(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114466659 A
(43)申请公布日 2022.05.10

(21)申请号 202080062933.7
(22)申请日 2020.09.08
(30)优先权数据
62/897,603 2019.09.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/075002 2020.09.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/048081 EN 2021.03.18
(71)申请人 葛兰素史克生物有限公司
地址 比利时里克桑萨尔
申请人 变异生物技术公司
(72)发明人 D·E·安德森 K·施耐德-奥鲁姆
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 郜红 徐志明
(51)Int.Cl.
A61K 39/245(2006.01)
A61K 39/21(2006.01)
A61K 39/39(2006.01)
A61K 9/127(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书27页
序列表34页

(54)发明名称

免疫治疗组合物

(57)摘要

本公开提供了可用于治疗多形性成胶质细胞瘤(GBM)的组合物和方法,其包括与包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂一起配制的包含鼠白血病病毒(MLV)核心蛋白和人巨细胞病毒表位gB和pp65的病毒样颗粒(VLP))。

CN 114466659 A

1.一种免疫原性组合物,其包含:

(i)病毒样颗粒(VLP),包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

和

(ii)包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂。

2.根据权利要求1所述的免疫原性组合物,用于治疗HCMV相关的癌症。

3.一种用于制备免疫原性组合物的试剂盒,所述试剂盒包括:

(i)包含病毒样颗粒的第一容器,所述病毒样颗粒包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

和

(ii)包含佐剂的第二容器,所述佐剂包含皂苷和TLR4激动剂。

4.一种用于制备免疫原性组合物的试剂盒,所述试剂盒包括:

(i)包含病毒样颗粒的第一容器,所述病毒样颗粒包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

(ii)包含皂苷的第二容器;

(iii)包含TLR4激动剂的第三容器。

5.用于与以下一起使用以在受试者中引发免疫反应的皂苷:

(i)病毒样颗粒,其包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

和

(ii)TLR4激动剂。

6.用于与以下一起使用以在受试者中引发免疫反应的TLR4激动剂:

(i)病毒样颗粒,其包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

和

(ii)皂苷。

7.一种用于与病毒样颗粒一起使用的包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂,所述病毒样颗粒包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

8.一种在受试者中引发免疫反应的方法,所述方法包括施用皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

9.根据权利要求8所述的方法,其中所述皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒以根据权利要求1所述的免疫原性组合物的形式施用。

10.一种在受试者中治疗HCMV相关的癌症的方法,所述方法包括施用皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

11.皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒在制备药物中,特别是在制备用于治疗HCMV相关的癌症的药物中的用途,所述病毒样颗粒包含:

(a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

(b)HCMV pp65蛋白;和

(c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含gB蛋白,所述gB蛋白包含与SEQ ID NO:8至少80%,例如至少90%,特别是至少95%,尤其是至少98%相同的氨基酸序列,例如由其组成。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含融合蛋白,所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:4至少80%,例如至少90%,特别是至少95%,尤其是至少98%相同的氨基酸序列,例如由其组成。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述皂苷为Quil A或其衍生物。

15.根据权利要求14所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述皂苷为QS21。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述TLR4激动剂为脂多糖。

17.根据权利要求16所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述脂多糖为单磷酰脂质A。

18.根据权利要求17所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述单磷酰脂质A为3-O-脱酰基单磷酰脂质A(3D-MPL)。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于施用于人,例如18至70岁的人。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于治疗HCMV相关癌症,所述HCMV相关癌症选自乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺

癌、横纹肌肉瘤、肝细胞癌、唾液腺肿瘤、神经母细胞瘤和脑肿瘤(如髓母细胞瘤和GBM)。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于治疗GBM。

22.根据权利要求21所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于治疗经历复发例如第一次复发的受试者的GBM。

23.根据权利要求21或22所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于治疗具有最大横截面积为400mm^2或更小的肿瘤的受试者的GBM。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于在治疗开始时具有至少2,例如至少2.5的CD4/CD8比率的受试者。

25.根据权利要求24所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于在治疗开始时具有至少3的CD4/CD8比率的受试者。

26.根据权利要求1至23中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于在治疗开始时CD4/CD8比率小于3,例如小于2.5,特别是小于2的受试者。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于引发抗原特异性的抗体反应。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于引发抗原特异性CD4+T细胞反应。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其用于引发抗原特异性CD8+T细胞反应。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述抗原特异性反应是针对pp65。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述抗原特异性反应是针对gB。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中人剂量包含以重量计的pp65含量的1/200至1/10的gB蛋白含量,例如pp65含量的1/120至1/40,特别是pp65含量的1/100至1/60。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中肌肉内施用含有VLP和脂质体制剂的佐剂的组合物且每4周重复施用,所述VLP包含10ug pp65蛋白,所述佐剂包含50ug QS21和50ug 3D-MPL。

免疫治疗组合物

发明领域

[0001] 本发明属于免疫肿瘤学领域,特别是用于治疗人类巨细胞病毒(HCMV)相关癌症如多形性成胶质细胞瘤(GBM)的含佐剂病毒样颗粒疫苗。

背景技术

[0002] HCMV感染与多种癌症有关,包括:GBMs(Cobbs 2002;Mitchel2008)、乳腺癌(Taher 2013;Harkins 2010);前列腺癌;髓母细胞瘤(Baryawno 2011;Libard 2014);脑膜瘤(Libard 2014)和神经母细胞瘤(Wolmer-Solberg 2013)。

[0003] GBM是最常见和最具侵袭性的原发性脑肿瘤,未经治疗的中位生存时间仅为三个月。在美国和欧洲,GBM每年影响每100,000人中的2至3名成年人。仅在美国,每年就有超过20,000人被诊断为GBM,并导致约15,000人死亡。

[0004] 对于HCMV相关的癌症,特别是GBM,仍然需要替代或改进的治疗方法。

发明内容

[0005] 本公开涉及可用于治疗HCMV相关癌症包括GBM的组合物和方法。更具体地,本公开提供了包含病毒样颗粒(VLP)的含佐剂组合物及其使用方法和相关方面,该病毒样颗粒(VLP)包含鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白和HCMV抗原gB和pp65。

[0006] 本发明提供了一种免疫原性组合物,其包含:

[0007] (i)病毒样颗粒,包括:

[0008] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0009] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0010] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

[0011] 和

[0012] (ii)包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂。

[0013] 适当地,佐剂包含为QS21的皂苷和为3-O-脱酰基单磷酰脂质A(3D-MPL)的TLR4激动剂。

[0014] 还提供在受试者中引发免疫反应的方法,所述方法包括施用皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒,病毒样颗粒包含:

[0015] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0016] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0017] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0018] 适宜地,皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒以包含病毒样颗粒和含皂苷和TLR4激动剂的佐剂的免疫原性组合物的形式施用。

[0019] 另外提供的是一种免疫原性组合物,其包含:

[0020] (i)病毒样颗粒,包含:

[0021] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0022] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0023] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

[0024] 和

[0025] (ii)包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂;

[0026] 用于治疗HCMV相关癌症。

[0027] 本发明还提供了治疗受试者中与HCMV相关的癌症的方法,所述方法包括施用包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂,以及包含以下的病毒样颗粒:

[0028] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0029] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0030] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0031] 序列列表

[0032] 以下是本文提及的序列的列表:

[0033] SEQ ID NO:1是MMLV-Gag氨基酸序列

[0034] SEQ ID NO:2是MMLV-Gag核苷酸序列

[0035] SEQ ID NO:3是密码子优化的MMLV-Gag核苷酸序列

[0036] SEQ ID NO:4是MMLV Gag-CMV pp65氨基酸序列

[0037] SEQ ID NO:5是MMLV Gag-CMV pp65核苷酸序列

[0038] SEQ ID NO:6是密码子优化的MMLV Gag-CMV pp65核苷酸序列

[0039] SEQ ID NO:7是密码子优化的MMLV Gag-CMV pp65核苷酸序列

[0040] SEQ ID NO:8是HCMV gB氨基酸序列

[0041] SEQ ID NO:9是HCMV gB核苷酸序列

[0042] SEQ ID NO:10是密码子优化的HCMV gB核苷酸序列

[0043] SEQ ID NO:11是HCMV pp65氨基酸序列

[0044] SEQ ID NO:12是HCMV pp65核苷酸序列

[0045] SEQ ID NO:13是密码子优化的HCMV pp65核苷酸序列

具体实施方式

[0046] 本发明提供了一种免疫原性组合物,其包含:

[0047] (i)病毒样颗粒,包含:

[0048] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0049] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0050] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

[0051] 和

[0052] (ii)包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂。

[0053] 适当地,佐剂包含为QS21的皂苷和为3-O-脱酰基单磷酰脂质A(3D-MPL)的TLR4激动剂。

[0054] 还提供了在受试者中引发免疫反应的方法,所述方法包括施用皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含:

[0055] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0056] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0057] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0058] 适宜地,皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒以包含病毒样颗粒和含皂苷和TLR4激动剂的佐剂的免疫原性组合物的形式施用。

[0059] 所引发的免疫反应通常包括抗原特异性抗体和/或CD4+T细胞和/或CD8+T细胞反应,适宜地抗体、CD4+T细胞和CD8+T细胞反应,针对pp65和gB蛋白中的一种或两者(适宜地,为两者)。

[0060] 本发明还提供了治疗受试者中HCMV相关的癌症的方法,所述方法包括施用包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂,以及包含以下的病毒样颗粒:

[0061] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0062] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0063] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0064] 本发明提供了皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒在制备药物中,特别是在制备用于治疗HCMV相关的癌症的药物中的用途,病毒样颗粒包含:

[0065] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0066] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0067] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0068] 另外提供了用于病毒样颗粒的包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂,该病毒样颗粒包含:

[0069] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0070] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0071] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0072] 包含VLP、皂苷和TLR4激动剂的组合物可以作为包括VLP、皂苷和TLR4激动剂的部件的试剂盒提供。例如,第一容器可以包含VLP,第二容器可以包含皂苷和TLR4激动剂。或者,第一容器可包含VLP,第二容器可包含皂苷,第三容器可包含TLR4激动剂。

[0073] 尽管组合物的组分作为单一混合物方便地施用至特定施用部位,但组分可单独(或以不完全组合)施用至相同或不同部位(参见例如WO2018114982,该文献以引用的方式并入本文以用于以下目的:提供有关基于皂苷和TLR4激动剂的佐剂递送的信息)。如果单独地(或以不完全组合)向相同或不同部位施用,则理想地施用在给药时间和给药部位上都足够接近,从而观察到的结果与通过单一混合物的施用观察到的结果基本相同。合适的单独施用是在2小时内,例如30分钟内,至适当引流到相同淋巴结的位置,例如10cm内。

[0074] HCMV相关癌症

[0075] 如前所述,HCMV感染与多种癌症有关(Nauclér 2019),包括:GBMs(Cobbs 2002;Mitchel 2008)、乳腺癌(Taher 2013;Harkins2010);前列腺癌;髓母细胞瘤(Baryawno 2011;Libard 2014);脑膜瘤(Libard 2014)和神经母细胞瘤(Wolmer-Solberg 2013)。HCMV一种β-疱疹病毒,是一种普遍存在的病原体。在免疫功能正常的人中,HCMV感染通常不会被注意,至多有轻微和非特异性的症状。

[0076] 本文中所用的术语“HCMV相关癌症”是指其中HCMV感染可能是促成因素并且其中抗HCMV治疗可能是有益的癌症。与HCMV感染相关的癌症包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和前列

腺癌、横纹肌肉瘤、肝细胞癌、唾液腺肿瘤、神经母细胞瘤和脑肿瘤(髓母细胞瘤和GBM)。因此,在本发明的一个实施方案中,HCMV相关癌症选自乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌、横纹肌肉瘤、肝细胞癌、唾液腺肿瘤、神经母细胞瘤和脑肿瘤(髓母细胞瘤和GBM)。特别感兴趣的是GBM。

[0077] 患有GBM的受试者可能是第一次出现GBM的那些或可能是经历GBM复发的那些。在一个实施方案中,受试者是第一次出现GBM的。在第二个实施方案中,受试者是具有GBM复发(例如第一次复发)的。

[0078] 合适地,受试者具有小肿瘤,例如基于二维磁共振成像最大横截面为400mm^{2}或更小的肿瘤。通常,这是在治疗开始时时。

[0079] 人受试者在治疗开始时理想地具有至少2,例如至少2.5,特别是至少3的CD4/CD8比率。人受试者在治疗开始时可具有小于3的CD4/CD8比率,例如小于2.5,特别是小于2。

[0080] 由于许多因素,包括肿瘤的定位、细胞对化疗的固有抗性以及脑细胞自我修复能力差,GBM对治疗的反应很差。通常,GBM肿瘤尽可能通过手术切除,但是,由于GBM细胞迅速侵入周围组织,通常不可能完全切除。放射和化学疗法通常在手术治疗后使用,以试图延缓疾病的进展。然而,GBM肿瘤通常会复发,接受治疗的患者的中位生存时间仅为12至15个月。

[0081] 近年来,基于T细胞已被证明杀死肿瘤细胞和浸润脑肿瘤的知识,已提出免疫疗法作为GBM的治疗方法。然而,由于肿瘤细胞的多样性和缺乏可作为免疫靶点的常见肿瘤排斥抗原,治疗GBM的免疫治疗剂的开发已被证明具有挑战性。特别是,GBM患者表现出各种不同的T细胞功能障碍,包括无反应性、耐受性和T细胞耗竭(Woroniecka 2018)。它们还显示出减弱的抗体反应。在一项研究中,31%的具有HCMV阳性肿瘤的GBM患者缺乏抗HCMV抗体(Rahbar 2015)。

[0082] 基于在GBM肿瘤细胞中发现病毒抗原而提出了治疗GBM的免疫治疗方法,这些病毒抗原在正常脑组织中的表达较低。早在2002年,就发现人巨细胞病毒(HCMV)存在于GBM细胞中(Cobbs 2002)。HCMV DNA和蛋白质在超过90%的GBM细胞中表达,但不在周围的正常脑组织中表达(Dziurzynski 2012)。尽管HCMV在GBM中的作用尚不清楚,但已显示HCMV糖蛋白B(gB)通过与受体酪氨酸激酶PDGFR-α(PDGFRα)结合来介导胶质瘤细胞进入,从而激活PI3激酶/Akt信号传导通路,其增强肿瘤细胞生长和侵袭性(Cobbs 2014)。低水平的HCMV表达与GBM患者的总体存活率提高相关(Rahbar 2012)。

[0083] GBM细胞中普遍存在HCMV导致建议HCMV抗原可以构成免疫治疗的治疗靶标。使用HCMV抗原作为靶标的特别潜在好处是它们在免疫学上被认为是“外来的”,并且T细胞对外来抗原的亲和力比对自身抗原的亲和力高得多。

[0084] 一些研究在GBM治疗中调查了针对HCMV抗原的免疫疗法。在一项研究中,HCMV特异性T细胞(CD4+和CD8+多功能T细胞)被证明可以识别并杀死自体GBM肿瘤细胞,从而证明HCMV抗原由肿瘤细胞以免疫学相关水平呈递(Nair 2014)。将这些观察结果扩展到临床,采用自体HCMV特异性T细胞的过继性T细胞疗法显示出令人鼓舞的早期临床结果,在研究期间,10名患者中有4名保持无疾病状态(Schuessler 2014)。

[0085] 虽然这些初步研究显示了HCMV靶向免疫疗法的前景,但其他研究表明,与健康人相比,GBM患者对HCMV的免疫反应显著降低(Liu 2018)。特别是,与HCMV阳性的健康受试者相比,GBM患者产生的抗HCMV抗体(IgG)显著降低(Liu 2018)。在一项研究中,31%患有具有

HCMV的GBM肿瘤的患者完全缺乏抗CMV抗体(Rahbar 2015)。因此,GBM患者对HCMV的免疫有明显的失调,这给开发基于HCMV抗原的免疫治疗带来了重大挑战。

[0086] 需要一种可获得的GBM免疫治疗方法,它有效地靶向GBM肿瘤细胞,但可以配制用于广泛的患者群体。

[0087] 本公开提供了一种免疫治疗组合物及其用于治疗HCMV相关癌症例如GBM的方法。本发明的免疫原性组合物刺激针对表达HCMV的肿瘤,例如表达HCMV的GBM肿瘤的抗HCMV T细胞免疫。

[0088] 免疫治疗组合物包含病毒样颗粒("VLP")。VLP是多蛋白结构,通常由一种或多种病毒蛋白组成。VLP模似病毒的构象,但缺乏遗传物质,因此不具有传染性。它们可以在适当情况下在病毒结构蛋白表达后形成(或"自组装")。VLPs克服了使用减毒病毒制备的疫苗的一些缺点,因为它们可以在生产过程中不需要存在任何活病毒的情况下生产。已有各种各样的VLP被制备。例如,已经制备了包括单个或多个衣壳蛋白的VLP,有或没有包膜蛋白和/或表面糖蛋白。在某些情况下,VLP是无包膜的,仅通过表达一种主要的衣壳蛋白来组装。在其他情况下,VLP被包膜并可以包含在相应的天然病毒中发现的多种抗原蛋白。带包膜VLP的自组装比非包膜VLP更复杂,因为与宿主细胞膜融合(Garrone 2011)和VLP"出芽"以形成完全包膜的单独颗粒需要复杂的反应。可以通过使用电子显微镜对颗粒进行成像来确认完整VLP的形成。

[0089] VLP通常类似于其相应的天然病毒,并且可以是多价颗粒状结构。与其他形式的抗原呈递(例如,不与VLP结合的可溶性抗原)相比,在VLP的情况下呈递表面糖蛋白有利于诱导针对多肽的中和抗体。中和抗体最常识别三级或四级结构;这通常需要呈递呈天然病毒构象的抗原蛋白,如包膜糖蛋白。VLP表面上表达的抗原也诱导CD4限制性T辅助细胞反应,其可帮助引发和维持中和抗体和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。相反,在VLP内部空间内表达的抗原可在称为交叉激发和呈递的过程中通过VLP的树突细胞摄取来促进CD8限制性CTL反应。

[0090] 本发明中使用的VLP通常来源于逆转录病毒载体。逆转录病毒是属于逆转录病毒科的包膜RNA病毒。逆转录病毒感染宿主细胞后,RNA通过逆转录酶转录成DNA。然后通过整合酶将DNA整合到宿主细胞的基因组中,然后作为宿主细胞DNA的一部分进行复制。逆转录病毒科包括以下属:α逆转录病毒(Alpharetrovirus)、β逆转录病毒(Betaretrovirus)、γ逆转录病毒(Gammaretrovirus)、δ逆转录病毒(Deltaretrovirus)、ε逆转录病毒(Epsilonretrovirus)、慢病毒(Lentivirus)和泡沫病毒(Spumavirus)。这个逆转录病毒科的宿主通常是脊椎动物。逆转录病毒产生感染性的病毒颗粒,该病毒颗粒包含被源自宿主细胞膜的脂质双层包围的球形核衣壳(与病毒结构蛋白复合的病毒基因组)。

[0091] 逆转录病毒载体可用于生成缺乏逆转录病毒衍生基因组的VLP,因此是非复制的。这是通过用待转移的基因或核苷酸序列替换逆转录病毒的大部分编码区来实现的;因此载体无法制造额外复制轮次所需的蛋白质。根据颗粒表面上存在的糖蛋白的特性,VLP与宿主细胞结合和进入宿主细胞的能力有限,但不能繁殖。因此,VLPs可以作为免疫原性组合物安全地施用。

[0092] 本发明利用包含鼠白血病病毒(MLV)Gag蛋白,特别是莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)的VLP。这些逆转录病毒的基因组在数据库中很容易获得。

[0093] 逆转录病毒的Gag蛋白具有总体结构相似性，并且在每一组逆转录病毒中，通常在氨基酸水平上是保守的。逆转录病毒Gag蛋白主要在病毒组装中起作用。一些病毒(例如，鼠白血病病毒，如MMLV)的Gag在一些宿主细胞中表达可导致表达产物自组装成VLP。多蛋白形式的Gag基因表达产物产生VLP的核心结构蛋白。在功能上，Gag多蛋白分为三个结构域：将Gag多蛋白靶向细胞膜的膜结合结构域、促进Gag多聚化的相互作用结构域和促进新生病毒颗粒从宿主细胞释放的晚期结构域。通常，介导病毒颗粒组装的Gag蛋白的形式是多蛋白。逆转录病毒组装由Gag多蛋白组成，但没有其他病毒元件(如病毒蛋白酶)的未成熟衣壳，Gag为未成熟病毒颗粒的结构蛋白。

[0094] MMLV Gag基因编码65kDa的多蛋白前体，其在成熟病毒颗粒中被MLV蛋白酶水解切割成4个结构蛋白(基质(MA)；p12；衣壳(CA)；和核衣壳(NC))。在没有MLV蛋白酶的情况下，多蛋白保持未切割，并且所得颗粒保持在未成熟形式。编码MMLV核酸的基因是SEQ ID NO:2。示例性的MMLV核酸的密码子优化序列提供为SEQ ID NO:3。

[0095] 因此，在一些实施方案中，适用于本发明的Gag多肽与为SEQ ID NO:1的MMLV Gag多肽基本上同源。在一些实施方案中，适用于本发明的Gag多肽具有与SEQ ID NO:1至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高同源的氨基酸序列。在一些实施方案中，适用于本发明的Gag多肽与SEQ ID NO:1基本相同或相同。

[0096] 在一些实施方案中，合适的MMLV Gag多肽由与SEQ ID NO:2具有至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的序列同一性的核酸序列编码。在一些实施方案中，合适的MMLV Gag多肽由具有SEQ ID NO:2或其密码子简并形式的核酸序列编码。

[0097] 如本领域技术人员所熟知的，可以通过将编码特定氨基酸(即密码子)的核酸替换为另一种在宿主生物体中更好地表达的密码子来改进核酸序列在宿主生物体中的表达。产生这种效应的一个原因是不同的生物体对不同的密码子表现出偏好这一事实。基于密码子偏好改变核酸序列以实现更好表达的过程称为密码子优化。本领域已知各种方法来分析各种生物体中的密码子使用偏倚，并且已经开发了许多计算机算法来在密码子优化基因序列的设计中实施这些分析。因此，在一些实施方案中，合适的MMLV Gag多肽由编码MMLV Gag，并且与SEQ ID NO:3具有至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的序列同一性的核酸序列的密码子优化形式编码。在一些实施方案中，合适的MMLV-Gag多肽由与SEQ ID NO:3基本相同或相同的核酸序列编码。

[0098] 如本领域所熟知的，氨基酸或核酸序列可以使用多种算法中的任一种进行比较，包括商业计算机程序中可用的那些算法，例如用于核苷酸序列的BLASTN和用于氨基酸序列的BLASTP、带空位BLAST和PSI-BLAST。此类程序的示例在Altschul等人，1990，J.Mol.Biol.，215(3)：403-410；Altschul等人，1996，Methods in Enzymology266：460-480；Altschul人，1997Nucleic Acid Res.25：3389-3402；Baxevanis等人，1998，Bioinformatics：A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins，Wiley；和Misener等人，(eds.)，1999，Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology，Vol.132)，Humana Press。除了鉴定同源序列之外，上述程序通常提供同源性程度的指示。在一些实施方案中，如果至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多的相应残基在一段

相关的残基上是同源的,则认为两个序列基本上同源。在一些实施方案中,相关的延伸段是完整的序列。在一些实施方案中,相关延伸段为至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500或更多个残基。

[0099] 本发明中使用的Gag多肽可以是修饰的逆转录病毒Gag多肽,与野生型或天然存在的Gag多肽相比,其含有一个或多个氨基酸置换、缺失和/或插入,同时保留了基本的自组装活性。通常,在自然界中,Gag蛋白包括大的C末端延伸,其可能含有逆转录病毒蛋白酶、逆转录酶和整合酶的酶活性。然而,VLP的组装通常不需要此类组分的存在。在一些情况下,单独的逆转录病毒Gag蛋白(例如,缺乏C末端延伸,缺乏基因组RNA、逆转录酶、病毒蛋白酶或包膜蛋白中的一种或多种)可以在体外和体内自组装以形成VLP(Sharma 1997)。

[0100] 在一些实施方案中,VLP包含pp65蛋白,该蛋白包含与SEQ ID NO:11至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,pp65蛋白包含由与SEQ ID NO:12至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源的核酸序列编码的多肽。

[0101] 根据本发明使用的Gag多肽适当地缺乏C-末端延伸并且通常表达为与来自HCMV的pp65抗原的融合蛋白。在天然存在的HCMV中,pp65位于衣壳和病毒包膜之间的被膜内。它是细胞毒性T细胞反应的主要靶标,且已知刺激T辅助细胞的形成并诱导针对HCMV的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。pp65多肽框内剪接成Gag多肽编码序列,例如在Gag多肽编码序列的3'端。Gag多肽编码序列和pp65抗原通过单个启动子表达。

[0102] 在一些实施方案中,VLP包含与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源的氨基酸序列的融合蛋白。在一些实施方案中,VLP包含由与SEQ ID NO:5至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源的核酸序列编码的融合蛋白。

[0103] 本发明中使用的VLP还在VLP表面上表达HCMV gB包膜糖蛋白。gB是HCMV中的主要B细胞抗原之一,从而诱导中和保护性免疫反应,包括有效的体液免疫反应。本发明的免疫原性组合物可包含VLP,该VLP包含野生型包膜HCMV gB多肽,其序列为SEQ ID NO:8或SEQ ID NO.8的密码子简并形式。编码该多肽的核酸如SEQ ID NO:9所示。SEQ ID NO:9的密码子优化形式如SEQ ID NO:10所示。

[0104] 在一些实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含含有gB多肽的VLP,所述gB多肽包含与SEQ ID NO:8至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽由与SEQ ID NO:9至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源的核酸序列编码。在一些实施方案中,多肽由SEQ ID NO:9的核酸序列的密码子优化形式编码,其与SEQ ID NO:10至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。

[0105] 在一些实施方案中,VLP包含由与SEQ ID NO:8至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列组成的gB多肽,以及由与SEQ ID NO:4至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列组成的Gag/pp65融合蛋白。

[0106] 应当理解,包含VLP的组合物通常包括具有一定尺寸范围的VLP的混合物。应当理

解，下面列出的直径值对应于混合物中最常见的直径。在一些实施方案中，组合物中>90％的囊泡将具有位于最常见值的50％以内(例如，1000±500nm)的直径。在一些实施方案中，分布可以更窄，例如，组合物中>90％的囊泡可以具有位于最常见值的40、30、20、10或5％内的直径。在一些实施方案中，声处理或超声处理可用于促进VLP形成和/或改变VLP尺寸。在一些实施方案中，过滤、透析和/或离心可用于调节VLP尺寸分布。

[0107] 通常，本公开的VLP可以是任何尺寸。在某些实施方案中，组合物可以包括直径在约20nm至约300nm范围内的VLP。在一些实施例中，VLP的特征在于其直径在以20、30、40、50、60、70、80、90或100nm的下限为界且以300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180或170nm的上限为界的范围内。在一些实施方案中，群体内的VLP显示出在以20、30、40、50、60、70、80、90或100nm的下限为界并且以300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180或170nm的上限为界的范围内的平均直径。在一些实施方案中，群体中的VLP具有小于0.5(例如，小于0.45、小于0.4或小于0.3)的多分散指数。在一些实施例中，VLP直径通过纳米定标(nanosizing)确定。在一些实施方案中，VLP直径通过电子显微镜确定。

[0108] 本发明的VLP可以根据本领域技术人员已知的一般方法来制备。例如，可以使用本领域技术人员熟知的技术来制备核酸分子、重构载体或质粒。VLP的多肽的重组表达需要构建含有编码一种或多种多肽的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码一种或多种多肽的多核苷酸，就可以使用本领域已知的技术通过重组DNA技术来生产用于生产多肽的载体。可根据本发明使用的表达载体包括但不限于哺乳动物和鸟类表达载体、杆状病毒表达载体、植物表达载体(例如，花椰菜花叶病毒(CaMV)、烟草花叶病毒(TMV))、质粒表达载体(例如，Ti质粒)等。

[0109] 本发明的VLP可以在任何可用的蛋白质表达系统中产生。通常，通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞，然后通过常规技术培养转染的细胞以产生VLP。在一些实施方案中，使用细胞的瞬时转染产生VLP。在一些实施方案中，使用稳定转染的细胞产生VLP。可用于VLP生产的典型细胞系包括但不限于哺乳动物细胞系，例如人胚肾(HEK)293、WI 38、中国仓鼠卵巢(CHO)、猴肾(COS)、HT1080、C10、HeLa、小仓鼠肾(BHK)、3T3、C127、CV-1、HaK、NS/0和L-929细胞。具体的非限制性实例包括但不限于BALB/c小鼠骨髓瘤系(NSO/1,ECACC No:85110503)；人成视网膜细胞(PER.C6(CruCell,Leiden,The Netherlands))；通过SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651)；人胚胎肾系(亚克隆用于悬浮培养的293细胞，Graham等人,J.Gen Virol.,36:59(1977))；幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL10)；中国仓鼠卵巢细胞+/-DHFR(CHO,Urlaub and Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216(1980))；小鼠支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-251(1980))；猴肾细胞(CV1 ATCC CCL70)；非洲绿猴肾细胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；人宫颈癌细胞(HeLa、ATCC CCL 2)；犬肾细胞(MDCK、ATCC CCL 34)；水牛鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442)；人肺细胞(W138、ATCC CCL75)；人肝细胞(Hep G2,HB 8065)；小鼠乳腺肿瘤(MMT060562,ATCC CCL51)；TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68(1982))；MRC 5细胞；FS4细胞；和人肝癌系(Hep G2)。在一些实施方案中，可用于VLP生产的细胞系包括昆虫(例如，Sf-9、Sf-21、Tn-368、Hi5)或植物(例如，豆科植物、谷物或烟草)细胞。在一些实施方案中应当理解，特别是当糖基化对于蛋白质功能重要时，哺乳动物细胞对于蛋白质表达和/或VLP产生是优选的(参见例如，Roldao A等人，2010Expt Rev Vaccines 9:1149-76)。

[0110] 应当理解,可以选择调节插入序列的表达或以特定方式修饰和加工基因产物的细胞株。不同的细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性和特定机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保正确修饰和加工所表达的外源蛋白。通常,可以根据本发明使用具有用于适当地加工初级转录物、基因产物的糖基化和磷酸化的适当细胞机制的真核宿主细胞(也称为包装细胞(例如,293T人胚肾细胞))。

[0111] VLP可根据已知技术纯化,例如离心、梯度、蔗糖梯度超速离心、切向流过滤和色谱法(例如离子交换(阴离子和阳离子)、亲和以及尺寸柱色谱法)或差异溶解度等。或者或另外,可直接使用细胞上清液,无需纯化步骤。额外的实体,例如额外的抗原或佐剂可以添加到纯化的VLP。

[0112] 为了产生本发明的VLP,用两种表达载体共转染细胞,第一载体编码Gag-pp65融合多肽,第二载体编码gB包膜糖蛋白。共转染的HCMV gB质粒使从细胞表面出芽的颗粒能够将gB蛋白整合到脂质双层中。结果,产生了包含HCMV pp65非结构蛋白和HCMV gB包膜糖蛋白的“二价”VLP。

[0113] 本发明人先前已经报道了HCMV VLP疫苗的开发,该疫苗包含以其天然构象呈递的刺激中和抗体产生的gB表面抗原,以及诱导辅助性T细胞(TH淋巴细胞)和细胞毒性T细胞(CTL)的pp65外膜蛋白。(参见WO2013068847,其通过引用并入本文以提供关于VLP及其制造的详细信息的目的)。在一项使用来自健康受试者的外周血单核细胞的研究中,该VLP显示出刺激CD4+和CD8+T细胞免疫反应,该反应优于由单独的重组gB和pp65抗原产生的反应(参见实施例3)。

[0114] 皂苷和TLR4激动剂

[0115] 本发明的组合物、方法和用途使用皂苷和TLR4激动剂。

[0116] 皂苷

[0117] 适用于本发明的皂苷是Quil A及其衍生物。Quil A是一种从南美石碱木(Quillaja saponaria Molina)中分离的皂苷制剂,并由Dalsgaard等人1974年首先将其描述为具有佐剂活性(“皂苷佐剂”,Archiv.für die gesamte Virusforschung,第44卷,Springer Verlag,柏林,p243-254)。Quil A的纯化级分已通过HPLC分离,其保留佐剂活性而没有与Quil A相关的毒性(参见例如EP0362278)。一般感兴趣的级分包括QS7、QS17、QS18和QS21,例如QS7和QS21(也称为QA7和QA21)。QS21是特别令人感兴趣的皂苷。

[0118] 在本发明的某些实施方案中,皂苷是石碱木Quil A的衍生物,合适地是可从Quil A获得的免疫活性级分,例如QS7、QS17、QS18或QS21,特别是QS21。

[0119] 通常皂苷,例如Quil A,特别是QS21,为至少90%纯度,例如至少95%纯度,尤其是至少98%纯度,特别是99%纯度。

[0120] QS21组分的纯度可以通过214nm处的UV吸光度作为所用皂苷中QS21组分的比例(例如至少95%,尤其是至少98%,尤其是99%)来确定。

[0121] 本发明的有益特征是皂苷存在于反应原性较低的组合物中,其中它被外源甾醇如胆固醇淬灭。特别地,如本文进一步描述的QS21与作为递送平台的基于胆固醇的脂质体一起配制。用胆固醇淬灭的QS21显示出与游离QS21等同的免疫刺激特性,但裂解性更低且更稳定(Garcon 2017)。

[0122] TLR4激动剂

[0123] TLR4激动剂的合适例子是脂多糖，合适的是脂质A的无毒衍生物，特别是单磷酰基脂质A，更特别是3-O-脱酰基单磷酰基脂质A(3D-MPL)。

[0124] 3D-MPL由GlaxoSmithKline Biologicals N.A.以“MPL”的名义出售，并在整个文件中称为3D-MPL。例如，参见美国专利号4,436,727;4,877,611;4,866,034和4,912,094。3D-MPL可以根据GB 2220 211A中描述的方法生产。化学上它是具有4、5或6个酰化链的3-脱酰基单磷酰基脂质A的混合物。在本发明的上下文中，小颗粒3D-MPL可用于制备水性佐剂组合物。小颗粒3D-MPL的粒径使其可以通过0.22um过滤器进行无菌过滤。此类制剂描述于WO94/21292中。合适地，粉末状3D-MPL用于制备用于本发明的水性佐剂组合物。

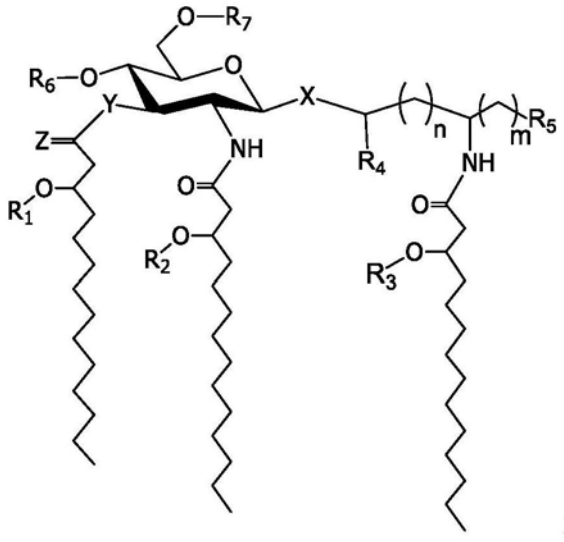
[0125] 其他可以使用的TLR4激动剂是氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸盐(AGP)，例如在WO98/50399或美国专利号6,303,347中描述的那些(也描述了制备AGP的方法)。有些AGP是TLR4激动剂，有些是TLR4拮抗剂。

[0126] 可用于本发明的其他TLR4激动剂包括吡喃葡萄糖基脂质佐剂(GLA)，例如WO2008/153541或WO2009/143457或文献文章Coler RN等人(2011)Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant.PLoS ONE 6(1):e16333.doi:10.1371/journal.pone.0016333和Arias MA等人(2012),Glucopyranosyl Lipid Adjuvant(GLA),a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140.PLoS ONE 7(7):e41144.doi:10.1371/journal.pone.0041144中所述。WO2008/153541或WO2009/143457通过引用并入本文以用于定义可用于本发明的TLR4激动剂的目的。

[0127] 通常，TLR4激动剂，例如脂多糖，尤其是3D-MPL，是至少90％的纯度，例如至少95％的纯度，特别是至少98％的纯度，尤其是99％的纯度。

[0128] AGP是TLR4调节剂。TLR4识别细菌LPS(脂多糖)并在被激活时，启动先天免疫反应。AGP是细菌LPS的脂质A部分的单糖模拟物，并且已在化合物的“酰基链”上发生醚键和酯键。制备这些化合物的方法是已知的并且公开于例如WO 2006/016997、美国专利号7,288,640和6,113,918以及WO 01/90129中，为了定义用于本发明的AGP及其制造方法的目的而通过引用将其全部并入本文中。其他AGP和相关方法公开于美国专利第7,129,219号、美国专利第6,525,028号和美国专利第6,911,434号中，为了定义用于本发明的AGP及其制造方法的目的而通过引用将其全部并入本文中。在本发明的组合物中使用的酰基链上具有醚键的AGP是已知的并且公开于WO 2006/016997中，该专利在此通过引用整体并入，目的是定义在本发明中使用的AGP及其制造方法。特别感兴趣的是在WO 2006/016997的第[0019]至[0021]段中根据式(III)示出和描述的AGP。

[0129] 因此，术语AGP包括下式化合物：

[0130] 

式1

[0131] 其中，

[0132] m为0至6；

[0133] n为0至4；

[0134] X是O或S，特别是O；

[0135] Y是O或NH；

[0136] Z是O或H；

[0137] R_1、R_2、R_3各自独立地选自C_{1-20}酰基和C_{1-20}烷基；

[0138] R_4是H或甲基；

[0139] R_5独立地选自-H、-OH、-(C_1-C_4)烷氧基、-$PO_3R_8R_9$、-$OPO_3R_8R_9$、-SO_3R_8、-OSO_3R_8、-NR_8R_9、-SR_8、-CN、-NO_2、-CHO、-CO_2R_8和-$CONR_8R_9$，

[0140] 其中R_8和R_9各自独立地选自H和(C_1-C_4)烷基；和

[0141] R_6和R_7各自独立地是H或PO_3H_2。

[0142] 技术人员将理解AGP可以盐的形式存在，特别是以药学上可接受的盐的形式存在。尽管在制造过程中可以使用非药学上可接受的盐，但理想地避免使用它们。

[0143] 正构脂肪酰基残基(即仲酰氧基或烷氧基残基，例如R_1O、R_2O和R_3O)所连接的3'立体中心的构型是R或S，合适的是R(如按照Cahn-Ingold-Prelog优先级规则命名的)。R_4和R_5所连接的苷元立体中心的构型可以是R或S。所有立体异构体，对映异构体和非对映异构体，以及它们的混合物，都包含在该式中。

[0144] 杂原子X和苷元氮原子之间的碳原子数由变量“n”确定，该变量可以是0到4的整数(即0、1、2、3或4)，合适地是0到2的整数(即0、1或2)。

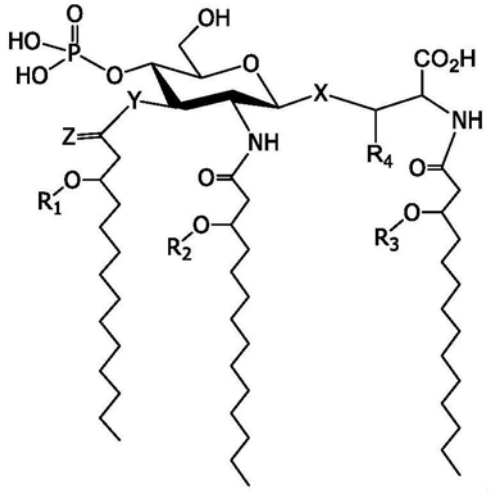
[0145] 正构脂肪酸R_1、R_2和R_3的链长度适当地为6至20个碳，尤其是6至16个碳，尤其是9至14个碳。链长可以相同或不同。理想的实施方案包括其中R_1、R_2和R_3独立地选自6、8、10、12或14的链长。

[0146] 在一个实施方案中，R_1、R_2和R_3是相同的。在第二实施方案中，所有的R_1、R_2和R_3都是不同的。在第三实施方案中，R_1、R_2和R_3之一不同于其他两个。该式涵盖L/D-丝氨酰、-苏氨酰、-半胱氨酰醚和酯脂质AGP，激动剂和拮抗剂两者及其同系物(n＝1-4)，以及各种羧酸生物电子等排体(即R_5是能够成盐的酸性基团；磷酸盐可以在葡糖胺单元的4位或6位，但合适

的是在4位)。

[0147] 在AGP化合物的一个具体实施方案中,n为0,R_5为CO_2H,R_6为PO_3H_2,并且R_7为H。因此此类AGP化合物由式1a定义:

[0148]



式 1a

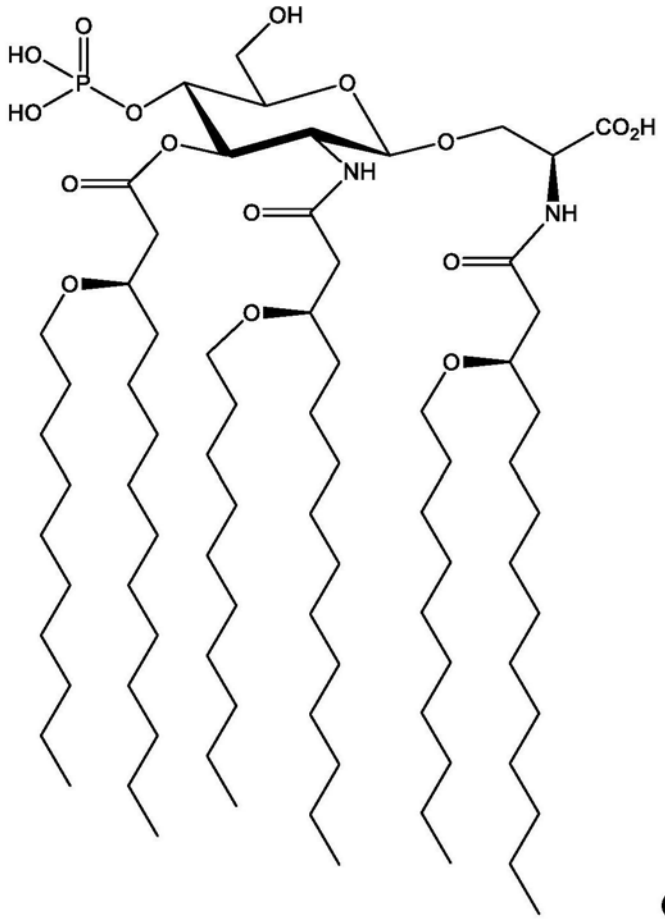
[0149] 其中X是O或S;Y是O或NH;Z是O或H;R_1、R_2、R_3各自独立地选自C_{1-20}酰基和C_{1-20}烷基;R_4为H或甲基。

[0150] 在式1a中,正构脂肪酰基残基(即仲酰氧基或烷氧基残基,例如R_1O、R_2O和R_3O)所连接的3'立体中心的构型为R或S,优选R(如按照Cahn-Ingold-Prelog优先级规则指定的)。R_4和CO_2H所连接的苷元立体中心的构型可以是R或S。所有立体异构体,对映异构体和非对映异构体两者,以及它们的混合物都包含在该式中。

[0151] 式1a涵盖L/D-丝氨酰、-苏氨酰、-半胱氨酰醚或酯脂质AGP,激动剂和拮抗剂两者。

[0152] 在式1和式1a中,Z是通过双键连接的O或各自通过单键连接的两个氢原子。即当Z=Y=O时,该化合物是酯连接的;当Z=O和Y=NH时,是酰胺连接的;和当Z=H/H和Y=O时,是醚连接的。

[0153] 式1的特定化合物称为CRX601:

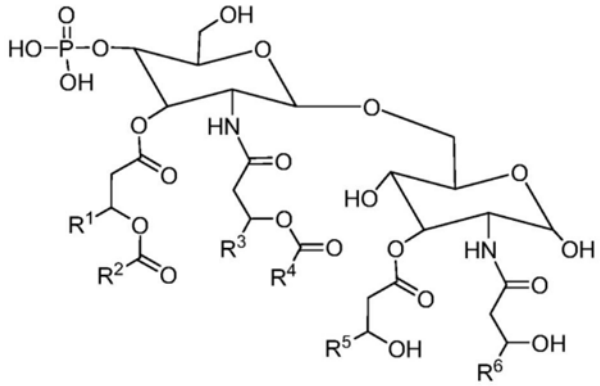
[0154] 

CRX601

[0155] 吡喃葡萄糖基脂质佐剂

[0156] GLA是TLR4调节剂,例如在WO2008/153541或WO2009/143457或文献文章Coler RN(2011)等人,Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant.PLoS 6(1):e16333.doi:10.1371/journal.pone.0016333,Arias MA等人(2012),Glucopyranosyl Lipid Adjuvant(GLA),Synthetic TLR4Agonist,Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140.PLoS 7(7):e41144.doi:10.1371/journal.pone.0041144中所述。

[0157] 因此,术语GLA包括下式化合物:

[0158] 

式2

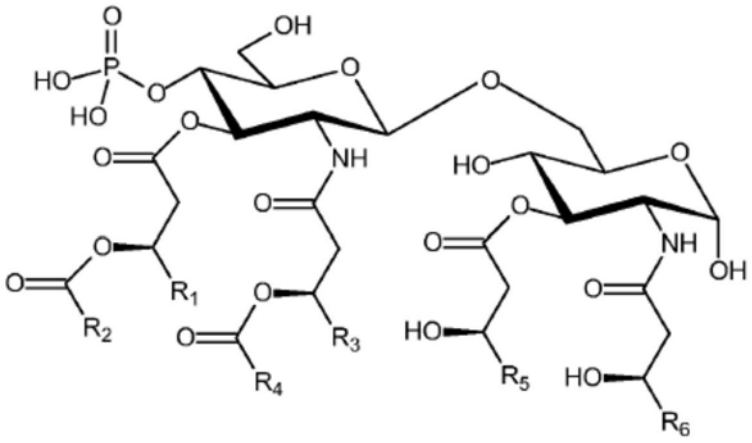
[0159] 其中:

[0160] R^1、R^3、R^5和R^6各自独立地为C_{11-20}烷基;和

[0161] R^2和R^4各自独立地是C_{12-20}烷基;

[0162] 及其盐,例如药学上可接受的盐。

[0163] 特别感兴趣的是具有立体化学的式2化合物:

[0164] 

式 2b

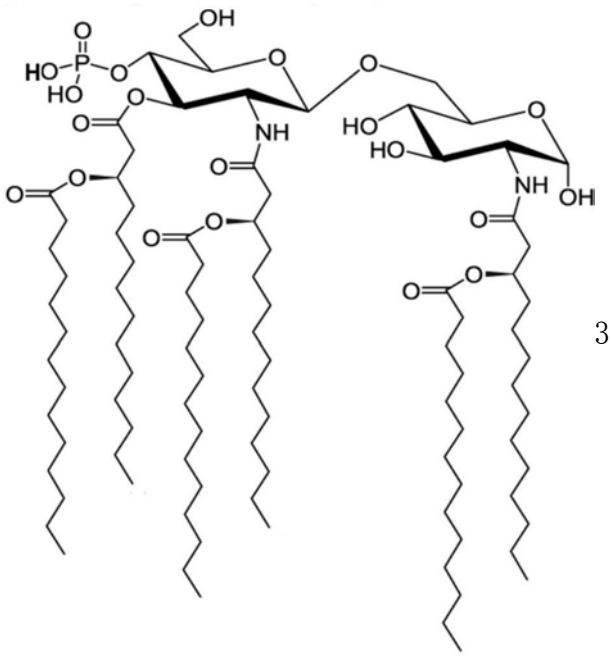
[0165] 及其盐,例如药学上可接受的盐。

[0166] 合适地,对于式2和2b的化合物,R^1至R^6全部都是直链烷基。

[0167] 合适地,R^1、R^3、R^5和R^6各自选自C_{11-15}烷基。适当地,R^1、R^3、R^5和R^6中的每一个都是相同的。理想地,R^1、R^3、R^5和R^6中的每一个是C_{11}烷基。

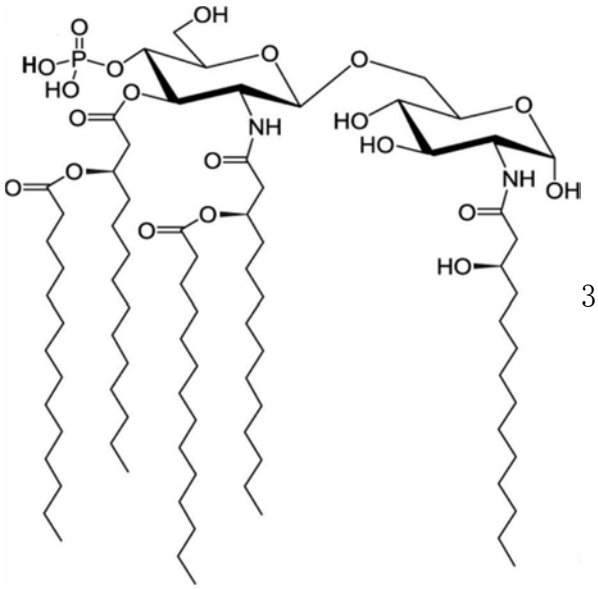
[0168] 合适地,R^2和R^4各自独立地选自C_{12-16}烷基。适当地,R^2和R^4中的每一个都是相同的。适当地,R^2和R^4中的每一个都是相同的。理想地,R^2和R^4中的每一个是C_{13}烷基。

[0169] 感兴趣的TLR4激动剂包括:

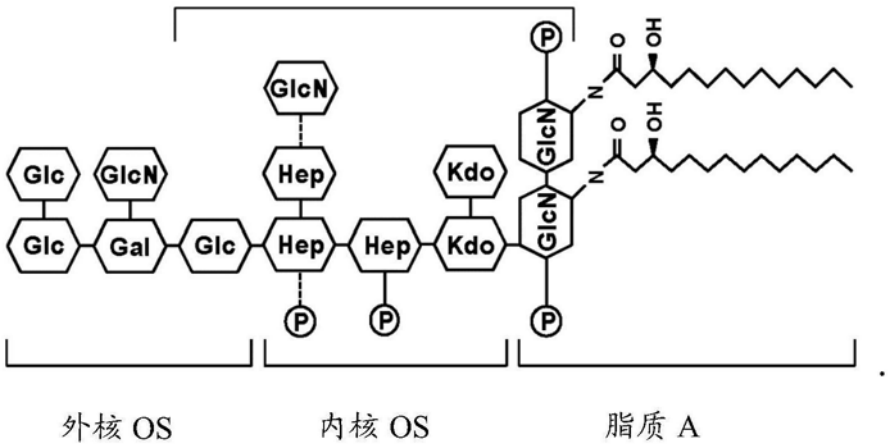
[0170] 

3-脱酰基单磷酰基六酰基脂质A。

[0171] 另一种感兴趣的TLR4激动剂是:

[0172]  3-脱酰基单磷酰基脂质A。

[0173] 感兴趣的TLR激动剂是dLOS(如Han,2014中所述):

[0174] 

[0175] 在一个实施方案中,TLR4激动剂是盐的形式,例如药学上可接受的盐。在第二实施方案中,TLR4激动剂不是盐的形式。

[0176] 通常,GLA至少为90%纯度,例如至少95%纯度,尤其是至少98%纯度,特别是99%纯度。

[0177] 受试者通常是哺乳动物,特别是人。人类可能是人类孩子。例如,在施用第一剂量时,人类受试者可能小于18岁。人可以是成年人。例如,在施用第一剂量时,人类受试者可以是18至60岁,例如18至40岁。

[0178] 人可以是老年人。例如,在施用第一剂量时,人类受试者可能大于60岁(例如60至80岁),例如大于65岁。人可以是18-70岁。

[0179] 典型的人剂量包含具有1至25ug pp65蛋白质含量的VLP,例如5至20ug,特别是8至12ug,尤其是10ug。典型的人剂量包含gB蛋白含量以重量计为pp65含量的1/200至1/10,例如pp65含量的1/120至1/40,特别是pp65含量的1/100至1/60的VLP。蛋白质含量可以通过如定量ELISA的方法确定。当pp65蛋白存在于融合蛋白中时,pp65含量基于融合蛋白的pp65部分。

[0180] 通常会根据需要重复施用。例如,可以每周至每6个月,例如每2周至每6周,例如大约每4周(+/-3天)重复施用。

[0181] 组合物可以包含至少一种另外的药学上可接受的赋形剂、辅助剂和/或载体。典型的载体包括乳液、ISCOMS和脂质体，特别是脂质体。

[0182] 术语“脂质体”在本领域中是众所周知的并且定义了囊泡的一般类别，其包含围绕水性空间的一个或多个脂质双层。因此，脂质体由一种或多种脂质和/或磷脂双层组成，并且在其结构中可以包含其他分子，例如蛋白质或碳水化合物。因为存在脂质相和水相，脂质体可以包封或截留水溶性材料、脂溶性材料和/或两亲性化合物。

[0183] 脂质体的大小可以从30nm到几微米不等，这取决于磷脂组成及其制备方法。在本发明中，脂质体大小将在50nm至200nm的范围内，尤其是60nm至180nm，例如70-165nm。最佳情况下，脂质体应该是稳定的，直径为～100nm，以允许通过过滤进行方便的灭菌。

[0184] 脂质体的结构完整性可以通过诸如动态光散射(DLS)的方法，从而测量脂质体的大小(Z-平均直径，Zav)和多分散性，或通过电子显微镜分析脂质体的结构来评估。合适地，平均粒度在95和120nm之间，和/或多分散性(PdI)指数不超过0.35，特别是不超过0.3，例如不超过0.25。在一个实施方案中，平均粒度在95和120nm之间，和/或多分散性(PdI)指数不超过0.2。

[0185] 本发明的脂质体可以含有磷脂酰胆碱脂质，例如二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)。适当地，脂质体还含有甾醇，例如胆固醇。

[0186] 皂苷，例如QS21，可以以每人剂量1至100ug，例如20至60ug的量使用。QS21的使用量约为50ug。合适范围的例子是40-60ug，适当地45-55ug或49-51ug，例如50ug。在进一步的实施方案中，人剂量包含约25ug水平的QS21。较低范围的例子包括20-30ug，适当地22-28ug或24-26ug，例如25ug。

[0187] TLR4激动剂，例如3D-MPL，可以以每人剂量1到100ug之间的量使用，例如20到60ug。3D-MPL的使用量可以为约50ug。合适范围的例子是40-60ug，适当地45-55ug或49-51ug，例如50ug。在进一步的实施方案中，人剂量包含约25ug水平的3D-MPL。较低范围的例子包括20-30ug，适当地22-28ug或24-26ug，例如25ug。

[0188] TLR4激动剂与皂苷的重量比合适地在1:5至5:1之间，尤其是1.2:1至1:1.2，例如1:1。

[0189] 与意图用于成人的剂量相比，意图用于儿童的人剂量可能会减少(例如减少50％)。

[0190] 皂苷:DOPC的比率通常为约1:50至1:10(w/w)，适宜为1:25至1:15(w/w)，优选1:22至1:18(w/w)，例如1:20(w/w)。

[0191] 在进一步的实施方案中，将缓冲剂添加到组合物中。液体制剂的pH值根据组合物的组分和对受试者给药所需的适宜性进行调节。合适地，液体混合物的pH为至少4、至少5、至少5.5、至少5.8、至少6。液体混合物的pH可以小于9、小于8、小于7.5或小于7。在其他实施方案中，液体混合物的pH在4和9之间，在5和8之间，例如在5.5和8之间。因此，pH适当地在6-9之间，例如6.5-8.5。在一个特别优选的实施方案中，pH在5.8和6.4之间。

[0192] 合适的缓冲剂可以选自乙酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、马来酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐和TRIS。在一个实施方案中，缓冲剂是磷酸盐缓冲剂，例如Na/Na_2PO_4、Na/K_2PO_4或K/K_2PO_4。

[0193] 缓冲剂可以至少6mM、至少10mM或至少40mM的量存在于液体混合物中。缓冲剂可以

以小于100mM、小于60mM或小于40mM的量存在于液体混合物中。

[0194] 众所周知，对于肠胃外施用，溶液应具有药学上可接受的渗透压，以避免细胞变形或溶解。药学上可接受的渗透压通常意味着溶液将具有近似等渗或轻度高渗的渗透压。合适地，当重构时，本发明的组合物将具有250至750mOsm/kg范围内的渗透压，例如，渗透压可以在250至550mOsm/kg范围内，例如在280至500mOsm/kg范围内。在一个特别优选的实施方案中，渗透压可以在280至310mOsm/kg的范围内。

[0195] 渗透压可以根据本领域已知的技术测量，例如通过使用市售的渗透压计，例如可从Advanced Instruments Inc.(USA)获得的AdvancedTM2020型。

[0196] “等渗剂”是生理上耐受的并且赋予制剂合适的张力以防止水净流过与制剂接触的细胞膜的化合物。在一些实施方案中，用于组合物的等渗剂是盐(或盐的混合物)，合适地盐是氯化钠，合适地浓度为约150nM。然而，在其他实施方案中，组合物包含非离子等渗剂并且组合物中氯化钠的浓度小于100mM，例如小于80mM，例如小于50mM，例如小于40mM，小于30mM，尤其是小于20mM。组合物中的离子强度可以小于100mM，例如小于80mM，例如小于50mM，小于40mM或小于30mM。

[0197] 在一个具体实施方案中，非离子等渗剂是多元醇，例如蔗糖和/或山梨糖醇。山梨糖醇的浓度可以例如为约3％至约15％(w/v)，例如约4％至约10％(w/v)。WO2012/080369中已经描述了包含免疫活性皂苷级分和TLR4激动剂的佐剂，其中等渗剂是盐或多元醇。

[0198] 适当地，人剂量体积在0.05ml和1ml之间，例如在0.1和0.5ml之间，特别是约0.5ml或0.7ml的剂量体积。所用组合物的体积可能取决于递送途径和位置，皮内途径给予的剂量较小。单位剂量容器可能含有过量(overage)，以允许在单位剂量施用期间对材料进行适当操作。

[0199] 此类组合物可以任选地与一种或多种另外的治疗活性物质如化疗治疗组合施用。

[0200] 组合物旨在用于施用，且因此通常以无菌注射形式(例如，适合肌肉内注射的形式)提供。例如，在一些实施方案中，药物组合物以适合注射的液体(例如水性)剂型提供。

[0201] 在一些实施方案中，所提供的组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂(例如，防腐剂、惰性稀释剂、分散剂、表面活性剂和/或乳化剂、缓冲剂等)。合适的赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、蔗糖、海藻糖、甘油、乙醇或类似物，以及它们的组合。Remington's The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro,(Lippincott,Williams& Wilkins,Baltimore,MD,2006)公开了用于配制药物组合物的各种赋形剂及其已知的制备技术。除非任何常规赋形剂介质与物质或其衍生物不相容，例如通过产生任何不希望的生物学效应或以其他方式与组合物的任何其他组分以有害方式相互作用，其用途预期在本发明的范围内。在一些实施方案中，组合物包含一种或多种防腐剂。在一些实施方案中，组合物不包含防腐剂。

[0202] 在一些实施方案中，组合物以可以冷藏和/或冷冻的形式提供。在一些实施方案中，重构溶液和/或液体剂型可以在重构之后储存一定时间段(例如，2小时、12小时、24小时、2天、5天、7天、10天、2周、一个月、两个月或更长时间)。在一些实施方案中，VLP制剂的储存超过指定时间导致VLP降解。

[0203] 本文所述的组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。在一些实施方案中，此类制备方法包括使活性成分与一种或多种赋形剂和/或一种

或多种其他辅助成分结合的步骤，然后，如果有必要和/或需要，将产品包装成所需的单一或多剂量单位。

[0204] 根据本发明的组合物可以作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量批量制备、包装和/或出售。如本文所用，“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用于受试者的剂量和/或这种剂量的便利部分，例如这种剂量的二分之一或三分之一。

[0205] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其他成分的相对量可以变化，这取决于受试者的身份、大小和/或状况和/或取决于该组合物将被施用的途径。

[0206] 在一些实施方案中，治疗包括在时间上适当间隔地多次施用本公开的组合物。本文所述的组合物通常在它们继续诱导免疫反应的这段时间内施用，或直到患者经历其疾病进展的这段时间。在本发明的一个优选实施方案中，本发明的组合物每4周施用。

[0207] 优选的剂量可能因受试者而异，并且可能取决于几个因素。因此，应当理解，一般而言，所使用的精确剂量将由开处方的医师确定，并且不仅取决于受试者的体重，而且取决于受试者的年龄，并且可能取决于疾病的进展，患者中针对HCMV的免疫失调的程度。

[0208] 在某些实施方案中，所提供的组合物可以配制用于肠胃外递送，例如通过注射。在这样的实施方案中，施用可以是例如静脉内、肌肉内、皮内或皮下，或通过输注或无针注射技术。在一个优选的实施方案中，组合物被配制用于肌内注射。

[0209] 根据本发明的组合物的施用可以改善受试者的生活质量、减轻症状、减缓进展和/或延长生存期。

[0210] 本发明通过以下条款进一步阐明：

[0211] 条款1.一种免疫原性组合物，包含：

[0212] (i)病毒样颗粒(VLP)，其包含：

[0213] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白；

[0214] (b)HCMV pp65蛋白；和

[0215] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白；

[0216] 和

[0217] (ii)包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂。

[0218] 条款2.根据条款1的免疫原性组合物，用于治疗HCMV相关癌症。

[0219] 条款3.一种用于制备免疫原性组合物的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0220] (i)包含病毒样颗粒的第一容器，所述病毒样颗粒包含：

[0221] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白；

[0222] (b)HCMV pp65蛋白；和

[0223] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白；

[0224] 和

[0225] (ii)包含佐剂的第二容器，佐剂包含皂苷和TLR4激动剂。

[0226] 条款4.一种用于制备免疫原性组合物的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0227] (i)包含病毒样颗粒的第一容器，所述病毒样颗粒包含：

[0228] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白；

[0229] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0230] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

[0231] (ii)包含皂苷的第二容器;

[0232] (iii)包含TLR4激动剂的第三容器。

[0233] 条款5.用于与以下一起使用以在受试者中引发免疫反应的皂苷:

[0234] (i)病毒样颗粒,包含:

[0235] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0236] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0237] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

[0238] 和

[0239] (ii)TLR4激动剂。

[0240] 条款6.用于与以下一起使用以在受试者中引发免疫反应的TLR4激动剂:

[0241] (i)病毒样颗粒,包含:

[0242] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0243] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0244] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白;

[0245] 和

[0246] (ii)皂苷。

[0247] 条款7.一种用于与病毒样颗粒一起使用的包含皂苷和TLR4激动剂的佐剂,所述病毒样颗粒包含:

[0248] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0249] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0250] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0251] 条款8.一种在受试者中引发免疫反应的方法,所述方法包括施用皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含:

[0252] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0253] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0254] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0255] 条款9.根据条款8的方法,其中皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒以根据条款1的免疫原性组合物的形式施用。

[0256] 条款10.用于治疗受试者的HCMV相关癌症的方法,所述方法包括施用皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含:

[0257] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0258] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0259] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0260] 条款11.皂苷、TLR4激动剂和病毒样颗粒在制备药物中,特别是在制备用于治疗HCMV相关癌症的药物中的用途,所述病毒样颗粒包含:

[0261] (a)鼠白血病病毒(MLV)gag蛋白;

[0262] (b)HCMV pp65蛋白;和

[0263] (c)HCMV糖蛋白B(gB)蛋白。

[0264] 条款12.根据条款1至11中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述MLV Gag蛋白是莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)Gag蛋白。

[0265] 条款13.根据条款1至12中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中VLP包含MLV Gag多肽,所述MLV Gag多肽包含与SEQ ID NO:1至少80%,例如至少90%,尤其是至少95%,尤其是至少98%相同的氨基酸序列,例如由其组成。

[0266] 条款14.根据条款1至13中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中VLP包含由与SEQ ID NO:2具有至少80%,例如至少90%,尤其是至少95%,尤其是至少98%相同的核酸序列编码的多肽。

[0267] 条款15.根据条款1至14中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含gB蛋白,所述gB蛋白包含与SEQ ID NO:8至少80%,例如至少90%,尤其是至少95%,尤其是至少98%相同的氨基酸序列,例如由其组成。

[0268] 条款16.根据条款1至15中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含由与SEQ ID NO:9具有至少80%,例如至少90%,特别是至少95%,尤其是至少98%相同的核酸序列编码的gB蛋白。

[0269] 条款17.根据条款1至16中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含pp65蛋白,所述pp65蛋白包含与SEQ ID NO:11至少80%,例如至少90%,特别是至少95%,尤其是至少98%相同的氨基酸序列,例如由其组成。

[0270] 条款18.根据条款1至17中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中VLP包含由与SEQ ID NO:12至少80%,例如至少90%,特别是至少95%,尤其是至少98%相同的核酸序列编码的pp65蛋白。

[0271] 条款19.根据条款1至18中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含MLV Gag和HCMV pp65蛋白的融合物。

[0272] 条款20.根据条款19的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中MLV Gag在N端直接或间接融合至pp65蛋白。

[0273] 条款21.根据条款20所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述VLP包含融合蛋白,所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:4至少80%,例如至少90%,特别是至少95%,特别是至少98%相同的氨基酸序列,例如由其组成。

[0274] 条款22.条款1至21中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中皂苷是Quil A或其衍生物。

[0275] 条款23.根据条款22的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中皂苷是QS21。

[0276] 条款24.根据条款1至23中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述TLR4激动剂是脂多糖。

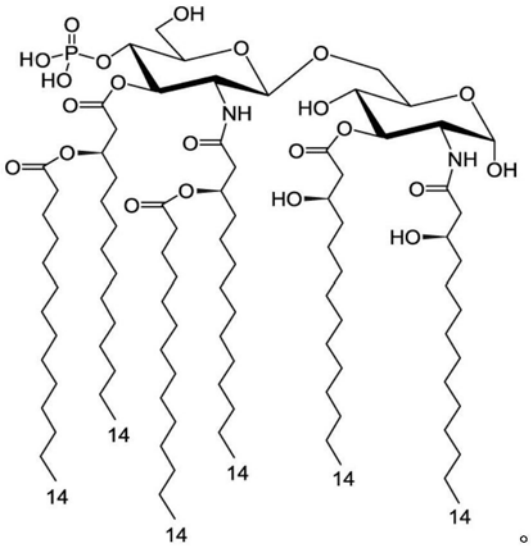
[0277] 条款25.根据条款24的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述脂多糖是单磷酰脂质A。

[0278] 条款26.根据条款25的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中单磷酰脂质A是3-O-脱酰基单磷酰脂质A(3D-MPL)。

[0279] 条款27.根据条款1至24中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、

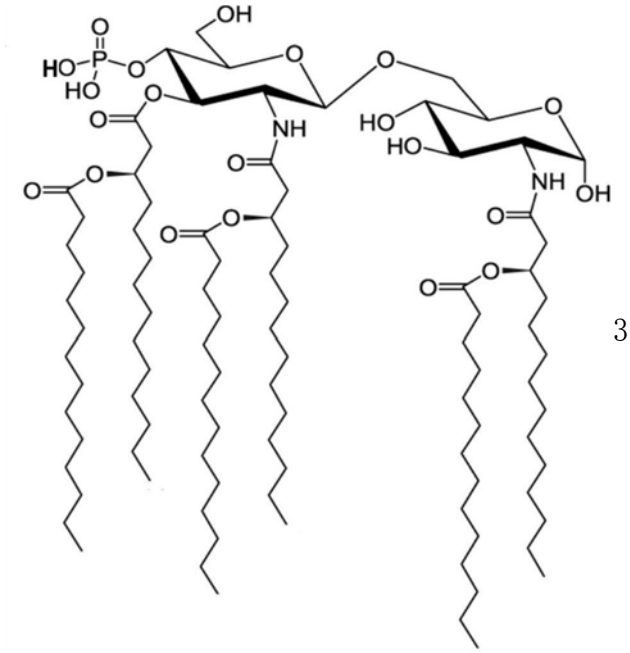
方法或用途，其中所述TLR4激动剂是AGP，例如式1或式1a的化合物，特别是CRX601。

[0280] 条款28.根据条款1至24中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中所述TLR4激动剂是吡喃葡萄糖基脂质佐剂，例如式2或式2b的化合物，特别是：

[0281] 

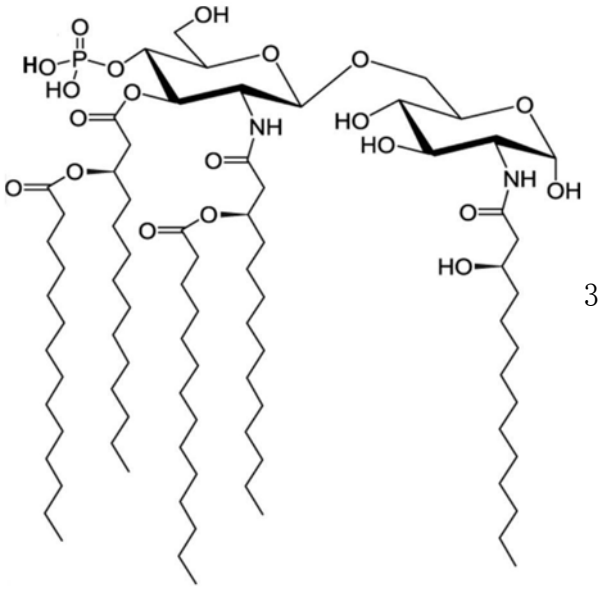
。

[0282] 条款29.根据条款1至24中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中所述TLR4激动剂是：

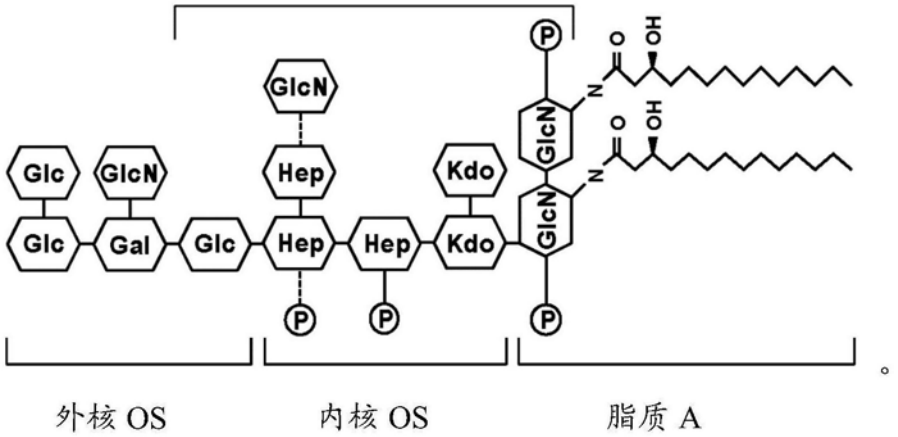
[0283] 

3-脱酰基单磷酰基六酰基脂质A。

[0284] 条款30.根据条款1至24中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中所述TLR4激动剂是：

[0285]  3-脱酰基单磷酰脂质A。

[0286] 条款31.根据条款1至24中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,其中所述TLR4激动剂是:

[0287] 

。

[0288] 条款32.根据条款1至31中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于施用于人,例如18至70岁的人。

[0289] 条款33.根据条款1至32中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于治疗HCMV相关癌症,所述HCMV相关癌症选自乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌、横纹肌肉瘤、肝细胞癌、唾液腺肿瘤、神经母细胞瘤和脑肿瘤(如髓母细胞瘤和GBM)。

[0290] 条款34.根据条款1至33中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于治疗GBM。

[0291] 条款35.根据条款34的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于治疗第一次发生GBM的受试者的GBM。

[0292] 条款36.根据条款34的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于治疗经历复发例如第一次复发的受试者的GBM。

[0293] 条款37.根据条款34至36中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于治疗患有最大横截面积为400mm^2或更小的肿瘤的受试者的GBM。

[0294] 条款38.根据条款1至37中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途,用于在治疗开始时具有至少2,例如至少2.5的CD4/CD8比率的受试者。

[0295] 条款39.根据条款38的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，用于在治疗开始时具有至少3的CD4/CD8比率的受试者。

[0296] 条款40.根据条款1至37中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，用于在治疗开始时CD4/CD8比率小于3，例如小于2.5和特别是小于2的受试者。

[0297] 条款41.条款1至40中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，用于引发抗原特异性抗体反应。

[0298] 条款42.条款1至41中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，用于引发抗原特异性CD4+T细胞反应。

[0299] 条款43.条款1至42中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，用于引发抗原特异性CD8+T细胞反应。

[0300] 条款44.条款1至43中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中抗原特异性反应是针对pp65。

[0301] 条款45.条款1至44中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中抗原特异性反应是针对gB。

[0302] 条款46.根据条款1至45中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中施用是肌内施用。

[0303] 条款47.根据条款1至46中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中人剂量包含1至25ug的pp65蛋白含量，例如5至20ug，特别是8到12ug，尤其是10ug。

[0304] 条款48.根据条款1至47中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中人剂量包含以重量计pp65含量的1/200至1/10的gB蛋白含量，如为pp65含量的1/120至1/40，特别是pp65含量的1/100至1/60。

[0305] 条款49.根据条款1至48中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中人剂量包含1至100ug皂苷，例如50ug。

[0306] 条款50.条款1至49中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中人剂量包含1至100ug TLR4激动剂，例如50ug。

[0307] 条款51.根据条款1至50中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中皂苷和/或TLR4激动剂与脂质体载体一起配制。

[0308] 条款52.根据条款51的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中皂苷和/或TLR4激动剂与包含甾醇例如胆固醇的脂质体载体一起配制。

[0309] 条款53.根据条款1至53中任一项的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中每周至每6个月重复施用，例如每2周至每6周，例如每4周一次。

[0310] 条款54.根据条款1至53中任一项所述的组合物、试剂盒、皂苷、TLR4激动剂、佐剂、方法或用途，其中肌肉内施用包含VLP和脂质体制剂形式的佐剂的组合物且每4周重复施用，所述VLP包含10ug pp65蛋白，所述佐剂包含50ug QS21和50ug 3D-MPL。

[0311] 实施例

[0312] 以下实施例描述了制备和实施本文所述免疫原性组合物的一些示例性模式。应当理解，这些实施例仅用于说明目的，并不意味着限制本文所述的组合物和方法的范围。

[0313] 实施例1:DNA表达质粒的构建

[0314] 本实施例描述了用于表达重组HCMV基因序列(gB(SEQ ID NO:10)和Gag/pp65融合基因(SEQ ID NO:6序列)的表达质粒和构建体的开发。标准表达质粒通常由哺乳动物来源的启动子序列、内含子序列、聚腺苷酸化信号序列(PolyA)、pUC复制起点序列(pUC-pBR322是colE1复制起点/起始位点,且用于在如大肠杆菌(DH5α)的细菌中复制质粒)以及抗生素抗性基因(作为质粒噬斑选择的选择标记)组成。在内含子之后的质粒内有多种限制酶位点,其可用于剪接感兴趣的基因或部分基因序列。

[0315] Propol II表达质粒包含pHCMV(HCMV的早期启动子)、β-珠蛋白内含子(BGL Intron)、兔珠蛋白多腺苷酸化信号序列(PolyA)、pUC复制起点序列(pUC-pBR322是colE1复制起点/复制起始位点,且用于在如大肠杆菌(DH5α)的细菌中复制质粒),以及氨苄青霉素抗性基因β-内酰胺酶(Amp R-质粒的选择性标记,赋予对氨苄青霉素(100μg/ml)的抗性)。

[0316] 为了开发Gag MMLV表达构建体("MLV-Gag"),将编码MMLV的Gag多蛋白(Gag,没有其C末端Pol序列)的互补DNA(cDNA)序列(Seq ID NO:3)克隆到Propol II中表达载体中。为了开发gB表达构建体("gB"),gB的全长序列针对人类表达进行了密码子优化(GenScript)(SEQ ID NO:10),并被克隆到Propol II表达载体中,包括gB的细胞外部分、跨膜结构域(TM)和胞质部分(Cyto)。为了开发Gag/pp65表达构建体("Gag/pp65"),将编码MMLV的Gag多蛋白(Gag,没有其C末端Pol序列)的序列与为人类表达进行密码子优化(GenScript)的pp65全长序列融合(SEQ ID NO:6)并克隆到Propol II表达载体中。

[0317] DNA质粒在感受态大肠杆菌(DH5α)中扩增,并根据标准方案用无内毒素制备试剂盒纯化。

[0318] 实施例2:病毒样颗粒的生产

[0319] 该实施例描述了用于生产含有实施例1中描述的各种重组HCMV抗原的病毒样颗粒的方法。

[0320] 源自HEK 293细胞的293SF-3F6细胞系是一种专有的悬浮细胞培养物,在无血清化学成分确定的培养基中生长(CA 2,252,972和US6,210,922)。细胞使用磷酸钙方法用MMLV-Gag/pp65 DNA表达质粒瞬时转染,并用实施例1中描述的gB DNA表达质粒共转染。通过流式细胞术证实HEK 293细胞表达HCMV抗原。转染48至72小时后,收获含有VLP的上清液并通过0.45um孔径的膜过滤,并在SW32Beckman转头中通过20%蔗糖垫超速离心(25,000rpm,2小时,4℃)进一步浓缩和纯化。将沉淀物重新悬浮在无菌无内毒素PBS(GIBCO)中以获得500倍浓缩的VLP原液。通过Bradford测定定量试剂盒(BioRad)在等分试样上测定总蛋白质。纯化的VLP储存在-80℃下直至使用。通过SDS-Page和蛋白质印迹使用针对gB(针对gB的CH 28小鼠单克隆抗体;Virusys Corporation;Pereira,L等人.1984Virology139:73-86)和pp65(针对UL83/pp65的CH12小鼠单克隆抗体;Virusys Corporation;Pereira,L.等人1982Infect Immun 36:924-932)的特异性抗体对每批纯化的VLP分析gB和MMLV-Gag/pp65融合蛋白的表达。使用增强化学发光(ECL)检测抗体。

[0321] 实施例3:使用gB/pp65Gag VLP刺激来自健康HCMV阳性受试者的PBMC中的T细胞

[0322] 本研究的目的是评估如实施例2中所述产生并通过蔗糖垫超速离心纯化的gB/pp65Gag VLP激活来自健康的HCMV阳性受试者的外周血单核细胞("PBMC")中预先存在的HCMV特异性CD4+和CD8+T细胞的能力。

[0323] 人外周血获自CMV^+健康供体。使用Ficoll梯度分离从全血中分离PBMC,并创建单

次使用等分试样。PBMC在分离后新鲜使用或在-170℃储存后使用。简而言之，PBMC在4mL PP培养管中以1x 10^6个细胞/mL培养。将gB/pp65 eVLP和对照添加到细胞中。在加入莫能菌素之前用刺激剂细胞培养3小时，并再培养10小时。

[0324] 根据分泌IFN-γ的CD4+和CD8+T细胞的频率，在离体PBMC培养物中评估效力。收集细胞并使用PerCP缀合的抗CD3、PE缀合的抗CD4和APC缀合的抗CD8单克隆抗体对表面抗原染色。然后对细胞进行透化和固定以用BV510缀合的抗IFN-γ进行细胞内染色。通过流式细胞术分析在FACS Accuri(Beckton-Dickinson)上分析染色的孔。使用FlowJo软件(TreeStar)，首先对CD3+细胞进行门控，以评估$CD3^+CD4^+$或$CD3^+CD8^+$细胞群体中IFN-γ分泌细胞的比例。

[0325] 数据如下表1所示。数据显示为细胞的平均百分比，在减去对用空VLP(在包含gB/pp65 VLP的组合物的情况下)或未刺激的细胞(在重组蛋白的情况下)刺激的背景反应后。

[0326] 表1

[0327]

组成	CD4+群体中IFN-γ +ve T细胞的平均%	CD8+群体中 IFN-γ +ve T细胞的平均%
gB/pp65Gag VLP (2 ug/ml gB 含量)	0.4811	0.8422
gB/pp65Gag VLP (1 ug/ml gB 含量)	0.4511	1.537
重组 gB (2 ug/ml) + pp65*	0.0656	0.4789
重组 gB (1 ug/ml) + pp65*	0.0889	0.8433

[0328] *pp65含量未显示，因为该实验早于经过验证的pp65 ELISA的开发

[0329] 如上表1所示，二价gB/pp65Gag VLP在体外刺激分泌IFN-γ的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞反应。重组gB和pp65蛋白的组合在刺激来自健康受试者的PBMC中的$CD8^+$和尤其是$CD4^+$T细胞反应方面不如二价VLP有效。

[0330] 实施例4：人类GBM患者中gB/pp65Gag VLPs的临床试验

[0331] gB/pp65Gag VLPs将在I/II期研究中进行测试，以确定包含gB/pp65Gag VLPs(基于pp65蛋白含量为10ug gB/pp65Gag VLP)的免疫原性组合物在GBM患者上的安全性、耐受性和影响，该gB/pp65Gag VLPs与脂质体佐剂(包含QS21(每剂50ug)和3D-MPL(每剂50ug))一起配制。

[0332] 具有肿瘤大小为400mm^2或更小的GBM首次复发的成年受试者(18-70岁)将参加。患者之前接受手术肿瘤减积术，然后进行放射治疗及替莫唑胺和皮质类固醇治疗。每4周对每个受试者肌肉内施用测试治疗。

[0333] 通过使用MRI测量肿瘤大小来监测临床疾病进展。

[0334] 对研究药物的反应确定如下：

[0335] • 在基线和每次治疗后2周通过ELISA测定针对HCMV gB抗原的抗体滴度，结果以基线和注射后样品中的血清IgG抗gB抗体滴度提供。

[0336] • 使用IFN-γ和IL-5ELISPOT在基线和每次治疗后2周评估针对HCMV gB和pp65抗原的细胞免疫。结果提供为在基线和每次治疗后HCMV刺激后每3×10^5铺板的PBMC的IFN-γ和IL-5斑点的频率。

[0337] • 从首次给药日期到进展(或死亡)日期的无进展生存期(PFS)。

[0338] 细胞免疫(CMI)数据表示为每10^6个PBMC的斑点形成细胞(SFC)。

[0339] 肿瘤反应显示为SD(疾病稳定)或PD(疾病进展)。

[0340] 在整个说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,否则“包含”一词以及诸如“包括(comprises)”和“含有(comprising)”之类的变体将被理解为暗示包含所述整数、步骤、整数组或一组步骤,但不排除任何其他整数、步骤、整数组或步骤组。

[0341] 构成本说明书和权利要求书一部分的申请可以用作任何后续申请的优先权基础。这种后续申请的权利要求可以针对本文所述的任何特征或特征的组合。实施方案被设想为独立地,在条件适合的情况下完全可彼此组合以形成本发明的进一步实施方案。它们可以采取产品、组合物、工艺或用途权利要求的形式,并且可以包括但不限于以下的权利要求。

[0342] 在本说明书中引用的所有出版物,包括但不限于专利和专利申请,都通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物被具体地和单独地指出通过引用并入本文一样,就好像完全阐述了一样。

[0343] 参考文献

[0344] Baryawno N et al.,Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target J Clin Invest 2011121,4043-4055

[0345] Cloughesy et al.,Neoadjuvant anti-PD-1immunotherapy promotes asurvival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma.Nature Medicine 2019 25:477-486

[0346] Cobbs CS et al,Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma.Cancer Res.2002Jun 15;62(12):3347-50

[0347] Cobbs C et al,HCMV glycoprotein B is expressed in primary glioblastomas and enhances growth and invasiveness via PDGFR-alpha activation Oncotarget 2014;5:1091-1100

[0348] Dziurzynski et al.,Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma Neuro-Onc.2012 14:246-55

[0349] Garçon N and Di Pasquale A,From discovery to licensure,the Adjuvant System story.Human Vaccines&Immunotherapeutics 2017 13:1,19-33,DOI:10.1080/21645515.2016.1225635

[0350] Garrone et al.,A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques.Science Transl.Med.2011 3:1-8

[0351] Han et al 2014 Characterization of the Structure and Immunostimulatory Activity of a Vaccine Adjuvant,De-O-Acylated Lipooligosaccharide PLoS ONE 9(1):e85838(and associated correction Han et al 2014 PLoS ONE 9(4):94517)

[0352] Harkins LE et al.,Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium Herpesviridae 2010 1(1):8

[0353] Libard S et al.,Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 Is

Detected in All Intra-and Extra-Axial Brain Tumours Independent of the Tumour Type or Grade PLoS ONE 2014 9,e108861

[0354] Liu et al.,Epstein-Barr virus-and cytomegalovirus-specific immune response in patients with brain cancer.J.Trans.Med.,2018 16:182

[0355] Mitchell DA et al.,Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma.Neuro Oncol.2008 Feb;10(1):10-8

[0356] Nair SK et al.,Recognition and Killing of Autologous Primary Glioblastoma Tumor Cells by Human Cytomegalovirus pp65-Specific Cytotoxic T Cells.Clin Cancer Res 2014;20:2684-2694

[0357] Nauclér CS et al.,The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis:a review of current evidence and potential therapeutic implications.Oncotarget.2019 Jul 2;10(42):4333-4347

[0358] Rahbar,A et al.,Low levels of Human Cytomegalovirus Infection in Glioblastoma multiforme associates with patient survival-a case-control study.Herpesviridae 2012;3:3

[0359] Rahbar A et al.,Discordant humoral and cellular immune responses to Cytomegalovirus(CMV)in glioblastoma patients whose tumors are positive for CMV.Oncoimmunology 2015 Feb;4(2):e982391

[0360] Schuessler A et al.,Autologous T-cell Therapy for Cytomegalovirus as aConsolidative Treatment for Recurrent Glioblastoma.Cancer Res.2014;74:3466-3476

[0361] Sharma S et al.,Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus packaging cells deficient in viral envelope become infectious in the presence of lipofection reagents.Proc Natl Acad Sci U S A.1997;94:10803-8

[0362] Taher C et al.,High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes 2013 PLoS One 2013;8(2):e56795

[0363] Wolmer-Solberg N et al.,Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma:a novel therapeutic target?Int J Cancer 2013133,2351-61Woroniecka et al.,T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma Clin Cancer Res.2018 24 4175-4186。

序列表

<110> 葛兰素史克生物有限公司
变异生物技术公司

<120> 免疫治疗组合物

<130> VB66807 WO / VBI-036-PCT

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 538
<212> PRT
<213> 鼠白血病病毒

<400> 1

Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
1 5 10 15

[0001]

Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys
20 25 30

Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val
35 40 45

Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val
50 55 60

Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val
65 70 75 80

Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp
85 90 95

Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser
100 105 110

Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser
115 120 125

Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly Ala Lys Pro Lys Pro
130 135 140

Gln Val Leu Ser Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Asp Leu Leu Thr Glu
145 150 155 160

Asp Pro Pro Pro Tyr Arg Asp Pro Arg Pro Pro Pro Ser Asp Arg Asp
165 170 175

Gly Asn Gly Gly Glu Ala Thr Pro Ala Gly Glu Ala Pro Asp Pro Ser
180 185 190

Pro Met Ala Ser Arg Leu Arg Gly Arg Arg Glu Pro Pro Val Ala Asp
195 200 205

Ser Thr Thr Ser Gln Ala Phe Pro Leu Arg Ala Gly Gly Asn Gly Gln
210 215 220

[0002] Leu Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ser Ser Asp Leu Tyr Asn Trp Lys Asn
225 230 235 240

Asn Asn Pro Ser Phe Ser Glu Asp Pro Gly Lys Leu Thr Ala Leu Ile
245 250 255

Glu Ser Val Leu Ile Thr His Gln Pro Thr Trp Asp Asp Cys Gln Gln
260 265 270

Leu Leu Gly Thr Leu Leu Thr Gly Glu Glu Lys Gln Arg Val Leu Leu
275 280 285

Glu Ala Arg Lys Ala Val Arg Gly Asp Asp Gly Arg Pro Thr Gln Leu
290 295 300

Pro Asn Glu Val Asp Ala Ala Phe Pro Leu Glu Arg Pro Asp Trp Asp
305 310 315 320

Tyr Thr Thr Gln Ala Gly Arg Asn His Leu Val His Tyr Arg Gln Leu
325 330 335

Leu Leu Ala Gly Leu Gln Asn Ala Gly Arg Ser Pro Thr Asn Leu Ala
340 345 350

Lys Val Lys Gly Ile Thr Gln Gly Pro Asn Glu Ser Pro Ser Ala Phe
355 360 365

Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Arg Tyr Thr Pro Tyr Asp Pro
370 375 380

Glu Asp Pro Gly Gln Glu Thr Asn Val Ser Met Ser Phe Ile Trp Gln
385 390 395 400

Ser Ala Pro Asp Ile Gly Arg Lys Leu Glu Arg Leu Glu Asp Leu Lys
405 410 415

Asn Lys Thr Leu Gly Asp Leu Val Arg Glu Ala Glu Lys Ile Phe Asn
420 425 430

[0003] Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Ile Arg Arg Glu Thr
435 440 445

Glu Glu Lys Glu Glu Arg Arg Arg Thr Glu Asp Glu Gln Lys Glu Lys
450 455 460

Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser Lys Leu Leu Ala Thr
465 470 475 480

Val Val Ser Gly Gln Lys Gln Asp Arg Gln Gly Gly Glu Arg Arg Arg
485 490 495

Ser Gln Leu Asp Arg Asp Gln Cys Ala Tyr Cys Lys Glu Lys Gly His
500 505 510

Trp Ala Lys Asp Cys Pro Lys Lys Pro Arg Gly Pro Arg Gly Pro Arg
515 520 525

Pro Gln Thr Ser Leu Leu Thr Leu Asp Asp

530 535

<210> 2
<211> 1614
<212> DNA
<213> 鼠白血病病毒

<400> 2

[0004]

atgggccaga ctgttaccac tcccttaagt ttgaccttag gtcactggaa agatgtcgag 60

cggatcgctc acaaccagtc ggtagatgtc aagaagagac gttgggttac cttctgctct 120

gcagaatggc caacctttaa cgtcggatgg ccgcgagacg gcacctttaa ccgagacctc 180

atcacccagg ttaagatcaa ggtcttttca cctggcccgc atggacaccc agaccaggtc 240

ccctacatcg tgacctggga agccttggct tttgaccccc ctccctgggt caagcccttt 300

gtacacccta agcctccgcc tcctcttcct ccatccgccc cgtctctccc ccttgaacct 360

cctcgttcga ccccgcctcg atcctccctt tatccagccc tcactccttc tctaggcgcc 420

aaacctaaac ctcaagttct ttctgacagt ggggggccgc tcatcgacct acttacagaa 480

gacccccccgc cttataggga cccaagacca ccccccttccg acagggacgg aaatggtgga 540

gaagcgaccc ctgcgggaga ggcaccggac ccctccccaa tggcatctcg cctacgtggg 600

agacgggagc cccctgtggc cgactccact acctcgcagg cattcccccct ccgcgcagga 660

ggaaacggac agcttcaata ctggccgttc tcctcttctg acctttacaa ctggaaaaat 720

aataaccctt ctttttctga agatccaggt aaactgacag ctctgatcga gtctgttctc 780

atcacccatc agcccacctg ggacgactgt cagcagctgt tggggactct gctgaccgga 840

gaagaaaaac aacgggtgct cttagaggct agaaaggcgg tgcggggcga tgatgggcgc 900

cccactcaac tgcccaatga agtcgatgcc gcttttcccc tcgagcgccc agactgggat 960

tacaccaccc aggcaggtag gaaccaccta gtccactatc gccagttgct cctagcgggt 1020

ctccaaaacg cgggcagaag ccccaccaat ttggccaagg taaaaggaat aacacaaggg 1080

cccaatgagt ctccctcggc cttcctagag agacttaagg aagcctatcg caggtacact 1140

ccttatgacc ctgaggaccc agggcaagaa actaatgtgt ctatgtcttt catttggcag 1200

tctgccccag acattgggag aaagttagag aggttagaag atttaaaaaa caagacgctt 1260

ggagatttgg ttagagaggc agaaaagatc tttaataaac gagaaacccc ggaagaaaga 1320

gaggaacgta tcaggagaga aacagaggaa aaagaagaac gccgtaggac agaggatgag 1380

cagaaagaga aagaaagaga tcgtaggaga catagagaga tgagcaagct attggccact 1440

gtcgttagtg gacagaaaca ggatagacag ggaggagaac gaaggaggtc ccaactcgat 1500

cgcgaccagt gtgcctactg caaagaaaag gggcactggg ctaaagattg tcccaagaaa 1560

ccacgaggac ctcggggacc aagaccccag acctccctcc tgaccctaga tgac 1614

<210> 3
<211> 1614
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密码子优化的

<400> 3
atgggacaga ccgtcacaac acccctgagc ctgaccctgg gacattggaa agacgtggag 60

aggatcgcac ataaccagag cgtggacgtg aagaaacgga gatgggtcac attctgcagt 120

[0005]

gctgagtggc caacttttaa tgtgggatgg ccccgagacg gcactttcaa cagggatctg 180

atcacccagg tgaagatcaa ggtctttagc ccaggacctc acggacatcc agaccaggtg 240

ccttatatcg tcacctggga ggcactggcc ttcgatcccc ctccatgggt gaagccattt 300

gtccacccaa aaccacctcc accactgcct ccaagtgccc cttcactgcc actggaacca 360

ccccggagca caccaccccg cagctccctg tatcctgctc tgactccatc tctgggcgca 420

aagccaaaac cacaggtgct gagcgactcc ggaggaccac tgattgacct gctgacagag 480

gacccccccac cataccgaga tcctcggcct ccaccaagcg accgcgatgg aaatggagga 540

gaggctactc ctgccggcga agcccctgac ccatctccaa tggctagtag gctgcgcggc 600

aggcgcgagc ctccagtggc agatagcacc acatcccagg ccttccctct gagggctggg 660

ggaaatgggc agctccagta ttggccattt tctagttcag acctgtacaa ctggaagaac 720

aataacccct ctttcagtga ggaccccggc aaactgaccg ccctgatcga atccgtgctg 780

attacccatc agcccacatg ggacgattgt cagcagctcc tgggcaccct gctgaccgga 840

gaggaaaagc agcgcgtgct gctggaggct cgcaaagcag tccgagggga cgatggacgg 900

```
cccacacagc tccctaatga ggtggacgcc gcttttccac tggaaagacc cgactgggat      960

tatactaccc aggcagggag aaaccacctg gtccattaca ggcagctcct gctggcaggc     1020

ctgcagaatg ccgggagatc ccccaccaac ctggccaagg tgaaaggcat cacacagggg     1080

cctaatgagt caccaagcgc ctttctggag aggctgaagg aagcttaccg acggtatacc     1140

ccatacgacc ctgaggaccc cggacaggaa acaaacgtct ccatgtcttt catctggcag     1200

tctgccccag acattgggcg gaagctggag agactggaag acctgaagaa caagaccctg     1260

ggcgacctgg tgcgggaggc tgaaaagatc ttcaacaaac gggagacccc cgaggaaaga     1320

gaggaaagga ttagaaggga aactgaggaa aaggaggaac gccgacggac cgaggacgaa     1380

cagaaggaga aagaacgaga tcggcggcgg caccgggaga tgtcaaagct gctggccacc     1440

gtggtcagcg gacagaaaca ggacagacag ggaggagagc gacggagaag ccagctcgac     1500

agggatcagt gcgcatactg taaggaaaaa ggccattggg ccaaggattg ccccaaaaag     1560

ccaagaggac caagaggacc aagaccacag acatcactgc tgaccctgga cgac           1614
```

[0006]

<210> 4
<211> 1099
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MMLV Gag - CMV pp65 氨基酸序列

<220>
<221> MMLV Gag 氨基酸序列
<222> (1)..(538)

<220>
<221> CMV pp65 氨基酸序列
<222> (539)..(1099)

<400> 4

```
Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
1               5                  10                  15

Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys
            20                  25                  30
```

```
Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val
        35                  40                  45

Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val
    50                  55                  60

Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val
65                  70                  75                  80

Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp
                85                  90                  95

Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser
            100                 105                 110

Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser
        115                 120                 125
```

[0007]

```
Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly Ala Lys Pro Lys Pro
    130                 135                 140

Gln Val Leu Ser Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Asp Leu Leu Thr Glu
145                 150                 155                 160

Asp Pro Pro Pro Tyr Arg Asp Pro Arg Pro Pro Pro Ser Asp Arg Asp
                165                 170                 175

Gly Asn Gly Gly Glu Ala Thr Pro Ala Gly Glu Ala Pro Asp Pro Ser
            180                 185                 190

Pro Met Ala Ser Arg Leu Arg Gly Arg Arg Glu Pro Pro Val Ala Asp
        195                 200                 205

Ser Thr Thr Ser Gln Ala Phe Pro Leu Arg Ala Gly Gly Asn Gly Gln
    210                 215                 220

Leu Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ser Ser Asp Leu Tyr Asn Trp Lys Asn
```

225 230 235 240

Asn Asn Pro Ser Phe Ser Glu Asp Pro Gly Lys Leu Thr Ala Leu Ile
245 250 255

Glu Ser Val Leu Ile Thr His Gln Pro Thr Trp Asp Asp Cys Gln Gln
260 265 270

Leu Leu Gly Thr Leu Leu Thr Gly Glu Glu Lys Gln Arg Val Leu Leu
275 280 285

Glu Ala Arg Lys Ala Val Arg Gly Asp Asp Gly Arg Pro Thr Gln Leu
290 295 300

Pro Asn Glu Val Asp Ala Ala Phe Pro Leu Glu Arg Pro Asp Trp Asp
305 310 315 320

Tyr Thr Thr Gln Ala Gly Arg Asn His Leu Val His Tyr Arg Gln Leu
[0008] 325 330 335

Leu Leu Ala Gly Leu Gln Asn Ala Gly Arg Ser Pro Thr Asn Leu Ala
340 345 350

Lys Val Lys Gly Ile Thr Gln Gly Pro Asn Glu Ser Pro Ser Ala Phe
355 360 365

Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Arg Tyr Thr Pro Tyr Asp Pro
370 375 380

Glu Asp Pro Gly Gln Glu Thr Asn Val Ser Met Ser Phe Ile Trp Gln
385 390 395 400

Ser Ala Pro Asp Ile Gly Arg Lys Leu Glu Arg Leu Glu Asp Leu Lys
405 410 415

Asn Lys Thr Leu Gly Asp Leu Val Arg Glu Ala Glu Lys Ile Phe Asn
420 425 430

Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Ile Arg Arg Glu Thr
435 440 445

Glu Glu Lys Glu Glu Arg Arg Arg Thr Glu Asp Glu Gln Lys Glu Lys
450 455 460

Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser Lys Leu Leu Ala Thr
465 470 475 480

Val Val Ser Gly Gln Lys Gln Asp Arg Gln Gly Gly Glu Arg Arg Arg
485 490 495

Ser Gln Leu Asp Arg Asp Gln Cys Ala Tyr Cys Lys Glu Lys Gly His
500 505 510

Trp Ala Lys Asp Cys Pro Lys Lys Pro Arg Gly Pro Arg Gly Pro Arg
515 520 525

[0009]

Pro Gln Thr Ser Leu Leu Thr Leu Asp Asp Cys Glu Ser Arg Gly Arg
530 535 540

Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val
545 550 555 560

Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Pro His Glu
565 570 575

Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val Arg Val Ser Gln Pro Ser
580 585 590

Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp Ser Thr Pro Cys His Arg
595 600 605

Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr Tyr Phe Thr Gly Ser Glu
610 615 620

Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn Pro Thr Gly Arg Ser Ile
625 630 635 640

Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu
645 650 655

Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala
660 665 670

Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val Ala Asp Ala Val Ile His
675 680 685

Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu
690 695 700

Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys Glu Pro Asp Val Tyr Tyr
705 710 715 720

Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg His Val
725 730 735

[0010]

Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr
740 745 750

Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser
755 760 765

Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu
770 775 780

Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met Thr Arg Asn Pro Gln Pro
785 790 795 800

Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu Cys Pro Lys
805 810 815

Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val
820 825 830

Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro Lys Ser Ile
835 840 845

Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu Met Asn Gly Gln Gln Ile
850 855 860

Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr
865 870 875 880

Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp Ile Asp Leu Leu Leu Gln
885 890 895

Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Arg
900 905 910

Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr Trp Asp Arg His Asp Glu
915 920 925

Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp Thr Ser Gly Ser Asp Ser
930 935 940

[0011] Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys Thr Pro Arg Val Thr Gly
945 950 955 960

Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser Ala Gly Arg Lys Arg Lys
965 970 975

Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ala Gly Val Met Thr Arg Gly
980 985 990

Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro Glu Glu Asp Thr Asp Glu
995 1000 1005

Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala Val Phe Thr Trp Pro
1010 1015 1020

Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val
1025 1030 1035

Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu Phe Phe Trp

1040 1045 1050

Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val
1055 1060 1065

Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln Asp
1070 1075 1080

Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg
1085 1090 1095

Gly

<210> 5
<211> 3300
<212> DNA
<213> 人工序列

[0012]

<220>
<223> MMLV Gag - CMV pp65 核苷酸序列

<220>
<221> MMLV Gag 核苷酸序列
<222> (1)..(1614)

<220>
<221> CMV pp65 核苷酸序列
<222> (1615)..(3297)

<220>
<221> 终止
<222> (3298)..(3300)

<400> 5
atgggccaga ctgttaccac tcccttaagt ttgaccttag gtcactggaa agatgtcgag 60

cggatcgctc acaaccagtc ggtagatgtc aagaagagac gttgggttac cttctgctct 120

gcagaatggc caacctttaa cgtcggatgg ccgcgagacg gcacctttaa ccgagacctc 180

atcacccagg ttaagatcaa ggtcttttca cctggcccgc atggacaccc agaccaggtc 240

ccctacatcg tgacctggga agccttggct tttgaccccc ctccctgggt caagccctttt 300

gtacacccta agcctccgcc tcctcttcct ccatccgccc cgtctctccc ccttgaacct 360

cctcgttcga ccccgcctcg atcctccctt tatccagccc tcactccttc tctaggcgcc 420

aaacctaaac ctcaagttct ttctgacagt ggggggccgc tcatcgacct acttacagaa 480

gacccccccgc cttataggga cccaagacca ccccccttccg acagggacgg aaatggtgga 540

gaagcgaccc ctgcgggaga ggcaccggac ccctccccaa tggcatctcg cctacgtggg 600

agacgggagc cccctgtggc cgactccact acctcgcagg cattcccccct ccgcgcagga 660

ggaaacggac agcttcaata ctggccgttc tcctcttctg acctttacaa ctggaaaaat 720

aataaccctt ctttttctga agatccaggt aaactgacag ctctgatcga gtctgttctc 780

atcacccatc agcccacctg ggacgactgt cagcagctgt tggggactct gctgaccgga 840

gaagaaaaac aacgggtgct cttagaggct agaaaggcgg tgcggggcga tgatgggcgc 900

cccactcaac tgcccaatga agtcgatgcc gcttttcccc tcgagcgccc agactgggat 960

tacaccaccc aggcaggtag gaaccaccta gtccactatc gccagttgct cctagcgggt 1020

ctccaaaacg cgggcagaag ccccaccaat ttggccaagg taaaaggaat aacacaaggg 1080

[0013]

cccaatgagt ctccctcggc cttcctagag agacttaagg aagcctatcg caggtacact 1140

ccttatgacc ctgaggaccc agggcaagaa actaatgtgt ctatgtcttt catttggcag 1200

tctgccccag acattgggag aaagttagag aggttagaag atttaaaaaa caagacgctt 1260

ggagatttgg ttagagaggc agaaaagatc tttaataaac gagaaacccc ggaagaaaga 1320

gaggaacgta tcaggagaga aacagaggaa aaagaagaac gccgtaggac agaggatgag 1380

cagaaagaga aagaaagaga tcgtaggaga catagagaga tgagcaagct attggccact 1440

gtcgttagtg gacagaaaca ggatagacag ggaggagaac gaaggaggtc ccaactcgat 1500

cgcgaccagt gtgcctactg caaagaaaag gggcactggg ctaaagattg tcccaagaaa 1560

ccacgaggac ctcggggacc aagaccccag acctccctcc tgaccctaga tgactgtgag 1620

tcgcgcggtc gccgttgtcc cgaaatgata tccgtactgg gtcccatttc ggggcacgtg 1680

ctgaaagccg tgtttagtcg cggcgacacg ccggtgctgc cgcacgagac gcgactcctg 1740

cagacgggta tccacgtgcg cgtgagccag ccctcgctga tcctggtgtc gcagtacacg 1800

cccgactcga cgccatgcca ccgcggcgac aatcagctgc aggtgcagca cacgtacttt 1860

acgggcagcg aggtggagaa cgtgtcggtc aacgtgcaca accccacggg ccggagcatc 1920

tgccccagcc aagagcccat gtcgatctat gtgtacgcgc tgccgctcaa gatgctgaac 1980

atccccagca tcaacgtgca ccactacccg tcggcggccg agcgcaaaca ccgacacctg 2040

cccgtagctg acgctgtgat tcacgcgtcg ggcaagcaga tgtggcaggc gcgtctcacg 2100

gtctcgggac tggcctggac gcgtcagcag aaccagtgga aagagcccga cgtctactac 2160

acgtcagcgt tcgtgtttcc caccaaggac gtggcactgc ggcacgtggt gtgcgcgcac 2220

gagctggttt gctccatgga gaacacgcgc gcaaccaaga tgcaggtgat aggtgaccag 2280

tacgtcaagg tgtacctgga gtccttctgc gaggacgtgc cctccggcaa gctctttatg 2340

cacgtcacgc tgggctctga cgtggaagag gacctgacga tgacccgcaa cccgcaaccc 2400

ttcatgcgcc cccacgagcg caacggcttt acggtgttgt gtcccaaaaa tatgataatc 2460

aaaccgggca agatctcgca catcatgctg gatgtggctt ttacctcaca cgagcatttt 2520

gggctgctgt gtcccaagag catcccgggc ctgagcatct caggtaacct attgatgaac 2580

[0014] gggcagcaga tcttcctgga ggtgcaagcg atacgcgaga ccgtggaact gcgtcagtac 2640

gatcccgtgg ctgcgctctt ctttttcgat atcgacttgc tgctgcagcg cgggcctcag 2700

tacagcgaac accccacctt caccagccag tatcgcatcc agggcaagct tgagtaccga 2760

cacacctggg accggcacga cgagggtgcc gcccagggcg acgacgacgt ctggaccagc 2820

ggatcggact ccgacgagga actcgtaacc accgagcgca agacgccccg cgttaccggc 2880

ggcggcgcca tggcgggcgc ctccacttcc gcgggccgca aacgcaaatc agcatcctcg 2940

gcgacggcgt gcacggcggg cgttatgaca cgcggccgcc ttaaggccga gtccaccgtc 3000

gcgcccgaag aggacaccga cgaggattcc gacaacgaaa tccacaatcc ggccgtgttc 3060

acctggccgc cctggcaggc cggcatcctg gcccgcaacc tggtgcccat ggtggctacg 3120

gttcagggtc agaatctgaa gtaccaggag ttcttctggg acgccaacga catctaccgc 3180

atcttcgccg aattggaagg cgtatggcag cccgctgcgc aacccaaacg tcgccgccac 3240

cggcaagacg ccttgcccgg gccatgcatc gcctcgacgc ccaaaaagca ccgaggttag 3300

<210> 6

<211> 3300
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密码子优化的 MMLV Gag - CMV pp65 核苷酸序列

<220>
<221> 密码子优化的 MMLV Gag
<222> (1)..(1614)

<220>
<221> 密码子优化的 CMV pp65
<222> (1615)..(3297)

<220>
<221> 终止
<222> (3298)..(3300)

<400> 6

[0015]

atgggacaga cagtcactac acccctgagc ctgacactgg gacattggaa agacgtggag 60

aggattgcac ataaccagag cgtggacgtg aagaaacgga gatgggtcac cttttgctcc 120

gccgagtggc caacattcaa tgtgggatgg ccccgagatg gcaccttcaa ccgggacctg 180

atcactcagg tgaagatcaa ggtcttctct ccaggacccc acggccatcc agatcaggtg 240

ccctacatcg tcacctggga ggctctggca tttgaccccc ctccatgggt gaagcctttc 300

gtccacccaa aaccacctcc accactgcct ccatctgccc ctagtctgcc actggaaccc 360

cctcggtcaa ccccacccag aagctccctg tatcccgcac tgacacctag cctgggggcc 420

aagcctaaac cacaggtgct gtctgatagt ggcgggcctc tgatcgatct gctgaccgag 480

gaccctccac ataccgcga cccacgacct ccaccaagcg accgggacgg aaacggagga 540

gaggctacac ccgcaggcga agcccccgat cctagtccaa tggcatcaag gctgcgcggg 600

aggcgcgaac ctccagtggc cgactcaacc acaagccagg catttccact gagggccggg 660

ggaaatggac agctccagta ttggcccttc tctagttcag atctgtacaa ctggaagaac 720

aataacccta gcttcagcga ggacccaggc aaactgaccg ccctgatcga atccgtgctg 780

attacccacc agcccacatg ggacgattgt cagcagctcc tgggcaccct gctgaccgga 840

gaggaaaagc agagagtgct gctggaggct aggaaagcag tccgcgggga cgatggaagg 900

[0016]

ccaacacagc tccccaatga ggtggatgcc gctttccctc tggaacggcc agattgggac 960

tatactaccc aggctggacg caaccacctg gtgcattacc ggcagctcct gctggctgga 1020

ctgcagaatg cagggcgcag ccccactaac ctggccaagg tgaaaggaat cacccagggc 1080

cccaatgagt ccccttctgc attcctggag cggctgaagg aagcctaccg acggtatact 1140

ccctacgatc ctgaggaccc aggccaggaa accaacgtga gtatgagctt catctggcag 1200

tccgctcctg acattggccg aaaactggag cggctggaag atctgaagaa caagaccctg 1260

ggcgacctgg tgcgggaggc agaaaagatc ttcaacaaaa gggagactcc agaggaacgg 1320

gaggaaagaa ttagaaggga aacagaggaa aaggaggaac gccgacggac tgaggatgaa 1380

cagaaggaga aagaaagaga ccggcggcgg caccgggaga tgtctaagct gctggccacc 1440

gtggtcagtg gccagaaaca ggatcgacag ggaggagagc gacggagaag ccagctcgat 1500

cgggaccagt gcgcctattg taaggaaaaa gggcattggg ctaaggactg ccccaagaaa 1560

cccagaggcc cacgcgggcc ccgacctcag acttccctgc tgaccctgga cgattgcgag 1620

agccggggcc ggcggtgccc agaaatgatc tctgtgctgg ggcccattag tggacatgtg 1680

ctgaaggccg tcttctccag gggagacacc cccgtgctgc ctcacgagac tcgactgctg 1740

cagaccggca tccatgtgcg ggtctcccag ccctctctga ttctggtgtc acagtataca 1800

ccagatagca ctccctgcca cagaggagac aatcagctcc aggtgcagca tacctacttt 1860

acaggctccg aggtcgaaaa cgtgtctgtc aatgtgcaca accctaccgg caggagcatc 1920

tgtcctagcc aggagccaat gagcatctac gtgtacgccc tgcctctgaa gatgctgaat 1980

atcccatcaa ttaacgtcca ccattaccct agcgcagccg aacggaagca cagacatctg 2040

ccagtggccg acgctgtcat ccatgccagc ggcaaacaga tgtggcaggc aagactgacc 2100

gtgtccgggc tggcctggac aaggcagcag aatcagtgga aggagcccga cgtgtactat 2160

accagcgcct tcgtgttccc taccaaagac gtggccctga gacatgtggt gtgcgcacat 2220

gagctggtgt gcagcatgga aaacactagg gccaccaaga tgcaggtcat cggcgatcag 2280

tatgtcaaag tgtacctgga gagtttttgc gaagacgtgc catcagggaa gctgttcatg 2340

catgtgaccc tgggcagcga tgtcgaggaa gacctgacca tgacaagaaa tccacagccc 2400

tttatgagac cccacgagag gaatgggttc actgtgctgt gccccaagaa catgatcatt 2460

aagcctggaa aaatcagtca tattatgctg gatgtggcct ttacatcaca cgagcatttc 2520

ggactgctgt gccccaaatc catccctgga ctgagcattt ccggcaatct gctgatgaac 2580

ggccagcaga tcttcctgga agtgcaggcc atccgggaga ccgtcgaact gcgacagtat 2640

gacccagtgg ctgcactgtt ctttttcgac atcgacctgc tgctgcagcg aggaccacag 2700

tacagcgagc accctacttt tacctcccag tatcggattc aggggaagct ggagtacagg 2760

cacacctggg atcgccatga cgaaggagcc gctcaggggg acgatgacgt gtggacatct 2820

ggcagtgatt cagacgagga actggtgaca actgagcgaa aaacccccg ggtgacagga 2880

ggaggggcaa tggcaggggc cagcaccagc gcagggcgga agcgaaaaag cgccagcagc 2940

gccacagcat gtaccgccgg cgtgatgact agaggaaggc tgaaggccga gtctacagtc 3000

gctcccgagg aagatactga cgaggatagt gacaatgaaa tccacaaccc cgccgtgttc 3060

acctggccac cttggcaggc agggattctg gctcgcaacc tggtccccat ggtggcaacc 3120

gtccagggac agaatctgaa gtatcaggag tttttctggg atgctaacga catctaccgg 3180

[0017] atttttgcag agctggaagg cgtgtggcag ccagcagccc agcccaaacg acggagacat 3240

cgacaggacg ctctgccagg accttgtatc gccagcacac caaagaagca caggggctaa 3300

<210> 7
<211> 3300
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 密码子优化的 MMLV Gag
<222> (1)..(1614)

<220>
<221> 密码子优化的 CMV pp65
<222> (1615)..(3297)

<220>
<221> 终止
<222> (3298)..(3300)

<400> 7
atgggacaga ccgtcacaac acccctgagc ctgaccctgg gacattggaa agacgtggag 60

[0018]

aggatcgcac ataaccagag cgtggacgtg aagaaacgga gatgggtcac attctgcagt 120

gctgagtggc caacttttaa tgtgggatgg ccccgagacg gcactttcaa cagggatctg 180

atcacccagg tgaagatcaa ggtctttagc ccaggacctc acggacatcc agaccaggtg 240

ccttatatcg tcacctggga ggcactggcc ttcgatcccc ctccatgggt gaagccattt 300

gtccacccaa aaccacctcc accactgcct ccaagtgccc cttcactgcc actggaacca 360

ccccggagca caccaccccg cagctccctg tatcctgctc tgactccatc tctgggcgca 420

aagccaaaac cacaggtgct gagcgactcc ggaggaccac tgattgacct gctgacagag 480

gacccccccac cataccgaga tcctcggcct ccaccaagcg accgcgatgg aaatggagga 540

gaggctactc ctgccggcga agcccctgac ccatctccaa tggctagtag gctgcgcggc 600

aggcgcgagc ctccagtggc agatagcacc acatcccagg ccttccctct gagggctggg 660

ggaaatgggc agctccagta ttggccattt tctagttcag acctgtacaa ctggaagaac 720

aataacccct ctttcagtga ggaccccggc aaactgaccg ccctgatcga atccgtgctg 780

attacccatc agcccacatg ggacgattgt cagcagctcc tgggcaccct gctgaccgga 840

gaggaaaagc agcgcgtgct gctggaggct cgcaaagcag tccgagggga cgatggacgg 900

cccacacagc tccctaatga ggtggacgcc gcttttccac tggaaagacc cgactgggat 960

tatactaccc aggcagggag aaaccacctg gtccattaca ggcagctcct gctggcaggc 1020

ctgcagaatg ccgggagatc ccccaccaac ctggccaagg tgaaaggcat cacacagggg 1080

cctaatgagt caccaagcgc ctttctggag aggctgaagg aagcttaccg acggtatacc 1140

ccatacgacc ctgaggaccc cggacaggaa acaaacgtct ccatgtcttt catctggcag 1200

tctgccccag acattgggcg gaagctggag agactggaag acctgaagaa caagaccctg 1260

ggcgacctgg tgcgggaggc tgaaaagatc ttcaacaaac gggagacccc cgaggaaaga 1320

gaggaaagga ttagaaggga aactgaggaa aaggaggaac gccgacggac cgaggacgaa 1380

cagaaggaga aagaacgaga tcggcggcgg caccgggaga tgtcaaagct gctggccacc 1440

gtggtcagcg gacagaaaca ggacagacag ggaggagagc gacggagaag ccagctcgac 1500

agggatcagt gcgcatactg taaggaaaaa ggccattggg ccaaggattg ccccaaaaag 1560

ccaagaggac caagaggacc aagaccacag acatcactgc tgaccctgga cgactgcgag 1620

agccggggcc ggcggtgccc agaaatgatc tctgtgctgg ggcccattag tggacatgtg 1680

ctgaaggccg tcttctccag gggagacacc cccgtgctgc ctcacgagac tcgactgctg 1740

cagaccggca tccatgtgcg ggtctcccag ccctctctga ttctggtgtc acagtataca 1800

ccagatagca ctccctgcca cagaggagac aatcagctcc aggtgcagca tacctacttt 1860

acaggctccg aggtcgaaaa cgtgtctgtc aatgtgcaca accctaccgg caggagcatc 1920

tgtcctagcc aggagccaat gagcatctac gtgtacgccc tgcctctgaa gatgctgaat 1980

atcccatcaa ttaacgtcca ccattaccct agcgcagccg aacggaagca cagacatctg 2040

ccagtggccg acgctgtcat ccatgccagc ggcaaacaga tgtggcaggc aagactgacc 2100

gtgtccgggc tggcctggac aaggcagcag aatcagtgga aggagcccga cgtgtactat 2160

accagcgcct tcgtgttccc taccaaagac gtggccctga gacatgtggt gtgcgcacat 2220

gagctggtgt gcagcatgga aaacactagg gccaccaaga tgcaggtcat cggcgatcag 2280

tatgtcaaag tgtacctgga gagtttttgc gaagacgtgc catcagggaa gctgttcatg 2340

[0019] catgtgaccc tgggcagcga tgtcgaggaa gacctgacca tgacaagaaa tccacagccc 2400

tttatgagac cccacgagag gaatgggttc actgtgctgt gccccaagaa catgatcatt 2460

aagcctggaa aaatcagtca tattatgctg gatgtggcct ttacatcaca cgagcatttc 2520

ggactgctgt gccccaaatc catccctgga ctgagcattt ccggcaatct gctgatgaac 2580

ggccagcaga tcttcctgga agtgcaggcc atccgggaga ccgtcgaact gcgacagtat 2640

gacccagtgg ctgcactgtt ctttttcgac atcgacctgc tgctgcagcg aggaccacag 2700

tacagcgagc accctacttt tacctcccag tatcggattc aggggaagct ggagtacagg 2760

cacacctggg atcgccatga cgaaggagcc gctcaggggg acgatgacgt gtggacatct 2820

ggcagtgatt cagacgagga actggtgaca actgagcgaa aaaccccccg ggtgacagga 2880

ggaggggcaa tggcaggggc cagcaccagc gcagggcgga agcgaaaaag cgccagcagc 2940

gccacagcat gtaccgccgg cgtgatgact agaggaaggc tgaaggccga gtctacagtc 3000

gctcccgagg aagatactga cgaggatagt gacaatgaaa tccacaaccc cgccgtgttc 3060

acctggccac cttggcaggc agggattctg gctcgcaacc tggtccccat ggtggcaacc 3120

gtccagggac agaatctgaa gtatcaggag tttttctggg atgctaacga catctaccgg 3180

atttttgcag agctggaagg cgtgtggcag ccagcagccc agcccaaacg acggagacat 3240

cgacaggacg ctctgccagg accttgtatc gccagcacac caaagaagca caggggctaa 3300

<210> 8
<211> 907
<212> PRT
<213> 人巨细胞病毒

<220>
<221> TM和CD
<222> (752)..(907)

<400> 8

Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile
1 5 10 15

Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Arg Gly Thr Ser
[0020] 20 25 30

Ala Thr His Ser His His Ser Ser His Thr Thr Ser Ala Ala His Ser
35 40 45

Arg Ser Gly Ser Val Ser Gln Arg Val Thr Ser Ser Gln Thr Val Ser
50 55 60

His Gly Val Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp
65 70 75 80

Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met
85 90 95

Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Val Cys Thr
100 105 110

Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val
115 120 125

Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln
130 135 140

Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile His Thr Thr Tyr
145 150 155 160

Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile
165 170 175

His His Ile Asn Ser His Ser Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val
180 185 190

Ile Ala Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn
195 200 205

Lys Thr Met Gln Leu Met Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr
210 215 220

[0021]

Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp
225 230 235 240

Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Val Thr Ile Thr Thr
245 250 255

Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp
260 265 270

Val Val Asp Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser
275 280 285

Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr
290 295 300

Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ser Ala Leu Glu Thr His Arg
305 310 315 320

Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile
325 330 335

Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser
340 345 350

Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser
355 360 365

Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met
370 375 380

Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu
385 390 395 400

Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly
405 410 415

Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Thr Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln
420 425 430

[0022]

Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg
435 440 445

Ser Ser Leu Asn Leu Thr His Asn Arg Thr Lys Arg Ser Thr Asp Gly
450 455 460

Asn Asn Ala Thr His Leu Ser Asn Met Glu Ser Val His Asn Leu Val
465 470 475 480

Tyr Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn
485 490 495

Arg Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg
500 505 510

Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile
515 520 525

Leu Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp
530 535 540

Val Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys
545 550 555 560

Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser
565 570 575

Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr
580 585 590

Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr
595 600 605

Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser
610 615 620

Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser
625 630 635 640

[0023] Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu
645 650 655

Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu
660 665 670

Arg Ser Ile Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn
675 680 685

Ser Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro
690 695 700

Leu Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly
705 710 715 720

Ala Ala Gly Lys Ala Val Gly Val Ala Ile Gly Ala Val Gly Gly Ala
725 730 735

Val Ala Ser Val Val Glu Gly Val Ala Thr Phe Leu Lys Asn Pro Phe

740 745 750

Gly Ala Phe Thr Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val Ile Ile Ile
755 760 765

Tyr Leu Ile Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Leu Cys Met Gln Pro Leu Gln
770 775 780

Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser
785 790 795 800

Gly Asn Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu
805 810 815

Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp
820 825 830

Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met
835 840 845

[0024]

Leu Leu Ala Leu Val Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn
850 855 860

Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln
865 870 875 880

Lys Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg
885 890 895

His Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
900 905

<210> 9
<211> 2724
<212> DNA
<213> 人巨细胞病毒

<220>
<221> TM 和 CD

<222> (2254)..(2721)

<220>
<221> 终止
<222> (2722)..(2724)

<400> 9

[0025]

atggagtcaa ggatttggtg cctggtcgtg tgcgtcaatc tgtgcatcgt ctgtctgggg 60

gctgccgtgt catcaagttc tacaagaggc accagcgcca cccactcaca ccatagctcc 120

cataccacat ccgccgctca ctcccggtct ggcagcgtga gccagagagt cacatctagt 180

cagaccgtga gccacggggt caacgagacc atctacaata ctaccctgaa gtatggcgac 240

gtggtcgggg tgaacacaac taaataccca tatagggtct gcagtatggc ccagggcact 300

gatctgatta gattcgaaag gaacatcgtg tgcaccagca tgaagcccat taatgaggac 360

ctggatgaag ggatcatggt ggtctacaaa cgcaatattg tggcccatac cttcaaggtg 420

cgagtctatc agaaagtgct gacatttcgg agatcttacg catatatcca caccacatac 480

ctgctgggga gtaacaccga gtatgtggct ccccctatgt gggaaattca ccatatcaat 540

agccattccc agtgctactc aagctacagc agagtgatcg ctggaacagt gttcgtcgca 600

taccacagag actcttatga gaacaagact atgcagctca tgcccgacga ttacagcaat 660

acacattcca ctagatatgt gacagtcaaa gatcagtggc actcaagggg cagcacctgg 720

ctgtaccgcg agacatgcaa cctgaattgt atggtgacta tcactaccgc tagatccaag 780

taccctatc acttctttgc aacttccacc ggggacgtgg tcgatatttc tcctttctac 840

aacggcacaa accggaatgc atcttatttt ggggagaacg ccgacaagtt ctttattttc 900

ccaaattaca ccatcgtgtc tgattttggc agacccaaca gtgccctgga gacacatcga 960

ctggtggcat tcctggaacg ggccgactcc gtcatttctt gggacatcca ggatgagaag 1020

aatgtgacct gccagctcac cttctgggag gccagcgaac gcaccatccg atccgaggct 1080

gaagattctt accacttctc ctctgccaaa atgacagcta cttttctgag caagaaacag 1140

gaggtgaaca tgtctgacag tgctctggat tgcgtgcggg acgaagcaat taataagctg 1200

cagcagatct tcaacacatc atacaaccag acttacgaga agtacggaaa cgtgagcgtc 1260

ttcgaaacaa ctggcgggct ggtggtcttt tggcagggca tcaagcagaa atccctggtg 1320

gagctggaaa ggctggccaa tcgcagttca ctgaacctga ctcataatcg gaccaagaga 1380

tctacagacg gaaacaatgc cacacatctg tctaacatgg agagtgtgca caatctggtc 1440

tacgctcagc tccagtttac ctacgacaca ctgagaggct atattaacag ggcactggcc 1500

cagatcgctg aagcatggtg cgtggatcag aggcgcaccc tggaggtctt caaggaactg 1560

tccaaaatca acccttcagc aattctgagc gccatctaca ataagccaat tgcagccagg 1620

tttatgggag acgtgctggg cctggccagt tgcgtcacta tcaaccagac ctcagtgaag 1680

gtcctgcgcg atatgaatgt gaaagagagt cccggcagat gctattcacg gcctgtggtc 1740

atcttcaact ttgctaatag ctcctacgtg cagtatggac agctcggcga ggacaacgaa 1800

attctgctgg ggaatcacag gaccgaggaa tgtcagctcc ctagcctgaa gattttcatc 1860

gctggaaact ccgcatacga gtatgtggat tacctgttca agcggatgat tgacctgtct 1920

agtatctcca ctgtggattc tatgattgcc ctggacatcg atccactgga aaataccgac 1980

ttcagggtgc tggagctgta tagccagaag gaactgcgct ccatcaacgt gttcgatctg 2040

gaggaaatta tgagagagtt taatagctac aagcagaggg tgaaatatgt cgaagataag 2100

[0026]

gtggtcgacc ccctgccacc ctacctgaaa ggcctggacg atctgatgag cgggctggga 2160

gctgcaggga aggcagtggg agtcgctatc ggcgcagtgg gaggagccgt ggccagcgtg 2220

gtcgagggag tggcaacatt cctgaaaaac cccttcgggg ccttcaccat cattctggtg 2280

gcaatcgccg tggtcatcat tatctacctg atctacacaa ggcagcggcg gctgtgcatg 2340

cagcctctgc agaacctgtt tccatacctg gtgagcgccg acgggaccac agtcacctca 2400

ggaaatacta aggatacctc tctgcaggcc cccccaagtt acgaggaatc agtgtataac 2460

agcggcagaa aaggaccagg accaccttca agcgacgcca gcactgccgc tccaccctac 2520

accaatgagc aggcctatca gatgctgctg gctctggtgc gcctggatgc cgaacagcga 2580

gctcagcaga acgggaccga ctccctggat ggacagaccg gaacacagga caagggacag 2640

aaacctaatc tgctggatcg gctgcggcac agaaaaaacg ggtataggca cctgaaggac 2700

tccgacgaag aagaaaatgt ctaa 2724

<210> 10
<211> 2724

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 密码子优化的 HCMV gB 核苷酸序列

<220>
<221> TM 和 CD
<222> (2254)..(2721)

<220>
<221> 终止
<222> (2722)..(2724)

<400> 10

[0027]

```
atggaatcca ggatctggtg cctggtagtc tgcgttaact tgtgtatcgt ctgtctgggt      60

gctgcggttt cctcatcttc tactcgtgga acttctgcta ctcacagtca ccattcctct     120

catacgacgt ctgctgctca ttctcgatcc ggttcagtct ctcaacgcgt aacttcttcc     180

caaacggtca gccatggtgt taacgagacc atctacaaca ctaccctcaa gtacggagat     240

gtggtggggg tcaacaccac caagtacccc tatcgcgtgt gttctatggc acagggtacg     300

gatcttattc gctttgaacg taatatcgtc tgcacctcga tgaagcccat caatgaagac     360

ctggacgagg gcatcatggt ggtctacaaa cgcaacatcg tcgcgcacac ctttaaggta     420

cgagtctacc agaaggtttt gacgtttcgt cgtagctacg cttacatcca caccacttat     480

ctgctgggca gcaacacgga atacgtggcg cctcctatgt gggagattca tcatatcaac     540

agtcacagtc agtgctacag ttcctacagc cgcgttatag caggcacggt tttcgtggct     600

tatcataggg acagctatga aaacaaaacc atgcaattaa tgcccgacga ttattccaac     660

acccacagta cccgttacgt gacggtcaag gatcaatggc acagccgcgg cagcacctgg     720

ctctatcgtg agacctgtaa tctgaattgt atggtgacca tcactactgc gcgctccaag     780

tatccctatc atttttcgc aacttccacg ggtgatgtgg ttgacatttc tcctttctac     840

aacggaacta atcgcaatgc cagctatttt ggagaaaacg ccgacaagtt tttcatttt      900

ccgaactaca ctatcgtctc cgactttgga agaccgaatt ctgcgttaga gacccacagg     960

ttggtggctt ttcttgaacg tgcggactca gtgatctcct gggatataca ggacgagaag    1020

aatgttactt gtcaactcac tttctgggaa gcctcggaac gcaccattcg ttccgaagcc    1080
```

gaggactcgt atcacttttc ttctgccaaa atgaccgcca ctttcttatc taagaagcaa 1140

gaggtgaaca tgtccgactc tgcgctggac tgtgtacgtg atgaggccat aaataagtta 1200

cagcagattt tcaatacttc atacaatcaa acatatgaaa aatatggaaa cgtgtccgtc 1260

tttgaaacca ctggtggttt ggtggtgttc tggcaaggta tcaagcaaaa atctctggtg 1320

gaactcgaac gtttggccaa ccgctccagt ctgaatctta ctcataatag aaccaaaaga 1380

agtacagatg gcaacaatgc aactcattta tccaacatgg agtcggtgca caatctggtc 1440

tacgcccagc tgcagttcac ctatgacacg ttgcgcggtt acatcaaccg ggcgctggcg 1500

caaatcgcag aagcctggtg tgtggatcaa cggcgcaccc tagaggtctt caaggaactt 1560

agcaagatca acccgtcagc tattctctcg gccatctaca acaaaccgat tgccgcgcgt 1620

ttcatgggtg atgtcctggg tctggccagc tgcgtgacca ttaaccaaac cagcgtcaag 1680

gtgctgcgtg atatgaatgt gaaggaatcg ccaggacgct gctactcacg accagtggtc 1740

atctttaatt tcgccaacag ctcgtacgtg cagtacggtc aactgggcga ggataacgaa 1800

[0028] atcctgttgg gcaaccaccg cactgaggaa tgtcagcttc ccagcctcaa gatcttcatc 1860

gccggcaact cggcctacga gtacgtggac tacctcttca aacgcatgat tgacctcagc 1920

agcatctcca ccgtcgacag catgatcgcc ctagacatcg acccgctgga aaacaccgac 1980

ttcagggtac tggaacttta ctcgcagaaa gaattgcgtt ccatcaacgt ttttgatctc 2040

gaggagatca tgcgcgagtt caattcgtat aagcagcggg taaagtacgt ggaggacaag 2100

gtagtcgacc cgctgccgcc ctacctcaag ggtctggacg acctcatgag cggcctgggc 2160

gccgcgggaa aggccgttgg cgtagccatt ggggccgtgg gtggcgcggt ggcctccgtg 2220

gtcgaaggcg ttgccacctt cctcaaaaac cccttcggag ccttcaccat catcctcgtg 2280

gccatagccg tcgtcattat catttatttg atctatactc gacagcggcg tctctgcatg 2340

cagccgctgc agaacctctt tccctatctg gtgtccgccg acgggaccac cgtgacgtcg 2400

ggcaacacca aagacacgtc gttacaggct ccgccttcct acgaggaaag tgtttataat 2460

tctggtcgca aaggaccggg accaccgtcg tctgatgcat ccacggcggc tccgccttac 2520

accaacgagc aggcttacca gatgcttctg gccctggtcc gtctggacgc agagcagcga 2580

gcgcagcaga acggtacaga ttctttggac ggacagactg gcacgcagga caagggacag 2640

aagcccaacc tgctagaccg actgcgacac cgcaaaaacg gctaccgaca cttgaaagac 2700

tccgacgaag aagagaacgt ctga 2724

<210> 11
<211> 561
<212> PRT
<213> 人巨细胞病毒

<400> 11

Cys Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly
1 5 10 15

Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr
20 25 30

Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val
35 40 45

[0029]

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

Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr
65 70 75 80

Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn
85 90 95

Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr
100 105 110

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val
115 120 125

His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val
130 135 140

Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg

145 150 155 160

Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys
165 170 175

Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp
180 185 190

Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met
195 200 205

Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val
210 215 220

Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
225 230 235 240

Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met
[0030] 245 250 255

Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe
260 265 270

Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser
275 280 285

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu
290 295 300

Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu
305 310 315 320

Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr
325 330 335

Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp
340 345 350

Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr
355 360 365

Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr
370 375 380

Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp
385 390 395 400

Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys
405 410 415

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser
420 425 430

Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ala
435 440 445

[0031]

Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro
450 455 460

Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala
465 470 475 480

Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu
485 490 495

Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu
500 505 510

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu
515 520 525

Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln
530 535 540

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg
545 550 555 560

Gly

<210> 12
<211> 1683
<212> DNA
<213> 人巨细胞病毒

<400> 12

tgtgagtcgc gcggtcgccg ttgtcccgaa atgatatccg tactgggtcc catttcgggg 60

cacgtgctga aagccgtgtt tagtcgcggc gacacgccgg tgctgccgca cgagacgcga 120

ctcctgcaga cgggtatcca cgtgcgcgtg agccagccct cgctgatcct ggtgtcgcag 180

tacacgcccg actcgacgcc atgccaccgc ggcgacaatc agctgcaggt gcagcacacg 240

tactttacgg gcagcgaggt ggagaacgtg tcggtcaacg tgcacaaccc cacgggccgg 300

agcatctgcc ccagccaaga gcccatgtcg atctatgtgt acgcgctgcc gctcaagatg 360

ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac tacccgtcgg cggccgagcg caaacaccga 420

[0032] cacctgcccg tagctgacgc tgtgattcac gcgtcgggca agcagatgtg gcaggcgcgt 480

ctcacggtct cgggactggc ctggacgcgt cagcagaacc agtggaaaga gcccgacgtc 540

tactacacgt cagcgttcgt gtttcccacc aaggacgtgg cactgcggca cgtggtgtgc 600

gcgcacgagc tggtttgctc catggagaac acgcgcgcaa ccaagatgca ggtgataggt 660

gaccagtacg tcaaggtgta cctggagtcc ttctgcgagg acgtgccctc cggcaagctc 720

tttatgcacg tcacgctggg ctctgacgtg gaagaggacc tgacgatgac ccgcaacccg 780

caacccttca tgcgccccca cgagcgcaac ggctttacgg tgttgtgtcc caaaaatatg 840

ataatcaaac cgggcaagat ctcgcacatc atgctggatg tggcttttac ctcacacgag 900

cattttgggc tgctgtgtcc caagagcatc ccgggcctga gcatctcagg taacctattg 960

atgaacgggc agcagatctt cctggaggtg caagcgatac gcgagaccgt ggaactgcgt 1020

cagtacgatc ccgtggctgc gctcttcttt ttcgatatcg acttgctgct gcagcgcggg 1080

cctcagtaca gcgaacaccc caccttcacc agccagtatc gcatccaggg caagcttgag 1140

taccgacaca cctgggaccg gcacgacgag ggtgccgccc agggcgacga cgacgtctgg 1200

accagcggat cggactccga cgaggaactc gtaaccaccg agcgcaagac gccccgcgtt 1260

accggcggcg gcgccatggc gggcgcctcc acttccgcgg gccgcaaacg caaatcagca 1320

tcctcggcga cggcgtgcac ggcgggcgtt atgacacgcg gccgccttaa ggccgagtcc 1380

accgtcgcgc ccgaagagga caccgacgag gattccgaca acgaaatcca caatccggcc 1440

gtgttcacct ggccgccctg gcaggccggc atcctggccc gcaacctggt gcccatggtg 1500

gctacggttc agggtcagaa tctgaagtac caggagttct tctgggacgc caacgacatc 1560

taccgcatct tcgccgaatt ggaaggcgta tggcagcccg ctgcgcaacc caaacgtcgc 1620

cgccaccggc aagacgcctt gcccgggcca tgcatcgcct cgacgcccaa aaagcaccga 1680

ggt 1683

<210> 13
<211> 1683
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0033] <223> 密码子优化的 HCMV pp65 核苷酸序列

<400> 13
tgcgagagcc ggggccggcg gtgcccagaa atgatctctg tgctggggcc cattagtgga 60

catgtgctga aggccgtctt ctccagggga gacacccccg tgctgcctca cgagactcga 120

ctgctgcaga ccggcatcca tgtgcgggtc tcccagccct ctctgattct ggtgtcacag 180

tatacaccag atagcactcc ctgccacaga ggagacaatc agctccaggt gcagcatacc 240

tactttacag gctccgaggt cgaaaacgtg tctgtcaatg tgcacaaccc taccggcagg 300

agcatctgtc ctagccagga gccaatgagc atctacgtgt acgccctgcc tctgaagatg 360

ctgaatatcc catcaattaa cgtccaccat taccctagcg cagccgaacg gaagcacaga 420

catctgccag tggccgacgc tgtcatccat gccagcggca aacagatgtg gcaggcaaga 480

ctgaccgtgt ccgggctggc ctggacaagg cagcagaatc agtggaagga gcccgacgtg 540

tactatacca gcgccttcgt gttccctacc aaagacgtgg ccctgagaca tgtggtgtgc 600

gcacatgagc tggtgtgcag catggaaaac actagggcca ccaagatgca ggtcatcggc 660

gatcagtatg tcaaagtgta cctggagagt ttttgcgaag acgtgccatc agggaagctg 720

ttcatgcatg tgaccctggg cagcgatgtc gaggaagacc tgaccatgac aagaaatcca 780

cagcccttta tgagacccca cgagaggaat gggttcactg tgctgtgccc caagaacatg 840

atcattaagc ctggaaaaat cagtcatatt atgctggatg tggcctttac atcacacgag 900

catttcggac tgctgtgccc caaatccatc cctggactga gcatttccgg caatctgctg 960

atgaacggcc agcagatctt cctggaagtg caggccatcc gggagaccgt cgaactgcga 1020

cagtatgacc cagtggctgc actgttcttt ttcgacatcg acctgctgct gcagcgagga 1080

ccacagtaca gcgagcaccc tacttttacc tcccagtatc ggattcaggg gaagctggag 1140

tacaggcaca cctgggatcg ccatgacgaa ggagccgctc agggggacga tgacgtgtgg 1200

[0034] acatctggca gtgattcaga cgaggaactg gtgacaactg agcgaaaaac cccccgggtg 1260

acaggaggag gggcaatggc aggggccagc accagcgcag ggcggaagcg aaaaagcgcc 1320

agcagcgcca cagcatgtac cgccggcgtg atgactagag gaaggctgaa ggccgagtct 1380

acagtcgctc ccgaggaaga tactgacgag gatagtgaca atgaaatcca caaccccgcc 1440

gtgttcacct ggccaccttg gcaggcaggg attctggctc gcaacctggt ccccatggtg 1500

gcaaccgtcc agggacagaa tctgaagtat caggagtttt tctgggatgc taacgacatc 1560

taccggattt ttgcagagct ggaaggcgtg tggcagccag cagcccagcc caaacgacgg 1620

agacatcgac aggacgctct gccaggacct tgtatcgcca gcacaccaaa gaagcacagg 1680

ggc 1683