



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104271745 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201280066355. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 09

C12N 15/63 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/245 (2006. 01)

61/558, 800 2011. 11. 11 US

A61K 39/295 (2006. 01)

61/654, 157 2012. 06. 01 US

A61P 31/22 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 37/04 (2006. 01)

2014. 07. 04

C07K 14/045 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 14/145 (2006. 01)

PCT/IB2012/002854 2012. 11. 09

C07K 14/15 (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 19/00 (2006. 01)

W02013/068847 EN 2013. 05. 16

C12N 15/38 (2006. 01)

(71) 申请人 变异生物技术公司

C12N 15/48 (2006. 01)

地址 加拿大魁北克

C12N 15/62 (2006. 01)

(72) 发明人 大卫·E·安德森

C12N 15/86 (2006. 01)

安妮·凯瑟琳·弗卢基格

C12N 7/01 (2006. 01)

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

C12N 7/04 (2006. 01)

公司 11227

代理人 彭鲲鹏 陈九洲

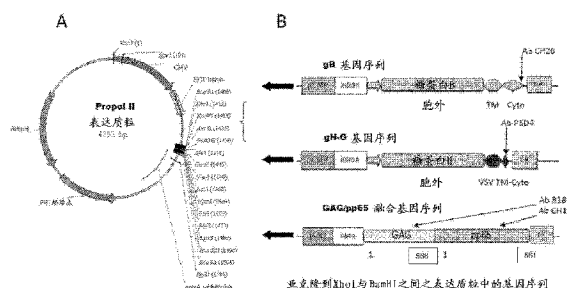
权利要求书9页 说明书53页 附图17页

(54) 发明名称

用于治疗巨细胞病毒的组合物和方法

(57) 摘要

本公开提供了可用于治疗 HCMV 感染的组合物和方法。如本文所述,所述组合物和方法基于开发包含病毒样颗粒 (VLP) 的免疫原性组合物,所述病毒样颗粒包含一个或更多个莫洛尼鼠白血病病毒 (MMLV) 核心蛋白并且包含一个或更多个 HCMV 表位,例如来自 HCMV 的包膜糖蛋白 gB 和 / 或 gH 和 / 或被膜蛋白 pp65。除了其他方面以外,本发明涵盖了可导致有益免疫应答的抗原 (例如,包膜糖蛋白和结构蛋白) 之组合的识别,所述免疫应答包括例如体液应答 (例如中和抗体的产生) 和细胞应答 (例如 T 细胞活化) 二者。



1. 病毒样颗粒 (VLP), 其包含:

第一多肽, 所述第一多肽为鼠白血病病毒 (MLV) gag 多肽, 其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的参考 MLV gag 蛋白之自组装部分显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分, 以及

第二多肽, 其氨基酸序列包含被结合人巨细胞病毒 (HCMV) 蛋白的一种或更多种抗体识别的表位。

2. 权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述第二多肽具有包含被 HCMV 糖蛋白 B(gB) 蛋白的一种或更多种抗体识别之表位的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述第二多肽具有包含被 HCMV 糖蛋白 H(gH) 蛋白的一种或更多种抗体识别之表位的氨基酸序列。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的 VLP, 其中所述第二多肽具有包含跨膜结构域、胞质结构域或二者的氨基酸序列。

5. 权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域不天然地存在于 HCMV 蛋白中。

6. 权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域天然地存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 蛋白中。

7. 权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域具有不同于 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:13 中所存在氨基酸序列的氨基酸序列。

8. 权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域具有选自以下的氨基酸序列: 存在于 SEQ ID NO:7 中的跨膜结构域, 存在于 SEQ ID NO:13 中的跨膜结构域和存在于 SEQ ID NO:16 中的跨膜结构域。

9. 权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域具有 SEQ ID NO:10 中 752 至 795 位残基的氨基酸序列。

10. 权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域具有由 SEQ ID NO:20 中 2152 至 2622 位核苷酸编码的氨基酸序列。

11. 权利要求 4 至 10 中任一项所述的 VLP, 其中所述第二多肽具有包含以下的氨基酸序列: 1) 存在于 SEQ ID NO:13 中的表位; 以及 2) 包含 SEQ ID NO:10 中 752 至 795 位残基之跨膜结构域的氨基酸序列。

12. 权利要求 4 至 10 中任一项所述的 VLP, 其中所述第二多肽具有包含以下的氨基酸序列: 1) 存在于 SEQ ID NO:13 中的表位; 以及 2) 包含由 SEQ ID NO:20 中 2152 至 2622 位核苷酸所编码氨基酸序列之跨膜结构域的氨基酸序列。

13. 权利要求 11 或权利要求 12 所述的 VLP, 其中所述第二多肽具有氨基酸序列, 其包含存在于 SEQ ID NO:13 中的除所述表位外的一个或更多个序列, 其中所述一个或更多个序列不包含完整的跨膜结构域。

14. 权利要求 1 至 13 中任一项所述的 VLP, 其中所述第一多肽为融合蛋白或包含融合蛋白。

15. 权利要求 1 至 13 中任一项所述的 VLP, 其中所述第二多肽为融合蛋白或包含融合蛋白。

16. 跨膜的经修饰的 gH 多肽。

17. 权利要求 16 所述的多肽,其包含存在于 HCMV 中的 gH 蛋白之 N 端胞外结构域。
18. 权利要求 16 或权利要求 17 所述的多肽,其包含跨膜结构域、胞质结构域或二者。
19. 权利要求 18 所述的多肽,其中所述跨膜结构域、胞质结构域或二者不天然地存在于所述 gH 蛋白中。
20. 权利要求 18 所述的多肽,其中所述跨膜结构域、胞质结构域或二者天然地存在于 VSV 蛋白中。
21. 权利要求 19 所述的多肽,其中所述跨膜结构域、胞质结构域或二者天然地存在于 gB 蛋白中。
22. 权利要求 16 所述的多肽,其包含 SEQ ID NO :16。
23. 权利要求 16 至 22 中任一项所述的多肽,其中所述多肽存在于 VLP 中。
24. 多核苷酸,其编码权利要求 16 至 22 中任一项所述的多肽。
25. 载体,其包含权利要求 24 所述的多核苷酸。
26. 病毒样颗粒 (VLP),其包含多肽,所述多肽包含存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之表位。
27. 权利要求 26 所述的 VLP,其中所述多肽包含存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之 N 端胞外结构域。
28. 权利要求 26 或 27 所述的 VLP,其中所述多肽包含跨膜结构域、胞质结构域或者二者。
29. 权利要求 28 所述的 VLP,其中所述跨膜结构域、胞质结构域或者二者不天然地存在于 gB 蛋白中。
30. 权利要求 28 所述的 VLP,其中所述跨膜结构域、胞质结构域或者二者天然地存在于 VSV 蛋白中。
31. 权利要求 26 所述的 VLP,其中所述多肽包含 SEQ ID NO :7。
32. 权利要求 30 所述的 VLP,其中所述多肽包含 SEQ ID NO :10。
33. 融合蛋白,其包含:
 - a) 第一多肽,所述第一多肽为 MLV gag 多肽,其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的参考 MLV gag 蛋白之自组装部分显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分,以及
 - b) 第二多肽,所述第二多肽为包含 pp65 表位的 HCMV pp65 多肽,其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO :4 中 539 至 1099 位残基之氨基酸序列的参考 pp65 蛋白显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分。
34. 包含融合蛋白的病毒样颗粒 (VLP),其包含:
 - a) 第一多肽,所述第一多肽为 MLV gag 多肽,其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的参考 MLV gag 蛋白之自组装部分显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分,以及
 - b) 第二多肽,所述第二多肽为包含 pp65 表位的 HCMV pp65 多肽,其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO :4 中 539 至 1099 位残基之氨基酸序列的参考 pp65 蛋白显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分。

35. 病毒样颗粒 (VLP), 其包含:

第一多肽, 其包含存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之表位; 和

第二多肽, 其包含跨膜的经修饰的 gH 多肽。

36. 权利要求 35 所述的 VLP, 其中所述第一多肽包含存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之 N 端胞外结构域。

37. 权利要求 36 所述的 VLP, 其中所述第一多肽包含跨膜结构域、胞质结构域或者二者。

38. 权利要求 37 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域、胞质结构域或者二者不天然地存在于 gB 蛋白中。

39. 权利要求 38 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域、胞质结构域或者二者天然地存在于 VSV 蛋白中。

40. 权利要求 35 所述的 VLP, 其中所述第一多肽包含 SEQ ID NO:7。

41. 权利要求 39 所述的 VLP, 其中所述第一多肽包含 SEQ ID NO:10。

42. 权利要求 35 所述的 VLP, 其中所述第二多肽包含天然地存在于 HCMV 中的 gH 蛋白之 N 端胞外结构域。

43. 权利要求 35 或 42 所述的 VLP, 其中所述第二多肽包含跨膜结构域、胞质结构域或者二者。

44. 权利要求 43 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域、胞质结构域或者二者不天然地存在于 gH 蛋白中。

45. 权利要求 43 所述的 VLP, 其中所述跨膜结构域、胞质结构域或者二者天然地存在于 VSV 蛋白中。

46. 权利要求 35 所述的 VLP, 其中所述第二多肽包含 SEQ ID NO:16。

47. 病毒样颗粒 (VLP), 其包含:

融合蛋白, 其包含:

a) 第一多肽, 所述第一多肽为 MLV gag 多肽, 其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的参考 MLV gag 蛋白之自组装部分显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分, 以及

b) 第二多肽, 所述第二多肽为包含 pp65 表位的 HCMV pp65 多肽, 其中其氨基酸序列包含与具有 SEQ ID NO:4 中 539 至 1099 位残基之氨基酸序列的参考 pp65 蛋白显示至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或 100% 同一性的长度为至少 100、200、300 或更多个氨基酸的部分; 以及

存在于 HCMV 中的第二蛋白之表位。

48. 权利要求 47 所述的 VLP, 其中所述融合蛋白设置并构建为使得其自组装以形成 VLP, 从而所述 pp65 表位位于所述 VLP 内部。

49. 权利要求 47 或权利要求 48 所述的 VLP, 其设置和构建为使得第二 HCMV 蛋白表位位于 VLP 表面上。

50. VLP, 其包含:

融合蛋白, 其包含融合在 HCMV 中所存在 pp65 蛋白之表位上游的 MLV 中所存在 gag 蛋白之 N 端部分; 以及

多肽,其包含存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之表位。

51. 权利要求 50 所述的 VLP,其中所述 gag 蛋白之 N 端部分不包含存在于 MLV 中的 C 端聚合酶序列。

52. 权利要求 50 或权利要求 51 所述的 VLP,其中所述 gag 蛋白之 N 端部分包含全长蛋白的 1 至 538 位残基。

53. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中所述 gB 蛋白的表位存在于全长 gB 蛋白中。

54. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中所述 gB 蛋白的表位被结合全长 gB 中表位的抗体识别。

55. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中所述 gB 蛋白的表位被结合 SEQ ID NO : 7 中表位的抗体识别。

56. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中包含 gB 表位的所述多肽具有包含全长 gB 蛋白中 1 至 751 位残基的氨基酸序列。

57. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中包含 gB 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO :7 之至少 15 个连续残基的氨基酸序列。

58. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中包含 gB 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列。

59. 权利要求 50 至 52 中任一项所述的 VLP,其中包含 gB 表位的所述多肽包含融合蛋白。

60. 权利要求 59 所述的 VLP,其中所述融合蛋白包含与第二多肽融合的第一多肽,所述第一多肽包含来自存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之 N 端胞外结构域,所述第二多肽包含不天然地存在于 HCMV 中的跨膜结构域、胞质结构域或二者。

61. 权利要求 60 所述的 VLP,其中所述第二多肽天然地存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中。

62. 权利要求 60 的 VLP,其中所述融合蛋白包含 SEQ ID NO :10。

63. VLP,其包含:

融合蛋白,其包含与存在于 HCMV 中的 pp65 蛋白之表位融合的存在于 MLV 中的 gag 蛋白之 N 端部分;以及

多肽,其包含存在于 HCMV 中的 gH 蛋白之表位。

64. 权利要求 63 所述的 VLP,其中所述 gag 蛋白的 N 端部分不包含存在于 MLV 中的 C 端聚合酶序列。

65. 权利要求 63 或权利要求 64 所述的 VLP,其中所述 gag 蛋白的 N 端部分包含全长蛋白的 1 至 538 位残基。

66. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP,其中所述 gH 蛋白的表位存在于全长 gH 蛋白中。

67. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP,其中所述 gH 蛋白的表位被结合全长 gH 中表位的抗体识别。

68. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP,其中所述 gH 蛋白的表位被结合 SEQ ID NO : 13 中表位的抗体识别。

69. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽具有包含全长 gH 蛋白中 1 至 751 位残基的氨基酸序列。

70. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO:13 之至少 15 个连续残基的氨基酸序列。

71. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列。

72. 权利要求 63 至 65 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽包含融合蛋白。

73. 权利要求 72 所述的 VLP, 其中所述融合蛋白包含与第二多肽融合的第一多肽, 所述第一多肽包含来自存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之 N 端胞外结构域, 所述第二多肽包含不天然地存在于 HCMV 蛋白中的跨膜结构域、胞质结构域或二者。

74. 权利要求 73 所述的 VLP, 其中所述第二多肽为 gB 蛋白。

75. 权利要求 73 所述的 VLP, 其中所述在第二多肽天然地存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中。

76. VLP, 其包含:

融合蛋白, 其包含融合在人巨细胞病毒 (HCMV) 中所存在 pp65 蛋白之表位上游的鼠白血病病毒 (MLV) 中所存在 gag 蛋白之 N 端部分;

多肽, 其包含存在于 HCMV 中的糖蛋白 B (gB) 蛋白之表位; 以及

多肽, 其包含存在于 HCMV 中的糖蛋白 H (gH) 蛋白之表位。

77. 权利要求 76 所述的 VLP, 其中所述 gag 蛋白的 N 端部分不包含存在于鼠白血病病毒 (MLV) 中的 C 端聚合酶序列。

78. 权利要求 76 或权利要求 77 所述的 VLP, 其中所述 gag 蛋白的 N 端部分包含全长蛋白的 1 至 538 位残基。

79. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中所述 gB 蛋白的表位存在于全长 gB 蛋白中。

80. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中所述 gB 蛋白的表位被结合全长 gB 中表位的抗体识别。

81. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中所述 gB 蛋白的表位被结合 SEQ ID NO:7 中表位的抗体识别。

82. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gB 表位的所述多肽具有包含全长 gB 蛋白中 1 至 751 位残基的氨基酸序列。

83. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gB 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO:7 之至少 15 个连续残基的氨基酸序列。

84. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gB 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

85. 权利要求 76 至 78 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gB 表位的所述多肽包含融合蛋白。

86. 权利要求 85 所述的 VLP, 其中所述融合蛋白包含与第二多肽融合的第一多肽, 所述第一多肽包含来自存在于 HCMV 中的 gB 蛋白之 N 端胞外结构域, 所述第二多肽包含不天然

地存在于 HCMV 蛋白中的跨膜结构域、胞质结构域或二者。

87. 权利要求 86 所述的 VLP, 其中所述第二多肽天然地存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中。

88. 权利要求 86 所述的 VLP, 其中所述融合蛋白包含 SEQ ID NO :10。

89. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中所述 gH 蛋白的表位存在于全长 gH 蛋白中。

90. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中所述 gH 蛋白的表位被结合全长 gH 中表位的抗体识别。

91. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中所述 gH 蛋白的表位被结合 SEQ ID NO :13 中表位的抗体识别。

92. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽具有包含全长 gH 蛋白中 1 至 717 位残基的氨基酸序列。

93. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO :13 之至少 15 个连续残基的氨基酸序列。

94. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽具有包含 SEQ ID NO :13 的氨基酸序列。

95. 权利要求 76 至 88 中任一项所述的 VLP, 其中包含 gH 表位的所述多肽包含融合蛋白。

96. 权利要求 95 所述的 VLP, 其中所述融合蛋白包含与第二多肽融合的第一多肽, 所述第一多肽包含来自存在于 HCMV 中的 gH 蛋白之 N 端胞外结构域, 所述第二多肽包含不天然地存在于 HCMV 蛋白中的跨膜结构域、胞质结构域或二者。

97. 权利要求 96 所述 VLP, 其中所述第二多肽为 gB 蛋白。

98. 权利要求 96 所述 VLP, 其中所述第二多肽天然地存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中。

99. 权利要求 1 至 15、26 至 32 和 34 至 98 中任一项所述的 VLP, 其中所述 VLP 的特征在于其直径范围的下限由 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100nm 界定并且上限由 300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180 或 170nm 界定。

100. 根据权利要求 1 至 15、26 至 32 和 34 至 98 中任一项所述 VLP 的群体, 其中所述群体中 VLP 平均直径范围的下限由 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100nm 界定并且上限由 300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180 或 170nm 界定。

101. 根据权利要求 100 所述的 VLP 之群体, 其中所述群体中 VLP 的多分散指数小于 0.5。

102. 权利要求 1 至 15、26 至 32 和 34 至 98 中任一项所述的 VLP, 其中所述 VLP 的特征在于所述糖蛋白的表位暴露在 VLP 的表面上并且所述融合蛋白位于 VLP 的被膜 / 内腔中。

103. 免疫原性组合物, 其包含权利要求 1 至 15、26 至 32 和 34 至 98 中任一项所述的 VLP。

104. 权利要求 103 所述的免疫原性组合物, 其中所述组合物的特征在于当施用至对象时其诱导体液免疫应答和细胞免疫应答二者。

105. 权利要求 104 所述的免疫原性组合物, 其中所述体液免疫应答在对象中持续至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少

约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少 12 个月。

106. 权利要求 104 所述的免疫原性组合物,其中所述细胞免疫应答在对象中持续至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少 12 个月。

107. 免疫原性组合物,其包含权利要求 50 所述之 VLP 与权利要求 63 所述之重组 VLP 的混合物。

108. 免疫原性组合物,其包含权利要求 50 所述之 VLP 与权利要求 75 所述之 VLP 的混合物。

109. 载体,其包含:

编码融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白包含融合在人巨细胞病毒 (HCMV) 中所存在 pp65 蛋白之表位上游的鼠白血病病毒 (MLV) 中所存在 gag 蛋白之 N 端部分;

其中所述编码融合蛋白的多核苷酸在单个启动子的控制之下;并且

其中所述载体包含在编码融合蛋白载体之多核苷酸下游的多聚腺苷酸化信号。

110. 权利要求 109 所述的载体,其中所述 gag 蛋白的 N 端部分不包含存在于鼠白血病病毒 (MLV) 中的 C 端聚合酶序列。

111. 权利要求 109 或权利要求 110 所述的载体,其中所述 gag 蛋白的 N 端部分包含全长蛋白的 1 至 538 位残基。

112. 权利要求 109 至 111 中任一项所述的载体,其包含 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:22 的多核苷酸序列。

113. 权利要求 109 至 111 中任一项所述的载体,其中所述载体如图 1 中所描绘。

114. 载体,其包含:

编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含存在于 HCMV 中的糖蛋白 B(gB) 蛋白之表位;

其中所述多核苷酸在单个启动子的控制之下;并且

其中所述载体包含所述多核苷酸上游的信号序列和所述多核苷酸下游的多聚腺苷酸化信号。

115. 权利要求 114 所述的载体,其中包含所述 gB 蛋白之表位的所述多肽包含全长 gB 蛋白的 1 至 751 位残基。

116. 权利要求 114 或权利要求 115 所述的载体,其包含 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9 的多核苷酸序列。

117. 权利要求 114 至 116 中任一项所述的载体,其中所述载体如图 1 中所描绘。

118. 载体,其包含:

编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含存在于 HCMV 中的糖蛋白 H(gH) 蛋白之表位;

其中所述多核苷酸在单个启动子的控制下;并且

其中所述载体包含所述多核苷酸上游的信号序列和所述多核苷酸下游的多聚腺苷酸化信号。

119. 权利要求 118 所述的载体,其中包含所述 gH 蛋白之表位的所述多肽不包含来自存在于 HCMV 中的 gH 蛋白之跨膜结构域或胞质结构域。

120. 权利要求 118 或权利要求 119 所述的载体,其中包含所述 gH 蛋白之表位的所述多肽包含融合蛋白。

121. 权利要求 120 所述的载体,其中所述融合蛋白包含融合在第二多肽上游的来自 HCMV 的 gH 蛋白质之 N 端胞外结构域,所述第二多肽包含不天然地存在于 HCMV 蛋白中的跨膜结构域、胞质结构域或二者。

122. 权利要求 121 所述的载体,其中所述第二多肽为 gB 蛋白。

123. 权利要求 121 所述的载体,其中所述第二多肽天然地存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中。

124. 权利要求 118 至 123 中任一项所述的载体,其中包含 gH 表位的所述多肽包含全长 gH 蛋白的 1 至 717 位残基。

125. 权利要求 118 至 124 中任一项所述的载体,其包含 SEQ ID NO:14 中 1 至 2148 位核苷酸或 SEQ ID NO:15 中 1 至 2148 位核苷酸的多核苷酸序列。

126. 权利要求 118 至 125 中任一项所述的载体,其中载体如图 1 所描绘。

127. 细胞,其包含权利要求 109 至 126 中任一项所述的一种或更多种载体。

128. 权利要求 127 所述的细胞,其中所述细胞用一种或更多种所述载体瞬时转染。

129. 权利要求 127 所述的细胞,其中所述细胞用一种或更多种所述载体稳定转染。

130. 用于生产 VLP 的方法,所述方法包括:

用权利要求 109 至 113 中任一项所述的载体和权利要求 114 至 117 中任一项所述的载体共转染宿主细胞;以及

在合适的培养基中于允许表达由所述载体编码之蛋白的条件下培养所述宿主细胞。

131. 用于生产 VLP 的方法,所述方法包括:

用权利要求 109 至 113 中任一项所述的载体和权利要求 118 至 126 中任一项所述的载体共转染宿主细胞;以及

在合适的培养基中于允许表达由所述载体编码之蛋白的条件下培养所述宿主细胞。

132. 用于生产 VLP 的方法,所述方法包括:

用权利要求 109 至 113 中任一项所述的载体、权利要求 114 至 117 中任一项所述的载体以及权利要求 118 至 126 中任一项所述的载体共转染宿主细胞;以及

在合适的培养基中于允许表达由所述载体编码之蛋白的条件下培养所述宿主细胞。

133. 权利要求 130 至 132 中任一项所述的方法,其还包括从所述培养基和/或所述宿主细胞回收 VLP 的步骤。

134. 药物组合物,其包含权利要求 1 至 15、26 至 32 和 34 至 98 中任一项所述的 VLP 和可药用载体。

135. 权利要求 134 所述的药物组合物,其还包含佐剂。

136. 权利要求 135 所述的药物组合物,其中所述佐剂选自细胞因子、凝胶型佐剂、微生物佐剂、油乳剂和基于乳化剂的佐剂、颗粒佐剂、合成佐剂、聚合物佐剂和/或其组合。

137. 用于在对象中减少 HCMV 感染之症状的频率、严重程度或延迟所述症状发作的方法,所述方法包括施用权利要求 134 至 136 中任一项所述的药物组合物。

138. 权利要求 137 所述的方法,其中所述对象处于 HCMV 感染的风险中。

139. 权利要求 138 所述的方法,其中所述对象为免疫抑制的对象。

140. 权利要求 139 所述的方法,其中所述免疫抑制的对象选自:HIV 感染的对象、AIDS 患者、移植受者、儿童对象和妊娠对象。

141. 权利要求 137 至 140 中任一项所述的方法,其中所述对象已经暴露于 HCMV 感染。

142. 权利要求 137 至 141 中任一项所述的方法,其中所述对象为人。

143. 权利要求 137 所述的方法,其中与施用所述药物组合物前所述对象中 HCMV 感染之症状的频率、严重程度或发作相比,所述对象中 HCMV 感染之症状的频率、严重程度或发作减少约 50%或更多。

144. 权利要求 143 所述的方法,其中与施用所述药物组合物前所述对象中 HCMV 感染之症状的频率、严重程度或发作相比,所述对象中 HCMV 感染之症状的频率、严重程度或发作减少约 60%或更多、约 70%或更多、或约 75%或更多。

145. 权利要求 137 至 144 中任一项所述的方法,其中所述药物组合物以初始剂量和至少一次加强剂量施用。

146. 权利要求 145 所述的方法,其中所述药物组合物以初始剂量和两次加强剂量施用。

147. 权利要求 145 所述的方法,其中所述药物组合物以初始剂量和三次加强剂量施用。

148. 权利要求 145 所述的方法,其中所述药物组合物以初始剂量和四次加强剂量施用。

149. 权利要求 145 所述的方法,其中所述药物组合物以初始剂量和在所述初始剂量后约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月的至少一次加强剂量施用。

150. 权利要求 149 所述的方法,其中所述药物组合物在所述初始剂量后约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 1 年以第二加强剂量施用。

151. 权利要求 137 至 150 中任一项所述的方法,其中所述药物组合每 1 年、每 2 年、每 3 年、每 4 年、每 5 年、每 6 年、每 7 年、每 8 年、每 9 年或每 10 年以加强剂量施用。

用于治疗巨细胞病毒的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2011 年 11 月 11 日提交的美国临时申请号 61/558,800 和于 2012 年 6 月 1 日提交的美国临时申请号 61/654,157 的优先权,二者的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 人巨细胞病毒 (HCMV) (β -疱疹病毒) 是一种无所不在的病原体。在免疫正常的人中 HCMV 感染通常被忽视,其具有最温和的且非特异性的症状。相比之下,某些高危人群,例如在免疫抑制患者(例如 AIDS 患者或移植受者)中,以及产前感染后, HCMV 感染具有严重的表现 (Staras SA 等,2006Clin Infect Dis43(9):1143-51;Hebart H 等,2004Hum Immunol65(5):432-6;Rowshani AT 等,2005Transplantation79(4):381-6)。现有的治疗方法包括使用免疫球蛋白和抗病毒制剂(例如更昔洛韦及其衍生物),其在高危人群中预防性使用或在非常早期的感染过程中使用时是最有效的。然而,现有疗法的特征为显著的毒性和有限的疗效,尤其是对晚发性疾病 (Boeckh M.,2004Pediatr Transplant8(增刊5):19-27;Limaye AP.,2004Transplantation78(9):1390-6),而且他们对先天性 HCMV 疾病尚无影响。开发有效的疫苗来防止 HCMV 疾病被认为是重要的公共卫生优先事项 (Arvin AM 等,2004Clin Infect Dis39(2):233-9)。

[0004] 发明概述

[0005] 除了其他方面以外,本发明提供了可用于预防、治疗和/或研究人巨细胞病毒 (HCMV) 感染的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明提供了病毒样颗粒 (virus-like particles, VLP),其包含一个或多个莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney Murine leukemia virus, MMLV) 核心蛋白并且包含一个或多个 HCMV 表位,例如来自 HCMV 的包膜糖蛋白 gB 和/或 gH 和/或被膜蛋白 pp65。除了其他方面以外,本发明涵盖了抗原(例如,包膜糖蛋白和结构蛋白)之组合可导致有益的免疫应答之诱导改善,所述免疫应答包括例如体液应答(例如中和抗体的产生)和细胞应答(例如 T 细胞活化)二者。可提供的 VLP 特征在于他们不含有病毒 DNA 并且无感染性。

[0006] 在一些实施方案中,提供的 VLP 被脂质膜包围,任选地含有来自病毒包膜糖蛋白(例如 gB 和/或 gH)的一个或多个表位,其是在病毒中和抗体的诱导中发挥作用的抗原。

[0007] 在一些实施方案中,提供的 VLP 含有来自病毒结构蛋白(例如 pp65)的一个或多个表位,其是在诱导细胞免疫应答(例如 T 细胞应答)中发挥作用的抗原。在一些实施方案中,利用的病毒结构蛋白(例如 pp65)不仅刺激 T 辅助细胞的形成还诱导抗 HCMV 的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。

[0008] 在一些实施方案中,本发明提供了病毒包膜糖蛋白(例如 gB 和/或 gH)的变体。在一些实施方案中,变体病毒包膜糖蛋白为融合蛋白或包含融合蛋白。在一些实施方案中,病毒糖蛋白的变体包含异源蛋白结构域(例如,来自不同蛋白的跨膜和/或胞质结构域)。在一些实施方案中,病毒结构蛋白的变体包含异源抗原或表位。在一些实施方案中,本发明

提供了包含病毒结构蛋白之变体的 VLP。在一些实施方案中,病毒结构蛋白的变体为融合蛋白或包含融合蛋白。

[0009] 本申请中所用的术语“约”和“大约”等同使用。在本申请中使用的带有或不带有约 / 大约的任意数值意味着涵盖被相关领域的普通技术人员理解的任何正常波动。

[0010] 本发明的其他特性、目的和益处以下的详细描述中将变得明显。然而,应当理解,尽管所述详细描述显示了本发明的实施方案,其仅通过举例说明的方式给出而非限制。从该详细描述,本发明范围内的多种改变和修饰对本领域技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0011] 附图仅用于举例说明目的而非限制。

[0012] 图 1 示出 DNA 表达质粒图谱 (A) 和示例性重组表达质粒的构建 (B)。

[0013] 图 2 示出 HEK293 包装细胞上示例性异源表面抗原的 FACS 分析 (A) 和示例性 VLP 组合物中异源抗原表达的蛋白质印迹分析 (B)。

[0014] 图 3 (A) 和 (B) 示出两种示例性 VLP 组合物的颗粒大小测定和多分散指数。

[0015] 图 4 示出在用示例性 gB/pp65 (A)、gH-G/pp65 (B) 或 gB/gH-G/pp65 (C) VLP 组合物处理之小鼠中的 ELISA 效价。

[0016] 图 5 示出用示例性 VLP 组合物处理的小鼠中的中和抗体活性 (在人成纤维细胞中测定)。

[0017] 图 6 示出用示例性 VLP 组合物处理的小鼠中的中和抗体活性 (在人上皮细胞中测定)。

[0018] 图 7 示出用示例性 VLP 组合物相对于重组 gB 蛋白处理的小鼠中的中和抗体活性 (在人成纤维细胞中测定)。

[0019] 图 8 示出用 HEK293 细胞中表达的示例性 VLP 组合物处理之小鼠中的抗原特异性 CTL 应答,其描述为基于 CFSE 衰减、选通 CD3⁺CD8⁺T 细胞的 CTL 频率 (A) 或 pp65- 特异性 CTL 增殖的频率 (B)。

[0020] 图 9 示出用 HEK293 细胞中表达的示例性 VLP 组合物处理的兔中的抗 -gB 和中和抗体效价 (在人成纤维细胞中测定)。

[0021] 图 10 示出用 HEK293 细胞中表达的示例性 VLP 组合物处理的兔中的中和抗体效价 (在人上皮细胞中测定)。

[0022] 图 11 示出通过 (A) 切向流过滤 (TFF) 或 (B) 阴离子交换 (AEX) 色谱纯化的 CHO 细胞中表达的示例性 VLP 组合物之负染电子显微镜 (EM) 图像。

[0023] 图 12 示出用在 CHO 细胞中表达并通过切向流过滤 (TFF) 和阴离子交换 (AEX) 色谱纯化的示例性 VLP 组合物处理之兔中的中和抗体效价 (在人成纤维细胞中测定)。

[0024] 图 13 示出用通过切向流过滤 (TFF) 和阴离子交换 (AEX) 色谱纯化的 CHO 细胞中表达的示例性 VLP 组合物处理之兔中的中和抗体效价 (在人上皮细胞中测定)。

[0025] 图 14 示出用在 CHO 细胞中表达并通过切向流过滤 (TFF) 和阴离子交换 (AEX) 色谱纯化的示例性 VLP 组合物处理之兔中产生的抗体之亲和力指数。

[0026] 定义

[0027] 为了本发明变得更易于理解,下文中首先对某些术语进行定义。以下术语和其他

术语的另外定义列在整个说明书中。

[0028] 氨基酸：本文所用的术语“氨基酸”以其最广泛的含义，指可被并入多肽链的任何化合物和 / 或物质。在一些实施方案中，氨基酸具有通式结构 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$ 。在一些实施方案中，氨基酸是天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，氨基酸是合成的氨基酸；在一些实施方案中，氨基酸是 d-氨基酸；在一些实施方案中，氨基酸是 l-氨基酸。“标准氨基酸”指任何在天然存在之肽中常规存在的 20 种标准 l-氨基酸。“非标准氨基酸”指除了标准氨基酸之外的任何氨基酸，无论其是合成制备的还是从天然来源获得的。本文所用的“合成氨基酸”涵盖化学修饰的氨基酸，包括但不限于盐、氨基酸衍生物（例如酰胺）和 / 或取代。氨基酸（包括肽中羧基和 / 或氨基末端氨基酸）可通过甲基化、酰胺化、乙酰化、保护基团和 / 或用其他化学基团取代进行修饰，这可改变肽的循环半衰期且不负面影响其活性。氨基酸可以参与二硫键。氨基酸可以包含一种或更多种翻译后修饰，例如与一种或更多种化学实体（例如甲基基团、乙酸盐 / 酯基团、乙酰基基团、磷酸盐 / 酯基团、甲酰基部分、类异戊二烯基团、硫酸盐 / 酯基团、聚乙二醇部分、脂质部分、碳水化合物部分、生物素部分等）结合。术语“氨基酸”与“氨基酸残基”可互换使用，并且可以指游离的氨基酸和 / 或肽的氨基酸残基。从使用该术语的上下文中，指游离氨基酸还是指肽的残基将会是显而易见的。

[0029] 抗原：本文所使用的术语“抗原”是指包含有一种或更多种被抗体识别的表位（线性表位、构象表位或两者）的物质。在某些实施方案中，抗原是或包含病毒或病毒多肽。在一些实施方案中，术语“抗原”指亚单位抗原（即从完整病毒分开或分离的抗原，所述抗原与所述完整病毒本质上相关；例如与病毒样颗粒相关的抗原）。或者或此外，在一些实施方案中，术语“抗原”指杀死的、减毒或灭活的病毒。在某些实施方案中，抗原是“免疫原”。

[0030] 大约或约：本文所用的应用至一个或更多个目的值的术语“大约”或“约”，指类似于所述参考值的值。在某些实施方案中，术语“大约”或“约”指落入所述参考值之任意方向（大于或小于）的 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 或更小之内（除了这样的数字将超过可能值的 100% 的情况）的一系列值。

[0031] 改善：本文所用的术语“改善”意味着预防、减少或减轻状态，或改进对象的状态。改善包括但不需要完全恢复或完全预防疾病、病症或病状（例如 HCMV 感染）。术语“预防”指延缓疾病、病症或病状的发作。当疾病、病症或病状的发作已经被延迟了预定的时间段时，可以视为完成了预防。

[0032] 特征部分：本文所用的术语物质的“特征部分”，以最广泛的含义，是享有完整物质的指定程度之结构同一性的一部分。在某些实施方案中，特征部分享有完整物质的至少一个功能特征。例如，蛋白质或多肽的“特征部分”是含有氨基酸之连续延伸，或者氨基酸连续延伸之集合的一部分，其一起构成了蛋白质或多肽的特征。在一些实施方案中，每个这种连续延伸通常含有至少 2、5、10、15、20、50 或更多个氨基酸。一般而言，物质（例如蛋白质或抗体等）的特征部分是（除以上详细描述的序列和 / 或结构同一性）享有相关的完整物质之至少一个功能特征的部分。在一些实施方案中，特征部分可以为生物学活性。

[0033] 特征序列：“特征序列”是指存在于多肽或核酸家族的所有成员中的序列，并且由此可被本领域的普通技术人员用来定义家族的成员。

[0034] 胞质结构域：如本领域已知的，多肽有时具有跨膜、胞质和 / 或胞外结构域。一般而言，本文所用的“胞质结构域”指具有存在于胞质中的性质的结构域。应当理解，不需要胞质结构域中的每一个氨基酸都存在于胞质中。例如，在一些实施方案中，胞质结构域的特征在于蛋白质的指定延伸或部分基本上位于胞质中。如本领域中公知的，可以使用多种算法分析氨基酸或核酸序列以预测蛋白亚细胞定位（例如胞质定位）。示例性的这样的程序包括 psort (PSORT.org)、Prosit (prosite.expasy.org) 等等。

[0035] 剂型：本文所用的术语“剂型”和“单位剂型”指用于待治疗之患者的治疗剂的物理不连续单位。各个单位含有预定量的经计算活性物质以产生期望的治疗效果。然而，应当理解，组合物的总剂量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。

[0036] 给药方案：本文所用的术语“给药方案”（或“治疗方案”）是单独施用至对象的通常被时间段隔开的一组单位剂量（通常多于一个）。在一些实施方案中，给定的治疗剂具有推荐的给药方案，其可涉及一个或更多次给药。在一些实施方案中，给药方案包括多次给药，各次之间被相同长度的时间段相互隔开；在一些实施方案中，给药方案包括多次给药以及将各次给药分开的至少两种不同的时间段。

[0037] 表达：如本文使用的核酸序列的“表达”指一个或更多个以下事件：(1) 从 DNA 序列产生 RNA 模板（例如通过转录）；(2) 加工 RNA 转录物（例如通过剪切、编辑、5' 帽形成和 / 或 3' 尾形成）；(3) 将 RNA 翻译成多肽或蛋白；和 / 或 (4) 多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0038] 胞外结构域：如本领域已知的，多肽有时具有跨膜、胞质和 / 或胞外结构域。一般而言，本文所用的“胞外结构域”指具有存在于细胞之外部的性质的结构域。应当理解，不需要胞外结构域中的每个氨基酸都存在于细胞的外部。例如，在一些实施方案中，胞外结构域的特征在于蛋白的指定延伸或部分基本上位于细胞外。如本领域中公知的，可以使用多种算法分析氨基酸或核酸序列以预测蛋白亚细胞定位（例如细胞外定位）。示例性的这样的程序包括 psort (PSORT.org)、Prosit (prosite.expasy.org) 等等。

[0039] 融合蛋白：本文所用的术语“融合蛋白”一般指包含至少两个片段的多肽，所述片段各自显示出与 (1) 天然存在的和 / 或 (2) 代表多肽的功能结构域的肽部分具有高度的氨基酸同一性。通常，含有至少两个这样的片段的多肽被认为是融合蛋白，如果所述两个片段是这样的部分：(1) 不包括在天然的同肽中，和 / 或 (2) 之前在单个多肽中未相互连接，和 / 或 (3) 已经通过人手工作用相互连接。

[0040] 基因：术语“基因”具有其本领域理解的含义。本领域的普通技术人员应当理解，术语“基因”可以包括基因调控序列（例如启动子、增强子等）和 / 或内含子序列。还应当理解，基因的定义包括涉及不编码蛋白而编码功能 RNA 分子（例如 tRNA、RNAi- 诱导剂等）的核酸。出于澄清的目的，我们注释本说明书中使用的术语“基因”一般指编码蛋白的核酸部分；本领域的普通技术人员将从上下文中明白，该术语可任选地涵盖调控序列。这一定义不旨在排除将术语“基因”应用于非蛋白编码表达单位，而是为了澄清在大多数情况下，在本文中使用的该术语指编码蛋白的核酸。

[0041] 基因产物或表达产物：本文所用的术语“基因产物”或“表达产物”一般指从基因（加工前和 / 或加工后）转录的 RNA 或者由从该基因转录的 RNA 编码的多肽（修饰前或修饰后）。

[0042] 异源：对于蛋白或多肽，本文所用的术语“异源”指非天然存在于特定有机体中的蛋白或多肽，例如反转录病毒或 VLP。在一些实施方案中，异源蛋白或多肽在特定的反转录病毒病毒体中是非天然存在的。对于蛋白结构域，本文所用的术语“异源”一般指在特定蛋白中非天然存在的蛋白结构域。

[0043] 免疫原性：本文所用的术语“免疫原性”意味着能够在宿主动物中针对非宿主实体（例如 HCMV 抗原）产生免疫应答。在某些实施方案中，这种免疫应答形成了通过针对特定感染性生物（例如 HCMV）的疫苗引起之保护性免疫的基础。

[0044] 免疫应答：本文所用的术语“免疫应答”指在动物中引起的应答。免疫应答可以指细胞免疫、体液免疫或者可以涉及二者。还可免疫应答限制在免疫系统的一部分。例如，在某些实施方案中，免疫原性组合物可以诱导 IFN γ 应答增加。在某些实施方案中，免疫原性组合物可以诱导黏膜 IgA 应答（例如，在鼻和 / 或直肠清洗液中测量的）。在某些实施方案中，免疫原性组合物可以诱导全身的 IgG 应答（例如，在血清中测量的）。在某些实施方案中，免疫原性组合物可以诱导病毒中和抗体或者中和抗体应答。

[0045] 改善、增加或减少：本文所用的术语“改善”、“增加”或“减少”或语法等价物，指示相对于基线测量的值，所述基线测量例如在本文所述的处理开始之前在相同的个体中的测量或在缺乏本文所述之处理的情况下在对照个体（或多个对照个体）中的测量。

[0046] 个体、对象、患者：本文所用的术语“对象”、“个体”或“患者”指人或非人哺乳动物对象。在一些实施方案中，被治疗的个体（也称为“患者”或“对象”）是患有疾病（例如 HCMV 感染）的个体（胎儿、婴儿、儿童、青少年或成人）。在一些实施方案中，对象有 HCMV 感染的风险。在一些实施方案中，所述对象是免疫抑制的对象。例如，在一些实施方案中，免疫抑制的对象选自 HIV 感染的对象、AIDS 患者、移植受者、儿童对象以及妊娠对象。在一些实施方案中，所述对象已经暴露于 HCMV 感染。在一些实施方案中，所述对象是人。

[0047] 分离的：本文所用的术语“分离的”指如下物质和 / 或实体，其已经 (1) 从在初始产生（无论在自然和 / 或在实验环境中）时与其相关联的至少一些组分分离，和 / 或 (2) 通过人工产生、制备和 / 或制造。分离的物质和 / 或实体可以从初始与其相关的其他组分的约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或大于约 99% 分离。在一些实施方案中，分离的药剂为约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或者大于约 99% 纯的。如果物质基本上没有其他组分，那么该物质是“纯的”。如本文所述的，分离的物质和 / 或实体之百分比纯度的计算不应当包括赋形剂（例如，缓冲液、溶剂、水等）。

[0048] 接头：本文所用的术语“接头”指（例如在融合蛋白中）非在天然蛋白的特定位置出现的适当长度的氨基酸序列，并且一般被设计为柔性和 / 或插入结构（例如两个蛋白部分之间的 α -螺旋）。一般而言，接头允许融合蛋白的两个或更多个结构域保留各自结构域之 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或更多的生物活性。接头还可以指间隔子。

[0049] 核酸：本文所用的术语“核酸”，以其最广泛的含义，指被并入或能够并入寡核苷酸链中的任何化合物和 / 或物质。在一些实施方案中，核酸是通过磷酸二酯键被并入或能够并入寡核苷酸链的化合物和 / 或物质。在一些实施方案中，“核酸”指单个核苷酸残基（例

如核苷酸和 / 或核苷)。在一些实施方案中,“核酸”指包含单个核酸残基的寡核苷酸链。本文所用的术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”可互换使用。在一些实施方案中,“核酸”涵盖 RNA 以及单链和 / 或双链 DNA 和 / 或 cDNA。此外,术语“核酸”、“DNA”、“RNA”和 / 或类似的术语包括核酸类似物,例如具有非磷酸二酯骨架的类似物。例如,在本领域已知并且在骨架中具有肽键而非磷酸二酯键的所谓的“肽核酸”被视为在本发明的范围内。术语“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此间的兼并版本 (degenerate version) 和 / 或编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白和 / 或 RNA 的核苷酸序列可以包括内含子。核酸可以从天然来源纯化,使用重组表达系统产生并任选地纯化,化学地合成等。其中,例如在化学合成分子的情况下,合适的核酸分子可包括核苷酸类似物,例如具有经化学修饰的碱基或糖、骨架修饰等的类似物。除非另有说明,核酸序列以 5' 至 3' 方向给出。本文所用的术语“核酸片段”是指为较长核酸序列之一部分的核酸序列。在许多实施方案中,核酸片段包含至少 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个残基。在一些实施方案中,核酸是或包含天然核苷 (例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷);核苷类似物 (2- 氨基腺苷、2- 硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3- 甲基腺苷、5- 甲基胞苷、C-5 丙炔基 - 胞苷、C-5 丙炔基 - 尿苷、2- 氨基腺苷、C5- 溴尿苷、C5- 氟尿苷、C5- 碘尿苷、C5- 丙炔基 - 尿苷、C5- 丙炔基 - 胞苷、C5- 甲基胞苷、2- 氨基腺苷、7- 脱氮腺苷、7- 脱氮鸟苷、8- 氧代腺苷、8- 氧代鸟苷、O(6)- 甲基鸟嘌呤和 2- 硫代胞苷);化学修饰的碱基;生物修饰的碱基 (例如甲基化的碱基);插入的碱基;修饰的糖 (例如 2' - 氟核糖、核糖、2' - 脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖);和 / 或经修饰的磷酸盐 / 酯基团 (例如硫代磷酸盐 / 酯和 5' -N- 亚磷酸酰胺键)。在一些实施方案中,本发明具体地涉及“未经修饰的核酸”,意指核酸 (例如多核苷酸和残基,包括核苷酸和 / 或核苷) 尚未被化学修饰以利于或实现递送。

[0050] 可药用:本文所用的术语“可药用”指在合理的医学判断范围内,适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的利益 / 风险比相当的物质。

[0051] 多肽:本文所用的“多肽”一般而言是至少两个氨基酸通过肽键彼此连接的串。在一些实施方案中,多肽可以包含至少 3 至 5 个氨基酸,每一个通过至少一个肽键与其他相连接。本领域的普通技术人员应当理解,任选地,多肽有时包括“非天然”氨基酸或者仍能够并入多肽链的其他部分。

[0052] 多蛋白:本文所用的术语“多蛋白”一般指在合成后可以被切割以产生几个功能不同的多肽的蛋白。多蛋白通常由单个氨基酸序列编码。在一些实施方案中,未切割的多蛋白保留其组成部分的生物活性。一些病毒产生这样的多蛋白,例如, Gag 多蛋白,其可作为功能多蛋白保留或者可被加工成几个功能不同的多肽。功能上, Gag 多肽被分成 3 个结构域:膜结合结构域,其使 Gag 多蛋白靶向细胞膜;相互作用结构域,其促进 Gag 聚合;以及晚期结构域,其利于新生病毒体从宿主细胞释放。一般而言,介导病毒颗粒组装的 Gag 蛋白的形式是多蛋白。

[0053] 自组装部分:一般而言,本文所用的“自组装部分”指采取限定的排列而无需来自外源的指导或管理之实体的相关延伸。在一些实施方案中,实体是蛋白。在一些实施方案中,实体是多蛋白。在一些这样的实施方案中,相关延伸为至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、

375、400、425、450、475、500 或更多个残基。自组装可以在例如在细胞的内容物内（例如体内）展示。或者或此外，自组装可以在细胞内容物外部（例如体外）展示。自组装可以为分子内（例如折叠）和 / 或分子间。在一些实施方案中，自组装可以是巨大分子，实体由此自组装成复合物和 / 或延展的巨大分子结构。自组装实体可以表现出广泛的结构模体 (motif)，包括但不限于颗粒、纤维、片层和带。在一些实施方案中，实体的自组装对于实体的生物学功能是重要的。例如，在一些实施方案中，脂质的自组装导致细胞膜结构的形成。在一些实施方案中，蛋白（例如病毒结构蛋白）的自组装导致颗粒结构（例如，病毒颗粒结构）的形成。例如，病毒结构多蛋白可以含有靶向序列，其能够引导其定位至其宿主细胞的细胞膜（例如质膜、内体等），病毒结构多蛋白可以从所述宿主细胞出芽形成 VLP，其含有包围病毒结构多蛋白的宿主细胞膜材料。

[0054] 基本同源性 (Substantial homology)：本文所用的短语“基本同源性”指氨基酸或核酸序列之间的比较。本领域的技术人员应当理解，如果两个序列在对应的位置含有同源残基，那么他们一般被认为是“基本同源”。同源残基可以为相同残基。或者，同源残基可以为具有大致相似的结构和 / 或功能特征的非相同残基。例如，本领域的普通技术人员公知，某些氨基酸通常分类为“疏水的”或“亲水的”氨基酸，和 / 或具有“极性”或“非极性”侧链。相同类型的一个氨基酸对另一个的替代经常可以认为是同源替代。

[0055] 如本领域所公知的，可以用多种算法的任一种进行氨基酸或核酸序列的比较，包括那些市售的计算机程序，例如用于核苷酸序列的 BLASTN 和用于氨基酸序列的 BLASTP、缺口的 BLAST 和 PSI-BLAST。示例性的这样的程序描述于 Altschul, 等, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3) :403-410, 1990 ; Altschul, 等, Methods in Enzymology 266 :460-480 (1996) ; Altschul, 等, " Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25 : 3389-3402, 1997 ; Baxevanis, 等, Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998 ; and Misener, 等, (编辑), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 132 卷), Humana Press, 1999。除了鉴别同源序列，上述程序通常提供同一性程度的指示。在一些实施方案中，如果在残基的相关延伸中其对应残基的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多为同源，那么两个序列被认为是基本同源。在一些实施方案中，相关延伸是整个序列。在一些实施方案中，相应延伸为至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 或更多个残基。

[0056] 基本同一性：本文所用的短语“基本同一性”指氨基酸或核酸序列之间的比较。本领域的普通技术人员应当理解，如果两个序列在对应位置含有相同的残基，那么他们一般被认为是“基本同一”。本领域公知，可以用多种算法中的任一种进行氨基酸或核酸序列的比较，包括那些市售的计算机程序，例如用于核苷酸序列的 BLASTN 和用于氨基酸序列的 BLASTP、缺口的 BLAST 和 PSI-BLAST。示例性的这样的程序描述于 Altschul, 等, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3) :403-410, 1990 ; Altschul, 等, Methods in Enzymology 266 :460-480 (1996) ; Altschul, 等, Nucleic Acids Res. 25 : 3389-3402, 1997 ; Baxevanis, 等, Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis

of Genes and Proteins, Wiley, 1998; and Misener, 等, (编辑), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 132 卷), Humana Press, 1999。除了鉴别相同序列, 上述程序通常提供同一性程度的指示。在一些实施方案中, 如果在残基的相关延长中其对应残基的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多为同一, 两个序列被认为是基本同一的。在一些实施方案中, 相关延伸是整个序列。在一些实施方案中, 相关延伸为至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 或更多个残基。

[0057] 患有: “患有” 疾病、病症或病况 (例如 HCMV 感染) 的个体已经被诊断为具有和 / 或表现出该疾病、病症或病况的一种或更多种症状。

[0058] 易感: “易感” 疾病、病症或病况 (例如 HCMV 感染) 的个体具有发生疾病、病症或病况的风险。在一些实施方案中, 易感疾病、病症或病况的个体不表现出疾病、病症或病况的任何症状。在一些实施方案中, 易感疾病、病症或病况的个体已经被诊断为具有疾病、病症和 / 或病况。在一些实施方案中, 易感疾病、病症或病况的个体是已经暴露于与该疾病、病症或病况的发生相关之条件的个体 (例如个体已经暴露于 HCMV)。

[0059] 症状减轻: 根据本发明, 当特定疾病、病症或病况的一种或更多种症状的程度 (强度、严重程度等) 或频率降低时, 则 “症状减轻”。出于澄清的目的, 特定症状之发作的延迟被认为是减少所述症状之频率的一种形式。不旨在将本发明仅限制为症状消除的情况。本发明具体地考虑到使得虽然未完全消除, 但一种或更多种症状减轻 (并且对象的病症由此 “改善”) 的治疗。

[0060] 治疗有效量: 本文所用的术语 “治疗有效量” 指以可应用于任何医疗治疗的合理的益处 / 风险比, 足以对所治疗的对象产生治疗效果的量。治疗效果可为客观的 (例如可通过某种测试或标志物测量) 或主观的 (例如对象给出效果的指示或感觉到效果)。特别地, “治疗有效量” 指有效地治疗、改善或预防期望的疾病或病症或者表现出可检测的治疗或预防效果 (例如通过改善与疾病相关的症状、预防或延迟疾病的发作、和 / 或还减轻疾病症状之严重程度或频率) 的治疗蛋白或组合物的量。治疗有效量通常以可以包含多种单位剂量的给药方案施用。对于任何特定的免疫原性组合物, 治疗有效量 (和 / 或有效给药方案内的适当单位剂量) 可以根据 (例如) 施用途径或与其他药剂的组合变化。此外, 对于任何特定患者, 具体的治疗有效量 (和 / 或单位剂量) 可以取决于多种因素, 包括: 被治疗的病症和病症的严重程度; 所采用的具体药剂的活性; 所采用的具体组合物; 患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食; 施用时间、施用途径、和 / 或所采用的具体免疫原性组合物的排泄或代谢速率; 治疗的持续时间; 以及医药领域中公知的类似因素。

[0061] 跨膜结构域: 本领域中已知, 多肽有时具有跨膜、胞质和 / 或胞外结构域。一般而言, 本文所用的 “跨膜结构域” 指具有存在于膜 (例如跨越细胞膜的一部分或全部) 中之性质的结构域。应当理解, 不需要跨膜结构域中的每个氨基酸都存在于膜中。例如, 在一些实施方案中, 跨膜结构域的特征在于蛋白的指定延伸或部分基本上定位于膜中。本领域中已知, 可以使用多种算法分析氨基酸或核酸序列以预测蛋白亚细胞定位 (例如跨膜定位)。示例性的这样的程序包括 psort (PSORT.org)、Prosites (prosites.expasy.org) 等等。

[0062] 治疗: 本文所用的术语 “治疗” 指对于特定疾病、病症和 / 或病况 (例如 HCMV 感染)

的一种或更多种症状或特征或者对该疾病的易感性予以部分或完全地减轻、改善、缓解、抑制、延迟其发作、减轻其严重程度、和 / 或减轻其发生率的免疫原性组合物的任何施用。这样的治疗可以对不表现出相关疾病、病症和 / 或病况之病征的对象进行,和 / 或仅表现出该疾病、病症和 / 或病况之早期病征的对象进行。或者或此外,这样的治疗可以对表现出相关疾病、病症和 / 或病况之一种或更多种已确定病征的对象进行。在某些实施方案中,术语“治疗”指患者的接种疫苗。

[0063] 接种疫苗:本文所用的术语“接种疫苗”指旨在对例如致病剂(例如, HCMV)产生免疫应答的组合物的施用。出于本发明的目的,接种疫苗可以在暴露于致病剂之前、期间和 / 或之后施用,并且在某些实施方案中,在暴露于致病剂之前、期间和 / 或不久之后施用。在一些实施方案中,接种疫苗包括疫苗组合物以适当间隔的时间多次施用。

[0064] 载体:本文所用的“载体”指能够转运与其缔合的另一个核酸的核酸分子。在一些实施方案中,载体能够染色体外复制和 / 或表达在宿主细胞(例如真核和 / 或原核细胞)中与其相连接的核酸。能够引导有效连接的基因之表达的载体在本文中称作“表达载体”。

[0065] 某些实施方案的详细描述

[0066] 除了其他方面以外,本发明提供了用于预防、治疗和 / 或研究人巨细胞病毒(HCMV)感染的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明提供了病毒样颗粒(virus-like particles, VLP),其包含一个或更多个莫洛尼鼠白血病毒(Moloney Murine leukemia virus, MMLV)核心蛋白并且包含一个或更多个 HCMV 表位,例如来自 HCMV 的包膜糖蛋白 gB 和 / 或 gH 和 / 或被膜蛋白(tegument protein)pp65。除了其他方面以外,本发明涵盖了以下认识:抗原(例如,包膜糖蛋白和结构蛋白)之组合可导致改善的有益免疫应答之诱导,所述有益免疫应答包括例如体液应答(例如中和抗体的产生)和细胞应答(例如 T 细胞活化)二者。所提供的 VLP 特征可在于他们不含有病毒 RNA 或 DNA 并且无感染性。在一些实施方案中,提供的 VLP 确实含有病毒 RNA 或 DNA 并且有感染性。在一些这样的实施方案中,提供的 VLP 可用作 DNA 疫苗。

[0067] 在一些实施方案中,对象中的体液免疫应答持续至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月、至少约 12 个月、至少约 13 个月、至少约 14 个月、至少约 15 个月、至少约 16 个月、至少约 17 个月、至少约 18 个月、至少约 19 个月、至少约 20 个月、至少约 21 个月、至少约 22 个月、至少约 23 个月、至少约 24 个月、至少约 28 个月、至少约 32 个月、至少约 36 个月、至少约 40 个月、至少约 44 个月、至少约 48 个月或更长。在一些实施方案中,对象中的细胞免疫应答持续至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少 12 个月。

[0068] 在一些实施方案中,所提供的 VLP 被脂质膜包围,所述脂质膜任选地含有来自病毒包膜糖蛋白(例如 gB 和 / 或 gH)的一种或更多种表位,其是在病毒中和抗体的诱导中发挥作用的抗原。

[0069] 在一些实施方案中,所提供的 VLP 含有来自病毒结构蛋白(例如 pp65)的一个或更多个表位,其是在细胞免疫应答(例如, T 细胞应答)的诱导中发挥作用的抗原。在一些实施方案中,所利用的病毒结构蛋白(例如 pp65)不仅刺激 T 辅助细胞(T_H)的形成而且还

诱导针对 HCMV 的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。

[0070] 在一些实施方案中,本发明提供了多种病毒包膜糖蛋白(例如 gB 和 / 或 gH)。在一些实施方案中,变体病毒包膜糖蛋白是或者包含融合蛋白。在一些实施方案中,病毒糖蛋白的变体包含异源蛋白结构域(例如,来自不同蛋白的跨膜和 / 或胞质结构域)。在一些实施方案中,病毒结构蛋白的变体包含异源抗原或表位。在一些实施方案中,本发明提供了包含病毒结构蛋白之变体的 VLP。在一些实施方案中,病毒结构蛋白的变体是或者包含融合蛋白。

[0071] I. 病毒样颗粒 (VLP)

[0072] 反转录病毒是包膜的 RNA 病毒,其属于反转录病毒科 (Retroviridae)。宿主细胞被反转录病毒感染后, RNA 经酶反转录酶转录为 DNA。然后 DNA 通过整合酶并入宿主细胞的基因组并且之后作为宿主细胞 DNA 的一部分复制。反转录病毒科包括以下属: α 反转录病毒属 (Alpharetrovirus)、 β 反转录病毒属 (Betaretrovirus)、 γ 反转录病毒属 (Gammaretrovirus)、 δ 反转录病毒属 (Deltaretrovirus)、 ϵ 反转录病毒属 (Epsilonretrovirus)、慢病毒属 (Lentivirus) 和泡沫病毒属 (Spumavirus)。反转录病毒科的宿主一般为脊椎动物。反转录病毒产生感染性病毒体,其含有被来自宿主细胞膜的脂质双层包围的球形核壳(与病毒结构蛋白复合的病毒基因组)。

[0073] 反转录病毒载体可用于产生包膜的病毒体,其是感染性的并且有复制能力或者复制缺陷的。有复制能力的感染性反转录病毒载体含有用于病毒体合成的所有必需基因并且一旦发生宿主细胞的感染后持续增殖自身。复制缺陷的感染性反转录病毒载体在初始感染后不传播。这通过用待转移的基因或核苷酸序列替换反转录病毒的大多数编码区完成;使得载体能够制造另外的复制循环所述的蛋白。

[0074] 或者或此外,反转录病毒载体可用于产生病毒样颗粒 (VLP),其缺乏来自反转录病毒的基因组并且是非感染性和非复制的。由于 VLP 有益的性质,VLP 可以用作抗原递送系统。此外,因为 VLP 是非感染性的,它们可作为免疫原性组合物(例如,疫苗)安全地施用。VLP 通常结构类似于上述的包膜的病毒体,但缺乏来自反转录病毒的基因组,使得病毒复制将不太可能发生。一些病毒(例如鼠白血病病毒,例如莫洛尼鼠白血病病毒 (MMLV)) 的衣壳蛋白(例如 Gag) 的表达导致自组装成类似于相应天然病毒的颗粒,该颗粒没有病毒遗传物质。

[0075] 已经制备了各种各样的 VLP。例如,已经制备了包含单种或多种衣壳蛋白,有或者没有包膜蛋白和 / 或表面糖蛋白的 VLP。在一些情况下,VLP 是非包膜的并且通过仅表达一种主要衣壳蛋白装配,如所示的从嗜肝 DNA 病毒(例如 Engerix™, GSK 和 Recombivax HB™, Merck)、乳头状瘤病毒(例如 Cervarix™, GSK 和 Gardasil™, Merck)、细小病毒 (parovirus) 或多瘤病毒制备的 VLP。在一些实施方案中,VLP 是包膜的并且可包含存在于相应的天然病毒中的多个抗原蛋白。VLP 通常类似于其对应的天然病毒并且可为多价的颗粒结构。在一些实施方案中,抗原蛋白可以存在于 VLP 内作为 VLP 结构的组分和 / 或在 VLP 的表面上。本发明涵盖了以下认识:与其他形式的抗原呈递(例如不与 VLP 缔合的可溶性抗原)相比,在 VLP 的情形中的抗原呈递有利于诱导针对该抗原的中和抗体。中和抗体大多数经常识别三级或四级结构,这经常需要以其天然病毒构象呈递抗原蛋白(如包膜糖蛋白)。或者或此外,VLP 可用于在诱导细胞免疫(例如 T 细胞应答)的情形下呈递抗原。

本发明还涵盖了这样的观点,在 VLP 系统中使用抗原组合可产生改进的免疫应答。

[0076] A. 结构蛋白

[0077] 在一些实施方案中,本发明利用由一种或更多种反转录病毒结构蛋白(例如 Gag)组成的 VLP。在一些实施方案中,根据本发明所使用的结构蛋白为 α 反转录病毒属(例如禽白血病病毒)、 β 反转录病毒属(小鼠乳腺癌病毒)、 γ 反转录病毒属(鼠白血病病毒)、 δ 反转录病毒属(牛白血病病毒)、 ϵ 反转录病毒属(大眼梭鲈皮肤肉瘤病毒, walley dermal sarcoma virus)、慢病毒属(人免疫缺陷病毒 1)和泡沫病毒属(黑猩猩泡沫病毒)结构蛋白。在某些实施方案中,结构蛋白为鼠白血病病毒(MLV)结构蛋白。这些反转录病毒的基因组在数据库中可容易地得到。所有这些反转录病毒的 Gag 基因具有整体上类似的结构并且在各个反转录病毒群中在氨基酸水平是保守的。反转录病毒 Gag 蛋白主要功能为病毒组装。多蛋白形式的 Gag 基因产生 VLP 的核心结构蛋白。MLV Gag 基因编码 65kDa 多蛋白前体,其在成熟的病毒体中由 MLV 蛋白酶蛋白水解切割为 4 个结构蛋白(基质(MA); p12; 衣壳(CA)和核壳(NC))。反转录病毒组装不成熟衣壳,其由从 Gag 多肽形成的 Gag 多蛋白组成但缺乏其他病毒元件(如病毒蛋白酶),Gag 作为该未成熟病毒颗粒的结构蛋白。功能上,Gag 多蛋白分为 3 个结构域:膜结合结构域,其将 Gag 多蛋白靶向细胞膜;相互作用结构域,其促进 Gag 聚合;以及晚期结构域,其利于新生病毒体从宿主细胞的释放。介导病毒颗粒组装的 Gag 蛋白之形式为多蛋白。

[0078] 在一些实施方案中,根据本发明使用的反转录病毒结构蛋白为 Gag 多肽。本文所用的术语“Gag 多肽”为来自反转录病毒的结构多肽,其负责本文所述的 VLP 的形成并且指其氨基酸序列包括 Gag 之至少一个特征序列的多肽序列。本领域和本领域普通技术人员已知来自多种反转录病毒的各种各样的 Gag 序列,参考这样的序列,可容易地鉴别一般 Gag 蛋白和/或特定 Gag 多肽的特征性序列。

[0079] 根据本发明使用的示例性 Gag 多肽如以下 SEQ ID NO:1 所示。在一些实施方案中,合适的 Gag 多肽与已知的反转录病毒 Gag 多肽基本同源。例如,Gag 多肽可以为经修饰的反转录病毒 Gag 多肽,其与野生型或天然存在的 Gag 多肽(例如 SEQ ID NO:1)相比含有一个或更多个氨基酸替代、缺失和/或插入,同时基本上保留自组装活性。因此,在一些实施方案中,适合用于本发明的 Gag 多肽基本上与 MMLV Gag 多肽(SEQ ID NO:1)同源。在一些实施方案中,适合用于本发明的 Gag 多肽具有与 SEQ ID NO:1 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,适合用于本发明的 Gag 多肽与 MMLV Gag 多肽(SEQ ID NO:1)基本同一。在一些实施方案中,适合用于本发明的 Gag 多肽具有与 SEQ ID NO:1 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0080] MMLV Gag 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)

[0081] MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDGTFN

[0082] RDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEALAFDPPPWWKPFVHPKPPPPLPPSAPSLPL

[0083] EPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDP PPPSDRDGNGG

[0084] EATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQYWPFSSSDLYNW

[0085] KNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEEKQRVLLLEARKAVRGD

[0086] DGRPTQLPNEVDAAFLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKV
[0087] KGITQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGRKLERLED
[0088] LKNKTLGDLVREAEIFNKRETPEREERIRRETEEKEERRRTEDEQKEKERDRRRHREM
[0089] SKLLATVVSQGKQDRQGGERRRSQLDRDQCAYCKEKHGWAKDCPKKPRGPRGPRPQT
[0090] SLLTLDD (SEQ ID NO :1)
[0091] MMLV Gag 核苷酸序列 (SEQ ID NO :2)
[0092] ATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAAGATGTC
[0093] GAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTACCTT
[0094] CTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAA
[0095] CCGAGACCTCATCACCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCATGGACA
[0096] CCCAGACCAGGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCC
[0097] CTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCTCCATCCGCCCCG
[0098] TCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCC
[0099] TCACTCCTTCTCTAGGCGCCAAACCTAAACCTCAAGTTCTTTCTGACAGTGGGGGGC
[0100] CGCTCATCGACCTACTTACAGAAGACCCCCCGCCTTATAGGGACCCAAGACCACCCC
[0101] CTTCCGACAGGGACGGAAATGGTGGAGAAGCGACCCCTGCGGGAGAGGCACCGGA
[0102] CCCCTCCCCAATGGCATCTCGCTACGTGGGAGACGGGAGCCCCCTGTGGCCGACTC
[0103] CACTACCTCGCAGGCATTCCCCCTCCGCGCAGGAGGAAACGGACAGCTTCAATACT
[0104] GGCCGTTCTCCTCTTCTGACCTTTACAACCTGGAAAAATAATAACCCTTCTTTTTCTGA
[0105] AGATCCAGGTAAACTGACAGCTCTGATCGAGTCTGTTCTCATCACCACATCAGCCCAC
[0106] CTGGGACGACTGTCAGCAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCGGAGAAGAAAAACAAC
[0107] GGGTGCTCTTAGAGGCTAGAAAGGCGGTGCGGGCGATGATGGGCGCCCCACTCAA
[0108] CTGCCCAATGAAGTCGATGCCGCTTTTCCCTCGAGCGCCAGACTGGGATTACACC
[0109] ACCCAGGCAGGTAGGAACCACCTAGTCCACTATCGCCAGTTGCTCCTAGCGGGTCTC
[0110] CAAAACGCGGGCAGAAGCCCCACCAATTTGGCCAAGGTAAAAAGGAATAACACAAG
[0111] GGCCCAATGAGTCTCCCTCGGCCTTCTAGAGAGACTTAAGGAAGCCTATCGCAGGT
[0112] ACACTCCTTATGACCCTGAGGACCCAGGGCAAGAACTAATGTGTCTATGTCTTTCA
[0113] TTTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGAGAAAGTTAGAGAGGTTAGAAGATTTAAAA
[0114] AACAAGACGCTTGAGATTTGGTTAGAGAGGCAGAAAAGATCTTTAATAAACGAGA
[0115] AACCCCGGAAGAAAGAGAGGAACGTATCAGGAGAGAAACAGAGGAAAAAGAAGA
[0116] ACGCCGTAGGACAGAGGATGAGCAGAAAGAGAAAGAAAGAGATCGTAGGAGACAT
[0117] AGAGAGATGAGCAAGCTATTGGCCACTGTCGTTAGTGGACAGAAACAGGATAGACA
[0118] GGGAGGAGAACGAAGGAGGTCCCAACTCGATCGCGACCAGTGTGCCTACTGCAAAAG
[0119] AAAAGGGGCACTGGGCTAAAGATTGTCCCAAGAAACACGAGGACCTCGGGGACC
[0120] AAGACCCAGACCTCCCTCCTGACCCTAGATGAC (SEQ ID NO :2)
[0121] 密码子优化的 MMLV Gag 核苷酸序列 (SEQ ID NO :3)
[0122] ATGGGACAGACAGTCACTACACCCCTGAGCCTGACACTGGGACATTGGAAAAGACGT
[0123] GGAGAGGATTGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTACCTT
[0124] TTTGCTCCGCCGAGTGGCCAACATTCAATGTGGGATGGCCCCGAGATGGCACCTTCA

[0125] ACCGGGACCTGATCACTCAGGTGAAGATCAAGGTCTTCTCTCCAGGACCCACGGCC
[0126] ATCCAGATCAGGTGCCCTACATCGTCACCTGGGAGGCTCTGGCATTGACCCCCCTC
[0127] CATGGGTGAAGCCTTTCGTCCACCCAAAACACCTCCACCACTGCCTCCATCTGCCC
[0128] CTAGTCTGCCACTGGAACCCCCCTCGGTCAACCCACCCAGAAGCTCCCTGTATCCCG
[0129] CACTGACACCTAGCCTGGGGGCCAAGCCTAAACCACAGGTGCTGTCTGATAGTGCC
[0130] GGGCCTCTGATCGATCTGCTGACCGAGGACCCCTCCACCATAACCGCGACCCACGACCT
[0131] CCACCAAGCGACCGGGACGGAACCGGAGGAGAGGCTACACCCGAGGCGAAGCCC
[0132] CCGATCCTAGTCCAATGGCATCAAGGCTGCGCGGGAGGCGGAACCTCCAGTGGCC
[0133] GACTCAACCACAAGCCAGGCATTTCCACTGAGGGCCGGGGGAAATGGACAGCTCCA
[0134] GTATTGGCCCTTCTCTAGTTCAGATCTGTACAACCTGGAAGAACAATAACCCTAGCTT
[0135] CAGCGAGGACCCAGGCAAACTGACCGCCCTGATCGAATCCGTGCTGATTACCCACC
[0136] AGCCCACATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCACCCTGCTGACCGGAGAGGAA
[0137] AAGCAGAGAGTGCTGCTGGAGGCTAGGAAAGCAGTCCGCGGGGACGATGGAAGGC
[0138] CAACACAGCTCCCCAATGAGGTGGATGCCGCTTTCCTCTGGAACGGCCAGATTGGG
[0139] ACTATACTACCCAGGCTGGACGCAACCACCTGGTGCAATTACCGGCAGCTCCTGCTGG
[0140] CTGGACTGCAGAATGCAGGGCGCAGCCCCACTAACCTGGCCAAGGTGAAAGGAATC
[0141] ACCCAGGGCCCCAATGAGTCCCTTCTGCATTCCCTGGAGCGGCTGAAGGAAGCCTAC
[0142] CGACGGTATACTCCCTACGATCCTGAGGACCCAGGCCAGGAAACCAACGTGAGTAT
[0143] GAGCTTCATCTGGCAGTCCGCTCCTGACATTGGCCGAAAACTGGAGCGGCTGGAAG
[0144] ATCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCAGAAAAGATCTTCAAC
[0145] AAAAGGGAGACTCCAGAGGAACGGGAGGAAAGAATTAGAAGGGAAACAGAGGAA
[0146] AAGGAGGAACGCCGACGGACTGAGGATGAACAGAAGGAGAAAAGAGACCGGC
[0147] GGCGGCACCGGGAGATGTCTAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGTGCCAGAAAACAG
[0148] GATCGACAGGGAGGAGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGATCGGGACCAGTGCGCCT
[0149] ATTGTAAGGAAAAAGGGCATTGGGCTAAGGACTGCCCCAAGAAACCCAGAGGCCCA
[0150] CGCGGGCCCCGACCTCAGACTTCCCTGCTGACCCTGGACGAT (SEQ ID NO :3)
[0151] 密码子优化的 MMLV Gag 核苷酸序列 (SEQ ID NO :21)
[0152] ATGGGACAGACCGTCACAACACCCCTGAGCCTGACCCTGGGACATTGGAAAGACGT
[0153] GGAGAGGATCGCACATAACCAGAGCGTGACGTGAAGAAACGGAGATGGGTCACA
[0154] TTCTGCAGTGCTGAGTGGCCAACTTTTAATGTGGGATGGCCCCGAGACGGCACTTTC
[0155] AACAGGGATCTGATCACCCAGGTGAAGATCAAGGTCTTTAGCCCAGGACCTCACGG
[0156] ACATCCAGACCAGGTGCCTTATATCGTCACCTGGGAGGCACTGGCCTTCGATCCCCC
[0157] TCCATGGGTGAAGCCATTTGTCCACCCAAAACACCTCCACCACTGCCTCCAAGTGC
[0158] CCCTTCACTGCCACTGGAACACCCCGGAGCACACCAACCCCGCAGCTCCCTGTATCC
[0159] TGCTCTGACTCCATCTCTGGGCGCAAAGCCAAAACACAGGTGCTGAGCGACTCCG
[0160] GAGGACCACTGATTGACCTGCTGACAGAGGACCCCCACCATACCGAGATCCTCGG
[0161] CCTCCACCAAGCGACCGGATGGAATGGAGGAGAGGCTACTCCTGCCGGCGAAGC
[0162] CCCTGACCCATCTCCAATGGCTAGTAGGCTGCGCGGACGGCGGAGCCTCCAGTGG
[0163] CAGATAGCACCATCCAGGCCTTCCCTCTGAGGGCTGGGGGAAATGGGCAGCTC

[0164] CAGTATTGGCCATTTTCTAGTTCAGACCTGTACAACCTGGAAGAACAATAACCCCTCT
[0165] TTCAGTGAGGACCCCGGCAAACTGACCGCCCTGATCGAATCCGTGCTGATTACCCAT
[0166] CAGCCCACATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCACCCTGCTGACCGGAGAGGA
[0167] AAAGCAGCGCTGCTGCTGGAGGCTCGCAAAGCAGTCCGAGGGGACGATGGACGG
[0168] CCCACACAGCTCCCTAATGAGGTGGACGCCGCTTTTCCACTGGAAAGACCCGACTGG
[0169] GATTATACTACCCAGGCAGGGAGAAACCACTGGTCCATTACAGGCAGCTCCTGCT
[0170] GGCAGGCCTGCAGAATGCCGGGAGATCCCCACCAACCTGGCCAAGGTGAAAGGCA
[0171] TCACACAGGGGCCTAATGAGTCACCAAGCGCCTTTCTGGAGAGGCTGAAGGAAGCT
[0172] TACCGACGGTATACCCCATACGACCCTGAGGACCCCGGACAGGAAACAAACGTCTC
[0173] CATGTCTTTTCATCTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGCGGAAGCTGGAGAGACTGGA
[0174] AGACCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGCGGGAGGCTGAAAAGATCTTCA
[0175] ACAAACGGGAGACCCCGAGGAAAGAGAGGAAAGGATTAGAAGGGAAACTGAGGA
[0176] AAAGGAGGAACGCCGACGGACCGAGGACGAACAGAAGGAGAAAGAACGAGATCG
[0177] GCGGCGGCACCGGGAGATGTCAAAGCTGCTGGCCACCGTGGTCAGCGGACAGAAAC
[0178] AGGACAGACAGGGAGGAGAGCGACGGAGAAGCCAGCTCGACAGGGATCAGTGCGC
[0179] ATACTGTAAGGAAAAAGGCCATTGGGCCAAGGATTGCCCCAAAAAGCCAAGAGGAC
[0180] CAAGAGGACCAAGACCACAGACATCACTGCTGACCCTGGACGAC (SEQ ID NO :21)

[0181] 通常自然情况下, Gag 蛋白包含大 C 端延伸,其可以含有反转录病毒蛋白酶、反转录酶和整合酶酶促活性。然而,VLP 的组装通常不需要这样的组分存在。在一些情况下,反转录病毒 Gag 蛋白可单独(例如,缺乏 C 端延伸,缺乏一种或更多种基因组 RNA、反转录酶、病毒蛋白酶或包膜蛋白)自组装以形成 VLP,无论在体外还是在体内(Sharma S 等,1997Proc. Natl. Acad. Sci. USA94 :10803-8)。反转录病毒 Gag 多蛋白可单独低聚并组装成 VLP。

[0182] 在一些实施方案中,根据本发明使用的 Gag 多肽缺乏 C 端延伸和 / 或含有经修饰的 C 端延伸。Gag 多肽可以任选地包含一个或更多个另外的多肽(例如,异源抗原)。在一些实施方案中, Gag 多肽与异源抗原共表达(例如在独立的启动子下和 / 或作为独立的蛋白)。在一些实施方案中,Gag 多肽表达为具有异源抗原的融合蛋白。Gag 多肽可连接至异源抗原以产生不改变 Gag 功能的融合蛋白。例如,可将异源抗原的编码序列剪接成 Gag 多肽编码序列,例如在 Gag 多肽编码序列的 3' 端。在一些实施方案中,可将异源抗原的编码序列框内(in frame)剪接成 Gag 多肽编码序列。在一些实施方案中,Gag 多肽编码序列和异源抗原可以由单个启动子表达。在一些实施方案中,在 Gag 多肽的 C 端插入(例如融合到)异源抗原。不希望受任何理论的限制,认为自组装的 Gag 多肽与异源抗原的融合产生了融合蛋白,其充当未修改的 Gag 并且因此将允许所述抗原并入到所产生的 VLP 之结构组分中。在一些实施方案中,VLP 结构组分充当有效的免疫原(例如用于诱导细胞免疫应答)。例如,所提供的 VLP 可以包括反转录病毒 Gag 多肽(例如 MMLV Gag)和 HCMV 的结构组分(例如 pp65)。在一些这样的实施方案中,pp65 并入到 VLP 中并且充当用于引发针对 HCMV 之免疫应答的抗原。

[0183] 根据本发明所用的示例性 Gag-pp65 融合多肽如以下 SEQ ID NO :4 所示。在一些实施方案中,合适的 Gag 多肽融合蛋白包含与已知的反转录病毒 Gag 多肽基本同源的 Gag 多肽之全部或部分,和与已知的 pp65 多肽基本同源的 pp65 多肽之全部或部分。例如,与野生

型或天然存在的 Gag 多肽和 / 或 pp65 多肽相比, Gag-pp65 多肽融合蛋白可以含有一个或更多个氨基酸替代、缺失和 / 或插入, 同时保留基本的自组装活性。因此, 在一些实施方案中, 适合用于本发明的 Gag-pp65 多肽融合蛋白与 SEQ ID NO :4 基本同源。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 Gag-pp65 多肽融合蛋白具有与 SEQ ID NO :4 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 Gag-pp65 多肽融合蛋白与 SEQ ID NO :4 基本同一。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 Gag-pp65 多肽融合蛋白具有与 SEQ ID NO :4 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。

[0184] MLLV Gag-CMV pp65 氨基酸序列 (SEQ ID NO :4)

[0185] MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSVDVKRRWVTFCSAEWPTFNVGWPRDG
[0186] TFNRDLITQVKIKVFSPGPHGPDQVPYIVTWEALAFDPPPWKPFVHPKPPPPLPP
[0187] SAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTPSLGAKPKQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPPYRDRP
[0188] PPSDRDNGGEATPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGNGQLQ
[0189] YWPFSSSDLYNWKNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQLLGTLLTGEE
[0190] KQRVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQL
[0191] LLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGPNESSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETN
[0192] VSMSFIWQSAPDIGRKLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETE
[0193] EKEERRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRSQLDRDQ
[0194] CAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRPQTSLTLDDCESRGRRCPEMISVLGPISGHV
[0195] LKAVFSRGDTPVLPHETRLQLTGTHVRVSQPSLILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYF
[0196] TGSEVENVS NVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPSINVHHYPSAAERKHRHL
[0197] PVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQWKEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHV
[0198] VCAHELVCSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCEDVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLT
[0199] MTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIKPGKISHIMLDVAFTSHEHFGLCPKSIPGLSIS
[0200] GNLLMNGQQIFLEVQAI RETVELRQYDPVAALFFFDIDL LLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQ
[0201] GKLEYRHTWDRHDEGAAQGGDDVWTS GSDSDEELVTTERKTPRVTGGGAMAGASTSA
[0202] GRKRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEEDTDESDNEIHNPAVFTWPPWQAGI
[0203] LARNLVPMVATVQGQNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAQPKRRRRHRQDALP
[0204] GPCIASTPKKHRG* (SEQ ID NO :4) (MLLV 氨基酸序列加粗)

[0205] MLLV Gag-CMV pp65 核苷酸序列 (SEQ ID NO :5)

[0206] ATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCAGTGGAAAGAT
[0207] GTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGT
[0208] TACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACG
[0209] GCACCTTTAACCAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTG
[0210] GCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTG
[0211] GCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCTAAGCCTCCGCCCT
[0212] CCTCTTCCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCCG
[0213] CCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCAAACCTAAA

[0214] CCTCAAGTTCTTTCTGACAGTGGGGGGCCGCTCATCGACCTACTTACAGAAGA
[0215] CCCCCCGCTTATAGGGACCCAAGACCACCCCTTCCGACAGGGACGGAAATG
[0216] GTGGAGAAGCGACCCCTGCGGGAGAGGCACCGGACCCCTCCCCAATGGCATCT
[0217] CGCCTACGTGGGAGACGGGAGCCCCCTGTGGCCGACTCCACTACCTCGCAGGC
[0218] ATTCCCCCTCCGCGCAGGAGGAAACGGACAGCTTCAATACTGGCCGTTCTCCT
[0219] CTTCTGACCTTTACAACCTGAAAAATAATAACCCCTTCTTTTTCTGAAGATCCAG
[0220] GTAAACTGACAGCTCTGATCGAGTCTGTTCTCATCACCACATCAGCCACCTGGG
[0221] ACGACTGTCAGCAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCGGAGAAGAAAAACAACGG
[0222] GTGCTCTTAGAGGCTAGAAAGGCGGTGCGGGGCGATGATGGGCGCCCCACTCA
[0223] ACTGCCCAATGAAGTCGATGCCGCTTTTCCCCTCGAGCGCCAGACTGGGATT
[0224] ACACCACCCAGGCAGGTAGGAACCACCTAGTCCACTATCGCCAGTTGCTCCTA
[0225] GCGGGTCTCCAAAACGCGGGCAGAAGCCCCACCAATTTGGCCAAGGTAAAAGG
[0226] AATAACACAAGGGCCCAATGAGTCTCCCTCGGCCTTCCTAGAGAGACTTAAGG
[0227] AAGCCTATCGCAGGTACACTCCTTATGACCCTGAGGACCCAGGGCAAGAACT
[0228] AATGTGTCTATGTCTTTTCATTTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGAGAAAGTTA
[0229] GAGAGGTTAGAAGATTTAAAAACAAGACGCTTGGAGATTTGGTTAGAGAGGC
[0230] AGAAAAGATCTTTAATAAACGAGAAACCCCGGAAGAAAGAGAGGAACGTATCA
[0231] GGAGAGAAACAGAGGAAAAAGAAGAACGCGTAGGACAGAGGATGAGCAGAA
[0232] AGAGAAAGAAAGAGATCGTAGGAGACATAGAGAGATGAGCAAGCTATTGGCCA
[0233] CTGTCGTTAGTGGACAGAAACAGGATAGACAGGGAGGAGAACGAAGGAGGTC
[0234] CCAACTCGATCGCGACCAAGTGTGCTACTGCAAAGAAAAGGGGCACTGGGCTA
[0235] AAGATTGTCCCAAGAAACACGAGGACCTCGGGGACCAAGACCCACAGACCTCC
[0236] CTCCTGACCCTAGATGACTGTGAGTCGCGCGGTGCGCGTTGTCCCGAAATGATATC
[0237] CGTACTGGGTCCCATTTTCGGGGCACGTGCTGAAAGCCGTGTTTAGTCGCGGCGACAC
[0238] GCCGGTGCTGCCGCACGAGACGCGACTCCTGCAGACGGGTATCCACGTGCGCGTGA
[0239] GCCAGCCCTCGCTGATCCTGGTGTCGAGTACACGCCCAGCTCGACGCCATGCCACC
[0240] GCGGCGACAATCAGCTGCAGGTGCAGCACACGTACTTTACGGGCAGCGAGGTGGAG
[0241] AACGTGTGCGTCAACGTGCACAACCCACGCGGCGGAGCATCTGCCCCAGCCAAGA
[0242] GCCCATGTGATCTATGTGTACGCGCTGCCGCTCAAGATGCTGAACATCCCCAGCAT
[0243] CAACGTGCACCACTACCCGTGCGGCGGCGAGCGCAAAACACCGACACCTGCCCCGTAG
[0244] CTGACGCTGTGATTACGCGTCGGGCAAGCAGATGTGGCAGGCGGTCTCACGGTCT
[0245] CGGGACTGGCCTGGACGCGTCAGCAGAACCAGTGGAAAGAGCCCGACGTCTACTAC
[0246] ACGTCAGCGTTCTGTTTTCCACCAAGGACGTGGCACTGCGGCACGTGGTGTGCGCG
[0247] CACGAGCTGGTTTGCTCCATGGAGAACACGCGCGCAACCAAGATGCAGGTGATAGG
[0248] TGACCAGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGTCTTCTGCGAGGACGTGCCCTCCGGCAA
[0249] GCTCTTTATGCACGTACGCTGGGCTCTGACGTGGAAGAGGACCTGACGATGACCCG
[0250] CAACCCGCAACCCCTTCATGCGCCCCACGAGCGCAACGGCTTTACGGTGTGTGTCC
[0251] CAAAAATATGATAATCAAACCGGGCAAGATCTCGCACATCATGCTGGATGTGGCTTT
[0252] TACCTCACACGAGCATTTTGGGCTGCTGTGTCCCAAGAGCATCCCGGGCCTGAGCAT

[0253] CTCAGGTAACCTATTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAGGTGCAAGCGATAC
[0254] GCGAGACCGTGGAAGTGCCTCAGTACGATCCCGTGGCTGCGCTCTTCTTTTCGATA
[0255] TCGACTTGCTGCTGCAGCGCGGGCTCAGTACAGCGAACACCCACCTTCACCAGCC
[0256] AGTATCGCATCCAGGGCAAGCTTGAGTACCGACACACCTGGGACCGGCACGACGAG
[0257] GGTGCCGCCCAGGGCGACGACGACGTCTGGACCAGCGGATCGGACTCCGACGAGGA
[0258] ACTCGTAACCAACGAGCGCAAGACGCCCCGCTTACCGGCGGCGGCGCCATGGCGG
[0259] GCGCCTCCACTTCCGCGGGCCGCAAAACGAAAATCAGCATCCTCGGCGACGGCGTGC
[0260] ACGGCGGGCGTTATGACACGCGGCGCCCTTAAGGCCGAGTCCACCGTCGCGCCCGA
[0261] AGAGGACACCGACGAGGATTCCGACAACGAAAATCCACAATCCGGCCGTGTTACCT
[0262] GGCCGCCCTGGCAGGCCGGCATCCTGGCCCGCAACCTGGTGCCCATGGTGGCTACG
[0263] GTTCAGGGTCAGAATCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACGCCAACGACATCTAC
[0264] CGCATCTTCGCCGAATTGGAAGGCGTATGGCAGCCCGCTGCGCAACCCAAACGTCG
[0265] CCGCCACCGCAAGACGCCTTGCCCGGGCCATGCATCGCCTCGACGCCCAAAAAGC
[0266] ACCGAGGTAG (SEQ ID NO :5) (MMLV Gag 核苷酸序列加粗)
[0267] 密码子优化的 MMLV Gag-CMV pp65 核苷酸序列 (SEQ ID NO :6)
[0268] ATGGGACAGACAGTCACTACACCCCTGAGCCTGACACTGGGACATTGGAAAGA
[0269] CGTGAGAGGATTGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGG
[0270] GTCACCTTTTGCTCCGCCGAGTGGCCAACATTCAATGTGGGATGGCCCCGAGA
[0271] TGGCACCTTCAACCGGGACCTGATCACTCAGGTGAAGATCAAGGTCTTCTCTCC
[0272] AGGACCCACGGCCATCCAGATCAGGTGCCCTACATCGTCACCTGGGAGGCTC
[0273] TGGCATTGTGACCCCCCTCCATGGGTGAAGCCTTTCGTCCACCCAAAACACCTC
[0274] CACCACTGCCTCCATCTGCCCCCTAGTCTGCCACTGGAACCCCTCGGTCAACCC
[0275] CACCCAGAAGCTCCCTGTATCCCGCACTGACACCTAGCCTGGGGGCCAAGCCT
[0276] AAACCACAGGTGCTGTCTGATAGTGGCGGGCCTCTGATCGATCTGCTGACCGA
[0277] GGACCTCCACCATAACCGGACCCACGACCTCCACCAAGCGACCGGGACGGAA
[0278] ACGGAGGAGAGGCTACACCCGAGGCGAAGCCCCGATCCTAGTCCAATGGCA
[0279] TCAAGGTGCGCGGGAGGCGCAACCTCCAGTGGCCGACTCAACCACAAGCCA
[0280] GGCATTTCCACTGAGGGCCGGGGGAAATGGACAGCTCCAGTATTGGCCCTTCT
[0281] CTAGTTCAGATCTGTACAACCTGGAAGAACAATAACCTAGCTTCAGCGAGGAC
[0282] CCAGGCAAACTGACCGCCCTGATCGAATCCGTGCTGATTACCCACCAGCCCAC
[0283] ATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCACCCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGC
[0284] AGAGAGTGCTGCTGGAGGCTAGGAAAGCAGTCCGCGGGGACGATGGAAGGCC
[0285] AACACAGCTCCCCAATGAGGTGGATGCCGCTTTCCTCTGGAACGGCCAGATT
[0286] GGGACTATACTACCCAGGCTGGACGCAACCACCTGGTGCATTACCGGCAGCTC
[0287] CTGCTGGCTGGACTGCAGAATGCAGGGCGCAGCCCCACTAACCTGGCCAAGGT
[0288] GAAAGGAATCACCCAGGGCCCCAATGAGTCCCCTTCTGCATTCTGGAGCGGC
[0289] TGAAGGAAGCCTACCGACGGTATACTCCCTACGATCCTGAGGACCCAGGCCAG
[0290] GAAACCAACGTGAGTATGAGCTTCATCTGGCAGTCCGCTCCTGACATTGGCCG
[0291] AAAACTGGAGCGGCTGGAAGATCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTGC

[0292] GGGAGGCAGAAAAGATCTTCAACAAAAGGGAGACTCCAGAGGAACGGGAGGA
[0293] AAGAATTAGAAGGGAAAACAGAGGAAAAGGAGGAACGCCGACGGACTGAGGAT
[0294] GAACAGAAGGAGAAAAGAAAGAGACCGGCGGCGGCACCGGGAGATGTCTAAGC
[0295] TGCTGGCCACCGTGGTCAGTGGCCAGAAAACAGGATCGACAGGGAGGAGAGCG
[0296] ACGGAGAAGCCAGCTCGATCGGGACCAGTGCGCCTATTGTAAGGAAAAAGGGC
[0297] ATTGGGCTAAGGACTGCCCCAAGAAAACCCAGAGGCCACGCGGGCCCCGACCT
[0298] CAGACTTCCCTGCTGACCCTGGACGATTGCGAGAGCCGGGGCCGGCGGTGCCCCA
[0299] GAAATGATCTCTGTGCTGGGGCCATTAGTGACATGTGCTGAAGGCCGTCTTCTCC
[0300] AGGGGAGACACCCCCGTGCTGCCTCACGAGACTCGACTGCTGCAGACCGGCATCCA
[0301] TGTGCGGGTCTCCCAGCCCTCTCTGATTCTGGTGTACAGTATACACCAGATAGCAC
[0302] TCCCTGCCACAGAGGAGACAATCAGCTCCAGGTGCAGCATACCTACTTTACAGGCTC
[0303] CGAGGTGCAAAACGTGTCTGTCAATGTGCACAACCCTACCGGCAGGAGCATCTGTC
[0304] CTAGCCAGGAGCCAATGAGCATCTACGTGTACGCCCTGCCTCTGAAGATGCTGAATA
[0305] TCCCATCAATTAACGTCCACCATTACCCTAGCGCAGCCGAACGGAAGCACAGACAT
[0306] CTGCCAGTGGCCGACGCTGTCATCCATGCCAGCGGCAAAACAGATGTGGCAGGCAAG
[0307] ACTGACCGTGTCCGGGTGGCCTGGACAAGGCAGCAGAATCAGTGAAGGAGCCCCG
[0308] ACGTGTACTATACCAGCGCCTTCGTGTTCCCTACCAAAGACGTGGCCCTGAGACATG
[0309] TGGTGTGCGCACATGAGCTGGTGTGCAGCATGGAAAAACACTAGGGCCACCAAGATG
[0310] CAGGTCATCGGCGATCAGTATGTCAAAGTGTACCTGGAGAGTTTTTGCGAAGACGTG
[0311] CCATCAGGGAAGCTGTTTCATGCATGTGACCCTGGGCAGCGATGTGAGGAAGACCT
[0312] GACCATGACAAGAAATCCACAGCCCTTTATGAGACCCACGAGAGGAATGGGTTCA
[0313] CTGTGCTGTGCCCCAAGAACATGATCATTAAGCCTGGAAAAATCAGTCATATTATGC
[0314] TGGATGTGGCCTTTACATCACACGAGCATTTTCGGACTGCTGTGCCCCAAATCCATCC
[0315] CTGGACTGAGCATTTCCGGCAATCTGCTGATGAACGGCCAGCAGATCTTCTTGGGAAG
[0316] TGCAGGCCATCCGGGAGACCGTGAAGTGCAGCAGTATGACCCAGTGGCTGCACTG
[0317] TTCTTTTTTCGACATCGACCTGCTGCTGCAGCGAGGACCACAGTACAGCGAGCACCCCT
[0318] ACTTTTACCTCCCAGTATCGGATTTCAGGGGAAGCTGGAGTACAGGCACACCTGGGAT
[0319] CGCCATGACGAAGGAGCCGCTCAGGGGGACGATGACGTGTGGACATCTGGCAGTGA
[0320] TTCAGACGAGGAAGTGGTGACAAGTGCAGCGAAAAACCCCCGGGTGACAGGAGGA
[0321] GGGGCAATGGCAGGGGCCAGCACCAGCGCAGGGCGGAAGCGAAAAAGCGCCAGCA
[0322] GCGCCACAGCATGTACCGCCGGCGTGATGACTAGAGGAAGGCTGAAGGCCGAGTCT
[0323] ACAGTCGCTCCCGAGGAAGATACTGACGAGGATAGTGACAATGAAATCCACAACCC
[0324] CGCCGTGTTACCTGGCCACCTTGGCAGGCAGGGATTCTGGCTCGCAACCTGGTCCC
[0325] CATGGTGGCAACCGTCCAGGGACAGAATCTGAAGTATCAGGAGTTTTTCTGGGATGC
[0326] TAACGACATCTACCGGATTTTTGCAGAGCTGGAAGGCGTGTGGCAGCCAGCAGCCC
[0327] AGCCCCAACGACGGAGACATCGACAGGACGCTCTGCCAGGACCTTGTATCGCCAGC
[0328] ACACCAAAGAAGCACAGGGGCTAA (SEQ ID NO :6) (MMLV Gag 核苷酸序列加粗)
[0329] 密码子优化的 MMLV Gag-CMV pp65 核苷酸序列 (SEQ ID NO :22)
[0330] ATGGGACAGACCGTCACAACACCCCTGAGCCTGACCCTGGGACATTGGAAAAGA

[0331] CGTGGAGAGGATCGCACATAACCAGAGCGTGGACGTGAAGAAACGGAGATGG
[0332] GTCACATTCTGCAGTGCTGAGTGGCCAACTTTTAATGTGGGATGGCCCCGAGA
[0333] CGGCACTTTCAACAGGGATCTGATCAGGAGGTGAAGATCAAGGTCTTTAGCC
[0334] CAGGACCTCACGGACATCCAGACCAGGTGCCTTATATCGTCACCTGGGAGGCA
[0335] CTGGCCTTCGATCCCCCTCCATGGGTGAAGCCATTTGTCCACCCAAAACACCT
[0336] CCACCACTGCCTCCAAGTGCCCTTCACTGCCACTGGAACCACCCCGGAGCAC
[0337] ACCACCCCGCAGCTCCCTGTATCCTGCTCTGACTCCATCTCTGGGCGCAAAGCC
[0338] AAAACCACAGGTGCTGAGCGACTCCGGAGGACCACTGATTGACCTGCTGACAG
[0339] AGGACCCCCACCATAACGAGATCCTCGGCCTCCACCAAGCGACCGCGATGGA
[0340] AATGGAGGAGAGGCTACTCCTGCCGGCGAAGCCCCTGACCCATCTCCAATGGC
[0341] TAGTAGGCTGCGCGGCAGGCGGAGCCTCCAGTGGCAGATAGCACCACATCCC
[0342] AGGCCTTCCCTCTGAGGGCTGGGGGAAATGGGCAGCTCCAGTATTGGCCATTT
[0343] TCTAGTTCAGACCTGTACAACCTGGAAGAACAATAACCCCTCTTTCAGTGAGGAC
[0344] CCGGGCAAACCTGACCGCCCTGATCGAATCCGTGCTGATTACCCATCAGCCCAC
[0345] ATGGGACGATTGTCAGCAGCTCCTGGGCACCCTGCTGACCGGAGAGGAAAAGC
[0346] AGCGCGTGCTGCTGGAGGCTCGCAAAGCAGTCCGAGGGGACGATGGACGGCC
[0347] CACACAGCTCCCTAATGAGGTGGACGCGCTTTTCCACTGGAAGACCCGACT
[0348] GGGATTATACTACCCAGGCAGGGAGAAACCACTGGTCCATTACAGGCAGCTC
[0349] CTGCTGGCAGGCCTGCAGAATGCCGGGAGATCCCCACCAACCTGGCCAAGGT
[0350] GAAAGGCATCACACAGGGGCCTAATGAGTCACCAAGCGCCTTTCTGGAGAGGC
[0351] TGAAGGAAGCTTACCGACGGTATACCCATACGACCCTGAGGACCCCGGACAG
[0352] GAAACAAACGTCTCCATGTCTTTTCATCTGGCAGTCTGCCCCAGACATTGGGGCG
[0353] GAAGCTGGAGAGACTGGAAGACCTGAAGAACAAGACCCTGGGCGACCTGGTG
[0354] CGGGAGGCTGAAAAGATCTTCAACAAACGGGAGACCCCGAGGAAAGAGAGG
[0355] AAAGGATTAGAAGGGAAACTGAGGAAAAGGAGGAACGCCGACGGACCGAGGA
[0356] CGAACAGAAGGAGAAAGAACGAGATCGGCGGCGGCACCGGGAGATGTCAAAG
[0357] CTGCTGGCCACCGTGGTCAGCGGACAGAAACAGGACAGACAGGGAGGAGAGC
[0358] GACGGAGAAGCCAGCTCGACAGGGATCAGTGCGCATACTGTAAGGAAAAAGGC
[0359] CATTGGGCCAAGGATTGCCCCAAAAGCCAAGAGGACCAAGAGGACCAAGACC
[0360] ACAGACATCACTGCTGACCCTGGACGACTGCGAGAGCCGGGGCCGGCGGTGCCC
[0361] AGAAATGATCTCTGTGCTGGGGCCCATAGTGGACATGTGCTGAAGGCCGTCTTCTC
[0362] CAGGGGAGACACCCCGTGCTGCCTCACGAGACTCGACTGCTGCAGACCGGCATCC
[0363] ATGTGCGGGTCTCCAGCCCTCTCTGATTCTGGTGTACAGTATACACCAGATAGCA
[0364] CTCCCTGCCACAGAGGAGACAATCAGCTCCAGGTGCAGCATACCTACTTTACAGGCT
[0365] CCGAGGTGCAAAACGTGTCTGTCAATGTGCACAACCTACCGGCAGGAGCATCTGT
[0366] CCTAGCCAGGAGCCAATGAGCATCTACGTGTACGCCCTGCCTCTGAAGATGCTGAAT
[0367] ATCCCATCAATTAACGTCCACCATTAACCTAGCGCAGCCGAACGGAAGCACAGACA
[0368] TCTGCCAGTGGCCGACGCTGTATCCATGCCAGCGGCAACAGATGTGGCAGGCAA
[0369] GACTGACCGTGTCCGGGCTGGCCTGGACAAGGCAGCAGAATCAGTGAAGGAGCCC

[0370] GACGTGTACTATACCAGCGCCTTCGTGTTCCCTACCAAAGACGTGGCCCTGAGACAT
[0371] GTGGTGTGCGCACATGAGCTGGTGTGCAGCATGGAAAACTAGGGCCACCAAGAT
[0372] GCAGGTCATCGGCGATCAGTATGTCAAAGGTACCTGGAGAGTTTTTGCGAAGACGT
[0373] GCCATCAGGGAAGCTGTTTCATGCATGTGACCCTGGGCAGCGATGTCGAGGAAGACC
[0374] TGACCATGACAAGAAATCCACAGCCCTTTATGAGACCCACGAGAGGAATGGGTTC
[0375] ACTGTGCTGTGCCCCAAGAACATGATCATTAAAGCCTGGAAAAATCAGTCATATTATG
[0376] CTGGATGTGGCCTTTACATCACACGAGCATTTCGGACTGCTGTGCCCCAAATCCATC
[0377] CCTGGACTGAGCATTTCCGGCAATCTGCTGATGAACGGCCAGCAGATCTTCCTGGAA
[0378] GTGCAGGCCATCCGGGAGACCGTCGAACTGCGACAGTATGACCCAGTGGCTGCACT
[0379] GTTCTTTTTTCGACATCGACCTGCTGCTGCAGCGAGGACCACAGTACAGCGAGCACCC
[0380] TACTTTTACCTCCCAGTATCGGATTCAGGGGAAGCTGGAGTACAGGCACACCTGGGA
[0381] TCGCCATGACGAAGGAGCCGCTCAGGGGGACGATGACGTGTGGACATCTGGCAGTG
[0382] ATTCAGACGAGGAAGTGGTGACAACTGAGCGAAAAACCCCCGGGTGACAGGAGG
[0383] AGGGGCAATGGCAGGGGCCAGCACCAGCGCAGGGCGGAAGCGAAAAAGCGCCAGC
[0384] AGCGCCACAGCATGTACCGCCGGCGTGATGACTAGAGGAAGGCTGAAGGCCGAGTC
[0385] TACAGTCGCTCCCGAGGAAGATACTGACGAGGATAGTGACAATGAAATCCACAACC
[0386] CCGCCGTGTTACCTGGCCACCTTGGCAGGCAGGGATTCTGGCTCGCAACCTGGTCC
[0387] CCATGGTGGCAACCGTCCAGGGACAGAATCTGAAGTATCAGGAGTTTTTCTGGGATG
[0388] CTAACGACATCTACCGATTTTTTGACAGAGCTGGAAGGCGTGTCGACGCCAGCAGCC
[0389] CAGCCCAAACGACGGAGACATCGACAGGACGCTCTGCCAGGACCTTGTATCGCCAG
[0390] CACACCAAAGAAGCACAGGGGCTAA (SEQ ID NO :22) (MMLV Gag 核苷酸序列加粗)

[0391] 在一些实施方案中,本发明提供了核酸,其编码 Gag 多肽或 Gag 多肽的特征部分。在某些实施方案中,核酸可为 DNA 或 RNA,并且可为单链或双链。在一些实施方案中,本发明的核酸可包含一种或更多种非天然的核苷酸;在另一些实施方案中,本发明的核酸仅包含天然核苷酸。

[0392] B. 包膜蛋白

[0393] 在一些实施方案中,本发明使用由来自 HCMV 的一种或更多种包膜多肽(例如 gB 和 / 或 gH) 组成的 VLP。本文所用的术语“包膜多肽”指其氨基酸序列包含包膜糖蛋白的至少一个特征序列的多肽序列。本领域和本领域技术人员已知来自多种病毒(包括但不限于 HCMV) 的各种各样的包膜糖蛋白序列,参考这样的序列,可容易地鉴别一般包膜糖蛋白和 / 或特定包膜糖蛋白的特征性序列。在一些实施方案中,包膜多肽包含胞质、跨膜和 / 或胞外部分或结构域。

[0394] 在一些实施方案中,来自 HCMV 的包膜多肽包含不天然地存在于 HCMV 蛋白中的跨膜和胞质结构域。例如,在一些实施方案中,来自 HCMV 的包膜多肽包含来自另一个 HCMV 蛋白(例如 gB 或 gH) 的跨膜和胞质结构域。在一些实施方案中,来自 HCMV 的包膜多肽包含天然地存在于水泡性口炎病毒(VSV) 中的跨膜结构域和胞质结构域。本领域已知,多肽有时具有跨膜、胞质和 / 或胞外结构域。一般而言,本文所用的“跨膜结构域”指具有存在于膜中(例如跨越细胞膜的一部分或全部)的性质的结构域。应当理解,不需要跨膜结构域中的每个氨基酸都存在于膜中。例如,在一些实施方案中,跨膜结构域的特征在于蛋白

的指定延伸或部分定位于膜中。本领域中公知,可以使用多种算法分析氨基酸或核酸序列以预测蛋白亚细胞定位(例如跨膜定位)。示例性的这样的程序包括 psort (PSORT.org)、Prosites (prosites.expasy.org) 等等。一般而言,本文所用的“胞质结构域”指具有存在于胞质中的性质的结构域。应当理解,不需要胞质结构中的每一个氨基酸都存在于胞质中。例如,在一些实施方案中,胞质结构域的特征在于蛋白的指定延伸或部分基本上位于胞质中。本领域中公知,可以使用多种算法分析氨基酸或核酸序列以预测蛋白亚细胞定位(例如胞质定位)。示例性的这样的程序包括 psort (PSORT.org)、Prosites (prosites.expasy.org) 等等。

[0395] VSV-G 的跨膜结构域的功能为将病毒糖蛋白靶向细胞膜 (Compton T 等,1989Proc Natl Acad Sci USA86:4112-4116)。将 VSV-G 的跨膜和胞质结构域与另一个蛋白的跨膜和胞质结构域交换已经用于将蛋白导向细胞膜,当天然的蛋白质不天然的发生这一情况或者需要辅助共表达的蛋白以完成这一情况时 (Garrone P 等,2011Sci Transl Med94:)。

[0396] 除了其他方面以外,本发明涵盖以下认识:包含病毒(例如 MLV)之结构组分和一个或多个异源表面抗原(例如包膜蛋白)的 VLP 对于抗原递送和诱发针对异源抗原的免疫应答特别有效。

[0397] C. 异源抗原

[0398] 由于中和抗体通常能够预防感染, HCMV 的包膜蛋白(例如糖蛋白 gB 和 gH) 是用于产生针对 HCMV 之中和抗体的重要靶标。已经开发了用于 HCMV 感染的治疗(例如 gB 亚单位疫苗)并且在试验动物和临床研究中测试。然而,来自这样的研究的结果已经证明了在人中,抗体应答不是终生的并且不足以在所有情况下有效地治疗 HCMV。对于仅基于 HCMV 之 gB 的亚单位疫苗的受限效果,已经提出了原因,依次是免疫应答中毒株特异性变化、细胞免疫应答的不充分诱导、和所用抗原的结构限制,所述抗原的表位被认为是构象依赖的。本发明人认识到,开发包含在 VLP 表面上以其天然构象存在之一种或更多种包膜多肽抗原的 HCMV 疫苗导致中和抗体的诱导(例如,经体液免疫应答),并且开发包含一种或更多种结构蛋白抗原(例如被膜蛋白 pp65)的 HCMV 疫苗导致辅助 T 细胞(T_H 淋巴细胞)和细胞毒性 T 细胞 (CTL) 的诱导(例如经细胞介导的免疫应答)。中和抗体通常针对病毒包膜蛋白形成,并且特别地针对 HCMV 糖蛋白 gB 和 gH。 T_H 细胞被病毒的被膜结构蛋白(例如 HCMV pp65(ppUL83)) 刺激。此外, pp65 在针对 HCMV 的 CTL 应答的诱导中发挥重要作用。

[0399] 应当理解,所提供的 VLP 可以包含任何异源的抗原,包括来自 HCMV 的异源抗原。例如,在一些实施方案中,根据本发明的 VLP 包含一种或更多种 HCMV 包膜多肽。在一些实施方案中,根据本发明的 VLP 包含一种或更多种 HCMV 结构多肽。在一些实施方案中,根据本发明的 VLP 包含一种或更多种 HCMV 包膜多肽和一种或更多种 HCMV 结构多肽。以下提供了示例性而非限制性的 HCMV 抗原列表。

[0400] gB-糖蛋白复合物 (gC) I

[0401] 表征得最完全的 HCMV 的糖蛋白复合物是 gB 复合物 (gB ;UL55)。已经证明来自 CMV 血清反应阳性之个体的血清含有对 gB 的抗体,并且在康复期血清中,中和抗体应答的至多 70% 为是 gB 特异性的 (Marshall GS 等,1994J Med Virol143:77-83)。

[0402] 示例性的 HCMVgB 多肽氨基酸和核酸序列分别如以下 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示。在一些实施方案中,合适的 gB 多肽与已知的 HCMV gB 多肽基本同源。例如, gB 多肽

可以为经修饰的HCMV gB多肽,其与野生型或天然存在的gB多肽(例如SEQ ID NO:7)相比含有一个或更多个氨基酸替换、缺失和/或插入。因此,在一些实施方案中,适合用于本发明的gB多肽与HCMV gB多肽(SEQ ID NO:7)基本同源。在一些实施方案中,适合用于本发明的HCMV多肽具有与SEQ ID NO:7有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,适合用于本发明的gB多肽与HCMV gB多肽(SEQ ID NO:7)基本同一。在一些实施方案中,适合用于本发明的gB多肽具有与SEQ ID NO:7有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0403] HCMV gB 氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)

[0404] MESRIWCLVVCVNLCLIVCLGAAVSSSTRGTSATHSHSSHTTSAAHSRSGSVSQRTSS
[0405] QTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVGVTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINE
[0406] DLDEGIMVVYKRNIWAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIH
[0407] HINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHS
[0408] RGSTWLYRETCNLNCMVTITTTARSKYPYHFFATSTGDDVDISPFGYNGTNRNASYFGENA
[0409] DKFFIFPNYTIIVSDFGRPNSALETHRLVAFLEADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERT
[0410] IRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEK
[0411] YGNVSFVETTGGLVVFQGIKQKSLVELERLANRSSNLTHNRTKRSTDGNNATHLSN
[0412] MESVHNLVYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRITLEVFKELSKINPSAIIISAI
[0413] YNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVFIFNFANSSYVQ
[0414] YGQLGEDNEILLGNHRTTEECQLPSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSISTVDSMIALD
[0415] IDPLENTDFRVLELYSQKELRSINVFDDLEEIMREFNSYKQRVKYVEDKVVDPLPPYLKGL
[0416] DDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGAFTIILVAIAVVIILYLIY
[0417] TRQRRLCMQPLQNLFPYLVSDGTTVTSGNTKDTSLQAPPSYEEESVYNSGRKGPSPSS
[0418] DASTAAPPYTNEQAYQMLLALVRLDAEQRAQQNGTDSLQDGGTGTQDKGQKPNLLDRL
[0419] RHRKNGYRHLKDSDEEENV*(SEQ ID NO:7)(TM和CD加下划线)

[0420] HCMV gB 核苷酸序列 (SEQ ID NO:8)

[0421] ATGGAATCCAGGATCTGGTGCCTGGTAGTCTGCGTAACTTGTGTATCGTCTGTCTG
[0422] GGTGCTGCGTTTCCTCATCTTCTACTCGTGAACCTTCTGCTACTCACAGTCAACATT
[0423] CCTCTCATACGACGTCTGCTGCTCATTCTCGATCCGGTTCAGTCTCTCAACGCGTAAC
[0424] TTCTTCCCAAACGGTCAGCCATGGTGTAAACGAGACCATCTACAACACTACCCCTCAA
[0425] GTACGGAGATGTGGTGGGGTCAACACCACCAAGTACCCCTATCGCGTGTGTTCTAT
[0426] GGCACAGGTACGGATCTTATTCGCTTTGAACGTAATATCGTCTGCACCTCGATGAA
[0427] GCCCATCAATGAAGACCTGGACGAGGGCATCATGGTGGTCTACAAACGCAACATCG
[0428] TCGCGCACACCTTTAAGGTACGAGTCTACCAGAAGGTTTTGACGTTTCGTCGTAGCT
[0429] ACGCTTACATCCACACCACTTATCTGCTGGGCAGCAACACGGAATACGTGGCGCCTC
[0430] CTATGTGGGAGATTTCATCATATCAACAGTCACAGTCAGTGCTACAGTTCCTACAGCC
[0431] GCGTTATAGCAGGCACGGTTTTTCGTGGCTTATCATAGGGACAGCTATGAAAAACAAA
[0432] ACCATGCAATTAATGCCCGACGATTATTCACACACCCACAGTACCCGTTACGTGACG

[0433] GTCAAGGATCAATGGCACAGCCGCGGCAGCACCTGGCTCTATCGTGAGACCTGTAA
[0434] TCTGAATTGTATGGTGACCATCACTACTGCGCGCTCCAAGTATCCCTATCATTTTTTC
[0435] GCAACTTCCACGGGTGATGTGGTTGACATTTCTCCTTTCTACAACGGAACATAATCGC
[0436] AATGCCAGCTATTTTGGAGAAAACGCCGACAAGTTTTTCATTTTTCCGAACTACACT
[0437] ATCGTCTCCGACTTTGGAAGACCGAATTCTGCGTTAGAGACCCACAGGTTGGTGGCT
[0438] TTTCTTGAACGTGCGGACTCAGTGATCTCCTGGGATATACAGGACGAGAAGAATGTT
[0439] ACTTGTCAACTCACTTTCTGGGAAGCCTCGGAACGCACCATTCTGTTCCGAAGCCGAG
[0440] GACTCGTATCACTTTTCTTCTGCCAAAATGACCGCCACTTTCTTATCTAAGAAGCAAG
[0441] AGGTGAACATGTCCGACTCTGCGCTGGACTGTGTACGTGATGAGGCCATAAATAAGT
[0442] TACAGCAGATTTTCAATACTTCATACAATCAAACATATGAAAAATATGAAAACGTGT
[0443] CCGTCTTTGAAACCACTGGTGGTTTGGTGGTGTCTGGCAAGGTATCAAGCAAAAAAT
[0444] CTCTGGTGGAACTCGAACGTTTGGCCAACCGCTCCAGTCTGAATCTTACTCATAATA
[0445] GAACCAAAAGAAGTACAGATGGCAACAATGCAACTCATTTATCCAACATGGAGTCG
[0446] GTGCACAATCTGGTCTACGCCCAGCTGCAGTTCACCTATGACACGTTGCGCGGTTAC
[0447] ATCAACCGGGCGCTGGCGCAAATCGCAGAAGCCTGGTGTGTGGATCAACGGCGCAC
[0448] CCTAGAGGTCTTCAAGGAACCTTAGCAAGATCAACCCGTCAGCTATTCTCTCGGCCAT
[0449] CTACAACAAACCGATTGCCGCGGTTTCATGGGTGATGTCTGGGTCTGGCCAGCTG
[0450] CGTGACCATTAACCAAAACAGCGTCAAGGTGCTGCGTGATATGAATGTGAAGGAAT
[0451] CGCCAGGACGCTGCTACTCACGACCAGTGGTCATCTTTAATTTGCGCAACAGCTCGT
[0452] ACGTGCAGTACGGTCAACTGGGCGAGGATAACGAAATCCTGTTGGGCAACCAACCGC
[0453] ACTGAGGAATGTCAGCTTCCCAGCCTCAAGATCTTCATCGCCGGCAACTCGGCCTAC
[0454] GAGTACGTGGACTACCTCTTCAAACGCATGATTGACCTCAGCAGCATCTCCACCGTC
[0455] GACAGCATGATCGCCCTAGACATCGACCCGCTGGAAAAACACCGACTTCAGGGTACT
[0456] GGAACTTTACTCGCAGAAAGAATTGCGTTCCATCAACGTTTTTGTCTCGAGGAGAT
[0457] CATGCGCGAGTTCAATTCTGTATAAGCAGCGGGTAAAGTACGTGGAGGACAAGGTAG
[0458] TCGACCCGCTGCCGCCCTACCTCAAGGGTCTGGACGACCTCATGAGCGGCCTGGGCG
[0459] CCGCGGGAAAGGCCGTTGGCGTAGCCATTGGGGCGTGGGTGGCGCGGTGGCCTCC
[0460] GTGGTCAAGGCGTTGCCACCTTCTCAAAAACCCCTTCGGAGCCTTCACCATCATC
[0461] CTCGTGGCCATAGCCGTCGTCATTATCATTTATTTGATCTATACTCGACAGCGGCGTC
[0462] TCTGCATGCAGCCGCTGCAGAACCTCTTTCCCTATCTGGTGTCCGCCGACGGGACCA
[0463] CCGTGACGTCGGGCAACACCAAAGACACGTCGTTACAGGCTCCGCCTTCCTACGAG
[0464] GAAAGTGTATAATTCTGGTCGCAAAGGACCGGGACCAACCGTCGTCTGATGCATCC
[0465] ACGGCGGCTCCGCCTTACACCAACGAGCAGGCTTACCAGATGCTTCTGGCCCTGGTC
[0466] CGTCTGGACGCGAGCAGCGAGCGCAGCAGAACGGTACAGATTCTTTGGACGGACA
[0467] GACTGGCACGCGAGGACAAGGGACAGAAGCCCAACCTGCTAGACCGACTGCGACACC
[0468] GCAAAAACGGCTACCGACACTTGAAAGACTCCGACGAAGAAGAGAACGTCTGA
[0469] (SEQ ID NO :8) (TM 和 CD 加下划线)
[0470] 密码子优化的 HCMV gB 核苷酸序列 (SEQ ID NO :9)
[0471] ATGGAGTCAAGGATTTGGTGCCTGGTGTGCGTCAATCTGTGCATCGTCTGTCTG

[0472] GGGGCTGCCGTGTCATCAAGTTCTACAAGAGGCACCAGCGCCACCCACTCACACCA
[0473] TAGCTCCCATACCACATCCGCCGCTCACTCCCGGTCTGGCAGCGTGAGCCAGAGAGT
[0474] CACATCTAGTCAGACCGTGAGCCACGGGGTCAACGAGACCATCTACAATACTACCC
[0475] TGAAGTATGGCGACGTGGTCGGGGTGAACACAACATAAATACCCATATAGGGTCTGC
[0476] AGTATGGCCCAGGGCACTGATCTGATTAGATTGAAAAGGAACATCGTGTGCACCAG
[0477] CATGAAGCCCATTAATGAGGACCTGGATGAAGGGATCATGGTGGTCTACAAACGCA
[0478] ATATTGTGGCCATACCTTCAAGGTGCGAGTCTATCAGAAAGTGCTGACATTTTCGGA
[0479] GATCTTACGCATATATCCACACCACATACCTGCTGGGGAGTAACACCGAGTATGTGG
[0480] CTCCCCCTATGTGGGAAATTCACCATATCAATAGCCATTCCCAGTGCTACTCAAGCT
[0481] ACAGCAGAGTGATCGCTGGAACAGTGTTTCGTCGCATACCACAGAGACTCTTATGAG
[0482] AACAAGACTATGCAGCTCATGCCCGACGATTACAGCAATACACATTCCACTAGATAT
[0483] GTGACAGTCAAAGATCAGTGGCACTCAAGGGGCAGCACCTGGCTGTACCGCGAGAC
[0484] ATGCAACCTGAATTGTATGGTGACTATCACTACCGCTAGATCCAAGTACCCCTATCA
[0485] CTTCTTTGCAACTTCCACCGGGGACGTGGTCGATATTTCTCCTTTCTACAACGGCACA
[0486] AACCGGAATGCATCTTATTTTGGGGAGAACGCCGACAAGTCTTTATTTTCCCAAAT
[0487] TACACCATCGTGTCTGATTTTGGCAGACCCAACAGTGCCCTGGAGACACATCGACTG
[0488] GTGGCATTCTGGAACGGGCCGACTCCGTCATTTCTTGGGACATCCAGGATGAGAAG
[0489] AATGTGACCTGCCAGCTCACCTTCTGGGAGGCCAGCGAACGCACCATCCGATCCGA
[0490] GGCTGAAGATTCTTACCCTTCTCCTCTGCCAAAATGACAGCTACTTTTCTGAGCAA
[0491] GAAACAGGAGGTGAACATGTCTGACAGTGCTCTGGATTGCGTGCGGGACGAAGCAA
[0492] TTAATAAGCTGCAGCAGATCTTCAACACATCATAACAACCAGACTTACGAGAAGTAC
[0493] GGAAACGTGAGCGTCTTCGAAACAACCTGGCGGGCTGGTGGTCTTTTGGCAGGGCAT
[0494] CAAGCAGAAATCCCTGGTGGAGCTGGAAAGGCTGGCCAATCGCAGTTCACTGAACC
[0495] TGA CT CATAATCGGACCAAGAGATCTACAGACGGAAACAATGCCACACATCTGTCT
[0496] AACATGGAGAGTGTGCACAATCTGGTCTACGCTCAGCTCCAGTTTACCTACGACACA
[0497] CTGAGAGGCTATATTAACAGGGCACTGGCCCAGATCGCTGAAGCATGGTGCCTGGA
[0498] TCAGAGGCGCACCTGGAGGTCTTCAAGGAACTGTCCAAAATCAACCCTTCAGCAA
[0499] TTCTGAGCGCCATCTACAATAAGCCAATTGCAGCCAGGTTTATGGGAGACGTGCTGG
[0500] GCCTGGCCAGTTGCGTCACTATCAACCAGACCTCAGTGAAGGTCTGCGCGATATGA
[0501] ATGTGAAAGAGAGTCCCGGCAGATGCTATTCACGGCCTGTGGTCATCTTCAACTTTG
[0502] CTAATAGCTCCTACGTGCAGTATGGACAGCTCGGCGAGGACAACGAAATTCTGCTG
[0503] GGGAATCACAGGACCGAGGAATGTCAGCTCCCTAGCCTGAAGATTTTCATCGCTGG
[0504] AAACCTCCGCATACGAGTATGTGGATTACCTGTTCAAGCGGATGATTGACCTGTCTAG
[0505] TATCTCCACTGTGGATTCTATGATTGCCCTGGACATCGATCCACTGGAAAAATACCGA
[0506] CTTCAGGGTGCTGGAGCTGTATAGCCAGAAGGAACTGCGCTCCATCAACGTGTTCTGA
[0507] TCTGGAGGAAATTATGAGAGAGTTTAATAGCTACAAGCAGAGGGTGAAATATGTCTG
[0508] AAGATAAGGTGGTCGACCCCTGCCACCTACCTGAAAGGCCTGGACGATCTGATG
[0509] AGCGGGCTGGGAGCTGCAGGGAAGGCAGTGGGAGTCGCTATCGGCGCAGTGGGAG
[0510] GAGCCGTGGCCAGCGTGGTCGAGGGAGTGGCAACATTCTGAAAAACCCCTTCGGG

[0511] GCCTTCACCATCATTCTGGTGGCAATCGCCGTGGTCATCATTATCTACCTGATCTACA
 [0512] CAAGGCAGCGGCGGCTGTGCATGCAGCCTCTGCAGAACCTGTTTCCATACCTGGTGA
 [0513] GCGCCGACGGGACCACAGTCACCTCAGGAAATACTAAGGATACCTCTCTGCAGGCC
 [0514] CCCCCAAGTTACGAGGAATCAGTGTATAACAGCGGCAGAAAAAGGACCAGGACCACC
 [0515] TTCAAGCGACGCCAGCACTGCCGCTCCACCCTACACCAATGAGCAGGCCTATCAGAT
 [0516] GCTGCTGGCTCTGGTGGCCTGGATGCCGAACAGCGAGCTCAGCAGAACGGGACCG
 [0517] ACTCCCTGGATGGACAGACCGGAACACAGGACAAGGGACAGAAACCTAATCTGCTG
 [0518] GATCGGCTGCGGCACAGAAAAAACGGGTATAGGCACCTGAAGGACTCCGACGAAG
 [0519] AAGAAAATGTCTAA (SEQ ID NO :9) (TM 和 CD 加下划线)

[0520] 在一些实施方案中,根据本发明使用的 gB 多肽缺乏跨膜结构域和 / 或胞质结构域和 / 或包含经修饰的跨膜结构域和 / 或胞质结构域。gB 多肽可以任选地包含一种或更多种另外的多肽 (例如异源跨膜结构域和 / 或胞质结构域多肽)。在一些实施方案中, gB 多肽表达为与异源多肽的融合蛋白。gB 多肽可连接至异源多肽以产生融合蛋白而不改变 gB 功能和 / 或抗原性。例如,可将异源多肽的编码序列剪接成 gB 多肽编码序列中,例如在 gB 多肽编码序列的 3' 端。在一些实施方案中,可将异源多肽的编码序列框内剪接成 gB 多肽编码序列。在一些实施方案中,gB 多肽编码序列和异源多肽可以通过单一启动子表达。在一些实施方案中,在 gB 多肽的 C 末端插入 (例如融合至) 异源多肽。

[0521] 在一些实施方案中,异源多肽是或包含存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中的跨膜结构域和 / 或胞质结构域。在一些实施方案中,缺乏跨膜结构域和 / 或胞质结构域的 gB 与来自 VSV 的跨膜结构域和 / 或胞质结构域融合。根据本发明使用的示例性 gB-VSV 融合多肽如下 SEQ ID NO :10 所示。在一些实施方案中,合适的 gB-VSV 多肽融合蛋白包含与已知 gB 多肽基本同源的 gB 多肽的全部或部分和与已知 VSV 多肽基本同源的 VSV 多肽的全部或部分。例如,与野生型或天然存在的 gB 和 / 或 VSV 多肽相比,gB-VSV 多肽融合蛋白可以含有一个或更多个氨基酸替换、缺失和 / 或插入。因此,在一些实施方案中,适合用于本发明的 gB-VSV 多肽融合蛋白与 SEQ ID NO :10 基本同源。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gB-VSV 多肽融合蛋白具有与 SEQ ID NO :10 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gB-VSV 多肽融合蛋白与 SEQ ID NO :10 基本同一。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gB-VSV 多肽融合蛋白具有与 SEQ ID NO :10 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。本文所用的“gB-G”指 HCMV gB-VSV TM/CTD 融合蛋白。

[0522] HCMV gB-G 氨基酸序列 (SEQ ID NO :10)
 [0523] MESRIWCLVVCVNLCLIVCLGA AVSSSTRGTSATHSHSSHTTSA AHSRSGSVSQRVTSS
 [0524] QTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVG VNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINE
 [0525] DLDEGIMVVYKRNI VAHTFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEI H
 [0526] HINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSYENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHS
 [0527] RGSTWLYRETCNLNCMV TITTARSKYPYHFFATSTGDVVDISP FYNGTNRNASYFGENA
 [0528] DKFFIFPNYTI VSDFGRPNSALETHRLVAFLERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERT

[0529] IRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEK
[0530] YGNVSVFETTGGGLVVFWQGIIKQKSLVELERLANRSSLNLTHNRTRKSTDGNNATHLSN
[0531] MESVHNLVYAQLQFTYDTLRGYINRALAQIAEAWCVDQRRITLEVFKELSKINPSAIIISAII
[0532] YNKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVIFNFANSSSYVQ
[0533] YGQLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSIISTVDSMIALD
[0534] IDPLENTDFRVLELYSQKELRSINVPDLEEIMREFN SYKQRVKYVEDKVVDPLPPYLKGL
[0535] DDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFFFIIGLLIIGLFLVLRVGIHL
[0536] CKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK*(SEQ ID NO :10) (TM 和 CTD 加下划线)
[0537] HCMV gB-G 核苷酸序列 (SEQ ID NO :11)
[0538] ATGGAATCCAGGATCTGGTGCCTGGTAGTCTGCGTTAACTTGTGTATCGTCTGTCTG
[0539] GGTGCTGCGGTTTCCTCATCTTCTACTCGTGGAACCTTCTGCTACTCACAGTCACCATT
[0540] CCTCTCATACGACGTCTGCTGCTCATTCTCGATCCGGTTCAGTCTCTCAACGCGTAAC
[0541] TTCTTCCCAAACGGTCAGCCATGGTGTTAACGAGACCATCTACAACACTACCCCTCAA
[0542] GTACGGAGATGTGGTGGGGGTCAACACCACCAAGTACCCCTATCGCGTGTGTTCTAT
[0543] GGCACAGGGTACGGATCTTATTCGCTTTGAACGTAATATCGTCTGCACCTCGATGAA
[0544] GCCCATCAATGAAGACCTGGACGAGGGCATCATGGTGGTCTACAAACGCAACATCG
[0545] TCGCGCACACCTTTAAGGTACGAGTCTACCAGAAGGTTTTGACGTTTCGTCGTAGCT
[0546] ACGCTTACATCCACACCACTTATCTGCTGGGCAGCAACACGGAATACGTGGCGCCTC
[0547] CTATGTGGGAGATTTCATCATATCAACAGTCACAGTCAGTGCTACAGTTCCTACAGCC
[0548] GCGTTATAGCAGGCACGGTTTTCTGGCTTATCATAGGGACAGCTATGAAAAACAAA
[0549] ACCATGCAATTAATGCCCGACGATTATTCCAACACCCACAGTACCCGTTACGTGACG
[0550] GTCAAGGATCAATGGCACAGCCGCGGCAGCACCTGGCTCTATCGTGAGACCTGTAA
[0551] TCTGAATTGTATGGTGACCATCACTACTGCGCGCTCCAAGTATCCCTATCATTTTTTTC
[0552] GCAACTTCCACGGGTGATGTGGTTGACATTTCTCCTTTCTACAACGGAACCTAATCGC
[0553] AATGCCAGCTATTTTGGAGAAAACGCCGACAAGTTTTTCATTTTTCCGAACTACACT
[0554] ATCGTCTCCGACTTTGGAAGACCGAATTCTGCGTTAGAGACCCACAGGTTGGTGGCT
[0555] TTTCTTGAACGTGCGGACTCAGTGATCTCCTGGGATATACAGGACGAGAAGAATGTT
[0556] ACTTGTCAACTCACTTTCTGGGAAGCCTCGGAACGCACCATTCGTTCCGAAGCCGAG
[0557] GACTCGTATCACTTTTCTTCTGCCAAAATGACCGCCACTTTCTTATCTAAGAAGCAAG
[0558] AGGTGAACATGTCCGACTCTGCGCTGGACTGTGTACGTGATGAGGCCATAAATAAGT
[0559] TACAGCAGATTTTCAATACTTCATACAATCAAACATATGAAAAATATGGAAACGTGT
[0560] CCGTCTTTGAAACCACTGGTGGTTTTGGTGGTGTCTGGCAAGGTATCAAGCAAAAAAT
[0561] CTCTGGTGGAACTCGAACGTTTGGCCAACCGCTCCAGTCTGAATCTTACTCATAATA
[0562] GAACCAAAAAGAAGTACAGATGGCAACAATGCAACTCATTTATCCAACATGGAGTCG
[0563] GTGCACAATCTGGTCTACGCCAGCTGCAGTTCACCTATGACACGTTGCGCGGTTAC
[0564] ATCAACCGGGCGCTGGCGCAAATCGCAGAAGCCTGGTGTGTGGATCAACGGCGCAC
[0565] CCTAGAGGTCTTCAAGGAACCTTAGCAAGATCAACCCGTCAGCTATTCTCTCGGCCAT
[0566] CTACAACAAACCGATTGCCGCGGTTTTCATGGGTGATGTCCTGGGTCTGGCCAGCTG
[0567] CGTGACCATTAACCAAAACAGCGTCAAGGTGCTGCGTGATATGAATGTGAAGGAAT

[0568] CGCCAGGACGCTGCTACTCACGACCAGTGGTCATCTTTAATTTGCGCCAACAGCTCGT
[0569] ACGTGCAGTACGGTCAACTGGGCGAGGATAACGAAATCCTGTTGGGCAACCAACCGC
[0570] ACTGAGGAATGTCAGCTTCCCAGCCTCAAGATCTTCATCGCCGGCAACTCGGCCTAC
[0571] GAGTACGTGGACTACCTCTTCAAACGCATGATTGACCTCAGCAGCATCTCCACCGTC
[0572] GACAGCATGATCGCCCTAGACATCGACCCGCTGGAAAAACACCGACTTCAGGGTACT
[0573] GGAACCTTTACTCGCAGAAAGAATTGCGTTCCATCAACGTTTTTGATCTCGAGGAGAT
[0574] CATGCGCGAGTTCAATTCGTATAAGCAGCGGGTAAAGTACGTGGAGGACAAGGTAG
[0575] TCGACCCGCTGCCGCCCTACCTCAAGGGTCTGGACGACCTCATGAGCGGCCCTGGGCG
[0576] CCGCGGGAAAGGCCGTTGGCGTAGCCATTGGGGCCGTGGGTGGCGCGGTGGCCCTCC
[0577] GTGGTCAAGGCGTTGCCACCTTCTCAAAAAACCCCTTTTTCTTTATCATAGGGTTAA
[0578] TCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCA
[0579] CACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGTAA
[0580] (SEQ ID NO :11) (TM 和 CTD 加下划线)
[0581] 密码子优化的 HCMA gB — G 核苷酸序列 (SEQ ID NO :12)
[0582] ATGGAGTCAAGGATTTGGTGTCTGGTCGTCTGCGTCAACCTGTGCATTGTCTGCCTG
[0583] GGAGCCGCCGTCTCATCATCTACCCGAGGCACATCCGCCACTCACTCTCACCAT
[0584] AGCTCCCATACCATCCGCCGCTCACTCAAGAAGCGGGTCCGTGTCTCAGAGGGTC
[0585] ACATCTAGTCAGACCGTGAGCCATGGAGTCAACGAGACAATCTACAATACTACCCCT
[0586] GAAGTATGGAGACGTGGTGGCGTGAACACAATAAATACCCCTATAGGGTCTGCT
[0587] CTATGGCCCAGGGACAGATCTGATCCGATTTGAACGGAACATCGTGTGCACTAGC
[0588] ATGAAGCCTATCAATGAGGACCTGGATGAAGGAATTATGGTGGTCTACAAACGAAA
[0589] TATCGTGGCCCATACTTTTAAGGTGAGAGTCTATCAGAAAGTGCTGACCTTCCGGAG
[0590] AAGCTACGCTTATATTACACCACATACCTGCTGGGGTCCAACACCGAGTATGTGGC
[0591] ACCCCCTATGTGGGAAATCCACCATATTAATAGTCATTACAGTGCTACTCAAGCTA
[0592] CAGCAGAGTGATCGCTGGAACCGTGTTGCTCGCATACCACAGAGACGTTATGAGA
[0593] ACAAGACAATGCAGCTCATGCCCCGACGATTACAGTAATACCCATTCAACAAGATAT
[0594] GTGACCGTCAAAGATCAGTGGCACTCTCGCGGCAGTACCTGGCTGTACCGAGAGAC
[0595] ATGCAACCTGAATTGTATGGTGACAATTACTACCGCCAGAAGCAAGTACCCTTATCA
[0596] CTTCTTTGTACCTCAACAGGGGACGTGGTGCACATCAGCCCCCTTCTACAACGGAAC
[0597] AAACCGGAATGCCTCCTATTTTCGGCGAGAACGCTGACAAATTCTTTATCTTCCCCAA
[0598] CTACACTATCGTGAGCGATTTTCGGCAGACCTAACAGTGCCCTGGAGACCCATCGGCT
[0599] GGTGGCATTCTTGAAAGAGCCGACAGCGTGATCTCCTGGGACATTACAGGATGAGA
[0600] AGAATGTGACCTGCCAGCTCACCTTCTGGGAGGCCAGCGAAAGAACCATCAGGTCC
[0601] GAGGCAGAAGATTCTTACCACTTTTCTCTGCAAAAAATGACTGCCACCTTCTGTCC
[0602] AAGAAACAGGAGGTGAACATGAGCGACTCCGCACTGGATTGCGTGCGGGACGAAGC
[0603] CATCAATAAGCTGCAGCAGATCTTCAACACATCTTACAACCAGACTTACGAGAAGTA
[0604] CGGCAACGTGAGTGTCTTTGAAACAACCTGGCGGGCTGGTGGTCTTCTGGCAGGGGAT
[0605] CAAGCAGAAATCTCTGGTGGAGCTGGAACGGCTGGCCAATAGAAGTTCACTGAACC
[0606] TGACTCATAATCGCACCAAGCGATCCACAGACGGAAACAATGCAACTCATCTGAGC

[0607] AACATGGAGTCCGTGCACAATCTGGTCTACGCCCAGCTCCAGTTCACTTACGACACC
[0608] CTGCGAGGCTATATCAACCGGGCCCTGGCTCAGATTGCAGAAGCCTGGTGCGTGGAT
[0609] CAGAGGCGCACCTGGAGGTCTTTAAGGAACTGAGCAAAATTAACCCATCTGCTATC
[0610] CTGAGTGCAATCTACAATAAGCCCATCGCAGCCAGGTTTCATGGGGGACGTGCTGGG
[0611] ACTGGCCTCCTGCGTCACTATCAACCAGACCTCTGTGAAGGTCCTGCGCGATATGAA
[0612] TGTGAAAGAGAGTCCTGGCAGGTGTTATTACGCCCAGTGGTCATCTTCAACTTCGC
[0613] TAATAGCTCCTACGTGCAGTATGGCCAGCTCGGGGAGGACAACGAAATCCTGCTGG
[0614] GAAATCACAGGACCGAGGAATGTCAGCTCCCAAGTCTGAAGATCTTTATTGCCGGC
[0615] AACTCAGCTTACGAGTATGTGGATTACCTGTTCAAACGCATGATCGACCTGTCTAGT
[0616] ATTTCAACAGTGGATAGCATGATCGCCCTGGACATTGATCCCCTGGAAAAATACTGAC
[0617] TTCAGGGTGCTGGAGCTGTATAGCCAGAAGGAACTGCGCTCCATTAACGTGTTTGAT
[0618] CTGGAGGAAATCATGAGGGAGTTCAATTCCTACAAGCAGCGCGTGAAATATGTCGA
[0619] AGATAAGGTGGTCGACCCTCTGCCACCCTACCTGAAAGGCCTGGACGATCTGATGA
[0620] GCGGGCTGGGAGCTGCAGGCAAGGCAGTGGGAGTCGCCATCGGAGCTGTGGGAGGC
[0621] GCTGTGCGATCCGTGGTCGAGGGAGTGGCTACCTTTCTGAAGAACCCATTCTTTTTTC
[0622] ATCATCGGCCTGATCATTGGGCTGTTCTGGTGCTGAGAGTCGGCATCCACCTGTGC
[0623] ATTAAGCTGAAGCACACCAAGAAGAGGCAGATCTACACCGATATTGAAATGAACAG

[0624] ACTGGGCAAGTGA (SEQ ID NO :12) (TM 和 CTD 加下划线)

[0625] gH- 糖蛋白复合物 (gC) III

[0626] gc III 复合物包含糖蛋白 gH(UL75)、gL(UL115) 和 gO(UL74) (Urban M 等, 1996J Gen Virol77 :1537-47)。像 gB 一样, gH 在人致病性疱疹病毒中是保守的并且在 HCMV 复制期间的多个步骤中发挥重要作用。HCMV 编码两个 gH/gL 复合物 :gH/gL/gO 和 gH/gL/UL128/UL130/UL131 复合物 (Wang D 和 Shenk T2005Proc Natl Acad USA102 :18153-8)。含有 gO 的复合物通常足以使成纤维细胞感染 HCMV, 而含有 UL128/UL130/UL131 的复合物对于 HCMV 感染内皮细胞和上皮细胞是需要的 (Wang D 和 Shenk T2005J Virol7910330-8)。天然感染 HCMV 通常引发对表皮细胞进入有特异性的高效价中和抗体并且已经证明针对 gH/gL/UL128/UL130/UL131 表位的抗体可以包含这一活性的主要组分 (Macagno A et al., 2010J Virol84 :1005-13)。对 gH 的免疫学研究已经证明在哺乳动物细胞中, 所述蛋白需要另外的多肽 (如 gL) 用于正确地加工和转运至细胞膜 (Urban M 等, 1996J Gen Virol77 :1537-1547)。如果单独表达, 仅在胞质和 / 或核膜中发现 gH (Cranage MP 等, 1988J Virol62 :1416-1422)。

[0627] 示例性 HCMV gH 多肽氨基酸和核酸序列分别如以下 SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :14 所示。在一些实施方案中, 合适的 gH 多肽与已知 HCMV gH 多肽基本同源。例如, gH 多肽可以为经修饰的 HCMV gH 多肽, 其与野生型或天然存在的 gH 多肽 (例如 SEQ ID NO :13) 相比含有一个或更多个氨基酸替换、缺失和 / 或插入。因此, 在一些实施方案中, 适合用于本发明的 gH 多肽与 HCMV gH 多肽 (SEQ ID NO :13) 基本同源。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 HCMV gH 多肽具有与 SEQ ID NO :13 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 gH 多肽与 HCMV gH 多肽 (SEQ ID NO :13) 基

本同一。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gH 多肽具有与 SEQ ID NO:13 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。

[0628] HCMV gH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)

[0629] MRPGLPSYLIVLAVCLLSHLLSSRYGAEATSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCT
[0630] YNSSLRNSTVVRNAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQ
[0631] QRLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSIPHVWMPQTTPHGW
[0632] ESHTTSGLRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSI
[0633] DDDTPMLLIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYKDPDFLD
[0634] AALDFNYLDLSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEE
[0635] AGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPPRTTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDI
[0636] TSLVRLVYILSKQNNQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVH
[0637] SMLVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLYTPCSSSGRRDHSLERLT
[0638] RLFPDATVPTTVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVSEHVSYYVTNQYLI
[0639] KGISYPVSTTVVGQSLIITQTDSQTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYD
[0640] DTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMMLKNGTVLEVTDVVVDATDS
[0641] RLLMMSVYALSATIGIYLLYRMLKTC* (SEQ ID NO:13) (TM 和 CTD 加下划线)
[0642] HCMV gH 核苷酸序列 (SEQ ID NO:14)

[0643] ATGCGGCCAGGCCTCCCCTCCTACCTCATCGTCCTCGCCGTCTGTCTCCTCAGCCACC
[0644] TACTTTCGTACGATATGGCGCAGAAGCCATATCCGAACCGCTGGACAAAGCGTTTC
[0645] ACCTACTGCTCAACACCTACGGGAGACCCATCCGCTTCTGCGTGAAAAACACCACCC
[0646] AGTGTACCTACAATAGCAGCCTCCGTAACAGCACGGTCGTCAGGGAAAAACGCCATC
[0647] AGTTTCAACTTTTTTCCAAAGCTATAATCAATACTATGTATTCCATATGCCTCGATGTC
[0648] TTTTGTGGGGTCTCTGGCGGAGCAGTTTCTGAACCAGGTAGATCTGACCGAAAACCC
[0649] TGGAAGATACCAACAGAGACTTAACACTTACGCGCTGGTATCCAAAGACCTGGCC
[0650] AGCTACCGATCTTTTTTCGAGCAGCTAAAGGCACAGGACAGCCTAGGTGAACAGCC
[0651] CACCACTGTGCCACCACCCATTGACCTGTCAATACCTCACGTTTGGATGCCACCGCA
[0652] AACCCTCCACACGGCTGGACAGAATCACATACCACCTCAGGACTACACCGACCAC
[0653] ACTTTAACCAGACCTGTATCCTCTTTGATGGACACGATCTACTATTACGACCCGTAC
[0654] ACCTTGTTTGCACCAAGGCTTTTACCTCATCGACGAACTACGTTACGTTAAAAATAAC
[0655] ACTGACCGAGGACTTCTTCGTAGTTACGGTGTCCATAGACGACGACACCCCATGCT
[0656] GCTTATCTTCGGCCATCTTCCACGCGTACTCTTTAAAGCGCCCTATCAACGCGACAA
[0657] CTTTATACTACGACAAACTGAAAAACACGAGCTCCTGGTGCTAGTTAAGAAAGATC
[0658] AACTGAACCGTCACTCTTATCTCAAAGACCCGGACTTTCTTGACGCCGCACTTGACT
[0659] TCAACTACCTGGACCTCAGCGCACTACTACGTAACAGCTTTCACCGTTACGCCGTGG
[0660] ATGTACTCAAAAGCGGTCGATGTCAGATGCTGGACCGCCGACGGTAGAAATGGCC
[0661] TTCGCTACGCATTAGCACTGTTTCGAGCAGCCCGACAAGAAGAGGCCGGCGCCCA
[0662] AGTCTCCGTCCACGGGCCCTAGACCGCCAGGCCGCACTCTTACAAATACAAGAATT
[0663] TATGATCACCTGCCTCTCACAAACACCACCACGACCCACGTTGCTGCTGTATCCCAC

40

[0703] TCAGGTGTCCGTCCCTCGCGCACTGGATCGACAGGCAGCCCTGCTGCAGATCCAGGA
[0704] GTTCATGATTACCTGTCTGTCTCAGACACCAACCCAGAACTACCCTGCTGCTGTACCC
[0705] CACTGCCGTGGACCTGGCTAAGAGGGCACTGTGGACCCCTAACCAGATCACTGATA
[0706] TTACCTCTCTGGTGCCTGGTCTATATCCTGAGTAAACAGAATCAGCAGCACCTGA
[0707] TCCCACAGTGGGCCCTGCGACAGATTGCCGACTTCGCTCTGAAGCTGCACAAAACCC
[0708] ATCTGGCTTCCTTCCTGTCTGCATTTGCCCGCCAGGAGCTGTACCTGATGGGCTCTCT
[0709] GGTGCACAGTATGCTGGTCCATACAACCTGAGAGGCGCGAAATCTTTATTGTGGAGAC
[0710] AGGGCTGTGCAGCCTGGCTGAACTGTCCCACTTCACTCAGCTCCTGGCCCATCCTCA
[0711] CCATGAGTACCTGTCCGATCTGTATACCCCATGTTCTAGTTCAGGCCGACGGGACCA
[0712] CTCTCTGGAACGACTGACTCGGCTGTTTCCTGATGCAACCGTGCTACCACCGTGCC
[0713] CGCCGCCCTGAGTATCCTGTCAACAATGCAGCCAAGCACACTGGAGACTTTCCCCGA
[0714] CCTGTTTTGCCTGCCTCTGGGGGAGTCATTACGCGCCCTGACCGTGTGAGAATGT
[0715] CAGCTACGTGGTCACAAACAGTATCTGATCAAGGAATTTCTACCCCGTGTCTAC
[0716] TACCGTGGTCGGCCAGAGTCTGATCATTACCCAGACAGATTCACAGACTAAATGTGA
[0717] GCTGACCCGGAATATGCACACAACCTCATAGCATCACCGCCGCTCTGAACATTTCCCT
[0718] GGAGAATTGCGCTTTTTGTGAGTGCCTGCTGGAATACGATGACACACAGGGCGT
[0719] GATCAACATTATGTATATGCACGATAGCGATGACGTGCTGTTTCGCTCTGGACCCCTA
[0720] CAACGAGGTGGTCGTGAGCTCCCTCGCACTCATTATCTGATGCTGCTGAAGAATGG
[0721] AACAGTGCTGGAAGTCACTGATGTCGTGGTCGATGCCACAGACTCCCGGCTGCTGAT
[0722] GATGTCTGTGTACGCACTGTCCGCCATCATCGGCATCTATCTGCTGTATCGAATGCTG
[0723] AAAACCTGTTGA (SEQ ID NO :15) (TM 和 CTD 加下划线)

[0724] 在一些实施方案中,根据本发明使用的 gH 多肽缺乏跨膜结构域和 / 或胞质结构域和 / 或包含经修饰的跨膜结构域和 / 或胞质结构域。gH 多肽可以任选地包含一种或更多种另外的多肽 (例如异源跨膜结构域和 / 或胞质结构域多肽)。在一些实施方案中, gH 多肽表达为与异源多肽的融合蛋白。gH 多肽可连接至异源多肽以产生融合蛋白而不改变 gH 功能和 / 或抗原性。例如,可将异源多肽的编码序列剪接成 gH 多肽编码序列中,例如在 gH 多肽编码序列的 3' 端。在一些实施方案中,可将异源多肽的编码序列框内剪接成 gH 多肽编码序列。在一些实施方案中,gH 多肽编码序列和异源多肽可以通过单一启动子表达。在一些实施方案中,在 gH 多肽的 C 末端插入 (例如融合至) 异源多肽。

[0725] 在一些实施方案中,异源多肽是或包含存在于水泡性口炎病毒 (VSV) 中的跨膜结构域和 / 或胞质结构域。在一些实施方案中,缺乏跨膜结构域和 / 或胞质结构域的 gH 与来自 VSV 的跨膜结构域和 / 或胞质结构域融合。根据本发明使用的示例性 gH-VSV 融合多肽如下 SEQ ID NO :16 所示。在一些实施方案中,合适的 gH-VSV 多肽融合蛋白包含与已知 HCMV gH 多肽基本同源的 gH 多肽的全部或一部分和与已知 VSV 多肽基本同源的 VSV 多肽的全部或一部分。例如,与野生型或天然存在的 gH 和 / 或 VSV 多肽相比,gH-VSV 多肽融合蛋白可以含有一个或更多个氨基酸替换、缺失和 / 或插入。因此,在一些实施方案中,适合用于本发明的 gH-VSV 多肽融合蛋白与 SEQ ID NO :16 基本同源。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gH-VSV 多肽融合蛋白具有与 SEQ ID NO :16 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同源性的氨基

酸序列。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gH-VSV 多肽融合蛋白与 SEQ ID NO:16 基本同一。在一些实施方案中,适合用于本发明的 gH-VSV 多肽融合蛋白具有与 SEQ ID NO:16 有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。本文所用的“gH-G”指 HCMV gH-VSV TM/CTD 融合蛋白。

[0726] HCMV gH-G 氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)

[0727] MRPGLPSYILVLAVCLLSHLLSSRYGAEATSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCT

[0728] YNSSLRNSTVVENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQ

[0729] QRLNTYALVSKDLASYRSFSQQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSIPHVWMPQTTPHGW

[0730] ESHTTSGLRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSI

[0731] DDDTPMLLIIFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKQQLNRHSYLDKDPDFLD

[0732] AALDFNYLDLSALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEE

[0733] AGAQVSVPRALDRQAALLQIQEFMITCLSQTTPRTTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDI

[0734] TSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVH

[0735] SMLVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHFTQLLAHPHHEYLSDLYTPCSSSGRRDHSLERLT

[0736] RLFPDATVPTTVPAALSILSTMQPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVSEHVSYYVTNQYLI

[0737] KGISYPVSTTVVGQSLIITQTSQTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYD

[0738] DTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVVSSPRTHYLMMLKNGTVLEVTDVVVDATDS

[0739] REFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLHKTKKRQIYTDIEMNRLGK* (SEQ ID NO:16) (TM 和 CTD 加下划线)

[0740] HCMV gH-G 核苷酸序列 (SEQ ID NO:17)

[0741] ATGCGGCCAGGCCTCCCCTCCTACCTCATCGTCCTCGCCGTCTGTCTCCTCAGCCACC

[0742] TACTTTCGTACGATATGGCGCAGAAGCCATATCCGAACCGCTGGACAAAGCGTTTC

[0743] ACCTACTGCTCAACACCTACGGGAGACCCATCCGCTTCCTGCGTGAAAAACCCACCC

[0744] AGTGTACCTACAATAGCAGCCTCCGTAACAGCACGGTCGTCAGGGAAAAACGCCATC

[0745] AGTTTCAACTTTTTCCAAAGCTATAATCAATACTATGTATTCCATATGCCTCGATGTC

[0746] TTTTTGCGGGTCTCTGGCGGAGCAGTTTCTGAACCAGGTAGATCTGACCGAAAACCC

[0747] TGGAAGATACCAACAGAGACTTAACACTTACGCGCTGGTATCCAAAGACCTGGCC

[0748] AGCTACCGATCTTTTTTCGAGCAGCTAAAGGCACAGGACAGCCTAGGTGAACAGCC

[0749] CACCACTGTGCCACCACCCATTGACCTGTCAATACCTCACGTTTGGATGCCACCGCA

[0750] AACCCTCCACACGGCTGGACAGAATCACATACCACCTCAGGACTACACCGACCAC

[0751] ACTTTAACCAGACCTGTATCCTCTTTGATGGACACGATCTACTATTACGACCCGTCAC

[0752] ACCTTGTTTGCACCAAGGCTTTTACCTCATCGACGAACCTACGTTACGTTAAAAATAAC

[0753] ACTGACCGAGGACTTCTTCGTAGTTACGGTGTCCATAGACGACGACACACCCATGCT

[0754] GCTTATCTTCGGCCATCTTCCACGCGTACTCTTTAAAGCGCCCTATCAACGCGACAA

[0755] CTTTATACTACGACAACTGAAAAACACGAGCTCCTGGTGCTAGTTAAGAAAGATC

[0756] AACTGAACCGTCACTCTTATCTCAAAGACCCGACTTTCTTGACGCCGCACTTGACT

[0757] TCAACTACCTGGACCTCAGCGCACTACTACGTAACAGCTTTCACCGTTACGCCGTGG

[0758] ATGTACTCAAAAGCGGTCGATGTCAGATGCTGGACCGCCGACGGTAGAAATGGCC

[0759] TTCGCCTACGCATTAGCACTGTTTCGCAGCAGCCCGACAAGAAGAGGCCGGCGCCCA
[0760] AGTCTCCGTCCACAGGGCCCTAGACCGCCAGGCCGCACTCTTACAAATACAAGAATT
[0761] TATGATCACCTGCCTCTCACAACACCACCACGCACCACGTTGCTGCTGTATCCAC
[0762] GGCCGTGGACCTGGCCAAACGAGCCCTTTGGACACCGAATCAGATCACCGACATCA
[0763] CCAGCCTCGTACGCCTGGTCTACATACTCTCTAAACAGAATCAGCAACATCTCATCC
[0764] CCCAGTGGGCACTACGACAGATCGCCGACTTTGCCCTAAAACTACACAAAACGCAC
[0765] CTGGCCTCTTTTCTTTTCAGCCTTCGCGCGTCAAGAACTCTACCTCATGGGCAGCCTCG
[0766] TCCACTCCATGCTAGTACATACGACGGAGAGACGCGAAATCTTCATCGTAGAAAACG
[0767] GGCCTCTGTTTCATTAGCCGAGCTATCACACTTTACGCAGTTGCTAGCTCATCCGCAC
[0768] CACGAATACCTCAGCGACCTGTACACACCCTGTTCCAGTAGCGGGCGACGCGATCA
[0769] CTCGCTCGAACGCCTCACACGTCTCTTCCCCGATGCCACCGTCCCCACTACCGTTCCC
[0770] GCCGCCCTCTCCATCCTATCTACCATGCAACCAAGCACGCTAGAAAACCTTCCCCGAC
[0771] CTGTTTTGTCTGCCGCTCGGCGAATCCTTCTCCGCGCTGACCGTCTCCGAACACGTCA
[0772] GTTATGTCTGTAACAAACCAGTACCTGATCAAAGGTATCTCCTACCCTGTCTCCACCA
[0773] CCGTCGTAGGCCAGAGCCTCATCATCACCCAGACGGACAGTCAAACTAAATGCGAA
[0774] CTGACGCGCAACATGCATACCACACACAGCATCACAGCGGCGCTCAACATTTCCCTA
[0775] GAAAACCTGCGCCTTTTGCCAAAGCGCCCTACTAGAATACGACGACACGCAAGGCGT
[0776] CATCAACATCATGTACATGCACGACTCGGACGACGTCCTTTTCGCCCTGGATCCCTA
[0777] CAACGAAGTGGTGGTCTCATCTCCGCGAACTCACTACCTCATGCTTTTGAAAAACGG
[0778] TACGGTCCTAGAAGTAACTGACGTCGTCGTGGACGCTACCGACAGTCGTTTTTCTTT
[0779] ATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCA
[0780] TTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAACACACATTTATACAGACATAGAGATGAACCGA
[0781] CTTGAAAGTAA (SEQ ID NO :17) (TM 和 CTD 加下划线)
[0782] 密码子优化的 HCMV gH-G 核苷酸序列 (SEQ ID NO :18)
[0783] ATGCGACCCGACTGCCAAGCTACCTGATTGTCCTGGCTGTCTGTCTGCTGTACAC
[0784] CTGCTGAGTTCAAGATATGGGGCCGAAGCCATCAGCGAGCCACTGGACAAGGCTTT
[0785] CCACCTGCTGCTGAACACCTACGGCAGACCCATTAGGTTTCTGCGCGAGAATACCAC
[0786] ACAGTGCACATATAACAGCTCCCTGAGGAATAGCACTGTGGTCCGCGAAAAACGCCA
[0787] TCTCTTTCAATTTCTTTTCAGAGTTACAACCAGTACTACGTGTTCCATATGCCACGCTG
[0788] TCTGTTTCGAGGACCCCTGGCCGAGCAGTTTCTGAACCAGGTGGACCTGACCGAGAC
[0789] ACTGGAAAGATACCAGCAGAGGCTGAATACCTATGCCCTGGTGAGTAAGGATCTGG
[0790] CTTTCATATCGGTCTTTTCAGTCAGCAGCTCAAGGCCAGGACTCTCTGGGAGAGCAGC
[0791] CTACTACCGTGCCCCCTCCAATCGATCTGAGTATTCCACACGTCTGGATGCCCCCTC
[0792] AGACAACTCCCCACGGATGGACCGAAAGCCATACCACATCCGGCCTGCACAGACCC
[0793] CACTTCAACCAGACATGCATCCTGTTTCGATGGCCACGACCTGCTGTTTTCCACTGTG
[0794] ACCCCTTGTCTGCATCAGGGGTTCTACCTGATCGATGAGCTGAGATATGTGAAGATT
[0795] ACACTGACTGAAGACTTCTTTGTGGTCACCGTGTCTATCGACGATGACACACCAATG
[0796] CTGCTGATTTTCGGACACCTGCCCCGGGTGCTGTTCAAGGCCCCCTACCAGCGAGAC
[0797] AACTTCATCCTGCGGCAGACCGAGAAACACGAACTGCTGGTGCTGGTCAAGAAAAGA

[0798] TCAGCTCAACCGGCATTCTATCTGAAGGACCCCGACTTCCTGGATGCCGCTCTGGA
[0799] CTTTAACTACCTGGACCTGTCAGCACTGCTGCGGAATAGCTTTACAGATATGCCGT
[0800] GGATGTCCTGAAATCTGGGCGCTGCCAGATGCTGGACCGGAGAACCGTGGAGATGG
[0801] CATTGCGCTACGCTCTGGCACTGTTTGAGCCGCTCGGCAGGAGGAAGCAGGAGCTC
[0802] AGGTGAGTGTCCCTCGCGCACTGGATCGACAGGCAGCCCTGCTGCAGATCCAGGAG
[0803] TTCATGATTACCTGTCTGAGCCAGACACCACCCAGAACTACCCCTGCTGCTGTACCCC
[0804] ACTGCCGTGGACCTGGCTAAGAGGGCACTGTGGACCCCTAACCCAGATCACTGATATT
[0805] ACCAGCCTGGTGAGACTGGTCTATATCCTGTCCAAACAGAAATCAGCAGCACCTGATC
[0806] CCACAGTGGGCCCTGAGGCAGATTGCCGACTTTGCTCTGAAGCTGCACAAAACCCAT
[0807] CTGGCTTCCTTTCTGTCTGCATTGCGCCAGACAGGAGCTGTACCTGATGGGATCTCTGG
[0808] TGCACAGTATGCTGGTCCATACAACCTGAGAGGCGCGAAATCTTCATTGTGGAGACA
[0809] GGCCTGTGCAGCCTGGCTGAACTGTCCCACTTTACTCAGCTCCTGGCCCATCCTCAC
[0810] CATGAGTACCTGTCAGATCTGTATACCCCATGTTCTAGTTCAGGACGACGGGACCAC
[0811] AGCCTGGAACGACTGACTCGGCTGTTCCCTGATGCAACCGTGCCTACCACCGTGCCC
[0812] GCCGCCCTGAGTATCCTGTCAACAATGCAGCCAAGCACACTGGAGACTTTTCCCGAC
[0813] CTGTTCTGCCTGCCTCTGGGCGAGAGCTTCAGCGCCCTGACCGTGAGCGAACATGTC
[0814] AGCTACGTGGTCAAAACCAGTATCTGATCAAGGGGATTTCTACCCCGTGTCTACT
[0815] ACCGTGGTCCGACAGTCCCTGATCATTACCCAGACAGATTCTCAGACTAAATGTGAG
[0816] CTGACCAGAAATATGCACACAACCTCATAGTATCACCGCCGCTCTGAACATTTCACTG
[0817] GAGAATTGCGCTTTCTGTGAGTCCGCACTGCTGGAATACGATGACACACAGGGCGTG
[0818] ATCAACATTATGTATATGCACGATTCTGATGACGTGCTGTTTGCTCTGGACCCCTACA
[0819] ACGAGGTGGTCCGTGAGCTCCCCAGAACTCATTATCTGATGCTGCTGAAGAATGGCA
[0820] CAGTGCTGGAAGTCACTGATGTGCTGGTTCGATGCCACAGACTCCCGCTTCTTTTTCAT
[0821] CATTGGCCTGATCATTGGGCTGTTCCCTGGTGCTGCGAGTCGGCATCCACCTGTGCAT
[0822] CAAGCTGAAGCATACAAAGAAGAGACAGATCTACACCGATATTGAAATGAACAGGC
[0823] TGGGCAAATGA (SEQ ID NO :18) (TM 和 CTD 加下划线)

[0824] 在一些实施方案中, gH 多肽包含存在于 gB 中的跨膜结构域和 / 或胞质结构域。根据本发明使用的编码 HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 融合多肽的示例性核苷酸如以下 SEQ ID NO :20 所示。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 多肽与 SEQ ID NO :20 编码的多肽基本同源。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 多肽具有与 SEQ ID NO :20 编码的多肽有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同源性的氨基酸序列。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 多肽与 SEQ ID NO :20 编码的多肽基本同一。在一些实施方案中, 适合用于本发明的 HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 多肽具有与 SEQ ID NO :20 编码的多肽有至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性的氨基酸序列。

[0825] HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 核苷酸序列 (SEQ ID NO :20)

[0826] ATGCGGCCAGGCCTCCCCTCCTACCTCATCGTCCTCGCCGTCTGTCTCCTCAGCCACC

[0827] TACTTTCGTCA~~CGATATGGCGCAGAAGCCATATCCGAACCGCTGGACAAAGCGTTTC~~
[0828] ACCTACTGCTCAACACCTACGGGAGACCCATCCGCTTCCTGCGTGAAAAACACCACCC
[0829] AGTGTACCTACAATAGCAGCCTCCGTAACAGCACGGTCGTCAGGGAAAAACGCCATC
[0830] AGTTTCAACTTTTTTCCAAAGCTATAATCAATACTATGTATTCCATATGCCTCGATGTC
[0831] TTTTTGCGGGTCCTCTGGCGGAGCAGTTTCTGAACCAGGTAGATCTGACCGAAAACCC
[0832] TGGAAAGATACCAACAGAGACTTAACACTTACGCGCTGGTATCCAAAGACCTGGCC
[0833] AGCTACCGATCTTTTTTCGCAGCAGCTAAAGGCACAGGACAGCCTAGGTGAACAGCC
[0834] CACCACTGTGCCACCACCCATTGACCTGTCAATACCTCACGTTTGGATGCCACCGCA
[0835] AACCCTCCACACGGCTGGACAGAATCACATAACCACCTCAGGACTACACCGACCAC
[0836] ACTTTAACCAGACCTGTATCCTCTTTGATGGACACGATCTACTATTACGACCCGTACAC
[0837] ACCTTGTTTGCACCAAGGCTTTTACCTCATCGACGAACTACGTTACGTTAAAAATAAC
[0838] ACTGACCGAGGACTTCTTCGTAGTTACGGTGTCCATAGACGACGACACACCCATGCT
[0839] GCTTATCTTCGGCCATCTTCCACGCGTACTCTTTAAAGCGCCCTATCAACGCGACAA
[0840] CTTTATACTACGACAAACTGAAAAACACGAGCTCCTGGTGCTAGTTAAGAAAGATC
[0841] AACTGAACCGTCACTCTTATCTCAAAGACCCGGACTTTCTTGACGCCGCACTTGACT
[0842] TCAACTACCTGGACCTCAGCGCACTACTACGTAACAGCTTTCACCGTTACGCCGTGG
[0843] ATGTACTCAAAAGCGGTCGATGTCAGATGCTGGACCGCCGCACGGTAGAAATGGCC
[0844] TTCGCCTACGCATTAGCACTGTTTCGCAGCAGCCGACAAGAAGAGGCCGGCGCCCA
[0845] AGTCTCCGTCCACAGGGCCCTAGACCGCCAGGCCGCACTCTTACAAATACAAGAAATT
[0846] TATGATCACCTGCCTCTCACAAACACCACCACGACCCACGTTGCTGCTGTATCCCAC
[0847] GGCCGTGGACCTGGCCAAACGAGCCCTTTGGACACCGAATCAGATCACCGACATCA
[0848] CCAGCCTCGTACGCCTGGTCTACATACTCTCTAAACAGAATCAGCAACATCTCATCC
[0849] CCCAGTGGGCACTACGACAGATCGCCGACTTTGCCCTAAAACTACACAAAAACGCAC
[0850] CTGGCCTCTTTTCTTTTACGCCCTTCGCGCGTCAAGAACTCTACCTCATGGGCAGCCTCG
[0851] TCCACTCCATGCTAGTACATACGACGGAGAGACGCGAAATCTTCATCGTAGAAAACG
[0852] GGCCTCTGTTTATTAGCCGAGCTATCACACTTTACGCAGTTGCTAGCTCATCCGCAC
[0853] CACGAATACCTCAGCGACCTGTACACACCCTGTTCCAGTAGCGGGCGACGCGATCA
[0854] CTCGCTCGAAGCCTCACACGTCTCTTCCCCGATGCCACCGTCCCCACTACCGTTCCC
[0855] GCCGCCCTCTCCATCCTATCTACCATGCAACCAAGCACGCTAGAAAACCTTCCCCGAC
[0856] CTGTTTTGTCTGCCGCTCGGCGAATCCTTCTCCGCGCTGACCGTCTCCGAACACGTCA
[0857] GTTATGTCGTAACAAACCAGTACCTGATCAAAGGTATCTCCTACCCTGTCTCCACCA
[0858] CCGTCGTAGGCCAGAGCCTCATCATCACCCAGACGGACAGTCAAACTAAATGCGAA
[0859] CTGACGCGCAACATGCATACCACACACAGCATCACAGCGGCGCTCAACATTTCCCTA
[0860] GAAAACTGCGCCTTTTGCCAAAGCGCCCTACTAGAATACGACGACACGCAAGGCGT
[0861] CATCAACATCATGTACATGCACGACTCGGACGACGTCCTTTTCGCCCTGGATCCCTA
[0862] CAACGAAGTGGTGGTCTCATCTCCGCGAACTCACTACCTCATGCTTTTGAAAAACGG
[0863] TACGGTCCTAGAAGTAACTGACGTCGTCGTGGACGCTACCGACAGTCGTTTCGGAG
[0864] CCTTCACCATCATCCTCGTGGCCATAGCCGTCGTCATTATCATTTATTTGATCT
[0865] ATACTCGACAGCGGCGTCTCTGCATGCAGCCGCTGCAGAACCTCTTTCCTATC

[0866] TGGTGTCCGCCGACGGGACACCGTGACGTCGGGCAACACCAAAGACACGTCG
[0867] TTACAGGCTCCGCCTTCCTACGAGGAAAGTGTTTATAATTCTGGTCGCAAAGGA
[0868] CCGGGACACCGTCGTCTGATGCATCCACGGCGGCTCCGCCTTACACCAACGA
[0869] GCAGGCTTACCAGATGCTTCTGGCCCTGGTCCGTCTGGACGCAGAGCAGCGAG
[0870] CGCAGCAGAACGGTACAGATTCTTTGGACGGACAGACTGGCACGCAGGACAAG
[0871] GGACAGAAGCCCAACCTGCTAGACCGACTGCGACACCGCAAAAAACGGCTACCG
[0872] ACACTTGAAAGACTCCGACGAAGAAGAGAACGTCTGA (SEQ ID NO :20) (gH肽信号加下划线 ;
gB TM — CTD 加粗)

[0873] 其他 (包括 gN 和 gM- 糖蛋白复合物 (gC) II)

[0874] 除了 gB 和 gH, 其他的包膜糖蛋白可以用于疫苗开发。例如, 含有 gN(UL73) 和 gM(UL100) 的 gCII 复合物是特别感兴趣的。HCMV 病毒体蛋白质组分析已经证明了 gCII 是病毒颗粒中表达最丰富的糖蛋白, 强调了其在保护性免疫中的潜在重要性 (Varnum SM 等, 2005 Human Gene Ther 16 :1143-50)。HCMV 感染在大多数血清反应阳性的个体中引发 gCII 特异性抗体应答 (Shimamura M 等, 2006 J Virol 80 :4591-600), 并且含有 gCII 抗原 gM 和 gN 的 DNA 疫苗已经示出在兔和小鼠中引发中和抗体应答 (Shen S 等, 2007 Vaccine 25 : 3319-27)。

[0875] pp65

[0876] 对 HCMV 的细胞免疫应答包括 MHC II 类限制的 CD4⁺ 和 MHC I 类限制的细胞毒性 CD8⁺ 对多种病毒抗原的 T- 淋巴细胞应答, 许多所述病毒抗原存在于病毒被膜 (位于包膜和核壳之间的病毒颗粒区域) 中。例如, HCMV pp65 蛋白 (UL83) 已经示出在 HCMV 感染后引发显著的 CD8⁺ T- 淋巴细胞应答 (McLaughlin-Taylor E 1994 J Med Virol 43 :103-10)。这一 65kDa 病毒蛋白是表达最丰富的 HCMV 的结构蛋白之一。示例性 pp65 序列在本文中描述。

[0877] 其他 (包括 IE1, pp150)

[0878] 引发 T 淋巴细胞应答的其他蛋白包括即刻早期 -1(immediate early-1) 蛋白 (UL123) 和 pp150(UL32) (Gibson L 等, 2004 J Immunol 172 :2256-64 ;La Rosa C 等, 2005 Human Immunol 66 :116-26)。

[0879] 如上所述, Gag 多肽可以任选地包含一种或更多种另外的多肽 (例如异源抗原)。在一些实施方案中, Gag 多肽与异源抗原共表达 (例如在独立的启动子下和 / 或作为独立的蛋白)。Gag 多肽可与异源抗原共表达而不改变 Gag 功能。不希望受任何理论的限制, 认为自组装 Gag 多肽与异源包膜抗原的共表达将允许该抗原并入所产生的 VLP 之包膜或脂质双层。在一些实施方案中, VLP 包膜组分充当有效的免疫原 (例如用于诱导体液免疫应答)。在一些实施方案中, Gag 多肽表达为具有异源抗原的融合蛋白。例如, 可将异源抗原的编码序列剪接成 Gag 多肽编码序列, 例如在 Gag 多肽编码序列的 3' 端。在一些实施方案中, 可将异源抗原的编码序列框内成 Gag 多肽编码序列。在一些实施方案中, Gag 多肽编码序列和异源抗原可以通过单个启动子表达。在一些实施方案中, 在 Gag 多肽的 C 端插入 (例如融合至) 异源抗原。不希望受任何理论的限制, 认为自组装 Gag 多肽与异源抗原的融合将允许所述抗原并入所产生的 VLP 之结构组分中。在一些实施方案中, VLP 结构组分充当有效的免疫原 (例如用于诱导细胞免疫应答)。例如, 所提供的 VLP 可以包含反转录病毒 gag 多肽 (例如 MLV gag) 和 HCMV 的结构组分 (例如, pp65)。在一些这样的实施方案中, pp65

并入 VLP 中并且充当用于引发针对 HCMV 之免疫应答的抗原。

[0880] 所提供的 VLP 可以含有结构反转录病毒蛋白（例如 Gag 多肽），其设置和构造为使得它自组装以形成 VLP 并且位于 VLP 内部。在一些实施方案中，所提供的 VLP 含有包膜蛋白（例如 gB 和 / 或 gH），其设置和构造为使得包膜蛋白（例如 gB 和 / 或 gH）的一个或更多个表位位于 VLP 表面上。在一些实施方案中，所提供的 VLP 含有融合结构蛋白（例如 Gag/pp65），其设置和构造为使得结构蛋白（例如 pp65）的一个或更多个表位位于 VLP 内部。

[0881] II. VLP 的生产

[0882] 应当理解，包含 VLP 的组合物通常将包含具有一系列尺寸之 VLP 的混合物。应当理解，以下所列的直径值对应于该混合物中最频繁的直径。在一些实施方案中，组合物中大于 90% 的小泡将具有位于最频繁值之 50% 以内的直径（例如 $1000 \pm 500\text{nm}$ ）。在一些实施方案中，分布可以更窄，例如组合物中大于 90% 的小泡可以具有位于最频繁值之 40%、30%、20%、10% 或 5% 以内的直径。在一些实施方案中，可使用超声处理或超 - 超声处理 (ultra-sonication) 以促进 VLP 形成和 / 或改变 VLP 大小。在一些实施方案中，可以使用过滤、透析和 / 或离心来调整 VLP 尺寸分布。

[0883] 一般而言，根据本公开内容的方法产生的 VLP 可以为任何尺寸。在一些实施方案中，组合物可以包含直径为约 20nm 至约 300nm 的 VLP。在一些实施方案中，VLP 的特征在于它直径范围的下限被 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100nm 界定并且上限被 300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180 或 170nm 界定。在一些实施方案中，群体内的 VLP 示出平均直径，其范围的下限被 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100nm 界定并且上限被 300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180 或 170nm 界定。在一些实施方案中，群体中的 VLP 的多分散指数小于 0.5，例如小于 0.45、小于 0.4 或小于 0.3。在一些实施方案中，VLP 直径通过纳米化 (nanosizing) 测定。在一些实施方案中，VLP 直径通过电子显微镜测定。

[0884] A. 体外 / 离体 VLP 生产

[0885] 根据本发明提供的 VLP 可以根据技术人员已知的一般方法学制备。例如，可以使用已知病毒之序列制备多种核酸分子、基因组或重组载体或质粒。这样的序列可从库 (bank) 获得，并且材料可以从多种保藏中心 (collection)、发表的质粒等获得。可使用技术人员公知的技术分离并操作这些元件，或者从本领域可得的质粒分离。还可以从计算机分析或通过（高通量）筛选文库产生多种合成或人工序列。重组表达 VLP 的多肽需要构建含有多核苷酸的表达载体，所述多核苷酸编码一种或更多种多肽。一旦已经获得了编码一种或更多种多肽的多核苷酸，可以使用本领域已知的技术通过重组 DNA 技术产生用于产生所述多肽的载体。根据本发明可以利用的表达载体包括但不限于哺乳动物表达载体、杆状病毒表达载体、植物表达载体（例如，花椰菜花叶病毒 (CaMV)、烟草花叶病毒 (TMV)）、质粒表达载体（例如，Ti 质粒）等等。

[0886] 根据本发明，可以使用的示例性 VLP 表达质粒如下 SEQ ID NO:19 所示：

[0887] Propol II 表达质粒 (SEP ID NO:19)

[0888] CTAGAGAGCTTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATAT

[0889] TGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG

[0890] TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAA

[0891] CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCA
[0892] ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGG
[0893] GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA
[0894] AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAG
[0895] TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
[0896] TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA
[0897] CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTCCTGGCACC
[0898] AAAATCAACGGGACTTTCAAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATG
[0899] GCGGTTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
[0900] TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGA
[0901] CCGATCCAGCCTCCGGTCGACCGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCCCT
[0902] TGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGTAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTT
[0903] TTCAGGGTGTTGTTTGAATGGGAAGATGTCCCTTGATCACCATGGACCCCTCATGA
[0904] TAATTTTGTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTTGTCTCCTCTTATTTCTTT
[0905] TCATTTTCTTGTAACTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCAATTTGTAACGAATTTTTAAAT
[0906] TCACTTTTGTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCACTTTTTTTTCAAGGC
[0907] AATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATT
[0908] AAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAAATTCCTGGCTGGCGTGGAATATTTCTT
[0909] ATTGGTAGAAACAACCTACATCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAAT
[0910] GATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTG
[0911] CTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTAT
[0912] TGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCTCGAGCGTACGCCTAGGGGATCCAG
[0913] CGCTATTTAAATGCTAGCATGCATGTAAACCCTGCAGGGGTACCGCGGCCGCAAGCT
[0914] TAGATCCGTCGAGGAATTCCTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGC
[0915] TGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAA
[0916] AAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAA
[0917] ATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACA
[0918] TATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCA
[0919] ACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTATCA
[0920] GTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTG
[0921] AGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTAAAAAT
[0922] TTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATA
[0923] GCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTCGACGGATCGGCCGCAATTCGTAATCATG
[0924] TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGA
[0925] GCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
[0926] AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA
[0927] TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTCCGC
[0928] TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC
[0929] TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA

[0930] ACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT
[0931] GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG
[0932] TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA
[0933] GCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCGCTT
[0934] TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTGCG
[0935] GTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGAC
[0936] CGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA
[0937] TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
[0938] TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATT
[0939] TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
[0940] ATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGAT
[0941] TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
[0942] CGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA
[0943] GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTA
[0944] TATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT
[0945] CAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAAC
[0946] TACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC
[0947] CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
[0948] CGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGG
[0949] GAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
[0950] ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTTCCC
[0951] AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGGTTAGCTC
[0952] CTTCCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTT
[0953] ATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGA
[0954] CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCT
[0955] CTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTG
[0956] CTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
[0957] AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTT
[0958] TCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG
[0959] AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTG
[0960] AAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
[0961] AAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCTAAATTGT
[0962] AAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTT
[0963] AACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGATAGACCGAGAT
[0964] AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTC
[0965] CAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCAT
[0966] CACCCTAATCAAGTTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTA
[0967] AAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAA
[0968] GGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGGTAGCGGTC

[0969] ACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTC

[0970] CCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCCTCTTC

[0971] GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA

[0972] CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGGTAA

[0973] TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCT (SEQ ID NO :19)

[0974] 所提供的 VLP 可以根据本领域已知的技术制备。例如,在一些实施方案中,所提供的 VLP 可以在任何可获得的蛋白表达系统中产生。通常,通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞中并且随后通过常规技术培养经转染的细胞以产生 VLP。在一些实施方案中,使用细胞的瞬时转染产生 VLP。在一些实施方案中,使用稳定转染的细胞产生 VLP。可用于 VLP 产生的典型细胞系包括但不限于哺乳动物细胞系,例如人胚肾 (HEK) 293、WI38、中国仓鼠卵巢 (CHO)、猴肾 (COS)、HT1080、C10、HeLa、幼仓鼠肾 (BHK)、3T3、C127、CV-1、HaK、NS/O 和 L-929 细胞。具体的非限制性实例包括但不限于, BALB/c 小鼠骨髓瘤系 (NS0/1, ECACC No :85110503);人成视网膜细胞 (PER. C6 (CruCell, Leiden, The Netherlands));用 SV40 (COS-7, ATCC CRL1651) 转化的猴肾 CV1 系;人胚肾系 (293 或亚克隆的用于在悬浮培养物中生长的 293 细胞, Graham 等, J. Gen. Virol., 36 :59 (1977));幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞 +/-DHFR (CHO, Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4216 (1980));小鼠支持细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23 :243-251 (1980));猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞 (HeLa, ATCC CCL2);犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL34);布法罗大鼠肝细胞 (buffalo rat liver cell) (BRL3A, ATCC CRL1442);人肺细胞 (W138, ATCC CCL75);人肝细胞 (Hep G2, HB8065);小鼠乳腺肿瘤 (MMT060562, ATCC CCL51);TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci., 383 :44-68 (1982));MRC5 细胞;FS4 细胞;和人肝细胞瘤系 (Hep G2)。在一些实施方案中,可用于 VLP 生产的细胞系包括昆虫 (例如 Sf-9、Sf-21、Tn-368、Hi5) 或植物 (例如豆科、谷类 (cereal) 或烟草) 细胞。应当理解,在一些实施方案中,特别是当糖基化对蛋白功能重要时,优选哺乳动物细胞用于蛋白表达和 / 或 VLP 生产 (参见,例如 Roldao A 等, 2010 Expt Rev Vaccines 9 :1149-76)。

[0975] 应当理解,可以选择调节插入序列的表达或以特定方式修饰并加工基因产物的细胞株。蛋白产物的这样的修饰 (例如糖基化) 和加工 (例如切割或转运至膜) 对于 VLP 的产生或者 VLP 多肽或另外多肽 (例如佐剂或另外的抗原) 之功能可以是重要的。对于蛋白和基因产物的转录后加工和修饰,不同的细胞具有特有的或特异性的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以确保表达的异种蛋白的正确修饰和加工。一般而言,根据本发明,可使用真核宿主细胞 (也称为包装细胞 (packaging cell) (例如 293T 人胚肾细胞)), 其具有用于适当加工基因产物之初级转录、糖基化和磷酸化的细胞机制 (cellular machinery)。

[0976] 可以根据已知的技术纯化 VLP, 例如离心、梯度、蔗糖梯度超速离心、切向过滤和色谱 (例如, 离子交换 (阴离子和阳离子)、亲和和尺寸柱色谱) 或差别溶解度 (differential solubility), 等等。或者或此外, 可以直接使用细胞上清液, 无需纯化步骤。可以向纯化的 VLP 添加另外的实体 (例如另外的抗原或佐剂)。

[0977] 在一些实施方案中, 所提供的多核苷酸序列是密码子优化的。密码子优化是本领域公知的并且涉及使用密码子的改造 (modification of codon usage) 使得产生更高水平

的蛋白。

[0978] B. 体内 VLP 生产

[0979] 根据本发明,所提供的 VLP 可以根据本领域公知的方法制备成 DNA 疫苗。例如,在一些实施方案中,将一种或更多种载体或质粒(例如,如上所述的那些)施用至对象使得受者细胞表达由载体或质粒编码的多肽。在一些实施方案中,表达这样的多肽的受者细胞产生包含所述多肽的 VLP。

[0980] C. 单价、二价、三价 eVLP

[0981] 根据本发明,可以用本文所述的单个表达载体转染细胞。在一些实施方案中,单个表达载体编码一个以上的 VLP 成分(element)(例如,一个以上的结构多蛋白、CMV 被膜多肽、CMV 糖蛋白等)。例如,在一些实施方案中,单个表达载体编码两个或更多个 VLP 成分。在一些实施方案中,单个表达载体编码三个或更多个 VLP 成分。

[0982] 在一些实施方案中,用两个或更多个表达载体转染细胞。例如,在一些实施方案中,用编码 Gag 多肽的第一载体和编码 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的第二载体转染细胞。在一些这样的实施方案中,生产包含 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的“单价”VLP。在一些实施方案中,用编码 Gag 多肽的第一载体、编码 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的第二载体以及编码另一种 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的第三载体转染细胞。在一些这样的实施方案中,生产包含两个 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 和 gH-G 或者 gB-G 和 gH-G)的“二价”VLP。在一些实施方案中,用编码 Gag-pp65 融合多肽的第一载体和编码 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的第二载体转染细胞。在一些这样的实施方案中,生产包含 HCMV 结构蛋白和 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的“二价”VLP。在一些实施方案中,用编码 Gag-pp65 融合多肽的第一载体、编码 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的第二载体以及编码另一种 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 或 gB-G 或 gH-G)的第三载体转染细胞。在一些这样的实施方案中,生产包含 HCMV 结构蛋白和 2 种 HCMV 包膜糖蛋白(例如 gB 和 gH-G 或者 gB-G 和 gH-G)的“三价”VLP。

[0983] 在一些实施方案中,混合单价、二价或三价 VLP。例如,在一些实施方案中,混合单价和二价 VLP 以形成三价 VLP 混合物。在一些实施方案中,混合两个二价 VLP 以形成三价 VLP 混合物。

[0984] III. HCMV 感染和治疗

[0985] 人巨细胞病毒(HCMV)(β -疱疹病毒)是一种广泛存在的病原体。一般而言,疱疹病毒进入细胞是复杂的过程,其通过吸附和受体结合起始并且随后是病毒包膜与细胞膜的融合。融合一般在质膜或内体膜处发生。HCMV 体内感染多种细胞类型,包括上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞(Plachter B 等,1996Adv Virus Res46:195-261)。它与成纤维细胞的质膜融合(Compton T 等,1992Virology191:387-395),但通过胞吞作用进入视网膜色素上皮细胞和脐静脉内皮细胞(Bodaghi B 等,1999J Immunol162:957-964;Ryckman BJ 等,2006J Virol80:710-722)。疱疹病毒通过何种机制选择其进入细胞的途径仍不清楚。通常假定进入途径主要由宿主细胞确定,但有证据表明病毒体糖蛋白的向性作用(tropic role)(Wang X 等,1998J Virol72:5552-5558)。如之前提到的,HCMV 编码两个 gH/gL 复合物:gH/gL/gO 和 gH/gL/UL128/UL130/UL131。含有 gO 的复合物足以使成纤维细胞感染,而含有 pUL128/

UL130/UL131 的复合物对于 HCMV 感染内皮细胞和上皮细胞是重要的。

[0986] HCMV 感染 50 % 至 85 % 的 40 岁以下的成年人 (Gershon AA 等, 1997 in *Viral Infections of Humans*, 第四版, New York ; Plenum Press : 229-251)。出生后获得 HCMV 的大多数健康个体很少发生症状。然而, HCMV 疾病在免疫低下的个体 (例如造血细胞移植 (HCT) 和实体器官移植 (SOT) 的受者) 中导致显著的发病率和死亡率 (Pass RF 2001 Cytomegalovirus. In *Fields Virology*. 第四版, Philadelphia ; Lippincott Williams & Wilkins : 2675-2705)。在 SOT 或 HCT 人群中, HCMV 疾病可由于由供体器官或 HCT 传输的新感染而发生, 或者可由于受者中潜伏病毒的再激活而复发。在 HIV 感染的个体中, 尽管可获得抗反转录病毒治疗, 但 HCMV 感染仍加速 AIDS 和死亡的进程 (Deayton JR 等, 2004 *Lancet* 363 : 2116-2121)。除了在 US, HCMV 是最常见的子宫内感染并在每年大约 8000 例婴儿中导致引起死亡或严重出生缺陷的先天性畸形, 包括耳聋和智力迟钝 (mental retardation), (Stagon S 等, 1986 *JAMA* 256 : 1904-1908)。

[0987] 控制 HCMV 的免疫应答未完全理解。通过与其他人疱疹病毒的类比, 可以推测细胞和体液免疫应答都发挥了重要作用 (Kohl S 1992 *Current topics in Microbiology and Immunology* 179 : 75-88)。对于鼠 CMV, 显示无论细胞毒性 T 细胞应答还是中和抗体的被动转运均足以防止致命挑战 (Rapp M 等, 1993 *Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease* : 327-332 ; Reddehase MJ 等, 198 *J Virology* 61 : 3102-3108)。

[0988] 在免疫低下的人中, CMV 的控制主要与细胞免疫应答相关 ; $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 淋巴细胞二者似乎对防止 CMV 疾病均是重要的 (Gamadia LE 等, 2003 *Blood* 101 : 2686-2692 ; Cobbold M 等, 2005 *J Exp Med* 202 : 379-386)。对 CMV 的细胞免疫应答包括对存在于病毒被膜 (包膜与衣壳之间的病毒颗粒区域) 中的多种抗原的 $CD4^+$ 辅助 T 淋巴细胞和 $CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞应答。最近对来自健康供体的 CMV 特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的研究使用了来自一系列 CMV 开放阅读框的重叠肽 (overlapping peptide) 来鉴别 CMV 感染后被识别的抗原 (Sylwester AW 等, 2005 *J Exp Med* 202 : 673-685)。CMV 被膜磷蛋白 65 (pp65) 和表面糖蛋白 gB 是最经常被 $CD4^+$ T 细胞识别的抗原, 并且 pp65 也是最经常被 $CD8^+$ T 细胞识别的抗原之一。

[0989] 与移植情况 (transplant setting) 相反, 母体针对病毒的体液免疫应答对于在新生儿中预防 HCMV 疾病似乎是重要的。对表面糖蛋白 (特别是 gB) 的抗体似乎对于防止 CMV 的母体 - 新生儿转移至关重要 (Fowler KB 等, 2003 *JAMA* 289 : 1008-1011)。此外, 在更早的接种疫苗研究中, 显示出防止再感染与中和抗体相关 (Adler SP 等, 1995 *J Infectious Diseases* 171 : 26-32)。对 CMV 的体液免疫应答以对存在于病毒颗粒之外部包膜中的病毒包膜糖蛋白 (例如 gB 和 gH) 的应答为主。

[0990] 在 HCMV 的情况下, 难以直接评估免疫学效应物 (effector) 功能, 因为病毒是严格物种特异性的并且没有可用的动物模型系统。然而, 鼠 CMV 和豚鼠 CMV 已经被用于评估这些宿主物种中的疫苗策略。

[0991] 诱导保护性 T 细胞和中和抗体应答二者的 CMV 疫苗具有防止感染或改善由先天性感染或移植导致的 CMV 疾病的潜力。

[0992] 在人中测试的第一个活的减毒 HCMV 疫苗候选者基于实验室改造的 AD169 毒株。用另一个实验室改造的临床分离株 (isolate) (Towne 毒株) 进行的随后实验证实了活的减毒疫苗能够引发中和抗体以及 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞应答。在肾移植受者中的一系列研

究中评估了 Towne 疫苗的效力。尽管 Towne 疫苗不提供对 HCMV 疾病的保护性效果,它无法防止移植后的 HCMV 感染 (Plotkin SA 等,1984Lancet1:528-530)。还在血清反应阴性之母的安慰剂对照研究中评估了 Towne 疫苗,这些母亲的孩子参加政府或社区所办的幼儿园 (group daycare),这种情况下无法防止这些母亲从她们的被 HCMV 感染的儿童获得感染 (Adler SP 等,1995J Infectious Diseases171:26-32)。对这些研究的解释为 Towne 被过度减毒 (overattenuated) 了。为了探究这种可能性,一系列的遗传重组体,其中 CMV 的未减毒的“Toledo”毒株的区域替代 Towne 基因组的对应区域,导致 Towne/Toledo “嵌合体”的构造,其含有部分而不是全部使得 Towne 疫苗弱化的突变 (Heineman TC 等 2006J Infect Disease193:1350-1360)。正在 I 期临床试验中测试 4 种 Towne/Toledo “嵌合体”的安全性和耐受性。关于建立潜伏 HCMV 感染之潜在风险的长期安全性关注已经阻碍了活的、减毒疫苗的进一步开发。

[0993] 重要的亚单位 CMV 疫苗候选者基于包膜糖蛋白 gB (纯化的重组 gB 疫苗由 Sanofi-Pasteur Vaccines 制造),因为这种蛋白能够在自然感染期间引发高效价的病毒中和抗体。重组 gB 疫苗引发中和抗体应答并且具有优异的安全谱,然而它排除了中和抗体应答的其他糖蛋白靶标和更重要地 T 淋巴细胞靶标。该疫苗需要 MF59 佐剂以优化免疫原性。在最近的实验中,这种疫苗在年轻妇女中的 2 期临床试验中对预防 CMV 感染提供了总共 50% 的效力 (Pass RF 等,2009N Engl J Med360:1191-1199)。正作为亚单位疫苗候选者被评估的其他病毒蛋白包括 pp65 和 IE1,它们都引发 T 细胞应答。

[0994] DNA 疫苗在动物中引发强大的细胞和体液免疫应答并且很好地匹配疫苗设计中的特异性和精确度 (precision)。已经开发了用于 CMV 的 DNA 疫苗,并且聚焦于 gB、IE1 和 pp65 蛋白作为候选的靶免疫原。使用编码 pp65 和 gB 之质粒 DNA 的二价 CMV DNA 疫苗候选者 (Wloch MK2008J Infectious Diseases297:1634-1642),和还包括编码 IE1 基因产物之第三质粒的三价疫苗候选者 (Jacobson MA2009Vaccine27:1540-1548),已经由 Vical Vaccines 开发 (专利 US7,410,795)。无论施用途径如何,单独的三价 DNA 疫苗的免疫原性最小。然而,在施用活的减毒 CMV (Towne) 后,CMV DNA 疫苗确实看起来安全地引发了所观察到之 CMV 抗原的记忆应答。

[0995] 在载体疫苗的途径中,所关注的基因产物在非复制 (通常为病毒) 载体的环境中表达。这种的一个实例是由 Virogenetics and Sanofi-Pasteur Vaccines 开发的称作 ALVAC 的金丝雀痘载体 (canarypox vector),其是减毒的无法在哺乳动物细胞中复制的痘病毒。已经在临床试验中测试了表达 CMV gB 的 ALVAC 和表达 pp65 的 ALVAC (US6,267,965)。ALVAC-CMV (gB) 不诱导中和抗体,但在用 Towne 毒株 CMV 后续感染后确实引发了更高的中和抗体效价 (Adler SP 等 1999J Infectious Diseases180:843-846),尽管在用 gB 亚单位 / MF59 疫苗后续免疫后,它似乎没有促进中和抗体效价 (Bernstein DI 等 2002J Infectious Diseases185:686-690)。表达 pp65、ALVAC-CMV (pp64) 的金丝雀痘载体在所有初始血清反应阴性的志愿者中诱导了持久的 CTL 应答,其频率与天然血清反应阳性的个体相当 (Berencsi K 等 2001J Infectious Diseases183:1171-1179)。用于表达 gB 作为载体疫苗的另一途径是使用 AlphaVax Inc 的 α 病毒复制子系统 (US7,419,674)。这一途径涉及源自甲病毒的减毒株 (委内瑞拉马脑炎 (Venezuelan Equine Encephalitis, VEE) 病毒) 的繁殖缺陷的单周期 (single-cycle) RNA 复制子载体系统以产生表达 pp65、IE1 或 gB 蛋白

的病毒样复制子颗粒 (VRP) (Berstein 等, 2010Vaccine28 :484-493)。使用了两组分甲病毒复制子疫苗来表达三种 CMV 蛋白作为 CMV gB (Towne 毒株) 和 pp65/IE1 融合蛋白的可溶形式 (Reap EA 等 2007Vaccine25 :7441-7449), 该疫苗被发现是安全的并且诱导高水平的中和抗体和多功能的 CD4+ 和 CD8+ 抗原特异性 T 细胞应答。高剂量组的几何平均滴度 (GMT, Geometric Mean Titre) 为在试验中所测试的 12 例自然感染的 CMV 血清反应阳性个体中之 GMT 的一半左右。

[0996] 目前处于临床前开发中的用于针对 HCMV 接种疫苗的新颖候选者为“密体”疫苗。密体 (dense body, DB) 是细胞培养物中在 CMV 的复制期间形成的包膜的、复制缺陷的颗粒。它们含有包膜糖蛋白和大量的 pp65 蛋白。DB 是非感染性的且是免疫原性的, 但不能在疫苗受者中建立潜在的 HCMV 感染。DB 已经示出能够在小鼠中, 在没有病毒基因表达的情况下诱导病毒中和抗体和 T 细胞应答 (Pepperl S 等, 2000J Virol74 :6132-6146-W000/53729 和 US6, 713, 070)。

[0997] IV. 药物组合物

[0998] 本发明提供了包含所提供的 VLP 和 / 或所提供的糖蛋白变体的药物组合物。在一些实施方案中, 本发明提供了 VLP 和至少一种可药用的赋形剂。这样的药物组合物可以任选地包含一种或更多种另外的治疗活性物质和 / 或与其结合施用。在一些实施方案中, 所提供的药物组合物可用于药物中。在一些实施方案中, 所提供的药物组合物可在 HCMV 或者与 HCMV 感染相关或有关之负面结果的治疗或预防中用作预防剂 (即疫苗)。在一些实施方案中, 所提供的药物组合物可用于治疗性施用, 例如在患有或者易患 HCMV 感染的个体中。在一些实施方案中, 药物组合物配制成药用于对人施用。

[0999] 例如, 本文提供的药物组合物可以以无菌可注射的形式 (例如, 适用于皮下注射或静脉内输注的形式) 提供。例如, 在一些实施方案中, 以适合于注射的液体剂型提供药物组合物。在一些实施方案中, 提供的药物组合物为粉剂 (例如冻干和 / 或灭菌的) (任选地在真空下), 其在注射前用水性稀释剂 (例如水、缓冲液、盐溶液等) 重构。在一些实施方案中, 药物组合物在水、氯化钠溶液、乙酸钠溶液、苄醇溶液、磷酸盐缓冲盐水等中稀释和 / 或重构。在一些实施方案中, 应当将粉剂与水性稀释剂温和地混合 (例如, 不要震荡)。

[1000] 在一些实施方案中, 所提供的药物组合物包含一种或更多种可药用赋形剂 (例如防腐剂、惰性稀释剂、分散剂、表面活性剂和 / 或乳化剂、缓冲剂等)。合适的赋形剂包括例如水、盐水、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、甘油、乙醇或类似物, 及其组合。此外, 如果需要, 疫苗可以含有辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂或增强疫苗有效性的佐剂。在一些实施方案中, 药物组合物包含一种或更多种防腐剂。在一些实施方案中, 药物组合物不包含防腐剂。

[1001] 在一些实施方案中, 药物组合物以可以被冷却和 / 或被冷冻的形式提供。在一些实施方案中, 药物组合物以不能被冷却和 / 或被冷冻的形式提供。在一些实施方案中, 重构的溶液和 / 或液体剂型可以在重构后贮存一段时间 (例如 2 小时、12 小时、24 小时、2 天、5 天、7 天、10 天、2 周、1 个月、2 个月或更长)。在一些实施方案中, VLP 制剂长于指定时间的贮存导致 VLP 的降解。

[1002] 液体剂型和 / 或重构的溶液在施用前可以包含颗粒物质和 / 或变色。在一些实施方案中, 如果溶液变色或浑浊和 / 或如果颗粒物质在过滤后保留, 则该溶液不应被使用。

[1003] 本文所述的药物组合物制剂可以通过药学领域中已知的或以后开发的任何方法制备。在一些实施方案中,这样的制备 (preparatory) 方法包括使活性成分与一种或更多种赋形剂和 / 或一种或更多种辅助物质结合,然后如果需要和 / 或期望,将产品成型和 / 或包装成期望的单一或多次剂量单位。

[1004] 根据本发明的药物组合物可以以散装、作为单一单位剂量和 / 或作为多个单一单位剂量制备、包装和 / 或销售。本文所用的“单位剂量”是包含预定量活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量一般等于会施用至对象的剂量和 / 或这种剂量的方便分数,例如这种剂量的二分之一或三分之一。

[1005] 根据本发明的药物组合物中活性成分、可药用赋形剂和 / 或任何另外的成分的相对量可以根据所治疗对象的身份、体型 (size) 和 / 或病症、和 / 或根据组合物待施用的途径而变化。例如,组合物可以包含 0.1% 至 100% (重量 / 重量) 的活性成分。

[1006] 本发明的药物组合物可以另外地包含可药用赋形剂,本文所用的赋形剂可以为或包含适合于期望的特定剂型的溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体载剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington 的 *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 21 版, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) 公开了用于配制药组合物多种赋形剂以及用于其制备的多种已知技术。任何常规的赋形剂介质,除非与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不期望的生物学作用或者以有害的方式与药物组合物的任何其他组分相互作用,其使用涵盖在本发明的范围内。

[1007] 在一些实施方案中,药物组合物具有充分的免疫原性作为疫苗 (例如,在缺乏佐剂的情况下)。在一些实施方案中,药物组合物通过包含佐剂增强免疫原性。根据本发明可以使用任何佐剂。大量的佐剂是已知的;国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 准备了许多这类化合物的有用的汇编并且可以找到 (www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf)。还参见 Allison (1998, *Dev. Biol. Stand.*, 92 :3-11 ;通过引用并入本文), Unkeless 等 (1998, *Annu. Rev. Immunol.*, 6 :251-281 ;通过引用并入本文) 和 Phillips 等 (1992, *Vaccine*, 10 :151-158 ;通过引用并入本文)。本领域已知数百种不同的佐剂并且可以在本发明的实践中采用。根据本发明可利用的示例性佐剂包括但不限于细胞因子、凝胶型佐剂 (例如氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙等);微生物佐剂 (例如,包含 CpG 模体的免疫调节性 DNA 序列;内毒素,如单磷酸脂质 A;外毒素,例如霍乱毒素、大肠杆菌热不稳定毒素和百日咳毒素;胞壁酰二肽等);油乳剂和基于乳化剂的佐剂 (如弗氏佐剂、MF59 [Novartis]、SAF 等);颗粒佐剂 (例如,脂质体、生物可降解的微球体、皂苷类等);合成佐剂 (例如,非离子型嵌段共聚物、胞壁酰肽类似物、聚磷腈、合成的多聚核苷酸等);和 / 或其组合。其它的示例性佐剂包括一些聚合物 (例如聚磷腈;描述于美国专利 5,500,161 中,其通过引用并入本文)、Q57、QS21、角鲨烯、四氯十烷氧化物 (tetrachlorodecaoxide), 等。可药用赋形剂之前已经在以上题为“药物组合物”的部分中进一步详细描述。

[1008] V. 施用

[1009] 所提供的组合物和本公开内容的方法可用于在对象 (包括成人和儿童) 中预防和 / 或治疗 HCMV 感染。然而,一般而言,它们可以用于任何动物。在某些实施方案中,本文的方法可以用于兽医应用,例如犬科或猫科应用。如果需要的话,本文的方法也可以用于农场

动物,例如绵羊、禽、牛、猪和马种类 (breed)。

[1010] 本文所用的术语“对象”、“个体”或“患者”指人或非人哺乳动物对象。被治疗的个体 (也称为“患者”或“对象”) 是患有疾病 (例如 HCMV 感染) 的个体 (胎儿、婴儿、儿童、青少年或成年人)。在一些实施方案中,对象有 HCMV 感染的风险。在一些实施方案中,对象为免疫抑制的对象。例如,在一些实施方案中,免疫抑制的对象选自:HIV 感染的对象、AIDS 患者、移植受者、儿童对象和妊娠对象。在一些实施方案中,对象已经暴露于 HCMV 感染。在一些实施方案中,对象为人。

[1011] 本文所述的组合物通常会以诱导免疫应答所需或足以诱导免疫应答的量和时间施用。给药方案可以由一段时间内的单一剂量或多次剂量组成。待施用的免疫原性组合物 (例如 VLP) 的确切量可以随对象而变化并且可以取决于几种因素。因此,将会理解,一般而言,所使用的确切剂量会由开处方的医生决定并且会不仅仅依赖于对象的体重和施用途径,而且还依赖于对象的年龄和症状的严重程度和 / 或感染之风险。在某些实施方案中,特定量的 VLP 组合物作为单一剂量施用。在某些实施方案中,特定量的 VLP 组合物作为多于一剂的剂量施用 (例如相隔 1 至 12 个月的 1 至 3 次剂量)。在某些实施方案中,特定量的 VLP 组合物作为单一剂量在几个时机施用 (例如相隔 1 至 12 个月的 1 至 3 次剂量)。

[1012] 在一些实施方案中,所提供的组合物以初始剂量和至少一次加强剂量施用。在一些实施方案中,所提供的组合物以初始剂量和至少两次加强剂量施用。在一些实施方案中,所提供的组合物以初始剂量和三次加强剂量施用。在一些实施方案中,所提供的组合物以初始剂量和四次加强剂量施用。在一些实施方案中,提供的组合物以初始剂量和在所述初始剂量后约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月的至少一次加强剂量施用。在一些实施方案中,所提供的组合物在初始剂量后约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 1 年以第二加强剂量施用。在一些实施方案中,所提供的组合物每 1 年、每 2 年、每 3 年、每 4 年、每 5 年、每 6 年、每 7 年、每 8 年、每 9 年或每 10 年以加强剂量施用。

[1013] 在某些实施方案中,所提供的组合物可以配制成用于肠胃外递送 (例如通过注射)。在这样的实施方案中,例如,可以通过输注或无针注射技术静脉内、肌肉内、皮内、或皮下施用。在某些实施方案中,组合物可以配制成用于口服递送、经口递送、鼻内递送、口腔递送、舌下递送、透皮递送、经皮递送、腹膜内递送、阴道内递送、直肠递送或颅内递送。

实施例

[1014] 以下实施例描述了制造和实施本文所述之某些组合物的一些示例性方式。应当理解,这些实施例仅用于举例说明目的并且不意味着限制本文所述的组合物和方法的范围。

[1015] 实施例 1 :DNA 表达质粒的构建

[1016] 该实施例描述了用于表达重组 HCMV 基因序列 (例如 gB、gB-G、gH-G 和 Gag/pp65 融合基因序列) 之表达质粒和构建体 (construct) 的开发。标准的表达质粒通常由以下组成:哺乳动物来源的启动子序列、内含子序列、多聚腺苷酸化信号序列 (PolyA)、复制序列的 pUC 起始点 (pUC-pBR322 是复制起始的 colE1 起始点 / 位点并且用于在细菌 (如大肠杆菌) (DH5 α) 中复制质粒) 以及作为用于质粒菌斑 (plasmid plaque) 选择之可选择标志物的抗生素抗性基因。质粒中内含子后是多个限制酶位点,其可用于剪接成感兴趣的基因或

部分基因序列。

[1017] Propol II 表达质粒含有 pHCMV (用于 HCMV 的早期启动子)、 β -球蛋白内含子 (BGL 内含子), 兔球蛋白多聚腺苷酸化信号序列 (PolyA), 复制序列的 pUC 起始点 (pUC-pBR322 是复制起始的 colE1 起始点 / 位点并且用于在细菌 (如大肠杆菌) (DH5 α) 中复制质粒) 以及氨苄青霉素抗性基因 β -内酰胺酶 (Amp R- 质粒的可选择标志物赋予对氨苄青霉素的抗性) (100 μ g/ml) (图 1A)。

[1018] 图 1B 描绘了示例性重组表达质粒。例如, 为开发 pHCMV-Gag MMLV 表达构建体 (“MLV-Gag”), 将编码 MMLV 之 Gag 多蛋白 (没有其 C 端聚合酶 (Pol) 序列的 Gag) 的互补 DNA (cDNA) 序列克隆到 Propol II (pHCMV) 表达载体中。为开发 gB 表达构建体 (“gB”), gB 的全长序列被密码子优化以用于人表达 (GenScript) 并且被克隆到 Propol II 表达载体中, 所述载体包含 gB 的胞外部分、跨膜结构域 (TM) 和胞质 (Cyto) 部分。为开发 gH-G 表达构建体 (“gH-G”), 将仅编码胞外部分的 gH 截短序列与 VSV-G 的 TM 和 Cyto 部分融合在一起并且将其密码子优化以用于人表达 (GenScript) 并克隆到 Propol II 表达载体中。类似地, 为开发 gB-G 表达构建体 (“gB-G”), 将仅编码胞外部分的 gB 截短序列与 VSV-G 的 TM 和 Cyto 部分融合在一起并且将其密码子优化以用于人表达 (GenScript) 并克隆到 Propol II 表达载体中。为开发 Gag/pp65 表达构建体 (“Gag/pp65”), 将编码 MMLV 之 Gag 多蛋白 (没有其 C 端聚合酶序列的 Gag) 的序列与 pp65 的全长序列融合并且将其密码子优化以用于人表达 (GenScript) 并克隆到 Propol II 表达载体中。

[1019] DNA 质粒在感受态大肠杆菌 (DH5 α) 中扩增并且用无内毒素制备试剂盒根据标准方案纯化。

[1020] 实施例 2: 病毒样颗粒 (VLP) 的生产

[1021] 这一实施例描述了用于生产病毒样颗粒 (VLP) 的方法, 所述病毒样颗粒含有实施例 1 中所述的多种重组 HCMV 抗原。

[1022] 使用磷酸钙法用 MMLV-Gag DNA 表达质粒瞬时转染 HEK293T 细胞 (ATCC, CRL-11268) 并且与 gB 或 gB-G (数据未示出) 或 gH-G DNA 表达质粒共转染。或者, 将细胞用 Gag/pp65DNA 表达质粒转染并用 gB 或 gB-G (数据未示出) 或 gH-G DNA 表达质粒共转染。应当理解, 细胞可用 MMLV-Gag DNA 表达质粒转染并且用 gB 和 gH-G 或者 gB-G 和 gH-G DNA 表达质粒二者共转染。由 HEK293 细胞表达的多种 HCMV 抗原通过流式细胞术确认 (图 2A)。转染后 48 至 72 小时, 收获含有 VLP 的上清液并且通过 0.45 μ m 孔径膜过滤, 并通过 SW32Beckman 转子 (25,000rpm, 2 小时, 4 $^{\circ}$ C) 中的 20% 蔗糖垫, 经超速离心进一步浓缩和纯化。将沉淀重悬在无菌无内毒素 PBS (GIBCO) 中以获得浓缩 500 倍的 VLP 原液。通过 Bradford 测定定量试剂盒 (BioRad) 在等分试样上测定总蛋白。将纯化的 VLP 贮存在 -80 $^{\circ}$ C 直到使用。对于 MMLV-Gag、gB、gH-G 和 / 或 MMLV-Gag/pp65 融合蛋白的表达, 通过带有对 gB 之特异性抗体 (对 gB 的 CH28 小鼠单克隆抗体; Virusys Corporation; Pereira, L 等 1984Virology139:73-86)、gH-G 之特异性抗体 (对抗 VSV-G 标签抗体 P5D4 的小鼠单克隆抗体; Abcam plc) 和 pp65 之特异性抗体 (对 UL83/pp65 的 CH12 小鼠单克隆抗体; Virusys Corporation; Pereira, L. 等 1982Infect Immun36:924-932) 的 SDS-Page 和蛋白质印迹分析了各个批次的经纯化 VLP (图 2B)。使用增强的化学发光 (ECL) 检测了抗体。

[1023] 实施例 3: 病毒样颗粒 (VLP) 的物理化学表征

[1024] VLP的物理化学分析包括粒径测定和使用Malvern Instrument Zeta-Sizer Nano series(ZEN3600) 评估多分散指数。从纳米化分析获得的示例性结果在图 3A 和 3B 中示出。在两个不同实验室中使用相同的重组表达载体产生了示例性 VLP 组合物 (gH-G/pp65 二价 VLP 组合物) 并且两种 VLP 制剂均给出了直径为 150nm 至 180nm 的平均粒径。这与 CMV 病毒体的尺寸一致,其报道为 150nm 至 200nm 的尺寸 (1997J Pathol1182 :273-281)。0.214 至 0.240 的低多分散指数 (PdI) 指示产品同质性和窄的尺寸分布。

[1025] 实施例 4 :VLP 在小鼠中的免疫原性和中和活性

[1026] 在 6 至 8 周龄的雌性 BALB/C 小鼠中测试了如实施例 2 中所述制备的 VLP 组合物 (每个测试组最少 6 只动物)。用 200 μ l 的 VLP 组合物腹膜内免疫小鼠 2 次,一次在 0 天 (引发 (Prime)) 并且一次在第 56 天 (第 8 周强化)。用 10 μ g、25 μ g 或 50 μ g (总蛋白) 的二价 gB/Gag/pp65、二价 gH-G/Gag/pp65 或三价 gB/gH-G/Gag/pp65VLP 组合物处理小鼠。为评估小鼠中的体液免疫应答,免疫接种前以及第一次和第二次免疫接种后在 0、2、3、4、6、8、9、10、12 和 14 周从研究组中的所有小鼠收集血液。研究设计总结在表 1 中。

[1027] 表 1

[1028]

测试编号 #	剂量	测试编号描述	免疫接种时间表 (周)
1	50 μ g	pp65/gB 二价 VLP	0, 8
2	25 μ g	pp65/gB 二价 VLP	0, 8
3	10 μ g	pp65/gB 二价 VLP	0, 8
4	50 μ g	pp65/gH-G 二价 VLP	0, 8
5	25 μ g	pp65/gH-G 二价 VLP	0, 8
6	10 μ g	pp65/gH-G 二价 VLP	0, 8
7	50 μ g	三价 pp65/gB/gH-G VLP	0, 8
8	25 μ g	三价 pp65/gB/gH-G VLP	0, 8
9	10 μ g	三价 pp65/gB/gH-G VLP	0, 8

[1029] 使用来自被 HCMV 毒株 AD169 感染之 MRC-5 细胞的裂解物包被的市售 ELISA 板 (IBL International) 进行酶联免疫吸附测定 (ELISA)。未加工的市售 HCMV 裂解物 (其含有所有 CMV 相关的抗原并且可用于检测 IgG 免疫应答) 被用作通过 ELISA 测定小鼠血清 HCMV IgG 含量的阳性对照。将小鼠血清的连续稀释 (在 TBS-T/BSA/DMEM10% FCS 中稀释) 与包被的板在室温孵育 2 小时。洗涤板后,以 1/10,000 的稀释度添加抗小鼠辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的第二抗体并孵育 1 小时,随后添加四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液。通过添加 HCL1N 终止反应并且在 ELISA 微孔板阅读器中在 450nm 下读出吸光度。图 4 示出在 8 周第二次免疫接种后,对于各个二价和三价 VLP 组合物,小鼠之持久抗体和强强化的证据。

[1030] 使用微量中和测定确定了对 HCMV 的中和抗体应答。用感染培养基（含有 1% 加热灭活的 FBS、1% 氨基酸混合物、1% 青霉素 - 链霉素以及无 Ca^{+2} 和 Mg^{+2} 之 PBS 的 DME）稀释标准量的 HCMV 毒株 VR1814（内皮细胞向性的 CMV 毒株 -Revello MG 等 J Gen Virol 82: 1429-1438），并添加至等体积的经加热灭活之测试血清的系列稀释并在转子上在 37°C 下孵育 1 小时。将血清 / HCMV 混合物添加到在 24 孔组织培养板中之盖玻片上生长的人包皮成纤维细胞（HFF）或视网膜色素上皮细胞（ARPE-19 细胞）并且在 37°C 下，5% CO_2 中孵育 2 小时。将板用 PBS 清洗两次然后在 37°C 下，5% CO_2 中培养 48 小时。用 4% 多聚甲醛固定细胞，使其与抗 IE1 单克隆抗体（对 IE1/2 的 CH160 小鼠单克隆抗体或对 IE1 的 CH443 单克隆抗体；Virusys Corporation）在室温下反应 1 小时，随后与 FITC 标记的山羊抗小鼠抗体在室温下反应 45 分钟。通过荧光显微术确定了表达 IE1 的细胞数目。在各个放血时间点（0、3、6、8 和 9 周）测试混合小鼠血清（1 : 6 稀释）的中和活性，一式两份。图 5 示出在 8 周第二次免疫接种后，各个二价和三价 VLP 组合物对小鼠之中和抗体（在成纤维细胞中测定）的诱导。图 6 示出在 8 周第二次免疫接种后，各个二价 VLP 组合物对小鼠之中和抗体的诱导（在成纤维细胞中测定）。

[1031] 在另一个研究中，在 6 至 8 周龄的雌性 BALB/C 小鼠中测试了如实施例 2 所述制备的单价 gB-G VLP 组合物（每个测试组最少 8 只动物）。用 200 μl 的 VLP 组合物腹膜内免疫小鼠 2 次，一次在 0 天（引发）并且一次在第 56 天（第 8 周强化）。用等量的每次注射 20 μg 的 gB 含量（通过 ELISA 确定）处理小鼠。为评估小鼠中的体液免疫应答，第一次免疫接种前、第一次免疫接种后在第 3 和 6 周、第二次免疫接种前在第 8 周以及第二次免疫接种后在第 9 周（从研究开始起）从研究组中的所有小鼠收集血液。研究设计总结在表 2 中。

[1032] 表 2

[1033]

测试编号 #	剂量	测试编号描述	免疫接种时间表（周）
1	20 μg	gB-G 单价 VLP	0, 8
2	20 μg	重组 gB	0, 8

[1034] 在成纤维细胞中基于表达绿色荧光蛋白的 HCMV 病毒（TB40）使用微量中和测定以及用流式细胞术分析感染的（GFP+）HFF 细胞，确定了对 HCMV 的中和抗体应答。为了评估血清样品中中和抗体的存在，将血清与表达 GFP 的 HCMV 预孵育足够中和抗体减少 HCMV 之感染性的一段时间。血清和 HCMV 之预孵育混合物的连续稀释用于接触易受 HCMV 感染的宿主细胞（成纤维细胞或上皮细胞）。通过流式细胞术确定表达报告基因构建体（GFP）的细胞数以评估病毒制剂的感染效价。图 7 描述了相对于重组 gB，在 0 和 8 周用单价 gB-G VLP 免疫 2 次的小鼠的中和抗体效价。将如所述的免疫接种前和免疫接种后收集的血清混合，并在 10% 豚鼠补体存在的情况下相对于阳性对照 CMV 超球蛋白（hyperglobulin）（Cytogam™）测试。如图 7 所示，相比于由重组 gB 蛋白引发的，单价 gB-G VLP 组合物引发成纤维细胞感染的更快且更有效的中和。

[1035] 可以看出（或者已经阅读本说明书的本领域技术人员会理解），除了其他方面以外，该数据证明了与重组 gB 相比，VLP（例如包含 gB-G 的 VLP）出乎意料好的活性。

[1036] 在另一个研究中,在 6 至 8 周龄的雌性 BALB/C 小鼠中测试了如实施例 2 所述制备的二价 gB/Gag/pp65VLP 组合物(每个测试组最少 4 只动物)。用 200 μ l 的 VLP 组合物腹腔内免疫小鼠 2 次,一次在 0 天(引发)并且一次在第 56 天(第 8 周强化)。用二价 gB/Gag/pp65VLP 处理小鼠并在 14 天后收集脾细胞。使用脾细胞刺激(1 : 5 比率)富集的 CD8⁺T 细胞,以确定针对 pp65 或 Gag 之 CTL 的频率,所述脾细胞用编码 Gag/pp65 或 Gag 的质粒转染 24 小时。基于 CFSE 衰减、选通 CD3⁺CD8⁺T 细胞确定 CTL 频率(图 8A)。该散点图显示了 pp65 特异性 CTL 减去针对 Gag 的应答后,增殖的频率(图 8B)。如在图 8 中描述的,二价 gB/Gag/pp65VLP 在免疫的小鼠中引发了 pp65 特异性的 CTL。

[1037] 实施例 5 :VLP 在兔中的免疫原性和中和活性

[1038] 在 6 至 8 周龄新西兰白兔中测试了如实施例 2 所述制备的二价 gB/Gag/pp65 和 gH-G/Gag/pp65VLP 组合物(每个测试组最少 6 只动物)。兔用 0.5ml 的 VLP 组合物肌肉免疫 3 次,一次在 0 天(引发),一次在第 56 天(第 8 周强化),一次在 168 天(24 周强化)。用 25 μ g 或 50 μ g 或 100 μ g(总蛋白)的二价 gB/Gag/pp65、二价 gH-G/Gag/pp65 或三价 gB/gH-G/Gag/pp65(以 1 : 1 比率混合在一起的二价 gB/Gag/pp65 和 gH-G/Gag/pp65)VLP 组合物处理兔。为评估兔中的体液免疫应答,第一次免疫接种前和第一次免疫接种后在第 2、4、6、8 周和第二次免疫接种后在第 10、13、16、20 和 24 周(从研究开始起)和第三次免疫接种后在第 26 和 28 周(从研究开始起)从研究组中的所有兔收集血液。研究设计总结在表 3 中。

[1039] 表 3

[1040]

测试编号#	剂量	测试编号描述	免疫接种时间表(周)
1	100 μ g	gB/pp65 二价 VLP	0, 8, 24
2	50 μ g	gB/pp65 二价 VLP	0, 8, 24
3	25 μ g	gB/pp65 二价 VLP	0, 8, 24
4	100 μ g	gH-G/pp65 二价 VLP	0, 8, 24
5	25 μ g	gH-G/pp65 二价 VLP	0, 8, 24
6	各 100 μ g	gB/pp65 二价 VLP + gH-G/pp65 二价 VLP (1:1 比率)	0, 8, 24
7	各 25 μ g	gB/pp65 二价 VLP + gH-G/pp65 二价 VLP (1:1 比率)	0, 8, 24

[1041] 通过 ELISA 测试单独兔血清针对重组 gB 抗原的反应性(在图 9A 左轴上绘出)。如实施例 4 所述,在成纤维细胞中基于表达 GFP 的 CMV 病毒(TB40)使用微量中和测定以及

用流式细胞术分析感染的 (GFP+) HFF 细胞确定了对 HCMV 的中和抗体应答 (在图 9B 右轴上绘出)。将如所述的免疫接种前和免疫接种后收集的兔血清混合并在 HFF 成纤维细胞中在对表达 GFP 的 HCMV 的补体存在的情况下,测试了相对于阳性对照 CMV 超球蛋白 (Cytogam™) 的中和活性。端点效价 (Endpoint titer) 被绘制并代表在 CMV 感染的细胞中相对于匹配的免疫前血清减少 50% (在图 9A 左轴上绘出)。在流式细胞术分析感染的 (GFP+) 细胞期间收集 50,000 个细胞 (在图 9B 右轴上绘出)。如图 9 所示,二价 gB/Gag/pp65VLP 组合物在兔中针对成纤维细胞感染引发高效价结合 (A) 和高效价中和抗体 (B) 应答。

[1042] 还在上皮细胞中基于表达 GFP 的 HCMV 病毒 (Towne TS15-rR) 使用微量中和测定以及用流式细胞术分析感染的 (GFP+) ARPE-19 细胞测试了混合的兔血清对 HCMV 的中和抗体应答。将如所述的免疫接种前和免疫接种后收集的兔血清混合并在 ARPE-19 上皮细胞中在针对表达 GFP 之 HCMV 的补体存在的情况下测试了相对于阳性对照 CMV 超球蛋白 (Cytogam™) 的中和活性。如图 10 中所示,出乎意料地,二价 gB/Gag/pp65 和二价 gH-G/Gag/pp65VLP 组合物的组合表现出协同作用,相对于 gB/Gag/pp65 或 gH/Gag/pp65,在兔中针对上皮细胞感染的中和抗体应答更快速。

[1043] 可以看出 (或者已经阅读本说明书的本领域技术人员会理解),除了其他方面以外,该数据证明了与包含 gB/Gag/pp65 的 VLP 或包含 gH-G/Gag/pp65 的 VLP 相比, VLP (例如通过包含 gB/Gag/pp65 之 VLP 和包含 gH-G/Gag/pp65 之 VLP 的组合) 出乎意料地好的活性。

[1044] 实施例 6 :病毒样颗粒 (VLP) 之按比例增加的生产和纯化

[1045] 如下生产和纯化 VLP。用选择的质粒 (如实施例 1 所述制备) 以预定浓度和比率转染细胞密度为 1.5×10^6 至 2.0×10^6 细胞 /mL 的 CHO 细胞。添加填充物 DNA (Stuffer DNA) 使得总 DNA 浓度升至 $1 \mu\text{g/mL}$ 细胞培养物。将用于转染的质粒首先通过 MaxiPrep 或 GigaPrep 质粒纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化。用于转染以将 DNA 递送至细胞的 PEIMAX 以 6 : 1 (PEI : DNA 重量 / 重量) 的比率提供。将细胞培养 72 小时,然后使用转子 JS-4. 2A (Beckman Coulter) 在 1L 瓶中,将培养物以 4000rpm 离心 20 分钟。将上清液通过 $0.8/0.45 \mu\text{m}$ 滤器 (AcroPak500Capsule, Pall) 过滤。然后通过切向流过滤 (TFF) 浓缩经过滤的上清液并对含组氨酸的缓冲液渗滤。将经渗滤的物质装载至阴离子交换层析柱 (AEX) 上,其中收集流出液。然后将流出液通过 $0.45 \mu\text{m}$ 无菌过滤以分装成不同的体积。

[1046] TFF 程序涉及两个 TFF 膜 (Pellicon2Mini500kDa 截止, 0.1m^2 表面积) 通过将它们平行固定在不锈钢外壳中在 0.5M NaOH 中的过夜消毒 (sanitization)。在渗余物 (retentate) 以及在渗透物 (permeate) 侧上运行水至中性 pH 后,使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 平衡膜。然后将经过滤的上清液装载至 TFF 渗余物再循环环中。开始的入口压力为 10.5psi ,渗透物流速为 400mL/分钟 ,其在浓缩的末期降低至约 200mL/分钟 。浓缩到约 10 至 20 倍以后,用 5 倍体积的 20mM 组氨酸 + 150mM NaCl, pH5.5 完成渗滤。透过流关闭再循环另一个 5 分钟后,收集渗滤物质并用等体积的组氨酸缓冲液 (his-buffer) 漂洗。然后收集渗余物并与之前收集的渗余物混合。为保持膜的功能性,用 PBS 漂洗膜 10 分钟;用 0.5M NaOH 漂洗 40 分钟 (通过渗透物和渗余物向废物冲刷 200mL 后);并且最后在渗余物和渗透物中用水漂洗至中性 pH。然后将膜贮存在冷藏室中的 0.1M NaOH 溶液中。

[1047] 使用 AEX 柱色谱以减少 DNA 含量,使用 20mL HiLoad16/10 琼脂糖 HP 柱,以 1.6mL/

分钟的流速来用平衡缓冲液 (20mM 组氨酸+150mM NaCl, pH5.5) 平衡, 并且以 3.2mL/ 分钟的流速进行装载、洗涤和剥离 (stripping) 步骤。在 0.8mL/ 分钟下进行清洁步骤。使用图表记录器监测 280nm 下的紫外吸收。使用 Gradifrac 色谱系统 (GE Healthcare), 其在使用前被消毒。使用 5 柱体积的超 Q 水 (低内毒素) 从柱移除第一乙醇 (在柱中作为贮藏缓冲液以 20% 体积 / 体积存在)。通过 5 柱体积的平衡缓冲液, 随后 5 柱体积的剥离缓冲液 (20mM 组氨酸+1000mM NaCl, pH5.5) 以调节柱。再次通过 5 柱体积的平衡缓冲液以准备用于装载的柱。以 3.2mL/ 分钟进行装载, 之后柱用 5 柱体积的平衡缓冲液清洗或者直到观察到基线。在材料的上样过程中, 从 UV 峰值开始直到 UV 峰值跌落至 UV 吸光度之最大峰值高度的约 10%, 收集流出物。然后通过 5 柱体积的剥离缓冲液 (20mM 组氨酸+1000mM NaCl, pH5.5) 剥离柱并收集峰值。之后是 5 柱体积的另外剥离缓冲液 (20mM 组氨酸+2000mM NaCl, pH5.5) 以除去任何强力键合的蛋白和核酸并且收集峰值。然后用 1M NaOH (4 柱体积, 0.8mL/ 分钟) 清洗柱以移除任何沉淀的蛋白。然后用水 (0.8mL/ 分钟) 将柱漂洗至中性 pH (通常 4 至 5 柱体积)。然后 20% 酒精 (4 柱体积, 0.8mL/ 分钟) 通过柱以除去任何脂蛋白或脂质 (2 柱体积)。在这一阶段, 柱或者贮存或者用水漂洗 (4 柱体积) 以重新开始第二批次的循环。

[1048] 图 11 描绘了经纯化的 gB-G 单价 VLP 的图像, 其由 CHO 细胞产生并且随后经过 TFF (图 11A) 和 AEX (图 11B) 纯化方法, 接着是负染电子显微镜分析方法。如图 11 所示, TFF (图 11A) 和 AEX 纯化 (图 11B) 后呈现了完整 gB-G 单价 VLP。

[1049] 实施例 7: 纯化的 VLP 在兔中的免疫原性和中和活性

[1050] 在 6 至 8 周龄新西兰白兔中测试了如实施例 6 所述制备的单价 gB-G VLP 组合物 (每个测试组最少 6 只动物)。将兔用 0.5ml (50 μ g gB 含量) 的 VLP 组合物肌肉免疫 3 次, 一次在 0 天 (引发), 一次在第 56 天 (第 8 周强化), 一次在第 168 天 (第 24 周强化)。为评估兔中的体液免疫应答, 第一次免疫接种前和第一次免疫接种后在第 2、4、6、8 周和第二次免疫接种后在第 10、13、16、20 和 24 周 (从研究开始起) 从研究组中的所有兔收集血液。研究设计总结在表 4 中。

[1051] 表 4

[1052]

测试编号#	剂量	测试编号描述	免疫接种时间表 (周)
1	50 μ g gB 含量	gB-G 单价 VLP (TFF&AEX 纯化的)	0, 8, 24

[1053] 图 12 描绘了成纤维细胞感染的有效中和, 其通过来自用 TFF/AEX 纯化的 CHO 细胞产生的 gB 单价 VLP (图 12 中“gB eVLPs”) 免疫之兔的血清引发。这一中和作用超过用阳性对照 CMV 超球蛋白 (Cytogam™) 达到的中和作用。图 12 还包括公开的 Towne 疫苗和佐剂的 gB 亚单位疫苗 (gB+MF59™) 的中和效价数据 (Cui X 等 2008Vaccine26 :5760-5766)。

[1054] 图 13 举例说明了上皮细胞感染的有效中和, 其通过来自用 TFF/AEX 纯化的 CHO 细胞产生的 gB-G 单价 VLP (图 13 中“gB eVLPs”) 免疫之兔的血清引发。这一中和作用比得上用阳性对照 CMV 超球蛋白 (Cytogam™) 达到的中和作用。图 13 还包括公开的 Towne 疫苗和佐剂的 gB 亚单位疫苗 (gB+MF59™) 的中和效价数据 (Cui X 等 2008Vaccine26 :5760-5766)。

[1055] 图 14 描绘了在用 TFF/AEX 纯化的 CHO 细胞产生的 gB-G 单价 VLP 组合物免疫之兔中引发的抗体之亲和力指数。混合的兔血清和阳性对照 CMV 超球蛋白 (Cytogam™) 以 1 : 600,000 稀释并且在存在或不存在 5M 尿素的情况下通过 ELISA 针对全长重组 gB 抗原测试。如前所述 (Marshall BC 和 Adler S2003Viral Immunol16 :491-500) 确定了抗体亲和力。如图 14 所示,通过用 TFF/AEX 纯化的 CHO 细胞产生的 gB-G 单价 VLP 的免疫接种在兔中引起了高亲和力中和抗体的快速诱导。两次 gB-G VLP 免疫接种后实现了最大的抗体亲和力。

[1056] 其他实施方案

[1057] 从本文公开的公开内容之实践或说明书考虑,本公开内容的其他实施方案对本领域技术人员将是显而易见的。本说明书和实施例旨在仅被视为示例性的,本公开内容的真实范围由以下权利要求书指出。本文涉及的任何参考文献的内容通过引用整体并入本文。

[1058] 序列表说明

[1059] SEQ ID NO :1 描述 MMLV Gag 氨基酸序列。

[1060] SEQ ID NO :2 描述 MMLV Gag 核苷酸序列。

[1061] SEQ ID NO :3 描述密码子优化的 MMLV Gag 核苷酸序列。

[1062] SEQ ID NO :4 描述 MMLV Gag-CMV pp65 氨基酸序列。

[1063] SEQ ID NO :5 描述 MMLV Gag-CMV pp65 核苷酸序列。

[1064] SEQ ID NO :6 描述密码子优化的 MMLV Gag-CMV pp65 核苷酸序列。

[1065] SEQ ID NO :7 描述 HCMV gB 氨基酸序列。

[1066] SEQ ID NO :8 描述 HCMV gB 核苷酸序列。

[1067] SEQ ID NO :9 描述密码子优化的 HCMV gB 核苷酸序列。

[1068] SEQ ID NO :10 描述 HCMV gB-G 氨基酸序列。

[1069] SEQ ID NO :11 描述 HCMV gB-G 核苷酸序列。

[1070] SEQ ID NO :12 描述密码子优化的 HCMV gB-G 核苷酸序列。

[1071] SEQ ID NO :13 描述 HCMV gH 氨基酸序列。

[1072] SEQ ID NO :14 描述 HCMV gH 核苷酸序列。

[1073] SEQ ID NO :15 描述密码子优化的 HCMV gH 核苷酸序列。

[1074] SEQ ID NO :16 描述 HCMV gH-G 氨基酸序列。

[1075] SEQ ID NO :17 描述 HCMV gH-G 核苷酸序列。

[1076] SEQ ID NO :18 描述密码子优化的 HCMV gH-G 核苷酸序列。

[1077] SEQ ID NO :19 描述 Propol II 表达质粒核苷酸序列。

[1078] SEQ ID NO :20 描述 HCMV gH-HCMV gB TM/CTD 核苷酸序列。

[1079] SEQ ID NO :21 描述密码子优化的 MMLV Gag 核苷酸序列。

[1080] SEQ ID NO :22 描述密码子优化的 MMLV Gag-CMV pp65 核苷酸序列。

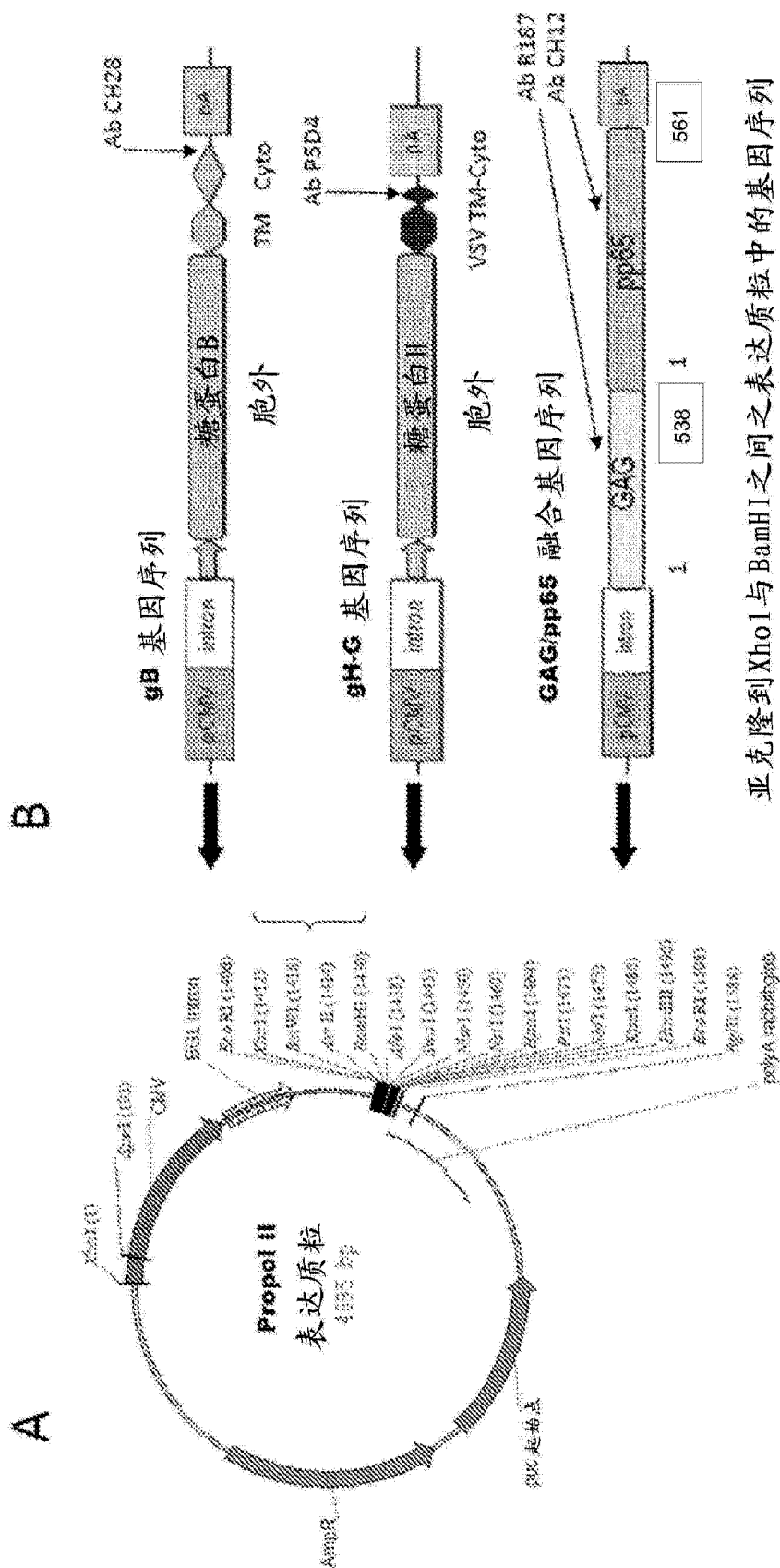


图 1

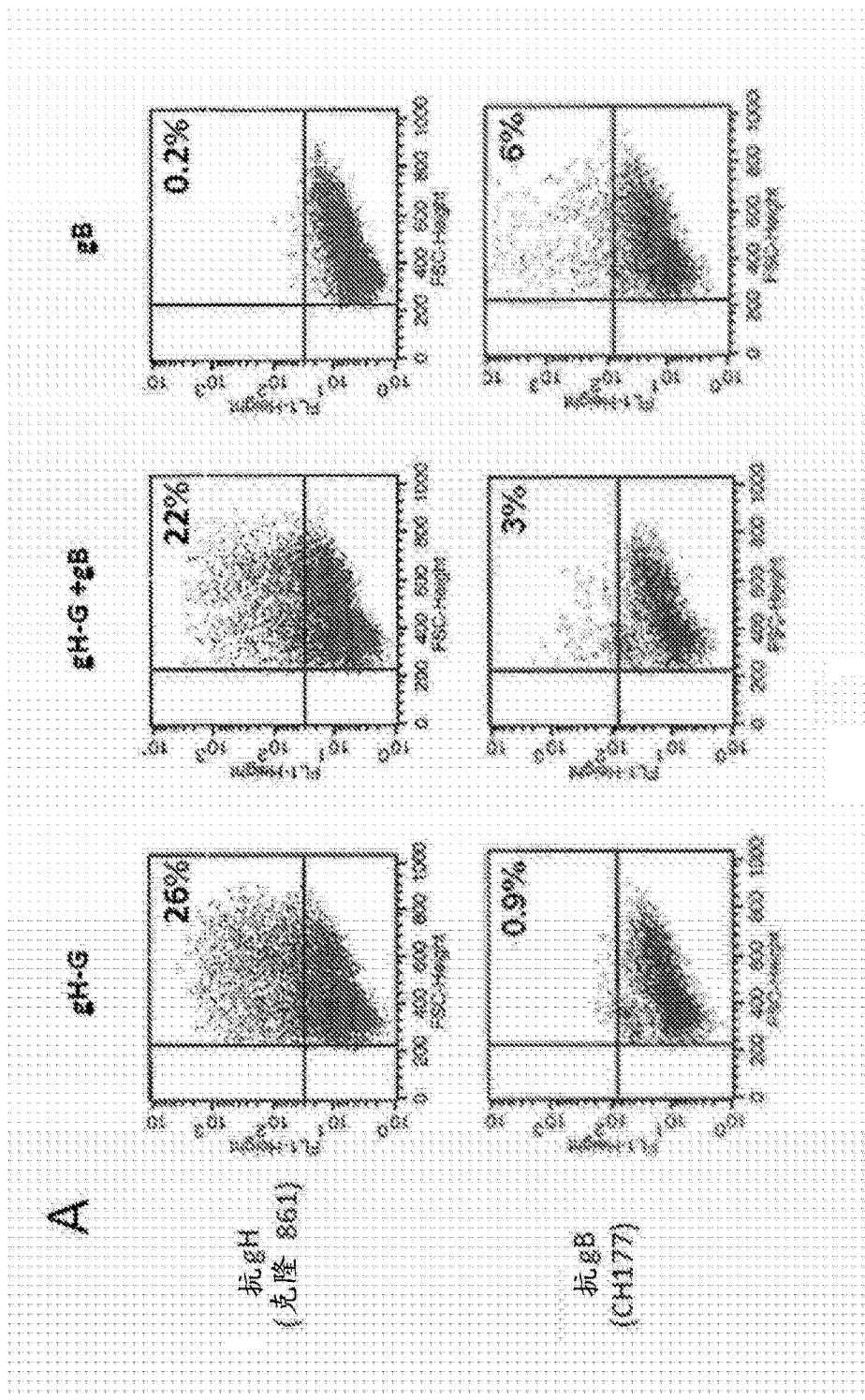


图 2

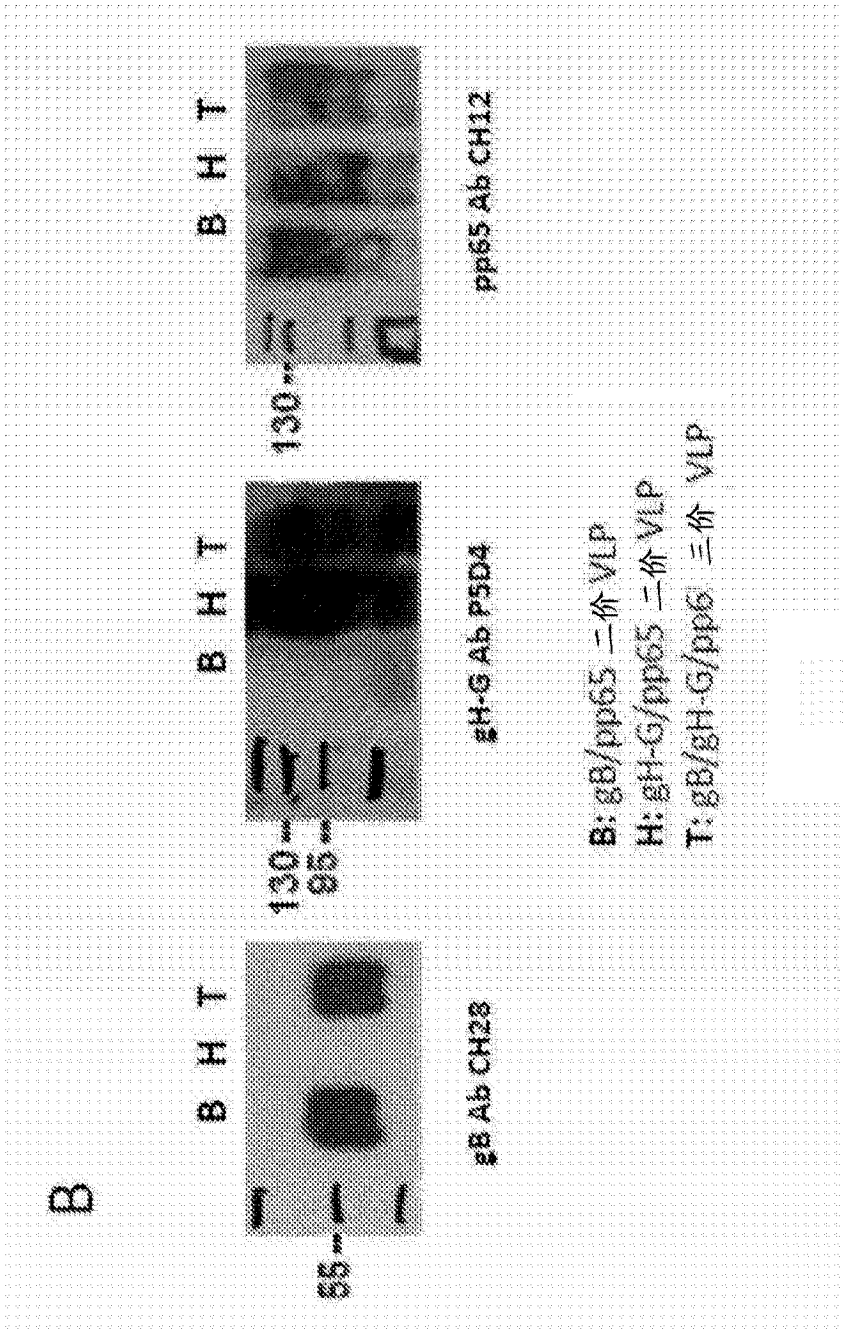


图 2

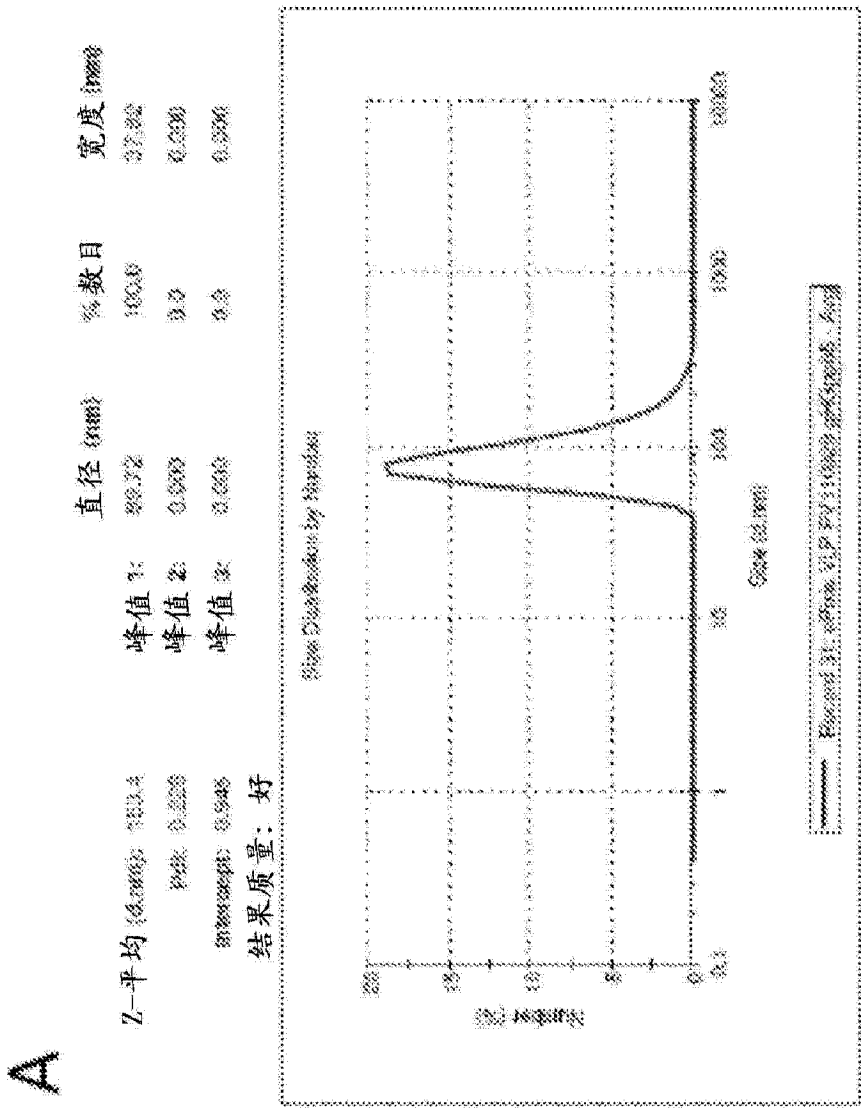


图 3

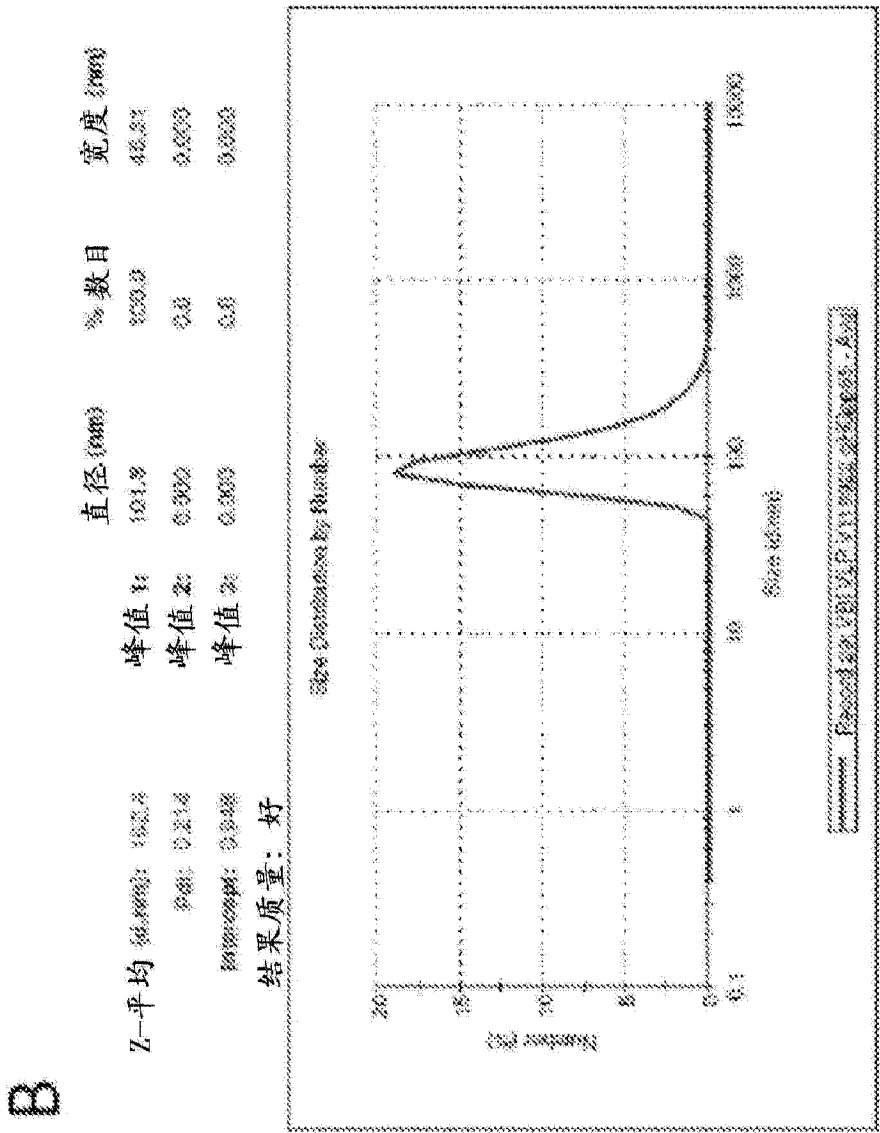


图 3

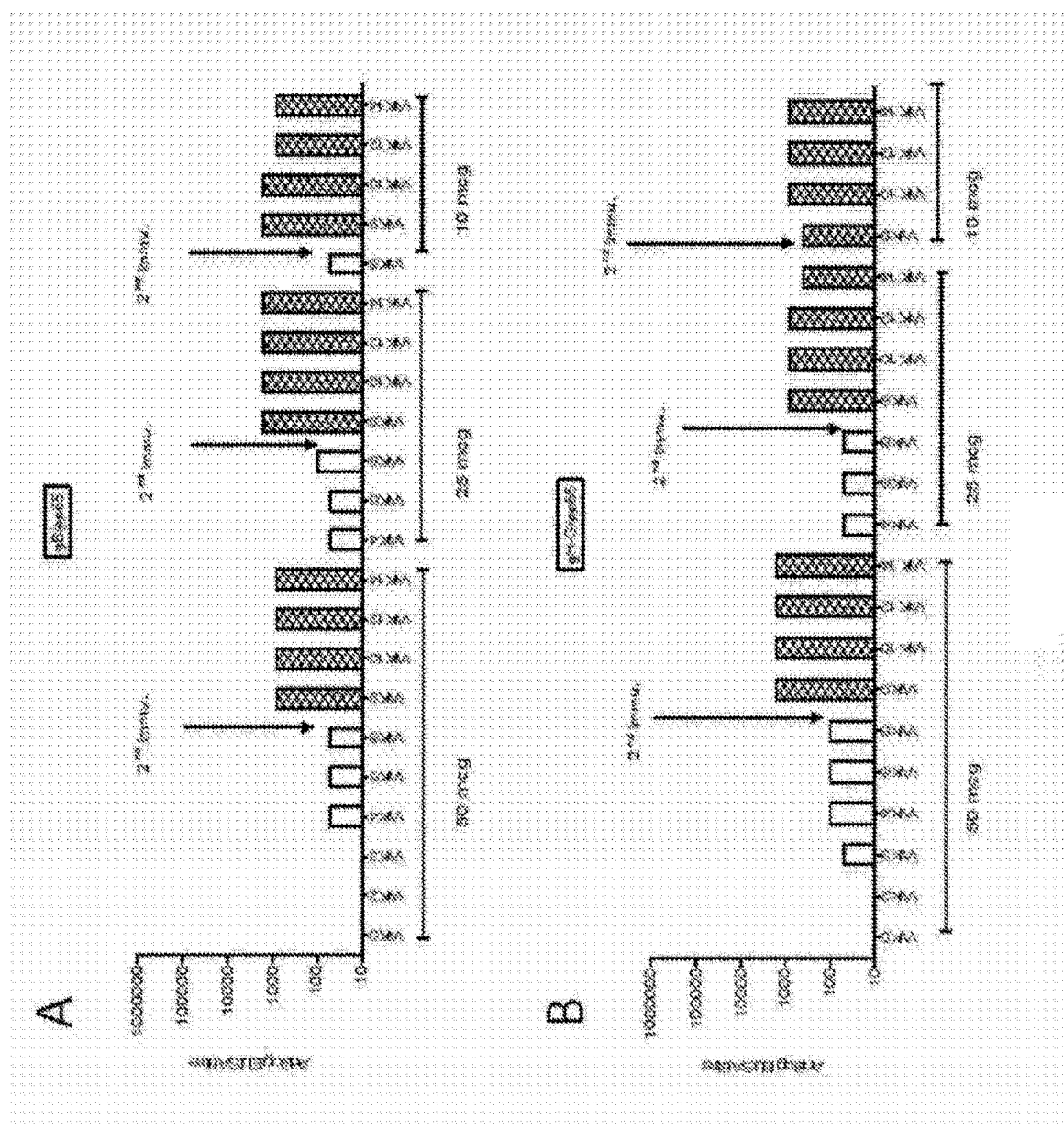


图 4

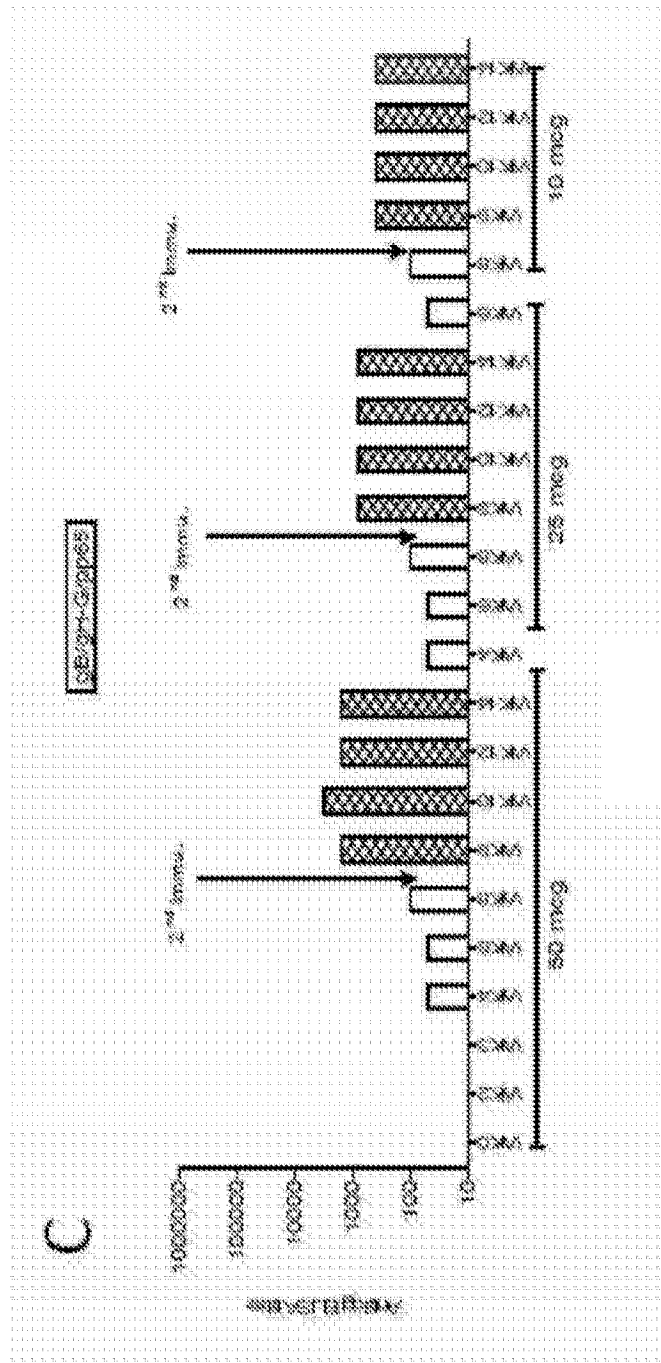


图 4

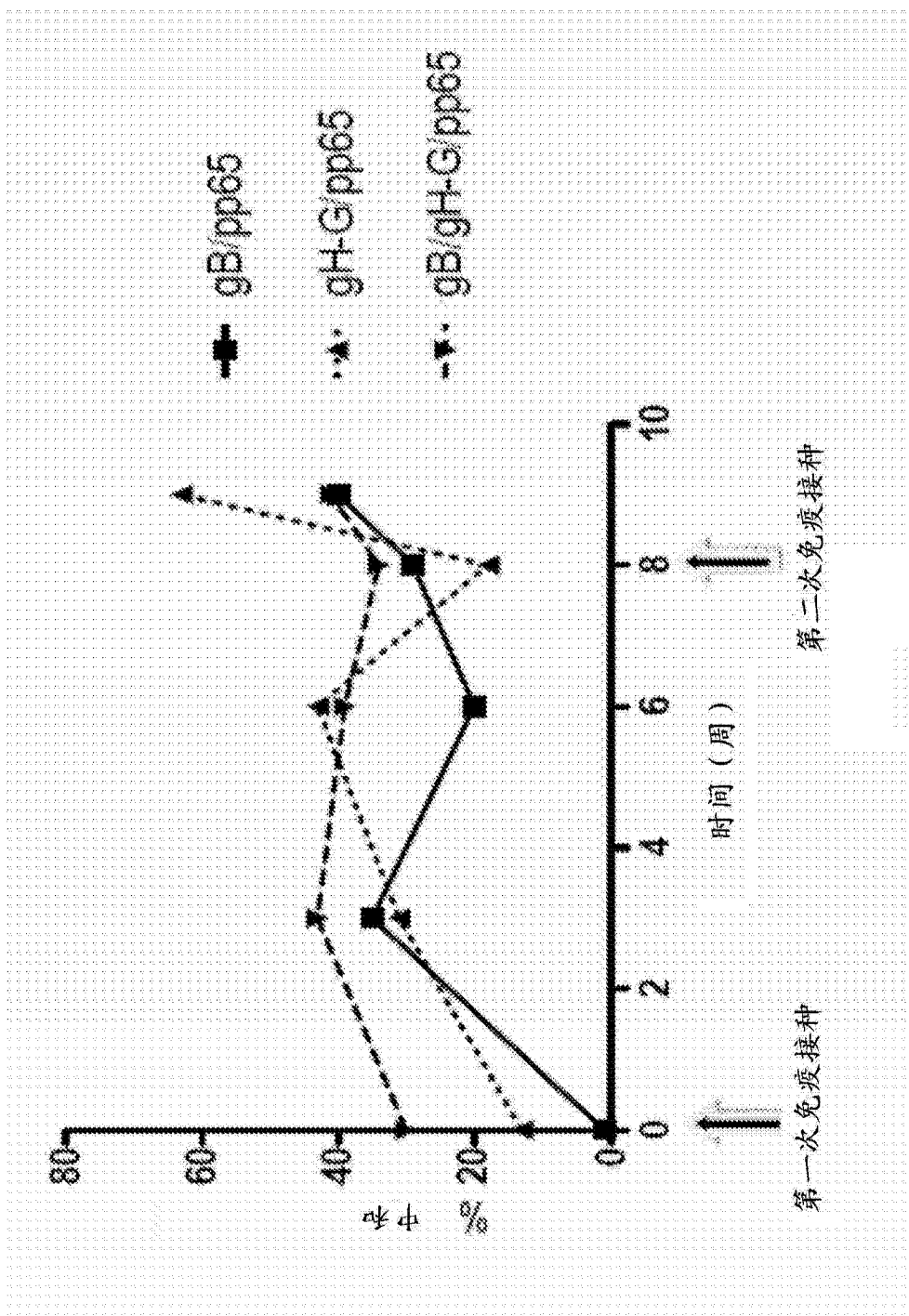


图 5

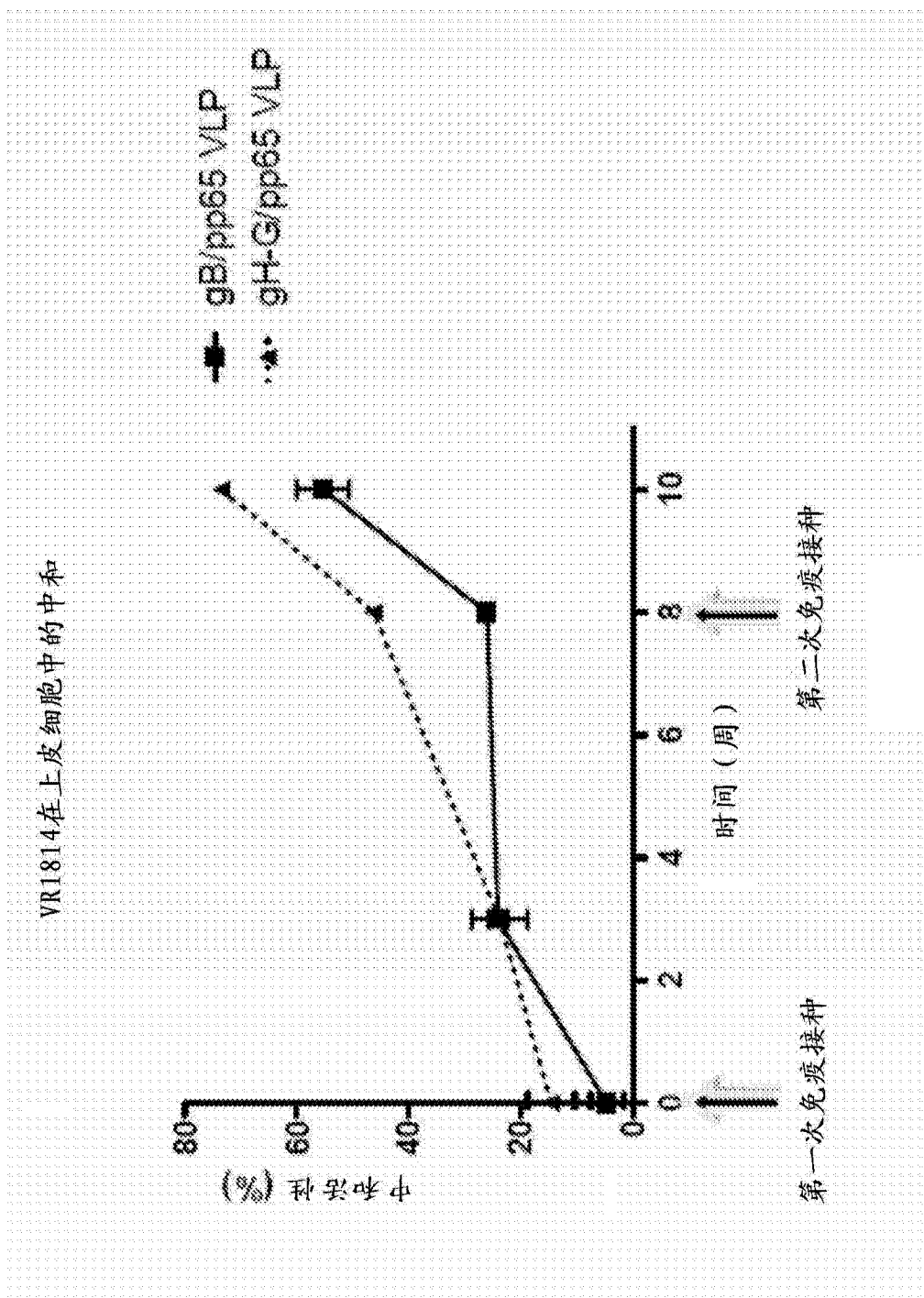


图 6

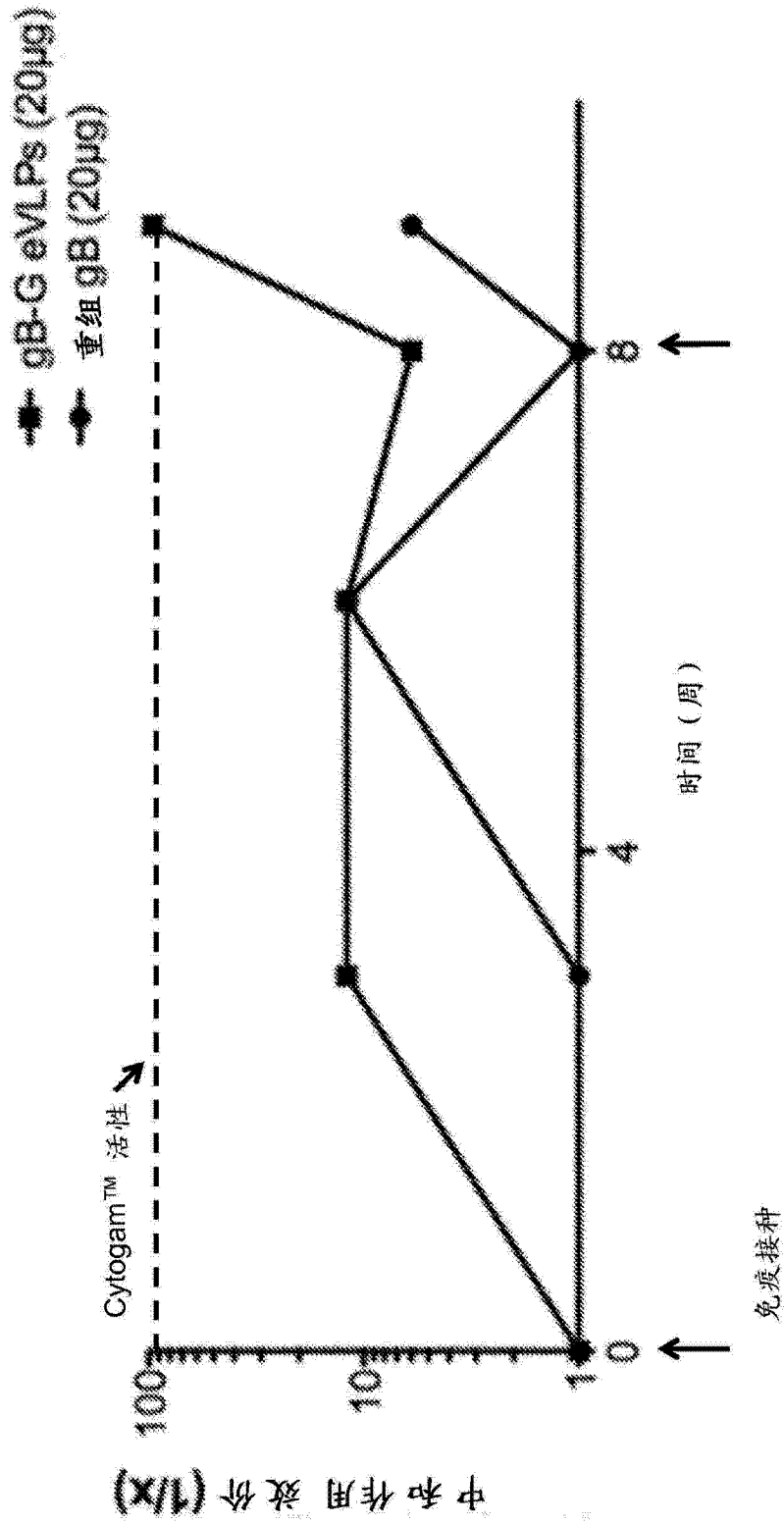


图 7

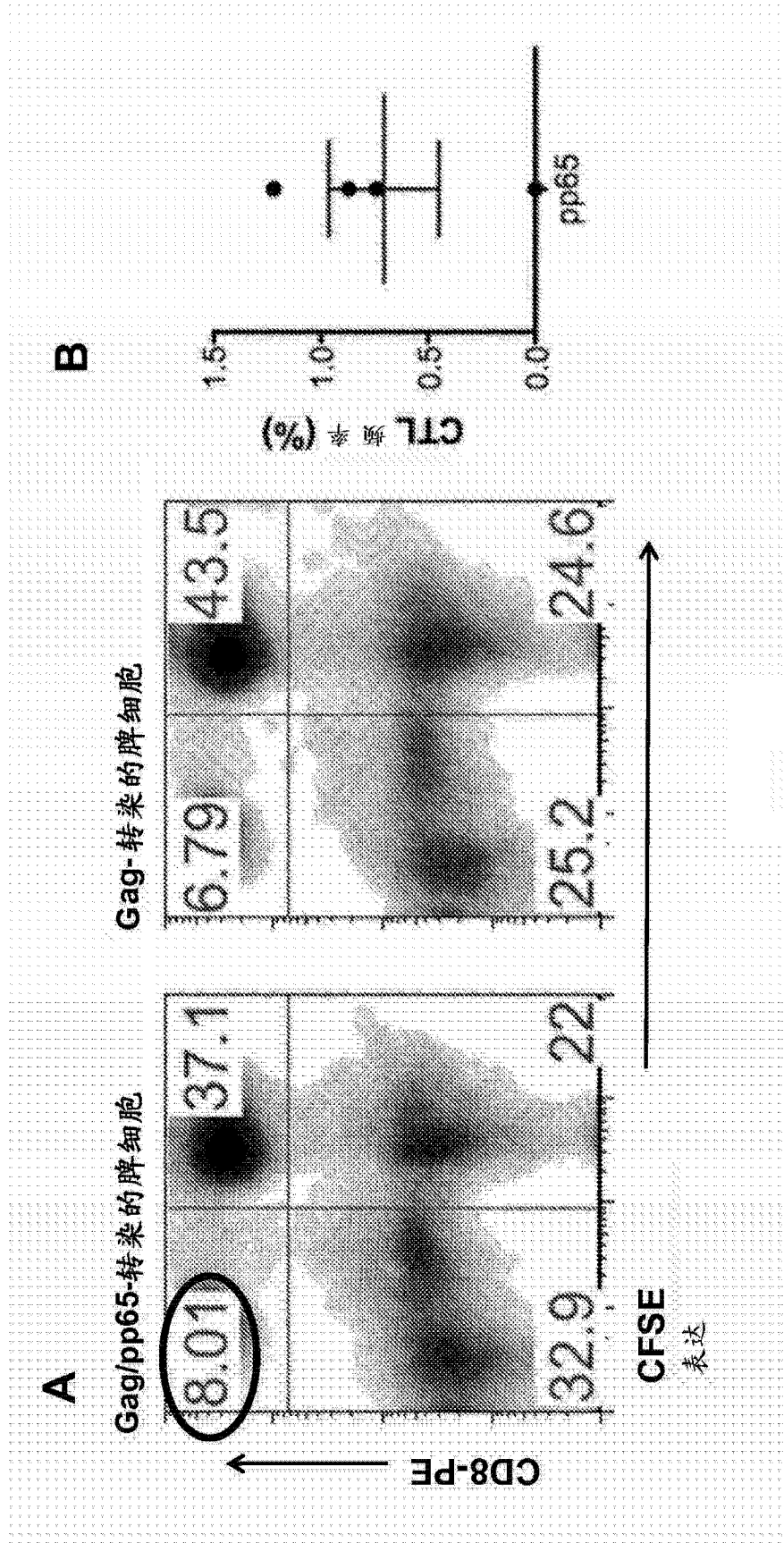


图 8

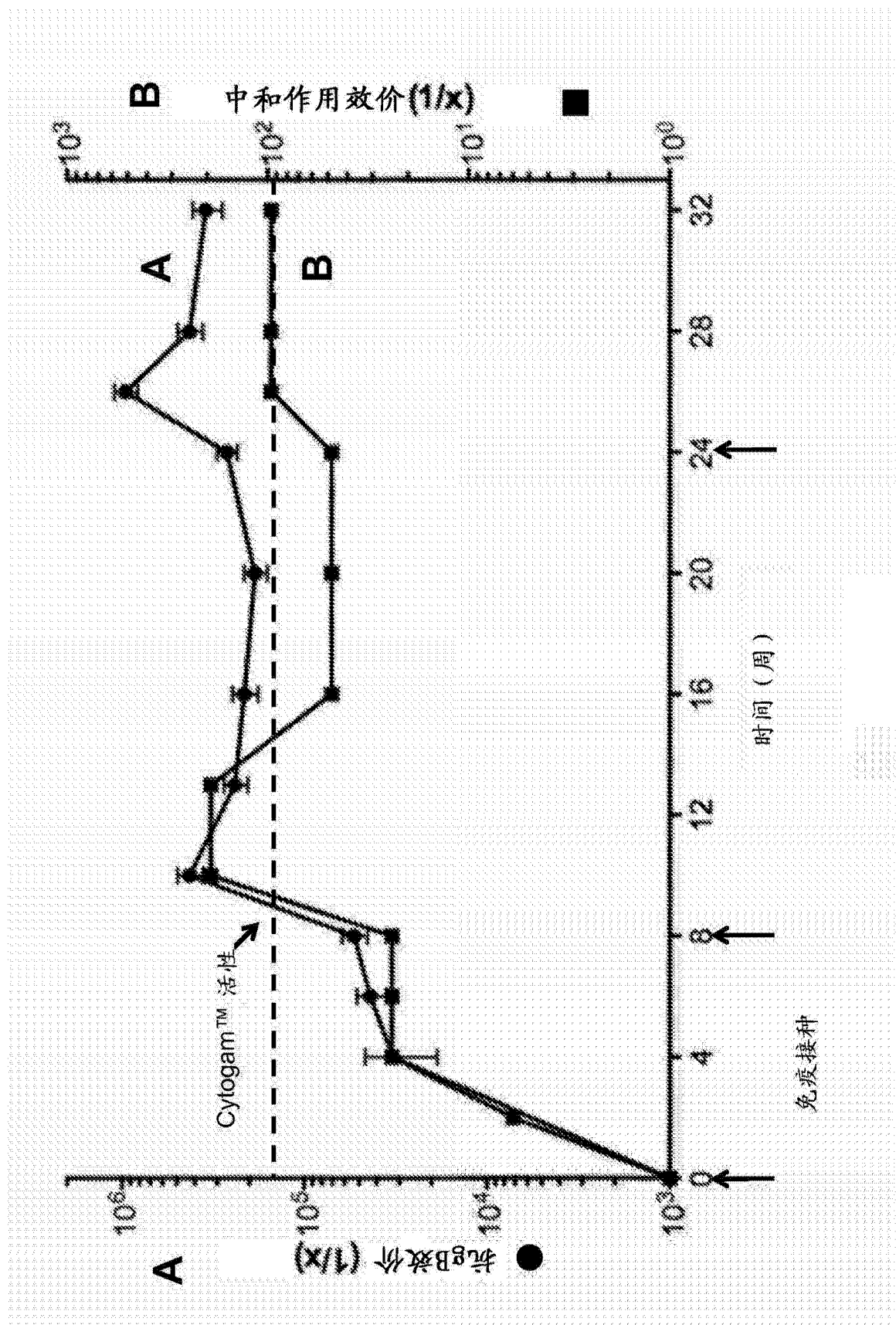


图 9

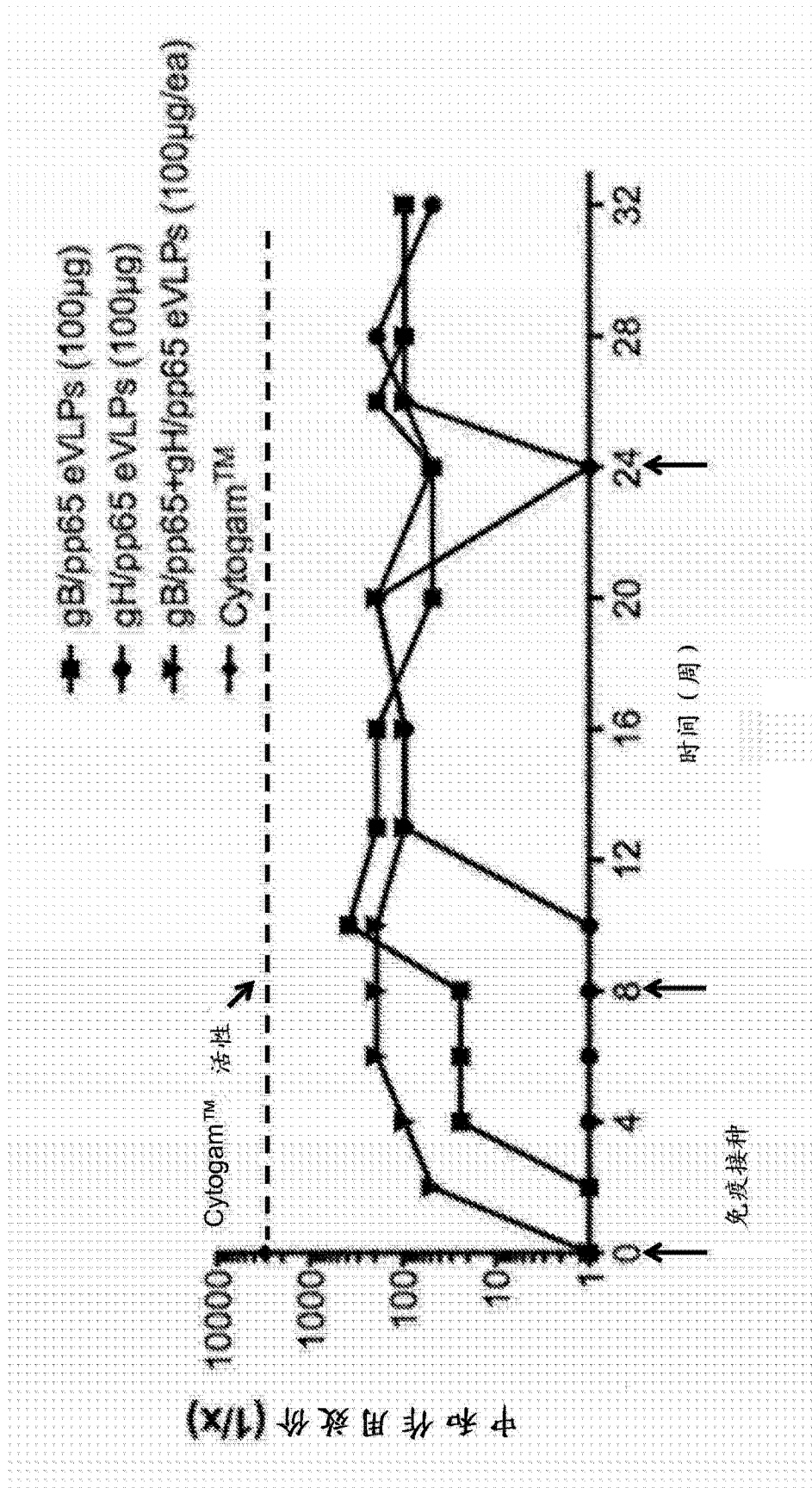


图 10

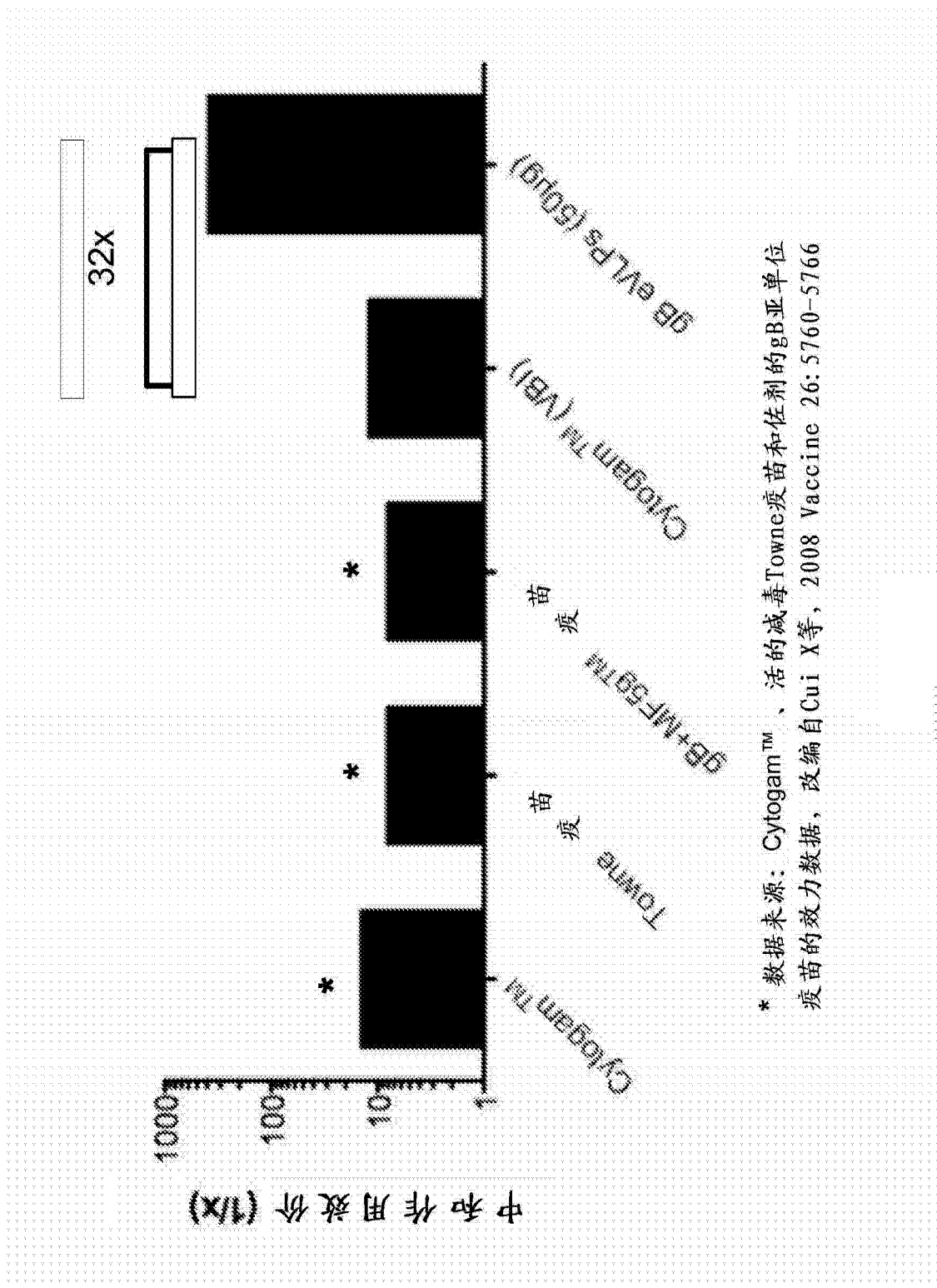


图 12

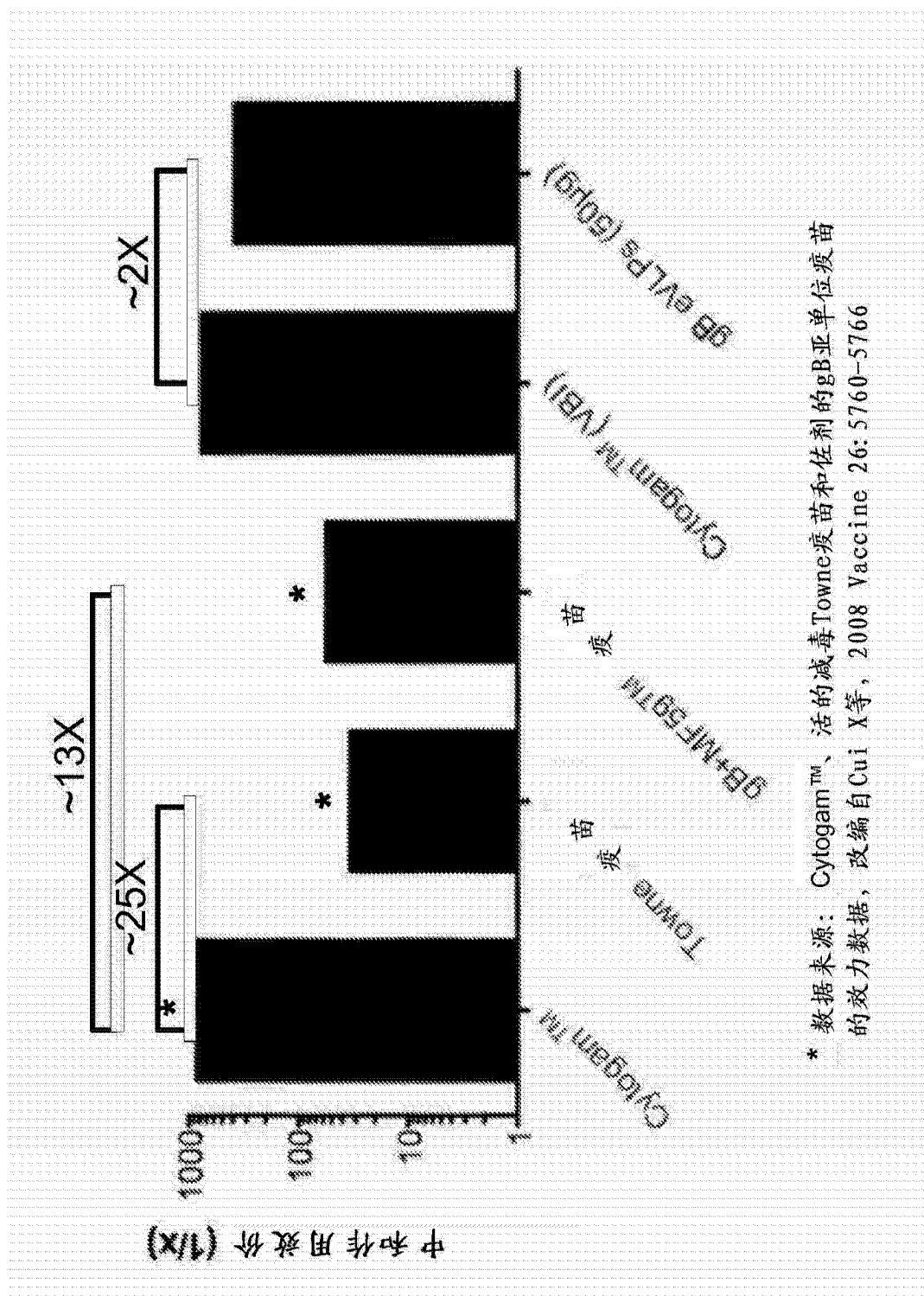


图 13

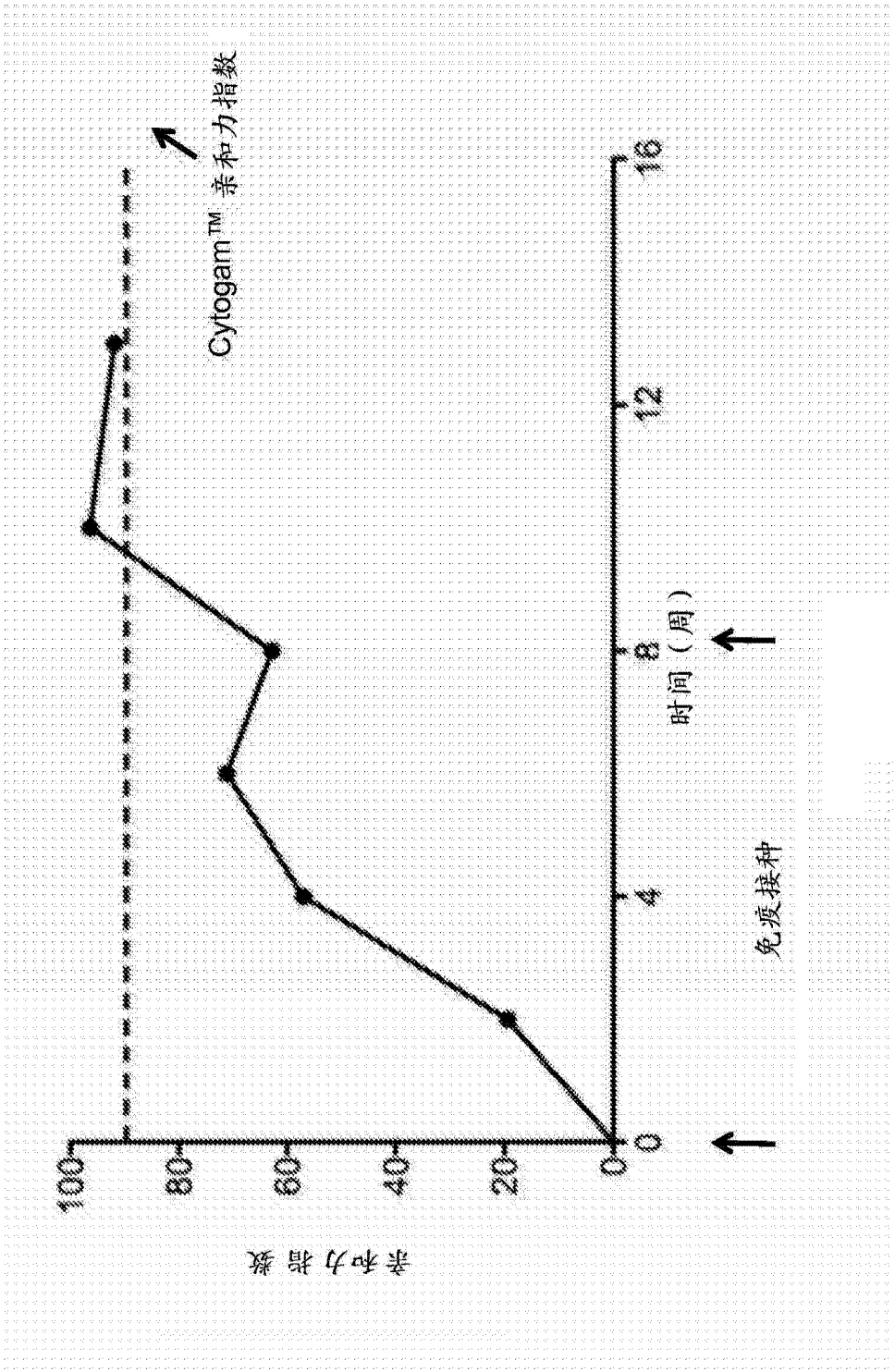


图 14