

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1136849 B
CN 101528941 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
10102129.8

[51] Int.Cl.⁸ C12P G01N C12Q

[22] Date of filing 提交日期
01.03.2010

[54] METHODS AND COMPOSITIONS FOR EXPRESSING NEGATIVE-SENSE VIRAL RNA IN CANINE CELLS 在犬細胞中表達負義病毒 RNA 的方法和組合物

[30] Priority 優先權

19.04.2006 US 60/793,522
19.04.2006 US 60/793,525
20.06.2006 US PCT/US2006/023867
20.06.2006 US 11/455,734
09.08.2006 US 11/501,067

[43] Date of publication of application 申請發表日期
09.07.2010

[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
05.12.2014

CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期
CN 200780022749.4 18.04.2007

CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期
CN 101528941 09.09.2009

Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期
12.03.2014

[73] Proprietor 專利所有人

MEDIMMUNE, LLC
One Medimmune Way
Gaithersburg, MD 20878
UNITED STATES/UNITED STATES OF AMERICA
米迪繆尼有限公司
美國/美利堅合眾國

[72] Inventor 發明人

DUKE, Gregory G · 杜克
KEMBLE, George G · 坎寶
WANG, Zhaoti 王兆悌
YOUNG, James J · 楊

[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址

Shanghai Intellectual Property Office
Unit F, 20th Floor, Neich Tower
128 Gloucester Road, HONG KONG



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101528941 B

(45) 授权公告日 2014.03.12

- (21) 申请号 200780022749.4
- (22) 申请日 2007.04.18
- (30) 优先权数据
 - 60/793,522 2006.04.19 US
 - 60/793,525 2006.04.19 US
 - PCT/US2006/023867 2006.06.20 US
 - 11/455,734 2006.06.20 US
 - 11/501,067 2006.08.09 US
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日 2008.12.18
- (86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2007/066895 2007.04.18
- (87) PCT国际申请的公布数据 W02007/124327 EN 2007.11.01
- (73) 专利权人 米迪缪尼有限公司
地址 美国马里兰州
- (72) 发明人 G·杜克 G·坎宝 王兆悌 J·杨
- (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 范征
- (51) Int. Cl.
 - C12P 19/34(2006.01)
 - C12P 21/06(2006.01)
 - G01N 33/567(2006.01)
 - C12Q 1/68(2006.01)
 - C12Q 1/70(2006.01)

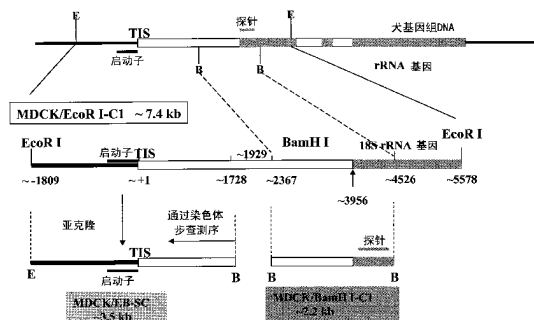
- (56) 对比文件
 - WO 2004/112831 A2, 2004.12.29, 权利要求书, 说明书第 4、5、9、11 页, 附图 1.
 - WO 2004/112831 A2, 2004.12.29, 权利要求书, 说明书第 4、5、9、11 页, 附图 1.
 - Erich Hoffmann 等. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. 《PNAS》. 2000, 第 11 卷 (第 97 期), 第 6108-6113 页.
 - Ewen F. Kirkness 等. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. 《science》. 2003, 第 5641 卷 (第 301 期), 第 1898-1903 页.
 - Ewen F. Kirkness 等. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. 《science》. 2003, 第 5641 卷 (第 301 期), 第 1898-1903 页.
 - Emmanuel Dos Santos Afonso 等. The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment. 《Virology》. 2005, (第 341 期), 第 34-46 页.

审查员 孙跃辉

权利要求书2页 说明书53页
序列表15页 附图19页

(54) 发明名称
在犬细胞中表达负义病毒 RNA 的方法和组合物

(57) 摘要
本发明提供用于在犬细胞, 如 MDCK 细胞中表达核酸序列的新型犬 polI 调节核酸序列。本发明还提供包含这种核酸的表达载体和细胞以及使用这种核酸制备包括感染性流感病毒在内的流感病毒的方法。



CN 101528941 B

1. 一种如 SEQ ID NO:26 所示的犬 RNA 聚合酶 I 启动子。
2. 一种分离核酸,所述分离核酸由权利要求 1 所述的启动子、编码负链病毒基因组 RNA 或相应 cRNA 的 cDNA 和可选地一种或多种表达控制元件组成,其中所述启动子操作性连接所述编码负链病毒基因组 RNA 或相应 cRNA 的 cDNA。
3. 如权利要求 2 所述的分离核酸,其特征在於,所述一种或多种表达控制元件选自增强子序列和转录终止序列。
4. 如权利要求 2 或 3 所述的分离核酸,其特征在於,所述负链病毒基因组 RNA 是流感病毒基因组 RNA。
5. 一种产生流感病毒基因组 RNA 的方法,该方法包括在细胞中转录如权利要求 4 所述的分离核酸,从而产生流感病毒基因组 RNA。
6. 一种包含如权利要求 4 所述的分离核酸的表达载体。
7. 一种产生流感病毒基因组 RNA 的方法,该方法包括将如权利要求 6 所述表达载体引入细胞从而产生流感病毒基因组 RNA。
8. 一种包含如权利要求 6 所述表达载体的细胞。
9. 如权利要求 8 所述的细胞,其特征在於,所述细胞是犬细胞。
10. 如权利要求 9 所述的细胞,其特征在於,所述犬细胞是肾细胞。
11. 如权利要求 10 所述的细胞,其特征在於,所述肾细胞是 MDCK 细胞。
12. 一种产生重组流感病毒的方法,该方法包括培养包含如权利要求 6 所述表达载体和表达 mRNA 的一种或多种表达载体的犬细胞,其中所述 mRNA 编码选自下组的一种或多种流感病毒多肽:PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2,其中每一种流感病毒多肽都被用到;和分离所述重组流感病毒。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在於,产生的流感病毒颗粒有感染性。
14. SEQ ID NO:29 所示的表达载体 pAD4000。
15. 一种产生重组流感病毒的方法,该方法包括:
 - (a) 将表达载体引入犬细胞群,所述表达载体能在所述细胞内表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段,其中所述表达载体包含如 SEQ ID NO:26 所示的犬 RNA 聚合酶 I 启动子;
 - (b) 将能够表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA 的表达载体引入所述细胞,其中每一种流感病毒多肽都被用到;和
 - (c) 培养所述细胞从而产生流感病毒颗粒。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在於,培养所述细胞 48-72 小时后产生的流感病毒颗粒滴度是至少 1.0×10^4 PFU/ml。
17. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在於,培养所述细胞 48-72 小时后产生的流感病毒颗粒滴度是至少 1.0×10^5 PFU/ml。
18. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在於,产生的流感病毒颗粒有感染性。
19. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在於,所述方法利用辅助病毒。
20. 一种产生重组流感病毒的方法,该方法包括:
 - i) 将表达载体引入犬细胞群,所述表达载体
 - a) 能在所述细胞中表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段,其

中一个或多个所述表达载体包含如 SEQ ID NO:26 所示的犬 RNA 聚合酶 I 启动子 ;和

b) 还能在所述细胞中表达编码选自下组的一种或多种流感病毒多肽的 mRNA :PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2, 其中每一种流感病毒多肽都被用到 ;和

ii) 培养所述细胞从而产生流感病毒颗粒。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 培养所述细胞 48-72 小时后产生的流感病毒颗粒滴度是至少 1.0×10^4 PFU/ml。

22. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 培养所述细胞 48-72 小时后产生的流感病毒颗粒滴度是至少 1.0×10^5 PFU/ml。

23. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述方法利用辅助病毒。

在犬细胞中表达负义病毒 RNA 的方法和组合物

[0001] 1. 发明领域

[0002] 在一方面,本发明提供包含犬 RNA 聚合酶 I 调节序列的分离核酸。在其它方面,本发明提供包含这种核酸的表达载体和细胞,以及利用这种核酸制备包括传染性流感病毒在内的流感病毒的方法。

[0003] 2. 背景

[0004] 因流感疾病而导致发病率和死亡率的全球性惊人增加定义为流感大流行。几种因素组合影响大流行的严重性和范围,包括人群的免疫力低和病毒在人群中的传播效率。后者通常不仅受病毒本身的影响,还受人群密度和进出该地区难易的影响。导致大流行的病毒通常都是最近出现而大多数人群以前未接触过的抗原性变体,因而对其没有免疫力或免疫力很低。另外,人对人的有效传播是快速传播的前提,以动物病毒的动物传染病向人群中传播为例,病毒必须适应在人体内复制,还要能有效传播。

[0005] 大流行流感传播很快,可造成破坏性的影响。二十世纪最严重的大流行是 1918 年的大流行,超过 500,000 美国公民死亡,而全球的死亡人数在 2 到 4 千万之间。大流行病可产生疾病潮,发病率高峰间隔几周几个月。大流行流感相对快速地发作和传播为应对这种程度的全球性侵袭提出了几个问题并施加给紧急反应人员(emergency responder)和卫生保健工作人员极大的负担。对即将出现的大流行作出快速鉴定和反应很明显是解决之道的必需要素;目前全球已有几套程序以监测即将出现的流感病毒,包括偶尔导致人患病的禽流感病毒。这些监测数据与预定的大流行警戒水平联用,来鉴定威胁的可能性并为有效应对提供指导。

[0006] 疫苗接种是预防每年流感流行所致疾病的最重要公共卫生手段。鉴定潜在大流行与疾病水平开始明显升高之间短暂的间隔对于制备有效疫苗以保护大部分人群而言是个很大的问题。在下一大流行出现之前具有疫苗制备技术和生产基础设施到位对于大量减少疾病和死亡至关重要。制备“大流行疫苗”所需的反应时间不长,因此为提供有效的反应不允许长时间进行研究或开发。

[0007] 迄今为止,美国所有针对非大流行毒株的市售流感疫苗都是在含胚鸡蛋内繁殖的。虽然流感病毒在鸡蛋内生长良好,但是疫苗的生产依赖于可用的鸡蛋。必须组织供应鸡蛋,在下一流感爆发季前数月选择用于疫苗生产的毒株,从而限制了此方法的灵活性,常导致生产和销售的滞后和短缺。不幸的是,某些流感疫苗毒株,如 2003-04 季流行的原型 A/Fujian/411/02 毒株,在含胚鸡蛋内不能很好地复制,因此不得不采用成本高且费时方法通过细胞培养分离。

[0008] 最近几年也开发了在细胞培养物内生产流感病毒的系统(参见,例如 Furminger, Vaccine Production(疫苗制备),刊于 Nicholson 等编的 Textbook of Influenza(流感教材),第 324-332 页;Merten 等,(1996),Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation(在细胞培养物内生产流感病毒用于疫苗制备),刊于 Cohen 和 Shafferman 编, Novel Strategies in Design and Production of Vaccines(疫苗设计与生产新策略),第 141-151 页)。这些方法通常包括用选择的病毒株感染合适的无限增殖宿主

细胞。虽然与在鸡蛋内生产疫苗相比,克服了许多困难,但是并非所有流感致病毒株都可按照已有的组织培养方法良好生长和制备。此外,许多具有例如,减毒、温度敏感性、冷适应性和适于制备减毒活疫苗等所需特征的病毒株不能利用已有方法在组织培养物内成功培养。

[0009] 除了依赖用活病毒感染细胞培养物的细胞培养方法外,采用重组 DNA 技术可以在细胞培养物中生产完全感染性的流感病毒。从重组 DNA 生产流感病毒可明显提高生产流感疫苗的组织培养方法的灵活性和效用。最近报道了从掺入编码病毒基因组的 cDNA 的重组质粒制备甲型和乙型流感病毒的系统,参见,例如,Neumann 等,(1999), Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs(完全由克隆的 cDNA 制备甲型流感病毒). *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9345-9350; Fodor 等,(1999), Rescue of influenza A virus from recombinant DNA(从重组 DNA 拯救甲型流感病毒). *J. Virol* 73:9679-9682; Hoffmann 等,(2000), A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids(从 8 个质粒制备甲型流感病毒的 DNA 转染系统). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6108-6113; WO 01/83794; Hoffmann 和 Webster,(2000), Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids(从 8 个质粒制备甲型流感病毒的单向 RNA 聚合酶 I-聚合酶 II 转录系统), 81:2843-2847; Hoffmann 等,(2002), Rescue of influenza B viruses from 8 plasmids(从 8 个质粒拯救乙型流感病毒), 99(17):11411-11416; 美国专利号 6,649,372 和 6,951,754; 美国专利公布号 20050003349 和 20050037487, 通过引用纳入本文。这些系统通常被称为“质粒拯救”,从而可能产生表达来自于任何所选病毒株的免疫原性 HA 和 NA 蛋白的重组病毒。

[0010] 然而,这些重组方法依赖于使用表达载体,其包含驱动病毒基因组 rRNA 转录的 RNA 聚合酶 I (RNA pol I) 调节元件。这种调节元件是产生流感病毒基因组 RNA 的确定 5' 和 3' 端所必需,从而能制备完全感染性流感病毒。目前的重组系统,如上面所描述的那些,利用人 RNA pol I 调节系统来表达病毒 RNA。由于 RNA pol I 启动子的物种特异性,这些调节元件只在人或灵长类动物细胞内有活性。因此,流感病毒的质粒拯救到目前为止只有通过将合适的质粒转染入人或灵长类动物细胞才可能实现。

[0011] 此外,这种人或灵长类动物细胞通常不能产生疫苗制备所需足够滴度的流感病毒。作为替代,可利用马-达二氏犬肾细胞(MDCK 细胞)将疫苗病毒株复制到足以制备商品化疫苗的滴度。因此,目前采用质粒拯救制备流感疫苗需要使用至少两种不同的细胞培养物。犬 RNA pol I 调节序列的鉴定和克隆使得可以在与病毒复制相同的细胞培养物上进行质粒拯救,从而无需单独的拯救培养物。因此,还需要鉴定和克隆可用于构建合适载体以便在 MDCK 和其它犬细胞内进行质粒拯救的犬 RNA pol I 调节元件。本发明提供了这些及其它未满足的要求。

[0012] 本文所引用或讨论的参考文献不应理解为承认这些是本发明的现有技术。此外,引用专利也不应理解为承认其有效性。

[0013] 3. 概述

[0014] 本文公开了包含能用于,例如,在犬细胞内表达流感病毒基因组 RNA 的调节元件的核酸。组合物如包含本发明犬调节序列的分离核酸、载体和细胞以及使用这些组合物的方法是本发明的实施方式。

[0015] 因此,在某些方面,本发明的分离核酸包含犬 RNA 聚合酶 I(pol I) 调节序列。在某些实施方式中,调节序列包含启动子。在某些实施方式中,调节序列包含增强子。在某些实施方式中,调节序列同时包含启动子和增强子。在一个实施方式中,调节序列包含相应的天然启动子的核苷酸 -250 到 -1 位(与从启动子转录的第一个核苷酸,也称为 +1 核苷酸有关)或其功能衍生物。在一个实施方式中,调节序列与病毒 DNA,例如,克隆的病毒 cDNA 操作性相连。在一个实施方式中,克隆的病毒 cDNA 编码负链或正链病毒的病毒 RNA 或相应的 cRNA。在某些实施方式中,克隆的病毒 cDNA 编码流感病毒的基因组病毒 RNA(或相应的 cRNA)。

[0016] 在一个实施方式中,本发明的分离核酸包含犬 RNA 聚合酶 I 调节序列和转录终止序列。在某些实施方式中,转录终止序列是 RNA 聚合酶 I 终止序列。在一个具体实施方式中,转录终止序列是人、猴或犬 pol I 终止序列。

[0017] 在某些方面,本发明提供了包含犬 RNA pol I 启动子的分离核酸。犬 RNA pol I 启动子优选与待转录的核酸如流感病毒基因组 RNA 操作性连接。在一个实施方式中,将核酸引入犬细胞会导致流感病毒基因组 RNA 转录,在有合适流感病毒蛋白存在下,可将 RNA 转录物包装进感染性流感病毒。在一个实施方式中,提供的分离核酸包含本发明的犬 RNA 调节序列(例如,犬 RNA pol I 启动子),其中调节序列与待转录的核酸操作性连接,体外或体内有合适蛋白(例如,在编码流感病毒 vRNA 区段的核酸的情形中是 RNP 复合物)存在下,可转录该分离核酸。在一个实施方式中,与所述调节序列操作性连接的核酸是流感病毒 vRNA 区段。

[0018] 在某些实施方式中,本发明核酸包含能结合人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽并与选自 SEQ ID No :1-28 中一个或多个核苷酸序列有至少 100%或约 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%或 65%相同性的多核苷酸序列或其功能活性片段,例如,犬 RNA pol I 调节序列。在一个实施方式中,该多核苷酸序列或其功能活性片段还保留了在有合适多肽(如人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽)存在下启动与该核苷酸序列操作性连接的第二多核苷酸序列转录的能力。在一个实施方式中,SEQ ID No :1-28 所列核酸的“功能活性片段”保留 SEQ ID No :1-28 所示全长序列的一种或多种本文所述功能活性。例如,提供如 SEQ ID No :1 所示调节序列的功能活性片段,而该调节序列片段与待转录的核酸操作性连接,体外或体内有合适蛋白存在下则转录。

[0019] 在某些实施方式中,本发明核酸包含能结合人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽和/或与选自 SEQ ID No :1-28 中一个或多个核苷酸序列有 100%或至少或约 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%或 65%相同性的多核苷酸序列或其片段,例如,犬 RNA pol I 调节序列。在一个实施方式中,该多核苷酸序列或其片段还保留了在有合适多肽(如人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽)存在下启动与该核苷酸序列操作性连接的第二多核苷酸序列转录的能力。

[0020] 在其它实施方式中,本发明的分离核酸包含犬 RNA 聚合酶 I 调节序列和核酶序列。这可以是,例如,丁型肝炎病毒基因组核酶序列或其功能衍生物。

[0021] 在一个实施方式中,本发明的核酸编码本领域技术人员已知的(而不限于)任何负链 RNA 病毒的基因组病毒 RNA。在某些实施方式中,病毒 RNA 编码单分子负链 RNA 病毒目病毒的基因组病毒 RNA。在某些实施方式中,病毒 RNA 编码以下病毒科的病毒的基

基因组病毒 RNA :副粘病毒科 (Paramyxoviridae)、肺病毒亚科 (Pneumovirinae)、弹状病毒科 (Rhabdoviridae)、纤丝病毒科 (Filoviridae)、博尔纳病毒科 (Bornaviricae)、正粘病毒科 (Orthomyxoviridae)、本扬病毒科 (Bunyaviridae) 或沙粒病毒科 (Arenaviridae)。在某些实施方式中,病毒 RNA 编码以下病毒属的病毒的基因组病毒 RNA :呼吸道病毒属 (Respirovirus)、麻疹病毒属 (Morbillivirus)、腮腺炎病毒属 (Rubulavirus)、亨德拉病毒属 (Henipavirus)、禽腮腺炎病毒属 (Avulavirus)、肺病毒属 (Pneumovirus)、间质肺炎病毒属 (Metapneumovirus)、水泡性病毒属 (Vesiculovirus)、狂犬病病毒属 (Lyssavirus)、短暂热病毒属 (Ephemerovirus)、质型弹状病毒属 (Cytorhabdovirus)、核型弹状病毒属 (Nucleorhabdovirus)、粒弹状病毒属 (Novirhabdovirus)、马尔堡病毒属 (Marburgvirus)、埃博拉病毒属 (Ebola virus)、博尔纳病毒属 (Bornavirus)、甲型流感病毒 (Influenzavirus A)、乙型流感病毒 (Influenzavirus B)、丙型流感病毒 (Influenzavirus C)、索戈托病毒属 (Thogotovirus)、鲑鱼贫血病毒属 (Isavirus)、正本雅病毒属 (Orthobunyavirus)、汉他病毒属 (Hantavirus)、内罗病毒属 (Nairovirus)、白蛉病毒属 (Phlebovirus)、番茄斑萎病毒属 (Tospovirus)、沙粒病毒属 (Arenavirus)、柑橘鳞皮病毒属 (Ophiovirus)、水稻条纹叶枯病毒属 (Tenuivirus) 或 δ -病毒属 (Deltavirus)。在某些实施方式中,病毒 RNA 编码以下病毒的基因组病毒 RNA :仙台病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、亨德拉病毒、新城疫病毒、人呼吸道合胞病毒、禽肺病毒、水泡性口炎印第安纳病毒、狂犬病病毒、牛三日热病毒、莴苣坏死黄化病毒、马铃薯黄矮病毒、传染性造血组织坏死病毒、维多利亚湖马尔堡病毒、扎伊尔埃博拉病毒、博尔纳病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、索哥托病毒、传染性鲑鱼贫血病毒、布尼亚病毒、汉坦病毒、达革毕病毒、立谷热病毒、番茄斑萎病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、柑橘鳞皮病毒、水稻条纹枯病毒以及丁型肝炎病毒。

[0022] 在另一方面,本发明提供了包含本发明核酸的载体。在某些实施方式中,载体是表达载体。在某些实施方式中,载体包含细菌的复制起点。在某些实施方式中,载体包含真核细胞的复制起点。在某些实施方式中,载体包含能在原核细胞内选择的选择性标记。在某些实施方式中,载体包含能在真核细胞内选择的选择性标记。在某些实施方式中,载体包含多克隆位点。在某些实施方式中,多克隆位点相对于犬 RNA 聚合酶 I 调节序列定向,从而能从调节序列转录引入多克隆位点内的多核苷酸序列。在某些实施方式中,载体包含能在犬细胞如 MDCK 细胞内表达的多核苷酸序列。

[0023] 在一个实施方式中,本发明提供用于从细胞培养物,如 MDCK 细胞培养物重组拯救病毒的表达载体。载体通常用于拯救本领域技术人员已知的任何病毒,需要这些病毒在其生命周期中产生具有确定末端的 RNA。这些病毒包括而限于负义 RNA 病毒,如上述那些病毒。病毒优选流感病毒,如甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒。

[0024] 在某些实施方式中,本发明的一种或多种载体还包含 RNA 转录终止序列。在某些实施方式中,转录终止序列选自 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。

[0025] 在某些实施方式中,表达载体是单向表达载体。在其它实施方式中,表达载体是双向表达载体。在一些实施方式中,本发明的双向表达载体掺入了插入到第二启动子和聚腺苷酸化位点如 SV40 聚腺苷酸化位点之间的第一启动子。在某些实施方式中,第一启动子是

犬 RNA pol I 启动子。在某些实施方式中,第二启动子是犬 RNA pol I 启动子。在一个实施方式中,第一和第二启动子以相反取向位于至少一个克隆位点的侧翼。

[0026] 在某些实施方式中,表达载体包含核酶序列或转录终止序列,相对于犬 RNA pol I 启动子其位于至少一个克隆位点的 3' 方向。在某些实施方式中,表达载体包含核酶序列或转录终止序列,相对于犬 RNA pol I 启动子其位于至少一个克隆位点的 3' 方向,从而能在胞内合成具有确切 5' 和 3' 端的 vRNA。

[0027] 在一个实施方式中,本发明的双向表达载体内的基因或 cDNA 位于本发明的上游 pol II 启动子和下游犬 pol I 调节序列(例如,pol I 启动子)之间。从 pol II 启动子转录基因或 cDNA 可产生加帽的正义病毒 mRNA,从犬 pol I 调节序列转录基因或 cDNA 可产生负义、未加帽的 vRNA。或者,在本发明的单向载体系统内,基因或 cDNA 位于 pol I 和 pol II 启动子的下游。Pol III 启动子可产生加帽的正义病毒 mRNA, pol I 启动子可产生未加帽的正义病毒 cRNA。

[0028] 在另一方面,本发明提供了包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 种载体的组合物,其中载体包含与病毒 cDNA 如流感病毒 cDNA 操作性连接的一种或多种本发明核酸(例如,本发明的犬 pol I 调节序列)。

[0029] 在某些实施方式中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多种本发明载体位于一个质粒内。在某些实施方式中,至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 种载体位于不同的质粒内。在某些实施方式中,每种载体都位于不同的质粒内。

[0030] 在某些实施方式中,本发明的载体是双向表达载体。本发明的双向表达载体通常包含第一启动子和第二启动子,其中第一和第二启动子分别与编码包含流感病毒基因组区段的病毒核酸的同一双链 cDNA 的两条链操作性连接。这些启动子中通常至少有一个是犬 RNA pol I 启动子。双向表达载体任选包含聚腺苷酸化信号和/或终止序列。例如,聚腺苷酸化信号和/或终止序列可位于所述两个启动子之间的流感病毒基因组区段的侧翼。一种优选的聚腺苷酸化信号是 SV40 聚腺苷酸化信号。

[0031] 在一个实施方式中,本发明包含以双向质粒为基础的表达系统和以单向质粒为基础的表达系统,其中病毒 cDNA 插入本发明犬 pol I 调节序列(例如,pol I 启动子)和终止序列(内部转录单位)之间。该内部转录单位侧翼是 RNA 聚合酶 II (pol II) 启动子和聚腺苷酸化位点(外部转录单位)。在单向系统中,pol I 和 pol II 启动子位于 cDNA 上游,产生正义未加帽 cRNA(来自 pol I 启动子)和正义加帽 mRNA(来自 pol II 启动子)。单向系统内的 pol I 启动子、pol I 终止序列、pol II 启动子和聚腺苷酸化信号可称为包含“上游到下游的方向”。在双向系统内,pol I 和 pol II 启动子位于 cDNA 的相对侧,其中上游 pol II 启动子产生正义加帽 mRNA,下游 pol I 启动子产生负义未加帽病毒 RNA (vRNA)。这些 pol I-pol II 系统从其自身的启动子开始转录两种细胞 RNA 聚合酶,可能在核的不同隔室内。双向系统内的 pol I 启动子和 pol I 终止序列可称为包含“下游到上游的方向”,而双向系统内的 pol II 启动子和聚腺苷酸化信号称为包含“上游到下游的方向”。

[0032] 在其它方面,本文公开的发明包括含有表达载体的组合物,其中表达载体包含犬 RNA 聚合酶 I 可转录的多核苷酸序列。在某些实施方式中,多核苷酸产生流感病毒 vRNA 或 cRNA。在某些实施方式中,组合物包含多种表达载体,其中各表达载体包含犬 RNA 聚合酶 I 可转录的多核苷酸序列。在某些实施方式中,多核苷酸产生多种流感病毒 vRNA 或 cRNA。在

某些实施方式中,多核苷酸产生所有 8 种流感病毒 vRNA 或 cRNA。

[0033] 在其它方面,本文公开的发明包括含有本发明多种表达载体的组合物,当在没有 / 有辅助病毒存在下将其引入犬细胞内时,可导致流感病毒基因组的产生。

[0034] 在某些实施方式中,本发明组合物包含多种表达载体,当在没有 / 有辅助病毒存在下将其引入犬细胞内时,可导致感染性流感病毒的产生。在某些实施方式中,感染性流感病毒是对冷敏感的流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是减毒的流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是温度敏感的流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是冷适应性流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是减毒、温度敏感、冷适应性流感病毒。

[0035] 在某些实施方式中,本发明组合物包含载体,所述载体从 5' 到 3' 包含与 5' 非编码流感病毒序列操作性连接的启动子,该 5' 非编码流感病毒序列与 cDNA 相连,该 cDNA 与 3' 非编码流感病毒序列相连,而该 3' 非编码流感病毒序列与转录终止序列相连。在某些实施方式中,载体内的一个或多个 cDNA 处于有义方向。在某些实施方式中,载体内的一个或多个 cDNA 处于反义方向。

[0036] 在某些实施方式中,本发明提供了包含多个载体的组合物,其中所述多个载体包括:含有本发明犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒聚合酶酸性蛋白 (PA) cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒聚合酶碱性蛋白 1 (PB1) cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒聚合酶碱性蛋白 2 (PB2) cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒血凝素 (HA) cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒核蛋白 (NP) cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒神经氨酸酶 (NA) cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒基质蛋白 cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连;以及含有犬调节序列的载体,所述犬调节序列与流感病毒 NS cDNA 操作性相连,而后者与转录终止序列相连。在某些实施方式中,组合物还包含一种或多种表达编码选自下组的一种或多种流感病毒多肽的 mRNA 的表达载体:PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、基质蛋白 1 (M1)、基质蛋白 2 (M2) 和非结构蛋白 1 和 2 (NS1 和 NS2)。在一个实施方式中,当组合物引入犬细胞内时会产生感染性流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是冷敏感的流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是减毒的流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是温度敏感的流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是冷适应性流感病毒。在某些实施方式中,感染性流感病毒是减毒、温度敏感、冷适应性流感病毒。

[0037] 在某些实施方式中,本发明提供可从克隆的病毒 cDNA 产生感染性流感病毒的组合物,该组合物包含一组质粒,其中各质粒包含编码至少一个病毒基因组区段的 cDNA,其中对应于病毒基因组区段的病毒 cDNA 插入本发明的犬 RNA 聚合酶 I 调节序列与调节元件(例如,犬 pol I 终止序列)之间以合成具有确切 3' 端的 vRNA 或 cRNA,从而导致 vRNA 或 cRNA 表达。

[0038] 在某些实施方式中,本发明提供可从克隆的病毒 cDNA 产生感染性流感病毒的组合物,该组合物包含一组质粒,其中各质粒包含编码至少一个病毒基因组区段的 cDNA,其中

对应于病毒基因组区段的病毒 cDNA 插入本发明的犬 RNA 聚合酶 I 调节序列与调节元件（例如，犬 pol I 终止序列）之间以合成具有确切 3' 端的 vRNA 或 cRNA，从而导致 vRNA 或 cRNA 表达，其中用于合成具有确切 3' 端的 vRNA 或 cRNA 的犬 RNA 聚合酶 I 调节序列、病毒 cDNA 和调节元件依次插入 RNA 聚合酶 II (pol II) 启动子和聚腺苷酸化信号之间，从而导致病毒 mRNA 及相应的病毒蛋白表达，其中全组 vRNA 或 cRNA 及病毒蛋白的表达可导致组装成感染性流感病毒。

[0039] 在某些实施方式中，用于合成具有确切 3' 端的 vRNA 或 cRNA 的调节元件是 RNA 聚合酶 I (pol I) 终止序列。正如本领域技术人员所知悉的，流感病毒 vRNA 的有效复制和转录需要在 vRNA 的 5' 和 3' 端具有十分特殊的序列。技术人员可利用 RNA 聚合酶 I (pol I) 终止序列来确保所制备的 RNA 转录物 3' 端的序列确实是该基因组 RNA 有效复制和 / 或转录所需的确切末端。在某些实施方式中，用于合成具有确切 3' 端的 vRNA 或 cRNA 的调节元件是核酶序列。在某些实施方式中，pol I 启动子靠近聚腺苷酸化信号，pol I 终止序列靠近 pol II 启动子。在某些实施方式中，pol I 启动子靠近 pol II 启动子，pol I 终止序列靠近聚腺苷酸化信号。在某些实施方式中，流感病毒是甲型流感病毒。在某些实施方式中，流感病毒是乙型流感病毒。

[0040] 在另一方面，本发明提供用于产生流感病毒基因组 RNA 的方法，包括转录本发明核酸从而产生流感病毒基因组 RNA。在某些实施方式中，流感病毒基因组 RNA 在无细胞系统内转录。在某些实施方式中，流感病毒基因组 RNA 在犬细胞如 MDCK 细胞内转录。

[0041] 在一个实施方式中，这些方法包括转录多个本发明核酸从而产生多个 RNA 分子，例如，多个流感病毒基因组 RNA。在某些实施方式中，1、2、3、4、5、6、7 或 8 个流感病毒基因组 RNA 被转录。在某些实施方式中，一组完整的流感病毒基因组 RNA 被转录。在某些实施方式中，当流感病毒基因组 RNA 在犬细胞如 MDCK 细胞内转录时，在有 PA、PB1、PB2 和 NP 存在下，其表达流感病毒蛋白。在某些实施方式中，流感病毒蛋白选自：PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2。在某些实施方式中，当一组完整的流感病毒基因组 RNA 在犬细胞如 MDCK 细胞内转录时，在有 PA、PB1、PB2 和 NP 存在下，其表达感染性的流感病毒。在某些实施方式中，这些方法包括与流感病毒基因组 RNA 一起引入 PA、PB1、PB2 和 NP。在某些实施方式中，PA、PB1、PB2 和 NP 由辅助病毒提供。在某些实施方式中，一组完整的流感病毒基因组 RNA 来自于冷适应性、温度敏感、减毒的流感病毒。

[0042] 一个实施方式提供转录流感病毒的 vRNA 区段的方法，所述方法包括步骤 1) 使包含选自 SEQ ID No :1-28 的核酸（或其活性片段）的多核苷酸与一种或多种流感病毒蛋白 PB1、PB2、NP 和 PA 接触，其中所述核酸与编码所述 vRNA 区段的 cDNA 分子操作性连接；和 2) 分离转录的 vRNA 区段。在一个具体实施方式中，该方法利用辅助病毒。

[0043] 在一个方面，本发明提供产生包含区段化 RNA 基因组的重组感染性重组病毒（例如，感染性流感病毒）的方法，包括以下步骤：培养犬宿主细胞如 MDCK 细胞，其中所述宿主细胞包含含有对应于病毒基因组中各基因的病毒 cDNA 的一种或多种本发明表达载体和表达编码一种或多种病毒多肽的病毒 mRNA 的一种或多种表达载体；和分离感染性病毒群。在一个实施方式中，感染性病毒群体是流感病毒群。在一个实施方式中，该方法还包括先进行将一种或多种表达载体引入犬宿主细胞的步骤，然后进行所述培养步骤。在一个实施方式中，该方法还包括先进行制备一种或多种表达载体的步骤，再进行所述引入步骤。

[0044] 一个实施方式提供产生包含区段化 RNA 基因组的重组感染性重组病毒（例如，感染性流感病毒）的方法，该方法包括以下步骤：a) 将对应于病毒基因组中各基因的病毒 cDNA 插入本发明一种或多种表达载体；(b) 将所述表达载体和表达编码一种或多种病毒多肽的病毒 mRNA 的一种或多种表达载体引入（例如，通过电穿孔）宿主细胞（例如，犬细胞）或宿主细胞群；(c) 培育所述宿主细胞；和 d) 分离感染性病毒群。在一个实施方式中，感染性重组病毒是流感病毒。在某些实施方式中，流感病毒是冷适应性的、温度敏感的、减毒的流感病毒。

[0045] 一个实施方式提供产生包含区段化 RNA 基因组的感染性重组病毒（例如，感染性流感病毒）的方法，其中该方法包括以下步骤：a) 将对应于病毒基因组中各基因的病毒 cDNA 插入本发明一种或多种表达载体；(b) 将所述表达载体引入（例如，通过电穿孔）宿主细胞（例如，犬细胞）或宿主细胞群；(c) 培育所述宿主细胞；和 d) 分离感染性病毒群。在一个实施方式中，感染性重组病毒是流感病毒。在某些实施方式中，流感病毒是冷适应性的、温度敏感的、减毒的流感病毒。

[0046] 在一个实施方式中，本发明提供利用本发明表达载体表达 vRNA 区段或相应的 cRNA 和流感病毒蛋白，特别是 PB1、PB2、PA 和 NA，从而在宿主细胞内产生感染性重组流感病毒的方法。根据该实施方式，可以利用或不用辅助病毒产生感染性重组流感病毒。

[0047] 在另一实施方式中，本发明提供产生重组流感病毒的方法，包括培养包含多种核酸的犬细胞，其中所述核酸包含与编码各流感病毒基因组 RNA 的一种或多种 cDNA 操作性连接的犬 RNA 聚合酶 I 调节序列和表达编码一种或多种流感病毒多肽：PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2 的病毒 mRNA 的表达载体；和从所述细胞分离所述重组流感病毒。

[0048] 在某些实施方式中，这些方法包括将可在细胞内指导基因组或反基因组病毒 RNA 区段、核蛋白和 RNA 依赖性聚合酶表达的表达载体引入犬细胞，从而能在没有辅助病毒存在下形成核糖核蛋白复合物并装配病毒颗粒；和 (b) 培养所述细胞，病毒颗粒可在其中包装和拯救。在某些实施方式中，重组负链病毒是非区段化病毒。在某些实施方式中，重组负链 RNA 病毒是区段化病毒。在某些实施方式中，负链 RNA 病毒是流感病毒。

[0049] 在某些实施方式中，这些方法包括将表达载体引入培养的犬细胞，所述表达载体可指导区段化负链 RNA 病毒的基因组或反基因组 RNA 区段、核蛋白和 RNA 依赖性聚合酶在能够形成包含病毒基因组 RNA 区段的 RNP 复合物并且在没有辅助病毒存在下装配病毒颗粒的条件下表达；和培养所述细胞，病毒颗粒在其中产生。在某些实施方式中，表达载体指导病毒基因组 RNA 区段表达。

[0050] 在某些实施方式中，本发明方法所用的犬细胞包含表达一种或多种蛋白的一种或多种表达载体，其中所述蛋白选自：核蛋白和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的亚单位。在某些实施方式中，表达载体指导一种或多种核蛋白和所述 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的亚单位表达。在某些实施方式中，在调节序列的控制下从表达载体表达一种或多种病毒蛋白，所述调节序列选自：与 2 型人腺病毒的剪接三联前导序列操作性连接的腺病毒 2 主要晚期启动子或人巨细胞病毒立即早期启动子、或调节序列的功能衍生物。

[0051] 在某些实施方式中，病毒是甲型、乙型或丙型流感病毒。在某些实施方式中，病毒是含有衍生自多个亲代病毒的 vRNA 区段的重配病毒 (reassortant virus)。

[0052] 在某些实施方式中，本发明的方法包括引入本发明的多个载体，其中各载体将一

部分流感病毒引入能支持病毒复制的宿主细胞群。宿主细胞可在允许病毒生长的条件下培养,并可回收流感病毒。在某些实施方式中,流感病毒是减毒的病毒、冷适应性的病毒和/或温度敏感的病毒。例如,在某些实施方式中,载体衍生的重组流感病毒可以是减毒的、冷适应性的、温度敏感的病毒,从而适于作为减毒活疫苗,例如在鼻内疫苗制剂中给予。在一典型实施方式中,通过引入掺入全部或部分乙型流感病毒 /AnnArbor/1/66 基因组,例如 ca B/Ann Arbor/1/66 病毒基因组的多个载体产生病毒。

[0053] 在某些实施方式中,包含编码一种流感病毒株的至少 6 个内部基因组区段(例如,编码除 HA 和 NA 之外所有流感病毒蛋白的基因组区段)的 cDNA 和编码另一种流感病毒株的一个或多个基因组区段(例如,HA 和 NA vRNA 区段)的 cDNA 的多个载体可引入宿主细胞群。例如,可将选择的减毒、冷适应性和/或温度敏感的甲型或乙型流感病毒株,如 B/Ann Arbor/1/66 的 ca、att、ts 株或人工改造的 ca、att、ts 甲型或乙型流感病毒株的至少 6 个内部基因组区段(“骨架”)与编码衍生自另一病毒株的免疫原性抗原的一个或多个区段一起引入宿主细胞群。免疫原性表面抗原通常包括血凝素(HA)和/或神经氨酸酶(NA)抗原中的一种或两种。在引入编码免疫原性表面抗原的单一区段的实施方式中,所选择病毒的 7 个互补区段也引入宿主细胞。

[0054] 在某些实施方式中,表达载体通过电穿孔转染入细胞。在某些实施方式中,通过在脂质体转染剂存在下转染入细胞或通过磷酸钙沉淀的方法将表达载体引入细胞。在某些实施方式中,表达载体是质粒。在某些实施方式中,表达载体包含用于表达所述病毒的各基因组 RNA 区段或相应编码 RNA 的不同表达载体。在某些实施方式中,在衍生自本文所述犬 Pol I 启动子的启动子序列控制下表达各基因组 RNA 区段或编码 RNA。

[0055] 在某些实施方式中,将掺入了流感病毒基因组区段的多个质粒载体引入宿主细胞群。例如,在某些实施方式中,可利用各自含有不同基因组区段的 8 个质粒将完整的流感病毒基因组引入宿主细胞。或者,还可利用掺入了更小基因组亚序列的更多数目的质粒。

[0056] 在另一方面,本发明提供在培养细胞内产生区段化负链 RNA 病毒的感染性病毒颗粒的方法,其中负链 RNA 病毒具有 3 个以上基因组 vRNA 区段,例如流感病毒,如甲型流感病毒,所述方法包括:(a) 将能够在所述细胞内表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段的第一组表达载体引入能支持所述病毒生长的细胞群内;(b) 将能够表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA 的第二组表达载体引入所述细胞;和(c) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,细胞是犬细胞。在某些实施方式中,细胞是 MDCK 细胞。在某些实施方式中,病毒是乙型流感病毒。在某些实施方式中,第一组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,第一组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,第二组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,第二组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,第一组、第二组或两组表达载体通过电穿孔引入。在某些实施方式中,第一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段。在某些实施方式中,第二组表达载体编码一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,第一组或第二组表达载体(或两组)包含本发明的核酸,例如,本发明的犬调节序列(例如,犬 pol I)。在某些实施方式中,第一组或第二组表达载体(或两组)编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,一组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和/或 NA mRNA 和/或 vRNA 的一种或多种载体。

[0057] 本发明还提供提供在培养细胞内产生区段化负链 RNA 病毒的感染性病毒颗粒的方法,

其中负链 RNA 病毒具有 3 个以上基因组 vRNA 区段,例如流感病毒,如甲型流感病毒,所述方法包括:(a) 将能在所述细胞内表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段还能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA 的一组表达载体引入能支持所述病毒生长的细胞群;(b) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,细胞是犬细胞。在某些实施方式中,细胞是 MDCK 细胞。在某些实施方式中,病毒是乙型流感病毒。在某些实施方式中,该组表达载体包含在 1-17 个质粒内。在某些实施方式中,该组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,该组表达载体包含在 1-3 个质粒内。在某些实施方式中,所述多组表达载体通过电穿孔引入。在某些实施方式中,该组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段。在某些实施方式中,该组表达载体编码一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,该组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段和一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,该组表达载体包含本发明的核酸,例如,本发明的犬调节序列(例如,犬 pol I)。在某些实施方式中,该组表达载体编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,该组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和 / 或 NA mRNA 和 / 或 vRNA 的一种或多种载体。在某些实施方式中,第一组或第二组表达载体(或两组)编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,一组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和 / 或 NA mRNA 和 / 或 vRNA 的一种或多种载体。

[0058] 在某些实施方式中,这些方法还包括利用与犬细胞相同或不同的细胞进行一个或多个其它细胞感染步骤以扩增犬细胞所产生的病毒颗粒。在某些实施方式中,这些方法还包括分离感染性病毒颗粒。在某些实施方式中,这些方法还包括病毒减毒或杀伤步骤。在某些实施方式中,这些方法还包括在疫苗组合内掺入减毒的或杀伤的病毒颗粒。

[0059] 在一个实施方式中,本发明产生病毒的方法所导致的病毒滴度(本发明载体引入宿主细胞后 24、36、48 小时、3 天或 4 天)为至少 0.1×10^3 PFU/ml、或至少 0.5×10^3 PFU/ml、或至少 1.0×10^3 PFU/ml、或至少 2×10^3 PFU/ml、或至少 3×10^3 PFU/ml、或至少 4×10^3 PFU/ml、或至少 5×10^3 PFU/ml、或至少 6×10^3 PFU/ml、或至少 7×10^3 PFU/ml、或至少 8×10^3 PFU/ml、或至少 9×10^3 PFU/ml、或至少 1×10^4 PFU/ml、或至少 5×10^4 PFU/ml、或至少 1×10^5 PFU/ml、或至少 5×10^5 PFU/ml、或至少 1×10^6 PFU/ml、或至少 1×10^7 PFU/ml、或在 $0.1-1 \times 10^3$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^3-1 \times 10^4$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^4-1 \times 10^5$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^5-1 \times 10^6$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^6-1 \times 10^7$ PFU/ml 的范围内、或高于 1×10^7 PFU/ml。因此,本发明提供拯救病毒的方法,其中 24-36 小时或 2-3 天时所拯救病毒的滴度是至少 0.1×10^3 PFU/ml、或至少 0.5×10^3 PFU/ml、或至少 1.0×10^3 PFU/ml、或至少 2×10^3 PFU/ml、或至少 3×10^3 PFU/ml、或至少 4×10^3 PFU/ml、或至少 5×10^3 PFU/ml、或至少 6×10^3 PFU/ml、或至少 7×10^3 PFU/ml、或至少 8×10^3 PFU/ml、或至少 9×10^3 PFU/ml、或至少 1×10^4 PFU/ml、或至少 5×10^4 PFU/ml、或至少 1×10^5 PFU/ml、或至少 5×10^5 PFU/ml、或至少 1×10^6 PFU/ml、或至少 5×10^6 PFU/ml、或至少 1×10^7 PFU/ml 或在 $0.1-1 \times 10^3$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^3-1 \times 10^4$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^4-1 \times 10^5$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^5-1 \times 10^6$ PFU/ml 的范围内、或在 $1 \times 10^6-1 \times 10^7$ PFU/ml 的范围内、或高于 1×10^7 PFU/ml。

[0060] 在一些实施方式中,流感病毒对应于乙型流感病毒。在一些实施方式中,流感病毒对应于甲型流感病毒。在某些实施方式中,这些方法包括回收能在给予,例如鼻内给予对象

后引发免疫反应的重组和 / 或重配流感病毒。在一些实施方式中,先使病毒灭活再给予,在其它实施方式中,给予减毒的活病毒。根据本发明方法产生的重组和重配甲型和乙型流感病毒也是本发明的特征。在某些实施方式中,病毒包括减毒的流感病毒、冷适应的流感病毒、温度敏感的流感病毒、或者具有这些所需特性的任意组合的病毒。在一个实施方式中,流感病毒掺入了乙型流感 /Ann Arbor/1/66 株病毒,例如,B/Ann Arbor/1/66 的冷适应、温度敏感的减毒株。在另一实施方式中,流感病毒掺入了甲型流感 /Ann Arbor/6/60 株病毒,例如,A/Ann Arbor/6/60 的冷适应、温度敏感的减毒株。

[0061] 任选地,通过联合引入编码病毒株的 6 个内部 vRNA 的载体和编码所选,例如致病株的表面抗原 (HA 和 NA) 的 vRNA 区段的载体产生重配病毒,其中前一种病毒株是根据其疫苗生产的优良特性而选择的。例如,HA 区段宜选自致病相关株 H1、H3 或 B,这对于疫苗生产是常规操作。类似地,HA 区段可选自新出现的致病株如 H2 株 (例如,H2N2)、H5 株 (例如,H5N1) 或 H7 株 (例如,H7N7)。或者,第一病毒株的 7 个互补基因区段可与 HA 或 NA 编码区段组合引入。在某些实施方式中,内部基因区段衍生自乙型流感 /Ann Arbor/1/66 或甲型流感 /Ann Arbor/6/60 毒株。此外,可以产生包含修饰的 HA 基因的流感病毒 (例如,H5N1、H9N2、H7N7 或 HxNy (其中 $x = 1-9$, $y = 1-15$))。例如,可通过去除多碱基切割位点来修饰 HA 基因。

[0062] 在另一方面,本发明提供包含本发明核酸或表达载体的宿主细胞。在某些实施方式中,所述细胞是犬细胞。在某些实施方式中,所述犬细胞是肾细胞。在某些实施方式中,所述犬肾细胞是 MDCK 细胞。在其它实施方式中,所述细胞选自下组:Vero 细胞、Per. C6 细胞,BHK 细胞、PCK 细胞、MDCK 细胞、MDBK 细胞、293 细胞 (例如,293T 细胞) 和 COS 细胞。在某些实施方式中,这些细胞系中至少两种细胞系的共培养混合物,例如,COS 和 MDCK 细胞的组合或 293T 和 MDCK 细胞的组合,构成宿主细胞群。

[0063] 可在病毒能复制和装配的条件下,培养包含本发明流感载体的宿主细胞。掺入了流感质粒的宿主细胞通常在 37°C 以下培养,温度优选等于或低于 35°C。在某些实施方式中,细胞在 32°C 到 35°C 之间培养。在一些实施方式中,细胞在约 32°C 到 34°C 之间,例如,约 33°C 培养。在经过合适的培养时间以使病毒复制到特定滴度后,可回收重组病毒。可任选灭活回收的病毒。

[0064] 在还有另一方面,本发明提供工程改造流感病毒以使其只限于在特定类型细胞内生长的方法,所述细胞包括但不限于:MRC-5、WI-38、FRhL-2、PerC6、293、NIH 3T3、CEF、CEK、DF-1、Vero、MDCK、Mv1Lu、人上皮细胞和 SF9 细胞类型。在一个实施方式中,限制生长,以使流感病毒不能在原代细胞 (例如,PerC6) 中生长。在另一实施方式中,限制生长,以使流感病毒不能在原代上皮细胞中生长。本领域技术人员应知道生长限制表型可以和一种或多种其它表型,例如冷适应的、温度敏感的、减毒的等相组合。还应知道导致生长限制表型的突变也可导致和 / 或负责其它表型,如上面所列的那些。

[0065] 在另一方面,本发明提供从 MDCK 细胞培养物拯救重组或重配甲型或乙型流感病毒 (即,甲型流感和 / 或流感病毒的野生型和突变株) 的新方法。在某些实施方式中,将掺入了流感病毒基因组的多个载体通过电穿孔引入 MDCK 细胞群,其中本发明的犬调节序列控制所述基因组的转录。细胞可在病毒能复制的条件下生长,例如,以冷适应的、减毒的、温度敏感的病毒株为例,MDCK 细胞可在 37°C 以下生长,优选温度等于或低于 35°C。细胞通常

在 32°C 到 35°C 之间的温度培养。在一些实施方式中,细胞在约 32°C 到 34°C 之间,例如约 33°C 的温度培养。MDCK 细胞任选(例如,对于疫苗生产)在不含任何动物源性产品的无血清培养基内生长。

[0066] 在上述方法的一些实施方式中,可在培养掺入了流感病毒基因组质粒的宿主细胞后回收流感病毒。在一些实施方式中,回收的病毒是重组病毒。在一些实施方式中,病毒是具有一个以上亲代病毒株遗传组分的重配流感病毒。回收的重组或重配病毒还可任选在培养的细胞或鸡蛋内传代来进一步扩增。

[0067] 可任选灭活回收的病毒。在一些实施方式中,回收的病毒包含流感疫苗。例如,回收的流感疫苗可以是具有衍生自甲型或乙型流感的所选病毒株的 HA 和 / 或 NA 抗原的重配流感病毒(例如,6:2 或 7:1 重配病毒)。在一个实施方式中,HA 或 NA 抗原经修饰。在某些优选实施方式中,重配流感病毒具有减毒表型。重配病毒任选冷适应的和 / 或温度敏感的,例如,减毒的、冷适应的或温度敏感的甲型或乙型流感病毒。这种流感病毒可用作,例如减毒活疫苗,从而预防性产生对所选的,例如致病性流感病毒株具有特异性的免疫反应。根据本发明方法制备的流感病毒,例如,减毒的重配病毒,也是本发明的额外特征。

[0068] 在另一方面,本发明涉及产生重组流感病毒疫苗的方法,包括将掺入了流感病毒基因组的多个载体引入能支持流感病毒复制的宿主细胞群,其中本发明的犬调节序列(例如,犬 RNA pol I 启动子)控制所述基因组转录;在低于或等于 35°C 的温度下培养宿主细胞;和回收在给予对象后能引发免疫反应的流感病毒。所述疫苗可包含甲型或乙型流感病毒株。

[0069] 在一些实施方式中,流感疫苗病毒包括减毒流感病毒、冷适应的流感病毒或温度敏感的流感病毒。在某些实施方式中,病毒具有这些所需特性的组合。在一个实施方式中,流感病毒掺入了甲型流感 /Ann Arbor/6/60 毒株病毒。在另一个实施方式中,流感病毒掺入了乙型流感 /Ann Arbor/1/66 毒株病毒。或者,疫苗还包含人工改造的甲型或乙型流感病毒,其中掺入了至少一个可影响 ca A/Ann Arbor/6/60 或 ca/B/Ann Arbor/1/66 的特征性生物学特性的取代氨基酸,如这些毒株的独特氨基酸。


[0070] 一个实施方式提供本发明方法产生的包含重组病毒(或其衍生的病毒)群的疫苗。在一具体实施方式中,疫苗包含本发明方法产生的活病毒。在另一具体实施方式中,疫苗包含本发明方法产生的杀伤或灭活病毒。在另一具体实施方式中,疫苗包含利用本发明方法产生的活的、杀伤的或灭活的病毒制备的免疫原性组合物。在另一具体实施方式中,疫苗包含本发明方法产生的减毒的活流感病毒、冷适应的流感病毒、温度敏感的流感病毒制备的免疫原性组合物。在另一具体实施方式中,疫苗包含本发明方法产生的减毒的活流感病毒、冷适应的流感病毒或温度敏感的流感病毒,或其衍生的病毒。

[0071] 4. 附图简述

[0072] 图 1 表示野生型和 ca B 毒株 (B/Beijing/243/97) 在 PerC6 和 MDCK 细胞中的生长曲线;通过 TCID50 实验测定每个时间点的病毒滴度。

[0073] 图 2 表示野生型和 ca A 毒株 (A/Sydney/05/97 和 B/Beijing/262/95) 在 PerC6 和 MDCK 细胞中的生长曲线;通过 TCID50 实验测定每个时间点的病毒滴度。

[0074] 图 3 表示野生型和 ca A 毒株 (A/Ann Arbor/6/60) 在 PerC6 和 MDCK 细胞中的生长曲线;通过 TCID50 实验测定每个时间点的病毒滴度。

[0075] 图 4 表示利用病毒 RNA 的 M 区段特异性 Taqman  (加利福尼亚州帕罗阿托罗氏分子系统公司 (Roche Molecular Systems ;Palo Alto, CA)) 探针实时分析 PerC6 和 MDCK 细胞中 A/Sydney 的病毒 RNA。

[0076] 图 5 表示 ca A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) 在 MDCK 细胞中的生长曲线 ;通过 TCID50 实验测定每个时间点的病毒滴度。

[0077] 图 6 显示通过 8- 质粒拯救技术产生的作为 7:1 重配株的各流感基因区段拯救。

[0078] 图 7 表示 PerC6 细胞中各 7:1 重配株的生长曲线 ;通过 TCID50 实验测定每个时间点的病毒滴度。

[0079] 图 8 表示包含犬 RNA pol I 调节序列的 Eco RI 片段的限制性图。

[0080] 图 9A、9B 和 9C 代表从犬基因组 DNA 克隆的约 3.5kB 核酸的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1), 该序列编码 18s rRNA 基因的至少一部分, 始于所显示序列的核苷酸 1809(+1)。

[0081] 图 10 表示质粒 pAD3000 的图, 该质粒不难经改造而适用于制备本发明的表达载体。

[0082] 图 11 表示用于微小基因组实验的 MDCK pol I 启动子构建物。

[0083] 图 12 表示微小基因组试验的实果。从 -1、+1 和 +2MDCK pol I 启动子构建物产生的 EGFP 信号分别显示在左上图、中上图和右上图。负启动子对照只显示了背景荧光 (左下图)。用 CMV-EGFP 构建物转染的细胞作为阳性对照 (右下图)。

[0084] 图 13 表示质粒表达载体 pAD4000 (SEQ ID NO :29) 的序列, 其包含 MDCK EcoRI-BamHI 亚克隆的 469bp 片段 (SEQ ID NO :1 的碱基 1340-1808) (pAD4000 中碱基 1-469)。注意 :该 469bp 片段以反向互补方向显示, 接头序列以下划线和粗体字显示。

[0085] 图 14 表明用于对所拯救病毒的 RNA 进行 RT-PCR 反应的引物的退火位置。

[0086] 图 15 表示用于对所拯救病毒的 RNA 进行 RT-PCR 反应的引物的序列。

[0087] 图 16A-B 显示 NS 和 PB1 区段的部分序列和所引入沉默突变的位置。

[0088] 5. 发明详述

[0089] 流感病毒的质粒拯救通常包括引入表达病毒蛋白的表达载体和在合适的细胞内转录病毒基因组 RNA。转录病毒基因组 RNA 通常用 RNA 聚合酶 I 进行, 因为这些酶可产生适合用作病毒基因组的具有末端的转录物。因此, 在质粒拯救期间可利用 RNA pol I 启动子和其它调节元件启动基因组 RNA 转录。不幸的是, RNA pol I 启动子是高度物种特异性的。即, 一个物种的 RNA pol I 可能有效结合或不能有效结合不相关物种的 RNA pol I 启动子。因此, 可用的 RNA pol I 启动子限制了能进行质粒拯救的细胞。在本发明之前, 质粒拯救在犬细胞内是不可能的。根据以下本发明内容, 首次可能在犬细胞内进行质粒拯救。

[0090] 因此, 在第一方面, 提供了包含犬 RNA 聚合酶 I 调节序列的本发明分离的核酸。在某些实施方式中, 调节序列是启动子。在一实施方式中, 调节序列是犬 pol I 启动子序列。在另一实施方式中, 调节序列与克隆的病毒 cDNA 操作性连接。在还有另一实施方式中, 克隆的病毒 cDNA 编码负链或正链病毒的病毒 RNA 或相应的 cRNA。在一具体实施方式中, 克隆的病毒 cDNA 编码流感病毒的基因组病毒 RNA (或相应的 cRNA)。

[0091] 在一具体实施方式中, 本发明的分离核酸包含犬 RNA 聚合酶 I 调节序列和转录终止序列。在某些实施方式中, 转录终止序列是 pol I 终止序列。在某些实施方式中, 转录终止序列是人、猴或犬 pol I 终止序列。

[0092] 在某些实施方式中,本发明核酸包含能结合人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽并与选自 SEQ ID No :1-28 的一个或多个核苷酸序列有至少 100%或约 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%或 65%相同性的多核苷酸序列或其功能活性片段,例如,犬 RNA pol I 调节序列。在一个实施方式中,多核苷酸序列或其功能活性片段还保留了在有合适多肽(如人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽)存在下启动与该核苷酸序列操作性连接的第二多核苷酸序列转录的能力。在一个实施方式中,SEQID No :1-28 中所列核酸的“功能活性片段”保留了 SEQ ID No :1-28 全长序列的本文所述一种或多种功能活性。例如,提供如 SEQ ID No :1 所述调节序列的功能活性片段,而该调节序列片段与待转录的核酸操作性连接,则体外或体内有合适蛋白存在下即可转录。在一具体实施方式中,本发明核酸包含 SEQ ID NO :26 所示核酸的多核苷酸序列。

[0093] 在某些实施方式中,本发明核酸包含能结合人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽和/或与选自 SEQ ID No :1-28 中一个或多个核苷酸序列有 100%或至少或约 99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%或 65%相同性的多核苷酸序列或其片段,例如,犬 RNA pol I 调节序列。在一个实施方式中,所述多核苷酸序列或其片段还保留了在有合适多肽(如人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽)存在下启动与该核苷酸序列操作性连接的第二多核苷酸序列转录的能力。

[0094] 在某些方面,本发明提供包含犬 RNA pol I 启动子的分离核酸。犬 RNA pol I 启动子优选与待转录的核酸,例如流感病毒基因组 RNA 操作性连接。核酸引入犬细胞导致流感病毒基因组 RNA 转录,在有合适流感病毒蛋白存在下, RNA 转录物可包装进感染性流感病毒。一个实施方式提供包含本发明的犬 RNA 调节序列(例如,犬 RNA pol I 启动子)的分离核酸,其中该调节序列与待转录的核酸操作性连接,体外或体内有合适蛋白存在下被转录。在一个实施方式中,与所述调节序列操作性连接的核酸是流感病毒 vRNA 区段。

[0095] 在另一方面,本发明提供在犬细胞培养物中完全从克隆的病毒 DNA 产生重组流感病毒的载体和方法。例如,可如下所述产生流感病毒:将包含克隆的 cDNA 的多个载体引入犬宿主细胞,其中 cDNA 在本发明的犬 RNA 调节序列(例如,犬 pol I 启动子)的控制之下编码各病毒基因组区段;培养犬细胞;和从细胞培养物中分离产生的重组流感病毒。当将编码流感病毒基因组的载体如此引入(例如,通过电穿孔)犬细胞时,通过标准纯化方法可回收适合用作疫苗的重组病毒。利用本发明的载体系统和方法,可在组织培养物中快速而有效地生产掺入了 6 个内部基因区段和来自所选,例如致病株的免疫源性 HA 和 NA 区段的重配病毒,其中前一病毒株是根据其与疫苗生产有关的所需特性而选择的。因此,本文所述系统和方法可用于在犬细胞培养物内快速生产和重配的甲型和乙型流感病毒,包括适于用作疫苗的病毒,包括减毒活疫苗。按照本发明方法制备的疫苗可通过鼻内或肌肉内递送。

[0096] 对于各 A 和 B 亚型,通常选择单一主供体病毒(MDV)株。以减毒活疫苗为例,主供体病毒株通常是根据其于疫苗生产有关的优良特性,例如,温度敏感性、冷适应性和/或减毒而选择的。例如,典型的主供体病毒株分别包括 A/Ann Arbor/6/60 和 B/Ann Arbor/1/66 的这种温度敏感株、减毒株和冷适应株。

[0097] 例如,所选择的主供体 A 型病毒(MDV-A)或主供体 B 型病毒(MDV-B)可从构成病毒基因组的多个克隆的病毒 cDNA 产生。在一个示范性实施方式中,从 8 个克隆的病毒 cDNA

制备重组病毒。将表示 PB2、PB1、PA、NP、HA、NA、M 和 NS 的所选 MDV-A 或 MDV-B 序列的 8 个病毒 cDNA 克隆入表达载体,例如双向表达载体,如质粒(例如, pAD3000 或 pAD4000),从而可从一条链的犬 RNA 聚合酶 I (pol I) 启动子转录病毒基因组 RNA,而从另一条链的 RNA 聚合酶 II (pol II) 启动子合成病毒 mRNA。任选可修饰任何基因区段,包括 HA 区段(例如,去除多碱基切割位点)。

[0098] 将携带 8 个病毒 cDNA 的质粒转染入合适的宿主细胞,例如 MDCK 细胞,然后回收感染性的重组 MDV-A 或 MDV-B 病毒。利用本文所描述的质粒和方法,本发明可用于,例如,通过共转染所选病毒(例如, MDV-A、MDV-B、PR8)的 6 个内部基因 (PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS) 与衍生自不同类型(甲型或乙型)流感病毒的 HA 和 NA 来产生 6:2 重配流感疫苗。例如, HA 区段优选来自致病相关的 H1、H3 或 B 毒株,这是疫苗生产的常规操作。HA 区段可类似地选自与致病株有相关性的毒株,致病株包括例如 H2 株(例如, H2N2)、H5 株(例如, H5N1) 或 H7 株(例如, H7N7)。也可以产生掺入了 MDV 的 7 个基因组区段和所选病毒株的 HA 或 NA 基因的重配株(7:1 重配体)。此外,该系统可用于测定疫苗生产相关表型特征的分子基础,例如,减毒 (att)、冷适应性 (ca) 和温度敏感 (ts) 表型。

[0099] 5.1 定义

[0100] 除非另有定义,所有科学和技术术语应理解为与其所述领域通常使用的含义相同。出于本发明的目的,下列术语定义如下。

[0101] 术语“核酸”、“多核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核酸序列”指单链或双链脱氧核糖核酸或核糖核酸聚合物或其嵌合体或类似物。本文所用的术语还包括具有天然核苷酸基本特性的天然核苷酸类似物的聚合物,其中它们可以与天然核苷酸相似的方式与单链核酸杂交(例如,肽核酸)。除非另有说明,除了明确表明序列外,本发明的特定核酸序列还包括互补序列。

[0102] 术语“基因”广泛用于指与生物功能有关的任何核酸。因此,基因包括其表达所需的编码序列和/或调节序列。术语“基因”适用于特定基因组序列以及该基因组序列编码的 cDNA 和 mRNA。

[0103] 基因还包括非表达核酸区段,例如,形成其它蛋白的识别序列的核酸区段。非表达调节序列包括“启动子”和“增强子”,调节蛋白如转录因子与之结合可导致毗邻或附近的序列转录。“组织特异性”启动子或增强子是只能在一种或多种特定组织类型或细胞类型中调节转录的启动子或增强子。

[0104] “启动子”或“启动子序列”是在诸如培养或生理条件等条件下,当有合适的转录相关酶,例如 RNA 聚合酶存在时(酶是有功能的),能够启动与其操作性连接的核酸序列转录的 DNA 调节区。启动子可位于其所启动转录的核酸序列的上游或下游。位于 cDNA 上游的启动子序列在其 3' 末端与转录起始位点连接并向上游(5' 方向)延伸从而包括在背景之上的可检测水平启动转录所必需的极少几个碱基或元件。位于 cDNA 下游的启动子序列(表达(-)RNA)在其 5' 末端与转录起始位点连接并向下游(3' 方向)延伸从而包括在背景之上的可检测水平上启动转录所必需的极少几个碱基或元件。本发明的双向系统同时包含上游启动子和下游启动子;而单向系统只包含上游启动子。转录起始位点位于启动子序列内或其附近(可通过,例如用核酶 S1 作图来方便地加以确定),可能还包含能驱动、调节、增强或者负责 RNA 聚合酶结合的蛋白结合结构域(共有序列)。

[0105] 本文所用的“犬 RNA 聚合酶 I 调节序列”或“犬 RNA 聚合酶 I 调节元件”（或其功能活性片段）指在诸如培养或生理条件等条件下，当存在犬 RNA 聚合酶 I 和任选的相关转录因子时（酶是有功能的），能够增强与其操作性连接的核酸序列转录的核酸序列。犬 RNA 聚合酶 I 调节序列的例子包括犬 RNA 聚合酶 I 启动子，它可以使与其操作性连接的核酸转录水平达到背景水平以上；以及犬 RNA 聚合酶 I 增强子，它可以增强与犬 RNA 聚合酶 I 启动子操作性连接的核酸转录超过无犬 RNA 聚合酶 I 增强子存在时观察到的水平。鉴定犬 RNA 聚合酶 I 调节元件的一种实验是将与感兴趣核酸操作性连接的假定犬 RNA 聚合酶 I 调节元件引入合适的犬细胞，例如 MDCK 细胞，并采用常规试验，例如，Northern 印迹，检测感兴趣核酸的转录。比较有和没有假定的犬 RNA 聚合酶 I 调节元件存在下的核酸转录水平使得技术人员能够确定核酸元件是否是犬 RNA 聚合酶 I 调节元件。

[0106] 术语“载体”指核酸，例如可用于将异源核酸序列引入细胞的质粒、病毒载体、重组核酸或 cDNA。本发明载体通常包含本发明的调节序列。载体可以自主复制，或不能自主复制。载体还可以是不能自主复制的裸 RNA 多核苷酸、裸 DNA 多核苷酸、由同一条链内的 DNA 和 RNA 组成的多核苷酸、多聚赖氨酸偶联的 DNA 或 RNA、肽偶联的 DNA 或 RNA、脂质体偶联的 DNA 等。本发明最常见的载体是质粒。

[0107] “表达载体”是能够促进掺入其中的核酸表达（例如转录）的载体，如质粒。本发明表达载体一般包含本发明的调节序列。表达载体可以自主复制，或不能自主复制。待表达的核酸通常与启动子和 / 或增强子“操作性”连接，受启动子和 / 或增强子的转录调节控制。

[0108] “双向表达载体”的特征通常是含有两个启动子，二者相对于该两个启动子之间的核酸方向相反，从而能在两个方向上启动表达，进而导致，例如正 (+) 或有义链和负 (-) 或反义链 RNA 转录。或者，双向表达载体可以是双义载体，其中病毒 mRNA 和病毒基因组 RNA (cRNA) 从同一链上表达。

[0109] 就本发明而言，术语“分离的”指基本上不含在其天然环境中与其相伴或相互作用的组分的生物材料，如核酸或蛋白质。分离材料任选包括在其天然环境，例如细胞中未发现的材料。例如，如果材料处于其天然环境，例如细胞内，那么该材料在细胞内处于不是在该环境中天然发现该材料的位置（例如，基因组或遗传元件）。例如，如果通过非天然方式将天然核酸（例如，编码序列、启动子、增强子等）引入与该核酸天然所在位置不同的基因组位置（例如，载体，如质粒或病毒载体，或扩增子）中，那么这种天然核酸就变成分离的。这种核酸也称为“异源”核酸。

[0110] 术语“重组体”表明通过人为干预而发生人工改变或合成改变（非天然）的材料（例如，核酸或蛋白质）。可以对处于其天然环境或状态内的，或者从其天然环境或状态中取出的材料实施改变。具体地说，如果指病毒，例如流感病毒，则当通过表达重组核酸来产生病毒时，该病毒是重组体。

[0111] 当术语“重配株”指病毒时，其表明该病毒包含衍生自多个亲代病毒株或来源的遗传和 / 或多肽组分。例如，7:1 重配株包含衍生自第一亲代病毒的 7 个病毒基因组区段（或基因区段）和第二亲代病毒的一个补充病毒基因组区段，例如编码血凝素或神经氨酸酶的区段。6:2 重配株包含衍生自第一亲代病毒的 6 个基因组区段，最常见的是 6 个内部基因，以及不同亲代病毒的两个补充区段，例如血凝素和神经氨酸酶区段。

[0112] 当术语“引入”指源或分离核酸时,其指将核酸掺入真核或原核细胞,其中该核酸可以掺入细胞的基因组(例如,染色体、质粒、质体或线粒体 DNA),转化成自主复制子,或者瞬时表达(例如,转染的 mRNA)。该术语包括诸如“感染”、“转染”、“转化”和“转导”等方法。就本发明而言,可采用各种方法将核酸引入到原核细胞,包括电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质介导的转染(脂质转染)等。

[0113] 术语“宿主细胞”表示能够或者已经摄入核酸,例如载体并支持该核酸复制和/或表达并任选产生一种或多种编码产物,包括多肽和/或病毒的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,例如大肠杆菌,或真核细胞,如酵母、昆虫、两栖动物、鸟类或哺乳动物细胞,包括人细胞。就本发明而言,典型的宿主细胞包括 Vero(非洲绿猴肾)细胞、Per. C6 细胞(人视网膜细胞)、BHK(幼仓鼠肾)细胞、原代鸡肾(PCK)细胞、马-达二氏犬肾(MDCK)细胞、马-达二氏牛肾(MDBK)细胞、293 细胞(例如,293T 细胞)和 COS 细胞(例如,COS1、COS7 细胞)。术语宿主细胞包括细胞的组合或混合物,包括,例如,不同细胞类型或细胞系(例如,Vero 和 CEK 细胞)的混合培养物。例如,2004 年 12 月 22 日提交的 PCT/US04/42669 描述了共培养电穿孔的 SF Vero 细胞,该份申请通过引用全文纳入。

[0114] 本文所用的术语“人工改造的”表明病毒、病毒核酸或病毒编码产物,例如,多肽、疫苗,包含通过重组方法,例如定向诱变、PCR 诱变等引入至少一个突变。当表述“人工改造的”指包含一个或多个核苷酸突变和/或氨基酸取代的病毒(或病毒组分或产物)时,其表明编码病毒(或病毒组分或产物)的病毒基因组或基因组区段不是衍生自天然来源,例如通过非重组方法(例如在 25°C 累进传代(progressive passage))产生的天然病毒株或以前就存在的实验室病毒株,例如,野生型或冷适应的 A/Ann Arbor/6/60 或 B/AnnArbor/1/66 毒株。

[0115] 术语“%序列相同性”在本文中可与术语“%相同性”互换使用,其指利用序列比对程序进行比对时,两个或多个肽序列之间的氨基酸序列相同性水平,或者两个或多个核苷酸序列之间的核苷酸序列相同性水平。例如,本文所用的 80%相同性表示与指定算法所确定的 80%序列相同性同样的情况,其表示一给定序列与另一长度的另一序列有至少 80%相同。序列相同性的示范性水平包括但不限于与给定序列有 60、70、80、85、90、95、98%或更高的序列相同性。

[0116] 术语“%序列同源性”在本文中可与术语“%同源性”互换使用,其指利用序列比对程序进行比对时,两个或多个肽序列之间的氨基酸序列同源性水平,或者两个或多个核苷酸序列之间的核苷酸序列同源性水平。例如,在本文中,80%同源性表示与指定算法所确定的 80%序列同源性同样的情况,因此,给定序列的同源物在给定序列的长度上有 80%以上的序列同源性。序列同源性的示范性水平包括但不限于与给定序列有 60、70、80、85、90、95、98%或更高的序列同源性。

[0117] 可用于测定两个序列之间相同性的示范性计算机程序包括但不限于 BLAST 程序套件,例如 BLASTN、BLASTX、和 TBLASTX、BLASTP 和 TBLASTN,它们在 NCBI 网站对公众开放,可以在互联网上找到。还可参见 Altschul 等,1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10(可特别参考公开的默认设置,即,参数 $w = 4$, $t = 17$) 和 Altschul 等,1997, Nucleic Acids Res., 25 :3389-3402。如果要相对于 GenBank 蛋白序列和其它公开数据库中的氨基酸序列来评估某给定氨基酸序列的相同性,一般利用 BLASTP 程序进行序列检索。优选用 BLASTX 程序根

据 GenBank 蛋白序列和其它公开数据库中的氨基酸序列来检索所有读框均已翻译的核酸序列。BLASTP 和 BLASTX 都可采用默认参数运行,即开放空位罚分为 11.0,延伸空位罚分为 1.0,并利用 BLOSUM-62 矩阵。同上。

[0118] 为确定两个或多个序列之间的“% 相同性”,可利用 MacVector6.5 版本的 CLUSTAL-W 程序优选比对所选择的序列,该程序利用开放空位罚分 10.0,延伸空位罚分 0.1,和 BLOSUM 30 相似性矩阵运行。

[0119] “特异地杂交”或“特异性杂交”或“选择性地杂交”指复杂混合物(例如,总细胞的)DNA 或 RNA 中存在特定核苷酸序列时,在严格条件下核酸分子优先与该核苷酸序列结合、形成双链或杂交。

[0120] 术语“严格条件”指探针优先与其靶亚序列杂交,与其它序列杂交程度低或根本不杂交的条件。对于核酸杂交试验,例如 Southern 和 Northern 杂交,“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”是序列依赖性的,在不同的环境参数下有区别。对核酸杂交的更广泛指导见 Tijssen,1993, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* (生物化学和分子生物学实验室技术-用核酸探针杂交),第 I 部分,第 2 章,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays (杂交原则和核酸探针分析策略概述)”,纽约艾斯维尔 (Elsevier, NY); Sambrook 等,2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室手册),冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory),第三版,纽约;以及 Ausubel 等编,最新版本, *Current Protocols in Molecular Biology* (新编分子生物学方法),纽约格里恩出版合作和威利国际科学出版社 (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY)。

[0121] 在特定离子强度和 pH 下,高严格杂交和洗涤条件通常选择比特定序列的热解链温度 (T_m) 低约 5°C 的温度。 T_m 是 50% 靶序列与完美匹配的探针杂交时的温度(在特定的离子强度和 pH 下)。十分严格的条件选择等于特定探针的 T_m 。

[0122] 在 Southern 或 Northern 印迹中,在滤膜上杂交含有约 100 个以上互补残基的互补核酸的严格杂交条件的例子是 42°C 、含 1mg 肝素的 50% 福尔马林,杂交过夜。高严格洗涤条件的例子是 0.15M NaCl、 72°C 、约 15 分钟。严格洗涤条件的例子是 65°C 、 $0.2\times\text{SSC}$ 中洗涤 15 分钟。SSC 缓冲液 的描述可参见 Sambrook 等。在高严格洗涤之前可先进行低严格洗涤以去除背景探针信号。对于,例如约 100 个以上核苷酸的双链体,示范性的中等严格洗涤是 45°C 、 $1\times\text{SSC}$ 、15 分钟。对于,例如约 100 个以上核苷酸的双链体来说,示范性的低严格洗涤是 40°C 、 $4-6\times\text{SSC}$ 、15 分钟。在具体杂交试验中,信-噪比高于不相关探针所观察到的信-噪比 2 倍(或更高)说明检测到特异性杂交。

[0123] 除非另有指明,本文所用的术语“约”指在该术语所修饰数值以上或以下不超过 10% 的数值。例如,术语“约 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ”表示从 $4.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 到 $5.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围。另一个例子,“约 1 小时”表示从 48 分钟到 72 分钟的范围。

[0124] 本文所用的术语“编码”指核酸,例如脱氧核糖核酸转录互补核酸的特性,包括能翻译成多肽的核酸。例如,脱氧核糖核酸可编码从脱氧核糖核酸转录的 RNA。脱氧核糖核酸可类似地编码从脱氧核糖核酸所转录的 RNA 翻译的多肽。

[0125] 5.2 包含犬 RNA Pol I 调节元件的核酸

[0126] 一个实施方式提供包含本发明的犬 RNA 调节序列（例如，犬 RNA pol I 启动子）的分离核酸。调节序列可以，例如与待转录核酸操作性连接，体外或体内有合适蛋白存在下可转录。在一个实施方式中，与上述调节序列操作性连接的核酸是流感病毒 vRNA 区段。

[0127] 在某些方面，本发明提供包含犬 RNA pol I 启动子的分离核酸。犬 RNA pol I 启动子优选与待转录的核酸，例如流感病毒基因组 RNA 操作性连接。核酸引入犬细胞可导致流感病毒基因组 RNA 转录，在有合适流感病毒蛋白存在下，一种或多种 RNA 转录物可包装进流感病毒，例如感染性流感病毒。

[0128] 在某些实施方式中，本发明核酸包含能结合人、灵长类动物、小鼠或犬 pol I 多肽并与选自 SEQ ID No :1-28 的一个或多个核苷酸序列有至少或约 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、或 60% 相同性的犬 RNA pol I 调节序列或其片段。在一个实施方式中，RNA pol I 调节序列或其片段还保留启动与该核苷酸序列操作性连接的基因转录的能力。在某些实施方式中，本发明核酸包含与 SEQ ID No :29 所示序列有至少或约 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、或 60% 相同性的多核苷酸序列。

[0129] 此外，本发明核酸还包括含有犬 RNA pol I 启动子的核酸的衍生物。这种衍生物可通过本领域技术人员已知的任何方法（但不限于这些方法）从下文鉴定的犬 RNA pol I 调节序列制备。例如，可通过定点诱变制备衍生物，包括取代、插入或删除该核酸中 1、2、3、5、10 或更多个核苷酸。或者，可通过随机诱变制备衍生物。随机诱变核酸的方法包括在有 0.1mM MnCl₂ 和不平衡的核苷酸浓度存在下，在 PCR 反应中扩增核酸。这些条件增加了 PCR 反应中聚合酶的误掺入率，导致被扩增的核酸随机诱变。衍生的核酸优选保留了启动与该核苷酸序列操作性连接的基因转录的能力。在某些实施方式中，本发明的核酸包含选自 SEQ ID No :1-28 的一个或多个核苷酸序列的至少约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000 个连续核苷酸。核酸优选包含在犬细胞内能启动与该核苷酸序列操作性连接的基因转录的序列，因此是功能衍生物。在一个实施方式中，核酸包含能在犬细胞内结合犬 pol I 多肽并启动（体外或体内）流感病毒 vRNA 转录的序列。一个实施方式提供包含 SEQ ID NO :26 所示序列的至少 250 个、或至少 350 个或至少 450 个连续核苷酸的分离核酸序列，其中当所述核酸序列与编码流感病毒 vRNA 的 cDNA 操作性连接并引入 MDCK 细胞时，其能指导所述流感病毒 vRNA 表达。另一实施方式提供包含与 SEQ ID NO :26 所示核苷酸序列有至少 80% 相同性的多核苷酸的分离核酸序列，其中当所述核酸序列与编码流感病毒 vRNA 的 cDNA 操作性连接并引入 MDCK 细胞时，其能指导所述流感病毒 vRNA 表达。另一实施方式提供包含能在严格杂交条件下与选自 SEQ ID NO :1-26 的核酸杂交的多核苷酸的分离核酸序列，其中当所述核酸序列与编码流感病毒 vRNA 的 cDNA 操作性连接并引入 MDCK 细胞时，其能指导所述流感病毒 vRNA 表达。在某些实施方式中，本发明的核酸包含 SEQ ID No :29 的至少约 400、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、2000 或 3000 个连续核苷酸。

[0130] 在某些实施方式中,本发明的核酸序列包含 SEQ ID NO:1 所示序列的核苷酸 -469 到 -1 (与从启动子转录的第一个核苷酸,也称为 +1 核苷酸有关) 或其功能衍生物,或者由这些核苷酸组成。在其它实施方式中,本发明的核酸序列包含 SEQ ID NO:1 所示序列的核苷酸 -250 到 -1 (与从启动子转录的第一个核苷酸,也称为 +1 核苷酸有关) 或其功能衍生物,或者由这些核苷酸组成。SEQ ID NO:1 上发现的从犬 RNA pol I 调节序列表达的 18S 核糖体 RNA 的 +1 核苷酸是 SEQ ID NO:1 的 1809 位的核苷酸。一个实施方式提供包含 SEQ ID NO:26 的核苷酸 1-469、其互补序列、其反向互补序列或其功能活性片段的核酸。

[0131] 本发明还提供 SEQ ID NO:1 (A. T. C. C. 登录号为 PTA-7540 的保藏克隆的核苷酸序列的亚序列) 的功能活性片段。因此,本发明还提供从 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的氨基末端删除了一个或多个核酸残基的多核苷酸。SEQ ID NO:1 的 N-末端缺失可以描述为通式 $m-3537$, 其中 m 是 2-3512 的整数, m 对应于在 SEQ ID NO:1 或保藏克隆 (A. T. C. C. 登录号 PTA-7540) 的核苷酸序列中鉴定的核苷酸位置。本发明还提供从 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列的羧基末端删除了一个或多个核酸残基的多核苷酸。SEQ ID NO:1 的 C-末端缺失可以描述为通式 $1-n$, 其中 n 是 2-3512 的整数, n 对应于在 SEQ ID NO:1 或保藏克隆 (A. T. C. C. 登录号 PTA-7540) 的核苷酸序列中鉴定的核苷酸位置。

[0132] 本发明还提供 SEQ ID NO:26 (保藏克隆的核苷酸序列的亚序列, A. T. C. C. 登录号 PTA-7540) 的功能活性片段。因此,本发明还提供从 SEQ ID NO:26 所示核苷酸序列的氨基末端删除了一个或多个核酸残基的多核苷酸。SEQ ID NO:26 的 N-末端缺失可以描述为通式 $m-469$, 其中 m 是 2-450 的整数, m 对应于在 SEQ ID NO:26 中鉴定的核酸残基的位置。本发明还提供从 SEQ ID NO:26 所示核苷酸序列的羧基末端删除了一个或多个核酸残基的多核苷酸。SEQ ID NO:26 的 C-末端缺失可以描述为通式 $1-n$, 其中 n 是 2-450 的整数, n 对应于在 SEQ ID NO:26 中鉴定的核酸残基的位置。

[0133] 在某些实施方式中,本发明的犬 RNA pol I 调节序列包含分离的核酸 (或其互补序列), 或者由其构成, 其中分离的核酸在严格杂交条件下可与包含选自 SEQ ID No:1-28 的核酸杂交并能在犬细胞内启动与该调节序列操作性连接的基因转录。

[0134] 在一个实施方式中,本发明的犬 RNA pol I 调节序列包含能与犬 RNA pol I 多肽结合并能 (在一个实施方式中) 在犬细胞内启动与该调节序列操作性连接的基因转录的核酸序列。在一个实施方式中,核酸包含能结合真核细胞 pol I 多肽并能启动 (体外或体内) 流感病毒 vRNA 转录的序列。在某些实施方式中,犬 RNA pol I 多肽与犬 RNA pol I 调节序列的结合可通过核酶保护实验来检定。在某些实施方式中,犬 RNA pol I 多肽与犬 RNA pol I 调节序列的结合可通过瑞典乌普萨拉巴尔科国际公司的 BIACORE 系统 (Biacore International AG, Uppsala, Sweden) 来检定以评估蛋白质相互作用。

[0135] 在某些实施方式中,所述核酸包含能结合犬 RNA pol I 的序列。在某些实施方式中,所述序列和犬 RNA pol I 结合的亲和力高于和选自下组的 RNA 聚合酶结合的亲和力: 灵长类 RNA pol I、人 pol I 和小鼠 pol I。在某些实施方式中,所述序列和犬 RNA pol I 结合的亲和力高于和犬 RNA pol II 结合的亲和力。在某些实施方式中,所述序列和犬 RNA pol I 结合的亲和力高于和犬 RNA pol III 结合的亲和力。在某些实施方式中,与犬 RNA pol I 调节序列的结合可通过瑞典乌普萨拉巴尔科国际公司的 BIACORE 系统来检定以评估蛋白质相互作用。

[0136] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0137] ATTCCCGGTGAGGCTGCCTCTGCCGCGGTGGCCCTCCACCTCCCCTGGCCCCGAGCCGGGGTTGGGGA
CGGCGGTAGGCACGGGGCGGTCTGAGGGCCGCGGGGACGGCCTCCGCACGGTGCCTGCCTCCGGAGAACTTTGA
TGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGC
GTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGCGTATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGA
CCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGT
GTCACGGTCCCGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCGAGAT
GAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGT (SEQ ID NO :26), 该序列是 A. T. C. C. 登录号 PTA-7540 的保藏
克隆的核苷酸序列的亚序列。

[0138] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0139] TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGC
GTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGTATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGG
GTGACACAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGC
CGTGTACGGTCCCGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCGAGA
TGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SEQ ID NO :2)。

[0140] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0141] TTGATGATTTTTCAAAGTCTCCTCCCGGAGATCACTGGCTTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGC
GCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGTATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCC
TGGGTGACACAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTT
GGCCGTGTACGGTCCCGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCG
AGATGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SEQ ID NO :20)。

[0142] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0143] GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGG
TCCCGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCGAGATGAACATTT
TTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SEQ ID NO :3)。

[0144] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0145] GCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGGTCCCGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCT
GGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCGAGATGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SE
Q ID NO :4)。

[0146] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0147] TGGCCGTGTACGGTCCCGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTT
TCTTGCCCGAGATGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SEQ ID NO :5)。

[0148] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0149] GTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGCAGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCGAGATGAACATTTTTTGTG
CAGGTAGGTGCTGACA (SEQ ID NO :6)。

[0150] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0151] AGGCGCGTTATTTTTCTTGCCCGAGATGAACATTTTTTGTGCCAGGTAGGTGCTGACA (SEQ ID
NO :7)。。

[0152] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0172] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0173] GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATCGCCCCCTCCTCCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGGTGGGGGGCGCCGTGGG GCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGC GCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :13)。

[0174] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0175] GGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGGCGTGGCGTCTCCACCGACCGGTATCGCCCCCTCCTCCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGGTGGGGGGCGCCGTGG GGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGG CGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :27)。

[0176] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0177] GCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCGACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGG TGGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCT GTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :14)。

[0178] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0179] GGGCTCCGTGGGGTGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGG TCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO : 15)。

[0180] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0181] GCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTG TCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :16)。

[0182] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0183] TGGCCGTGTACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTT TCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :17)。

[0184] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0185] GGCGTGGCGTCTCCACCGACCCGTATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCG ACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGT GTACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :18)。

[0186] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0187] GGCGTGGCGTCTCCACCGACCGGTATCGCCCCCTCCTCCCCTCCCCCCCCCCCCCGTTCCCTGGGTCG ACCAGATAGCCCTGGGGGCTCCGTGGGGTGGGGGTGGGGGGCGCCGTGGGGCAGGTTTTGGGGACAGTTGGCCGTG TCACGGTCCCGGGAGGTCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO :28)。

[0188] 在某些实施方式中,犬 RNA pol I 启动子包含以下核苷酸序列,或由其构成:

[0189] TCGCGGTGACCTGTGGCTGGTCCCCGCCGGCAGGCGCGGTTATTTTCTTGCCCGAG (SEQ ID NO : 19)。

[0190] 5.3 载体和表达载体

[0191] 在另一方面,本发明提供包含本发明核酸的载体,包括用于从细胞培养物重组拯

救病毒的表达载体。表达载体通常可用于拯救本领域技术人员已知的任何病毒,这些病毒要求在其生命周期中产生具有确定末端的 RNA。例如,如上所述,流感病毒基因组 RNA 应该含有确定的 5' 和 3' 末端,从而能在重组系统内有效复制和包装。也可参见通过引用方式纳入本文的 Neumann 等, (2002), 83 :2635-2662 的综述。以下讨论集中在适用于流感(病毒)的表达载体;但应当注意其它病毒也可利用本发明的载体拯救。

[0192] 按照本发明,在一个实施方式中,可将编码病毒基因组 RNA 的 cDNA 插入表达载体,从而能操作和产生流感病毒,所述 RNA 对应于流感病毒 8 个基因组区段(区段可来自不同的流感病毒,例如,6 个来自毒株 X, 2 个来自毒株 Y) 中每一个区段。包括病毒载体、质粒、粘粒、噬菌体和人工染色体在内的各种载体可用于本发明。为便于操作,一般将 cDNA 插入质粒载体内,这种载体提供能在细菌和真核细胞内起作用的一个或多个复制起点和任选的便于筛选或选择包含质粒序列的细胞的标记。参见,例如 Neumann 等,1999, PNAS. USA 96 : 9345-9350。

[0193] 在一个实施方式中,本发明载体是能在任一方向上从插入的 cDNA 启动病毒基因组区段转录的双向表达载体,这就是说,产生 (+) 链和 (-) 链 RNA 分子。为进行双向转录,各病毒基因组区段都插入含有至少两个独立启动子的表达载体内,从而第一 RNA 聚合酶启动子(例如犬 RNA pol I 启动子)可从一条链转录病毒基因组 RNA 拷贝,从第二 RNA 聚合酶启动子(例如,在犬细胞内能通过 RNA pol II 启动转录的犬 RNA Pol II 启动子或其他启动子)合成病毒 mRNA。因此,两个启动子可以相对方向排列,侧接至少一个克隆位点(即,限制性酶识别序列),优选适于插入病毒基因组 RNA 区段的独特克隆位点。或者,也可使用“双义”表达载体,其中 (+) 链 mRNA 和 (-) 链病毒 RNA (cRNA) 从载体的同一链转录。如上所述,用于转录病毒基因组 RNA 的 pol I 启动子优选犬 pol I 启动子。

[0194] 为确保表达的各 vRNA 或 cRNA 具有确切的 3' 端,各 vRNA 或 cRNA 表达载体可以在 RNA 编码序列下游插入核酶序列或合适的终止子序列(例如,人、小鼠、灵长类动物或犬 RNA 聚合酶 I 终止序列)。这种序列可以是,例如肝炎 δ 病毒基因组核酶序列或其功能衍生物,或者鼠科 rDNA 终止子序列(Genbank 登录号 M12074)。或者,例如可用 Pol I 终止子序列(Neumann 等,1994, Virology 202 :477-479)。可以与以下文献所述的 vRNA 表达载体相同的方式构建 RNA 表达载体:Pleschka 等,1996, J. Virol. 70 :4188-4192 ;Hoffmann 和 Webster,2000, J. Gen Virol. 81 :2843-2847 ;Hoffmann 等,2002, Vaccine 20 :3165-3170 ;Fodor 等,1999, J. Virol. 73 :9679-9682 ;Neumann 等,1999, P. N. A. S. USA 96 :9345-9350 ;和 Hoffmann 等,2000, Virology 267 :310-317,各篇文献通过引用的方式全文纳入本文。

[0195] 在其它系统中,pol I 和 pol II 启动子转录的病毒序列可以转录自不同的表达载体。在这些实施方式中,可以使用编码在本发明犬调节序列,例如犬 pol I 启动子控制下的各病毒基因组区段的载体(“vRNA 表达载体”)和编码在 pol II 启动子控制下的一种或多种病毒多肽,例如流感 PA、PB1、PB2 和 NP 多肽的载体(“蛋白表达载体”)。

[0196] 对于 pol II 启动子,在各种情况下,待表达的流感病毒基因组区段可操作性连接于合适的转录控制序列(启动子)以指导 mRNA 合成。各种启动子适用于表达载体以调节流感病毒基因组区段的转录。某些实施方式利用巨细胞病毒(CMV)DNA 依赖性 RNA 聚合酶 II (Pol II) 启动子。如果需要,例如为调节有条件的表达,可以替换其它启动子以诱导在特定条件下,或者在特定组织或细胞内的 RNA 转录。现已有许多病毒和哺乳动物,例如人的

启动子可用,或者可根据所考虑具体应用分离这些启动子。例如,得自动物和人病毒的其它启动子包括,如腺病毒(如腺病毒 2)、乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒和多瘤病毒,以及各种逆转录病毒启动子等启动子。哺乳动物启动子包括但不限于:肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热激启动子等。在一具体实施方式中,调节序列包括与人腺病毒 2 的剪接三联前导序列相连的腺病毒 2 主要晚期启动子,如 Berg 等(Bio Techniques 14 :972-978)所述。此外,噬菌体启动子也可以和关联 RNA 聚合酶联用,例如 T7 启动子。

[0197] 用于表达病毒蛋白,特别是形成 RNP 复合物的病毒蛋白的表达载体优选表达与所需病毒同源的病毒蛋白。这些表达载体所表达的病毒蛋白可被本领域技术人员已知的任何调节序列调节。调节序列可以是组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子。蛋白表达载体中可用于控制病毒蛋白表达的启动子的其它例子包括但不限于:SV40 早期启动子区(Bernoist 和 Chambon,1981, Nature 290 :304-310)、包含在 Rous 肉瘤病毒的 3' 长末端重复序列中的启动子(Yamamoto 等,1980, Cell 22 :787-797)、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等,1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :1441-1445)、金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster 等,1982, Nature 296 :39-42);原核表达载体如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff 等,1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 :3727-3731),或 tac 启动子(DeBoer 等,1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 :21-25);也可参见“Useful proteins from recombinant bacteria(重组细菌来源的有用蛋白)”,刊于 Scientific American(科学美国),1980,242 :74-94;包含胭脂氨酸合成酶启动子区(Herrera-Estrella 等, Nature 303 :209-213)或花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子(Gardner 等,1981, Nucl. Acids Res. 9 :2871)的植物表达载体,以及光合酶二磷酸核酮糖羧化酶的启动子(Herrera-Estrella 等,1984, Nature 310 :115-120);酵母或其它真菌的启动子元件如 Gal 4 启动子、ADC(乙醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、碱性磷酸酶启动子以及下列动物转录控制区,这些转录控制区都显示组织特异性并已用于转基因动物:在胰腺腺泡细胞内有活性的弹性蛋白酶 I 基因控制区(Swift 等,1984, Cell 38 :639-646;Omitz 等,1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50 :399-409;MacDonald,1987, Hepatology7 :425-515);在胰腺 β 细胞内有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan,1985, Nature 315 :115-122),在淋巴样细胞内有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl 等,1984, Cell 38 :647-658;Adames 等,1985, Nature 318 :533-538;Alexander 等,1987, Mol. Cell. Biol. 7 :1436-1444),在睾丸细胞、乳腺细胞、淋巴样细胞和肥大细胞内有活性的小鼠乳头瘤病毒控制区(Leder 等,1986, Cell 45 :485-495),在肝脏内有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert 等,1987, Genes and Devel. 1 :268-276),在肝脏内有活性的甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf 等,1985, Mol. Cell. Biol. 5 :1639-1648;Hammer 等,1987, Science235 :53-58),在肝脏内有活性的 α 1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey 等,1987, Genes and Devel. 1 :161-171),在髓样细胞内有活性的 β 球蛋白基因控制区(Mogram 等,1985, Nature 315 :338-340;Kollias 等,1986, Cell 46 :89-94);在脑的少突胶质细胞内有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead 等,1987, Cell 48 :703-712),在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链 2 基因控制区(Sani,1985, Nature 314 :283-286),和在下丘脑内有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason 等,1986, Science 234 :1372-1378)。

[0198] 在一具体实施方式中,本发明的蛋白表达载体包含与核酸序列操作性连接的启动

子、一个或多个复制起点、以及任选的一个或多个可选标记（例如抗生素抗性基因）。在另一实施方式中，本发明的蛋白表达载体能够产生双顺反子 mRNA，可通过插入双顺反子 mRNA 序列来制备这种载体。可以利用某些内部核糖体进入位点（IRES）序列。优选的 IRES 元件包括但不限于哺乳动物 BiP IRES 和丙型肝炎病毒 IRES。

[0199] 在一个实施方式中，可将本发明核酸插入质粒 pAD3000 或其衍生物内。参见美国专利申请公布 20050266026 和图 10。因此，在某些实施方式中，表达载体是双向表达载体。在某些实施方式中，表达载体包含侧接两个启动子内的流感病毒基因组区段的 SV40 聚腺苷酸化信号。在某些实施方式中，表达载体包含巨细胞病毒（CMV）DNA 依赖性 RNA Pol II 启动子。在一个实施方式中，可将本发明核酸插入质粒 pAD4000 或其衍生物内。在一个实施方式中，本发明核酸包含 SEQ ID NO:29 所示 pAD4000 的序列或由其构成。

[0200] 可以通过，例如三种通用方法鉴定包含插入基因的载体：(a) 核酸杂交；(b) 存在或不存在“标记”基因功能；和，在表达载体的情形下，(c) 插入序列的表达。在第一种方法中，可以利用包含插入基因同源序列的探针，通过核酸杂交检测载体内是否存在插入的病毒基因。在第二种方法中，可以根据是否存在由于基因插入载体而产生的某些“标记”基因功能（例如，抗生素耐药和转化表型）来鉴定和选择重组载体/宿主系统。在第三种方法中，可以通过检验表达的基因产物来鉴定表达载体。这种检验可依据，例如病毒蛋白在体外检验系统中的物理或功能特性，例如病毒蛋白与抗体的结合来进行。

[0201] 在一具体实施方式中，一种或多种蛋白表达载体编码和表达 RNP 复合物形成所必需的病毒蛋白。在另一实施方式中，一种或多种蛋白表达载体编码和表达形成病毒颗粒所必需的病毒蛋白。在另一实施方式中，一种或多种蛋白表达载体编码和表达特定负链 RNA 病毒的所有病毒蛋白。

[0202] 可任选通过纳入增强子序列来增强表达载体的转录。增强子通常较短，例如 10-500bp，能与启动子协同作用以增强转录的顺式作用 DNA 元件。已经从哺乳动物基因（血红蛋白、弹性酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素）和真核细胞病毒中分离出许多增强子序列。可以将增强子剪接入载体中异源编码序列的 5' 或 3' 端的位置，但通常插入启动子 5' 端的位点。通常选择启动子和（如果需要）其它转录增强序列以优化引入异源 DNA 在宿主细胞类型中的表达（Scharf 等（1994），“Heat stress promoters and transcription factors（热应激启动子和转录因子）”Results Probl Cell Differ 20: 125-62；Kriegler 等（1990），Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to controlexpression of transferred genes（装配增强子、启动子和剪接信号以控制所转移基因的表达）Methods in Enzymol 185:512-27）。扩增子还可任选包含用于启动翻译的核糖体结合位点或内部核糖体进入位点（IRES）。

[0203] 本发明的表达载体还可包含用于转录终止和稳定 mRNA 的序列，例如聚腺苷酸化位点或终止序列（例如，人、小鼠、灵长类动物或犬 RNA 聚合酶 I 终止序列）。这种序列通常存在于真核细胞或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' 和（偶尔）3' 非翻译区。在某些实施方式中，SV40 聚腺苷酸化序列提供聚腺苷酸化信号。

[0204] 此外，如上所述，载体还可包含一个或多个可选标记基因以选择转化的宿主细胞的表型特征，除了上述基因外，例如二氢叶酸还原酶或新霉素耐药性等标记也适合于在真核细胞培养物中选择。

[0205] 可利用包含上述合适 DNA 序列以及合适启动子或控制序列的表达载体转化允许蛋白表达的宿主细胞。虽然本发明的表达载体可以在细菌细胞内复制,但为了表达,最常见的是优选将其引入哺乳动物细胞内,例如 Vero 细胞、BHK 细胞、MDCK 细胞、293 细胞、COS 细胞,更优选 MDCK 细胞。

[0206] 本发明的表达载体可用于指导包含一个或多个突变(例如,去除特定流感大流行毒株如 H5N1 的 HA 基因中多碱基切割位点或使之灭活)的基因组 vRNA 或相应的 cRNA 表达。这些突变可导致病毒减毒。例如,vRNA 区段可以是在柄柄样双链启动子区域中含有减毒碱基对取代,特别是,例如 NA 特异性 vRNA 的双链区中 11-12' 位的 A 取代 C 和 U 取代 G 的已知减毒碱基对取代的甲型流感病毒的 vRNA 区段(Fodor 等,1998, J. Virol. 6923-6290)。采用本发明方法产生重组负链 RNA 病毒,可以鉴定新的减毒突变。

[0207] 此外,美国专利号 6,951,754、6,887,699、6,649,372、6,544,785、6,001,634、5,854,037、5,824,536、5,840,520、5,820,871、5,786,199 和 5,166,057 以及美国专利申请公布号 20060019350、20050158342、20050037487、20050266026、20050186563、20050221489、20050032043、20040142003、20030035814 和 20020164770 中描述的任何表达载体都可用于本发明。通过将本文所述的本发明核酸(例如,本发明的犬调节序列如犬 pol I 启动子序列)引入表达载体以指导病毒 vRNA 或 cRNA 合成,可改造这些出版物描述的载体使之适用于本发明。

[0208] 5.3.1 其它表达元件

[0209] 最常见的是,编码流感病毒蛋白的基因组区段包含其表达(包括翻译成功能性病毒蛋白)所需的任何其它序列。在其它情形中,可以使用编码病毒蛋白,例如 HA 或 NA 蛋白的微小基因或其它人工构建体。在这种情况下,通常优选包含有助于异源编码序列有效翻译的特异性起始信号。这些信号包括,例如,ATG 起始密码子及其毗邻序列。为了确保翻译完整的插入片段,将起始密码子插入相对于病毒蛋白正确的读框中。外源转录元件和起始密码子可以是各种来源,可以是天然及合成的。通过将合适的增强子插入所用的细胞系统可提高表达效率。

[0210] 如果需要,可将编码其它表达元件,如信号序列、分泌或定位序列等的多核苷酸序列掺入载体,这些序列通常与感兴趣的基因同框,例如以使多肽表达靶向所需细胞隔室、膜或细胞器,或者进入细胞培养基。这种序列是技术人员已知的,包括分泌前导肽、细胞器靶向序列(例如,核定位序列、ER 保留信号(ER retention signal)、线粒体转运序列)、膜定位/锚定序列(例如,终止转运序列,GPI 锚定序列)等。

[0211] 5.4 制备嵌合病毒的表达载体

[0212] 还可利用本发明表达载体制备能表达病毒基因组的异源序列的嵌合病毒。将指导 vRNA 或相应 cRNA 表达的表达载体与指导病毒蛋白表达的表达载体一起引入宿主细胞以产生新型感染性重组负链 RNA 病毒或嵌合病毒。参见,例如美国专利申请公布号 US20040002061。可经工程改造插入这些病毒的异源序列包括反义核酸和核酸,如核酶。或者,可将表达肽或多肽的异源序列工程改造插入这些病毒。可将编码以下肽或多肽的异源序列工程改造插入这些病毒:1) 病原体的特征性抗原;2) 自身免疫病的特征性抗原;3) 变应原的特征性抗原;和 4) 肿瘤的特征性抗原。例如,可经工程改造而插入本发明嵌合病毒的异源基因序列包括但不限于:人免疫缺陷病毒(HIV)的表位如 gp160;乙型肝炎病毒表面

抗原 (HbsAg) ; 疱疹病毒的糖蛋白 (例如, gD、gE) ; 脊髓灰质炎病毒的 VP1 ; 和非病毒病原体, 如细菌和寄生虫 (只是举例) 的抗原决定簇。

[0213] 自身免疫病的特征性抗原通常衍生自哺乳动物组织的细胞表面、细胞质、细胞核、线粒体等, 包括糖尿病、多发性硬化症、系统红斑狼疮、类风湿性关节炎、恶性贫血、阿狄森氏病、硬皮病、自身免疫性萎缩性胃炎、青少年糖尿病和盘状红斑狼疮的特征性抗原。

[0214] 作为变应原的抗原通常是蛋白或糖蛋白, 包括衍生自花粉、粉尘、霉、孢子、皮屑、昆虫和食物的抗原。

[0215] 肿瘤抗原的特征性抗原通常衍生自肿瘤组织细胞的细胞表面、细胞质、细胞核、细胞器等。例子包括肿瘤蛋白的特征性抗原, 包括突变的癌基因编码的蛋白 ; 肿瘤相关的病毒蛋白 ; 和糖蛋白。肿瘤包括但不限于源自以下癌症类型的那些肿瘤 : 唇癌、鼻咽癌、咽和口腔癌、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胆囊癌、胰腺癌、喉癌、肺和支气管癌、皮肤黑色素瘤、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、膀胱癌、肾癌、子宫癌、脑和神经系统其它部位的癌、甲状腺癌、前列腺癌、睾丸癌、何杰金病、非何杰金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和白血病。

[0216] 在本发明一具体实施方式中, 异源序列衍生自人免疫缺陷病毒 (HIV), 优选人免疫缺陷病毒 -1 或人免疫缺陷病毒 -2 的基因组。在本发明的另一实施方式中, 可将异源编码序列插入负链 RNA 病毒基因编码序列, 从而可表达病毒蛋白内包含异源肽序列的嵌合基因产物。在本发明的这种实施方式中, 异源序列还可衍生自人免疫缺陷病毒, 优选人免疫缺陷病毒 -1 或人免疫缺陷病毒 -2 的基因组。

[0217] 在异源序列衍生自 HIV 的例子中, 这种序列包括但不限于 : 衍生自 env 基因 (即, 编码全长或一部分 gp160、gp120 和 / 或 gp41 的序列)、pol 基因 (即, 编码全长或一部分反转录酶、核酸内切酶、蛋白酶和 / 或整合酶的序列)、gag 基因 (即, 编码全长或一部分 p7、p6、p55、p17/18、p24/25 的序列)、tat、rev、nef、vif、vpu、vpr 和 / 或 vpx 的序列。

[0218] 构建这些杂交分子的一种方法是将异源编码序列插入负链 RNA 病毒基因的互补 DNA, 使异源序列侧接病毒聚合酶活性所需的病毒序列, 例如, 犬 RNA pol I 启动子和多腺苷酸化位点。在另一种方法中, 可将编码犬 RNA pol I 启动子的寡核苷酸 (例如病毒基因组区段 3' 端或两端的互补物 (complement)) 与异源编码序列连接以构建杂交分子。从前, 将外源基因或外源基因某区段放置在靶序列内受限于靶序列内是否存在合适的限制性酶切位点。但是最近在分子生物学上的进展已极大减轻了该问题。通过定点诱变不难将限制性酶切位点置于靶序列的任何位置 (例如, 参见例如 Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 :488 描述的技术)。所描述的聚合酶链式反应 (PCR) 技术的改进形式也能特异性地插入序列 (即, 限制性酶切位点) 并易于构建杂交分子。或者, PCR 反应可用于制备重组模板而无需克隆。例如, 可采用 PCR 反应制备包含 DNA 指导型 RNA 聚合酶的启动子 (例如, 噬菌体酶 (bacteriophage) T3、T7 或 SP6) 的双链 DNA 分子及包含异源基因和犬 RNA pol I 启动子的杂交序列。然后可以从该重组 DNA 直接转录 RNA 模板。在另一实施方式中, 可利用 RNA 连接酶将指明异源基因极性的 RNA 与犬 RNA pol I 启动子相连而制备重组 vRNA 或相应的 cRNA。

[0219] 可以构建双顺反子 mRNA, 从而能内部启动病毒序列的翻译并从规则末端起始位点表达外源蛋白编码序列。或者, 可以构建双顺反子 mRNA 序列, 其中从规则末端开放读框翻译病毒序列, 而从内部位点起始外源序列 (的翻译)。可以利用某些内部核糖体进入位点

(IRES) 序列。所选择的 IRES 序列应该足够短从而不会干扰病毒包装限制。因此,选择用于这种双顺反子方法的 IRES 长度优选不超过 500 个核苷酸,更优选少于 250 个核苷酸。此外,所用的 IRES 优选与小核糖核酸病毒元件不具有序列或结构同源性。优选的 IRES 元件包括但不限于:哺乳动物 BiP FRES 和丙型肝炎病毒 IRES。

[0220] 或者,可以从内部转录单位表达外源蛋白,其中转录单位含有起始位点和聚腺苷酸化位点。在另一实施方式中,将外源基因插入负链 RNA 病毒基因,从而得到的表达蛋白是融合蛋白。

[0221] 5.5 产生重组病毒的方法

[0222] 本发明提供在没有辅助病毒存在下,将本发明的蛋白表达载体和表达 vRNA 或相应 cRNA 的表达载体引入宿主细胞以产生感染性重组负链 RNA 病毒的方法。宿主细胞优选犬细胞,例如 MDCK 细胞。本发明还提供在有辅助病毒存在下,将本发明的蛋白表达载体和表达 vRNA 或相应 cRNA 的表达载体引入宿主细胞以产生感染性重组负链 RNA 病毒的方法。宿主细胞可以是,例如犬细胞(如 MDCK 细胞)、Vero 细胞、Per. C6 细胞、BHK 细胞、PCK 细胞、MDCK 细胞、MDBK 细胞、293 细胞(如 293T 细胞)和 COS 细胞。

[0223] 可以利用本领域技术人员已知的任何技术(但不限于这些技术)将蛋白表达载体和指导 vRNA 或相应 cRNA 表达的载体引入宿主细胞。例如,本发明的表达载体可以采用电穿孔、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂质体、显微注射和微粒轰击引入宿主细胞(参见,例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室手册),第二版,1989,纽约冷泉港冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.))。本发明的表达载体可以同时或依次引入宿主细胞。

[0224] 在一个实施方式中,先将指导 vRNA 或相应 cRNA 表达的一个或多个表达载体引入宿主细胞,再引入指导病毒蛋白表达的载体。在另一实施方式中,先将指导病毒蛋白表达的一个或多个表达载体引入宿主细胞,再引入指导 vRNA 或相应 cRNA 表达的一个或多个表达载体。根据这些实施方式,指导 vRNA 或相应 cRNA 表达的载体可一起引入或在不同的转染中分别引入。此外,根据这些实施方式,指导病毒蛋白表达的载体可一起引入或在不同的转染中分别引入。

[0225] 在另一实施方式中,可将指导 vRNA 或相应 cRNA 表达的一个或多个表达载体与指导病毒蛋白表达的一个或多个表达载体同时引入宿主细胞。在某些实施方式中,可利用脂质体将所有表达载体引入宿主细胞。

[0226] 一个实施方式提供产生重组流感病毒的方法,包括将表达载体引入犬细胞群,所述表达载体能在所述细胞中表达基因组 vRNA 区段,从而能提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段,其中所述表达载体包含 SEQ ID NO:26 的核苷酸 1-469,或其功能活性片段;(b) 将表达载体引入所述细胞,所述表达载体能表达编码所述病毒的一种或多种感兴趣多肽的 mRNA;和 (c) 培养所述细胞,从而产生流感病毒颗粒。在一个实施方式中,将所述细胞培养 48-72 小时产生的流感病毒颗粒滴度是至少 1.0×10^4 PFU/ml 或至少 1.0×10^5 PFU/ml。

[0227] 一个实施方式提供产生重组流感病毒的方法,该方法包括将表达载体引入犬细胞群,所述表达载体能在所述细胞中表达基因组 vRNA 区段,从而能提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段,其中所述表达载体包含 SEQ ID NO:26 的核苷酸 1-469,或其功能活性片段;(b) 将表达载体引入所述细胞,所述表达载体能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的

mRNA ;和 (c) 培养所述细胞,从而产生流感病毒颗粒。在一个实施方式中,将所述细胞培养 48-72 小时产生的流感病毒颗粒滴度是至少 1.0×10^4 PFU/ml 或至少 1.0×10^5 PFU/ml。

[0228] 常规实验可以确定用于实施本发明方法的表达载体的合适数量和比例。作为指导,以采用脂质体转染或磷酸钙沉淀将质粒引入宿主细胞为例,估计各质粒优选使用几微克,例如 1-10 μ g,例如先稀释到最终 DNA 总浓度为约 0.1 μ g/ml,再以常规方式与转染剂混合。表达 NP 和 / 或 RNA 依赖性 RNA 聚合酶亚单位的载体的浓度优选高于表达 vRNA 区段的那些载体。本领域技术人员应知道表达载体的数量和比例可以根据宿主细胞而有所不同。

[0229] 在一个实施方式中,将至少 0.5 μ g, 优选至少 1 μ g、至少 2.5 μ g、至少 5 μ g、至少 8 μ g、至少 10 μ g、至少 15 μ g、至少 20 μ g、至少 25 μ g 或至少 50 μ g 的一种或多种本发明蛋白表达载体引入宿主细胞内以产生感染性重组负链 RNA 病毒。在另一实施方式中,将至少 0.5 μ g, 优选至少 1 μ g、至少 2.5 μ g、至少 5 μ g、至少 8 μ g、至少 10 μ g、至少 15 μ g、至少 20 μ g、至少 25 μ g 或至少 50 μ g 的一种或多种指导 vRNA 或 cRNA 表达的本发明表达载体引入宿主细胞以产生感染性重组负链 RNA 病毒。

[0230] 用于产生本发明负链 RNA 病毒的宿主细胞包括原代细胞、培养的或次生细胞和转化的或无限增殖的细胞(例如,293 细胞、293T 细胞、CHO 细胞、Vero 细胞、PK、MDBK、OMK 和 MDCK 细胞)。宿主细胞优选动物细胞,更优选哺乳动物细胞,最优选犬细胞。在一个优选实施方式中,本发明的感染性重组负链 RNA 病毒在 MDCK 细胞中产生。

[0231] 本发明提供在稳定转导的宿主细胞系中产生感染性重组负链 RNA 病毒的方法。可通过将合适表达控制元件(例如,启动子、增强子序列、转录终止序列、聚腺苷酸化位点等)控制的 cDNA 和选择性标记引入到宿主细胞来产生本发明的稳定转导的宿主细胞系。引入外源 DNA 后,转导的细胞可在富集培养基中生长 1-2 天,然后转移至选择培养基。选择性标记赋予细胞耐受性,从而使得细胞能将 DNA 稳定整合入其染色体。可以克隆稳定整合 DNA 的转导宿主细胞并扩增成细胞系。

[0232] 可利用许多选择系统,包括但不限于:单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler 等,1977, Cell 11 :223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska 和 Szybalski,1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 :2026) 和腺嘌呤核酸核糖转移酶(Lowy 等,1980, Cell 22 :817) 基因,这些基因可分别用于 tk⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞中。抗代谢物耐受性也可用作选择以下基因的基础:dhfr 基因,产生对氨基蝶呤的耐受性(Wigler 等,1980, Natl. Acad. Sci. USA 77 :3567 ;0' Hare 等,1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :1527) ;gpt 基因,产生对霉酚酸的耐受性(Mulligan 和 Berg,1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :2072) ;neo 基因,产生对氨基糖苷 G-418 的耐受性(Colberre-Garapin 等,1981, J. Mol. Biol. 150 :1) ;和 hygro 基因,产生潮霉素的耐受性(Santerre 等,1984, Gene30 :147)。

[0233] 可通过,例如经典方法使本发明方法产生的非减毒、感染性重组负链 RNA 病毒减毒或灭活。例如,可通过热处理或福尔马林处理灭活本发明的重组负链 RNA 病毒,从而使得病毒不能复制。可通过,例如在非天然宿主内传代以产生具有免疫原性而无致病性的子代病毒,从而使本发明的非减毒、重组负链 RNA 病毒减毒。

[0234] 随后可将本发明产生的减毒活病毒或杀死的病毒以常规方式掺入疫苗组合物,或者用于生产额外病毒,例如,在鸡蛋中生产。如果这种病毒含有上述编码外源抗原的嵌合 vRNA 区段,其可以制成制剂以实现同时抵御多种病原体的免疫接种。还可为其它治疗用途,

例如抗肿瘤药物或基因治疗工具设计本发明产生的含有嵌合 vRNA 区段的减毒重组病毒,在这种情况下,产生病毒后可将其与药学上可接受的载体或稀释剂一起掺入合适的药物组合物。

[0235] 本发明的无辅助病毒拯救特别有利于产生重配株病毒,尤其是疫苗所需的重配株流感病毒,因为不需要通过选择方法来除去辅助病毒培养物。

[0236] 可以改进本发明方法以结合本领域技术人员熟知方法的各方面,从而提高拯救感染性病毒颗粒的效率。例如,反向遗传技术包括制备含有负链病毒 RNA 的非编码区的合成重组病毒 RNA,这种非编码区是病毒聚合酶识别和产生成熟病毒体所需的包装信号所必须的。重组 RNA 可以从重组 DNA 模板合成并在体外与纯化的病毒聚合酶复合物重建形成可用于转染细胞的重组核糖核蛋白 (RNP)。如果在合成 RNA 的体外或体内转录期间存在病毒聚合酶蛋白,那么就可以达到更有效率的转染。可将合成的重组 RNP 拯救入感染性病毒颗粒中。以下文献描述了在先技术:1992年11月24日授权的美国专利号 5,166,057;1998年12月29日授权的美国专利号 5,854,037;1998年8月4日授权的美国专利号 5,789,229;1996年2月20日公开的欧洲专利公开 EP 0702085A1;美国专利申请序列号 09/152,845;1997年4月3日公布的国际专利公布 PCR WO 97/12032;1996年11月7日公布的 WO 96/34625;欧洲专利公开 EP-A780475;1999年1月21日公布的 WO 99/02657;1998年11月26日公布的 WO 98/53078;1998年1月22日公布的 WO 98/02530;1999年4月1日公布的 WO 99/15672;1998年4月2日公布的 WO 98/13501;1997年2月20日公布的 WO 97/06720;和1997年6月25日公布的 EPO 780 475A1,各篇文献通过引用的方式全文纳入本文。

[0237] 5.5.1 区段化负链 RNA 病毒的具体实施方式

[0238] 本发明提供在培养细胞中产生具有 3 个以上基因组 vRNA 区段的区段化负链 RNA 病毒的感染性重组病毒颗粒的方法,所述负链 RNA 病毒包括例如,流感病毒如甲型流感病毒,所述方法包括:(a) 将第一组表达载体引入细胞群,所述表达载体能在所述细胞内表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段,而所述细胞能支持所述病毒生长;(b) 将第二组表达载体引入所述细胞,所述表达载体能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA;和(c) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,所述细胞是犬细胞。在某些实施方式中,所述细胞是 MDCK 细胞。在某些实施方式中,所述重组病毒是甲型或乙型流感病毒。在某些实施方式中,所述第一组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,所述第一组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,所述第二组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,所述第二组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,通过电穿孔引入所述第一组、第二组或两组表达载体。在某些实施方式中,所述第一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段。在某些实施方式中,所述第二组表达载体编码一种或多种或所有流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,所述第一组或第二组表达载体(或两组)包含本发明核酸,例如,本发明的犬 RNA pol I 调节序列(如犬 RNA pol I 启动子)。在某些实施方式中,所述第一组或第二组表达载体(或两组)编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,一组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和 / 或 NA mRNA 和 / 或 vRNA 的一种或多种载体。在一个实施方式中,该方法利用辅助病毒。在一个实施方式中,该方法所用的培养细胞是犬细胞。

[0239] 本发明提供在培养的细胞中产生具有 3 个以上基因组 vRNA 区段的区段化负链

RNA 病毒的感染性重组病毒颗粒的方法,所述负链 RNA 病毒包括例如流感病毒如甲型流感病毒,所述方法包括:(a) 将一组表达载体引入细胞群中,所述表达载体能在所述细胞内表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段也能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA,所述细胞能支持所述病毒生长;(b) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,所述细胞是犬细胞。在某些实施方式中,所述细胞是 MDCK 细胞。在某些实施方式中,所述病毒是甲型或乙型流感病毒。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1-17 个质粒内。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1-3 个质粒内。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,通过电穿孔引入所述一组表达载体。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段和一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含本发明的核酸,例如本发明的犬 RNA pol I 调节序列(例如,犬 RNA pol I 启动子)。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,所述一组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和 / 或 NA mRNA 和 / 或 vRNA 的一种或多种载体。在某些实施方式中,第一组或第二组表达载体(或两组)编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,一组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和 / 或 NA mRNA 和 / 或 vRNA 的一种或多种载体。在一个实施方式中,该方法利用辅助病毒。在一个实施方式中,该方法所用的培养细胞是犬细胞。

[0240] 本发明提供在培养的细胞中产生负链 RNA 病毒的感染性重组病毒颗粒的方法,所述方法包括:(a) 将第一组表达载体引入细胞群,所述表达载体能在所述细胞中表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段,所述细胞能支持所述病毒生长;(b) 将能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA 的第二组表达载体引入所述细胞;和(c) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,所述细胞是犬细胞。在某些实施方式中,所述细胞是 MDCK 细胞。在某些实施方式中,所述病毒是乙型流感病毒。在某些实施方式中,所述第一组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,所述第一组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,所述第二组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,所述第二组表达载体包含在 1 个质粒内。在某些实施方式中,通过电穿孔引入所述第一组、第二组或两组表达载体。在某些实施方式中,所述第一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段。在某些实施方式中,所述第二组表达载体编码一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,所述第一组或第二组表达载体(或两组)包含本发明的核酸,例如本发明的犬 RNA pol I 调节序列(例如,犬 RNA pol I 启动子)。在一个实施方式中,该方法利用辅助病毒。在一个实施方式中,该方法所用的培养细胞是犬细胞。

[0241] 本发明提供在培养的细胞中产生负链 RNA 病毒的感染性重组病毒颗粒的方法,所述方法包括:(a) 将一组表达载体引入细胞群,所述表达载体能在所述细胞内表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段也能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA,所述细胞能支持所述病毒生长;(b) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,所述细胞是犬细胞。在某些实施方式中,所述细胞是 MDCK 细胞。在某些实施方式中,所述病毒是乙型流感病毒。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1-17

个质粒内。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1-8 个质粒内。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含在 1-3 个质粒内。在某些实施方式中,通过电穿孔引入所述一组表达载体。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码流感病毒的各 vRNA 区段和一种或多种流感病毒多肽的 mRNA。在某些实施方式中,所述一组表达载体包含本发明的核酸,例如,本发明的犬 RNA pol I 调节序列(如犬 RNA pol I 启动子)。在某些实施方式中,所述一组表达载体编码第二病毒的 vRNA 或 mRNA。例如,所述一组载体包含编码第二流感病毒的 HA 和 / 或 NA mRNA 和 / 或 vRNA 的一种或多种载体。在一个实施方式中,该方法利用辅助病毒。在一个实施方式中,该方法所用的培养细胞是犬细胞。

[0242] 本发明提供在培养的犬细胞中产生具有 3 个以上基因组 vRNA 区段的区段化负链 RNA 病毒的感染性病毒颗粒的方法,所述负链 RNA 病毒包括例如,流感病毒如甲型流感病毒,所述方法包括:(a) 提供第一犬细胞群,该细胞群能支持所述病毒生长并且引入了第一组表达载体,该组表达载体在没有辅助病毒存在下能在所述犬细胞中指导基因组 vRNA 区段表达以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段或相应的 cRNA,从而提供任何这种 RNA 区段,所述犬细胞还能够提供核蛋白和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶,从而可形成包含所述病毒的基因组 vRNA 区段的 RNP 复合物并在所述犬细胞内装配所述病毒颗粒;和 (b) 培养所述犬细胞从而产生所述病毒颗粒。在某些实施方式中,所述犬细胞是 MDCK 细胞。

[0243] 本发明还提供在培养的犬细胞中产生区段化负链 RNA 病毒的感染性病毒颗粒的方法,所述方法包括:(i) 提供第一犬细胞群,该细胞群能支持所述病毒生长并且经修饰从而能 (a) 在无辅助病毒存在下提供所述病毒的基因组 vRNA 和 (b) 提供核蛋白和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶,从而可形成包含所述基因组 vRNA 的 RNA 复合物并能装配所述病毒颗粒,所述基因组 vRNA 可在犬 RNA pol I 调节序列或其功能衍生物的控制下在所述细胞内直接表达;和 (ii) 培养所述犬细胞从而产生所述病毒颗粒。

[0244] 本发明还提供在培养的细胞中产生区段化负链 RNA 病毒的感染性病毒颗粒的方法,所述方法包括:(i) 提供犬细胞群,该细胞群能支持所述病毒生长并且经修饰从而能 (a) 在无辅助病毒存在下提供所述病毒的基因组 vRNA 和 (b) 提供核蛋白和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶,从而可以形成包含所述基因组 vRNA 的 RNP 复合物并装配所述病毒颗粒,所述基因组 vRNA 可在犬 RNA pol I 调节序列或其功能衍生物,例如上述犬 RNA Pol I 启动子的控制下在所述犬细胞内表达;和 (ii) 培养所述犬细胞从而产生所述病毒颗粒。

[0245] 在一具体实施方式中,可用本文描述的方法在犬宿主细胞中产生具有至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个或至少 8 个基因组 vRNA 区段的感染性重组负链 RNA 病毒。

[0246] 在一具体实施方式中,本发明提供利用表达载体表达 vRNA 区段或相应的 cRNA 和流感病毒蛋白,特别是 PB1、PB2、PA 和 NA 从而在宿主细胞中产生感染性重组流感病毒的方法。根据该实施方式,可以使用或不使用辅助病毒来产生感染性重组流感病毒。

[0247] 本发明的感染性重组流感病毒可能或不能复制并产生后代。本发明的感染性重组流感病毒优选减毒的。减毒的感染性重组流感病毒可以,例如在 NS1 基因中具有突变。

[0248] 在某些实施方式中,本发明的感染性重组病毒可用于产生其它病毒,这些病毒可用于制备本发明的疫苗组合物。在一个实施方式中,通过本发明方法产生的重组或重配株

病毒用于产生用作疫苗的其他病毒。例如,通过本发明方法产生的包含本发明犬 RNA pol I 调节序列(例如,犬 RNA pol I 启动子)的重组或重配株病毒群。随后在鸡蛋或其它培养物中繁殖病毒群从而产生用于制备疫苗或免疫原性组合物的其它病毒。

[0249] 在某些实施方式中,本发明的感染性重组流感病毒表达异源(即,非流感病毒的)序列。在另一实施方式中,本发明的感染性重组流感病毒表达不同流感病毒株的流感病毒蛋白。在另一优选实施方式中,本发明的感染性重组流感病毒表达融合蛋白。

[0250] 5.5.2 将载体引入宿主细胞

[0251] 根据本领域熟知的方法(参见,例如美国专利申请公布号 US20050266026 和 20050158342)可将包含流感病毒基因组区段的载体引入(例如,转染)宿主细胞以将异源核酸引入真核细胞,这些方法包括,例如磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂质转染和利用多胺转染试剂转染。例如,按照生产商的使用说明书利用多胺转染试剂 TransIT-LT1(Mirus)可将载体,如质粒转染入宿主细胞,如 MDCK 细胞、COS 细胞、293T 细胞或其组合中。将待引入宿主细胞群的约 1 μ g 各载体与用 160 μ l 培养基(优选无血清培养基)稀释的约 2 μ l TransIT-LT1 混合,总体积为 200 μ l。DNA:转染试剂混合物在室温下温育 45 分钟,然后加入 800 μ l 培养基。然后将转染混合物加到宿主细胞中,按照上述方法培养细胞。因此,为在细胞培养物中产生重组或重配株病毒,将包含 8 个基因组区段(PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA 和 NA)中各区段的载体与约 20 μ l TransIT-LT1 混合并转染入宿主细胞。任选地,在转染之前先用无血清培养基,如 Opti-MEM I 代替含血清培养基,并温育 4-6 小时。

[0252] 或者,可采用电穿孔将包含流感病毒基因组区段的载体引入宿主细胞。参见,例如通过引用方式纳入本文的美国专利申请公布 US20050266026 和 20050158342。例如,根据以下流程可采用电穿孔将包含甲型或乙型流感病毒的质粒载体引入 MDCK 细胞。简言之,将例如生长在添加 10%胎牛血清(FBS)的改良型 Eagle 培养基(MEM)中的 5×10^6 个 MDCK 细胞悬浮于 0.3ml OptiMEM,然后置于电穿孔容器内。将最多 25 μ l 体积的 20 μ g DNA 加入电穿孔容器内的细胞中,通过敲击温和混合。按照生产商的使用说明书(例如,连有 Capacitance Extender Plus 的伯乐基因脉冲器 II(BioRad Gene Pulser II))实施电穿孔,参数为 300 伏特、950 微法拉、时间常数在 35-45 毫秒之间。通过温和敲打再次混合细胞,电穿孔后约 1-2 分钟将 0.7ml OPTI-MEM 直接加入电穿孔容器内。然后将细胞转移到含 2ml 无血清 OPTI-MEM 的标准 6 孔组织培养板的两个孔中。洗涤该容器以回收任何残留的细胞,洗涤悬液分配在两个孔中。终体积约为 3.5ml。然后在允许病毒生长的条件下温育细胞,例如冷适应的病毒株在约 33 $^{\circ}$ C 的条件下温育。

[0253] 将载体引入宿主细胞的进一步指导可见,例如美国专利号 6,951,754、6,887,699、6,649,372、6,544,785、6,001,634、5,854,037、5,824,536、5,840,520、5,820,871、5,786,199 和 5,166,057 以及美国专利申请公布号 20060019350、20050158342、20050037487、20050266026、20050186563、20050221489、20050032043、20040142003、20030035814 和 20020164770。

[0254] 5.6 细胞培养

[0255] 一般可在常规培养宿主细胞的培养基组合中繁殖病毒。用于流感病毒复制的合适宿主细胞包括,例如 Vero 细胞、Per. C6 细胞、BHK 细胞、MDCK 细胞、293 细胞和 COS 细

胞,其中包括 293T 细胞、COS7 细胞。本发明优选 MDCK 细胞。使用非成瘤性 MDCK 细胞作为宿主细胞也是本发明的实施方式。还可以,例如 1:1 的比例使用包含两种上述细胞系,例如 MDCK 细胞和 293T 细胞或 COS 细胞的共培养物以提高复制效率。参见,例如 20050158342。通常在标准商业化培养基中培养,例如添加血清(例如,10%胎牛血清)的 Dulbecco 改良型 Eagle 培养基,或者在无血清培养基中培养细胞,培养条件为适于维持中性缓冲 pH(例如,pH 在 7.0 到 7.2 之间)的受控湿度和 CO₂ 浓度。培养基可任选包含用以防止细菌生长的抗生素,例如青霉素、链霉素等,和 / 或其它营养物,例如 L- 谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸、促进有利生长特性的其它添加物,如胰蛋白酶、β- 巯基乙醇等。

[0256] 在培养物中维持哺乳动物细胞的方法已有广泛报道且为本领域技术人员所熟知。以下文献提供了通用方法,例如 Freshney, (1983) Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique (动物细胞的培养:基本技术手册),纽约艾伦阿利斯公司 (Alan R. Liss, New York); Paul, (1975) Cell and Tissue Culture (细胞和组织培养),第 5 版,爱丁堡利文斯顿公司 (Livingston, Edinburgh); Adams, (1980), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists (生物化学和分子生物学实验技术 - 生化学家使用的细胞培养), Work 和 Burdon 编,阿姆斯特丹艾斯维尔公司 (Elsevier, Amsterdam)。体外产生流感病毒过程中特别感兴趣的组织培养方法的其它细节包括,例如 Merten 等, (1996), Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation (在细胞培养物中制备流感病毒用于疫苗生产), 刊于 Cohen 和 Shafferman 编, Novel Strategies in Design and Production of Vaccines (设计和制备疫苗的新策略), 该篇文献全文纳入本文。此外,通过常规实验不难确定适合本发明的这些方法的改进形式。

[0257] 用于产生流感病毒的细胞可以在含血清或无血清培养基中培养。在某些情况下,例如用于制备纯化病毒时,优选在无血清条件下培养宿主细胞。细胞可以在小规模,例如少于 25ml 的培养基、培养管或烧瓶中培养,或者在振荡的大烧瓶、旋转瓶或者在烧瓶、培养瓶或反应器培养中的微载体珠(例如,DEAE- 葡聚糖微载体珠,如 PL 公司 (Pfeifer & Langen) 的 Dormacell; 流体实验室 (Flow Laboratories) 的 Superbead; 苯乙烯共聚物 - 三 - 甲胺珠,如 Hillex、SoloHill、Ann Arbor) 上培养。微载体珠是小球(直径在 100-200 微米之间),可在单位体积的细胞培养液提供贴壁细胞生长所需的大表面积。例如,1 升培养基可包含 2 千万个以上的微载体珠,从而提供 8000 平方厘米以上的生长表面。对于病毒的商业生产,例如疫苗生产,常优选在生物反应器或发酵罐中培养细胞。现有的生物反应器的体积从 1 升以下到 100 升以上,例如 Cyto3 生物反应器(明尼苏达州明尼汤卡的奥斯莫尼克公司 (Osmonics, Minnetonka, MN); NBS 生物反应器(纽约爱迪逊的 NBS 科技公司 (New Brunswick Scientific, Edison, N. J.)); BB 生物技术国际公司的实验室和商业规模生物反应器(德国梅尔森根的 BB 生物技术国际公司 (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany))。

[0258] 无论培养体积有多大,就本发明而言,培养物可维持于低于或等于 35°C 的温度下以确保有效回收重组和 / 或重配株流感病毒,特别是冷适应性的、温度敏感的、减毒重组和 / 或重配株流感病毒。例如,细胞在约 32°C 到 35°C 之间培养,温度一般在约 32°C 到约 34°C 之间,通常在约 33°C。

[0259] 通常使用感知和维持细胞培养系统温度的调节器,例如恒温器或其它装置来确保

病毒复制期间温度不会超过 35℃。

[0260] 5.7 回收病毒

[0261] 通常从其中已经生长了感染（转染）细胞的培养基中回收病毒。通常先澄清粗培养基，再浓缩流感病毒。常用的方法包括过滤、超滤、硫酸钡吸附和洗脱、及离心。例如，感染培养物的粗培养基首先经离心澄清，例如 1000–2000×g 离心足够的时间，例如 10 到 30 分钟以除去细胞碎片和其它大颗粒物。此外，将培养基经 0.8 μm 醋酸纤维素滤膜过滤除去完整的细胞和其它大颗粒物。然后任选离心澄清的培养基上清液以使流感病毒沉淀，例如以 15,000×g 离心约 3 到 5 小时。将病毒沉淀重悬在合适缓冲液，如 STE (0.01M Tris-HCl ;0.15M NaCl ;0.0001M EDTA) 或 pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中后，通过蔗糖 (60%–12%) 或酒石酸钾 (50%–10%) 密度梯度离心浓缩病毒。连续或分步梯度，例如 4 步 12% 的 12% 到 60% 的蔗糖梯度都合适。梯度离心的速度和时间应足以使病毒浓缩成可见的条带用于回收。此外，为了大规模商业应用，利用以连续模式操作的区带离心转子从密度梯度中淘选病毒。以下文献提供了足以指导技术人员从组织培养物中制备流感病毒的其它细节，例如，Furminger, 疫苗制备 (Vaccine Production), 刊于 Nicholson 等 (编), Textbook of Influenza (流感病毒教科书), 第 324–332 页 ;Merten 等, (1996), Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation (在细胞培养物中制备用于疫苗生产的流感病毒), 刊于 Cohen 和 Shafferman 编, Novel Strategies in Design and Production of Vaccines (疫苗设计和生产新策略), 第 141–151 页, 和美国专利号 5,690,937、美国公布申请号 20040265987、20050266026 和 20050158342, 这些文献通过引用的方式纳入本文。如果需要, 可在有蔗糖 – 磷酸 – 谷氨酸 (SPG) 作为稳定剂存在下将回收的病毒储存于 -80℃。

[0262] 5.8 流感病毒

[0263] 流感病毒的基因组由线性 (-) 链核糖核酸 (RNA) 的 8 个区段组成, 其编码免疫原性的血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 蛋白和 6 个内部核心多肽: 核衣壳核蛋白 (NP); 基质蛋白 (M); 非结构蛋白 (NS); 和 3 个 RNA 聚合酶 (PA、PB1、PB2) 蛋白。在复制期间, 基因组病毒 RNA 在宿主细胞核中转录成 (+) 链信使 RNA 和 (-) 链基因组 cRNA。8 个基因组区段各自包装入核糖核蛋白复合物中, 除 RNA 外, 该复合物还含有 NP 和聚合酶复合物 (PB1、PB2 和 PA)。

[0264] 可通过本发明方法在本发明 MDCK 细胞中产生的流感病毒包括但不限于: 包含批准的减毒、温度敏感型主病毒株的所选血凝素和 / 或神经氨酸酶抗原的重配病毒。例如, 病毒可包含作为, 例如温度敏感株 (ts)、冷适应株 (ca) 或减毒株 (att) 中一种或多种的主病毒株 (例如, A/Ann Arbor/6/60、B/AnnArbor/1/66、PR8、B/Leningrad/14/17/55、B/14/5/1、B/USSR/60/69、B/Leningrad/179/86、B/Leningrad/14/55、B/England/2608/76、A/PuertoRico/8/34 (即, PR8) 等, 或其抗原性变体或衍生物)。

[0265] 5.9 流感病毒疫苗

[0266] 历史上, 流感病毒疫苗在含胚鸡蛋中利用根据经验预测相关毒株而选择的病毒株产生。最近产生了包含批准的减毒温度敏感主病毒株的所选血凝素和 / 或神经氨酸酶抗原的重配株病毒。通过在鸡蛋内多次传代培养病毒后, 回收流感病毒, 任选灭活回收的流感病毒, 例如利用甲醛和 / 或 β-丙酸内酯。但是以这种方式产生流感疫苗有几个明显的缺点。

鸡蛋残留的污染物是高抗原性、热原性的,给予后常导致明显的副作用。更重要的是,通常必须在下一个流感季节到来前几个月选择和分配生产所用病毒株,从而有时间生产和灭活流感疫苗。尝试在细胞培养物中生产重组和重配株疫苗时,障碍是批准用于疫苗生产的任何病毒株不能在标准细胞培养条件下有效生长。

[0267] 本发明提供在培养物中产生重组和重配株病毒的载体系统、组合物和方法,从而能快速生产对应于一种或多种所选抗原性病毒株的疫苗。具体地说,提供的条件和病毒株能在细胞培养物中从多质粒系统有效产生病毒。如果需要,病毒可任选在鸡蛋或与拯救病毒所用的培养物不同的细胞培养物中进一步扩增。

[0268] 例如,以前不可能在标准细胞培养条件,如37°C培养乙型流感病毒主病毒株B/Ann Arbor/1/66。在本发明的方法中,将各包含一个流感病毒基因组区段的多个质粒引入合适的细胞,在低于或等于35°C的条件下维持在培养物中。培养通常维持在约32°C到35°C之间的温度,优选约32°C到约34°C之间,例如约33°C。

[0269] 培养物通常维持在例如细胞培养箱的系统中,在受控湿度和CO₂下,用温度调节器,如恒温器保持恒定温度,从而确保温度不超过35°C。

[0270] 通过引入包含cDNA的载体亚组和衍生自感兴趣病毒株(例如,感兴趣的抗原性变体)的补充区段不难获得重配流感病毒,其中所述cDNA编码主流感病毒的基因组区段。通常根据与疫苗给予有关的所需特性来选择主病毒株。例如,为生产疫苗,如为生产减毒活疫苗,可选择具有减毒表型、冷适应和/或温度敏感性的主供体病毒株。就此而言,甲型流感病毒株caA/Ann Arbor/6/60;乙型流感病毒株ca B/Ann Arbor/1/66;或因其理想表型特性而选择的其它病毒株,例如减毒、冷适应性和/或温度敏感性的病毒株优选作为主供体病毒株。

[0271] 在一个实施方式中,将包含编码流感病毒主病毒株的6个内部vRNA区段(即,PB1、PB2、PA、NP、NB、M1、BM2、NS1和NS2)的cDNA连同编码具有所需抗原性的病毒株(例如预计可引起明显的局部或全球流感病毒感染的病毒株)的血凝素和神经氨酸酶vRNA区段的cDNA的质粒转染入合适的宿主细胞。在有效回收的合适温度,例如等于或低于35°C,如约32°C到35°C之间,如约32°C到约34°C之间,或约33°C,在细胞培养物中复制重配株病毒后回收重配株病毒。任选利用变性剂,如甲醛或β-丙酸内酯灭活回收的病毒。

[0272] 5.10 预防性给予疫苗的方法和组合物

[0273] 可以预防性给予合适的载体或赋形剂配制的本发明重组和重配株病毒以刺激针对一种或多种流感病毒株的特异性免疫反应。载体或赋形剂通常是药学上可接受的载体或赋形剂,如无菌水、盐水溶液、缓冲盐水溶液、葡萄糖水溶液、甘油水溶液、乙醇、未感染鸡蛋的尿囊液(即,正常的尿囊液“NAF”)或其组合。按照本领域已有的方法可制备确保无菌、pH、等渗性和稳定性的这种溶液。所选的载体或赋形剂通常能最大程度降低过敏和其它不良效应,并且适合特定给药途径,例如皮下、肌肉内、鼻内等。

[0274] 通常给予用量足以刺激针对一种或多种流感病毒株的特异性免疫反应的本发明流感病毒。给予流感病毒优选能引发保护性免疫反应。本领域技术人员知道引发抵御一种或多种流感病毒株的保护性免疫反应的剂量和方法。例如,提供灭活流感病毒的每次给药剂量范围约为1-1000 HID₅₀(人感染剂量),即,约10⁵-10⁸pfu(空斑形成单位)。或者,无佐剂时给药剂量约为10-50 μg,例如约15 μg HA,含佐剂时给予剂量更小。给药剂量通常可根

据,例如年龄、身体条件、体重、性别、饮食、给药时间和其它临床因素而在该范围内调整。预防性疫苗制剂可全身性给予,例如用针头和注射器或无针注射装置通过皮下或肌肉内注射给予。或者,疫苗制剂可通过滴剂、大颗粒气溶胶(约10微米以上)或喷入上呼吸道而鼻内给予。虽然任何上述递送途径产生保护性的全身免疫反应,但鼻内给药可在流感病毒的进入部位引发粘膜免疫,从而产生额外的益处。对于鼻内给药,通常优选减毒活病毒疫苗,例如减毒、冷适应性和/或温度敏感性的重组或重配株流感病毒。虽然优选通过单次给药来刺激保护性免疫反应,但可通过相同或不同途径给予附加剂量以获得所需预防效果。

[0275] 或者,可以利用流感病毒离体或体内靶向树突状细胞来刺激免疫反应。例如,增殖的树突状细胞与充足量的病毒接触足够时间,从而使树突状细胞能捕获流感病毒抗原。然后通过标准的静脉移植方法将细胞转移入待疫苗接种的对象。

[0276] 用于预防性给予流感病毒或其亚单位的制剂还任选包含一种或多种增强针对流感病毒抗原的免疫反应的佐剂。合适的佐剂包括:皂苷、矿物质凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、普罗流尼克(pluronic)、多元醇、多聚阴离子、肽、油或烃乳剂、卡介苗(BCG)、短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)以及合成的佐剂QS-21和MF59。

[0277] 如果需要,流感病毒的预防性疫苗可以联合一种或多种免疫刺激分子一起给予。免疫刺激分子包括具有免疫刺激、免疫增强和促炎活性的各种细胞因子、淋巴因子和趋化因子,例如白细胞介素(如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13);生长因子(如粒细胞-巨噬细胞(GM)-集落刺激因子(CSF));以及其它免疫刺激分子,如巨噬细胞炎症因子、Flt3配体、B7.1、B7.2等。免疫刺激分子可以与流感病毒在同一制剂中给予,或可单独给予。可以给予蛋白或编码蛋白的表达载体以产生免疫刺激效应。

[0278] 在另一实施方式中,可利用包含流感病毒基因组区段的本发明载体连同上述合适的药物载体或赋形剂将异源核酸引入宿主生物或宿主细胞,例如哺乳动物细胞,例如衍生自人对象的细胞。通常将异源核酸插入基因或基因区段的非必需区,例如区段7的M基因。异源多核苷酸序列可编码多肽或肽,或RNA,如反义RNA或核酶。然后通过产生包含异源核酸的重组病毒而将异源核酸引入宿主或宿主细胞,如上所述给予该病毒。在一个实施方式中,异源多核苷酸序列不是衍生自流感病毒。

[0279] 或者,可以将载体共转染入感染流感病毒的细胞从而将包含异源核酸的本发明载体引入宿主细胞并表达。随后任选将细胞输回或递送给对象,通常递送至获得它们的部位。在一些应用中,采用已有的转移或移植方法将细胞转移到感兴趣的组织、器官或系统部位(如上所述)。例如,可采用标准的递送或输注技术将造血谱系的干细胞,如骨髓、脐带血或外周血衍生的造血干细胞递送至对象。

[0280] 或者,可将包含异源核酸的载体递送至对象体内细胞。这种方法通常包括将载体颗粒给予靶细胞群(例如,血细胞、皮肤细胞、肝细胞、神经(包括脑)细胞、肾细胞、子宫细胞、肌肉细胞、肠细胞、宫颈细胞、阴道细胞、前列腺细胞等,以及衍生自细胞、组织和/或器官的肿瘤细胞)。给药可以是全身性的,例如通过静脉注射病毒颗粒,或通过各种方法将病毒颗粒直接转移到感兴趣的部位,包括注射(例如,使用针头或注射器),无针疫苗递送,局部给药,或者推进组织、器官或皮肤部位。例如,可通过吸入、口服、静脉内、皮下、真皮内、肌肉内、腹膜内、鞘内,或者通过阴道或直肠给药,或者通过将病毒颗粒放置在身体腔或其它部位内(例如外科手术期间)而递送病毒载体颗粒。

[0281] 通过将包含编码治疗性或预防性有效多肽（或肽）或 RNA（例如，反义 RNA 或核酶）的异源多核苷酸的本发明载体在体外、离体或体内引入靶细胞群，上述方法可用于治疗性和 / 或预防性治疗疾病或病症。编码感兴趣的多肽（或肽）或 RNA 的多核苷酸通常与“表达载体”和“其它表达元件”章节所述的合适调节序列操作性连接。任选将多个异源编码序列掺入单一的载体或病毒。例如，除编码治疗性或预防性活性多肽或 RNA 的多核苷酸外，载体还可以包含其它治疗性或预防性多肽，例如抗原、共刺激分子、细胞因子、抗体等，和 / 或标记等。

[0282] 在一个实施方式中，本发明提供包含本发明的重配株和重组病毒（或其各部分）的组合物，这些病毒已用如 benzonase 等试剂处理以清除潜在癌基因。因此，无癌基因的疫苗组合物特别包括在本发明实施方式中。

[0283] 本发明的方法和载体可用于治疗性或预防性治疗各种疾病，包括遗传性和获得性疾病，例如用作病毒、细菌等引起的感染性疾病的疫苗。

[0284] 5.11 试剂盒

[0285] 为了促进本发明载体和载体系统的应用，可将任何载体，例如共有流感病毒质粒、变体流感病毒多肽质粒、流感病毒多肽文库质粒等，和为实验或治疗目的可用于流感病毒包装和感染的其它组分，例如缓冲剂、细胞、培养基等包装成试剂盒的形式。除上述组分外，试剂盒通常还可包含其它材料，例如用于实施本发明方法的说明书、包装材料和容器。

[0286] 5.12 病毒核酸和蛋白的操作

[0287] 就本发明而言，可以按照熟知的分子生物学技术操作本发明的包含犬 RNA pol I 调节序列的核酸或其它核酸、表达载体、流感病毒核酸和 / 或蛋白等。许多这类方法，包括扩增、克隆、诱变、转化等的详细方案，描述于：例如，Ausubel 等，Current Protocols in Molecular Biology（新编分子生物学实验指南）（2000 年增补），约翰威利父子公司（John Wiley & Sons），纽约（“Ausubel”）；Sambrook 等，Molecular Cloning-A Laboratory Manual（分子克隆 - 实验室手册）（第 2 版），1-3 卷，纽约冷泉港冷泉港出版社（Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.），1989（“Sambrook”）；Berger 和 Kimmel，Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology（分子克隆技术指导，酶学方法），第 152 卷，加州圣地亚哥学术出版社有限公司（Academic Press, Inc.，San Diego, CA）（“Berger”）。

[0288] 除上述参考文献外，可用于，例如扩增本发明的 cDNA 探针的体外扩增技术，如聚合酶链式反应（PCR）、连接酶链式反应（LCR）、Q β -复制酶扩增和其它 RNA 聚合酶介导的技术（例如，NASBA）的方案见以下文献：Mullis 等，（1987），美国专利号 4,683,202；PCR Protocols A Guide to Methods and Applications（PCR 操作规程 - 方法和应用指导）（Innis 等编），加州圣地亚哥学术出版社有限公司（Academic Press Inc. San Diego, CA）（1990）（“Innis”）；Arnheim 和 Levinson，（1990）C&EN 36；The Journal Of NIH Research（1991）3：81；Kwoh 等（1989）Proc Natl Acad Sci USA 86,1173；Guatelli 等（1990）Proc Natl Acad Sci USA 87：1874；Lomell 等（1989）J Clin Chem 35：1826；Landegren 等，（1988）Science 241：1077；Van Brunt（1990）Biotechnology 8：291；Wu 和 Wallace（1989）Gene 4：560；Barringer 等（1990）Gene 89：117；Sooknanan 和 Malek（1995）Biotechnology 13：563。本发明中用于克隆核酸的其它方法包括 Wallace 等的美国专利

No. 5, 426, 039. 通过 PCR 扩增核酸的改进方法总结于 Cheng 等, (1994) *Nature* 369 :684 和其中的参考文献。

[0289] 可采用各种固相策略合成本发明的某些多核苷酸, 例如寡核苷酸, 这些策略包括依据单核苷酸和 / 或三核苷酸的亚磷酰胺耦联化学方法。例如, 可通过将活化的单体和 / 或三体依次加入延伸中的多核苷酸链来合成核酸序列。参见, 例如 Caruthers, M. H. 等, (1992) *Meth Enzymol* 211 :3。

[0290] 合成所需序列时, 可以从许多公司订购基本上任何核酸, 例如米德兰标准试剂公司 (The Midland Certified Reagent Company) (mrcr@oligos.com)、泛美基因公司 (The Great American Gene Company) (www.genco.com)、快速基因有限公司 (ExpressGen, Inc.) (www.expressgen.com)、操纵子技术有限公司 (Operon Technologies, Inc.) (www.operon.com) 和许多其它公司订购。

[0291] 此外, 通过, 例如定点诱变可取代病毒多肽中选择的氨基酸残基。例如, 可通过将特异性突变引入编码多肽的病毒核酸区段以产生包含与, 例如减毒表型、冷适应性、温度敏感性等所需表型特征功能性相关的氨基酸取代的病毒多肽。定点诱变方法是本领域熟知的, 其描述于, 例如 Ausubel、Sambrook 和 Berger, 同上。可从市场上购得许多用于定点诱变的试剂盒, 例如拉霍亚的斯特拉塔基因公司 (Stratagene, La Jolla) 的 Chameleon 定点诱变试剂盒, 按照生产商的使用说明书可用于将, 例如一个或多个氨基酸取代分别引入编码甲型或乙型流感病毒多肽的基因组区段。

[0292] 5.13 其它病毒

[0293] 本发明的核酸、载体和方法还可用于其它重组病毒的表达和纯化。以下讨论为考虑改造载体使之适用于其它这类病毒提供指导。

[0294] 如果靶病毒包含正链区段化 RNA 基因组, 则其 RNA pol I 启动子优选位于在内部转录单位中的 cDNA 上游 (单向系统)。在该实施方式中, 产生正链 RNA 以直接掺入新病毒。然而, 利用单向系统产生包含负链区段化 RNA 基因组的靶病毒的实施方式也属于本发明范围。

[0295] 如果靶病毒包含负链区段化 RNA 基因组, 则其 RNA pol I 启动子优选位于内部转录单位中的 cDNA 下游 (双向系统)。在该实施方式中, 产生负链 RNA 以直接掺入新病毒。利用双向系统产生包含正链区段化 RNA 基因组的靶病毒的实施方式也属于本发明范围。

[0296] 本发明还可用于产生包含感染性或非感染性的非区段化 RNA 基因组 (单链或双链) 的病毒。将感染性病毒基因组 RNA 简单地引入宿主细胞通常足以启动细胞内的病毒生命周期和最终完整病毒的产生。例如, 将小核糖核酸病毒基因组 RNA 简单地引入宿主细胞足以产生完整的小核糖核酸病毒。启动包含非感染性基因组 RNA 的病毒的生命周期通常需要额外引入其它病毒蛋白, 这些蛋白通常和基因组一起携带于病毒颗粒内。例如, 副流感病毒 III 携带 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 在新感染的宿主细胞内, 该聚合酶的存在是启动病毒基因组 RNA 复制和病毒 mRNA 转录所必需的; 没有该聚合酶存在下, 副流感病毒 III 基因组 RNA 是非感染性的。在产生包含感染性非区段化基因组 RNA 的病毒的本发明实施方式中, 将携带包含病毒基因组的核酸的本发明双表达质粒简单地引入合适的宿主细胞足以产生完整的病毒。在产生包含非感染性非区段化基因组 RNA 的病毒的实施方式中, 其它表达质粒也可能不得不和携带病毒基因组的双表达质粒一起引入宿主细胞。其它质粒应当表达启动病

毒生命周期所必需的蛋白,这些蛋白通常在感染后引入宿主细胞(例如,RNA 依赖性 RNA 聚合酶)。

[0297] 在产生包含感染性非区段化 RNA 基因组的微小 RNA 病毒的实施方式中,将包含完整病毒基因组的 cDNA 插入本发明的双启动子表达质粒。外部转录单位中的上游启动子,优选 pol II 启动子指导包含完整病毒基因组的正链 mRNA 的产生-多聚蛋白从 mRNA 翻译,单个蛋白从多聚蛋白中切割并释放(例如,借助该多聚蛋白内的蛋白酶)。由于病毒基因组包含正链 RNA,因此内部转录单位(单向系统)中的第二上游启动子,优选犬 RNA pol I 可指导基因组正链拷贝的产生。如果病毒基因组包含负链 RNA,那么内部转录单位(双向系统)中的第二下游启动子,优选犬 RNA pol I 可指导基因组负链拷贝的产生。利用单向系统产生负链非区段化 RNA 病毒的实施方式属于本发明范围。同样,利用双向系统产生正链非区段化 RNA 病毒的实施方式也属于本发明范围。

[0298] 本发明也可用于产生包含非感染性非区段化 RNA 基因组的病毒,其中不产生多聚蛋白。例如,本系统可用于产生弹状病毒科病毒或副粘病毒科病毒,优选副流感病毒 III,其生命周期中通常包括由病毒来源的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶从基因组负链 RNA 产生多个单顺反子 mRNA;各蛋白从单顺反子 mRNA 表达。在这些实施方式中,包含启动子,优选 pol II 启动子的外部转录单位指导病毒基因组的正链多顺反子拷贝的产生,通常只从中翻译第一基因(NP)。此外,包含启动子,优选 pol I 启动子的内部转录单位指导基因组 RNA 拷贝的表达,以掺入新病毒。由于副流感病毒 III 病毒基因组包含负链 RNA,因此内部转录单位的启动子优选位于 cDNA 的下游(双向系统)。如果病毒基因组包含正链 RNA,则内部转录单位的启动子优选位于 cDNA 的上游(单向系统)。利用双向系统产生包含正链 RNA 基因组的病毒的实施方式和利用单向系统产生包含负链 RNA 基因组的病毒的实施方式属于本发明范围。其它病毒蛋白(除表达自多顺反子 mRNA 的蛋白外)也是病毒转录和复制所需(L和P),这些蛋白可由不同的表达质粒分别提供。

[0299] 本发明还包括产生包含双链区段化 RNA 基因组的病毒的实施方式。在这些实施方式中,将包含靶病毒基因组中各基因的质粒插入本发明的双启动子表达质粒。质粒可以是单向质粒或双向质粒。外部转录单位中的启动子,优选 pol II 启动子指导各基因的 mRNA 转录物的表达,其翻译成所编码的蛋白。内部转录单位内的启动子,优选 pol I 启动子指导正链(单向系统)或负链(双向系统)的转录。然后,产生的第一链可作为模板,从而利用病毒 RNA 聚合酶产生互补链。所得到的双链 RNA 产物掺入新病毒。

6. 具体实施方式

[0300] 1. 包含犬 RNA 聚合酶 I 调节序列的分离核酸。

[0301] 2. 实施方式 1 的核酸,其中,所述调节序列是启动子。

[0302] 3. 实施方式 1 的核酸,其中,所述调节序列是增强子。

[0303] 4. 实施方式 1 的核酸,其中,所述调节序列是增强子和启动子。

[0304] 5. 实施方式 1 的核酸,其中,所述 RNA 聚合酶调节序列包含 SEQ IDNO :1 的核苷酸 1 到 1808 或其功能活性片段。

[0305] 6. 实施方式 1、2、3、4 或 5 的核酸,其中,所述调节序列与编码负链病毒基因组 RNA 或相应 cRNA 的 cDNA 操作性连接。

- [0306] 7. 实施方式 6 的核酸,其中,所述负链病毒基因组 RNA 是流感病毒基因组 RNA。
- [0307] 8. 实施方式 6 或 7 的核酸,其中,所述核酸还包含转录终止序列。
- [0308] 9. 包含实施方式 1、2、3、4、5、6、7 或 8 的核酸的表达载体。
- [0309] 10. 实施方式 9 的表达载体,其中,所述表达载体包含细菌的复制起点。
- [0310] 11. 实施方式 9 的表达载体,其中,所述表达载体包含可在原核细胞中选择的选择性标记。
- [0311] 12. 实施方式 9 的表达载体,其中,所述表达载体包含可在真核细胞内选择的选择性标记。
- [0312] 13. 实施方式 9 的表达载体,其中,所述表达载体包含多克隆位点。
- [0313] 14. 实施方式 13 的表达载体,其中,所述多克隆位点相对于所述犬 RNA 聚合酶 I 调节序列取向,从而自所述调节序列表达引入多克隆位点的编码序列。
- [0314] 15. 一种用于产生流感病毒基因组 RNA 的方法,包括转录实施方式 7 的核酸,从而产生流感病毒基因组 RNA。
- [0315] 16. 一种用于产生重组流感病毒的方法,包括培养包含实施方式 9、10、11、12、13 或 14 的表达载体以及表达编码一种或多种流感病毒多肽的 mRNA 的一种或多种表达载体的犬细胞,其中所述流感病毒多肽选自:PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2 ;和分离所述重组流感病毒。
- [0316] 17. 实施方式 16 的方法,其中,使用辅助病毒。
- [0317] 18. 实施方式 16 的方法,其中,产生的流感病毒是感染性的。
- [0318] 19. 实施方式 16、17 或 18 的方法,其中,所述方法可产生至少 1×10^3 PFU/ml 流感病毒。
- [0319] 20. 一种包含实施方式 1、2、3、4、5、6、7 或 8 的核酸的细胞。
- [0320] 21. 一种包含实施方式 9、10、11、12、13 或 14 的表达载体的细胞。
- [0321] 22. 实施方式 20 或 21 的细胞,其中,所述细胞是犬细胞。
- [0322] 23. 实施方式 22 的犬细胞,其中,所述犬细胞是肾细胞。
- [0323] 24. 实施方式 23 的犬肾细胞,其中,所述犬肾细胞是 MDCK 细胞。
- [0324] 25. 一种在培养的犬细胞中产生具有 3 个以上基因组 vRNA 区段的重组区段化负链 RNA 病毒的方法,所述方法包括:(a) 将第一组表达载体引入犬细胞群,所述第一组表达载体能在所述细胞中表达基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段;(b) 将第二组表达载体引入所述细胞,所述第二组表达载体能表达编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA ;和 (c) 培养所述细胞从而产生病毒颗粒。
- [0325] 26. 实施方式 25 的方法,其中,产生感染性流感病毒颗粒。
- [0326] 27. 实施方式 25 或 26 的方法,其中,利用辅助病毒。
- [0327] 28. 一种在培养的犬细胞中产生感染性流感病毒颗粒的方法,所述方法包括:(a) 将一组表达载体引入犬细胞群,其中所述表达载体能在所述细胞内表达 (i) 基因组 vRNA 区段以提供所述病毒的完整基因组 vRNA 区段和 (ii) 编码所述病毒的一种或多种多肽的 mRNA ;(b) 培养所述细胞从而产生所述病毒颗粒。
- [0328] 29. 一种转录流感病毒的 vRNA 区段的方法,该方法包括使犬 pol I 聚合酶多肽与包含选自 SEQ ID No :1-28 的核酸的多核苷酸接触,其中所述核酸与编码所述负链病毒的所

述 vRNA 区段的 cDNA 分子操作性连接 ;和分离转录的 vRNA 区段。

[0329] 30. 实施方式 29 的方法,其中,所述 vRNA 在宿主细胞中转录。

[0330] 31. 实施方式 16、17、18、19、25、26、27 或 28 的方法,其中,各表达载体位于单独的质粒上。

[0331] 32. 包含多个载体的组合物,其中,所述多个载体包括以下载体:含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 PA cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 PB1 cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 PB2 cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 HA cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 NP cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 NA cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 M cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连;和含有犬 pol I 启动子的载体,所述犬 pol I 启动子与流感病毒 NS cDNA 操作性相连,后者与转录终止序列相连。

[0332] 33. 实施方式 32 的组合物,该组合物还包含表达 mRNA 的一种或多种表达载体,其中所述 mRNA 编码选自下组的一种或多种流感病毒多肽:PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2。

[0333] 34. 包含实施方式 32 或 33 的组合物的宿主细胞。

[0334] 35. 包含通过实施方式 16、17、18、19、25、26、27 或 28 的方法产生的病毒的疫苗。

[0335] 36. 包含从病毒制备的免疫原性组合物的疫苗,其中所述病毒按照实施方式 16、17、18、19、25、26、27 或 28 的方法产生。

[0336] 37. 实施方式 35 或 36 的组合物,其中,各表达载体位于单独的质粒上。

[0337] 7. 实施例

[0338] 以下实施例只是为了说明本发明,并非要以任何方式限制本发明。

[0339] 7.1 实施例 1:在 MDCK 细胞内培养流感病毒株

[0340] 本实施例描述了培养流感病毒的几种细胞系的表征。评估了几种不同细胞系和原代细胞,包括 MRC-5、WI-38、FRhL-2、PerC6、293、NIH3T3、CEF、CEK、DF-1、Vero 和 MDCK 产生野生型 (wt) 和衍生自经实验室改造的,如冷适应性 (ca) 的甲型和乙型流感病毒株的遗传重配株的能力。虽然许多细胞类型都在有限的程度上支持某些冷适应流感病毒株的复制,但只有 MDCK 一直能产生高滴度的甲型和乙型病毒。例如,发现 PerC6 细胞能支持某些 wt 和 ca 乙型病毒复制,其水平与在 MDCK 细胞中观察到的相似,尽管其生长动力学不同(参见图 1)。比较而言,PerC6 不能支持许多 ca 甲型病毒复制。图 2 显示了 wt 和 ca A/Sydney/05/97 和 A/Beijing/262/95 病毒的生长曲线。在这两个情况中,ca 病毒株在 PerC6 细胞中不能良好复制。图 3 类似地描述了 wt 和 ca A/Ann Arbor/6/60 的生长曲线,证明 ca 病毒株不能在 PerC 细胞内有效复制,wt A/Ann Arbor/6/60 的复制也不如在 MDCK 细胞中稳定。实时 PCR 分析流感病毒在 PerC 细胞中的复制,显示在感染后的第一个 24 小时内,ca 和 wt 甲型流感病毒株的病毒 RNA (vRNA) 有所增加,但是只有 wt 病毒株持续增加到 120 小时以上,ca 病毒株无此情况。比较而言,wt 和 ca vRNA 在 MDCK 细胞中均有所增加,并且在第 3 天时

达到平台阶段 (plateau)。参见图 4。

[0341] 还检验了 MDCK 细胞支持潜在的大流行疫苗 (病毒株) caA/Vietnam/1203/2004 复制的能力。用低感染复数的 ca A/Vietnam/1203/2004 感染 MDCK 细胞, 在感染后的不同时间点定量测定上清液中的病毒。感染后 48 小时, ca A/Vietnam/1203/2004 的滴度达到约 $8\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 随后的 3 到 4 天中保持稳定。参见图 5。

[0342] 在该实验中, 将得自 ATCC 的 MDCK 细胞 (登录号 CCL-34) 在含 10% 源自美国的胎牛血清的培养基或合适的无血清培养基 (例如, SFMV100) 中扩增有限的次数, 从而产生前-主细胞 (pre-master cell) 储备物以用于初步表征研究。合适的无血清培养基描述于 2004 年 12 月 23 日提交的美国临时申请号 60/638, 166 ; 2005 年 1 月 5 日提交的美国临时申请号 60/641, 139 ; 和 2005 年 12 月 16 日提交的美国专利申请号 11/304, 589, 各份申请通过引用的方式全文纳入本文。细胞容易在这两种类型的培养基中生长, 两种细胞储备物都支持冷适应性疫苗毒株和大流行毒株复制, 分别如下表 1 和图 5 所示。

[0343] 表 1

[0344] 含血清和无血清培养的 MDCK 细胞产生冷适应性流感病毒株的生产力比较

[0345]

病毒株(6:2 重配株)	TCID ₅₀ /mL (log ₁₀)	
	MDCK, 含血清	MDCK, 无血清
A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	8.1	7.8
A/Panama/20/99 (H3N2)	6.8	6.4
A/Sydney/05/97 (H3N2)	7.0	6.5
B/Brisbane/32/2002	7.2	7.5
B/Hong Kong/330/2001	7.2	7.4
B/Victoria/504/2000	6.9	7.5

[0346] 为了研究负责在 PerC 细胞中限制性生长的基因区段, 利用 8- 质粒拯救技术产生流感病毒株 A/AA/6/60 的各基因区段的 7:1 重配株。8- 质粒流感病毒拯救系统的代表性描述可参见, 例如美国专利 6, 951, 754。图 6 显示了各 7:1 重配株的示意图和命名策略。然后检验所得重配株在 PerC 细胞中的复制能力。参见图 7。生长限制表型看来定位于 PB2 和 PB1 基因区段。采用本领域熟知的方法可以对负责此表型的精确位置详细作图。例如, 在已鉴定的基因区段中比较 wt 和 ca 病毒株的序列可确定其具体差别, 然后可以在 wt 或 ca 病毒株中进行回复突变。然后分析这些突变株在 PerC6 细胞中的生长能力。阻止 wt 病毒株生长或使得 ca 病毒株生长的任何突变可鉴定为造成生长限制表型的突变。

[0347] 7.2 实施例 2 :MDCK 细胞系的成瘤性

[0348] 利用无胸腺裸鼠模型评估 MDCK 细胞的两种前-主细胞储备物的潜在成瘤性, 所述两种前-主细胞储备物分别在含血清的培养基和无血清培养基中培养, 所述模型处于代表第 5 代细胞的阶段, 此后预计可用于疫苗生产。为评估成瘤性, 将 10^7 细胞皮下注射到各具 10 只小鼠的多个小组中, 84 天后处死动物并检查。接种了在无血清培养基中传代的细胞的 10 只小鼠中有 6 只观察到肿瘤形成。相比之下, 接种了补充 10% 胎牛血清的培养基中传代的细胞的小鼠中未见肿瘤形成的证据, 虽然在接种部位观察到一些纤维肉瘤, 如表 2 所示, 但在血清中传代的细胞是非成瘤性的。

[0349] 表 2

[0350] 在两种不同培养基中传代的 MDCK 细胞的成瘤性和核型

[0351]

	无血清		10%血清	
	4 代	20 代	4 代	20 代
致瘤性	ND	注意到肿瘤形成	ND	无肿瘤形成。注射部位有纤维肉瘤
估计的 TP ₅₀ * (有肿瘤小鼠数/小鼠总数)	ND	~10 ⁷ (6/10)	ND	无法估计(>10 ⁷) (0/10)
核型中位数; 注释	78; 染色体数为 52 到 82 的细胞大量分布	78; 染色体数为 52 到 82 的细胞大量分布	78; 具有异常染色体数(70 到 82)的细胞很少	78; 具有异常染色体数(70 到 82)的细胞很少

[0352] *TP₅₀: 在 50% 小鼠中诱导肿瘤所需的细胞数

[0353] ND: 未做

[0354] 如表 2 所示, 对在各自培养基中第 4 代和第 20 代的两种前主细胞储备物进行核型分析。在 10% FCS 中传代的非成瘤性细胞的中期染色体中位数为 78, 具有其它染色体数(70 到 82) 的细胞分布相对有限。而在无血清培养基中传代的细胞的中期染色体中位数也是 78, 观察到明显更多细胞具有范围是 53 到 82 条中期染色体的非整倍体染色体数。在两种情况下, 传代未改变细胞核型。

[0355] 7.3 实施例 3: 使 MDCK 细胞适应在无血清培养基中生长

[0356] ATCC 的 MDCK 细胞在含有经 γ 射线照射的 FBS 的培养基中传代。然后将这些细胞在选择用于支持细胞库生产的无血清培养基配方中传代有限次数。无血清培养基描述于美国临时申请号 60/638, 166 和 60/641, 139 以及美国专利申请 11/304, 589。这些额外的传代可在 37°C 或 33°C 进行。MDCK 细胞在包含植物来源的添加剂而非血清的三种培养基中传代, 产生的细胞的核型与在含 FCS 的培养基中传代的 MDCK 细胞的核型相似(数据未显示)。

[0357] 7.4 实施例 4: MDCK 细胞的克隆

[0358] 通过有限稀释对细胞进行生物学克隆以确保产生细胞是衍生自某一独特遗传背景。筛选克隆的表型特性, 包括倍增时间和相对成瘤性以及病毒生产能力。在初步的概念论述实验中, 在含 FCS 的培养基中得到 54 个 MDCK 克隆。将这些克隆传代, 以低感染复数用 ca A/New Caledonia/20/99 感染每一克隆。感染后几天取出上清液, 并通过 TCID₅₀ 测定上清液中的病毒量。少数克隆产生较高滴度的病毒, 高于非克隆的亲代细胞产生的病毒。利用具有优良生物学和生理学特性的克隆建立主细胞库(MCB), 如下所述。

[0359] 7.5 主细胞库的测试和表征

[0360] 全面检验 MCB 以确保不会出现外来物质。例如, 进行一种或多种 PCR 和 / 或抗体特异性测试来检测可用的病毒物质, 如下面的表 3 所示。

[0361] 表 3

[0362] MCB 的测试方案

[0363]

通用试验

PCR*/Ab 特异性

[0364]

无菌	AAV 1 和 2 型
支原体	HCMV
体外外来物质(多个细胞系)	EBV
体内外来物质	HSV
PERT	乙型、丙型和戊型肝炎病毒
共培养	HHV 6、7 和 8
核型	HIV 1 和 2
电子显微镜	HPV
成瘤性完整细胞(TP ₅₀)	HTLV I 和 II
细胞 DNA 的致癌性	多瘤(BK 和 JC 病毒)
细胞裂解物的致癌性	环病毒
牛病毒 per 9CFR	犬细小病毒
猪病毒 per 9CFR	犬瘟热
	腺病毒
	SV40

[0365] 7.6 实施例 6 :细胞培养物衍生的流感病毒临床前表征

[0366] 本实施例描述从细胞培养物以及鸡蛋产生的流感病毒株的表征,并比较了两个系统所产生的病毒。这种流感病毒通常适于用作人疫苗,并且其生物学特性使得该病毒适用于这种用途。在本实施例中,所述流感病毒是冷适应性的(ca;具有在较低温度下有效复制的能力)、温度敏感的(ts;在体外温度较高时复制受限)、和减毒的(att;在雪貂肺组织内检测不到复制),在本文中被称为 catsatt 病毒株。所作的比较包括:病毒产物的生物化学、抗原性和遗传学评估(测序);病毒在人细胞内复制后的生物学和生物化学表征;在准许的生物模型中的复制;和在准许的动物模型中的免疫原性。

[0367] 7.6.1 遗传学、生物化学和抗原性比较

[0368] A/H1N1、A/H5N1、A/H3N2 和乙型的 ca ts att 病毒株在 MDCK 细胞内复制的滴度相对较高。此外,ca ts att 病毒株在 MDCK 细胞内传代不改变它们的基因组序列。三个 ca ts att 病毒株,ca A/Sydney/05/97、ca A/Beijing/262/95 和 ca B/Ann Arbor/1/94 在 MDCK 细胞内传代一次或两次,测序所有 6 个内部基因的完整编码区,并与起始材料作比较。未观察到核苷酸改变,证明通过这种底物进行的这种传代不会改变这些病毒株的遗传学组成。在估计能模拟产生过程的条件下对 MDCK 细胞内产生的不同疫苗毒株进行其它序列表征,所述条件包括培养基组成、输入剂量(moi)、温育温度和收获时间。根据这些初步数据,估计 MDCK 产生的病毒的基因组序列未改变。

[0369] 由于在 MDCK 细胞中传代后,基因组在遗传学上稳定,因此预计不能区分在鸡蛋或 MDCK 细胞内产生的疫苗的生物特性。但是,细胞培养物的原代病毒产物与鸡蛋的产物相比还是有些细微差异,特别是包括 HA 和 NA 在内的病毒蛋白的翻译后修饰方面,或者病毒膜中脂质组成的方面;二者都可能改变病毒体的总体物理特性。关于细胞培养物产生和鸡蛋产生疫苗的抗原性的初步临床前数据表明该重要参数未检测到差异。几个疫苗毒株的鸡蛋储备物经 MDCK 细胞传代,利用参比抗血清测定 HAI 滴度来测定两种产物的抗原性。如表 4

所示,所有 HAI 滴度都在彼此的 2 倍以内,表明与鸡蛋衍生的物质相比,疫苗(毒株)在细胞内复制未改变疫苗的抗原性。

[0370] 表 4

[0371] 在鸡蛋和 MDCK 细胞中产生的病毒株的 HAI 滴度

[0372]

病毒株	HAI 滴度	
	鸡蛋产生的	MDCK 产生的
A/Panama/20/99	256	256
A/Wuhan/359/95	1024	2048
A/Wyoming/03/2003	512	1024
B/Jilin/20/2003	64	32
B/Hong Kong/330/01	64	64
B/Jiangsu/10/2003	128	128

[0373] 实施例 7:感染培养的人上皮细胞

[0374] 在一个实施方式中,为了评估 MDCK 和鸡蛋产生的疫苗在人源细胞内复制后的生物化学、生物学和结构相似性,可将疫苗在相关的二倍体人源细胞,如正常人支气管上皮细胞(NHBE)内传代 1 次。这种传代可用于模拟人气道内的单次感染事件,因而能比较子代病毒,即最终负责引发有效免疫反应的病毒。可根据这些材料研究疫苗的血凝素(结合和融合)和神经氨酸酶活性,并可评估其它生物化学和结构研究,包括电子显微镜、感染性颗粒与总颗粒之比和病毒基因组等价物。总之,这些比较可用于证明细胞衍生的疫苗与鸡蛋产生的疫苗一样有效和安全。分析研究总结于表 5。

[0375] 表 5

[0376] 比较细胞和鸡蛋产生的疫苗的临床前研究

[0377]

体内(雪貂)	体外*
减毒/复制	病毒结合
在上气道内的复制程度	血细胞凝集滴度
在上气道内的复制动力学	与不同唾液酸的结合
免疫原性	物理特性
交叉反应性	EM 的形态学
动力学	感染性颗粒:总颗粒(基因组)
感染性	融合活性
能检测到复制所需的剂量	最佳 pH
产生抗体反应所需的剂量	最佳温度
	基因组序列
	神经氨酸酶活性

[0378] * 比较原代产物与在人细胞内传代一次的产物

[0379] 7.8 实施例 8:临床前动物模型

[0380] 雪貂是用于评估减毒流感疫苗和组分疫苗毒株的减毒特性和免疫原性的稳定动物模型。从 MCB 产生的细胞衍生的流感病毒株的性能与鸡蛋产生的相同病毒株比较。在可控的研究中头对头比较这些材料可以高水平地确保这些病毒产物的可比性。

[0381] 为评估两种疫苗感染雪貂或者实现“进入”雪貂的能力,轻度麻醉雪貂,鼻内接种

细胞或鸡蛋产生的病毒制品。在接种后的几个时间点收集鼻洗涤物质,采用现有几种方法中的一种评估病毒量,从而能评估病毒在雪貂上呼吸道内复制的动力学和程度。实验在某剂量范围内进行,包括多个病毒株和不同的三价混合物,从而能归纳细胞培养物培养的毒株和鸡蛋产生的毒株的相对感染性。这些研究同样也用于评估流感病毒株的免疫原性,即与病毒启动感染的能力有内在联系的特性。在接种后的各种时间点(周)采集雪貂的血样并收集鼻洗涤液;用这些样品评估针对感染的血清抗体和鼻 IgA 反应。感染性、血清抗体和粘膜抗体反应,这些数据的极值可用于比较和评估细胞产生的疫苗和鸡蛋产生的疫苗的可感染性。预计最可能的结果是细胞产生和鸡蛋产生的疫苗毒株具有相似感染性和免疫原性。如果细胞衍生的疫苗比鸡蛋衍生的产物更具感染性或免疫原性,则进一步研究以评估采用较低剂量的可能性。

[0382] 在雪貂模型中进行许多免疫原性和复制研究以评估单一单位人剂量的细胞培养物衍生的疫苗。用 ca ts att 病毒株感染通常在雪貂中引发强大而快速的抗体反应。此外,常规测试了各 ca ts att 病毒株,显示病毒因在鼻咽内复制到较高滴度而在这些动物肺内的复制无法检测到而表达减毒(att)表型。还评估了细胞培养物生长对这些生物特性的影响。但是,不可能观察到所有差异,因为 att 表型是这些病毒株的遗传组成的不可分割部分。在给予这些动物单次人剂量后评估这些病毒株的生长动力学和交叉反应性。这可引发能与遗传谱系内多个病毒株产生交叉反应的血清抗体;预计细胞衍生的疫苗也有同样能力。

[0383] 这些比较评估应能更明显地理解原代病毒产物的潜在生物化学和/或生物物理学差异,并显示通过病毒在人细胞内首次传代或动物研究检测的表观遗传差异对 ca ts att 病毒株特性的影响。根据到目前为止的序列信息,预计用 MDCK 细胞生产不会对 ca ts att 病毒株免疫原性特性产生影响。

[0384] 雪貂是流感的熟知动物模型,通常用于评估 ca ts att 病毒株的减毒表现和免疫原性。一般用 8-10 周龄的动物评估减毒特性;研究设计通常是每个测试或对照组评估 $n = 3-5$ 只动物。利用 8 周到 6 个月大的动物进行免疫原性研究,通常每个实验组或对照组需要 $n = 3-5$ 只动物。这些数目可提供足够的信息以在两组之间进行统计学有效或观察上重要的比较。在大多数研究中,可能观察到流感样病征,但可能性不大。雪貂未表现食欲或体重下降、流鼻涕或眼分泌物的病征;观察流感样疾病的病征是研究的必需部分,未使用诸如镇痛药等干预。如果有其它不舒服的迹象,如口腔溃疡或体重明显下降,与主治医师商议后可以对动物进行适当处置。

[0385] 7.9 实施例 9:主病毒种子(MVS)的建立

[0386] 用野生型病毒和甲型或乙型 MDV 共转染禽细胞并分离和筛选所需 6:2 基因布局(genetic constellation)的子代病毒,以产生目前的流感病毒疫苗毒株。该过程需要病毒在禽细胞培养物和/或 SPF 鸡蛋内多次传代。最近,将质粒拯救应用于产生流感病毒制品。在该过程中,广泛研究和表征的细胞库的 Vero(非洲绿猴)细胞用,例如 8 个 DNA 质粒电穿孔,各质粒包含 8 个流感病毒 RNA 区段中一个的 cDNA 拷贝。电穿孔后数天,这些电穿孔细胞的上清液中含有流感病毒。然后将上清液接种入 SPF 鸡蛋以扩增和生物克隆疫苗毒株。这两个过程都产生可以接种入 SPF 鸡蛋以生产 MVS 的疫苗毒株。虽然质粒拯救有多种优点,包括更可靠地定时、遗传学上更精确的基因区段和受野生型分离株的外来物质污染的可能

性更低,但是这两种方法产生的各 MVS 彼此难以区别,都可用于启动大批量的疫苗生产。利用本发明的方法和组合物时,使该方法适于利用 MDCK 细胞而非 Vero 细胞进行质粒拯救。

[0387] 在衍生自 MDCK 细胞库的细胞中进行疫苗毒株的最终扩增。可用 MDCK 细胞的小规模培养 (<20L) 实现这种最终扩增。收集、浓缩并表征 / 检验这些细胞的上清液以产生 MVS。

[0388] 7.10 犬 RNA Pol I 调节序列的克隆

[0389] 本实施例描述了犬 18S 核糖体 RNA 基因和该基因 5' 一侧核酸序列的克隆。

[0390] 首先,利用威斯康星州麦迪逊震源生物技术公司 (EPICENTRE Biotechnologies; Madison, WI) 的 MasterPure DNA 纯化试剂盒分离 MDCK 细胞 (登录号 CCL-34, ATCC) 的基因组 DNA。序列比对表明 18S rRNA 基因在犬、人、小鼠、大鼠和鸡中有约 90% 相同。根据 18S rRNA 基因 5' 端附近的保守区域中的序列设计引物对以用于从 MDCK 基因组 DNA 中 PCR 扩增一个约 500bp 的片段,该片段可作为探针通过 Northern 杂交检测膜上具有互补序列的消化片段。用 BamH I (约 2.2kb) 和 EcoR I (约 7.4kb) 分别消化基因组 DNA 鉴定到一个限制性酶切片段。将两个片段克隆入威斯康星州麦迪逊普洛麦格公司 (Promega Corp.; Madison, WI) 的 pGEM7 载体作进一步分析。包含 EcoR I 片段的质粒已于 2006 年 4 月 19 日提交美国典型培养物保藏中心保藏,指定的 A. T. C. C. 登录号为 PTA-7540,保藏日期为 2006 年 4 月 20 日。

[0391] 通过限制性消化分析比对获得的两个克隆,通过测序两克隆的两末端以确定两个克隆的方向。EcoR I 片段的限制性酶切图见图 8。然后,确定 5' EcoR I 位点与 3' 方向上下一 BamH I 位点之间的片段的完整核酸序列,并装配成包含约 3536 个碱基的核苷酸序列。该序列见图 9A-C 中 (SEQ IDNO :1)。

[0392] 然后,进行引物延伸实验以鉴定从犬 RNA pol I 调节元件表达的转录物的起始核苷酸。简言之,从 MDCK 细胞分离总 RNA。标记的寡核苷酸引物与 RNA 退火,用于启动 DNA 向 18s rRNA 的 5' 端合成。为鉴定转录物的第一个核苷酸,采用常规双脱氧核苷酸方法,利用相同的引物测序 rRNA。通过比较引物延伸所得核酸的长度与测序反应所得各种核酸的长度可以确定 18s rRNA 的第一个碱基。第一个被转录的核苷酸 (+1 位) 是图 9A-C 所示核苷酸序列的 1809 位碱基。

[0393] 为证实该核苷酸上游的序列包含足够的调节元件以指导下游基因转录,采用标准技术构建包含调节序列控制下的 EGFP 基因的构建体。该构建体所用的 EGFP 基因是 Hoffmann 等 ((2000), "Ambisense" approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template" (产生甲型流感病毒的“双义”方法:从一个模板合成 vRNA 和 mRNA) *Virology* 15 :267 (2) :310-7)) 描述的 EGFP 基因。然后采用常规技术将该构建体转染入 MDCK 细胞。转染后 24 小时,从转染细胞分离 RNA,与编码 EGFP 基因的标记 DNA 进行 Northern 印迹分析。检测到大小合适的转录物证实转染入 MDCK 细胞的质粒包含指导调节元件 3' 一侧序列转录的调节序列。

[0394] 7.11 实施例 11:鉴定犬 RNA 聚合酶 I 调节元件

[0395] 本实施例描述了犬 RNA 聚合酶 I 调节元件 (犬 RNA 聚合酶 I 启动子) 的鉴定和表征。

[0396] 通过检查 18s rRNA 转录起点 5' 一侧的犬启动子序列可鉴定犬 RNA pol I 启动子和其它调节区。此外,可进行简单的缺失实验以鉴定有效启动转录所必需的序列。在一个

这样的缺失实验中,通过定点诱变将限制性位点引入编码图 9A-C 所示核苷酸序列的质粒内,或者在其中鉴定限制性位点。将该限制性位点引入以上鉴定的 +1 核苷酸 3' 方向约 50 个核苷酸处,所述 +1 核苷酸是图 9A-C 所示序列的核苷酸 1809。通过定点诱变在相对于 +1 位置的图 9A-C 所示核苷酸序列的 5' 一侧鉴定或引入另一限制性位点。

[0397] 然后用合适的限制性酶消化将包含这些限制性位点的载体线性化。随后用合适的核酸酶(例如,外切核酸酶 I、外切核酸酶 III 等)消化该线性核酸。在不同的时间点终止反应,可以获得转录起始位点 5' 侧区域中大小不同的缺失。然后,将线性质粒再环化并转化入合适宿主细胞,再经筛选以鉴定包含所需缺失的质粒。或者,可以合成包含侧接待引入缺失的序列的合适寡核苷酸。然后采用标准技术,利用这种寡核苷酸制备包含环-出缺失的衍生物。还可采用标准技术利用寡核苷酸产生定点取代。

[0398] 通过将质粒转染入 MDCK 细胞并通过上述 Northern 印迹检测从质粒转录的 RNA 可确定不同缺失或取代突变体启动转录的能力。通过比较能转录的质粒序列与不能转录的质粒序列,可以鉴定犬 RNA 聚合酶 I 启动子的序列。然后采用常规技术克隆编码该序列的核酸。

[0399] 或者,采用本领域熟知的其它方法,例如小基因组方法可以从 SEQ ID NO:1 所示核酸绘制犬 RNA pol I 启动子。称为 pFlu-CAT 的流感病毒小基因组报道物的应用可参见,例如公布的美国专利申请 20050266026,其包含在 pol I 启动子控制下克隆的负义 CAT 基因。也可参见,Hoffmann 等((2000),“Ambisense”approach for the generation of influenza A virus:vRNA and mRNA synthesis from one template”(制备甲型流感病毒的“双义”方法:从一个模板合成 vRNA 和 mRNA)*Virology*15:267(2):310-7)所述的 EGFP 小基因组;和 Pleschka 等((1996)*J. Virol.*70(6):4188-4192)所述的 CAT 小基因组系统 pPOLI-CAT-RT。

[0400] 为使用这些系统鉴定并表征有效转录起始所需的序列,将上述不同的缺失/取代突变体或 SEQ ID NO:1 的其它亚序列插入所选的报道质粒(例如,pFlu-CAT、EGFP 小基因组),从而报道基因的负义拷贝的转录依赖于缺失或取代突变体的转录启动。上述含 EGFP 的构建体通常可用于制备这种缺失或取代突变体。然后,病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶可从转录自报道质粒的负链 RNA 合成正链 mRNA。细胞机器随后翻译该正链 mRNA,从而能检测报道蛋白(EGFP 或 CAT)活性。

[0401] 在这些试验中,包含 PB1、PB2、PA 和 NP 或 PB1、PA、NP(-PB2 作为阴性对照)的 cDNA 的一组表达质粒与包含在推定犬 RNA pol I 调节序列控制下的甲型流感病毒 EGFP 小基因组或 pFlu-CAT 报道物的质粒一起转染入 MDCK 细胞。然后在能转录和翻译报道序列的条件下培养细胞。

[0402] 采用常规技术检测报道蛋白的活性。对于 EGFP,在转染后 48 小时用相差显微镜或荧光显微镜观察转染的细胞。或者,还可采用流式细胞术检测 EGFP 表达。在利用包含 CAT 基因的小基因组的测定中,利用 pFlu-CAT 检测聚合酶活性。在这种试验中,可通过直接检测 CAT 蛋白(例如,通过 ELISA)、检测编码 CAT 的 mRNA(例如,通过 Northern 印迹)或检测 CAT 活性(例如,检测放射性标记的乙酰基向合适底物的转移)作为报道物活性的指示物来测定 CAT 的表达。

[0403] 例如,将表现出启动子活性的 MDCK 克隆的 DNA 片段(参见上述引物延伸和转录实验)克隆入插入物的上游,该插入物包含分别与反义 EGFP 基因 5' 端和 3' 端融合的流感病

毒 5' 和 3' 非翻译区, 其后是鼠 PoI I 终止子 (参见图 11)。共制备区别在于所插入的 MDCK 序列的三个不同构建体: SEQ ID NO:1 的 MDCK 序列 1-1807(-1)、1-1808(+1) 和 1-1809(+2)。将这些构建体分别与流感病毒复制蛋白 (PB1、PB2、PA 和 NP) 的表达质粒组合, 通过电穿孔引入 MDCK 细胞。电穿孔后 24 小时通过荧光显微术检查细胞。如图 12 所示, 所有三个 MDCK 片段, -1、+1 和 +2 (分别在左上图、中上图、右上图) 都产生 EGFP 荧光, 而缺乏启动子活性的构建体只展示背景荧光 (左下图)。1-1808(+1) 片段产生的荧光水平最高。包含驱动 EGFP 表达的 CMV 启动子的质粒用作阳性对照 (右下图)。

[0404] 流感病毒复制蛋白只复制真正的流感病毒 vRNA 末端。包含 MDCK poII 序列的各质粒的 EGFP 信号说明犬调节序列片段含有启动子活性, 从而能产生含正确流感病毒 vRNA 末端的 RNA, 因而能支持流感病毒的复制。

[0405] 其它可用于鉴定并表征犬 RNA pol I 调节序列的实验包括 RNA 足迹实验。在这种方法中, 包含, 例如图 9A-C 所示序列的 RNA 分子与犬 RNA 聚合酶 I 的一个或多个亚单位接触。犬 RNA pol I 的一个或多个亚单位根据其特定亲和力与合适的 RNA 序列结合。然后, 利用 RNA 酶, 例如 RNA 酶 I 降解犬 RNA 聚合酶的一个或多个亚单位未保护的 RNA。随后灭活 RNA 酶, 从 RNA 聚合酶 I 的一个或多个保护性亚单位中分离被保护的 RNA 片段。分离的片段包含与 RNA 聚合酶 I 的一个或多个亚单位结合的序列, 其是具有启动子 / 增强子活性的极佳候选序列。此外, 这些足迹实验还可在有犬 RNA 聚合酶 I 的不同亚单位存在下进行, 从而鉴定哪个亚单位与哪个 RNA 序列结合。这些实验有助于测定不同结合序列的活性, 例如, 通过比较不同的犬 PoI I 聚合酶亚单位与序列和结合特异性已知的其它物种的 RNA 聚合酶 I 亚单位的序列来测定。

[0406] 还可采用体外技术监测从推定犬 RNA pol I 调节序列的转录。在这些技术中, 上述不同的缺失 / 取代突变体或 SEQ ID NO:1 或 26 的其它亚序列与感兴趣的转录物操作性连接。然后将一组转录所需的犬 RNA 聚合酶 I 蛋白加入转录体。通过检测犬 RNA 聚合酶 I 蛋白所制备的 RNA 转录体 (例如通过 Northern 印迹) 来检测有效转录。

[0407] 可采用相似实验鉴定其它犬 RNA pol I 调节元件, 例如影响 RNA pol I 转录的增强子、阻抑物或其他元件。在这种试验中, 通常将包含 SEQ ID NO:1 的缺失、取代或亚序列的报道构建体的表达水平与上述鉴定的微小 RNA pol I 启动子的表达水平作比较。通过比较表达水平, 可以鉴定是否存在与转录增强或降低有关的元件。

[0408] 7.12 实施例 12: MDCK 细胞中的流感病毒拯救

[0409] 本实施例描述利用实施例 10 克隆的犬 RNA pol I 调节元件在 MDCK 细胞培养物中拯救流感病毒。

[0410] 采用常规分子生物学技术构建编码在犬 RNA pol I 启动子控制下的病毒基因组 RNA 的 8 个表达载体。具体地说, 通过用 MDCK EcoRI-BamHI 亚克隆 (SEQ ID NO:1 的碱基 1808-1340) 的 469bp 片段 (pAD4000 中的碱基 1-469) 替代 pAD3000 中的 213bp 人 PoI I 启动子序列, 从 pAD3000 载体 (Hoffman 等, PNAS (2002), 99 (17): 11411-11416, 图 10) 构建质粒表达载体 pAD4000 (SEQ ID NO:29, 图 13)。注意: 图 13 中的 469bp 片段显示为碱基 1-469, 但是反向互补取向。该 469bp MDCK 片段含有功能性犬 PoI I 启动子。此外, 用 pAD4000 中的 24bp 接头序列 AGAGTCTTCTCGAGTAGAAGACCG (SEQ ID NO:31) 替代 pAD3000 中的 18bp 接头序列 AGGAGACGGTACCGTCTC (SEQ ID NO:30)。

[0411] 将编码 MDV B 基因组的 8 个流感病毒区段克隆入 8 个独立的 pAD4000 表达载体 (在功能性犬 Po1 I 启动子控制下), 所述 8 个流感病毒区段中的 2 个 (NS, SEQ ID NO :32 和 PB1, SEQ ID NO :40) 含有沉默突变 (分别是 SEQ IDNO :33 和 41, 和图 16)。然后在英杰公司 (Invitrogen) 的无血清 Opti-MEM[®] I 培养基中将该 8 个表达载体电穿孔入 MDCK 细胞, 利用细胞的上清液接种鸡蛋。33°C 温育 72 小时后从 HA 阳性鸡蛋收集病毒。对从病毒提取的 RNA 进行 RT-PCR 反应 (参见, 引物序列 (SEQ ID NO :34-39) 和图 14 和 15 中的退火位置), 随后对 PCR 产物进行核苷酸序列分析。根据存在含沉默突变的 PB1 和 NS 区段, 确定已在 MDCK 细胞中拯救了感染性活流感病毒。

[0412] 发现上清液中拯救的病毒 (MDV-B 和 MDV-Bm [含沉默突变的 MDV-B]) 的滴度出乎意料地高。参见表 6。例如, 在第 3 天检测到 $4-5 \log_{10}$ PFU/ml 的病毒。在第 2 到第 3 天, 基于 Vero 细胞利用人 Po1 I 启动子系统拯救的病毒滴度通常只有 ≤ 100 pfu。因此, 本文所述的犬 Po1 I 质粒拯救系统看来远比他人所述的现有质粒拯救技术有效。

[0413] 表 6

[0414]

	HAI 滴度 PFU/mL	
	MDV-B	MDV-Bm
第 2 天	1.48E+03	2.22E+02
第 3 天	6.60E+05	9.80E+04
第 4 天	2.28E+07	5.20E+06
第 5 天	1.90E+07	1.80E+07
第 6 天	3.60E+06	3.20E+06
第 7 天	2.62E+06	2.96E+06

[0415] 通过拯救乙型毒株和甲型毒株 ca 主供体病毒 (MDV) 以及许多甲型和乙型重配株证明犬 Po1 I 质粒拯救系统的有效性。对于重配株, 将合适 MDV (甲型或乙型病毒株) 的 6 个内部基因区段与 H1N1、H2N2、H3N2、H5N1 亚型的甲型毒株或 Yamagata 或 B/Victoria 谱系乙型毒株的 HA 和 NA 区段组合。表 7 总结了拯救的 MDV 毒株和重配株。基本上如上所述拯救这些病毒。将编码甲型或乙型病毒株基因组的流感病毒区段克隆入不同 pAD4000 表达载体 (含有上述功能性犬 Po1 I 启动子)。然后将编码待拯救毒株的所有 8 个流感病毒区段的 8 个表达载体转染入无血清 Opti-MEM[®] I 培养基 (英杰公司) 中的 MDCK 细胞, 利用细胞上清液接种鸡蛋。在这些实验中, 按照生产商的使用说明书, 利用德国 PK 公司的非脂质体转染试剂 (PromoFectin 目录号 PK-CT-2000, PromoKine, Germany) 进行转染。33°C 温育 72 小时后, 从 HA 阳性鸡蛋收集 HA。

[0416] 表 7

[0417]

甲型毒株	乙型毒株
H1N1 <i>ca</i> A New Caledonia/20/1999	<i>ca</i> B Malaysia/2506/2004 <i>ca</i> B Florida/07/2004
H2N2 MDV A (A/Ann Arbor/6/1960)	<i>ca</i> B Jiangsu/10/2003 <i>ca</i> B Hong Kong/330/2001
H3N2 <i>ca</i> A Wisconsin/67/2005 <i>ca</i> A California/7/2004 <i>ca</i> A Panama/2007/1999	MDV B (B/Ann Arbor/1/1966)
H5N1 <i>ca</i> A Hong Kong/213/2003 <i>ca</i> A Hong Kong/67/1997 (491H5/486N1)	

[0418] 虽然为清晰和理解的目的已对本发明的一些细节作了描述,但是本领域技术人员通过阅读本文应明白可以在形式和细节上作出各种改进而不偏离本发明的真实范围。例如,可以各种组合使用上述所有技术和设备。如同每份出版物、专利、专利申请或其它文件出于所有目的单独表明通过引用方式纳入本文的程度一样,本申请引用的所有出版物、专利、专利申请或其它文献均出于所有目的通过引用方式全文纳入本文。此外,以下专利申请出于所有目的通过引用方式全文纳入本文:2006年6月20日提交的PCT专利申请序列号PCT/US2006/023867;2006年6月20日提交的美国专利申请序列号11/455,734;2006年8月9日提交的11/501,067;2006年4月19日提交的美国临时专利申请号60/793,522;2006年4月19日提交的U.S. 60/793,525;2005年7月22日提交的U.S. 60/702,006;2005年7月15日提交的U.S. 60/699,556;2005年7月15日提交的U.S. 60/699,555;2005年6月21日提交的U.S. 60/692,965;和2005年6月21日提交的U.S. 60/692,978。

序列表

<110> 米迪缪尼有限公司 (MedImmune Vaccines, Inc)

G. 杜克 (Duke, Gregory)

G. 坎宝 (Kemble, George)

J. 杨 (Young, James)

王招娣 (Wang, Zhaoti)

<120> 在犬细胞中表达负义病毒 RNA 的方法和组合物

<130>FL412PCT2

<150>11/501, 067

<151>2007-08-09

<150>11/455, 734

<151>2006-06-20

<150>60/793, 522

<151>2006-04-19

<150>60/793, 525

<151>2006-04-19

<160>41

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>3537

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>1

```

aattctggag aaacagattg tgttataaga aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa   60
gagaaaatcc ttatgttctt tgagcctccc ctcccccca gaattgagtt cctcttccac   120
gaccttcttct cattcaacc aatagacaag tatttggggg ggggggtcag gtcccagacg   180
ctgagagggt ggaggtgaag gtggtgcggg gggggggggg cacaccgtcc tctccagcgc   240
ctttggttca gacctcttc gtgacctccc tccctcctc cctcctctct cctcctctct   300

```

cctcctccct	cttcgtctta	taaatatata	aataaaatcc	taaagaaaag	aaaaagaaaa	360
aaaaaaaaag	gaaggacacg	agaaaaaacg	gtgcatccgt	tgccgtcctg	agagtcctcg	420
cctggtttcg	gctctacgtt	ccctccctga	cctcggaaac	gtgcctgagt	cgtcccggga	480
gccccgcgcg	gcgagcgcga	ccccctttcg	ggcggcagcg	ggccccggacg	gacggacgga	540
cggacggacg	ggttttccaa	ggctcccccg	ccccgggagg	acgggggttc	gcggtgcgcg	600
gccgtgtgct	ccggggccct	ccgccgtccc	cgggccgaga	ggcgagatcc	gaggegcctg	660
acggcctcgc	cgccccgatc	tgccccgctg	tcgttcgcgc	cggttgtcgg	gtgccactgg	720
cggccgcttt	tatagagcgt	gtccctccgg	aggctcggcg	gcgacaggca	aggaacagct	780
ttgggtgtcgg	tttccccggg	ccgagttcca	ggaggagggc	ggctccggcg	cgagcgtctg	840
tcgccccggc	ctcggcgcga	tgcgctcgcc	ggagattgga	ctccggagct	gcgagggagt	900
gtcgccgtcg	cccgtgtcgc	ccgtgtccgc	tcgcctcgc	tcccggagga	ggccgtgcgg	960
gccgcctggg	tgggtcgacc	agcaccgcgc	gtggctcctc	ctcgccccgc	cggaccgacc	1020
tgggcgcctc	ggggggcggg	gacaggggtg	gtcccccgct	ccgtcctgtg	gctccgggcg	1080
atcttcgggc	cttccctccg	tgtaactcgg	ttgtctcccg	tggtcacgcc	ctggcgacgg	1140
ggaccggtct	gagcctggag	gggaagcccc	tgggtggcgc	gacagaccgc	gctgcgggca	1200
cgtgtggggg	tccccggcgt	cggacgcgat	tttctcccct	ttttccgagg	cccgtgcgg	1260
aggtgggtcc	cgggcggctg	gaccgggtgc	cacgcggggg	tgggcgggccc	gtccgttcgg	1320
gcgtccggcc	ccggtggcga	ttccccgtga	ggctgcctct	gccgcgcgtg	gccctccacc	1380
tcccctgccc	cgagccgggg	ttggggacgg	cggtaggcac	ggggcggtcc	tgagggcgcg	1440
gggggacggc	ctccgcacgg	tgctgcctc	cggagaactt	tgatgatttt	tcaaagtctc	1500
ctccccgaga	tactggctt	ggcggcgtgg	cggcgtggcg	gcgtggcggc	gtggcggcgt	1560
ggcggcgtgg	cgtctccacc	gaccgcgtat	cgccccctct	ccccccccc	cccccccccg	1620
ttccctgggt	cgaccagata	gccctggggg	ctccgtgggg	tgggggtggg	ggggcgccgt	1680
ggggcaggtt	ttggggacag	ttggccgtgt	cacggctccg	ggaggtcgcg	gtgacctgtg	1740
gctggtcccc	gccggcaggc	gcggttattt	tcttgcccga	gatgaacatt	ttttgttgcc	1800
aggtaggtgc	tgacacgttg	tgtttcggcg	acaggcagac	agacgacagg	cagacgtaaa	1860
agacagccgg	tccgtccgtc	gctcgcctta	gagatgtggg	cctctgggcg	cgggtggggt	1920
tccggccttg	accgcgcggc	cgagccggtc	cctgtcctcg	ctcgtggag	cctgagccgt	1980
ccgcctgggc	ctgcgcgcgc	gctctcgtgc	tggactccag	gtggccccggg	tcgcggtgtc	2040
gccctccggt	ctccggcacc	cgagggaggg	cggtgtgggc	aggtggcggg	gggtctttta	2100
cccccgctgc	ctccatgcgc	tgggcaccgc	gccgttggcc	gtgacaacc	ctgtctcgca	2160
aggctccgtg	ccgcgtgtca	ggcgtcccc	gctgtgtctg	gggttgtccg	gtcgtcctg	2220
cccccccc	cccgggggtc	gaggggcttg	ccggtgaggc	ggaagcaggt	cccccggtc	2280
gccgtcctcg	ctgggctttt	gctcctcggg	aagccccctc	ggggccgcag	cttgetgcgc	2340
atcgategat	gtggtgatct	cgtgctctcc	tgggccgggc	ctaagccgcg	tcagacgagg	2400
gacgggcgtc	cacggcggat	gcgaccgctc	ttctcgttct	gccccggggc	ccctccctcc	2460
ccggtcctc	cgcgcgccgc	cgctcgtggc	ggtgcgcggg	gggcgcgcgc	cggggttggg	2520
ggtggtgcgg	actccggccc	gacccccgcc	tcccccttc	ttgcctcgcg	gcgctggcgg	2580
gaccggggtc	ctcggacgcg	gcggacactc	tcgccggcct	ttcccgaagg	ccctgggtcc	2640

gtggcgagcg gccctcccct cctccgcggg ggagggccgg cccgacgccg cgctgctcac 2700
 cgccccgcct gggcgcgctt gagcgcgctt cgccccggccc tccgtggtgc ccctggagcg 2760
 ctccaggtcg cctcaggtgc ctgaggccga gcggtggcgt cgtttccttc cccggcgact 2820
 cccctcgggc tgccgccgcc gtcgtcggcg tgtccgagga gcgggtgggtg gaagaagtcg 2880
 gcaagggagg cgcacccgtg cccctggcgg gggcgcgggc gcctcgtctt ccttcccctc 2940
 tcctctcctc cccctcgcg cgccggcggg ggggtgggtgg cgtggggcgg tgtgactcgg 3000
 aggacttggc ggggctcgtg aggccgcggc gggccgggccc acgccgcggc gcttgccagc 3060
 cgaggggctg cccctctctc cggcacgggt cgtgtccccg tctccgtccc tctctctcgc 3120
 gctcgcggga ggcggggagc tctctctctt gggcggtgac gtgaccacgc cgtgcgcggg 3180
 cgagggcggg gtggcgctct cgagggggca cggccgcga gcgctcgggg ttgccctgtg 3240
 cctgtccctt gccggagatc cgccccccgc cccgcgagcc tgtcggcccc ggagcgcgcg 3300
 ctggtggggc ccgtttggga ggacgaacgg gtggggcgat gcgccctcgg tgagaaagcc 3360
 ttctctagcg atccgagagg gtgccttggg gtaccggagc ccccagccgc tgcccctcct 3420
 ctgcgcgtgt agtgtggcca gcgacgcggg gttggactcc cgtcgcgacg tgtttgggca 3480
 gagtgccgct ctttgccctac ctaccgcgcg tgcgtcctccc cctccgagac ggggggag 3537

<210>2

<211>333

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>2

ttgatgattt ttcaaagtcc tcccggagat cactggcttg gcggcgtggc ggcgtggcgg 60
 cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg acccgatcg cccctcctcc 120
 cctccccccc ccccccggtt ccctgggtcg accagatagc cctgggggct ccgtgggggtg 180
 ggggtggggg ggcgccgtgg ggcaggtttt ggggacagtt ggccgtgtca cggccccggg 240
 aggtcgcggt gacctgtggc tggccccgc cggcaggcgc ggttattttc ttgcccgaga 300
 tgaacatttt ttgttgccag gtaggtgctg aca 333

<210>3

<211>168

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>3

gggctccgtg ggggtgggggt gggggggcgc cgtggggcag gttttgggga cagttggccg 60
 tgtcacggtc ccgggaggtc gcggtgacct gtggctggtc cccgccggca ggcgcggtta 120
 ttttcttgcc cgagatgaac attttttgtt gccaggtagg tgctgaca 168

<210>4

<211>140

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>4

gccgtggggc aggttttggg gacagttggc cgtgtcacgg tcccgggagg tcgcggtgac	60
ctgtggctgg tccccgccgg caggcgcggt tattttcttg cccgagatga acattttttg	120
ttgccaggta ggtgctgaca	140

<210>5

<211>114

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>5

tggccgtgtc acggtcccgg gaggtcgcgg tgacctgtgg ctggtccccg ccggcaggcg	60
cggttatttt cttgcccagag atgaacattt tttgttgcca ggtaggtgct gaca	114

<210>6

<211>85

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>6

gtgacctgtg gctgggtccc gccggcaggc gcggttattt tcttgcccga gatgaacatt	60
ttttgttgcc aggtaggtgc tgaca	85

<210>7

<211>59

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>7

aggcgcggtt attttcttgc ccgagatgaa cattttttgt tgccaggtag gtgctgaca	59
--	----

<210>8

<211>164

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>8
 ttgatgattt ttcaaagtcc tcccggagat cactggcttg gcggcgtggc ggcgtggcgg 60
 cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg acccgtatcg cccctcctcc 120
 cctccccccc ccccccggtt ccctgggtcg accagatagc cctg 164

<210>9

<211>137

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>9

ttgatgattt ttcaaagtcc tcccggagat cactggcttg gcggcgtggc ggcgtggcgg 60
 cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg acccgtatcg cccctcctcc 120
 cctccccccc ccccccc 137

<210>10

<211>109

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>10

ttgatgattt ttcaaagtcc tcccggagat cactggcttg gcggcgtggc ggcgtggcgg 60
 cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg acccgtatc 109

<210>11

<211>55

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>11

ttgatgattt ttcaaagtcc tcccggagat cactggcttg gcggcgtggc ggcgt 55

<210>12

<211>299

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>12

ttgatgattt ttcaaagtcc tcccggagat cactggcttg gcggcgtggc ggcgtggcgg 60
 cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg acccgtatcg cccctcctcc 120

cctcccccc ccccccggtt ccctgggtcg accagatagc cctgggggct ccgtgggggtg 180
 ggggtggggg ggcgccgtgg ggcaggtttt ggggacagtt ggccgtgtca cggccccggg 240
 aggtcgcggt gacctgtggc tggccccgc cggcaggcgc ggttattttt ttgcccag 299

<210>13

<211>244

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>13

ggcggcgtgg cggcgtggcg gcgtggcggc gtggcgcttc caccgaccgc tategccct 60
 cctccccctc ccccccccc ccgttccctg ggtcgaccag atagccctgg gggtccctg 120
 ggggtgggggt gggggggcgc cgtggggcag gttttgggga cagttggccg tgtcacggtc 180
 ccgggaggtc gcggtgacct gtggctggtc cccgccggca ggcgcggtta ttttcttgcc 240
 cgag 244

<210>14

<211>190

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>14

gccccctc cctcccccc cccccccgt tcctgggtc gaccagatag cctgggggc 60
 tccgtgggggt ggggggtggg gggcgccgtg gggcaggttt tggggacagt tgccctgtc 120
 acggtcccg gaggtcgcgg tgacctgtgg ctggtccccg ccggcaggcg cggttatttt 180
 cttgcccag 190

<210>15

<211>134

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>15

gggctccgtg ggggtgggggt gggggggcgc cgtggggcag gttttgggga cagttggccg 60
 tgtcacggtc ccgggaggtc gcggtgacct gtggctggtc cccgccggca ggcgcggtta 120
 ttttcttgcc cgag 134

<210>16

<211>106

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<400>16	
gccgtggggc aggttttggg gacagttagc cgtgtcacgg tcccgggagg tcgcggtgac	60
ctgtggctgg tccccgccgg caggcgcggt tattttcttg cccgag	106
<210>17	
<211>80	
<212>DNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<400>17	
tggccgtgtc acggtccccg gaggtcgcgg tgacctgtgg ctggtccccg ccggcaggcg	60
cggttatttt cttgccccgag	80
<210>18	
<211>217	
<212>DNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<400>18	
ggcgtggcgt ctccaccgac ccgtatcgcc cctcctcccc tcccccccc cccccgttcc	60
ctgggtcgac cagatagccc tgggggctcc gtgggggtggg ggtggggggg cgccgtgggg	120
caggttttgg ggacagttag ccgtgtcacg gtccccgggag gtcgcggtga cctgtggctg	180
gtccccgccg gcaggcgcgg ttattttctt gccccgag	217
<210>19	
<211>56	
<212>DNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<400>19	
tcgcggtgac ctgtggctgg tccccgccgg caggcgcggt tattttcttg cccgag	56
<210>20	
<211>336	
<212>DNA	
<213> 家犬 (Canis familiaris)	
<400>20	

ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct tggcggcgtg gcggcgtggc	60
ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcgtctccac cgaccgcgta tcgcccctcc	120
tcccctcccc ccccccccc gttccctggg tcgaccagat agccctgggg gctccgtggg	180
gtgggggtgg gggggcgccg tggggcaggt tttggggaca gttggccgtg tcacggtccc	240
gggaggtcgc ggtgacctgt ggctgggtccc cgccggcagg cgcggttatt ttcttgcccg	300
agatgaacat tttttgttgc caggtaggtg ctgaca	336

<210>21

<211>167

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>21

ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct tggcggcgtg gcggcgtggc	60
ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcgtctccac cgaccgcgta tcgcccctcc	120
tcccctcccc ccccccccc gttccctggg tcgaccagat agccctg	167

<210>22

<211>140

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>22

ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct tggcggcgtg gcggcgtggc	60
ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcgtctccac cgaccgcgta tcgcccctcc	120
tcccctcccc ccccccccc	140

<210>23

<211>112

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>23

ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct tggcggcgtg gcggcgtggc	60
ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcgtctccac cgaccgcgta tc	112

<210>24

<211>57

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>24

ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct tggcggcgtg gcggcgt 57

<210>25

<211>302

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>25

ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct tggcggcgtg gcggcgtggc 60
 ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcgtctccac cgaccgcgta tcgcccctcc 120
 tcccctcccc ccccccccc gtccctggg tcgaccagat agccctgggg gctccgtggg 180
 gtgggggtgg gggggcgcgg tggggcaggt tttggggaca gttggcgtg tcacggtecc 240
 gggaggtegc ggtgacctgt ggctggtecc cgccggcagg cgcggttatt ttcttgcccc 300
 ag 302

<210>26

<211>469

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>26

attcccgggtg aggctgcctc tgccgcgcgt ggccctccac ctcccctggc ccgagccggg 60
 gttggggacg gcggtaggca cggggcggtc ctgagggccg cgggggacgg cctccgcacg 120
 gtgcctgcct ccggagaact ttgatgattt ttcaaagtct cctcccggag atcactggct 180
 tggcggcgtg gcggcgtggc ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcgtctccac 240
 cgaccgcgta tcgcccctcc tcccctcccc ccccccccc gtccctggg tcgaccagat 300
 agccctgggg gctccgtggg gtgggggtgg gggggcgcgg tggggcaggt tttggggaca 360
 gttggcgtg tcacggtecc gggaggtegc ggtgacctgt ggctggtecc cgccggcagg 420
 cgcggttatt ttcttgcccc agatgaacat tttttgttgc caggtaggt 469

<210>27

<211>245

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>27

ggcggcgtgg cggcgtggcg gcgtggcggc gtggcgtctc caccgaccgc gtatcgcccc	60
tcctcccctc ccccccccc cccgttcctt gggtcgacca gatagccctg ggggctccgt	120
ggggtggggg tgggggggcg ccgtggggca ggttttgggg acagttggcc gtgtcacggt	180
cccgggaggt cgcggtgacc tgtggctggt ccccgccggc aggcgcgggtt attttcttgc	240
ccgag	245

<210>28

<211>218

<212>DNA

<213> 家犬 (Canis familiaris)

<400>28

ggcgtggcgt ctccaccgac cgcgtatcgc cctcctccc ctccccccc cccccgttc	60
cctgggtcga ccagatagcc ctgggggctc cgtgggggtg gggtaggggg gcgccgtggg	120
gcaggttttg gggacagttg gccgtgtcac ggtccccgga ggtcgcgggtg acctgtggct	180
ggtccccgcc ggcaggecgc gttattttct tgccccgag	218

<210>29

<211>3100

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 质粒

<400>29

acctacctgg caacaaaaaa tttcatctc gggcaagaaa ataaccgcgc ctgccggcgg	60
ggaccagcca caggtcaccg cgacctccg ggaccgtgac acggccaact gtccccaaaa	120
cctgccccac ggcgcccccc cccccccacc ccacggagcc cccagggcta tctggctgac	180
ccagggaacg gggggggggg gggaggggag gaggggcgat acgcggtcgg tggagacgcc	240
acgccgccac gccgccacgc cgccacgcc ccacgccgcc acgccgcaa gccagtgate	300
tccgggagga gactttgaaa aatcatcaaa gttctccgga ggcaggcacc gtgcggaggc	360
cgccccccgc ggccctcagg accgccccgt gcctaccgcc gtccccaaacc ccggctcggg	420
ccaggggagg tggagggcca cgcgcggcag aggcagcctc accgggaata tgggcccgt	480
cacctcagac atgataagat acattgatga gtttgacaa accacaacta gaatgcagtg	540
aaaaaaatgc tttattttgt aaattttgtga tgctattgct ttattttgtaa ccattataag	600
ctgcaataaa caaggatctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc	660
gtattgggcg ctcttccgct tcctcgetca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc	720
ggcgagcgggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata	780

acgcagga	aaa	gaacatgtga	gcaaaaaggcc	agcaaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	840
cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatecgacgct		900
caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa		960
gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggataacctg	tccgcctttc		1020
tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcaat	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg		1080
aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg		1140
ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccaactgg		1200
cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcgggtgct	acagagttct		1260
tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atgttggtatc	tgcgctctgc		1320
tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg		1380
ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc		1440
aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt		1500
aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa		1560
aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat		1620
gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagega	tctgtctatt	tcgttccatc	atagttgect		1680
gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggctt	accatctggc	cccagtgctg		1740
caatgatacc	gcgagacca	cgtcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag		1800
ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggctctg	caactttatc	cgcctccatc	cagtctatta		1860
attgtttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgcgc	aacgttgttg		1920
ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	cgctgtttgg	tatggcttca	ttcagctccg		1980
gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	gcggttagct		2040
ccttcggtec	tccgatcgtt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	ctcatggtta		2100
tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg		2160
gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc		2220
cgcgctcaat	acgggataat	accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg		2280
gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga		2340
tgtaaccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg		2400
ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgccg	caaaaaagg	aataagggcg	acacggaaat		2460
gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	ggttattgtc		2520
tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca		2580
catttccccg	aaaagtgcca	cctgacgtcg	atatgccaag	tacgccccct	attgacgtca		2640
atgacggtaa	atggccccgc	tggcattatg	cccagtacat	gaccttatgg	gactttccta		2700
cttggcagta	catctacgta	ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgcgg	ttttggcagt		2760
acatcaatgg	gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccccattg		2820
acgtcaatgg	gagtttgttt	tgccaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgctgtaaca		2880
actccgcccc	attgacgcaa	atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca		2940
gagctctctg	gctaactaga	gaaccactg	cttactggct	tatcgaaatt	aatacgactc		3000
actatagggg	gaccaagct	gttaacgcta	gctagcagtt	aaccggagta	ctggtcgacc		3060
tccgaagtgg	ggggggagag	tcttctcgag	tagaagaccg				3100

<210>30	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成的接头	
<400>30	
aggagacggt accgtctc	18
<210>31	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成的接头	
<400>31	
agagtcttct cgagtagaag accg	24
<210>32	
<211>119	
<212>DNA	
<213> 乙型流感病毒	
<400>32	
aaaaattcct caaatagcaa ctgtccaaac tgcaattgga ccgattacce tccaacacca	60
ggaaagtgcc ttgatgacat agaagaagaa cgggagaatg ttgatgacce aactgaaat	119
<210>33	
<211>119	
<212>DNA	
<213> 乙型流感病毒	
<400>33	
aaaaattcct caaatagcaa ctgtccaaac tgcaattgga ccgattacce tccaacgcca	60
ggaaagtgcc ttgatgacat agaagaagaa cgggagaatg ttgatgacce aactgaaat	119

<210>34	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成的引物	
<400>34	
ggcactaatg gtcacaactg	20
<210>35	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成的引物	
<400>35	
atcagagggt ttgtattagt ag	22
<210>36	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成的引物	
<400>36	
tgggctgtct ctggttattc	20
<210>37	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	

<223> 合成的引物

<400>37

tctctttatg aggaaaccct 20

<210>38

<211>20

<212>DNA

<213> 家犬 (*Canis familiaris*)

<400>38

gtgagcctga aagtaaaagg 20

<210>39

<211>20

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成的引物

<400>39

gcaacaagtt tagcaacaag 20

<210>40

<211>423

<212>DNA

<213> 乙型流感病毒

<400>40

tcattgattc attggacaaa cctgaaatga ctttcttctc ggtaaagaat ataaagaaaa 60

aattgcctgc taaaaacaga aagggtttcc tcataaagag aataccaatg aaggtaaaag 120

acagaataac cagagtggaa tacatcaaaa gagcattatc attaaacaca atgacaaaag 180

atgctgaaag aggcaaacta aaaagaagag caattgccac cgctgggata caaatcagag 240

ggtttgtatt agtagttgaa aacttggtta aaaatatctg tgaaaatcta gaacaaagtg 300

gtttgccagt aggtgggaac gagaagaagg ccaaactgtc aatgcagtg gccaaaatgc 360

tcagtaactg cccaccagga gggatcagca tgacagtgtac aggagacaat actaaatgga 420

atg 423

<210>41

<211>423

<212>DNA

<213> 乙型流感病毒

<400>41

tcattgattc attggacaaa cctgaaatga ctttcttctc ggtaaagaat ataaagaaaa	60
aattgcctgc taaaaacaga aagggtttcc tcataaagag aataccaatg aaggtaaaag	120
acagaataac cagagtggaa tacatcaaaa gagcattatc attaaacaca atgacaaaag	180
atgctgaaag aggcaaacta aaaagaagag caattgccac cgctgggata caaatcagag	240
ggtttgtatt agtagttgaa aacttggcta aaaatatctg tgaaaatcta gaacaaagtg	300
gtttgccagt aggtgggaac gagaagaagg ccaaactgtc aaatgcagtg gccaaaatgc	360
tcagtaactg cccaccagga gggatcagca tgacggtgac aggagacaat actaaatgga	420
atg	423

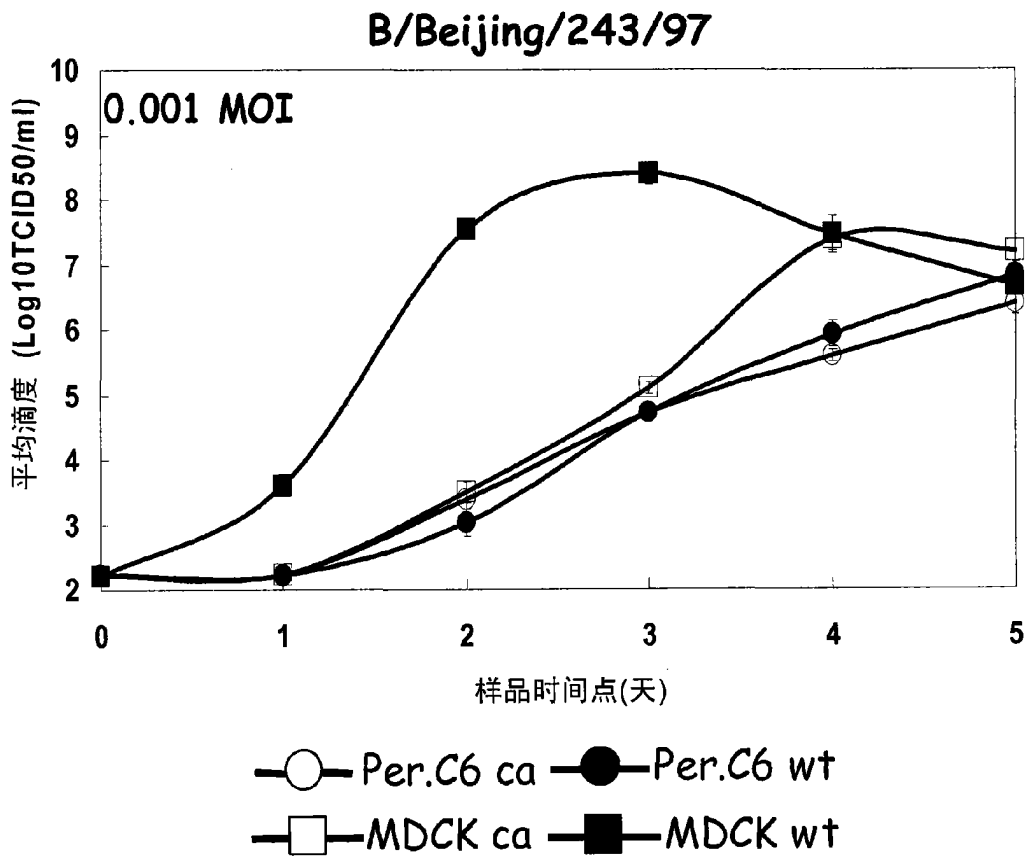


图 1

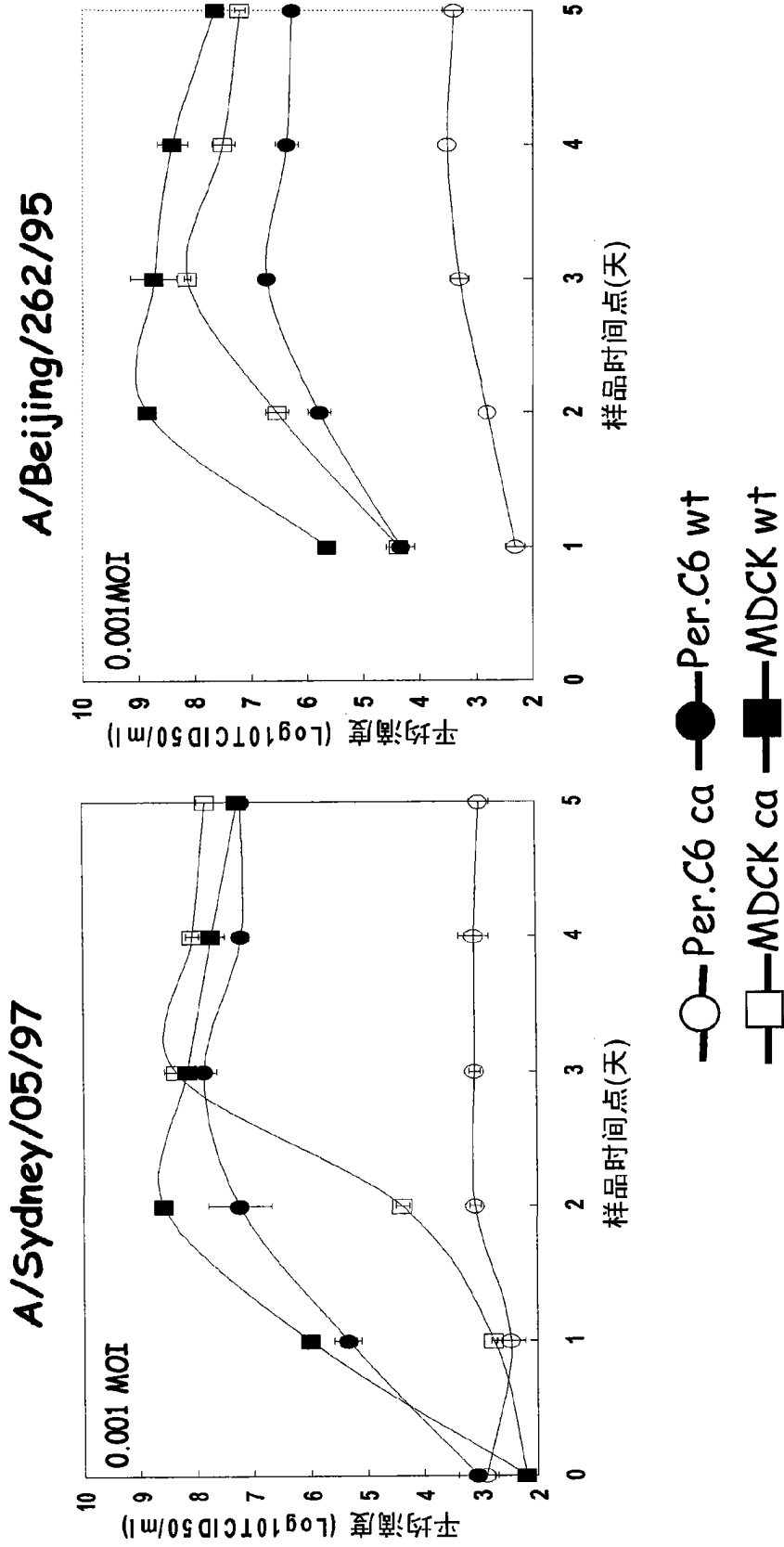


图 2

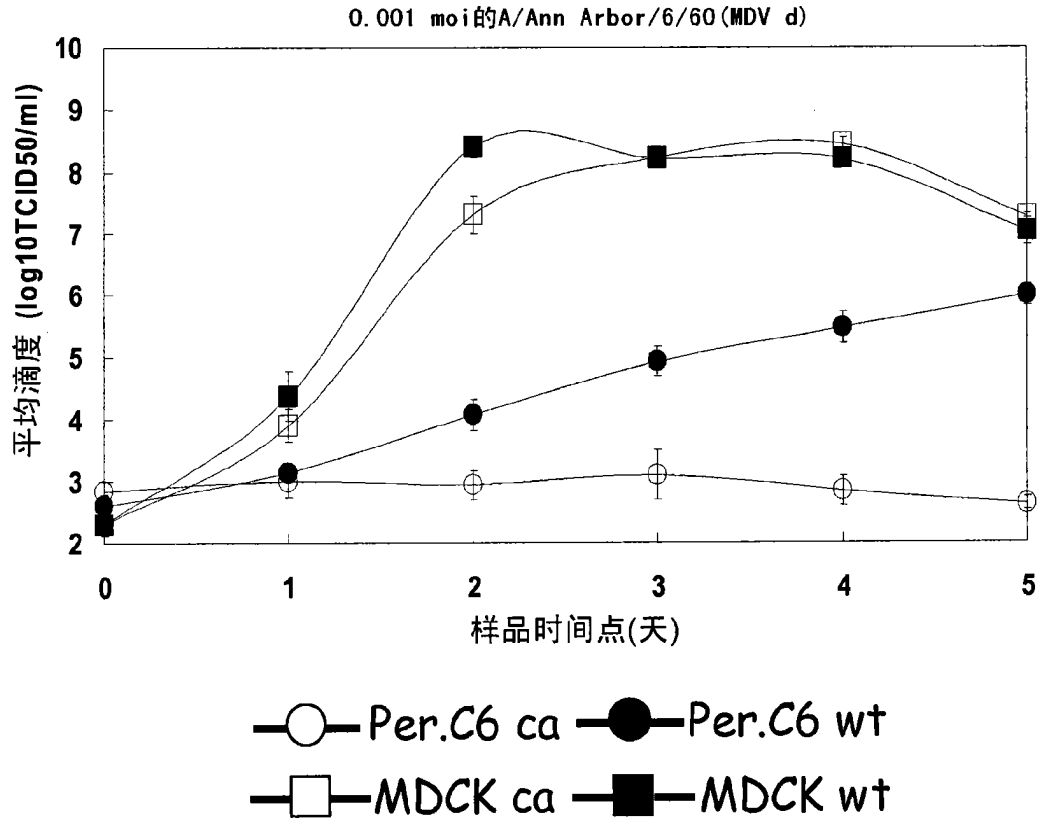


图 3

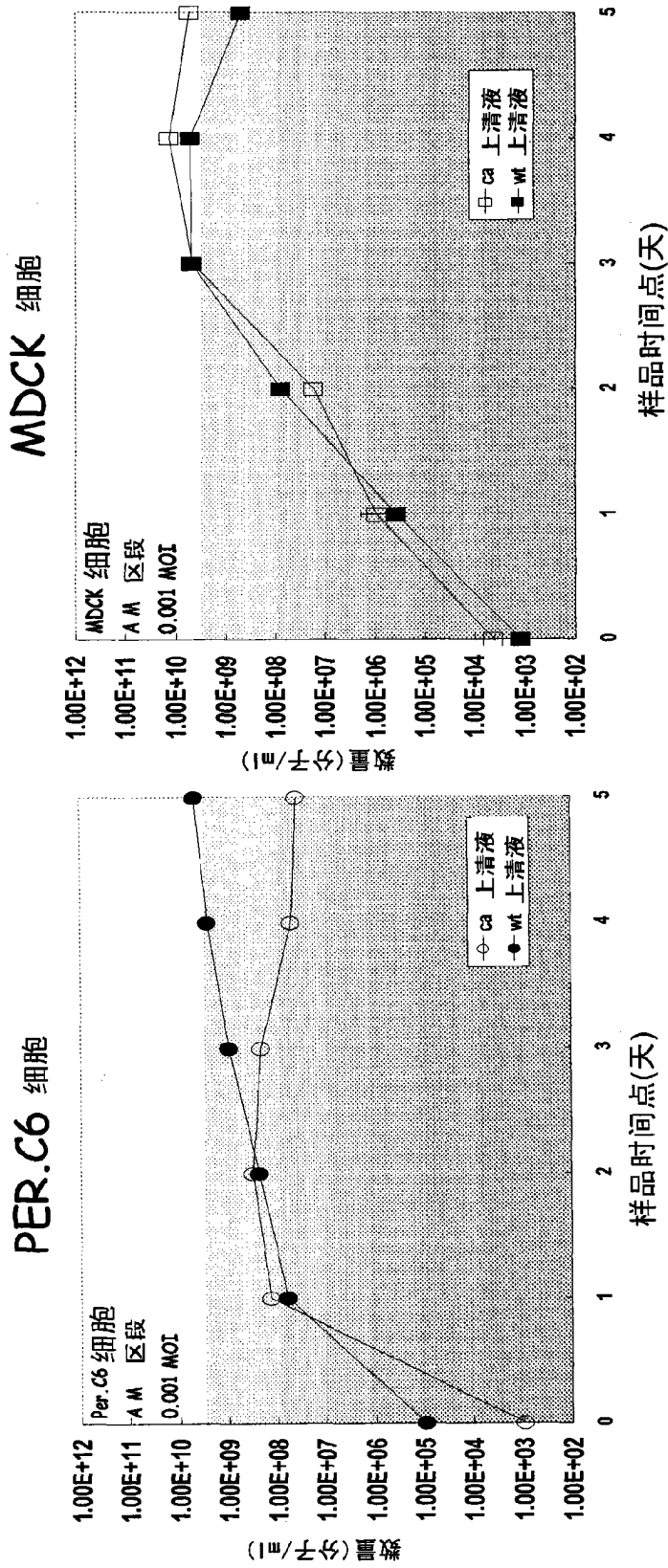


图 4

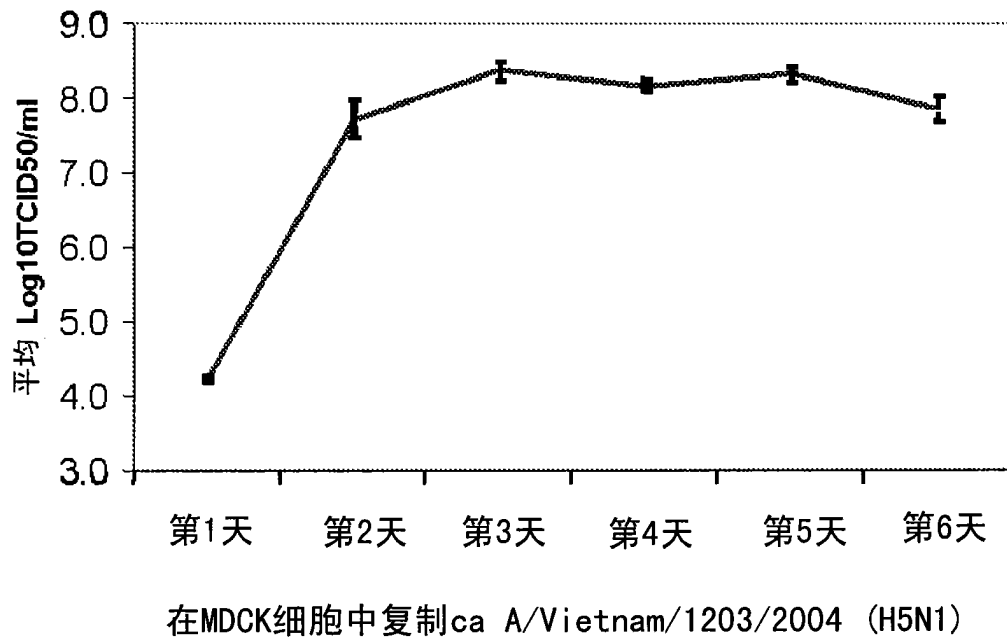


图 5



图 6

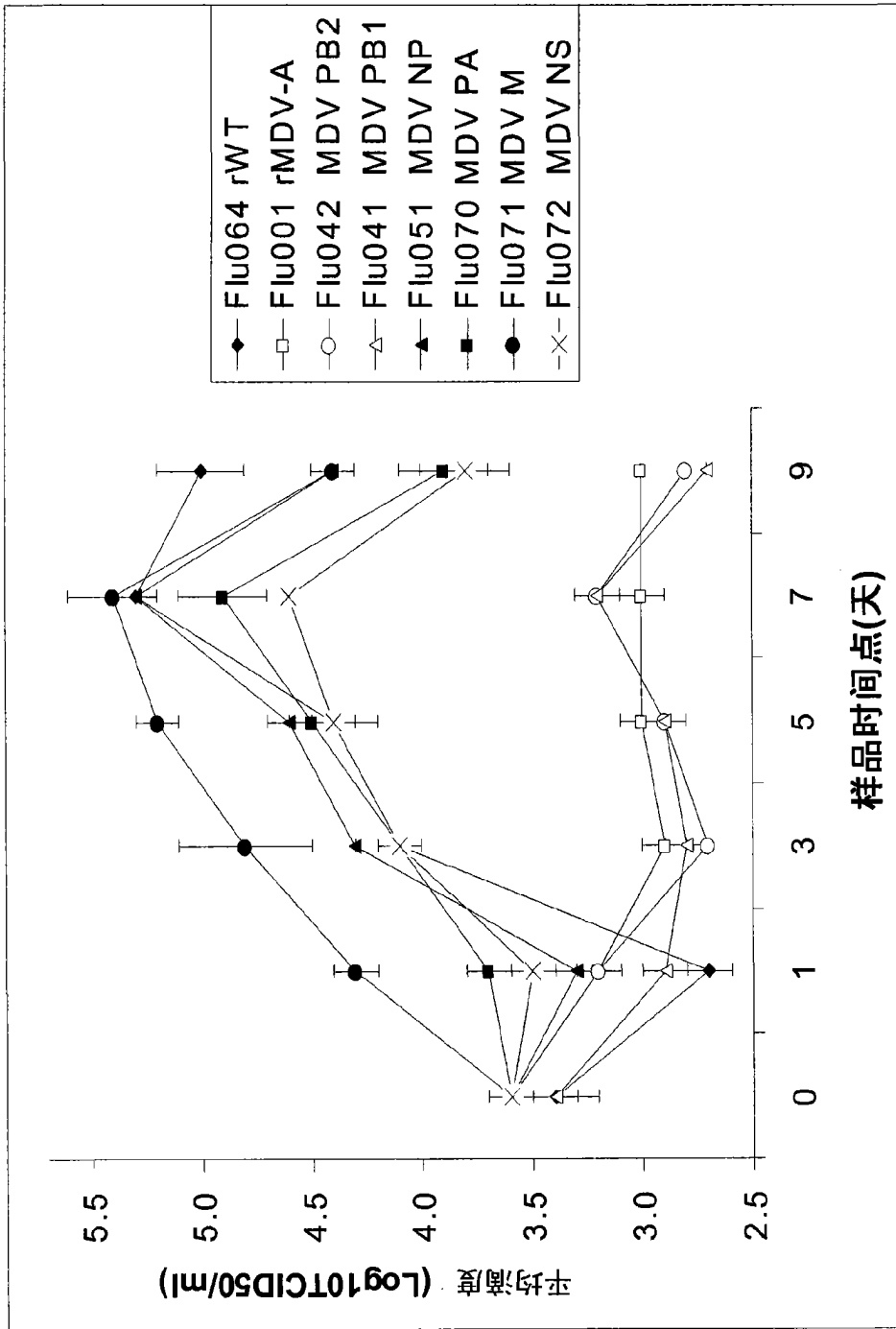


图 7

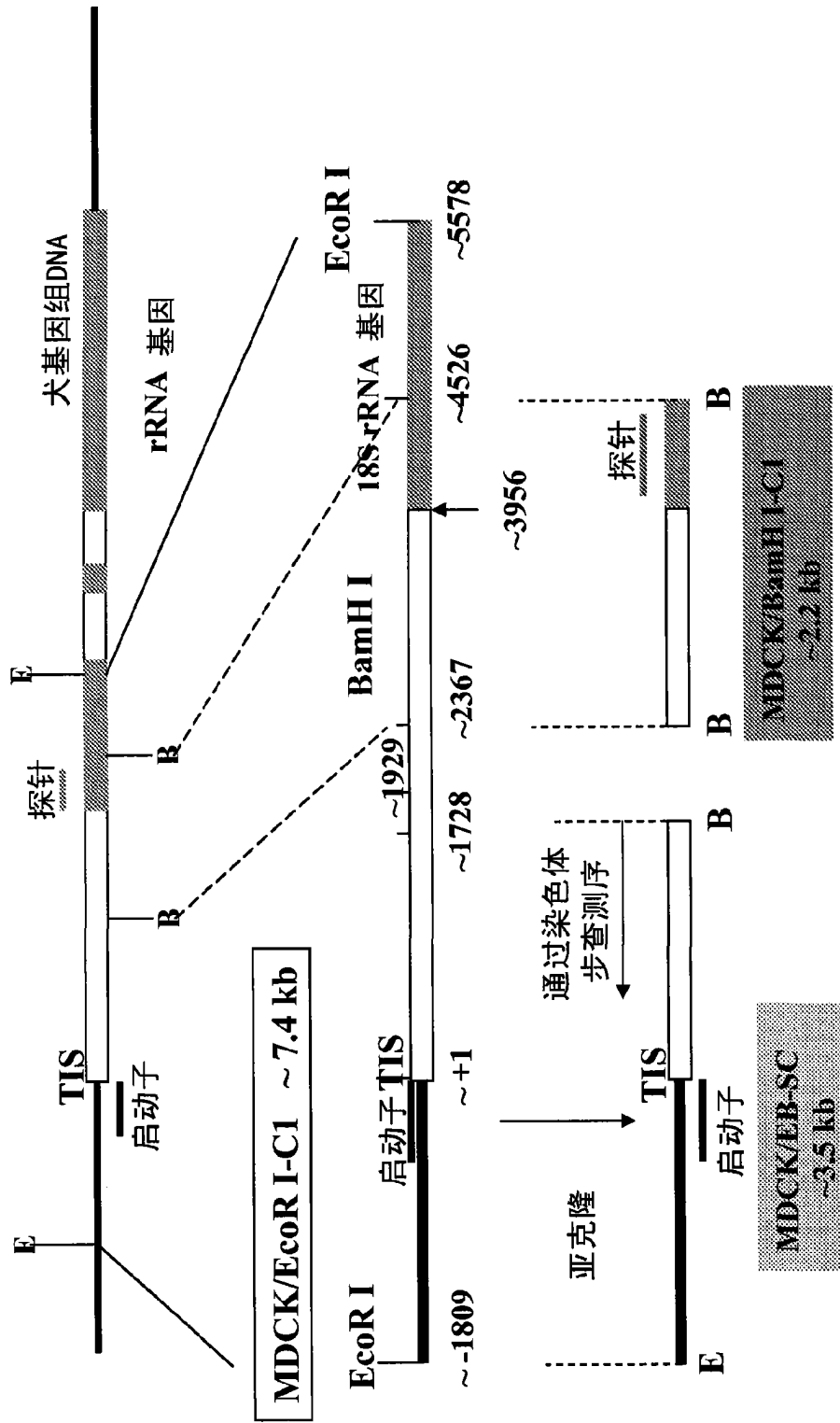


图 8

(SEQ ID NO:1)

```

aattctggag aaacagattg tgttataaga aagaaagaaa gaaagaaaaga aagaaagaaa 60
gagaaaaatcc ttatgttctt tgagcctccc ctccccccca gaattgagtt cctcttccac 120
gaccttctt cattcaacc aatagacaag tatttggggg ggggggtcag gtcccagacg 180
ctgagagggg ggaggtgaag gtggtgcggg gggggggggg cacaccgtcc tctccagcgc 240
ctttggttca gacctcttc gtgacctccc tccctccctc cctccctcct cctcctcct 300
cctcctccct ctctgtctta taaatatata aataaaaatcc taaagaaaaa aaaaagaaaa 360
aaaaaaaag gaaggacacg agaaaaaacg gtgcctcctg tgccgtcctg agagtcctcg 420
cctggtttcg gctctacgtt ccctccctga cctcggaaac gtgcctgagt cgtccccgga 480
gccccgcgcg gcgagcgcga cccccttctg ggcggcagcg ggcgggacg gacggacgga 540
cggaacggacg ggttttccaa ggctcccccg cccccggagg acgggggttc gcggtgcgcg 600
gccgtgtgct ccggggccct ccgccgtccc cgggcccaga ggcgagatcc gaggcgcctg 660
acggcctcgc cgccccgacg tgtcccgtg tctccgtcg cggttgtcgg gtgccactgg 720
cggccgcttt tatagagcgt gtccctccgg aggtcggcg gcgacaggca aggaacagct 780
ttgggtgcgg tttcccgggg ccgagttcca ggaggagggc ggctcccggc cgagcgtctg 840
tcgccccggc ctgggcgcga tgcgctcgc ggagattgga ctccggagct gcgagggagt 900
gtcgcctcgc cccgtgtcgc ccgtgtccgc tccgcctcgc tcccggagga ggccgtgcgg 960
gccgcctggg tgggtcgacc agcaccgccc gtggctcctc ctcgcccggc cggaccgacc 1020
tggggccctc gggggcgggg gacaggggtg gtcccccggt cctcctctgt gctccggggc 1080
atcttcgggc ctctctccg tgtcactcgg ttgtctcccg tggtcacgcc ctggcgacgg 1140
ggaccgggtct gacctggag gggaaagccc tgggtggcgc gacagaccgg gctgcgggca 1200

```

图 9A

(SEQ ID NO:1 续)

cgtgtgggg tcccgggct cggacggat tttctcccct ttttccgagg ccgctgcgg 1260
aggtgggtcc cgggcggtcg gaccgggtgc caccgggggg tggcgggcc gtccgttcgg 1320
gcgtccggcc ccggtggcga ttcccgtga ggctgcctct gccgcgctg gccctccacc 1380
tcccctggcc cgagccggg ttggggaagg cggtaggcac gggcggtcc tgaggccgc 1440
gggggacggc ctccgacgg tgcctgcctc cggagaactt tgatgatttt tcaaatctc 1500
ctcccggaga tcactggctt ggcggcgtgg cggcgtggcg gcgtggcggc gtggcggcgt 1560
ggcggcgtgg cgtctccacc gaccgcgtat cgcctcctct cccctcccc ccccccccg 1620
ttccctgggt cgaccagata gccctggggg ctccgtgggg tgggggtggg gggcgccgt 1680
ggggcaggtt ttggggacag ttggccgtgt caccgtcccg ggaggtcgcg gtgacctgtg 1740
gctggtcccc gccggcaggc gcggttattt tcttgcccga gatgaacatt ttttgttgcc 1800
aggtaggtgc tgacacgttg tgtttcggcg acaggcagac agacgacaaa cagacgtaaa 1860
agacagccgg tccgtccgtc gctcgcctta gagatgtggg cctctgggcg cgggtgggg 1920
tccgggcttg accgcgcggc cgagccggtc cctgtcctcg ctgcgtggag cctgagccgt 1980
ccgcctgggc ctgvcgccc gctctcgtgc tggactccag gtggcccggg tcgvcggtgc 2040
gccctccggt ctccggcacc cgaggagggg cgggtgtggc aggtggcggg gggcttttta 2100
cccccgctcg ctccatgccc tgggcacccc gccgttgcc gtgacaaccc ctgtctcgca 2160
aggctccgtg ccgctgtca ggcgtccccc gctgtgtctg gggttgtccg gtcgctcctg 2220
ccccccccc cccgggggtc gaggggcttg ccggtgaggc ggaagcaggc cccccggtc 2280
gcccctcctg ctgggctttt gctcctcggg aagccccctc ggggcccgag cttgctgccc 2340
atcgatcgat gtggtgatct cgtgctctcc tgggcccggc ctaagcccgc tcagacgagg 2400
gacgggcgtc cacggcggat gcgaccgctc ttctcgttct gcccggggc ccctccctcc 2460



(SEQ ID NO.1 续)

```

ccggctcctc cgcgccggc cgtcgtggcg ggtgcgcggg gggcgcgcgc cggggttggg 2520
ggtggtgegg actccggccc gacccccgcc tcccccttc tgcctcgcg gcgctggcgg 2580
gaccggggtc ctgggacgcg gcggaaactc tcgccggcct tccccgaagg ccctgggtcc 2640
gtggcgagcg gccctccct cctccgcggg ggagggccgg cccgacgccg cgtgctcac 2700
cgccccgctt gggcgctt gagcgcgttg cgcgccggccc tccgtggtgc ccctggagcg 2760
ctccaggtcg cctcaggtgc ctgaggccga gcggtggcgt cgtttccttc cccggcgact 2820
ccccctggc tgcgcgcc gtcgtcggcg tgtccgagga gcggtggtg gaagaagtcg 2880
gcaaggagg cgcaccctg cccctggcgg gggcgcgggc gcctcgtctt cctccccctc 2940
tcctctctc cccccctgc cgcggcggg ggggtgggtg cgtggggcgg tgtgactcgg 3000
aggacttggc ggggtcgtg aggcgcggc gggccgggcc acgccgcggc gcttgccagc 3060
cgagggtcg cccctctc cggcacgggt cgtgtccccg tctccgtccc tctctctcgc 3120
gctcgcggga ggcggggagc tctctctct gggcgggtgac gtgaccacgc cgtgcgcggg 3180
cgaggcgggg gtggcgtcct cgagggggca ccggccgcga gcgctcgggg ttgccctgtg 3240
cctgtccctt gccggagatc cgcgccccc cccgcgagcc tgtcggcccc ggagcgcgc 3300
ctggtggggc ccgtttgga ggacgaaacg gtggggcgat gcgccctcgg tagaaaaacc 3360
ttctctagcg atccgagagg gtgccttggg gtaccggagc cccagaccgc tgccccctc 3420
ctgcgcgtgt agtgtggcca gcgacgcggg gttggactcc cgtcgcgacg tgtttgggca 3480
gagtcccgt ctttgctac ctaccgcgc tgcctcccc cctccgagac ggggggag 3537

```



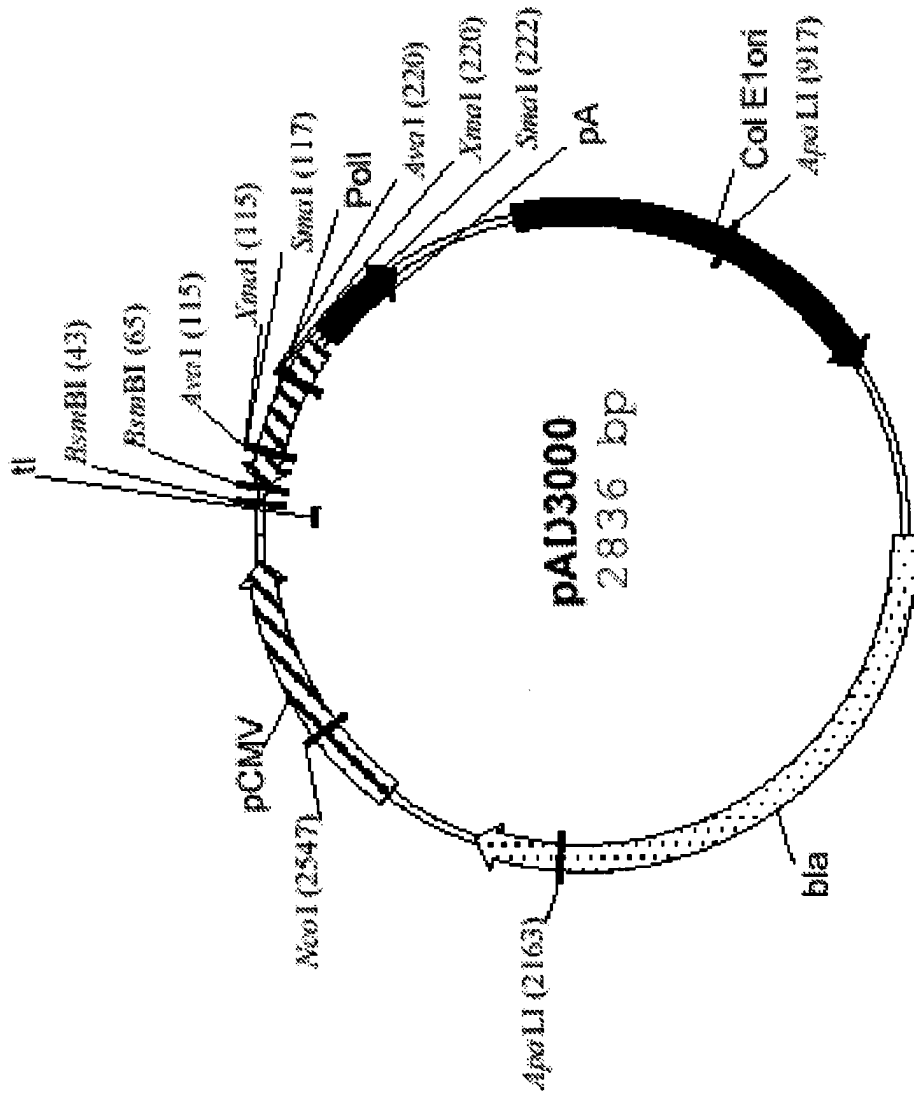


图 10

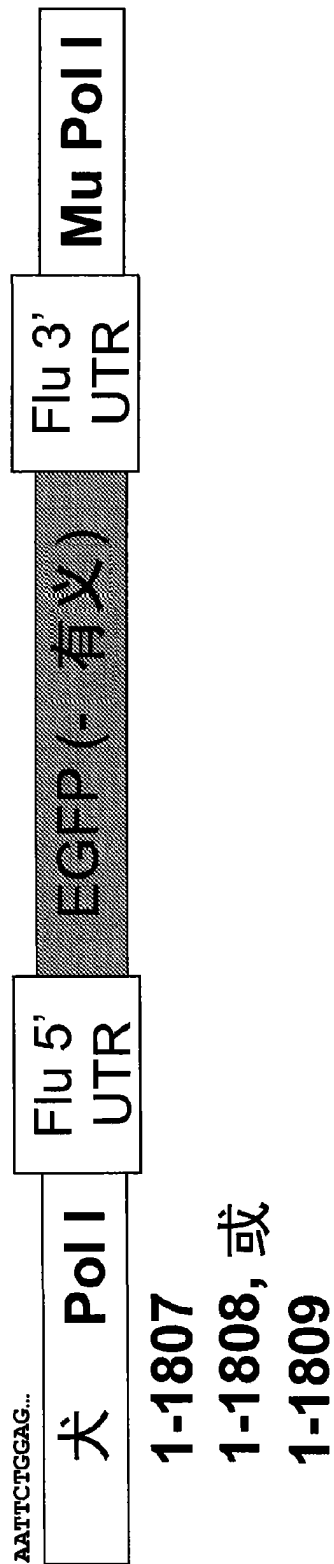


图 11

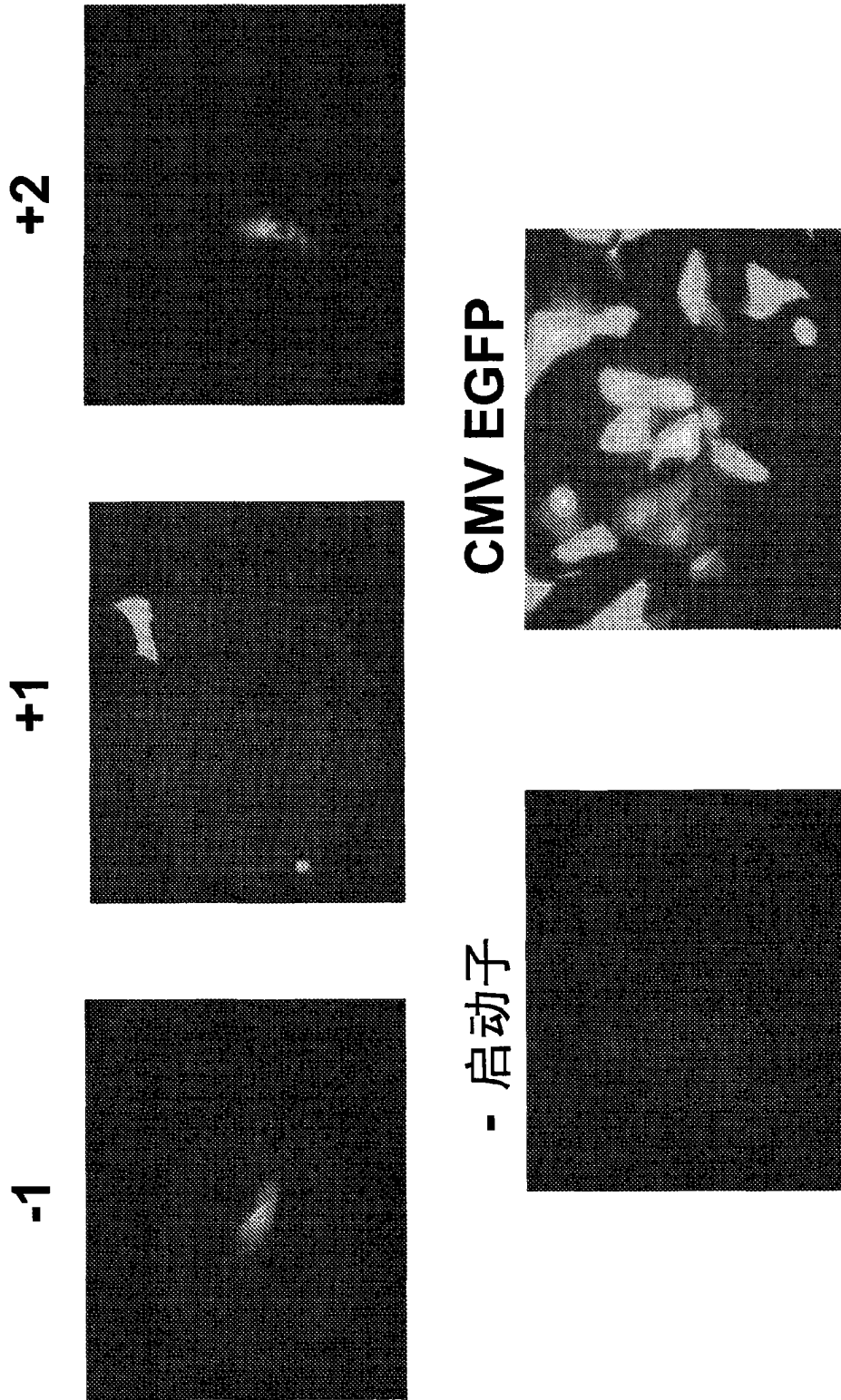


图 12

pAD4000 载体
(SEQ ID NO:29)

```

1   ACCTA CCTGG CAACA AAAAA TG TTC ATCTC GGGCA AGAAA ATAAC CGCGC
51  CTGCC GCGCG GGACC AGCCA CAGGT CACCG CGACC TCCCG GGACC GTGAC
101 ACGGC CAACT GTCCC CAAAA CCTGC CCCAC GCGCG CCCCC CACCC CCACC
151 CCACG GAGCC CCCAG GGCTA TCTGG TCGAC CCAGG GAACG GGGGG GGGGG
201 GGGAG GGGAG GAGGG GCGAT ACGCG GTCGG TGGAG ACGCC ACGCC GCCAC
251 GCCGC CACGC CGCCA CGCCG CCACG CCGCC ACGCC GCCAA GCCAG TGATC
301 TCCGG GAGGA GACTT TGAAA AATCA TCAA GTTCT CCGGA GGCAG GCACC
351 GTGCG GAGGC CGTCC CCCGC GGCCC TCAGG ACCGC CCCGT GCCTA CCGCC
401 GTCCC CAACC CCGGC TCGGG CCAGG GGAGG TGGAG GGCCA CCGCG GGCAG
451 AGGCA GCCTC ACCGG GAATA TCGGG CCCGT CACCT CAGAC ATGAT AAGAT
501 ACATT GATGA GTTTG GACAA ACCAC AACTA GAATG CAGTG AAAAA AATGC
551 TTTAT TTGTG AAATT TGTGA TGCTA TTGCT TTATT TGTA CCATT ATAAG
601 CTGCA ATAAA CAAGG ATCTG CATT ATGAA TCGGC CAACG CCGCG GGAGA
651 GCGCG TTTGC GTATT GGGCG CTCTT CCGCT TCCTC GCTCA CTGAC TCGCT
701 GCGCT CGGTC GTTCG GCTGC GCGA GCGGT ATCAG CTCAC TCAA GGCGG
751 TAATA CGGTT ATCCA CAGAA TCAGG GGATA ACGCA GGAAA GAACA TGTGA
801 GCAAA AGGCC AGCAA AAGCG CAGGA ACCGT AAAAA GGCCG CGTTG CTGGC
851 GTTTT TCCAT AGGCT CCGCC CCCCT GACGA GCATC ACAA AATCG ACGCT
901 CAAGT CAGAG GTGGC GAAAC CCGAC AGGAC TATAA AGATA CCAGG CGTTT
951 CCCCC TGGAA GCTCC CTCGT GCGCT CTCCT GTTCC GACCC TGCCG CTTAC
1001 CCGT ACCTG TCCGC CTTTC TCCCT TCGGG AAGCG TGGCG CTTTC TCAAT
1051 GCTCA CGCTG TAGGT ATCTC AGTTC GGTGT AGGTC GTTCG CTCCA AGCTG
1101 GGCTG TGTGC ACGAA CCCCC CGTTC AGCCG GACCG CTGCG CTTA TCCGG
1151 TAACT ATCGT CTTGA GTCCA ACCCG GTAAG ACACG ACTTA TCGCC ACTGG
1201 CAGCA GCCAC TGGTA ACAGG ATTAG CAGAG CGAGG TATGT AGGCG GTGCT
1251 ACAGA GTTCT TGAAG TGGTG GCCTA ACTAC GGCTA CACTA GAAGG ACAGT
1301 ATTTG GTATC TGCGC TCTGC TGAAG CCAGT TACCT TCGGA AAAAG AGTTG
1351 GTAGC TCTTG ATCCG GCAAA CAAAC CACCG CTGGT AGCGG TGGTT TTTTT
1401 GTTTG CAAGC AGCAG ATTAC GCGCA GAAAA AAAGG ATCTC AAGAA GATCC
1451 TTTGA TCTTT TCTAC GGGGT CTGAC GCTCA GTGGA ACGAA AACTC ACGTT
1501 AAGGG ATTTT GGTCA TGAGA TTATC AAAAA GGATC TTCAC CTAGA TCCTT
1551 TTAAA TTAAA AATGA AGTTT TAAAT CAATC TAAAG TATAT ATGAG TAAAC
1601 TTGGT CTGAC AGTTA CCAAT GCTTA ATCAG TGAGG CACCT ATCTC AGCGA
1651 TCTGT CTATT TCGTT CATCC ATAGT TGCCT GACTC CCCGT CGTGT AGATA
1701 ACTAC GATAC GGGAG GGCTT ACCAT CTGGC CCCAG TGCTG CAATG ATACC
1751 GCGAG ACCCA CGCTC ACCGG CTCCA GATTT ATCAG CAATA AACCA GCCAG
1801 CCGGA AGGGC CGAGC GCAGA AGTGG TCCTG CAACT TTATC CGCCT CCATC
1851 CAGTC TATTA ATTGT TGCCG GGAAG CTAGA GTAAG TAGTT CGCCA GTTAA
1901 TAGTT TGCGC AACGT TGTTG CCATT GCTAC AGGCA TCGTG GTGTC ACGCT
1951 CGTCG TTTGG TATGG CTTCA TTCAG CTCCG GTTCC CAACG ATCAA GGCGA
2001 GTTAC ATGAT CCCCC ATGTT GTGCA AAAAA GCGGT TAGCT CCTTC GGTCC
2051 TCCGA TCGTT GTCAG AAGTA AGTTG GCCGC AGTGT TATCA CTCAT GGTTA
2101 TGGCA GCACT GCATA ATTCT CTTAC TGTC A TGCCA TCCGT AAGAT GCTTT
2151 TCTGT GACTG GTGAG TACTC AACCA AGTCA TTCTG AGAAT AGTGT ATGCG
2201 GCGAC CGAGT TGCTC TTGCC CCGCG TCAAT ACGGG ATAAT ACCGC GCCAC

```

图 13A

```

2251  ATAGC AGAAC TTTAA AAGTG CTCAT CATTG GAAAA CGTTC TTCGG GCGGA
2301  AAACT CTCAA GGATC TTACC GCTGT TGAGA TCCAG TTCGA TGTA  CCCAC
2351  TCGTG CACCC AACTG ATCTT CAGCA TCTTT TACTT TCACC AGCGT TTCTG
2401  GGTGA GCAAA AACAG GAAGG CAAAA TGCCG CAAAA AAGGG AATAA GGGCG
2451  ACACG GAAAT GTTGA ATACT CATA  TCTTC CTTTT TCAAT ATTAT TGAAG
2501  CATTT ATCAG GGTTA TTGTC TCATG AGCGG ATACA TATTT GAATG TATTT
2551  AGAAA AATAA ACAA  TAGGG GTTCC GCGCA CATT  CCCC  AAAAG TGCCA
2601  CCTGA CGTCG ATATG CCAAG TACGC CCCCT ATTGA CGTCA ATGAC GGTA  A
2651  ATGGC CCGCC TGGCA TTATG CCCAG TACAT GACCT TATGG GACTT TCCTA
2701  CTTGG CAGTA CATCT ACGTA TTAGT CATCG CTATT ACCAT GGTGA TGCGG
2751  TTTTG GCAGT ACATC AATGG GCGTG GATAG CGGTT TGA  CACGG GGATT
2801  TCCAA GTCTC CACCC CATTG ACGTC AATGG GAGTT TGTTT TGGCA CCAA  A
2851  ATCAA CGGGA CTTTC CAAAA TGTCG TAACA ACTCC GCCCC ATTGA CGCAA
2901  ATGGG CGGTA GCGGT GTACG GTGGG AGGTC TATAT AAGCA GAGCT CTCTG
2951  GCTAA CTAGA GAACC CACTG CTTAC TGGCT TATCG AAATT AATAC GACTC
3001  ACTAT AGGGA GACCC AAGCT GTTAA CGCTA GCTAG CAGTT AACCG GAGTA
3051  CTGGT CGACC TCCGA AGTTG GGGGG GAGAG TCTTC TCGAG TAGAA GACCG
3101

```

图 13B

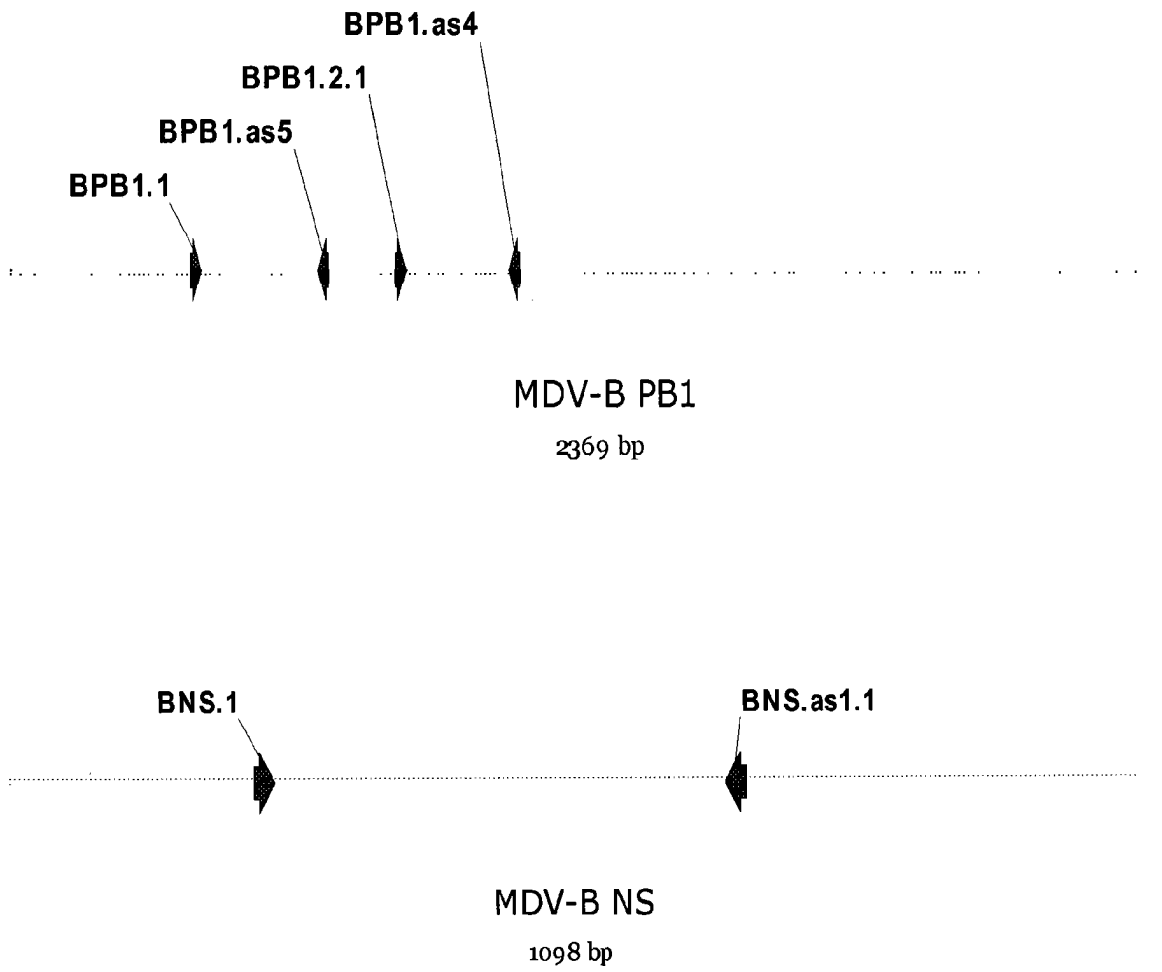


图 14

引物	序列	位置	
BPB1.1	GGCACTAATGGTCACAACCTG	357-346	(SEQ ID NO: 34)
BPB1.2.1	ATCAGAGGGTTTGTATTAGTAG	763-784	(SEQ ID NO: 35)
BPB1.as4	TGGGCTGTCTCTGGTTATTC	992-1011	(SEQ ID NO: 36)
BPB1.as5	TCTCTTTATGAGGAAACCCT	611-630	(SEQ ID NO: 37)
引物	序列	位置	
BNS.1	GTGAGCCTGAAAGTAAAAGG	238-257	(SEQ ID NO: 38)
BNS.as1.1	GCAACAAGTTTAGCAACAAG	696-715	(SEQ ID NO: 39)

图 15

360 429
MDV-B NS (SEQ ID NO:32)
AAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAAACTGCAATTGGACCGATTACCCTCCAACACCAGGAAAGTGCC

含沉默突变的拯救的MDV-B NS (SEQ ID NO:33)
AAAAATTCCTCAAATAGCAACTGTCCAAACTGCAATTGGACCGATTACCCTCCAACGCCAGGAAAGTGCC

430 478
MDV-B NS
TTGATGACATAGAAGAAGAACCGGAGAAATGTTGATGACCCAACCTGAAAT

含沉默突变的拯救的MDV-B NS
TTGATGACATAGAAGAAGAACCGGAGAAATGTTGATGACCCAACCTGAAAT

图 16A

530 599
MDV-B PB1 (SEQ ID NO:40)
TCATTGATTCATTGGACAAACCTGAAATGAC^TTTCTTCTCGGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGC

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1 (SEQ ID NO:41)
TCATTGATTCATTGGACAAACCTGAAATGAC^CTTCTTCTCGGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGC

600 669
MDV-B PB1
TAAAAACAGAAAGGGTTTCCCTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGACAGAATAACCAGAGTGGAA

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1
TAAAAACAGAAAGGGTTTCCCTCATAAAGAGAATACCAATGAAGGTAAAAGACAGAATAACCAGAGTGGAA

670 739
MDV-B PB1
TACATCAAAAGAGCATTATCATTAAACACAATGACAAAAGATGCTGAAAGAGGCCAACTAAAAAGAAGAG

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1
TACATCAAAAGAGCATTATCATTAAACACAATGACAAAAGATGCTGAAAGAGGCCAACTAAAAAGAAGAG

740 809
MDV-B PB1
CAATTGCCACCGCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAAAAATATCTG

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1
CAATTGCCACCGCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAAAAATATCTG

810 879
MDV-B PB1
TGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACGAGAAGAAGGCCAACTGTCAAATGCAGTG

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1
TGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGGTGGGAACGAGAAGAAGGCCAACTGTCAAATGCAGTG

880 949
MDV-B PB1
GCCAAAATGCTCAGTAACTGCCACCAGGAGGGATCAGCATGAC^AGTGACAGGAGACAATACTAAATGGA

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1
GCCAAAATGCTCAGTAACTGCCACCAGGAGGGATCAGCATGAC^GGTGACAGGAGACAATACTAAATGGA

950
MDV-B PB1
ATG

含沉默突变的拯救的MDV-B PB1
ATG

图 16B