



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116926128 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 24

(21) 申请号 202310470923.2

(22) 申请日 2016.11.20

(30) 优先权数据

62/258,393 2015.11.20 US

62/365,259 2016.07.21 US

(62) 分案原申请数据

201680075638.9 2016.11.20

(71) 申请人 俄勒冈健康与科学大学

地址 美国俄勒冈州

(72) 发明人 杰伊·内尔松 斯科特·汉森

米根·H·汉考克

路易斯·皮克尔 克劳斯·弗鲁赫

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

专利代理师 樊英如 张华

(51) Int.Cl.

C12N 15/869 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

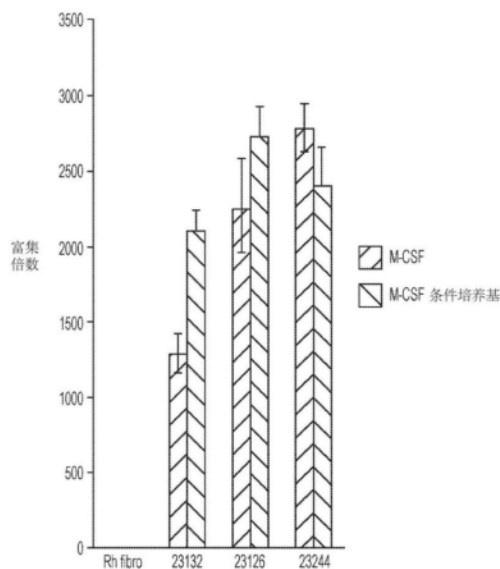
权利要求书3页 说明书18页 附图13页

(54) 发明名称

包含微小RNA识别元件的CMV载体

(57) 摘要

本发明公开了包含异源抗原和微小RNA识别元件的重组CMV载体,以在源自髓样细胞的微小RNA,活性UL128蛋白和活性UL130蛋白存在下沉默CMV基因的表达。本发明还公开了包含异源抗原和微小RNA识别元件的重组CMV载体,以在源自髓样细胞的微小RNA,无活性UL128蛋白和无活性UL130蛋白存在下沉默CMV基因的表达。本发明还公开了使用这些载体产生非常规免疫应答的方法。这种免疫应答的特征在于产生主要受MHC-II限制的CD8+T细胞应答。



1. 一种巨细胞病毒 (CMV) 载体, 其包含:
 - (a) 编码至少一种异源抗原的第一核酸序列;
 - (b) 第二核酸序列, 其包含与CMV基因能操作地连接的第一微小RNA识别元件 (MRE), 所述CMV基因对于CMV生长是必需的或增强的, 并且其中在由髓系细胞表达的微小RNA存在下所述MRE沉默表达;
 - (c) 编码活性UL128蛋白或其直系同源物的第三核酸序列; 和
 - (d) 编码活性UL130蛋白或其直系同源物的第四核酸序列。
2. 如权利要求1所述的CMV载体, 其中在miR-142-3p、miR-223、miR-27a、miR-652、miR-155、miR146a、miR-132、miR-21或miR-125中的一种或一种以上存在下, 所述第一MRE沉默。
3. 如权利要求1或2所述的CMV载体, 其中所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原或宿主自身抗原。
4. 如权利要求3所述的CMV载体, 其中所述宿主自身抗原是源自T细胞受体 (TCR) 的可变区的抗原或源自B细胞受体的可变区的抗原。
5. 如权利要求3所述的CMV载体, 其中所述病原体特异性抗原衍生自选自以下的病原体: 人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫寄生虫和结核分枝杆菌。
6. 如权利要求3所述的CMV载体, 其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症有关: 急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴母细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌 (RCC) 和生殖细胞肿瘤。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性UL82 (pp71) 蛋白、US11或其直系同源物。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白或其直系同源物。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性US11蛋白或其直系同源物。
10. 如权利要求1-6中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性UL82 (pp71) 蛋白或活性UL79蛋白、或其直系同源物。
11. 如权利要求1-6中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性UL82 (pp71) 蛋白或活性US11蛋白、或其直系同源物。
12. 如权利要求1-6中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白或活性US11蛋白质、或其直系同源物。
13. 如权利要求1-6中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白、活性UL82 (pp71) 蛋白、或活性US11蛋白、或其直系同源物。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的CMV载体, 其中所述CMV载体是人CMV (HCMV) 载体或恒河猴CMV (RhCMV) 载体。
15. 一种在受试者中产生针对至少一种异源抗原的免疫应答的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-14中任一项所述的CMV载体以在所述受试者中引发针对所述至少一种异源抗原的CD8+T细胞应答。

16. 如权利要求15所述的方法,其中由所述CMV载体引发的所述CD8+T细胞中的至少10%受II类MHC或其直系同源物限制。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述CD8+T细胞中的至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少75%受II类MHC或其直系同源物限制。

18. 如权利要求17所述的方法,其中少于10%的所述CD8+T细胞受MHC-E或其直系同源物限制。

19. 如权利要求15-18中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经暴露于CMV。

20. 如权利要求15-19中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类或非人灵长类动物。

21. 如权利要求15-20中任一项所述的方法,其中施用所述CMV载体包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内或口服施用所述CMV载体。

22. 一种巨细胞病毒(CMV)载体,其包含:

(a) 编码至少一种异源抗原的第一核酸序列;

(b) 第二核酸序列,其包含与CMV基因能操作地连接的第一微小RNA识别元件(MRE),所述CMV基因对于CMV生长是必需的或增强的,并且其中在由髓系细胞表达的微小RNA存在下所述MRE沉默表达;

其中所述CMV载体不表达活性的或缺乏UL128蛋白或其直系同源物;并且不表达或缺乏活性UL130蛋白或其直系同源物。

23. 如权利要求22所述的CMV载体,其中在miR-142-3p、miR-223、miR-27a、miR-652、miR-155、miR146a、miR-132、miR-21或miR-125中的一种或一种以上存在下,所述第一MRE沉默。

24. 如权利要求22或23所述的CMV载体,其中所述至少一种异源抗原包含病原体特异性抗原、肿瘤抗原、组织特异性抗原、或宿主自身抗原。

25. 如权利要求24所述的CMV载体,其中所述宿主自身抗原是源自T细胞受体(TCR)的可变区的抗原或源自B细胞受体的可变区的抗原。

26. 如权利要求24所述的CMV载体,其中所述病原体特异性抗原源自选自以下的病原体:人类免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、乳头瘤病毒、疟原虫寄生虫和结核分枝杆菌。

27. 如权利要求24所述的CMV载体,其中所述肿瘤抗原与选自以下的癌症有关:急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴母细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

28. 如权利要求22-27中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL82(pp71)蛋白、US11、或其直系同源物。

29. 如权利要求22-28中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白或其直系同源物。

30. 如权利要求22至29中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性US11蛋白或其直系同源物。

31. 如权利要求22-27中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白

或活性UL82 (pp71) 蛋白、或其直系同源物。

32. 如权利要求22-27中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL82 (pp71) 蛋白或活性US11蛋白、或其直系同源物。

33. 如权利要求22-27中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白或活性US11蛋白、或其直系同源物。

34. 如权利要求22-27中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体不表达活性UL79蛋白、活性UL82 (pp71) 蛋白、或活性US11蛋白、或其直系同源物。

35. 如权利要求22-34中任一项所述的CMV载体,其中所述CMV载体是人CMV (HCMV) 载体或恒河猴CMV (RhCMV) 载体。

36. 一种在受试者中产生针对至少一种异源抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求22-35中任一项所述的CMV载体,以在所述受试者中引发针对所述至少一种异源抗原的CD8+T细胞应答。

37. 如权利要求36所述的方法,其中由所述CMV载体引发的CD8+T细胞中的至少10%受II类MHC或其直系同源物限制。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述CD8+T细胞中的至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少75%受II类MHC或其直系同源物限制。

39. 如权利要求38所述的方法,其中受MHC-II限制的CD8+T细胞识别“超表位”,即由多个不同的MHC-II等位基因呈递的肽。

40. 如权利要求38所述的方法,其中少于10%的所述CD8+T细胞受MHC-I或其直系同源物限制。

41. 如权利要求36-40中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经暴露于CMV。

42. 如权利要求36-41中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类或非人灵长类动物。

43. 如权利要求36-42中任一项所述的方法,其中施用所述CMV载体包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内或口服施用所述CMV载体。

包含微小RNA识别元件的CMV载体

本申请是申请号为201680075638.9,申请日为2016年11月20日,申请人为俄勒冈健康与科学大学,发明创造名称为“包含微小RNA识别元件的CMV载体”的发明专利申请的分案申请。

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请基于并且要求于2015年11月20日提交的名称为CMV VECTORS COMPRISING MICRORNA RECOGNITION ELEMENTS的美国临时申请第62/258,393号,以及于2016年7月21日提交的名称为CMV VECTORS COMPRISING MICRORNA RECOGNITION ELEMENTS的美国临时申请第62/365,259号的优先权,以上临时申请的公开内容通过引用整体并入本发明。

技术领域

[0002] 本发明实施方式涉及CMV载体在免疫中的用途,更具体地,涉及用异源抗原免疫后引发非常规免疫应答的改良CMV载体形式的生成。

感谢政府支持

[0003] 本发明是在美国政府的支持下根据美国国立卫生研究院授予的资助号P01 AI094417的条款创建的。美国政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0004] 表达猿猴免疫缺陷病毒蛋白的恒河猴巨细胞病毒疫苗(RhCMV/SIV)提供对致病SIV的保护(Hansen SG等,Nat Med 15,293

(2009);Hansen SG等,Nat 473,523(2011);这两篇文献均通过引用并入本发明)。这种保护与其他T细胞疫苗根本不同之处在于其非常有效并且几乎瞬时发作,约50%的疫苗在病毒血症严重钝化和收缩急性期后表现出对病毒复制的完全控制。尽管受RhCMV保护的猕猴呈现周期性低水平的病毒血症“脉冲”,但没有观察到CD4+记忆T细胞耗竭,没有出现SIV特异性抗体应答,随后,随着时间的推移,病毒核酸变得几乎无法量化而有复制能力的病毒从受保护动物的组织中消失。这些事件在自发SIV优良对照和DNA初始/Ad5加强接种的对照中并未发生(Hansen SG等,Nature 502,100(2013);其通过引用并入本发明)。考虑到在RhCMV/

SIV接种的猕猴中RhCMV诱导的CD8+T细胞在介导这种保护作用中的核心作用,界定这些T细胞的功能特性对理解它们对RhCMV/SIV载体诱导控制SIV复制的机理贡献至关重要。理解这些特性可能反过来导致表达异源抗原的巨细胞病毒疫苗载体的新用途。

[0005] CMV可在髓系细胞中潜伏并重新激活,并且巨噬细胞在病毒传播中起核心作用。此外,树突状细胞是必需的体内抗原呈递细胞。表达异源抗原的CMV载体特异性地构建为它们不能在这些细胞中复制,可以用作引发改良的非常规免疫谱的新疫苗候选物。

发明内容

[0006] 本发明公开了巨细胞病毒(CMV)载体,其包含编码至少一种异源抗原的第一核酸

序列;和包含微小RNA识别元件(MRE)的第二核酸序列,所述第二核酸序列在由髓系细胞表达的微小RNA存在下沉默表达。微小RNA识别元件可操作地连接到CMV基因上,该CMV基因是体内CMV生长所必需的或促进体内CMV生长。所述载体还包括编码活性UL128蛋白(或其直系同源物)的核酸序列和编码活性UL130蛋白(或其直系同源物)的核酸序列。在一些实施方式中,所述载体将缺乏活性UL128蛋白和活性UL130蛋白。

[0007] 本发明还公开了在受试者中对至少一种异源抗原产生免疫应答的方法。该方法包括以有效引起对异源抗原的CD8+T细胞应答的量向受试者施用本发明公开类型的CMV载体。该免疫应答的特征在于至少10%的CD8+T细胞受II类MHC限制,少于10%的细胞受MHC-E限制。

附图说明

[0008] 通过以下结合附图的详细描述将容易理解实施方式。在附图中通过示例而非限制的方式示出了实施方式。

[0009] 图1是显示根据各种实施方式,使用M-CSF或M-CSF条件培养基分化的来自恒河猴的CD14+PBMC中miR-142-3p表达的条形图;

[0010] 图2是显示根据各种实施方式,分离自恒河猴的指定细胞类型和组织中miR-142-3p表达的条形图;

[0011] 图3A、3B、3C和3D共同显示了根据各种实施方式通过galK重组产生的重组RhCMV 68-1RTN Rh156/Rh108 miR-142 3p突变病毒的分析;

[0012] 图3A是显示根据各种实施方式,使用位于插入位点侧翼的引物的PCR证明galK表达盒的插入及用miR-142 3p靶位点替换galK表达盒的结果的凝胶图像;;

[0013] 图3B是显示根据各种实施例,BAC DNA的XmaI消化的凝胶图像,显示保持完整的基因组;

[0014] 图3C是显示BAC基因组DNA被分离并电穿孔进入恒河猴成纤维细胞的凝胶图像。在三次传代中的每一代将病毒进行噬斑纯化,分离病毒DNA并通过PCR分析miR-142 3p靶位点插入的保持。此外,根据各种实施方式,对这些PCR产物进行测序,并未检测到突变;

[0015] 图3D是根据各种实施方式的显示来自构建体的gag和HA表达的凝胶图像;

[0016] 图4是一组两幅图,每个图显示使用68-1RTN Rh156/

Rh108 miR-142 3p病毒的多步增长曲线。用阴性对照miRNA或miR-142 3pRNA模拟物转染端粒酶处理的(Telomerized)恒河猴成纤维细胞。转染后24小时,以0.01的MOI用WT或68-1RTN Rh156/Rh108 miR-142 3p病毒感染细胞。根据各种实施方式,在指定的时间收获细胞和上清液并在恒河猴成纤维细胞上滴定;

[0017] 图5是使用磁性细胞分选从恒河猴PBMC中分离的CD14+细胞的条形图。在M-CSF条件培养基存在下培养细胞7天以允许其分化成巨噬细胞。以10的MOI用WT 68-1RTN或68-1RTN Rh156/Rh108 miR-142 3p病毒感染细胞。根据各种实施方式,在指定的时间点收获病毒DNA并通过qPCR分析Rh87 DNA水平;

[0018] 图6是一组两幅图,显示根据各种实施方式,外周T细胞对用RhCMV-68-1-Rh156, 108miR-142-SIVrtn感染的动物中的SIV RTN抗原的应答;

[0019] 图7是根据各种实施方式,在用68-1.2RhCMV-Rh156, 108miR142/SIVgag感染的动

物中的CD8+T细胞应答的一组三幅图；

[0020] 图8是根据各种实施方式,用指定载体感染的指定基因型动物的表位MHC限制性图谱；

[0021] 图9是一组两幅图,显示使用68-1.2RTN Rh156/Rh108miR-142 3p病毒的生长曲线。根据各种实施方式,另外如图4所述进行该过程；

[0022] 图10是根据各种实施方式,通过galK重组产生RhCMV Rh156/Rh108 miR-142 3p突变病毒的示意图。

[0023] 图11A,11B和11C共同显示根据各种实施方式的通过galK重组产生的重组RhCMV 68-1.2GAG Rh156/Rh108 miR-142 3p突变病毒的分析；

[0024] 图11A是凝胶图像,其显示使用位于插入位点侧翼的引物的PCR证明galK表达盒的插入及用miR-142 3p靶位点替换galK表达盒的结果。另外,分离BAC基因组DNA并电穿孔进入恒河猴成纤维细胞。在三次传代(P1,P2和P3)的每一代中分别噬斑纯化病毒并分离病毒DNA,并通过PCR分析miR-142 3p靶位点插入的保持。根据各种实施方式,对这些PCR产物进行测序并未检测到突变；

[0025] 图11B是显示根据各种实施方式的RhCMV68-1.2GAG Rh156/Rh108miR-142 3p BAC DNA的XmaI消化的凝胶图像,其表明保持完整基因组；

[0026] 图11C是显示根据各种实施方式,在恒河猴成纤维细胞中RhCMV 68-1.2GAG Rh156/Rh108 miR-142 3p在整个3代传代中GAG表达的凝胶图像；

[0027] 图12是根据各种实施方式,在用68-1RhCMV-

Rh156,108miR142/SIVgag感染的动物中的T细胞应答的一组三幅图；

[0028] 图13是根据各种实施方式,用68-1GAG Rh156/Rh108miR-142 3p感染的动物或四个用68-1GAG感染的动物的表位MHC限制性图谱；以及

[0029] 图14是根据各种实施方式,用68-1.2RhCMV-

Rh156,108miR142/SIVgag感染的三个动物的CD8+T细胞应答和这些动物的表位MHC-限制性图谱的一组三幅图。

具体实施方式

[0030] 在下面的详细描述中,参考附图,这些附图形成其一部分,并且其中通过示例性方式示出可以实践的实施方式。应该理解,可以使用其他实施方式并且可以在不脱离本发明范围的情况下进行结构或逻辑上的改变。因此,以下详细描述不应被视为具有限制意义,并且实施方式的范围由所附权利要求及其等同物界定。

[0031] 各种操作可以可能有助于理解实施方式的方式依次被描述为多个独立操作；然而,描述的顺序不应解释为暗示这些操作是依赖于顺序的。

[0032] 描述可以使用基于透视的描述,诸如上/下,后/前,以及上/下。这样的描述仅用于促进讨论,并不意图限制所公开的实施方式的应用。

[0033] 可以使用术语“耦合”和“连接”及其派生词。应该理解,这些术语不是作为彼此的同义词。而是,在特定实施例中,“连接”可用于表示两个或两个以上元件彼此直接物理或电接触。“耦合”可能意味着两个或两个以上元件直接物理或电接触。然而,“耦合”也可能意味着两个或两个以上元件彼此不直接接触,但仍然彼此协作或相互作用。

[0034] 为了描述的目的,形式为“A/B”或形式为“A和/或B”的短语表示(A),(B)或(A和B)。为了描述的目的,“A,B和C中的至少一个”形式的短语表示(A),(B),(C),(A和B),(A和C),(B和C)或(A,B和C)。为了描述的目的,“(A)B”形式的短语表示(B)或(AB),即A是可选要素。

[0035] 说明书可以使用术语“实施方式”或“多个实施例”,其可以分别指代一个或一个以上相同或不同的实施方式。此外,对实施方式使用的术语“包括”,“包含”,“具有”等是同义词。

[0036] 本发明的实施方式提供了新颖的重组CMV载体,其包括但不限于包含编码至少一种异源蛋白质抗原的核酸和对由髓系细胞表达的微小RNA特异的至少一种微小RNA识别元件的重组CMV载体,所述微小RNA识别元件可操作地连接到对于体内生长是必需的或促进的CMV基因。进一步公开了使用新的重组CMV载体的方法,例如在受试者中对异源抗原产生免疫应答的方法。

I. 术语

[0037] 除非另有说明,根据常规用法使用技术术语。本发明引用的所有出版物,专利,专利申请,互联网网站和登录号/数据库序列(包括多核苷酸序列和多肽序列两者)为了所有目的通过引用整体并入本发明,其程度如同每一单独的出版物,专利,专利申请,互联网网站或登录号/数据库序列被具体地和单独地表示为通过引用这样并入。尽管在本公开的实践或测试中可以使用与本发明描述的方法和材料类似或等同的方法和材料,但是下面描述合适的方法和材料。另外,这些材料,方法和实例仅仅是说明性的而不是限制性的。为了便于回顾本公开的各种实施方式,提供了对特定术语的以下解释:

[0038] 抗原:如本发明所用,术语“抗原”或“免疫原”可互换使用,是指能够在受试者中诱导免疫应答的物质,通常为蛋白质。该术语还指在以下意义上具有免疫活性的蛋白质:一旦对受试者施用(直接施用或通过向受试者施用编码蛋白质的核苷酸序列或载体)能够引起针对该蛋白的体液和/或细胞类型的免疫应答。

[0039] 施用:如本发明所用,术语“施用”是指通过任何有效途径提供或给予受试者药剂,所述药剂例如包含有效量的含有外源抗原的CMV载体的组合物。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如皮下,肌内,皮内,腹膜内和静脉内),口服,舌下,直肠,透皮,鼻内,阴道和吸入途径。

[0040] 有效量:如本发明所用,术语“有效量”是指药剂的量,所述药剂例如包含异源抗原的CMV载体或转染的CD8⁺T细胞,其识别MHC-E/异源抗原-衍生的肽复合物,足以产生所需反应,例如减少或消除病症或疾病的体征或症状或诱导针对抗原的免疫应答。在一些实例中,“有效量”是治疗(包括预防)任何障碍或疾病的一种或一种以上症状和/或潜在原因的量。有效量可以是治疗有效量,包括防止特定疾病或病症的一种或一种以上体征或症状发展的量,例如与感染性疾病,癌症或自身免疫性疾病相关的一种或一种以上体征或症状。

[0041] 微小RNA:如本发明所用,术语“微小RNA”是指涉及控制基因表达的一类主要的生物分子。例如,在人类心脏,肝脏或大脑中,miRNA在组织特化或细胞谱系决定中发挥作用。此外,miRNA影响多种过程,包括早期发育,细胞增殖和细胞死亡,细胞凋亡和脂肪代谢。大量的miRNA基因,多样的表达模式以及潜在的miRNA靶标的丰富性表明miRNA可能是遗传多样性的重要来源。

[0042] 成熟miRNA通常是18-25个核苷酸的非编码RNA,其调节mRNA的表达,包括与miRNA

互补的序列。已知这些小RNA分子通过调节mRNA的稳定性和/或翻译来控制基因表达。例如，miRNA与靶mRNA的3'UTR结合并抑制翻译。miRNA也可以结合靶mRNA并通过RNAi途径介导基因沉默。miRNA也可能通过引起染色质凝聚来调节基因表达。

[0043] miRNA通过与miRNA识别元件(MRE)结合来沉默一种或一种以上特定mRNA分子的翻译,所述miRNA识别元件被定义为直接与mRNA转录本上的某处的miRNA直接碱基配对并与其相互作用的任何序列。通常,MRE存在于mRNA的3'非翻译区(UTR)中,但它也可以存在于编码序列或5'UTR中。MRE不一定与miRNA的完全互补,通常只有少量碱基与miRNA互补,并且通常在这些互补碱基中含有一个或一个以上错配。MRE可以是能够被miRNA充分结合的任何序列,从而MRE可操作地连接的基因(例如对体内生长是必需的或促进的CMV基因)的翻译被miRNA沉默机制(如RISC)所抑制。

[0044] 突变:如本发明所用,术语“突变”是指核酸或多肽序列中与正常,共有(consensus)或“野生型”序列的任何差异。突变体是包含突变的任何蛋白质或核酸序列。另外,具有突变的细胞或生物体也可以被称为突变体。

[0045] 编码序列突变的一些类型包括点突变(单个核苷酸或氨基酸的差异);沉默突变(不导致氨基酸改变的核苷酸差异);缺失(缺失一个或一个以上核苷酸或氨基酸,直至并包括基因的整个编码序列缺失的差异);移码突变(其中被3除不尽的多个核苷酸缺失导致氨基酸序列改变的差异。导致氨基酸差异的突变也可称为氨基酸取代突变。氨基酸取代突变可以通过氨基酸序列中特定位置处相对于野生型的氨基酸改变来描述。

[0046] 核苷酸序列或核酸序列:如本发明所用,术语“核苷酸序列”和“核酸序列”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)序列,包括但不限于信使RNA(mRNA),DNA/RNA杂合体或合成核酸。所述核酸可以是单链的,或者部分或完全双链的(双链体)。双链核酸可以是同源双链体或异源双链体。

[0047] 可操作地连接:如本发明使用术语“可操作连接的”,当第一核酸序列以使其对第二核酸序列具有影响的方式放置时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,MRE与编码序列可操作地连接,如果miRNA与MRE的结合使编码序列的表达沉默,则所述编码序列沉默。可操作地连接的DNA序列可以是连续的,或者它们可以一定距离操作。

[0048] 启动子:如本发明所用,术语“启动子”可以指指导核酸转录的许多核酸控制序列中的任何一种。通常,真核启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列,例如在聚合酶II型启动子的情况下,TATA元件或被一种或一种以上转录因子识别的任何其他特定DNA序列。启动子的表达可以通过增强子或阻遏子元件进一步调节。许多启动子的例子都是可用的,并且是本领域普通技术人员熟知的。包含可操作地连接至编码特定多肽的核酸序列的启动子的核酸可称为表达载体。

[0049] 重组:如本发明所用,关于核酸或多肽的术语“重组”是指具有非天然存在的序列或具有通过两种或两种以上另外分离的序列片段人工组合制备的序列的核酸或多肽,例如包含异源抗原的CMV载体和/或通过添加与CMV基因可操作连接的miRNA应答元件而产生复制缺陷的CMV载体,所述CMV基因对于体内生长是必需的或促进的。这种人工组合通常通过化学合成来实现,或者更常见地,通过人工操作核酸的分离片段,例如通过基因工程技术来实现。重组多肽还可以指已经使用重组核酸制备的多肽,包括使用转移至多肽非天然来源的宿主生物体的重组核酸(例如,编码形成包含异源抗原的CMV载体的多肽的核酸)。

[0050] 复制缺陷型:如本发明所用,“复制缺陷型”CMV是一旦在宿主细胞中不能进行病毒复制的病毒或基因组复制能力明显受限并因此产生病毒体的能力明显受限的病毒。在其他实例中,复制缺陷型病毒可能是传播缺陷型的,例如,它们能够复制其基因组,但不能感染另一种细胞,因为病毒颗粒不从感染细胞释放,或者因为非感染性病毒颗粒被释放。在其他实例中,复制缺陷型病毒是扩散缺陷的,例如,感染性病毒不从感染宿主分泌,因此病毒不能从宿主扩散到宿主。在一些实施方式中,复制缺陷型CMV是包含导致病毒复制所必需的一种或一种以上基因(“必需基因”)的表达缺乏或最佳复制所需的一种或一种以上基因(“增强基因”)的表达缺乏的突变的CMV。CMV必需基因和增强基因在本领域(具体而言,US2013/0136768,其通过引用并入本文)已有描述,并在本发明中公开。

[0051] 药学上可接受的载体:如本发明所用,使用的“药学上可接受的载体”是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第19版, 1995描述了适用于本发明公开的组合物的药物递送的组合物和制剂。一般来说,载体的性质取决于所采用的特定施用模式。例如,胃肠外制剂通常包含可注射流体,其包括药学上和生理上可接受的流体,例如作为载体的水、生理盐水、平衡盐溶液、含水右旋糖、甘油等等。对于固体组合物(例如粉末,丸剂,片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可以包括例如药物级别的甘露糖醇,乳糖,淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性载体外,待施用的药物组合物可含有少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨糖醇单月桂酸酯。

[0052] 多核苷酸:如本发明所用,术语“多核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的聚合物。多核苷酸由以下四种碱基组成:腺嘌呤,胞嘧啶,鸟嘌呤和胸腺嘧啶/尿嘧啶(尿嘧啶用于RNA)。来自核酸的编码序列指示由核酸编码的蛋白质的序列。

[0053] 多肽:术语“蛋白质”,“肽”,“多肽”和“氨基酸序列”在本发明中可互换使用以指任何长度的氨基酸残基的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的,它可以包含修饰的氨基酸或氨基酸类似物,并且可以被不同于氨基酸的化学部分中断。这些术语还包括已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如形成二硫键,糖基化,脂化,乙酰化,磷酸化或任何其他操作或修饰,例如与标记或生物活性组分缀合。

[0054] 序列同一性/相似性:如本发明所用,两个或两个以上核酸序列或两个或两个以上氨基酸序列之间的同一性/相似性按照序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以百分比同一性来检测;百分比越高,序列越相同。序列相似性可以百分比同一性或相似性(其考虑到保守性氨基酸取代)检测;百分比越高,序列越相似。具有大量序列同一性并且也彼此相同或相似地起作用的多肽或其蛋白结构域(例如,在不同物种中发挥相同功能的蛋白质或不改变蛋白功能或其量的蛋白突变形式)可以被称为“同源物”。

[0055] 用于比较的序列比对方法在本领域中是公知的。多种程序和比对算法描述于:Smith&Waterman, Adv. Appl. Math 2, 482 (1981); Needleman&Wunsch, J Mol Biol 48, 443 (1970); Pearson&Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444 (1988); Higgins&Sharp, Gene 73, 237-244 (1988); Higgins&Sharp, CABIOS 5, 151-153 (1989); Corpet等, Nuc Acids Res 16, 10881-10890 (1988); Huang等人, Computer App Biosci 8, 155-165 (1992); 和Pearson等, Meth Mol Bio 24, 307-331 (1994)。此外, Altschul等人, J Mol Biol 215, 403-410 (1990)详细考虑了序列比对方法和同源性计算。

[0056] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul等人,(1990)同上)可从几个来源获得,包括国家生物信息中心(NCBI,National Library of Medicine,Building 38A,Room 8N805,Bethesda,MD 20894)和因特网上,用于与序列分析程序blastp,blastn,blastx,tblastn和tblastx结合使用。更多信息可在NCBI网站上找到。

[0057] BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。如果两个比较序列享有同源性,则指定的输出文件将那些同源性区域呈现为对齐序列。如果两个比较序列不共享同源性,那么指定的输出文件将不会呈现对齐序列。

[0058] 一旦对齐,通过计算两个序列中存在相同核苷酸或氨基酸残基的位置数来确定匹配数。百分比序列同一性通过将匹配数目除以所鉴定序列中所列序列的长度或除以较接长度(例如来自鉴定序列中所列序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基),然后将所得值乘以100来确定。例如,当与具有1154个核苷酸的测试序列比对时,具有1166个匹配的核酸序列与测试序列具有75.0%的同一性($1166 \div 1554 * 100 = 75.0$)。序列同一性百分比值四舍五入到最接近的十分位。例如,75.11,75.12,75.13和75.14四舍五入为75.1,而75.15,75.16,75.17,75.18和75.19四舍五入为75.2。长度值将始终为整数。在另一实例中,如下含有与来自所鉴定序列的20个连续核苷酸对齐的20个核苷酸区域的靶序列包含与该鉴定序列共享75%序列同一性的区域(即 $15 \div 20 * 100 = 75$)。

[0059] 为了比较大于约30个氨基酸的氨基酸序列,使用Blast 2序列函数,使用设置为默认参数的默认BLOSUM62矩阵(缺口存在成本为11,并且每个残基缺口成本为1)。同源物的典型特征是通过使用NCBI Basic Blast 2.0,用数据库(如nr数据库,swissprot数据库和专利序列数据库)进行缺口blastp,与氨基酸序列进行全长比对具有至少70%序列同一性。用blastn程序搜索的查询序列用DUST(Hancock&Armstrong,Comput Appl Biosci 10,67-70(1994))过滤。其他程序使用SEG。另外,可以进行手工比对。当通过该方法评估时,具有更大相似性的蛋白质将显示增加的百分比同一性,例如与蛋白质至少约75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%序列同一性。

[0060] 当比对短肽(少于约30个氨基酸)时,使用设定为默认参数的PAM30矩阵(开口缺口9,延伸缺口1罚分)使用Blast 2序列函数进行比对。当通过该方法评估时,与参考序列具有更大相似性的蛋白将显示出增加的百分比同一性,例如与蛋白有至少约60%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%的序列同一性。当比较少于全长的序列的序列同一性时,同源物通常在10-20个氨基酸的短窗内具有至少75%的序列同一性,并且可以具有至少85%,90%,95%或98%的序列同一性,具体取决于与参考序列的同一性。在NCBI网站上描述了在这些短窗中确定序列同一性的方法。

[0061] 如上所述,两个核酸分子紧密相关的一个迹象是两个分子在严格条件下彼此杂交。由于遗传密码的简并性,因此不显示高度同一性的核酸序列仍可编码相同或相似(保守的)氨基酸序列。可以使用该简并性使得核酸序列发生变化以生成全都编码基本上相同的蛋白质的多种核酸分子。这种同源核酸序列可以例如与编码蛋白的核酸具有至少约50%,60%,70%,80%,90%,95%,98%或99%的序列同一性。

[0062] 受试者:如本发明所用,术语“受试者”是指活的多细胞脊椎动物生物体,即包括人类和非人类哺乳动物的类别。

[0063] 治疗:如本发明所用,术语“治疗”是指改善疾病或病理状况的体征或症状的介入。

如本发明所用,关于疾病,病理状况或症状的术语“治疗(treatment)”,“治疗(treat)”和“治疗(treating)”也指治疗的任何可观察的有益效果。例如,所述有益效果可以通过以下证实:在易感受试者中疾病的临床症状延迟发作,疾病的一些或所有临床症状的严重程度降低,疾病进展缓慢,疾病的复发次数减少,受试者总体健康状况或幸福感改善,或通过本领域众所周知的对特定疾病具有特异性的其他参数证实。预防性治疗是为了降低发生病理的风险而对未表现出疾病体征或仅显示早期体征的受试者施用的治疗。治疗性治疗是在疾病的体征和症状已经发生之后施用于受试者的治疗。

II. 重组CMV载体及其使用方法

[0064] 本发明公开了能够重复感染生物体的人或动物CMV载体。所述CMV载体包含编码异源蛋白质抗原的核酸序列,并且还包含在由髓样细胞表达的miRNA存在下作为沉默表达的miRNA应答元件(MRE)起作用的核酸序列。由髓样细胞表达的这种miRNA的实例包括miR-142-3p,miR-223,miR-27a,miR-652,miR-155,miR-146a,miR-132,miR-21和/或miR-125(Gilicze AB等,Biomed Res Int,2014,870267(2014);其通过引用并入本发明)。所述MRE与CMV基因可操作地连接,所述CMV基因对于体内CMV生长是必需的或增强的。这种基因的实例包括I-E2和UL79,或其直系同源物。一个,两个,三个或三个以上CMV基因可以分别与载体中的一个,两个,三个或三个以上MRE可操作地连接。所述载体同时编码活性UL128基因和活性UL130基因。可选地,所述载体可能缺乏活性UL128和活性UL130基因。

[0065] 所述MRE可以是在髓样细胞表达的miRNA存在下沉默表达的任何miRNA识别元件。这种MRE可能与miRNA的完全互补。可选地,其他序列可以用作给定miRNA的MRE。例如,MRE可以通过序列预测。在一个实例中,可以在网站microRNA.org(www.microRNA.org)上搜索miRNA。反过来,将列出miRNA的mRNA靶标列表。例如,以下网页:<http://www.microRNA.org/microRNA/getTargets.do?matureName=hsa-miR-142-3p&organism=9606>,于2015年10月6日最后访问,将列出miR-142-3p的推定mRNA靶标。对于页面上列出的每个靶标,可以访问“比对细节”并访问推定的MRE。

[0066] 本领域的普通技术人员可以从文献中选择经验证的、推定的或突变的MRE序列,预测所述序列以在髓样细胞例如巨噬细胞中表达的miRNA存在下诱导沉默。一个实例涉及上面引用的网站。然后,本领域普通技术人员可以获得表达构建体,通过该构建体,报道基因(例如荧光蛋白,酶或其它报道基因)具有由启动子(例如组成型活性启动子或细胞特异性启动子)驱动的表达。然后将所述MRE序列引入表达构建体中。可以将表达构建体转染到合适的细胞中,并用目标miRNA转染细胞。报告基因缺失表明MRE在miRNA存在下沉默基因表达。

[0067] 异源抗原可以是任何抗原,包括衍生自例如人类免疫缺陷病毒,猿猴免疫缺陷病毒,1型单纯疱疹病毒,2型单纯疱疹病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,乳头瘤病毒,疟原虫寄生虫,破伤风梭菌和结核分枝杆菌等的病原体特异性抗原。在又一些实例中,异源抗原可以是肿瘤抗原,包括例如与以下有关的肿瘤抗原:急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴母细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。在更进一步的实例中,异源抗原可以是组织特异性抗原或宿主自身抗原,包括例如源自T细胞受体可变区的抗原,源自B细胞受体可变区的抗原,精子抗原

或卵抗原。

[0068] 在一些实例中,由于在编码UL82(pp71),UL79,US11或其他CMV蛋白的核酸序列中存在突变,所述载体不表达活性UL82(pp71),UL79,US11或其他CMV蛋白,所述其他CMV蛋白包括其同源物或其直系同源物(感染其他物种的CMV的同源基因)。在一些实施方式中,所述载体不表达活性UL82(pp71)蛋白或活性UL79蛋白或其直系同源物。在一些实施方式中,所述载体不表达活性UL82(pp71)蛋白或活性US11蛋白、或其直系同源物。在一些实施方式中,所述载体不表达活性UL79蛋白或活性US11蛋白、或其直系同源物。在一些实施方式中,所述载体不表达活性UL79蛋白、活性UL82(pp71)蛋白、或活性US11蛋白、或其直系同源物。所述突变可以是导致缺乏活性蛋白质表达的任何突变。这样的突变可以包括点突变,移码突变,少于编码蛋白的全长序列的缺失(截短突变),或编码蛋白的全长序列缺失或任何其他突变。

[0069] 本发明还公开了在受试者中对异源抗原产生CD8⁺T细胞应答的方法。该方法涉及将有效量的CMV载体施用于受试者。所述CMV载体具有编码至少一种异源抗原的核酸序列和作为由髓样细胞表达的miRNA的miRNA应答元件(MRE)发挥作用的核酸序列。所述MRE与CMV基因可操作地连接,所述CMV基因对于体内CMV生长是必需的或增强的。

[0070] 在一些实例中,所述CMV载体还含有编码活性UL128蛋白和活性UL130蛋白的核酸序列。这些载体可用于引发CD8⁺T细胞应答,其特征为至少10%CD8⁺T细胞针对由II类MHC呈递的表位。在一些实施方式中,CD8⁺T细胞的至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%或至少75%受II类MHC限制。这是出乎预料的结果,因为先前的研究显示II类MHC限制性CD8⁺T细胞在缺乏UL128和UL130的CMV中产生(Hansen SG等,Science 340,1237874 (2013);其通过引用并入本文)。少于10%的CD8⁺T细胞受MHC-E限制。

[0071] 在一些实例中,由于编码UL128和UL130的核酸序列和/或包括其同源物或其直系同源物在内的其他CMV蛋白的核酸序列(感染其他物种的CMV的同源基因)中存在突变,因此CMV载体不表达活性UL128和UL130基因。所述突变可以是导致活性蛋白表达缺乏的任何突变。这种突变可以包括点突变,移码突变,少于编码蛋白质的全长序列的缺失(截短突变),或编码蛋白质的所有核酸序列的缺失或任何其他突变。这些载体可用于引发CD8⁺T细胞应答,其特征为少于10%的CD8⁺T细胞受MHC-I限制和CD8⁺T细胞中的至少10%,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%或至少75%受II类MHC限制。这些载体也可以用于引发对MHC-II超表位(Supertope)的CD8⁺T细胞应答,所述超表位(Supertope)例如由不同的MHC-II分子呈递给CD8⁺T细胞的肽。因此超表位被不具有相同MHC-II等位基因的个体所识别。

[0072] 在进一步的实例中,所述方法涉及向所述受试者施用有效量的第二CMV载体,所述第二CMV载体包含编码第二异源抗原的核酸序列。该第二载体可以是任何CMV载体。所述第二异源抗原可以是任何异源抗原,包括与第一CMV载体中的异源抗原相同的异源抗原。所述第二CMV载体可以在与第一CMV载体的施用相关的任何时间施用,包括在施用第一CMV载体之前,同时或之后施用。这包括在第一载体之前或之后任意数月,数天,数小时,数分钟或数秒施用第二载体。

[0073] 当用作表达载体时,人或动物CMV载体在所选受试者(例如人)中天生是非致病的。在一些实施方式中,通过限制在所选受试者中的宿主内和宿主到宿主的扩散来对所述CMV

载体进行修饰以使它们不具有致病性。

[0074] 异源抗原可以是不来源于CMV的任何蛋白质或其片段,包括癌症抗原,病原体特异性抗原,模型抗原(如溶菌酶KLH或卵清蛋白),组织特异性抗原,宿主自身抗原,或任何其他抗原。

[0075] 病原体特异性抗原可以来自任何人或动物病原体。所述病原体可以是病毒病原体,细菌病原体或寄生虫,并且所述抗原可以是来源于病毒病原体,细菌病原体或寄生虫的蛋白质。所述寄生虫可以是生物体或由生物体引起的疾病。例如,所述寄生虫可以是原生动物体,引起疾病的原生动物体,蠕虫生物体或蠕虫,由蠕虫生物体引起的疾病,外寄生虫或由外寄生物引起的疾病。

[0076] 所述抗原可以是来源于癌症的蛋白质。这些癌症包括但不限于急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴母细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、肾细胞癌(RCC)和生殖细胞肿瘤。

[0077] 所述抗原可以是宿主自身抗原。宿主自身抗原包括但不限于来源于T细胞受体可变区或来源于B细胞受体可变区的抗原。所述抗原可以是组织特异性抗原。组织特异性抗原包括但不限于精子抗原或卵抗原。

[0078] 本发明公开的CMV载体可用作含有重组CMV病毒或载体和药学上可接受的载体或稀释剂的免疫原性组合,免疫学组合或疫苗组合。含有重组CMV病毒或载体(或其表达产物)的免疫学组合引发局部或全身免疫应答。所述应答可能,但不一定是保护性的。含有重组CMV病毒或载体(或其表达产物)的免疫原性组合同样引发局部或全身免疫应答,其可以但不必是保护性的。疫苗组合引起局部或全身保护性应答。因此,术语“免疫学组合”和“免疫原性组合”包括“疫苗组合”(因为前两个术语可以是保护性组合)。

[0079] 本发明公开的CMV载体可用于诱导受试者中免疫应答的方法中,所述方法包括向受试者施用包含重组CMV病毒或载体和药学上可接受的载体或稀释剂的免疫原性、免疫学或疫苗组合。为了本说明书的目的,术语“受试者”包括含有非人灵长类动物和人类的所有动物,而“动物”包括除人类之外的所有脊椎动物物种;“脊椎动物”包括所有的脊椎动物,包括动物(如本文使用的“动物”)和人类。当然,“动物”的一个子集是“哺乳动物”,为了本说明书的目的,其包括除人类以外的所有哺乳动物。

[0080] 本发明公开的CMV载体可用于含有重组CMV病毒或载体和药学上可接受的载体或稀释剂的治疗性组合。本发明公开的CMV载体可通过将包含编码异源抗原的序列的DNA插入CMV基因组的必需或非必需区域来制备。该方法可以进一步包括从CMV基因组中删除一个或一个以上区域。该方法可以包括体内重组。因此,所述方法可以包括在供体DNA存在下,在细胞相容性培养基中用CMV DNA转染细胞,所述供体DNA包含异源DNA,所述异源DNA的旁侧为与CMV基因组的一部分同源的DNA序列,由此将异源DNA引入CMV的基因组,然后任选地回收由体内重组修饰的CMV。

[0081] 该方法还可以包括切割CMV DNA以获得切开的CMV DNA,将异源DNA连接至切开的CMV DNA以获得杂交CMV异源DNA,用杂交的CMV-异源DNA转染细胞,随后任选地回收由异源DNA的出现进行修饰的CMV。因为体内重组是已经了解的,该方法还相应地提供包含不天然存在于CMV中的编码CMV外源多肽的供体DNA的质粒,所述供体DNA位于CMV DNA的片段内,该

片段原本会与CMV基因组的必需或非必需区域共线性,从而使得来自CMV的必需或非必需区域的DNA位于供体DNA的旁侧。可以将所述异源DNA插入CMV以生成任何取向的重组CMV,从而在需要时产生该DNA的稳定整合及其表达。

[0082] 编码重组CMV载体中的异源抗原的DNA也可以包含启动子。所述启动子可以来自诸如疱疹病毒之类的任何来源,包括内源性巨细胞病毒(CMV)启动子,如人CMV(HCMV),恒河猴CMV(RhCMV),鼠CMV(MCMV)或其他CMV启动子。所述启动子也可以是非病毒启动子,如EF1 α 启动子。所述启动子可以是截短的转录活性启动子,其包含由通过病毒提供的反式激活蛋白反式激活的区域和截短的转录活性启动子所源自的全长启动子的最小启动子区域。所述启动子可以由对应于所述最小启动子和上游调控序列的DNA序列组合组成。最小启动子由CAP位点加TATA盒组成(基本转录水平的最小序列;不受调节的转录水平);“上游调控序列”由上游元件和增强子序列组成。此外,术语“截短的”表示全长启动子不完全存在,即全长启动子的某些部分已被除去。并且,截短的启动子可以源自疱疹病毒如MCMV或HCMV,例如HCMV-IE或MCMV-IE。基于碱基对,全长启动子可能有高达40%甚至高达90%的尺寸减小。

[0083] 所述启动子也可以是经修饰的非病毒启动子。至于HCMV启动子,可参考美国专利第5,168,062号和第5,385,839号。至于用质粒DNA转染细胞用于由此进行表达,参考Felgner等人(1994),*J. Biol. Chem.* 269,2550-2561。至于直接注射质粒DNA作为针对多种感染性疾病的疫苗接种的简单而有效的方法,参考*Science*, 259:1745-49, 1993。因此,在本公开的范围内,所述载体可以通过直接注射载体DNA使用。

[0084] 本发明还公开了可以插入到重组病毒或质粒中的包含截短的转录活性启动子的表达盒。所述表达盒可进一步包含功能性截短的聚腺苷酸化信号;例如被截短但功能正常的SV40聚腺苷酸化信号。考虑到天然提供更大信号,截短的聚腺苷酸化信号是功能性的确实令人惊讶。截短的聚腺苷酸化信号解决了重组病毒如CMV的插入片段大小限制问题。所述表达盒还可以包含与其所插入的病毒或体系有关的异源DNA;并且该DNA可以是如本发明所述的异源DNA。

[0085] 关于用于疫苗或免疫学组合物的抗原,还参见Stedman's Medical Dictionary(第24版,1982),例如疫苗的定义(用于疫苗制剂中使用的抗原列表);可以使用这些抗原或来自这些抗原的感兴趣的表位。关于异源抗原,本领域普通技术人员可以通过肽或多肽的氨基酸和相应DNA序列的知识以及通过特定氨基酸的性质(例如大小,电荷等)和密码子词典选择异源抗原及其编码DNA,而无需过多的实验。

[0086] 确定抗原的T表位的一种方法涉及表位绘图。通过寡肽合成产生异源抗原的重叠肽。然后测试各种肽结合由天然蛋白质引发的抗体的能力或诱导T细胞或B细胞活化的能力。由于T细胞识别与MHC分子复合的短线性肽,因此该方法在T细胞表位绘图方面特别有用。

[0087] 通常如下产生针对异源抗原的免疫应答:仅当蛋白质被切割成更小的肽并存在于位于另一细胞表面的称为“主要组织相容性复合物(MHC)”的复合物中时,T细胞才识别该蛋白质。有两类MHC复合物-I类和II类,每类由许多不同的等位基因组成。不同物种和个体受试者具有不同类型的MHC复合体等位基因;认为他们有不同的MHC类型。

[0088] 应当注意,包含编码异源抗原的序列的DNA本身可以包含用于驱动CMV载体中的表达的启动子,或者该DNA可只限于异源抗原的编码DNA。该构建体可以相对于内源性CMV启动

子的取向放置以使其与所述启动子可操作连接,并由此进行表达。此外,可以使用多拷贝的编码异源抗原的DNA或使用强启动子或早期启动子或早期和晚期启动子或其任何组合以增强或增加表达。因此,编码异源抗原的DNA可以相对于CMV-内源性启动子适当定位,或者这些启动子可以连同编码异源抗原的DNA一起易位以插入另一位置。编码多于一种异源抗原的核酸可以包装在所述CMV载体中。

[0089] 此外,本发明公开了含有所公开的CMV载体的药物和其他组合物。这样的药物和其他组合物可以配制成可用于本领域已知的任何给药过程。这样的药物组合物可以通过胃肠外途径(皮内,肌内,皮下,静脉内或其他)。也可以通过粘膜途径,例如口服,鼻腔,生殖器等施用。

[0090] 所公开的药物组合物可以根据制药领域普通技术人员公知的标准技术来制备。这样的组合物可以以医学领域普通技术人员所熟知的剂量和技术施用,所述医学领域普通技术人员会考虑到诸如特定患者的品种或物种,年龄,性别,体重和症状以及给药途径。所述组合物可以单独施用,或者可以与其他CMV载体或与其他免疫学,抗原性或疫苗组合物或治疗组合物共同施用或顺序施用。这样的其他组合物可以包括纯化的天然抗原或表位或通过重组CMV或另一载体系统表达的抗原或表位;并且考虑到上述因素来施用这样的其他组合物。

[0091] 组合物的实例包括用于孔口(例如口,鼻,肛门,生殖器(例如阴道等))施用的液体制剂,例如混悬剂,糖浆或酞剂;和用于肠胃外,皮下,皮内,肌内或静脉内施用(例如可注射施用)的制剂,如无菌混悬剂或乳剂。在这样的组合物中,重组体可以与合适的载体,稀释剂或赋形剂(例如无菌水,生理盐水,葡萄糖等)混合。

[0092] 抗原性,免疫学或疫苗组合物通常可以含有佐剂和一定量的CMV载体或表达产物以引发期望的应答。在人体应用中,明矾(磷酸铝或氢氧化铝)是典型的佐剂。皂苷及其纯化组分Quil A,弗氏完全佐剂和用于研究和兽用的其他佐剂具有毒性,这限制了它们在人类疫苗中的潜在用途。还可以使用化学上界定的制剂如胞壁酰二肽,单磷酸脂质A,如由Goodman-Snitkoff等人,J.Immunol.147:410-415(1991)描述的那些磷脂缀合物,如Miller等,J.Exp.Med.176:1739-1744(1992)描述的将蛋白质包裹在蛋白脂质体内,以及诸如Novasome脂质囊泡(Micro Vesicular Systems,Inc.,Nashua,N.H.)之类将蛋白质封装在脂质囊泡中。

[0093] 所述组合物可以单剂量形式包装以通过肠胃外(例如肌内,皮内或皮下)施用或孔口施用(例如,舌下(例如口服)),胃内施用,粘膜(包括口腔内,肛门内,阴道内)施用,和类似施用进行免疫。再次,有效剂量和给药途径由以下确定:组合物的性质,表达产物的性质,表达水平(如果直接使用重组CMV),以及已知因素(如品种或物种,年龄,性别,体重,症状和宿主性质,以及已知的LD₅₀和其他筛选过程),不需要过多的实验。表达产物的剂量范围可以从几微克到几百微克,例如5 μ g到500 μ g。所述CMV载体可以以任何合适的量施用以在这些剂量水平的表达。在非限制性实例中:CMV载体可以以至少10²pfu的量施用;因此,CMV载体可以以至少这个量施用;或以约10²pfu至约10⁷pfu范围内的量施用。其他合适的载体或稀释剂可以是水或缓冲盐水,含有或不含防腐剂。所述CMV载体可以是冻干的以在给药时再悬浮或可以是溶液形式。“大约”可以是指与定义值相差1%,5%,10%或20%以内。

[0094] 应该理解,本公开内容的蛋白质和编码这些蛋白质的核酸可以不同于本发明所示

和描述的确切序列。因此,本公开包括了对所示序列的缺失,添加,截短和取代,只要所述序列根据本公开的方法起作用即可。在这方面,取代通常本质上是保守的,即在氨基酸家族内发生的那些取代。例如,氨基酸一般分为四个家族:(1)酸性-天冬氨酸和谷氨酸;(2)碱性-赖氨酸,精氨酸,组氨酸;(3)非极性-丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸,色氨酸;和(4)不带电极性-甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,半胱氨酸,丝氨酸苏氨酸和酪氨酸。苯丙氨酸,色氨酸和酪氨酸有时被归类为芳香族氨基酸。可以合理预测的是,用异亮氨酸或缬氨酸单独取代亮氨酸,反之亦然;用谷氨酸取代天冬氨酸或反之亦然;用丝氨酸取代苏氨酸或反之亦然;或用结构相关的氨基酸对氨基酸进行类似的保守取代,将不会对生物活性产生重大影响。因此,具有与所述蛋白质基本相同的氨基酸序列但具有基本上不影响蛋白质免疫原性的少量氨基酸取代的蛋白质在本公开的范围。

[0095] 本公开的核苷酸序列可以是密码子优化的,例如密码子可以被优化用于人细胞。例如,任何病毒或细菌序列可以如此改变。包括HIV和其他慢病毒在内的许多病毒使用大量稀有密码子,并且通过将密码子改变成对应于期望对象中常用的密码子,可以如Andre等,J.Virol.72:1497-1503,1998所述实现异源抗原的表达提高。

[0096] 本发明包括编码CMV载体和包含于其中的糖蛋白的功能和/或抗原等效变体和衍生物的核苷酸序列。这些功能等效的变体,衍生物和片段显示出保留抗原活性的能力。例如,不改变编码的氨基酸序列的DNA序列的变化,以及导致氨基酸残基保守取代,一个或几个氨基酸缺失或添加以及氨基酸残基被氨基酸类似物取代的那些DNA序列的变化是不会显著影响编码的多肽的性质的那些变化。保守氨基酸取代是甘氨酸/丙氨酸;缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸;天冬酰胺/谷氨酰胺;天冬氨酸/谷氨酸;丝氨酸/苏氨酸/甲硫氨酸;赖氨酸/精氨酸;和苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸。在一种实施方式中,所述变体与目标抗原,表位,免疫原,肽或多肽具有至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少86%,至少87%,至少88%,至少89%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%的同源性或同一性。

[0097] 序列同一性或同源性通过在比对时比较序列来确定以使重叠和同一性最大化,同时使序列缺口最小化。具体而言,可以使用多种数学算法中的任何一种来确定序列同一性。用于比较两个序列的数学算法的非限制性实例是如在Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1993;90:5873-5877的,在Karlin&Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1990;87:2264-2268中改良的算法。

[0098] 用于比较序列的数学算法的另一实例是Myers&Miller,CABIOS 1988;4:11-17的算法。这种算法被整合至作为GCG序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(版本2.0)。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表,缺口长度罚分12和缺口罚分4。用于识别局部序列相似和对齐的区域的另一有用算法是如Pearson&Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988;85:2444-2448中所描述的FASTA算法。

[0099] 对根据本公开内容的用途有利的是WU-BLAST(华盛顿大学BLAST)2.0版软件。用于多个UNIX平台的WU-BLAST 2.0版可执行程序可以从ftp://blast.wustl.edu/blast/executables下载。该程序基于WU-BLAST 1.4版,其基于公共域NCBI-BLAST 1.4版(Altschul&Gish,1996,Local alignment statistics,Doolittle ed.,Methods in

Enzymology 266:460-480;Altschul et al.,Journal of Molecular Biology 1990;215:403-410;Gish&States,1993;Nature Genetics 3:266-272;Karlin&Altschul,1993;Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877;所有这些文献通过引用并入本文)。

[0100] 使用标准重组DNA和克隆技术制备本公开的各种重组核苷酸序列和抗体和/或抗原。这些技术对于本领域的普通技术人员来说是公知的。参见例如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook等,1989)。

[0101] 本公开内容中的核苷酸序列可以插入“载体”中。术语“载体”被广泛使用并且被本领域普通技术人员理解,并且如本发明所使用的,术语“载体”与其对于本领域的普通技术人员来说的意义一致。例如,本领域普通技术人员通常使用术语“载体”来指允许或促进将核酸分子从一种环境转移到另一环境或允许或促进核酸分子的操作的载体。

[0102] 根据本公开,可以使用允许本公开的病毒的表达的任何载体。在某些实施方式中,所公开的病毒可以体外使用(例如使用无细胞的表达体系)和/或在体外培养生长的细胞中使用以产生编码的异源抗原(例如病原体特异性抗原,HIV抗原,肿瘤抗原和抗体),然后它们可用于各种应用,例如用于生产蛋白质疫苗。对于这样的应用,可以使用允许病毒在体外和/或在培养的细胞中表达的任何载体。

[0103] 对于所公开的待表达的异源抗原,异源抗原的蛋白质编码序列应该与指导蛋白质转录和翻译的调控序列或核酸控制序列“可操作地连接”。如本发明所用,当编码序列和核酸控制序列或启动子共价连接以使编码序列的表达或转录和/或翻译处于核酸控制序列的影响或控制之下时,其被称为“可操作地连接”。所述“核酸控制序列”可以是指导与其可操作地连接的核酸序列或编码序列的表达的任何核酸元件,例如但不限于启动子,增强子,IRES,内含子,miRNA识别元件(MRE)和本发明所述的其它元件。术语“启动子”在本发明中将用于指一组转录控制模块,其在RNA聚合酶II的起始位点周围聚集,并且当与本公开内容的蛋白编码序列操作性连接时导致所编码的蛋白质表达。本公开的转基因的表达可处于组成型启动子或诱导型启动子的控制之下,所述诱导型启动子仅在暴露于某些特定的外部刺激时启动转录,所述刺激例如但不限于抗生素(如四环素),激素(如蜕皮激素)或重金属。所述启动子也可以对特定的细胞类型,组织或器官具有特异性。本领域已知许多合适的启动子和增强子,并且任何这种合适的启动子或增强子可用于表达本公开的转基因。例如,合适的启动子和/或增强子可以选自真核启动子数据库(EPDB)。

[0104] 本公开涉及表达异源蛋白抗原的重组病毒载体。在一些实例中,所述抗原是HIV抗原。有利地,所述HIV抗原包括但不限于在美国公开第2008/0199493A1号和第2013/0136768A1号中讨论的HIV抗原,这两个专利通过引用并入本文。HIV,核酸或其免疫原性片段可用作HIV蛋白抗原。例如,可以使用美国公开第2008/0199493A1号和第2013/0136768A1号中讨论的HIV核苷酸。由HIV抗体识别的任何抗原都可以用作HIV蛋白抗原。所述蛋白抗原也可以是SIV抗原。例如,可以使用在美国公开第2008/0199493A1号和第2013/0136768A1号中讨论的SIV抗原。

[0105] 根据本公开内容使用的载体可以含有合适的基因调控区(例如启动子或增强子),从而使抗原可以被表达。

[0106] 例如为了产生针对HIV-1抗原的免疫应答和/或针对HIV-1的保护性免疫,在受试者体内表达本发明的抗原,应该选择适于在该受试者上表达并且在体内使用是安全的表达

载体。在一些实例中,可能期望在实验室动物中表达抗体和/或抗原,例如用于本公开的HIV-1免疫原性组合物和疫苗的临床前测试。在其他实例中,可以在人类受试者中表达抗原,例如在临床试验中以及本公开的免疫原性组合物和疫苗的实际临床应用中进行。

[0107] 本发明描述的CMV载体可以含有可以防止在宿主内和从宿主到宿主扩散的突变,由此使得病毒不能在免疫功能低下或其他因CMV感染而可能面对并发症的受试者中扩散或感染免疫功能低下或其他因CMV感染而可能面对并发症的受试者。本发明所述的CMV载体还可含有导致呈递免疫显性和非免疫显性表位以及非常规MHC限制的突变。然而,本发明描述的CMV载体中的突变不影响载体重新感染之前已经感染CMV的受试者的能力。这种CMV突变在例如美国专利公开2013-0136768;2010-0142823;2014-0141038;和PCT申请公开W02014/138209中描述,其全部通过引用并入本文。

[0108] 所公开的CMV载体可以体内施用,例如其目的是产生免疫原性应答,包括CD8⁺免疫应答,其包括以高比例的受II类(或其同源物或直系同源物)MHC限制的CD8⁺T细胞应答为特征的免疫应答。例如,在一些实例中,可能期望在实验室动物例如恒河猴中使用所公开的CMV载体以使用RhCMV进行免疫原性组合物和疫苗的临床前测试。在其他实例中,例如在临床试验中以及使用HCMV的免疫原性组合物的实际临床应用中,将期望在人类受试者中使用所公开的CMV载体。

[0109] 对于这种体内应用,所公开的CMV载体作为免疫原性组合物的组分施用,所述免疫原性组合物还包含药学上可接受的载体。本公开的免疫原性组合物可用于刺激针对异源抗原(包括病原体特异性抗原)的免疫应答,并且可用作针对HIV-1的预防性或治疗性疫苗的一种或一种以上组分以预防,改善或治疗AIDS。本公开内容的核酸和载体尤其可用于提供基因工程疫苗,即用于将编码本公开内容的抗原的核酸递送至受试者(如人)的疫苗,从而使抗原在受试者中表达以引发免疫应答。

[0110] 对于动物(包括人类)的免疫时间表(或方案)是众所周知的,并且可以容易地针对特定受试者和免疫原性组合物来确定。因此,可以对受试者施用免疫原一次或一次以上。优选地,在免疫原性组合物的分开施用之间存在设定的时间间隔。虽然该时间间隔对于每个受试者都是不同的,但是通常从10天到几周不等,一般是2周,4周,6周或8周。对于人类来说,所述时间间隔通常为2至6周。在本公开的一个特别有利的实施方式中,所述时间间隔更长,有利地,约10周,12周,14周,16周,18周,20周,22周,24周,26周,28周,30周,32周,34周,36周,38周,40周,42周,44周,46周,48周,50周,52周,54周,56周,58周,60周,62周,64周,66周,68周或70周。所述免疫方案通常施用1至6次免疫原性组合物,但可以少至1次或2次或4次。诱导免疫应答的方法还可以包括伴随免疫原施用佐剂。在某些情况下,一年一次,两年一次或其他长时间间隔(5-10年)加强免疫可以补充初始免疫接种方案。目前的方法还包括各种初免加强方案。在这些方法中,一次或一次以上初次免疫后接着进行一次或一次以上加强免疫。对于每次免疫和免疫原性组合物的类型(例如含有蛋白质或表达载体),实际免疫原性组合物可以是相同的或不同的,免疫原的途径和配方也可以不同。例如,如果表达载体用于初免和加强步骤,则其可以是相同或不同类型(例如DNA或者细菌或病毒表达载体)。一种有用的初免-加强方案提供两次初次免疫,间隔四周,然后在最后一次初免免疫后4周和8周进行两次加强免疫。对本领域普通技术人员来说还显而易见的是,通过使用本公开内容的DNA,细菌和病毒表达载体提供初免和加强方案,本发明包括数种排列和组合。当表达

来源于不同病原体的不同抗原时,CMV载体可以重复使用。

实施例

[0111] 实施例1-包含微小RNA识别元件(MRE)的CMV载体

[0112] 为了限制基于RhCMV的载体在髓系细胞中复制的能力,CMV被工程化以表达骨髓特异性miRNA miR-142 3p。据推测,将miR-142 3p靶位点插入到必需RhCMV基因的3'UTR中将导致由表达miRNA的细胞中靶病毒mRNA的降解引起的病毒复制的抑制。

[0113] miR-142 3p miRNA在源自三只动物外周血的恒河猴巨噬细胞中高度表达(图1)。分离全血,使用CD14珠粒用磁性细胞分选分离CD14阳性细胞。将CD14阳性细胞接种于含有M-CSF的RPMI或RPMI与M-CSF条件化RPMI的1:1混合物中。7天后,CD14阳性细胞粘附于组织培养板并分化为更成熟的巨噬细胞。在Trizol中收获这些细胞,并使用标准步骤分离RNA。还分离了来自恒河猴成纤维细胞的RNA,并对所有样品进行miR-142 3p的qRT-PCR。这些数据表明,与恒河猴成纤维细胞相比,恒河猴髓系细胞表达水平高得多的miR-142 3p,并提供了使用该miRNA靶向必需RhCMV转录物的基本原理。

[0114] 为了更好地理解其他细胞类型中miR-142 3p的表达,使用Trizol从各种均化的胎儿和成人组织中分离RNA(图2)。使用miRNA模拟物作为标准对照对miR-142-3p进行qRT-PCR。在通常含有大量髓样细胞的组织(包括胎儿脾脏,淋巴细胞和肝脏)中以及成人肺中检测到miR-142-3p的最高表达(约 10^7 拷贝/10ng RNA)。因此,在各种组织中可检测到miR-142-3p的表达。然而,目前还不清楚miRNA是来自于驻留的或循环的髓系细胞还是由组织中的其他细胞类型表达。这些数据表明限制疫苗载体在髓系细胞中的复制可能阻止载体向广泛的各种组织传播。

[0115] 由于上述数据证明miR-142-3p在恒河猴髓系细胞中高度表达,因此通过使用miR-142-3p作为宿主限制因子来改变疫苗载体向性。生成在Rh156(与HCMV IE2同源的必需立即早期基因)和Rh108(与HCMV UL79同源的必需早期基因)的3'UTR中含有miR-142-3p靶位点的RhCMV 68-1(UL128/UL130-缺失)和68-1.2(UL128/UL130-完整)病毒。通过将EF1 α 启动子控制下的这种抗原插入基因Rh211,这些载体另外表达源自SIV(例如SIVgag或SIVretanef)的异源抗原。

[0116] 在miR-142-3p水平高的细胞中,由于miR-142-3p将与Rh156和Rh108的3'UTR结合并且降解mRNA,因此严重地抑制病毒复制,由此该病毒的生长将受到严重抑制。使用galK介导的BAC重组,将galK选择盒插入Rh156的3'UTR内,然后用含有4个拷贝的miR-142-3p结合位点(由8个随机核苷酸隔开)的人工盒取代galK选择盒。然后进行第二系列重组,从而将galK盒插入到Rh108的3'UTR中并用上述人工盒代替galK盒(图10,3A,11A)。通过使用针对插入位点旁侧区域设计的引物进行PCR,随后对PCR产物测序来确认成功的重组。通过对纯化的BAC DNA进行XmaI消化,随后在琼脂糖凝胶上电泳来评估BAC基因组的完整性(图3B,11B)。随后将完整的BAC DNA电穿孔转入原代恒河猴成纤维细胞中,并分离出单个病毒噬斑并繁殖总共三代。在每个阶段从上清液中分离病毒DNA,并通过用插入位点两侧的引物进行PCR并对PCR产物进行测序来评估miR-142-3p盒的保持(图3C,11A)。

[0117] 然后使用多步生长曲线分析在miR-142-3p存在下,由上述BAC重组产生的68-1和68-1.2Rh156/Rh108病毒的生长情况(图4,9)。使用带有阴性对照miRNA或miR-142 3p模拟物的Lipofectamine 2000®转染恒河猴成纤维细胞。转染后两天,用MOI为0.01的野生型

68-1或68-1Rh156/Rh108 miR-142-3p突变体感染细胞(图4)。可选地,转染后两天,用MOI为0.01的野生型68-1.2或68-1.2Rh156/Rh108 miR-142-3p突变体感染细胞(图9)。在指定的时间收获细胞沉淀和上清液并在原代恒河猴成纤维细胞上滴定。miR-142-3p模拟物的存在对WT病毒的生长没有任何影响。重要的是,68-1Rh156/Rh108 miR-142-3p和68-1.2Rh156/Rh108 miR-142-3p突变病毒在阴性对照miRNA存在下不显示任何生长缺陷,但是在miR-142-3p存在下生长受到严重抑制。例如,miR-142-3p的存在将68-1Rh156/Rh108 miR-142-3p突变病毒的病毒滴度降低了高达4log,但对野生型68-1病毒的病毒滴度没有影响(图4)。因此,在体外miRNA存在下,将miR-142-3p靶位点工程化到两个必需基因的3'UTR中的病毒的生长严重受限,表明在体内该病毒将不能在miR-142-3p水平天然较高的髓样细胞中复制。

[0118] 测试了68-1Rh156/Rh108 miR-142-3p病毒在离体来源的恒河猴巨噬细胞中复制的能力(图5)。如上所述分离和分化来自恒河猴外周血的CD14⁺细胞并以10的MOI用WT病毒或68-1Rh156/Rh108miR-142 3p病毒感染该CD14⁺细胞。对Rh87和GAPDH(作为对照)进行qPCR来评估在感染后8小时以及感染后5天和10天的病毒DNA水平。虽然在感染WT病毒的细胞中病毒DNA水平随时间增加,但在感染突变病毒的细胞中几乎没有检测到病毒DNA增加。这些数据表明插入到病毒基因组中的miR-142-3p靶位点限制了恒河猴巨噬细胞中的病毒复制,并且进一步证明了miR-142-3p在该细胞类型中充当强宿主限制因子。

[0119] 体内评估了miR-142-3p限制性病毒的免疫原性。最初,用68-1RhCMV Rh156/Rh108 miR-142 3p/SIVrtn病毒(其还包含在EF1 α 启动子控制下的RTN转基因(SIV rev,tat和nef的融合物))感染两只成年动物,并分离和分析外周血CD4⁺和CD8⁺记忆T细胞对重叠RTN肽的应答(图6)。两只动物均引发了对转基因的强力的长期CD4和CD8 T细胞应答,表明疫苗载体的总体免疫原性不会因引入miR-142-3p靶位点而受损。

[0120] 然后评估用68-1.2RhCMV Rh156/Rh108 miR-142-3p/SIVgag病毒(其还包含在EF1 α 启动子控制下的GAG转基因)感染的动物中的外周T细胞应答。如图7和图14所示,该疫苗载体还引发针对疫苗载体内编码的HIV gag蛋白的强力的长期CD4⁺和CD8⁺T细胞应答。先前已经证明,缺乏UL128和UL130的疫苗载体(例如68-1)引起非常规MHC-E和MHC-II限制性CD8 T细胞应答,包括在所有感染的动物中可检测到的所谓的“超表位”(“supertope”)应答。在包含完整UL128和UL130的载体(例如68-1.2)中,仅检测到常规MHC-I限制性CD8 T细胞。图7和图14证明在用68-1.2Rh156/Rh108miR-142-3p病毒感染的动物中,MHC-E和MHC-II限制性“超表位”均不存在。

[0121] 然而,出乎意料地,通过对T细胞应答进一步表位作图(图8和14),确定主要的非常规MHC-II限制性T细胞应答由68-1.2Rh156/Rh108 miR-142-3p/SIVgag病毒引发,同时检测到相对较少的MHC-Ia应答。通过改变68-1.2(UL128和UL130-完整)的髓样细胞向性,应答从常规MHC-1a转变为非常规MHC-II限制性T细胞应答,而没有MHC-E应答和MHC-II‘超表位’应答。这些数据证明了通过防止髓系细胞中的病毒复制来引发非常规MHC-II限制性CD8 T细胞的替代方法。另外,因为巨噬细胞在体内病毒传播中起重要作用,所以使用基于miR-142 3p的载体可以提高疫苗安全性。

[0122] 还在用68-1RhCMV Rh156/Rh108 miR-142-3p/SIVgag病毒(其还含有在EF1 α 启动子控制下的GAG转基因)感染的动物中评估外周T细胞应答。如图12所示,该疫苗载体还引发

针对疫苗载体内编码的HIV gag蛋白的强力且长期的CD4+和CD8+T细胞应答。先前已经证明,缺乏UL128和UL130的基于68-1的载体引发非常规MHC-E和MHC-II限制性CD8 T细胞应答,包括在所有感染的动物中都可检测到的所谓“超表达”应答。然而,图12表明,尽管68-1RhCMV Rh156/Rh108 miR-142-3p病毒保留了引起对MHC-II的超表位应答的能力,但该载体未能引发受MHC-E限制的超表位应答。此外,通过对T细胞应答进一步表位作图(图13),确定了68-1RhCMV Rh156/Rh108 miR-142-3p载体只引发MHC-II限制性CD8+T细胞应答而没有任何MHC-I限制性或MHC-E限制性CD8+T细胞。因此,该载体仅引发MHC-II限制性CD8+T细胞。由于RhCMV引发的CD4+T细胞总是受MHC-II限制,因此这些数据表明通过将miR-142-3p靶位点导入缺乏UL128和UL130的载体中,可以产生仅引发MHC-II限制性应答(包括许多不同个体共享的MHC-II超表位应答)的疫苗。

[0123] 虽然本发明已经说明并描述了某些实施方式,但是本领域的普通技术人员应理解,为了实现相同目的而计算出的多种替代和/或等同实施方式或实现方式可以替代所显示和描述的实施方式而不偏离本发明的范围。本领域的普通技术人员将容易理解,实施方式可以以多种方式来实现。本申请旨在覆盖这里讨论的实施方式的任何修改或变化。因此,显然意味着实施方式仅受权利要求及其等同方案限制。

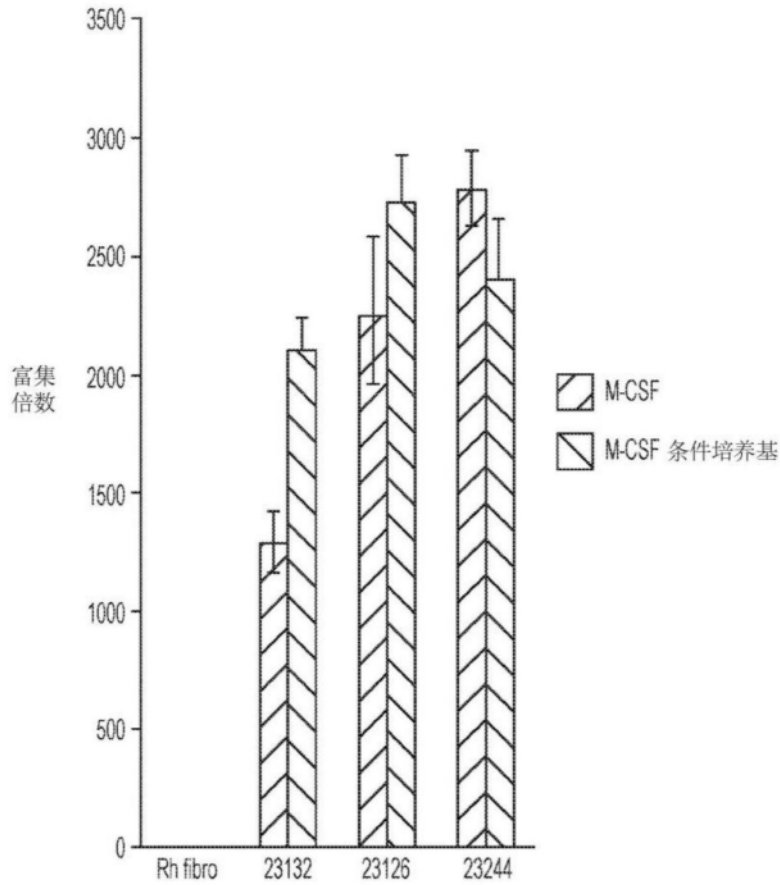


图1

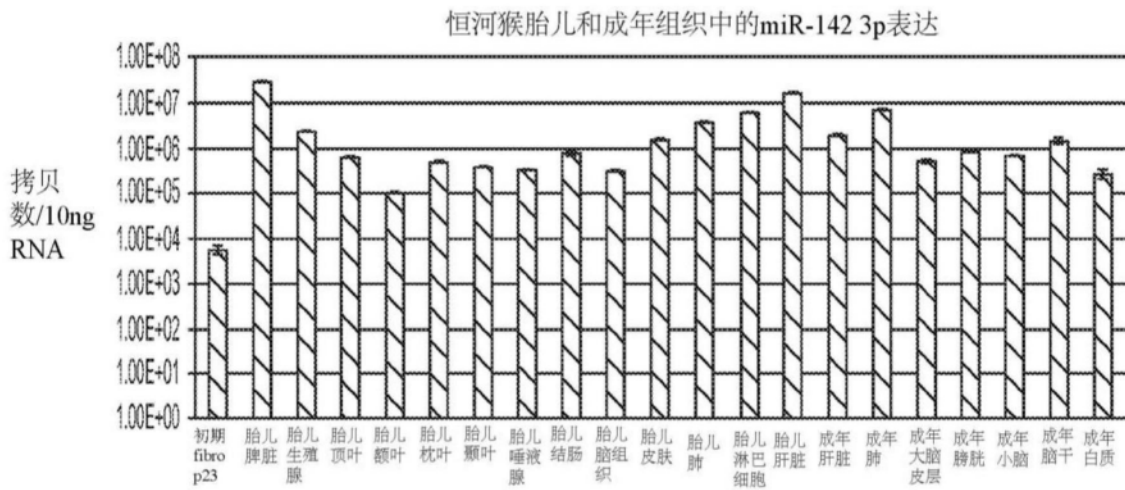


图2

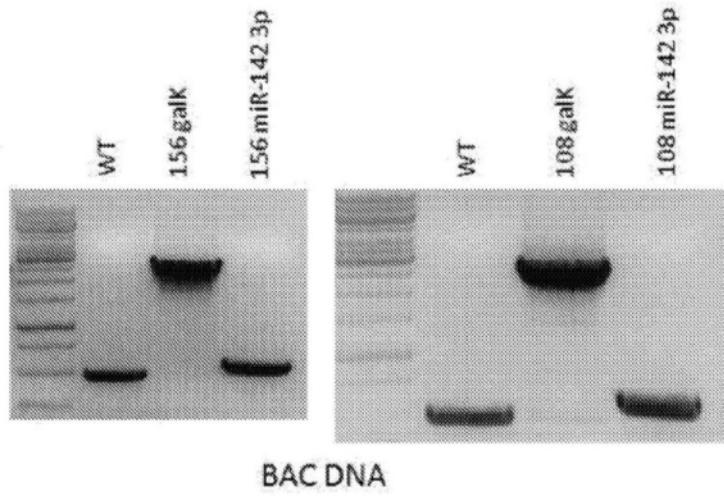


图3A

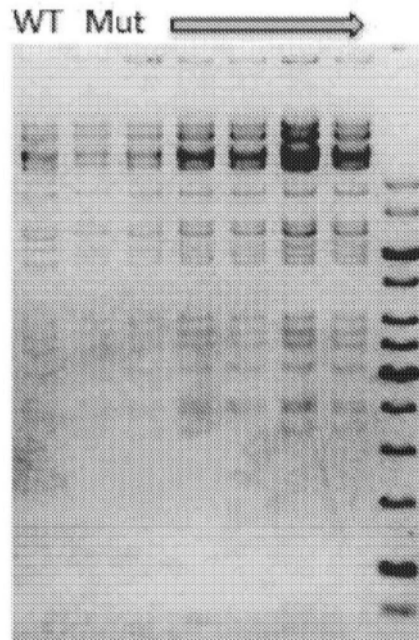


图3B

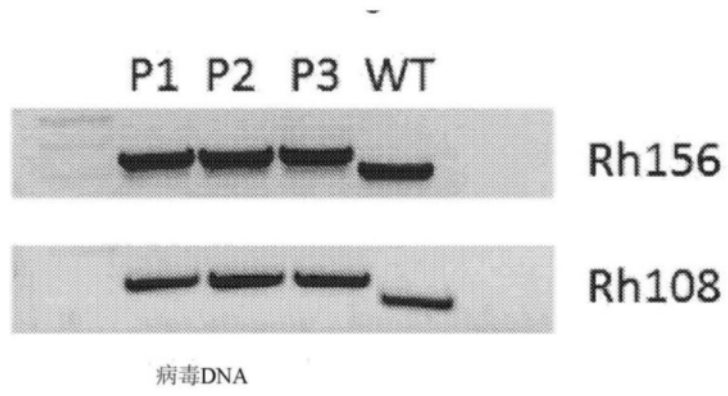


图3C

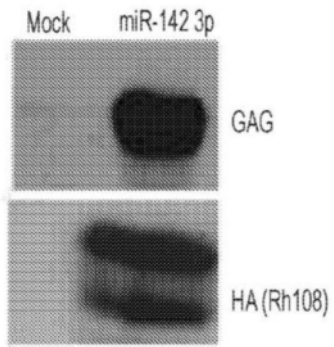


图3D

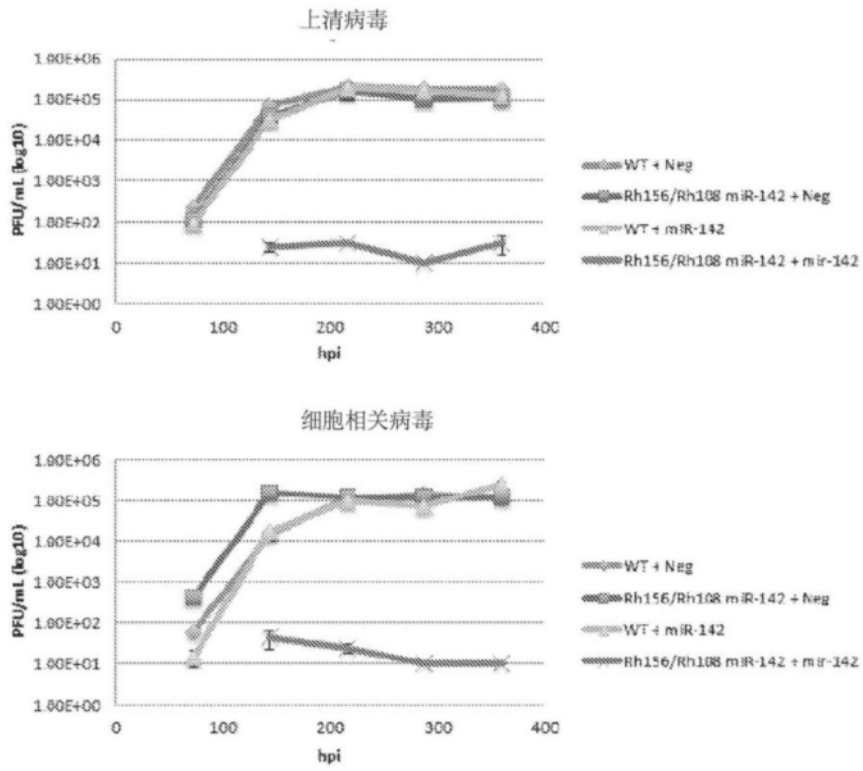


图4

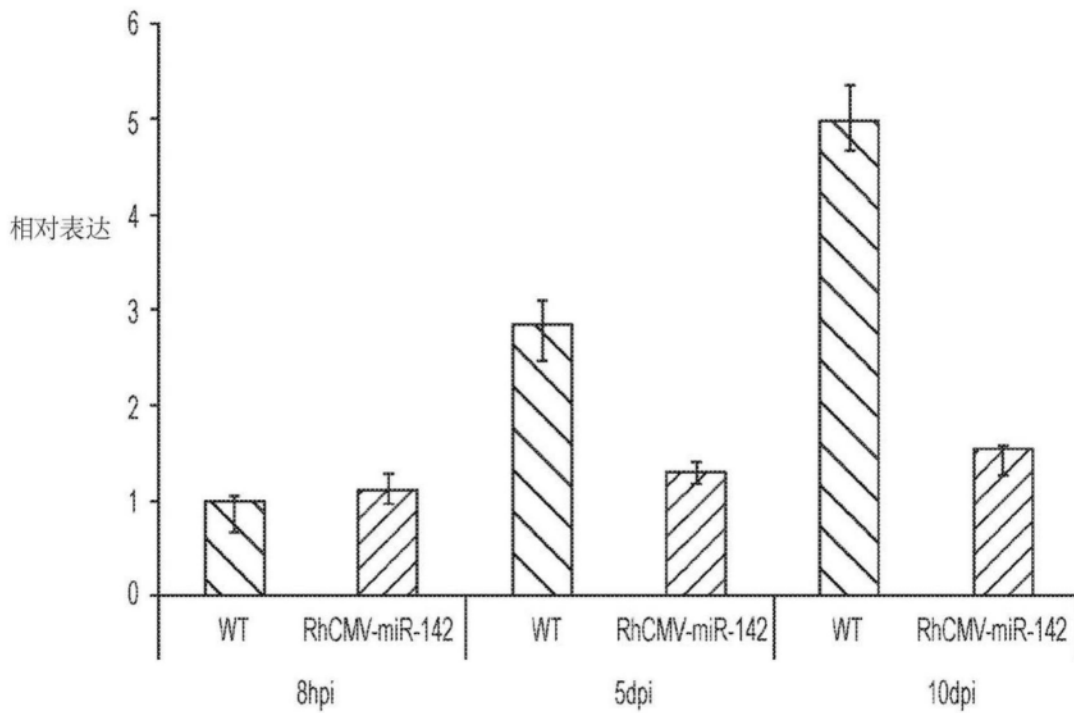


图5

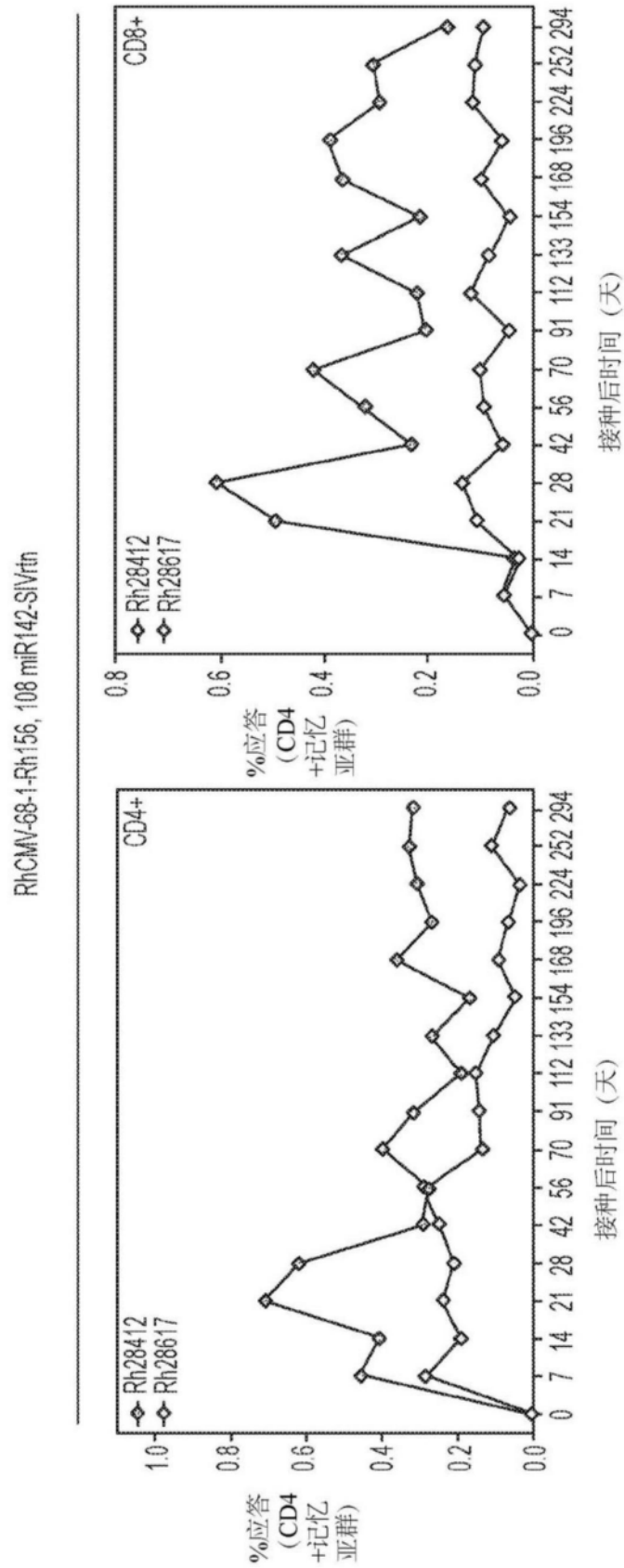


图6

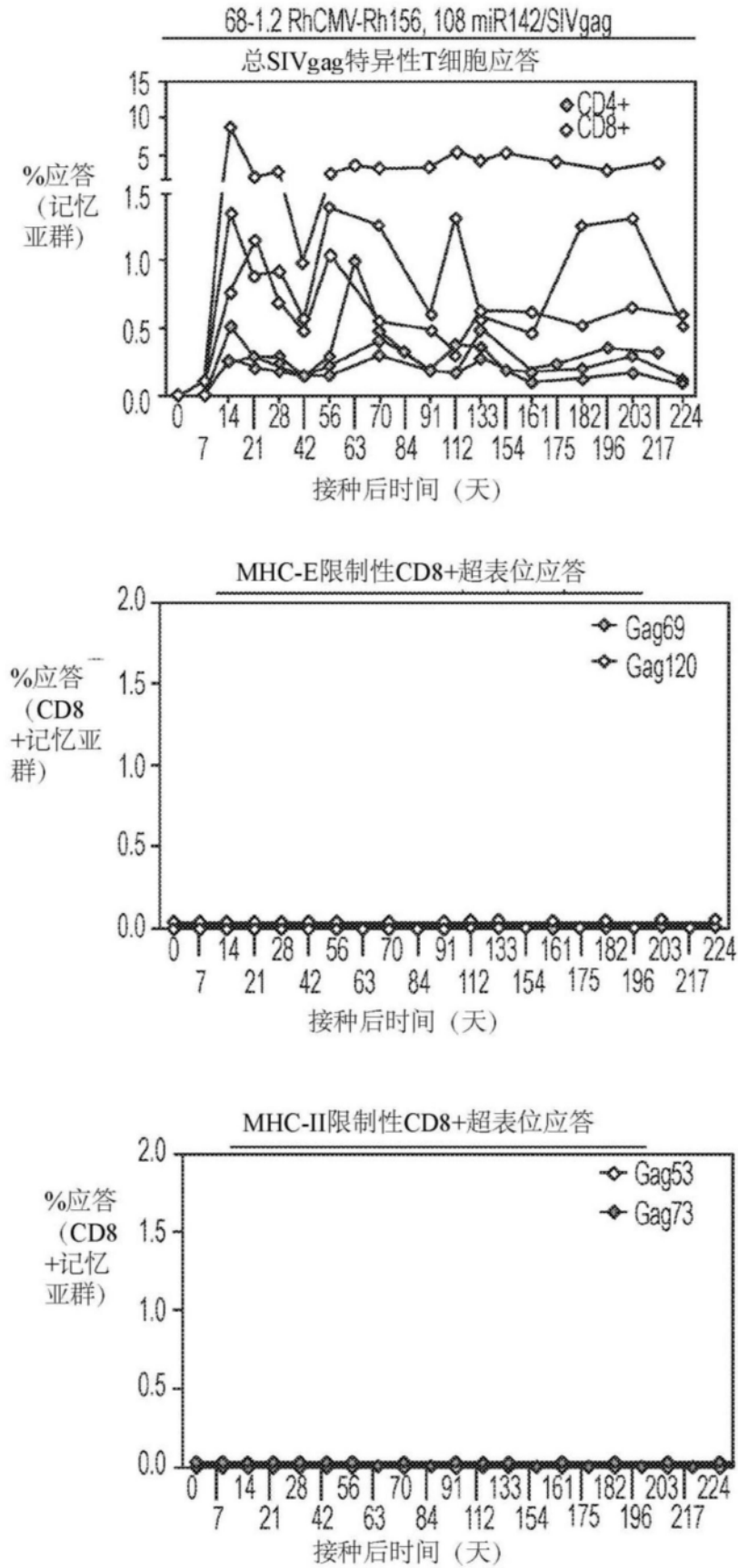


图7

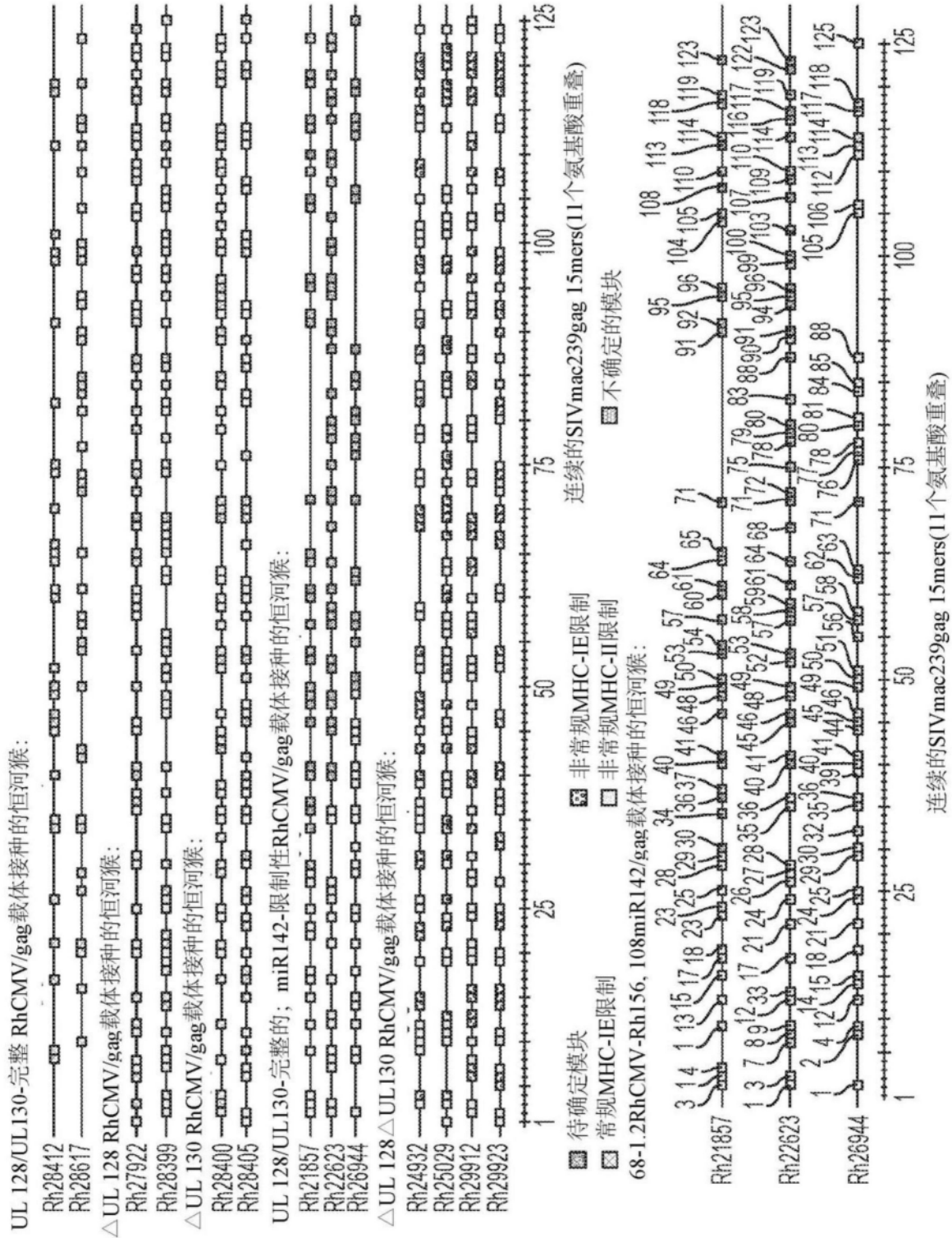


图8

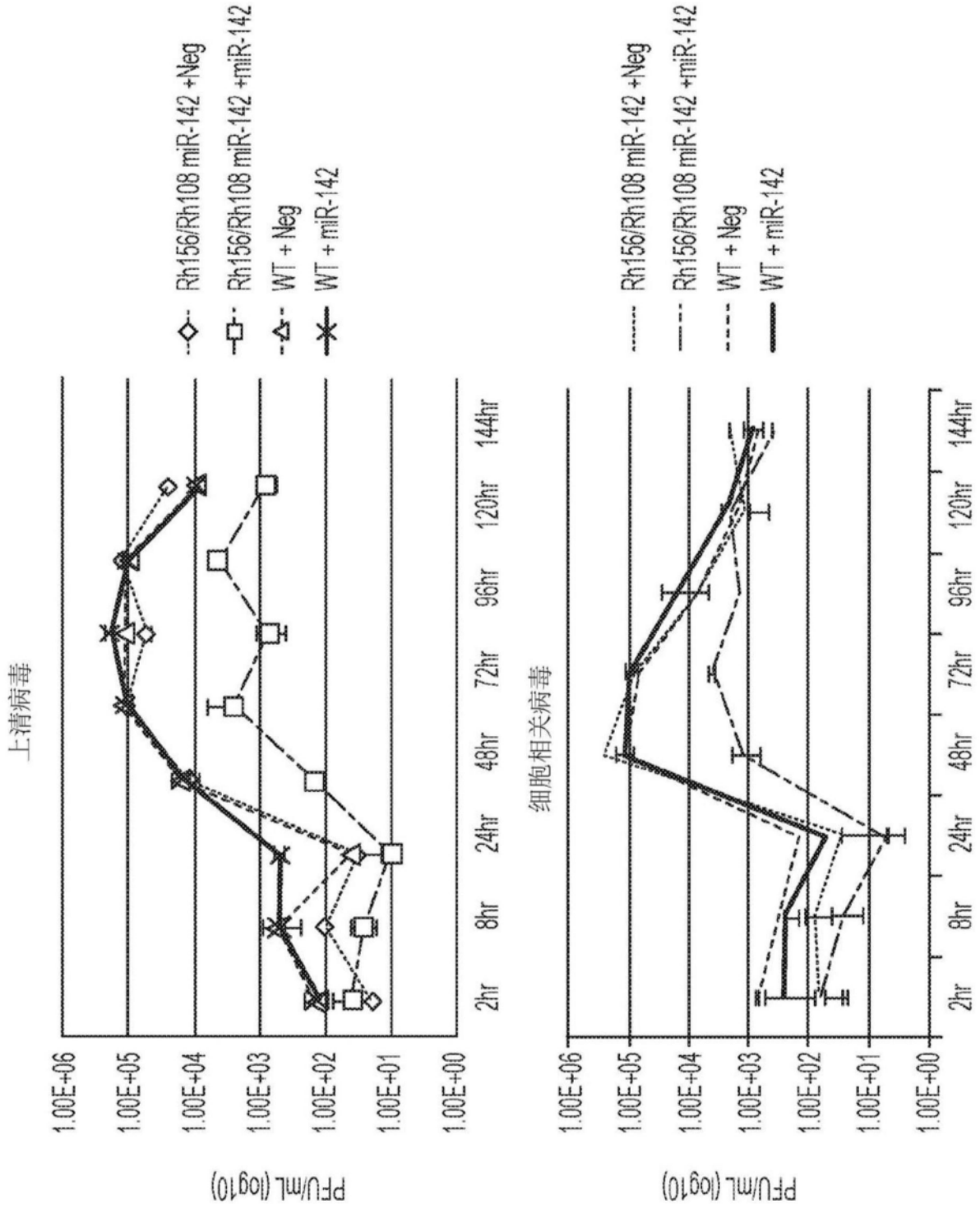


图9

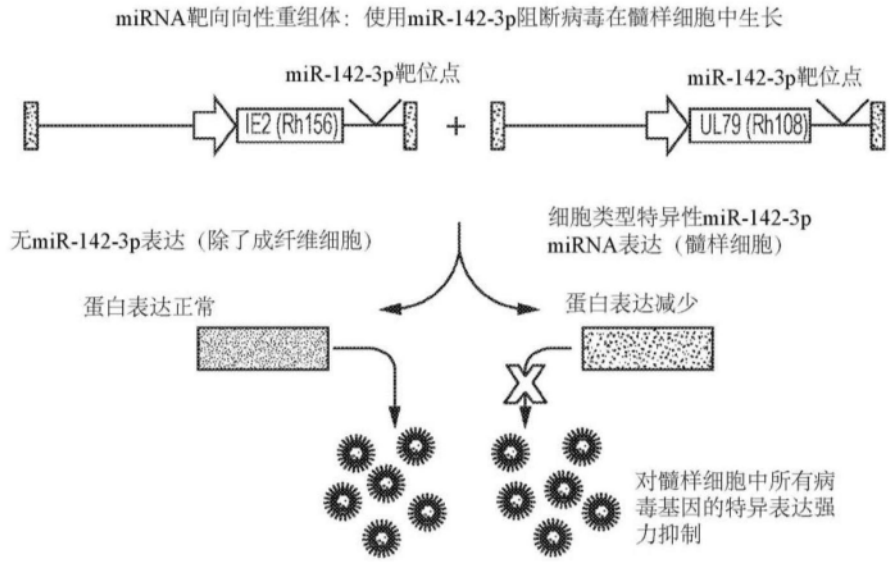


图10

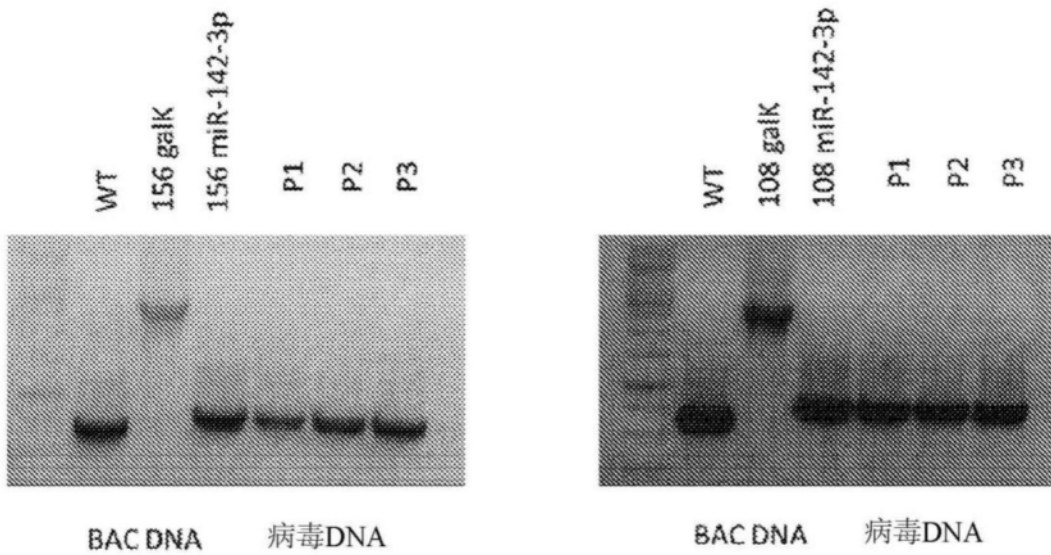


图11A



图11B

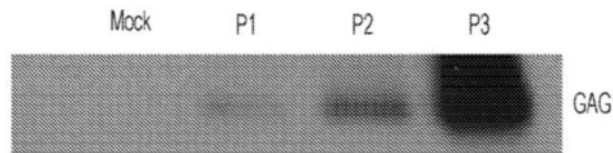


图11C

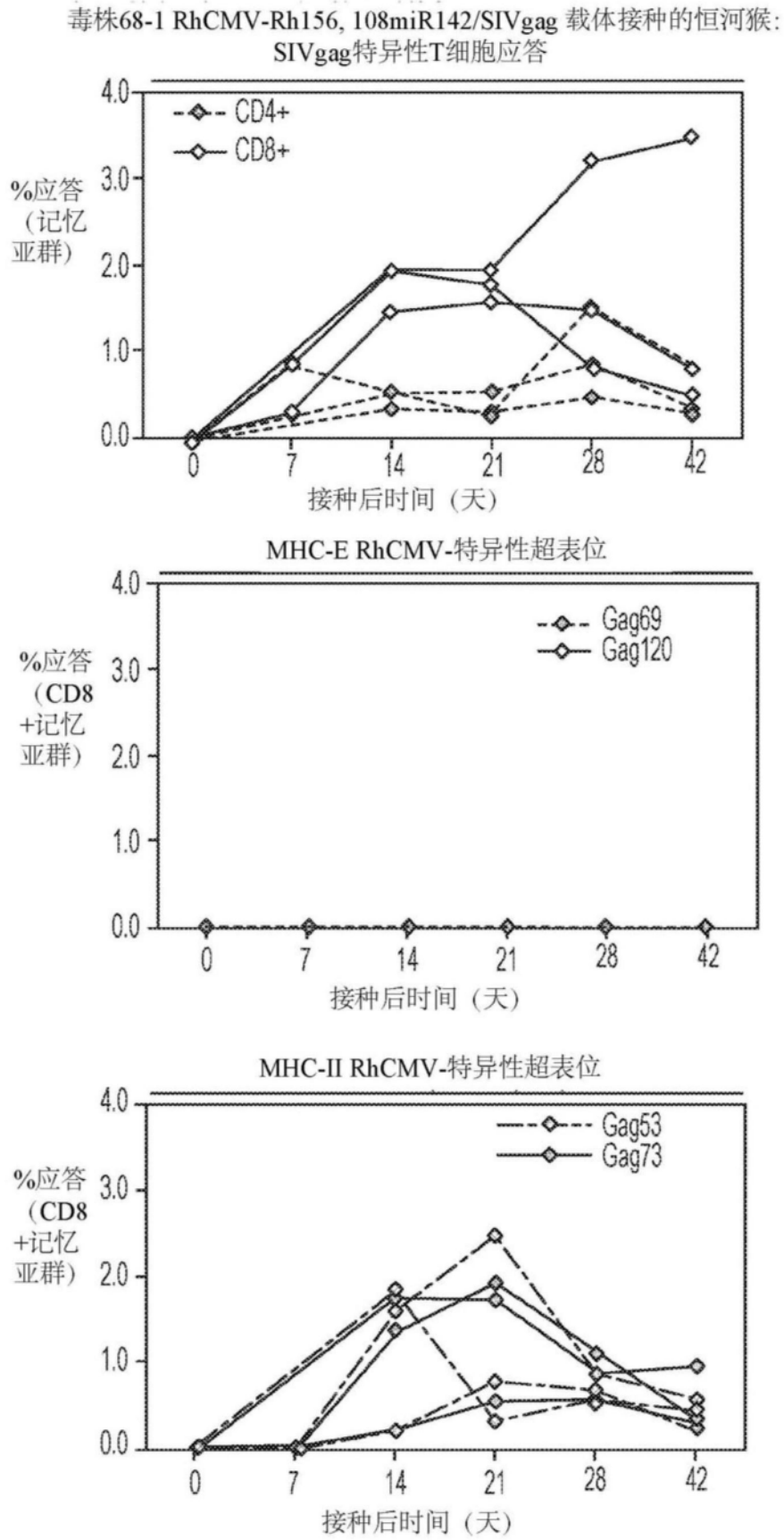


图12

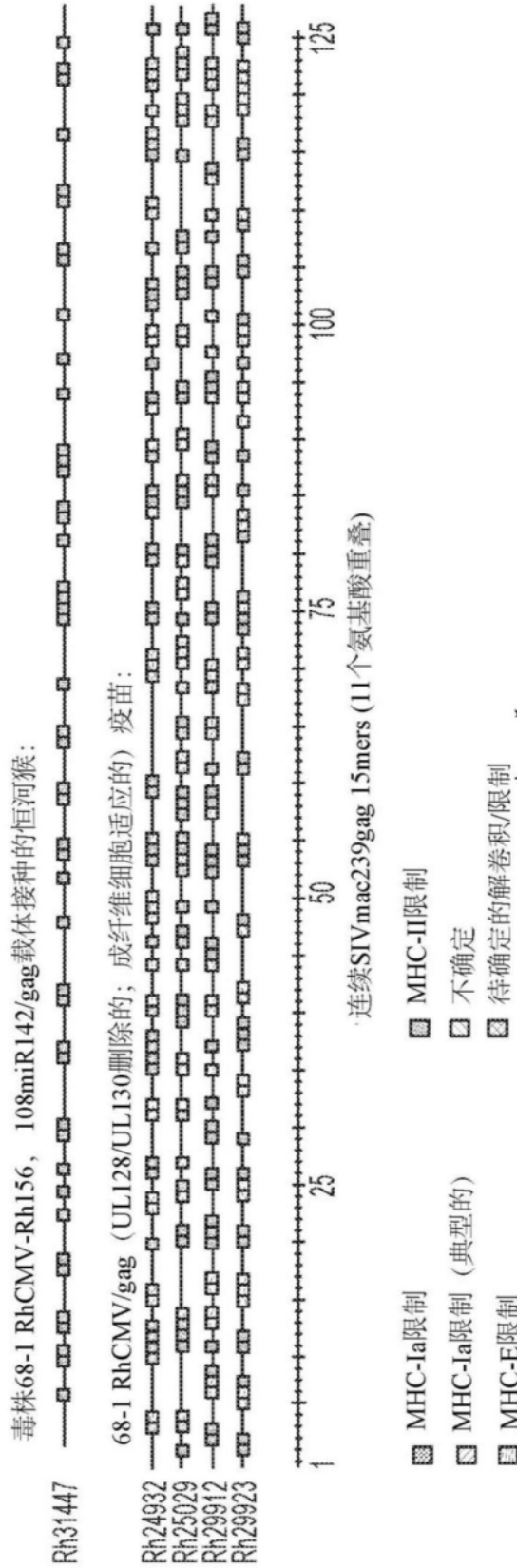


图13

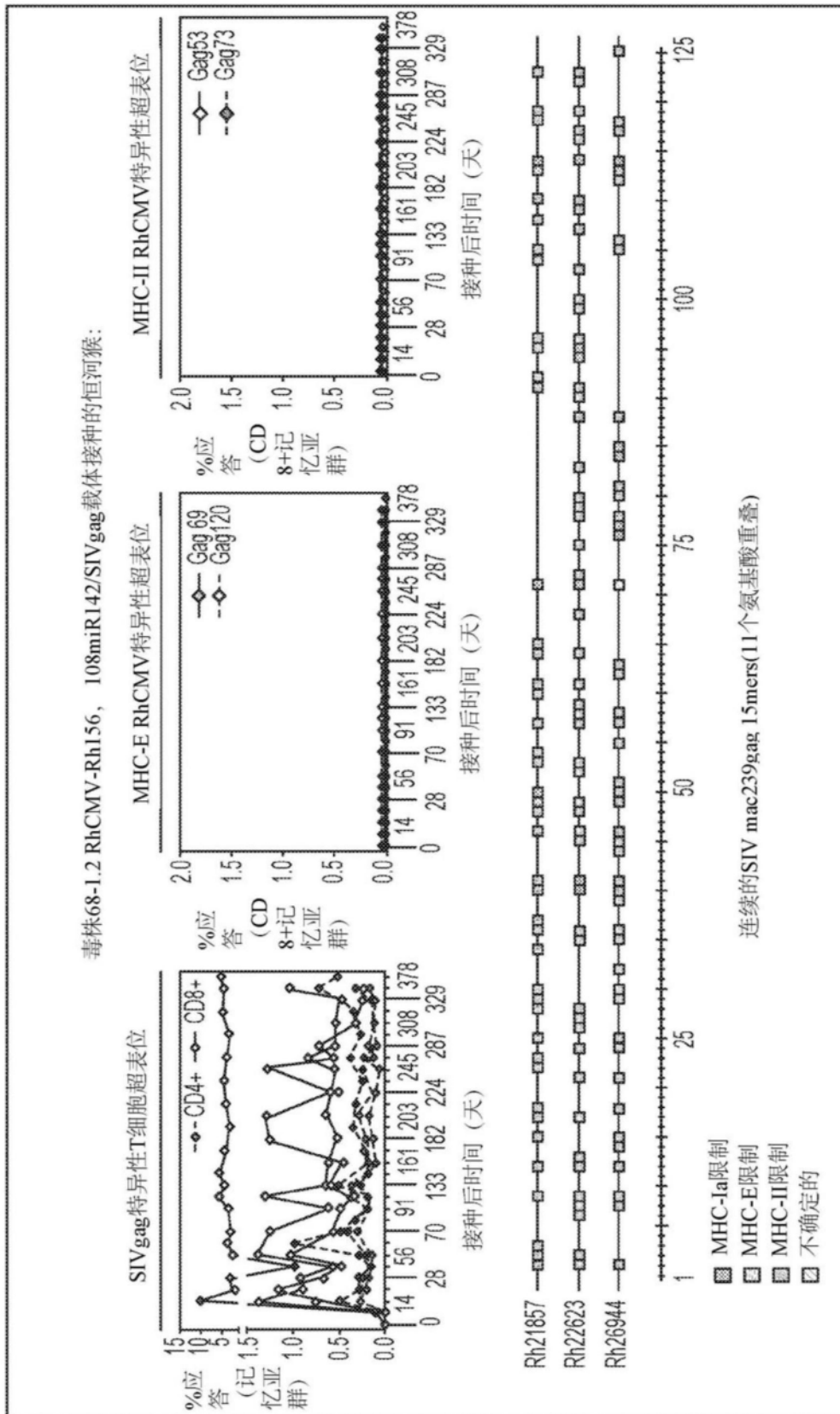


图14