



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111246854 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 201880068068.X

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

(22)申请日 2018.08.17

代理人 王健

(30)优先权数据

62/546,648 2017.08.17 US

62/701,019 2018.07.20 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 31/7115(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/245(2006.01)

C07K 14/035(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/056210 2018.08.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/035066 EN 2019.02.21

(71)申请人 宾夕法尼亚大学理事会

地址 美国宾夕法尼亚

(72)发明人 H·弗里德曼 D·韦斯曼

S·阿瓦斯蒂 G·科恩

权利要求书3页 说明书61页

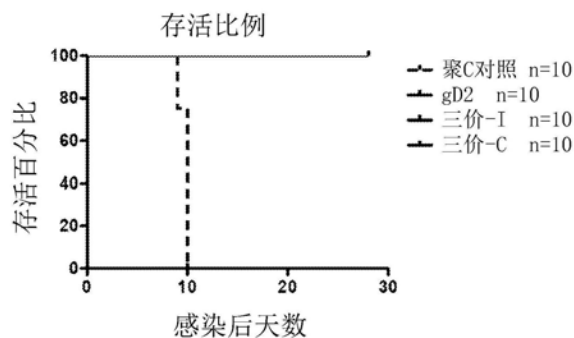
序列表24页 附图19页

(54)发明名称

编码单纯疱疹病毒糖蛋白的修饰mRNA疫苗及其用途

(57)摘要

本发明提供了用于预防和治疗生殖器疱疹的组合物,其包含编码单纯疱疹病毒(HSV)糖蛋白的核苷修饰的mRNA,包括参与病毒进入和免疫逃逸的mRNA,及其使用方法。



1. 一种包含一种或多种核苷修饰的mRNA的组合物,其中每个所述核苷修饰的mRNA编码单纯疱疹病毒(HSV)糖蛋白或其免疫原性片段,并且其中所述核苷修饰的mRNA包含一种或多种假尿苷残基。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种假尿苷残基包含m<sup>1</sup>Ψ(1-甲基假尿苷)。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种假尿苷残基包含m<sup>1</sup>acp<sup>3</sup>Ψ(1-甲基-3-(3-氨基-5-羧丙基)假尿苷、Ψ<sub>m</sub>(2'-O-甲基假尿苷、m<sup>5</sup>D(5-甲基二氢尿苷)、m<sup>3</sup>Ψ(3-甲基假尿苷)或其任何组合。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种核苷修饰的mRNA编码a) HSV糖蛋白D(gD)或其免疫原性片段,b) HSV糖蛋白C(gC)或其免疫原性片段,和c) HSV糖蛋白E(gE)或其免疫原性片段,或其任何组合。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述HSV糖蛋白包含HSV-1糖蛋白。

6. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述HSV糖蛋白包含HSV-2糖蛋白。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中编码HSV gD免疫原性片段的所述免疫原性片段的所述核苷修饰的mRNA包含来自HSV-2株333的氨基酸26-331,或来自另一HSV株的同源序列。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述核苷修饰的mRNA的核酸序列如SEQ ID NO:4所示。

9. 根据权利要求4-8中任一项所述的组合物,其中HSV gC的所述免疫原性片段包含其C3b结合结构域,其备解素干扰结构域,其C5干扰结构域或所述C3b结合结构域、备解素干扰结构域或C5干扰结构域的片段。

10. 根据权利要求6-9中任一项所述的组合物,其中编码HSV gC的所述免疫原性片段的所述核苷修饰的mRNA包含来自HSV-2株333的氨基酸27-426,或来自另一HSV株的同源序列。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述核苷修饰的mRNA的核酸序列如SEQ ID NO:10所示。

12. 根据权利要求6-11中任一项所述的组合物,其中HSV gE的所述免疫原性片段包含来自HSV-2株2.12的氨基酸24-405,或来自另一HSV株的同源序列。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述核苷修饰的mRNA的核酸序列如SEQ ID NO:16所示。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种核苷修饰的mRNA编码a) HSV糖蛋白B(gB)或其免疫原性片段,b) HSV糖蛋白H(gH)或其免疫原性片段,c) HSV糖蛋白L(gL)或其免疫原性片段,d) HSV糖蛋白I(gI)或其免疫原性片段,或e) 其任何组合。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的组合物,其中一种或多种所述核苷修饰的mRNA进一步包含聚-A尾。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的组合物,其中一种或多种所述核苷修饰的mRNA进一步包含m<sup>7</sup>GpppG帽、3'-O-甲基-m<sup>7</sup>GpppG帽或抗反向帽类似物。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的组合物,其中一种或多种所述核苷修饰的mRNA进一步包含帽非依赖性翻译增强子。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的组合物,其中一种或多种所述核苷修饰的mRNA

进一步包含增强翻译的5'和3'非翻译区。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的组合物,其中一种或多种所述核苷修饰的mRNA被包封在纳米颗粒、脂质、聚合物、胆固醇或细胞穿透肽中。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述纳米颗粒是脂质体纳米颗粒。

21. 一种治疗受试者的单纯疱疹病毒 (HSV) 感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1-20中任一项所述的核苷修饰的mRNA组合物的步骤。

22. 一种在受试者中遏制、抑制或降低单纯疱疹病毒 (HSV) 感染发生率的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1-20中任一项所述的核苷修饰的mRNA组合物的步骤。

23. 根据权利要求21-22中任一项所述的方法,其中所述HSV感染包括HSV-1感染。

24. 根据权利要求21-22中任一项所述的方法,其中所述HSV感染包括HSV-2感染。

25. 根据权利要求21-24中任一项所述的方法,其中所述HSV感染包括原发性HSV感染。

26. 根据权利要求21-24中任一项所述的方法,其中所述HSV感染包括原发性HSV感染后的爆发、复发或HSV唇。

27. 根据权利要求21-24中任一项所述的方法,其中所述HSV感染包括潜伏HSV感染的再激活。

28. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中所述HSV感染包括HSV脑炎、HSV新生儿感染、生殖器HSV感染或口腔HSV感染。

29. 一种在受试者中诱导免疫应答的方法,其包括对所述受试者施用根据权利要求1-20中任一项所述的核苷修饰的mRNA组合物的步骤。

30. 根据权利要求21-29中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括肌内施用。

31. 根据权利要求21-29中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括皮下施用。

32. 根据权利要求21-29中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括皮内施用。

33. 根据权利要求21-29中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括鼻内、阴道内或直肠内施用。

34. 根据权利要求21-29中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括局部施用。

35. 根据权利要求21-34中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括a) 施用包含编码第一HSV糖蛋白的核苷修饰的mRNA的第一组合物,b) 施用包含编码第二HSV糖蛋白的核苷修饰的mRNA的第二组合物,和c) 施用包含编码第三HSV糖蛋白的核苷修饰的mRNA的第三组合物。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述第一、第二和第三组合物在单个施用部位施用给所述受试者。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中所述第一、第二和第三组合物在不同施用部位施用给所述受试者。

38. 根据权利要求35-37中任一项所述的方法,其中所述第一、第二和第三组合物同时施用。

39. 根据权利要求35-37中任一项所述的方法,其中所述第一、第二和第三组合物连续施用。

40. 根据权利要求35-39中任一项所述的方法,其中所述第一、第二和第三组合物通过

相同的施用途径施用。

41. 根据权利要求35-39中任一项所述的方法,其中所述第一、第二和第三组合物通过不同的施用途径施用。

42. 根据权利要求21-41中任一项所述的方法,还包括以下步骤:在所述第一次施用之后,向所述受试者施用所述核苷修饰的mRNA组合物的一次或多次额外施用。

43. 根据权利要求21-41中任一项所述的方法,还包括以下步骤:向所述受试者施用包含所述HSV糖蛋白或其免疫原性片段的组合物。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中包含所述HSV糖蛋白的所述组合物在施用所述核苷修饰的mRNA组合物之后施用。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中包含所述HSV糖蛋白的所述组合物在施用所述核苷修饰的mRNA组合物之前施用。

46. 根据权利要求43-45中任一项所述的方法,其中所述HSV糖蛋白包含gD、gC、gE或其组合。

47. 根据权利要求29-46中任一项所述的方法,其中所述免疫应答包括CD4免疫应答。

48. 根据权利要求29-46中任一项所述的方法,其中所述免疫应答包括CD8免疫应答。

49. 根据权利要求29-46中任一项所述的方法,其中所述免疫应答包括T滤泡辅助细胞免疫应答。

50. 根据权利要求29-46中任一项所述的方法,其中所述免疫应答包括生发中心B细胞免疫应答。

51. 根据权利要求29-46中任一项所述的方法,其中所述免疫应答包括对gC2、gD2、gE2或其组合的IgG抗体应答。

## 编码单纯疱疹病毒糖蛋白的修饰mRNA疫苗及其用途

### 发明领域

[0001] 本发明提供了用于预防和治疗生殖器疱疹的组合物,其包含编码单纯疱疹病毒(HSV)糖蛋白的核苷修饰的mRNA,包括参与病毒进入和免疫逃逸的mRNA,及其使用方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 迫切需要生殖器疱疹疫苗以预防疼痛和痛苦,减少新生儿疱疹的发生率,并减少伴随生殖器感染的HIV获得和传播的风险。全世界大约有五亿人感染了2型单纯疱疹病毒(HSV-2),一种引起生殖器疱疹的病毒。在某些个体中,感染会导致痛苦的复发性生殖器溃疡,而在其他个体中,感染会保持静息。在这两种情况下,受感染的个人都可能将病毒传播给其亲密伴侣。生殖器疱疹增加了被感染者在性交中如果暴露而获得HIV的风险。迫切需要生殖器疱疹疫苗,但目前尚无。

[0004] Chiron公司评估了一种预防性疫苗,该疫苗包含参与病毒进入的两种HSV-2糖蛋白,以MF59为佐剂的糖蛋白B(gB2)和D(gD2)。该疫苗虽然能在免疫后的头5个月内延迟感染发生,但不能保护血清阴性伴侣免受HSV-2感染。葛兰素史克(GSK)使用以单磷酸脂质A(MPL)和明矾为佐剂的gD2抗原评估了一种预防性疫苗。总体而言,虽然在HSV-1和HSV-2双重血清阴性女性的亚组中注意到明显的保护作用,但未检测到针对生殖器病变的保护措施。对双重血清阴性的妇女进行了一项随访试验,该试验未显示出对生殖器疱疹的总体保护作用;但是,该疫苗对HSV-1是有效的。该结果值得注意,因为对照组中HSV-1占生殖器疱疹感染的60%。这些研究表明,靶向疫苗以阻断HSV-2进入是不够的。

[0005] HSV-1和HSV-2 gC是免疫逃避分子,其充当补体级联的调节剂。在补体激活过程中,最丰富的补体蛋白C3被裂解为C3b,C3b激活了膜攻击复合物,导致病毒中和和感染细胞的裂解。C3b刺激B细胞和T细胞应答,并充当先天免疫与获得性免疫之间的联系。HSV-1和HSV-2 gC结合C3b以抑制C3b介导的活性。用gC1和gC2免疫产生与糖蛋白结合并阻断其免疫逃逸功能的抗体。

[0006] HSV-1和HSV-2糖蛋白E(gE)通过将与其F(ab')<sub>2</sub>结构域结合的IgG分子的Fc结构域结合到其靶标而起到免疫逃避分子的作用。含有gE2亚基抗原的疫苗产生与gE2结合并阻断其免疫逃逸功能的抗体。HSV-2 gC2和gE2执行类似于哺乳动物补体和IgG Fc调节蛋白的活性,但与哺乳动物受体没有序列同源性,这实际上表明没有免疫接种将诱发自身免疫性的风险。

[0007] 我们实验室的先前工作检查了包含gC、gD和gE的疫苗,并发现此类疫苗可提供针对HSV感染的保护作用。但是,尚不清楚编码HSV gC、gD和gE的mRNA疫苗是否能有效预防HSV感染。

[0008] 使用核酸作为疫苗具有多个优点。核酸疫苗可以诱导体液和细胞免疫应答;有效剂量低;操作简单;有效快速测试;在大规模生产和分离中具有成本效益且可再现;可以高频率生产并且易于分离;比常规疫苗对温度更稳定;保质期长;易于储存和运输;并且不太可能需要冷链(Shedlock&Weiner, J Leukocyte Biol. Vol 68, 2000)。

[0009] 原则上,外源DNA或RNA均可在哺乳动物体内表达蛋白质。DNA和mRNA表达的蛋白质

能否产生类似的免疫活性尚不确定。传统观点认为，DNA因其稳定性和易用性而在疫苗生产和基因治疗方面具有优势。

[0010] DNA已成功用于疫苗中。DNA非常稳定且无反应，可以长期保存。但是，DNA是自我复制的，很容易被紫外线辐射破坏。由于可能将DNA插入基因组，可能破坏基因和形成抗DNA抗体，基于DNA的疫苗也可能引起安全性问题。

[0011] RNA疫苗表现出重要的安全性。RNA比DNA更具反应性，稳定性较差，但对紫外线辐射具有抗性。mRNA不整合到宿主染色体中。mRNA的递送导致感兴趣的抗原的更快表达，并且需要更少的拷贝用于表达。mRNA表达是瞬时的，这增加了其安全性。在有丝分裂后和非分裂细胞中，mRNA比DNA更有效地产生蛋白质，因为DNA需要通过核成员和质膜转运，而mRNA仅需要通过质膜转运。mRNA不仅是翻译的模板，而且还是to11样受体的配体，对核酸酶敏感；因此，对水平传播的关注较少。

[0012] 此外，RNA疫苗完美地整合了佐剂性和抗原表达，从而模仿了病毒感染的相关方面。与需要使用佐剂的灭活疫苗相比，这提高了它们的功效，简化了处理和生产。RNA可以处理一系列专用的免疫模式识别受体，包括To11样受体3、7和8、RIG-1、MDA5、PKR以及其他可能协同作用并用于增强对抗原特异性适应性B和T细胞应答的诱导的受体。重要的是，通过在转染的宿主细胞中进行抗原合成，mRNA疫苗将抗原直接引入细胞抗原加工和呈递途径中，从而允许进入MHC分子并触发T细胞应答，而与宿主MHC单倍型无关。这使得能够诱导多克隆T细胞应答，其可以与包括B细胞的其他免疫应答协同作用。而且，抗原的内源性产生确保了忠实的翻译后修饰（例如蛋白水解加工、糖基化等），其可以积极地影响免疫原性。

## 发明内容

[0013] 在一个实施例中，本发明提供了包含一种或多种核苷修饰的mRNA的组合物，其中每个所述核苷修饰的mRNA编码单纯疱疹病毒（HSV）糖蛋白或其免疫原性片段，并且其中所述核苷修饰的mRNA包含一种或多种假尿苷残基。

[0014] 在另一个实施例中，本发明提供了包含一种或多种核苷修饰的mRNA的组合物，其中每个所述修饰的mRNA编码单纯疱疹病毒（HSV）糖蛋白或其免疫原性片段，并且其中所述核苷修饰的mRNA包含1-甲基假尿苷，其中所述假尿苷残基包含 $m^1acp^3\Psi$ （1-甲基-3-（3-氨基-5-羧丙基）假尿苷、 $m^1\Psi$ （1-甲基假尿苷）、 $\Psi_m$ （2'-O-甲基假尿苷、 $m^5D$ （5-甲基二氢尿苷）、 $m^3\Psi$ （3-甲基假尿苷）或其任何组合。

[0015] 在另一个实施例中，本发明提供了包含含有一种或多种假尿苷残基的修饰的mRNA的组合物，其中每个所述修饰的mRNA编码a) HSV糖蛋白D（gD）或其免疫原性片段，b) HSV糖蛋白C（gC）或其免疫原性片段，c) HSV糖蛋白E（gE）或其免疫原性片段，或其任何组合。

[0016] 在另一个实施例中，本发明提供了一种治疗受试者的单纯疱疹病毒（HSV）感染的方法，其包括向所述受试者施用包含一种或多种修饰的mRNA的组合物步骤，其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段，并且其中所述修饰的mRNA包含假尿苷残基。

[0017] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中诱导免疫应答的方法，其包括向所述受试者施用包含一种或多种修饰的mRNA的组合物步骤，其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段，并且其中所述修饰的mRNA包含假尿苷残基。

[0018] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中遏制、抑制或降低单纯疱疹病毒(HSV)感染发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用包含一种或多种修饰的mRNA的组合物的步骤,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段,并且其中所述修饰的mRNA包含假尿苷残基。

[0019] 在又一个实施例中,本发明提供了一种治疗受试者的单纯疱疹病毒(HSV)感染的方法,该方法包括向所述受试者施用包含一种或多种编码a) HSV糖蛋白D(gD)或其免疫原性片段,b) HSV糖蛋白C(gC)或其免疫原性片段,c) HSV糖蛋白E(gE)或其免疫原性片段,或其任何组合的修饰的mRNA的组合物的步骤。

[0020] 在又一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中遏制、抑制或降低单纯疱疹病毒(HSV)感染发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用包含一种或三种修饰的mRNA的组合物的步骤,其中每个所述修饰的mRNA编码a) HSV糖蛋白D(gD)或其免疫原性片段,b) HSV糖蛋白C(gC)或其免疫原性片段,和c) HSV糖蛋白E(gE)或其免疫原性片段,或其任何组合。

[0021] 通过以下详细描述实例和附图,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,表示本发明的优选实施例的详细描述和具体实例仅以说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将从该详细描述中变得显而易见。

## 附图说明

[0022] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本公开的某些方面,通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文提出的具体实施例的详细描述,可以更好地理解其中发明。专利或申请文件包含至少一张彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将由专利局根据请求提供并支付必要的费用。

[0023] 图1A-1C。Vero细胞中gC2-,gD2-和gE2修饰的mRNA的胞外结构域翻译产物的表征。

[0024] 图1A。蛋白质印迹显示修饰的mRNA的gC2表达。

[0025] 图1B。蛋白质印迹显示修饰的mRNA的gD2表达。

[0026] 图1C。蛋白质印迹显示修饰的mRNA的gE2表达。

[0027] 图2A。在用以下免疫的小鼠中通过抗原特异性ELISA确定的gC2抗体(Ab)应答:gD2 mRNA;或gC2 mRNA、gD2 mRNA和gE2 mRNA,各自在不同的皮内部位施用(三价-I);或gC2 mRNA、gD2 mRNA和gE2 mRNA组合施用(三价-C)。I表示第一次免疫;II表示第二次免疫。

[0028] 图2B。在用以下免疫的小鼠中通过抗原特异性ELISA确定的gD2 Ab应答:gD2 mRNA;或gC2 mRNA、gD2 mRNA和gE2 mRNA,各自在不同的皮内部位施用(三价-I);或gC2 mRNA、gD2 mRNA和gE2 mRNA组合施用(三价-C)。I表示第一次免疫;II表示第二次免疫。

[0029] 图2C。在用以下免疫的小鼠中通过抗原特异性ELISA确定的gE2 Ab应答:gD2 mRNA;或gC2 mRNA、gD2 mRNA和gE2 mRNA,各自在不同的皮内部位施用(三价-I);或gC2 mRNA、gD2 mRNA和gE2 mRNA组合施用(三价-C)。I表示第一次免疫;II表示第二次免疫。

[0030] 图3A。接种mRNA的小鼠中的抗原特异性IgG1应答。在第一次和第二次免疫后评估抗体的IgG1应答。I表示第一次免疫;II表示第二次免疫。

[0031] 图3B。接种mRNA的小鼠中的抗原特异性IgG2a应答。在第一次和第二次免疫后评估

抗体的IgG2a应答。I表示第一次免疫；II表示第二次免疫。

[0032] 图4。接种mRNA的小鼠中的中和抗体效价。第二次免疫后获得血清的50%终点中和效价。使用10%人补体进行效价测定。用各自在不同部位施用的gC2/脂质体纳米颗粒(LNP)、gD2/LNP和gE2/LNP免疫三价-I动物。用结合成单个LNP的gC2、gD2和gE2免疫三价-C动物。比较50%终点中和效价的P值：三价-I相对于gD2,  $p=0.04$ ；三价-C相对于gD2,  $p=0.002$ ；三价-I相对于三价C,  $p=0.026$ 。

[0033] 图5。CD4<sup>+</sup>T细胞对各自在不同皮内部位施用的gC2、gD2和gE2 mRNA的应答。用亚基抗原糖蛋白(图5A)或具有11个重叠氨基酸的15个氨基酸肽刺激脾细胞,以刺激HSV-2特异性T细胞应答(图5B)。\*表示将gC、gD或gE与PBS刺激的CD4<sup>+</sup>T细胞或DMSO刺激的CD4<sup>+</sup>T细胞进行比较的 $p<0.05$ (t检验)。误差条代表SD。

[0034] 图6。CD8<sup>+</sup>T细胞对各自在不同皮内部位施用的gC2、gD2和gE2 mRNA的应答。用亚基抗原糖蛋白(图6A)或具有11个重叠氨基酸的15个氨基酸肽刺激脾细胞,以刺激HSV-2特异性T细胞应答(图B)。\*表示将gE库2与DMSO对照进行比较的 $p<0.05$ 。误差棒代表SD。

[0035] 图7A。以28天间隔用mRNA免疫两次并用HSV-2进行阴道内攻击的BALB/c小鼠的存活率。三价-I代表用各自在不同皮内部位施用的gC2/LNP、gD2/LNP和gE2/LNP免疫的动物。三价-C代表用结合成单个LNP进行免疫的gC2、gD2和gE2免疫的动物。

[0036] 图7B。以28天间隔用mRNA免疫两次并用HSV-2进行阴道内攻击的BALB/c小鼠的体重减轻(-)或增加(+)和神经系统体征。三价-I代表用各自在不同皮内部位施用的gC2/LNP、gD2/LNP和gE2/LNP免疫的动物。三价-C代表用结合成单个LNP进行免疫的gC2、gD2和gE2免疫的动物。

[0037] 图8A-8B。用HSV-2进行阴道内攻击后,接种mRNA的小鼠中的阴道病毒效价。攻击后第2天(图8A)和第4天(图B)获得阴道拭子效价。虚线表示测定的检测限为7PFU/ml。

[0038] 图9。HSV-2阴道攻击后,接种mRNA的小鼠中的生殖器疾病。对小鼠用聚C作为对照或用对于每个糖蛋白mRNA在各自部位的三价gD2mRNA/LNP(三价-I),或者用三价组合的所有三个mRNA(三价-C)进行免疫。对生殖器疾病进行了28天的评分。聚C组中的所有动物均在第10天死亡。\*\*\*表示将聚C与其他3组进行比较的 $p<0.001$ 。

[0039] 图10。在攻击后第4天,在接种mRNA的小鼠中的背根神经节(DRG)中的HSV-2 DNA拷贝。通过qPCR测量DRG中的HSV-2 DNA。在攻击后4天,评估每组4至5只动物的DRG的HSV-2 DNA。条表示每组的平均值。

[0040] 图11A。三价mRNA-LNP疫苗在小鼠中诱导有效的T滤泡辅助细胞应答。使BALB/c雌性小鼠作为未处理的对照动物未被免疫,或用聚C mRNA-LNP或三价修饰的mRNA-LNP以28天间隔皮内免疫两次。聚C mRNA对照接受10 $\mu$ g分成4等份的聚C mRNA-LNP并在4个单独的部位施用。三价修饰的mRNA组接受10 $\mu$ g gC2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP和10 $\mu$ g gE2 mRNA-LNP,各分为2等份,各在2个部位施用。第二次免疫后两周,从每组5只动物中收获脾脏,并进行流式细胞术以检测T滤泡辅助(Tfh)细胞应答(\* $p<0.05$ )。

[0041] 图11B。三价mRNA-LNP疫苗在小鼠中诱导有效的生发中心B细胞应答。使BALB/c雌性小鼠作为未处理的对照动物未被免疫,或用聚C mRNA-LNP或三价修饰的mRNA-LNP以28天间隔皮内免疫两次。聚C mRNA对照接受10 $\mu$ g分成4等份的聚C mRNA-LNP并在4个单独的部位施用。三价修饰的mRNA组接受10 $\mu$ g gC2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP和10 $\mu$ g gE2 mRNA-

LNP,各分为2等份,各在2个部位施用。第二次免疫后两周,从每组5只动物中收获脾脏,并进行流式细胞术以检测生发中心B细胞应答(\* $p < 0.05$ )。

[0042] 图12A-C。生殖器粘膜IgG抗体应答。使BALB/c小鼠以28天间隔用10 $\mu$ g聚C mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP或10 $\mu$ g的gC2、gD2、gE2三价修饰的mRNA-LNP皮内免疫两次。将三价mRNA组合,并以组合成LNP并分成4等份并在4个部位施用的10 $\mu$ g gC2 mRNA和10 $\mu$ g gD2 mRNA和10 $\mu$ g gE2 mRNA施用。第二次免疫后一个月,将60 $\mu$ l培养基引入阴道腔并回收。通过ELISA以阴道洗液与gC2(图12A)、gD2(图12B)和gE2(图12C)的1:50稀释度测定IgG效价(聚C组中 $n = 10$ 只小鼠,gD2 mRNA组中 $n = 10$ 以及三价mRNA组中 $n = 25$ ;\*\*\* $p < 0.001$ ;\*\* $p < 0.01$ )。

[0043] 图13。三价mRNA-LNP疫苗产生阻断gC2与补体成分C3b结合的抗体。使BALB/c小鼠作为非免疫IgG来源不被免疫,或用聚C mRNA-LNP或三价mRNA-LNP进行皮内免疫。聚C mRNA对照接受10 $\mu$ g分成4等份并在4个单独部位施用的聚C mRNA-LNP。gD2 mRNA组接受10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP,如针对聚C mRNA-LNP所述的那样施用。三价修饰的mRNA组接受组合成LNP并分成4等份并在4个部位施用的10 $\mu$ g gC2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP和10 $\mu$ g gE2 mRNA-LNP。每组10只小鼠。收集来自10只小鼠的血清并纯化IgG。评估IgG在12 $\mu$ g/200 $\mu$ l下阻断补体成分C3b结合gC2的能力(\*\*\*\* $p < 0.0001$ )。

[0044] 图14A-14F。当肌内施用疫苗时,三价mRNA疫苗为小鼠提供出色的保护。使BALB/c小鼠用聚C mRNA-LNP作为对照(15/组)或用含有10 $\mu$ g gC2、gD2和gE2 mRNA-LNP中每一种的三价mRNA(20/组)进行肌内免疫。图14A显示了小鼠存活的数据;图14B显示了体重减轻的数据;图14C显示了生殖器疾病的数据。在感染后第7天与第12天之间的安乐死时从9只聚C动物中收获DRG,或在三价mRNA组中在第28天实验结束时进行。图14D显示了DRG中HSV-2 DNA的数据。图14E显示了第2天阴道病毒培养物的数据,图14F显示了第4天阴道病毒培养物的数据。对于图14A-14F,聚C和三价组之间的差异是显著的, $p < 0.001$ 。

[0045] 图15A-15C。三价mRNA疫苗在豚鼠生殖器感染模型中是非常有效的。使Hartley品系雌性豚鼠不被免疫和不被感染(未处理组, $n = 10$ ),以每月一次间隔用20 $\mu$ g聚C mRNA-LNP( $n = 10$ )或用20 $\mu$ g gC2、gD2、gE2修饰的mRNA-LNP中的每一种( $n = 10$ )进行皮内免疫3次。最后一次免疫后一个月,用 $5 \times 10^5$  PFU的HSV-2株MS(50LD<sub>50</sub>)在阴道内感染聚C和三价mRNA组的动物。观察动物的死亡,在感染的急性期(第1-14天)的生殖器病变和在感染的复发期(第15-60天)的生殖器病变。图15A显示了存活数据;图15B提供了阴道疾病的数据(急性期);图15C提供了阴道疾病的数据(复发期)。

## 具体实施方式

[0046] 组合物

[0047] 在一个实施例中,本发明提供了包含一种或多种修饰的mRNA的组合物,其中每种所述修饰的mRNA编码单纯疱疹病毒(HSV)糖蛋白或其免疫原性片段。

[0048] 在一个实施例中,本发明提供了一种包含一种或多种核苷修饰的mRNA的组合物,其中每种所述修饰的mRNA编码单纯疱疹病毒(HSV)糖蛋白或其免疫原性片段,并且其中所述修饰的mRNA包含一种或多种假尿苷或假尿苷家族残基。

[0049] 在一个实施例中,HSV糖蛋白包括糖蛋白D(gD)、糖蛋白C(gC)、糖蛋白E(gE)、糖蛋白B(gB)、糖蛋白H(gH)、糖蛋白L(gL)糖蛋白I(gI)或其组合。

[0050] 因此,在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含一种或多种编码HSV gD、gC、gE、gB、gH、gL、gI或其免疫原性片段的修饰的mRNA。在一实施例中,修饰的mRNA包括假尿苷修饰的mRNA。

[0051] 在一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gD或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gC或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gE或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gB或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gH或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gL或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV gI或其片段的修饰的mRNA的组合物。

[0052] 在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV gD或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV gC或其片段的修饰的mRNA。

[0053] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV gD或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV gE或其片段的修饰的mRNA。

[0054] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV gC或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV gE或其片段的修饰的mRNA。

[0055] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV gD或其片段的修饰的mRNA;(b) 编码HSV gC或其片段的修饰的mRNA,和(c) 编码HSV gE或其片段的修饰的mRNA。

[0056] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV gD或其片段的修饰的mRNA;(b) 编码HSV gC或其片段的修饰的mRNA,(c) 编码HSV gE或其片段的修饰的mRNA;和(d) 编码HSV gB或其片段的修饰的mRNA。

[0057] 在一个实施例中,HSV糖蛋白是HSV-2糖蛋白。在另一个实施例中,HSV糖蛋白是HSV-1糖蛋白。在一个实施例中,HSV糖蛋白包括HSV-2糖蛋白和HSV-1糖蛋白。在另一个实施例中,HSV糖蛋白包含HSV-2糖蛋白和HSV-1糖蛋白的混合物。

[0058] 在一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gD或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gC或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gE或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gE或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gB或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gH或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gL或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-2 gI或其片段的修饰的mRNA的组合物。

[0059] 在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-2 gD或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV-2 gC或其片段的修饰的mRNA。

[0060] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-2 gD或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV-2 gE或其片段的修饰的mRNA。

[0061] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-2 gC或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV-2 gE或其片段的修饰的mRNA。

[0062] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-2 gD或其片段的修饰的mRNA;(b) 编码HSV-2 gC或其片段的修饰的mRNA,和(c) 编码HSV-2 gE或其片段的修饰的mRNA。

[0063] 在一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gD或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gC或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gE或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gE或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gB或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gH或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gL或其片段的修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明提供了包含编码HSV-1 gI或其片段的修饰的mRNA的组合物。

[0064] 在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-1 gD或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV-1 gC或其片段的修饰的mRNA。

[0065] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-1 gD或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV-1 gE或其片段的修饰的mRNA。

[0066] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-1 gC或其片段的修饰的mRNA;和(b) 编码HSV-1 gE或其片段的修饰的mRNA。

[0067] 在另一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 编码HSV-1 gD或其片段的修饰的mRNA;(b) 编码HSV-1 gC或其片段的修饰的mRNA,和(c) 编码HSV-1 gE或其片段的修饰的mRNA。

[0068] 在一个实施例中,本文所述的任何组合物基本上由一种或多种修饰的mRNA组成,其中每种所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段。在另一个实施例中,本文所述的任何组合物由一种或多种修饰的mRNA组成,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段。

[0069] 在另一个实施例中,本发明提供了组合物,其包含编码HSV gD蛋白的修饰的mRNA,编码HSV gC蛋白的修饰的mRNA,编码HSV gE蛋白的修饰的mRNA和编码一种或多种另外的HSV糖蛋白的修饰的mRNA。在一个实施例中,所述另外的HSV糖蛋白包含gB或其免疫原性片段、gH或其免疫原性片段、gL或其免疫原性片段、gI或其免疫原性片段或其任何组合。在一个实施例中,所述另外的HSV糖蛋白包括糖蛋白M(gM)、糖蛋白N(gN)、糖蛋白K(gK)、糖蛋白G(gG)、糖蛋白J(gJ)或其免疫原性片段。

[0070] 在一个实施例中,本发明的和用于本发明方法的组合物包含HSV-2糖蛋白或糖蛋白片段和HSV-1糖蛋白或糖蛋白片段。在另一个实施例中,本发明的和用于本发明方法的组合物包含HSV-2糖蛋白或糖蛋白片段和HSV-1糖蛋白或糖蛋白片段的混合物。例如,在一个实施例中,本发明的组合物包含HSV-2 gC、HSV-1 gD和HSV-2 gE或其片段。在另一个实施例中,本发明的组合物包含HSV-1 gC、HSV-2 gD和HSV-2 gE或其片段。在另一个实施例中,本发明的组合物包含HSV-2 gC、HSV-2 gD和HSV-1 gE或其片段。在另一个实施例中,本发明的组合物包含HSV-1 gC、HSV-1 gD和HSV-2 gE或其片段。在另一个实施例中,本发明的组合物包含HSV-1 gC、HSV-2 gD和HSV-1 gE或其片段。在另一个实施例中,本发明的组合物包含HSV-2 gC、HSV-1 gD和HSV-1 gE或其片段。

[0071] 在另一个实施例中,如本文所述,本发明的组合物包含一种或多种另外的HSV-1糖蛋白或HSV-2糖蛋白或HSV-1和HSV-2糖蛋白。例如,在一个实施例中,包含HSV-2 gC、HSV-1 gD和HSV-2 gE的本发明的组合物可进一步包含HSV-1 gI。在另一个实施例中,包含HSV-2 gC、HSV-2 gD和HSV-2 gE的本发明的组合物可进一步包含HSV-1 gB。HSV-1和HSV-2糖蛋白的每种可能的组合代表本发明的单独实施例。

[0072] 在一个实施例中,“编码”是指包含编码目的蛋白质的基因的RNA分子。在另一个实施例中,RNA分子包含编码目的蛋白质的蛋白质编码序列。在另一个实施例中,还编码一种或多种其他蛋白质。在另一个实施例中,目的蛋白质是唯一编码的蛋白质。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0073] 在另一个实施例中,“免疫原性片段”是指当施用于受试者时具有免疫原性并引起保护性免疫应答的蛋白质的一部分。

[0074] 在一个实施例中,本文使用的“免疫原性”或“免疫原性的”是指当蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体施用于动物时,蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体在动物体内引起免疫应答的先天能力。因此,在一个实施例中,“增强免疫原性”是指当蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体施用于动物时,增加蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体在动物体内引起免疫应答的能力。在一个实施例中,蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体引起免疫应答的能力的增加可以通过针对蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体的更大数量的抗体,针对抗原或生物体的多样性更大的抗体,对蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体具有特异性的更大数量的T细胞,对蛋白质、肽、核酸、抗原或生物体具有更强的细胞毒性或辅助T细胞应答等来测量。

[0075] 在一个实施例中,免疫原性多肽也是抗原性的。在另一个实施例中,“抗原性”是指能够与免疫系统的抗原识别分子例如免疫球蛋白(抗体)或T细胞抗原受体特异性相互作用的肽。在另一个实施例中,抗原性肽包含至少约8个氨基酸(AA)的表位。多肽的抗原部分(在一个实施例中在本文中也称为表位)可以是对抗体或T细胞受体识别具有免疫优势的部分,或者其可以用于通过将抗原部分与用于免疫的载体多肽缀合而产生针对分子的抗体的部分。具有抗原性的分子本身不必具有免疫原性,即能够在没有载体的情况下引发免疫应答。

[0076] 在一个实施例中,本发明含义内的“功能性”在本文中用于指蛋白质、肽、核酸、其片段或变体表现出生物学活性或功能的固有能力。在一个实施例中,这样的生物学功能是其与相互作用伴侣例如膜相关受体的结合性质,在另一实施例中是其三聚性质。就本发明的功能片段和功能变体而言,这些生物学功能实际上可以例如在其特异性或选择性方面改变,但保留基本生物学功能。

[0077] 在一个实施例中,术语“片段”在本文中用于指比全长蛋白质或多肽更短或包含更少氨基酸的蛋白质或多肽。在另一个实施例中,片段是指编码比全长核酸更短或包含更少核苷酸的蛋白质片段的核酸。在另一个实施例中,片段是N-末端片段。在另一个实施例中,片段是C-末端片段。在一个实施例中,片段是蛋白质、肽或核酸的序列内部分。在另一个实施例中,片段是蛋白质、肽或核酸的免疫原性序列内部分。在另一个实施例中,片段是蛋白质、肽或核酸内的功能性序列内部分。在另一个实施例中,片段是N末端免疫原性片段。在一个实施例中,片段是C末端免疫原性片段。在另一个实施例中,片段是N末端功能性片段。在另一个实施例中,片段是C末端功能性片段。在另一个实施例中,片段包含连接在一起的蛋

白质片段或连接在一起的多种蛋白质片段。

[0078] 因此,在一个实施例中,本发明中描述的蛋白质的“免疫原性片段”是指在一个实施例中是免疫原性的并在另一实施例中当施用给受试者时引起保护性免疫应答的蛋白质部分。

[0079] 在另一方面,本发明提供了包含修饰的mRNA的组合物,其中所述修饰的mRNA中的每一个编码a) HSV糖蛋白D (gD) 或其免疫原性片段, b) HSV糖蛋白C (gC) 或其免疫原性片段, c) HSV糖蛋白E (gE) 或其免疫原性片段或其任何组合。

[0080] 在一个实施例中,本发明提供了一种组合物,其包含编码HSV gD或其免疫原性片段的修饰的mRNA,编码HSV gC或其免疫原性片段的修饰的mRNA,以及编码HSV gE或其免疫原性片段的修饰的mRNA。

[0081] 在一个实施例中,编码gD-1的修饰的mRNA的组合物对HSV-1感染具有保护作用。此外,与包含单独编码gC-1、单独编码gD-1或单独编码gE-1的修饰的mRNA的组合物相比,编码gC-1/gD-1/gE-1的修饰的mRNA的组合组合物具有更好的保护作用。此外,如本文提供的,编码gD-2的修饰的mRNA的组合物对HSV-2感染具有保护作用(图7-10)。此外,与包含单独编码gC-2、单独编码gD-2或单独编码gE-2的修饰的mRNA的组合物相比,编码gC-2/gD-2/gE-2的修饰的mRNA的组合组合物具有更好的保护作用。

[0082] 在另一个实施例中,在本发明的组合物中包含编码gC的修饰的mRNA和/或编码gE的修饰的mRNA增加了由该组合物引起的抗gD抗体的效力。在另一个实施例中,在本发明的组合物中包含编码gC的修饰的mRNA和/或编码gE的修饰的mRNA增加了引起抑制gD与细胞受体结合的抗体所需的编码gD的修饰的mRNA的剂量。在另一个实施例中,当将编码gD的修饰的mRNA的剂量与编码gC蛋白或gE蛋白的修饰的mRNA分开施用时,在本发明的组合物中包含编码gC的修饰的mRNA和/或编码gE的修饰的mRNA降低了引发抑制gD与细胞受体结合的抗体所需的编码gD的修饰的mRNA的剂量。

[0083] 在另一个实施例中,在本发明的组合物中包含编码gC的修饰的mRNA和/或编码gE的修饰的mRNA增强了先天免疫应答的有效性。在另一个实施例中,先天免疫应答是抗体介导的免疫应答。在另一个实施例中,先天免疫应答是非抗体介导的免疫应答。在另一个实施例中,先天免疫应答是NK(天然杀伤)细胞应答。在另一个实施例中,先天免疫应答是本领域已知的任何其他先天免疫应答。

[0084] 在另一个实施例中,在本发明的组合物中包含编码gC的修饰的mRNA和/或编码gE的修饰的mRNA增加了针对上述糖蛋白中一种由该组合物引发的抗体的效力。在另一个实施例中,当糖蛋白中一种的剂量与其它糖蛋白中一种分开施用时,在本发明的组合物中包含编码gC的修饰的mRNA和/或编码gE的修饰的mRNA降低引发抑制糖蛋白与其细胞受体结合的抗体所需的上述糖蛋白中一种的剂量。

[0085] 糖蛋白D

[0086] 在一个实施例中,本发明的组合物包含编码HSV-1 gD蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码HSV-1 gD蛋白的片段的修饰的mRNA。

[0087] 在一个实施例中,编码HSV-1 gD片段的修饰的mRNA的核苷酸序列包括:

[0088]

GGAAUAAAAGUCUCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUC  
AAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAG  
CAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCAUGCGCAUGCAGCU  
**GCUGCUGCUGAUCGCCUGUCCUGGCCUGGUGACCAACUCCAAGUACGC**  
CCUGGCCGACGCCUCCUGAAGAUGGCCGACCCAACCGCUUCCGCGGCAAGG  
ACCUGCCCUGUGCUGGACCAGCUGACCGACCCCCCGGCGUGCGCCGCGUGUAC  
CACAUCCAGGCCGGCCUGCCCAGCCCUUCCAGCCCCCUCCUGCCCAUCACC  
GUGUACUACGCCGUGCUGGAGCGCGCCUGCCGCUCCGUGCUGCUGAACGCCCC  
CUCCGAGGCCCCCCAGAUUGCUGCGGGCGCCUCCGAGGACGUGCGCAAGCAGC  
CCUACAACCUGACCAUCGCCUGGUUCCGCAUGGGCGGCAACUGCGCCAUCCCC  
AUCACCGUGAUGGAGUACACCGAGUGCUCCUACAACAAGUCCUGGGCGCCUG  
CCCCAUCCGCACCCAGCCCCGUGGAACUACUACGACUCCUUCUCCGCCGUGU  
CCGAGGACAACCUGGGCUUCCUGAUGCACGCCCCGCCUUCGAGACCGCCGGC  
ACCUACCUGCGCCUGGUGAAGAUAACGACUGGACCGAGAUCACCCAGUUCAU  
CCUGGAGCACCGCGCCAAGGGCUCCUGCAAGUACGCCUGCCCCUGCGCAUCC  
CCCCUCCGCCUGCCUGUCCCCCAGGCCUACCAGCAGGGGCGUGACCGUGGAC  
UCCAUCGGCAUGCUGCCCCGCUUCAUCCCCGAGAACCAGCGCACCGUGGCCGU  
GUACUCCUGAAGAUCGCCGGCUGGCACGGCCCCAAGGCCCCCUACACCUCCA  
CCCUGCUGCCCCCGAGCUGUCCGAGACCCCAACGCCACCCAGCCGAGCUGG  
CCCCGAGGACCCCGAGGACUCCGCCUGCUGGAGGACCCCGUGGGCACCGUG  
GCCCCCAGAUCCCCCCAACUGGCACAUCCCCUCCAUCCAGGACGCCGCCACC  
CCCUACUAACUAGUAGUGACUGACUAGGAUCUGGUUACCACUAAACCAGCCUCA  
GAAACCCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUAACCAACUUAACACUUAACAAAUGU  
UGUCCCCCAAUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUC  
ACAUUCUAAA  
AAAC (SEQ ID NO: 1)

[0089] 在一个实施例中,所有尿苷残基均为1-甲基-假尿苷。在一个实施例中,带下划线的残基代表5'非翻译序列。在一个实施例中,粗体残基代表辅助gD1片段表达的信号序列(前导序列)。在一个实施例中,斜体残基代表3'非翻译序列和聚腺苷化尾。

[0090] 在另一个实施例中,编码HSV-1 gD片段的修饰的mRNA的核苷酸序列缺少5'非翻译序列、信号序列、3'非翻译序列、聚腺苷化尾或其组合。

[0091] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gD片段包含来自HSV-1Patton株的gD的氨基酸26-331,如以下氨基酸序列所示:

[0092] KYALADASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPGVRVYHIQAGLPDPFQPPSLPITV  
YYAVLERACRSVLLNAPSEAPQIVRGASEDVRKQPYNLTIAWFRMGGNCAIPITVME  
YTECSYNKSLGACPIRTQPRWNYDSFS AVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKIN  
DWTEITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPSACLSAQAYQQGVTVD SIGMLPRFIPENQRT  
VAVYSLKIAGWHGPKAPYTSTLLPELSETPNATQPELAPEDPEDSALLEDPVGT VAP  
QIPPNWHIPSIQDAATPY (SEQ ID NO: 2)

[0093] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的全长HSV-1 gD包含以下氨基酸序列:

[0094] MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKYALADASLKLADPNRFRKDLPLVDQLTDP  
PGVRVYHIQAGLPDPFQPPSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQIVRGASEDVR  
KQPYNLTIAWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRTQPRWNYDSFS AVSE  
DNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPSACLS  
PQAYQQGVTVD SIGMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAGWHGPKAPYTSTLLPELSETPN  
ATQPELAPEAPEDSALLEDPVGT VAPQIPPNWHIPSIQDAATPYHPPATPNMGLIAG  
AVGGSLLAALVICGIVYWMRRRTQKAPKRIRLPHIREDDQPSSHQPLFY (SEQ ID NO:  
3)

[0095] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gD包含如以下GenBank登录号中任一个所示的氨基酸序列:AAL90884.1 (KHS2株)、AAL90883.1 (KHS1株)、AAK93950.1 (F株)、AAB59754.1 (F株)、AAA19631.1 (未鉴定突变株)、AAA19630.1 (未鉴定突变株)或AAA19629.1 (未鉴定株)。

[0096] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gD包含如以下GenBank登录号中任一个所示的氨基酸序列:A1Z0Q5.2、AAA45780.1、AAA45785.1、AAA45786.1、AAA96682.1、AAK19597.1、AAN74642.1、ABI63524.1、ABM52978.1、ABM52979.1、ABM52980.1、ABM52981.1、ABM66847.1、ABM66848.1、ACM62295.1、ADD60053.1、ADD60130.1、ADM22389.1、ADM22466.1、ADM22542.1、ADM22619.1、ADM22696.1、ADM22773.1、ADM22849.1、ADM22926.1、ADM23003.1、ADM23079.1、ADM23155.1、ADM23231.1、ADM23309.1、ADM23383.1、ADM23457.1、ADM23531.1、ADM23605.1、ADM23680.1、ADM23755.1、ADM23831.1、AEQ77097.1、AER37647.1、AER37715.1、AER37786.1、AER37857.1、AER37929.1、AER38000.1、AER38070.1、AFE62894.1、AFH41180.1、AFI23657.1、AFK50415.1、AFP86430.1、AGZ01928.1、AIR95858.1、AJE60009.1、AJE60080.1、AJE60151.1、AJE60222.1、AJE60293.1、AJE60439.1、AKE48645.1、AKG59246.1、AKG59318.1、AKG59391.1、AKG59462.1、AKG59536.1、AKG59609.1、AKG59682.1、AKG59755.1、AKG59826.1、AKG59898.1、AKG59972.1、AKG60046.1、AKG60118.1、AKG60189.1、AKG60261.1、AKG60334.1、AKG60404.1、AKG60474.1、AKG60546.1、AKG60620.1、AKG60692.1、AKG60763.1、AKG60835.1、AKG60906.1、AKG60978.1、AKG61050.1、AKG61123.1、AKG61194.1、AKG61267.1、AKG61339.1、AKG61411.1、AKG61484.1、AKG61556.1、AKG61629.1、AKG61703.1、AKG61774.1、AKG61847.1、AKG61920.1、AKG61993.1、AKH80463.1、AKH80536.1、ALM22635.1、ALM22709.1、ALM22783.1、ALM22857.1、ALO18662.1、ALO18738.1、AMB65662.1、AMB65735.1、AMB65809.1、AMB65885.1、AMB65956.1、AMN09832.1、ANN83964.1、ANN84041.1、

ANN84117.1、ANN84194.1、ANN84271.1、ANN84348.1、ANN84424.1、ANN84500.1、ANN84577.1、ANN84653.1、ANN84730.1、ANN84806.1、ANN84883.1、ANN84959.1、ANN85036.1、ANN85112.1、ANN85187.1、ANN85264.1、ANN85341.1、ANN85416.1、ANN85494.1、ANN85571.1、ANN85648.1、ANN85724.1、ANN85801.1、AOY34093.1、AOY34141.1、AOY34243.1、AOY34271.1、AOY34337.1、AOY36685.1、ARB08957.1、AR037961.1、AR037962.1、AR037963.1、AR037964.1、AR037965.1、AR037966.1、AR037967.1、AR037968.1、AR037969.1、AR037970.1、AR037971.1、AR037972.1、AR037973.1、AR037974.1、AR037975.1、AR037976.1、AR037977.1、AR037978.1、AR037979.1、AR037980.1、AR037981.1、AR037982.1、AR037983.1、AR037984.1、AR037985.1、AR037986.1、AR037987.1、AR037988.1、AR037989.1、AR037990.1、AR037991.1、AR037992.1、AR037993.1、AR037994.1、AR037995.1、AR037996.1、AR037997.1、AR037998.1、AR037999.1、ASM47664.1、ASM47741.1、ASM47818.1、ASM47893.1、BAM73419.1、CAA26060.1、CAA32283.1、CAA32284.1、CAA32289.1、CAA38245.1、CAT05431.1、P06476.1、P36318.1、P57083.1、P68331.1、Q05059.1、Q69091.1、SB007792.1、SB007819.1、SB007855.1、SB007869.1、SB007887.1、SB007908.1、SBS69553.1、SBS69561.1、SBS69579.1、SBS69625.1、SBS69688.1、SBS69694.1、SBS69717.1、SBS69727.1、SBS69811.1、SBT69395.1、SCL76902.1、VGBEDZ或YP\_009137141.1。

[0097] 在另一个实施例中，组合物包含编码HSV-2 gD蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中，组合物包含编码HSV-2 gD蛋白的片段的修饰的mRNA。

[0098] 在一个实施例中，编码HSV-2 gD片段的修饰的mRNA的核苷酸序列包括：

GGAAUAAAAGUCUCAACACAACAUUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUCAA  
GCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAGCAAU  
UUUCUGAAAAUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCAUGACCCGCCUGACCCGUGCU  
**GGCCCUGCUGGCCGGCCUGCUGGCCUCCUCCCGCGCCAAGUACGCCCUGGCCG**  
**ACCCUCCCUGAAGAUGGCCGACCCCAACCGCUUCCGCGGCAAGAACCUGCCCGU**  
**GCUGGACCAGCUGACCCGACCCCCCGGCGUGAAGCGCGUGUACCACAUCCAGCCC**  
**UCCCUGGAGGACCCUUCAGCCCCCUCCAUCCCAUCACCGUGUACUACGCCGU**  
**GCUGGAGCGCGCCUGCCGCUCCGUGCUGCUGCACGCCCCUCCGAGGCCCCCCAGA**  
**UCGUGCGCGGCCUCCGACGAGGCCCGCAAGCACACCUACAACCUGACCAUCGC**  
**CUGGUACCGCAUGGGCGACAACUGCGCCAUCCCAUCACCGUGAUGGAGUACACC**  
**GAGUGCCCCUACAACAAGUCCUGGGCGUGUGCCCCAUCCGCACCCAGCCCCGU**  
**GGUCCUACUACGACUCCUUCUCCGCCGUGUCCGAGGACAACCUGGGCUUCCUGAU**  
**GCACGCCCCCGCCUUCGAGACCCGGCACCUCACCGCGCCUGGUGAAGAUCAAC**  
**GACUGGACCGAGAUCACCCAGUUAUCCUGGAGCACCGCGCCCGCGCCUCCUGCA**  
**AGUACGCCUGCCCCUGCGCAUCCCCCGCCGCCUGCCUGACCUCCAAGGCCUAC**  
**CAGCAGGGCGUGACCGUGGACUCCAUCGGCAUGCUGCCCCGCUUCAUCCCGAGA**  
**ACCAGCGCACCGUGGCCUGUACUCCUGAAGAUCGCCGGCUGGCACGGCCCCAA**  
**GCCCCCUACACCUCACCCUGCUGCCCCCGAGCUGUCCGACACCACCAACGCCA**  
**CCCAGCCCGAGCUGGUGCCCGAGGACCCCGAGGACUCCGCCUGCUGGAGGACCC**  
**CGCCGGCACCGUGUCCUCCAGAUCCCCCCAACUGGCACAUCCCCUCCAUCCAGG**  
**ACGUGGCCCCCCACCACUAA***CUAGUAGUGACUGACUAGGAUCUGGUUACCACUAAAC*  
*CAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUUACCAACUUACUUAC*  
*AAAAUGUUGUCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAAGAAUUU*  
*CUUCACAUUCUAAA*  
*AAAC* (SEQ ID NO: 4)

[0100] 在一个实施例中,所有尿苷残基均为1-甲基-假尿苷。在一个实施例中,带下划线的残基代表5'非翻译序列。在一个实施例中,粗体残基代表辅助gD2片段表达的信号序列(前导序列)。在一个实施例中,斜体残基代表3'非翻译序列和聚腺苷化尾。

[0101] 在另一个实施例中,编码HSV-2 gD片段的修饰的mRNA的核苷酸序列缺少5'非翻译序列、信号序列、3'非翻译序列,聚腺苷化尾或其组合。

[0102] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-2 gD片段包含来自HSV-2株333的gD的氨基酸26-331,如以下氨基酸序列所示:

KYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTDPGPKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPITVY  
 YAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMGDNCAIPITVME  
 YTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKIN  
 [0103] DWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTISKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQR  
 TVALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVS  
 SQIPPNWHIPSIQDVAPHH (SEQ ID NO: 5).

[0104] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的全长HSV-

2 gD包含以下氨基酸序列：

[0105] MGRLTSGVGTAAALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTD  
PPGVKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEAR  
KHTYNLTIAWYRMGDNCAIPITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSE  
DNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACL  
SKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVALYSLKIAGWHGPKPPYTSTLLPELSDTTN  
ATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWHIPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGAL  
AGSTLAVLVIGGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDAPPSHQPLFY (SEQ ID NO:  
6).

[0106] 在另一个实施例中，由本发明的方法和组合中使用的修饰的mRNA编码的HSV-2 gD包含如以下GenBank登录号所示的氨基酸序列：1003204A、AAA45841.1、AAA45842.1、AAB60552.1、AAB60553.1、AAB60554.1、AAB60555.1、AAB72102.1、AAS01730.1、AAW23130.1、AAW23131.1、AAW23132.1、AAW23133.1、AAW23134.1、ABS84899.1、ABU45433.1、ABU45434.1、ABU45435.1、ABU45461.1、ABU45462.1、ACA28831.1、AEV91405.1、AFM93876.1、AFS18198.1、AFS18199.1、AFS 18200.1、AFS18201.1、AFS 18202.1、AFS18203.1、AFS 18204.1、AFS 18205.1、AFS 18206.1、AFS 18207.1、AFS 18208.1、AFS 18209.1、AFS18210.1、AFS18211.1、AFS18212.1、AFS 18213.1、AFS18214.1、AFS18215.1、AFS18216.1、AFS18217.1、AFS18218.1、AFS18219.1、AFS 18220.1、AFS 18221.1、AHG54730.1、AIL27720.1、AIL27721.1、AIL27722.1、AIL27723.1、AIL27724.1、AIL27725.1、AIL27726.1、AIL27727.1、AIL27728.1、AIL27729.1、AIL27730.1、AIL27731.1、AIL28069.1、AIL28070.1、AKC42828.1、AKC59305.1、AKC59376.1、AKC59447.1、AKC59518.1、AKC59589.1、AMB66102.1、AMB66171.1、AMB66244.1、AMB66321.1、AMB66394.1、AMB66463.1、AQZ55754.1、AQZ55825.1、AQZ55896.1、AQZ55967.1、AQZ56038.1、AQZ56109.1、AQZ56180.1、AQZ56251.1、AQZ56322.1、AQZ56393.1、AQZ56464.1、AQZ56535.1、AQZ56606.1、AQZ56677.1、AQZ56748.1、AQZ56819.1、AQZ56890.1、AQZ56961.1、AQZ57032.1、AQZ57103.1、AQZ57174.1、AQZ57245.1、AQZ57316.1、AQZ57387.1、AQZ57458.1、AQZ57529.1、AQZ57600.1、AQZ57671.1、AQZ57742.1、AQZ57813.1、AQZ57884.1、AQZ57955.1、AQZ58026.1、AQZ58097.1、AQZ58168.1、AQZ58239.1、AQZ58310.1、AQZ58381.1、AQZ58452.1、AQZ58523.1、AQZ58594.1、AQZ58665.1、AQZ58736.1、AQZ58807.1、AQZ58878.1、AQZ58949.1、AQZ59020.1、AQZ59091.1、AQZ59162.1、AR038000.1、AR038001.1、AR038002.1、AR038003.1、AR038004.1、AR038005.1、AR038006.1、AR038007.1、AR038008.1、AR038009.1、AR038010.1、AR038011.1、AR038012.1、AR038013.1、AR038014.1、AR038015.1、AR038016.1、AR038017.1、AR038018.1、AR038019.1、AR038020.1、AR038021.1、AR038022.1、AR038023.1、AR038024.1、AR038025.1、AR038026.1、AR038027.1、AR038028.1、AR038029.1、AR038030.1、AR038031.1、AR038032.1、AR038033.1、AR038034.1、AR038035.1、AR038036.1、AR038037.1、AR038038.1、AR038039.1、AR038040.1、AR038041.1、AR038042.1、AR038043.1、AR038044.1、CAA26025.1、CAB06713.1、CAC33573.1、CAT05432.1、P03172.2、Q69467.1或YP\_009137218.1。

[0107] 在另一个实施例中，gD蛋白或片段包含Y63。在另一个实施例中，gD蛋白或片段包含R159。在另一个实施例中，gD蛋白或片段包含D240。在另一个实施例中，gD蛋白或片段包

含P246。在另一个实施例中，gD蛋白或片段包含选自Y63、R159、D240和P246的残基。在另一个实施例中，包含这些残基中的一个引起抑制与nectin-1结合的抗体。

[0108] 本文中用于gD氨基酸残基的命名法包括信号序列的残基。因此，成熟蛋白的第一个残基被称为“26”。

[0109] 编码gD-1和gD-2蛋白或其片段的每个修饰的mRNA代表本发明的单独实施例。

[0110] 在另一个实施例中，由本文公开的修饰的mRNA编码的HSV gD、gC和gE蛋白及其片段描述于美国专利公开号2013-0028925-A1中，其通过引用全文并入本文。

[0111] 在另一个实施例中，由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gD蛋白片段是免疫原性片段。在另一个实施例中，gD免疫保护性抗原不必是整个蛋白质。在另一个实施例中，保护性免疫应答通常涉及抗体应答。在另一个实施例中，gD的突变体、序列保守变体和功能性保守变体可用于本发明的方法和组合物中，条件是所有这些变体均保持所需的免疫保护作用。在另一个实施例中，免疫原性片段可以包含来自任何HSV株的免疫保护性gD抗原。在另一个实施例中，免疫原性片段可以包含如在感染个体中发现的HSV的序列变体。

[0112] 糖蛋白C

[0113] 在另一个实施例中，本发明的组合物包含编码HSV-1 gC蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中，组合物包含编码HSV-1 gC蛋白的片段的修饰的mRNA。

[0114] 在一个实施例中，编码HSV-1 gC片段的修饰的mRNA的核苷酸序列包含：

[0115]

GGAAUAAAAGUCUCAACACAACAUUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUC  
AAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAG  
CAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCAUGGCCAUCUCCGG  
**CGUGCCCGUGCUGGGCUUCUUAUCAUCGCCGUGCUGAUGUCCGCCAGG**  
**AGUCCUGGGCCGAGACCGCCUCCACCGGCCCCACCAUACCGCCGGCGCCGUG**  
ACCAACGCCUCCGAGGCCCCACCUCGGCUCUCCCCGGCUCGCGCCUCCCC  
GAGGUGACCCCACCUCACCCCCAACCCCAACAACGUGACCCAGAACAAGAC  
CACCCCACCGAGCCCGCCUCCCCCCCCACCACCCCAAGCCCACCUCACCCC  
CAAGUCCCCCCCCACCUCACCCCCGACCCAAGCCCAAGAACAACACCACCCC  
CGCCAAGUCCGGCCGCCACCAAGCCCCCGGCCCGUGUGGGUGCGACCGCCG  
CGACCCCUGGCCCGCUACGGCUCGCGUGCAGAUCGCGUGCCGCUUCCGCA  
ACUCCACCCGCAUGGAGUUCGCGCUGCAGAUCUGGCGCUACUCCAUGGGCCCC  
UCCCCCCCCAUCGCCCCGCCCCGACCUGGAGGAGGUGCUGACCAACAUCACC  
GCCCCCCCCGGCGGCCUGCUGGUGUACGACUCCGCCCCAACCUGACCGACCCC  
CACGUGCUGUGGGCCGAGGGCGCCGGCCCCGGCGCCGACCCCCCCCUGUACUC  
CGUGACCGGCCCCCUGCCCACCCAGCGCCUGAUAUCGGCGAGGUGACCCCCG  
CCACCAGGGCAUGUACUACCUGGCCUGGGGCCGCAUGGACUCCCCCACGAG  
UACGGCACCCUGGGUGCGCGUGCGCAUGUUCGCCCCCCCUCUCCUGACCCUGCA  
GCCCCACGCCGUGAUGGAGGGCCAGCCCUUCAAGGCCACCUGCACCGCCGCCG  
CCUACUACCCCCGCAACCCCGUGGAGUUCGACUGGUUCGAGGACGACCGCCAG  
GUGUUAACCCCGGCCAGAUUCGACACCCAGACCCACGAGCACCCCGACGGCUU  
CACCACCGUGUCCACCGUGACCUCGAGGCCGUGGGCGGCCAGGUGCCCCCCC  
GCACCUUCACCUGCCAGAUGACCUGGCACCGCGACUCCGUGACCUUCUCCCGC  
CGAACGCCACCGGCCUGGCCUGGUGCUGCCCCGCCCCACCAUCACCAUGGA  
GUUCGGCGUGCGCCACGUGGUGUGCACCGCCGGCUGCGUGCCCGAGGGCGUGA  
CCUUCGCCUGGUUCCUGGGCGACGACCCUCCCCCGCCGCAAGUCCGCCGUG  
ACCGCCAGGAGUCCUGCGACCACCCGGCCUGGCCACCGUGCGCUCCACCCU  
GCCAUUCUCCUACGACUACUCCGAGUACAUCUGCCGCCUGACCGGCUACCCCG  
CCGGCAUCCCCGUGCUGGAGCACCAUAACCUAGUAGUGACUGACUAGGAUCUGG  
UUACCACUAAAACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAAGCUACAUAUAC  
CAACUUACACUUACAAAAUGUUGUCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCC  
UAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AA  
AAAAAAAAAAC (SEQ ID NO: 7)

[0116] 在一个实施例中,所有尿苷残基均为1-甲基-假尿苷。在一个实施例中,带下划线的残基代表5'非翻译序列。在一个实施例中,粗体残基代表辅助gC1片段表达的信号序列

(前导序列)。在一个实施例中,斜体残基代表3'非翻译序列和聚腺苷化尾。

[0117] 在另一个实施例中,编码HSV-1 gC片段的修饰的mRNA的核苷酸序列不包含5'非翻译序列、信号序列、3'非翻译序列、聚腺苷化尾或其组合。

[0118] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gC片段包含来自HSV-1KOS株的gC的氨基酸27-457,如以下氨基酸序列所示:

[0119] ETASTGPTITAGAVTNASEAPTSGSPGSAASPEVTPPTSTPNPNNVTQNKTTPTPEASPP  
TTPKPTSTPKSPPTSTPDPKPKNNTTPAKSGRPTKPPGPVWCDRRDPLARYGSRVQIR  
CRFRNSTRMEFRLQIWRYSMGSPPIAPAPDLEEVLTNITAPPGLLVYDSAPNLTD  
HVLWAEGAGPGADPPLYSVTGPLPTQRLIIGEVTPATQGMYYLAWGRMDSPEHYGT  
WVRVRMFRPPSLTLQPHAVMEGQPFKATCTAAAYYPRNPVEFDWFEDDRQVFNPG  
QIDTQTHEHPDGFTTVSTVTSEAVGGQVPPRTFTCQMTWHRDSVTFSSRNATGLAL  
VLPRPTITMEFGVRHVCTAGCVPEGVTFWFLGDDPSPAAKSAVTAQESCDHPGL  
ATVRSTLPISYDYSEYICRLTGYPAGIPVLEHH (SEQ ID NO: 8).

[0120] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gC片段包含来自HSV-1株的gC的氨基酸27-457。

[0121] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的全长HSV-1 gC包含以下氨基酸序列:

[0122] MAPGRVGLAVVLWGLLWLGAGVAGGSETASTGPTITAGAVTNASEAPTSGSPGSA  
SPEVTPPTSTPNPNNVTQNKTTPTPEASPPPTTPKPTSTPKSPPTSTPDPKPKNNTTPAKSG  
RPTKPPGPVWCDRRDPLARYGSRVQIRCFRNSTRMEFRLQIWRYSMGSPPIAPAP  
DLEEVLTNITAPPGLLVYDSAPNLTDPHVLWAEGAGPGADPPLYSVTGPLPTQRLII  
GEVTPATQGMYYLAWGRMDSPEHYGTWVRVRMFRPPSLTLQPHAVMEGQPFKAT  
CTAAAYYPRNPVEFDWFEDDRQVFNPGQIDTQTHEHPDGFTTVSTVTSEAVGGQVP  
PRTFTCQMTWHRDSVTFSSRNATGLALVLPRPTITMEFGVRHVCTAGCVPEGVTF  
AWFLGDDPSPAAKSAVTAQESCDHPGLATVRSTLPISYDYSEYICRLTGYPAGIPVLE  
HHGSHQPPRPDPTERQVIEAIEWVGIGVLAAGVLVVTAVYVVRTSQRQRHRR  
(SEQ ID NO:9).

[0123] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gC包含如以下GenBank登录号中任一个所示的氨基酸序列:

[0124] AAA45779.1、AAA96680.1、ABI63505.1、ABM52973.1、ABM52976.1、ABM52977.1、  
ACM62267.1、ADD60042.1、ADD60119.1、ADM22367.1、ADM22444.1、ADM22520.1、ADM22597.1、  
ADM22674.1、ADM22751.1、ADM22827.1、ADM22904.1、ADM22981.1、ADM23057.1、ADM23133.1、  
ADM23210.1、ADM23287.1、ADM23361.1、ADM23435.1、ADM23509.1、ADM23583.1、ADM23658.1、  
ADM23733.1、ADM23809.1、AEQ77075.1、AEQ77099.1、AER37628.1、AER37697.1、AER37767.1、  
AER37838.1、AER37910.1、AER37981.1、AER38051.2、AFA36179.1、AFA36180.1、AFA36181.1、  
AFA36182.1、AFA36183.1、AFA36184.1、AFA36185.1、AFA36186.1、AFA36187.1、AFA36188.1、  
AFA36189.1、AFA36190.1、AFA36191.1、AFA36192.1、AFA36193.1、AFA36194.1、AFA36195.1、

AFA36196.1、AFA36197.1、AFA36198.1、AFA36199.1、AFA36200.1、AFA36201.1、AFA36202.1、AFA36203.1、AFE62872.1、AFH78104.1、AFI23635.1、AFK50391.1、AFP86408.1、AGZ01906.1、AIR95840.1、AJE59989.1、AJE60060.1、AJE60131.1、AJE60202.1、AKE48623.1、AKE98415.1、AKE98416.1、AKE98417.1、AKE98418.1、AKE98419.1、AKE98420.1、AKE98421.1、AKE98422.1、AKE98423.1、AKE98424.1、AKE98425.1、AKE98426.1、AKE98427.1、AKE98428.1、AKE98429.1、AKE98430.1、AKE98431.1、AKE98432.1、AKE98433.1、AKE98434.1、AKE98435.1、AKG59227.1、AKG59299.1、AKG59372.1、AKG59444.1、AKG59516.1、AKG59591.1、AKG59663.1、AKG59736.1、AKG59807.1、AKG59879.1、AKG59953.1、AKG60027.1、AKG60099.1、AKG60170.1、AKG60243.1、AKG60316.1、AKG60386.1、AKG60456.1、AKG60528.1、AKG60601.1、AKG60674.1、AKG60745.1、AKG60817.1、AKG60887.1、AKG60959.1、AKG61032.1、AKG61104.1、AKG61175.1、AKG61248.1、AKG61321.1、AKG61392.1、AKG61464.1、AKG61537.1、AKG61611.1、AKG61684.1、AKG61756.1、AKG61828.1、AKG61902.1、AKG61974.1、AKH80444.1、AKH80517.1、AKM76368.1、ALM22613.1、ALM22687.1、ALM22761.1、ALM22835.1、AL018641.1、AL018717.1、AMB65642.1、AMB65715.1、AMB65862.1、AMN09813.1、ANN83942.1、ANN84019.1、ANN84095.1、ANN84172.1、ANN84249.1、ANN84326.1、ANN84403.1、ANN84478.1、ANN84555.1、ANN84632.1、ANN84708.1、ANN84785.1、ANN84861.1、ANN84938.1、ANN85014.1、ANN85091.1、ANN85167.1、ANN85242.1、ANN85319.1、ANN85396.1、ANN85472.1、ANN85549.1、ANN85626.1、ANN85703.1、ANN85779.1、AOY34308.1、AOY36663.1、AOY36687.1、ARB08935.1、ARO38059.1、ARO38060.1、ARO38061.1、ARO38062.1、ARO38063.1、ARO38064.1、ARO38065.1、ARO38066.1、ASM47642.1、ASM47719.1、ASM47796.1、ASM47871.1、BAM73394.1、CAA32294.1、CAB40083.1、CAD13356.1、CAD13357.1、CAD13358.1、CAD13359.1、CAD 13360.1、CAD13361.1、CAD13362.1、CAD13363.1、CAD 13364.1、CAD13365.1、CAD 13366.1、CAD13367.1、CAD13368.1、CAD13369.1、CAD 13370.1、CAD13371.1、CAD 13372.1、CAD13373.1、CAD 13374.1、CAD13375.1、CAD 13376.1、CAD13377.1、CAD13378.1、P04290.1、P04488.1、P09855.1、P10228.1、P28986.1、SB007729.1、SB007793.1、SB007798.1、SB007812.1、SB007880.1、SBS69375.1、SBS69379.1、SBS69440.1、SBS69448.1、SBS69560.1、SBS69599.1、SBS69602.1、SBS69637.1、SBS69790.1、SBT69374.1、SCL76887.1、YP\_009137119.1或YP\_009137143.1。

[0125] 在另一个实施例中，组合物包含编码HSV-2 gC蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中，组合物包含编码HSV-2 gC蛋白的片段的修饰的mRNA。

[0126] 在一个实施例中，编码HSV-2 gC片段的修饰的mRNA的核苷酸序列包含：

[0127]

GGAAUAAAAGUCUCAACACAACAUUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUC  
AAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAG  
CAAUUUUCUGAAAAUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCAUGCGCAUGCAGCU  
**GCUGCUGCUGAUCGCCUGUCCCUGGCCCUGGUGACCAACUCCGCCUCCCC**  
CGGCCGCACCAUCACCGUGGGCCCCCGCGGCAACGCCUCCAACGCCGCCCCCUC  
CGCCUCCCCCGCAACGCCUCCGCCCCCCGCACCACCCCCACCCCCCCCCAGCCC  
CGCAAGGCCACCAAGUCCAAGGCCUCCACCGCCAAGCCCGCCCCCCCCCAAG  
ACCGGCCCCCCCAAGACCUCUCCGAGCCGUGGCGUGCAACCGCCACGACCCC  
CUGGCCCGCUACGGCUCCCGCGUGCAGAUCCGCUGCCGCUUCCCCAACUCCAC  
CCGCACCGAGUUCGCCUGCAGAUUCUGGCGCUACGCCACCGCCACCGACGCCG  
AGAUCGGCACCGCCCCUCCUGGAGGAGGUGAUGGUGAACGUGUCCGCCCCC  
CCCGGCCGCCAGCUGGUGUACGACUCCGCCCCCAACCGCACCGACCCCCACGU  
GAUCUGGGCCGAGGGCGCCGGCCCCGGCGCCUCCCCCGCCUGUACUCCGUGG  
UGGGCCCCUGGGCCGCCAGCGCCUGAUCAUUCGAGGAGCUGACCCUGGAGACC  
CAGGGCAUGUACUACUGGGUGUGGGGCCGCACCGACCGCCCCUCCGCCUACGG  
CACCUGGGUGCGCGUGCGGUGUUCGCCCCCCUCCUGACCAUCCACCCCCA  
CGCCGUGCUGGAGGGCCAGCCUUCAAGGCCACCUGCACCGCCGCCACCUACU  
ACCCCGGCAACCGCGCCGAGUUCGUGUGGUUCGAGGACGGCCGCCGCGUGUUC  
GACCCCGCCAGAUCCACACCCAGACCCAGGAGAACCCCGACGGCUUCUCCAC  
CGUGUCCACCGUGACCUCGCGCCGUGGGCGGCCAGGGCCCCCCCCCGCACCU  
UCACCUGCCAGCUGACCUGGCACCGCGACUCCGUGUCCUUCUCCCGCCGCAAC  
GCCUCCGGCACCGCCUCCGUGCUGCCCCGCCACCACCAUCCAUUGGAGUUCACC  
GGCGACCACGCCGUGUGCACCGCCGGCUGCGUGCCCGAGGGCGUGACCUUCGC  
CUGGUUCCUGGGCGACGACUCCUCCCCGCCGAGAAGGUGGCCGUGGCCUCCC  
AGACCUCUGCGGCCGCCCGGCACCGCCACCAUCCGCUCCACCCUGCCCGUGU  
CCUACGAGCAGACCGAGUACAUCUGCCGCCUGGCCGGCUACCCCGACGGCAUC  
CCCGUGCUGGAGCACACUAACUAGUAGUGACUGACUAGGAUCUGGUUACCACU  
AAACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUUAC  
ACUUACAAAUGUUGUCCCCAAAUGUAGCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAA  
GAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AA  
C (SEQ ID NO: 10).

[0128] 在一个实施例中,所有尿苷残基均为1-甲基-假尿苷。在一个实施例中,带下划线的残基代表5'非翻译序列。在一个实施例中,粗体残基代表辅助gC2片段表达的信号序列(前导序列)。在一个实施例中,斜体残基代表3'非翻译序列和聚腺苷化尾。

[0129] 在另一个实施例中,编码HSV-2 gC片段的修饰的mRNA的核苷酸序列缺少5'非翻译序列、信号序列、3'非翻译序列,聚腺苷化尾或其组合。

[0130] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-2 gC片段包含来自HSV-2株333的gC的氨基酸27-426,如以下氨基酸序列所示:

ASPGRITITVGPRGNASNAAPSASPRNASAPRTTPTPPQPRKATKSKASTAKPAPPPKT  
GPPKTSSEPVRCNRHDPLARYGSRVQIRCFPNSTRTESRLQIWRYATATDAEIGTAP  
SLEEVMVNVSAPPGQLVYDSAPNRTDPHVIWAEGAGPGASPRLYSVVGPLGRQRL  
IIEELTLETQGMYYVWVWGRTRDRPSAYGTWVRVRVFRPPSLTIHPHAVLEGQPFKATC  
[0131] TAATYYPGNRAEFVWFEDGRRVFDPAQIHTQTQENPDGFSTVSTVTSAAVGGQGPP  
RTFTCQLTWHRDSVSFSRRNASGTASVLRPTITMEFTGDHAVCTAGCVPEGVTFA  
WFLGDDSSPAEKVAVASQTSCGRP GTATIRSTLPVSYEQTEYICRLAGYPDGIPVLEH  
H (SEQ ID NO: 11).

[0132] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的全长HSV-2 gC包含以下氨基酸序列:

MALGRVGLAVGLWGLLWVGVVVLANASPGRTITVGPRGNASNAAPSASPRNASA  
PRTTPTPPQPRKATKSKASTAKPAPPPKTGPPKTSSEPVRCNRHDPLARYGSRVQIRC  
RFPNSTRTEFRLQIWRYATATDAEIGTAPSLEEVMVNVSAPPGQLVYDSAPNRTDP  
HVIWAEGAGPGASPRLYSVVGPLGRQRLIIEELTLETQGMYYVWVWGRTRDRPSAYGT  
[0133] WVRVRVFRPPSLTIHPHAVLEGQPFKATCTAATYYPGNRAEFVWFEDGRRVFDPAQI  
HTQTQENPDGFSTVSTVTSAAVGGQGPPRTFTCQLTWHRDSVSFSRRNASGTASVLP  
RPTITMEFTGDHAVCTAGCVPEGVTFAWFLGDDSSPAEKVAVASQTSCGRP GTATIR  
STLPVSYEQTEYICRLAGYPDGIPVLEHHGSHQPPRDPTRQVIRAVEGAGIGVAVL  
VAVVLAGTAVVYLTHASSVRYRRLR (SEQ ID NO: 12).

[0134] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-2 gC包含如以下GenBank登录号中任一个所示的氨基酸序列:

[0135] AAA20532.1、AAA66442.1、AAB60549.1、AAB60550.1、AAB60551.1、AAB72101.1、  
ABU45429.1、ABU45430.1、ABU45431.1、ABU45432.1、ABU45459.1、ABU45460.1、AEV91348.1、  
AEV91383.1、AEV91407.1、AFM93864.1、AHG54708.1、AKC42808.1、AKC59285.1、AKC59357.1、  
AKC59428.1、AKC59499.1、AKC59570.1、AMB66008.1、AMB66079.1、AMB66151.1、AMB66224.1、  
AMB66252.1、AMB66253.1、AMB66368.1、AMB66441.1、AQZ55735.2、AQZ55806.1、AQZ55877.1、  
AQZ55948.1、AQZ56019.1、AQZ56090.1、AQZ56161.2、AQZ56232.2、AQZ56303.2、AQZ56374.2、  
AQZ56445.1、AQZ56516.1、AQZ56587.1、AQZ56658.1、AQZ56729.2、AQZ56800.1、AQZ56871.1、  
AQZ56942.2、AQZ57013.1、AQZ57084.2、AQZ57155.1、AQZ57226.1、AQZ57297.1、AQZ57368.1、  
AQZ57439.1、AQZ57510.1、AQZ57581.1、AQZ57652.1、AQZ57723.1、AQZ57794.2、AQZ57865.2、  
AQZ57936.1、AQZ58007.2、AQZ58078.1、AQZ58149.2、AQZ58220.1、AQZ58291.1、AQZ58362.1、  
AQZ58433.1、AQZ58504.1、AQZ58575.1、AQZ58646.1、AQZ58717.2、AQZ58788.2、AQZ58859.2、  
AQZ58930.1、AQZ59001.2、AQZ59072.1、AQZ59143.1、AR038067.1、AR038068.1、AR038069.1、  
AR038070.1、AR038071.1、AR038072.1、CAA25687.1、CAA26025.1、CAB06730.1、CAB06734.1、  
CAB96544.1、P03173.1、P06475.1、P89475.1、Q89730.1、YP\_009137161.1、YP\_009137196.1  
或 Y P\_009137220.1。

[0136] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gC蛋白片段包含备解素干扰结构域,“备解素干扰结构域”在一个实施例中是指阻断或抑制宿主C3b分子与宿主备解素分子结合的结构域。在另一个实施例中,该术语是指阻断或抑制宿主C3b分子与宿主备解素分子相互作用的结构域。

[0137] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gC蛋白片段是C5干扰结构域。在另一个实施例中,gC蛋白片段是C5干扰结构域的一部分。在另一个实施例中,“C5-干扰结构域”是指干扰宿主C3b分子与宿主C5分子结合的结构域。在另一个实施例中,该术语是指干扰宿主C3b分子与宿主C5分子相互作用的结构域。

[0138] 每个编码gC-1或gC-2蛋白或其片段的修饰的mRNA代表本发明的单独实施例。

[0139] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gC蛋白片段是免疫原性片段。在另一个实施例中,gC免疫保护性抗原不必是整个蛋白质。在另一个实施例中,保护性免疫应答通常涉及抗体应答。在另一个实施例中,gC的突变体、序列保守变体和功能性保守变体可用于本发明的方法和组合物中,条件是所有这些变体均保持所需的免疫保护作用。在另一个实施例中,免疫原性片段可以包含来自任何HSV株的免疫保护性gC抗原。在另一个实施例中,免疫原性片段可以包含如在感染个体中发现的HSV的序列变体。

[0140] 糖蛋白E

[0141] 在另一个实施例中,本发明的组合物包含编码HSV-1 gE蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码HSV-1 gE蛋白的片段的修饰的mRNA。

[0142] 在一个实施例中,编码HSV-1 gD片段的修饰的mRNA的核苷酸序列包含:

GGAAUAAAAGUCUCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUC  
AAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAG  
CAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCAUGCGCAUGCAGCU  
**GCUGCUGCUGAUCGCCUGUCCUGGCCUGGUGACCAACUCCAAGACCUC**  
CUGGCGCCGCGUGUCCGUGGGCGAGGACGUGUCCUGCUGCCCGCCCCGGCC  
CCACCGGCCGCGGCCCCACCCAGAAGCUGCUGUGGGCCGUGGAGCCCCUGGAC  
GGCUGCGGCCCCUGCACCCUCCUGGGUGUCCUGAUGCCCCCAAGCAGGU  
GCCCGAGACCGUGGUGGACGCCGCCUGCAUGCGCGCCCCGUGCCCCUGGCCA  
UGGCCUACGCCCCCCCCGCCCCUCCGCCACCGGCGGCCUGCGCACCGACUUCG  
UGUGGCAGGAGCGCGCCGCCGUGGUGAACC GCUCCUGGUGAUCUACGGCGUG  
CGCGAGACCGACUCCGGCCUGUACACCCUGUCCGUGGGCGACAUCAAGGACCC  
CGCCCGCCAGGUGGCCUCCGUGGUGCUGGUGGUGCAGCCCGCCCCGUGCCCA  
CCCCCCCCCACCCCGCCGACUACGACGAGGACGACAACGACGAGGGCGAG  
GGCGAGGACGAGUCCUGGCCGGCACCCCCGCCUCCGGCACCCCCGCCUGCCC  
CCC UCCCCCGCCCCCCCCGCUCCUGGCCUCCGCCCGAGGUGUCCACGUG  
CGCGGCUGACCGUGCGCAUGGAGACCCCGAGGCCAUCCUGUUCUCCCCGG  
CGAGGCCUUCUCCACCAACGUGUCCAUCCACGCCAUCGCCACGACGACCAGA  
CCUACACCAUGGACGUGGUGUGGCCUGCGCUUCGACGUGCCCACCUCUGCGCC  
GAGAUGCGCAUCUACGAGUCCUGCCUGUACCACCCCGAGCUGCCCGAGUGCCU  
GUCCCCCGCCGACGCCCCUGCGCCGCCUCCACCUGGACCUCGCGCCUGGCCGU  
GCGCUCCUACGCCGGCUGCUCGCGACCAACCCCCCCCCCGCUGCUCGCGCA  
GGCCACAUGGAGCCUUCGCGGCCUGGCCUGGCAGGCCGCCUCCGUGAACC  
UGGAGUUCGCGACGCCUCCCCCAGCACUCCGGCCUGUACCUGUGCGUGGUG  
UACGUGAACGACCACAUCCACGCCUGGGGCCACAUCACCAUCAACACCGCCGC  
CCAGUACCGCAACGCCGUGGUGGAGCAGCCCCUGCCCCAGCGCGGCCGCCGACC  
UGGCCGAGCCACCCACCCACGUGGGCGCCUAACUAGUAGUGACUGACUAGG  
AUCUGGUUACCACUAAACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAAGCUACA  
UAAUACCAACUUACACUUACAAAUGUUGUCCCCAAAUGUAGCCAUUCGUAUCU  
GCUCCUAAUAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAC (SEQ ID NO: 13).

[0144] 在一个实施例中,所有尿苷残基均为1-甲基-假尿苷。在一个实施例中,带下划线的残基代表5'非翻译序列。在一个实施例中,粗体残基代表辅助gE1片段表达的信号序列(前导序列)。在一个实施例中,斜体残基代表3'非翻译序列和聚腺苷化尾。

[0145] 在另一个实施例中,编码HSV-1 gE片段的修饰的mRNA的核苷酸序列缺少5'非翻译序列、信号序列、3'非翻译序列、聚腺苷化尾或其组合。

[0146] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gE

片段包含来自HSV-1 NS株的gE的氨基酸24-409,如以下氨基酸序列所示:

[0147] KTSWRRVSVGEDVSLLPAPGPTGRGPTQKLLWAVEPLDGCGLHPSWVSLMPPKQV  
 PETVVDAACMRAPVPLAMAYAPPAPSATGGLRTDFVWQERAAVVNRSLVIYGVRE  
 TDSGLYTLVSGDIKDPARQVASVVLVVQPAPVPTPPPTPADYDEDDNDEGEDESL  
 AGTPASGTPRLPPSPAPRSWPSAPEVSHVRGVTVRMETPEAILFSPGEAFSTNVSIIHA  
 IAHDDQTYTMDVVWLRFDVPTSCAEMRIYESCLYHPQLPECLSPADAPCAASTWTS  
 RLAVRSYAGCSRTNPPPRCSAEAHMEPFPLAWQAASVNLEFRDASPQHSGLYLCV  
 VYVNDHIIHAWGHITINTAAQYRNAVVEQPLPQRGADLAEPHPHVGA (SEQ ID NO:  
 14).

[0148] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gE片段包含来自HSV-1株的gE的氨基酸24-409。

[0149] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的全长HSV-1 gE包含以下氨基酸序列:

[0150] MDRGAVVGFLGVCVVSCLAGTPKTSWRRVSVGEDVSLLPAPGPTGRGPTQKLLW  
 AVEPLDGCGLHPSWVSLMPPKQVPETVVDAACMRAPVPLAMAYAPPAPSATGGL  
 RTDFVWQERAAVVNRSLVIYGVRETDSGLYTLVSGDIKDPARQVASVVLVVQPAPV  
 PTPPPTPADYDEDDNDEGEDESLAGTPASGTPRLPPSPAPRSWPSAPEVSHVRGVT  
 TVRMETPEAILFSPGEAFSTNVSIIHAIAHDDQTYTMDVVWLRFDVPTSCAEMRIYES  
 CLYHPQLPECLSPADAPCAASTWTSRLAVRSYAGCSRTNPPPRCSAEAHMEPFPLA  
 WQAASVNLEFRDASPQHSGLYLCVVYVNDHIIHAWGHITINTAAQYRNAVVEQPLPQ  
 RGADLAEPHPHVGAAPPHPPTHGALRLGAVMGAALLLSALGLSVWACMTCWRRR  
 AWRVKSRSASGKGPYIRVADSELYADWSSDSEGERDQVPWLAPPERPDSPTNGS  
 GFEILSPTAPSVYPRSDGHQSRRQLTTFGSGRPDRRYSQASDSSVFW (SEQ ID NO: 15).

[0151] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-1 gE包含如以下GenBank登录号中任一个所示的氨基酸序列:

[0152] AAA45779.1、AAA96680.1、ABI63526.1、ACM62297.1、ADD60055.1、ADD60132.1、  
 ADM22391.1、ADM22468.1、ADM22544.1、ADM22621.1、ADM22698.1、ADM22775.1、ADM22851.1、  
 ADM22928.1、ADM23005.1、ADM23081.1、ADM23157.1、ADM23233.1、ADM23311.1、ADM23385.1、  
 ADM23459.1、ADM23533.1、ADM23607.1、ADM23682.1、ADM23757.1、ADM23833.1、ADN34689.1、  
 ADN34692.1、ADN34695.1、AEQ77099.1、AER37649.1、AER37717.1、AER37788.1、AER37859.1、  
 AER37931.1、AER38002.1、AER38072.1、AFA36179.1、AFA36180.1、AFA36181.1、AFA36182.1、  
 AFA36183.1、AFA36184.1、AFA36185.1、AFA36186.1、AFA36187.1、AFA36188.1、AFA36189.1、  
 AFA36190.1、AFA36191.1、AFA36192.1、AFA36193.1、AFA36194.1、AFA36195.1、AFA36196.1、  
 AFA36197.1、AFA36198.1、AFA36199.1、AFA36200.1、AFA36201.1、AFA36202.1、AFA36203.1、  
 AFE62896.1、AFI23659.1、AFK50417.1、AFP86432.1、AGZ01930.1、AIR95859.1、AJE60011.1、  
 AJE60082.1、AJE60153.1、AJE60224.1、AJE60295.1、AKE48647.1、AKE98373.1、AKE98374.1、  
 AKE98375.1、AKE98376.1、AKE98377.1、AKE98378.1、AKE98379.1、AKE98380.1、AKE98381.1、  
 AKE98382.1、AKE98383.1、AKE98384.1、AKE98385.1、AKE98386.1、AKE98387.1、AKE98388.1、

AKE98389.1, AKE98390.1, AKE98391.1, AKE98392.1, AKE98393.1, AKG59248.1, AKG59320.1, AKG59393.1, AKG59464.1, AKG59538.1, AKG59611.1, AKG59684.1, AKG59757.1, AKG59828.1, AKG59900.1, AKG59974.1, AKG60048.1, AKG60120.1, AKG60191.1, AKG60263.1, AKG60336.1, AKG60406.1, AKG60476.1, AKG60548.1, AKG60622.1, AKG60694.1, AKG60765.1, AKG60837.1, AKG60908.1, AKG60980.1, AKG61052.1, AKG61125.1, AKG61196.1, AKG61269.1, AKG61341.1, AKG61413.1, AKG61486.1, AKG61558.1, AKG61631.1, AKG61705.1, AKG61776.1, AKG61849.1, AKG61922.1, AKG61995.1, AKH80465.1, AKH80538.1, ALM22637.1, ALM22711.1, ALM22785.1, ALM22859.1, AL018664.1, AL018740.1, AMB65664.1, AMB65737.1, AMB65811.1, AMB65887.1, AMB65958.1, AMN09834.1, ANN83966.1, ANN84043.1, ANN84119.1, ANN84196.1, ANN84273.1, ANN84350.1, ANN84426.1, ANN84502.1, ANN84579.1, ANN84655.1, ANN84732.1, ANN84808.1, ANN84885.1, ANN84961.1, ANN85038.1, ANN85114.1, ANN85189.1, ANN85266.1, ANN85343.1, ANN85418.1, ANN85496.1, ANN85573.1, ANN85650.1, ANN85726.1, ANN85803.1, AOY34085.1, AOY36687.1, ARB08959.1, ARO38073.1, ARO38074.1, ARO38075.1, ARO38076.1, ARO38077.1, ARO38078.1, ARO38079.1, ARO38080.1, ASM47642.1, ASM47666.1, ASM47743.1, ASM47820.1, ASM47895.1, BAM73421.1, CAA26062.1, CAA32272.1, CAF24756.1, CAF24757.1, CAF24758.1, CAF24759.1, CAF24760.1, CAF24761.1, CAF24762.1, CAF24763.1, CAF24764.1, CAF24765.1, CAF24766.1, CAF24767.1, CAF24768.1, CAF24769.1, CAF24770.1, CAF24771.1, CAF24772.1, CAF24773.1, CAF24774.1, CAF24775.1, CAF24776.1, CAF24777.1, CAF24778.1, CAF24779.1, CAF24780.1, CAF24781.1, CAF24782.1, CAF24783.1, CAF24784.1, CAF24785.1, P04290.1, P04488.1, P28986.1, Q703F0.1, SB007910.1, SBS69571.1, SBS69576.1, SBS69595.1, SBS69636.1, SBS69693.1, SBS69701.1, SBS69722.1, SBS69732.1, SBS69813.1, SBT69397.1 或YP\_009137143.1。

[0153] 在另一个实施例中,组合物包含编码HSV-2 gE蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码HSV-2 gE蛋白的片段的修饰的mRNA。

[0154] 在一个实施例中,编码HSV-2 gE片段的修饰的mRNA的核苷酸序列包含:

GGAAUAAAAGUCUCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUC  
AAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUCUUUUAAAAGCAAAG  
CAAUUUCUGAAAAUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCAUGCGCAUGCAGCU  
**GCUGCUGCUGAUCGCCUGUCCUGGGCCUGGUGACCAACUCCCCGACCUC**  
CUGGAAGCGCGUGACCUCGGCGAGGACGUGGUGCUGCUGCCCCGCCCCGCG  
GCCCCGAGGAGCGCACCCGCGCCACAAGCUGCUGUGGGCCGCGAGCCCCUG  
GACGCCUGCGGCCCCUGCGCCCCUCCUGGGUGGCCCUGUGGGCCCCCGCCGC  
GUGCUGGAGACCGUGGUGGACGCCGCGUGCAUGCGCGCCCCGAGCCCCUGGC  
CAUCGCCUACUCCCCCCCUCGCCGCGGACGAGGGCCUGUACUCCGAGC  
UGGCCUGGCGGACCGCGUGGCCGUGGUGAACGAGUCCUGGUGAUCUACGGC  
[0155] GCCUGGAGACCGACUCCGCGCCUGUACACCCUGUCCGUGGUGGGCCUGUCCGA  
CGAGGCCCGCCAGGUGGCCUCCGUGGUGCUGGUGGUGGAGCCCGCCCCGUGC  
CCACCCACCCCGACGACUACGACGAGGAGGACGACGCCGGCGUGUCCGAG  
CGCACCCCGUGUCCGUGCCCCCCCCACCCCGCCGCCCCCGUGGCC  
CCCCCACCCACCCCGCGUGAUCCCCGAGGUGUCCACGUGCGCGGCGUGACC  
GUGCACAUGGAGACCCCGAGGCCAUCCUGUUCGCCCCGGCGAGACCUUCGG  
CACCAACGUGUCCAUCCACGCCAUCGCCACGACGACGGCCCUACGCCAUGG  
ACGUGGUGUGGAUGCGCUUCGACGUGCCUCCUCCUGCGCCGAGAUGCGCAUC  
UACGAGGCCUGCCUGUACCACCCCGAGCUGCCCGAGUGCCUGUCCCCGCCGA  
CGCCCCUGCGCCGUGUCCUCCUGGGCCUACCGCCUGGCCGUGCGCUCCUACG  
CCGGCUGCUCCCGCACCCACCCCGCCGCGUGCUUCGCGAGGCCCGCAUGG  
AGCCCGUGCCCGGCCUGGCCUGGCCUCCACCGUGAACCUGGAGUCCAG  
CACGCCUCCCCCAGCACGCCGGCCUGUACCUGUGCGUGGUGUACGUGGACGA  
CCACAUCCACGCCUGGGGCCACAUGACCAUCUCCACCGCCGCCAGUACCGCA  
ACGCCGUGGUGGAGCAGCACCUGCCCCAGCGCCAGCCGAGCCCGUGGAGCCC  
ACCCGCCCCACGUGCGCGCCUAACCUAGUAGUGACUGACUAGGAUCUGGUUACC  
[0156] ACUAAACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACU  
UACACUACAAAAUGUUGUCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUA  
AAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AA  
AAAAC (SEQ ID NO: 16)

[0157] 在一个实施例中，所有尿苷残基均为1-甲基-假尿苷。在一个实施例中，带下划线的残基代表5'非翻译序列。在一个实施例中，粗体残基代表辅助gE2片段表达的信号序列(前导序列)。在一个实施例中，斜体残基代表3'非翻译序列和聚腺苷化尾。

[0158] 在另一个实施例中，编码HSV-2 gE片段的修饰的mRNA的核苷酸序列缺少5'非翻译序列、信号序列、3'非翻译序列，聚腺苷化尾或其组合。

[0159] 在一个实施例中，由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV-2 gE



ARO38081.1、ARO38082.1、ARO38083.1、ARO38084.1、ARO38085.1、ARO38086.1、CAB06715.1、P89436.1、P89475.1或YP\_009137220.1。

[0164] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gE片段包含gE蛋白的IgG Fc结合结构域。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gE结构域是本领域已知的任何其他介导与IgG Fc结合的gE结构域。

[0165] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gE蛋白包含参与细胞间扩散的gE结构域。

[0166] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA片段编码的gE片段包含免疫逃避结构域。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA片段编码的gE片段包含免疫逃避结构域的一部分。

[0167] 每个编码gE-1或gE-2蛋白或其片段的修饰的mRNA代表本发明的单独实施例。

[0168] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的gE蛋白片段是免疫原性片段。在另一个实施例中,gE免疫保护性抗原不必是整个蛋白质。在另一个实施例中,保护性免疫应答通常涉及抗体应答。在另一个实施例中,gE的突变体、序列保守变体和功能性保守变体可用于本发明的方法和组合物中,条件是所有这些变体均保持所需的免疫保护作用。在另一个实施例中,免疫原性片段可以包含来自任何HSV株的免疫保护性gE抗原。在另一个实施例中,免疫原性片段可以包含如在感染个体中发现的HSV的序列变体。

[0169] 在一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV糖蛋白是本文提供的序列的同源物。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV糖蛋白是本文提供的序列的同工型。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV糖蛋白是本文提供的序列的变体。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA编码的HSV糖蛋白是本文提供的序列的片段。

[0170] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物的修饰的mRNA编码的糖蛋白片段包含糖蛋白的胞外结构域。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物的修饰的mRNA编码的糖蛋白片段由糖蛋白的胞外结构域组成。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物的修饰的mRNA编码的糖蛋白片段包含糖蛋白的胞外结构域的片段。在另一个实施例中,糖蛋白片段可以是本领域已知的任何糖蛋白片段。

[0171] 在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA片段编码的糖蛋白或免疫原性片段可以来自任何HSV株。在另一个实施例中,由本发明的方法和组合物中使用的修饰的mRNA片段编码的免疫原性片段可以包含如在感染个体中发现的HSV的序列变体。

[0172] 在一个实施例中,“变体”是指与群体的大部分不同但仍与常见模式足够相似以被视为其中一种例如剪接变体的氨基酸或核酸序列(或在其他实施例中为生物体或组织)。在一个实施例中,变体可以是序列保守变体,而在另一实施例中,变体可以是功能性保守变体。在一个实施例中,变体可以包含一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。

[0173] 在一个实施例中,“免疫逃避结构域”是指干扰或降低抗HSV抗体(例如抗gD抗体)的体内抗HSV功效的结构域。在另一个实施例中,该结构域干扰或降低抗HSV免疫应答的体

内抗HSV功效。在另一个实施例中,该结构域降低随后感染期间HSV蛋白(例如gD)的免疫原性。在另一个实施例中,该结构域在随后的攻击期间降低HSV蛋白的免疫原性。在另一个实施例中,该结构域在随后的攻击期间降低HSV的免疫原性。在另一个实施例中,该结构域在进行中的HSV感染情况下降低HSV蛋白的免疫原性。在另一个实施例中,该结构域在进行中的HSV感染情况下降低HSV的免疫原性。在另一个实施例中,该结构域用作IgG Fc受体。在另一个实施例中,该结构域促进抗体双极性桥连,在一个实施例中,该术语是指抗体分子通过其Fab结构域与HSV抗原结合并且通过其Fc结构域与单独的HSV抗原(例如在一个实施例中为gE)结合,从而阻断Fc结构域激活补体的能力。

[0174] 本发明还提供了编码HSV蛋白或多肽的类似物或其片段的修饰的mRNA。类似物可能与天然存在的蛋白质或肽的区别在于保守氨基酸序列取代或不影响序列的修饰或两者兼而有之。

[0175] 在另一个实施例中,由本发明的修饰的mRNA编码的HSV糖蛋白与上文明确地或通过参考GenBank条目所述的序列同源。在涉及任何蛋白质或肽时,术语“同源性”,“同源的”等在一个实施例中是指在比对序列并引入缺口(如果必要的话)以实现最大同源性百分比,并且不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分后,候选序列中与相应天然多肽的残基相同的氨基酸残基的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是众所周知的。

[0176] 在另一个实施例中,“同源性”是指由修饰的mRNA编码的蛋白质序列与本文公开的序列的同一性大于70%。在另一个实施例中,同一性大于72%。在另一个实施例中,同一性大于75%。在另一个实施例中,同一性大于78%。在另一个实施例中,同一性大于80%。在另一个实施例中,同一性大于82%。在另一个实施例中,同一性大于83%。在另一个实施例中,同一性大于85%。在另一个实施例中,同一性大于87%。在另一个实施例中,同一性大于88%。在另一个实施例中,同一性大于90%。在另一个实施例中,同一性大于92%。在另一个实施例中,同一性大于93%。在另一个实施例中,同一性大于95%。在另一个实施例中,同一性大于96%。在另一个实施例中,同一性大于97%。在另一个实施例中,同一性大于98%。在另一个实施例中,同一性大于99%。在另一个实施例中,同一性是100%。

[0177] 在一个实施例中,“同工型”是指分子例如蛋白质的一种形式,与同一蛋白质的另一同工型仅略有不同。在一个实施例中,同工型可以由不同但相关的基因产生,或者在另一实施例中,可以通过选择性剪接由同一基因产生。在另一个实施例中,同工型由单核苷酸多态性引起。

[0178] 在另一个实施例中,如本文所述的编码糖蛋白或糖蛋白片段的修饰的mRNA进一步编码抗原标签。在一个实施例中,标签是组氨酸(“His”)标签。在一个实施例中,His标签包含5个组氨酸残基。在另一个实施例中,His标签包含6个组氨酸残基。

[0179] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物利用嵌合分子,其包含编码HSV蛋白的修饰的mRNA与编码标签多肽的修饰的mRNA的融合物,所述标签多肽提供抗标签抗体可以选择性结合的表位。在其他实施例中,表位标签位于蛋白质的氨基或羧基末端或其中的内部位置。在另一个实施例中,使用针对标签多肽的抗体来检测重组HSV蛋白的这种表位标记形式的存在。在另一个实施例中,包含表位标签使重组HSV蛋白易于使用抗标签抗体或结合表位标签的另一种类型的亲和基质通过亲和纯化来纯化。各种标签多肽及其各自的抗体是本领域已知的。

[0180] 在一个实施例中,本发明的组合物包含佐剂,而在另一实施例中,组合物不包含佐剂。在另一个实施例中,“佐剂”是指当施用给个体或在体外测试时,在施用了抗原的个体或测试系统中增加对抗原的免疫应答的化合物。在另一个实施例中,免疫佐剂当单独施用增强对免疫原性弱的抗原的免疫应答,即不诱导抗体效价或诱导弱抗体效价或细胞介导的免疫应答。在另一个实施例中,佐剂增加针对抗原的抗体效价。在另一个实施例中,佐剂降低有效在个体中实现免疫应答的抗原的剂量。多种类型的佐剂在本领域中是已知的,并且在美国专利公开2013/0028925中进行了详细描述,其通过引用并入本文。

[0181] 修饰的mRNA

[0182] 在一个实施例中,本发明提供了包含修饰的mRNA的组合物及其使用方法。在一个实施例中,修饰的mRNA包含一种或多种修饰的核苷残基。

[0183] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的核苷是m<sup>5</sup>C(5-甲基胞苷)。在另一个实施例中,修饰的核苷是m<sup>5</sup>U(5-甲基尿苷)。在另一个实施例中,修饰的核苷是m<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-甲基腺苷)。在另一个实施例中,修饰的核苷是s<sup>2</sup>U(2-硫代尿苷)。在另一个实施例中,修饰的核苷是 $\Psi$ (假尿苷)。在另一个实施例中,修饰的核苷是Um(2'-O-甲基尿苷)。

[0184] 在其他实施例中,修饰的核苷是m<sup>1</sup>A(1-甲基腺苷)、m<sup>2</sup>A(2-甲基腺苷)、m<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-甲基腺苷)、Am(2'-O-甲基腺苷)、ms<sup>2</sup>m<sup>6</sup>A(2-甲硫基-N<sup>6</sup>-甲基腺苷)、i<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷)、ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A(2-甲硫基-N<sup>6</sup>-异戊烯基腺苷)、io<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)、ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A(2-甲硫基-N<sup>6</sup>-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)、g<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷)、t<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷)、ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A(2-甲硫基-N<sup>6</sup>-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷)、m<sup>6</sup>t<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-甲基-N<sup>6</sup>-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷)、hn<sup>6</sup>A(N<sup>6</sup>-羟基正戊酰基氨基甲酰基腺苷)、ms<sup>2</sup>hn<sup>6</sup>A(2-甲硫基-N<sup>6</sup>-羟基正戊酰基氨基甲酰基腺苷)、Ar(p)(2'-O-核糖基腺苷(磷酸))、I(肌苷)、m<sup>1</sup>I(1-甲基肌苷)、m<sup>1</sup>Im(1,2'-O-二甲基肌苷)、m<sup>3</sup>C(3-甲基胞苷)、m<sup>5</sup>C(5-甲基胞苷)、Cm(2'-O-甲基胞苷)、s<sup>2</sup>C(2-硫胞苷)、ac<sup>4</sup>C(N<sup>4</sup>-乙酰基胞苷)、f<sup>5</sup>C(5-甲酰基胞苷)、m<sup>5</sup>Cm(5,2'-O-二甲基胞苷)、ac<sup>4</sup>Cm(N<sup>4</sup>-乙酰基-2'-O-甲基胞苷)、k<sup>2</sup>C(赖氨酸)、m<sup>1</sup>G(1-甲基鸟苷)、m<sup>2</sup>G(N<sup>2</sup>-甲基鸟苷)、m<sup>7</sup>G(7-甲基鸟苷)、Gm(2'-O-甲基鸟苷)、m<sup>2</sup><sub>2</sub>G(N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-二甲基鸟苷)、m<sup>2</sup>Gm(N<sup>2</sup>,2'-O-二甲基鸟苷)、m<sup>2</sup><sub>2</sub>Gm(N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,2'-O-三甲基鸟苷)、Gr(p)(2'-O-核糖基鸟苷(磷酸))、yW(怀丁苷)、o<sub>2</sub>yW(过氧怀丁苷)、OHyW(羟基怀丁苷)、OHyW\*(未改性的羟基怀丁苷)、imG(怀俄苷)、mimG(甲基怀俄苷)、Q(癸苷)、oQ(环氧癸苷)、galQ(半乳糖基癸苷)、manQ(甘露糖基癸苷)、preQ0(7-氰基-7-去氮鸟苷)、preQ1(7-氨基甲基-7-去氮鸟苷)、G<sup>+</sup>(古嘌呤)、 $\Psi$ (假尿苷)、D(二氢尿苷)、m<sup>5</sup>U(5-甲基尿苷)、Um(2'-O-甲基尿苷)、m<sup>5</sup>Um(5,2'-O-二甲基尿苷)、m<sup>1</sup> $\Psi$ (1-甲基假尿苷)、 $\Psi$ <sub>m</sub>(2'-O-甲基假尿苷)、s<sup>2</sup>U(2-硫代尿苷)、s<sup>4</sup>U(4-硫代尿苷)、m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U(5-甲基-2-硫代尿苷)、s<sup>2</sup>Um(2-硫代-2'-O-甲基尿苷)、acp<sup>3</sup>U(3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷)、ho<sup>5</sup>U(5-羟基尿苷)、mo<sup>5</sup>U(5-甲氧基尿苷)、cmo<sup>5</sup>U(尿苷5-氧乙酸)、mcmo<sup>5</sup>U(尿苷5-氧乙酸甲酯)、chm<sup>5</sup>U(5-(羧基羟甲基)尿苷)、mchm<sup>5</sup>U(5-(羧基羟甲基)尿苷甲酯)、mcm<sup>5</sup>U(5-甲氧基羰基甲基尿苷)、mcm<sup>5</sup>Um(5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷)、mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U(5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷)、nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U(5-氨基甲基-2-硫代尿苷)、mnm<sup>5</sup>U(5-甲氨基甲基尿苷)、mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U(5-甲氨基甲基-2-硫代尿苷)、mnm<sup>5</sup>se<sup>2</sup>U(5-甲氨基甲基-2-硒基尿苷)、ncm<sup>5</sup>U(5-氨基甲酰基甲基尿苷)、ncm<sup>5</sup>Um(5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷)、cmnm<sup>5</sup>U(5-羧甲基氨基甲基尿苷)、cmnm<sup>5</sup>Um(5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷)、cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U(5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷)、m<sup>6</sup><sub>2</sub>A(N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-二甲

基腺苷)、Im(2'-O-甲基肌苷)、 $m^4C$ (N4-甲基胞苷)、 $m^4Cm$ (N4,2'-O-二甲基胞苷)、 $hm^5C$ (5-羟甲基胞苷)、 $m^3U$ (3-甲基尿苷)、 $m^1acp^3\Psi$ (1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷)、 $cm^5U$ (5-羧甲基尿苷)、 $m^6Am$ (N6,2'-O-二甲基腺苷)、 $m^6_2Am$ (N6,N6,2'-O-三甲基腺苷)、 $m^2,^7G$ (N2,7-二甲基鸟苷)、 $m^2,^2,^7G$ (N2,N2,7-三甲基鸟苷)、 $m^3Um$ (3,2'-O-二甲基尿苷)、 $m^5D$ (5-甲基二氢尿苷)、 $m^3\Psi$ (3-甲基假尿苷)、 $f^5Cm$ (5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷)、 $m^1Gm$ (1,2'-O-二甲基鸟苷)、 $m^1Am$ (1,2'-O-二甲基腺苷)、 $\tau m^5U$ (5-牛磺酸甲基尿苷)、 $\tau m^5s^2U$ (5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷)、imG-14(4-去甲基怀俄苷)、imG2(异怀俄苷)、 $ac^6A$ (N6-乙酰腺苷)、 $inm^5U$ (5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷)、 $inm^5s^2U$ (5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代尿苷)、 $inm^5Um$ (5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基尿苷)、 $m^2,^7Gm$ (N2,7,2'-O-三甲基鸟苷)、 $m^4_2Cm$ (N4,N4,2'-O-三甲基胞苷)、 $C^+$ (胍丁胺)、 $m^8A$ (8-甲基腺苷)、 $gmm^5s^2U$ (香叶基化的5-甲氨基甲基-2-硫代尿苷)、 $gcmnm^5s^2U$ (香叶基化的5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷)或 $cnm^5U$ (5-氰甲基-尿苷)。

[0185] 在一个实施例中,修饰的核苷残基是假尿苷或假尿苷家族残基。

[0186] 在一个实施例中,修饰的mRNA包含假尿苷残基。在一个实施例中,假尿苷是指核苷尿苷的C-糖苷异构体。在一个实施例中,假尿苷残基包含 $m^1acp^3\Psi$ (1-甲基-3-(3-氨基-5-羧丙基)假尿苷)、 $m^1\Psi$ (1-甲基假尿苷)、 $\Psi m$ (2'-O-甲基假尿苷)、 $m^5D$ (5-甲基二氢尿苷)、 $m^3\Psi$ (3-甲基假尿苷)或其组合。在一个实施例中,所述假尿苷残基包含1-甲基假尿苷而不是尿苷。

[0187] 在一个实施例中,修饰的核苷残基是假尿苷类似物。在一个实施例中,“假尿苷类似物”是假尿苷的任何修饰、变体、同工型或衍生物。例如,假尿苷类似物包括但不限于1-羧甲基-假尿苷、1-丙炔基-假尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代假尿苷、1-甲基假尿苷( $m^1\Psi$ )、1-甲基-4-硫代假尿苷( $m^1s^4\Psi$ )、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷( $m^3\Psi$ )、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮杂-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮杂-假尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷( $acp^3\Psi$ )和2'-O-甲基-假尿苷( $\Psi m$ )。

[0188] 在一些实施例中,修饰的核碱基是修饰的尿嘧啶。具有修饰的尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括假尿苷( $\Psi$ )、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷( $s^2U$ )、4-硫代尿苷( $s^4U$ )、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿苷( $ho^5U$ )、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代尿苷(例如5-碘尿苷或5-溴尿苷)、3-甲基尿苷( $m^3U$ )、5-甲氧基尿苷( $mo^5U$ )、尿苷5-氧乙酸( $cmo^5U$ )、尿苷5-氧乙酸甲酯( $mcmo^5U$ )、5-羧甲基-尿苷( $cm^5U$ )、1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羟甲基-尿苷( $chm^5U$ )、5-羧基羟甲基-尿苷甲酯( $mchm^5U$ )、5-甲氧基羰基甲基-尿苷( $mcm^5U$ )、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷( $mcm^5s^2U$ )、5-氨基甲基-2-硫代尿苷( $nm^5s^2U$ )、5-甲氨基甲基-尿苷( $mnm^5U$ )、5-甲氨基甲基-2-硫代尿苷( $mnm^5s^2U$ )、5-甲氨基甲基-2-硒代尿苷( $mnm^5se^2U$ )、5-氨基甲酰基甲基尿苷( $ncm^5U$ )、5-羧甲基氨基甲基-尿苷( $cmnm^5U$ )、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷( $cmnm^5s^2U$ )、5-丙炔基尿苷、1-丙炔基假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷( $\tau cm^5U$ )、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷( $\tau rm^5s^2U$ )、1-牛磺酸甲基-2-硫代假尿苷、5-甲基-尿苷( $m^5U$ ,即具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基假尿苷( $m^1\Psi$ )、5-甲基-2-硫代尿苷( $m^5s^2U$ )、1-甲基-4-硫代假尿苷( $m^1s^4\Psi$ )、4-硫代-1-甲基假尿苷、3-甲基-假尿苷( $m^3\Psi$ )、2-硫代-1-甲基假尿苷、1-甲基-1-脱氮杂-假

尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮杂-假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷( $m^5D$ )、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷(也被称为1-甲基假尿苷( $m^1\Psi$ ))、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷( $acp^3U$ )、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧丙基)假尿苷( $acp^3\Psi$ )、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷( $inm^5U$ )、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代尿苷( $inm^5s^2U$ )、 $\alpha$ -硫代尿苷、2'-0-甲基尿苷(Um)、5,2'-0-二甲基-尿苷( $m^5Um$ )、2'-0-甲基-假尿苷( $\Psi m$ )、2-硫代-2'-0-甲基-尿苷( $s^2Um$ )、5-甲氧基羰基甲基-2'-0-甲基尿苷( $mcm^5Um$ )、5-氨基甲酰基甲基-2'- $\beta$ -甲基尿苷( $ncm^5Um$ )、5-羧甲基氨基甲基-2'-0-甲基尿苷( $cmnm^5Um$ )、3,2'-0-二甲基尿苷( $m^3Um$ )、5-(异戊烯基氨基甲基)-2'- $\beta$ -甲基尿苷( $inm^5Um$ )、1-硫代尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖尿苷、5-(2-羧甲氧基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。

[0189] 在一些实施例中,修饰的核碱基是修饰的胞嘧啶。具有修饰的胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括5-氮杂胞苷、6-氮杂胞苷、假异胞苷、3-甲基胞苷( $m^3C$ )、N4-乙酰基胞苷( $ac^4C$ )、5-甲酰基胞苷( $f^5C$ )、N4-甲基胞苷( $m^4C$ )、5-甲基胞苷( $m^5C$ )、5-卤代胞苷(例如5-碘胞苷)、5-羟甲基胞苷( $hm^5C$ )、1-甲基-假异胞苷、吡咯并胞苷、吡咯并假异胞苷、2-硫代胞苷( $s^2C$ )、2-硫代-5-甲基胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮杂-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮杂-假异胞苷、zebularine、5-氮杂-zebularine、5-甲基-zebularine、5-氮杂-2-硫代-zebularine、2-硫代-zebularine、2-甲氧基胞苷、2-甲氧基-5-甲基胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、赖氨酸( $k_2C$ )、 $\alpha$ -硫代胞苷、2'-0-甲基胞苷(Cm)、5,2'-0-二甲基胞苷( $m^5Cm$ )、N4-乙酰基-2'-0-甲基胞苷( $ac^4Cm$ )、N4,2'-0-二甲基胞苷( $m^4Cm$ )、5-甲酰基-2'-0-甲基胞苷( $f^5Cm$ )、N4,N4,2'-0-三甲基胞苷( $m^4_2Cm$ )、1-硫代胞苷、2'-F-阿糖胞苷、2'-F-胞苷和2'-OH-阿糖胞苷。

[0190] 在一些实施例中,修饰的核碱基是修饰的腺嘌呤。具有修饰的腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤代嘌呤(例如2-氨基-6-氯嘌呤)、6-卤代嘌呤(例如6-氯嘌呤)、2-氨基-6-甲基嘌呤、8-叠氮基腺苷、7-脱氮杂-腺嘌呤、7-脱氮杂-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮杂-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮杂-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮杂-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷( $m^1A$ )、2-甲基腺嘌呤( $m^2A$ )、N6-甲基腺苷( $m^6A$ )、2-甲硫基-N6-甲基腺苷( $ms^2m^6A$ )、N6-异戊烯基腺苷( $i^6A$ )、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷( $ms^2i^6A$ )、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷( $io^6A$ )、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷( $ms^2io^6A$ )、N6-甘氨酸基氨基甲酰基-腺苷( $g^6A$ )、N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷( $t^6A$ )、N6-甲基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷( $m^6t^6A$ )、2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷( $m^2g^6A$ )、N6,N6-二甲基-腺苷( $m^6_2A$ )、N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷( $hn^6A$ )、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷( $ms^2hn^6A$ )、N6-乙酰基-腺苷( $ac^6A$ )、7-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基腺嘌呤、 $\alpha$ -硫代腺苷、2'-0-甲基腺苷(Am)、N6,2'-0-二甲基腺苷( $m^6Am$ )、N6,N6,2'-0-三甲基腺苷( $m^6_2Am$ )、1,2'-0-二甲基腺苷( $m^1Am$ )、2'- $\beta$ -核糖基腺苷(磷酸盐)(Ar(p))、2-氨基-N6-甲基嘌呤、1-硫代腺苷、8-叠氮基腺苷、2'-F-阿糖腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-阿糖腺苷和N6-(19-氨基五氧杂十九烷基)-腺苷。

[0191] 在一些实施例中,修饰的核碱基是修饰的鸟嘌呤。具有修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基肌苷( $m^1I$ )、怀俄苷(imG)、甲基怀俄苷(mimG)、4-脱甲基怀

俄昔(imG-14)、异怀俄昔(imG2)、怀丁昔(yW)、过氧怀丁昔(o<sub>2</sub>yW)、羟基怀丁昔(OHyW)、未修饰的羟基怀丁昔(OHyW\*)、7-脱氮杂-鸟苷、癸苷(Q)、环氧癸苷(oQ)、半乳糖基-癸苷(galQ)、甘露糖基癸苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮杂-鸟苷(preQ<sub>0</sub>)、7-氨基甲基-7-脱氮杂-鸟苷(preQ<sub>1</sub>)、古嘌呤(G<sup>+</sup>)、7-脱氮杂-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮杂-鸟苷、6-硫代-7-脱氮杂-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷(m<sup>7</sup>G)、6-硫代-7-甲基鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基-鸟苷(m<sup>1</sup>G)、N<sub>2</sub>-甲基-鸟苷(m<sup>2</sup>G)、N<sub>2</sub>,N<sub>2</sub>-二甲基-鸟苷(m<sup>2</sup><sub>2</sub>G)、N<sub>2</sub>,7-二甲基鸟苷(m<sup>2</sup>,<sup>7</sup>G)、N<sub>2</sub>,N<sub>2</sub>,7-二甲基鸟苷(m<sup>2</sup>,<sup>2</sup>,<sup>7</sup>G)、8-氧代鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代鸟苷、N<sub>2</sub>-甲基-6-硫代鸟苷、N<sub>2</sub>,N<sub>2</sub>-二甲基-6-硫代鸟苷、α-硫代鸟苷、2'-O-甲基鸟苷(Gm)、N<sub>2</sub>-甲基-2'-O-甲基鸟苷(m<sup>2</sup>Gm)、N<sub>2</sub>,N<sub>2</sub>-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m<sup>2</sup><sub>2</sub>Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m<sup>1</sup>Gm)、N<sub>2</sub>,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m<sup>2</sup>,<sup>7</sup>Gm)、2'-O-甲基肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基肌苷(m<sup>1</sup>Im)和2'-O-核糖基鸟苷(磷酸盐)(Gr(p))。

[0192] 核苷酸的核碱基可以独立地选自嘌呤、嘧啶、嘌呤或嘧啶类似物。例如，核碱基可各自独立地选自腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或次黄嘌呤。在另一个实施例中，核碱基还可包括例如天然存在的和合成的碱基衍生物，包括吡唑并[3,4-d]嘧啶、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代(例如8-溴)、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代特别是5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、脱氮杂鸟嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、3-脱氮杂鸟嘌呤、脱氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂腺嘌呤、3-脱氮杂腺嘌呤、吡唑并[3,4-d]嘧啶、咪唑并[1,5-a]1,3,5三嗪酮、9-脱氮嘌呤、咪唑并[4,5-d]吡嗪、噁唑并[4,5-d]嘧啶、吡嗪-2-酮、1,2,4-三嗪、哒嗪；和1,3,5三嗪。当使用简写A、G、C、T或U描绘核苷酸时，每个字母表示代表性碱基和/或其衍生物，例如A包括腺嘌呤或腺嘌呤类似物，例如7-脱氮杂腺嘌呤。

[0193] 对核苷间键的修饰

[0194] 可以掺入多核苷酸、初级构建体或mRNA分子中的修饰的核苷酸可以在核苷间键(例如，磷酸酯主链)上被修饰。在本文中，在多核苷酸主链的上下文中，短语“磷酸酯”和“磷酸二酯”可互换使用。可以通过用不同的取代基替换一个或多个氧原子来修饰主链磷酸酯基团。此外，修饰的核苷和核苷酸可包括用本文所述的另一个核苷间键整体替换未修饰的磷酸酯部分。修饰的磷酸酯基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯、磷酸氢酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、烷基或芳基磷酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的两个非连接氧都被硫替换。也可以通过用氮(桥连的氨基磷酸酯)、硫(桥连的硫代磷酸酯)和碳(桥连的亚甲基磷酸酯)替换连接氧来修饰磷酸酯接头。

[0195] 提供α-硫代取代的磷酸酯部分以通过非天然的硫代磷酸酯主链键向RNA和DNA聚合物赋予稳定性。硫代磷酸酯DNA和RNA具有增加的核酸酶抗性，并因此在细胞环境中具有更长的半衰期。预期硫代磷酸酯连接的多核苷酸、初级构建体或mmRNA分子也通过细胞先天免疫分子的较弱结合/激活来降低先天免疫应答。

[0196] 在具体实施例中，修饰的核苷包括α-硫代核苷(例如5'-O-(1-硫代磷酸酯基)-腺

昔、5'-0-(1-硫代磷酸酯基)-胞昔( $\alpha$ -硫代-胞昔)、5'-0-(1-硫代磷酸酯基)-鸟昔、5'-0-(1-硫代磷酸酯基)-尿昔或5'-0-(1-硫代磷酸酯基)-假尿昔)。

[0197] 根据本发明可以使用的其他核苷间键包括不含磷原子的核苷间键,如下文描述。

[0198] 修饰的糖、核碱基和核苷间键的组合

[0199] 本发明的多核苷酸,初级构建体和mmRNA可以包括对糖、核碱基和/或核苷间键的修饰的组合。

[0200] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的RNA、寡核糖核苷酸或多核糖核苷酸的纯化制剂包含两种或更多种上述修饰的组合。在另一个实施例中,RNA或寡核糖核苷酸的纯化制剂包含三种或更多种上述修饰的组合。在另一个实施例中,RNA或寡核糖核苷酸的纯化制剂包含三种以上的上述修饰的组合。

[0201] 在一个实施例中,修饰的mRNA包含体外合成的修饰的mRNA。

[0202] 在一个实施例中,本发明包含一种或多种编码HSV糖蛋白的修饰的mRNA。在一个实施例中,修饰的RNA包含假尿昔或假尿昔家族残基。在另一个实施例中,本发明的修饰的mRNA能够指导在其上编码的HSV糖蛋白的蛋白表达。

[0203] 在另一个实施例中,本发明提供了一种编码HSV糖蛋白的体外转录的mRNA分子,其包含假尿昔。在另一个实施例中,本发明提供了编码HSV糖蛋白的合成的mRNA分子,其包含假尿昔。

[0204] 在另一个实施例中,通过T7噬菌体RNA聚合酶合成本发明的方法和组合物的体外转录的mRNA分子。在另一个实施例中,该分子是通过SP6噬菌体RNA聚合酶合成的。在另一个实施例中,该分子是通过T3噬菌体RNA聚合酶合成的。在另一个实施例中,分子是通过选自以上聚合酶的聚合酶合成的。在另一个实施例中,mRNA类似于DNA在柱上化学合成。

[0205] 在另一个实施例中,在本发明的方法和组合物的RNA、寡核糖核苷酸或多核糖核苷酸中修饰的核苷是尿昔(U)。在另一个实施例中,修饰的核苷是胞昔(C)。在另一个实施例中,修饰的核苷是腺嘌呤(A)。在另一个实施例中,修饰的核苷是鸟嘌呤(G)。

[0206] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA还包含聚-A尾。在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA不包含聚-A尾。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0207] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA包含m7GpppG帽。在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA不包含m7GpppG帽。在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA包含3'-0-甲基-m7GpppG。在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA包含不可逆的帽类似物,在一个实施例中,将其在mRNA的转录过程中添加。在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA包含抗反向帽类似物。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0208] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA还包含帽非依赖性翻译增强子。在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA不包含帽非依赖性翻译增强子。在另一个实施例中,帽非依赖性翻译增强子是烟草蚀纹病毒(TEV)帽非依赖性翻译增强子。在另一个实施例中,帽非依赖性翻译增强子是本领域已知的任何其他帽非依赖性翻译增强子。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0209] 在一个实施例中,“假尿昔”是指 $m^1acp^3\Psi$ (1-甲基-3-(3-氨基-5-羧丙基)假尿昔)。

在另一个实施例中,该术语是指 $m^1\Psi$  (1-甲基假尿苷)。在另一个实施例中,该术语是指 $\Psi m$  (2'-O-甲基假尿苷)。在另一个实施例中,该术语是指 $m^5D$  (5-甲基二氢尿苷)。在另一个实施例中,该术语是指 $m^3\Psi$  (3-甲基假尿苷)。在另一个实施例中,修饰的核苷是4' (假尿苷)。在另一个实施例中,该术语是指未经进一步修饰的假尿苷部分。在另一个实施例中,该术语是指任何上述假尿苷的单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯。在另一个实施例中,该术语是指本领域已知的任何其他假尿苷。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0210] 在另一个实施例中,修饰的RNA包含修饰的核苷,在一个实施例中,其包含 $m^5C$ 、 $m^5U$ 、 $m^6A$ 、 $s^2U$ 、 $\Psi$ 、2'-O-甲基-U、2'-O-甲基假尿苷或其组合。

[0211] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于将重组蛋白递送至受试者的方法,该方法包括以下步骤:使受试者与本发明的方法和组合物的修饰的mRNA接触,从而将重组蛋白递送至受试者。

[0212] 在另一个实施例中,本发明的方法包括增加RNA分子中修饰的尿苷核苷的数量、百分比或频率,以降低免疫原性或提高翻译效率。在一个实施例中,RNA、寡核糖核苷酸或多核糖核苷酸分子中修饰的尿苷残基的数量决定了本发明中观察到的作用的程度。

[0213] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA中0.1%至100%的尿苷残基被修饰(例如,通过假尿苷的存在)。在另一个实施例中,0.1%的残基被修饰。在另一个实施例中,为0.2%。在另一个实施例中,该分数是0.3%。在另一个实施例中,该分数是0.4%。在另一个实施例中,该分数是0.5%。在另一个实施例中,该分数是0.6%。在另一个实施例中,该分数是0.8%。在另一个实施例中,该分数是1%。在另一个实施例中,该分数是1.5%。在另一个实施例中,该分数是2%。在另一个实施例中,该分数是2.5%。在另一个实施例中,该分数是3%。在另一个实施例中,该分数是4%。在另一个实施例中,该分数是5%。在另一个实施例中,该分数是6%。在另一个实施例中,该分数是8%。在另一个实施例中,该分数是10%。在另一个实施例中,该分数是12%。在另一个实施例中,该分数是14%。在另一个实施例中,该分数是16%。在另一个实施例中,该分数是18%。在另一个实施例中,该分数是20%。在另一个实施例中,该分数是25%。在另一个实施例中,该分数是30%。在另一个实施例中,该分数是35%。在另一个实施例中,该分数是40%。在另一个实施例中,该分数是45%。在另一个实施例中,该分数是50%。在另一个实施例中,该分数是60%。在另一个实施例中,该分数是70%。在另一个实施例中,该分数是80%。在另一个实施例中,该分数是90%。在另一个实施例中,该分数是100%。

[0214] 在另一个实施例中,该分数小于5%。在另一个实施例中,该分数小于3%。在另一个实施例中,该分数小于1%。在另一个实施例中,该分数小于2%。在另一个实施例中,该分数小于4%。在另一个实施例中,该分数小于6%。在另一个实施例中,该分数小于8%。在另一个实施例中,该分数小于10%。在另一个实施例中,该分数小于12%。在另一个实施例中,该分数小于15%。在另一个实施例中,该分数小于20%。在另一个实施例中,该分数小于30%。在另一个实施例中,该分数小于40%。在另一个实施例中,该分数小于50%。在另一个实施例中,该分数小于60%。在另一个实施例中,该分数小于70%

[0215] 在另一个实施例中,给定的尿苷核苷酸的0.1%的残基被修饰。在另一个实施例中,核苷酸的分数是0.2%。在另一个实施例中,该分数是0.3%。在另一个实施例中,该分数是0.4%。在另一个实施例中,该分数是0.5%。在另一个实施例中,该分数是0.6%。在另一

个实施例中,该分数是0.8%。在另一个实施例中,该分数是1%。在另一个实施例中,该分数是1.5%。在另一个实施例中,该分数是2%。在另一个实施例中,该分数是2.5%。在另一个实施例中,该分数是3%。在另一个实施例中,该分数是4%。在另一个实施例中,该分数是5%。在另一个实施例中,该分数是6%。在另一个实施例中,该分数是8%。在另一个实施例中,该分数是10%。在另一个实施例中,该分数是12%。在另一个实施例中,该分数是14%。在另一个实施例中,该分数是16%。在另一个实施例中,该分数是18%。在另一个实施例中,该分数是20%。在另一个实施例中,该分数是25%。在另一个实施例中,该分数是30%。在另一个实施例中,该分数是35%。在另一个实施例中,该分数是40%。在另一个实施例中,该分数是45%。在另一个实施例中,该分数是50%。在另一个实施例中,该分数是60%。在另一个实施例中,该分数是70%。在另一个实施例中,该分数是80%。在另一个实施例中,该分数是90%。在另一个实施例中,该分数是100%。

[0216] 在另一个实施例中,给定的尿苷核苷酸的分数小于8%。在另一个实施例中,该分数小于10%。在另一个实施例中,该分数小于5%。在另一个实施例中,该分数小于3%。在另一个实施例中,该分数小于1%。在另一个实施例中,该分数小于2%。在另一个实施例中,该分数小于4%。在另一个实施例中,该分数小于6%。在另一个实施例中,该分数小于12%。在另一个实施例中,该分数小于15%。在另一个实施例中,该分数小于20%。在另一个实施例中,该分数小于30%。在另一个实施例中,该分数小于40%。在另一个实施例中,该分数小于50%。在另一个实施例中,该分数小于60%。在另一个实施例中,该分数小于70%。

[0217] 在另一个实施例中,术语“核糖核苷酸”、“寡核糖核苷酸”和多核糖核苷酸在一个实施例中是指包含其中糖部分为核糖的核苷酸的化合物。在另一个实施例中,该术语包括RNA和其中主链被修饰的RNA衍生物。许多RNA主链修饰是本领域已知的并且包括在本发明中。在一个实施例中,修饰的RNA是PNA(肽核酸)。PNA包含肽主链和核苷酸碱基,并且在另一个实施例中能够结合DNA和RNA分子。在另一个实施例中,通过用硫代磷酸酯键替换一个或多个磷酸二酯键来修饰核苷酸。在另一个实施例中,人工核酸包含本领域已知的天然核酸的磷酸主链的任何其他变体。每种核酸衍生物代表本发明的单独实施例。

[0218] 用于产生具有修饰的主链的核酸的方法是本领域众所周知的,并且例如在授予Hutcherson等人的美国专利号5,723,335和5,663,153和相关的PCT公开W095/26204中描述。每种方法代表本发明的单独实施例。

[0219] 目的核酸可以通过本领域已知的任何方法或将要开发的任何方法进行纯化,只要纯化方法从核酸制品中去除污染物并从而显著降低核酸制剂的免疫原性潜力。在一实施例中,使用高效液相色谱法(HPLC)纯化目的核酸。在另一个实施例中,通过使目的核酸与细菌酶RNase III接触来纯化目的核酸。在其他各种实施例中,可以使用实质上降低核酸制剂的免疫原性的任何核酸纯化方法。可与本发明的组合物和方法一起使用的纯化方法的非限制性实例是液相色谱分离和酶消化,各自单独或以任何组合,同时或以任何顺序使用。液相色谱分离的非限制性实例包括HPLC和快速蛋白质液相色谱(FPLC)。可用于本发明的HPLC和FPLC方法的材料包括但不限于交联的聚苯乙烯/二乙烯基苯(PS/DVB)、PS/DVB-C18、PS/DVB烷基化的Helix DNA柱(Varian)、Eclipse dsDNA分析柱(安捷伦科技公司)、反相5(RPC-5)交换材料、DNAPac、ProSwift和生物惰性UltiMate.RTM.3000钛柱(Dionex)。可用于本发明的酶消化方法的酶包括能够消化本发明的核酸制品中的任何污染物的任何酶,比如例如

dsRNA污染物,并且包括但不限于RNase III、RNase VI、Dicer和Chipper(参见Fruscoloni等人,2002,PNAS 100:1639)。用于评估目的核酸纯度的测定法的非限制性实例包括斑点印迹测定法、Northern印迹测定法和树突状细胞激活测定法,如本文其他地方所述。

[0220] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA的免疫原性显著低于具有相同序列的未修饰的体外合成的mRNA分子。在另一个实施例中,修饰的mRNA分子的免疫原性比其未修饰的对应物低2倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了3倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了5倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了7倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了10倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了15倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了50倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了100倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了200倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了500倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了1000倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了2000倍。在另一个实施例中,免疫原性降低了另一个倍数差异。

[0221] 在另一个实施例中,“免疫原性显著降低”是指免疫原性的可检测到的降低。在另一个实施例中,该术语是指免疫原性的倍数降低(例如,以上列举的倍数降低之一)。在另一个实施例中,该术语是指使得可以施用有效量的修饰的mRNA而不会触发可检测到的免疫应答的降低。在另一个实施例中,该术语是指使得可以重复施用修饰的mRNA而不会引起足以可检测地降低重组蛋白表达的免疫应答的降低。在另一个实施例中,该降低使得可以重复施用修饰的mRNA而不会引起足以消除重组蛋白的可检测表达的免疫应答。

[0222] 测定免疫原性的方法在本领域中是众所周知的,并且在美国专利8,278,036中进行了详细描述,该专利通过引用并入文中。

[0223] 在另一个实施例中,本发明的方法和组合物的修饰的mRNA比具有相同序列的未修饰的mRNA分子在细胞中更有效地翻译。在另一个实施例中,修饰的mRNA表现出增强的被靶细胞翻译的能力。在另一个实施例中,翻译相对于其未修饰的对应物提高了2倍。在另一个实施例中,翻译提高了3倍。在另一个实施例中,翻译提高了5倍。在另一个实施例中,翻译提高了7倍。在另一个实施例中,翻译提高了10倍。在另一个实施例中,翻译提高了15倍。在另一个实施例中,翻译提高了20倍。在另一个实施例中,翻译提高了50倍。在另一个实施例中,翻译提高了100倍。在另一个实施例中,翻译提高了200倍。在另一个实施例中,翻译提高了500倍。在另一个实施例中,翻译提高了1000倍。在另一个实施例中,翻译提高了2000倍。在另一个实施例中,该因子是10-1000倍。在另一个实施例中,该因子是10-100倍。在另一个实施例中,该因子是10-200倍。在另一个实施例中,该因子是10-300倍。在另一个实施例中,该因子是10-500倍。在另一个实施例中,该因子是20-1000倍。在另一个实施例中,该因子是30-1000倍。在另一个实施例中,该因子是50-1000倍。在另一个实施例中,该因子是100-1000倍。在另一个实施例中,该因子是200-1000倍。在另一个实施例中,翻译以任何其他显著量或量的范围提高。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0224] 测定翻译效率的方法在本领域中是众所周知的,包括例如测量编码的报道蛋白(例如荧光素酶或海肾或绿色荧光蛋白)的活性[Wall A A,Phillips A M等人,通过在第一顺反子中缺少框内AUG密码子来确定第二顺反子在两种果蝇双顺反子转录物中的有效翻译。J Biol Chem 2005;280(30):27670-8]),或测量掺入翻译蛋白中的放射性标记(Ngosuwan J,Wang N M等人,胞质Hsp70和Hsp40分子伴侣在分泌前蛋白翻译后转位到内质

网中的作用。J Biol Chem 2003;278(9):7034-42)。每种方法代表本发明的单独实施例。

[0225] 在另一个实施例中,本发明方法的靶细胞是树突细胞。在另一个实施例中,本发明方法的靶细胞是巨噬细胞。在另一个实施例中,本发明方法的靶细胞是B细胞。在另一个实施例中,本发明方法的靶细胞是另一种抗原呈递细胞。在另一个实施例中,本发明方法的靶细胞是粘膜细胞。在另一个实施例中,本发明方法的靶细胞是上皮细胞。在另一个实施例中,细胞是皮肤细胞。在另一个实施例中,细胞是表皮细胞。在另一个实施例中,细胞是角质形成细胞。在另一个实施例中,细胞是默克尔细胞、黑素细胞或朗格汉斯细胞。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0226] 组合物的治疗方法和用途

[0227] 本发明还提供了对受试者进行抗HSV接种并治疗、阻止、抑制、降低HSV感染或其症状或表现的发生率或遏制其发生的方法,其包括施用本发明的组合物。

[0228] 在一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗受试者的HSV感染的方法,其包括使所述受试者与包含一种或多种修饰的mRNA的组合物接触,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段。

[0229] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于遏制受试者的HSV感染的方法,其包括使所述受试者与包含一种或多种修饰的mRNA的组合物接触,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段。

[0230] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于抑制受试者的HSV感染的方法,其包括使所述受试者与包含一种或多种修饰的mRNA的组合物接触,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段。

[0231] 在另一个实施例中,本发明提供了一种降低受试者中HSV感染发生率的方法,其包括使所述受试者与包含一种或多种修饰的mRNA的组合物接触,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV糖蛋白或其免疫原性片段。

[0232] 在一个实施例中,HSV感染是HSV-1感染。在另一个实施例中,HSV感染是HSV-2感染。

[0233] 在一个实施例中,向受试者施用HSV-1糖蛋白以用于治疗、抑制、遏制等HSV-1感染的方法。在另一个实施例中,向受试者施用HSV-2糖蛋白以用于治疗、抑制、遏制等HSV-2感染的方法。在另一个实施例中,向受试者施用HSV-1糖蛋白以用于治疗、抑制、遏制等HSV-1感染、HSV-2感染或其组合的方法。在另一个实施例中,向受试者施用HSV-2糖蛋白以用于治疗、抑制、遏制等HSV-1感染、HSV-2感染或其组合的方法。在一个实施例中,施用HSV-1糖蛋白(例如,gC1、gD1、gE1或其组合)治疗或预防HSV-1和HSV-2感染。在另一个实施例中,施用HSV-2糖蛋白(例如,gC2、gD2和gE2,或其组合)治疗或预防HSV-1和HSV-2感染。

[0234] 根据这个方面并且在一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗、遏制、抑制或降低受试者中单纯疱疹病毒1(HSV-1)感染的发生率的方法,该方法包括使所述受试者与包含一种或多种修饰的mRNA的组合物接触,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV-1糖蛋白或其免疫原性片段。

[0235] 在一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗、遏制、抑制或降低受试者中单纯疱疹病毒2(HSV-2)感染的发生率的方法,该方法包括使所述受试者与包含一种或多种修饰的mRNA的组合物接触,其中每个所述修饰的mRNA编码HSV-2糖蛋白或其免疫原性片段。

[0236] 在一个实施例中,所述接触是通过施用于所述受试者。

[0237] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗、遏制、抑制或降低受试者中HSV感染的发生率的方法,该方法包括以下步骤:向所述受试者施用包含编码以下的修饰mRNA的免疫原性组合物:(a) HSV gD或其免疫原性片段;(b) 如本文所述的HSV gC或其片段;(c) 如本文所述的HSV gE或其片段,或其组合。

[0238] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗、遏制、抑制或降低受试者中HSV感染的发生率的方法,该方法包括以下步骤:向所述受试者施用包含编码以下的修饰mRNA的免疫原性组合物:(a) HSV-2 gD或其免疫原性片段;(b) 如本文所述的HSV-2 gC或其片段;和(c) 如本文所述的HSV-2 gE或其片段,或其组合。

[0239] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗、遏制、抑制或降低受试者中HSV感染的发生率的方法,该方法包括以下步骤:向所述受试者施用包含编码以下的修饰mRNA的免疫原性组合物:(a) HSV-1 gD或其免疫原性片段;(b) 如本文所述的HSV-1 gC或其片段;和(c) 如本文所述的HSV-1 gE或其片段,或其组合。

[0240] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于在受试者中诱导抗HSV免疫应答的方法,该方法包括以下步骤:向所述受试者施用包含编码以下的修饰mRNA的免疫原性组合物:(a) HSV gD或其免疫原性片段;(b) 如本文所述的HSV gC或其片段;(c) 如本文所述的HSV gE或其片段,或其组合。

[0241] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于在受试者中诱导抗HSV免疫应答的方法,该方法包括以下步骤:向所述受试者施用包含编码以下的修饰mRNA的免疫原性组合物:(a) HSV-2 gD或其免疫原性片段;(b) 如本文所述的HSV-2 gC或其片段;和(c) 如本文所述的HSV-2 gE或其片段,或其组合。

[0242] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于在受试者中诱导抗HSV免疫应答的方法,该方法包括以下步骤:向所述受试者施用包含编码以下的修饰mRNA的免疫原性组合物:(a) HSV-1 gD或其免疫原性片段;(b) 如本文所述的HSV-1 gC或其片段;和(c) 如本文所述的HSV-1 gE或其片段,或其组合。

[0243] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中抑制原发性HSV感染的方法,该方法包括向受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中降低HSV感染发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中抑制原发性HSV感染后突发的方法,该方法包括给所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0244] 在一个实施例中,本发明提供了一种治疗和/或遏制原发性HSV感染和/或继发性HSV感染的方法。在一个实施例中,“原发性”感染是指首次感染。在一个实施例中,“继发性”感染是指HSV感染的复发。

[0245] 在一个实施例中,“突发”或“复发”是指在潜伏的神经元HSV感染后皮肤组织的再感染。在另一个实施例中,该术语指的是在潜伏期后的HSV再激活。在另一个实施例中,该术语指的是无症状潜伏期后的症状性HSV损害。

[0246] 在另一个实施例中,本发明提供了一种抑制HSV扩散的方法。在一实施例中,抑制了从DRG扩散到皮肤。在一实施例中,抑制了HSV的细胞间扩散。在一实施例中,抑制了顺行

扩散。在一实施例中，抑制了逆行扩散。在一个实施例中，“DRG”是指神经元细胞体，在另一实施例中，其包含神经纤维的神经元细胞体。在另一个实施例中，该术语是指本领域中使用的“DRG”的任何其他定义。在另一个实施例中，抑制了HSV扩散到神经组织。

[0247] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中抑制原发性HSV感染后的复发的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中预防原发性HSV感染后复发的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0248] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中抑制原发性HSV感染后HSV唇的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0249] 在另一个实施例中，本发明提供了一种预防HSV感染复发的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中，本发明提供了一种减轻HSV感染复发的严重性的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中，本发明提供了一种降低HSV感染复发频率的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在一个实施例中，本发明在HIV感染的受试者中提供了任何所述方法。

[0250] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中治疗HSV脑炎的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中降低HSV脑炎的发生率的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在一个实施例中，“HSV脑炎”是指由单纯疱疹病毒-1 (HSV) 引起的脑炎。在另一个实施例中，该术语是指与HSV相关的脑炎。在另一个实施例中，该术语是指本领域已知的任何其他类型的HSV介导的脑炎。

[0251] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中治疗或减轻HSV新生儿感染的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0252] 在另一个实施例中，本发明提供了一种用于将HSV糖蛋白引入受试者细胞的方法，其包括使所述细胞与编码重组蛋白的体外转录的mRNA分子接触，其中所述体外转录的mRNA分子还包含修饰的核苷，从而将所述HSV糖蛋白引入所述受试者的所述细胞中。

[0253] 在另一个实施例中，本发明提供了一种诱导哺乳动物细胞产生HSV糖蛋白的方法，该方法包括使所述哺乳动物细胞与编码HSV糖蛋白的体外合成的mRNA分子接触，该体外合成的mRNA分子包含假尿苷，从而诱导所述哺乳动物细胞产生所述HSV糖蛋白。

[0254] 应当理解，本文中对HSV的提及在一个实施例中是指HSV-1，而在另一实施例中是指HSV-2，而在另一实施例中是指HSV-1和HSV-2。

[0255] 在另一个实施例中，“HSV-1”是指单纯疱疹病毒-1。在另一个实施例中，该术语是指KOS株。在另一个实施例中，该术语是指F株。在另一个实施例中，该术语是指NS株。在另一个实施例中，该术语是指CL101株。在另一个实施例中，该术语是指“17”株。在另一个实施例中，该术语是指“17+syn”株。在另一个实施例中，该术语是指MacIntyre株。在另一个实施例中，该术语是指MP株。在另一个实施例中，该术语是指HF株。在另一个实施例中，该术语是指本领域已知的任何其他HSV-1株。

[0256] 在另一个实施例中，“HSV-2”是指单纯疱疹病毒-2。在另一个实施例中，该术语是指HSV-2 333株。在另一个实施例中，该术语是指2.12株。在另一个实施例中，该术语是指

HG52株。在另一个实施例中,该术语是指MS株。在另一个实施例中,该术语是指G株。在另一个实施例中,该术语是指186株。在另一个实施例中,该术语是指本领域已知的任何其他HSV-2株。

[0257] 在另一个实施例中,本发明提供了一种对受试者进行抗HSV感染接种的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中遏制HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中阻止HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中阻止原发性HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中阻止神经元HSV扩散的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0258] 在另一个实施例中,术语“阻止HSV感染”和“阻止原发性HSV感染”是指降低感染性病毒的效价。在另一个实施例中,该术语是指降低病毒复制的程度。

[0259] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中降低HSV介导的疱疹性眼病的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗HSV-1角膜感染或疱疹性角膜炎的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中降低HSV-1角膜感染或疱疹性角膜炎的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0260] 在另一个实施例中,本发明提供一种治疗、遏制或抑制HSV生殖器感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供一种治疗、遏制或抑制复发性HSV感染的任何表现的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0261] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中降低HSV介导的生殖器溃疡疾病的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中阻止建立潜伏HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0262] 在一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗、遏制或抑制生殖器疱疹感染的方法,其包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗、遏制或抑制口腔疱疹感染的方法,其包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0263] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中降低HSV介导的脑炎的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0264] 在另一个实施例中,通过本发明的方法治疗或预防的疱疹介导的脑炎是局灶性疱疹脑炎。在另一个实施例中,疱疹介导的脑炎是新生儿疱疹脑炎。在另一个实施例中,疱疹介导的脑炎是本领域已知的任何其他类型的疱疹介导的脑炎。

[0265] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗或降低与HSV介导的脑炎相关或继发的疾病、障碍或症状的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0266] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗HSV感染、减轻其发病、改善其症状、改善其继发症状、降低其发生率、延长其复发潜伏期的方法,其包括向受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0267] 在另一个实施例中,本发明提供了一种保护受试者免于在人类受试者中形成带状疱疹样病变或类似爆发的方法。在另一个实施例中,本发明提供了一种在人类受试者中抑制HSV带状疱疹样病变或类似爆发形成的方法。

[0268] 在一个实施例中,“带状疱疹样的(zosteriform)”是指HSV感染为特征的皮肤病变,特别是在再激活感染期间,在一个实施例中,其以皮疹开始并分布在皮区附近,通常以条状或带状模式发生。在一个实施例中,皮疹演变成充满浆液的囊泡或小水泡。在一个实施例中,由于与HSV接触而在小鼠中形成带状疱疹样病变。在另一个实施例中,由于与HSV接触而在人类中形成带状疱疹样病变。在一个实施例中,“带状疱疹样扩散”是指HSV感染,其从神经节扩散至皮区内的继发性皮肤部位。在另一个实施例中,该术语是指在与初始感染部位相同的皮区内扩散。在另一个实施例中,该术语是指本领域已知的“带状疱疹样扩散”的任何其他定义。在另一实施例中,“爆发”是指疾病症状或疾病的扩散或流行的突然增加,并且在另一个实施例中,是指带状疱疹样病变的突然增加,而在另一实施例中,“爆发”是指带状疱疹样病变的突然发作。

[0269] 在一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中阻止皮区病变或类似病症形成的方法。在一实施例中,由于与HSV接触而形成皮区病变。在另一实施例中,当病毒在神经节中从潜伏期再激活时,最常发生皮区病变,并且在另一个实施例中,其沿神经扩散,在一个实施例中,引起复发性感染。

[0270] 应当理解,本发明的方法可以用于治疗、抑制、遏制等HSV感染或在受试者暴露于HSV后与这种感染有关的原发性或继发性症状的方法。在另一个实施例中,受试者在疫苗接种之前已经感染了HSV。在另一个实施例中,所述受试者处于HSV感染的风险中。在另一个实施例中,无论受试者在疫苗接种时是否已感染HSV,通过本发明的方法进行疫苗接种对于治疗、抑制、遏制等HSV感染或与这种感染相关的原发性或继发性症状是有效的。

[0271] 在一个实施例中,“治疗”是指治疗性治疗或预防性或预防性措施,其中目的是预防或减轻如上所述的目标病理病症或障碍。因此,在一个实施例中,治疗可包括直接影响或治愈、遏制、抑制、预防、减轻其严重性、延缓其发作、减轻与该疾病、障碍或病症有关的症状或其组合。因此,在一个实施例中,“治疗”尤其是指延迟进展、加快缓解、诱导缓解、增加缓解、加快恢复、增加替代疗法的疗效或降低对替代疗法的抗性或其组合。在一个实施例中,“预防”尤其是指延迟症状发作、预防疾病复发、减少复发发作的次数或频率、增加症状性发作之间的潜伏期或其组合。在一个实施例中,“遏制”或“抑制”尤其是指减轻症状的严重性、减轻急性发作的严重性、减少症状的数量、降低疾病相关症状的发生率、降低症状的潜伏期、改善症状、减轻继发性症状、减轻继发性感染、延长患者存活时间或其组合。

[0272] 在一个实施例中,本发明的组合物和方法可有效降低HSV采集率、HSV感染持续时间、HSV再激活的频率或其组合。在另一个实施例中,本发明的组合物和方法有效治疗或抑制生殖器溃疡疾病,在一个实施例中,其需要降低HSV生殖器溃疡疾病的严重性或频率。在一个实施例中,本发明的组合物和方法阻断补体免疫逃避。在一个实施例中,用mRNA编码的HSV亚基进行疫苗接种可产生高效价的中和抗体或有效的T细胞应答;但是,在随后的感染

中,HSV免疫逃逸分子可能会阻断抗体或T细胞的活性,从而降低组合物效力。在一个实施例中,本发明的组合物和方法结合了通过在一个实施例中增强例如使用gC-1的gD-1亚基组合物阻止补体免疫逃避的有效性来阻断病毒介导的免疫逃避的策略。

[0273] 在一个实施例中,在豚鼠和小鼠中的研究表明神经节中的病毒载量与复发性HSV感染的频率相关。因此,在一个实施例中,本发明的组合物和方法可用于预防或抑制复发性HSV感染。在一个实施例中,针对例如gC-1的抗体阻断参与免疫逃避的结构域,其增强补体活性,改善抗gD-1 IgG的中和活性,增加抗体和补体依赖性细胞毒性,并增强对感染细胞的补体介导的中和和裂解。

[0274] 在一个实施例中,症状是原发性的,而在另一个实施例中,症状是继发性的。在一个实施例中,“原发性”是指作为受试者病毒感染的直接结果的症状,而在一个实施例中,“继发性”是指源自或继发于原发性病因的症状。在一个实施例中,用于本发明的组合物和毒株治疗与HSV感染有关的原发性或继发性症状或继发性并发症。

[0275] 在另一个实施例中,“症状”可以是HSV感染的任何表现,其包括女性的尿道、子宫颈、大腿和/或肛门以及男性的阴茎、尿道、阴囊、大腿和肛门上的水疱、溃疡或病变、炎症、肿胀、发热、流感样症状、口疮、喉咙痛、咽炎、疼痛、舌头、口或嘴唇上的水疱、溃疡、唇疱疹、颈部疼痛、淋巴结肿大、发红、出血、瘙痒、排尿困难、头痛、肌肉疼痛等或其组合。

[0276] 在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是发热。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是头痛。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是颈部僵硬。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是癫痫发作。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是部分麻痹。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是木僵。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是昏迷。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是与疱疹介导的脑炎有关或继发于其的本领域已知的任何其他疾病、障碍或症状。

[0277] 确定疱疹介导的脑炎的存在和严重性的方法在本领域中是众所周知的,并且描述于例如Bonkowsky JL等人(Herpes simplex virus central nervous system relapse during treatment of infantile spasms with corticotropin. *Pediatrics* (在用促肾上腺皮质激素治疗婴儿痉挛期间单纯疱疹病毒中枢神经系统复发). 2006年5月;117(5): e1045-8)和Khan OA等人(Herpes encephalitis presenting as mild aphasia: case report (表现为轻度失语的疱疹性脑炎: 病例报告). *BMC Fam Pract.* 2006年3月24日;7:22)中。每种方法代表本发明的单独实施例。

[0278] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中治疗或降低与HSV感染有关的疾病、障碍或症状的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0279] 在另一个实施例中,继发于HSV感染的疾病、障碍或症状是口腔病变。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是生殖器病变。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是口腔溃疡。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是生殖器溃疡。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是发热。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是头痛。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是肌肉疼痛。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是腹股沟区的腺体肿大。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是排尿疼痛。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是阴道分泌物。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是水疱。在另一个实施例中,所述疾病、障碍或症状是流感样不适。在另一个实施例中,所述疾

病、障碍或症状是角膜炎。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是疱疹性瘰疬。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是贝尔麻痹。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是多形疱疹性红斑。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是下背部症状（例如，麻木、臀部或肛门周围区域的刺痛、尿滞留、便秘和阳痿）。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是局部性疱疹性湿疹。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是弥散性疱疹性湿疹。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是格斗疱疹。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是疱疹性须疮。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是食道症状（例如吞咽困难或灼烧、吞咽时挤压喉咙疼痛、体重减轻、吞咽时上胸部或后胸部疼痛）。在另一个实施例中，所述疾病、障碍或症状是本领域已知的任何其他疾病、障碍或症状。每种疾病、障碍或症状代表本发明的单独实施例。

[0280] 因此，在一个实施例中，本发明的组合物和方法治疗、遏制、抑制或降低感染本身的发生率，而在另一实施例中，本发明的组合物和方法治疗、遏制、抑制或降低感染的原发性症状的发生率，而在另一个实施例中，本发明的组合物和方法治疗、遏制、抑制或降低感染的继发性症状的发生率。应当理解，本发明的组合物和方法可以影响感染，由感染引起的原发性症状和与感染有关的继发性症状的任何组合。

[0281] 在另一个实施例中，通过本发明的方法和组合物治疗或改善的HSV感染是生殖器HSV感染。在另一个实施例中，HSV感染是口腔HSV感染。在另一个实施例中，HSV感染是眼HSV感染。在另一个实施例中，HSV感染是皮肤HSV感染。

[0282] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者中降低弥散性HSV感染的发生率的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0283] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者后代中降低新生儿HSV感染的发生率的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0284] 在另一个实施例中，本发明提供了一种减少HSV感染从受试者传播到其后代的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0285] 在另一个实施例中，后代是婴儿。在另一个实施例中，减少或抑制的传播是出生期间的传播。在另一个实施例中，减少或抑制了母乳喂养期间的传播。在另一个实施例中，减少或抑制的传播是本领域已知的任何其他类型的亲子传播。

[0286] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在受试者后代中降低新生儿HSV感染的严重性的方法，该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0287] 在一个实施例中，本发明提供了一种在HIV感染的受试者中治疗、遏制、抑制或降低HSV感染发生率的方法，该方法包括向所述受试者施用包含以下的组合物的步骤：(a) 编码HSV gC蛋白或其片段的修饰的mRNA；(b) 编码HSV gE蛋白或其片段的修饰的mRNA；和(c) 佐剂。在另一个实施例中，本发明提供了一种在HIV感染的受试者中治疗、遏制、抑制或降低HSV感染发生率的方法，该方法包括向所述受试者施用包含以下的组合物的步骤：(a) 编码HSV gC蛋白或其片段的修饰的mRNA，其中所述片段包含其C3b结合结构域，其备解素干扰结构域，其C5干扰结构域或所述C3b结合结构域、备解素干扰结构域或C5干扰结构域的片段；(b) 编码HSV gE蛋白或其片段的修饰的mRNA，其中所述片段包含AA 24-409或其片段；和(c) 佐剂。

[0288] 在另一个实施例中，本发明提供了一种在感染HIV的受试者中治疗HSV感染的方法

法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在感染HIV的受试者中遏制HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在感染HIV的受试者中抑制HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在感染HIV的受试者中降低HSV感染的发生率的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种预防HIV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的HSV组合物的步骤。在一个实施例中,HSV感染增加了HIV感染的风险,并且针对HSV感染的保护降低了HIV感染的风险。因此,在一个实施例中,本发明提供了一种降低HIV感染风险的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。

[0289] 在一个实施例中,用于本发明方法的组合物引发针对HSV的免疫应答。在另一个实施例中,用于本发明方法的组合物引发针对HSV-1的免疫应答。在另一个实施例中,用于本发明方法的组合物引发针对HSV-2的免疫应答。在另一个实施例中,组合物包含编码gD和gC蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码gE和gD蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码gC和gE蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码gE、gD和gC蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,组合物包含编码gE、gD或gC蛋白的修饰的mRNA。在另一个实施例中,由修饰的mRNA编码的蛋白质是HSV-1蛋白。在另一个实施例中,由修饰的mRNA编码的蛋白质是HSV-2蛋白。在另一个实施例中,由修饰的mRNA编码的蛋白质包含HSV-1和HSV-2蛋白。

[0290] 应理解,在一个实施例中,根据本文所述的任何实施例的受试者可以是感染HSV的受试者,或者在另一个实施例中,为易于感染HSV的受试者。在一个实施例中,受试者可以感染至少一种其他病原体,或在另一个实施例中,易于感染至少一种其他病原体。在一个实施例中,受试者可以是免疫受损的。在一个实施例中,受试者被HSV感染,而在另一个实施例中,受试者具有被HSV感染的风险,在一个实施例中,受试者是新生儿,在另一个实施例中,是免疫受损的,在另一个实施例中,是老年人,在另一个实施例中,是免疫受损的新生儿或免疫受损的老年受试者。

[0291] 在另一个实施例中,本发明的组合物及其相关用途可以遏制、抑制、预防或治疗受试者的HIV感染。在一个实施例中,本发明的组合物及其相关用途可以治疗HIV感染的继发性并发症,在一个实施例中,其是机会性感染、肿瘤、神经异常或进行性免疫恶化。在另一个实施例中,该方法包括治疗获得性免疫缺陷综合症(AIDS)。在另一个实施例中,该方法包括治疗CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞数目的减少。

[0292] 在另一个实施例中,本发明提供了一种减少HIV-1向后代传播的方法,该方法包括向受试者施用本发明的组合物的步骤。如本领域中已知的,HSV-2感染增加生殖器分泌物中HIV-1病毒的脱落(Nagot N等人,Reduction of HIV-1RNA levels with therapy to suppress herpes simplex virus(用遏制单纯疱疹病毒的疗法降低HIV-1RNA水平).N Engl J Med.2007年2月22日;356(8):790-9)。因此,本发明抑制HSV-2感染的方法对于减少HIV-1向后代传播也是有效的。在另一个实施例中,突变体HSV株是HSV-1株。在另一个实施例中,突变体HSV株是HSV-2株。

[0293] 在另一个实施例中,本发明提供了一种减少HIV-1向性伴侣传播的方法,该方法包

括向受试者施用本发明的组合物的步骤。如本领域中已知的,HSV-2感染增加生殖器分泌物中HIV-1病毒的脱落。因此,本发明抑制HSV-2感染的方法对于减少HIV-1向性伴侣传播也是有效的。在另一个实施例中,突变体HSV株是HSV-1株。在另一个实施例中,突变体HSV株是HSV-2株。

[0294] 在另一个实施例中,本发明提供了一种降低对HIV-1的易感性的方法,该方法包括向受试者施用本发明的组合物的步骤。如本领域中已知的,HSV-2感染增加HIV-1复制(Ouedraogo A 等人,Impact of suppressive herpes therapy on genital HIV-1RNA among women taking antiretroviral therapy:a randomized controlled trial(遏制性疱疹疗法对接受抗逆转录病毒疗法的女性中生殖器HIV-1RNA的影响:一项随机对照试验).AIDS.2006年11月28日;20(18):2305-13)。因此,本发明抑制HSV-2感染的方法对于减少对HIV-1的易感性也是有效的。在另一个实施例中,突变体HSV株是HSV-1株。在另一个实施例中,突变体HSV株是HSV-2株。

[0295] 因此,在一个实施例中,本发明提供了一种在HIV感染的受试者中抑制原发性HSV感染的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在HIV感染的受试者中治疗或降低HSV感染的发生率的方法,其包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在HIV感染的受试者中抑制原发性HSV感染后的爆发、复发或HSV唇(labialis)的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的组合物的步骤。在一个实施例中,施用本发明的组合物诱导抗HSV免疫应答。

[0296] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中诱导免疫应答的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的核苷修饰的mRNA组合物的步骤。在另一个实施例中,免疫应答包括CD4免疫应答。在另一个实施例中,免疫应答包括CD8免疫应答。在另一个实施例中,免疫应答包括T滤泡辅助细胞免疫应答。在另一个实施例中,免疫应答包括生发中心B细胞免疫应答。在另一个实施例中,免疫应答包括对gC2、gD2、gE2或其组合的IgG抗体应答。

[0297] 在另一个实施例中,本发明提供了一种治疗受试者的单纯疱疹病毒(HSV)感染的方法,该方法包括向所述受试者肌肉施用本发明的核苷修饰的mRNA组合物的步骤。在另一个实施例中,本发明提供了一种在受试者中遏制、抑制或降低单纯疱疹病毒(HSV)感染的发生率的方法,该方法包括向所述受试者肌肉施用本发明的核苷修饰的mRNA组合物的步骤。

[0298] 施用和药物方案

[0299] 在另一个实施例中,本发明的组合物可以通过本领域技术人员已知的任何方法施用给受试者,例如肠胃外、癌旁、经粘膜、经皮、肌肉、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、脑室内、颅内、阴道内、鼻内、肿瘤内或局部。

[0300] 在另一个实施例中,“施用”是指通过注射或其他方式将本发明的组合物直接引入受试者。在另一个实施例中,“施用”是指使受试者的免疫系统的细胞与编码HSV蛋白的组合物或修饰的mRNA或其混合物接触。

[0301] 在本发明的方法和组合物的另一个实施例中,将组合物口服施用,并因此配制成适于口服施用的形式,即作为固体或液体制剂。合适的固体口服制剂包括片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂、丸剂等。合适的液体口服制剂包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油等。在本发明的另一个实施例中,将活性成分配制在胶囊中。根据该实施例,除了活性化合物和惰性载体

或稀释剂之外,本发明的组合物还包含硬凝胶胶囊。

[0302] 在其他实施例中,药物组合物通过液体制剂的静脉内、动脉内或肌肉内注射施用。合适的液体制剂包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油等。在另一个实施例中,药物组合物是静脉内施用的,因此被配制成为适于静脉内施用的形式。在另一个实施例中,药物组合物是通过动脉内施用的,因此被配制成为适于动脉内施用的形式。在另一个实施例中,药物组合物是肌肉内施用的,因此被配制成为适于肌肉内施用的形式。

[0303] 在另一个实施例中,将药物组合物局部施用于体表,并因此被配制成为适于局部施用的形式。合适的局部制剂包括凝胶、软膏、乳膏、洗剂、滴剂等。对于局部施用,制备组合物或其生理学上耐受的衍生物,并在含有或不含有药物载体的生理学上可接受的稀释剂中以溶液、悬浮液或乳液的形式施用。

[0304] 在另一个实施例中,组合物以栓剂的形式施用,例如直肠栓剂或尿道栓剂。在另一个实施例中,药物组合物通过皮下植入丸剂来施用。在另一个实施例中,丸剂在一段时间内提供药剂的受控释放。

[0305] 在优选的实施例中,药物组合物通过肌肉内、皮下或皮内施用。

[0306] 在另一个实施例中,修饰的mRNA的“有效剂量”是指足以发挥治疗作用的量。在另一个实施例中,该术语是指足以引起可检测量的编码蛋白的表达的量。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0307] 用于测量编码HSV糖蛋白的修饰的mRNA的剂量的方法(例如在人类受试者中)是本领域众所周知的,并且包括例如剂量递增试验。每种方法代表本发明的单独实施例。

[0308] 在一些实施例中,在本文所述的任何形式或实施例中,本发明的和用于本发明方法的任何HSV组合物将包含编码本发明的HSV蛋白的修饰的mRNA或编码本发明的HSV蛋白的修饰的mRNA的组合。在一些实施例中,在本文所述的任何形式或实施例中,所述方法的和用于所述方法的任何组合物由编码本发明的HSV蛋白的修饰的mRNA或编码本发明的HSV蛋白的修饰的mRNA的组合组成。在一些实施例中,在本文所述的任何形式或实施例中,本发明的组合物将基本上由编码本发明的HSV蛋白的修饰的mRNA或编码本发明的HSV蛋白的修饰的mRNA的组合组成。在一些实施例中,术语“包含”是指包含编码其他HSV蛋白的修饰的mRNA,以及包含编码本领域中已知的其他蛋白的修饰的mRNA。在一些实施例中,术语“基本上由...组成”是指具有编码特定HSV蛋白或其片段的修饰的mRNA的组合物。但是,可以包括不直接参与编码HSV蛋白的修饰的mRNA的应用的其它组分。在一些实施例中,术语“由...组成”是指在本文所述的任何形式或实施例中,具有编码特定HSV蛋白或片段的修饰的mRNA或编码本发明的HSV蛋白或片段的修饰的mRNA的组合物。

[0309] 在另一个实施例中,本发明提供了用于治疗HSV-1或其症状或表现的组合物,该组合物包含本发明的修饰的mRNA。

[0310] 在另一个实施例中,本发明提供了用于治疗HSV-2或其症状或表现的组合物,该组合物包含本发明的修饰的mRNA。

[0311] 应当理解,本发明的组合物和方法也可以用于非HSV疱疹病毒,在一个实施例中蛋白gD、gE或gC蛋白与HSV-1的或在另一个实施例中与HSV-2的gD、gE或gC蛋白在一个实施例中为70%同源性,在另一个实施例中为80%同源性,在另一个实施例中为85%同源性,在另一个实施例中为90%同源性,在另一个实施例中为95%同源性,在另一个实施例中为98%

同源性,在另一个实施例中为100%同源性。在一个实施例中,此类组合物可用于遏制、抑制、预防或治疗癌症,或在另一实施例中用于肿瘤。在一个实施例中,非HSV疱疹病毒包括水痘带状疱疹病毒(VZV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、EBNA、巨细胞病毒(CMV)和人疱疹病毒6(HHV-6)。

[0312] 在本发明方法的另一个实施例中,将本发明的组合物施用一次。在另一个实施例中,将组合物施用两次。在另一个实施例中,将组合物施用三次。在另一个实施例中,将组合物施用四次。在另一个实施例中,将组合物施用至少四次。在另一个实施例中,将组合物施用超过四次。

[0313] 在另一个实施例中,剂量是日剂量。在另一个实施例中,剂量是周剂量。在另一个实施例中,剂量是月剂量。在另一个实施例中,所述剂量是年剂量。在另一个实施例中,剂量是一系列确定数量的剂量。在另一个实施例中,剂量是一次性剂量。

[0314] 在一个实施例中,将上文所述的任何加强剂量在包含一种或多种编码HSV-1蛋白或其免疫原性片段的修饰的mRNA的引发剂量之后施用。在另一个实施例中,将上文所述的任何加强剂量在包含一种或多种编码HSV-2蛋白或其免疫原性片段的修饰的mRNA的引发性接种疫苗之后施用。

[0315] 在一个实施例中,通过单次施用组合物来免疫受试者。在另一个实施例中,用单剂量免疫受试者。在另一个实施例中,用两次剂量免疫受试者。在另一个实施例中,用三次剂量免疫受试者。在另一个实施例中,用四次剂量免疫受试者。在另一个实施例中,用五次剂量免疫受试者。

[0316] 在一个实施例中,组合物的所有组分以相等的浓度提供。根据该方面,在一个实施例中,编码gC、gD和gE的修饰的mRNA以1:1:1的比例提供。在另一个实施例中,编码gC、gD和gE的修饰的mRNA以5:2:5的比例提供。在另一个实施例中,编码gC和gD的修饰的mRNA以1:1的比例提供。在另一个实施例中,编码gC和gE的修饰的mRNA以1:1的比例提供。在另一个实施例中,编码gD和gE的修饰的mRNA以1:1的比例提供。

[0317] 在一个实施例中,将编码gC、gD、gE或其组合或与其他HSV糖蛋白组合的修饰的mRNA在单一组合物中在相同部位并通过相同途径施用,而在另一实施例中,将编码gC、gD和gE的修饰的mRNA在单独组合物中在不同部位但通过相同施用途径施用,或在另一个实施例中,将编码gC、gD和gE的修饰的mRNA在单独组合物中在单独部位并通过不同施用途径施用,或在另一个实施例中,将编码gC、gD和gE的修饰的mRNA在单独组合物中在相同部位并通过不同施用途径(例如注射和局部)施用。

[0318] 在一个实施例中,本发明的方法包括一次或单次施用包含一种或多种本发明的核苷修饰的mRNA的组合物。在另一个实施例中,本发明的方法包括以引发和加强方法施用包含一种或多种核苷修饰的mRNA的组合物。在一个实施例中,本发明的方法进一步包括在第一次施用之后向所述受试者施用所述核苷修饰的mRNA组合物的一次或多次额外施用的步骤。

[0319] 在另一个实施例中,本发明的方法包括施用包含一种或多种编码一种或多种HSV糖蛋白的核苷修饰的mRNA的组合物作为第一次施用,以及施用包含一种或多种HSV糖蛋白的组合物作为第二次或随后施用。在一个实施例中,在第一次(或引发)施用中的由mRNA编码的HSV糖蛋白与在第二次或随后(或加强)施用中的糖蛋白相同。在另一个实施例中,将包

含一种或多种HSV糖蛋白的组合物作为第一次施用,并且将包含一种或多种编码一种或多种HSV糖蛋白的核苷修饰的mRNA的组合物作为第二次或随后施用。每种可能性代表本发明的单独实施例。

[0320] 在另一个实施例中,同时施用编码gC、gD和gE的修饰的mRNA,随后施用加强剂量的编码gD的修饰的mRNA,而不施用编码gC或gE的修饰的mRNA。在另一个实施例中,同时施用编码gC、gD和gE的修饰的mRNA,随后施加加强剂量的编码gC的修饰的mRNA,而不施加编码gD或gE的修饰的mRNA。在另一个实施例中,同时施用编码gC、gD和gE的修饰的mRNA,随后施加加强剂量的编码gE的修饰的mRNA,而不施加编码gD或gC的修饰的mRNA。在另一个实施例中,同时施用编码gC、gD和gE的修饰的mRNA,随后施加加强剂量的编码gC和gD的修饰的mRNA,而不施加编码gE的修饰的mRNA。在另一个实施例中,同时施用编码gC、gD和gE的修饰的mRNA,随后施加加强剂量的编码gC和gE的修饰的mRNA,而不施加编码gD的修饰的mRNA。在另一个实施例中,同时施用编码gC、gD和gE的修饰的mRNA,随后施加加强剂量的编码gD和gE的修饰的mRNA,而不施加编码gE的修饰的mRNA。在一个实施例中,加强施用在与引发施用相同的部位和相同的施用模式下进行。在另一个实施例中,加强施用在与引发施用不同的部位,但是通过与引发施用相同的施用模式进行。在一个实施例中,加强施用在与引发施用相同的部位,但是通过不同施用模式进行。在另一个实施例中,加强施用在与引发施用不同的部位并通过不同施用模式进行。

[0321] 在一个实施例中,与相同量的具有相同序列的未修饰RNA相比,修饰的mRNA诱导可检测的更低的先天免疫应答。

[0322] 在一个实施例中,本发明的组合物和方法的有效性取决于补体的存在,而在另一实施例中,本发明的组合物和方法不取决于补体的存在。在一个实施例中,用于本发明方法的一些组合物的有效性取决于补体的存在,而其他则不是。在一个实施例中,抗gC抗体针对HSV的有效性依赖于补体。

[0323] 在一个实施例中,补体是先天和获得性免疫的重要贡献者。在一个实施例中,补体激活通过颗粒吞噬作用和裂解促进病毒中和,充当嗜中性粒细胞和巨噬细胞的趋化因子,并增强B和T细胞应答。在一个实施例中,HSV-1 gC结合补体C3b并阻断C5和备解素与C3b的相互作用,从而抑制补体激活和补体介导的病毒中和。在一个实施例中,与补体相互作用的gC-1结构域位于氨基酸33至133内,并阻断C5和备解素与C3b的结合,并且在一个实施例中,与补体相互作用的gC-1结构域从氨基酸124延伸至366,并直接结合C3b。在一个实施例中,在小鼠侧翼模型中,在C3b结合结构域中缺失的HSV-1 gC突变病毒在体外对补体介导的病毒中和更敏感,并且比野生型(WT)病毒更弱。因此,在一个实施例中,gC-1和C3b之间的相互作用增强了HSV-1毒力,并且在一个实施例中,阻断gC-1结构域可有效预防或治疗HSV-1感染。

[0324] 在一个实施例中,本发明的组合物和方法用于人类受试者,而在另一实施例中,它们用于动物受试者。在另一个实施例中,受试者是哺乳动物。在另一个实施例中,受试者是易被HSV感染的任何生物。在一个实施例中,受试者是鼠、牛、羊、犬、猫、马、猪等。在一个实施例中,本发明的组合物和方法在男性受试者中是有效的。在另一个实施例中,本发明的组合物和方法在女性受试者中是有效的。在一个实施例中,本发明的组合物和方法在血清阴性受试者中是有效的。在另一个实施例中,本发明的组合物和方法在血清阳性受试者中是

有效的。

[0325] 药物制剂

[0326] 在一个实施例中,本发明的方法还包括在接触步骤之前将修饰的mRNA与转染试剂混合。在另一个实施例中,本发明的方法进一步包括将修饰的mRNA与转染试剂一起施用。在另一个实施例中,转染试剂是阳离子脂质试剂。

[0327] 在另一个实施例中,转染试剂是基于脂质的转染试剂。在另一个实施例中,转染试剂是基于蛋白质的转染试剂。在另一个实施例中,转染试剂是基于聚乙烯亚胺的转染试剂。在另一个实施例中,转染试剂是磷酸钙。在另一个实施例中,转染试剂是 **Lipofectin®** 或 **Lipofectamine®**。在另一个实施例中,转染试剂是本领域已知的任何其他转染试剂。

[0328] 在另一个实施例中,转染试剂形成脂质体。在另一个实施例中,脂质体增加细胞内稳定性,增加摄取效率并改善生物活性。

[0329] 在另一个实施例中,脂质体是由以与构成细胞膜的脂质相似的方式排列的脂质组成的空心球形囊泡。在另一个实施例中,它们具有用于包埋水溶性化合物的内部水性空间,其直径范围为0.05至几微米。在另一个实施例中,脂质体可以生物活性形式将RNA递送至细胞(参见Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat等人,在 *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer* (脂质体在传染病和癌症中的治疗)中, Lopez-Berestein和Fidler(编辑), Liss, New York, 第353-365页 (1989); Lopez-Berestein, 同上, 第317-327页; 基本参见同上)。

[0330] 每种类型的转染试剂代表本发明的单独实施例。

[0331] 在另一个实施例中,本发明的修饰的mRNA被包封在纳米颗粒中。用于纳米颗粒包装的方法在本领域中是众所周知的,并且在例如Bose S等人 (*Role of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection of Human Lung Epithelial Cells*. (核仁素在人肺上皮细胞的人副流感病毒3型感染中的作用) *J. Virol.* 78:8146.2004); Dong Y等人 (*Poly (d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs* (用于口服抗癌药物的聚(d,l-丙交酯-共-乙交酯)/蒙脱土纳米颗粒). *Biomaterials* 26:6068.2005); Lobenberg R.等人 (*Improved body distribution of 14C-labelled AZT bound to nanoparticles in rats determined by radio luminography* (通过放射照相术测定的与纳米颗粒结合的14C标记的AZT在大鼠中的改善的体内分布) *J Drug Target* 5:171.1998); Sakuma S R等人 (*Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastrointestinal tract* (具有表面亲水性聚合物链的聚苯乙烯纳米颗粒在胃肠道中的粘膜粘附) *Int J Pharm* 177:161.1999); Virovic L等人 (*Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis:an update* (治疗病毒性肝炎的新型递送方法:更新) *.Expert Opin Drug Deliv* 2:707.2005); 和Zimmermann E等人, (*Electrolyte-and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media* (在人工胃肠道介质中的水性固体脂质纳米颗粒 (SLN) 分散体的电解质和pH稳定性). *Eur J Pharm Biopharm* 52:203.2001)。每种方法代表本发明的单独实施例。

[0332] 在一个实施例中， $\Psi$  mRNA被包封在纳米颗粒中以改善 $\Psi$  mRNA的递送和表达效率。纳米颗粒包装涉及使用包括聚-L-赖氨酸和聚乙二醇的化学物质将RNA浓缩和包封成比核膜孔更小的颗粒。在一个实施例中，将RNA包装成四种纳米颗粒制剂(PEI、PLL、PAE和CK<sub>30</sub>PEG<sub>10k</sub>)中的一种。

[0333] 脂质纳米颗粒

[0334] 在一个实施例中，用于本发明的组合物和方法中的纳米颗粒包含脂质纳米颗粒，如Cullis, P., & Hope, M. (n.d.). *Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies* (用于基因治疗的脂质纳米颗粒系统). *Molecular therapy.*, 25 (7) 所述，其通过引用全文并入文中。

[0335] 在一个实施例中，核苷修饰的RNA的递送包括任何合适的递送方法，包括本文其他地方描述的示例性RNA转染方法。在某些实施例中，将核苷修饰的RNA递送至受试者包括在接触步骤之前将核苷修饰的RNA与转染试剂混合。在另一个实施例中，本发明的方法还包括将核苷修饰的RNA与转染试剂一起施用。在另一个实施例中，转染试剂是阳离子脂质试剂。

[0336] 在另一个实施例中，转染试剂是基于脂质的转染试剂。在另一个实施例中，转染试剂是基于蛋白质的转染试剂。在另一个实施例中，转染试剂是基于聚乙烯亚胺的转染试剂。在另一个实施例中，转染试剂是磷酸钙。在另一个实施例中，转染试剂是Lipofectin®、Lipofectamine®、或TransIT®。在另一个实施例中，转染试剂是本领域已知的任何其他转染试剂。

[0337] 在另一个实施例中，转染试剂形成脂质体。

[0338] 在另一个实施例中，脂质体增加细胞内稳定性，增加摄取效率并改善生物活性。在另一个实施例中，脂质体是由以与构成细胞膜的脂质相似的方式排列的脂质组成的空心球形囊泡。在另一个实施例中，它们具有用于包埋水溶性化合物的内部水性空间，其直径范围为0.05至几微米。在另一个实施例中，脂质体可以生物活性形式将RNA递送至细胞。

[0339] 在一个实施例中，组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)和本文所述的一种或多种核酸分子。例如，在一个实施例中，组合物包含LNP和编码一种或多种抗原的一种或多种核苷修饰的RNA分子、佐剂或其组合。

[0340] 术语“脂质纳米颗粒”是指至少一个尺寸为纳米量级(例如，1-1,000nm)的颗粒，其包括一种或多种脂质，例如式(I)，(II)或(III)的脂质，如W02016176330A1中所述，其通过引用整体并入本文。

[0341] 在一些实施例中，脂质纳米颗粒包含在制剂中，所述制剂包含如本文所述的核苷修饰的RNA。在一些实施例中，此类脂质纳米颗粒包含阳离子脂质和一种或多种选自中性脂质、带电脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质(例如，聚乙二醇化脂质，例如结构(IV)的聚乙二醇化脂质，例如化合物IVa)的赋形剂。在一些实施例中，核苷修饰的RNA被包封在脂质纳米颗粒的脂质部分或被脂质纳米颗粒的一些或全部脂质部分包围的水性空间中，从而保护其免受酶促降解或由宿主生物或细胞的机制诱导的其他不期望的作用，例如不良的免疫应答。

[0342] 在各种实施例中，脂质纳米颗粒的平均直径为约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、或约

30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm,并且基本上是无毒的。在某些实施例中,当存在于脂质纳米颗粒中时,核苷修饰的RNA在水溶液中对核酸酶的降解具有抗性。

[0343] LNP可以包含能够形成一种或多种核酸分子附着于其上或一种或多种核酸分子封装于其中的颗粒的任何脂质。术语“脂质”是指一组有机化合物,其是脂肪酸的衍生物(例如酯),并且通常以不溶于水但可溶于许多有机溶剂为特征。脂质通常分为至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪、油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;和(3)“衍生脂质”例如类固醇。

[0344] 在一个实施例中,LNP包含一种或多种阳离子脂质和一种或多种稳定脂质。稳定脂质包括中性脂质和聚乙二醇化脂质。

[0345] 在一个实施例中,LNP包含阳离子脂质。如本文所用,术语“阳离子脂质”是指这样的脂质,其为阳离子的或当pH降低到脂质的可电离基团的pK以下时变为阳离子的(质子化的),但是在较高的pH值下逐渐更中性。在低于pK的pH值下,脂质能够与带负电荷的核酸缔合。在某些实施例中,阳离子脂质包含两性离子脂质,其在pH降低时呈现正电荷。

[0346] 在某些实施例中,阳离子脂质包括在选择性pH例如生理pH下带有净正电荷的多种脂质物质中的任一种。这样的脂质包括但不限于N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);N-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB);N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Choi)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、双十八烷基酰胺基甘氨酸羧基精胺(DOGS)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)和N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。另外,可获得许多可用于本发明的阳离子脂质的商业制剂。这些包括,例如LIPOFECTIN®(可商购的阳离子脂质体包含DOTMA和1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE),来自GIBCO/BRL,纽约州格兰德岛);LIPOFECTAMINE®(可商购的阳离子脂质体包含N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)和(DOPE),来自GIBCO/BRL);和TRANSFECTAM®(可商购的阳离子脂质体包含在乙醇中的双十八烷基酰胺基甘氨酸羧基精胺(DOGS),来自威斯康星州麦迪逊市的Promega Corp.)。以下脂质为阳离子型并在低于生理pH值的情况下具有正电荷:

[0347] DODAP、DODMA、DMDMA、1,2-二亚油醇基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻醇基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)。

[0348] 在一个实施例中,阳离子脂质是氨基脂质。可用于本发明的合适的氨基脂质包括WO 2012/016184中描述的那些,其通过引用整体并入本文。代表性的氨基脂质包括但不限于:1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油醇基硫代-3-甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰

基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐 (DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷 (DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇 (DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇 (DOAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷 (DLin-EG-DMA) 和2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-DMA)。

[0349] 在某些实施例中,阳离子脂质在LNP中的存在量为约30至约95摩尔%。在一个实施例中,阳离子脂质在LNP中的存在量为约30至约70摩尔%。在一个实施例中,阳离子脂质在LNP中的存在量为约40至约60摩尔%。在一个实施例中,阳离子脂质在LNP中的存在量为约50摩尔%。在一个实施例中,LNP仅包含阳离子脂质。在某些实施例中,LNP包含一种或多种另外的脂质,其在颗粒形成期间稳定颗粒的形成。

[0350] 合适的稳定脂质包括中性脂质和阴离子脂质。

[0351] 术语“中性脂质”是指在生理pH下以不带电或中性两性离子形式存在的多种脂质物质中的任一种。

[0352] 代表性的中性脂质包括二酰基磷脂酰胆碱系、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂和脑苷脂。

[0353] 示例性的中性脂质包括,例如二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二油酰磷脂酰甘油 (DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE) 和二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯 (DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、16-0-单甲基-PE、16-0-二甲基-PE、18-1-反式-PE、1-硬脂酰-2-油酰磷脂酰乙醇胺 (SOPE) 和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (反式DOPE)。在一个实施例中,中性脂质是1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DSPC)。

[0354] 在一些实施例中,LNP包含选自DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM的中性脂质。在各种实施例中,阳离子脂质(例如式(I)的脂质)与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

[0355] 在各种实施例中,LNP还包含类固醇或类固醇类似物。

[0356] 在某些实施例中,类固醇或类固醇类似物是胆固醇。在这些实施例的一些中,阳离子脂质(例如式(I)的脂质)与胆固醇的摩尔比为约2:1至1:1。

[0357] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG) 和其它与中性脂质连接的阴离子修饰基团。

[0358] 在某些实施例中,LNP包含糖脂(例如,单唾液酸神经节苷脂GM1)。在某些实施例中,LNP包含甾醇,例如胆固醇。

[0359] 在一些实施例中,LNP包含聚合物缀合的脂质。术语“聚合物缀合的脂质”是指包含脂质部分和聚合物部分的分子。聚合物缀合的脂质的实例是聚乙二醇化脂质。术语“聚乙二醇化脂质”是指包含脂质部分和聚乙二醇部分的分子。聚乙二醇化脂质在本领域中是已知的,并且包括1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油 (PEG-s-DMG) 等。

[0360] 在某些实施例中,LNP包含另外的稳定脂质,其为聚乙二醇-脂质(聚乙二醇化脂

质)。合适的聚乙二醇脂质包括PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺(例如PEG-CerC14或PEG-CerC20)、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油。

[0361] 代表性的聚乙二醇脂质包括PEG-c-DOMG、PEG-c-DMA和PEG-s-DMG。在一个实施例中,聚乙二醇脂质为N-[(甲氧基聚(乙二醇)<sub>2000</sub>)氨基酰基]-1,2-二肉豆蔻氧基丙-3-胺(PEG-c-DMA)。在一个实施例中,聚乙二醇脂质是PEG-c-DOMG)。在其他实施例中,LNP包括聚乙二醇化二酰基甘油(PEG-DAG),例如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEG-S-DAG),例如4-0-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基)-1-0-(共甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG)、聚乙二醇化神经酰胺(PEG-cer)、或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯,例如Q-甲氧基(聚乙氧基)乙基-N-(2,3-二(十四烷氧基)丙基)氨基甲酸酯或2,3-二(十四烷氧基)丙基-N-(共-甲氧基(聚乙氧基)乙基)氨基甲酸酯。在各种实施例中,阳离子脂质与聚乙二醇化脂质的摩尔比为约100:1至约25:1。

[0362] 在某些实施例中,另外的脂质在LNP中的存在量为约1至约10摩尔%。在一个实施例中,另外的脂质在LNP中的存在量为约1至约5摩尔%。在一个实施例中,另外的脂质在LNP中的存在量为约1至约1.5摩尔%。

[0363] 在某些实施例中,LNP包含一个或多个能够将LNP靶向细胞或细胞群体的靶向部分。例如,在一个实施例中,靶向部分是将LNP引导至细胞表面上发现的受体的配体。

[0364] 在某些实施例中,LNP包含一个或多个内化结构域。例如,在一个实施例中,LNP包含一个或多个与细胞结合以诱导LNP内化的结构域。例如,在一个实施例中,一个或多个内化结构域与细胞表面上发现的受体结合以诱导受体介导的LNP摄取。在某些实施例中,LNP能够在体内结合生物分子,其中LNP结合的生物分子然后可以被细胞表面受体识别以诱导内化。例如,在一个实施例中,LNP结合全身性ApoE,这导致LNP和相关货物的摄取。

[0365] 其他示例性LNP及其制造描述于本领域中,例如,WO2016176330A1、美国专利申请公布号US20120276209、Semple等人,2010,Nat Biotechnol.,28(2):172-176;Akinc等人,2010,Mol Ther.,18(7):1357-1364;Basha等人,2011,Mol Ther,19(12):2186-2200;Leung等人,2012,J Phys Chem C Nanomater Interfaces,116(34):18440-18450;Lee等人,2012,Int J Cancer.,131(5):E781-90;Belliveau等人,2012,Mol Ther nucleic Acids,1:e37;Jayaraman等人,2012,Angew Chem Int Ed Engl.,51(34):8529-8533;Mui等人,2013,Mol Ther Nucleic Acids,2,e139;Maier等人,2013,Mol Ther.,21(8):1570-1578;和Tarn等人,2013,Nanomedicine,9(5):665-74,其每一个均通过引用整体并入本文。

[0366] 在另一个实施例中,本发明的方法包括施用编码HSV糖蛋白的修饰的mRNA和药学上可接受的载体或稀释剂。在其他实施例中,用于液体制剂的药学上可接受的载体可以是水性或非水性溶液、悬浮液、乳液或油。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。油的实例是石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、橄榄油、葵花油和鱼肝油。

[0367] 如本文所用,“药学上可接受的载体或稀释剂”是本领域技术人员众所周知的。

[0368] 在另一个实施例中,本文提供的药物组合物是控释组合物,即其中化合物在施用

后的一段时间内释放的组合物。控释或缓释组合物包括在亲脂性贮库(例如脂肪酸、蜡、油)中的制剂。在另一个实施例中,组合物是速释组合物,即在施用后立即释放整个化合物的组合物。

[0369] 每种添加剂、赋形剂、制剂和施用方法代表本发明的单独实施例。

[0370] 在另一个实施例中,本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包含用于执行本发明的方法的试剂。在另一个实施例中,本发明提供了一种试剂盒,其包含本发明的组合物、工具或仪器。

[0371] 给出以下实例以更充分地说明本发明的优选实施例。但是,它们绝不应被解释为限制本发明的广泛范围。

[0372] 实验细节部分

[0373] 实例1:材料和实验方法

[0374] 表达HSV-2糖蛋白C、D和E(gC2/gD2/gE2)胞外结构域的修饰的mRNA。基于编码来自HSV-2株333的HSV-2糖蛋白C(gC2)氨基酸27-426(SEQ ID NO:11)、来自HSV-2株333的HSV-2糖蛋白D(gD2)氨基酸26-331(SEQ ID NO:5),和来自HSV-2株2.12的HSV-2糖蛋白C(gE2)氨基酸24-405(SEQ ID NO:17)的DNA编码序列来制备修饰的mRNA(编码gC2(SEQ ID NO:10)、编码gD2(SEQ ID NO:4)、和编码gE2(SEQ ID NO:16))。

[0375] 通过Acuitas Therapeutics将修饰的mRNA掺入脂质体纳米颗粒(LNP)中以制备以下免疫原:(a)LNP中的聚C mRNA;(b)LNP中的gC2修饰的mRNA;(c)LNP中的gD2修饰的mRNA;(d)LNP中的gE2修饰的mRNA;(e)LNP中的gC2&gD2&gE2修饰的mRNA。

[0376] 免疫接种组如下:

[0377] a)对照(聚C组):将10 $\mu$ g聚C mRNA/LNP分为4等分试样,并在4个单独部位施用。

[0378] b)单独的gD2(gD2组):将10 $\mu$ g gD2 mRNA/LNP分为4等分试样,并在4个单独部位施用。

[0379] c)单独的三价(三价-I组):将10 $\mu$ g gC2 mRNA/LNP,10 $\mu$ g gD2 mRNA/LNP,10 $\mu$ g gE2 mRNA/LNP分别分为2等分试样,并分别在2个部位施用。

[0380] d)结合的三价(三价-C组):将10 $\mu$ g gC2 mRNA和10 $\mu$ g gD2 mRNA&10 $\mu$ g gE2 mRNA合并成LNP,分为4等分试样,并在4个部位施用。

[0381] 实验步骤。使用电动剃刀和Nair从6-8周龄大的BALB/c小鼠的背部脱毛。在第一次和第二次免疫接种之前以及在阴道内攻击之前将小鼠放血。每隔28天在皮内进行两次免疫接种。对裸露的背部进行皮内免疫接种。在第二次免疫接种后14天处死五只在各个部位接受三价疫苗的小鼠(上述c组)。收获脾脏,以得到针对gC2、gD2和gE2亚基抗原或15个各自具有11个重叠氨基酸的氨基酸肽的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞应答。第二次免疫接种后28天,用2mg Depo-Provera皮下处理小鼠,并在5天后用5 $\times$ 10<sup>3</sup>PFU HSV-2株MS(约400LD<sub>50</sub>)阴道内感染。攻击后第2天和第4天,获得阴道拭子用于病毒培养。攻击后第4天,处死每个疫苗组中的一些小鼠,并切除背根神经节(DRG)进行HSV-2 DNA qPCR。评估剩余的动物的体重减轻和后肢无力10天,同时监测存活和生殖器疾病28天。

[0382] 实例2:由gC2、gP2和gE2修饰的MRNA产生的翻译产物的表征

[0383] 证实了修饰的mRNA在转染到哺乳动物细胞中时表达具有预期分子量的蛋白质的能力。使用TransIT-mRNA(Mirus Bio LLC)将0.1 $\mu$ g gC2-、gD2-或gE2-修饰的mRNA转染到

293T细胞中以进行转染。十八小时后,收获细胞并制备提取物以进行蛋白质印迹。mRNA被设计为表达gC2、gD2和gE2的异位主体(标记的mRNA-ecto)。作为预期分子量的对照,使用表达与mRNA构建体(标记的Bac-ecto)相同的氨基酸的纯化的杆状病毒蛋白gC2、gD2和gE2(图1A-C)。

[0384] 结论:当转染到哺乳动物细胞中时,编码HSV-2 gC2(图1A),gD2(图1B)和gE2(图1C)的胞外结构域的修饰的mRNA产生具有适当分子量的蛋白质,该蛋白质与针对蛋白质印迹上的糖蛋白的抗体反应。

[0385] 实例3:免疫接种gD2或三价修饰的mRNA疫苗的受试者的ELISA抗体应答

[0386] 对在第一次和第二次免疫接种后28天获取的血清评估ELISA终点效价。免疫接种组如下:聚C(将10 $\mu$ g聚C mRNA/LNP分为4等分试样,并在4个单独部位施用)(对照);gD2(将10 $\mu$ g gD2 mRNA/LNP分为4等分试样,并在4个单独部位施用);三价-I(将10 $\mu$ g gC2 mRNA/LNP,10 $\mu$ g gD2 mRNA/LNP,10 $\mu$ g gE2mRNA/LNP分别分为2等分试样,并分别在2个部位施用);和三价-C(将10 $\mu$ g gC2 mRNA和10 $\mu$ g gD2 mRNA和10 $\mu$ g gE2 mRNA合并成LNP,分为4等分试样,并在4个部位施用)。

[0387] 评估每组四只动物。在第一次免疫接种后获得对每种免疫原的高ELISA效价(标记为罗马数字I;图2A-C),在第二次免疫接种后效价增加甚至更高(标记为罗马数字II;图2A-C)。用gD2修饰的mRNA疫苗免疫接种选择性诱导了针对gD2的ELISA抗体的极高效价(图2B),而用三价修饰的mRNA疫苗免疫接种则诱导了针对gC2(图2A)和gD2(图2B)的ELISA抗体的极高效价并针对gE2获得高效价(图2C)。在所有非对照组中,与第一次免疫接种相比,第二次免疫接种显著提高了ELISA效价。第二次免疫接种与第一次免疫接种的效价之间的差异是显著的, $p < 0.05$ (t检验,比较第一次免疫接种和第二次免疫接种后的抗体效价)。

[0388] 结论:第一次免疫接种后,gD2 mRNA和gC2、gD2和gE2 mRNA免疫原诱导了ELISA抗体的极高效价,这在第二次免疫接种后明显提高。

[0389] 实例4:通过修饰的mRNA免疫接种产生平衡的 $T_H1$ 和 $T_H2$  IgG同种型

[0390] 通过确定是否产生IgG1( $T_H2$ )或IgG2a( $T_H1$ )抗体来测试mRNA免疫接种主要刺激 $T_H1$ 或 $T_H2$ 免疫应答的能力。在包被有所有三种抗原gC2、gD2和gE2的平板上进行ELISA。将第一次或第二次免疫接种后获得的血清添加到抗原包被的平板中,并使用HRP抗小鼠IgG1或IgG2a检测IgG1或IgG2a。用gD2和三价修饰的mRNA疫苗免疫接种后,IgG1(图3A)和IgG2a(图3B)效价显著提高。此外,与第一次相比,第二次修饰的mRNA免疫接种后的IgG1(图3A)或IgG2a(图3B)效价显著更高, $p < 0.05$ (t检验)。

[0391] 结论:结果表明针对IgG1和IgG2a同种型产生了高效价的抗体,这表明对用修饰的gC2、gD2和gE2 mRNA免疫接种的平衡的 $T_H1$ 和 $T_H2$ 应答。

[0392] 实例5:修饰的mRNA免疫接种后高中和抗体效价

[0393] 在第二次免疫接种后28天获得血清,并使用连续2倍的血清稀释液测定中和抗体效价,所述稀释液从1:25稀释度开始且10%人血清作为补体来源。人血清从HSV-1和HSV-2呈血清阴性的个体获得。修饰的mRNA组各自均与聚C对照显著不同( $p < 0.001$ ;图4)。尽管每个mRNA组之间没有显著差异,但以组合免疫原使用的三价疫苗(三价-C)在三个mRNA组中表现最好(图4)。

[0394] 结论:在10%人补体存在下,每个修饰的mRNA组均产生极高效价的中和抗体。

[0395] 实例6:修饰的mRNA免疫接种后脾细胞中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞应答

[0396] 在第二次免疫接种后14天,对来自在单独部位用每种糖蛋白mRNA免疫接种的三价修饰的mRNA组的五只动物(三价-I组)进行安乐死。制备脾细胞用于T细胞测定。用在杆状病毒中制备的糖蛋白亚基抗原或包含11个重叠氨基酸的15个氨基酸肽刺激脾细胞。CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞应答分别显示在图5和6中。

[0397] CD4<sup>+</sup>T细胞:修饰的mRNA表达的gC2、gD2和gE2亚基抗原各自刺激多功能CD4<sup>+</sup>T细胞应答(图5A-5B)。从免疫接种的受试者收获脾细胞,然后用亚基抗原糖蛋白刺激,增加了多功能CD4<sup>+</sup>T细胞应答(图5A)。从免疫接种的受试者收获脾细胞,然后用15个氨基酸重叠肽刺激,增加了多功能CD4<sup>+</sup>T细胞应答和IFN  $\gamma$  应答(图5B)。CD8<sup>+</sup>T细胞:仅gE肽库2刺激了显著的IFN  $\gamma$  CD8<sup>+</sup>T细胞应答(图6B)。

[0398] 实例7:修饰的mRNA免疫接种和阴道内攻击后的存活、体重减轻和神经学体征

[0399] 第二次免疫接种后三十三天,用 $5 \times 10^3$ PFU的HSV-2株MS(约400LD<sub>50</sub>)在阴道内给动物接种。每天观察动物的存活情况,包括后肢无力或麻痹和驼背步态的神经学体征以及体重减轻或增加。聚C对照组中的所有动物均死亡,而单独gD2,单独给予三价(标记的三价-I)或联合给予三价(标记的三价-C)中的所有动物均存活(图7A;将三个mRNA/LNP组与聚C对照进行比较,通过对数秩(Mantel-Cox)的 $p=0.002$ )。图7B表明以28天的间隔两次施用修饰的mRNA疫苗并用HSV-2进行阴道内攻击不会导致神经学体征或体重减轻。未施用疫苗且用HSV-2进行阴道内攻击的对照受试者显示出体重减轻和神经学体征。

[0400] 每个mRNA/LNP组显著优于对照组。用约400LD<sub>50</sub>的HSV-2进行阴道内攻击后,用修饰的mRNA免疫的所有小鼠均存活,并且没有体重减轻,神经系统疾病或生殖器病变的迹象。

[0401] 实例8:修饰的mRNA免疫接种和阴道内攻击后的HSV-2阴道效价

[0402] 在攻击后2天和4天,从每组10只动物获得阴道拭子,并培养有复制能力HSV-2病毒。结果示于图8中。聚C组中的9/10只动物在第2天(图8A)和第4天(图8B)具有阳性培养物,而gD2组为3/10,三价-I或三价C组为0/10(将三价组与单独的gD2进行比较,通过Fisher Exact检验的P值并不显著;将三价I或三价C与聚C进行比较 $p<0.001$ ;将单独的gD2与聚C进行比较 $p=0.02$ )。

[0403] 每个mRNA/LNP组明显优于聚C对照组。值得注意的是,攻击后第2天和第4天的阴道效价在用三价mRNA免疫的小鼠中是阴性的,无论是在单独的部位还是以联合免疫接种进行施用。将任意三价组与单独的gD2组进行比较未检测到显著差异,尽管两个三价组都优于单独的gD2组,因为gD2组中10只小鼠有3个从阴道拭子中分离出病毒。

[0404] 实例9:修饰的mRNA免疫接种和阴道内攻击后的生殖器疾病

[0405] 攻击后每天监测动物的生殖器疾病,持续28天。0分表示没有疾病,而肛门或生殖器孔周围的脱发,生殖器红斑,生殖器渗出液和生殖器组织坏死则各为1分(图9)。

[0406] gD2或三价mRNA/LNP组中没有动物发生生殖器疾病,这与聚C对照显著不同( $p<0.001$ ,通过Kruskal-Wallis检验进行单向ANOVA,然后进行Dunn多重比较以进行显著性分析)。

[0407] 实例10:修饰的mRNA免疫接种和阴道内攻击后背根神经节中的HSV-2 DNA

[0408] 在攻击后4天,将每组五只动物安乐死,三价联合组除外,其中将四只动物安乐死。收获背根神经节(DRG)用于通过qPCR进行HSV-2 DNA定量以检测Us9基因。聚C组中的所有五

只动物在DRG中均检测到HSV-2 DNA,而gD mRNA中2/5只动物,单独位点的三价mRNA中1/5以及在同一位点施用的三价mRNA中1/4对HSV-2 DNA呈阳性(图10;Mann-Whitney检验:gD2与聚C相比较, $p=0.03$ ;不同部位的三价与聚C相比较, $p<0.01$ ;同一部位的三价与聚C相比较, $p=0.14$ )。修饰的mRNA免疫组之间的差异不显著。

[0409] 结论:在用单独gD2或三价疫苗免疫的动物的75%至80%中,感染后第4天,背根神经节对HSV-2 DNA呈阴性。在不同部位的三价mRNA组和gD2 mRNA组显著优于聚C mRNA对照组,而一起施用所有糖蛋白的三价mRNA组与聚C组没有显著差异,这可能是由于三价联合组中的样品量较小。

[0410] 总结

[0411] 表达单独gD2或gC2、gD2和gE2的修饰的mRNA疫苗提供了针对HSV-2生殖器攻击的出色保护。基于攻击后第2天和第4天效价,以及在第4天在DRG中检测到的HSV-2 DNA的动物数量较少,这三种蛋白质的表达略胜于gD2。

[0412] 实例11:免疫小鼠中的T滤泡辅助(Tfh)细胞和生发中心B细胞应答

[0413] 使BALB/c雌性小鼠作为未处理的对照动物未被免疫,或用聚C mRNA-LNP或三价修饰的mRNA-LNP以28天间隔皮内免疫两次。聚C mRNA对照接受10 $\mu$ g分成4等份的聚C mRNA-LNP并在4个单独的部位施用。三价修饰的mRNA组接受10 $\mu$ g gC2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP和10 $\mu$ g gE2 mRNA-LNP,各分为2等份,各在2个部位施用。第二次免疫后两周,从每组5只动物中收获脾脏,并进行流式细胞术以检测T滤泡辅助(Tfh)细胞(图11A;\* $p<0.05$ )和生发中心B细胞应答(图11B;\* $p<0.05$ )。

[0414] 结论:三价mRNA-LNP疫苗诱导了有效的Tfh和生发中心B细胞应答,并且显著优于聚C对照免疫( $p<0.05$ )和未处理组( $p<0.05$ )的Tfh和生发中心B细胞应答。这些免疫应答表明三价修饰的mRNA-LNP疫苗将可能诱导持久的抗体应答。

[0415] 实例12:小鼠中对修饰的MRNA免疫接种的阴道IgG应答

[0416] 使BALB/c小鼠以28天间隔用10 $\mu$ g聚C mRNA-LNP,10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP或各10 $\mu$ g gC2、gD2、gE三价修饰的mRNA-LNP皮内免疫。以组合成LNP并分成4等份并在4个部位施用的10 $\mu$ g gC2 mRNA和10 $\mu$ g gD2 mRNA和10 $\mu$ g gE2 mRNA来将三价mRNA组合并施用。第二次免疫接种后一个月,将60 $\mu$ l培养基引入阴道腔并取回。通过ELISA在1:50稀释的阴道洗液下测定针对gC2(图12A)、gD2(图12B)和gE2(图12C)的IgG效价(图12A-C,聚C组中 $n=10$ 只小鼠,gD2 mRNA组中 $n=10$ ,三价mRNA组中 $n=25$ ; $***p<0.001$ ; $**p<0.01$ )。

[0417] 结论:三价mRNA对gC2(图12A)和gD2(图12B)产生了强烈的阴道IgG应答,对gE2产生了更适度的应答(图12C)。与用修饰的gD2 mRNA疫苗免疫的小鼠相比,用修饰的三价mRNA疫苗免疫的小鼠的gD2 ELISA效度更高(图12B)。

[0418] 实例13:小鼠中三价MRNA免疫接种产生的针对gC2的抗体阻断gC2上的免疫逃避结构域

[0419] 使BALB/c小鼠未被免疫作为非免疫IgG的来源,或用聚C mRNA-LNP或三价mRNA-LNP皮内免疫。聚C mRNA对照接受10 $\mu$ g分为4等份并在4个单独部位施用的聚C mRNA-LNP。gD2 mRNA组接受10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP,如针对聚C mRNA-LNP所述进行施用。三价修饰的mRNA组接受组合成一个LNP并分为4等份并在4个部位施用的10 $\mu$ g gC2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP和10 $\mu$ g gE2 mRNA-LNP。每组有10只小鼠。合并来自10只小鼠的血清,并纯化IgG。

评估了IgG在12 $\mu$ g/200 $\mu$ l下阻断补体成分C3b与gC2结合的能力。该阻断试验用于评估免疫接种产生的抗体是否阻断gC2的免疫逃逸特性。非免疫鼠IgG、来自聚C mRNA组的IgG和来自gD2 mRNA组的IgG均不能阻断gC2与C3b的结合。相反,来自三价mRNA免疫动物的IgG完全阻断了gC2和C3b之间的相互作用(图13,\*\*\*\*p<0.0001)。

[0420] 结论:三价mRNA疫苗产生的抗体可阻断gC2上的免疫逃避结构域,如阻断gC2与C3b之间的相互作用所确定的。

[0421] 实例14:修饰的mRNA免疫接种后HSV-2的较高接种效价下小鼠的阴道内感染

[0422] 使BALB/c小鼠(n=5)通过使用各自分成2等份并各自单独在2个部位施用的10 $\mu$ g gC2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gD2 mRNA-LNP、10 $\mu$ g gE2 mRNA-LNP的三价修饰的mRNA免疫。第二次免疫接种后一个月,用甲羟孕酮治疗小鼠,五天后,用5x10<sup>4</sup> PFU HSV-2株MS(2,000LD<sub>50</sub>)进行阴道内感染。跟踪动物28天,并在感染后2天和4天评估死亡、生殖器疾病、阴道病毒滴度以及感染后28天的背根神经节(DRG)HSV-2 DNA拷贝数。用三价mRNA-LNP疫苗免疫的小鼠没有死亡,出现生殖器疾病,在感染后2或4天检测到任何病毒或在DRG中检测到HSV-2 DNA(表1)。

[0423] 表1.用HSV-2株MS(2.000LD<sub>50</sub>)攻击的三价mRNA-LNP免疫小鼠

疾病参数	小鼠	%保护
死亡	0/5	100
生殖器疾病	0/5	100
第2天的阴道病毒滴度	0/5	100
第4天的阴道病毒滴度	0/5	100
DRG中的HSV-2 DNA拷贝数	0/5	100

[0425] 结论:小鼠被HSV-2感染,其剂量比本文所述的早期实验中使用的剂量高10倍(图7-10)。即使在这种更高滴度的攻击下,对小鼠的保护也仍然出色。我们在所有5只小鼠中实现了杀菌免疫力,如通过感染后第2天和第4天没有死亡、没有生殖器疾病、阴道病毒滴度呈阴性以及第28天腰骶部DRG中没有HSV-2 DNA所确定(表1)。

[0426] 实例15:小鼠中修饰的mRNA免疫接种的肌肉途径的评估

[0427] 使BALB/c小鼠用聚C mRNA-LNP作为对照(15/组)或用含有各10 $\mu$ g gC2,gD2和gE2 mRNA-LNP的三价mRNA(20/组)肌肉免疫。所有聚C对照动物在第12天死亡,而三价mRNA组中的所有动物存活(图14A)。在三价mRNA组中未发生体重减轻,而聚C对照动物体重减轻>15%(图14B)。聚C组出现广泛的生殖器疾病,而三价mRNA动物没有生殖器疾病(图14C)。在感染后7天与12天之间的安乐死时从九只聚C动物收获DRG,或在三价mRNA组中在第28天实验结束时收获。聚C组中所有动物在DRG中均检测到HSV-2 DNA,而三价mRNA组中对HSV-2 DNA不呈阳性(图14D)。在第2天(图14E)和第4天(图14F),聚C组中所有15只动物的阴道病毒培养物均呈阳性,而三价mRNA组中所有20只动物的培养物均呈阴性。聚C与三价组之间的差异是显著的,每个图均为p<0.001(图14A-14F)。

[0428] 结论:肌肉施用,三价修饰的mRNA-LNP在小鼠中提供出色的保护作用。当小鼠进行皮内免疫时,我们报道了上述相当发现。总体而言,我们现在已经评估了64只小鼠,它们用在10 $\mu$ g在皮内(图7-10)或肌肉(图14)施用的每种免疫原下的三价mRNA进行免疫。基于无死亡、无生殖器疾病、无体重减轻、第2天和第4天阴道滴度呈阴性以及DRG中HSV-2 DNA呈阴

性,我们在63/64 (98%) 小鼠中获得了杀菌免疫力。

[0429] 实例16:在BALB/c小鼠中用三价mRNA-LNP和三价亚基抗原CPG/明矾免疫接种的简要比较

[0430] 下表2中所示的结果代表了BALB/c小鼠中所有结果的总结,这些小鼠经皮内或肌肉内用含有各10 $\mu$ g gC2、gD2和gE2 mRNA-LNP的三价mRNA进行了免疫(总共研究了64只小鼠)。我们显示了与BALB/c小鼠中获得的结果的比较,这些BALB/c小鼠分别用5 $\mu$ g含有来自HSV-2株333的gC2氨基酸27-426的bac-gC2 (27-426t),含有来自HSV-1株333的gD2氨基酸26-331的bac-gD2 (306t) 和含有来自HSV-2株2.12的gE2氨基酸24-405的bac-gE2 (24-405t)。将gC2、gD2、gE2亚基抗原与150 $\mu$ g CpG和25 $\mu$ g明矾/每 $\mu$ g蛋白作为佐剂混合并肌肉内施用。将小鼠以28天间隔用三价mRNA-LNP免疫两次,并以14天间隔用亚基抗原免疫3次,正如我们在先前实验中所做的那样。将mRNA和亚基抗原实验同时进行。表2中总结的结果表明,三价mRNA-LNP疫苗在许多免疫应答参数方面比三价亚基抗原疫苗明显优越,并且最重要的是在疫苗效力方面。三价mRNA-LNP疫苗可在63/64 (98%) 的小鼠中实现杀菌免疫力,而在亚基抗原组中则为15/20 (75%)。

[0431] 表2. 在BALB/c小鼠中用三价mRNA-LNP或三价亚基抗原CpG/明矾免疫的比较。

比较	三价 mRNA	三价亚基抗原	P 值
血清 IgG ELISA			
gC2	1:256,000	1:32,000	p<0.001
gD2	1:512,000	1:128,000	p<0.01
gE2	1:64,000	1:16,000	p<0.05
阴道液 IgG ELISA OD 在 405 nm 下以 1:50 稀释度测试			
gC2	1.6 OD	0.6 OD	p<0.001
gD2	1.5 OD	1.0 OD	p<0.05
gE2	0.5 OD	0.25 OD	p<0.01
血清中和抗体			
针对 HSV-2	1:4,800	1:1,600	p<0.01
针对 HSV-1	1:6,400	1:4,000	p=NS*
阻断 C3b 与 gC2 结合	完全阻断	完全阻断	p=NS
CD4 <sup>+</sup> T 细胞应答	针对 gC2、gD2 和 gE2 显著应答	仅针对 gD2 显著应答	三价 mRNA 更有效
CD8 <sup>+</sup> T 细胞应答	针对 gE2 显著应答	无显著应答	三价 mRNA 更有效
实现杀菌免疫力 <sup>#</sup>	63/64(98%)小鼠	15/20(75%)小鼠	p<0.01

[0433] \*NS, 无显著性; <sup>#</sup>杀菌免疫力定义为无死亡、无生殖器疾病、无体重减轻和无亚临床感染的迹象, 如感染后第2天和第4天阴道培养物以及感染后第4天或第28天背根神经节中HSV-2 DNA所测量的。

[0434] 实例17: 豚鼠中三价mRNA-LNP疫苗的评价

[0435] 使Hartley品系雌性豚鼠未被免疫和未感染(未处理组, n=10), 以每月一次间隔用20 $\mu$ g聚C mRNA-LNP (n=10) 或用各20 $\mu$ g gC2、gD2、gE修饰的mRNA-LNP (n=10) 皮内免疫三次。最后一次免疫接种后一个月, 用5x10<sup>5</sup> PFU的HSV-2株MS (50LD<sub>50</sub>) 在阴道内感染聚C和三价mRNA组中的动物。观察动物的死亡, 在感染的急性期(第1-14天)的生殖器病变和在感染

的复发期(第15-60天)的生殖器病变。在聚C对照组中,在感染后7与20天之间有7/10只动物死亡或被人实施安乐死,而三价组中动物和未处理(未感染)动物没有死亡(图15A)。在感染的急性期,聚C组的生殖器病变为平均6.4天,有9/10只动物出现急性生殖器疾病,而三价组或未处理(未感染)组中没有动物出现急性生殖器疾病(图15B)。在感染的复发期(第15-60天),聚C动物的生殖器病变为平均3.7天,有2/3只动物出现了复发性生殖器病变(图15C)。相反,三价免疫的豚鼠和未处理的(未感染的)动物没有复发性生殖器病变(图15C)。

[0436] 结论:三价修饰的mRNA-LNP在豚鼠中对于急性和复发性生殖器病变提供了出色的保护。

[0437] 已经参考附图描述了本发明的优选实施例,应当理解,本发明不限于精确的实施例,并且本领域技术人员在不脱离所附权利要求所限定的本发明的范围或精神下可以在其中进行各种改变和变型。

[0438] 本文引用的所有专利文件和参考文献都通过引用结合到本文中,就好像已完全阐述一样。

## 序列表

<110> 宾夕法尼亚大学理事会

<120> 编码单纯疱疹病毒糖蛋白的修饰 mRNA 疫苗及其用途

<130> P-572137-PC

<150> 62/546,648

<151> 2017-08-17

<150> 62/701,019

<151> 2017-07-20

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1386

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> All uridine residues are 1-methyl-pseudouridine - encodes glycoprotein D from Herpes Simplex Virus-1

<400> 1

```

ggaauaaaag ucucaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucucaagcaa ucaagcauuc 60
uacuucuaau gcagcaauuu aaaucauuuc uuuuaaagca aaagcaauuu ucugaaaauu 120
uucaccauuu acgaacgaua gcaugcgcau gcagcugcug cugcugaucg ccugugcccu 180
ggcccuggug accaacucca aguacgcccu ggccgacgcc ucccugaaga uggccgaccc 240
caaccgcuuc cgcggcaagg accugcccgu gcuggaccag cugaccgacc cccccggcgu 300
gcgcccgcgug uaccacauc aggccggccu gcccgacccc uuccagcccc ccuccugccc 360
cauaccgug uacuacgccg ugcuggagcg cgccugccgc uccgugcugc ugaacgcccc 420
cuccgaggcc ccccagaucg ugcgcggcgc cuccgaggac gugcgcaagc agcccuacaa 480
ccugaccauc gccugguucc gcaugggagg caacugcgcc aucccauca ccgugaugga 540
guacaccgag ugcuccuaca acaaguccu gggcgccugc cccaucgca cccagccccg 600
cuggaacuac uacgacuccu ucuccgccgu guccgaggac aaccugggcu uccugaugca 660
cgcccccgcc uucgagaccg ccggcaccua ccugcgccug gugaagauca acgacuggac 720
cgagaucacc caguucaucc uggagcaccg cgccaagggc uccugcaagu acgcccugcc 780
ccugcgcauc cccccuccg ccugccuguc cccccaggcc uaccagcagg gcgugaccgu 840
ggacuuccauc ggcaugcugc cccgcuucau ccccagaaac cagcgcaccg uggccgugua 900
cucccugaag aucgcccggcu ggcacggccc caaggcccc uacaccucca ccugcugccc 960
ccccgagcug uccgagaccc ccaacgccac ccagcccag cuggcccccg aggacccccga 1020
ggacuuccgcc cugcuggagg accccguggg caccgugccc ccccagauc cccccaacug 1080
gcacaucccc uccauccagg acgccgccac cccuacuaa cuaguaguga cugacuagga 1140
ucugguuacc acuaaaccag ccucaagaac acccgaaugg agucucuaag cuacauaaua 1200

```

ccaacuuaca cuuacaaaau guuguccccc aaaauguagc cauucguauc ugcuccuaau 1260  
 aaaaagaaag uuucucaca uucuaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380  
 aaaaac 1386

<210> 2

<211> 306

<212> PRT

<213> Human alphaherpesvirus 1

<400> 2

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro  
                   20                    25                    30  
 Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe  
                   35                    40                    45  
 Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg  
                   50                    55                    60  
 Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr  
                   85                    90                    95  
 Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val  
                   100                    105                    110  
 Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro  
                   115                    120                    125  
 Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val  
                   130                    135                    140  
 Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr  
 145                    150                    155                    160  
 Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile  
                   165                    170                    175  
 Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala  
                   180                    185                    190  
 Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr  
                   195                    200                    205  
 Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile  
                   210                    215                    220  
 Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly  
 225                    230                    235                    240

Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu  
 245 250 255  
 Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro  
 275 280 285  
 Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr  
 290 295 300  
 Pro Tyr  
 305  
 <210> 3  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> Human alphaherpesvirus 1  
 <400> 3  
 Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val  
 1 5 10 15  
 Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Leu Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Arg Lys Asp Leu Pro  
 35 40 45  
 Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His  
 50 55 60  
 Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu 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  
 Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp  
 100 105 110  
 Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly  
 115 120 125  
 Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser  
 130 135 140  
 Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp  
 145 150 155 160  
 Asn 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 Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro  
 210 215 220  
 Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln 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 Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro  
 260 265 270  
 Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr Pro Asn Ala  
 275 280 285  
 Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Ala Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu  
 290 295 300  
 Glu Asp Pro Val Gly Thr Val Ala Pro Gln Ile Pro Pro Asn Trp His  
 305 310 315 320  
 Ile Pro Ser Ile Gln Asp Ala Ala Thr Pro Tyr His Pro Pro Ala Thr  
 325 330 335  
 Pro Asn Asn Met Gly Leu Ile Ala Gly Ala Val Gly Gly Ser Leu Leu  
 340 345 350  
 Ala Ala Leu Val Ile Cys Gly Ile Val Tyr Trp Met Arg Arg Arg Thr  
 355 360 365  
 Gln Lys Ala Pro Lys Arg Ile Arg Leu Pro His Ile Arg Glu Asp Asp  
 370 375 380  
 Gln Pro Ser Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr  
 385 390

<210> 4

<211> 1386

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> All uridine residues are 1-methyl-pseudouridine - encodes glycoprotein D from Herpes Simplex Virus-2

<400> 4

ggaauaaaag ucucaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucucaagcaa ucaagcauuc 60  
 uacuucuaau gcagcaauuu aaaucauuuc uuuuaaagca aaagcaauuu ucugaaaauu 120  
 uucaccauuu acgaacgaua gcaugacccg ccugaccgug cuggcccugc uggccggccu 180  
 gcuggccucc ucccgcgcca aguacgcccu ggccgacccc ucccugaaga uggccgaccc 240  
 caaccgcuuc cgcggcaaga accugcccgu gcuggaccag cugaccgacc cccccggcgu 300

gaagcgcgug uaccacaucc agcccucccu ggaggacccc uuccagcccc ccuccauccc 360  
 caucaccgug uacuacgccg ugcuggagcg cgcugccgc uccgugcugc ugcacgcccc 420  
 cuccgaggcc ccccagaucg ugcgcggcgc cuccgacgag gcccgcaagc acaccuacaa 480  
 ccugaccauc gccugguacc gcaugggcca caacugcgc aucccauca ccgugaugga 540  
 guacaccgag ugccccuaca acaagucccu gggcgugugc cccaucgca cccagccccg 600  
 cugguccuac uacgacuccu ucuccgccgu guccgaggac aaccugggcu uccugaugca 660  
 cgccccgcc uucgagaccg ccggcaccua ccugcgcug gugaagauca acgacuggac 720  
 cgagaucaucc caguucaucc uggagcaccg cgcccgcgc uccugcaagu acgccugcc 780  
 ccugcgauc cccccgccg ccugccugac cuccaaggcc uaccagcagg gcgugaccgu 840  
 ggacuuccauc ggcaugcugc cccgcuucau ccccgagaac cagcgcaccg uggcccugua 900  
 cucccugaag aucgccggu ggcacggccc caagcccc uacaccucca cccugcugcc 960  
 ccccgagcug uccgacacca ccaacgccac ccagcccag cuggugcccg aggaccccga 1020  
 ggacuuccgug cugcuggagg accccgccg caccgugucc ucccagauc ccccaacug 1080  
 gcacaucucc uccauccagg acguggcccc ccaccacuaa cuaguaguga cugacuagga 1140  
 ucugguuacc acuaaaccag ccucaagaac acccgaaugg agucucuaag cuacuaaau 1200  
 ccaacuuaa cuuacaaaau guugucuccc aaaauguagc cauucguauc ugcuccuaau 1260  
 aaaaagaaag uuucucaca uucuaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380  
 aaaaac 1386

<210> 5

<211> 306

<212> PRT

<213> Human alphaherpesvirus 2

<400> 5

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Pro Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Phe Arg Gly Lys Asn Leu Pro Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro  
                   20                    25                    30  
 Gly Val Lys Arg Val Tyr His Ile Gln Pro Ser Leu Glu Asp Pro Phe  
                   35                    40                    45  
 Gln Pro Pro Ser Ile Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg  
                   50                    55                    60  
 Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu His Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Val Arg Gly Ala Ser Asp Glu Ala Arg Lys His Thr Tyr Asn Leu Thr  
                   85                    90                    95  
 Ile Ala Trp Tyr Arg Met Gly Asp Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val  
                   100                    105                    110  
 Met Glu Tyr Thr Glu Cys Pro Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro

115	120	125
Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val		
130	135	140
Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr		
145	150	155
Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile		
165	170	175
Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Arg Ala Ser Cys Lys Tyr Ala		
180	185	190
Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ala Ala Cys Leu Thr Ser Lys Ala Tyr		
195	200	205
Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile		
210	215	220
Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly		
225	230	235
Trp His Gly Pro Lys Pro Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu		
245	250	255
Leu Ser Asp Thr Thr Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Val Pro Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Ala Gly Thr Val Ser Ser		
275	280	285
Gln Ile Pro Pro Asn Trp His Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val Ala Pro		
290	295	300
His His		
305		
<210> 6		
<211> 393		
<212> PRT		
<213> Human alphaherpesvirus 2		
<400> 6		
Met Gly Arg Leu Thr Ser Gly Val Gly Thr Ala Ala Leu Leu Val Val		
1	5	10
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 Ala			
	370	375	380

Pro Pro Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr

385

390

<210> 7

<211> 1779

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> All uridine residues are 1-methyl-pseudouridine - encodes glycoprotein C from Herpes Simplex Virus-1

<400> 7

```

ggaauaaaaag ucucaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucucaagcaa ucaagcauuc 60
uacuucuaauu gcagcaauuu aaaucauuuc uuuuaaagca aaagcaauuu ucugaaaauu 120
uucaccauuu acgaacgaua gcauggccau cuccggcgug cccgugcugg gcuucuucuu 180
caucgccgug cugauguccg cccaggaguc cugggccgag accgccucca cgggccccac 240
caucaccgcc ggcgccguga ccaacgccuc cgaggcccc accuccggcu cccccggcuc 300
cgccgccucc cccgagguga cccccaccuc ccccccaac cccaacaacg ugaccagaa 360
caagaccacc cccaccgagc ccgccucucc ccccaccacc cccaagccca ccuccacccc 420
caagucuccc cccaccucca cccccgacc caagcccaag aacaacacca cccccgcaa 480
guccggccgc cccaccaagc cccccggccc cguguggugc gaccgccgcg acccccuggc 540
ccgcuacggc ucccgcgugc agauccgcug ccgcuuccgc aacuccacc gcauggaguu 600
ccgccugcag aucuggcgcu acuccauggg cccucuccc cccaucgcc ccgccccga 660
ccuggaggag gugcugacca acaucaccgc ccccccgcc gccugcugg uguacgacuc 720
cgcccccaac cugaccgacc cccacgugcu gugggccgag ggcgccggcc ccggcgccga 780
ccccccccug uacuccguga ccggccccu gccaccag cgccugauca ucggcgaggu 840
gacccccgcc acccagggca uguacuaccu ggccuggggc cgcauggacu cccccacga 900
guacggcacc ugggugcgcg ugcgcauguu ccgcccccc uccugacc ugcagccca 960
cgccgugaug gagggccagc ccuucaggc caccugcacc gccgccccu acuacccccg 1020
caacccccgug gaguucgacu gguucgagga cgaccgccag guguucaacc ccggccagau 1080
cgacaccag acccagagc accccagcg cuuaccacc guguccaccg ugaccuccga 1140
ggccgugggc gccaggugc cccccgcac cuuaccugc cagaugaccu ggcaccgca 1200
cuccgugacc uucuccgcc gcaacgccac cggccuggcc cuggugcugc cccgccccac 1260
caucaccaug gaguucggcg ugcgccacgu ggugugcacc gccggcugcg ugcccagg 1320
cgugaccuuc gccugguucc ugggcgacga cccucuccc gccgccaagu ccgccgugac 1380
cgcccaggag uccugcgacc accccggccu ggccaccgug cgcuccacc ugcccacuc 1440
cuacgacuac uccgaguaca ucugccgccu gaccggcuac cccgccgca uccccgugcu 1500
ggagcaccac uaacuaguag ugacugacua ggaucgguu accacuaaac cagccucaag 1560
aacacccgaa uggagucucu aagcuacaua auaccaacu acacuacaa aauguugucc 1620
cccaaaaugu agccauucgu aucugcuccu aauaaaaaga aaguucuu acauucuaaa 1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740

```





100	105	110
Ala Lys Ser Gly Arg Pro Thr Lys Pro Pro Gly Pro Val Trp Cys Asp		
115	120	125
Arg Arg Asp Pro Leu Ala Arg Tyr Gly Ser Arg Val Gln Ile Arg Cys		
130	135	140
Arg Phe Arg Asn Ser Thr Arg Met Glu Phe Arg Leu Gln Ile Trp Arg		
145	150	155
Tyr Ser Met Gly Pro Ser Pro Pro Ile Ala Pro Ala Pro Asp Leu Glu		
165	170	175
Glu Val Leu Thr Asn Ile Thr Ala Pro Pro Gly Gly Leu Leu Val Tyr		
180	185	190
Asp Ser Ala Pro Asn Leu Thr Asp Pro His Val Leu Trp Ala Glu Gly		
195	200	205
Ala Gly Pro Gly Ala Asp Pro Pro Leu Tyr Ser Val Thr Gly Pro Leu		
210	215	220
Pro Thr Gln Arg Leu Ile Ile Gly Glu Val Thr Pro Ala Thr Gln Gly		
225	230	235
Met Tyr Tyr Leu Ala Trp Gly Arg Met Asp Ser Pro His Glu Tyr Gly		
245	250	255
Thr Trp Val Arg Val Arg Met Phe Arg Pro Pro Ser Leu Thr Leu Gln		
260	265	270
Pro His Ala Val Met Glu Gly Gln Pro Phe Lys Ala Thr Cys Thr Ala		
275	280	285
Ala Ala Tyr Tyr Pro Arg Asn Pro Val Glu Phe Asp Trp Phe Glu Asp		
290	295	300
Asp Arg Gln Val Phe Asn Pro Gly Gln Ile Asp Thr Gln Thr His Glu		
305	310	315
His Pro Asp Gly Phe Thr Thr Val Ser Thr Val Thr Ser Glu Ala Val		
325	330	335
Gly Gly Gln Val Pro Pro Arg Thr Phe Thr Cys Gln Met Thr Trp His		
340	345	350
Arg Asp Ser Val Thr Phe Ser Arg Arg Asn Ala Thr Gly Leu Ala Leu		
355	360	365
Val Leu Pro Arg Pro Thr Ile Thr Met Glu Phe Gly Val Arg His Val		
370	375	380
Val Cys Thr Ala Gly Cys Val Pro Glu Gly Val Thr Phe Ala Trp Phe		
385	390	395
Leu Gly Asp Asp Pro Ser Pro Ala Ala Lys Ser Ala Val Thr Ala Gln		
405	410	415

Glu Ser Cys Asp His Pro Gly Leu Ala Thr Val Arg Ser Thr Leu Pro  
                   420                                  425                                  430  
 Ile Ser Tyr Asp Tyr Ser Glu Tyr Ile Cys Arg Leu Thr Gly Tyr Pro  
                   435                                  440                                  445  
 Ala Gly Ile Pro Val Leu Glu His His Gly Ser His Gln Pro Pro Pro  
                   450                                  455                                  460  
 Arg Asp Pro Thr Glu Arg Gln Val Ile Glu Ala Ile Glu Trp Val Gly  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Ile Gly Ile Gly Val Leu Ala Ala Gly Val Leu Val Val Thr Ala Ile  
                                   485                                  490                                  495  
 Val Tyr Val Val Arg Thr Ser Gln Ser Arg Gln Arg His Arg Arg  
                                   500                                  505                                  510

<210> 10

<211> 1668

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> All uridine residues are 1-methyl-pseudouridine - encodes glycoprotein C from Herpes Simplex Virus-2

<400> 10

ggaauaaaag ucucaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucucaagcaa ucaagcauuc 60  
 uacuucuaau gcagcaauuu aaaucauuuc uuuuaagca aaagcaauuu ucugaaaauu 120  
 uucaccauuu acgaacgaua gcaugcgcau gcagcugcug cugcugaucg ccugugcccu 180  
 ggcccuggug accaacuccg ccucccccgg ccgcaccauc accgugggcc cccgcggcaa 240  
 cgccuccaac gccgcccccu ccgccucucc ccgcaacgcc uccgcccccc gcaccacccc 300  
 ccccccccc cagccccgca aggccaccaa guccaaggcc uccaccgcca agcccgcccc 360  
 ccccccaag accggcccc ccaagaccuc cuccgagccc gugcgcugca accgccacga 420  
 cccccuggcc cgcuaacggcu cccgcgugca gauccgcugc cgcuucccca acuccaccg 480  
 caccgaguuc cgccugcaga ucuggcgcua cgccaccgcc accgacgccg agaucggcac 540  
 cgccccucc cuggaggagg ugauggugaa cguguccgcc cccccggcg gccagcuggu 600  
 guacgacucc gcccccaacc gcaccgacc ccacgugauc ugggccgagg gcgccggccc 660  
 cggcgccucc ccccgccugu acuccguggu gggccccug ggccgccagc gccugaucau 720  
 cgaggagcug acccuggaga cccagggcgu guacuacugg guguggggcc gcaccgaccg 780  
 cccuccgcc uacggcaccu gggugcgcgu gcgcguguuc cgccccccu ccugaccuau 840  
 ccacccccac gccgugcugg agggccagcc cuucaaggcc accugcaccg ccgccaccua 900  
 cuacccccgc aaccgcgcc aguuugugug guucgaggac ggccgccgcg uguucgacc 960  
 cgcccagauc cacaccaga cccaggagaa ccccgacggc uucuccaccg uguccaccgu 1020  
 gaccuccgcc gccgugggcg gccagggcc cccccgacc uucaccugcc agcugaccug 1080  
 gcaccgcgac uccguguccu ucucccgcc caacgccucc ggcaccgccu ccgugcugcc 1140

ccgccccacc aucaccaugg aguucaccgg cgaccacgcc gugugcaccg ccggcugcgu 1200  
 gcccgagggc gugaccuucg ccugguuccu gggcgacgac uccucccccg ccgagaaggu 1260  
 ggccguggcc ucccagaccu ccugcggccg ccccggcacc gccaccaucc gcuccaccu 1320  
 gcccgugucc uacgagcaga ccgaguacau cugccgccug gccggcuacc ccgacggcau 1380  
 ccccgugcug gagcaccacu aacuaguagu gacugacuag gaucugguua ccacuaaacc 1440  
 agccucaaga acacccgaau ggagucucua agcuacauaa uaccaacuua cacuuacaaa 1500  
 auguugucc ccaaaaugua gccauucgua ucugcuccua auaaaaagaa aguuucuuca 1560  
 cauucuaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaac 1668

<210> 11

<211> 400

<212> PRT

<213> Human alphaherpesvirus 2

<400> 11

Ala	Ser	Pro	Gly	Arg	Thr	Ile	Thr	Val	Gly	Pro	Arg	Gly	Asn	Ala	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Pro	Arg	Asn	Ala	Ser	Ala	Pro	Arg	Thr
			20					25					30		
Thr	Pro	Thr	Pro	Pro	Gln	Pro	Arg	Lys	Ala	Thr	Lys	Ser	Lys	Ala	Ser
		35					40					45			
Thr	Ala	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Lys	Thr	Gly	Pro	Pro	Lys	Thr	Ser
		50					55				60				
Ser	Glu	Pro	Val	Arg	Cys	Asn	Arg	His	Asp	Pro	Leu	Ala	Arg	Tyr	Gly
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Gln	Ile	Arg	Cys	Arg	Phe	Pro	Asn	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu
					85					90					95
Ser	Arg	Leu	Gln	Ile	Trp	Arg	Tyr	Ala	Thr	Ala	Thr	Asp	Ala	Glu	Ile
			100						105					110	
Gly	Thr	Ala	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Met	Val	Asn	Val	Ser	Ala	Pro
			115						120				125		
Pro	Gly	Gly	Gln	Leu	Val	Tyr	Asp	Ser	Ala	Pro	Asn	Arg	Thr	Asp	Pro
			130					135					140		
His	Val	Ile	Trp	Ala	Glu	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Arg	Leu
145					150						155				160
Tyr	Ser	Val	Val	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	Gln	Arg	Leu	Ile	Ile	Glu	Glu
				165							170				175
Leu	Thr	Leu	Glu	Thr	Gln	Gly	Met	Tyr	Tyr	Trp	Val	Trp	Gly	Arg	Thr
				180							185				190
Asp	Arg	Pro	Ser	Ala	Tyr	Gly	Thr	Trp	Val	Arg	Val	Arg	Val	Phe	Arg

195	200	205
Pro Pro Ser Leu Thr Ile His	Pro His Ala Val Leu Glu Gly Gln Pro	
210	215	220
Phe Lys Ala Thr Cys Thr Ala Ala Thr Tyr Tyr Pro Gly Asn Arg Ala		
225	230	235
240		245
Glu Phe Val Trp Phe Glu Asp Gly Arg Arg Val Phe Asp Pro Ala Gln		
	245	250
255		260
Ile His Thr Gln Thr Gln Glu Asn Pro Asp Gly Phe Ser Thr Val Ser		
260	265	270
Thr Val Thr Ser Ala Ala Val Gly Gly Gln Gly Pro Pro Arg Thr Phe		
275	280	285
Thr Cys Gln Leu Thr Trp His Arg Asp Ser Val Ser Phe Ser Arg Arg		
290	295	300
Asn Ala Ser Gly Thr Ala Ser Val Leu Pro Arg Pro Thr Ile Thr Met		
305	310	315
320		325
Glu Phe Thr Gly Asp His Ala Val Cys Thr Ala Gly Cys Val Pro Glu		
	325	330
335		340
Gly Val Thr Phe Ala Trp Phe Leu Gly Asp Asp Ser Ser Pro Ala Glu		
	340	345
350		355
Lys Val Ala Val Ala Ser Gln Thr Ser Cys Gly Arg Pro Gly Thr Ala		
355	360	365
Thr Ile Arg Ser Thr Leu Pro Val Ser Tyr Glu Gln Thr Glu Tyr Ile		
370	375	380
Cys Arg Leu Ala Gly Tyr Pro Asp Gly Ile Pro Val Leu Glu His His		
385	390	395
400		
<210> 12		
<211> 480		
<212> PRT		
<213> Human alphaherpesvirus 2		
<400> 12		
Met Ala Leu Gly Arg Val Gly Leu Ala Val Gly Leu Trp Gly Leu Leu		
1	5	10
15		20
Trp Val Gly Val Val Val Val Leu Ala Asn Ala Ser Pro Gly Arg Thr		
	20	25
30		35
Ile Thr Val Gly Pro Arg Gly Asn Ala Ser Asn Ala Ala Pro Ser Ala		
	35	40
45		50
Ser Pro Arg Asn Ala Ser Ala Pro Arg Thr Thr Pro Thr Pro Pro Gln		
50	55	60
Pro Arg Lys Ala Thr Lys Ser Lys Ala Ser Thr Ala Lys Pro Ala Pro		

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



ggccuggcag gccgccuccg ugaaccugga guuccgcgac gccucceccc agcacuccgg 1200  
 ccuguaccug ugcguggugu acgugaacga ccacauccac gccuggggcc acaucaccau 1260  
 caacaccgcc gcccaguacc gcaacgccgu gguggagcag cccugcccc agcgcggcgc 1320  
 cgaccuggcc gagcccaccc acccccacgu gggcgccuaa cuaguaguga cugacuagga 1380  
 ucugguuacc acuaaaccag ccucaagaac acccgaaugg agucucuaag cuacauaaua 1440  
 ccaacuuaa cuuacaaaau guugucceccc aaaauaguagc cauucguauc ugcuccuaau 1500  
 aaaaagaaaag uuucuucaaa uucuaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620  
 aaaaac 1626

<210> 14

<211> 386

<212> PRT

<213> Human alphaherpesvirus 1

<400> 14

Lys Thr Ser Trp Arg Arg Val Ser Val Gly Glu Asp Val Ser Leu Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Ala Pro Gly Pro Thr Gly Arg Gly Pro Thr Gln Lys Leu Leu Trp  
                   20                    25                    30  
 Ala Val Glu Pro Leu Asp Gly Cys Gly Pro Leu His Pro Ser Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Leu Met Pro Pro Lys Gln Val Pro Glu Thr Val Val Asp Ala Ala  
                   50                    55                    60  
 Cys Met Arg Ala Pro Val Pro Leu Ala Met Ala Tyr Ala Pro Pro Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Pro Ser Ala Thr Gly Gly Leu Arg Thr Asp Phe Val Trp Gln Glu Arg  
                   85                    90                    95  
 Ala Ala Val Val Asn Arg Ser Leu Val Ile Tyr Gly Val Arg Glu Thr  
                   100                    105                    110  
 Asp Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ser Val Gly Asp Ile Lys Asp Pro Ala  
                   115                    120                    125  
 Arg Gln Val Ala Ser Val Val Leu Val Val Gln Pro Ala Pro Val Pro  
                   130                    135                    140  
 Thr Pro Pro Pro Thr Pro Ala Asp Tyr Asp Glu Asp Asp Asn Asp Glu  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Glu Gly Glu Asp Glu Ser Leu Ala Gly Thr Pro Ala Ser Gly Thr  
                   165                    170                    175  
 Pro Arg Leu Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Arg Ser Trp Pro Ser Ala  
                   180                    185                    190  
 Pro Glu Val Ser His Val Arg Gly Val Thr Val Arg Met Glu Thr Pro

195	200	205
Glu Ala Ile Leu Phe Ser Pro Gly	Glu Ala Phe Ser Thr Asn Val Ser	
210	215	220
Ile His Ala Ile Ala His Asp Asp Gln Thr Tyr Thr Met Asp Val Val		
225	230	235
240		245
Trp Leu Arg Phe Asp Val Pro Thr Ser Cys Ala Glu Met Arg Ile Tyr		
	245	250
		255
Glu Ser Cys Leu Tyr His Pro Gln Leu Pro Glu Cys Leu Ser Pro Ala		
	260	265
		270
Asp Ala Pro Cys Ala Ala Ser Thr Trp Thr Ser Arg Leu Ala Val Arg		
	275	280
		285
Ser Tyr Ala Gly Cys Ser Arg Thr Asn Pro Pro Pro Arg Cys Ser Ala		
	290	295
		300
Glu Ala His Met Glu Pro Phe Pro Gly Leu Ala Trp Gln Ala Ala Ser		
305	310	315
		320
Val Asn Leu Glu Phe Arg Asp Ala Ser Pro Gln His Ser Gly Leu Tyr		
	325	330
		335
Leu Cys Val Val Tyr Val Asn Asp His Ile His Ala Trp Gly His Ile		
	340	345
		350
Thr Ile Asn Thr Ala Ala Gln Tyr Arg Asn Ala Val Val Glu Gln Pro		
	355	360
		365
Leu Pro Gln Arg Gly Ala Asp Leu Ala Glu Pro Thr His Pro His Val		
	370	375
		380
Gly Ala		
385		
<210> 15		
<211> 552		
<212> PRT		
<213> Human alphaherpesvirus 1		
<400> 15		
Met Asp Arg Gly Ala Val Val Gly Phe Leu Leu Gly Val Cys Val Val		
1	5	10
		15
Ser Cys Leu Ala Gly Thr Pro Lys Thr Ser Trp Arg Arg Val Ser Val		
	20	25
		30
Gly Glu Asp Val Ser Leu Leu Pro Ala Pro Gly Pro Thr Gly Arg Gly		
	35	40
		45
Pro Thr Gln Lys Leu Leu Trp Ala Val Glu Pro Leu Asp Gly Cys Gly		
	50	55
		60
Pro Leu His Pro Ser Trp Val Ser Leu Met Pro Pro Lys Gln Val Pro		

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

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

<210> 16

<211> 1614

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> All uridine residues are 1-methyl-pseudouridine - encodes glycoprotein E from Herpes Simplex Virus-2

<400> 16

ggaauaaaag ucucaacaca acauauacaa aacaaacgaa ucucaagcaa ucaagcauuc 60  
 uacuucuaau gcagcaauuu aaaucauuuc uuuuaaagca aaagcaauuu ucugaaaauu 120  
 uucaccauuu acgaacgaua gcaugcgcau gcagcugcug cugcugaucg ccugucccu 180  
 ggcccuggug accaacucce gcaccuccug gaagcgcgug accuccggcg aggacugggu 240  
 gcugcugccc gccccgccc gccccgagga gcgcaccgc gccacaagc ugcugugggc 300  
 cgccgagccc cuggagccu gcggccccc gcgcccucc uggguggccc uguggcccc 360  
 ccgccgcgug cuggagaccg ugguggacgc cgccugcaug cgcgccccg agccccuggc 420  
 caucgccuac ucccccccu uccccgccg cgacgagggc cuguacuccg agcuggccug 480  
 gcgcgaccgc guggccgugg ugaacgaguc ccuggugauc uacggcgcgc uggagaccga 540

cuccggccug uacaccucgu ccgugguggg ccuguccgac gaggccccgcc agguggccuc 600  
 cguggugcug gugguggagc ccgcccccg gcccaccccc acccccgacg acuacgacga 660  
 ggaggacgac gccggcgugu ccgagcgcac ccccgugucc gugccccccc ccaccccccc 720  
 ccgcccggccc cccguggccc cccccacca cccccgcgug auccccgagg ugucccacgu 780  
 gcgcggcgug accgugcaca uggagacccc cgaggccauc cuguucgccc ccggcgagac 840  
 cuucggcacc aacgugucca uccacgccau cgcccacgac gacggccccc acgccaugga 900  
 cguggugugg augcgcuucg acgugcccuc cuccugcgcc gagaugcgca ucuacgaggc 960  
 cugccuguaac cccccccagc ugcccagagug ccuguccccc gccgacgccc ccugcgccgu 1020  
 guccuccugg gccuaccgcc uggccgugcg cuccuacgcc ggcugcuccc gcaccacccc 1080  
 cccccccgc ugcuuccgagc aggcccgcg gaggcccug cccggccugg ccuggcuggc 1140  
 cuccaccgug aaccuggagu uccagcacgc cuccccccag cacgccggcc uguaccugug 1200  
 cgugguguaac guggacgacc acauccacgc cuggggccac augaccaucu ccaccgccgc 1260  
 ccaguaccgc aacgccgugg uggagcagca ccugccccag cgccagcccg agcccgugga 1320  
 gccacccgc ccccacgugc gcgccuaacu aguagugacu gacuaggauc ugguuaccac 1380  
 uaaaccagcc ucaagaacac ccgaauggag ucucuaagcu acauaauacc aacuuacacu 1440  
 uacaaaauug ugucccccaa aauguagcca uucguaucug cuccuaauaa aaagaauguu 1500  
 ucuucacauu cuaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaac 1614

<210> 17

<211> 382

<212> PRT

<213> Human alphaherpesvirus 2

<400> 17

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

Ala Arg Gln Val Ala Ser Val Val Leu Val Val Glu Pro Ala Pro Val  
 130 135 140  
 Pro Thr Pro Thr Pro Asp Asp Tyr Asp Glu Glu Asp Asp Ala Gly Val  
 145 150 155 160  
 Ser Glu Arg Thr Pro Val Ser Val Pro Pro Pro Thr Pro Pro Arg Arg  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Ala Pro Pro Thr His Pro Arg Val Ile Pro Glu Val Ser  
 180 185 190  
 His Val Arg Gly Val Thr Val His Met Glu Thr Pro Glu Ala Ile Leu  
 195 200 205  
 Phe Ala Pro Gly Glu Thr Phe Gly Thr Asn Val Ser Ile His Ala Ile  
 210 215 220  
 Ala His Asp Asp Gly Pro Tyr Ala Met Asp Val Val Trp Met Arg Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Val Pro Ser Ser Cys Ala Glu Met Arg Ile Tyr Glu Ala Cys Leu  
 245 250 255  
 Tyr His Pro Gln Leu Pro Glu Cys Leu Ser Pro Ala Asp Ala Pro Cys  
 260 265 270  
 Ala Val Ser Ser Trp Ala Tyr Arg Leu Ala Val Arg Ser Tyr Ala Gly  
 275 280 285  
 Cys Ser Arg Thr Thr Pro Pro Pro Arg Cys Phe Ala Glu Ala Arg Met  
 290 295 300  
 Glu Pro Val Pro Gly Leu Ala Trp Leu Ala Ser Thr Val Asn Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Gln His Ala Ser Pro Gln His Ala Gly Leu Tyr Leu Cys Val Val  
 325 330 335  
 Tyr Val Asp Asp His Ile His Ala Trp Gly His Met Thr Ile Ser Thr  
 340 345 350  
 Ala Ala Gln Tyr Arg Asn Ala Val Val Glu Gln His Leu Pro Gln Arg  
 355 360 365  
 Gln Pro Glu Pro Val Glu Pro Thr Arg Pro His Val Arg Ala  
 370 375 380  
 <210> 18  
 <211> 545  
 <212> PRT  
 <213> Human alphaherpesvirus 2  
 <400> 18  
 Met Ala Arg Gly Ala Gly Leu Val Phe Phe Val Gly Val Trp Val Val  
 1 5 10 15

Ser Cys Leu Ala Ala Ala Pro Arg Thr Ser Trp Lys Arg Val Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Glu Asp Val Val Leu Leu Pro Ala Pro Ala Glu Arg Thr Arg Ala  
 35 40 45  
 His Lys Leu Leu Trp Ala Ala Glu Pro Leu Asp Ala Cys Gly Pro Leu  
 50 55 60  
 Arg Pro Ser Trp Val Ala Leu Trp Pro Pro Arg Arg Val Leu Glu Thr  
 65 70 75 80  
 Val Val Asp Ala Ala Cys Met Arg Ala Pro Glu Pro Leu Ala Ile Ala  
 85 90 95  
 Tyr Ser Pro Pro Phe Pro Ala Gly Asp Glu Gly Leu Tyr Ser Glu Leu  
 100 105 110  
 Ala Trp Arg Asp Arg Val Ala Val Val Asn Glu Ser Leu Val Ile Tyr  
 115 120 125  
 Gly Ala Leu Glu Thr Asp Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Ser Val Val Gly  
 130 135 140  
 Leu Ser Asp Glu Ala Arg Gln Val Ala Ser Val Val Leu Val Val Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Pro Val Pro Thr Pro Thr Pro Asp Asp Tyr Asp Glu Glu Asp  
 165 170 175  
 Asp Ala Gly Val Thr Asn Ala Arg Arg Ser Ala Phe Pro Pro Gln Pro  
 180 185 190  
 Pro Pro Arg Arg Pro Pro Val Ala Pro Pro Thr His Pro Arg Val Ile  
 195 200 205  
 Pro Glu Val Ser His Val Arg Gly Val Thr Val His Met Glu Thr Leu  
 210 215 220  
 Glu Ala Ile Leu Phe Ala Pro Gly Glu Thr Phe Gly Thr Asn Val Ser  
 225 230 235 240  
 Ile His Ala Ile Ala His Asp Asp Gly Pro Tyr Ala Met Asp Val Val  
 245 250 255  
 Trp Met Arg Phe Asp Val Pro Ser Ser Cys Ala Asp Met Arg Ile Tyr  
 260 265 270  
 Glu Ala Cys Leu Tyr His Pro Gln Leu Pro Glu Cys Leu Ser Pro Ala  
 275 280 285  
 Asp Ala Pro Cys Ala Val Ser Ser Trp Ala Tyr Arg Leu Ala Val Arg  
 290 295 300  
 Ser Tyr Ala Gly Cys Ser Arg Thr Thr Pro Pro Pro Arg Cys Phe Ala  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Arg Met Glu Pro Val Pro Gly Leu Ala Trp Leu Ala Ser Thr

	325		330		335										
Val	Asn	Leu	Glu	Phe	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Gln	His	Ala	Gly	Leu	Tyr
	340		345		350										
Leu	Cys	Val	Val	Tyr	Val	Asp	Asp	His	Ile	His	Ala	Trp	Gly	His	Met
	355		360		365										
Thr	Ile	Ser	Thr	Ala	Ala	Gln	Tyr	Arg	Asn	Ala	Val	Val	Glu	Gln	His
	370		375		380										
Leu	Pro	Gln	Arg	Gln	Pro	Glu	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	His	Val
385			390		395		400								
Arg	Ala	Pro	His	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Arg	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly
	405		410		415										
Ala	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	Ala
	420		425		430										
Trp	Ala	Cys	Met	Thr	Cys	Trp	Arg	Arg	Arg	Ser	Trp	Arg	Ala	Val	Lys
	435		440		445										
Ser	Arg	Ala	Ser	Ala	Thr	Gly	Pro	Thr	Tyr	Ile	Arg	Val	Ala	Asp	Ser
	450		455		460										
Glu	Leu	Tyr	Ala	Asp	Trp	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Gly
465			470		475		480								
Ser	Leu	Trp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg	Pro	Asp	Ser	Pro	Ser	Thr	Asn
	485		490		495										
Gly	Ser	Gly	Phe	Glu	Ile	Leu	Ser	Pro	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro
	500		505		510										
His	Ser	Glu	Gly	Arg	Lys	Ser	Arg	Arg	Pro	Leu	Thr	Thr	Phe	Gly	Ser
	515		520		525										
Gly	Ser	Pro	Gly	Arg	Arg	His	Ser	Gln	Ala	Ser	Tyr	Pro	Ser	Val	Leu
	530		535		540										
Trp															
545															

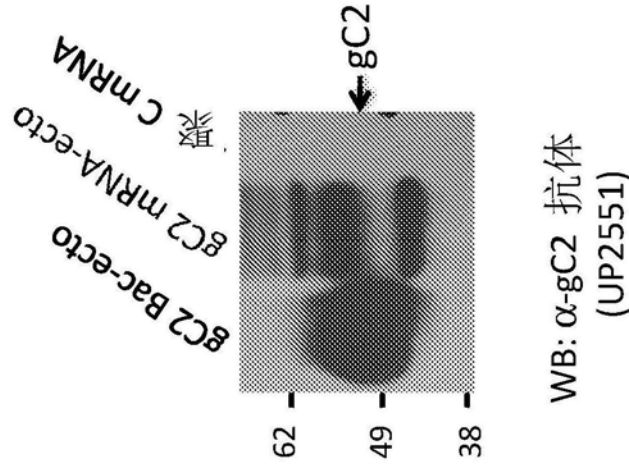


图1A

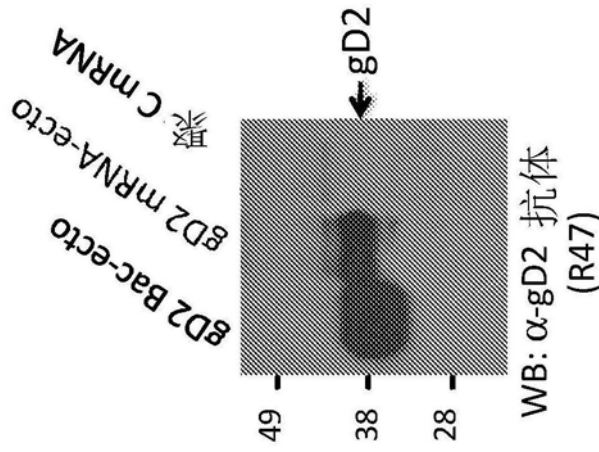


图1B

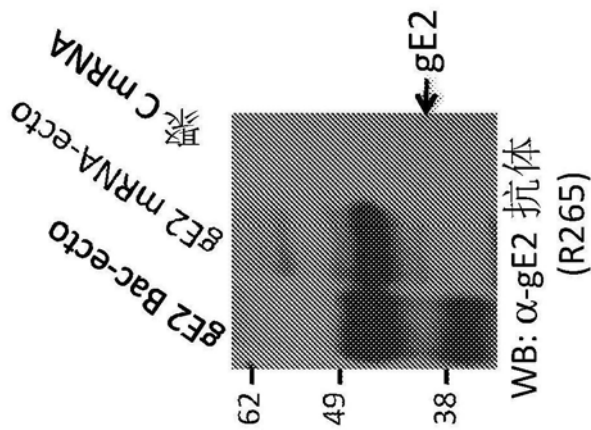


图1C

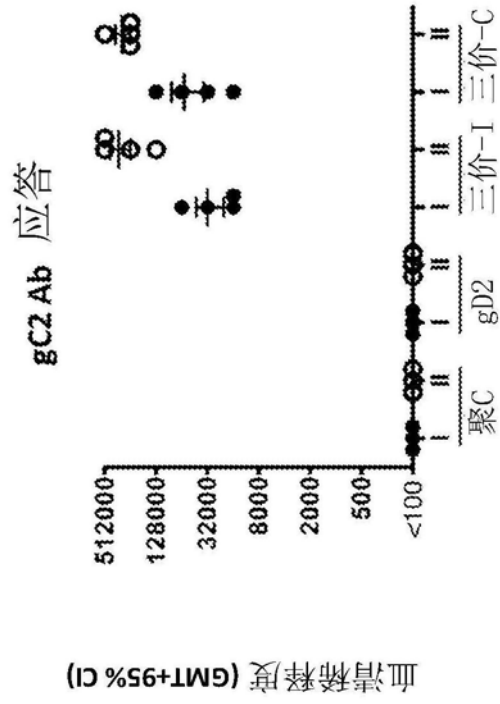


图2A

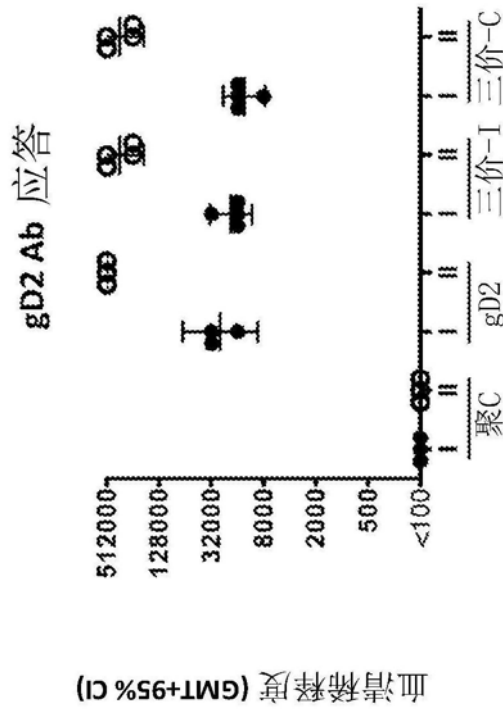


图2B

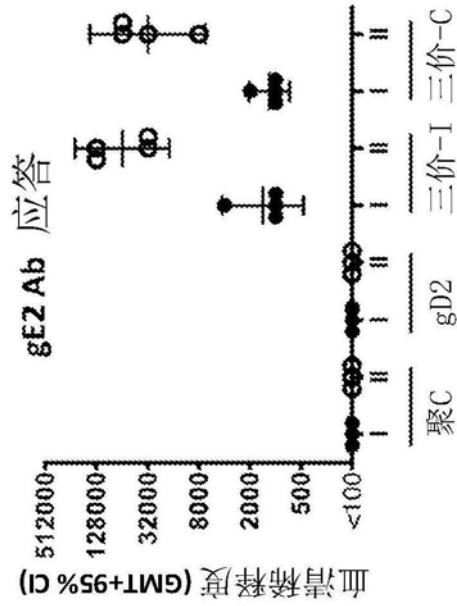


图2C

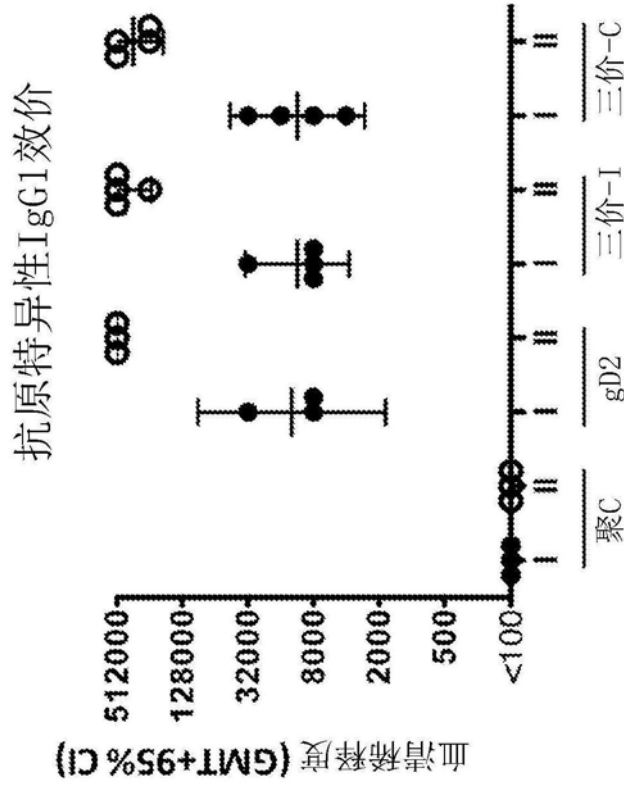


图3A

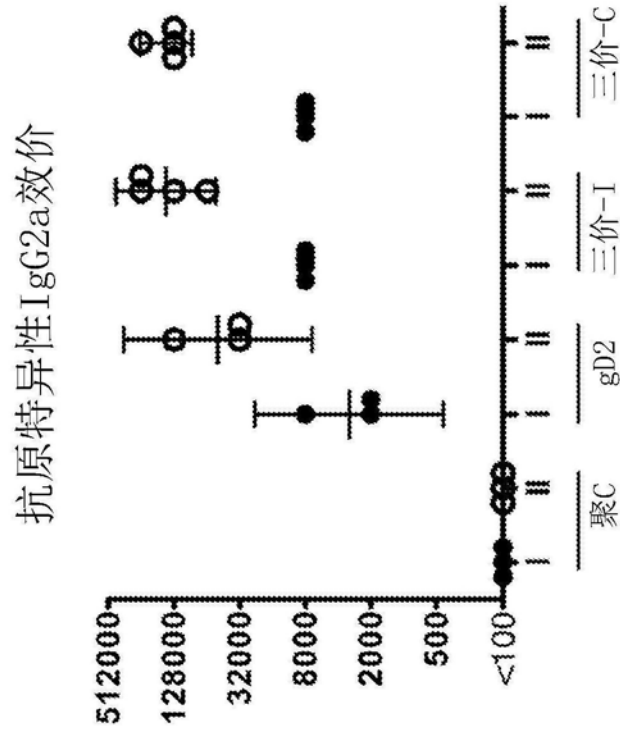


图3B

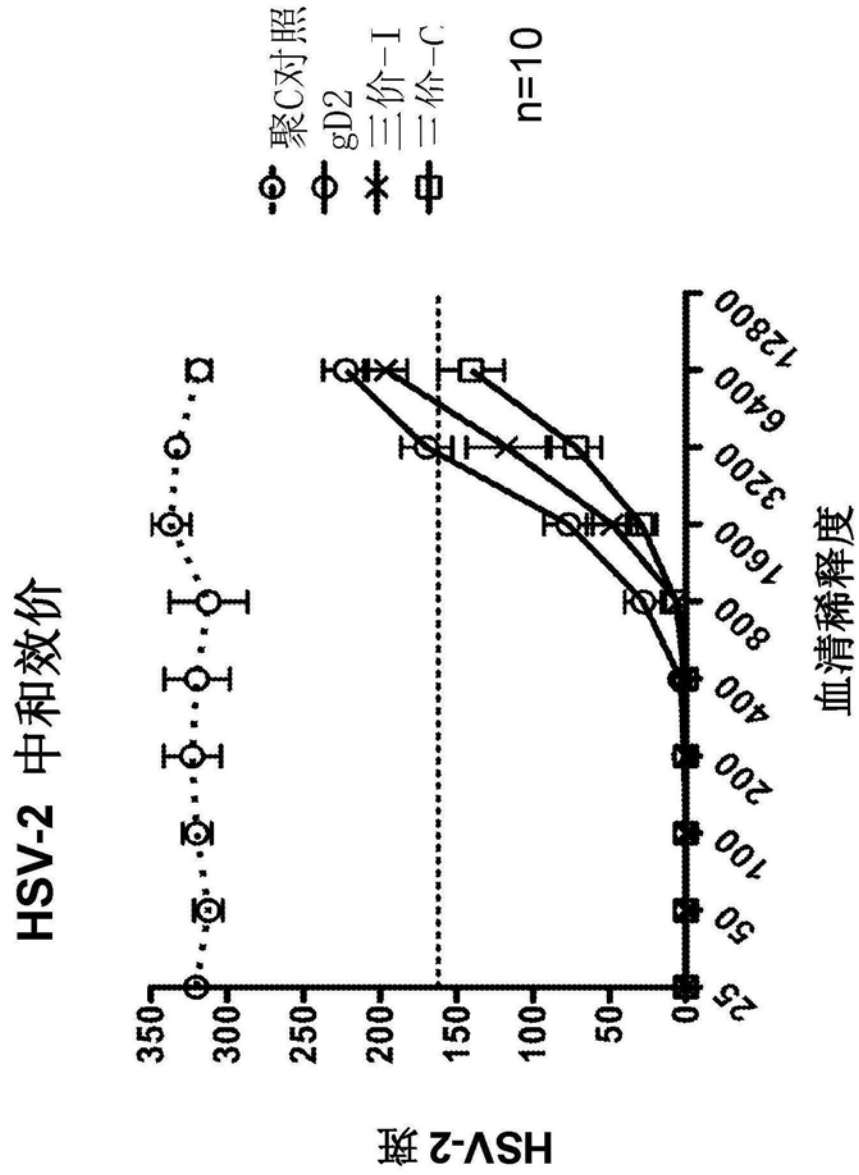


图4

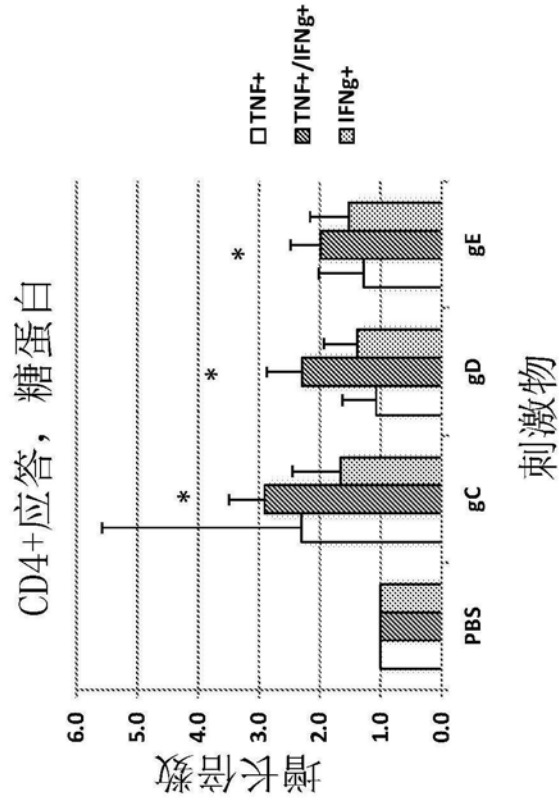


图5A

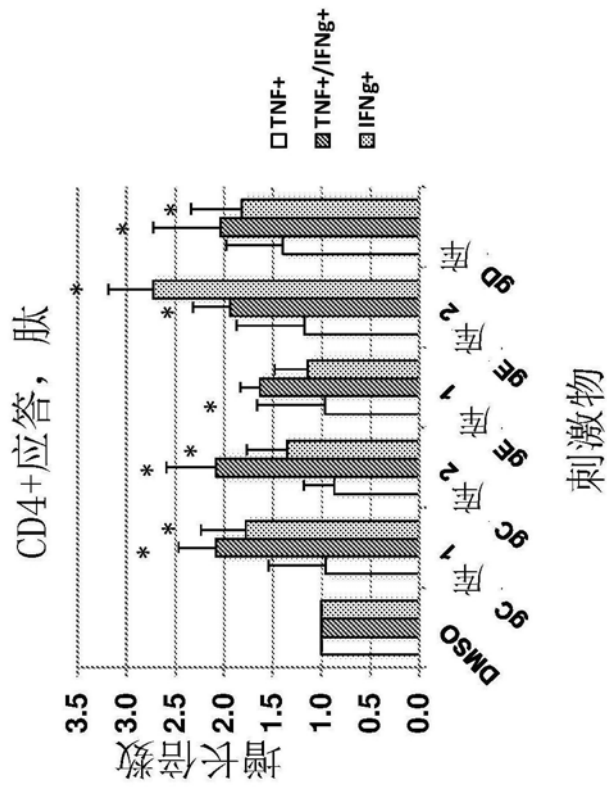


图5B

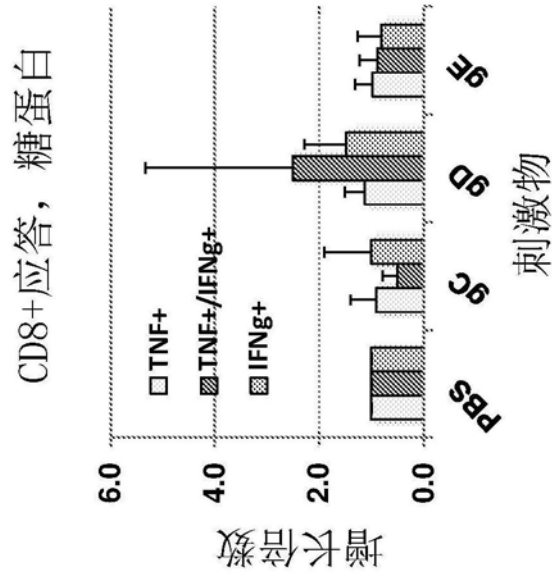


图6A

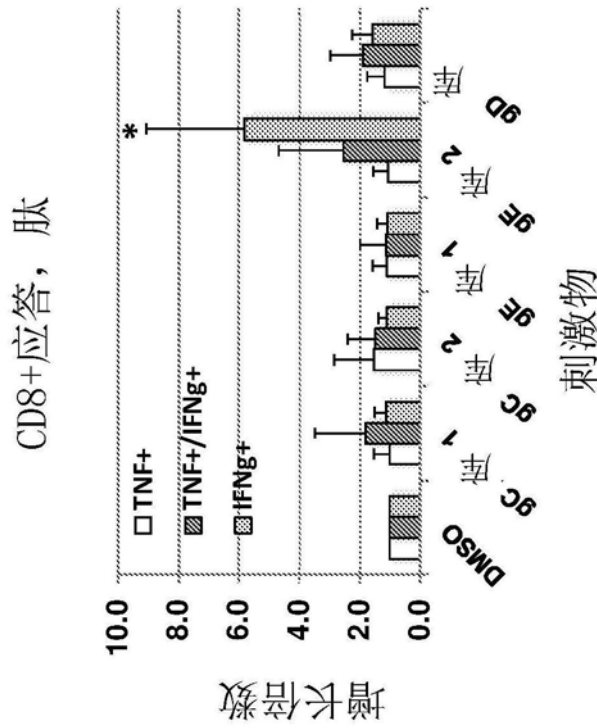


图6B

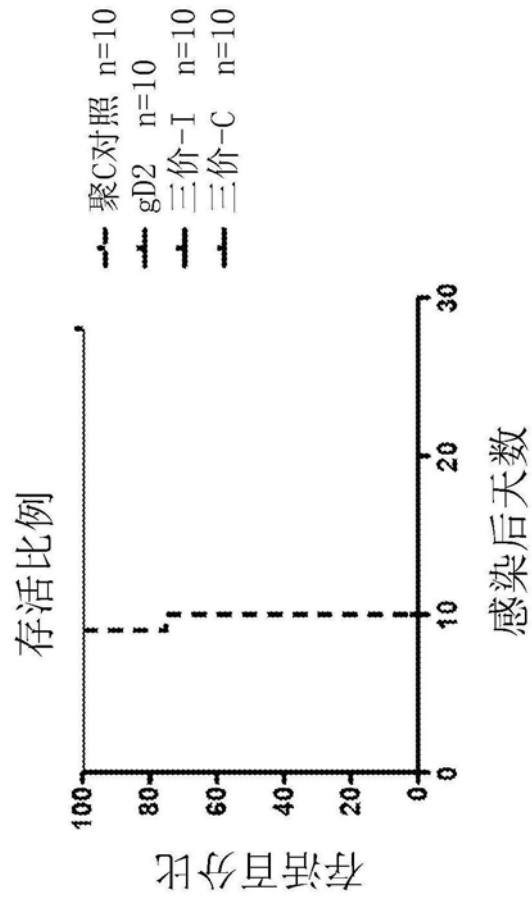
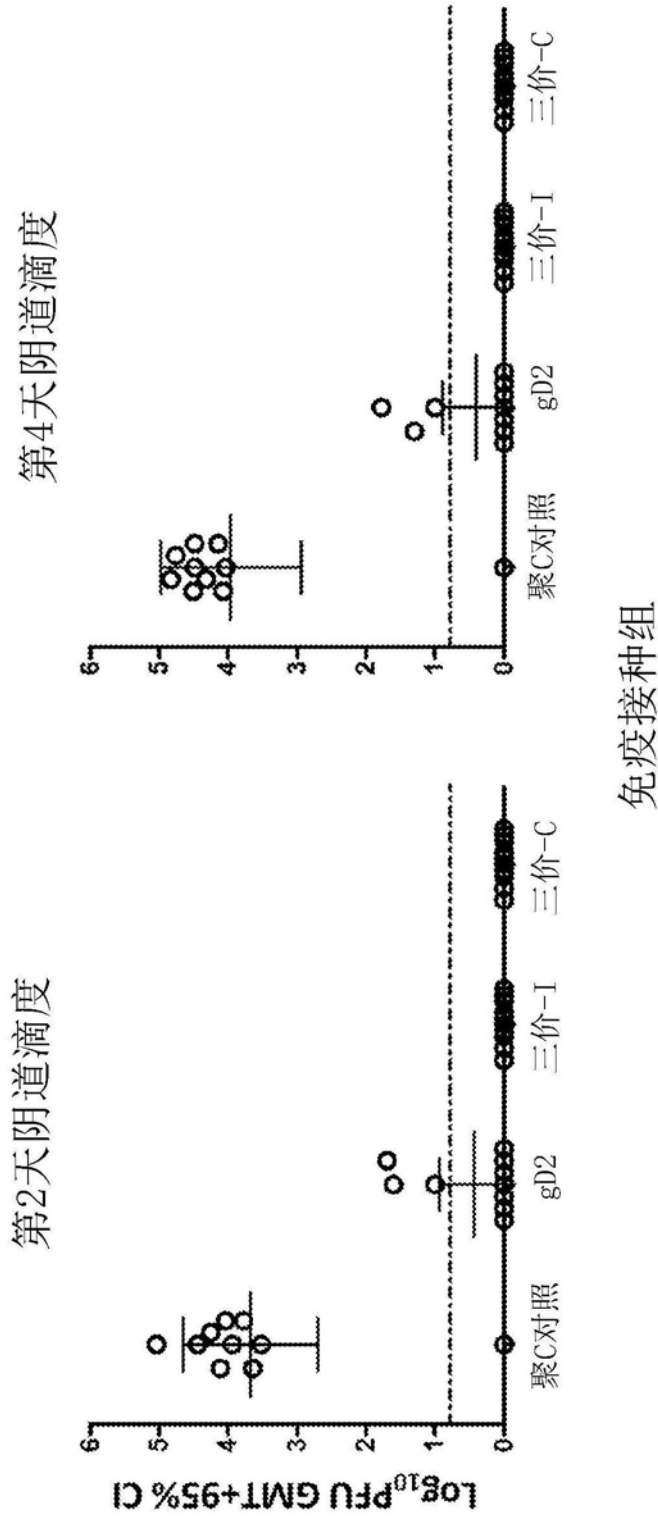


图7A

体重减轻和神经学体征

条件	模拟	gD2	三价-单独	三价-结合
体重减轻/增加	-15%	+5%	+5%	+4%
神经学体征	100%	0%	0%	0%

图7B



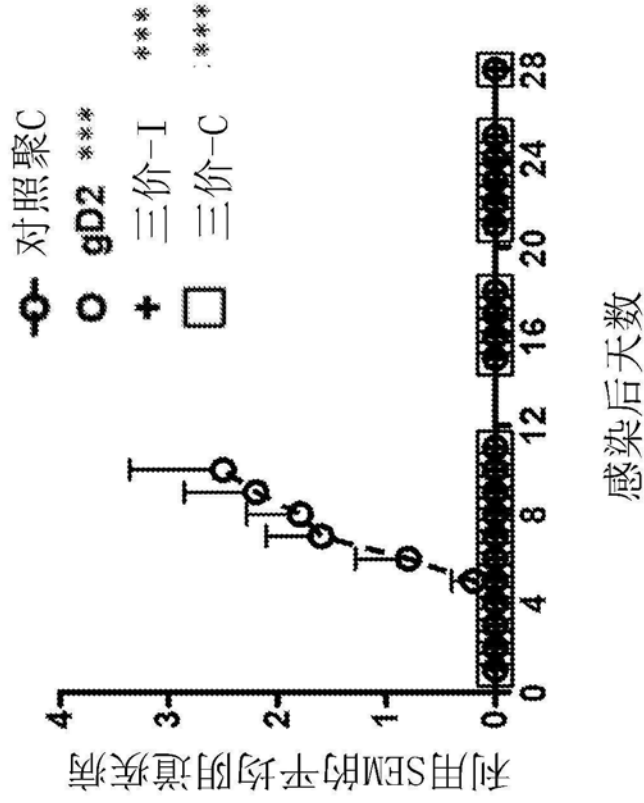


图9

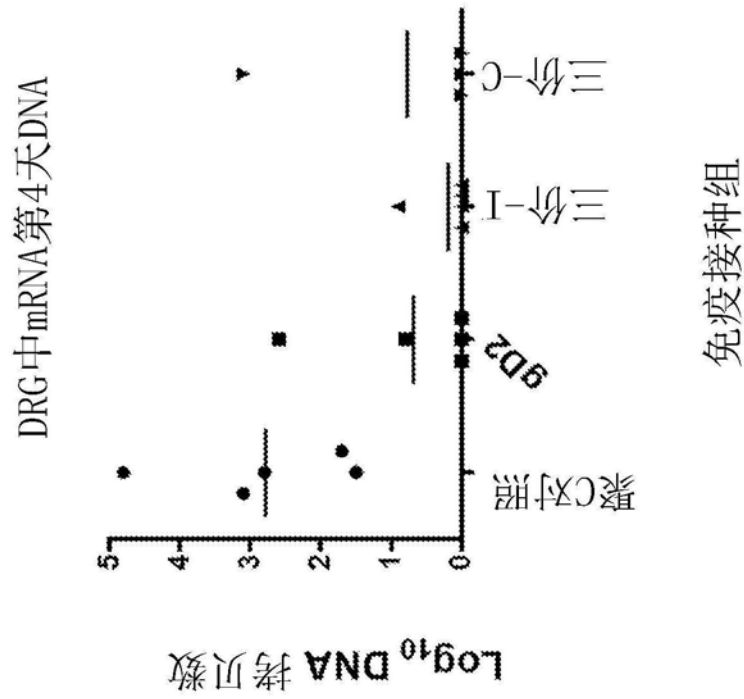


图10

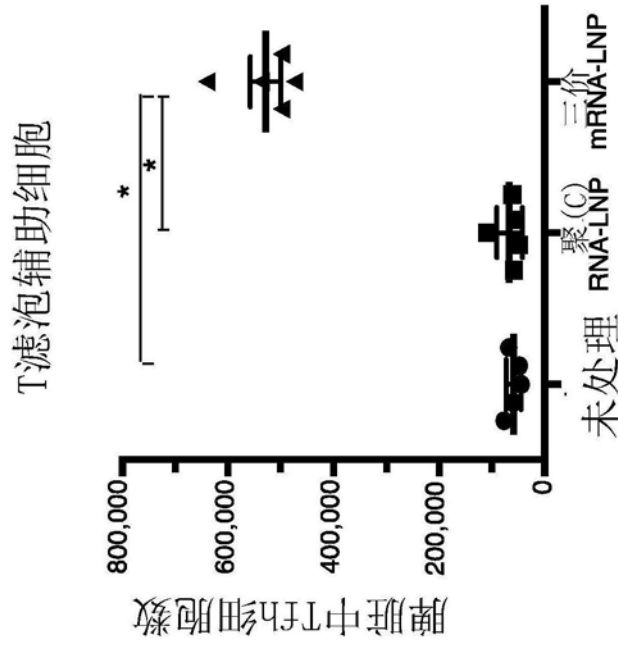


图11A

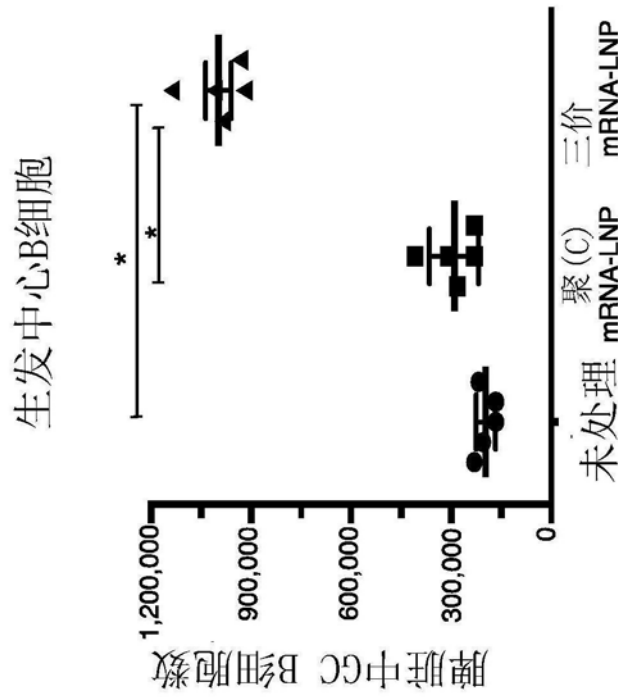


图11B

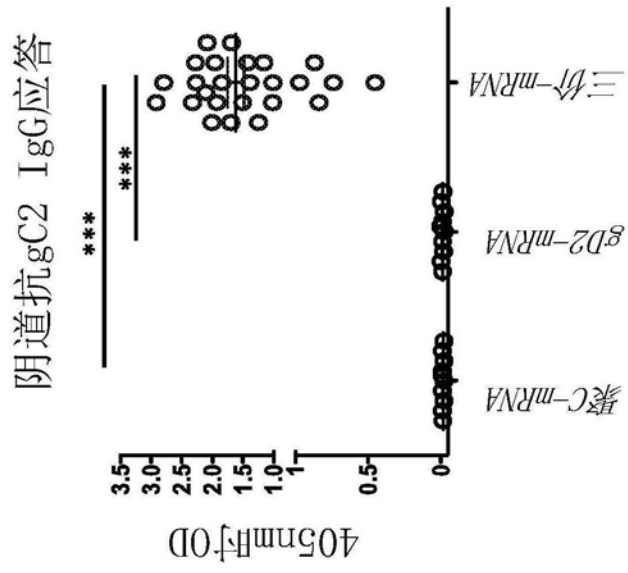


图12A

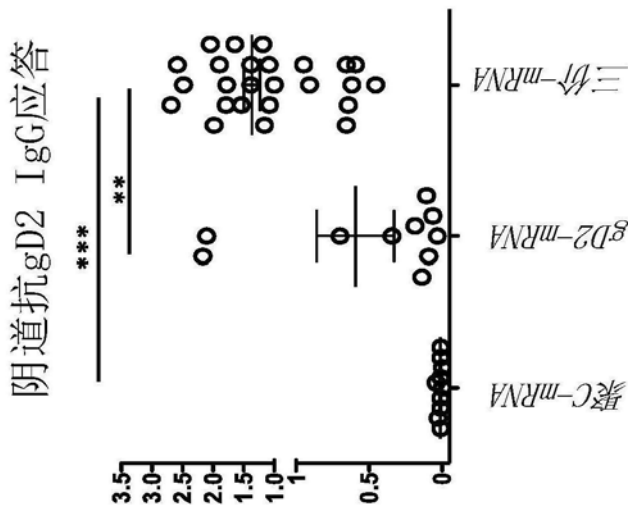


图12B

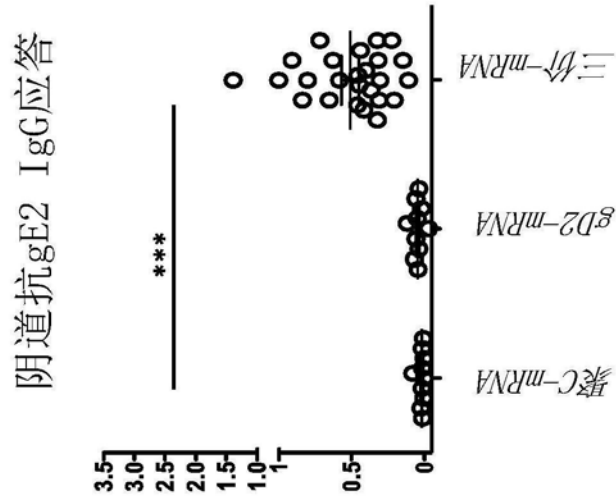


图12C

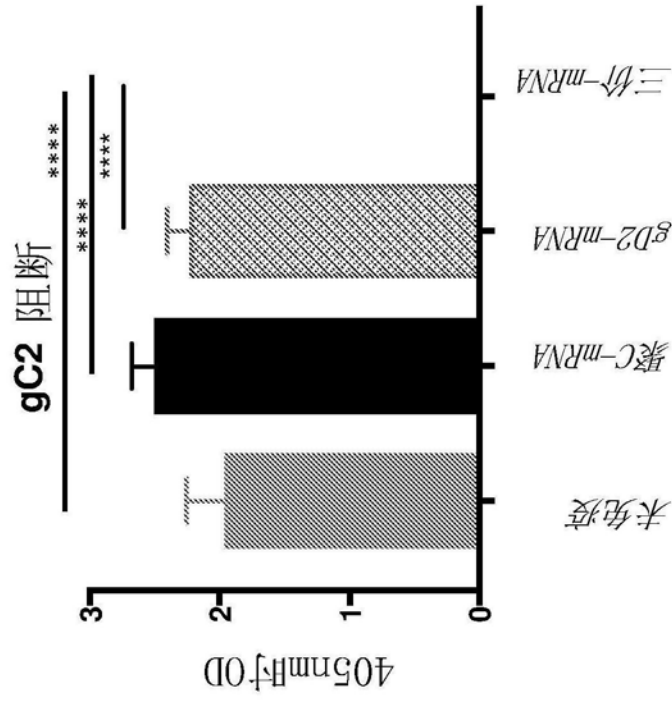


图13

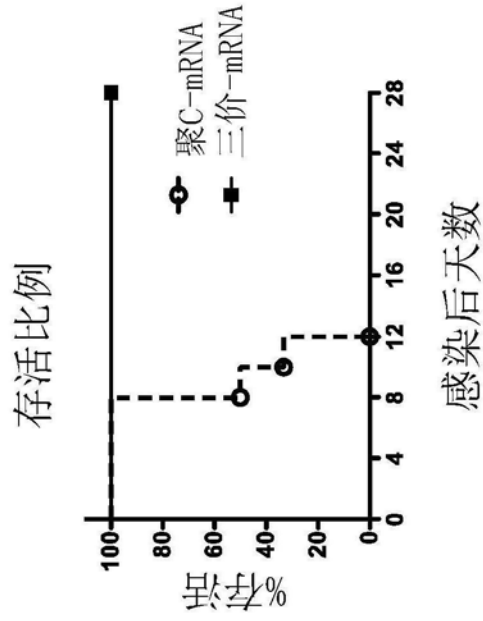


图14A

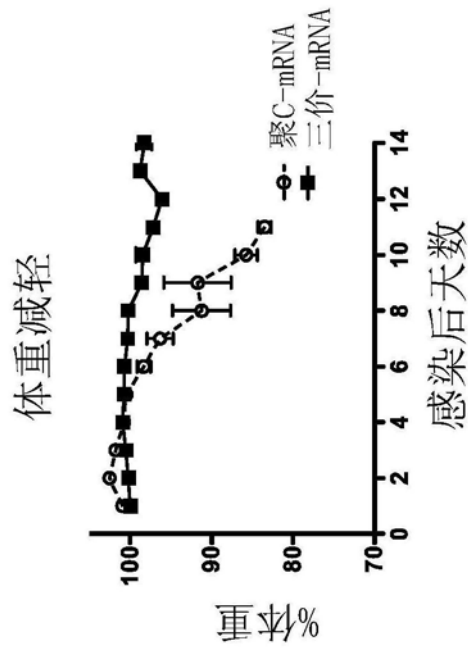


图14B

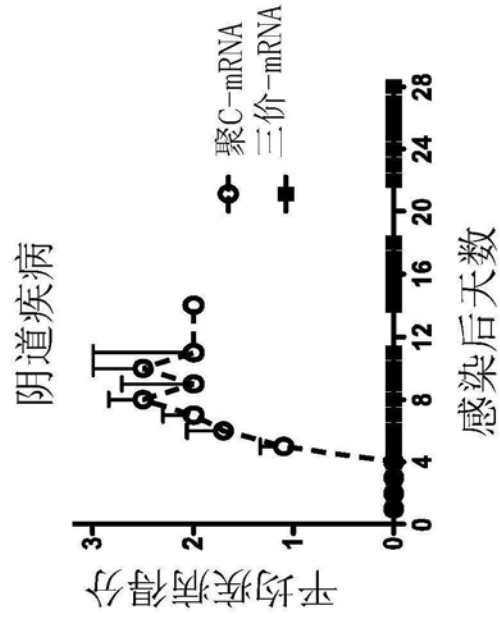


图14C

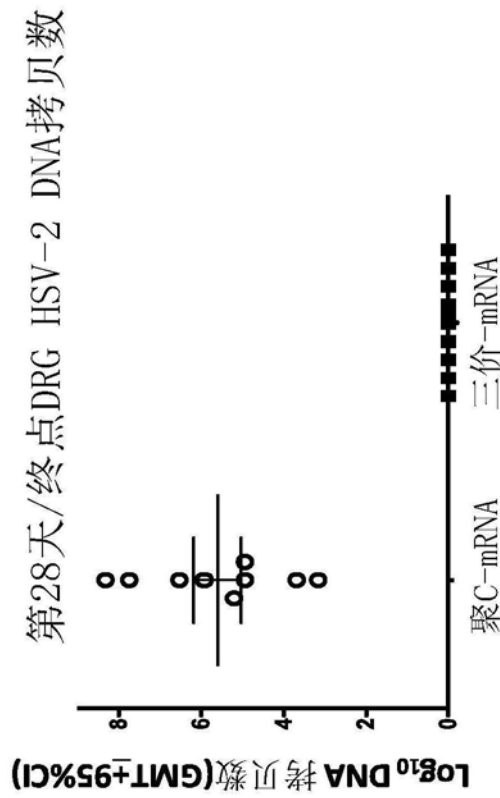


图14D

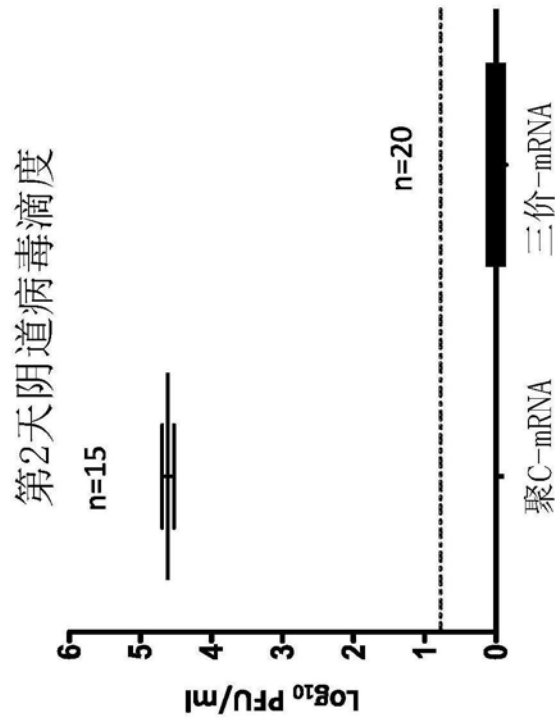


图14E

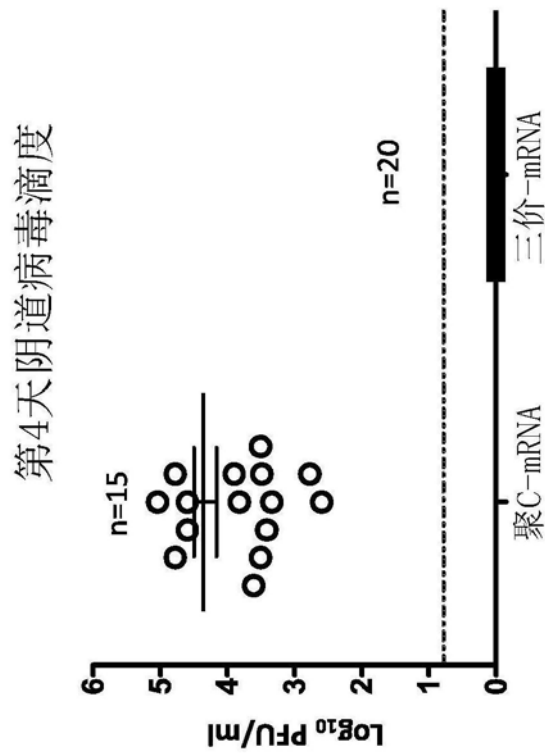


图14F

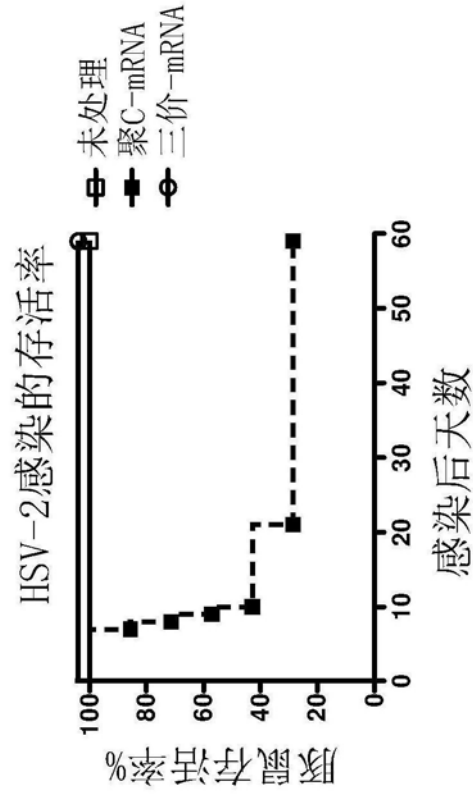


图15A

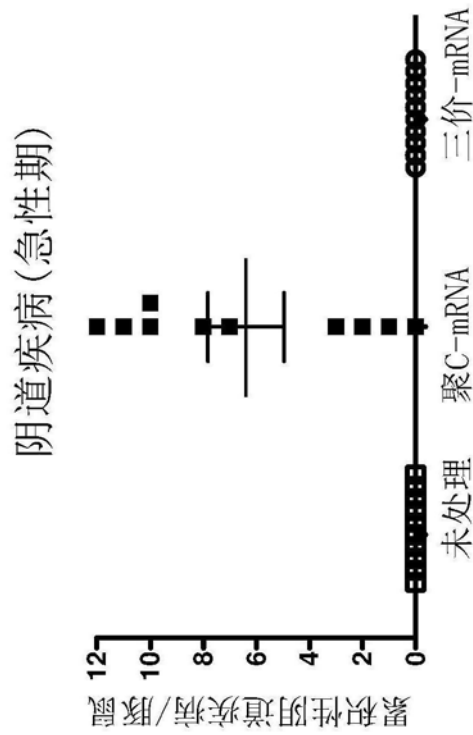


图15B

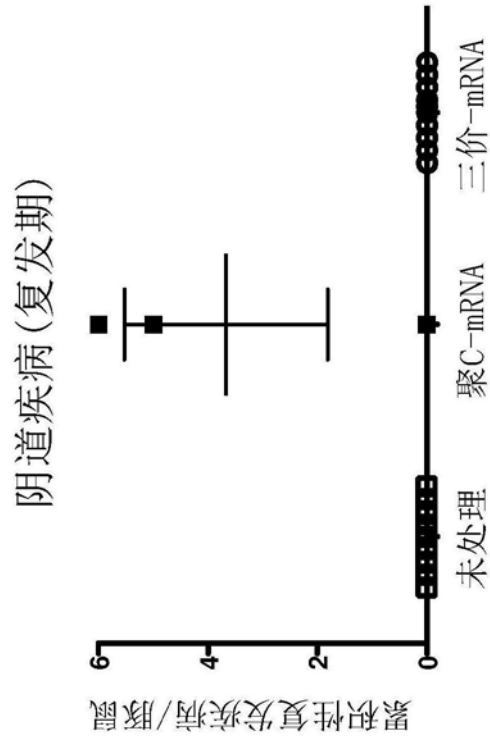


图15C