



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106456805 B

(45)授权公告日 2020.01.10

(21)申请号 201580022222.6

(22)申请日 2015.03.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106456805 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据

61/946,965 2014.03.03 US

62/080,663 2014.11.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/018272 2015.03.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/134368 EN 2015.09.11

(73)专利权人 阿尔伯特爱因斯坦医学院公司

地址 美国纽约

(72)发明人 W·雅各布

P·A·冈萨雷斯穆诺茨

B·赫罗尔德 C·佩特罗

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 王芝艳 吴小瑛

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

C12N 7/00(2006.01)

C12N 15/74(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2005005637 A2,2005.01.20,

CN 101583381 A,2009.11.18,

WO 2006004878 A1,2006.01.12,

审查员 郑召磊

权利要求书3页 说明书20页 附图7页

(54)发明名称

重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)疫苗载体

(57)摘要

本申请提供了重组单纯疱疹病毒2(HSV-2)疫苗载体、其病毒粒、包含前者的组合物和疫苗，以及使用它们的方法。

1. 一种重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2), 在其基因组中具有其编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失, 并且在其脂质双层上包含单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 糖蛋白, 其中所述HSV-1糖蛋白不是由重组HSV-2基因组编码的, 并且其中HSV-1糖蛋白是HSV-1糖蛋白D。

2. 根据权利要求1所述的重组HSV-2, 在其脂质双层上包含进一步的非HSV-2病毒表面糖蛋白。

3. 根据权利要求1所述的重组HSV-2, 在其脂质双层上包含进一步的细菌表面糖蛋白。

4. 根据权利要求1所述的重组HSV-2, 在其脂质双层上包含进一步的寄生物表面糖蛋白, 其中所述寄生物是哺乳动物的寄生物。

5. 根据权利要求1所述的重组HSV-2, 其中编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。

6. 根据权利要求2所述的重组HSV-2, 其中所述进一步的病毒表面糖蛋白由已经插入到重组HSV-2的基因组中的转基因编码。

7. 根据权利要求3所述的重组HSV-2, 其中所述进一步的细菌表面糖蛋白由已经插入到重组HSV-2的基因组中的转基因编码。

8. 根据权利要求4所述的重组HSV-2, 其中所述进一步的寄生物表面糖蛋白由已经插入到重组HSV-2的基因组中的转基因编码。

9. 根据权利要求2-8中任一项所述的重组HSV-2, 其中通过用具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失的重组HSV-2构建体转染细胞的方式, 所述HSV-1糖蛋白D存在于其脂质双层中, 其中所述细胞经转染或已经转染以在其细胞膜上表达HSV-1糖蛋白D, 并且其中从所述细胞产生包含在脂质双层上存在的HSV-1糖蛋白D的重组HSV-2。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的重组HSV-2的病毒粒。

11. 分离的细胞, 在其中包含根据权利要求1-9中任一项所述的病毒或根据权利要求10所述的病毒粒, 其中所述细胞不存在于人类中。

12. 疫苗组合物, 其包含根据权利要求1-9中任一项所述的病毒, 或根据权利要求10所述的病毒粒。

13. 组合物, 其包含根据权利要求1-9中任一项所述的病毒, 或根据权利要求10所述的病毒粒, 其中所述病毒或病毒粒的基因组至少包含第二基因的缺失, 其中所述第二基因是HSV-2病毒复制必需的。

14. 药物组合物, 包含根据权利要求1-9中任一项所述的病毒, 或根据权利要求10所述的病毒粒, 和可药用载体。

15. 权利要求1-9中任一项所述的病毒或权利要求10所述的毒粒在制备用于激发受试者中免疫应答的药物中的用途。

16. 权利要求1-9中任一项所述的病毒或权利要求10所述的毒粒在制备用于治疗受试者中HSV-1或HSV-2感染或治疗受试者中由HSV-1或HSV-2感染所致疾病的药物中的用途。

17. 根据权利要求16所述的用途, 其中由HSV-2感染所致的疾病包括生殖器溃疡。

18. 根据权利要求16所述的用途, 其中由HSV-2感染所致的疾病包括皮肤水疱或皮肤溃疡。

19. 权利要求1-9中任一项所述的病毒或权利要求10所述的毒粒在制备用于针对HSV-1或HSV-2感染接种受试者的药物中的用途。

20. 权利要求1-9中任一项所述的病毒或权利要求10所述的毒粒在制备用于免疫受试

者对抗HSV-1或HSV-2感染的药物中的用途。

21. 根据权利要求16、19或20所述的用途,其中制备药物用于施用皮下预备剂量和用于皮下或阴道内施用第二剂量。

22. 产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含HSV-1糖蛋白D,所述方法包括用在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),在允许所述重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下,感染包含了编码HSV-1糖蛋白D的异源核酸的细胞,并且回收所述细胞产生的在其脂质双层上包含HSV-1糖蛋白D的重组HSV-2病毒粒。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述细胞在其细胞膜上表达HSV-1糖蛋白D。

24. 产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因的缺失并且在其脂质双层上包含HSV-1表面糖蛋白,其中所述HSV-1表面糖蛋白不是由所述重组HSV-2基因组编码并且其中所述HSV-1表面糖蛋白是HSV-1糖蛋白D,所述方法包括用在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),在允许所述重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下,感染包含了编码HSV-1表面糖蛋白的异源核酸的细胞,并且回收所述细胞产生的在其脂质双层上包含HSV-1表面糖蛋白的重组HSV-2病毒粒。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述细胞在其细胞膜上表达HSV-1表面糖蛋白。

26. 重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,并且在其脂质双层上包含单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 糖蛋白,其中所述HSV-1糖蛋白不是由重组HSV-2基因组编码的,并且其中HSV-1糖蛋白是HSV-1糖蛋白D,并且还包含病原体的异种抗原。

27. 根据权利要求26所述的重组HSV-2,在其脂质双层上包含病原体的异种抗原。

28. 根据权利要求26所述的重组HSV-2,其中所述病原体是细菌或病毒性病原体。

29. 根据权利要求26所述的重组HSV-2,其中所述病原体是哺乳动物的寄生物。

30. 根据权利要求26-29中任一项所述的重组HSV-2,其中编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。

31. 根据权利要求26-29中任一项所述的重组HSV-2,其中所述异种抗原由已经插入所述重组HSV-2的基因组中的转基因编码。

32. 根据权利要求31所述的重组HSV-2,其中所述转基因是编码结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 生物被膜的基因或所述转基因是编码HIV gp120的基因。

33. 分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 在制备用于在受试者中针对抗原性靶诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的药物中的用途,所述单纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,并且在其脂质双层上包含单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 糖蛋白,其中所述HSV-1糖蛋白不是由重组HSV-2基因组编码的,并且其中HSV-1糖蛋白是HSV-1糖蛋白D,并且还在其脂质双层上包含异种抗原,所述异种抗原的量有效针对抗原性靶诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述异种抗原是所述抗原性靶的表面抗原。

35. 根据权利要求33所述的用途,其中所述异种抗原是寄生物抗原。

36. 根据权利要求33所述的用途,其中所述异种抗原是细菌性抗原或病毒性抗原。

37. 根据权利要求33或34所述的用途, 其中所述抗原性靶是病毒并且是拉沙病毒、人类免疫缺陷病毒、RSV、肠病毒、流感病毒、副流感病毒、猪呼吸道冠状病毒、狂犬病毒、布尼亚病毒或丝状病毒。

38. 根据权利要求33或34所述的用途, 其中所述抗原性靶是细菌并且是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), 溃疡分枝杆菌 (*M. ulcerans*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)、*M. abscessus*、衣原体沙眼 (*Chlamydia trachomatis*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 或苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)。

39. 根据权利要求36所述的用途, 其中所述分离的重组HSV-2包含转基因, 所述转基因是编码结核分枝杆菌生物被膜的基因或所述转基因是编码HIV gp120的基因。

## 重组单纯疱疹病毒2 (HSV-2) 疫苗载体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年3月3日提交的美国临时申请号61/946,965和2014年11月17日提交的美国临时申请号62/080,663的权益,所述文献的内容因而通过引用的方式并入。

[0003] 政府资助声明

[0004] 本发明借助美国政府支持在国家健康研究所资助的基金编号AI-061679 和AI-51519下做出。美国政府在本发明中享有某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 在本申请书的全文范围内,参考了多种出版物,包括依据方括号内的编号参考。可以在本说明书的末尾找到对这些参考文献的完整援引。本文中参考的这些出版物、全部专利和专利申请公开及书籍的公开内容因而通过引用的方式完整并入本申请中,以更充分地描述本发明所属的现有技术。

[0007] 单纯疱疹病毒1型和2型 (HSV-1和HSV-2) 作为重大健康问题在全球持续存在,在全世界不成比例地影响发展中国家和贫穷社区及助长HIV流行。因为目前不存在针对HSV-1、HSV-2或HIV的有效疫苗,因而迫切需要针对这些感染的疫苗。HSV-1是传染性失明的主要病因,而HSV-2是全球生殖器溃疡的主要病因,不过现在HSV-1更通常地被鉴定为与发达国家中的生殖道疾病有关。生殖器疱疹是一种可能羞辱及在心理上影响那些患者的复发性终生疾病。HSV-2感染显著地增加获得和传播HIV的可能性,而任一种血清型的垂直传播都经常导致婴儿重度发病或死亡。单独或与糖蛋白B (gD和gB) 联合使用病毒糖蛋白D的基于亚单位制剂的HSV-2疫苗的最近临床试验已经失败,尽管诱导出了全身性中和抗体。令人惊讶地,HSV-2gD亚单位 (gD-2) 疫苗提供了针对HSV-1的部分保护作用,但是未提供针对HSV-2的保护作用。已经临床前评价了几个减毒病毒,但是临床研究迄今已经限于治疗性应用(降低复发频率)并且同样尚未显示效力。因此,必须工程化新的疫苗策略并对其进行评价。

[0008] 本发明满足对新型和改进型HSV-1疫苗和HSV-2疫苗的这种需求。

[0009] 发明简述

[0010] 提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因 ( $U_{s6}$ ) 缺失。

[0011] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因 ( $U_{s6}$ ) 缺失。

[0012] 提供一种分离的细胞,所述细胞在其中包含如本文所述的重组HSV-2基因组或如本文所述的重组HSV-1基因,其中实施细胞不存在于人类中。

[0013] 还提供一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包含如本文所述的重组HSV-2 病毒或如本文所述的病毒粒。

[0014] 还提供一种组合物,所述组合物包含如本文所述的重组HSV-2病毒或如本文所述的病毒粒,其中所述病毒或病毒粒的基因组至少包含第二基因的缺失,其中第二基因是HSV-2病毒复制或毒力必需的。

[0015] 提供一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的重组HSV-2病毒或如本

文所述的病毒粒和可药用载体。

[0016] 还提供一种激发受试者中免疫应答的方法,所述方法包括向受试者以有效激发受试者中免疫应答的量施用(i)如本文所述的重组HSV-2病毒;(ii)如本文所述的其病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0017] 还提供一种治疗受试者中HSV-1、HSV-2或者HSV-1和HSV-2共感染或治疗受试者中HSV-1、HSV-2或共感染所致疾病的方法,包括向受试者以有效治疗受试者中HSV-1、HSV-2或共感染或治疗HSV-1、HSV-2或共感染所致疾病的量施用(i)如本文所述的重组HSV-2病毒;(ii)如本文所述的其病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0018] 还提供一种针对HSV-1、HSV-2或共感染而接种受试者的方法,所述方法包括向受试者以有效针对HSV-1、HSV-2或共感染接种受试者的量施用(i)如本文所述的重组HSV-2病毒;(ii)如本文所述的其病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0019] 还提供一种免疫受试者对抗HSV-1、HSV-2或共感染的方法,所述方法包括向受试者以有效免疫受试者对抗HSV-1、HSV-2或共感染的量施用(i)如本文所述的重组HSV-2病毒;(ii)如本文所述的其病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0020] 在疫苗、组合物和药物组合物及其使用方法的一个实施方案中,重组 HSV-2的量是有效实现所述目的的重组HSV-2的pfu量。

[0021] 还提供一种产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含HSV-1或HSV-2糖蛋白D,所述方法包括用其基因组中具有编码HSV-2 糖蛋白D的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 在允许重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下感染包含了编码HSV-1或HSV-2糖蛋白D的异源核酸的细胞,并且回收细胞产生的重组HSV-2病毒粒。

[0022] 还提供一种重组核酸,所述重组核酸具有与野生型HSV-2基因组相同的序列,例外是重组核酸不包含编码HSV-2糖蛋白D的序列。

[0023] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述重组单纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-1、HSV-2或共感染。

[0024] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-1、HSV-2 或共感染。

[0025] 提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失。

[0026] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失。

[0027] 还提供一种分离的细胞,所细胞在其中包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒,其中所述细胞不存在于人类中。

[0028] 一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒。

[0029] 还提供一种组合物,所述组合物包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒,其中所述病毒或病毒粒的基因组至少包含第二基因的缺失,其中第二基因是HSV-2病毒复制必需的。

[0030] 还提供药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒和可药用载体。

[0031] 还提供一种激发受试者中免疫应答的方法,所述方法包括向受试者以有效激发受试者中免疫应答的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0032] 还提供一种治疗受试者中HSV-2感染或治疗受试者中由HSV-2感染所致疾病的方法,所述方法包括向受试者以有效在受试者中治疗HSV-2感染或治疗由HSV-2感染所致疾病的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0033] 还提供一种针对HSV-2感染接种受试者的方法,所述方法包括向受试者以有效针对HSV-2接种受试者的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0034] 还提供一种免疫受试者对抗HSV-2感染的方法,所述方法包括向受试者以有效免疫受试者对抗HSV-2的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0035] 还提供一种产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含HSV-1糖蛋白D,所述方法包括用其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D 的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 在允许重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下感染包含了编码HSV-1糖蛋白D的异源核酸的细胞,并且回收细胞产生的在其脂质双层上包含HSV-1糖蛋白D的重组HSV-2病毒粒。

[0036] 还提供一种产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含非HSV-2表面糖蛋白,所述方法包括用其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白 D的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 在允许重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下,感染包含了编码非HSV-2表面糖蛋白的异源核酸的细胞,并且回收细胞产生的在其脂质双层上包含非HSV-2表面糖蛋白的重组 HSV-2病毒粒。

[0037] 还提供一种重组核酸,所述重组核酸具有与HSV-2基因组相同的序列,例外是所述序列不包含编码HSV-2糖蛋白D的序列。

[0038] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2 在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-2感染。

[0039] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2 在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-1感染。

[0040] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-2感染。

[0041] 还提供一种治疗受试者中HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2共感染,或治疗受试者中

由HSV-2感染或者HSV-1和HSV-2共感染所致疾病的方法,所述方法包括向受试者以有效治疗受试者中HSV-2感染或治疗由HSV-2感染所致疾病的量或有效治疗受试者中HSV-1和HSV-2共感染或治疗由HSV-1 和HSV-2共感染感染所致疾病的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0042] 还提供一种针对HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2共感染接种受试者的方法,所述方法包括向受试者以有效针对HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2 共感染接种受试者的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0043] 还提供一种免疫受试者对抗HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2共感染的方法,所述方法包括向受试者以有效免疫受试者对抗HSV-1感染或者HSV-1 和HSV-2共感染的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii) 如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0044] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2 在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且还包含病原体的异种抗原。

[0045] 还提供一种在受试者中针对抗原性靶诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的方法,所述方法包括向受试者以有效针对抗原性靶诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的量施用分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且还其脂质双层上包含异种抗原。

## 附图说明

[0046] 图1:HSV-2  $\Delta$  gD启动顿挫型感染:HSV-2  $\Delta$  gD-/+仅在反式提供gD的细胞中(例如VD60[40,41])成功复制,但在不编码Us6的细胞如Vero细胞(ATCC CCL-81,绿猴肾)或CaSki(ATCC CRL-1550,智人(*Homo sapiens*),子宫颈)中未成功复制。无复制能力的HSV-2  $\Delta$  gD(从Vero细胞获得的 $\Delta$  gD-/-)不能感染不编码Us6的细胞如Vero和CaSki。

[0047] 图2A-C:A.在大剂量阴道内或皮下接种后,用多达 $10^7$ 个噬斑形成单位(pfu)的HSV-2  $\Delta$  gD-/+病毒接种的重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠不表现出疾病体征。相比之下,用野生型病毒按低1,000倍的病毒剂量( $10^4$ 个pfu)接种的SCID小鼠死于疾病。在A中显示生存曲线,B中显示红斑、水肿或生殖器溃疡证据的上皮评分(0至5打分)并且C中显示神经元感染证据的神经学评分(0至5打分)。

[0048] 图3A-C:用HSV-2  $\Delta$  gD-/+病毒免疫激发了抗HSV-2抗体。尽管皮下-皮下免疫激发显著水平的全身性和粘膜(阴道洗液)抗HSV-2抗体,但是 HSV-2  $\Delta$  gD-/+的皮下-阴道内免疫激发了较低水平的全身性抗HSV-2抗体并且阴道洗液中抗体水平没有增加。A中显示血清中的抗HSV-2抗体水平并且 B中显示阴道洗液中的抗HSV-2抗体水平。用 $\Delta$  gD-/+免疫的小鼠显示在强毒性HSV-2攻击后中和了血清中的抗HSV-2抗体。C中显示由 $\Delta$  gD-/+免疫激发的抗体的中和能力(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )。

[0049] 图4A-C:A:以TgT细胞转移并随后用HSV-2  $\Delta$  gD-/+或VD60裂解物(对照)初免和加强免疫的C57Bl/6小鼠的脾中CD8+gBT-I T细胞计数。B:接种小鼠或对照小鼠的脾中gBT-I记忆T细胞的百分数。C:在加强免疫后14天,将脾细胞分离并在体外用gB498-505肽再刺激



并稍后6小时通过胞内细胞因子染色法和流式细胞术分析细胞因子产生。(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )。

[0050] 图5A-F:用HSV-2  $\Delta$  gD-/+ ( $10^6$ 个pfu/小鼠)免疫保护了小鼠免受致死性 HSV-2攻击影响。将小鼠以皮下方式初免并且间隔3周皮下或阴道内加强免疫并且随后在阴道内加强免疫3周之后用LD<sub>90</sub>的强毒野生型HSV-2 (4674) 攻击。尽管对照(用VD60细胞裂解物免疫的)小鼠死于疾病,如体重明显减轻(A) 和死亡(B) 所显示,  $\Delta$  gD-/+免疫的小鼠显示明显较少的病变。另外,  $\Delta$  gD-/+ 免疫的小鼠在致死性攻击后显示较少上皮疾病(C) 和神经学病变(D)。此外与作为对照用VD60细胞裂解物免疫的小鼠相比,在致死量的强毒HSV-2阴道内攻击后,  $\Delta$  gD-/+接种的小鼠在阴道洗液(E)、阴道组织和背根神经节 (DRG) (F) 中显示明显较少的病毒载量。在第4天阴道洗液或第5天阴道组织和DRG,从  $\Delta$  gD-/+免疫的小鼠中没有回收到感染性病毒(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )。

[0051] 图6A-C:用强毒HSV-2攻击后,用HSV-2  $\Delta$  gD-/+免疫的小鼠在阴道洗液中分泌较少的炎性细胞因子。用HSV-2  $\Delta$  gD-/+免疫的小鼠在阴道洗液中分泌比VD60裂解物免疫并用强毒HSV-2攻击的小鼠更少的TNF- $\alpha$ 、IL-6和 IL-1 $\beta$ 。在攻击后的不同时间点观察到炎性细胞因子表达的差异(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )。

[0052] 图7A-D:用HSV-2  $\Delta$  gD-/+免疫招募T细胞至感染部位和相关的淋巴结 (LN)。用强毒HSV-2攻击后,用  $\Delta$  gD-/+皮下-皮下免疫的小鼠显示骹淋巴结 (LN) 中活化的抗HSV-2gB-T CD8+T细胞(A) 和CD4+T细胞(B) 的百分数增加。提取LN并与UV灭活的  $\Delta$  gD-/-温育6小时并且随后用抗体染色以便流式细胞分析。用强毒HSV-2攻击后,用  $\Delta$  gD-/+按皮下-阴道内方式免疫的小鼠显示阴道中抗HSV-2gB-T CD8+T细胞(C) 和CD4+T细胞(D) 的数目增加。加工阴道组织以提取T细胞并用抗体染色以便流式细胞分析。用 (CountBright™, Lifetechnologies) 进行细胞计数。(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )。

[0053] 发明详述

[0054] 提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2), 所述单纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失。

[0055] 在一个实施方案中,HSV-2糖蛋白D包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列:

[0056] MGRLTSGVGTAALLVVAVGLRVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKN LPVLDQLTDPPGVKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHA PSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMGDNCAIPITVMEYTECPYNKS LGVCPIRTQPRWSYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDW TEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSAKYQQGVTVDSIGMLPRFIPE NQRTVALYSLKIAGWHGPKPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSAL LEDPAGTVSSQIPPNWHIPSIQDVAPHHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVI GGIAFWVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDAPPSHQPLFY (HSV-2参考株 HG52)

[0057] 在一个实施方案中,分离的重组HSV-2还在其脂质双层上包含单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 糖蛋白D。

[0058] 在一个实施方案中,HSV-1糖蛋白D包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列:

[0059] MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVGRKYALADASLKMADPNRFRGK DLPVLDQLTDPPGVRRVYHIQAGLPDPFQPPSLPITVYYAVLERACRSVLL NAPSEAPQIVRGASEDVRKQPYNLTIWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYN KSLGACPIRTQPRWNYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKIND WTEITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPSACLSPQAYQQGVTVDSIGMLPRFI PENQRTVAVYSLKIAGWHGPKAPYTSTLLPPELSETPNATQP

ELAPEDPEDS ALLEDPVGTVPQIPPNNWHIPSIQDAATPYHPPATPNNMGLIAGAVGGSLLA ALVICGIVYWMR  
RRTQKAPKRIRLPHIREDDQPSSHQPLFY (HSV-1参考株 F)

[0060] 在一个实施方案中,编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。(例如,参见Dolan等人,J Virol.1998March;72(3):2010-2021.(PMCID: PMC109494)关于HSV-2基因组和Us6基因,“The Genome Sequence of Herpes Simplex Virus Type 2”,所述文献因而通过引用方式完整地并入)。

[0061] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失。

[0062] 在一个实施方案中,病毒粒还在其脂质双层上包含HSV-1或HSV-2糖蛋白D。在一个实施方案中,编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。

[0063] 在一个实施方案中,病毒还在其脂质双层上包含HSV-1或HSV-2糖蛋白D。在一个实施方案中,编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。

[0064] 提供一种分离的细胞,所述细胞在其中包含了不含HSV-2Us6基因的重组HSV-2基因组。

[0065] 在一个实施方案中,细胞是补充细胞,所述补充细胞提供不由重组HSV-2基因组编码的已表达的HSV-1或2糖蛋白。在一个实施方案中,补充细胞包含编码HSV-1或HSV-2糖蛋白D的异源核酸。在一个实施方案中,细胞在其膜上表达HSV-1糖蛋白D。在细胞的一个实施方案中,HSV-1糖蛋白D由异源核酸编码,所述异源核酸是HSV-1或HSV-2糖蛋白D基因,或是具有与HSV-1或HSV-2糖蛋白D基因相同的序列的核酸。

[0066] 还提供一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包含如本文所述的重组HSV-2病毒或如本文所述的病毒粒。在一个实施方案中,疫苗包含免疫佐剂。在一个实施方案中,疫苗不包含免疫佐剂。在本文所述的包含重组HSV-2的疫苗、组合物或药物组合物的一个实施方案中,HSV-2是活的。

[0067] 还提供一种组合物,所述组合物包含如本文所述的重组HSV-2病毒或如本文所述的病毒粒,其中病毒或病毒粒的基因组至少包含第二基因的缺失,其中第二基因是HSV-2病毒复制或毒力必需的。

[0068] 提供一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的重组HSV-2病毒或如本文所述的病毒粒和可药用载体。

[0069] 在一个实施方案中,将组合物或药物组合物或疫苗如此配制,从而它适于皮下施用至人类受试者。在一个实施方案中,将组合物或药物组合物或疫苗如此配制,从而它适于阴道内施用至人类受试者。在一个实施方案中,将组合物或药物组合物或疫苗如此配制,从而它适于肌内、鼻内或粘膜施用至人类受试者。

[0070] 还提供一种激发受试者中免疫应答的方法,所述方法包括向受试者以有效激发受试者中免疫应答的量施用(i)如本文所述的重组HSV-2病毒;(ii)如本文所述的其病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0071] 还提供一种治疗受试者中HSV-2感染或治疗受试者中HSV-1、HSV-2或共感染所致疾病的方法,包括向受试者以有效治疗受试者中HSV-1、HSV-2或共感染或治疗HSV-1、HSV-2或共感染所致疾病的量施用(i)如本文所述的重组HSV-2病毒;(ii)如本文所述的其病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

在一个实施方案中,该方法包括治疗由HSV-1、HSV-2或共感染所致的HSV-1或HSV-2病变。在该方法的一个实施方案中,HSV-1、HSV-2或共感染所致的疾病是生殖器溃疡。在该方法的一个实施方案中,HSV-1、HSV-2或共感染所致的疾病是疱疹、口腔疱疹、疱疹性瘰疽 (herpes whitlow)、生殖器疱疹 (genital herpes)、疱疹样湿疹 (eczema herpeticum)、摔跤手疱疹 (herpes gladiatorum)、HSV角膜炎、HSV视网膜炎、HSV脑炎或HSV脑膜炎。

[0072] 在本文中有关治疗HSV-1、HSV-2或共感染 (即HSV-1和HSV-2同时感染) 或针对其接种的方法的实施方案中,提供了治疗HSV-1感染、治疗HSV-2 感染、治疗共感染、针对HSV-1感染接种、针对HSV-2感染接种和针对共感染接种的独立、单独实施方案。

[0073] 还提供一种针对HSV-1、HSV-2或共感染接种受试者的方法,所述方法包括向受试者以有效针对HSV-1、HSV-2或共感染接种受试者的量施用 (i) 如本文所述的重组HSV-2病毒; (ii) 如本文所述的其病毒粒, (iii) 如本文所述的疫苗; (iv) 如本文所述的组合物; 或 (v) 如本文所述的药物组合物。

[0074] 还提供一种免疫受试者对抗HSV-1、HSV-2或共感染的方法,所述方法包括向受试者以有效免疫受试者对抗HSV-1、HSV-2或共感染的量施用 (i) 如本文所述的重组HSV-2病毒; (ii) 如本文所述的其病毒粒, (iii) 如本文所述的疫苗; (iv) 如本文所述的组合物; 或 (v) 如本文所述的药物组合物。

[0075] 在该方法的一个实施方案中,向受试者施用皮下或阴道内预备剂量并且皮下或阴道内施用第二剂量。在该方法的实施方案中,向受试者施用尽量多的皮下或阴道内预备剂量以激发抗HSV抗体和T细胞。

[0076] 还提供一种产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含HSV-1或HSV-2糖蛋白D,所述方法包括用其基因组中具有编码HSV-2 糖蛋白D的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),在允许重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下,感染包含了编码HSV-1或HSV-2糖蛋白D的异源核酸的细胞,并且回收细胞产生的重组HSV-2病毒粒。

[0077] 在一个实施方案中,细胞在其膜上表达HSV-1或HSV-2糖蛋白D。

[0078] 还提供一种重组核酸,所述重组核酸具有与野生型HSV-2基因组相同的序列不同之处是重组核酸不包含编码HSV-2糖蛋白D的序列。在一个实施方案中,重组核酸是DNA。在一个实施方案中,重组核酸是RNA。

[0079] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述重组单纯疱疹病毒 -2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-1、HSV-2或共感染。在一个实施方案中,分离的重组HSV-2 还在其脂质双层上包含单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 或单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 糖蛋白D。在分离的重组HSV-2的一个实施方案中,编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。

[0080] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-1、HSV-2 或共感染。在一个实施方案中,病毒粒还在其脂质双层上包含HSV-1或HSV-2 糖蛋白D。在一个实施方案中,编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2Us6基因。

[0081] 在如所述的病毒或病毒粒的一个实施方案中,HSV-1、HSV-2或共感染造成生殖器溃疡。

[0082] 提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2), 所述纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失。

[0083] 在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2还在其脂质双层上包含作为单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 糖蛋白D的表面糖蛋白。在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2还在其脂质双层上包含非HSV-2病毒表面糖蛋白。在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2还在其脂质双层上包含细菌表面糖蛋白。在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2还在其脂质双层上包含寄生物表面糖蛋白, 其中寄生物是哺乳动物的寄生物。

[0084] 在一个实施方案中, 编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2U<sub>S6</sub>基因。在一个实施方案中, 表面糖蛋白由已经插入重组HSV-2的基因组中的转基因编码。在一个实施方案中, 表面糖蛋白通过用具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失的重组HSV-2感染细胞的方式存在其脂质双层中, 其中细胞经转染或已经转染以在其细胞膜上表达表面糖蛋白, 并且其中从细胞产生包含在脂质双层上存在的表面糖蛋白的重组HSV-2。在一个实施方案中, 病毒糖蛋白来自HIV、肠病毒、RSV、流感病毒、副流感病毒、猪呼吸道冠状病毒病毒、狂犬病病毒、拉沙病毒、布尼亚病毒、CMV或丝状病毒。在一个实施方案中, 糖蛋白是HIV gp120。在一个实施方案中, 丝状病毒是埃博拉病毒。在一个实施方案中, 病毒是HIV、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、衣原体 (*chlamydia*)、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*)、麻风分支杆菌 (*M. leprae*)、*M. abscessus*、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoea*) 或密螺旋体 (*Treponeme*)。在一个实施方案中, 密螺旋体是苍白密螺旋体 (*Treponeme pallidum*)。

[0085] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒, 所述毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失。

[0086] 在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2的病毒粒还在其脂质双层上包含作为单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 糖蛋白D的表面糖蛋白。在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2的病毒粒还在其脂质双层上包含非HSV-2病毒表面糖蛋白。在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2的病毒粒还在其脂质双层上包含细菌表面糖蛋白。在一个实施方案中, 分离的重组HSV-2的病毒粒还在其脂质双层上包含寄生物表面糖蛋白, 其中寄生物是哺乳动物的寄生物。在一个实施方案中, 编码HSV-2糖蛋白D的基因是HSV-2U<sub>S6</sub>基因。在一个实施方案中, 表面糖蛋白由已经插入病毒粒的重组HSV-2基因组中的转基因编码。在一个实施方案中, 表面糖蛋白通过用具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失的重组HSV-2感染细胞的方式存在其脂质双层中, 其中细胞经转染或已经转染以在其细胞膜上表达表面糖蛋白, 并且其中从细胞产生包含在脂质双层上存在的表面糖蛋白的重组HSV-2。在一个实施方案中, 病毒粒已经由此回收。在一个实施方案中, 病毒糖蛋白来自HIV、肠病毒、RSV、流感病毒、副流感病毒、猪呼吸道冠状病毒病毒、狂犬病病毒、拉沙病毒、布尼亚病毒、CMV 或丝状病毒。在一个实施方案中, 糖蛋白是HIV gp120。在一个实施方案中, 丝状病毒是埃博拉病毒。在一个实施方案中, 病毒是HIV、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、衣原体、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*)、麻风分支杆菌 (*M. leprae*)、*M. abscessus*、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoea*) 或密螺旋体 (*Treponeme*)。在一个实施方案中, 密螺旋体是苍白密螺旋体 (*Treponeme pallidum*)。

[0087] 还提供一种分离的细胞, 所细胞在其中包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒, 其中细胞不存在于人类中。在细胞的一个实施方案中, 细胞包含编码HSV-1糖蛋白D的

异源核酸。在细胞的一个实施方案中,细胞在其膜上表达HSV-1糖蛋白D。

[0088] 在细胞的一个实施方案中,HSV-1糖蛋白D由异源核酸编码,所述异源核酸是HSV-1糖蛋白D基因,或是具有与HSV-1蛋白D基因相同的序列的核酸。

[0089] 一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒。在疫苗组合物在一个实施方案中,疫苗组合物包含免疫佐剂。

[0090] 还提供一种组合物,所述组合物包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒,其中病毒或病毒粒的基因组至少包含第二基因的缺失,其中第二基因是HSV-2病毒复制或必需的。在一个实施方案中,组合物包含来自哺乳动物的血清,或衍生自源于哺乳动物的血清,其中已经事先向所述哺乳动物引入所述病毒或病毒粒,从而激发免疫应答。

[0091] 还提供药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的病毒或如本文所述的病毒粒和可药用载体。

[0092] 还提供一种激发受试者中免疫应答的方法,所述方法包括向受试者以有效激发受试者中免疫应答的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0093] 还提供一种治疗受试者中HSV-2感染或治疗受试者中由HSV-2感染所致疾病的方法,所述方法包括向受试者以有效在受试者中治疗HSV-2感染或治疗由HSV-2感染所致疾病的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0094] 还提供一种针对HSV-2感染接种受试者的方法,所述方法包括向受试者以有效针对HSV-2接种受试者的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0095] 还提供一种免疫受试者对抗HSV-2感染的方法,所述方法包括向受试者以有效免疫受试者对抗HSV-2感染的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0096] HSV-2和HSV-1疾病是本领域已知的,并且还在本文中描述。HSV-2和 HSV-1疾病各自的治疗和预防均独立的彼此涵盖。还涵盖了HSV-2和HSV-1 共感染的治疗或预防。预防理解为意指如与未治疗的受试者相比,改善了用本文所述的病毒、病毒粒、疫苗或组合物治疗的受试者中有关疾病或感染发展程度。

[0097] 还提供一种产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含HSV-1糖蛋白D,所述方法包括用其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D 的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),在允许重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下,感染包含了编码HSV-1糖蛋白D的异源核酸的细胞,并且回收细胞产生的在其脂质双层上包含HSV-1糖蛋白D的重组HSV-2病毒粒。

[0098] 还提供一种产生重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 的病毒粒的方法,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且在其脂质双层上包含非HSV-2表面糖蛋白,所述方法包括用其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白 D的基因缺失的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),在允许重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2) 复制的条件下,感染包含了编码非HSV-2表面糖蛋白的异源核酸的细胞,并且回收细胞产生的在其脂质双层上包含非HSV-2表面糖蛋

白的重组 HSV-2病毒粒。

[0099] 还提供一种重组核酸,所述重组核酸具有与HSV-2基因组相同的序列,不同之处是所述序列不包含编码HSV-2糖蛋白D的序列。

[0100] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2 在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-2感染。

[0101] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2 在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-1感染。

[0102] 还提供一种分离的重组HSV-2的病毒粒,所述病毒粒在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失,用于治疗或预防受试者中的HSV-2感染。

[0103] 还提供一种治疗受试者中HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2共感染或治疗受试者中由HSV-2感染或者HSV-1和HSV-2共感染所致疾病的方法,所述方法包括向受试者以有效治疗受试者中HSV-2感染或治疗由HSV-2感染所致疾病的量或有效治疗受试者中HSV-1和HSV-2共感染或治疗由HSV-1和 HSV-2共感染感染所致疾病的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0104] 还提供一种针对HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2共感染接种受试者的方法,所述方法包括向受试者以有效针对HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2 共感染接种受试者的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii)如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0105] 还提供一种免疫受试者对抗HSV-1感染或者HSV-1和HSV-2共感染的方法,所述方法包括向受试者以有效免疫受试者对抗HSV-1感染或者HSV-1 和HSV-2共感染的量施用(i)如本文所述的病毒;(ii)如本文所述的病毒粒,(iii) 如本文所述的疫苗;(iv)如本文所述的组合物;或(v)如本文所述的药物组合物。

[0106] 在本文中用于免疫、接种或激发免疫应答的方法的一个实施方案中,可以实现病毒粒或病毒或因其诱导的抗体或免疫因子从一位受试者被动转移至另一位受试者。有关产物可以在从一位受试者获得后且施用至第二位受试者之前进行处理。在本文所述的发明的一个优选实施方案中,受试者是哺乳动物受试者。在一个实施方案中,哺乳动物受试者是人类受试者。

[0107] 还提供一种分离的重组单纯疱疹病毒-2 (HSV-2),所述单纯疱疹病毒-2 在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且还包含病原体的异种抗原。在一个实施方案中,异种抗原是蛋白质、肽、多肽或糖蛋白。在一个实施方案中,异种抗原是相对于HSV-2的异种抗原,但是是在有关“病原体”上或在其中发现的抗原。本文中描述了病毒性和细菌性病原体。在一个实施方案中,病原体是哺乳动物的细菌性病原体或哺乳动物的病毒病原体。在一个实施方案中,抗原或编码病原体的转基因并未从病原体实际取得或物理取出,然而具有与病原体抗原或编码性核酸序列相同的序列。在一个实施方案中,分离的重组HSV-2在其脂质双层上包含病原体的异种抗原。在分离的重组HSV-2的一个实施方案中,病原体是细菌或病毒性质的。在一个实施方案中,病原体是哺乳动物的寄生物。在一个实施方案中,编码HSV-2糖蛋白D 的基因是HSV-2US6基因。在分离的重组HSV-2的一个实施方案中,异种抗原由已经插入重组HSV-2的基因组中的转基因编码。

[0108] 还提供一种在受试者中针对抗原性靶诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的方法,所述方法包括向受试者以有效针对抗原性靶诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的量,施用分离的重组单纯疱疹病毒 -2 (HSV-2),所述纯疱疹病毒-2在其基因组中具有编码HSV-2糖蛋白D的基因缺失并且还在其脂质双层上包含异种抗原。

[0109] 表达适宜转基因的重组HSV-2  $\Delta gD^{-/+gD^{-/+}}$  将选择性地诱导保护皮肤或粘膜免遭病原体感染的抗体和细胞性免疫应答。

[0110] 在一个实施方案中,异种抗原是表面抗原。

[0111] 在一个实施方案中,转基因编码来自HIV、结核分枝杆菌、衣原体、溃疡分枝杆菌、海分枝杆菌、麻风分支杆菌、*M. abscessus*、淋病奈瑟菌或密螺旋体的抗原。在一个实施方案中,密螺旋体是苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)。在一个实施方案中,转基因是编码结核分枝杆菌生物被膜的基因。在一个实施方案中,转基因是编码HIV gp120的基因。

[0112] 在一个实施方案中,异种抗原是抗原性靶的表面抗原。在一个实施方案中,异种抗原是寄生物抗原。在一个实施方案中,异种抗原是细菌性抗原或病毒性抗原。

[0113] 在一个实施方案中,抗原性靶是病毒并且是拉沙病毒、人类免疫缺陷病毒、RSV、肠病毒、流感病毒、副流感病毒、猪呼吸道冠状病毒、狂犬病毒、布尼亚病毒或丝状病毒。

[0114] 在一个实施方案中,抗原性靶是细菌并且是结核分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、海分枝杆菌、麻风分支杆菌、*M. abscessus*、衣原体沙眼 (*Chlamydia trachomatis*)、淋病奈瑟菌或苍白密螺旋体。

[0115] 在一个实施方案中,分离的重组HSV-2转基因是编码结核分枝杆菌生物被膜的基因或其中转基因是编码HIV gp120的基因。

[0116] 在本文所述的方法的一个优选实施方案中,受试者是人。在本文所述的方法的一个实施方案中,受试者尚未遭受HSV-1、HSV-2感染或共感染。在本文所述的方法的一个实施方案中,受试者已经遭受HSV-1、HSV-2感染或共感染。

[0117] 如本文所述的,共感染意指遭受HSV-1和HSV-2共感染。

[0118] 除非本文中另外说明或否则明确相悖于上下文,否则本文所述的各种要素的全部组合均处于本发明的范围内。

[0119] 将从以下的实验详述更好理解本发明。但是,本领域技术人员将轻易地理解,讨论的具体方法和结果仅说明如后附权利要求中更充分描述的本发明。

[0120] 实验详述

[0121] 本文中公开了HSV-2的gD (US6) 基因的基因工程化缺失突变体以及在小鼠感染模型中针对HSV-2阴道内攻击评价的其安全性、免疫原性和疫苗效力。将gD基因替换为编码绿色荧光蛋白 (gfp) 的DNA片段并且将表达HSV-1 gD的Vero细胞 (VD60细胞) 用该构建体转染,并筛选形成绿色灶斑的同源重组病毒。分子分析揭示,已经工程化了精确的重组,其在补充性VD60细胞中复制至高滴度,但是在非补充性细胞上增殖时无感染性。用 $10^7$  pfu/小鼠的互补性gD-无效病毒 (对于基因型gD缺失,但是通过在VD60细胞上生长而表型上互补的病毒,本文中命名为HSV-2  $\Delta gD^{-/+}$ ) 阴道内攻击野生型小鼠或 SCID小鼠未揭示毒力,而剂量低至 $10^4$  pfu/小鼠的亲本野生型病毒是100%致死的。另外,用HSV-2  $\Delta gD^{-/+}$  免疫小鼠产生了对抗HSV-2临床分离株阴道内攻击的完全保护。测量HSV-2  $\Delta gD^{-/+}$  激发的稳健体液免疫力和细胞免疫力,并且得出结论,体内生产性感染需要gD并且这种必需糖蛋白缺失的减毒株激发了

抗HSV-2的保护性免疫。因此,HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>是一种预防或治疗生殖器疱疹的有前景疫苗。

[0122] HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>激发的保护作用的机制和相关物。生成gD-2无效病毒,并且证明它在免疫功能健全和免疫受损的小鼠中高度减毒并且作为疫苗候选物测试时,诱导对抗HSV-2阴道内攻击的保护性免疫应答。用HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup> 皮下免疫将诱导对抗两种HSV血清型(HSV-2和HSV-1)阴道内攻击的保护作用所需要的体液免疫应答和细胞免疫应答。

[0123] HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>启动顿挫感染:构建了Us6缺失的HSV-2毒株,以评估其对细胞感染期间发生的早期信号传导事件的贡献[41]。除非在其内源启动子(例如,在一个实施方案中,gD-1启动子)控制下在编码Us6的gD-补充性细胞系(例如,编码D-1的VD60细胞[40,41])上培育,否则这种病毒不能够感染宿主细胞。实际上,从非补充性细胞分离的HSV-2  $\Delta$  gD粒子不感染上皮细胞(图1)或神经元细胞(SK-N-SH,未显示)。然而,如果在VD60细胞中增殖,则获得表型互补的病毒( $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>),所述病毒完全能够感染作为野生型HSV-2 共同靶的细胞。然而,用 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>感染后,从这些细胞中不产生感染性粒子或病毒噬斑(pfu)并且病毒没有从感染细胞扩散至未感染的细胞,这反映这些过程中需要gD;因此它是一种顿挫感染。

[0124] HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>在鼠感染模型中是安全的:在野生型小鼠和重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠中通过皮下或阴道内接种大剂量评价 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>的体内安全性。在整个实验期间,用 $10^7$ 个pfu的 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>(在补充性细胞上滴定)阴道内接种的小鼠未表现出病毒所致病变的任何体征,而用低1,000倍的野生型病毒( $10^4$ 个pfu)接种的动物死于HSV-2疾病并且在接种后第8天开始死亡(图2A)。在整个实验期间,用 $10^7$ 个pfu的 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>阴道内接种的小鼠未表现出毒所致的上皮或神经系统疾病的任何体征(图2B和图2C)。如通过蚀斑测定法或DRG 与Vero细胞共培养所测定的(未显示),从生殖道组织或DRG未回收到感染性病毒。

[0125] HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>激发针对HSV-2的全身性抗体和粘膜抗体:用 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>皮下接种和加强免疫(皮下-皮下)或用这种候选疫苗株( $10^6$ pfu/小鼠)皮下接种并且阴道内加强免疫(皮下-阴道内)的小鼠激发了针对HSV-2的体液免疫应答,如血清和阴道洗液中的抗HSV-2抗体增加所佐证(图3A和图3B)。对照动物用未感染的VD60细胞裂解物(称作对照)免疫。使用感染的细胞裂解物作为抗原(对未感染的细胞裂解物的应答作为背景扣除),通过ELISA测量抗体。值得注意地,抗体应答的量级随免疫途径而不同。实际上,皮下-皮下免疫激发了比皮下-阴道内免疫显著更多的针对HSV-2的血清抗体和阴道洗液抗体。这项研究结果表明,阴道洗液抗体或许代表了来自血液的IgG渗出液并且表明皮下-皮下是激发针对HSV-2的高水平全身和局部IgG抗体的更适宜途径。另外,用 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>( $10^6$ pfu/小鼠)皮下(皮下-皮下)接种和加强免疫的小鼠激发了中和性抗HSV-2,如用病毒和来自这些小鼠的血清在Vero细胞单层上的体外中和作用所佐证(图3C)。

[0126] HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>激发了HSV-2-特异性T细胞活化:在接种之前,将gB498-505特异性转基因CD8<sup>+</sup>T细胞(gBT-I)转移至C57BL/6小鼠中。免疫接种的小鼠用 $10^6$ 个pfu的 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>或用VD60细胞裂解物(对照)接种。将脾在加强免疫后第14天收获并且使用计数珠(CountBright™,Lifetechnologies),通过流式细胞术定量(图4A)。在同一天,将脾对记忆细胞表面标志物染色并通过流式细胞术分析(图4B)。最后,将同一天收获的脾细胞用激动剂gB498-505-肽在体外再刺激6小时并且进行胞内细胞因子染色法以测量这些细胞的IFN- $\gamma$ 产生。与对照小鼠相比,用 $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>免疫增加了接种小鼠中的IFN- $\gamma$ 产生(图4C)。对照小鼠中的应答假定反映了转移后幼稚小鼠中gBT-I T 细胞的持久性。通过使用gB498-



505-肽在体外再刺激(未显示)的脾细胞的上清液的多重细胞因子分析,获得了类似结果。这些结果显示,疫苗诱导了T 细胞反应。

[0127] 用HSV-2  $\Delta$  gD-/+免疫的小鼠受到保护对抗阴道内HSV-2致死性攻击(challenge):用HSV-2  $\Delta$  gD-/+皮下-皮下或皮下-阴道内接种的动物在等同于 LD<sub>90</sub> ( $5 \times 10^4$  pfu/小鼠)的阴道内致死剂量攻击后出现较小的体重并且幸免于攻击,而用VD60对照裂解物免疫的小鼠至第10天死于疾病(图5A和图5B)。该疫苗还提供对抗10倍LD<sub>90</sub> ( $5 \times 10^5$  pfu/小鼠,数据未显示)的完全保护作用。这种保护作用与上皮病情评分显著降低(图5C)和完全不存在神经学体征(图 5D)相关。如先前所描述那样进行评定[44]。另外,在阴道攻击后第2天,与对照小鼠相比,在  $\Delta$  gD-/+免疫小鼠的阴道洗液中回收到显著较少的病毒,这提示存在快速清除(图5E)。另外,在第4天阴道洗液中(图5E)或在攻击后第5天分离的阴道组织或DRG中(图5F)未回收到感染性病毒。后者表明疫苗阻止病毒在DRG中抵达和/或复制。

[0128] 在强毒HSV-2攻击后,用HSV-2  $\Delta$  gD-/+免疫防止了感染部位处的炎症:与用VD60裂解物(对照)接种的动物相比,用HSV-2  $\Delta$  gD-/+接种和用强毒 HSV-2阴道内攻击的小鼠在感染部位显示显著较少的炎性细胞因子。实际上,接种的小鼠在感染后第2天和第7天在阴道洗液中分泌比对照小鼠显著更少的TNF- $\alpha$  (图6A)、IL-6 (图6B) 和IL-1 $\beta$  (图6C)。值得注意地,增加的炎性细胞因子水平与HSV-2和HIV共感染时生殖器处增加的HIV复制和卸载相关[45,46]。还体外观察到相似现象[47]。

[0129] 用HSV-2  $\Delta$  gD-/+免疫将T细胞招募至感染部位和相关的淋巴结(LN)。用强毒HSV-2攻击后,用  $\Delta$  gD-/+皮下-皮下免疫的小鼠显示骶淋巴结(LN)中活化的抗HSV-2gBT-I CD8+T细胞(图7A)和CD4+T细胞(图7B)的百分数增加。用强毒HSV-2攻击后,用  $\Delta$  gD-/+按皮下-阴道内方式免疫的小鼠显示阴道中抗HSV-2gBT-I CD8+T细胞(图7C)和CD4+T细胞(图7D)的数目增加,这提示用  $\Delta$  gD-/+接种将抗HSV-2CD8+T细胞和活化的CD4+T细胞(可能抗HSV-2)召集至感染部位和相关的淋巴结。

[0130] 在其他实验中,发现用HSV-2-  $\Delta$  gD<sup>-/+gD-1</sup>免疫在C57BL/6和Ba1b/C中赋予对抗强毒HSV-2阴道攻击的保护作用。此外,HSV-2阴道内攻击的  $\Delta$  gD<sup>-/+gD-1</sup>免疫小鼠在攻击后5天在阴道或神经组织中没有可检出的HSV-2。不同于 HSV-2病态结合的小鼠,发现HSV-2  $\Delta$  gD-/+gD-1皮下-皮下抗体识别多种 HSV-2蛋白(gD和gB两者)。来自接种动物的血清抗体显示了对HSV-1和 HSV-2的体外中和作用。另外,来自  $\Delta$  gD-/+gD-1接种小鼠的血清在体外激发了HSV-2感染细胞的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。

[0131] 总之,在野生型(wt)小鼠和SCID小鼠中,HSV-2  $\Delta$  gD-/+gD-1被削弱并且是完全安全的。重组HSV-2  $\Delta$  gD-/+gD-1保护免遭致死性HSV-2阴道内感染和HSV-2/HSV-1皮肤感染。在两个不同小鼠品系中观察到保护作用。没有可检测的感染和消除性免疫力。还观察到HSV-2特异性CD8+T细胞以及全身性和粘膜HSV抗体的诱导。IgG2a和IgG2b是优势的抗HSV同种型。还观察到Fc $\gamma$ RIII/II依赖的ADCC。令人惊讶地,被动式转移免疫血清保护了幼稚小鼠,FcRn和Fc $\gamma$ R敲除小鼠不受免疫血清保护。

[0132] 讨论

[0133] 世界卫生组织估计,全球超过5亿人感染单纯疱疹病毒类2型(HSV-2),每年大约两千万个新病例[1]。感染风险随年龄而增加并且因为病毒在频繁的亚临床或临床再激活情

况下建立潜伏期,所以感染的影响是终生的。令人警觉地,HSV-2显著地增加获得和传播HIV的风险[2-4]。HSV-2的流行率在全球各地区间不定,从日本8.4%波动直至撒哈拉以南非洲地区70%(其中HIV 流行率呈流行的地区)[5,6]。在美国,HSV-2流行率是约16%并且HSV-1的流行率已经下降到约54%。美国(和其他欧洲国家)的HSV-1流行率日益降低与生殖器型HSV-1的增加相关,这由最近令人失望的糖蛋白D(gD)亚单位疫苗试验的结果所佐证,在所述试验中大部分生殖器疱疹疾病病例由HSV-1引起[7-9]。尽管与HSV-2相比,HSV-1与复发较少和生殖道病毒散播较少相关,但是两种血清型在围产期传播并引起新生儿疾病;新生儿疾病与高发病率和死亡率相关,甚至采用阿昔洛韦治疗也是如此[10-12]。与生殖器疱疹相关的发病率、其与HIV流行的协同作用及其直接的医疗费用(单在美国就超过五亿美元)凸显开发安全和有效疫苗的必要性[13]。

[0134] 由组合佐剂的病毒包膜糖蛋白组成的亚单位制剂已经统治HSV-2疫苗领域几乎20年并且大部分临床试验以这种策略为核心[8,14-19]。尽管亚单位制品安全并激发中和抗体,但是这些制剂在临床试验中提供低下的抗HSV-2 感染或疾病效力[8,14]。令人惊讶地,一种HSV-2gD亚单位疫苗提供针对生殖器型HSV-1的保护作用,但是不提供针对HSV-2的保护作用[8,20]。后续研究发现,血清HSV-2gD抗体水平与针对HSV-1的保护作用相关,从而显示HSV-2保护作用所需的抗体滴度可能高于抗HSV-1保护作用所需要的抗体滴度[21]。相比之下,细胞介导的免疫力(响应于重叠性gD肽的胞内细胞因子应答)与针对任一种血清型的保护作用不相关[21]。该疫苗激发CD4<sup>+</sup>T 细胞应答,但不激发CD8<sup>+</sup>T细胞应答,然而在接种的感染女性和未感染女性之间不存在CD4<sup>+</sup>T细胞应答的差异[21]。未测量生殖道或其他粘膜抗体应答。一种其中gH从基因组缺失的HSV-2候选疫苗在血清阳性受试者内实施的临床试验中没有降低病毒复发的频率,不过未评价疫苗对抗首发感染的效力[29]。

[0135] 临床研究显示HIV感染的患者中HSV-2再激活率增加,同时gD亚单位疫苗尽管诱中和性血清抗体但未激发任何CD8<sup>+</sup>T细胞应答,这些临床研究表明有效疫苗必须还激发保护性的T细胞反应[28,30-32]。显示HSV-1反应性 T细胞选择性滞留于人三叉神经节中的研究进一步凸显了T细胞的重要性。CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞被鉴定为包围神经元,同时在靶向的病毒蛋白中存在不均一性,病毒蛋白16(VP16,间层蛋白)由多个三叉神经节T细胞在多样性HLA-A和B等位基因的背景下识别;这些结果表明间层蛋白可能是重要的免疫原[33]。类似地,还在HSV-2潜隐型感染的人类研究中,鉴定到指向间层蛋白的细胞毒T细胞[34]。在HSV再激活后CD8<sup>+</sup>T细胞(包括CD8<sup>αα</sup><sup>+</sup>T细胞)持续存在于生殖器皮肤和粘膜中皮肤-表皮结合部处,这表明它们在免疫控制中发挥作用[35]。

[0136] 本文中公开了一种以遗传方式缺失天然HSV-2gD的工程化HSV-2病毒。HSV-2gD基因编码对病毒进入和细胞-细胞扩散必需的包膜糖蛋白。糖蛋白D还与肿瘤坏死因子受体超家族成员14(TNFRSF14)(免疫调节开关,也称作疱疹病毒进入介体(HVEM))结合。因为HVEM携带针对多于一种配体的停泊位点并且信号转导依据这些分子是否与HVEM顺式或反式结合而不同,gD可以对免疫细胞具有调节作用[36,37]。实际上,最新研究表明gD与天然配体竞争这个受体并且调节对病毒的细胞因子应答[38,39]。将gD基因替换为编码绿色荧光蛋白(gfp)的DNA片段,并且针对用这种构建体转化的表达HSV-1gD(例如,gD-1启动子下的gD-1)的补充性Vero细胞(VD60细胞[40])筛选形成绿色灶斑的同源重组病毒。突变病毒在补充性Vero细胞系中复制至高滴度(在补充细胞上传代时,命名为HSV-2 Δ gD<sup>-/+</sup>),但是在非补

充细胞中无感染性(从非补充细胞分离时,命名为HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/-</sup>)。将这种病毒纯化并体外表征[41]。与野生型亲本病毒引起的致死性感染相比,免疫功能健全小鼠或免疫受损(SCID)小鼠的阴道内或皮下接种显示无毒力。免疫(皮下初免随后皮下或阴道内单次加强免疫施用)产出对抗强毒性HSV-2阴道内攻击的100%保护作用。稳健的体液及细胞免疫力由HSV-2  $\Delta$  gD<sup>-/+</sup>激发,并且得出结论:Us6(gD-2)是体内生产性感染所需要的。这种活的减毒株将提供对抗HSV的消除性免疫力。还可以使用被动式血清或血清产物转移。

[0137] 参考文献

[0138] 1.Looker,K.J.,G.P.Garnett和G.P.Schmid,An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2infection.Bull World Health Organ,2008.86(10):p.805-12,A.

[0139] 2.Freeman,E.E等人,Herpes simplex virus 2infection increases HIV acquisition in men and women:systematic review and meta-analysis of longitudinal studies.AIDS,2006.20(1):p.73-83.

[0140] 3.Gray,R.H等人,Probability of HIV-1transmission per coital act in monogamous,heterosexual,HIV-1-discordant couples in Rakai,Uganda.Lancet,2001.357(9263):p.1149-53.

[0141] 4.Wald,A.和K.Link,Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons:a meta-analysis.J Infect Dis,2002.185(1):p.45-52.

[0142] 5.Paz-Bailey,G等人,Herpes simplex virus type 2:epidemiology and management options in developing countries.Sex Transm Infect,2007.83(1):p.16-22.

[0143] 6.Doii,Y等人,Seroprevalence of herpes simplex virus 1and 2in a population-based cohort in Japan.J Epidemiol,2009.19(2):p.56-62.

[0144] 7.Bradley,H等人,Seroprevalence of herpes simplex virus types 1and 2--United States,1999-2010.J Infect Dis,2014.209(3):p.325-33.

[0145] 8.Belshe,R.B等人,Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine.N Engl J Med,2012.366(1):p.34-43.

[0146] 9.Bernstein,D.I等人,Epidemiology,clinical presentation,and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1and type 2in young women.Clin Infect Dis,2013.56(3):p.344-51.

[0147] 10.Kimberlin,D.,Herpes simplex virus,meningitis and encephalitis in neonates.Herpes,2004.11Suppl 2:p.65A-76A.

[0148] 11.Ward,K.N等人,Herpes simplex serious neurological disease in young children:incidence and long-term outcome.Arch Dis Child,2012.97(2):p.162-5.

[0149] 12.Lafferty,W.E等人,Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection.Influence of site of infection and viral type.N Engl J Med,1987.316(23):p.1444-9.

[0150] 13.Owusu-Edusei,K.,Jr等人,The estimated direct medical cost of

selected sexually transmitted infections in the United States,2008.Sex Transm Dis,2013.40(3):p.197-201.

[0151] 14.Mertz,G.J等人,Double-blind,placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2glycoprotein vaccine in persons at high risk for genital herpes infection.J Infect Dis,1990.161(4):p.653-60.

[0152] 15.Group,H.S.V.S等人,Safety and immunogenicity of a glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy girls 10-17years of age:results from a randomised,controlled,double-blind trial.Vaccine,2013.31(51):p.6136-43.

[0153] 16.Leroux-Roels,G等人,Immunogenicity and safety of different formulations of an adjuvanted glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy adults:a double-blind randomized trial.Hum Vaccin Immunother,2013.9(6):p. 1254-62.

[0154] 17.Bernstein,D.I等人,Safety and immunogenicity of glycoprotein D-adjuvant genital herpes vaccine.Clin Infect Dis,2005.40(9):p.1271-81.

[0155] 18.Stanberry,L.R等人,Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes.N Engl J Med,2002.347(21):p.1652-61.

[0156] 19.Corey,L等人,Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2infection:two randomized controlled trials.Chiron HSV Vaccine Study Group.JAMA,1999.282(4):p.331-40.

[0157] 20.jh.richardus@rotterdam.nl,Safety and immunogenicity of a glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy girls 10-17years of age: Results from a randomised,controlled,double-blind trial.Vaccine,2013.31(51): p. 6136-43.

[0158] 21.Belshe,R.B等人,Correlate of Immune Protection Against HSV-1 Genital Disease in Vaccinated Women.J Infect Dis,2013.

[0159] 22.Gerber,S.I.,B.J.Belval和B.C.Herold,Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1and HSV-2in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism.Virology,1995.214(1):p.29-39.

[0160] 23.Lubinski,J.M等人,The herpes simplex virus 1IgG fc receptor blocks antibody-mediated complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo.J Virol,2011.85(7):p.3239-49.

[0161] 24.Para,M.F.,L.Goldstein和P.G.Spear,Similarities and differences in the Fc-binding glycoprotein(gE)of herpes simplex virus types 1and 2and tentative mapping of the viral gene for this glycoprotein.J Virol,1982.41(1): p. 137-44.

[0162] 25.Hook,L.M等人,Herpes simplex virus type 1and 2glycoprotein C prevents complement-mediated neutralization induced by natural immunoglobulin M antibody.J Virol,2006.80(8):p.4038-46.

[0163] 26.Lubinski,J.M等人,Herpes simplex virus type 1evades the effects of

antibody and complement in vivo. *J Virol*, 2002. 76 (18) : p. 9232-41.

[0164] 27. Awasthi, S 等人, Immunization with a vaccine combining herpes simplex virus 2 (HSV-2) glycoprotein C (gC) and gD subunits improves the protection of dorsal root ganglia in mice and reduces the frequency of recurrent vaginal shedding of HSV-2 DNA in guinea pigs compared to immunization with gD alone. *J Virol*, 2011. 85 (20) : p. 10472-86.

[0165] 28. Manservigi, R 等人, Immunotherapeutic activity of a recombinant combined gB-gD-gE vaccine against recurrent HSV-2 infections in a guinea pig model. *Vaccine*, 2005. 23 (7) : p. 865-72.

[0166] 29. de Bruyn, G 等人, A randomized controlled trial of a replication defective (gH deletion) herpes simplex virus vaccine for the treatment of recurrent genital herpes among immunocompetent subjects. *Vaccine*, 2006. 24 (7) : p. 914-20.

[0167] 30. Ouwendijk, W. J 等人, T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Curr Opin Virol*, 2013. 3 (4) : p. 452-60.

[0168] 31. Parr, M. B. 和 E. L. Parr, Mucosal immunity to herpes simplex virus type 2 infection in the mouse vagina is impaired by in vivo depletion of T lymphocytes. *J Virol*, 1998. 72 (4) : p. 2677-85.

[0169] 32. Noisakran, S. 和 D. J. Carr, Lymphocytes delay kinetics of HSV-1 reactivation from in vitro explants of latent infected trigeminal ganglia. *J Neuroimmunol*, 1999. 95 (1-2) : p. 126-35.

[0170] 33. van Velzen, M 等人, Local CD4 and CD8 T-cell reactivity to HSV-1 antigens documents broad viral protein expression and immune competence in latently infected human trigeminal ganglia. *PLoS Pathog*, 2013. 9 (8) : p. e1003547.

[0171] 34. Muller, W. J 等人, Herpes simplex virus type 2 tegument proteins contain subdominant T-cell epitopes detectable in BALB/c mice after DNA immunization and infection. *J Gen Virol*, 2009. 90 (Pt 5) : p. 1153-63.

[0172] 35. Zhu, J 等人, Immune surveillance by CD8 $\alpha$  $\alpha$ +skin-resident T cells in human herpes virus infection. *Nature*, 2013. 497 (7450) : p. 494-7.

[0173] 36. Steinberg, M. W 等人, Regulating the mucosal immune system: the contrasting roles of LIGHT, HVEM, and their various partners. *Semin Immunopathol*, 2009. 31 (2) : p. 207-21.

[0174] 37. Steinberg, M. W., T. C. Cheung 和 C. F. Ware, The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev*, 2011. 244 (1) : p. 169-87.

[0175] 38. Kopp, S. J., C. S. Storti 和 W. J. Muller, Herpes simplex virus-2 glycoprotein interaction with HVEM influences virus-specific recall cellular responses at the mucosa. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012 : p. 284104.

[0176] 39. Yoon, M 等人, Functional interaction between herpes simplex virus

type 2gD and HVEM transiently dampens local chemokine production after murine mucosal infection. *PLoS One*, 2011.6(1):p.e16122.

[0177] 40. Ligas, M.W. 和 D.C. Johnson, A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol*, 1988.62(5):p.1486-94.

[0178] 41. Cheshenko, N 等人, HSV activates Akt to trigger calcium release and promote viral entry: novel candidate target for treatment and suppression. *FASEB J*, 2013.27(7):p.2584-99.

[0179] 42. Parr, E.L. 和 M.B. Parr, Immunoglobulin G is the main protective antibody in mouse vaginal secretions after vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. *J Virol*, 1997.71(11):p.8109-15.

[0180] 43. Mbopi-Keou, F.X 等人, Cervicovaginal neutralizing antibodies to herpes simplex virus (HSV) in women seropositive for HSV Types 1 and 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003.10(3):p.388-93.

[0181] 44. Hendrickson, B.A 等人, Decreased vaginal disease in J-chain-deficient mice following herpes simplex type 2 genital infection. *Virology*, 2000.271(1):p.155-62.

[0182] 45. Nixon, B 等人, Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in Humanized HIV-Transgenic Mice Triggers HIV Shedding and Is Associated With Greater Neurological Disease. *J Infect Dis*, 2013.

[0183] 46. Carr, D.J. 和 L. Tomanek, Herpes simplex virus and the chemokines that mediate the inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006.303:p.47-65.

[0184] 47. Stefanidou, M 等人, Herpes simplex virus 2 (HSV-2) prevents dendritic cell maturation, induces apoptosis, and triggers release of proinflammatory cytokines: potential links to HSV-HIV synergy. *J Virol*, 2013. 87(3):p.1443-53.

[0185] 48. Bourne, N 等人, Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis*, 2003.187(4):p.542-9.

[0186] 49. Bourne, N 等人, Impact of immunization with glycoprotein D2/AS04 on herpes simplex virus type 2 shedding into the genital tract in guinea pigs that become infected. *J Infect Dis*, 2005.192(12):p.2117-23.

[0187] 50. Bernstein, D.I 等人, The adjuvant CLDC increases protection of a herpes simplex type 2 glycoprotein D vaccine in guinea pigs. *Vaccine*, 2010. 28(21):p.3748-53.

[0188] 51. Bernstein, D.I 等人, Potent adjuvant activity of cationic liposome-DNA complexes for genital herpes vaccines. *Clin Vaccine Immunol*, 2009.16(5):p.699-705.

[0189] 52. Sweeney, K.A 等人, A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*,

2011.17 (10) :p.1261-8.

[0190] 53.Kohl,S等人,Limited antibody-dependent cellular cytotoxicity antibody response induced by a herpes simplex virus type 2 subunit vaccine.J Infect Dis,2000.181 (1) :p.335-9.

[0191] 54.John,M等人,Cervicovaginal secretions contribute to innate resistance to herpes simplex virus infection.J Infect Dis,2005.192 (10) :p.1731-40.

[0192] 55.Nugent,C.T等人,Analysis of the cytolytic T-lymphocyte response to herpes simplex virus type 1 glycoprotein B during primary and secondary infection.J Virol,1994.68 (11) :p.7644-8.

[0193] 56.Mueller,S.N等人,Characterization of two TCR transgenic mouse lines specific for herpes simplex virus.Immunol Cell Biol,2002.80 (2) :p.156-63.

[0194] 57.Wallace,M.E等人,The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant.J Virol,1999.73 (9) :p.7619-26.

[0195] 58.Milligan,G.N等人,T-cell-mediated mechanisms involved in resolution of genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection of mice.J Reprod Immunol,2004.61 (2) :p.115-27.

[0196] 59.Wang,K等人,A herpes simplex virus 2 glycoprotein D mutant generated by bacterial artificial chromosome mutagenesis is severely impaired for infecting neuronal cells and infects only Vero cells expressing exogenous HVEM.J Virol,2012.86 (23) :p.12891-902.

[0197] 60.Barletta,R.G等人,Identification of expression signals of the mycobacteriophages Bxb1, L1 and TM4 using the Escherichia-Mycobacterium shuttle plasmids pYUB75 and pYUB76 designed to create translational fusions to the lacZ gene.J Gen Microbiol,1992.138 (1) :p.23-30.

[0198] 61.Yamaguchi,S等人,A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector.PLoS One,2011.6 (2) :p.e17267.

[0199] 62.Xu,Z等人,Accuracy and efficiency define Bxb1 integrase as the best of fifteen candidate serine recombinases for the integration of DNA into the human genome.BMC Biotechnol,2013.13:p.87.

[0200] 63.Hill,A等人,Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity.Nature,1995.375 (6530) :p.411-5.

[0201] 64.Shu,M等人,Selective degradation of mRNAs by the HSV host shutoff RNase is regulated by the UL47 tegument protein.Proc Natl Acad Sci U S A, 2013.110 (18) :p.E1669-75.

[0202] 65.Umbach,J.L等人,MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs.Nature,2008.454 (7205) :p.780-3.

- [0203] 66.Cheshenko,N等人,Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways.J Cell Biol,2003.163(2):p.283-93.
- [0204] 67.Cheshenko,N.和B.C.Herold,Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread.J Gen Virol,2002.83(Pt 9):p.2247-55.
- [0205] 68.Cheshenko,N等人,Multiple receptor interactions trigger release of membrane and intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry. Mol Biol Cell,2007.18(8):p.3119-30.
- [0206] 69.Immergluck,L.C等人,Viral and cellular requirements for entry of herpes simplex virus type 1 into primary neuronal cells.J Gen Virol,1998.79(Pt 3):p.549-59.
- [0207] 70.Nixon,B等人,Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in Humanized HIV-Transgenic Mice Triggers HIV Shedding and Is Associated With Greater Neurological Disease.J Infect Dis,2014.209(4):p.510-22.
- [0208] 71.Cheshenko,N等人,HSV usurps eukaryotic initiation factor 3 subunit M for viral protein translation: novel prevention target.PLoS One,2010.5(7):p. e11829.
- [0209] 72.Carbonetti,S等人,Soluble HIV-1 Envelope Immunogens Derived from an Elite Neutralizer Elicit Cross-Reactive V1V2 Antibodies and Low Potency Neutralizing Antibodies.PLoS One,2014.9(1):p.e86905.
- [0210] 73.Janes,H等人,Vaccine-induced gag-specific T cells are associated with reduced viremia after HIV-1 infection.J Infect Dis,2013.208(8):p.1231-9.
- [0211] 74.Ferre,A.L等人,Immunodominant HIV-specific CD8+T-cell responses are common to blood and gastrointestinal mucosa, and Gag-specific responses dominate in rectal mucosa of HIV controllers.J Virol,2010.84(19):p. 10354-65.



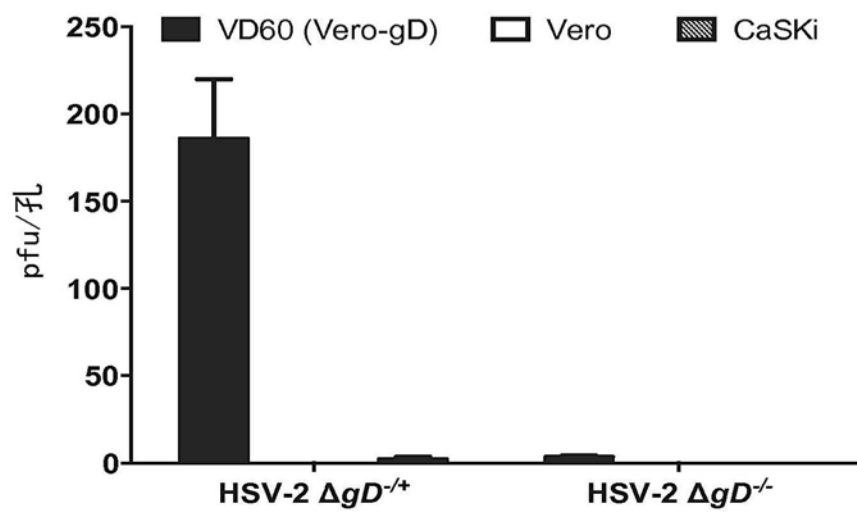


图1

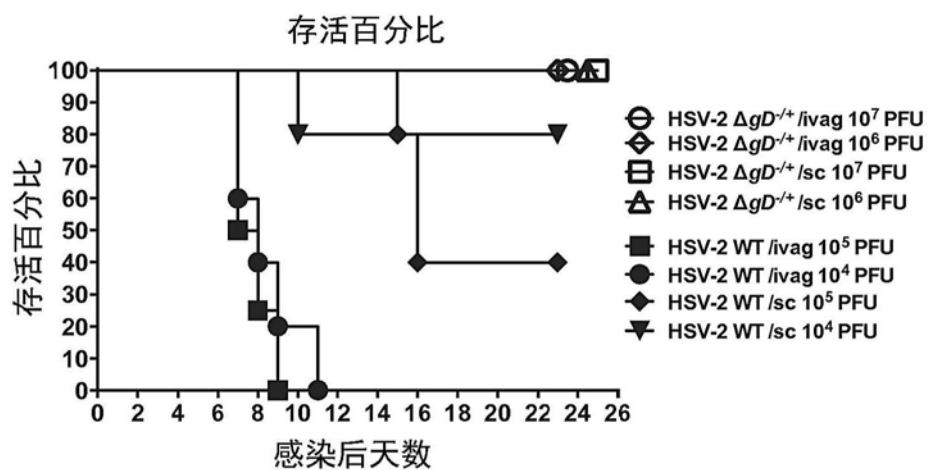
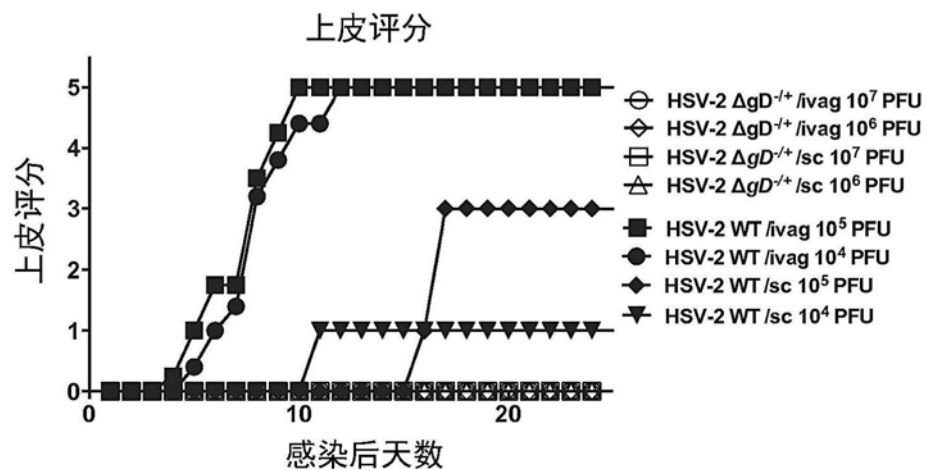
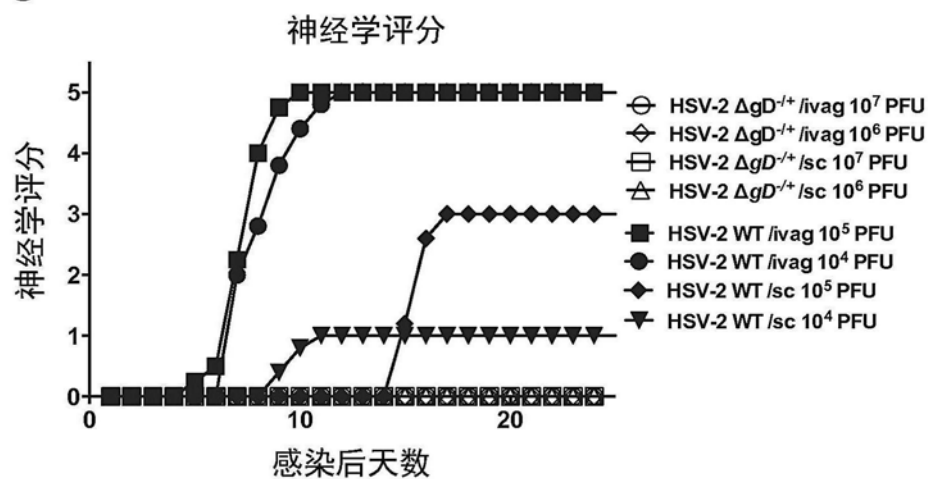
**A****B****C**

图2A-C

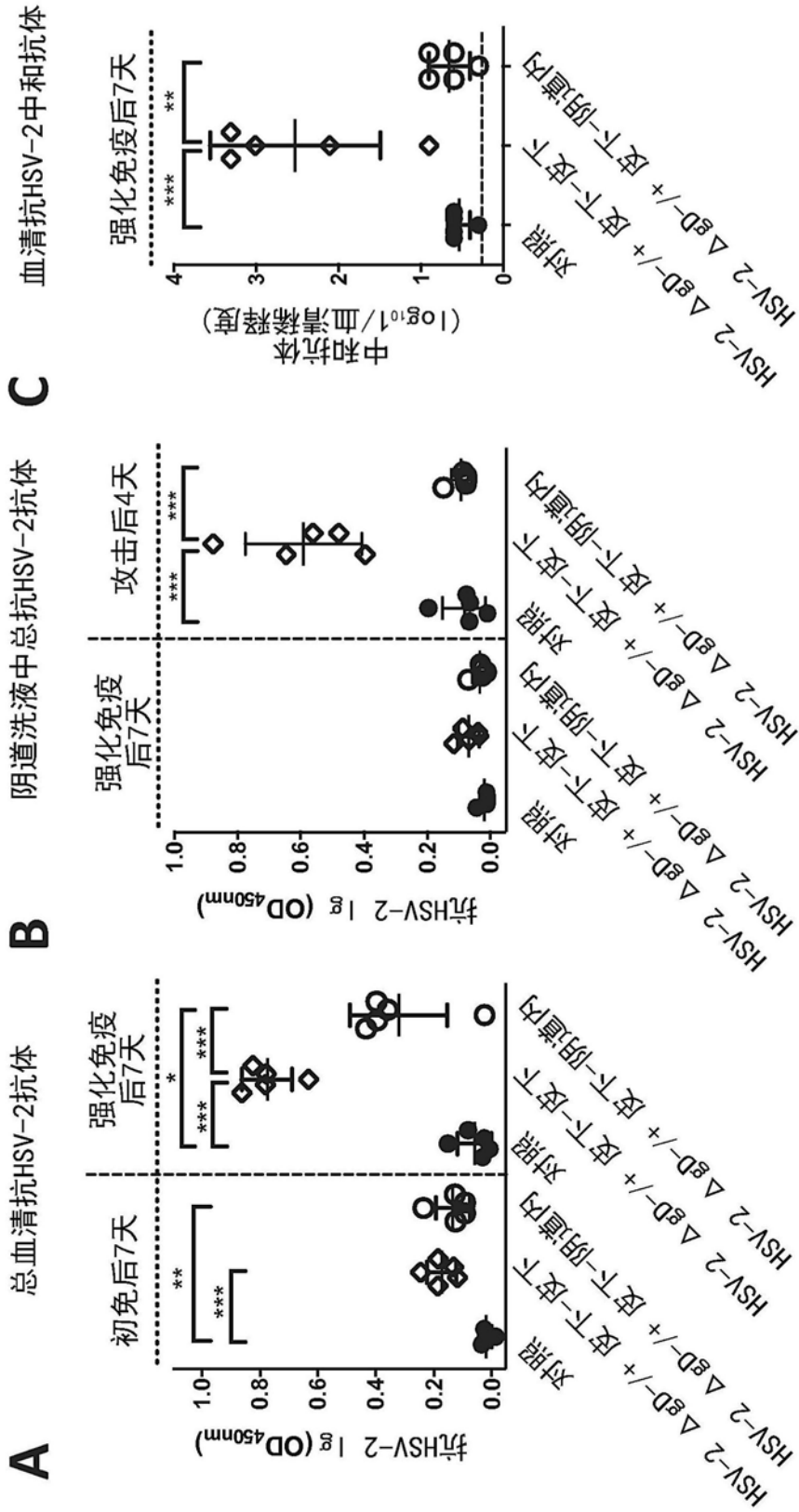


图3A-C

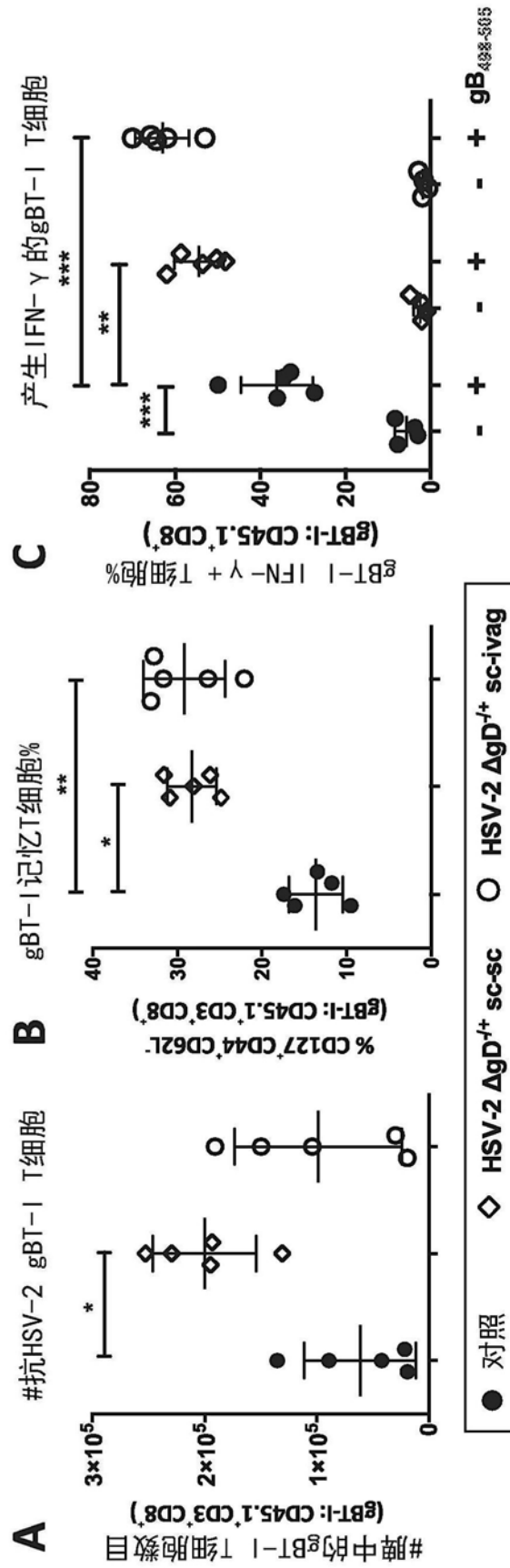


图4A-C

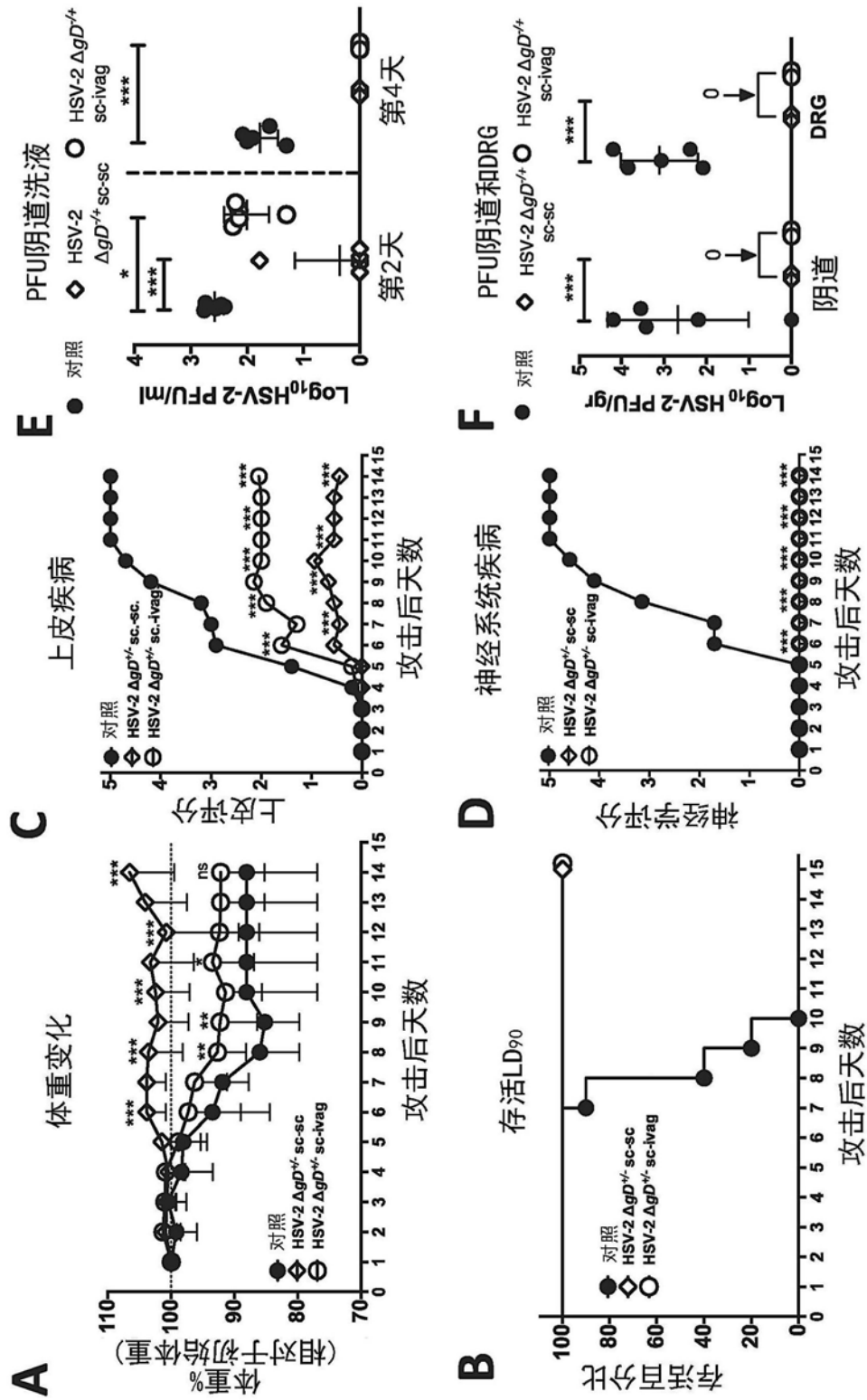


图5A-F

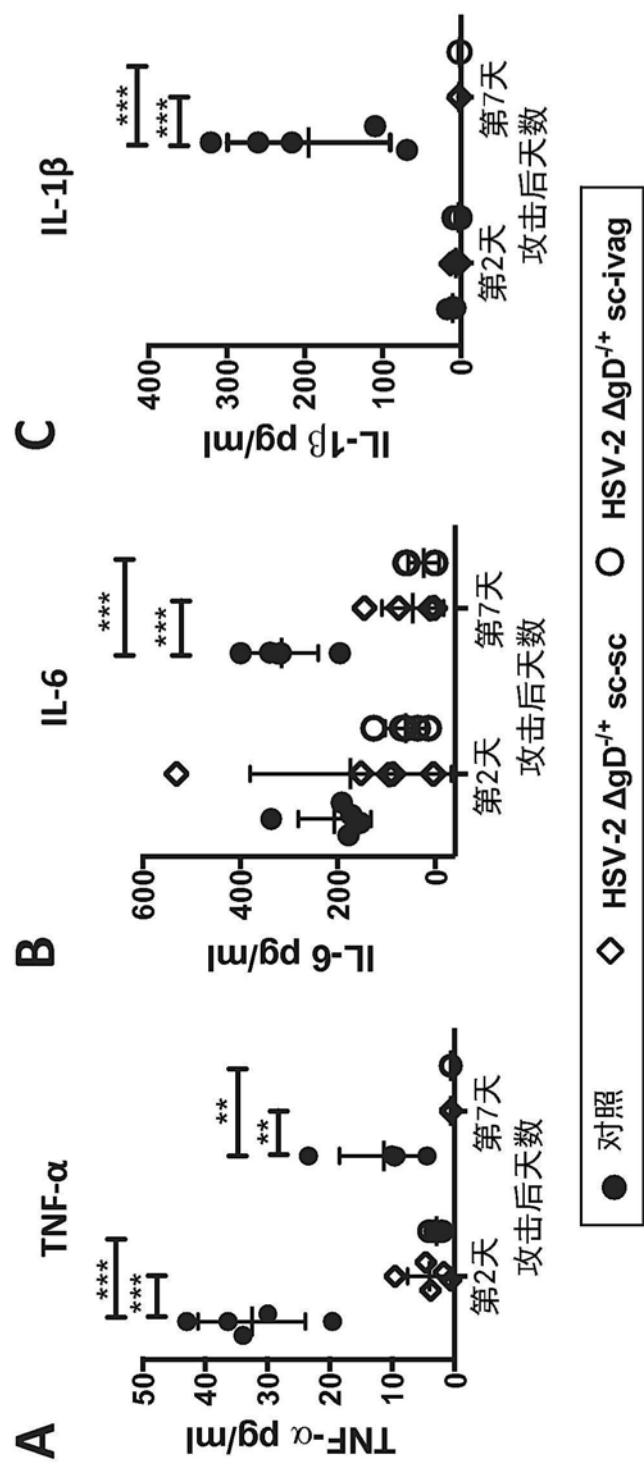


图6A-C

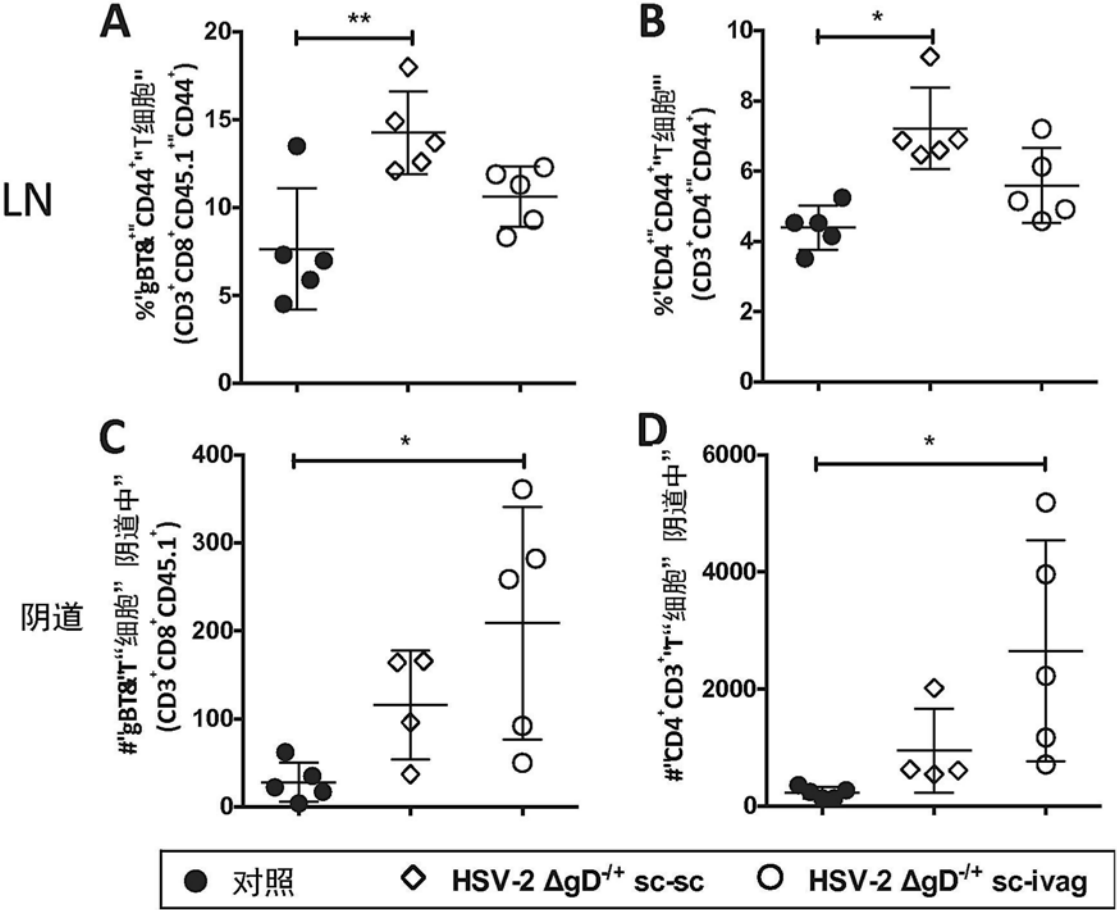


图7A-D