

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101820906 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 01

(21) 申请号 200880111084. 9

A61P 31/22(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 10

(30) 优先权数据

60/998, 426 2007. 10. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/079494 2008. 10. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/049138 EN 2009. 04. 16

(71) 申请人 普林斯顿大学理事会

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 汤玛斯·雪克 王戴

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

11243

代理人 雒纯丹

(51) Int. Cl.

A61K 39/245(2006. 01)

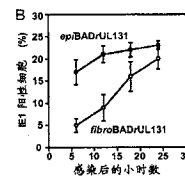
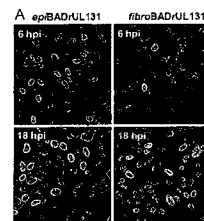
权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图 6 页

(54) 发明名称

巨细胞病毒疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明揭示通过选择繁殖巨细胞病毒的细胞型增加巨细胞病毒疫苗多样性的方法, 和由所述方法所制备的巨细胞病毒在疫苗组合物研发中的用途。本发明还揭示包含从上皮细胞分离的 CMV 的疫苗组合物。



1. 一种制备巨细胞病毒 (CMV) 疫苗的方法,其包含:
 - a) 在选定细胞型的培养细胞中繁殖 CMV 病毒株或分离株,从而制备细胞型条件性 CMV ; 以及
 - b) 由所述细胞型条件性 CMV 制备 CMV 疫苗。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 CMV 病毒株或分离株是人 CMV 病毒株或分离株。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述选定的细胞型包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、神经元细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、树突状细胞和基质细胞。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,所述选定的细胞型是上皮细胞。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其包含在两种或两种以上不同的选定细胞型中制备所述细胞型条件性 CMV 和合并所述 CMV 来制备所述 CMV 疫苗。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其包含提供两种或两种以上 CMV 病毒株或分离株,使所述病毒株或分离株各在包含所述选定细胞型或两种或两种以上不同的选定细胞型的所述培养细胞中繁殖,和合并由此制备的所述细胞型条件性 CMV 来制备所述 CMV 疫苗。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其包含制备减毒活 CMV 疫苗。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其包含制备灭活或死 CMV 疫苗。
9. 一种 CMV 疫苗,其由根据权利要求 1 所述的方法制备。
10. 一种试剂盒,其包含容器,所述容器含有:
 - a) 一种或一种以上 CMV 病毒株或临床分离株;
 - b) 一种或一种以上选定细胞型的培养细胞;以及
 - c) 关于使用所述培养细胞和所述 CMV 病毒株或分离株制备用于 CMV 疫苗的细胞型条件性 CMV 的说明书。
11. 一种疫苗组合物,其包含与适合的药用载体或佐剂混合的巨细胞病毒 (CMV) 群体或其病毒粒子组分,其中所述 CMV 群体从上皮细胞培养物中分离。
12. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物,其中,所述 CMV 是人类 CMV。
13. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物,其中,从所述上皮细胞培养物中分离的所述 CMV 群体的特征在于随后感染的宿主细胞中的一个或一个以上包含以下的特征:
 - a) 通过与宿主细胞质膜融合进入所述宿主细胞中;
 - b) 与从培养的成纤维细胞中分离的相同 CMV 群体相比,所述宿主细胞的由病毒粒子介导的细胞-细胞融合更多;
 - c) 与从培养的成纤维细胞中分离的相同 CMV 群体相比,所述宿主细胞中的病毒生长加速;
 - d) 引发细胞应答,包括与由从培养的成纤维细胞中分离的相同 CMV 群体在感染后 10 小时所引发的应答相比,约三分之二以下的基因的表达改变大于或等于 2.5 倍;或
 - e) 引发细胞应答,包括一个或一个以上由以下基因库登录号表示的基因的表达改变:
AK094860、NM_145023、NM_133492、NM_001039580、NM_001004301、NM_001034、AI369525、AK123066、NM_005345、NM_020731、BC071797、NM_003414、NM_000800、NM_138467、AK090803、AL133118、NM_001165、BG001037、NM_024861、NM_001043、NM_016239、NM_001018084、NM_001037442、NM_017600、NM_022097、NM_175868、NM_032266、NM_003841、NM_005039、

NM_145051、NM_004294、AW856073、NM_024050、AF085968、NM_080927、NM_022115、AK056703、NM_000808、NM_012377、NM_006793、NM_031466、NM_005185、NM_139173、BX360933、NM_016125、NM_002104、NM_032188、NM_004185、NM_004843 或 NM_173550。

14. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物,其进一步包含从另一细胞型的细胞培养物中分离的 CMV 群体或其病毒粒子组分。

15. 根据权利要求 14 所述的疫苗组合物,其中,所述另一细胞型是成纤维细胞型。

16. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物,其中所述 CMV 群体包含两种或两种以上在上述上皮细胞培养物中生长的 CMV 病毒株或临床分离株。

17. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物,其包含减毒活 CMV 疫苗。

18. 根据权利要求 11 所述的疫苗组合物,其包含灭活 CMV 疫苗。

19. 一种使个体对 CMV 免疫的方法,其包含向所述个体给药 CMV 疫苗组合物,所述 CMV 疫苗组合物包含与适合的药用载体或佐剂混合的巨细胞病毒 (CMV) 群体或其病毒粒子组分,其中所述 CMV 群体从上皮细胞培养物中分离。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述个体是人。

巨细胞病毒疫苗及其制备方法

[0001] 本发明主张 2007 年 10 月 10 日申请的美国临时申请案第 60/998,426 号的权利,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0002] 根据 35 U. S. C. § 202(c), 承认美国政府可具有本发明的某些权利, 本发明部分用美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 的批准号为 CA85786、CA82396、AI54430 及 GM71508 的基金完成。

技术领域

[0003] 本发明大体来说涉及疫苗研发领域。更具体来说, 本发明涉及通过选择繁殖巨细胞病毒的细胞型增加巨细胞病毒疫苗多样性的方法, 以及由这些方法制备的巨细胞病毒在疫苗组合物研发中的用途。

背景技术

[0004] 本说明书通篇引用各种公开案, 包含专利、公开申请案、技术文献和学术文章。这些引用的公开案各以全文引用的方式并入本文中。本说明书最后列出说明书内以圆括号中的数字提及的完全引用或未完全引用的公开案。

[0005] 巨细胞病毒 (CMV) 是归为疱疹病毒科 β 亚科的成员的疱疹病毒。根据疾病控制和预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention), 发现 CMV 感染颇为普遍地存在于人类群体中, 据估算 40-80% 的美国成人群体受感染。这一病毒主要通过体液传播, 且时常从怀孕母体传递给胎儿或新生儿。虽然 CMV 感染在大多数个体中是潜伏性的, 但病毒激活 (virus activation) 会引发高烧、寒战、疲劳、头痛、恶心和脾肿大。

[0006] 虽然大多数人类 CMV 感染是无症状的, 但免疫不成熟或免疫受损个体 (诸如新生儿、HIV 阳性患者、同种异体移植患者和癌症患者) 的 CMV 感染尤其是个问题。这些个体的 CMV 感染除其它有害病况外还会引发危重症, 包括肺炎、肝炎、脑炎、结肠炎、葡萄膜炎、视网膜炎、失明和神经病。另外, CMV 是先天缺陷的主要原因。目前, 尚无治愈或预防 CMV 感染的疫苗。

[0007] 疱疹病毒进入细胞是一个复杂的过程, 从吸附和受体结合开始, 接着是病毒包膜与细胞膜融合。融合发生在质膜或内体膜上。举例来说, EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 通过受体介导的胞吞作用进入初级 B 细胞 (1, 2), 又通过使病毒粒子包膜与质膜融合感染上皮细胞或转化的 B 细胞 (1)。虽然单纯疱疹病毒与一些细胞型的质膜融合, 但通过胞吞作用进入其他细胞型 (3-6)。人巨细胞病毒 (HCMV) 活体内感染多种细胞型, 包括上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞 (7)。虽然其与成纤维细胞的质膜融合 (8), 但通过胞吞作用进入视网膜色素上皮细胞和脐静脉内皮细胞 (9, 10)。

[0008] 疱疹病毒“选择”其进入途径的机理尚不清楚。虽然一般认为进入途径主要由宿主细胞决定, 但病毒粒子糖蛋白的趋性角色 (tropic role) 优先 (11)。EBV 病毒粒子含有两种 gH 复合物, 即 gH/gL 和 gH/gL/gp42 (12, 13), 其具有互斥功能 (11)。虽然与 B 细胞质膜融合由 gH/gL/gp42 介导 (14-16), 但进入上皮细胞由 gH/gL 引发 (11, 12, 17)。制备 EBV

的细胞型可改变 EBV 的趋性。B 细胞衍生的 EBV 病毒粒子所含的 gH-gL-gp42 少于上皮细胞衍生的病毒粒子。因此, B 细胞产生的病毒对上皮细胞更具感染性, 而上皮细胞衍生的病毒具 B 细胞趋性的 (18)。

[0009] HCMV 还编码两种 gH/gL 复合物: gH/gL/gO 和 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 (19, 20)。含 gO 的复合物足以用于成纤维细胞感染, 而含 pUL128/pUL130/pUL131 的复合物为感染内皮细胞和上皮细胞所需 (19-21)。AD169 实验室病毒株在其病毒粒子中仅含有 gH/gL/gO 复合物 (19)。第二种 gH/gL 复合物的缺乏造成 HCMV 实验室病毒株的上皮细胞和内皮细胞趋性丧失 (19-22)。

[0010] 需要 CMV 疫苗变种和 CMV 疫苗多样性, 且需要控制病毒传播和激活、尤其免疫受损个体和孕妇的病毒传播和激活的有效方法。本发明解决这一需要。

发明内容

[0011] 本发明的一个方面提供一种制备巨细胞病毒 (CMV) 疫苗的方法。这一方法包含在选定细胞型的培养细胞中繁殖 CMV 病毒株或分离株, 从而制备细胞型条件性 CMV, 和由所述细胞型条件性 CMV 制备 CMV 疫苗。在某些实施例中, CMV 病毒株或分离株是人 CMV (HCMV) 病毒株或分离株。有多种多样的细胞型适用于这一方法, 包括 (但不限于): 上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、神经元细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、树突状细胞和基质细胞。在一个具体实施例中, 选定的细胞型是上皮细胞。

[0012] 上述方法可进一步包含在两种或两种以上不同的选定细胞型中制备细胞型条件性 CMV 和合并这些 CMV 来制备 CMV 疫苗。可选地或另外地, 这一方法包含提供两种或两种以上 CMV 病毒株或分离株, 使这些病毒株或分离株的每一株在包含选定细胞型或两种或两种以上不同的选定细胞型的培养细胞中生长和合并由此制备的所有 CMV 来制备 CMV 疫苗。

[0013] 在某些实施例中, 这一方法包含制备减毒活 CMV 疫苗。在另一实施例中, 其包含制备灭活或死 CMV 疫苗。在其它实施例中, 其包含制备包含一种或一种以上减毒活病毒、灭活病毒和其它免疫原性组分 (例如免疫原性 CMV 蛋白和肽) 等的组合疫苗。

[0014] 由上述方法制备的 CMV 疫苗也属于本发明的范畴。

[0015] 本发明的另一方面提供一种实施本发明方法的试剂盒。这些试剂盒通常包括内部含有一种或一种以上 CMV 病毒株或临床分离株、一种或一种以上选定细胞型的培养细胞的包装, 以及关于使用培养细胞和 CMV 病毒株或分离株制备用于 CMV 疫苗的细胞型条件性 CMV 的说明书。

[0016] 本发明的另一方面提供一种疫苗组合物, 其包含与适合的药用载体或佐剂混合的巨细胞病毒 (CMV) 群体或其病毒粒子组分, 其中所述 CMV 群体从选定细胞型的培养细胞中分离。在一个实施例中, 选定的细胞型是上皮细胞。在一个实施例中, 疫苗组合物包含人巨细胞病毒 (HCMV)。

[0017] 在疫苗组合物的各个实施例中, 从上皮细胞培养物中分离的 CMV 群体的特征在于在随后感染的宿主细胞中的一个或一个以上特征, 包括 (但不限于): (a) 通过与宿主细胞质膜融合进入宿主细胞中; (b) 与从培养的成纤维细胞中分离的相同 CMV 群体相比, 宿主细胞的由病毒粒子介导的细胞-细胞融合更多; (c) 与从培养的成纤维细胞中分离的相同 CMV 群体相比, 宿主细胞中的病毒生长加速; (d) 引发细胞应答, 包括与由从培养的成纤维细胞

中分离的相同 CMV 群体在感染后 10 小时所引发的应答相比,约三分之二以下的基因的表达改变大于或等于 2.5 倍;或 (e) 引发细胞应答,包括如本文中表 2 和表 4 中所示的一个或一个以上基因的表达发生变化,所述基因由以下基因库登录号 (GenBank Accession Nos) 表示:AK094860、NM_145023、NM_133492、NM_001039580、NM_001004301、NM_001034、AI369525、AK123066、NM_005345、NM_020731、BC071797、NM_003414、NM_000800、NM_138467、AK090803、AL133118、NM_001165、BG001037、NM_024861、NM_001043、NM_016239、NM_001018084、NM_001037442、NM_017600、NM_022097、NM_175868、NM_032266、NM_003841、NM_005039、NM_145051、NM_004294、AW856073、NM_024050、AF085968、NM_080927、NM_022115、AK056703、NM_000808、NM_012377、NM_006793、NM_031466、NM_005185、NM_139173、BX360933、NM_016125、NM_002104、NM_032188、NM_004185、NM_004843 或 NM_173550。

[0018] 在某些实施例中,疫苗组合物包含从两种或两种以上不同的选定细胞型的细胞培养物中分离的 CMV 群体或其病毒粒子组分。举例来说,CMV 群体可从上皮细胞和另一细胞型(诸如成纤维细胞型)的细胞中分离。在其它实施例中,CMV 群体包含两种或两种以上在选定细胞型中生长的 CMV 病毒株或临床分离株。某些实施例可包含多种在多种不同细胞型的细胞培养物中生长的 CMV 病毒株或临床分离株。

[0019] 在一个实施例中,疫苗组合物包含减毒活 CMV 疫苗。在另一实施例中,其包含灭活 CMV 疫苗。在其它实施例中,疫苗组合物可为包含减毒活病毒或其组分、灭活病毒或其组分和/或其它免疫原性 CMV 肽或蛋白中的一种或一种以上病毒株的组合疫苗。

[0020] 本发明的另一方面提供一种使个体对 CMV 免疫的方法,其包含向个体给药由上述方法制备和/或包含上述特征的 CMV 疫苗组合物。在一个实施例中,待免疫的个体是人类。

[0021] 可参阅如下附图、实施方式和实例来理解本发明的其它特征和优点。

附图说明

[0022] 图 1 HCMV IE1 于 ARPE-19 细胞中表达的动力学。(A) 在指定时间时固定感染细胞(每个细胞 0.1pfu),且对 IE1(彩色照片中为绿色,黑白照片中为浅灰色)、Sp100(彩色照片中为红色,黑白照片中为极深的灰色)和 DNA(彩色照片中为蓝色,黑白照片中为深灰色)进行染色。(B) 在感染(每个细胞 0.1pfu)后各时间点,定量表达 IE1 的细胞的百分比;结果显示于图中。

[0023] 图 2 HCMV 进入 ARPE-19 细胞的电子显微镜分析。在 4℃ 下使 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131 粒子(每个细胞 50pfu)与细胞结合,随后在 37℃ 下内化 15 分钟。呈示代表性图像。

[0024] 图 3 内体酸化抑制剂和病毒粒子源对 HCMV 进入 ARPE-19 细胞的作用。一式三份进行实验,且相对于未处理培养物,记录经药物处理的培养物中阳性细胞的数目。(A) 用 NH₄Cl 或 BFA 预处理细胞 1 小时,接种 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131(每个细胞 1pfu),且 16 小时后对 IE1 进行染色。(B) 用 50mM NH₄Cl 或 40nM BFA 预处理细胞 1 小时,随后接种指定细胞型中所制备的 BADrUL131(每个细胞 0.1pfu)或 FIXwt(每个细胞 0.01pfu),且 16 小时后对 IE1 进行染色。

[0025] 图 4 由上皮细胞衍生的病毒诱导的从 ARPE-19 细胞外部的融合。(A) 给细胞接种 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131(每个细胞 20pfu),随后维持在含 200 μg/ml PFA 的培养

基中。感染后 16 小时,获取相衬图像 (Phase contrast image)。(B) 在 4°C 下用 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131 (每个细胞 20pfu) 感染报告分子 (reporter) 与效应细胞 (effector cell) 的混合物 1 小时。随后使培养物转变到 37°C 历时 6 小时,此后测量相对荧光素酶活性。

[0026] 图 5pUL130 特异性中和抗体对 HCMV 感染和进入的作用。(A) 与各种浓度的抗 pUL130 一起培育上皮细胞或成纤维细胞衍生的病毒,且测定残余感染性。(B) 用最终浓度为 20 μ g/ml 的抗 pUL130 或用 PBS 预处理上皮细胞或成纤维细胞衍生的病毒粒子,随后在 4°C 下吸附于 ARPE-19 细胞 1 小时。用冷 PBS 洗涤细胞两次,且提取与细胞相关的病毒 DNA 测定附着于细胞的粒子的相对数目。或者,使细胞转变到 37°C 历时 2 小时以使病毒进入。利用 EDTA-胰蛋白酶处理移除未穿透细胞的病毒粒子。接着利用实时 PCR 定量内化的病毒 DNA。

[0027] 图 6 上皮细胞中所制备的 HCMV 相对于成纤维细胞中所制备的 HCMV 对 ARPE-19 转录组 (transcriptome) 的调节。(A) 文氏图 (Venn diagram) 描绘相对于模拟感染,经 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131 (每个细胞 3pfu) 感染后 6 小时或 10 小时,分化调控基因的分布。(B) 实时 RT-PCR 测定的相对 RNA 水平的变化。所测试的基因是羟甲基胆素合成酶 (HMBS, NM_000190)、与发病机理相关的 GLI 1 (胶质瘤) (GliPR, NM_006851)、由 IL-1 β 快速诱导的与穿透素 (pentraxin) 相关的基因 (PTX3, NM_002852)、2' -5' -寡腺苷酸合成酶 3 (OAS3, NM_006187)、干扰素诱导的蛋白 44 (IFI44, NM_006417)、v-rel 网状内皮组织增殖病毒致癌基因同系物 B 细胞中 κ 轻链多肽基因强化子的核因子 3 (relB, NM_006509) 和 ATP 结合盒子族 C (CFTR/MRP) 成员 3 (MRP3, NM_003786)。

具体实施方式

[0028] 本说明书和权利要求书通篇使用与本发明方法和其它方面有关的各种术语。除非另作定义,否则本文中所使用的所有科技术语具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。虽然任何与本文所述的方法和材料类似或相同的方法和材料都可用于测试本发明的实践中,但本文描述优选材料和方法。在描述和主张本发明时,将使用以下术语。应理解,本文中所使用的术语仅出于描述特定实施例的目的且不打算限制本发明。

[0029] 定义 :

[0030] 如本说明书和随附权利要求书中所使用,除非另外明确说明,否则单数形式“一 (a, an)”和“所述 (the)”包括多个指示物。因此,例如提及“一个细胞”包含两个或两个以上细胞的组合等。

[0031] 如本文所使用的“约”当提及诸如量、持续时间 (temporal duration) 等可测量值时,打算涵盖距指定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、甚至更优选 $\pm 1\%$ 且更优选 $\pm 0.1\%$ 的变动,因为这些变动适于进行所揭示的方法。

[0032] 术语“扩增”、“繁殖”和“生长”在本文中可互换使用,是指根据病毒学家和医学生物学家熟知的方法在允许病毒在细胞内复制和增殖的条件下向培养细胞中引入病毒或用病毒感染细胞的一般方法。具体来说,这些术语在本文中用于指本发明方法中 CMV 通过在选定细胞型上繁殖而“条件化”的步骤,该步骤之后为使用条件性 CMV 制备疫苗。

[0033] “生物分子”包括蛋白质、多肽、核酸、脂质、多糖、单糖和其所有片段、类似物、同系

物、结合物以及衍生物。

[0034] “细胞培养物”一般指取自活生物体且在控制条件下（“在培养物中”或“培养”）生长的细胞。“原代细胞培养物”是在第一继代培养之前直接取自生物体的细胞、组织或器官的培养物。“细胞系”是由原代细胞培养物的一次或一次以上继代培养所形成的细胞群体。

[0035] 基因的“编码区”由基因的编码链的核苷酸残基和基因的非编码链的核苷酸组成，所述链各别与基因转录所制备的 mRNA 分子的编码区同源或互补。

[0036] mRNA 分子的“编码区”也由 mRNA 分子的核苷酸残基组成，这些残基在 mRNA 分子翻译期间与转移 RNA 分子的反密码子区匹配或编码终止密码子。因此，编码区可包括对应于不存在于 mRNA 分子编码的成熟蛋白质中的氨基酸残基（例如蛋白质输出信号序列中的氨基酸残基）的核苷酸残基。

[0037] 术语“条件性病毒 (conditioned virus)”、“细胞型条件性病毒 (celltype-conditioned virus)”、“条件性 CMV (conditioned CMV)”或“细胞型条件性 CMV (cell type-conditioned CMV)”是指根据本文所述的方法在用于制备疫苗之前已在选定细胞型中繁殖的 CMV。这些术语打算类似于术语“条件性培养基”，描述已生长特定细胞型或细胞系随后移出且含有细胞制备的组分或因子，从而改变培养基的功能的培养基。出于本申请案的目的，术语“条件性病毒 (conditioned virus)”类似地指已在选定细胞型中生长，随后从这些细胞中移出的病毒，其中病毒此后展现一种或一种以上因在这种细胞型中生长而产生的改变的功能特征。

[0038] “编码”是指诸如基因、cDNA 或 mRNA 的多核苷酸中的核苷酸的特定序列用作生物过程中合成具有确定序列的核苷酸（即 rRNA、tRNA 和 mRNA）或确定序列的氨基酸的其它聚合物和大分子的模板的固有性质和由此产生的生物性质。因此，如果对应于基因的 mRNA 的转录和翻译在细胞或其它生物系统中制备蛋白质，那么这一基因编码蛋白质。核苷酸序列与 mRNA 序列一致且通常提供于序列列表中的编码链与用作基因或 cDNA 转录模板的非编码链可称作编码这一基因或 cDNA 的蛋白质或其它产物。除非另作说明，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此互为简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和 RNA 的核苷酸序列可包括内含子。

[0039] “有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用，且指如本文所述有效实现特定生物结果的化合物、调配物、物质或组合物的量。这些结果可包括（但不限于）如任何适于所属领域的方法所确定的对病毒感染的抑制。

[0040] 如本文所使用的“内源性”是指来自生物体、细胞、组织或系统或生物体、细胞、组织或系统内部所制备的任何物质。“外源性”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或在生物体、细胞、组织或系统外部所制备的任何物质。

[0041] 如本文所使用的术语“表达”定义为在启动子驱动下转录和 / 或翻译特定核苷酸序列。

[0042] 如本文所使用的“免疫”或“疫苗接种”在本文中可互换使用且意指预防性或治疗性免疫或疫苗接种。“治疗性疫苗接种”意思是给 CMV 感染患者接种疫苗。

[0043] “分离”意思是从自然状态变更或移出。举例来说，天然存在于活的动物中的核酸或肽不是“分离”的，而部分或完全与其自然状态的共存物质分离的相同核酸或肽是“分离”

的。分离的核酸或蛋白质可以实质上纯的形式存在,或可存在于非原生环境(诸如宿主细胞)中。除非本文另外特别说明,否则形成本发明标的物的蛋白质、病毒粒子复合物、抗体和其它生物分子都是分离的或可被分离。

[0044] 术语“患者”、“个体”等在本文中可互换使用,且指任何可被 CMV 感染的动物或其活体外或原位细胞。在某些非限制性实施例中,患者或个体是人类。

[0045] 免疫原性或疫苗组合物的“肠外”给药包括例如皮下(s. c.)、静脉内(i. v.)、肌肉内(i. m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0046] 如本文所使用的术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,如本文所使用的核酸与多核苷酸可互换。所属领域的技术人员一般认为核酸是多核苷酸,其可水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可水解成核苷。如本文所使用的多核苷酸包括(但不限于)由所属领域中可利用的任何方法获得的所有核酸序列,所述方法包括(但不限于)重组方法(即使用普通克隆和扩增技术等从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列)和合成方法。

[0047] 如本文所使用的术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,且指包含经肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,且对蛋白质或肽序列可包含的氨基酸的最大数目无限制。多肽包括包含两个或两个以上经肽键相互连接的氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所使用,这一术语是指短链(在所属领域中通常也称为肽、寡肽和寡聚物)与长链(在所属领域中一般称为蛋白质,其有许多类型)。“多肽”尤其包括例如生物活性片段、实质上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变异体、经修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0048] “医药学上可接受”是指就组合物、调配物、稳定性、患者接受性和生物可用性来说,从药理学/毒理学角度患者可接受且从物理/化学角度医药制备化学家可接受的性质和/或物质。“医药学上可接受的载体”是指不干扰活性成分的生物活性效果且对给药所述载体的宿主无毒的介质。

[0049] 术语“单个包装”意思是试剂盒的组分在实体上位于一个或一个以上容器中或与所述容器相关且视为一个制备、分配、销售或使用单元。容器包括(但不限于)袋、盒、瓶、热缩包装(shrink wrap package)、主要或附加组件或其组合。“单个包装”还可包括虚拟组件。举例来说,试剂盒可含有实体包装内部所含的简化的实体说明书和从例如网站等虚拟环境获取更详细说明书的说明书。

[0050] 如本文所使用的术语“治疗性”意思是治疗和/或预防。通过消除、延迟、抑制、缓解或根除与 CMV 感染相关的疾病状态获得治疗性作用。

[0051] 如本发明上下文所使用的术语“治疗”打算包括对疾病或病症的治疗性治疗和预防或抑制措施。因此,例如术语治疗包括在疾病或病症发作之前或之后给药药剂,从而预防或消除疾病或病症的所有病征。另一实例为,在疾病临床表现之后给药药剂以对抗疾病症状包含“治疗”疾病。此包括例如预防 CMV 繁殖到生物体的未感染细胞中。短语“减弱 CMV 感染”在本文中有时用于指包括如临床医师熟知的方法所确定降低感染 CMV 的患者的感染程度的治疗方法。

[0052] 描述:

[0053] 巨细胞病毒(CMV)活体内感染多种细胞型,包括上皮细胞、内皮细胞和成纤维细

胞。如以上背景材料中所概述,各种研究已报导虽然病毒与成纤维细胞质膜融合,但通过胞吞作用进入视网膜色素上皮细胞和脐静脉内皮细胞。由于与上皮细胞或内皮细胞培养物相比,在培养的成纤维细胞中繁殖 CMV 相对容易,因此诸如上述研究等研究已使用成纤维细胞繁殖的 CMV 病毒株执行。同样,培养的成纤维细胞通常是繁殖 CMV 用于临床应用(诸如研发用于疫苗的减毒病毒株)的所选细胞型。

[0054] 根据本发明现已证明,制备 CMV 粒子的细胞型对 CMV 粒子在后续一系列感染中的特性具有重大影响。因此,例如当迄今报导 CMV 通过胞吞作用进入上皮细胞时,本发明发明者已证明这是在成纤维细胞中繁殖的 CMV 的进入方式,而不是在培养上皮细胞中繁殖的 CMV 的进入方式。上皮细胞繁殖的 CMV 主要通过质膜融合进入上皮细胞。这种不同的进入方式产生多种生理学结果:影响感染继续进行的动力学且显著影响对感染的细胞应答。举例来说,与经在成纤维细胞中生长的病毒感染的细胞相比,在上皮细胞中生长的病毒引起显著减弱的细胞应答。许多在经成纤维细胞中生长的病毒感染之后表达的细胞抗病毒基因在经上皮细胞中生长的病毒感染之后不表达。因此,预测在上皮细胞中生长的 CMV 与疫苗和在成纤维细胞中生长的 CMV 的作用方式不同,从而为 CMV 疫苗的产生提供一种新颖且出乎意料多样性来源。同样,在 CMV 能够感染的诸如内皮细胞或特殊细胞型等其它细胞型(例如神经元、中枢或周围神经系统的其它细胞、平滑肌细胞、肝细胞、基质细胞、巨噬细胞或树突状细胞)中繁殖 CMV 应为 CMV 疫苗的产生提供其它新颖的多样性来源。

[0055] 因此,本发明的一个方面提供利用与选择繁殖病毒的细胞型相关的变化性制备 CMV 疫苗的方法。另一方面提供实施上述方法的试剂盒。本发明的另一方面提供预防或治疗 CMV 感染的疫苗组合物和使用这些组合物使个体免疫的方法。下文阐述本发明这些方面的各种实施例。

[0056] 制备 CMV 疫苗的方法:

[0057] 根据本发明的一个方面的方法包含(1)提供 CMV 病毒株或分离株;(2)在选定细胞型的细胞培养物中繁殖病毒株或分离株;和(3)收集通过在这一细胞型中生长所制备的 CMV 病毒粒子(本文中称为“细胞型条件性 CMV”以用于制备 CMV 疫苗。

[0058] 在 CMV 用于疫苗研发之前经选择用于繁殖 CMV 的细胞型可以是制备一定产量病毒粒子的容许 CMV 感染的任何细胞系。病毒粒子在一些测定中可能具高感染性,或粒子在许多测定中可能展现有限的感染性或无感染性。适合的细胞型包括(但不限于)(1)上皮细胞系,诸如本文中举例说明的 ARPE-19 和其它视网膜色素上皮细胞系(例如上皮细胞系 K-1034)(Ando, Y. 等人,1997, Arch. Virol. 142(8):1645-1658)、源自正常人类结肠粘膜的 HCMC(Smith, JD, 1986, J. Virol. 60(2):583-588)、Caco-2 肠上皮细胞(Esclatine. A. 等人, 2000, J. of Virol. 74(1):513-51)、SW480、HCT116、HeLa、H1299 和 MCF-7(关于后五者,参考 Wang. D. 和 T. Shenk, 2005. J. Virol. 79:10330);(2)内皮细胞系,诸如 HMEC-1, 一种人类微血管内皮细胞系,SV-40 病毒大 T 抗原使之永生化(Guetta. E. 等人, 2001. Cardiovascular Research 50:538-546)、HUVEC 和 LMVEC(关于后两者,参见 Wang. D. 和 T. Shenk. 2005, J. Virol. 79:10330);(3)神经元细胞,诸如 SK-N-SH、SK-N-AS 和 IMR-32(参见 Wang, D. 和 T. Shenk, 2005. J. Virol. 79:10330)和源自多种组织/器官源的初级上皮、内皮、平滑肌、巨噬细胞和树突状细胞。

[0059] 能够研发成疫苗的任何 CMV 或 CMV 的组合都适于用作这一方法的 CMV 源,只要其

可在至少一种选定细胞型中生长。在一个实施例中, CMV 是人 CMV (HCMV), 为先前已分离且特性化的分离株或新颖的 HCMV 分离株或 HCMV 样病毒。在另一个实施例中, CMV 起源于另一种灵长类动物, 包括 (但不限于) 黑猩猩 (Davison. AJ 等人, 2003, J. Gen. Virol. 84 : 17-28) 和 猕猴 (Hansen. SG 等人, 2003. J. Virol. 77 :6620-36 ;Rivailier. P 等人, 2006. J. Virol. 80 :4179-82)。CMV 可以是来自选定来源的未经修饰的病毒, 或其可以通过遗传修饰或合并来自两个或两个以上不同 CMV 病毒株或分离株的成分制备的嵌合病毒。

[0060] 所属领域中已知制备嵌合病毒的方法。为此目的, 克隆至少 6 种人类 CMV 病毒株作为感染性细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 并测序 (Murphy. E 等人, 2003. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 :14976-14981)。BAC 序列可由以下基因库登录号获得 :AC146999 (实验室病毒株 AD 169, 由其制备本文所述的 BADrUL131 变异体); AC146851 (实验室病毒株 Towne); AC146904 (临床分离株 PH); AC146905 (临床样分离株 Toledo); AC146906 (临床分离株 TR); 和 AC146907 (临床分离株 FIX)。未进行先前 BAC 克隆, 已测序至少两种人类 CMV 病毒株, 且其可由以下基因库登录号获得 :BK000394 (实验室病毒株 AD169) 和 AY446894 (临床分离株 Merlin)。黑猩猩 CMV 病毒株的整个基因组可以基因库登录号 AF480884 获得。也可获得两种猕猴 CMV 病毒株的基因组序列 (登录号 AY186194 和 DQ205516)。利用本申请案的教导, 所属领域的技术人员将能够使用任何前述序列或任何其它公开可用的 CMV 序列来制备嵌合 CMV 或对 CMV 进行遗传修饰。

[0061] 根据本发明已证明, 可通过在选定细胞型上繁殖成功条件化已在成纤维细胞中重复传代的 CMV 实验室病毒株。举例来说, 如本文实例中所述, 通过电穿孔将 BADrUL131 (一种重复传代的 AD169 HCMV 病毒株的 UL131 ORF 已修复的 BAC 克隆) 引入培养人类包皮成纤维细胞中, 且在上皮细胞系 ARPE-19 中扩增所得病毒制剂一次。因此, 本发明的各种实施例包含使用已在不同于选择用于条件化步骤的细胞型的细胞型中传代的 CMV (或 CMV 基因组)。举例来说, 可使 CMV 病毒株在成纤维细胞中传代多次, 随后在上皮细胞中扩增, 此后用于制备疫苗。应了解, CMV 可在选定的细胞型中扩增 / 繁殖一次或一次以上。

[0062] 在优选实施例中, 本发明方法用于制备减毒活 CMV 以用作疫苗。所属领域中已知使病毒减毒的方法。减毒 CMV 优选展现减弱的包括潜伏和激活的感染性和 / 或病原性, 但仍能够诱导治疗或保护宿主抵抗 CMV 感染的免疫应答。减毒 CMV 病毒株的实例包括 (但不限于) 实验室病毒株, 诸如 AD169 和 Towne, 其几乎仅在成纤维细胞中复制。这些减毒病毒株, 必要时经工程改造以制备必需的表面蛋白质或蛋白质复合物以获得适当的趋性, 其可如以上所讨论, 在上皮细胞中, 或在成纤维细胞中生长此后在上皮细胞中生长, 以用于本发明的疫苗组合物中。

[0063] 可使用在培养细胞、尤其成纤维细胞中连续传代使 CMV 减毒。活体外进行病毒感染宿主细胞的重复传代直到充分使病毒减毒。传代可在诸如调节的温度、pH 值、湿度等特定环境条件下进行以选择感染性或病原性降低的病毒。如果使用这种减毒方法, 那么随后在选定的细胞型中扩增连续传代的病毒一代或一代以上以制备 CMV 供本发明疫苗组合物使用。

[0064] 也可利用诱变使病毒减毒。举例来说, 根据所属领域中已知的技术, 可将 CMV 病毒粒子暴露于紫外线或电离辐射或化学诱变剂中。除用于制备嵌合病毒外, 重组技术还可用于制备减毒的 CMV 病毒粒子。举例来说, 可使用定点诱变、基因置换或基因剔除技术来获得

感染性、病原性或潜伏性减弱的病毒株。WO/2007/038316 中阐述通过剔除诱变修饰 CMV 的实例,其描述基因组缺失一个或一个以上潜伏促进基因的 CMV,显现改变的进入或维持潜伏状态的能力。

[0065] 在其它实施例中,灭活或杀死从选定的细胞培养物中分离的 CMV 且用于疫苗组合物中。所属领域中熟知灭活或杀死病毒的方法,例如用诸如福尔马林 (formalin) 等化学品灭活或杀死病毒。所属领域的技术人员应了解,杀死或灭活的 CMV 应包含病毒粒子的所有或大部分组分,如此在疫苗组合物中维持通过在选定细胞型中扩增所产生的多样性。

[0066] 可使用本发明方法产生在不同选定细胞型中繁殖的 CMV 的组合,从而赋予所制备的疫苗另一层面的多样性。在一个实施例中,使用单个 CMV 分离株或病毒株感染两个或两个以上不同类型的不同培养细胞系,例如视网膜上皮细胞和内皮细胞。随后合并通过在各别细胞型中扩增所制备的 CMV 而用于单个疫苗中。在另一个实施例中,使用两个或两个以上不同 CMV 临床分离株或病毒株感染单个选定的细胞系,且使用通过扩增在这一细胞型中制备的多病毒株或多分离株 CMV 群体制备疫苗。在又一个实施例中,使用多个分离株或病毒株感染两个或两个以上不同类型的不同培养细胞系,且合并通过在各别细胞型中扩增制备的 CMV 群体而用于疫苗中。

[0067] 本发明的另一方面提供根据上述方法制备 CMV 疫苗物质的试剂盒。视使用和试剂盒组分而定,试剂盒在单个包装的各别容器或虚拟包装的各别容器中包含一种或一种以上选定细胞型的细胞系的等分试样和一个或一个以上 CMV 分离株或病毒株或待引入选定培养细胞系中并在所述细胞系中扩增的携带这些 CMV 病毒株的基因组的载体。这些试剂盒通常还含有说明书或说明书链接以说明如何进行这一方法的各个步骤。试剂盒任选地还可包含培养基和其它适于进行细胞培养和病毒操作的试剂。

[0068] 疫苗组合物和使用方法:

[0069] 本发明的另一方面提供免疫原性组合物(本文可互换称为疫苗组合物),其包含与适合的药用载体或佐剂混合的巨细胞病毒(CMV)群体或其病毒粒子组分,其中 CMV 通过在例如上皮细胞培养物等选定细胞型中繁殖获得。如上所提及,CMV 疫苗迄今通常使用在成纤维细胞中繁殖的 CMV 制得。然而,根据本发明已证明,在上皮细胞中繁殖产生的病毒在许多不同方面与成纤维细胞中繁殖的病毒不同。上皮细胞中所制备的病毒优先与质膜融合,而成纤维细胞衍生的病毒主要通过受体介导的胞吞作用进入。另外,上皮细胞产生的病毒粒子的内在“从外部融合”活性高于成纤维细胞中产生的粒子,此影响感染的动力学。此外,受感染上皮细胞的转录概况的显著不同的差异提供证据表明,这两种病毒制剂引发不同细胞信号传导反应。

[0070] 具体来说,在上皮细胞中繁殖制备的 CMV 与通过在成纤维细胞中繁殖而制备的所述病毒的相同病毒株或分离株相比具有一个或一个以上以下特征。第一,如上所提及,不同之处可在于其通过与宿主细胞质膜融合进入宿主细胞。上皮细胞上所制备的 CMV 还显示,与从培养的成纤维细胞分离的相同 CMV 群体相比,宿主细胞的病毒粒子介导的细胞-细胞融合较多,以及与从培养的成纤维细胞分离的相同 CMV 群体相比,宿主细胞中的病毒生长加速。另外,与在成纤维细胞中繁殖的相同 CMV 相比,其引发的细胞应答减弱。感染后 10 小时,约三分之二以下的基因(约 50 个基因对约 150 个基因)展现 2.5 倍或 2.5 倍以上的表达水平变化。另外,上皮细胞中生长的 CMV 的特性可在于宿主基因的特定概况,所

述基因在感染后表达发生变化（增加或减小）。实例中详细描述这些基因表达概况，且可包括一个或一个以上由以下基因库登录号表示的基因的表达改变：AK094860、NM_145023、NM_133492、NM_001039580、NM_001004301、NM_001034、AI369525、AK123066、NM_005345、NM_020731、BC071797、NM_003414、NM_000800、NM_138467、AK090803、AL133118、NM_001165、BG001037、NM_024861、NM_001043、NM_016239、NM_001018084、NM_001037442、NM_017600、NM_022097、NM_175868、NM_032266、NM_003841、NM_005039、NM_145051、NM_004294、AW856073、NM_024050、AF085968、NM_080927、NM_022115、AK056703、NM_000808、NM_012377、NM_006793、NM_031466、NM_005185、NM_139173、BX360933、NM_016125、NM_002104、NM_032188、NM_004185、NM_004843 或 NM_173550。

[0071] 在本发明的这一方面，如在本发明的上述方面，能够研发成疫苗的 CMV 或 CMV 的组合都适于用作上述 CMV 群体来源，只要其可在至少一种上皮细胞系中或另一选定细胞型中生长。在一个实施例中，CMV 是 HCMV 或 HCMV 样病毒。在另一个实施例中，如上所述，CMV 起源于另一种灵长类动物，包括（但不限于）黑猩猩和猕猴。如上所述，CMV 可以是来自选定来源的未经修饰的病毒，或其可以通过遗传修饰或合并来自两个或两个以上不同 CMV 病毒株或分离株的成分制备的嵌合病毒。

[0072] 在优选实施例中，疫苗组合物包含减毒活 CMV，所述减毒活 CMV 可利用上述方法制备，所有上述方法都为所属领域的技术人员所熟知。在其它实施例中，灭活或杀死从选定的细胞培养物中分离的 CMV 且用于疫苗组合物中。

[0073] 疫苗组合物可包含不同 CMV 病毒株或分离株的组合以便再产生多样性，所述 CMV 病毒株或分离株可在单个上皮细胞培养物上繁殖或在若干不同上皮细胞培养物上繁殖或在另一细胞型的细胞上繁殖。此外，可合并减毒活 CMV 与死或灭活 CMV 或 CMV 的免疫原性组分以制备组合疫苗，例如合并减毒活 CMV 与热杀死的 CMV，或合并减毒活 CMV 与亚单位疫苗用物质，或合并所有三种类型的物质。标题为“Cytomegalovirus Surface Protein Complex for Use in Vaccines and as a Drug Target (用于疫苗和作为药物靶的用途的巨细胞病毒表面蛋白复合物)”的 WO 2007/146024 中描述适于亚单位疫苗的免疫原性 CMV 多肽和复合物的实例。

[0074] 疫苗组合物可进一步包含一种或一种以上佐剂。佐剂可以是增强对疫苗中的抗原的免疫应答的任何物质。适用于本发明的佐剂的非限制性实例包括弗氏佐剂 (Freund' s adjuvant)；不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund' s adjuvant)；皂甙；表面活性剂，诸如十六烷基胺、十八烷基胺、溶血卵磷脂 (lysolecithin)、脱甲基二 - 十八基溴化铵、N, N- 二 - 十八基 -N' -N- 双 (2- 羟乙基丙二胺)、甲氧基十六基甘油、氧化异丙烯多元醇 (pluronic polyol)；聚阴离子，诸如吡喃、二乙氨基乙基 (DEAE) 葡聚糖、硫酸葡聚糖、凝聚胺 (polybrene)、聚 IC、聚丙烯酸 (polyacrylic acid)、卡波普 (carbopol)、乙烯马来酸 (ethylene maleic acid)、氢氧化铝和磷酸铝肽；油或烃乳液等。

[0075] 疫苗可在水溶液（诸如水或乙醇）或生理学上相容的缓冲液（诸如汉氏溶液 (Hanks' solution)、林格氏溶液 (Ringer' s solution) 或生理盐水缓冲液（包括 PBS））中调配。疫苗调配物也可制成固体型制剂，所述固体型制剂打算例如通过在即将使用之前用适合的媒剂（诸如无菌水、生理盐水溶液或乙醇）复原，在使用前即刻转化成适于向个体给药的液体型制剂。

[0076] 疫苗组合物还可使用持续释放媒剂或长效型制剂 (depot preparation) 调配。这些长效作用调配物可通过植入 (例如皮下或肌肉内) 或肌肉内注射给药。因此, 例如疫苗可与适合的聚合或疏水性物质一起调配 (例如调配成于可接受的油中的乳液) 或与离子交换树脂一起调配, 或调配成微溶衍生物 (例如微溶盐)。可使用脂质体和乳液作为适于供疏水性调配物使用的传递媒剂。视化学性质而定, 持续释放媒剂释放抗原的时间可在数小时至数天至数周至数月范围内。

[0077] 疫苗组合物可进一步包括一种或一种以上抗氧化剂。例示性还原剂包括巯基丙酰基甘氨酸、N-乙酰基半胱氨酸、 β -巯基乙胺、谷胱甘肽、抗坏血酸和其盐、亚硫酸盐或偏亚硫酸氢钠或类似物质。另外, 抗氧化剂还可包括天然抗氧化剂, 诸如维生素 E、维生素 C、黄质素 (leutein)、黄嘌呤、 β 胡萝卜素和矿物 (诸如锌和硒)。

[0078] 疫苗组合物可进一步合并其它物质来充当稳定剂、防腐剂、缓冲剂、润湿剂、乳化剂、分散剂并且合并单糖、多糖和改变渗透平衡的盐。疫苗可进一步包含增强疫苗功效的免疫刺激分子。这些分子可加强免疫应答, 可诱发炎症且可以是任何淋巴因子或细胞因子。细胞因子的非限制性实例包括白细胞介素 (IL)-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13、粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞炎症因子等。

[0079] 疫苗可经调配用于输注或注射 (静脉内、动脉内、肌肉内、皮内、皮下、鞘内、十二指肠内、腹膜内等) 或通过输注或注射给药。疫苗还可通过鼻内、阴道、直肠、经口、局部、经颊、经粘膜或经皮方式给药。

[0080] 可由所属领域非常完善的方法凭经验确定治疗 CMV 感染的有效抗原剂量。疫苗的有效剂量可取决于若干变量, 包括 (但不限于) 个体的体型、身高、体重、年龄、性别、总体健康状况、调配物类型、给药模式或方式、病毒是活性的还是潜伏性的、患者是否二次感染或罹患其它相关病况。

[0081] 疫苗方案也可基于上述因素。疫苗接种可在个体生命周期 (包括从胎儿发育成成人) 的任何时候进行。为完全保护, 可能需要补充给药或增强免疫。为确定是否已实现足够的免疫保护, 可在疫苗接种后监测患者的血清转化和抗体效价。

[0082] 提供以下实例以更详细地描述本发明。这个实例打算说明本发明, 而不限制本发明。

[0083] 实例

[0084] 人类巨细胞病毒使用两种不同途径进入视网膜色素上皮细胞

[0085] 这一实例中描述的实验结果证明, 两种不同细胞型中所制备的 HCMV 通过不同途径进入上皮细胞。上皮细胞中产生的病毒粒子优先通过在质膜处融合进入, 而来自成纤维细胞的病毒粒子通过 pH 依赖性胞吞作用进入。这两种病毒制剂诱导显著不同的细胞应答。

[0086] 材料和方法

[0087] 生物试剂: 将第 10 至 15 代的人类包皮成纤维细胞 (HFF) 维持在含 10% 新生牛血清的培养基中。将第 24 至 34 代人类 MRC-5 胚胎肺成纤维细胞和 ARPE-19 视网膜色素上皮细胞 (美国典型微生物菌种保藏中心 (American Type Culture Collection) 维持在含 10% 胎牛血清的培养基中。使人类近端肾小管上皮细胞 (hRPTEC) (Cambrex) 在含 10% 胎牛血清的培养基中生长且使用第 4 至 5 代。

[0088] BADwt 衍生自 AD169 HCMV 病毒株的 BAC 克隆; BADrUL131 (19, 21) 是 UL131 ORF 已

修复的BADwt 衍生物 ;BFXwt 衍生自 VR1814 临床 HCMV 分离株的 BAC 克隆。通过将 BAC DNA 电穿孔于 HFF 中制备病毒,且除非另作说明,否则在 ARPE-19 细胞或 HFF 中扩增所得病毒制剂一次。通过经由山梨醇垫 (sorbitol cushion) 离心部分纯化无细胞的病毒粒子,且再悬浮于无血清培养基中。利用空斑测定 (plaque assay) 测定 MRC-5 细胞的病毒效价。利用空斑还原测定 (19) 使用纯化的抗 pUL130 单克隆抗体 (3E3) (19) 测定 BADrUL131 的中和。

[0089] 先前已描述抗 IE1 单克隆抗体 1B12 (21)。使用兔抗 Sp100 多克隆抗体 (Chemicon) 观察 ND10。

[0090] 电镜:将 ARPE-19 细胞在 4°C 下暴露于病毒中 1 小时,通过用冷 PBS 洗涤两次移除未结合病毒,添加生长培养基 (37°C) 15 分钟,用磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 清洗细胞,固定且处理以进行电镜检查,且用 FEI Tecnai-T12 显微镜在 80kv 下检查。

[0091] 关于感染对内体酸化的依赖性的测定:在 37°C 下用 NH₄Cl 或巴弗洛霉素 A1 (Bafilomycin A1, BFA) (Sigma) 预处理 ARPE-19 细胞 1 小时,接着在抑制剂继续存在的情况下感染。16 小时后,将培养物固定在 2% 三聚甲醛中,且用 0.1% 曲通 (Triton) X-100 渗透。利用免疫荧光使用单克隆抗体 1B12 (21) 加 Alexa 546 结合二次抗体鉴别 IE1,且用 DAPI 对核进行染色。以表达 IE1 的药物处理的细胞相对于未处理细胞的百分比计算抑制。

[0092] 病毒粒子蛋白质的融合活性的分析:为测定“从外部的融合”,使 ARPE-19 细胞生长到汇合度为 90% 且使之感染。在 37°C 下 1 小时后,移除接种物,且添加含 200 μg/ml 膦甲酸 (PFA) 的培养基来抑制病毒 DNA 合成。通过目测检查合胞体形成来监测融合。

[0093] 使荧光素酶报告分子测定适于定量分析病毒粒子融合活性。分别用携带荧光素酶基因的质粒在 T7 启动子控制下和用 pcDNA3-T7 聚合酶质粒通过电穿孔 (效率为 90-95%) 制备报告分子和效应 ARPE-19 细胞。转染后 24 小时,以 1 : 1 的比率混合细胞,且在 37°C 下再培育 16 小时。随后将混合群体在 4°C 下暴露于 HCMV 病毒粒子中 1 小时,此后用冷 PBS 洗涤单层两次,接着添加缓冲液 (含 10mM 2-(N-吗啉基)乙烷磺酸和 10mM HEPES 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS)), 最终 pH 值在 4.5 至 8 范围内。在 37°C 下 3 分钟之后,移除缓冲液,且添加正常生长培养基。感染后 6 小时,溶解细胞,且使用荧光素酶报告分子测定系统 (普洛麦格 (Promega)) 测定荧光素酶活性。

[0094] 细胞转录反应的测定:使汇合的 ARPE-19 细胞血清饥饿 24 小时,接着进行模拟感染或感染。在感染后 6 小时或 10 小时,使用 Trizol (英杰 (Invitrogen)) 提取总 RNA,且经 RNeasy 管柱 (凯杰 (Qiagen)) 纯化。扩增 RNA 样品,且用安捷伦 (Agilent) 低 RNA 输入荧光线性扩增试剂盒作标记 (菁 -3)。为控制芯片间的变化 (chip to chip variation), 给参考 RNA (克隆技术 (Clontech)) 作标记 (菁 -5) 且将其与由模拟感染或 HCMV 感染细胞制备的探针共杂交。一式两份用 Agilent 人类 44K 寡核苷酸阵列进行杂交。使用 Agilent 扫描仪在 5 微米分辨率下扫描阵列,且用安捷伦特征提取 (Agilent Feature Extraction) 软件分析图像以确定杂交点样和本底扣除的荧光信号的强度。使用 Agilent GeneSpring GX 软件归一化和定量相对 RNA 变化。

[0095] 结果

[0096] 成纤维细胞衍生的病毒粒子激活 ARPE-19 细胞中的即刻早期基因表达,其中动力学比上皮细胞衍生的病毒粒子慢。AD169 HCMV 病毒株 (BADwt) 因 UL131 基因突变而在 ARPE-19 上皮细胞中不良复制 (10, 21)。制备 BADrUL131 的 AD169 突变的修复通过制备成

功进入上皮细胞中所需的 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 病毒粒子糖蛋白复合物 (19, 20), 使这些细胞的趋性恢复 (21)。

[0097] 在 ARPE-19 上皮细胞中生长的 BADrUL131 (epiBADrUL131) 启动上皮细胞中的基因表达程序的速度大于在 HFF 成纤维细胞中生长的 BADrUL131 (fibroBADrUL131) (图 1A)。当 ARPE-19 细胞受 epiBADrUL131 感染时, 约 17% 的细胞在感染后 (hpi) 6 小时表达可检测的 IE1 蛋白。IE1 表达的同时伴随核中 ND10 的破坏。相比之下, fibroBADrUL131 感染在感染后 6 小时仅在 2.8% 的 ARPE-19 细胞中引起 IE1 表达。然而, 表达 IE1 的细胞的数目随时间增加。经两种细胞型中制备的病毒感染后 24 小时, 表达 IE1 的 ARPE-19 细胞的百分比并无显著差异 (图 1B)。

[0098] 在 HFF 中所制备的病毒粒子相对于在 ARPE-19 细胞中制备的病毒粒子通过不同途径进入 ARPE-19 细胞。电镜检查病毒进入来确定是否 ARPE-19 细胞衍生的病毒相对于 HFF 衍生的病毒的 IE1 积聚的不同动力学由病毒基因表达开始之前的事件引起。在 4°C 下使得与 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131 一起培育的 ARPE-19 细胞附着于细胞表面, 且培养物转变到 37°C 历时 15 分钟以内化, 之后处理以进行镜检。每个样品检查 40-50 个细胞, 至少 90% 的细胞显示完整的病毒粒子或衣壳。各细胞中病毒粒子的数目在 2-8 个不等, 大多数细胞显示 2-3 个粒子。

[0099] 在受 epiBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞中, 发现病毒粒子几乎仅位于细胞表面, 约 97% 的病毒粒子在顶膜上。一些粒子靠近细胞, 但这部分未显示接触的证据 (图 2A, 图 a), 且在融合过程中, 其它粒子被捕捉在质膜上 (图 2A, 图 b 和图 c)。很少观察到膜内表面下面的衣壳, 实际上, 仅鉴别到两个实例 (图 2A, 图 d 和图 e)。细胞内部未发现包膜的病毒粒子。这一结果表明, epiBADrUL131 通过与质膜融合进入 ARPE-19 细胞。相反, 经 fibroBADrUL131 感染的细胞在细胞膜上 (约占总数的 65%) 和细胞内部在囊泡中 (约占总数的 35%) 含有病毒粒子 (图 2B)。囊泡内的粒子被包膜, 表明其通过胞吞作用进入。

[0100] 还检查在成纤维细胞中繁殖的 BFxwt 临床分离株的进入。这一临床分离株积聚在 ARPE-19 细胞内的囊泡中 (图 2C), 表明 BADrUL131 作为 HCMV 临床分离株的细胞进入模型是有效的。

[0101] 成纤维细胞衍生的病毒对 ARPE-19 细胞的感染是 pH 依赖性的, 但上皮细胞衍生的病毒不是。许多通过胞吞作用进入细胞的病毒 (1, 4, 10) 需要酸化内体以便病毒粒子包膜与内体膜融合并将衣壳释放到细胞质中。测试缓冲内体 pH 值的 NH_4Cl 和阻断内体 ATP 酶质子泵的巴弗洛霉素 A1 (BFA) 对 ARPE-19 细胞感染的影响。用任一试剂预处理之后, 感染细胞且在含药物培养基中再培养 16 小时。通过测定 IE1 阳性细胞对成功的感染进行评分。与上述超微结构分析一致, 用任一试剂预处理仅对 epiBADrUL131 感染产生适度影响 (图 3A)。相反, 这两种试剂在 fibroBADrUL131 感染之后以剂量依赖性方式抑制 IE1 表达, 表明成纤维细胞产生的病毒的进入取决于内体酸化。所述试剂对 epiBADrUL131 的进入几乎不产生影响的事实显示对 fibroBADrUL131 的抑制不是由毒性产生。

[0102] 接着, 确定在其它类型上皮细胞和成纤维细胞中生长的病毒是否显示与 ARPE19 衍生的病毒粒子和 HFF 衍生的病毒粒子相同的性质。在用 NH_4Cl 或 BFA 处理之后, 使用来自 hRPTEC 上皮细胞和 MRC-5 成纤维细胞的病毒母液 (virus stock) 感染 ARPE-19 细胞, 且其对抑制剂的反应完全与在 ARPE-19 细胞或 HFF 中生长的病毒相同 (图 3B, 左图)。因此, 在

两种不同成纤维细胞中制备的 BADrUL131 对抑制剂的敏感性实质上大于在两种不同上皮细胞系中制备的病毒。

[0103] 还测定内体 pH 值对 BFXwt 临床分离株进入 ARPE-19 细胞的影响 (图 3B, 右图)。虽然 NH_4Cl 或 BFA 显著降低因受成纤维细胞产生的 BFXwt 感染制备的 IE1 阳性 ARPE-19 细胞的数目, 但经上皮细胞衍生的 BFXwt 感染之后, 仅观察到轻微的抑制。

[0104] 上皮细胞中制备的病毒粒子的内在融合活性大于成纤维细胞中制备的病毒粒子。其它疱疹病毒的情况也是这样。HCMV 临床分离株促进细胞-细胞融合, 所述融合早在感染后 3-5 小时即可检测到。无需从头合成病毒包膜蛋白而快速产生合胞体表明, 此受“从外部融合”促进, 从外部融合是一种包膜的病毒粒子直接融合靶细胞的过程。因为上皮细胞中制备的 BADrUL131 相对于成纤维细胞中制备的 BADrUL131 以不同方式进入上皮细胞中, 所以测试其会展现不同的“从外部融合”活性的可能性。

[0105] 模拟感染的 ARPE-19 细胞不展现合胞体 (图 4A), 且在经 fibroBADrUL131 感染后, 合胞体也很罕见 (图 4B)。相反, 暴露于 epiBADrUL131 之后, 早在感染后 6 小时即检测到细胞-细胞融合, 且在感染后 24 小时, 20-30% 的核聚集在合胞体中 (图 4C)。用阻断发展成感染晚期的 PFA 处理细胞, 因此融合必定已被 epiBADrUL131 粒子诱发, 但未被新表达的病毒粒子蛋白诱发。

[0106] 使用荧光素酶报告分子测定定量病毒粒子的融合活性以及 pH 值对从外部融合的影响。报告分子和效应细胞各别接受由 T7 启动子驱动的含荧光素酶基因的质粒或 T7 RNA 聚合酶表达质粒。混合这两种 ARPE-19 衍生物, 且通过测定荧光素酶表达定量感染依赖性融合, epiBADrUL131 诱导的融合活性始终高于 fibroBADrUL131 (图 4D)。在 pH 7-8 时, fibroBADrUL131 的活性是 epiBADrUL131 的活性约三分之一。当病毒吸附后用低 pH 值缓冲液处理细胞时, 这两种病毒制剂介导适度增强的融合。在这一测定中, BADwt 不诱导融合。

[0107] 进入的方式不改变 HCMV 细胞趋性。如以上所讨论, 取决于感染病毒在哪种细胞中制备, 疱疹病毒优先偏爱进入特定细胞型。这一现象不同于如上所述所观察到的现象, 即来自不同细胞型的 HCMV 制剂利用不同机理进入上皮细胞。尽管如此, 不同进入机理仍有可能会影响复制效率和产率, 从而产生趋性作用。因此, 进行实验以确定进入方式是否影响上皮细胞上的 HCMV 空斑产生, 与成纤维细胞作比较 (表 1)。在 ARPE-19、hRPTEC、HFF 或 MRC-5 细胞中制备 BADrUL131 母液, 且测定 ARPE-19 或 MRC-5 细胞上的空斑形成 (表 1)。虽然 ARPE-19 上产生的空斑稍多于 MRC-5 细胞, 但上皮细胞衍生的病毒与成纤维细胞衍生的病毒相较于另一细胞型都不优先在一种细胞型上产生空斑。

[0108] 表 1. ARPE19 和 MRC5 细胞 ($\times 10^5$ 个) 中的上皮细胞衍生或成纤维细胞衍生的 BADrUL131 的效价测定

[0109]

复制源 ^a	靶细胞		比率 ^b
	ARPE-19	MRC5	
ARPE-19	8.8	3.4	2.6
hRPTEC	2.9	1.9	1.5
MRC5	4.3	2.7	1.6
HFF	6.8	2.7	2.5

[0110] ^a 使用最初在 HFF 中测定效价的 2×10^5 pfu BADrUL131 来感染 ARPE-19 或 MRC5 细

胞。

[0111] ^bARPE-19 效价相对于 MRC5 效价之比。

[0112] pUL130 特异性抗体阻断上皮细胞衍生和成纤维细胞衍生的病毒对 ARPE-19 的感染。中和上皮细胞的 HCMV 感染 (19) 的 pUL130 特异性抗体能够阻断由任一进入方式对 ARPE-19 的感染 (图 5A)。其以剂量依赖性方式抑制这两种病毒的感染,但 epiBADrUL131 对中和的敏感性稍大于 fibroBADrUL131。抗体抑制这两种进入方式的能力增强了如下结论:无论融合发生在质膜上还是内体膜上,含 pUL130 的复合物都起作用。

[0113] 先前已报导,gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 复合物不为内皮细胞或上皮细胞内化 HCMV 所必需,因为缺乏这一复合物的实验室病毒株有效被胞吞 (10)。然而,与内体膜的后续融合和逸入细胞质中需要这一复合物。与这些早期结果一致,当针对 ARPE-19 细胞测定时,pUL130 的抗体不阻断 epiBADrUL131、fibroBADrUL131 或 BADwt 的结合或内化 (图 5B)。然而,内化的成纤维细胞衍生的病毒的总量低于上皮细胞衍生的病毒的总量。这可能反映内化率降低,此可与成纤维细胞衍生的病毒延迟 IE1 表达的开始一致 (图 1)。

[0114] epiBADrUL131 和 fibroBADrUL131 在 ARPE-19 细胞中诱导不同的转录反应。如同许多其它病毒,HCMV 调节进入期间的细胞信号传导途径。细胞内信号传导变更的一个结果是细胞转录组显著变化,此实质上由病毒粒子糖蛋白与宿主细胞接触所引起。

[0115] 因此,研究这两种进入途径对 ARPE-19 细胞的转录反应的影响。模拟感染或用 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131 感染细胞,且 6 小时或 10 小时后纯化总 RNA。通过使用微阵列分析相对 RNA 水平,并且鉴别相对于模拟感染对照组水平变化 ≥ 2.5 倍的感染细胞 RNA (表 2-5)。用图 6A 中的文氏图描绘表达增加或减小的 RNA 的分布。

[0116] 表 2. 感染后 6 小时,由经 epiBADrUL131 感染的 ARP19 细胞分化转录的基因

[0117]

基因库	变化倍数	基因名称
NM_020904	7.218	PEPP1
AK124132	5.97	LOC340286
AK074031	4.89	SLIM; FLJ34715
NM_058188	4.658	PRED54; MGC149386; MGC149387
NM_022047	4.578	IBP
NM_020436	3.172	DRRS; HSAL4; ZNF797; MGC133050; dJl 112F19.1
NM_001165	3.049	AIP1; API2; MIHC; C1AP2; HAIP1; HIAP1; MALT2; RNF49
NM_001039580	3.011	ASAP; FLJ21159
NM_000364	2.91	CMH2; TnTC; cTnT; CMPD2; MGC3889
NM_005031	2.866	PLM; MGC44983
L08436	2.825	CLP; FLJ43657; MGC19733
NM_145867	2.768	MGC33147
AL133118	2.731	AL133118
NM_001034	2.706	R2; RR2M
NM_020943	2.674	KIAA1604
BC039151	2.67	PABPCIL; FLJ42053; dJ1069P2.3
NM_031217	2.659	DKFZP434G2226
NM_003425	2.61	KOX5; ZNF13
NM_000499	2.58	AHH; AHRR; CP11; CYP1; PI-450; P450-C; P450DX
NM_182751	2.578	CNA43; PRO2249; MGC126776
NM_144620	2.572	MGC14816; DKFZp313O1122
NM_020359	0.4	PLSCR2
AF085968	0.396	AF085968
NM_053064	0.388	GNG2
NM_005039	0.38	PM; PMF; PMS; Ps 1; Ps 2; PRBIL; PRBIM
NM_152525	0.373	FLJ25351; FLJ40332
AK125975	0.365	FLJ43987
NM_175868	0.365	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
NM_017600	0.358	DKFZp434M0331
NM_006650	0.355	CPX2; 921-L; CPX-2; MGC138492
NM_004294	0.343	RF1; MTTRF1; MGC47721
NM_006434	0.343	CAP; FLAF2; R85FL; SH3D5; SORB1
NM_031466	0.339	NIBP; TI; IBP; MGC4737; MGC4769; KIAA1882

[0118]

NM_000808	0.324	MGC33793
NM_012377	0.324	OR7C3; OR19-18; CIT-HSP-87M17
NM_001018084	0.31	NM_001018084
NM_024050	0.304	DDA1; PCIAI; MGC2594
NM_005185	0.299	CLP
NM_022115	0.272	PFM15; ZNF298; C21orf83
NM_016125	0.259	LOC51136; MGC11090
NM_004843	0.256	CRL1; TCCR; WSX1; 1L27R; zcytor1
NM_004334	0.242	CD157
NM_004185	0.233	WNT13; XWNT2
BX360933	0.229	SLC25A5
NM_032188	0.222	MOF; hMOF; FLJ14040
NM_173550	0.221	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805
NM_002104	0.162	TRYP2

将与 epiBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞的经标记 RNA 杂交的微阵列靶与模拟感染细胞作比较，且列出水平变化 ≥ 2.5 倍的探针组。列出基因库编号、变化倍数和基因名称。

[0119] 表 3. 感染后 6 小时, 由经 fibroBADrUL131 感染的 ARP19 细胞分化转录的基因
[0120]

基因库	变化倍数	基因名称
NM_183040	15.03	SDY; DBND; HPS7; My031; FLJ30031; MGC20210; DKFZP564K192
NM_001165	12.48	AIP1; API2; MIHC; CIAP2; HAIP1; HIAP1; MALT2; RNF49
NM_002852	11.21	TSG-14; TNFAIP5
NM_006509	7.008	I-REL
NM_139314	6.679	NL2; ARP4; FIAF; PGAR; HFARP; pp1158; ANGPTL2
NM_002982	5.977	HC11; MCAF; MCP1; MCP-1; SCYA2; GDCF-2
NM_025169	5.938	ZFP; ZNF64; ZKSCAN7; FLJ12738
NM_033066	5.144	DLG6; ALS2CR5
NM_001946	4.971	MKP3; PYST1
NM_000212	4.92	CD61; GP3A; GPIIIa
NM_001673	4.214	TS11
NM_004464	4.183	HBGF-5; Smag-82
NM_021101	4.072	CLD1; SEMP1; ILVASC
NM_006851	4.07	GLIPR; RTVP1; CRISP7
AK094860	3.913	AK094860
NM_052875	3.667	Pep8b; MGC10485
NM_005347	3.648	BIP; MIF2; GRP78; FLJ26106
NM_022842	3.592	CD318; TRASK; SIMA135
U16307	3.36	GLIPR; RTVP1; CRISP7
NM_000800	3.335	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB
NM_000800	3.306	HBGF1; GLIO703; ECGF- β ; FGF- α
NM_198833	3.257	PI8; CAP2
NM_002053	3.21	GBP1
NM_058179	3.161	PSA; EPIP; PSAT; MGC1460
NM_001004301	3.131	FLJ16542; FLJ34141
NM_180989	3.117	ITR
NM_000640	3.116	IL-13R; IL13BP; CD213A2

[0121]

NM_002658	3.09	ATF; UPA; URK; u-PA
NM_018284	3.076	FLJ10961; DKFZp686E0974; DKFZp686L15228
NM_000201	3.022	BB2; CD54; P3.58
NM_005923	3.007	ASK1; MEKK5; MAPKKK5
NM_018836	3.001	MOT8; SHREW1; SHREW-1; RP3-426F10.1
NM_004556	2.971	IKBE
NM_022044	2.955	SDF2L1
NM_006611	2.954	Ly49; KLRA#; LY49L; Ly-49L; MGC126520; MGC126522
NM_014314	2.935	R1G-I; FLJ3599; DKFZp434J1111; DKFZp686N19181
NM_003897	2.906	DIF2; IEX1; PRG1; DIF-2; GLY96; IEX-1; IEX-1L
NM_006417	2.899	p44; MTAP44
NM_006187	2.877	p100; MGC133260
NR_002186	2.876	DKFZp58611420
NM_033036	2.872	GAL3ST2; GAL3ST-3; MGC142112; MGC142114
NM_014331	2.86	xCT; CCBRI
NM_003786	2.831	MLP2; MRP3; ABC31; MOAT-D; cMOAT2; EST90757
NM_001511	2.829	GRO1; GROa; MGSA; NAP-3; SCYB1; MGSA-a; MGSA α
NM_000189	2.827	HKII; HXK2; DKFZp686M1669
NM_001901	2.821	CCN2; NOV2; HCS24; IGFBP8; MGC102839
NM_031217	2.811	DKFZP434G2226
NM_002849	2.766	PTPRQ; EC-PTP; PCPTP1; PTP-SL; PTPBR7
NM_019891	2.764	EROILB
NM_002234	2.745	HK2; HCK1; PCN1; HPCN1; KV1.5; MGCI17058; MGCI17059
NM_198569	2.739	DREG; VIGR; PSITP2
NM_020799	2.726	AMSH-FP; AMSH-LP; ALM α ; FLJ31524; KIAA1373 等
NM_014632	2.726	KIAA0750; MICAL2PV1; MICAL2PV2
NM_182920	2.721	FLJ42955; KIAA1312
NM_003483	2.715	BABL; LIPO; HMGIC; HMGI-C
NM_133492	2.706	ACER1; MGC138327; MGC138329
CR598364	2.633	ENST00000370238
NM_000970	2.62	TXREB1; SHUJUN-2; TAXREB107
NM_005444	2.617	RCD1; CNOT9; RCD1+
NM_194303	2.614	NM_194303
NM_015359	2.612	ZIP14; cig19; LZT-Hs4; KIAA0062
NM_016354	2.608	POAT; OATP1; OATP-E; OATP4A1; OATPRP1; SLC21A12
NM_015009	2.607	LNx3; SEMACAP3
AK124941	2.602	AK124941
NM_001548	2.602	G10P1; IFI56; ISG56; IFI-56; IFNAI1; RNM561; GARG-16
NM_145023	2.597	FLJ32762; DKFZp686N0559; RP11-479G22.1
NM_023070	2.592	FLJ34293; RP11-656D10.1
NM_001902	2.584	MGC9471
NM_004233	2.563	BL11; HB15
NM_020683	2.562	A3AR; AD026; bA552M11.5; RP11-552M11.7
NM_031938	2.56	FLJ34464; B-DIOX-II
NM_152649	2.55	FLJ34389
BC048263	2.543	LOC146909
XM_210365	2.527	LOC284288
NM_007107	2.515	TRAPG; SSR γ
NM_002837	2.513	PTPB; HPTPB; FLJ44133; MGC59935; HPTP- β ;
NM_172345	2.505	NM_172345

[0122]

NM_002609	0.4	JTK12; PDGFR; CD140B; PDGFR1; PDGF-R-β
NM_198353	0.4	KCTD8
NM_003558	0.394	MSS4; STM7
NM_001010911	0.392	bA418C1.3
NM_017644	0.391	DRE1; FLJ25796
NM_052892	0.388	FLJ45333; DKFZp686J19100
NM_175868	0.387	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
NM_007282	0.38	RZF; MGC13689
NM_005185	0.38	CLP
NM_021990	0.378	GABRE
AK055156	0.375	FLJ30594; MGC120893; DKFZp761K2322
AF085968	0.375	AF085968
NM_019555	0.371	GEF3; STA3; XPLN; MGC118905; DKFZP434F2429
NM_004294	0.368	RFI; MTTRF1; MGC47721
NM_173039	0.365	AQPX1
BU943730	0.364	BU943730
NM_017600	0.364	DKFZp434M0331
NM_007282	0.36	RZF; MGC13689
AL713743	0.357	FLJ42875; MGC35434; DKFZp761G0122
NM_007314	0.347	ARG; ABL
AK056190	0.345	WHRN; CIP98; USH2D; KIAA1526; RP11-9M16.1; DKFZP434N014
NM_000372	0.345	OCAIA; OCAIA
BC015929	0.338	RVR; BD73; HZF2; EAR-Ir; Hs.37288
NM_012377	0.328	OR7C3; OR19-18; CIT-HSP-87M17
NM_138440	0.324	SLITL2
NM_001018084	0.317	NM_001018084
NM_000808	0.311	MGC33793
NM_033260	0.31	HFH1
NM_022160	0.309	DMO; MGC163307; MGC163309
BC018597	0.308	BC018597
NM_198404	0.305	bA321C24.3
NM_024050	0.303	DDA1; PCIAI; MGC2594
NM_031466	0.299	NIBP; T1; IBP; MGC4737; MGC4769; KIAA1882
NM_016831	0.287	GIG13
NM_022115	0.251	PFM15; ZNF298; C21orf83
NM_016125	0.249	LOC51136; MGC111090
NM_002104	0.242	TRYP2
NM_013261	0.236	LEM6; PGC1; PGCIA; PGC-1v; PPARGC1; PGC-1(α)
NM_002167	0.211	HEIR-1
NM_032188	0.204	MOF; hMOF; FLJ14040
BX360933	0.197	SLC25A5
NM_003862	0.194	ZFGF5; FGF-18
NM_173550	0.148	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805
NM_004185	0.135	WNT13; XWNT2

将与 fibroBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞的经标记 RNA 杂交的微阵列靶与模拟感染细胞作比较, 且列出水平变化 ≥ 2.5 倍的探针组。列出基因库编号、变化倍数和基因名称。

[0123] 表 4. 感染后 10 小时, 由经 epiBADrUL131 感染的 ARP19 细胞分化转录的基因

[0124]

基因库	变化倍数	基因名称
AK094860	5.688	AK094860
NM_145023	4.19	FLJ32762; DKFZp686N0559; RP11-479G22.1
NM_133492	3.456	ACER1; MGC138327; MGC138329
NM_001039580	3.352	ASAP; FLJ21159
NM_001004301	2.982	FLJ16542; FLJ34141
NM_001034	2.911	R2; RR2M
AI369525	2.764	AI369525
AK123066	2.753	AK123066
NM_005345	2.729	HSP72; HSPA1; HSPA1B; HSP70-1
NM_020731	2.712	AHH; AHHR; KIAA1234
BC071797	2.631	BC071797
NM_003414	2.609	HZF2
NM_000800	2.576	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB; HBGFI; GLIO703 等
NM_138467	2.571	Clorf171; FLJ40918
AK090803	2.557	SRrp35; FLJ14459; FLJ33484; FLJ41221; RP11-63L7.3
AL133118	2.529	AL133118
NM_001165	2.508	AIP1; API2; MIHC; CIAP2; HAIP1; HIAP1; MALT2; RNF49
BG001037	0.392	TXNRD1
NM_024861	0.388	FLJ22671; MGC150431; MGC150432
NM_001043	0.385	NET; NAT1; NET1; SLC6A5
NM_016239	0.384	DFNB3; MYO15; DKFZp686N18198
NM_001018084	0.383	NM_001018084
NM_001037442	0.381	RIPX; KIAA0871
NM_017600	0.377	DKFZp434M0331
NM_022097	0.369	LOC63928
NM_175868	0.356	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
NM_032266	0.342	DKFZp434G118; DKFZp781D2023
NM_003841	0.342	LIT; DCRI; TRID; CD263; TRAILR3; MGC149501; MGC149502
NM_005039	0.339	PM; PMF; PMS; Ps 1; Ps 2; PRB1L; PRB1M
NM_145051	0.339	MGC4734; FLJj1197
NM_004294	0.336	RF1; MTTRF1; MGC47721
AW856073	0.335	AW856073
NM_024050	0.327	DDA1; PCIA1; MGC2594
AF085968	0.327	AF085968
NM_080927	0.318	ESDN; CLCP1
NM_022115	0.317	PFM15; ZNF298; C21orf83
AK056703	0.309	LOC219731
NM_000808	0.301	MGC33793
NM_012377	0.299	OR7C3; OR19-18; CIT-HSP-87M17
NM_006793	0.298	AOP1; MER5; AOP-1; SP-22; PRO1748; MGC24293; MGC104387
NM_031466	0.289	NIBP; T1; IBP; MGC4737; MGC4769; KIAA1882
NM_005185	0.286	CLP
NM_139173	0.286	MGC131641
BX360933	0.28	SLC25A5
NM_016125	0.269	LOC51136; MGC111090
NM_002104	0.251	TRYP2

	NM_032188	0.248	MOF; hMOF; FLJ14040
	NM_004185	0.245	WNT13; XWNT2
[0125]	NM_004843	0.237	CRL1; TCCR; WSX1; IL27R; zcytor1
	NM_173550	0.208	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805

[0126] 将与 epiBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞的经标记 RNA 杂交的微阵列靶与模拟感染细胞作比较,且列出水平变化 ≥ 2.5 倍的探针组。列出基因库编号、变化倍数和基因名称。

[0127] 表 5. 感染后 10 小时,由经 fibroBADrUL131 感染的 ARP19 细胞分化转录的基因
[0128]

基因库	变化倍数	基因名称
AK094860	11.26	AK094860
NM_033066	8.751	DLG6; ALS2CR5
NM_145023	6.529	FLJ32762; DKFZp686N0559; RP11-479G22.1
NM_152377	4.463	FLJ44073; MGC34837
NM_002310	4.386	SWS; SJS2; STWS; CD118
NR_001279	4.051	LOC164380; MGC26611; MGC26924
NM_005345	4.008	HSP72; HSPA1; HSPA1B; HSP70-1
NM_006417	3.879	p44; MTAP44
NM_017638	3.783	p28b; FLJ20045
NM_001165	3.695	AIP1; API2; MIHC; CIAP2; HAIP1; HIAP1; MALT2; RNF49
NM_000640	3.659	IL-13R; IL13BP; CD213A2
NM_001673	3.313	TS11
NM_002526	3.274	NT; eN; NT5; NTE; cNT; CD73; ESNT
NM_003786	3.244	MLP2; MRP3; ABC31; MOAT-D; cMOAT2; EST90757
NM_005527	3.229	hum70t; HSP70-HOM
NM_018372	3.224	RIF1; FLJ11269; RP11-96K19.1
NM_133492	3.16	ACER1; MGC138327; MGC138329
NM_033160	3.101	FLJ32813; MGC35232; DKFZp572C163
DB318210	3.094	DB318210
NM_182751	3.093	CNA43; PRO2249; MGC126776
NM_180989	3.089	ITR
NM_005345	3.048	HSP72; HSPA1; HSPA1B; HSP70-1
NM_005345	3.029	HSP72; HSPA1; HSPA1B; HSP70-1
NM_000212	2.993	CD61; GP3A; GPIIIa
NM_145867	2.991	MGC33147
NM_021813	2.976	BACH2
NM_006187	2.943	p100; MGC133260
CR594200	2.942	LOC643837
NM_012419	2.941	RGSZ2; RGS-17; hRGS17
AF038194	2.923	AF038194
NM_018664	2.921	SNFT; BATF3; JUNDM1
NM_017577	2.907	FLJ35862; FLJ40464
NM_144633	2.887	ELK; ELK1; elk3; Kv12.1
NM_144620	2.86	MGC14816; DKFZp313O1122
NM_001004301	2.859	FLJ16542; FLJ34141
NM_002852	2.847	TSG-14; TNFAIP5
NM_007107	2.839	TRAPG; SSRy
NM_032778	2.836	MDIG; NO52; MINA53; FLJ14393; DKFZp762O1912

[0129]

NM_032523	2.828	ORP6; FLJ36583; MGC59642
NM_005515	2.808	HB9; SCRA1; HOXHB9
NM_002201	2.804	CD25; HEM45
NM_152649	2.799	FLJ34389
NM_033036	2.794	GAL3ST2; GAL3ST-3; MGC142112; MGC142114
NM_006509	2.791	I-REL
NM_004233	2.789	BL11; 11B15
NM_180989	2.772	ITR
NM_020988	2.735	GNAO; G-ALPHA-o; DKFZp686O0962
U16307	2.687	GLIPR; RTVP1; CRISP7
NM_003706	2.672	CPLA2-γ; DKFZp586C0423
NM_153689	2.662	FLJ38973
NM_000800	2.653	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB; HBGF1; GLIO703 等
BC043212	2.643	LOC402125
NM_002670	2.619	I-PLASTIN
NM_152408	2.614	FLJ35779; MGC120442; MGC120443; MGC120444
NM_198951	2.613	TG2; TGC
NM_012329	2.595	MMA; PAQR11
NM_001009954	2.589	FLJ20105; MGC131695
NM_032228	2.585	FAR1; FLJ22728; FLJ33561
AI369525	2.584	AI369525
NM_004170	2.583	EAACI; EAAT3
NM_002930	2.571	RIN; RIBA; ROC2
AK023856	2.569	LOC339803
NM_024525	2.558	FLJ22584
NM_152649	2.553	FLJ34389
NM_181795	2.552	PRKACN2; FLJ23817
BC039151	2.549	PABPCIL; FLJ42053; dJ1069P2.3
NM_006547	2.525	IMP3; KOC1; IMP-3; VICKZ3; DKFZp686F1078
NM_000641	2.521	AGIF; IL-11
NM_145306	2.506	C10orf35
AK021804	0.398	AK021804
NM_007211	0.397	HoJ-1; C12orf2
NM_203434	0.397	MGC70833; bA247A12.2
NM_000362	0.397	SFD; K222; K222TA2; HSMRK222
AK056703	0.395	LOC219731
NM_003558	0.395	MSS4; STM7
NM_016831	0.394	GIG13
NM_024861	0.394	FLJ22671; MGC150431; MGC150432
BF514513	0.393	BF514513
NR_002819	0.392	MALAT-1
NM_002609	0.391	JTK12; PDGFR; CD140B; PDGFR1; PDGF-R-β
NM_018027	0.391	FRMD4; FLJ10210; KIAA1294; bA295P9.4
NM_001010911	0.39	bA418C1.3
AW444553	0.389	FAM84B
AK056190	0.388	WHRN; CIP98; USH2D; KIAA1526; RP11-9M16.1
NM_175868	0.385	MAGE6; MAGE3B; MAGE-3b; MGC52297
AB051431	0.385	KIAA1644; MGC125851; MGC125852
NM_001003683	0.384	HCAMI; HSPDE1A; MGC26303
NM_004294	0.384	RFI; MTTRFI; MGC47721

[0130]

NM_006516	0.383	GLUT; GLUT1; MGC141895; MGC141896
BX104999	0.382	BX104999
AL713743	0.381	FLJ42875; MGC35434; DKFZp761G0122
NM_000322	0.381	RDS; RP7; rd2; AVMD; PRPH; AOFMD; TSPAN22
NM_007314	0.381	ARG; ABLL
NM_018371	0.376	ChGn, FLJ11264; β 4GalNAcT
NR_002802	0.376	TncRNA
DB527271	0.376	DB527271
NM_006393	0.374	LKEBL; bA56H7.1; MGC119746; MGC119747
NM_013989	0.372	D2; 5DII; ScfY; TXDI2
NM_017600	0.37	DKFZp434M0331
BC011595	0.369	NMB; HGFN
AF085968	0.366	AF085968
BC018597	0.365	BC018597
NM_014729	0.362	TOX1; KIAA0808
NM_001003940	0.362	FLJ00065
NM_000372	0.358	OCAIA; OCAIA
NM_019555	0.358	GEF3; STA3; XPLN; MGC118905; DKFZP434F2429
NM_022115	0.357	PFM15; ZNF298; C21orf83
NM_198353	0.355	KCTD8
NM_032434	0.355	KIAA1805; MGC111046
AK055386	0.355	AK055386
NM_006933	0.352	SMIT; SMIT2
CR622110	0.35	CR622110
AW856073	0.347	AW856073
NM_015074	0.345	KLP; CMT2; CMT2A; CMT2A1; HMSNII
NM_032866	0.342	JACOP; FLJ14957; KIAA1749; MGC138254
NM_012377	0.342	OR7C3; OR19-18; CIT-HSP-87M17
NM_005261	0.341	KIR; MGC26294
AK023391	0.339	AK023391
NM_002214	0.339	ITGB8
NM_182728	0.339	LAT2; LPI-PC1
NM_024050	0.338	DDA1; PCIA1; MGC2594
NM_005185	0.338	CLP
NM_016613	0.337	AD021; AD036; FLJ38155; DKFZp434L142
NM_000782	0.336	CP24; CYP24; MGC126273; MGC126274; P450-CC24
NM_001624	0.335	ST4
NM_007282	0.333	RZF; MGC13689
NM_001037442	0.327	RIPX; KIAA0871
NM_004318	0.32	BAH; HAAH; JCTN; junctin; CASQ2BP1
BU943730	0.32	BU943730
NM_205849	0.319	FLJ40182
NM_000808	0.315	MGC33793
NM_033260	0.313	HFHI
	0.309	OT-R
NM_032188	0.309	MOF; hMOF; FLJ14040
BX360933	0.306	SLC25A5
NM_014351	0.304	NST; BRSTL1; SULTX3; BR-STL-1; MGC40032; DJ388M5.3 等
NM_002167	0.3	HEIR-1
NM_001033086	0.298	dJ63IM13.5; RP11-189J1.1

[0131]

NM_000372	0.292	OCAIA; OCAIA
NM_001002926	0.289	TWISTNB
AK094143	0.288	C14orf78; KIAA2019
NM_004466	0.287	GPC5
NM_031466	0.276	NIBP; T1; IBP; MGC4737; MGC4769; KIAA1882
NM_013261	0.271	LEM6; PGC1; PGC1A; PGC-1v; PPARGC1; PGC-1 (α)
NM_000693	0.267	ALDH6; RALDH3; ALDIII A6
NM_016125	0.26	LOC51136; MGC111090
AK124390	0.23	AK124390
NM_002104	0.228	TRYP2
NM_005341	0.209	HKR3; pp9964
NM_173082	0.202	FLJ27258; FLJ37625; FLJ45012
NM_173550	0.191	FLJ39267; FLJ46740; MGC50805
NM_004185	0.133	WNT13; XWNT2
NM_021727	0.0415	CYB5RP; LLCDL3

[0132] 将与 fibroBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞的经标记 RNA 杂交的微阵列靶与模拟感染细胞作比较,且列出水平变化 ≥ 2.5 倍的探针组。列出基因库编号、变化倍数和基因名称。

[0133] epiBADrUL131 感染后 6 小时,与模拟感染细胞相比,47 个 RNA 的水平发生变化;且相对于模拟感染细胞, fibroBADrUL131 感染细胞的 121 个 RNA 改变。这两种病毒的调节的 RNA 组实质上不同;经 epiBADrUL131 或 fibroBADrUL131 感染后,仅 19 个 RNA 改变。虽然可能在数种情况下基因会因一种病毒而改变 ≥ 2.5 倍,而另一种病毒诱导低于这一临界值的更适度改变,但对数据的检查表明这并不常见。感染后 10 小时, epiBADrUL131 调节的宿主细胞 RNA 的数目仅稍有增加 (50 个 RNA),而 fibroBADrUL131 观察到的较大幅度的增加 (153 个 RNA)。此后,这两种病毒调节的 RNA 数目增加的程度有限 (28 个 RNA)。微阵列结果由 1 个未改变的 RNA 和 6 个因感染而改变的 RNA 的实时 RT-PCR 得到证实 (图 6B)。

[0134] 为进一步比较 fibroBADrUL131 与 epiBADrUL131 对 RNA 水平的调节,使用包含以下四个基因本体 (Gene Ontology) 组的基因列表过滤阵列结果:宿主-病原体相互作用 (GO:0030383)、细胞通讯 (GO:0007154)、病毒生命周期 (GO:0016032) 以及细胞-细胞信号传导 (GO:0007267)。在 fibroBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞中调节大于 2.5 倍的约三分之一的 mRNA (222 个中的 70 个) 出现在并入的组中 (表 6)。与之形成鲜明对比,在这四个基因本体组中仅发现 epiBADrUL131 诱导的 86 个 RNA 中的 1 个。这两种病毒制剂在感染上皮细胞后产生实质上不同的转录反应。

[0135] 表 6. 经 fibroBADrUL131 修饰的细胞 RNA 水平

[0136]

基因库	变化倍数	变化倍数	基因名称
	6hpi	10hpi	
NM_006509	7.008	2.791	I-REL NL2; ARP4; FIAF; PGAR; HFARP; ppl 158;
NM_139314	6.679	2.067	ANGPTL2
NM_002982	5.977	nc	HC11; MCAF; MCP1; MCP-1; SCYA2; GDCF-2 等
NM_000212	4.92	2.993	CD61; GP3A; GPIIIa
NM_002310	nc	4.386	SWS; SJS2; STWS; CD118
NM_004464	4.183	2.264	HBGF-5; Smag-82
NM_021101	4.072	nc	CLD1; SEMP1; ILVASC
NM_006851	4.07	2.364	GLIPR; RTVP1; CRISP7
NM_005347	3.648	nc	BIP; MIF2; GRP78; FLJ26106
U16307	3.36	2.687	GLIPR; RTVP1:CRISP7
NM_000800	3.335	2.115	AFGF; ECGF; FGFA; ECGFA; ECGFB; HBGF1 等
NM_002526	nc	3.274	NT; eN; NT5; NTE; eNT; CD73; E5NT
NM_005527	nc	3.229	hum70t; HSP70-HOM
NM_002053	3.21	nc	GBP1
NM_180989	3.117	nc	ITR
NM_000640	3.116	3.659	IL-13R; IL13BP; CD213A2
NM_002658	3.09	nc	ATF; UPA; URK; u-PA
NM_180989	nc	3.089	ITR
NM_018284	3.076	2.185	FLJ10961; DKFZp686E0974; DKFZp686L 15228
NM_005345	nc	3.048	HSP72; HSPA1; HSPA1B; HSP70-1
NM_000201	3.022	nc	BB2; CD54; P3.58
NM004556	2.971	nc	IKBE
NM_006611	2.954	2.263	Ly49; KLRA#; LY49L; Ly-49L; MGC126520 等 RIG-1; FLJ13599; DKFZp434J1111
NM_014314	2.935	2.071	DKFZp686N19181
NM_003897	2.906	nc	DIF2; IEX1; PRG1; DIF-2; GLY96; IEX-1; IEX-IL
NM_006417	2.899	3.879	p44; MTAP44
NM_144633	nc	2.887	ELK; ELK1; elk3; Kv12.1
NM_006187	2.877	2.943	p100; MGC133260
NM_032778	nc	2.836	MDIG; NO52; MINA53; FLJ14393; DKFZp762O1912 MLP2; MRP3; ABC31; MOAT-D; cMOAT2
NM_003786	2.831	3.244	EST90757
NM_001511	2.829	nc	GRO1; GROa; MGSA; NAP-3; SCYB1; MGSA-a 等
NM_001901	2.821	nc	CCN2; NOV2; HCS24; IGFBP8; MGC102839
NM_002849	2.766	nc	PTPRQ; EC-PTP; PCPTP1; PTP-SL; PTPBR7
NM_002234	2.745	nc	HK2; HCK1; PCN1; HPCN1; KV1.5; MGC117058 等
NM_198569	2.739	2.182	DREG; VIGR; PSITP2
NM_000970	2.62	nc	TXREB1; SHUJUN-2; TAXREB107
NM_198951	nc	2.613	TG2; TGC

[0137]

NM_015359	2.612	DC	ZIP14; cig19; LZT-Hs4; KIAA0062
NM_001548	2.602	nc	G10P1; 1F156; 1SG56; IFI-56; IFNAI1; RNM561 等
NM_012329	nc	2.595	MMA; PAQR11
NM_002930	nc	2.571	RIN; RIBA; ROC2
NM_004233	2.563	2.789	BL11; HB15
NM_020683	2.562	nc	A3AR; AD026; bA552M11.5; RP11-552M11.7
NM_181795	nc	2.552	PRKACN2; FLJ23817
NM_006547	nc	2.525	IMP3; KOCI; IMP-3; VICKZ3; DKFZp686F1078
NM_000641	nc	2.521	AGIF; IL-11
KM_172345	2.505	nc	NM_172345
NM_012419	2.359	2.941	RGSZ2; RGS-17; hRGS17
NM_020988	2.188	2.735	GNAO; G-ALPHA-o; DKFZp686O0962
NM_002201	2.028	2.804	CD25; HEM45
NM_004318	0.495	0.32	BAH; HAAH; JCTN; junctin; CASQ2BP1
NM_013989	0.492	0.372	D2; 5DII; ScIY; TXDI2
NM_005261	0.468	0.341	KIR; MGC26294
NM_000916	0.434	0.309	OT-R
NM_014351	0.408	0.304	NST; BRSTL1; SULTX3; BR-STL-1; MGC40032 等
NM_002609	0.4	0.391	JTK12; PDGFR; CD140B; PDGFR1; PDGF-R- β
NM_007211	nc	0.397	HoJ-1; C12orf2
NM_001003683	nc	0.384	HCAM1; HSPDE1A; MGC26303
NM_006516	nc	0.383	GLUT; GLUT1; MGC141895; MGC141896
NM_000322	nc	0.381	RDS; RP7; rd2; AVMD; PRPH; AOFMD; TSPAN2
NM_021990	0.378	0.49	GABRE
NM_018371	nc	0.376	ChGn; FLJ11264; β 4GalNAcT
NM_019555	0.371	0.358	GEF3; STA3; XPLN; MGC118905; DKFZP434F2429
NM_007314	0.347	0.381	ARG; ABLL
NM_002214	nc	0.339	ITGB8
NM_182728	nc	0.339	LAT2; LPI-PCI
BC015929	0.338	0.453	RVR; BD73; HZF2; EAR-Ir; Hs.37288
NM_016831	0.287	0.394	GIG13
NM_013261	0.236	0.271	LEM6; PGC1; PGC1A; PGC-1v; PPARGC1 等
NM_003862	0.194	nc	ZFGF5; FGF-18

[0138] 并入四个 GO 组: 宿主-病原体相互作用 (GO:0030383)、细胞通讯 (GO:0007154)、病毒生命周期 (GO:0016032) 以及细胞-细胞信号传导 (GO:0007267)。使用含 9276 个基因的组过滤 fibroBADrUL131 感染的 ARPE-19 细胞的阵列结果。显示基因库识别号和基因名称以及感染后 6 小时和 10 小时的诱导或抑制倍数。与模拟感染细胞相比改变不大于且不等于 2.5 的探针组由表示无变化的“nc”表示。

[0139] 讨论

[0140] ARPE-19 上皮细胞可通过两种不同途径被 HCMV 感染, 在质膜处融合, 或融合之后, 在内体膜处胞吞。这两种进入方式引发产毒感染 (productive infection)。进入途径取决于病毒繁殖所在细胞型。上皮细胞制备的 HCMV 通过前一种途径进入, 而在成纤维细胞中生长的病毒遵循后一种途径。这个结论由超微结构分析和感染对阻断内体酸化的试剂的敏感性有差异得出。在上皮细胞中生长的病毒的“从外部融合”活性大于在成纤维细胞中制备

的病毒的结果增强如下观点：这两种病毒制剂以根本上不同的方式与 ARPE-19 细胞相互作用。重要的是，这两种进入方式需要 pUL130 功能，因为 pUL130 抗体中和由任一来源制备的病毒的感染。如果感染病毒已在上皮细胞中制备，那么 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 复合物在 ARPE-19 质膜处起作用，且如果病毒在成纤维细胞中生长，那么所述复合物在内体膜处起作用。在内体中中和的病毒不能逃逸，且估计可能遭受与缺乏含 pUL130 复合物的 AD169 相同的命运，且积聚在上皮细胞内体中但未引发产毒感染 (10)。

[0141] 在成纤维细胞中生长的病毒相对于来自上皮细胞的病毒在延迟后诱导 IE1 蛋白积聚在 ARPE-19 细胞中，表明相较于通过在质膜处融合进入，通过胞吞作用进入的某个方面进行得较慢。成纤维细胞产生的病毒进入后，内体中显而易见许多病毒粒子，但在细胞质内未见到衣壳；且在受上皮细胞制备的病毒感染的细胞的细胞质中也很少发现衣壳。显然，病毒粒子在内体中逗留一段时间，而一旦衣壳无包膜且到达细胞质，其即快速分解。

[0142] HCMV 病毒粒子是如何在两种不同细胞型中制备的？看来不同的“从外部融合”活性提供暗示。不仅 epiBADrUL131 诱导融合的效率大于 fibroBADrUL131，而且 pH 值降低会增强两种病毒制剂的活性。不打算受任何机理解释的约束或限制，膜的融合有可能需要一定阈值的融合活性。因为 pUL130 抗体中和这两种病毒制剂的能力表明两者都取决于用于融合的 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 复合物，所以设计实验来假设病毒含有不同量的复合物。测定数个其组成部分，且发现 epiBADrUL131 粒子中呈现的 gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 与 gH/gL/g0 的比率稍高于（约 2 倍）fibroBADrUL131 粒子中。gB、pp28 以及 pp65 的水平在这两种病毒粒子制剂中类似。

[0143] EBV 中优先制备含不同相对量的 gH 复合物的病毒；由 B 细胞制备的粒子缺乏 gH/gL/gp42(18)。然而，可能涉及其它因子。复合物的未测定的组成部分可能改变。或者，gH 复合物与一种或一种以上其它病毒粒子糖蛋白复合物的比率可能改变融合活性。最后，当在上皮细胞或成纤维细胞内制备病毒粒子时，供应给病毒粒子的未鉴别的细胞蛋白质可能改变复合物。

[0144] 两种进入方式是否有生理学结果？epiBADrUL131 和 fibroBADrUL131 在感染 ARPE-19 细胞后诱导显著不同的细胞转录反应。假定差异确实由病毒粒子或病毒粒子加特定相关的细胞因子所致，那么微阵列实验证明对感染的转录反应惊人地不同。胞吞作用密切参与细胞表面分子的信号传导的调控。因此，如果病毒通过在质膜处融合进入，相对于通过胞吞作用进入，病毒可以不同方式调节细胞信号传导和细胞转录组。细胞信号传导的差异很可能产生在培养细胞中未检测到的生理学结果，诸如对病毒传播、免疫逃逸或毒力的影响。

[0145] 参考文献：

[0146] 1. Miller. N. 和 Hutt-Fletcher, L. M. (1992) 病毒学杂志 (J Virol)66, 3409-14.

[0147] 2. Nemerow. G. R. 和 Cooper. N. R. (1984) 病毒学 (Virology) 132, 186-98.

[0148] 3. Nicola. A. V., Hou. J., Major, E. O. 和 Straus, S. E. (2005) J Virol 79, 7609-16.

[0149] 4. Nicola, A. V., McEvoy, A. M. 和 Straus, S. E. (2003) J Virol 77, 5324-32.

[0150] 5. Milne. R. S., Nicola. A. V., Whitbeck, J. C., Eisenberg, R. J. 和 Cohen, G. H. (2005) J Virol 79, 6655-63.

[0151] 6. Wittels. M. 和 Spear, P. G. (1991) 病毒研究 (Virus Res) 18, 271-90.

- [0152] 7. Plachter, B., Sinzger, C. 和 Jahn, G. (1996) 病毒研究前沿 (Adv Virus Res) 46, 195-261.
- [0153] 8. Compton, T., Nepomuceno, R. R. 和 Nowlin, D. M. (1992) Virology 191, 387-95.
- [0154] 9. Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J. L. 和 Michelson, S. (1999) 免疫学杂志 (J Immunol) 162, 957-64.
- [0155] 10. Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A. 和 Johnson, D. C. (2006) J Virol 80, 710-22.
- [0156] 11. Wang, X., Kenyon, W. J., Li, Q., Mullberg, J. 和 Hutt-Fletcher, L. M. (1998) J Virol 72, 5552-8.
- [0157] 12. Li, Q., Turk, S. M. 和 Hutt-Fletcher, L. M. (1995) J Virol 69, 3987-94.
- [0158] 13. Hutt-Fletcher, L. M. 和 Lake, C. M. (2001) 在微生物学和免疫学方面的当今的题目 (Curr Top Microbiol Immunol) 258, 51-64.
- [0159] 14. Haan, K. M., Kwok, W. W., Longnecker, R. 和 Speck, P. (2000) J Virol 74, 2451-4.
- [0160] 15. Haan, K. M. 和 Longnecker, R. (2000) 美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A) 97, 9252-7.
- [0161] 16. Li, Q., Spriggs, M. K., Kovats, S., Turk, S. M., Comeau, M. R., Nepom. B. 和 Hutt-Fletcher, L. M. (1997) J Virol 71, 4657-62.
- [0162] 17. Wang, X. 和 Hutt-Fletcher, L. M. (1998) J Virol 72, 158-63.
- [0163] 18. Borza, C. M. 和 Hutt-Fletcher, L. M. (2002) 自然医学 (Nat Med) 8, 594-9.
- [0164] 19. Wang, D. 和 Shenk, T. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18153-8.
- [0165] 20. Adler, B., Scrivano, L., Ruzsics, Z., Rupp, B., Sinzger, C. 和 Koszinowski, U. (2006) 普通病毒学杂志 (J Gen Virol) 87, 2451-2460.
- [0166] 21. Wang, D. 和 Shenk, T. (2005) J Virol 79, 10330-8.
- [0167] 22. Hahn, G., Revello, M. G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanesi, G., Koszinowski, U., Baldanti, F. 和 Gerna, G. (2004) J Virol 78, 10023-33.
- [0168] 虽然本发明不受以上描述和举例说明的实施例限制,但在随附权利要求书的范畴内能够进行变更和修改。

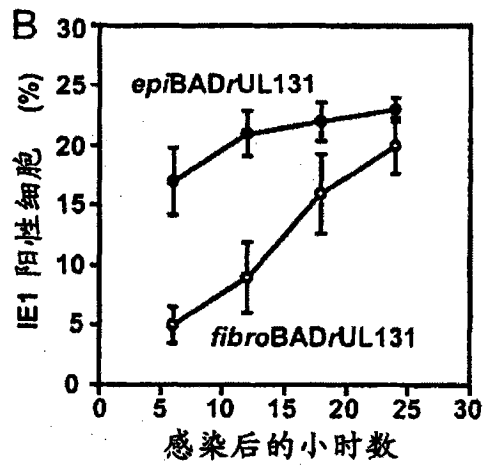
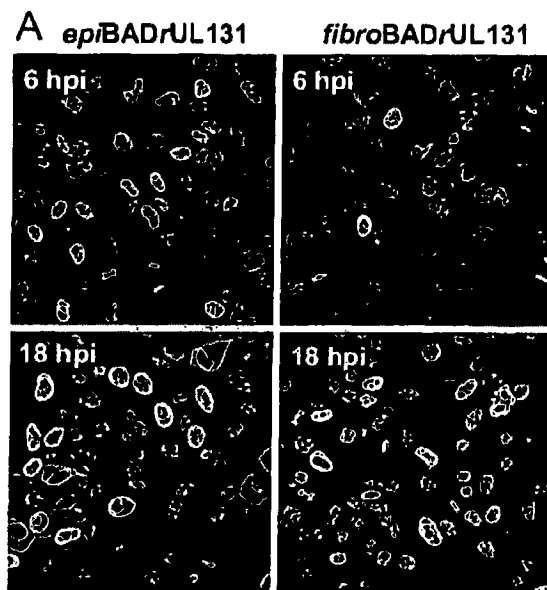


图 1

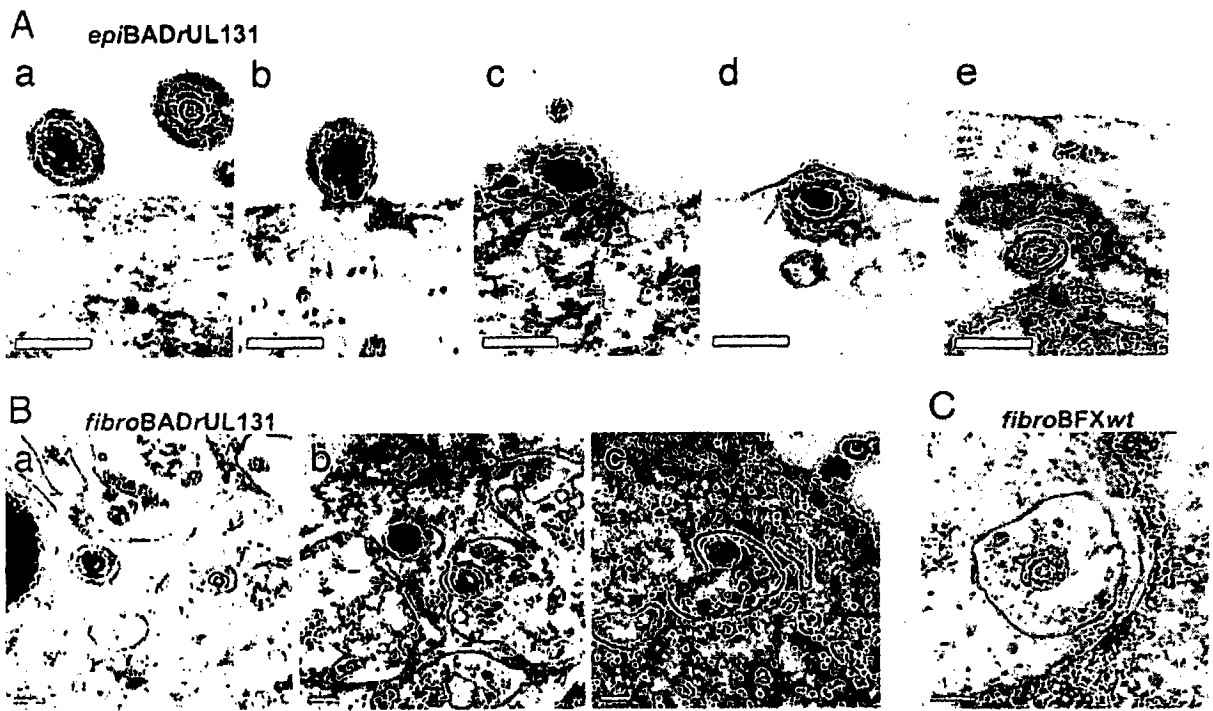


图 2

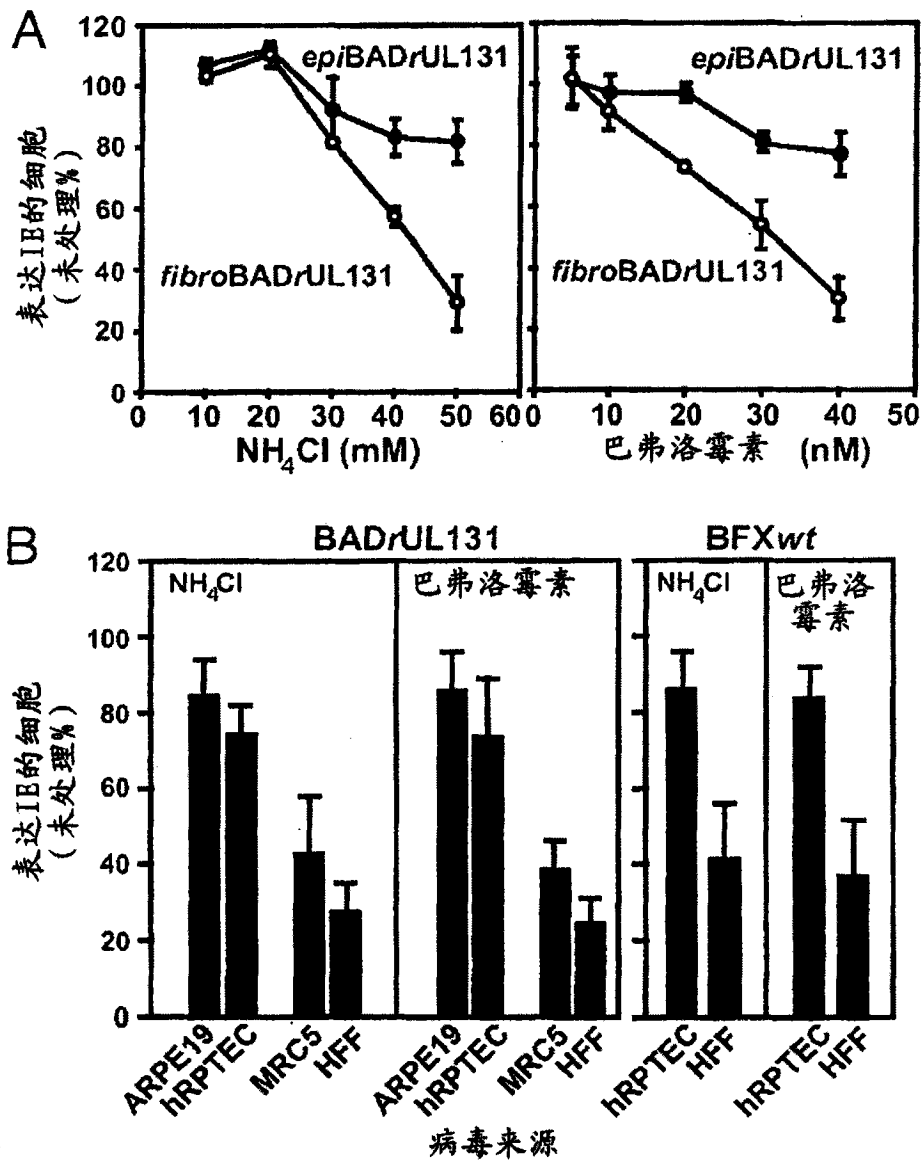


图 3

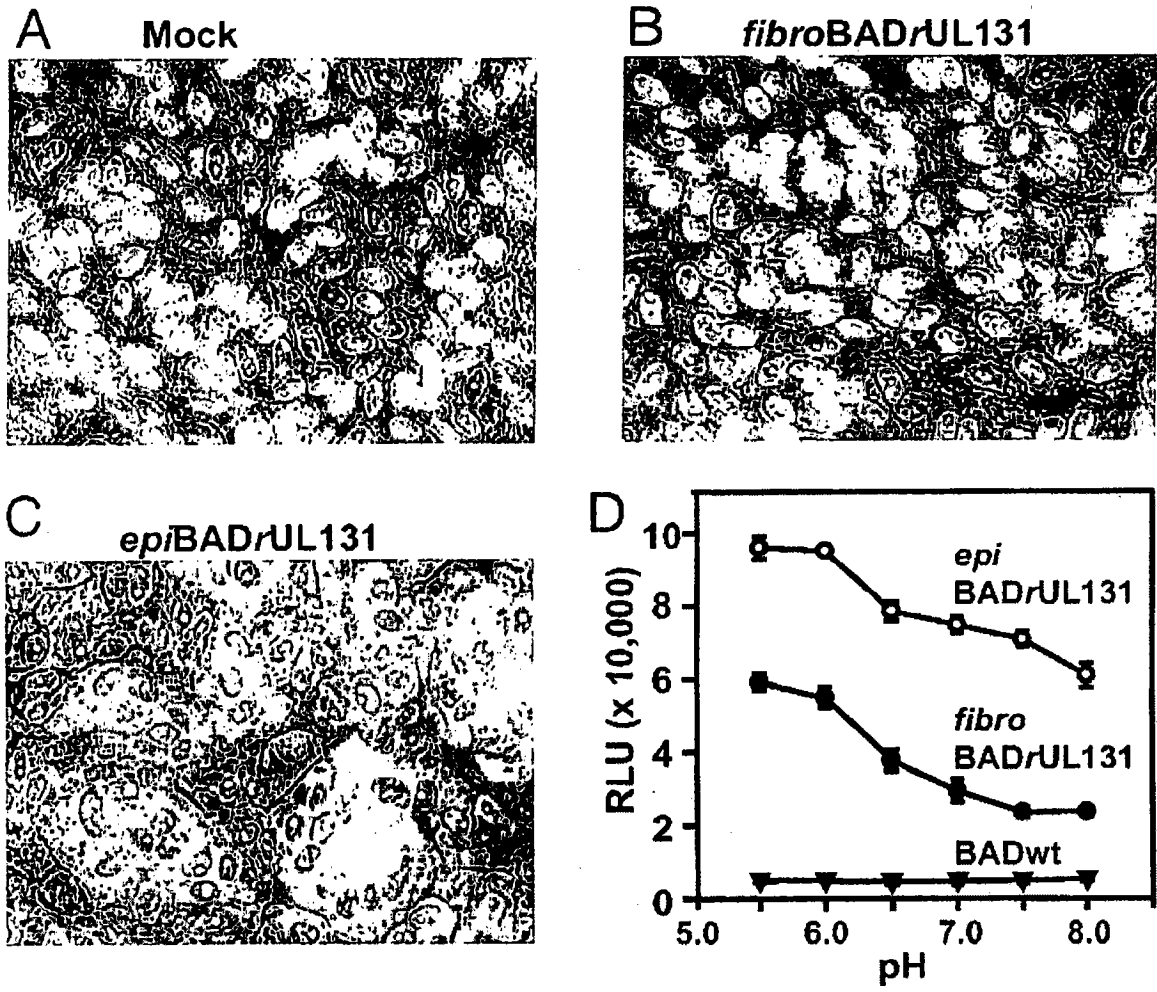


图 4

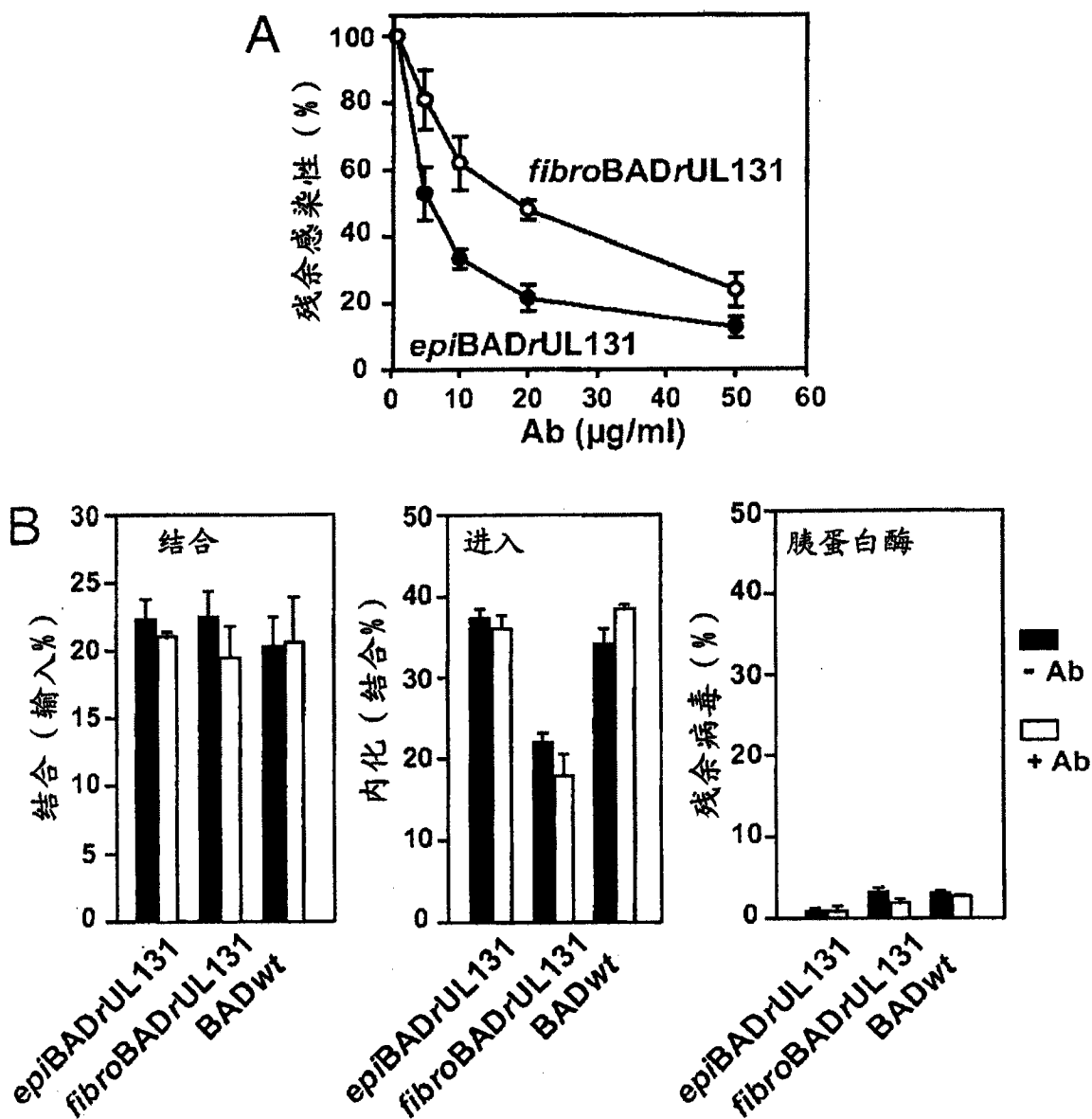


图 5

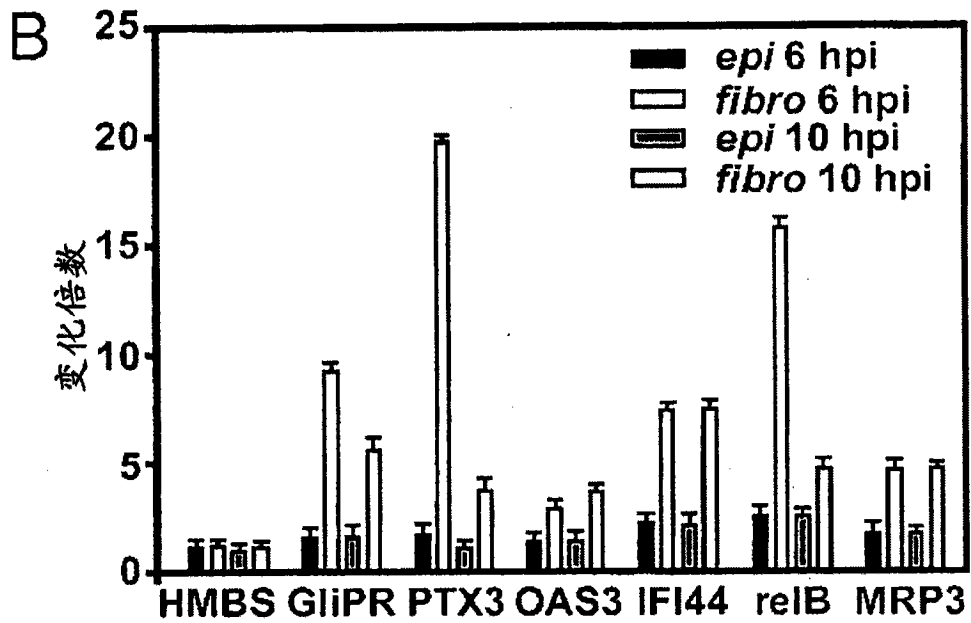
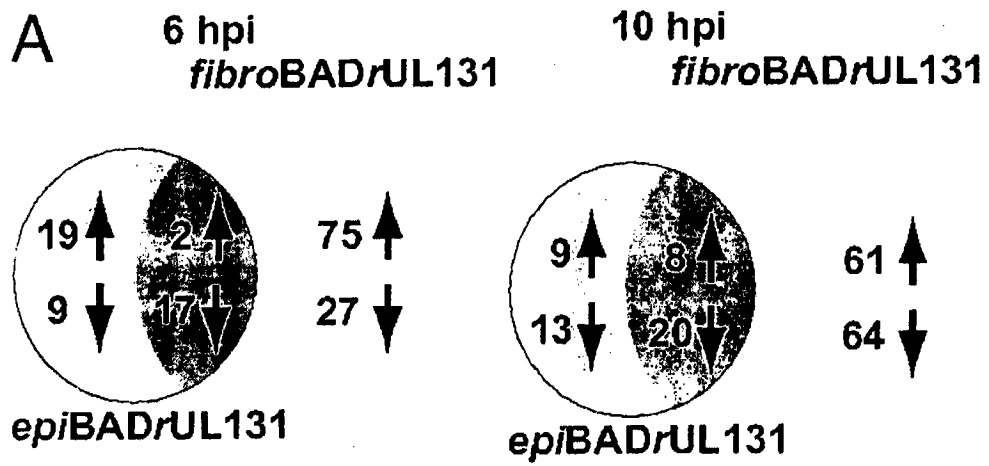


图 6