. 蛋白质的重组产生

[0130] 包含编码免疫原的多核苷酸序列的重组表达载体可用于产生免疫原。重组表达载体包括至少一种调节表达序列,诸如启动子或增强子,其可操作地连接至编码免疫原的多核苷酸。表达载体各自可用于转化、转导或转染适当的宿主细胞用于重组产生相应的免疫原。适合用于产生免疫原的宿主细胞包括原核生物、酵母以及高等真核细胞(例如CHO和COS)。免疫原可各自使用已知并且在蛋白质领域中常规地实践的多种分离方法(例如过滤、透滤、色谱法(包括亲和色谱法、高压液相色谱法)以及制备型电泳)中的任一种来与相应宿

主细胞或宿主细胞培养物分离。在某些实施方案中,如本文所描述,分离的免疫原可接着用药学上适合的赋形剂调配以提供免疫原性组合物。

[0131] 用于重组产生多肽的特定方法是通常熟知的并且常规地使用的。举例来说,分子生物学程序由Sambrook等描述(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; 还参见Sambrook等, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001))。DNA测序可如Sanger等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977))和Amersham International plc测序手册中所描述并且包括对其作出改进来进行。

[0132] B. 用于将蛋白质递送至受试者的重组表达载体

[0133] 重组表达载体可用于表达本文所描述的免疫原中的任何一种或多种。在特定实施方案中,重组表达载体是递送至适当的细胞(例如抗原呈现的细胞,即在细胞表面上展示肽/MHC复合物的细胞,诸如树突状细胞)或组织(例如淋巴组织),其将诱导所要免疫反应(即特定体液反应(即B细胞反应)和/或诱导特定细胞介导免疫反应,其可包括免疫原特异性CD4和/或CD8T细胞反应,所述CD8T细胞反应可包括细胞毒性T细胞(CTL)反应)。因此,重组表达载体可还包括例如淋巴组织特异性转录调节元件(TRE),诸如B淋巴细胞、T淋巴细胞;或树突状细胞特异性TRE。淋巴组织特异性TRE是本领域中已知的(参见例如Thompson等, Mol. Cell. Biol. 12, 1043-53 (1992); Todd等, J. Exp. Med. 177, 1663-74 (1993); Penix等, J. Exp. Med. 178:1483-96 (1993))。

[0134] 在一个特定实施方案中,重组表达载体是质粒DNA或粘粒DNA。含有一种或多种编码如本文所描述的免疫原的多核苷酸的质粒DNA或粘粒DNA是使用本领域中熟知的标准技术容易构建的。载体基因组可典型地以可接着转染至包装或产生者细胞系中的质粒形式来构建。质粒通常包含适用于复制细菌中的质粒的序列。所述质粒是本领域中熟知的。此外,包括原核复制起点的载体还可以包括一种基因,所述基因的表达赋予可检测或可选标记诸如耐药性。典型细菌药物抗性产物是赋予氨苄西林(ampicillin)或四环素(tetracycline)抗性的产物。关于用以证实正确核苷酸序列并入质粒中的分析,质粒可在大肠杆菌中复制,纯化并且通过限制性核酸内切酶消化来分析并且/或者通过常规方法测定其核苷酸序列。

[0135] C. 病毒载体

[0136] 在其它特定实施方案中,重组表达载体是病毒载体。示例性重组表达病毒载体包括慢病毒载体基因组、痘病毒载体基因组、牛痘病毒载体基因组、腺病毒载体基因组、腺病毒相关病毒载体基因组、疱疹病毒载体基因组以及 α 病毒载体基因组。病毒载体可以是活的、减毒的、条件复制型的或复制缺陷型的,并且典型地是非致病性(缺陷型)具复制能力病毒载体。

[0137] 举例来说,在一个特定实施方案中,当病毒载体是牛痘病毒载体基因组时,编码所关注的免疫原的多核苷酸可插入牛痘病毒载体的非基本位点中。所述非基本位点描述于例如Perkus等, Virology 152:285 (1986); Hruby等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3411 (1983); Weir等, J. Virol. 46:530 (1983) 中。适合用于牛痘病毒的启动子包括但不限于P7.5(参见例如Cochran等, J. Virol. 54:30 (1985); P11(参见例如Bertholet, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2096 (1985)); 以及CAE-1(参见例如Patel等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9431 (1988))。高度减毒牛痘病毒株对于用于人类来说是更

可接受的并且包括Lister;NYVAC,其含有特异性基因组缺失(参见例如Guerra等,J.Virol.80:985-98(2006);Tartaglia等,AIDS Research and Human Retroviruses 8:1445-47(1992))或MVA(参见例如Gheradi等,J.Gen.Virol.86:2925-36(2005);Mayr等,Infection3:6-14(1975))。还参见Hu等(J.Virol.75:10300-308(2001),其描述使用类牙巴病(Yaba-Like disease)病毒作为载体用于癌症治疗);美国专利号5,698,530和6,998,252。还参见例如美国专利号5,443,964。还参见美国专利号7,247,615和7,368,116。

[0138] 在某些实施方案中,腺病毒载体或腺病毒相关病毒载体可用于表达所关注的免疫原。已描述若干用于施用载体的腺病毒载体系统和方法(参见例如Molin等,J.Virol.72:8358-61(1998);Narumi等,Am J.Respir.Cell Mol.Biol.19:936-41(1998);Mercier等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:6188-93(2004);美国专利号6,143,290;6,596,535;6,855,317;6,936,257;7,125,717;7,378,087;7,550,296)。

[0139] 逆转录病毒载体基因组可包括基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、嗜亲性逆转录病毒、猿免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)以及组合的逆转录病毒载体基因组(参见例如Buchscher等,J.Virol.66:2731-39(1992);Johann等,J.Virol.66:1635-40(1992);Sommerfelt等,Virology 176:58-59(1990);Wilson等,J.Virol.63:2374-78(1989);Miller等,J.Virol.65:2220-24(1991);Miller等,Mol.Cell Biol.10:4239(1990);Kolberg,NIH Res.4:431992;Cornetta等,Hum.Gene Ther.2:215(1991))。

[0140] D.慢病毒载体

[0141] 在一个更特定实施方案中,重组表达病毒载体是慢病毒载体基因组。基因组可衍生自大量适合的可获得的基于慢病毒基因组的载体中的任一种,其包括识别用于人类基因治疗应用的基于慢病毒基因组的载体(参见例如Pfeifer等,Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.2:177-211(2001))。适合的慢病毒载体基因组包括基于人免疫缺陷病毒(HIV-1)、HIV-2、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马传染性贫血病毒、猿免疫缺陷病毒(SIV)以及梅迪/维斯纳病毒(maedi/visna virus)。慢病毒的理想特征是其能够感染分裂与非分裂细胞两者,不过靶细胞不必是分裂细胞或被刺激以进行分裂。一般来说,基因组和包膜糖蛋白将是基于不同病毒,使得所得病毒载体粒子是假型的。载体基因组的安全性特征得以理想地并入。安全性特征包括自灭活LTR和非整合基因组。示例性载体含有包装信号(psi)、Rev反应元件(RRE)、剪接供体、剪接受体、中央多嘌呤通道(cPPT)以及WPRE元件。在某些示例性实施方案中,病毒载体基因组包含来自诸如HIV-1基因组或SIV基因组等慢病毒基因组的序列。病毒基因组构建体可包含来自慢病毒的5'和3'LTR的序列,并且具体地说可包含来自慢病毒的5'LTR和来自慢病毒的灭活或自灭活3'LTR的R和U5序列。LTR序列可以是来自任何物种的任何慢病毒的LTR序列。举例来说,其可以是来自HIV、SIV、FIV或BIV的LTR序列。典型地,LTR序列是HIV LTR序列。

[0142] 载体基因组可包含灭活或自灭活3'LTR(参见例如Zufferey等,J.Virol.72:9873,1998;Miyoshi等,J.Virol.72:8150,1998;这两者均以其全文并入本文中)。自灭活载体通常具有增强子和启动子序列从3'长末端重复序列(LTR)的缺失,所述3'长末端重复序列在载体整合期间被复制进入5'LTR中。在一种情况下,3'LTR的U3元件含有其增强子序列、TATA盒、Sp1以及NF- κ B位点的缺失。作为自灭活3'LTR的结果,在进入和逆转录之后产生的原病

毒将包含灭活5'LTR。基本原理是通过降低载体基因组的活动危险和LTR对附近细胞启动子的影响来提高安全性。自灭活3'LTR可通过本领域中已知的任何方法来构建。

[0143] 任选地,来自慢病毒5'LTR的U3序列可用病毒构建体中的启动子序列(诸如异源启动子序列)来置换。这可增加从包装细胞系回收的病毒的效价。还可以包括增强子序列。可使用增加包装细胞系中病毒RNA基因组的表达的任何增强子/启动子组合。在一个实例中,使用CMV增强子/启动子序列(参见例如美国专利号5,385,839和5,168,062)。

[0144] 在某些实施方案中,通过将慢病毒载体基因组构建为整合缺陷型来使插入诱变的危险最小化。可寻求多种途径来产生非整合载体基因组。这些途径需要将突变工程改造为pol基因的整合酶组分,使得其编码具有灭活整合酶的蛋白质。可通过例如突变或缺失连接位点中的一者或两者,或通过缺失或修饰使3'LTR近端多嘌呤通道(PPT)为非功能性来修饰载体基因组本身以防止整合。此外,非基因途径是可用的;这些途径包括抑制整合酶的一种或多种功能的药理学药剂。所述途径不互相排斥,也就是说,每次可使用它们中的超过一种。举例来说,整合酶与连接位点两者均可以是非功能性的,或整合酶和PPT位点可以是非功能性的,或连接位点和PPT位点可以是非功能性的,或它们全部可以是非功能的。

[0145] 整合酶参与病毒双链平末端DNA的裂解和所述末端与染色体靶位点的两条链中的5'磷酸的接合。整合酶具有三个功能域:N端域,其含有锌结合基序(HHCC);中心域核,其含有催化核和保守DD35E基序(HIV-1中的D64、D116、E152);以及C端域,其具有DNA结合性质。引入整合酶中的点突变足以破坏正常功能。已构建并且表征了许多整合酶突变(参见例如Philpott和Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Apolonia, 提交给University College London的论文, 2009年4月, 第82-97页; Engelman等, J. Virol. 69:2729, 1995; Nightingale等, Mol. Therapy, 13:1121, 2006)。可缺失或突变编码整合酶蛋白质的序列以使蛋白质失活, 优选地不会使逆转录酶活性或核靶向显著削弱, 从而仅防止原病毒整合到靶细胞基因组中。可接受的突变可降低整合酶催化、链转移、与att位点的结合、与宿主染色体DNA的结合以及其它功能。举例来说, 在HIV或SIV整合酶的第35位残基处的单个天冬氨酸至天冬酰胺的取代完全消除了病毒DNA整合。整合酶的缺失将通常限于C端域。第235-288位残基的编码序列的缺失产生适用非功能性整合酶(参见例如Engelman等, J. Virol. 69:2729, 1995)。作为其它实例, 可产生突变, 例如Asp64(针对HIV-1给出的残基编号, 来自其它慢病毒或逆转录病毒的整合酶的相应残基编号可由一般技术人员容易地确定)(例如D64E、D64V)、Asp116(例如D116N)、Asn120(例如N120K)、Glu152、Gln148(例如Q148A)、Lys156、Lys159、Trp235(例如W235E)、Lys264(例如K264R)、Lys266(例如K266R)、Lys273(例如K273R)。可构建其它突变并且对整合、转基因表达以及任何其它所需参数进行测试。这些功能的分析是熟知的。可通过多种技术中的任一种来产生突变, 所述多种技术包括核酸序列的定点诱变和化学合成。可进行一种突变, 或者这些突变中的超过一种可存在于整合酶中。举例来说, 整合酶可在两个氨基酸、三个氨基酸、四个氨基酸等处具有突变。

[0146] 或者或与整合酶突变体的使用组合, 还可以突变U3和U5中的连接位点(att)。整合酶与这些位点结合, 并且3'末端二核苷酸在载体基因组的两个末端处裂解。CA二核苷酸位于3'凹端; CA是加工所需的, 核苷酸的突变阻断了向宿主染色体中整合。CA二核苷酸的A是用于整合的最关键核苷酸, 并且在基因组的两个末端处的突变将给出最佳结果(参见例如Brown等, J. Virol. 73:9011 (1999))。在一个范例中, 各末端处的CA变成TG。在其它范例中,

各末端处的CA在一个末端处变成TG而在另一个末端处变成GT。在其它范例中,各末端处的CA缺失;在其它范例中,在各末端处CA的A缺失。

[0147] 整合还可以通过突变或缺失接近3'LTR定位的多嘌呤通道(PPT)来抑制(参见例如WO 2009/076524)。PPT是具有约15个核苷酸的多嘌呤序列,其可充当用于正链DNA合成的引物结合位点。在这种情况下,PPT的突变或缺失靶向逆转录过程。在不希望限于特定机制的情况下,通过突变或缺失PPT直链DNA的产生根本上降低并且基本上仅产生1-LTR DNA环。整合需要直链双链DNA载体基因组,并且没有直链双链DNA载体基因组的情况下整合基本上消除。如本文所陈述,可通过突变或通过缺失使PPT为非功能性的。典型地,缺失整个约15nt的PPT,不过在一些实施方案中,可进行14nt、13nt、12nt、11nt、10nt、9nt、8nt、7nt、6nt、5nt、4nt、3nt和2nt的较短缺失。当进行突变时,典型地进行多种突变,尤其在PPT的5'一半中进行(例如McWilliams等,J.Virol.77:11150,2003),不过前四个碱基中的单一和双重突变仍降低转录。在PPT的3'末端处进行的突变通常具有更显著的效果(参见例如Powell等,J.Virol.70:5288,1996)。

[0148] U3区可包含紧接上游的PPT(多嘌呤通道)序列。在某些特异性实施方案中,至少三个不同U3区中的任一种(在3'末端)可包括于慢病毒载体中(参见SEQ ID NO:13-15)。构建体在U3区中含有缺失。SIN构建体在U3中具有约130个核苷酸的缺失(参见例如Miyoshi,等J.Virol.72:8150,1998;Yu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:3194,1986),其去除TATA框,从而消除LTR启动子活性。构建体703和704中的缺失增加从慢病毒载体的表达(参见例如Bayer等,Mol.Therapy 16:1968,2008)。此外,构建体704含有3'PPT的缺失,其降低载体的整合(参见例如WO 2009/076524)。还参见美国专利申请号12/842,609和国际专利申请公布号WO 2011/011584(国际专利申请号PCT/US10/042870),其各自以其全文引用的方式来并入。

[0149] 用于制备非整合载体基因组的这些不同途径可个别地或以组合形式使用。使用超过一种途径可用于通过冗余机构构建失效安全载体。因此,PPT突变或缺失可与att位点突变或缺失或与整合酶突变组合,或者PPT突变或缺失可与att位点突变或缺失与整合酶突变两者组合。类似地,att位点突变或缺失和整合酶突变可彼此或与PPT突变或缺失组合。

[0150] 如本文所描述,慢病毒载体构建体还可以含有用于在哺乳动物细胞中表达的启动子。本文中更详细论述的启动子包括例如人类泛素C启动子(UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)以及劳斯氏肉瘤病毒(RSV)启动子。

[0151] E. 病毒样粒子

[0152] 在各种实施方案中,提供病毒样粒子(VLP),其包含至少一种诱导免疫原和其相应指定抗原的免疫反应的HSV2免疫原。

[0153] HSV-1或HSV-2病毒样粒子可通过使VP5、VP19、VP23、VP22a以及成熟蛋白酶(UL26基因产物)体外自组装来制备。参见例如Newcomb等,J.Virol,1994年9月,6059-6063;Newcomb等,J.Mol.Biol.,263:432-446(1996);Thomsen等,J.Virol,1994年4月,2442-2457;其全部以全文引用的方式并入本文中。本文所描述的病毒样粒子可包含一种或多种HSV-2免疫原(即至少一种、至少两种、至少三种免疫原等),所述免疫原更详细描述于本文中。在特定实施方案中,HSV-2的至少一种、两种或三种或更多种免疫原可封入病毒样粒子中或与其缔合。举例来说,免疫原可以是HSV-2蛋白,诸如UL19(例如UL19上域片段或其免疫

原性片段或变体)和/或gD(或其免疫原性片段或变体)和/或UL47(或其免疫原性片段或变体),或者可以是HSV-2蛋白的另一种免疫原性片段或区域。

[0154] 调节表达序列

[0155] 如本文所描述,重组表达载体包含至少一种调节表达序列。在某些实施方案中,当重组表达载体包含病毒载体基因组时,需要至少一种免疫原在特定靶细胞中表达。典型地,举例来说,在慢病毒载体中,编码免疫原的多核苷酸序列位于5'LTR与3'LTR序列之间。另外,编码核苷酸序列优选地与其它基因或调节序列或特征以一种功能关系可操作地连接,例如包括启动子或增强子的转录调节序列,其以特定方式调节免疫原的表达。在某些情况下,适用转录调节序列是在时间和空间上关于活性高度调节的转录调节序列。可用于调节编码多肽的表达的表达控制元件是本领域中已知的,并且包括但不限于诱导型启动子、组成型启动子、分泌信号、增强子以及其它调节序列。

[0156] 编码免疫原和任何其它可表达序列的多核苷酸典型地与内部启动子/增强子调节序列处于一种功能关系。相对于慢病毒载体构建体,“内部”启动子/增强子是在病毒载体中位于5'LTR与3'LTR序列之间的启动子/增强子,并且可操作地连接至所关注的编码多核苷酸序列。内部启动子/增强子可以是已知使与其处于一种功能关系的基因的表达增加的任何启动子、增强子或启动子/增强子组合。“功能关系”和“可操作地连接”意味着但不限于序列位于正确的位置并且相对于启动子和/或增强子取向,以使得当启动子和/或增强子与适当的分子接触时所关注的序列将被表达。

[0157] 内部启动子/增强子的选择是基于所要的免疫原表达模式和已知启动子/增强子的特定性质。因此,内部启动子可以是组成型活性的。可使用的组成型启动子的非限制性实例包括泛素的启动子(参见例如美国专利号5510474;WO 98/32869);CMV(参见例如Thomsen等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:659,1984;美国专利号5168062); β -肌动蛋白(Gunning等1989Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4831-4835);以及pgk(参见例如Adra等1987Gene 60:65-74;Singer-Sam等1984Gene 32:409-417;以及Dobson等1982Nucleic Acids Res.10:2635-2637)。

[0158] 或者,启动子可以是组织特异性启动子。在一些实施方案中,启动子是靶细胞特异性启动子。靶向树突状细胞可增强免疫反应,特别是适用于HSV-2的免疫的细胞毒性反应。举例来说,启动子可来自树突状细胞表达的任何产物,包括CD11c、CD103、TLR、DC-SIGN、BDCA-3、DEC-205、DCIR2、甘露糖受体、Dectin-1、Clec9A、II类MHC。此外,可选择启动子以允许免疫原的诱导型表达。用于诱导型表达的许多系统是本领域中已知的,包括四环素反应系统、lac操作子-抑制子系统以及对多种环境或生理变化起反应的启动子,所述多种环境或生理变化包括热休克、金属离子(诸如金属硫蛋白启动子)、干扰素、缺氧、类固醇(诸如孕酮或糖皮质激素受体启动子)、放射线(诸如VEGF启动子)。启动子的组合还可以用于获得所要的编码免疫原的多核苷酸序列各自的表达。一般技术技工将能够根据所要的在所关注的有机体或靶细胞中的多核苷酸序列表达模式来选择启动子。

[0159] 包括病毒载体基因组的重组表达载体可包含至少一种RNA聚合酶II或III反应性启动子。此启动子可操作地连接至所关注的多核苷酸序列并且还可以连接至终止序列。此外,可并入超过一种RNA聚合酶II或III启动子。RNA聚合酶II和III启动子是本领域技术人员熟知的。适合范围的RNA聚合酶III启动子可见于例如Paule和White,Nucleic Acids

Res.,第28卷,第1283-1298页(2000)中。RNA聚合酶II或III启动子还包括任何合成或工程改造DNA片段,其可引导RNA聚合酶II或III转录下游RNA编码序列。另外,用作病毒载体基因组的一部分的RNA聚合酶II或III(Pol II或III)启动子可以是诱导型的。任何适合的诱导型Pol II或III启动子均可用于本文所描述的方法中。特别地适合的Pol II或III启动子包括四环素反应启动子,其提供于Ohkawa和Taira,Human Gene Therapy,11:577-585(2000)以及Meissner等,Nucleic Acids Res.,29:1672-1682(2001)中。

[0160] 内部增强子还可以存在于包括病毒载体基因组的重组表达载体中,以增加所关注的多核苷酸序列的表达。举例来说,可使用CMV增强子(参见例如Boshart等,Cell 41:521,1985)。已识别并且表征了病毒基因组(诸如HIV、CMV)和哺乳动物基因组中的许多增强子(参见例如公开可用的数据库,诸如基因库)。增强子可与异源启动子组合使用。本领域一般技术人员将能够根据所要表达模式选择适当的增强子。

[0161] 当使包括病毒载体基因组的重组表达载体的递送靶向特定靶细胞时,载体基因组通常将含有由靶细胞识别并且与所关注的序列、病毒组分(当载体是病毒载体时)以及本文所论述的其它序列可操作地连接的启动子。启动子是由核酸序列形成并且允许RNA聚合酶的结合和转录发生的表达控制元件。启动子可以是诱导型的、组成型的、时间活性的或组织特异性的。诱导型启动子的活性是通过存在或不存在生物因素或非生物因素来诱导。诱导型启动子可以是适用于基因工程改造的工具,因为其可操作地连接的基因的表达可在有机体发育的某些阶段、在其制造时或在特定组织中启动或停止。诱导型启动子可分组为化学调节启动子和物理调节启动子。典型化学调节启动子包括但不限于醇调节启动子(例如乙醇脱氢酶I(alcA)基因启动子)、四环素调节启动子(例如四环素反应启动子)、类固醇调节启动子(例如基于大鼠糖皮质激素受体(GR)的启动子、基于人类雌激素受体(ER)的启动子、基于蛾蛻皮激素受体的启动子以及基于类固醇/类视黄醇/甲状腺受体超家族的启动子)、金属调节启动子(例如基于金属硫蛋白基因的启动子)以及致病相关启动子(例如基于拟南芥和玉蜀黍病原体相关(PR)蛋白质的启动子)。典型物理调节启动子包括但不限于温度调节启动子(例如热休克启动子)和光调节启动子(例如大豆SSU启动子)。其它示例性启动子另外描述于例如通过检索美国专利与商标局数据库来识别的专利和已公布的专利申请中。

[0162] 本领域技术人员将能够根据特定情况选择适当的启动子。许多不同启动子是本领域中熟知的,正如用于将启动子可操作地连接至所要表达的多核苷酸序列的方法那样。天然启动子序列与许多异源启动子两者均可用于引导包装细胞和靶细胞中的表达。典型地使用异源启动子,因为其天然启动子相比通常允许所要蛋白质的更大转录和更高产率。

[0163] 启动子可例如从诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒、鸟肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、B型肝炎病毒以及猿猴病毒40(SV40)等病毒的基因组获得。启动子还可以是例如异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、热休克启动子或一般与天然序列有关的启动子,前提条件是所述启动子与靶细胞相容。在一个实施方案中,启动子是在病毒表达系统中天然存在的病毒启动子。在一些实施方案中,启动子是树突状细胞特异性启动子。树突状细胞特异性启动子可以是例如CD11c启动子。

[0164] 转录可通过将增强子序列插入载体中来增加。增强子典型地是DNA的顺式作用元件,长度通常是约10至300个碱基对,其作用于启动子以增加其转录。许多增强子序列现已知来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性酶、白蛋白、甲胎蛋白以及胰岛素)和来自真核细胞病

毒。实例包括位于复制起点的后侧(碱基对100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。增强子可在抗原特异性多核苷酸序列的位置5'或3'处剪接至载体中,但优选地位于启动子的位点5'。

[0165] 表达载体还可以含有为终止转录和稳定化mRNA所必需的序列。这些序列常常可见于真核或病毒DNA或cDNA的5'以及偶而3'未翻译区域中,并且是本领域中熟知的。

[0166] 包括病毒载体基因组的重组表达构建物还可以含有其它基因元件。可包括于构建体中的元件的类型不以任何方式受限制并且可进行选择以实现特定结果。举例来说,可包括促进靶细胞中的重组表达载体或病毒基因组的核进入的信号。所述信号的实例是HIV-1flap信号。可包括促进靶细胞中原病毒整合位点的表征的其它调节序列。举例来说,tRNA琥珀抑制子序列可包括于构建体中。例如来自鸡 β -球蛋白的绝缘子序列也可以包括于病毒基因组构建体中。此元件降低使靶细胞中因甲基化和异染色质化作用而使整合原病毒沉默的机会。此外,绝缘子可保护内部增强子、启动子以及外源性多核苷酸序列不受到来自染色体上的整合位点处的环绕DNA的正面或负面位置影响。此外,包括载体基因组的重组构建体可含有一种或多种被设计以增强所关注的基因的表达的基因元件。举例来说,可将早獭肝炎病毒反应元件(WRE)置于构建体中(参见例如Zufferey等1999.J.Virol.74:3668-81; Deglon等,2000.Hum.Gene Ther.11:179-90)。

[0167] 当重组表达载体是病毒载体基因组时,病毒载体基因组典型地以可转染至包装或产生者细胞系中用于产生病毒载体基因组构建体的质粒形式构建。质粒通常包含适用于复制细菌中的质粒的序列。所述质粒是本领域中熟知的。此外,包括原核复制起点的载体还可以包括一种基因,所述基因的表达赋予可检测或可选标记诸如耐药性。典型细菌药物抗性产物是赋予氨苄西林或四环素抗性的产物。

[0168] 在某些构型中,重组表达载体含有编码树突状细胞(DC)成熟/刺激因子的多核苷酸序列。示例性刺激分子包括GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNF α 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体(CD40L)、药物诱导型CD40(iCD40)等。这些多核苷酸典型地受一种或多种引导树突状细胞中编码序列的表达的调节元件的控制。在某些其它特定实施方案中,排除引导编码免疫原与GM-CSF两者的核苷酸序列的表达并且包括所述核苷酸序列的重组表达载体。树突状细胞的成熟有助于成功接种(参见例如Banchereau等,Nat.Rev.Immunol.5:296-306(2005);Schuler等,Curr.Opin.Immunol.15:138-147(2003);Figdor等,Nat.Med.10:475-480(2004))。成熟可转化来自细胞的DC,所述细胞主动参与将抗原捕获至被特化用于T细胞引发的细胞中。举例来说,CD40通过CD40L结合于CD4辅助性T细胞上是DC成熟的关键信号,引起CD8+T细胞的有效激活。所述刺激分子也称为成熟因子或成熟刺激因子。免疫检查点表示癌症中功能性细胞免疫激活的重要屏障,并且对T细胞上的抑制配体特异的拮抗性抗体(包括CTLA4和程序性死亡-1(PD-1))是临床上评估的靶向剂的实例。慢性感染和癌症中的重要耐受性机制是表达高水平PD-1的抗原特异性T细胞的功能性耗尽。由于已显示出治疗性免疫的效力通过与免疫检查点控制(作为非限定性实例)组合而显著增强,本领域一般技术人员应了解,抑制免疫检查点的替代途径是抑制程序性死亡(PD)配体一和二(PD-L1/L2)的表达。实现抑制的一种方式诸如本文所述的那些RNA分子的表达,其抑制由编码相关分子中的一种或多种的诸如慢病毒载体基因组等病毒载体基因组转导的DC中的PD-L1/L2的表达。DC的成熟或诸如免疫检查点(例如PD-1配体)等特定元件

的表达可通过诸如MHC II等表面标记的上调的流式细胞术分析以及通过所表达的趋化因子和细胞因子的型态(例如通过进行本文所描述的技术和方法)来表征。

[0169] 编码可检测产物(通常是蛋白质)的序列可被包括在内以允许鉴别表达所要产物的细胞。举例来说,诸如绿色荧光蛋白(GFP)等荧光标记蛋白连同所关注的(即编码至少一种免疫原)多核苷酸序列一起并入重组表达构建体中。在其它情况下,蛋白质可通过抗体来检测,或者蛋白质可以是作用于底物以产生可检测产物的酶,或者可以是允许选择转染或转导靶细胞(例如赋予药物抗性,诸如潮霉素抗性)的蛋白质产物。典型选择基因编码赋予对适合用于真核细胞的抗生素或其它毒素(例如尤其本领域中已知的新霉素、甲氨蝶呤、灭瘟素(blasticidine))的抗性的蛋白质,或补充营养缺陷型缺陷,或供给从培养基中扣留的关键养分。所述可选标记可任选地是呈现上一种分开的质粒并且引入通过共转染。

[0170] 关于本文所描述的载体粒子,可使用一个或多个多顺反子表达单位,其包括编码免疫原的多核苷酸序列中的两种或更多种,以及编码如本文所描述的包膜分子或为在包装细胞中产生所要载体粒子所必需的一种或多种DC成熟因子的序列。多顺反子载体的使用降低所需的核酸分子的总数目并且因此可避免与由多个载体基因组协同表达有关的可能的困难。在多顺反子载体中,所要表达的各种元件可操作地连接至一个或多个启动子(和根据需要的其它表达控制元件)。在某些构型中,多顺反子载体包含编码所关注的至少一种免疫原(即一种或多种)的序列、编码报告产物的序列以及编码一种或多种载体粒子组分的序列。在重组构建体包含编码免疫原的多核苷酸的某些实施方案中,构建体任选地编码DC成熟因子。在某些其它实施方案中,多顺反子载体包含编码免疫原、DC成熟因子以及任选地病毒组分(当表达载体是病毒表达载体时)的多核苷酸序列。在其它实施方案中,多顺反子载体引导表达并且编码至少两种或更多种免疫原。

[0171] 在多顺反子表达载体中所要表达的各组分可(例如)由内部核糖体进入位点(IRES)元件或病毒2A元件隔开,以允许各种蛋白质由相同启动子独立表达。IRES元件和2A元件是本领域中已知的(参见例如美国专利号4,937,190;de Felipe等2004.Traffic 5:616-626)。在一个实施方案中,与来自口蹄疫病毒(FMDV);马鼻肺炎A病毒(ERAV);以及明脉扁刺蛾病毒(TaV)(参见例如Szymczak等2004Nat.Biotechnol.22:589-594)的2A样序列连接的诸如furin裂解位点序列(RAKR)(参见例如Fang等2005Nat.Biotech.23:584-590)等寡核苷酸用于分隔多顺反子载体中的基因元件。特定多顺反子载体的功效可使用标准方案通过检测各个基因的表达容易地测试。

[0172] 在一个特定范例中,病毒载体基因组包含:巨细胞病毒(CMV)增强子/启动子序列;来自HIV 5'LTR的R和U5序列;包装序列(Ψ);HIV-1flap信号;内部增强子;内部启动子;所关注的基因;旱獭肝炎病毒反应元件;tRNA琥珀抑制子序列;缺失增强子序列的U3元件;鸡 β -球蛋白绝缘子;以及3'HIV LTR的R和U5序列。在一些范例中,载体基因组包含完整慢病毒5'LTR和自灭活3'LTR(参见例如Iwakuma等Virology 15:120,1999)。

[0173] 载体基因组的构建可使用本领域中已知的任何适合的基因工程改造技术来实现,所述技术包括但不限于限制性核酸内切酶消化、连接、转化、质粒纯化以及DNA测序的标准技术,例如如以下文献中所描述:Sambrook等(1989和2001版;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY);Coffin等(Retroviruses.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.(1997));以及“RNA

Viruses:A Practical Approach”(Alan J.Cann编著,Oxford University Press,(2000),前述文献各自以全文引用的方式并入本文中。

[0174] 还可以使用用于在哺乳动物细胞中瞬时表达的载体构建体。瞬时表达涉及使用表达载体,所述表达载体能够在宿主细胞中有效复制,使得宿主细胞累积表达载体的许多拷贝并且进而在表达载体中合成高水平的由免疫原特异性多核苷酸编码的多肽。参见 Sambrook等,同上,第16.17-16.22页,1989。适合用于适应于多肽的表达的其它载体和方法是本领域中熟知的并且容易适应于特定情况。

[0175] 通过使用本文所提供的教导和本领域中的知识,本领域技术人员将认识到,特定表达系统的功效可如下测试:通过用包含编码报告蛋白的多核苷酸序列的载体转染包装细胞,并且使用适合的技术(例如测量来自绿色荧光蛋白质缀合物的荧光)测量表达。其它适合的报告基因是本领域中熟知的。

[0176] 示例性实施方案

[0177] 除在详细描述中所描述的前述实施方案中的任一者之外,涵盖包括以下中的任一者或其任何组合的实施方案:

[0178] 1.一种免疫原性药物组合物,其包含,

[0179] (i) HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;

[0180] (ii) 不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;

[0181] (iii) 任选地,激活先天免疫的试剂;以及

[0182] (iv) 药学上可接受的载体。

[0183] 2.如实施方案1所述的组合物,其中所述HSV-2的包膜糖蛋白是gD2。

[0184] 3.如实施方案1所述的组合物,其包含包膜糖蛋白gD2的免疫片段。

[0185] 4.如实施方案1-3中任一项所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白选自UL47、ICP0、UL19、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26。

[0186] 5.如实施方案1所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白是UL19。

[0187] 6.如实施方案2所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白是UL19。

[0188] 7.如实施方案1所述的组合物,其包含UL19的免疫片段。

[0189] 8.如实施方案2所述的组合物,其包含UL19的免疫片段,例如SEQ ID NO12。

[0190] 9.如实施方案1所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白是UL25。

[0191] 10.如实施方案2所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白是UL25。

[0192] 11.如实施方案1所述的组合物,其包含UL25的免疫片段。

[0193] 12.如实施方案2所述的组合物,其包含UL25的免疫片段。

[0194] 13.如实施方案1所述的组合物,其中HSV-2的结构蛋白是UL47。

[0195] 14.如实施方案2所述的组合物,其中HSV-2的结构蛋白是UL47。

[0196] 15.如实施方案1所述的组合物,其包含UL47的免疫片段。

[0197] 16.如实施方案2所述的组合物,其包含UL47的免疫片段。

[0198] 17.如实施方案1-16中任一项所述的组合物,其进一步包含第二HSV-2的结构蛋白或其免疫片段。

[0199] 18.如实施方案17所述的组合物,其中所述第二HSV-2的结构蛋白选自UL47、ICP0、UL19、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26,其中所述第二结构蛋白与所述第一结构蛋白不相同。

- [0200] 19.如实施方案18所述的组合物,其中所述第二结构蛋白是全长蛋白。
- [0201] 20.如实施方案18所述的组合物,其中所述第二结构蛋白是所述第二结构蛋白的免疫片段。
- [0202] 21.如实施方案5-8中任一项所述的组合物,其进一步包含UL25。
- [0203] 22.如实施方案5-8中任一项所述的组合物,其进一步包含UL25的免疫片段。
- [0204] 23.如实施方案5-8中任一项所述的组合物,其进一步包含UL47。
- [0205] 24.如实施方案5-8中任一项所述的组合物,其进一步包含UL47的免疫片段。
- [0206] 25.如实施方案9-12中任一项所述的组合物,其进一步包含UL19。
- [0207] 26.如实施方案9-12中任一项所述的组合物,其进一步包含UL19的免疫片段,例如SEQ ID NO.12。
- [0208] 27.如实施方案9-12中任一项所述的组合物,其进一步包含UL47。
- [0209] 28.如实施方案9-12中任一项所述的组合物,其进一步包含UL47的免疫片段。
- [0210] 29.如实施方案13-16中任一项所述的组合物,其进一步包含UL19。
- [0211] 30.如实施方案13-16中任一项所述的组合物,其进一步包含UL19的免疫片段,例如SEQ ID NO.12。
- [0212] 31.如实施方案13-16中任一项所述的组合物,其进一步包含UL25。
- [0213] 32.如实施方案13-16中任一项所述的组合物,其进一步包含UL25的免疫片段。
- [0214] 33.如实施方案1-32中任一项所述的组合物,其中所述试剂是佐剂。
- [0215] 34.如实施方案33所述的组合物,其中所述佐剂是GLA。
- [0216] 35.如实施方案1所述的组合物,其包含gD2;UL25;UL19;GLA佐剂;以及药学上可接受的载体。
- [0217] 36.如实施方案1所述的组合物,其包含gD2、UL25以及UL19的免疫片段,例如SEQ ID NO.12。
- [0218] 37.如实施方案1所述的组合物,其包含gD2、UL19以及UL25的免疫片段。
- [0219] 38.如实施方案35-37中任一项所述的组合物,其进一步包含UL47。
- [0220] 39.如实施方案35-37中任一项所述的组合物,其进一步包含UL47的免疫片段。
- [0221] 40.如实施方案1所述的组合物,其包含ICP0或其免疫片段,以及UL47或其免疫片段、UL19或其免疫片段、UL25或其免疫片段、UL46或其免疫片段、UL39或其免疫片段、UL7或其免疫片段以及UL26或其免疫片段中的一种或多种。
- [0222] 41.如实施方案2所述的组合物,其包含ICP0或其免疫片段,以及UL47或其免疫片段、UL19或其免疫片段、UL25或其免疫片段、UL46或其免疫片段、UL39或其免疫片段、UL7或其免疫片段以及UL26或其免疫片段中的一种或多种。
- [0223] 42.如实施方案40或41所述的组合物,其包含ICP0或其免疫片段以及两个其它结构蛋白或其免疫片段。
- [0224] 43.如实施方案1所述的组合物,其包含UL46或其免疫片段,以及UL47或其免疫片段、UL19或其免疫片段、UL25或其免疫片段、ICP0或其免疫片段、UL39或其免疫片段、UL7或其免疫片段以及UL26或其免疫片段中的一种或多种。
- [0225] 44.如实施方案2所述的组合物,其包含UL46或其免疫片段,以及UL47或其免疫片段、UL19或其免疫片段、UL25或其免疫片段、ICP0或其免疫片段、UL39或其免疫片段、UL7或其

其免疫片段以及UL26或其免疫片段中的一种或多种。

[0226] 45.如实施方案43或44所述的组合物,其包含UL46或其免疫片段以及两个其它结构蛋白或其免疫片段。

[0227] 46.一种用于治疗受试者的HSV-2感染的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-45中任一项所述的组合物。

[0228] 47.一种用于在受试者中产生对HSV-2感染的免疫反应的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-45中任一项所述的组合物。

[0229] 48.如实施方案47所述的方法,其中所述受试者是HSV-2血清阳性并且是HSV-1血清阳性的。

[0230] 49.如实施方案47所述的方法,其中所述受试者是HSV-2血清阳性并且是HSV-1血清阴性的。

[0231] 50.一种药物组合物,其包含,

[0232] HSV-2的包膜糖蛋白的抗原部分以及药学上可接受的载体,其中所述抗原部分包含HSV-2的包膜糖蛋白的前导序列。

[0233] 51.如实施方案50所述的组合物,其中所述抗原部分结合于中和抗体。

[0234] 52.如实施方案50所述的组合物,其中所述HSV-2的包膜糖蛋白是gD2或gB2。

[0235] 53.如实施方案50-52所述的组合物,其中所述抗原部分包含两个或更多个来自所述包膜糖蛋白的线性表位。

[0236] 54.如实施方案50-52所述的组合物,其中所述抗原部分包含两个或更多个来自所述包膜糖蛋白的不连续表位。

[0237] 55.如实施方案50-54中任一项所述的组合物,其进一步包含激活先天免疫的试剂。

[0238] 56.如实施方案55所述的组合物,其中所述试剂是佐剂。

[0239] 57.如实施方案56所述的组合物,其中所述佐剂是GLA。

[0240] 58.一种用于治疗受试者的HSV-2或HSV-1感染的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案50-57中任一项所述的组合物。

[0241] 59.一种用于在受试者中产生对HSV-2或HSV-1的免疫反应的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案50-57中任一项所述的组合物。

[0242] 60.如实施方案58-59所述的方法,其中所述受试者是HSV-2血清阳性并且是HSV-1血清阳性的。

[0243] 61.如实施方案58-59所述的方法,其中所述受试者是HSV-2血清阳性并且是HSV-1血清阴性的。

[0244] 62.一种包括小瓶的试剂盒,所述小瓶包含如实施方案50所述的组合物。

[0245] 63.一种UL19的分离的片段,其至少缺乏SEQ ID NO:4的第1-336位和第1295-1374位氨基酸。

[0246] 64.一种分离的多肽,其包含由SEQ ID NO:12组成的UL19的片段或其片段。

[0247] 65.如实施方案64所述的多肽,其进一步包含融合至所述UL19的片段的非UL19肽。

[0248] 66.一种分离的多肽,其包含由在50个连续氨基酸上与SEQ ID NO:12至少80%同一的氨基酸序列组成的肽,其任选地融合至非UL19肽。

- [0249] 67. 一种免疫原性药物组合物, 其包含,
- [0250] (i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的多肽或其免疫变体或片段, 或如实施方案63-67中任一项所述的片段或多肽;
- [0251] (ii) 佐剂; 以及
- [0252] (iii) 药学上可接受的载体。
- [0253] 68. 如实施方案67所述的组合物, 其中所述佐剂是TLR4激动剂。
- [0254] 69. 如实施方案68所述的组合物, 其中所述佐剂是GLA (图1)。
- [0255] 70. 如实施方案67所述的组合物, 其进一步包含以下中的任一种或多种: (a) HSV-2的包膜蛋白, (b) 不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白, 或 (c) (a) 或 (b) 的免疫片段。
- [0256] 71. 如实施方案67所述的组合物, 其进一步包含HSV-2的结构蛋白。
- [0257] 72. 如实施方案71所述的组合物, 其中所述结构蛋白选自UL47、ICP0、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26。
- [0258] 73. 如实施方案67所述的组合物, 其进一步包含gD2或其免疫片段、UL25或其免疫片段以及任选地UL47或其免疫片段。
- [0259] 74. 一种免疫原性药物组合物, 其包含,
- [0260] (i) HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;
- [0261] (ii) GLA (图1); 以及
- [0262] (iii) 药学上可接受的载体。
- [0263] 75. 如实施方案74所述的组合物, 其中所述HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段是gD2或其免疫片段。
- [0264] 76. 一种免疫原性药物组合物, 其包含,
- [0265] (i) 不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;
- [0266] (ii) GLA; 以及
- [0267] (iii) 药学上可接受的载体。
- [0268] 77. 如实施方案76所述的组合物, 其中所述HSV-2的结构蛋白或其免疫片段选自UL47、ICP0、UL19、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26或其中任一种的免疫片段。
- [0269] 78. 如实施方案33、34、56、57、66、67以及71-77中任一项所述的组合物, 其进一步包含第二佐剂。
- [0270] 79. 如实施方案78所述的组合物, 其中所述第二佐剂选自TLR激动剂, 例如TLR7激动剂或TLR9激动剂; 明矾; 乳液; 皂苷; 细胞因子; 未甲基化CpG二核苷酸; 以及修饰型皂苷。
- [0271] 80. 如实施方案78所述的组合物, 其中所述第二佐剂选自弗氏不完全佐剂、MF-59TM、MontanideTM、AS02TM、AS04TM、QS-21TM以及ISCOMTM。
- [0272] 81. 一种免疫原性药物组合物, 其包含,
- [0273] (i) ICP4或其免疫片段;
- [0274] (ii) gD2或其免疫片段;
- [0275] (iii) GLA (图1); 以及
- [0276] (iii) 药学上可接受的载体。
- [0277] 82. 一种免疫原性药物组合物, 其包含,

- [0278] (i) HSV-2的 α 组基因产物或其免疫片段;和/或
- [0279] (ii) HSV-2的 $\beta 1$ 基因产物或其免疫片段;和/或
- [0280] (iii) HSV-2的 $\beta 2$ 基因产物或其免疫片段;和/或
- [0281] (iv) HSV-2的 $\gamma 1$ 基因产物或其免疫片段;和/或
- [0282] (v) HSV-2的 $\gamma 2$ 基因产物或其免疫片段;和/或
- [0283] (vi) 佐剂,优选地GLA (图1);以及
- [0284] (vii) 药学上可接受的载体。
- [0285] 83.如实施方案1-45、50-57以及65-82中任一项所述的组合物,其进一步包含表面活性剂。
- [0286] 84.一种用于治疗受试者的HSV-2感染或HSV-1感染的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案65-83中任一项所述的组合物。
- [0287] 85.一种用于在受试者中产生对HSV-2或HSV-1感染的免疫反应的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案65-83中任一项所述的组合物。
- [0288] 86.如实施方案84-85中任一项所述的方法,其中所述受试者是HSV-2血清阳性并且是HSV-1血清阳性的。
- [0289] 87.如实施方案85-85中任一项所述的方法,其中所述受试者是HSV-2血清阳性并且是HSV-1血清阴性的。
- [0290] 88.如实施方案83-87中任一项所述的方法,其中施用途径是真皮内、经粘膜、肌肉内、皮下、舌下、直肠或阴道。
- [0291] 89.一种使HSV-2从受试者传播减少的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57以及65-83中任一项所述的组合物。
- [0292] 90.一种用于使受试者的HSV-2脱落减少的方法,其包括向受试者施用如实施方案1-45、50-57以及65-83中任一项所述的组合物。
- [0293] 91.一种用于降低HSV-2感染受试者的损害频率的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57以及65-83中任一项所述的组合物。
- [0294] 92.一种用于降低HSV-2感染受试者接触HIV的危险的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57以及65-83中任一项所述的组合物。
- [0295] 93.一种用于诱导在受试者中对HSV-2的消除性免疫的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57以及65-83中任一项所述的组合物。
- [0296] 94.一种试剂盒,其包含如实施方案1-45、50-57以及65-83中任一项所述的组合物。
- [0297] 95.如实施方案94所述的试剂盒,其进一步包含减毒HSV1或HSV2病毒。
- [0298] 96.如实施方案94所述的试剂盒,其进一步包含灭活HSV1或HSV2病毒。
- [0299] 97.如实施方案94所述的试剂盒,其进一步包含病毒载体,所述病毒载体包含编码HSV1或HSV2抗原的多核苷酸。
- [0300] 98.如实施方案94所述的试剂盒,其进一步包含病毒样粒子,所述病毒样粒子包含编码HSV1或HSV2抗原的多核苷酸。
- [0301] 99.如实施方案94所述的试剂盒,其进一步包含编码HSV1或HSV2抗原的多核苷酸。
- [0302] 100.如实施方案1-45中任一项所述的组合物,其中所述包膜糖蛋白和/或结构蛋

白融合至异源肽。

[0303] 101.如实施方案58-61以及84-93中任一项所述的方法,其进一步包括施用编码HSV1和/或HSV2抗原的多核苷酸。

[0304] 102.如实施方案101所述的方法,其中所述多核苷酸是病毒载体的基因组的一部分。

[0305] 103.如实施方案58-61以及84-93中任一项所述的方法,其进一步包括施用灭活或减毒HSV1或HSV2病毒。

[0306] 104.如实施方案58-61以及84-93中任一项所述的方法,其进一步包括施用包含编码HSV1或HSV2抗原的多核苷酸的病毒样粒子。

[0307] 105.一种免疫原性药物组合物,其包含,

[0308] (i) 第一多核苷酸,其编码HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;

[0309] (ii) 第二多核苷酸,其编码不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;

[0310] (iii) 任选地激活先天免疫的试剂,诸如佐剂;以及

[0311] (iv) 药学上可接受的载体。

[0312] 106.如实施方案105所述的组合物,其中所述HSV-2的包膜糖蛋白是gD2。

[0313] 107.如实施方案105所述的组合物,其包含包膜糖蛋白gD2的免疫片段。

[0314] 108.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白选自UL47、ICP0、UL19、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26。

[0315] 109.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白或其免疫片段是UL19或其免疫片段。

[0316] 110.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述第二多核苷酸编码UL19。

[0317] 111.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述第二多核苷酸编码UL19的免疫片段,任选地如实施方案63-66中任一项所述的片段或多肽。

[0318] 112.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述第二多核苷酸编码SEQ ID NO 12。

[0319] 113.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白或其免疫片段是UL25或其免疫片段。

[0320] 114.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述第二多核苷酸编码UL25。

[0321] 115.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述第二多核苷酸编码UL25的免疫片段。

[0322] 116.如实施方案105-107中任一项所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白或其免疫片段是UL47或其免疫片段。

[0323] 117.如实施方案105-116中任一项所述的组合物,其进一步包含编码第二HSV-2的结构蛋白或其免疫片段的第三多核苷酸。

[0324] 118.如实施方案117所述的组合物,其中所述第二HSV-2的结构蛋白选自UL47、ICP0、UL19、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26,并且其中所述第二结构蛋白与所述第一结构蛋

白不相同。

[0325] 119.如实施方案118所述的组合物,其中所述第二结构蛋白是全长蛋白或其免疫片段。

[0326] 120.如实施方案100-112中任一项所述的组合物,其进一步包含编码UL25或其免疫片段的多核苷酸。

[0327] 121.如实施方案106-109中任一项所述的组合物,其进一步包含编码UL47或其免疫片段的多核苷酸。

[0328] 122.如实施方案113-115中任一项所述的组合物,其进一步包含编码UL19的多核苷酸。

[0329] 123.如实施方案113-115中任一项所述的组合物,其进一步包含编码SEQ ID NO.12的多核苷酸。

[0330] 124.如实施方案113-115中任一项所述的组合物,其进一步包含编码UL47或其免疫片段的多核苷酸。

[0331] 125.如实施方案116所述的组合物,其进一步包含编码UL19的多核苷酸。

[0332] 126.如实施方案116中任一项所述的组合物,其进一步包含编码SEQ ID NO.12的多核苷酸。

[0333] 127.如实施方案116中任一项所述的组合物,其进一步包含编码UL25或其免疫片段的多核苷酸。

[0334] 128.如实施方案105-127中任一项所述的组合物,其中所述试剂是佐剂,任选地是TLR4激动剂。

[0335] 129.如实施方案128所述的组合物,其中所述佐剂是GLA。

[0336] 130.如实施方案105所述的组合物,其中所述第一多核苷酸编码gD2;所述第二多核苷酸编码UL25;并且其中所述组合物进一步包含编码UL19的第三多核苷酸;GLA佐剂;以及药学上可接受的载体。

[0337] 131.如实施方案105所述的组合物,其中所述第一多核苷酸编码gD2,所述第二多核苷酸编码UL25,并且其中所述组合物进一步包含编码SEQ ID NO.12的多核苷酸。

[0338] 132.如实施方案105所述的组合物,其中所述第一多核苷酸编码gD2,所述第二多核苷酸编码UL19,其中所述组合物进一步包含编码UL25的免疫片段的多核苷酸。

[0339] 133.如实施方案130-132中任一项所述的组合物,其进一步包含编码UL47或其免疫片段的多核苷酸。

[0340] 134.如实施方案105或106所述的组合物,其包含编码ICP0或其免疫片段的多核苷酸,以及编码UL47或其免疫片段、UL19或其免疫片段、UL25或其免疫片段、UL46或其免疫片段、UL39或其免疫片段、UL7或其免疫片段以及UL26或其免疫片段的多核苷酸中的一种或多种。

[0341] 135.如实施方案134所述的组合物,其包含编码ICP0或其免疫片段以及两个其它结构蛋白或其免疫片段的多核苷酸。

[0342] 136.如实施方案105或106所述的组合物,其包含编码UL46或其免疫片段的多核苷酸以及编码UL47或其免疫片段、UL19或其免疫片段、UL25或其免疫片段、ICP0或其免疫片段、UL39或其免疫片段、UL7或其免疫片段以及UL26或其免疫片段的多核苷酸中的一种或多

种。

[0343] 138. 如实施方案136所述的组合物,其包含编码UL46或其免疫片段的多核苷酸,以及编码两个其它结构蛋白或其免疫片段的多核苷酸。

[0344] 139. 一种免疫原性药物组合物,其包含,

[0345] (i) 第一多核苷酸,其编码包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的多肽或其免疫变体或片段;

[0346] (ii) 任选地激活先天免疫的试剂,诸如佐剂;以及

[0347] (iii) 药学上可接受的载体。

[0348] 140. 如实施方案139所述的组合物,其中所述试剂是佐剂。

[0349] 141. 如实施方案140所述的组合物,其中所述佐剂是GLA。

[0350] 142. 如实施方案139所述的组合物,其进一步包含编码不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段的第二多核苷酸。

[0351] 143. 如实施方案139所述的组合物,其进一步包含编码除UL19 (ud) 之外的HSV-2的结构蛋白的第三多核苷酸。

[0352] 144. 如实施方案143所述的组合物,其中所述结构蛋白选自UL47、ICP0、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26。

[0353] 145. 一种免疫原性药物组合物,其包含,

[0354] (i) 第一多核苷酸,其编码HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;

[0355] (ii) GLA;以及

[0356] (iii) 药学上可接受的载体。

[0357] 146. 如实施方案145所述的组合物,其中所述HSV-2的包膜糖蛋白是gD2。

[0358] 147. 一种免疫原性药物组合物,其包含,

[0359] (i) 第一多核苷酸,其编码不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;

[0360] (ii) GLA;以及

[0361] (iii) 药学上可接受的载体。

[0362] 148. 如实施方案147所述的组合物,其中所述HSV-2的结构蛋白选自UL47、ICP0、UL19、UL25、UL46、UL39、UL7以及UL26。

[0363] 149. 如实施方案105149中任一项所述的组合物,其进一步包含第二佐剂。

[0364] 150. 如实施方案149所述的组合物,其中所述第二佐剂选自TLR激动剂、明矾、乳液、皂苷、细胞因子、未甲基化CpG二核苷酸以及修饰型皂苷。

[0365] 151. 如实施方案149所述的组合物,其中所述第二佐剂选自弗氏不完全佐剂、MF-59TM、MontanideTM、AS02TM、AS04TM、QS-21TM以及ISCOMTM。

[0366] 152. 一种免疫原性药物组合物,其包含,

[0367] (i) 第一多核苷酸,其编码ICP4或其免疫片段;

[0368] (ii) 第二多核苷酸,其编码gD2或其免疫片段;

[0369] (iii) GLA;以及

[0370] (iii) 药学上可接受的载体。

[0371] 153. 一种免疫原性药物组合物,其包含,

- [0372] (i) 第一多核苷酸,其编码HSV-2的即刻早期基因产物或其免疫片段;
- [0373] (ii) 第二多核苷酸,其编码HSV-2的早期基因产物或其免疫片段;
- [0374] (iii) 第三多核苷酸,其编码HSV-2的后期基因产物或其免疫片段;以及
- [0375] (iv) 药学上可接受的载体。
- [0376] 154.如实施方案105-153中任一项所述的组合物,其进一步包含表面活性剂。
- [0377] 155.如实施方案105-154中任一项所述的组合物,其中所述多核苷酸存在于一种或多种重组表达载体中。
- [0378] 156.如实施方案155所述的组合物,其中所述重组表达载体是病毒载体或病毒样粒子。
- [0379] 157.一种用于治疗受试者的HSV-2或HSV-1感染的方法,其包括向所述受试者施用如实施方案105-156中任一项所述的组合物并且共施用包含佐剂的第二组合物。
- [0380] 158.如实施方案157所述的方法,其中所述佐剂是TLR4激动剂。
- [0381] 159.如实施方案158所述的方法,其中所述TLR4激动剂是GLA。
- [0382] 160.一种用于在受试者中产生对HSV-2或HSV-1的免疫反应的方法,其包括向受试者施用如实施方案105-156中任一项所述的组合物并且共施用包含佐剂的第二组合物。
- [0383] 161.如实施方案160所述的方法,其中所述佐剂是TLR4激动剂。
- [0384] 162.如实施方案161所述的方法,其中所述TLR4激动剂是GLA。
- [0385] 163.如实施方案1-45、50-57以及66-83中任一项所述的组合物,其进一步包含病毒样粒子,其中所述病毒样粒子包含如实施方案1-45中任一项所述的HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段以及不同于HSV-2的包膜糖蛋白的HSV-2的结构蛋白或其免疫片段;如实施方案50-57中任一项所述的HSV-2的包膜糖蛋白的抗原部分;如实施方案63-65中任一项所述的UL19的片段;如实施方案66-73中任一项所述的多肽;如实施方案74-75中任一项所述的HSV-2的包膜糖蛋白或其免疫片段;如实施方案76-77中任一项所述的结构蛋白;或如实施方案81所述的ICP4或其免疫片段以及所述gD2或其免疫片段。
- [0386] 164.一种用于治疗受试者的HSV-2感染或HSV-1感染的方法,其包括:引发步骤,包括向所述受试者施用减毒活HSV病毒;以及加强步骤,包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57、66-83以及105-156中任一项所述的组合物。
- [0387] 165.一种用于在受试者中产生对HSV-2感染或HSV-1感染的免疫反应的方法,其包括:引发步骤,包括向所述受试者施用减毒活HSV病毒;以及加强步骤,包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57、66-83以及105-156中任一项所述的组合物。
- [0388] 166.一种用于治疗受试者的HSV-2感染或HSV-1感染的方法,其包括引发步骤,包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57、66-83以及105-156中任一项所述的组合物;以及加强步骤,包括向所述受试者施用减毒活HSV病毒。
- [0389] 167.一种用于在受试者中产生对HSV-2或HSV-1感染的免疫反应的方法,其包括引发步骤,包括向所述受试者施用如实施方案1-45、50-57、66-83以及105-156中任一项所述的组合物;以及加强步骤,包括向所述受试者施用减毒活HSV病毒。
- [0390] 提供以下实施例作为说明而不是作为限制之用。
- [0391] 实施例
- [0392] 实施例1

[0393] 当在小鼠中多次接种之后用佐剂GLA-SE调配时,基于CD4T细胞的针对HSV-2GD2蛋白的免疫发生增加

[0394] 在此实施例中,评估了在用重组蛋白疫苗免疫小鼠之后GLA-SE使CD4T细胞反应增加的能力。

[0395] 用以100 μ l (每条腿50 μ l) 肌肉内递送的与0.8、4或20 μ g GLA-SE (在此研究和所有以后的研究中SE百分比是2%)、单独SE或PBS组合的0.8、4或20 μ g重组gD蛋白经由引发/加强免疫方案(d0引发/d21加强)对各组的五只Ba1b/c小鼠进行免疫。在不存在重组蛋白的情况下用GLA-SE、单独SE或PBS免疫的小鼠充当阴性对照。在加强后第4天,通过在用gD₂₇₂₋₂₈₅肽对脾细胞培养物离体再刺激5小时之后进行关于IFN- γ 、TNF- α 以及IL-2的细胞内细胞因子染色(ICS)来测量抗原特异性脾CD4T细胞反应,所述gD₂₇₂₋₂₈₅肽事先确定为在H-2d单体型情况下存在于小鼠中的gD2中的CD4T细胞表位。如图2中所描绘,仅在包括GLA-SE或SE作为佐剂时观测到针对用各剂量的gD2重组蛋白进行的免疫的CD4T细胞反应。在各剂量的重组gD2抗原下并且在各剂量的GLA-SE下,gD2特异性CD4T细胞反应的量值比针对与单独SE一起调配的相同量的重组gD2抗原所观测到的反应有所增加。此外,在各剂量的重组gD2蛋白质下并且在各剂量的GLA下,如通过在作出反应的CD4T细胞群体内IFN- γ +、TNF- α +以及IL-2 + CD4T细胞(三者阳性)的频率所测量的作出反应的抗原特异性CD4T细胞群体的质量比当gD2与单独SE一起调配时所观测有所增加。此研究的资料表明,如通过细胞免疫反应的量值与质量两者所测量,佐剂GLA-SE与重组HSV-2蛋白抗原一起调配使疫苗的性能与通过用单独重组蛋白或与单独SE一起调配的重组蛋白进行免疫所实现相比基本上增加。

[0396] 实施例2

[0397] GLA增加小鼠中的CD8T细胞反应

[0398] 在此实施例中,评估了在用重组蛋白疫苗免疫小鼠之后GLA-SE使CD8T细胞反应增加的能力。

[0399] 卵清蛋白是用作一种模型蛋白。将雌性C57B1/6小鼠s.c.注射编码慢病毒的卵清蛋白(图3和4中的“LV-OVA”)并且在第21天通过i.m.注射具有各种剂量的GLA-SE的重组卵清蛋白佐剂(图3和4中的“OVA+GLA/SE”)进行加强。四天后,通过细胞内细胞因子染色(ICS)测量针对以下体外刺激剂的脾T细胞反应:OVA MHC I类肽55-62和257-264以及MHC II类肽323-339或CD3和CD28的抗体。CD8T细胞确定为分泌细胞因子IFN- γ 、IL-2以及TNF- α 中的任一种的细胞

[0400] 如图3中所示,在接受抗原加强的小鼠中存在较高的CD8T细胞百分比,其中在加强中接受GLA-SE加上抗原的小鼠中的百分比最高。图4提供CD8T细胞的四个子集的比率的实验细节。因此,使用重组OVA蛋白+GLA-SE的i.m.疫苗“加强”加强了经由先前的LV接种已产生的事先存在的CD8T细胞。中间剂量(4 μ g)和低剂量(0.8 μ g)GLA提供CD8T细胞在这些实验环境下的最高增加。因此,这些资料显示GLA佐剂蛋白可用于加强预先存在的CD8记忆T细胞的蛋白质特异性反应。CD8记忆细胞的激活被认为是针对HSV-2的治疗性疫苗用于治疗受感染个体的所需性质,从而强调GLA佐剂蛋白可赋予HSV-2疫苗的优越性质。

[0401] 实施例3

[0402] 在小鼠中多次接种之后针对个别HSV-2GD2、UL19以及UL25蛋白的基于CD4T细胞的免疫原性

[0403] 这组研究的目的是识别单一小鼠株,其中可评估在疫苗中针对各蛋白质亚单位的基于CD4T细胞的免疫原性。为此,在小鼠中进行一系列实验以识别在不同MHC单体型(即BALB/c (H-2^d)、C57BL/6 (H-2^b)以及CB6F1 (H-2^d+2^b))情形内,各HSV-2抗原内的个别CD4T细胞表位(即gD2、UL19以及UL25)。实验策略由在引发/加强免疫方案(d0引发/d21加强)的情形内用与5μg GLA-SE一起调配的5μg各重组蛋白作为单价免疫原以100μl(每条腿50μl)肌肉内免疫未感染小鼠组成。在加强后第4天,使用序列源自单价免疫原的相应氨基酸序列的15-mer肽库(各肽之间有11个aa重叠)分析抗原特异性CD4T细胞反应。在初级筛选中,分析脾CD4细胞响应于用来自对应于个别HSV-2编码抗原的肽库的个别15-mer肽池对脾细胞培养物的离体刺激的IFN-γ、TNF-α以及IL-2产生。所观测的肽池中的CD4T细胞反应被视为阳性命中,并且随后用相同的免疫和分析策略使用来自先前筛选的阳性池内的个别肽(作为离体刺激)或来自先前筛选的以不同组合再汇集的阳性池内的肽进行二级(并且在一些情况下是三级)筛选。如图5A-B中所示,这些研究识别个别15-mer肽,针对所述个别15-mer肽可观测在MHC单体型H-2b (C57BL/6小鼠)的情形内疫苗内的个别重组HSV-2蛋白各自(即gD2、UL19以及UL25)的抗原特异性CD4T细胞反应。

[0404] 实施例4

[0405] 在小鼠中三价制剂多次接种之后针对各个别HSV-2亚单位蛋白质的基于CD4T和B细胞的免疫原性

[0406] 此实施例展示当在C57BL/6小鼠中疫苗内的个别重组蛋白亚单位中的每一种以三价制剂形式与GLA-SE一起递送时针对疫苗内的个别重组蛋白亚单位中的每一种的基于CD4T细胞和B细胞的免疫原性。实验策略由使用两组五只C57BL/6小鼠组成。一组用以100μl(每条腿50μl)肌肉内递送的组合递送并且在等摩尔基础上与5.5μg GLA-SE组合调配(分别0.8、3.3以及1.4μg蛋白质)的重组HSV-2gD2、UL19以及UL25蛋白经由引发/加强免疫方案(d0引发/d21加强)免疫。第二组用媒介物(PBS)假免疫。在加强后第4天将动物处死,以收获脾和周围血液(经由心脏穿刺)。通过在用事先确定为含有三价疫苗内的各重组蛋白免疫原的CD4T细胞表位的15-mer肽对脾细胞培养物离体再刺激之后进行关于IFN γ、TNFα以及IL-2的ICS来测量抗原特异性脾CD4T细胞反应(参见实施例3)。通过直接ELISA分析各接种和模拟接种小鼠的血清中针对三价疫苗内的重组蛋白免疫原中的每一种的IgG1亚类抗原特异性抗体的存在。如图6A-B中所示,当以三价制剂形式与GLA-SE一起递送时对于HSV-2重组蛋白抗原中的每一种均观测到抗原特异性CD4T细胞和抗体反应。这些数据支持三价疫苗的显著免疫原性以及其引发针对HSV-2蛋白的综合免疫反应(体液反应与细胞反应两者)的能力。出乎意料地,针对UL19抗原所产生的免疫反应的量值最大。UL19从未被包括作为现有的为治疗或预防人类HSV-2感染而施用的基于重组亚单位的疫苗中的任一种的组分。这些资料提供以下证明:所要求的疫苗展示优于现有技术疫苗的优越性质。

[0407] 实施例5

[0408] 在小鼠中用GLA-SE进行HSV-2UL19的单次和多次免疫之后的抗原特异性CD4T细胞反应

[0409] 此实施例显示在小鼠中通过与GLA-SE一起调配的HSV-2UL19的单次和重复免疫产生的基于CD4T细胞的免疫原性。对于此研究,两组五只C57BL/6小鼠接受一次免疫,并且两组五只c57BL/6小鼠接受两次免疫(相隔21天),其使用5μg重组UL19蛋白作为单价免疫原加

上5 μ g GLA-SE。在最终免疫之后第4天或第10天将各组小鼠处死,用于分析抗原特异性CD4T细胞反应。相应分析组接受的免疫在时间上错开,使得所有四组小鼠在同一天处死,用于分析抗原特异性CD4T细胞反应。通过响应于用已事先确定为含有对UL19具特异性的CD4T细胞表位的个别UL19 15-mer肽编号250和297对脾细胞离体刺激的IFN- γ 、TNF- α 以及IL-2的产生来测量对免疫原的抗原特异性CD4T细胞反应(参见实施例3)。如图7A-B中所描绘,在最后一次免疫后第四天,仅在接受两次免疫的动物中检测到UL19特异性CD4T细胞反应,而在最后一次免疫后在实验的第10天在引发与引发/加强实验组两者内均检测到UL19特异性CD4T细胞反应。在最后一次免疫后第10天,与只接收单次免疫的动物相比在接受两次免疫的动物中反应的量值明显增加(~ 2.5 倍)。这些发现证实重复施用含有重组HSV-2蛋白+GLA-SE的疫苗对于增加反应和接着发生的抗原特异性CD4T细胞反应的量值来说是优越方案。

[0410] 为测试在重复施用疫苗之后CD4T细胞反应增加对GLA-SE的依赖性,进行类似实验,其中用单独UL19蛋白或与单独SE一起调配的蛋白质或GLA-SE免疫各组小鼠。在最终免疫后第5天或第10天将各组小鼠处死,用于分析抗原特异性CD4T细胞反应。通过响应于用已事先确定为含有对UL19具特异性的CD4T细胞表位的个别UL19 15-mer肽编号250和297对脾细胞离体刺激的IFN- γ 、TNF- α 以及IL-2的产生来测量对免疫原的抗原特异性CD4T细胞反应(参见实施例3)。如图8A-B中所描绘,与只接收单次免疫的动物相比接受两次免疫的动物展示抗原特异性CD4T细胞反应显著增加,从而证实前述实验的结果。重要的是,发现此增加取决于GLA-SE佐剂,因为当在不存在GLA的情况下单独或与SE一起施用免疫原时接受两次免疫的小鼠未展示显著的CD4T细胞反应。

[0411] 实施例6

[0412] 在小鼠中用与GLA-SE一起调配的三价HSV疫苗免疫之后的抗原特异性CD4T细胞反应

[0413] 此实施例显示,当在等摩尔以及等质量基础上调配重组蛋白时,针对在GLA-SE中调配的包含gD2、UL19以及UL25抗原的三价亚单位疫苗的各亚单位可产生CD4T细胞反应。将各组雌性C57BL/6小鼠(5只小鼠/组)用三价疫苗免疫,其中在等摩尔或等质量基础上总蛋白是5 μ g或15 μ g。在第21天使小鼠接受用类似制剂进行的第二次免疫,并且在最后一次免疫之后五天在用适当的肽离体再刺激之后通过ICS测量T细胞反应。如图9中所示,针对三价HSV-2亚单位疫苗的各个别组分产生表位特异性CD4T细胞反应。不管重组蛋白组分是在等摩尔还是等质量基础上调配均观测到阳性反应,这表明基于疫苗的相对蛋白质组成所述反应不显著影响或改变。

[0414] 实施例7

[0415] 当与佐剂GLA-SE一起调配时在小鼠中多次接种之后针对HSV-2gD2蛋白的基于抗体的免疫原性的增加

[0416] 在此实施例中,评估了在用重组蛋白疫苗免疫小鼠之后GLA-SE使CD4T细胞反应增加的能力。

[0417] 用以100 μ l(50 μ l/腿)肌肉内递送的与4 μ g GLA-SE、单独SE或PBS媒介物组合的4 μ g重组gD蛋白经由引发/加强免疫方案(d0引发/d21加强)免疫各组的五只Balb/c小鼠。通过ELISA测量IgG、IgG1以及IgG2a同型抗原的HSV-2gD2特异性抗体。如图10中所描绘,GLA-SE佐剂使针对HSV-2gD2的总IgG反应增强,使抗原特异性IgG1的产生降低,并且使抗原特异性

IgG2a的产生增加。

[0418] 实施例8

[0419] 当与佐剂GLA-SE一起调配时针对HSV-2UL19UD蛋白的基于CD8T细胞的免疫原性的增加

[0420] 在此实施例中,评估了用含有重组HSV-2gD2、UL19上域(UL19ud;SEQ ID NO:12)以及UL25的三价疫苗免疫小鼠之后GLA-SE诱导功能性HSV-2UL19特异性CD8T细胞反应的能力。

[0421] 向各组的五只C57BL/6小鼠提供由与5μg GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2、UL19ud以及UL25各5μg组成的三价疫苗的单次肌肉内免疫。用单独媒介物免疫的小鼠充当阴性对照。在免疫后第6天,通过在用gD2、UL19或UL25肽对脾细胞培养物离体再刺激5小时之后进行关于IFN-γ、TNF-α以及IL-2的细胞内细胞因子染色(ICS)来测量抗原特异性脾CD4和CD8T细胞反应。如图11中图片A所描绘,当包括GLA-SE作为佐剂时观测到对三价疫苗的各组分(gD2、UL19ud以及UL25)的CD4T细胞反应。值得注意的是,如图11中图片B所描绘,当与GLA-SE一起提供时针对UL19ud抗原观测到CD8T细胞反应。在确认这些CD8T细胞是功能性的情况下,将未免疫或早期用三价疫苗加上GLA-SE免疫4周的小鼠用减毒HSV-2胸苷激酶缺乏型(TK-)病毒皮下激发,并且通过ICS测量UL19特异性CD8T细胞反应。如图11中图片C所描绘,在事先用疫苗免疫的小鼠中在病毒激发后CD8T细胞反应的量值更大。

[0422] 实施例9

[0423] 当与佐剂GLA-SE一起调配时重组HSV-2蛋白疫苗的预防性抗病毒功效的增加

[0424] 在此实施例中,评估了GLA-SE使二价重组HSV-2蛋白疫苗针对致死HSV-2激发进行保护的能力增强的能力。

[0425] 相隔28天向各组的十只C57BL/6小鼠提供两次由与5μg GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2和UL19ud各5μg组成的二价疫苗的肌肉内免疫。用单独5μg GLA-SE免疫的小鼠充当阴性对照。第二次免疫后22天,将小鼠用药性持久的乙酸甲羟孕酮处理并且接着在六天后用50xLD₅₀剂量的野生型HSV-2阴道内激发。每天监测小鼠的生殖器损害形成和存活率。感染后第1天、第3天以及第5天,收集阴道拭子用于通过PCR定量HSV-2DNA。感染后约2个月,从幸存小鼠收获背根神经节并且通过PCR定量潜伏性HSV-2DNA。如图12中图片A所描绘,与用单独gD2和UL19ud或单独GLA-SE免疫的小鼠相比,用gD2和UL19ud加上GLA-SE免疫的小鼠的损害形成显著降低并且存活率增加。同样地,如图12中图片B所描绘,用gD2和UL19ud加上GLA-SE免疫的10只小鼠中9只到第5天不具有可检测的HSV-2DNA,然而在任一对照组中的小鼠在5天中均在阴道中显示持续水平的HSV-2。如图12中图片C所描绘,尽管在仅GLA-SE组中存在三只幸存鼠,但是这3只小鼠中2只在背根神经节中显示显著水平的潜伏性HSV-2,用gD2和UL19ud加上GLA-SE免疫的小鼠在神经节中显示极少到不显示可检测的HSV-2。

[0426] 实施例10

[0427] 当与佐剂GLA-SE一起调配时因重组HSV-2蛋白疫苗造成的预先存在的记忆CD8T细胞的扩增的增加

[0428] 在此实施例中,评估了GLA-SE使三价重组HSV-2蛋白疫苗增加事先由HSV-2感染诱导的记忆CD8T细胞的能力增强的能力。

[0429] 用次致死剂量的减毒HSV-2胸苷激酶缺乏型(TK-)病毒皮下感染各组的五只C57BL/6小鼠。28天后,用由与5 μ g GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2、UL19ud (SEQ ID NO:12)以及UL25各5 μ g组成的三价疫苗对感染或未感染小鼠进行免疫。对照组包括用单独GLA-SE或单独媒介物处理的感染小鼠以及用单独媒介物处理的未感染小鼠。免疫后六天,通过ICS测量UL19特异性CD4和CD8T细胞反应。如图13中所描绘,在使先前感染的小鼠免疫之后UL19特异性CD4和CD8T细胞的频率更大,表明存在感染诱导的记忆T细胞的召回。重要的是,因重组蛋白疫苗造成的这些记忆T细胞的最大增加需要存在GLA-SE佐剂。

[0430] 实施例11

[0431] 重组HSV-2蛋白疫苗治疗豚鼠的复发性HSV-2的能力

[0432] 在此实施例中,评估了三价重组HSV-2蛋白疫苗降低复发性HSV-2损害的频率的能力。

[0433] 用次致死剂量的HSV-2株333病毒阴道内感染各组的七只豚鼠。在感染后第13天和第27天,用由与5 μ g GLA-SE组合的重组gD2、UL19ud (参见SEQ ID NO:12)以及UL25各5 μ g组成的三价疫苗免疫豚鼠。用单独GLA-SE处理的感染豚鼠充当阴性对照。每天监测动物的阴道损害并且对各损害日分配以得分0-4。将各组的日损害得分取平均值并且描绘随时间变化的曲线。如图14中所描绘,与用单独GLA-SE处理的动物相比,用三价疫苗加GLA-SE处理的动物的复发性损害具有约50%降低。

[0434] 实施例12

[0435] 衍生自HSV-2包膜糖蛋白并且含有前导序列的免疫原性蛋白的构建

[0436] 在此实施例中,免疫原性蛋白是由gD2序列构建并且包含gD2前导序列。

[0437] gD2的前导序列是40个氨基酸长(SEQ ID No.:1中的第1-40位残基)。将编码100氨基酸片段(第1-100位残基)的核苷酸序列插入表达载体中。使用定点诱变来将第38-42位残基从CysAlaLysTyr (SEQ ID NO:16)改变为GlyLeuAlaVal (SEQ ID NO:17)或在蛋白质合成期间不会裂解的其它序列。用含有变更序列的载体转化CHO细胞并且分离gD2蛋白。或者,将核苷酸序列插入杆状病毒表达载体和从Sf9细胞分离的蛋白中。通过HPLC分析获得对存在前导序列的证实。

[0438] 实施例13

[0439] GLA/SE加重重组三价蛋白质疫苗针对恶性HSV-2情况下的致死激发的保护性功效

[0440] 在此实施例中,评估了三价重组HSV-2蛋白疫苗加GLA佐剂针对致死HSV-2进行保护的能力。

[0441] 相隔28天向各组的十只C57BL/6小鼠提供两次由与5 μ g GLA-SE或5%右旋糖媒介物组合的重组gD2、UL19ud (参见SEQ ID NO:12)以及UL25各5 μ g组成的三价疫苗的肌肉内免疫。用单独5 μ g GLA-SE免疫的小鼠充当阴性对照。其它对照组由激发之后24小时开始用5 μ g GLA-SE和1毫克/ml阿昔洛韦(ACV)/饮用水免疫的小鼠组成。第二次免疫后二十二天,将小鼠用药性持久的乙酸甲羟孕酮处理并且接着在六天后用50xLD₅₀剂量的野生型HSV-2阴道内激发。每天监测小鼠的生殖器损害形成和存活率。感染后第1天、第3天以及第5天,收集阴道拭子用于通过PCR定量HSV-2DNA。

[0442] 如图15中所描绘,与用单独三价蛋白质疫苗或单独GLA-SE免疫的小鼠相比,用三价重组gD2、UL19ud以及UL25加上GLA-SE免疫的小鼠的损害形成显著降低(图片A)并且存活

率增加(图片B)。同样地,如图16中所描绘,用gD2/UL19ud/UL25加上GLA-SE免疫的10只小鼠中7只到第5天不具有可检测的阴道HSV-2DNA,而所有三个对照组中的小鼠在5天中在阴道中均显示持续水平的HSV-2。接受阿昔洛韦的动物在第1天、第3天以及第5天也具有一样高的HSV-2DNA病毒负荷。接受GLA/SE加gD2/UL19ud/UL25活疫苗的动物具有明显更低的病毒负荷,并且到第5天许多动物灭菌(即没有可检测的病毒负荷)。

[0443] 总之,这些实验表明GLA/SE+重组三价gD2/UL19ud/UL25蛋白质疫苗针对恶性HSV-2情况下的致死激发的体内保护性功效。

[0444] 实施例14

[0445] 疫苗在人类中的安全性和免疫原性

[0446] 与GLA-SE或单独SE一起调配的上文所描述的免疫原的安全性和免疫原性可使用HSV-2血清阴性受试者(预防性疫苗的目标)和HSV-2血清阳性受试者(免疫治疗性疫苗的目标)在阶段1A/1B研究设计中进行测试。研究设计可遵循:通过HIV疫苗试验网络(HVTN)建立,并且在最近10年中已用于40次人类HIV-1阶段1A疫苗试验。

[0447] 这些阶段1A试验的设计由每组标准化格式的12个受试者(10个疫苗-2个安慰剂)组成,并且是基于确定在15%发病率下的严重有害事件的能力。还确定了不具免疫原性(10个受试者中<2个出现免疫)的疫苗。在HSV-2阶段1A研究中,受试者以4周时间间隔接受3次1 μ g或2.5 μ g GLA-SE的i.m.免疫。在阶段1A试验中免疫了总共48个HSV血清阴性且HSV-2血清阳性受试者(HSV-1血清阳性或HSV-1血清阴性)。

[0448] 在第0天通过西方墨点法确定HSV-2血清阴性受试者。除安全性评估之外,可监测进行研究的受试者的可能的疫苗诱导的HSV-2特异性免疫体液和细胞免疫反应以及生殖器溃疡复发的频率(仅HSV-2血清阳性受试者)。对于HSV-2感染群体,可使用两次预接种时间点来形成gD2的抗体。对HSV-2重组蛋白的细胞免疫可通过IFN- γ ELISPOT和ICS分析来评估,并且gD2特异性体液免疫通过ELISA和中和抗体分析来评估。

[0449] 由前述内容应了解,尽管本文已出于说明的目的描述了特定实施方案,但是可作出各种改进,而不会偏离本发明的精神和范围。因此,本发明除由随附权利要求书限制以外不受其它限制。

序列表

<110> 免疫设计公司
杜宾斯基等

<120> 用于 HSV-2 的疫苗

<130> 31943/47733

<150> 61/647,764

<151> 2012-05-16

<150> 61/679,387

<151> 2012-08-03

<150> 61/714,158

<151> 2012-10-15

<160> 17

<170> PatentIn 版本 3.5

[0001]

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 1

Met Arg Gly Gly Gly Leu Ile Cys Ala Leu Val Val Gly Ala Leu Val

1 5 10 15

Ala Ala Val Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Arg Ala

20 25 30

Ser Gly Gly Val Ala Ala Thr Val Ala Ala Asn Gly Gly Pro Ala Ser

35 40 45

Arg Pro Pro Pro Val Pro Ser Pro Ala Thr Thr Lys Ala Arg Lys Arg

50 55 60

Lys Thr Lys Lys Pro Pro Lys Arg Pro Glu Ala Thr Pro Pro Pro Asp	65	70	75	80
Ala Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Ala His Leu	85	90	95	
Arg Glu Ile Lys Val Glu Asn Ala Asp Ala Gln Phe Tyr Val Cys Pro	100	105	110	
Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys	115	120	125	
Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val	130	135	140	
Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr	145	150	155	160
Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln	165	170	175	
Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro Phe Glu Glu Val	180	185	190	
Ile Asp Lys Ile Asn Thr Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala Lys Tyr	195	200	205	
Val Arg Asn Asn Met Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu	210	215	220	
Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Lys Val Ala Thr Arg Thr Ser Arg	225	230	235	240

	Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala	
	245 250 255	
	Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp	
	260 265 270	
	Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp	
	275 280 285	
	Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr	
	290 295 300	
	Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe	
	305 310 315 320	
[0003]	Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ser Pro Thr Thr	
	325 330 335	
	Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Val	
	340 345 350	
	Pro Lys Arg Pro Ala Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp	
	355 360 365	
	Glu Met Leu Arg Ala Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp	
	370 375 380	
	Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Ser	
	385 390 395 400	
	Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Arg Asp Ala Arg Glu Ala Ile	
	405 410 415	

Asp Arg Met Phe Ala Arg Lys Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly
420 425 430

Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Thr Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln
435 440 445

Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr Val Arg Glu Tyr Met
450 455 460

Arg Glu Gln Asp Arg Lys Pro Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Arg
465 470 475 480

Glu Ala Pro Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser
485 490 495

[0004] Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln Arg
500 505 510

His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Ile Ala Val Ala Trp Cys Glu Leu
515 520 525

Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro
530 535 540

Asn Ala Ile Ala Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met
545 550 555 560

Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala Pro Asp
565 570 575

Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Val Ser Ser Arg Pro Gly Thr
580 585 590

	Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp Gln Gly Pro	
	595 600 605	
	Leu Ile Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg	
	610 615 620	
	Asp Ala Leu Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe Ile Phe	
	625 630 635 640	
	Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Tyr Ala Tyr Ser His Gln Leu	
	645 650 655	
	Ser Arg Ala Asp Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile	
	660 665 670	
[0005]	Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg	
	675 680 685	
	His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg	
	690 695 700	
	Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile	
	705 710 715 720	
	Arg Ala Asp Ala Asn Ala Ala Met Phe Ala Gly Leu Cys Ala Phe Phe	
	725 730 735	
	Glu Gly Met Gly Asp Leu Gly Arg Ala Val Gly Lys Val Val Met Gly	
	740 745 750	
	Val Val Gly Gly Val Val Ser Ala Val Ser Gly Val Ser Ser Phe Met	
	755 760 765	

	Ser Asn Pro Phe Gly Ala Leu Ala Val Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly	
	770 775 780	
	Leu Val Ala Ala Phe Phe Ala Phe Arg Tyr Val Leu Gln Leu Gln Arg	
	785 790 795 800	
	Asn Pro Met Lys Ala Leu Tyr Pro Leu Thr Thr Lys Glu Leu Lys Thr	
	805 810 815	
	Ser Asp Pro Gly Gly Val Gly Gly Glu Gly Glu Glu Gly Ala Glu Gly	
	820 825 830	
	Gly Gly Phe Asp Glu Ala Lys Leu Ala Glu Ala Arg Glu Met Ile Arg	
	835 840 845	
[0006]	Tyr Met Ala Leu Val Ser Ala Met Glu Arg Thr Glu His Lys Ala Arg	
	850 855 860	
	Lys Lys Gly Thr Ser Ala Leu Leu Ser Ser Lys Val Thr Asn Met Val	
	865 870 875 880	
	Leu Arg Lys Arg Asn Lys Ala Arg Tyr Ser Pro Leu His Asn Glu Asp	
	885 890 895	
	Glu Ala Gly Asp Glu Asp Glu Leu	
	900	
	<210> 2	
	<211> 393	
	<212> PRT	
	<213> 单纯疱疹病毒 2	
	<400> 2	

Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu
180 185 190

Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His
195 200 205

Arg Ala Arg Ala Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro
210 215 220

Ala Ala Cys Leu Thr Ser Lys Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp
225 230 235 240

Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val
245 250 255

[0008] Ala Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Pro Pro
260 265 270

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Asp Thr Thr Asn Ala
275 280 285

Thr Gln Pro Glu Leu Val Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
290 295 300

Glu Asp Pro Ala Gly Thr Val Ser Ser Gln Ile Pro Pro Asn Trp His
305 310 315 320

Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val Ala Pro His His Ala Pro Ala Ala Pro
325 330 335

Ser Asn Pro Gly Leu Ile Ile Gly Ala Leu Ala Gly Ser Thr Leu Ala
340 345 350

Val Leu Val Ile Gly Gly Ile Ala Phe Trp Val Arg Arg Arg Ala Gln
355 360 365

Met Ala Pro Lys Arg Leu Arg Leu Pro His Ile Arg Asp Asp Asp Ala
370 375 380

Pro Pro Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
385 390

<210> 3

<211> 306

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 3

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Pro Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg
1 5 10 15

[0009]

Phe Arg Gly Lys Asn Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro
20 25 30

Gly Val Lys Arg Val Tyr His Ile Gln Pro Ser Leu Glu Asp Pro Phe
35 40 45

Gln Pro Pro Ser Ile Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu His Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
65 70 75 80

Val Arg Gly Ala Ser Asp Glu Ala Arg Lys His Thr Tyr Asn Leu Thr
85 90 95

Ile Ala Trp Tyr Arg Met Gly Asp Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val

100	105	110
Met Glu Tyr Thr Glu Cys Pro Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro		
115	120	125
Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val		
130	135	140
Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr		
145	150	155
		160
Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile		
165	170	175
Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Arg Ala Ser Cys Lys Tyr Ala		
180	185	190
[0010]		
Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ala Ala Cys Leu Thr Ser Lys Ala Tyr		
195	200	205
Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile		
210	215	220
Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly		
225	230	235
		240
Trp His Gly Pro Lys Pro Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu		
245	250	255
Leu Ser Asp Thr Thr Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Val Pro Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Ala Gly Thr Val Ser Ser		

275

280

285

Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val Ala Pro

290

295

300

His His

305

<210> 4

<211> 1374

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 4

Met Ala Ala Pro Ala Arg Asp Pro Pro Gly Tyr Arg Tyr Ala Ala Ala

1

5

10

15

[0011]

Met Val Pro Thr Gly Ser Ile Leu Ser Thr Ile Glu Val Ala Ser His

20

25

30

Arg Arg Leu Phe Asp Phe Phe Ala Arg Val Arg Ser Asp Glu Asn Ser

35

40

45

Leu Tyr Asp Val Glu Phe Asp Ala Leu Leu Gly Ser Tyr Cys Asn Thr

50

55

60

Leu Ser Leu Val Arg Phe Leu Glu Leu Gly Leu Ser Val Ala Cys Val

65

70

75

80

Cys Thr Lys Phe Pro Glu Leu Ala Tyr Met Asn Glu Gly Arg Val Gln

85

90

95

Phe Glu Val His Gln Pro Leu Ile Ala Arg Asp Gly Pro His Pro Val

100

105

110

	Glu Gln Pro Val His Asn Tyr Met Thr Lys Val Ile Asp Arg Arg Ala	
	115 120 125	
	Leu Asn Ala Ala Phe Ser Leu Ala Thr Glu Ala Ile Ala Leu Leu Thr	
	130 135 140	
	Gly Glu Ala Leu Asp Gly Thr Gly Ile Ser Leu His Arg Gln Leu Arg	
	145 150 155 160	
	Ala Ile Gln Gln Leu Ala Arg Asn Val Gln Ala Val Leu Gly Ala Phe	
	165 170 175	
	Glu Arg Gly Thr Ala Asp Gln Met Leu His Val Leu Leu Glu Lys Ala	
	180 185 190	
[0012]	Pro Pro Leu Ala Leu Leu Leu Pro Met Gln Arg Tyr Leu Asp Asn Gly	
	195 200 205	
	Arg Leu Ala Thr Arg Val Ala Arg Ala Thr Leu Val Ala Glu Leu Lys	
	210 215 220	
	Arg Ser Phe Cys Asp Thr Ser Phe Phe Leu Gly Lys Ala Gly His Arg	
	225 230 235 240	
	Arg Glu Ala Ile Glu Ala Trp Leu Val Asp Leu Thr Thr Ala Thr Gln	
	245 250 255	
	Pro Ser Val Ala Val Pro Arg Leu Thr His Ala Asp Thr Arg Gly Arg	
	260 265 270	
	Pro Val Asp Gly Val Leu Val Thr Thr Ala Ala Ile Lys Gln Arg Leu	
	275 280 285	

	Leu Gln Ser Phe Leu Lys Val Glu Asp Thr Glu Ala Asp Val Pro Val	
	290 295 300	
	Thr Tyr Gly Glu Met Val Leu Asn Gly Ala Asn Leu Val Thr Ala Leu	
	305 310 315 320	
	Val Met Gly Lys Ala Val Arg Ser Leu Asp Asp Val Gly Arg His Leu	
	325 330 335	
	Leu Glu Met Gln Glu Glu Gln Leu Glu Ala Asn Arg Glu Thr Leu Asp	
	340 345 350	
	Glu Leu Glu Ser Ala Pro Gln Thr Thr Arg Val Arg Ala Asp Leu Val	
	355 360 365	
[0013]	Ala Ile Gly Asp Arg Leu Val Phe Leu Glu Ala Leu Glu Lys Arg Ile	
	370 375 380	
	Tyr Ala Ala Thr Asn Val Pro Tyr Pro Leu Val Gly Ala Met Asp Leu	
	385 390 395 400	
	Thr Phe Val Leu Pro Leu Gly Leu Phe Asn Pro Ala Met Glu Arg Phe	
	405 410 415	
	Ala Ala His Ala Gly Asp Leu Val Pro Ala Pro Gly His Pro Glu Pro	
	420 425 430	
	Arg Ala Phe Pro Pro Arg Gln Leu Phe Phe Trp Gly Lys Asp His Gln	
	435 440 445	
	Val Leu Arg Leu Ser Met Glu Asn Ala Val Gly Thr Val Cys His Pro	
	450 455 460	

	Ser Leu Met Asn Ile Asp Ala Ala Val Gly Gly Val Asn His Asp Pro	
	465 470 475 480	
	Val Glu Ala Ala Asn Pro Tyr Gly Ala Tyr Val Ala Ala Pro Ala Gly	
	485 490 495	
	Pro Gly Ala Asp Met Gln Gln Arg Phe Leu Asn Ala Trp Arg Gln Arg	
	500 505 510	
	Leu Ala His Gly Arg Val Arg Trp Val Ala Glu Cys Gln Met Thr Ala	
	515 520 525	
	Glu Gln Phe Met Gln Pro Asp Asn Ala Asn Leu Ala Leu Glu Leu His	
	530 535 540	
[0014]	Pro Ala Phe Asp Phe Phe Ala Gly Val Ala Asp Val Glu Leu Pro Gly	
	545 550 555 560	
	Gly Glu Val Pro Pro Ala Gly Pro Gly Ala Ile Gln Ala Thr Trp Arg	
	565 570 575	
	Val Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ala Leu Cys Pro Val Ala Phe Arg	
	580 585 590	
	Asp Ala Arg Gly Leu Glu Leu Gly Val Gly Arg His Ala Met Ala Pro	
	595 600 605	
	Ala Thr Ile Ala Ala Val Arg Gly Ala Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Pro	
	610 615 620	
	Ala Val Phe Tyr Leu Leu Gln Ala Ala Ile His Gly Ser Glu His Val	
	625 630 635 640	

	Phe Cys Ala Leu Ala Arg Leu Val Thr Gln Cys Ile Thr Ser Tyr Trp	
	645 650 655	
	Asn Asn Thr Arg Cys Ala Ala Phe Val Asn Asp Tyr Ser Leu Val Ser	
	660 665 670	
	Tyr Ile Val Thr Tyr Leu Gly Gly Asp Leu Pro Glu Glu Cys Met Ala	
	675 680 685	
	Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala His Val Glu Ala Leu Ala Gln Leu Val	
	690 695 700	
	Asp Asp Phe Thr Leu Pro Gly Pro Glu Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ala	
	705 710 715 720	
[0015]	Glu Leu Asn His Leu Met Arg Asp Pro Ala Leu Leu Pro Pro Leu Val	
	725 730 735	
	Trp Asp Cys Asp Gly Leu Met Arg His Ala Ala Leu Asp Arg His Arg	
	740 745 750	
	Asp Cys Arg Ile Asp Ala Gly Gly His Glu Pro Val Tyr Ala Ala Ala	
	755 760 765	
	Cys Asn Val Ala Thr Ala Asp Phe Asn Arg Asn Asp Gly Arg Leu Leu	
	770 775 780	
	His Asn Thr Gln Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Asp Arg Pro His	
	785 790 795 800	
	Arg Pro Ala Asp Trp Thr Val His His Lys Ile Tyr Tyr Tyr Val Leu	
	805 810 815	

Val Pro Ala Phe Ser Arg Gly Arg Cys Cys Thr Ala Gly Val Arg Phe
820 825 830

Asp Arg Val Tyr Ala Thr Leu Gln Asn Met Val Val Pro Glu Ile Ala
835 840 845

Pro Gly Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Val Thr Asp Pro Ala His Pro
850 855 860

Leu His Pro Ala Asn Leu Val Ala Asn Thr Val Asn Ala Met Phe His
865 870 875 880

Asn Gly Arg Val Val Val Asp Gly Pro Ala Met Leu Thr Leu Gln Val
885 890 895

[0016] Leu Ala His Asn Met Ala Glu Arg Thr Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala
900 905 910

Ala Pro Asp Ala Gly Ala Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asn Met Arg Ile
915 920 925

Phe Asp Gly Ala Leu His Ala Gly Val Leu Leu Met Ala Pro Gln His
930 935 940

Leu Asp His Thr Ile Gln Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Val Leu Pro Val
945 950 955 960

His Ala Leu Phe Ala Gly Ala Asp His Val Ala Asn Ala Pro Asn Phe
965 970 975

Pro Pro Ala Leu Arg Asp Leu Ala Arg His Val Pro Leu Val Pro Pro
980 985 990

	Ala Leu Gly Ala Asn Tyr Phe Ser	Ser Ile Arg Gln Pro	Val Val Gln
	995	1000	1005
	His Ala Arg Glu Ser Ala Ala	Gly Glu Asn Ala Leu	Thr Tyr Ala
	1010	1015	1020
	Leu Met Ala Gly Tyr Phe Lys	Met Ser Pro Val Ala	Leu Tyr His
	1025	1030	1035
	Gln Leu Lys Thr Gly Leu His	Pro Gly Phe Gly Phe	Thr Val Val
	1040	1045	1050
	Arg Gln Asp Arg Phe Val Thr	Glu Asn Val Leu Phe	Ser Glu Arg
	1055	1060	1065
[0017]	Ala Ser Glu Ala Tyr Phe Leu	Gly Gln Leu Gln Val	Ala Arg His
	1070	1075	1080
	Glu Thr Gly Gly Gly Val Ser	Phe Thr Leu Thr Gln	Pro Arg Gly
	1085	1090	1095
	Asn Val Asp Leu Gly Val Gly	Tyr Thr Ala Val Ala	Ala Thr Ala
	1100	1105	1110
	Thr Val Arg Asn Pro Val Thr	Asp Met Gly Asn Leu	Pro Gln Asn
	1115	1120	1125
	Phe Tyr Leu Gly Arg Gly Ala	Pro Pro Leu Leu Asp	Asn Ala Ala
	1130	1135	1140
	Ala Val Tyr Leu Arg Asn Ala	Val Val Ala Gly Asn	Arg Leu Gly
	1145	1150	1155

	Pro Ala	Gln Pro Leu Pro Val	Phe Gly Cys Ala Gln	Val Pro Arg
	1160		1165	1170
	Arg Ala	Gly Met Asp His Gly	Gln Asp Ala Val Cys	Glu Phe Ile
	1175		1180	1185
	Ala Thr	Pro Val Ala Thr Asp	Ile Asn Tyr Phe Arg	Arg Pro Cys
	1190		1195	1200
	Asn Pro	Arg Gly Arg Ala Ala	Gly Gly Val Tyr Ala	Gly Asp Lys
	1205		1210	1215
	Glu Gly	Asp Val Ile Ala Leu	Met Tyr Asp His Gly	Gln Ser Asp
	1220		1225	1230
[0018]	Pro Ala	Arg Pro Phe Ala Ala	Thr Ala Asn Pro Trp	Ala Ser Gln
	1235		1240	1245
	Arg Phe	Ser Tyr Gly Asp Leu	Leu Tyr Asn Gly Ala	Tyr His Leu
	1250		1255	1260
	Asn Gly	Ala Ser Pro Val Leu	Ser Pro Cys Phe Lys	Phe Phe Thr
	1265		1270	1275
	Ala Ala	Asp Ile Thr Ala Lys	His Arg Cys Leu Glu	Arg Leu Ile
	1280		1285	1290
	Val Glu	Thr Gly Ser Ala Val	Ser Thr Ala Thr Ala	Ala Ser Asp
	1295		1300	1305
	Val Gln	Phe Lys Arg Pro Pro	Gly Cys Arg Glu Leu	Val Glu Asp
	1310		1315	1320

Pro Cys Gly Leu Phe Gln Glu Ala Tyr Pro Ile Thr Cys Ala Ser
1325 1330 1335

Asp Pro Ala Leu Leu Arg Ser Ala Arg Asp Gly Glu Ala His Ala
1340 1345 1350

Arg Glu Thr His Phe Thr Gln Tyr Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Pro
1355 1360 1365

Leu Lys Gly Leu Ser Leu
1370

<210> 5

<211> 585

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

[0019]

<400> 5

Met Asp Pro Tyr Tyr Pro Phe Asp Ala Leu Asp Val Trp Glu His Arg
1 5 10 15

Arg Phe Ile Val Ala Asp Ser Arg Ser Phe Ile Thr Pro Glu Phe Pro
20 25 30

Arg Asp Phe Trp Met Leu Pro Val Phe Asn Ile Pro Arg Glu Thr Ala
35 40 45

Ala Glu Arg Ala Ala Val Leu Gln Ala Gln Arg Thr Ala Ala Ala Ala
50 55 60

Ala Leu Glu Asn Ala Ala Leu Gln Ala Ala Glu Leu Pro Val Asp Ile
65 70 75 80

	Glu Arg Arg Ile Arg Pro Ile Glu Gln Gln Val His His Ile Ala Asp	
	85 90 95	
	Ala Leu Glu Ala Leu Glu Thr Ala Ala Ala Ala Glu Glu Ala Asp	
	100 105 110	
	Ala Ala Arg Asp Ala Glu Ala Arg Gly Glu Gly Ala Ala Asp Gly Ala	
	115 120 125	
	Ala Pro Ser Pro Thr Ala Gly Pro Ala Ala Ala Glu Met Glu Val Gln	
	130 135 140	
	Ile Val Arg Asn Asp Pro Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Asn Leu Pro Val	
	145 150 155 160	
[0020]	Asp Leu Leu His Met Val Tyr Ala Gly Arg Gly Ala Ala Gly Ser Ser	
	165 170 175	
	Gly Val Val Phe Gly Thr Trp Tyr Arg Thr Ile Gln Glu Arg Thr Ile	
	180 185 190	
	Ala Asp Phe Pro Leu Thr Thr Arg Ser Ala Asp Phe Arg Asp Gly Arg	
	195 200 205	
	Met Ser Lys Thr Phe Met Thr Ala Leu Val Leu Ser Leu Gln Ser Cys	
	210 215 220	
	Gly Arg Leu Tyr Val Gly Gln Arg His Tyr Ser Ala Phe Glu Cys Ala	
	225 230 235 240	
	Val Leu Cys Leu Tyr Leu Leu Tyr Arg Thr Thr His Glu Ser Ser Pro	
	245 250 255	

	Asp Arg Asp Arg Ala Pro Val Ala Phe Gly Asp Leu Leu Ala Arg Leu	
	260	265 270
	Pro Arg Tyr Leu Ala Arg Leu Ala Ala Val Ile Gly Asp Glu Ser Gly	
	275	280 285
	Arg Pro Gln Tyr Arg Tyr Arg Asp Asp Lys Leu Pro Lys Ala Gln Phe	
	290	295 300
	Ala Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Glu His Gly Ala Leu Ala Thr His Val	
	305	310 315 320
	Val Ile Ala Thr Leu Val Arg His Gly Val Leu Pro Ala Ala Pro Gly	
	325	330 335
[0021]	Asp Val Pro Arg Asp Thr Ser Thr Arg Val Asn Pro Asp Asp Val Ala	
	340	345 350
	His Arg Asp Asp Val Asn Arg Ala Ala Ala Ala Phe Leu Ala Arg Gly	
	355	360 365
	His Asn Leu Phe Leu Trp Glu Asp Gln Thr Leu Leu Arg Ala Thr Ala	
	370	375 380
	Asn Thr Ile Thr Ala Leu Ala Val Leu Arg Arg Leu Leu Ala Asn Gly	
	385	390 395 400
	Asn Val Tyr Ala Asp Arg Leu Asp Asn Arg Leu Gln Leu Gly Met Leu	
	405	410 415
	Ile Pro Gly Ala Val Pro Ala Glu Ala Ile Ala Arg Gly Ala Ser Gly	
	420	425 430

Leu Asp Ser Gly Ala Ile Lys Ser Gly Asp Asn Asn Leu Glu Ala Leu
435 440 445

Cys Val Asn Tyr Val Leu Pro Leu Tyr Gln Ala Asp Pro Thr Val Glu
450 455 460

Leu Thr Gln Leu Phe Pro Gly Leu Ala Ala Leu Cys Leu Asp Ala Gln
465 470 475 480

Ala Gly Arg Pro Leu Ala Ser Thr Arg Arg Val Val Asp Met Ser Ser
485 490 495

Gly Ala Arg Gln Ala Ala Leu Val Arg Leu Thr Ala Leu Glu Leu Ile
500 505 510

[0022] Asn Arg Thr Arg Thr Asn Thr Thr Pro Val Gly Glu Ile Ile Asn Ala
515 520 525

His Asp Ala Leu Gly Ile Gln Tyr Glu Gln Gly Leu Gly Leu Leu Ala
530 535 540

Gln Gln Ala Arg Ile Gly Leu Ala Ser Asn Ala Lys Arg Phe Ala Thr
545 550 555 560

Phe Asn Val Gly Ser Asp Tyr Asp Leu Leu Tyr Phe Leu Cys Leu Gly
565 570 575

Phe Ile Pro Gln Tyr Leu Ser Val Ala
580 585

<210> 6

<211> 696

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 6

Met Ser Val Arg Gly His Ala Val Arg Arg Arg Arg Ala Ser Thr Arg

1 5 10 15

Ser His Ala Pro Ser Ala His Arg Ala Asp Ser Pro Val Glu Asp Glu

20 25 30

Pro Glu Gly Gly Gly Gly Gly Leu Met Gly Tyr Leu Arg Ala Val Phe

35 40 45

Asn Val Asp Asp Asp Ser Glu Val Glu Ala Ala Gly Glu Met Ala Ser

50 55 60

[0023]

Glu Glu Pro Pro Pro Arg Arg Arg Arg Glu Ala Arg Gly His Pro Gly

65 70 75 80

Ser Arg Arg Ala Ser Glu Ala Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Arg Ala

85 90 95

Ser Phe Pro Arg Pro Arg Ser Val Thr Ala Arg Ser Gln Ser Val Arg

100 105 110

Gly Arg Arg Asp Ser Ala Ile Thr Arg Ala Pro Arg Gly Gly Tyr Leu

115 120 125

Gly Pro Met Asp Pro Arg Asp Val Leu Gly Arg Val Gly Gly Ser Arg

130 135 140

Val Val Pro Ser Pro Leu Phe Leu Asp Glu Leu Ser Tyr Glu Glu Asp

145 150 155 160

	Asp Tyr Pro Ala Ala Val Ala His Asp Asp Gly Ala Gly Ala Arg Pro	
	165 170 175	
	Pro Ala Thr Val Glu Ile Leu Ala Gly Arg Val Ser Gly Pro Glu Leu	
	180 185 190	
	Gln Ala Ala Phe Pro Leu Asp Arg Leu Thr Pro Arg Val Ala Ala Trp	
	195 200 205	
	Asp Glu Ser Val Arg Ser Ala Leu Ala Leu Gly His Pro Ala Gly Phe	
	210 215 220	
	Tyr Pro Cys Pro Asp Ser Ala Phe Gly Leu Ser Arg Val Gly Val Met	
	225 230 235 240	
[0024]	His Phe Ala Ser Pro Ala Asp Pro Lys Val Phe Phe Arg Gln Thr Leu	
	245 250 255	
	Gln Gln Gly Glu Ala Leu Ala Trp Tyr Val Thr Gly Asp Ala Ile Leu	
	260 265 270	
	Asp Leu Thr Asp Arg Arg Ala Lys Thr Ser Pro Ser Arg Ala Met Gly	
	275 280 285	
	Phe Leu Val Asp Ala Ile Val Arg Val Ala Ile Asn Gly Trp Val Cys	
	290 295 300	
	Gly Thr Arg Leu His Thr Glu Gly Arg Gly Ser Glu Leu Asp Asp Arg	
	305 310 315 320	
	Ala Ala Glu Leu Arg Arg Gln Phe Ala Ser Leu Thr Ala Leu Arg Pro	
	325 330 335	

	Val Gly Ala Ala Ala Val Pro Leu Leu Ser Ala Gly Gly Ala Ala Pro			
	340	345	350	
	Pro His Pro Gly Pro Asp Ala Ala Val Phe Arg Ser Ser Leu Gly Ser			
	355	360	365	
	Leu Leu Tyr Trp Pro Gly Val Arg Ala Leu Leu Gly Arg Asp Cys Arg			
	370	375	380	
	Val Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Arg Met Thr Tyr Ile Ala Thr Gly Ala			
	385	390	395	400
	Leu Leu Ala Arg Phe Asn Pro Gly Ala Val Lys Cys Val Leu Pro Arg			
	405	410	415	
[0025]	Glu Ala Ala Phe Ala Gly Arg Val Leu Asp Val Leu Ala Val Leu Ala			
	420	425	430	
	Glu Gln Thr Val Gln Trp Leu Ser Val Val Val Gly Ala Arg Leu His			
	435	440	445	
	Pro His Ser Ala His Pro Ala Phe Ala Asp Val Glu Gln Glu Ala Leu			
	450	455	460	
	Phe Arg Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Gly Val Val Ala Ala Glu His			
	465	470	475	480
	Glu Ala Leu Gly Asp Thr Ala Ala Arg Arg Leu Leu Ala Thr Ser Gly			
	485	490	495	
	Leu Asn Ala Val Leu Gly Ala Ala Val Tyr Ala Leu His Thr Ala Leu			
	500	505	510	

	Ala Thr Val Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Ala Cys Gly Asp Ala Arg Arg	
	515	520 525
	Arg Arg Asp Asp Ala Ala Ala Arg Ala Val Leu Ala Thr Gly Leu	
	530	535 540
	Ile Leu Gln Arg Leu Leu Gly Leu Ala Asp Thr Val Val Ala Cys Val	
	545	550 555 560
	Ala Leu Ala Ala Phe Asp Gly Gly Ser Thr Ala Pro Glu Val Gly Thr	
	565	570 575
	Tyr Thr Pro Leu Arg Tyr Ala Cys Val Leu Arg Ala Thr Gln Pro Leu	
	580	585 590
[0026]	Tyr Ala Arg Thr Thr Pro Ala Lys Phe Trp Ala Asp Val Arg Ala Ala	
	595	600 605
	Ala Glu His Val Asp Leu Arg Pro Ala Ser Ser Ala Pro Arg Ala Pro	
	610	615 620
	Val Ser Gly Thr Ala Asp Pro Ala Phe Leu Leu Glu Asp Leu Ala Ala	
	625	630 635 640
	Phe Pro Pro Ala Pro Leu Asn Ser Glu Ser Val Leu Gly Pro Arg Val	
	645	650 655
	Arg Val Val Asp Ile Met Ala Gln Phe Arg Lys Leu Leu Met Gly Asp	
	660	665 670
	Glu Glu Thr Ala Ala Leu Arg Ala His Val Ser Gly Arg Arg Ala Thr	
	675	680 685

Gly Leu Gly Gly Pro Pro Arg Pro
690 695

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 7

Gln Pro Arg Trp Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 8

[0027]

Ser Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 9

Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln His Ala Arg
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 10

Cys Glu Phe Ile Ala Thr Pro Val Ala Thr Asp Ile Asn Tyr Phe
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 11

Met Asp Pro Tyr Tyr Pro Phe Asp Ala Leu Asp Val Trp Glu His
1 5 10 15

<210> 12

<211> 604

<212> PRT

<213> 单纯疱疹病毒 2

<400> 12

[0028]

Arg Leu Ser Met Glu Asn Ala Val Gly Thr Val Cys His Pro Ser Leu
1 5 10 15

Met Asn Ile Asp Ala Ala Val Gly Gly Val Asn His Asp Pro Val Glu
20 25 30

Ala Ala Asn Pro Tyr Gly Ala Tyr Val Ala Ala Pro Ala Gly Pro Gly
35 40 45

Ala Asp Met Gln Gln Arg Phe Leu Asn Ala Trp Arg Gln Arg Leu Ala
50 55 60

His Gly Arg Val Arg Trp Val Ala Glu Cys Gln Met Thr Ala Glu Gln
65 70 75 80

Phe Met Gln Pro Asp Asn Ala Asn Leu Ala Leu Glu Leu His Pro Ala
85 90 95

	Phe Asp Phe Phe Ala Gly Val Ala Asp Val Glu Leu Pro Gly Gly Glu	
	100 105 110	
	Val Pro Pro Ala Gly Pro Gly Ala Ile Gln Ala Thr Trp Arg Val Val	
	115 120 125	
	Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ala Leu Cys Pro Val Ala Phe Arg Asp Ala	
	130 135 140	
	Arg Gly Leu Glu Leu Gly Val Gly Arg His Ala Met Ala Pro Ala Thr	
	145 150 155 160	
	Ile Ala Ala Val Arg Gly Ala Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Pro Ala Val	
	165 170 175	
[0029]	Phe Tyr Leu Leu Gln Ala Ala Ile His Gly Asn Glu His Val Phe Cys	
	180 185 190	
	Ala Leu Ala Arg Leu Val Thr Gln Cys Ile Thr Ser Tyr Trp Asn Asn	
	195 200 205	
	Thr Arg Cys Ala Ala Phe Val Asn Asp Tyr Ser Leu Val Ser Tyr Ile	
	210 215 220	
	Val Thr Tyr Leu Gly Gly Asp Leu Pro Glu Glu Cys Met Ala Val Tyr	
	225 230 235 240	
	Arg Asp Leu Val Ala His Val Glu Ala Leu Ala Gln Leu Val Asp Asp	
	245 250 255	
	Phe Thr Leu Pro Gly Pro Glu Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ala Glu Leu	
	260 265 270	

	Asn His Leu Met Arg Asp Pro Ala Leu Leu Pro Pro Leu Val Trp Asp	
	275	280 285
	Cys Asp Gly Leu Met Arg His Ala Ala Leu Asp Arg His Arg Asp Cys	
	290	295 300
	Arg Ile Asp Ala Gly Gly His Glu Pro Val Tyr Ala Ala Ala Cys Asn	
	305	310 315 320
	Val Ala Thr Ala Asp Phe Asn Arg Asn Asp Gly Arg Leu Leu His Asn	
		325 330 335
	Thr Gln Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Asp Arg Pro His Arg Pro	
		340 345 350
[0030]	Ala Asp Trp Thr Val His His Lys Ile Tyr Tyr Tyr Val Leu Val Pro	
	355	360 365
	Ala Phe Ser Arg Gly Arg Cys Cys Thr Ala Gly Val Arg Phe Asp Arg	
	370	375 380
	Val Tyr Ala Thr Leu Gln Asn Met Val Val Pro Glu Ile Ala Pro Gly	
	385	390 395 400
	Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Val Thr Asp Pro Ala His Pro Leu His	
		405 410 415
	Pro Ala Asn Leu Val Ala Asn Thr Val Lys Arg Met Phe His Asn Gly	
		420 425 430
	Arg Val Val Val Asp Gly Pro Ala Met Leu Thr Leu Gln Val Leu Ala	
	435	440 445

	His Asn Met Ala Glu Arg Thr Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala Ala Pro	
	450	455 460
	Asp Ala Gly Ala Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asn Met Arg Ile Phe Asp	
	465	470 475 480
	Gly Ala Leu His Ala Gly Val Leu Leu Met Ala Pro Gln His Leu Asp	
		485 490 495
	His Thr Ile Gln Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Val Leu Pro Val His Ala	
		500 505 510
	Leu Phe Ala Gly Ala Asp His Val Ala Asn Ala Pro Asn Phe Pro Pro	
		515 520 525
[0031]	Ala Leu Arg Asp Leu Ala Arg Asp Val Pro Leu Val Pro Pro Ala Leu	
		530 535 540
	Gly Ala Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln His Ala	
		545 550 555 560
	Arg Glu Ser Ala Ala Gly Glu Asn Ala Leu Thr Tyr Ala Leu Met Ala	
		565 570 575
	Gly Tyr Phe Lys Met Ser Pro Val Ala Leu Tyr His Gln Leu Lys Thr	
		580 585 590
	Gly Leu His Pro Gly Phe Gly Phe Thr Val Val Arg	
		595 600
	<210> 13	
	<211> 683	

<212> DNA

<213> 人类免疫缺陷病毒类型 1

<400> 13

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg 180

actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatgc ctgtatctgt ggatctacca 240

cacacaaggc tacttccctg attggcagaa ctacacacca gggccaggga tcagatatcc 300

actgaccttt ggatgggtgt acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360

caatgaagga gagaacaccc gcttgttaca cctgtgagc ctgcatggga tggatgaccc 420

ggagagagaa gtattagagt ggaggtttga cagccgccta gcatttcac acatggcccg 480

agagctgcat ccggactgta ctgggtctct ctggtagac cagatctgag cctgggagct 540

[0032]

ctctggetaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgccctt gagtgttca 600

agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggttaactag agatccctca gaccctttta 660

gtcagtgttg aaaatctcta gca 683

<210> 14

<211> 416

<212> DNA

<213> 人类免疫缺陷病毒类型 1

<400> 14

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg 180

actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgccct gtactgggtc 240

tctctggtta gaccagatct gaggctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300

	taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga	360
	ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca	416
	<210> 15	
	<211> 401	
	<212> DNA	
	<213> 人类免疫缺陷病毒类型 1	
	<400> 15	
	cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc	60
	ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gteacacctc aggtaccttt	120
	aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac ttttactgg aagggctaaf	180
	tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggctctctt ggtagacca	240
	gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca ctgettaagc ctcaataaag	300
[0033]	cttgcectga gtgettcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag	360
	atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a	401
	<210> 16	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> HSV-2 片段	
	<400> 16	
	Cys Ala Lys Tyr	
	1	
	<210> 17	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> HSV-2 修饰型片段	
	<400> 17	
	Gly Leu Ala Val	
[0034]	1	

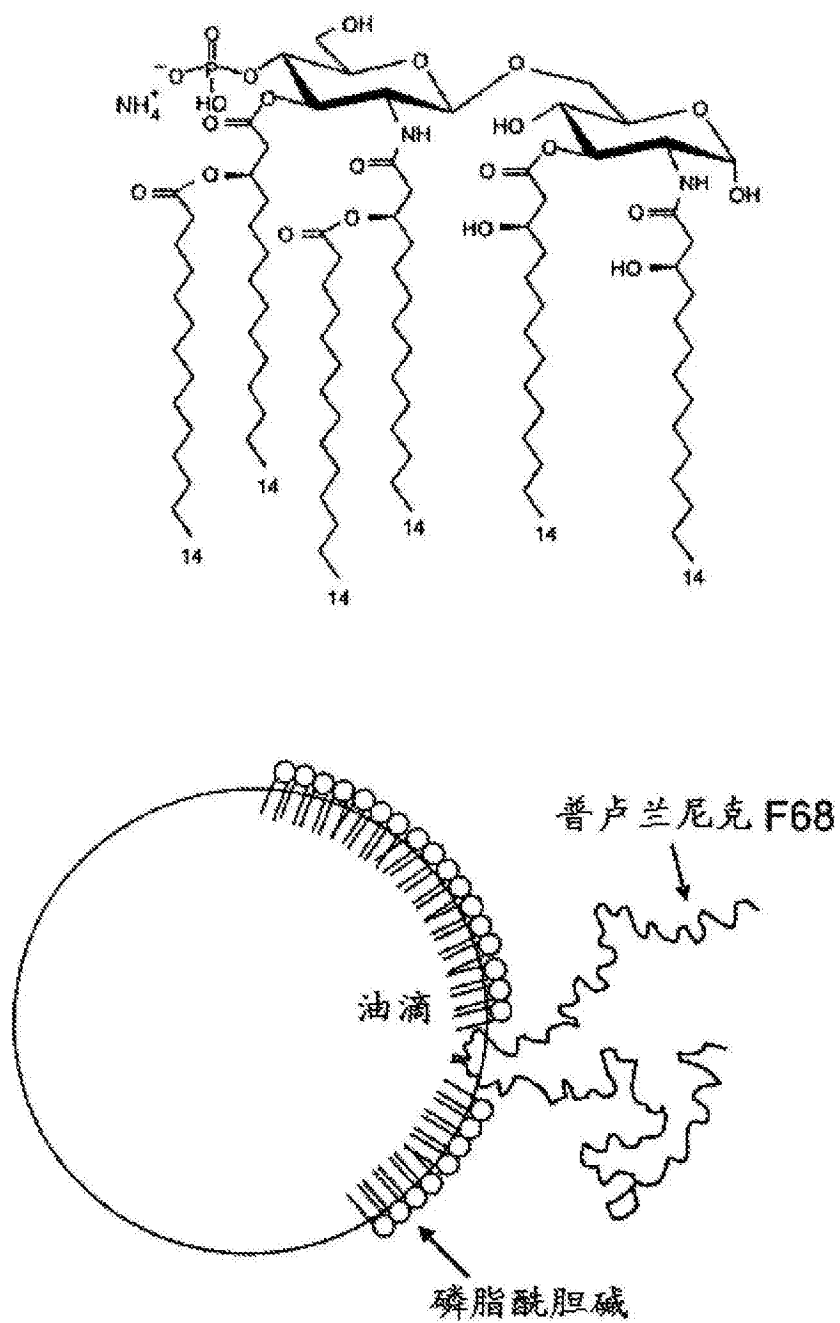


图1

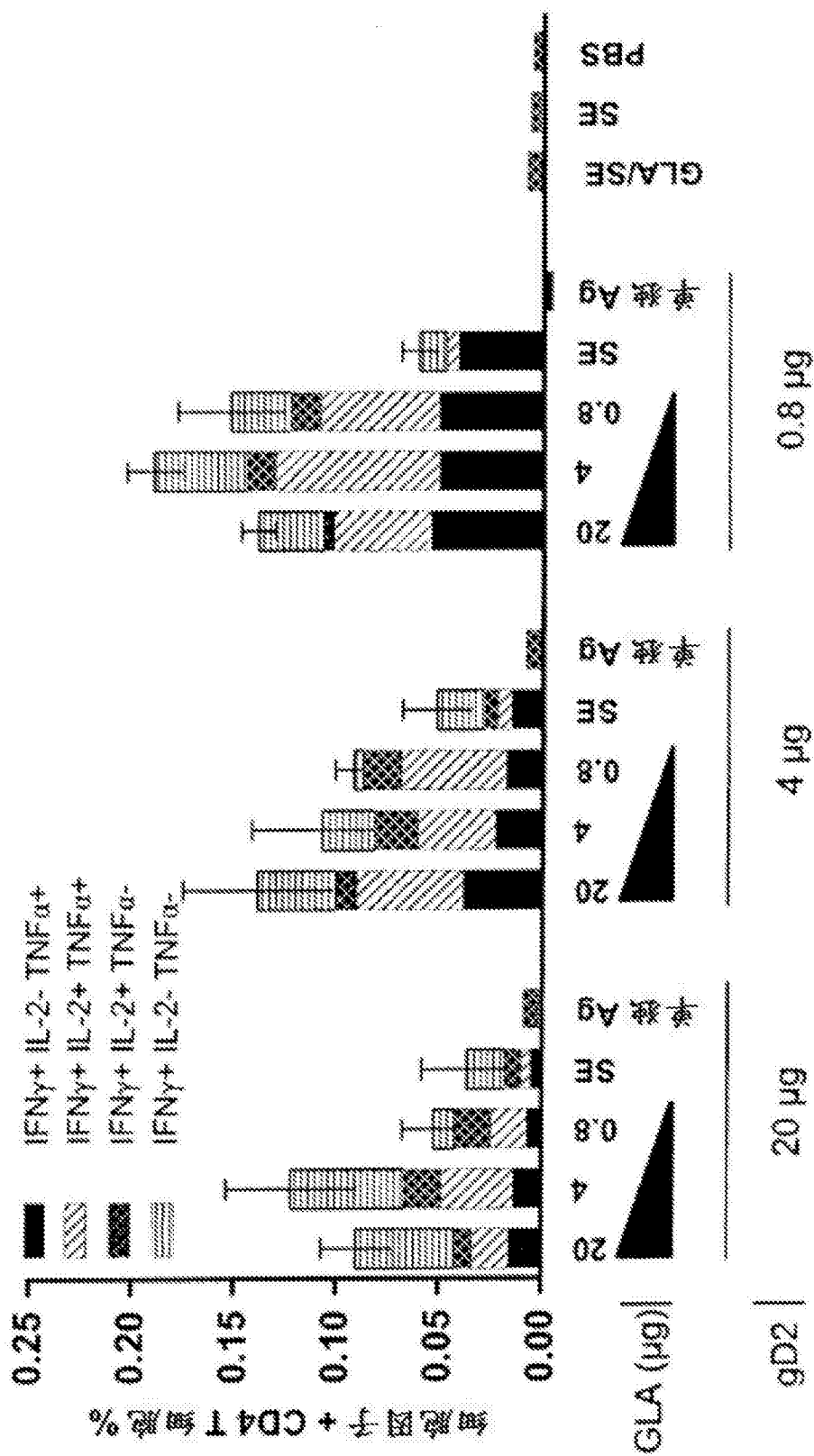


图2

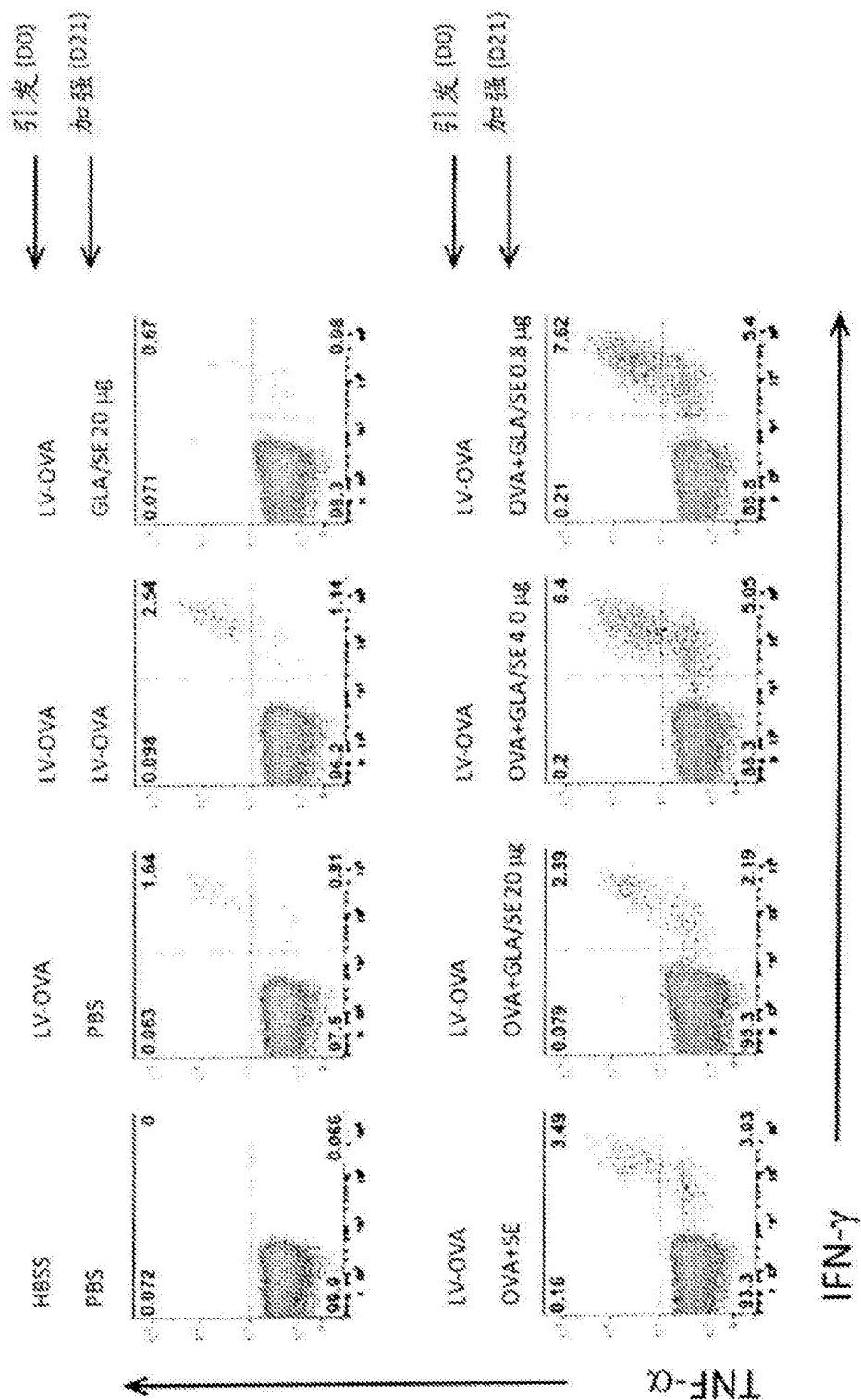


图3

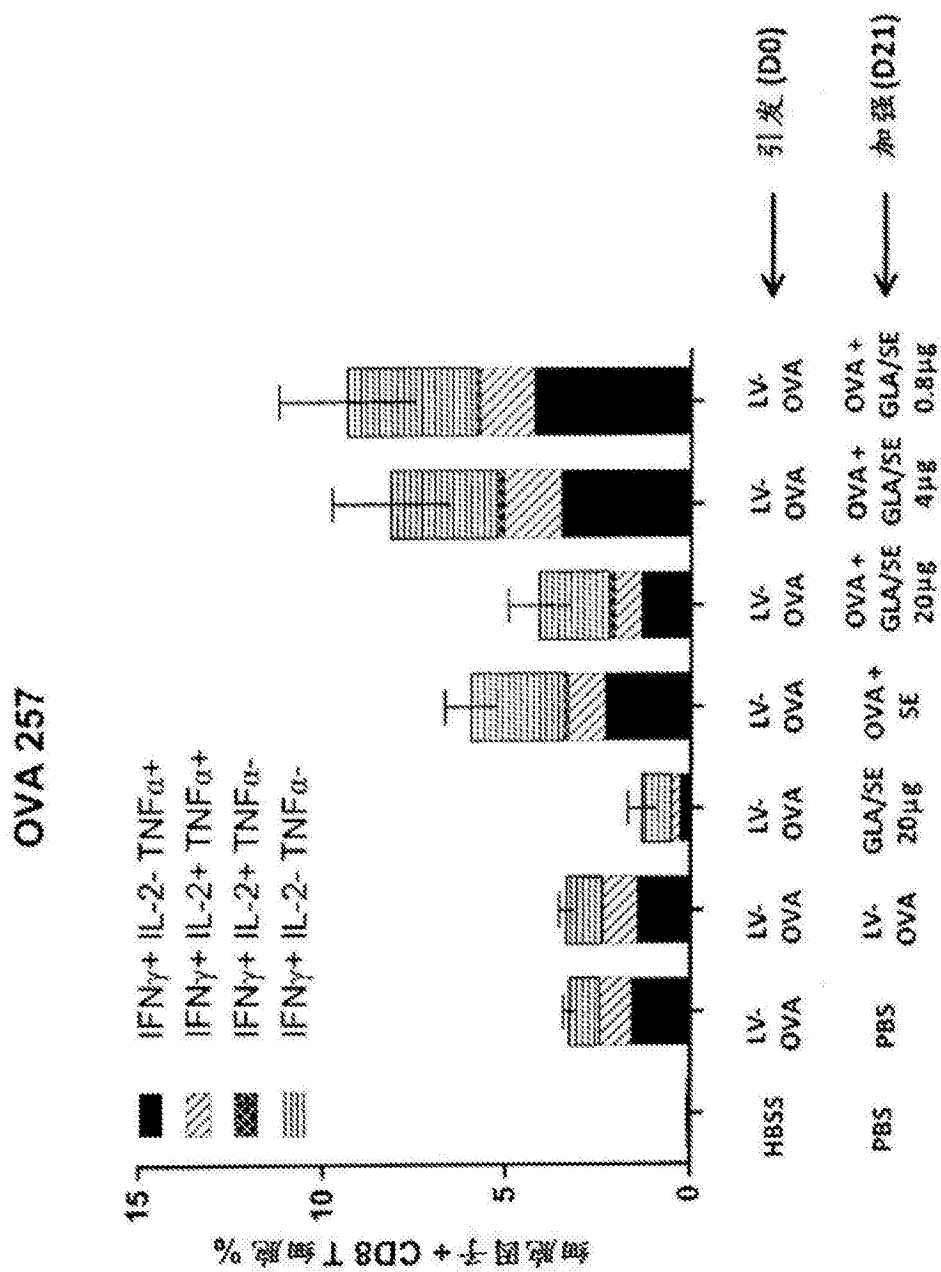


图4

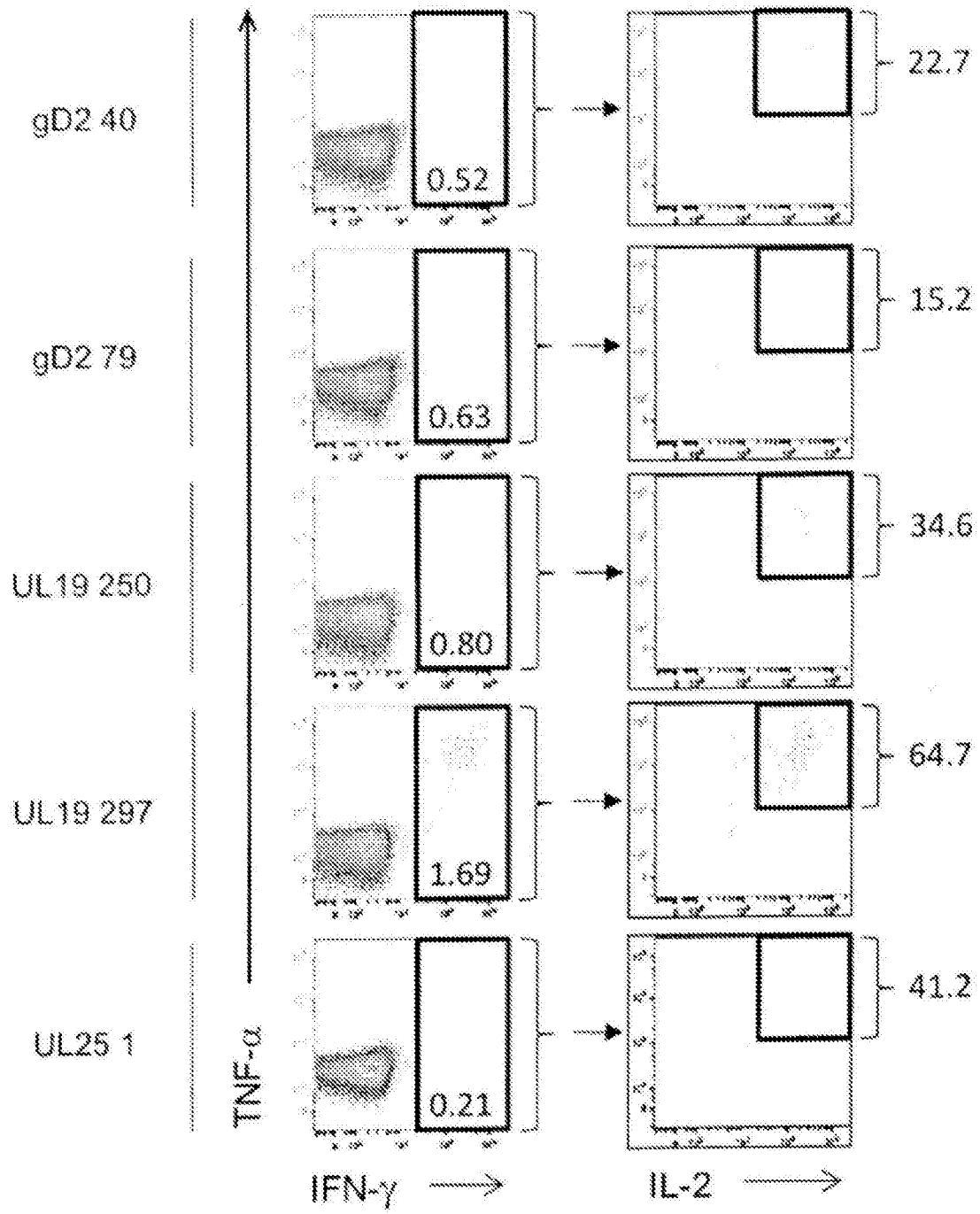


图5A

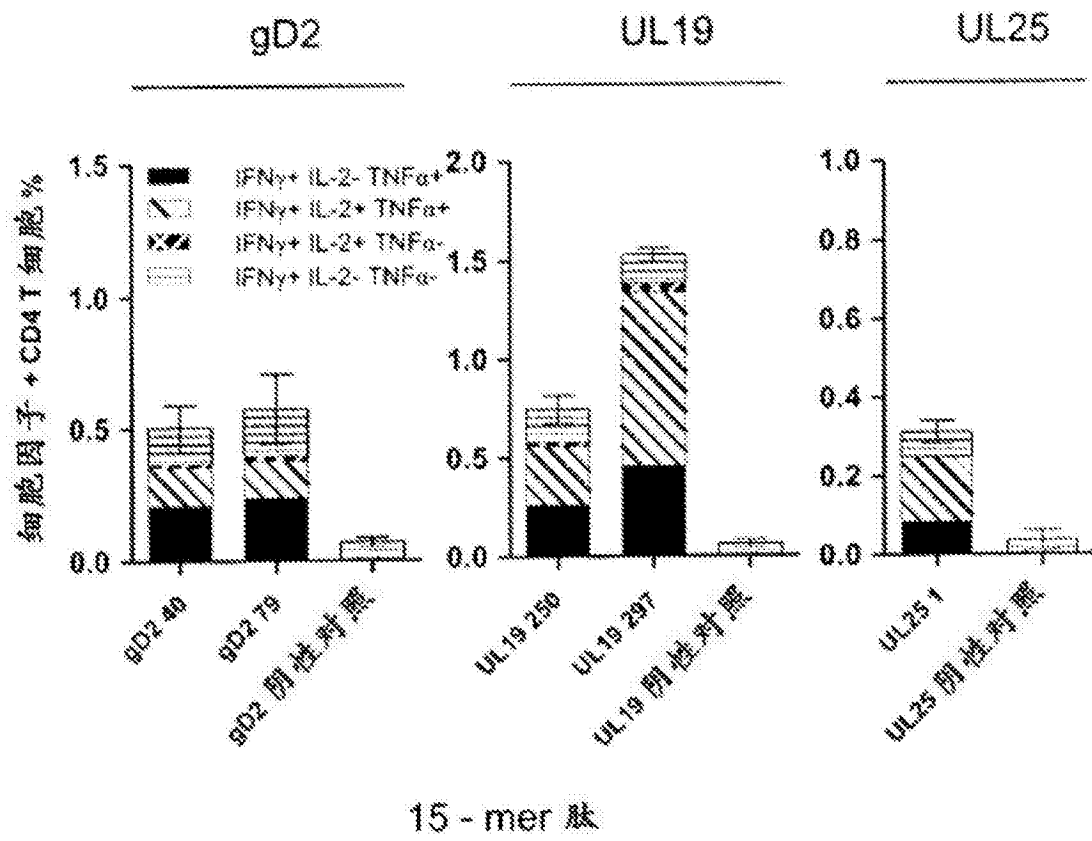


图5B

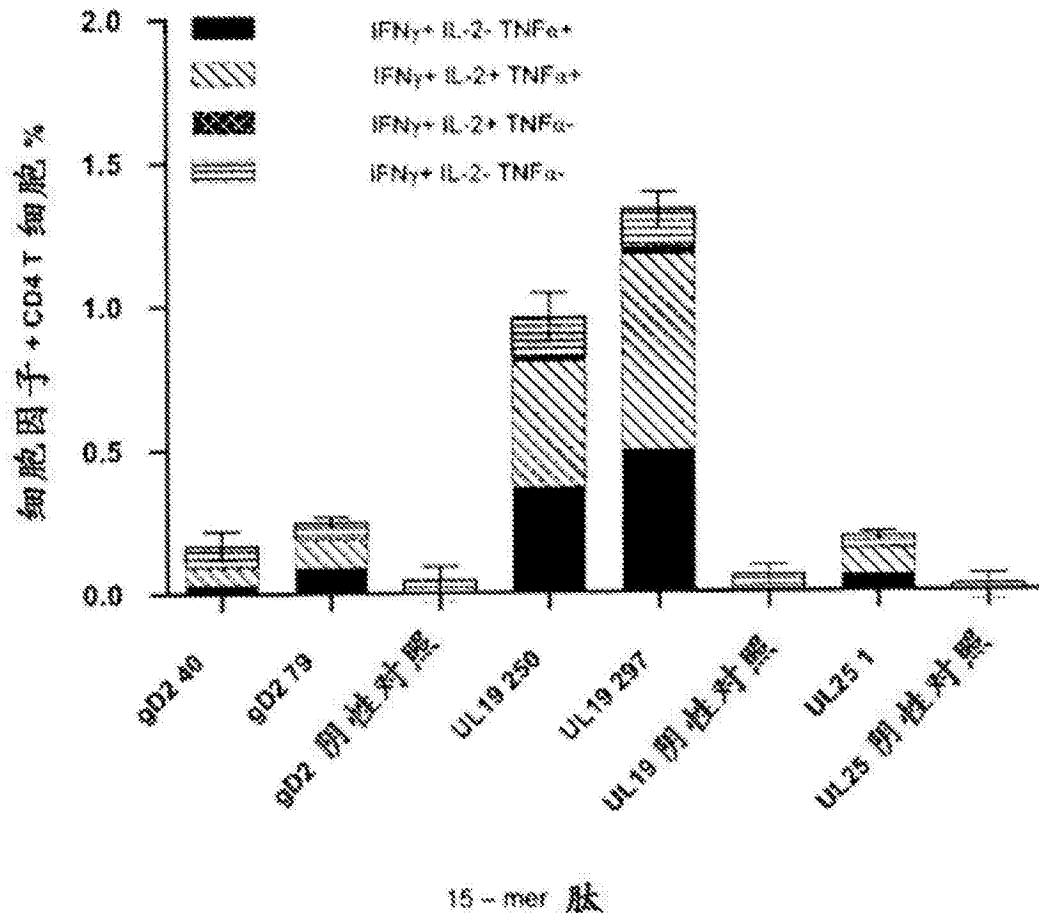


图6A

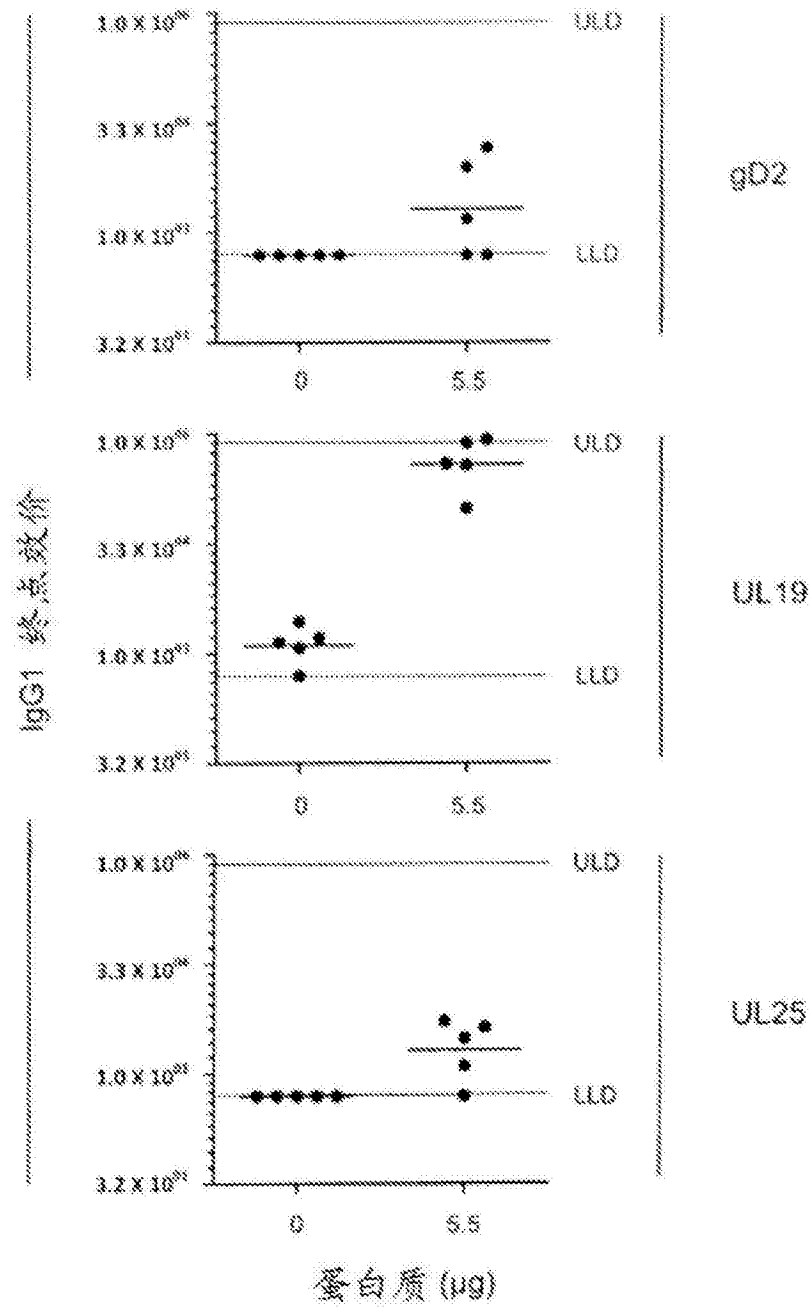


图6B

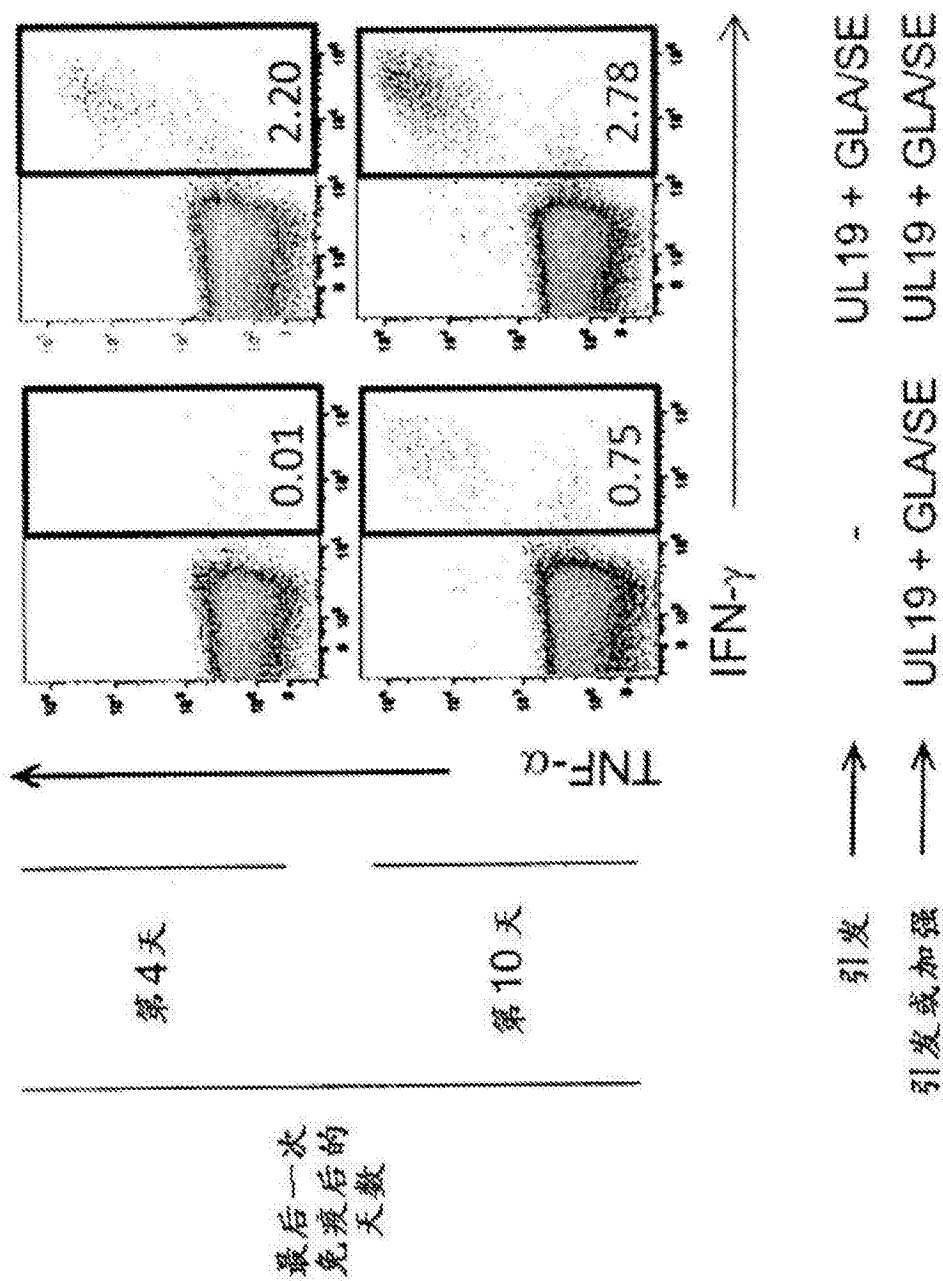


图7A

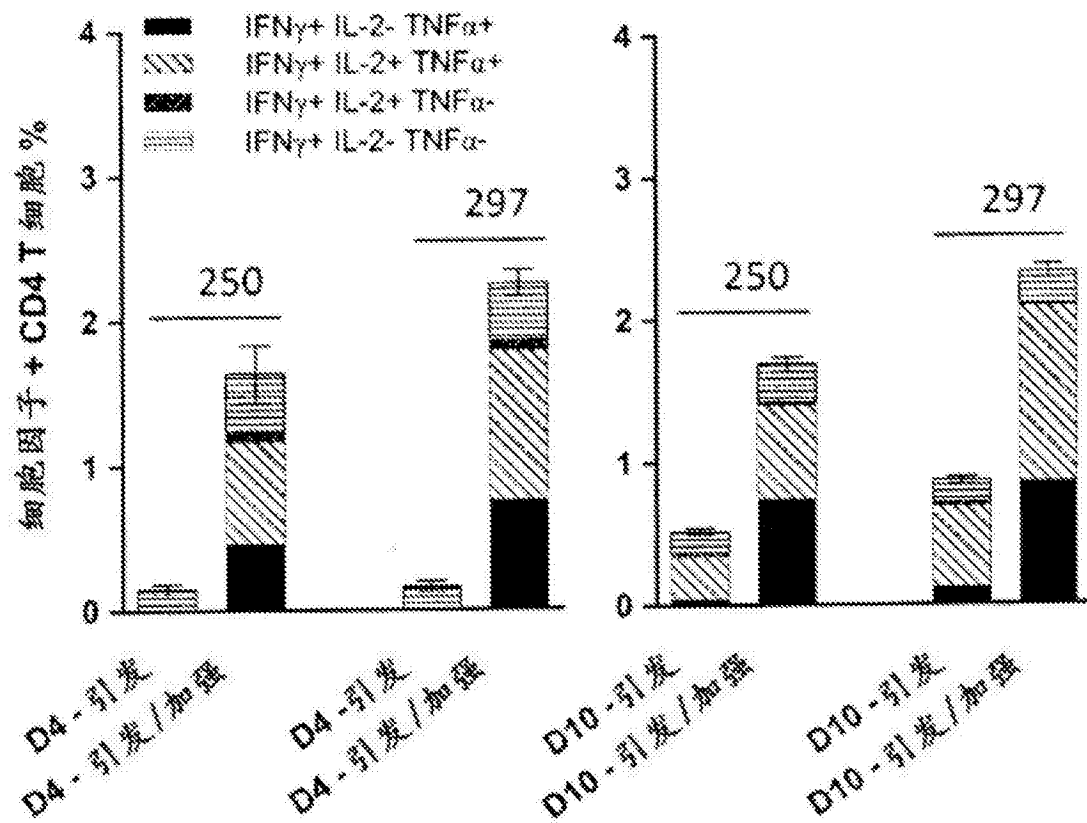


图7B

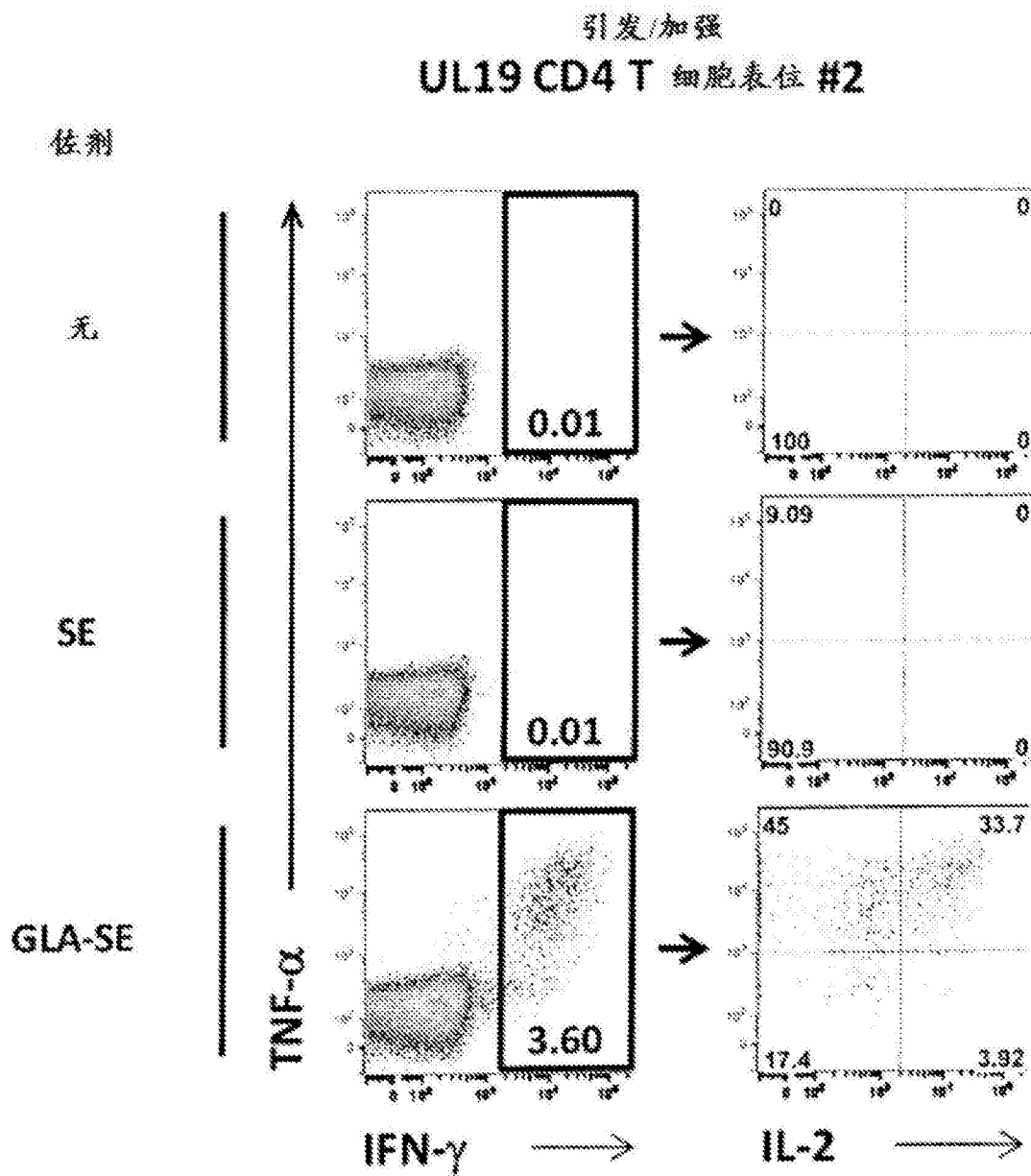


图8A

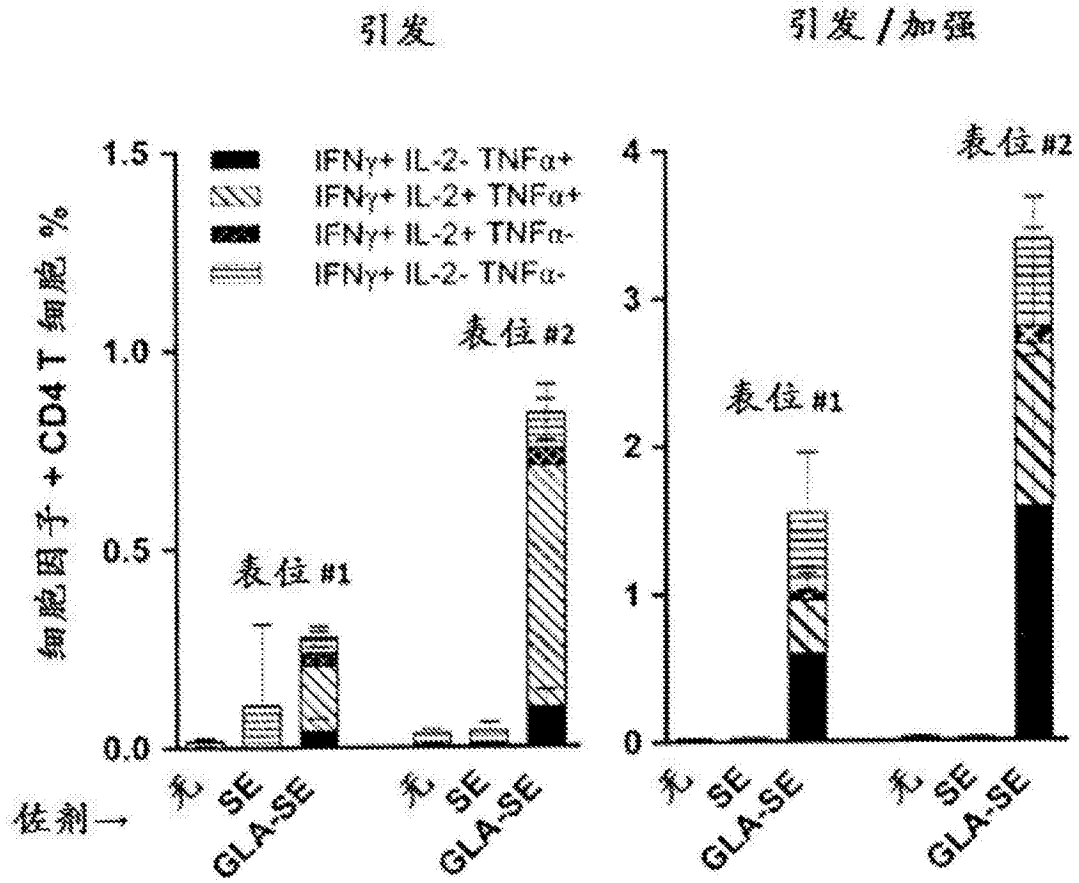


图8B

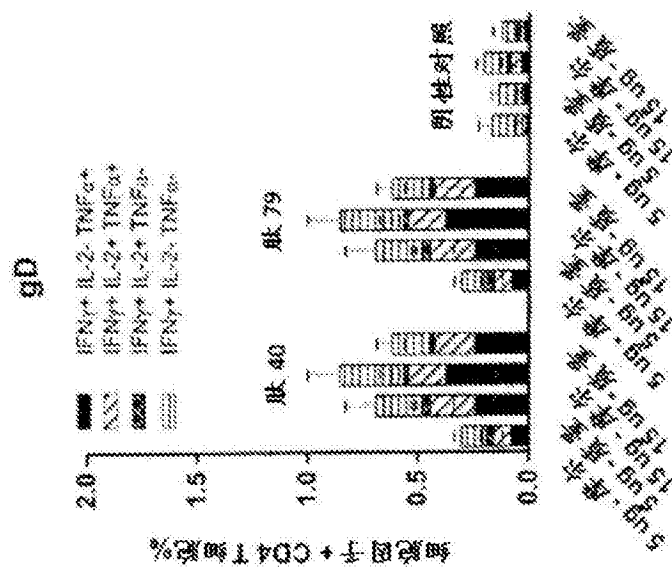
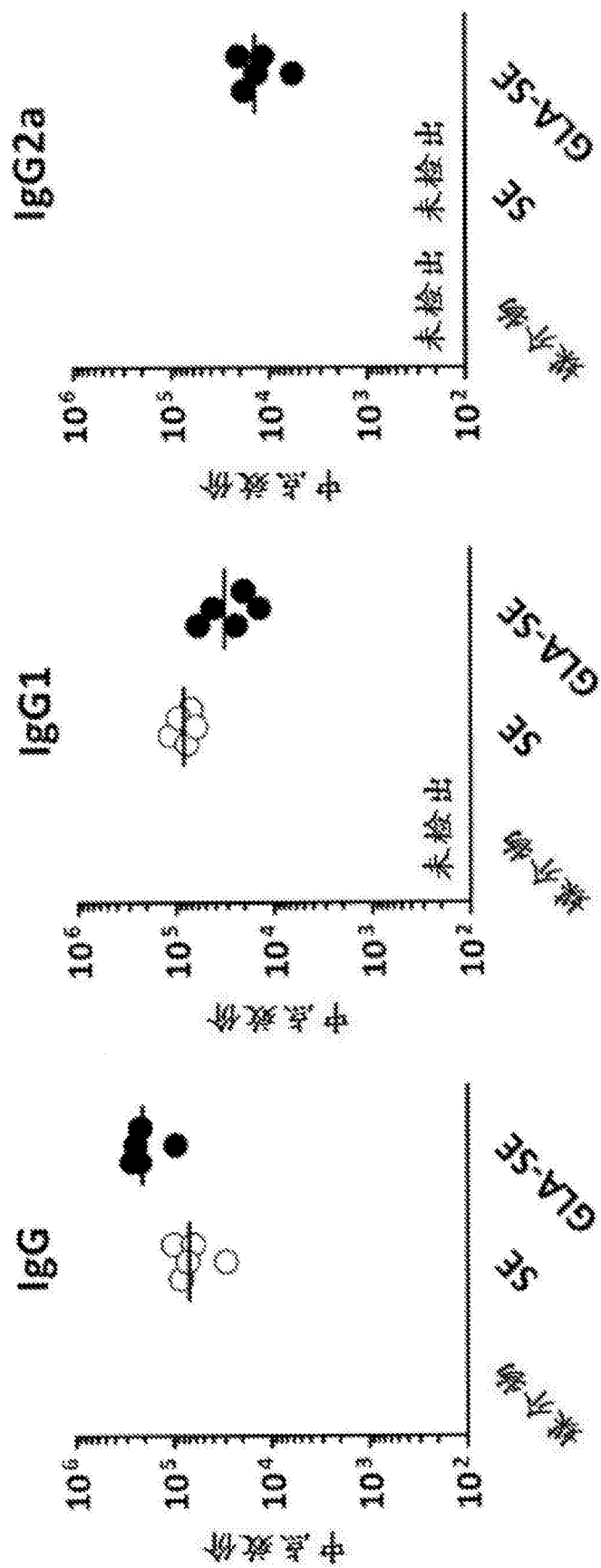


图9A



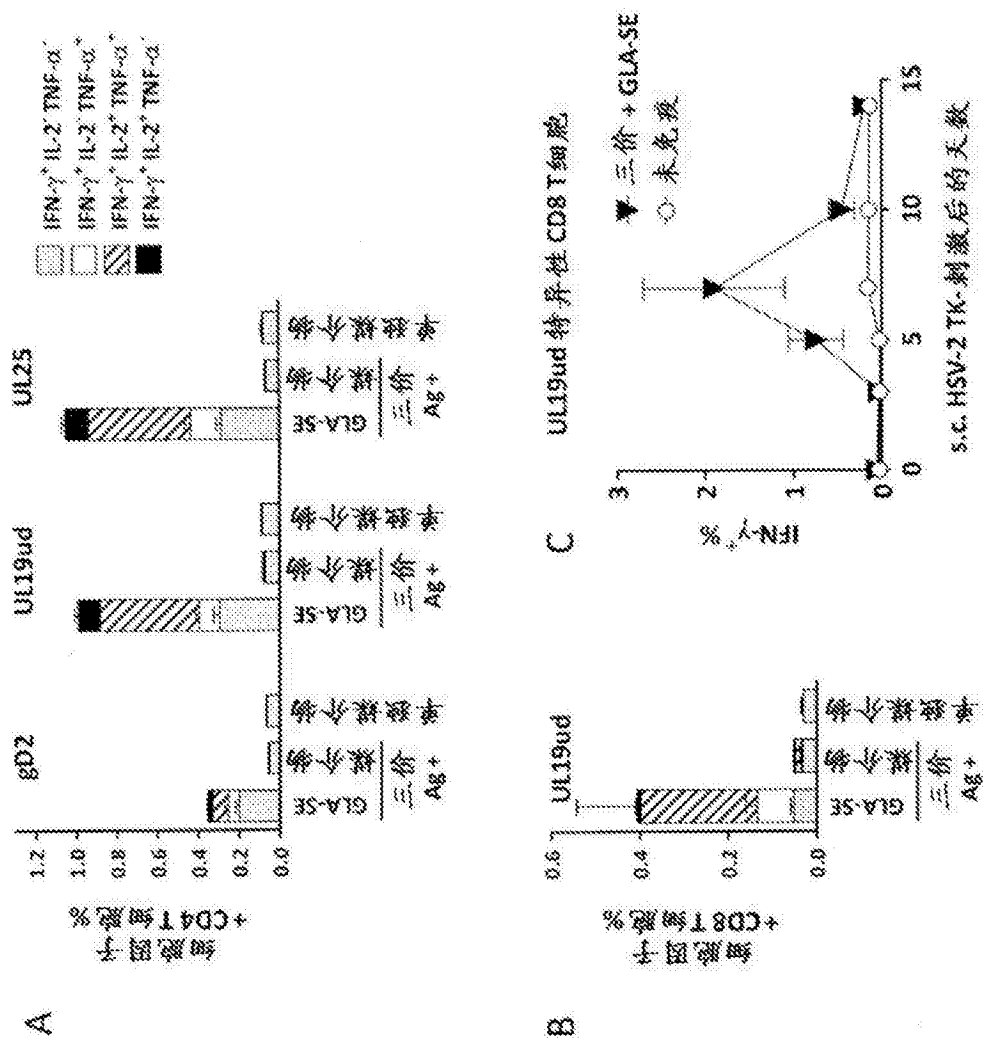


图11

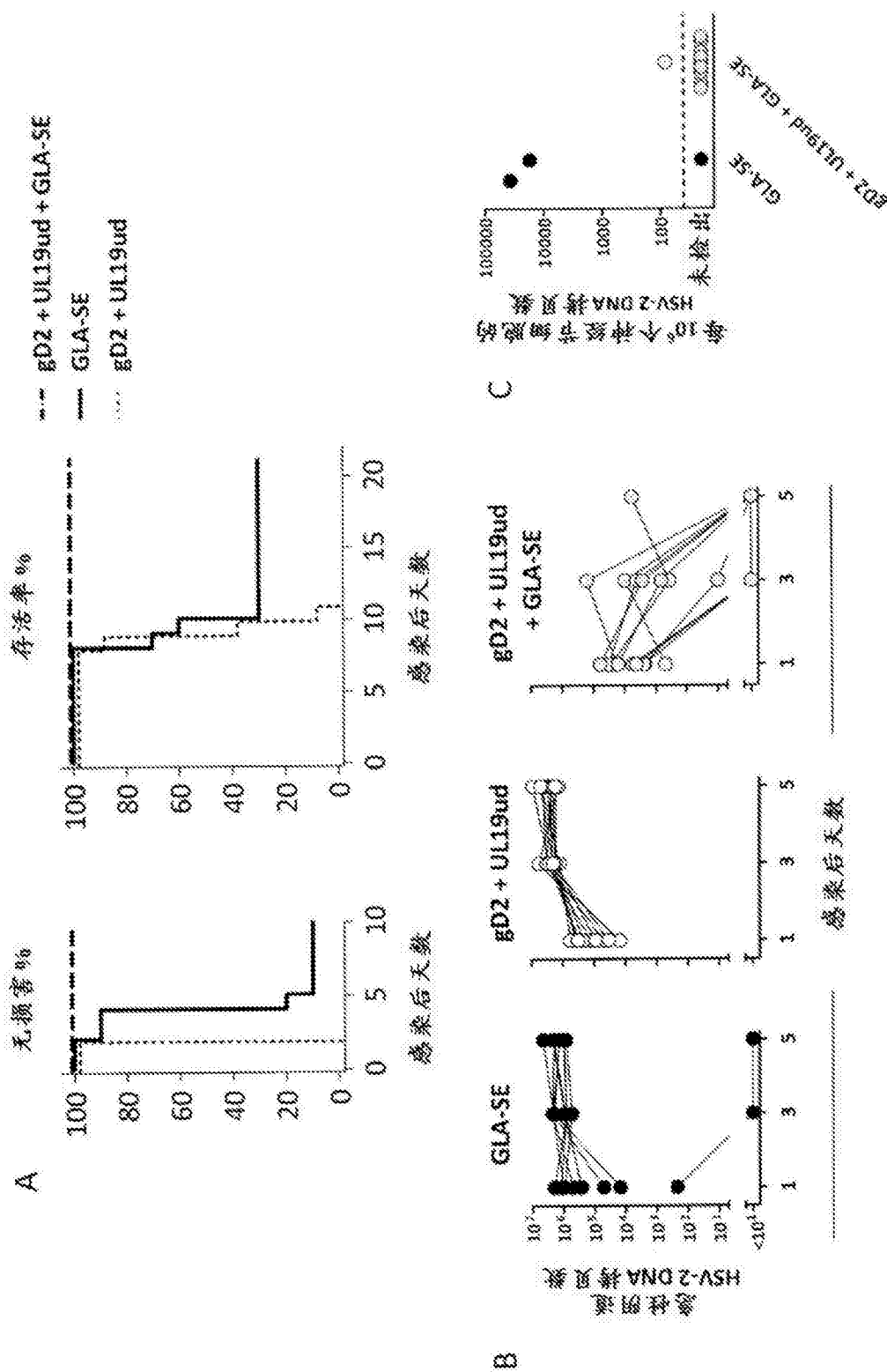


图12

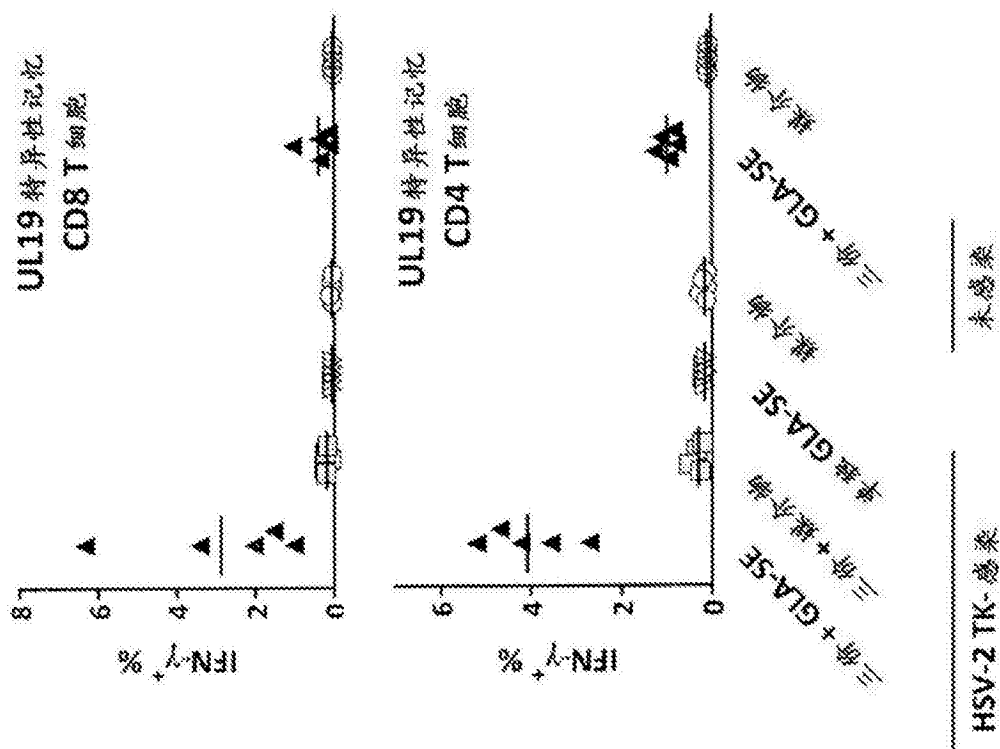


图13

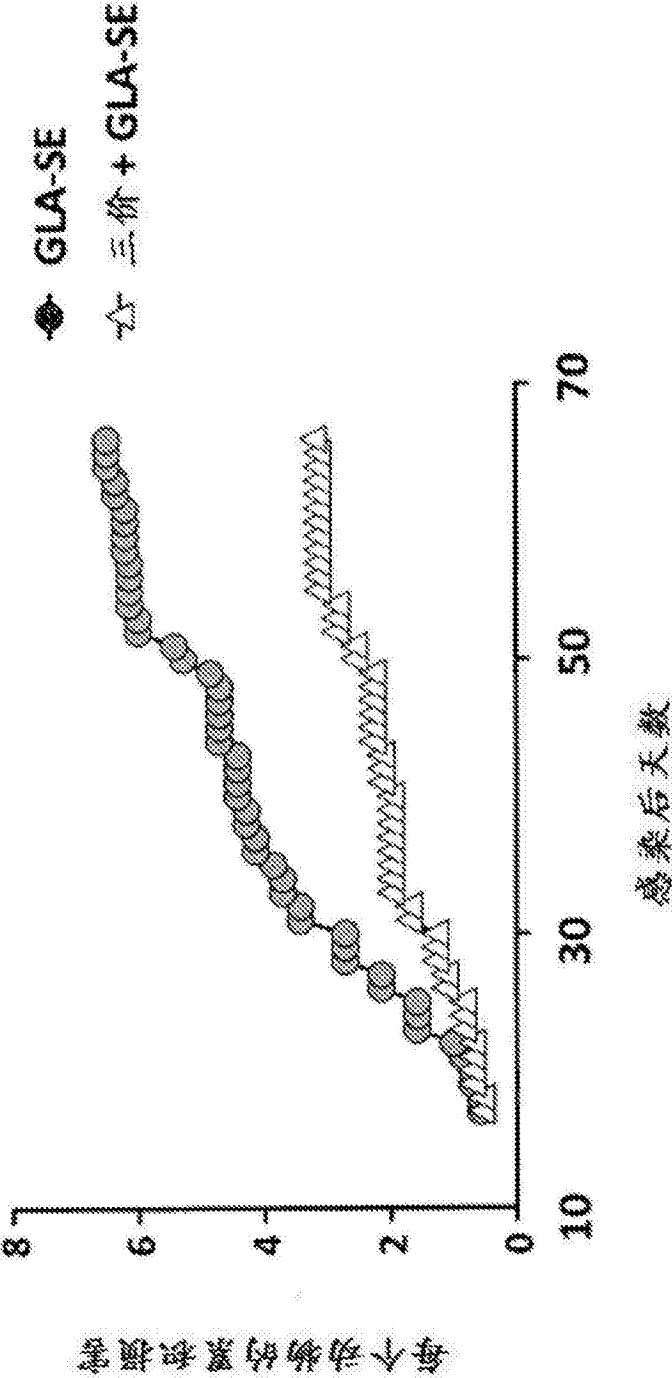


图14

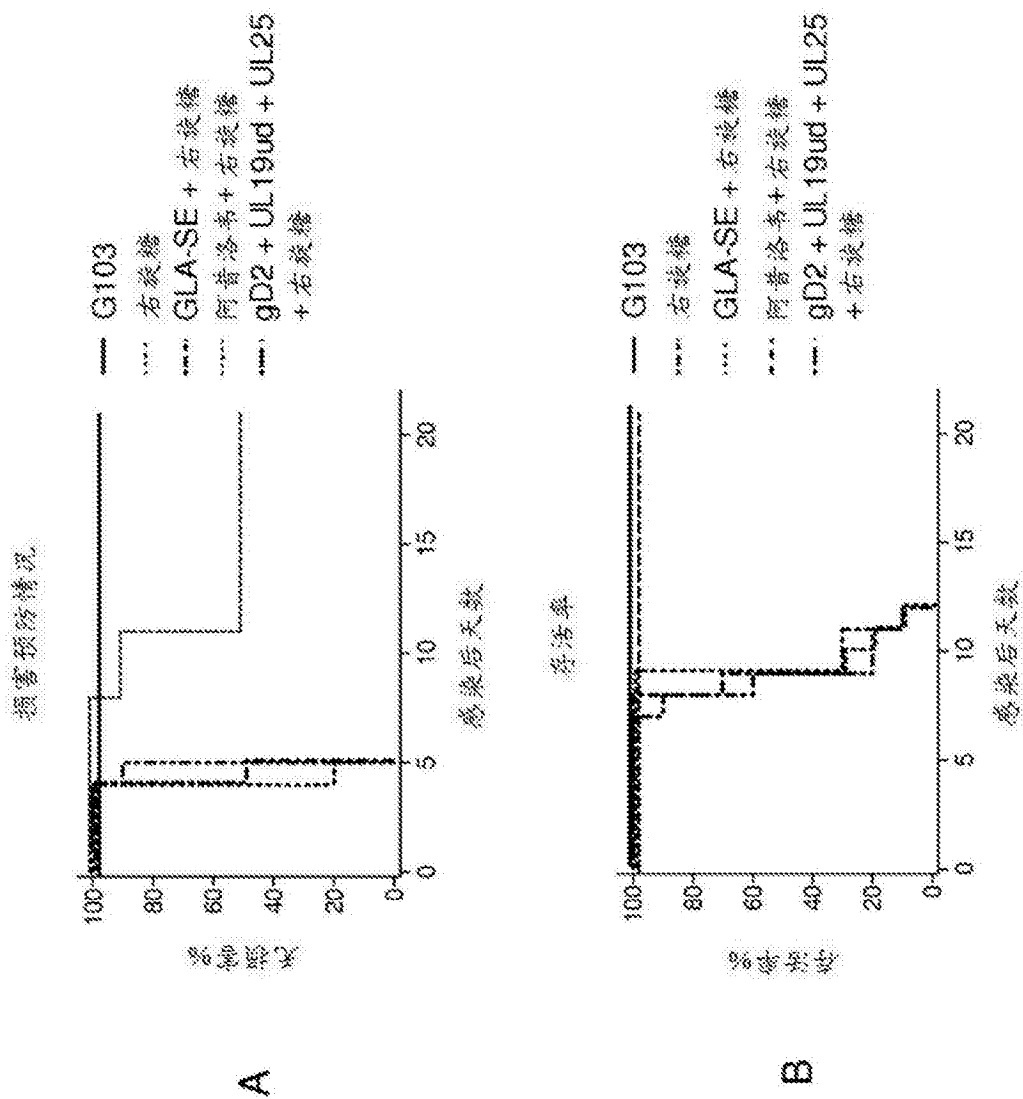


图15

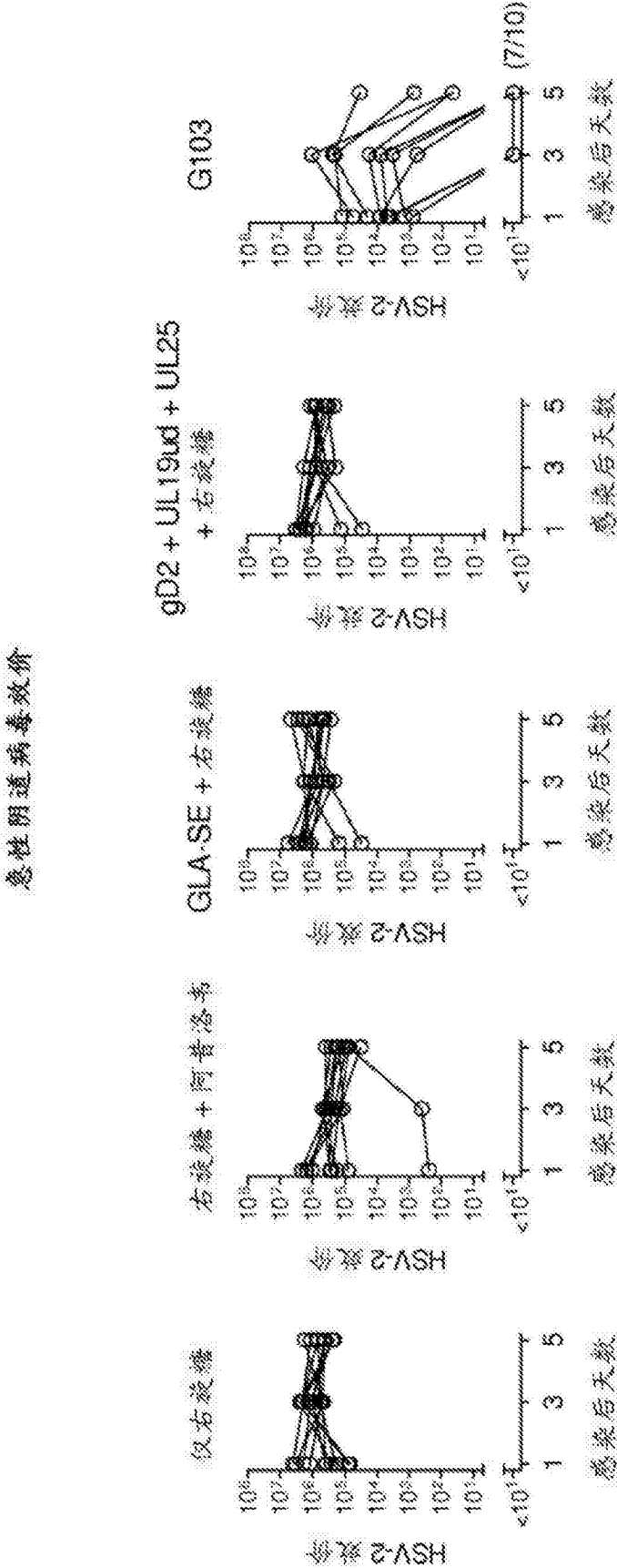


图16