



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119546752 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 28

(21) 申请号 202380034277.3

(22) 申请日 2023.04.14

(30) 优先权数据

63/332037 2022.04.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/015132 2023.04.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/204148 EN 2023.10.26

(71) 申请人 Cyn-K 生物公司

地址 日本京都

申请人 国立大学法人京都大学

(72) 发明人 上野隆司 赤田涉 后藤和也

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 段菊兰 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书1页 说明书23页

序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

炎性病况的治疗

(57) 摘要

本公开提供一种用于在有需要的哺乳动物受试者中治疗炎性病况,尤其是年龄相关的炎性病况的方法,其包括有效量的包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒、出于其目的包含其的组合物或疫苗。

1. 一种包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒 (VLP), 其用于治疗炎性病况。

2. 根据权利要求1所述的VLP, 其中所述炎性病况为年龄相关的炎性病况。

3. 根据权利要求1所述的VLP, 其中所述炎性病况为中枢神经系统 (CNS) 中的炎症。

4. 根据权利要求3所述的VLP, 其中所述CNS中的炎症为神经退行性疾病。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述神经退行性疾病为帕金森病、肌萎缩侧索硬化症 (ALS, “路盖里格氏病”)、亨廷顿病、阿尔茨海默病、克罗伊茨费尔特-雅各布病或一般神经退行性病况。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的VLP, 其中所述病毒结构蛋白衍生自甲病毒或黄病毒。

7. 根据权利要求6所述的VLP, 其中所述病毒结构蛋白衍生自基孔肯雅病毒或委内瑞拉马脑炎病毒。

8. 根据权利要求7所述的VLP, 其中所述病毒结构蛋白衍生自基孔肯雅病毒毒株37997或毒株OPY-1或者委内瑞拉马脑炎病毒毒株TC-83。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的VLP, 其中至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入到所述病毒结构蛋白的包膜蛋白E3中。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的VLP, 其中所述半乳糖凝集素-3抗原选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的肽。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的VLP, 其中所述半乳糖凝集素-3抗原为SEQ ID NO:12的肽。

12. 根据权利要求7所述的VLP, 其中所述至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入对应于SEQ ID NO:6的321和326、SEQ ID NO:7的残基321和326或SEQ ID NO:8的残基330和335的残基之间。

13. 一种用于在哺乳动物受试者中治疗炎性病况的药物组合物或疫苗组合物, 其包含有效量的包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒。

14. 包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒用于制造药物的用途, 所述药物用于在哺乳动物受试者中治疗炎性病况。

炎性病况的治疗

技术领域

[0001] 本公开涉及受试者中的炎性病况,尤其是年龄相关炎性病况的治疗。

背景技术

[0002] 衰老为大多数神经退行性疾病(比如阿尔茨海默病和帕金森病)的主要风险因素。最常见的神经退行性疾病类型主要发生于老年个体。事实上,预计超过65岁的10个个体中就有1个患有神经退行性病况,这种可能性随着年龄呈指数级增加。

[0003] 中枢神经系统(CNS)的神经退行性疾病定义为神经元细胞的进行性和不可逆丧失,并与行为障碍(包括运动和/或认知功能的丧失)有关。鉴于神经退行性疾病与衰老之间的强联系,神经退行性病况经常被认为是大脑衰老过程的一部分。

[0004] 可用于神经退行性病况的有效治疗很少或没有,并且大多数集中于减轻症状而不是针对疾病的根源。因此,直接地解决大脑的衰老过程以减缓其进展可提供更好的策略来减轻神经退行性疾病的发作和负担。

[0005] 神经退行性疾病包括一系列严重衰弱性病况,包括帕金森病、肌萎缩侧索硬化症(ALS,“路盖里格氏病(Lou Gehrig's disease)”)、亨廷顿病、阿尔茨海默病等。这些病况的特征为患者的病况随着时间的推移逐渐但不停地恶化。

[0006] 阿尔茨海默病(AD)和帕金森病(PD)为最常见的神经退行性疾病。阿尔茨海默病(AD)为一种多因素进行性神经退行性疾病,其特征为记忆丧失和认知缺陷。目前可用于阿尔茨海默病(AD)的疗法显示效力有限,至今仍不存在真正的治愈。

[0007] 帕金森病(PD)的特征为从黑质致密部(SNpc)投射到背侧纹状体的多巴胺(DA)神经元进行性变性。所导致的纹状体中的多巴胺丧失导致衰弱性运动功能障碍,包括强直、静止性震颤、姿势不稳和运动迟缓。目前可用于帕金森病(PD)的疗法提供运动症状的缓解,但达不到表现出防止多巴胺(DA)神经元进行性变性所需的神经保护作用。此外,没有疗法同时针对PD的多种衰弱性非运动症状。

[0008] 神经退行性疾病显示慢性异常炎症。

[0009] 半乳糖凝集素为凝集素家族的成员,其对 β -半乳糖苷显示出高亲和力。在哺乳动物中发现了由LGALS基因编码的约15种半乳糖凝集素,其以连续方式编号。目前在人类中仅鉴定了半乳糖凝集素-1、-2、-3、-4、-7、-7B、-8、-9、-9B、9C、-10、-12、-13、-14和-16。

[0010] 半乳糖凝集素-3(Gal-3)为高度保守的动物凝集素家族的成员,其与含有 β -半乳糖苷的糖缀合物(糖蛋白或糖脂)结合(非专利文献1:Henderson NC 2006,非专利文献2:Mourad-Zeidan AA2008)。Gal-3与其他半乳糖凝集素家族蛋白不同,其结构由以下两个结构域构成:一个含有碳水化合物结合区的羧基端结构域和一个主要由9个氨基酸的串联重复组成,用于交联碳水化合物和非碳水化合物配体的氨基端结构域(非专利文献3:Barondes SH 1994)。其由各种类型的细胞(包括单核细胞、巨噬细胞和上皮细胞)分泌,但主要由巨噬细胞分泌(非专利文献4:Reynolds 2005,非专利文献5:MacKinnon AC 2008)。分泌的细胞外Gal-3形成同二聚体或五聚体,并且其对生物学功能很重要。半乳糖凝集素-3

的N-端结构域已证明对蛋白寡聚体的形成很重要(非专利文献6:Dumic J 2006,非专利文献7:Kuklinski S1998,非专利文献8:Lepur A2012)。释放的蛋白可作为细胞外分子起作用来激活细胞,介导细胞-细胞和细胞-ECM相互作用,诱导各种类型细胞的迁移,并负向调控T细胞受体信号传导(非专利文献9:Yang RY 1996)。Gal-3显示在各种纤维化疾病模型和患者(包括肺纤维化、肝纤维化、系统性硬化症和心脏纤维化)中增加(非专利文献10:Henderson NC 2008,非专利文献11:Barman等人2019,非专利文献12:Nishi Y 2007,非专利文献13:De Boer 2010)。这表明Gal-3可能是组织纤维化的重要介体和有效治疗靶点。迄今为止,研究性半乳糖凝集素-3抑制剂的临床前和临床研究显示出针对纤维化病症的保护(非专利文献14:Nikhil Hirani 2017,非专利文献15:Yu L 2013)。

[0011] 据报道,在神经退行性疾病(比如特发性帕金森病(IPD))神经保护和神经修复治疗方案中,血浆半乳糖凝集素-3水平将作为生物标志物和治疗剂变得重要起来(非专利文献16:Yazar H0等人,J Clinical Neuroscience 2019)。半乳糖凝集素-3在AD患者和5×FAD(家族性阿尔茨海默病)小鼠的大脑中高度上调,并在与A β 斑块相关的小胶质细胞中特异性地表达(非专利文献17:Boza-Serrano A等人Acta Neuropathology,2019)。与对照相比较,AD和ALS患者的血清和CSF样品中的半乳糖凝集素-3更高,这潜在地表明AD和ALS患者以及健康个体(对照)的Gal-3的血清和CSF水平与认知状态之间存在明确关联(非专利文献18:Ashraf GM等人Front Neuroscience,2018)。

[0012] 在过去100-150年期间,医学中的主要成功案例之一是靶向各种感染性疾病的疫苗。疫苗与抗生素一起对人类健康的重要性可能超过人类的任何其他部分。由于疫苗的成功,对使用疫苗技术用于治疗非感染性疾病比如过敏、自身免疫和癌症的兴趣正在增加。然而,针对这些疾病的靶点通常为自身抗原,这可造成效力问题。由于耐受机制,与非自身抗原——细菌、病毒或寄生物蛋白相比较,诱导对自身抗原的强抗体反应相当困难(非专利文献19:Hellman 2008,非专利文献20:Falk Saupe 2015)。

[0013] 甲病毒包括一组遗传、结构和血清学相关的披膜病毒(Togaviridae)科蚊媒病毒。甲病毒包括东部马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、沼泽地病毒(Everglades Virus)、穆坎布病毒(Mucambo Virus)、皮克孙纳病毒(PixunaVirus)、西方马脑炎病毒(WEEV)、辛德毕斯病毒(Sindbis Virus)、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest Virus)、米德尔堡病毒(Middleburg Virus)、基孔肯雅病毒(Chikungunya Virus,CHIKV)、阿尼昂-尼昂病毒(O'nyong-nyong Virus)、罗斯河病毒(Ross River Virus)、巴马森林病毒(Barmah Forest Virus)、格塔病毒(Getah Virus)、鹭山病毒(Sagiyama Virus)、贝巴鲁病毒(Bebaru Virus)、马亚罗病毒(Mayaro Virus)、乌纳病毒(Una Virus)、奥拉病毒(Aura Virus)、沃达罗河病毒(Whataroa Virus)、巴班肯病毒(Babanki Virus)、库孜拉加奇病毒(Kyzylagach Virus)、高地J病毒(Highlands J virus)、摩根堡病毒(Fort Morgan Virus)、恩杜茂病毒(Ndumu Virus)和博吉河病毒(Buggy Creek Virus)。含有单个病毒蛋白的结构亚基衣壳在二十面体核衣壳中与RNA基因组缔合。在病毒粒子中,衣壳由覆盖有跨膜蛋白刺突的规则阵列的脂质包膜包围,所述跨膜蛋白刺突的每一个由两种糖蛋白E1和E2的异二聚体复合物组成。

[0014] 病毒样颗粒(VLP)为模仿真实天然病毒的组织结构和构象但缺少病毒基因组的多蛋白结构,其可能产生更安全和更便宜的候选疫苗。目前,几种预防性的基于VLP的疫苗在全球

范围内商业化:GlaxoSmithKline的EngerixR(乙型肝炎病毒)和CervarixR(人类乳头瘤病毒)以及Merck and Co.,Inc.的Recombivax HBR(乙型肝炎病毒)和GardasilR(人类乳头瘤病毒)为一些实例。其他基于VLP的候选疫苗处于临床试验中或正在经历临床前评估,比如流感病毒、细小病毒、诺瓦克(Norwalk)和各种嵌合VLP。许多其他仍限于小规模基础研究,尽管它们在临床前测试中取得了成功。在过程控制、监控和优化的背景下讨论了大规模VLP生产的影响。相应地鉴定并讨论了主要的上游和下游技术挑战。成功的基于VLP的疫苗重磅产品附随来自临床试验的最新结果以及用于治疗或预防性疫苗接种的基于嵌合VLP的技术的最新发展简要呈现。

[0015] 到目前为止,已产生了感染人类和其他动物的多于30种不同病毒的基于VLP的疫苗。实例包括AAV(腺相关病毒)、H5N3(禽流感)、BFDV(鸚鵡幼雏病病毒(Budgerigar fledgling disease virus))、BTV(蓝舌病毒(Bluetongue virus))、埃博拉(Ebola)、肠病毒71(Enterovirus 71)、GHPV(鹅出血性多瘤病毒(Goose hemorrhagic polyoma virus))、HBV(乙型肝炎病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)、HDV(δ 型肝炎病毒)、HEV(戊型肝炎病毒)、HIV、HPV(人类乳头瘤病毒)、IBDV(传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus))、甲型流感、甲型流感H1N1、甲型流感H3N2、JC多瘤病毒、马尔堡(Margurg)、MS2、IPCV(印度花生丛簇病毒(Indian peanut clump virus))、NDV(新城疫病毒)、No(诺如病毒(Norovirus))、Nv(诺沃克病毒)、PhMV(酸浆斑疹病毒(Physalis mottle virus))、多瘤病毒、PPV(猪细小病毒)、RHDV(兔出血病病毒)、轮状病毒(Rotavirus)、SARS、SIV(猿猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus))、SV40(猿猴病毒40)、SVDV(猪水疱病病毒(Swine vesicular disease virus))等(非专利文献1:Expert Rev.Vaccines 9(10), 1149-1176, 2010)。

[0016] 美国专利号9,353,353公开了包含一种或多种基孔肯雅病毒结构蛋白的病毒样颗粒(VLP),其可用于配制诱导对感染或其至少一种症状的免疫的基孔肯雅的疫苗或抗原组合物。美国专利号9,487,563公开了经修饰的甲病毒或黄病毒病毒样颗粒(VLP)以及增强用于预防或治疗甲病毒和黄病毒介导的疾病的经修饰VLP的产生的方法。美国专利号9,249,191公开了基孔肯雅病毒(CHIKV)或委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)病毒样颗粒,其中所述病毒样颗粒含有至少一种插入到E2包膜蛋白中以形成融合蛋白的抗原。美国专利号9,969,986公开了甲病毒病毒样颗粒,其中所述病毒样颗粒包含含有包膜蛋白E3的甲病毒结构蛋白,其中所述包膜蛋白E3修饰为含有至少一种插入到其弗林蛋白酶切割位点中的外来抗原(这些引用的参考文献通过引用并入本文)。

引用列表

[0017] 专利文献

- [PTL 1] 美国专利号9,353,353
- [PTL 2] 美国专利号9,487,563
- [PTL 3] 美国专利号9,249,191
- [PTL 4] 美国专利号9,969,986
- [PTL 5] 美国专利公开号2005/0118191
- [PTL 6] WO 2022/225057

[0018] [非专利文献]

[NPL 1]Henderson NC,Mackinnon AC,Farnworth SL,Poirier F,Russo FP,Iredale JP,Haslett C,Simpson KJ,Sethi T.2006."Galectin-3regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis."Proc Natl Acad Sci U S A 103 (13):5060-5.

[NPL 2]Mourad-Zeidan AA,Melnikova VO,Wang H,Raz A和Bar-Eli M.2008."Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry."Am J Pathol 173: 1839-1852.

[NPL 3]Barondes SH,Cooper DN,Gitt MA,Leffler H.1994."Galectins.Structure and function of a large family of animal lectins."J Biol Chem 269:20807-20810.

[NPL 4]Herbert Y.Reynolds,"Lung Inflammation and Fibrosis,An Alveolar Macrophage-centered Perspective from the 1970s to 1980s"Am J Respir Crit Care Med第171卷.第98-102页,2005

[NPL 5]MacKinnon AC,Farnworth SL,Hodkinson PS,Henderson NC,Atkinson KM,Leffler H,Nilsson UJ,Haslett C,Forbes SJ和Sethi T.2008."Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3."J Immunol 180:2650-2658.

[NPL 6]Dumic J,Dabelic S,Flougel M.2006."Galectin-3:An open-ended story."BBA-Gen Subjects 1760:616-635.

[NPL 7]Kuklinski S,Probstmeier R.1998."Homophilic binding properties of galectin-3:Involvement of the carbohydrate recognition domain."J Neurochem 70:814-823.

[NPL 8]Lepur A,Salomonsson E,Nilsson UJ,Leffler H.2012."Ligand induced galectin-3 protein self-association."J Biol Chem 287:21751-21756.

[NPL 9]Yang RY,Hsu DK和Liu FT.1996."Expression of galectin-3modulates T-cell growth and apoptosis."Proc Natl Acad Sci USA 93:6737-6742.

[NPL 10]Henderson NC,Mackinnon AC,Farnworth SL,Kipari T,Haslett C,Iredale JP,Liu FT,Hughes J,Sethi T.2008."Galectin-3expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis."Am J Pathol.172(2):288-98.

[NPL 11]Barman,Scott A,Xueyi Li,Stephen Haigh,Dmitry Kondrikov,Keyvan Mahboubi,Zsuzsanna Bordan和Stepp W David.2019."Galectin-3is Expressed in Vascular Smooth Muscle Cells and Promotes Pulmonary Hypertension through changes in Proliferation,Apoptosis and Fibrosis."Epub ahead of print.

[NPL 12]Nishi Y,Sano H,Kawashima T,Okada T,Kuroda T,Kikkawa K,Kawashima S,Tanabe M,Goto T,Matsuzawa Y,Matsumura R,Tomioka H,Liu FT,Shirai K.2007."Role of Galectin-3in Human Pulmonary Fibrosis"Allergol Int.56(1):57-65.

[NPL 13]De Boer,R.A.,Yu,L.和van Veldhuisen,D.J.2010."Galectin-3in

cardiac remodeling and heart failure."Curr.Heart Fail.Rep.7,1-8.

[NPL 14]Nikhil Hirani,Alison Mackinnon,Lisa Nicol,Jeremy Walker,Paul Ford,Hans Schambye,Anders Pederson,Ulf Nilsson,Hakon Leffler,Tracy Thomas,Danielle Francombe,John Simpson,Michael Gibbons,Toby M.Maher.2017."TD139,A Novel Inhaled Galectin-3 Inhibitor for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis(IPF).Results from the First in(IPF)Patients Study."American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 195:A7560.

[NPL 15]Yu L,Ruifrok WP,Meissner M,Bos EM,van Goor H,Sanjabi B,van der Harst P,Pitt B,Goldstein IJ,Koerts JA,等人2013."Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis."Circ Heart Fail 6:107-117.

[NPL 16]H.O.Yazar等人"A preliminary data:Evaluation of serum Galectin-3 levels in patients with Idiopathic Parkinson's Disease"Journal of Clinical Neuroscience 70(2019)164-168

[NPL 17]Boza-Serrano A等人"Galectin-3,a novel endogenous TREM2 ligand,detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease"Acta Neuropathologica(2019)138:251-273

[NPL 18]Ghulam Md Ashraf和Saleh S Baeesa"Investigation of Gal-3 Expression Pattern in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients Suffering From Neurodegenerative Disorders"Frontiers in Neuroscience 2018第12卷,文章430

[NPL 19]Hellman,L.2008."Therapeutic vaccines against IgE-mediated allergies."Expert Rev Vaccines 7(2):193-208.

[NPL 20]Falk Saupe,Elisabeth J.M.Huijbers,Tobias Hein,Julia Femel,Jessica Cedervall,Anna-Karin Olsson和Lars Hellman.2015."Vaccines targeting self-antigens:mechanisms and efficacy-determining parameters."FASEB J 29(8):3253-62.

[NPL 21]Anto'nio **Roldão**,Maria Candida M,Mellado,Leda R,Castilho,Manuel JT Carrondo和Paula M Alves"Virus-like particles in vaccine development"Expert Rev.Vaccines 9(10),1149-1176,2010

[NPL 22]Goldfarb,D.和N.Michaud(1991)"Pathways for the nuclear transport of proteins and RNAs"Trends Cell Biol.1,20-24

[NPL 23]Gorlich,D.和I.W.Mattaj(1996)"Nucleocytoplasmic Transport"Science 271,1513-1518

[NPL 24]Schneider,J.等人(1988)"A Mutant SV40 Large T Antigen Interferes with Nuclear Localization of a Heterologous Protein"Cell 54,117-125

[NPL 25]Dingwall等人(1988)"The Nucleoplasmin Nuclear Location Sequence Is Larger and More Complex than That of SV-40Large T Antigen"Cell Biol.107(3):841-9

发明内容

[0019] 本公开涉及炎性病况的治疗。特别地,本公开提供一种用于在哺乳动物受试者中治疗炎性病况,尤其是年龄相关的炎性病况的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒。

[0020] 本公开还提供一种包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒,其用于在哺乳动物受试者中治疗炎性病况,尤其是年龄相关的炎性病况。

[0021] 本公开还提供一种用于在哺乳动物受试者中治疗炎性病况,尤其是年龄相关的炎性病况的药物组合物,其包含含有病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒。

[0022] 本公开还提供包含病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原的病毒样颗粒用于制造药物的用途,所述药物用于在哺乳动物受试者中治疗炎性病况,尤其是年龄相关的炎性病况。

附图说明

[0023] [图1]用VEEV-Gal-3-VLP免疫的小鼠血清中的抗小鼠半乳糖凝集素-3 (Gal-3) 抗体。向一组小鼠(第2组)肌肉施用VEEV-Gal-3 VLP并向另一组(第1组)肌肉施用生理盐水。小鼠在实验开始时、第一次施用之后2周和4周施用。实验开始之后6周,从每只小鼠获取血液样品并通过使用ELISA检测血清中的Gal-3。

[0024] [图2]5×FAD小鼠的穿梭被动回避测试结果。实验开始之后5个月,进行穿梭被动回避测试并测量电刺激之后24 h的潜伏期。

[0025] [图3]用VEEV-Gal-3-VLP免疫的5×FAD小鼠的海马体中Gal-3的量。在图2所示的测试之后,收集小鼠大脑并测量大脑裂解物中与β-肌动蛋白相比较的Gal-3和β-淀粉样蛋白的量。

[0026] [图4]VEEV-Gal-3-VLP对老年C57BL/6J小鼠存活的影响。将C57BL/6J小鼠分成两组。向一组小鼠(B6-V组)肌肉施用VEEV-Gal-3 VLP并向另一组(B6-N组)肌肉施用生理盐水。

[0027] [图5]VEEV-Gal-3-VLP对5×FAD小鼠存活的影响。将5×FAD小鼠分成两组。向一组小鼠(F-V组)肌肉施用VEEV-Gal-3 VLP并向另一组(F-N组)肌肉施用生理盐水。

具体实施方式

[0028] 如本文使用的,术语“半乳糖凝集素-3抗原”是指可由免疫系统识别和/或刺激细胞介导的免疫反应和/或刺激对抗原具有特异性的抗体产生的源自半乳糖凝集素-3蛋白的任何抗原结构。半乳糖凝集素-3表位肽可为天然存在的半乳糖凝集素-3蛋白的片段,或具有一些修饰的天然存在的半乳糖凝集素蛋白的片段。天然存在的半乳糖凝集素-3蛋白可优选为人类半乳糖凝集素蛋白,并且尤其是人类半乳糖凝集素半乳糖凝集素-3蛋白。在一个实施方案中,经修饰的片段与天然存在的半乳糖凝集素-3蛋白的片段具有至少80%、85%、90%、95%或98%的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,经修饰的肽片段为突变体,其中基于天然存在的半乳糖凝集素-3蛋白的片段缺失、取代和/或添加至多10%的氨基酸。

[0029] 半乳糖凝集素-3[智人](GenBank登录号:AAB86584.1)

MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPAGWGNQPAAGAGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAP
PGAYPGAPGAYPGAPAPGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPYGAAGPLIVPYNLPL
PGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENRRRVIVCNTKLDNNWGR
EERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTAS
YTMI (SEQ ID NO: 1)

[0030] 半乳糖凝集素-3抗原,即半乳糖凝集素-3表位肽的实例可包括以下:

ADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPAGWGNQPA (SEQ ID NO: 2)

YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGA (SEQ ID NO: 3)

YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAPAGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSA
TGAYPATGPYGA (SEQ ID NO: 4)

ADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQPA (SEQ ID NO: 5)

[0031] Gal-3表位肽SEQ ID NO:2由人类N-端Gal-3表位肽组成。Gal-3表位肽SEQ ID NO:3和4由人类Gal-3 N-端重复序列表位肽组成且SEQ ID NO:4具有比SEQ ID NO:3更长的重复序列。SEQ ID NO:5编码小鼠Gal-3 N-端肽。

[0032] 在W0 2022/225057 (该文件的内容通过引用并入本文) 中,制备了带有以上Gal-3表位肽的VLP并证实了这些VLP的免疫原性。

[0033] 甲病毒

如本文使用的“甲病毒”意指属于病毒的披膜病毒科的含有RNA的病毒。示例性的披膜病毒科病毒包括但不限于东部马脑炎病毒 (EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV)、沼泽地病毒、穆坎布病毒、皮克孙纳病毒、西方马脑炎病毒 (WEEV)、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒、米德尔堡病毒、基孔肯雅病毒 (CHIKV)、阿尼昂-尼昂病毒、罗斯河病毒、巴马森林病毒、格塔病毒、鹭山病毒、贝巴鲁病毒、马亚罗病毒、乌纳病毒、奥拉病毒、沃达罗河病毒、巴班肯病毒、库孜拉加奇病毒、高地J病毒、摩根堡病毒、恩杜茂病毒、博吉河病毒、奥克尔布病毒 (Ockelbo virus)。

[0034] “病毒结构蛋白”意指与天然存在的病毒衣壳或包膜蛋白具有至少约80%氨基酸序列同一性并且在哺乳动物中具有免疫原性活性的多肽或其片段。在一个实施方案中,甲病毒结构蛋白与以上讨论的甲病毒具有至少约85%、90%、95%或更大的氨基酸序列同一性。

[0035] 病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原可直接或间接地融合。在一个实施方案中,一个或两个接头可介于抗原的N-端残基与病毒结构蛋白之间和/或抗原的C-端残基与病毒结构蛋白之间。

[0036] 抗原或病毒结构蛋白可截短和由短接头替代。在一些实施方案中,抗原或病毒结构蛋白包括一个或多个肽接头。一般地,接头由2-25个氨基酸 (例如2、3、4、5或6个氨基酸) 组成。通常,其长度为2-15个氨基酸,尽管在某些情况下,其可仅为一个,比如单个甘氨酸残基。

[0037] 在一个实施方案中,其中编码病毒结构蛋白的多核苷酸与编码抗原的多核苷酸遗传上融合的核酸分子在宿主细胞 (例如哺乳动物细胞 (例如293F细胞)) 中表达,使得第一附接位点和第二附接位点通过肽键连接。在这种情况下,病毒结构蛋白和抗原通过肽键连接。对于该实施方案,第一附接位点和/或第二附接位点可从初始蛋白或抗原遗传修饰。例如,

第一附接位点从病毒结构蛋白修饰,使得蛋白通过接头肽(包括SG、GS、SGG、GGS和SGSG)与抗原缀合。当病毒结构蛋白与抗原化学缀合时,第一附接位点和第二附接位点可通过作为化合物的化学交联剂连接。交联剂的实例包括但不限于SMPH、磺基-MBS、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-SIAB、磺基-SMPB、磺基-SMCC、SVSB、SIA和可自Pierce Chemical Company获得的其他交联剂。

[0038] 优选地,抗原可与基孔肯雅病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白连接作为通过遗传工程化产生的融合蛋白。

[0039] 用于本申请的基孔肯雅病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白可为基孔肯雅病毒或委内瑞拉马脑炎病毒包膜蛋白或衣壳或一种或多种包膜蛋白和/或衣壳蛋白的复合物。

[0040] 基孔肯雅病毒的实例包括但不限于毒株37997和毒株LR2006 OPY-1。

[0041] 委内瑞拉马脑炎病毒的实例包括但不限于毒株TC-83。

[0042] 用于本申请的基孔肯雅病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白可为天然存在的病毒结构蛋白或其经修饰的蛋白。经修饰的蛋白可为天然存在的病毒结构蛋白的片段。在一个实施方案中,经修饰的蛋白与天然存在的病毒衣壳和/或包膜蛋白具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,经修饰的蛋白为突变体,其中基于天然存在的病毒衣壳和/或包膜蛋白缺失、取代和/或添加至多10%的氨基酸。例如,可将K64A或K64N突变引入到用于本申请的委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白的衣壳中。

[0043] 基孔肯雅病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白可由衣壳、E3、E2和E1蛋白组成或包含它们。E3和E2蛋白可一起表达,使得E2和E3可形成一种蛋白。

[0044] 基孔肯雅病毒结构蛋白的实例包括但不限于基孔肯雅病毒毒株37997的衣壳-E3-E2-E1以及基孔肯雅病毒LR2006 OPY-1的衣壳-E3-E2-E1。

[0045] 委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白的实例包括但不限于委内瑞拉马脑炎病毒毒株TC-83的衣壳-E3-E2-E1。

[0046] 示例性的基孔肯雅病毒结构蛋白序列以Genbank登录号ABX40006.1提供,其在以下描述(SEQ ID NO:6):

[化学式1]

mefiptqtfnriryqprpwtptrptiqvirprprpqrqagqlaqlisavnkltmravpqqkpr
rnrknkkqkqkqapqnnntnqkkqppkkkpaqkkkkpgrrrermcmkiendcifevkhegkvt
gyaclvgdkvmkpahvkgtdnadlaklafkrsskydlecaqipvhmksdaskfthekepegy
ynwhhgavqysggrftiptgagkpgdsgripfdnkgrrvaivlgganegartalsvvtwnkd
ivtkitpegaeewslaipvmcllanttfpcsqppctpcceyekepeetlrmlednvmrpgyyq
llqasltcsphrqrstkdnfnykatrpylahcpdcgeghschspvalerirneatdgtlk
iqvslqigiktdsdhwtklrymdnhmpadaeraglfvrtsapctitgtmghfilarcpkge
tlvtvgftdsrkishscthpfhhdppvigrekfhsrpqhgkelpcstyvgstaateeievhm
ppdtpdrtlmsqqsgnvkitvngqtvrykcncggsneglttttdkvinncvkdqchaavtnhk
kwqynsplvrnaelgdrkgkihipfplanvtcrvpkarnptvtygknqvimllypdhptll
syrnmgeepnyqeewvmhkkevltvpteglevtwgnnepkykwpqlstngtahghpheill
yyyelyptmtvsvsvatfillsmvgmaagmcmcarrrcitpyeltpgatvpfllsliccir
takaatyqeaaiylwneqqplfwlqaliplaalivlcnclrlpcccktaflavmsvgaht
vsayehvtvipntvgvpyktlvnrpgyspmvlemellsvtleptlsldytceyktvipspy
vkccgtaeckdknlpdysckvftgvypfmwggaycfcdaentqlseahveksescktefasa
yrahtasasaklrlyqgnnitvtayangdhavtvkdakfivgpmssawtpfdnkivvykgd
vynmdyppfagagrpqgfgdiqsrtpeskdvyantqlvlqrpavgtvhvpysqapsqgfywllk
ergaslqhtapfgcqiatsnpvravncavgnmpisidipeaaftrrvdapsltdmscevpact
hssdfggvaiikyaaskkgkcavhsmtnavtireaeievegnsqqlqisfstalasaefrvqv
cstqvhcaaechppkdhivnypashttlgvqdisatamswvqkitggvgllvavaalilivv
lcvsfsrh

[0047] 另一个示例性的基孔肯雅病毒结构蛋白序列以Genbank登录号ABX40011.1提供，其在以下描述 (SEQ ID NO:7)：

[化学式2]

mefiptqtfnriryqprpwprptiqvirprprpqrqagqlaqlisavnkltmravpqqkpr
rnrknkkqkqkqapqndpkqkkqppqkkpaqkkkkpgrrrermcmkiendcifevkhegkvm
gyaclvgdkvmkpahvkgtdnadlaklafkrsskydlecaqipvhmksdaskfthekepegy
ynwhhgavqysggrftiptgagkpgdsgripfdnkgrrvaivlgganegartalsvvtwnkd
ivtkitpegaeewslalpvldllanttfpcsqppctpcceyekepestlrmlednvmrpgyyq
llkasltcsphrqrstkdnfnykatrpylahcpdcgeghschspialerirneatdgtlk
iqvslqigiktdsdhwtklrymdshtpadaeragllvrtsapctitgtmghfilarcpkge
tlvtvgftdsrkishtcthpfhheppvigrerfhsrpqhgkelpcstyvgstaataeeievhm
ppdtpdrtlmtqqsgnvkitvngqtvrykcncggsneglttttdkvinncidqchaavtnhk
nwqynsplvrnaelgdrkgkihipfplanvtcrvpkarnptvtygknqvtmllypdhptll
syrnmgeepnyheewvthkkevltvpteglevtwgnnepkykwpqmstngtahghpheill
yyyelyptmtvviivsvasfvllsmvgtavgmvcarrrcitpyeltpgatvpfllsllccvr
ttkaatyeeaaaylwneqqplfwlqaliplaalivlcnclklpcccktaflavmsigaht
vsayehvtvipntvgvpyktlvnrpgyspmvlemelqsvtleptlsldytceyktvipspy
vkccgtaeckdkslpdysckvftgvypfmwggaycfcdaentqlseahveksescktefasa
yrahtasasaklrlyqgnnitvaayangdhavtvkdakfvvgpmssawtpfdnkivvykgd
vynmdyppfagagrpqgfgdiqsrtpeskdvyantqlvlqrpaaagtvhvpysqapsqgfywllk
ergaslqhtapfgcqiatsnpvravncavgnipisidipdaaftrrvdapsvtdmscevpact
hssdfggvaiikytaskkgkcavhsmtnavtireadvevegnsqqlqisfstalasaefrvqv
cstqvhcaaaachppkdhivnypashttlgvqdisttamswvqkitggvgllvavaalilivv
lcvsfsrh

[0048] 示例性的委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白在以下描述 (SEQ ID NO:8)：

[化学式3]

mfpfqpmypmqmpyrnpfaaprpfprtdpflamqvqeltrsmantlftkqrrdappegps
aakpkkeasqkqkggggkknqgkktaktgppnpkaqngnkkktknkpgkrqrmvmkles
dktfpimlegkingyacvvggklfrpmhvegkidndvlaalktkkaskydeyadvpqnra
dtfkytheqpggyyswhhgavqyengrftvpkgvgakgdsgrpildnqgrvvaivlggvneg
srtalsvmmwnekgvtvkytpenceqswlvtmcllanvtfpcagppicydrkpaetlaml
vnvdnpgydelleaavkcpgrkrsteelfneykltrpymarcircavgschspiaieavks
dghdgyvrlqtssqyglldssgnlkgtrmrydmhgtikeiplhqvslytsrpchivdghgyfl
larcpagdsitmefkkdsvrhscsvpyevkfnpvgrelythppegveqacqvyahdaqnr
ayvemhlpqsevdsslvslsgssvtvtpdpdgtssalvececggtkisetinktkqfsqctk
qcrayrlqndkwvynsdklpkaagatlkgklhvpflladgkctvplapepmifgfrsvslk
lhpknptylitrqladephythelisepavrnftvtekgwefvwnhpnkfrwaqetapgnp
hglphevithyhyhrypmstilglisicaaiatvsvaastwlfcrsrvacltpyriltpnaripf
clavlccartaraettwesldhlwnnnqgmfwlqlliplaalivvtrllrcvccvvpflvma
gaagagayehattmpsagisyntivnragyaplpisitptkikliptvnleyvthyktgm
dspaikccgsqectptyrpdeqckvftgvypfmwggaycfcdtentqvsakayvmksddclad
haeaykahtasvqaflnitvgehsivttvyvnetpvnfngvkitagplstawtpfdrkivq
yageiynydfpeygagqpqgaafgdiqsrvtsssdlyantnlvlqrpkagaihvpytqapsgfe
qwkdkapslkftapfgceiytnpirancavgsiplafldipdalfrvsetptlsaaectl
necvyssdfggiatvkysasksgkcavhvpstatlkeaavelteggstahfstanihpef
rlqictsyvtckgdchppkdhivthpqyhaqftaavsktawtwltsllggsaviiiglv
ativamyvltngkhn

在一个实施方案中,第一附接位点包含氨基,优选为赖氨酸残基的氨基。在一个实施方案中,第二附接位点包含巯基,优选为半胱氨酸的巯基。

[0049] 根据本申请,基孔肯雅病毒样颗粒或委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒包含基孔肯雅病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白和至少一种半乳糖凝集素-3抗原,其中至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入病毒结构蛋白的E3中,并且基孔肯雅病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原表达为可提供的融合蛋白。半乳糖凝集素-3抗原可直接或间接地插入病毒结构蛋白的E3中。

[0050] 基孔肯雅病毒以及委内瑞拉马脑炎的病毒结构蛋白由E1、E2、6K和E3组成。6K在组装过程期间自然切割并从VLP去除。成熟VLP由衣壳、E1和E2组成。在本说明书和权利要求中,“病毒结构蛋白”不仅指具有6K的那些,而且指去除6K之后的那些。

[0051] 在工作实例中使用的CHIKV和VEEV的6K序列如下:

CHIKV毒株OPY-1,6K:SEQ ID NO:6的749-809aa

atyqeaaiylwneqqplfwlqalipaalivlcnclrlppcccktlaflavmsvgahtvsa (SEQ ID NO:6)

CHIKV毒株37997,6K:SEQ ID NO:7的749-809aa

atyeeaaaylwneqqplfwlqalipaalivlcnclklppcccktlaflavmsigahtvsa (SEQ ID NO:7)

VEEV毒株TC-83,6K:SEQ ID NO:8的758-813aa

ettwesldhlwnnnqgmfwlqlliplaalivvtrllrcvccvvpflvmagaagaga
(SEQ ID NO:8)

[0052] 对于基孔肯雅病毒结构蛋白,可插入至少一种半乳糖凝集素-3抗原以代替SEQ ID NO:6或7的322R至325R的弗林蛋白酶位点(RKRR)。例如,对于基孔肯雅病毒结构蛋白,至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入SEQ ID NO:6或7的321位残基H和326位S之间;SEQ ID NO:6或7的320位P和326位S之间;或者SEQ ID NO:6或7的319位S和326位S之间。VLP_CHI 0.56载体可用于制备基孔肯雅病毒样颗粒,其中半乳糖凝集素-3抗原插入SEQ ID NO:6或7的残基

321和326之间。当半乳糖凝集素-3抗原插入SEQ ID NO:6或7的残基321和326之间时,由本申请提供的病毒样颗粒可为基孔肯雅病毒样颗粒,其由E2和E3的复合物、衣壳和E1组成,并且其中至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入到E3区域中。

[0053] 委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白,可插入至少一种半乳糖凝集素-3抗原以代替SEQ ID NO:8的331R至334R的弗林蛋白酶位点(RKRR)。例如,对于委内瑞拉马脑炎病毒结构蛋白,至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入SEQ ID NO:8的330位G和335位S之间;SEQ ID NO:8的329位P和335位S之间;或者SEQ ID NO:8的328位C和335位S之间。VLP_VEEV 0.66载体可用于制备委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒,其中抗原插入SEQ ID NO:8的残基330和335之间。当抗原插入SEQ ID NO:8的残基330和335之间时,由本申请提供的病毒样颗粒可为委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒,其由E2和E3的复合物、衣壳和E1组成,并且其中至少一种半乳糖凝集素-3抗原插入到E3区域中。

[0054] 就多肽序列或多核苷酸序列而言,“改变”意指指定位置处的氨基酸或核苷酸的改变。如本文使用的,改变包括在多肽或多核苷酸的指定位置处的氨基酸或核苷酸的取代、缺失或插入。在一些实施方案中,甲病毒衣壳蛋白核定位信号的改变包括用不带电荷的氨基酸(例如丙氨酸或天冬酰胺,或除碱性带电荷的氨基酸比如赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸)取代带电荷的氨基酸(例如赖氨酸或精氨酸)。

[0055] “类似物”意指不相同但具有类似的功能或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留相应的天然存在多肽的生物活性,同时相对于天然存在的多肽具有增强类似物的功能的某些生物化学修饰。此类生物化学修饰可增加类似物的蛋白酶抗性、膜渗透性或半衰期,而不改变例如配体结合。类似物可包括非天然氨基酸。

[0056] 在本公开中,“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“含有”和“具有”等可具有在美国专利法中赋予它们的含义,并且可意指“包括(includes)”、“包括(including)”等;“基本上由...组成(consisting essentially of)”或“基本上由...组成(consists essentially)”同样具有在美国专利法中赋予的含义,并且该术语为开放式的,允许存在超过所列举的,只要所列举的基本特征或新特征不被存在超过所列举的改变即可,但排除现有技术实施方案。

[0057] “检测”意指鉴定待检测分析物的存在、不存在或量。

[0058] “疾病”意指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何病况或病症。

[0059] “药剂”意指任何小分子化合物、抗体、核酸分子或多肽或其片段。

[0060] “有效量”意指相对于未治疗的患者改善疾病的症状所需的药剂的量。用于实践本文公开的用于预防或治疗疾病的方法的活性化合物的有效量取决于施用方式、受试者的年龄、体重和一般健康而不同。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和剂量方案。这种量称为“有效”量。

[0061] “改善”意指降低、抑制、减弱、减少、阻止或稳定疾病或其症状的发展或进展。

[0062] 本公开提供了可用于开发对治疗或预防本文所述的疾病具有高度特异性的药物的许多靶点。另外,本文公开的方法提供了易行的方法来鉴定对用于受试者安全的疗法。另外,这些方法提供了以高通量、高灵敏度和低复杂性分析几乎任何数量的化合物对本文所述疾病的影响的途径。

[0063] “片段”意指多肽或核酸分子的一部分。该部分优选含有参考核酸分子或多肽的整

个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。片段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90或100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个核苷酸或氨基酸。

[0064] “分离的多核苷酸”意指不含在核酸分子所源自的生物体的天然存在基因组中侧接该基因的基因的核酸分子(例如DNA)。因此,该术语包括例如重组DNA,其掺入到载体中;掺入到自主复制的质粒或病毒中;或掺入到原核生物或真核生物的基因组DNA中;或者作为独立于其他序列的单独分子(例如通过PCR或限制性核酸内切酶消化而产生的cDNA或基因组或cDNA片段)存在。另外,该术语包括从DNA分子转录的RNA分子,以及作为编码另外的多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0065] “分离的多肽”意指已与天然伴随其的成分分离的多肽。一般地,当多肽为按重量计至少60%,不含与其天然缔合的蛋白和天然存在的有机分子时,多肽为分离的。优选地,制剂为按重量计至少75%,更优选至少90%,且最优选至少99%的本发明的多肽。分离的多肽可例如通过从天然来源提取、通过表达编码这种多肽的重组核酸;或通过化学合成蛋白来获得。纯度可通过任何适当的方法例如柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过HPLC分析来测量。

[0066] “标志物”意指具有与疾病或病症相关的表达水平或活性改变的任何蛋白或多核苷酸。

[0067] 如本文使用的,“核定位信号”或“NLS”为当存在于多肽表面时将多肽靶向至细胞核的氨基酸序列。NLS序列为本领域已知的。参见例如,非专利文献22:Goldfarb,D.和N.Michaud(1991)Trends Cell Biol.1,20-24;非专利文献23:Gorlich,D.和I.W.Mattaj(1996)Science 271,1513-1518)。在一个实施方案中,NLS包括一个或多个带正电荷氨基酸(比如赖氨酸或精氨酸)的短序列。NLS的共有序列包括K-K/R-X-K/R(非专利文献24:Schneider,J.等人(1988)Cell 54,117-125)和由约10个氨基酸的间隔区隔开的两个碱性氨基酸簇,例如KR[PAATKKAGQA]KKKK(非专利文献25:Dingwall等人,Cell Biol.107(3):841-9)。就本文公开的甲病毒氨基酸序列而言,NLS存在于EEEV衣壳蛋白的氨基酸67-70处(KRKK);WEEV衣壳蛋白的氨基酸67-70处(KKKK);VEEV衣壳蛋白的氨基酸64-68处(KKPKK);CHIKV衣壳蛋白的氨基酸62-69处(RRNRKNKK);罗斯河病毒衣壳蛋白的氨基酸71-74处(RKKK);以及巴马森林病毒衣壳蛋白的氨基酸64-68处(KKPKK)。

[0068] 如本文使用的,如“获得药剂”中的“获得”包括合成、购买或以其他方式获取药剂。

[0069] “减少”意指至少10%、25%、50%、75%或100%的负改变。

[0070] “参考”意指标准或对照条件。

[0071] “参考序列”为用作序列比较的基础的确定序列。参考序列可为指定序列的子集或全部;例如全长cDNA或基因序列的区段,或完整的cDNA或基因序列。对于多肽,参考多肽序列的长度通常将为至少约16个氨基酸,优选至少约20个氨基酸,更优选至少约25个氨基酸,且甚至更优选约35个氨基酸、约50个氨基酸或约100个氨基酸。对于核酸,参考核酸序列的长度通常将为至少约50个核苷酸,优选至少约60个核苷酸,更优选至少约75个核苷酸,且甚至更优选约100个核苷酸或约300个核苷酸或其附近或其间的任何整数。

[0072] “特异性地结合”意指识别和结合本发明的多肽,但基本上不识别和结合天然地包括本发明的多肽的样品(例如生物样品)中其他分子的化合物或抗体。

[0073] 可用于本文方法的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。此

类核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但一般地将表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”的多核苷酸一般地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。可用于本发明方法的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但一般地将表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”的多核苷酸一般地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意指在各种严格性条件下,在互补多核苷酸序列(例如本文所述的基因)或其部分之间配对以形成双链分子。

[0074] 例如,严格的盐浓度通常将为小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选为小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,且更优选为小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格性杂交可在不存在有机溶剂(例如甲酰胺)的情况下获得,而高严格性杂交可在存在至少约35%甲酰胺,且更优选至少约50%甲酰胺的情况下获得。严格的温度条件通常将包括至少约30°C,更优选至少约37°C,且最优选至少约42°C的温度。不同的另外参数,比如杂交时间、去污剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度以及包含或不包含载体DNA,为本领域技术人员众所周知的。通过根据需要组合这些不同条件来实现各种严格性水平。在一个优选实施方案中,杂交将在30°C下于750mM NaCl,75mM柠檬酸三钠和1% SDS中发生。在一个更优选实施方案中,杂交将在37°C下于500mM NaCl,50mM柠檬酸三钠,1% SDS,35%甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精子DNA(ssDNA)中发生。在一个最优选实施方案中,杂交将在42°C下于250mM NaCl,25mM柠檬酸三钠,1% SDS,50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中发生。这些条件的有用变型为本领域技术人员易于显而易见的。

[0075] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤的严格性也会不同。洗涤严格性条件可通过盐浓度和通过温度来定义。如上,可通过降低盐浓度或通过提高温度来提高洗涤严格性。例如,用于洗涤步骤的严格盐浓度优选将为小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,且最优选为小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严格温度条件通常将包括至少约25°C,更优选至少约42°C,且甚至更优选至少约68°C的温度。在一个优选实施方案中,洗涤步骤将在25°C下于30mM NaCl,3mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。在一个更优选实施方案中,洗涤步骤将在42°C下于15mM NaCl,1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。在一个更优选实施方案中,洗涤步骤将在68°C下于15mM NaCl,1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。

[0076] 这些条件的另外变型为本领域技术人员易于显而易见的。杂交技术为本领域技术人员众所周知的,并且描述于例如Benton和Davis(*Science* 196:180,1977);Grunstein和Hogness(*Proc.Natl.Acad.Sci.,USA* 72:3961,1975);Ausubel等人(*Current Protocols in Molecular Biology*,Wiley Interscience,New York,2001);Berger和Kimmel(*Guide to Molecular Cloning Techniques*,1987,Academic Press,New York);以及Sambrook等人,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York中。“基本上相同”意指表现出与参考氨基酸序列(例如本文所述氨基酸序列的任一种)或核酸序列(例如本文所述核酸序列的任一种)的至少50%同一性的多肽或核酸分子。优选地,这种序列在氨基酸水平或核酸上与用于比较的序列具有至少60%,更优选80%或85%,且更优选90%、95%或甚至99%的同一性。

[0077] 序列同一性一般地使用序列分析软件(例如威斯康辛大学生物技术中心(University of Wisconsin Biotechnology Center),1710University Avenue,Madison,

Wis.53705的遗传学计算机组的序列分析软件包、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)来测量。这种软件通过对各种取代、缺失和/或其他修饰指定同源性程度来匹配相同或相似的序列。保守取代一般地包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。在一个确定同一性程度的示例性方法中,可使用BLAST程序,其中概率评分在 $e<3$ 和 $e<100$ 之间表明密切相关的序列。

[0078] “受试者”意指哺乳动物,包括但不限于人类或非人哺乳动物,比如牛、马、犬、绵羊或猫。

[0079] 本文提供的范围应理解为该范围内所有值的简写。例如,1-50的范围应理解为包括选自以下的任何数字、数字的组合或子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。

[0080] 如本文使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指减轻或改善病症和/或与其相关的症状。应当意识到,尽管不排除,但是治疗病症或病况并不需要完全地消除病症、病况或与其相关的症状。

[0081] 除非具体地说明或从上下文显而易见,否则如本文使用的,术语“或”理解为包含性的。

[0082] 除非具体地说明或从上下文显而易见,否则如本文使用的,术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该/所述”理解为单数或复数的。

[0083] 除非具体地说明或从上下文显而易见,否则如本文使用的,术语“约”理解为处于本领域正常容许的范围之内,例如处于平均值的2个标准偏差之内。约可理解为处于所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之内。除非从上下文另外明确,否则本文提供的所有数值均由术语约修饰。

[0084] 在本文变量的任何定义中对化学基团列表的列举包括作为任何单个基团或所列举基团的组合的该变量的定义。本文中关于变量或方面的实施方案的列举包括作为任何单个实施方案或者与任何其他实施方案或其部分组合的该实施方案。

[0085] 本文提供的任何组合物或方法可与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或多种组合。

[0086] 甲病毒多核苷酸

通常,本公开包括编码VLP的任何核酸序列,所述VLP在结构蛋白中具有增强VLP在哺乳动物细胞中的表达的改变。在一个实施方案中,甲病毒多肽包括至少一种甲病毒E2蛋白或衣壳蛋白NLS,其包含增加VLP在哺乳动物细胞中的表达的改变。在一个实施方案中,甲病毒E2蛋白在对应于CHIKV E2蛋白中氨基酸234的氨基酸位置处具有非赖氨酸残基(例如天冬酰胺)和/或在对应于CHIKV E2蛋白中氨基酸251的氨基酸位置处具有在病毒出芽期间使E2蛋白不稳定的修饰。在另一个实施方案中,甲病毒多肽包括至少一种甲病毒衣壳蛋白,其在对应于甲病毒衣壳蛋白NLS中赖氨酸残基的氨基酸位置处具有非赖氨酸残基(例如丙氨酸或天冬酰胺)和/或在对应于甲病毒衣壳蛋白NLS中精氨酸残基的氨基酸位置处具有非精氨酸残基(例如丙氨酸或天冬酰胺)。在特定实施方案中,甲病毒衣壳蛋白为WEEV毒株CBA87衣壳蛋白,其具有改变K67N、K68N和/或K69N中的一种或多种。在某些实施方案中,甲

病毒衣壳蛋白为VEEV毒株TC83衣壳蛋白,其具有改变K64N、K65A、K65N、K67A和/或K67N中的一种或多种。在一些实施方案中,甲病毒衣壳蛋白为EEEV毒株PE-6衣壳蛋白,其具有改变K67N。在特别的实施方案中,甲病毒衣壳蛋白为CHIKV(毒株37997)毒株衣壳蛋白,其具有改变R62A、R63A、R65A、K66A、K68A和/或K69A中的一种或多种。在特定实施方案中,甲病毒衣壳蛋白为罗斯河病毒衣壳蛋白,其具有改变R71N、K72N、K73N和/或K74N中的一种或多种。在特定实施方案中,甲病毒衣壳蛋白为巴马森林病毒衣壳蛋白,其具有改变K64A、K64N、K65A、K65N、K67A、K67N、K68A和/或K68N中的一种或多种。分离的核酸分子可通过本领域众所周知的重组DNA技术进行操纵。因此,其中5'和3'限制性位点已知的,或聚合酶链式反应(PCR)引物序列已公开的载体中含有的核苷酸序列被认为是分离的,但在其天然宿主中以其天然状态存在的核酸序列则不是。在某些示例性实施方案中,载体包含CHIKV 37997或WEEV 71V-1658核酸区段或其片段。载体可进一步包含CMV/R启动子。载体还可包含衣壳蛋白或其片段。

[0087] 在其他示例性实施方案中,除E2蛋白之外,载体还包含选自E3、6K和E1的另一种包膜蛋白。在某些实例中,疫苗可包含衣壳、E3、E2、6K和E1。在其他实例中,疫苗可包含E3、E2、6K和E1。

[0088] 在一个特别的实施方案中,本文公开的序列中所示的核酸分子包括核苷酸序列,所述核苷酸序列编码与编码选自甲病毒衣壳、E3、E2、6K和E1(包括CHIKV或VEEV衣壳、E3、E2、6K和E1)的蛋白的多肽具有至少约50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或更高同一性(例如,当与氨基酸序列的总长度相比较时)的多肽。

[0089] 在本发明的一些实施方案中,蛋白可包含突变,所述突变含有产生沉默的取代、添加或缺失但不改变编码蛋白的特性或活性或者蛋白如何制备的改变。可出于多种原因,例如针对特定宿主优化密码子表达而产生核苷酸变体,参见美国专利公开2005/0118191,其出于所有目的通过引用以其全部并入本文。

[0090] 另外,可对核苷酸测序以确保克隆正确的编码区且不含任何不需要的突变。核苷酸可亚克隆到表达载体(例如杆状病毒)中用于在任何细胞中表达。本领域的技术人员理解各种亚克隆方法为可获得的且为可能的。

[0091] 分离的核酸可为基本上纯化的,但并非必须的。例如,在克隆或表达载体内的分离的核酸不是纯的,因为其可能仅占其所在细胞中材料的微小百分比。当在本文中使用该术语时,这种核酸为分离的,因为其可通过本领域普通技术人员已知的标准技术易于操纵。

[0092] 多肽表达

通常,可通过用在合适的表达媒介物中的编码多肽的核酸分子或其片段的全部或部分转化合适的宿主细胞来产生包含一种或多种本文甲病毒多肽的VLP。

[0093] 分子生物学领域的技术人员将理解,可使用多种多样的表达系统中的任一种来提供重组蛋白。所使用的确切宿主细胞对本发明并不关键。本发明的多肽可在原核宿主(例如大肠杆菌(*E. coli*))或在真核宿主(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、昆虫细胞,例如Sf21细胞、或哺乳动物细胞,例如NIH 3T3、HeLa、COS细胞)中产生。此类细胞可从广泛范围的来源获得(例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection), Rockland, Md.; 也参见例如Ausubel等人,同上)。昆虫细胞的非限制性实例为

草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf) 细胞, 例如 Sf9、Sf21、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞, 例如 High Five 细胞和果蝇 S2 细胞。真菌 (包括酵母) 宿主细胞的实例为酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*, K lactis)、假丝酵母属 (*Candida*) 物种, 包括白色假丝酵母 (*C. albicans*) 和光滑假丝酵母 (*C. glabrata*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*, S.pombe)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和解脂亚罗酵母 (*Yarrowia lipolytica*)。哺乳动物细胞的实例为 COS 细胞、幼仓鼠肾细胞、小鼠 L 细胞、LNCaP 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、人胚胎肾 (HEK) 细胞、非洲绿猴细胞、CV1 细胞、HeLa 细胞、MDCK 细胞、Vero 和 Hep-2 细胞。也可使用非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞或两栖动物来源的其他细胞。原核宿主细胞包括细菌细胞, 例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和分枝杆菌。

[0094] 克隆所述蛋白的方法为本领域已知的。例如, 可通过从提取自感染有所述病毒的细胞的多聚腺苷酸化 mRNA 进行 RT-PCR 来分离编码特定甲病毒蛋白 (例如 CHIKV、WEEV、EEEV、VEEV、罗斯河病毒或巴马森林病毒结构蛋白) 的基因。所得产物基因可作为 DNA 插入物克隆到载体中。术语“载体”是指核酸可通过其而在生物体、细胞或细胞成分之间传播和/或转移的工具。载体包括质粒、病毒、细菌噬菌体、原病毒、噬菌粒、转座子、人工染色体等, 它们自主复制或者可整合到宿主细胞的染色体中。载体也可作为裸 RNA 多核苷酸、裸 DNA 多核苷酸、在同一链内由 DNA 和 RNA 两者构成的多核苷酸、多聚赖氨酸缀合的 DNA 或 RNA、肽缀合的 DNA 或 RNA、脂质体缀合的 DNA 等, 它们不能自主复制。在许多但非全部的常见实施方案中, 本发明的载体为质粒或杆粒。

[0095] 本发明进一步提供克隆到可在提供 VLP 形成的细胞中表达的表达式载体中的编码蛋白 (包括嵌合分子) 的核苷酸。“表达式载体”为能够促进掺入其中的核酸的表达以及复制的载体, 比如质粒。

[0096] 一般地, 待表达的核酸分子“可操作地连接”至启动子和/或增强子, 并且通过启动子和/或增强子进行转录调节控制。

[0097] 存在用于产生本发明的多肽的多种表达系统。可用于产生此类多肽的表达式载体非限制性地包括染色体、附加体和病毒衍生的载体, 例如衍生自细菌质粒、细菌噬菌体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件、病毒比如杆状病毒、乳多空病毒 (papovavirus) 比如 SV40、痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病病毒和逆转录病毒的载体以及衍生自其组合的载体。

[0098] 本文提供的构建体和/或载体包含编码结构多肽的甲病毒多核苷酸, 所述结构多肽包括如本文所述的包膜蛋白或衣壳蛋白或其部分。载体可为例如噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。包含核苷酸的构建体和/或载体应可操作地连接至适当的启动子, 比如 CMV 启动子、噬菌体 λ PL 启动子、大肠杆菌 lac、phoA 和 tac 启动子、SV40 早期和晚期启动子, 且逆转录病毒 LTR 的启动子为非限制性实例。取决于宿主细胞和/或所期望的表达速率, 其他合适的启动子为技术人员已知的。表达式构建体将进一步含有用于转录起始、终止的位点, 并在转录区含有用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的转录物的编码部分将优选包括在待翻译多肽开始处的翻译起始密码子和适当地位于待翻译多肽末端处的终止密码子。

[0099] 表达式载体将优选包括至少一种选择标记。此类标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶、G418 或新霉素抗性以及用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素、卡那霉

素或氨苄青霉素抗性基因。在载体中优选的是病毒载体,比如杆状病毒、痘病毒(例如痘苗病毒、禽痘病毒、金丝雀痘病毒、鸡痘病毒、浣熊痘病毒、猪痘病毒等)、腺病毒(例如犬腺病毒)、疱疹病毒和逆转录病毒。可与本发明一起使用的其他载体包含用于细菌的载体,其包含pQE70、pQE60和pQE-9、pBluescript载体、Phagescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。优选的真核载体为pFastBac1 pWINE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体为技术人员易于显而易见的。

[0100] 重组构建体可制备并用于转染、感染或转化,且可将病毒蛋白(包括本文所述的那些)表达至真核细胞和/或原核细胞中。因此,本发明提供了包含一种或多种载体的宿主细胞,所述载体含有编码以上描述的甲病毒结构基因(包括衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分)和/或任何嵌合分子的核酸,并且允许以上描述的甲病毒结构基因(包括衣壳E3、E2、6K和E1或其部分),和/或任何嵌合分子在允许形成VLP的条件下在所述宿主细胞中表达。

[0101] 在一个实施方案中,所述载体为重组杆状病毒。在另一个实施方案中,将所述重组杆状病毒转染到昆虫细胞中。在一个优选实施方案中,所述细胞为昆虫细胞。在另一个实施方案中,所述昆虫细胞为Sf9细胞。

[0102] 在另一个实施方案中,所述载体和/或宿主细胞包含编码如所描述的甲病毒基因(包括衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分)的核苷酸。

[0103] 在另一个实施方案中,所述载体和/或宿主细胞基本上由如本文所述的甲病毒衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分组成。在另一实施方案中,所述载体和/或宿主细胞由包含衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分的甲病毒蛋白组成。这些载体和/或宿主细胞含有如本文所述的甲病毒核心、E3、E2、6K和E1或其部分,并且可含有另外的细胞成分,比如细胞VL蛋白(celluVLProtein)、杆状病毒蛋白、脂质、碳水化合物等。

[0104] 一种用于多肽生产的特定细菌表达系统为大肠杆菌pET表达系统(Novagen, Inc., Madison, Wis)。根据该表达系统,将编码多肽的DNA以被设计为允许表达的取向插入到pET载体中。由于编码这种多肽的基因处于T7调节信号的控制下,因此多肽的表达通过在宿主细胞中诱导T7 RNA聚合酶的表达来实现。这一般使用响应于IPTG诱导而表达T7RNA聚合酶的宿主菌株来实现。一旦产生,然后便根据本领域已知的标准方法分离重组多肽,所述方法例如本文描述的那些。

[0105] 另一种用于多肽生产的细菌表达系统为pGEX表达系统(Pharmacia)。该系统采用GST基因融合系统,其被设计用于高水平表达作为融合蛋白的基因或基因片段以及快速纯化和回收功能性基因产物。将感兴趣的蛋白与来自日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)的谷胱甘肽S-转移酶蛋白的羧基末端融合,并通过使用Glutathione Sepharose 4B的亲和色谱法容易地从细菌裂解物中纯化。融合蛋白可在温和条件下通过用谷胱甘肽洗脱来回收。谷胱甘肽S-转移酶结构域从融合蛋白的切割通过在该结构域上游存在用于位点特异性蛋白酶的识别位点来促进。例如,pGEX-2T质粒中表达的蛋白可用凝血酶切割;在pGEX-3X中表达的那些可用因子Xa切割。

[0106] 甲病毒多肽和类似物

本发明提供包含一种或多种甲病毒多肽的VLP。本发明中还包括包含一种或多种甲病毒多肽或其片段的VLP,所述甲病毒多肽或其片段以增强或不抑制其调节免疫反应的

能力的方式进行修饰。在一个实施方案中,本发明提供了通过产生改变来优化甲病毒氨基酸序列或核酸序列的方法。此类改变可包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本发明进一步包括任何天然存在的本发明多肽的类似物。类似物可通过氨基酸序列差异、翻译后修饰或两者而与天然存在的本发明多肽不同。本发明的类似物通常表现出与天然存在的本发明的氨基酸序列的全部或部分至少85%,更优选90%,且最优选95%或者甚至99%的同一性。序列比较的长度为至少10、13、15个氨基酸残基,优选至少25个氨基酸残基,且更优选超过35个氨基酸残基。

[0107] 甲病毒多肽的改变包括但不限于定点诱变、随机点诱变、同源重组(DNA改组)、使用含有尿嘧啶的模板的诱变、寡核苷酸介导的诱变、硫代磷酸酯修饰的DNA诱变、使用带缺口的双链体DNA的诱变等。另外合适的方法包括点错配修复、使用修复缺陷宿主菌株的诱变、限制性选择和限制性纯化、缺失诱变、通过总基因合成的诱变、双链断裂修复等。诱变,例如涉及嵌合构建体的诱变,也包括在本发明中。在一个实施方案中,诱变可由天然存在的分子或者改变或突变的天然存在的分子的已知信息,例如序列、序列比较、物理特性、晶体结构等来指导。

[0108] 在一个实施方案中,本发明提供不同于参考多肽的多肽变体。术语“变体”是指相对于参考序列有一个或多个氨基酸被改变的氨基酸序列。变体可具有“保守”变化,其中取代的氨基酸具有相似的结构或化学特性,例如用异亮氨酸替代亮氨酸。备选地,变体可具有“非保守”变化,例如用色氨酸替代甘氨酸。类似的微小变化也可包括氨基酸缺失或插入,或两者。可使用本领域众所周知的计算机程序(例如DNASTAR软件)找到确定哪些氨基酸残基可被取代、插入或缺失而不消除生物或免疫活性的指南。合乎期望地,变体显示出显著生物活性。在一个实施方案中,蛋白变体形成VLP并在向受试者施用时引发抗体反应。

[0109] 天然变体可由于蛋白中的突变而出现。这些突变可导致传染性病原体(infectious agent)的个体组内的抗原变异性。因此,感染有特定毒株的人会发展针对该病毒的抗体,当较新的病毒毒株出现,针对从前的毒株的抗体不再识别较新的病毒并可发生再次感染。本发明包括用于制备VLP的来自传染性病原体的蛋白的所有抗原和遗传变异性。

[0110] 除全长多肽之外,本发明还包括本发明多肽的任一种的片段。如本文使用的,术语“片段”意指至少5、10、13或15。在其他实施方案中,片段为至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸、或至少50个连续氨基酸,且在其他实施方案中为至少60至80或更多个连续氨基酸。本发明的片段可通过本领域技术人员已知的方法产生,或者可由正常的蛋白加工产生(例如从新生多肽去除生物活性不需要的氨基酸,或者通过选择性mRNA剪接或选择性蛋白加工事件去除氨基酸)。

[0111] 具有被设计为模拟甲病毒VLP的化学结构或一种或多种甲病毒多肽功能活性的非蛋白类似物可根据本发明的方法施用。甲病毒类似物可超过天然甲病毒的生理活性。

[0112] 类似物设计的方法为本领域众所周知的,并且可通过修饰化学结构使得所得类似物表现出天然甲病毒多肽的免疫调节活性,根据此类方法进行类似物的合成。这些化学修饰包括但不限于取代可替代的R基团和改变天然甲病毒分子的特定碳原子的饱和程度。

[0113] 优选地,类似物对体内降解具有相对抗性,在施用时导致更持久的治疗效果。用于测量功能活性的测定包括但不限于以下实施例中描述的那些。

[0114] 药物组合物和施用

本发明的特征为包含VLP的药物组合物,所述VLP包含如本文所述的甲病毒的病毒结构蛋白和半乳糖凝集素-3抗原。本文中有用的药物组合物含有药学上可接受的载体以及本发明的VLP,所述药学上可接受的载体包括任何合适的稀释剂或赋形剂,其包括本身不会诱导产生对接受组合物的脊椎动物有害的免疫反应的任何药用物质,并且其可在没有过度毒性的情况下施用。如本文使用的,术语“药学上可接受”意指由联邦或州政府监管机构批准,或在美国药典、欧洲药典或其他普遍公认的药典中列出,用于哺乳动物,并且更特别地用于人类。这些组合物可用作用于在脊椎动物中诱导保护性免疫反应的疫苗和/或抗原组合物。

[0115] 药学上可接受的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、无菌等渗水性缓冲液及其组合。Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co.N.J. 当前版本) 中呈现了对药学上可接受的载体、稀释剂和其他赋形剂的彻底讨论。制剂应适于施用模式。在优选实施方案中,制剂适合于施用于人类,优选地为无菌、非颗粒和/或无热原的。

[0116] 如果需要,组合物还可含有少量的润湿或乳化剂,或pH缓冲剂。组合物可为固体形式,比如适合于重构的冻干粉剂、液体溶液剂、悬浮剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂。口服制剂可包括标准载体,比如药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0117] 在某些实施方案中,VLP组合物以液体形式,例如在指示VLP组合物的量和浓度的密封容器中提供。

[0118] 优选地,VLP组合物的液体形式在气密密封容器中以至少约50 μ g/ml,更优选至少约100 μ g/ml、至少约200 μ g/ml、至少500 μ g/ml或至少1mg/ml提供。

[0119] 备选地,疫苗制剂通过滴剂、大颗粒气溶胶(大于约10微米)或喷入到上呼吸道或小颗粒气溶胶(小于10微米)或喷入到下呼吸道而鼻内施用。尽管任何以上递送途径均会产生免疫反应,但鼻内施用赋予在许多病毒(包括甲病毒,例如CHIKV或VEEV)进入位点处引发粘膜免疫的额外益处。

[0120] 因此,本发明还包括配制诱导哺乳动物对感染或其至少一种症状的免疫的疫苗或抗原组合物的方法,包括向所述制剂中添加有效剂量的VLP,例如甲病毒(例如CHIKV或VEEV)。

[0121] 在某些情况下,优选的是用单个剂量刺激免疫,然而也可通过相同或不同途径施用另外的剂量,以达到期望的效果。例如,在新生儿和婴儿中,可能需要多次施用来引发足够的免疫水平。必要时,可在整个儿童期每隔一段时间继续施用,以保持足够的水平或保护。

[0122] 类似地,特别易受反复或严重感染影响的成年人,比如卫生保健工作者、日托工作者、幼儿的家庭成员、老年人和心肺功能或免疫系统受损的个体,可能需要多次免疫以建立和/或保持保护性免疫反应。诱导的免疫水平可例如通过测量中和性分泌性和血清抗体的量来监测,并在必要时调整剂量或重复接种疫苗以引发和保持期望的保护水平。

[0123] 技术人员可容易地确定药物制剂的剂量,例如通过首先鉴定有效引发预防性或治疗性免疫反应的剂量,例如通过测量病毒特异性免疫球蛋白的血清滴度或者通过测量血清样品或尿液样品或粘膜分泌物中抗体的抑制比率。所述剂量可由动物研究确定。用于研究

疫苗效力的动物的非限制性列表包括豚鼠、仓鼠、雪貂、毛丝鼠、小鼠和棉鼠以及非人灵长类动物。大多数动物不是传染性病原体的天然宿主,但仍可用于疾病各方面的研究。例如,可对任何以上动物给予候选疫苗,例如本发明的VLP,以部分地表征诱导的免疫反应,和/或确定是否已产生了任何中和性抗体。例如,已在小鼠模型中进行了许多研究,因为小鼠体型小,而且其成本低允许研究者可以大规模进行研究。

[0124] 另外,可由技术人员进行人类临床研究以确定用于人类的优选有效剂量。此类临床研究为常规的,并且为本领域众所周知的。待采用的精确剂量也将取决于施用途径。有效剂量可从来源于体外或动物测试系统的剂量-反应曲线推断。

[0125] 还如本领域众所周知的,可通过使用免疫反应的非特异性刺激剂(称为佐剂)来增强特定组合物的免疫原性。如本文使用的,术语“佐剂”意指当与制剂中的特定免疫原组合使用时,将增强、改变或修饰所得免疫反应的化合物。实验上已经使用佐剂来促进针对未知抗原的免疫的普遍增加。免疫方案使用佐剂来刺激反应已有多数,并且因此,佐剂为本领域普通技术人员众所周知的。一些佐剂影响抗原呈递的方式。例如,当蛋白抗原被铝佐剂(alum)沉淀时,免疫反应增加。抗原的乳化还延长抗原呈递的持续时间。意图将Vogel等人,“A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (第2版)”中描述的任何佐剂包含在本发明的范围内,所述文献出于所有目的通过引用以其全部并入本文。

[0126] 示例性的佐剂包括完全弗氏佐剂(含有杀死的结核分枝杆菌的免疫反应的非特异性刺激剂)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。其他佐剂包括GMCSF、BCG、氢氧化铝、MDP化合物比如thur-MDP和nor-MDP、CGP (MTP-PE)、脂质A和单磷酸脂质A (MPL)。还考虑在2%角鲨烯/Tween-80乳液中的RIBI,其含有从细菌中提取的三种成分,即MPL、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)。也可使用MF-59、Novasomes、RTM、MHC抗原。

[0127] 本发明的VLP也可与“免疫刺激剂”一起配制。这些“免疫刺激剂”为增加免疫系统反应的身体自身化学信使(细胞因子)。免疫刺激剂包括但不限于具有免疫刺激、免疫增强和促炎活性的各种细胞因子、淋巴因子和趋化因子,比如白细胞介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13);生长因子(例如粒细胞-巨噬细胞(GM)集落刺激因子(CSF));和其他免疫刺激分子,比如巨噬细胞炎性因子,Flt3配体、B7.1、B7.2等。免疫刺激分子可与VLP在同一制剂中施用,或者可分开施用。可施用蛋白或编码蛋白的表达载体以产生免疫刺激作用。因此在一个实施方案中,本发明包含含有佐剂和/或免疫刺激剂的抗原和疫苗制剂。

[0128] 神经退行性疾病(包括阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化症和亨廷顿病)显示出慢性异常炎症。

[0129] 根据本公开,组合物显示出脑内Gal-3水平的降低以及认知功能的改善,这强烈表明其不仅对治疗神经退行性疾病有用,而且对一般炎性病况也有用。

[0130] 炎性病况的实例为各种器官,比如肺、关节、眼、肠道、皮肤、心脏、肾脏和中枢神经系统(CNS)的炎性病况。肺的病况包括哮喘、成人呼吸窘迫综合征、支气管炎和囊性纤维化(其可另外或备选地涉及肠道或其他组织)。关节的病况包括类风湿性关节炎、类风湿性脊柱炎、骨关节炎、痛风性关节炎和其他关节炎病况。炎性眼病包括葡萄膜炎(包括虹膜炎)和结膜炎。炎性肠病包括克罗恩病、溃疡性结肠炎和远端直肠炎。皮肤病包括与细胞增殖相关的那些,比如牛皮癣、湿疹和皮炎(无论是否源于过敏)。心脏的病况包括冠状动脉梗塞损伤。肾脏的病况包括慢性肾病(CKD),比如肾小球肾炎(伴有肾病综合征和不伴有肾病综合

征,例如包括特发性肾病综合征或微小病变性肾病)。其他炎性病况和免疫病症包括慢性炎症中的组织坏死、内毒素休克、平滑肌增殖病症(例如血管成形术后的再狭窄)和移植手术后的组织排斥。

[0131] CNS中的炎症为神经退行性疾病发病机制的一部分。神经退行性疾病包括但不限于帕金森病、肌萎缩侧索硬化症(ALS,“路盖里格氏病”)、亨廷顿病、阿尔茨海默病、克罗伊茨费尔特-雅各布病和一般神经退行性病况。

[0132] 根据本公开,该组合物或方法可用于治疗炎性病况,尤其是年龄相关的炎性病况,从而可增强与整体健康和疾病进展相关的生物功能,促进长寿和健康寿命,和/或在受试者中延缓或抑制细胞衰老过程。

[0133] 将参考以下实施例详细描述本申请,然而,这些实施例并不旨在限制本申请的范围。

[0134] 实施例1

(1) 具有Gal-3抗原的VLP的制备

通过使用人类和小鼠Gal-3蛋白的蛋白氨基酸序列和3D结构设计了半乳糖凝集素-3(Gal-3)疫苗表位(表1)。将接头SGG(N-端)和GGG(C-端)附接至表位肽SEQ ID NO:5。为产生哺乳动物表达载体pVEEV Gal-3质粒DNA载体,根据WO 2022/225057中公开的程序,将合成的Gal-3表位肽序列的dsDNA片段(gBlocks, IDT)插入到pVEEV载体中编码VEEV E3包膜蛋白的DNA的特定位置(330位的G和335位的S之间)以获得VEEV-Gal-3 VLP。

[0135] [表1]

Gal-3表位肽

表位肽 SEQ ID NO: 9	长度 (A.A.)	DNA 序列 SEQ ID NO: 10
SGGADSFSLN DALAGSGNPN PQGYPGAAGN QPAGGS	36	GGC GCG GAC TCT TTT TCC TTG AAT GAT GCT CTC GCT GGG TCC GGT AAT CCT AAC CCA CAA GGC TAT CCT GGAGCG TGG GGC AAT CAA CCG GCG GGC

[0136] 在37°C, 8% CO₂下,使用振荡温育箱,用FreeStyle 293表达培养基(Thermo Fisher Scientific, #12338-018)悬浮培养FreeStyle 293F细胞(Thermo Fisher Scientific, #R790-07)。在0.8μg DNA/10⁶个细胞, DNA:PEI=1:3(w/w)和1.25×10⁶个细胞/mL培养基的条件下,通过PEI(聚乙烯亚胺, Polysciences, #23966),用pVEEV Gal-3 VLP质粒DNA表达载体转染293F细胞。在转染后4天收获培养上清液并通过离心(3,000rpm, 10min)澄清,然后用0.45μm PES膜过滤系统(VWR#10040-470)过滤。

[0137] 将含有VLP的培养上清液分层到1.5mL OptiPrep(60% (w/v) 碘克沙醇, Accurate chemical, #AN1114542)上,并在SW-28转子(Beckman)中以52,000×g离心1.5hr。在去除上清液以在界面上方留下1.5mL之后,将两层混合以制备50% OptiPrep溶液,并在NVT100转子(Beckman)中以360,000×g离心2.5hr以形成密度梯度。

[0138] 收集粗品VLP并用HiPrep 16/60Sephacryl S-500HR柱(GE, #28-9356-06)和磷酸盐缓冲盐水(PBS),使用Biologic Duo-Flow FPLC系统(Bio-Rad),通过尺寸排阻色谱纯化。通过Amicon Ultra-15离心过滤装置(EMD Millipore, #UFC910024)浓缩含有VLP的级分并

通过0.20 μ m PES膜过滤。

[0139] 按照制造商的说明,通过BCA蛋白测定(Pierce,#23225)测量总蛋白浓度。通过SDS-PAGE分析(Any kD Mini-PROTEAN TGX预制蛋白凝胶,Bio-Rad,#456-9035),然后是使用QC胶体考马斯染料(Bio-Rad,#1610803)的基于考马斯染料的染色,确认VLP的纯度。将蔗糖和EDTA分别以250mM和5mM的最终浓度添加到VLP溶液中。将VLP样品的蛋白浓度调整为0.4mg/mL并储存在-80°C下。

[0140] 在变性条件下,通过SDS-PAGE分析包含Gal-3表位肽的VEEV VLP的分子大小和纯度。获得的VLP与理论分子量相匹配并且纯度超过90%。证实了关于融合蛋白Gal-3肽以及VEEV病毒结构蛋白的蛋白条带。

[0141] (2) 在免疫小鼠中检测抗小鼠半乳糖凝集素-3(Gal-3)抗体

将5 $\times$ FAD小鼠用作阿尔茨海默病模型小鼠。将小鼠分成两组。将VEEV-Gal-3 VLP与RIBI佐剂混合并向一组小鼠(第2组)肌内施用,并向另一组(第1组)肌内施用生理盐水。VLP的浓度为0.2mg/ml并且每只小鼠中施用50微克的VLP。小鼠在实验开始时、第一次施用之后2周和4周施用。实验开始之后6周,从每只小鼠获得血液样品并制备血清。使用ELISA检测产生的抗小鼠Gal-3抗体,其中将Gal-3蛋白涂覆在ELISA板上。结果显示,包含小鼠Gal-3衍生多肽的病毒样颗粒在第2组小鼠中诱导了抗小鼠Gal-3抗体(参见图1)。

[0142] (3) 包含病毒结构多肽的委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒在5 $\times$ FAD小鼠中增加穿梭被动回避测试的潜伏期。

[0143] 实验开始之后5个月,进行了穿梭被动回避测试。被动回避测试通常用作测试回避记忆保留的方法。被动回避反应使用“穿梭”装置测量。该装置分成两个隔室。第一天,将小鼠置于照明隔室中。当小鼠从照明区域运动到黑暗隔室时,释放3s的电击(0.3mA)。第二天,将小鼠置于照明隔室中并将小鼠进入到黑暗隔室的时间记录为“停留时间”。

[0144] 结果显示VLP-Gal-3注射组增加了潜伏期,这表明了VLP-Gal-3注射组的记忆保留(参见图2)。

[0145] (4) VEEV-Gal-3-VLP减少5 $\times$ FAD小鼠的海马体中的Gal-3。

测试之后,将小鼠大脑收集在微型管中并用裂解缓冲液匀浆化。将裂解物在4°C下离心10min并在NUPAGE 12%,Bis-Tris凝胶上解析上清液并转移至PVDF膜。用Bullet Blocking One(nacalai tesque)封闭膜并与一抗一起在4°C下温育过夜。一抗为抗Gal-3(1:1000,R&D)和抗 β -淀粉样蛋白(1:000,BioLegend)。该温育后,将膜与抗大鼠二抗(1:3000,Jackson ImmunoResearch)或抗小鼠二抗(1:5000,Jackson ImmunoResearch)一起温育。通过化学发光将印迹显影并使用化学发光检测器(LAS500;GE Healthcare)扫描图像。 β -肌动蛋白用于内参对照(loading control)。作为结果,在VLP-Gal-3注射组中,海马体中的Gal-3表达水平显著降低(参见图3)。

[0146] (5) VEEV-Gal-3-VLP延长老年C57BL/6J小鼠的寿命。

将C57BL/6J小鼠分成两组。向一组小鼠(B6-V组)肌内施用VEEV-Gal-3 VLP并向另一组(B6-N组)肌内施用生理盐水。

[0147] VLP在101-102周龄时施用3次。约5周之后,B6-N组中的一些小鼠逐渐死亡。另一方面,B6-V组中的小鼠完全没有死亡(参见图4)。

[0148] (6) VEEV-Gal-3-VLP延长5 $\times$ FAD小鼠的寿命。

将5×FAD小鼠分成两组。向一组小鼠(F-V组)肌内施用VEEV-Gal-3 VLP并向另一组(F-N组)肌内施用生理盐水。

[0149] VLP在28、30、32和42周龄时施用4次。F-N组中的一些小鼠在50周龄之后逐渐死亡。另一方面,B6-V组中的小鼠在54周龄之前完全没有死亡(参见图5)。

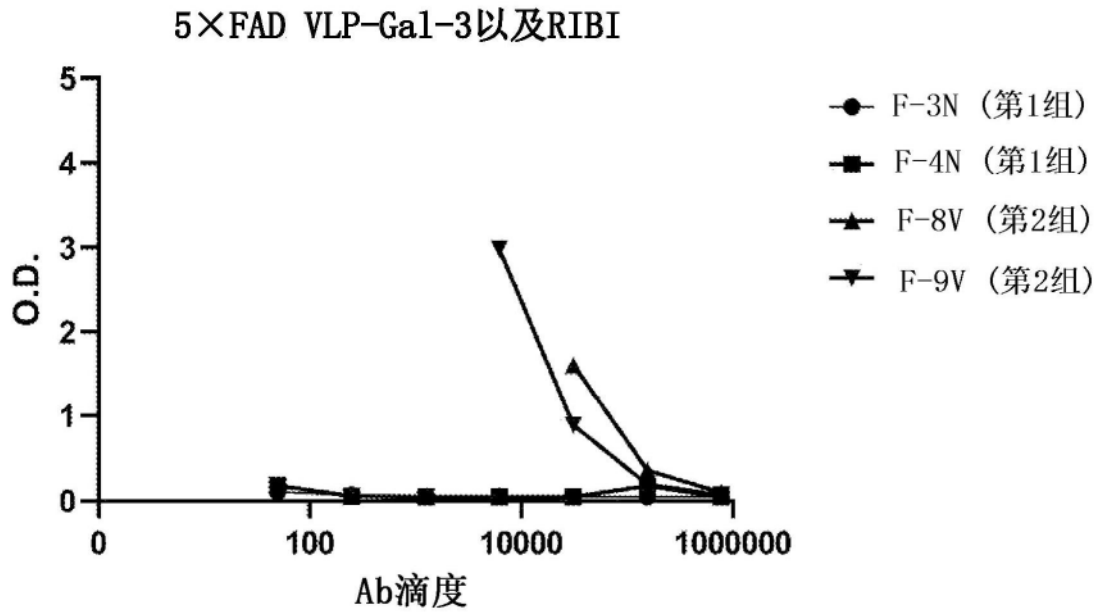


图1

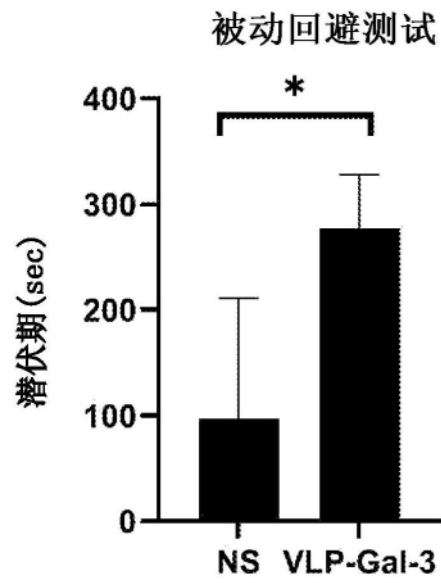


图2

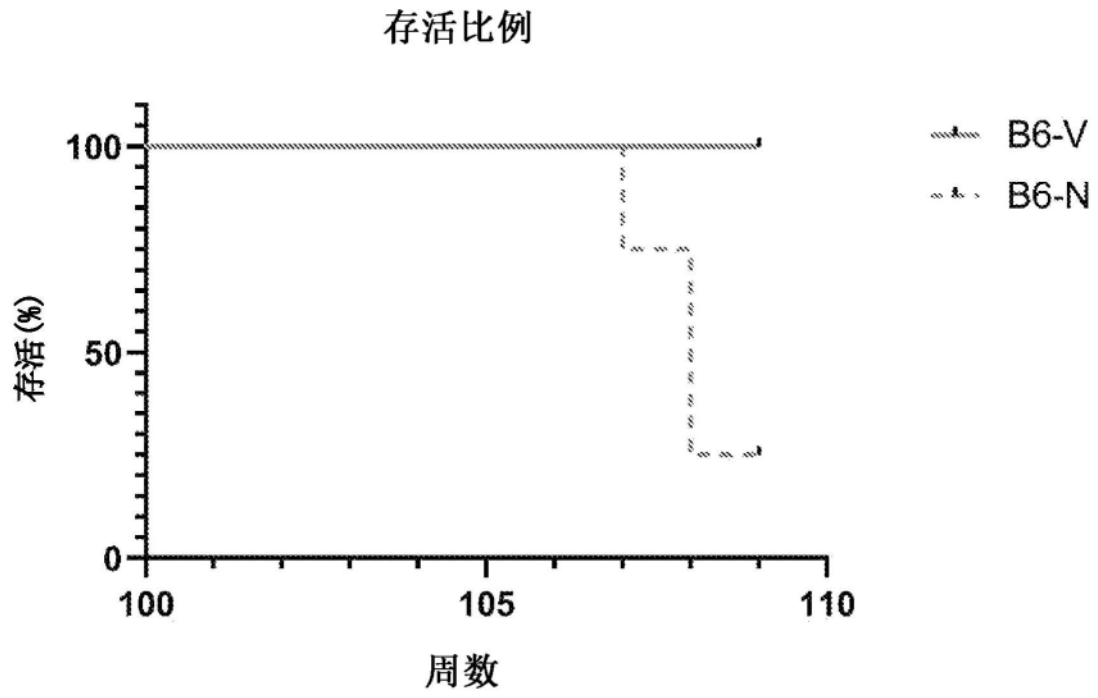


图4

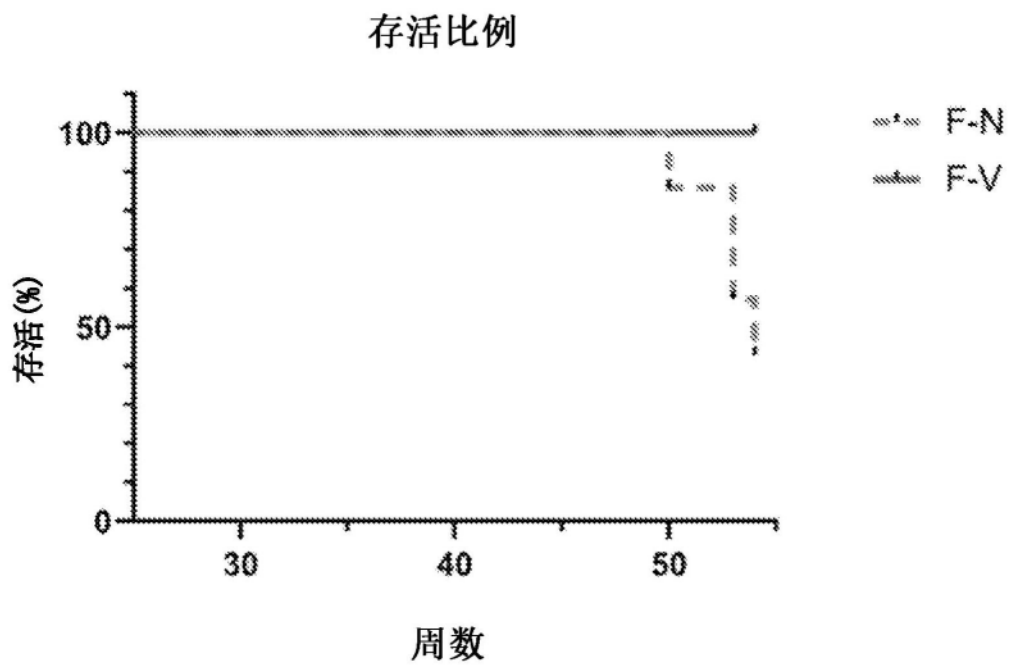


图5