



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107208110 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201580057749.2

(22)申请日 2015.10.26

(30)优先权数据

62/068316 2014.10.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2015/092836 2015.10.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/062294 EN 2016.04.28

(71)申请人 港大科桥有限公司

地址 中国香港数码港

申请人 南京大学

(72)发明人 陈志伟 吴喜林 吴稚伟

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 初明明 黄希贵

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/49(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页 附图12页

(54)发明名称

用于诱导特异性抗体和细胞免疫的DNA基序化合物和方法

(57)摘要

本发明涉及应用免疫技术和医药领域。更具体地说,它涉及DNA基序疫苗设计、糖-DNA基序疫苗设计和免疫原设计,用于产生针对任意序列的表位或多糖表位,特别是否则很难诱导抗体的那些表位,例如HIV-1的表位的抗体。本发明还涉及免疫原设计以诱导稳健的细胞和体液免疫。

1. 一种DNA基序疫苗,其包含:
具有核酸序列的质粒,所述核酸序列编码第一多个氨基酸残基GPG和侧接第一多个氨基酸残基的第二和第三多个随机氨基酸残基,其中所述疫苗诱导针对HIV的广泛中和抗体。
2. 权利要求1的DNA基序疫苗,其中所述质粒具有pVAX载体骨架。
3. 权利要求2的DNA基序疫苗,其中所述质粒选自PD1-P24-pVAX、PD1-OVA-pVAX和CTLA4-P24-pVAX。
4. 权利要求3的DNA基序疫苗,其中所述质粒包括选自SEQ ID NO: 7、8和9的引物。
5. 权利要求1的DNA基序疫苗,其中第一多个氨基酸残基的长度范围是在基序序列的中心的3至30个氨基酸残基。
6. 权利要求1的DNA基序疫苗,其中随机氨基酸残基范围是5至50个氨基酸残基并由15至150个核苷酸长度范围的核苷酸片段编码。
7. 一种糖-DNA基序疫苗,其包含:
选自160M01、160M02、160M03、295M01、332M01和332M02的质粒,其中所述质粒包含编码基序肽NxS/T的糖基化基序基因,和其中糖-DNA基序疫苗诱导对gp120特异性的抗体。
8. 权利要求7的糖-DNA基序疫苗,其中糖基化基序肽NxS/T被修饰以在天冬酰胺(N)的氨基酸残基上添加宿主来源的碳水化合物,用于促进体内肽表达。
9. 权利要求7的糖-DNA基序疫苗,其能够诱导针对糖原表位的抗体,以抑制病毒或细菌感染,包括HIV感染。
10. 权利要求7的糖-DNA基序疫苗,其中所述质粒包括选自SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18和19的引物。
11. 权利要求7的糖-DNA基序疫苗,其包含质粒160M01。
12. 权利要求11的糖-DNA基序疫苗,其中所述质粒160M01通过在HIV gp120中插入编码N160的糖基化肽的基序基因构建。
13. 权利要求7的糖-DNA基序疫苗,其中所述质粒是具有pVAX骨架的PD1-p24质粒。
14. 一种抑制HIV-1感染的方法,其包括给予有需要的患者权利要求11的DNA基序疫苗。
15. 一种在患者中诱导细胞和体液免疫反应的方法,其包括给予权利要求1或权利要求7的DNA基序疫苗。
16. 一种在患者中诱导细胞和体液免疫反应的方法,其包括给予权利要求1和权利要求7的DNA基序疫苗。
17. 一种DNA基序免疫的方法,其包括用权利要求1或权利要求7的DNA基序疫苗免疫动物模型或人类受试者。
18. 一种诱导针对HIV的广泛中和抗体的药试剂盒,所述药试剂盒包含:
治疗有效量的权利要求1的DNA基序疫苗。
19. 权利要求18的药试剂盒,其中DNA基序疫苗的质粒还包含选自SEQ ID NO: 7、8和9的引物。
20. 一种诱导针对HIV的广泛中和抗体的药试剂盒,所述药试剂盒包含治疗有效量的权利要求7的糖-DNA基序疫苗。
21. 权利要求20的药试剂盒,其中糖-DNA基序疫苗的质粒还包含选自SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18和19的引物。

用于诱导特异性抗体和细胞免疫的DNA基序化合物和方法

[0001] 相关申请的交叉参照

本申请要求2014年10月24日提交的美国临时申请系列号62/068,316的优先权,其通过引用以其整体结合到本文中。

[0002] 1. 领域

本申请涉及应用免疫技术和医药领域。更具体地说,它涉及DNA基序疫苗设计或免疫原设计,用于产生针对难以诱导抗体的任意序列的表位或多糖表位的抗体。

[0003] 2. 背景

人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)是一种高度变异的病毒,其可在不同的感染阶段,在不同的病毒颗粒/被膜区中变异,并且甚至在同一患者中显示出不同的突变。这种高突变率是生产针对HIV-1的疫苗的多次失败的主要原因。由许多实验性疫苗诱导的抗体不能结合和中和HIV-1病毒颗粒,因为HIV-1病毒变异以避免被靶向抗体捕获。广泛中和抗体(bNAb),例如b12、447-52D、PGT128、VRC01、10E8,已在非人类灵长类动物的被动免疫和攻击研究中表现出保护作用。然而,到目前为止,由于这些区域的弱免疫原性,尚没有能够诱导针对高度保守的HIV-1病毒表位的广泛中和抗体的疫苗。

[0004] 此外,HIV-1的表面抗原,gp120,被大量的各种N-连接的聚糖覆盖。这些宿主来源的碳水化合物结构包含gp120的一半质量并遮蔽了非常多的基础蛋白表面,其在感染和免疫逃避中发挥重要的功能作用。已显示出结合于gp120的宿主来源的碳水化合物的广泛中和抗体如PG9、PG16、PGT128和2G12提供针对HIV感染的保护作用。这些结果提示,诱导结合gp120的碳水化合物的表位的广泛中和抗体的疫苗可预防HIV感染。然而,尚无在体外合成这些呈现与体内gp120的宿主来源的碳水化合物结构类似的构型的宿主来源的多糖的有效方法。另外,宿主来源的多糖属于T细胞非依赖性抗原,其显示出弱免疫原性。因此,诱导对宿主来源的碳水化合物特异性的抗体是困难的。尽管到目前为止产生的各种类型的疫苗—包括减毒疫苗、病毒样颗粒、蛋白和肽—它们都不能防止高度突变的和高度糖基化的HIV-1感染。

[0005] 肽基序免疫是一种在HIV动物模型(包括小鼠、兔和恒河猴)中,能够诱导针对HIV-1被膜蛋白的高度保守和功能性结构域的广泛中和抗体(bNAb)的技术。虽然针对弱免疫原性表位的bNAb在如在WO/2013/040564中描述的这些实施例和模型中被肽基序免疫诱导,但它不能引发针对宿主来源的碳水化合物的抗体,所述碳水化合物难以在体外合成以确保其构型与在体内修饰的天然状态类似。此外,肽抗原的半寿期远短于DNA抗原且它不能诱导针对HIV-1感染的细胞免疫。尽管针对HIV的稳健细胞免疫已由先前构建的PD1-P24的质粒诱导,但针对HIV-1的中和抗体则不能通过这样的方法引发。到目前为止,尚无显示出稳健的细胞免疫的针对HIV-1的成功疫苗。大量的数据表明,bNAb对于抑制HIV-1感染是重要的。因此,存在对诱导bNAb并且还显示出针对HIV-1的稳健细胞免疫的HIV-1疫苗的持续需求。

[0006] 3. 概述

本公开内容的一个目的是提供用于引发针对HIV的免疫反应的DNA基序疫苗。更具体地说,本申请提供用于诱导针对HIV的广泛中和抗体(bNAb)的DNA基序疫苗和糖-DNA基序疫

苗。

[0007] 根据本发明的一个方面，DNA基序疫苗包含至少一种包含核酸序列的质粒，所述核酸序列编码在基序序列中心的第一多个氨基酸残基，和在侧接第一多个氨基酸残基的区域中的第二和第三多个随机氨基酸残基，使得第一多个氨基酸残基包括氨基酸序列GPG。

[0008] 根据本发明的另一方面，DNA基序疫苗可包含具有pVAX载体骨架的质粒。在至少一个方面，所述质粒可选自PD1-P24-pVAX、PD1-OVA-pVAX，和CTLA4-P24-pVAX。

[0009] 根据另一方面，DNA基序疫苗的质粒可包括选自以下的引物：

Fc正向5' (GGC CCCGGC NNB NNB NNB NNB NNB NNB ATCCTGATGCAGTACATCAAGG) 3' (SEQ ID NO: 7)；

P24反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGCAAAACTCTTG) 3' (SEQ ID NO: 8)；和

OVA反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGAGGGGAAACA) 3' (SEQ ID NO: 9)。

[0010] 根据另一方面，在基序序列中心的第一多个氨基酸残基的长度范围可为3至30个氨基酸残基。

[0011] 根据另一方面，随机氨基酸残基范围可为5至50个氨基酸残基，并由范围从15至150个核苷酸长度的核苷酸片段编码。

[0012] 根据另一方面，可提供糖-DNA基序疫苗，其中糖-DNA基序疫苗包含选自160M01、160M02、160M03、295M01、332M01和332M02的质粒，和质粒包含编码基序肽NxS/T的糖基化基序基因，其中糖-DNA基序疫苗诱导对gp120特异性的抗体。

[0013] 根据进一步的方面，糖基化基序肽NxS/T可被修饰以在天冬酰胺(N)的氨基酸残基上加入宿主来源的碳水化合物，用于促进体内肽表达。

[0014] 根据另一方面，糖-DNA基序疫苗可诱导针对糖原表位的抗体，以抑制病毒或细菌感染，包括HIV感染。

[0015] 根据另一方面，糖-DNA基序疫苗的质粒可包含选自以下的引物：AACTGCTCCTTCAACATCACCACCNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 13)；

AACNNBTCCNNBAACNNBACCACCNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 14)；

NNBNNBTCCNNBAACNNBACCACCNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 15)；

ATCAACTGCACCCGCCNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 16)；

GCCCACTGCAACATCTCCNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 17)；

GCCNNBTGCAACNNBTCCNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 18)；和

VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGAGGGGAAACA (SEQ ID NO: 19)。

[0016] 根据另一方面，糖-DNA基序疫苗包含质粒160M01。根据进一步的方面，质粒160M01可通过在HIV gp120中插入编码N160的糖基化肽的基序基因构建。

[0017] 根据另一方面,糖-DNA基序疫苗的质粒是具有pVAX骨架的PD1-p24质粒。

[0018] 根据另一方面,本发明提供抑制HIV-1感染的方法,其包括给予有需要的患者DNA基序疫苗。根据进一步的方面,所述方法包括给予具有质粒160M01的DNA基序疫苗。

[0019] 根据另一方面,本发明提供一种在患者中诱导细胞和体液免疫反应的方法,其包括给予DNA基序疫苗。

[0020] 根据另一方面,本发明提供一种DNA基序免疫的方法,其包括用DNA基序疫苗免疫动物模型或人类受试者。

[0021] 根据另一方面,本发明提供一种诱导针对HIV的广泛中和抗体的药剂盒,其中药剂盒包含治疗有效量的DNA基序疫苗。根据进一步的方面,药剂盒的DNA基序疫苗可包括选自SEQ ID NO: 7、8和9的引物。

[0022] 根据另一方面,本发明提供一种诱导针对HIV的广泛中和抗体的药剂盒,所述药剂盒包含治疗有效量的糖-DNA基序疫苗。根据进一步的方面,药剂盒的糖-DNA基序疫苗可包括选自SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、18和19的引物。

[0023] 4. 附图简述

图1A-C包括4个DNA基序质粒的表(图1A)以及基序序列(GPG)的序列确认(图1B)。图1A中所示的4个质粒构建体经测序验证。图1A显示4个DNA基序质粒(包括3个新的DNA基序质粒库)的每一个的组件,其在pVAX质粒的背景上建立,并且其全部含有插入的基因基序“GPG”。质粒PPC被用作对照,因为它缺乏插入的基序基因。在图1B中,由在PPMC质粒中插入的基因基序编码的氨基酸序列经测序确定并通过Clustalw软件比对。其在weblogo的格式中显示。氨基酸残基的高度表示不同的质粒克隆中保守的比率(较高的字母表示更大的保守)。X轴表示由插入的基因编码的氨基酸残基的位置。图1C是来自基序库的代表性质粒(含有基序序列GPG)的氨基酸测序结果的表。

[0024] 图2显示对于4个质粒的荧光-活化细胞分选(FACS)蛋白表达结果。对于FACS分析,293T细胞用每个不同的质粒瞬间转染。MOCK转染被用作无质粒的阴性对照,而PPC是用作蛋白表达的阳性对照的背景质粒,如先前所表征的。PPMC、POMC和CPMC质粒是目前构建的DNA基序疫苗质粒,每个含有插入的编码GPG氨基酸基序的基因基序。FACS测定蛋白的表达。前5个图是通过流式细胞仪检查的斑点图(dot spot diagrams),而最后的图描述每个相应的质粒的直方图,黑实线作为阴性对照。

[0025] 图3A-B是说明从使用3个DNA基序疫苗质粒和对照质粒作为免疫原生成抗血清的图。图3A显示通过ELISA检测的针对HIV-1 P24的抗血清的滴度。图3B显示在使用3个DNA基序疫苗质粒和对照质粒用作免疫原生成的样本上,通过流式细胞仪检查的与来自293T细胞上的不同亚型的HIV的gp160结合的抗血清。

[0026] 图4A-B显示中和测定的结果,具体地说是说明中和不同亚型的HIV的抗血清特征的图和表。在图4A中,PPMC质粒导致中和不同亚型的HIV的抗血清的产生(虚线是对照)。图4B是列出针对HIV假病毒的不同抗血清的ND50的汇总表。在ND50下的深色阴影列代表超过40稀释度的ND50,和4E10是熟知的用作阳性对照的bNAb。

[0027] 图5显示DNA基序疫苗诱导的p24-特异性四聚体-阳性和长期记忆CD8+T细胞反应的流式细胞术数据。特别是,流式细胞术的图显示在最终免疫后2周,CD8+ T细胞群的HIV-1 p24-特异性H2-Kd-AMQMLKDTI-PE四聚体染色,和数据被表示为最后的小图中的柱形图。

[0028] 图6A-B是显示小鼠模型中DNA基序引起的抗原特异性免疫的比較的图。根据免疫计划表,用100 μg DNA i.m/EP对BALB/c小鼠进行接种。在图6A-B中,在分别使用特异性肽GAG A-I和GAG 26刺激的BALB/c脾细胞中,通过ELISPOT测定法测定产生IFN- γ -的CD8+细胞(图6A)和CD4+细胞(图6B)。

[0029] 图7A-D显示对糖-DNA基序质粒构建体的序列分析和基序序列。在图7A-C,将含有N160(图7A)、N295(图7B)或N332(图7C)的糖基化结构域的不同结构域在得自HIV数据库的HIV分离株的4633个序列中进行比对。Y轴代表保守的序列比率,和X轴描述通过用根据HXB2编号标记的位置编号定位的氨基酸残基。在图7D中,表格是糖-DNA基序构建体的概要,其中的每一个将起着免疫不同的组的作用。所列出的基序序列是通过插入到PD1-P24质粒中的基序基因编码的序列,如对于本文根据一个或多个实施方案描述的PPMC质粒。

[0030] 图8A-F显示6个不同的糖-DNA基序质粒的序列比对,如通过测序所证实的。对每组糖-DNA基序质粒库的超过60个克隆测序,并比对每个库的测序结果。氨基酸残基的高度代表存在于不同克隆中的残基的保守百分率。

[0031] 图9显示用指定的不同质粒瞬间转染293T细胞的FACS数据。MOCK被用作无质粒的阴性对照,和PPC是作为阳性对照的背景质粒。糖-DNA基序质粒160M01、160M02、160M03、295M01、332M01和332M02是新构建的含有如图8A-F中所示的不同糖基化基序的质粒。

[0032] 图10A-B显示中和测定的结果,特别是该图显示了针对不同亚型的HIV的抗血清滴度和中和作用的特征。在图10A中,针对P24的抗血清的滴度通过ELISA检测。在图10B中,通过使用针对不同亚型的HIV的假病毒中和作用来表征来自不同的糖-DNA基序免疫的抗血清。阴性对照是来自PBS组的抗血清,和VRC01(一种熟知的中和抗体)被用作阳性对照。Mu1v是由鼠白血病病毒被膜蛋白与PNL4-3骨架的gag-pol构成的假病毒,其被用作阴性病毒。

[0033] 图11A-B是显示抗血清结合gp120的膜印迹或凝胶。与gp120结合的抗血清通过蛋白质印迹表征。对于两种凝胶,泳道1、3、5和7显示亚型IIIB、ADA、JR-FL和SF162的gp120蛋白。对于两种凝胶,泳道2、4、6和8显示相同的4个不同的亚型gp120,其中多糖通过EndoH除去。图11A显示与160M01抗血清一起孵育的具有转移gp120的膜。图11B显示与来自HIV阳性病人的抗血清一起孵育的具有转移gp120蛋白的膜。

[0034] 图12显示用于构建本文根据一个或多个实施方案描述的DNA基序质粒的pVAX-1载体的关键特征和序列。

[0035] 4.1 定义

如本文所用的术语例如“a”、“an”或“one”一般指“至少一个”或“一个或多个”,除非另外指明。此外,术语“包含”意欲指“包括”,因而允许除了那些明确地叙述之外的其它组分、特征、条件或步骤的存在。

[0036] 如本文所用的术语“抗体”一般包括单克隆和多克隆抗体。更具体地说,术语“抗体”也可包括全长单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如,双特异性抗体),和抗体片段,只要它们显示出所需的生物学活性,即发挥如在下文的详细描述中描述的功能即可。

[0037] 术语“抗原”一般指被免疫系统的特异性识别组件(如,抗体、T-细胞)识别的物质。

[0038] 术语“广泛中和作用”、“广泛地中和”等,一般指可中和一种以上亚型的病毒的抗体(如,“广泛中和抗体[bNAbs])或血清。

[0039] 术语“DNA基序疫苗”指包含DNA分子的疫苗,所述DNA分子具有编码一种或多种针对特异性基序氨基酸残基、蛋白、肽或多肽的基因的DNA序列,其在疫苗接受者中产生编码的基序氨基酸残基、蛋白、肽或多肽以引发免疫反应。

[0040] 术语“表位”一般指被免疫系统,例如被抗体、B-细胞或T-细胞识别的抗原或免疫原中的区域。如本文所用的,“表位”通常指至少约3-5,优选地约5-10或15,且不超过约1,000个氨基酸(或其间的任何整数)的序列,其定义本身或作为较大序列的一部分来结合响应这样序列而生成的抗体或刺激细胞免疫反应的序列。术语“表位”可涵盖与天然序列相同的序列,以及对天然序列的修饰,例如缺失、添加和取代(通常在性质上保守)。在某些实施方案中,用于本发明的抗原可仅包含单一表位,GPG。

[0041] “HIV”一般指人免疫缺陷病毒1(HIV-1),除非另外指明。

[0042] 术语“免疫原”一般指能够在个体中诱导适应性免疫反应的物质,其中所述适应性免疫反应靶向免疫原。关于当前的应用,免疫原将诱导与免疫原反应的抗体。换言之,免疫原可以是能够诱导免疫的抗原。

[0043] 如本文所用的术语“核酸片段”和“核酸序列”被理解为任何核酸分子。该术语包括任何长度的核酸分子,例如从10至10000个核苷酸,这取决于应用。当核酸分子用作药物,例如在DNA疗法中,或用于生产根据本公开内容的多肽的方法时,优选使用编码至少一个表位的分子,其具有长度约3-10、10-15、15-18、18-100、100-200、200-400、400-1000个核苷酸,所述分子任选插入载体中。

[0044] 如本文所用的术语“多肽”应具有其通常的意义。它是一个任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白、寡肽、短肽及其片段,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。多肽可通过糖基化,通过脂化(例如通过如Mowat等1991所述用棕榈酰氧基琥珀酰亚胺或如由Lustig等1976所述用十二碳酰氯经化学脂化),通过包含辅基,或通过包含额外的氨基酸例如his-标签或信号肽,经化学修饰。因此,每个多肽可由特定的氨基酸表征,并由特定的核酸序列编码。应该理解,这样的序列包括通过重组或合成方法产生的类似物和变体,其中这样的多肽序列已通过重组多肽中取代、插入、添加或缺失一个或多个氨基酸残基进行修饰并且在本文所述的任何生物学测定中仍然是免疫原性的。取代优选地是“保守的”。每个多肽被特定的核酸序列编码。应该理解,这样的序列包括其类似物和变体,其中这样的核酸序列已通过取代、插入、添加或缺失一个或多个核酸进行修饰。取代优选地是在密码子使用中的沉默取代,其不会导致氨基酸序列的任何改变,但可能被引入以增强蛋白的表达。

[0045] 如本文所用的术语“治疗性免疫”或“治疗性免疫反应”一般指针对传染因子的免疫或引发免疫反应,其改善或消除感染或减轻其至少一种症状。

[0046] 术语“疫苗”一般指包含免疫原的组合物,并且其能够诱导免疫反应,所述免疫反应能够减少发展病理状态的风险或者能够诱导治疗有效的免疫反应,后者可有助于病理状态的治愈(或至少减轻其症状)。

[0047] 5. 详细描述

有两个主要的理由导致预防性AIDS疫苗失败。一个是HIV-1的被膜蛋白是高度突变的。另一个是HIV-1颗粒被多糖严重覆盖。

[0048] 本申请涉及一个新的疫苗策略,DNA基序免疫,其可生成针对保守的结构域并且也针对经体内修饰以引发抗体的多糖表位的抗体。作为对于DNA基序免疫的概念验证(POC),

一个DNA基序质粒库(称为PPMC)通过引入侧接固定的靶定表位两侧的随机核苷酸构建。这种固定的靶定表位可编码范围5-50个氨基酸残基的长度的氨基酸片段。这种DNA基序质粒库(PPMC),当用作免疫原以接种小鼠时,诱导100%中和测试的各种亚型的HIV-1株(在V3区含有GPG基序)的GPG-特异性抗体。另外,构建含有糖基化基序(如,NXS/T)的6组DNA基序库(本文称为糖-DNA基序)。特别是,160M01糖-DNA基序质粒疫苗诱导对gp120的多糖特异性的抗体。

[0049] 本申请的一个目的是构建一种新的形式的DNA疫苗,称为DNA基序疫苗。为此,一系列引物库被合成以将基序基因引入pVAX骨架载体的骨架中。测序结果和FACS数据表明,肽基序构建可通过这些方法,使用本文描述的引物组合,在DNA基序质粒中复制(图1A-B和图2)。此外,含有糖基化编码基因的糖-DNA基序质粒也被构建并通过相同的策略证实(图7A-D)。因此,在此创立了引发所需免疫反应的两种新的技术,一种利用常规DNA基序疫苗的形式,而另一种使用糖-DNA基序。

[0050] 因此,本申请的另一个目的是提供一种用于DNA基序疫苗的免疫原设计的新方法,所述疫苗能够引起针对病毒感染(例如,HIV感染)的治疗意义的抗体。DNA基序免疫的概念验证首次得以实现。特别是,本文表明PPMC,DNA基序质粒之一,可诱导针对含有GPG表位的天然蛋白的高滴度抗体(图2)。另外,进行了一组HIV假病毒中和实验,这表明由PPMC诱导的抗血清可中和各种亚型的HIV感染,所述HIV含有在V3环顶端的GPG表位。

[0051] 本申请的再另一个目的是提供能够诱导稳健的细胞免疫的DNA基序疫苗。在DNA基序免疫后,提取PBMC和脾细胞以测试细胞免疫的功效。该数据显示,PPMC组诱导对CD8表位有特异性的高百分比的阳性T细胞(图5),并在加入CD4和CD8表位肽后引起细胞分泌IFN- γ (图6)。这些数据说明本文描述的DNA基序疫苗可诱导稳健的细胞免疫。

[0052] 本申请的更进一步的目的是提供能够诱导对不同的蛋白(例如HIV的gp120)上的宿主来源的碳水化合物有特异性的抗体的糖-DNA基序疫苗。在用160M01质粒进行糖-DNA基序免疫后,通过蛋白质印迹法,测试抗血清对gp120的不同亚型和gp120的结合。结果表明,由160M01诱导的抗血清可特异性地结合天然gp120,而不是无糖原的gp20,表明这样的抗血清特异性地结合gp120上的宿主来源的碳水化合物。总之,糖-DNA基序可诱导对宿主来源的碳水化合物有特异性的抗体。

[0053] 本申请的进一步的目的是提供DNA基序疫苗,其能够在罹患病毒感染的患者中引起产生针对保守的结构域或宿主来源的碳水化合物表位的治疗有效的抗体和稳健的细胞免疫。在本文测试的质粒中构建的DNA基序可在动物模型中诱导针对HIV被膜蛋白的保守结构域和糖原的广泛中和抗体和稳健的细胞免疫。

[0054] 肽基序免疫,如在W02013/040564中所述,引起对不同亚型的HIV-1的NJU009中和抗体;而肽免疫的缺点包括呈现出与蛋白免疫和DNA免疫对比的较短的半寿期,其中DNA免疫呈现出最长的半寿期。另外,与肽免疫比较,DNA免疫可引起稳健的细胞免疫。此外,在DNA免疫期间,DNA质粒可在肌细胞中转染以表达并用多糖修饰,如果它在体内含有糖基化基序的话。目前的结果建立用于可提高免疫力的DNA免疫的PD1靶向DC细胞的平台(PD1-P24、PPC),同时引起针对HIV-1感染的细胞免疫,而不诱导针对HIV-1的bNAbs。最后,如本文描述的进一步的结果说明组合PD1靶向DC细胞的肽基序和DNA免疫,以构建DNA基序免疫的优点。

[0055] 在此,合成一系列引物库。在一个或多个实施方案中,基序基因被引入PD1-P24载

体的骨架。测序结果和FACS数据表明,通过目前的引入本文所述的基序基因/引物库的方法,肽基序构建可在DNA基序质粒中复制。DNA基序免疫的概念验证被首次显示,证明PPMC也可诱导对GPG表位特异性的bNAb和稳健的细胞免疫。此外,这种方法被用来构建糖-DNA基序,例如160M01,以诱导对多糖表位的天然构型特异性的抗体。HIV颗粒被多糖严重遮蔽,因而对开发靶向多糖的中和抗体有着迫切的需求。对于常规抗原,像蛋白质,当用注射蛋白免疫动物或人类时,诱导抗体是容易的。然而,由于多糖属于T-细胞非依赖性抗原并遭受免疫抑制,其免疫原性比常规蛋白抗原(如,T-细胞依赖性抗原)更弱。此外,在体外合成的多糖要确保其构型与其体内构型一致是很难的。为此,尚无有效的方法引起对多糖表位的天然构型有特异性的抗体。因此,引入一种新方法,糖-DNA基序,以引起针对多糖的天然构型的抗体,是重要的。因此,诱导针对多糖的抗体的紧急疫苗是必要的。发明人的糖-DNA基序免疫可诱导对多糖表位的天然构型有特异性的抗体。此外,发明人的糖-DNA基序对于疫苗设计和对于引入针对多糖的抗体是一个重大的进步。

[0056] 在一个或多个实施方案中,本申请提供几个超过现有技术的进步。首先,发明人引入了一种新的形式的基序抗原,DNA基序,其可复制具有较长半寿期的肽基序的结果。其次,DNA基序不仅可引起稳健的细胞免疫,而且还引起针对HIV的bNAb。第三,糖-DNA基序,另一类含有糖基化基序位点的DNA基序,可用肌细胞中的多糖修饰,然后具有天然多糖构型的多糖表位可提呈给免疫系统,以诱导对多糖特异性的抗体。第四,DNA基序是一个作为HIV疫苗的候选物。相信DNA基序免疫将在疫苗设计的领域宣告了引入针对具有天然构型的弱免疫原性表位和多糖表位的抗体的新的策略。

[0057] 如本文所公开的,本申请的实施方案包括DNA基序疫苗,其包含至少一种质粒,其中所述质粒包含编码至少氨基酸序列GPG的基序基因。在一或多项实施中,所述质粒诱导针对HIV的广泛中和抗体(bNAb)。在某些实施方案中,所述质粒具有pVAX载体骨架。此外,在至少一个实施方案中,基序基因被包含在选自PD1-P24-pVAX、PD1-OVA-pVAX和CTLA4-P24-pVAX的质粒内。

[0058] 在某些实施方案中,P24和OVA可在体内表达以提供载体蛋白引入对基序表位有特异性的抗体的功能。另外,在某些实施方案中,PD1和/或CTLA4通过靶向树突细胞增强基序表位的免疫反应。

[0059] 在一个或多个实施方案中,所述质粒可包含选自以下的引物:

Fc正向5' (GGC CCCGGC NNB NNB NNB NNB NNB ATCCTGATGCAGTACATCAAGG) 3' (SEQ ID NO: 7);

P24反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGCAAAACTCTTG) 3' (SEQ ID NO: 8);和

OVA反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGAGGGGAAACA) 3' (SEQ ID NO: 9)。

[0060] 在某些实施方案中,基序基因可编码许多能够被抗体结合的表位的固定氨基酸残基。此外,在至少一个实施方案中,基序基因可编码在基序序列中心包含第一多个固定的氨基酸残基的基序肽,和在侧接第一多个固定的氨基酸残基的区域中的第二和第三多个随机氨基酸残基。

[0061] 在一个或多个实施方案中,固定的氨基酸残基的长度范围为在基序序列的中心的从3至30个氨基酸残基。在某些实施方案中,在基序序列中心的固定的氨基酸残基的长度是

3-5个氨基酸残基、5-8个氨基酸残基、8-10个氨基酸残基、10-12个氨基酸残基、12-15个氨基酸残基、15-18个氨基酸残基、18-20个氨基酸残基、20-25个氨基酸残基,或25-30个氨基酸残基。在一些实施方案中,在基序序列中心的固定的氨基酸残基的长度是5-30个氨基酸残基、8-30个氨基酸残基、10-30个氨基酸残基、12-30个氨基酸残基、15-30个氨基酸残基、18-30个氨基酸残基,或20-30个氨基酸残基。

[0062] 在一个或多个实施方案中,随机氨基酸残基的范围是5-50个氨基酸残基并由范围在从15至150个核苷酸长度的核苷酸片段编码。在某些实施方案中,随机氨基酸残基由具有15-20个核苷酸、20-30个核苷酸、30-40核苷酸、40-50个核苷酸、50-60个核苷酸、60-70个核苷酸、70-80个核苷酸、80-90个核苷酸、90-100个核苷酸、100-110个核苷酸、110-120个核苷酸、120-130个核苷酸、130-140个核苷酸,或140-150个核苷酸长度的核苷酸片段编码。在一些实施方案中,随机氨基酸残基由20-150个核苷酸、30-150个核苷酸、40-150个核苷酸、50-150个核苷酸、60-150个核苷酸、70-150个核苷酸、80-150个核苷酸、90-150个核苷酸、100-150个核苷酸、110-150个核苷酸、120-150个核苷酸,或130-150个核苷酸长度的核苷酸片段编码。

[0063] 术语“序列同一性”表示两个等长氨基酸序列之间或两个等长核苷酸序列之间的同源性程度的定量量度。要比较的两个序列必须对齐至最可能的配合,允许插入缺口或作为选择,在蛋白序列的两端截短。或者,序列同一性可通过BLAST程序如BLASTP程序(Pearson, 1988)计算。在某些实施方案中,比对如由Thompson JD等1994所述,用具有默认参数的序列比对方法Clustal W进行。序列同一性的最小百分比是至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%和至少99.9%。

[0064] 在某些实施方案中,DNA编码为多肽的基序。本文描述的多肽包含多肽的免疫原性部分,例如对于B-细胞或T-细胞的表位。多肽的免疫原性部分是一部分多肽,其在动物或人类中,和/或在通过本文描述的任何生物学测定法测定的生物样本中引起免疫反应。多肽的免疫原性部分可以是T-细胞表位或B-细胞表位。免疫原性部分可与多肽的一个或几个相对小的部分相关,它们可被分散在整个多肽序列或位于多肽的特定部分。在某些实施方案中,肽具有从多肽衍生的例如8-11个氨基酸残基的长度。在某些实施方案中,多肽具有至少7个氨基酸残基,例如至少8、至少9、至少10、至少12、至少14、至少16、至少18、至少20、至少22、至少24和至少30个氨基酸残基的长度。在某些实施方案中,多肽具有最多50、40、35、30、25和20个氨基酸残基。在某些实施方案中,多肽是18,例如17、16、15、14、13、12和甚至11个氨基酸残基。在某些实施方案中,多肽是7-12个氨基酸残基。在某些实施方案中,多肽是11、10、9、8、7、6、5、4、3个氨基酸残基。

[0065] 本文公开的多肽的共同特征是它们诱导如在实施例中说出的免疫学反应的能力。要理解本文描述的通过取代、插入、添加或缺失产生的多肽的变体也可以是免疫原性的,如通过本文描述的任何测定法测定的。

[0066] 在还有的另外的实施方案中,基序基因可包含编码基序肽 N_xS/T 的糖基化基序基因。在至少一个实施方案中,糖基化基序肽 N_xS/T 任选地经修饰以在天冬酰胺(N)的氨基酸残基上添加宿主来源的碳水化合物,用于促进体内肽表达。

[0067] 在一个或多个实施方案中,DNA基序疫苗(糖-DNA基序疫苗)可诱导对宿主来源的

碳水化合物特异性的抗体。在还有的另外的实施方案中，DNA基序疫苗能够诱导针对糖原表位的抗体，以抑制病毒或细菌感染，包括HIV感染。

[0068] 在某些实施方案中，糖基化基序基因被插入PD1-P24-pVAX质粒内。在至少一个实施方案中，糖-DNA基序疫苗包含一个或多个选自160M01、160M02、160M03、295M01、332M01和332M02的质粒。

[0069] 在某些实施方案中，所述质粒包括选自以下的引物：

AACTGCTCCTTCAACATCACCACCNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 13)；

AACNNBTCCNNBAACNNBACCACCNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 14)；

NNBNNBTCCNNBAACNNBACCACCNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 15)；

ATCAACTGCACCCGCCCNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 16)；

GCCCACTGCAACATCTCCNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 17)；

GCCNNBTGCAACNNBTCCNNBNNBNNBNNBNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG (SEQ ID NO: 18)；和

VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGAGGGGAAACA (SEQ ID NO: 19)。

[0070] 在至少一个实施方案中，糖-DNA基序疫苗包含质粒160M01。在某些实施方案中，质粒160M01可通过在HIV gp120中插入编码N160的糖基化肽的基序基因构建。在还有的另外的实施方案中，DNA基序疫苗可诱导对gp120的糖原特异性的抗体。

[0071] 本申请的实施方案可另外包括一种抑制HIV-1感染的方法，其包括给予有需要的患者一或多种本文描述的DNA基序质粒疫苗或糖基化基序基因(糖-DNA)质粒疫苗。

[0072] 在还有的另外的实施方案中，糖-DNA基序疫苗还可包含至少一种选自xxxxxNCSFNITTTxxxx (SEQ ID NO: 1)、xxxxxNxSxNxTTxxxx (SEQ ID NO: 2)、xxxxxxxxSxNxTTxxxx (SEQ ID NO: 3)、xxxxxINCTRPxxxxx (SEQ ID NO: 4)、xxxxxAHCNISxxxxx (SEQ ID NO: 5)，和xxxxxAxCNxSxxxxx (SEQ ID NO: 6)的基序肽。

[0073] 本申请的实施方案还可包括一种在患者中诱导细胞和体液免疫反应的方法，其包括将一种或多种DNA基序疫苗单独，或与本文描述的一种或多种糖基化基序基因质粒疫苗组合给予有需要的患者。

[0074] 本申请的实施方案还可包括一种DNA基序免疫的方法，其包括用一种或多种DNA基序疫苗单独，或与本文描述的一种或多种糖基化基序基因质粒疫苗组合免疫动物模型或人类受试者。

[0075] 本申请的至少一个实施方案包括用于生成包含本文描述的引物的任何组合的质粒库，以制备本文所述的DNA基序疫苗质粒的方法。

[0076] 5.1 抗体和疫苗

在一个或多个实施方案中，本申请提供结合于HIV-1 gp120的抗体，如上所述的。术语“抗体”以其最广泛的意义使用并尤其包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗

体、多特异性抗体(如,双特异性抗体),和抗体片段,只要它们呈现出所需的生物学活性即可。

[0077] 如本文所用的术语“单克隆抗体”指从基本上同源的抗体群获得的抗体,即组成群体的单个抗体是相同的,除了可能的突变外,如可以小数量存在的天然发生的突变。因此,修饰语“单克隆”表示抗体不是离散抗体的混合物的特征。在某些实施方案中,这样的单克隆抗体通常包括含有结合靶的多肽序列的抗体,其中靶-结合多肽序列通过包括从多个多肽序列选择单一的靶结合多肽序列的方法获得。例如,选择方法可以是从小克隆,例如杂交瘤克隆、噬菌体克隆,或重组DNA克隆的库中选择独特的克隆。应该理解,选择的靶结合序列可被进一步修改,例如,以改进对靶的亲合力,使靶结合序列人源化,改进其在细胞培养中的生产,减少其在体内的免疫原性,创建多特异性抗体等,并且包含改变的靶结合序列的抗体也是如本文所述的单克隆抗体。与多克隆抗体制剂(其通常包括针对不同的决定簇(表位)的不同的抗体)形成对比,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体制剂的优势之处可在于它们通常不被其它免疫球蛋白污染。

[0078] 修饰语“单克隆”表示从基本上同源的抗体群获得的抗体的特征,并且不视为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,根据本申请所用的单克隆抗体可通过各种技术制备,包括但不限于,重组DNA方法、噬菌体-展示技术,和杂交瘤方法。

[0079] 本文的单克隆抗体特别地包括“嵌合”抗体,其中一部分重链和/或轻链是与从特定物种衍生或属于特定抗体类或亚类的抗体的对应序列相同或同源的,而链的其余部分是与从另一个物种衍生或属于另一个抗体类或亚类的抗体以及这样的抗体的片段的对应序列相同或同源的,只要它们显示出所需的生物学活性。

[0080] “人抗体”是具有对应于由人产生的和/或使用如本文公开的、用于制备人抗体的任何技术已经制得的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体可使用本领域已知的各种技术制备,包括噬菌体-展示库。人抗体也可通过给予抗原至已经修饰以响应抗原性攻击而产生这样的抗体,但其内源的基因座已丧失能力的转基因动物来制备。

[0081] 疫苗是建立或改进对特定疾病的免疫的生物学制剂。疫苗可以是预防性的(如预防或改善由任何天然的或“野生的”病原体未来感染的效果),暴露后(如防止潜伏性感染但没有临床症状的个体的重新激活)或治疗性的(如用来治疗活动性疾病的疫苗,其单独或结合抗生素治疗以缩短治疗)。

[0082] 可使用编码本文描述的基序的核酸片段来实现抗原体内表达,即核酸片段可被用于所谓的“DNA基序疫苗”。因此,一个或多个实施方案也可涉及一种包含核酸片段的暴露后疫苗,所述疫苗通过已给予疫苗的动物,包括人类,实现抗原的体内表达,表达的抗原的量有效提供动物,包括人类的感染的治疗。

[0083] DNA基序疫苗可引起细胞介导的免疫反应和抗体反应二者。因此,DNA基序疫苗代表一种对其它接种模式的有吸引力的替代选择。

[0084] 5.2 组合物和制剂

本申请的疫苗和/或抗体可被配制为一种药物形式,优选地与药学上可接受的载体组合。适合于注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散液和用于无菌注射溶液或分散液的临时制备的无菌粉末。在注射使用的所有情况下,所述形式必须是无菌的且必须是存在

可注射性的程度的流体。它在生产和贮存条件下必须是稳定的且必须防止微生物,例如细菌和真菌的污染。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如,水、乙醇、多元醇(如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),其合适的混合物,和/或植物油。适当的流动性可例如通过使用包衣(例如卵磷脂),在分散剂的情况下通过维持所需粒径,和通过使用表面活性剂维持。微生物污染的预防可用各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等进行。在某些实施方案中,优选的是包括等渗剂,例如,糖或氯化钠。注射组合物的延长吸收可通过使用延迟吸收的试剂的组合物,例如,单硬脂酸铝和明胶产生。

[0085] 在某些实施方案中,根据本公开内容的组合物包含为表达基序蛋白(或蛋白类)或肽(或多肽)的质粒的免疫原性递送系统。

[0086] 为了以水性溶液胃肠外给予,例如,如果必要时,溶液应适当地被缓冲,而液体稀释液首先用足够的盐水或葡萄糖使呈现为等渗的。这些特定水性溶液可特别适合于静脉内、动脉内、肌内、皮下、肿瘤内和腹腔内给予。在这一点上,依据本申请,可以使用的无菌水性介质是本领域普通技术人员已知的。例如,一个剂量可溶于1 ml等渗NaCl溶液,并且加入到1000 ml皮下输液液体,或者在提议的输注部位注射。剂量的一些变化将必然会发生,这取决于要治疗的受试者的病症。负责给药的人将在任何情况下,确定用于个体受试者的适当剂量。此外,对于给予人,制剂应满足如FDA生物制品办公室(FDA Office of Biologics)标准所要求的无菌、产热原性,和总体安全性和纯度标准。

[0087] 无菌注射溶液可在需要时通过将所需量的活性化合物掺入含有上面列举的各种其它成分的适当的溶剂中,接着经过滤灭菌来制备。一般来说,分散液可通过将各种无菌活性成分掺入含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其它成分的无菌媒介中制备。在制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制剂方法包括从其先前的无菌-过滤溶液产生活性成分加任何另外的所需成分的粉末的真空-干燥和冷冻-干燥技术。

[0088] 本文公开内容的组合物可以中性或盐形式配制。药学上可接受的盐包括酸加成盐,且其可用无机酸例如,如盐酸或磷酸,或这样的有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。用游离羧基形成的盐也可从无机碱例如,钠、钾、铵、钙或铁氢氧化物,和这样的有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等衍生。在配制时,溶液应以与剂量制剂适配的方式和以治疗有效的量给予。制剂可以各种剂型如注射溶液、药物释放胶囊等给予。

[0089] 如本文所用的,“载体”包括,但不限于,溶剂、分散介质、溶媒、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、助悬剂、胶体、脂质体和病毒颗粒。用于药用活性物质的这样的介质和试剂的使用是本领域熟知的。除了在任何常规介质或试剂与活性成分适配的情况下,还包括其在治疗性组合物中的应用。补充活性成分也可掺入组合物中。

[0090] 短语“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”指当给予人时,不产生过敏或类似的不利反应的分子实体和组合物。含有作为活性成分的蛋白的水性组合物的制备是本领域完全理解的。通常,这样的组合物可制备为注射剂,作为液体溶液或者混悬液。在注射前适合于在液体中的溶液或混悬液的固体形式也可制备。

[0091] 疫苗组合物还可含有提高疫苗的保护功效的试剂,例如佐剂。佐剂包括用以增加对肽抗原的保护免疫反应,从而减少疫苗中所必需的抗原的量,和/或产生保护免疫反应所必需的给药频率的任何一种或多种化合物。佐剂可包括例如,乳化剂;胞壁酰二肽;吡啶;水

性佐剂如氢氧化铝;含氧金属盐;基于壳聚糖的佐剂,和本领域已知的任何各种皂苷、油和其它物质,例如Ampfaigen、LPS、细菌细胞壁提取物、细菌DNA、CpG序列、合成寡核苷酸及其组合,草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*) (phlei) 细胞壁提取物(CWE)、草分枝杆菌(*M. phlei*) DNA (M-D A),和M-DNA-草分枝杆菌(*M. phlei*) 细胞壁复合物(MCC)、不耐热肠毒素(LT)、霍乱毒素(CT),和霍乱毒素B亚单位(CTB)。可用作乳化剂的化合物包括天然的和合成乳化剂,以及阴离子、阳离子和非离子化合物。含氧金属盐包括Al、K、Ca、Mg、Zn、Ba、Na、Li、B、Be、Fe、Si、Co、Cu、Ni、Ag、Au,和Cr的盐,所述盐为磷酸盐、氢氧化物、磷酸盐、硝酸盐、碘酸盐、溴酸盐、碳酸盐、水合物、乙酸盐、柠檬酸盐、草酸盐,和酒石酸盐,及其混合的形式,包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、硫酸铝钾、磷酸钙、Maalox (氢氧化铝和氢氧化镁的混合物)、氢氧化铍、氢氧化锌、碳酸锌、氯化锌,和硫酸钡。在合成化合物中,阴离子乳化剂可包括,例如,月桂酸和油酸的钾、钠和铵盐,脂肪酸的钙、镁和铝盐,和有机磺酸盐如十二烷基硫酸钠。合成阳离子剂包括,例如,十六烷基三乙基溴化铵,而合成非离子剂由甘油酯(如,单硬脂酸甘油酯)、聚氧乙烯乙二醇酯和醚,和脱水山梨醇脂肪酸酯(如,脱水山梨醇单棕榈酸酯)及其聚氧乙烯衍生物(如,聚氧乙烯脱水山梨醇单棕榈酸酯)举例说明。天然的乳化剂包括阿拉伯胶、明胶、卵磷脂和胆固醇。

[0092] 其它合适的佐剂可用油成分,例如单一油、油的混合物、油包水乳液,或水包油乳液形成。油可以是矿物油、植物油,或动物油。矿物油是通过蒸馏技术从矿脂获得的液体烃,并且在本领域也称为液体石蜡、液体矿脂,或白矿物油。合适的动物油包括,例如,鱼肝油、大比目鱼油、鲱鱼油、大西洋胃胸鲷油(orange roughy oil)和鲨鱼肝油,前全部可经商业获得。合适的植物油,包括,例如,菜籽油、杏仁油、棉籽油、玉米油、橄榄油、花生油、红花油、芝麻油、大豆油等。弗氏完全佐剂(FCA)和弗氏不完全佐剂(FIA)是两种通常用于疫苗制剂的普通佐剂,并且也适用于根据本申请的一个或多个实施方案。FCA和FIA二者是矿物油包水乳液;然而,FCA也含有杀灭的分枝杆菌(*Mycobacterium* sp)。粘膜疫苗的佐剂可以包括半乳糖基神经酰胺(GalCer)。

[0093] 免疫调节细胞因子也可用于疫苗组合物以增强疫苗功效,例如,作为佐剂。这样的细胞因子的非限制性实例包括干扰素 α (IFN- α)、白介素-2 (IL-2),和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),或其组合。

[0094] 在某些实施方案中,在组合物中组合或包含另外的多肽、肽或编码一种或多种多肽或肽的多核苷酸(作为“共刺激”成分发挥功能)可能是有利的。这样的共刺激成分可包括例如在本申请的组合物中的细胞表面蛋白、细胞因子或趋化因子。共刺激成分可例如作为多肽或肽,或作为编码多肽或肽的多核苷酸包括在组合物中。

[0095] 当预防性提供时,本申请的免疫原性组合物可在HIV感染或有HIV感染迹象前,或在因AIDS所致的任何症状之前给予受试者,特别在高风险受试者中。预防性给予免疫原性组合物可用于提供给受试者针对HIV-1感染的保护免疫或在已经感染HIV-1的受试者中预防或减缓AIDS的进展。当治疗性提供时,免疫原性组合物可用于改善和治疗AIDS症状和可有利地在感染后尽可能快地使用,优选在AIDS的任何症状出现之前,但也可在疾病症状发生时(或之后)使用。

[0096] 5.3 剂量

本发明的DNA基序疫苗组合物通常以足以提供益处给受试者的量给予受试者。该量被

定义为“治疗有效量”。治疗有效量将由特定组合物的功效或效力,给药的持续时间或频率,以及受试者的大小和病情,包括受试者的特定治疗反应来确定。另外,在确定治疗有效量时应考虑给药途径。期望本发明的DNA基序疫苗组合物的治疗有效量将在从约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至1 mg/kg 总核酸的范围内。合适的剂量包括约5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -500 mg/kg 的总DNA,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的总DNA,或10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -170 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的总DNA。在一个实施方案中,人类受试者(年龄18-50岁,45-75 kg)被给予1.2 mg-7.2 mg的DNA。“总DNA”和“总核酸”指编码独特的免疫原性分子的核酸库。例如,编码5种不同的免疫原性分子的剂量50 mg的总DNA可具有1 mg的每种分子。DNA基序疫苗可分多次给予,例如约2-6次之间。在一示例性方法中,100 μg 的DNA组合物以0、4和12周给予人类受试者(每次给予100 μg)。

[0097] 本申请的治疗可包括各种“单位剂量”。单位剂量被定义为含有预定量的本申请的治疗性组合物。要给予的量,和具体途径和制剂,都在临床领域的技术人员范围内。单位剂量不必作为单一注射给予,而是可包括在规定的时间段的连续输液。单位剂量可含有至少0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0或50.0 mg的活性成分。任选地,单位剂量含有少于0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0或50.0 mg的活性成分。在至少一个实施方案中,单位剂量含有从约0.001 mg至约50 mg的活性成分。在一个或多个实施方案中,单位剂量含有从约1 mg至约10 mg的活性成分。

[0098] 5.4 给药方法

给药可通过胃肠外或非-胃肠外途径。给药途径可随疾病的性质变化,并包括,例如静脉内、动脉内、皮内、透皮、肌内、粘膜皮下、经皮、气管内、腹腔内、灌注和灌洗。在一个或多个实施方案中,给药通过粘膜途径,例如通过鼻、口(经由消化系统的粘膜)、阴道、颊、直肠、舌下、眼部、尿道、肺或耳(经耳)途径。对于经鼻给予,示例性制剂可以是鼻喷雾剂、灌洗液、滴剂或喷射系统。

[0099] 在至少一个实施方案中,疫苗组合物可以单一日剂量给予,或总日剂量可以分开的剂量,例如,每日2、3或4次给予。而且,疫苗组合物可通过局部使用合适的鼻内媒介,以鼻内形式,通过透皮途径,使用本领域普通技术人员已知的透皮贴剂的那些形式,通过植入泵给予;或通过任何其它合适的给药手段给予。为以透皮递送系统的形式给予,例如,剂量给予在整个给药方案中将是连续的而非间歇的。

[0100] 利用疫苗组合物的给药方案可根据各种因素来选择,包括但不限于患者的类型、物种、年龄、体重、性别和医学病症;所治疗病症的严重性;给药途径;患者的肾和肝功能;以及所用的特定化合物。普通技术的临床医师或兽医可容易地确定并开具为预防、对抗或阻止要治疗的疾病或病症的进展所需的有效量的药物。

[0101] 疫苗给予还可包括一个引发-加强方案。在这些方法中,一或多次引发免疫可接着一或多次加强免疫。对于每次免疫,实际免疫原性组合物可以是相同或不同的,免疫原性组合物的类型、途径和免疫原的制剂也可变化。例如,一个有用的引发-加强方案提供两次引发免疫,相隔4周,接着在最后的引发免疫后4和8周进行两次加强免疫。在一个或多个实施方案中,引发或者加强,或二者,可以编码提及的肽或多肽的DNA分子的形式给予。

[0102] 免疫计划表(或方案)是熟知的并可容易地针对特定受试者和免疫原性组合物确定。同样地,免疫原可一或多次给予受试者。在一个或多个实施方案中,在免疫原性组合物的分开给予之间有固定的时间间隔。虽然这种时间间隔对于每一个受试者是不同的,通常

其范围是从10天至数周,并且通常是2、4、6或8周。对于人,时间间隔通常是从2至6周。在本申请的一个或多个实施方案中,时间间隔是较长的,例如约10周、12周、14周、16周、18周、20周、22周、24周、26周、28周、30周、32周、34周、36周、38周、40周、42周、44周、46周、48周、50周、52周、54周、56周、58周、60周、62周、64周、66周、68周或70周。

[0103] 免疫方案通常包括从1至6次给予免疫原性组合物,但可具有少至1、2、3、4或5次。诱导免疫反应的方法也可包括给予佐剂与免疫原。在一些情况下,每年、每半年或其它长的时间间隔(5-10年)加强免疫可补充初始免疫方案。

[0104] 至少一个本申请的实施方案提供通过给予本申请的免疫原性组合物,在受试者中诱导针对HIV的免疫反应的方法。这样的免疫可例如,根据所需的免疫方案以至少2、4或6周(或更长)的时间间隔重复多次。

[0105] 本申请的免疫原性组合物可单独给予,或可与其它HIV免疫原和/或HIV免疫原性组合物,如与“其它”免疫学、抗原性或疫苗或治疗性组合物共同给予或顺序给予,从而提供多价或组合的本申请组合物。此外,给予的成分和方式(顺序或共同-给药),以及剂量可在考虑这样的因素如具体受试者的年龄、性别、体重、种族和病情,和给药途径后确定。当用于组合时,其它HIV免疫原可在相同的时间或在不同的时间作为总的免疫方案的一部分,如,作为引发-加强方案或其它免疫方案的一部分给予。

[0106] 可与本文提供的组合物和方法一起使用的其它药物包括抗-HIV剂,包括例如蛋白酶抑制剂、HIV进入抑制剂、逆转录酶抑制剂,和/或抗-逆病毒核苷类似物。合适的化合物可包括,例如,安普那韦(amprenavir)、双汰芝(Retrovir/Epivir)、佳息患(茚地那韦)、Emtriva(恩曲他滨)、Epivir(3tc/拉米夫定)、Epzicom、Fortovase/Invirase(沙奎那韦)、Fuzeon(恩夫韦肽)、Hivid(ddc/扎西他滨)、Kaletra(洛匹那韦)、Lexiva(福沙那韦)、诺韦(利托那韦)、Rescriptor(地拉委定)、Retrovir/AZT(齐多夫定)、Reyatax(阿扎那韦,BMS-232632)、Sustiva(依法韦仑)、Trizivir(阿巴卡韦/齐多夫定/拉米夫定)、Truvada(恩曲他滨/替诺福韦DF)、惠妥滋(ddI/地丹诺辛)、惠妥滋EC(ddI,地丹诺辛)、Viracept(奈韦拉平)、Viread(tenofovir disoproxil fumarate)、Zerit(d4T/司他夫定),和Ziagen(阿巴卡韦)。其它合适的药物是本领域技术人员已知的。这样的药物可在给予组合物和/或采用本文描述的方法之前、期间或者之后使用。

[0107] 核酶疗法也是对HIV/AIDS疗法的一种选择。它通过侧接裂解位点序列的底物识别序列的突变,使用工程改造的反式裂解核酶以裂解特定序列,因此可被用来从基因组除去HIV基因例如U5, pol,以实现HIV复制抑制。在一个实施方案中,为了HIV/AIDS的治疗,本文提供的DNA基序疫苗组合物与一种或多种工程改造的反式裂解核酶,或表达反式裂解核酶的载体组合给予。

[0108] 基于RNA的抗-HIV基因遗传疗法也在各种HIV/AIDS治疗中,其通过RNA干扰抑制病毒复制。抗-HIV基因siRNA(小干扰RNA)或shRNA(短发夹)可经工程改造为用于序列特异性mRNA降解。此外,长反义寡核苷酸可被设计以结合HIV基因的mRNA并通过RNase H依赖性路径触发mRNA的降解,或阻断核糖体结合,因而抑制基因表达。HIV基因可成为靶标,包括但不限于HIV env、U1和反式-激活反应(TAR)元件。在一个实施方案中,本文提供的DNA基序疫苗组合物与一种或多种抗-HIV基因分子,或表达反义RNA的载体组合给予,用于HIV/AIDS治疗。

[0109] 此外,适体也可被用于HIV/AIDS治疗。适体是可以高亲和力结合作为诱饵的蛋白的单链RNA或DNA分子。这些分子,通常为15-40个碱基长,可被用作结合病毒蛋白的诱饵或用作靶向传递siRNA的媒介。慢病毒载体可用来表达这样的适体,其以对病毒复制关键的TAR和其它病毒蛋白为靶标。在一个实施方案中,为治疗HIV/AIDS,本文提供的DNA基序疫苗组合物与一种或多种适体,或表达适体的载体组合给予。

[0110] 如本文所讨论的,“治疗”包括疗效性治疗和预防性或预防治疗二者,其中目的是预防或减慢为靶标的病理状态或病症。需要治疗的那些包括已经罹患病症的那些以及易于罹患所述病症的那些或其中病症要预防的那些。术语“疗法”、“治疗的”、“治疗”或“处理”包括减少、减轻或抑制或消除疾病的症状或进展的能力或行动。治疗的所需效果包括预防疾病的发生或复发,减轻症状,消除疾病的直接或间接病理后果,防止转移,降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状况,和缓解或改善预后。在一些实施方案中,本申请的方法和组合物被用来延缓疾病或病症的发生或减慢疾病或病症的进展。

[0111] 根据本申请的治疗可包括治疗癌症或其它肿瘤病症的方法,其包括给予需要治疗的患者本申请的肽、核酸、抗体组合物。在至少一个实施方案中,治疗还包括给予所述患者化疗性药物,例如前药形式的药物。两种成分可一起给予,例如以合并的丸剂形式,或分开给予。给予也可以是序贯或同时的。“序贯”给予表示各成分在不同的时间或时间点给予,尽管如此这可能是重叠的。同时给予表示各成分在相同的时间给予。

[0112] 本申请的治疗的有效量,或优选治疗有效量被给予。“有效量”指以必需的剂量和时间段有效达到所需治疗或预防结果的量。有效量可根据共同给予治疗的药物或前药变化。本申请的治疗的“治疗有效量”可根据因素如疾病状态、个体的年龄、性别和体重,和蛋白引起所需治疗结果的能力而变化。治疗有效量涵盖这样的量,其中蛋白的任何毒性或有害作用被治疗有益效果超过。治疗有效量也涵盖足以赋予利益,如临床利益的量。

[0113] 5.5 药剂盒

本发明提供含有可用来治疗本文描述的病症的物质的制品和药剂盒。制品可包括如本文描述的化合物的容器及标签。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶,和试管。容器可由各种材料如玻璃或塑料形成。容器容纳具有有效治疗或预防HIV感染的DNA基序疫苗的组合物。容器上的标签可指示组合物可用于治疗特定病症,并且也可指明给药的用法说明。

[0114] 在一个或多个实施方案中,本发明可提供用于诱导针对HIV的bNAbs的药剂盒,所述药剂盒包含治疗有效量的DNA基序疫苗和/或糖-DNA基序疫苗。要理解,根据本发明的一个或多个实践,DNA基序疫苗和/或糖-DNA基序疫苗的任何实施方案可包括在一个或多个药剂盒中。

[0115] 6. 实施例

6.1 方法

6.1.1 构建基于sPD1的基序疫苗和对照物

根据一个或多个实施方案,在载体pVAX1的背景下,分别构建了3组DNA基序质粒库:PPMC、POMC和CPMC。pVAX1载体购自Invitrogen(商品目录号V260-20;Eugene, OR)。pVAX1是设计用于开发DNA基序疫苗的3.0 kb质粒载体。构建载体以符合食品和药物管理局(FDA)文件:“Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications”,1996年12月22日发表。

[0116] 编码鼠PD1 (sPD1)、CTLA4、HIV-1p24片段和卵清蛋白的细胞外结构域的序列先前已引入pVAX1的骨架以构建质粒:PD1-P24-Fc、PD1-OVA-Fc和CTLA4-P24-Fc (见, Zhou, Cheung等2013)。所有质粒含有促进蛋白纯化的兔Fc标签。

[0117] 为将编码基序靶序列的DNA插入所需的质粒中,合成3个引物;

引物01 Fc正向5' (GGC CCGGC NNB NNB NNB NNB NNB NNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG)3' (SEQ ID NO: 7)

引物02 P24反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGCAAACTCTTG)3' (SEQ ID NO: 8)

引物03 OVA反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGAGGGGAAACA)3' (SEQ ID NO: 9)

其中V表示核酸可以是A、C或G的任何一个;其中N表示核酸可以是A、C、G或T的任何一个;B表示核酸可以是C或者G或者T;和其中VNN表示可编码可变氨基酸残基的以上核苷酸的随机组合。

[0118] 下划线引物序列是与质粒骨架互补的序列;引物序列的无下划线的左边部分对应于编码靶/基序的插入的基因。根据不同的质粒骨架,选择引物01和02 (SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 8)或01与03 (SEQ ID NO: 7和SEQ ID NO: 9)的组合以运行PCR,作为靶向基因插入PD1-P24-Fc、PD1-OVA-Fc和CTLA4-P24-Fc质粒中。根据标准条件和特别是如下条件进行PCR反应:根据TAKARA的PrimeSTAR (Cat. # R010A)的方案,于94°C开始变性2 min,接着于94°C 15秒,55°C 30秒,和68°C 4分钟的35个循环,接着于68°C最后延长10分钟。

[0119] 表达PD1、HIV-1 p24,或Fc的质粒单独用作对照质粒。质粒通过限制酶消化和再连接生成,并经测序验证。DNA转染到(HEK-)293T细胞中使用聚乙烯亚胺(PEI)进行,而蛋白表达通过FACS使用抗-兔Fc抗体检测。以类似的方式,按照这些方法构建和验证糖-DNA基序质粒。糖-基序序列在图7D中描述。

[0120] 6.1.2 小鼠免疫

所有动物实验经香港大学实验室动物技术和研究中心的活动物使用委员会批准(Committee on the Use of Live Animals in Teaching and Research at the Laboratory Animal Unit of The University of Hong Kong)。在香港大学实验室动物中心(Laboratory Animal Unit of The University of Hong Kong),在标准无病原条件下喂饲6-8周龄雌性BALB/c小鼠。在具有可调节温度和湿度的标准条件下,在笼子里圈养小鼠,自由饲喂投掷食物和自来水,并根据实验室动物的护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)中概述的标准护理。免疫程序类似于发明人先前的方案(Zhou, Cheung等2013)。简言之,小鼠经i.m.注射(经电传孔)接受5次DNA免疫,每3周以100 µg/每只小鼠的剂量给予。每次免疫后2周,采集血样用于血清测试。最终免疫后2周,处死小鼠,并收集血清和脾细胞用于免疫反应分析。

[0121] 6.1.3 ELISA

特异性抗体反应通过如前所述的ELISA评价(Qi, Zhang等2009)。简言之,高-亲和力、蛋白-结合ELISA板(Corning)用HIV-1 p24蛋白(Abcam)涂布。然后加入系列稀释的血清并用HRP-标记的抗-小鼠IgG BALB' c/3小鼠血清)抗体(Sigma-Aldrich)检测抗体。相对抗体滴度被表示为与相同稀释度的对照血清样本的光学密度读出比较,产生至少2-倍的光学密

度读出的样本的最高稀释的倒数。

[0122] 6.1.4 中和

所有血浆样本在测试前于56℃经热灭活1小时。简言之,将200 TCID₅₀的假型病毒与系列稀释的抗血清在96-孔板中,按一式三份于37℃孵育1小时。大约 1×10^4 个GH_{OST}.CD4/X4/R5细胞被稳定转染以表达HIV-1受体CD4,然后加入如前所述的复合受体CCR5或CXCR4 (Shang, Han等2011),并于37℃维持培养另外48小时。中和活性通过与对照比较的荧光素酶活性的减少来测定。ID₅₀滴度基于先前发表的标准算法 (Brown, Frost等2003) 计算。

[0123] 6.1.5 HIV-1 Gag p24-特异性T细胞反应的评价

产生IFN- γ 的T细胞用如前所述的ELISPOT测定 (Millipore) 评价 (Zhou, Cheung等2013)。10微克/每毫升的HIV-1 p24肽 (对于每种肽以最终浓度2 μ g/ml,由NIH捐赠,产品目录号8117) 被用来在体外刺激脾细胞。肽GAG A-I (AMQMLKDTI) (SEQ ID NO: 10) 是对CD8+ T细胞特异性的,而肽GAG 26 (TSNPPIPVGDYKRWIILGL) (SEQ ID NO: 11) 是对CD4+ T细胞特异性的。细胞用500 ng/ml的12-豆蔻酸13-乙酸佛波醇酯 (PMA; Sigma-Aldrich) 加1 μ g/ml莫能霉素钙 (calcium ionocymine) 刺激或留在仅分别用作阳性和阴性对照的介质中。细胞于37℃、5% CO₂,和100%湿度下培养20小时。斑点用免疫斑点读出仪和图像分析仪 (Thermo Scientific) 鉴定。四聚体-阳性CD8+T细胞群使用PE-缀合的MHC I类四聚体H2d-Kd-AMQMLKDTI (SEQ ID NO: 12) (Beckman Coulter) 评价。

[0124] 6.1.6 Endo H消化

5微克的纯化gp120通过于100℃加热反应变性10分钟,然后按照供应商 (New England Biolabs, Ipswich, MA) 的推荐程序,于37℃用500单位的Endo H处理1小时。然后使样本经受SDS-PAGE和蛋白质印迹分析。

[0125] 6.1.7 蛋白质印迹

上面的5 μ g蛋白通过在7.5%聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离并转移至PVDF膜,将其与200稀释的血清或血浆一起孵育过夜。抗原-抗体反应通过辣根过氧化物酶 (HRP) -标记的抗-人或者抗-小鼠球蛋白 (Santa Cruz biotechnology) 和3,3'-二氨基联苯胺四盐酸脱水底物检测。

[0126] 6.2 结果

6.2.1 概念验证:DNA基序免疫

1) DNA基序质粒的测序

构建PPMC、POMC和CPMC的DNA基序质粒库 (图1A) 后,测序结果表明氨基酸残基GPG位于插入的基因的中心并且侧区序列由随机氨基酸残基构成 (图1B)。这表示DNA基序质粒库用含有GPG的基序构建。

[0127] 2) 表征质粒表达

结果表明PPMC、POMC和CPMC的库质粒都在转染的293T细胞中表达类似水平的蛋白;阳性细胞都可以类似水平达到阳性对照PPC的约30% (图2)。这显示这样的质粒可在真核细胞中表达蛋白。

[0128] 3) 表征抗血清滴度

第五DNA基序质粒生成针对p24的高滴度抗血清。PPMC和CPMC组都诱导超过20,000稀释的针对P24的抗血清。同时,POMC也诱导结合P24的高滴度抗血清,而不管所述质粒不含P24

的基因的事实(图3A)。先前已表明V3M01通过结合在C-末端含有GPG表位的P24,可诱导抗血清,而目前的质粒和方法认为,在C-末端的GPG P24的表位有助于POMC的抗血清结合P24 (Zhiwei 2012)。此外,所有3种由质粒PPMC、CPMC和POMC生成的抗血清可结合在细胞表面上表达的JR-FL和ADA的gp160,而都不能结合作为阴性对照的Mu1v蛋白(图3B)。这些结果表明针对P24和gp160的高滴度抗血清通过对GPG的表位有特异性的PPMC组诱导。

[0129] 4) 抗血清中和作用的表征

通过使用作为免疫原的PPMC、POMC和CPMC质粒生成的抗血清都显示出针对不同的HIV亚型的广泛中和作用(图4B)。与来自POMC和CPMC组的抗血清形成对照,PPMC的抗血清中和在V3尖端中含有GPG的HIV假病毒的各种亚型,像亚型B、B'、B' C CRF01AE、AE CRF08BC;虽然它不能中和在V3尖端中具有GLG的CNE11并且不显示针对阴性对照病毒,VSV-G的中和作用(图4A和4B)。这些数据进一步提示PPMC质粒执行对GPG表位特异性的中和作用。结果还显示PPMC的抗血清不仅可中和慢性病毒,而且还中和传播/创立病毒,例如Ch40.R5和X4 HIV病毒都可被PPMC质粒生成的抗血清中和。此外,PPMC的ND50稀释度超过40稀释,这表明当用作疫苗时,使用PPMC作为免疫原可提供针对病毒感染的保护作用(Mascola和Montefiori 2010)。最重要的是,表明PPMC可诱导针对在V3环顶端含有GPG氨基酸残基的各种类型的HIV的bNAb。

[0130] 5) 细胞免疫的表征

FACS结果表明来自PPMC组的PBMC含有2.57-5.76% CD8⁺T,其对AMQMLKDTI (SEQ ID NO: 12)的表位具有特异性。0.67-1.63%的特异性CD8⁺T细胞在组CPMC的PBMC中鉴定。如所期望的,特异性CD8⁺T细胞在来自POMC组和阴性对照的PBMC中少于1%,因为POMC组基序抗原含有代替P24的卵清蛋白的表位,因而合理的是,对P24肽表位特异性的CD8⁺T细胞少于1%,如PBS组(图5)。Elispot实验显示与POMC和PBS组比较,PPMC和CPMC组可引起针对P24的特异性CD8和CD4表位的IFN- γ +(图6A-B)。总之,提示PPMC和CPMC可诱导针对HIV的P24的稳健的细胞免疫。

[0131] 从目前检测的质粒来看,表明PPMC是优选的针对HIV感染的候选DNA基序疫苗,因为它能够诱导bNAb和稳健的细胞免疫。此外,这是首次证明DNA基序免疫的概念。它表明DNA基序免疫对诱导体液和细胞免疫是有效的。

[0132] 6.2.2 糖-DNA基序引入

1) DNA基序质粒的测序

根据一个或多个实施方案,有几个结合HIV颗粒上的多糖的bNAb,如2G12、PG9和PGT128。例如,PG9与N160的多糖相互作用,2G12识别N295的多糖,和N332的多糖涉及结合PGT128。这样的不同的多糖结构域在来自HIV数据库的4633个不同的分离的HIV序列中进行比对(图7A-C)。根据比对结果,它显示与糖基化基序位点有关的氨基酸残基是高度保守的。选择这些保守的序列以构建糖-DNA基序质粒库,如对PPMC质粒构建所述的。6组糖-DNA基序质粒库如在图7D中所示构建。

[0133] 用来构建糖-DNA基序质粒的引物可包括160M01-F、160M02-F、160M03-F、295M01-F、332M01-F和332M02-F,其在下面示出:

糖-DNA基序质粒PCR引物(5' -3'):

```

160M01-F AACTCGCTCCTTCAACATCAACCACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SAQ ID NO: 13)
160M02-F AACNNSTCCNBNBAACNNBACCACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBAATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SAQ ID NO: 14)
160M03-F NNNNNNTCCNBNBAACNNBACCACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SAQ ID NO: 15)
295M01-F ATCAACTGCACCCCGCCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SAQ ID NO: 16)
332M01-F GCCCACTGCAACATCTTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SAQ ID NO: 17)
332M02-F GCCNNBTGCAACNNBNTCCNBNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBAATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SAQ ID NO: 18)
...
VNN VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCUACCTGAGGGGAACA... (SEQ ID NO: 19)

```

多糖表位的天然构型可通过这样的糖-DNA基序免疫呈递给免疫系统。在构建糖-DNA基序质粒库后,对质粒库测序并对插入的编码蛋白基序序列的基序基因进行比对(图8A-F)。测序比对结果如同预期的那样,其中插入的基序基因被固定并保持在序列的中心,并存在由侧接靶向基因的核酸编码的随机氨基酸残基。这表示糖-DNA基序质粒库用在序列中心的靶向糖基化基序位点成功地建立。

[0134] 2) 质粒表达的表征

FACS结果表明糖-DNA基序库质粒都呈递类似百分比的表达作为阳性对照的蛋白的阳性细胞,所述蛋白由PPC的质粒转染至转染的293T细胞;所述百分比的阳性细胞都达到约30% (图9)。提示这样的糖-DNA基序质粒也可在真核细胞中表达蛋白,而插入的糖-DNA基序对蛋白表达没有影响。这些结果也提示糖-DNA基序的插入的基序基因可用加入的多糖表达,其中Fc蛋白的下游被表达,这由FACS证实。

[0135] 3) 表征抗血清滴度和中和作用

第五糖-DNA基序质粒库都生成针对p24的高滴度抗血清(图10A)。表明这样的质粒当用作免疫原时引起体液免疫。从小鼠提取的抗血清进行针对不同的亚型的HIV的假病毒中和作用。采用VRC01作为阳性对照和采用来自PBS组的抗血清作为阴性对照(图10B)。当考虑中和效力和广度时,来自糖-DNA基序质粒160M01组的抗血清与来自其它组的抗血清比较,显示最佳的中和作用。从糖-DNA基序质粒160M01生成的抗血清中和所有4种HIV假病毒,包括CNE15和ADA的两个慢性病毒和Ch08和Pv04的两个传播/创立病毒。它也不能显示与来自阴性对照的抗血清相比的针对阴性Mu1v病毒的更好的中和作用。这个结果提示160M01糖-DNA基序质粒库可以是HIV-1候选疫苗。

[0136] 4) 160M01抗血清多糖表位的表征

为测试160M01抗血清是否对HIV gp120的多糖是特异性的,进行蛋白质印迹法。结果表明160M01抗血清分别在泳道1、3、5和7结合gp120的4个转移亚型;而在泳道2、4、6和8中没有条带,其中gp120的4个转移亚型的多糖由酶Endo H除去(图11A)。为证实在泳道2、4、6和8的蛋白位于膜中,抗体用脱离缓冲液(stripping buffer)洗涤,然后与来自HIV阳性患者的抗血清一起孵育。所有的泳道显示出条带,并且在泳道2、4、6和8中的条带与泳道1、3、5和7中的条带位置相比,出现较低位置,提示Endo H酶仅除去gp120的多糖,导致蛋白重量的减轻(图11B)。总之,来自160M01组的抗血清可在多糖的帮助下结合gp120。因此,160M01糖-DNA基序质粒库成功地诱导对天然多糖特异性的抗体。

[0137] 本发明不限于本文所述的特定实施方案的范围。事实上,除了本文描述的那些外,本发明的各种修改对本领域技术人员而言从前面的描述和附图也将变得显而易见。这样的

修改打算落入所附权利要求书的范围内。

[0138] 在整个本申请中引用了专利、专利申请和出版物,其公开内容,特别是,包括所有公开的化学结构,通过引用结合到本文中。以上出版物或文件的引用不打算作为任何前述内容是相关的现有技术的认可,也不构成关于这些出版物或文件的内容或日期的任何认可。本文引用的所有参考文献通过引用结合到本文中,其程度如同各个单独的出版物、专利申请或专利特别地和单独地指明通过引用结合到本文中一样。

[0139] 前文所写的说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。除了本文显示和描述的那些外,本发明的各种修改对本领域技术人员而言从前面的描述中也将变得显而易见,并且入所附权利要求书的范围内。

[0140] 缩写

PPMC:PD1-P24-基序-环-质粒

POMC:PD1-OVA-基序-环-质粒

CPMC:CTLA4-OVA-基序-环-质粒

PPC:PD1-P24-环-质粒

ID50:50%的抑制剂量

DEAE:二乙基氨基乙基

PEI:聚乙烯亚胺

HIV:人免疫缺陷病毒

AIDS:获得性免疫缺陷综合征

ELISA:酶-联免疫吸附测定

氨基酸基序序列

xxxxxNCSFNITTxxxx, (SEQ ID NO: 1)

xxxxxNxSxNxTTxxxx, (SEQ ID NO: 2)

xxxxxxxxSxNxTTxxxx, (SEQ ID NO: 3)

xxxxxINCTRPxxxxx, (SEQ ID NO: 4)

xxxxxAHCNISxxxxx, (SEQ ID NO: 5)

xxxxxAxCNxSxxxxx (SEQ ID NO: 6)

肽GAG A-I (AMQMLKDTI) (SEQ ID NO: 10)

肽GAG 26 (TSNPPIPVGDIIYKRWIILGL) (SEQ ID NO: 11)

H2d-Kd-AMQMLKDTI (SEQ ID NO: 12)

核酸和引物序列

引物01 Fc正向5' (GGC CCCGGC NNB NNB NNB NNB NNB NNB_ ATCCTGATGCAGTACATCAAGG) 3' (SEQ ID NO: 7)

引物02 P24反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGCAAAACTCTTG) 3' (SEQ ID NO: 8)

引物03 OVA反向5' (VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCGAGCGGAGGGGAAACA) 3' (SEQ ID NO: 9)

糖-DNA基序质粒PCR引物(5'-3'):

1605801-F AACTGCTCCTTCAACATCACACCACCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SEQ ID NO: 13)

1605802-F AACNNBTCCNNBAACNNBACCACCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SEQ ID NO: 14)

1605803-F NNNNNBTCCNNBAACNNBACCACCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SEQ ID NO: 15)

2935801-F ATCAACTGCACCEGCCCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SEQ ID NO: 16)

332M01-F GCCCACTGCAACAATCTCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SEQ ID NO: 17)

332M02-F GCCNNBTGCAACNNNNBTCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATCCTGATGCAGTACATCAAGG
(SEQ ID NO: 18)

序列引物 VNN VNN VNN VNN VNN VNN CTCTGACCGGACGGCAAACA(SEQ ID NO: 19)

参考文献

Brown, A. J. L., S. D. W. Frost, W. C. Mathews, K. Dawson, N. S. Hellmann, E. S. Daar, D. D. Richman和S. J. Little (2003). “耐药人免疫缺陷病毒的传播适应性和抗逆病毒-治疗的群体中耐药性的流行 (Transmission fitness of drug-resistant human immunodeficiency virus and the prevalence of resistance in the antiretroviral-treated population).” *Journal of Infectious Diseases* 187 (4): 683-686.

Lustig JV, Rieger HL, Kraft SC等“用脂质-缀合的牛血清白蛋白口服和胃肠外免疫后对天然抗原的体液和细胞反应 (Humoral and cellular responses to native antigen following oral and parenteral immunization with lipid-conjugated bovine serum albumin).” *Cell Immunol.* 1976 Jun 1; 24(1): 164-72.

Mascola, J. R.和D. C. Montefiori (2010). “HIV疫苗中抗体的作用 (The Role of Antibodies in HIV Vaccines).” *Annual Review of Immunology*, Vol 28. Palo Alto, Annual Reviews. 28: 413-444.

Mowat AM, Donachie AM, Reid G, Jarrett O. “含有Quil A和蛋白抗原的免疫-刺激复合物在体内引发I类MHC-限制性T淋巴细胞并且经口服途径是免疫原性的 (Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes in vivo and are immunogenic by the oral route).” *Immunology.* 1991 Mar; 72 (3): 317-22.

Pearson WR, Lipman DJ. “生物学序列比较的改进工具 (Improved tools for biological sequence comparison).” *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85: 2444-2448.

Qi, Y., B. Q. Zhang, Z. Shen和Y. H. Chen (2009). “聚集于典型猪瘟疫病毒表位的候选疫苗诱导具有中和活性的抗体 (Candidate Vaccine Focused on a Classical Swine Fever Virus Epitope Induced Antibodies with Neutralizing Activity).” *Viral Immunology* 22 (3): 205-213.

Shang, H., X. Han, X. Shi, T. Zuo, M. Goldin, D. Chen, B. Han, W. Sun, H. Wu, X. Wang和L. Zhang (2011). “来自中国慢性感染患者的不同HIV-1 env克隆的遗传和中和灵敏性 (Genetic and Neutralization Sensitivity of Diverse HIV-1 env

Clones from Chronically Infected Patients in China).” *Journal of Biological Chemistry* 286(16): 14531-14541.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. “CLUSTAL W:改进通过序列加权、位置-特异性空位处罚和权重矩阵选择的累进多序列比对的灵敏性 (CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice).” *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11; 22(22): 4673-80.

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, 等(1993). “通过注射编码病毒蛋白的DNA导致针对流感的异源保护作用 (Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding viral protein).” *Science* 259(5102):1745-1749.

W02013/040564; Zhiwei, W. X., WU; (2012). 识别任意地设计的在肽中的3个或更多个氨基酸残基的表位的抗体和其生成方法 (Antibody recognizing arbitrarily designed epitope of three or more amino acid residues in a peptide and method of generating thereof).

Zhou, J., A. K. Cheung, Z. Tan, H. Wang, W. Yu, Y. Du, Y. Kang, X. Lu, L. Liu, K. Y. Yuen和Z. Chen (2013). “基于PD1的DNA疫苗在小鼠中扩增HIV-1 GAG-特异性CD8+ T细胞 (PD1-based DNA vaccine amplifies HIV-1 GAG-specific CD8+ T cells in mice).” *Journal of Clinical Investigation*.

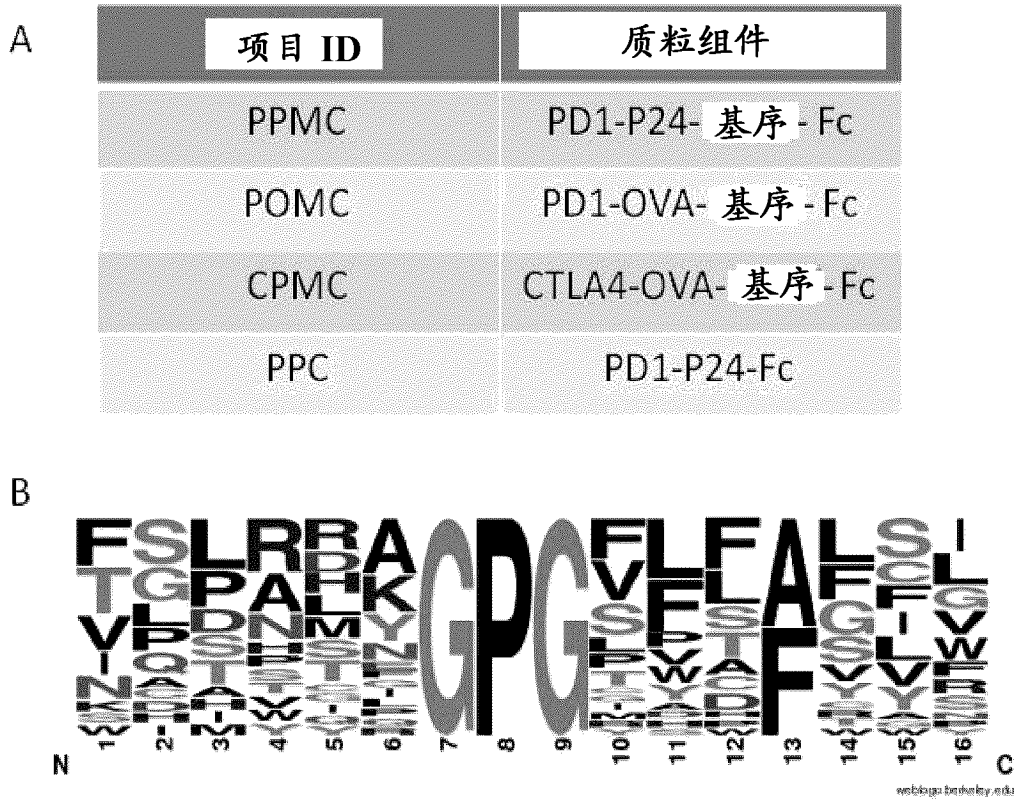


图 1A-B

CTM12	KGLVQAGPGFYF-GLL
CTM13	ICAWTGGPGFPL-FIV
CTM14	NHDHMNGPGM-SF-IW
CTM15	TAPRMKGPFTFP-RSY
CTM16	NLLARYGPGFVL-TCF
OVAM01	-----AGPGPFC-GYV
OVAM05	-----GPGRFW-LSL
OVAM06	SSPYTLGPGLY---LG
OVAM07	-----IGPGVND-VVI
OVAM09	TST-RYGPGSLF-WGR
OVAM10	-----PGPGFVF-LYF
OVAM11	VLHSYKGPGLA-SSL
OVAM15	FD-NIQGPGVATAYFI
OVAM16	FPLRSRGPGFPS-FLS
OVAM18	VSPPLEGPGGLA-CWL
OVAM21	-----GPGILS-LCP
OVAM23	IGLASYGPGYHH-LIR
OVAM24	----HAGPGVLL-FSW
OVAM25	FII-GFGPGSDD-VFS
OVAM26	FPSARAGPGPFC-GYV
OVAM27	----HAGPGVLL-FSW
OVAM28	IQTRDKGPGSFF-SAG
OVAM29	IQSRDKGPGSFF-SVG
OVAM30	VGMNCNGPGTLE-GCN
PDM06	-----GPGLST-LVI
PDM08	WSDTLAGPGVWT-YFI

图 1C

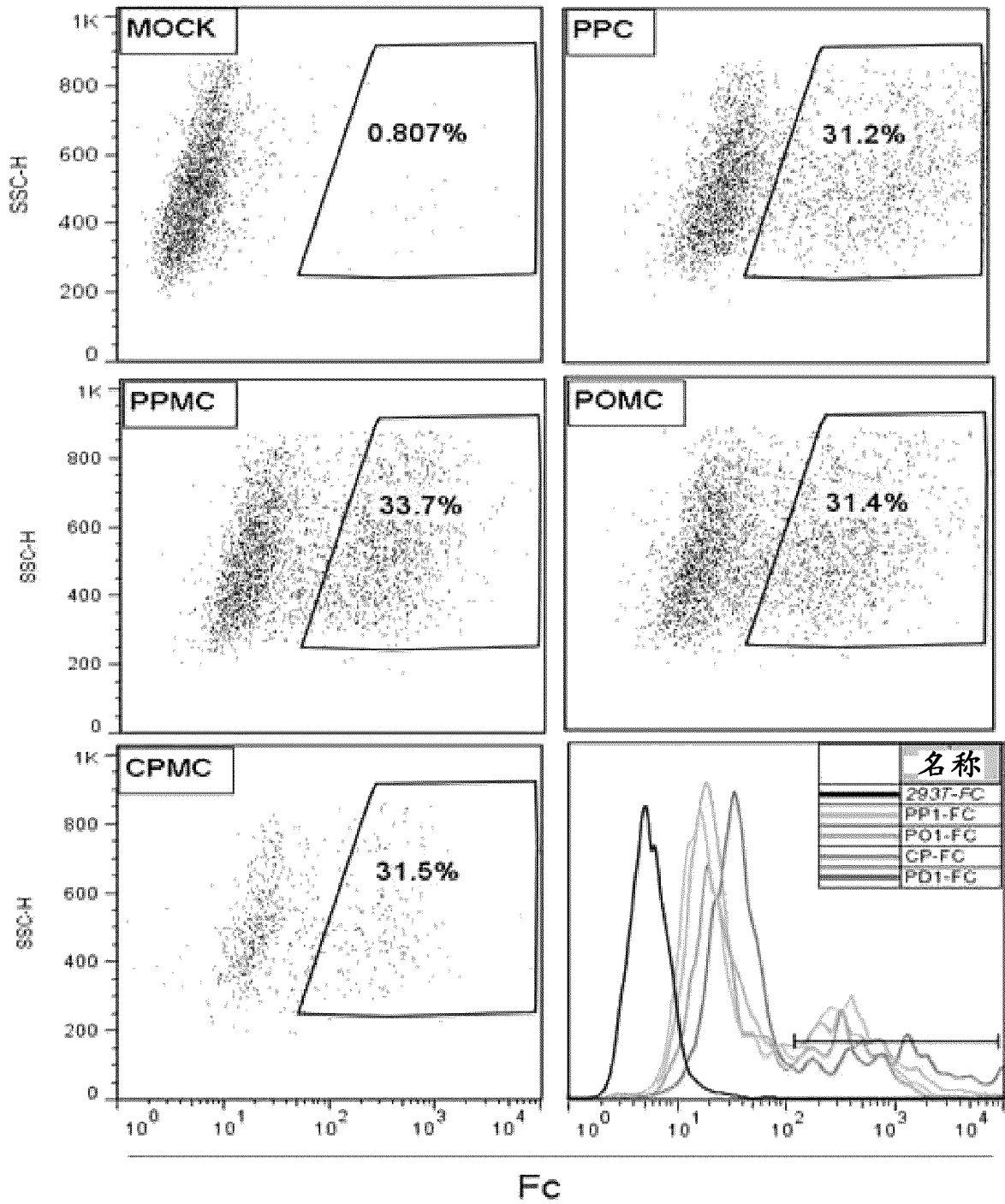


图 2

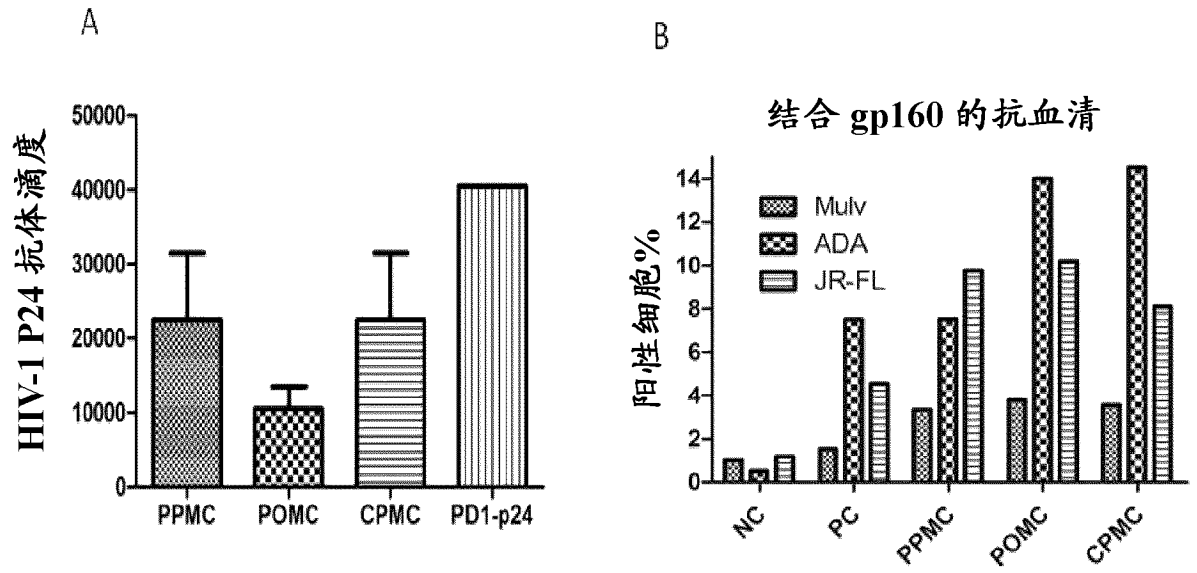
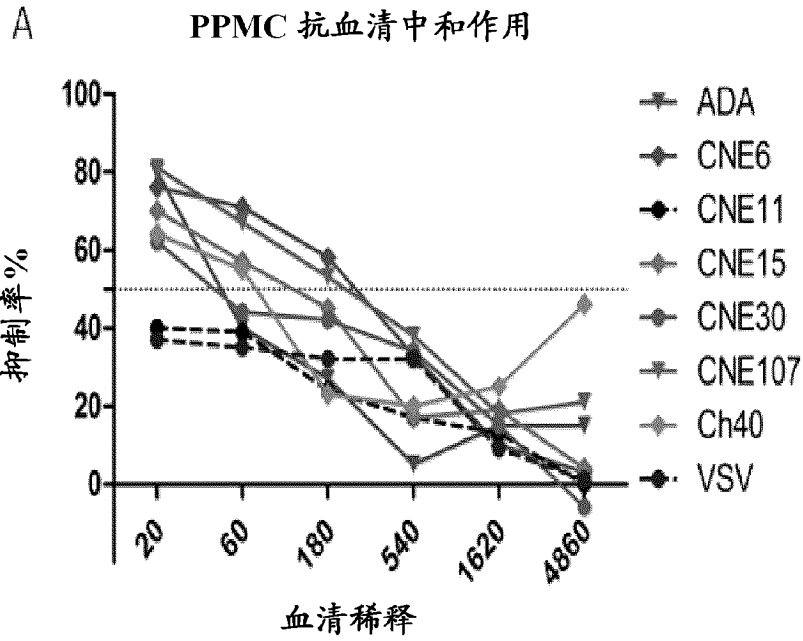


图 3A-B



分化体 ID	分化体	感染阶段	复合受体使用	滴度	V3 尖端序列	ND50 (1/稀释度)					ID50 (u.r./ml) 4E10
						PPMC _{max}	POMC _{max}	CPMC _{max}	RPC _{max}	空白	
ADA	B	慢性	R5	2	GPGR	46	34	40	ND	29	5.3
CNE6	B'	慢性	R5	2	GLGR	253	227	147	42	<20	2.34
CNE11	B'	慢性	R5	2	QQGR	<20	<20	<20	<20	<20	4.50
CNE15	B'C	慢性	R5	2	GPQQ	116	81	108	33	<20	4.10
CNE30	CRF08_BC	慢性	R5	3	GPQQ	43	28	<20	ND	<20	9.43
CNE107	CRF01_AE	慢性	X4	2	GPGR	230	143	147	96	<20	0.93
Ch40	AE	传播	R5	----	GPGR	72	86	85	<20	<20	2.33
VSV-G	Vesicular stomatitis virus	----	----	----	----	<20	54	<20	<20	<20	<20

图 4A-B

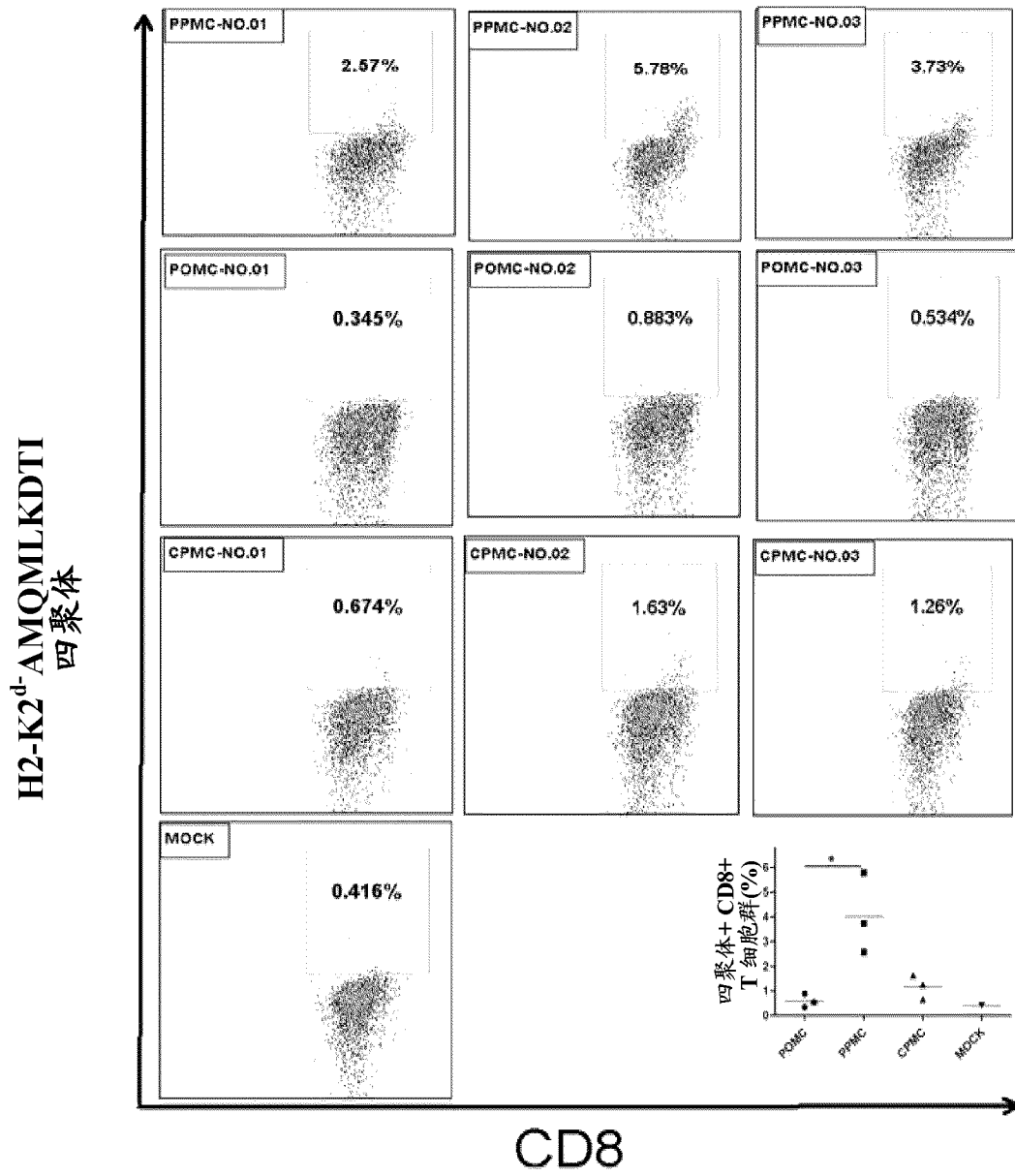
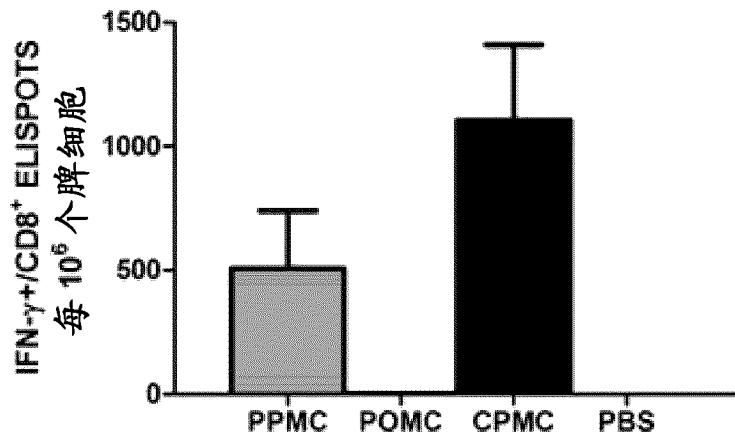


图 5

A



B

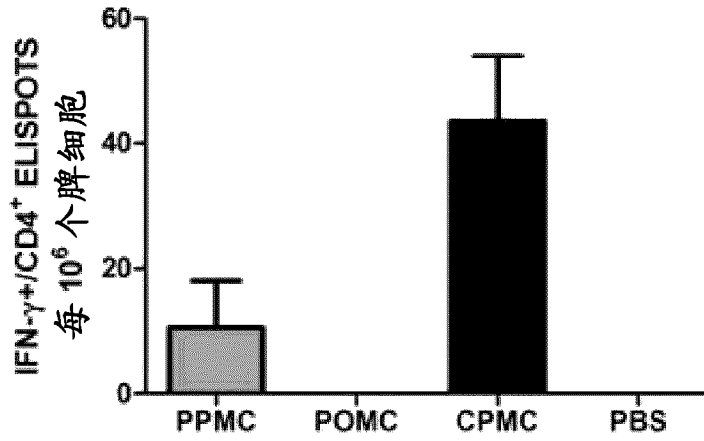


图 6A-B

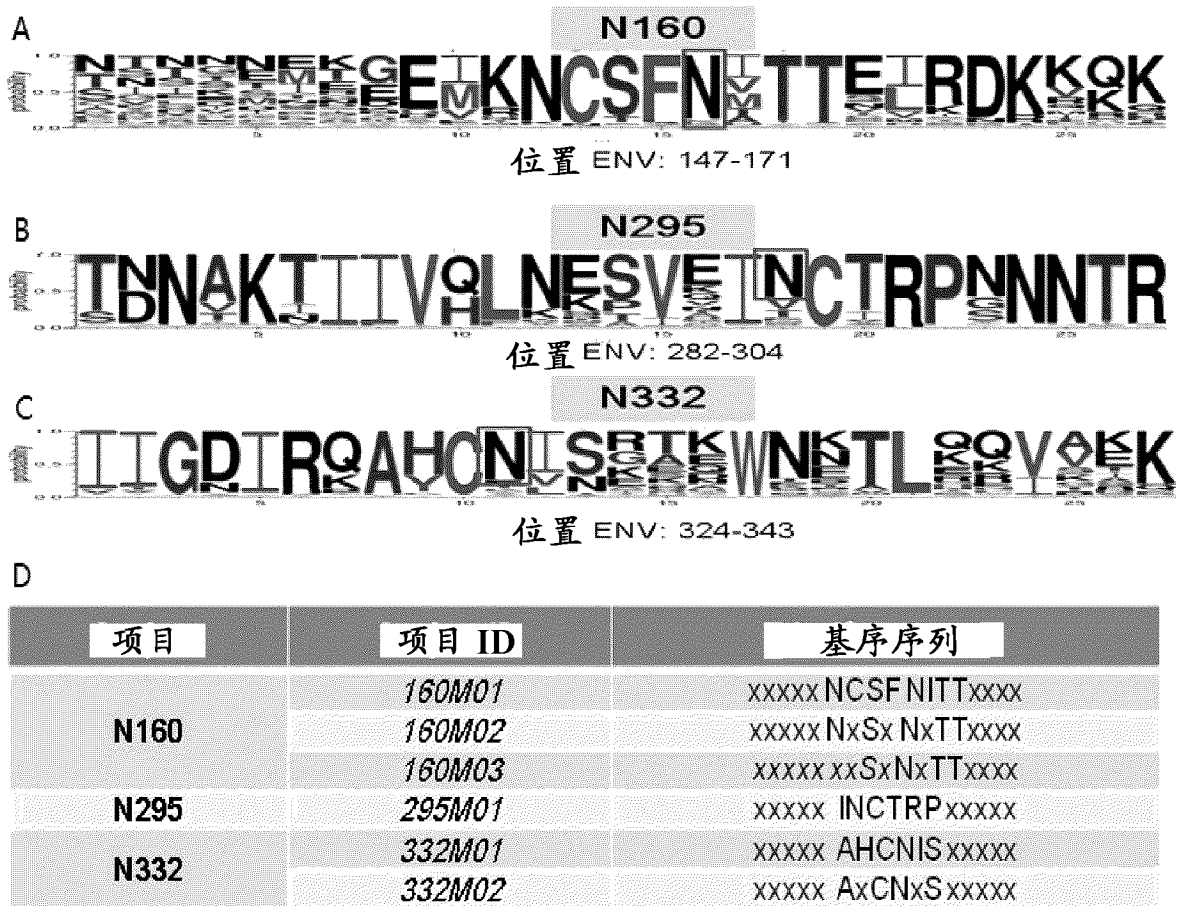


图 7A-D

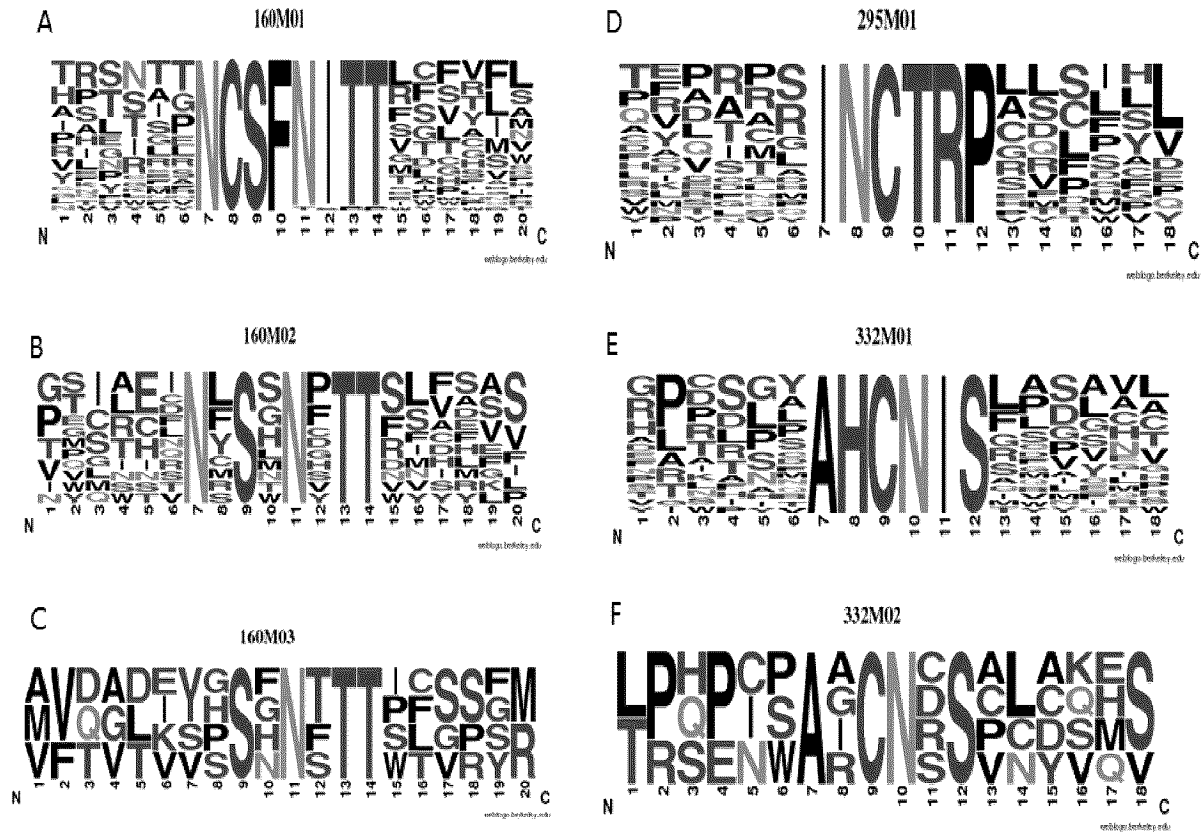


图 8A-F

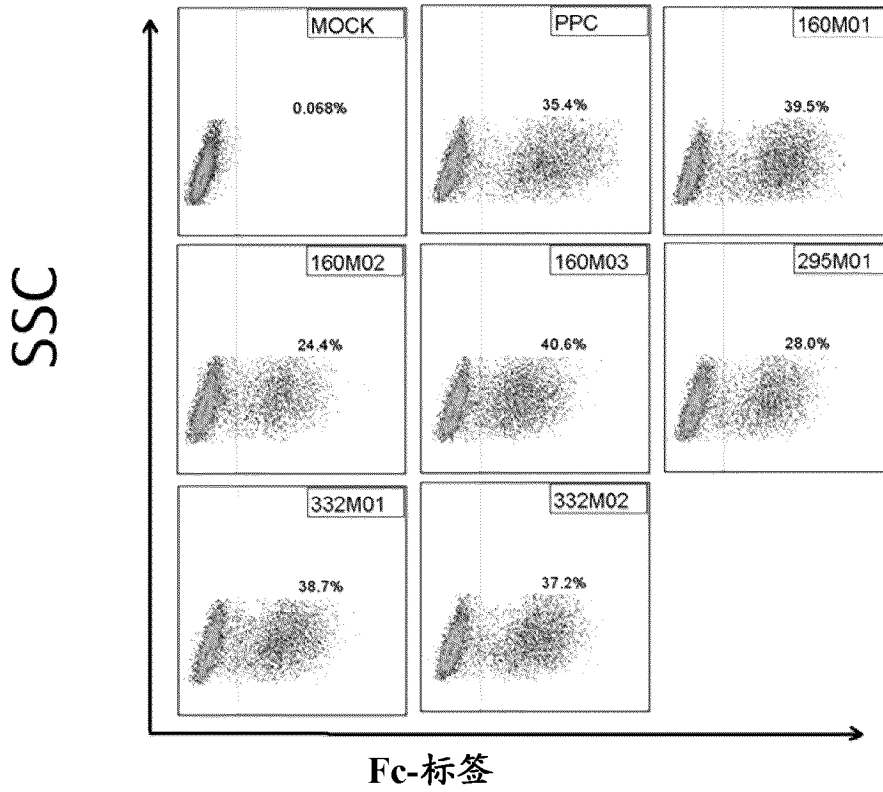


图 9

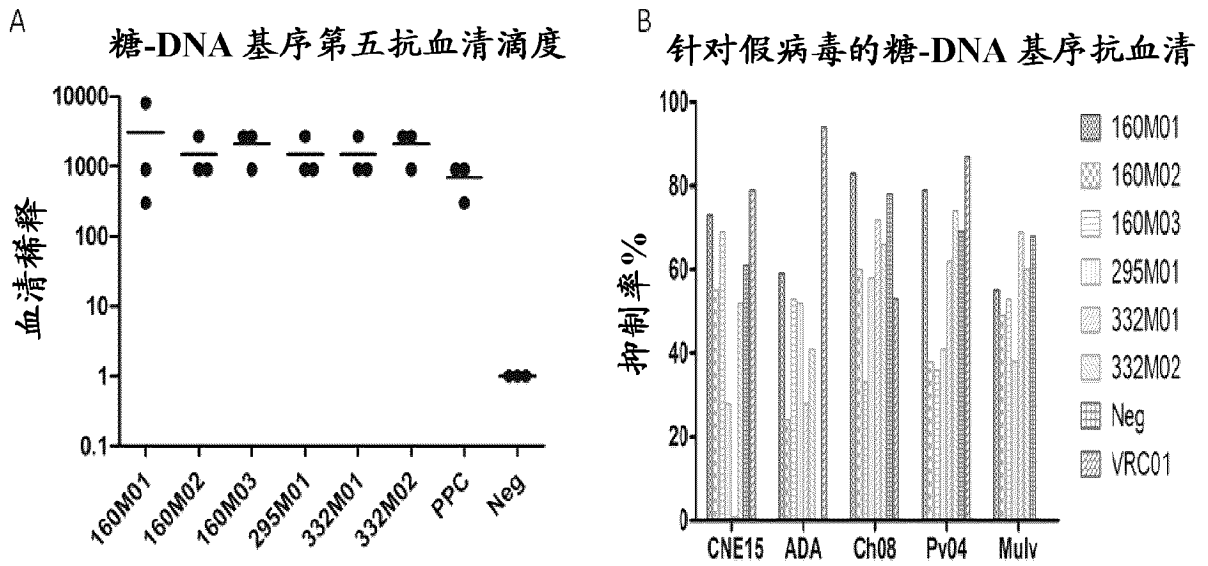


图 10A-B

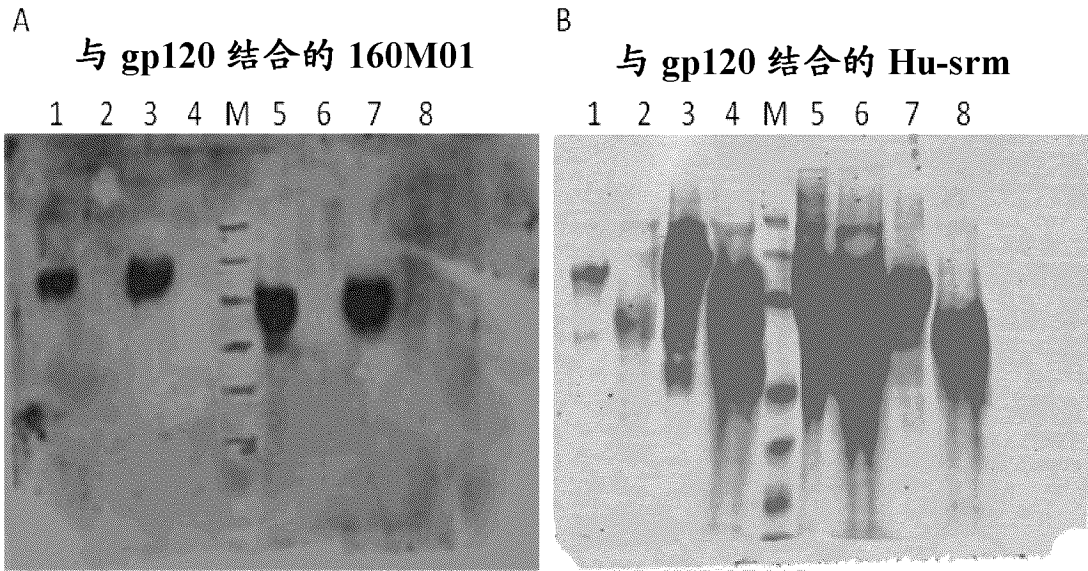


图 11A-B

pVAX-1™ 载体的图谱

pVAX1™ 的图谱

下图概括 pVAX1™ 载体的特征，
pVAX-1™ 的序列可从 www.lifetechnologies.com
或从 Technical Support (见 10 页) 下载获得。

**pVAX1™ 的注释：
2999 bp**

- CMV 启动子: 碱基 33-620
- T7 启动子/引发位点: 碱基 664-683
- 多克隆位点: 碱基 696-811
- BGH 反向引发位点: 碱基 823-840
- BGH 多腺苷酸化信号: 碱基 829-1053
- 卡那霉素抗性基因: 碱基 1226-2020
- pUC 起点: 碱基 2320-2993

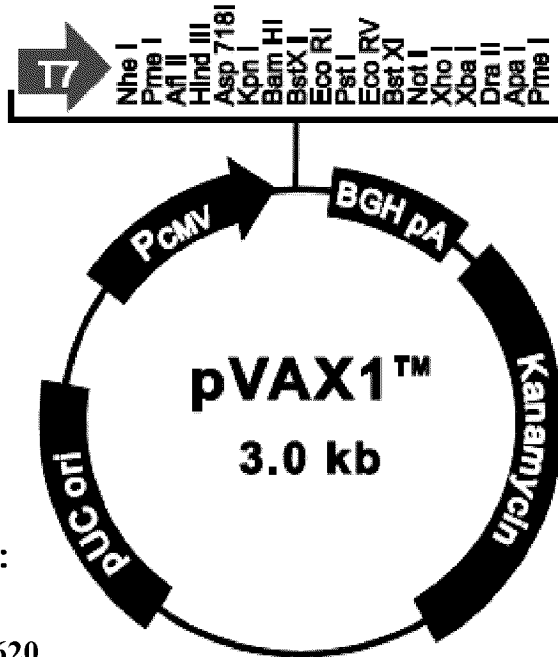


图 12