



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1871355 B

(45) 授权公告日 2011.12.14

(21) 申请号 200480020973.6

(22) 申请日 2004.06.08

(30) 优先权数据

60/477,389 2003.06.09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.01.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/018305 2004.06.08

(87) PCT申请的公布数据

W02004/113517 EN 2004.12.29

(73) 专利权人 惠氏

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 C·L·派克斯 S·A·乌登

M·S·西德胡

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 徐迅

(51) Int. Cl.

C12N 15/86(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

C12N 7/00(2006.01)

(56) 对比文件

W0 0200883 A2, 2002.01.03, 权利要求 1, 2, 17, 图 1.

CN 1303426 A, 2001.07.11, 说明书, 权利要求书.

张晓东等人. 重组质粒转染蟑螂对黑胸大蠊浓核病毒的拯救. 中国病毒学 14 02. 1999, 14(02), 152-156.

Harty Ronald N等人. Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 3 4. 2001, 3(4), 513-517.

审查员 邢云龙

权利要求书 7 页 说明书 58 页 附图 6 页

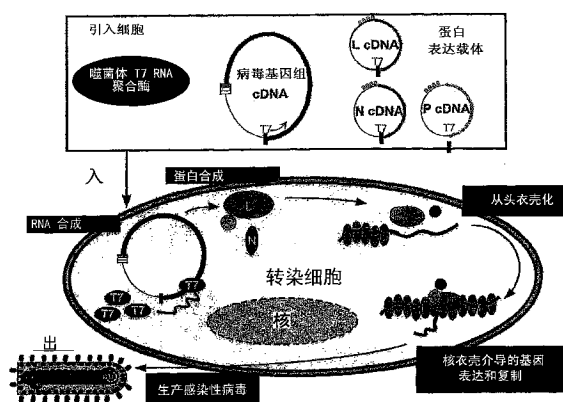
(54) 发明名称

从 cDNA 中回收非节段性负链 RNA 病毒的改进方法

(57) 摘要

本发明提供了产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,包括在用编码 RNA 聚合酶的表达载体瞬时转染的宿主细胞中共表达病毒的 cDNA 和必需病毒蛋白 N、P 和 L。在另一种方法中,用病毒 cDNA 表达载体和编码 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白的一种或多种载体转染宿主细胞后,将宿主细胞暴露于足以提高重组病毒回收率的有效热激条件下。在另一实施方式中,在病毒拯救开始后转移所述宿主细胞,与噬斑扩增细胞,一般是单层扩增细胞共培养,从该共培养物中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。本发明也提供用于产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的组合物,和用上述方法和组合物产生的重组病毒和采用该重组病毒的免疫原性组合物和方法。在其它实施方式中,采用本发明方法和组合物产生生长

或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒和亚病毒颗粒。



1. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,其中所述宿主细胞表达 N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白,并由瞬时转染的质粒表达载体瞬时表达 DNA 依赖性 RNA 聚合酶,其中,在将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染的表达载体引入宿主细胞后,将宿主细胞在足以有效提高重组病毒回收率的条件下,暴露于有效热激下;和

(b) 从所述宿主细胞中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶是 T7RNA 聚合酶。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,

(1) 将所述病毒 cDNA 表达载体和编码并指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶瞬时表达的瞬时表达载体混合于 DNA 转染混合物中,并同时加入宿主细胞培养物以实现协同转染;

(2) 在引入编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染的表达载体之前,将所述病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞;

(3) 在引入编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染的表达载体之后,但在所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶在所述宿主细胞中累积到可检测水平之前,将所述病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染的表达载体通过磷酸钙转染或电穿孔引入到宿主细胞中。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在足以让所述病毒 cDNA 表达载体和编码并指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶表达的瞬时转染的表达载体表达的时间后,将宿主细胞与相同或不同类型细胞的噬斑扩增细胞共培养,以使被拯救的病毒散播到噬斑扩增细胞中。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述感染性、非节段性负链 RNA 病毒是完全病毒。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,编码所述基因组或反义基因组的多核苷酸分子编码野生型非节段性负链 RNA 病毒的序列。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,修饰所述非节段性负链 RNA 病毒,使其编码选自下组的非病毒分子:细胞因子、T- 辅助表位、限制性位点标记或能够在哺乳动物宿主中引发免疫应答的微生物病原体或寄生物的蛋白质。

9. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括下述步骤:

将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码并指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体在足以使得所述载体共表达和产生重组病毒的条件引入合适的宿主细胞,所述基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述病毒 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,其中编码 RNA 聚合酶的所述瞬时表达载体是质粒,并且将一种或多种所

述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;

转移所述宿主细胞,与噬斑扩增细胞共培养;和

从所述共培养物中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

10. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括下述步骤:

(a) 将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,该宿主细胞瞬时表达:

(1)DNA 依赖性 RNA 聚合酶、

(2)N 蛋白、

(3)P 蛋白、和

(4)L 蛋白、

其中所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶和 N、P 和 L 蛋白各自由瞬时转染的表达载体表达,并且将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;和

(b) 从宿主细胞中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

11. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括下述步骤:

将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码并指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体引入合适的宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述病毒 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,其中编码 RNA 聚合酶的所述瞬时表达载体是质粒,并且将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;和

从所述宿主细胞中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

12. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的组合物,该组合物包含:

(a) 含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以在合适的宿主细胞中指导由所述 cDNA 合成病毒 RNA 转录物,所述宿主细胞通过在足以提高从宿主细胞中回收重组病毒的回收率的条件下暴露于有效热激中修饰;

(b) 在所述宿主细胞中编码和指导:

(1)N 蛋白、

(2)P 蛋白、和

(3)L 蛋白

表达的一种或多种支持载体;和

(c) 在所述宿主细胞中编码和指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶瞬时表达的瞬时表达质粒载体。

13. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,在无细胞共转染混合物中提供了所述病毒 cDNA 表达载体、编码 N、P 和 L 的所述一种或多种支持载体、以及编码和指导瞬时表达所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的所述瞬时表达载体。

14. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,将所述病毒 cDNA 表达载体、编码 N、P 和 L 的所述一种或多种支持载体、以及编码和指导瞬时表达所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的所述瞬时表达载体转染入所述宿主细胞。

15. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶是 T7RNA 聚合酶。

16. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含与宿主细胞细胞类型相同或不同的噬斑扩增细胞,以使被拯救的病毒从宿主细胞扩散到噬斑扩增细胞中。

17. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,所述感染性、非节段性负链 RNA 病毒是完全病毒。

18. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,一种或多种所述 N、P 和 L 蛋白是异源非节段性负链 RNA 病毒的蛋白。

19. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,编码所述基因组或反义基因组的多核苷酸分子编码野生型非节段性负链 RNA 病毒的序列。

20. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,所述非节段性负链 RNA 病毒是:(a) 副粘病毒科家族的一员或 (b) 弹状病毒科家族的一员。

21. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,通过引入一种或多种减毒突变重组修饰所述非节段性负链 RNA 病毒。

22. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,通过 RNA 编辑位点的突变、移码突变、改变翻译起始位点的突变、在基因的开放阅读框中引入一个或多个终止密码子或转录信号中的突变,导致所述非节段性负链 RNA 病毒的一种或多种基因全部或部分缺失,或该基因的表达降低或消除。

23. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,修饰所述非节段性负链 RNA 病毒,使其编码选自下组的非病毒分子:细胞因子、T- 辅助表位、限制性位点标记或能够在哺乳动物宿主中引发免疫应答的微生物病原体或寄生物的蛋白质。

24. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,编码所述基因组或反义基因组的多核苷酸包含部分或完整的载体基因组或反义基因组,它们与编码一种或多种异源病原体的一种或多种抗原决定簇的一种或多种异源基因或基因组节段相组合而形成嵌合基因组或反义基因组。

25. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,与所述非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组中所述基因或基因组节段的野生型基因顺序位置相比,通过在更接近启动子或更远离启动子的位置上添加、取代或转座基因或基因组节段来修饰编码所述基因组或反义基因组的多核苷酸。

26. 如权利要求 12 所述的组合物,其特征在于,所述一种或多种表达载体编码相同或不同非节段性负链 RNA 病毒的结构蛋白的任何一种或任何组合。

27. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括下述步骤:

(a) 将含有编码生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,其中所述宿主细胞表达 N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白,并由瞬时转染的质粒表达载体瞬时表达 DNA 依赖性 RNA 聚合酶,并且将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;和

(b) 从所述宿主细胞中回收组装的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,所述病毒在所述宿主细胞中组装后,不能完成一轮复制。

29. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,所述病毒能够在体外生长和 / 或复制,但在体内是生长或复制缺陷的。

30. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,将所述病毒 cDNA 表达载体和编码并指导瞬时表达 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时表达载体混合于 DNA 转染混合物中,并同时加入到宿主细胞培养物中,以实现协同转染。

31. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,在引入编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染的表达载体之前,将所述病毒 cDNA 表达载体以及编码 N、P、L 蛋白的一种或多种支持载体引入宿主细胞。

32. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体通过磷酸钙转染或电穿孔引入所述宿主细胞。

33. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,所述复制缺陷型、非节段性负链 RNA 病毒是亚病毒颗粒。

34. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,一种或多种所述 N、P 和 L 蛋白是异源非节段性负链 RNA 病毒的蛋白。

35. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,所述非节段性负链 RNA 病毒是:(a) 副粘病毒科家族的一员;或(b) 弹状病毒科的一员。

36. 如权利要求 1 或 27 所述的方法,其特征在于,通过引入一种或多种减毒突变重组修饰所述非节段性负链 RNA 病毒。

37. 如权利要求 1 或 27 所述的方法,其特征在于,通过 RNA 编辑位点的突变、移码突变、改变翻译起始位点的突变、在基因的开放阅读框中引入一个或多个终止密码子或转录信号中的突变,导致所述非节段性负链 RNA 病毒的一种或多种基因全部或部分缺失,或该基因的表达降低或消除。

38. 如权利要求 1 或 27 所述的方法,其特征在于,所述编码基因组或反义基因组的多核苷酸包含部分或完整的载体基因组或反义基因组,它们与编码一种或多种异源病原体的一种或多种抗原决定簇的一种或多种异源基因或基因组节段相组合而形成嵌合基因组或反义基因组。

39. 如权利要求 1 或 27 所述的方法,其特征在于,与所述非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组中所述基因或基因组节段的野生型基因顺序位置相比,在更接近启动子或更远离启动子的位置添加、取代或转座基因或基因组节段,来修饰编码所述基因组或反义基因组的所述多核苷酸。

40. 如权利要求 1 或 27 所述的方法,还包括在所述宿主细胞中共引入和 / 或共表达相同或不同非节段性负链 RNA 病毒的结构蛋白的任何一种或任何组合。

41. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括下述步骤:

将含有编码生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码并指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体在足以使得所述载体共表达和产生重组病毒条件下引入合适的宿主细胞,所述基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,其中编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时表达载体是质粒,并且将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;

转移所述宿主细胞,与噬斑扩增细胞共培养;和

从所述共培养物中回收组装的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒。

42. 如权利要求 41 所述的方法,其特征在于,所述复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒在所述宿主细胞中组装后,不能完成一轮复制,或能够在体外生长和 / 或复制,但在体内是生长或复制缺陷的。

43. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的方法,该方法包括下述步骤:

(a) 将含有编码生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由所述 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,该宿主细胞瞬时表达:

(1)DNA 依赖性 RNA 聚合酶、

(2)N 蛋白、

(3)P 蛋白、和

(4)L 蛋白,

其中所述 RNA 聚合酶和 N、P 和 L 蛋白各自由瞬时转染的表达载体表达,其中编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时表达载体是质粒,并且将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;和

(b) 从所述宿主细胞中回收组装的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒。

44. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒在所述宿主细胞中组装后,不能完成一轮复制,或能够在体外生长和 / 或复制,但在体内是生长或复制缺陷的。

45. 一种产生单分子负链 RNA 病毒目的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的方法

法,该方法包括下述步骤:

将含有编码生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体以及编码和指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白的一种或多种瞬时表达载体引入合适的宿主细胞,所述基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导所述 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,其中编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时表达载体是质粒,并且将一种或多种所述病毒 cDNA 表达载体和编码 DNA 依赖性 RNA 聚合酶的瞬时转染表达载体引入所述宿主细胞后,将所述宿主细胞在足以提高重组病毒回收率的条件下暴露于有效热激中;和

从所述宿主细胞中回收组装的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒。

46. 如权利要求 45 所述的方法,还包括在所述宿主细胞中共引入和 / 或共表达相同或不同非节段性负链 RNA 病毒的结构蛋白的任何一种或任何组合。

47. 一种用于产生单分子负链 RNA 病毒目的生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的组合物,该组合物包含:

(a) 含有编码生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以在合适的宿主细胞中指导由所述 cDNA 合成病毒 RNA 转录物,所述宿主细胞通过在足以提高从宿主细胞中回收重组病毒的回收率的条件下暴露于有效热激中修饰;

(b) 在所述宿主细胞中编码和指导:

(1)N 蛋白、

(2)P 蛋白、和

(3)L 蛋白

瞬时表达的一种或多种表达载体;和

(c) 在所述宿主细胞中编码和指导 DNA 依赖性 RNA 聚合酶瞬时表达的瞬时表达载体。

48. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,所述病毒在所述宿主细胞中组装后,不能完成一轮复制,或能够在体外生长和 / 或复制,但在体内是生长或复制缺陷的。

49. 如权利要求 48 所述的组合物,其特征在于,所述 DNA 依赖性 RNA 聚合酶是 T7RNA 聚合酶。

50. 如权利要求 47 所述的组合物,还包含至少一层噬斑扩增细胞,以建立宿主和噬斑扩增细胞的共培养。

51. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,所述复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒是亚病毒颗粒。

52. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,所述非节段性负链 RNA 病毒是:(a) 副粘病毒科家族的一员;或 (b) 弹状病毒科家族的一员。

53. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,通过引入一种或多种减毒突变重组修饰所述非节段性负链 RNA 病毒。

54. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,通过 RNA 编辑位点的突变、移码突变、改变翻译起始位点的突变、在基因的开放阅读框中引入一个或多个终止密码子或转录信号中的突变,导致所述非节段性负链 RNA 病毒的一种或多种基因全部或部分缺失,或该基因的表达降低或消除。

55. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,所述编码基因组或反义基因组的多核苷酸包含部分或完整的载体基因组或反义基因组,它们与编码一种或多种异源病原体的一种或多种抗原决定簇的一种或多种异源基因或基因组节段相组合以形成嵌合基因组或反义基因组。

56. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,与所述非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组中所述基因或基因组节段的野生型基因顺序位置相比,在更接近启动子或更远离启动子的位置上添加、取代或转座基因或基因组节段,修饰编码所述基因组或反义基因组的多核苷酸。

57. 如权利要求 47 所述的组合物,其特征在于,所述一种或多种表达载体还编码相同或不同非节段性负链 RNA 病毒结构蛋白的一种或任何组合。

从 cDNA 中回收非节段性负链 RNA 病毒的改进方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2003 年 6 月 9 日提交的美国临时申请 60/477,389 的优先权,将其引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及产生称为单分子负链 RNA 病毒 (Mononegavirales) 目的感染性、复制性、非节段性负链 RNA 病毒的改进方法和组合物。该方法和组合物也适用于产生生长或复制缺陷型的这些病毒。

[0004] 发明背景

[0005] 有包膜、非节段性、负义、单链 RNA 病毒组成和表达独特。负义、单链病毒的基因组 RNA 在核衣壳内容中具有两种模板功能:作为信使 RNA (mRNA) 的合成模板和作为反义基因组 (+) 链的合成模板。负义、单链 RNA 病毒编码和包装它们自己的 RNA- 依赖性 RNA 聚合酶。仅当其核衣壳进入受感染细胞的胞质时,才合成信使 RNA。病毒复制发生在 mRNA 合成之后,需要病毒蛋白的连续合成。新合成的反义基因组 (+) 链用作进一步产生 (-) 链基因组 RNA 拷贝的模板。

[0006] RNA- 依赖性聚合酶复合物通过在基因组的 3' 端,具体说,在启动子区产生顺式作用信号而驱动和实现转录和复制。然后由基因组模板从 3' 至 5' 端单方向地转录病毒基因。相对于它们的上游邻居 (如核蛋白基因 (N)) 来说,下游基因 (如聚合酶基因 (L)) 产生的 mRNA 较少。因此,诸基因根据相对于基因组 3' 端的位置,其 mRNA 丰度呈梯度分布。

[0007] 对于许多非节段性负链 RNA 病毒来说,没有任何种类的有效疫苗可用。因此,非常需要开发改进的免疫原性组合物和方法,以抵抗这些人和动物的病原体。

[0008] 在寻求开发抵抗非节段性负链 RNA 病毒的免疫原性组合物和方法中可使用各种方法,包括使用 (1) 纯化的单个病毒蛋白疫苗 (亚单位疫苗); (2) 灭活的全病毒制剂; 和 (3) 减毒活病毒。

[0009] 亚单位疫苗具有的优良特征是纯、成分明确和用各种方法,包括重组 DNA 表达方法大量产生相对容易。迄今,明显地除了乙型肝炎表面抗原以外,病毒亚单位疫苗通常仅引发短期和 / 或不充分的免疫力,尤其是在初次受试者中。

[0010] 已证明,经福尔马林灭活的脊髓灰质炎 (IPV) 和甲型肝炎全病毒制剂是安全和有效的。相反,用类似方法灭活的全病毒,如呼吸道合胞病毒 (RSV) 和麻疹病毒疫苗免疫会引发不良的免疫应答和 / 或使疫苗接种者后来遇到天然产生的或“野生型”病毒时易发生过度的或异常的疾病反应。

[0011] 免疫幼儿的早期尝试 (1966) 采用胃肠道外给予福尔马林灭活的 RSV 疫苗。不幸的是,该疫苗的几次现场试验显示有严重的副反应,包括后来天然感染 RSV 后,发生不寻常特征的严重疾病 (Kapikian 等, Am J Epidemiol. 4 :405-21, 1969 ; Kim 等, Am J Epidemiol. 4 :422-34, 1969 ; Collins 等, 呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus) “现场病毒学 (Field's Virology)”, 第 3 版。Lippincott-Raven, 1443-1475, 2001 ; Collins 等, Adv.

Virus. Res. ,54 :423-451,1999)。有人提出,此种福尔马林处理的 RSV 抗原引发异常或不平衡的免疫应答,使疫苗接种者易患 RSV 疾病 (Collins 等,呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus) “现场病毒学 (Field's Virology)” 第 3 版。Lippincott-Raven, 1443-1475,2001 ;Collins 等 Adv. Virus. Res. ,54 :423-451)。

[0012] 此后,通过冷传代或化学诱变产生候选的减毒活 RSV 疫苗。发现这些 RSV 株在血清阳性成人中毒力降低。不幸的是,当给予血清阴性的婴儿时,证明它们是过度减毒或减毒不足的;在一些情况下,也发现它们缺乏遗传稳定性 (Collins 等, R, 呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus) “现场病毒学 (Field's Virology)” 第 3 版。Lippincott-Raven, 1443-1475,2001 ;Collins 等, Adv. Virus. Res. ,54 :423-451)。另一采用胃肠道外给予活病毒进行免疫的方法无效,沿此路线进行的努力已停止 (Collins 等, 呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus) “现场病毒学 (Field's Virology)” 第 3 版。Lippincott-Raven, 1443-1475,2001 ;Collins 等, Adv. Virus. Res. ,54 :423-451)。值得注意的是,这些 RSV 活疫苗从来不伴有上述福尔马林灭活 RSV 疫苗观察到的病情加重。目前,没有批准给予人的 RSV 疫苗,但是采用各种 RSV 减毒突变体的临床试验正在进行当中。

[0013] 野生型病毒的适当减毒的活衍生物为用于免疫原性组合物和方法提供了独特优点。因为是活的复制因子,它们可引发受试者感染,在此期间,病毒基因产物被表达、加工并与免疫接种者的特定的 MHC I 和 II 类分子一起提呈。在此方式中,减毒活病毒候选疫苗有效引发体液和细胞介导的免疫应答,以及刺激协同细胞因子和趋化因子,此与天然感染存活者的免疫应答特性类似。

[0014] 这种有利的免疫应答模式与灭活或亚单位疫苗引发的有界限的应答反应完全不同,后者一般主要限于体液免疫监督臂。而且,一些福尔马林灭活的全病毒疫苗,例如,1960 年代开发的麻疹和呼吸道合胞病毒疫苗引起的免疫应答特性,不仅不能提供持续保护,而且实际上当疫苗接种者后来遇到野生型病毒时,导致易于发生异常、过度、甚至致命的疾病。

[0015] 虽然对用于免疫原性组合物和方法来说,减毒活病毒具有所需特征,但证明产生和评价它们很困难。困难的症结在于需要分离得到失去致病潜力 (即毒力),但仍保留足够的复制能力能感染接受者并引发足量所需免疫应答的野生型病毒衍生物。

[0016] 历史上,曾在改变的生长条件 (如温度) 下,通过不同宿主组织或细胞连续传代野生型病毒分离物实现毒力和减毒之间的这种微妙平衡。该方法推测有利于病毒变体 (突变体) 的生长,其中有些病毒具有令人鼓舞的减毒特征。偶尔也可通过化学诱变达到进一步减毒。

[0017] 这种增殖 / 传代方案一般导致出现温度敏感型 (ts)、冷适应型 (ca) 和 / 或宿主范围 (hr) 改变的病毒衍生物 - 其中一个或全部由野生型、致病病毒变化而来 - 即可能发生与减毒相关的改变。

[0018] 此方法已产生了几种病毒活疫苗,包括预防麻疹和腮腺炎 (副粘病毒) 以及预防脊髓灰质炎和风疹 (正链 RNA 病毒) 的疫苗,并为整个世界提供了目前儿童时期免疫的主要方案。

[0019] 然而,这种产生候选减毒病毒活疫苗的方法时间很长,可能不能预测,很大程度上依赖于选择性产生具有所需减毒特征的随机发生的基因组突变体。产生的用于免疫原性组

合物的候选病毒在免疫对象中常常是减毒不足或过度减毒的。

[0020] 即使目前已有使用的疫苗,仍需要更有效的候选减毒活病毒,以产生改进的免疫原性组合物和方法。例如,目前的麻疹疫苗能提供相当好的保护。然而,最近麻疹流行病学资料说明目前疫苗的效率有缺陷。即使母亲有免疫力,低于一岁的儿童中发生急性麻疹感染的比例仍然很高,这反映出这些疫苗不能诱导麻疹抗体水平达到相当于后来野生型麻疹感染所产生的水平 (Griffin, 麻疹病毒 (Measles Virus) “现场病毒学 (Field's Virology)”,第3版。Lippincott-Raven, 1401-1442, 2001 ;Cutts 等, J. Infectious Dis., 170 :S32-S41, 1994)。结果,疫苗免疫的母亲不大可能透过胎盘给她们的婴儿提供足以在新生儿生命的最初几个月中保护他们的被动抗体。

[0021] 在曾经免疫过的青少年和青年中发生的急性麻疹感染指出另一问题。这些第二次疫苗接种失败说明目前的疫苗诱导和维持足量和长效抗病毒保护的能力有限 (Atkinson 等, United States. Annu. Rev. Med., 43 :451-463, 1992)。最近,又揭示了另一潜在问题。过去 15 年中分离的野生型麻疹病毒的血凝素蛋白显示与疫苗株的距离不断增加 (Bellini 等, Emerging Infectious Diseases, 4 :29-35, 1998)。这种“抗原性漂变”引起了大家的合理关注,这些疫苗可能不含有提供最优保护所需的理想抗原组分。因此,需要改进的免疫原性组合物。

[0022] 从 cDNA 中回收重组非节段性负链 RNA 病毒需要特殊的拯救系统,因为将病毒基因组 RNA (vRNA) 本身引入细胞不足以启动病毒复制。启动病毒复制循环还需要在细胞内合成三种或多种病毒反式作用蛋白,包括病毒核衣壳和聚合酶复合体的诸组分。

[0023] 尝试了许多不同的拯救方法从 cDNA 中回收重组非节段性负链 RNA 病毒。这些报道的方法大多数包括共转染步骤,其中用多个质粒,包括病毒基因组 cDNA 克隆加编码必需病毒蛋白如核衣壳蛋白 (N 或 NP)、磷蛋白 (P) 和大聚合酶亚基 (L) 的表达载体,来转染宿主细胞。

[0024] 已采用特别为非节段性负链病毒、T7RNA 聚合酶的胞内表达设计的拯救方法来促进转染的 DNA 转录。为此目的,已使用了 T7RNA 聚合酶,因为 :i) 用适当设计的病毒 cDNA 质粒,可迫使 T7 聚合酶在病毒基因组的精确 5' 端启动 vRNA 合成,ii) T7RNA 聚合酶导致在这类病毒复制的场所 - 胞质中高水平表达,和 iii) RNA 的胞质合成消除了通过核剪切或聚腺苷酸化途径加工 vRNA 的可能性。这些特征使设计以 T7RNA 聚合酶为基础的拯救系统具有很大优势。

[0025] 虽然在拯救系统中使用 T7RNA 聚合酶伴有重要优势,但也有不足之处。为实现 T7RNA 聚合酶的高水平胞内表达,大多数救援系统还需要用表达噬菌体聚合酶基因 (如 MVA/T7) 的重组牛痘病毒感染该转染细胞 (参见,例如,Pattnaik 等, J. Virol. 64 : 2948-2957, 1990)。Lawson 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :4477-4481, 1995) 报道,通过采用这种通用拯救方法成功回收了水泡性口炎病毒 (VSV)。类似地,Conzelmann 于 2000 年 3 月 7 日提交美国专利号 6,033,886 报道,通过将 RV cDNA 基因组与编码 RV N、P 和 L 蛋白的质粒共转染入感染了重组牛痘病毒 vTF7-3 可表达 T7RNA 聚合酶的幼仓鼠肾 (BHK) 细胞中,从 cDNA 中成功回收了狂犬病病毒 (RV)。

[0026] 即使这些和其它成功报道涉及了基于牛痘的回收系统,但在病毒回收系统中使用重组牛痘病毒仍然伴有重要不足。具体说,这种回收方法需要从牛痘辅助病毒中纯化游离

的所需病毒。具体说,必须从受拯救的病毒中分离得到牛痘辅助病毒以实现回收。使这种回收复杂化,牛痘病毒实际上可干扰被拯救病毒的复制。对于像 RV 和 VSV 这样复制到高滴度的病毒来说,这些因素的问题较小。然而,很多其他非节段性负链 RNA 病毒生长较慢,可能在基于牛痘的系统中难以回收,例如,呼吸道合胞病毒 (RSV),人副流感病毒 (HPIVs),3 型牛副流感病毒 (BPIV3) 和麻疹病毒 (MV)。由于牛痘病毒可在宿主细胞群中,甚至几代后引起广泛的细胞病变效应 (CPE),基于牛痘的回收系统存在相关缺点。牛痘病毒引起的 CPE 可妨碍被拯救病毒所形成噬斑的检测,也可通过降低细胞培养物支持复制的能力而减少被拯救病毒的产率。牛痘病毒诱导的 CPE 也可能通过限制转染细胞保持活力的时间窗口而阻碍、或甚至排除对生长缓慢的减毒病毒的拯救。最后,如果想要使被拯救的重组病毒成为制备免疫原性组合物或开发基因治疗载体的种子贮液,残余牛痘病毒感染是一个重要问题。

[0027] 非节段性负链 RNA 病毒的另一种拯救系统采用特殊的组成性表达噬菌体聚合酶基因的“辅助”细胞系。据报道,示例性 T7 辅助细胞系有效规避了牛痘病毒系统的相关问题。Billeter 等 (国际公告号 WO 97/06270,引入本文作为参考) 报道的一个开发系统可从 cDNA 中回收感染性麻疹病毒 (MV)。Billeter 等的系统用组成性表达 RNA 聚合酶如 T7RNA 聚合酶的辅助细胞系取代了辅助病毒。该辅助细胞系还提供 MV 的 N 和 P 蛋白的组成性“基因组表达”。将含有操作性连接有表达控制序列的 MV 全部 (+) 链序列的 cDNA 质粒引入此特殊修饰的细胞系。将编码 MV 的 L 蛋白的质粒与 MVcDNA 共转染入辅助细胞系中进行瞬时表达。

[0028] 虽然据报道,此种替代的 T7 辅助细胞回收系统是 MV 回收的成功工具,但它也具有与上述牛痘辅助系统不同的缺点。最重要的是,Billeter 等的系统用组成性表达 T7RNA 聚合酶,以及 MV 的 N 和 P 蛋白的特殊辅助细胞系取代辅助病毒,似乎并不适合拯救其它非节段性负链 RNA 病毒。而且,当使用这种特殊的辅助细胞系时,必须为每个不同的待拯救病毒构建一个新细胞系。

[0029] 用于回收非节段性负链 RNA 病毒的另一种细胞系也具有在辅助细胞中仅组成性表达 T7 聚合酶的特征。因此,Buchholz 等 (J. Virol. 73:251-259,1999,引入本文作为参考) 构建了组成性表达 T7RNA 聚合酶的 BHK-21 细胞系。该系统的优点是其细胞系较不特殊,因为它也不组成性表达具体病毒的 N、P 或 L 蛋白,据报道,细胞系在 100 次连续传代后,T7 聚合酶的表达仍是稳定的。

[0030] 但是,所有辅助细胞系的类似缺点是它们难以构建,并且这些细胞系对回收广泛范围的不同非节段性负链 RNA 病毒中的用途有限。目前,仅开发了几个高水平表达聚合酶并支持病毒拯救的 T7 辅助细胞系。经验说明,可能难于分离得到满足不同病毒和新形成毒株的具体需要的新 T7 细胞系。这大大限制了可用于拯救的 T7 细胞系的数量,并对产生许多非节段性负链 RNA 病毒的合格细胞系提出了严重问题。显示特异性细胞嗜性不能生长于任何可利用的 T7 辅助细胞系中的非节段性负链 RNA 病毒产生了相关问题。

[0031] 虽然在回收和产生非节段性负链 RNA 减毒活病毒上已有很多进展,但是本领域仍然明确需要其它工具和方法,以工程改造产生安全有效的免疫原性组合物来减轻这些病原体所引起的严重健康问题。该领域的其余挑战需要采用基于 cDNA 的回收系统更有效地拯救非节段性负链 RNA 病毒的其它工具。为有助于达到这些目的,必须扩展从 cDNA 中回收非节段性负链 RNA 病毒的现有方法。在这方面,尤其需要开发回收和遗传操纵非节段性负链

RNA 病毒的方法和组合物,该方法和组合物不需要采用重组牛痘病毒或经修饰组成性表达 T7RNA 聚合酶的特殊细胞系。令人惊讶的是,本发明满足了这些需求并具有其它目的和优点,如下所述。

[0032] 发明概述

[0033] 本发明采用不依赖于辅助病毒(如牛痘病毒)和不需要经工程改造组成性表达 RNA 聚合酶的特殊辅助细胞系的组合物和方法,从克隆的 cDNA 中有效回收大量非节段性负链 RNA 病毒。

[0034] 在本发明的一个方面,产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法包括将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,在宿主细胞中表达 N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白,并由瞬时转染的表达载体瞬时表达 RNA 聚合酶,然后从宿主细胞中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

[0035] 在本发明的另一实施方式中,提供了产生单分子负链 RNA 病毒目的生长或复制缺陷型、非节段性负链 RNA 病毒的方法。对这些实施方式而言,需要产生生长或复制缺陷型或不能随后拯救的缺陷型病毒,例如体外或体内生长或复制能力受限的病毒。在本发明的这些实施方式中,将编码生长或复制缺陷型非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的 cDNA 表达构建物引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,在宿主细胞中表达 N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白,并由瞬时转染的表达载体瞬时表达 RNA 聚合酶。然后从宿主细胞中回收生长或复制缺陷型、非节段性负链 RNA 病毒,用于免疫原性组合物或其它目的。生长和复制缺陷型病毒和亚病毒颗粒将用作“载体”,如本文下面所详述。

[0036] 在本发明的其它实施方式中,产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法包括将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,宿主细胞瞬时表达:

[0037] (1)RNA 聚合酶,

[0038] (2)N 蛋白,

[0039] (3)P 蛋白,和

[0040] (4)L 蛋白,

[0041] 其中 RNA 聚合酶和 N、P 和 L 蛋白各自由瞬时转染的表达载体表达;然后从宿主细胞中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

[0042] 在另一实施方式中,产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,包括将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码和指导 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体引入合适的宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由病毒 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物,然后从宿主细胞中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

[0043] 在本发明的更详细方面,产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA

病毒的方法,包括将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码和指导 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体引入合适的宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由病毒 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物。在将一种或多种病毒 cDNA 表达载体和编码 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体引入宿主细胞后,对宿主细胞在足以提高重组病毒的回收的条件下进行有效热激。

[0044] 在本发明的其它方面,产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法,包括将含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码和指导 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体,在足以共表达这些载体并产生重组病毒的条件引入合适的宿主细胞,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由病毒 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物。然后将该宿主细胞转移,与噬斑扩增细胞,一般为单层扩展细胞共培养,从共培养物中回收组装的感染性、非节段性负链 RNA 病毒。

[0045] 本发明中也提供用于产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的组合物。该组合物包含含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以在合适的宿主细胞中指导由 cDNA 合成病毒 RNA 转录物;和在宿主细胞中编码和指导:

[0046] (1)RNA 聚合酶,

[0047] (2)N 蛋白,

[0048] (3)P 蛋白,和

[0049] (4)L 蛋白

[0050] 瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体,

[0051] 以及在所述宿主细胞中编码和指导 RNA 聚合酶瞬时表达的瞬时表达载体。

[0052] 在另一实施方式中,如上所述提供的组合物中,非节段性负链 RNA 病毒是生长或复制缺陷型病毒。可以各种制备性或活性制剂和混合物方式提供本发明的这些和相关组合物。例如,可提供的上述组合物中,将病毒 cDNA 表达载体和编码 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体组合成共转染混合物。或者,可将上述诸组分在共转染的宿主细胞中或转染的宿主细胞和噬斑扩增细胞的共培养物中组合。

[0053] 本发明的其它实施方式涉及根据上述方法产生的重组非节段性负链 RNA 病毒,以及含有这些病毒的免疫原性组合物,在哺乳动物对象中引发免疫应答的方法包括将所述病毒和免疫原性组合物给予该对象。

[0054] 附图简要说明

[0055] 图 1 描述了用质粒供给 T7 而不是 MVA-T7 来拯救 RSV。

[0056] 图 2A-2C 提供了瞬时 T7 聚合酶表达载体,质粒 pCI-Neo-Bcl-T7 的示例性序列 (SEQ ID NO:1)。ATG 是 T7 pol 起始密码子。T7 pol 的第二个密码子是从 AAC 变化为 gAC,以优化翻译起始序列 (Kozak 序列)。还加入序列 GCCACC,以优化翻译起始序列。在加入 T7RNA 聚合酶编码序列之前,将该序列的小写部分 get agcctcgagtgtatcagaatt c 插入 pCI-Neo 载体中取代 T7 启动子。该序列包括 NheI、XhoI、BclI 和 EcoRI 限制性位点。

[0057] 图 3A 和 3B (图 A-C) 说明可将异源负链 RNA 病毒中鉴定的各种突变掺入本发明的

重组非节段性负链 RNA 病毒中（在本文中掺入 HP1V1 构建物中），以产生减毒或其它所需的表型改变。

[0058] 发明详述

[0059] 本发明采用不依赖于辅助病毒（如牛痘病毒）和不需要经工程改造组成性表达 RNA 聚合酶的特殊辅助细胞系的组合物和方法，从克隆的 cDNA 中有效回收大量非节段性负链 RNA 病毒。

[0060] 在本发明的一个方面，提供了有效拯救非节段性负链 RNA 病毒的方法和组合物，即将瞬时表达载体掺入能够支持拯救所述病毒的宿主细胞中以瞬时表达 RNA 聚合酶。在此种瞬时（表达）聚合酶载体拯救系统中，将编码，如 T7RNA 聚合酶的表达载体与病毒基因组或反义基因组 cDNA 协同引入宿主细胞，在宿主细胞中表达支持病毒拯救所必需的病毒支持蛋白（如 N、P 和 L 蛋白）。图 1 描述说明了本发明的拯救系统，如采用质粒提供 T7 来拯救 RSV。

[0061] 因此，在本发明的病毒回收方法和组合物中，通过在细胞核中转录的瞬时转染质粒使宿主细胞程序化地表达 RNA 聚合酶，从而支持在非牛痘病毒系统中和在适于拯救不同种类和类型的非节段性负链 RNA 病毒的细胞中进行病毒回收。

[0062] 本文所述方法和组合物的应用和多能性（例如，与基于牛痘和基于辅助细胞的回收系统相比）克服了这些预计障碍，如瞬时载体表达系统常伴有的转染效率低和表达时间短。与 T7 辅助细胞系统不同，当所有细胞都组成性表达 T7 聚合酶时，瞬时表达系统中的转染效率通常低至约 10-20%。此外，预计瞬时表达，如 T7 聚合酶的瞬时表达会在约 72 小时的有限时间内衰减和停止。据此，本文公开的多能系统采用瞬时 RNA 聚合酶共转染有效地拯救非节段性负链 RNA 病毒，包括许多不同的生长缓慢和减毒种类和毒株，这是出人意料的。

[0063] 用本发明的瞬时 RNA 聚合酶表达系统拯救负链 RNA 病毒与现有系统相比具有几个优点。具体说，不需要用重组牛痘病毒感染细胞来提供 RNA 聚合酶，从而消除了 CPE 和其他因素对病毒回收效率和保真度以及开发有效免疫原性组合物的不良影响。一个相关的优点是开始拯救后，在转染期间转染细胞保持活力和支持病毒拯救的时间较长。这有助于促进拯救非节段性负链 RNA 病毒中常见的生长缓慢的病毒种和毒株。此外，本拯救系统不需要从所需重组病毒中纯化去除重组牛痘病毒。对开发免疫原性组合物和基因治疗载体而言，也消除了对拯救病毒制备物中重组牛痘病毒污染的担心。最后，本方法和组合物无需开发特殊的辅助细胞系，任何可以被转染的细胞系都可用于回收多种不同的非节段性负链 RNA 病毒。

[0064] 可通过实施本发明的方法和组合物从 cDNA 中成功回收多种不同的重组非节段性负链 RNA 病毒。根据 1993 年国际病毒分类学委员会修订的重新分类，设立了称为单分子负链 RNA 病毒目的非节段性负链 RNA 病毒目。该目包括三个具有负极性（负义）的单链、非节段性 RNA 基因组的有包膜病毒科。这些非节段性负链 RNA 病毒科是副粘病毒科，弹状病毒科和线状病毒科。副粘病毒科进一步分为两个亚科：副粘病毒亚科和肺病毒亚科。副粘病毒亚科包括三个属：呼吸道病毒属（Respirovirus）（以前称为副粘病毒），腮腺炎病毒属（Rubulavirus）和麻疹病毒属（Morbillivirus）。肺病毒亚科包括肺病毒属。表 1 表示单分子负链 RNA 病毒的目前的分类学地位，以及各属的非限制性例子，它们代表了可经本发

明方法和组合物拯救的非节段性负链 RNA 病毒的种和属。

- [0065] 表 1
- [0066] 单分子负链 RNA 病毒目的非节段性负义、单链 RNA 病毒分类
- [0067] 副粘病毒科
- [0068] 副粘病毒亚科
- [0069] 呼吸道病毒属
- [0070] 仙台病毒 (1 型小鼠副流感病毒)
- [0071] 1 和 3 型人副流感病毒 (PIV)
- [0072] 3 型牛副流感病毒 (BPV)
- [0073] 腮腺炎病毒属
- [0074] 猴病毒 5 (SV) (2 型犬副流感病毒)
- [0075] 腮腺炎病毒
- [0076] 新城疫病毒 (NDV) (禽副粘病毒 1)
- [0077] 2、4a 和 4b 型人副流感病毒
- [0078] 麻疹病毒属
- [0079] 麻疹病毒 (MV)
- [0080] 海豚麻疹病毒
- [0081] 犬瘟热病毒 (CDV)
- [0082] 小反刍兽疫病毒
- [0083] 海豹疫热病毒
- [0084] 牛瘟病毒
- [0085] 未分类
- [0086] 亨得拉病毒
- [0087] 立百病毒
- [0088] 肺病毒亚科
- [0089] 肺病毒属
- [0090] 人呼吸道合胞病毒 (RSV)
- [0091] 牛呼吸道合胞病毒
- [0092] 小鼠肺炎病毒
- [0093] 肺炎后病毒 (metapneumovirus) 属
- [0094] 人肺炎后病毒 (human metapneumovirus)
- [0095] 禽肺炎病毒 (以前称为土耳其鼻气管炎病毒)
- [0096] 弹状病毒科
- [0097] 狂犬病病毒属
- [0098] 狂犬病病毒
- [0099] 水泡病毒属
- [0100] 水泡性口炎病毒
- [0101] 短时热病毒属
- [0102] 牛短时热病毒

[0103] 线状病毒科

[0104] 丝状病毒属

[0105] 马伯格病毒

[0106] 单分子负链 RNA 病毒成员的现行分类方案是根据形态学标准、病毒基因组构成、生物学活性以及病毒基因和基因产物的序列相关性分类。副粘病毒亚科的有包膜病毒的形态学区别特征是核衣壳的大小和形状。相关的生物学特征是：1) 属成员之间的抗原交叉反应性，和 2) 呼吸道病毒属、腮腺炎病毒属有神经氨酸酶活性，麻疹病毒属没有该活性。此外，要考虑 P 基因编码可能不同，因为腮腺炎病毒属有一个额外的基因 (SH)。

[0107] 可通过形态学特征将肺炎病毒与副粘病毒亚科区别开来，因为肺炎病毒含有狭窄的核衣壳。此外，肺炎病毒与副粘病毒亚科不同的主要区别在于编码蛋白的顺反子数量不同（肺炎病毒有 10 个而副粘病毒亚科有 6 个）和有一种连接蛋白 (G)。虽然副粘病毒和肺炎病毒的六个蛋白似乎在功能上相对应 (N、P、M、G/H/HN、F 和 L)，但只有后两个蛋白在两个亚科之间显示出显著的序列相关性。几种肺炎病毒蛋白，即非结构蛋白 NS1 和 NS2，小疏水蛋白 SH 和第二蛋白 M2 在大多数副粘病毒中缺少相似物。一些副粘病毒蛋白，即 C 和 V，在肺炎病毒中缺少相似物。然而，肺炎病毒和副粘病毒的基本基因组构成是相同的，弹状病毒和丝状病毒也是如此。

[0108] 本发明回收非节段性负链 RNA 病毒的总的方法总结如下。将从所需病毒基因组克隆的 DNA 等价物（正链，信使正义）置于合适的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶启动子（如 T7、T3 或 SP6RNA 聚合酶启动子）和插入合适的转录载体（如可增殖的细菌质粒）中的自身切割核酶序列（如丁型肝炎核酶）之间。该转录载体提供容易操纵的 DNA 模板，RNA 聚合酶（例如，T7RNA 聚合酶）可从该模板忠实地转录出具有准确或几乎准确的 5' 和 3' 端的病毒反义基因组（或基因组）的单链 RNA 拷贝。基因组的病毒 DNA 拷贝的方向以及侧翼启动子和核酶序列决定反义基因组或基因组 RNA 等价物是否被转录。

[0109] 根据本发明拯救新病毒后代还需要病毒特异性反式作用支持蛋白把裸露的单链病毒反义基因组或基因组 RNA 转录物衣壳化成为功能性核衣壳模板。这些蛋白通常包括病毒核衣壳 (N) 蛋白、聚合酶相关磷蛋白 (P) 和聚合酶 (L) 蛋白。不同病毒科或属中，这些蛋白的命名可能略有不同。例如，在弹状病毒科中，磷蛋白可称为“P”或“NS”。在呼吸道病毒和腮腺炎病毒属中，核衣壳蛋白称为“NP”。本文所用术语“N 蛋白”和“N 基因”适合指 N 或 NP 核衣壳蛋白和基因，术语“P 蛋白”和“P 基因”适合指 P 或 NS 磷蛋白和基因。选作拯救的某些病毒可能需要其它蛋白。一般说，虽然不排除他，但拯救非节段性负链 RNA 病毒还需要在携带有病毒 cDNA 的宿主细胞中表达 RNA 聚合酶，以驱动含 cDNA 的转录载体和编码支持蛋白的载体的转录。

[0110] 在本发明中，从 cDNA 中回收非节段性负链 RNA 病毒的新拯救方法，包括将编码目标病毒的基因组或反义基因组的病毒 cDNA 表达载体引入宿主细胞，并共同引入编码和指导 RNA 聚合酶瞬时表达的瞬时聚合酶表达载体。本文所用的 RNA 聚合酶包括但不限于：T7、T3 或 SP6 噬菌体聚合酶。宿主细胞也在共同引入病毒 cDNA 和瞬时聚合酶表达载体之前、期间或之后在宿主细胞中表达 N、P 和 L 支持蛋白，这是产生复制性、感染性病毒或亚病毒颗粒所必需的。

[0111] 一般来说，用编码或指导支持蛋白表达的一种或多种附加表达载体将病毒 cDNA

和瞬时聚合酶表达载体共同转染入宿主细胞。支持蛋白可能是待拯救病毒的野生型或突变蛋白,或可选自异源非节段性负链 RNA 病毒相应的支持蛋白。在另一实施方式中,可以在宿主细胞中共表达其它病毒蛋白,如聚合酶延伸因子(如 RSV 的 M2-1)或能提高回收或在所述方法和组合物内提供其它所需结果的其它病毒蛋白。在其他实施方式中,可通过在宿主细胞中组成性表达支持蛋白或通过用编码支持蛋白的辅助病毒共感染宿主细胞,在宿主细胞中表达一种或多种支持蛋白。

[0112] 在本发明的更详细方面,病毒 cDNA 表达载体含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导由 cDNA 表达载体合成病毒 RNA 转录物。将该病毒 cDNA 载体引入瞬时表达 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白的宿主细胞。可从一种或多种瞬时转染的表达载体,表达各 RNA 聚合酶和 N、P 和 L 蛋白。经常由各个表达载体,通常是瞬时表达质粒表达各 RNA 聚合酶和 N、P 和 L 蛋白。经过足够时间后并在合适的条件下,从宿主细胞中回收组装的感染性非节段性负链 RNA 病毒。

[0113] 为从 cDNA 表达的基因组或反义基因组产生感染性非节段性负链 RNA 病毒,将该基因组或反义基因组与产生能够进行 RNA 复制的核衣壳,并赋予后代能够进行 RNA 复制和转录的核衣壳所必需的那些病毒蛋白共表达。基因组核衣壳的转录提供了其它病毒蛋白并启动了产毒性感染。或者,共表达可提供产毒性感染所需的其它病毒蛋白。

[0114] 在本发明的某些实施方式中,用一种或多种辅助病毒提供编码产生转录、复制病毒核衣壳所必需的蛋白的互补序列。这些辅助病毒可以是野生型或突变体。在某些实施方式中,可从表型上将辅助病毒与重组病毒 cDNA 编码的病毒区分。例如,可能需要提供与辅助病毒而非重组病毒 cDNA 编码的病毒发生免疫应答的单克隆抗体。这种抗体可以是中和抗体。在一些实施方式中,该抗体可用于亲和层析,来分离重组病毒与辅助病毒。为帮助获得这种抗体,可在病毒 cDNA 中引入突变,以提供辅助病毒的,如糖蛋白基因的抗原多样性。

[0115] 可利用,例如以集合的完整基因组或反义基因组提供的组装克隆的 cDNA 节段,通过病毒 mRNA 或基因组 RNA 逆转录拷贝的聚合酶链反应等(PCR;见美国专利号 4,683,195 和 4,683,202 中描述,PCR 方法:方法和应用指南(PCR protocols:A Guide to Methods and Applications,Innis 等编,Academic Press,San Diego,1990)构建用于本发明的重组病毒基因组或反义基因组。例如,可产生包含含有反义基因组的左手端、跨越合适的启动子(如 T7、T3 或 SP6RNA 聚合酶启动子)和在合适的表达载体(如质粒、粘粒、噬菌体或 DNA 病毒载体)中组装的 cDNA 的第一构建物。可用诱变和/或插入合成的含有经设计有助于组装的独特限制性位点的多聚接头修饰该载体。如需要反义基因组质粒的右手端可含有其它序列,如侧翼核酶和一个或串联 T7 转录终止子。该核酶可以是锤头型,它会产生含有一个非病毒核苷酸的 3' 端,或者可以是任何其它合适的核酶,如丁型肝炎病毒的核酶(Perrotta 等,Nature 350:434-436,1991),它会产生没有非病毒核苷酸的 3' 端。

[0116] 构建编码病毒基因组或反义基因组的 cDNA 的替代方法包括用改进的 PCR 条件进行逆转录 PCR(例如,Cheng 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699,1994 中所述,引入本文作为参考),将亚基 cDNA 组件的数目降低到少至一或两个。在其它实施方式中,可使用不同启动子(如 T3 或 SPQ)。对于增殖可用不同 DNA 载体(如粘粒)来更好地容纳大尺寸的基因组或反义基因组。

[0117] 非节段性负链 RNA 病毒的“感染性克隆”或“感染性 cDNA”指合成的 cDNA 或其产物,以及能够直接掺入可转录成基因组或反义基因组病毒 RNA 的感染性病毒粒子的 RNA,其中基因组或反义基因组病毒 RNA 能够用作产生感染性病毒或亚病毒颗粒基因组的模板。如上述,可通过各种常规技术(如定位诱变)将确定的突变引入感染性病毒克隆的基因组或反义基因组的 cDNA 拷贝。如本文所述用基因组或反义基因组 cDNA 亚片段组装完整的基因组或反义基因组 cDNA 具有以下优点:可分别操作各区域,其中小的 cDNA 构建物比大 cDNA 构建物更易于操作,然后容易地组装成完整的 cDNA。

[0118] 构建或修饰本发明的某些重组病毒,以限制该重组病毒的生长能力、复制活性或感染性。这些生长或复制缺陷型病毒和亚病毒颗粒用作载体和免疫原,它们不具给予宿主完全感染性(即具有接近野生型病毒的生长和/或复制活性水平)病毒时的某些风险。复制缺陷型指其在宿主细胞或哺乳动物对象中生长或复制的能力有限,或在细胞中或细胞间传染和/或增殖的能力有缺陷的病毒或亚病毒颗粒。复制缺陷型病毒的复制能力常常仅限于在宿主细胞或对象中复制一轮或两轮。常常将生长和复制缺陷型病毒和亚病毒颗粒用作“载体”,见本文以下的详述。

[0119] 因此,为产生生长和/或复制缺陷型、非节段性负链 RNA 病毒提供各种方法和组合物。在更详细的实施方式中,与相应野生型或亲代病毒的生长、复制和/或感染性相比,生长或复制缺陷型病毒的生长、复制和/或感染性特征受到很大损伤。本文中,与野生型或亲代病毒的生长、复制和/或感染水平相比,其生长、复制和/或感染性在体外和/或体内受到的损伤至少约 10-20%、20-50%、50-75%和高达 95%或更高。

[0120] 一般用下面详述的热激(蛋白)/T7-质粒联合拯救系统拯救具有不同程度的生长或复制缺陷的病毒。示例性毒株包括:掺入了以下所述修饰的 VSV 高减毒株(如 C-末端 G 蛋白截短或易位基因)(参见,例如,Johnson 等, *J. Virol.* 71:5060-5078, 1997, Schnell 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11359-11365, 1996; Schnell 等, *Cell* 90:849-857, 1997; Roberts 等, *J. Virol.* 72:4704-4711, 1998; 和 Rose 等, *Cell* 106:539-549, 2001, 各自引入本文作为参考)。一些目标病毒包含仅部分受损的缺陷,例如其中某些病毒在没有遗传补充时仍可增殖。可通过在编码、非编码和调节序列中引入氨基酸取代、核苷酸取代、部分或完全的基因缺失或敲除等实现本文所述的这种缺陷,例如在 RSV、PIV 和 VSV 中描述的特殊 ts 或 ca 表型。

[0121] 当重组非节段性负链 RNA 病毒在细胞系中增殖时,该病毒常常具有不导致严重生长损伤但在天然宿主中复制大受限制的部分或全部基因缺失或基因“敲除”。本文中的示例性突变体包括 SH、NS1 和 NS2 基因或蛋白的一种或多种部分或全部缺失或敲除的 RSV。在其它实施方式中,通过引入损伤基因功能但不阻断复制的突变或其它改变来构建生长或复制缺陷型病毒。例如,上述参考文献描述了有用的具有 C 末端缺失而影响 G 蛋白胞质尾的 VSV 候选病毒。例如,通过将异源抗原决定簇掺入重组载体基因组或反义基因组中将这些和同样的生长或复制缺陷型病毒用作“载体”。在具体实施例中,将 MV 或 HIV 糖蛋白、糖蛋白结构域或一种或多种抗原决定簇掺入 VSV 载体或“骨架”中。

[0122] 其它生长或复制缺陷型病毒具有的碱基取代或小缺失对其在细胞系中生长不需要但能影响其对哺乳动物宿主的致病性的蛋白表达有抑制作用。此方面的示例性构建物包括 C、D 和/或 V ORF 中一种或多种全部或部分切除或缺失的 HPIV(参见,例如, Durbin

等, *Virology* 261 :319-30, 1999, 引入本文作为参考), 和 V 蛋白全部或部分缺失或敲除 (Schneider 等, *Virology* 227 :314-22, 1997, 引入本文作为参考) 或突变 (参见, 例如, Parks 于 2003 年 12 月 16 日提交的美国专利号 6, 664, 066, 引入本文作为参考) 的 MV。

[0123] 其它生长或复制缺陷型病毒具有能切除 (敲除) 或降低基因表达的部分或全部基因缺失或其它类型的修饰, 其中所述缺陷是部分损伤, 但不完全阻断在细胞系中的复制。本文中有用候选物的例子包括缺失或敲除了基质蛋白的 MV, Cathomen 等, *EMBOJ.* 17 : 3899-908, 1998 (引入本文作为参考), 和缺失和或敲除 NS1、NS2、M2-2 和 / 或 SH 中一种或多种的 RSV (Jin 等, *Virology* 273 :210-8, 2000, 引入本文作为参考)。

[0124] 在其它实施方式中, 重排了生长或复制缺陷型病毒或位置“改组”了导致生长受损但不阻止复制的基因。本文引用的参考文献中描述了各种所述位置改变的 RSV 突变体。本文中描述了 VSV 的这类其它示例性重组物 (参见, 例如, Wertz 等于 2003 年 7 月 22 日发表的美国专利号 6, 596, 529 ;Ball 等于 2000 年 10 月 24 日发表的美国专利号 6, 136, 585 ;和 Wertz 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :3501-6, 1998, 各自引入本文作为参考)。

[0125] 在其它实施方式中, 生长或复制缺陷型病毒具有损害其生长的部分或全部基因取代。在这个方面, 可以用感染另一物种的相关病毒的基因取代一种或多种病毒基因, 如表达 HPIV 或 RSV 抗原决定簇的各种宿主范围受限的人-牛 PIV (HBPIV) (Skiadopoulos 等, *J. Virol.* 77 :1141-8, 2003 ;Bailly 等, *J. Virol.* 74 :3188-95, 2000, Schmidt 等, *J. Virol.* 75 :4594-603, 2001, 各自引入本文作为参考) 和用另一 RSV 或 VSV 的 F 和 / 或 G 基因取代其 F 和 / 或 G 基因的 RSV (参见, 例如 Oomens 等, *J. Virol.* 77 :3785-98, 2003, 引入本文作为参考)。

[0126] 在本发明的其它详述实施方式中, 构建生长或复制缺陷型病毒使其具有必须用补充细胞系、辅助病毒、转染或提供所缺失功能的一些其它方式来补充的缺陷。示例性构建物包括其 G 蛋白表达降低或消除的 VSV。通过转染或利用一些类型的辅助病毒系统 (‘假型’) 来提供缺失的 G 蛋白表达 (参见, 例如, Lefkowitz 等, *Virology* 178 :373-83, 1990, 引入本文作为参考)。或者, 用补充细胞系 (参见, 例如, Schnell 等, *Cell* 90 :849-57, 1997, 引入本文作为参考) 或用 G 蛋白融合物 (例如, 其中 VSV G 蛋白包括融合于异源序列 (如麻疹病毒的 F 或 H 基因) 的 VSV 跨膜序列和胞质结构域) (参见, 例如, Schnell 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 :11359-11365, 1996 ;Schnell 等, *Cell* 90 :849-857, 1997 ;Roberts 等, *J. Virol.* 72 :4704-4711, 1998 ;和 Rose 等, *Cell* 106 :539-549, 2001, 各自引入本文作为参考) 来提供缺失的 G 功能。在本文描述的一个示例性实施方式中, 通过第二步将病毒转染细胞与转染了编码功能性 G 蛋白的质粒的细胞共培养, 回收 G 功能受损的重组 VSV。在其它示例性候选物中, 用一种杂交 G 蛋白代替 VSV G 蛋白, 该杂交 G 蛋白构成了将病毒靶向特定细胞, 如 CD4⁺ 细胞的受体 (Johnson 等, *J. Virol.* 71 :5060-5078, 1997, 引入本文作为参考)。

[0127] 通过前导区或尾随区的修饰构建部分生长或复制缺陷型的其它病毒, 例如用见于前导区序列中的弱启动子的一个拷贝取代尾随区 (Finke 等, *J. Virol.* 73 :3818-25, 1999, 引入本文作为参考)。

[0128] 为易于制备, 可将 N、P、L 和其它所需病毒蛋白组装到一种或多种单独载体中。很多合适的表达载体是本领域已知的, 可用于掺入和指导编码 RNA 聚合酶和支持蛋白的多核苷酸表达, 包括例如质粒、粘粒或噬菌体载体、缺陷型病毒载体、所谓“复制子” (例如辛德

毕斯或委内瑞拉马脑炎病毒复制子)和其它用于指导瞬时和/或组成性表达的载体。与聚合酶和/或支持载体操作性整合的瞬时表达控制元件指导 RNA 聚合酶和(当可应用时)N、P 和 L 蛋白的瞬时表达。在一个示例性实施方式中, RNA 聚合酶的瞬时表达控制元件是 RNA 聚合酶 II 调节区, 如人巨细胞病毒 [hCMV] 的立即早期启动子和增强子(参见, 例如, 美国专利 5, 168, 062, 引入本文作为参考)。

[0129] 可通过本领域已知的任何各种方法, 包括转染、电穿孔、机械插入、转导等, 将编码病毒 cDNA、瞬时表达的 RNA 聚合酶以及 N、P 和 L 蛋白的载体引入合适的宿主细胞。在某些示例性实施方式中, 通过磷酸钙介导的转染 (Wigler 等, Cell 14:725, 1978; Corsaro 等, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham 等, Virology 52:456, 1973)、电穿孔 (Neumann 等, EMBO J. 1:841-845, 1982), DEAE-右旋糖苷介导的转染 (Ausubel 等编, 《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987) 或阳离子脂质介导的转染 (Hawley-Nelson 等, Focus 15:73-79, 1993) 将所述载体引入培养的细胞中。在另一实施方式中, 加入转染促进剂以提高细胞对 DNA 的摄入。很多这些试剂是本领域已知的。LIPOFECTACE® (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 和 EFFECTENE® (Qiagen, Valencia, CA) 是常见的例子。LIPOFECTACE® 和 EFFECTING® 二者也是。这些试剂是包裹 DNA 并增强细胞的摄入 DNA 的阳离子脂质。LIPOFECTACE® 可形成包围 DNA 的脂质体而 EFFECTINE® 可包被 DNA 但不形成脂质体。另一种促进 DNA 摄入的商业试剂是 LIPOFECTAMINE-2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA)。

[0130] 用于本发明的合适的宿主细胞能够支持所述非节段性负链 RNA 病毒的产毒性感染, 并允许支持病毒产生所必需的载体及其编码产物的表达。这种宿主细胞可选自原核细胞或真核细胞。合适的细胞包括昆虫细胞如 Sf9 和 Sf21, 具有合适启动子的细菌细胞如大肠杆菌, 和酵母细胞如酿酒酵母。宿主细胞一般选自脊椎动物, 如灵长类动物的细胞。由于本发明所用的很多 RNA 病毒是人类病原体, 所以在通常情况下常用灵长类动物细胞。例如, 麻疹病毒 (MV) 主要限于感染灵长类动物细胞。也有例外, 如犬瘟热病毒和感染非人哺乳动物的其它麻疹病毒。对增殖病毒而言, 一些真核细胞系比其它细胞系运作得更好, 对某些病毒一些细胞系根本不运作。一般采用产生可检测细胞病变效应的细胞系, 以便可以容易地检测到拯救的活病毒。宿主细胞常常衍生自人细胞, 如人胚肾 (HEK) 细胞。Vero 细胞 (非洲绿猴肾细胞), 以及很多其它类型的细胞也可用作宿主细胞。就麻疹和可能还有其它病毒而言, 将其转染的细胞在 Vero 细胞上培养, 因为这类病毒在 Vero 细胞上快速扩散而产生容易检测的噬斑。下面是其它合适的宿主细胞的例子: (1) 人双倍体原代细胞系: 如 WI-38 和 MRC-5 细胞; (2) 猴双倍体细胞系: 如 Cos、胎恒河猴肺 (FRhL) 细胞; (3) 准原代连续细胞系: 如 AGMK-非洲绿猴肾细胞; (4) 人 293 细胞 (合格的) 和 (5) 啮齿类 (如 CHO、BHK)、犬如, Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 和原代鸡胚成纤维细胞。本发明方法和组合物所用的示例性具体细胞系包括: HEp-2、HeLa、HEK (如 HEK293)、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5 和 Vero 细胞。

[0131] 在本文提供的方法和组合物中, 将 RNA 聚合酶载体、病毒 cDNA 克隆和支持载体 (如编码 N、P 和 L 的质粒) 同时协同引入宿主细胞。例如, 可将所有所述 DNA 组合到一个 DNA 转染 (如磷酸钙转染) 混合物中, 同时加入宿主细胞培养物中实现协同转染。在另一实

施方式中,可对所述聚合酶和支持载体及病毒 cDNA 载体的任何两种或多种分别进行转染。一般说,在有效的共转染步骤中以接近的时间顺序分别进行转染而协同引入聚合酶和支持载体及病毒 cDNA 载体。在一个这种协同转染方法中,将病毒 cDNA 和 / 或 N、P 和 L 支持质粒引入宿主细胞,然后转染 RNA 聚合酶质粒。在其它实施方式中,在将 RNA 聚合酶质粒转染到宿主细胞中的同时或之后,但在 RNA 聚合酶在宿主细胞中开始实质性表达之前(例如,在 T7 聚合酶累积到可检测水平之前,或在 T7 水平累积到足以激活 T7 启动子驱动的质粒表达之前)将病毒 cDNA 和 / 或 N、P、L 支持质粒引入宿主细胞。

[0132] 在本发明的其它详细方面,产生感染性、非节段性负链 RNA 病毒的方法包括额外热激处理宿主细胞,以提高重组病毒的回收率。将一种或多种病毒 cDNA 表达载体和编码 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白的一种或多种瞬时表达载体引入宿主细胞后,使该宿主细胞接触有效热激刺激而提高重组病毒的回收率。

[0133] 在这样的一种方法中,使宿主细胞暴露于有效热激温度,暴露时间足以实现对细胞的热激,进而促使病毒回收增加。有效的热激温度高于本领域所认为进行病毒拯救可接受的、推荐的或优化的温度。在许多情况下,有效热激温度高于 37℃。当在有效热激温度下实施本发明改良的拯救方法时,导致所需重组病毒的回收率比不提高温度进行拯救时重组病毒的回收率水平提高。有效热激温度和暴露时间因所用拯救系统而不同。这种温度和时间不同可能是由于所选病毒或宿主细胞类型的不同而异。

[0134] 虽然温度可能不同,但可用具体重组病毒进行几次试验性拯救程序,并测定所需重组病毒的回收百分数随温度和暴露时间不同而变化,而容易地确定有效热激温度。确定的是,进行拯救的任何温度范围的上限是转染组分受到破坏,或转染组分的功能在转染中缺失或消失的温度。用于本发明这个方面的示例性有效热激温度范围是:约 37℃ 至约 50℃,约 38℃ 至约 50℃,约 39℃ 至约 49℃,约 39℃ 至约 48℃,约 40℃ 至约 47℃,约 41℃ 至约 47℃,约 41℃ 至约 46℃。所选的有效热激温度范围常用约 42℃ 至约 46℃。在更具体的实施方式中,采用约 43℃、44℃、45℃ 或 46℃ 的有效热激温度。

[0135] 在进行确定所选有效热激温度或温度范围的测试中,也可选择进行热激程序的有效时间。施加有效热激温度的足够时间是所需重组病毒的回收率比在上述不提高温度进行拯救时重组病毒回收水平有可检测增加的时间。有效热激时间可因拯救系统,包括所选病毒和宿主细胞而不同。虽然时间不同,但用具体重组病毒进行几次试验性拯救程序,并测定所需重组病毒的回收率或百分数随温度和时间不同而变化,而容易地确定施加有效热激温度的时间量。进行拯救所用的任何时间变化范围的上限是转染组分受到破坏,或转染组分的功能在转染中损失或消失的时间量。热激程序的时间可不同,从几分钟至几小时,只要获得所需重组病毒回收率增加。用于本发明这个方面的示例性有效热激时间用分钟表示是:约 5 至约 300 分钟,约 5 至约 200 分钟,约 15 至约 300,约 15 至约 240,约 20 至约 200,约 20 至约 150。有效热激时间常用约 30 分钟至约 150 分钟。

[0136] 可用许多方法确定通过使宿主细胞暴露于有效热激而提高的重组非节段性负链 RNA 病毒回收水平。例如,氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 报道基因可用于监测已知方法对重组病毒的拯救。该报道基因的相应活性确定了基线水平和重组病毒表达水平的提高。其它方法包括检测所获重组病毒噬斑数量和通过测序确认拯救病毒的产生。一种测定回收率提高的示例性方法包括制备许多相同的转染细胞培养物,使它们暴露于不同的热激条件(不同

时间和温度)下,然后将这些培养物的回收率值与对照细胞(如转染并维持在恒温 37℃下的细胞)的相应值作比较。转染后 72 小时,将转染的细胞转移到含约 75%铺满的单层 Vero 细胞(或选用于测定重组病毒噬斑形成的细胞类型)的 10 厘米板中,继续培养直到噬斑可见。然后,计数噬斑并与对照细胞获得的值相比。优化热激条件应该使噬斑的数量最大。

[0137] 根据本发明的这些实施方式,病毒回收率的提高至少约为 10%或 25%,常常至少约 40%。在某些实施方式中,由于暴露于有效热激的重组病毒回收的增加比不用热激法所见的或回收的重组病毒量增加了 2 倍、5 倍、高达 10 倍和更高。

[0138] 在本发明的另一实施方式中,对其中导入了病毒 cDNA 和瞬时 RNA 聚合酶载体(和任选的编码必需的支持蛋白的一种或多种载体)的宿主细胞进行“噬斑扩增”步骤。一般在足以允许病毒 cDNA 表达载体和编码和指导 RNA 聚合酶、N 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白的瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体进行表达的一段时间后(如转染后),进行该步骤。为实现噬斑扩增,将支持病毒进一步扩增能力常常受损的宿主细胞与相同或不同类型细胞的噬斑扩增细胞共培养。此共培养步骤可使受拯救的病毒扩散到噬斑扩增细胞中,这更适于该病毒的大量扩增。一般将宿主细胞培养物转移到一层或多层噬斑扩增细胞上。例如,可使宿主细胞培养物扩散到单层噬斑扩增细胞上,然后,重组非节段性负链 RNA 病毒将感染该噬斑扩增细胞并在其中进一步扩增。在另一实施方式中,宿主细胞与噬斑扩增细胞的细胞类型相同或不同。

[0139] 本发明改进的噬斑扩增方法和组合物提供了产生重组的单分子负链 RNA 病毒的改进的拯救方法。该方法一般包括,将含有编码单分子负链 RNA 病毒目的非节段性负义单链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的分离的核酸分子的转录载体,和编码和指导 RNA 聚合酶瞬时表达的瞬时转录载体,与至少一种包含编码衣壳化、转录和复制所必须的反式作用蛋白的至少一种分离的核酸分子的表达载体一起,在足以使所述载体共表达和产生重组病毒的条件引入宿主细胞。然后将该宿主细胞转移到至少一层噬斑扩增细胞上。

[0140] 为了实现噬斑扩增,一般将受转染细胞转移到噬斑扩增细胞的共培养容器中。本领域已知的各种培养板或容器都可用于噬斑扩增步骤。在某些实施方式中,将转染细胞转移到至少约 50%铺满的单层噬斑扩增细胞上。或者,噬斑扩增细胞至少约 60%铺满,或甚至至少约 75%铺满。在某些实施方式中,噬斑扩增细胞的表面积大于用于准备用于转染病毒的表面积。如需要可将表面积比例提高到 2 : 1 至 100 : 1。常常需要至少提高到 10 : 1 的表面积比例。

[0141] 根据天然或重组病毒在何种细胞中成功生长来选择噬斑扩增细胞。用于进行转染的宿主细胞常常不是所需重组病毒生长的最优宿主。因此,可通过选择天然病毒或重组病毒在其中显示出生长增加的噬斑扩增细胞来提高从受转染细胞中的重组病毒回收。可根据上述选择用于本发明这个方面的各种噬斑扩增细胞。可用于支持本发明重组非节段性负链 RNA 病毒的回收和扩增的示例性具体噬斑扩增细胞选自:HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRhL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5 和 Vero 细胞。PCT 公布的 W099/63064 中提供了用于本发明的有关热激和噬斑扩增方法的其它详情,引入本文作为参考。

[0142] 本发明也提供了用于产生单分子负链 RNA 病毒目的感染性、非节段性负链 RNA 病毒的组合物。该组合物包括含有编码非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组的多核苷酸的病毒 cDNA 表达载体和编码和指导 RNA 聚合酶、N、P 和 L 蛋白在宿主细胞中瞬时表达

的一种或多种瞬时表达载体,该基因组或反义基因组操作性连接有表达控制序列以指导从 cDNA 合成病毒 RNA 转录物。在本发明的这个方面,该组合物在无细胞共转染混合物中可包含病毒 cDNA 表达载体和编码和指导 RNA 聚合酶、N、P 和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体。或者,宿主细胞中可提供病毒 cDNA 表达载体和编码和指导所述 RNA 聚合酶、N、P 和 L 蛋白瞬时表达的一种或多种瞬时表达载体(例如,向该宿主细胞中转染了所述载体后)。在某些实施方式中, RNA 聚合酶选自 T7、T3 或 SP6 RNA 聚合酶。在其它实施方式中,编码 RNA 聚合酶的瞬时表达载体是质粒。在又一实施方式中,上述组合物还包括与宿主细胞的细胞类型相同或不同的噬斑扩增细胞,使被拯救的病毒得以从该宿主细胞扩散到噬斑扩增细胞而有助于重组病毒扩增。

[0143] 在下述本发明的一个示例性实施方式中,将 T7 RNA 聚合酶瞬时表达载体(pSC6-T7,由苏黎世大学的 Martin Billeter 博士提供)与麻疹病毒(MV+)全长 cDNA 克隆,以及操作性连接有表达控制序列(如 T7 RNA 聚合酶启动子)的编码 MV N、P 和 L 蛋白的质粒共转染到 Vero 细胞中,成功回收 MV。

[0144] 在其他示例性实施方式中,用本发明方法和组合物成功回收呼吸道合胞病毒(RSV)的 40 种不同重组构建物,包括 A 型和 B 型 RSV、嵌合性 A/B RSV 和掺入一个或多个减毒突变和/或下述的其它重组修饰(如基因缺失)的重组 RSV。提供了说明成功回收的其它例子,如 3 型人副流感病毒(HPIV3)、嵌合性型人副流感病毒 3-1(其中用 1 型人副流感病毒的糖蛋白基因 F 和 HN 代替了 PIV-3 的糖蛋白基因 F 和 HN)、嵌合性型人副流感病毒 3-2CT(其中用 2 型人副流感病毒的糖蛋白基因 F 和 HN 替代了 PIV-3 的糖蛋白基因 F 和 HN 的胞质尾部分)、3 型牛 PIV(BPIV3)、嵌合性型人-牛 PIV-3(其中用人 PIV-3 的糖蛋白基因 F 和 HN 代替了 3 型牛副流感病毒的糖蛋白基因 F 和 HN)和水泡性口炎病毒(VSV)。

[0145] 在本发明的其它详述实施方式中,基于 pCl-Neo 骨架(Promega, Madison WI)构建 T7 RNA 聚合酶瞬时表达质粒。在插入 T7 RNA 聚合酶基因之前,通过去除位于多个克隆位点 5' 侧的 T7 启动子修饰该载体,产生 pCl-Neo-Bcl。去除 T7 启动子以增加 T7 RNA 聚合酶基因插入物在细菌增殖期间的稳定性。T7 RNA 聚合酶的过表达对细菌可能有毒性,如果将 T7 RNA 聚合酶基因克隆到 T7 RNA 聚合酶启动子的下游,这可能会是一个问题。

[0146] 用于克隆的 T7 基因采用掺入 PCR 引物的 EcoRI(5')和 XbaI(3')位点进行 PCR 扩增和克隆。ATG 翻译起始密码子的 5' 端也包括 Kozak 共有序列,以保证高效率的蛋白合成。将 T7 基因插入 pCl-Neo-Bcl 产生 pCL-Neo-Bcl-T7,这导致 T7 基因位于 hCMV 启动子和增强子的控制下。获得的质粒 pCl-Neo-Bcl-T7 具有图 2 所列的序列(SEQ IDNO:1),并含有 HCMV 启动子/增强子,依次后随一个内含子、T7 RNA 聚合酶 SV40 聚 A、SV40 启动子/增强子和 Neo^r 元件。任选以新霉素抗性基因提供的选择标记受 SV40 启动子/增强子控制,它位于 T7 基因的 3'。新霉素标记增加了该质粒的多能性,因为它可用于选择稳定转化的细胞系。可选择标记基因的该位置将 SV40 增强子置于 T7 RNA 聚合酶基因的 3' 端也值得注意。已被证明的 SV40 增强子的双向转录刺激作用可能明显有助于 T7 RNA 聚合酶在质粒 pCl-Neo-Bcl-T7 中的全面表达。

[0147] 可与被拯救病毒的各种重组修饰相结合进行本发明方法,各种重组修饰方法是本领域所熟知的。例如,可通过缺失一个完整基因、缺失某基因的一部分、编码区的点突变、用异源核酸序列(来自另一病毒、另一病原体、编码药学上有用的多肽或编码免疫调节剂)取

代部分或全部基因、将异源核酸序列插入如基因间区和基因顺序的重排等其它修饰,来修饰病毒基因组或反义基因组。因为本文提供的拯救系统足够强大和有效,所以可成功实施对这些生长受损和 / 或减毒重组或突变衍生物的回收。

[0148] 因此,可通过将明确的改变引入该重组病毒并以高频率和高保真度产生用于含有所有确定基因组序列的免疫原性组合物的候选病毒的新共表达系统,产生本发明的感染性、重组非节段性负链 RNA 病毒。这些修饰可用于各种应用,包括开发携带有预定、明确的减毒突变的减毒活病毒株。通过胞内共表达编码病毒基因组或反义基因组 RNA 的一种或多种分离的多核苷酸分子与编码产生转录性、复制性核衣壳所需或至少必要的病毒蛋白的一种或多种多核苷酸,来产生本发明的感染性非节段性负链 RNA 病毒。

[0149] 构建编码非节段性负链 RNA 病毒基因组或反义基因组的 cDNA,使其与所选病毒蛋白在胞内共表达,以形成感染性病毒。“非节段性负链 RNA 病毒反义基因组”指一种分离的正义多核苷酸分子,它可用作子代病毒基因组的合成模板。一般构建的是复制性中间 RNA 相对应的正义病毒基因组或反义基因组的 cDNA,以使与编码产生转录、复制性核衣壳所必须的蛋白的互补序列的正义转录物杂交的可能性最少。虽然如前所述,但可采用反义病毒基因组(参见,例如,Kato 等,Genes to Cells 1:569-579,1996,引入本文作为参考)

[0150] 在本发明的一些实施方式中,重组非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组仅需含有产生其编码的感染性病毒或亚病毒颗粒所必需的那些基因或其部分。而且,可通过一种以上的多核苷酸分子提供这些基因或其部分,即可通过互补等由各个核苷酸分子提供这些基因。在其它实施方式中,所述病毒基因组或反义基因组可在没有辅助病毒参与或质粒或辅助细胞系提供的病毒功能的情况下编码病毒生长、复制和感染所必需的所有功能。

[0151] “重组非节段性负链 RNA 病毒”指直接或间接衍生自重组表达系统或由其产生的病毒或亚病毒颗粒增殖获得的完整病毒或感染性亚病毒颗粒。该重组表达系统采用包含操作性连接的转录单元的重组病毒表达载体,该转录单元含有在病毒基因表达中组装的具有调节作用的至少一个以上的遗传元件,如启动子、可转录为病毒 RNA 的结构或编码序列、以及合适的转录起始和终止序列。

[0152] 通过提供有效拯救非节段性负链 RNA 病毒的感染性克隆的方法,本发明能将多种改变用重组方法制作到各种目标病毒的基因组(或反义基因组)中,产生规定所需表型特定改变的明确突变。产生重组非节段性负链 RNA 病毒的本发明组合物和方法,能利用,例如这些明确的突变来改变所选病毒蛋白的功能或表达而易于详细地分析和操纵病毒的分子生物学和致病机理。本领域技术人员不难理解其相关的诊断用途。用本发明方法和组合物,可以容易地区分负责所需表型改变的突变和沉默的偶然突变,从而选择掺入重组非节段性负链 RNA 病毒基因组或反义基因组的表型特异性突变。

[0153] 本文中,在构建 cDNA 期间或之后,可以在重组病毒基因组或反义基因组中进行各种核苷酸插入、缺失、取代和重排。例如,可以合成特异性所需核苷酸序列,用方便的限制性酶位点将其插入 cDNA 中的合适区域。或者,可用此类技术如位点特异性诱变、丙氨酸扫描、PCR 诱变或本领域熟知的其它技术将突变引入 cDNA。

[0154] 本发明提供的非节段性负链 RNA 病毒的重组修饰定向产生用于诊断和免疫原性组合物的候选病毒,例如,以提高病毒的减毒和免疫原性,消除与不良免疫病理表现相关的

表位,适应抗原性漂变等。为实现这些和其它目标,本发明组合物和方法允许将各种修饰引入非节段性负链 RNA 病毒基因组或反义基因组中以掺入感染性重组病毒。例如,可将编码抗原决定簇(如保护性抗原或免疫原性表位)的外来基因或基因节段加入病毒克隆中,以产生能够诱导对亲代或“背景”病毒和产生抗原决定簇的另一“供体”病毒或病原因子的免疫力的重组病毒。或者,可将外来基因全部或部分插入编码免疫系统的调节剂,如细胞因子中,以提高候选病毒的免疫原性。在本发明方法拯救的病毒克隆中可包括其它突变,例如,用重组病毒克隆中的对应基因或基因节段取代异源基因或基因节段(例如,编码糖蛋白基因的胞质尾的基因节段)。或者,可以改变病毒克隆中基因的相对顺序,可以将病毒基因组启动子或其它调节元件用其反义基因组的对应物,或所选无功能的病毒基因(例如,通过功能性消除,包括引入终止密码子来防止该基因表达)取代。可在非节段性负链 RNA 病毒中产生其它修饰,如将独特的限制性位点插入病毒基因组或反义基因组的各种非编码或编码区域,以利于操纵。此外,可去除不翻译的基因序列,以提高插入外来序列的容量。

[0155] 如上所述,常常需要通过引入能提高或降低减毒或者改变重组病毒的表型来调整重组非节段性负链 RNA 病毒的表型。针对副流感病毒,在本发明中详细示例了从 cDNA 产生重组非节段性负链 RNA 病毒,以及选择、引入和测试各种减毒突变和其它修饰的有用材料和方法,这些材料和方法通常也可应用于本发明方法和组合物中的 PIV 和其它非节段性负链 RNA 病毒(参见,例如, Durbin 等, *Virology* 235 :323-332, 1997 ;1998 年 5 月 22 日提交的美国专利申请序列号 09/083,793 ;1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/458,813 ;1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/459,062 ;1998 年 5 月 22 日提交的美国专利申请序列号 09/083,793 (对应于国际公告号 W0 98/53078) 及其 1997 年 5 月 23 日提交的优先权美国临时申请号 60/047,575 和 1997 年 9 月 19 日提交的 60/059,385,各自引入本文作为参考)。具体说,上述引入的参考文献描述了通过构建和表达编码与 PIV 必要蛋白共表达的 PIV 基因组或反义基因组的 cDNA 产生感染性重组 HPIV3 的方法,包括可用于产生感染性病毒克隆的示例性质粒的描述。通过构建和表达编码与 PIV 必要蛋白共表达的 HPIV1 重组物或嵌合基因组或反义基因组的 cDNA 来产生感染性重组 HPIV1 的方法类似于 2001 年 9 月 21 日提交的美国临时申请号 60/331,961,和 Newman 等, *Virus Genes* 24 :77-92, 2002 (各自引入本文作为参考) 中的描述。通过构建和表达编码与 PIV 必要蛋白共表达的 HPIV2 重组物或嵌合基因组或反义基因组的 cDNA 来产生感染性重组 HPIV2 的方法类似于 2002 年 9 月 18 日提交的美国临时申请号 60/412,053 (引入本文作为参考) 中的描述。

[0156] 类似地,已经描述了从 cDNA 克隆呼吸道合胞病毒 (RSV) 的示例性方法和材料,及本发明中涉及用于构建重组非节段性负链 RNA 病毒的选择、引入和测试减毒突变和其它修饰的其它公开内容(参见,例如, 1996 年 9 月 27 日提交的美国专利申请号 08/720,132,对应于 97 年 4 月 3 日发表的国际公告 W097/12032 和 1995 年 9 月 27 日提交的优先权美国临时专利申请号 60/007,083 ;1996 年 7 月 15 日提交的美国临时专利申请号 60/021,773 ;1997 年 5 月 9 日提交的美国临时专利申请号 60/046,141 ;1997 年 5 月 23 日提交的美国临时专利申请号 60/047,634 ;1997 年 7 月 15 日提交的美国专利申请号 08/892,403,对应于 1998 年 1 月 22 日公开的国际公告号 W098/02530 ;1999 年 4 月 13 日提交的美国专利申请号 09/291,894,对应于 2000 年 10 月 19 日公开的国际公告号 W0 00/61611 和 1999 年 4 月 13

日提交的优先权美国临时专利申请序列号 60/129,006 ;2000 年 6 月 23 日提交的美国专利申请号 09/602,212 和相应的 2001 年 1 月 18 日公开的相应的国际公告号 W0 01/04335 和 1999 年 4 月 13 日提交的优先权美国临时专利申请号 60/129,006、1999 年 7 月 9 日提交的 60/143,097 和 1999 年 7 月 9 日提交的 60/143,132 ;2000 年 10 月 19 日公开的国际公告号 W000/61737 ;Collins 等,Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 92 :11563-11567,1995 ;Bukreyev 等, J. Virol. 70 :6634-41,1996, Juhasz 等, J. Virol. 71 :5814-5819,1997 ;Durbin 等, Virology 235 :323-332,1997 ;He 等 Virology 237 :249-260,1997 ;Baron 等 J. Virol. 71 :1265-1271, 1997 ;Whitehead 等, Virology 247 :232-9,1998a ;Whitehead 等, J. Virol. 72 :4467-4471, 1998b ;Jin 等 Virology 251 :206-214,1998 ;和 Whitehead 等, J. Virol. 73 :3438-3442, 1999 和 Bukreyev 等, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 96 :2367-72,1999,各自内容引入本文作为参考)。

[0157] 这些上述引入的参考文献描述了诱变、分离和表征非节段性负链 RNA 病毒以获得减毒突变株(如温度敏感型(ts)、冷传代(cp)冷适应的(ca)、小嗜菌斑(sp)和宿主范围受限的(h7)突变株)的方法和步骤,及鉴定规定减毒表型的遗传改变。与这些方法相结合,上述引入的参考文献详述了在与人体内活性合理相关的已接受的模型系统中,包括仓鼠或啮齿类和非人灵长类模型系统中,确定通过生物学计数衍生的和重组产生的减毒非节段性负链 RNA 病毒的复制、免疫原性、遗传稳定性和免疫效力的方法。此外,这些参考文献描述了开发和测试非节段性负链 RNA 病毒的免疫原性组合物,包括单价和二价免疫原性组合物的通用方法。

[0158] 上述引入的参考文献中也公开了构建和评价感染性、重组非节段性负链 RNA 病毒的方法,该病毒经修饰掺入了在生物学方法产生的突变体,例如冷传代(cp)冷适应的(ca)、宿主范围受限(hr)、小嗜菌斑(sp)和/或温度敏感型(ts)突变体,如 HPIV3 JS cp45 突变株(根据布达佩斯条约保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209,美国,专利保藏名为 PTA-2419 ;保藏物引入本文作为参考)中鉴定的表型特异性突变。可将在此病毒和其它突变病毒(例如,RSV-参见上述参考文献)中鉴定的突变容易地掺入本发明的重组 PIV 或其它非节段性负链 RNA 病毒中,见以下的进一步详述。

[0159] 因此,可将减毒突变和其它修饰常规引入本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒中。在本发明的某些方面,鉴定、评价用生物学方法产生的突变病毒的突变和将其引入相同或不同病毒的重组毒株中。用于掺入本发明重组病毒中的生物学方法产生的非节段性负链 RNA 病毒的减毒突变可能是天然发生的,或可通过熟知的诱变和分析方法将其引入野生株后鉴定并分析特征。例如,可通过病毒在细胞培养物中的生长期间加入化学诱变剂进行化学诱变,通过选择在次优温度下传代的病毒以引入生长限制性突变,或通过选择在细胞培养物中产生小嗜菌斑(sp)的诱变病毒,来产生不完全减毒的亲代病毒突变株,见上述引入的参考文献中所述。

[0160] “生物学方法产生的”指任何不通过重组方法产生的病毒。因此,生物学方法产生的病毒包括具有野生型基因组序列的天然产生的病毒和具有参比野生型序列的等位基因或突变基因组变异的病毒,例如,生物学方法产生的具有确定减毒表型突变的病毒。同样,生物学方法产生的病毒包括通过其它方法,如不包括直接重组 DNA 操作而通过人工诱变和

选择方法,由亲代毒株产生的突变体。

[0161] 如需要,可以单独或组合方式引入在生物学方法产生的突变的非节段性负链 RNA 病毒中鉴定的突变,以将本发明重组病毒调整到合适的减毒和免疫原性水平,和对减毒表型逆转的遗传抗性等。按照前面的描述,能从 cDNA 有效产生感染性重组非节段性负链 RNA 病毒使得能将经特定工程改造的变化引入重组病毒的广泛组装中。可用这些感染性重组病毒进一步鉴定生物学方法产生的减毒株中的特异性突变,例如规定 ts、ca、att 和其它表型的突变。将这个和其它方法鉴定的所需突变引入其它重组病毒株。本文提供的从 cDNA 产生新的非节段性负链 RNA 病毒的独特能力得以将这些突变以单独或各种所选组合的方式常规掺入新病毒的 cDNA 克隆中,随后不难测定含引入突变的被拯救的重组病毒的表型。

[0162] 在本发明其它实施方式中,通过制作异源突变病毒的突变图谱、用常规序列排列对比鉴定受体重组病毒的相应位点、和将受体病毒的天然序列突变为在该异源突变基因型中观察到的相同或保守突变,而“转移”异源负链 RNA 病毒中鉴定的所需突变。此种转移突变的通用性合理设计方法的描述见 2000 年 4 月 12 日提交的国际申请号 PCT/US00/09695, 10/19/00 公开的 WO 00/61737, 对应于 01/08/02 提交的美国国家阶段申请 09/958,292, 并要求 1999 年 4 月 13 日提交的美国临时专利申请序列号 60/129,006 的优先权,各自引入本文作为参考。Newman 等, *Virus Gene* 24 :77-92,2002 ;Feller 等, *Virology* 10 :276 :190-201,2000 ;Skiadopoulos 等, *Virology* 260 :125-35,1999 ; 和 Durbin 等, *Virology* 261 :319-30,1999 中提供了关于本发明这个方面的其它描述,各自引入本文作为参考。

[0163] 常常需要修饰受体重组病毒基因组或反义基因组,使其编码目标突变位点中的改变,该改变保守地对应于异源突变病毒中所鉴定的改变。例如,如果与相应的野生型序列相比,某氨基酸取代标志着该突变病毒中的一个位点突变,那么可在该重组病毒的相应残基上经工程改造产生一个类似取代。一般这种取代特指与该突变病毒蛋白中存在的取代残基相同或保守的氨基酸。然而也可以改变该突变蛋白中的取代残基的非保守突变位点的天然氨基酸残基(例如,利用任何其它氨基酸来破坏或削弱野生型残基的功能)。鉴定到其中含有示例性突变并将其转移入本发明重组病毒的负链 RNA 病毒包括:PIV(如 HPIV1、HPIV2、HPIV3、BPIV3 和 MPIV1)、RSV、新城疫病毒(NDV)、猴病毒 5(SV5)、麻疹病毒(MV)、牛瘟病毒、犬瘟热病毒(CDV)、腮腺炎病毒、狂犬病病毒(RaV)和水泡性口炎病毒(VSV)等。

[0164] 如上所述,可以通过几种已知方法来产生足够减毒的生物学方法产生的病毒突变株。一种这样的方法包括使部分减毒的病毒在细胞培养物中在逐渐降低的减毒温度下传代。例如,通过在细胞培养物中,在次优温度下传代来产生部分减毒的突变株。因此,冷适应的(ca)突变株或其它部分减毒的病毒株适应了较低温度下培养传代而有效生长。这种在冷传代期间选出的突变病毒与部分减毒的亲代相比,衍生株的残余毒力大大降低。或者,可通过对部分减毒的亲代病毒进行化学诱变将特定突变引入生物学方法产生的病毒,例如,引入 ts 突变,或者在对已含 ts 的病毒而言,引入足以提高该减毒衍生物的减毒效果和/或 ts 表型稳定性的其它 ts 突变。将 ts 突变引入非节段性负链 RNA 病毒的方法包括在诱变剂如 5-氟尿嘧啶的存在下根据公知方法复制病毒。也可使用其它化学诱变剂。虽然几乎任何病毒基因中的 ts 突变均可导致减毒,但发现对于此目的特别适合的靶是聚合酶(L)基因。例如,通过比较在许可温度下的复制与几种限制温度下的复制,来确定用于本发明的示例性减毒病毒复制的温度敏感性水平。与病毒在许可温度下的复制相比,使病毒

复制降低 100 倍或更多的最低温度称为截断 (shutoff) 温度。在实验性动物和人中,非节段性负链 RNA 病毒的复制和毒力与该突变体的截断温度相关。

[0165] 如图 3(A-C 图)所示,可将在异源负链 RNA 病毒中鉴定的各种突变掺入本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒,产生减毒或其它所需表型改变。该图提供 HPIV2 野生型 (wt)、HPIV3wt、HPIV1wt 或 BPIV3wt 之间的示例性序列排列对比,鉴定异源病毒中含有的已知减毒突变区域。根据这些和类似比较,将以前在异源病毒中鉴定的突变绘制到本发明目标病毒的相应位置图上,以便“转移”(即通过引入相同的保守或非保守突变,可能包括在通过排列对比鉴定的同源或相应位置上的取代、缺失或插入)到本发明的所述重组病毒中。将已可得到的这种突变的大组合物(参见,例如,Newman 等, *Virus Genes* 24:77-92, 2002; Feller 等, *Virology* 276:190-201, 2000; Skiadopoulos 等, *Virology* 260:125-35, 1999; 和 Durbin 等, *Virology* 261:319-30, 1999, 各自引入本文作为参考)掺入本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒。如图 3A 和 3C(A-C 图)所示,通过常规序列对比可鉴定出以前规定异源病毒的表型改变(当例如,通过取代改变了所指野生型残基时)所示的相应氨基酸位置。从而鉴定本发明目标病毒(如 HPIV1)的相应氨基酸位置,成为在重组病毒中产生减毒或其它所需表型改变进行突变的靶位点。

[0166] 在某些详述实施方式中,本发明的非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组经重组修饰,而掺入了选自以前在 HPIV3 JS cp45 病毒 L 蛋白 Tyr942、Leu992 和 / 或 Thr1558 相应位置上鉴定的氨基酸取代的一个突变或其任意组合。例如,掺入这些示例性突变的野生型 (wt) HPIV2 L 的相应靶位置是 Tyr948、Ala998 和 Leu566。在其它示例性实施方式中,修饰重组的 HPIV 或其它非节段性负链 RNA 病毒基因组或反义基因组,以在与异源性突变非节段性负链 RNA 病毒,如另一种 HPIV、非人 PIV 如牛 PIV3 (BPIV3) 或鼠 PIV1 (MPIV1), 或非 PIV 病毒如呼吸道合胞病毒 (RSV) 中所鉴定的减毒突变某氨基酸位置相对应的氨基酸位置上掺入减毒突变。在一个示例性实施方式中,将在 BPIV3 病毒 L 蛋白的氨基酸位置 Thr 1711 中鉴定的减毒突变掺入重组 HPIV2 的相应位置 (Ser1724),如常规排列对比方法所鉴定的位置中(图 3A 和 3C, A-C 图;也参见 Schmidt 等, *J. Virol.* 74:8922-9, 2000, 引入本文作为参考)。

[0167] 在本发明的其它详述实施方式中,非节段性负链 RNA 病毒的基因组或反义基因组在与呼吸道合胞病毒 (RSV) 中所鉴定的减毒突变的某氨基酸位置相对应的氨基酸位置上掺入了规定减毒突变的重组修饰。在一个特定实施方式中,与例如 HPIV2、HPIV3 和 HPIV1 L 蛋白中的保守位置对比,在 RSV 中鉴定的减毒突变包含 RSV L 蛋白 521 位置上的苯丙氨酸取代。在 HPIV2 中,突变的示例性保守靶位点对应于 HPIV2 L 蛋白的 Phe460,图 3A 和 3B(A-C 图)。因此,在一个示例性实施方式中, HPIV2 L 蛋白的 Phe460 被替换为 Leu 残基,或另一氨基酸。

[0168] 下表 2 说明和描述了用于掺入本发明的重组 RSV 中和其它非节段性负链 RNA 病毒的 RSV 中的各种示例性突变,并在本文以下的实施例中进一步详述。

[0169]

表 2
RSV cDNA 突变
野生型 RSV 与 RSV cDNA 突变的序列对比

突变	基因	核苷酸位置	限制性位点	核苷酸序列	氨基酸位置	氨基酸改变
cp	N	1938		野生 AAA TCA GTT AAA	267	V>I
				突变 AAA TCA ATT AAA		
cp	F	6314		野生 ATA TCA AAT ATA GAA ACT GTG	218	E>A
				突变 ATA TCA AAT ATA GCA ACT GTG		
cp	F	7229		野生	523	T>I
				突变		
cp	L	9454	<i>AccI</i> (丢失)	野生 GGA GAT TGT ATA	319	C>Y
				突变 GGA GAT TAC ATA		
cp	L	13566	<i>Sac I</i>	野生 CAT ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAA TTA GAA	1690	H>Y
				突变 TAC ATA AGG ATT GCT AAT TCT GAG CTC GAA		
L248	L	10990		野生 ACT CAT GCT CAA GCA GAT	831	Q>L
				突变 ACT CAT GCT TTA GCA GAT		
L404	L	12047	<i>Xho I</i>	野生 CTT CCA TTG GAT TGT AAC	1183	D>E
				突变 CTT CCA CTC GAG TGT AAC		
L530	L	10061	<i>Bst EII</i>	野生 CGT TTC TAT CGT GAG TTT CGG TTG CCT	521	F>L
				突变 CGT CTA TAT CGT GAG TTT CGG TTA CCT		
L955	L	8626	<i>Na</i>	野生 CTC AAA AAT GAT	43	N>I
				突变 CTC AAA ATA GAT		
L1009	L	12003	<i>Bst XI</i>	野生 GCC ACT GAG ATG ATG AGG	1169	M>V
				突变 GCC ACT GAG ATG GTC AGG		
L1030	L	12459	<i>Bsu 36I</i>	野生 ACC CTT GGG TTA ACA TAT GAA	1321	Y>N
				突变 ACC TTA GGG TTA ACA AAT GAA		
M2 404	M2	7606	<i>Xba I</i>	野生 GGGGCAAT ATG TCA CGA	na	na
				突变 GGGGCAAC ATG TCA CGA		
				野生 GGGGCAAT ATG TCT AGA		

[0170]

突变	基因	核苷酸位置	限制性位点	核苷酸序列	氨基酸位置	氨基酸改变
位点	P	2999, 3002	<i>Aat</i> II	野生 CCA ACA TCA 突变 CCG ACG TCA	na	na
位点	NS2/N	1099	<i>Afl</i> II	野生 TAATTTAAAA. TTAAGGAGAGAT rA2 TAATTTAAAACTTAAGGAGAGAT	na	na
位点	N	1139-40	<i>Nco</i> I	野生 GGGGCAAAATACAAAG ATG GCT rA2 GGGGCAAAATACAACC ATG GCT	na	na
位点	F	5709	<i>Pst</i> I (丢失)	野生 ATC CTC ACT GCA GTC rA2 ATC CTC ACC GCA GTC	16	沉默
位点	G/F IGR	5612, 16	<i>Stu</i> I	野生 TTATCACAAAAAGCCATGACCAACTT rA2 TTATCACAAAAAGCCTTGACCAACTT	na	na
4C	前导区	4	na	野生 ACGCGAAAAATGCGTACAACAAACT rA2 ACGGGGAAAAATGCGTACAACAAACT	na	na
7 与 8As	P	3243	na	野生 TAGTTACAAAAAAGGAAAGGGT rA2 TAGTTACAAAAAAGGAAAGGGT	na	na

[0171] 可经工程改造掺入到本发明重组非节段性负链 RNA 病毒中的许多上述示例性突变已在基于重组 HPIV3 的候选病毒中被成功地工程改造和回收 (Durbin 等, Virology 235: 323-332, 1997; Skiadopoulou 等, J. Virol. 72: 1762-1768, 1998; Skiadopoulou 等,

J. Virol. 73 :1374-1381, 1999 ;1998 年 5 月 22 日提交的美国专利申请序列号 09/083, 793 ; 1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/458, 813 ;1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/459, 062 ;1997 年 5 月 23 日提交的美国临时申请号 60/047, 575 (对应于国际公告号 WO 98/53078) 和 1997 年 9 月 19 日提交的美国临时申请号 60/059, 385, 各自引入本文作为参考)。此外, 上述引入的参考文献描述了构建嵌合性 PIV 重组病毒, 例如, 其 HPIV 1 的 HN 和 F 基因被替换为 HPIV3 的部分背景基因组或反义基因组, 经进一步修饰而携带有在 HPIV3 JS cp45 中鉴定的一个或多个减毒突变。一种这样的嵌合重组病毒掺入了在 cp45 的 L 基因中鉴定的所有减毒突变。已显示, 可将异源 (HPIV1) HN 和 F 基因外的所有 cp45 突变掺入 HPIV3-1 重组病毒中, 来产生减毒的嵌合性候选病毒。

[0172] 如上所述, 生物学方法产生的非节段性负链 RNA 病毒的这些和其它突变代表一个大“菜单”, 可从其中选择单个突变并与其它突变组合, 以调整本发明重组病毒的减毒、免疫原性和遗传稳定性水平。在本文中, 许多重组候选病毒包括一种或多种, 常常是两种或多种生物学方法产生的非节段性负链 RNA 病毒的突变, 例如, HPIV3 JS cp45、BPIV3 和 RSV 中鉴定的任何一个突变或其组合。本发明的许多重组病毒将掺入多个如此鉴定的突变。在规定这些突变的密码子中进行多个核苷酸取代而使重组病毒中的突变稳定化, 以抵制重组病毒 (毒力) 的回复。

[0173] 通过鉴定与所需表型, 如 ca 或 ts 表型相关的特定突变并将其掺入感染性重组病毒中, 本发明在所鉴定的突变位置上或其附近提供了其它的位点特异性修饰。生物学方法产生的非节段性负链 RNA 病毒中产生的大多数减毒突变是单核苷酸改变, 但也可通过重组技术将其它“位点特异性”突变掺入本发明重组病毒中。本文使用的位点特异性突变包括 1-3 个, 高达约 5-15 个或更多个核苷酸的改变 (例如, 从野生型病毒序列、从所选突变病毒株序列、或从经过诱变的亲代重组病毒克隆改变而产生) 的插入、取代、缺失或重排。可将这种位点特异性突变掺入所选的生物学方法产生的点突变的区域内。或者, 可将突变引入重组病毒克隆中的其它不同部分中, 例如, 引入顺式作用调节序列或编码蛋白活性位点、结合位点、免疫原性表位等的核苷酸序列中或其附近。在各种实施方式中, 将位点特异性核苷酸取代、增加、缺失或重排引入相对于靶核苷酸 5' 或 3' 位置的上游或下游, 如距离 1-3 个、5-10 个和多达 15 个或更多个核苷酸, 例如, 以构建或消除原有的顺式作用调节元件。

[0174] 除了单点和多点突变和位点特异性突变外, 对本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒的改变包括一个或多个基因或基因组节段的缺失、插入、取代或重排。特别有用的是参与产生其它所需表型影响的一个或多个基因或基因组节段的缺失。本文中描述了对 HPIV 的各种修饰 (参见, 例如, Durbin 等于 2002 年 6 月 25 日发表的美国专利号 6, 410, 023, 引入本文作为参考)。例如, 在 HPIV3 中, 可通过修饰重组的 HPIV3 基因组或反义基因组, 例如掺入改变起始密码子的编码分配的突变、引入一个或多个终止密码子或使 ORF 的全部或部分编码序列缺失, 而降低或消除 C、D 或 V 开放阅读框 (ORF) 或另一辅助基因中的一种或多种的表达 (参见, 例如, Durbin 等于 2002 年 6 月 25 日提交的美国专利号 6, 410, 023, 引入本文作为参考)。对 HPIV1 和 HPIV2 的其它示例性修饰包括能改变或消除 C、C'、Y1 和 / 或 Y2 ORF 或其它辅助基因中一种或多种表达的修饰。这些重组病毒将拥有非常理想的用于开发免疫原性组合物的表型特征。具体说, 所述修饰是高度稳定的, 可规定一种或多种所需表型改变, 包括 (i) 在细胞培养物中生长性能的改变, (ii) 在哺乳动物的上和 / 或下呼吸道中

减毒, (iii) 病毒噬斑大小的改变, (iv) 细胞病变效应的改变, 和 (v) 免疫原性的改变。

[0175] 因此, 在本发明的更详细方面, 重组非节段性负链 RNA 病毒掺入了部分或全部基因缺失、敲除突变或仅降低或提高所选基因表达的突变中的一种或多种。这可通过, 例如, 在所选编码序列中引入移码框突变或终止密码子, 改变翻译起始位点, 改变某基因位置或引入一个上游起始密码子以改变其表达速率, 改变基因起始 (GS) 和 / 或基因终止 (GE) 转录信号以改变表型, 或修饰 RNA 编辑位点 (例如, 生长转录、温度限制等) 实现。在本发明的更详细方面, 提供的重组非节段性负链 RNA 病毒中在没有缺失基因或其节段的情况下, 通过例如将多个翻译终止密码子引入翻译开放阅读框、改变起始密码子或修饰某编辑位点而能在翻译或转录水平上消除一种或多种基因的表达。这些形式的敲除病毒常常显示在组织培养中生长速率降低, 噬斑尺寸小。因此, 这些方法提供了另一类型的减毒突变, 可消除病毒基因, 一般不是主要的病毒保护性抗原之一的基因的表达。本文中, 可通过上述缺失诱变替代在没有基因或基因组节段缺失的情况下所产生的敲除病毒表型, 以有效预防可恢复靶蛋白合成的校正突变。用本领域已知的替代设计和方法进行其它基因敲除 (如 Kretschmer 等, *Virology* 216 :309-316, 1996 ;Radecke 等, *Virology* 217 :418-421, 1996 ;Karo 等, *EMBO J.* 16 :578-587, 1987 ;和 Schneider 等, *Virology* 277 :314-322, 1996 中的描述, 各自引入本文作为参考)。

[0176] 可引入本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒的核苷酸修饰可改变基因组或反义基因组中的少量碱基 (如 15-30 个碱基、多达 35-50 个碱基或更多), 大段核苷酸 (如 50-100、100-300、300-500、500-1, 000 个碱基), 或几乎全部或全部基因 (例如 1, 000-1, 500 个核苷酸、1, 500-2, 500 个核苷酸、2, 500-5, 000 个核苷酸、5, 000-6, 000 个核苷酸或更多), 这取决于修饰的性质和所需效应。例如, 可通过改变少量碱基插入或消除某免疫原性表位或改变小的基因组节段, 而当添加 (插入, addition)、取代、缺失或重排诸基因或大基因组节段时, 涉及大量碱基。

[0177] 在相关方面, 本发明提供的适合于在衍生自生物学方法产生的非节段性负链 RNA 病毒的重组非节段性负链 RNA 病毒中的补充突变 (例如, ca 和 ts 突变), 涉及进一步修饰的重组病毒中相同或不同基因的其它突变类型。例如, 可根据表达水平选择性改变, 或加入、缺失或取代一种或多种天然或异源基因的整体或一部分, 可单独或与其它所需修饰组合地进行这些修饰, 以产生具有新特征的重组病毒。或者或此外, 可以改变基因在该重组病毒中的顺序, 可用基因组启动子的反义基因组对应物取代该基因组启动子, 反之亦然。可以在该序列中进行不同或额外的修饰, 以有助于操纵, 如在各基因间区或其它地方插入独特的限制性位点。可去除不翻译的基因序列, 以增加插入外来序列的容量。

[0178] 用于掺入本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒中的其它突变包括针对顺式作用信号的突变, 这可通过例如病毒微型基因组的突变分析容易地鉴定。例如, 对前导区、尾随区和 / 或侧翼序列的插入和缺失分析可鉴定病毒启动子和转录信号, 并提供与 RNA 复制或转录的不同程度降低相关的一系列突变。也可利用这些顺式作用信号的饱和诱变 (借此将各位置修饰为各替代的核苷酸) 来鉴定影响 RNA 复制或转录的许多突变。可将这些突变之一如本文所述插入病毒的反义基因组或基因组中。利用病毒微型基因组帮助采用完整的反义基因组 cDNA 评价和操纵反式作用蛋白和顺式作用 RNA 序列, 见上述引用的参考文献中所述。

[0179] 本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒中的其它突变还可包括用其反义基因组对应物取代基因组的 3' 端, 反之亦然, 这与 RNA 复制和转录的改变相关。在一个示例性实施方式中, 可通过用合成方法制备的和设计的能有效翻译的序列取代天然序列, 以提高特定病毒蛋白, 如 PIV 的保护性 HN 和 / 或 F 抗原的表达水平。本文中显示了密码子的采用可能是哺乳动物病毒蛋白翻译水平的主要影响因素 (Haas 等, *Current Biol.* 6 :315-324, 1996, 引入本文作为参考)。通过重组方法优化编码重组病毒所述蛋白的 mRNA 的密码子采用将提高这些基因的表达。

[0180] 在另一示例性实施方式中, 单独或与引入上游启动密码子结合修饰了围绕所选病毒基因翻译起始位点的序列 (常常包括相对于 AUG 起始位点 -3 位置的核苷酸), 以通过规定上调或下调翻译来调节基因表达。或者, 与本文揭示的其它重组修饰结合, 可通过改变转录 GS 或 GE 信号调节重组病毒任一所选基因的表达。在另一实施方式中, 在转录水平调节重组非节段性负链 RNA 病毒中的基因表达水平。在一个方面, 改变所选基因在病毒基因图中的位置, 使其更接近启动子或更远离启动子, 从而分别更有效或更不有效地表达该基因。根据这个方面, 可实现调节特定基因的表达, 使该基因的表达与常常伴随的位置上互补取代的基因表达水平降低程度相当的野生型水平相比, 降低或升高 2 倍, 更通常是 4 倍, 高达 10 倍或更高。这些和其它转座性改变产生, 例如由于所选涉及 RNA 复制的病毒蛋白的表达降低而具有减毒表型或具有其它需要性能如抗原表达增加的新重组病毒。

[0181] 在其它实施方式中, 可方便地修饰用于免疫原性组合物中的重组病毒, 以适应循环病毒中的抗原性漂变。一般该修饰位于抗原性糖蛋白中, 例如 PIV 的 HN 和 / 或 F 蛋白, 或 RSV 的 F、G 或 SH 蛋白中。通过替换不同毒株或群受体克隆中的相应区域, 或通过加入一个或多个拷贝的能提呈多个抗原形式的基因或基因组节段, 将一个病毒株或群的整个糖蛋白基因, 或编码其具体免疫原性区域的基因组节段掺入重组基因组或反义基因组 cDNA 中。然后, 可将该修饰的重组病毒产生的后代病毒用于免疫方法中对抗新出现的毒株。

[0182] 在本发明的某些方面, 用异源性 (即, 来自不同种病毒或株) 对应序列取代非节段性负链 RNA 病毒的编码序列或非编码序列 (如启动子、基因末端、基因起点、基因间元件或其它顺式作用元件), 产生具有各种可能的减毒和其它表型效应的嵌合性病毒。例如, 可将牛 PIV3 (BPIV3) 或鼠 PIV1 (MPIV1) 的基因或基因组节段输入重组 HPIV “背景” 基因组或反义基因组中来工程改造其宿主范围和其它所需效应, 其中牛或鼠基因不能在人类细胞中起有效作用 (例如, 由于该异源序列或蛋白和通常与被取代序列合作行使病毒转录、翻译、组装等的生物学相互作用的 HPIV 序列或蛋白不相容, 或更通常是在宿主范围限制上, 与在许可和不太许可的宿主之间功能不同的细胞蛋白不相容)。

[0183] 在示例性实施方式中, 根据牛和异源性人 PIV 结构和功能的已知方面, 选择用于引入 HPIV 的牛 PIV 序列。在更详细方面, 本发明提供了以构建的 HPIV 和非人 PIV, 例如 MPIV1 (仙台病毒)、BPIV3、SV5、SV41 和 NDV 之间嵌合体为基础使重组 HPIV 候选物减毒的方法 (例如, Schmidt 等于 2000 年 6 月 1 日提交的美国专利申请序列号 09/586, 479 (对应于 PCT 公告 WO 01/04320); Schmidt 等, *J. Virol.* 74 :8922-9, 2000 中所述, 各自引入本文作为参考)。该减毒方法基于因将非人 PIV 的一个或多个基因或基因组节段引入人 PIV 载体的嵌合病毒中而产生的宿主范围效应。例如, BPIV 和 HPIV 之间有许多核苷酸和氨基酸序列差异, 这反映为宿主范围不同。HPIV3 和 BPIV3 之间, 各下述蛋白的氨基酸相同性百分数为:

N(86%)、P(65%)、M(93%)、F(83%)、HN(77%)和L(91%)。与BPIV3的两种不同株在相同动物中的限制性复制相比,HPIV3在恒河猴中高度许可地生长说明宿主范围不同(van Wyke Coelingh等,J. Infect. Dis. 157:655-662,1988,引入本文作为参考)。虽然HPIV3和BPIV3之间宿主范围不同的基础还有待完全阐明,但已显示涉及到多个基因和多个氨基酸差异。涉及的多个基因和可能的顺式作用调节序列,各包括多个氨基酸或核苷酸不同,为减毒对逆转高度稳定性提供了广泛基础。这与通过一个或几个点突变减毒的其它减毒HPIV3活病毒的情况相反。在后一种情况下,任何单个突变的逆转都可能产生明显的毒力回复,或者在仅有一个残基减毒的情况下,毒力完全回复。在本发明示例性实施方式中,重组HPIV基因组或反义基因组与异源基因或基因组节段,如来源于BPIV3的ORF的N、P、M或L,或其它动物的副粘病毒相组合。

[0184] 因此,本文提供的嵌合性人-牛或人-鼠重组HPIV,包含部分或完整的“背景”HPIV基因组或反义基因组,其衍生自或模仿HPIV与非人PIV的一个或多个异源基因或基因组节段相组合后形成了该嵌合性PIV基因组或反义基因组。在本发明的某些方面,这种类型的嵌合性HPIV掺入了与例如牛PIV的一个或多个异源基因或基因组节段组合的部分或完整的HPIV背景基因组或反义基因组。该部分或完整的HPIV背景基因组或反义基因组一般起受体骨架的作用,其中掺入了对应的非人PIV的异源基因或基因组节段。该对应的PIV的异源基因或基因组节段代表“供体”基因,或代表与背景基因组或反义基因组相组合或在其中含有取代的多核苷酸,从而产生与一个或两个供体PIV相比具有新表型特征的嵌合性HPIV。例如,在所选受体HPIV株中加入异源基因或基因组节段或取代,与未修饰的受体和/或供体的相应表型相比,可导致减毒增加或降低、生长改变、免疫原性改变或其它所需的表型改变(Schmidt等于2000年6月1日提交的美国专利申请序列号09/586,479;Schmidt等,J. Virol. 74:8922-9,2000,各自引入本文作为参考)。

[0185] 可选择用于在嵌合性PIV载体中作为异源取代或加入的基因和基因组节段,包括编码PIV N(或者称为NP、核衣壳蛋白)、V、P、M、F、HN和/或L蛋白或其部分的基因或基因组节段。此外,可将编码见于其它PIV病毒的蛋白质,以及非PIV蛋白质(如见于腮腺炎、RSV和SV5病毒中的SH蛋白)的基因和基因组节段,掺入本发明的其它嵌合性HPIV重组物中,反之亦然。调节区,如基因外3'前导区或5'尾随区,和基因起点、基因末端、基因间区、或者3'或5'非编码区也可用作异源取代或加入。在示例性方面,携带有一个或多个牛或鼠PIV基因或基因组节段的嵌合性HPIV,例如在人PIV感染的哺乳动物模型,如仓鼠和非人灵长类的呼吸道中显示出高度的宿主范围限制。在更详细的实施方式中,通过加入或取代选自N、M、L、V和P基因和基因组节段的一个或多个牛PIV3基因或基因组节段,将HPIV减毒成为部分或完整的HPIV背景基因组或反义基因组。

[0186] 一般说,用于本发明免疫原性组合物的人-牛和其它嵌合病毒表现出的宿主范围限制程度与各非人病毒或其它“供体”株表现出的宿主范围限制程度相当。在某些实施方式中,该限制与真正的宿主范围表型相对应,即,应对所述宿主特异,体外应不限制在合适细胞系中的复制。此外,携带有一个或多个异源基因或基因组节段的嵌合病毒应能在易于被受体病毒感染的宿主中引发所需的免疫应答。因此,本发明提供了根据宿主范围效应对活的非节段性负链RNA病毒的减毒,用于开发防御这些病毒和其它病原体的免疫原性组合物。

[0187] 与本发明嵌合病毒中提供的宿主范围表型效应结合,常常需要通过引入使嵌合性病毒减毒提高或降低的其它突变来调整减毒表型。因此,在本发明的其它方面,通过在得到的病毒或亚病毒颗粒中引入规定减毒表型的一种或多种减毒突变进一步修饰产生的减毒嵌合病毒的嵌合基因组或反义基因组。这些可包括根据上述合理设计的诱变策略从头产生的突变并测试其减毒效果。例如,可鉴定现有的生物学方法产生的突变病毒中的减毒突变,然后将其掺入本发明的嵌合病毒。示例性突变具体指 RNA 调节序列或编码蛋白中的损伤。

[0188] 本发明的某些候选减毒病毒和嵌合病毒,与相应的野生型或突变体亲代病毒株的生长相比,以在已接受的动物模型(如仓鼠、恒河猴或黑猩猩—其中该病毒显示了与人体中所见到的相关复制和免疫原活性)的下和/或上呼吸道中复制为标志的减毒降低了至少约两倍,更经常约 5 倍、10 倍或 20 倍,有时 50-100 倍和高达 1,000 倍或更高(例如,在感染后 3-8 天之间测定)。

[0189] 可将各种添加的或取代的基因或基因组节段用常规方法引入本发明重组和嵌合性病毒。例如,可在重组或嵌合基因组或反义基因组内的各种位点之一,例如在 HPV 中 N 的 3' 位置, N/P、P/M 和 / 或 HN/L 基因之间,或在 HPV 基因组或反义基因组的其它基因间连接区或非编码区中插入各种额外的异源基因或基因组节段。插入的基因可以在受体基因的共同控制下,或在一组独立的转录信号的控制下。本文中感兴趣基因包括编码细胞因子,如白介素 (IL-2 至 IL-18,如白介素 2 (IL-2)、白介素 4 (IL-4)、白介素 5 (IL-5)、白介素 6 (IL6)、白介素 12 (IL-12)、白介素 18 (IL-18)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素 γ (IFN γ) 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的基因(参见,例如,2000 年 7 月 12 日提交的美国申请号 09/614,285 和 1999 年 7 月 13 日提交的优先权美国临时申请序列号 60/143,425,各自引入本文作为参考)。这些额外蛋白的共表达能够定量和/或定性地修饰和改进针对本发明重组病毒的免疫应答。

[0190] 在本发明的其它方面,分别采用将异源核苷酸序列插入重组非节段性负链 RNA 病毒来调节候选重组病毒的,例如对上呼吸道感染的减毒水平。因此,可将核苷酸序列插入重组非节段性负链 RNA 病毒,指导外来蛋白的表达和在动物宿主中减毒该病毒,或分别用核苷酸插入来减毒候选病毒。为明确支配基因插入物对减毒的影响的一些规律,可将不同长度的基因单位插入野生型病毒骨架中,并检测基因单位长度对减毒的影响。在这个方面,考虑了不含明显 ORF 的基因单位插入物,允许在不受该基因表达的蛋白的影响下鉴定基因单位长度的影响。可将这些异源序列作为不同大小的额外基因单位插入,例如,长度从约 150 或更多个核苷酸至长度长达 3,000 个核苷酸或更长。如本文所证明的,基因插入或延伸的长度大于约 3,000 个核苷酸。

[0191] 长度约 1,000 或 2,000 个核苷酸的基因单位 (GU) 插入物将使用于哺乳动物对象上呼吸道的本发明非节段性负链 RNA 病毒大大减毒。此外,基因单位插入物可具有使候选病毒减毒和诱导抗第二病毒的免疫应答的双重效果。或者,在不能表达其它蛋白的病毒基因 3' 非编码区 (NCR) 的基因延伸也可使其自身减毒。在本发明这些方法中,基因插入长度是减毒的决定因素。

[0192] 本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒中的 GU 和 NCR 插入物所产生的减毒表型特征是在体外有效复制,而在体内复制降低。GU 插入所引起的减毒机制可能是由于一种或多种下述因素在体内起到支配性作用所致。由于在转录梯度中接近启动子的基因的转录速

率比远离启动子的基因高,所以额外基因单位的加入可降低下游基因的转录水平。如果下游基因产物有限或如果改变了有效复制所需的基因产物的特定比率,由于下游基因产物的 mRNA 丰度降低所引起它们的表达降低可导致减毒。据认为,转录梯度是转录期间以及在跨越基因连接处转移期间转录酶复合物从模板上脱落的结果。或者,基因组总长度的增加和转录了额外的 mRNA 可提高产生的病毒双链 RNA 的水平,进而可诱导干扰素系统的抗病毒活性达到较高水平。最后,由于基因组和反义基因组长度的增加,可降低基因组复制的总水平。这可能是由于在复制基因组 RNA 或反义基因组 RNA 期间复制酶复合物从模板上脱离。降低可用于包装入病毒粒子中的基因组的量可致使导致减毒病毒产率降低。

[0193] 涉及本发明重组非节段性负链 RNA 病毒中全病毒基因或基因组节段改变的缺失、插入、取代和其它突变可产生高度稳定的候选病毒,这对免疫抑制的个体而言尤其重要。许多这些改变将导致获得减毒的毒株,然而其它改变将规定不同类型的所需表型改变。例如,附属(即不是体外生长必需的)基因是编码特异性干扰宿主免疫力的蛋白的优秀候选物(参见,例如, Kato 等, EMBO. J. 16 :578-87, 1997, 引入本文作为参考)。预计消除候选病毒中的这种基因能降低毒力和致病性和 / 或提高免疫原性。

[0194] 在本发明其它详述实施方式中,用经重组修饰掺入异源病原体的一种或多种抗原决定簇的“载体”基因组或反义基因组,构建嵌合性非节段性负链 RNA 病毒。该载体基因组或反义基因组包含部分或整个非节段性负链 RNA 病毒基因组或反义基因组,本身可掺入核苷酸修饰如减毒突变。通过掺入异源基因或基因组节段修饰该载体基因组或反义基因组形成嵌合性结构。更具体说,通过基于 cDNA 的病毒回收系统构建本发明嵌合性病毒,该回收系统产生掺入与编码异源抗原决定簇的一种或多种“供体”核苷酸序列相结合的部分或整个载体或“背景”病毒基因组或反义基因组。在示例性实施方式中,修饰非节段性负链 RNA 病毒载体基因组或反义基因组,使其掺入编码一种或多种异源非节段性负链 RNA 病毒(如 HPiV、HMPV、MV 或 RSV)和 / 或非病毒病原体的抗原决定簇的一种或多种基因或基因组节段。这样构建的本发明嵌合性病毒可引发针对特异性非节段性负链 RNA 病毒(如 HPiV1、HPiV2、HPiV3、RSV-A、RSV-B、HMPV 或 MV)或针对非病毒病原体的免疫应答。或者,提供采用嵌合性病毒的组合物和方法能引发针对多个非节段性负链 RNA 病毒(例如,多个 HPiV,或者 HPiV 和 RSV 或 MV)的多特异性免疫应答的组合物和方法。在又一实施方式中,提供了用嵌合性病毒引发抗节段性负链 RNA 病毒(如流感 A 或 B 或冠状病毒)、正链 RNA 病毒(如披膜病毒、 α 病毒(包括脑炎病毒)、黄病毒(包括西尼罗河病毒、登革热病毒),和小核糖核酸病毒(包括脊髓灰质炎病毒和其它肠道病毒))或 DNA 病毒(如单纯疱疹和带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、EB 病毒和细胞巨化病毒)的免疫应答反应。

[0195] 在更详细方面,部分或整个载体基因组或反义基因组通常的作用是作为骨架掺入到不同病原体的异源基因或基因组节段中。异源病原体常常是不同的非节段性负链 RNA 病毒,这些病毒的一种或多种基因或基因组节段与载体基因组或反义基因组相组合或被取代。除提供新免疫特性之外,在载体病毒中加入或代之以异源基因或基因组节段,与未修饰的载体和供体病毒的相应表型相比可产生减毒提高或降低、生长改变或其它所需表型改变。

[0196] 引入异源免疫原性蛋白、蛋白结构域和免疫原性表位以产生嵌合性病毒,对于在免疫宿主中产生新免疫应答尤其有用。在受体载体基因组或反义基因组中加入或代之以一

种供体病原体的免疫原性基因或基因组节段可产生针对该供体病原体、该载体或这二者的免疫应答。

[0197] 对于 HPIV3 已开发了用于工程改造嵌合性病毒的通用方法和组合物 (Durbin 等, *Virology* 235:323-332, 1997; Skiadopoulos 等, *J. Virol.* 72:1762-1768, 1998; Tao 等, *J. Virol.* 72:2955-2961, 1998; Skiadopoulos 等, *J. Virol.* 73:1374-1381, 1999; Skiadopoulos 等, *Vaccine* 18:503-510, 1999; Tao 等, *Vaccine* 17:1100-1108, 1999; Tao 等, *Vaccine* 18:1359-1366, 2000; 1998 年 5 月 22 日提交的美国专利申请序列号 09/083,793; 1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/458,813; 1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/459,062; 1997 年 5 月 23 日提交的美国临时申请号 60/047,575 (对应于国际公告号 WO 98/53078) 和 1997 年 9 月 19 日美国临时申请号 60/059,385, 各自引入本文作为参考)。具体说, 上述引入的参考文献描述了嵌合性 PIV 重组病毒的构建, 例如 HPIV 1 的 HN 和 F 基因被取代为部分 HPIV3 背景基因组或反义基因组, 再经进一步修饰使其携带有在 HPIV3 JS cp45 中鉴定的一种或多种减毒突变。一种这类嵌合性重组病毒掺入了在异源 (HPIV1) HN 和 F 基因以外 cp45 的 L 基因中鉴定的所有减毒突变, 产生了一种减毒的候选嵌合病毒。在上述引入的参考文献中对于 RSV 提供了产生嵌合性非节段性负链 RNA 病毒的其它代表性内容。

[0198] 也可构建表达嵌合性蛋白, 如对融合有不同非节段性负链 RNA 病毒或非病毒病原体的异源胞外结构域的载体具有特异性胞质尾和 / 或跨膜结构域的免疫原性糖蛋白的本发明嵌合性非节段性负链 RNA 病毒, 提供的融合蛋白能引发抗该异源病原体的免疫应答。例如, 可将编码 HPIV1 或 HPIV3 的 HN 糖蛋白胞外结构域或 F 糖蛋白的异源基因组节段与编码相应 HPIV2 HN 或 F 糖蛋白胞质和跨膜结构域的基因组节段连接, 形成的 HPIV2-1 或 HPIV2-3 嵌合性糖蛋白引发抗 HPIV1 或 HPIV3 的免疫应答。在更详细的实施方式中, 该异源基因组节段编码糖蛋白胞外结构域或其免疫原性部分或表位, 任选地还可包含异源糖蛋白或“供体”糖蛋白的其它部分, 例如被载体基因组或反义基因组中对应的糖蛋白胞外和跨膜结构域取代的胞外结构域和跨膜区。Tao 等于 1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/459,062 中说明了有关本发明这些方面的其它详情, 引入本文作为参考。

[0199] 本发明的这种嵌合性非节段性负链 RNA 病毒的另一例子, 是表达有效促进该重组病毒与靶细胞膜融合的异源融合蛋白或其多肽片段的嵌合性蛋白, 其与编码病毒 G 蛋白一部分, 具体是该蛋白的羧基端近膜胞外区 (“尾”) 部分的 cDNA 融合。在一个实施方式中, 该异源融合蛋白是 CD4, 所述病毒是 VSV。Whitt 等于 2002 年 12 月 24 日发表的美国专利号 6,497,873 中说明了有关本发明这些方面的其它详情, 引入本文作为参考。

[0200] 本文所用术语“基因”一般指编码 mRNA 的非节段性负链 RNA 病毒基因组的一部分, 它一般在上游端的基因起始 (GS) 信号处开始, 在下游端的基因终止 (GE) 信号处终止。术语基因也可与术语“翻译开放阅读框”或 ORF 互换使用, 尤其是当蛋白由另一 ORF 而非独特的 mRNA 表达时。病毒基因组也含有基因外前导区和尾随区, 具有病毒复制和转录所需的启动子部分, 以及非编码和基因间区。转录在 3' 端开始, 并通过依次的停止—启动机制进行, 该机制受基因边界处的短保守基序指导。各基因的上游端含有基因起始 (GS) 信号, 它指导其对应 mRNA 的启动。各基因的下游端含有指导聚腺苷酸化和终止的基因终止 (GE) 基序。

[0201] “基因组节段”指任意长度的 PIV 基因组的连续核苷酸,可以是 ORF、基因或基因外区的一部分,或它们的组合。当所述基因组节段编码抗原决定簇时,该基因组节段编码至少一个能够在哺乳动物宿主中引发体液或细胞介导的免疫应答的免疫原性表位。该基因组节段也可编码免疫原性片段或蛋白结构域。在其它方面,供体基因组节段可编码多个免疫原性结构域或表位,包括经重组方法合成的含多个、重复或不同的免疫原性结构域或表位的序列。

[0202] 对于人 PIV3 株 JS(GenBank 登录号 Z11575,引入本文作为参考)和 Washington(Galinski M. S. Kingsbury, D. W. (编),《副粘病毒》(The Paramyxoviruses),第 537-568 页,Plenum Press, New York, 1991,引入本文作为参考);HPIV1/Wash64(GenBank 登录号 AF457102,引入本文作为参考);HPIV2(2002 年 9 月 18 日提交的美国临时申请号 60/412,053,引入本文作为参考);牛 PIV3(BPIV3)株 910N(GenBank 登录号 D80487,引入本文作为参考);BPIV3 堪萨斯(GenBank 登录号 AF178654,引入本文作为参考);BPIV 航运热(GenBank 登录号 AF178655,引入本文作为参考);RSV A2(GenBank 登录号 AF035006,引入本文作为参考);和 HMPV(GenBank 登录号 AF371337,引入本文作为参考)已描述了用于构建本发明的嵌合性非节段性负链 RNA 病毒的示例性异源病毒基因组序列。例如,在 1998 年 5 月 22 日提交的美国专利申请序列号 09/083,793;1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/458,813;1999 年 12 月 10 日提交的美国专利申请序列号 09/459,0629;1997 年 5 月 23 日提交的美国临时申请号 60/047,575(对应于国际公告号 W098/53078),1997 年 9 月 19 日提交的美国临时申请号 60/059,385;1999 年 12 月 10 日提交的美国临时申请号 60/170,195;和 2000 年 12 月 8 日提交的美国专利申请序列号 09/733,692(对应于国际公告号 WO 01/42445A2)中提供了关于构建用于本发明的嵌合性非节段性负链 RNA 病毒的其他详情,各自引入本文作为参考。

[0203] 可容易地修饰本发明的嵌合性非节段性负链 RNA 病毒,使其表达广范围病原体的一种或多种主要抗原决定簇。在此方面,本发明提供了开发的掺入有下述病毒抗原决定簇能够引发有效的抗下述病毒的免疫应答的重组病毒:呼吸道合胞病毒(RSV)亚组 A 和亚组 B、HMPV、麻疹病毒、人肺炎后病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、1 型和 2 型人免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、人肺炎后病毒(metapneumovirus)、EB 病毒、线状病毒、布尼亚病毒、黄病毒、冠状病毒(如 SARS 相关人冠状病毒)、 α 病毒和流感病毒等其它病原体。可作为开发本发明方法所用免疫原性组合物的靶标的病原体包括病毒和细菌病原体,以及原生动物和多细胞细胞病原体。本文所述可用于掺入本发明嵌合性病毒中的许多重要人病原体的有用抗原决定簇是已知的或不难鉴定。因此,已鉴定了上述示例性病原体的主要抗原,包括麻疹病毒 HA 和 F 蛋白;RSV 的 F、G、SH 和 M2 蛋白,腮腺炎病毒 HN 和 F 蛋白,人乳头瘤病毒 L1、L2、E6 或 E7 蛋白,1 型和 2 型人免疫缺陷病毒 gp120 和 gp160 蛋白,单纯疱疹病毒和巨细胞病毒 gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL 和 gM 蛋白,狂犬病病毒 G 蛋白,人肺炎后病毒 F 和 G 蛋白,EB 病毒 gp350 蛋白;线状病毒 G 蛋白,布尼亚病毒 G 蛋白,黄病毒 E 和 NS1 蛋白,肺炎后病毒 G 和 F 蛋白,冠状病毒刺突(S)和小膜(E)蛋白,和 α 病毒 E 蛋白。已良好地表征了这些主要抗原,以及所列病原体和其它病原体的本领域已知的其它抗原,对它们的许多抗原决定簇,包括全长蛋白和它们的组成性免疫原性结构域、片段和表位作了鉴定、绘图,并表征了各自的免疫原活性。

[0204] 在鉴定和表征用于本发明的各种病原体主要抗原的众多示例性绘图研究中,表位作图研究了 HPiV3 的血凝素-神经氨酸酶 (HN) 基因 (van Wyke Coelingh 等, *J. Virol.* 61 : 1473-1477, 1987, 引入本文作为参考)。该报道利用抗 HN 蛋白的单克隆抗体 (MAb) (抑制神经氨酸酶、血凝或二者活性) 对选出的 HPiV3 变体的 16 个抗原变体作了详细的抗原结构分析。各变体在 HN 基因中含有的单-点突变编码 HN 蛋白中的一个氨基酸取代。HN 蛋白的操作性和拓扑学图谱与取代的相对位置良好相关。HN 蛋白的计算机辅助分析预测出二级结构,主要由随机亲水性螺旋结构互连的疏水 β 折叠组成。HN 表位位于预测的螺旋区。抑制该病毒神经氨酸酶活性的 MAb 所识别的表位位于一个似乎在几种副粘病毒 HN 蛋白中结构保守的区域可能代表了 HN 分子的唾液酸结合位点。

[0205] 采用常规抗原作图方法的此示例性工作,鉴定了对 HN 表位完整性很重要的一个氨基酸。大多数这些表位位于该分子的 C-末端一半,正如所料,一个蛋白锚定在其 N 末端 (Elango 等, *J. Virol.* 57 : 481-489, 1986)。以前发表的 PIV3 HN 的操作性和拓扑图说明所用 MAb 识别出组成两个拓扑结构上分离的位点 (A 和 B) 的六组不同的表位 (I 至 VI),它们通过第三位点 (C) 部分桥接。这些表位组代表了可单独或以各种组合方式掺入本发明嵌合病毒中的有用候选抗原决定簇 (也参见 Coelingh 等, *Virology* 143 : 569-582, 1985 ; Coelingh 等, *Virology* 162 : 137-143, 1988 ; Ray 等, *Virology* 148 : 232-236, 1986 ; Rydbeck 等, *J. Gen. Virol.* 67 : 1531-1542, 1986, 各自引入本文作为参考)。

[0206] van Wyke Coelingh 等 (*J. Virol.* 63 : 375-382, 1989) 进行的其它研究提供了有关选择用于本发明的 PIV 抗原决定簇的进一步信息。在本研究中,用 26 个单克隆抗体 (MAb) (14 个中和性和 12 个非中和性) 检查 HPiV3 融合 (F) 糖蛋白的抗原结构、生物学性质和天然变异。对实验室选择的抗原变体和 PIV3 临床分离物的分析说明该组 MAb 识别至少 20 个表位,其中 14 个参与中和。竞争型结合试验证实了这 14 个中和表位组成了 3 个非重叠的主要抗原区 (A、B 和 C) 和一个桥联位点 (AB), 6 个非中和表位形成四个位点 (D、E、F 和 G)。大多数中和性 MAb 参与非相互竞争性结合反应,提示它们引起了其它中和表位中的构象改变。

[0207] 已鉴定并表征了用于本发明的呼吸道合胞病毒 (RSV) 的其它抗原决定簇。例如, Beeler 等, *J. Virol.* 63 : 2941-2950, 1989, 引入本文作为参考,利用十八种对 RSV A2 株的融合糖蛋白的特异性中和单克隆抗体 (MAb) 构建了涉及 RSV 中和和融合表位的详细拓扑和操纵性图。竞争性结合试验鉴定到三个非重叠抗原区 (A、B 和 C) 和一个桥联位点 (AB)。选出了十三种 MAb 抗性突变体 (MARM), MAb 与 MARM 或 RSV 临床株的中和模式鉴定到至少 16 个表位。用抗六个位点 A 和 AB 表位的抗体选出的 MARM 显示了小噬斑表型,这与 F 分子的生物活性区中的改变相一致。MARM 分析也表明这些中和表位占据了拓扑学上不同但构象上相互依赖的区域,具有独特的生物学和免疫学性能。然后,在交叉中和试验中用 18 个抗 F MAb 检测 23 个临床分离物 (18 个亚组 A 和 5 个亚组 B) F 表位中的抗原性改变。该分析鉴定了该分子上的恒定、可变和超变区,表明 RSV F 糖蛋白中和表位中的抗原性改变是非累积性遗传异源性的结果。这 16 个表位中,8 个在所有 23 个亚组 A 或亚组 B 临床分离物 (除一个外) 中是保守的。这些抗原决定簇包括全长蛋白和它们的组成性抗原结构域、片段和表位,都代表了用于整合入本发明上述嵌合病毒中以引发新免疫应答的有用候选病毒。(也参见 Anderson 等, *J. Infect. Dis.* 151 : 626-633, 1985 ; Coelingh 等, *J. Virol.* 63 : 375-382, 1989 ;

Fenner 等, Scand. J. Immunol. 24 :335-340, 1986 ;Fernie 等, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171 : 266-271, 1982 ;Sato 等, J. Gen. Virol. 66 :1397-1409, 1985 ;Walsh 等, J. Gen. Virol. 67 : 505-513, 1986 ;Olmsted 等, J. Virol. 63 :411-420, 1989, 美国专利号 5, 639, 853, 各自引入本文作为参考)。

[0208] 为在嵌合非节段性负链 RNA 病毒中表达异源病原体的抗原决定簇, 本发明提供了许多方法和构建物。在某些详述实施方式中, 将含有编码抗原蛋白的基因 (如麻疹病毒 HA 基因) 的开放阅读框 (ORF) 的转录单元加入载体基因组或反义基因组的的不同位置中。在下面所述的示例性实施方式中, 工程改造嵌合病毒, 使其掺入编码呼吸道合胞病毒 (RSV) 的保护性抗原的异源核苷酸序列以产生候选感染性减毒病毒。掺入一种或多种 RSV 抗原决定簇的嵌合非节段性负链 RNA 病毒一般含有与编码 RSV 抗原糖蛋白、蛋白结构域 (如糖蛋白胞外结构域) 或一种或多种免疫原性表位的异源基因或基因组节段相组合的载体基因组或反义基因组。在下面说明的一个实施方式中, 将 RSV F 和 / 或 G 基因的一种或多种基因或基因组节段与不同亚型的 RSV 载体基因组或反义基因组相组合, 以形成嵌合性 (如 RSV A/B 嵌合) 病毒。

[0209] 相对其它病毒载体构建物, 本发明的嵌合载体构建物提供了某些优点。用作载体的大多数其它单分子负链 RNA 病毒并非衍生自人病原体 (如鼠 PIV1 (仙台病毒) (Sakai 等, FEBS Lett. 456 :221-6, 1999)、属于牛病原体的水泡性口炎病毒 (VSV) (Roberts 等, J. Virol. 72 :4704-11, 1998) 和犬 PIV2 (SV5) He 等, Virolo 237 :249-60, 1997))。对于这些非人病毒, 其载体骨架上提呈的抗原只能产生很少或很弱的对任何人类病毒的免疫力。因此, 表达人病原体额外基因的非人病毒载体只能诱导抗一种人病原体的抵抗力 (然而, 在一些情况下可能需要这种抵抗力)。

[0210] 此外, 可通过模拟天然感染的鼻内给药途径给予受试者本发明方法 (例如, 基于 RSV 或 HPIV) 回收的许多嵌合性载体病毒。因此, 本发明的病毒和免疫原性组合物将诱导粘膜和全身性免疫力, 并降低新生儿中来自母亲的血清 IgG 的中和免疫抑制作用。

[0211] 如上所述, 本发明包括对重组非节段性负链 RNA 病毒的广泛修饰, 产生规定所需表型改变的明确突变。在本发明的更详细方面, 将这些明确突变引入所述病毒基因组或反义基因组的 cDNA 拷贝, 一般采用基因组或反义基因组 cDNA 亚片段组装完整的基因组或反义基因组 cDNA。该构建方法具有的优点是可分别操作基因组或反义基因组的各区域, 其中小 cDNA 构建物比大 cDNA 构建物更易于操作, 因此可容易地组装成完整的 cDNA。因此, 可将完整的反义基因组或基因组 cDNA, 或其所选亚片段用作寡核苷酸定向诱变的模板。这可通过单链噬菌粒形式的介导, 如用 Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) 的 Muta-gene[®] 试剂盒, 或直接将双链质粒用作模板的方法如 Strategene (La Jolla, CA) 的 CHAMELEO[®] 诱变试剂盒, 或通过采用含有感兴趣突变的寡核苷酸引物或模板的聚合酶链反应来实现。然后, 可将突变的亚片段组装成完整的反义基因组或基因组 cDNA。各种其它诱变技术是已知的, 可常规采纳用于在本发明病毒反义基因组或基因组 cDNA 中产生感兴趣突变。

[0212] 因此, 在一个示例性实施方式中, 用购自 Bio-Rad Laboratories 的 Muta-gene[®] 噬菌粒体外诱变试剂盒诱导这些突变。简要说, 将编码 PIV 基因组或反义基因组的 cDNA 克隆入质粒 pTZ18U, 用于转化 CJ236 细胞 (Life Technologies)。如生产商所推荐地制备噬菌粒制品。通过将改变的核苷酸引入该基因组或反义基因组的所需位置设计用于诱变的寡

核苷酸。然后扩增含有基因组或反义基因组遗传上改变的质粒。

[0213] 对本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒的基因或基因组节段进行与相同或不同病毒或其它来源的现有“对应”基因或基因组节段的结构或功能相关的某些取代、插入、缺失或重排（例如，对编码所选蛋白或蛋白区域，如胞质尾、跨膜结构域或胞外结构域，表位位点或区域，结合位点或区域，活性位点或含有活性位点的区域等的基因组节段进行取代）。这种修饰产生的新重组病毒与野生型或亲代病毒株相比具有所需的表型改变。例如，此类型重组病毒可表达具有与异源病毒胞外结构域融合的一种非节段性负链 RNA 病毒的胞质尾和 / 或跨膜结构域的嵌合性蛋白。其它此类型示例性重组病毒表达重复的蛋白区域，如重复的免疫原性区域。

[0214] 本文所用的“对应”基因、基因组节段、蛋白或蛋白区域，一般为异源来源（例如，来自不同基因，或代表不同种病毒或毒株的相同（即同源或等位）基因或基因组节段）。本文所选择的典型对应物共同具有大体的结构特征，例如，各对应物可编码相当的蛋白或蛋白结构域，如胞质结构域、跨膜结构域、胞外结构域、结合位点或区域、表位位点或区域等。对应结构域及其编码基因组节段包括的组装种类，具有由所述结构域或基因组节段变体共同生物学活性而限定的大小和序列变化种类的组装。

[0215] 本文公开的用于产生本发明重组非节段性负链 RNA 病毒的对应基因和基因组节段，以及其它多核苷酸，与所选多核苷酸“参比序列”，例如与另一所选对应序列常常在序列上基本相同。本文所用的“参比序列”定义为用作序列比较的基础序列，例如，全长 cDNA 或基因的某节段，或完整的 cDNA 或基因序列。通常，参比序列的长度为至少 20 个核苷酸，常常长度为至少 25 个核苷酸，经常长度为至少 50 个核苷酸。由于两种多核苷酸可各自 (1) 包含在这两种多核苷酸之间相似的序列（即整个多核苷酸序列的一部分相似），和 (2) 还可包含在这两种多核苷酸之间不同的序列，对两种（或多种）多核苷酸之间的序列比较一般是比较这两种多核苷酸的“比较窗口”中的序列，以鉴定和比较局部区域的序列相似性。本文所用的，“比较窗口”指至少含 20 个连续核苷酸位置的概念性节段，其中可将某多核苷酸序列与至少 20 个连续核苷酸的参比序列进行对比。对于两个序列的最优排列对比而言，该多核苷酸序列的比较窗口中的部分序列与参比序列（不含有添加或缺失）相比，可含有 20% 或更少的添加或缺失（即缺口）。对于比较窗口中序列的最优排列对比，可采用 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 (Adv. Appl. Math. 2 :482, 1981)，Needleman 和 Wunsch 的同源性对比算法 (J. Mol. Biol. 48 :443, 1970)，Pearson 和 Lipman 的相似性搜索方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :2444, 1988)（各自引入本文作为参考），通过计算机实施这些算法 (Wisconsin 遗传学软件包 7.0 版中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA，遗传学计算机小组，575 Science Dr., Madison, WI, 引入本文作为参考)，或通过查看所选各种方法产生的最佳对比（即产生比较窗口序列相似性的最高百分数）进行最优的序列对比。术语“序列相同性”指两个多核苷酸序列在比较窗口中是相同的（即核苷酸 - 核苷酸相同）。术语“序列相同性百分数”的计算如下：通过比较两个最优排列的序列在比较窗口中的对比序列，确定两个序列中具有相同核酸碱基（如 A、T、C、G、U 或 I）的位置数，以产生匹配位置数，将匹配位置数除以比较窗口的位置总数（即窗口大小），将该结果乘以 100 即产生序列相同性百分数。本文所用的术语“基本相同性”指某多核苷酸序列的特征，其中将该多核苷酸所含的序列与参比序列比较窗口中的至少 20 个核苷酸位置、常常为至少 25-50 个核苷酸相比，具

有至少 70% 序列相同性、常常是 85% 序列相同性、有时至少 90-95% 序列相同性和高达至少 99% 序列相同性,其中通过将参比序列与可包含参比序列对比窗口总共 20% 或更少的缺失或添加的多核苷酸序列作比较,计算出序列相同性百分数。参比序列可以是某较大序列的亚组。

[0216] 除了这些多核苷酸序列的相关性之外,通常还选择本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒编码的蛋白和蛋白区域,与所选参比多肽具有保守性关系,即与所选参比多肽具有基本上的序列相同性或序列相似性。应用于多肽时术语“序列相同性”指二种肽在相应位置具有相同的氨基酸。术语“序列相似性”指二种肽在相应位置具有相同或相似的氨基酸(即保守取代)。术语“基本上序列相同性”指当,如采用默认缺口权衡的 GAP 或 BESTFIT 程序进行最优排列对比时,两个肽序列具有至少 70% 的序列相同性,常常为 80% 序列相同性,有时至少为 90% 序列相同性,和高达至少 95% 序列相同性或更高(例如,99% 序列相同性)。术语“基本上相似”指两个肽序列具有相应百分数的序列相似性。常通过保守氨基酸取代使不相同的残基位置不相同。保守氨基酸取代指具有类似侧链的残基可互换。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;和具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。保守性氨基酸组内取代包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。本文所用的二十种天然产生的氨基酸的缩写遵循其常规用法(《免疫学-合成》Immunology-A synthesis,第二版,E. S. Golub 和 D. R. Gren 编,Sinauer Associates,Sunderland,MA,1991,引入本文作为参考)。二十种常规氨基酸、非天然氨基酸如 α , α -双取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸和其它非常规氨基酸的立体异构体(如 D-氨基酸)也可以是本发明多肽的合适组分。非常规氨基酸的例子包括:4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷脂酰丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、间-N-甲基精氨酸和其它类似氨基酸和亚氨基酸(如 4-羟基脯氨酸)。而且,可通过糖基化、磷酸化等修饰氨基酸。

[0217] 为选择本发明的候选病毒,根据熟知方法确定活力、减毒和免疫原性的标准。本发明免疫原性组合中最需要的病毒必须维持活力,具有稳定的减毒表型,显示能在免疫的宿主中复制(虽然水平较低)和能在接受者中有效引发产生免疫应答反应,使其足以引发所需的免疫应答。本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒不仅是活的适当减毒的病毒,它们在体内遗传上更稳定-维持激发免疫应答和在一些情况下扩大多种修饰所引发的免疫应答的能力,例如,诱导抗不同病毒株或亚组的免疫应答,或激发不同免疫基础,如分泌性免疫球蛋白与血清免疫球蛋白、细胞免疫等介导的应答。

[0218] 可以在各种熟知和广为接受的体外和体内模型中测试本发明的重组非节段性负链 RNA 病毒,以验证其足够减毒、对表型逆转的抗性和免疫原性。在体外试验中,测试该修饰病毒(如经多重减毒的、生物学方法产生的或重组的病毒)的病毒复制温度敏感性,即 ts 表型,和小噬斑或其它所需表型。还在病毒感染的动物模型中测试该修饰病毒。本文引用的各种参考文献中描述并总结了各种动物模型,包括评价用于免疫原性组合物和方法中的

候选病毒的减毒和免疫原活性的有用的啮齿类和非人灵长类模型。这些模型是本领域广泛接受的,从它们获得的数据与本发明所述病毒在人中感染性、减毒和免疫原性良好相关。

[0219] 根据以上描述,本发明也提供用于免疫原性组合物中的分离的感染性重组非节段性负链 RNA 病毒。作为免疫原性组合物一种组分的减毒病毒是分离的和纯化形式。分离的指不是从野生型病毒天然环境中,如感染个体的鼻咽部中分离得到的重组非节段性负链 RNA 病毒。更通常地,分离的指所包含的减毒病毒为以控制方式在细胞培养物或其它人工培养基中增殖并经特征鉴定的一个组分。例如,可从细胞培养物中分离得到感染的细胞培养物,加入稳定剂来产生本发明的减毒非节段性负链 RNA 病毒。

[0220] 为用于免疫原性组合物,可将本发明产生的重组非节段性负链 RNA 病毒直接用于制剂中,或如需要用本领域技术人员熟知的冻干方法冻干。冻干的病毒一般保存在约 4℃。当准备使用时,如下所述稳定溶液,如盐水或含有 SPG、Mg⁺⁺ 和 HEPES 的溶液中重建冻干病毒,加或不加佐剂。

[0221] 本发明的免疫原性组合物含有免疫学有效量的如本文所述产生的重组非节段性负链 RNA 病毒,作为其活性成分。可用生理学可接受的载体和 / 或佐剂将该修饰病毒引入宿主。有用的载体是本领域熟知的,包括例如:水、缓冲液、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸等。可包装所获的水溶液,即用形式,或冻干后使用,在给予前将冻干制剂与无菌溶液混合,如上所述。如需要接近生理条件,该组合物可含有药学上可接受的辅助物质,如 pH 调节和缓冲剂、强度调节剂、湿润剂等,如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸山梨聚糖酯,油酸三乙醇胺酯等。可接受的佐剂包括不完全弗氏佐剂、MPL™ (3-O-脱酰基单磷酸脂 A; Corixa, Hamilton MT) 和 IL-12 (Genetics Institute, Cambridge MA) 等本领域熟知的许多其它合适佐剂。

[0222] 当如本文所述用重组非节段性负链 RNA 病毒组合物免疫时(例如,通过气雾剂、滴剂、口服、局部、肌肉内、鼻内、肺、皮下,静脉内或其它途径),宿主的免疫系统通过产生所述病毒或病毒载体构建物的特异性抗体而对该免疫原性组合物作出应答反应。用免疫学有效量的如本文所述产生的重组非节段性负链 RNA 病毒免疫的结果是,宿主对靶病毒感染至少产生部分或完全的免疫力,或对发展成中度或严重感染产生抵抗力。

[0223] 给予该免疫原性组合物的宿主可以是易于受所述非节段性负链 RNA 病毒(或对于嵌合性载体构建物而言是供体病毒)感染的和能够对免疫用的病毒抗原产生免疫应答的任何哺乳动物宿主。因此,本发明提供了生产各种人用和兽医用免疫原性组合物的方法。

[0224] 将含有本发明重组非节段性负链 RNA 病毒的组合物给予易受所述病毒(或供体病毒)感染的或处于所述病毒(或供体病毒)感染危险中的宿主,以增强宿主自身的免疫应答能力。所用剂量定义为“免疫学有效剂量”。在此种应用中,给予重组病毒有效剂量内的准确量将取决于宿主的健康状况和体重、给予方式、剂型特性等,但通常的剂量范围是每个宿主约 10³ 至约 10⁷ 噬斑形成单位(PFU)的病毒或更多,更常为每个宿主约 10⁴ 至 10⁶ PFU 病毒。在任何情况下,这些制剂提供的本发明修饰的病毒量应足以在宿主病人中引发抗所述病原体的可检测的免疫应答,例如,可通过血凝抑制、补体固定、噬斑中和和 / 或酶联免疫吸附试验等其它方法测定。

[0225] 可将本发明产生的重组非节段性负链 RNA 病毒与其它血清型或株的病毒结合,以引发所需的抗多种病毒血清型或株的免疫应答。或者,可如本文所述将多种血清型或株的

保护性表位经工程改造组合到一个病毒中而获得抗多种病毒血清型或株的免疫应答。一般当给予不同病毒时,将它们混合同时给予,但也可分别给予。用一个毒株进行免疫可能使(宿主)产生对相同或不同血清型不同株的免疫力。

[0226] 在新生儿和婴儿中,可能需要多次给予才能引发足够水平的免疫力。可以在出生的第一个月中开始给予,如需要维持对天然(野生型)病毒感染的免疫应答,在整个儿童时期以一定间隔如两个月、六个月、一年和两年时给予。类似地,特别易患重复和严重感染的成年人,如卫生保健工作者、日托工作者、幼儿的家庭成员、老年人、心肺功能不全的个体可能需要多次免疫才能建立和/或维持免疫应答反应。可通过测定中和性分泌和血清抗体的量来监测所诱导的免疫力水平,如需要维持所需水平的免疫应答反应可调整剂量或重复免疫。而且,对给予不同接受者群体而言,可采用不同的候选病毒。

[0227] 在本发明的又一方面,将重组非节段性负链 RNA 病毒用作,如呼吸道短时基因治疗的载体。根据该实施方式,重组病毒基因组或反义基因组掺入了能够编码感兴趣基因产物的序列。该感兴趣基因产物处在相同或不同启动子的控制下,由该启动子控制病毒的表达。通过一种或多种上述给予途径给予含有编码感兴趣基因产物的序列的感染性重组病毒。给予该病毒的量足以导致治疗或预防水平的所需基因产物表达。可掺入该重组病毒并在本方法中给予的代表性基因产物一般是适合于短时表达的,包括例如:白介素-2、白介素-4、 γ -干扰素、GM-CSF、G-CSF、促红细胞生成素等其它细胞因子,葡糖脑苷脂酶、苯丙氨酸羟化酶、囊肿性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶、细胞毒素、肿瘤抑制基因、反义 RNA 等其它候选抗原。

[0228] 提供以下实施例,用于说明而非限制。

[0229] 将本文引用的所有专利和出版物的内容引入本文作为参考。

[0230] 实施例 I

[0231] 用于从 Vero 细胞中拯救非节段性负链 RNA 病毒的通用磷酸钙转染方法

[0232] 溶液

[0233] 下述溶液通常可用于宿主细胞转染:280mM NaCl[16.4 克 NaCl(或 56 毫升 5MNaCl)],50mM BES[10.7 克 BES(不含酸形式)]和 1.5mM 磷酸钠[0.21 克 Na_2HPO_4]的 2×BBS(每 L)溶液(2×BBS-缓冲盐水)。用 NaOH 将 BBS 溶液的 pH 调整为 6.95-6.98。然后将该溶液过滤除菌并冷冻储存。

[0234] 配制每 100 毫升总体积含 36.8 克氯化钙的 2.5M CaCl_2 溶液,储存于 -20°C 。用硝酸纤维素(膜)过滤除菌该溶液。避免使用醋酸纤维素滤膜,因为它们会阻塞。或者,高压灭菌该转染溶液。然而,不大需要后一步骤,因为 2×BBS 溶液在高压灭菌期间可能发生轻微改变。

[0235] 通常可将下述溶液用作培养基:DMEM 的 DMEM+FBS 溶液(含谷氨酰胺的高葡萄糖;Gibco/BRL, [Grand Island, NY]),添加有 10%热灭活的合格的 FBS,和 10-20 微克/毫升(任选可高达 50 微克/毫升)庆大霉素。

[0236] MEM 的 MEM+FBS 溶液(补充有谷氨酰胺,非必需氨基酸,10%热灭活的合格的 FBS,和 10-20 微克/毫升(任选可高达 50 微克/毫升)的 20-25mM Hepes 缓冲液;Gibco/BRL)(Grand Island, NY)和任选地包括 1X 两性霉素 B)。

[0237] Hepes-缓冲盐水洗涤溶液,20mM hepes, pH 7.0, 150mM NaCl, 1mM MgCl_2 的 HBS 溶

液。

[0238] 方法

[0239] 通常采用的宿主细胞可选自分裂性 Vero 细胞,在转染前一天将该细胞置于 DMEM+FBS 中,使它们在第二天生长至大约 50% 铺满 [对于 RSV 是 80-90% 铺满] (在六孔板或 12.5 厘米² 培养瓶中)。较高细胞密度运作效率较低。第二天,在转染前 1-4 小时向各培养物中加入 4.5 毫升 DMEM+FBS。然后,将细胞转移到 3% CO₂ 和 32℃ 的 CO₂ 培养箱中。Vero 细胞可培养过夜,只要它们在转染时达到约 50% 铺满。

[0240] 如下所述获得 CaCl₂/磷酸盐沉淀:在开始前将 BBS 和 CaCl₂ 维持在室温下。在含有总体积 250 微升的 5 毫升聚丙烯管中制备 DNA 混合物,其中总共有 2-20 微克的质粒 DNA 和 25 微升 CaCl₂。用于全长拯救的 DNA 包括 5 微克所选非节段性负链 RNA 病毒的全长 cDNA 构建物,400 纳克 N 蛋白,300 纳克 P 蛋白,100-200 纳克 L 蛋白,200 纳克 M2 (仅对 RSV) 蛋白,和 5-10 微克 pCl-Neo-Bcl-T7 质粒 (SEQ ID NO:1;图 2)。在 Vero 细胞中的拯救效率低,因此每个被拯救的全长构建物转染 3-6 个孔。

[0241] 制备好所有 DNA/CaCl₂ 溶液后,加入 2×BBS。这通常以连续低速涡旋温和振荡小管并沿小管侧面逐滴加入 250 微升 2XBBS 完成。对所有小管重复这一操作,室温再放置 15-20 分钟以使 DNA-磷酸钙沉淀形成。室温孵育后,将沉淀逐滴加入细胞培养基中,摇动培养板使细胞均匀分布。然后将该培养基在 3% CO₂ 的培养箱中孵育 3 小时。3% CO₂ 水平对 BBS/CaCl₂ 转染技术而言是重要的;如果是 5% CO₂,作用就非常差。3% CO₂ 控制了培养基的 pH,得以在培养基中形成有效的磷酸钙-DNA 沉淀。

[0242] 然后,任选地进行热激步骤,例如在开始转染后 3 小时。将细胞转移到 44℃ 的水浴中。将该细胞密封在塑料储存袋中,使培养物完全浸没在水中。44℃ 3 小时后,将细胞转移回 3% CO₂ 的 32℃ 培养箱中,继续培养过夜。

[0243] 第二天,去除转染培养基,用 HBS 洗涤细胞两次。洗涤后,加入 2 毫升新鲜的 DMEM+FBS。PBS 和 Hank 氏缓冲液在该洗涤步骤中作用差,可能是因为这些缓冲液中的磷酸根引起了更多的 CaCl₂ 从转染培养基中沉淀出来。

[0244] 然后,任选地进行共培养程序。在转染后 48-72 小时,将转染细胞刮入培养基,将细胞和培养基转移到含有 50% 铺满的单层 Vero 细胞的 T25 培养瓶中收集细胞。开始此共培养后 6 小时,用 4 毫升 MEM+FBS 替换旧培养基。然后,孵育培养物 5 天。如果在此孵育期间培养基开始显示耗尽的迹象,就去除 2 毫升培养基并用新鲜的 MEM+FBS 替换。为了保存在拯救期间在培养基中可能存在的小量病毒,不推荐替换所有培养基。在这个共培养期间,CPE 可能变得明显,但不会如此。如果没有明显的 CPE,则可继续拯救。

[0245] 开始共培养后 5 天,收集细胞。首先,将 0.5 毫升的 2.18M 蔗糖,37.6mM 的 KH₂PO₄,71.0mM K₂HPO₄,49.0mM 谷氨酸钠溶液加入培养基,摇动培养瓶混合之。然后将细胞刮入培养基中,用移液器上下吹打以混合,然后分成等份加入运输的冷冻管中,然后在干冰/乙醇浴中快速冷冻,储存于 -80℃。

[0246] 实施例 II

[0247] 拯救副粘病毒的通用磷酸钙转染方法

[0248] 下述另一种转染方法采用的磷酸钙转染操作程序是根据 Chen 和 Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752, 1987 的方法,引入本文作为参考。

[0249] 示例性 DNA：

[0250] 1. 全长病毒基因组 cDNA 克隆含有与正义链的 5'端融合的 T7 启动子和与 3'端融合的核酶。

[0251] 2. 蛋白表达质粒,受 T7RNA 聚合酶启动子控制,编码核衣壳蛋白 (N 或 NP),磷蛋白 (P) 和聚合酶蛋白 (L)。

[0252] 3. 编码在人巨细胞病毒立即早期转录控制区控制下的 T7RNA 聚合酶蛋白的质粒。

[0253] 示例性磷酸钙转染试剂：

[0254] 1. 2X BES- 缓冲盐水 :50mM BES(pH 6.95-6.98),280 mM NaCl,1.5mM Na₂HPO₄。
2. 2.5 M CaCl₂。

[0255] 3. Hepes- 缓冲盐水洗涤溶液 (HBS)

[0256] 示例性操作程序：

[0257] 1. 在六孔板中用含 10%胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 培养 HEp2、Vero 或其它合适细胞系,至细胞密度约 50-75%铺满。

[0258] 2. 转染前 1-2 小时,向待转染各孔加入 4.5 毫升含 10%胎牛血清 (FBS) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM)。

[0259] 3. 在 3% CO₂ 的 32℃培养箱中孵育细胞。

[0260] 4. 如下所述制备磷酸钙 -DNA 转染混合物：

[0261] 5. 在 5 毫升聚丙烯管中混合以下 DNA :400 纳克 T7-N、300 纳克 T7-P、100 纳克 T7 L 和 5 微克病毒基因组 cDNA 克隆、5 微克 hCMV-T7 瞬时表达载体 (如 pCl-Neo-Bcl-T7 质粒)。对于 RSV 拯救而言,还包括 100 纳克 T7-M2 (聚合酶延伸因子) 表达质粒。

[0262] 6. 用水将体积调整到 225 微升。

[0263] 7. 加入 25 微升 2.5M CaCl₂。

[0264] 8. 在温和涡旋振荡该小管的同时,加入 250 微升的 2×BBS,然后让该管在室温下静置 15-20 分钟。

[0265] *注意,可能需要优化各质粒 DNA 的量以实现拯救。此外,虽然实施例 I 和 II 的磷酸钙转染方法在本发明中可广泛使用,但是也可成功地采用其它转染方法。

[0266] 9. 从培养箱中取出细胞,在温和涡旋振荡培养基的同时,将磷酸钙 -DNA 混合物缓慢地加入培养基。立即将细胞放回 32℃ -3% CO₂ 培养箱。

[0267] 10. 开始转染实验后 3 小时,将培养皿密封在塑料袋中,完全浸没在 44℃的水浴中 3 小时,以诱导细胞热激反应。该任选的热激步骤常能提高拯救结果。然而,不同细胞类型对不同有效热激温度 (例如,在约 40-45℃的范围内) 或不同有效热激时间 (例如,约 30 分钟 -3 小时的范围内) 均由较好反应。

[0268] 11. 热激后,将细胞放回 32℃ -3% CO₂ 培养箱,继续孵育过夜。

[0269] 12. 第二天,用 HBS 洗涤细胞 2 次,给予细胞 2 毫升补充有 10% FBS 的 DMEM 或最低必需培养基 (MEM)。

[0270] 在此阶段,该方法对于需要用胰蛋白酶来促进病毒播散的一些 PIV 毒株是不同的。在 48 小时时,用 PBS 洗涤细胞以去除残留的血清,用每毫升含有约 0.5 微克胰蛋白酶的无血清培养基替换旧培养基。

[0271] 13. 开始转染后 48 小时,用足够的 Vero 细胞接种 10 厘米² 板,以在第二天产生

50%铺满的(细胞)单层(开始转染后72小时)。为各转染培养物准备一个10厘米²板。

[0272] 14. 转染后72小时,将转染细胞刮入培养基中,将细胞和培养基转移到前一天准备好的10厘米²板中。这就开始了在10厘米²板中共培养转染细胞和单层(细胞)。将该板在5% CO₂的37℃培养箱中孵育;对温度敏感型突变病毒采用适当的较低温度。

[0273] 15. 4-6小时后,用补充有10% FBS的新鲜DMEM替换旧培养基。

[0274] 16. 监测细胞5-7天,以检测出现的细胞病变效应。

[0275] 实施例 III

[0276] 在 Vero 细胞中拯救麻疹病毒 (MV)

[0277] 用上述实施例 I 中所述的示例性转染方法在 Vero 细胞中拯救麻疹病毒。T7 来源是质粒 pSC6-T7(无 MVA) 或 MVA/T7(Wyatt 等,1995)。结果表明成功拯救了许多 MV(+),见下表 3 所示(A-F 列表示在不同日期进行的不同拯救实验,各实验由多重转染表示-实验 E 和 F 中有多达 12 个单独转染(孔))。

[0278] 表 3

[0279] 用质粒 -T7 或 MVA/T7 拯救麻疹病毒

[0280]

孔	实验						T7 来源
	A	B	C	D	E	F	
1	+	+	-	-	-	+	MVA/T7
2	-	+	-	-	+	+	MVA/T7
3	+	-	-	+	-	+	MVA/T7
4	-	-	-	-	-	+	MVA/T7
5	+	+	-	-	-	+	MVA/T7
6	-	+	-	-	-	-	MVA/T7
7					-	+	pSC6-T7
8					+	+	pSC6-T7
9					-	+	pSC6-T7
10					-	+	pSC6-T7
11					-	+	pSC6-T7
12					-	+	pSC6-T7

[0281] 实施例 IV

[0282] 用不同来源的聚合酶拯救麻疹病毒 (MV)

[0283] 本实施例证明根据本文方法的瞬时 T7 聚合酶表达载体提供了足够的 T7RNA 聚合酶表达水平,以支持病毒拯救。用上述实施例 I 的方法转染细胞。当用 T7RNA 聚合酶表达质粒进行拯救时,将 DNA 与病毒特异性质粒共转染。当用 MVA-T7(Wyatt 等,Virology 210: 202-5,1995) 感染提供 T7RNA 聚合酶时,在转染的同时将病毒以感染复数 2 加入培养基进

行感染。Billeter 等曾描述过用于此实验的 T7 表达质粒 (pSC6-T7), (Radelce 等, EMBO J. 14 :5773-5784, 1995)。它含有在 hCMV 转录控制区控制下的 T7RNA 聚合酶基因。将瞬时表达质粒 pCI-Neo-Bcl-T7 (SEQ ID NO :1 ;图 2) 用于本文所列的所有后续病毒拯救步骤中。本实施例所用的病毒基因组克隆是含有与麻疹病毒 Edmonston 实验室毒株相应的 cDNA 序列的 p(+)MV (Radecke 等, EMBO J. 14 :5773-5784, 1995)。

[0284] 下表 4 中显示了拯救麻疹病毒的阳性结果。

[0285] 表 4

[0286] 用质粒 T7 或 MVA/T7 拯救麻疹病毒

[0287]	实验	转染孔	产生麻疹病毒的孔	T7RNA 聚合酶表达的来源
	#1	6	1	MVA-T7
		6	1	pSC6-T7
	#2	6	5	MVA-T7
		6	6	pSC6-T7

[0288] 实施例 V

[0289] 拯救重组副流感病毒 (PIV)

[0290] 用上述实施例 I 中所述的 T7 质粒拯救系统在 Vero 细胞中拯救嵌合性牛 - 人 PIV-3 (HBPIV3) 毒株。此示例性 PIV 克隆含有人 PIV-3 的 F 和 HN 基因, 作为牛 PIV-3 载体或骨架中的取代物。如标准的血凝 (fHAD) 试验所测定, 五个独立拯救样品中五个均是阳性, fHAD 试验是将感染细胞与豚鼠红细胞 (RBC) 一起孵育来测定重组病毒的存在。通过跨 M/F 基因连接区的标准 RT-PCR 进一步证实了此结果, 证实该重组病毒是预计的人 - 牛杂交病毒。为进行 RT-PCR 培养了 2 代病毒贮存物。该贮存物在 Vero 细胞中的滴度是 $5-10 \times 10^7$ pfu/毫升。

[0291] 除 HBPIV3 嵌合性病毒外, 根据本发明方法拯救了几种其它重组 PIV 构建物, 见下表 5 中所作的部分小结。在一个示例性实施方式中, 从五个转染的 Vero 细胞培养物中拯救了减毒的嵌合性重组 PIV 毒株 PIV3cp45 (3-1) (含有 HPIV3 cp45 的冷传代突变和取代相应 PIV3 基因的 PIV 1 的 F 和 G 糖蛋白基因), 然后用该病毒感染新鲜的单层细胞。病毒吸附后, 将细胞维持在每毫升含 0.5 微克胰蛋白酶的无血清培养基中五天。然后对感染的培养物进行血凝试验, 感染了重组 PIV 的细胞能吸附 RBC 证实了阳性拯救结果。

[0292] 表 5

[0293]

病毒	描述
PIV3cp45-456	含有 L 基因中的减毒突变和负责冷传代表型的突变的 PIV3
PIV3cp45 (3-1)	含有冷传代突变和取代相应 PIV3 基因的 PIV1 糖蛋白基因的 PIV3
PIV3-2CT	含有嵌合性 PIV2 糖蛋白基因的 PIV3。PIV3 序列编码胞质结构域,跨膜和胞外结构域来自 PIV2
HBPIV3	含有取代同源牛基因的 hPIV3 糖蛋白基因的牛 PIV

[0294] 在另一示例性实施方式中,回收 HPIV3-HPIV-2 嵌合性构建物,它含有与上述 HPIV3 胞质结构域融合的 HPIV2 F 和 HN 跨膜域和胞外结构域的嵌合性糖蛋白(称为 PIV3-2CT)。从 Vero 细胞中回收此嵌合性构建物,用 RT-PCR 和后续限制性位点分析确认了该重组病毒的身份。

[0295] 用本发明方法回收的其它 PIV 重组病毒包括称为“航运热”(SF)的 BPIV 毒株(Reisinger 等,J. Am. Vet. Med. Assoc. 135 :147-152,1959,引入本文作为参考)和含有 L 基因中的减毒突变和负责冷传代表型的突变的重组 HPIV,称为 PIV3cp45-456。在 Vero 细胞中拯救这二种病毒,通过 RT-PCR 和测序确认它们的身份。PIV3cp45-456 在 HN 基因中含有两个从前述在 HN 中含有两个引入突变的 PIV3cp45 重组病毒校正的突变,因此背离了生物学方法产生的 cp45 突变体的序列。PIV3cp45-456 克隆纠正了残基 263 上取代的异亮氨酸和残基 370 上取代的苏氨酸这两个突变,使其回复到生物学方法产生的分别编码苏氨酸和脯氨酸的基因型。

[0296] 实施例 VI

[0297] 在 293 细胞中拯救水泡性口炎病毒

[0298] 本发明的瞬时 RNA 聚合酶载体系统的精妙处在于能拯救用于免疫原性组合物中的所有重组负链 RNA 病毒。在以下实施例中,为回收水泡性口炎病毒(VSV)和相关的 VSV 载体毒株优化该技术。虽然大多数 VSV 毒株在广泛细胞系中非常有效地复制,但迄今,证明回收重组 VSV 是非常困难的。文献中描述的 VSV 拯救方法特地采用 BHK 细胞系和牛痘病毒/T7 辅助病毒,但对于人类临床应用产生免疫原性组合物所用的方法而言,这二者都不理想。

[0299] 从合格的 Vero 细胞中拯救重组 VSV 的尝试开始时采用组合的热激/质粒 T7 拯救方案(如上述拯救副流感病毒和麻疹病毒的方案)并不成功。认为该系统的限制因素之一是转染效率差,尤其是与 Vero 细胞相关的转染效率低下。热激/质粒 T7 拯救系统这两种不同的修饰解决了这个问题。在一种修饰中,磷酸钙转染/热激方法大部分未作改变,但采用了不同类型的宿主细胞。或者,用不同转染方法来优化 Vero 细胞拯救系统(参见实施例 VII)。

[0300] 简要说,采用上述基本的热激/质粒 T7 系统,根据以下修订的操作程序实现了从 293 细胞中成功拯救 VSV。

[0301] 试剂

[0302] 质粒 DNA :

[0303] 1. 全长病毒基因组 cDNA

[0304] 2. pT7-N

- [0305] 3. pT7-P
- [0306] 4. pT7-L
- [0307] 5. pT7-M
- [0308] 6. pT7-G
- [0309] 7. pCI-Neo-bcl-T7 (p0061)
- [0310] 磷酸钙转染试剂：
- [0311] 1. 2X BES- 缓冲盐水：50mM BES (pH 6.95-6.98)，280mM NaCl，1.5mM Na₂HPO₄。
- [0312] 2. 2.5 M CaCl₂。
- [0313] 3. HEPES- 缓冲盐水洗涤溶液 (HBS)：20mM hepes (pH7.0-7.5)，140mM KCl，1mMMgCl₂。
- [0314] 细胞培养溶液：
- [0315] 1. 补充有 10% 合格的热灭活 FBS 的 DMEM (DMEM/FBS)。
- [0316] 2. 补充有 10% 合格的热灭活 FBS 的 Iscoves 改良的最低必需培养基 (IMEM) (IMEM/FBS)。
- [0317] 3. 聚 L- 赖氨酸：0.01% 溶于 H₂O。
- [0318] 4. PBS。
- [0319] 5. 猪胰蛋白酶 /EDTA。
- [0320] 步骤
- [0321] 293 细胞培养：
- [0322] 293 细胞难于培养，有许多不同方法处理它们。本方法已成功用作 VSV 和修饰的 VSV 载体构建物拯救系统的一部分。
- [0323] 常规传代培养：
- [0324] 1. 去除培养基并用 5 毫升温热的 PBS 洗涤铺满的单层（细胞）（10 厘米板）；用移液器沿培养皿侧面温和地加入，以防止细胞脱离（293 细胞在室温下太长时间，或在变为碱性（红色）的培养基中会脱离）培养板。
- [0325] 2. 温和地加入 2 毫升胰蛋白酶，摇动板使其覆盖整个单层（细胞）。吸弃胰蛋白酶，让培养板在室温下静置约 1 分钟。将板倾斜到 45 度角，在通风柜的工作面上拍打板，以使细胞脱离。如果细胞不脱离，在室温下再孵育 1 分钟（在这个阶段确保细胞脱离，从而可避免用移液器剧烈吹打）。
- [0326] 3. 温和地加入 5 毫升 DMEM/FBS，用移液器缓慢地上下吹打，以分散细胞。
- [0327] 4. 将 1 毫升细胞加入含有 9 毫升 DMEM/FBS 的板中。
- [0328] 5. 在 37℃，5% CO₂ 中孵育。
- [0329] 转染传代培养：
- [0330] 1. 用聚-L 赖氨酸包被所需数量的板。每板加入约 3-4 毫升 0.001% 的聚-L 赖氨酸，使板室温静置至少 30 分钟。吸弃聚-L 赖氨酸溶液。用 5 毫升培养基冲洗该板。
- [0331] 2. 如上所述用胰蛋白酶消化细胞。采用在第二天产生 50-75% 铺满的板以（1：3 至 1：6）比例分瓶。
- [0332] 3. 使细胞脱离后，加入 IMEM/FBS，将细胞转移到含有 9 毫升 IMEM/FBS 的包被板中。转染前将细胞分瓶，在 IMEM/FBS 中培养过夜似乎是重要的。

[0333] 4. 在 37℃, 5% CO₂ 中孵育。

[0334] 转染：

[0335] 1. 转染前 1-3 小时, 给予细胞 9 毫升 IMEM/FBS, 将细胞在 3% CO₂ 的 32℃ 培养箱中培养。

[0336] 2. 磷酸钙 -DNA 转染混合物的制备如下：

[0337] a. 在 5 毫升聚丙烯管中混合以下 DNA：

[0338] i. 8 微克 T7-N

[0339] ii. 4 微克 T7-P

[0340] iii. 1.2 微克 T7 L

[0341] iv. 1.0 微克 T7-M

[0342] v. 1.0 微克 T7-G

[0343] vi. 10 微克病毒基因组 cDNA 克隆。

[0344] vii. 10 微克 hCMV-T7 表达载体。

[0345] b. 用水调整体积至终体积为 450 微升。

[0346] c. 加入 50 微升 2.5M CaCl₂。

[0347] d. 在温和涡旋振荡该小管的同时, 加入 500 微升 2×BBS, 然后让该小管在 室温下静置 15-20 分钟。

[0348] 3. 从培养箱中取出细胞, 将磷酸钙 -DNA 混合物缓慢加入培养基中, 温和涡旋使沉淀分散。立即将细胞放回 32℃ -3% CO₂ 培养箱。

[0349] 4. 开始转染实验后 3 小时, 将培养皿密封在塑料袋中, 完全浸没在 43℃ 的水浴中 2 小时, 诱导细胞热激反应。

[0350] 5. 热激后, 将细胞放回 32℃ -3% CO₂ 培养箱, 继续孵育过夜。

[0351] 6. 第二天, 用 HBS 洗涤细胞 2 次, 给予细胞 10 毫升 IMEM/FBS。在 37℃, 5% CO₂ 中孵育。

[0352] 7. 在开始转染后 48-72 小时, 为将转染细胞转移到较大容器中, 准备足够的含有 20 毫升 DMEM/FBS 的 T150 培养瓶。一个 T150 培养瓶用于一个 10 厘米板的转染。

[0353] 8. 用移液器温和吹打单层 (细胞) 上的培养液使其从细胞面分离, 转移转染的 293 细胞。避免剧烈吹打, 用恰好足够的力量分离细胞。细胞分离后, 用移液器上下吹打约 5 次减小细胞团大小, 然后将培养基和细胞转移到含有 20 毫升 IMEM/FBS 的 T150 培养瓶中。

[0354] 9. 4-6 小时后, 用补充有 10% FBS 的新鲜 DMEM 替换旧培养基 (注意, 如果细胞没有贴附到板上, 可推迟此步骤到 24 小时。也可成功地跳过该步骤)。

[0355] 10. 监测细胞 5-7 天, 以检测出现的细胞病变效应。

[0356] 11. 当明显出现 CPE 时, 将 50 微升培养基上清转移到含有培养基和已建立了单层 Vero 细胞的六孔板孔中。如果发生拯救, 第二天就可观察到 CPE。(注意, 此步骤重要, 因为 293 细胞有时会从 T150 培养瓶的表面脱离, 从而当它们实际上并未被感染时看起来被 VSV 感染)。

[0357] 12. 将小样品转移到单层 Vero 细胞后, 收集 T150 培养瓶中的细胞和培养基并 -70℃ 冷冻。通常用移液器吹打单层 (细胞) 上的培养基使细胞脱离, 收集 293 细胞。

[0358] 用上述修订的操作程序, 从 293 细胞中回收各种重组 VSV 构建物。在本文中成功

回收的 VSV 构建物包括本文所述基础 VSV 载体骨架构建物,和含有 HIV 包膜基因或 HIV gag 基因的两种修饰的 VSV 载体。因此,显然本发明的瞬时 RNA 聚合酶载体系统在不同细胞类型中能适应一定范围的不同重组病毒,包括经大量修饰的(如减毒和载体)构建物。具体说,显然 293 细胞可支持 VSV 的拯救而改进的转染效率对在其它细胞(如 Vero 细胞)中实现 VSV 拯救可能很重要。

[0359] 值得注意,用进一步修饰的方法,包括加入编码所选病毒结构基因的表达质粒进行了其它 VSV 和麻疹病毒的拯救实验。对 VSV 拯救而言,将表达 G 和 M 基因的质粒共转染入宿主细胞(如在以上的修饰方案中所述)。对 MV 拯救而言,转染混合物补充有编码 M、F 和 H 的质粒。因此认为,本发明的任何一种非节段性负链 RNA 病毒的拯救可任选地包括共引入和 / 或共表达结构蛋白,包括相同病毒或异源病毒、亚型或毒株的蛋白的任何一种或任何组合。

[0360] 实施例 VII

[0361] 通过替代的电穿孔 - 介导的转染在 Vero 细胞中拯救水泡性口炎病毒

[0362] 为进一步评价转染效率在本发明的瞬时 RNA 聚合酶表达系统中的作用,研究了电穿孔作为磷酸钙转染 Vero 细胞的替代方法。确定了电穿孔 Vero 细胞的条件,然后将其加入改良的热激 / 质粒 -T7 拯救方案中,详述如下。

[0363] DNA 制备:

[0364] 1. 对各电穿孔而言,在微量离心管中混合下述质粒 DNA:

[0365] 50 微克表达 T7 的质粒 (pCI-Neo-Bcl-T7)。

[0366] 0 微克 VSV 全长质粒。

[0367] 8 微克 N 质粒。

[0368] 4 微克 P 质粒。

[0369] 1 微克 L 质粒。

[0370] 1 微克 M 质粒 (VSV)。

[0371] 1 微克 G 质粒 (VSV)。

[0372] 同时制备荧光素酶转染对照的 DNA:

[0373] 50 微克 (pCI-Neo-Bcl-T7)。

[0374] 5 微克 T7- 荧光素酶质粒。

[0375] a) 在生物安全柜工作条件下,用无菌、无核酸酶的水将 DNA 体积调整到 250 微升。

[0376] b) 加入 50 微升 3M 乙酸钠 (pH 5)。

[0377] c) 加入 750 微升 100% 乙醇,并混合。

[0378] d) 在 -20℃ 孵育 1 小时至过夜

[0379] e) 在微量离心管中,14,000rpm、4℃、离心 20 分钟沉淀 DNA

[0380] f) 在生物安全柜工作条件下,弃去上清,不要搅动沉淀。

[0381] g) 快速离心该管,收集管底残留的乙醇,用移液器去除

[0382] h) 让沉淀在空气中干燥(在生物安全柜中)5-10 分钟。

[0383] i) 用 50 微升无菌、无核酸酶的水重悬沉淀。

[0384] 溶液:

[0385] 胰蛋白酶 /EDTA

[0386] Hank 氏缓冲盐水

[0387] 用 PBS 制备 1 毫克 / 毫升大豆胰蛋白酶抑制剂

[0388] 培养基组分 (见下)

[0389] 培养基

[0390]

培养基 1	培养基 2	培养基 3
Dulbecco 改良的最低必需培养基 (DMEM)	Iscove 改良的 Dulbecco 培养基 (IMDM)	Dulbecco 改良的最低必需培养基 (DMEM)
10% 热灭活的胎牛血清	220 μ M 2- 巯基乙醇 (组织培养级)	10% 热灭活的胎牛血清
220 μ M 2- 巯基乙醇 (组织培养级)	1% DMSO (组织培养级)	220 μ M 2- 巯基乙醇 (组织培养级)
1% 非必需氨基酸 (10mM 溶液)	1% 非必需氨基酸 (10mM 溶液)	1% 非必需氨基酸 (10mM 溶液)
1% 丙酮酸钠 (100mM 溶液)	1% 丙酮酸钠 (100mM 溶液)	1% 丙酮酸钠 (100mM 溶液)
		50 微克 / 毫升庆大霉素

[0391] 制备 Vero 细胞:

[0392] 每次电穿孔需要约 1.3 个几乎铺满细胞的 T150 培养瓶。

[0393] 1. 用约 5 毫升 Hank 氏缓冲盐溶液洗涤单层细胞 1 次。

[0394] 2. 加入 4 毫升胰蛋白酶 /EDTA, 摇动培养瓶以均匀分布该溶液。

[0395] 3. 室温孵育 3-5 分钟。

[0396] 4. 吸干胰蛋白酶溶液。

[0397] 5. 拍打培养瓶侧面以分离细胞。

[0398] 6. 用 10 毫升培养基 #1 从培养瓶中收集细胞, 将细胞转移到 50 毫升圆锥管中。

[0399] 7. 加入 1 毫升胰蛋白酶抑制剂 (1 毫克 / 毫升), 并温和地混合。

[0400] 8. 用台式离心机室温 1000rpm 离心细胞 5 分钟。

[0401] 9. 吸干上清。

[0402] 10. 将细胞重悬于 10 毫升培养基 2 中。

[0403] 11. 加入 1 毫升胰蛋白酶抑制剂温和地混合。

[0404] 12. 如上所述用台式离心机室温 1000rpm 离心收集细胞。

[0405] 13. 吸干培养基。

[0406] 14. 将细胞重悬于培养基 2 中。温和地重悬, 最终体积相当于每次电穿孔 0.8 毫升 (考虑到细胞沉淀会占据一定体积)。

[0407] 15. 将 0.8 毫升细胞悬液转移到含有质粒 DNA 溶液的离心管中。用装有 p1000 吸头的移液器温和地上下吹打, 混合细胞和 DNA。转移到电穿孔仪台上。

[0408] 电穿孔:

[0409] BTX 820 方波电穿孔仪

[0410] 1. 用移液器上下吹打细胞 /DNA 3 次以温和地混合, 转移到电穿孔小杯中。

[0411] 2. 将小杯插入电穿孔架。

[0412] 3. 电穿孔细胞 (4 个脉冲, 70 毫秒, 140 伏)。

[0413] 4. 电穿孔所有样品后, 将小杯放回生物安全柜中, 加入 1 毫升培养基 1。用无菌塑料转移移液管将细胞从小杯中转移到含有 10 毫升培养基 1 的 15 毫升离心管中。

[0414] 5. 温和地混合, 如上所述离心收集细胞。

[0415] 6. 吸干培养基。

[0416] 7. 将细胞重悬于 10 毫升培养基 1 中, 将悬液转移到含有 25 毫升培养基 1 的 T150 培养瓶中。

[0417] 8. 37°C (5% CO₂) 孵育细胞 3 小时。

[0418] 9. 43°C (3-5% CO₂) 热激细胞 3 小时。

[0419] 10. 将细胞放回 37°C 2 小时。

[0420] 11. 用 30 毫升培养基 3 替换旧培养基, 继续在 37°C 孵育。

[0421] 12. 每天检查细胞有无细胞病变效应迹象。早至 3-4 天应出现 VSV 复制, 但可能更长达 6 天。

[0422] 按照上述电穿孔 / 热激 / T7 质粒步骤, 从 Vero 细胞中成功回收了所有的重组 VSV、MV 和 PIV。值得注意的是, 采用含有据报道能降低提前终止的一个氨基酸取代 (MacDonald 等, J. Mol. Biol. 238 :145-158, 1994, 引入本文作为参考) 的修饰的 PC1-Neo-Bcl-T7 质粒进行了几次成功的 VSV 拯救。

[0423] 实施例 VIII

[0424] 在 Vero 细胞中拯救呼吸道合胞病毒

[0425] 本实施例说明, 用本发明的瞬时 RNA 聚合酶载体系统 (例如上述实施例 II 所列改良的磷酸钙 / 热激方法) 成功回收了被拯救的五十个不同重组 RSV 株。表 6 说明了此法回收的重组 RSV 候选病毒的各种组装: 包括通过掺入生物学方法产生的 RSV 突变株的一种或多种减毒突变修饰的 RSV 重组病毒; 通过部分或全部缺失一种或多种基因或基因组节段 (如 SH、NS1、NS2、M2-2) 或者敲除一种或多种基因或损伤其表达的其它修饰而修饰的 RSV; RSV-RSV 嵌合性构建物 (如以其中含有 RSV B 糖蛋白取代为背景的 RSV A2 毒株); 含有一种或多种基因插入物的 RSV; 和含有相对于野生型 RSV 基因图中相应基因位置发生位置改变的一种或多种基因 (即“基因改组”) 的 RSV 重组物。表 6 中鉴定的被拯救毒株主要包括 RSV A2 毒株的变体和衍生物, 但用本发明方法和组合物也成功地回收了一个 RSV B1 毒株。在表 6 中所列回收的 RSV 重组物中, 回收了各种减毒、多重减毒和嵌合性病毒, 以及含有一种或多种基因缺失的 RSV 重组物, 上述内容和上述引入的参考文献中描述了所有这些情况。

[0426] 表 6

[0427] RSV 拯救的 cDNA 克隆

[0428]

	WV cDNA 构建物/病毒 (描述)	拯救的		确认的 病毒序列 †
		MVA 方法*	质粒 方法	
1	rA2cp Δ SH M2/404 L248/404 (A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 248 和 404 突变)	是	是	-
2	rA2cp Δ SH M2/404 L248/1030 (A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 248 和 1030 突变)	-	是	-
3	rA2cp Δ SH M2/404 L1030 (A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 1030 突变)	-	是	-

[0429]

4	rA2cp Δ SH M2/404(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变)	-	是	-
5	rA2cp Δ SH M2/404 L248(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 248 突变)	-	是	-
6	rA2cp Δ SH(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失)	-	是	-
7	rA2cp Δ SH L248(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 248 突变)	-	是	-
8	rA2cp Δ SH L404(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 404 突变)	-	是	-
9	rA2cp Δ SH L248/1030(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 248 和 1030 突变)	-	是	-
10	rA2cp Δ SH L1030(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 1030 突变)	-	是	-
11	rA2cp Δ SH L/248/404(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 248 和 404 突变)	-	是	-
12	rA2cp Δ SH L/404/1030(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 404 和 1030 突变)	-	是	-
13	rA2cp M2/404 L248/404/1030(A2 骨架, cp 突变, M2 基因中 404 突变, L 基因中 248、404 和 1030 突变)	是	是	-
14	rA2cp Δ SH/404/M2/L248(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 248 突变)	-	是	-
15	rA2cp Δ SH M2/404 L404(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 404 突变)	-	是	-
16	rA2cp Δ SH M2/404 L404/1030(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404 突变, L 基因中 404 和 1030 突变)	-	是	-
17	rA2cp Δ SH L248/404/1030(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, L 基因中 248、404 和 1030 突变)	-	是	是
18	rA2cp Δ SHcpFstb L248/404/1030(A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, 稳定化 F 中的 cp 突变, L 基因中 248、404 和 1030 突变)	是	是	是

[0430]

19	rA2cp M2/404 L530/1009 (A2 骨架, cp 突变, SH 基因缺失, M2 基因中 404, L 基因中 530 和 1009 突变)	是	是	-
20	rA2cp Δ NS2 M2/404 L530/1009 (A2 骨架, cp 突变, NS2 基因缺失, M2 基因中 404, L 基因中 530 和 1009 突变)	-	是	-
21	rA2cp Δ NS2 M2/404 L248/404 (A2 骨架, cp 突变, NS2 基因缺失, M2 基因中 404, L 基因中 248 和 404 突变)	是	是	-
22	rA2cp Δ NS2 530/1009 (A2 骨架, cp 突变, NS2 基因缺失, L 基因中 530 和 1009 突变)	是	是	-
23	rA2cp L530/1009/955 M2/404 (A2 骨架, cp 突变, M2 基因中 404, L 基因中 530、1009 和 955 突变)	-	是	是
24	rA2cp Δ NS2 L530/1009/955 (A2 骨架, cp 突变, NS2 基因缺失, L 基因中 530、1009 和 955 突变)	-	是	-
25	rA2cp 530/1009/955 (A2 骨架, cp 突变, L 基因中 530、1009 和 955 突变)	是	是	是
26	rA2cp Δ NS1 (A2 骨架, cp 突变, NS1 基因缺失)	-	是	是
27	rA2cp Δ NS2 (A2 骨架, cp 突变, NS2 基因缺失)	是	是	是
28	rA2wt Δ NS1 (A2 骨架, NS1 基因缺失)	-	是	是
29	rA2cp Δ NS1 Δ NS2 (A2 骨架, cp 突变, NS1 基因缺失, NS2 基因缺失)	-	是	-
30	rA2 Δ M2/2 (A2 骨架, M2-2 ORF 缺失)	-	是	是
31	rA2wt Δ NS2 (A2 骨架, NS2 基因缺失)	-	是	是
32	rA2wt (基于 RSV A2 毒株的骨架)	-	是	是
33	rA2cpNPM (A2 骨架, cp 突变, N 基因插入第 3 位置, P 插入第 4 位置, M 基因插入第 5 位置—wt 顺序)	-	是	是
34	rA2cpPNM (A2 骨架, cp 突变, P 基因插入第 3 位置, N 插入第 4 位置, M 基因插入第 5 位置)	-	是	是
35	rA2cpPMN (A2 骨架, cp 突变, P 基因插入第 3 位置, M 插入第 4 位置, N 基因插入第 5 位置)	-	是	是
36	rB1 (基于 RSV B1 毒株的骨架)	-	是	是
37	rB1 Δ NS1 (B1 骨架, NS1 基因缺失)	-	是	是

[0431]

38	rB1t Δ NS2 (B1 骨架, NS2 基因缺失)	-	是	是
39	rA2 B1M/G (A2 骨架, 用 B1 的 M、SH 和 G 基因取代 M、SH 和 G 基因)	-	是	-
40	rA2 Δ NS1 B1M/G (A2 骨架, 用 B1 的 M、SH 和 G 基因取代 M、SH 和 G 基因, NS1 基因缺失)	-	是	-
41	rA2 Δ NS2 B1M/G (A2 骨架, 用 B1 的 M、SH 和 G 基因取代 M、SH 和 G 基因, NS2 基因缺失)	-	是	-
42	rA2 Δ NS1 Δ NS2 B1M/G (A2 骨架, 用 B1 的 M、SH 和 G 基因取代 M、SH 和 G 基因, NS1 和 NS2 基因缺失)	-	是	是
43	rA2cpG (B ORF) 248/404/1030 (A2 骨架, cp 突变, M2 基因中 404 突变, L 基因中 248、404 和 1030 突变, 用亚组 B(V9511)G ORF 取代 A2 G ORF)	-	是	-
44	rABcp 530/1009/955 V9511GF (A2 骨架, cp 突变, L 基因中 530、1009 和 955 突变, 分别用亚组 B(V9511)G 和 F ORF 取代 A2 G 和 F ORF)	-	是	是
45	rABwt Δ NS1 V9511GF (A2 骨架, NS1 基因缺失, 分别用亚组 B(V9511)G 和 F ORF 取代 A2 G 和 F ORF)	-	是	-
46	rABwt Δ NS2 V9511GF (A2 骨架, NS2 基因缺失, 分别用亚组 B(V9511)G 和 F ORF 取代 A2 G 和 F ORF)	-	是	-
47	rA2cpG Δ 第 1 AUG (A2 骨架, cp 突变, G ORF 的第 1 个起始密码子缺失)	-	是	是
48	rA2cpG Δ 第 2 AUG (A2 骨架, cp 突变, G ORF 的第 2 个起始密码子缺失)	-	是	是
49	rA2cpG4CtoR (A2 骨架, cp 突变, G ORF 中的 4 个半胱氨酸残基改变为丙氨酸)	-	是	-
50	rA2cpG1F2 530/1009/955 (A2 骨架, cp 突变, L 基因中 530、1009 和 955 突变, G 基因易位到基因组的第一个位置, F 基因易位到基因组的第二个位置)	-	是	是

[0432] *MVA 方法拯救的所有病毒的序列是正确的。

[0433] † 仅指质粒拯救的构建物

[0434] 实施例 IX

[0435] 通过质粒 T7/ 电穿孔 / 热激方法拯救其它负链病毒

[0436] 本实施例描述,通过上述实施例 VII 中所述改进的质粒 T7/ 电穿孔 / 热激系统成功回收了其它负链 RNA 病毒。本文中还应应用此改进的回收方法产生了大量其它减毒的重组 VSV(rVSV) 株,以及经修饰编码异源抗原的各种 rVSV 和 bPIV 载体。除 rVSV 之外,也用质粒 T7/ 电穿孔 / 热激方法从 Vero 细胞中拯救各种其它示例性重组负链 RNA 病毒(见下表 7)。如上对 rVSV 的描述,在这些示例性实施方式中,电穿孔 DNA 的组合物任选地包括编码除 CMV-T7、基因组 cDNA、N、P 和 L 之外的基质蛋白和病毒糖蛋白的质粒。当回收被证明难以拯救的病毒时,任选地加入编码该基质蛋白和糖蛋白的质粒可提供显著的优点。如以上进一步讨论的,本发明的这些(电穿孔)方法和组合物中也可任选地包括编码一种或多种其它结构蛋白(如 RSV 的 M、SH、NS1、NS2、F 和 / 或 G,以及 PIV 的 M、HN 和 / 或 F)的质粒。

[0437] 表 7 通过质粒 T7/ 电穿孔 / 热激方法回收的其它负链 RNA 病毒

[0438]

	重组病毒	用于拯救的支持质粒
1	犬瘟热病毒 (Onderstepoort 株)	N、P、L、M、F、H
2	腮腺炎病毒 (Jeryl Lynn 株)	NP、P、L
3	麻疹病毒 (Edmonston Rubeovax 株)	N、P、L、M、F、H
4	呼吸道合胞病毒 • rA2cp Δ SH/M2-404/L248-404	N、P、L、M2
5	牛 PIV(航运热株)	N、P、L
6	牛-人杂交 PIV(bPIV SF 株的 F 和 HN 基因被 hPIV3 同源物取代) 除 h/bPIV 嵌合性病毒外,还分离到含有 RSV A 或 RSV B 基因的三个毒株 • h/bPIV-Ga1 • h/bPIV-Fa1 • h/bPIV3-Fb1	N、P、L RSV-A2, G 基因在位置 1 RSV-A2, F 基因在位置 1 RSV-B, F 基因在位置 1

[0439] 关于 rVSV,已用质粒 T7/ 电穿孔 / 热激方法产生和回收了各种其它构建物。拯救了这些 rVSV 重组病毒后,在体外检查其复制速率,在预计在人体中有活性(如减毒和免疫原性)的小动物模型系统中评价相对毒力,以确定这些病毒是否减毒到足以用于本发明免疫原性组合物和方法中。

[0440] 在示例性实施方式中,产生并回收了含有编码异源抗原,如 HIV GAG 蛋白或 HSV-2 gD 糖蛋白的第六基因的许多 rVSV。证明五种普通策略可有效引入阻碍病毒复制的修饰,包括:(1) 将参与转录和 RNA 复制(如 N 基因)或病毒粒子成熟(如 M 或 G)的基因转座或‘改组’到下游位置中导致相应 mRNA 转录降低(参见,例如,Ball 等,J. Virol. 73 :4705-4712, 1999 ;Finke 等,J. Gen. Virol. 84 :1613-1621, 2003 ;和 Wertz 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :3501-3506, 1998,各自引入本文作为参考);(2) 截断病毒附着蛋白(如 G 蛋白)的胞质

尾结构域 (CT 缺失) (参见,例如,Roberts 等, J. Virol. 73 :3723-3732, 1999, 引入本文作为参考); (3) 用编码温度敏感型多肽的同源物取代载体骨架中的基因 (参见,例如, Pringle, J. Virol. 5 :559-567, 1970 ;Gallione 等, J. Virol. 54 :374-382, 1985, 各自引入本文作为参考); (4) 将突变引入编码 M 蛋白的基因中降低病毒粒子成熟率和细胞病理作用 (参见,例如, Jayakar 等, J. Virol. 76 :8011-8018, 2002, 引入本文作为参考); 和 (5) 将 CT 缺失与改组基因、ts 突变或 M 突变相组合。下表 8 列出了这些方法拯救的各种示例性减毒 rVSV 毒株。

[0441] 关于上述策略 (3), 可用在生物学方法产生的 ts 突变病毒中鉴定的突变基因取代野生型或原型基因, 容易地实现温度敏感型突变的引入。为了产生含有这种 ts 突变的示例性 rVSV 重组病毒, 将用示例性的生物方法产生的 ts 突变株 tsG11、tsG31、tsG41 或 ts045 转染的 BHK 细胞 (参见,例如, Gallione 等, J. Virol. 54 :374-382, 1985 ;Whitt 等, J. Virol. 64 :4907-4913, 1990 ;Pringle, J. Virol. 5 :559-567, 1970, 各自引入本文作为参考) 培养在许可的温度 (32°C) 中, 直到在约 75% 的培养物中出现细胞病变效应, 此时, 将细胞刮入培养基中低速离心收集。用硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿抽提得到细胞沉淀中感染细胞的总 RNA, 将纯化的 RNA 用于逆转录和 PCR 扩增, 以制备编码蛋白的序列, 然后用它取代 rVSV cDNA 克隆中的同源基因。通过将克隆的 ts 基因的序列与直接从相应的生物学方法产生的 ts 病毒的基因组 RNA 测定的序列相比, 证实为克隆的 ts 基因的序列。序列确认后, 用上述电穿孔 / 热激方法拯救编码一种或多种 ts 基因的 rVSV 毒株, 除了细胞培养在 32°C 而不是 37°C 外 (除非在热激过程中), 以产生预计的 ts 表型。电穿孔后 5-9 天, 在成功的拯救试验中出现了细胞病变效应, 此时收获新毒株用于启动噬斑纯化。3 轮噬斑纯化后, 扩增了病毒贮存液并测定了基因组序列。然后对含有所需序列的病毒在几种温度下 (32°C、37°C 和 39°C) 进行噬斑试验, 以评价插入的 ts 基因的作用。

[0442] 表 7 质粒 T7 / 电穿孔 / 热激方法回收的其它 rVSV 毒株

[0443]

改组	
rVSV-M5	M 基因改组到位置 5
rVSV-G5	G 基因改组到位置 5
rVSV-GAG1-N3-CT1	N 基因改组到位置 3, 与 CT 缺失相结合。注意 :CT1 命名中的 1 指仅含有一个氨基酸的截短的胞质结构域。不是指基因位置。
rVSV-GAG1-N4-CT1	N 基因改组到位置 4, 与 CT 缺失相结合。
ts 突变	
rVSV-tsN	用病毒 ts41 的 tsN 取代 N 基因

rVSV-GAG1-tsN	HIV-1 GAG 基因插入位置 1, 用病毒 ts41 的 tsN 取代 N 基因
rVSV-tsL	用病毒 ts1 1 的 tsL 取代 L 基因
rVSV-GAG1-tsL	HIV-1 GAG 基因插入位置 1, 用病毒 ts1 1 的 tsL 取代 L 基因
rVSV-gD-tsL	疱疹 2 型 gD 基因插入位置 1, 用病毒 ts1 1 的 tsL 取代 L 基因
rVSV-tsN+L	分别用病毒 ts41 的 tsN 和病毒 ts1 1 的 tsL 取代 N 和 L
rVSV-GAG1-tsN+L	HIV-1 GAG 基因插入位置 1, 分别用病毒 ts41 的 tsN 和病毒 ts1 1 的 tsL 取代 N 和 L
rVSV-tsG	用 ts045 的 tsG 取代 G 基因
rVSV-GAG1-tsG	HIV-1 GAG 基因插入位置 1, 用 ts045 的 tsG 取代 G 基因
rVSV-tsM	用 ts31 的 tsM 取代 M 基因
rVSV-GAG1-N4-CT9-tsL	N 基因改组到位置 4, G 蛋白的 C- 末端尾缩短到 9 个氨基酸 (CT9), HIV GAG 基因插入位置 1
非细胞病变性 M 基因突变	
rVSV-GAG1-M _{nep12} -CT1	M 中的 nep12 突变防止两个下游 ATG 密码子的翻译。用丙氨酸密码子替代甲硫氨酸密码子 (33 和 55)。

[0444] * 命名注释: VSV 基因组含有排列为 3' -N(1)-P(2)-M(3)-G(4)-L(5)-5' 的 5 个基因。除了上述的 CT 修饰外, 许多数字命名指在所述重组病毒中的最终基因位置。因此, 例如, 称为“rVSV-M5”的病毒包含改组到最后或第 5 个位置的 M 基因。从第一个基因位置具有编码 HIV GAG 的基因插入物的 rVSV-M5 的载体衍生物含有 6 个基因, 一致地称为 rVSV-GAG1-M6。表 8 中鉴定的各 VSV 重组物一开始是用 Indiana 血清型骨架建立的, 但是大多数所述重组物也是用从 New Jersey (NJ) 血清型背景制备的伴随载体回收的。称谓“ts”后接特定基因或产物 (如“tsG”) 指该重组病毒掺入了在生物学方法产生的突变病毒中鉴定的基因或突变, 如引入的参考文献所述。通常采用已知减毒的生物学方法产生的病毒来构建突变基因的 cDNA 拷贝用于掺入重组的减毒病毒中。或者, 当生物学方法产生的突变病毒中特定的靶突变基因座已知时, 可将所述突变直接掺入重组病毒中, 例如, 通过定位诱变。

[0445] 产生和回收表达外来或“异源”抗原或抗原决定簇 - 产生所需的免疫原特异性改变的其它 rVSV 和其它病毒构建物。例如, 设计了重组 VSV、牛 PIV (bPIV) 和 hPIV3-cp45, 评

价其可作为递送 HIV-1、A 和 B 型流感病毒、2 型单纯疱疹病毒、冠状病毒以及 A 和 B 型 RSV 的抗原的可能载体。如本文所述拯救这些载体,用于后续的免疫原性和安全性研究。上表 8 中列出了被拯救的 VSV-HIV GAG 构建物和示例性 VSV-HSV gD 构建物,而下表 9 总结了设计用于表达呼吸道病毒性病原体(RSV、流感和冠状病毒)的糖蛋白的示例性载体。

[0446] 表 9 表达通过质粒 T7/电穿孔/热激方法回收的病毒性

[0447] 呼吸道病原体的糖蛋白的 VSV 和 bPIV 载体

[0448]

载体	注释
RSV 基因	
rVSV-Ga5	RSV A2 G 基因位于位置 5
rVSV-Gb5	RSV B G 基因位于位置 5
rVSV-Fa5	RSV A2 F 基因位于位置 5
rVSV-Fb5	RSV B G 基因位于位置 5
h/bPIV-Ga1	bPIV(SF 毒株)载体中已用人同源物取代了 HN 和 F 糖蛋白。 位置 1 表达的 RSV A2 G 基因。(SF)
h/bPIV-Fa1	bPIV(航运热毒株)载体中已用人同源物取代了 HN 和 F 糖蛋白。 位置 1 表达的 RSV A2 F 基因
h/bPIV-Fb1	bPIV(航运热毒株)载体中已用人同源物取代了 HN 和 F 糖蛋白。 位置 1 表达的 RSV B G 基因
流感病毒基因	
rVSV-HA5 _{PAN}	A/Panama 的 HA 位于位置 5
rVSV-HA5 _{NC}	A/New Caledonia 的 HA 位于位置 5
rVSV-HA5 _{HK}	B/Hong Kong 的 HA 位于位置 5
rVSV-HA5 _{PAN}	A/Panama 的 NA 位于位置 5
rVSV-HA5 _{NC}	A/New Caledonia 的 NA 位于位置 5
rVSV-HA5 _{HK}	B/Hong Kong 的 NA 位于位置 5
冠状病毒基因	
bPIV-冠状病毒-E1	在位置 1 上含有冠状病毒 E 糖蛋白基因的 bPIV

[0449] 注意:上面所列 VSV 载体是用 Indiana 血清型骨架建立的。在大多数情况下,分离的伴随载体是用 NJ 血清型骨架制备的。

[0450] 实施例 X

[0451] 拯救缺少 G 基因或基因组节段的复制缺陷型 VSV 载体

[0452] 如上所述,常常需要构建不能从接种疫苗的部位显著扩散,但保留感染细胞和表达靶抗原能力的载体重组物。缺少结构基因,如 M 或 G 基因的示例性载体可容易地实现这个目标。M 或 G 基因的缺陷将通过完全阻断病毒粒子的成熟而理想地防止感染后免疫载体的扩散,但不会干扰 N、P 和 L 蛋白介导的转录和基因表达。已描述了缺少全部或大多数 G 基因的 rVSV,它们是吸引人的用于本发明免疫原性组合物和方法的候选物(参见,例如,Roberts 等,J. Virol. 73 :3723-3732,1999,Jeetendra 等,J. Virol. 76 :12300-12311,2002; Robison 等,J. Virol. 74 :2239-2246,2000,各自引入本文作为参考)。为了促进拯救和增殖这些复制缺陷型候选病毒,本实施例描述了改进的质粒 T7/电穿孔/热激方法。为说明该改进方法在产生和开发复制缺陷型候选病毒中的用途,工程改造并回收了两种类型的突变病毒。一种示例性突变类型完全缺少 G 基因(称为“ΔG”)。第二种突变体编码的 G 蛋白缺少病毒附着所必需的 G 蛋白胞外结构域(称为“G-茎”)。该突变基因编码与最后 91 个残基,包括跨膜和胞内结构域融合的 G 蛋白的前 19 个氨基酸, G 蛋白中大多数氨基酸被切掉,然后将该蛋白插入平滑内质网中。

[0453] 用于回收复制或生长缺陷型负链病毒(例如 ΔG 或 G-茎病毒)的改进的拯救方法如下。

[0454] VSV/Vero 电穿孔拯救步骤:

[0455] 溶液:

[0456] 胰蛋白酶/EDTA

[0457] Hank 氏缓冲盐水

[0458] 用 PBS 制备 1 毫克/毫升大豆胰蛋白酶抑制剂

[0459] 培养基组分(见下)

[0460] 培养基

[0461]

培养基 1	培养基 2	培养基 3
Dulbecco 改良的最低必需培养基 (DMEM)	Iscove 改良的 Dulbecco 培养基 (IMDM)	Dulbecco 改良的最低必需培养基 (DMEM)
10%热灭活的胎牛血清	220 μM 2-巯基乙醇 (组织培养级)	10%热灭活的胎牛血清
220 μM 2-巯基乙醇 (组织培养级)	1% DMSO (组织培养级)	220 μM 2-巯基乙醇 (组织培养级)
1%非必需氨基酸 (10mM 溶液)	1%非必需氨基酸 (10mM 溶液)	1%非必需氨基酸 (10mM 溶液)
1%丙酮酸钠 (100mM 溶液)	1%丙酮酸钠 (100mM 溶液)	1%丙酮酸钠 (100mM 溶液)
		50 微克/毫升庆大霉素

[0462] 制备 Vero 细胞:

- [0463] 每次电穿孔需要约 1.3 个铺满细胞的 T150 培养瓶。
- [0464] 1) 用约 5 毫升 Hank 氏缓冲盐溶液洗涤单层细胞 1 次。
- [0465] 2) 加入 4 毫升胰蛋白酶 /EDTA, 摇动培养瓶以均匀分布该溶液。
- [0466] 3) 室温孵育 3-5 分钟。
- [0467] 4) 吸干胰蛋白酶溶液。
- [0468] 5) 拍打培养瓶侧面以分离细胞。
- [0469] 6) 用 10 毫升培养基 #1 收集培养瓶中的细胞, 将细胞转移到 50 毫升圆锥管中。
- [0470] 7) 加入 1 毫升胰蛋白酶抑制剂 (1 毫克 / 毫升), 并温和地混合。
- [0471] 8) 用台式离心机室温 1000rpm 离心细胞 5 分钟。
- [0472] 9) 吸干上清。
- [0473] 10) 将细胞重悬于 10 毫升培养基 2 中。
- [0474] 11) 加入 1 毫升胰蛋白酶抑制剂并温和地混合。
- [0475] 12) 如上所述用台式离心机室温 1000rpm 离心收集细胞。
- [0476] 13) 吸干培养基。
- [0477] 14) 将细胞重悬于培养基 2 中。温和地重悬, 至最终体积相当于每次电穿孔 0.7 毫升 (考虑到细胞沉淀会占据一定体积)。
- [0478] 15) 将 0.7 毫升细胞悬液转移到含有质粒 DNA 溶液的离心管中。用装有 p1000 吸头的移液器温和地上下吹打, 混合细胞和 DNA。转移到电穿孔仪台上。
- [0479] DNA 制备:
- [0480] 对每次拯救的电穿孔而言, 电穿孔
- [0481] 50 微克 CMV-G
- [0482] a) 在生物安全柜工作条件下, 用无菌、无核酸酶的水将 DNA 体积调整到 250 微升。
- [0483] b) 加入 50 微升 3M 乙酸钠 (pH 5)。
- [0484] c) 加入 750 微升 100% 乙醇, 并混合。
- [0485] d) -20℃ 孵育 1 小时至过夜
- [0486] e) 在微量离心管中, 14,000rpm、4℃、离心 20 分钟沉淀 DNA
- [0487] f) 在生物安全柜工作条件下, 弃去上清, 不要搅动沉淀。
- [0488] g) 快速离心该管, 收集管底残留的乙醇, 用移液器去除。
- [0489] h) 让沉淀在空气中干燥 (在生物安全柜中) 5-10 分钟。
- [0490] i) 用 50 微升无菌、无核酸酶的水重悬沉淀。
- [0491] 电穿孔:
- [0492] BTX 820 方波电穿孔仪
- [0493] 1) 用移液器上下吹打细胞 /DNA 3 次轻轻混合, 转移到电穿孔小杯中。
- [0494] 2) 将小杯插入电穿孔架中。
- [0495] 3) 电穿孔细胞 (4 个脉冲, 70 毫秒, 140 伏)。
- [0496] 4) 电穿孔所有样品后, 将小杯放回生物安全柜中, 加入 1 毫升培养基 1。用无菌的塑料转移移液管将细胞从小杯转移到含有 10 毫升培养基 1 的 15 毫升离心管中。
- [0497] 5) 温和地混合, 如上所述离心收集细胞。
- [0498] 6) 吸干培养基。

[0499] 7) 将细胞重悬于 10 毫升培养基 1 中,将悬液转移到含有 25 毫升培养基 1 的 T150 培养瓶中。

[0500] 8) 37°C (5% CO₂) 孵育细胞 3 小时。

[0501] 9) 43°C (3-5% CO₂) 热激细胞 3 小时。

[0502] 10) 将细胞放回 37°C 2 小时。

[0503] 11) 用 20 毫升培养基 3 替换旧培养基。

[0504] 12) 吸干含有拯救物质的 T150。加入 10 毫升培养基 3。将细胞刮入培养基中转移到 1 个含有 G 表达细胞的 T150 瓶中,继续 37°C 孵育。

[0505] 13) 每天检查细胞的细胞病变效应迹象。早至 3-4 天应出现 VSV 复制,但可能更长达 6 天。

[0506] 与实施例 VII 中所述的替代示例性方法相比,上述改进的电穿孔方法的主要不同之处是包括了共培养步骤,在该步骤中,将用于拯救的细胞与经工程改造富表达 G 蛋白的细胞一起培养。简要说,通过电穿孔含有 CMV-T7 质粒、病毒基因组 cDNA 和编码 N、P、L、M 和 G 的载体的 Vero 细胞(病毒拯救细胞)启动 VSV 拯救。然后,将这些细胞热激 3 小时后孵育过夜。当进行病毒拯救电穿孔时,电穿孔第二组 Vero 细胞,以准备用于瞬时表达大量 G 蛋白的共培养的细胞。加入相对大量的编码 VSV G 蛋白的 CMV 表达质粒,电穿孔这些共培养细胞。电穿孔后的第二天,将转染了该拯救混合物的细胞刮入培养基中,转移到 G 蛋白表达共培养单层细胞上。通常在 2-4 天后,可见明显的病毒性细胞病变效应。

[0507] 虽然以实施例的方式详细描述了上述本发明,但本领域技术人员明白,可以在所附权利要求的范围内实施某些改变和修改,以示例性而非限制性方式对它们进行说明。

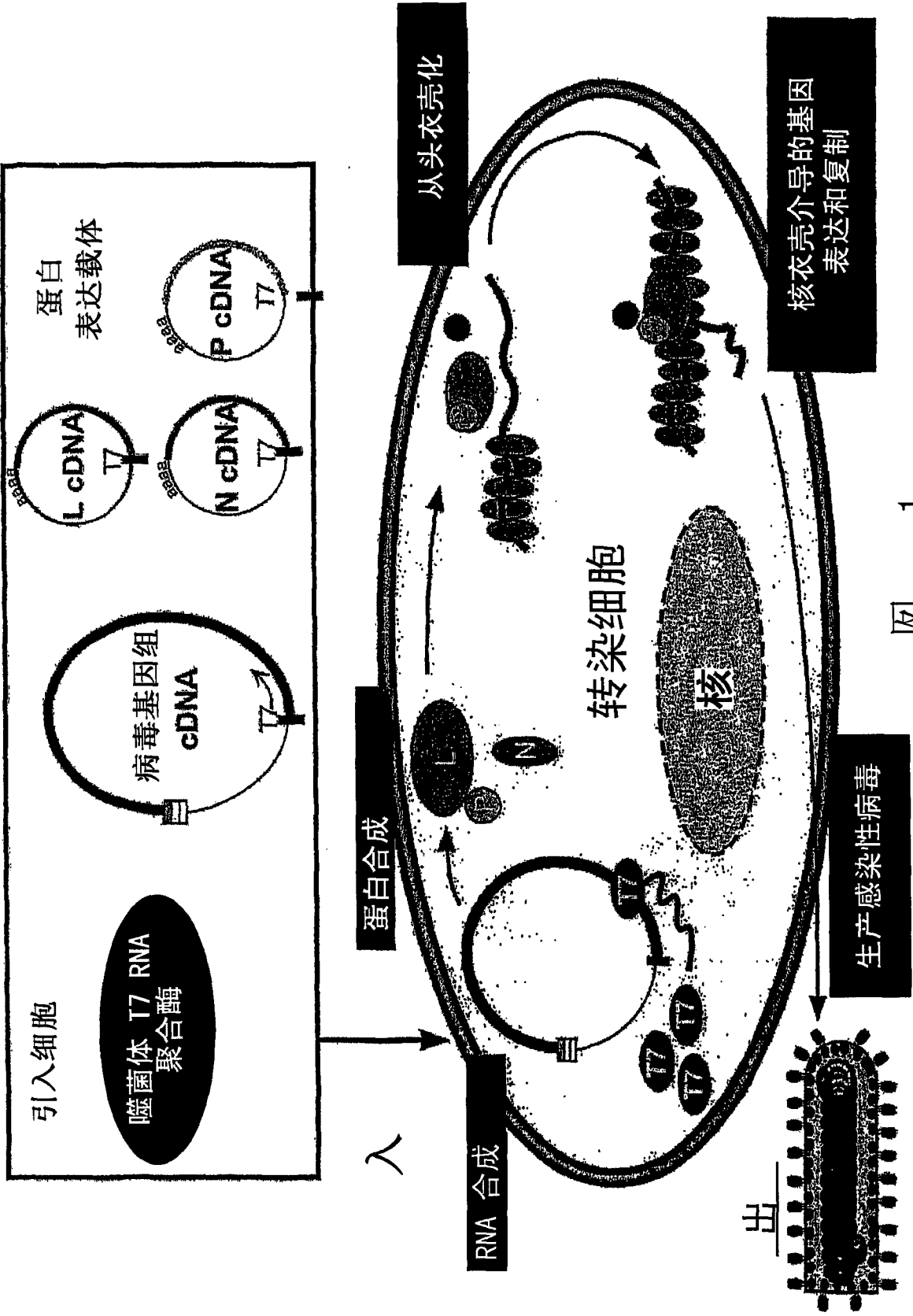


图 1

```

1 TCAATATTGG CCATTAGCCA TATTATTTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
61 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCTATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG GCTCATGTCC
121 AATATGACCG CCATGTTGGC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG
181 GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC
241 GCCTGGCTGA CCGCCCAACG ACCCCGCCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT
301 AGTAACGCCA ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC
361 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTCCG CCCCCTATTG ACGTCAATGA
421 CCGTAAATGG CCGGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTACGGGACT TTCCTACTTG
481 GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAC
541 CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT
601 CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACGT
661 CGATCGCCCG CCCCCTTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA GGTCTATATA
721 AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC ACTAGAAGCT TTATTGCGGT AGTTTATCAC
781 AGTTAAATTG CTAACGCACT CAGTGCTTCT GACACAACAG TCTCGAAGTT AAGCTGCAGT
841 GACTCTCTTA AGGTAGCCTT GCAGAAGTTG GTCGTGAGGC ACTGGGCAGG TAAGTATCAA
901 GGTTACAAGA CAGGTTTAAG GAGACCAATA GAAACTGGGC TTGTCGAGAC AGAGAAGACT
961 CTTGCGTTTC TGATAGGCAC CTATTGGTCT TACTGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC
1021 AGGTGTCCAC TCCCAGTTCA ATTACAGCTC TTAAGGCTAG AGTACTTgct agcctcgagt
1081 gatcagaatt cGCCACCATG gACACGATTA ACATCGCTAA GAACGACTTC TCTGACATCG
1141 AACTGGCTGC TATCCCGTTC AACACTCTGG CTGACCATTA CCGTGAGCGT TTAGCTCGCG
1201 AACAGTTGGC CCTTGAGCAT GAGTCTTACG AGATGGGTGA AGCAGCGCTT CGCAAGATGT
1261 TTGAGCGTCA ACTTAAAGCT GGTGAGGTTG CGGATAACGC TGCCGCCAAG CCTCTCATCA
1321 CTACCCTACT CCCTAAGATG ATTGCACGCA TCAACGACTG GTTTGAGGAA GTGAAAGCTA
1381 AGCGCGGCAA GCGCCGACA GCCTTCCAGT TCCTGCAAGA AATCAAGCCG GAAGCCGTAG
1441 CGTACATCAC CATTAGACC ACTCTGGCTT GCCTAACCGA TGCTGACAAT ACAACCGTTC
1501 AGGCTGTAGC AAGCGCAATC GGTCCGGCCA TTGAGGACGA GGCTCGCTTC GGTCTATACC
1561 GTGACCTTGA AGCTAAGCAC TTCAAGAAA ACCTTGAGGA ACAACTCAAC AAGCGCGTAG
1621 GGCACGTCTA CAAGAAAGCA TTTATGCAAG TTGTCGAGGC TGACATGCTC TCTAAGGGTC
1681 TACTCGGTGG CGAGGCGTGG TCTTCGTGGC ATAGGAAGA CTCTATTCTT GTAGGAGTAC
1741 GCTGCATCGA GATGCTCATT GAGTCAACCG GAATGGTTAG CTTACACCGC CAAAATGCTG
1801 GCGTAGTAGG TCAAGACTCT GAGACTATCG AACTCGCACC TGAATACGCT GAGGCTATCG
1861 CAACCCGTGC AGGTGCGCTG GCTGGCATCT CTCCGATGTT CCAACCTTGC GTAGTTCTCT
1921 CTAAGCCGTG GACTGGCATT ACTGGTGGTG GCTATTGGGC TAACSGTCTG CGTCTCTTGG
1981 CGCTGCTGCG TACTCACAGT AAGAAAGCAC TGATGCGCTA CGAAGACGTT TACATGCCCT
2041 AGGTGTACAA AGCGATTAAC ATTGCGCAAA ACACCGCATG GAAAATCAAC AAGAAAGTCC
2101 TAGCGGTGCG CAACGTAATC ACCAAGTGGA AGCATGTGTC GGTGAGGAC ATCCCTGCGA
2161 TTGAGCGTGA AGAATCCCG ATGAAACCGG AAGACATCGA CATGAATCCT GAGGCTCTCA
2221 CCGCGTGGAA ACGTGCTGCC GCTGCTGTGT ACCGCAAGGA CAAGGCTCGC AAGTCTCGCC
2281 GTATCAGCCT TGAGTTCATG CTTGAGCAAG CCAATAAGTT TGCTAACCAT AAGGCCATCT
2341 GGTTCCTCTA CAACATGGAC TGGCGCGGTC GTGTTTACGC TGTGTCAATG TTCAACCCGC
2401 AAGGTAACTA TATGACCAA GGAATGCTTA CGCTGGCGAA AGGTAAACCA ATCGGTAAGG
2461 AAGGTTTACA CTGGCTGAAA ATCCACGGTG CAAACTGTGC GGTGTCTGAT AAGGTTCCGT
2521 TCCCTGAGCG CATCAAGTTC ATTGAGGAAA ACCACGAGAA CATCATGGCT TGCGCTAAGT
2581 CTCCACTGGA GAACACTTGG TGGGCTGAGC AAGATTCTCC GTTCTGCTTC CTTGCGTTCT
2641 GCTTTGAGTA CGCTGGGTA CAGCACACG GCCTGAGCTA TAACTGCTCC CTTCCGCTGG
2701 CGTTTGACCG GTCTTGCTCT GGCATCCAGC ACTTCTCCGC GATGCTCCGA GATGAGGTAG
2761 GTGGTCCGCG GGTAAACTTG CTTCTAGTG AAACCGTTCA GGACATCTAC GGGATTGTTG
2821 CTAAGAAAGT CAACGAGATT CTACAAGCAG ACGCAATCAA TGGGACCGAT AACGAAGTAG
2881 TTACCGTGAC CGATGAGAAC ACTGGTGAAA TCTCTGAGAA AGTCAAGCTG GGCACTAAGG
2941 CACTGGCTGG TCAATGGCTG GCTTACGGTG TTACTCGCAG TGTGACTAAG CGTTCAGTCA
3001 TGACGCTGGC TTACGGGTCC AAAGAGTTCG GCTTCCGTCA ACAAGTGCTG GAAGATACCA
3061 TTCAGCCAGC TATTGATTCC GGCAAGGGTC TGATGTTTAC TCAGCCGAAT CAGGCTGCTG
3121 GATACATGCG TAAGCTGATT TGGGAATCTG TGAGCGTGAC GGTGGTAGCT GCGGTTGAAG
3181 CAATGAATCG GCTTAAGTCT GCTGCTAAGC TGCTGGCTGC TGAGGTCAA GATAAGAAGA
3241 CTGGAGAGAT TCTTCGCAAG CGTTGCGCTG TGCAATGGGT AACTCCTGAT GGTTCCTCTG
3301 TGTGGCAGGA ATACAAGAAG CCTATTGAGA CGCGCTTGAA CCTGATGTTT CTCGGTCAGT
3361 TCCGCTTACA GCCTACCATT AACACCAACA AAGATAGCGA GATTGATGCA CACAAACAGG
3421 AGTCTGGTAT CGCTCCTAAC TTTGTACACA GCCAAGACGG TAGCCACCTT CGTAAGACTG
3481 TACTGTGGGC ACACGAGAAG TACGGAATCG AATCTTTTGC ACTGATTAC GACTCCTTCG
3541 GTACCATTCG GGCTGACGCT GCGAACCTGT TCAAGCAGT GCGCGAAACT ATGGTTGACA
3601 CATATGAGTC TTGTGATGTA CTGGCTGATT TCTACGACCA GTTCGCTGAC CAGTTGCACG
3661 AGTCTCAATT GGACAAAATG CCAGCACTTC CGGCTAAAGG TAACTTGAAC CTCCGTGACA

```

```

3721 TCTTAGAGTC GGACTTCGCG TTCCGCTAAc tCTAGAGTCG ACCCGGGCGG CCGCTTCCCT
3781 TTAGTGAGGG TTAATGCTTC GAGCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGGACAAAC
3841 CACAAC TAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT
3901 ATTTGTAAAC ATTATAAGCT GCAATAACA AGTTAACAAC AACAAATTGCA TTCATTTTAT
3961 GTTTCAGGTT CAGGGGGAGA TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACC TCTACAAATG
4021 TGGTAAAATC CGATAAGGAT CGATCCGGGC TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT
4081 CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT GCGGAATGGA CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT
4141 TAAGCGCGGC GGGTGTGCTG GTTACGCGCA GCGTGACCGC TACACTTGCC AGCGCCCTAG
4201 CGCCCGCTCC TTTCGCTTTC TTCCCTTCCT TTCTCGCCAC GTTCGCGCGC TTTCGCCGTC
4261 AAGCTCTAAA TCGGGGGCTC CTTTAGGGT TCCGATTTAG TGCTTTACGG CACCTCGACC
4321 CCAAAAAACT TGATTAGGGT GATGTTTAC GTAGTGGGC ATCGCCCTGA TAGACGGTTT
4381 TTCCGCTTT GACGTTGGAG TCCACGTTCT TTAATAGTGG ACTGTTGTTT CAAACTGGAA
4441 CAACACTCAA CCTATCTCG GTCTATTCTT TTGATTATA AGGGATTTC CCGATTTCGG
4501 CCTATTGGTT AAAAAATGAG CTGATTAAAC AAATATTTAA CGCGAATTTT AACAAAATAT
4561 TAACGTTTAC AATTTGCGCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CGGTATTTCA
4621 CACCGCATAC GCGGATCTGC GCAGCACCAT GGCCTGAAAT AACCTCTGAA AGAGGAACCT
4681 GGTTAGGTAC CTTCTGAGGC GGAAGAACC AGCTGTGGA TGTGTGTGTC TTAGGGTGTG
4741 GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG
4801 CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC
4861 TCAATTAGTC AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACCTCCG
4921 CCAATTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT GCAGAGGCCG
4981 AGGCCGCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT GGAGGCTTAG
5041 GCTTTTGC AAAGCTTGAT TCTCTGACA CAACAGTCTC GAACCTAAGC ATAGAGCCAC
5101 CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCAAGCAGG TTCTCCGGCC GCTTGGGTGG AGAGGCTATT
5161 CGGCTATGAC TGGGCACAAC AGACAATCGG CTGCTCTGAT GCCGCCGTGT TCCGCTGTG
5221 AGCGCAGGGG CGCCCGGCTC TTTTGTCAA GACCGACCTG TCCGGTGCCC TGAATGAAC
5281 GCAGGACGAG GCAGCGCGGC TATCGTGGCT GGCACGAGC GCGCTTCCCT GCGCAGCTGT
5341 GCTCGACGTT GTCACTGAAG CGGGAAGGGA CTGGCTGCTA TTGGGCGAAG TGCCGGGCCA
5401 GGATCTCCTG TCATCTCACC TTGCTCCTGC CGAGAAAGTA TCCATCATGG CTGATGCAAT
5461 GCGGCGGCTG CATACGCTTG ATCCGGCTAC CTGCCCATTC GACCACCAAG CGAAACATCG
5521 CATCGAGCGA GCACGTACTC GGATGGAAGC CGGTCTGTGT GATCAGGATG ATCTGGACGA
5581 AGAGCATCAG GGGCTCGCGC CAGCCGAAC GTTCCGCCAG CTCAAGGCGC GCATGCCCGA
5641 CGGCGAGGAT CTGCTGTGTA CCCATGGCGA TGCTGTCTTG CGGAATATCA TGGTGGAAAA
5701 TGGCCGCTTT TCTGGATTCA TCGACTGTGG CCGGCTGGGT GTGGCGGACC GCTATCAGGA
5761 CATAGCGTTG GCTACCCGTG ATATTGCTGA AGAGCTTGGC GCGGAATGGG CTGACCGCTT
5821 CCTCGTGTCT TACGGTATCG CCGCTCCCGA TTCGACGCGC ATCGCCTTCT ATCGCCTTCT
5881 TGACGAGTTC TTCTGAGCGG GACTCTGGGG TTCGAAATGA CCGACCAAGC GACGCCCAAC
5941 CTGCCATCAC GATGGCCGCA ATAAATATC TTTATTTTCA TTACATCTGT GTGTGGTTT
6001 TTTGTGTGAA TCGATAGCGA TAAGGATCCG CGTATGGTGC ACTCTCAGTA AGTCTGCTC
6061 TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGCCCGACA CCCGCCAACA CCGCTGACG CGCCCTGACG
6121 GGCTTGTCTG CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT
6181 GTGTACAGAG TTTTACCCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGA CGAAAGGGCC TCGTGATACG
6241 CCTATTTTFA TAGGTTAATG TCATGATAAT AATGGTTTCT TAGACGTCAG GTGGCACTTT
6301 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA
6361 TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
6421 GAGTATTC AAATTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCTTCTCTGT
6481 TTTTGTCTAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGACAG
6541 AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCGA
6601 AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG
6661 TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCC CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
6721 TGAGTACTCA CCAGTACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG
6781 CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC TTACTTCTGA CAACGATCGG
6841 AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCCTGA
6901 TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC
6961 TGAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACCTGC GAACACTTCA CTCTAGCTTC
7021 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC
7081 GGGCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG
7141 CGGTATCATT GCAGCACTGG GCGCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC
7201 GACGGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCCTC
7261 ACTGATTAA GCAATTGTAAC TGTGAGACCA AGTTTACTCA TATATACCTT AGATTGATTT
7321 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC
7381 CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA GACCCCGTAG AAAAGATCAA

```

```
7441 AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAACC
7501 ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT
7561 AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
7621 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC
7681 AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT
7741 ACCGATAAAG GCGCAGCGGT CCGGCTGAAC GGGGGGTTCC TGCACACAGC CCAGCTTGGA
7801 GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT
7861 TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
7921 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA
7981 CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG GGGCGGAGCC TATGGAAAAA
8041 CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGGC
8101 TCGACAGATC T
```

图 2

C.

5. MP1V1 C中的减毒性F170S突变

HP1V1 C F170S:(164) KTKLRDSQKRYEEVHPY(180)
HP1V1 WT: (164) KTKLRDFQKRYEEVHPY(180)
MP1V1 WT: (164) KTKLRDFQKRYEEVHPY(180)
MP1V1 C F170S:(164) KTKLRDSQKRYEEVHPY(180)

9. RSV L中的减毒性F521L突变 (HP1V3中的F456L)

HP1V1 L F456L:(450) SF1GFKLLKFTFPQLDED(467)
HP1V1 WT: (450) SF1GFKFLKFTFPQLDED(467)
HP1V3 WT: (450) SF1GKFNKFTFPQLDED(467)
HP1V3 L F456L:(450) SF1GKLNKFTFPQLDED(467)

图 3B