(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112368017 A
(43)申请公布日 2021.02.12

(21)申请号 201980044626.3

(22)申请日 2019.05.01

(30)优先权数据
62/665,050 2018.05.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.31

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/030259 2019.05.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/213305 EN 2019.11.07

(71)申请人 阿尔伯特爱因斯坦医学院
地址 美国纽约

(72)发明人 威廉·雅各布斯 贝琪·赫罗尔德 约瑟夫·达迪克 凯拉·A·韦斯

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
代理人 刘明海 周瑞

(51)Int.Cl.
A61K 39/245(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
C12N 7/00(2006.01)

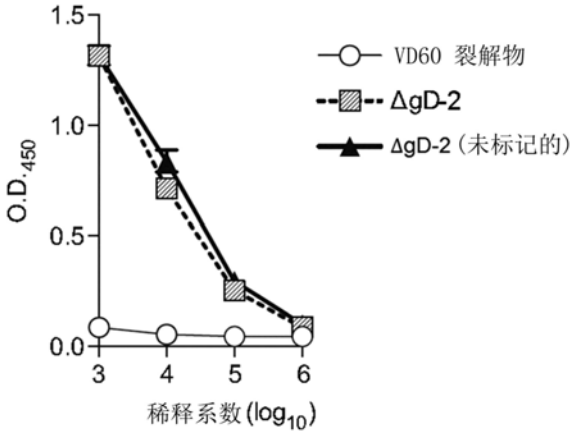
权利要求书4页 说明书35页
序列表8页 附图35页

(54)发明名称

HSV-2-DELTA-gD疫苗及其生产和使用方法

(57)摘要

分别提供了重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)疫苗载体,包含其的组合物和疫苗,以及其使用方法。



CN 112368017 A

1.一种用于生产针对异源抗原的疫苗载体的工艺,所述工艺包括:

a)提供HSV-2基因组,其包括:

(i)编码HSV-2糖蛋白D的基因的完全或部分缺失,和

(ii)包含启动子-FP构建体的核酸,其中FP是编码荧光蛋白的核酸;

b)用(i)a)的HSV-2基因组和(ii)编码异源抗原的线性DNA片段共转染宿主细胞,所述共转染在所述HSV-2基因组和所述DNA片段之间发生等位基因重组的条件下进行;

c)筛选由b)产生的噬菌斑,以鉴定在引发荧光蛋白荧光的激发光下不显示荧光的噬菌斑;和

d)从c)中不显示荧光的那些噬菌斑中回收重组HSV-2病毒或病毒粒子,以获得针对异源抗原的疫苗载体。

2.根据权利要求1所述的工艺,其中所述宿主细胞是HSV-1糖蛋白D补充细胞。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的工艺,其中所述启动子-FP构建体的启动子是异源启动子。

4.根据权利要求1-3中的任一项所述的工艺,其中所述共转染通过电穿孔进行。

5.根据权利要求1-4中的任一项所述的工艺,其中所述荧光蛋白是红色荧光蛋白(RFP)。

6.根据权利要求1-5中的任一项所述的工艺,其中使用以下共转染所述宿主细胞:(i)a)的HSV-2基因组和(ii)线性DNA片段,所述线性DNA片段依次编码(i)HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构异域、HSV-2gD胞质结构域,但不编码HSV-2gD胞外结构域,或依次编码(ii)HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的胞质结构域。

7.根据权利要求1-5中的任一项所述的工艺,其中使用以下共转染所述宿主细胞:(i)a)的HSV-2基因组和(ii)线性DNA片段,所述线性DNA片段依次编码(i)启动子、异源抗原以及任选的poly-A信号。

8.根据权利要求1-7中的任一项所述的工艺,其中所述异源抗原是流感抗原。

9.根据权利要求1-8中的任一项所述的工艺,其中所述异源抗原是流感血凝素(HA)抗原。

10.根据权利要求9所述的工艺,其中所述HA抗原是全长HA胞外结构域或是HA茎。

11.根据权利要求1-7中的任一项所述的工艺,其中所述异源抗原是HIV抗原。

12.根据权利要求11所述的工艺,其中所述HIV抗原是Env gp145。

13.根据权利要求1-12中的任一项所述的工艺,其中所述异源抗原在上游CMV启动子的控制下并且具有下游SV40 poly-A信号。

14.根据权利要求1-13中的任一项所述的工艺,其中所述启动子是延伸因子1α基因的启动子($P_{EF1\alpha}$),并且其中$P_{EF1\alpha}$和FP融合在一起($P_{EF1\alpha}$-FP)。

15.一种疫苗载体或一种重组单纯疱疹病毒-2(HSV-2),其包含编码异源抗原的基因组,并由如权利要求1-14中的任一项所述的工艺制备。

16.一种重组单纯疱疹病毒-2(HSV-2),其包含:

(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的完全缺失;和

(ii)(a)线性DNA片段,其编码启动子、异源抗原信号序列和异源抗原,或者(b)编码启动子和异源抗原。

17.一种重组单纯疱疹病毒-2(HSV-2),其包含:

(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的部分缺失;和

(ii)(a)线性DNA片段,其依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构域,任选地,HSV-2gD胞质结构域,但不编码HSV-2gD胞外结构域,或(b)线性DNA片段,其依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的跨膜胞质尾区。

18.根据权利要求16或17所述的重组HSV-2,其进一步包括在其脂质双层上的寄生虫表面糖蛋白,其中所述寄生虫是哺乳动物的寄生虫。

19.根据权利要求16-18中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述HSV-2糖蛋白D编码基因是HSV-2U_S6基因。

20.根据权利要求16-19中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述异源抗原是流感抗原。

21.根据权利要求16-20中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述异源抗原是血凝素(HA)抗原。

22.根据权利要求21所述的重组HSV-2,其中所述HA抗原是全长HA胞外结构域或是HA茎。

23.根据权利要求16-19中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述异源抗原是HIV抗原。

24.根据权利要求23所述的重组HSV-2,其中所述HIV抗原是Env gp145。

25.一种细胞,其在其中包含如权利要求16-24中的任一项所述的重组病毒,其中所述细胞不存在于人类中。

26.一种疫苗组合物,其包含如权利要求16-24中的任一项所述的重组病毒。

27.一种药物组合物,其包含如权利要求16-24中的任一项所述的病毒和药学上可接受的载体。

28.一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求16-24中的任一项所述的重组病毒,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

29.一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求26所述的疫苗,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

30.一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求27所述的药物组合物,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

31.一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求16-22中的任一项所述的重组病毒,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

32.一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求26所述的疫苗,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

33.一种治疗受试者中流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求27所述的药物组合物,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

34.一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法,所述方法

包括向所述受试者施用一定量的如权利要求16-19、23或24中的任一项所述的重组病毒，其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

35.一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求26所述的疫苗，其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

36.一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求27所述的药物组合物，其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

37.一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求16-22中的任一项所述的重组病毒，其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

38.一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求26所述的疫苗，其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

39.一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求27所述的药物组合物，其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

40.一种针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求16-19、23或24中的任一项所述的重组病毒，其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

41.一种针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求26所述的疫苗，其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

42.一种针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向所述受试者施用一定量的如权利要求27所述的药物组合物，其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

43.一种引发和/或增强受试者中免疫应答的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)，所述重组单纯疱疹病毒2通过如权利要求1-14中的任一项所述的工艺制备并且包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原，其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

44.一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)，所述重组单纯疱疹病毒2通过如权利要求1-13中的任一项所述的工艺制备并且包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原，其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

45.一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的重组单纯疱疹病毒2，所述重组单纯疱疹病毒2通过如权利要求1-14中的任一项所述的工艺制备并且包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原，其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

46.根据权利要求43-45中的任一项所述的方法，其中所述HA抗原是全长HA胞外结构域。

47.根据权利要求46所述的方法，其进一步包括，在最初施用编码全长HA胞外结构域的重组单纯疱疹病毒2之后，施用一种或多种量的如下的重组单纯疱疹病毒2，所述重组单纯疱疹病毒2包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、HA抗原信号序列和HA茎，但不编码全长HA。

48.根据权利要求28-47中的任一项所述的方法，其中所述受试者是人类。

49.一种定量细胞群中抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)的速率或数量的方法，所述方法包括：

在允许荧光蛋白在细胞中表达的条件下，用表达荧光蛋白的重组HSV-2感染细胞群中的多个细胞，所述重组HSV-2包含缺失编码HSV-2gD的基因的基因组；

使多个被感染的细胞与含有抗体的溶液和免疫细胞群接触，以及

在一个或多个时间点定量显示荧光蛋白荧光和任选的一种或多种标记物的多个感染细胞的数量，以便随时间定量活的被感染的细胞的数量，从而定量细胞群中ADCK的速率或数量。

50.根据权利要求49所述的方法，其中所述方法在体外进行。

51.根据权利要求49或50所述的方法，其中所述免疫细胞群包括巨噬细胞。

52.根据权利要求49-51中的任一项所述的方法，其中所述含有抗体的溶液包含血清。

53.根据权利要求49-51中的任一项所述的方法，其中所述荧光蛋白是红色荧光蛋白。

54.根据权利要求49-53中的任一项所述的方法，其中显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的多个被感染细胞的数量通过荧光激活细胞分选(FACS)来测量。

55.根据权利要求49-55中的任一项所述的方法，其中所述至少一种标记物包括细胞膜标记物、活/死细胞标记物或其组合。

56.根据权利要求49-55中的任一项所述的方法，其进一步包括在一个或多个时间点，在被感染的细胞的对照细胞群中定量显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的细胞的数量，所述对照细胞群在其他方面相同但未与含有抗体的溶液接触，并将所定量的数量或速率与对于与含有抗体的溶液接触的细胞群所定量的数量或速率进行比较。

57.根据权利要求49-56中的任一项所述的方法，其中免疫细胞群的效应细胞:靶细胞比率为5:1或更高。

58.根据权利要求49-57中的任一项所述的方法，其中所述重组HSV-2通过如权利要求1-14中任一项所述的工艺制备。

HSV-2-DELTA-gD疫苗及其生产和使用方法

[0001] 政府支持声明

[0002] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的编号为AI117321和AI007501的政府支持下完成的。政府在本发明中具有一定的权利。

背景技术

[0003] 包括流感和HIV病毒感染在内的病原体感染对总体健康具有重大影响。已经为包括流感和HIV病毒感染两者在内的许多病原体开发了疫苗，但是它们都有缺点和局限性。因此，必须设计和评估新的疫苗策略。

发明内容

[0004] 本文公开了新的和改进的基于HSV-2的疫苗，其用于多种抗原性靶标，包括流感和HIV。

[0005] 提供了一种用于生产针对异源抗原的疫苗载体的工艺，所述工艺包括：

[0006] a)提供HSV-2基因组，其包括：

[0007] (i)编码HSV-2糖蛋白D的基因的全部或部分缺失，和

[0008] (ii)包含启动子-FP构建体的核酸，其中FP是编码荧光蛋白的核酸；

[0009] b)用(i)a)的HSV-2基因组和(ii)编码异源抗原的线性DNA片段共转染宿主细胞，所述共转染在所述HSV-2基因组和所述DNA片段之间发生等位基因重组的条件下进行；

[0010] c)筛选由b)产生的噬菌斑(plaque)，以鉴定在引发荧光蛋白荧光的激发光下不显示荧光的噬菌斑；

[0011] d)从c)中的不显示荧光的那些噬菌斑中回收重组HSV-2病毒或病毒粒子，以获得针对异源抗原的疫苗载体。

[0012] 还提供了通过本文所述的工艺制备的具有编码异源抗原的基因组的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)。

[0013] 还提供了一种重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)，其具有(i)HSV-2糖蛋白D编码基因(称为ΔgD-2)在其基因组中的完全缺失和(ii)(a)编码：启动子、异源抗原信号序列、异源抗原或(b)编码：启动子、异源抗原。

[0014] 还提供了一种重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)，其具有(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的部分缺失和(ii)(a)依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构域，任选地HSV-2gD胞质结构域，但不编码HSV-2gD胞外结构域，或(b)依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的跨膜胞质尾区。

[0015] 还提供了其中包含如本文所述的重组HSV-2病毒的分离的细胞，其中所述细胞不存在于人类中。

[0016] 还提供了包含如本文所述的重组HSV-2病毒的疫苗组合物。

[0017] 还提供了药物组合物，其包含如本文所述的重组HSV-2病毒和药学上可接受的载体。

[0018] 还提供了一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组HSV-2病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0019] 还提供了一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组HSV-2病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

[0020] 还提供了一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组HSV-2病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

[0021] 还提供了针对流感感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组HSV-2病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0022] 还提供了针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组HSV-2病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0023] 还提供了定量细胞群中抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)的速率或数量的方法，所述方法包括：在允许荧光蛋白在细胞中表达的条件下，用表达荧光蛋白的重组HSV-2感染细胞群中的多个细胞，所述重组HSV-2包含缺失了编码HSV-2gD的基因的基因组；使多个被感染的细胞与含有抗体的溶液和免疫细胞群接触；以及，在一个或多个时间点定量显示荧光蛋白荧光的和任选的一种或多种标记物的细胞的数量，以便随时间定量活的被感染的细胞的数量，从而定量细胞群中ADCK的速率或数量。

附图说明

[0024] 图1A-1B:HSV-2ΔgD::HA和HSV-2ΔgD::HA茎是通过质粒DNA和ΔgD-2::$P_{EF1\alpha}$-RFP(B3x2.8，也称为ΔgD-2::RFP)基因组DNA的共转染而创建的，并通过PCR进行了验证。图1A：将含有所需gD::HA基因的纯化的pYUB2169用PacI切割，并与HSV-2ΔgD::PEF1α-RFP基因组DNA共转染到VD60细胞中。使用电穿孔。将得到的RFP-噬菌斑纯化3次，并评估HA的存在。图1B:重组病毒通过来自质粒和重组病毒DNA的细胞外HA结构域的PCR扩增来验证。所使用的引物位于细胞外HA结构域的上游和下游100个碱基对(bp)处。两种重组病毒均显示了所需的条带，通过与质粒DNA的比较可见。在含有来自ΔgD*2(B^3x2.9)的DNA的孔中不存在该尺寸的条带(泳道1和4)。泳道2显示来自pYUB2169的DNA，其包含全长HA构建体。泳道3显示了来自重组HSV-2ΔgD-2::HA(B^3x2.10)的DNA，其包含非密码子优化的全长细胞外HA结构域。泳道5显示了来自重组HSV-2ΔgD-2::HA茎的DNA，其包含密码子优化的HA的茎结构域。泳道6显示了来自B^3x2.11的DNA。

[0025] 图2显示了对用ΔgD-2::GFP(B^3x 2.7)或ΔgD-2(B^3x 2.9)疫苗接种的抗体应答。

[0026] 图3显示了用ΔgD-2::GFP病毒与用未标记的ΔgD-2病毒感染的细胞的抗体依赖性细胞毒性的结果。

[0027] 图4:对Δ gD-2::GFP病毒与对未标记病毒的T细胞应答。

[0028] 图5:Δ gD-2疫苗接种可防止野生型HSV-2株4674攻击,与Δ gD-2::GFP的保护相似。

[0029] 图6:嵌合Δ gD-2::HA病毒的构建和在小鼠中的免疫应答。在A/Puerto Rico/1934/8(PR8)HA(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列和功能结构域中指示与HA1茎区、HA1头区、HA2茎区、HA2跨膜区和HA2胞质区相对应的区。对于嵌合Δ gD-2::HA病毒,将HA1茎、HA1头(或4个甘氨酸残基)和HA2茎与HSV-2(G)gD的跨膜结构域、胞质结构域和信号序列结构域融合。对于无头Δ gD-2::HA基因,HA1头结构域被4个甘氨酸残基取代。

[0030] 图7:通过PCR验证重组病毒中嵌合Δ gD-2::HA的存在。泳道如下:泳道1:Δ gD-2基因组DNA,泳道2:Δ gD-2::FL HA nOP基因组DNA,泳道3:pBJJ1质粒DNA,泳道4:Δ gD-2基因组DNA,泳道5:Δ gD-2::HL HA nOP基因组DNA,泳道6:pBJJ2质粒DNA。用于PCR扩增的引物位于HA胞外结构域的上游和下游。没有外源启动子被插入表达盒。结果,嵌合基因表达受内源启动子调控。

[0031] 图8:接种了Δ gD-2::FL HA nOP(β3x1)和gD-2::HL HA OPT(β3x3)的小鼠可完全抵抗HSV-2攻击,但不会形成抗HA IgG。在第0天和第21天,用对照VD60细胞裂解物或$1x10^6$ PFU的gD-2::FL HA nOP、gD-2::HL HA OPT或Δ gD-2::RFP对小鼠进行初免-加强免疫接种。图8A:在第42天,用10x LD_{90}的野生型HSV-2 4674攻击小鼠。接种gD-2::FL HA nOP和gD-2::HL HA OPT的小鼠受到完全保护,免受攻击。图8B:初免免疫接种后第40天,取小鼠的血以观察血清抗体。针对可溶性PR8 HA进行的ELISA显示小鼠中不存在HA特异性IgG。

[0032] 图9是pEGFP-N1表达质粒的图谱。将PCMV::HA::SV40 polyA盒限制性克隆到pBRL812中,pBRL812是一种在US6上游和下游包含>5.5kB的HSV-2(G)基因组的质粒。用AsiSI和PacI切割pBRL812,并将其与Δ gD-2::RFP基因组DNA共转染到VD60细胞中。在PCR验证重组之前,通过RFP表达缺乏来鉴定等位基因交换并选取RFP阴性噬菌斑并纯化3次。

[0033] 图10:如上述图9的说明所述制备的pBRL812 HSV重组质粒的图谱。

[0034] 图11A:验证Δ gD-2::P_{CMV}-FL HA nOP。使用P_{CMV}::HA::SV40 PolyA盒上游和下游的引物进行的PCR。在图11A中,未标记的泳道:DNA梯形条带,泳道1:pJHA1,泳道2:1.2.1潜在的重组分离物,以及泳道3:阴性对照Δ gD-2基因组DNA。

[0035] 图11B:使用PCR验证Δ gD-2::P_{CMV}-HL HA nOP,所述PCR使用P_{CMV}::HA::SV40 PolyA盒上游和下游的引物。未标记泳道:DNA梯形条带,泳道1:pJHA2,泳道2:2.2.2潜在的重组分离物,泳道3:2.3.1潜在的重组分离物,以及泳道4:阴性对照Δ gD-2基因组DNA。

[0036] 图11C:验证Δ gD-2::P_{CMV}-HL HA OPT。使用P_{CMV}::HA::SV40 PolyA盒上游和下游的引物进行的PCR。泳道1:pJHA4,泳道2:1.2.2潜在的重组分离物,泳道3:1.2.3潜在的重组分离物,未标记泳道:DNA梯形条带。扩增后者(1.2.3潜在的重组)分离物,以制成原始的Δ gD-2::P_{CMV}-HL HA OPT原液。

[0037] 图12:Δ gD-2::P_{CMV}-HA重组病毒均表达HA。用3MOI的Δ gD-2::P_{CMV}-FL HA nOP、Δ gD-2::P_{CMV}-HL HA nOP或Δ gD-2::P_{CMV}-HL HA OPT将VD60细胞感染。感染后16小时,收获细胞并为HSV蛋白和HA表达染色。使用接种了Δ gD-2::RFP的小鼠的血清测量HSV蛋白表达。使用单克隆抗HA茎IgG C179测量HA表达。用细胞可渗透或细胞不可渗透的方法对细胞染色。统计学是通过对照荧光与为HA表达染色的孔中的荧光之间的几何平均数的学生t检验来计

算的。仅ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP可以在感染的细胞膜中诱导高水平的HA表达，但是所有三种病毒均可以诱导通过细胞可渗透染色法测量的表达。

[0038] 图13示出了ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP没有在细胞之间扩散。

[0039] 图14A-14E：与亲本HSV-2ΔgD-2::GFP(ΔgD-2)株相比，荧光蛋白表达和HSV-2ΔgD-2::RFP(ΔgD-2::RFP)感染的动力学。图14A：通过同时用HSV-2ΔgD-2::GFP(ΔgD-2)基因组DNA和含有pEF1α::RFP的质粒转染VD60细胞，来创建HSV-2ΔgD-2::RFP(ΔgD-2::RFP)，所述pEF1α::RFP在任一侧上侧接有与HSV-2(G)基因组同源的区域。基因组和质粒DNA之间的同源重组产生了ΔgD-2::RFP。通过三轮噬菌斑纯化分离重组病毒，并通过PCR和病毒基因组测序进行验证。图14B和14C：用1MOI的HSV-2ΔgD-2(B)或ΔgD-2::RFP感染Vero细胞。随时间监测感染、RFP表达和GFP表达的动力学。两种病毒都显示出相似的感染动力学。甚至在感染后24小时，ΔgD-2仍诱导很少的GFP表达，而在感染后4.5小时开始，ΔgD-2::RFP诱导高水平的RFP表达。图14D和14E：图像示出了用1MOI的ΔgD-2::RFP感染后12小时的Vero(D)和VD60(E)细胞。感染的VD60细胞正在形成合胞体，表明生产性感染(productive infection)。Vero细胞尚未形成任何合胞体。通过去卷积，以10倍放大倍率拍摄的图像。

[0040] 图15A-15C：在Raw 264.7和J774.1细胞中验证新型快速荧光抗体依赖性细胞介导的杀伤(RFADCK)试验。图15A：通过使用膜标记物和活/死细胞标记物的双重表达的流式分析，分离高表达的靶细胞。然后，通过确定被感染的靶细胞群的平均RFP强度，来门控表达高水平HSV蛋白的细胞比例。然后，将治疗组和未治疗组之间的该群体比例的百分比差异计算为ADCK。图15B：在与J774.1巨噬细胞共培养之前，在存在或不存在ΔgD-2::RFP血清的情况下孵育感染的靶细胞。共培养12小时后将细胞固定，并定量$RFP^{高}$和$RFP^{中}$靶细胞的比例。在含有接种ΔgD-2:RFP的小鼠血清的测定孔中，共培养结束时$RFP^{高}$细胞明显减少($p<0.05$，平均值＝70.5、49.3)，但$RFP^{中}$或$RFP^{高+中}$细胞并非如此。值代表至少一式三份进行的3个独立实验。图15C：使用Raw 264.7和J774.1巨噬细胞作为效应细胞平行进行ADCK测定。将含有接种了ΔgD-2:RFP或VD60细胞裂解物的小鼠的血清的共培养物中存在的$RFP^{高}$细胞的数量与不含血清的共培养物中的$RFP^{高}$细胞的数量进行了比较。接种了ΔgD-2:RFP的小鼠的血清在含有Raw 264.7细胞和J774.1细胞两者的共培养物中诱导更多杀伤($p=0.09$、$p<0.001$；平均值＝18.8%、38.3%)。数据代表在效应细胞与靶细胞比率为10:1的情况下，用J774.1和Raw 264.7细胞一式三份进行的三个独立实验。所有实验中使用的靶细胞为HEK 293。B中的统计学是使用学生t检验完成的。C中的统计学是使用单向ANOVA完成的。误差条反映SEM。*$p<0.05$；***$p<0.001$.

[0041] 图16：ADCC和ADCP难以区分，但在存在接种了HSV-2ΔgD-2::RFP的小鼠的血清的情况下，由Raw 264.7巨噬细胞介导。与从缺少血清的共培养物拍摄的影片相比，在三部影片期间死亡的被感染细胞数量的定量表明，添加接种了HSV-2ΔgD-2::RFP的小鼠的血清比添加给予了对照VD60细胞裂解物的小鼠的血清诱导更多的杀伤(对于两组：$p=0.14$，平均值＝18.5、3.7，n＝58个被感染的细胞)。图像代表以60倍放大率拍摄的一部影片的部分帧。每15分钟拍摄一次图像，持续24小时。将HEK 293细胞用作靶细胞。将Raw 264.7细胞用作巨噬细胞。所有测定均在效应细胞与靶细胞的比例为10:1的情况下完成。统计学是用学生t检验完成的。

[0042] 图17A-17B：ADCK测定可适用于敲除小鼠品系和其他模型生物。图17A：使用来自Fc

γR$^{-/-}$和WT小鼠的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)进行ADCK测定。在含有接种了VD60裂解物的小鼠的血清的共培养物中,确定感染的靶细胞的基线杀伤。数据代表含接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清的共培养物与基线之间的百分比差异。在效应细胞:靶细胞比率为10:1的一个实施方案中,,在存在接种了HSV-2ΔgD-2::RFP的血清的情况下,WT BMDM比FcγR$^{-/-}$BMDM实现了明显更多的杀伤($p<0.05$)。FcγR$^{-/-}$BMDM在含有接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清的共培养物中对被感染细胞的杀伤与在含有VD60裂解物模拟接种的小鼠的血清的共培养物中的没有区别。图17B:使用源自幼稚豚鼠骨髓的BMDM进行ADCK测定。通过含有幼稚动物血清的共培养物,确定基线ADCK。由于骨髓可用性有限,使用的效应细胞与靶细胞比率为5:1。在此比率下,含有接种了ΔgD-2的豚鼠的混合血清的共培养物中的BMDM比含有VD60模拟接种的豚鼠的混合血清的共培养物中的BMDM实现了明显更多的ADCK($p<0.001$)。每个混合的样品包含来自6-9只动物的血清。数据代表一式三份进行的两次独立测定。将HEK 293细胞用作靶细胞。统计学是由学生t检验完成的。误差条反映SEM。*$p<0.05$;***$p<0.001$。

[0043] 图18:通过接种多种PR8甲型流感病毒(IAV)血凝素(HA)HSV-2重组体引发的抗HA抗体(请参见图例)。

[0044] 图19:通过接种HSV-2重组体ΔgD-2::FL HA nOP引发的抗HA抗体同种型。**$p<0.01$。

[0045] 图20:抗PR8 IgG同种型ELISA。

[0046] 图21A-21C:接种了ΔgD-2::FL HA_{PR8}(ΔgD-2::HA_{PR8})的小鼠受到完全保护而免受PR8的攻击。小鼠间隔3周以$5x10^6$PFU的ΔgD-2::RFP或ΔgD-2::HA_{PR8}进行皮下初免-加强免疫接种或用VD60细胞裂解物进行模拟接种。图21A:加强免疫后一周将小鼠放血,并测量针对A/Puerto Rico/1934/8IAV(PR8)的血清中和滴度。用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠对PR8产生了显著的中和抗体滴度(平均值=304)。虚线表示所述测定的检测极限。图21B和21C:加强免疫后三周,用6xLD_{50}的PR8鼻内攻击小鼠。当小鼠达到其初始重量的75%时将其牺牲。用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠受到完全保护而免受PR8攻击,而接受对照接种的小鼠在第9天之前都死于感染。中和滴度的统计学通过ANOVA计算。存活统计学通过Mantel-Cox对数秩检验进行计算*$p<0.05$;**$p<0.01$;***$p<0.001$。

[0047] 图22A-22C示出重组gD-2::HA_{PR8}表达高水平的PR8蛋白。在图22A中,将ΔgD-2::RFP DNA与在P_{CMV}下游和聚腺苷酸化信号上游含有血凝素(HA)基因的HA表达盒一起共转染到VD60细胞中,所述血凝素(HA)基因来自IMV H1N1株A/Puerto Rico/1934/8(PR8)。在图22B中,在感染了3MOI的ΔgD-2、ΔgD-2::HA_{PR8}或含截短版本的PR8 HA表达盒(ΔgD-2::HLHA_{PR8})的ΔgD-2的Vero和VD60细胞中,通过流式细胞术测量了细胞外和细胞内HA表达。

[0048] 图23A-23F示出了用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生高滴度的功能性和同种型转换的抗PR8抗体。将小鼠间隔21天以VD60细胞裂解物、ΔgD-2::RFP载体或ΔgD-2::HA_{PR8}进行初免-加强免疫接种。初免后第28天,收集血清用于分析。图A-E:通过ELISA测量针对纯化的HA PR8蛋白的抗PR8抗体。用ΔgD::HA_{PR8}免疫的小鼠产生了同种型转换抗PR8 HA抗体,其主要是IgG2c和IgG2b。在图23F中,与用ΔgD-2免疫的小鼠的血清相比,用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠的血清诱导了明显的血凝抑制($p<0.001$;平均值$_{HAI滴度}$=80)。用ΔgD-2::RFP免疫的小鼠未产生任何血凝抑制抗体。所有图均显示1个代表性实验,其中n=5只小鼠/组。统计学是用学生t检验计算的。**$p<0.01$。

[0049] 图24A-24L示出了用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生了对IAV攻击的保护作用。将小鼠间隔21天用VD60细胞裂解物、ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}进行初免-加强免疫，在初免后第28天放血，并在14天后用6x LD_{50}的IAV进行鼻内攻击。图24A-24C，用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠对PR8产生明显的中和滴度(平均滴度$_{PR8}$＝1:304；p_{VD60}<0.01；$p_{\Delta gD-2}$<0.05；n＝10只小鼠/组)。用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠受到完全保护而免于体重损失和死亡，然后用PR8攻击(p<0.001；n＝5只小鼠/组)。图24D-24F：用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生了针对A/California/2009H1N1(A/Cal/2009)IAV的重要中和抗体(平均滴度$_{A/Cal}$＝26；p_{VD60}<0.01$p_{\Delta gD-2}$＝0.1；n＝10只小鼠/组)。用A/Cal/2009攻击后，用ΔgD::HA_{PR8}免疫的小鼠受到部分保护而免于体重损失和死亡(p<0.05，n＝15只小鼠/组)。如图24G-24I所示，用ΔgD-2::HA_{PR8}、ΔgD-2::RFP或VD60细胞裂解物免疫的小鼠未产生针对流感株A/Victoria/3/75H3N2(A/Vic)和A/Aichi/68H3N2(X-31)的中和抗体滴度，并且在攻击后没有受到保护而免于体重损失和死亡($n_{中和}$＝10只小鼠/组；$n_{A/Vic攻击}$＝15只小鼠/组；$n_{X-31攻击}$＝5只小鼠/组)。使用微量中和测定针对各株测量中和滴度。在达到起始重量的70％后将小鼠牺牲。中和测定的统计学使用3向ANOVA检验完成。存活的统计学使用Mantel-Cox对数秩检验完成。*p<0.05；**p<0.01；***p<0.001。

[0050] 图25A-25F：用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠针对HSV-2产生完全保护性的ADCC免疫。将小鼠间隔21天以VD60细胞裂解物、ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}进行初免-加强免疫接种。在图25A和25B中，在加强免疫后1周将小鼠放血，并通过ELISA分析血清。接受ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠产生了类似的高水平HSV特异的IgG(图25A)。另外，这些IgG主要是IgG2c。在图25C中，使用与图25A和25B中相同的血清进行快速荧光抗体依赖性细胞介导的杀伤(RFADCK)测定。与给予了VD60细胞裂解物的小鼠血清相比，接种了ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠的血清在J774.1巨噬细胞和ΔgD-2感染的细胞存在下引发了显著的ADCK活性(p<0.01)。由接种了ΔgD-2和ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠的血清引起的ADCK活性之间没有差异。在图25D-25F中，加强免疫后21天，用10x LD_{90}的HSV-2 4674通过皮肤划痕攻击小鼠。接受VD60细胞裂解物的小鼠到第10天死于HSV-2，并出现明显的上皮和神经系统疾病。接受ΔgD-2和ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠在攻击后受到完全保护，使其免于发病和死亡。n＝5只小鼠/组，来自代表性实验。RFADCK测定的统计学使用3向ANOVA检验完成。存活的统计学使用Mantel-Cox对数秩检验完成。**p<0.01；****p<0.0001。

[0051] 图26显示了mFcγRIV ADCC报告子对连续稀释的血清样本的生物测定反应结果，所述血清样本来自接种了HSV-2ΔgD::HA、HSV-2ΔgD::RFP以及灭活的A/Puerto Rico/8/1934H1N1病毒(PR8)的小鼠。将感染PR8病毒的犬肾传代(MDCK)细胞用作靶细胞，将表达mFcγRIV的Jurkat T细胞用作效应细胞。将靶细胞与连续稀释的血清样本和效应细胞一起孵育。加入Bio-Glo™试剂，并测量发光。与接种HSV-2ΔgD-2::RFP和灭活的PR8病毒的小鼠相比，接种重组HSV-2ΔgD-2::HA的小鼠显示明显更高的mFcγRIV受体的活化。显著性的p值<0.05。符号：**P≤0.01、***P≤0.001、****P≤0.0001。

[0052] 图27是质粒ZM109F.PB4的图谱，所述质粒用于扩增全长HIV-1Env(进化枝C)和Rev，以及HIV-1的部分Nef。

[0053] 图28是pBkk412质粒的图谱。

[0054] 图29A：筛选存在克隆的插入物的转化的大肠杆菌菌落。

[0055] 图29B:通过PCR分析以鉴定具有正确核酸大小的克隆。

具体实施方式

[0056] 提供了一种用于生产针对异源抗原的疫苗载体的工艺,所述工艺包括:

[0057] a)提供HSV-2基因组,其包括:

[0058] (i)编码HSV-2糖蛋白D的基因的全部或部分缺失,和

[0059] (ii)包含启动子-FP构建体的核酸,其中FP是编码荧光蛋白的核酸;

[0060] b)用(i)a)的HSV-2基因组和(ii)编码异源抗原的线性DNA片段共转染宿主细胞,所述共转染在所述HSV-2基因组和所述DNA片段之间发生等位基因重组的条件下进行;

[0061] c)筛选由b)产生的噬菌斑,以鉴定在引发荧光蛋白荧光的激发光下不显示荧光的噬菌斑;

[0062] d)从c)中的不显示荧光的那些噬菌斑中回收重组HSV-2病毒或病毒粒子,以获得针对异源抗原的疫苗载体。

[0063] 在多个实施方案中,启动子-FP构建体的启动子是异源启动子。

[0064] 还提供了一种用于生产针对抗原的疫苗载体的工艺,所述工艺包括:

[0065] a)提供HSV-2基因组,其包括:

[0066] (i)编码HSV-2糖蛋白D的基因的缺失,和

[0067] (ii)包含$P_{EF1\alpha}$-RFP构建体的核酸,其中$P_{EF1\alpha}$是延伸因子1α基因的启动子并且RFP是编码红色荧光蛋白的核酸,其中$P_{EF1\alpha}$和RFP融合在一起($P_{EF1\alpha}$-RFP);

[0068] b)使用以下共转染宿主细胞:(i)a)的HSV-2基因组和(ii)线性DNA片段,所述线性DNA片段依次编码(i)HSV-2gD信号序列、抗原、HSV-2gD跨膜结构域、HSV-2gD胞质结构域,但不编码HSV-2gD胞外结构域,或依次编码(ii)HSV-2gD信号序列、抗原和HSV-2gD的跨膜胞质尾区,在允许等位基因重组的条件下。

[0069] c)筛选由b)产生的噬菌斑,以鉴定在引发红色荧光蛋白荧光的激发光下不显示红色荧光的噬菌斑;

[0070] d)从c)中的不显示红色荧光的那些噬菌斑中回收重组HSV-2病毒或病毒粒子,以获得针对抗原的疫苗载体。

[0071] 可以使用多种启动子。优选异源启动子,包括高效的那些。这样的启动子包括CMV启动子,包括巨细胞病毒主要立即早期启动子。人延伸因子-1α(EF-1alpha)组成型启动子是人起源的,并可用于在体外和体内驱动异位基因表达。可以使用多种PEF-1alpha。人EF1α基因序列是本领域已知的,例如参见NCBI登录号J04617。本领域已知且可用于本发明的其他异源启动子包括但不限于与鸡β-肌动蛋白启动子(CAG)融合的CMV增强子、小鼠巨细胞病毒(小鼠CMV),中国仓鼠延伸因子-1α(CHEF-1α)和磷酸甘油酸激酶(PGK)。

[0072] 在所述工艺的多个实施方案中,所述宿主细胞是补充细胞,例如表型上补充HSV-1糖蛋白D的细胞。在所述工艺的多个实施方案中,所述宿主细胞是VD60细胞,其在表型上补充HSV-1gD。在多个实施方案中,所产生的疫苗载体是HSV-2gD基因型缺失的,并且在表型上补充其脂质双层上的HSV-1gD。在多个实施方案中,所产生的疫苗载体不在基因型上编码任何HSV gD。

[0073] 在多个实施方案中,使用以下共转染所述宿主细胞:(i)a)的HSV-2基因组和(ii)

线性DNA片段，所述线性DNA片段依次编码(i)HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构异域、HSV-2gD胞质结构域，但不编码HSV-2gD胞外结构域，或依次编码(ii)HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的跨膜胞质尾区。

[0074] 在多个实施方案中，使用以下共转染所述宿主细胞：(i)a)的HSV-2基因组和(ii)线性DNA片段，所述线性DNA片段依次编码(i)启动子、异源抗原以及任选的poly-A信号。

[0075] 在多个实施方案中，所述共转染通过电穿孔进行。

[0076] 用于本发明的可核酸编码的荧光蛋白的例子包括红色、远红、黄色、绿色、橙色、青色或光转换荧光蛋白。此类蛋白质的实例是本领域众所周知的。供应商包括Molecular Probes(ThermoFisher，美国)和Takara(美国)。在一个实施方案中，所述荧光蛋白是红色荧光蛋白。激发范围为554-584纳米(nm)并且发射范围为562-610nm的荧光蛋白是优选的。实例包括红色荧光蛋白、mCherry、mTomato、J-Red和mOrange。RFP的激发波长为556nm，发射波长为584nm。或者，可以使用萤火虫荧光素酶或纳米荧光素酶。

[0077] 在多个实施方案中，所述抗原不是HSV-2抗原，即，它是异源抗原。如本文所用，当抗原相对于HSV-2是异源时，即，不天然存在于野生型HSV-2上或其中，所述抗原是异源的。

[0078] 所述异源抗原可源自活的生物体，包括例如病毒、细菌、寄生虫、人类细胞、动物细胞或其组合。所述异源抗原可以是表面蛋白或非表面蛋白。

[0079] 所述病毒可以是病原性病毒，其实例包括巨细胞病毒(CMV)、柯萨奇病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、基孔肯雅病毒、登革病毒、多里病毒、东部马脑炎(EEE)病毒、埃博拉病毒、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)、肝炎病毒、疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)病毒、人类乳头瘤病毒，人类SARS冠状病毒、人类嗜T淋巴细胞病毒(HTLV)、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、诺沃克病毒、狂犬病病毒、轮状病毒、风疹病毒，严重发热伴血小板减少综合征(SFTS)病毒，呼吸道合胞体病毒(RSV)、水痘带状疱疹病毒、西部马脑炎病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、寨卡病毒或其组合。

[0080] 所述细菌可以是病原性细菌，其实例包括芽孢杆菌物种(Bacillus sp.)、巴通氏菌物种(Baronella sp.)、博德氏菌物种(Bordatella sp.)、伯氏疏螺旋体物种(Borellia sp.)、布鲁氏杆菌物种(Brucella sp.)、弯曲杆菌物种(Campylobacter sp.)、披衣菌物种(Chlamydia sp.)、梭菌物种(Clostridium sp.)、棒杆菌物种(Corynebacterium sp.)、肠球菌物种(Enterococcus sp.)、肠杆菌物种(Escherichia sp.)、嗜血杆菌物种(Haemophilis sp.)、螺旋杆菌物种(Helicobacter sp.)、军团菌物种(Legionella sp.)、钩端螺旋体物种(Leptospira sp.)、李斯特菌物种(Listeria sp.)、分枝杆菌物种(Mycobacterium sp.)、支原体物种(Mycoplasma sp.)、奈瑟菌物种(Neisseria sp.)、立克次体物种(Rickettsia sp.)、绿脓杆菌物种(Pseudomonas sp.)、沙门氏菌物种(Salmonella sp.)、志贺氏菌物种(Shigella sp.)、金黄色葡萄球菌物种(Staphylococcus sp.)、链球菌物种(Streptococcus sp.)、螺旋菌物种(Treponema sp.)、弧菌物种(Vibrio sp.)、耶尔辛氏菌物种(Yersinia sp.)或其组合。

[0081] 所述寄生虫可以是病原性寄生虫，其实例包括棘阿米巴物种(Acanthamoeba spp.)、巴拉目阿米巴物种(Balamuthia spp.)、巴倍虫物种(Babesia sp.)，结肠小袋纤毛虫(Balantidium coli)、芽囊原虫物种(Blastocystic sp.)、隐胞子虫物种(Cryptospiridium sp.)、环孢子虫(Cyclospora cayetanensis)、溶组织内阿米巴

(Entamoeba histolytica)、蓝氏贾第鞭毛虫(Giardia lamblia)、贝氏等孢球虫(Isospora bello)、利什曼原虫物种(Leishmania sp.)、福氏内格里虫(Naegleria foweri)、疟原虫物种(Plasmodium sp.)、西氏鼻芽孢菌(Rhinosporidium seeberi)、肉孢子虫物种(Sarcocystis sp.)、弓形虫(Toxoplasma gondii)、滴虫物种(Trichomonas sp.)、锥虫物种(Trypanosoma sp.)或其组合。

[0082] 所述人类细胞或动物细胞可以是例如癌细胞。

[0083] 在多个实施方案中,所述异源抗原是流感抗原。在多个实施方案中,所述异源抗原是流感血凝素(HA)抗原。在多个实施方案中,所述HA抗原是全长HA胞外结构域或是HA茎结构域。

[0084] 在多个实施方案中,所述异源抗原是HIV抗原。在多个实施方案中,所述HIV抗原是Env gp145。

[0085] 在多个实施方案中,所述异源抗原在上游CMV启动子的控制下并且具有下游SV40 poly-A信号。所述SV40 poly-A信号在本领域中是已知的。它促进聚腺苷酸化和转录终止。

[0086] 在多个实施方案中,所述启动子是延伸因子1α基因的启动子($P_{EF1\alpha}$),并且其中$P_{EF1\alpha}$和FP融合在一起($P_{EF1\alpha}$-FP)。

[0087] 在多个实施方案中,将所述核酸进行密码子优化以用于表达。参见,例如本文以下实施例中的表4。

[0088] 还提供了通过本文所述的工艺制备的疫苗载体。

[0089] 还提供了通过本文所述的工艺制备的具有编码异源抗原的基因组的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)。

[0090] 还提供了一种重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),其具有(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的完全缺失和(ii)(a)编码:启动子、异源抗原信号序列和异源抗原或(b)编码:启动子和异源抗原。

[0091] 还提供了一种重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),其具有(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的部分缺失和(ii)(a)依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构域,任选地HSV-2gD胞质结构域,但不编码HSV-2gD胞外结构域,或(b)依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD的胞质结构域。

[0092] 还提供了一种重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),其具有(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的部分缺失和(ii)(a)依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构域、HSV-2gD胞质结构域,但不编码HSV-2gD胞外结构域,或(b)依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的跨膜胞质尾区。

[0093] 在多个实施方案中,所述重组HSV-2在其脂质双层上进一步包含寄生虫表面糖蛋白,其中所述寄生虫是哺乳动物的寄生虫。

[0094] 在一个实施方案中,所述HSV-2糖蛋白D编码基因是HSV-2U_{S6}基因。(例如,参见Dolan等人J Virol.1998 March;72(3):2010-2021.(PMCID:PMC109494)“The Genome Sequence of Herpes Simplex Virus Type 2”for HSV-2 genome and U_{S6}gene,hereby incorporated by reference in its entirety)。在多个实施方案中,所述HSV-2糖蛋白D编码基因是HSV-2U_S6基因的等同物。本领域技术人员使用容易获得的测序和比对工具可以容易地识别出这些等同物。

[0095] 在多个实施方案中，所述异源抗原是流感抗原。在多个实施方案中，所述异源抗原是流感血凝素(HA)抗原。

[0096] 在多个实施方案中，所述HA抗原是全长HA胞外结构域或是HA茎。在多个实施方案中，所述全长HA包括HA信号序列。在多个实施方案中，所述HA是人类甲型流感或人类乙型流感的HA。血凝素基因("HA")的实例包括GenBank V01098.1;NCBI参考序列:NP_040980.1。HA基因序列和成熟的血凝素肽序列在本领域中是众所周知的，并且本领域技术人员可以在NCBI数据库中获得多个HA序列。此外，本领域技术人员可以容易地鉴定通常讨论的血凝素的茎、胞外结构域和其他区域。此外，季节性流感病毒株序列，包括HA序列，在本领域中可以被常规测序和鉴定。

[0097] 可以通过与B3x2.8(ΔgD-2::$P_{EF1\alpha}$-RFP)等位基因交换而被添加到ΔgD-2的其他流感基因(作为异源抗原)包括神经氨酸酶(neuraminidase,NA)、基质蛋白1(M1)、甲型流感病毒(IAV)基质蛋白2(M2)、乙型流感病毒(IBV)基质蛋白2(M2)、核蛋白(NP)和乙型流感病毒NB。也可以使用包含至少一种前述物质的组合。可以添加每种毒株的相应修饰的无头HA基因，以及每种无头抗原的版本(其中已添加三聚结构域)以增加稳定性。表1提供了其他此类抗原基因的非限制性流感实例。其他例子包括插入来自A/越南/1203/04的HA基因、来自例如B/山形/16/1988和B/维多利亚/2/1987株的HA、无头HA、NA、M1、M2、NP和NB基因。

[0098] 表1-示例性流感抗原实例的Genbank序列登记号

[0099]

抗原	A/波多黎各/1934/8 H1N1	A/加利福尼亚/04/2009 大流行性 H1N1 猪流感	A/香港/156/97 禽流感 H5N1	A/纽约/35/2017 季节性流感 H3N2	A/香港/213/2003 禽流感 H5N1	A/上海/01/2014 禽流感 H7N9	A/猪/密苏里/2124514/2006 猪流感 H2N3	A/意大利/3/2013 禽流感 H7N7	A/荷兰/602/2009 H1N1	A/香港/33982/2009 H9N2
HA		KX136139	AF028709	CY256029	AB212054	KJ411975	EU258939	KF918337	CY148123	KF188316
NA	CY121111	KX136323	AF036357	CY256031	AB212056	KJ411977	EU258937	KF918339	CY039528	KF188318
M1	KC866600	KX135622	AF036358	CY256032	AB212057	KJ411976	EU258938	KF918340	CY046944	KF188319
M2	KC866600	KX135622	AF036358	CY256032		KJ411976	EU258938	KF918340	CY046944	KF188319
NP	CY148246.1	KX136793	AJ291400	CY256030	AB212055	KJ411978	EU258936	KF918338	CY046943	KF188317

[0100] 产生表达HIV或甲型流感病毒抗原的重组HSV-2gD-/-病毒载体的一种方法如下：

[0101] 1.通过部分缺失糖蛋白D编码基因Us6来生成工程化HSV-2基因组，从而仅留下糖蛋白D信号序列和跨膜胞质结构域序列(不存在胞外结构域序列)。糖蛋白D基因的缺失部分被P_{EF1}-RFP基因取代，其中红色荧光蛋白(RFP)在$P_{EF1\alpha}$启动子的控制下表达。

[0102] 2.粘粒pYUB2169可工程化以表达所选的异源抗原(例如，HIV包膜蛋白抗原Env gp145或流感病毒HA茎抗原)的基因，所述基因分别在任一侧侧接HSV-2信号序列和跨膜-胞质结构域序列。

[0103] 3.(1)的HSV-2gD-/-RFP+基因组和(2)的工程化粘粒pYUB2169均可被引入VD60细胞系。

[0104] 4.在VD60细胞系内，同源重组发生在(1)的部分缺失糖蛋白D基因(插入RFP基因)的HSV-2与(2)的pYUB2169-HIV Env gp145或甲型流感病毒HA茎抗原表达基因之间。预期成功的重组将导致RFP基因丢失，并产生表达异源HIV或流感病毒抗原的HSV-2gD-/-病毒(参见图1A-1B)。

[0105] 5.RFP表达阴性的VD60细胞培养噬菌斑含有HSV-2gD-/-病毒颗粒，预期表达HIV Env gp145或I流感病毒HA茎抗原。

[0106] 6.如此产生的表达异源HIV Env gp145或甲型流感病毒HA茎抗原的HSV-2gD-/-病毒可用于给人接种，并引发强烈的抗体介导的针对HIV或流感病毒的响应和保护性免疫。

[0107] 在多个实施方案中，所述异源抗原是HIV抗原。在多个实施方案中，所述HIV抗原是HIV-1或HIV-2抗原。例如，所述异源抗原是HIV-1抗原。在多个实施方案中，所述HIV是C亚型。在多个实施方案中，所述HIV抗原是Env、Pol、Gag或Nef。在一个实施方案中，所述HIV抗原是Env抗原。在多个实施方案中，所述HIV抗原是C亚型Env抗原。在多个实施方案中，所述抗原是Env gp145。在多个实施方案中，所述异源抗原是完全完整的膜近侧外部区域(MPER)。在多个实施方案中，所述异源抗原通过聚赖氨酸尾延伸。在多个实施方案中，所述异源抗原没有通过聚赖氨酸尾延伸。HIV gp145 Env蛋白序列很容易通过比对工具进行鉴定，并且可以常规测序。在多个实施方案中，HIV Env gp145的胞外域与HSV gD的信号肽和跨膜胞质尾区融合。

[0108] 还提供了其中包含如本文所述的重组病毒的细胞，其中所述细胞不存在于人类中。

[0109] 还提供了包含如本文所述的重组病毒的疫苗组合物。在多个实施方案中，疫苗包含不衍生自HSV-2的佐剂。佐剂在本领域中是众所周知的，包括明矾、水包油或油包水乳液、铝盐(如氢氧化铝、磷酸铝和硫酸铝钾)以及单磷酰脂质A。在多个实施方案中，所述疫苗不包含佐剂。

[0110] 还提供了药物组合物，其包含如本文所述的重组HSV-2病毒和药学上可接受的载体。药学上可接受的载体是本领域众所周知的。

[0111] 还提供了一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0112] 还提供了一种在受试者中引发和/或增强针对表达异源抗原的病原体的免疫应答的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答，其中(i)、(ii)或(iii)的重组病毒表达所述异源抗原。

[0113] 还提供了一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。为了治疗或减少流感的可能性，所述异源抗原是流感HA抗原。还提供了针对流感感染为受试者接种疫苗的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0114] 还提供了一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法，所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组病毒；(ii)如本文所述的疫苗；或(iii)如本文所述的药物组合物，其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。为了治疗HIV或减少HIV的可能性，所述异源抗原是HIV抗原。还提供了针

对HIV感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的(i)如本文所述的重组病毒;(ii)如本文所述的疫苗;或(iii)如本文所述的药物组合物,其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0115] 还提供了一种引发和/或增强受试者中免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的通过本文所述工艺制备的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),所述重组单纯疱疹病毒2包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失并且(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0116] 还提供了一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的通过本文所述工艺制备的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),所述重组单纯疱疹病毒2包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失并且(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

[0117] 还提供了针对流感感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的通过本文所述工艺制备的重组单纯疱疹病毒2,所述重组单纯疱疹病毒2包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失并且(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原,其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0118] 在多个实施方案中,所述HA抗原是全长HA胞外结构域。

[0119] 在多个实施方案中,所述方法还包括,在最初施用编码全长HA胞外结构域的重组单纯疱疹病毒2之后,施用一种或多种量的重组单纯疱疹病毒2,所述重组单纯疱疹病毒2具有(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失并且(ii)编码启动子、HA抗原信号序列和HA茎,但不编码全长HA。

[0120] 在所述方法或工艺的实施方案中,所述HSV-2糖蛋白D包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列:

[0121] MGRLTSGVGTAALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTDPPGVKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMGDNCAIPITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWHIPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVIGGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDAPPSHQPLFY(HSV-2参照株HG52)

[0122] 在一个实施方案中,其中缺失HSV-2糖蛋白D编码基因的HSV-2是具有以下Genbank列出序列之一所示的基因组(缺失之前)的HSV-2:HSV-2(G)(KU310668)、HSV-2(4674)(KU310667)、B3x1.1(KU310657)、B3x1.2(KU310658)、B3x1.3(KU310659)、B3x1.4(KU310660)、B3x1.5(KU310661)、B3x2.1(KU310662)、B3x2.2(KU310663)、B3x2.3(KU310664)、B3x2.4(KU310665)、B3x2.5(KU310666)。这些序列通过引用并入本文。

[0123] 提供了一种细胞,其中包含本文所述的重组HSV-2基因组。

[0124] 还提供了包含如本文所述的重组HSV-2病毒的疫苗组合物。在一个实施方案中,所述疫苗包含免疫佐剂。在一个实施方案中,所述疫苗不包含免疫佐剂。在本文所述的包含重组HSV-2的疫苗、组合物或药物组合物的一个实施方案中,所述HSV-2是减活的。

[0125] 还提供了包含如本文所述的重组HSV-2病毒的组合物,其中所述病毒或病毒粒子

的基因组包含至少第二基因的缺失,其中所述第二基因对于HSV-2病毒复制或毒力是必需的。

[0126] 一种药物组合物,其包含如本文所述的重组HSV-2病毒和药学上可接受的载体。

[0127] 在一个实施方案中,将所述组合物或药物组合物或疫苗配制成适合于对人类受试者进行皮下施用。在一个实施方案中,将所述组合物或药物组合物或疫苗配制成适合于对人类受试者进行口服施用。在一个实施方案中,将所述组合物或药物组合物或疫苗配制成适合于对人类受试者进行阴道内施用。在一个实施方案中,将所述组合物或药物组合物或疫苗配制成适合于对人类受试者进行肌肉内、鼻内或粘膜施用。在本文方法的实施方案以及本文组合物或药物组合物或疫苗制剂的实施方案中,施用可以是耳、颊、结膜、皮肤、皮下、子宫颈内、鼻窦内(endosinusial)、气管内、肠内、硬膜外、通过血液透析、间质、腹内、羊膜内、动脉内、关节内、胆内、支气管内、囊内、心内、软骨内、尾部内、海绵窦内、腔内、脑内、脑池内、角膜内、冠状动脉内、真皮内、椎间盘内、导管内、表皮内、食管内、胃内、阴道内、牙龈内、回肠内、管腔内、病灶内、淋巴管内、髓内、脑膜内、肌内、眼内、卵巢内、心外膜内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、窦内、脊柱内、滑膜内、腱内、睾丸内、鞘内、胸内、小管内、瘤内、鼓室内、子宫内、血管内、静脉内、心室内、膀胱内、玻璃体内、喉部、鼻部、鼻饲、眼部、口腔、口咽部、肠胃外、经皮、关节周围、硬膜周围、直肠、吸入、眼球后、蛛网膜下、结膜下、舌下、粘膜下、局部、透皮、经粘膜、经胎盘、经气管、输尿管、尿道或阴道。也可以使用包含至少一种前述施用途径的组合。

[0128] 还提供了一种在受试者中引发免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的(i)本文所述的重组HSV-2病毒,其量可有效引发受试者中的免疫应答。

[0129] 在一个实施方案中,所述HSV-2糖蛋白D编码基因是HSV-2US6基因。在一个实施方案中,所述HSV-2重组病毒编码异源表面糖蛋白。在一个实施方案中,所述异源表面糖蛋白是HSV-1gD。在一个实施方案中,所述HSV-2重组病毒包含非基因型编码的HSV-1gD,它还编码异源表面糖蛋白,所述异源表面糖蛋白不是疱疹病毒糖蛋白和/或不参与疱疹病毒科感染,并且由已插入重组HSV-2的基因组的转基因编码。在一个实施方案中,所述重组HSV-2的基因组不编码任何疱疹病毒gD。在一个实施方案中,通过用具有HSV-2糖蛋白D编码基因缺失的重组HSV-2感染细胞,表面糖蛋白存在于病毒的脂质双层上,其中所述细胞被转染或已经被转染以在其细胞膜上表达表面糖蛋白,并且其中包含存在于脂质双层上的表面糖蛋白的重组HSV-2由所述细胞产生。在一个实施方案中,所述宿主细胞是HSV-1gD补充细胞。在一个实施方案中,所述宿主细胞在内源基因启动子下编码HSV-1gD。在一个实施方案中,所述宿主细胞是HSV-1gD补充性VD60细胞。(参见,例如,Ligas等人J Virol.1988May;62(5):1486-94,通过引用并入本文)。

[0130] 还提供了其中包含如本文所述的重组病毒的细胞,其中所述细胞不存在于人类中。

[0131] 一种疫苗组合物,其包含如本文所述的重组病毒。在所述疫苗组合物的一个实施方案中,所述疫苗组合物包含免疫佐剂。

[0132] 还提供了包含如本文所述的重组病毒的组合物,其中所述病毒的基因组包含至少第二基因的缺失,其中所述第二基因对于HSV-2病毒复制是必需的。

[0133] 在一个实施方案中,本文所述的重组病毒不包含第二基因的缺失。

[0134] 减少病毒感染的可能性被理解为是指与未治疗的受试者相比，在用本文所述的病毒、疫苗或组合物治疗的受试者中相关疾病的发展程度或感染机会的改善。

[0135] 在本文用于免疫、接种或引发免疫应答的方法的一个实施方案中，由此诱导的病毒或抗体或免疫因子的被动转移可以从一个受试者到另一个受试者进行。可以从一个受试者获得后，在对第二受试者施用之前，对相关产品进行处理。在本文描述的本发明的优选实施方案中，所述受试者是哺乳动物受试者。在一个实施方案中，所述哺乳动物受试者是人类受试者。

[0136] 在一个实施方案中，用抗原接种受试者会在受试者中引发对该抗原的体液免疫应答。与疫苗接种之前相比，接种疫苗的个体通常能够对来自包含该抗原的病原体的后续攻击产生更有效的免疫应答。

[0137] 在本文描述的方法的一个实施方案中，所述受试者尚未被流感病毒感染。在本文描述的方法的一个实施方案中，所述受试者尚未被HIV感染。在本文描述的方法的一个实施方案中，所述受试者已经被流感病毒感染。在本文描述的方法的一个实施方案中，所述受试者已经被HIV感染。

[0138] 在多个实施方案中，所述流感感染是人甲型流感病毒感染。在多个实施方案中，所述流感感染是人乙型流感病毒感染。在多个实施方案中，所述HIV感染是HIV-1感染。在多个实施方案中，所述HIV感染是HIV-2感染。

[0139] “密码子优化”被定义为修饰核酸序列以增强在目的(例如人类)细胞中的表达，所述修饰通过用该脊椎动物的基因中更常用或最常用的密码子替换天然序列的至少一个、多于一个或大量的密码子来进行。多种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特别的偏好。在一方面，本发明涉及密码子优化的插入物、核酸或载体或包含其的宿主细胞。

[0140] 还提供了定量细胞群中抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)的速率或数量的方法，所述方法包括：在允许荧光蛋白在细胞中表达的条件下，用表达荧光蛋白的重组HSV-2感染细胞群中的多个细胞，所述重组HSV-2包含缺失编码HSV-2gD的基因的基因组；使多个被感染的细胞与含有抗体的溶液和免疫细胞群接触，并在一个或多个时间点定量显示荧光蛋白荧光的和任选的一种或多种标记物的细胞的数量，以便随时间定量活的被感染的细胞的数量，从而定量免疫细胞群中ADCK的速率或数量。

[0141] 还提供了定量细胞群中抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)的速率或数量的方法，所述方法包括：在允许荧光蛋白在细胞中表达的条件下，用表达荧光蛋白表达的重组HSV-2感染细胞群中的多个细胞，所述重组HSV-2包含缺失编码HSV-2gD的基因的基因组；使多个被感染的细胞与含有抗体的溶液接触，并在一个或多个时间点定量显示荧光蛋白荧光的和任选的一种或多种标记物的细胞的数量，以便随时间定量活的被感染的细胞的数量，从而定量细胞群中ADCK的速率或数量。

[0142] 在多个实施方案中，所述重组HSV-2通过本文所述的工艺制备。

[0143] 在多个实施方案中，所述方法在体外进行。在多个实施方案中，所述免疫细胞群包括巨噬细胞群。在多个实施方案中，所述巨噬细胞是人类的。在多个实施方案中，所述含抗体的溶液包含血清。在多个实施方案中，所述荧光蛋白是如上所述的。在一个实施方案中，所述荧光蛋白是红色荧光蛋白。在一个实施方案中，仅被定量为$RFP^{高}$的细胞被认为是活细胞。在一个实施方案中，如果多个细胞表达RFP高于被感染细胞群中表达RFp的细胞的平均

强度,则它们是RFP^{高}。在多个实施方案中,用效应细胞:靶细胞比率为5:1或更大的免疫细胞群进行该方法。在多个实施方案中,用效应细胞:靶细胞比率为10:1或更大的免疫细胞群进行该方法。

[0144] 在多个实施方案中,显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的细胞的量通过荧光激活细胞分选(FACS)来测量。在多个实施方案中,显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的细胞的量通过荧光光谱仪、荧光微孔板检测仪和荧光显微镜或荧光孔板检测仪来测量。在多个实施方案中,所述一种或多种标记物包括细胞膜标记物和/或活/死细胞标记物。

[0145] 在多个实施方案中,所述方法还包括在一个或多个时间点,在被感染的细胞的对照细胞群中定量显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的细胞的量,所述对照细胞群在其他方面相同但未与含抗体的溶液接触,并将所定量的数量或速率与对于与含抗体的溶液接触的细胞群所定量的数量或速率进行比较。

[0146] 在涉及ADCK测定的本发明的其他实施方案中,重组HSV-2ΔgD-2中的标记物可以是β半乳糖苷酶或碱性磷酸酶,而不是荧光蛋白。因此,本文公开的方法、工艺和组合物,加以必要的修改,可以包含重组HSV-2ΔgD-2,所述重组HSV-2ΔgD-2在其基因组中包含编码β半乳糖苷酶或碱性磷酸酶的核酸。

[0147] 如本文所用,“和/或”,以选项A和/或选项B为例,涵盖(i)选项A、(ii)选项B和(iii)选项A加选项B的单独实施方案。

[0148] 除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则本文描述的各种元件的所有组合均在本发明的范围内。

[0149] 通过以下实施例可以更好地理解本发明。

[0150] 实施例

[0151] 实施例1

[0152] 构建了工程化的HSV-2病毒,所述病毒用强烈表达红色荧光蛋白(RFP)的基因替代了gD基因(ΔgD-2)。一旦实现,就为鉴定和获得新的重组体提供了改进的筛选。ΔgD-2::RFP重组体由显示出保护作用的ΔgD-2制成。红色荧光ΔgD-2:RFP,在本文中也称为B^{3}x2.8或ΔgD-2::$P_{EF1\alpha}$-RFP,保留了原始ΔgD-2引发针对HSV感染的保护性免疫的能力,但似乎没有改变体外复制动力学。此外,ΔgD-2::RFP在制备重组体方面比HSV-2ΔgD::GFP病毒具有明显优势。由于RFP基因与高效启动子(例如EF1α(延伸因子1α)基因的启动子)融合,因此可以使用荧光显微镜轻松检测其表达。此外,用ΔgD-2::RFP感染的细胞中的红色荧光的可视化没有使用绿色荧光ΔgD-2时出现的背景。此属性可以明确鉴定其中ΔgD-2::$P_{EF1\alpha}$-RFP等位基因被其他等位基因交换底物替代的重组病毒。

[0153] 使用HSV-2(G)作为骨架构建了HSV-2ΔgD-/+gD-1病毒(以下称为“ΔgD-2”),详情如下。为了制备等位基因交换构建体,通过Gibson克隆到大肠杆菌质粒中来产生表达构建体,将表达构建体克隆到穿梭载体(例如粘粒pYUB2169)的SpeI和BclI位点之间,所述穿梭载体包含12kb的从US1到US9的HSV-2(G)病毒,将来自pYUB2169重组体的PacI限制性片段与ΔgD-2::RFP DNA一起电穿孔到VD60细胞中,并筛选所得的丧失红色荧光的噬菌斑。(见图1)。

[0154] 该系统用于产生两组重组ΔgD-2株,其包含源自甲型流感病毒(IAV)株A/波多黎

各/8/1934(PR8)的血凝素(HA)抗原。第一组重组体包含通过使用例如pYUB2169重组到ΔgD-2的US6区域中的嵌合gD::HA基因。这些重组基因由PR8 HA的胞外结构域组成,所述PR8 HA的胞外结构域与HSV-2(G)gD的跨膜、胞质和信号序列结构域融合。第二组重组体包含与上游CMV启动子和下游SV40聚腺苷酸化信号融合的、修饰或未修饰的PR8 HA基因。使用鉴定为pBRL812的修饰的pYUB2169,将这些盒插入到ΔgD-2的US6区域。每组重组体均包含三种类型的HA基因:

[0155] FL HA nOP-全长胞外结构域血凝素,未经密码子优化的。

[0156] HL HA nOP-无头胞外结构域血凝素,未经密码子优化的。

[0157] HL HA OPT-无头胞外结构域血凝素,经密码子优化的。

[0158] 制备了以下构建体:

[0159] 通过以下步骤构建了ΔgD-2::RFP(ΔgD-2::PEF1α-RFP):(1)在RFP质粒ptwB中引入卡那霉素标记,(2)用在US6上游和下游具有约50bp同源序列的寡核苷酸扩增kan标记和RFP(dTomato),(3)在DY331细胞中重组,然后加入PCR产物,然后用粘粒pYUB2156转化。(4)通过限制性消化和连接除去kan标记。(5)将HSV2(G)基因组DNA和pYUB2167在VD60细胞中共转染,以通过等位基因交换产生ΔgD-2::RFP。

[0160] 通过将粘粒pYUB2163与ΔgD-2::RFP基因组在VD60细胞中共转染,以通过等位基因交换产生ΔgD-2基因组,来获得ΔgD-2。此基因组不含所有标记物和抗生素抗性基因。根据RFP表达的缺乏,对所得的未标记的病毒进行分类。将RFP阴性噬菌斑纯化3次,并通过PCR和测序验证RFP基因的缺失。

[0161] 通过以下步骤构建了ΔgD-2::FL HA nOP:(1)将HSV-2(G)gD的胞质、跨膜和信号序列结构域Gibson克隆到pYUB2169质粒中定制合成的PR8 HA(Genscript,Piscataway,NJ)的胞外结构域,以及(2)将所得质粒pBJJ1与ΔgD-2:RFP基因组共转染到VD60细胞中,以通过等位基因交换产生所需的重组体。

[0162] ΔgD-2::HL HA nOP的构建与ΔgD-2::FL HA nOP相似,但使用定制合成的PR8 HA基因,其中HA1头结构域被4个甘氨酸残基(Genscript)替换。用于转染的质粒称为pBJJ2。

[0163] ΔgD-2::HL HA OPT的构建与ΔgD-2::HL HA nOP相似,但使用定制合成的PR8 HA基因,其中将HA1头结构域用4个甘氨酸残基替换,并且将其同源氨基酸在HSV-2(G)gD中表现度少于9.5%的每个密码子替换为HSV-2(G)gD中最丰富的密码子(Genscript)。用于转染的质粒称为pBJJ4。

[0164] 通过以下构建了ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP:(1)将全长PR8 HA基因(Genscript)限制性克隆到pEGFP-N1(Addgene,Cambridge,MA)的xbaI和HindIII限制性位点之间,(2)将所得质粒的P_{CMV}-FL HA nOP::SV40 polyA盒限制性克隆到pBRL812的SpeI和BclI位点。所得到的质粒pJHA1用PacI和AsiSI切割,并与ΔgD-2::RFP基因组共转染到VD60细胞中,以通过等位基因交换产生所需的重组体。

[0165] ΔgD-2::P_{CMV}-HL HA nOP的构建与ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP相似,但使用定制合成的PR8 HA基因,其中HA1头结构域被4个甘氨酸残基(Genscript)替换。用于转染的质粒称为pJHA2。

[0166] ΔgD-2::P_{CMV}-HL HA OPT的构建与ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP相似,但使用定制合成的PR8 HA基因,其中将HA1头结构域用4个甘氨酸残基替换,并且将其同源氨基酸在HSV-2

(G)gD中表现度少于9.5%的每个密码子替换为HSV-2(G)gD中最丰富的密码子(Genscript)。用于转染的质粒称为pJHA4。

[0167] 表2:生成的HSV-2病毒

原液 #	亲本	基因型	构建方式	参考
B^3x 2.6	HSV-2 G	野生型	N/A	ATCC
B^3x 2.7	HSV-2 G	ΔgD-2::GFP	等位基因交换 w G	Petro, Gonzalez 等人 *Elife* Petro 等人 *JCI*
B^3x 2.8	B^3x 2.7	ΔgD-2::RFP (也称为 ΔgD-2::$P_{EF1\alpha}$-RFP)	等位基因交换 w B^3x 2.6	本文公开
B^3x 2.9	HSV-2 G	ΔgD-2	等位基因交换 w B^3x 2.8 (未标记的 ΔgD-2)	本文公开
B^3x 2.10	HSV-2 G	ΔgD-2::HA_{PR8}	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开
B^3x 2.11	HSV-2 G	ΔgD-2::$HA_{PR8-茎}$	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开
$\beta^3\chi$1	HSV-2 G	ΔgD-2::FL HA nOP	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开
$\beta^3\chi$2	HSV-2 G	ΔgD-2::HL HA nOP	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开

[0168]

$\beta^3\chi$3	HSV-2 G	ΔgD-2::HL HA OPT	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开
$\beta^3\chi$4	HSV-2 G	ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开
$\beta^3\chi$5	HSV-2 G	ΔgD-2::P_{CMV}-HL HA nOP	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开
$\beta^3\chi$6	HSV-2 G	ΔgD-2::P_{CMV}-HL HA OPT	等位基因交换 w B^3x 2.8	本文公开

[0169]

[0170] 全基因组测序用于验证US6的缺失。为了测试免疫原性,在第0天(d0)和d21接种小

鼠，然后在d40采集血清。Δ gD-2引发的抗HSV抗体类似于用Δ gD-2::GFP获得的那些(参见图2)。

[0171] 从机理上讲，似乎最重要的相关保护是ADCC和ADCP。接种了Δ gD-2的小鼠的血清比接种了Δ gD-2::GFP的小鼠的血清诱导了明显更高的ADCC/ADCP免疫(图3)。使用相同的疫苗接种策略，在第40天，CD8和CD4 T细胞应答相似(图4)。

[0172] 接种Δ gD-2可保护小鼠免受野生型HSV-2 4674以及GFP标记的构建体的攻击，所述野生型HSV-2 4674是从Montefiore医院(Bronx,NY)的病毒学实验室获得的临床分离株。在d0和d21用野生型HSV-2或GFP标记的构建体病毒对小鼠进行接种。加强免疫后21天，用10X LD90 HSV-2 4674皮下攻击小鼠，然后观察其皮肤病变变化、背根神经节中病毒的存在、体重和存活。在所有测试中未标记病毒的行为几乎相同(图5)。

[0173] 材料和方法

[0174] 将HSV-1(17)(Brown等人，1973)、HSV-2(G)(Ejercito等人，1968)、HSV-1(F)(Ejercito等人，1968)和HSV-2(333)ZAG(Nixon等人，2013)，一种表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组病毒在Vero细胞上繁殖。将HSV-2 4674(Nixon等人，2013)在HaCAT细胞上繁殖。VD60细胞(在内源基因启动子下编码gD-1的Vero细胞(Ligas和Johnson，1988))在补充有10％胎牛血清的DMEM中传代。将HSV-2Δ gD-2(Δ gD-/+gD-1)病毒的原液在补充性VD60细胞上繁殖，并在VD60和Vero细胞上测定滴度。将浓缩的病毒原液储存在-80℃，并在需要时在PBS中稀释至所需浓度。

[0175] Δ gD-2::GFP的构建。质粒pcDNA3-eGFP(13031;Addgene,Cambridge,MA,美国)被用作模板，以PCR扩增侧接Van91I限制性酶切位点的pCMV-eGFP-Neo^{r}和OriE-Amp^{r}区域。使用引物Fwd-pCMV和Rev-NeoR-Term对pCMV-eGFP-Neo^{r}区域进行PCR扩增(引物列表请参见表3)。使用引物Fwd-Origin和Rev-AmpR对OriE-Ampr区域进行PCR扩增。

[0176] 平行地，使用纯化的病毒DNA(HSV-2株4674)作为模板，以及引物LL-V91I-US6和LR-V91I-US6为左同源臂，以及引物RL-V91I-US6和RR-V91I-US6为右同源臂，来PCR扩增HSV-2中US6基因(gD)左右两侧的基因组区域(序列比对请参见表3)。将所有四个PCR片段用凝胶纯化，用Van91I(Fermentas Molecular Biology Tools,Thermo Scientific,West Palm Beach,FL,美国)消化，用快速连接酶(Quick-Ligase)[New England Biolabs(NEB),Ipswich,MA,美国]连接，并转化到NEB5-α感受态细胞中。

[0177] 对所得质粒(eKO2-US6)进行序列验证，并使用无内毒素的质粒小量提取试剂盒(MO-BIO Laboratories,Carlsbad,CA,美国)从大肠杆菌中提取。根据制造商的建议，使用Effectene(Qiagen,Valencia,CA,美国)将HSV-2DNA(1μg)与100ng的eKO2-US6共转染到VD60细胞中。

[0178] 转染后第4天，对板进行绿色噬菌斑筛选并收集上清液，并将其覆盖在新鲜的VD60细胞上1h，然后洗涤并用Optimem(Invitrogen,Carlsbad,CA,美国)中制备的4％低熔点琼脂糖覆盖。使用该方法，挑选单个绿色荧光噬菌斑，并纯化3次。如对于HSV-1gD缺失病毒所述(Ligas,1988)，病毒原种在VD60细胞上生长，通过收获Vero细胞的感染的细胞裂解物，来产生非补充病毒。

[0179] 通过PCR进行Δ gD-2::GFP中gD缺失的基因型确认。使用引物组确认样品中野生型(WT)和Δ gD-2病毒DNA的存在(引物RL-V91I-US6和RL-V91IUS6)，而另一组引物(Neo-Out和

US8-Out)则用于扩增包含eKO2-US6的DNA区域和基因组靶区域。为了确认gD表达的缺失,将Vero或VD60细胞用亲本WT或Δ gD-2病毒(在VD60细胞上生长,因此能够进入)感染,感染复数(MOI)为10个噬菌斑形成单位(PFU)/细胞(基于VD60滴度)。孵育1小时后,将细胞用PBS洗涤两次,在Optimem中于37℃孵育48小时,并收获,并通过Western印迹评估gD表达。

[0180] 表3.构建gD-2缺失病毒使用的引物。

扩增的区域	引物名称	序列(5'至3')
A. 用于构建eKO2-US6的引物(Van91I位点以下划线标出)		
pCMV-eGFP-新霉素抗性	*正向-pCMV*	TTT TTT TTC CAA GAA ATG GAG GCC TAC CCG GGT TGA CAT TGA TTA TTG ACT AGT TAT TAA TAG TAA TC (SEQ ID NO:3)
	反向-NeoR-Term	TTT TTT TTC CAA TCT ATG GAG CCC CAG CTG GTT CTT TCC (SEQ ID NO:4)
pUC复制起点-氨苄青霉素抗性	*正向-起点*	TTT TTT TTC CAA TTT ATG GGC TGG GCT GTG TGC ACG AAC C (SEQ ID NO:5)
	反向-AmpR	TTT TTT TTC CAA AAG ATG GGC AGC GCA AAA CGC CTA ACC CTA AG (SEQ ID NO:6)
左US6同源臂	*LL-V91I-US6*	TTT TTT TTC CAT AAA TTG GAA AGG GAA CAG CGA CCA AAT GTC AC (SEQ ID NO:7)
	LR-V91I-US6	TTT TTT TTC CAT TTC TTG GTG ATA CGC

[0181]

		GAT GCA CAC GAA AAA CG (SEQ ID NO:8)
右US6同源臂	*RL-V91I-US6*	TTT TTT TTC CAT AGA TTG GTT CCC CGC TCC CGT GTA CC (SEQ ID NO:9)
	RR-V91I-US6	TTT TTT TTC CAT CTT TTG GCG GGG GCG CCT GTA TCG G (SEQ ID NO:10)
b. 验证基因缺失的引物		
WT和ΔgD病毒	*RL-V91I-US6*	TTT TTT TTC CAT AGA TTG GTT CCC CGC TCC CGT GTA CC (SEQ ID NO:9)
	RR-V91I-US6	TTT TTT TTC CAT CTT TTG GCG GGG GCG CCT GTA TCG G (SEQ ID NO:10)
ΔgD病毒	*Neo-Out*	GTA TAC CGT CGA CCT CTA GC (SEQ ID NO:11)
	US8-Out	GGT GAC TTG GTG CGC CGC C (SEQ ID NO:12)

[0182]

[0183] 用于构建eKO2-US6质粒的PCR片段的序列同源性。使用Blast2搜索已公开的Addgene pcDNA3-eGFP(id:13031,6159bp)序列的pCMV-eGFP-新霉素抗性引物,得到1819bp片段:

查询 10 CGGGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC 49 (SEQ ID NO:13)

序列 229 CGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC 268 正链

[0184]

查询 1 AGCCCCAGCTGGTTCTTTCC 20 (SEQ ID NO:14)

序列 2010 AGCCCCAGCTGGTTCTTTCC 1991 负链

[0185] 搜索pcDNA3-eGFP序列的pUC起始-氨苄青霉素抗性引物,得到1754bp的片段:

查询 1 GCTGGGCTGTGTGCACGAACC 21 (SEQ ID NO:15)

序列 4647 GCTGGGCTGTGTGCACGAACC 4667 正链

[0186]

查询 1 GCAGCGCAAAACGCCTAACCCTAAG 25 (SEQ ID NO:16)

序列 204 GCAGCGCAAAACGCCTAACCCTAAG 180 负链

[0187] 在blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi数据库中搜索人HSV-2株HG52(完整基因组)的单纯疱疹病毒(2型)(taxid:10310)返回序列的US6左同源臂：

[0188] US6左同源臂的BLAST得到一个991bp同源区域,1029bp片段：

查询 1 AAAGGGAACAGCGACCAAATGTCAC 25 (SEQ ID NO:17)

序列 140020 AAAGGGAACAGCGACCAAATGTCAC 140044 正链

[0189]

查询 1 TGATACGCGATGCACACGAAAAACG 25 (SEQ ID NO:18)

序列 141011 TGATACGCGATGCACACGAAAAACG 140987 负链

[0190] US6右同源臂的BLAST得到一个1072bp同源区域,1110bp片段：

查询 1 TTCCCCGCTCCCGTGTACC 19 (SEQ ID NO:19)

[0191] 序列 142204 TTCCCCGCTCCCGTGTACC 142222 正链

查询 1 CGGGGGCGCCTGTATCGG 18 (SEQ ID NO:20)

[0192] 序列 143276 CGGGGGCGCCTGTATCGG 143259 负链

[0193] 表4:在定制合成的密码子优化的HA基因中被替换的密码子。合成HA基因时,设计的版本将PR8 HA中的、在HSV-2(G)gD中的表现度少于9.5%的密码子替换为其各自在HSV-2(G)gD中具有最高表现度的氨基酸的密码子。

[0194]

原始密码子	HA中的出现率	gD 中的出现率	改变的密码子	gD 中的出现率	做出的替换
ATA	38.89%	4.35%	ATC	86.96%	14
ATT	30.56%	8.70%	ATC	86.96%	11
GTA	28.53%	4.00%	GTC	40.00%	8
CTT	9.62%	5.13%	CTG	43.59%	5
TTA	11.54%	7.69%	CTG	43.59%	6
TCT	28.13%	7.69%	TCG	69.23%	9
TCA	53.13%	0.00%	TCG	69.23%	17
CCT	5.00%	0.00%	CCC	65.12%	1
CCA	50.00%	6.98%	CCC	65.12%	10
ACT	23.33%	4.35%	ACG	39.13%	7
ACA	46.67%	4.35%	ACC	52.17%	14
GCA	45.45%	7.32%	GCC	60.98%	15
CAT	53.85%	9.09%	CAC	90.91%	7
TGT	62.50%	0.00%	TGC	100.0%	10
AGT	53.33%	8.33%	AGC	91.67%	8
AGA	52.17%	0.00%	CGC	58.33%	12
AGG	47.83%	0.00%	CGC	58.33%	11

[0195] 通过PCR验证了重组病毒中嵌合gD::HA的存在(见图7)。从左到右的泳道如下:泳道1:ΔgD-2基因组DNA,泳道2:ΔgD-2::FL HA nOP基因组DNA,泳道3:pBJJ1质粒DNA,泳道4:ΔgD-2基因组DNA,泳道5:ΔgD-2::HL HA nOP基因组DNA,泳道6:pBJJ2质粒DNA。用于PCR扩增的引物位于HA胞外结构域的上游和下游。没有外源启动子被插入表达盒。结果,嵌合基因表达受内源启动子调控。使用Sanger测序以验证重组病毒中的嵌合gD::HA基因的正确构建。基因验证后,在第0天和第21天对6-8周龄的C57BL/6小鼠用ΔgD-2::FL HA nOP或ΔgD-2::HL HA OPT并平行地用亲本ΔgD-2::RFP株进行初免-加强免疫接种,并且用VD60细胞裂解物对对照组进行模拟接种。加强免疫后21天,用10x LD90的HSV-2 4674攻击小鼠的皮肤,以确定抗HSV免疫是否受到损害。

[0196] 接种了ΔgD-2::FL HA nOP和ΔgD-2::HL HA OPT的小鼠受到完全保护以抵抗HSV-2攻击,但不会形成抗HA IgG(见图8)。在第0天和第21天,用对照VD60细胞裂解物或$1x10^6$ PFU的ΔgD-2::FL HA nOP、ΔgD-2::HL HA OPT或ΔgD-2::RFP对小鼠进行初免-加

强免疫接种。在第42天，用10x LD90的HSV-2 4674攻击小鼠。接种ΔgD-2::FL HA nOP和ΔgD-2::HL HA OPT的小鼠受到完全保护，免受攻击。(参见图8A)初免免疫接种后第40天，取小鼠的血以观察血清抗体。针对可溶性PR8 HA进行的ELISA显示小鼠中不存在HA特异性IgG。(参见图8B)

[0197] ΔgD-2::P_{CMV}-HA病毒的构建和HA表达。研究了将非嵌合HA基因插入含组成型启动子和聚腺苷酸化序列的盒中的ΔgD基因组是否更具免疫原性。为此，将合成的PR8 HA基因限制性克隆到表达质粒pEGFP-N1(Addgene)中。将HA基因插入xbaI和HindIII位点之间，并替换质粒中的EGFP。

[0198] 给小鼠接种ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP。用5x10^6 PFU的每种病毒对小鼠进行初免免疫接种(参见图18所用不同病毒的图例)。n＝5只小鼠/组，除了10只ΔgD-2::FL HA nOP小鼠。用表达ΔgD-2的茎HA对五(5)只ΔgD-2::FL HA nOP小鼠进行加强免疫，将5μg/mL的纯化PR8 HA用作抗原来源。将山羊抗小鼠Ig抗体用于总的抗体ELISA。初免免疫后的第14天，抗PR8 HA ELISA显示，用茎HA(ΔgD-2::FL HA nOP)接种的小鼠的血清表现出总体的抗体应答，但在同种型ELISA中未超过背景。(参见图18)重要的是，接种ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP(β3x4)产生的IgG2c比IgG1明显更多(参见图19)。接种全长HA引起最大的抗HA应答，而该应答主要是IgG2c。这与重组病毒疫苗对于外源抗原和对于内源HSV蛋白可获得相同的IgG同种型应答是一致的。

[0199] ΔgD-2::P_{CMV}-HA重组病毒均表达HA。如图12所示，用3MOI的ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP、ΔgD-2::P_{CMV}-HL HA nOP或ΔgD-2::P_{CMV}-HL HA OPT将VD60细胞感染。感染后16小时，收获细胞并为HSV蛋白和HA表达染色。使用接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清测量HSV蛋白表达。使用单克隆抗HA茎IgG C179测量HA表达。用细胞可渗透或细胞不可渗透的方法对细胞染色。统计学是通过对照荧光与为HA表达染色的孔中的荧光之间的几何平均数的学生t检验来计算的。仅β^3x4可以在感染的细胞膜中诱导高水平的HA表达，但是所有三种病毒均可以诱导通过细胞可渗透染色法测量的表达。

[0200] 为了确定将全长PR8 HA插入ΔgD-2是否会引入新的细胞进入途径，用0.01MOI的ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP或ΔgD-2::$P_{EF1\alpha}$-RFP感染了Vero细胞。感染后120小时，没有生产性感染的迹象。另外，对5只C57BL/6小鼠皮下注射5x10^6PFU的ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP，并每天监测，持续一周。他们没有表现出疾病或痛苦的迹象。另外，进行了体外测定，其中用ΔgD-2::P_{CMV}-FL HA nOP和ΔgD-2::PEF1α-RFP滴定感染了非补充性Vero细胞。感染后70小时，将细胞固定并对HSV-2糖蛋白B(gB)染色。染色显示在每种病毒10^{-3}的稀释度下存在分离的感染细胞，但没有细胞间病毒传播的迹象(见图13)。考虑到甲型流感病毒和乙型流感病毒质子泵基因(均称为M2)是介导核内体释放病毒粒子所必需的，因此这并不奇怪。由于β3x4-6也不包含质子泵基因，因此它们缺乏进入后退出细胞核内体的机制。

[0201] 实施例2

[0202] 设计HIV构建体以在HSV-2ΔgD病毒中表达：研究了产生疫苗载体，其中从诱导ADCC的HSV-2ΔgD载体表达HIV的糖蛋白抗原。使用该载体的基本原理是，它会引发针对HSV的非中和的、ADCC诱导性IgG抗体，并且这种免疫应答与迄今为止唯一的显示出任何功效的HIV疫苗试验中的保护作用相关(Haynes,Gilbert等人2012)。对于糖蛋白抗原，从CHAVI001急性HIV-1感染队列中的供体CH505中选择了缺少胞质尾区的Env gp145的传递/创建克隆，

因为这种特征明确的HIV-1进化枝C糖蛋白被认为是在高HIV流行区通过感染瓶颈的那些的代表(Liao,Lynch等人2013)。在自然感染的情况下,HIV Env不能特别好地表达,并且通常不能很好地外源性表达,因此研究了在我们的构建体中增强抗原表达的步骤。发现Env gp145可以比全长更有效地掺入病毒样颗粒(VLP)中,并且用来自宿主蛋白或其他病毒糖蛋白的相应结构域替换Env信号肽和跨膜结构域会进一步增加掺入VLP(Wang,Liu等人2007)。为了有效地将HIV Env掺入HSV VLP中,构建了HIV Env的胞外域与HSV-2gD的信号肽和跨膜胞质尾区的嵌合体。HSV2 gD的信号肽长度为25个残基,并且所述胞外域总计306个残基(Eisenberg,Long等人1984,Nicola,Willis等人1996)。等位基因交换构建体由Gibson组装生成(Gibson,Young等人2009)。简而言之,合成了寡核苷酸引物以从HSV2株G的基因组DNA中扩增同源臂序列,所述同源臂序列为HSV2 US6的第25个密码子的5'端约800bp以及HSV2 US6的第306个密码子的3'端约800bp。使用包含第30个密码子至第680个密码子的引物,从CH505 TF gp145表达质粒HV1300631(Huaxin Liao,Duke University提供的礼物)中扩增插入物。将片段克隆到pUC19中的EcoRI和BamHI限制性酶切位点之间。

[0203] 实施例3

[0204] 简介

[0205] 使用表达RFP的HSV-2ΔgD株的功能性体外巨噬细胞抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)测定(如实施例1所作出的):缺失糖蛋白D(ΔgD-2)的单周期(single-cycle)2型单纯疱疹病毒(HSV-2)株通过诱导结合并激活Fcγ受体(FcγR)的抗体而引发消除性(sterilizing)抗HSV免疫。鼠FcγRIV在接种疫苗的小鼠的血清存在下被高度活化,并在巨噬细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞上表达。通过FcγR杀死细胞的确切机制尚不完全清楚并且需要其他工具。结合FcyR的抗体通过结合被感染细胞上的抗原,然后结合和激活先天性白细胞上的FcγR,来介导HSV感染细胞的杀伤。这会沉淀抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和吞噬作用(ADCC和ADCP),在此称为抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)。当前的测定面临许多限制,其包括但不限于不灵活的靶标和效应细胞系、人工抗原呈递系统、ADCC和ADCP的间接或单独输出以及难处理的放射性同位素的使用。

[0206] 为了克服这些限制,构建了定量体外测定,以研究响应于抗HSV抗体的ADCK。高度表达红色荧光蛋白基因(rfp)的ΔgD-2变体被用于标记感染。然后,使用RFP和细胞活力标记物来鉴定活的感染的靶细胞,确定其下降的比例是细胞杀伤的结果。FACS分析用于定量在与巨噬细胞共培养后活的感染的靶细胞的下降比例。

[0207] 使用该新的测定,其表明,接种ΔgD-2的小鼠的血清通过永生化的巨噬细胞系和来自小鼠和豚鼠的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)诱导了大量的ADCK。使用Raw巨噬细胞的测定的活细胞成像(live-imaging)显示,杀伤的读数(readout)不易归因于细胞毒性或吞噬作用,但所述过程可以同时发生,从而强调了使用测量两者的测定的重要性。另外,当使用来自FcγR$^{-/-}$小鼠的BMDM时,消除了ADCK,这表明主要读数是FcγR依赖性的,并且该测定适合研究不同敲除小鼠品系中的ADCK。该测定允许在不同物种和动物模型中精确研究ADCK及其相关基因和FcγR。

[0208] 传统上,ADCC是通难处理的^{51}Cr释放测定测量的,但是已经开发出许多FACS方法来测量响应于不同抗原和抗体的ADCC。这些方法的统称是快速荧光ADCC(RFADCC)。在这些测定中,将靶细胞用持久性膜染料和活-死细胞标记物染色,所述活-死细胞标记物在凋亡开

始时消散。然后将ADCC活性测量为膜染料$^{+}$细胞(也是活-死细胞标记物$^{+}$)比例的减少。在类似的测定中,通过以吞噬荧光细胞为标记的巨噬细胞比例来测量ADCP。但是,如本文数据所示,ADCC和ADCP无法通过这些方法完全分开,因此在本文中统称为抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)。现有技术的测定还有一些其他的缺点,因为它们通常在选择抗体或效应细胞方面受到限制。Petro等人2015使用了类似的测定,但是HSV感染、复制并杀死靶细胞和效应细胞的能力限制了该测定用于研究免疫细胞及其FcγR的效用(Petro等人,2015)。

[0209] ΔgD-2是非补充细胞中的单周期病毒,最近被证明不会在体外诱导树突状细胞死亡。研究了明亮的荧光ΔgD-2株是否可以精确研究ADCK的细胞机制。使用RFADCK测定构建并开发了表达RFP的ΔgD-2(ΔgD-2::RFP)株,所述测定可精确测量巨噬细胞在体外对HSV-2ΔgD-2:RFP感染的细胞的效应活性。所述测定使用J774细胞、Raw 264.7巨噬细胞和骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)对永生细胞系和原代细胞系进行了验证。与当前的RFADCC测定不同,此方法可模拟感染环境,测量ADCC和ADCP两者,并且具有极大的灵活性,可使用多克隆动物血清以及不同的细胞系和小鼠品系。

[0210] 细胞系:将Vero细胞(CCL-81;ATCC,Manassas,VA)和VD60细胞(含有在内源基因启动子下的多拷贝gD-1的Vero细胞)在补充有5%胎牛血清(FBS,Gemini Bio-Products,West Sacramento,CA)和10U/ml青霉素以及10μg/ml硫酸链霉素(Thermo Fisher Scientific)的DMEM(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中传代。如先前所述,从C57Bl/6小鼠获得骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)。如果不立即使用,将骨髓前体保存在补充有50%FBS和10%DMSO的DMEM中(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)。使用来自L929细胞培养物(ATCC)的上清液分化小鼠BMDM。使用重组人M-CSF(BioLegend,San Diego,CA)分化豚鼠BMDM。将Raw264.7、J774.1和HEK 293细胞(ATCC)在补充有10%FBS和1%青霉素-链霉素(Pen-strep)的DMEM中传代。

[0211] ΔgD-2::RFP的创建和病毒繁殖。将HSV-2ΔgD:GFP(ΔgD-2)基因组DNA和含有40kB HSV-2基因组(其中US6基因被EF1α启动子下游的tdtomato取代)的粘粒DNA共转染VD60细胞。使用RFP表达作为同源重组的标记,将所得病毒噬菌斑纯化3次。通过PCR和测序验证了纯化的ΔgD-2::RFP病毒。

[0212] ΔgD-2和ΔgD-2::RFP在VD60细胞上繁殖,这可补充gD缺失并允许多轮复制。所有病毒株通过连续稀释滴定并在它们各自的细胞类型上繁殖。

[0213] 动物:使用获自Jackson实验室(JAX,Bar Harbor,ME)的4-6周龄的雌性C57BL/6小鼠获得血清。从JAX获得4-6周龄的雄性C57BL/6小鼠,并通过用补充有10%FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM冲洗其股骨,来分离骨髓细胞悬液。5-6周龄的雌性Hartley豚鼠购自Charles River实验室(Wilmington,MA)。通过用补充有10%FBS和1%Pen-strep的DMEM冲洗股骨和胫骨,来分离骨髓细胞悬液。通过皮下注射进行疫苗接种。所有程序均由阿尔伯特·爱因斯坦医学院的机构动物护理和使用委员会批准。

[0214] 免疫接种:通过皮下应用总体积200μL的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的$5x10^{6}$噬菌斑形成单位(PFU)的HSV-2ΔgD::RFP或等量的VD60细胞裂解物,来对6-8周龄的小鼠或豚鼠进行初免免疫接种。21天后,以相同剂量对动物进行加强免疫。

[0215] 抗体依赖性细胞杀伤测定:将骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)、J774.1巨噬细胞和Raw 264.7巨噬细胞在LPS(Sigma-Aldrich)中孵育12小时,然后与HEK293细胞(ATCC)共培养。根

据制造商的说明，将HEK 293细胞用PKH67膜(Sigma-Aldrich)和Tag-it Violet™(Biolegend)染料进行双重染色。在共培养前4小时，在无血清DMEM中用3MOI的HSV-2ΔgD::RFP感染HEK细胞。3.5小时后，去除感染培养基，并用1:5稀释的热灭活小鼠或豚鼠血清代替，所述血清在第40天从如前所述用HSV-2ΔgD::RFP或VD60细胞裂解物进行初免-加强免疫注射的小鼠中收集。将HEK 293T细胞在血清中在37℃孵育30分钟，然后添加到96孔组织培养板中的巨噬细胞培养物(Corning Inc,New York City,NY)。将共培养物孵育12小时，然后固定并在LSRII(BD Biosciences,Franklin Lakes,NJ)上通过流式细胞术进行分析。对于活细胞成像实验，将Raw264.7巨噬细胞和HEK 293细胞以10:1的比例在玻璃底96孔板(Matrical Bioscience,Spokane WA)上共培养，并使用具有反卷积的NIS Elements软件通过倒置NIKON Eclipse TiE显微镜成像。

[0216] 统计学分析：将数据在GraphPad Prism(GraphPad Software,Inc.,La Jolla,CA)中编译。使用图中注明的检验进行的统计学分析也使用GraphPad Prism进行。统计学显著性在图中表示为*，$p<0.5$；***，$p<0.001$。

[0217] 结果

[0218] 将rfp插入HSV-2ΔgD的US6不会改变病毒生长表型。用1感染复数(MOI)的HSV-2ΔgD-2::GFP感染Vero细胞，以确定GFP表达的动力学。使用荧光显微镜以将GFP表达可视化，所述GFP表达即使在感染后24小时仍很低(图14B)。我们在EF1α启动子下用RFP替换了ΔgD-2的US6基因座中的GFP，以创建ΔgD-2::RFP(图14A)。为了确定RFP表达的动力学，将非补充性Vero细胞用1MOI的HSV-2ΔgD-2::RFP或ΔgD-2感染。通过荧光显微镜的可视化显示，RFP表达在感染后4.5小时在ΔgD-2::RFP中开始，并持续增加直至感染后24小时(图14C)。相差成像显示，在Vero细胞中，用ΔgD-2::RFP进行的病毒感染与亲本ΔgD-2株的病毒感染相似(图14B和14C)。以3MOI的ΔgD-2::RFP感染在感染后12小时会在VD60中导致合胞体形成(图14E)，但在Vero细胞中不会(图14D)，这表明该病毒保持了其单周期复制表型。将pEF1α::RFP引入ΔgD-2::GFP的gD基因座可引起强烈的RFP表达，同时保持亲本ΔgD-2株的病毒动力学和单周期表型。

[0219] 接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清在RFADCK测定中诱导了明显的ADCK。为了测量由接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清引起的ADCK活性水平，基于以前的RFADCC测定开发了体外方案。将靶细胞HEK 293T用膜染料和活-死细胞标记物染色，并用3MOI的ΔgD-2::RFP感染。将感染的靶细胞孵育3.5小时，然后除去感染培养基，并添加培养基或小鼠血清再孵育30分钟。将感染的HEK 293T细胞与J774.1鼠巨噬细胞共培养12小时，所述J774.1鼠巨噬细胞在12小时前已经被LPS刺激。根据先前报道的测定，我们使用的效应细胞与靶细胞比率为10:1。以该比例，来自接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清诱导了大约70.5％的高度感染($RFP^{高}$)靶细胞的杀伤(图15B)。这明显高于在无血清的情况下的49.3％的杀伤($p<0.05$)。研究了是否只有$RFP^{高}$细胞会显著减少，因为模型中的RFP是病毒蛋白表达的替代物，并且这些蛋白表达水平更高的细胞将结合更多的抗体交联FcγR，从而启动ADCK。在两个处理组之间，$RFP^{中}$或$RFP^{中+高}$(总感染细胞)的杀伤没有显著差异(图15B)。感染的靶细胞被定义为在缺乏效应细胞的培养物中表达RFP的双阳性HEK293T细胞。$RFP^{高}$细胞被定义为表达RFP的细胞高于被感染靶细胞的平均强度。$RFP^{中}$细胞被定义为表达RFP低于平均强度的所有被感染的靶细胞(图15A)。

[0220] 与接种了对照细胞裂解物的小鼠的血清相比，在接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清存在下，ADCK显著增加。将感染的HEK 293细胞与接种了ΔgD-2::RFP或对照VD60细胞裂解物的小鼠的血清一起孵育，以确定由不同的永生化巨噬细胞系介导的杀伤是否是由抗原特异性ADCK引起的。对于每个处理组，将共培养16小时后的$RFP^{高}$细胞比例与缺乏血清的平行测定的相比较。在含有J774.1巨噬细胞的培养物中，来自接种了ΔgD-2::RFP的小鼠的血清比来自模拟接种VD60的小鼠的血清诱导了显著更多的对$RFP^{高}$细胞的杀伤($p<0.001$；图15C)。在含有Raw 264.7巨噬细胞的培养物中也观察到了类似的趋势($p=0.09$)。另外，对于J774.1和Raw 264.7巨噬细胞，在含有模拟接种VD60的小鼠血清的培养物中测得的ADCK与缺乏血清的培养物没有区别(平均百分比差＝-5.9±7.6，-0.3±3.5)。这表明非特异性抗体在我们的测定中不诱导杀伤。这些结果证实，在RFADCK测定中测量的ADCK是通过接种ΔgD-2::RFP引起的HSV特异性抗体的结果。

[0221] 通过ADCK测定的活细胞成像跟踪感染的细胞表明，细胞毒性和吞噬作用不是相互排斥的。如上所述进行ADCK测定，不同之处在于使用玻璃底96孔板，并且效应细胞是Raw 264.7鼠巨噬细胞，其已经显示出执行相似量的ADCC和ADCP。在去卷积显微镜上大约每15分钟将所述测定以60x的放大率成像，持续24小时。被感染的细胞是RFP^{+}。未感染的HEK293细胞是高度膜标记物$^{+}$(Mem^{+})和活/死细胞标记物$^{+}$($Live/Dead^{+}$)的。巨噬细胞未染色。图15A显示在指示的时间点观察到巨噬细胞对感染细胞的不同类型的细胞杀伤(白色箭头)：随着时间，巨噬细胞(*)聚集在左边感染的细胞周围，而右边感染的细胞在4.5小时观察到凋亡性起泡。这些产生的泡被巨噬细胞快速吞噬，巨噬细胞在7.5小时观察到RFP发出荧光。该受感染细胞的受控凋亡表明已经发生ADCC，但是巨噬细胞的吞噬作用和随后的荧光将通过流式分析进行测量，作为ADCP。捕获的感染细胞总数很低，这导致较高的变异性(n＝58个感染细胞/组)，但是对来自三个实验的影片中的感染细胞的杀伤的定量显示，在Raw 264.7巨噬细胞存在下的平均ADCK与之前通过RFADCK测定所测量的相似(平均$_{RFADCK}$＝18.8％，平均$_{影片}$＝18.5％杀伤；图15C，16B)。

[0222] 骨髓来源的巨噬细胞的ADCK活性是FcγR依赖性的。使用野生型和$Fc\gamma R^{-/-}$小鼠的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)进行RFADCK测定，以确定观察到的ADCK是否为FcγR依赖性的。ADCK活性被定义为与来自模拟接种VD60裂解物的小鼠血清的平行培养物相比，$RFP^{高}$细胞的减少。在效应细胞与靶细胞的比例为10:1的情况下，在接种HSV-2ΔgD-2::RFP的小鼠血清存在下，野生型BMDM比$Fc\gamma R^{-/-}$BMDM明显杀伤了更多的被感染靶细胞($p<0.05$；图17A)。此外，在接种HSV-2ΔgD-2::RFP的小鼠血清存在下，$Fc\gamma R^{-/-}$BMDM对$RFP^{高}$细胞的杀伤与在模拟接种VD60裂解物的小鼠血清存在下的杀伤没有区别(平均百分比差＝3.6±4.0)，这表明在我们的测定中测得的ADCK活性完全依赖FcγR。

[0223] 使用豚鼠骨髓来源的巨噬细胞的RFADCK概括了鼠的结果。为了确定另一物种的效应细胞在我们的测定中进行ADCK的能力，将豚鼠BMDM与ΔgD-2::RFP感染的HEK 293细胞在接种了ΔgD-2的、模拟接种VD60裂解物的或幼稚豚鼠的血清存在下共培养。将在包含来自幼稚动物血清的平行共培养物中的$RFP^{高}$细胞的杀伤用作基线。在来自接种了ΔgD-2的动物的血清存在下，豚鼠BMDM进行了显著的ADCK($p<0.001$；图17B)。

[0224] 抗PR8 IgG同种型ELISA。对小鼠皮下注射ΔgD-2::RFP、表达全长PR8血凝素的ΔgD-2(FL nOP，β3x4)、表达无头PR8血凝素的ΔgD-2(HL nOP，β3x5)或对HSV-2(G)进行了密

码子优化的表达无头PR8血凝素的ΔgD-2(HL OPT,β3x6),或用VD60细胞裂解物进行了模拟接种。5只小鼠/组分别用每种处理进行了初免-加强免疫接种。(见图20)。用FL nOP对5只小鼠进行初免免疫接种并用HL nOP进行加强免疫接种。在每种情况下,每次注射均给予$5x10^6$ PFU的病毒。在第30天(加强免疫后9天),给小鼠放血并收集血清。然后运行酶联免疫吸附测定(ELISA),以检查针对纯化的PR8 HA的抗体或被HSV-2 4674感染的Vero细胞。用FL nOP初免-加强免疫接种的小鼠或用FL nOP初免免疫接种并用HL nOP加强免疫接种的小鼠产生了针对PR8 HA的IgG1和IgG2c抗体。没有其他组形成抗PR8 IgG抗体。除VD60裂解物组外,所有组均产生相似且高滴度的抗HSV IgG。所有疫苗株均诱导产生抗HSV IgG抗HSV IgG。

[0225] 实施例4

[0226] 接种了ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠受到完全保护而免受PR8的攻击。小鼠间隔3周以$5x10^6$ PFU的ΔgD-2::RFP或ΔgD-2::HA_{PR8}进行皮下初免-加强免疫接种或用VD60细胞裂解物进行模拟接种。加强免疫接种后一周对小鼠放血,并测量针对A/波多黎各/1934/8IAV(PR8)的血清中和滴度。(参见图21A)用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠针对PR8产生了显著的中和抗体滴度(平均值=304)。虚线表示所述测定的检测极限。加强免疫接种后三周,用6xLD_{50}的PR8株鼻内攻击小鼠。当小鼠达到其初始重量的75%时将其牺牲。如图21B和21C所示,用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠受到完全保护而免受PR8攻击,而接受对照接种的小鼠在第9天之前都死于感染。

[0227] 重组gD-2::HA_{PR8}表达高水平的PR8蛋白。为了评估表达,将ΔgD-2::RFP gDNA与含有血凝素(HA)基因的HA表达盒一起共转染到VD60细胞中,所述血凝素(HA)基因来自IMV H1N1株A/波多黎各/1934/8(PR8),位于表达盒的P_{CMV}下游和聚腺苷酸化信号上游,如图22A所示。如图22B所示,在感染了3MOI的ΔgD-2、ΔgD-2::HA_{PR8}或含截短版本的PR8 HA表达盒的ΔgD-2(ΔgD-2::HL HA_{PR8})的Vero和VD60细胞中,通过流式细胞术测量了细胞外和细胞内HA表达。

[0228] 用gD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生高滴度的功能性和同种型转换的抗PR8抗体。将小鼠间隔21天以VD60细胞裂解物、ΔgD-2::RFP载体或ΔgD-2::HA_{PR8}进行初免-加强免疫接种(每组5只小鼠)。初免接种后第28天,收集血清用于分析。通过ELISA测量针对纯化的HA PR8蛋白的抗PR8抗体。用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生了同种型转换抗PR8 HA抗体,其主要是IgG2c和IgG2b。(参见图23A-23E)与用ΔgD-2免疫的小鼠的血清相比,用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠的血清诱导了明显的血凝抑制($p<0.001$;平均值$_{HAI滴度}$=80)。(参见图23F)用ΔgD-2::RFP免疫的小鼠未产生任何血凝抑制抗体。

[0229] 用gD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生了针对IAV攻击的保护作用。将小鼠间隔21天用VD60细胞裂解物、ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}进行初免-加强免疫,在初免后第28天放血,并在14天后用6x LD_{50}的IAV进行鼻内攻击。在达到起始重量的70%后牺牲小鼠,并使用微量中和测定针对各株测量中和滴度。如图24A-24C所示,用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠针对PR8产生明显的中和滴度(平均滴度$_{PR8}$=1:304;$p_{VD60}<0.01$;$p_{\Delta gD-2}<0.05$;n=10只小鼠/组)。用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠受到完全保护而免于PR8攻击后的体重损失和死亡($p<0.001$;n=5只小鼠/组)。如图24D-24F所示,用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠产生了针对A/加利福尼亚/2009H1N1(A/Cal/2009)IAV的重要中和抗体(平均滴度$_{A/Cal}$=26;$p_{VD60}<0.01$ $p_{\Delta gD-2}$=0.1;n=10只小鼠/组)。用ΔgD::HA_{PR8}免疫的小鼠受到部分保护而免于A/Cal/2009攻击后的体重损

失和死亡($p<0.05$,n＝15只小鼠/组)。如图24G-24I所示,用ΔgD-2::HA_{PR8}、ΔgD-2::RFP或VD60细胞裂解物免疫的小鼠未产生针对A/Victoria/3/75H3N2(A/Vic)和A/Aichi/68H3N2(X-31)的中和抗体滴度,并且没有受到保护而使其免于攻击后的体重损失和死亡($n_{中和}$＝10只小鼠/组;$n_{A/Vic}$攻击＝15只小鼠/组;n_{X-31}攻击＝5只小鼠/组)。

[0230] 用ΔgD-2::HA_{PR8}免疫的小鼠针对HSV-2产生完全保护性的ADCC免疫。将小鼠间隔21天以VD60细胞裂解物、ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}进行初免-加强免疫接种(每组5只小鼠)。在图25A和25B中,在加强免疫后1周将小鼠放血,并通过ELISA分析血清。接受ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠产生了类似高水平的HSV特异的IgG(图25A)。另外,这些IgG主要是IgG2c。在图25C中,使用与图25A和25B中相同的血清进行快速荧光抗体依赖性细胞介导的杀伤(RFADCK)测定。与给予了VD60细胞裂解物的小鼠血清相比,接种了ΔgD-2或ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠的血清在J774.1巨噬细胞和ΔgD-2感染的细胞存在下引发了显著的ADCK活性($p<0.01$)。由接种了ΔgD-2和ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠的血清引起的ADCK活性之间没有差异。加强免疫后21天,用10x LD_{90}的HSV-24674通过皮肤划痕攻击小鼠。接受VD60细胞裂解物的小鼠到第10天死于HSV-2,并出现明显的上皮和神经系统疾病。接受ΔgD-2和ΔgD-2::HA_{PR8}的小鼠受到完全保护,而免于攻击后的发病和死亡。(参见图25D-25F)

[0231] mFcγRIVADCC报告子生物测定应答。将收集自接种了ΔgD-2::HA、ΔgD-2::RFP和灭活的A/波多黎各/8/1934H1N1病毒(PR8)的小鼠的血清样品进行系列稀释,并进行mFcγRIV ADCC报告子生物测定。将感染PR8病毒的犬肾传代(MDCK)细胞用作靶细胞,将表达mFcγRIV的Jurkat T细胞用作效应细胞。将靶细胞与连续稀释的血清样本和效应细胞一起孵育。加入Bio-GloTM试剂,并测量发光。与接种ΔgD-2::RFP和灭活的PR8病毒的小鼠相比,接种HSV-2ΔgD::HA的小鼠在测试的每种稀释度下都显示了明显更高的mFcγRIV受体的活化。(参见图26)

[0232] 实施例5

[0233] HIV-1Env在含有HSV-2基因的pBkk412质粒中的克隆。从获得自NIH艾滋病试剂项目的质粒ZM109F.PB4(图27)PCR扩增了全长HIV-1Env(进化枝C)和Rev基因以及部分Nef基因。

[0234] 使用RE sbf I和blp I,将也包含bGH polyA信号和T7启动子的PCR片段产物克隆到pBkk412质粒的多克隆位点(MCS)中,处于CMV启动子的控制下。(参见图28)

[0235] 将稳定的感受态大肠杆菌细胞转化,并在琼脂+羧苄青霉素上铺板。使用PCR筛选存在插入物的菌落(图29A),并将其用于制备用于分析的DNA。通过PCR扩增DNA,并选择具有正确大小的克隆(CL 15-6和CL 26-11)用于瞬时转染以评估HIV-1蛋白表达。(图29B)

[0236] 一旦确认了HIV蛋白在转染细胞中表达,就将细胞与线性重组质粒和HSVΔgD-2阴性病毒(例如ΔgD-2::RFP、ΔgD-2::GFP)共转染并选择表达HIV蛋白而不表达GFP或RFP标记物的重组体。由新的重组病毒表达的HIV蛋白将通过Western印迹或流式细胞术(FACS)进行评估。将对小鼠进行肌内免疫(初免免疫和加强免疫),并收集血清并筛选是否存在HIV特异性抗体。抗体的功能(例如中和和非中和功能)也将被测量。使小鼠易受HIV感染的人源化小鼠模型也将用于评估疫苗是否保护小鼠免受HIV感染。

[0237] 以下列出的是本文公开的工艺、重组病毒和方法的一些实施方案。

[0238] 实施方案1:一种用于生产针对异源抗原的疫苗载体的工艺,所述工艺包括:a)提

供HSV-2基因组，其包括：(i)编码HSV-2糖蛋白D的基因的完全或部分缺失，和(ii)包含启动子-FP构建体的核酸，其中FP是编码荧光蛋白的核酸；b)用(i)a)的HSV-2基因组和(ii)编码异源抗原的线性DNA片段共转染宿主细胞，所述共转染在所述HSV-2基因组和所述DNA片段之间发生等位基因重组的条件下进行；c)筛选由b)产生的噬菌斑，以鉴定在引发荧光蛋白荧光的激发光下不显示荧光的噬菌斑；d)从c)中不显示荧光的那些噬菌斑中回收重组HSV-2病毒或病毒粒子，以获得针对异源抗原的疫苗载体。

[0239] 实施方案2：根据实施方案1所述的工艺，其中所述宿主细胞是HSV-1糖蛋白D补充细胞。

[0240] 实施方案3：根据实施方案1或实施方案2所述的工艺，其中所述启动子-FP构建体的启动子是异源启动子。

[0241] 实施方案4：根据实施方案1-3中的任一项所述的工艺，其中所述共转染通过电穿孔进行。

[0242] 实施方案5：根据实施方案1-4中的任一项所述的工艺，其中所述荧光蛋白是红色荧光蛋白(RFP)。

[0243] 实施方案6：根据实施方案1-5中的任一项所述的工艺，其中使用以下共转染所述宿主细胞：(i)a)的HSV-2基因组和(ii)线性DNA片段，所述线性DNA片段依次编码(i)HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构异域、HSV-2gD胞质结构域，但不编码HSV-2gD胞外结构域，或依次编码(ii)HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的胞质结构域。

[0244] 实施方案7：根据实施方案1-5中的任一项所述的工艺，其中使用以下共转染所述宿主细胞：(i)a)的HSV-2基因组和(ii)线性DNA片段，所述线性DNA片段依次编码(i)启动子、异源抗原以及任选的poly-A信号。

[0245] 实施方案8：根据实施方案1-7中的任一项所述的工艺，其中所述异源抗原是流感抗原。

[0246] 实施方案9：根据实施方案1-8中的任一项所述的工艺，其中所述异源抗原是流感血凝素(HA)抗原。

[0247] 实施方案10：根据实施方案9所述的工艺，其中所述HA抗原是全长HA胞外结构域或是HA茎。

[0248] 实施方案11：根据实施方案1-7中的任一项所述的工艺，其中所述异源抗原是HIV抗原。

[0249] 实施方案12：根据实施方案11所述的工艺，其中所述HIV抗原是Env gp145。

[0250] 实施方案13：根据实施方案1-12中的任一项所述的工艺，其中所述异源抗原在上游CMV启动子的控制下并且具有下游SV40 poly-A信号。

[0251] 实施方案14：根据实施方案1-13中的任一项所述的工艺，其中所述启动子是延伸因子1α基因的启动子($P_{EF1\alpha}$)，并且其中$P_{EF1\alpha}$和FP融合在一起($P_{EF1\alpha}$-FP)。

[0252] 实施方案15：一种疫苗载体或一种重组单纯疱疹病毒-2(HSV-2)，其包含编码异源抗原的基因组，并由如实施方案1-14中的任一项所述的工艺制备。

[0253] 实施方案16：一种重组单纯疱疹病毒-2(HSV-2)，其包含：(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的完全缺失；和(ii)(a)线性DNA片段，其编码启动子、异源抗原信号序列和异源抗原，或(b)编码启动子和异源抗原。

[0254] 实施方案17:一种重组单纯疱疹病毒-2(HSV-2),其包含:(i)HSV-2糖蛋白D编码基因在其基因组中的部分缺失和(ii)(a)线性DNA片段,其依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原、HSV-2gD跨膜结构域,任选地,HSV-2gD胞质结构域,但不编码HSV-2gD胞外结构域,或(b)线性DNA片段,其依次编码HSV-2gD信号序列、异源抗原和HSV-2gD的跨膜胞质尾区。

[0255] 实施方案18:根据实施方案16或17所述的重组HSV-2,其进一步包括在其脂质双层上的寄生虫表面糖蛋白,其中所述寄生虫是哺乳动物的寄生虫。

[0256] 实施方案19:根据实施方案16-18中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述HSV-2糖蛋白D编码基因是HSV-2U_S6基因。

[0257] 实施方案20:根据实施方案16-19中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述异源抗原是流感抗原。

[0258] 实施方案21:根据实施方案16-20中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述异源抗原是血凝素(HA)抗原。

[0259] 实施方案22:根据实施方案21所述的重组HSV-2,其中所述HA抗原是全长HA胞外结构域或是HA茎。

[0260] 实施方案23:根据实施方案16-19中的任一项所述的重组HSV-2,其中所述异源抗原是HIV抗原。

[0261] 实施方案24:根据实施方案23所述的重组HSV-2,其中所述HIV抗原是Env gp145。

[0262] 实施方案25:一种细胞,其在其中包含如实施方案16-24中的任一项所述的重组病毒,其中所述细胞不存在于人类中。

[0263] 实施方案26:一种疫苗组合物,其包含如实施方案16-24中的任一项所述的重组病毒。

[0264] 实施方案27:一种药物组合物,其包含如实施方案16-24中的任一项所述的病毒和药学上可接受的载体。

[0265] 实施方案28:一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案16-24中的任一项所述的重组病毒,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0266] 实施方案29:一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案26所述的疫苗,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0267] 实施方案30:一种引发和/或增强受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案27所述的药物组合物,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0268] 实施方案31:一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案16-22中的任一项所述的重组病毒,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

[0269] 实施方案32:一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案26所述的疫苗,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

[0270] 实施方案33:一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的

方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案27所述的药物组合物,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

[0271] 实施方案34:一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案16-19、23或24中的任一项所述的重组病毒,其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

[0272] 实施方案35:一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案26所述的疫苗,其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

[0273] 实施方案36:一种治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案27所述的药物组合物,其量可有效治疗受试者中的HIV感染或降低受试者中HIV感染的可能性。

[0274] 实施方案37:一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案16-22中的任一项所述的重组病毒,其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0275] 实施方案38:一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案26所述的疫苗,其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0276] 实施方案39:一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案27所述的药物组合物,其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0277] 实施方案40:一种针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案16-19、23或24中的任一项所述的重组病毒,其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0278] 实施方案41:一种针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案26所述的疫苗,其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0279] 实施方案42:一种针对HIV感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如实施方案27所述的药物组合物,其量在针对HIV感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0280] 实施方案43:一种引发和/或增强受试者中免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),所述重组单纯疱疹病毒2通过如实施方案1-14中的任一项所述的工艺制备并且包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原,其量可有效引发和/或增强受试者中的免疫应答。

[0281] 实施方案44:一种治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的重组单纯疱疹病毒2(HSV-2),所述重组单纯疱疹病毒2通过如实施方案1-13中的任一项所述的工艺制备并且包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原,其量可有效治疗受试者中的流感感染或降低受试者中流感感染的可能性。

[0282] 实施方案45:一种针对流感感染为受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的重组单纯疱疹病毒2,所述重组单纯疱疹病毒2通过如实施方案1-14中的任一项所述的工艺制备并且包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、流感血凝素(HA)抗原信号序列和HA抗原,其量在针对流感感染为受试者接种疫苗方面是有效的。

[0283] 实施方案46:根据实施方案43-45中的任一项所述的方法,其中所述HA抗原是全长HA胞外结构域。

[0284] 实施方案47:根据实施方案46所述的方法,其进一步包括,在最初施用编码全长HA胞外结构域的重组单纯疱疹病毒2之后,施用一种或多种量的如下的重组单纯疱疹病毒2,所述重组单纯疱疹病毒2包括(i)其基因组中HSV-2糖蛋白D编码基因的完全缺失以及(ii)编码启动子、HA抗原信号序列和HA茎,但不编码全长HA。

[0285] 实施方案48:根据实施方案28-47中的任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

[0286] 实施方案49:一种定量细胞群中抗体依赖性细胞介导的杀伤(ADCK)的速率或数量的方法,所述方法包括:在允许荧光蛋白在细胞中表达的条件下,用表达荧光蛋白的重组HSV-2感染细胞群中的多个细胞,所述重组HSV-2包含缺失编码HSV-2gD的基因的基因组;使多个被感染的细胞与含有抗体的溶液和免疫细胞群接触,并在一个或多个时间点定量显示荧光蛋白荧光和任选的一种或多种标记物的多个感染细胞的数量,以便随时间定量活的被感染的细胞的数量,从而定量细胞群中ADCK的速率或数量。

[0287] 实施方案50:根据实施方案49所述的方法,其中所述方法在体外进行。

[0288] 实施方案51:根据实施方案49或50所述的方法,其中所述免疫细胞群包括巨噬细胞。

[0289] 实施方案52:根据实施方案49-51中的任一项所述的方法,其中所述含有抗体的溶液包含血清。

[0290] 实施方案53:根据实施方案49-51中的任一项所述的方法,其中所述荧光蛋白是红色荧光蛋白。

[0291] 实施方案54:根据实施方案49-53中的任一项所述的方法,其中显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的多个被感染细胞的数量通过荧光激活细胞分选(FACS)来测量。

[0292] 实施方案55:根据实施方案49-55中的任一项所述的方法,其中所述至少一种标记物包括细胞膜标记物、活/死细胞标记物或其组合。

[0293] 实施方案56:根据实施方案49-55中的任一项所述的方法,其进一步包括在一个或多个时间点,在被感染的细胞的对照细胞群中定量显示荧光蛋白荧光和任选地一种或多种标记物的细胞的数量,所述对照细胞群在其他方面相同但未与含有抗体的溶液接触,并将所定量的数量或速率与对于与含有抗体的溶液接触的细胞群所定量的数量或速率进行比较。

[0294] 实施方案57:根据实施方案49-56中的任一项所述的方法,其中免疫细胞群的效应细胞:靶细胞比率为5:1或更高。

[0295] 实施方案58:根据实施方案49-57中的任一项所述的方法,其中所述重组HSV-2通

过如实施方案1-14中任一项所述的工艺制备。

[0296] 在整个申请中,参考了各种出版物。这些参考文献的完整引用可以在本说明书的末尾找到。这些出版物的公开内容,以及本文中提及的所有专利、专利申请出版物和书籍,通过引用整体并入本申请,以更充分地描述本发明所属的领域。

[0297] 本领域的技术人员将容易理解,如在随后的权利要求中更充分地描述的,以上讨论的特定方法和结果仅是对本发明的说明。

[0298] 参考文献

[0299] Bouvier,N.M.和A.C.Lowen(2010)."Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission."Viruses 2(8):1530-1563。

[0300] Cheshenko,N.,J.B.Trepanier,M.Stefanidou,N.Buckley,P.Gonzalez,W.Jacobs和B.C.Herold(2013)."HSV activates Akt to trigger calcium release and promote viral entry:novel candidate target for treatment and suppression."FASEB J 27(7):2584-2599。

[0301] Eisenberg,R.J.,D.Long,R.Hogue-Angeletti和G.H.Cohen(1984)."Amino-terminal sequence of glycoprotein D of herpes simplex virus types 1 and 2."J Virol 49(1):265-268。

[0302] Gibson,D.G.,L.Young,R.Y.Chuang,J.C.Venter,C.A.Hutchison,3rd和H.O.Smith(2009)."Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases."Nat Methods 6(5):343-345。

[0303] Haynes,B.F.,P.B.Gilbert,M.J.McElrath,S.Zolla-Pazner,G.D.Tomaras,S.M.Alam,D.T.Evans,D.C.Montefiori,C.Karnasuta,R.Sutthent,H.X.Liao,A.L.DeVico,G.K.Lewis,C.Williams,A.Pinter,Y.Fong,H.Janes,A.DeCamp,Y.Huang,M.Rao,E.Billings,N.Karasavvas,M.L.Robb,V.Ngauy,M.S.de Souza,R.Paris,G.Ferrari,R.T.Bailer,K.A.Soderberg,C.Andrews,P.W.Berman,N.Frahm,S.C.De Rosa,M.D.Alpert,N.L.Yates,X.Shen,R.A.Koup,P.Pitisuttithum,J.Kaewkungwal,S.Nitayaphan,S.Rerks-Ngarm,N.L.Michael和J.H.Kim(2012)."Immune-correlates analysis of an HIV-1vaccine efficacy trial."N Engl J Med 366(14):1275-1286。

[0304] He,W.,G.S.Tan,C.E.Mullarkey,A.J.Lee,M.M.Lam,F.Krammer,C.Henry,P.C.Wilson,A.A.Ashkar,P.Palese和M.S.Miller(2016)."Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus."Proc Natl Acad Sci U S A 113(42):11931-11936。

[0305] Jegaskanda S.,P.C.R.,和Stephen J.Kent(2014)."Influenza-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity:Toward a Universal Influenza Vaccine."The Journal of Immunology。

[0306] Liao,H.X.,R.Lynch,T.Zhou,F.Gao,S.M.Alam,S.D.Boyd,A.Z.Fire,K.M.Roskin,C.A.Schramm,Z.Zhang,J.Zhu,L.Shapiro,N.C.S.Program,J.C.Mullikin,S.Gnanakaran,P.Hraber,K.Wiehe,G.Kelsoe,G.Yang,S.M.Xia,D.C.Montefiori,R.Parks,K.E.Lloyd,R.M.Scearce,K.A.Soderberg,M.Cohen,G.Kamanga,M.K.Louder,L.M.Tran,Y.Chen,F.Cai,S.Chen,S.Moquin,X.Du,M.G.Joyce,S.Srivatsan,B.Zhang,A.Zheng,G.M.Shaw,B.H.Hahn,

T.B.Kepler,B.T.Korber,P.D.Kwong,J.R.Mascola和B.F.Haynes(2013)."Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1antibody and founder virus."Nature 496(7446):469-476。

[0307] Mullarkey,C.E.,M.J.Bailey,D.A.Golubeva,G.S.Tan,R.Nachbagauer,W.He,K.E.Novakowski,D.M.Bowdish,M.S.Miller和P.Palese(2016)."Broadly Neutralizing Hemagglutinin Stalk-Specific Antibodies Induce Potent Phagocytosis of Immune Complexes by Neutrophils in an Fc-Dependent Manner."MBio 7(5)。

[0308] Nicola,A.V.,S.H.Willis,N.N.Naidoo,R.J.Eisenberg和G.H.Cohen(1996)."Structure-function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D."J Virol 70(6):3815-3822。

[0309] Osterholm,M.T.,N.S.Kelley,A.Sommer和E.A.Belongia(2012)."Efficacy and effectiveness of influenza vaccines:a systematic review and meta-analysis."Lancet Infect Dis 12(1):36-44。

[0310] Petro,C.,P.A.Gonzalez,N.Cheshenko,T.Jandl,N.Khajoueinejad,A.Benard,M.Sengupta,B.C.Herold和W.R.Jacobs(2015)."Herpes simplex type 2virus deleted in glycoprotein D protects against vaginal,skin and neural disease."Elife 4。

[0311] Petro,C.D.,B.Weinrick,N.Khajoueinejad,C.Burn,R.Sellers,W.R.Jacobs,Jr.和B.C.Herold(2016)."HSV-2DeltagD elicits FcgammaR-effector antibodies that protect against clinical isolates."JCI Insight 1(12)。

[0312] Wang,B.Z.,W.Liu,S.M.Kang,M.Alam,C.Huang,L.Ye,Y.Sun,Y.Li,D.L.Kothe,P.Pushko,T.Dokland,B.F.Haynes,G.Smith,B.H.Hahn和R.W.Compans(2007)."Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus-like particles."J Virol 81(20):10869-10878。

[0313] Wohlbold,T.J.,R.Nachbagauer,I.Margine,G.S.Tan,A.Hirsh和F.Krammer(2015)."Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses."Vaccine 33(29):3314-3321。

序列表

<110> 阿尔伯特爱因斯坦医学院

<120> HSV-2-DELTA-gD疫苗及其生产和使用方法

<130> EIC0003PCT

<150> US62/665,050

<151> 2018-05-01

<160> 20

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> HSV-2

<400> 1

Met Gly Arg Leu Thr Ser Gly Val Gly Thr Ala Ala Leu Leu Val Val
1 5 10 15
Ala Val Gly Leu Arg Val Val Cys Ala Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Pro
20 25 30
Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu Pro
35 40 45
Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Lys Arg Val Tyr His
50 55 60
Ile Gln Pro Ser Leu Glu Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Ile Pro Ile
65 70 75 80
Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu
85 90 95
His Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Asp Glu
100 105 110
Ala Arg Lys His Thr Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Met Gly
115 120 125
Asp Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Pro
130 135 140
Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe
165 170 175
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

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> 2
<211> 580
<212> PRT
<213> 流感
<400> 2

Met Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Asp
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly

65 70 75 80
Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95
Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110
Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn
130 135 140
Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser
145 150 155 160
Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro
165 170 175
Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190
Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Asn Ile
195 200 205
Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn
210 215 220
Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240
Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr
245 250 255
Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270
Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser
275 280 285
Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn
290 295 300
Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
305 310 315 320
Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
325 330 335
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400
Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys
405 410 415
Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430
Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
435 440 445
Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460
Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480
Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
485 490 495
Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
500 505 510
Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr
515 520 525
Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
530 535 540
Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560
Gln Cys Arg Ile Cys Ile Asp Asn Phe Arg Asn Met Arg Lys Asn Thr
565 570 575
Leu Val Ser Thr
580

<210> 3
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Fwd-pCMV, 正向引物
<400> 3
tttttttcc aagaaatgga ggcctacccg ggttgacatt gattattgac tagttattaa 60
tagtaatc 68

<210> 4
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Rev-NeoR-Term, 引物
<400> 4
ttttttttcc aatctatgga gccccagctg gttctttcc 39
<210> 5
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Fwd-Origin, 正向引物
<400> 5
ttttttttcc aatttatggg ctgggctgtg tgcacgaacc 40
<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Rev-AmpR, 反向引物
<400> 6
ttttttttcc aaaagatggg cagcgcaaaa cgcctaaccc taag 44
<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> LL-V91I-US6, 引物
<400> 7
ttttttttcc ataaattgga aagggaacag cgaccaaatg tcac 44
<210> 8
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> LR-V91I-US6, 引物
<400> 8
ttttttttcc atttcttggt gatacgcgat gcacacgaaa aacg 44
<210> 9
<211> 38
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> RL-V91I-US6, 引物
<400> 9
tttttttcc atagattggt tccccgctcc cgtgtacc 38
<210> 10
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RR-V91I-US6, 引物
<400> 10
tttttttcc atcttttggc gggggcgcct gtatcgg 37
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Neo-Out, 引物
<400> 11
gtataccgtc gacctctagc 20
<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> US8-Out, 引物
<400> 12
ggtgacttgg tgcgccgcc 19
<210> 13
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR片段, 正链
<400> 13
cgggttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 40
<210> 14
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR片段，负链
<400> 14
agccccagct ggttctttcc 20
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR产物，正链
<400> 15
gctgggctgt gtgcacgaac c 21
<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR产物，负链
<400> 16
gcagcgcaaa acgcctaacc ctaag 25
<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR产物，正链
<400> 17
aaagggaaca gcgaccaaat gtcac 25
<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR产物，负链
<400> 18
tgatacgcga tgcacacgaa aaacg 25
<210> 19

<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR产物，正链
<400> 19
ttccccgctc ccgtgtacc 19
<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> PCR产物，负链
<400> 20
cgggggcgcc tgtatcgg 18

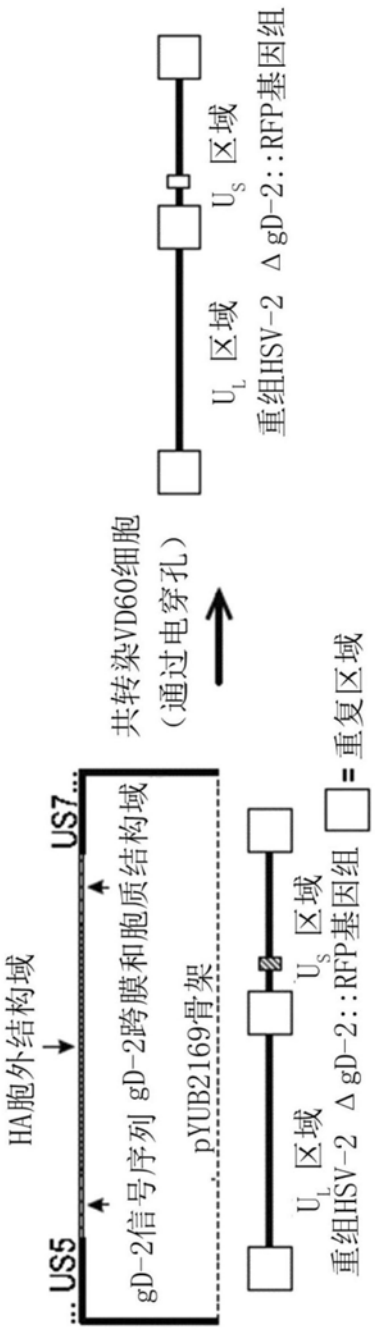

HA胞外结构域
US5
US7
gD-2信号序列 gD-2跨膜和胞质结构域
pYUB2169骨架
共转染VD60细胞
（通过电穿孔）
U_L 区域
U_S 区域
重组HSV-2 Δ gD-2::RFP基因组
= 重复区域

图1A

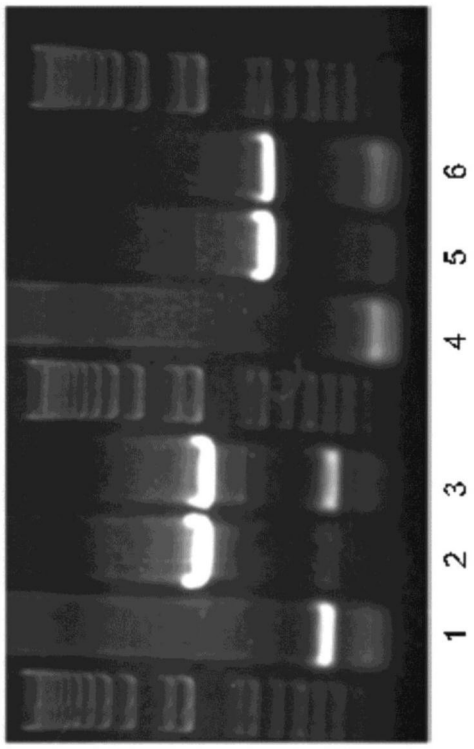


图1B

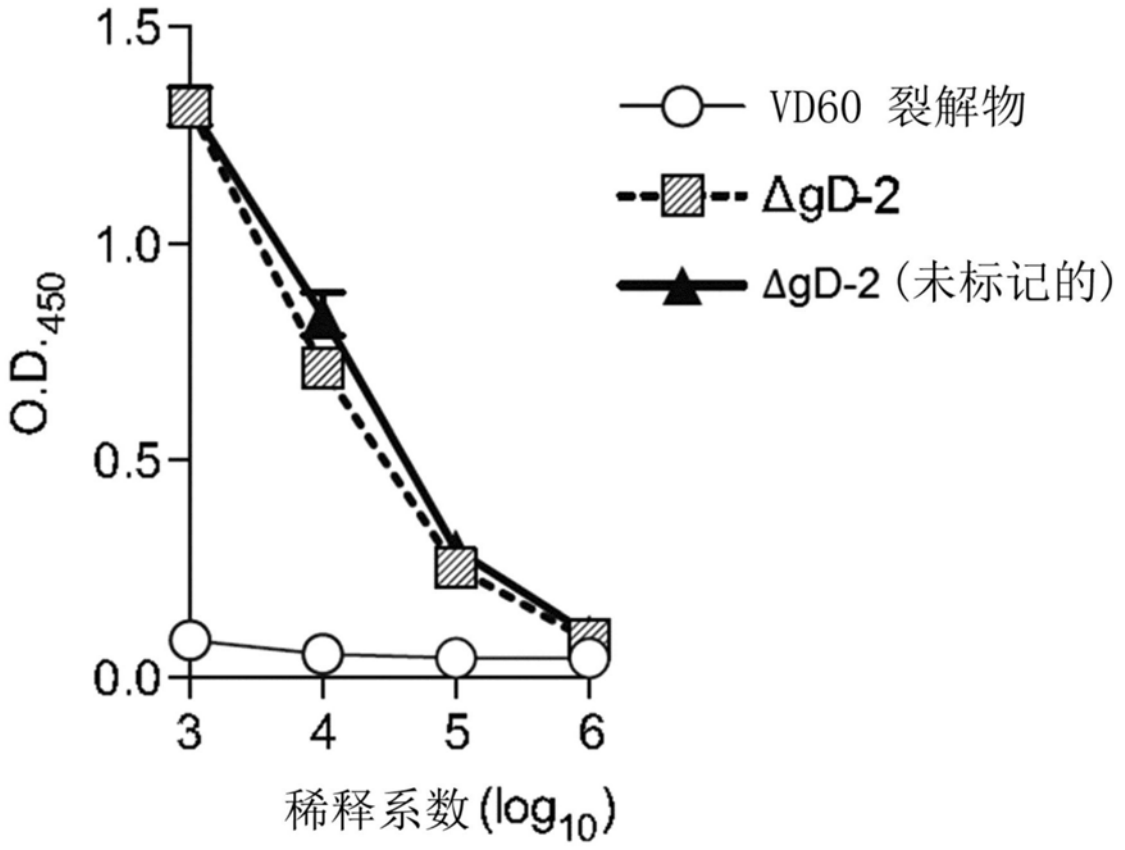


图2

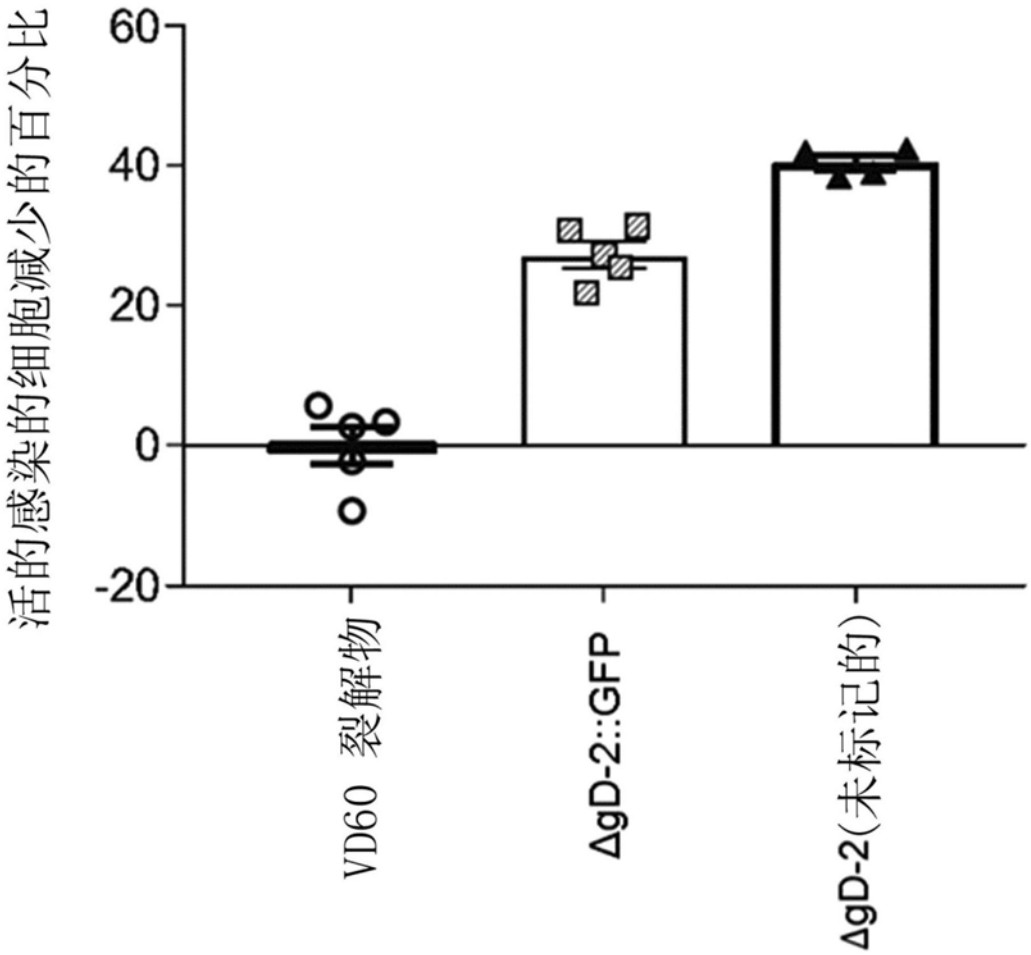

活的感染的细胞减少的百分比
60
40
20
0
-20
VD60 裂解物
ΔgD-2::GFP
ΔgD-2(未标记的)

图3

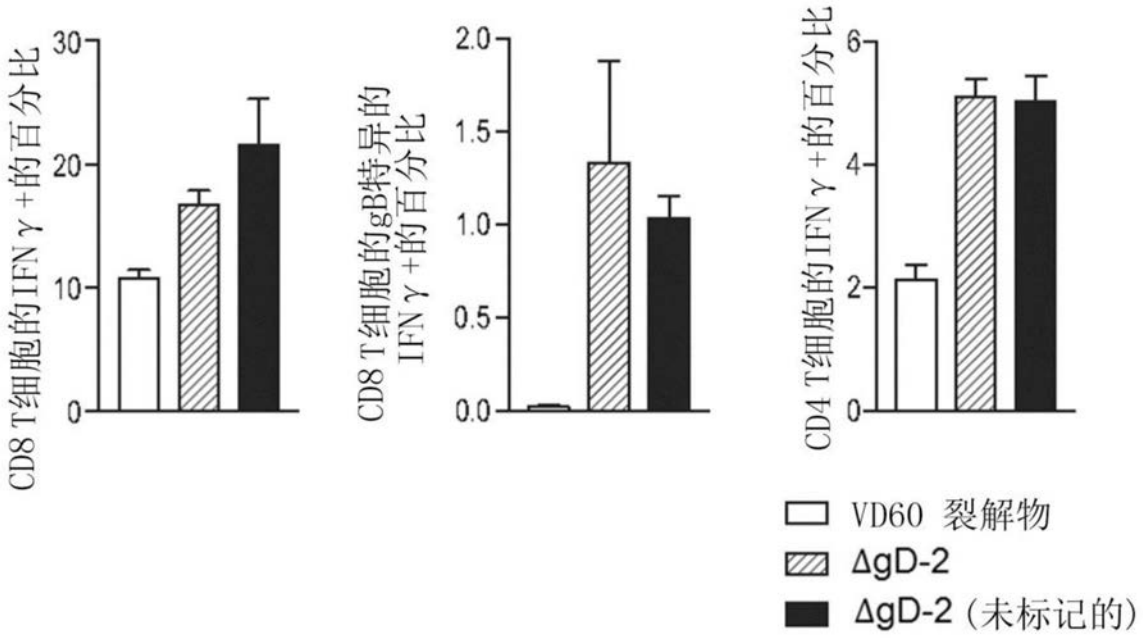

CD8 T细胞的IFNγ+的百分比
30
20
10
0
CD8 T细胞的gB特异的IFNγ+的百分比
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CD4 T细胞的IFNγ+的百分比
6
4
2
0
VD60 裂解物
ΔgD-2
ΔgD-2 (未标记的)

图4

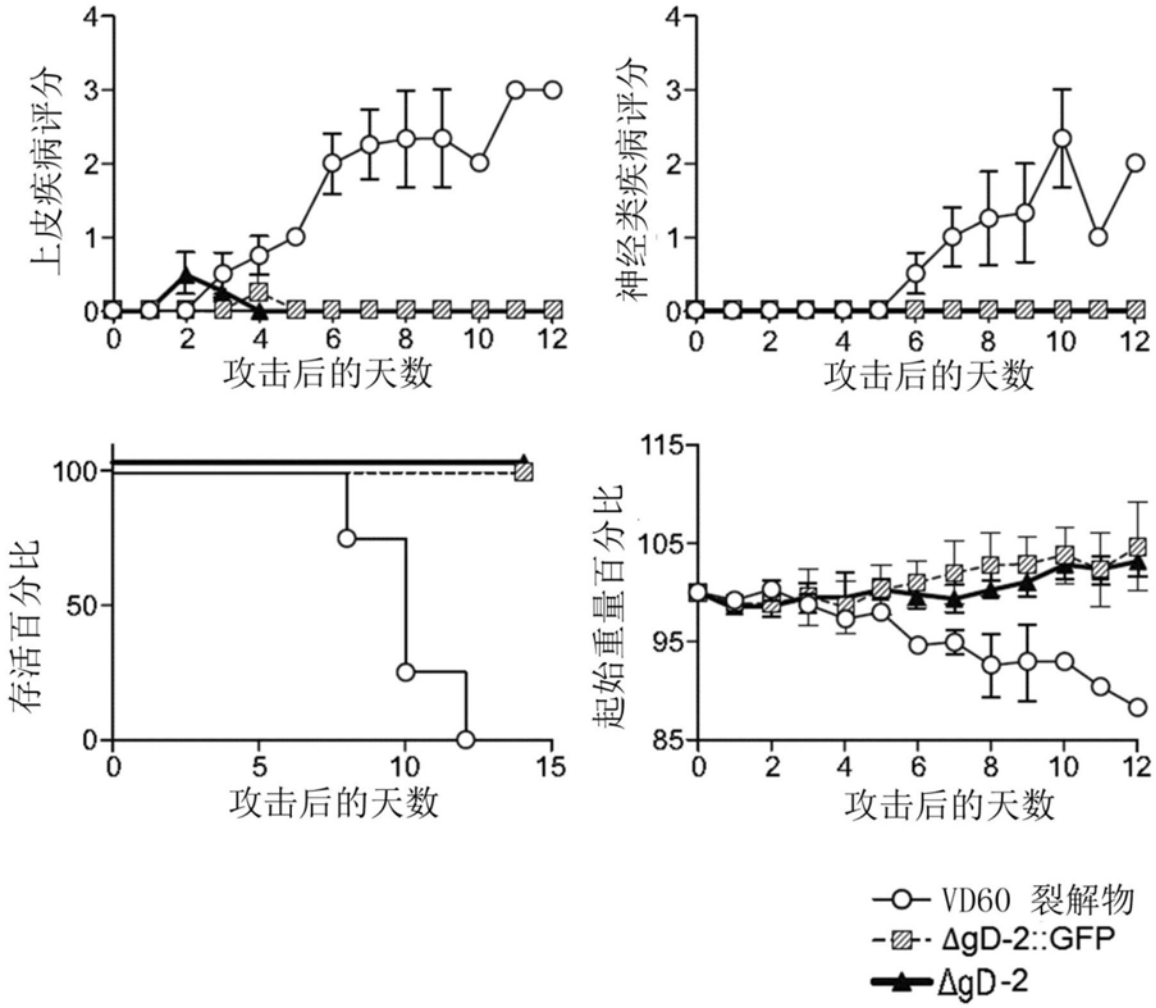

上皮疾病评分
攻击后的天数
神经类疾病评分
攻击后的天数
存活百分比
攻击后的天数
起始重量百分比
攻击后的天数
VD60 裂解物
ΔgD-2::GFP
ΔgD-2

图5

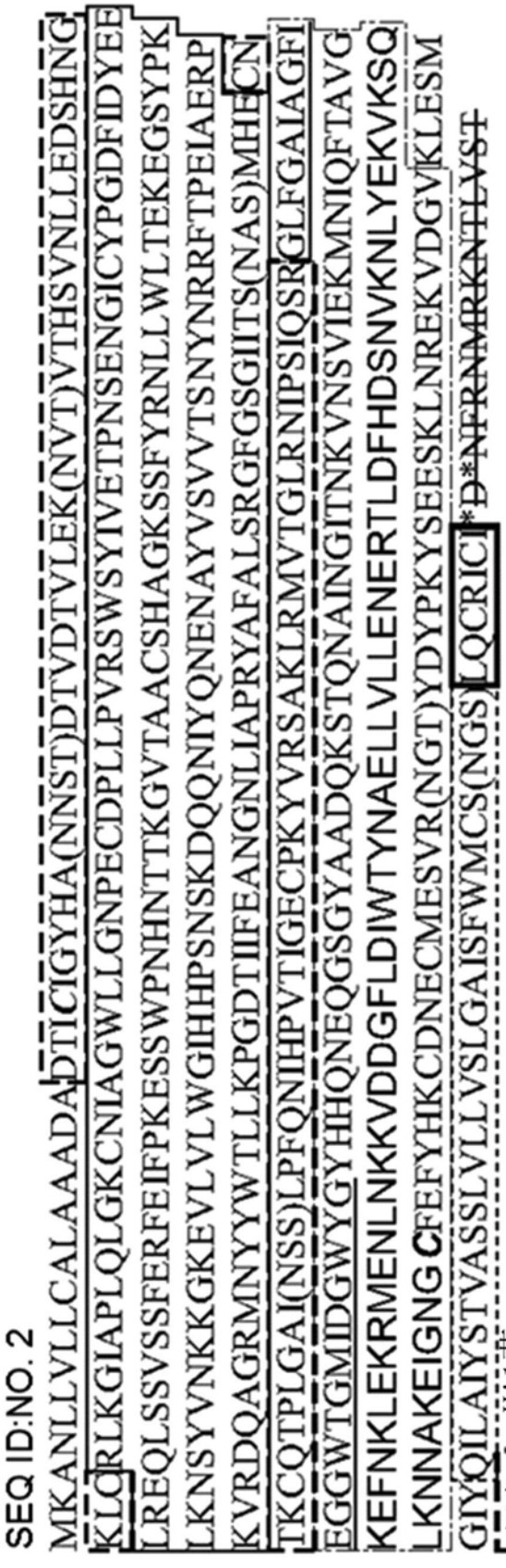

SEQ ID:NO. 2
MKANLLVLLCALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDSHNG
KLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTTKGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPK
LKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPSNSKDQQNIYQNENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP
KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIITSNASMHECN
TKCQTPLGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFI
EGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNIQFTAVG
KEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ
LKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESM
GIYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI*D*NFRNAMRKNTLVST
绿色 = HA1茎
灰色 = HA1头
黄色 = HA2茎
蓝色 = HA2跨膜
粉色 = HA2胞质
删除线 = 终止密码子后的遗传物质
下划线 = 融合肽
粗体和斜体 = 二硫键位点
() = PR8病毒的糖基化位点
糖基化位点因病毒而异

图6

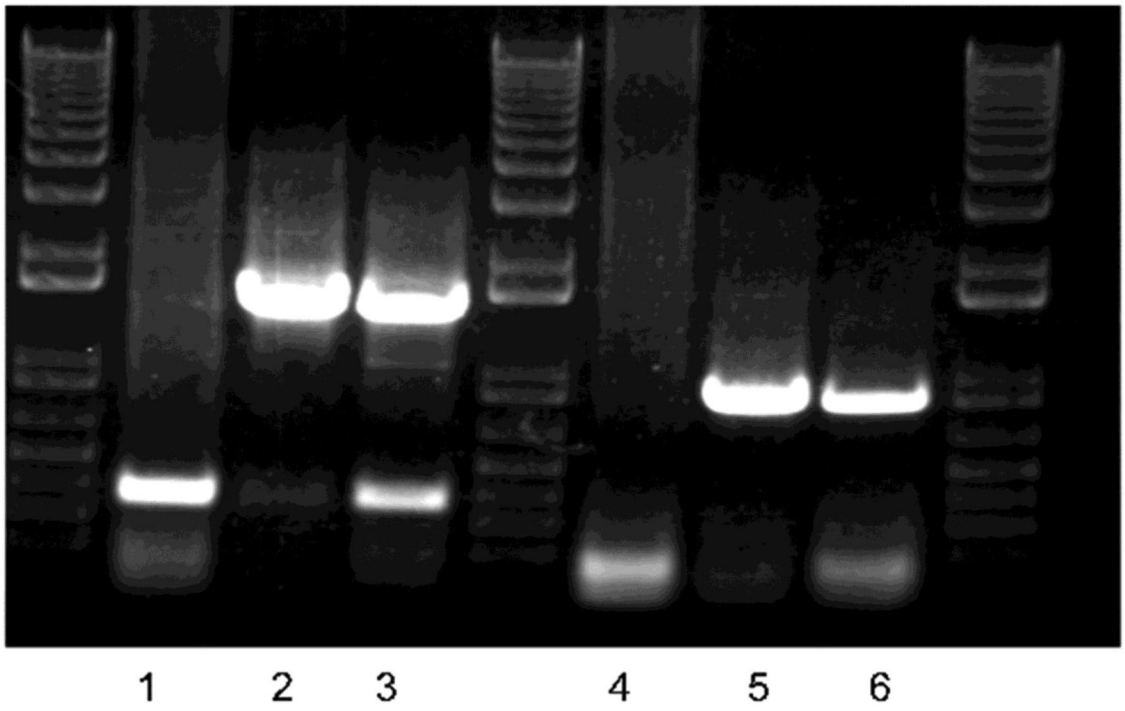
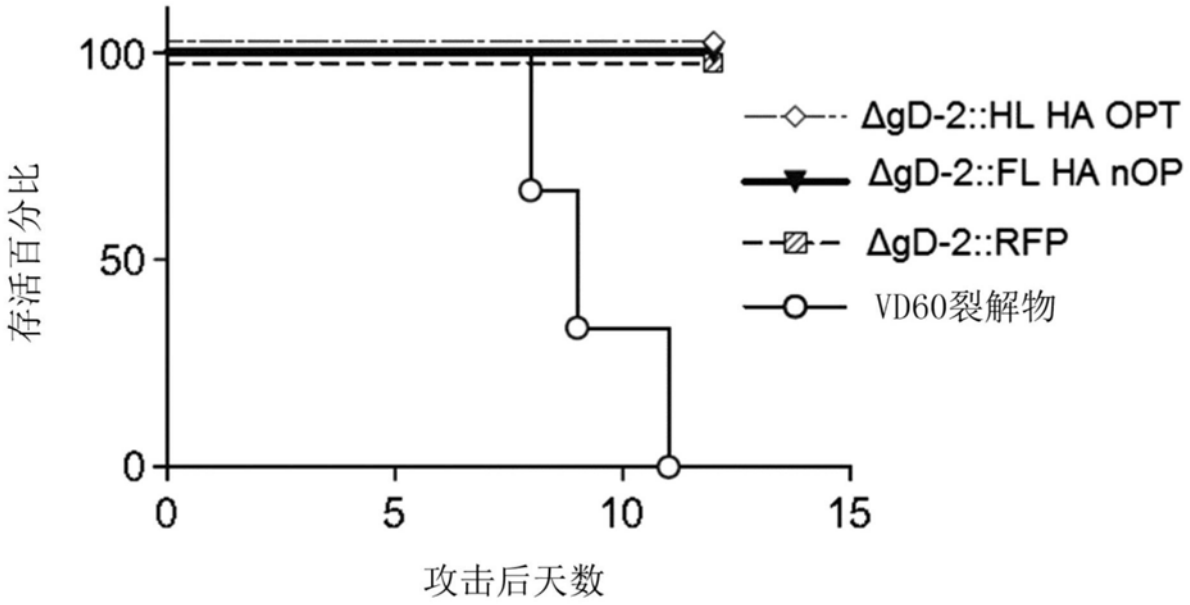


图7


100
50
0
0
5
10
15
存活百分比
攻击后天数
ΔgD-2::HL HA OPT
ΔgD-2::FL HA nOP
ΔgD-2::RFP
VD60裂解物

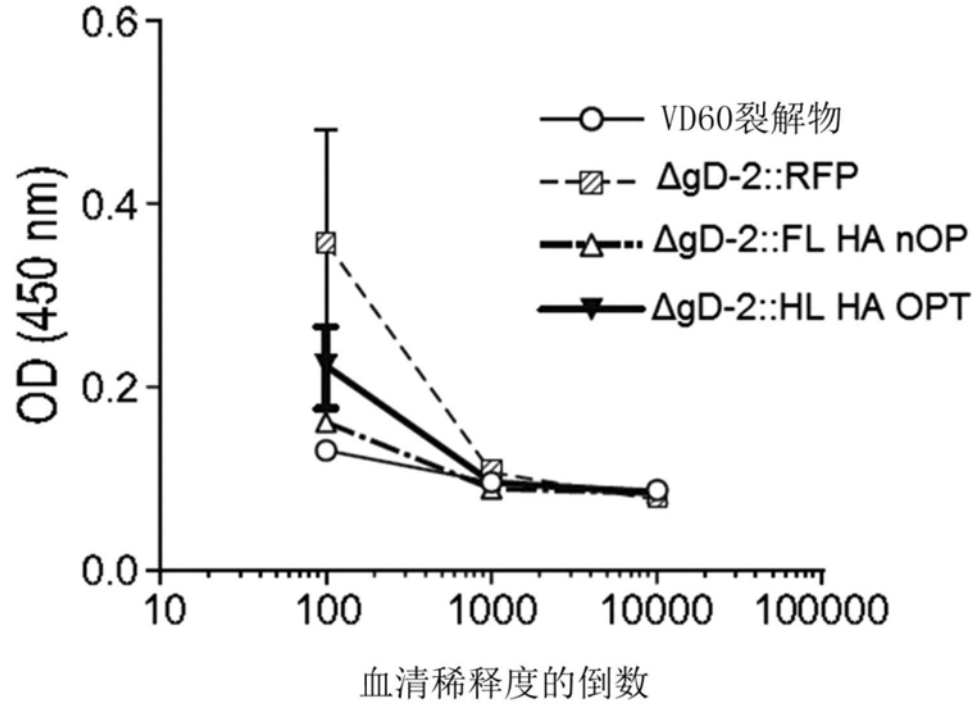

0.6
0.4
0.2
0.0
OD (450 nm)
10
100
1000
10000
100000
血清稀释度的倒数
VD60裂解物
ΔgD-2::RFP
ΔgD-2::FL HA nOP
ΔgD-2::HL HA OPT

图8

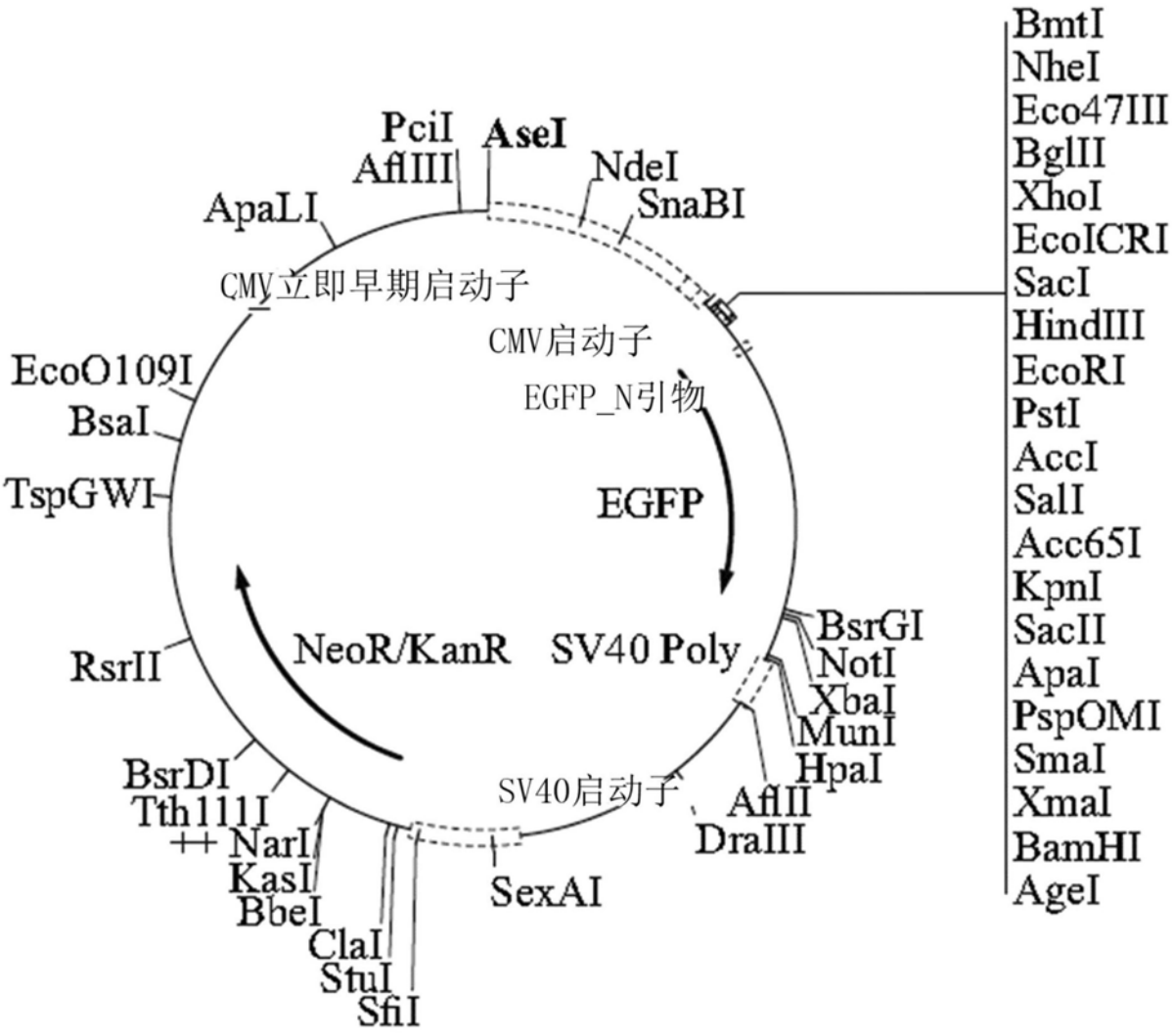

PciI
AflIII
AseI
NdeI
SnaBI
ApaLI
CMV立即早期启动子
CMV启动子
EGFP_N引物
EGFP
EcoO109I
BsaI
TspGWI
RsrII
NeoR/KanR
SV40 Poly
BsrGI
NotI
XbaI
MunI
HpaI
AflII
DraIII
SV40启动子
SexAI
BsrDI
Tth111I
NarI
KasI
BbeI
ClaI
StuI
SfiI
BmtI
NheI
Eco47III
BglII
XhoI
EcoICRI
SacI
HindIII
EcoRI
PstI
AccI
SalI
Acc65I
KpnI
SacII
ApaI
PspOMI
SmaI
XmaI
BamHI
AgeI

图9

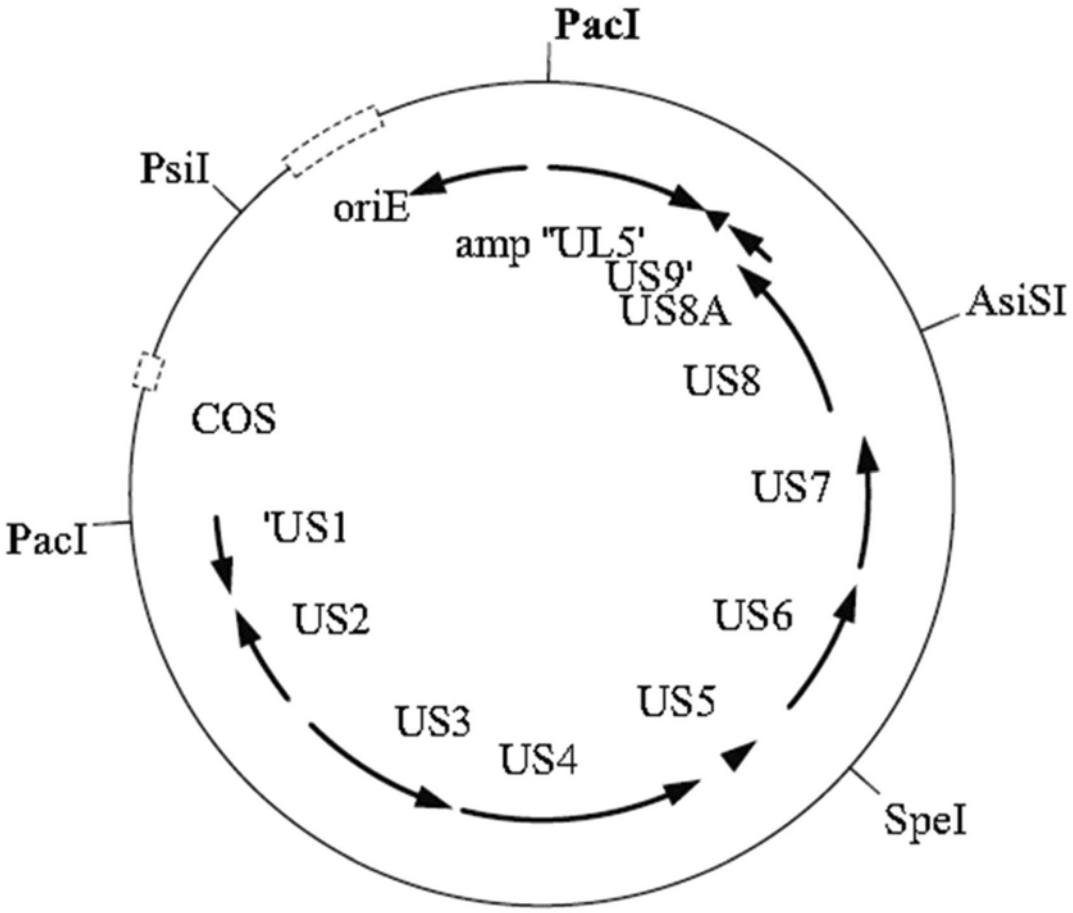

PacI
PsiI
oriE
amp
'UL5'
US9'
US8A
US8
AsiSI
COS
US7
PacI
'US1
US2
US6
US3
US5
US4
SpeI

图10

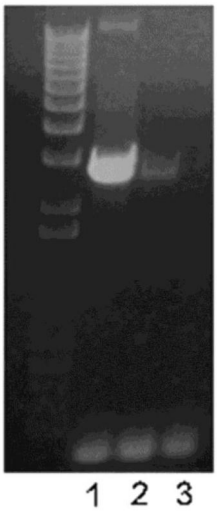

1 2 3

图11A

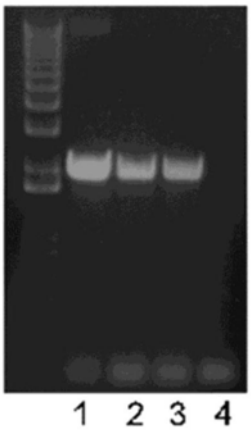


图11B

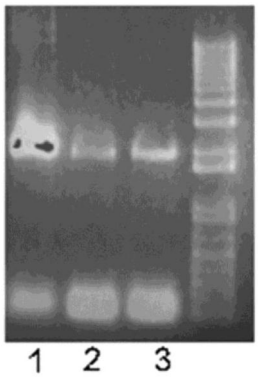


图11C

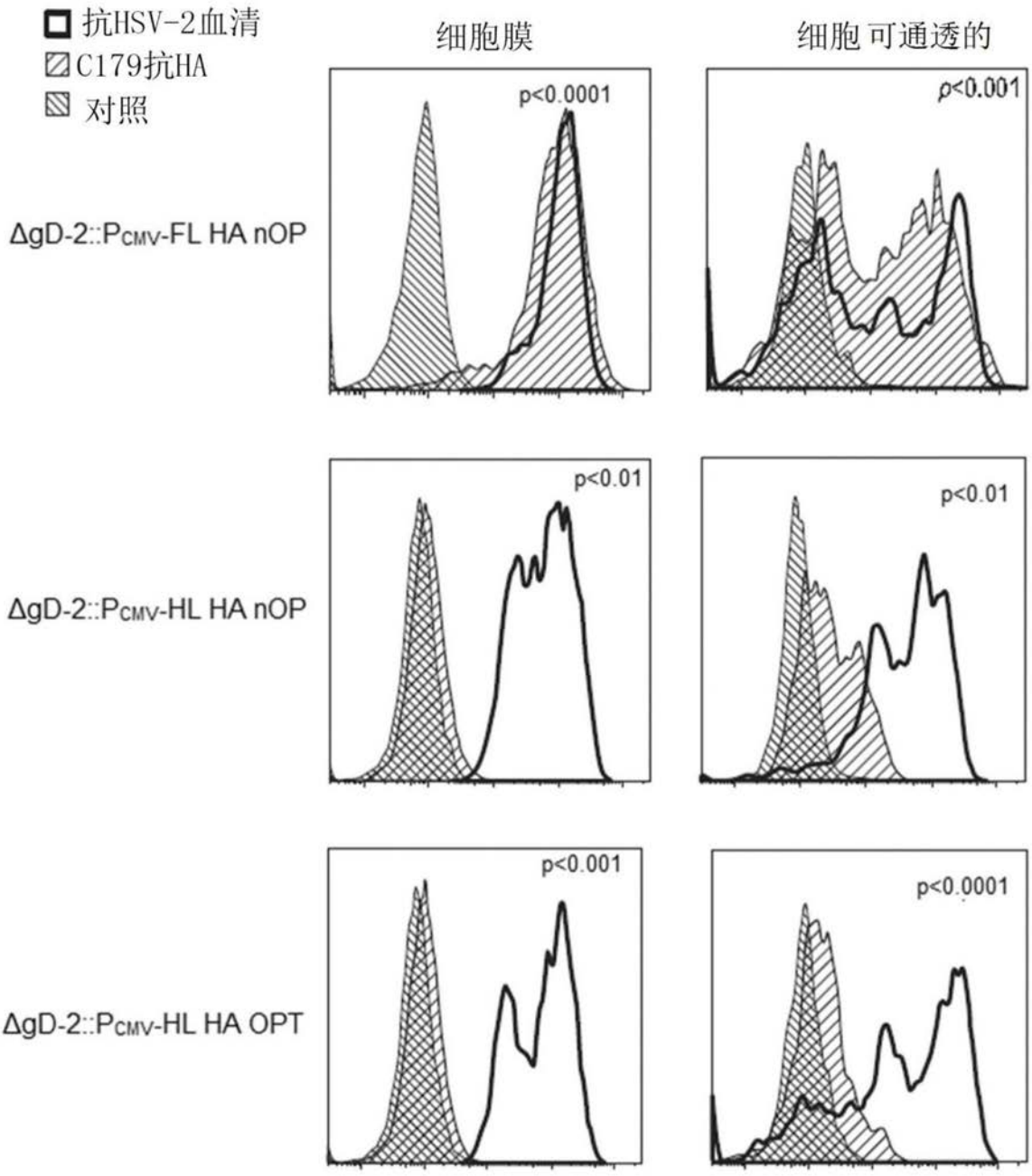

抗HSV-2血清
C179抗HA
对照
细胞膜
细胞可通透的
ΔgD-2::PCMV-FL HA nOP
ΔgD-2::PCMV-HL HA nOP
ΔgD-2::PCMV-HL HA OPT
p<0.0001
p<0.001
p<0.01
p<0.01
p<0.001
p<0.0001

图12

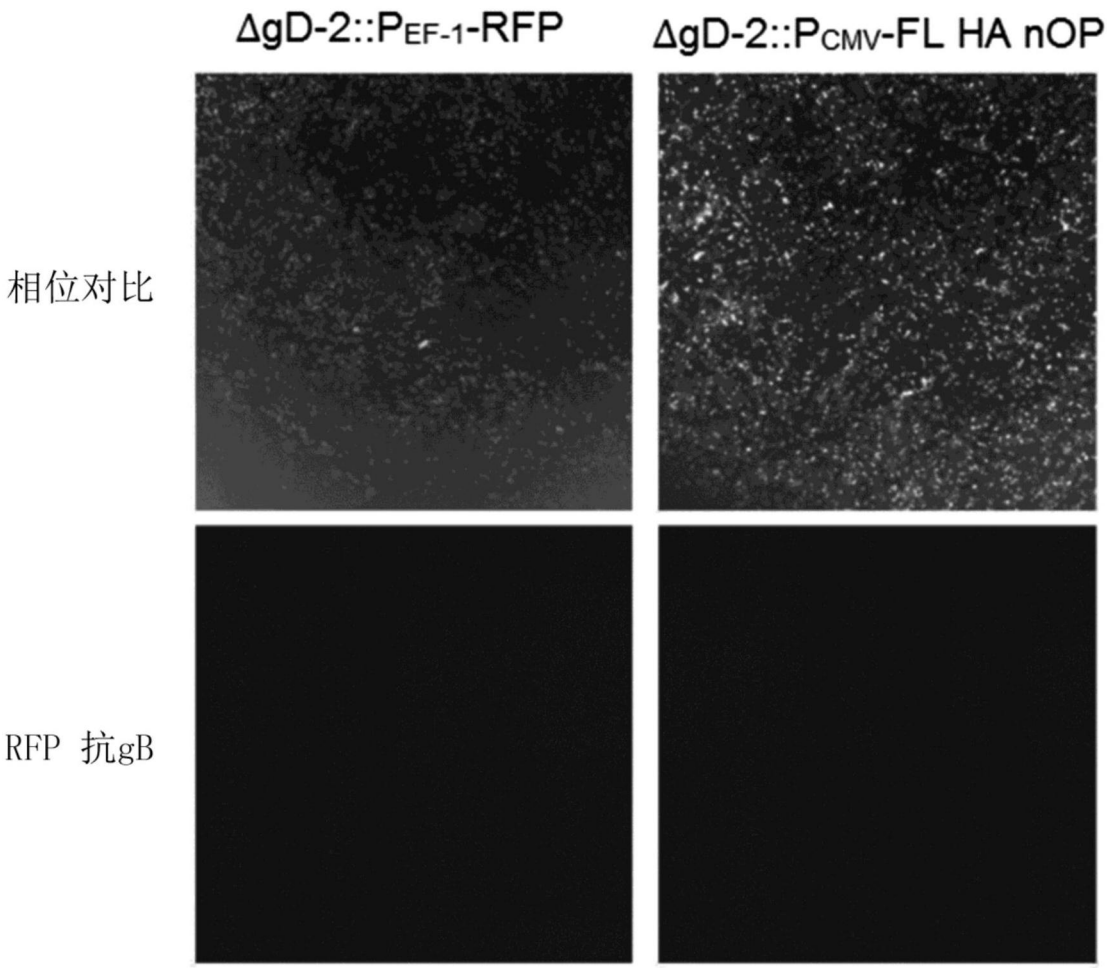

ΔgD-2::PEF-1-RFP
ΔgD-2::PCMV-FL HA nOP
相位对比
RFP 抗gB

图13

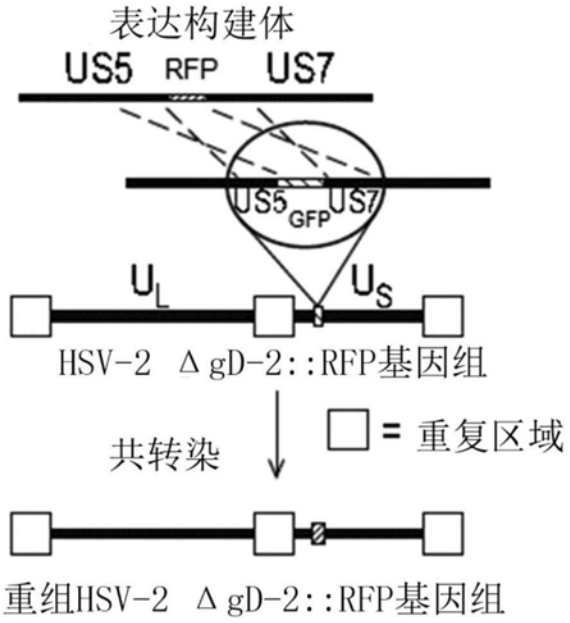

表达构建体
US5 RFP US7
US5GFP US7
UL
US
HSV-2 ΔgD-2::RFP基因组
共转染
= 重复区域
重组HSV-2 ΔgD-2::RFP基因组

图14A

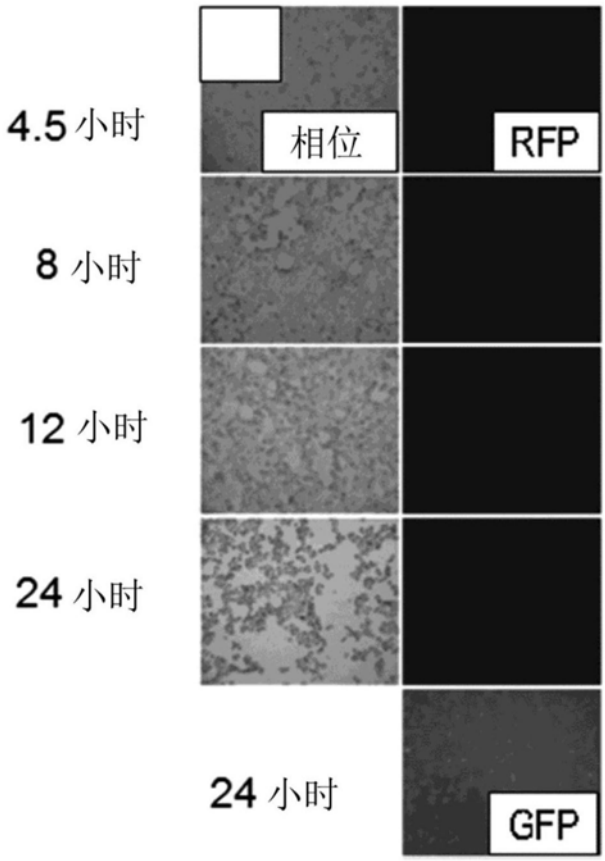


图14B

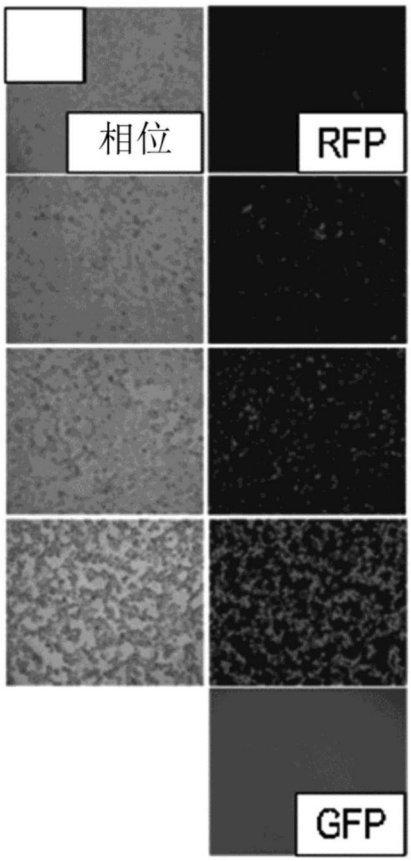


图14C

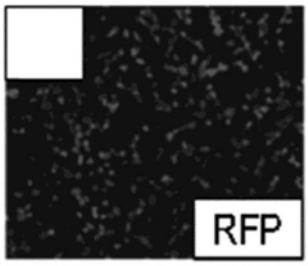


图14D

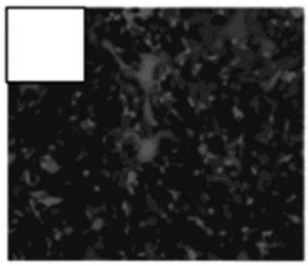


图14E

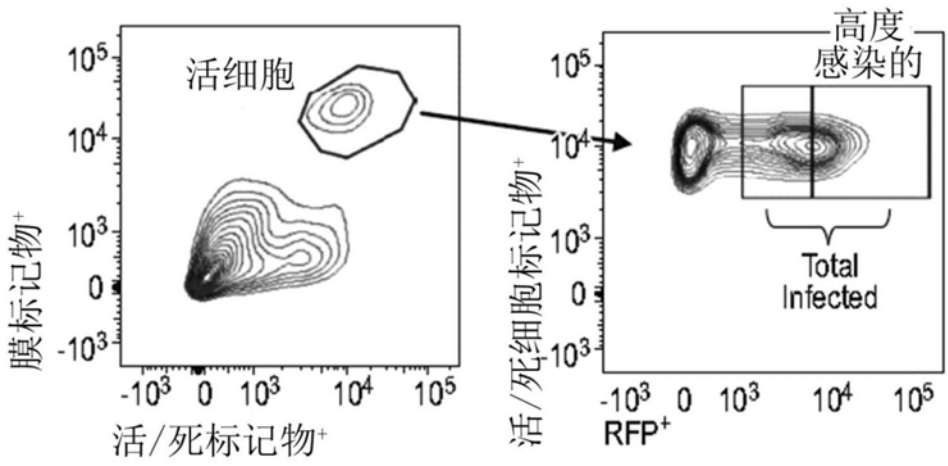

活细胞
高度
感染的
Total
Infected
膜标记物+
活/死标记物+
活/死细胞标记物+
RFP+

图15A

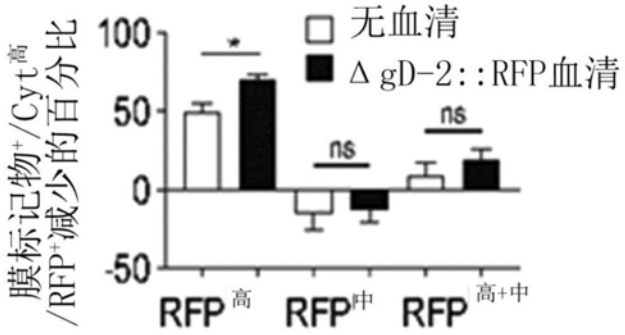

无血清
Δ gD-2::RFP血清
膜标记物+/Cyt高
/RFP+减少的百分比
ns
RFP高
RFP中
RFP高+中

图15B

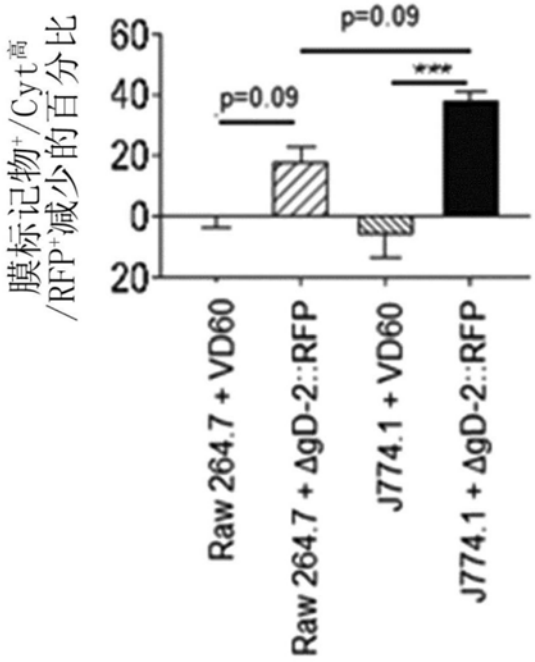

膜标记物+/Cyt高
/RFP+减少的百分比
60
40
20
0
20
p=0.09
p=0.09
***
Raw 264.7 + VD60
Raw 264.7 + ΔgD-2::RFP
J774.1 + VD60
J774.1 + ΔgD-2::RFP

图15C

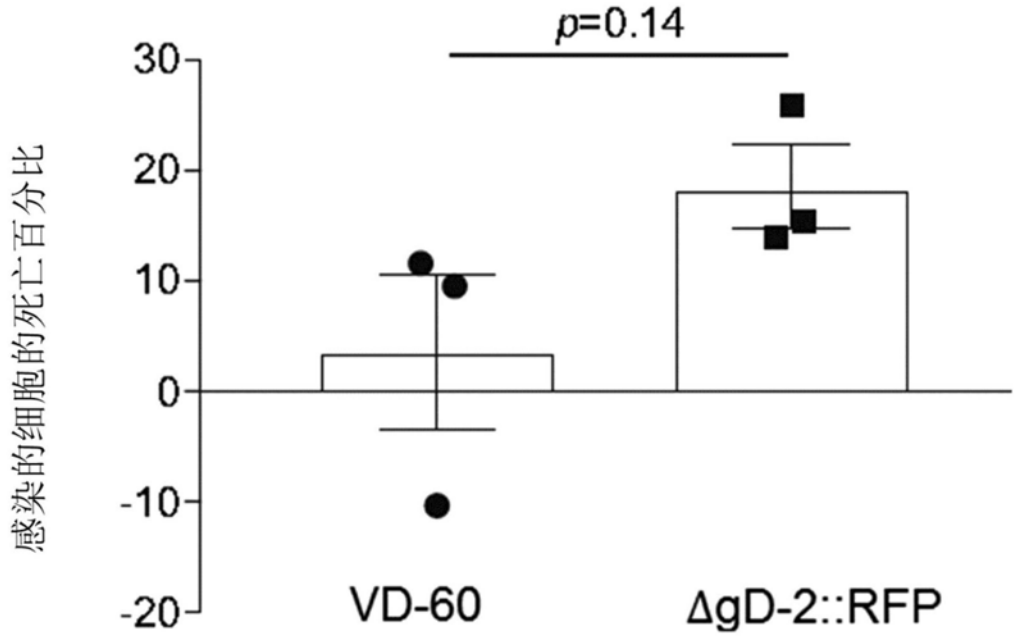

p=0.14
感染的细胞的死亡百分比
30
20
10
0
-10
-20
VD-60
ΔgD-2::RFP

图16

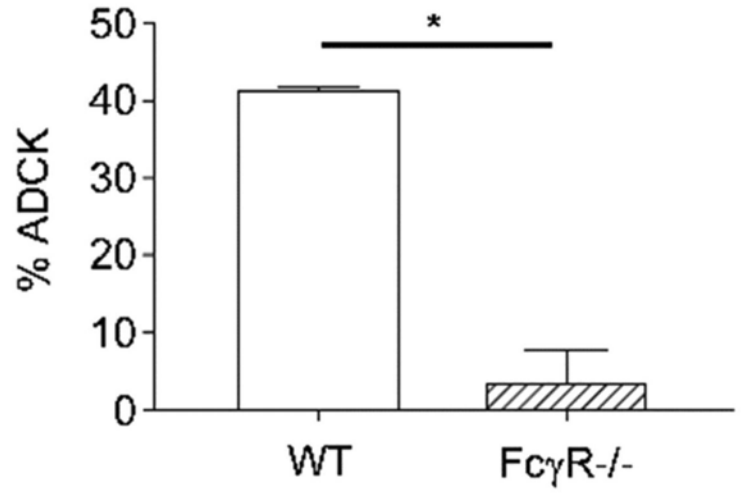


图17A

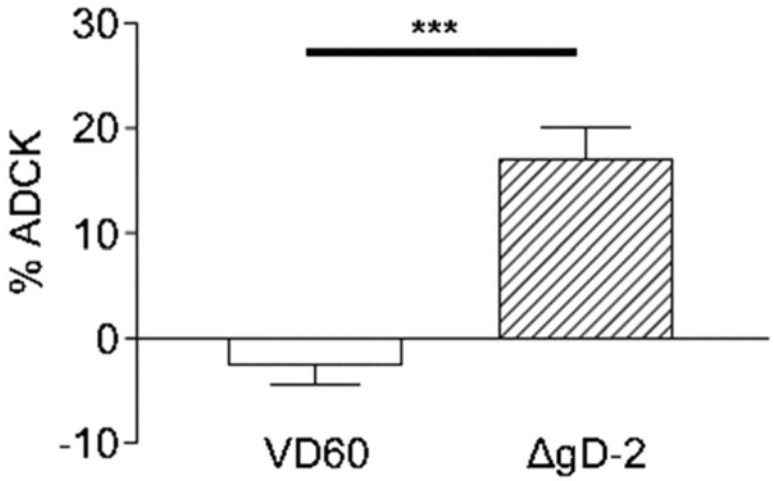


图17B

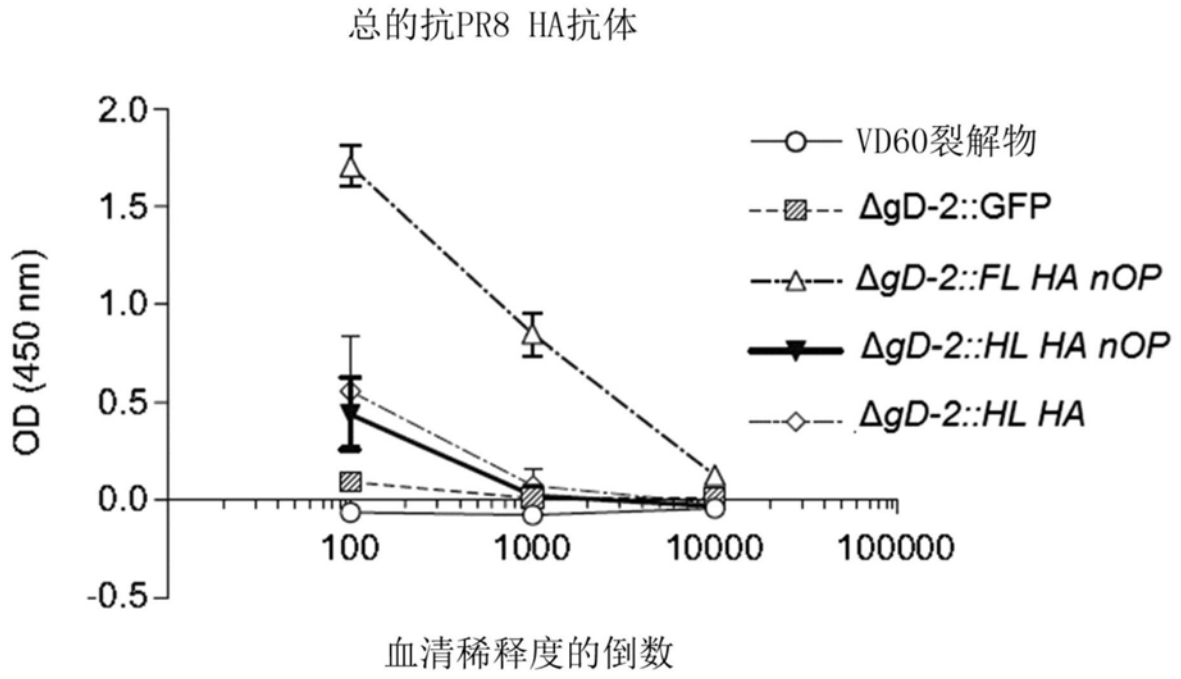

总的抗PR8 HA抗体
OD (450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
100
1000
10000
100000
VD60裂解物
ΔgD-2::GFP
ΔgD-2::FL HA nOP
ΔgD-2::HL HA nOP
ΔgD-2::HL HA
血清稀释度的倒数

图18

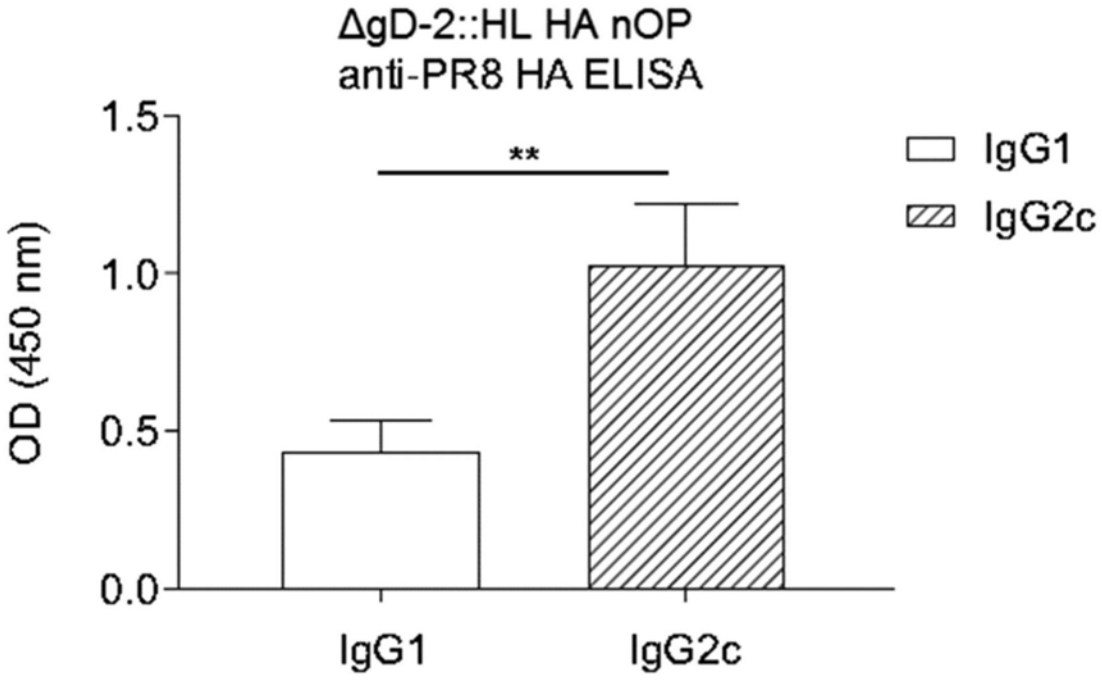

ΔgD-2::HL HA nOP
anti-PR8 HA ELISA
OD (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
IgG1
IgG2c
IgG1
IgG2c

图19

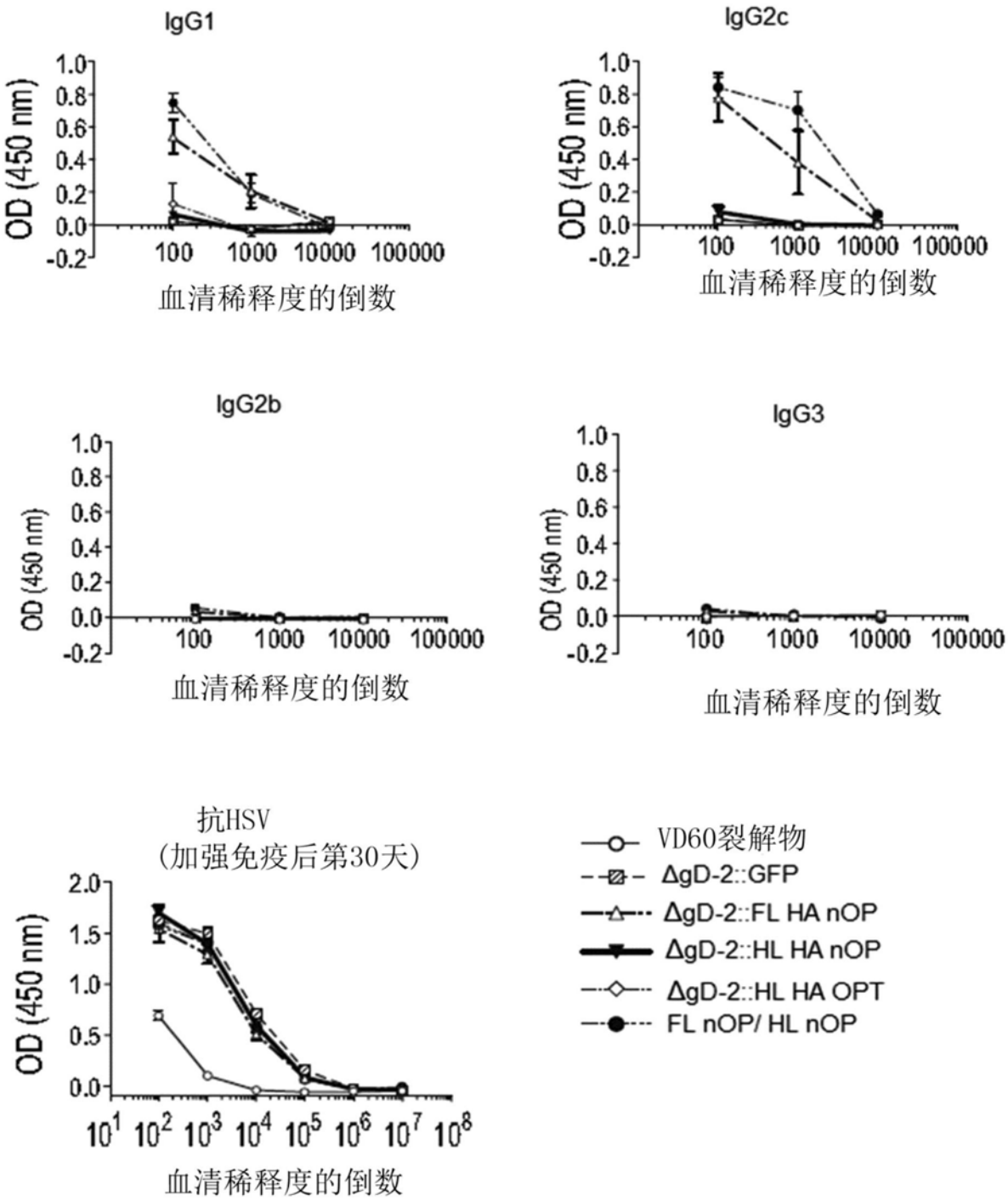

IgG1
OD (450 nm)
血清稀释度的倒数
IgG2c
OD (450 nm)
血清稀释度的倒数
IgG2b
OD (450 nm)
血清稀释度的倒数
IgG3
OD (450 nm)
血清稀释度的倒数
抗HSV
(加强免疫后第30天)
OD (450 nm)
血清稀释度的倒数
VD60裂解物
ΔgD-2::GFP
ΔgD-2::FL HA nOP
ΔgD-2::HL HA nOP
ΔgD-2::HL HA OPT
FL nOP/ HL nOP

图20

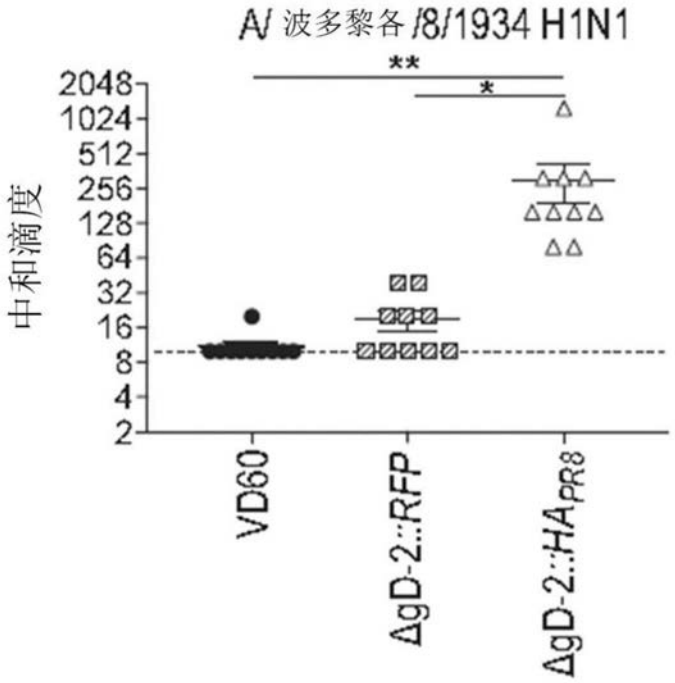

A/ 波多黎各/8/1934 H1N1
**
*
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
中和滴度
VD60
ΔgD-2::RFP
ΔgD-2::HA PR8

图21A

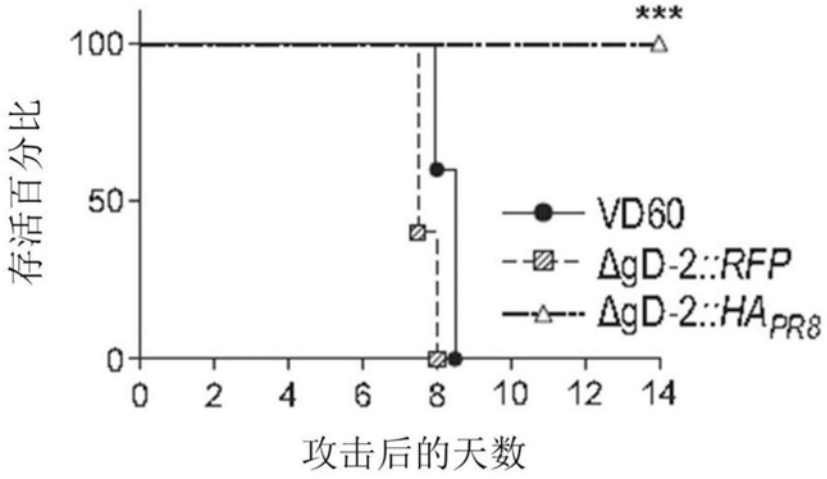

***
100
50
0
存活百分比
0 2 4 6 8 10 12 14
攻击后的天数
VD60
ΔgD-2::RFP
ΔgD-2::HA PR8

图21B

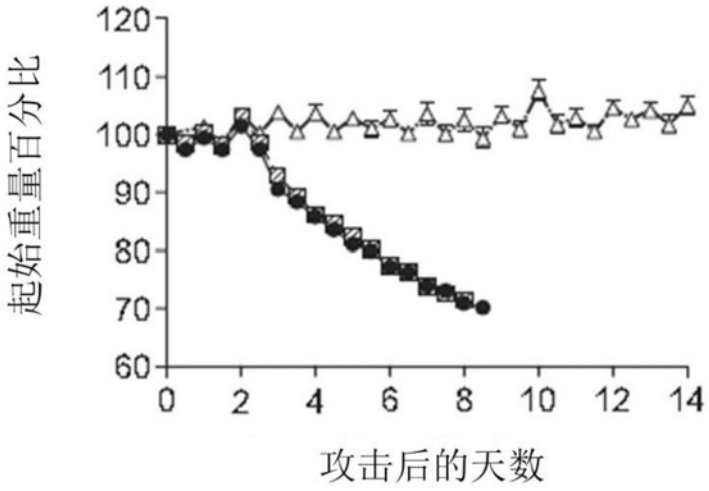

起始重量百分比
120
110
100
90
80
70
60
0
2
4
6
8
10
12
14
攻击后的天数

图21C

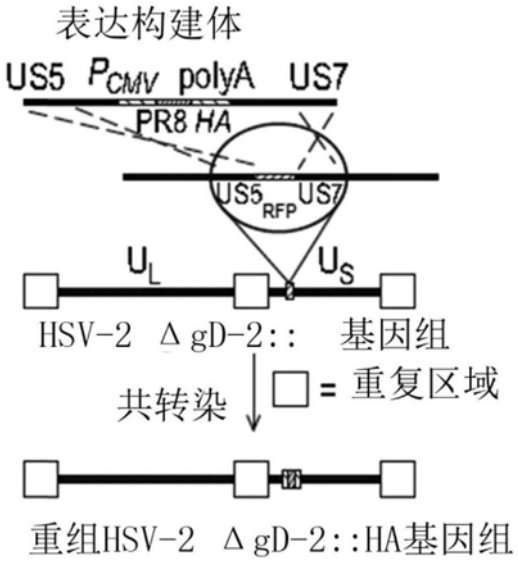

表达构建体
US5 P_{CMV} polyA US7
PR8 HA
US5 RFP US7
U_L
U_S
HSV-2 Δ gD-2:: 基因组
共转染
= 重复区域
重组HSV-2 Δ gD-2::HA基因组

图22A

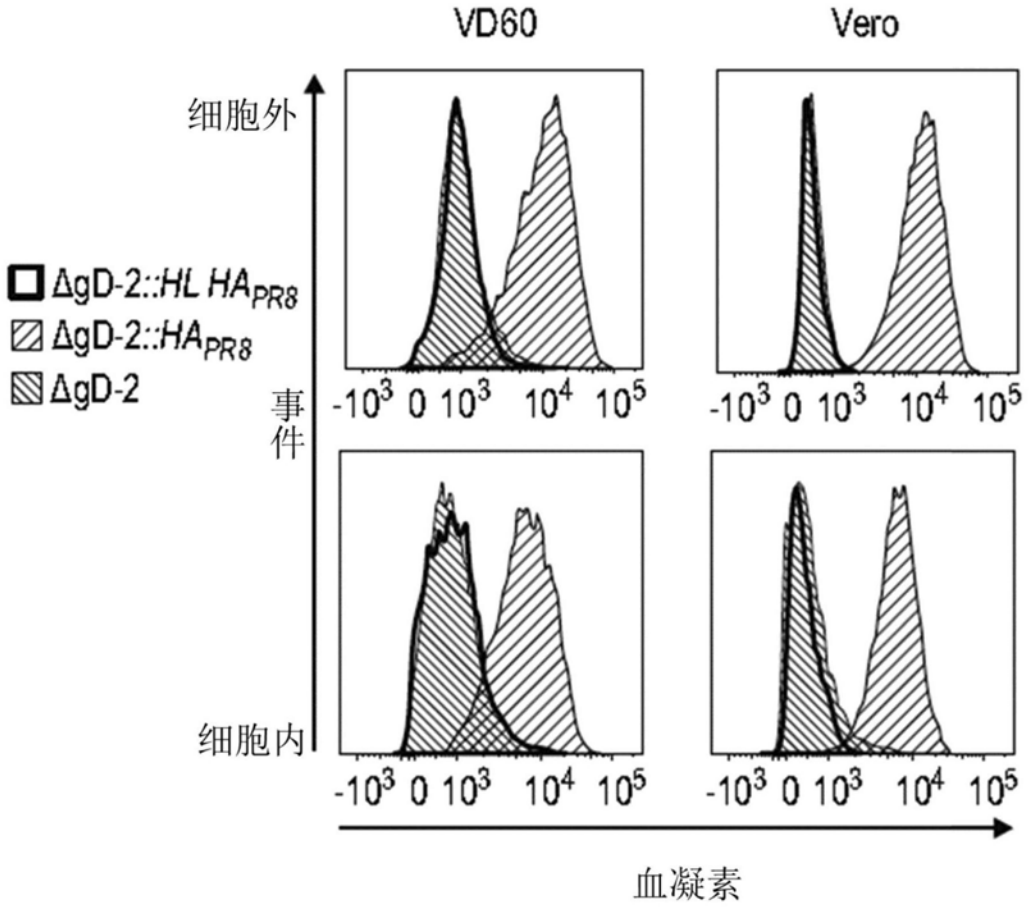

VD60
Vero
细胞外
ΔgD-2::HL HA$_{PR8}$
ΔgD-2::HA$_{PR8}$
ΔgD-2
事件
细胞内
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
血凝素

图22B

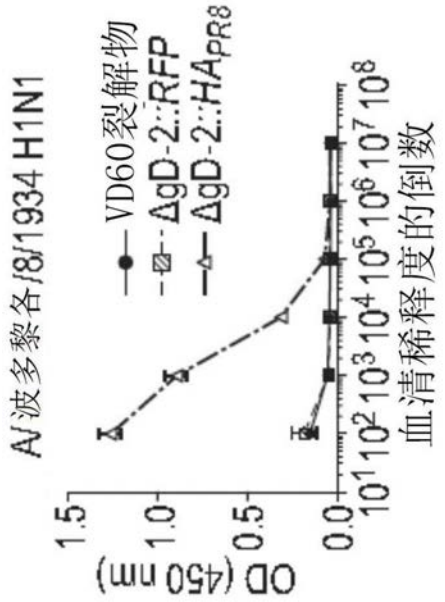

A/波多黎各/8/1934 H1N1
VD60裂解物
ΔgD-2::RFP
ΔgD-2::HA$_{PR8}$
OD (450 nm)
0.0
0.5
1.0
1.5
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7 10^8
血清稀释度的倒数

图23A

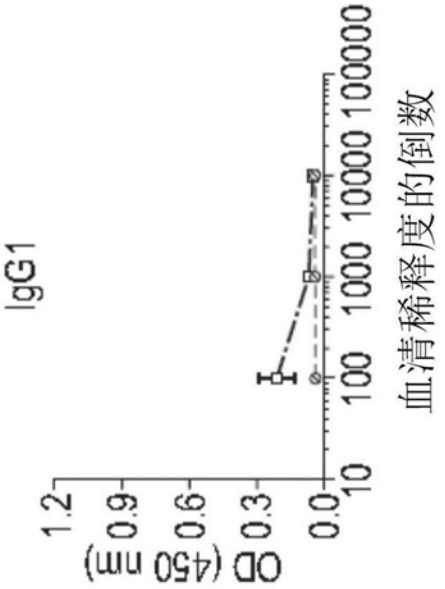

IgG1
OD (450 nm)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
10
100
1000
10000
100000
血清稀释度的倒数

图23B

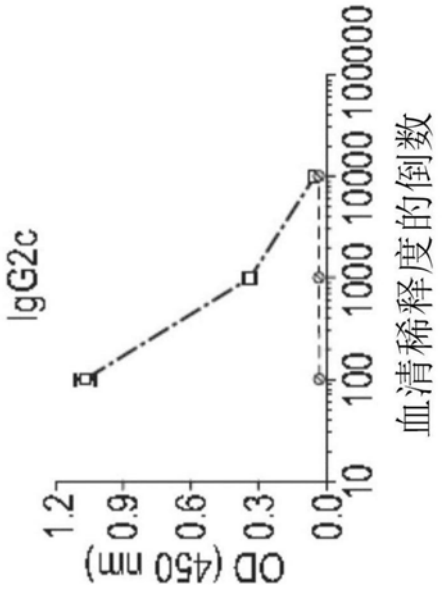

IgG2c
OD (450 nm)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
10
100
1000
10000
100000
血清稀释度的倒数

图23C

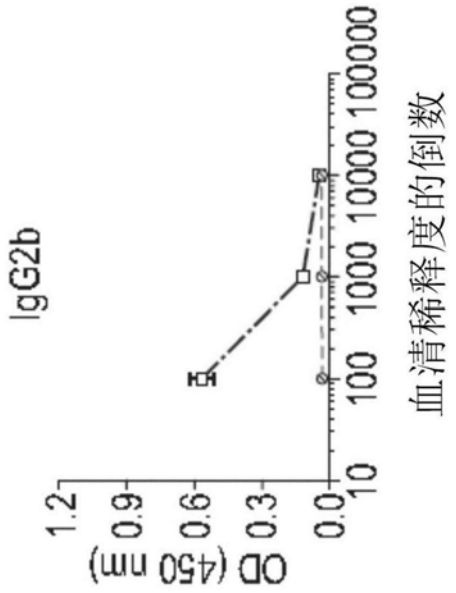

IgG2b
OD (450 nm)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
10
100
1000
10000
100000
血清稀释度的倒数

图23D

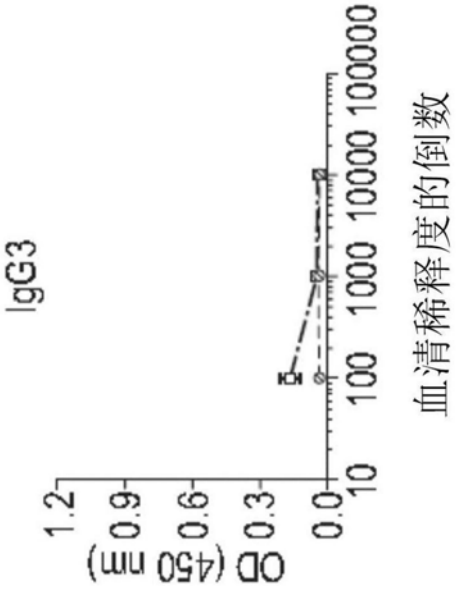

IgG3
OD (450 nm)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
10
100
1000
10000
100000
血清稀释度的倒数

图23E

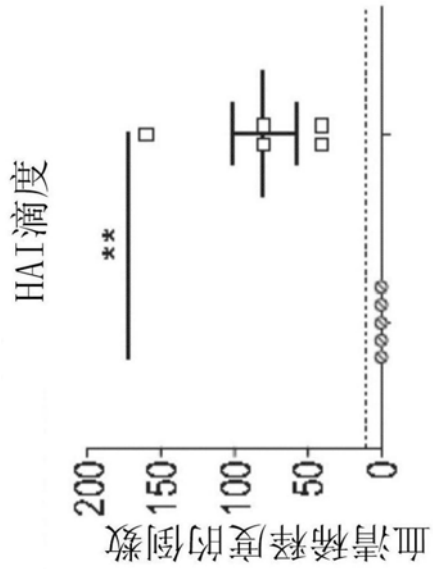

血清稀释度的倒数
200
150
100
50
0
HAI滴度
**

图23F

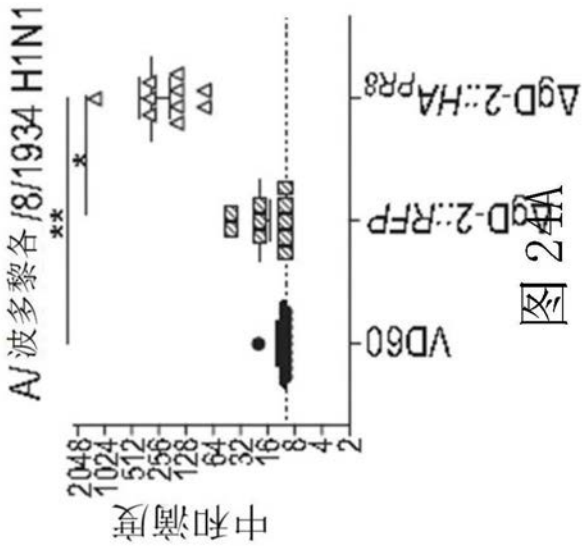

中和滴度
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
A/波多黎各/8/1934 H1N1
**
*
VD60-
Δgd-2::RFP
Δgd-2::HAPR8

图24A

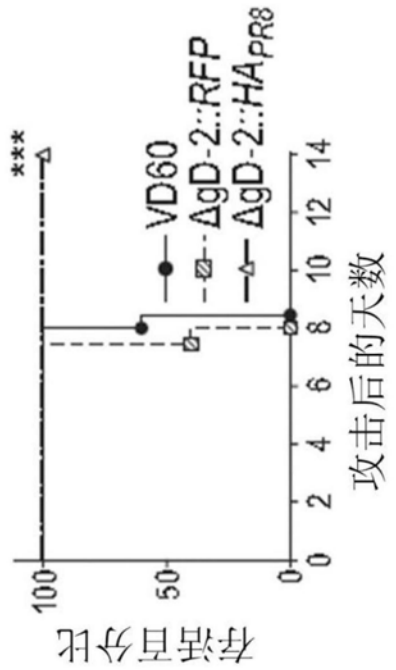

***
VD60
ΔgD-2::RFP
ΔgD-2::HA$_{PR8}$
存活百分比
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14
攻击后的天数

图24B

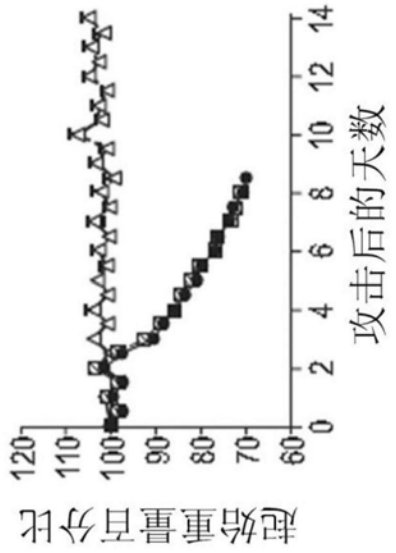

起始重量百分比
120
110
100
90
80
70
60
0 2 4 6 8 10 12 14
攻击后的天数

图24C

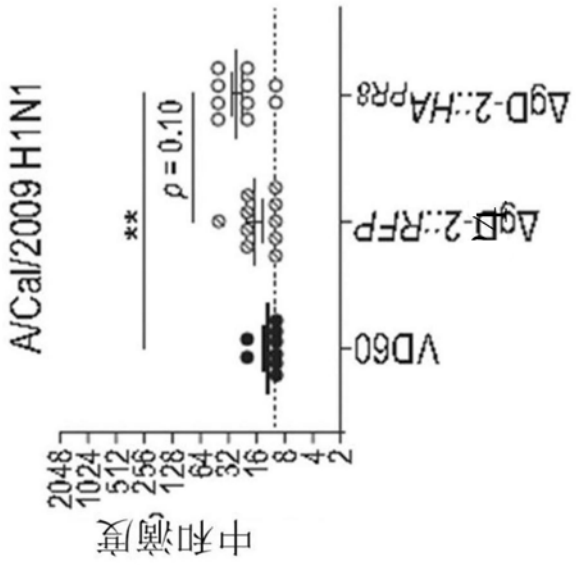

A/Cal/2009 H1N1
**
p = 0.10
中和滴度
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
VD60
Δgp-2::RFP
Δgp-2::HAPR8

图24D

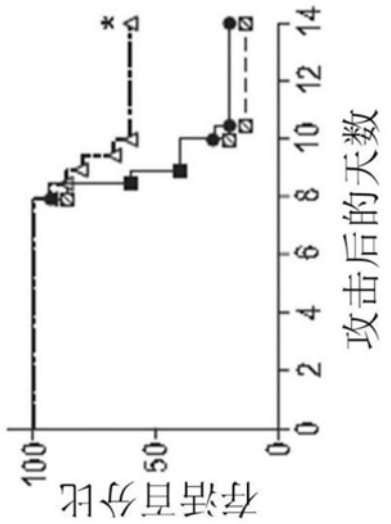

*
存活百分比
100
50
0
0
2
4
6
8
10
12
14
攻击后的天数

图24E

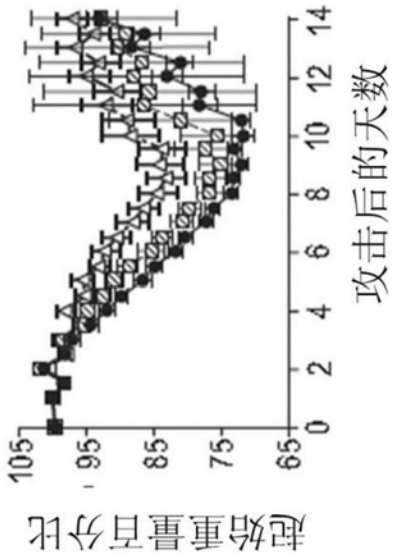

105
95
85
75
65
0
2
4
6
8
10
12
14
攻击后的天数
起始重量百分比

图24F

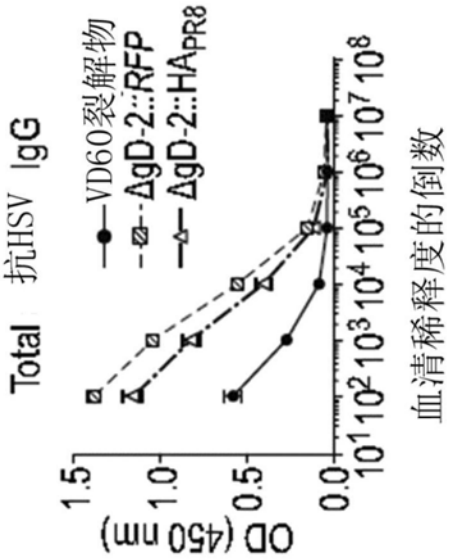

Total 抗HSV IgG
VD60裂解物
ΔgD-2::RFP
ΔgD-2::HAPR8
OD (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7 10^8
血清稀释度的倒数

图25A

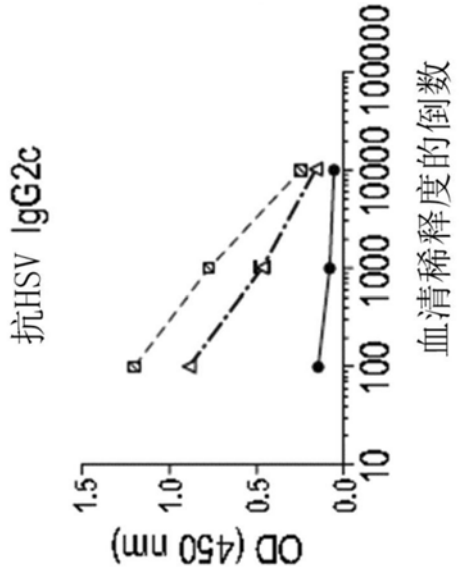

抗HSV IgG2c
OD (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
10
100
1000
10000
100000
血清稀释度的倒数

图25B

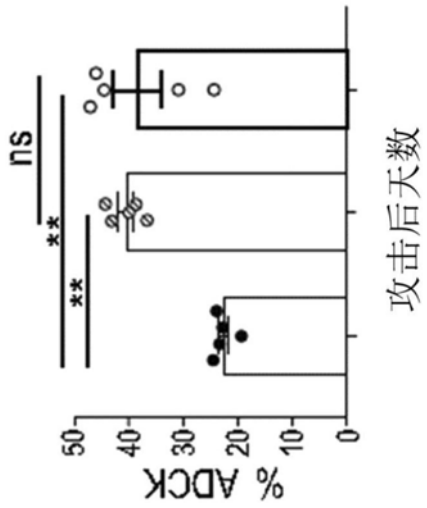

% ADCK
50
40
30
20
10
0
ns
**
**
攻击后天数

图25C

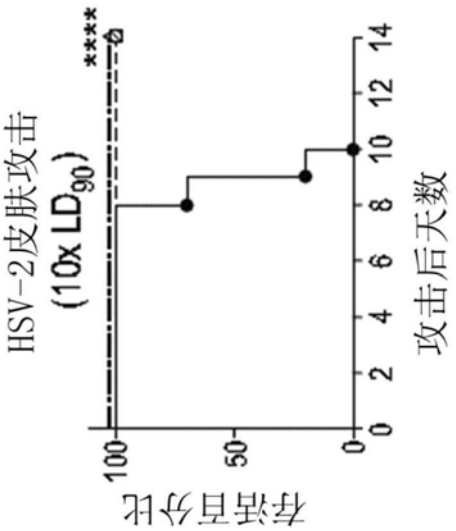

HSV-2皮肤攻击
(10x LD90)
****
存活百分比
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14
攻击后天数

图25D

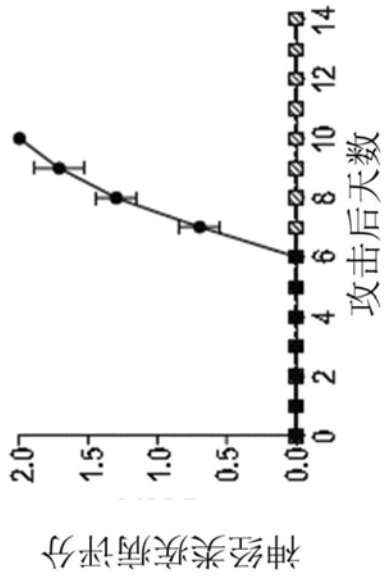

神经类疾病评分
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 2 4 6 8 10 12 14
攻击后天数

图25E

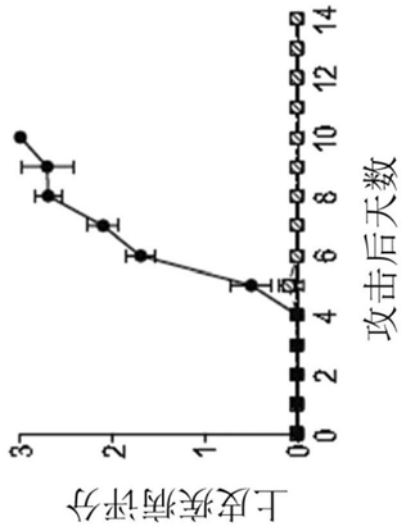

攻击后天数
0
2
4
6
8
10
12
14
上皮疾病评分
0
1
2
3

图25F

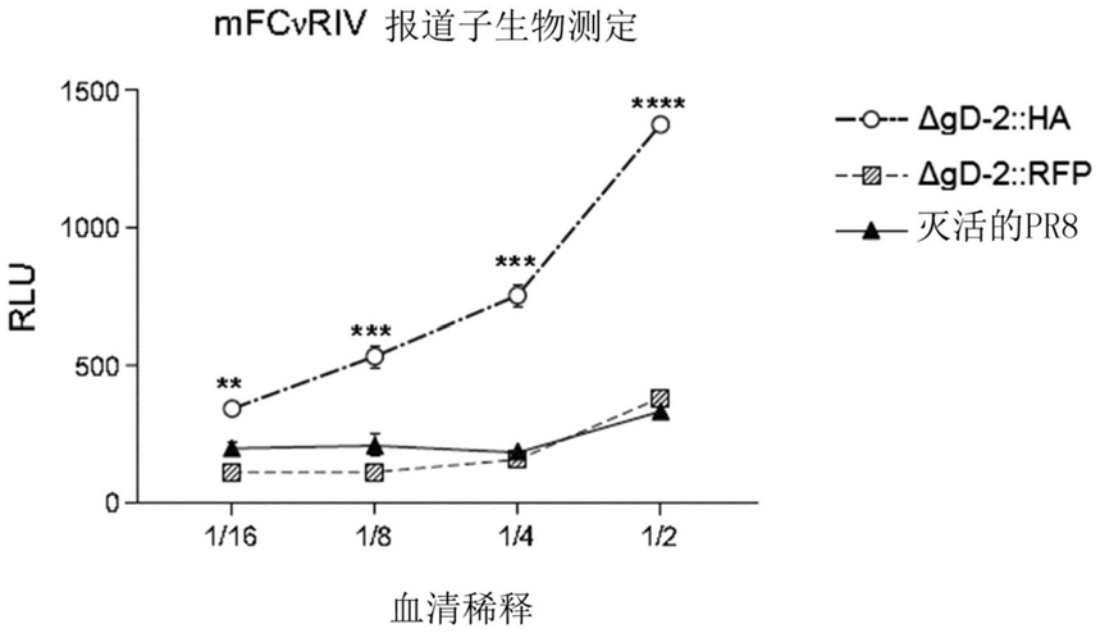

mFCvRIV 报道子生物测定
RLU
1500
1000
500
0
**
***
***
****
1/16
1/8
1/4
1/2
血清稀释
ΔgD-2::HA
ΔgD-2::RFP
灭活的PR8

图26

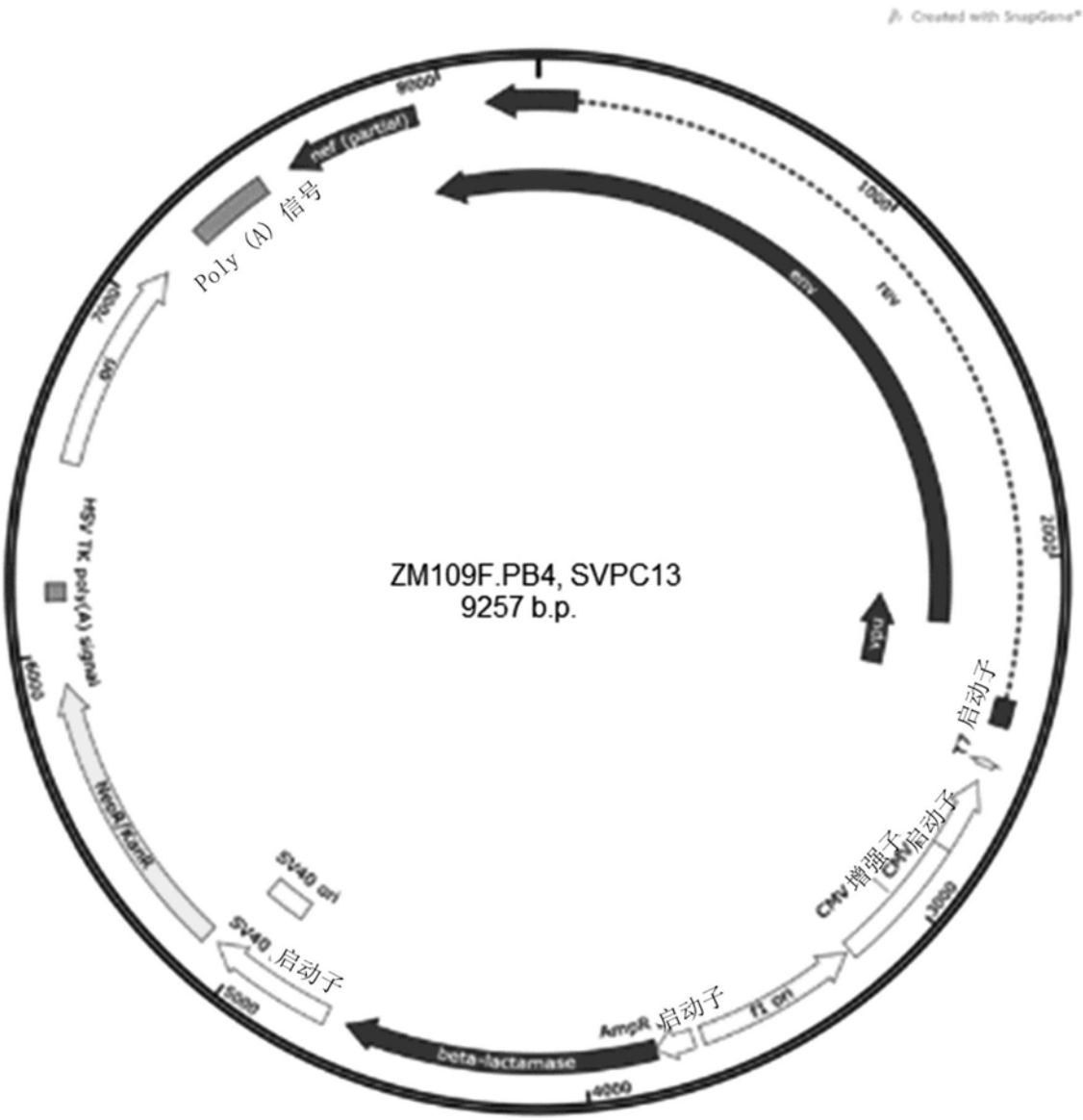

Created with SnapGene®
ZM109F.PB4, SVPC13
9257 b.p.
9000
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
ref (partial)
Poly (A) 信号
env
rev
T7 启动子
CMV 增强子
CMV 启动子
f1 ori
AmpR 启动子
beta-lactamase
SV40 ori
SV40 启动子
NeoR/KanR
HSV TK poly(A) signal
RNA

图27

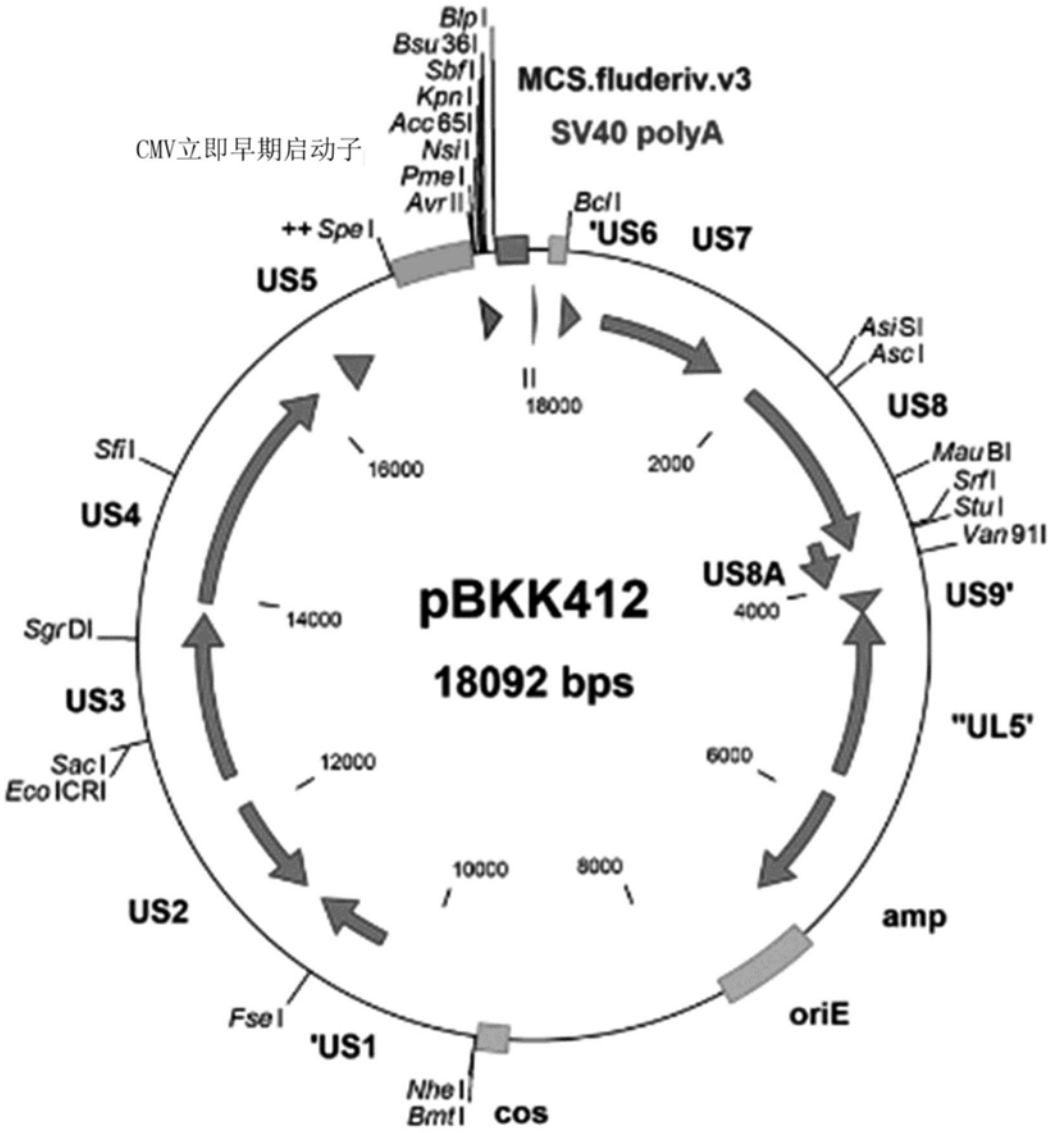

Blp I
Bsu36I
Sbf I
Kpn I
Acc65I
Nsi I
Pme I
Avr II
MCS.fluderiv.v3
SV40 polyA
CMV立即早期启动子
++ Spe I
Bcl I
'US6
US7
US5
AsiSI
Asc I
US8
Mau BI
Srf I
Stu I
Van91I
US9'
US8A
4000
6000
"UL5'
amp
oriE
cos
Nhe I
Bmt I
'US1
Fse I
US2
10000
8000
12000
Sac I
Eco ICRI
US3
Sgr DI
14000
US4
Sfi I
16000
18000
2000
pBKK412
18092 bps

图28



图29A

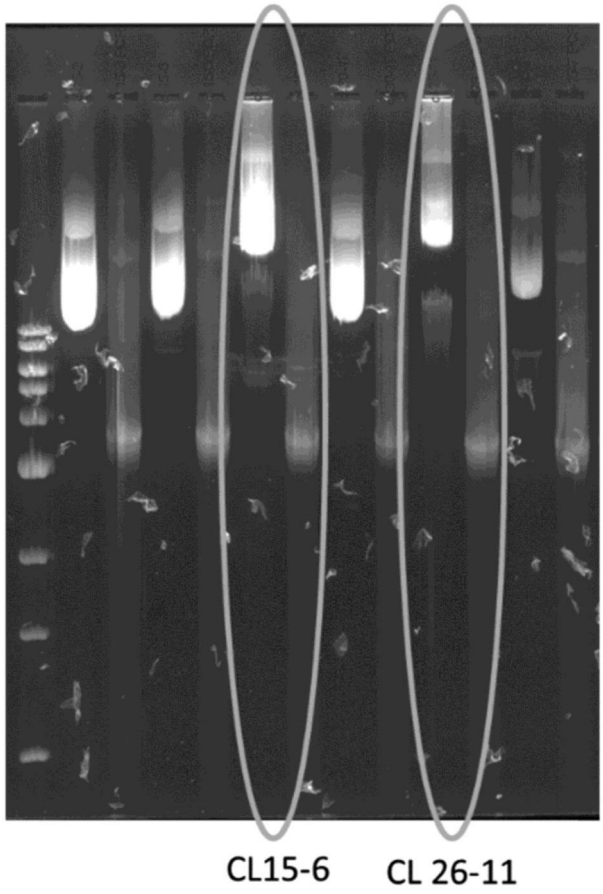


图29B