



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105121634 B

(45)授权公告日 2019.07.26

(21)申请号 201380075430.3

C12N 15/44(2006.01)

(22)申请日 2013.12.27

C12N 15/38(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105121634 A

(43)申请公布日 2015.12.02

(30)优先权数据

10-2013-0026767 2013.03.13 KR

10-2013-0117325 2013.10.01 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/012263 2013.12.27

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2014/142433 KO 2014.09.18

(73)专利权人 易木农麦克斯有限公司

地址 韩国首尔

(72)发明人 朴世镐 李殷妃

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桢

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

(56)对比文件

CN 101516910 A,2009.08.26,

US 20120083035 A1,2012.04.05,

Philip H Jones等.Bone marrow stromal cell antigen 2 (BST-2) restricts mouse mammary tumor virus (MMTV) replication in vivo.《retrovirology》.2012,

Rie Watanabe等.Influenza virus is not restricted by tetherin whereas influenza VLP production is restricted by tetherin..《Virology 》.2011,摘要.

Xiao-Ben Pan等.BST2/Tetherin Inhibits Dengue Virus Release from Human Hepatoma Cells.《PLOS ONE》.2012,

Ernest C. Borden等.Interferon-Stimulated Genes and Their Protein Products What and How?.《JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH》.2011,第2页.

审查员 徐俊

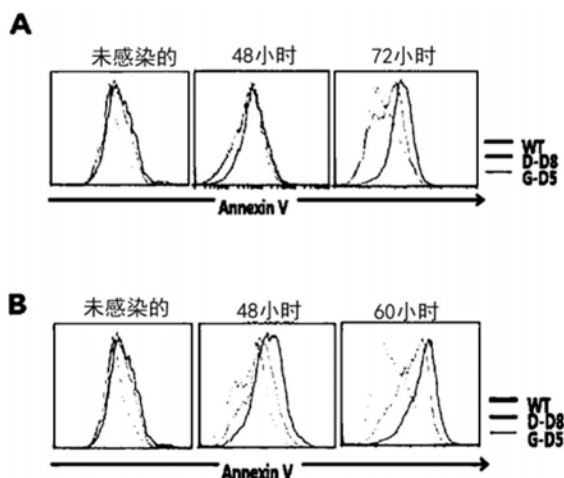
权利要求书1页 说明书14页 附图7页

(54)发明名称

具有提高的病毒生产能力的细胞系及其生产方法

(57)摘要

本发明涉及本发明涉及具有提高的病毒生产能力的细胞系及其制备方法,更具体地,涉及由于Bst-2(tetherin)基因的功能丧失而具有增加的病毒生产能力的细胞系及其生产方法。根据本发明,丧失Bst-2基因功能的细胞系相比于野生型细胞系具有优异的病毒生产能力。因此,当将该突变细胞系用作产病毒的细胞系时,可以提高病毒产率。此外,该突变细胞系可用于生产和研究用于预防和治疗病毒性疾病的疫苗。



1. 一种制备细胞凋亡被抑制的产病毒突变细胞系的方法,该方法包括突变在产病毒细胞系中的Bst-2基因以缺乏Bst-2基因的功能,其中所述突变是MDCK Bst-2基因的外显子1区域的位置45至48的4个核苷酸缺失;VERO Bst-2基因的外显子1区域的位置116至127的12个核苷酸缺失;或VERO Bst-2基因的外显子1区域的位置127至130的1个核苷酸缺失。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述病毒是流感病毒。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述病毒是单纯疱疹病毒。

4. 如权利要求2所述的方法,其中所述流感病毒选自Pandemic/H1N1、A/H1N1和A/H3N2组成的组。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述Bst-2基因的外显子1区域编码Bst-2蛋白的胞质域。

6. 一种在具有产病毒能力的细胞系中缺乏Bst-2基因功能的产病毒突变细胞系,其中所述突变细胞系通过缺乏所述Bst-2基因功能而具有增加的病毒生产能力,

其中所述突变细胞系具有MDCK Bst-2基因的外显子1区域的位置45至48的4个核苷酸缺失;VERO Bst-2基因的外显子1区域的位置116至127的12个核苷酸缺失;或VERO Bst-2基因的外显子1区域的位置127至130的1个核苷酸缺失。

7. 一种生产所需病毒的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 用所需病毒感染权利要求6的具有增加的病毒生产能力的突变细胞系;和

(b) 培养被所需病毒感染的细胞系,然后离心培养物的上清液以回收所需病毒。

8. 如权利要求7所述的方法,其中用0.005-0.05MOI的所需病毒感染所述细胞系。

9. 一种生产针对病毒疾病的疫苗的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 用所需病毒感染权利要求6的具有增加的病毒生产能力的突变细胞系;

(b) 培养被感染所需病毒的细胞系,然后离心培养物的上清液以回收所需病毒;和

(c) 衰减或灭活所回收的病毒。

具有提高的病毒生产能力的细胞系及其生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及具有提高的病毒生产能力的细胞系及其制备方法,更具体地,涉及由于Bst-2(tetherin)基因的功能丧失而具有提高的病毒生产能力的细胞系以及其生产方法。

背景技术

[0002] 流感是一种由流感病毒感染呼吸道所引起的急性发热性疾病。流感病毒根据它们的核心蛋白被分类为A、B和C型。A、B和C型流感的宿主之间在流行病学和临床特点上有所不同。流感病毒是具有80-120nm直径的球形病毒,并且基于病毒表面上的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)糖蛋白的抗原性质被分成各种亚型。在A型流感的情况中,已经鉴定出16种HA亚型(H1至H16)和9种NA亚型(N1至N9)。因此,理论上存在144种A型流感病毒的亚型(例如,H1N1、H1N2等)(Treanor J.J.et al.,In Principles and Practice of Infectious Diseases,2060-85,2005)。

[0003] 流感疫苗包括灭活疫苗和活疫苗。灭活疫苗是通过纯化在含胚卵中培养的病毒,并将培养的病毒用福尔马林等灭活而产生的。灭活疫苗包括灭活的全病毒疫苗,通过用醚等破坏病毒包膜产生的裂解疫苗,通过纯化血凝素和神经氨酸酶组分获得的亚单位疫苗等。作为活疫苗,已经开发并使用活的减毒流感疫苗(LAIVs)。因为全病毒疫苗在婴儿中引起副作用,这些疫苗在包括韩国在内的许多国家几乎不使用,而仅在某些国家使用。然而,组分疫苗如裂解疫苗或亚单位疫苗是高度安全的并且具有公认的效果,因此被最频繁地使用。另外,已开发出含有用于增强免疫反应的免疫佐剂(如MF-59)的疫苗,或形成病毒样小泡的病毒体疫苗,并在一些国家中使用(Bridges C.B.et.al.,In Vaccines,259-290,2008;Belshe R.B.et.al.,In Vaccines,291-309,2008)。

[0004] 到现在为止,为了生产用于产生抗流感疫苗的病毒,使用将种子病毒接种到受精卵中并培养接种病毒的方法(韩国专利公开号10-2012-0103737A)。但是,这种方法由于包括供应受精卵的安全性、过敏诱发和病毒传播等问题而具有非常低的效率。为获得用于疫苗生产的特异性无病原体的受精卵,应该在与外界完全隔离的无菌设施中,在不向鸡施用抗生素和疫苗的状态下饲养鸡,并应从鸡生产受精卵。所产生的无病原体的卵在孵化所孵化约10天,在这之后由注射器针头或类似物将病毒接种到卵的胚胎或尿囊液。接种后培养接种病毒3天,然后回收培养的病毒并进行纯化处理。在某些情况下将这种程序制备的病毒进行灭活工艺,然后向其中加入用于诱导有效的免疫应答的佐剂、稳定剂、防腐剂等,由此生产疫苗。将所生产的疫苗装填到单个小瓶或注射器中,在这之后进行检查、包装和运输。在日本脑炎病毒的情况下,除了使卵受精并培养以外,也将该病毒接种到乳鼠的大脑中。

[0005] 在这种传统的疫苗生产方法中,扩大生产设施很困难。例如,需要额外供给作为原料的受精卵,扩大使用受精卵的生产工艺,而对于这种供应,也应该扩大无病菌的养鸡设施。因为在这些设施中饲养的鸡免疫很弱,这些鸡比一般的鸡难以饲养,需要被彻底控制。因此,扩大这样的设施在空间或经济方面有许多限制。此外,当禽类传染性疾病如禽流感

(AI) 或新城疫 (ND) 流行时, 还有可能难以稳定地供给无病原体的卵。

[0006] 在尝试克服这种常规问题中, 通过动物细胞培养来生产疫苗的方法很久前就受到关注 (韩国专利公开号 10-2012-0033334)。这些方法包括通过无菌条件下培养大量动物细胞并用病毒感染培养的动物细胞来生产疫苗的方法, 通过基因工程方法仅生产诱导抗体产生的抗原的方法, 等。通过动物细胞培养来生产疫苗的方法的最大优点是可以扩大生产规模。具体而言, 根据被用于疫苗生产原料的动物细胞的培养规模可以按需扩大生产规模。

[0007] 然而, 尽管有这样多的优点, 通过动物细胞培养来生产疫苗并不容易实现。这是因为最初的投资太高, 为顺利地进行该生产的个体基础设施是不够的, 并且每单位体积的产率比现有的使用受精卵或动物的略低。为了克服在使用动物细胞来生产疫苗时每单位体积产量低的问题, 做了一些尝试来使用基因工程技术开发优良的宿主动物细胞系 (Jang J. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol, 85:1509-1520, 2010), 但这种尝试仍在不充分的水平。因此, 为了优化病毒生产, 需要产病毒细胞系的鉴定、培养条件的改善以及感染条件的改善。

[0008] 目前典型的用于生产病毒疫苗的细胞系的例子包括: MDCK (来自 Madin-Darby 犬肾的细胞), CRUCCELL (荷兰) 开发的 PERC6 (来自通过插入人腺病毒 5 型的 E1 基因而遗传修饰的人胚胎视网膜细胞的细胞), VERO (来自在日本千叶县的千叶大学分离的非洲绿猴 (*Cercopithecus aethiops*) 肾脏的上皮细胞的细胞), 和 BHK21 (从幼仓鼠肾细胞永生的细胞)。

[0009] 同时, 当病毒感染机体时, 发生病毒在受感染细胞中的增殖, 并且增殖病毒颗粒穿过细胞膜出芽而感染其他周围细胞。在细胞抵御病毒感染的防御机制部分中, Bst-2 基因在细胞膜上表达。Bst-2 在 N 末端和 C 末端两端具有细胞膜结合位点, 并且因此在细胞膜中以中间被抬起的形式 (像桥) 表达。Bst-2 的 C 末端位于细胞膜的脂筏区域, 而 N 末端位于非脂筏区域。

[0010] 尚不知晓固定到脂筏区域的 C-末端区域的功能。同时, 当病毒从脂筏区域出芽到细胞外时, Bst-2 通过其固定到非脂筏区域的区域而抑制病毒颗粒穿过细胞膜。对于哺乳动物细胞的这种防御机制, 一些病毒产生促进 Bst-2 基因降解的蛋白, 以避免宿主细胞的这种机制。这矛盾地表明 Bst-2 基因的功能强烈地有助于抑制病毒生产。然而, 并非所有病毒都有这个功能, 一些病毒 (特别是 HIV 病毒) 具有由 Vpu 基因促进 Bst-2 基因降解的功能, 而其他大多数病毒不具有靶向 Bst-2 基因的避免机制。

[0011] 因此, 为了有效地生产大量的病毒, 并使用所产生的病毒用于疫苗生产, 需要开发一种能灭活或抑制在动物细胞中的 Bst-2 基因功能以培养不促进 Bst-2 基因降解的病毒的技术。

[0012] 因此, 本发明人进行了广泛的努力来开发一种用于增加宿主细胞的病毒生产能力的方法, 并且结果发现, 当在细胞中丧失 Bst-2 基因功能时, 可以生产由于促进病毒的胞外释放和减少细胞凋亡而具有增加的病毒生产能力的病毒生产细胞系, 从而完成了本发明。

[0013] 在背景技术部分公开的信息仅用于增强对本发明背景的理解, 并因此可能不包含已被本领域的普通技术人员公知的形成现有技术的信息。

发明内容

[0014] 本发明的一个目的是提供一种细胞凋亡被抑制的产病毒突变细胞系的方法。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种具有增加的病毒生产能力的产病毒突变细胞系。

[0016] 本发明的又一个目的是提供一种使用具有增加的病毒生产能力的产病毒突变细胞系生产病毒的方法。

[0017] 本发明的再另一个目的是提供一种使用具有增加的病毒生产能力的产病毒突变细胞系生产针对病毒疾病的疫苗的方法。

[0018] 为了达到上述目的,本发明提供了一种细胞凋亡被抑制的产病毒突变细胞系,所述方法包括突变在产病毒细胞系中的Bst-2基因。

[0019] 本发明还提供了一种产病毒突变细胞系,其在具有病毒生产能力的细胞系中缺乏Bst-2基因的功能,其中具有增加的病毒生产能力的产病毒突变细胞系缺乏所述Bst-2基因的功能。

[0020] 本发明还提供一种产病毒突变细胞系,其中在产病毒细胞系中引入不表达Bst-2的突变的Bst-2基因,其中该突变细胞系因引入突变的Bst-2基因而具有增加的病毒生产能力。

[0021] 本发明还提供了一种生产所需病毒的方法,该方法包括以下步骤:(a)用所需病毒感染具有增加的病毒生产能力的突变细胞系;和(b)培养被所需病毒感染的细胞系,然后离心培养物的上清液以回收所需病毒。

[0022] 本发明还提供了一种用于生产针对病毒疾病的疫苗的方法,所述方法包括以下步骤:用所需病毒感染具有增加的病毒生产能力的突变细胞系;(b)培养被所需病毒感染的细胞系,然后离心培养物的上清液以回收所需病毒;和(c)衰减或灭活所回收的病毒。

[0023] 本发明的其它的特征和实施例将从以下详细描述和所附权利要求中更加清楚。

附图说明

[0024] 图1示出具有突变的Bst-2基因的MDCK细胞系的PCR(聚合酶链反应)产物通过电泳的结果。

[0025] 图2示出具有突变的Bst-2基因的VERO细胞系的PCR产物通过电泳的结果。

[0026] 图3示出进行菌斑测定法来测量野生型MDCK细胞和Bst-2突变的MDCK细胞系在病毒感染后得到的上清的滴度的结果。

[0027] 图4示出进行菌斑测定法来测量野生型VERO细胞和Bst-2突变的VERO细胞系在病毒感染后得到的上清的滴度的结果。

[0028] 图5示出通过稀释野生型MDCK细胞和Bst-2突变的MDCK细胞系,用病毒感染稀释细胞并培养病毒感染的细胞所获得的结果。

[0029] 图6示出通过稀释野生型VERO细胞和Bst-2突变的VERO细胞系,用病毒感染稀释细胞并培养病毒感染的细胞所获得的结果。

[0030] 图7示出Bst-2缺失细胞的细胞内信号减少。(A:用不同浓度的LPS处理的亚硝酸盐生产比较;和B:用LPS处理的NFκB磷酸化的比较)。

[0031] 图8是一组照片,示出病毒感染后Bst-2缺失细胞的凋亡样态明显减少。(A:感染了H1N1的Vero细胞系;和B:感染了H3N2的Vero细胞系)。

[0032] 图9示出进行磷脂酰丝氨酸(细胞凋亡指示剂)染色来观察病毒感染后在Bst-2缺失细胞中凋亡样态明显减少的现象的结果。(A:感染了H1N1的Vero细胞系;和B:感染了H3N2的Vero细胞系)。

[0033] 图10示出进行Bst-2再次导入实验以证明胞质域参与细胞凋亡的结果。(A:再次导入Bst-2后的Bst-2表达的FACS分析;和B:感染MHV68病毒后细胞凋亡的比较)。

[0034] 图11示出Bst-2突变的Vero细胞系的病毒生产能力由于其细胞凋亡减少而显著增加。

[0035] 图12示出当在正常NIH/3T3细胞系中另外表达具有缺失的胞质域的Bst-2时,病毒生产增加。

[0036] 图13示出使用B2K进行实验来证明Bst-2缺失的细胞系的病毒生产增加是由于细胞凋亡抑制的结果。

具体实施例

[0037] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。通常,将在下面描述的、本文中使用的命名法和实验方法是本领域中公知且普遍采用的。

[0038] 在本发明中,发现具有增加的病毒生产能力的细胞系可以通过在细胞中缺乏Bst-2基因的功能,使病毒从宿主细胞中释放而不被宿主细胞干扰,以及使细胞凋亡减少来生产。

[0039] 如本文所用,术语“生产能力”是指在细胞存活期间,在产病毒细胞系中增殖的病毒被释放到培养基中,以增加培养基中的病毒滴度。

[0040] 如本文所用,术语“缺乏功能”是指在细胞中突变Bst-2基因的一个或多个核苷酸并从细胞释放病毒。优选地,该术语指Bst-2基因的外显子1区域的缺失或插入,或Bst-2基因的敲除或沉默。

[0041] 如本文所用,术语“病毒”是指能够引起人或动物疾病的病毒。优选地,该术语是指流感病毒。更优选地,是指由P/H1N1、A/H1N1和A/H3N2组成的组之一。

[0042] 在本发明中,“病毒”不限于流感病毒,并且可以包括其它致病病毒,优选单纯疱疹病毒。

[0043] 如本文所用,术语“细胞凋亡”是指细胞主动地消耗生物能量ATP,导致死亡的过程。典型的细胞凋亡过程包括细胞的收缩,DNA的常规裂解和细胞膜的片段化。当细胞由于异常的细胞分裂、辐射、紫外线、细菌感染或病毒感染而不能保持它们的正常功能时,可以诱发细胞凋亡。

[0044] 在一个方面,本发明涉及在具有病毒生产能力的细胞系中缺乏Bst-2基因功能的产病毒突变细胞系,其中该突变细胞系由于缺乏所述Bst-2基因的功能而具有增加的病毒生产能力。

[0045] 作为具有病毒生产能力的细胞系,可以使用任何用于流感疫苗开发的细胞系。优选地,可以使用动物细胞系,并且更优选地,可以使用MDCK细胞、VERO细胞或成纤维细胞。

[0046] 在本发明中使用的MDCK(Madin-Darby犬肾)细胞是从犬肾得到的表皮样细胞,并且VERO细胞是从猴肾得到的细胞。两种细胞系显示出对肝炎病毒、牛痘病毒和流感病毒的

敏感性,并且因此最经常用于病毒研究。

[0047] 突变细胞系可以具有一部分Bst-2基因的插入、缺失、重复、倒置、取代或易位,整个Bst-2基因的缺失,或Bst-2基因的沉默。

[0048] 突变细胞系可具有从Bst-2基因的外显子1区域的1-15个核苷酸缺失或在外显子1区域中的1-15个核苷酸插入。

[0049] 突变细胞系可具有Bst-2基因的外显子1区域的位置45至50的1-4个核苷酸缺失或外显子1区域的位置45至50的1-3个核苷酸插入。

[0050] 突变细胞系可具有Bst-2基因的外显子1区域的位置116至130的1-12个核苷酸缺失。

[0051] 突变细胞系可具有Bst-2基因的外显子1区域的位置4至90的核苷酸缺失。

[0052] 在本发明中,从由SEQ ID NO:1或2表示的Bst-2基因的外显子1区域中插入或缺失1-15个核苷酸,以产生突变细胞系。

[0053] 在本发明的一个例子中,从由SEQ ID NO:1表示的MDCK Bst-2基因的外显子1区域中插入或缺失一个或多个核苷酸,以产生包含突变的等位基因并具有增加的病毒生产能力的突变细胞系。

[0054] SEQ ID NO:1:

[0055] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACTGACGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCA GCCTCCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAG ACTGTG

[0056] 在本发明的另一个例子中,通过从Bst-2基因的外显子1区域中缺失1-4个核苷酸或插入1-3个核苷酸来生产缺乏Bst-2基因功能的突变细胞系。这些突变细胞系可包括具有SEQ ID NO:3至8的核苷酸序列中任一种的细胞系,并且优选可以是K-E4、J-C10、J-D10、D-E2、K-G3、J-E2和H-G5。

[0057] SEQ ID NO:3:

[0058] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACTGAAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGC CTCCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGAC TGTG

[0059] SEQ ID NO:4:

[0060] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACACGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGC CTCCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGAC TGTG

[0061] SEQ ID NO:5:

[0062] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACTAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTC

AGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATC
TTTGTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCT
CCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGACTG
TG

[0063] SEQ ID NO:6:

[0064] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACTGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGT
CAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCAT
CTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCC
TCCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGACT
GTG

[0065] SEQ ID NO:7:

[0066] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACGAGTCAGAGTCAATGTCATCAAGTC
AGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCTGATCATC
TTTGTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCACCAGCCT
CCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAACAAGACTG
TG

[0067] SEQ ID NO:8:

[0068] ATGGCACCTACGCTTTACCACTACTACTGGCCTGTGCCCATAACTGACGACGAGTCAGAGTCAATGTCA
TCAAGTCAGAAGCTGAGCTGGCTGGAGTGGCTGGGCATCTTGGGGATCCCAGTGGTGATGGGTCTGTCTGTGGCTCT
GATCATCTTTGTTGTCAAGACCAACAGCAAAGCCTGCGGGGATGGCCTCCTAGTAGAGCAGGAGTGTACAATGTCA
CCAGCCTCCTGGAGCGCCAATAACCCAAACCCGGCAAGCGTTACAGGGGACCATGGACCAGGCTACCACCTGCAAC
AAGACTGTG

[0069] 在本发明的又一个例子中,包含突变的等位基因并具有增加的病毒生产能力的突变细胞系是通过从SEQ ID NO:2表示的VERO Bst-2基因的外显子1区域缺失核苷酸来生产的。

[0070] SEQ ID NO:2:

[0071] ATGGCACCTATTTTGTATGACTATTGCAAAATGCCCATGGATGACATTTGCAAGGAAGACAGGGACAAG
TGCTGTAAACTGGCCGTAGGAATTCTGGGGCTCCTGGTCATAGTGCTTCTGGGGGTGCCCTGATTTTCTTCATCAT
CAAGGCCAACAGCGAGGCCTGCCAGGATGGCCTCCGGGCAGTGATGGAGTGTACAATGTCACCTATCTCCTGCAAC
AAGAGCTGGCCGAGGCCAGCGGGGCTTTGCGGACGCAGAGGCCAGGCTGTACCTGCAACCAGACTGTG

[0072] 在本发明的又一个例子中,通过从Bst-2基因的外显子1区域的位置116至130中缺失1-12个核苷酸来生产缺乏Bst-2基因功能的突变细胞系。这些突变细胞系可包括具有SEQ ID NO:9和10的核苷酸序列中任一种的细胞系,并且优选可以是D-D8和G-D5。

[0073] SEQ ID NO:9:

[0074] ATGGCACCTATTTTGTATGACTATTGCAAAATGCCCATGGATGACATTTGCAAGGAAGACAGGGACAAG
TGCTGTAAACTGGCCGTAGGAATTCTGGGGCTCCTGGTCATAGTGCCCTGATTTTCTTCATCATCAAGGCCAACAG
CGAGGCCTGCCAGGATGGCCTCCGGGCAGTGATGGAGTGTACAATGTCACCTATCTCCTGCAACAAGAGCTGGCCG
AGGCCAGCGGGGCTTTGCGGACGCAGAGGCCAGGCTGTACCTGCAACCAGACTGTG

[0075] SEQ ID NO:10:

[0076] ATGGCACCTATTTTGTATGACTATTGCAAAATGCCCATGGATGACATTTGCAAGGAAGACAGGGACAAGTGCTGTAACTGGCCGTAGGAATTCTGGGGCTCCTGGTCATAGTGCTTCTGGGGGTGCCCTGATTTTCTTCATCATCAAGGCCAACAGCGAGGCCTGCCAGGATGGCCTCCGGGCAGTGATGGAGTGTACAATGTCACCTATCTCCTGCAACAAGAGCTGGCCGAGGCCAGCGGGCTTTTCGGGACGCAGAGGCCAGGCTGTCACCTGCAACCAGACTGTG

[0077] 对本发明中生产的突变细胞系的核苷酸序列进行分析,并且结果可以看出,在来自MDCK细胞的K-E4、J-C10和J-D10细胞系的等位基因的移码突变。

[0078] 如本文所用,术语“移码突变”是指导致能够读取三核苷酸的遗传密码的移码改变的1、2或更多个核苷酸(除3的倍数之外)的缺失或插入。

[0079] 在突变细胞系中,J-D10以保藏号KCLRF-BP-00285保藏。

[0080] 另一个方面,本发明涉及一种细胞凋亡被抑制的产病毒突变细胞系的方法,所述方法包括突变在产病毒突变细胞系中的Bst-2基因。

[0081] 在本发明的一个例子中,通过在VERO细胞系的Bst-2基因的外显子1区域中缺失1-12个核苷酸来生产D-D8和G-D5细胞系。结果表明,用H1N1或H3N2病毒感染的突变细胞系的细胞凋亡降低。

[0082] 根据本发明的细胞凋亡被抑制的产病毒突变细胞系可以是动物细胞系。

[0083] 动物细胞系可以是任何用于开发流感疫苗的细胞系。优选地,可以选自MDCK、VERO和小鼠成纤维细胞组成的组中。

[0084] 根据本发明的突变可以是Bst-2基因的外显子1区域的一部分的插入、缺失、重复、倒置、取代或易位,整个Bst-2基因的外显子1区域的缺失,或Bst-2基因的沉默。

[0085] Bst-2基因的外显子1区域可编码Bst-2蛋白的胞质域。

[0086] 在本发明的另一个例子中,发现将野生型Bst-2基因导入到Bst缺失的小鼠成纤维细胞时,出现类似于野生型细胞系的细胞凋亡,但是当导入具有胞质域缺失的Bst-2基因时,细胞凋亡减少,这与Bst-2缺失的细胞系相似。

[0087] 在本发明的另一例子中,表明野生型Vero细胞在感染流感病毒后经历细胞凋亡,并且因此显示出低的病毒生产能力,而Bst-2突变的Vero细胞的病毒诱导的细胞凋亡减少并在3天后显示出病毒生产能力增加了50倍以上。

[0088] 在本发明的又另一例子中,具有缺失参与细胞凋亡的胞质域的Bst-2基因在正常小鼠成纤维细胞中额外表达以干扰正常基因的功能。结果观察到,细胞生产病毒的能力。另外观察到,当在对病毒具有增加的能力的Bst-2缺失的B2K细胞系中表达具有胞质域缺失的Bst-2基因时,细胞维持病毒生产能力。这证明细胞病毒生产能力的增加归因于细胞凋亡的减少。

[0089] 在又另一个方面,本发明涉及突变细胞系,其中导入在产病毒细胞系中不表达Bst-2的突变的Bst-2基因,其中该突变细胞系通过引入突变的Bst-2基因而具有增加的病毒生产能力。

[0090] Bst-2突变基因可以具有在野生型Bst-2基因的外显子1区域的一部分中的一个或多个核苷酸的插入、缺失、重复、倒置、置换或易位,或野生型Bst-2基因的整个外显子1区域的缺失,或Bst-2基因的沉默。

[0091] 在又一个方面,本发明涉及一种生产所需病毒的方法,该方法包括以下步骤:(a)用所需病毒感染具有增加的病毒生产能力的突变细胞系;和(b)培养被所需病毒感染的细

胞系,然后离心培养物的上清液以回收所需病毒。

[0092] 在本发明中,将具有移码突变的细胞铺于6孔平板,培养24-48小时,然后接种到含有流感病毒的培养基。

[0093] 细胞的数目可以是 1×10^4 至 1×10^7 ,优选 5×10^4 至 5×10^6 ,更优选 1×10^5 至 1×10^6 。

[0094] 接种到培养基中的病毒优选在5%CO₂培养箱中于37℃感染30分钟到2小时。

[0095] 可以将感染的病毒在新鲜培养基中孵育50-70小时,然后可以收集培养基并在合适的条件下离心,收集上清液。优选地,可以在4℃至15℃以1500-5000rpm进行离心5-15分钟来收集上清液。

[0096] 在本发明中,检查在没有表达Bst-2基因的突变细胞系的病毒感染时形成的菌斑。

[0097] 突变细胞系在培养基中稀释,并用病毒感染,然后培养。结果可以看出,突变细胞系的病毒生产能力增加。

[0098] 对病毒具有增加的能力的突变细胞系可以用于生产预防或治疗由流感病毒引起的疾病的疫苗。

[0099] 在进一步的方面,本发明涉及一种生产针对病毒疾病的疫苗的方法,所述方法包括以下步骤:(a)用所需病毒感染具有增加的病毒生产能力的突变细胞系;和(b)培养被所需病毒感染的细胞系,然后离心培养物的上清液以回收所需病毒;和(c)衰减或灭活回收的病毒。

[0100] 疫苗组合物可以进一步包含药学上可接受的佐剂或赋形剂。作为佐剂,可以使用任何佐剂,只要它在向体内注射时可以促进抗体形成以实现本发明的目的。具体地,佐剂优选铝酸盐(Al(OH)₃、AlPO₄)、角鲨烯、脱水山梨醇、聚山梨醇酯80、CpG、脂质体、胆固醇、MPL(单磷酸脂质A)和GLA(吡喃葡萄糖基脂A)中的一种或多种,但并不限于此。

[0101] 实施例

[0102] 以下,参照实施例对本发明进行更详细地说明。对本领域的普通技术人员这显而易见的是,这些实施例是说明性的目的,并且不应被解释为限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求书及其等同物来限定。

[0103] 实施例1:Bst-2突变的MDCK细胞系的生产和其中突变的确认

[0104] 将 5×10^5 个从Moon-Jung Song教授(韩国大学,韩国)的实验室获得的野生型MDCK细胞在100Φ培养皿中的DMEM完全(GIBCO,美国)培养基(含有10%FBS,2mM的L-谷氨酰胺,5μM的β-巯基乙醇,10μg/ml庆大霉素,50U/ml青霉素和50μg/ml链霉素)中培养24小时。然后,将15μg的一对能够结合由SEQ ID NO:1所代表的Bst-2基因的外显子1区域的TALEN载体(ToolGen,韩国),一个报告载体(ToolGen,韩国)和Turbofect试剂(Thermo,USA)的混合物加入到培养的细胞中,然后在37℃,5%CO₂的条件下孵育48小时。

[0105] 将培养的细胞通过FACS Aria(BD Bioscience,美国)进行分选,以筛选500个对GFP和RFP呈阳性的细胞,并将所筛选的细胞接种在96孔板中,由此获得单克隆细胞。

[0106] 为了证实在所得到的单克隆细胞中的突变,向单克隆细胞中加入裂解缓冲液(50mM的Tris-Cl,pH8.0,50mM EDTA,1%SDS,10mM NaCl,100μg/ml蛋白酶K)(300μl)然后在54℃孵育16小时。然后,向培养的细胞中加入300μl的苯酚和氯仿的1:1混合物中并混合,然后以1700×g离心10分钟。将上清液(300μl)转移到新管中,并向其中加入100%乙醇(600μl)和3M乙酸钠(90μl),然后以1700xg离心10分钟。然后,除去上清液,向剩余的材料中加入

1ml的70%乙醇,然后以1700×g离心2分钟。然后,除去上清液,并将残留在底部的基因组DNA干燥3分钟,然后悬浮于50μl的去离子水(DW)中。使用由SEQ ID NO:11所代表的dBst-2-F引物和由SEQ ID NO:12所代表的dBst-2-R引物,在下列条件下对提取的基因组DNA进行聚合酶链反应(PCR):95℃5分钟,然后25个循环,每个循环包括94℃30秒,60℃30秒和72℃1分钟,随后72℃10分钟。

[0107] 将反应产物稀释至 10^{-3} ,并使用由SEQ ID NO:13所代表的NdBst-2-F引物和由SEQ ID NO:14所代表的NdBst-2-R引物在下列条件下进行PCR:95℃5分钟,然后25个循环,每个循环包括94℃30秒,60℃30秒和72℃1分钟,随后72℃10分钟。

[0108] SEQ ID NO:11:GGTCAGGATGGCTCCTATGC

[0109] SEQ ID NO:12:AACCTGACAGGGTCACCTGG

[0110] SEQ ID NO:13:GTAGCCCCAGCCAAAGGTTTC

[0111] SEQ ID NO:14:AGGCCTCCCCATGCCCAAAC

[0112] 为了确认在反应产物中的靶区域中的突变,将反应产物在下述条件下通过PCR熔化并退火:保持95℃5分钟,温度以2℃/秒的速度从95℃降低到85℃,温度以0.3℃/秒的速度从85℃降低到25℃,并停止在16℃。然后,将得到的反应产物用T7E1酶(ToolGen,韩国)处理并在37℃孵育15分钟,之后通过电泳分析反应产物大小。结果表明,在由SEQ ID NO:1所代表的外显子1区域中具有假定突变的细胞系具有一个正常PCR反应产物大小和两个额外由内切酶切割所造成的条带,表明在外显子1区域中发生了突变(图1)。

[0113] 为了分析被证实具有突变的细胞系的核苷酸序列,将PCR反应产物用Bgl II-Xba I消化,与pUC18载体连接,并在含有氨苄青霉素和X-gal-IPTG的培养基中培养,由此得到白色菌落。在获得的白色菌落中,对每个克隆选择6个菌落并测序。

[0114] 结果表明,在具有Bst-2的外显子1区域的核苷酸缺失或插入的7种突变细胞系(K-E4、J-C10、J-D10、D-E2、K-G3、J-E2和H-G5)中,3种突变细胞系(K-E4、J-C10、J-D10)具有在一对等位基因中发生的移码突变。

[0115] 实施例2:Bst-2突变VERO细胞系的生产和其中突变的确认

[0116] 将 5×10^5 个从Chengyu Liang教授(南加州大学)的实验室获得的野生型VERO细胞在100Φ培养皿中的DMEM完全(GIBCO,美国)培养基(含有10%FBS,2mM的L-谷氨酰胺,5μM的β-巯基乙醇,10μg/ml庆大霉素,50U/ml青霉素和50μg/ml链霉素)中培养24小时。然后,将15μg的一对能够结合由SEQ ID NO:2所代表的Bst-2基因的外显子1区域的TALEN载体(ToolGen,韩国),一个报告载体(ToolGen,韩国)和Turbofect试剂(Thermo,USA)的混合物加入到培养的细胞中,然后在37℃,5%CO₂的条件下孵育48小时。

[0117] 将培养的细胞通过FACS Aria(BD Bioscience,美国)进行分选,以筛选500个对GFP和RFP呈阳性的细胞,并将所筛选的细胞接种在96孔板中,由此获得单克隆细胞。

[0118] 为了证实在所得到的单克隆细胞中的突变,向单克隆细胞中加入裂解缓冲液(50mM Tris-Cl,pH8.0,50mM EDTA,1%SDS,10mM NaCl,100μg/ml蛋白酶K)(300μl)然后在54℃孵育16小时。然后,向培养的细胞中加入300μl的苯酚和氯仿的1:1混合物中并混合,然后以1700×g离心10分钟。将上清液(300μl)转移到新管中,并向其中加入100%乙醇(600μl)和3M乙酸钠(90μl),然后以1700xg离心10分钟。然后,除去上清液,向剩余的材料中加入1ml的70%乙醇,然后以1700×g离心2分钟。然后,除去上清液,并将残留在底部的基因组

DNA干燥3分钟,然后悬浮于50 μ l的去离子水(DW)中。使用由SEQ ID NO:11所代表的dBst-2-F引物和由SEQ ID NO:16所代表的AGM-R引物,在下列条件下对提取的基因组DNA进行聚合酶链反应(PCR):95 $^{\circ}$ C 5分钟,然后25个循环,每个循环包括94 $^{\circ}$ C 30秒,60 $^{\circ}$ C 30秒和72 $^{\circ}$ C 1分钟,随后72 $^{\circ}$ C 10分钟。

[0119] 将反应产物稀释至 10^{-3} ,并使用由SEQ ID NO:15所代表的AGM-F引物和由SEQ ID NO:16所代表的AGM-R引物在下列条件下进行PCR:95 $^{\circ}$ C 5分钟,然后25个循环,每个循环包括94 $^{\circ}$ C 30秒,60 $^{\circ}$ C 30秒和72 $^{\circ}$ C 1分钟,随后72 $^{\circ}$ C 10分钟。

[0120] SEQ ID NO:15:GAGGGGAGATCTGGATGG

[0121] SEQ ID NO:16:CTTCTCTGCATCCAGGGAAG

[0122] 为了确认在反应产物中的靶区域中的突变,将反应产物在下述条件下通过PCR熔化和退火:保持95 $^{\circ}$ C 3分钟,以2 $^{\circ}$ C/秒的速度将温度从85 $^{\circ}$ C降低到25 $^{\circ}$ C,并停止在16 $^{\circ}$ C。然后,将得到的反应产物用T7E1酶(ToolGen,韩国)处理并在37 $^{\circ}$ C孵育15分钟,之后通过电泳分析反应产物大小。结果表明,在由SEQ ID NO:2所代表的外显子1区域中具有假定突变的细胞系具有一个正常PCR反应产物大小和两个额外由内切酶切割所造成的条带,表明在外显子1区域中发生了突变(图2)。在下文中,将经确认在Bst-2中具有突变的单细胞系分别命名为“D-D8”和“G-D5”。

[0123] 实施例3:Bst-2突变的MDCK细胞系的病毒生产能力

[0124] 为了检查不表达Bst-2基因的突变细胞系的病毒生产能力,比较野生型MDCK细胞系的病毒生产能力与细胞系K-E4、J-C10和J-D10的病毒生产能力,后者是在实施例1中得到的并在Bst-2基因的外显子1区域中具有移码突变。

[0125] 具体地,将野生型MDCK细胞系和实施例1中生产的突变细胞系各以 5×10^4 细胞/孔的密度接种在6孔板中。48小时后,用0.01MOI的P/H1N1感染各细胞系。72小时后,收集上清液并测定上清液的滴度。

[0126] 结果如在图3中看出,K-E4的病毒生产是 5×10^4 pfu/ml,比野生型MDCK细胞系(1.8×10^4 pfu/ml)的高三倍,而J-C10的病毒生产是 2.2×10^4 pfu/ml,比MDCK(1.8×10^4 pfu/ml)的高1.2倍,而J-D10的病毒生产为 25×10^4 pfu/ml,比MDCK(1.8×10^4 pfu/ml)的高14倍。

[0127] 此外,细胞系J-C10和J-D10各被稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 并感染P/H1N1病毒,接着温育48小时。结果如图5所示,观察到由病毒形成的噬斑。

[0128] 因此可以看出,具有使Bst-2基因沉默的移码突变的突变细胞系相比于野生型细胞系具有增加的病毒生产能力。

[0129] 实施例4:Bst-2突变的VERO细胞系的病毒生产能力

[0130] 为了检查不表达Bst-2基因的突变细胞系的病毒生产能力,比较野生型VERO细胞系的病毒生产能力与细胞系D-D8和G-D5的病毒生产能力,后者是在实施例2中得到的并在Bst-2基因的外显子1区域中具有移码突变。

[0131] 具体地,将野生型VERO细胞系和实施例2中生产的突变细胞系各以 5×10^5 细胞/孔的密度接种在12孔板中。24小时后,用0.01MOI的H3N2感染各细胞系。60小时后,收集上清液并测定上清液的滴度。

[0132] 结果如在图4中看出,D-D8的病毒生产为 6.5×10^5 pfu/ml,比野生型VERO细胞系(2.5×10^5 pfu/ml)的高三倍,而G-D5的病毒生产是 1.9×10^6 pfu/ml,比野生型VERO细胞系

(2.5×10^5 pfu/ml) 的高约8倍。

[0133] 此外,细胞系D-D8和G-D5各被稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 并感染H3N2病毒,接着温育60小时。结果如图6所示,观察到由病毒形成的噬斑。

[0134] 因此可以看出,具有使Bst-2基因沉默的突变的突变细胞系相比于野生型细胞系具有增加的病毒生产能力。

[0135] 实施例5:Bst-2对细胞内信号途径的影响

[0136] 将Bst-2基因敲除小鼠 (ISU Abxis, 韩国) 与野生型B6小鼠 (Orient Bio, 韩国) 交配来生产Bst-2杂小鼠。从Bst-2杂小鼠和基因敲除小鼠的腹腔获得巨噬细胞。在获得的细胞中,将 1×10^6 个细胞加入到96孔平板的每个孔中,并用0、0.01、0.1和 $1 \mu\text{g/ml}$ 的LPS (脂多糖) 处理,然后培养24小时。使用Griess技术测量在培养基中的亚硝酸盐浓度。结果是,从Bst-2基因敲除小鼠中得到的巨噬细胞相比从Bst-2杂小鼠得到的巨噬细胞显示出亚硝酸生产减少约60% (图7A)。

[0137] 从Bst-2杂小鼠和基因敲除小鼠得到巨噬细胞。在获得的细胞中,将 5×10^6 个细胞接种在6孔板的各孔中,并静置2小时以附着培养皿。然后,将细胞用 100 ng/ml 的LPS处理。经过30分钟和90分钟后,使用M-PER缓冲液 (Pierce Biotechnology, 美国) 从细胞获得蛋白质。对于每种样品,将 $30 \mu\text{g}$ 总蛋白通过SDS-PAGE电泳根据大小分离,并结合到PVDF膜。所用的抗磷酸化-NF κ B抗体 (克隆93H1)、抗NF κ B抗体 (克隆C22B4) 和抗I κ B α 抗体 (克隆L35A5) 购自Cell Signaling Technology (美国),第二抗体使用了HRP偶联的抗-兔IgG (Koma Biotech, 韩国)。抗体反应后,信号用ECL plus或ELC fempto (Pierce Biotechnology, 美国) 显色,然后用像LAS 3000成像。结果表明,磷酸化NF- κ B与总NF- κ B的比率减少约90% (图7B)。因此可以看出,当Bst-2突变时,细胞内信号减少。

[0138] 实施例6:Bst-2缺失的细胞系的细胞凋亡延迟

[0139] 6-1:感染病毒的细胞系的细胞凋亡的观察

[0140] 将野生型 (WT) Vero细胞系、Bst-2杂 (D-D8) Vero细胞系和Bst-2基因敲除 (G-D5) 细胞系各以 1×10^6 个细胞的密度加入到6孔板的各孔中。20小时后,用0.1MOI的每种季节性H1N1流感 (图8A) 或H3N2流感 (图8B) 感染细胞。

[0141] 在感染后48小时和72小时,分析经修饰的细胞形状。结果是,正常细胞大多在感染病毒后1天或2天死亡,但在Bst-2缺失的细胞的情况下,即使在病毒感染2天后,显著数量的细胞仍维持正常细胞形状。具体地,在48小时和72小时,野生型细胞表现出典型的细胞凋亡形态,其细胞膜扭曲,而Bst-2基因敲除细胞 (G-D5) 大多维持正常的细胞形状 (图8)。Bst-2杂细胞 (D-D8) 显示出在野生型细胞和基因敲除细胞中间水平的细胞凋亡。

[0142] 6-2:在感染病毒的细胞系中磷脂酰丝氨酸表达的观察

[0143] 随着细胞凋亡进行,存在于内层细胞膜中的磷脂酰丝氨酸 (PS) 迁移到外细胞膜,并因此可以通过染色被检测。因此,为了比较细胞凋亡程度,将细胞用识别该指示剂PS的膜联蛋白-V染色。

[0144] 具体地,将野生型 (WT) Vero细胞系,Bst-2杂 (D-D8) Vero细胞系和Bst-2基因敲除 (G-D5) 细胞系各以 1×10^6 个细胞的密度结合到6-孔板的每个孔中。20小时后,用0.1MOI季节性H1N1或H3N2流感感染每种细胞系。在感染后48小时或72小时,将细胞分离,并向其中加入PBS,将细胞溶液在室温以1250rpm离心4分钟,除去上清液。然后,向细胞中加入含有膜联

蛋白V-FITC (BD Biosciences, 美国) 和膜联蛋白V的缓冲液, 然后, 在暗处染色15分钟。

[0145] 结果观察到, 在感染H1N1病毒后72小时, 野生型细胞在细胞表面上强烈表达PS, 而基因敲除细胞系 (G-D5) 仍保持低水平的PS表达 (图9A)。Bst-2杂细胞系 (D-D8) 表达的PS在野生型细胞系和基因敲除细胞系中间的水平。

[0146] 同时, 观察到当细胞感染了H3N2病毒时也出现相同的样态 (图9B)。具体地, 随着Bst-2基因的表达水平降低, 指示细胞凋亡进展的膜联蛋白V的表达也降低。

[0147] 6-3: Bst-2-再次引入的细胞的细胞凋亡的增加

[0148] 为了生产缺乏Bst-2的小鼠成纤维细胞系 (B2K), 将100 μ g的MCA (3-甲基胆蒽) 注入24周龄的Bst-2基因敲除小鼠 (ISU Abxis, 韩国) 的大腿。约4个月后, 分离在大腿形成的肿瘤, 并用70%乙醇洗涤以除去细菌, 之后将其转移到含有10%FBS和RPMI培养基的盘中, 用手术剪切成细块。将肿瘤块和13ml消化液 (500单位/ml胶原酶IV, 150单位/ml的DNase I) 置于50-ml锥形管中并在37 $^{\circ}$ C摇床上以250rpm振荡1小时30分钟。将经振荡的溶液用10-ml吸液管吹吸3-5次以进一步分散肿瘤块, 然后通过尼龙网过滤, 并置于50-ml新锥形管中。然后, 将得到的溶液以1250rpm离心5分钟, 除去上清液, 然后将沉淀在新鲜培养基中悬浮, 通过尼龙网过滤, 并在上述条件下离心。除去上清液后, 将沉淀分离, 以每10cm培养皿有 2.4×10^7 个细胞的密度接种, 并培养以获得基因敲除肿瘤细胞系 (B2K)。

[0149] 同时, 为生产野生型肿瘤细胞系 (MB19), 将100 μ g的MCA (3-甲基胆蒽) 注入24周龄的B6野生型小鼠 (Orient Bio, 韩国) 的大腿。约4个月后, 分离在大腿形成的肿瘤, 并用70%乙醇洗涤以除去细菌, 之后将其转移到含有10%FBS和RPMI培养基的盘中, 用手术剪切成细块。将肿瘤块和13ml消化液 (500单位/ml胶原酶IV, 150单位/ml的DNase I) 置于50-ml锥形管中并在37 $^{\circ}$ C摇床上以250rpm振荡1小时30分钟。将经振荡的溶液用10-ml吸液管吹吸3-5次以进一步分散肿瘤块, 然后通过尼龙网过滤, 并置于50-ml新锥形管中。然后, 将得到的溶液以1250rpm离心5分钟, 除去上清液, 然后将沉淀在新鲜培养基中悬浮, 通过尼龙网过滤, 并在上述条件下离心。除去上清液后, 将沉淀分离, 以每10cm培养皿有 2.4×10^7 个细胞的密度接种, 并培养以获得野生型肿瘤细胞系 (MB19)。

[0150] 将Bst-2基因敲除细胞系 (B2K) 和Bst-2野生型肿瘤细胞系 (MB19) 每种的MHC类 (KbDb (R1.21.2)-APC, CD1d (1B1)-PE), LFA-1 (207)-Cyc和Bst-2 (e.Bio927) 生物素+链霉亲和素-PE进行荧光染色, 并且比较它们的表达水平。具体地, 将B2K细胞和MB19细胞以 1×10^6 个细胞的密度悬浮于50 μ l的FACS缓冲液中, 并向细胞中加入20 μ g/ml的2.4G2抗体, 然后将其在冰上孵育20分钟, 以阻断细胞表面上的Fc γ 受体。然后, 向细胞中加入Bst-2生物素 (1 μ g/ml), 然后在冰上孵育30分钟。接着, 向细胞中加入500 μ l的FACS缓冲液, 并将细胞溶液在4 $^{\circ}$ C以1250rpm离心4分钟, 除去上清液以除去剩余的抗体。此外, 向细胞中加入另一种抗体KbDb-APC (0.1 μ g/ml)、CD1d-PE (1.5 μ g/ml)、LFA-1 (1 μ g/ml) 或链霉亲和素-PE (0.5 μ g/ml), 然后将其在遮光条件下冰上孵育。30分钟后, 为了除去残留的抗体, 将500 μ l的FACS缓冲液加入到细胞中, 并将细胞溶液在4 $^{\circ}$ C以1250rpm离心4分钟。使用FACScaliber (Becton Dickinson, 德国) 进行分析。结果观察到, MB19正常表达Bst-2, 而B2K肿瘤细胞系不表达Bst-2。因此, B2K肿瘤细胞系被用在以下实施例。

[0151] 向已建立的B2K细胞 (B2K空) 中导入Bst-2野生型基因 (Flag WT; SEQ ID NO:17)、具有胞质域缺失的基因 (Flag Δ CT; SEQ ID NO:18)、或空载体。

[0152] SEQ ID NO:17:

[0153] ATGGCGCCCTCTTTCTATCACTATCTGCCCCGTGCCCATGGATGAGATGGGGGGGAAGCAAGGATGGGGC
AGCCACCGGCAGTGGCTGGGGTACCGCGGGAGAAAAGATAGTGATAGACGGGAACGGGTACCTACTCTACCCCCCCTT
CGTTCCTACCCCGTCGGTGGCCGTCACCGACCCC

[0154] SEQ ID NO:18:

[0155] ATGTACCGCGGGAGAAAAGATAGTGATAGACGGGAACGGGTACCTACTCTACCCCCCCTTCGTTTCCTACC
CCGTCGGTGGCCGTCACCGACCCC

[0156] 这些基因的N末端连接有Flag或V5蛋白质,并且使用抗Bst-2抗体(PDCA-1, eBio927;Ebioscience,美国)分析其表达(图10A)。FACS分析的结果表明,B2K空由于Bst-2的抑制而不表达Bst-2蛋白,并因此没有在Q2区域和Q3区域出现。在包括引入到B2K空中的Bst-2野生型基因的Flag WT的情况下,56%或更多的细胞存在于Q2和Q3区域中。

[0157] B2K空、B2K-Flag WT和B2K-Flag V5 Δ CT细胞系各以 2×10^6 个细胞的密度添加至每个6孔板中。20小时后,各细胞系感染0.1MOI的MHV-68病毒。1天(24小时)或2天(48小时)后,拍摄细胞形态。结果如图10B中所示,观察到,在再次引入野生型Bst-2基因的细胞(B2K-Flag WT)的情况下,细胞凋亡被迅速诱导,而在引入具有被确定参与信号途径的胞质域缺失的Bst-2基因的细胞(B2K-FlagV5 Δ CT)的情况下,细胞凋亡仍然延迟。

[0158] 换句话说,通过Bst-2再次引入实验,第一次证明,胞质域在诱导病毒感染的细胞的细胞凋亡的信号途径方面起重要作用。这一事实表明,当感染任何病毒的细胞的存活时间延长时,病毒的生产可以继续并且产生的病毒量可以增加。

[0159] 6-4:Bst-2突变细胞系的病毒生产能力的增加

[0160] 为了检查因病毒诱导的细胞凋亡而减少的Bst-2突变细胞系的病毒生产能力,将野生型VERO细胞系的病毒生产能力与细胞系D-D8和G-D5的病毒生产能力相比较,后者是在实施例2中生产的并具有在Bst-2基因的外显子1区域中的突变。

[0161] 具体地,将VERO野生型细胞系和实施例2中制备的突变细胞系各以 1×10^6 个细胞/孔的密度接种在6孔板中。24小时后,各细胞系感染0.1MOI H3N2。48、60或72小时后,收集上清液,测量上清液的滴度。

[0162] 结果如图11中所示,观察到野生型细胞系由于流感病毒感染后的细胞凋亡显示出在培养基中的低滴度,而突变细胞系由于其病毒诱导的细胞凋亡减少,在长达72小时显示出高50倍的病毒生产能力。这种效果在G-D5细胞中比在G-D8细胞中更好。

[0163] 6-5:Bst-2突变细胞系生产单纯疱疹病毒的能力的增加

[0164] 以与实施例6-3中所描述相同的方式,将具有胞质域缺失的Bst-2基因引入(Δ CT)正常表达Bst-2的成纤维细胞(NIH/3T3)。将不含Bst-2的空载体导入对照正常细胞中,并将对照细胞的病毒生产能力与突变细胞系进行比较。结果如从图12中看出,观察到缺乏Bst-2基因的正常功能的突变细胞系,由于Bst-2突变基因的导入增加了约1.5倍的病毒生产能力。

[0165] 为了再现与其他细胞系中相同的效果,根据与实施例6-3中所述相同的方法,用单纯疱疹病毒感染B2K细胞,并且比较其病毒生产能力。结果是,Bst-2-缺失的B2K细胞(空)显示出增加的病毒生产能力,而再引入野生型Bst-2基因的B2K细胞(Flag-WT)的病毒生产能力减少了约50%以上,并且与野生型细胞类似。同时,再引入具有胞质域缺失的野生型Bst-

2基因的B2K细胞(V5-ΔCT)显示病毒生产能力没有降低。这表明,病毒诱导的细胞凋亡的减少对于增加细胞的病毒生产能力是非常重要的。此外,证实在本发明中的具有增加的病毒生产能力的细胞系,不仅对于如上述实施例描述的流感病毒生产是有用的,而且也可用于生产其它传染性病毒。

[0166] 工业实用性

[0167] 如上所述,根据本发明,相比于野生型细胞系,缺乏Bst-2基因功能的细胞系具有优异的病毒生产能力。因此,当突变细胞系被用作产病毒细胞系时,可以提高病毒的产率。此外,突变细胞系可用于生产和研究用于预防和治疗病毒性疾病的疫苗。

[0168] 尽管参照具体特征对本发明作了详细描述,但对本领域技术人员是显而易见的是该描述仅仅用于优选实施方式,并不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求书及其等同物来限定。

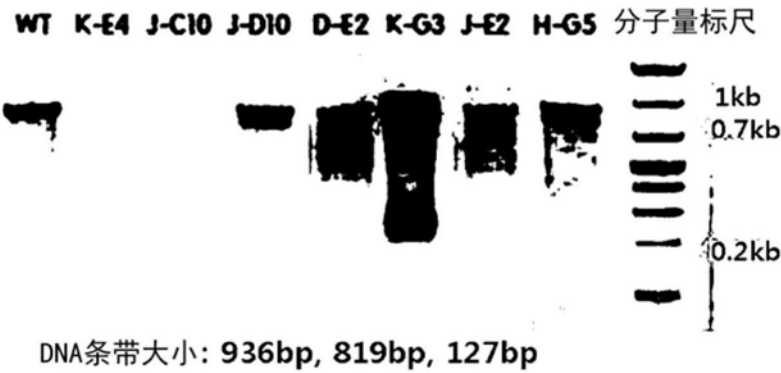


图1

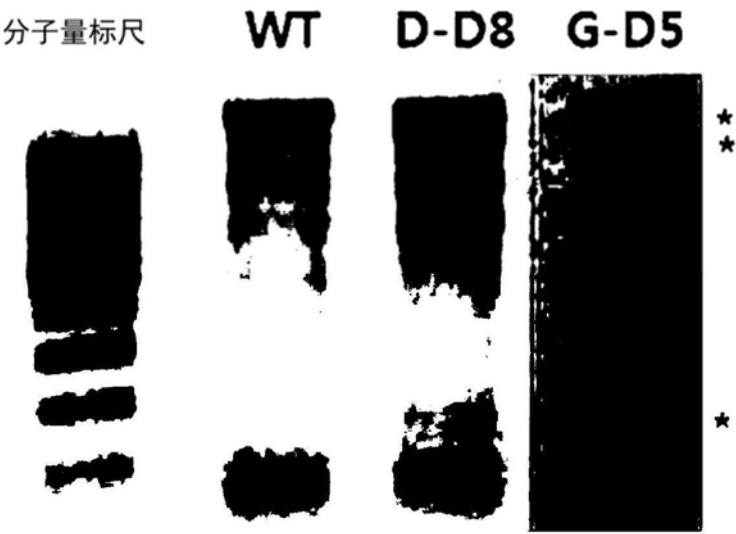


图2

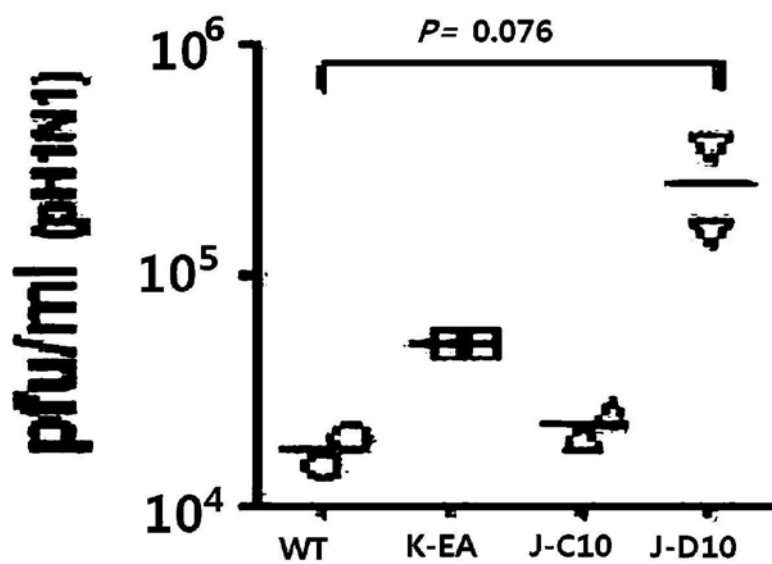


图3

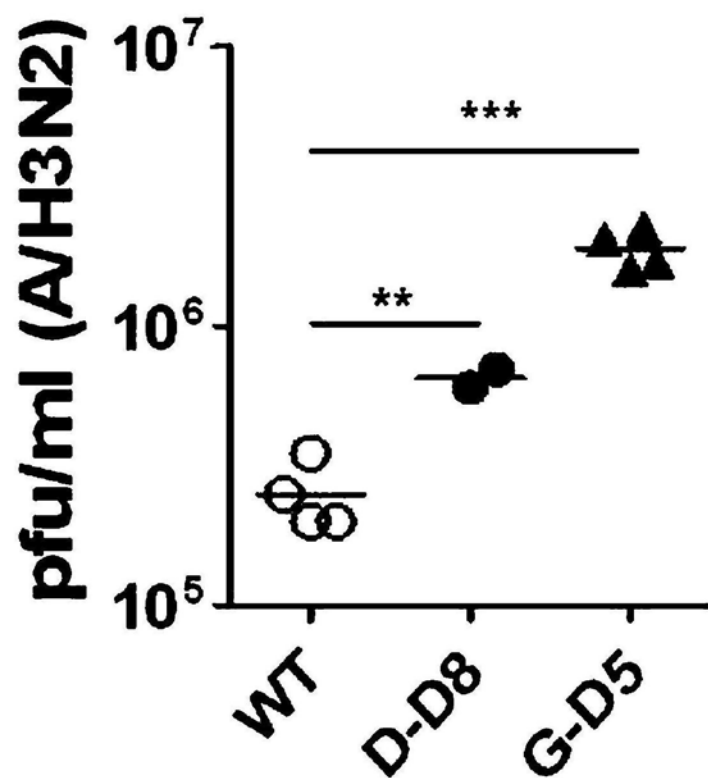


图4

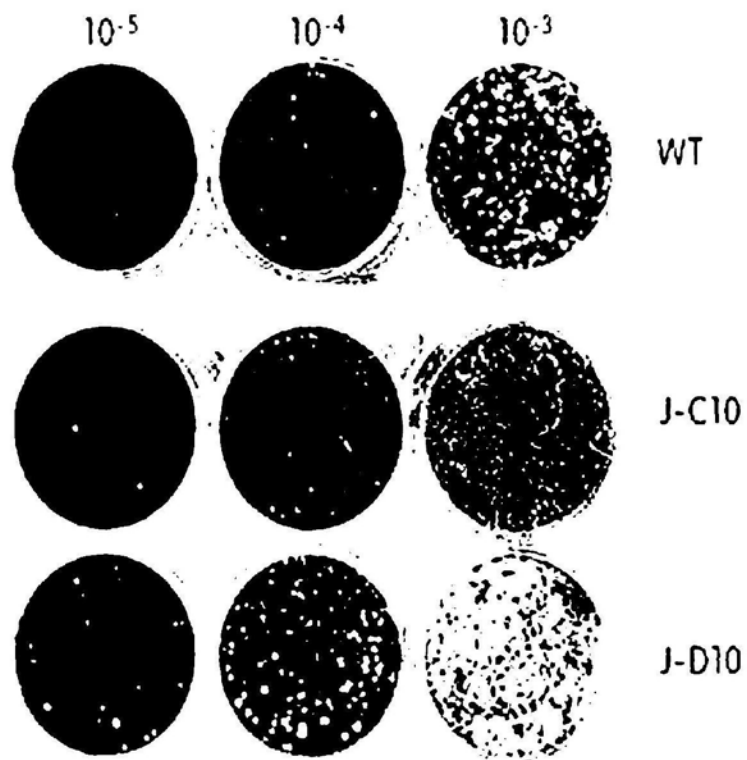


图5

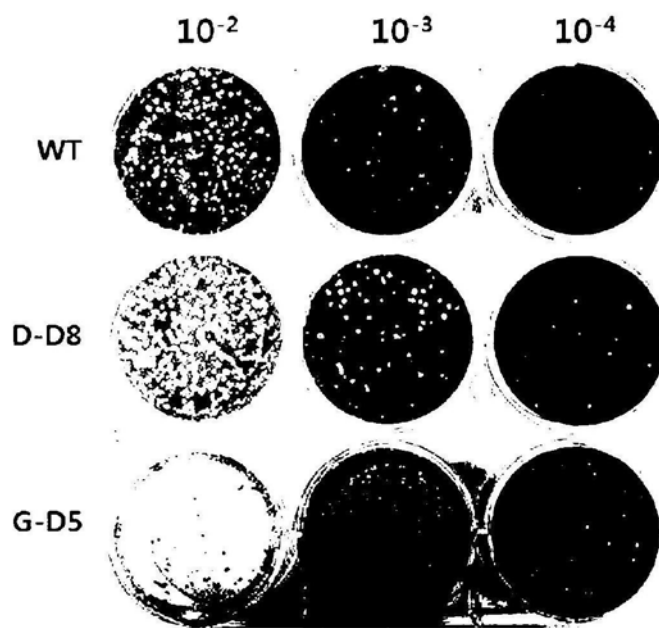


图6

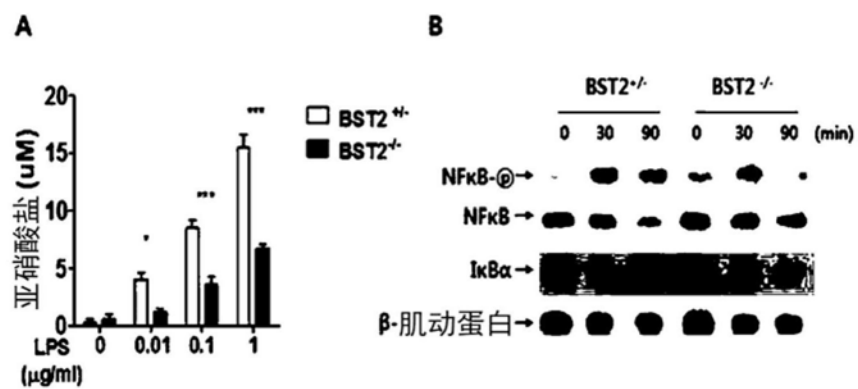


图7

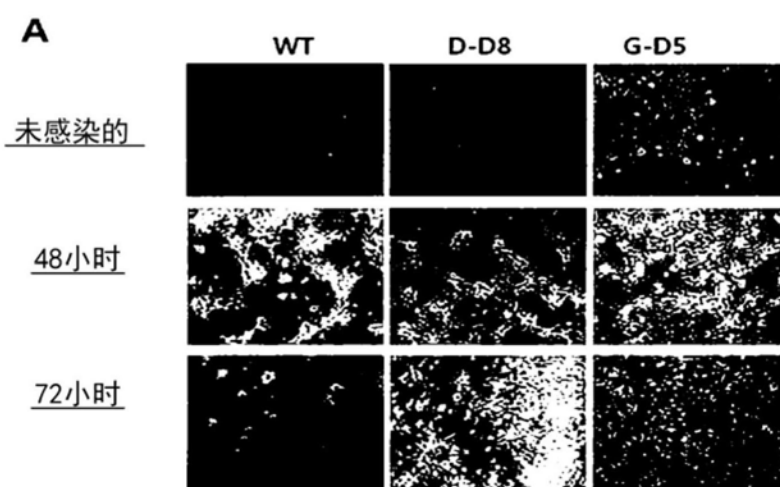


图8

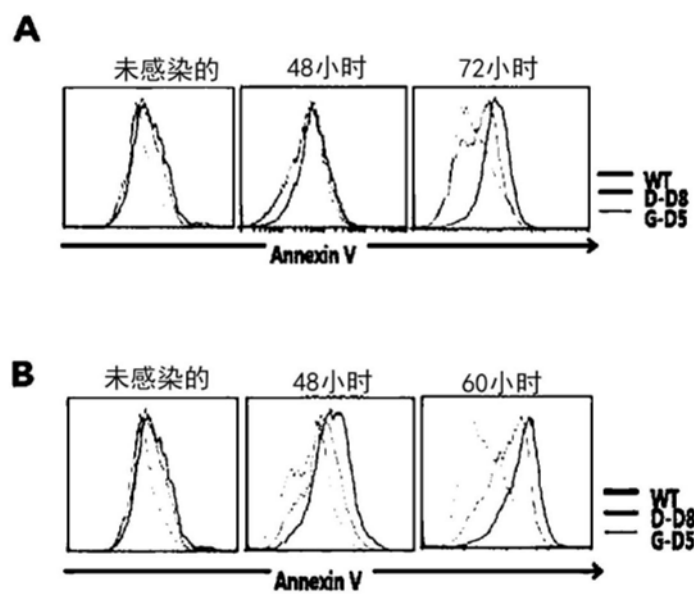


图9

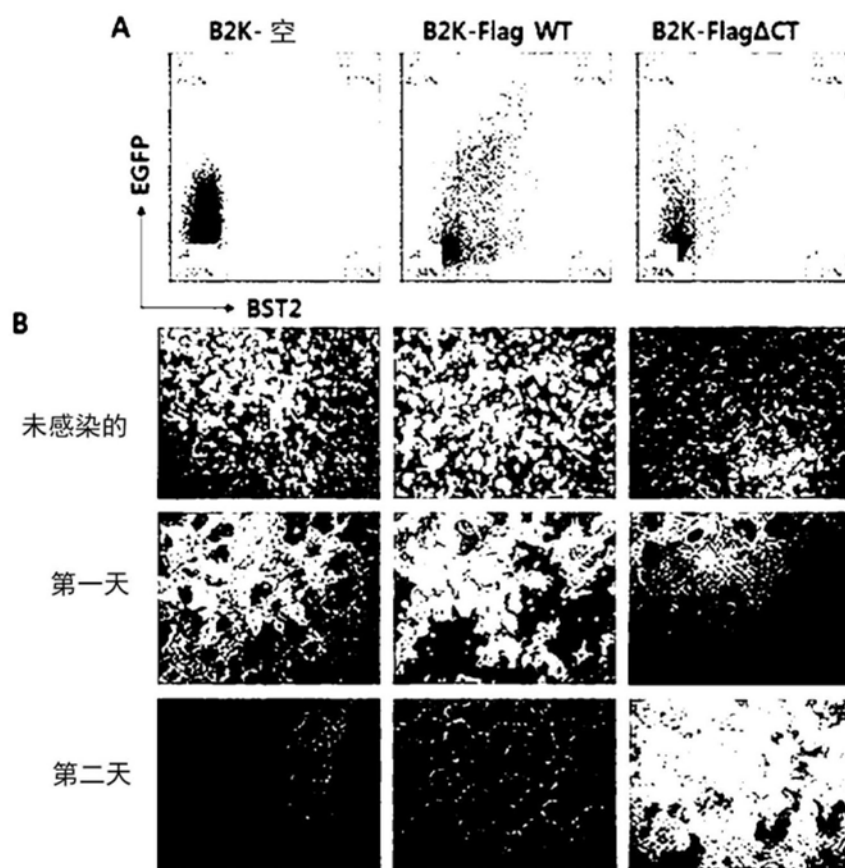


图10

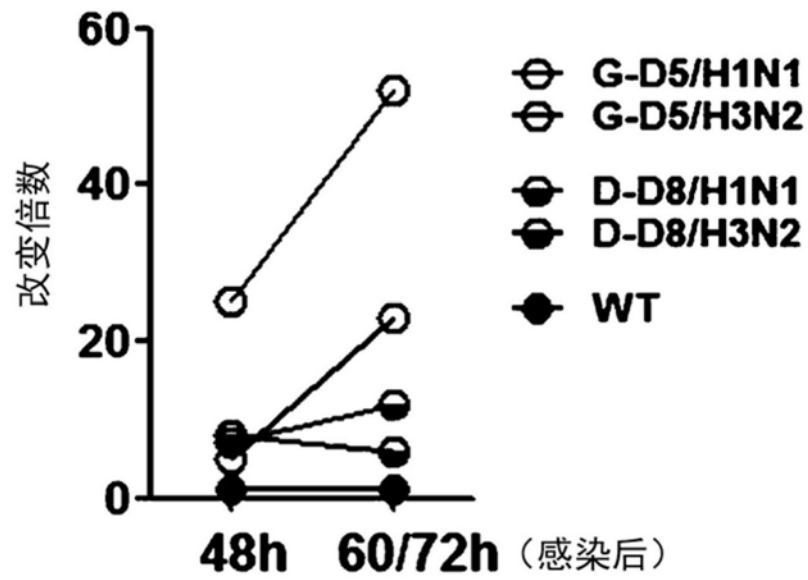


图11

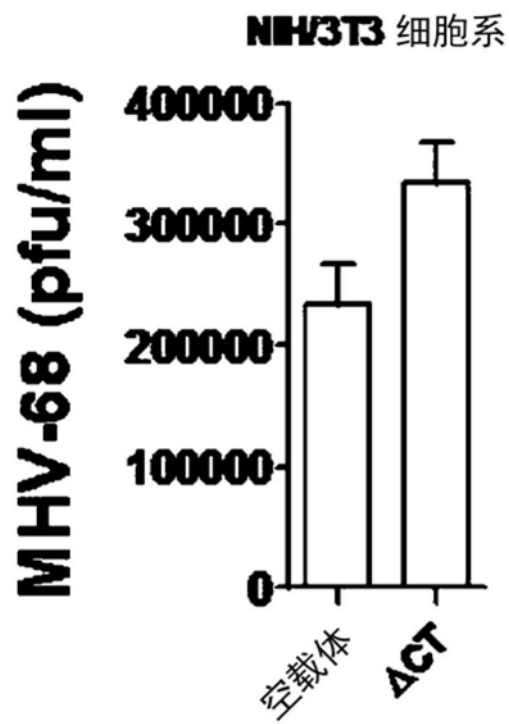


图12

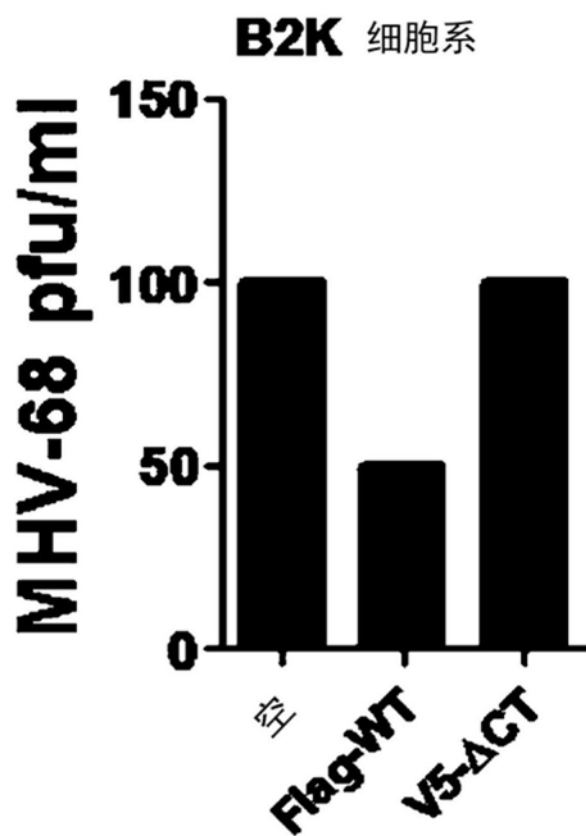


图13