

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 7/00
A61K 39/155 A61P 31/14



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01814362.8

[43] 公开日 2004 年 1 月 14 日

[11] 公开号 CN1468301A

[22] 申请日 2001.6.22 [21] 申请号 01814362.8
[30] 优先权
[32] 2000.6.23 [33] US [31] 60/213,708
[86] 国际申请 PCT/US01/20107 2001.6.22
[87] 国际公布 WO02/00693 英 2002.1.3
[85] 进入国家阶段日期 2003.2.19
[71] 申请人 美国政府健康及人类服务部
地址 美国马里兰州
[72] 发明人 克里斯蒂娜·D·克伦普尔
彼得·L·柯林斯
布雷恩·R·墨菲
乌尔苏拉·布赫霍尔茨
斯蒂芬·S·怀特黑德

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 30 页 说明书 122 页 序列表 6 页
附图 19 页

[54] 发明名称 从邻近启动子的基因表达保护性抗
原的呼吸道合胞病毒疫苗

[57] 摘要

在其基因组或反基因组内含有移位基因的重组
呼吸道合胞病毒 (RSV) 是对人和哺乳类具有感染性
的减毒病毒。含有移位基因的 RSV 是通过在重组
基因组或反基因组内插入、删除或重排基因或基因
组片段而构建的, 这种 RSV 对设计用于诱导抗 RSV
免疫反应的疫苗很有用。另外提供的还有分离的
多核苷酸分子和载体, 其中整合了一个重组 RSV 基
因组或反基因组, 在此基因组或反基因组中有一个
基因或基因片段移位到了与 RSV 基因图上该基因野
生型位点相比更靠近或远离启动子的位点。用这
种方式将基因移位, 根据移位的性质和程度, 可以
选择性地提高或降低基因表达。在一个实例中,
通过将一个或多个编码糖蛋白的基因移位到一个靠
近启动子的位点, 使 RSV 糖蛋白表达得到了正调
节。创建移位基因 RSV 所需要操作的目标基因可

以是 NS1、NS2、N、P、M、SH、M2 (ORF1)、M2
(ORF2)、L、F、G 基因中的任何一个基因, 也可
以是属于某基因的一部分或基因外部分的一个基因
组片段。本发明还提供了含移位基因的 RSV 的多
种其它突变和核苷酸修饰, 以得到期望的表型和结
构效果。

1. 一种分离的感染性重组呼吸道合胞病毒(RSV)，其包括：一主要的病毒粒子(N)蛋白质、一病毒粒子磷蛋白质(P)、一大型聚合酶蛋白质(L)、一 RNA 聚合酶延伸因子，以及一个完全地或部分地重组的 RSV 基因组或反基因组；该 RSV 在上述重组基因组或反基因组内有一个或一个以上被转移的 RSV 基因或基因组片段，相对于上述 RSV 基因或基因组片段在野生型 RSV 基因组或反基因组内的位置，被转移至一个离启动子较近或离启动子较远的位置。

10

2. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述一个或一个以上移位基因或基因组片段，通过在上述完全地或部分地重组 RSV 基因组或反基因组内，删除或插入一个或数个多核苷酸取代体的方式，被转移至一个离启动子较近或离启动子较远的位置。

15

3. 第 2 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体包括一个或数个多核苷酸插入基，其长度为 150 至 4,000 个核苷酸单位(NTS)，该插入基被插入至基因组或反基因组的非编码区域(NCR)或作为一个单独的基因单位(GU)被插入，上述多核苷酸插入基缺乏一个完全的可读框(ORF)并在上述重组 RSV 中决定了一种减毒表型。

20

4. 第 3 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸插入基包括一个或数个 RSV 基因或基因组片段。

25

5. 第 2 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体包括一个或数个 RSV 基因或基因组片段，它(们)是从 RSVNS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 和 G 基因和基因组片段中，以及 RSV 基因组及其片段的首段、尾段及基因间区域中选出的。

30

6. 第 2 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 上述多核苷酸取代体包括一个或数个牛类 RSV(BRSV)或人类 RSV(HRSV)基因或基因组片段, 它(们)是从 RSVNS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 和 G 基因或基因组片段中, 以及 RSV 基因组或其片段的首段、尾段及基因间区域中选出的。

7. 第 6 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 上述多核苷酸取代体 被删除以形成重组 RSV 基因组或反基因组, 并导致上述一个或一个以上被转移的 RSV 基因或基因组片段的位置, 相对于上述 RSV 基因或基因组片段在野生型 RSV 基因组或反基因组内的位置, 在上述重组基因组或反基因组内被转移至一个离启动子较近的位置。

8. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 上述被删除以形成重组 RSV 基因组或反基因组的多核苷酸取代体, 包括一个或一个以上 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2), 或 G 基因或其基因组片段。

9. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 包括一个 RSV NS1 的多核苷酸取代体被删除以形成重组 RSV 基因组或反基因组。

10. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 包括一 RSVNS2 基因的多核苷酸取代体被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组。

11. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 包括一 RSVSH 基因的多核苷酸取代体被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组。

12. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，包括一 RSVM2(ORF2)基因的多核苷酸取代体被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组。

5

13. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，包括一 RSVG 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组。14. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSVF 和 G 基因两者均被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

10

15. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSVNS1 和 NS2 基因两者均被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

15

16. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSVSH 和 NS2 基因两者均被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

20

17. 第 8 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSVSH、NS1 和 NS2 基因全部均被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

25

18. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体包括一个或数个删除部分，其处于一个 RSV 可读框的开始或末尾、或一个基因间的区域、或该 RSV 基因组的 3' 前导或 5' 尾端部分的一个非转录的序列内。

30

19. 第 18 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体包括一个部分性基因删除部分。

20. 第 19 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述部分性基因删除是 SH 基因的部分性删除。

5 21. 第 20 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述 SH 基因的部分删除包括一个在 SH 下游非转录的区域内的删除。

 22. 第 21 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，它是在重组 RSV 反基因组的 4499-4610 位，有 112 个核苷酸单位被删除的
10 RSV6120。

 23. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体，是从 RSV 基因一个下游未转录的序列中的一个或一个以上区域内选出的。

15 24. 第 23 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述下游未转录的序列是源自于 NS1(519-563 位)，NS2(1003-1086 位)，P(3073-3230 位)，M(4033-4197 位)，F(7387-7539 位)，和/或 M2(8433-8490 位)等基因。

20 25. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体是从 RSV 基因一个上游未转录的序列中的一个或一个以上区域内选出的。

25 26. 第 25 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述一个或数个上游未转录的序列源自于 NS1(55-96 位)，NS2(606-624 位)和/或 SH(4231-4300 位)。

 27. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体包括了 RSVG 基因第 4683 至 4685 位核苷酸被删除
30

的部分。

28. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体是从一个或一个以上 RSV 基因间的序列中选出的。

5

29. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体是从该 RSV 5' 尾段区域内的核苷酸中选出的。

30. 第 29 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，紧随 L 基因的 5' 尾段区域的一部分，尺寸被减少了 75 个核苷酸单位，100 个核苷酸单位，125 个或更多的核苷酸单位，而使 5' 基因组终点原封未动。

31. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体是从该 RSV 3' 前导区域内的核苷酸中选出的。

32. 第 31 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，3' 尾段区域的一部分被删除，但该部分不包括位于该 3' 前导区域最初 11 个核苷酸单位内的病毒启动子的核心部分。

20

33. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，完全地或部分地删除 RSV NS1、NS2、SH、F 和/或 M2 等基因中的一个或其任何组合，导致了基因组长度的可调节的减少，其范围为 1-806 个核苷酸单位。

25

34. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，完全地或部分地删除 RSV 基因间区域中的一个或其任何组合，导致了基因组长度的可调节的减少，其范围为 1-198 个核苷酸单位。

30

35. 第 7 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，完

全地或部分地删除 RSV 基因间区域中的一个或其任何组合，导致了基因组长度的可调节的减少，其范围为 1-198 个核苷酸单位。

5 36. 第 6 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体被加入、替换或重排至重组 RSV 基因组或反基因组内，导致上述一个或一个以上被转移的 RSV 基因或基因组片段的位置，在上述重组基因组或反基因组内，相对于野生型 RSV 基因组或反基因组之内上述 RSV 基因或基因组片段的位置，被转移至一个离启动子较近或离启动子较远的位置。

10

 37. 第 36 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述被加入、替换、或重排至重组 RSV 基因组或反基因组内的多核苷酸取代体，包括一个或数个 RSVNS1、NS2、SH、M2(ORF2)、F 和/或 G 基因或其基因组片段。

15

 38. 第 36 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体包括一个或一个以上 RSV 基因或基因组片段，为一个或数个 RSV 糖蛋白质、或免疫性的功能区、或其抗原免疫因子编码。

20

 39. 第 38 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述多核苷酸取代体是从为 RSVF、G 和/或 SH 糖蛋白质、或免疫性的功能区、或其抗原免疫因子编码的基因或基因组片段中选出的。

25

 40. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSV F、G 和 SH 的一个或数个 RSV 糖蛋白基因或基因组片段，被加入、替换或重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，与上述一个或一个以上 RSV 糖蛋白的野生型基因顺序位置相比，离启动子较近的基因顺序位置。

30

41. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 G 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 的野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近的基因顺序位置。

5 42. 第 41 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 G 被转移至上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1。

10 43. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 F 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 F 的野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近的基因顺序位置。

15 44. 第 43 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 F 被转移至上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1。

20 45. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白质基因 G 和 F 两者均被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 和 F 的野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近的基因顺序位置。

25 46. 第 45 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 在上述重组 RSV 基因组或反基因组内, RSV 糖蛋白基因 G 被转移至基因顺序位置 1, 而 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2。

 47. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 一个或数个 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)或 G 基因、或其基因组片段, 在该重组 RSV 基因组或反基因组内被删除。

30 48. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中,

包括一个 RSVNS1 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基因组或反基因组。

5 49. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
包括一个 RSVNS2 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基因组或反基因组。

10 50. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
包括一个 RSV SH 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基因组或反基因组。

15 51. 第 50 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSV 糖蛋白基因 G 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，与 G 的野生型基因顺序位置相比，离启动子较近的基因顺序位置。

52. 第 51 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSV 糖蛋白基因 G 被转移至上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1。

20 53. 第 52 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其为 G1/ΔSH。

25 54. 第 50 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSV 糖蛋白基因 F 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，与 F 的野生型基因顺序位置相比，离启动子较近的基因顺序位置。

30 55. 第 54 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，RSV 糖蛋白基因 F 被转移至上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1。

56. 第 55 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其为 F1/ Δ SH。

57. 第 50 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 和 F 野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近的基因顺序位置。

58. 第 57 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 在上述重组 RSV 基因组或反基因组内, RSV 糖蛋白基因 G 被转移至基因顺序位置 1, 而 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2。

59. 第 58 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其为 G1F2/ Δ SH。

60. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV SH 和 NS2 基因两者均被删除, 以形成该重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

61. 第 60 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 和 F 野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近的基因顺序位置。

62. 第 61 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 在上述重组 RSV 基因组或反基因组内, RSV 糖蛋白基因 G 被转移至基因顺序位置 1, 而 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2。

63. 第 62 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其为 G1F2/ Δ NS2 Δ SH。

64. 第 40 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSVSH、NS1 和 NS2 基因全部被删除, 以形成该重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

5

65. 第 64 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, RSV 糖蛋白基因 G 和 F 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 和 F 离野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近的基因顺序位置。

10

66. 第 65 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 在上述重组 RSV 基因组或反基因组内, RSV 糖蛋白基因 G 被转移至基因顺序位置 1, 而 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2。

15

67. 第 66 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其为 G1F2/ Δ NS2 Δ NS2 Δ SH。

20

68. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 重组基因组或反基因组包括完全的或部分的的人类 RSV(HRSV)或牛类 RSV(BRSV)背景基因组或反基因组; 其与源自于不同 RSV 的一个或一个以上异源基因或基因组片段结合, 以形成人一牛的虚构 RSV 基因组或反基因组。

25

69. 第 68 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 异源基因或基因组片段被加入或替换至一个位置; 在完全的或部分的 HRSV 或 BRSV 背景基因组或反基因组内, 该位置是与对应物基因或基因组片段的野生型基因顺序位置相比, 离启动子较近或离启动子较远的位置。

30

70. 第 69 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 人类 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均被分别替换至基因顺序位置 1 和

2, 以在一不完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组中, 取代在野生型位置 7 和 8 被分别删除的对应物糖蛋白基因 G 和 F。

5 71. 第 70 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其为 rBRSV/A2-G1F2。

72. 第 69 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 一个或一个以上从 NS1、NS2、F、G、SH 和 M 选出的人类 RSV 非结构性的和/或外壳有联系的基因, 被加入或替换至一个完全的或部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内。

15 73. 第 69 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 一个或一个以上从 F、G、SH、和 M 选出的人类 RSV 外壳有联系的基因, 被加入或替换至一不完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内, 其中, 一个或一个以上从 F、G、SH 和 M 选出的、外壳有联系的基因已被删除。

20 74. 第 73 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 人类 RSV 外壳有联系的基因 F、G 和 M 被加入至一不完全的牛类 RSV 背景基因组内或反基因组内, 其中所有外壳有联系的基因 F、G、SH 和 M 均已被删除的。

25 75. 第 74 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其为 rBRSV/A2-MGF。

30 76. 第 69 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 人类 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均分别被替换至基因顺序位置 3 和 4, 以在一个不完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内, 取代在野生型位置 7 和 8 分别被删除的对应物糖蛋白基因 G 和 F。

77. 第 76 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其为 rBRSV/A2-G3F4。

5 78. 第 69 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
人类 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均分别被替换至基因顺序位置 1 和 2，以在一不完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内，取代在野生型位置 7 和 8 分别被删除的对应物糖蛋白基因 G 和 F；而且人类 RSV 基因 NS1 和 NS2 也被用来替换其对应物牛类基因。

10 79. 第 78 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其为 rBRSV/A2-G1F2NS3NS4。

15 80. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中 RSV M2(ORF1)被转移至该重组 RSV 基因组或反基因组内一个离启动子较近的位置，以正向调节重组病毒的转录。

20 81. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中重组基因组或反基因组整合了至少一个和最多达一整套的减毒突变体，存在于—组突变型人类 RSV 菌株，上述突变体包括 cpts RSV248(ATCC VR 2450)、cpts RSV248/404(ATCC VR 2454)、cpts RSV248/955(ATCC VR 2453)、cpts RSV530(ATCC VR 2452)、cpts RSV530/1009(ATCC VR 2451)、cpts RSV530/1030(ATCC VR 2455)、RSVB-1 cp52/2B5(ATCC VR 2542)和 RSVB-1 cp 23(ATCC VR 2579)。

25 82. 第 81 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中该重组基因组或反基因组整合了从不同的突变 RSV 菌株接受的减毒突变体。

30 83. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中重组基因组或反基因组整合了至少一个和最多达一整套的减毒突变体，该

突变体决定了氨基酸在 RSV N 基因内的 Val267、在 RSV F 基因内的 Glu218 和/或 Thr523 、在 RSV 聚合酶基因内的 LAsn43, Cys319, Phe 521, Gln831, Met1169, Tyr1321 和/或 He1690 等部位的取代, 以及核苷酸在基因 M2 的基因起始顺序部位的取代。

5

84. 第 83 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 重组基因组或反基因组整合了至少两个减毒突变体。

10

85. 第 83 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 重组基因组或反基因组包括了至少一个被一个决定突变的密码子中多个核苷酸的变化所稳定的减毒突变体。

15

86. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 重组基因组或反基因组更进一步包括了一个核苷酸变体, 其决定了选自生长特征、减毒性、温度敏感性、冷适应性、菌斑大小、宿主范围限制等变化、或选自免疫性变化的表型变化。

20

87. 第 86 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该核苷酸变体改变了该重组病毒的一个 SH、NS1、NS2、M2ORF2 或 G 基因。

25

88 第 87 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该重组病毒的一个 SH、NS1、NS2、M2 ORF2 或 G 基因被从完全地或部分地删除, 或该基因的表达通过在基因的一个可读框内引入一个或数个中止密码子而被消除。

30

89. 第 86 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该核苷酸变体包括了一核苷酸的删除、插入、取代、加成, 或该重组 RSV 基因组或反基因组内一选定基因的顺式作用调节序列的重排。

90. 第 89 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, NS1 或 NS2 基因的基因末端(GE)信号被加以修饰。

5 91. 第 89 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该核苷酸变体包括了该重组基因组或反基因组内一个转录起始位点的插入、删除、取代、或重排。

92. 第 91 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 一种分泌形式的该 RSV G 糖蛋白的转录起始位点被消除。

10

93. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该重组基因组或反基因组, 被修饰而为一非 RSV 分子编码, 该非 RSV 分子选自细胞质、T-辅助抗原决定基、限制性位点标志、或一能在哺乳动物宿主体内诱导一个抵抗上述病原体的保护性免疫反应的微生物病原体的蛋白质。

15

94. 第 93 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 整合了一个或数个来自副流感病毒(PIV)的基因和/或基因组片段。

20

95. 第 94 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该重组基因组或反基因组为一 HN 或 F 糖蛋白、或一外部区域、或 PIV1、PIV2、或 PIV3 的 HN 或 F 的免疫性抗原决定基编码。

25 96. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 它是一种病毒。

97. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 它是一种亚病毒粒子。

30 98. 第 2 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 上

述多核苷酸取代体被加入至该重组 RSV 基因组或反基因组的一个非编码区域，或从其中被删除。

5 99. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，该重组基因组或反基因组整合了源自于人类 RSV 亚群 A 和亚群 B 或该两种亚群之一的抗原免疫因子。

10 100. 一种刺激接种者的免疫系统以诱导抵抗 RSV 的保护作用的方法，其包括将一生理上可接受的载体与足够免疫剂量的第 1 项权利要求中所述之重组 RSV 相结合而接种于该接种者。

 101. 第 100 项权利要求中所述之方法，其中，以 10^3 至 10^6 PFU 的剂量进行该重组 RSV 的接种。

15 102. 第 100 项权利要求中所述之方法，其中，该重组 RSV 被接种于上呼吸道。

20 103. 第 100 项权利要求中所述之方法，其中，该重组 RSV 以喷雾、点滴或烟雾剂的方式接种。

 104. 第 100 项权利要求中所述之方法，其中，该重组 RSV 被接种于 RSV 抗体的血清反应呈阴性、或具有经胎盘获得的母体 RSV 抗体的个体。

25 105. 第 100 项权利要求中所述之方法，其中，该重组 RSV 诱导了一个抵抗人类 RSV A 或 RSV B 的免疫反应。

30 106. 第 100 项权利要求中所述之方法，其中，该重组 RSV 诱导了一个能同时抵抗人类 RSV A 和 RSV B 的免疫反应。

107. 第 100 项权利要求中所述之方法, 其中, 该重组 RSV 诱导了一个抵抗人类 RSV A 或 RSV B 的免疫反应, 而且该重组 RSV 与足够免疫剂量的、能诱导抵抗人类 RSV A 或 RSV B 的免疫反应之第二种减毒 RSV 结合接种, 藉此而诱导了一个能同时抵抗人类 RSV A 和 RSV B 的免疫反应。

108. 第 107 项权利要求中所述之方法, 其中该重组 RSV 和第二种减毒 RSV 作为混合物而被一起用于接种。

109. 一种诱导抗 RSV 免疫反应的免疫性成分, 其包含了一个生理上可接受的载体所载的足够免疫剂量的如第 1 项权利要求中所述之重组 RSV。

110. 第 109 项权利要求中所述之免疫性成分, 其配制剂量为 10^3 to 10^6 PFU。

111. 第 109 项权利要求中所述之免疫性成分, 被配制成以喷雾、点滴或烟雾剂的方式接种于上呼吸道。

112. 第 109 项权利要求中所述之免疫性成分, 其中, 该重组 RSV 诱导了一个抵抗人类 RSV A 或 RSV B, 或同时抵抗该两种人类 RSV A 和 RSV B 的免疫反应。

113. 第 1 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 该重组基因组或反基因组包括了一个完全的或部分的 RSV 载体基因组或反基因组, 其与为一个或数个异源病原体中一个或数个抗原免疫因子编码的一个或数个异源基因或基因组片段相结合。

114. 第 113 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV, 其中, 上述一个或数个异源病原体是一异源 RSV, 且上述异源基因或基因

组片段为一个或数个 RSV NS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 或 G 蛋白质或其片段编码。

5 115. 第 113 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
该载体基因组或反基因组是一个完全的或部分的 RSV A 基因组或反基因组，而且该为抗原免疫因子编码的异源基因或基因组片段是一种 RSV B 亚群病毒。

10 116. 第 113 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
该虚构基因组或反基因组整合了一个或数个基因或基因组片段，该 BRSV 决定了减毒性。

15 117. 第 113 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
一个或数个 HPIV1、HPIV2 或 HPIV3 基因或基因组片段被加入至或被整合在该完全的或部分的 HRSV 载体基因组或反基因组内，该 HPIV1、HPIV2 或 HPIV3 基因或基因组片段为一个或数个 HN 和/或 F 糖蛋白质或抗原区域、片段或其抗原免疫因子编码。

20 118. 第 113 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
该载体基因组或反基因组是一个完全的或部分的 BRSV 基因组或反基因组，而且为该抗原免疫因子编码的该异源基因或基因组片段是一个或数个 HRSV。

25 119. 第 118 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，
该完全的或部分的 BRSV 基因或反基因组整合了一个或数个基因或基因组片段，其为一个或数个选自 F、G 和 SH 的 HRSV 糖蛋白基因编码；或一个或数个基因组片段，其为 F、G 和/或 SH HRSV 细胞质区域、横跨膜区域、外部区域或免疫性决定基部分编码。

30 120. 第 113 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，

该载体基因组或反基因组是一个完全的或部分的 HRSV 或 BRSV 基因组或反基因组，而且该异源病原体是选自麻疹病毒、亚群 A 和亚群 B 呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、人类乳突淋巴瘤病毒、I 型和 II 型人类免疫缺陷病毒、疱疹单式病毒、细胞巨化病毒、狂犬病病毒、Epstein Barr 病毒、filoviruses 病毒、bunyaviruses 病毒、flaviviruses 病毒、阿尔法病毒和流行性感冒病毒等病毒。

121. 第 120 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，上述一个或数个异源抗原免疫因子是选自麻疹病毒 HA 和 F 蛋白质、亚群 A 或亚群 B 呼吸道合胞病毒 F、G、SH 和 M2 蛋白质、腮腺炎病毒 HN 和 F 蛋白质、人类乳突淋巴瘤病毒 L1 蛋白质、I 型或 II 型人类免疫缺陷病毒 gp160 蛋白质、疱疹单式病毒和细胞巨化病毒 gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL 和 gM 蛋白质、狂犬病病毒 G 蛋白质、Epstein Barr 病毒 gp350 蛋白质、filovirus G 蛋白质、bunyavirus G 蛋白质、Flavivirus E 和 NS1 蛋白质和阿尔法病毒 E 蛋白质，以及抗原区域、片段及其抗原免疫因子。

122. 第 121 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，该异源病菌是麻疹病毒，而且该异源抗原免疫因子是选自麻疹病毒 HA 和 F 蛋白质和抗原区域、片段及其抗原免疫因子。

123. 第 122 项权利要求中所述之分离的感染性重组 RSV，其中，一个包括一个麻疹病毒 HA 基因可读框(ORF)的转录单位，被加入至或被整合在 HRSV 载体基因组或反基因组内。

124. 一种分离的多核苷酸分子，其包括一重组 RSV 基因或反基因组，它有一个或数个在上述重组基因或反基因组内移位 RSV 基因或基因组片段；它(们)的位置被转移至相对于上述 RSV 基因或反基因组片段在野生型 RSV 基因组或反基因组内的位置、一个离启动子较近或离启动子较远的位置。

125. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述一个或数个移位基因或基因组片段, 通过在上述完全的或部分的重组 RSV 基因组或反基因组内插入或删除一个或数个多核苷酸取代体, 而被转移至一个离启动子较近的位置。

126. 第 125 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸取代体包括一个或数个长度为 150 至 4,000 个核苷酸单位(nts)的多核苷酸插入基, 其被插入在基因组或反基因组的非编码区域内, 或作为一个单独的基因单位(GU)被插入, 上述多核苷酸插入基缺乏一个完全的可读框(ORF), 并在上述重组 RSV 内决定了减毒表型。

127. 第 126 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸插入基包括一个或数个 RSV 基因或基因组片段。

128. 第 127 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸取代体包括一个或数个牛类 RSV(BRSV)或人类 RSV(HRSV)基因或基因组片段, 其选自 RSV NS1、NS2、N、P、M, SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 和 G 基因或基因组片段和首段, 尾段和 RSV 基因或其片段的基因间的部位。

129. 第 128 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸取代体被删除, 以形成该重组 RSV 基因组或反基因组, 从而导致了上述一个或数个移位 RSV 基因或基因组片段的位置, 在上述重组基因组或反基因组内被转移至相对于上述 RSV 基因或基因组片段内在野生型 RSV 基因组或反基因组内的位置、离启动子较近的位置。

130. 第 129 项权利要求中所述之多核苷酸分子, 其中, 上述被删除以形成该重组 RSV 基因组或反基因组的多核苷酸取代体, 包括一

个或数个 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)，或 G 基因或其基因组片段。

5 131. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSV NS1 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV
基因组或反基因组。

10 132. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSV NS2 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV
基因组或反基因组。

15 133. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSV SH 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基
因组或反基因组。

 134. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSV M2(ORF2)的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV
基因组或反基因组。

20 135. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSVG 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基
因组或反基因组或反基因组。

25 136. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSV F 和 G 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV
基因组或反基因组或反基因组。

30 137. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一含有 RSVNS1 和 NS2 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重
组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

138. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 一含有 RSVSH 和 NS2 基因的多核苷酸取代体被删除, 以形成该重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

5

139. 第 130 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 该 RSV SH、NS1 和 NS2 基因全部被删除, 以形成该重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

10

140. 第 128 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸取代体在该重组 RSV 基因组或反基因组内被加入、被替换、或被重排, 从而导致了上述一个或数个移位 RSV 基因或基因组片段的位置, 在上述重组基因组或反基因组内被转移至相对于上述 RSV 基因或基因组片段内在野生型 RSV 基因组或反基因组内的位置、离启动子较近或离启动子较远的位置。

15

141. 第 140 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述在该重组 RSV 基因组或反基因组内被加入、被替换、或被重排的多核苷酸取代体, 包括一个或数个 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)、F 和/或 G 基因或其基因组片段。

20

142. 第 140 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸取代体包括一个或数个为一个或数个 RSV 糖蛋白质或免疫功能区或其抗原决定基编码的 RSV 基因或基因组片段。。

25

143. 第 141 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中, 上述多核苷酸取代体是选自为 RSV F、G 和/或 SH 糖蛋白质或免疫功能区或其抗原决定基编码的基因或基因组片段。

30

144. 第 143 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,

一个或数个选自 F、G 和 SH 的 RSV 糖蛋白基因，在上述重组 RSV 基因组或反基因组内，被加入、替换或重排至相对于上述一个或数个 RSV 糖蛋白基因的野生型基因顺序的位置、离启动子较近的位置。

5 145. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，RSV 糖蛋白基因 G 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，相对于该野生型基因顺序的位置、离启动子较近的基因顺序位置。

10 146. 第 145 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 G 在上述重组 RSV 基因组或反基因组内，被转移至基因顺序位置 1。

15 147. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 F 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，相对于该野生型基因顺序位置 F、离启动子较近的基因顺序位置。

20 148. 第 147 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 F 在上述重组 RSV 基因组或反基因组内，被转移至基因顺序位置 1。

25 149. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 均被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，相对于该野生型基因顺序位置 G 和 F 离启动子较近的基因顺序位置。

30 150. 第 149 项权利要求所述之分离的多核苷酸分子，其中，在上述重组 RSV 基因组或反基因组内，该 RSV 糖蛋白基因 G 被转移至基因顺序位置 1，而 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2。

151. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，

一个或数个 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)或 G 基因或其基因组片段，被从该重组 RSV 基因组或反基因组中删除。

5 152. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，一个含有 RSV NS1 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基因组或反基因组。

10 153. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，一个含有 RSV NS2 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基因组或反基因组。

15 154. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，一个含有 RSV SH 基因的多核苷酸取代体被删除，以形成该重组 RSV 基因组或反基因组。

155. 第 154 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 G 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，相对于该野生型基因顺序位置 G 离启动子较近的基因顺序位置。

20 156. 第 155 项权利要求所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 G 被转移至上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1 。

25 157. 第 154 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 F 被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因组内，相对于该野生型基因顺序位置 F 离启动子较近的基因顺序位置。

30 158. 第 157 项权利要求所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至在上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1 。

159. 第 158 项权利要求所述之分离的多核苷酸分子, 其为 F1/ Δ SH.

5 160. 第 154 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,
该 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 被重排至上述重组 RSV 基因内或反基因组
内, 相对于该野生型基因顺序位置 G 和 F 离启动子较近的基因顺序位
置。

10 161. 第 160 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,
在上述重组 RSV 基因组或反基因组内, 该 RSV 糖蛋白基因 G 被转移
至基因顺序位置 1, 而该 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2 。

15 162. 第 144 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,
该 RSV SH 和 NS2 基因均被删除, 以形成该重组 RSV 基因组或反基
因组或反基因组。

20 163. 第 162 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,
该 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 均被重排至上述重组 RSV 基因组或反基因
组内, 相对于该野生型基因顺序位置 G 和 F 离启动子较近的基因顺序
位置。

25 164. 第 163 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,
在上述重组 RSV 基因内或反基因组呢, 该 RSV 糖蛋白基因 G 被转移
至基因顺序位置 1, 而该 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2 。

 165. 第 164 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,
该 RSV SH、NS1 和 NS2 基因全部被删除, 以形成该重组 RSV 基因组
或反基因组或反基因组。

30 166. 第 165 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子, 其中,

该 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 被重排至上述重组 RSV 基因内或反基因组对基因内，相对于该野生型基因顺序位置 G 和 F 离启动子较近的基因顺序位置。

5 167. 第 166 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，在上述重组 RSV 基因组或反基因组内，该 RSV 糖蛋白基因 G 被转移至基因顺序位置 1，而该 RSV 糖蛋白基因 F 被转移至基因顺序位置 2。

10 168. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸，其中，该重组基因组或反基因组包括一完全的或部分的人类或牛类 RSV 背景基因组或反基因组，与源自不同的 RSV 的一个或数个异源基因和/或基因组片段结合，以形成人-牛类虚构基因组或反基因组。

15 169. 第 168 项权利要求中所述之分离的多核苷酸，其中，一个或两个人类 RSV 糖蛋白基因 F 和 G 取代了一不完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内，对应的一个或两个 F 和 G 糖蛋白基因。

20 170. 第 169 项权利要求中所述之分离的多核苷酸，其中，人类 RSV 糖蛋白基因 F 和 G 两者均取代了牛类 RSV 背景基因或反基因组内对应的 F 和 G 糖蛋白基因。

25 171. 第 168 项权利要求中所述之分离的多核苷酸，其中，一个或数个选自 F、G 和 SH 的人类 RSV 糖蛋白基因，被加入或替换至一个完全的或部分牛类 RSV 背景基因组或反基因组内，相对于其对应物基因或基因组片段的野生型基因顺序位置，离启动子较近的基因顺序位置。

30 172. 第 171 项权利要求中所述之分离的多核苷酸，其中，人类 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均被分别替换至一不完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内的顺序位置 1 和 2，以分别取代在野生型位置 7 和

8 被删除的其对应物 G 和 F 糖蛋白基因。

5 173. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸，其中，通过
在完全的或部分的牛类背景基因或反基因组内，一个或数个另外的选
自人类 RSV 的异源基因或基因组片段的加成或替换，该重组基因组或
反基因组被进一步修饰，以提高基因稳定性或在该重组病毒培养基上
改变减毒性、反应遗传性或生长率。

10 174. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
该重组基因或反基因组整合了选自人类 RSV 亚群 A 和亚群 B 的抗原
免疫因子。

15 175. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
该重组基因或反基因组通过整合一个或数个减毒突变体而被进一步修
饰。

20 176. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
该重组基因或反基因组通过整合核苷酸变体而被进一步修饰，该核苷
酸变体决定了选自生长特征、减毒性、温度敏感性、冷适应性、菌斑
大小、宿主范围限制等方面的变化，或免疫原性变化的表型变化。

 177. 第 176 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一个 SH、NS1、NS2、M2ORF2 或 G 基因被修饰。

25 178. 第 177 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
该 SH、NS1、NS2、M2 ORF2 或 G 基因被完全地或部分地删除，或
该基因的表达通过在该基因的一个可读框内引入一个或数个中止密码
子而被消除。

30 179. 第 176 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，

该核苷酸变体包括了在重组 RSV 基因组或反基因组内，一个核苷酸单位的删除、插入、加成，或一个选定的 RSV 基因顺式作用的调节序列的重排。

5 180. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，上述多核苷酸取代体包括在 RSV 可读框的开端或末端，或在该 RSV 基因组的一个基因间区域或 3'前导或 5'尾段，非转录序列内一个或数个的删除。

10 181. 第 180 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，上述多核苷酸取代体包括基因的部分性删除。

 182. 第 181 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，上述部分性基因删除是 SH 基因的部分性删除。

15 183. 第 182 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，该 SH 基因的上述部分性删除包括该 SH 下游非转录区域内的一个删除。

20 184. 第 183 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其为 RSV6120，在该重组 RSV 反基因组内的 4499-4610 位置，有 112 个核苷酸单位被删除。

 185. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
25 上述多核苷酸取代体是选自 RSV 基因内下游未转录序列的一个或数个的区域。

 186. 第 185 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
 上述下游未转录的序列是选自 NS1(位置 519-563)、NS2(位置 1003-
30 1086)、P(位置 3073-3230)、M(位置 4033-4197)、F(位置 7387-7539)和/

或 M2(位置 8433-8490)等基因。

187. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
上述多核苷酸取代体是选自 RSV 基因内上游未转录序列的一个或数个
5 的区域。

188. 第 187 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
上述一个或数个上游未转录的序列是选自 NS1(位置 55-96)、NS2(位置
10 606-624)和/或 SH(位置 4231-4300)。

189. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
上述多核苷酸取代体包括该 RSVG 基因内第 4683 到 4685 位核苷酸单
位的删除。

190. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
15 上述多核苷酸取代体是选自一个或数个 RSV 基因间序列。

191. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
上述多核苷酸取代体选自该 RSV 的 5'尾段区域内的核苷酸。

20 192. 第 191 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
紧随 L 基因 5'尾段的一部分区域，尺寸被减少了 75 核苷酸单位、100
核苷酸单位、125 个或更多的核苷酸单位，而使 5'基因组终点原封未
动。

25 193. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
上述多核苷酸取代体选自 RSV 3'前导区域内的核苷酸。

194. 第 193 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
30 未包括位于 3'前导区域最初 11 个核苷酸单位内的病毒启动子核心部

分的一部分 3' 尾段区域被删除。

195. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一个 RSV NS1、NS2、SH、F 和/或 M2 基因、或其任一组合的部分性
或完全性删除，使基因组长度可调性地减少了 1-806 个核苷酸单位。

196. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一个 RSV 基因间区域、或其任一组合的部分性或完全性删除，使基因
组长度可调性地减少了 1-198 个核苷酸单位。

197. 第 124 项权利要求中所述之分离的多核苷酸分子，其中，
一个 RSV 基因间区域、或其任一组合的部分性或完全性删除，使基因
组长度可调性地减少了 1-198 个核苷酸单位。

198. 一个从一个或数个分离的为 RSV 编码的多核苷酸分子来生
产感染性减毒重组 RSV 病毒粒子的方法，其包括：

在一细胞或无细胞溶菌产物中的表达载体，其含有一分离的多核
苷酸，该核苷酸含有一重组 RSV 基因组或反基因组，该重组基因组或
反基因组内含有一个或数个被转移的 RSV 基因或基因组片段；相对于
上述 RSV 基因或基因组片段在野生型 RSV 基因组或反基因组内、以
及 RSV N、P、L 和 RNA 聚合酶延伸因子蛋白质内的位置，该重组基
因组或反基因组的位置被转移至一个离启动子较近或离启动子较远的
位置。

199. 第 198 项权利要求所述之方法，其中，该重组 RSV 基因组
或反基因组以及 N、P、L 和 RNA 聚合酶延伸因子蛋白质，是由两个
或两个以上不同的表达载体来表达的。

200. 一种分离的感染性嵌合呼吸道合胞病毒(RSV)，其包括一主
要的病毒粒子(N)蛋白质、一病毒粒子磷蛋白质(P)、一大聚合酶蛋白

质(L)、一 RNA 聚合酶延伸因子, 和一个完全的或部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组, 其与选自 RSV NS1、NS2、M、SH、G 和/或 F 异源基因和/或基因组片段的人类 RSV 的许多异源基因和/或基因组片段结合, 以形成一嵌合人-牛 RSV 基因组或反基因组。

5

201. 第 200 项权利要求中所述之分离的感染性 RSV, 其中, 人类 NS1 和 NS2 基因两者均取代了其对应物牛类 NS1 和 NS2 基因。

10

202. 第 201 项权利要求中所述之分离的感染性 RSV 为 rBRSV/A2-NS1+2。

15

203. 第 200 项权利要求中所述之分离的感染性 RSV, 其中, 人类 NS1、NS2、G 和 F 基因取代了其对应物牛类 NS1、NS2、G 和 F 基因。

20

204. 第 203 项权利要求中所述之分离的感染性 RSV 为 rBRSV/A2-NS1+2GF。

205. 第 200 项权利要求中所述之分离的感染性 RSV, 其中, 人类 M、SH、G 和 F 基因取代了其对应物牛类 M、SH、G 和 F 基因。

206. 第 203 项权利要求中所述之分离的感染性 RSV 为 rBRSV/A2-MSHGF。

25

207. 一分离的多核苷酸分子, 其包括一重组 RSV 基因或反基因组, 其包括一个完全的或部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组, 其与选自 RSV NS1、NS2、M、SH、G 和/或 F 异源基因和/或基因组片段的人类 RSV 的许多异源基因和/或基因组片段结合, 以形成一嵌合人-牛 RSV 基因组或反基因组。

30

从邻近启动子的基因表达保护性抗原
的呼吸道合胞病毒疫苗

5

与有关申请书的对照参考

本申请书要求获得由 Krempf 等人于 2000 年 6 月 23 日提交的美国第 60/213,708 号临时专利申请书的优先权。

10

本发明的背景

15

人类的呼吸道合胞病毒(HRSV)是全世界导致严重小儿科呼吸道疾病最主要的病毒(Collins 等, 菲尔德病毒学 2:1313-1352, 1996)。与所有的微生物病菌相比, 呼吸道合胞病毒(RSV)是一岁以下婴儿肺炎和细支气管炎最主要的起因。实际上所有儿童在两岁前均会受感染, 而且大龄儿童和年轻的成人发生再感染的频率相当可观(Chanock 等, 人类病毒感染, 第 3 版, A.S. Evans, ed., Plenum Press, N.Y., 1989)。RSV 是五分之一以上因呼吸道疾病入院的小儿科病例的起因。仅在美国, RSV 每年导致了近 100,000 例住院和 4,500 例死亡(Heilman, 传染病杂志 161:402-6, 1990。此外, 有证据显示, 在生命早期的严重呼吸道感染, 可能会引起哮喘或使其恶化(Sigurs 等, 小儿科 95:500-5, 1995)。

20

25

虽然人类的 RSV 通常被认为是儿科的问题, 它也被认为是在老年人中导致严重疾病的一个重要因素(Falsey 等, 传染病杂志 172:389-394, 1995)。人类 RSV 在某些缺乏免疫能力的人中, 例如骨髓移植接受者, 也会引起有生命威胁的疾病(Fouillard 等, 骨髓移植 9:97-100, 1992)。

30

为了应付人类的 RSV, 可利用一种化学治疗试剂三氮唑核苷。但是, 它的功效和应用是有争议的。还有一些可作为 RSV 干涉剂的由供体 IgG (Groothuis 等, 新英格兰医学杂志 329:1524-30, 1993)或一种人

格化 RSV 特效单克隆抗体所组成的获许可证产品。这些产品是作为被动性免疫预防制剂而用于高风险患者。虽然这些产品是很有益的，但它们的高成本以及缺乏长期功效等其它因素，使得它们不适合于普遍应用。其它的不利因素包括经血液传播病毒的可能性以及在制备和贮存方面的困难和费用。然而，控制传染病、尤其是控制起源于病毒的疾病的历史，显示了疫苗的高度重要性。

尽管为了开发抵抗 RSV 的有效疫苗试剂而进行了数十年的研究，仍还没有获得安全和有效的疫苗，以防止与 RSV 感染相关的严重发病率和相当高的死亡率。疫苗开发的失败，部分地与幼小婴儿对 RSV 抗原的血清和分泌抗体反应较弱的这个事实有关。所以，这些患者遭受 RSV 的感染则更加严重，但是渐增的免疫功能似乎能保护大龄儿童和成人免受病毒的更严重的影响。

RSV 感染的免疫机制在最近成了焦点。分泌抗体对于保护上呼吸道似乎是最重要的，但是，在抵抗 RSV 对下呼吸道感染方面，高水平的血清抗体被认为是起主要的作用。RSV 特效细胞毒素 T 细胞，另一种诱导性免疫的效应物武器，对于解决 RSV 感染的问题也是很重要的。然而，虽然该效应物能因先前的免疫接种而增效，从而增强对病毒挑战的抵抗力，但其效果是短命的。F 和 G 表面糖蛋白是 RSV 两个主要的保护性抗原，并且显示是能诱导起 RSV 抑制性抗体以及对挑战长期的抵抗力仅有的两种 RSV 蛋白质(Collins 等, 菲尔德病毒学, Fields 等编, 2:1313-1352, Lippincott-Raven, 费城, 1996 年; Connors 等, 病毒学杂志 65(3):1634-7, 1991)。第三种 RSV 表面蛋白质 SH, 则未能诱导起 RSV 抑制性抗体或对 RSV 挑战的明显抵抗力。

开发 RSV 活疫苗的一个障碍是，对于在减毒性和免疫性之间达到适当平衡有一定的困难，其部分原因是由于某些减毒病毒基因的不稳定性、RSV 在细胞培养基内相对较差的生长，以及病毒粒子的不稳定性。此外，自然感染所诱导的免疫性并不能完全地防护随后发生的

感染。可能造成这种情况的一系列的因素，包括免疫系统在限制呼吸道内腔表面病毒感染性方面的相对无效、粘膜局部免疫性的短命本性、病毒迅速和广泛的复制、年幼者由于免疫能力尚未成熟而较低的免疫反应、经胎盘获得的母亲血清抗体所产生的免疫抑制，以及病毒的某些特征，例如 G 蛋白质的高度糖基化。而且，正如下面将要叙述的，人类 RSV 是作为两个抗原亚群 A 和 B 而存在，并且免疫性对于一个亚群的效力与另一个亚群相比是减少的。

虽然 RSV 在整个生命期间能多次发生再感染，但由于先前的感染所诱导的保护性免疫，其严重程度通常是降低的；因此，进行免疫预防是可行的。经减毒的活 RSV 疫苗，可通过鼻内注射以引发轻微的免疫感染。与肠外注射途径相比，这种方式具有简单和安全的优点。它还造成了对于局部性呼吸道免疫的直接刺激，其在抵抗 RSV 方面起了一个主要的作用。它还消除了 RSV 特有的经母体衍生的血清抗体的免疫抑制作用，这种抑制作用在非常年幼者身上是典型的。并且，虽然 RSV 抗原的肠外注射有时可能与同免疫病理的复杂化有关(Murphy 等，疫苗 8(5):497-502, 1990)，但在活的病毒中这还从未被观察到过。

在 60 年代中期，一种经甲醛钝化的病毒疫苗被用来对 RSV 进行试验，但未能成功地保护免受 RSV 感染或疾病的侵犯，而且在实际上，其在随后的病毒感染期间反而使症状恶化。(Kim 等，Am. J. Epidemiol, 89:422-434, 1969 年；Chin 等，Am. J. Epidemiol, 89:449-463, 1969 年；Kapikian 等，Am. J. Epidemiol, 89:405-421, 1969)。

最近，对 RSV 疫苗的研究集中于减毒的 RSV 突变体。Friedewald 等，(美国医学学会 204:690-694, 1968)报导了一种冷法培育的 RSV 突变体(cpRSV)，它看来已被减毒的足以作为一种候选疫苗。这种突变体与它的野生型(wt)亲本病毒相比，在 26°C 条件下显示出成长率略有增加，但它的复制过程既对温度不敏感，对冷也相当不适应。但是，该冷法培育的突变体，被减毒以用于成人。尽管其减毒效果及对于曾

被 RSV 感染过的婴幼儿(即血清反应呈阳性者)所产生的免疫性是令人满意的, 该 cpRSV 突变体仍保留了对于血清反应呈阴性婴儿上呼吸道的低度毒性。

5 同样, Gharpure 等人(病毒学 3:414-421, 1969)也报导了温度敏感性 RSV(tsRSV)突变体的分离。这也是一种有前途的候选疫苗。一种被称为 ts-1 的突变体, 在实验室和自愿者中进行了详尽的评估试验。突变体在成人自愿者中引起了无症状感染, 并在免疫接种 45 天以后对野生型的病毒产生了抵抗。此外, 在血清反应呈阳性的婴幼儿经历
10 无症状感染的同时, 血清反应呈阴性的婴儿却出现了鼻炎症状以及其它轻微的症状。再者, 还发现了 ts 的表型的不稳定性。虽然温度敏感性完全或部分地丧失的病毒只代表了一小部分可从疫苗接种者中重获的病毒, 但它没有与除轻微的鼻炎以外的其它症状联系在一起。

15 上述研究及其它研究显示, 某些冷法培育和温度敏感性 RSV 菌株的减毒程度不足, 并在某些疫苗接种者中引起了轻微的症状, 尤其是血清反应呈阴性的婴儿; 而其它一些菌株则是减毒过度, 且未能充分地进行复制以引起保护性免疫反应(Wright 等, 感染性免疫, 37:397-400, 1982)。而且, 候选疫苗突变体的基因不稳定性导致其温
20 度敏感性表型的损失, 更进一步妨害了有效的 RSV 疫苗的开发。参阅(Hodes 等, 实验生物和医学协会学报, 实验生物和医学协会 145:1158-1164, 1974 年; McIntosh 等, 儿科疾病 8:689-696, 1974 年; 及 Belshe 等, 医疗病毒学, 3:101-110, 1978)。

25 作为减毒 RSV 活疫苗的一个替代物, 研究人员还使用净化的 RSV 包膜糖蛋白对亚单位候选疫苗进行了试验。糖蛋白在棉鼠的肺部引起了对 RS 病毒感染的抵抗力(Walsh, 传染病杂志 155:1198 年-- 1204 年, 1987), 但该抗体的抑制作用及对啮齿动物的免疫作用非常微弱, 净化亚单位疫苗导致了疾病恶化(Murphy, 疫苗 8:497-502, 1990)。

30

对于表达 F 或 G 包膜糖蛋白的重组牛痘病毒疫苗也进行了探索。这些重组体表达的 RSV 糖蛋白难以同其真正的对应物病毒区分，而且，被牛痘-RSVF 和 G 重组体经皮感染的啮齿目动物，产生了能抑制病毒感染的高度有效抗体。用牛痘-F 重组体对棉鼠的感染，确实在下
5 呼吸道激起了对于 RSV 的复制几乎完全的抵抗，在上呼吸道也激起了相当的抵抗。(Olmsted 等, 全国科学院学报, 美国 83:7462-7466, 1986)。然而，对黑猩猩用牛痘-F 和-G 重组体进行免疫接种时，其对于 RSV 在上呼吸道的挑战几乎未能提供什么保护(Collins 等., 疫苗 8:164-168, 1990)，而在下呼吸道的保护则是非一致性的(Crowe 等, 疫苗
10 11:1395-1404, 1993)。

尽管有上述为开发各种有效 RSV 疫苗所作出的各种各样的努力，至今尚无 RSV 疫苗被批准获得许可证。先前的各种方法尚未兑现诺言的事实强调，对于开发 RSV 疫苗需要有新的战略，尤其是操纵重组
15 RSV、整合基因变化之方法，从而在有活力的减毒 RSV 重组体中产生新的表型性能。然而事实证明，迄今为止，对 RSV 的基因 RNA 及其它非节段型负义 RNA 病毒的操纵是困难的。这方面主要的障碍包括这些病毒的裸露基因 RNA 的非感染性、病毒在组织培养基中的不良成长、很长的复制周期、病毒粒子的不稳定性、复杂的基因，以及基因
20 产品的难以控制。

重组 DNA 技术使得从 cDNA 回收感染性非节段型负链 RNA 病毒、用基因手段操纵病毒的克隆以构成新颖的候选疫苗，以及迅速地评估其减毒性和表型稳定性程度均成为可能(关于这方面的回顾，参阅
25 Conzelmann, 普通病毒学杂志 77:381-89, 1996; Palese 等, 美国国家科学院 93:11354-58, 1996)。在这方面，在基本的病毒蛋白质存在的情况下，从 cDNA-编码反基因组 RNA 回收感染性呼吸道合胞病毒(RSV)、副流感病毒(PIV)、狂犬病病毒(RaV)、囊状口腔炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、牛瘟病毒和仙台病毒(SeV)等重组体的研究均有所报道。(参阅，如 Garcin 等, 欧洲分子生物机构杂志 14:6087-6094, 1995;
30

Lawson 等, 美国国家科学院 92:4477-81, 1995; Radecke 等, 欧洲分子生物机构杂志 14:5773-5784, 1995; Schnell 等, 欧洲分子生物机构杂志 13:4195-203, 1994; Whelan 等, 美国国家科学院 92:8388-92, 1995; Hoffman 等, 病毒学杂志 71:4272-4277, 1997; Pecters 等, 5 病毒学杂志 73:5001-5009, 1999; Kato 等, 从基因到细胞 1:569-579, 1996; Roberts 等, 病毒学 247(1), 1-6, 1998; Baron 等, 病毒学杂志 71:1265-1271, 1997; 国际出版物 No. WO 97/06270; 美国临时专利申请书 No. 60/007,083, 1995 年 9 月 27 日申请; 美国专利申请书 No. 08/720,132, 1996 年 9 月 27 日申请; 美国临时专利申请书 No. 10 60/021,773, 1996 年 7 月 15 日申请; 美国临时专利申请书 No. 60/046,141, 1997 年 5 月 9 日申请; 美国临时专利申请书 No. 60/047,634, 1997 年 5 月 23 日申请; 美国专利申请书 No. 5,993,824, 1999 年 11 月 30 日发布(对应于国际出版物 No. WO 98/02530); 美国专利申请书 No. 09/291,894, 由 Collins 等于 1999 年 4 月 13 日申请; 15 美国临时专利申请书 No. 60/129,006, 由 Murphy 等于 1999 年 4 月 13 日申请; Collins, 等, 美国国家科学院学报 92:11563-11567, 1995; Bukreyev 等, 病毒学杂志 70:6634-41, 1996, Juhasz 等, 病毒学杂志 71(8):5814-5819, 1997; Durbin 等, 病毒学 235:323-332, 1997; He 等, 病毒学 237:249-260, 1997; Baron 等, 病毒学杂志 20 71:1265-1271, 1997; Whitehead 等, 病毒学 247(2):232-9, 1998a; Buchholz 等 病毒学杂志 73:251-9, 1999; Whitehead 等, 病毒学杂志 72(5):4467-4471, 1998b; Jin 等, 病毒学 251:206-214, 1998; 和 Whitehead 等, 病毒学杂志 73:(4)3438-3442, 1999, 以及 Bukreyev 等, 美国国家科学院学报 96:2367-72, 1999, 出于一切目的, 所包括 25 的每项参考文献均完整地引用在此)。

在前述的开发研究基础上, 现在有可能从 cDNA 恢复感染性 RSV, 并设计和实施对 RSV 的各种各样的基因操纵, 以便构成新颖的候选疫苗。其后, 除了其它理想的表型特征外, 还可对减毒程度和表型稳定性, 再进行评估和调整。因此, 目前依然存在的挑战是发展出 30

一份关于基因操纵方法的广泛且多样化的菜单，这些方法可以单独地使用，也可与其它类型的基因操纵结合使用，以构建可用于广泛疫苗用途的感染性、减毒的 RSV。就此而论，目前在此技术区域中的紧迫需要，依然是新的安全有效的手段和方法，以便能设计出安全有效的疫苗，以减轻 RSV 造成的严重健康问题。令人惊讶的是，本发明为构建感染性减毒候选 RSV 疫苗提供了进一步的手段，从而实现了这一需要。

本发明之概述

10 本发明提供了一类重组呼吸道合胞病毒(RSV)，以产生一种对人类和哺乳动物有感染性的、使病毒减弱并产生免疫性能的重组疫苗病毒。该病毒是在一个重组 RSV 基因组或反基因组之内，通过转换一个或数个的基因或基因组片段之间的相对基因顺序或空间位置而修饰的病毒。本发明之重组 RSV 典型地包括一主要的病毒粒子(N)蛋白质、
15 一病毒粒子磷蛋白质(P)、一个大的聚合酶蛋白质(L)、一 RNA 聚合酶延伸因子，及一个完全地或部分地重组的 RSV 基因组或反基因组。在该重组基因组或反基因组之内，具有一个或数个其位置被转移的 RSV 基因或基因组片段。在本发明的某些方面，该重组 RSV 之特征为一个或数个其位置被转移的 RSV 基因或基因组片段，能在一完全地或部分
20 地重组的 RSV 基因组或反基因组之内，通过一个或数个的多核苷酸取代基的插入、删除或重排，而被转移到离启动子更近或更远的位置。多核苷酸取代基可作为一个单独的基因单位(GU)，被插入或被重排入一重组基因组或反基因组的非编码区域(NCR)，也可被引入重组 RSV 基因组或反基因组。

25 在本发明的一些典型的具体实施例中，被分离出的感染性重组 RSV 由一个或一个以上多核苷酸取代基的添加、删除或重排而构成。该多核苷酸可从一个或数个 RSV 基因或基因组片段中选出；而该 RSV 基因或基因组片段则是从 RSV NS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、
30 M2(ORF2)、L、F 和 G 基因、基因组片段，以及 RSV 基因组及其片

段的首段、尾段和基因间部位中选出的。在一些更详细的具体实施例中，被插入的多核苷酸及在重组 RSV 基因组或反基因组内被删除或被重排的单元，是从一个或数个牛类 RSV(BRSV)或人类的 RSV(HRSV)基因或基因组片段中选出；而该 BRSV 或 HRSV 基因或基因组片段则是从 RSV NS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 和 G 基因、基因组片段，以及 RSV 基因组及其片段的首段、尾段和基因间部位中选出的。

在本发明的某些方面，多核苷酸取代基被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组。以此方式被删除的多核苷酸取代基，使得一个或一个以上在重组基因组或反基因组内“已转移的”RSV 基因或基因组片段，在一野生型的 RSV(例如，HRSV A2 或 BRSV 堪萨斯菌株)基因组或反基因组之内再次发生位置转移，转移至一个相对于被转移基因或基因组片段的位置而言较接近于启动子的位置。能以此方式被删除以形成重组 RSV 基因组或反基因组的典型多核苷酸取代基，可从一个或数个 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)、或 G 基因或其基因组片段中选出。

在本发明的一些更详细的具体实施例中，一个含有 RSV NS1 基因的多核苷酸取代基被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组。作为选择方案，一个含有 RSV NS2 基因的多核苷酸取代基，也可被删除以形成重组 RSV 基因组或反基因组。作为选择方案，含有 RSV SH 基因的多核苷酸取代基，也可被删除以形成重组 RSV 基因组或反基因组。作为选择方案，含有 RSV M2(ORF2)的多核苷酸取代基也可被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组。作为选择方案，一个含有 RSV G 基因的多核苷酸取代基可被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

在另外的一些具体实施例中，多个含有 RSV 基因或基因组片段的多核苷酸取代基可以被删除。例如，RSV F 和 G 基因两者均可被删

除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。作为选择方案，RSV NS1 和 NS2 基因也可两者均被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。作为选择方案，RSV SH 和 NS2 基因也可两者均删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。作为选择方案，RSV SH、NS1 和 NS2 基因可全部被删除，以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组。

在本发明的一些不同的具体实施例中，提供了被分离出的感染性重组 RSV，其中，一个或数个多核苷酸取代基被加入、取代、或重排在重组 RSV 基因组或反基因组内，使得一个或一个以上已转移 RSV 基因或基因组片段发生位置转移。在这些变种之中，基因和基因组片段的插入和重排，可将所涉及的基因或基因组片段，在一对应的(例如牛或人类的)野生型 RSV 基因组或反基因组之内，引入或重排至相对于每个所涉及的(被插入的或被重排的)基因或基因组片段的位置来说，较接近或较远离于启动子的位置。能在重组 RSV 基因组或反基因组内被加入、取代或重排的多核苷酸取代基，可从一个或一个以上 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)、F、和/或 G 基因或其基因组片段中选出。

在更详细的一些具体实施例中，被插入或重排的多核苷酸取代基是在含有一个或一个以上 RSV 基因或基因组片段的重组 RSV 基因组或反基因组中选出的。该 RSV 基因或基因组片段已为一个或数个 RSV 糖蛋白、或免疫性区域、或 RSV 糖蛋白的抗原决定基编码。在一些典型的实施例中，这些多核苷酸取代基是从为 RSV F、G、和/或 SH 糖蛋白、或免疫性区域、或其抗原决定基编码的基因或基因组片段中选出的。例如，一个或数个从 F、G 和 SH 中选出的 RSV 糖蛋白基因，可在重组 RSV 基因组或反基因组之内，被加入、取代或重排至与该基因的野生型基因顺序位置相比，较接近于或远离于启动子的位置。

在一些典型的实施例中，RSV 糖蛋白基因 G 在重组 RSV 基因组或反基因组之内，被重排至一个与 G 基因的野生型基因顺序位置

相比, 较接近于启动子的顺序位置。在一些更详细的方面, RSV 糖蛋白基因 G 被转移至上述重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1。在其它的一些典型具体实施例中, RSV 糖蛋白基因 F 被重排在重组 RSV 基因组或反基因组内较接近于启动子的位置, 例如通过将 F 基因转移至重组基因组或反基因组内的基因顺序位置 1 的方式。在另外一些典型具体实施例中, RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均在重组 RSV 基因组或反基因组内被重排, 与它们各自的野生型的基因顺序位置相比, 较接近于启动子的基因顺序位置。在某些更详细的方面, RSV 糖蛋白基因 G 被转移到基因顺序位置 1, 而 RSV 糖蛋白基因 F 则被转移到基因顺序位置 2。

在另外一些以糖蛋白基因转移为特征的结构中, 产生了重组 RSV, 它们含有一个或一个以上从 F、G 和 SH 中、或其基因组片段中选出的 RSV 糖蛋白基因, 并被加入、取代或重排在重组 RSV 基因组或反基因组内, 其中, 一个或数个 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2) 或 G 基因、或其基因组片段被删除。如此, RSV F、G 或 SH 的一个基因或基因组片段可被加入、取代或重排在背景中, 其中, 一含有 RSV NS1 基因的多核苷酸取代基被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组。作为选择方案, RSV F、G 或 SH 的基因或基因组片段也可被加入、取代或重排在背景中, 其中, 一含有 RSV NS2 基因的多核苷酸取代基被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组。作为选择方案, RSV F、G 或 SH 的基因或基因组片段也可被加入、取代或重排在背景中, 其中, 一含有 RSV SH 基因的多核苷酸取代基被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组。

在如下的一个例子中, RSV 糖蛋白基因 G 被重排在一个 SH 基因已被删除的重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 的野生型基因的顺序位置相比, 较接近于启动子的基因顺序位置。在某些更详细的方面, RSV 糖蛋白基因 G 被转移到重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1, 正如该候选重组疫苗 G1/ Δ SH 的例子所示。在另一个例子

中, RSV 糖蛋白基因 F 被重排在一个 SH 基因已被删除的重组 RSV 基因组或反基因组之内较接近于启动子的位置。在某些更详细的方面, 基因 F 被转移到基因顺序位置 1, 正如该候选重组疫苗 F1/ Δ SH 的例子所示。在如下另一例子中, RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均被重排在一个 Δ SH 重组 RSV 基因组或反基因组内, 与 G 和 F 野生型基因的顺序位置相比, 较接近于启动子的基因顺序位置。在更详细的方面, RSV 糖蛋白基因 G 被转移到基因顺序位置 1, 而 RSV 糖蛋白基因 F 则被转移到重组 RSV 基因组或反基因组内的基因顺序位置 1, 正如该重组 G1F2/ Δ SH 的例子所显示的。

另外还提供了一些以糖蛋白基因转移为特征之移位基因 RSV 例子; 该糖蛋白基因是从在一个重组 RSV 基因组或反基因组之内生成的 F、G 和 SH 中所选出的; 该重组 RSV 基因组或反基因组已有多个从 RSV NS1、NS2、SH、M2(ORF2)及 G 基因或基因组片段选出的基因或基因组片段被删除。在一个例子中, RSV SH 和 NS2 基因两者均被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组, 而且 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 之一或两者均被重排在重组 RSV 基因组之内离启动子较近的基因顺序位置。在某些更详细的方面, G 被转移到基因顺序位置 1, 而 F 被转移到基因顺序位置 2, 正如重组 G1F2/ Δ NS2 Δ SH 的例子所示。在另一例子中, 所有 RSV SH、NS1 和 NS2 基因均被删除, 以形成重组 RSV 基因组或反基因组或反基因组, 并且 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 之一或两者均被重排在重组 RSV 基因组或反基因组之内离启动子较近的位置, 正如该重组候选疫苗 G1F2/ Δ NS2 Δ NS2 Δ SH 的例子所示。

在本发明的另外一些方面, 移位基因 RSV 被结合或被引入人-牛类嵌合 RSV 内。在这些方面, 重组基因组或反基因组包括一个完全的或部分的人类 RSV (HRSV)或牛类 RSV(BRSV)背景基因组或反基因组; 该背景基因组或反基因组与一个或数个异源基因或基因组片段相结合; 该异源基因或基因组片段的范围为从一个不同的 RSV 至一个

人-牛类嵌合 RSV 基因组或反基因组。该不同的 RSV、HRSV 或 BRSV 的异源基因或基因组片段，可被加入或被取代至该部分的或完全的 HRSV 或 BRSV 背景基因组或反基因组内，与对应物基因或基因组片段的野生型基因顺序位置相比，离启动子较近或离启动子较远的位置。在此提供的一个这样的例子中，人类 RSV 糖蛋白基因 G 和 F 两者均分别在基因顺序位置 1 和 2 被取代，以在一个部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内，替换在野生型位置 7 和 8 被分别删除的对应物 G 和 F 糖蛋白基因，正如重组病毒 rBRSV/A2-G1F2 的例子所示。在其它的一些具体实施例中，从 F、G、SH 和 M 中选出的一个或一个以上外壳有联系的人类 RSV 基因，被加入或被取代至一部分的或完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组之内。在一些更详细的方面，从 F、G、SH 和 M 选出的一个或一个以上外壳有联系的人类 RSV 基因，被加入或被取代至一部分的或完全的牛类 RSV 背景基因组或反基因组之内，其中从 F、G、SH 和 M 中选出的一个或一个以上外壳有联系的基因被删除。在下述的一个例子中，人类 RSV 外壳有联系的基因 F、G 和 M 被加入至一部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组之内，其中所有外壳有联系的 F、G、SH 和 M 基因均被删除，正如重组 rBRSV/A2-MGF 病毒的例子所示。

在本发明的另一供选择的具体实施例中，提供了一些所分离出的感染性重组 RSV，其中 RSV M2(ORF1)被转移到重组 RSV 基因组或反基因组内一个离启动子较近的位置。这个基因转移的结果是正向调节了重组病毒的转录产物。

在本发明的另一些方面，产生了一些能减毒的、移位基因 RSV，其中，通过引入一个或一个以上减毒突变体之方式，使重组基因组或反基因组被进一步修饰，从而在所生成的病毒或亚病毒粒子中规定了一种减毒表型。这些减毒突变体可以根据一个合理的设计诱变战略，重新产生并测试减毒性。作为选择方案，该减毒突变体可在现有的生物衍生的突变型 RSV 和其后被引入本发明的基因位置转移的 RSV 中

被鉴定。

结合本发明被引入重组 RSV 的基因位置改变，通过引入能增强或减弱嵌合病毒之减毒性的额外突变体，以调整减毒表型，往往是令人中意的。如此，通过引入至少一个、最好是两个或更多的不同的减毒突变体，例如，从已知的一组生物衍生的突变型 RSV 菌株中鉴定出的突变体，候选的疫苗菌株的病毒可被进一步减弱。理想的人类突变型 RSV 菌株是冷法培育的(cp)和/或是对温度敏感的(ts) 突变体，例如，名为“cpts RSV 248 (ATCC VR 2450)、cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454)、cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453)、cpts RSV 530 (ATCC VR 2452)、cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451)、cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455)、RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542)，以及 RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579)”等突变体(每种均按照布达佩斯条约的规定储存在美国分类培养基收集机构(ATCC)，其地址为 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A.，并被授予上述识别登记号)。这类生物衍生的典型突变体，提供了一份很大的减毒突变体“菜单”，每一种减毒突变体均可与该组中任何其它突变体相结合，用以校准作为疫苗使用的人类-牛类嵌合重组 RSV 的减毒水平。其它的突变体可按其名称从具有非-ts 和非-cp 减毒突变体的 RSV 衍生，例如，小噬菌斑(sp)、冷适应性(ca) 或寄主范围受限(hr)突变体菌株。如列在参考文献中、由 Murphy 等在 1999 年 4 月 13 日提出的美国第 60/129,006 号临时专利申请书所述，突变体可被引入人类或牛类反基因组顺序中，而且，在人类、牛类或其它 RSV 突变体中所鉴定出的减毒突变体，通过使突变体基因定位至基因组受体相应的同源部位，并使受体的自然顺序变异为突变体基因型的方式(通过一个同样的或保守的突变体)，可能被转移到异源的 RSV 受体内的(例如，牛类或人类各自的 RSV)。

如此，在本发明之更详细的具体实施例中，提供了一些移位基因 RSV，其中，重组基因组或反基因组整合了至少一种、最多达一整套

的存在于一组突变型人类 RSV 菌株内的减毒突变体，该组突变型菌株包括：cpts RSV 248 (ATCC VR 2450)、cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454)、cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453)、cpts RSV 530 (ATCC VR 2452)、cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451)、cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455)、RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542)，以及 RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579)。在某些具体实施例中，重组基因组或反基因组整合了从不同的突变型 RSV 菌株中所接收的减毒突变体。

设计并选择来用于疫苗用途的移位基因 RSV，经常有至少两个、有时三个或更多的减毒突变体，以使减毒达到一个令人满意的水平而用于广泛的临床使用。在一个具体实施例中，至少有一个减毒的突变体发生在 RSV 聚合酶基因 L(或是供体，或受体基因)中，并涉及一个或数个核苷酸取代基，其规定了氨基酸在聚合酶蛋白质中的变化。该聚合酶蛋白质又规定了或许涉及、也或许不涉及温度敏感性(ts)表型的减毒表型。除 L 以外，譬如 M2 基因的情况，在任何额外的 RSV 基因中，本发明的移位基因 RSV 可引入一个减毒突变体。然而在这方面，理想的人-牛嵌合 RSV，在聚合酶大基因 L 中含有一个或数个核苷酸取代基，从而造成了 RSV 聚合酶基因 L 中，氨基酸 Asn43, Cys319, Phe 521, Gln831, Met1169, Tyr1321 和/或 His 1690 等的变化，正如 Ile 取代 Asn43, Leu 取代 Phe521, Leu 取代 Gln831, Val 取代 Met1169, 以及 Asn 取代 Tyr1321 的例子。氨基酸的另一些变化，尤其是这些位置上的与突变体残余有关的保守变化，当然也可以发生，从而产生一个与突变体取代体类似的效应。本发明中另外一些希望引入嵌合人-牛 RSV 中的突变体，包括在 RSV N 基因中的 Val267、在 RSV F 基因中的 Glu218 和/或 Thr523 规定了氨基酸取代基、以及在基因 M2 基因的开端序列中规定了核苷酸取代基的减毒突变体。任何在此所鉴定出的一个或一个以上减毒突变体的组合，直至全套的这类突变体，均可被引入该嵌合人-牛 RSV，以产生适用于选定的或广泛的疫苗接种者的减毒重组病毒。

30

在本发明的其它更详细的具体实施例中，提供了移位基因 RSV，其中，该重组基因组或反基因组引入了至少一个、最多可达一整套的减毒突变体；该减毒突变体规定了在 RSV N 基因中的 Val267、在 RSV F 基因中的 Glu218 和/或 Thr523，在 RSV 聚合酶基因 L 中的 Asn43、Cys319、Phe 521、Gln831、Met1169、Tyr1321 和/或 He1690 中的氨基酸取代基，以及在基因 M2 的开端序列中的核苷酸取代基。在某些方面，重组基因组或反基因组引入了至少两个、通常三个、四个或五个，有时一整套的所有这些减毒突变体。往往，至少一个减毒突变体，因规定此突变体位置的密码子中的多个核苷酸的变化而的稳定。

本发明用于引入嵌合人-牛 RSV 的减毒突变体，可以从一个供体或受体 RSV 基因的编码部分选择，或从非编码区域例如顺式调节序列中选择。非编码突变体包括在一个基因的开端序列中的单个或数个的基础变化，如同在 M2 基因的起始序列中、核苷酸 7605 位一个单个或数个基本取代基(在重组序列中的核苷酸 7606 位置)的例子所显示的。

本发明的感染性 RSV 可以从任一种异源的 RSV 或 RSV 类病毒引入异源的、编码的或非编码的核苷酸序列，例如，人类、牛类、鼠科(老鼠肺炎病毒)、或鸟类(火鸡鼻气管炎病毒)肺炎病毒，或从另一种包膜病毒，例如，副流感病毒(PIV)。典型的异源序列包括与另一种人类 RSV 菌株的序列相结合的一种人类 RSV 菌株的 RSV 序列，或与一种牛类 RSV 菌株的序列相结合的一种人类 RSV 菌株的 RSV 序列。本发明的移位基因 RSV 可含有源自于两个或更多的野生型或突变 RSV 菌株的序列，例如源自于 cpts RSV248，cpts 248/404，cpts 248/955，cpts RSV530，cpts 530/1009，或 cpts 530/1030 的突变体菌株。作为选择方案，虚构 RSV 可含有源自于两个或更多的野生型或突变体人类 RSV 亚群的序列，例如人类 RSV 亚群 A 和亚群 B 序列的结合。在另一些方面，一个或数个人类 RSV 为多核苷酸编码或未编码 被一个源自于异源 RSV 或非 RSV 病毒的对应物序列单独地取代，或被其与

一个或一个以上经选择的减毒突变体(如 cp 和/或 ts 突变体)的组合取代, 产生新颖的减毒疫苗菌株。

5 本发明的移位基因 RSV DNAs、细菌载体和病毒粒子内所含有的突变体, 可以单独地被引入, 或以组合的方式引入, 从而成为一整条的 RSV cDNA; 而且含有引入的突变体的被抢救的病毒表型可以容易地被确定。在一典型的具体实施例中, 相对于由野生型 RSV、如 cpRSV 或 tsRSV 所显示的变化, 生物衍生的减毒病毒所显示的氨基酸变化, 与移位基因 RSV 结合在一起而被引入, 以达到理想的减毒水平。

10

在本发明的另一些方面, 移位基因 RSV 可容易地被设计为“载体”, 其含有源自于不同病原体的抗原免疫因子, 包括一个以上的 RSV 菌株或菌群(例如, 两组人类 RSV A 和 RSV B 亚群), 人类副流感病毒(HPIV), 包括 HPIV3, HPIV2 和 HPIV1, 麻疹病毒以及其它病原体(参见, 如美国临时专利申请 No. 60/170,195; 美国专利申请 No. 09/458,813; 以及美国专利申请 No. 09/459,062, 每项均作为参考列入此处)。在各种具体实施例中, 重组基因组或反基因组包括一完全的部分的 RSV “载体基因组或反基因组”, 其与为一个或数个抗原免疫因子的一个或数个异源病菌编码的、一个或数个异源基因或基因组片段结合。异源病原体可以是异源 RSV(如, 不同的菌株或亚群的 RSV), 而且该异源基因或基因组片段可为 RSVNS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 或 G 蛋白质或其片段编码(例如, 一免疫原区域或抗原决定基)。例如, 细菌载体基因组或反基因组可以是完全的部分的 RSV A 基因组或反基因组, 该异源基因或基因组片段可为 RSV B 亚群病毒的抗原免疫因子编码。

15

20

25

在供选择的具体实施例中, 移位基因 RSV 载体基因或反基因组是一完全的部分的 BRSV 基因组或反基因组, 而且该为抗原免疫因子编码的异源基因或基因片段是一个或数个 HRSV。例如, 该完全的部分的 BRSV 基因组或反基因组可含有为从 F、G 和 SH 选出的一

30

个或数个 HRSV 糖蛋白基因编码的、一个或数个基因或基因片段；或为 F、G 和/或 SH HRSV 的细胞质区域、横跨膜区域、外部区域或免疫原抗原决定基部分编码的一个或数个基因片段。

5 如上所注，为运载异源抗原免疫因子而被设计载体的移位基因 RSV，可含有非 RSV 病原体的一个或数个抗原免疫因子，例如人类副流感病毒(HPIV)。在一典型的具体实施例中，为一个或数个 HN 和/或 F 糖蛋白质或抗原区域、片段或其抗原决定基编码的一个或数个 HPIV1、HPIV2 或 HPIV3 基因或基因片段，是被加入来或引入在完全
10 的或部分的 HRSV 载体基因组或反基因组内。在一些更详细的具体实施例中，一个包括 HPIV1，HPIV2，或 HPIV3 HN 或 F 基因的可读框(ORF)的转录单位，被加入或被整合重组载体基因组或反基因组内。

 在另一些供选择的具体实施例中，载体基因组或反基因组包括一
15 完全的或部分的 HRSV 或 BRSV 基因组或反基因组，且异源病原体是从麻疹病毒、亚群 A 和亚群 B 呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、人类乳头淋巴瘤病毒、I 型和 II 型 人类免疫缺陷病毒、疱疹单式病毒、细胞巨化病毒、狂犬病病毒、Epstein Barr 病毒、filoviruses、bunyaviruses、flaviviruses、阿尔法病毒 和流行性感冒病毒中选出的。根据这张典型的
20 候选病原体清单，所选择的异源抗原免疫因子可从麻疹病毒 HA 和 F 蛋白质、亚群 A 或亚群 B 呼吸道合胞病毒 F、G、SH 和 M2 蛋白质、腮腺炎病毒 HN 和 F 蛋白质中选出的、人类乳头淋巴瘤病毒 L1 蛋白质、1 型或 2 型人类免疫缺陷病毒 gp160 蛋白质、疱疹单式病毒和细胞巨化病毒 gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL 和 gM
25 蛋白质，狂犬病病毒 G 蛋白质、Epstein Barr 病毒 gp350 蛋白质中选出的；filovirus G 蛋白质、bunyavirus G 蛋白质、Flavivirus E 和 NS1 蛋白质，和阿尔法病毒 E 蛋白质、和抗原区域、片段及其抗原决定基。

 在一具体实施例中，异源病原体是麻疹病毒，并且异源抗原免疫
30 因子是从麻疹病毒 HA 和 F 蛋白质和抗原区域、片段和抗原决定基中

选出的。为了达到这样虚构修饰，一个转录单位包括麻疹病毒 HA 基因的可读框(ORF)可加入或被整合 HRSV 载体基因或反基因组。本发明因此提供了移位基因 RSV、多核苷酸表达结构(也称为载体)，以及能将多个以各种结合方式引入针对表型的突变体的粒子，被整合移位基因 RSV 基因组或反基因组内，以产生减毒、感染性病毒或亚病毒粒子。此过程与定期的表型评估相结合，提供了移位基因 RSV，其具有各种理想的特征，如减毒性、温度敏感性，改变的免疫性，冷适应性，菌斑大小、宿主范围限制等。如此识别出的突变体被编入一份“菜单”，并以各种组合方式被引入，以便将疫苗病毒校准至某一选定水平的减毒性、免疫性和稳定性。

在本发明的另一些方面，带有或不带减毒突变体的移位基因 RSV，被修饰成具有一个核苷酸变体，以产生理想的表型、结构、或功能的变化。通常，所选择的核苷酸变体将规定表型的变化，例如在生长特征、减毒性、温度敏感性、冷适应性、菌斑大小、宿主范围限制，或免疫性上的变化。在这方面的结构变化包括 RSV 编码 cDNAS 内限制部位的引入或切除，以便于操纵和鉴别。

在某些具体实施例中，移位基因 RSV 内的核苷酸变化包括通过删除基因或切除其表达的方式而进行的病毒基因的修饰。在这方面突变的目标基因包括，附加的(G)蛋白质、融合(F)蛋白质、小疏水性(SH)、RNA 约束蛋白质(N)、磷蛋白质(P)、大聚合酶蛋白质(L)、转录产物延伸因子(M2 ORF1)、RNA 调节因子 M2 ORF2、矩阵(m)蛋白质，以及两个非结构性的蛋白质 NS1 和 NS2。这些蛋白质每个都能全部地或部分地、单独地或以与其它理想的变体结合的方式被选择性地、删除、取代或重排，以得到新颖的虚构 RSV 重组体。

在本发明的一个方面，一个 SH、NS1、NS2、G 或 M2-2 基因在移位基因 RSV 中被修饰。例如，这些基因每个均可被删除或切除其表达(例如，通过引入中止密码子)，以改变所生成的 RSV 的表型，从而

改善其成长、减毒性、免疫性或其它理想的表型特征。例如，在重组基因组或反基因组中 SH 基因的删除，将产生 RSV，其有新颖的表型特征，例如在试管内的生长强化和/或体内的减毒性。在一相关的方面，一个 SH 基因的删除、或另一个选定的非本质性基因或基因组片段的删除，例如一个 NS1、NS2、G 或 M2-2 基因的删除，可发生在移位基因 RSV 结构中。这种删除可以是单独地、或者是与一个或数个不同的规定减毒表型的突变体一起进行，例如，与直接地(或以修改过的形式，例如，通过在规定突变体的密码子中引入多个核苷酸的变化)从以生物学方式获得的减毒 RSV 突变体中接受的点突变体。例如，SH、NS1、NS2、G 或 M2-2 基因可以与从 cpts248/404、cpts530/1009、cpts530/1030 或其它选定的突变 RSV 菌株中接受的一个或数个 cp 和/或 ts 突变体一起被删除，以产生一个移位基因 RSV，其具有增高的病毒产率、改进的减毒性、改善的免疫性，以及对于因各种突变体的联合效应而源自于减毒表型的逆转的遗传学抵抗力。

15

供选择的核苷酸变体可包括对于移位基因 RSV 内一个选定的基因，删除、插入、加入或重排一个顺式作用的调节序列的。在一个例子中，一个 RSV 基因的顺式作用的调节序列被改变，以符合于一个异源调节序列，它可以是不同 RSV 内同样基因的顺式作用调节序列对应物，或是一个不同 RSV 基因内的一个顺式作用调节序列。例如，一个基因末端信号可以通过转换或置换的方式被修饰为同样 RSV 菌株内不同基因的基因末端信号。在其它一些具体实施例中，核苷酸的修饰可包括该嵌合基因组或反基因组内，一个转录起点部位的插入、删除、取代或重排，例如，切除另一个选自蛋白质的转录起点部位。在一个例子中，一个隐匿形式的 RSV G 蛋白质的转录起点部位被切除，以修改这种形式的 G 蛋白质表达，从而产生理想的体内效应。

25

另外，一系列其它的基因改变可在移位基因 RSV 基因组或反基因组内单独地发生，或与一个或数个从生物衍生的突变 RSV 中所接受的减毒突变体一起发生。例如，非 RSV 来源的基因或基因组片段可被

30

整体或部分地插入。非转录的基因序列可以被除去，譬如，为插入外来的序列增加容量。在另一些方面，为该基因位置发生转移基因组或反基因组编码的多核苷酸分子或载体，可被修饰成为非 RSV 序列编码，例如，为细胞质、T-辅助抗原决定基、限制部位标志，或能在一个预定的宿主中引起保护性免疫反应微生物病原体的蛋白质(如病毒、细菌或真菌)编码。在移位基因 RSV 反基因组中还可以进行不同或另外的修饰以便于操纵，例如在各种基因间部位中(例如，在 G 和 F 基因之间的一个独特的 StuI 部位)或在别处插入独特的限制部位。

所有前述的移位基因 RSV 基因组或反基因组内的修饰，包括核苷酸插入，重排，删除或取代，产生了点突变、部位针对性的核苷酸变化，以及涉及整个基因或基因组片段的变化，可以对一完全的或部分的 RSV 基因组或反基因组进行，或在嵌合 RSV 内一异源供体基因或基因组片段、或受体、背景基因组或反基因组之内进行。在每种情况下，这些改变将更适宜地规定所生成的重组 RSV 内的一种或多种的表型变化，例如一种导致减毒性、温度敏感性、冷适应性、菌斑大小，宿主范围限制、基因表达变化的表型变化，或免疫性抗原决定基内的变化。

在本发明的另一方面，提供了为生产分离出的、感染性的、移位基因 RSV 所需的成分(例如，所分离出的含有 RSV 编码 cDNA 多核苷酸和载体)和方法。使用这些成分和方法，从一个与病毒粒子(N)蛋白质、病毒粒子磷蛋白质(P)、大(L)聚合酶蛋白质，以及 RNA 聚合酶延伸因子共同表达的重组 RSV 基因组或反基因组，产生了感染性移位基因 RSV 粒子或亚病毒粒子。在本发明的相关方面，提供了将上述结构和表型变化引入重组移位基因 RSV 中的成分和方法，以产生感染性、减毒疫苗病毒。

在一具体实施例中，提供了一种表达载体，它包括一个为基因位置发生转移 RSV 基因组或反基因组编码的分离出的多核苷酸分子。还

提供了同样的或不同的表达载体，它包括一个或数个为 N、P、L 和 RNA 聚合酶延伸因子等蛋白质编码的分离出的多核苷酸分子。这些蛋白质也可以直接地从基因组或反基因组 cDNA 表达。细菌载体在细胞或无细胞溶菌产物内被表达或更好地被共表达，从而产生了一个感染性的移位基因 RSV 粒子或亚病毒的粒子。

RSV 基因组或反基因组和 N、P、L 以及 RNA 聚合酶延伸因子(最好是 RSV 的 M2(ORF1)的产品)等蛋白质可以被同样的或不同的表示载体共表达。在某些例子中，N、P、L 和 RNA 聚合酶延伸因子等蛋白质，每个都被编码在不同的表达载体上。为移位基因 RSV 基因或反基因组编码的多核苷酸分子与这些控制序列结合，以生产感染性病毒或病毒粒子。在本发明的另一些方面，移位基因 RSV 基因或反基因组可包括源自于多个人类 RSV 菌株或亚群(A 和 B)的序列，也可包括其它非人类的(如鼠科动物)RSV 序列。在其它另一些方面，基因位置发生转移的基因组或反基因组可包括非 RSV 序列，例如含有源自于人类和牛类 RSV 序列的多核苷酸；该多核苷酸与一个为 PIV 或其它负链 RNA 病毒的点突变、突变体、蛋白质、蛋白质区域或免疫性抗原决定基等编码的核苷酸或多核苷酸结合。

上述为生产移位基因 RSV 的方法和成分，产生了感染性病毒或亚病毒 粒子，或其衍生物。感染性病毒与真正的 RSV 病毒粒子是相当的，而且同样具有感染性。它能直接地感染新的细胞。一个感染性亚病毒的粒子通常是病毒粒子的亚成分，它在适当的条件下能引发一种感染。例如，含有基因组或反基因组 RNA 和 N、P、L 和 M2(ORF1)等蛋白质的病毒粒子就是亚病毒粒子的一个例子。如果被引入细胞的细胞质，它能引发感染。在本发明中所提供的亚病毒粒子包括缺乏一个或数个蛋白质、蛋白质片段，或其它对于感染性是非实质性病毒组分的病毒粒子。

在其它一些具体实施例中，本发明提供了一种细胞或无细胞溶菌

产物，该细胞或无细胞溶菌产物含有一个表达载体，其包括了一个如上所述为基因位置发生转移基因组或反基因组编码的、分离出的多核苷酸分子；该细胞或无细胞溶菌产物还含有一个表达载体(同样的或不同的载体)，其包括了一个或数个为 RSV 蛋白质的 N、P、L 及 RNA 聚合酶延伸因子编码的、分离出的多核苷酸分子。一个或数个这类蛋白质还可从基因组或反基因组 cDNA 加以表达。在表达时，基因组或反基因组和 N、P、L，和 RNA 聚合酶延伸因子等蛋白质联合产生了一个感染性移位基因 RSV 病毒或亚病毒粒子。

10 本发明的基因位置发生转移的减毒 RSV，在被感染的人类宿主体内能引起保护性免疫反应，但已被充分地减毒，所以不致于在所免疫的宿主体内引起严重的、不可接受的呼吸道病症状。减毒病毒或亚病毒粒子可存在于从细胞培养基中所分离出的培养基上清液内，或存在于被完全地或部分地净化的培养基上清液内。病毒也可被冻干，也可与各种各样的其它组分结合，以便根据需要进行贮存或送交给宿主。

20 本发明更进一步地提供了新颖的疫苗，其含有生理上可接受的载体和/或辅助药以及所分离出的基因位置发生转移的减毒 RSV。在一项具体实施例中，组成疫苗的移位基因 RSV 具有至少一个、最好是两个或更多的减毒突变体，或其它如上所述的核苷酸变体。疫苗可配制成减毒病毒剂量为 10^3 至 10^6 配制单位(PFU)。疫苗可由这样的基因位置发生转移的减毒 RSV 组成，它能引起免疫反应，抵抗单一的 RSV 菌株或抗原亚群，如 A 或 B，或抵抗复合的 RSV 菌株或亚群。在这方面，本发明的移位基因 RSV 可单独地引起单效免疫反应或多效免疫反应，以抵抗复合 RSV 菌株或亚群。移位基因 RSV 可与其它具有不同免疫特征的 RSV 在疫苗配方中结合使用，以获得抵抗一种或多种 RSV 菌株或亚群更有效的保护作用。

30 在相关的一些方面，本发明提供了一个刺激患者免疫系统而诱导免疫反应的方法，以抵抗一哺乳动物受检者体内 RSV 的一个或数个菌

株或亚群。该方法包括将一个具有充分免疫力的、基因位置发生转移的减毒 RSV 的配方，置于生理上可接受的载体和/或辅助药中再用于接种。在一具体实施例中，免疫原的成分，是一种由移位基因 RSV 组成的疫苗，其具有至少一个、最好是两个或更多的减毒突变体，或其它核苷酸变体，规定了理想的如上所述的表型。该疫苗可配制成减毒病毒剂量为 10^3 至 10^6 配制单位(PFU)。该疫苗可包含基因位置发生转移的减毒 RSV 病毒，其能诱导免疫反应抵抗单一 RSV 菌株或抗原亚群、如 A 或 B，或抵抗多个 RSV 菌株或亚群。在这方面，移位基因 RSV 能诱导单效的免疫反应或多效的免疫反应，以抵抗多个 RSV 菌株或亚群。作为选择方案，在一协同治疗方案中，具有不同免疫特征的移位基因 RSV 可配制在一个混合疫苗内，或单独地用于接种，以诱导抵抗单一 RSV 菌株、或抵抗多个 RSV 菌株或亚群的更有效的保护效应。免疫成分最好是以诸如喷雾、点滴或烟雾剂的方式接种于上呼吸道。该成分往往用于 RSV 抗体的血清反应呈阴性的，或具有经胎盘获得的母体 RSV 抗体的接种者。

图画的简要描述

图 1. G 基因或 F 基因、或 G 基因和 F 基因一起转移至 RSV 基因内靠近启动子的位置。图的上方显示了以 Blp/ Δ SH 所表示的该 RSV 基因组，如前所述，其中的 SH 基因已被删除(Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年；作为参考列入此处)，而且 BlpI 限制性酶切位点被加入至靠近启动子 NS1 基因上游非编码区。M 基因的基因结束(GE)信号标有星号，表示其含有 SH 基因删除期间所发生的单一核苷酸变化，如前所述，使得它与自然出现的 SH GE 信号相同(Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年；作为参考列入此处)。图下方的两个方框显示了基因组 Blp/ Δ SH 结构的细节，以及为制造基因组 G1/ Δ SH、F1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 而对 Δ SH/Blp 靠近启动子的末端(左手方框)和 M-G-F-M2 区(右手方框)所做的改造。所有的操作都是针对 RSV 反基因组 RNA 一克隆的 cDNA 进行的(Collins 等，国家科学院学报，美国 92:11563-11567，1995 年；Collins 等，病毒学

259:251-255, 1999 年; 和 Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年; 作为参考列入此处), 而且, 按照野生型重组 RSV 完整的反基因组序列(含有 SH 基因), 核苷酸位置被编了号。(Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995 年; Murphy 等, 美国专利 No. 5,993,824; 每项均作为参考列入此处)。注意“上游”和“下游”分别指的是靠近启动子和远离启动子的方向(该启动子是在如图 1 左方所示负向基因组 RNA 的 3'前导序列末端。)

基因组 B1p/ Δ SH: 如前所述的 RSV 的 SH 删除突变体的核苷酸 92 和 97 (Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年; 作为参考列入此处)分别从 G 和 A(在左手方框中的最上方图解里, 用小写字母表示)变成了 C 和 C(大写黑体字母), 因而在 NS1 开放读码框架(ORF)的 ATG 翻译起始密码子(用斜体字印刷, 黑体)前面一个核苷酸处制造了一个 B1pI 位点(下划线)。B1p/ Δ SH 基因组的 M- G -F 区(右手方框)说明了 SH 的删除(SH 基因通常位于 M 和 G 基因之间)。

基因组 G1/ Δ SH: 这个基因组在靠近启动子的位置上含有在 B1pI 位点插入的 G 基因(左手方框)。G cDNA 插入单元按如下的方法构建: 完整的 G ORF 和下游 G 非编码序列以及 GE 信号(核苷酸 4692 到 5596)被设计由含有 6 个核苷酸的 IG 序列跟随(代表自然发生的 G-F IG 序列的前 6 个核苷酸, CATATT(序列标识号: 1)), 其后跟随着 NS1 基因的含有 10 个核苷酸的 GS 信号的一个拷贝(用方框框定)。这个克隆序列的两侧是 B1pI 位点, 并且被克隆入基因组 B1p/ Δ SH 的 B1pI 位点。在 RSV GS 和 GE 信号的控制之下, 如此将 G ORF 放置在靠近启动子的位置。在同一基因组里, G 基因从它在 M 和 F 基因之间的下游位置被删除了 (删除点用一个大箭头表示), 并且 M 和 F 基因现在只由 G-F IG 序列分开。

基因组 F1/ Δ SH: 这个基因组在靠近启动子的位置上含有在 B1pI 位点插入的 F 基因。F cDNA 插入单元按如下的方法构建: 完整的 F

ORF 和下游非编码序列以及 GE 信号(核苷酸 5662 到 7551)被设计由含有 6 个核苷酸的 IG 序列跟随(代表自然发生的 F-M2 IG 序列的前 6 个核苷酸, CACAAT (序列标识号: 2)), 其后跟随着 NS1 基因的含有 10 个核苷酸的 GS 信号。这个克隆序列的两侧是 B_lpI 位点, 并且被克隆入基因组 B_lp/ΔSH 的 B_lpI 位点。在 RSV GS 和 GE 信号的控制之下, 如此将 F ORF 放置在靠近启动子的位置。在同一基因组里, F 基因从它在 G 和 M2 基因之间的下游位置被删除了(删除点用一个大箭头表示), 并且这两个基因现在只由 F-M2 IG 序列分开。

基因组 G1F2/ΔSH: 这个基因组在第一个和第二个靠近启动子的地方分别含有 G 和 F 基因, 它们作为一个单一的 cDNA 被插入 B_lpI 位点。构建的 G-F cDNA 插入单元含有(以从上游到下游的顺序): 完整的 G ORF, 其下游非编码和 GE 信号, G-F IG 序列, 完整的 F 基因, 来自 F-M2 IG 序列的 6 个核苷酸(CACAAT)(序列标识号: 2), 和 NS1 的 GS 信号。这个 cDNA 的两侧是 B_lpI 位点, 并且被克隆入基因组 B_lp/ΔSH 的 B_lpI 位点。如此将 G 和 F 基因分别放置在相对启动子的位置 1 和 2。在同一基因组里, G 和 F 基因从它们在 M 和 M2 基因之间的下游位置被删除了(删除点用一个大箭头表示), 并且 M 和 M2 基因现在只由 F-M2 IG 序列分开。

20

图 2. 转染期间和体外培育初期的传染性重组病毒的生产。如所描述的(Murphy 等, 美国专利 5,993,824), HEp-2 细胞转染上标明的单个反基因组质粒和 N、P、L 和 M2-1 支持质粒。3 天以后, 收获培养上清液, 在 HEp-2 细胞里进行连续的未稀释培育, 并且每隔 3 至 7 天收获一次培养上清液。每次收获的样品被取来, 快速冷冻, 并且在以后做噬斑测定分析。病毒都以它们各自的 cDNA 名称来表示, 即 B_lp/ΔSH, G1/ΔSH 等。有关 B_lp/ΔSH, G1/ΔSH, F1/ΔSH 和 G1F2/ΔSH 的数据示于图中。转染是于 32°C 进行的, 并且随后的培育是于 37°C 进行的。

30

图 3A. 重组 wt RSV(包含 SH 基因), 和 0.1 输入感染倍数(MOI)下的感染引起的 Δ SH(不包含 BlpI 位点), Blp/ Δ SH, G1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 突变型病毒的体外复制。Vero(上图)或 HEp-2 细胞(下图)的复制培养基被感染并于 37°C 培养。在标明的时间点, 收获每一个病毒的复制单层, 并且快速冷冻其培养上清液。同时, 这些样品以后用噬斑测定分析。

图 3B 描述了 Blp/SH, G1/SH, F1/SH 和 G1F2/SH 病毒在以 3.0 的输入感染倍数感染 HEp-2(上图)和 Vero(下图)细胞单层之后的单步生长。复制细胞单层被感染并于 37°C 培养, 并且在标明的时间点, 收获复制单层和快速冷冻培养上清液。

图 4. 在 Vero 细胞里用 Blp/ Δ SH, G1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 病毒对 G 蛋白质表达用 Western 免疫印迹法进行分析。在图 3A 上图内的时间点上收获细胞, 并且用凝胶电泳法和 Western 免疫印迹法分析总蛋白含量。印记是在对 G 蛋白质肽特异的兔子抗血清培养过程中形成的。粘附的抗体然后放射自显影。G 蛋白质以两种形式移动: 90 kDa 成熟形式和 50 kDa 不完全糖基化形式。

图 5. 减毒 RSV 的结构, 其中 G 和 F 基因转移至位置 1 和 2. 图 A: 重组 RSV G1F2/ Δ NS2 Δ SH 的结构, 其中, 如所描述的, SH 和 NS2 基因被删除了(Teng 和 Collins, 病毒学杂志, 73:466-473, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志 73:3438-3442, 1999 年; 作为参考列入此处), 而且, 如图 1 所示, G 和 F 基因分别移入位置 1 和 2. 图 B: 重组 RSV G1F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH 的结构, 其中 SH、NS1 和 NS2 基因被删除了并且 G 和 F 基因分别移入位置 1 和 2, 。

图 6 详述了嵌合 rBRSV/HRSV 基因组的构建细节, 其中 BRSV 的 G 和 F 基因被删除了, 而且 HRSV 的 G 和 F 基因被放置在靠近启动子的位置。BRSV 的基因被遮蔽; HRSV 的基因变得明确。核苷酸

序列位置的编号相对于完整的 rBRSV 反基因组(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-259, 1999; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000 年; GenBank 登录号 AF092942 或完整的 rHRSV 反基因组在 Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995 年里; 每项均作为参考列入此处); 指代 HRSV 序列的序列位置编号用下划线表示。图 6 (A) 详述了含有以前的工作中加入的 NotI, SalI and XhoI 位点的 rBRSV 的结构(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-259, 1999 年; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000)。图 6 (B) 描述了对 rBRSV/A2-G1F2 而对 rBRSV 所做的改造。通过重新连接由 SalI 和 XhoI 的消化作用所产生的相同的粘端, BRSV 的 G 和 F 基因被删除了。通过使用包含需要的, 将被整合入 cDNA 两端的变化的引物, PCR 扩增了 HRSV 基因组中含有 G 和 F 基因, 从核苷酸 4692 到 7557, 的区域。扩增的 PCR 产品包含(以从上游到下游的顺序): NotI 位点, BlnI 位点, 完整的 HRSV G ORF, 其下游非编码区和 GE 信号, HRSV G-F IG 序列, 完整的 HRSV F 基因, 来自 HRSV F-M2 IG 序列的 6 个核苷酸(CACAAT), NS1 GS 信号, BlnI 位点和 NotI 位点。此 cDNA 被克隆入独特的位于 rBRSV 位置 67 的 NotI 位点。图 6 (C) 说明基因组 RNA rBRSV/A2-G1 F2 的结构。

图 7 描述了 RBRSV, rHRSV(rA2), rBRSV/A2, 和 rBRSV/A2-G1 F2 在 HEp-2 人(左图)和 MDBK 牛类(右图)细胞里的多周期生长。复制细胞单层以 0.1 的 MOI 感染上标明的病毒并于 37°C 培养, 而且在标明的时间上, 收获等分试样培养基, 快速冷冻, 贮存于-70°C, 并随后滴定一式两份。滴定量取两次成功测定的平均值。

图 8 显示了感染了 rBRSV/A2-G1F2, rBRSV/A2, 或 rA2 的 HEp-2 细胞的间接免疫荧光。细胞以 0.1 的 MOI 被感染, 于 37°C 培养 96 个小时, 用丙酮来固定, 经过过滤, 并与对 HRSV 的 G 蛋白质特异的单克隆抗体 021/1G, 或与对 HRSV 的 F 蛋白质特异的单克隆抗体 44F 起反应。抗体的绑缚可以通过其与被标记的对鼠科 IgG 特异的抗体的

反应而显影。

图 9 详述了含有 HRSV 的 M, G 和 F 基因的嵌合 rBRSV/HRSV 的构建。BRSV 的基因被遮蔽了; HRSV 的基因变得明确了。指代 HRSV 基因的序列位置编号用下划线表示。图 9 (A) 描述了为在位于 P 和 M 基因之间的基因间区(P-M IG)内的位置 3204 包含一个独特的 MluI 位点而对 rBRSV/A2 所做的改造。IG 序列示于图中, 并用小写字母表示原来的核苷酸分配。下划线字母表示由 5 个核苷酸替换而生成的 MluI 位点。核苷酸序列位置的编号相对于完整的 rBRSV 反基因组(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-259, 1999 年; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000 年; GenBank 登录号 AF092942 或完整的 rHRSV 反基因组在 Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995 里); 指代 HRSV 序列的序列位置编号用下划线来表示。图 9 (B) 说明了为制造 rBRSV/A2-MGF 而对 rBRSV/A2 所做的改造。包含 BRSV 的 M 和 SH 基因的 MluI-SalI 片段被切除了, 并用包含 HRSV 的 M 基因的 MluI-SalI 片段来替换。包含 HRSV 的 M 基因的 MluI-SalI 片段示于方框内。同时显示的还有紧邻 MluI 位点上游末端的序列, 包括 BRSV P 基因结束序列, 和紧邻 MluI 位点下游末端的序列, 包括 M 和 G 基因之间的基因间序列 (M-G IG), HRSV G 基因开始信号, 和起始 G ORF 的 ATG(黑体, 斜体字)。图 9 (C) 描述了基因组 rBRSV/A2-MGF 的结构。

图 10 描述了重组 BRSV(rBRSV, 最上方)和五个 BRSV/HRSV 嵌合病毒基因组的结构, 其中特定的 BRSV 基因(涂有阴影的长方框)用它们的 HRSV 对应物(未涂有阴影的长方框)替换。另外, 在最下方的两个病毒内, G 和 F 基因从它们的正常位置移至位置 3 和 4, 或 1 和 2。在 rBRSV 的图解里, 指明了几个限制性位点。用在各种构建中的限制性位点被指明了: KpnI 位点是自然产生的, 而其它的会在必要时介绍(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-9, 1999 年; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000 年, 每项均作为参考列入此处)。

图 11 描述了 BRSV/HRSV 嵌合病毒 rBRSV/A2-G3F4(上图)和 HEx (下图)的多周期生长, 并以 rHRSV(rA2)和 rBRSV 亲本病毒以及前述的嵌合病毒 rBRSV/A2-GF(先前称作 rBRSV/A2; Buchholz, 2000 年, 见前)和 rBRSV/A2-G1F2 为参照。Vero 细胞的单层培养基以 0.1 的输入感染倍数被感染并于 37°C 培养。在标明的时间上, 对上层培养液采样, 并用限制稀释的方法确定病毒的滴定量。0.1 ml 的 104 BHK-21 细胞被加入至每皿(well) 0.1 ml 的经屡次 10 倍稀释的病毒。48 个小时后, 细胞被固定在 80%的丙酮里, 并用对 BRSV M 蛋白质特异的, 与 HRSV M 蛋白质交叉反应的抗体对其进行间接免疫荧光检验分析, 而且对感染的靶细胞进行计数(参见, Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-9, 1999 年(作为参考列入此处))。

图 12 比较了所标明的病毒在人 HEp-2 细胞(上图)和牛类 MDBK 细胞(下图)上形成的菌斑或病灶的大小, 其表示为 HRSV(HEp-2 细胞)或 BRSV(MDBK 细胞)的百分比。

图 13A 和 13B 描述了重组 BRSV 基因组的结构, 其中 N 和/或 P 基因由它们的 HRSV 对应物替换了。图 13A 显示了替换发生在 rBRSV 主链内的嵌合体, 而图 13B 显示了主链是 rBRSV/A2-NS1+2 病毒的嵌合体。

图 14. 含有 SH 基因内删除的重组 rRSV/6120 病毒的基因组 RNA 的图解, 该 RNA 作为负向画于图中, 3' 到 5'。每个编码 mRNA 用长方框标记, 非 mRNA 编码的基因外和基因间区域用水平线标记。亲本 RSV 反基因组 cDNA, 正如前述(Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995), 在 G-F 基因间区有一个 XmaI 位点的进一步改造 (Bukreyev 等, 病毒学杂志, 70:6634-6641, 1996 年, 作为参考列入此处)。经过改造, 此 cDNA(i) 在 SH ORF 的最后四个密码子, 包括平移中止密码子, 内含有五个翻译忽略的核苷酸替换; (ii)从

完整的反基因组序列的 SH 基因的下游非翻译区删除 112 个 核苷酸(位置 4499-4610) (方框内)。构建中使用的 XhoI 和 PacI 位点用斜体字标记, SH 基因结束信号用下划线标记, SH 密码子以三个字母一组的形式标记, 核苷酸替换用小写字母标记, 而且删除的序列用一个方框表示并标明了序列位置。

图 15A-15B. 相比于全长重组 rRSV 亲本 D53, 在 SH 基因内有一个删除的 rRSV/6120 的生长动力。三组(图 15A, 图 15B 和图 15C)HEp-2 细胞单层培养基以 0.005 的感染倍数被标明的病毒感染。吸附期之后, 细胞于 37°C 培育。每隔 12 小时, 培养基全部被收获, 并且为以后的滴定, 等分试样被快速冷冻。细胞被清洗三次, 并且加入新的培养基, 继续培育。在实验的最后, 用噬斑测定分析样品从而确定病毒滴定量。

具体实施例的描述

本发明提供了重组呼吸道合胞病毒(RSVs)。此病毒是通过在一个重组 RSV 基因组或反基因组内, 使一个或一个以上基因的序列或空间位置发生转移而构建的, 其目的是生成一种疫苗病毒。该疫苗病毒在人体和其它哺乳动物体内具有感染性, 但毒性得到减弱。通常, 可以通过改变一个或一个以上“被转移”基因或基因片段的位置, 来修饰重组 RSV 基因组或反基因组。这种位置的改变可通过在基因组内直接地或间接地引入、删除或重新排列第二个“多核苷酸取代基”来实现, 从而导致所涉及的基因或基因组片段转移至一个离启动子较近的或离启动子较远的位置。在这种情况下, 基因或基因片段转移到亲本 RSV 基因组或反基因组内有关的基因或基因片段的位置, 例如, 其相对于基因转移之前有关基因或基因片段在野生型 RSV 基因组或反基因组(如 HRSV A2 或 BRSV 堪萨斯菌株), 或于此所披露的亲本重组 RSV 基因组或反基因组内的位置, 是在基因转移之前就决定了的。

在本发明的某些方面, 移位基因 RSV 的特征是一个或一个以上

移位基因或基因组片段。它(们)是通过在完全的或部分的重组 RSV 基因组或反基因组之内，插入，删除或重新排列一个或数个多核苷酸取代基，而被转移到一个离启动子较近的或离启动子较远的位置。多核苷酸取代基可以由一个 RSV 基因或基因组片段构成，包括源自于不同的或“异源的”RSV 的基因或基因组片段(例如异源的基因或基因组片段被插入另一个不同的 RSV 的基因组或反基因组的情况)。或者，多核苷酸取代基也可以来源于非 RSV，包括非 RSV 病原体，例如副流感病毒(PIV)或麻疹病毒。多核苷酸取代基可为蛋白质或蛋白质的一部分编码，例如糖蛋白中产生免疫的区域或抗原免疫因子部位；或者它们可代表一个残缺不全或受损的编码序列，包括非编码和无意义的多核苷酸序列。

在本发明的某些方面，重组 RSV 以一个或数个位置发生转移的基因或基因片段为特征。这些基因或基因组片段可通过于在完全的或部分的重组 RSV 基因组或反基因组之内，一个或数个多核苷酸取代基的插入、删除或重新排列，而被转移到离启动子较近的或离启动子较远的位置。一方面，多核苷酸取代基是 RSV 基因或基因组片段。而在另一方面，多核苷酸取代基缺乏一个完全的可读框(ORF)。在更详细的具体实施例中，多核苷酸取代基由长度为 150 核苷酸(nts)到 4,000 核苷酸的多核苷酸插入基组成。多核苷酸取代基可以被插入或重排入重组基因组或反基因组的一个非编码区域(NCR)，也可以作为一个单独的基因单位(GU)被引入重组 RSV 基因组或反基因组。

本发明中重组 RSV 内基因位置的转移通常是相对于基因组或反基因组的“启动子”而决定的。RSV 启动子包含聚合酶的起始部位。它是一个可被聚合酶识别的保留序列单元。启动子位于基因组或反基因组的 3'尾端，大约在 30 个 3'尾端的核苷酸之内。如果是在 RSV 基因内的情况下，是由启动子指导转录和复制。然而，缺乏转录信号且只能自然地控制复制的反基因组“启动子”，通过插入已知的转录信号后就被修饰得也能指导转录。为叙述本发明的目的，RSV 启动子被

解释为处于基因组或反基因组的 3'尾端，而此处所使用的词汇“离启动子较近”和“离启动子较远”则分别指的是朝向或背离基因组或反基因组的 3'尾端。

5 如此，在本发明中提供了分离出的多核苷酸分子，载体(表达结构)，以及整合了一个重组 RSV 基因组或反基因组的重组病毒。其中，一个或数个基因或基因片段被转移到重组 RSV 基因组或反基因组内、相对于 RSV 基因地图中其亲本或野生型的基因位置，离启动子较近或离启动子较远的一个位置。这种方式的基因位置的转移，使得能根据
10 位置转移的性质和程度，选择性地增加或减小一个或数个移位基因的表达。在一个具体实施例中，可以通过将一个或数个糖蛋白编码基因转移到一个离启动子较近的位置，使 RSV 糖蛋白得到了正调节。为了构建移位基因 RSV，所希望的可操纵的基因包括任何 NS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 或 G 基因，也可包括
15 作为基因的一部分、或基因外的基因片段。在本发明的移位基因 RSV 中，为了产生理想的表型和结构效应，提供了各种各样的新的突变和核苷酸变体。

20 人-牛 RSV 的重组结构产生了一种病毒粒子或亚病毒粒子。它们在哺乳动物体内，尤其是人体内具有感染性，因而对生产临床使用的可产生免疫的成分是有用的。在本发明之中还提供了用作设计和合成移位基因减毒 RSV 的新颖的方法和成分，以及预防和治疗 RSV 感染的方法和成分。按照本发明，移位基因 RSV 和免疫性成分可能会引起对一个特定 RSV 子群或菌株所产生的免疫反应，它们也可以引起
25 对多个 RSV 子群或菌株的多效的反应。因而，本发明中的移位基因 RSV 在人体和其它哺乳动物体内具有感染性，但毒性得到减弱。在相关方面，本发明为设计和合成基因位置被转移的减毒 RSV 提供了新颖的方法。这些 RSV 是很有用的成分，能在易受 RSV 感染的宿主体内引起理想的抗 RSV 免疫反应。本发明在这些方面包括了新颖的、分离出的
30 多核苷酸分子、载体，以及被感染的细胞；该细胞整合的分子中含有

一个移位基因 RSV 基因组或反基因组。按照本发明，移位基因 RSV 可引起对一个特定 RSV 子群或菌株的免疫反应，也可以引起对多个 RSV 子群或菌株的多效反应。本发明还提供了另外的成分和方法，可以用来设计和合成基因位置被转移的减毒 RSV。这些 RSV 可以作为带菌体来整合其它病原体的抗原免疫因子，以抵抗我们感兴趣的各種病原体、产生理想的免疫反应。本发明还提供了为预防和治疗由 RSV 和其它病原体引起的感染和疾病的整合移位基因 RSV 的方法和成分。

本发明将在最近出现和改进的从 cDNA 合成感染性重组 RSV 的方法上一系列持续的发现推到了高峰，并给予补充。根据这些工作，直接研究核糖核酸和蛋白质结构在 RSV 基因表达和复制中的作用已成为可能。这些研究在下述文献中得到描述或报道：美国临时专利申请 No. 60/007,083，于 1995 年 9 月 27 日申请；美国专利申请 No. 08/720,132，于 1996 年 9 月 27 日申请；美国临时专利申请，No. 60/021,773，1996 年 7 月 15 日申请；美国临时专利申请 No. 60/046,141，于 1997 年 5 月 9 日申请；美国临时专利申请 No. 60/047,634，于 1997 年 5 月 23 日申请；美国专利 No. 5,993,824，发布于 1999 年 11 月 30 日(相应于国际出版物 No. WO 98/02530)；美国专利申请 No. 09/291,894，由 Collins 等于在 1999 年 4 月 13 日申请；美国临时专利书。60/129,006，由 Murphy 等于 1999 年 4 月 13 日申请。；Crowe 等，疫苗 12: 691-699，1994 年；Crowe 等，疫苗 12: 783-790，1994 年；Collins，等，国家科学院学报，美国 92:11563-11567，1995 年；Bukreyev，等，病毒学杂志 70:6634-41，1996 年，Juhasz 等，病毒学杂志，71(8):5814-5819，1997 年；Durbin 等，病毒学 235:323-332，1997 年；Karron 等，传染病杂志 176:1428-1436 1997 年；He 等，病毒学 237:249-260，1997 年；Baron 等。病毒学杂志，71:1265-1271 1997 年；Whitehead 等，病毒学 247(2):232-9，1998a；Whitehead 等，病毒学杂志，72(5):4467-4471，1998b；Kim 等。病毒学 251:206-214，1998 年；Bukreyev，等，国家科学院学报，美国 96:2367-2372，1999 年；Bermingham 和 Collins，国家科学院学报，

美国 96:11259-11264, 1999 年 Juhasz 等, 疫苗 17:1416-1424 1999 年; Juhasz 等, 病毒学杂志, 73:5176-5180, 1999 年; Teng 和 Collins, 病毒学杂志, 73:466-473, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:9773-9780, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:871-877, 1999 年; 并且 Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年, Kim 等, 病毒学, 273:210-8, 2000 年; 金等, 病毒学杂志, 74:74-82, 2000 年; Teng 等., 病毒学杂志, 74:9317-21, 2000 年, 出于所有目的, 每项均作为参考文献完整地列入此处)。

关于本发明中的移位基因 RSV, 许多先前所列的报道都集中在修饰 RSV 内自然发生的基因序列。例如, 每个 NS1, NS2, SH 和 G 基因都成功地从具有感染性的 RSV 重组体内被单独地删除了, 因此, 相对于病毒启动子, 下游基因的位置被转移了。在本发明的其它重组体内, NS1 和 NS2 基因一起被删除了, 从而使剩余的基因在重组 RSV 基因组或反基因组之内被转移到靠近启动子的方向。例如, 当 NS1 和 NS2 一起被删除时, N 从位置 3 移到了位置 1, P 从位置 4 移到了位置 2, 其它依此类推。在本发明中其它可供选择的具体实施例中, 删除任何一个其它的 RSV 基因都会类似地转移更下游的基因的位置 (相对于启动子)。例如, SH 在野生型病毒占有位置 6, 删除它并不影响在位置 5 的 M(或其它任何上游基因), 而只是将 G 相对于启动子从位置 7 移动到 6。值得注意的是, 基因删除还可能(但很少)发生在生物衍生的突变体病毒(Karron 等, 国家科学院学报, 美国 94:13961-13966, 1997 年; 作为参考文献列入此处)。注意这里的“上游”和“下游”各自指的是靠近启动子和远离启动子的方向 (启动子位于负义基因核糖核酸的 3'前导区)。

本发明对移位基因 RSV 进行的改变基因顺序的修饰, (即, 在重组病毒基因内将一个或数个基因移到离启动子较近或离启动子较远的位置方面的修饰), 可改变病毒的生物学性质。例如, 缺乏 NS1, NS2, SH, G, NS1 和 NS2, 或缺乏 SH 和 G 的 RSV 已经被证实在试管内

或体内，或同时在两种情况下毒性得到了减弱。缺乏某种特定病毒蛋白质的表达很可能是这种表型的主要原因。然而，经修饰的基因图谱也可能有助于我们所观察到的表现型。这种效应在删除了 SH 的病毒中得到了很好的展示。这种病毒在某些细胞类型中比野生型病毒还生长得迅速。这可能是由于基因的删除导致了基因序列或者还有基因大小的改变，致使转录、复制，或两者的效率都得到提高。在其它病毒中，例如删除了 NS1 或 NS2 或两者的 RSV，可能出现的由于基因序列的改变而引起的生长上的变化，很可能会被因 RSV 蛋白质表达的消失而引起的更主要的表型所掩盖。

此外，还成功地引入了改变 RSV 基因序列的其它变化，从而改进了它作为减毒活疫苗的性质。在展示本发明效力的具体例子中，RSV 的 G 和 F 基因被单独或结合在一起转移到相对于其野生型基因序列离启动子较近的位置。这两个蛋白质通常在 RSV 基因序列(NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L)里占有位置 7(G)和 8(F)。为了增加成功恢复的可能性，G 和 F 的位置操作是在 SH 基因被删除了的 RSV 中进行的(参阅，例如，Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-42(1999)，作为参考文献列入此处)。由于这种病毒在试管内制造较大的噬菌斑，故方便了病毒的回收(Bukreyev 等，病毒学杂志 71:8973-82，1997 年，作为参考文献列入此处)。G 和 F 然后被单独地移到了位置 1，或同时分别移到了位置 1 和 2。

令人惊讶的是，当 G 或 F 被移到了位置 1，或 G 和 F 各自被移到了位置 1 和 2 时，重组 RSV 很容易回收。这个结果与早先报道的关于多泡状口腔炎病毒(VSV)的研究有很大的不同。对于多泡状口腔炎病毒，使单一的 VSV 糖蛋白基因只移动两个位置，对病毒的生长是非常有害的(Ball 等，病毒学杂志 73:4705-4712，1999 年，作为参考文献列入此处)。回收这些修饰过病毒的能力也是很令人吃惊的，因为 RSV 的复制效率很低，而且 RSV 的基因序列很复杂，它的糖蛋白基因位移涉及到许多的位置改变。的确，被重排的 RSV 能至少象它们的有

野生型基因序列的直接亲本一样地生长。正如上面所指出，这对 RSV 特别重要，因为野生型病毒在细胞培养中生长效率低，在试管内对复制的进一步减少可能会使疫苗的制备变得不可行。因而，所有 NS1-NS2-N-P-M 蛋白质能相对于启动子移动一两个位置而不严重影响生长状况是非常显著的。另外，对 G 糖蛋白表达的检查表明相对于它的亲本病毒，被重排的 RSV 的 G 糖蛋白增加了好几倍。这表明，相对于其它病毒的蛋白质，在第一位置含有 G 和(或)F 的疫苗病毒表达了这些保护性抗原更高的克分子数，因此提供了具有理想疫苗性质的病毒。

10

类似地广泛改变基因顺序也获得了两个毒性大幅减弱的 RSV 候选疫苗。这两个疫苗的 NS2 基因或被独自删除了，或与 NS1 基因一起被删除了，正如在上述文献中所详述的。在这两个疫苗中，G 和 F 糖蛋白各自被同时移向位置 1 和 2，并且 G，F 和 SH 糖蛋白从它们的原来的下游位置上被删除了。因而，恢复了的病毒 G1F2 Δ NS2 Δ SH 和 G1F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH 分别有两个和三个基因被删除了 G 和 F 基因的转移之外。为了说明所涉及的变化程度，我们可以比较一下野生型 RSV 的基因序列(NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L)和 G1F2/ Δ NS2 Δ SH 病毒(G-F-NS1-N-P-M-M2-L)的或 Δ NS1 Δ NS2 Δ SH(G-F-N-P-M-M2-L)的基因序列。这表明大多数或所有的基因的位置相对于启动子都改变了。仍然，这些毒性大幅减弱的衍生物保留了在细胞培养中生长的能力。

15

20

其它的变化已被成功地引入，以改变人-牛嵌合的 RSV 基因序列中，从而改善了人-牛嵌合的 RSV 作为减毒活疫苗的性质(参阅，美国专利申请书 No. 09/602, 212，由 Bucholz 等于 2000 年 6 月 23 日申请，其对应的 PCT 申请书被作为 WO 01/04335 于 2001 年 1 月 18 日出版，其美国优先权临时申请书 No. 60/143, 132 于 1999 年 7 月 9 日提出，每项均作为参考文献列于此处)。正如以下例子所说明的，具有感染性的重组人牛嵌合 RSV(rBRSV/HRSV)已被成功地构建并回收。在这个过程中，HRSV G 和 F 基因被替换入重组牛 RSV(rBRSV)内。

25

30

如此生成的人-牛嵌合体包含两个 HRSV 基因,即 G 和 F,和八个 BRSV 基因,即 NS1, NS2, N, P, M, SH, M2 和 L。除了这基本的被替换的糖蛋白结构之外, HRSV G 和 F 基因被转移到 rBRSV 主体中一个离启动子较近的位置,即相对于 F 和 G 基因在 RSV 基因组中迅速生长类型基因序列的位置。更加具体地说, F 和 G 基因从它们相对于启动子通常的地点,即,分别是基因位置 7 和 8,被各自移到了位置 1 和 2。这样生成的嵌合的重组病毒 rBRSV/A2-G1F2,正如由荧光免疫检验法查出的具有与 wt HRSV 非常相似的 F 和 G 蛋白质表达水平。该结果证明了由于 F 和 G 基因靠近启动子的转移,使 G 和 F 糖蛋白的表达得以增加。由于本 rBRSV/A2-G1F2 病毒在其背底基因中拥有和 BRSV 基因同样的位置,它很可能共享这种很强的宿主范围限制表型。在这种情况下,这两种体内的保护性抗原表达的增加会使该病毒产生的免疫性增加,从而产生非常理想的疫苗性质。

RSV 是属于单负链病毒类目的一种非节段型负义 RNA 病毒。单负链病毒构成了一个庞大而多样化类目。它包括四个科: Family Rhabdoviridae 科,以多泡状口腔炎病毒(VSV)和狂犬病病毒为代表; Bornaviridae 科,以 borna disease 病毒为代表; Filoviridae 科,以 Marburg 和 Ebola 病毒为代表,和 Paramyxoviridae 科。最后一科可以进一步分为两个亚科: Paramyxovirinae,包括 Sendai,麻疹,腮腺炎和副流感病毒,和 Pneumovirinae,包括呼吸道合胞病毒。

单负链病毒的基因组是一条包含从 5 个(VSV)到 11 个(RSV)线性排列的基因的 RNA 的单一菌株。单负链病毒基因组并不直接地编码蛋白质(因此被称为“负义”),而是对辅助的正义 mRNA 进行编码。每个 mRNA 都会对一个或数个蛋白质进行编码。通常地,基因以一个短基因起始信号为开始,以一个短基因结束信号为结束。这些信号通常包括 8 到 12 个核苷酸。这些信号在给定病毒的基因之间是高度保守的,而在相关的病毒之间,其程度相对较低。

对于 RSV 来讲, 基因组在长度上略大于 15.2 kb, 且转录成 10 个不同的为 11 个被识别蛋白质编码的主要 mRNA。具体地说, RSV 基因序列是 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', 且 M2 mRNA 为两个来源于重叠 ORFs 的蛋白质、M2 1 和 M2 2 编码。在正在进行的工作中, 对 RSV 的基因起始和结束的信号以及参与 RNA 复制和启动子功能的序列都进行了识别和分析。(Bukreyev et al., 病毒学杂志 70:6634-6641, 1996 年; Collins 等, 国家科学院学报, 美国 88:9663-9667, 1991; Mink 等, 病毒学 185:615-624, 1991 年; Grosfeld 等, 病毒学杂志 69:5677-5686, 1995 年; Hardy 和 Wertz, 病毒学杂志 72:520-526, 1998 年; Hardy 等, 病毒学杂志 73:170-176, 1999 年; Kuo 等, 病毒学杂志 70:6143-6150, 1996; Kuo 等, 病毒学杂志 70:6892-6901, 1996 年; Samal 和 Collins, 病毒学杂志 70:5075-5082, 1996 年; Kuo 等, 病毒学杂志 71:4944-4953, 1997 年; Fearn 和 Collins, 病毒学杂志 73:388-397, 1999 年; 每项均作为参考文献列入此处)。

15

单负链病毒基因组的 3'端包含了一个指导聚合酶入口的启动子 (Lamb and Kolakofsky, 菲尔德病毒学, 1:1177-1204 1996 年; Wagner 和 Rose, 菲尔德病毒学, 1121-1136 1996 年; 每项均作为参考文献列入此处)。该启动子被完全地或部分地包括在一个基因外首段区域内基因的 3'尾端。然后, 聚合酶以线性的、时停时开的方式, 在基因起始和基因结束信号的引导下, 对基因组 3'至 5'基因组进行转录。每个基因的基因起始信号指挥着对应的 mRNA 合成的引发过程, 而基因结束信号则指挥对应的 mRNA 的聚腺苷酸化、终止和释放。然后该聚合酶保持向着模板的方向, 在下游的下一个基因起始信号处重新引发。此过程被一再重覆, 按照 3'至 5'的顺序一个基因接着一个基因地进行转录 (Lamb 和 Kolakofsky, 菲尔德病毒学 1:1177-1204 1996 年; Wagner 和 Rose, 菲尔德病毒学, 1121-1136 1996 年; Abraham 和 Banerjee, 国家科学院学报, 美国 73:1504-1508, 1976 年; Ball 和 White, 国家科学院学报, 美国, 73:442-446, 1976 年; 球, 病毒学杂志 21:411-414, 1977 年; Banerjee 等, 普通病毒学杂志 34:1-8, 1977 年; 艾文森和 Rose,

30

细胞 23:477-484, 1981 年; 艾文森和 Rose, 病毒学杂志 44:356-365, 1982 年; Banerjee 等, 医药理论 51:47-70, 1991 年; 每项均作为参考文献列入此处)。

5 以上列举的四种 RSV 蛋白质是病毒粒子/聚合酶蛋白质, 即主要病毒粒子 N 蛋白质、磷蛋白质 P 和聚合酶蛋白质 L, 以及转录反终止蛋白质 M2 1。三种是表面糖蛋白, 即附加的 G 蛋白质、负责渗透和形成合胞体的融合 F 糖蛋白, 以及作用未知的疏水性小 SH 蛋白质。基质蛋白质 M 是参与病毒体形成的内部病毒体蛋白质。有两个作用未知
10 的非结构性蛋白质 NS1 和 NS2。最后, 在 mRNA M2 中还有为 RNA 调节因子 M2-2 编码的第二个可读框(ORF)。

 G 和 F 蛋白质是主要的抑制和保护抗原(Collins 等, 菲尔德病毒学 2:1313-1352 1996 年; Connors 等, 病毒学杂志, 66:1277-81, 1992)。
15 RSV 对再感染性的抵抗主要由专门抵抗这些蛋白质的血清和粘膜抗体来调节。RSV 特效细胞毒素的 T 细胞也被 RSV 的感染诱发, 并能抵抗一定数量的各种蛋白质, 但此效应物并未显示是对于长期抵抗再感染的一个重要因素。然而, CD8+和 CD4+ 细胞两者在调控免疫反应时可能均是重要的, 并且两者可以参与病毒的发病机理(Johnson 等,
20 病毒学杂志, 72:2871-80, 1998 年; Srikiatkachorn 和 Braciale, 实验医学杂志 186:421-32, 1997)。因此, F 和 G 是最重要的抗原免疫因子, 但其它蛋白质在免疫反应中也能发挥重要作用。

 按照其与单克隆抗体的反应性, RSV 分离体可被分为两类抗原亚群: A 和 B(Anderson 等, 传染病杂志 151:626-33, 1985 年, Mufson 等, 普通病毒学杂志 66:2111-24, 1985)。两个亚群显示了跨基因的区别, 但是最大的分歧是在 G 蛋白质的外部功能区, 其中, 氨基酸序列分歧的百分比可超出 50%, 而基于单效多克隆抗血清的反应性抗原分歧为 95%。(Johnson 等, 国家科学院学报, 美国 84:5625-9, 1987 年;
25 Johnson 等, 病毒学杂志, 61:3163-6, 1987)。在 RSV A 和 B 两个亚
30

群之间, F 蛋白质的氨基酸序列分歧约为 10% , 而抗原分歧则为 50%(Johnson 等, 病毒学杂志, 61:3163-6, 1987 年; Johnson 和 Collins, 普通病毒学杂志 69:2623-8, 1988)。因此, 两亚群均应体现在疫苗中。

5 据报道, RSV 和其它单负链病毒病毒显示了一个基因效率下降的梯度, 最接近启动子的基因转录是效率最高的, 并且其后每个基因显示了一个减少趋势渐增的转录效率(Lamb 和 Kolakofsky, 菲尔德病毒学, 1:1177-1204, 1996 年; Wagner 和 Rose, 菲尔德病毒学, 1121-1136 1996 年; Abraham 和 Banerjee, 国家科学院学报, 美国 73:1504-1508 1976 10 年; Ball 和 White, 国家科学院学报, 美国 73:442-446, 1976 年; Ball, 病毒学杂志, 21:411-414, 1977 年; Banerjee 等, 普通病毒学杂志, 34:1-8, 1977 年; Iverson 和 Rose, 细胞 23:477-484, 1981 年; Iverson 和 Rose, 病毒学杂志, 44:356-365, 1982 年; Banerjee 等, 医药理论 51:47-70, 1991 年; 每项均作为参考文献列入此处)。这个基因表达的 15 梯度被加以报道并部分地被定为 RSV 的特性(Collins 和 Wertz, 国家科学院学报, 美国 80:3208-3212, 1983 年; Collins , 病毒学杂志, 49:572-578, 1984 年; Dickens 等, 病毒学杂志, 52:364-369, 1984 年; 每项均作为参考文献列入此处)。此梯度被部分地归因于聚合酶在序列 20 转录期间的“脱落”。关于棒状病毒 VSV 这一最简单单负链病毒的研究建议, 脱落主要发生在基因间的部位(Iverson 和 Rose, 细胞 23:477-484, 1981 年; Iverson 和 Rose, 病毒学杂志, 44:356-365, 1982 年; 每项均作为参考文献列入此处), 尽管大的 L mRNA 的不均衡分布建议, 在基因内部也有重大的脱落。

25 所报道的单负链病毒中的基因转录梯度, 被认为是确定被感染细胞中的各种病毒 mRNA 的相对克分子比率的一个主要因素。这种现象相继又被认为是确定病毒蛋白质相对克分子比率一个主要因素。所有单负链病毒均有以下五种蛋白质或其对应编码的基因: RNA 结合的病毒粒子蛋白质 N、磷蛋白质 P、内部病毒体基体蛋白质 M、附加蛋白 30 质 G、HA 或 HN, 以及大聚合酶蛋白质 L。此外, 这些总是在 3' 至 5'

次序 N-P-M-G-L 中被发现。一种解释是, 这个基因组结构反映了在 单负链病毒之中对于大量的 N 和 P 蛋白质、少量的 L, 以及中等数量的 M 和 G 的共同需要。换言之, 它建议, 单负链病毒中缺乏同源的再结合, 导致了对祖先基因序列的保留, 这对病毒而言未必是最理想的(Ball 等, 病毒学杂志, 73:4705-4712, 1999 年; 作为参考文献列入此处)。

被约束的基因序列和转录的极性本质被认为是单负链病毒中调节基因表达的一个重要因素。然而, 其它的次要因素也被认为会影响一个或数个单负链病毒蛋白质表达的相对水平, 包括在顺向作用的 RNA 信号效率上的区别, 在各种 mRNAs 的转录效率上的区别, 以及在蛋白质的处理和稳定性上的区别。

简单、原型的单负链病毒, VSV, 有 5 个基因(Wagner 和 Rose, 菲尔德病毒学, 1121-1136, 1996 年; Schubert 等, 病毒学杂志, 51:505-514, 1984 年; 每项均作为参考文献列入此处)。然而, 其它单负链病毒有多达 11 个(RSV)或 12 个(老鼠的肺炎病毒)基因(Barr 等, 病毒学杂志, 68:5330-5334, 1994 年; 作为参考文献列入此处)。这些包括蛋白质, 例如在所有副粘病毒和肺炎病毒 es 中发现的融合 F 基因, 在某些副粘病毒中发现的 C、D 和 V 基因, 以及在大多数肺炎病毒 es 中发现的 NS1、NS2、SH 和 M2 等基因。而且, 甚至在那些对 VSV 和 RSV(N、P、M、G 和 L)可是共同的五种蛋白质之中, 只有 L 存在着明显的序列相关性, 并且该相关性较低(Poch 等, 欧洲分子生物学机构杂志 8:3867-3674, 1989 年; Stec 等, 病毒学 183:273-287, 1991 年; 每项均作为参考文献列入此处)。

考虑到基因产品在排列和结构上的这种巨大区别, 再考虑到反式和顺向作用的组分在结构和作用上的区别, 一种单负链病毒的特点和性质, 例如 VSV, 不能被直接地推论到其它的单负链病毒, 例如 RSV 上。能说明这种不确定性的例子是这样一个发现: RSV 聚合酶含有 4 种而不是 3 种蛋白质, 那另一种是在 VSV 中没有对应的 M2 1 转录反

终止因子(Hardy 和 Wertz, 病毒学杂志, 72:520-526, 1998 年; Hardy 等, 病毒学杂志, 73:170-176, 1999 年; Collins 等, 国家科学院学报, 美国 93:81-85, 1996 年; Fearn 和 Collins, 病毒学杂志, 73:5852-5864, 1999 年; 每项均作为参考文献列入此处)。这被证明对于有效地恢复重组 RSV 是关键的(Collins 等, 病毒学 259:251-255, 1999 年; 作为参考文献列入此处)。此外, RSV RNA 的合成受至少两种蛋白质, NS1 和 M2-2 进一步调节。该两种蛋白质在 VSV 中没有对应(Bermingham 和 Collins, 国家科学院学报, 美国 96:11259-64, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年; Atreya 等, 病毒学杂志, 72:1452-61 1998 年; Jin 等, 病毒学杂志, 74:74-82, 2000 年; 每项均作为参考文献列入此处)。

VSV 基因表达和调节的许多重要特点似乎与许多其它的单负链病毒没有任何相关性, 尤其是 RSV, 例如终端在 VSV 基因表达控制中的参与(Wertz 等, 国家科学院学报, 美国 91:8587-8591, 1994 年; Whelan 和 Wertz, 病毒学杂志, 73:297-306, 1999 年; Peeples 和 Collins, 病毒学杂志, 74:146-155, 2000 年; 每项均作为参考文献列入此处), 直接参与基因表达的高度保守的 VSV 基因间部位, (Barr 等, 病毒学杂志, 71:1794-1801 1997 年; 作为参考文献列入此处) 但 RSV 则不同(Kuo 等, 病毒学杂志, 70:6143-6150, 1996 年; 作为参考文献列入此处), 在其它单负链病毒群中未发现的 VSV 基因组包装信号(Whelan 和 Wertz, 病毒学杂志, 73:307-315, 1999 年; 作为参考文献列入此处), 以及 N 蛋白质对 VSV 基因表达和复制的控制(Wagner 和 Rose, 菲尔德病毒学, 1121-1136 1996 年; Fearn 等, 病毒学 236:188-201, 1997 年; 作为参考文献列入此处)。这些特点似乎未发生在 RSV 中(Peeples 和 Collins, 病毒学杂志, 74:146-155, 2000 年; 作为参考文献列入此处), 相反, RSV 具有一些未发生在 VSV 中的基因表达和调节的重要特点, 包括缺乏顺向作用的功能单元的分歧的基因间的序列(Kuo 等, 病毒学杂志, 70:6143-6150, 1996 年; 作为参考文献列入此处), 一种调节特定部位减毒性的基因交叠(Fearn 和 Collins, 病毒学杂志,

73:388-397, 1999 年; Collins 等, 国家科学院学报, 美国 84:5134-5138, 1987 年; 由参考文献), 以及对于 L 的基因表达很关键的、聚合酶跟踪机制的存在(Fearns 和 Collins, 病毒学杂志, 73:388-397, 1999 年; 作为参考文献列入此处)。尤其是, 一种调整序列转录过程的转录反终止因子的存在(Fearns 和 Collins, 病毒学杂志, 73:5852-5864, 1999 年; 作为参考文献列入此处), 专门的调节蛋白质, 特定部位的减毒性, 以及针对基因连接处的转录调整(Hardy 等的基因连接点具体模块化。), 病毒学杂志, 73:170-176, 1999 年; 由参考文献), 与 VSV 的情况形成鲜明对比的。

10

在本发明的某些具体实施例中, 基因位置的转移是通过一个或数个 RSVNS1、NS2、SH 和(或)G 基因的删除而实现的, 已分别在上面所列出的参考文献中公布。关于上述任何所鉴定的 RSV 基因或基因组片段, 也可以采取删除基因或基因组片段的其它方式, 以便为其余的 RSV 基因改变基因位置。在更详细的具体实施例中, 有多个基因或基因组片段被删除, 正如上面所列参考文献中通过成对地删除 NS1 和 NS2 基因的例子所说明的(Bukreye, 病毒学杂志, 71:8973-8982, 1997 年; Teng 和 Collins, 病毒学杂志, 73:466-473, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年; 作为参考文献列入此处)。

20

在一个重组 RSV 基因组或反基因组内, 删除一个或数个基因或基因组片段, 起了将所有的下游基因移向离启动子的作用(例如, 将下游的基因在靠近启动子的方向, 移动一个或数个基因位置)。譬如, RSV NS1 和 NS2 基因在基因图上是第一个和第二个基因, 它们的删除会改变其余所有基因的位置。因此, 当 NS1 和 NS2 一起被删除时, N 就从位置 3 被移向位置 1、P 从位置被移向 4 位置 2, 依此类推。此外, 基因序列内任何其它基因的删除, 将只影响处于更下游的那些基因(相对于启动子)的位置。譬如, SH 处于野生型病毒的位置 6, 它的删除并不影响处于位置 5 的 M(或上游任何其它基因), 而只是将 G 相对于启动子的位置从位置 7 移到了 6。应注意的是, 基因的删除还可能(但

30

很少)发生在通过生物学方式衍生的病毒中。例如，一种在细胞培养基中经过大规模繁殖的 RSV 亚群 B, 自发地删除了 SH 和 G 基因。(Karron 等, 国家科学院学报, 美国 94:13961-13966, 1997 年; 作为参考文献列入此处)。注意, “上游”和“下游”分别指的是接近启动子和远离启动子方向(启动子是处于负义 RNA 基因组的 3' 首端)。

在本发明中基因序列重排的第二个有用例子, 牵涉到将基因、基因组片段或异源多核苷酸序列插入重组 RSV 基因组或反基因组, 以改变其基因序列; 或在重组基因组或反基因组中引入相对于启动子的基因位置转移(参阅如 Bukreyev 等, 病毒学杂志, 70:6634-6641, 1996 年; Bukreyev 等, 国家科学院学报, 美国 96:2367-2372, 1999 年; Moriya 等, 欧洲生化协会杂志 425:105-111, 1998 年; Singh 和 Billeter, 普通病毒学杂志 80:101-106, 1999 年; 作为参考文献列入此处)。相对于启动子的位置, 每个被插入的基因使所有下游基因移动一个位置。这些和其它多核苷酸取代基 也可被插入或被重排入重组基因组或反基因组的非编码区域(NCR), 或也可作为一个单独的基因单位(GU), 被引入重组 RSV 基因组或反基因组中。

如同此处所使用的, “RSV 基因”通常指的是为 mRNA 编码 RSV 基因的一部分, 通常起始于带有 10 个核苷酸单位基因开端(GS)信号的上游端, 及终止于带有 12 至 13 个核苷酸单位基因终端(GE)信号的下游端。本发明中用于 RSV 的有十个这样的基因, 即 NS1、NS2、N、P、M、SH、G, F, M2 和 L。术语“基因”指的是“转录的可读框”(ORF)。ORF 被更具体地定义为一种重要的 RSV 蛋白质编码的转录可读框, 现已鉴定出该 RSV 蛋白质中的 11 种: NS1、NS2、N、P、M、SH、G, F, M2 1(或 M2(ORF1))、M2 2(或 M2(ORF2)), 以及 L。因此, 术语“基因”指的是一种基因 RNA, 它为一种子基因 RNA 编码; 它也可指一种 ORF(后一术语特别适合于例如 RSV M2 基因的这样一种情况下, 其中一个单独的 mRNA 含有两个交叠的、分别为不同的蛋白质编码分明的 ORF)。(Collins 等, 普通病毒学杂志 71:3015-3020,

1990; Bermingham 和 Collins, 国家科学院学报, 美国 96:11259-11264, 1999 年; Ahmadian 等, 欧洲生化协会杂志 19:2681-2689, 2000 年; Jin 等, 病毒学杂志, 74:74-82, 2000 年; 每项均作为参考文献列入此处)。当术语“基因”被用于关于确定基因相对于启动子的位置时, 该术语通常严格指的是由转录基因开端和基因末端信号主题所限定的一个 mRNA 的编码序列(Collins 等, 国家科学院学报, 美国 83:4594-4598, 1986 年; Kuo 等, 病毒学杂志, 70:6892-6901, 1996 年; 每项均作为参考文献列入此处)。

10 “基因组片段”的意思是取自 RSV 基因的任一长度的连续核苷酸分子链, 它可以是一个 ORF、一个基因、或一个基因外区域的一部分, 或它们的组合。

15 可被选择用于在本发明的移位基因 RSV 内作为插入单元、替换单元、被删除单元或重排单元的基因和基因组片段包括, 为 NS1、NS2、N、P、M、SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)、L、F 或 G 蛋白质或其一部分编码的基因或基因组片段。调节部位, 例如基因外的首部或尾部部位, 也可被考虑。在本发明理想的某些具体实施例中, 嵌合的 RSV 整合了一个或数个为 RSV F、G 或 SH 糖蛋白编码的异源基因。作为选择, 重组 RSV 也可含有一为 RSV F、G 或 SH 糖蛋白的细胞质功能区、横跨膜功能区、外部功能区或免疫性抗原免疫因子编码的基因组片段。这些免疫性蛋白质、功能区和抗原免疫因子在移位基因 RSV 内是特别有用的, 因为它们在一免疫宿主体内产生了新颖的免疫反应。特别是, G 和 F 蛋白质、免疫性功能区及其中的抗原免疫因子, 提供了主要的抑制性和保护性抗原。另外, 为非 RSV 蛋白质、如在腮腺炎和 SV5 病毒内所发现的 SH 蛋白质编码的基因和基因组片段, 也可被整合在本发明的移位基因 RSV 之内。调节部位, 例如基因外 3'前导或 5'尾端区域、和基因起始、基因结束、基因间部位、或 3'或 5'非编码区, 也可用作异源(起源于不同 RSV 菌株或亚群或来源于非 RSV, 例如 PIV、麻疹、腮腺炎等)的替换或加成单元。

例如，来源于人类 RSV 亚群或菌株的一个或数个免疫性基因或基因片段，对于牛类受体基因组或反基因组内的加成或替换，产生了一个重组的嵌合病毒或亚病毒粒子，其能产生免疫反应以直接抵抗人类供体的病毒，包括一种或多种特殊的人类 RSV 亚群或菌株；同时，牛类的主链赋予了一种减毒表型，使得该嵌合体成为一种开发疫苗有用的候选病毒。在这样的一个典型具体方案中，一个或数个的人类 RSV 糖蛋白基因 F、SH 和(或)G 被加入或被替换至一完全的或部分的牛类基因组或反基因组内，以产生一减毒、具有感染性的人-牛嵌合体，它能在易受感染的宿主体内诱导人类 RSV 免疫反应。在其它“嵌合的”具体实施例中，移位基因 RSV 整合了一异源基因或基因组片段，可为一免疫性蛋白质、蛋白质功能区或抗原免疫因子编码，其来源于复合的人类 RSV 菌株，例如来源于 RSV 亚群 A 和 B 的两个 F 或 G 蛋白质或其免疫性部分。在另一些选择性具体实施例中，含移位基因的基因组或反基因组，可为重组病毒或亚病毒粒子内的嵌合糖蛋白编码，其兼有人类和牛类的糖蛋白功能区或免疫性抗原免疫因子。例如，一为来源于人类 RSV F、SH 或 G 糖蛋白的糖蛋白外部功能区编码异源基因组片段，可与一为牛类背景基因组或反基因组内对应的牛类 F、SH 或 G 糖蛋白细胞质和内部功能区编码的基因组片段结合。

20

按照本发明的方法，人-牛嵌合 RSV 可通过用异源的基因或基因组片段、取代其在部分的 RSV 背景基因组或反基因组内之对应基因或基因组片段的方式来构建。作为选择方案，该异源基因或基因组片段可作为附加的的基因或基因组片段，与一完全的(或部分的，如果另一基因或基因组片段被删除)RSV 背景基因组或反基因组结合而一起被加入。例如，两个人类 RSV G 或 F 基因或基因组片段可被包括加入，从 RSV 亚群 A 和 B 内各取一个。

25

移位基因或基因组片段(包括异源基因或基因组片段)经常被加入一完全的或部分的 RSV 基因组或反基因组内一基因间部位。作为选择

30

方案，该基因或基因组片段可置于基因的其它非编码区，例如在 5'或 3'非编码区内，或在该完全的或部分的基因组或反基因组内非编码核苷酸出现的其它部位。在一个方面，非编码的调节部位含有为进行有效的复制、信号转移、转录所需的顺向作用信号，因此，其代表了引入一取代基因或基因组片段、或如同此处所披露的其它突变体来修饰上述功能的目标位点。在本发明更详细的一些方面，减毒突变体被引入顺向作用的调节部位，产生了如：(1)组织特效减毒性(Gromeier 等，病毒学杂志，73:958-64，1999 年；Zimmermann 等，病毒学杂志，71:4145-9，1997)，(2)增强干扰素敏感性(Zimmermann 等，病毒学杂志，71:4145-9，1997)，(3)温度敏感性(Whitehead 等，病毒学 247:232-9，1998)，(4)复制水平一般限制(Men 等，病毒学杂志，70:3930-7，1996 年；Muster 等，国家科学院学报，美国 88:5177-5181，1991)，和(或)(5)宿主对复制的特殊限制(Cahour 等，病毒学 207:68-76，1995)。这些减毒突变体可通过各种方式获得，例如点突变、相关病毒之间的序列互换，或删除等方式，以合成本发明的移位基因减毒 RSV。

在本发明其它一些供选择的具体实施例中，提供了移位基因 RSV，该重组 RSV 通过许多种基因或基因组片段的删除、插入、替换、或重排而得以修饰。在某些具体实施例中，选定的“基因集”被通过其中一种手段，协调地转移进、出该重组 RSV 基因组或反基因组，或在其内转移。典型的可从其中选出个别的或协调地转移基因组的 RSV 基因，包括 RSV N、P、NS1、NS2、M2-1 和 M 基因。以上基因可被单独地或以任一组合方式在人类或牛类 RSV 基因组或反基因组内转移，以产生移位基因减毒衍生物。在更详细的一些方面，人类或牛类 RSV 的 N 和 P 基因两者均被协调地删除、插入、替换或重排(例如，通过在 HRSV 基因组或反基因组内被协调地删除或被对应的牛类 RSV N 和 P 基因取代)。该 RSV 基因内某些基因之间功能上的协调性促进了这种协调性基因转移。这种协调性经常出现在基因组内相邻的基因对中。如此，在其它一些供选择的具体实施例中，NS1 和 NS2 基因两者均被协调地转移，例如，在人类 RSV 中被来自牛类 RSV 的对应的

NS1 和 NS2 基因所取代。在另一些具体实施例中，RSV 内两个或更多的 M2-1、M2-2 和 L 基因被协调地转移。对于本发明中希望具有高度宿主范围限制的某些候选疫苗而言，人类 RSV 的每个 N、P、NS1、NS2、M2-1 和 M 基因分别被牛类 RSV 中对应的 N、P、NS1、NS2、M2-1 和 M 基因所取代。

在人-牛嵌合体 RSV 内协调的基因转移也被指向在一牛类背景基因组或反基因组内引入人类抗原基因。在某些具体实施例中，一个或数个选自 F、G、SH 和 M 的人类 RSV 包膜相连的基因，被加入或替换至一完全的或部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内。例如，一个或数个选自 F、G、SH 和 M 的人类 RSV 包膜相连的基因，可被加入或替换至一部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组之内，其中，一个或数个选自 F、G、SH 和 M 的包膜相连的基因被删除。在更详细的一些方面，被定义为人类 RSV 包膜相连基因 F、G 和 M 之基因集内一个或数个基因，被加入至一部分的牛类 RSV 背景基因组或反基因组内，其中，包膜相连的基因 F、G、SH 和 M 被删除。一个典型的具备如下各例所述特点的人-牛嵌合体 RSV 为 rBRV/A2-MGF。

在本发明其它一些方面，将异源核苷酸序列插入 RSV 候选疫苗的方式被单独地应用，以调节候选疫苗重组体的减毒程度，例如用于上呼吸道。因此，有可能将核苷酸序列插入 rRSV，使两者均能指导外来蛋白质的表达，并在动物宿主体内使病毒减毒，或有可能单独地使用核苷酸插入方式使候选疫苗病毒减毒。为实现本发明的这些方面，提出了一些一般的手段和方法，例如在美国临时专利申请 No. 60/170,195、美国专利申请 No. 09/458,813 以及美国专利申请 No. 09/459,062(每项均作为参考文献列入此处)中。在为此提供的本发明一典型的具体方案中，将麻疹 HA ORF 插入一选定的 RSV 基因交汇点之间将限制病毒在体内的复制。在本发明的这些方面，该选定的基因插入单元可相对较大(约 1900 nts 或更多)。就此而论，插入单元的尺寸决定了所生成重组病毒一个可选择的减毒程度。从异源病毒所衍生

5 的各种长度的取代序列(例如, 作为单一基因单位(GU)被引入和被专门设计成缺乏任何重要的 ORF)显示了由于增加基因长度(即相对于一额外 mRNA 的表达)而产生的可选择减毒效果。尺寸相似的插入单元被引入一 RSV 基因下游非编码区域(NCR)的其它结构, 在本发明之内也是有用的。

10 为了确定支配基因插入对减毒的影响的某些规则, 各种长度的基因单位可被插入一野生型 RSV 主链, 而且基因单位的长度对减毒的影响被加以审查。被设计成不含重要 ORF 的基因插入单位, 使得对于基因单位长度影响的评估与该基因所表达蛋白质的影响无关。这些异源序列作为 HN 和 L 基因间尺寸为 168 nt 至 3918 nt 的一额外基因单位被插入 PIV 主链。此外, 还进行了控制 CDNA 的构建和病毒的制造, 其中尺寸相似的插入单元被置于 PIV HN 基因的 3'非编码区域, 故未介入一额外基因的加成。这些病毒被制造出来以评估整体基因长度和
15 基因数字的增加对于减毒的影响。一额外基因单位的插入预计将减少插入位点下游基因的信号转移, 将同时影响整体的充足程度和所表达蛋白质的比率。如同此处所示, 长度约为 3000 nts 以上基因的插入或延长, 使仓鼠上、下呼吸道的野生型病毒得以减毒。长度约为 2000 nts 基因的插入使用于上呼吸道的 rHPIV3cp45L 候选疫苗进一步得以减
20 毒。因此, RSV 内可比的插入基因可具有使候选疫苗病毒减毒及诱导保护功能以抵抗另一种病毒的双重影响。不能表达额外蛋白质的基因 3'非编码区域内的基因的延长部分, 也能在其内部进行自身减毒。在本发明的这些方法内, 插入基因的长度是减毒的决定因素。

25 本发明中所用的基因顺序重排的一个单独例子, 涉及改变一个或数个自然产生的基因相对于其它自然发生的基因的位置, 而没有引入或删除实质性长度的多核苷酸(例如, 100 个核苷酸以上)。例如, 人类 F 和 G 基因或人一牛嵌合 RSV 可通过基因消除后重新插入重组基因组或反基因组的方式, 从其自然基因顺序部位被转移至更接近于启动子
30 的部位, 而不实质性地改变重组 RSV 基因组或反基因组的长度。

这些基因位置和(或)基因顺序的改变,通常会产生生物性质改变了的病毒。例如,本发明中缺乏一个或数个选定基因的重组 RSV,如 NS1、NS2、SH,或 G、NS1 和 NS2 一起,或 SH 和 G 一起,均可在体外、体内或同时以该两种方式被减毒。尽管很可能该表型主要地是受到特定病毒蛋白质表达丧失的影响,但也很可能是改变了的基因图谱对表型产生了影响。对于 SH 被删除病毒的观察结果支持了这一点,该病毒比某些细胞类型中的野生型更有效地生长,大概是由于因基因删除及其所产生的基因顺序变化、还可能包括基因尺寸的变化,而导致信号转移、复制效率,或两者的同时提高。

从 cDNA 产生感染性 RSV 的这种能力,为将预定的变化通过 cDNA 中间体引入感染性病毒提供了一种方法。该方法被用于合成一系列野生型重组 RSV 菌株 A2 的感染性衍生物;该衍生物含有减毒突变体,其包括例如顺向作用的 RNA 信号中一个或数个核苷酸取代基,和(或)在一个或数个病毒蛋白质中一个或数个氨基酸取代基,和(或)一个或数个基因的删除,或该基因表达的消除(Bukreyev 等, 病毒学杂志, 71:8973-8982, 1997 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 72:4467-4471, 1998 年; Whitehead 等, 病毒学 247:232-239, 1998 年; Bermingham 和 Collins, 国家科学院学报, 美国 96:11259-11264, 1999; Juhasz 等, 疫苗 17:1416-1424 1999 年; Juhasz 等, 病毒学杂志, 73:5176-5180, 1999 年; TenG 和 Collins, 病毒学杂志, 73:466-473, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:871-877, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年; Collins 等, 高等病毒研究 54:423-451, 1999 年; 美国临时专利申请 No. 60/143,097, July 9, 1999 申请, U.S. 专利申请系列号 09/611,829 及其对应的作为 WO 01/04321 出版的 PCT 申请书;每项均作为参考文献列入此处)。

菌株 A2 代表了抗原亚群 A,一种有效的 RSV 疫苗还应该代表其它抗原亚群,亚群 B。G 和 F 糖蛋白质是主要的抗原免疫因子及主

5 要的保护性 RSV 抗原(Connors 等, 病毒学杂志, 65:1634-1637 1991 年; Murphy 等, 病毒研究 32:13-36, 1994 年; Collins 等, 菲尔德病毒学 2:1313-1352 1996 年; 并且 Crowe 等, 新一代疫苗, 711-725 1997 年; 每项均作为参考文献列入此处)。因此, 重组菌株 A2 的 G 和 F 基因被其源自抗原亚群 B 的 B1 菌株对应物所取代(Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:9773-9780, 1999 年, 作为参考文献列入此处)。这是通过
10 使用野生型和减毒菌株 A2 为主链而实现的。如此, 得到了重组病毒, 而且“嵌合化”并未在可察觉的程度上干扰病毒的复制。这显示了一个加速制造疫苗病毒的方法: 具体地说, 使用减毒菌株 A2 主链来表达亚群 B 的抗原免疫因子(待审专利申请书)。因此, 一旦适当减毒的亚群 A 的移位基因 RSV 疫苗病毒在临床试验中得到鉴定, 它的主链可以被修饰, 从而以加速的方式合成可比较的亚群 B 疫苗, 而且该两病毒可被结合而做为二价的疫苗。

15 在上述参考文献资料中显示, 本发明中有用的 RSV 能表达一作为附加的基因加入、被置于各种基因组位置中的任何位点最好是基因间区域的外来基因。此概念被用来制造一种重组菌株 A2 病毒, 它也将亚群 B 的 G 糖蛋白作为一个附加的基因而加以表达。因此, 一单一的病毒表达了两个亚群的抗原免疫因子。此处引证的另一例子, 涉及
20 干扰素伽玛作为一附加基因的表达, 其导致了减毒但未降低免疫性, 并且还提供了一种方法, 以减少 T 辅助淋巴细胞子集 2 的相对刺激程度, 该 T 辅助淋巴细胞子集 2 被建议用来缓和对 RSV 的免疫病原反应。(参阅, 如美国临时申请书 No. 60/143,425, 1999 年 7 月 13 日申请, 美国专利申请系列号 09/614,285 以及作为 WO 01/04271 公布的相应 PCT 申请, 每项均作为参考文献引入此处)。
25

在本发明的另一些具体实施例中, 提供了一种不同的适用于含移位基因活病毒疫苗减毒的基础, 其减毒过程是部分地以宿主范围影响为基础的。在这方面, 此项即时性技术披露通过在 HRSV 和 BRSV 之间引入基因组片段、整个基因或多个基因, 提供了嵌合型减毒 RSV。
30

HRSV 和 BRSV 之间宿主范围的区别, 可以黑猩猩为例来说明。HRSV 在黑猩猩体内的生长非常随意, 相比之下, BRSV 在同一动物体内的生长几乎觉察不到、或根本觉察不到。黑猩猩显示了可与人类相比较的病毒复制及疾病, 故是广为接受的代表 RSV 在人体内感染性和免疫性的模型。如下所述, 在黑猩猩身上所观察到的嵌合 RSV 宿主范围的区别, 可与在细胞培养基上所观察到的宿主范围区别相关联, 从而提供了一个方便的初步分析用试样。

在本发明的嵌合型人-牛 RSV 内观察到的宿主范围影响通常是与观察到的 HRSV 和 BRSV 之间核苷酸和氨基酸序列的区别有关。例如, 在 HRSV 和 BRSV 之间的, 以下每个蛋白质的氨基酸同一性百分数是: NS1(69%)、NS2(84%)、N(93%)、P(81%)、M(89%)、SH(38%)、G(30%)、F(81%)、M2-1(80%)、L(77%)。由于 HRSV 和 BRSV 之间(例如, 用 BRSV 的 N 基因取代 HRSV 的 N 基因涉及了约 26 个氨基酸区别)很大的基因分歧, 本发明的嵌合型牛-人 RSV 是特别有用的候选疫苗。如以下例子所示, 用 HRSV 的 G 和 F 糖蛋白来取代 BRSV 的对应物, 提高了重组 BRSV 在黑猩猩体内复制的任意性。由于(赋予多个氨基酸或核苷酸区别的)多个基因和基因组片段的参与, 为高度稳定、难以逆转的减毒过程提供了广泛的基础。这种方式的减毒与被一个或多位点突变体减毒的 HRSV 病毒的情况, 形成了鲜明的对比。在 20 后一情况下, 一单独的突变体将导致毒性显著的或完全的重获。此外, HRSV 内已知的减毒位点突变体通常会产生一种温度敏感性表型。这是因为温度敏感性表型被专门地用为第一次筛选以识别 HRSV 接触诱变剂之后改变了的后代。减毒性与温度敏感性相关的一个问题是, 当 25 病毒在上呼吸道内被减毒时, 其在下呼吸道内的复制可能会被过分地限制。这是因为在呼吸道之内有一个温度梯度, 下呼吸道内温度越高(限制性越高), 上呼吸道内温度则越低(限制性越低)。减毒病毒在上呼吸道内的复制能力可能会导致复杂化, 包括充血、鼻炎, 发烧和中耳炎。因此, 仅仅靠温度敏感性突变体来达到减毒也许并不是理想的。相反, 30 存在于本发明的移位基因 RSV 内的宿主范围突变体, 在许多情况下不

会赋予温度敏感性。所以，这个新颖的减毒方法将：(i)在遗传和表型方面更稳定，(ii)与其它的活疫苗方法相比，不大可能会与上呼吸道内的残余毒性联系在一起。

5 如上所注，BRSV 和 HRSV 之间序列分歧量约是 HRSV A 和 B 亚群之间分歧量的两倍。因此，F 蛋白质在 BRSV 和 HRSV 之间约有 20% 的氨基酸分歧，G 蛋白质约有 70% 的分歧(Lerch 等，病毒学杂志 64:5559-69, 1990; Lerch 等，病毒学 181:118-31, 1991 年; Mallipeddi 和 Samal，普通病毒学杂志 74:2001-4 1993 年; Mallipeddi 和 Samal，
10 兽医微生物学 36:359-67, 1993; Samal 等，病毒学 180:453-456, 1991; Samal and Zamora，普通病毒学杂志 72:1717-1720 1991 年; Zamora 和 Samal，病毒研究 24:115-121, 1992 年; ibid，普通病毒学杂志 73:737-741, 1992 年; Mallipeddi 和 Samal，普通病毒学杂志 73:2441-2444, 1992 年, Pastey 和 Samal，普通病毒学杂志 76:193-197, 1995
15 年; Walravens 等，普通病毒学杂志 71:3009-3014, 1990; Yunnus 等，普通病毒学杂志 79:2231-2238, 1998 年，每项均作为参考文献列入此处)。

20 在此处所包括的先前的披露中，重组 BRSV 通过用其人类 RSV 的对应物来取代 G 和 F BRSV 基因而加以修饰。所生成的嵌合型 BRSV/HRSV 病毒在 BRSV 主链上具有人类 RSV 的抗原免疫因子，在黑猩猩体内比其 BRSV 亲本更有效地被复制，但仍保留了高度的减毒性。这表明 G 和 F 基因是决定 BRSV 的宿主范围限制的因素，但也显示一个或数个其它基因也决定了宿主范围限制。这代表了构建优选的
25 BRSV/HRSV 嵌合病毒的一个起点，该病毒的特征为如上所述的基因位置改变，并含有人类 RSV G 和 F 抗原免疫因子，所产生的重组 RSV 由于一个或数个 BRSV 基因的存在而被减毒，从而赋予宿主范围限制 (Buchholz 等，病毒学杂志, 74:1187-1199 2000 年; 美国专利申请书 No. 60/143,132, 于 1999 年 7 月 9 日申请; 每项均作为参考文献列入此处)。

30

关于通过 cDNA 来合成重组 RSV、和制造和测试一整套突变体和核苷酸变体的材料和方法的详细描述，作为本发明的补充方面而在此处披露，被列在：例如，美国临时专利申请 No. 60/007,083，于 1995 年 9 月 27 日申请；美国专利申请 No. 08/720,132，于 1996 年 9 月 27 日申请；美国临时专利申请 No. 60/021,773，于 1996 年 7 月 15 日申请；美国专利申请 No. 08/892,403，现作为美国专利 No. 5,993,824 发布；美国临时专利申请 No. 60/046,141，于 1997 年 5 月 9 日申请；美国临时专利申请 No. 60/047,634，于 1997 年 5 月 23 日申请；美国专利 No. 5,993,824，于 1999 年 11 月 30 日发布(对应于国际出版物 No. WO 98/02530)；美国专利申请 No. 09/291,894，由 Collins 等于 1999 年 4 月 13 日申请，对应于已出版的 PCT 申请书 WO 00/61737；美国临时专利申请 No. 60/129,006，由 Murphy 等于 1999 年 4 月 13 日申请；Crowe 等，疫苗 12: 691-699，1994 年；及 Crowe 等，疫苗 12: 783-790，1994 年；Collins，等，国家科学院学报，美国 92:11563-11567，1995 年；Bukreyev 等，病毒学杂志 70:6634-41，1996 年，Juhasz 等，病毒学杂志，71(8):5814-5819，1997 年；Durbin 等，病毒学 235:323-332，1997 年；Karron 等，感染性疾病杂志 176:1428-1436 1997 年；He 等，病毒学 237:249-260，1997 年；Baron，病毒学杂志 71:1265-1271 1997 年；Whitehead 等，病毒学 247(2):232-9，1998a；Whitehead 等，病毒学杂志 72(5):4467-4471，1998b；Jin 等，病毒学 251:206-214，1998 年；Bukreyev 等，国家科学院学报，美国 96:2367-2372，1999 年；Bermingham 和 Collins，国家科学院学报，美国 96:11259-11264，1999 年；Juhasz 等，疫苗 17:1416-1424 1999 年；Juhasz 等，病毒学杂志，73:5176-5180，1999 年；Teng 和 Collins，病毒学杂志，73:466-473，1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志 73:9773-9780，1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志 73:871-877，1999 年；及 Whitehead 等，病毒学杂志 73:3438-3442，1999 年。

通过 CDNA 合成重组 RSV 典型的方法涉及细胞内的共同表达，通常是源自 RSV 反基因组 RNA 和 RSV N、P、M2-1 和 L 蛋白质的

质粒，其通过共转染而进入组织培养基细胞。这就引起了有效的感染性，导致了被称为重组病毒的感染性 cDNA 衍生病毒的合成。一旦产生后，重组 RSV 很容易以与生物方式获得的病毒同样的方式繁殖，并且重组病毒和其对应的以生物方式获得的病毒将无法区别，除非前者被修饰得含有一个或数个被引入的变化作为标记。

在更详细的一些方面，前述所引用文件所叙述的方法和步骤，可用于本发明的诱变、分离和表征 RSV，以获得减毒突变体菌株，例如，温度敏感性(ts)、冷培育(cp)冷适应性(ca)、小型噬菌斑(sp)及宿主范围有限的(hr)突变体菌株)，及识别那些能决定减毒表型的基因变化。与这些方法一起，前述文件详述了在公认的模式系统、包括鼠科和非人灵长类模式系统里，为确定生物衍生的和以重组方式合成的人类减毒 RSV 的复制、免疫性、基因稳定性保护功效的步骤，包括用于人类 RSV A 和 B 亚群的步骤。此外，这些文件叙述了开发和测试用于预防和治疗 RSV 感染的免疫性成分、包括单价和二价疫苗的一般方法。

从 cDNA 产生感染性 RSV 的能力，提供了一个将预定变化通过 cDNA 中间体引入感染性病毒的方法。此方法显示了能合成范围广泛的 RSV 感染性减毒衍生物，例如候选重组疫苗，其包括病毒蛋白质内一个或数个氨基酸的替换，一个或数个基因删除或基因表达的消除；和(或)在顺向作用的 RNA 信号内一个或数个核苷酸的替换，以产生理想的对病毒表型的影响(参阅，例如，Bukreyev 等，病毒学杂志 71:8973-8982，1997 年；Whitehead 等，病毒学杂志 72:4467-4471，1998 年；Whitehead 等，病毒学 247:232-239，1998 年；Bermingham 和 Collins，国家科学院学报，美国 96:11259-11264,1999；Juhasz 等，疫苗 17:1416-1424 1999 年；Juhasz 等，病毒学杂志，73:5176-5180，1999 年；Teng 和 Collins，病毒学杂志 73:466-473，1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志 73:871-877，1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志 73:3438-3442，1999 年；并且 Collins 等，高等病毒研究 54:423-451，1999 年，每项均作为参考文献列入此处)。前述学说中很值得仿效的

是构建和评估改性感性重组 RSV 的方法，该重组 RSV 被修饰为具有表型针对性的、从生物衍生的 RSV 突变体中所确定的突变体，例如，重组 RSV 所接受的 cp 和 ts 突变体；类似的生物衍生的突变体中还有：cpts RSV 248 (ATCC VR 2450)、 cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454)、
5 cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453)、 cpts RSV 530 (ATCC VR 2452)、 cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451)、 cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455)、 RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542)，和 RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579)。 这些方法很容易被用于本发明的移位基因重组 RSV 的构建。如此提供的重组 RSV 可含有两个或更多的、来源于相同的或不同的生物衍生的 RSV 突变体，例如一个或数个 248/404、248/955、
10 530/1009、或 530/1030 生物突变体。就后者而言，复合减毒重组体可以具有两个、三个或更多的生物学突变体所组合的减毒突变体，例如，由 RSV 突变体 530/1009/404，248/404/1009，248/404/1030，或 248/404/1009/1030 突变体所组成的减毒突变体组合。在一些典型的具体方案中，一个或数个减毒突变体在 RSV 聚合酶基因内氨基酸 Asn43、
15 Phe521、Gln831、Met1169 或 Tyr1321 等位置决定了一个温度敏感性取代基，或在基因 M2 的基因起始序列决定了一个温度敏感性核苷酸取代基。最好的是，这些突变体涉及的异变与下列这些从生物衍生的突变 RSV 中所识别的异变是相同的、或比其保守的，例如比下列在 L 聚合酶基因中所识别的取代保守的异变：Ile 取代 Asn43，Leu 取代
20 Phe521，Leu 取代 Gln831，Val 取代 Met1169，和 Asn 取代 Tyr1321。

另外还可被整合在本发明的移位基因 RSV 内的突变体是，例如，在异源 RSV 或关系更远的负链 RNA 病毒中所识别的减毒突变体。特别是，减毒的和其它理想的、在一负链 RNA 病毒中所识别的减毒突变体，可被“转移”，例如，被拷贝至人类的或牛类 RSV 基因组或反基因组内一个对应的部位，可以是在移位基因 RSV 内部，也可以是作为构建基因移位 RSV 的手段。简言之，在一异源负链 RNA 病毒中的理想的突变体，被转移到 RSV 受体(例如，分别为牛类或人类 RSV)。
25 这涉及到在异源病毒内比对该突变体，通过序列对准的方式，识别人

类或牛类 RSV 中对应的位点, 然后使 RSV 受体内的天然序列异变为突变基因型(经过一个相同的或保守的异变), 如由 Murphy 等于 1999 年 4 月 13 日申请、作为参考文献列入此处的美国临时专利申请 No. 60/129,006 中所述的那样。如本项披露所传授的, 最好是修饰嵌合体基因组或反基因组, 为突变位点上的改变编码。这种改变保守地对应于异源突变体病毒内所识别出的改变。例如, 与对应的野生型序列比较, 如果氨基酸的取代为突变体病毒内的突变位点打下了标记, 那么, 应该在重组病毒内对应的残基上设计一个相似的取代。最好的是, 该取代过程将涉及与突变体病毒蛋白质内存在的取代残基相同的或较保守的氨基酸。然而, 也可能在突变位点, 相对于突变体蛋白质内的取代残基, 非保守性地修饰非天然氨基酸残基(例如, 通过使用其它的氨基酸来干扰或削弱野生型残基的功能)。从负链 RNA 病毒中可识别出典型的突变体, 并将其转移到本发明的移位基因 RSV 内。该负链 RNA 病毒包括其它的 RSV(如鼠科的)、PIV、仙台病毒(SeV)、纽卡斯尔氏病毒(NDV)、猿病毒 5(SV5)、麻疹病毒(MeV)、牛瘟病毒、犬瘟病毒(CDV)、狂犬病病毒(RaV)及多泡状口腔炎病毒(VSV)。

业已披露了各种各样典型的突变体, 包括但不限于 RSV L 蛋白质内氨基酸取代 521 位的苯丙氨酸(对应于 HPIV3 L 蛋白质内 456 位的苯丙氨酸取代)。在突变体被打下了删除或插入标记的情况下, 这些可作为对应的删除或插入被引入重组病毒, 然而, 被删除或被插入的蛋白质片段的具体尺寸和氨基酸序列是可以变化的。在前面所引用的参考文献文献中, 还披露了各种各样别的类型的突变体, 并可容易地被设计在本发明的移位基因重组 RSV 内, 以便校准减毒性、免疫性或提供其它有利的结构和(或)表型作用。例如, 限制部位标记定期地被引入在移位基因组或反基因组之内以便于 cDNA 的构建和操纵。在所引用的参考文献中还叙述了范围广泛的核苷酸突变体, 点或位点突变体, 可用于本发明。例如, 披露了一些合成重组 RSV 的方法和成分, 该重组 RSV 能表达一附加的外来基因, 例如氯胺苯醇乙酰基转移酶(CAT)或萤光素酶基因。这样的重组体通常显示了与被插入基因有关

的下降的生长率。这种减毒性似乎随插入基因长度的增加而增加。

5 重组 RSV 中外来基因的插入降低了复制程度，而且其在试管内培育期间是稳定的。这一发现，提供了其它使 RSV 减毒以用于配制疫苗的有效方法。通过插入其它理想的基因也可达到相似的或改进的作用，例如干扰素- γ 、白细胞间介素-2、白细胞间介素-4 和 GM-CSF 等细胞素的插入等。

10 在本发明的一些方法中，附加的基因或基因组片段可被插入或靠近移位基因 RSV 基因组或反基因组。这些基因可与受体基因被置于共同的控制之下，或可置于单独的一组转移信号的控制之下。所希望的基因包括上述被识别的 RSV 基因以及非 RSV 基因。所希望的非 RSV 基因则包括那些编码细胞素(例如从 IL-2 至 IL-18，尤其是 IL-2、IL-6 和 IL-12、IL-18 等)、伽玛干扰素，以及富有 T 辅助细胞抗原决定基的蛋白质。这些附加的蛋白质可以作为单独的蛋白质被表达，或是作为从一 RSV 蛋白质的第二份拷贝而设计的嵌合体来表达，例如 SH。这就使得能定量地和定性地修饰和改进抵抗 RSV 的免疫反应。

20 基因长度的增加将在所合成 RSV 内产生减毒性，其在一定程度上取决于插入单元的长度。此外，从插入移位基因 RSV 内的非 RSV 基因所发出的某些蛋白质(例如细胞素)的表达，将由于该蛋白质的作用而导致病毒的减毒。典型的能产生感染性减毒病毒表型及出自 RSV 转染细胞的高水平细胞素表达的细胞素，包括白细胞间介素-2 (IL-2)、IL-4、GM-CSF 和 γ -干扰素。其它的作用，包括细胞和(或)体液免疫反应的强化，也将随着 细胞素引入本发明的移位基因 RSV 而产生。

30 涉及本发明之移位 RSV 内的整个病毒基因或基因组片段异变的删除、插入、替换及其它突变，产生了高度稳定的诸候选疫苗。该疫苗对于免疫抑制性患者的情况是特别重要的。许多这类变异将导致所合成疫苗菌株的减毒，而其它变异将决定不同类型的理想的表型突

变。例如，附加的(即对于试管内生长是非关键性的)基因是为专门干扰宿主免疫性的蛋白质编码的优秀候选基因(参阅，例如，Kato 等，欧洲分子生物学机构杂志 16:578-87，1997 年，作为参考文献列入此处)。在嵌合疫苗病毒内消除的这样基因，预计将降低毒性、发病机理和(或)改进免疫原性。

另外，前述参考文献所披露的、可用于整合到本发明之移位基因 RSV 重组基因的独立核苷酸变体，包括一个选定的 RSV 基因的部分性地或完全地删除或消除。因此，RSV 基因或基因组片段可被删除，包括在 RSV NS1、NS2、N、P、M，G，F，SH、M2(ORF1)、M2(ORF2)和(或)L 等基因中，部分性地或完全地删除可读框和(或)顺向作用的调节序列。在一个例子中，在所产生的重组 RSV 内，通过除去为 SH mRNA 编码的多核苷酸序列，使得 SH 基因的表达被消除。SH 基因的删除不仅产生了可恢复的、感染性 RSV，就感染性病毒的产量和噬菌斑大小而论，还在组织培养基内产生了一种生长情况显著改善的 RSV。这种在组织培养基内由于 SH 的删除而改善了的生长情况，为开发移位基因 RSV 疫苗提供了有用的手段，例如可克服培养基中 RSV 产量低下的问题。而且，这些删除对于抵抗基因逆转是高度稳定的，使得从其获得的 RSV 克隆制品在作为疫苗试剂时特别有用。

SH-minus RSV 重组体在老鼠的上呼吸道内也显示了针对特定定位点的减毒性，为开发疫苗展示了新的优越性。作为活病毒疫苗被评估的当前的 RSV 菌株，例如 cp 突变体，在组织培养基内未显示出生长情况的显著改变。这些是宿主范围突变体，而且它们对黑猩猩和人类呼吸道内病毒复制的限制，约为下呼吸道内的一百倍。另一典型的突变体，ts 突变，由于从上呼吸道至下呼吸道增长的体温梯度，倾向于优先地限制病毒在下呼吸道内的复制。与这些 cp 和 ts 突变体对比，SH-minus RSV 突变体则具有截然不同的对上呼吸道有较大限制的表型。这对用于非常年幼的婴儿的疫苗病毒是特别理想的，因为，为了保证疫苗能安全地用于这一其呼吸主要是通过鼻腔、易受病毒攻击的

年龄组，要求限制上呼吸道内病毒的复制。再者，在任一年龄组中，上呼吸道内减少的复制将降低中耳炎的发病率。除这些优点外，SH 删除突变体在本质上涉及了将近 400 nt 和整个 mRNA 的消除，代表了一种对逆转有高度抵抗力的表型。作为一“多核苷酸取代体”同时又指导基因位置的转移，例如正向调节 F 和 G 糖蛋白基因的表达，SH-minus 的删除所起的作用，被充分地显示在如下例子中。

关于 SH 基因修饰还讨论了不同 RSV 中、包括人类和牛类 RSV 中 SH 基因的比较，和其它肺炎病毒的比较，以提供另外的产生有用的 RSV 重组疫苗的手段和方法。例如，两种 RSV 抗原亚群，A 和 B，在某些 SH 功能区均显示了相对较高的保守性。在这两个功能区中，RSV A 和 B 中 N 原子端区域和假定的横跨膜功能区在氨基酸水平上显示了 84% 的同一性，而 C 原子端的假定的外部功能区更加分歧(同一性约为 50%)。对于人类 RSV 亚群 B 两种菌株的 SH 基因的比较，8/60 和 18537，只识别出一个氨基酸的区别(Anderson 等，见上文)。人类的 SH 蛋白质与牛类 RSV 的比较约为 40% 相同，而且共享主要的结构特点，包括(i)所保留残基的不对称分布；(ii)非常相似的疏水性外形；(iii)存在两 N 连接的糖基化位点，在疏水性区域的每边各有一个位点；以及(iv)单一的半胱氨酸残基，位于每个 SH 蛋白质的中央疏水性区域之羧基端一侧。(Anderson 等，见上文)。这些和其它基因序列的相似性和区别性，可以选择异源的序列，以便替换或插入感染性移位基因 RSV 的克隆产物内，例如生产具有多功能免疫效应的疫苗，或作为选择的或附加的目的，产生减毒之类的理想效应。

在本发明供选择的具体实施例中，部分性基因删除或其它有限的核苷酸删除，被设计在重组 RSV 内，以产生理想的表型异变。在一个例子中，通过从 SH 基因的下游非编码区域删除序列，RSV 基因的长度被缩短。通过利用在 G-F 基因间区域内含有 XmaI 位点的反基因组 cDNA 的一个版本，构建了这种典型的部分性基因删除；这是一种预计其本身不会影响编码病毒的变化。该编码的病毒，被定名为

RSV/6120, 其在 SH ORF 的最后三个密码子和终端密码子处有一个沉默的核苷酸替换, 并在 SH 下游非转录区域有 112 个核苷酸的删除(在重组反基因组内 4499-4610 位)。这个删除使基因末端信号原封未动(Bukreyev 等, 病毒学杂志, 70:6634-41, 1996 年, 作为参考文献列入此处)。这些位点性突变和 112 个核苷酸的删除未改变任何病毒蛋白质的编码氨基酸, 它们亦不中断任何已知病毒 RNA 信号或改变编码 mRNAs 的数量。

对于 6120 病毒的多阶段生长效率, 对照其未经删节的对应物 D53 进行了平行的分析; 该病毒显示了一个高于 D53 病毒 1.5 至 2 倍的滴定峰值。因此, 在 112 个核苷酸非编码序列的 SH 基因内小规模的部分性删除, 导致了试管内生长效率的显著增加。

其它部分性基因删除和小规模的核苷酸删除, 可容易地被设计在本发明的重组 RSV 中, 以改变病毒表型, 包括在下列情况下核苷酸的删除:(1)在各种 ORF 的开端(或)末尾非转录的序列, 顺向作用的 RNA 信号除外, (2)基因间部位, 以及(3)对于启动子的活性非关键性的 3' 前导端和 5' 尾端。非转录基因序列删除或插入的例子包括 NS1、NS2、P、M、F 和 M2 基因的下游未转录区域的以下部位: 即, 序列位置分别为 519-563、1003-1086、3073-3230、4033-4197、7387-7539 和 8433-8490, 系按照重组反基因组编号。并且, 作为进一步的例子, nt 55-96、nt 606-624、nt 4231-4300 可从 NS1、NS2 和 SH 基因上游非转录的区域被分别删除。按照此处的传授, 可以做到从这些序列中部分性地或完全地删除任何一个或数个序列, 以提供很容易筛选出的候选者, 以便获得有益的、由选择性的删除所决定的表型突变。RSV 基因内其它的非转录区域在这方面也是有用的。由于针对重要部位对基因起始和基因终止信号进行了比对和定性(Kuo 等, 病毒学杂志, 71:4944-4953; 1997 年; Harmon 等, 病毒学杂志, 75:36-44, 2001 年, 每项均作为参考文献列入此处), 涉及一个或一些(例如, 3-10, 10-20, 20-45)nt 的删除或修饰也可以被考虑。在某些情况下, 还可获得特殊

的优越性。例如，在 G 基因内，nt 4683 至 4685 的删除(其包括了基因起始信号的一个 nt 和非转录的序列的两个 nt)消除了 mRNA 中第一个 AUG；该 AUG 不引发重要的 ORF，但被认为会使核糖体从下一个 AUG(其引发 G ORF)转向。另外，这种删除恢复了 GS 信号并保留了 G ORF 的转录起始位点。因此，可以根据该基因的知识选择修饰的非转录位点，或随机地选择并用本发明的方法迅速地进行测试。

关于基因间序列，对于微基因组的研究显示，一个基因间区域可以被减少至单一的 nt，或全部被删除而不影响转录和 RNA 的复制。菌株 A2 的基因间部位总共代表了另外 207 nt(注意，重组反基因组的 NS2-N 基因间区域被设计得比其生物学对应物长出 1 nt；参阅，例如，Collins 等，国家科学院学报，美国，92:11563-11567，1995 年，作为参考文献列入此处)。

RSV5' 尾段区域长度是 155 nt，因此，比大多数单负链病毒的对应区域长约 100 nt，而且比 RSV 首段区域长 111 nt。对于微基因组的研究建议，这个序列的许多部分不是关键的，而且是修饰的候选对象(Kuo 等，病毒学杂志，70:6892-901，1996 年，作为参考文献列入此处)。例如，紧随 L 基因的区域尾端尺寸可减少 75 nt、100 nt、125 nt 或更多，而使 5'基因组终端原封未动(它为 3'反基因组的末端，包括反基因组启动子编码)。同样，44 nt 的首段区域也可被修饰。例如，3'首端末端的的最初 11 nt 形成了病毒启动子的核心，因此，程序从首段区域其余部分也许可被删除或修饰。

在本发明的某些具体实施例中，从 NS1、NS2、SH、F 及 M2 基因(部分性地或完全地)删除一个或数个如上所述的非转录序列，将导致最多可达 806 个 nt 的基因长度可调性地缩短，比本例子中所述的 112 个 nt 的删除多了 7 倍。部分性地或完全地删除最初 9 个基因之间的一个或数个基因间区域(例如，少至每段的最小长度为一个 nt)，将导致最多可达另外 198 nt 的可调性删除。尾部和(或)首部的全部或部分

的删除, 可导致多达 50、75、100 个或更多 nt 的进一步删除。如此, 例如, 将非转录的基因序列 806 个 nt 与基因间区域的 198 nt 以及尾段的 100 nt 结合将产生总共 1104 nt, 代表了比此处所述的 112 nt 删除大将近 10 倍的删除(并代表了 RSV 基因的 7% 以上)。

5

在上面所引用的参考文献中所述的另一例子中, 通过将中止密码子引入转录的可读框(ORF), NS2 基因的表达被消除。对于 NS2 “击昏”病毒, 感染性病毒的释放率与野生型比较是减小了。另外, 突变型和野生型病毒的噬菌斑比较显示, NS2 “击昏”病毒的噬菌斑大小减少了许多。因此, 这种类型的突变可被整合在有活力的移位基因重组 RSV 之内, 以产生改性表型, 在这一例中, 则为试管内病毒生长率和噬菌斑大小的减少。所以, 根据已知的减小的试管内噬菌斑大小和体内减毒性之间的相关关系, 这些和其它的一些“击昏”方法和突变体将提供另外一些重组 RSV 疫苗试剂。NS2 基因的表达也因 NS2 基因的彻底

10 除去而被消除, 产生了类似表型的病毒。

15

成功地被删除的其它 RSV 基因包括 NS1 和 M2-2 基因。前者是通过除去为各自蛋白质编码的多核苷酸序列, 后者是通过引入一个框架位移或改变转录起始位点和引入中止密码子。有趣的是, 恢复的 NS 1-minus 病毒在组织培养基内产生了小的噬菌斑, 尽管它不象被删除的 NS 2 病毒一样小。NS 1 病毒能(尽管是以较低的效率)增长的事实, 确定了 NS1 蛋白质是一个对病毒生长可有可无的辅助蛋白质。NS 1-minus 病毒的噬菌斑大小与“击昏”病毒的相似, 该“击昏”病毒中 NS2 蛋白质的表达通过将转录中止密码子引入其编码序列而被消除。小型的噬菌斑表型通常与减毒突变体有关。这类突变体可被独立地整合在有活性的重组 RSV 之内而产生改变的表型。因此, 根据已知的试管内噬菌斑大小和体内减毒性之间的相关关系, 这些和其它的一些“击昏”方法和突变体, 将提供另外一些移位基因重组 RSV 疫苗试剂。该 NS 2“击昏”突变体在上呼吸道内显示了中度的减毒表型, 并在未曾用作实验的黑猩猩的下呼吸道内显示了高度的减毒表型。这个突变体在黑猩

20

25

30

猩身上也激起了对野生型病毒挑战显著的抵抗能力，引起了大为减轻的症状(Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年，均作为参考文献列入此处)。

5 在所引用的参考文献中提供的、并对本发明有用的另外一些方法和成分，涉及了移位基因 RSV 内不同的核苷酸变体，其改变了嵌合体基因组或反基因组内的顺向作用调节序列。例如，一种分泌形式的 RSV G 糖蛋白的转录起始位点，可以被删除以扰乱这种形式 G 糖蛋白的表达。RSVG 蛋白质是以两种形式合成的：一种是锚型 II 整体膜蛋白质，
10 另一种是 N-终端被切除的形式，其基本上缺乏所有的锚型膜并采取一种分泌的形式(Hendricks 等，病毒学杂志，62:2228-2233，1988)。这两种形式是通过在两个不同起始位点处转录的起始而衍生的：长型的起始于 G ORF 的第一个 AUG，另一个是起始于该 ORF 第二个 AUG 的 48 位的密码子，再通过蛋白质水解作用而进一步加工(Roberts 等，
15 病毒学杂志 68: 4538-4546，1994)。这第二个起始位点的存在是高度保守的，迄今存在于所有的人类、牛类和绵羊的 RSV 序列的所有菌株内。有人建议，可溶性形式的 G 蛋白质也许可作为抑制抗体的诱饵而起作用，从而缓和宿主的免疫性。而且，可溶性 G 涉及 Th2 偏向性反应中的优先刺激，后者又似乎是与接触 RSV 后增强的免疫机理有关。至于 RSV 疫苗病毒，对于最大程度地降低抗体的抑制性或免疫系统刺激的不均衡性而言，它是非常理想的。因此，对于消除分泌形式 G 蛋白质的表达，它也将会是理想的。这一点在重组病毒中已经实现。因此，这个突变体特别有用于定性地和(或)定量地改变宿主重组病毒所诱导的免疫反应，而不是直接地使病毒减毒。

25

 所引用的参考文献还叙述了通过改变典型基因(例如 NS1 和 NS2)顺向作用的信号转移来实现重组 RSV 表型的模式化。这些核苷酸修饰的结果与基因表达通过改变顺式调节单元的修饰是一致的，例如减少“漏读” mRNA 的程度和增加蛋白质出自下游基因的表达。所产生的
30 重组病毒将更佳地显示出上升的生长动力学机理和增加的噬菌斑大

小。对于顺向作用调节序列典型的修饰包括对基因末端(GE)并且基因起始端(GS)信号的与 RSV 基因相关的修饰。在这方面,典型的异变,包括 NS1 和 NS2 基因的 GE 信号的改变,使这些信号与 RSV N 基因的自然出现的 GE 信号相同。所产生的重组病毒显示了上升的生长动力学机理和噬菌斑大小,并提供了对移位基因 RSV 候选疫苗的表型进行有益修饰的另外一些手段。

以上所列参考文献所提供的方法和成分还能合成含有源自 RSV 亚群 A 和 B 序列的移位基因减毒 RSV 疫苗病毒,以便产生诸如 RSV A 或 B 疫苗、或二价 RSV A/B 疫苗(参阅,美国专利申请书 No. 09/291,894,由 Collins 等于 1999 年 4 月 13 日申请,作为参考文献列入此处)。在这方面进一步发挥本发明,特殊的减毒突变体被整合入嵌合性 RSV A/B 病毒,包括:(i) 5 个 cp 突变体中的 3 个,即 N(V267I) 内的 1 个突变体以及 L(C319Y 和 H1690Y)内的 2 个,但不包括 F 内的 2 个,因为这些被 B1 F 基因取代了;(ii)在 M2 基因的减毒菌株 A2 病毒内所确定的 248(Q831L)、1030(Y1321N)以及 404-L(D1183E)突变体;(iii)在基因 M2 基因起始信号内单一的 9 位核苷酸取代基,和(iv) SH 基因的删除。其它可立即利用的含有 RSV A 和或 RSV B 基因或基因组片段的移位基因 RSV 的突变体,包括但不限于 NS1、NS2、G 或 M2-2 基因的删除,以及 530 和 1009 位的突变,无论是单独地或以组合方式。

在本发明其它一些详细的方面,移位基因 RSV 被用作为异源病原体的保护性抗原的载体,包括其它 RSV 和非 RSV 病毒,以及非病毒病原体。在这些方面,含移位基因的基因组或反基因组含有一完全的或部分的 RSV “载体基因组或反基因组”,其与一个或数个异源基因或基因组片段结合;该异源基因或基因组片段为一个或数个异源病原体的一个或数个抗原免疫因子编码(参阅,美国临时专利申请书 No. 60/170,195;美国专利申请书 No. 09/458,813;及美国专利申请书 No. 09/459,062,每项均作为参考文献列入此处)。就此而论,异源病原体

也许是一种异源 RSV(例如, 不同的 RSV 菌株或亚群), 且该异源基因或基因片段可选择来为一个或数个上面所鉴定的 RSV 蛋白质, 以及蛋白质功能区、片段和免疫性区域或其抗原免疫因子等编码。如此构建的 RSV 载体疫苗可诱导一个多效的免疫反应, 并可用于与其它疫苗试剂同时接种或以协调治疗的方案接种。

被设计为其它病原体载体的移位基因 RSV, 可包含一载体基因组或反基因组, 它是一个完全的或部分的 HRSV 基因组或反基因组, 与一个或数个异源基因或基因组片段结合, 或被修饰成含有一个或数个异源 RSV, 包括选自 HRSVA 或 HRSVB 的异源 HRSV, 的抗原免疫因子编码。在另一些方面, 载体基因组或反基因组是一完全的或部分的 HRSV 基因组或反基因组; 为抗原免疫因子编码的异源基因或基因组片段, 是一个或数个非 RSV 病原体。载体基因组或反基因组可进一步整合一个或数个决定减毒性的 BRSV 基因或基因片段。作为选择方案, 载体病毒可包括一完全的或部分的 BRSV 背景基因组或反基因组, 其整合了一个或数个 HRSV 基因或基因组片段, 其中该移位基因 RSV 载体病毒被修饰, 结果包括了一个或数个为非 RSV 病原体的的一个抗原免疫因子编码的供体基因或基因组片段。

因而, 在本发明的某些详细的方面, 提供了移位基因 RSV 作为一系列非 RSV 病原体的载体(参阅美国临时专利申请 No. 60/170,195; 美国专利申请 09/458,813; 及美国专利申请 09/459,062, 每项均作为参考文献列入此处)。用于本发明这些方面的载体基因组或反基因组, 可包括一完全的或部分的 BRSV 或 HRSV 基因组或反基因组, 其分别整合了一个异源 HRSV 或 BRSV 基因或基因组片段, 而且该异源病原体可选自麻疹病毒、亚群 A 和亚群 B 呼吸道合胞病毒、HPIV1、HPIV2、HPIV3、腮腺炎病毒、人类乳突淋巴瘤病毒, I 型和 II 型 人类免疫缺陷病毒、疱疹单式病毒、细胞巨化病毒、狂犬病病毒、Epstein Barr 病毒、filoviruses 病毒、bunyaviruses 病毒、

flaviviruses 病毒，以及阿尔法病毒和流感病毒。

例如，用于构建本发明基因位置发生转移的 RSV、HRSV 或 BRSV 载体基因组或反基因组，可整合从麻疹病毒 HA 和 F 蛋白质、或抗原功能区、片段及其抗原免疫因子等选出的异源抗原免疫因子。在一些具体实施例中，一含有麻疹病毒 HA 基因的可读框(ORF)的转录单位，被加入或被整合在 BRSV 或 HRSV3 载体基因或反基因组内。作为选择方案，本发明的移位基因 RSV 可用作载体，以整合源自副流感病毒(PIV)的异源抗原免疫因子，例如整合一个或数个为 HPIV1、HPIV2 或 HPIV3 HN、F 糖蛋白、免疫功能区或其抗原免疫因子编码的基因或基因组片段。

将异源免疫性蛋白质、功能区和抗原免疫因子引入移位基因 RSV 内，对于在免疫宿主体内产生新颖的免疫反应是特别有用的。例如，源自一不同 RSV 亚群或菌株受体基因组或反基因组内、供体 RSV 亚群或菌株免疫性基因或基因组片段的加成或替换，可以诱导一个免疫反应，以抵抗供体亚群或菌株，受体亚群或菌株，或同时抵抗供体和受体亚群或菌株。为达此目的，移位基因 RSV 也可以构建为能表达一嵌合型蛋白质，例如，具有细胞质尾部和(或)横跨膜功能区的免疫性糖蛋白，其专门针对一与不同 RSV 的外部功能区融合的 RSV。如此，就可提供，例如，人一牛融合蛋白质，或整合了源自两个不同的人类 RSV 亚群或菌株功能区的融合蛋白质。在一理想的具体实施例中，含移位基因的基因组或反基因组为重组病毒或亚病毒粒子内的嵌合糖蛋白编码；该嵌合糖蛋白具有人类和牛类糖蛋白功能区或免疫性抗原免疫因子。例如，为源自人类 RSVF、SH 或 G 糖蛋白的糖蛋白外部功能区编码的异源基因组片段，可结合于一为对应的牛类 F、SH 或 G 糖蛋白细胞质和内部功能区编码的多核苷酸序列(即基因组片段)，从而形成移位基因 RSV 基因组或反基因组。

在其它具体实施例中，可用于疫苗配方的移位基因 RSV，可方便

地修饰为可容纳循环(流通)病毒中的漂移抗原。通常,修饰将在 G 和(或)F 蛋白质内进行。一源自 RSV 菌株为其特殊免疫功能区编码的完全的 G 或 F 基因、或基因组片段,通过在不同 RSV 菌株或亚群的克隆受体内置换一个对应的区域,或通过加入一个或数个该基因的拷贝,而被整合到移位基因 RSV 基因组或反基因组 cDNA 内,使得几种抗原的形式均得到代表。然后,从该修饰后 RSV 克隆合成的子代病毒可用于各种接种方案中,以抵抗出现的 RSV 菌株。

本发明各种各样的其它具体实施例仅涉及将一供体基因的一个部分加成或替换至受体移位基因 RSV 基因组或反基因组。通常,非编码核苷酸,例如顺向作用的调节单元和基因间序列不需要随着供体基因编码区域转移。因此,一特殊基因的一个编码序列(例如,一完全的或部分的阅读框 ORF)可被加入或替换至完全的或部分的背景基因组或反基因组,在一对应的基因或与供体序列不同的基因的异源启动子的控制下(例如,存在于背景基因组或反基因组内的启动子)。各种各样其它的基因组片段提供了有用的供体多核苷酸,用于包含在一嵌合体基因组或反基因组内,以表达具有新和有用的性质的移位基因 RSV。例如,异源基因组片段可为选自人类或牛类 RSV 的蛋白质的全部或部分的糖蛋白细胞质尾部区域、横跨膜功能区或外部功能区、一个抗原决定基位点或区域,一结合位点或含有一结合位点的区域、一活性位点或包含一活性位点的区域等编码。这些以及其它的基因组片段可以加成至一完全的背景基因组或反基因组,或在其中取代其对应物基因组片段,以产生新颖的嵌合 RSV 重组体。某些重组体将表达一嵌合蛋白质,例如,含有一个与另一 RSV 的外部功能区融合的 RSV 的细胞质尾部和(或)横跨膜功能区的蛋白质。

用于本发明的移位基因 RSV 内的基因和基因组片段,缠绕着一群不同尺寸和序列的可供选择的多核苷酸。在这一方面,有用的基因组片段的范围从约 15-35 核苷酸(在为蛋白质的小功能区域,如抗原决定基位点,编码的基因组片段情况下)至约 50, 75, 100, 200-500,

500-1,500 或更多的核苷酸(在为较大的功能区或蛋白质区域编码的基因组片段情况下)。对应物基因和基因组片段的选择, 取决于基因内主题对应物之间序列的同一性或线性相关性。在这方面, 一选定的人类或牛类的多核苷酸“参照序列”被定义为, 存在于供体或受体基因组或反基因组内的一个序列或其一部分。该参照序列作为一定义的序列, 提供了一个与对应物异源序列进行序列比较的理论基础。例如, 该参照序列可以是一确定的 cDNA 片段或基因, 或一完全的 cDNA 或基因序列。通常, 用于定义对应物基因和基因组片段的参照序列其长度至少为 20 个核苷酸, 最经常见的是至少 25 个核苷酸, 经常是至少 50 个核苷酸。由于两个聚核苷酸可各自(1)包含一个在该两个多核苷酸之间比较时是相似的序列(即一完全的多核苷酸序列的一部分), (2)也可包括在该两个多核苷酸之间比较时是分歧的序列, 该两个多核苷酸序列的比较往往是通过一个“比较窗口”来进行, 以识别和比较序列相似的局部区域。“比较窗口”, 正如此处所说的, 指的是一个为了使该两个序列能最佳地对准的、至少包括 20 个相邻核苷酸的位点的概念性片段, 其中, 一个多核苷酸序列可与一个至少包括 20 个相邻核苷酸的参照序列进行比较, 而且该多核苷酸序列在比较窗口内部分与参照序列相比较(其不包括加成或删除), 可包括 20%或以下的加成或删除(即间隙)。比较窗口的序列最佳对准可运用局部拓扑算法(Smith & Waterman, 高等应用数学 2:482, 1981)、拓扑排列算法(Needleman & Wunsch, 分子生物学杂志 48:443, 1970)、搜寻相似性法(Pearson & Lipman, 国家科学院学报, 美国 85:2444, 1988)(以上各项均作为参考文献列入此处), 通过计算机化实施进行(威斯康辛遗传学软件发行 7.0 版中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, 遗传学计算机小组, 575 Science Dr., Madison, WI, 作为参考文献列入此处), 或通过观察; 然后选择各种方法所产生的最佳对准状态(即在比较窗口中达到序列相似性的最高百分比)。术语“序列同一性”的意思是两个多核苷酸序列在比较窗口内是相同的(即在核苷酸对核苷酸的基础上)。术语“序列同一性百分比”是通过在比较窗口内比较最佳对准状态的两个序列, 来确定两个序列中相同核酸单元所在位置(例如, A、

T、C、G、U，或 I)的位号并得出相匹配位点的数量，再用比较窗口内位点的总数(即窗口尺寸)来除该匹配位点的数量，再将结果乘以 100 就得出序列同一性百分比。

5 对应的残基位置，例如，两个不同的人类 RSV 之间或在牛类和人类 RSV 之间，可能是分歧的、相同的或相差若干个保守的氨基酸取代基。保守的氨基酸取代基指的是具有相似侧链的残基的互换性。例如，一组具有脂肪族侧链的保守氨基酸是氨基乙酸，氨基丙酸、缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸；一组具有脂肪族一羟基侧链的氨基酸是丝氨酸和苏氨酸；一组侧链中含有氨基化合物的氨基酸是氨羧丙氨酸和谷氨酰胺；一组具有芳香族侧链的是苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；一组具有碱性侧链的是赖氨酸、精氨酸和组氨酸；以及一组具有含硫侧链的氨基酸是半胱氨酸和蛋氨酸。理想的保守氨基酸取代基是：缬氨酸—亮氨酸—异亮氨酸、苯基丙氨酸—酪氨酸、赖氨酸—精氨酸、丙氨酸—缬氨酸，以及氨羧丙氨酸—谷氨酰胺。20 个常规氨基酸的立体异构体(例如，D-氨基酸)，非常规的氨基酸例如 α,α -双取代氨基酸、N 烷基氨基酸、乳酸，以及其它非常规的氨基酸也可以是本发明的多肽的合适的组分。非常规的氨基酸例子包括：4-羟基脯氨酸、 γ -carboxy 谷氨酸盐、N,N,N-三甲基赖氨酸、N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 ω -N-甲基精氨酸，以及其它氨基和亚氨基酸(例如 4-羟基脯氨酸)。而且，氨基酸可以通过糖基化、磷酸化过程等被修饰。

25 本发明使用以 cDNA 为基础的方法构建各种各样的移位基因重组 RSV 病毒和亚病毒粒子。这些重组 RSV 具备改善的减毒性和免疫性以用于作为疫苗试剂。被设计入移位基因 RSV 的理想的表型突变包括，但不限于，培养基或选定宿主环境的减毒性、对于减毒表型的抗逆转性、改进的免疫特征(例如通过免疫反应的增强或减弱所确定的)，选定病毒产品转录和(或)翻译的正向调节或负向调节等。在本发明理想的一些方面，合成了移位基因减毒 RSV。通过在其中引入一个或数

个决定减毒表型的减毒突变体，该嵌合体基因组或反基因组得以进一步修饰。这些突变体可按照如上所列参考文献所述的合理设计的诱变战略，再进行合成及测试减毒效果。作为选择方案，减毒突变体可从生物衍生的突变 RSV 中识别出，然后被整合进本发明的移位基因 RSV。

以生物学方式衍生、用于引入移位基因 RSV 疫苗菌株内的减毒性突变体，可自然地产生，或可通过著名的诱变步骤将其引入野生型 RSV 菌株。例如，未完全减毒的亲本 RSV 菌株，可通过病毒在细胞培养基内生长期间的化学诱变来合成。该细胞培养基内加入了化学诱变剂，通过选择在非最适宜条件下所培育的病毒，以便引入生长受限制的突变体；或通过选择在细胞培养基内产生小噬菌斑(sp)的诱变病毒，正如此处以及于 1999 年 7 月 13 日公布的 USSN 美国专利 No. 5,922,326(作为参考文献列入此处)中所述的。

所谓“生物衍生的 RSV”，意思是非通过重组手段合成的任一 RSV。因此，生物衍生的 RSV 包括所有亚群和菌株的自然产生的 RSV，包括，例如，自然产生的含有野生型基因组序列的 RSV，和含有源自参照野生型 RSV 序列的基因组变异的 RSV，例如，含有指定减毒表型的突变体的 RSV。同样，生物衍生的 RSV 包括，通过人工诱变和选择步骤从亲本 RSV 菌株中获得的 RSV 突变体。

为了从生物衍生的菌株来合成令人满意的减毒 RSV，最好是将突变体引入一未完全地或部分地减毒的亲本菌株，例如 RSV 亚群 A 的 A2 菌株中著名的 ts-1、s-1NG 或 cp RSV 突变体，或其衍生物或亚克隆。使用这些和其它一些部分性减毒的菌株，可产生另一些突变体，它(们)能进一步使菌株减毒，例如，在哺乳动物宿主体内达到限制性复制的理想水平，同时仍保持充分的免疫性，以向疫苗接种者提供保护。

合成亚群 A 或 B 病毒的部分性减毒突变体可采用著名的在可接受的细胞基体内以生物方式克隆野生型病毒、以及开发其冷培育突变体的方法；使病毒发生化学诱变以产生 ts-突变体；或选择小型噬斑或类似的表型突变体(参阅，例如，Murphy 等，国际出版物 WO 93/21310，
5 作为参考文献列入此处)。对于亚群 B 病毒，一种典型的部分性减毒的亲本病毒是 cp 23，它是亚群 B 的 B1 菌株的突变体。

各种已知的选择技术可结合起来使用，以从非减毒亚群 A 或 B 菌株来合成部分性减毒的突变体，正如此处所述，它们对于进一步的
10 衍生是很有用的。再者，决定减毒表型的突变体可单独地或以结合的方式引入未完全减毒的亚群 A 或 B 病毒，以合成具有多突异性、限定减毒的突变体的疫苗病毒，从而赋予疫苗接种者一理想水平的减毒性和免疫性。

15 如上所述，一生物衍生的充分减毒的 RSV 突变体，可通过几种著名的方法来合成。其中一种步骤涉及让一种部分性减毒病毒在细胞培养基里逐步降低的减毒温度下培育。例如，野生型病毒通常是在约 34 - 37°C 温度下培养，而该部分性减毒突变体是在非理想的温度下，
20 例如 20 - 26°C，在细胞培养基(例如主要的牛肾细胞)内产生的。如此，该 cp 突变体或其它部分性减毒菌株，例如，ts-1 或 sp RSV，适应了
在 MRC-5 或 Vero 细胞内低温下的高效生长，该温度可低达约 20 - 24°C，最好是 20-22°C。这种在冷培育期间选择突变 RSV 的方式，与部分性减毒的亲本相比，大大地降低了衍生的菌株内任何残余的毒性。

25 作为选择方案，可将特殊的突变体通过使一部分性减毒亲本发生化学诱变的方式，引入生物衍生的 RSV，例如，引入 ts 突变体、或若其已经是 ts 病毒，则引入其它的 ts 减毒体，该 ts 减毒体应能充分地提供增高的减毒衍生物的 ts-表型的减毒性和(或)稳定性的。将 ts 突
30 变体引入 RSV 的手段，病毒在诱变剂存在条件下的复制，例如浓度约

为 10^{-3} 至 10^{-5} M, 最好是约 10^{-4} M 的 5-氟尿苷或 5-氟尿嘧啶诱变剂; 还包括使病毒暴露于浓度约为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的亚硝基胍, 例如按照 (Gharpure 等, 病毒学杂志, 3:414-421, 1969 年和 Richardson 等, 医学病毒学杂志 3:91-100, 1978) 中所述的一般做法; 或以遗传方式引入特殊的 ts-突变体。其它的化学诱变剂也可以使用。减毒性可来源于几乎所有 RSV 基因的 ts 突变体, 尽管经发现符合此目的特别合适的目标是聚合酶(L)基因。

在用于本发明的典型减毒 RSV 中复制的温度敏感性程度, 是通过比较其在一宽容温度条件下与几个受限制的温度条件下所进行的复制情况而确定的。与其在宽容温度下的复制比较, 病毒复制减少一百倍或以上时的最低温度被称为停止温度。在实验动物和人员中, RSV 的复制和毒性均与突变体的停止温度相关。其停止温度为 39°C 的突变体的复制受到了中度的限制, 而停止温度为 38°C 的突变体的复制情况则较差, 且疾病症状主要是限于上呼吸道内。停止温度为 35°C 到 37°C 的病毒通常在黑猩猩体内将得到充分的减毒, 而在人体内将得到实质性的减毒。因此, 本发明生物衍生的 ts 减毒突变体和移位 RSV, 将具有范围为约 35°C 到 39°C 、最好是 35°C 到 38°C 的停止温度。将 ts-突变体加入部分性减毒菌株, 产生了在本发明的疫苗成分内有用的多突异性减毒病毒。

业已开发了作为鼻内接种候选疫苗的许多减毒 RSV 菌株, 利用多次化学诱变, 将多个突变体引入在冷培育期间已减毒的病毒(例如 Connors 等, 病毒学 208: 478-484, 1995 年; Crowe 等, 疫苗 12: 691-699, 1994 年; 及 Crowe 等, 疫苗 12: 783-790, 1994 年, 作为参考文献列入此处)。对于啮齿目动物、黑猩猩、成人和婴儿的评估均表明, 某些这些候选疫苗菌株在遗传学方面是相对地稳定的, 具有高度的免疫性, 并可令人满意地减毒。对于这些减毒病毒中某些病毒的核苷酸序列分析表明, 减毒增加的每一级程度均是与特定的核苷酸和氨基酸取代相关的。上面所引用的参考文献中还披露了如何通过将突变

体单独地或以各种组合方式引入感染性 RSV 克隆基因组或反基因组，来定期地区分沉默的偶然发生的突变与那些影响表型区别的突变。与对亲本和衍生物病毒表型特征的评估相结合，此过程鉴定了对于各种理想的特征，如减毒性、温度敏感性、冷适应性、噬菌斑大小、宿主范围限制等起作用的突变体。

如此鉴定的突变体被编入“菜单”，然后根据需要单独地或以组合方式引入，以便将移位基因 RSV 疫苗病毒的减毒程度、免疫性、对于减毒表型逆转的遗传抵抗力等，校准至一适当的理想水平。最好，本发明的嵌合 RSV 通过整合上述菜单中至少一个、最好两个或两个以上减毒突变体的方式来减毒，该突变体可被定义为一系列生物衍生的突变 RSV 菌株中的一组已知的突变体。此处所述理想的突变 RSV 菌株系列是冷法培育的(cp)和(或)温度敏感性(ts)突变体，例如由 RSV 突变体组成的一系列，其命名为：cpts RSV 248 (ATCC VR 2450), cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454), cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453), cpts RSV 530 (ATCC VR 2452), cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451), cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455), RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 2542), and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579) (每种均按照布达佩斯条约的决定储存在美国分类培养基收集机构(ATCC)，其地址为 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A., 并被授予上述识别登记号)。

这一系列生物衍生的典型突变体，提供了一份很大的减毒突变体“菜单”，每一种减毒突变体均可与该组中任何其它突变体相结合，用以校准作为疫苗使用的人类-牛类嵌合重组 RSV 的减毒水平。其它的突变体可按其名称从具有非-ts 和非-cp 减毒突变体的 RSV 衍生，例如，小噬菌斑(sp)、冷适应性(ca)或寄主范围受限(hr)突变体菌株。减毒突变体，可以从一个供体或受体 RSV 基因的编码部分选择，或从非编码区域例如顺式调节序列中选择。例如，减毒突变体可在基因起始序列内包括单一的或多个基本的突变，如同在 M2 基因的起始序列

中、核苷酸 7605 位一个单个或数个基本取代基(在重组序列中的核苷酸 7606 位置)的例子所显示的。

5 被设计且选择用于疫苗的移位基因 RSV 往往具有至少两个、有时三个或更多的减毒突变体, 以达到一个令人满意的减毒水平而用于广泛的临床应用。在一具体实施例中, 有至少一个减毒突变体出现在 RSV 聚合酶基因(供体或受体基因)内, 且涉及了一核苷酸取代, 其决定了发生在聚合酶蛋白质中氨基酸的变异, 从而确定了温度敏感性(ts-)表型。在这方面, 典型的移位基因 RSV 在大聚合酶基因 L 中整合了一个或数个核苷酸取代基, 造成了 Asn43、Phe521、Gln831、Met1169, 10 或 Tyr1321 等氨基酸的变化, 正如 Leu 取代 Phe521、Leu 取代 Gln831、Val 取代 Met1169, 以及 Asn 取代 Tyr1321 等例子中所显示的。作为选择或附加的方案, 本发明的移位基因 RSV 可在一不同的 RSV 基因内整合一 ts 突变体, 如在 M2 基因内。最好, 有两个或更多的核苷酸变化被整合在一决定减毒突变的密码子内, 如在决定 ts 突变的密码子 15 内, 从而减少减毒表型逆转的可能性。

按照本发明的方法, 移位基因 RSV 可很容易地进行构建和定性, 其整合了至少一个和最多为一整套的、存在于一系列生物衍生的突变 20 RSV 菌株内的减毒突变体。因此, 突变体可以选自一系列突变体的任一组合进行组装, 例如: cpts RSV 248 (ATCC VR 2450)、cpts RSV 248/404 (ATCC VR 2454)、cpts RSV 248/955 (ATCC VR 2453)、cpts RSV 530 (ATCC VR 2452)、cpts RSV 530/1009 (ATCC VR 2451)、cpts RSV 530/1030 (ATCC VR 2455)、RSV B-1 cp52/2B5 (ATCC VR 25 2542)、and RSV B-1 cp-23 (ATCC VR 2579)。以这种方式, 重组候选疫苗的减毒性可精确地被校准, 以用于一类或数类的患者, 包括血清反应呈阴性的婴儿。

30 在一些更详细的具体实施例中, 用于疫苗用途的移位基因 RSV, 整合了至少一个、最多可达一整套的减毒突变体, 其在 Asn43、Phe521、

Gln831、Met1169 或 Tyr1321 在 RSV 聚合酶基因 L 内，确定了一个温度敏感和(或)减毒的氨基酸取代；或在基因 M2 的起始基因序列内确定了一个温度敏感性核苷酸取代。作为选择或附加的方案，本发明的移位基因 RSV 可整合至少一个、最多可达一整套的突变体源自冷法培育的减毒 RSV，例如一个或数个突变体，其决定了在 RSV N 基因的 Val267、在 RSV F 基因 Glu218 或 Thr523、Cys319 或在 RSV 聚合酶基因 L 的 His1690 等位点的氨基酸取代。

在其它一些详细的具体实施例中，本发明的移位基因 RSV 被进一步修饰，以整合减毒突变体，其选自：(i) 一突变体系列，其决定了各温度敏感性氨基酸的取代：在 RSV 聚合酶基因 L 内的 Gln831 取代 Leu，以及 Tyr1321 取代 Asn；(ii) 在基因 M2 序列的基因起始内，一个温度敏感性核苷酸替换；(iii) 一个从冷法培育的 RSV 接受的减毒一突变体系列突变体，其决定了在 RSVN 基因内 Val267 Ile、和 RSV 聚合酶基因 L 内的 Cys319 Tyr 和 His1690 Tyr 等氨基酸的取代；或(iv) 一个或数个 RSV SH、NS1、NS2、G 和 M2-2 基因表达的删除或消除。最好的是，这些和其它一些移位基因 RSV 的例子，整合了至少两个从生物衍生的突变 RSV 中接受的减毒突变体，其可源自于相同的或不同的生物衍生的突变 RSV 菌株。同样最好的是，这些典型的突变体有一个或数个减毒突变体，被多个核苷酸突变所稳定；该突变发生在指定突变的密码子中。

按照前面的叙述，从 cDNA 合成感染性 RSV 的能力，使得能够在移位基因 RSV 内引入专门设计的变化。尤其是，感染性重组 RSV 被用于鉴定特殊的生物衍生的减毒 RSV 菌株，例如决定了 ts、ca、att 以及其它表型的突变体。如此，理想的突变被鉴定并被引入了移位基因重组 RSV 疫苗菌株。从 cDNA 合成病毒的能力，使得这些突变体能以单独地或以各种选择性的组合方式被常规地整合进全长度的 cDNA 克隆；然后，又使得含有整合突变体的重组病毒被挽救的表型很容易地被确定。

通过鉴别并将特殊的、与理想表型有关的生物衍生突变(例如一 cp 或 ts 表型)整合进感染性嵌合 RSV 克隆的方式, 本发明在所识别的突变体位置或其近处提供了其它针对特定位置的修饰。但是大多数在生物衍生的 RSV 中合成的减毒突变是单一的核苷酸变化, 其它“位点针对性”突变也能依靠重组技术被整合进生物衍生的或重组 RSV。如此处所使用的, 位点针对性突变包括 1 至 3 个、最多可达约 5-15 或更多的改变的(例如, 从一野生型 RSV 系列、从一选定的突变 RSV 菌株的系列, 或从一受到诱变的亲本重组 RSV 克隆变来的)核苷酸的插入、替换、删除或重排。这种位点针对性的突变可被整合在一个选定的生物衍生的突变的区域内。作为选择方案, 突变可在一系列其它情况下被引入 RSV 克隆之内, 例如在一顺向作用的调节序列处或其附近、或为蛋白质活性位点、束缚部位、免疫性抗原免疫因子等编码的核苷酸序列。位点针对性 RSV 突变体通常保留了理想的减毒表型, 但也可显示出改变的与减毒性无关的表型特征, 例如, 增强的或拓宽的免疫性, 和(或)改善的生长率。理想的、位点针对性突变体的进一步例子包括一重组 RSV, 其被设计成将附加的稳定的核苷酸突变体整合在一决定减毒突变的密码子内。在可能的场合, 两个或更多的核苷酸取代基被引入密码子, 该密码子在亲本突变体或重组 RSV 克隆内决定了减毒氨基酸突变, 结果产生了具有对减毒表型逆转的遗传学抵抗力的生物衍生的或重组的 RSV。在其它一些具体实施例中, 位点针对性的核苷酸的替换、加成、删除或重排被引入上游(N-终端方向)或下游(C-终端方向), 例如, 1 至 3、5、10, 最多可达 15 个核苷酸或更多的 5'或 3'尾端, 相对一目标核苷酸部位, 例如, 构建或消除一现有的顺向作用的调节单元。

除了单一的和多点突变以及位点针对性突变之外, 对于此处披露的移位基因 RSV 发生的变化包括整体基因或基因组片段的删除、插入, 替换或重排。这些突变体可在供体或受体基因组或反基因组内, 改变少量的单元(例如, 15-30 个单元、35-50 个单元或以上)、大批的

核苷酸(例如, 50-100、100-300、300-500、500-1,000 个单元), 或几乎整个基因(例如, 1,000-1,500 核苷酸、1,500-2,500 核苷酸、2,500-5,000 核苷酸、5,000-6,5000 核苷酸或更多), 取决于变化的本质(即, 可改变小量的单元以插入或消除一免疫性抗原决定基, 或改变一小基因组片段; 而当基因或大基因组片段被加入、被替换、被删除或被重排时, 就涉及到大批的单元。

在本发明的其它一些方面, 该从 cDNA 表达的基因组或反基因组合成的感染性移位基因 RSV, 可以是任何 RSV 或 RSV 似的菌株, 例如, 人类、牛类、鼠类等, 或任何肺炎病毒, 例如, 老鼠肺炎病毒、鸟类肺炎病毒(先前称为火鸡鼻气管炎病毒)。为了引起一保护性免疫反应, 该 RSV 菌株可以是一种对于免疫对象是内生性的 RSV 菌株, 例如被用于人类免疫的人类 RSV。然而, 内生性 RSV 的基因组或反基因组可以被修饰, 以表达来自不同来源的 RSV 基因或基因组片段的组合, 例如, 源自不同的 RSV 类、亚群, 或菌株的基因或基因组片段的组合, 或源自 RSV 和其他呼吸病原体, 如 PIV。

将前面所定义的突变引入感染性移位基因 RSV 克隆, 可以通过各种著名的方法来完成。所谓 DNA “感染性克隆” 意思是 cDNA 或其人工合成的或非人工合成的产品, 它可被转录到有能力作为感染性病毒或亚病毒粒子合成基因模板的基因组或反基因组 RNA 内。因此, 所定义的突变体可通过常规技术(例如, 位点定向的诱变体)被引入一 cDNA 基因组或反基因组的拷贝。如此处所述的使用反基因组或基因组 cDNA 子片段来装配一完全的反基因组或基因 cDNA 的方式, 具有其优越性, 因为每个区域可以被单独地操纵(较小的 cDNA 比大的 cDNA 容易操纵), 然后很容易地被装配进一完全的 cDNA。因此, 该完全的反基因组或基因组 cDNA, 或其任一子片段, 均可被用为指向低聚核苷酸的诱变体的模板。这可通过使用一单线噬菌体质粒形式的中间体来实现, 例如使用 Bio-Rad Laboratories (Richmond, 加利福尼亚州)出品的 Muta-gene® 试剂, 或采用一个直接使用双线质粒作为模板的方

法, 例如 Stratagene 公司(La jolla, 加利福尼亚州)出品的 Chameleon 诱变成套试剂, 或通过利用低聚核苷酸引子或含有所需突变体的模板的聚合酶连锁反应。然后, 一突变的子片段可装配进该完全的反基因组或基因 cDNA。已知的一系列其它诱变技术可用于合成 RSV 反基因组或基因 DNA 内所需的突变体。突变体的范围可从一单一核苷酸的变化直至含有一个或数个基因或基因组区域的一大段 cDNA 的取代。

因此, 在一作为例证的具体实施例中, 通过使用可从 Bio-Rad 购到的 Muta-gene 噬菌体质粒试管诱变试剂, 引入了突变体。简言之, 为一段 RSV 基因或反基因组编码的 cDNA 被克隆进质粒 pTZ18U, 并被用于使 CJ236 细胞(Life Technologies 出品)的转换。噬菌体质粒是依照制造商的推荐而制备的。低聚核苷酸是设计来用于诱变, 通过

在所希望的基因组或反基因组部位引入一已改变的核苷酸。该质粒包含遗传性质已改变的基因组或反基因组片段, 然后被放大, 然后突变的片断再被重新引入全长度的基因组或反基因组克隆。

本发明还提供了一些方法, 用于从一个或数个分离的多核苷酸, 例如一个或数个 cDNA, 来合成感染性移位基因 RSV。按照本发明, 构建了为 RSV 基因组或反基因组编码的 cDNA, 用于细胞内或试管内的与必需病毒蛋白质的共同表达, 以形成感染性 RSV。所谓“RSV 反基因组”的意思是一分离出的正义多核苷酸分子, 用来作为合成子代 RSV 基因的模板。最理想的是, 构建一作为 RSV 基因正片版本的 cDNA, 其对应于复制的中间体 RNA 或反基因组, 以便最大限度地减小补体序列的正义转录产物的杂交可能性; 该补体序列是为合成可转录和可复制的病毒粒子所必需的蛋白质, 即 N、P、L 及 M2(ORF1) 等蛋白质编码的系列。在 RSV 小基因组系统中, 基因和反基因组在抢救中是同等活跃的, 无论是否与 RSV 或质粒互补; 该事实表明, 可以使用基因组或反基因组, 因此在方法上或其它方面可有选择余地。

一天然的 RSV 基因通常包括负义多核苷酸分子, 它通过互补的

病毒 mRNAs, 可为十一种病毒蛋白质编码, 即, 非结构性 NS1 和 NS2、N、P、基质(M)、小的疏水性(SH)、糖蛋白(G)、融合(F)、M2(ORF1)、M2(ORF2)、以及 L。这方面在文献中有大量的报道(Mink 等, 病毒学 185:615-624, 1991 年; Stec 等, 病毒学 183:273-287, 1991 年; 及 Connors 等, 病毒学 208:478-484, 1995 年; Collins 等, 国家科学院学报, 美国 93:81-85, 1996, 每项均作为参考文献列入此处)。出于本发明的目的, 本发明的重组 RSV 的基因组或反基因组, 只需要包含那些对于病毒或亚病毒粒子的编码(因此而具有感染性)是必需的基因或其一部分。再者, 基因或其一部分可从一个以上的多核苷酸分子获得, 即, 一基因可通过源自一单独核苷酸分子的互补作用或类似方式而获得, 或可直接地从基因组或反基因组 cDNA 而得到表达。

重组 RSV 指一个直接或间接地衍生于一个重组表达系统、或从由此而产生的病毒或亚病毒颗粒增殖而得到的 RSV 或类似 RSV 的病毒或亚病毒颗粒。重组表达系统将使用一种由利用可行技术连接的一个转录单位组成的重组表达载体。此转录单位包括至少一个或数个对 RSV 基因有调节作用的遗传因子, 如启动子、一个可转录为 RSV RNA 的结构或编码序列, 以及合适的转录起始和终止序列。

为了从 cDNA 表达的基因组或反基因组得到有感染能力的 RSV, 要将基因组或反基因组与下面两种功能所必需的某些 RSV 蛋白共同表达。这两种功能是: (1) 产生一个能进行 RNA 复制的病毒粒子; (2) 使后代病毒粒子同时具有 RNA 复制和转录能力。基因组病毒粒子的转录将提供其它 RSV 蛋白, 并起始增殖感染。另一种办法是通过共同表达来提供增殖感染所需要的其它 RSV 蛋白。

通过 RSV mRNA 或基因组 RNA 反转录拷贝的多聚酶链反应 (PCR; 具体描述见本文件参考文献中包括的美国专利号 4,683,195 和 4,683,202、以及《PCR 操作规程: 方法与应用指南》(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, San

Diego, 1990) 等文献) 可以克隆总体上含有全部反基因组序列的 cDNA 片段, 然后通过组装克隆的 cDNA 片段, 即可构建一个用于本发明的 RSV 反基因组。例如, 将包含反基因组左手端、从一个适用的启动子 (如 T7 RNA 聚合酶启动子) 直到与 SH 基因互补的前导区的 cDNA 片段组装到一个适用的表达载体 (如 pBR322) 或各种可用的科斯质粒、噬菌体、或 DNA 病毒载体中。对载体可以通过诱变和 (或) 插入含有为了便利组装而设计的独特限制酶切位点、合成的多连接片段而进行修饰。例如, 本文献描述的一个质粒载体即是通过用一个含有方便的限制酶切位点的合成 DNA 片段取代 pBR322 中的 PstI-EcoRI 片段而得到的。用 pBR322 作为载体稳定了 RSV 序列中的第 3716-3732 号核苷酸, 否则这段顺序中会发生核苷酸删除或插入; 质粒增殖在 DH10B 菌株中进行, 从而避免否则将在 4499 号核苷酸附近发生、操作造成的复制和插入。为了制备方便, G、F 和 M2 基因可以象 L 和拖尾序列那样组装到另外一个载体中。反基因组质粒的右手端 (即 L 和拖尾序列) 可以包括其它所需的序列, 如一个侧翼核糖核酸酶和前后衔接的 T7 转录终止子。核糖核酸酶可以是锤子头类型的 (如 Grosfeld et al., *J. Virol.* 69:5677-5686, 1995 所述), 此种类型可产生一个包括单个非病毒核苷酸的 3' 端; 也可以是任何其它适用的核糖核酸酶, 如产生不包括非 RSV 核苷酸 3' 端的丁型肝炎病毒核糖核酸酶 (Perrotta et al., *Nature* 350:434-436, 1991)。将一个中间片段 (如 G 到 M2 的一段) 插入前导区-SH 基因质粒的适当限制酶切位点, 再将 L-拖尾序列-核糖核酸酶-终止子片段插入此中间片段, 即产生一个完整的反基因组。在本文献所述的一个说明性的例子中, 前导端被构建成紧邻 T7 RNA 多聚酶的启动子, 后者包括三个被转录的 G 残基, 以求最佳活性; 通过转录这三个非病毒的 G 残基进入反基因组的 5' 端。这三个非病毒的 G 残基可被删除, 产生一个不包括非病毒核苷酸的 5' 端。为了产生一个几近正确的 3' 端, 拖尾端被构建成与一个锤子头型核糖核酸酶相邻, 后者在切断后向被编码 RNA 的 3' 端提供一个单个的 3'-磷酸化的 U 残基。

在本发明的某些实例中，编码那些产生可转录、可复制 RSV 病毒粒子所必需的蛋白的互补序列来自一个或多个辅助病毒。这些辅助病毒可以是野生型，也可以是突变型，最好在表型上与 RSV cDNA 编码的病毒有区别。例如，理想的情况是能提供与辅助病毒有免疫学反应、但与 RSV cDNA 编码的病毒没有免疫学反应的单克隆抗体。这些抗体可以是中和抗体。在某些实例中，可以用抗体来中和辅助病毒本底，以便利重组病毒的识别和回收，或用亲和层析法分离辅助病毒与重组病毒。可以向 RSV cDNA 中引入突变，使重组 RSV 对这些抗体的中和作用不起反应或具有抗性。

在基因移位的 RSV 基因组或反基因组中可以进行多种核苷酸插入和删除以产生适当减毒的克隆。野生型人 RSV 基因组的核苷酸链长度（15,222 个核苷酸）是 6 的倍数，而且副粘病毒属和麻疹病毒属的病毒一般都符合一个“六的倍数法则”，即基因组（或小基因组）只有在其核苷酸链长度为 6 的倍数时才能高效率地复制（据认为是核苷酸残基相对于包壳 NP 蛋白的精确空间定位所需的条件）。RSV 基因组的长度如果增加一个单个残基对复制的效率没有影响，而且下面几种不同的小基因组突变的序列分析显示，长度区别得以保持而没有代偿变化发生。所以，RSV 没有基因组长度必须为 6 的倍数的严格要求，在 RSV 基因组或反基因组中插入或删除核苷酸不会破坏本发明中重组 RSV 的复制。

构建编码一个基因移位的 RSV 基因组或反基因组的 cDNA 的其它方法，还有采用改进 PCR 条件的反转录 PCR（如本文件参考文献中包括的下列文献所述：Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994; Samal et al., J. Virol. 70:5075-5082, 1996）将亚单位 cDNA 组份的数目减少至一或两个。在其它实例中可以使用不同的启动子（如 T3、SP6）或不同的核糖核酸酶（如丁型肝炎病毒核糖核酸酶）。也可以使用不同的 DNA 载体进行增殖，以适合比较大的基因组或反基因组。

RNA 复制所必需的 N、P 和 L 蛋白需要有一个 RNA 多聚酶延伸因子，如 M2(ORF1)蛋白，才能进行前向转录。所以，M2(ORF1)或一个大体等同的负链 RNA 病毒转录延伸因子既为产生有感染活性的 RSV 所必需，也是增殖感染过程中有功能的病毒粒子的一个必要组份。

M2(ORF1)蛋白的必要性与其转录延伸因子的作用是一致的。负链 RNA 病毒的 RNA 多聚酶延伸因子蛋白表达的必要性是本发明的一个特点。M2(ORF1) 可以通过整个 M2 基因的表达来提供，或者是用嵌合基因组或反基因组，或者是与之共同表达，虽然此时第二个 ORF2 可能也会被表达并对 RNA 复制具有抑制作用。所以，为了用完整的 M2 基因产生有感染活性的病毒，两个 ORF 的活性必须彼此平衡，使 M2(ORF1) 能充分表达达到既能提供转录延伸活性、又不致产生过多的 M2(ORF2) 从而抑制 RNA 复制的程度。替代性的方法是用切除了 ORF2 或编码失活的 ORF2 的 cDNA 来提供 ORF1 蛋白。病毒生产的效率还可以通过共同表达其它一些病毒蛋白基因而提高，如编码外壳蛋白（即 SH、M、G、F 蛋白）的基因。

与这些有关 M2(ORF2)的结果一致的是本发明的另一个实例。此实例包括一个整合了 M2(ORF2)突变的基因移位 RSV（本文参考文献中包括的 Collins and Wertz, *J. Virol.* 54:65-71, 1985; Collins et al., *J. Gen. Virol.* 71:3015-3020, 1990, Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:81-85, 1996），以产生新型的候选 RSV 疫苗（见本文参考文献中包括的、Collins 等人于 1999 年 7 月 9 日呈报的美国临时专利申请号 60/143,097）。在某些情况下，M2 ORF2 的表达可由于对重组 RSV 基因组或反基因组进行修饰以便在 M2 ORF2 中整合一个移码突变或一个终止密码子、产生一个“击昏的”病毒克隆而被降低或消除。一种替代性方法是全部或部分删除 M2 ORF2，使 M2-2 蛋白部分或完全失去功能、或彻底破坏其表达，从而产生一个 M2 ORF2 “缺失突变”的嵌合 RSV。另一种替代性方法是，M2-2 ORF 可在基因组或反基因组

内转位到与 M2-2 基因的自然顺序位置相比更靠近或远离启动子的位置，从而对 M2-2 ORF 表达进行正调节或负调节。在其它实例中，M2-2 ORF 作为一个有其基因起始和基因终止信号的独立基因而被整合到基因组或反基因组中。此修饰导致 M2-2 ORF 表达的正调节。

5

在本发明中，整合了 M2 ORF2 突变的基因移位 RSV 具有对于疫苗研制来说非常理想的表型特征。上述对重组基因组或反基因组的修饰，在其造成的病毒或亚病毒颗粒中确定了一种或多种理想的表型改变。由此产生的候选疫苗表现出一种或数种以下特征：（1）mRNA
10 转录发生了改变；（2）病毒蛋白表达水平发生了改变；（3）基因组或反基因组 RNA 复制发生了改变；（4）病毒生长特征发生了改变；
（5）噬菌斑大小发生了改变；（6）细胞病原性发生了改变。

在整合了一个 M2 ORF 2 缺失突变或击昏突变的 RSV 重组子实例中，理想的表型改变包括与相应的野生型或突变亲本 RSV 株相比，
15 病毒生长发生衰减。具体而言，由于 M2 ORF2 中的突变，病毒在培养细胞中的生长可以衰减大约 10 倍或更多倍。病毒生长的动力学也显示出有益于疫苗研制的变化。

20 本发明还包括与相应的野生型或突变亲本 RSV 株的 mRNA 合成动力学相比显示出延滞的病毒 mRNA 合成动力学的 M2-ORF 2 缺失和击昏突变 RSV。虽然转录动力学延滞，但与亲本病毒相比这些新型候选疫苗的累积 mRNA 合成却显示了增长。这些表型改变通常都伴随着一个特征，即被感染细胞中的病毒蛋白累积比被野生型或其它亲本
25 RSV 株感染的细胞中的蛋白累积增多。同时，M2 ORF2 基因移位的 RSV 与 M2 ORF2 功能正常的亲本 RSV 株相比病毒 RNA 复制减少，于是基因组和反基因组 RNA 的累积也减少。

30 本发明的一项优越之处，即是构建了嵌合的 M2 ORF2 缺失或“击昏的”RSV，用以在没有降低的、通常是增高的水平上表达病毒抗原，

同时又表现了一种减毒表型。由于 mRNA 转录和抗原表达水平没有降低或额外提高，致免疫潜力得以保持；同时，异源基因或基因片段的整合以及 M2-ORF 2 缺失及击昏突变引起的 RNA 复制和病毒生长的伴随降低，又导致了减毒表型。这一套新的表型特征对于疫苗的研制非常有用。在 M2 ORF2 缺失和“击昏的”基因移位 RSV 中观察到的其它有用的表型，包括大噬斑表型以及与相应的野生型或突变亲本 RSV 株相比改变的细胞病原性。

用转染、电穿孔、机械插入、转导或类似的方法，将分离出的编码一个基因移位的 RSV 基因组或反基因组的多核苷酸（如 cDNA）以及分别或顺式的、或从反基因组或基因组 cDNA 表达的 N、P、L、M2(ORF1)蛋白插入能够支持 RSV 增殖感染的细胞，如 HEp-2、FRhL-DBS2、MRC 和 Vero 细胞。分离的多核苷酸序列转染分子可用诸如磷酸钙中介的转染（Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973）、电穿孔（Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-845, 1982）、DEAE 右旋糖酐中介的转染（Ausubel et al., (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987）、阳离子脂中介的转染（Hawley-Nelson et al., *Focus* 15:73-79, 1993）或一种商品化转染剂，如 LipofectACE®（Life Technologies）（本文的参考文献中包括上述各种文献）引入培养细胞。

N、P、L、M2(ORF1)蛋白是由一个或多个 cDNA、表达载体及其多种组合编码，表达载体与编码基因组或反基因组的载体可以是同一个，也可是另外一个。如果需要也可以包括其它蛋白，由其自身的载体或一个编码 N、P、L、M2(ORF1)蛋白和（或）整个基因组或反基因组的载体编码。用转染的质粒表达基因组或反基因组及蛋白，可以通过诸如将每个 cDNA 置于一个 T7 RNA 聚合酶启动子的控制之下的方式达到，后者则是用一个 T7 RNA 聚合酶的表达系统，如表达 T7 RNA 聚合酶的牛痘病毒 MVA 株重组子（Wyatt et al., *Virology*, 210:202-205,

1995, 本文参考文献中包括) 进行感染、转染或转导而得到。病毒蛋白和(或) T7 RNA 多聚酶也可以通过哺乳类细胞转化或用预加工的 mRNA 或蛋白转染而得到。

- 5 其它方法有在一个转录-翻译合二为一的反应中体外(无细胞)合成反基因组或基因组, 然后转染至细胞中, 或者是体外合成反基因组或基因组 RNA, 然后转染到表达 RSV 蛋白的细胞中。

10 在本发明中, 选择候选疫苗病毒所依据的存活能力、减毒性和致免疫性标准是用一些众所周知的方法来确定的。对本发明的疫苗来说最理想的病毒必须保持存活能力、有稳定的减毒表型、在免疫接种的宿主中表现复制活动(但水平较低), 并且只要接种足够量的疫苗, 就能在之后野生型病毒感染时有效地产生免疫反应, 抵抗疾病。很显然, 迄今为止已知的 RS 病毒突变株都不符合上述标准。本发明的病毒则与基于已知减毒 RSV 报导结果的期望相反, 不但具有存活力、比
15 以往的突变株减毒性更好, 而且在体内比以往的突变株具有更强的遗传稳定性, 同时保持激发保护性免疫反应的能力, 在某些情况下还能扩展多个修饰所提供免疫保护, 例如, 诱导针对不同病毒株系或亚型的保护, 或在不同的免疫学基础上提供保护, 如分泌相对于血清免疫球蛋白、细胞免疫, 等等。在本发明之前, ts (译注: 温度敏感) 表
20 型在体内复制后的遗传稳定性对于 ts 病毒来说已经很普通 (Murphy et al., *Infect. Immun.* 37:235-242, 1982)。

25 要增殖一个用于疫苗或其它目的的基因移位的 RSV 病毒, 很多 RSV 能够生长的细胞系都可以使用。RSV 可在多种人类和哺乳类细胞内生长。适合增殖疫苗用减毒 RSV 的细胞系有 DBS-FRhl-2、MRC-5 和 Vero 细胞。要得到最高的病毒产率, 一般是用上皮细胞系, 如 Vero 细胞。一般是以 0.001 到 1.0 或更高的感染复数将用病毒接种细胞, 然后在允许病毒复制的条件如大约 30-37°C 下培养约 3-5 天或病毒达到
30 足够效价所必需的天数。从培养瓶中移出病毒上清液, 用常用的澄

清操作方法（如离心）将病毒与细胞组份分离，如有必要可以用一些本领域专家熟知的方法进一步纯化。

5 对经过减毒和本文件描述的其它修饰处理的基因移位的 RSV，可以用多种众所周知、普遍接受的体外和体内模型进行检验，以确认具有用于疫苗所需要的足够的减毒性、表型反转抗性和致免疫性。在体外分析中，对经过修饰的病毒（如多重减毒的、生物衍生的或重组的 RSV）检验其病毒复制的温度敏感性，即 t_s 表型，以及小噬斑表型。然后在 RSV 感染的动物模型中对经过修饰的病毒进行进一步检验。已被描述和总结的动物模型有多种（本文参考文献中包括的《呼吸道合胞病毒感染的动物模型》(Meignier et al., eds., Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infection, Merieux Foundation Publication, 1991)）。一个 RSV 感染的棉鼠模型见本文参考文献（美国专利号 4,800,078 和 Prince et al., Virus Res. 3:193-206, 1985），并被认为是
10 是对人类和非人灵长类中减毒性和有效性的预言。另外，一个使用黑猩猩的 RSV 感染灵长类模型预示了在人类中的减毒性和有效性，详见本文参考文献(Richardson et al., J. Med. Virol. 3:91-100, 1978; Wright et al., Infect. Immun. 37:397-400, 1982; Crowe et al., Vaccine 11:1395-1404, 1993)。

20

用于鉴定候选 RSV 疫苗的包括啮齿类和黑猩猩在内的 RSV 模型系统在设计上都被广泛接受，得到的数据也与 RSV 感染和减毒有很好的相关性。当候选 RSV 病毒在黑猩猩中显示生长不足时（如 B 亚型 RSV 病毒的情况），小鼠和棉鼠模型尤为有用。

25

根据上述说明和下面的例子，本发明还提供用于疫苗的分离的、有感染能力的、基因移位的 RSV 组成。作为疫苗一个组份的减毒嵌合病毒是分离的形式，通常是纯化的形式。“分离的”是指 RSV 处于有别于野生型病毒所处自然环境的其它环境，如被感染个体的鼻咽。更
30 广义地说，所谓“分离的”病毒，包括作为细胞培养或其它人工培养

介质组份、在此介质中能在控制条件下被增殖和定性的减毒病毒。例如，本发明中的减毒 RSV 可以从被感染的培养细胞中产生、从培养细胞中分离、并被加入稳定剂。

5 本发明的 RSV 疫苗包含作为活性成份、足以产生致免疫效力含量的、按本文描述的方法产生的 RSV。生物学衍生的或重组产生的 RSV 可以直接用于疫苗配方，或将其冷冻干燥。冷冻干燥的病毒通常在大约 4°C 储藏。在使用之前，将冷冻干燥的病毒重建于一种稳定溶液中，如盐溶液或含有 SPG、Mg⁺⁺和 HEPES 的溶液，包括或不包括佐剂，
10 如下文所述。生物学衍生或重组修饰产生的病毒可以用一种生理学上可以接受的载体和（或）佐剂引入宿主。本技术领域熟知的有用载体有水、缓冲水、0.4%盐溶液、0.3%甘氨酸、透明质酸等等。产生的水相溶液可以原样包装备用，也可以冷冻干燥；冷冻干燥制备物在接种前需要与一种无菌溶液混合，如上所述。如为接近生理条件所需要，
15 成份中可以包括制药学上可以接受的辅助物质，诸如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂等，如醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、一月桂酸脱水山梨糖醇、油酸三乙醇胺，等等。可接受的佐剂包括不完全的弗洛因德佐剂、磷酸铝、氢氧化铝、明矾，这些都是本技术领域熟知的物质。其它理想的佐剂有 Stimulon® QS-21 (Aquila
20 Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA)、MPL® (3-0-脱乙酰基单磷酸脂 A; Corixa, Hamilton, MT)、白细胞介素 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA)。

25 通过气雾、小滴、口腔、局部或其它途径，以本文件描述的方法用基因移位的 RSV 疫苗成份免疫之后，宿主的免疫系统对疫苗发生反应，产生对一个或多个 RSV 病毒蛋白的特异性抗体，如 F 和（或）G 糖蛋白抗体。作为接种疫苗的结果，宿主变得对 RSV 感染至少部分免疫，或是完全免疫，或能够抵抗中等程度或严重的 RSV 疾病，尤其是下呼吸道疾病。

30

本发 明的基因移位的 RSV 疫苗可以包含能够诱导针对单一 RSV 株系或抗原亚型（如 A 或 B）或针对多个 RSV 株系或亚型的免疫反应的减毒病毒。在此意义上，基因移位的 RSV 可以诱导单特异性的免疫反应或针对多个 RSV 株系或亚型的多特异性免疫反应。另外，也可以将具有不同致免疫性特性的基因移位的 RSV 混合于一个疫苗混合物中，或是在一个协调治疗方案中分别接种，以诱导针对一个 RSV 株系或针对多个 RSV 株系或亚型的更有效的保护反应。

接受疫苗的宿主可以是对 RSV 或与其非常相近的病毒易感并能针对接种的疫苗病毒产生保护性免疫反应的任何哺乳类。因此合适的宿主包括人、非人灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、兔子、啮齿类等。可见，本发明提供的方法可用于设计多种人类和兽医学用途的疫苗。

将本发明中含有减毒的基因移位 RSV 的疫苗组份，以“致免疫有效剂量”，即足够诱发或加强个体针对 RSV 的免疫反应能力的剂量，接种于对 RSV 易感或因其它原因有 RSV 感染危险的患者。对于人类患者接种本发明的减毒病毒，是采用已经成熟的人类 RSV 疫苗使用方法，如本文参考文献中描述的方法（Wright et al., Infect. Immun. 37:397-400, 1982; Kim et al., Pediatrics 52:56-63, 1973; and Wright et al., J. Pediatr. 88:931-936, 1976）。简而言之，对成人或儿童在鼻内小滴接种致免疫有效剂量的 RSV 疫苗，通常使用 0.5 ml 生理学可接受的稀释液或载体。此方法与肠胃内接种非复制性疫苗相比的优越性是简单、安全。另外这种方法还对局部呼吸道免疫有直接刺激作用，这对抵抗 RSV 具有主要作用。另外这种疫苗接种方式还有效地避开了通常在幼儿中发生的来自母体血清抗体的 RSV 特异性免疫抑制作用。此外，肠胃内接种 RSV 抗原有时候会伴随一些免疫病理学的并发症，但使用活病毒从未发现这种情况。

对于所有被接种者，接种基因移位的 RSV 疫苗的精确用量、时

间和频度根据患者的健康状况、体重、接种方法、配方性质等因素而定。剂量范围一般在每个患者 10^3 到大约 10^6 或更多噬斑形成单位 (PFU) 的病毒数量, 最常见的是每个患者 10^4 到 10^5 PFU 的病毒。无论如何, 疫苗配方所提供的本发明的减毒 RSV 含量, 都必须能足够刺激或诱导抗 RSV 的免疫反应, 即用补体结合、噬斑中和、以及 (或) 酶联免疫吸附分析等方法鉴定如是。在此方面, 还须监视被接种者是否有上呼吸道疾病的迹象或症状。同大猩猩使用的状况一样, 疫苗的减毒病毒在被接种者鼻咽中生长的水平比野生型病毒低大约 10 倍或更多倍, 比不完全减毒的 RSV 也低大约 10 倍或更多倍。

在婴幼儿中可能需要重复接种以诱导足够水平的免疫反应。应在出生第一个月内进行第一次接种, 然后在整个儿童期内每隔一定时间接种一次, 如在两个月、六个月、一岁、两岁时接种, 以保证维持针对自然 (野生型) RSV 感染的足够水平的免疫保护。同理, 对重复性或严重 RSV 感染特别易感的成人, 如医务人员、幼儿园教师、幼儿家属、老人、心肺机能不健全者, 可能也需要重复接种以建立和 (或) 保持保护性免疫反应。可以通过测定分泌的和血清中的中和抗体量来监测诱导产生的免疫水平, 进而调节剂量或接种次数, 以保证维持必要的免疫保护水平。另外, 对不同的接种对象可以使用不同的疫苗病毒。例如, 一个用基因操作技术构建、表达细胞素或另一种 T 细胞抗原决定簇中富集的蛋白的基因移位 RSV 株可能对成人非常适用, 但却不适用于婴儿。用本发明的方法产生的 RSV 疫苗可与表达另一种 RSV 亚型或株系抗原的病毒配合, 以诱导针对多种 RSV 亚型或株系的免疫保护。另外, 疫苗病毒中还可以整合用本文件描述的方法整合到一个 RSV 克隆中的多个 RSV 株系或亚型的保护性抗原决定簇。

当使用不同的疫苗病毒时通常是将它们混合后同时接种, 但是也可以分别接种。例如, 两个 RSV 亚型的 F 糖蛋白之间的只有 10% 的氨基酸顺序差别, 此相似性即是用 RSV 或 F 抗原免疫、被一个异源株系攻击的动物所表现出的交叉保护免疫反应的基础。因此, 接种一

个株系，可以诱导针对相同或不同亚型的不同株系的免疫保护。但是要得到最好的免疫效果，需要针对两种亚型都接种。

5 本发明的基因移位 RSV 疫苗诱导产生一种免疫反应，使个体在后来感染野生型 RSV 时得到保护，防止下呼吸道的严重疾病，如肺炎和细支气管炎。虽然自然循环的病毒还是能够导致感染，尤其是在上呼吸道的感染，但由于疫苗接种和后来野生型病毒感染可能造成的抗性激升，发生鼻炎的可能性极大地降低。接种之后，有可检测水平的宿主产生血清抗体和分泌抗体，能够在体外和体内中和同源（同亚型）
10 野生型病毒。在很多情况下，宿主抗体还能够中和不同的亚型或非疫苗亚型的野生型病毒。

与在人体中自然循环的野生型病毒相比，本发明中理想的基因移位 RSV 表现出毒性降低。基因移位病毒的减毒程度足以使大多数接种者都不会发生感染症状。在某些情况下，减毒病毒还是能够传播到未接种疫苗的个体，但是其毒性已减弱到不会使已接种的或偶然宿主发生严重下呼吸道感染的程度。
15

基因移位的 RSV 疫苗病毒的减毒水平可以通过诸如定量检测免疫宿主呼吸道中存在的病毒数量、并与野生型 RSV 或作为候选疫苗株系已经过鉴定的其它减毒 RSV 相比而测定。例如，本发明的减毒嵌合病毒在黑猩猩等高度易感宿主的上呼吸道中复制的限制水平与野生型病毒复制水平相比要高，可以少 10 - 1000 倍。此外，减毒 RSV 疫苗株在黑猩猩上呼吸道的复制水平应该低于 RSV A2 ts-1 突变株，后者
20 以前已被证明在血清阴性的人类婴儿中不完全地减毒。由于鼻溢与上呼吸道中的病毒复制相关，为了进一步降低鼻溢的发展，理想候选疫苗病毒的复制水平应该在上呼吸道和下呼吸道中都受到限制。但是，本发明的减毒病毒对于人类必须具有足够的感染能力和致免疫能力，这样才能对接种的个体具有免疫保护作用。确定被感染宿主鼻咽中
25 RSV 水平的方法已有众所周知的文献描述。通过抽吸或洗出鼻咽分泌
30

物取样，用组织培养或其它实验室方法测定病毒数量。本文参考文献列出了部分文献，可参阅(Belshe et al., 滤过性微生物学杂志 1:157-162, 1977; Friedewald et al., J. Amer. Med. Assoc. 204:690-694, 1968; Gharpure et al., J. Virol. 3:414-421, 1969; and Wright et al., Arch. Ges. Virusforsch. 41:238-247, 1973)。动物宿主(如黑猩猩)鼻咽中的病毒可以很方便地测定。

在某些情况下，可能需要将本发明中的基因移位 RSV 疫苗与诱导对其它病原体(尤其是其它儿童期病毒)产生保护性免疫反应的疫苗相配合。例如，本发明的基因移位 RSV 疫苗可以与副流感病毒疫苗同时免疫，如本文参考文献所述(Clements et al., J. Clin. Microbiol. 29:1175-1182, 1991)。本发明的另一方面是，通过用本文所述的方法将编码其它呼吸道病原体(如 PIV)保护性抗原的序列整合到用于产生感染性重组 RSV 的基因移位 RSV 基因组或反基因组中，嵌合 RSV 可被用作此保护性抗原的载体。

本发明还有另外一个方面，即基因移位 RSV 可被用作呼吸道瞬时基因疗法的载体。根据本实例，基因移位 RSV 基因组或反基因组中含有一段顺序，此顺序可用于编码一个需要的基因产物。此基因产物处于控制 RSV 表达的同一个启动子或一个不同启动子的控制之下。将通过重组 RSV 基因组或反基因组与 N、P、L、M2(ORF1)蛋白共同表达以及包括一个编码所需基因产物的顺序所产生的感染性 RSV 接种于患者。这可以涉及一个完全感染性的(即能感染培养细胞并产生有感染性子代的)重组 RSV，也可以是一个诸如缺失一个或多个 G、F、SH 表面糖蛋白基因、在通过稳定或瞬时表达而反式提供一个或多个这些蛋白的细胞中增殖的重组 RSV。在此情况下产生的重组病毒本身能够有效地感染，但却很难产生有感染能力的病毒颗粒。没有细胞表面糖蛋白的表达也使宿主免疫系统消除被感染细胞的效率降低。这些特征使外源基因表达的持久性和安全性提高。

用于基因疗法时，一般采用气雾、喷雾或其它局部方法接种于患者的呼吸道。基因移位 RSV 的接种剂量要足够引起所需基因产品以治疗水平或预防水平表达。以这种方法接种的代表性基因产物的例子包括那些特别适合瞬时表达的产物，如白细胞介素 2、白细胞介素 4、伽玛干扰素、GM-CSF、G-CSF、红细胞生成素或其它细胞素、葡糖脑苷脂酶、苯丙氨酸羟化酶、囊肿性纤维化跨膜电导调节因子（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、以及疫苗抗原。

以下各例是作为例证而提供的，并非是一种限制。

例 I

重组 RSV 的构建，其中 G 和 F 基因被单独地或以组合的形式重排到一个靠近启动子的位置

本例子提供了感染性 RSV 基因顺序的重排，其中一个或一个以上对抗原免疫因子编码的基因或基因片段，例如 G 和/或 F 基因，被转移到一个离启动子较近的位置。在下面提到的一个例子中，G 和 F 基因被从它们在野生株基因顺序中的位置同等地移动，从而占据重组 RSV 基因组或反基因组重排的位置 1 和 2。这种操作是对 RSV 反基因组 RNA 的克隆 cDNA 进行的。如上文所述，该 cDNA 的 SH 基因被删除了(RSV Δ SH)(参见，例如，Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年，作为参考列入此处)。删除了 SH 基因的野生型 RSV 在体外生长得与完全野生型 RSV 相同地好或稍好，但在老鼠的上呼吸道和黑猩猩的上下呼吸道内被轻微地减毒了 (Bukreyev 等，病毒学杂志，71:8973-8982，1997 年； Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年，作为参考列入此处)。删除了 SH 基因的野生型 RSV 的致免疫性和防护功效的水平与野生型病毒的非常接近。因而，相比于野生型病毒，RSV Δ SH 病毒轻微地减毒，否则它们有着非常相似的生物性质，而且它在本研究中代表亲本病毒。 Δ SH 病毒的这些特征，以及 RSV 删除突变体通常具有的增强的遗传稳定性，

使其作为生产基因移位的 RSV，促进突变体衍生物的恢复和操作的亲本重组体特别有用。

使用以上所描述的过程和策略，反基因组 cDNA 得到了操作，
5 并且重组病毒得到了恢复（参见，Collins 等，国家科学院学报，美国
92:11563-11567，1995 年；Bukreyev 等，病毒学杂志，70:6634-6641，
1996 年；Bukreyev 等，病毒学杂志，71:8973-8982，1997 年；
Whitehead 等，病毒学杂志，72:4467-4471，1998 年；Whitehead 等，
病毒学 247:232-239，1998 年；Bermingham 和 Collins，国家科学
10 学院学报，美国 96:11259-11264，1999 年；Collins 等，病毒学
259:251-255，1999 年；Bukreyev 等，国家科学院学报，美国
96:2367-2372，1999 年；Juhasz 等，疫苗 17:1416-1424 1999 年；
Juhasz 等，病毒学杂志，73:5176-5180，1999 年；TenG 和 Collins，
病毒学杂志，73:466-473，1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志，
15 73:9773-9780，1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志，73:871-877，
1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年；美国
给予专利 No. 5,993,824；每项均作为参考列入此处）。反基因组 cDNA
被作为三个亚克隆 进行操作。一个亚克隆，D51/ Δ SH，包含 T7 启动
子，和从前导区到 M 基因下游末端的基因组左手端。第二个亚克隆，
20 pUC19-GFM2，包含来自基因组中部的 G，F 和 M2 基因。第三个亚
克隆，D39，包含 L 基因，其后跟随着来自基因组右手端的尾部，再
后面跟随着一个自裂型核糖体序列和前后衔接的 T7 转录终止子。

使用诱变引物，PCR 被用来分开地或合在一起作为单一的 G-F
25 cDNA，扩增和改造包含 G 和 F 基因的 cDNAs 的末端(图 1)。为了产
生一个插入时用的仅含 G 的 cDNA，PCR 被用来扩增完整的重组 RSV
反基因组序列的核苷酸 4692-5596 (从起始 G ORF 的 ATG 到 G 基因结
束信号的下流末端)。PCR 引物被设计来在紧邻 G 基因结束信号的后面
加入 G-F 基因间(IG)区的前 6 个 核苷酸，其后跟随着 NS1 基因的
30 含有 10 个核苷酸的 GS 信号的一个拷贝(图 1)。PCR 引物还被用来在

扩增的 cDNA 的两端各加入一个 BspI 位点。为了产生一个插入时用的仅含 F 的 cDNA, PCR 被用来扩增完整的反基因组序列的核苷酸 5662-7551 (从起始 F ORF 的 ATG 到 F 基因结束信号的末端)。PCR 引物被设计来在紧邻 F 基因结束信号的后面加入 F-M2 IG 的前 6 个核苷酸, 其后跟随着含有 10 个核苷酸的 NS1 基因开始信号的一个拷贝(图 1)。PCR 引物也在 cDNA 的两端各放置了一个 BspI 位点。

为了产生一个插入时用的含有 G 和 F 基因的 cDNA, PCR 被用来扩增完整的反基因组 cDNA 的核苷酸 4692-7551 (从 G ORF 的 ATG 到 F 基因结束信号的末端) (图 1)。PCR 引物被设计来在紧邻 F 基因结束信号的后面加入 F-M2 IG 的前 6 个核苷酸, 其后跟随着 NS1 基因开始信号的一个拷贝。PCR 引物还被设计来在 cDNA 的两端各加入一个 BspI 位点。所有的 cDNAs 进行整体排序, 从而在结构上保持一致。

为了产生一个插入 G, F, 或 G-F cDNAs 时用的靠近启动子的位点, NS1 基因的上游非编码区在反基因组位置 92(G 到 C, 正义)和 97(A 到 C)上被核苷酸取代, 因此产生了一个 BspI 位点 (图 1)。这种操作是在一个包含 RSV 反基因组 RNA 的前 419 个核苷酸的 BstBI-MfeI 亚克隆上进行的。核苷酸取代是由 PCR 在完整的质粒上引入的 (Byrappa 等, 基因研究 5:404-407, 1995 年; 作为参考列入此处)。改造过的 BstBI-MfeI 片段被重新插入到 D51/ Δ SH 内, 并且 G, F, 和如上所述构建的 G-F BspI cDNA 片段又被插入到 BstBI-MfeI 亚克隆内。因为 BspI 有一个不对称的七聚体识别序列, 这些片段只可能以正确的方向插入。

当 G, F, 或 G-F DNA 被放在靠近启动子的位置, 对应的基因就从正常的下游位置被删除了, 以至于每个重组基因组都含有 G 和 F 的一个单一拷贝(图 1)。为了单独删除 G, 在 pUC19-G-F-M2 上进行 PCR, 从而扩增了 StuI/HpaI 片段(核苷酸 5611-6419, 从 G-F IG 到 F 基因的

中部)。另外,PCR 还将序列 TTAATTAAAAACATATTATCACAAA (序列标识号: 3) 加入到 cDNA 的上游末端。该序列包含一个 *PacI* 位点(用斜体字表示)。在反基因组 cDNA 里,此位点位于 SH 的基因结束信号内。此序列然后能被作为一个 *PacI*HpaI 片段引入未改造的 pUC19-GFM2 的 *PacI*HpaI 窗口,因此删除了 G 基因。经受了 PCR 的 cDNA 片段的顺序通过二脱氧核苷酸测序而被证实了。

或者,为了单独删除 F,在 pUC19-GFM2 上进行 PCR,从而扩增了起始于位于核苷酸 4618 的 *BlpI* 位点,结束于位于核苷酸 5596 的 G 基因结束信号的片段。另外,PCR 还将序列 CACAATTGCATGC (序列标识号: 4) 加到 cDNA 的下游末端。该序列包含 F-M2 IG 序列的上游部分,其后跟随着一个出现在重组 RSV 反基因组的 F-M2 IG 内的 *SphI* 位点 (用斜体字表示)。将此 cDNA 作为一个 *PacI**SphI* 片段克隆入未改造过的 pUC19-GFM2 的 *PacI*-*SphI* 窗口,会造成 F 基因的删除。经受了 PCR 的 cDNA 片段的顺序通过二脱氧核苷酸测序而被证实了。

为了同时删除 G 和 F 基因,*SphI*-*BamHI* 片段,使用了 Byrappa (Byrappa 等,基因研究,5:404-407(1995))等发明的方法的 PCR 被用来扩增 pUC-GFM2 的核苷酸 7559-8506 (从 F-M2 IG 到 M2/L 重叠),并且以下序列被加入到 cDNA 的上游末端: TTAATTAAAAACACAATT(序列标识号: 5)。由此所获得的 cDNA 插入单元包含一个 *PacI* 位点 (用斜体字表示)和紧邻 *SphI* 位点之前的 F-M2 IG 序列的上游部分,但缺乏 G 和 F 基因。经受了 PCR 的 cDNA 片段的顺序通过二脱氧核苷酸测序而被证实了。

然后,完整的反基因组 cDNA,如上文所述,组装在一起(参见, Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995 年; BukreyeV 等., 病毒学杂志, 70:6634-6641, 1996 年; BukreyeV 等, 病毒学杂志, 71:8973-8982, 1997 年; Whitehead 等, 病毒学杂志,

72:4467-4471, 1998 年; Whitehead 等, 病毒学 247:232-239, 1998 年; Bermingham 和 Collins, 国家科学院学报, 美国 96:11259-11264, 1999 年; Collins 等, 病毒学 259:251-255, 1999 年; BukreyeV 等, 国家科学院学报, 美国 96:2367-2372, 1999 年; Juhasz 等, 疫苗 17:1416-1424 1999 年; Juhasz 等, 病毒学杂志, 73:5176-5180, 1999 年; TenG 和 Collins, 病毒学杂志, 73:466-473, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:9773-9780, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:871-877, 1999 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年; 并且美国 专利 No. 5,993,8244; 每项均作为参考列入此处)。这种组装产生了对 Blp/ Δ SH, G1/ Δ SH, F1/ Δ SH, 和 G1F2/ Δ SH 反基因组 cDNA 编码的 cDNA。

这些 cDNA 各自与 N, P, M2-1 和 L 支持质粒一起转染到 HEp-2 细胞内, 并于 32°C 培养(参见, 即, Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995 年; Collins 等, 病毒学 259:251-255, 1999 年; 美国 专利 No. 5,993,824, 每项均作为参考列入此处)。3 天以后, 转染上清液被传给新鲜细胞, 并在 HEp-2 细胞内 于 37°C 连续培育, 每隔 3 至 7 天收获一次。对于感染了 F1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 病毒的单层, 较短的时间间隔非常必要, 因为它们显示了更迅速的合胞体发展和随后的细胞破坏。这可以解释为, 反应了 F 基因位置的改变造成 fusogenic F 蛋白质表达的加强。如图 2 所示, 每次收获的上清液等量试样被快速冷冻, 并在以后做滴定用。这些结果表明 G1F2/ Δ SH 和 F1/ Δ SH G1F2 病毒的恢复和扩增效率超过了 Blp/ Δ SH or G1/ Δ SH 病毒, 正如它们相对于 Δ SH 病毒和野生型病毒所测定的结果。

全部 RNA 从感染了每一个重组病毒的细胞内分离出来, 并在适用的基因组片段上进行 RT-PCR, 从而证实实际所得的基因组结构与设计和构建的基因组结构相同。另外, Northern 吸印转移法分析证实适用的亚基因 mRNAs 的表达。

在体外生长和抗原生产动力学方面，以下病毒得到了比较：野生型 RSV(包含 SH 基因)， Δ SH (SH 基因被删除，但在 NS1 的非编码区不包含 B1pI 位点)，B1p/ Δ SH, G1/ Δ SH, 和 G1F2/ Δ SH。HEp-2 细胞和 Vero 细胞的复制单层培养基以 0.1 按单位细胞计噬菌斑形成单位(PFU)的 MOI 被感染，吸附期间是 1 小时(-1 到 0 小时)。这些单层然后被清洗三次，并于 37°C 培养。在吸附后 t=0 小时立刻开始，每隔 12 个小时，对每个病毒收获两个复制单层。培养上清液被快速冷冻，以便日后分析，通过噬斑测定可以估计被释放的具有感染性的病毒的数量(图 3A)。这表示，可以比较病毒在 Vero(图 3A, 上图)和 HEp-2(图 3A, 下图) 细胞里制造具有感染性的病毒的能力。

在同样的实验里，在每个时间点上收获 Vero 细胞单层(图 3A, 上图)，并用 Western 免疫印记法分析，从而表征 G 蛋白质的表达(图 4)。每个时间点上的全部感染细胞蛋白质的样品在改性聚丙烯酰胺胶体内电泳，然后转移到硝化纤维素,并通过与 G 蛋白质肽特异性的抗血清一起培养而得到分析。使用商业化合光工具包可以检测和量化粘附的抗体。抗体绑缚在 G 蛋白质的两个主要的与细胞相关联的形态上，即较大的 90 kDa 完全成熟形态和较小的 50 kDa 不完全糖基化形态。这种比较表明，虽然所有病毒以相似的方式生产感染性微粒(图 3A, 上图)，但在感染了 G1/ Δ SH 或 G1F2/ Δ SH 病毒的细胞内含有相对而言相当多数量的与细胞相关联的 G 蛋白质(图 4)。用曝光感光片上使用的测密度术估计胶体横纹的数量，其结果表明 G1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 病毒分别显示出比 B1p/ Δ SH 病毒多 6 倍和 4 倍的 G 蛋白质。

正如上文所提到的，感染了 F1/ Δ SH 或 G1F2/ Δ SH 病毒的细胞单层显示出迅速发作的细胞病变作用，包括合胞体的形成。这可以解释为，反应了 F 蛋白质的表达被增强了。增强的细胞病变作用不会使这种病毒用作疫苗成为禁忌，因为体内疫苗病毒的感染只含有少量的上皮细胞。不论这些分散的上皮细胞的病变发作得快还是慢，它们都会

死亡而被新细胞代替。然而，如果细胞病变在体外的发作不那么迅速，就可能已经达到更高的病毒滴定量了。这些因素的解析将通过在高度减毒情况下构建基因移位的 RSV 来达到。在当前情况下，很显著的是基因的转移并没有影响 RSV 的生长，相反，它还把 G 蛋白质的总表达增加了好几倍。

在进一步研究中，做了比较转基因病毒在 HEp-2 和 Vero 细胞单层内复制能力的实验，其中感染倍数是 3.0 (图 3B)。这个比较是在两个分开的实验中做的，并得到了相似的结果。其中一个实验得到的数据列于图 3B。在这个单周期生长分析中，三个在靠近启动子位置包含 G 和/或 F 的病毒，即 G1/ Δ SH, F1/ Δ SH, 和 G1F2/ Δ SH, 都比控制病毒 Blp/SH 有更高的复制效率。此外，在 Vero 细胞里的差值比在 HEp-2 细胞里的大。例如，感染后 24 小时，在 HEp-2 细胞里，G1/ Δ SH 病毒的滴定量是 7.2×10^6 PFU/ml, 而 Blp/ Δ SH 控制病毒的滴定量是 6.8×10^6 PFU/ml, 两者相差 $0.4 \log_{10}$ 。而在 Vero 细胞里，两个滴定量分别是 G1/ Δ SH 病毒的 6.6×10^6 PFU/ml 和 Blp/ Δ SH 控制病毒的 5.6×10^6 PFU/ml, 两者相差 $1.0 \log_{10}$ 。另外两个转基因病毒的滴定量也都超过了控制病毒的滴定量。因而，在这个例子中，转移 G 和/或 F 到靠近启动子的位置，增加了病毒在 HEp-2 和 Vero 细胞里的产量，在 Vero 细胞内的最大产量可达 10 倍。Vero 细胞是一个细胞链，对大规模的病毒生产很有用。

转基因重组病毒在 BALB/c 老鼠的上下呼吸道内的复制能力也得到了考察 (表 1)。老鼠被分成小组，每组 18 只。每只老鼠都感染了每个动物 10^6 PFU 的 G1/ Δ SH, F1/ Δ SH, G1F2/ Δ SH, 或控制病毒 Blp/ Δ SH。在感染后的第 3, 4 和 5 天，每个小组有六只老鼠被牺牲掉。它们的鼻咽和肺被收获下来进行噬斑测定分析，从而确定病毒分别在上下呼吸道内的滴定量。如表 1 所示，Blp/ Δ SH 和 F1/ Δ SH 病毒的复制水平在本质上难以区分。因而，虽然后者病毒在体外有更高的复制效率，它在体内的复制并没有改变。因为复制力和毒性都没有得到增

强，转基因病毒的改造可以通过加入减毒性突变而被简化。G1F2/ Δ SH 病毒的复制力稍微低于“野生型”Blp/ Δ SH 控制病毒。与之相比，G1/ Δ SH 病毒的复制力也较低，尤其是在感染初期。例如，在第 3 天，G1/ Δ SH 病毒在上下呼吸道内的滴定量都比 Blp/ Δ SH 控制病毒低 $0.7 \log_{10}$ 。

5

表 1 在靠近启动子的位置含有 G 和/或 F 基因的重组 RSV 在老鼠的上下呼吸道内的复制

病毒 ¹	第 3 天	鼻咽 平均滴定量 $\pm$ SE ($\log_{10}$ PFU/ 克 组织) 第 4 天	第 5 天	第 3 天	肺部平均 滴定量 $\pm$ SE ($\log_{10}$ PFU/克 组 织) 第 4 天	第 5 天
B BM	4.2 ± 0.17	4.0 ± 0.32	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.26	4.1 ± 0.37	4.5 ± 0.09
G1/ SH	3.5 ± 0.24	3.4 ± 0.54	3.5 ± 0.24	2.9 ± 0.2	3.9 ± 0.34	4.6 ± 0.13
F1/ SH	4.4 ± 0.11	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.12	3.9 ± 0.09	4.7 ± 0.08	4.9 ± 0.16
G1F2/ SH	3.3 ± 0.50	3.5 ± 0.13	3.3 ± 0.13	3.1 ± 0.13	4.2 ± 0.28	4.1 ± 0.07

1. 在第 0 天，每组有 18 只的 BALB/C 老鼠在鼻内接种了每只老鼠 10^6 PFu 的表中标明的病毒。在第 3，4，和 5 天，每组有六只老鼠被牺牲了，它们的鼻咽和肺被收获并用噬斑测定来确定病毒的滴定量。表 1 列出了平均滴定量并标明了标准误差。

因而，转移一个或一个以上的基因到靠近启动子的位置，或一般地重排 RSV 基因，可以对体内复制用的病毒轻微地减毒。这对设计减毒疫苗株很有价值，因为它补充了有用的减毒方法的清单。此外，存在代表不同的类或型的减毒性突变是很重要的，例如温度敏感点突变，非温度敏感点突变，基因删除等。不同类型的突变以不同的方式运作而影响病毒的表型，并且在单个疫苗病毒里存在多种突变可以提高稳定性。在这种情况下，转移基因带来的减毒作用代表了另一类有用的减毒性突变。根据本发明，基因转移可以轻度减毒。这个发现为细调疫苗株的减毒表型提供了有用的新工具。

本发明内的某些有用的减弱性突变属于“有条件的”品种，其中，减毒作用在指定的条件下(例如，在体外)是最小的，而在其它条件下(例如，在体内)是最大的。体外最小的或不产生作用的减毒表型允许疫苗病毒的高效生产。这对在细胞培养基中生长艰难的 RSV 和其它病毒特别重要。当然，正如这里所阐明的，为了减少疾病和疫苗病毒的致反应性，减毒表型在体内必须是产生作用的。

这里所示的 G1/ Δ SH 重组体演示了一个特别理想的，由源于转基因的特征构成的组合。具体而言，当 G1/ Δ SH 重组体在体内的复制适度地降低，它在体外的生长实际上增加了 10 倍。这种现象提供的好处是，与体内减毒作用一道提高了供疫苗生产的效率，并如上文所述，改善了抗原表达。

在 BALB/c 老鼠中，转基因病毒在体内引起的免疫性得到了研究。正如上文刚描述过的，每组六个的老鼠各自感染上单个病毒。它们的血清在接种前一天，接种后 28 天，和 56 天被采样(表 2)。这些血清样品用针对于 IgG 的糖蛋白特异性的酶联免疫吸附剂测定(ELISA)进行分析(表 2)。对 G 蛋白质特异性的 IgG 的分析表明，F1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 病毒引起的反应与 B1p/ Δ SH 控制病毒引起的反应非常相似。另一方面，G1/ Δ SH 病毒引起的 G 特异性反应也适度地减少了(多达四倍)。这可能，如表 1 所描述，至少部分是由于该病毒的复制力减小。对于 F 特异性反应的分析显示，相对于 G1/ Δ SH 和 B1p/ Δ SH 病毒，F1/ Δ SH 和 G1F2/ Δ SH 病毒在抗体水平上有适度增加(2.5 到 4 倍)。这与，向靠近启动子位置移动 F 基因会增加抗原的体内表达和增加免疫性的解释相符。此外，这些结果表明，在免疫病毒整体复制不被改变的情况下，转移基因能在体内增加免疫性。这是一个高度理想的结果，因为它提供了一个制造 RSV 疫苗的具体方法。RSV 疫苗天生就能比野生型亲本病毒产生更大的免疫性。值得注意的是，老鼠模型可被用来识别和表征病毒的生物性质，也可能揭示理想的，例如这里显示的，

新特征。

5 表 2 由糖蛋白特异性酶联免疫吸附剂测定(ELISA)，或感染了在靠近启动子的位置上含有 G 和 /或 F 基因的重组 RSV 的老鼠的血清抗体反应，获得的测量。

相对于标明的 RSV 蛋白质 ² 的血清免疫球蛋白 G ELISA 滴定量 (平均倒数 log ₂ ± SE)							
病毒 ¹	每组 动物 数目	接种前	抗 RSV G IgG		接种前	抗 RSV F IgG	
			第 28 天	第 56 天		第 28 天	第 56 天
B SV	6	5.3 ± 0	9.6 ± 0.6	11.7 ± 0.8	5.3 ± 0	10.3 ± 0.4	12.0 ± 0.4
G1 SH	6	5.3 ± 0	9.0 ± 0.6	9.6 ± 0.6	5.3 ± 0	10.0 ± 0.4	12.0 ± 0.7
F1 SH	6	5.3 ± 0	9.6 ± 0.9	11.6 ± 0.6	5.3 ± 0	11.6 ± 0.3	13.6 ± 0.3
G1F2 SH	6	5.3 ± 0	9.3 ± 0.7	11.6 ± 0.8	5.3 ± 0	12.3 ± 0.4	14.0 ± 0.4

1. 在第 0 天, 每组六只的 BALB/C 老鼠在鼻内接种了每 0.1 ml 接种体 10⁶ PFU 的病毒。
- 10 2. 血清样品在接种前 1 天(Pre), 接种后 28 和 56 天被采集, 并按如上所示, 用糖蛋白特异性 ELISA 分析 IgG 抗体对 RSV 的 G 或 F 蛋白质的抗性。表 2 列出了平均滴定量并标明了标准误差。

例子 II

15 在高度减毒情况下, 含有位置向靠近启动子方向转移的 G 和 F 基因的重组 RSV

以上所描述的基因转移突变被引入到一个 SH 基因被删除的基因环境中。在野生型病毒中, 这种删除轻微地增强了病毒在细胞培养基中的生长, 并适度地进行体内减毒(Bukreyev 等, 病毒学杂志, 71:8973-8982, 1997 年; Whitehead 等., 病毒学杂志, 73:3438-3442, 1999 年, 作为参考列入此处)。然而, 作为一个易感染 RSV 的婴幼儿服用安全的 RSV 疫苗, 仅删除ΔSH 提供的减毒作用是不够的。所以, 提供本例子就是为了证实本发明中的基因转换突变体可以在高度减毒

20

的情况下成功地恢复。

两种情况被用来举例说明本发明的这个方面：一种是缺乏 SH 和 NS2 基因，另一个是缺乏 SH、NS1 和 NS2 基因。如上文所列的参考文献所描述，删除 Δ NS2 和删除 Δ NS1 都会各自引起高度减毒(参见，
5 例如，Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999)。虽然在疫苗生产环境下， Δ NS2 病毒取得了与野生型病毒相当的产量，但在体外，含有任何一个突变的病毒的生产却被延缓和减少了。在黑猩猩体内， Δ NS2 和 Δ NS1 病毒都被高度减毒以减少复制和疾病，同时它们
10 又具有很强的抗 RSV 感染的致免疫性和保护性。每一突变，不论是独自还是与其它突变相组合，都是包括在重组疫苗病毒内的优秀候选者。 Δ NS1 和 Δ NS2 突变合在一起会产生一种在体外比 Δ NS2 病毒的减毒更多的病毒。在本例子中，构建了这些删除的进一步组合，并对它们支持进一步的基因位置转移突变的能力进行测试。

15

两种反基因组 cDNA 被构建了。一种是将 G 和 F 基因移至删除了 NS2 和 SH 基因的反基因组内的位置 1 和 2，称之为 G1F2/ Δ NS2 Δ SH (图 5，A 部分)。另一种是将 G 和 F 基因移至删除了 NS1，NS2 和 SH 基因的反基因组内的位置 1 和 2，称之为
20 G1F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH (图 5，B 部分)。正如上文例 I 中所描述的，这些反基因组 cDNA 被用来恢复重组病毒。在使用了任一种反基因组 cDNA 的情况下，重组病毒都很容易在体外恢复和繁殖。因而，本例子显示出，包含多个具有减毒作用的突变，且 G 和 F 基因被转移到靠近启动子位置的基因移位 RSV 可以被容易地生产和恢复。通过对这些
25 和其它的基因移位 RSV 做关于复制和抗原表达水平，以及其在体内的生长，免疫性和防护功效的分析，从而筛选出与这里描述的方法一致的候选疫苗。

在上述例子中，在 RSV 的基因顺序上进行了具有代表性的变化，
30 从而改进了 RSV 作为减毒活疫苗的性质。特别是，G 和 F 基因被单独

地和前后衔接地移到了一个离启动子较近的位置。这两种蛋白质通常在 RSV 基因顺序(NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L)里占有位置 7(G)和 8(F)。为了增加成功恢复的可能性,操作是在被删除了 SH 基因的 RSV 版本上进行的。G 和 F 然后各自被移至位置 1,或一起被分别移至位置 1 和 2。出乎意料的是,当 G 和 F 被移到了位置 1,或 G 和 F 被分别移动到了位置 1 和 2,重组 RSV 很容易恢复。这个结果与早先对 VSV 的研究大不相同,仅移动单个的 VSV 糖蛋白基因两个位置对病毒的生长非常有害。因为 RSV 的复制效率很低,并且 RSV 的基因顺序很复杂,且在 RSV 内移动糖蛋白基因会涉及到大量的位置改变,所以这些改造过的病毒具有这样的恢复能力的确令人惊奇。实际上,重排过的 RSV 的生长至少与它们的具有野生型基因顺序的上一代亲本一样好。正如以上所指出的,这对 RSV 特别重要,因为野生型病毒在细胞培养基中的生长效率很低,体外复制的进一步减少很有可能会使疫苗制备变得不可行。显著的是,所有的 NS1-NS2-N-P-M 蛋白质可以相对启动子转置一到两个位置,而不明显地损害生长状况。另外,对 G 糖蛋白表达的检查表明,相对于亲本病毒,重排的 RSV 的 G 糖蛋白表达增加了好几倍。这表明,在第一位置上包含 G 和/或 F 的疫苗病毒显示出比其它病毒蛋白质更高摩尔数量的防护抗原,因而代表了一种具有高度理想的疫苗性质的病毒。

此外,基因顺序的改造也可以在先前工作中产生的两种高度减毒的候选疫苗上进行。在一种候选疫苗里,如上所述,NS2 基因被单独地删除了。在另一种候选疫苗里,NS1 和 NS2 基因一起被删除了。在这两种候选疫苗里,G 和 F 糖蛋白分别一起被移动到了位置 1 和 2,并且 G, F 和 SH 糖蛋白从它们最初的下游位置上删除了。因而,恢复了的 G1F2 Δ NS2 Δ SH 和 G1F2/ Δ NS1 Δ NS2 Δ SH 病毒除了转移了 G 和 F 基因之外,还分别有两个和三个基因被删除。为了说明所涉及的变化范围,可以比较野生型 RSV 的基因顺序(NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L)和 G1F2/ Δ NS2 Δ SH 病毒的基因顺序(G-F-NS1-N-P-M-M2-L)或 Δ NS1 Δ NS2 Δ SH 病毒的基因顺序(G-F-N-P-M-M2-L)。其结果表明,相

对启动子，大多数或所有的基因位置都被改变了。虽然如此，这些高度减毒的衍生物保留了在细胞培养基中生长的能力，表明它们在候选疫苗病毒发展中的明确作用。

5 例 III

含有位置向靠近启动子方向转移的 HRSV G 和 F 基因的嵌合 BRSV/HRSV 的构建

本例子描述了具有感染性的 rBRSV/HRSV 嵌合体的构建。在 rBRSV/HRSV 嵌合体中，HRSV 的 G 和 F 基因被替代入重组牛 RSV (rBRSV) 中。所得的人-牛嵌合体包含两个 HRSV 的基因，即 G 和 F，以及八个来自 BRSV 的基因，即 NS1、NS2、N、P、M、SH、M2 和 L。在由 Buchholz 等于 2000 年 6 月 23 日提出的美国专利申请 No. 09/602,212 里提供了另外的细节描述人-牛 RSV 构建。其中，人的 G 和 F 基因被替代至它们在牛 RSV 中对应的野生型位置上(称之为 rBRSV/A2)。该专利对应的 PCT 申请书在 2001 年 1 月 18 日作为 WO 01/04335 出版。它的临时优先权申请 No.60/143,132 在 1999 年 7 月 9 日提出，每项均作为参考列入此处。

在本例中，除了基本的 rBRSV/A2 糖蛋白替代构建，HRSV 的 G 和 F 基因还被转移至 rBRSV 主链内，相对于它们在 BRSV 基因组的野生型基因顺序中的位置，离启动子较近的位置。更具体地说，F 和 G 基因从它们相对启动子的通常位置，即分别是基因位置 7 和 8，分别移到了位置 1 和 2。为了达到这个目的，构建了完整的具有感染性的 rBRSV。在此构建中，通过核苷酸取代，在位置 67，4,673 和 7,471 上分别创建了独特的 NotI，SalI 和 XhoI 位点(图 6，A 部分)(参见 Buchholz 等，病毒学杂志，73:251-259，1999 年；Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，列于此作为参考)。NotI 位点包含在 BRSV NS1 基因的上游非翻译区内，而 SalI 和 XhoI 位点在基因间区。通过用 SalI 和 XhoI 消化 rBRSV 反基因组 cDNA，酶切了全部的 BRSV G 和 F 基因，并得到两个被连接的相同粘端(图 6，B 部

分)。这导致了 rBRSV 反基因组 cDNA 缺乏 G 和 F 基因，以及包含具有以下序列的含有 64 个核苷酸的 SH-M2 基因间区：

TTAAACTTAAAAATGGTTTATGtcgaGGAATAAAATCGATTAA
CAACCAATCATTCAAAAAGAT (序列标识号：6) (原本分开的 SalI
和 XhoI 位点的四聚核苷酸粘端用小写字母表示)。相对而言，自然产生的 BRSV F-M2 基因间序列的长度是 55 核苷酸。

可以通过使用 PCR 及改造 cDNA 末端的诱变引物来制备含有 HRSV G 和 F 基因的 cDNA。具体而言，PCR 被用来扩增完整的 HRSV 反基因组 cDNA 内的核苷酸 4692-7551 (从 G ORF 的 ATG 到 F 基因结束信号的末端)。引物被用来在紧邻 F 基因结束信号的后面加入 F-M2 IG 的前 6 个核苷酸，其后面跟着 NS1 基因开始信号的一个拷贝。PCR 引物还被用来在 cDNA 的两个末端各加入一个 BlnI 位点和一个 NotI 位点。经受了 PCR 的 cDNA 片段的顺序通过二脱氧核苷酸测序而被证实了。所得的 cDNA 随后被作为一个 NotI 片段插入，如上所述的，缺乏 G 和 F 基因的 rBRSV 反基因组 cDNA 之内唯一的 NotI 位点。正确的重组体可用限制片段基因定位来识别，并称之为 rBRSV/A2-G1F2。编码基因组 RNA 的结构示于图 6，C 部分。如图所示，在这个 cDNA 里，G 和 F 基因相对于启动子从位置 7 和 8 移到了位置 1 和 2。

如上所述，对 rBRSV/A2-G1 F2 反基因组 RNA 编码的质粒，与对 N、P、M2-1 和 L 支持蛋白质编码的质粒，一起转染到稳定地表达了 T7 RNA 聚合酶的 BSR T7/5 细胞内(参见，Buchholz 等，病毒学杂志，73:251-259，1999 年；Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，每项均作为参考列入此处)，并且传染性病毒得到了恢复。在恢复了的 rBRSV/A2-G1F2 病毒与 rBRSV，rHRSV(也称作 rA2)和 rBRSV/A2 之间做了关于它们在人 HEp-2 细胞和牛类 MDBK 细胞里多周期生长效率的比较。如上所描述(参见，Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，作为参考列入此处)，在

HEp-2 细胞里，rHRSV 的生长效率比 rBRSV 高，并且 rBRSV/A2 病毒的生长效率介于它的两个亲本的中间。如图 7 所示，rBRSV/A2-G1F2 的复制效率与 rBRSV/A2 的难以区分。因而，出乎意料的是，G 和 F 基因在位置上的变化并没有降低体外生长效率。这个新结果允许 RSV 疫苗病毒的高效生产。

在感染了 wt HRSV 病毒，或 rBRSV/A2 或 rBRSV/A2-G1F2 嵌合病毒的 HEp-2 细胞上进行了荧光免疫检验法。在此过程中使用了两种特异于 HRSV G 或 F 蛋白质的单克隆抗体，即分别是 021/01G 和 44F (Lopez 等，病毒学杂志，72:6922-6928，1998 年；Melero 等，普通病毒学杂志 78:2411-2418，1997 年，每项均作为参考列入此处)。每个单克隆抗体都被染色。虽然这个测定只是半定量的，但早先已有人确定这种测定可以可靠地区分 wt rBRSV 和 rBRSV/A2(后者在 rBRSV 主链内的正常基因位置含有 HRSV 的 G 和 F 基因)。特别是，wt HRSV 有一个非常强而广泛的预示高效而广泛的抗原表达的免疫荧光模式，而 rBRSV/A2 提供了一个较弱，较分散，且较不广泛的模式(Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，每项均作为参考列入此处)。对 rBRSV/A2-G1F2 进行的一个类似的测定表明(图 8)，转移了启动子的嵌合病毒的免疫荧光模式与 wt HRSV 的非常相似。这结果与增强的 G 和 F 糖蛋白表达一致。同时，相对于 wt HRSV，与 rBRSV/A2-G1F2 相关的细胞病变作用被减少了，从而更类似于 rBRSV/A2 的细胞病变作用(Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，每项均作为参考列入此处)。具体而言，rBRSV/A2 和 rBRSV/A2-G1F2 会引起较少和较小的合胞体。

因而，本例子提供了 rBRSV/A2 人-牛嵌合 RSV 病毒的改造。该病毒是在 BRSV 里含有 HRSV 的主要防护抗原基因，G 和 F 蛋白质。为在灵长类的呼吸道内复制，BRSV 被剧烈减毒。rBRSV/A2 病毒有很强的宿主范围限制，这使它在灵长类内被高度减毒。因为本基因移位 rBRSV/A2-G1F2 病毒在其基因起源里拥有同样的 BRSV 基因星

座，它很可能享有这种强的宿主范围限制表型，因而增强了两种主要防护抗原的表达。这两种被增强的防护抗原的体内表达被进一步期望能增加该病毒引起的免疫性。因而，本例子通过向靠近启动子的位置移动 HRSV 基因，改造并改进了 rBRSV/A2 病毒。这程幅度的位置转移，即相对启动子，G 和 F 基因从野生型的位置 7 和 8 移到了新位置 1 和 2，先前并没有描述过。

例 IV

用源于 HRSV，与包膜相关的 M，G 和 F 蛋白质构建嵌合 BRSV/HRSV 本例子展示了另一个产生于人-牛嵌合情况下的基因转位 RSV。如上所述，其过程包括对类似 rBRSV/A2 嵌合体的抗原嵌合病毒所做的改造（在 BRSV 宿主范围内减毒的情况下，有 HRSV 的 G 和 F 防护抗原基因）。BRSV 和 HRSV 都有 4 个与包膜相关的蛋白质：主要的防护抗原 G 和 F 糖蛋白；看上去并非是 HRSV 的中和或防护抗原的，具有未知功能的疏水性 SH 蛋白质(Whitehead 等，病毒学杂志，73:3438-3442，1999 年；Connors 等，病毒学杂志，65:1634-1637，1991 年，每项均作为参考列入此处)；和不是防护抗原但对病毒的合成很重要的非糖基化内部基质 M 蛋白质，(TenG 和 Collins，病毒学杂志，72:5707-16，1998 年，作为参考列入此处)。

20

在这个例子，构建了一个 BRSV/HRSV 嵌合病毒，其中所有四个与包膜相关的 BRSV 蛋白质基因都被删除了，即 BRSV M、SH、G 和 F，并且三个与包膜相关的 HRSV 蛋白质基因，即 M，G 和 F，被插入在它们应在的位置上。其结果是 F 和 G 糖蛋白基因向靠近启动子的方向移动了长度相当于一个 SH 基因的距离。

25

对以上所述的 rBRSV/A2 结构(参见，Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，作为参考列入此处)进行改造，使其在 P 和 M 基因之间的基因间区内的位置 3204 上包含一个唯一的 MluI 位点(图 9，A 部分；P-M IG)。在这个过程中，引入了 5 个核苷酸取代。

30

核苷酸序列位置编号都是相对于完整的 rBRSV 反基因组(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-259, 1999 年; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199 2000 年; GenBank 登录号 AF092942 或完整的 rHRSV 反基因组, Collins 等, 国家科学院学报, 美国 92:11563-11567, 1995 年; 每项均作为参考列入此处), 并且指代 HRSV 序列的序列位置编号用下划线表示。MluI-SalI 片段被酶切, 并用含有 M 基因的 MluI-SalI 片段替代。

参看图 9, B 部分, 通过使用可以引起 cDNA 末端变化的引物, PCR 扩增和改造了包含 HRSV M 基因的 cDNA。具体而言, 如此改造 M cDNA 致使它的上游末端包含一个 MluI 位点, 其后是 P-M 基因间区内的最后一个核苷酸(这对于 HRSV 和 BRSV 是相同的), 其后是完整的 HRSV M 基因, 其后是 BRSV SH-G 基因间部位内的前 4 个核苷酸, 再其后是一个 SalI 位点。所得的 cDNA 的顺序被证实全部是正确。再经过 MluI 和 SalI 的消化和 rBRSV 反基因组 MluI-SalI 窗口内的克隆, 就会产生一个 rBRSV/A2-MGF。如图 9 C 部分所示, 这个嵌合体包含一个由六个 BRSV 基因, 即 NS1, NS2, N、P、M2 和 L, 和三个与包膜有关的 HRSV 蛋白质基因, 即 M, G 和 F, 组成的主链。

如上文所详细描述, 反基因组质粒与对 N、P、M2-1 和 L 支持蛋白质编码的质粒一起被转染入稳定地表达了 T7 RNA 聚合酶的 BSR T7/5 细胞(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-259, 1999 年; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000 年, 每项均作为参考列入此处), 并且感染性病毒得到了恢复。因而, 本例子还显示出, 包含一个基因删除并因此使 G 和 F 基因向靠近启动子的方向转移的基因移位 RSV 是容易生产和恢复的。通过对本例中的和其它的基因位移 RSV 进行关于复制和抗原表示水平, 以及体内生长, 免疫性和防护功效的分析, 可以依照这里所描述的方法筛选出适当的候选疫苗。

例 v

其它包含了替代入 BRSV 主链的 HRSV 非结构性 NS1 和 NS2 基因和/或与包膜相关的 M、SH、G 和/或 F 基因的 BRSV/HRSV 嵌合病毒的构建和恢复

- 5 其它包含了替代入 BRSV 主链的 HRSV 非结构性 NS1 和 NS2 基因和/或与包膜相关的 M、SH、G 和/或 F 基因的 BRSV/HRSV 嵌合病毒被构建了。这些嵌合病毒中的大多数含有来自于 HRSV 的 G 和 F 基因。这是一个理想的特点，因为 G 和 F 基因对主要的防护抗原编码，因而对 HRSV 疫苗的有效性也颇为重要。

10

- 在某些典型的病毒中，BRSV NS1 和 NS2 基因由它们的 HRSV 对应物替换。NS1 和 NS2 最近被证明是 I 型干扰素间接抗病毒状态的拮抗剂(Schlender 等，病毒学杂志，74:8234-42，2000 年，作为参考列入此处)，并且这些基因的取代提供了一种改造疫苗病毒的成长性质和毒性的方发。这是因为一般发现干扰素拮抗剂倾向于宿主特异
- 15 (Young 等，病毒学，269:383-90，2000 年；Didcock 等，病毒学杂志，73:3125-33，1999 年；Didcock 等，病毒学杂志，73:9928-33，1999 年，每项均作为参考列入此处)。因而，在疫苗病毒里包含 BRSV 特异的 NS1 和 NS2 基因会促进病毒在牛类细胞里的生长，但对于其在灵长类细胞
- 20 和人类接种者体内的生长会构成一个减毒突变。

- 相反地，HRSV 特异的 NS1 和 NS2 基因会提供一种改善疫苗病毒在人类细胞内生长的方发。因而，这为操作疫苗病毒的生长性质和致反应性提供了一个新方法。在另一个病毒里，完整的，HRSV 特异的，与膜相关的基因，即 M、SH、G 和 F，的星座被安置在 BRSV
- 25 的主链上。因为在基因表达，基因组复制，和病毒体生产期间，病毒粒子的各种蛋白质被认为是以各种各样的方式相互作用，所以生成各种组合的能力为候选疫苗提供了广泛的来源。

- 30 最后，接下来这部分举例说明这样一些类型的病毒：病毒的某些

基因被替代但其基因顺序没有改变；病毒的某些基因被替代而且其基因顺序也改变了；以及相对于 BRSV 主链，某些被替代的基因的顺序没有改变，但其它被代替的基因的顺序被改变了。因而，本部分提供了一个关于，操纵 cDNA 衍生病毒从而生成多种嵌合病毒的能力，和恢复修改过的，具有理想的生物性质的能存活的病毒的能力的严密测试。

通过去掉 rBRSV 主链里的 NS1 和 NS2 基因，并用 HRSV 的 NS1 和 NS2 基因来替换可以构建一个 BRSV/HRSV 嵌合病毒，从而生成名为 rBRSV/A2-NS1+2 的病毒(图 10，从上数第二个结构)。该构建的主链是 rBRSV 反基因组 cDNA。为了含有如图 10 (最上面的结构)所示和先前所详述的(Buchholz 等, 病毒学杂志, 73:251-9, 1999 年; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000 年, 每项均作为参考列入此处) 唯一的 NotI, KpnI, Sall 和 XhoI 位点, 对 rBRSV 反基因组 cDNA 进行改造。HRSV NS1 和 NS2 编码序列作为一个单个片段被 PCR 扩增了。该片段横跨完整的 HRSV 反基因组序列的位置 75 到 1036, 包括 HRSV NS1 ORF, NS1/NS2 基因连接点, 和 NS2 ORF。其上游末端也包含了一个加在紧邻 HRSV 序列之前的 NotI 位点, 和加在位于 HRSV 位置 91 的 NS1 ORF 非翻译序列上游内的 BlnI 位点。PCR cDNA 的下游末端在紧邻 HRSV 序列之后包含了一个 KpnI 位点。这个 PCR 产品进行克隆, 并且它的顺序得到了证, 然后作为一个 NotI-KpnI 片段插入到对应的 rBRSV 主链窗口内。

又生成了另一种 BRSV/HRSV 嵌合病毒。其中, 以下四个 rBRSV 内的基因用它们在 HRSV 内的对应物替换了: NS1、NS2、G 和 F。这种病毒被称为 rBRSV/A2-NS1+2GF(图 10, 从上数第三个结构)。这个结构通过整合来自于 rBRSV/A2-NS1+2 和先前描述的 rBRSV/A2 的片段而生成 (参见, 图 7 和 8; 美国专利申请 Serial No. 09/602,212; Buchholz 等, 病毒学杂志, 74:1187-1199, 2000 年, 每项均作为参考列入此处)。这里, rBRSV/A2 也可被称为 rBRSV/A2-GF。尤其是, 两

种结构都包含一个位于前导区质粒序列上游内的 *Xma*I 位点和如图 10 所示的 *Kpn*I 位点. RBRSV/A2-NS1+2 的 *Xma*I-*Kpn*I 片段被转移到对应的 rBRSV/A2-GF 质粒窗口内。

5 又生成了另一种 BRSV/HRSV 嵌合病毒。其中，以下四个 rBRSV 内的基因用它们在 HRSV 内的对应物替换了: M, SH, G 和 F。这种病毒被称为 rBRSV/A2- MSHGF (图 10, 从上数第四个结构)。其中, *Mlu*I 位点被加入到 rBRSV 主链的 P-M 基因间区(参见图 9)。因而, 如图 9 所示, 插入的 HRSV 序列以 *Mlu*I 和 *Xho*I 位点为它的上游和下游边界。含有两侧为 *Mlu*I 和 *Xho*I 位点的 HRSV M-SH-G-F 序列的 HRSV 10 插入物是用 PCR 制备的。所得的产品被克隆并证实了它的顺序。*Mlu*I-*Xho*I 片段然后被克隆入对应的 rBRSV 主链窗口。

又生成了另一种 BRSV/HRSV 嵌合病毒。其中, G 和 F 基因用 15 它们在 HRSV 内的对应物替换, 并被放在 rBRSV 主链内的第三和第四位置上。这种病毒被称为 rBRSV/A2-G3F4 (图 10, 从上数第五个结构)。在这个构建中, PCR 被用来扩增 HRSV G 和 F ORF。PCR 引物被设计来在 G 的上游末端加入以下特征: 一个 *Kpn*I 位点, 一个 BRSV 基因结束信号 (5'-AGTTATTTAAAAA) 和一个由三个 nt 构成的基因 20 间序列(CAT), 其后是 HRSV G 和 F 基因。被扩增的片段的下游末端结束在位于 HRSV 反基因组位置 7420 的 HRSV F 基因下游非翻译区内, 其后加入了一个 *Kpn*I 位点。这个 PCR 产品被克隆并且它的顺序得到了证实。如图 6 B 部分所示, 含有 HRSV G 和 F 序列的 *Kpn*I 片段然后被克隆入缺乏 G 和 F 基因的 rBRSV cDNA 的 *Kpn*I 位点内。 25 在正确的方向上包含此插入单元的重组体由限制分析法鉴别了。

又生成了另一种 BRSV/HRSV 嵌合病毒。其中, 以下的基因在 30 rBRSV 主链内被替换了: NS1, NS2, G 和 F。其中, G 和 F 基因被移到靠近启动子的位置上。这种病毒被称为 Hex, 或 rBRSV/A2-G1F2NS3NS4 (图 10, 最下面的结构)。这个嵌合体由改造 rBRSV/A2-

NS1+2 而获得。其中, BRSV 的 G 和 F 基因由它们在 HRSV 内的对应物替换, 并移到第一和第二个位置上, 如同以上所描述的 rBRSV/A2-G1F2 的构建(例子 III, 图 6, B 部分)。具体而言, 如上所述(例子 III), BRSV 的 G 和 F 基因通过与 SalI 和 XhoI 分离开而从 rBRSV/A2-NS1+2 反基因组 cDNA 内酶切了。随后, 如上所述(例子 III, 图 6, B 部分), 一个包含 HRSV G 和 F 基因的 NotI 片段被克隆入位于 rBRSV/A2-NS1+2 反基因组 cDNA 的 NS1 非编码区内的 HRSV 序列之前的唯一 NotI 位点内。在正确的方向上包含此插入单元的重组体由限制分析法鉴别了。

以上所列的每个病毒都很容易地从 cDNA 恢复。迄今为止, 还没有一个设计的病毒不能恢复。

对应于先前测试的 rBRSV/A2-GF 和 rBRSV/A2-GF 病毒(如上所示, 前面的例子中的最后一个病毒叫 rBRSV/A2, 但在这里为了与新构建明显区别而被改称了), 新的 rBRSV/A2-G3F4 和 HEx 病毒做了体外生长效率的比较。单层 Vero 细胞培养基进行了 0.1 感染倍数的感染, 并于 37°C 培养。等量试样在如图 11 所示的时间点上被采样, 并用噬斑测定来确定病毒的滴定量。在这些情况下, BRSV 的复制效率比 HRSV 的低一些, 这反应了 BRSV 在灵长类细胞内的的宿主范围限制。如图 11 上部分所示, 相比于其它的嵌合病毒和 rBRSV, rBRSV/A2-G3F4 显示了改善的体外生长状况。实际上, 它的生长效率类似于重组 HRSV(rA2)。因而, 经过用 HRSV 内的 G 和 F 基因替换 BRSV 内的 G 和 F 基因 (如同 rBRSV/A2-GF), rBRSV 病毒的生长状况被改善了, 而且经过将 HRSV 基因放在靠近启动子的位置上(如同 rBRSV/A2-G1F2)会进一步改善 rBRSV 病毒的生长状况。如果将 HRSV 的 G 和 F 基因放置在位置 3 和 4 上(如同 rBRSV/A2-G3F4), rBRSV 病毒的生长状况会更进一步被改善。这些结果展示了如何操作病毒基因的源体和顺序, 从而系统地调节本发明内的病毒的性质。

同样地，HEX 病毒也被评估了(图 11，最下部)。它的成长状况介于 rBRSV 和 rA2 之间，表明这个有四个基因被替换的病毒保留了体外复制的良好性，并且实际上超出了它的 rBRSV 亲本。值得注意的是，因为 Vero 细胞缺乏 I 型干扰素用的结构基因，所以干扰素特异的作用不能被评估。另一方面，Vero 细胞是一个对大规模疫苗生产有用的受质，而且，在这些细胞里的高效生长对于疫苗病毒也是一个重要特点。

在来源于人的 HEp-2 和牛类的 MDBK 细胞里，这些 RBRSV/HRSV 嵌合病毒的生长状况可以根据菌斑大小进一步评估(图 12 的上部和下部)。这个比较还包括了先前例子里描述的嵌合病毒，即 rBRSV/A2-GF(先前叫做 rBRSV/A2)，rBRSV/A2-MGF，和 rBRSV-G1F2。在 HEp-2 细胞里，rHRSV 生成的菌斑比 rBRSV 的大，这与宿主范围限制一致(图 12，上部)。本讨论首先考虑了保留了 BRSV 的 NS1 和 NS2 基因的那些病毒。在这群病毒中，rBRSV/A2-G3F4，rBRSV/A2-G1F2 和 rBRSV/A2-GF 病毒生成的菌斑大小介于 HRSV 和 BRSV 之间，HRSV 的菌斑最大，BRSV 的最小。这与生长运动学数据完全一致，并且证实了这样一个想法：在 rBRSV 主链内引入 HRSV 的 G 和 F 基因会改善 rBRSV 在 HEp-2 细胞里的生长，并且进一步的改善可以通过改变这些基因的位置来获得。RBRSV/A2-MGF 和 rBRSV/A2-MSHGF 病毒产生的菌斑比 rBRSV 的小。这个例子表示，这些病毒可以被恢复和操作，但为了确定它们生长性质的全部特性，需要进一步的体外和体内表征。

对那些 NS1 和 NS2 基因来源于 HRSV 的病毒同样进行了 HEp-2 细胞里的生长检测。具体而言，仅在 NS1 和 NS2 基因的来源上不同的许多对病毒进行了相互比较。下面列出这些对病毒，每对包括一个含有 HRSV 的 NS1 和 NS2 基因的病毒：rBRSV 与 rBRSV/A2-NS1+2；rBRSV/A2-GF 与 rBRSV/A2-NS1+2GF；rBRSV/A2-G1F2 与 HEX。对于每一对病毒，含有来源于 HRSV 的 NS1 和 NS2 基因的病毒都会使

菌斑增大，表明宿主范围限制的调节。这说明如何将选择 NS1 和 NS2 基因的起源作为一种预测性地调节 HRSV 疫苗的生长性质的方法。在这个例子中，两个基因是被成对地操作的，虽然很明确的是根据这里的研究它们也可以被单独操作。

5

这些病毒在 MDBK 牛细胞里的特征被显示在图 12 的下部。相比于先前 HEp-2 细胞内的比较，宿主范围限制在这些细胞里被反转了，以至于 BRSV 生成了比 HRSV 更大的菌斑。在 rBRSV 的主链里包含 HRSV 的 G 和 F 基因并不会对生长有很大的影响，而含有来自于 HRSV 的 NS1 和 NS2 基因则会使病毒减毒，这大概是因为由 HRSV 获得的干扰素拮抗剂在牛细胞里的运作效率较低。既然牛细胞和牛宿主并不是这些候选 HRSV 疫苗的重要目标，这些在 MDBK 细胞中的发现主要用于对这些蛋白质的功能和它们对生长的贡献提供一个更清楚的理解。

10

15

总之，上述例子说明如何容易地生成一组显示出一系列所期望的生长性质的重组 HRSV 候选疫苗。对选中的候选疫苗做临床评估将提供使用本发明中的方法对候选疫苗进行优化的指导基准。早先研究表明，rBRSV 和它的 rBRSV/A2-GF 衍生物在黑猩猩体内被过度减毒，虽然后者病毒是 rBRSV 之上的改善物 (Buchholz 等，病毒学杂志，74:1187-1199，2000 年，作为参考列入此处)。因而，这里获得的进一步的，阶层化的生长上的改善代表了 RSV 疫苗重组体优化进程中的一个巨大进步。

20

25

例 VI

其它的包含来自于 HRSV 或 BRSV 的 NS1 和 NS2 蛋白质对 BRSV 主链内的 N 和/或 P 基因替代的 BRSV/HRSV 嵌合病毒的构建和恢复

人类的副流感病毒类型 3(HPIV3)有一个牛对应物(BPIV3)。BPIV3 在灵长类体内显示出宿主范围限制，因而为发展基于 HPIV3/BPIV3 嵌合病毒之上的减毒 HPIV3 疫苗提供了依据。一个有希望的嵌合体由

30

一个 HPIV3 主链构成, 其中 HPIV3 内的 N ORF 由它在 BPIV3 内的对应物替换了。显著的是, 这个嵌合病毒在细胞培养基内的复制效率很高, 并且在灵长类体内显示出减毒表型(Bailly 等, 病毒学杂志, 74:3188-95, 2000 年, 作为参考列入此处)。

5

在本例子里, 为了确定单个的 BRSV 基因是否能由它们的 HRSV 对应物替换, 进行了一些研究。具体而言, N 基因和 P 基因被单独替代了(图 13A)。同时也进行了另外的研究来确定是否两个基因能一起被替换。最后进行的额外研究用来确定是否也可以在包含 HRSV NS1 和 NS2 基因的主链里进行基因替换 (图 13B)。值得注意的是, 这些取代都是在含有 BRSV 的 G 和 F 基因的 rBRSV 主链内进行的。为了得到优化的 HRSV 疫苗, 这些基因可由它们的 HRSV 对应物替换。这些对应物可插入在自然基因顺序位置上或其它位置上。根据迄今所做的研究, 可以看出, 这样的取代很容易实现, 并且实际上一般会改善生长性质。

15

通过用 HRSV 的 N 编码序列替换 BRSV 的 N 编码序列就可以构建一个 BRSV/HRSV 嵌合物。这个嵌合物被称为 rBRSV/A2-N(图 13A)。在这个构建里, 一个 Aat II 位点被设计入 rBRSV N 基因内的 nt 2305-2310, 位于 N ORF 的最后三个密码子内。这种取代在氨基酸水平上是未提及的。同样的位点被设计入 HRSV 反基因组 cDNA 的 HRSV N ORF 内。另外, 对 HRSV 反基因组 cDNA 进行了改造, 从而使 NS2 下游非翻译区内的反基因组 nt 1037-1042 改变成一个 Kpn I 位点。这个 Kpn I-Aat II HRSV 片段被克隆入对应的 rBRSV 窗口内, 转移了 N ORF 的大部分。BRSV 和 HRSV 的 N ORF 内的最后几个密码子有着同样的氨基酸编码分配, 因而保留 BRSV N ORF 内的这几个 nt 对编码一个完整的 HRSV N 蛋白质做出了贡献。

20

25

通过用 HRSV 的 P 基因替换 BRSV 的 P 基因就可以构建一个 BRSV/HRSV 嵌合物。这个嵌合物被称为 rBRSV/A2-P (图 13A)。这

30

这个过程使用了上述的 Aat II 位点以及一个先前描述的 Mlu I 位点(参见图 9)。将这个 HRSV 片段移动到对应的 rBRSV 窗口内转移了整个的 P 基因。如上所示, 在这个片段内转移的几个 N ORF nt 在 BRSV 和 HRSV 内有着同样的编码分配。

5

通过将上述的 HRSV 的 N 和 P 序列转移入 rBRSV 就可以构建一个 BRSV/HRSV 嵌合物 rBRSV/A2-NP(图 13A)。这使用了以上提到的 Kpn I 和 Mlu I 位点。

10

同样的转移也可在包含 HRSV NS1 和 NS2 基因的 rBRSV 主链, 即在先前例子中描述的 rBRSV/A2-NS1+2, 内进行。这导致了 rBRSV/A2-NS1+2N, rBRSV/A2-NS1+2P, 和 rBRSV/A2-NS1+2NP(图 13B)。

15

每个前述的重组病毒都可以从 cDNA 容易地恢复。rBRSV/A2-P 病毒在 MDBK 细胞里的复制可与野生型 rBRSV 相媲美, 但是 rBRSV/A2-N 的复制比野生型 rBRSV 大约低 10 倍, rBRSV/A2-NP 病毒介于两者中间。因而, 获得了一个生长性质范围。根据以上所描述的方法, 可以对这些病毒进行改造, 从而使其含有 HRSV G 和 F 基因。

20

另外, 也可在 rHRSV 主链内进行类似的基因取代。即, HRSV 的 N 和/或 P 基因可以由其在 BRSV 内的对应物替代。实现与 NS1 和 NS2 基因取代相关的各种取代的能力为达到一种体外疫苗生产和人类接种体内减毒性和免疫性优化水平提供了进一步的灵活性。

25

如上述的例子表明, 根据现有的有关 RSV 的结构/功能的知识, 可以选择基因位移 RSV 内很有可能在功能上或结构上相互作用的基因来进行转移。在基因位移 RSV 之内的这些交换和其它改造可以根据如下事实而被简化: 相互作用的蛋白质在基因组里是并置的, 例如 N 和 P 壳包核酸蛋白质, M、SH、F 和 G 包膜蛋白质, 和 M2-1, M2-2 和 L 聚合酶成分。因而, 根据本发明可以获得另外的候选疫苗株, 例如,

30

整合两个或更多的并置基因，即，可以从 N 和 P，M、SH、F 和 G 包膜基因中的两个或更多个，或 M2-1, M2-2 和 L 基因中的两个或更多个中选择，一起作为接收者或背景基因组或反基因组内的一个异源插入单元或取代单位。

5

例如，在 rBRSV/A2 内，M 和 SH 基因可以一起用它们的 HRSV 对应物替换。所得病毒的病毒包膜蛋白质 (G, F, SH 和 M) 全部来自于 HRSV，而内部蛋白质来自于 BRSV。如果需要的话，另外的 BRSV 基因也可用它们的人对应物替换，例如，N 和 P 可以作为另一对，NS1 和 NS2 是另一对，以及 M2-1, M2-2 和 L 作为另一组。各对基因的并置都将使替代简化。同时，一个相反的将单个的 BRSV 基因插入 HRSV，但不干扰 HRSV 的 G 和 F 抗原免疫因子的方法也会生成本发明内的所期望的候选疫苗。例如，人 RSV 的 N、P、M2-1 和 M 基因中的一个或多个可以由其牛对应物单独替换。如这里所例证的，恢复的重组病毒然后会在细胞培养基，啮齿目动物，和非人的灵长类内进行减毒表型评估。这样，本发明鉴别了各种科题内治疗和预防 RSV，并具有所期望的减毒和防护功效水平的候选人—牛嵌合 RSV 疫苗病毒。

10

15

20

例 VII

改善了的部分基因被删除的 RSV 疫苗病毒的体外复制

25

30

根据前面的描述，已经表明 RSV 的体外复制效率对基因组核苷酸长度的变化很敏感。当长度增加时，一类调节重组 RSV 生长表型的改造包括插入另外一个对外来蛋白质编码的基因。例如，细菌氯霉素乙酰转移酶(CAT)，萤火虫荧光素酶，鼠科伽玛干扰素(IFNg)，鼠科白细胞间介素 2(IL-2)，和鼠科粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的编码序列被单独地插入了入 G-F 基因间区。每个插入都有降低病毒体外生长效率的作用。在一个实例中，在 G-F 基因间区内插入大约 0.76 kb 的 CAT 转录记录会使病毒的体外生长降低 20 倍。淋巴因子起源于鼠科，预计在人的 HEp-2 细胞内是不活跃的。而且，各种大小相当的

插入单元在减缓 RSV 体外生长方面的作用也程度相当。这些研究中报道的阻碍作用可归咎于序列本身的增加，而不是各种编码的外来蛋白质的表达。

5 在同样的基因区内插入 1.75 kb 的荧光素酶记录对病毒的复制有更大的抑制作用(减少 50 倍以上)，表明较大的插入单元具有更强的抑制性。另一方面，有证据显示这个作用也许还取决于插入单元在基因组内的位置。例如，在 NS1 基因的非编码区插入 0.8 kb 转录记录，
10 并将其安置在一个靠近启动子的位置对病毒的生长只有少量的抑制作用 (Hallak 等，病毒学杂志，74:10508-13，2000 年，作为参考列入此处)。还不确定的是观察到的作用是仅因为核苷酸长度的增加，还是由于其它 mRNA 编码个体的加入，或两者都是。

 在其它例子中，在一个重组 RSV 的基因间区内，增加了核苷酸的长度。迄今为止所分析的自然产生的 RSV 基因间区的长度范围是从 1 到 56 nt。在缺乏 SH 基因的重组病毒中，M-SH 基因间区被增加到 160 nt，同时对生长具有极少量的抑制作用。

 在另外的例子里，RSV 基因组被减小从而对病毒表型产生所期望的作用。在选中的具体化方案中，NS1、NS2、SH，G 和 M2-2 基因中的一个或多个基因在不消除病毒感染性的情况下从重组病毒中被单一地，或以某种组合形式删除了。每个删除都会导致被删除的蛋白质丧失表达，并且在许多情况下，导致病毒在体外和体内的生长效率降低。唯一的例外是，删除了 SH 的病毒在体外的生长并没有被减弱，
20 在某些细胞链里甚至被少量地加强了。在另一个涉及在 RSV 株 A2 和 B1 之间构建嵌合病毒的例子里，G 和 F 基因之间的基因间区的长度从 52 nt 缩短到 5 nt(参见，即，Whitehead 等，病毒学杂志，73:9773-80，1999 年，作为参考列入此处)。

30 许多先前的报道已经讨论了带有基因或基因间序列删除的重组

RSV 的生产(Bermingham 和 Collins, 美国国家科学院学报, 96:11259-64, 1999 年; Bukreyev 等, 病毒学杂志, 71:8973-82, 1997 年; Jin 等, 病毒学, 273:210-8, 2000 年; Jin 等, 病毒学杂志, 74:74-82, 2000 年; TenG 和 Collins, 病毒学杂志, 73:466-473, 1999 年; Teng 等, 病毒学学报, 2000 年; Whitehead 等, 病毒学杂志, 73:3438-42, 1999 年, 每项均作为参考列入此处)。然而, 每一种删除都伴随着开放读码框架或其它重要基因组特征的改变, 从而带来了核苷酸删除对病毒表型作用的不确定性。

在本例子中, 展示了通过删除 SH 基因下游非编码区内的序列从而减小 RSV 基因组长度的作用。这个示范性的部分基因删除(概要地在图 14 中说明)是在一个在 G-F 基因间区内包含一个 XmaI 位点的反基因组 cDNA 的版本上构建的, 预计这种变化本身不会影响编码病毒。横跨 SH ORF 末端到 SH 基因结束信号的 141-bp XhoI-PacI 窗口由以下两个低聚核苷酸形成的合成 DNA 替换: TCGAGTtAAtACtTgaTAAAGTAGTTAAT(序列标识号: 7)和 TAACTACTTTAtcAaGTaTTaAC (序列标识号: 8) (XhoI 和 PacI 限制位点部分用黑体字表示, SH 可读框和终止密码子的核苷酸用下划线表示, 并且沉默核苷酸变化用小写字母表示)。命名为 RSV/6120 的编码病毒在 SH ORF 的最后三个密码子和终止密码子内有沉默核苷酸取代, 并从 SH 下游非翻译区(在重组反基因组内的位置 4499-4610)内删除了 112 个核苷, 但未损害基因结束信号(Bukreyev 等, 病毒学杂志, 70:6634-41, 1996 年, 作为参考列入此处)(图 14)。因而, 这些点突变和 112 个 nt 的删除没有改变任何病毒蛋白质的编码氨基酸, 没有干扰任何已知的病毒 RNA 信号, 也没有改变编码 mRNA 的数量。

因为 SH 基因末端在细菌生长期间是不稳定的, 所以要对这个区域做了一些非编码改动。的确, 这些改动极大地改善了细菌内的稳定性, 这个性质对操作和繁殖反基因组质粒十分重要。因而, RSV/6120 提供了一个不受编码蛋白质, RNA 信号, 或编码 mRNAs 数量的改变而

引起的次要的和第三作用干扰的情况下检查从基因组中删除序列的作用。正如对，作为标记引入重组 RSV 和人和牛副流感病毒类型 3 的各种基因内的，与生物特性的重大变化没有关系的点突变的研究(Collins 等，高等病毒研究，54:423-51，1999 年；Schmidt 等，病毒学杂志，74:8922-9，2000 年；Schmid 等，病毒学杂志，75:4594-603，2001 年；Skiadopoulos 等，病毒学杂志，72:1762-8，1998 年；Skiadopoulos 等，病毒学杂志，73:1374-81 1999 年；Whitehead 等，病毒学杂志，72:4467-4471，1998 年；Whitehead 等，病毒学杂志，73:871-7，1999 年，每项均作为参考列入此处)所表明的，预计在 SH ORF 的最后几个密码子内所做的五个点突变不会影响编码病毒的生物性质。

在三组分开的感染实验(图 15A，15B 和 15C)中，6120 病毒与其全长对应物，称为 D53，一起做了多步生长效率的分析。如图中所示，6120 病毒的高峰滴定量比 D53 病毒可复制地高 1.5 到 2 倍。因而，对 SH 基因的改造，特别是 112 个非编码 nt 的删除(代表 0.7% 的基因组长度)，会极大地增加体外生长效率。因为 RSV 较不强壮的生长特点是疫苗发展中的一个重要问题，并预计会使疫苗生产复杂化，所以任何体外生长效率的增加都会为 RSV 疫苗生产带来好处。

这里所描述的具体的，明确的改造提供了一个通用的工具，可以应用在各种优化重组疫苗病毒的生长和其它表型特征中。根据目前的发现，15.2 kb 的 RSV 基因组为诸如部分基因删除或其它核苷酸删除的改造提供了目标位点的大集会。通常，就此选择的改动不会涉及这 11 个病毒 ORF 和它们的翻译起始位点(参见，即，Kozak，基因，234:187-208，1999 年，作为参考列入此处)。病毒 ORF 占基因组的 90% 以上，因此部分删除改造的目标位点通常选择在剩下的非翻译区 (或指非编码区)内。另外，这里所讲的核苷酸删除的目标位点一般不包括顺式复制和转录信号，包括基因两侧的由 10 个 nt 组成的基因开始和由 12 到 13 个 nt 组成的基因结束信号(参见，即，Collins 等，区域病毒学，2:1313-1352，1996 年，作为参考列入此处)，以及在基因组的

3'端发现的 11 个 nt 组成的核心启动子和在基因组的 5'端发现的反基因组启动子的补体。

5 本例子意外地说明 RSV 体外生长的效率可以通过去除非翻译序列，例如病毒 ORF 两侧的序列，或位于基因之间或之后的序列，或在 3' 和 5' 基因外区内的序列，来大幅增加。本例子显示出即使小的序列删除也可能改善病毒的生长。这是一个高度期望的结果，因为体外生长效率的改善会促进大规模的疫苗发展和生产。

10 微生物储存信息

以下物质已按照布达佩斯条约的规定储存在美国分类培养基收集机构(ATCC)，其地址为 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A.，并被标明如下：

质粒	登录号	储存日期
Cpts RSV 248	ATCC VR 2450	1994 年 3 月 22 日
Cpts RSV 248/404	ATCC VR 2454	1994 年 3 月 22 日
cpts RSV 248/955	ATCC VR 2453	1994 年 3 月 22 日
cpts RSV 530	ATCC VR 2452	1994 年 3 月 22 日
cpts RSV 530/1009	ATCC VR 2451	1994 年 3 月 22 日
cpts RSV 530/1030	ATCC VR 2455	1994 年 3 月 22 日
RSV B-1 cp52/2B5	ATCC VR 2542	1996 年 9 月 26 日
RSV B-1 cp-23	ATCC VR 2579	1997 年 7 月 15 日
P3/7(131)	ATCC 97990	1997 年 4 月 18 日
p3/7(131)2G	ATCC 97989	1997 年 4 月 18 日
P218(131)	ATCC 97991	1997 年 4 月 18 日

15 虽然，为了清楚的理解，前述的发明通过举例被详细地描述了，但对工匠来说，显而易见的是在附加的权利要求书范围内的某些改变和改造也许是实际的。权利要求书是以说明而非限制的方式呈现的。在本上下文中，为了节省笔墨，在前面的揭示中援引了各种的出版物和其它参考。以防各种用途，每个参考文献作为参考全部列入此处。

<110> 克里斯蒂娜·D·克伦普尔 (Krempl, Christine D.)
彼得·L·科林 (Collins, Peter L.)
布雷恩·R·墨菲 (Murphy, Brian R.)
乌尔苏拉·布赫霍尔茨 (Buchholz, Ursula)
斯蒂芬·S·怀特黑德 (Whitehea, Stephen S.)
美国政府 (The Government of the United States of America, as)

<120> 从邻近启动子的基因表达保护性抗原的呼吸道合胞病毒疫苗
(RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS VACCINES EXPRESSING
PROTECTIVE ANTIGENS FROM PROMOTOR-PROXIMAL GENES)

<130> SCT022983-09

<140> PCT/US01/20107
<141> 2001-06-22

<150> 60/213,708
<151> 2000-06-23

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 1
catatt 6

<210> 2
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 2
cacaat 6

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 3
ttaaattaaaa acatattatc acaaa 25

<210> 4
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 4
cacaattgca tgc 13

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 5
ttaaattaaaa acacaatt 18

<210> 6
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 6
ttaaacttaa aaatggttta tgctgaggaa taaaatcgat taacaaccaa tcattcaaaa 60
agat 64

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 7
tcgagttaat acttgataaa gtagttaat 29

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 8
taactacttt atcaagtatt aac 23

<210> 9
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 9
ggggcaaata agaatttgat aagtaccact taaatttaac tcccttgctt agcgatg 57

<210> 10
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 10
ttagcgatg 9

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 11
catattgggg caaataagc 19

<210> 12
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 12

cacaatgggg caaataagc

19

<210> 13

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 13

ggggcaaata caagttaatt cgcggccgcc ccctctcttc tttctacaga aaatg

55

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 14

gcggccgcta aatttaactc ccttgcttag cgatg

35

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 15

cacaatgggg caaaataagc ttagcggccg c

31

<210> 16

<211> 5

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 16
 taaaa 5

<210> 17
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 17
 taaagacgcg tt 12

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 18
 agttagtaaa aataaagacg cggt 24

<210> 19
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 19
 ttatgtcgcgac tggggcaaat gcaaacatg 29

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 20
 Arg Ala Arg Val Asn Thr
 1 5

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 21
agagctcgag tcaacacata gca 23

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 22
tataaagtag ttaattaaaa atag 24

<210> 23
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 人呼吸道合胞病毒 (Artificial Respiratory Syncytial Virus)

<400> 23
agagctcgag ttaatacttg ataaagtagt taattaaaaa tag 43

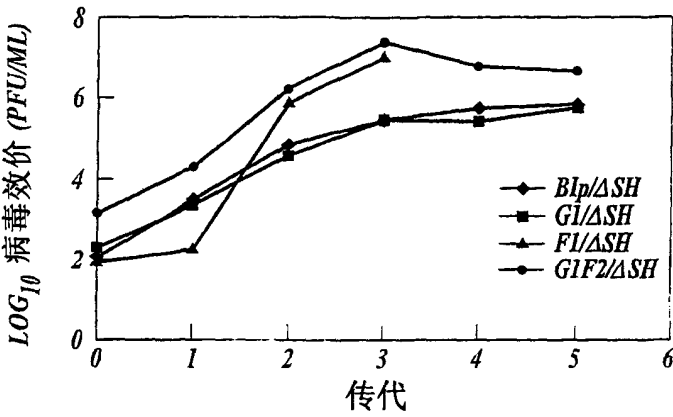


图2

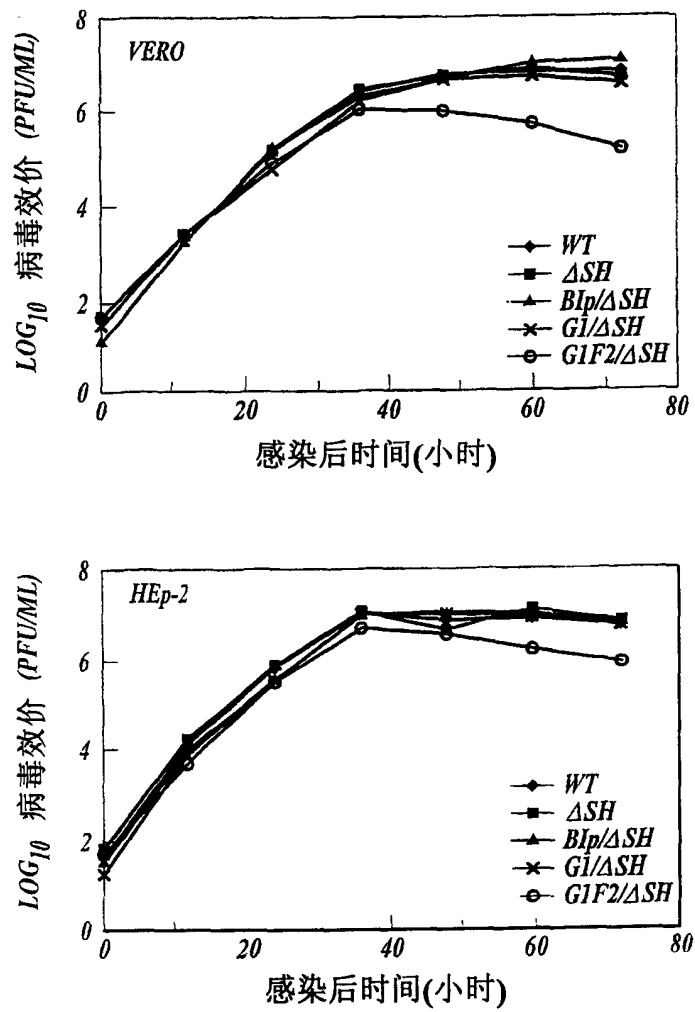


图3A

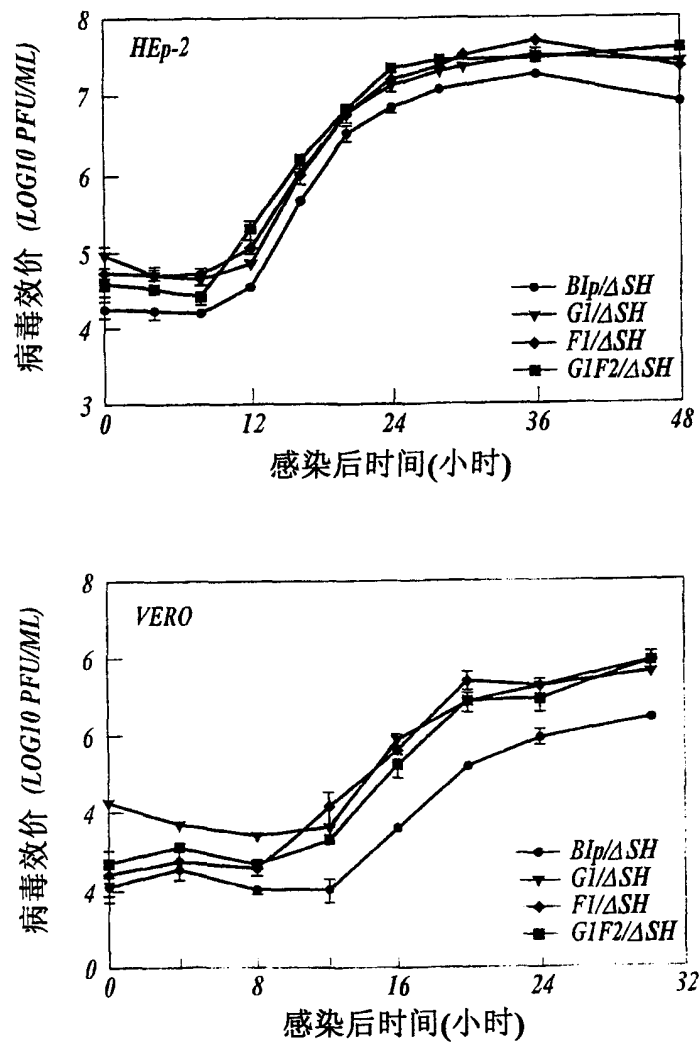


图3B

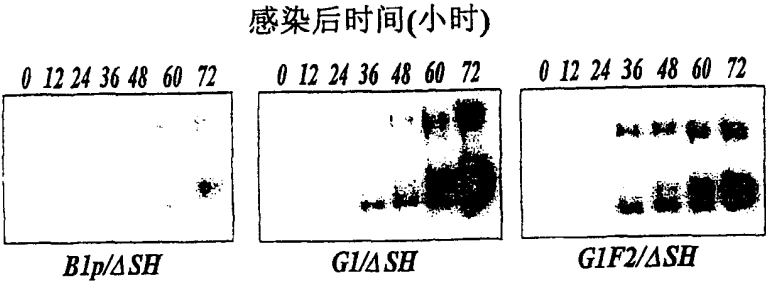


图4

五
五

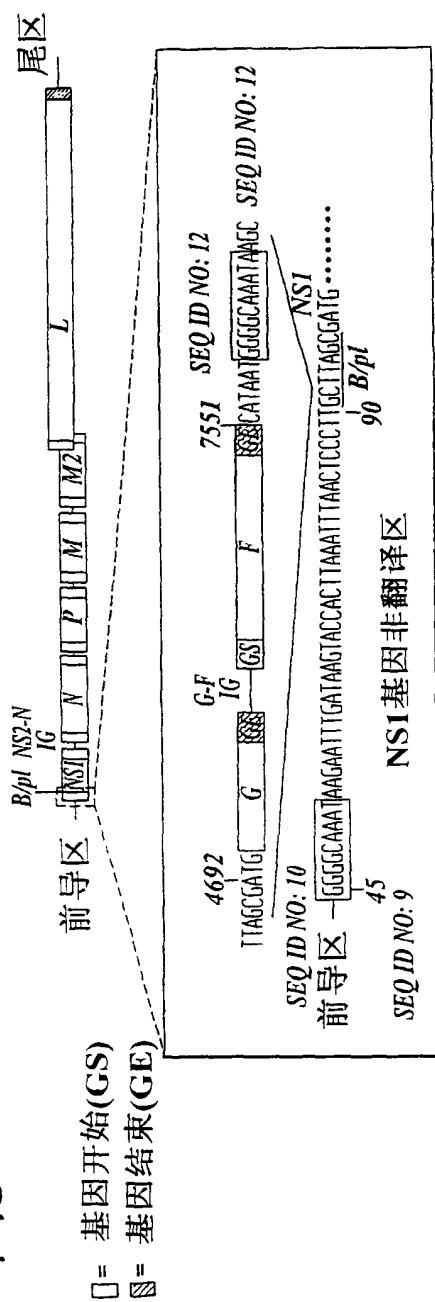
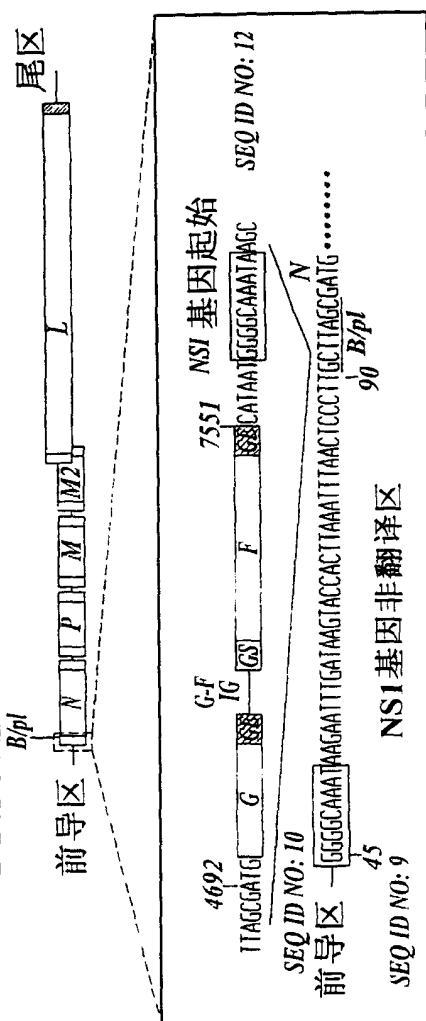
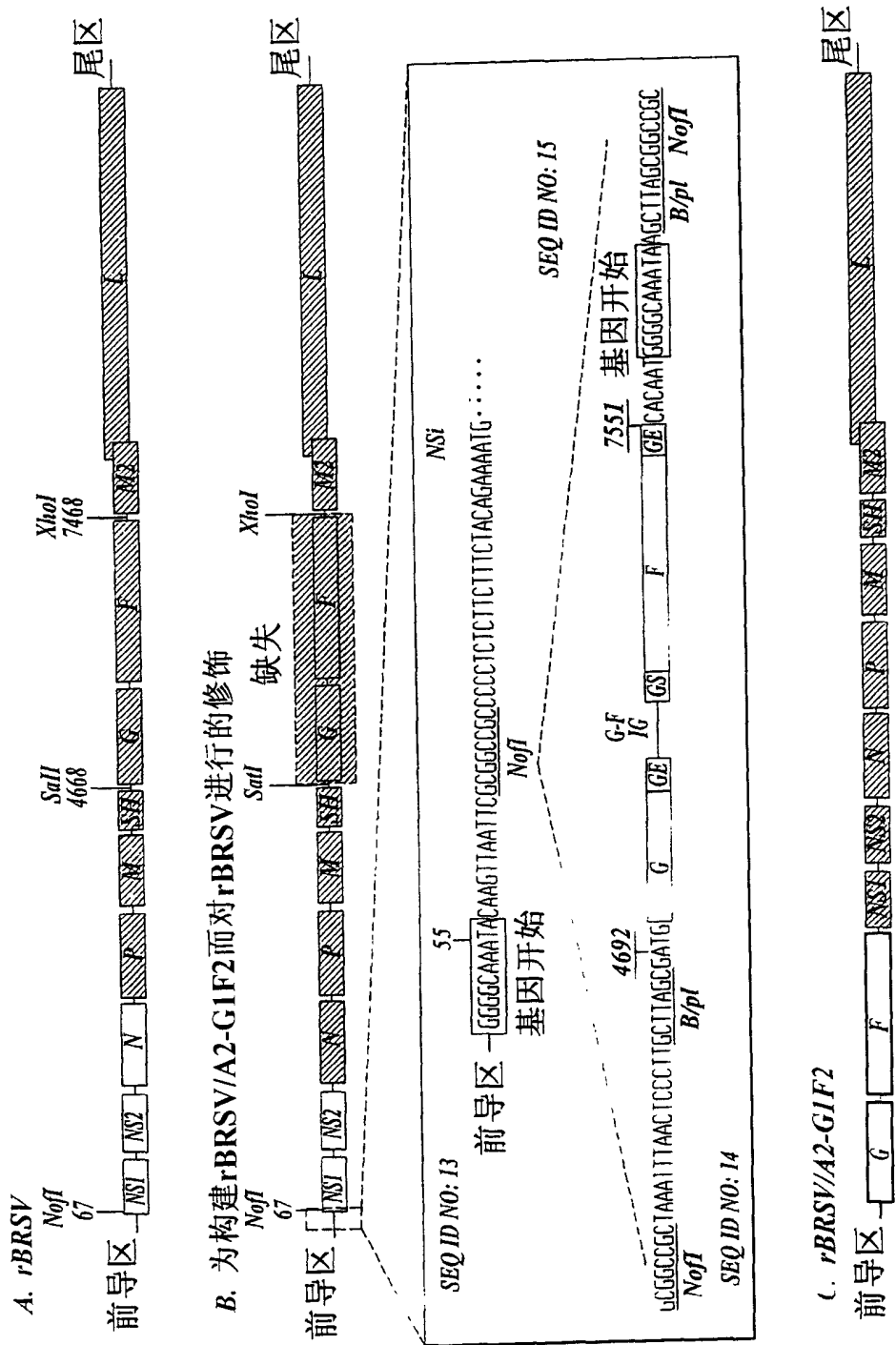
A组:RSV基因组 G1F2/ Δ NS2B组:RSV基因组 G1F2/ Δ NS1 Δ NS2

图6



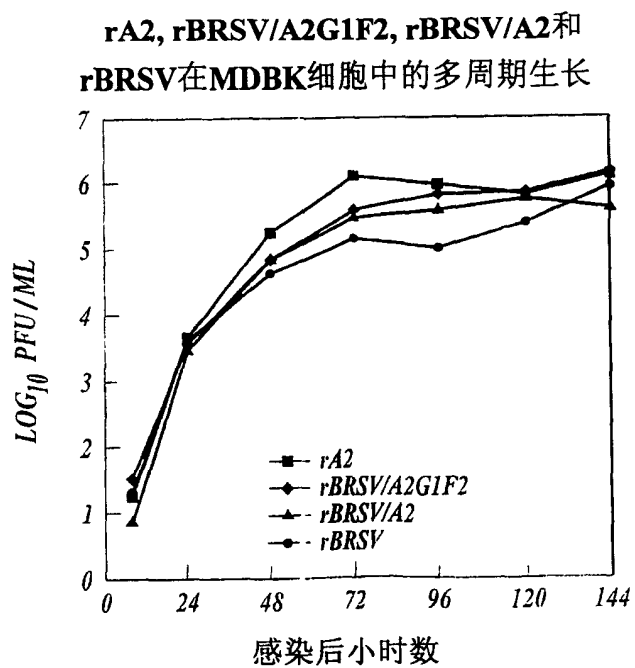
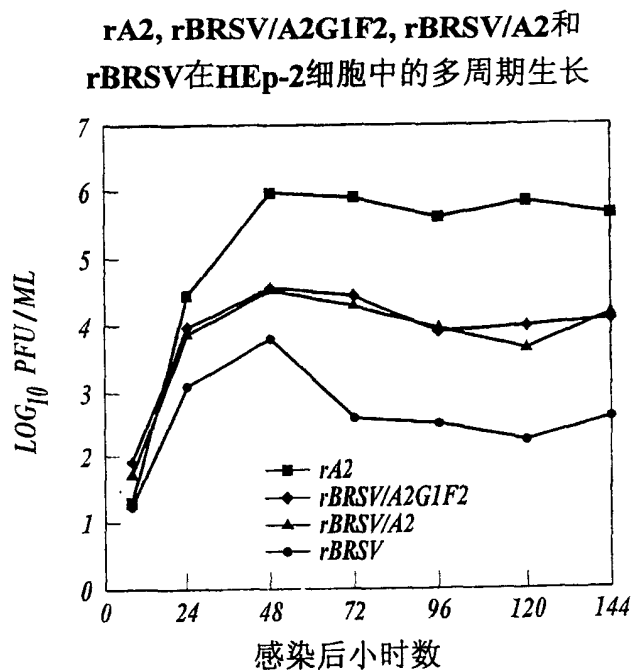


图7

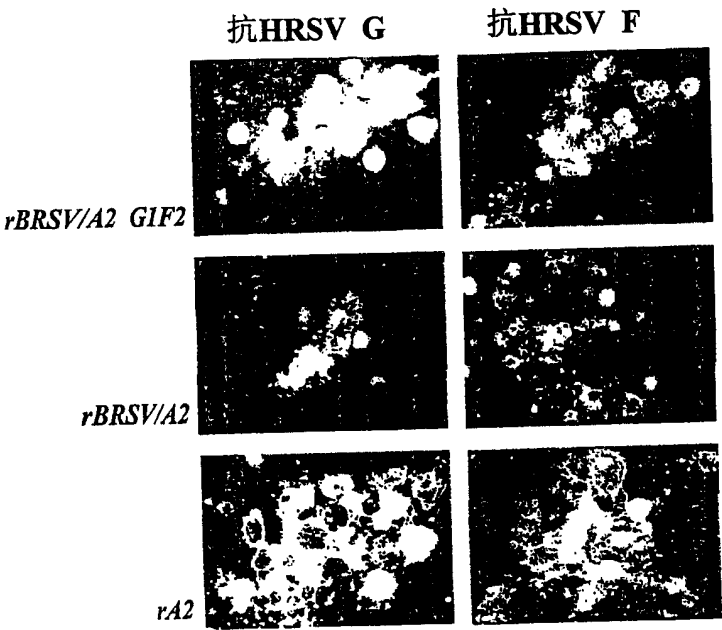
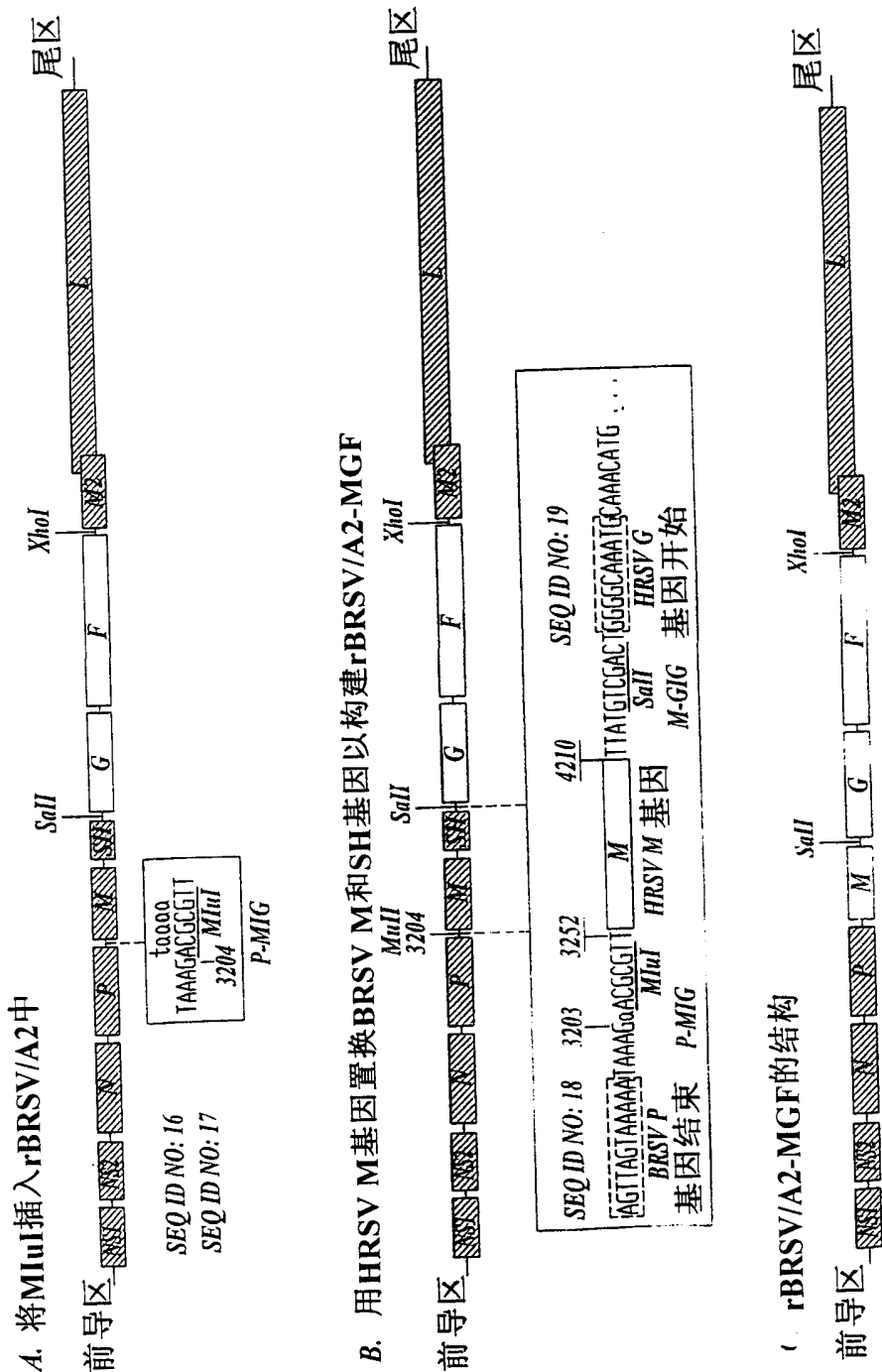


图8

图9



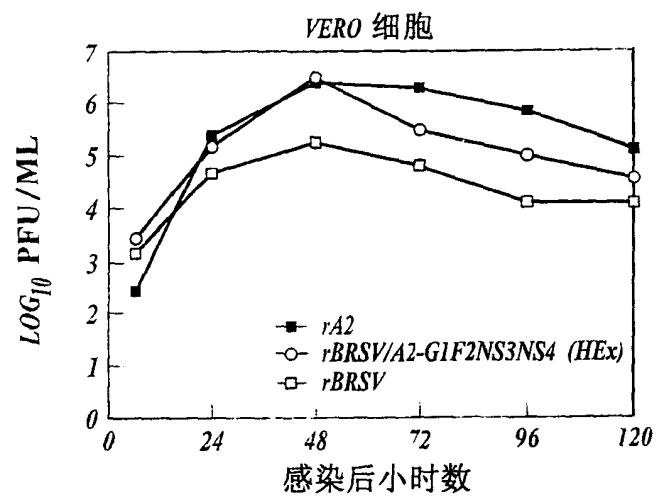
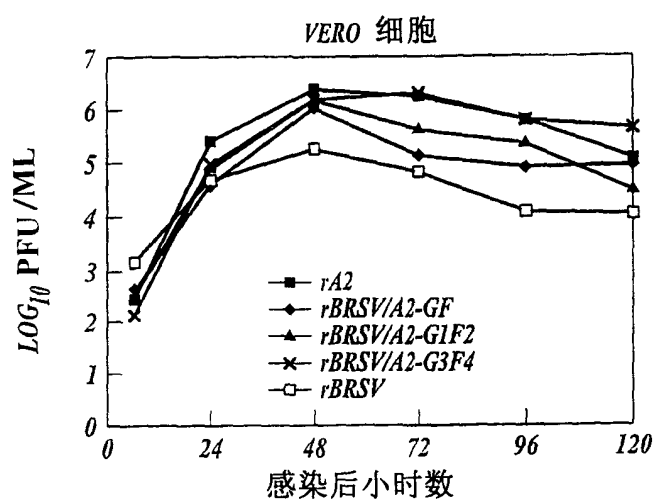


图11

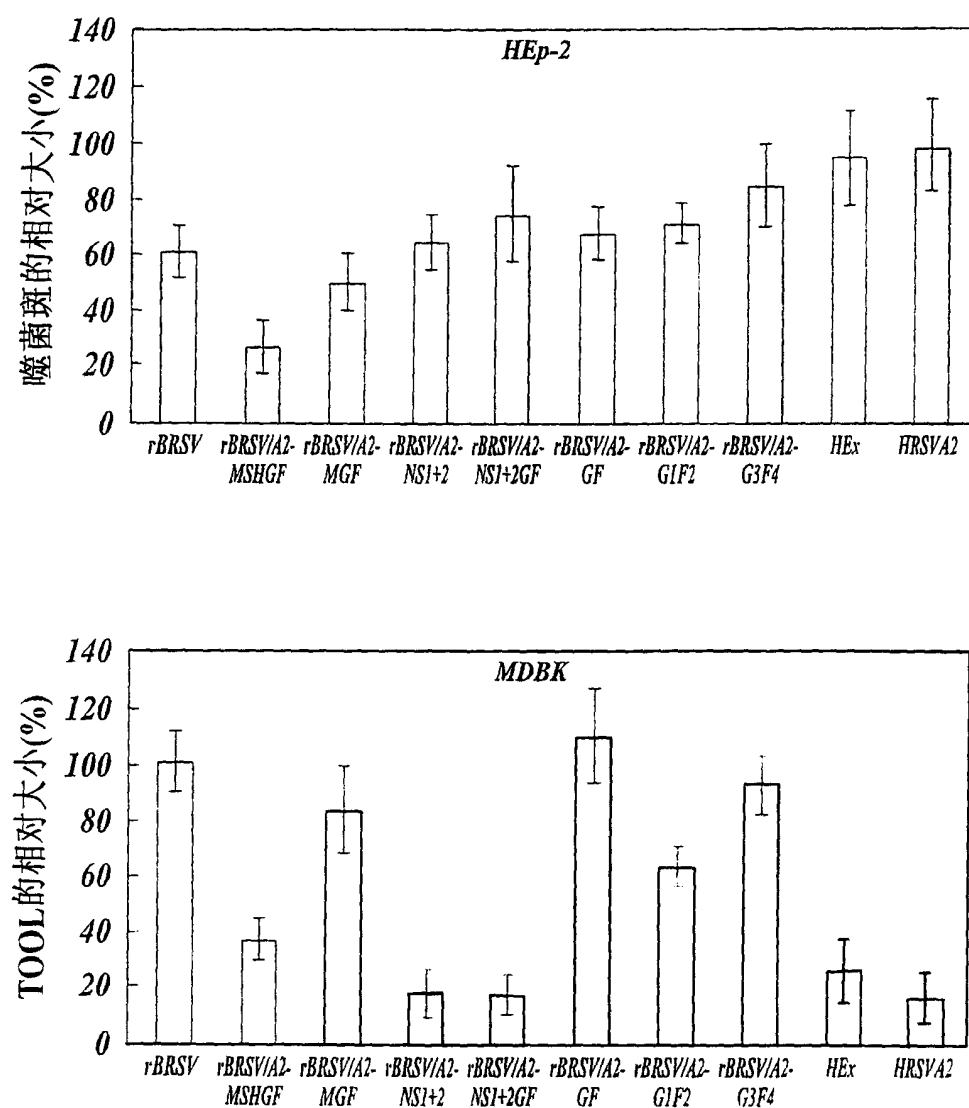


图12

图13A

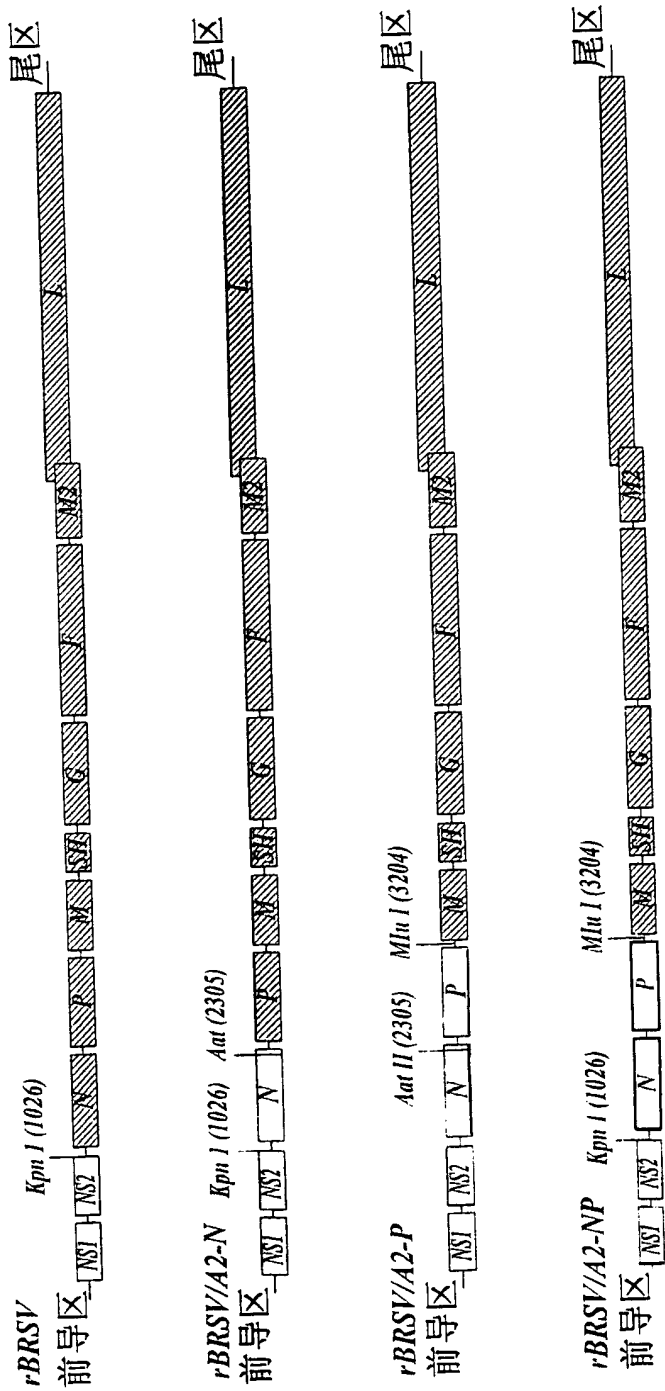


图13B

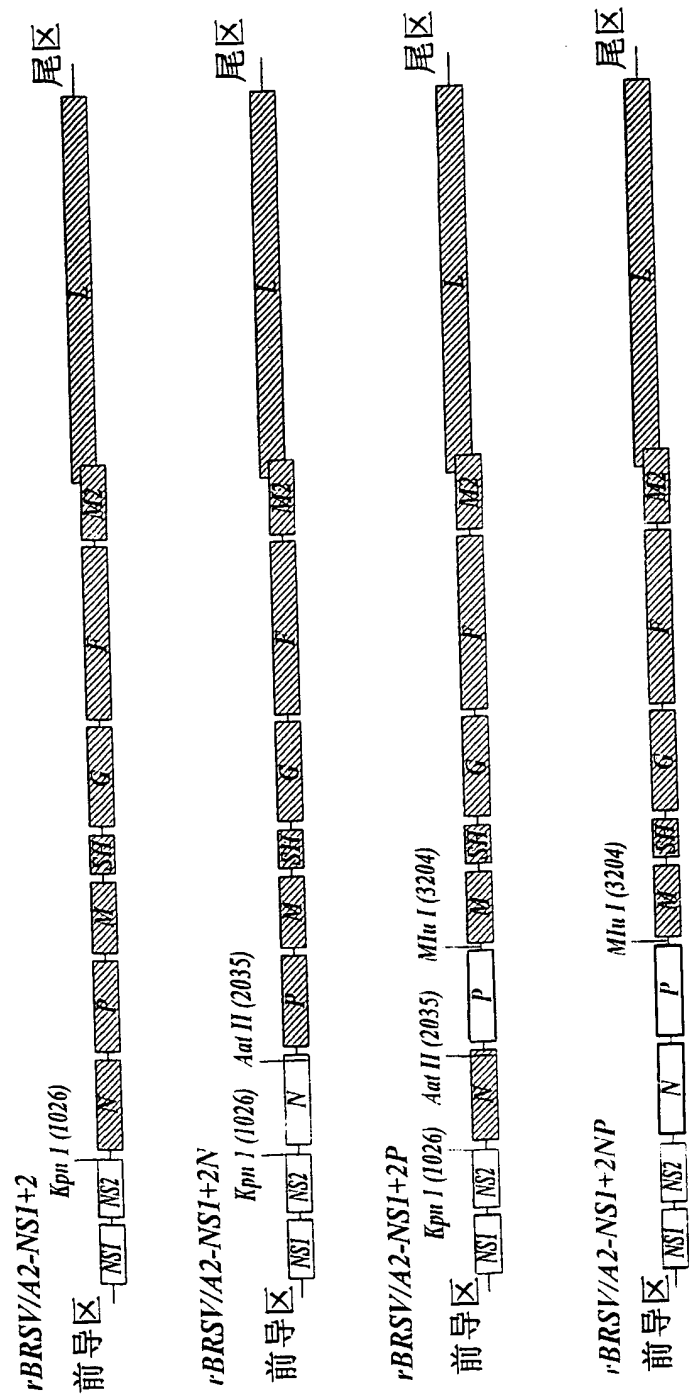
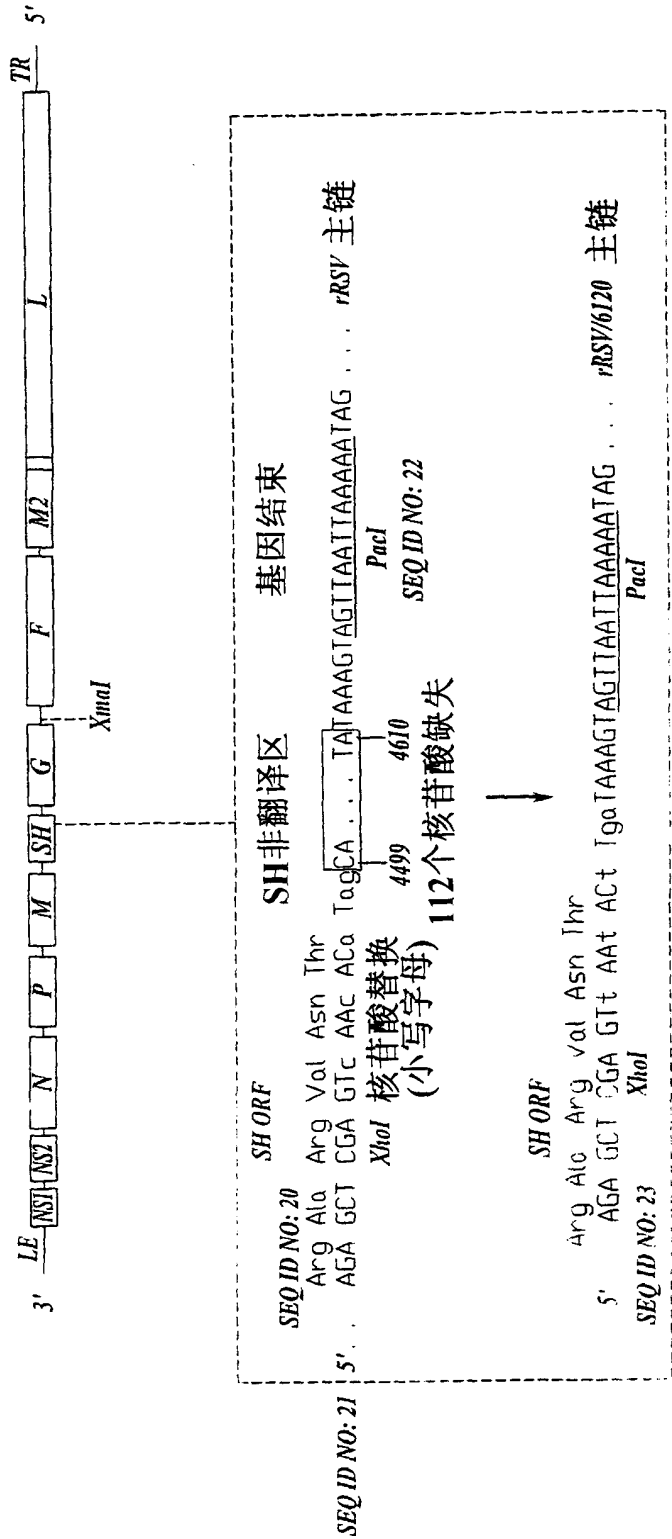


图14



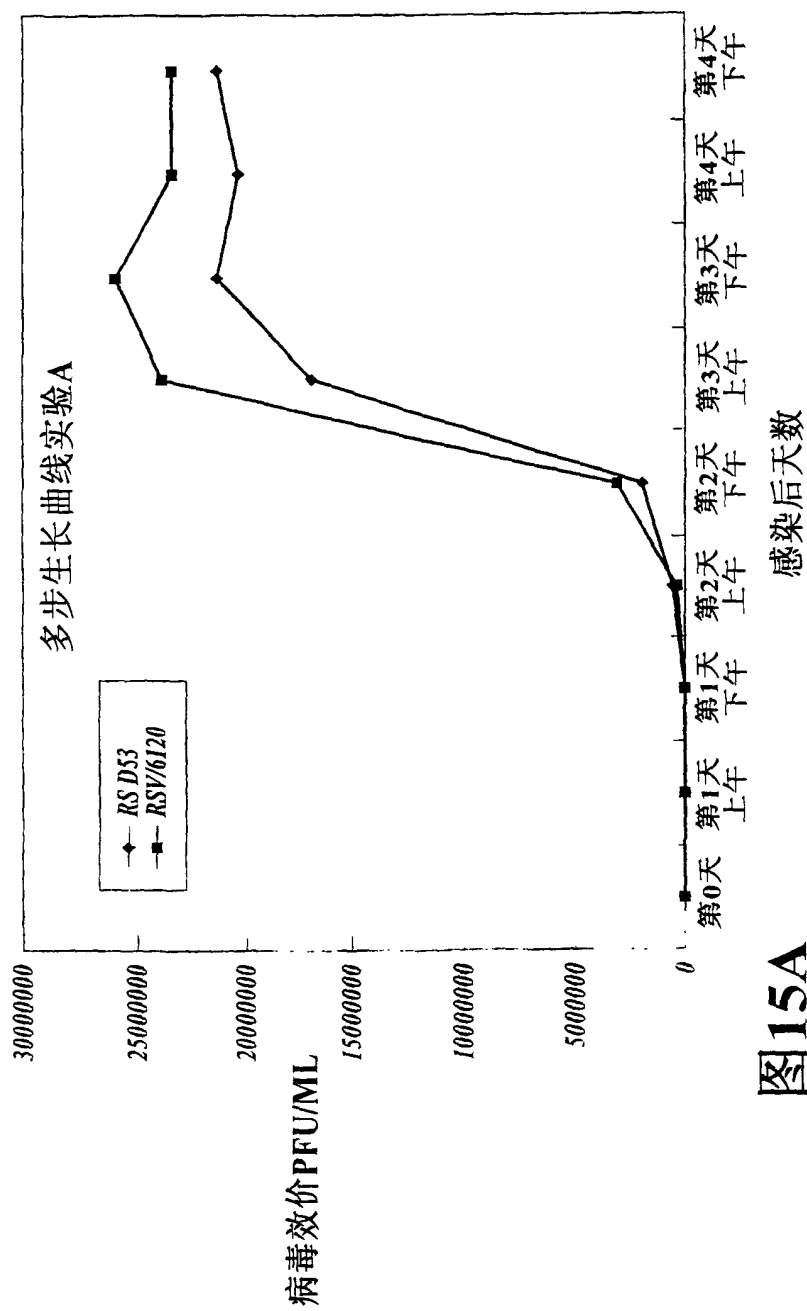


图15A

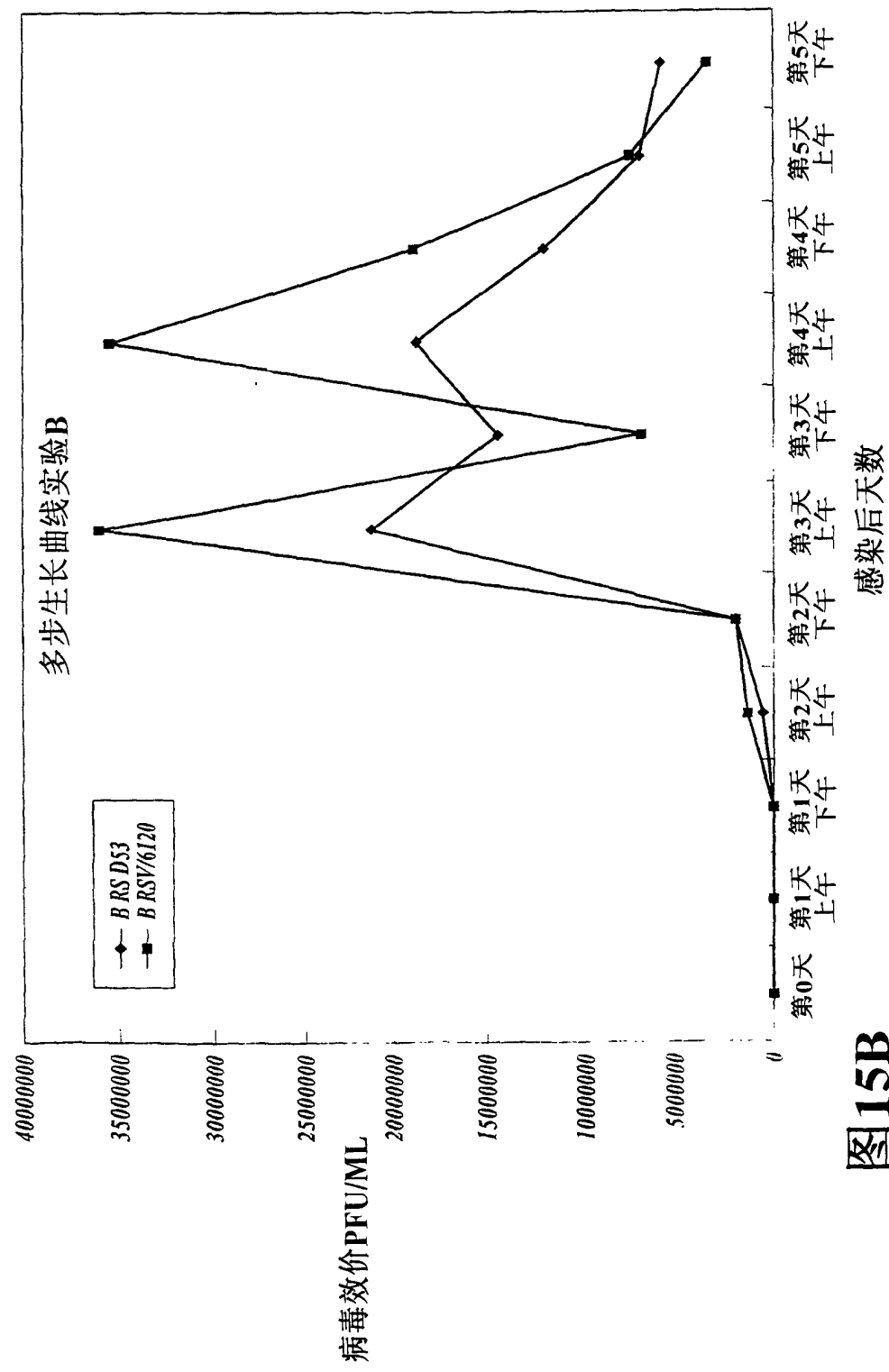


图15B

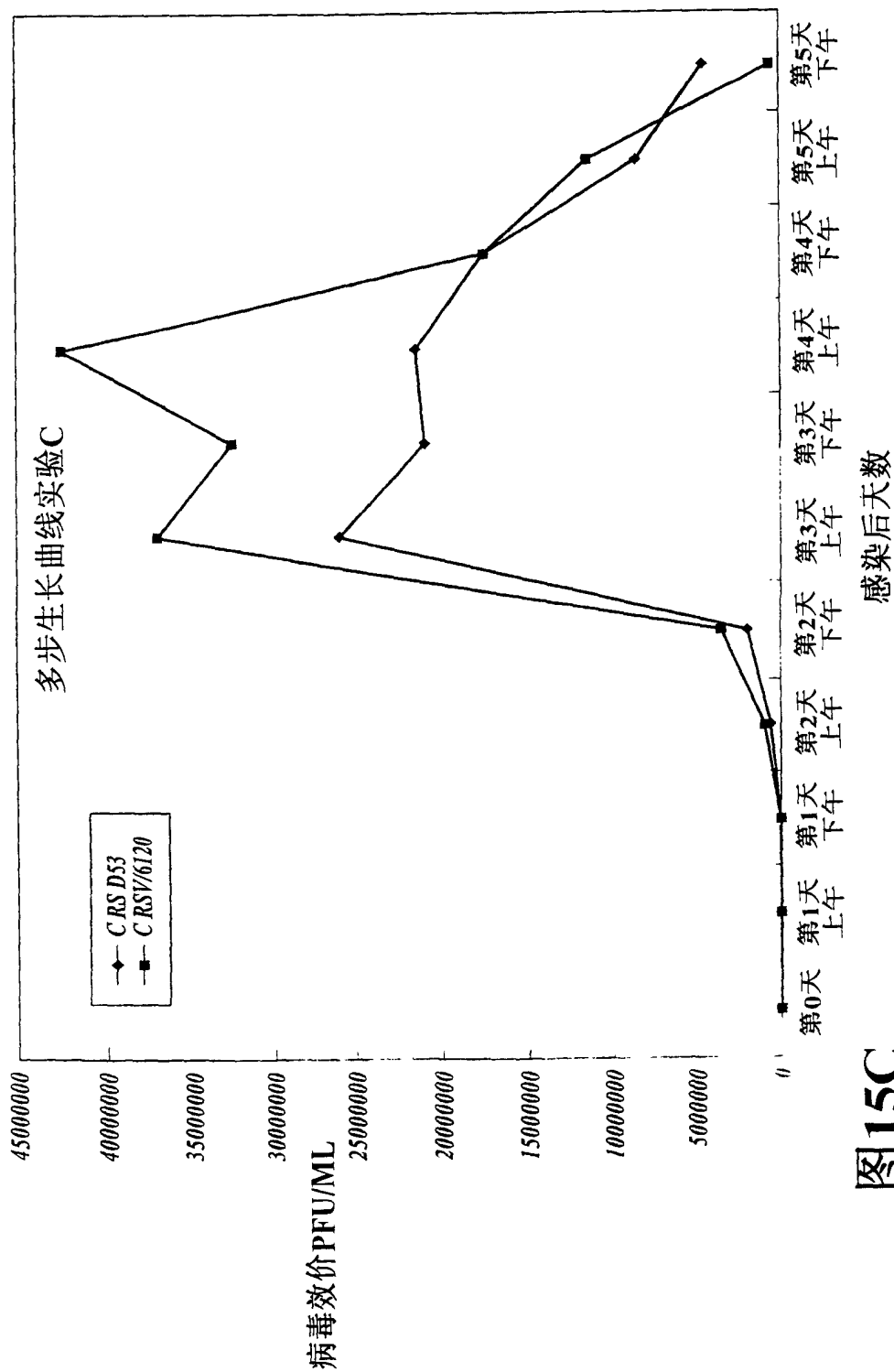


图15C