

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480022014.8

[43] 公开日 2006 年 9 月 6 日

[11] 公开号 CN 1829799A

[22] 申请日 2004.5.27

[21] 申请号 200480022014.8

[30] 优先权

[32] 2003.5.28 [33] US [31] 60/473,797

[86] 国际申请 PCT/US2004/016649 2004.5.27

[87] 国际公布 WO2005/028658 英 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.27

[71] 申请人 威斯康星旧生研究基金会

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 河冈义裕 S·哈姆 H·埃比哈拉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 周慧敏 王景朝

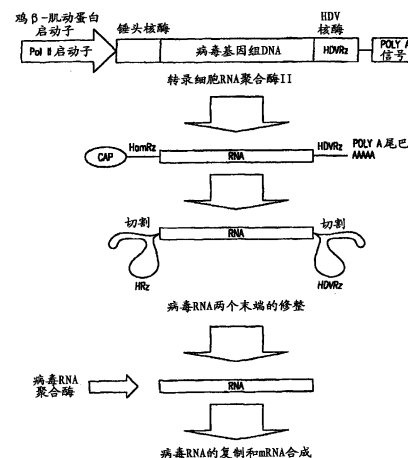
权利要求书 6 页 说明书 42 页 序列表 11 页
附图 17 页

[54] 发明名称

含 POLII 启动子和核酶的重组流感载体

[57] 摘要

本发明提供了一种使用包括 PolIII 启动子和多个核酶序列的载体用于制备流感病毒的组合物，例如在缺少辅助病毒时。



1. 一种包含多个正粘病毒载体的组合物, 包含

a) 选自包含与连接转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 M cDNA 可操作连接的启动子的载体、或包含与连接转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 可操作连接的启动子的载体的至少两个载体; 其中至少一个载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子, 该启动子连接第一个核酶序列, 该第一个核酶序列连接病毒 cDNA, 该病毒 cDNA 连接第二个核酶序列, 该第二个核酶序列连接转录终止序列; 和

b) 选自包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、或包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体和任选地, 选自包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 NA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M1 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体或包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体的至少两个载体。

2. 一种包含多个正粘病毒载体的组合物, 包含

a) 选自包含与连接转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NB 和 NA cDNA 可操作连接的启动子的载体、或包含

与连接转录终止序列的流感病毒 M cDNA 可操作连接的启动子的载体、或包含与连接转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 可操作连接的启动子的载体的至少两个载体；其中至少一个载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子，该启动子连接第一个核酶序列，该第一个核酶序列连接病毒 cDNA，该病毒 cDNA 连接第二个核酶序列，该第二个核酶序列连接转录终止序列；和

b) 选自包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、或包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体和任选地，选自包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 NA 和 NB 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体或包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体的至少两个载体。

3. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中所述 HA 是甲型 HA。

4. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中所述 HA 是乙型 HA。

5. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中 a) 的多个载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子。

6. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中 a) 的所有载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子。

7. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中 a) 的每个载体在分开的质粒上。

8. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中 b) 的每个载体在分开的质粒上。

9. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中 a) 的一个或多个载体，但不是所有载体的启动子是 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子或 T3 启动子。

10. 权利要求 9 的组合物，其中所述 RNA 聚合酶 I 启动子是人 RNA 聚合酶 I 启动子。

11. 权利要求 9 的组合物，其中不包含 RNA 聚合酶 II 启动子的一个或多个载体的转录终止序列是 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 III 转录终止序列或核酶。

12. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中 b) 的每个载体进一步包含 RNA

转录终止序列。

13. 权利要求 1 至 12 任一项的组合物, 进一步包括包含启动子的载体, 该启动子与 5'正粘病毒序列连接, 5'正粘病毒序列包含与感兴趣的 cDNA 连接的 5'正粘病毒非编码序列, 该 cDNA 连接 3'正粘病毒序列, 该 3'正粘病毒序列包含与转录终止序列连接的 3'正粘病毒非编码序列。

14. 权利要求 13 的组合物, 其中所述感兴趣的 cDNA 是正义方向。

15. 权利要求 13 的组合物, 其中所述感兴趣的 cDNA 是反义方向。

16. 权利要求 1 至 12 任一项的组合物, 进一步包括包含 RNA 聚合酶 II 启动子的载体, 该启动子连接第一个核酶序列, 该第一个核酶序列连接 5'正粘病毒序列, 该 5'正粘病毒序列包含与感兴趣 cDNA 连接的 5'正粘病毒非编码序列, 该 cDNA 连接 3'正粘病毒序列, 该 3'正粘病毒序列包含 3'正粘病毒非编码序列, 该 3'正粘病毒非编码序列连接第二个核酶序列, 该第二个核酶序列连接转录终止序列。

17. 权利要求 13 或 16 任一项的组合物, 其中所述感兴趣的 cDNA 包含编码病原体的免疫原性多肽或肽或治疗多肽或肽的开放阅读框。

18. 一种制备流感病毒的方法, 包括: 将细胞与有效产生传染性流感病毒量的权利要求 1 至 17 任一项的组合物相接触。

19. 权利要求 18 的方法, 进一步包括分离该病毒。

20. 通过权利要求 19 的方法获得的病毒。

21. 一种制备基因送递载体的方法, 包括: 将细胞与有效产生流感病毒量的权利要求 13 至 17 任一项的组合物相接触, 和分离该病毒。

22. 通过权利要求 21 的方法获得的病毒。

23. 接触权利要求 1 至 2 任一项的组合物细胞。

24. 权利要求 20 或 22 的病毒所感染的细胞。

25. 一种载体, 包含 RNA 聚合酶 II 启动子, 该启动子连接第一个核酶序列, 该第一个核酶序列连接流感病毒 cDNA, 该流感病毒 cDNA 连接第二个核酶序列, 其中该流感病毒 cDNA 是流感病毒 PA cDNA、流感病毒 PB1 cDNA、流感病毒 PB2 cDNA、流感病毒 NP cDNA、流感病毒 HA cDNA、流感病毒 NA cDNA、流感病毒 M1 cDNA、流感病毒 M2 cDNA、流感病毒 NS2 cDNA、流感病毒 BM2 cDNA 或流感病毒 NS cDNA。

26. 权利要求 25 的载体, 进一步包含与所述第二个核酶序列连接的 RNA 聚合酶 II 转录终止序列。

27. 一种制备流感病毒的方法, 包括使细胞接触包含与连接转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 M cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、和包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体, 以产生传染性病毒, 其中包含病毒 cDNA 的至少一个载体中的启动子包括 RNA 聚合酶 II 启动子, 该启动子连接第一个核酶序列, 该第一个核酶序列连接病毒 cDNA, 该病毒 cDNA 连接第二个核酶序列, 该第二个核酶序列连接转录终止序列。

28. 权利要求 27 的方法, 进一步包括包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 NA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M1 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体和包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体。

29. 一种制备流感病毒的方法, 包括使细胞接触包含与连接转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NB 和 NA

cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 M cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 NA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、和包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体，其中包含病毒 cDNA 的至少一个载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子，该启动子连接第一个核酶序列，该第一个核酶序列连接病毒 cDNA，该病毒 cDNA 连接第二个核酶序列，该第二个核酶序列连接转录终止序列。

30. 权利要求 29 的方法，进一步包括包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 NA 和 NB 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 M 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体、包含与编码流感病毒 BM2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体和包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 节段可操作连接的启动子的载体。

31. 权利要求 27 至 30 任一项的方法，进一步包括包含与 5'流感病毒序列连接的启动子的载体，该 5'流感病毒序列包含 5'流感病毒非编码序列，该非编码序列连接感兴趣的 cDNA 或其片段，该 cDNA 或其片段连接 3'流感病毒序列，该 3'流感病毒序列包含与转录终止序列连接的 3'流感病毒非编码序列。

32. 权利要求 27 至 30 任一项的方法，进一步包括包含 RNA 聚合酶 II 启动子的载体，该启动子连接第一个核酶序列，该第一个核酶序列连接 5'流感病毒序列，该 5'流感病毒序列包含与感兴趣 cDNA 或其片段连接的 5'流感病毒非编码序列，该 cDNA 或其片段连接 3'流感病毒序列，该 3'流感病毒序列包含 3'流感病毒非编码序列，该 3'流感病毒非编码序列连接第二个核酶序列，该第二个核酶序列连接转录终止序列。

33. 权利要求 31 或 32 的方法，其中所述感兴趣的 cDNA 包含编码病原体的免疫原性多肽或肽或治疗多肽或肽的开放阅读框。

34. 权利要求 27 至 33 任一项的方法，其中所述 HA 是甲型 HA。

35. 权利要求 27 至 33 任一项的方法，其中所述 HA 是乙型 HA。

36. 权利要求 27 或 29 的方法，其中 a) 的所有载体包含 RNA PolII 启动子。

37. 权利要求 27 至 33 任一项的方法，进一步包括分离该病毒。

38. 通过权利要求 27 至 37 任一项的方法获得的病毒。

39. 接触权利要求 38 的病毒的细胞。

40. 权利要求 38 的病毒所感染的细胞。

41. 一种免疫个体对抗病原体的方法，包括给该个体施用有效免疫该个体的量的权利要求 38 的病毒。

含 POLII 启动子和核酶的重组流感载体

相关申请的相互参照

本申请要求 2003 年 5 月 28 日申请的美国申请系列号 60/473,797 的申请日的根据 35 U. S. C. § 119(e)的益处,其公开内容在此引入作为参考。

政府权利的声明

本发明是在美国政府基金资助下(国立变态反应和传染病公共卫生服务学会(the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Public Health Service)基金 AI-47446)作出的。政府可以享有本发明的某些权利。

发明背景

负义 RNA 病毒分为七个家族(弹状病毒科(Rhabdoviridae)、副粘病毒科、丝状病毒科、波那病毒科(Bornaviridae)、正粘病毒科、本扬病毒科(Bunyaviridae)和沙粒病毒科(Arenaviridae)),它包括常见的人病原体,如呼吸道合胞病毒、流感病毒、麻疹病毒和埃博拉病毒,以及对家禽和家畜产业有主要经济影响的动物病毒(例如新城疫病毒和牛瘟病毒)。前四个家族的特征在于非节段基因组,而后三个分别具有包含六至八个、三个或两个负义 RNA 节段的基因组。负义 RNA 病毒(negative-sense RNA virus)的共同特征是它们 RNA 基因组的负极性;即,病毒 RNA(vRNA)与 mRNA 互补,因此其自身没有传染性。为了启动病毒转录和复制,vRNA 不得不分别通过病毒聚合酶复合体和核蛋白转录为正义 mRNA 或 cRNA;对于甲型流感病毒,病毒聚合酶复合体包括三个聚合酶蛋白 PB2、PB1 和 PA。在病毒复制过程中,cRNA 用作新 vRNA 分子合成的模板。对于所有负链 RNA 病毒,vRNA 和 cRNA 的 5'和 3'末端非编码区对病毒基因组的转录和复制是关键。与细胞或病毒 mRNA 转录物不同,cRNA 和 vRNA 两者既不在 5'末端加帽,也不在 3'末端聚腺苷酸化。

许多病毒蛋白的基本功能已在生物化学上和/或在病毒感染方面被

阐明。然而，反向遗传学系统显著地增长了我们对于负链节段和非节段 RNA 病毒关于它们的病毒复制和致病性，以及活减毒病毒疫苗发展的认识。反向遗传学，该术语用于分子病毒学时，定义为具有来源于克隆 cDNAs 的基因组的病毒的产生(对于综述，见 Neumann et al., 2002)。

为了启动负链 RNA 病毒的病毒复制，vRNA(s)或 cRNA(s)必须与聚合酶复合体和核蛋白共表达。狂犬病病毒是完全从克隆 cDNA 产生的第一个非节段负义 RNA 病毒：Schnell et al.(1994)通过编码全长 cRNA 的 cDNA 构建体和都处于 T7 RNA 聚合酶启动子控制下的 L、P 和 N 蛋白的蛋白表达构建体的共转染产生了重组狂犬病病毒。用提供 T7 RNA 聚合酶的重组牛痘病毒感染导致传染性狂犬病病毒的产生。在这个 T7 聚合酶系统中，在 T7 RNA 聚合酶控制之下的全长 cRNA 的初级转录产生非加帽 cRNA 转录物。然而，形成 T7 RNA 聚合酶的最佳起始序列的三个胍核苷酸(guanidine nucleotides)附于 5'末端。为了产生对生产性感染循环必不可少的 cRNA 转录物正确的 3'末端，cRNA 转录物 3'末端的精确自身催化切割使用肝炎 6 核酶(HDVRz)序列。

自从 Schnell et al.(1994)首次报道以来，使用类似技术的反向遗传学系统引发许多非节段负链 RNA 病毒的产生(Conzelmann, 1996; Conzelmann, 1998; Conzelmann et al., 1996; Marriott et al., 1999; Munoz et al., 2000; Nagai, 1999; Neumann et al., 2002; Roberts et al., 1998; Rose, 1996)。最初的援救(rescue)方法包括从稳定转染的细胞系(Radecke et al., 1996) 或从蛋白表达质粒(Lawson et al., 1995)表达 T7 RNA 聚合酶，或热休克方法以增加援救效率(Parks et al., 1999)。基于 T7 聚合酶系统，Bridgen 和 Elliott(1996)从克隆 cDNAs 产生了布尼奥罗病毒(本扬病毒科家族)并证明了通过 T7 聚合酶系统人工产生节段负义 RNA 病毒的可行性。

1999 年，以细胞 RNA 聚合酶 I 为基础产生了基于质粒的反向遗传学技术用于完全从克隆 cDNAs 产生节段甲型流感病毒而(Fodor et al., 1999; Neumann and Kawaoka, 1999)。RNA 聚合酶 I-一种核仁酶，合成核糖体 RNA，核糖体 RNA 如同流感病毒 RNA，不含有 5'帽或 3' polyA 结构。含有侧翼连接 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子序列的流感病毒 cDNA 的构建体的 RNA 聚合酶 I 转录导致流感 vRNA 合成(Fodor et al., 1999; Neumann and Kawaoka, 1999; Neumann and Kawaoka,

2001; Pekosz et al., 1999)。该系统效率很高, 转染后 48 小时, 每毫升质粒转染的细胞上清液产生 10^8 个以上传染性病毒颗粒。然而, RNA 聚合酶 I 的宿主细胞特异性限制了 RNA 聚合酶 I 系统的应用。例如, 人 RNA 聚合酶 I 启动子的启动子序列不被异源 RNA 聚合酶 I 识别, 例如鼠 RNA 聚合酶 I (Grummt et al., 1982; Learned et al., 1982)。

因此, 需要的是完全从克隆 cDNAs 制备节段、负链 RNA 病毒的改进方法, 例如正粘病毒如甲型流感病毒。

发明概述

本发明提供了至少一个下列分离的和/或纯化的载体: 包含与连接转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 M cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NA 和 NB cDNA 可操作连接的启动子的载体, 或包含与连接转录终止序列的流感病毒 BM2 cDNA 可操作连接的启动子的载体, 其中该载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子, 该启动子连接第一个(5')核酶序列, 该序列连接病毒 cDNA, 该病毒 cDNA 连接第二个(3')核酶序列, 该第二个核酶序列连接转录终止序列。本发明范围内的核酶包括但不限于四膜虫核酶、RNase P、锤头核酶、发夹核酶、肝炎核酶, 以及合成的核酶(对于示范核酶见 Kumar et al.(1995); Pley et al.(1994); Chowrira et al.(1994); Kijima et al.(1995); 和 U. S. Patent Nos. 5,631, 115 and 5,683, 902)。包含 RNA 聚合酶 II 启动子的载体中的核酶序列可以相同或不同, 并且, 当使用多个包含 RNA 聚合酶 II 启动子的载体时, 每个载体可以包含相对于任何其它载体相同或不同的核酶序列。类似地, 一个载体中的 RNA 聚合酶 II 启动子可以相同或不同于不同载体中的 RNA 聚合酶 II 启动子。cDNA 相对于启动子可以是正义

或反义方向。因此，本发明的载体可以编码正粘病毒蛋白(正义)或vRNA(反义)。可以使用任何合适的启动子或转录终止序列表达蛋白，例如病毒蛋白、非病毒病原体蛋白或治疗蛋白。

在一个实施方案中，用于制备vRNA的一个或多个载体包含RNA聚合酶II启动子。在另一个实施方案中，用于制备vRNA的一个或多个但不是所有载体包含不同于RNA聚合酶II启动子的启动子，启动子包括但不限于RNA聚合酶I启动子，例如人RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子或T3启动子。如果存在，优选包含RNA聚合酶II启动子的vRNA载体中的转录终止序列是RNA聚合酶II转录终止序列，其位于3'核酶序列的3'。不包含RNA聚合酶II启动子的vRNA载体的优选转录终止序列包括但不限于RNA聚合酶I转录终止序列、RNA聚合酶III转录终止序列或核酶。尽管可预想任何病毒的基因都可以用在本发明的载体或方法中，但是优选，载体包含流感cDNA，例如甲型(例如任何甲型流感基因，包括任何15HA或9NA亚型)、乙型或丙型流感DNA(见Fields *Virology* 的45和46章(Fields et al.(eds.), Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, PA(1996), 在此特别引入作为参考)。

本发明提供了一种包含本发明的多个正粘病毒载体的组合物。在本发明的一个实施方案中，该组合物包含：a)选自包含与连接转录终止序列的流感病毒PA cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒PB1 cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒PB2 cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒HA cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒NP cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒NA cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒M cDNA可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒NS cDNA可操作连接的启动子的载体的至少两个载体，其中至少一个载体包含RNA聚合酶II启动子，其连接第一个核酶序列的5'，第一个核酶序列连接对应于病毒编码序列的序列的5'，该序列连接第二个核酶序列的5'，第二个核酶序列连接转录终止序列的5'；和b)选自编码流感病毒PA的载体、编码流感病毒PB1的载体、编码流感病毒PB2的载

体和编码流感病毒 NP 的载体的至少两个载体。任选，b)的载体包括编码 NP、NS、M 的一个或多个载体，例如 M1 和 M2、HA 或 NA。

在本发明的另一个实施方案中，该组合物包含：a)选自包含与连接转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NA 和 NB cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 M cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 可操作连接的启动子的载体、包含与连接转录终止序列的流感病毒 BM2 cDNA 可操作连接的启动子的载体的至少两个载体，其中至少一个载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子，其连接第一个核酶序列的 5'，第一个核酶序列连接对应于包括病毒编码序列的病毒序列的序列的 5'，该序列连接第二个核酶序列的 5'，第二个核酶序列连接转录终止序列的 5'；和 b)选自编码流感病毒 PA 的载体、编码流感病毒 PB1 的载体、编码流感病毒 PB2 的载体和编码流感病毒 NP 的载体的至少两个载体。任选，b)的载体包括编码 NP、NS、M、HA 或 NA 的一个或多个载体。

优选，编码病毒蛋白的载体进一步包含转录终止序列。优选包含流感病毒 cDNA 的载体的启动子包括 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子，然而，vRNA 的至少一个载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子。包含 RNA 聚合酶 II 启动子的 vRNA 载体包含侧翼连接核酶序列的病毒编码序列，和任选 RNA 聚合酶 II 转录终止序列，其连接 3'核酶序列的 3'。在一个实施方案中，一个或多个但不是所有用于制备 vRNA 的载体包括转录终止序列，例如 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列、RNA 聚合酶 III 转录终止序列或核酶。在一个实施方案中，至少 2 个和优选更多，例如 3、4、5、6、7 或 8 个用于制备 vRNA 的载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子、第一个核酶序列、其连接对应于包括病毒编码序列的病毒序列的序列的 5'，该序列连接第二个核酶序列的 5'，

该第二个核酶序列连接转录终止序列的 5'。每个 vRNA 载体中的 RNA 聚合酶 II 启动子可以相同或不同于任何其它 vRNA 载体中的 RNA 聚合酶 II 启动子。类似地，每个 vRNA 载体中的每个核酶序列可以相同或不同于任何其它 vRNA 载体中的核酶序列。在一个实施方案中，单个载体中的核酶序列不相同。优选，载体包含流感 DNA，例如甲型、乙型或丙型流感 DNA。

本发明的另一个实施方案包括进一步包含载体的如上所述的本发明组合物，该载体包含与 5'正粘病毒序列连接的启动子，其任选包括 5'正粘病毒编码序列或其部分，其连接期望的核酸序列，例如期望的 cDNA，其与 3'正粘病毒序列连接，任选包括 3'正粘病毒编码序列或其部分，其连接转录终止序列。优选，期望的核酸序列如 cDNA 是反义方向。这种组合物导入允许正粘病毒复制的宿主细胞产生包含对应于载体序列的 vRNA 的重组病毒，该载体包含 5'正粘病毒序列，任选包含 5'正粘病毒编码序列或其部分，其连接 cDNA，其连接 3'正粘病毒序列，任选包含 3'正粘病毒编码序列或其部分。这种用于制备 vRNA 的载体中的启动子可以是 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子，和任选该载体包含转录终止序列，如 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列、RNA 聚合酶 III 转录终止序列或核酶。在一个实施方案中，包含期望 cDNA(感兴趣的 cDNA)的载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子，其连接第一个核酶序列，其连接感兴趣的 cDNA，其连接第二个核酶序列，其连接转录终止序列。在另一个实施方案中，该载体包含 RNA 聚合酶 II 启动子，其连接第一个核酶序列，其连接 5'正粘病毒序列，任选包括 5'正粘病毒编码序列或其部分，其连接感兴趣的 cDNA，其连接 3'正粘病毒序列，任选包括 3'正粘病毒编码序列或其部分，其连接第二个核酶序列，其连接转录终止序列。在另一个实施方案中，感兴趣的 cDNA 可以存在于用于蛋白表达的载体中。感兴趣的 cDNA，无论在用于制备 vRNA 还是蛋白的载体中，都可以编码免疫原性表位，如对癌症治疗或疫苗或基因治疗有用的表位。

本发明的多个载体可以物理连接或每个载体可以存在于单独的质粒或其它例如线性核酸递送载体(delivery vehicle)中。

本发明也提供了制备流感病毒的方法。该方法包括使细胞接触有

效产生传染性流感病毒量的本发明的多个载体，例如依次或同时，例如使用本发明的组合物。本发明也包括从接触该组合物的细胞中分离病毒。因此，本发明进一步提供了分离的病毒，以及接触本发明的组合物或病毒的宿主细胞。在另一个实施方案中，本发明包括在接触用于制备 vRNA 或蛋白的载体的其它载体之前，使细胞接触一个或多个用于制备 vRNA 或蛋白的载体。

如下文所述，完全从克隆的 cDNAs 制备甲型流感病毒。此外，对于其它病毒可以使用相同方法完全从克隆的 cDNA 制备非节段负链 RNA 病毒(即副粘病毒科、弹状病毒科和丝状病毒科)，或其它节段负链 RNA 病毒，例如沙粒病毒科和本扬病毒科。

本发明的方法允许流感病毒的容易操作，例如减毒突变导入病毒基因组。此外，因为流感病毒诱导强烈的体液和细胞免疫，所以本发明大大提高了这些病毒作为疫苗载体，尤其是考虑到病毒天然变异体的可得性，它们可以顺序使用，允许基因治疗重复使用。

因此，本发明提供了分离和纯化的载体或质粒，它表达或编码流感病毒蛋白，或表达或编码流感 vRNA-天然和重组 vRNA。因此，本发明的载体或质粒可以包含感兴趣的基因或开放阅读框，例如，编码用作疫苗的免疫原性肽或蛋白的外源基因。优选，表达流感 vRNA 的载体或质粒包含适于在特定宿主细胞中表达的启动子，例如鸟类或哺乳动物宿主细胞，如犬科动物、猫科动物、马、牛、绵羊或灵长类动物细胞，包括人细胞，或优选适于在一个以上宿主中表达的启动子。也优选，包含对制备流感 vRNA 有用的 DNA 的一个或多个载体或质粒包含 RNA 聚合酶 II 转录终止序列。对于包含感兴趣的基因或开放阅读框的载体或质粒，优选该基因或开放阅读框侧翼连接 5'和 3'流感病毒序列，分别包括流感病毒的 5'和 3'非编码序列，和在一个实施方案中，侧翼连接 5'和 3'流感病毒序列的基因或开放阅读框可操作连接 RNA 聚合酶 II 启动子和 RNA 聚合酶 II 转录终止序列。当制备病毒时，包含基因或开放阅读框的载体或质粒可以代替流感病毒基因的载体或质粒或可以是除所有流感病毒基因的载体或质粒之外的载体或质粒。

在此描述的不需要辅助病毒感染来制备病毒的方法在病毒诱变研究和疫苗(例如对于 AIDS、流感、乙型肝炎、丙型肝炎、鼻病毒、丝状病毒、疟疾、疱疹和口蹄疫)和基因治疗载体(例如对于癌症、AIDS、

腺苷脱氨酶、肌营养不良、鸟氨酸转氨甲酰酶缺陷和中枢神经系统肿瘤)的制备中 useful。因此,提供了医学治疗(例如疫苗或基因治疗)中使用的病毒。

本发明也提供了一种免疫个体抵抗病原体的方法,例如,细菌、病毒或寄生虫或恶性肿瘤。该方法包括给该个体施用有效免疫该个体的量的至少一种本发明分离的病毒,任选与佐剂结合。该病毒包括包含病原体编码的多肽或肿瘤特异性多肽的 vRNA。

也提供了一种提高或增加哺乳动物中内源性蛋白表达的方法,该哺乳动物具有以内源性蛋白量降低或缺乏为特征的指征或疾病。该方法包括给该哺乳动物施用有效提高或增加该哺乳动物中内源性蛋白的量的本发明分离的病毒。优选,该哺乳动物是人。

附图简述

图 1. 建立的反向遗传学系统的示意图。在 RNP 转染方法(A)中,使用体外合成 vRNA 将纯化的 NP 和聚合酶蛋白装配入 RNPs。用 RNPs 转染细胞,随后是辅助病毒感染。在 RNA 聚合酶 I 方法(B)中,含有 RNA 聚合酶 I 启动子的质粒,编码待援救 vRNA 的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子的质粒转染细胞。由 RNA 聚合酶 I 进行的细胞内转录产生合成的 vRNA,在辅助病毒感染后它被包装入子代病毒颗粒。在两个方法中,转染体病毒(即含有来源于克隆 cDNA 的 RNA 的病毒)选自辅助病毒群。

图 2. 产生 RNA 聚合酶 I 构建体的示意图。PCR 扩增来源于流感病毒的 cDNAs,用 BsmBI 消化并克隆入 pHH21 载体的 BsmBI 位点(E. Hoffmann, Ph. D. thesis, Justus, Liebig-University, Giessen, Germany),该载体含有人 RNA 聚合酶 I 启动子(P)和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子(T)。终止子序列(*T)上游的胸苷核苷酸表示流感病毒 RNA 的 3'末端。甲型流感病毒序列以粗体字显示。(SEQ ID NOs:26-37)

图 3. 建议的产生节段负义 RNA 病毒的反向遗传学方法。含有 RNA 聚合酶 I 启动子、八个病毒 RNA 节段每一节段的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子的质粒连同蛋白表达质粒转染入细胞。尽管可以用表达 PA、PB1、PB2 和 NP 的质粒产生传染性病毒,但是所有剩余结构蛋白(括号中显示)的表达增加病毒制备效率,取决于所产生病毒。

图 4. 转染体病毒(transfectant virus)感染的细胞中 FLAG 表位的检测。抗体染色用来鉴定 PR8-WSN-FL79(A, D)或 A/WSN/33 野生型病毒(B, E)感染的 MDCK 细胞中的 NA, 或模仿感染(mock-infected)的 MDCK 细胞(C, F)上的 NA。感染后九小时, 细胞用低聚甲醛固定, 用 Triton X-100 处理并与抗 FLAG(A-C)或抗 WSN NA(D-F)单克隆抗体培养。阳性样品(A, D 和 E)中强烈的高尔基染色(红色)明显。

图 5. PA 突变体的回收。RT-PCR 扩增每个病毒的 PA 基因, 使用产生 1226 bp 片段(mRNA 的 677 至 1903 位, 泳道 1、3、5)的引物, 然后用限制性酶 Bsp120I(mRNA 的 846 位, 泳道 4、7)或 PvuII(mRNA 的 1284 位, 泳道 2、6)消化。PCR 产物中 Bsp120I 或 PvuII 位点的存在分别产生 169 bp 和 1057 bp 或 607 bp 和 619 bp 的片段。MW=分子量标记。

图 6A 和 6B. 用来扩增流感序列的引物(SEQ ID NOS:1-16)。

图 7. 产生编码 GFP 蛋白的流感病毒样(VLP) RNA 的 pPolI-GFP 质粒。这个质粒在甲型流感病毒节段 5 的 5'和 3'非编码区之间含有反义方向的 GFP 基因(来源于 pEGFP-NI; Clontech, Palo Alto, CA), 侧翼连接入 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子。各个蛋白表达质粒和含有 RNA 聚合酶 I 启动子、编码 GFP 报道基因的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子的质粒转染入 293T 细胞。由 RNA 聚合酶 I 进行的细胞内转录产生负极性 GFP vRNA, 由颠倒字母指示。收获含有 VLPs 的上清液, 与流感辅助病毒混合并接种入 MDCK 细胞。

图 8. 甲型流感病毒的 PA、PB1、PB2 和 NP 蛋白将由 RNA 聚合酶 I 产生的 GFP RNA 包壳化, 导致 GFP 表达。用表达 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白(A)的质粒或用除表达 NP 蛋白(B)的质粒外的所有质粒, 连同用于细胞内合成报道基因 vRNA 的 RNA 聚合酶 I-GFP 基因质粒转染 293T 细胞。转染后固定细胞 48 小时, 用荧光显微镜确定 GFP 表达。

图 9. 传染性流感 VLPs 的产生。用九个质粒转染 293T 细胞, 每个质粒表达不同的病毒结构蛋白质(A), 或用省去 NP(B)的构建体的八个质粒连同 RNA 聚合酶 I-GFP 基因质粒转染 293T 细胞。转染后四十八小时, 收集含 VLP 的上清液, 与 A/WSN/33 辅助病毒混合, 并接种入 MDCK 细胞。在感染后 10 小时固定细胞, 用荧光显微镜确定 GFP 表达。

图 10. 使用 Cre 重组酶在细胞中表达流感 NS2 蛋白的简图, 用重组 DNA 分子(augment)其基因组。细胞基因组包含重组 DNA 分子, 该分子包含与位点特异性重组位点(例如, loxP)相连的启动子, 该位点连接转录终止序列, 该序列以与第一位点特异性重组位点相同方向连接第二位点特异性重组位点, 该第二位点特异性重组位点连接 NS2 基因。

图 11. 复制有缺陷的流感病毒的制备。

图 12. pCAGGS-2Ribo-1 的载体图。在脊椎动物细胞中, RNA 聚合酶 II 驱动双核酶盒的 RNA 转录, 该盒处于强大的鸡 β -肌动蛋白启动子/CMV 增强子盒控制之下。病毒 cDNA 克隆在锤头核酶位点(HamRz)下游和 HDV 核酶位点(HDVRz)上游。

图 13. 产生用于反向遗传学的全长 vRNA 的 RNA 聚合酶 II/双核酶系统的示意图。RNA 聚合酶 II 产生的初级 mRNA 转录物包括侧翼连接两个核酶位点(HamRz 和 HDVRz)的 vRNA。核酶引起的自身催化切割产生具有正确 5'和 3'末端的 vRNA, 它用作病毒转录和复制中的模板。

图 14. 从克隆 cDNAs 产生 HK3PB2-627E 病毒。HK3/PB2-627E 的 PA、PB1、NP、M、NS、NA 和 HA vRNAs 由 RNA 聚合酶 I 系统合成, 而 PB2 vRNA 由 RNA 聚合酶 II/双核酶系统提供。由蛋白表达构建体表达的病毒 NP 和聚合酶蛋白复制并转录 vRNAs, 导致所有病毒蛋白的合成和复制流感病毒的产生。

图 15. 从克隆 cDNAs 产生 WSN/HK3PB2-627E 病毒。A/WSN/33 的 PA、PB1、NP、M、NS、NA 和 HA vRNAs 由 RNA 聚合酶 I 系统合成, 而 WSN/HK3PB2-627E 的 PB2 vRNA 由 RNA 聚合酶 II/双核酶系统提供。由蛋白表达构建体表达的病毒 NP 和聚合酶蛋白复制并转录 vRNAs, 导致所有病毒蛋白的合成和复制流感病毒的产生。

图 16. 示范的锤头(HH)、发夹(HP)和 HDV 核酶序列(SEQ ID NOS:23-25)。实线箭头表明自身加工位点。

发明详述

定义

这里使用的术语“分离的和/或纯化的”是指本发明载体、质粒或

病毒的体外制备、分离和/或纯化，使得它与体内物质不相结合，或基本上从体外物质中纯化。分离的病毒制剂通常由体外培养和增殖获得并且基本上没有其它传染物。如这里使用的“基本上没有”意思是对于特定传染物，使用该物质的标准检测方法，处于检测水平之下。“重组”病毒是已经体外操作过，例如使用重组 DNA 技术而向病毒基因组中引入改变的病毒。如这里使用的术语“重组核酸”或“重组 DNA 序列或节段”是指核酸，例如 DNA，它源自或分离自一种来源，可以随后体外化学改变，因此它的序列不是天然存在的，或对应于天然存在序列，该天然存在序列不是位于天然基因组中它们所处的位置。“源自”一种来源的 DNA 的实例是被鉴定为有用片段，并且然后以基本上纯的形式化学合成的 DNA 序列。这种“分离”自一种来源的 DNA 的实例是有用 DNA 序列，该序列被化学方法从所述来源切除或除掉，例如通过限制性内切酶的使用，使得它可以用基因工程方法被进一步操作，例如扩增，用于本发明。

流感病毒复制

甲型流感病毒具有编码总共十个蛋白的八个单链负义病毒 RNAs(vRNAs)的基因组。流感病毒生活史从血球凝集素(HA)与宿主细胞表面上含有唾液酸的受体结合开始，后面是受体介导的胞吞作用。晚期内涵体的低 pH 触发 HA 构象变化，由此暴露 HA2 亚单位(所谓的融合肽)的 N-末端。融合肽启动病毒和内涵体膜的融合，基质蛋白(M1)和 RNP 复合物释放到细胞质。RNPs 由包壳化 RNA 的核蛋白(NP)和由 PA、PB1 和 PB2 蛋白形成的病毒聚合酶复合体组成。RNPs 被运输到细胞核，在那里发生转录和复制。RNA 聚合酶复合体催化三个不同的反应：具有 5'帽和 3'polyA 结构的 mRNA 合成、全长互补 RNA(cRNA)的合成和使用 cDNA 作为模板的基因组 RNA 的合成。然后新合成的 vRNAs、NP 和聚合酶蛋白装配到 RNPs，从细胞核输出，并运输至胞质膜，在那里发生子代病毒颗粒的出芽。神经氨酸酶(NA)蛋白在感染后期起着决定性作用，通过从唾液酸寡糖除去唾液酸，由此从细胞表面释放新装配的病毒粒子并防止病毒颗粒自身聚集。尽管病毒装配包括蛋白-蛋白和蛋白-vRNA 交互作用，但是这些交互作用的性质基本上未知。

尽管乙型和丙型流感病毒在结构上和功能上类似于甲型流感病

毒,但是它们有一些差异。例如,乙型流感病毒不含具有离子通道活性的 M2 蛋白。类似地,丙型流感病毒不含具有离子通道活性的 M2 蛋白。然而,CM1 蛋白可能具有这个活性。离子通道蛋白的活性可以用本领域熟知方法测定,参见例如 Holsinger et al.(1994)和 WO01/79273。

首戈托病毒(Thogotovirus)

首戈托病毒(THOV)代表正粘病毒科中的一个新属。它们由壁虱传播并且已经在家畜中发现,包括骆驼、山羊和牛。因此,THOV 可以在壁虱和脊椎动物细胞中复制。THOV 基因组包含单链负义 RNA 的六个节段。由三个最大的节段编码的蛋白显示与流感病毒聚合酶蛋白 PB2、PB1 和 PA 具有显著同源性。节段 5 编码与流感病毒 NP 相关的蛋白。由节段 4 编码的 THOV 糖蛋白与流感病毒 HA 或 NA 都没有同源性,但是它显示与杆状病毒糖蛋白具有序列相似性。认为最小的节段编码基质蛋白并且与任何流感病毒蛋白都不相似。如同流感病毒,vRNA 的 3'和 5'末端是启动子活性所需的,并且这个活性分别位于 vRNA 的 3'和 5'末端的末端 14 和 15 个核苷酸。

THOV 的 mRNA 合成由源自宿主细胞的帽结构启动。然而,与流感病毒对比,仅仅帽结构(无另外的核苷酸)从细胞 mRNAs 切割下来(Albo et al., 1996; Leahy et al., 1997; Weber et al., 1996)。体外切割试验揭示 vRNA 的 5'和 3'末端是核酸内切酶活性所需的(Leahy et al., 1998),但是模型 cRNA 启动子的添加不刺激核酸内切酶活性(Leahy et al., 1998),这对于流感病毒已证明(Cianci et al., 1995; Hagen et al., 1994)。对于 THOV 提出“钩”结构(Leahy et al., 1997; Weber et al., 1997),类似于对于流感病毒提出的瓶塞钻结构(Flick et al., 1996)。然而,仅仅在 THOV vRNA 启动子中发现这个“钩”结构。cRNA 启动子序列不允许 cRNA 5'末端的 2 和 9 位之间,和 3 和 8 位之间形成碱基对。在 3 和 8 位允许这些核苷酸之间碱基配对的改变刺激核酸内切酶活性,它是提出的“钩”结构的强力支持证据(Leahy et al., 1998)。此外,这个结构对于 THOV 生活史的调节可能是决定性的;vRNA 启动子形成“钩”结构,可以刺激 PB2 核酸内切酶活性,因此允许转录。相比之下,cRNA 启动子可能不形成“钩”结构且可能因此不能刺激核酸内切酶活性,由此导致复制。

本扬病毒科

本扬病毒科包括在人类中引起出血性或脑炎性发热(例如, Rift fever valley, Hantaan, La Crosse, 和 Crimean-Congo 出血热)的几个病毒。球状和被膜病毒粒子含有三个单链负义 RNA 节段(Elliott, 1997 中综述)。最大节段(L)编码病毒 RNA 聚合酶蛋白(L 蛋白), 而 M 节段编码两个病毒糖蛋白 G1 和 G2, 和一个非结构蛋白(NSm)。最小的节段(S)编码核壳蛋白(N)和第二个非结构蛋白(NSs)。病毒复制和转录发生在细胞质中, 和新装配的病毒粒子通过高尔基体的膜出芽。

Bridgen & Elliott(1996)建立了反向遗传学系统以完全从克隆 cDNAs 制备传染性布尼奥罗病毒。他们遵循 Schnell et al.(1994)对于狂犬病病毒首次描述的策略: 编码正义反基因组 RNA(而不是编码负义基因组 RNA)的 cDNA 在表达病毒聚合酶和核蛋白的细胞中进行细胞内转录。Bridgen & Elliott(1996)用表达 T7 聚合酶的牛痘病毒感染 HeLaT4+ 细胞和用表达由 S、M 和 L 节段编码的蛋白的质粒转染这些细胞。然后他们用编码全长反基因组 cDNAs 的三个质粒转染这些细胞, 该 cDNAs 侧翼连接 T7 聚合酶启动子和肝炎 δ 病毒核酶。为增加本扬病毒颗粒相对于牛痘病毒颗粒的数量, 作者使用其中布尼奥罗而不是牛痘病毒复制的蚊子细胞。这个规程不仅可以用于基因工程改造本扬病毒科, 而且可以用于产生用不同本扬病毒科菌株共感染细胞不易获得的重排列病毒。

为研究本扬病毒启动子元件和转录和复制所需的病毒蛋白, Dunn et al.(1995) 在布尼奥罗 S RNA 节段的 5'和 3'非翻译区之间负义方向克隆了 CAT 基因。用表达由 L 和 S 节段编码的蛋白的构建体转染细胞, 然后用体外转录的 RNA 转染, 其引起 CAT 活性。本扬病毒 S 段以重叠阅读框编码两个蛋白-N 和 NSs。为确定这两个蛋白是否是转录和复制所需的, 检测仅表达 N 或 NSs 的构建体的 CAT 活性。N 蛋白表达连同 L 蛋白引起 CAT 活性, 而用 NSs 表达构建体没有检测到 CAT 活性。因此, L 和 N 蛋白对于本扬病毒样 RNA 的转录和复制足够。

如流感病毒一样, 本扬病毒 RNAs 的末端序列互补且非常保守。因此认为这些序列元件定义本扬病毒启动子并且对于启动子活性是决定性的。病毒 RNA 3'末端五个核苷酸的缺失急剧降低 CAT 表达(Dunn et al., 1995)。相比之下, 5'末端两个核苷酸的添加或 3'末端 11 或 35

个核苷酸的添加不消除 CAT 表达(Dunn et al., 1995)。因此,如同流感病毒聚合酶复合体,本扬病毒聚合酶蛋白显然可以内部启动转录和/或复制。

可用于本发明的细胞系和流感病毒

根据本发明,支持流感病毒有效复制的任何细胞可以用于本发明,包括表达减少或降低水平的一个或多个唾液酸的突变体细胞,唾液酸是流感病毒受体。该方法获得的病毒可以制备成重排列病毒。

优选,细胞是 WHO 认证的或可证明的传代细胞系。证明这种细胞系的必要条件包括关于家系、生长特征、免疫标记、病毒易感性、致肿瘤性和储藏条件中的至少一种的表征,而且通过在动物、蛋和细胞培养物中检测。这种表征用来证实该细胞没有可检测的外来物质。在一些国家,可能也需要细胞核学。此外,优选致肿瘤性在处于与用于疫苗制备的相同传代水平的细胞中检测。在被灭活或减毒用于疫苗制备前,优选已表明得到一致结果的方法纯化病毒(参见例如世界卫生组织,1982)。

优选建立待使用的细胞系的完整表征,因此可以包括为终产物的纯度所作的适当检测。可以用于表征待用于本发明的细胞的资料包括(a)关于它的起源、衍生和传代史的信息;(b)关于它的生长和形态特征的信息;(c)外来物质的检测结果;(d)区别特征,如允许从其它细胞系中清楚辨认细胞的生物化学、免疫和细胞遗传模式;和(e)致肿瘤性的检测结果。优选,宿主细胞的传代水平或群体倍增尽可能低。

优选细胞中生产的病毒在疫苗或基因治疗配制前被高度纯化。通常,纯化方法将导致细胞 DNA、其它细胞组分和外来物质的广泛清除。还可以使用广泛降解或变性 DNA 的方法。参见例如 Mizrahi, 1990。

疫苗

本发明的疫苗可以包含免疫原性蛋白,包括任何病原体的糖蛋白,例如来自一个或多个细菌、病毒、酵母或真菌的免疫原性蛋白。因此,在一个实施方案中,本发明的流感病毒可以是流感病毒或其它病毒病原体的疫苗载体,包括但不限于慢病毒如 HIV、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、疱疹病毒如 CMV 或 HSV 或口蹄疫病毒。

通过超滤作用浓缩完全病毒粒子疫苗,然后通过区带离心或层析纯化。纯化前或后,使用例如福尔马林或 β -丙内酯灭活。

亚单位疫苗包含纯化糖蛋白。可以如下制备这种疫苗：使用洗涤剂处理成片段的病毒悬液，通过例如超速离心法纯化表面抗原。因此亚单位疫苗主要含有 HA 蛋白以及 NA。使用的洗涤剂可以是阳离子洗涤剂，例如溴化十六烷基三甲铵(Bachmeyer, 1975)、阴离子洗涤剂如脱氧胆酸铵(Laver & Webster, 1976; Webster et al., 1977); 或非离子型洗涤剂如名为 TRITON X100 的被商品化的洗涤剂。也可以在用蛋白酶如菠萝蛋白酶处理病毒粒子后分离血球凝集素，然后用如 Grand and Skehel(1972)描述的方法纯化。

片段疫苗包含已受到溶解脂质的试剂处理的病毒粒子。可以如下制备片段疫苗：在搅拌下，通过与洗涤剂有关的脂质溶剂如乙醚或氯仿处理如上获得的纯化病毒的水悬液，灭活或不灭活。病毒被膜脂质的溶解导致病毒颗粒的破碎。恢复水相，其含有片段疫苗，主要组成是它们的原始脂质环境被消除的血球凝集素和神经氨酸酶和核或它的降解产物。然后如果尚未灭活，那么灭活残余传染性颗粒。

灭活疫苗。通过使用已知方法灭活本发明的复制病毒提供本发明的灭活流感病毒疫苗，所述方法例如但不限于福尔马林或 β -丙内酯处理。可用于本发明的灭活疫苗类型可以包括全病毒(WV)疫苗或亚病毒颗粒体(SV)(片段)疫苗。WV 疫苗含有完整的灭活病毒，而 SV 疫苗含有纯化病毒，其用溶解含有脂质的病毒被膜的洗涤剂破坏，随后是残余病毒的化学灭活。

此外，可以使用的疫苗包括含有分离的 HA 和 NA 表面蛋白的疫苗，被称为表面抗原或亚单位疫苗。通常，对 SV 和表面抗原(即纯化的 HA 或 NA)疫苗的反应类似。含有与流行病毒免疫上相关的 NA 抗原和无关的 HA 的实验灭活 WV 疫苗看来不如常规疫苗有效(Ogra et al., 1977)。优选含有全部两个相关表面抗原的灭活疫苗。

活减毒病毒疫苗。减毒活流感病毒疫苗还可以用于预防或治疗流感病毒感染，按照已知的方法步骤。优选减毒作用是根据已知方法通过来自减毒供体病毒的减毒基因转移至复制的分离物或重排列病毒而一步实现的(参见例如 Murphy, 1993)。由于对甲型流感病毒的抗性是通过 HA 和 NA 糖蛋白的免疫反应的发展调节的，因此编码这些表面抗原的基因必须来自重排列病毒或高生长临床分离物。减毒基因源自于减毒亲本。在这个方法中，优选给予减毒作用的基因不编码 HA 和

NA 糖蛋白。否则, 这些基因不能转入具有临床病毒分离物的表面抗原的重排列病毒。

已经评价了很多供体病毒可重复地减毒流感病毒的能力。作为非限制性实例, A/Ann Arbor(AA)/6/60(H2N2)冷适应(cold adapted, ca)供体病毒可以用于减毒疫苗制备(参见例如 Edwards, 1994; Murphy, 1993)。另外, 通过 ca 供体病毒与本发明的有毒力复制病毒的交配可以产生减毒活重排列病毒疫苗。然后在 25℃ 选择重排列后代, (限制有毒力病毒的复制), 在 H2N2 抗血清存在下, 其抑制具有减毒 A/AA/6/60(H2N2)ca 供体病毒的表面抗原的病毒复制。

已经在人中评价了一大系列 H1N1 和 H3N2 重排列体并令人满意地发现: (a)有传染性、(b)对于血清阴性的儿童和免疫激发的成人减毒、(c)有免疫原性和(d)遗传稳定。ca 重排列体的免疫原性与它们的复制水平相当。因此, 通过新野生型病毒进行的 ca 供体病毒的六个可转移基因的获得可重复将这些病毒减毒用于接种易感成人和儿童。

通过定点诱变可以将其它减毒突变引入流感病毒基因以援救具有这些突变基因的传染性病毒。减毒突变可以引入基因组的非编码区, 以及编码区。这种减毒突变还可以引入除 HA 或 NA 之外的基因, 例如 PB2 聚合酶基因(Subbarao et al., 1993)。因此, 还可以产生具有通过定点诱变引入的减毒突变的新供体病毒, 和这种新供体病毒可以用在减毒活重排列体 H1N1 和 H3N2 疫苗候选物的减毒, 以类似于上述对于 A/AA/6/60 ca 供体病毒的方式。类似地, 可以用本发明的流感病毒将其它已知和合适的减毒供体菌株重排列而获得适用于哺乳动物接种的减毒疫苗(Ewami et al., 1990; Muster et al., 1991; Subbarao et al., 1993)。

优选这种减毒病毒保留编码基本上类似于原始临床分离物的抗原决定簇的来自病毒的基因。这是因为减毒疫苗的目的是提供与病毒的原始临床分离物基本上相同的抗原性, 同时传染性丧失至该疫苗在接种的哺乳动物中引起最小的诱导严重病情的改变的程度。

因此该病毒可以根据已知方法被减毒或灭活, 配制和给予, 作为疫苗在动物中诱导免疫反应, 例如哺乳动物。测定这种减毒或灭活疫苗是否维持与临床分离物或由此而来的高生长菌株相似的抗原性的方法是本领域熟知的。这种已知方法包括清除表达供体病毒的抗原决定簇的病毒的抗血清或抗体的使用; 化学选择(例如, 金刚烷胺或

rimantidine); HA 和 NA 活性和抑制; 和 DNA 筛选(如探针杂交或 PCR)以证实编码抗原决定簇的供体基因(例如 HA 或 NA 基因)不存在于减毒病毒中。参见例如, Robertson et al., 1988; Kilbourne, 1969; Aymard-Henry et al., 1985; Robertson et al., 1992。

药物组合物

适于接种或肠胃外或口服给药的本发明的药物组合物包含减毒或灭活的流感病毒, 任选进一步包含无菌水或非水溶液、悬浮剂和乳剂。如本领域所知, 该组合物可以进一步包含助剂或赋形剂。参见例如, Berkow et al., 1987; Goodman et al., 1990; Avery's Drug Treatment, 1987; Osol, 1980; Katzung, 1992。本发明的组合物通常以单独剂量(单位剂量)形式存在。

常规疫苗通常含有约 0.1 至 200 μ g, 优选 10 至 15 μ g 进入它们的组合物的来自每个菌株的血球凝集素。形成本发明疫苗组合物的主要成分的疫苗可以包含甲型、乙型或丙型病毒或其任何组合, 例如三个类型中的至少两个、不同亚型中的至少两个、同一类型中的至少两个、同一亚型中的至少两个, 或不同的分离物或重排列体。人甲型流感病毒包括 H1N1、H2N2 和 H3N2 亚型。

肠胃外给药的制剂包括无菌水或非水溶液、悬浮剂和/或乳剂, 其可以含有本领域已知的助剂或赋形剂。无水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油, 和可注射的有机酯如油酸乙酯。载体或封闭敷裹可用于增加皮肤渗透性和提高抗原吸收。口服给药的液态剂型通常可以包含含有液态剂型的脂质体溶液。悬浮脂质体的合适形式包括乳剂、悬浮剂、溶液、糖浆和酏剂, 其含有本领域通常使用的惰性稀释剂, 如纯净水。除了惰性稀释剂, 这种组合物还可以包括佐剂、润湿剂、乳化和悬浮剂、或甜味剂、调味剂或芳香剂。参见例如 Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery's, 1987; Osol, 1980 和 Katzung, 1992。

当本发明的组合物用于给个体施用时, 它可以进一步包含盐、缓冲液、佐剂或提高该组合物功效所期望的的其它物质。对于疫苗, 可以使用佐剂, 可以增加特异性免疫反应的物质。通常, 助剂和组合物在呈递给免疫系统前混合, 或分开呈递, 但是进入所免疫生物体的相同部位。Osol(1980)中提供了适合用于疫苗组合物的物质实例。

通过混合至少两个流感病毒菌株的复制流感病毒可以提供疫苗中的异质性，如 2-50 个菌株或其中的任何范围或值。优选具有现代抗原性组成的甲型或乙型流感病毒株。根据本发明，使用本领域已知技术可以提供流感病毒单一菌株中变异的疫苗。

根据本发明的药物组合物可以进一步或另外包含至少一种化疗化合物，例如，对于基因治疗，免疫抑制剂、抗炎药或免疫增强剂，和对于疫苗，化疗药物包括但不限于 γ 球蛋白、金刚烷胺、胍、羟基苯并咪唑、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 、缩氨硫脲、甲吡啶酮、利福平、病毒唑、嘧啶类似物、嘌呤类似物、磷甲酸、磷酰乙酸、无环鸟苷、双脱氧核苷、蛋白酶抑制剂、或更昔洛韦。参见例如，Katzung(1992)，和其中分别在 798-800 和 680-681 页引用的参考文献。

该组合物还可以含有不定量但是少量的无内毒素的甲醛和防腐剂，已经发现它们安全并且不对给予该组合物的生物增加不期望的作用。

药物目的

组合物(或它引出的抗血清)的施用可以是“预防”或“治疗”目的。当预防性提供时，作为疫苗的本发明组合物在表现出病原体感染的任何症状之前提供。该组合物的预防性施用用来预防或减少任何随后的感染。当预防性提供时，本发明的基因治疗组合物在表现出疾病的任何症状之前提供。该组合物的预防性施用用来预防或减少与该疾病相关的一种或多种症状。

当治疗性提供时，在检测到实际感染症状之后提供减毒或灭活的病毒疫苗。化合物的治疗性施用用来减少任何实际感染。参见例如 Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery, 1987; 和 Katzung, 1992。当治疗性提供时，在检测到该疾病的症状或迹象之后提供基因治疗组合物。化合物的治疗性施用用来减少那个疾病的症状或迹象(indication)。

因此，本发明的减毒或灭活疫苗组合物可以在感染开始之前提供(以便预防或减少预期感染)或实际感染开始后提供。类似地，对于基因治疗，该组合物可以在表现出紊乱或疾病的任何症状之前或检测到一种或多种症状之后提供。

如果接受的患者可以忍受一种组合物的施用，就说它是“药理学可接受的”。如果给予的量是生理学有意义的 (physiologically significant)，就说这种试剂以“治疗有效量”给予。如果本发明组合物的存在引起接受的患者生理学的可检测改变，那么它是生理学有意义的，所述改变例如提高针对传染性流感病毒的至少一个菌株的至少一种原发或继发体液或细胞免疫反应。

提供的“保护”不必是绝对的，即如果与对照患者群或组相比，有统计上显著的改善，则不需要完全预防或根除流感感染。保护可以限于减轻流感病毒感染症状的严重性或开始的快速性。

药物施用

通过被动免疫或主动免疫，本发明的组合物可以赋予对一种或多种病原体例如一种或多种流感病毒菌株的抗性。在主动免疫中，灭活或减毒活疫苗组合物预防性给予宿主(例如哺乳动物)，宿主对该给药的免疫反应保护其免于感染和/或疾病。对于被动免疫，可以回收引出的抗血清并给予怀疑具有由至少一个流感病毒菌株引起的感染的受体。本发明的基因治疗组合物可以通过主动免疫产生预防或治疗水平的期望基因产物。

在一个实施方案中，在时间和量足以引起免疫反应产生的条件下，将疫苗提供给雌性哺乳动物(怀孕或分娩时或之前)，该反应用来保护该雌性哺乳动物和胎儿或新生儿(通过抗体穿过胎盘或位于母亲的乳汁中而被动掺入)。

因此本发明包括预防或减轻紊乱或疾病的方法，例如由病原体的至少一个菌株引起的感染。如这里使用的，说疫苗预防或减轻疾病，如果它的施用引起该疾病的症状或情况的全部或部分减轻(即抑制)，或引起个体对该疾病的全部或部分免疫性。如这里使用的，说基因治疗组合物预防或减轻疾病，如果它的施用引起该疾病的症状或情况的全部或部分减轻(即抑制)，或引起个体对该疾病的全部或部分免疫性。

本发明的至少一种灭活或减毒流感病毒或其组合物可以实现预定目的的任何方式给予，使用如前所述的药物组合物。

例如，这种组合物的施用可以通过各种肠胃外途径，如皮下、静脉内、皮内、肌内、腹膜内、鼻内、经口或透皮途径。肠胃外给药可以通过弹丸注射或随时间逐步输注。使用本发明药物组合物的优选模

式是通过肌肉或皮下应用。参见例如, Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery, 1987 和 Katzung, 1992。

预防、抑制或治疗流感病毒相关病理的典型方案包括给予有效量的如这里描述的疫苗组合物, 以单次治疗给予, 或在达到和包括一周至大约 24 个月的时间内, 或其中的任何范围或值, 以提高或增强剂量重复给予。

根据本发明, 组合物的“有效量”是足以实现期望生物效应的量。可以理解有效剂量将依赖于受体的年龄、性别、健康和体重, 并行治疗的类型, 如果有, 治疗的频率, 和需要的效果的性质。以下提供的有效剂量范围不意欲限制本发明并且代表优选剂量范围。然而, 如本领域技术人员理解和可确定的, 最优选剂量将根据个体受试者而调整。参见例如, Berkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery's, 1987; Ebadi, 1985 和 Katsung, 1992。

哺乳动物(例如人)或鸟类成年生物的减毒病毒疫苗的剂量可以是大约 10^3 - 10^7 噬斑形成单位(PFU)/kg 或其中的任何范围或值。灭活疫苗剂量可以从约 0.1 至 200 μ g, 例如, 50 μ g 血球凝集素蛋白。然而, 剂量应该是使用现存疫苗作为起点, 用惯用方法确定的安全和有效的量。

每剂复制病毒疫苗的免疫活性 HA 的剂量可以被标准化而含有合适量, 例如 1-50 μ g 或其中的任何范围或值, 或由美国公众医务处(PHS)推荐的量, 通常是对于年长儿童、3 岁, 每个成分 15 μ g, 和对于<3 岁的年长儿童, 每个成分 7.5 μ g。NA 的量也可以被标准化, 然而, 在加工纯化和贮存期间这个糖蛋白可以不稳定(Kendal et al., 1980; Kerr et al., 1975)。每 0.5 ml 疫苗剂量优选含有大约 10-500 亿病毒颗粒, 和优选 100 亿颗粒。

将通过下列实施例进一步描述本发明。

实施例 1

材料和方法

细胞和病毒。293T 人胚肾细胞和 Madin-Darby 犬肾细胞(MDCK)分别维持在补充 10%胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)和含有 5%新生牛血清的改良 Eagle 培养基(MEM)中。所有细胞维持在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 中。流感病毒 A/WSN/33(H1N1)和 A/PR/8/34(H1N1)在

10 日龄蛋中繁殖。

质粒的构建。为了产生 RNA 聚合酶 I 构建体，源自 A/WSN/33 或 A/PR/8/34 病毒 RNA 的克隆 cDNAs 引入 RNA 聚合酶 I 的启动子和终止子序列之间。简言之，通过 PCR 用含有 BsmBI 位点的引物扩增克隆 cDNAs，用 BsmBI 消化，并克隆入含有被 BsmBI 位点隔开的人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子的 pHH21 载体的 BsmBI 位点(图 2)。PCR 扩增 A/WSN/33 菌株的 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因，分别使用下列质粒：pSCWPB2、pGW-PB1 和 pSCWPA(全部从 University of California Los Angeles 的 Dr.Debi Nayak 获得)和 pWH17、pWNP152、pT3WNA15(Castrucci et al., 1992)、pGT3WM 和 pWNS 1。使用 pcDNA774(PB1)(Perez et al., 1998)作为模板扩增流感 A/PR/8/34 病毒的 PB1 基因。引物序列参见图 6。为了保证该基因不含不需要的突变，用自动测序仪根据制造商推荐的方案对 PCR 得到的片段进行测序(Applied Biosystem Inc., CA, USA)。如(Huddleston et al., 1982)描述克隆编码 A/WSN/33 病毒的 HA、NP、NA 和 M1 基因的 cDNAs 并亚克隆入真核表达载体 pCAGGS/MCS(受鸡 β -肌动蛋白启动子控制)(Niwa et al., 1991)，分别产生 pEWSN-HA、pCAGGS-WSN-NPO-14、pCAGGS-WNA15 和 pCAGGS-WSN-MI-2/1。PCR 扩增来自 A/PR/8/34 病毒的 M2 和 NS2 基因并克隆入 pCAGGS/MCS，产生 pEP24c 和 pCA-NS2。最后，pcDNA774(PB1)、pcDNA762(PB2)和 pcDNA787(PA)用来表达在巨细胞病毒启动子(Perez et al., 1998)控制之下的 PB2、PB1 和 PA 蛋白。

传染性流感颗粒的产生。用最多 17 个质粒以不同量,使用 Trans IT LT-1(Panvera, Madison, Wisconsin), 根据制造商的规程转染 293T 细胞(1×10^6)。简言之，DNA 和转染试剂混合(2 μ l Trans IT-LT-1 每 μ g DNA)，在室温孵育 45 分钟并添加到细胞中。六小时后，用含有 0.3% 牛血清白蛋白和 0.01% 胎牛血清的 Opti-MEM(Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland)替代 DNA-转染试剂混合物。在转染后不同时间，从上清液收获病毒并在 MDCK 细胞上滴定。由于用这个方法不要求辅助病毒，因此分析回收的转染病毒无需噬斑纯化。

产生病毒的质粒转染细胞的百分比的测定。转染后二十四小时，用 0.02% EDTA 将 293T 细胞分散为单细胞。然后细胞悬液稀释 10 倍

并转移到 24 孔板中 MDCK 细胞的融合单层。用血细胞凝集试验检测病毒。

免疫染色试验。用流感病毒感染后九小时，细胞用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤两次并用 3.7% 仲甲醛(在 PBS 中)在室温下固定 20 分钟。接下来，用 0.1% Triton X-100 处理它们并如 Neumann et al.(1997)描述进行加工。

结果

质粒驱动的疾病 RNA 节段、三个聚合酶亚单位和 NP 蛋白的表达引起的传染性病毒的产生。尽管用从纯化病毒粒子提取的 RNPs 的混合物转染细胞产生传染性流感颗粒，但是当使用八个不同体外产生的 RNPs 时，这个策略不太可能有效。为了完全从 cDNAs 制备传染性流感病毒，体内产生八个病毒 RNPs。因此，制备含有 A/WSN/33 病毒的全长病毒 RNAs 的 cDNAs 的质粒，该 cDNAs 侧翼连接入 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子。原则上，这八个质粒转染真核细胞应该导致全部八个流感 vRNAs 合成。接着蛋白表达质粒共转染产生的 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白应当将 vRNAs 装配为被复制和转录的功能性 vRNPs，最终形成传染性流感病毒(图 3)。用蛋白表达质粒(1 μ g pcDNA762(PB2)、1 μ g pcDNA774(PB1)、0.1 μ g pcDNA787(PA)和 1 μ g pCAGGS-WSN-NPO/14)和 1 μ g 下列 RNA 聚合酶 I 质粒中的每种(pPolII-WSN-PB2、pPolII-WSN-PB1、pPolII-WSN-PA、pPolII-WSN-HA、pPolII-WSN-NP、pPolII-WSN-NA、pPolII-WSN-M 和 pPolII-WSN-NS)转染 1×10^6 个 293T 细胞。使用降低量 pcDNA787(PA)的决定是基于早先的观察(Mena et al., 1996)和产生病毒样颗粒(VLPs)的最佳条件的数据(未显示数据)。293T 细胞转染后二十四小时，在每 ml 上清液中得到 7×10^3 pfu 病毒(实验 1、表 1)，首次显示了完全从质粒制备甲型流感病毒的反向遗传学的能力。

表 1. 用于从克隆 cDNA 制备流感病毒的质粒组*

		实验							
RNA聚合酶 I质粒: [†]	I	1	2	3	4	5	6	7	8
PB1		+	+	-	-	-	-	-	-
PR8-PB1		-	-	+	+	+	+	+	+
PB2		+	+	+	+	+	+	+	+
PA		+	+	+	+	+	+	+	+
HA		+	+	+	+	+	+	+	+
NP		+	+	+	+	+	+	+	+
NA		+	+	+	+	+	+	+	+
M		+	+	+	+	+	+	+	+
NS		+	+	+	+	+	+	+	+
蛋白表达									
质粒:									
PB1		+	+	+	+	+		+	+
PB2		+	+	+	+	+	+	-	+
PA		+	+	+	+	+	+	-	+
NP		+	+	+	+	+	+	+	-
HA		-	+	-	+	+	+	+	+
NA		-	+	-	+	+	+	+	+
M1		-	+	-	+	+	+	+	+
M2		-	+	-	+	+	+	+	+
NS2		-	+	-	+	+	+	+	+
病毒滴度 (pfu/ml)		7 × 10 ³	7 × 10 ³	1 × 10 ³	3 × 10 ⁴	0	0	0	0

*用所示质粒转染 293T 细胞。二十四(实验 1 和 2)或四十八小时(实验 3-8)后, MDCK 细胞中测定上清液的病毒滴度。

†除非另有陈述, 用代表 A/WSN/33 病毒 RNAs 的 cDNAs 构建质粒。

用所有病毒结构蛋白共表达制备流感病毒的效率。尽管病毒 NP 和聚合酶蛋白的表达足以满足质粒驱动的流感病毒的产生, 但有可能效率能提高。在以前的研究中, 所有流感病毒结构蛋白(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2 和 NS2)的表达产生含有编码氯霉素-转乙酰酶报道基因的人工 vRNA 的 VLPs(Mena et al., 1996)。因此, 结构蛋白整体补充的可得性, 而不仅仅是病毒 RNA 复制和转录所需的那些, 可

以提高病毒制备的效率。为此目的,用最佳量病毒蛋白质表达质粒(根据 VLP 制备判断;未发表数据): 1 μ g pcDNA762(PB2)和 pcDNA774(PB1); 0.1 μ g pcDNA787(PA); 1 μ g pEWSN-HA、pCAGGS-WSN-NP0/14 和 pCAGGS-WNA15; 2 μ g pCAGGS-WSN-M1-2/1; 0.3 μ g pCA-NS2 和 0.03 μ g pEP24c(对于 M2),连同 1 μ g 每种 RNA 聚合酶 I 质粒(实验 2、表 1)转染 293T 细胞。除 PB1 基因之外,用相同组 RNA 聚合酶 I 质粒转染第二组细胞,对于 PB1 基因, pPolII-PR/8/34-PB1 被代替试图产生重排列病毒,连同仅表达 PA、PB1、PB2 和 NP 的质粒(实验 3、表 1)或表达所有流感结构蛋白的质粒(实验 4、表 1)。WSN 病毒的产量在转染后 24 小时(实验 1 和 2、表 1)或在 36 小时(未显示数据)没有可感知的差异。然而,当提供所有流感病毒结构蛋白时(实验 3 和 4、表 1),有 PR/8/34-PB1 的病毒的产量得到 10 倍以上增加。缺乏 PA、PB1、PB2、NP 蛋白的表达质粒之一的阴性对照不产生任何病毒(实验 5-8、表 1)。因此,根据所产生的病毒,所有甲型流感病毒结构蛋白的表达可感知地提高反向遗传学方法的效率。

接下来,使用用于产生含 A/PR/8/34-PB1 基因的病毒的质粒组确定细胞转染后病毒生产的动力学。在三个实验的两个中,转染后 24 小时首次检测到病毒。那时候测量滴度>103 pfu/ml,转染后 48 小时增加到>106pfu/ml(表 2)。为了估计生产病毒的质粒转染细胞的百分比,在转染后 24 小时用 EDTA(0.02%)处理 293T 细胞以分散细胞,然后进行有限稀释研究。在这个实验中,在这个时间点在培养上清液中没有发现游离病毒。该结果表明 103.3 个细胞中有一个产生传染性病毒颗粒。

表 2. 质粒转染 293T 细胞后病毒制备的动力学*

质粒转染后 数小时数	培养上清液中病毒滴度 (pfu/ml)		
	实验		
	1	2	2
6	0	ND	ND
12	0	ND	0
18	0	ND	0
24	0	2×10^3	6×10^3
30	ND	5×10^4	9×10^4
36	6×10^2	$> 1 \times 10^5$	7×10^5
42	ND	$> 1 \times 10^6$	5×10^6
48	8×10^4	$> 1 \times 10^6$	1×10^7

*用除源自于 A/PR/8/34 病毒的 PB1 基因之外, 编码 A/WSN/33 病毒基因的八个 RNA 聚合酶 I 质粒和如本文所述的九个蛋白表达质粒转染 293T 细胞。在不同时间点, 我们在 MDCK 细胞中滴定培养上清液中的病毒。ND=未做。

含有 NA 蛋白中 FLAG 表位的流感病毒的回收。为了证实新反向遗传学系统允许将突变引入甲型流感病毒的基因组, 产生含有 NA 蛋白中 FLAG 表位(Castrucci et al., 1992)的病毒。用含有编码 NA 蛋白和该蛋白头端底部的 FLAG 表位的 cDNA 的 RNA 聚合酶 I 质粒(pPolI-WSN-NA/FL79), 连同所需要的 RNA 聚合酶 I 和蛋白表达质粒转染 293T 细胞。为了证实回收的病毒(PR8-WSN-FL79)事实上确实表达了 NA-FLAG 蛋白, 对 PR8-WSN-FL79 或 A/WSN/33 野生型病毒感染的细胞进行免疫染色试验。FLAG 表位的单克隆抗体检测用 PR8-WSN-FL79 感染的细胞, 而不检测用野生型病毒感染的细胞(图 4)。PR8-WSN-FL79 病毒的回收如同未标记的野生型病毒一样有效(未显示数据)。这些结果表明新反向遗传学系统允许人们将突变引入甲型流感病毒基因组。

PA 基因中含有突变的传染性流感病毒的产生。为了制备 PA 基因中具有突变的病毒, 引入两个沉默突变, 产生新的限制性内切酶的识别序列(mRNA 的 846 位 BspI20I 和 1284 位 PvuII)。以前, 做不到通过

反向遗传学改变这个基因，因为缺乏可信的选择系统。回收转染体病毒、PA-T846C 和 PA-A1284。通过两次连续的有限稀释生物学上克隆回收的转染体病毒。为了证实回收的病毒确实是 PA 基因中具有突变的转染体，通过反转录酶-PCR 获得 PA 基因的 cDNA。如图 5 所示，PA-T846C 和 PA-A1284C 病毒在 PA 基因内具有预期的突变，如新引入的限制性位点的存在而证明。相同病毒样品和引物的无反转录步骤的 PCR 未能产生任何产物(未显示数据)，表明 PA cDNA 的确来源于 vRNA，而不是用于产生病毒的质粒。这些结果阐明了如何不使用辅助病毒制备和回收具有突变基因的病毒。

讨论

在此描述的反向遗传学系统允许人们完全从克隆 cDNAs 有效制备甲型流感病毒。Bridgen 和 Elliott(1996)也使用反向遗传学产生布尼奥罗病毒(本扬病毒科)，但是它仅仅含有负义 RNA 的三个节段，其制备效率低， 10^2 pfu/ 10^7 细胞。尽管实验当中病毒产量不同，但是对于流感病毒，观察到产量始终 $> 10^3$ pfu/ 10^6 细胞，其含有八个节段。有上文描述的反向遗传学系统高效率的几种解释。代替体外制备 RNPs(Luytjes et al., 1989)，通过使用 RNA 聚合酶 I 细胞内合成 vRNAs 和通过质粒驱动的病毒聚合酶蛋白和 NP 表达，体内产生 RNPs。此外，用质粒轻易转染的 293T 细胞(Goto et al., 1997)的使用保证了大量细胞接受病毒制备所需的所有质粒。此外，通过生长细胞中最丰富表达的酶-RNA 聚合酶 I 生产的大量转录物可能有助于系统的总效率。这些特征产生相应大量的 vRNA 转录物和足够量的用于 vRNA 衣壳化的病毒蛋白质，细胞核中 RNPs 的形成和这些复合物输出至细胞膜，在那里装配和释放新病毒。

以前建立的反向遗传学系统(Enami et al., 1990; Neumann et al., 1994; Luytjes et al., 1989; Pleschka et al., 1996)需要辅助病毒感染，因此所需的选择方法要允许从很多辅助病毒中回收得到少量的转染体。这种策略已经用于产生具有下列源自 cDNA 的基因之一的流感病毒：PB2(Subbarao et al., 1993)、HA(Enami et al., 1991; Horimoto et al., 1994)、NP(Li et al., 1995)、NA(Enami et al., 1990)、M(Castrucci et al., 1995; Yasuda et al., 1994)和 NS(Enami et al., 1991)。除了适用于 HA 和 NA 基因的方法之外，大多数选择方法依赖于生长温度、宿

主范围限制或药物敏感性，因此限制了反向遗传学在基因产物功能分析中的应用。即使采用 HA 和 NA 基因，对于它们来说可信的抗体驱动选择系统是可获得的，仍很难制备具有突出生长缺陷的病毒。相比之下，在此描述的反向遗传学系统不需要辅助病毒并允许人们产生在任何基因片段内具有突变或具有严重生长缺陷的转染体。图 5 证明了这个优点，它是具有突变 PA 基因的转染体病毒的回收。该技术将任何可存活突变(viable mutation)引入甲型流感病毒基因组，将能够使研究者解决很多长期存在的问题，如病毒基因组非翻译区的调节序列的性质、病毒蛋白的结构功能关系和宿主范围限制和病毒致病性的分子基础。

尽管灭活流感疫苗是可获得的，但是它们的功效次优，部分由于它们引发局部 IgA 和细胞毒性 T 细胞反应的能力有限。现在在进行之中的冷适应活流感疫苗的临床试验提示这种疫苗被最佳减毒，因此它们不会引起流感症状，但是仍将诱导保护性免疫(Keitel & Piedra, 1998 中综述)。然而，初步结果表明这些活病毒疫苗不会比最好的灭活疫苗显著更有效(Keitel. & Piedra, 1998 综述)，为进一步改善留下空间。一种可能性将是用如上所述的反向遗传学系统改变冷适应疫苗。或者，人们能使用反向遗传学从头开始制备编码内部蛋白的基因中具有多种减毒突变的“主要(master)”甲型流感菌株。在此描述的反向遗传学系统的最吸引人应用可能在于在怀疑大流行的情况下，减毒活病毒疫苗的快速制备，所述大流行涉及新 HA 或 NA 亚型流感病毒。

这个新反向遗传学系统将可能提高流感病毒作为疫苗载体的使用。该病毒可以被工程改造而表达除流感病毒蛋白之外的外来蛋白或免疫原性表位。人们能够例如产生具有作为第九节段的外来蛋白的病毒(Enami et al., 1991)并使用它们作为活疫苗。流感病毒不仅确实刺激强烈的细胞介导和体液免疫反应，而且它们还赋予病毒粒子表面 HA 和 NA 蛋白的宽泛排列(例如，15 个 HA 和 9 个 NA 亚型和它们的流行变体)，允许相同目标人群的重复免疫。

通过采用牛痘-T7 聚合酶系统表达病毒结构蛋白和 vRNA 已经制备了具有编码报道基因的人工 vRNA 的流感 VLPs(Mena et al., 1996)。使用反向遗传学，现在人们可以产生含有编码 vRNA 转录和复制所需蛋白(即 PA、PB1、PB2 和 NP)的 vRNAs，以及编码感兴趣蛋白的 vRNAs

的 VLPs。这种 VLPs 可以作为基因送递载体。重要的是，它们缺少编码病毒结构蛋白的基因将保证 VLP 基因治疗后不会产生传染性病毒。由于流感病毒基因组不整合到宿主染色体中，因此 VLP 系统将适于仅仅需要短期细胞转导情况下的基因治疗(例如对于癌症治疗)。与腺病毒载体(Kovesdi et al., 1997)对比，流感 VLPs 可能含有 HA 和 NA 变体，允许目标人群的重复治疗。

正粘病毒科包含甲型、乙型和丙型流感病毒，以及最近分类的首戈托病毒。在此描述的完全从克隆 cDNAs 产生传染性甲型流感病毒的策略将应用于任何正粘病毒，并且也许也应用于其它节段负义 RNA 病毒(例如本扬病毒科、沙粒病毒科)。无技术限制操作病毒基因组的能力对于病毒生活史和它们的调节、病毒蛋白的功能和病毒致病性的分子机制的研究具有深远意义。

实施例 2

流感病毒蛋白 PB2、PB1、PA 和 NP 的表达导致人工病毒 RNA 的复制和转录。为了产生流感 VLPs，使用用于流感病毒 RNAs 在体内细胞内合成的 RNA 聚合酶 I 系统(图 7)。在这个系统中，编码反义方向报道基因的 cDNA 侧翼连接流感病毒 RNA 的 5'和 3'非编码区。这个盒插入 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子之间。这种构建体转染真核细胞通过细胞 RNA 聚合酶 I 导致报道基因转录，由此产生流感病毒样 RNAs(Neumann et al., 1994)。流感病毒感染后，人工 vRNAs 就通过病毒聚合酶复合体复制和转录，导致报道基因表达。

为了确定 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白的表达是否引起由 RNA 聚合酶 I 衍生的转录物编码的报道基因表达，表达在鸡 β -肌动蛋白启动子(pCAGGS-WSN-NPO/14)控制下的 A/WSN/33(H1N1)病毒 NP 蛋白、在巨细胞病毒启动子 [pcDNA762(PB2)、pcDNA774(PB1) 和 pcDNA787(PA)]控制下的 A/PR/8/34 病毒的聚合酶蛋白的质粒(每种 1 μ g)，和 RNA 聚合酶 I 报道基因构建体(pPolII-GFP)转染人胚肾(293T)细胞。四十八小时后，30%-40%细胞表达 GFP(图 8)。相比之下，在缺乏聚合酶或 NP 蛋白的转染细胞中不能检测到 GFP 表达。这些结果表明 NP 和三个流感病毒聚合酶蛋白形成了复制和转录源自 RNA 聚合酶 I 的 GFP vRNA 的功能性复合体。

最佳的 vRNA 转录和复制。为了确定最佳报道 GFP 表达所需质粒

DNA 的量, 我们调节了聚合酶蛋白和 NP 的表达。以前的研究表明大量 PA 降低转录/复制系统中报道基因表达的程度(Mena et al., 1996)。因此, PA 从质粒的表达以逐渐方式降低, 确定 0.1 μ g pcDNA787(PA) 作为产生最强 GFP 表达的模板量。对于 NP, RNP 复合物的主要结构成分, 可能需要蛋白表达质粒的量高。然而, 更高量质粒不显著影响 GFP 阳性 293T 细胞的数量。此外, 各种量的 PB2 和 PB1 蛋白表达质粒(从 1.0 至 0.03 μ g)不影响 293T 细胞中的 GFP 表达。因此, 在所有随后的实验中, 使用 0.1 μ g pcDNA787(PA)和 1.0 μ g pcDNA774(PB1)、pcDNA762(PB2)和 pCAGGS-WSN-NPO/14。

从克隆 cDNAs 形成流感 VLPs。以前对于牛痘病毒 T7 RNA 聚合酶系统的研究表明流感 VLPs 的形成需要九个流感病毒蛋白: PB2、PB1、PA、HA、NA、NP、M1、M2 和 NS2(Mena et al., 1996)。相比之下, NS1 蛋白对于颗粒形成是可有可无的(Mena et al., 1996)。为了建立产生 VLP 的有效质粒驱动系统, 产生编码 HA、NA、M1、M2 和 NS2 基因的 cDNAs。该 cDNAs 克隆入真核表达载体 pCAGGS/MCS(受鸡 β -肌动蛋白启动子控制), 分别产生 pEWSN-HA、pCAGGS-WNA15、pCAGGS-WSN-M1-2/1、pEP24c 和 pCA-NS2。Western 印迹分析证实每种蛋白的表达。

为产生 VLPs, 用 1.0 μ g 每个蛋白表达质粒(除了 pcDNA787(PA), 使用 0.1 μ g), 和 1 μ g 报道基因构建体 pPolII-GFP 转染 10^6 个 293T 细胞。转染后 48 小时收获培养上清并与 A/WSN/33 病毒混合以提供 GFP vRNA 复制和转录所需的流感病毒蛋白。然后混合物接种到 MDCK 细胞。培养后十小时, 检测到 GFP 阳性的 MDCK 细胞, 相当于 450 个颗粒/毫升上清液(表 3)。因此, 质粒驱动的所有流感病毒结构蛋白的表达导致含有 GFP vRNA 的传染性流感 VLPs 的形成。此外, GFP vRNA 送递给 MDCK 细胞。

流感病毒的最佳装配。也研究了表达不同量 RNA 聚合酶 I 报道基因构建体, 以及 HA、NA、M1、M2 和 NS2 质粒 DNAs 的细胞中的 VLP 形成。在对于 pPolII-GFP 的实验中, 1.0 μ g 质粒 DNA 产生 VLPs 的效率很高, 而对于 2.0 μ g 或 3.0 μ g, 效率显著降低。因为在感染末期 NS2 和 M2 蛋白表达量低, 所以有可能最佳 VLP 形成将需要相对少量的表达质粒。M2 表达构建体从 1.0 μ g 降低至 0.3 μ g 导致 GFP 阳性的 MDCK

细胞数量增加十倍以上(表 3)。质粒进一步降至 0.03 μ g 不增加 VLPs 数量。对于 NS2, 检测的质粒量降低(0.1 μ g)关系到 VLPs 形成效率降低(表 3)。

M1 蛋白是病毒粒子的主要结构成分。因此, 高水平 M1 表达可能是 VLPs 有效形成所需的。在比较用 1.0 μ g 或 2.0 μ g M1 质粒 DNA 转染的细胞中 VLP 形成的实验中检验这个预测。如表 3 所示, 更高量质粒导致 GFP 阳性的 MDCK 细胞数量增加十倍以上。表达 HA 和 NA 蛋白的两个不同量(1 μ g 对 2 μ g)质粒的比较没有揭示 VLP 形成方面任何可评估的差异, 使得选择 1 μ g 每种质粒(pEWSN-HA、pCAGGS-WNA15)用于随后实验。总的说来, 这些研究导致 VLP 形成效率>100 倍增加, 最终导致每毫升上清液超过 10^4 个传染性流感病毒颗粒的产生(图 9)。

表 3. 感染 VLPs 形成的最佳量质粒 DNA*。

表达下列蛋白的质粒DNA的量 (μ g)										VLP形成的 相对效率†
PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M1	M2	NS2	GFP vRNA	
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	28
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.03	1.0	1.0	17
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	28
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	0.3	1.0	24
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	0.1	1.0	11
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	28
1.0	1.0	0.1	1.0	1.0	1.0	2.0	0.1	1.0	1.0	220

*用全部九个流感病毒结构蛋白的表达质粒和用 RNA 聚合酶 I-GFP 基因质粒转染 293T 细胞，转染后四十八小时，收集含有 VLP 的上清液，与 A/WSN/33 辅助病毒混合并接种给 MDCK 细胞。在感染后 10 小时固定细胞和用荧光显微镜测定 GFP 表达。仅仅 M1、M2 和 NS2 质粒的量变化(粗体字母)，以确定 MDCK 细胞中 GFP 表达的最佳量。

†通过计算五个显微镜视野中 GFP 阳性细胞的数量确定 VLP 形成的相对效率。选择含有 1μg 每种质粒(其产生 450 个传染性 VLP/毫升上清液)的样品作为参照(值为 1)。

完全从质粒制备 VLPs 的真实性。为了证实 VLPs 以与真正流感病毒相同的方式启动感染，用 WSN HA 的抗体中和 VLPs。来源于质粒转染的 293T 细胞的含 VLP 的上清液与抗 WSN HA 单克隆抗体或水泡性口膜炎病毒(VSV)(阴性对照)的 G 蛋白的单克隆抗体库在室温下培养 1 小时。不被抗 WSN HA 单克隆抗体库中和的 A/PR/8/34 辅助病毒添加到混合物并接种给 MDCK 细胞。仅仅抗 WSN-HA 特异性单克隆抗体中和 VLPs，表明 HA 介导(medicates)VLPs 与细胞的附着和 VLPs 进入细胞。

接下来，确定 VLPs 形成所需蛋白的最小组。其他人已确定了，三个流感病毒聚合酶和 NP 对 vRNA 复制和转录必不可少(Honda et al., 1988)。因此，包括这四个蛋白中的每一个，但是 HA、NA、M1、M2 或 NS2 顺序省去。排除这些质粒中的任何一个不影响转染的 293T 细胞中 GFP vRNA 的复制/转录。来源于转染的缺乏 HA、NA、M1 或 NS2 蛋白的 293T 细胞的上清液不促进感染 MDCK 细胞中 GFP 表达，表明传染性 VLPs 的缺乏。省去 M2 来检测传染性 VLPs，但是数量低(与全组结构蛋白相比，降低>500 倍)。因此，所有流感病毒结构蛋白是传染性 VLPs 有效形成所需的，与牛痘病毒系统的研究数据一致(Mena et al., 1996)。

在 VLPs 的制备中，VSV 糖蛋白可以替换 HA 和 NA 蛋白。用在受体结合和融合中起作用的 VSV G 蛋白替换流感病毒 HA 和 NA 蛋白。在用 pPolII-GFP、最佳量 PB2、PB1、PA、NP、M1、M2 和 NS2 表达构建体；和 1 μ g VSV-G 构建体(pCAGGS-VSV-G)转染的 293T 细胞中，VSV-G 蛋白对于流感病毒糖蛋白的替换没有不利影响 VLP 形成。相反，较高数量 GFP 阳性细胞可重现地得到，当 VSV-G，而不是 HA 和 NA 用作病毒糖蛋白时。因此，VSV G 蛋白可以有效并入流感病毒粒子并可以与 HA 和 NA 一样好地在病毒释放和进入中起作用。

产生传染性流感病毒颗粒的有效系统将是这个病毒研究中的资产和基因治疗的疫苗和载体制备中的潜在资产。与现存牛痘病毒系统对比，在此描述的 VLP 制备策略效率很高，细胞的初始转染和 VLPs 的产量(>10⁴ 传染性颗粒/毫升上清液)的效率都很高。此外，它完全通过表达流感病毒蛋白(即缺少任何其它病毒蛋白)的质粒驱动，大大简化了结果分析。另一个主要优点是研究致死突变在病毒粒子形成、RNP 复

合物的包装、病毒复制的出芽和结合和融合过程中的作用的能力。此外,很可能在上文描述的系统将对其它病毒同样好地运行,例如副粘病毒和弹状病毒。

流感病毒 HA 和 NA 蛋白可以被 VSV 糖蛋白 G 在功能上替代。以前,已经报道了当通过重组 SV40 病毒提供时,流感病毒未能并入 VSV G 蛋白(Naim et al., 1993)。在此描述的结果提示 HA 或 NA 都不是 VLPs 形成必不可少的,尽管不能排除这些糖蛋白在与其它病毒蛋白的相互作用中起作用,因此影响病毒粒子的结构,如表达无尾 HAs、NAs 或二者的病毒拉长的形状所提示(Garcia-Sastre et al., 1995; Jin et al., 1994; Jin et al., 1997; Mitnaul et al., 1996)。

上文描述的基于质粒的系统可能对治疗性基因送递特别有用。可以制备含有编码转录和复制所需蛋白(即 NP 和聚合酶)的 vRNA,以及编码感兴趣蛋白的 vRNA 的 VLPs。这些颗粒是有传染性的,并可以将指定基因送递至靶细胞中,在那里它将复制和转录。因为这些颗粒不含有病毒基因的完全互补物,所以它们不能制备传染性子代病毒。这个特征,连同缺乏病毒基因组整合入宿主染色体,将确保在人类和非人类受试者中基因送递的生物安全。最后,15 个 HA 和 9 个 NA 亚型和它们的变体的可得性将允许 VLPs 重复施用,因此克服对载体产生的蛋白的免疫抗性-其它病毒载体如腺病毒的重复使用所面临的主要障碍之一。质粒驱动系统的更多益处将在仅需要外来蛋白短期表达的情况下实现,如在癌症治疗中。

实施例 3

通过使用 Cre-loxP 系统,人们可以产生制备复制缺陷型病毒的包装细胞系。例如,制备含有侧翼连接两个 loxP 位点和一个病毒基因的转录终止盒的蛋白表达载体(例如 Life Technologies, Bethesda 的 pBS302, Maryland; 和 Sauer et al., 1993; Lasko et al., 1992; Pichel et al., 1993; Bolivar et al., 1977; Stuhl et al., 1981; Stuhl, 1985; Fiers et al., 1978)。在启动子序列处启动的转录在转录终止位点被阻断。因此,病毒基因不被转录和翻译。用这种载体稳定转染的细胞被缺乏编码克隆入 loxP 系统的基因的 vRNA 的流感病毒感染。这个病毒还含有编码 Cre 蛋白的另外的 vRNA。这个病毒在正常细胞中没有活力,因为它缺乏它的 vRNAs 中的一个。然而,在包装细胞系中,从 vRNA

表达的 Cre 蛋白导致 loxP 位点的重组, 导致转录终止位点的缺失。因此, 现在转录和表达各自的病毒基因, 允许病毒在这些细胞中扩增(图 10)。

此外, 制备表达 loxP 系统控制的晚期病毒蛋白(即 HA、NA、M1、M2 和 NS2)的包装细胞系(图 12)。HA 和 NA 可以被其它病毒受体结合和融合蛋白(例如 Ebola GP、Marburg GP、本扬病毒科糖蛋白 GP1 和 GP2、弹状病毒和副粘病毒的 G 和/或 F 蛋白、首戈托病毒糖蛋白和正链 RNA 病毒糖蛋白)替代。产生含有编码转录/复制所需蛋白(即聚合酶和 NP 蛋白)的 vRNAs、编码感兴趣基因的 vRNA 和编码 Cre 的 vRNA 的病毒样颗粒。这些 vRNAs 包装入包装细胞系中的病毒样颗粒。

这些病毒样颗粒可以用于疫苗和基因治疗目的, 因为(i)它们不含有病毒基因的全部互补物(full complement)并因此不能形成有传染性的子代颗粒, 满足所关心的严格安全; (ii)它们将可能表达高水平外来蛋白; (iii)它们不表达是主要抗原的病毒糖蛋白(HA、NA); 因此抗病毒蛋白的宿主免疫反应应该被限制。

实施例 4

建立了 RNA 聚合酶 II/双核酶系统, 它可以导致任何脊椎动物细胞系, 例如人 293T 细胞、鼠 NA 细胞或仓鼠 BHK-21 细胞中流感病毒的产生, 例如甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒。表达甲型流感 vRNA, 产生含有来源于 RNA 聚合酶 II 引起的 RNA 转录物的节段(PB2)的甲型流感病毒。

材料和方法

细胞

293T 人胚肾细胞, 一种组成性表达猿猴病毒 40 T 抗原的基因的 293 系衍生物(DuBridge et al., 1989), 被维持在补充 10% FCS、4 mM L-谷氨酰胺和抗生素的 DMEM(葡萄糖浓度: 4.5g/l)中。Madin-Darby 犬肾细胞(MDCK)生长在含有 5%新生牛血清、4 mM L-谷氨酰胺和抗生素的含 Eagle's 盐的极限必需培养基(MEM)中。

质粒构建

RNA 聚合酶 II 驱动的 vRNA 表达载体的构建是基于 pCAGGS-MCS(Hatta et al., 2001; Niwa et al., 1991), 其中 RNA 聚合酶 II 调节的转录由 β -肌动蛋白鸡启动子/CMV 增强子盒驱动。从 pX8dT(Schnell

et al. , 1984) 扩增 HDVRz 盒, 使用引物 5'-GCATGCGAAGACTTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCT-3'(SEQ ID NO:17) 和 5'-AGATCTAGGGAGCTCTCCCTTAGCCATCCGA-3'(SEQ ID NO:18) 并使用 BglII 和 SphI 限制性位点克隆入 pCAGGS-MCS。使用 pCAGGS-MCS 中的 EcoRI 和 NsiI 位点, 通过寡接头连接采用 5'-

AATTCTTTCTACTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACCCGGAGTCCC

GGGTCGGAGACGATGCA-3' (SEQ ID NO:19) 和 5'-

TCGTCTCCGACCCGGGACTCCGGGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGA

GTAGAAAG-3' (SEQ ID NO:20)

产生 HamRz 盒。用 BbsI 和 BsmBI 消化所产生的 PolII/双核酶载体 pCAGGS-2Ribo-I(图 12)产生线性化载体, 用于插入用 5'-

CGTCTCCGGTCAGTAGAAACAAGG-3' (SEQ ID NO:21) 和 5'-

CGTCTCCACCCAGCAAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:22)

通过 PCR 扩增获得的病毒 cDNA 构建体。RNA 聚合酶 II 驱动的表达和随后的两个核酶在 5'和 3'末端自身催化切割产生具有正确 3'和 5'末端的甲型流感 vRNA 分子(图 13)。pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E 表达在第 627 位氨基酸含有单个 Lys 至 Glu 置换的 HK483 的 PB2 vRNA。

重组病毒的产生

Neumann et al.(1999)和 Hatta et al.(2001)分别描述了重组甲型流感病毒 A/WSN/33 和 HK3/PB2-627E 的专门基于 RNA 聚合酶 I 反向遗传学系统的产生。

为了产生 HK3/PB2-627E(图 14)或 WSN/HK483 PB2 627E(图 14), 用 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E(0.1μg, 对于 PB2 节段的制备), 连同通过 RNA 聚合酶 I 制备各个病毒剩余 RNA 节段的质粒(每种 0.1μg, pPolII 质粒)转染 293T 细胞。也用 WSN/33 的 PA、PB1、PB2 和 NP 的蛋白表达构建体(每种 1μg)转染这些细胞。转染后四十八小时, 收集等分 293T 细胞上清液并在 MDCK 细胞中扩增病毒或用噬菌斑法在 MDCK 细胞上滴定。对于重组病毒的进一步分析, 从病毒上清液提取病毒 RNA 并用 RT PCR 和测序反应分析 PB2 vRNA。作为阴性对照, 从转染混合物中省去 PB2 的 vRNA 表达构建体, 并使用 PB2 vRNA 的 RNA 聚合酶 I 表达构建体代替 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E 用作阳性对照。

结果

对于具有正确 5'和 3'末端的全长甲型流感 vRNAs 的合成, 构建 pCAGGS-2Ribo-1(图 12)。然后插入来源于全长病毒 RNAs 的 cDNAs, 因此它们侧翼在 5'末端连接 HRz 和在 3'末端连接 HDVRz 序列。用鸡 β -肌动蛋白启动子/CMV 增强子盒从上游控制这个双核酶盒的表达。这种构建体转染细胞后, 双核酶盒, 包括病毒序列, 就被细胞 RNA 聚合酶 II 转录, 和转录物两个末端的自身催化核酶切割导致正确 vRNA 的产生(图 13)。

为了检验这个方法的可行性, 构建质粒 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E。这个构建体编码在两个核酶位点之间第 627 位氨基酸含有 Glu 的 HK3/PB2-627E 的 PB2 vRNA。在反向遗传学方法中, 通过 12 个质粒在 293T 细胞中共表达来检测这个构建体: PB2 vRNA 由 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E 表达, HK3/PB2-627E(PA、PB1、NP、M、NS、NA、HA)的剩余 vRNAs 由 RNA 聚合酶 I 系统表达; 蛋白表达质粒提供 A/WSN/33 的 PA、PB1、PB2 和 NP(图 14)。作为阴性对照, 从转染混合物中省去 PB2 的 vRNA 表达构建体, 和作为阳性对照, 用 PB2 vRNA 的 RNA 聚合酶 I 表达构建体 (pPolI-PB2/483-627E) 代替 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E。转染后四十八小时, 等分 293T 细胞上清液与 MDCK 细胞培养。四十八小时内, 在来源于 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E 或 pPolI-PB2/483-627E 转染的 293T 细胞的上清液中观察到细胞病变效应(CPE), 表明这些细胞中流感病毒的产生。在缺乏 PB2 vRNA 表达质粒下没有见到 CPE。为证明流感病毒粒子的确由表达流感 vRNAs 的 RNA 聚合酶 I 和 RNA 聚合酶 II/双核酶构建体的组合产生, 从 MDCK 细胞上清液中分离 vRNA 并对 PB2 RT-PCR 产物第 627 位氨基酸进行测序。重组病毒的确含有 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E 编码的 PB2 基因。

为进一步证明 RNA 聚合酶 I/双核酶系统的功能, 用制备 HK3/PB2-627E 的 PB2 vRNA 的 pCAGGS-2Ribo-PB2/483-627E 和制备 A/WSN/33 的 PA、PB1、NP、M、NS、NA、HA vRNAs 的 pPolI 质粒, 连同 A/WSN/33 的 PA、PB1、PB2 和 NP 蛋白表达的质粒转染 293T 细胞(图 15)。转染后 48 小时, 在 293T 细胞的上清液中得到 5×10^3 pfu/ml 病毒, 类似于在 pPolI 质粒表达所有 vRNAs 包括 PB2 vRNA 的阳性对照中观察到的。

讨论

这个研究证明 RNA 聚合酶 II/双核酶系统可以产生具有正确 (authentic) 5' 和 3' 末端的甲型流感 vRNAs。在这个系统中, 强大的鸡 β -肌动蛋白启动子/CMS 增强子盒驱动编码甲型流感 vRNA 的 RNA 转录物的表达, 其在 vRNA 的 5' 末端(HRz)和 3' 末端(HDVRz)侧翼连接核酶序列。这个初级 RNA 转录物在核酶位点的自身催化切割导致甲型流感 vRNAs 的产生。

使用这个系统, 产生了具有来源于 RNA 聚合酶 II/双核酶系统的 PB2 vRNA 的重组甲型流感病毒。因此, 这个实验清楚地证明由 RNA 聚合酶 II/双核酶系统产生的甲型流感 vRNA 分子的功能, 表明 RNA 聚合酶 II/双核酶系统应该允许完全从克隆的 cDNA 产生甲型流感病毒和/或其它节段 RNA 病毒。

该新 RNA 聚合酶 II/双核酶系统提供了几个优于迄今为止所描述的对于负链 RNA 病毒的两个反向遗传系统的主要优点。RNA 聚合酶 II 启动子没有宿主细胞特异性。因此, 这个 RNA 聚合酶 II/双核酶反向遗传学系统可以用于任何脊椎动物细胞系。相比之下, RNA 聚合酶 I 具有宿主特异性: 人 RNA 聚合酶 I 未能由小鼠启动子启动转录, 反之亦然(Grummt et al., 1982; Learned et al., 1982)。此外, 与 T7 聚合酶系统相比, RNA 聚合酶 II/双核酶系统提供了不需要表达反式(in trans)RNA 聚合酶和病毒 RNA 末端精确休整的优点。对于许多病毒来说, 病毒 RNA 基因组精确 3' 末端的合成对于有效的病毒产生是决定性的。然而在 T7 RNA 聚合酶系统中, 一至三个 G 核苷酸的添加是有效转录所需的, 它在很多情况下降低触发病毒复制的效率, 因此降低反向遗传学引起的重组病毒的产生。RNA 聚合酶 II/双核酶系统合成具有与真正病毒 RNAs 相同末端的 RNA 分子。

总之, RNA 聚合酶 II/双核酶系统显示出人工合成正确甲型流感 vRNA 的能力。这首次描述了产生具有源于基于 RNA 聚合酶 II 的反向遗传学系统的 RNA 节段的节段负链 RNA 病毒。由于 RNA 聚合酶 II/双核酶系统不受宿主细胞物种限制的影响, 因此它将可能对疫苗的制备具有重大影响, 此情况下由于生物安全预防措施, 仅仅可以使用非常有限数量的细胞系。鸡胚成纤维细胞可能被批准用于活疫苗的制备; 因此这些细胞中的候选菌株通过反向遗传学产生。因为人 RNA 聚

合酶 I 启动子在鸡胚成纤维细胞中不是功能性的(未显示数据), 所以基于 RNA 聚合酶 I 的反向遗传学系统在这个系统中将不会成功。RNA 聚合酶 II/双核酶系统将可能克服这些限制并提供广泛使用反向遗传学系统进行流感和其它负链 RNA 病毒的疫苗制备的基础。

参考文献

Albo et al., J. Virol., 70:9013 (1996).

Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1987).

Aymard-Henry et al., Virology: A Practical Approach, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150 (1985).

Bachmeyer, Intervirology, 5:260 (1975).

Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck & Co., Rahway, NJ (1992).

Baron et al., J. Virol., 71:1265 (1997).

Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977).

Bridgen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93:15400 (1996).

Castrucci et al., J. Virol., 66:4647 (1992).

Castrucci et al., J. Virol., 69:2725 (1995).

Chowira et al., J. Biol. Chem., 269:25856 (1994).

Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:11563 (1995).

Conzelmann et al., J. Gen. Virol., 77:381 (1996).

Conzelmann et al., Trends Microbiol., 4:386 (1996).

Conzelmann, Annu. Rev. Genet., 32:123 (1998).

Cozelmann et al., J. Virol., 68:713 (1994).

DuBridge et al., Mol. Cell Biol., 7:379 (1987).

Dunn et al., Virology, 211:133 (1995).

Edwards, J. Infect. Dis., 169: 68 (1994).

Elliott, Mol. Med., 3:572 (1997).

Enami et al., J. Virol., 65:2711 (1991).

Enami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:3802 (1990).

Enami et al., Virology, 185:291 (1991).

Fiers et al., Nature, 273:113 (1978).

Fodor et al., J. Virol., 73:9679 (1999).

Garcia-Sastre et al., Virus Res., 37:37 (1995).

Garcin et al., EMBO J., 14:6087 (1995).

Goto et al., Virology, 238:265 (1997).

Grand and Skehel, Nature, New Biology, 238:145 (1972).

Grummt et al., Nature, 296:173 (1982)..

- Hagen et al., J. Virol., **68**:1509 (1994).
- Hatta et al., Science, **293**:1840 (2001)..
- He et al., Virology, **237**:249 (1997).
- Hoffman et al., J. Virol., **71**:4272 (1997).
- Honda et al., J. Biochem. (Tokyo), **104**:1021 (1988).
- Horimoto et al., J. Virol., **68**:3120 (1994).
- Huddleston et al., Nucl. Acids Res., **10**:1029 (1982).
- Inoue et al., J. Virol. Methods, **107**:229 (2003).
- Jin et al., EMBO J., **13**:5504 (1994).
- Jin et al., EMBO J., **16**:1236 (1997).
- Kajima et al., Pharma Ther., **68**:247 (1995).
- Kato et al., Genes Cells, **1**:569 (1996).
- Keitel et al., in Textbook of Influenza, eds. Nickolson, K. G., Webster, R. G., and Hay, A. (Blackwell, Oxford), pp. 373-390 (1998).
- Kilbourne, Bull. M2 World Health Org., **41**: 653 (1969).
- Kobasa et al., J. Virol., **71**:6706 (1997).
- Kovesdi et al., J. Curr. Opin. Biotechnol., **8**:583 (1997).
- Kumar et al., FASEB J., **9**:1183 (1995).
- Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**:6232 (1992).
- Laver & Webster, Virology, **69**:511 (1976).
- Lawson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **92**:4477 (1995).
- Leahy et al., J. Virol., **71**:8347 (1997).
- Leahy et al., J. Virol., **71**:8352 (1997).
- Leahy et al., J. Virol., **72**:2305 (1998).
- Learned et al., J. Mol. Appl. Genet., **1**:575 (1982).
- Li et al., Virus Res., **37**:153 (1995).
- Luytjes et al., Cell, **59**:1107 (1989).
- Marriott et al., Adv. Virus Res., **53**:321 (1999).
- Mena et al., J. Virol., **70**:5016 (1996).
- Mizrahi, (ed.), Viral Vaccines, Wiley-Liss, New York, 39-67 (1990).
- Murphy, Infect. Dis. Clin. Pract., **2**: 174 (1993).
- Muster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 5177 (1991).

- Munoz et al., Antiviral Res., **46**:91 (2000).
- Nagai et al., Microbiol. Immunol., **43**:613 (1999).
- Nagai, Rev. Med. Virol., **9**:83 (1999).
- Naim et al., J. Virol., **67**:4831 (1993).
- Neumann et al., Adv. Virus Res., **53**:265 (1999).
- Neumann et al., J. Gen. Virol., **83**:2635 (2002).
- Neumann et al., J. Virol., **71**:9690 (1997).
- Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **96**:9345 (1999).
- Neumann et al., Virology, **202**:477 (1994).
- Neumann et al., Virology, **287**:243 (2001).
- Niwa et al., Gene, **108**:193 (1991).
- Ogra et al., J. Infect. Dis., **134**: 499 (1977).
- Osol (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).
- Palese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **93**:11354 (1996).
- Parks et al., J. Virol., **73**:3560 (1999).
- Pekosz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **96**:8804 (1999).
- Perez et al., Virology, **249**:52 (1998).
- Pichel et al., Oncogene, **8**:3333 (1993).
- Pleschka et al., J. Virol., **70**:4188 (1996).
- Pley et al., Nature, **372**:68 (1994).
- Radecke et al., EMBO J., **14**:5773 (1995).
- Radecke et al., Virology, **217**:418 (1996).
- Roberts et al., Virology, **247**:1 (1998).
- Robertson et al., Biologicals, **20**:213 (1992).
- Robertson et al., Giornale di Igiene e Medicina Preventiva, **29**:4 (1988).
- Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **93**:14998 (1996).
- Schnell et al., EMBO J., **13**:4195 (1994).
- Struhl et al., J. Mol. Biol., **152**:553 (1985).
- Struhl, NAR, **13**:8587 (1985).
- Subbarao et al., J. Virol., **67**:7223 (1993).
- Weber et al., Arch. Virol., **142**:1029 (1997).
- Weber et al., J. Virol., **70**:8361 (1996).

Weber et al., Arch. Virol., 142:1029 (1997).

World Health Organization TSR No. 673 (1982).

Whelan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:8388 (1995).

Yasuda et al., J. Virol., 68:8141 (1994).

所有出版物、专利和专利申请并入这里作为参考文献。虽然在上述说明书中，已经描述了本发明涉及的其某些优选实施方案，并且为了说明，已经阐述了许多细节，但是对于本领域技术人员来说，本发明可以有另外的实施方案并且在此描述的某些细节可以相当大地变化而不背离本发明的基本原则将是显而易见的。

<110> Kawaoka, Yoshihiro

Hamm, Stefan

Ebihara, Hideki

WARF - Wisconsin Alumni Research Foundation

<120> 含 POLII 启动子和核酶的重组流感载体

<130> 800.037W01

<150> US 60/473,797

<151> 2003-05-28

<160> 37

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 1

cacacacgtc tcgtattagt agaaacaagg tcgtttttaa actattcgac actaattgat 60

ggccatccga attcttttgg 80

<210> 2

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 2

cacacacgtc tccgggagcg aaagcaggtc aattatattc aatatggaaa gaataaaaga 60

actaagg 67

<210> 3

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 3

cacacacgtc tcgtattagt agaaacaagg cattttttca tgaaggacaa gctaaattca 60

ctattttttgc cgtctgagct cttcaatgg 89

<210> 4

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 4

cacacacgtc tccgggagcg aaagcaggca aaccatttga atggatgtca atccgacttt 60

acttttct 67

<210> 5

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 5

ccaacccgtc tcctattagt agaaacaagg tacttttttg gacagtatgg atagcaaata 60

gtagcattgc cacaactatc tcaatgcatg tgtgaggaag gag 103

<210> 6

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 6
ccaacccgtc tccgggagcg aaagcaggta ctgattcaaa atggaagatt ttgtgcgaca 60
atgcttc 67

<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 7
cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg gtgtttttcc 40

<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 8
cacacacgtc tccgggagca aaagcagggg aaaataaaaa caacc 45

<210> 9
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引物

<400> 9
cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg gtatTTTTtct ttaattg 47

<210> 10
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 10

cacacacgtc tccgggagca aaagcagggt agataatcac tc

42

<210> 11

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 11

cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg agttttttga acaaac

46

<210> 12

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 12

cacacacgtc tccgggagcg aaagcaggag tttaaatgaa tccaaacc

48

<210> 13

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 13

cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg tagtttttta ctccagc

47

<210> 14

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 14

cacacacgtc tccgggagca aaagcaggta gatattgaaa g

41

<210> 15

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 15

cacacacgtc tcctattagt agaaacaagg gtgtttttta ttattaaata agc

53

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 16

cacacacgtc tccgggagca aaagcagggt gacaaagaca taatgg

46

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 17

gcatgcgaag acttgggtcg gcatggcatc tccacctcct

40

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 18

agatctaggg agctctccct tagccatccg a

31

<210> 19

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡接头

<400> 19

aattctttct actctgatga gtccgtgagg acgaaacccg gagtcccggg tcggagacga
tgca

60

64

<210> 20

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡接头

<400> 20

tcgtctccga cccgggactc cgggtttcgt cctcacggac tcatcagagt agaaag

56

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<400> 21

cgtctccggt cagtagaaac aagg

24

<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引物	
<400> 22	
cgtctccacc cagcaaaagc agg	23
<210> 23	
<211> 96	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的锤头 (HH) 序列	
<400> 23	
gggcgaaagc ccagaagguc cugaugaggc cgaaaggccg aagagguc aa gcucgaaag	60
cgagaguagu cgagaugaaa gcaucuccug accuca	96
<210> 24	
<211> 115	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的发夹 (HP) 序列	
<400> 24	
gggcgaaagc ccagaagguc cugaugaggc cgaaaggccg aaacuccagu ggcaguccug	60
uugaaaaaca gagaagccaa ccagagaaac acacguugug guauauuacc uggua	115
<210> 25	
<211> 110	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的 HDV 核酶序列	

<400> 25

gggcgaaagc ccagaagguc cugaugaggc cgaaaggccg aaacuccaaa gggucggcau 60
ggcaucucca ccuccucgcg guccgaccug ggcuacuucg guaggcuaag 110

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体序列

<400> 26

gggttattgg agacggtacc gtctcctccc ccc 33

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体序列

<400> 27

ggggggagga gacggtaccg tctccaataa ccc 33

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (18)

<223> n = A, T, C 或 G

<400> 28

cgtctcntat tagtagaa 18

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (17)

<223> n = A, T, C 或 G

<400> 29

ttttgctccc ngagacg

17

<210> 30

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (17)

<223> n = A, T, C 或 G

<400> 30

cgtctcnggg agcaaaa

17

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (18)

<223> n = A, T, C 或 G

<400> 31

ttctactaat angagacg

18

<210> 32

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<400> 32

tattagtaga a

11

<210> 33

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<400> 33

gggagcaaaa

10

<210> 34

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<400> 34

gggttattag tagaa

15

<210> 35

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列

<400> 35

ttttgctccc ccc	13
<210> 36	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列	
<400> 36	
ggggggagca aaa	13
<210> 37	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的载体/流感病毒 cDNA 序列	
<400> 37	
ttctactaat aaccc	15

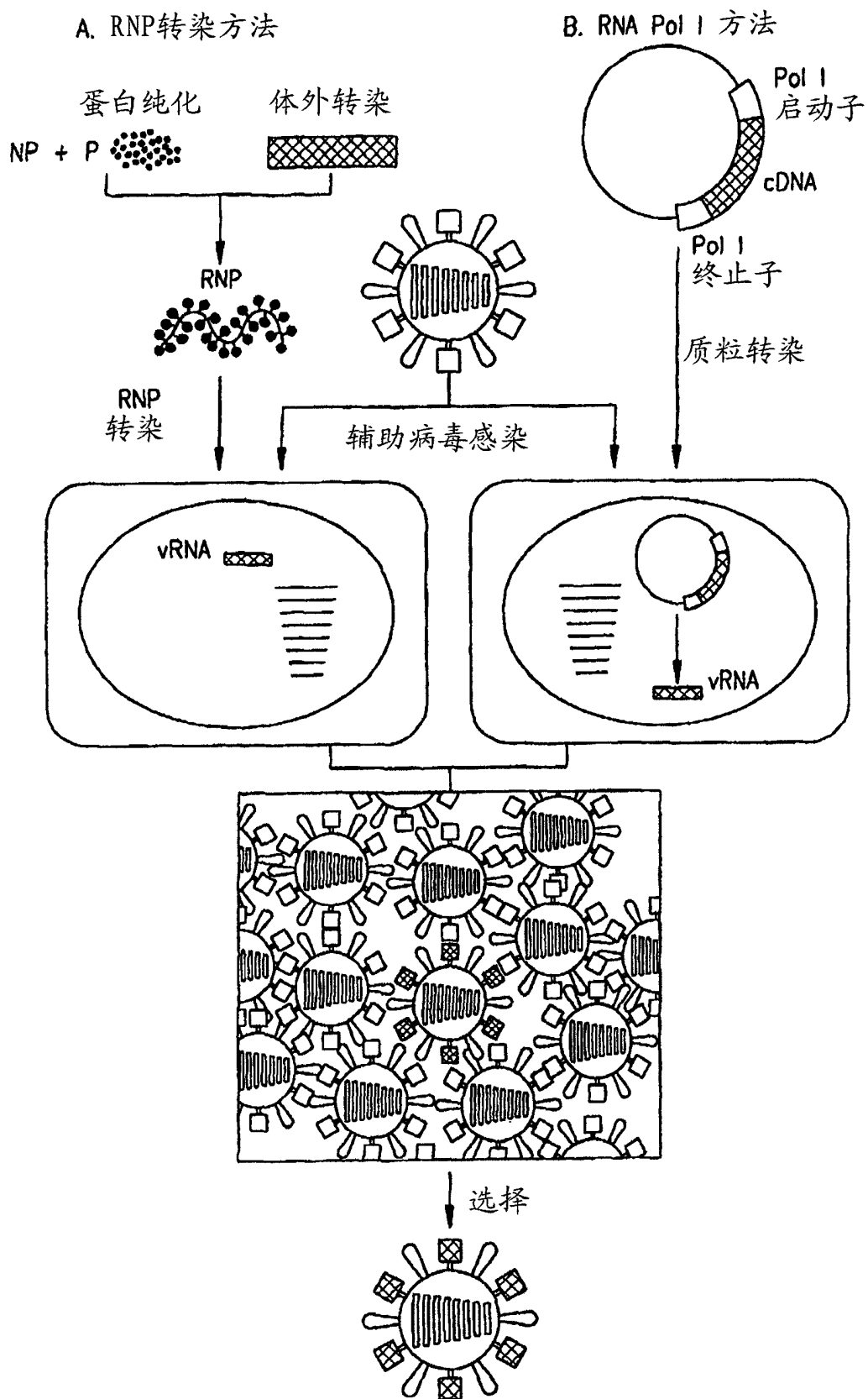


图 1

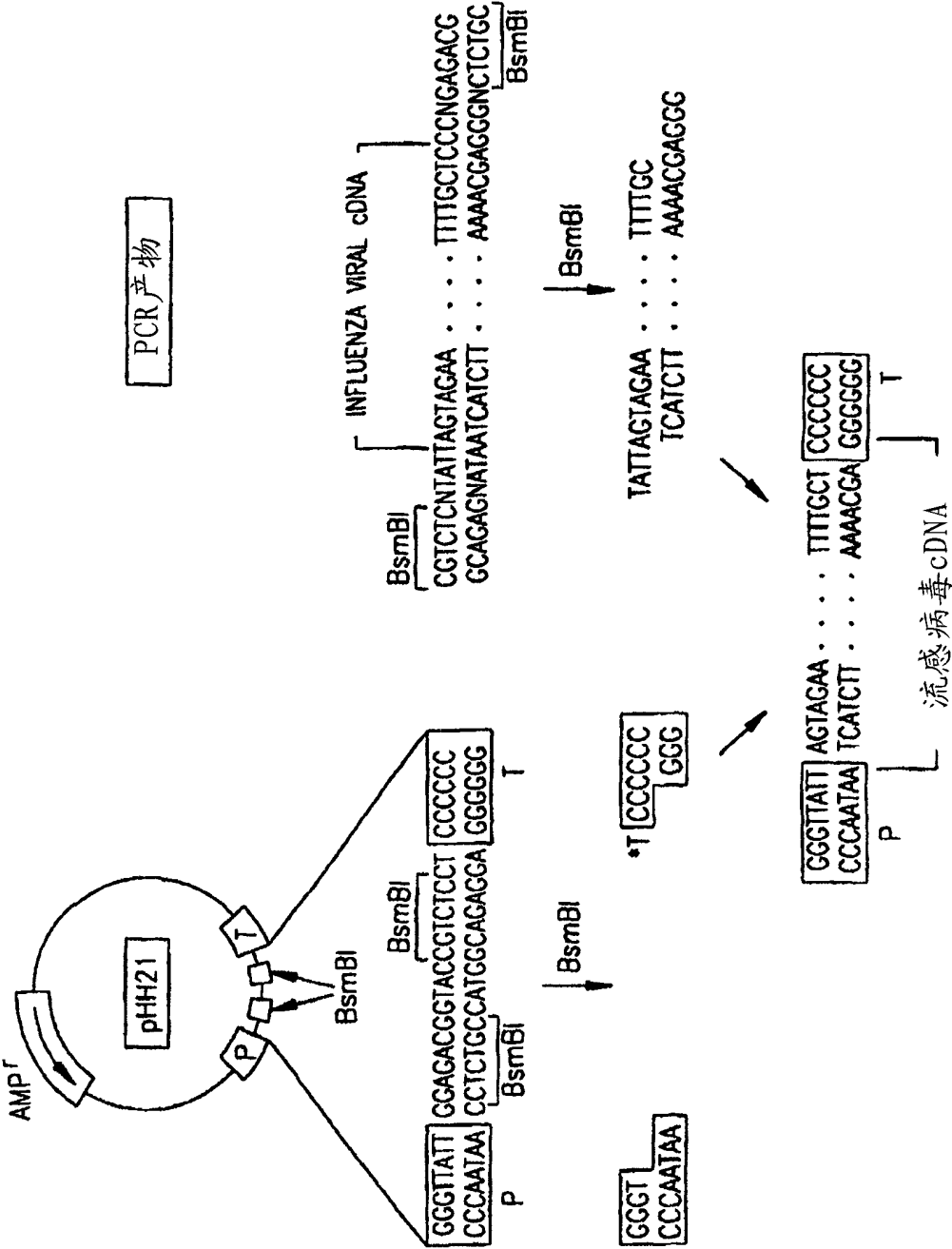


图 2

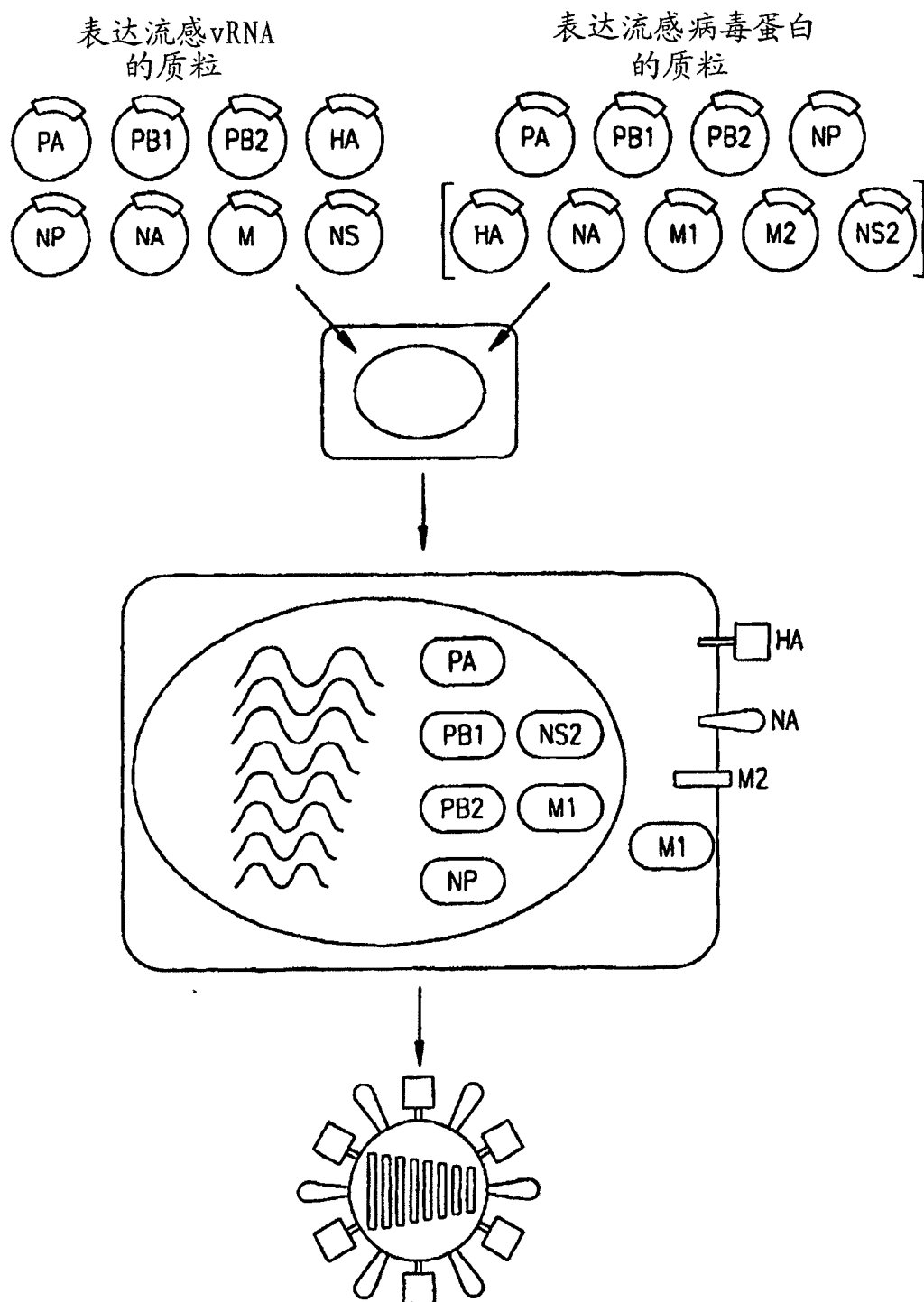




图 4C

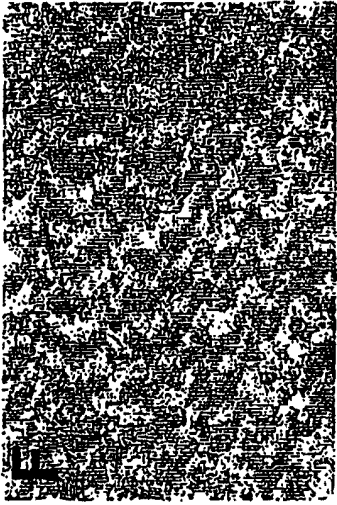


图 4F

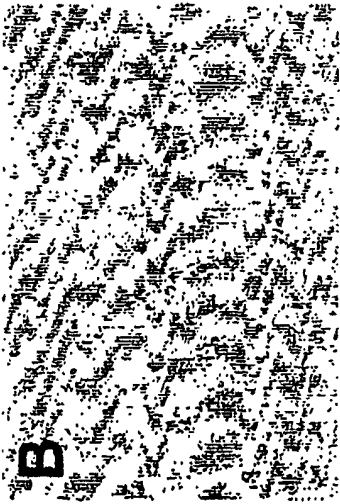


图 4B

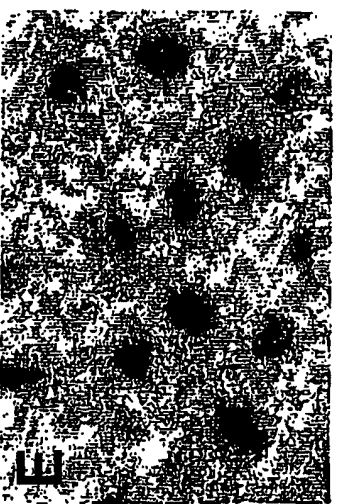


图 4E



图 4A

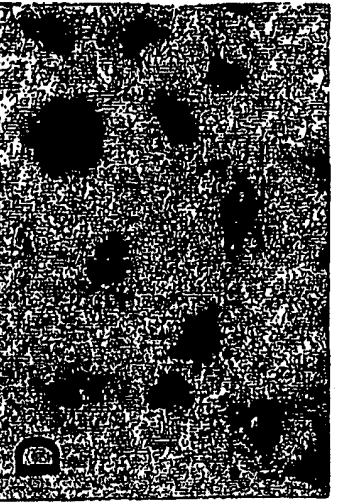


图 4D

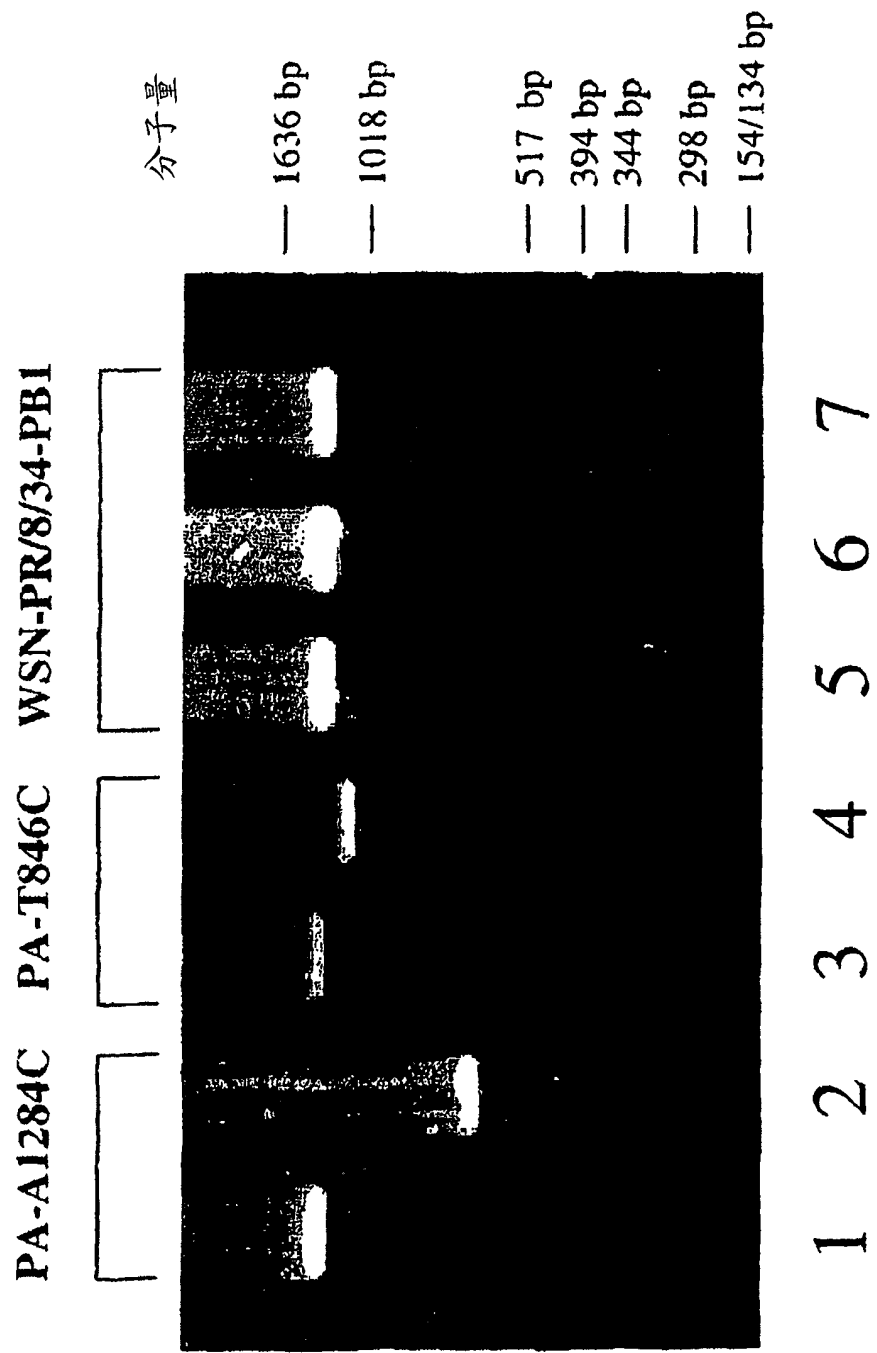


图 5

Poli-5'WPB2

CAC ACA CGT CTC GTA TTA GTA GAA ACA AGG TCG TTT TTA AAC TAT TCG
ACA CTA ATT GAT GGC CAT CCG AAT TCT TTT GG

长度: 80 nt

重叠: 26 nt

Poli-3'WPB2

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GTC AAT TAT ATT CAA TAT GGA
AAG AAT AAA AGA ACT AAG G

长度: 67 nt

重叠: 24 nt

Poli-5'WPB1

CAC ACA CGT CTC GTA TTA GTA GAA ACA AGG CAT TTT TTC ATG AAG GAC
AAG CTA AAT TCA CTA TTT TTG CCG TCT GAG CTC TTC AAT GG

长度: 89 nt

重叠: 26 nt

Poli-3'WPB1

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GCA AAC CAT TTG AAT GGA TGT
CAA TCC GAC TTT ACT TTT C

长度: 67 nt

重叠: 27 nt

Poli-5'WPA

CCA ACC CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG TAC TTT TTT GGA CAG TAT
GGA TAG CAA ATA GTA GCA TTG CCA CAA CTA TCT CAA TGC ATG TGT GAG
GAA GGA G

长度: 103

重叠: 25 nt

Poli-3'WPA

CCA ACC CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GTA CTG ATT CAA AAT GGA AGA
TTT TGT GCG ACA ATG CTT C

长度: 67 nt

重叠: 27 nt

Poli-5'WHA

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTG TTT TTC C

长度: 40 nt

重叠: 22 nt

Poli-3'WHA

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGG AAA AT AAA AAC AAC C

长度: 46 nt

重叠: 29 nt

图 6A

Poli-5'WNP

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTA TTT TTC TTT AAT TG

长度: 47 nt

重叠: 30 nt

Poli-3'WNP

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT AGA TAA TCA CTC

长度: 42 nt

重叠: 26 nt

Poli-5'WNA

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG AGT TTT TTG AAC AAA C

长度: 46 nt

重叠: 29 nt

Poli-3'WNA

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GAG TTT AAA TGA ATC CAA ACC

长度: 48 nt

重叠: 32 nt

Poli-5'WM

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG TAG TTT TTT ACT CCA GC

长度: 47 nt

重叠: 30 nt

Poli-3'WM

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GTA GAT ATT GAA AG

长度: 41 nt

重叠: 26 nt

Poli-5'WNSCAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTG TTT TTT ATT ATT AAA
TAA GC

长度: 53 nt

重叠: 36 nt

Poli-3'WNS

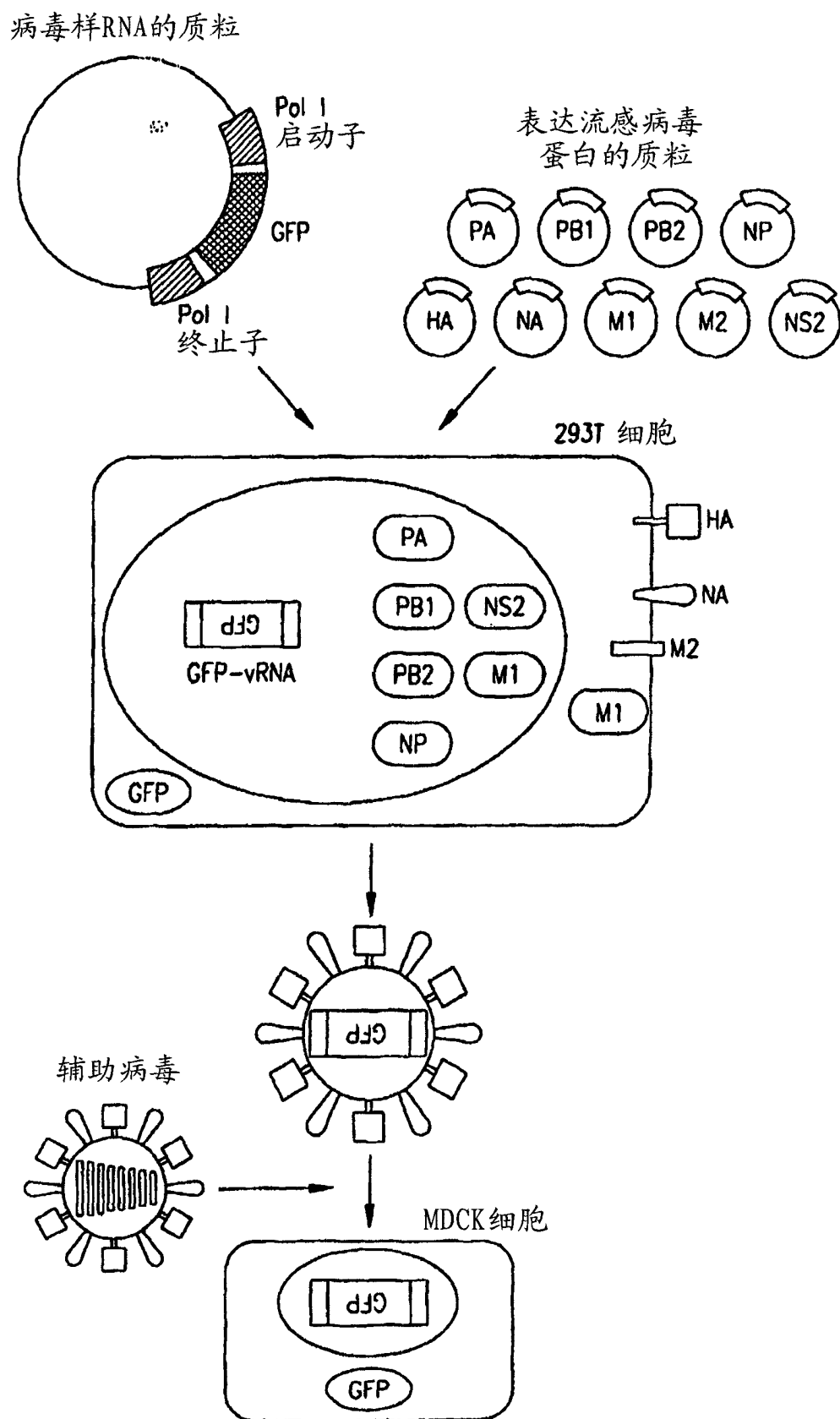
CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT GAC AAA GAC ATA ATG G

长度: 46 nt

重叠: 30 nt

斜体: BsmBI识别序列
 下划线: 流感病毒序列
 下划线+粗体: 流感病毒编码区

图 6B



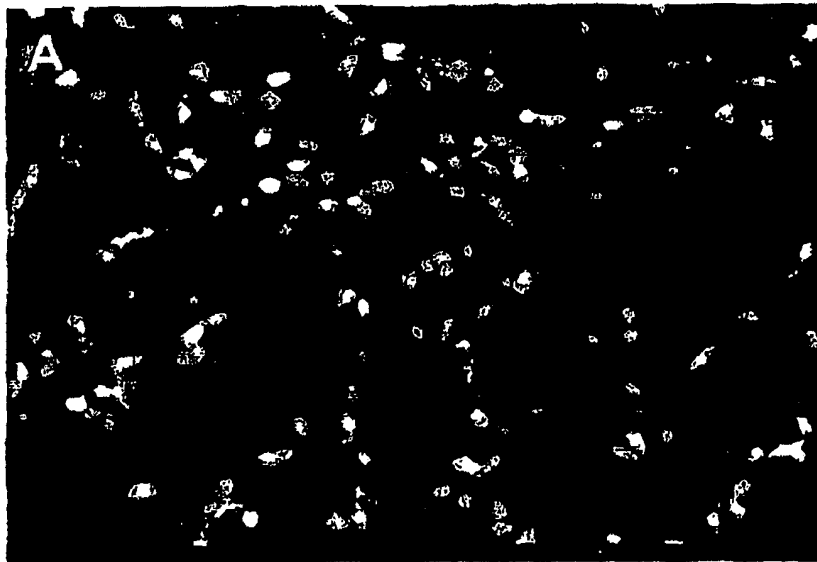


图 8A

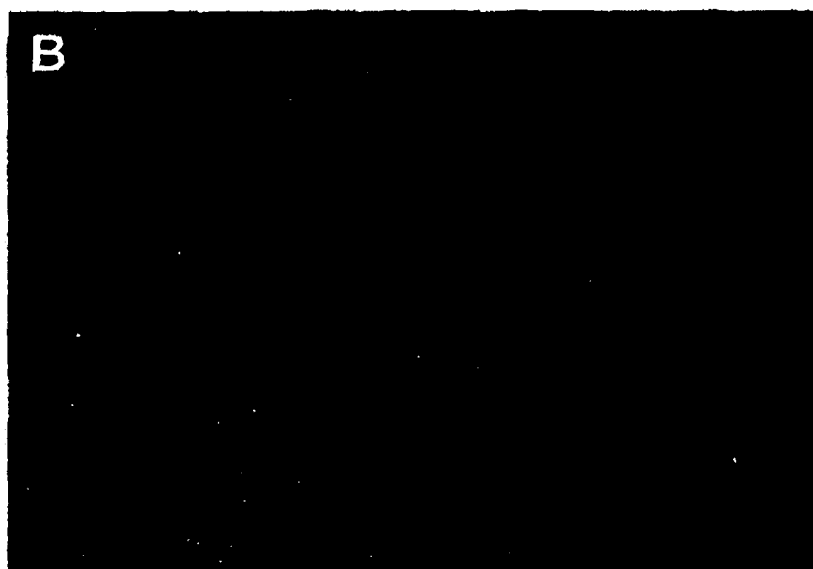


图 8B



图 9A



图 9B

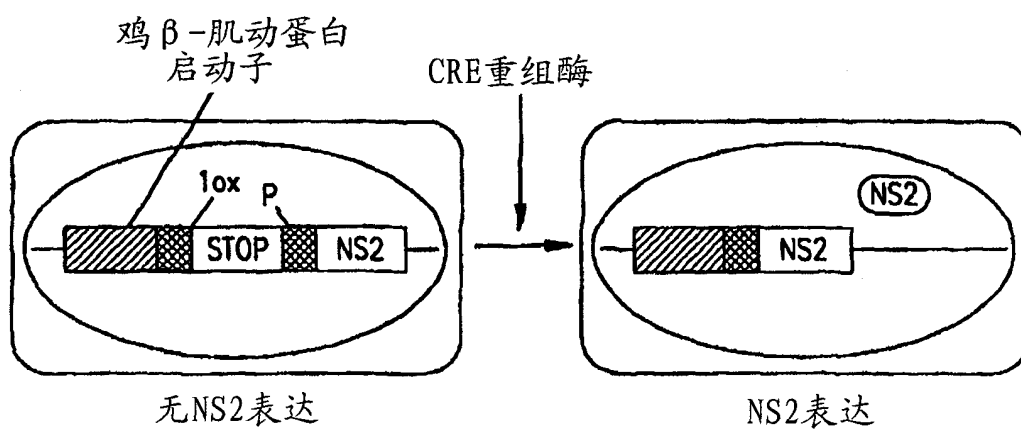


图 10

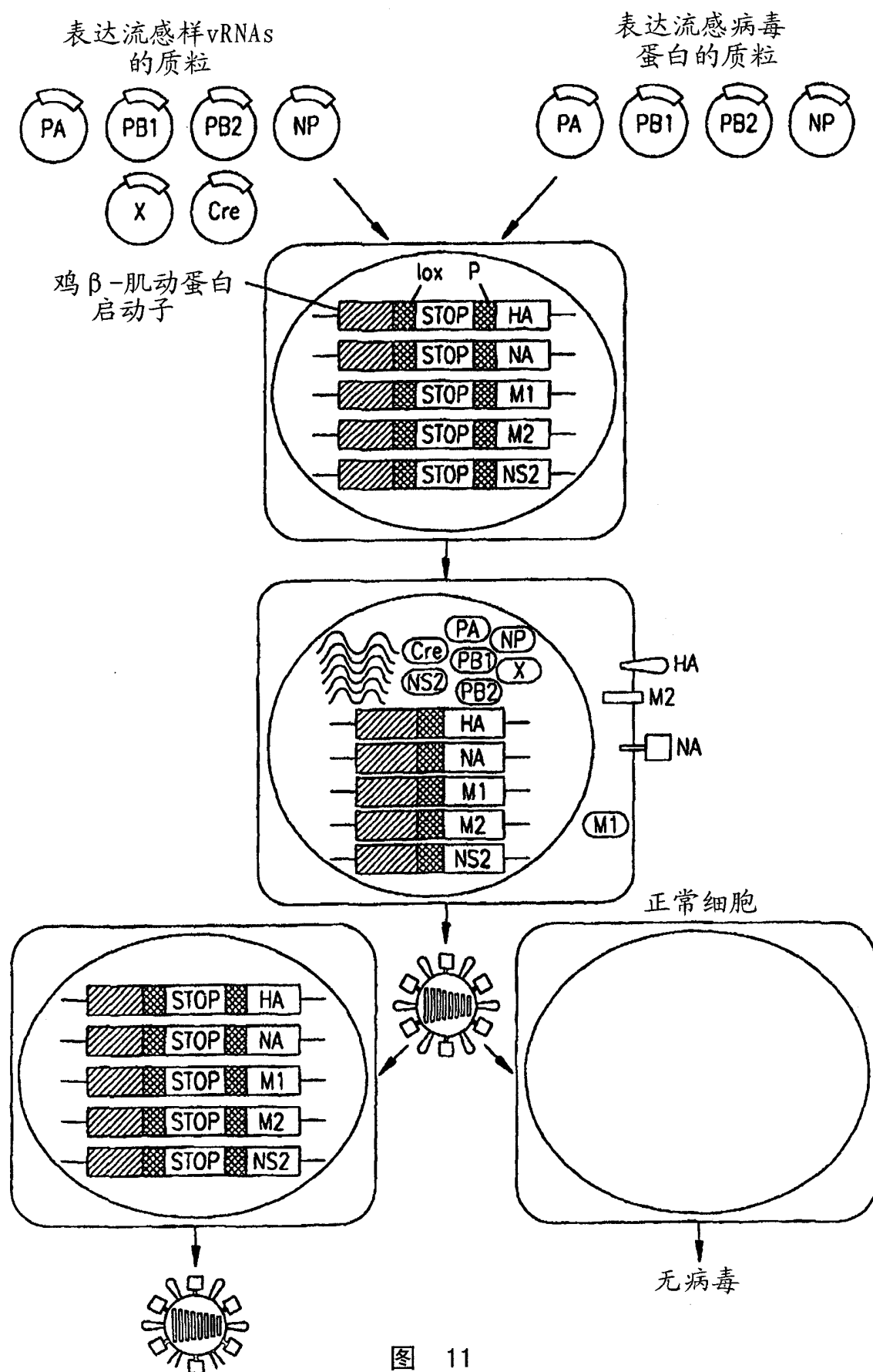


图 11

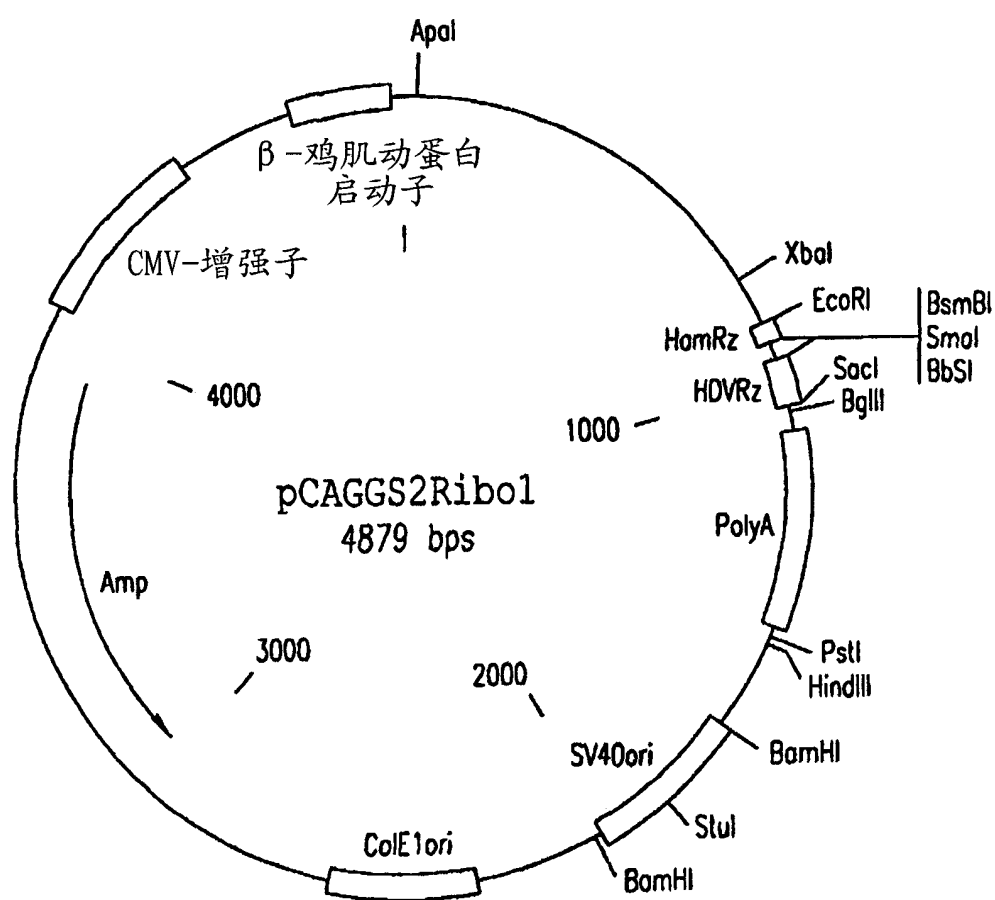


图 12

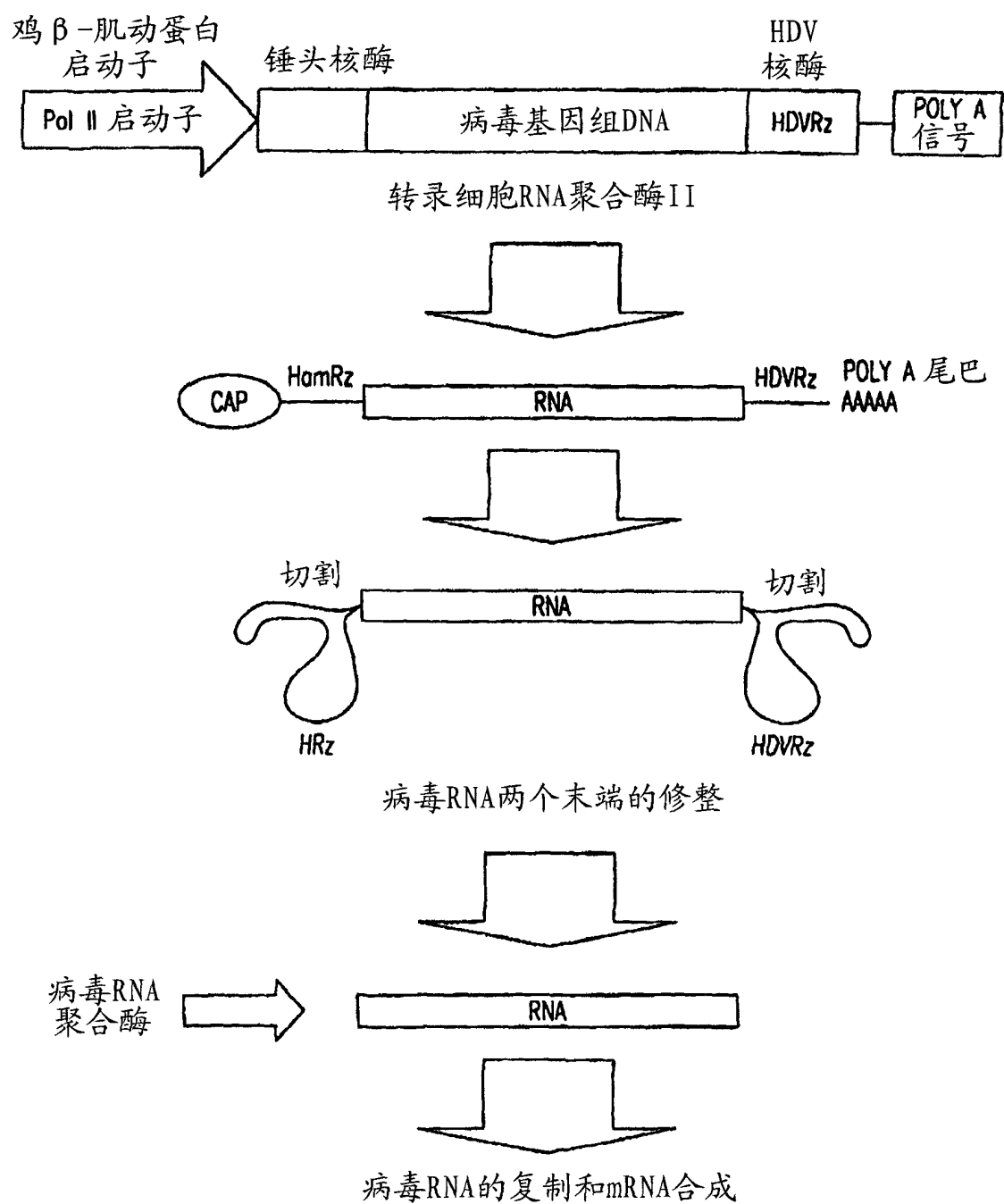


图 13

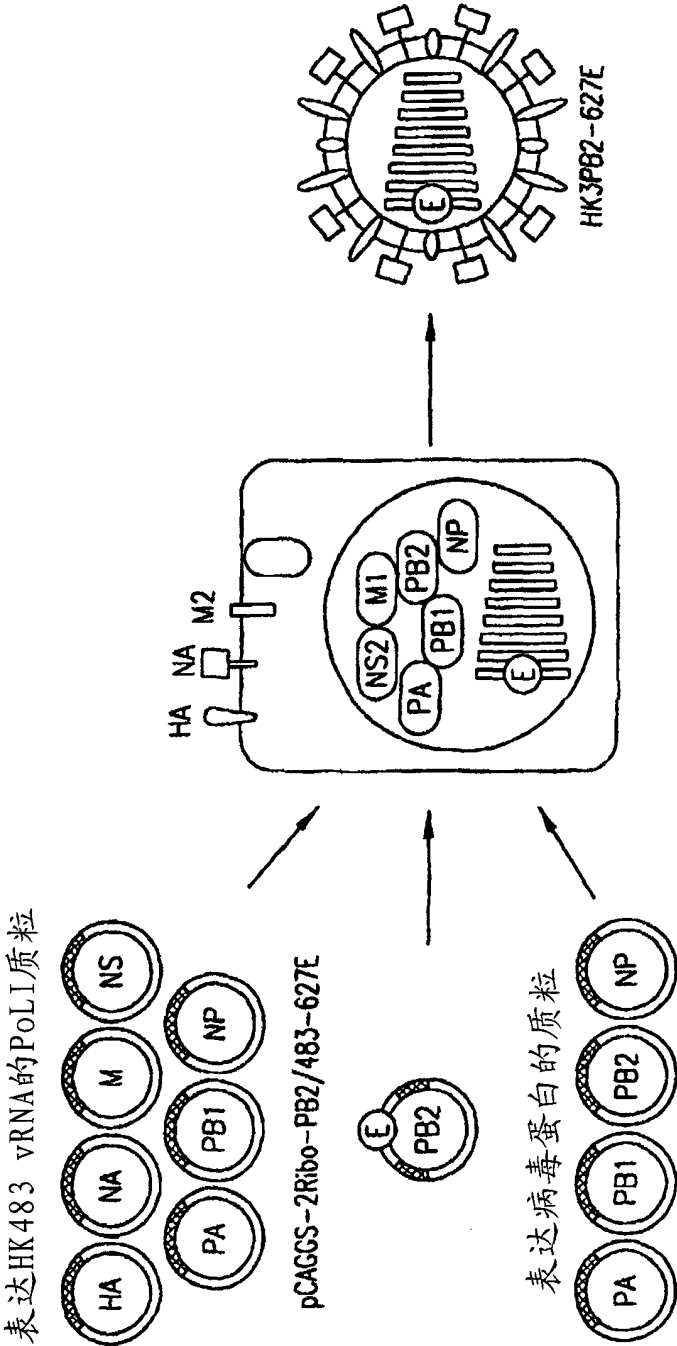


图 14

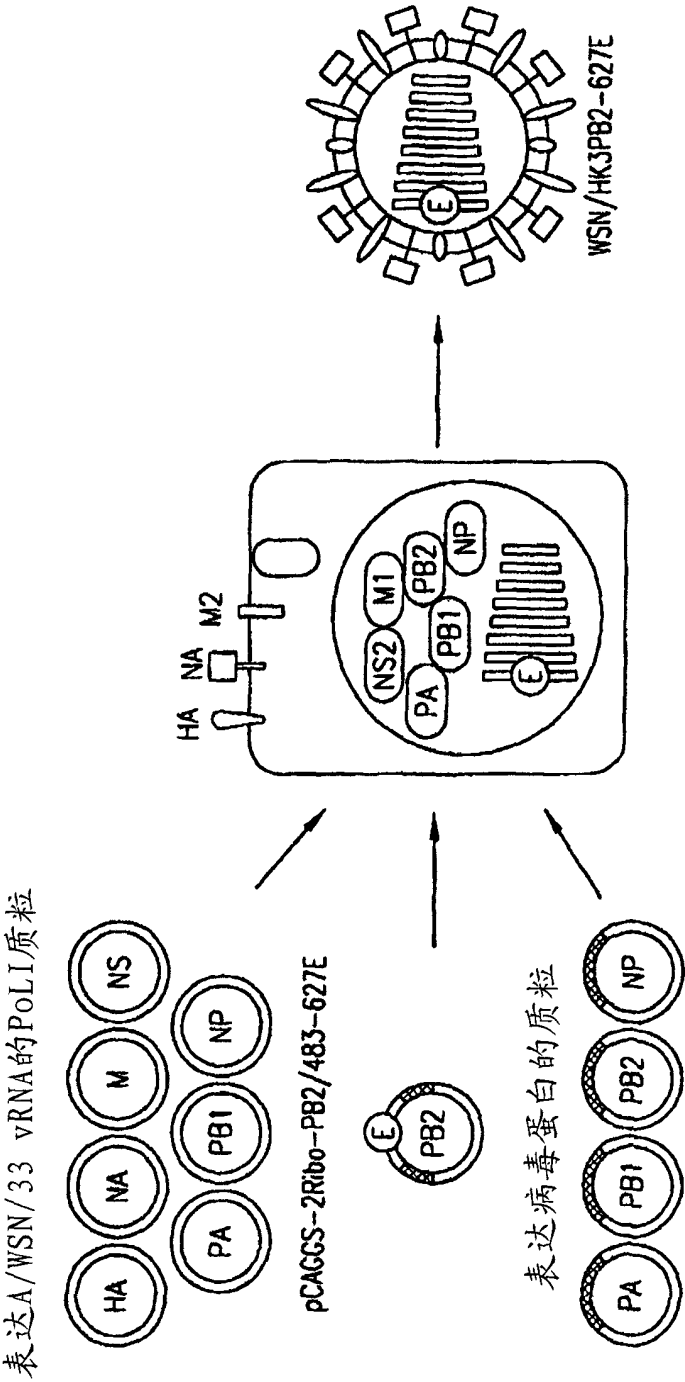


图 15

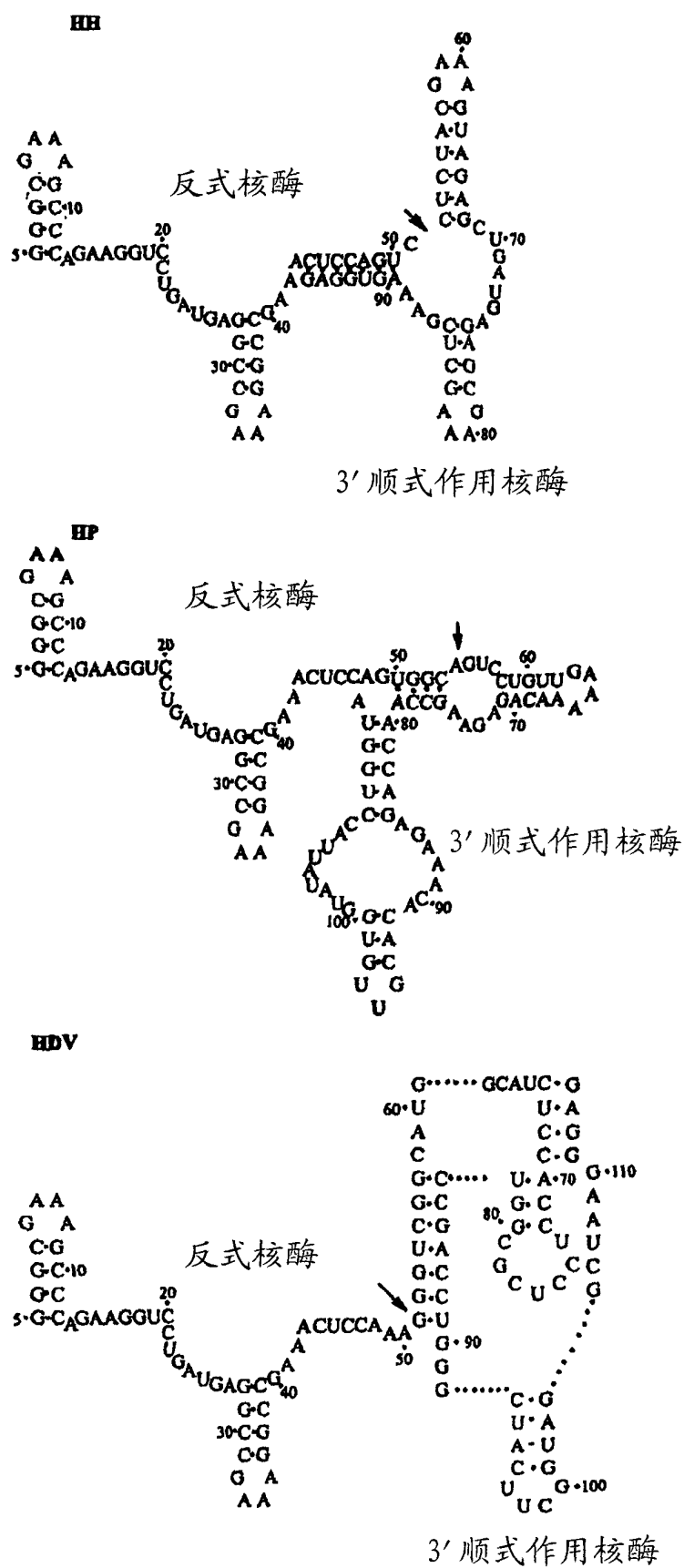


图 16