



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117486979 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 02

| | |
|--|-----------------------------------|
| (21) 申请号 202311410316.3 | (51) Int.Cl. |
| (22) 申请日 2017.05.17 | C07K 14/08 (2006.01) |
| (30) 优先权数据 | C12N 15/40 (2006.01) |
| 62/338,400 2016.05.18 US | C12N 15/86 (2006.01) |
| (62) 分案原申请数据 | C07K 19/00 (2006.01) |
| 201780044797.7 2017.05.17 | A61K 39/12 (2006.01) |
| (71) 申请人 巴塞尔大学 | A61P 31/14 (2006.01) |
| 地址 瑞士巴塞尔 | C12Q 1/06 (2006.01) |
| 申请人 霍欧奇帕生物科技有限公司 | C12R 1/93 (2006.01) |
| (72) 发明人 威尔迪·博尼拉 | |
| 丹尼尔·大卫·平舍韦尔 | |
| 克劳斯·奥尔林格 | |
| (74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理 有限公司 11262 | |
| 专利代理师 徐爱文 武晶晶 | 权利要求书3页 说明书106页 序列表(电子公布) 附图9页 |

(54) 发明名称
作为疫苗载体的三区段PICHINDE病毒

(57) 摘要
本申请涉及在其基因组中其可读框(“ORF”)进行重排的Pichinde病毒。具体地讲,本文描述了修饰的Pichinde病毒基因组区段,其中所述Pichinde病毒基因组区段经改造以在ORF的野生型位置以外的位置携带病毒ORF。本文还描述了包含一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。本文所述Pichinde病毒可适用于疫苗和/或疾病治疗和/或适用于免疫疗法。

1. 一种Pichinde病毒基因组区段, 其中所述基因组区段经改造以在开放阅读框架(“ORF”)野生型位置以外的位置携带病毒ORF, 其中所述Pichinde病毒基因组区段选自:

(i) S区段, 其中编码核蛋白(“NP”)的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组5' 非翻译区(“UTR”)的控制下;

(ii) S区段, 其中编码基质蛋白Z(“Z蛋白”)的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组5' UTR的控制下;

(iii) S区段, 其中编码RNA依赖性的RNA聚合酶L(“L蛋白”)的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组5' UTR的控制下;

(iv) S区段, 其中编码病毒糖蛋白(“GP”)的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组3' UTR的控制下;

(v) S区段, 其中编码L蛋白的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组3' UTR的控制下;

(vi) S区段, 其中编码Z蛋白的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组3' UTR的控制下;

(vii) L区段, 其中编码GP的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组5' UTR的控制下;

(viii) L区段, 其中编码NP的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组5' UTR的控制下;

(ix) L区段, 其中编码L蛋白的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组5' UTR的控制下;

(x) L区段, 其中编码GP的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组3' UTR的控制下;

(xi) L区段, 其中编码NP的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组3' UTR的控制下; 和

(xii) L区段, 其中编码Z蛋白的Pichinde病毒ORF处于Pichinde病毒基因组3' UTR的控制下。

2. 如权利要求1所述的Pichinde病毒基因组区段, 其中所述Pichinde病毒基因组3' UTR为Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的3' UTR, 且其中所述Pichinde病毒基因组5' UTR为Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的5' UTR。

3. 如权利要求1所述的Pichinde病毒基因组区段的cDNA。

4. 一种DNA表达载体, 其包含如权利要求3所述的cDNA。

5. 一种宿主细胞, 其包含如权利要求1所述的Pichinde病毒基因组区段、如权利要求3所述的cDNA或如权利要求4所述的载体。

6. 一种Pichinde病毒颗粒, 其包含如权利要求1或2所述的Pichinde病毒基因组区段和第二Pichinde病毒基因组区段使得Pichinde病毒颗粒包含S区段和L区段。

7. 如权利要求6所述的Pichinde病毒颗粒, 其中所述Pichinde病毒颗粒是感染性和可复制型的。

8. 如权利要求6所述的Pichinde病毒颗粒, 其中所述Pichinde病毒颗粒的毒性减弱。

9. 一种产生如权利要求1所述的Pichinde病毒基因组区段的方法, 其中所述方法包括使如权利要求3所述的cDNA转录。

10. 一种产生如权利要求6所述的Pichinde病毒颗粒的方法,其中所述方法包括:
- (i) 使如权利要求3所述的cDNA转染至宿主细胞;
 - (ii) 使包含第二Pichinde病毒基因组区段的cDNA的质粒转染至宿主细胞;
 - (iii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和
 - (iv) 收集Pichinde病毒颗粒。
11. 如权利要求10所述的方法,其中L区段和S区段的转录使用双向启动子进行。
12. 如权利要求10所述的方法,其中所述方法进一步包括使编码Pichinde病毒聚合酶的一个或多个核酸转染至宿主细胞。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述Pichinde病毒聚合酶是L蛋白。
14. 如权利要求10或12所述的方法,其中所述方法进一步包括使编码NP蛋白的一个或多个核酸转染至宿主细胞。
15. 如权利要求10所述的方法,其中L区段和S区段的转录各自处于选自以下的启动子的控制下:
- (i) RNA聚合酶I启动子;
 - (ii) RNA聚合酶II启动子;和
 - (iii) T7启动子。
16. 一种疫苗,其包含如权利要求6-8任一项所述的Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体。
17. 一种药物组合物,其包含如权利要求6-8任一项所述的Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体。
18. 如权利要求1所述的Pichinde病毒基因组区段或如权利要求6所述的Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒来源于病毒株Munchique CoAn4763分离株P18或P2毒株。
19. 一种包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因1 (RAG1) 且用 10^4 PFU的所述三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后所述三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。
20. 一种包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因1 (RAG1) 且用 10^4 PFU的所述三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后所述三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。
21. 一种测定Pichinde病毒的滴度的方法,包括
- (i) 将细胞以 3×10^4 细胞/孔的密度接种在96孔板中,与MEM/2%FCS中制备的 $100 \mu\text{l}$ 3.17倍连续稀释的病毒混合;
 - (ii) 在 37°C 下温育2-4小时后,每孔加入 $80 \mu\text{l}$ 粘性培养基(含2%甲基纤维素的2x补充DMEM),确保病毒颗粒只扩散到相邻细胞;
 - (iii) 在 37°C 下48小时后,轻轻弹去上清液,通过在室温下加入 $100 \mu\text{l}$ 甲醇20分钟使细胞固定;
 - (iv) 将细胞用 $100 \mu\text{l}$ /孔BSS/1%Triton X-100透化20分钟,随后用PBS/5%FCS封闭60

分钟;

(v) 对于抗NP染色,将大鼠抗Pichinde-NP单克隆抗体用作第一染色抗体,在PBS/2.5% FCS中稀释60分钟;

(vi) 将板用自来水洗涤3次,以PBS/2.5%FCS中的1:100稀释度加入第二HRP-山羊-抗大鼠-IgG,温育1小时;

(vii) 将板再次用自来水洗涤3次;

(viii) 加入颜色反应(0.5g/l DAB(Sigma D-5637),含0.5g/l硫酸镍铵的PBS/0.015% H2O2),10分钟后用自来水终止反应;

(ix) 清点染色的病灶,根据稀释度计算最终滴度。

22. 一种评价持续感染AGR小鼠血清中循环的病毒的生长特性的方法,包括:

(i) 使在感染后第147天在BHK-21细胞中收集的病毒血症血清传代,以及

(ii) 48小时后通过NP FFU测定法测定病毒感染性。

作为疫苗载体的三区段PICHINDE病毒

[0001] 相关申请

[0002] 本申请为2017年5月17日提交的、发明名称为“作为疫苗载体的三区段PICHINDE病毒”、申请号为201780044797.7的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本申请要求2016年5月18日提交的美国临时申请号62/338,400的优先权,通过引用以其整体并入本文。

[0004] 以电子版提交的序列表的引用

[0005] 本申请通过引用与本申请一起以文本文件提交的序列表并入,该文件名为“Sequence_Listing_13194-020-228.TXT”,创建于2017年5月16日,大小为61,423字节。

[0006] 1. 引言

[0007] 本申请涉及在其基因组中其可读框(“ORF”)具有重排的Pichinde病毒。具体地讲,本文描述了修饰的Pichinde病毒基因组区段,其中Pichinde病毒基因组区段经改造以在ORF的野生型位置以外的位置携带病毒ORF。本文还描述了包含一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。本文所述Pichinde病毒可适用于疫苗和/或疾病治疗和/或适用于免疫疗法。

[0008] 2. 发明背景

[0009] 2.1 Pichinde病毒一般背景和基因组结构

[0010] Pichinde病毒一种自哥伦比亚白喉稻鼠(*Oryzomys albigularis*) (稻鼠)分离的沙粒病毒(有关综述见McLay et al, 2014, *Journal of General Virology*, 95:1-15)。Pichinde病毒是不致病的,一般认为不引起人类疾病。血清学证据表明即使在当地人群中血清阳性率也极低(Trapido et al, 1971, *Am J Trop Med Hyg*, 20:631-641)。沙粒病毒科(Arenaviridae)被分成两个属:旧世界(OW)沙粒病毒例如拉沙热病毒(LASV)和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)和新世界(NW)沙粒病毒例如Pichinde病毒和胡宁病毒(Buchmeier et al, 2001, *Arenaviridae: The Viruses and Their Replication*, *Fields Virology Vol 2*, 1635-1668)。沙粒病毒是包膜RNA病毒。其基因组由负义的单链RNA的两个区段组成(图1A) (McLay et al, 2014, *Journal of General Virology*, 95:1-15)。每个区段编码呈相反方向的两个病毒基因。短区段(S区段)编码病毒糖蛋白(GP)和核蛋白(NP)。长区段(L区段)表达依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp; L蛋白)和基质蛋白Z(蛋白Z), 一种环指蛋白。每个区段上的两个基因被非编码基因间区(IGR)间隔开并且两侧是5' 和3' 非翻译区(UTR)。IGR形成稳定的发夹结构,并显示参与病毒mRNA转录的结构依赖性终止(Pinschewer et al., 2005, *J Virol* 79(7):4519-4526)。UTR的末端核苷酸显示高度互补性,因此被认为导致二级结构形成。已知这些锅柄结构用作转录和复制的病毒启动子,且通过位点定向诱变对其的分析显示序列和结构依赖性,不耐受甚至较小的序列改变(Perez and de la Torre, 2003, *Virol* 77(2):1184-1194)。

[0011] 2.2 反向遗传系统

[0012] 自负链病毒如Pichinde病毒分离纯化的RNA不能直接作为mRNA,即当导入细胞时不能翻译。因此具有病毒RNA的细胞的转染不导致感染性病毒颗粒。为了从培养的允许细胞

中的cDNA产生负链RNA病毒的感染性病毒颗粒,病毒RNA区段必需与转录和复制所需要的最小因子反向互补。借助于几年前公开的小基因组系统,最终可对参与病毒颗粒转录、复制和形成的病毒顺式作用元件和反式作用因子进行分析(Lee et al.,2000,J Virol 74(8):3470-3477;Lee et al.,2002,J Virol 76(12):6393-6397;Perez and de la Torre 2003,J Virol 77(2):1184-1194;Pinschewer et al.,2003,J Virol 77(6):3882-3887;Pinschewer et al.,2005,J Virol 79(7):4519-4526)。已开发了成功表明Pichinde病毒拯救的这类反向遗传系统(参见例如Liang et al,2009,Ann N Y Acad Sci,1171:E65-E74;Lan et al,2009,Journal of Virology,83(13):6357-6362)。

[0013] 2.3表达目标基因的重组Pichinde

[0014] 长期以来进行了表达外源目标基因的重组负链RNA病毒的生产。公开了用于其它病毒的不同策略(Garcia-Sastre et al.,1994,J Virol 68(10):6254-6261;Percy et al.,1994,J Virol 68(7):4486-4492;Flick and Hobom,1999,Virology 262(1):93-103;Machado et al.,2003,Virology 313(1):235-249)。已公开了活的Pichinde病毒型载体((Dhanwani et al.,2015,Journal of Virology 90:2551-2560;国际专利申请公布号W0 2016/048949)。公开了三区段Pichinde病毒(Dhanwani et al.,2015,Journal of Virology 90:2551-2560;国际专利申请公布号W0 2016/048949)。在Dhanwani 2015公开的三区段病毒中,NP和GP两者保留在其各自在S区段中的天然位置,因此在其邻接UTR中的天然启动子的控制下。

[0015] 2.4复制缺陷型沙粒病毒

[0016] 已表明可对感染性沙粒病毒颗粒进行改造以含有具有在感染细胞中扩增和表达其遗传物质的能力但不能在正常的非遗传工程改造细胞中进一步产生子代的基因组(即感染性复制缺陷型沙粒病毒颗粒)(国际公布号:W0 2009/083210 A1和国际公布号:W0 2014/140301 A1)。

[0017] 3.发明概述

[0018] 本申请涉及在其基因组中其ORF重排的Pichinde病毒。具体地讲,本申请涉及经改造在野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF的Pichinde病毒基因组区段。本申请还提供包含一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段、不重组成为可复制型二区段Pichinde病毒颗粒的三区段Pichinde病毒颗粒。本申请表明三区段Pichinde病毒颗粒可经改造以提高遗传稳定性并确保持续的转基因表达。

[0019] 在某些实施方案中,本文提供的病毒载体是感染性的,即能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞。在某些更具体的实施方案中,本文提供的病毒载体是感染性的,即能够进入宿主细胞或将其遗传物质注入宿主细胞接着其遗传信息在宿主细胞中扩增和表达。在某些实施方案中,病毒载体是经改造含有具有在感染细胞中扩增和表达其遗传信息的能力但不能在正常的非遗传工程改造的细胞中进一步产生感染性子代颗粒的基因组的感染性复制缺陷型Pichinde病毒病毒载体。在某些实施方案中,感染性Pichinde病毒病毒载体是可复制型并且能够在正常的非遗传工程改造的细胞中进一步产生感染性子代颗粒。在某些更具体的实施方案中,与可复制病毒载体来源于其中的野生型病毒相比,这类可复制病毒载体的毒性减弱。

[0020] 3.1非天然可读框

[0021] 因此,一方面,本文提供Pichinde病毒基因组区段。在某些实施方案中,基因组区段经改造以在ORF的野生型位置以外的位置携带病毒ORF。在某些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段选自:

[0022] (i)S区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0023] (ii)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0024] (iii)S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0025] (iv)S区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0026] (v)S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0027] (vi)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0028] (vii)L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0029] (viii)L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0030] (ix)L区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0031] (x)L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0032] (xi)L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0033] (xii)L区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0034] 在一些实施方案中,Pichinde病毒3' UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的3' UTR。在某些实施方案中,Pichinde病毒5' UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的5' UTR。

[0035] 本文还提供的是本文提供的Pichinde病毒基因组区段的分离的cDNA。本文还提供包含Pichinde病毒基因组区段的cDNA的DNA表达载体。

[0036] 本文还提供包含Pichinde病毒基因组区段的宿主细胞、Pichinde病毒基因组区段的cDNA或包含Pichinde病毒基因组区段的cDNA的载体。

[0037] 本文还提供包含Pichinde病毒基因组区段和第二Pichinde病毒基因组区段使得Pichinde病毒颗粒包含S区段和L区段的Pichinde病毒颗粒。

[0038] 在某些实施方案中,Pichinde病毒颗粒是感染性的和可复制型。在某些实施方案中,Pichinde病毒颗粒的毒性减弱。在其它实施方案中,Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能在非补给细胞(non-complementing cell)中进一步产生感染性子代。

[0039] 在某些实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除或使之功能失活。

[0040] 在某些实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在其它实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的仅仅一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在一个更具体的实施方案中,将编码GP的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在其它实施方案中,将编码NP的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在一些实施方案中,将编码Z蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在其它实施方案中,将编码L蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0041] 在某些实施方案中,异源ORF编码报道蛋白。在一些实施方案中,异源ORF编码来源于感染性生物、肿瘤或变应原的抗原。在其它实施方案中,编码抗原的异源ORF选自人免疫

缺陷病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、乙型肝炎表面抗原、水痘-带状疱疹病毒 (varizella zoster virus) 抗原、巨细胞病毒抗原、结核杆菌 (mycobacterium tuberculosis) 抗原、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原 (例如肿瘤新抗原和肿瘤新表位)。

[0042] 在某些实施方案中,Pichinde病毒颗粒的生长或感染性不受来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF影响。

[0043] 本文还提供产生Pichinde病毒基因组区段的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使Pichinde病毒基因组区段的cDNA转录。

[0044] 本文还提供产生Pichinde病毒颗粒的方法。在某些实施方案中,产生Pichinde病毒颗粒的方法包括:

[0045] (i) 使Pichinde病毒基因组区段的cDNA转染至宿主细胞;

[0046] (ii) 使包含第二Pichinde病毒基因组区段的cDNA的质粒转染至宿主细胞;

[0047] (iii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和

[0048] (iv) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0049] 在某些实施方案中,L区段和S区段的转录使用双向启动子进行。

[0050] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括使编码Pichinde病毒聚合酶的一个或多个核酸转染至宿主细胞。在又一些更具体的实施方案中,聚合酶是L蛋白。在其它实施方案中,所述方法进一步包括使编码NP的一个或多个核酸转染至宿主细胞。

[0051] 在某些实施方案中,L区段和S区段的转录各自在选自以下的启动子的控制下:

[0052] (i) RNA聚合酶I启动子;

[0053] (ii) RNA聚合酶II启动子;和

[0054] (iii) T7启动子。

[0055] 在另一个实施方案中,本文提供包含Pichinde病毒颗粒的疫苗,其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除或使之功能失活;或其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少1种ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的另一种生物的异源ORF替换;或其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的仅仅一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在更具体的实施方案中,疫苗另包含药学上可接受的载体。

[0056] 在另一个实施方案中,本文提供包含Pichinde病毒颗粒的药物组合物,其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除或使之功能失活;或其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少1种ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的另一种生物的异源ORF替换;或其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的仅仅一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在更具体的实施方案中,药学上可接受的载体另包含一种药学上可接受的载体。

[0057] 在一些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒来源于极高毒性、高传代毒株Munchique CoAn4763分离株P18,或低传代P2毒株,或来源于Trapido和同事描述的几个分离株的任一个(Trapido et al,1971,Am J Trop Med Hyg,20:631-641)。

[0058] 3.2三区段Pichinde病毒

[0059] 一方面,本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因1 (RAG1) 并用 10^4 PFU的三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中,在持续感染70天后三区段Pichinde病毒

颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。在某些实施方案中,两个S区段的区段间重组,使2种Pichinde病毒ORF在仅仅一个而非两个单独的区段上结合,消除了病毒启动子活性。

[0060] 另一方面,本文提供包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因1(RAG1)并用 10^4 PFU的三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中,在持续感染70天后三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。在某些实施方案中,两个L区段的区段间重组,使2种Pichinde病毒ORF在仅仅一个而非两个单独的区段上结合,消除了病毒启动子活性。

[0061] 在某些实施方案中,两个S区段之一选自:

[0062] (i) S区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0063] (ii) S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0064] (iii) S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0065] (iv) S区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0066] (v) S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0067] (vi) S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0068] 在某些实施方案中,两个L区段之一选自:

[0069] (i) L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0070] (ii) L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0071] (iii) L区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0072] (iv) L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0073] (v) L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0074] (vi) L区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0075] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒3' UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的3' UTR。在其它实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒5' UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的5' UTR。

[0076] 在某些实施方案中,两个S区段包含(i)来自Pichinde病毒以外的生物的一种或两种异源ORF;或(ii)一种或两种重复的Pichinde病毒ORF;或(iii)来自Pichinde病毒以外的生物的一种异源ORF和一种重复的Pichinde病毒ORF。

[0077] 在某些实施方案中,两个L区段包含(i)来自Pichinde病毒以外的生物的一种或两种异源ORF;或(ii)一种或两种重复的Pichinde病毒ORF;或(iii)来自Pichinde病毒以外的生物的一种异源ORF和一种重复的Pichinde病毒ORF。

[0078] 在某些实施方案中,异源ORF编码来源于感染性生物、肿瘤或变应原的抗原。在其它实施方案中,编码抗原的异源ORF选自人免疫缺陷病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、乙型肝炎表面抗原、水痘-带状疱疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、结核杆菌抗原、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原(例如肿瘤新抗原和肿瘤新表位)。

[0079] 在某些实施方案中,至少一种异源ORF编码荧光蛋白。在其它实施方案中,荧光蛋白是绿色荧光蛋白(GFP)或红色荧光蛋白(RFP)。

[0080] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒包含所有4种Pichinde病毒ORF。在

某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是感染性和可复制型的。

[0081] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒缺乏4种Pichinde病毒ORF的一种或多种。在其它实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能够在非补给细胞中进一步产生感染性子代。

[0082] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒缺乏4种Pichinde病毒ORF之一,其中三区段Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能够在非补给细胞中进一步产生感染性子代。

[0083] 在一些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒缺乏GP ORF。

[0084] 又一方面,本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,第一S区段经改造携带在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码GP的ORF和在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码第一目标基因的ORF。在一些实施方案中,第二S区段经改造携带在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码NP的ORF和在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码第二目标基因的ORF。

[0085] 再一方面,本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,第一S区段经改造携带在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码GP的ORF和在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码第一目标基因的ORF。在一些实施方案中,第二S区段经改造携带在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码NP的ORF和在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码第二目标基因的ORF。

[0086] 在某些实施方案中,目标基因编码来源于感染性生物、肿瘤或变应原的抗原。在其它实施方案中,目标基因编码选自以下的抗原:人免疫缺陷病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、乙型肝炎表面抗原、水痘-带状疱疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、结核杆菌抗原、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原(例如肿瘤新抗原和肿瘤新表位)。在又一个实施方案中,至少一个目标基因编码荧光蛋白。在一个具体实施方案中,荧光蛋白是GFP或RFP。

[0087] 本文还提供三区段Pichinde病毒颗粒基因组的分离的cDNA。本文还提供包含三区段Pichinde病毒颗粒基因组的cDNA的DNA表达载体。本文还提供包含三区段Pichinde病毒各自或其总体的cDNA的一种或多种DNA表达载体。

[0088] 本文还提供包含三区段Pichinde病毒颗粒、三区段Pichinde病毒颗粒基因组的cDNA或包含三区段Pichinde病毒颗粒基因组的cDNA的载体的宿主细胞。

[0089] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒的毒性减弱。

[0090] 本文还提供产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法。在某些实施方案中,产生Pichinde病毒颗粒的方法包括:

[0091] (i) 使一个L区段和两个S区段的一个或多个cDNA转染至宿主细胞;

[0092] (ii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和

[0093] (iii) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0094] 本文还提供产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法。在某些实施方案中,产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法包括:

[0095] (i) 使两个L区段和一个S区段的一个或多个cDNA转染至宿主细胞;

[0096] (ii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和

[0097] (iii) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0098] 在某些实施方案中,一个L区段和两个S区段的转录使用双向启动子进行。在一些

实施方案中,两个L区段和一个S区段的转录使用双向启动子进行。

[0099] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括使编码Pichinde病毒聚合酶的一个或多个核酸转染至宿主细胞。在又一些更具体的实施方案中,聚合酶是L蛋白。在其它实施方案中,所述方法进一步包括使编码NP蛋白的一个或多个核酸转染至宿主细胞。

[0100] 在某些实施方案中,一个L区段和两个S区段的转录各自在选自以下的启动子的控制下:

[0101] (i)RNA聚合酶I启动子;

[0102] (ii)RNA聚合酶II启动子;和

[0103] (iii)T7启动子。

[0104] 在某些实施方案中,两个L区段和一个S区段各自的转录在选自以下的启动子的控制下:

[0105] (i)RNA聚合酶I启动子;

[0106] (ii)RNA聚合酶II启动子;和

[0107] (iii)T7启动子。

[0108] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒具有与二区段Pichinde病毒颗粒一样的向性。在其它实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是复制缺陷型的。

[0109] 在另一个实施方案中,本文提供包含三区段Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体的疫苗。

[0110] 在另一个实施方案中,本文提供包含三区段Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0111] 在一些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒来源于极高毒性的高传代毒株Munchique CoAn4763分离株P18,或低传代P2毒株,或来源于Trapido和同事描述的几个分离株的任一个(Trapido et al,1971,Am J Trop Med Hyg,20:631-641)。

[0112] 3.3约定和缩略语

[0113]

| 缩略语 | 约定 |
|----------------|--|
| APC | 抗原呈递细胞 |
| art | 人工 |
| CAT | 氯霉素乙酰转移酶 |
| CMI | 细胞介导免疫 |
| CD8 | 分化群 8 |
| CD4 | 分化群 4 |
| GFP | 绿色荧光蛋白 |
| GP | 糖蛋白 |
| IGR | 基因间区 |
| LCMV | 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 |
| L 蛋白 | 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 |
| L 区段 | 长区段 |
| MHC | 主要组织相容性复合体 |
| Z 蛋白 | 基质蛋白 Z |
| NP | 核蛋白 |
| ORF | 可读框 |
| RFP | 红色荧光蛋白 |
| r3PIC | 重组三区段 Pichinde 病毒 |
| S 区段 | 短区段 |
| UTR | 非翻译区 |
| VSV | 水泡性口炎病毒 |
| VSVG | 水泡性口炎病毒糖蛋白 |
| GM-CSF | 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 |
| sP1AGM protein | i) VSVG 信号肽, ii) P815 小鼠肥大细胞瘤肿瘤细胞系的 P1A 抗原, iii) GSG |

[0114]

| 缩略语 | 约定 |
|------|--|
| | 接头, iv) 肠病毒 2A 肽, 和 v) 小鼠 GM-CSF 的融合蛋白 |
| RNP | 核糖核蛋白 |
| RAG1 | 重组激活基因 |
| OW | 旧世界沙粒病毒 |
| NW | 新世界沙粒病毒 |
| LASV | 拉沙热病毒 |

[0115] 4. 附图简述

[0116] 图1A-1D: 二和三区段Pichinde病毒基因组结构的图示。野生型Pichinde病毒的二区段基因组由编码GP和NP的一个S区段和编码Z蛋白和L蛋白的一个L区段组成。两个区段的

两侧是各自的5' 和3' UTR。(图1A)是具有其天然基因组区段S (SEQ ID NO:16) 和L (SEQ ID NO:2) 的cDNA衍生野生型Pichinde病毒的rPIC^{wt} Pichinde病毒基因组的图解描述,所述基因组通过导入以消除各自cDNA中的BsmBI和BbsI位点的沉默突变而被修饰。(图1B-1D) 重组三区段Pichinde病毒(r3PIC) 的基因组由一个L区段和具有将目标基因(此为GFP/sP1AGM融合蛋白) 插入每一个S区段的一个位置的两个S区段组成。(图1B) 具有人工结构的三区段Pichinde病毒载体基因组的图解描述。在重复的S区段之一中,将糖蛋白(GP) ORF代替核蛋白(NP) ORF置于天然S区段,即在3' UTR和IGR之间。(图1C) r3PIC-GFP^{art}由位于其天然位置的全部病毒基因组成,只是GP ORF除外,其被人为地与3' UTR并置,并在其控制下表达(S-GP/GFP^{art};SEQ ID NO:13)。(图1D) 三区段Pichinde病毒型sP1AGM-表达r3PIC-sP1AGM^{art}载体基因组的图解描述。

[0117] 图2:三区段r3PIC-GFP^{art}与其二区段野生型亲代病毒相比毒性减弱。以0.01的感染复数(moi)感染的BHK-21细胞中所示病毒的生长动力学(野生型Pichinde病毒:黑色正方形;r3PIC-GFP^{art}:黑色圆形)。在感染后的规定时间点获取上清液,通过病灶形成测定法测定病毒滴度。

[0118] 图3:用于图2和4所述实验的质粒表达盒的图解描述。

[0119] 图4:从具有r3PIC-GFP^{art}的细胞中的cDNA重构感染性GFP表达病毒。在BHK-21细胞用下列质粒组合转染后48或168小时拍摄的GFP表达的荧光图像:

[0120] S区段小基因组:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-miniS-GFP;

[0121] L区段小基因组:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-L-GFP-Bsm;

[0122] r3PIC-GFP^{art}:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-L、pol-I-PIC-NP-GFP、pol-I-PIC-GP-GFP;

[0123] rPIC^{wt}:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-L、pol-I-PIC-S

[0124] 图5A-5B:基于三区段Pichinde病毒的病毒载体是高度免疫原性的。用10e5 FFU的r3PIC-sP1AGM^{art}静脉内使BALB/c小鼠感染。未使对照小鼠免疫。8天后,通过MHC I类四聚物染色测定外周血中的P1A特异性CD8+T细胞频率。显示了示例性的FACS图(图5A) 和外周血中CD8+T细胞内四聚物结合细胞的频率(图5B)。B中的符号代表每只小鼠。

[0125] 图6:被设计成其分别在5' 和3' UTR启动子控制下,表达糖蛋白(GP) 和核蛋白(NP) 基因的三区段Pichinde病毒载体基因组的图解描述,即在人为重复的S区段的情况下其各自的“天然”位置—S-GP/GFP^{nat} (SEQ ID NO:15) 和S-NP/GFP(亦称为PIC-NP-GFP;SEQ ID NO:11)。基因组由一个L和具有将目标基因(此为GFP蛋白) 插入每一个S区段的一个位置的两个S区段组成。

[0126] 图7:三区段r3PIC-GFP^{nat}和r3PIC-GFP^{art}的早期传代与其二区段野生型亲代病毒相比毒性减弱。培养物中以0.01的感染复数(moi) 感染的BHK-21细胞中指定病毒的生长动力学。在感染后48小时获得上清液,通过病灶形成测定法测定病毒滴度。符号表示各个平行细胞培养孔的滴度;误差条表示均值+/-SD。

[0127] 图8:与经稳定减毒的r3PIC-GFP^{art}不同,在小鼠持续感染期间r3PIC-GFP^{nat}达到在rPIC^{wt}范围内的滴度。按图中规定用10e5 FFU的病毒静脉内使AGR小鼠(I型和II型干扰素受体以及RAG1三重缺陷的小鼠) 感染(野生型Pichinde病毒—rPIC^{wt}:灰色三角形;r3PIC-GFP^{art}:黑色圆形;r3PIC-GFP^{nat}:白色正方形)。在第7、14、21、28、35、42、56、77、98、120和147

天收集血液,在病灶形成测定法中检测Pichinde病毒核蛋白(NP FFU)以测定病毒感染性。

[0128] 图9:与经稳定减毒的r3PIC-GFP^{art}不同,在小鼠持续感染期间,r3PIC-GFP^{nat}达到在rPIC^{wt}范围内的滴度。按图中所示,用10e5 FFU的病毒静脉内使AGR小鼠(I型和II型干扰素受体以及RAG1三重缺陷的小鼠)感染(野生型Pichinde病毒—rPIC^{wt}:灰色三角形;r3PIC-GFP^{art}:黑色圆形;r3PIC-GFP^{nat}:白色正方形)。在第7、14、21、28、35、42、56、77、98、120和147天收集血液,在病灶形成测定法中检查r3PIC-GFP^{nat}和r3PIC-GFP^{art}的病毒GFP转基因以测定病毒感染性(GFP FFU)。

[0129] 图10:基于三区段Pichinde病毒、含人工基因组的病毒载体是高度免疫原性的。按图中规定,用10e5 FFU的病毒静脉内使AGR小鼠(I型和II型干扰素受体以及RAG1三重缺陷的小鼠)感染(r3PIC-GFP^{art}:黑色圆形;r3PIC-GFP^{nat}:白色正方形)。在第7、14、21、28、35、42、56、77、98、120和147天收集血液,如图9和图10所示通过病灶形成测定法测定病毒感染性。所得值用来计算每只动物和时间点的NP:GFP FFU比例。

[0130] 图11:r3PIC-GFP^{art}感染后147天收集的小鼠血清中的病毒显示当在细胞培养中直接传代时的减毒生长,而自r3PIC-GFP^{nat}感染小鼠生长的病毒达到与rPIC^{wt}相当的滴度。使在BHK-21细胞中感染后第147天收集的的血清传代,48小时后通过NP FFU测定法测定病毒感染性。符号显示各小鼠血清来源病毒的滴度;误差条表示均值+/-SD。

[0131] 图12:自在r3PIC-GFP^{art}感染后147天收集的小鼠血清分离和扩增的病毒显示当在细胞培养中直接传代时的减毒生长,而从r3PIC-GFP^{nat}感染小鼠分离和扩增的病毒达到与rPIC^{wt}相当的滴度。用在感染后第147天收集且之前传代48小时的血清获得的病毒以标准感染复数=0.01感染BHK-21细胞。48小时后测定病毒滴度。符号显示各小鼠血清来源病毒的滴度;误差条表示均值+/-SD

[0132] 图13:r3PIC-GFP^{art}在小鼠持续感染147天时间内未能使其两个S区段重组,而在用r3PIC-GFP^{nat}持续感染147天的小鼠血清中检出含有NP和GP序列两者的S区段RNA类。使用引物对在病毒感染后第147天收集的的血清样品进行RT-PCR,所述引物被设计成分别与Pichinde病毒NP和GP结合,并且跨越Pichinde病毒S区段的基因间区(IGR),从而预测其产生rPIC^{wt}基因组模板上的357碱基对的PCR扩增子。各泳道表示图8-10所示实验中单个小鼠的RT-PCR产物。

[0133] 发明详述

[0134] 4.1在非天然位置具有可读框的Pichinde病毒

[0135] 本文提供其ORF重排的Pichinde病毒。在某些实施方案中,这类Pichinde病毒是可复制和有感染性的。本文提供这类Pichinde病毒的基因组序列。一方面,本文提供Pichinde病毒基因组区段,其中Pichinde病毒基因组区段经改造以在其中各个基因存在于自野外分离的病毒的位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF,例如ORF的Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18(参见7.序列表中的SEQ ID NO:1和2)(本文称为“野生型位置”)(即非天然位置)。

[0136] 野生型Pichinde病毒基因组区段和ORF是本领域已知的。具体地讲,Pichinde病毒基因组由S区段和L区段组成。S区段携带编码GP和NP的ORF。L区段编码L蛋白和Z蛋白。两个区段的两侧是各自的5'和3' UTR(参见图1A)。SEQ ID NO:1和2中提供说明性野生型Pichinde病毒基因组区段。

[0137] 在某些实施方案中,可对Pichinde病毒基因组区段进行改造以在野生型位置以外的位置携带两种或更多种Pichinde病毒ORF。在其它实施方案中,可对Pichinde病毒基因组区段进行改造以在野生型位置以外的位置携带2种Pichinde病毒ORF,或3种Pichinde病毒ORF,或4种Pichinde病毒ORF。

[0138] 在某些实施方案中,本文提供的Pichinde病毒基因组区段可以是:

[0139] (i)Pichinde病毒S区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0140] (ii)Pichinde病毒S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0141] (iii)Pichinde病毒S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0142] (iv)Pichinde病毒S区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0143] (v)Pichinde病毒S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0144] (vi)Pichinde病毒S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0145] (vii)Pichinde病毒L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0146] (viii)Pichinde病毒L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0147] (ix)Pichinde病毒L区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0148] (x)Pichinde病毒L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0149] (xi)Pichinde病毒L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0150] (xii)Pichinde病毒L区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0151] 在某些实施方案中,在本文所述Pichinde病毒基因组区段的非天然位置的ORF可在Pichinde病毒3' UTR或Pichinde病毒5' UTR的控制下。在更具体的实施方案中,Pichinde病毒3' UTR是Pichinde病毒S区段的3' UTR。在另一个具体的实施方案中,Pichinde病毒3' UTR是Pichinde病毒L区段的3' UTR。在更具体的实施方案中,Pichinde病毒5' UTR是Pichinde病毒S区段的5' UTR。在其它具体实施方案中,5' UTR是L区段的5' UTR。

[0152] 在其它实施方案中,在本文所述Pichinde病毒基因组区段的非天然位置的ORF可在沙粒病毒保守末端序列元件(5' -和3' -端19-21-nt区)的控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194)。

[0153] 在某些实施方案中,在Pichinde病毒基因组区段的非天然位置的ORF可在5' UTR的启动子元件的控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在另一个实施方案中,在Pichinde病毒基因组区段的非天然位置的ORF可在3' UTR的启动子元件的控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,5' UTR的启动子元件是S区段或L区段的5' UTR启动子元件。在另一个具体的实施方案中,3' UTR的启动子元件是S区段或L区段的3' UTR启动子元件。

[0154] 在某些实施方案中,在Pichinde病毒基因组区段的非天然位置的ORF可在截短的Pichinde病毒3' UTR或截短的Pichinde病毒5' UTR的控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194;Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,截短的3' UTR是Pichinde病毒S区段或L区段的3' UTR。在更具体的实施方案中,截短的5' UTR是Pichinde病毒S区段或L区段的5' UTR。

[0155] 本文还提供包含经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的第一基因组区段和第二Pichinde病毒基因组区段使得Pichinde病毒颗粒包含S区段和L区段的Pichinde病毒颗粒。在具体的实施方案中,在ORF野生型位置以外的位置处的ORF是Pichinde病毒ORF之

一。

[0156] 在某些具体的实施方案中,Pichinde病毒颗粒可包含所有4种Pichinde病毒ORF的完全互补序列。在具体的实施方案中,第二Pichinde病毒基因组区段经改造以在ORF野生型位置以外的位置携带ORF。在另一个具体的实施方案中,第二Pichinde病毒基因组区段可为野生型基因组区段(即包含野生型位置区段中的ORF)。

[0157] 在某些实施方案中,第一Pichinde病毒基因组区段是L区段,第二Pichinde病毒基因组区段是S区段。在其它实施方案中,第一Pichinde病毒基因组区段是S区段,第二Pichinde病毒基因组区段是L区段。

[0158] 包含在ORF野生型位置以外的位置处具有ORF的基因组区段和第二基因组区段的Pichinde病毒颗粒的非限制性实例见表1。

[0159] 表1

[0160] Pichinde病毒颗粒

[0161] *位置1在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置2在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下;位置3在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置4在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下。

[0162]

| 位置1 | 位置2 | 位置3 | 位置4 |
|-----|-----|-----|-----|
| GP | NP | L | Z |
| GP | Z | L | NP |
| GP | Z | NP | L |
| GP | L | NP | Z |
| GP | L | Z | NP |
| NP | GP | L | Z |
| NP | GP | Z | L |
| NP | L | GP | Z |
| NP | L | Z | GP |
| NP | Z | GP | L |
| NP | Z | L | GP |
| Z | GP | L | NP |
| Z | GP | NP | L |
| Z | NP | GP | L |
| Z | NP | L | GP |
| Z | L | NP | GP |
| Z | L | GP | NP |
| L | NP | GP | Z |
| L | NP | Z | GP |
| L | GP | Z | NP |
| L | GP | NP | Z |
| L | Z | NP | GP |
| L | Z | GP | NP |

[0163] 本文还提供经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA。在更具体的实施方案中,本文提供表1所列Pichinde病毒基因组的cDNA或一组cDNA。

[0164] 在某些实施方案中,编码本文所述Pichinde病毒基因组区段的核酸可与本文公开的核酸序列具有至少某种序列同一性。因此,在一些方面,编码Pichinde病毒基因组区段的核酸具有与本文通过SEQ ID NO公开的核酸序列或与本文通过SEQ ID NO公开的核酸序列杂交的核酸序列具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少91%同一性、至少92%同一性、至少93%同一性、至少94%同一性、至少95%同一性、至少96%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性或至少99%同一性或相同的核酸序列。杂交条件可包括本领域技术人员熟知的高严格、中等严格或低严格杂交条件,例如本文描述的那些。同样,如本文所述可用于产生Pichinde病毒基因组区段的核酸可与本文通过SEQ ID NO公开的核酸或与本文通过SEQ ID NO公开的核酸杂交的核酸具有某一百分比序列同一性。例如,用来产生Pichinde病毒基因组区段的核酸可与本文所述核酸序列具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少91%同一性、至少92%同一性、至少93%同一性、至少94%同一性、至少95%同一性、至少96%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性或至少99%同一性或相同。

[0165] 序列同一性(亦称为同源性或相似性)是指两个核酸分子之间或两个多肽之间的序列相似性。同一性可通过比较各个序列中的位置来确定,可对各序列进行比对用于比较目的。当所比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则在该位置的分子相同。序列之间的同一性程度随所述序列共有的匹配或同源位置的数目而变化。可应用本领域已知的软件程序,例如Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999) 中描述的那些,对两个序列进行比对以测定其百分比序列同一性。优选,比对使用默认参数。可应用的本领域众所周知的一个比对程序是设置为默认参数的BLAST。具体地讲,程序是使用以下默认参数的BLASTN和BLASTP: Genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50序列; sort by=HIGH SCORE; 数据库=非冗余, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详情可参见National Center for Biotechnology Information。

[0166] 严格杂交是指杂交的多核苷酸所处的是稳定的条件。正如本领域技术人员已知的,杂合体的解链温度(T_m)反映了杂交的多核苷酸的稳定性。一般而言,杂交的多核苷酸的稳定性随盐浓度(例如钠离子浓度)和温度而变化。杂交反应可在较低严格性条件下进行,接着变化而较高的严格性的洗涤。提及杂交严格性涉及这类洗涤条件。高严格的杂交包括允许在0.018M NaCl中在65°C下形成稳定的杂交多核苷酸的仅有的那些核酸序列杂交的条件,例如,如果杂合体在0.018M NaCl中在65°C下不稳定,则如本文所预期的,它在高严格性条件下将不稳定。可如下提供高严格性条件,例如通过在50%甲酰胺、5X Denhart溶液、5X SSPE、0.2% SDS中在42°C下杂交,接着在0.1X SSPE和0.1% SDS中在65°C下洗涤。高严格杂交条件以外的杂交条件也可用来描述本文公开的核酸序列。例如,短语中等严格杂交是指相当于在50%甲酰胺、5X Denhart溶液、5X SSPE、0.2% SDS中在42°C下杂交,接着在0.2X SSPE、0.2% SDS中在42°C下洗涤的条件。短语低严格杂交是指相当于在10%甲酰胺、

5X Denhart溶液、6X SSPE、0.2% SDS中在22℃下杂交,接着在1X SSPE、0.2% SDS中在37℃下洗涤的条件。Denhart溶液含有1% Ficoll、1% 聚乙烯吡咯烷酮和1% 牛血清白蛋白(BSA)。20X SSPE (氯化钠、磷酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)) 含有3M氯化钠、0.2M磷酸钠和0.025M(EDTA)。其它合适的低、中和高严格性杂交缓冲液和条件为本领域技术人员熟知,描述于例如Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001); 和Ausubel et al., *Current方案 in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

[0167] 在某些实施方案中,经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA是DNA表达载体的一部分或被掺入DNA表达载体中。在一个具体实施方案中,经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA一部分或被掺入有利于本文所述Pichinde病毒基因组区段产生的DNA表达载体中。在另一个实施方案中,可使本文所述cDNA成为质粒的一部分。第4.5.1节中提供了cDNA或核酸和表达系统的更详细的描述。cDNA生产的技术是分子生物学和DNA操作和生产的常规和常用的技术。可采用技术人员已知的任何克隆技术。例如技术是众所周知的,且是技术人员在例如Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001) 等实验室手册中可获得的。

[0168] 在某些实施方案中,将经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA导入(例如感染)宿主细胞。因此,在本文提供的一些实施方案中,是包含经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA(即基因组区段的cDNA)的宿主细胞。在其它实施方案中,本文所述cDNA是DNA表达载体的一部分或可被掺入DNA表达载体中并被导入宿主细胞。因此,在本文提供的一些实施方案中是包含掺入载体中的本文所述cDNA的宿主细胞。在其它实施方案中,将本文所述Pichinde病毒基因组区段掺入宿主细胞。

[0169] 在某些实施方案中,本文描述了产生Pichinde病毒基因组区段的方法,其中所述方法包括使Pichinde病毒基因组区段的cDNA转录。在某些实施方案中,病毒聚合酶蛋白质可在Pichinde病毒基因组区段体外或体内转录期间存在。

[0170] 在某些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段的转录使用双向启动子进行。在其它实施方案中,Pichinde病毒基因组区段的转录使用双向表达盒进行(参见例如Ortiz-Riaño et al., 2013, *J Gen Virol.*, 94 (Pt 6): 1175-1188)。在更具体的实施方案中,双向表达盒包含分别从相对侧向插入的Pichinde病毒基因组区段的两个末端读取的聚合酶I和聚合酶II启动子两者。在又一些更具体的实施方案中,具有pol-I和pol-II启动子的双向表达盒从相对端向L区段和S区段读取。

[0171] 在其它实施方案中,本文所述Pichinde病毒基因组区段的cDNA的转录包含启动子。启动子的具体实例包括RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子、SP6启动子或T3启动子。

[0172] 在某些实施方案中,产生Pichinde病毒基因组区段的方法可进一步包括将Pichinde病毒基因组区段的cDNA导入宿主细胞。在某些实施方案中,产生Pichinde病毒基因组区段的方法可进一步包括将Pichinde病毒基因组区段的cDNA导入宿主细胞,其中宿主细胞表达用于产生Pichinde病毒基因组区段的所有其它组分;从宿主细胞的上清液中纯化

Pichinde病毒基因组区段。所述方法是本领域技术人员所熟知的。

[0173] 本文提供培养用本文提供的核酸、载体和组合物感染的细胞的细胞系、培养物和方法。第4.5节提供本文所述核酸、载体系统和细胞系的更多详细描述。

[0174] 在某些实施方案中,本文所述Pichinde病毒颗粒产生感染性和可复制型Pichinde病毒颗粒。在具体的实施方案中,使本文所述Pichinde病毒颗粒减毒。在一个具体实施方案中,使Pichinde病毒颗粒减毒,使得该病毒保持增殖、至少部分能够增殖并可体内复制,但只可产生低病毒载量,导致不致病的亚临床感染水平。这类减毒病毒可用作免疫原性组合物。本文提供如第4.7节中所述包含在非天然位置具有ORF的Pichinde病毒的免疫原性组合物。

[0175] 4.1.1在非天然位置具有可读框的复制缺陷型Pichinde病毒颗粒

[0176] 在某些实施方案中,本文提供Pichinde病毒颗粒,其中(i) ORF位于ORF野生型位置以外的位置;和(ii) 编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的ORF被去除或功能失活使得所得病毒无法进一步产生感染性子代病毒颗粒。包含其中一种或多种ORF缺失或功能失活的遗传修饰的基因组的Pichinde病毒颗粒可在补给细胞(即表达已缺失或功能失活的Pichinde病毒ORF的细胞)中产生。所得Pichinde病毒颗粒的遗传物质可在宿主细胞感染时转移到宿主细胞中,其中遗传物质可表达和扩增。另外,本文所述的遗传修饰的Pichinde病毒颗粒的基因组可编码来自Pichinde病毒颗粒以外的生物的异源ORF。

[0177] 在某些实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在另一个实施方案中,可将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少1种ORF、至少2种ORF、至少3种ORF或至少4种ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在具体的实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的仅仅一种去除并用来自Pichinde病毒颗粒以外的生物的异源ORF替换。在更具体的实施方案中,将编码Pichinde病毒基因组区段的GP的ORF去除。在另一个具体的实施方案中,将编码Pichinde病毒基因组区段的NP的ORF去除。在更具体的实施方案中,将编码Pichinde病毒基因组区段的Z蛋白的ORF去除。在再一个具体实施方案中,将编码L蛋白的ORF去除。

[0178] 因此,在某些实施方案中,本文提供的Pichinde病毒颗粒包含以下基因组区段:(i) 经改造在非天然位置携带ORF;(ii) 编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除;(iii) 被去除的ORF用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0179] 在某些实施方案中,异源ORF为8-100个核苷酸长度、15-100个核苷酸长度、25-100个核苷酸长度、50-200个核苷酸长度、50-400个核苷酸长度、200-500个核苷酸长度或400-600个核苷酸长度、500-800个核苷酸长度。在其它实施方案中,异源ORF为750-900个核苷酸长度、800-100个核苷酸长度、850-1000个核苷酸长度、900-1200个核苷酸长度、1000-1200个核苷酸长度、1000-1500个核苷酸或10-1500个核苷酸长度、1500-2000个核苷酸长度、1700-2000个核苷酸长度、2000-2300个核苷酸长度、2200-2500个核苷酸长度、2500-3000个核苷酸长度、3000-3200个核苷酸长度、3000-3500个核苷酸长度、3200-3600个核苷酸长度、3300-3800个核苷酸长度、4000个核苷酸-4400个核苷酸长度、4200-4700个核苷酸长度、4800-5000个核苷酸长度、5000-5200个核苷酸长度、5200-5500个核苷酸长度、5500-5800个核苷酸长度、5800-6000个核苷酸长度、6000-6400个核苷酸长度、6200-6800个核苷酸长度、6600-7000个核苷酸长度、7000-7200个核苷酸长度、7200-7500个核苷酸长度或7500个核苷

酸长度。在一些实施方案中,异源ORF编码肽或多肽,所述肽或多肽是5-10个氨基酸长度、10-25个氨基酸、25-50个氨基酸长度、50-100个氨基酸长度、100-150个氨基酸长度、150-200个氨基酸长度、200-250个氨基酸长度、250-300个氨基酸长度、300-400个氨基酸长度、400-500个氨基酸长度、500-750个氨基酸长度、750-1000个氨基酸长度、1000-1250个氨基酸长度、1250-1500个氨基酸长度、1500-1750个氨基酸长度、1750-2000个氨基酸长度、2000-2500个氨基酸长度或超过2500个或更多个氨基酸长度。在一些实施方案中,异源ORF编码不超过2500个氨基酸长度的多肽。在具体的实施方案中,异源ORF不含终止密码子。在某些实施方案中,异源ORF是密码子优化的。在某些实施方案中,核苷酸组成、核苷酸对组成或两者可被优化。这类优化的技术是本领域已知的,可用来使异源ORF优化。

[0180] 来自Pichinde病毒以外的生物的任何异源ORF可包括在Pichinde病毒基因组区段中。在一个实施方案中,异源ORF编码报道蛋白。报道蛋白的更多详细描述见第4.3节。在另一个实施方案中,异源ORF编码感染性病原体的抗原或与能够诱导免疫应答的任何疾病有关的抗原。在具体的实施方案中,抗原来源于感染性生物、肿瘤(即癌症)或变应原。有关异源ORF的更多详细描述见第4.3节。

[0181] 在某些实施方案中,Pichinde病毒颗粒的生长和感染性不受来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF影响。

[0182] 可采用本领域技术人员已知技术产生包含经改造在野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF的Pichinde病毒基因组区段的Pichinde病毒颗粒。例如,反向遗传技术可用来产生这类Pichinde病毒颗粒。在其它实施方案中,复制缺陷型Pichinde病毒颗粒(即经改造在野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF的Pichinde病毒基因组区段,其中编码GP、NP、Z蛋白、L蛋白的ORF缺失)可在补给细胞中产生。

[0183] 在某些实施方案中,本申请涉及本文所述适于用作疫苗的Pichinde病毒颗粒和在疫苗接种和例如感染或癌症的治疗或预防中使用这类Pichinde病毒颗粒的方法。第4.6节中提供使用本文所述Pichinde病毒颗粒的方法的更多详细描述。

[0184] 在某些实施方案中,本文提供在一个或多个容器中包含本文所述一种或多种cDNA的试剂盒。在一个具体实施方案中,该试剂盒在一个或两个或更多个容器中包含本文所述Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒。该试剂盒可进一步包含以下的一种或两种:适于拯救Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒的宿主细胞,适用于将质粒cDNA转染至宿主细胞的试剂、辅助病毒、编码病毒蛋白质的质粒和/或对修饰的Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒或其cDNA有特异性的一种或多种引物。

[0185] 在某些实施方案中,本申请涉及本文所述适于用作药物组合物的Pichinde病毒颗粒和在疫苗接种和例如感染和癌症的治疗或预防中使用这类Pichinde病毒颗粒的方法。第4.7节提供使用本文所述Pichinde病毒颗粒的方法的更多详细描述。

[0186] 4.2三区段Pichinde病毒颗粒

[0187] 本文提供其ORF重排的三区段Pichinde病毒颗粒。一方面,本文提供包含一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒不重组成为可复制型二区段Pichinde病毒颗粒。更具体地说,在某些实施方案中,两个基因组区段(例如分别为两个S区段或两个L区段)无法以产生可代替两个亲本区段的单一病毒区段的方式重组。在具体的实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒

在ORF野生型位置以外的位置包含ORF。在再一个具体实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒包含所有4种Pichinde病毒ORF。因此,在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是可复制型和感染性的。在其它实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒缺乏4种Pichinde病毒ORF之一。因此,在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能够在非补给细胞中进一步产生感染性子代。

[0188] 在某些实施方案中,编码本文所述三区段Pichinde病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在Pichinde病毒3' UTR或Pichinde病毒5' UTR的控制下。在更具体的实施方案中,三区段Pichinde病毒3' UTR是Pichinde病毒S区段的3' UTR。在另一个具体的实施方案中,三区段Pichinde病毒3' UTR是三区段Pichinde病毒L区段的3' UTR。在更具体的实施方案中,三区段Pichinde病毒5' UTR是Pichinde病毒S区段的5' UTR。在其它具体实施方案中,5' UTR是L区段的5' UTR。

[0189] 在其它实施方案中,编码本文所述三区段Pichinde病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在沙粒病毒保守末端序列元件(5' -和3' -端19-21-nt区)的控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194)。

[0190] 在某些实施方案中,编码三区段Pichinde病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在5' UTR的启动子元件的控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在另一个实施方案中,编码三区段Pichinde病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白、L蛋白的ORF可在3' UTR的启动子元件的控制下(参见例如Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4)。在更具体的实施方案中,5' UTR的启动子元件是S区段或L区段的5' UTR启动子元件。在另一个具体的实施方案中,3' UTR的启动子元件是S区段或L区段的3' UTR启动子元件。

[0191] 在某些实施方案中,编码三区段Pichinde病毒颗粒的GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF可在截短的Pichinde病毒3' UTR或截短的Pichinde病毒5' UTR的控制下(参见例如Perez&de la Torre,2003,J Virol.77(2):1184-1194;Albarino et al.,2011,J Virol.,85(8):4020-4。在更具体的实施方案中,截短的3' UTR是Pichinde病毒S区段或L区段的3' UTR。在更具体的实施方案中,截短的5' UTR是Pichinde病毒S区段或L区段的5' UTR。

[0192] 本文还提供三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA。在更具体的实施方案中,本文提供编码表2或表3所列的三区段Pichinde病毒颗粒的DNA核苷酸序列或一组DNA核苷酸序列。

[0193] 在某些实施方案中,编码本文所述三区段Pichinde病毒基因组区段的核酸可与本文公开的核酸序列具有至少某种序列同一性。因此,在一些方面,编码三区段Pichinde病毒基因组区段的核酸具有与本文通过SEQ ID NO公开的核酸序列或与本文通过SEQ ID NO公开的核酸序列杂交的核酸序列具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少91%同一性、至少92%同一性、至少93%同一性、至少94%同一性、至少95%同一性、至少96%同一性、至少97%同一性、至少98%同一性或至少99%同一性或相同的核酸序列。杂交条件可包括本领域技术人员熟知的高严格、中等严格或低严格杂交条件,例如本文描述的那些。同样,可用于产生本文所述三区段Pichinde病毒基因组区段的核酸可与本文通过SEQ ID NO公开的核酸或与本文通过SEQ ID NO公开的核酸杂交的核酸具有某一百分比序列同一性。例如,用于产生三区段Pichinde病毒基因组区段的核酸可与本文所述核酸序列具有至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性、至少91%同一性、至少92%同一性、至少93%同一性、至少94%同一性、至少95%同一性、至少96%同一性、至少97%同一性、至少

98%同一性或至少99%同一性或相同。

[0194] 在某些实施方案中,编码三区段Pichinde病毒基因组的核酸是一种或多种DNA表达载体的一部分或被掺入其中。在一个具体实施方案中,编码三区段Pichinde病毒颗粒的基因组的核酸是一部分或被掺入有利于产生本文所述三区段Pichinde病毒颗粒的一种或多种DNA表达载体中。在另一个实施方案中,可使本文所述cDNA成为质粒的一部分。第4.5.1节提供cDNA和表达系统的更多详细描述。cDNA生产的技术是分子生物学和DNA操作和产生的常规和常用的技术。可采用技术人员已知的任何克隆技术。这类技术是众所周知的,且是技术人员在例如Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. (2001) 等实验室手册中可获得的。

[0195] 在某些实施方案中,将三区段Pichinde病毒的cDNA导入(例如感染)宿主细胞。因此,在本文提供的一些实施方案中,是包含三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA(即三区段Pichinde病毒颗粒的基因组区段的cDNA)的宿主细胞。在其它实施方案中,本文所述cDNA是DNA表达载体的一部分或可被掺入DNA表达载体中并被导入宿主细胞。因此,在本文提供的一些实施方案中,是包含掺入载体中的本文所述cDNA的宿主细胞。在其它实施方案中,将本文所述三区段Pichinde病毒基因组区段(即L区段和/或S区段或区段)导入宿主细胞。

[0196] 在某些实施方案中,本文描述了产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法,其中所述方法包括使三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA转录。在某些实施方案中,病毒聚合酶蛋白质可在三区段Pichinde病毒颗粒体外或体内转录期间存在。在某些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段的转录使用双向启动子进行。

[0197] 在其它实施方案中,Pichinde病毒基因组区段的转录使用双向表达盒进行(参见例如Ortiz-Riaño et al., 2013, *J Gen Virol.*, 94(Pt 6):1175-1188)。在更具体的实施方案中,双向表达盒包含分别从相对侧向插入的Pichinde病毒基因组区段的两个末端读取的聚合酶I和聚合酶II启动子两者。

[0198] 在其它实施方案中,本文所述Pichinde病毒基因组区段的cDNA的转录包含启动子。启动子的具体实例包括RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子、SP6启动子或T3启动子。

[0199] 在某些实施方案中,产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法可进一步包括将三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA转入宿主细胞。在某些实施方案中,产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法可进一步包括将三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA转入宿主细胞,其中宿主细胞表达产生三区段Pichinde病毒颗粒的所有其它组分;将三区段Pichinde病毒颗粒从宿主细胞的上清液中纯化。所述方法是本领域技术人员所熟知的。

[0200] 本文提供培养用本文提供的核酸、载体和组合物感染的细胞的细胞系、培养物和方法。第4.5节提供本文所述核酸、载体系统和细胞系的更多详细描述。

[0201] 在某些实施方案中,本文所述三区段Pichinde病毒颗粒产生感染性和可复制型Pichinde病毒颗粒。在具体的实施方案中,使本文所述Pichinde病毒颗粒减毒。在一个具体实施方案中,使三区段Pichinde病毒颗粒减毒,使得病毒至少部分保持可复制能力并可体内复制,但只可产生低病毒载量,导致是不致病的亚临床感染水平。这类减毒病毒可用作免疫原性组合物。

[0202] 在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒具有与二区段Pichinde病毒颗粒一

样的向性。

[0203] 本文还提供在一个或多个容器中包含本文所述一种或多种cDNA的药盒。在一个具体实施方案中,该药盒在一个或两个或更多个容器中包含本文所述三区段Pichinde病毒颗粒。该药盒可进一步包含以下的一种或两种:适于拯救三区段Pichinde病毒颗粒的宿主细胞、适用于将质粒cDNA转染至宿主细胞的试剂、辅助病毒、编码病毒蛋白质的质粒和/或对修饰的Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒或其编码核酸有特异型的一种或多种寡核苷酸引物。

[0204] 本文还提供包含第4.6和4.7节中描述的四区段Pichinde病毒颗粒的免疫原性组合物。

[0205] 4.2.1包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒

[0206] 一方面,本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。在具体的实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的增殖在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因(RAG1)并用 10^4 PFU的三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中持续感染至少10天、至少20天、至少30天、至少40天、至少50天、至少60天、至少70天、至少80天、至少90天或至少100天后不产生可复制型二区段病毒颗粒(参见第4.8.13节)。在其它实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的增殖在至少10次传代、至少20次传代、至少30次传代、至少40次传代或至少50次传代后不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0207] 在某些实施方案中,使两个沙粒病毒ORF在一个而不是两个单独的区段结合的本文提供的三区段Pichinde病毒颗粒的两个S区段的区段间重组产生无功能启动子(即结构:5' UTR-----5' UTR或3' UTR-----3' UTR的基因组区段),其中形成基因组一端的每个UTR是同一基因组另一端的反转重复序列。

[0208] 在某些实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒经改造在ORF野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF。在其它实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒经改造在野生型位置以外的位置携带2个Pichinde病毒ORF,或3个Pichinde病毒ORF,或4个Pichinde病毒ORF,或5个Pichinde病毒ORF,或6个Pichinde病毒ORF。在具体的实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒包含所有4种Pichinde病毒ORF的完全互补序列。因此,在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是感染性和可复制型三区段Pichinde病毒颗粒。在具体的实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒的两个S区段经改造在野生型位置以外的位置携带其ORF之一。在更具体的实施方案中,两个S区段包含S区段ORF的完全互补序列。在某些具体的实施方案中,L区段经改造在野生型位置以外的位置携带ORF或L区段可为野生型基因组区段。

[0209] 在某些实施方案中,两个S区段之一可为:

[0210] (i)Pichinde病毒S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0211] (ii)Pichinde病毒S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0212] (iii)Pichinde病毒S区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0213] (iv)Pichinde病毒S区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0214] (v) Pichinde病毒S区段,其中编码L的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0215] (vi) Pichinde病毒S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0216] 在某些实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒可包含重复ORF (duplicate ORF) (即2种野生型S区段ORF,例如GP或NP)。在具体的实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒可包含一种重复ORF (例如 (GP, GP)) 或两种重复ORF (例如 (GP, GP) 和 (NP, NP))。

[0217] 下表2A是包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的基因组结构的实例,其中三区段Pichinde病毒基因组中两个S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性 (即所得重组的S区段由2个3' UTR而非3' UTR和5' UTR构成)。

[0218] 表2A

[0219] 包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒

[0220] 位置1在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置2在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下;位置3在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置4在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下;位置5在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置6在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下。

[0221] *ORF表示已插入异源ORF。

[0222]

| 位置 1 | 位置 2 | 位置 3 | 位置 4 | 位置 5 | 位置 6 |
|------|------|------|------|------|------|
| *ORF | GP | *ORF | NP | Z | L |
| *ORF | NP | *ORF | GP | Z | L |
| *ORF | NP | *ORF | GP | L | Z |
| *ORF | NP | *ORF | Z | L | GP |
| *ORF | NP | Z | GP | *ORF | Z |
| *ORF | NP | Z | GP | Z | *ORF |
| *ORF | NP | *ORF | L | Z | GP |
| *ORF | L | *ORF | NP | Z | GP |
| *ORF | L | Z | NP | *ORF | GP |
| *ORF | L | *ORF | GP | Z | NP |
| *ORF | L | Z | GP | *ORF | NP |
| *ORF | Z | L | NP | *ORF | GP |
| *ORF | Z | *ORF | GP | L | NP |
| *ORF | Z | L | GP | *ORF | NP |
| L | GP | *ORF | NP | *ORF | Z |
| L | GP | *ORF | *ORF | Z | NP |
| L | GP | *ORF | Z | *ORF | NP |
| L | *ORF | Z | GP | *ORF | NP |
| L | GP | *ORF | NP | *ORF | Z |
| L | GP | *ORF | Z | *ORF | NP |
| L | GP | Z | NP | *ORF | *ORF |
| L | GP | Z | NP | *ORF | *ORF |
| L | *ORF | Z | NP | *ORF | GP |
| L | NP | *ORF | Z | *ORF | GP |
| L | NP | Z | *ORF | GP | *ORF |
| L | *ORF | Z | *ORF | GP | NP |
| L | NP | Z | GP | *ORF | *ORF |
| L | NP | *ORF | Z | *ORF | GP |
| L | *ORF | Z | NP | *ORF | GP |
| L | Z | *ORF | GP | *ORF | NP |
| L | Z | *ORF | NP | *ORF | GP |
| Z | GP | *ORF | NP | *ORF | L |
| Z | GP | *ORF | *ORF | L | NP |

| | 位置 1 | 位置 2 | 位置 3 | 位置 4 | 位置 5 | 位置 6 |
|--------|------|------|------|------|------|------|
| [0223] | Z | GP | *ORF | L | *ORF | NP |
| | Z | *ORF | L | GP | *ORF | NP |
| | Z | GP | *ORF | NP | *ORF | L |
| | Z | GP | *ORF | L | *ORF | NP |
| | Z | GP | L | NP | *ORF | *ORF |
| | Z | GP | L | NP | *ORF | *ORF |
| | Z | *ORF | L | NP | *ORF | GP |
| | Z | NP | *ORF | *ORF | L | GP |
| | Z | NP | *ORF | GP | *ORF | L |
| | Z | NP | *ORF | *ORF | L | GP |
| | Z | NP | *ORF | L | *ORF | GP |
| | Z | NP | L | GP | *ORF | *ORF |
| | Z | *ORF | L | GP | *ORF | NP |
| | Z | NP | *ORF | GP | *ORF | L |
| | Z | NP | *ORF | L | *ORF | GP |
| | Z | *ORF | L | NP | *ORF | GP |
| | Z | L | *ORF | GP | *ORF | NP |

[0224] 在某些实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR。在一个具体实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒S区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒S区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR。在某些实施方案中,其它组合也是可能的。例如,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中三区段Pichinde病毒基因组中两个S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组的S区段2个5' UTR而非3' UTR和5' UTR构成)。

[0225] 在某些实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒中S区段和L区段的区段间重组恢复了功能性区段,其中两个病毒基因在唯一一个区段而非两个独立的区段上。在其它实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒中S区段和L区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0226] 下表2B是包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的基因组结构的实例,其中三区段Pichinde病毒基因组中S区段和L区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组的S区段由2个3' UTR而非3' UTR和5' UTR构成)。

[0227] 表2B

[0228] 包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒

[0229] 位置1在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置2在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下;位置3在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置4在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下;位置5在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置6在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下。

[0230] *ORF表示已插入异源ORF。

[0231]

| 位置1 | 位置2 | 位置3 | 位置4 | 位置5 | 位置6 |
|-----|-----|------|------|------|------|
| L | GP | *ORF | NP | Z | *ORF |
| L | GP | Z | *ORF | *ORF | NP |
| L | GP | *ORF | NP | Z | *ORF |
| L | GP | Z | *ORF | *ORF | NP |
| L | NP | *ORF | GP | Z | *ORF |
| L | NP | Z | *ORF | *ORF | GP |
| L | NP | *ORF | GP | Z | *ORF |
| L | NP | Z | *ORF | *ORF | GP |
| Z | GP | *ORF | NP | L | *ORF |
| Z | GP | L | *ORF | *ORF | NP |
| Z | GP | *ORF | NP | L | *ORF |
| Z | NP | L | *ORF | *ORF | GP |
| Z | NP | *ORF | GP | L | *ORF |
| Z | NP | L | *ORF | *ORF | GP |

[0232] 在某些实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR。在一个具体实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒S区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒S区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR。在某些实施方案中,其它组合也是可能的。例如,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中三区段Pichinde病毒基因组中两个S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组的S区段2个5' UTR而非3' UTR和5' UTR构成)。

[0233] 在某些实施方案中,本领域技术人员可构建具有表2A或2B列举和本文描述的结构Pichinde病毒基因组,然后采用第4.8节描述的测定法测定三区段Pichinde病毒颗粒是否是遗传稳定的,即不产生本文所述的可复制型二区段病毒颗粒。

[0234] 4.2.2包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒

[0235] 一方面,本文提供包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。在具体的实施方案中,在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因(RAG1)并用 10^4 PFU的三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中持续至少10天、至少20天、至少30天、至少40天,或至少50天、至少60天、至少70天、至少80天、至少90天、至少100天后,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒(参见第4.8.13节)。在其它实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的增殖在至少10次传代、20次传代、30次传代、40次传代或50次传代后不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0236] 在某些实施方案中,使2个Pichinde病毒ORF在一个而非两个单独的区段中结合的本文提供的三区段Pichinde病毒颗粒的两个L区段的区段间重组产生无功能启动子(即结构:5' UTR-----5' UTR或3' UTR-----3' UTR的基因组区段),其中形成基因组

一端的每个UTR是同一基因组另一端的反转重复序列。

[0237] 在某些实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒经改造在ORF野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF。在其它实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒经改造在野生型位置以外的位置携带2个Pichinde病毒ORF,或3个Pichinde病毒ORF,或4个Pichinde病毒ORF,或5个Pichinde病毒ORF,或6个Pichinde病毒ORF。在具体的实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒包含所有4种Pichinde病毒ORF的完全互补序列。因此,在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒是感染性和可复制型三区段Pichinde病毒颗粒。在具体的实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒的两个L区段经改造在野生型位置以外的位置携带其ORF之一。在更具体的实施方案中,两个L区段包含L区段ORF的完全互补序列。在某些具体的实施方案中,S区段经改造在野生型位置以外的位置携带其ORF之一或S区段可为野生型基因组区段。

[0238] 在某些实施方案中,两个L区段之一可以是:

[0239] (i)L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0240] (ii)L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0241] (iii)L区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0242] (iv)L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0243] (v)L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0244] (vi)L区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0245] 在某些实施方案中,包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒可包含重复ORF(即两种野生型L区段ORF,例如Z蛋白或L蛋白)。在具体的实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒可包含一种重复ORF(例如(Z蛋白,Z蛋白))或两种重复ORF(例如(Z蛋白,Z蛋白)和(L蛋白,L蛋白))。

[0246] 下表3是包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的基因组结构的实例,其中三区段Pichinde病毒基因组中的两个L区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即假定的所得重组L区段可由两个3' UTR或两个5' UTR而非3' UTR和5' UTR构成)。根据表3,可预测类似组合以产生由两个5' UTR而非3' UTR和5' UTR构成Pichinde病毒颗粒。

[0247] 表3

[0248] 包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒

[0249] *位置1在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置2在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下;位置3在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置4在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下;位置5在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置6在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下。

[0250] *ORF表示已插入异源ORF。

[0251]

| 位置 1 | 位置 2 | 位置 3 | 位置 4 | 位置 5 | 位置 6 |
|------|------|------|------|------|------|
| ORF* | Z | ORF* | L | NP | GP |
| ORF* | Z | ORF* | L | GP | NP |
| ORF* | Z | GP | L | ORF* | NP |
| ORF* | Z | ORF* | GP | NP | L |
| ORF* | Z | GP | ORF* | NP | L |
| ORF* | Z | NP | ORF* | GP | L |
| ORF* | ORF* | NP | Z | GP | L |
| ORF* | Z | GP | NP | ORF* | L |
| ORF* | Z | NP | GP | ORF* | L |
| ORF* | L | ORF* | Z | NP | GP |
| ORF* | L | ORF* | Z | GP | NP |
| ORF* | L | ORF* | GP | NP | Z |
| ORF* | L | GP | Z | ORF* | NP |

[0252]

| 位置 1 | 位置 2 | 位置 3 | 位置 4 | 位置 5 | 位置 6 |
|------|------|------|------|------|------|
| ORF* | L | ORF* | GP | NP | Z |
| ORF* | L | NP | Z | ORF* | GP |
| ORF* | L | GP | NP | ORF* | Z |
| ORF* | L | NP | GP | ORF* | Z |
| ORF* | GP | ORF* | L | NP | Z |
| ORF* | GP | NP | L | ORF* | Z |
| ORF* | GP | ORF* | Z | NP | L |
| ORF* | GP | NP | Z | ORF* | L |
| ORF* | NP | ORF* | L | GP | Z |
| ORF* | NP | GP | L | ORF* | Z |
| ORF* | NP | GP | Z | ORF* | L |
| ORF* | NP | ORF* | Z | GP | L |
| ORF* | L | ORF* | Z | NP | GP |
| ORF* | L | ORF* | Z | GP | NP |
| ORF* | L | ORF* | NP | GP | Z |
| ORF* | L | ORF* | GP | NP | Z |
| ORF* | L | NP | Z | ORF* | GP |
| ORF* | Z | ORF* | GP | NP | L |
| ORF* | Z | GP | L | ORF* | NP |
| ORF* | Z | NP | GP | ORF* | L |
| ORF* | Z | GP | NP | ORF* | L |
| ORF* | GP | ORF* | L | NP | Z |
| ORF* | GP | ORF* | L | Z | NP |
| ORF* | GP | ORF* | Z | GP | L |
| ORF* | GP | NP | L | ORF* | Z |
| GP | L | ORF* | Z | ORF* | NP |
| GP | L | ORF* | NP | ORF* | Z |
| GP | Z | ORF* | L | ORF* | NP |
| GP | Z | ORF* | L | ORF* | NP |
| GP | Z | ORF* | NP | ORF* | L |
| GP | NP | ORF* | Z | ORF* | L |
| NP | L | ORF* | Z | ORF* | GP |
| NP | L | ORF* | GP | ORF* | Z |
| NP | L | ORF* | Z | ORF* | GP |

[0253] 在某些实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR。在一个具体实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒S区段IGR。在某些实施方案中,其它组合也是可能的。

[0254] 在某些实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的L区段和S区段的区段间重组恢复了功能性区段,其中两个病毒基因在唯一一个区段而非两个单独的区段上。在其它实施方案中,包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒

颗粒中L区段和S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0255] 下表3B是包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒的基因组结构的实例,其中三区段Pichinde病毒基因组中L区段和S区段的区段间重组不产生可复制型二区段病毒颗粒并消除了沙粒病毒启动子活性(即所得重组的S区段由2个3' UTR而非3' UTR和5' UTR构成)。

[0256] 表3B

[0257] 包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒

[0258] *位置1在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置2在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下;位置3在Pichinde病毒L区段5' UTR的控制下;位置4在Pichinde病毒L区段3' UTR的控制下;位置5在Pichinde病毒S区段5' UTR的控制下;位置6在Pichinde病毒S区段3' UTR的控制下。

[0259] *ORF表示已插入异源ORF。

[0260]

| 位置1 | 位置2 | 位置3 | 位置4 | 位置5 | 位置6 |
|-----|-----|------|------|------|------|
| NP | Z | *ORF | GP | L | *ORF |
| NP | Z | GP | *ORF | *ORF | L |
| NP | Z | *ORF | GP | L | *ORF |
| NP | Z | GP | *ORF | *ORF | L |
| NP | L | *ORF | GP | Z | *ORF |
| NP | L | GP | *ORF | *ORF | Z |
| NP | L | *ORF | GP | Z | *ORF |
| NP | L | GP | *ORF | *ORF | Z |
| GP | Z | *ORF | NP | L | *ORF |
| GP | Z | NP | *ORF | *ORF | L |
| GP | Z | *ORF | NP | L | *ORF |
| GP | L | NP | *ORF | *ORF | Z |
| GP | L | *ORF | NP | Z | *ORF |
| GP | L | NP | *ORF | *ORF | Z |

[0261] 在某些实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒S区段或L区段IGR。在一个具体实施方案中,位置1和位置2间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR;位置2和3间的IGR可为Pichinde病毒L区段IGR;位置5和6间的IGR可为Pichinde病毒S区段IGR。在某些实施方案中,其它组合也是可能的。

[0262] 在某些实施方案中,本领域技术人员可构建具有表3A或3B和本文所述结构的Pichinde病毒基因组,然后采用第4.8节描述的测定法测定三区段Pichinde病毒颗粒是否是遗传稳定的,即不产生本文所述的可复制型二区段病毒颗粒。

[0263] 4.2.3复制缺陷型三区段Pichinde病毒颗粒

[0264] 在某些实施方案中,本文提供三区段Pichinde病毒颗粒,其中(i) ORF位于ORF野生型位置以外的位置;和(ii) 编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除或功能失活使得所得病毒无法进一步产生感染性子代病毒颗粒(即是复制缺陷型的)。在某些实施方案中,第三

Pichinde病毒区段可以是S区段。在其它实施方案中,第三Pichinde病毒区段可以是L区段。在更具体的实施方案中,第三Pichinde病毒区段可经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF或第三Pichinde病毒区段可为野生型Pichinde病毒基因组区段。在又一些更具体的实施方案中,第三Pichinde病毒区段缺乏编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的Pichinde病毒ORF。

[0265] 在某些实施方案中,三区段基因组区段可以是S或L区段杂合体(即可以是S区段和L区段的组合的基因组区段)。在其它实施方案中,杂合区段是包含L区段IGR的S区段。在另一个实施方案中,杂合区段是包含S区段IGR的L区段。在其它实施方案中,杂合区段是具有L区段IGR的S区段UTR。在另一个实施方案中,杂合区段是具有S区段IGR的L区段UTR。在具体的实施方案中,杂合区段是具有L区段IGR的S区段5' UTR或具有L区段IGR的S区段3' UTR。在其它具体实施方案中,杂合区段是具有S区段IGR的L区段5' UTR或具有S区段IGR的L区段3' UTR。

[0266] 包含其中一种或多种ORF缺失或功能失活的遗传修饰的基因组的三区段Pichinde病毒颗粒可在补给细胞(即表达已缺失或功能失活的Pichinde病毒ORF的细胞)中产生。所得Pichinde病毒颗粒的遗传物质可在宿主细胞感染时转移到宿主细胞中,其中遗传物质可表达和扩增。另外,本文所述的遗传修饰的Pichinde病毒颗粒的基因组可编码来自Pichinde病毒颗粒以外的生物的异源ORF。

[0267] 在某些实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在另一个实施方案中,可将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少1种ORF、至少2种ORF、至少3种ORF或至少4种ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在具体的实施方案中,将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的仅仅一种去除并用来自Pichinde病毒颗粒以外的生物的异源ORF替换。在更具体的实施方案中,将编码Pichinde病毒基因组区段的GP的ORF去除。在另一个具体的实施方案中,将编码Pichinde病毒基因组区段的NP的ORF去除。在更具体的实施方案中,将编码Pichinde病毒基因组区段的Z蛋白的ORF去除。在再一个具体实施方案中,将编码L蛋白的ORF去除。

[0268] 在某些实施方案中,本文提供包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中(i) ORF位于ORF野生型位置以外的位置;和(ii) 编码GP或NP的ORF被去除或功能失活,使得所得病毒复制缺陷型的且无感染性。在一个具体实施方案中,1种ORF被去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在另一个具体的实施方案中,2种ORF被去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在其它具体实施方案中,3种ORF被去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在具体的实施方案中,将编码GP的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在其它具体实施方案中,将编码NP的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在又一些更具体的实施方案中,编码NP的ORF和编码GP的ORF被去除并用来自Pichinde病毒颗粒以外的生物的一种或两种异源ORF置换。因此,在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒包含(i) 一个L区段和两个S区段; (ii) 在ORF野生型位置以外的位置处的ORF; (iii) 一种或多种来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF。

[0269] 在某些实施方案中,本文提供包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中(i) ORF位于ORF野生型位置以外的位置;和(ii) 编码Z蛋白和/或L蛋白的ORF被去除或功能失活,使得所得病毒是复制缺陷型的且无感染性。在一个具体实施方案中,1种ORF

被去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在另一个具体的实施方案中,2种ORF被去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在具体的实施方案中,将编码Z蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在其它具体实施方案中,将编码L蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。在又一些更具体的实施方案中,编码Z蛋白的ORF和将编码L蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒颗粒以外的生物的异源ORF替换。因此,在某些实施方案中,三区段Pichinde病毒颗粒包含(i)两个L区段和一个S区段;(ii)在ORF野生型位置以外的位置处的ORF;(iii)来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF。

[0270] 因此,在某些实施方案中,本文提供的三区段Pichinde病毒颗粒包含以下的三区段Pichinde病毒颗粒(即一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段):i)经改造在非天然位置携带ORF;ii)编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除;iii)被去除的ORF用一种或多种来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF置换。

[0271] 在某些实施方案中,异源ORF为8-100个核苷酸长度、15-100个核苷酸长度、25-100个核苷酸长度、50-200个核苷酸长度、50-400个核苷酸长度、200-500个核苷酸长度、或400-600个核苷酸长度、500-800个核苷酸长度。在其它实施方案中,异源ORF为750-900个核苷酸长度、800-100个核苷酸长度、850-1000个核苷酸长度、900-1200个核苷酸长度、1000-1200个核苷酸长度、1000-1500个核苷酸或10-1500个核苷酸长度、1500-2000个核苷酸长度、1700-2000个核苷酸长度、2000-2300个核苷酸长度、2200-2500个核苷酸长度、2500-3000个核苷酸长度、3000-3200个核苷酸长度、3000-3500个核苷酸长度、3200-3600个核苷酸长度、3300-3800个核苷酸长度、4000个核苷酸-4400个核苷酸长度、4200-4700个核苷酸长度、4800-5000个核苷酸长度、5000-5200个核苷酸长度、5200-5500个核苷酸长度、5500-5800个核苷酸长度、5800-6000个核苷酸长度、6000-6400个核苷酸长度、6200-6800个核苷酸长度、6600-7000个核苷酸长度、7000-7200个核苷酸长度、7200-7500个核苷酸长度或7500个核苷酸长度。在某些实施方案中,异源ORF编码为5-10个氨基酸长度、10-25个氨基酸长度、25-50个氨基酸长度、50-100个氨基酸长度、100-150个氨基酸长度、150-200个氨基酸长度、200-250个氨基酸长度、250-300个氨基酸长度、300-400个氨基酸长度、400-500个氨基酸长度、500-750个氨基酸长度、750-1000个氨基酸长度、1000-1250个氨基酸长度、1250-1500个氨基酸长度、1500-1750个氨基酸长度、1750-2000个氨基酸长度、2000-2500个氨基酸长度或超过2500个或更多个氨基酸长度的肽或多肽。在某些实施方案中,异源ORF编码不超过2500个氨基酸长度的多肽。在具体的实施方案中,异源ORF不含终止密码子。在某些实施方案中,异源ORF是密码子优化的。在某些实施方案中,核苷酸组成、核苷酸对组成或两者可被优化。这类优化的技术是本领域已知的,可用来使异源ORF优化。

[0272] 来自Pichinde病毒以外的生物的任何异源ORF可包括在三区段Pichinde病毒颗粒中。在一个实施方案中,异源ORF编码报道蛋白。报道蛋白的更多详细描述见第4.3节。在另一个实施方案中,异源ORF编码感染性病原体的抗原或与任何疾病有关的抗原和能够诱导免疫应答的抗原。在具体的实施方案中,抗原来源于感染性生物、肿瘤(即癌症)或变应原。有关异源ORF的更多详细描述见第4.3节

[0273] 在某些实施方案中,Pichinde病毒颗粒的生长和感染性不受来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF影响。

[0274] 可采用本领域技术人员已知技术产生包含经改造在野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF的Pichinde病毒基因组区段的Pichinde病毒颗粒。例如,反向遗传技术可用来产生这类Pichinde病毒颗粒。在其它实施方案中,复制缺陷型Pichinde病毒颗粒(即经改造在野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF的Pichinde病毒基因组区段,其中编码GP、NP、Z蛋白、L蛋白的ORF缺失)可在补给细胞中产生。

[0275] 在某些实施方案中,本申请涉及本文所述适于用作疫苗的Pichinde病毒颗粒和疫苗接种和例如感染和癌症的治疗或预防中使用这类Pichinde病毒颗粒的方法。第4.6节中提供使用本文所述Pichinde病毒颗粒的方法的更多详细描述。

[0276] 在某些实施方案中,本申请涉及本文所述适于用作药物组合物的Pichinde病毒颗粒和在疫苗接种和例如感染或癌症的治疗或预防中使用这类Pichinde病毒颗粒的方法。第4.6节中提供使用本文所述Pichinde病毒颗粒的方法的更多详细描述。

[0277] 4.3表达异源ORF的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒

[0278] 在某些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段和相应的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可包含异源ORF。在其它实施方案中,Pichinde病毒基因组区段和相应的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可包含目标基因。在更具体的实施方案中,异源ORF或目标基因编码抗原。在更具体的实施方案中,异源ORF或目标基因编码报道蛋白或荧光蛋白。

[0279] 在某些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可包含一个或多个异源ORF或一个或多个目标基因。在其它实施方案中,Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可包含至少一个异源ORF、至少2个异源ORF、至少3个异源ORF或更多个异源ORF。在其它实施方案中,Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒包含至少一个目标基因、至少2个目标基因、至少3个目标基因或更多个目标基因。

[0280] 各种抗原可通过本申请的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒表达。在一个实施方案中,异源ORF编码感染性病原体的抗原或与能够诱导免疫应答的任何疾病有关的抗原。在某些实施方案中,异源ORF可编码来源于病毒、细菌、真菌、寄生物的抗原,或可在肿瘤或肿瘤相关疾病(即癌症)、自身免疫疾病、退行性疾病、遗传性疾病、物质依赖性、肥胖症或过敏性疾病中表达。

[0281] 在一些实施方案中,异源ORF编码病毒抗原。病毒抗原的非限制性实例包括来自以下的抗原:腺病毒科(adenoviridae)(例如哺乳动物腺病毒属(mastadenovirus)和禽腺病毒属(aviadenovirus))、疱疹病毒科(herpesviridae)(例如单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、单纯疱疹病毒5、单纯疱疹病毒6、Epstein-Barr病毒、HHV6-HHV8和巨细胞病毒)、光滑噬菌体科(leviviridae)(例如光滑噬菌体属(levivirus)、肠细菌噬菌体MS2、allolevirus)、痘病毒科(poxviridae)(例如脊椎动物痘病毒亚科(chordopoxvirinae)、副痘病毒属(parapoxvirus)、禽痘病毒属(avipoxvirus)、山羊痘病毒属(capripoxvirus)、野兔痘病毒属(leporipoxvirus)、猪痘病毒属(suipoxvirus)、软疣痘病毒属(molluscipoxvirus)和昆虫痘病毒亚科(entomopoxvirinae))、乳多空病毒科(papovaviridae)(例如多瘤病毒属(polyomavirus)和乳头瘤病毒属(papillomavirus))、副粘病毒科(paramyxoviridae)(例如副粘病毒属(paramyxovirus)、副流感病毒1型、mobillivirus(例如麻疹病毒)、腮腺炎病

毒属(rubulavirus)(例如腮腺炎病毒)、肺病毒亚科(pneumonovirinae)(例如肺病毒属(pneumovirus)、人呼吸道合胞病毒)、人呼吸道合胞病毒和偏肺病毒(metapneumovirus)(例如禽肺病毒和人偏肺病毒)、微小RNA病毒科(picornaviridae)(例如肠道病毒属(enterovirus)、鼻病毒属(rhinovirus)、肝病毒属(hepatovirus)(例如人甲型肝炎病毒)、心病毒属(cardiovirus)和口蹄疫病毒(apthovirus))、呼肠孤病毒科(reoviridae)(例如正呼肠孤病毒属(orthoreovirus)、环状病毒属(orbivirus)、轮状病毒属(rotavirus)、质型多角体病毒属(cypovirus)、斐济病毒属(fijivirus)、植物呼肠孤病毒属(phytoreovirus)和水稻病毒属(oryzavirus))、反转录病毒科(retroviridae)(例如哺乳动物B型反转录病毒、哺乳动物C型反转录病毒、禽C型反转录病毒、D型反转录病毒群、BLV-HTLV反转录病毒、慢病毒属(lentivirus)(例如人免疫缺陷病毒(HIV)1和HIV-2(例如HIV gp160)、泡沫病毒属(spumavirus))、黄病毒科(flaviviridae)(例如丙型肝炎病毒、登革热病毒、西尼罗病毒)、肝DNA病毒科(hepadnaviridae)(例如乙型肝炎病毒)、披膜病毒科(togaviridae)(例如甲病毒属(alphavirus)(例如新培斯病毒)和风疹病毒属(rubivirus)(例如风疹病毒))、弹状病毒科(rhabdoviridae)(例如水泡性病毒属(vesiculovirus)、狂犬病毒属(lyssavirus)、暂时热病毒属(ephemerovirus)、质型弹状病毒属(cytorhabdovirus)和核型弹状病毒属(necleorhabdovirus))、沙粒病毒科(arenaviridae)(例如沙粒病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、Ipp病毒和拉沙病毒)和冠状病毒科(coronaviridae)(例如冠状病毒属(coronavirus)和凸隆病毒属(torovirus))。在一个具体实施方案中,病毒抗原为HIV gp120、gp41、HIV Nef、RSV F糖蛋白、RSV G糖蛋白、HTLV tax、单纯疱疹病毒糖蛋白(例如gB、gC、gD和gE)或乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎病毒E蛋白质或冠状病毒突起蛋白。在一个实施方案中,病毒抗原不是HIV抗原。

[0282] 在其它实施方案中,异源ORF编码细菌抗原(例如细菌外被蛋白)。在其它实施方案中,异源ORF编码寄生物抗原(例如原生动物抗原)。在其它另外的实施方案中,异源核苷酸序列编码真菌抗原。

[0283] 细菌抗原的非限制性实例包括来自以下细菌的抗原:水螺菌科(Aquaspirillum)、固氮螺菌科(Azospirillum)、固氮菌科(Azotobacteraceae)、拟杆菌科(Bacteroidaceae)、巴尔通氏体属(Bartonella)菌种、蛭弧菌科(Bdellovibrio)、弯曲杆菌属(Campylobacter)菌种、衣原体属(Chlamydia)菌种(例如肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae))、梭菌属(clostridium)、肠杆菌科(肠杆菌科)(例如柠檬酸杆菌(Citrobacter)菌种、爱德华氏菌属(Edwardsiella)、产气肠杆菌(Enterobacter aerogenes)、欧文氏菌属(Erwinia)菌种、大肠杆菌(Escherichia coli)、哈夫尼菌属(Hafnia)菌种、克雷伯氏菌属(Klebsiella)菌种、摩根氏菌属(Morganella)菌种、普通变形菌(Proteus vulgaris)、普罗威登斯菌属(Providencia)、沙门氏菌属(Salmonella)菌种、粘质沙雷菌(Serratia marcescens)和弗氏志贺氏菌(Shigella flexneri))、加德纳氏菌科(Gardinella)、流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)、盐杆菌科(Halobacteriaceae)、螺杆菌科(Helicobacter)、军团菌科(Legionellaceae)、李斯特氏菌属(Listeria)菌种、甲基球菌科(Methylococcaceae)、分枝杆菌(mycobacteria)(例如结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis))、奈瑟氏菌科(Neisseriaceae)、海洋螺杆菌科(Oceanospirillum)、巴斯德

氏菌科 (Pasteurellaceae)、肺炎球菌菌种 (Pneumococcus)、假单胞菌属 (Pseudomonas) 菌种、根瘤菌科 (Rhizobiaceae)、螺菌科 (Spirillum)、螺状菌科 (Spirosomaceae)、葡萄球菌属 (Staphylococcus) (例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 和酿脓葡萄球菌 (Staphylococcus pyrogenes))、链球菌属 (Streptococcus) (例如肠炎链球菌 (Streptococcus enteritidis)、Streptococcus fasciae 和肺炎链球菌 (肺炎链球菌))、Vampirovibr、螺杆菌科 (Helicobacter)、耶尔森氏菌科 (Yersinia family)、炭疽芽孢杆菌 (Bacillus anthracis) 和吸血弧菌科 (Vampirovibrio)。

[0284] 寄生物抗原的非限制性实例包括来自以下寄生物的抗原:例如阿米巴、疟疾寄生物、疟原虫属 (Plasmodium)、克氏锥虫 (Trypanosoma cruzi)。真菌抗原的非限制性实例包括来自以下真菌的抗原:犁头霉属 (Absidia) (例如伞枝犁头霉 (Absidia corymbifera) 和分枝犁头霉 (Absidia ramosa))、曲霉属菌种 (Aspergillus) (例如黄曲霉 (Aspergillus flavus)、烟曲霉 (Aspergillus fumigatus)、巢曲霉 (Aspergillus nidulans)、黑曲霉 (Aspergillus niger) 和土曲霉 (Aspergillus terreus))、林蛙粪霉 (Basidiobolus ranarum)、皮炎芽生菌 (Blastomyces dermatitidis)、念珠菌属 (Candida) 菌种 (例如白念珠菌 (Candida albicans)、光滑念珠菌 (Candida glabrata)、Candida kern、克鲁斯念珠菌 (Candida krusei)、近平滑念珠菌 (Candida parapsilosis)、假热带念珠菌 (Candida pseudotropicalis)、季也蒙念珠菌 (Candida quillermondii)、皱褶念珠菌 (Candida rugosa)、星形念珠菌 (Candida stellatoidea) 和热带念珠菌 (Candida tropicalis))、粗球孢子菌 (Candida kern)、耳霉属 (Conidiobolus) 菌种、新生隐球菌 (Cryptococcus neoforms)、小克银汉霉属 (Cunninghamella) 菌种、dermatophytes、荚膜组织胞浆菌 (Histoplasma capsulatum)、石膏状小孢子菌 (Microsporum gypseum)、微小毛霉 (Mucor pusillus)、巴西副球孢子菌 (Paracoccidioides brasiliensis)、Pseudallescheria boydii、希伯氏鼻孢子虫 (Rhinosporidium seeberi)、卡氏肺孢子虫 (Pneumocystis carinii)、根霉属 (Rhizopus) 菌种 (例如少根根霉 (Rhizopus arrhizus)、米根霉 (Rhizopus oryzae) 和小孢根霉 (Rhizopus microsporus))、酵母属 (Saccharomyces) 菌种、申克孢子丝菌 (Sporothrix schenckii)、接合菌 (zygomycetes) 和例如接合菌纲 (Zygomycetes)、子囊菌纲 (Ascomycetes)、担子菌纲 (Basidiomycetes)、半知菌纲 (Deuteromycetes) 和卵菌纲 (Oomycetes) 等纲。

[0285] 在某些实施方案中,异源ORF编码肿瘤抗原或肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,肿瘤抗原或肿瘤相关抗原包括来自包括以下肿瘤相关疾病的抗原:急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、肾上腺皮质癌、儿童肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、卡波西肉瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样瘤、基底细胞癌、胆管癌、肝外 (参见肝胆管型肝癌)、膀胱癌、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干神经胶质瘤、脑癌、脑瘤、大脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤脑瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层瘤、视通路和下丘脑神经胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、伯基特淋巴瘤、类癌瘤、胃肠类癌瘤、原发部位不明癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、大脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性支气管炎、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性骨髓增殖性疾病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、肺气肿、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、肿瘤尤因家族中的尤因肉瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺

外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼内黑素瘤、成视网膜细胞瘤、胆囊癌、胃(stomach/gastric)癌、胃肠类癌瘤、胃肠基质瘤、生殖细胞瘤:颅外、性腺外或卵巢妊娠滋养细胞肿瘤、脑干神经胶质瘤、神经胶质瘤、儿童脑星形细胞瘤、儿童视通路和下丘脑、胃类癌瘤、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、咽下部癌、下丘脑和视通路神经胶质瘤、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、急性成淋巴细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、口唇口腔癌、脂肉瘤、肝癌(原发性)、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、AIDS相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤、成神经管细胞瘤、眼内(眼)黑素瘤、默克尔细胞癌、成人恶性间皮瘤、间皮瘤、隐匿原发转移性鳞状颈癌、口癌、多发性内分泌瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞瘤、蕈样肉芽肿病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性髓细胞性白血病、成人急性髓细胞样白血病、儿童急性髓细胞样白血病、多发性骨髓瘤(骨髓癌)、慢性骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、少突神经胶质瘤、口癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮-基质瘤)、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤、成松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层瘤、垂体腺瘤、浆细胞瘤形成/多发性骨髓瘤、胸膜肺胚细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管移行细胞癌、成视网膜细胞瘤、儿童横纹肌肉瘤、涎腺癌、尤因肿瘤家族肉瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、塞扎里综合征、皮肤癌(非黑素瘤)、皮肤癌(黑素瘤)、默克尔细胞皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌一参见皮肤癌(非黑素瘤)、隐匿原发转移性鳞状颈癌、胃癌、幕上原发性外胚层肿瘤、T细胞淋巴瘤、皮肤一参见蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、儿童肾盂和输尿管移行细胞癌、未知原发部位妊娠滋养细胞肿瘤、成人未知原发部位癌、儿童输尿管和肾盂癌、移行细胞癌、尿道癌、子宫内膜子宫癌、子宫肉瘤、支气管肿瘤、中枢神经系统胚胎性肿瘤;儿童脊索瘤、结肠直肠癌、颅咽管瘤、室管膜母细胞瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增多病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病(成人/儿童)、小细胞肺癌、髓质口皮瘤、口腔癌、乳头状瘤病、中度分化的松果体实质肿瘤、垂体瘤、涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌、脊髓肿瘤、胸腺瘤、甲状腺癌、阴道癌;外阴癌和维尔姆斯瘤。

[0286] 肿瘤或肿瘤相关抗原的非限制性实例包括亲脂蛋白、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BING-4、CALCA、CD45、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKK1、ENAH(hMena)、EpCAM、EphA3、EZH2、FGF5、磷脂酰肌醇聚糖-3、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、ID01、IGF2B3、IL13Ralpha2、Intestinal carboxyl esterase、甲胎蛋白、激肽释放酶4、KIF20A、Lengsin、M-CSF、MCSP、mdm-2、Meloe、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、p53、PAX5、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、secernin 1、SOX10、STEAP1、存活蛋白、端粒酶、VEGF或WT1、EGF-R、CEA、CD52、gp 100蛋白、MELANA/MART1、NY-ESO-1、p53 MAGE1、MAGE3和CDK4、 α 辅肌动蛋白-4、ARTC1、BCR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-Raf、CASP-5、CASP-8、 β 联蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、CLPP、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移

酶AS融合蛋白、NFYC、OGT、OS-9、pml-RARalpha融合蛋白、PRDX5、PTPRK、K-ras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TGF-betaRII、磷酸丙糖异构酶、Lengsin、M-CSF、MCSP或mdm-2。

[0287] 在某些实施方案中,异源ORF编码呼吸道病原体抗原。在一个具体实施方案中,呼吸道病原体是病毒,例如RSV、冠状病毒、人偏肺病毒、副流感病毒、亨德拉病毒(hendra virus)、尼帕病毒、腺病毒、鼻病毒或PRRSV。呼吸道病毒抗原的非限制性实例包括呼吸道合胞病毒F、G和M2蛋白、冠状病毒(SARS、HuCoV)突起蛋白(S)、人偏肺病毒融合蛋白、副流感病毒融合蛋白和血凝素蛋白(F、HN)、亨德拉病毒(HeV)和尼帕病毒(NiV)吸附糖蛋白(G和F)、腺病毒衣壳蛋白、鼻病毒蛋白和PRRSV野生型或修饰的GP5和M蛋白。

[0288] 在一个具体实施方案中,呼吸道病原体是细菌,例如炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、结核杆菌、百日咳鲍特氏菌(*Bordetella pertussis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、肺炎衣原体、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。呼吸道细菌抗原的非限制性实例包括炭疽芽孢杆菌保护性抗原PA、结核杆菌分枝杆菌抗原85A和热激蛋白(Hsp65)、百日咳鲍特氏菌百日咳类毒素(PT)和丝状血凝素(FHA)、肺炎链球菌分选酶A和表面黏附素A(PsaA)、鼠疫耶尔森氏菌F1和V亚基和来自金黄色葡萄球菌、土拉热弗朗西丝氏菌、嗜肺军团菌、肺炎衣原体、铜绿假单胞菌、脑膜炎奈瑟氏球菌和流感嗜血菌的蛋白质。

[0289] 在某些实施方案中,异源ORF编码T细胞表位。在其它实施方案中,异源ORF编码细胞因子或生长因子。

[0290] 在其它实施方案中,异源ORF编码自身免疫疾病中表达的抗原。在更具体的实施方案中,自身免疫疾病可以是I型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、红斑狼疮和银屑病。自身免疫疾病抗原的非限制性实例包括Ro60、dsDNA或RNP。

[0291] 在其它实施方案中,ORF编码过敏性疾病中表达的抗原。在更具体的实施方案中,过敏性疾病可包括但不限于季节性和常年性鼻结膜炎、哮喘和湿疹。过敏反应抗原的非限制性实例包括Bet v 1和Fel d 1。

[0292] 在其它实施方案中,Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒另包含报道蛋白。报道蛋白能够与本文所述抗原同时表达。理想的是,表达在普通光源或其它光波长下是可见的。在某些实施方案中,报道蛋白产生的作用强度可用来直接测量和监测Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。

[0293] 报道基因易被本领域技术人员识别。在某些实施方案中,Pichinde病毒颗粒是荧光蛋白。在其它实施方案中,报道基因是GFP。当暴露于UV或蓝光时,GFP发出明亮的绿色光。

[0294] 报道蛋白的非限制性实例包括各种酶,例如但不限于 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、新霉素磷酸转移酶、萤光素酶或RFP。

[0295] 在某些实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒具有用作疫苗接种的载体的所需性质(参见例如第4.6节)。在另一个实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段

Pichinde病毒颗粒能够在宿主(例如小鼠、兔、山羊、驴、人)中诱导免疫应答。在其它实施方案中,表达本文所述异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导先天性免疫应答。在其它实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导适应性免疫反应。在更具体的实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导先天性和适应性免疫反应两者。

[0296] 在另一个实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导T细胞应答。在又一些更具体的实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导CD8+T细胞应答。在其它实施方案中,携带外源目标基因的Pichinde病毒颗粒诱导高频率和功能性的潜在的CD8+T细胞应答。在其它实施方案中,来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导对相应的外源目标基因的一个或多个表位有特异性的CD8+T细胞。

[0297] 在某些实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可诱导1型T辅助细胞分化、CD4+T细胞的记忆形成和/或诱导持久的抗体应答。这些抗体对肿瘤细胞可能是中和性的、调理性的、有毒的或可具有其它有利的生物学性质。在其它实施方案中,表达异源ORF的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒对树突细胞具有强向性并在感染时激活它们。这可增强抗原呈递细胞对抗原的呈递。

[0298] 在某些实施方案中,来源于感染性生物、癌症或变应原的抗原的Pichinde病毒基因组区段、Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导针对Pichinde病毒的低或不可检出的中和抗体滴度和对各自外源转基因的高保护性中和抗体。在某些实施方案中,表达来源于感染性生物、癌症或变应原的抗原的形成颗粒的Pichinde病毒构件或三区段Pichinde病毒颗粒对于诱导对Pichinde病毒构件组分的免疫具有低性能。

[0299] 4.4Pichinde病毒颗粒和三区段Pichinde病毒颗粒的产生

[0300] 一般而言,Pichinde病毒颗粒可通过针对另一种沙粒病毒LCMV所述标准反求遗传技术重组产生(参见Flatz et al.,2006,Proc Natl Acad Sci USA 103:4663-4668; Sanchez et al.,2006,Virology 350:370;Ortiz-Riano et al.,2013,J Gen Virol.94:1175-88,其通过引用并入本文)。为了产生本文提供的Pichinde病毒颗粒,可如下所述应用这些技术。病毒的基因组可分别按第4.1节和第4.2节所述修饰。

[0301] 4.4.1非天然位置可读框

[0302] 包含经修饰在ORF野生型位置以外的位置携带病毒ORF的基因组区段的Pichinde病毒颗粒可通过本领域技术人员已知的任何反求遗传技术产生。

[0303] (i)感染性和可复制型Pichinde病毒颗粒

[0304] 在某些实施方案中,产生Pichinde病毒颗粒的方法包括(i)使第一Pichinde病毒基因组区段的cDNA转染至宿主细胞;(ii)使第二Pichinde病毒基因组区段的cDNA转染至宿主细胞;(iii)将表达Pichinde病毒的反式作用因子NP和L的质粒转染至宿主细胞;(iv)将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和(v)收获Pichinde病毒颗粒。在某些更具体的实施方案中,cDNA包含在质粒中。

[0305] 一旦自cDNA产生,便可使Pichinde病毒颗粒(即感染性和可复制型)增殖。在某些实施方案中,可使Pichinde病毒颗粒在容许病毒生长至允许使用本文所述病毒的滴度的任何宿主细胞中增殖。在一个实施方案中,宿主细胞容许Pichinde病毒颗粒生长至与针对相应的野生型测定的滴度相当的滴度。

[0306] 在某些实施方案中,可使Pichinde病毒颗粒在宿主细胞中增殖。可以使用的宿主细胞的具体实例包括BHK-21、HEK 293、VERO等。在一个具体实施方案中,可使Pichinde病毒颗粒在细胞系中增殖。

[0307] 在某些实施方案中,使宿主细胞保持培养并用一种或多种质粒感染。质粒表达将在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如包含聚合酶I启动子和终止子)控制下产生的Pichinde病毒基因组区段。

[0308] 可用于产生Pichinde病毒颗粒的质粒可包括:i) 编码S基因组区段的质粒,例如pol-I S, ii) 编码L基因组区段的质粒,例如pol-I L。在某些实施方案中,可将编码指导病毒L和S区段的胞内合成的Pichinde病毒聚合酶的质粒掺入转染混合物中。例如,可以存在编码L蛋白的质粒和/或编码NP的质粒(分别为pC-L和pC-NP)。L蛋白和NP是病毒RNA转录和复制必需的反式作用因子。或者,病毒L和S区段连同NP和L蛋白的胞内合成可使用具有从相对侧分别向两个独立质粒的L和S区段cDNA读取的pol-I和pol-II启动的表达盒进行。

[0309] 在某些实施方案中,Pichinde病毒基因组区段在启动子的控制下。通常,可以使用RNA聚合酶I驱动表达盒、RNA聚合酶II驱动盒或T7噬菌体RNA聚合酶驱动盒。在某些实施方案中,编码Pichinde病毒基因组区段的质粒可以相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的启动子转录。启动子的具体实例包括RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子、SP6启动子或T3启动子。

[0310] 另外,质粒的特征可为哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌呤霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌(E.coli)中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0311] 宿主细胞用质粒的转染可采用常用策略的任一种进行,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌呤霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达克隆。

[0312] 对于回收本文所述Pichinde病毒颗粒,预期下列方法。第1天:将通常在M6孔板中80%汇合的细胞用上述质粒的混合物转染。为此,可采用任何常用的策略,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0313] 3-5天后:收获培养上清液(Pichinde病毒载体制备物),等分,并根据Pichinde病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。通过免疫聚焦测定法,评价Pichinde病毒载体制备物的感染滴度。或者,在转染后第3-5天,可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中,在传代后至多5天收获培养上清液。

[0314] 本申请此外涉及异源ORF的表达,其中编码基因组区段的质粒被修饰成掺入的异源ORF。可使用限制性内切酶将异源ORF掺入质粒中。

[0315] (ii) 感染性复制缺陷型Pichinde病毒颗粒

[0316] 可如上所述拯救感染性复制缺陷型Pichinde病毒颗粒。然而,一旦自cDNA产生,便可使本文提供的感染性复制缺陷型Pichinde病毒在补给细胞中增殖。补给细胞是提供其基因组通过修饰已从复制缺陷型Pichinde病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白缺失或功能失活,则补给细胞便提供GP蛋白)。

[0317] 由于Pichinde病毒载体中一种或多种ORF去除或功能失活(此处糖蛋白GP的缺失可作为实例),Pichinde病毒载体可在外在(in trans)提供缺失病毒基因(例如本例中的GP)的细胞中产生并增殖。这类补给细胞系,此后称为C细胞,通过用表达目标病毒基因的一种或多种质粒(补给质粒(complementation plasmid),称为C质粒)转染细胞系(例如BHK-21、HEK 293、VERO等)来产生。C质粒表达在适于在哺乳动物细胞中表达的一种或多种表达盒(例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如具有多腺苷酸化信号的EF1 α 启动子)的控制下产生的Pichinde病毒载体中缺失的病毒基因。另外,补给质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌呤霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0318] 将可使用的细胞(例如BHK-21、HEK 293、MC57G等)保持培养,并采用任一种策略(例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔),用补给质粒转染。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌呤霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达的C细胞克隆。作为稳定转染的C细胞使用的备选方法,正常细胞的瞬时转染可补充下面将使用C细胞的各步骤中遗失的病毒基因。另外,可使用辅助病毒外在提供遗失的功能性。

[0319] 质粒可具有两种类型:i)二质粒,称为TF-质粒,用于在C细胞中胞内表达Pichinde病毒的最小反式作用因子,来源于例如本实例中的Pichinde病毒的NP和L蛋白;和ii)质粒,称为GS-质粒,用于在C细胞中胞内表达Pichinde病毒载体基因组区段,例如含规定修饰的区段。TF-质粒在适于在哺乳动物细胞中进行蛋白质表达的表达盒的控制下表达各个Pichinde病毒载体的NP和L蛋白,所述表达盒通常例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如CMV或EF1 α 启动子,其任一个优先与多腺苷酸化信号组合。GS-质粒表达载体的小(S)和大(L)基因组区段。通常,可使用聚合酶I驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶(T7-)驱动表达盒,后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在使用基于T7的系统的情况下,C细胞中T7的表达必须如下提供:通过在回收过程中包括类似于TF-质粒构建的额外表达质粒,提供T7,或构建以稳定方式额外表达T7的C细胞。在某些实施方案中,TF和GS质粒可相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polIII启动子转录。

[0320] 为了回收Pichinde病毒载体,可采用下列程序。第1天:将通常在M6孔板中80%汇合的C细胞用两种TF-质粒加两种GS-质粒的混合物转染。在某些实施方案中,TF和GS质粒可相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polIII启动子转录。为此,可采用任一种常用策略,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0321] 3-5天后:收获培养上清液(Pichinde病毒载体制备物),等分,并根据Pichinde病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。然后通过对C细胞的免疫聚焦测

定法,评价Pichinde病毒载体制备对在C细胞的感染滴度。或者,在转染后第3-5天,可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中,在传代后至多5天收获培养上清液。

[0322] 本发明此外涉及细胞培养物中抗原的表达,其中细胞培养物用表达抗原的感染性复制缺陷型Pichinde病毒感染。当抗原在培养的细胞中表达时,可采用下列两种方法:

[0323] i) 将本文所述Pichinde病毒载体制备物以1或更大(例如2、3或4)的感染复数(MOI)感染目标细胞类型,导致在感染后来不久在全部细胞中产生抗原。

[0324] ii) 或者,可使用更低的MOI,并且可针对其病毒驱动的抗原表达水平,选择个体细胞克隆。随后个体克隆可因Pichinde病毒载体的非细胞溶解性质而无限扩增。不论方法,随后可从培养上清液或从细胞本身收集(并纯化)抗原,这取决于所产生的抗原的性质。然而,本发明不限于这两种策略,可考虑使用感染性复制缺陷型Pichinde病毒作为载体驱动抗原表达的其它方式。

[0325] 4.4.2三区段Pichinde病毒颗粒的产生

[0326] 可通过本领域已知反向遗传技术,例如如Emonet et al.,2008,PNAS,106(9):3473-3478;Popkin et al.,2011,J.Virol.,85(15):7928-7932;Dhanwani et al.,2015,Journal of Virology,doi:10.1128/JVI.02705-15所述,其通过引用并入本文,重组产生三区段Pichinde病毒颗粒。本文提供的三区段Pichinde病毒颗粒的产生可按第4.2节中所述修饰。

[0327] (i) 感染性和可复制型三区段Pichinde病毒颗粒

[0328] 在某些实施方案中,产生三区段Pichinde病毒颗粒的方法包括(i) 将一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段的cDNA转染至宿主细胞;(ii) 将表达Pichinde病毒的反式作用因子NP和L的质粒转染至宿主细胞;(iii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和(iv) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0329] 一旦自cDNA产生,便可使三区段Pichinde病毒颗粒(即感染性和可复制型)增殖。在某些实施方案中可使三区段Pichinde病毒颗粒在容许病毒生长至允许本文所述病毒使用的滴度的任何宿主细胞中增殖。在一个实施方案中,宿主细胞容许Pichinde病毒颗粒生长至与针对相应的野生型测定的滴度相当的滴度。

[0330] 在某些实施方案中,可使三区段Pichinde病毒颗粒在宿主细胞中增殖。可以使用的宿主细胞的具体实例包括BHK-21、HEK 293等。在一个具体实施方案中,可使三区段Pichinde病毒颗粒在细胞系中增殖。

[0331] 在某些实施方案中,使用宿主细胞保持培养并用一种或多种质粒感染。质粒表达将在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如包含聚合酶I启动子和终止子)控制下产生的Pichinde病毒基因组区段。

[0332] 在具体的实施方案中,使宿主细胞保持培养并用一种或多种质粒感染。质粒表达将在适于在哺乳动物细胞中表达的一个或多个表达盒(例如包含聚合酶I启动子和终止子)控制下产生的病毒基因。

[0333] 可用于产生包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒的质粒可包括:i) 各自编码S基因组区段的二质粒,例如pol-I-PIC-S,ii) 编码L基因组区段的质粒,例如pol-I-PIC-L。包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒所需的质粒为:i) 各自编码L

基因组区段的二质粒,例如pol-I-PIC-L,ii) 编码S基因组区段的质粒,例如pol-I-PIC-S。

[0334] 在某些实施方案中,可将编码指导病毒L和S区段的胞内合成的Pichinde病毒聚合酶的质粒掺入转染混合物中。例如,编码L蛋白的质粒和编码NP的质粒(分别为pC-PIC-L和pC-PIC-NP)。L蛋白和NP是病毒RNA转录和复制必需的反式作用因子。或者,病毒L和S区段连同NP和L蛋白的胞内合成可使用具有从相对侧分别向两个独立质粒的L和S区段cDNA读取的pol-I和pol-II启动的表达盒进行。

[0335] 另外,质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如,适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌呤霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0336] BHK-21细胞用质粒转染可采用常用策略的任一种进行,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌呤霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达克隆。

[0337] 通常,可以使用RNA聚合酶I驱动表达盒,RNA聚合酶II驱动盒或T7噬菌体RNA聚合酶驱动盒,后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在某些实施方案中,编码Pichinde病毒基因组区段的质粒可以相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polIII启动子转录。

[0338] 对于回收Pichinde病毒三区段Pichinde病毒载体,预期下列方法。第1天:将通常在M6孔板中80%汇合的细胞用上述质粒的混合物转染。为此,可采用任何常用策略,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0339] 3-5天后:收获培养上清液(Pichinde病毒载体制备物),等分,并根据Pichinde病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。通过免疫聚焦测定法,评价Pichinde病毒载体制备物的感染滴度。或者,在转染后第3-5天,可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中,在传代后至多5天收获培养上清液。

[0340] 本申请此外涉及异源ORF的表达和/或目标基因,其中编码基因组区段的质粒被修饰成掺入的异源ORF和/或目标基因。异源ORF和/或目标基因可使用限制性内切酶掺入到质粒中。

[0341] (ii) 感染性复制缺陷型三区段Pichinde病毒颗粒

[0342] 可如上所述拯救感染性复制缺陷型三区段Pichinde病毒颗粒。然而,一旦自cDNA产生,便可使本文提供的感染性复制缺陷型Pichinde病毒在补给细胞中增殖。补给细胞是提供其基因组通过修饰已从复制缺陷型Pichinde病毒中消除的功能的细胞(例如如果编码GP的ORF蛋白质缺失或功能失活,则补给细胞便提供GP蛋白GP蛋白)。

[0343] 由于Pichinde病毒载体中一种或多种ORF去除或功能失活(此处糖蛋白GP的缺失可作为实例),Pichinde病毒载体可在外在提供缺失病毒基因(例如本例中的GP)的细胞中产生并增殖。这类补给细胞系,此后称为C细胞,通过用表达目标病毒基因的一种或多种质粒(补给质粒,称为C质粒)转染哺乳动物细胞系例如BHK-21、HEK 293、VERO等(此处BHK-21可作为实例)来产生。C质粒表达在适于在哺乳动物细胞中表达的一种或多种表达盒(例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如具有多腺苷酸化信号的CMV或EF1 α 启动子)控制下产生的

Pichinde病毒载体中缺失的病毒基因。另外,补给质粒的特征在于哺乳动物选择标记,例如适于在哺乳动物细胞中的基因表达的表达盒(例如上述聚合酶II表达盒)控制下的嘌呤霉素抗性,或病毒基因转录物后面是内部核糖体进入位点(例如脑心肌炎病毒之一),接着是哺乳动物抗性标记。对于在大肠杆菌中生产,质粒的特征还在于细菌选择标记,例如氨苄西林抗性表达盒。

[0344] 将可使用的细胞(例如BHK-21、HEK 293、MC57G等)保持培养,并采用任一种策略(例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔),用补给质粒转染。几天后,以滴定的浓度加入合适的选择剂,例如嘌呤霉素。按照标准规程分离存活的克隆并亚克隆,采用蛋白质印迹或流式细胞术规程,用针对目标病毒蛋白质的抗体鉴定高表达的C细胞克隆。作为稳定转染的C细胞使用的备选方法,正常细胞的瞬时转染可补充下面将使用C细胞的各步骤中遗失的病毒基因。另外,可使用辅助病毒外在提供遗失的功能性。

[0345] 可以使用两种类型的质粒:i) 二质粒,称为TF-质粒,用于在C细胞中胞内表达Pichinde病毒的最小反式作用因子,来源于例如本实例中的Pichinde病毒的NP和L蛋白;和ii) 质粒,称为GS-质粒,用于在C细胞中胞内表达Pichinde病毒载体基因组区段,例如含规定修饰的区段。TF-质粒在适于在哺乳动物细胞中进行蛋白质表达的表达盒的控制下表达各个Pichinde病毒载体的NP和L蛋白,所述表达盒通常例如哺乳动物聚合酶II启动子,例如CMV或EF1 α 启动子,其任一个优先与多腺苷酸化信号组合。GS-质粒表达载体的小(S)和大(L)基因组区段。通常,可使用聚合酶I驱动的表达盒或T7噬菌体RNA聚合酶(T7-)驱动表达盒,后者优先与3'端核酶一起用于加工初级转录物以产生正确的末端。在使用基于T7的系统的情况下,C细胞中T7的表达必须如下提供:通过在回收过程中包括类似于TF-质粒构建的额外表达质粒,提供T7,或构建以稳定方式额外表达T7的C细胞。在某些实施方案中,TF和GS质粒可以相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polIII启动子转录。

[0346] 为了回收Pichinde病毒载体,可采用下列程序。第1天:将通常在M6孔板中80%汇合的C细胞用两种TF-质粒加两种GS-质粒的混合物转染。在某些实施方案中,TF和GS质粒可以相同,即基因组序列和反式作用因子可通过来自一个质粒的T7、polI和polIII启动子转录。为此,可采用任一种常用策略,例如磷酸钙、基于脂质体的方案或电穿孔。

[0347] 3-5天后:收获培养上清液(Pichinde病毒载体制备物),等分,并根据Pichinde病毒载体在用前将保存多久而保存在4℃、-20℃或-80℃下。然后通过免疫聚焦测定法,评价Pichinde病毒载体制备对在C细胞的感染滴度。或者,在转染后第3-5天,可将转染细胞和上清液传代至较大的容器(例如T75组织培养瓶)中,在传代后至多5天收获培养上清液。

[0348] 本发明此外涉及细胞培养物中抗原的表达,其中细胞培养物用表达抗原的感染性复制缺陷型三区段Pichinde病毒感染。当用于在培养的细胞中表达CMV抗原时,可采用下列两种方法。

[0349] i) 将本文所述Pichinde病毒载体制备物以1或更大(例如2、3或4)的感染复数(MOI)感染目标细胞类型,导致在感染后来不久在全部细胞中产生抗原。

[0350] ii) 或者,可使用更低的MOI,并且可针对其病毒驱动的抗原表达水平,选择各细胞克隆。随后各克隆可因Pichinde病毒载体的非细胞溶解性质而无限扩增。不论方法,随后可从培养上清液或从细胞本身收集(并纯化)抗原,这取决于所产生的抗原的性质。然而,本发

明不限于这两种策略,可考虑使用感染性复制缺陷型Pichinde病毒作为载体驱动CMV抗原表达的其它方式。

[0351] 4.5核酸、载体系统和细胞系

[0352] 在某些实施方案中,本文提供包含如分别第4.1节和第4.2节所述Pichinde病毒基因组区段或三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA或由其组成。

[0353] 4.5.1非天然位置可读框

[0354] 在一个实施方案中,本文提供编码如第4.1节所述Pichinde病毒基因组区段的核酸。在更具体的实施方案中,本文提供表1所列的DNA核苷酸序列或一组DNA核苷酸序列。第4.1节还提供包含这类核酸的宿主细胞。

[0355] 在具体的实施方案中,本文提供经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA,其中编码异源ORF的Pichinde病毒基因组区段如第4.1节所述的。

[0356] 在一个实施方案中,本文提供编码经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的DNA表达载体系统。准确地讲,本文提供DNA表达载体系统,其中一种或多种载体编码两种Pichinde病毒基因组区段,即本文所述Pichinde病毒颗粒的L区段和S区段。这类载体系统可以编码(一个或多个单独的DNA分子)。

[0357] 在另一个实施方案中,本文提供是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中的经改造在野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒S区段的cDNA。在其它实施方案中,经改造在野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒S区段的cDNA是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中。在某些实施方案中,是经改造以携带以下的Pichinde病毒基因组区段的cDNA: (i) 在ORF野生型位置以外的位置处的ORF;和(ii) 编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除,并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0358] 在某些实施方案中,本文提供的cDNA可来源于Pichinde病毒的特定毒株。Pichinde病毒的毒株包括Munchique CoAn4763分离株P18及其衍生物、P2及其衍生物或来源于Trapido和同事描述的几个分离株的任一个(Trapido et al,1971,Am J Trop Med Hyg,20:631-641)。在具体的实施方案中,cDNA来源于Pichinde病毒Munchique CoAn4763分离株P18毒株。

[0359] 在某些实施方案中,所产生的编码本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的载体可基于Pichinde病毒的特定毒株。Pichinde病毒的毒株包括Munchique CoAn4763分离株P18及其衍生物、P2及其衍生物或来源于Trapido和同事描述的几个分离株的任一个(Trapido et al,1971,Am J Trop Med Hyg,20:631-641)。在某些实施方案中,本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可基于Pichinde病毒Munchique CoAn4763分离株P18毒株。Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18的S区段的序列以SEQ ID NO:1列出。在某些实施方案中,Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18的S区段的序列是SEQ ID NO:1所列序列。Pichinde病毒的L区段的序列以SEQ ID NO:2列出。

[0360] 在另一个实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含本节上述的cDNA或载体系统。本文还提供来源于这类细胞的细胞系、包含这类细胞的培养物、培养被感染的这类细胞的方法。在某些实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含经改造在ORF野生型位置以外的位

置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段的cDNA。在某些实施方案中,细胞包含S区段和/或L区段。

[0361] 4.5.2三区段Pichinde病毒颗粒

[0362] 在一个实施方案中,本文提供编码第4.2节所述的三区段Pichinde病毒颗粒的核酸。在更具体的实施方案中,本文提供例如列于表2或表3的DNA核苷酸序列或一组DNA核苷酸序列。第4.2节还提供包含这类核酸的宿主细胞。

[0363] 在具体的实施方案中,本文提供由经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA组成的cDNA。在其它实施方案中,是经改造的以下三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA: (i) 在ORF野生型位置以外的位置携带Pichinde病毒ORF;和(ii) 其中三区段Pichinde病毒颗粒编码第4.2节所述的异源ORF。

[0364] 在一个实施方案中,本文提供共同编码本文所述三区段Pichinde病毒颗粒的DNA表达载体系统。准确地讲,本文提供DNA表达载体系统,其中一个或多个载体编码3个Pichinde病毒基因组区段,即本文所述三区段Pichinde病毒颗粒的一个L区段和两个S区段或两个L区段和一个S区段。这类载体系统可以编码(一个或多个单独的DNA分子)。

[0365] 在另一个实施方案中,本文提供经改造在野生型位置以外的位置携带ORF,且是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中的Pichinde病毒S区段的cDNA。在其它实施方案中,经改造在野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒L区段的cDNA是DNA表达系统的部分或掺入DNA表达系统中。在某些实施方案中,是经改造携带以下的三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA: (i) 在ORF野生型位置以外的位置处的ORF;和(ii) 编码GP、NP、Z蛋白或L蛋白的ORF被去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0366] 在某些实施方案中,本文提供的cDNA可来源于Pichinde病毒的特定毒株。Pichinde病毒的毒株包括Munchique CoAn4763分离株P18及其衍生物、P2及其衍生物或来源于Trapido和同事描述的几个分离株的任一个(Trapido et al,1971,Am J Trop Med Hyg,20:631-641)。在具体的实施方案中,cDNA来源于Pichinde病毒Munchique CoAn4763分离株P18毒株。

[0367] 在某些实施方案中,所产生的编码本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的载体可基于Pichinde病毒的特定毒株。Pichinde病毒的毒株包括Munchique CoAn4763分离株P18及其衍生物、P2及其衍生物或来源于Trapido和同事描述的几个分离株的任一个(Trapido et al,1971,Am J Trop Med Hyg,20:631-641)。在某些实施方案中,本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒可基于Pichinde病毒Munchique CoAn4763分离株P18毒株。Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18的S区段的序列以SEQ ID NO:1列出。在某些实施方案中,Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18的S区段的序列是SEQ ID NO:1所列序列。Pichinde病毒的L区段的序列以SEQ ID NO:2列出。

[0368] 在另一个实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含本节上述的cDNA或载体系统。本文还提供来源于这类细胞的细胞系、包含这类细胞的培养物、培养被感染的这类细胞的方法。在某些实施方案中,本文提供细胞,其中细胞包含三区段Pichinde病毒颗粒的cDNA。在某些实施方案中,细胞包含S区段和/或L区段。

[0369] 4.6使用方法

[0370] 疫苗已成功用于预防和/或治疗感染性疾病,例如用于脊髓灰质炎病毒和麻疹的疫苗。然而,在已确定的慢性病(包括慢性感染和癌症两者)的背景下治疗性免疫不太成功。产生Pichinde病毒颗粒和/或三区段Pichinde病毒颗粒的能力代表了崭新的疫苗策略。

[0371] 在一个实施方案中,本文提供治疗受试者的感染和/或癌症的方法,所述方法包括给予对象一种或多种类型的本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物。在一个具体实施方案中,治疗本文所述感染和/或癌症的方法包括给予有需要的对象有效量的一种或多种本文所述的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物。对象可以是哺乳动物,例如但不限于人类、小鼠、大鼠、豚鼠、驯养动物,例如但不限于牛、马、绵羊、猪、山羊、猫、狗、仓鼠、驴。在一个具体实施方案中,对象是人。人对象可以是男性、女性、成人、儿童、年长者(65岁以上)和患有多种疾病的人(即多病受试者)。在某些实施方案中,对象是他们的疾病在用化学疗法、放射疗法、手术和/或生物制剂治疗后有发展的人。

[0372] 在另一个实施方案中,本文提供诱导针对来源于对象的感染性生物、肿瘤或过敏原的抗原的免疫应答的方法,所述方法包括给予对象表达来源于感染性生物、肿瘤或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物。

[0373] 在另一个实施方案中,向其给予表达来源于本文所述感染性生物、肿瘤或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物的对象患有、易患感染、癌症或过敏反应或有感染、发生癌症或过敏反应的风险,或显示癌前组织病变。在另一个具体的实施方案中,向其给予表达来源于本文所述感染性生物、肿瘤或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物的对象患有、易患、有其风险或诊断为感染、癌症、癌前组织病变或过敏反应。

[0374] 在另一个实施方案中,向其给予表达来源于本文所述感染性生物、肿瘤或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物的对象患有、易患以下疾病或有其风险:感染、癌症、癌前病变、或肺部系统、中枢神经系统、淋巴系统、胃肠系统或循环系统的过敏反应亦在其中。在一个具体实施方案中,向其给予表达来源于本文所述感染性生物、肿瘤或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物的对象患有、易患以下疾病或有其风险:一个或多个机体器官的感染、癌症或过敏反应,包括但不限于脑、肝、肺、眼、耳、肠、食管、子宫、鼻咽或唾液腺。

[0375] 在另一个实施方案中,向其给予表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物的对象患有包括但不限于以下的症状:发热、盗汗、疲劳、不适、不安、喉咙痛、腺体肿大、关节痛、肌肉痛、食欲不振、体重减轻、腹泻、胃肠溃疡、胃肠出血、呼吸急促、肺炎、口腔溃疡、视力问题、肝炎、黄疸、脑炎、癫痫发作、昏迷、瘙痒、红斑、色素沉着、淋巴结改变或听力损失。

[0376] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予患有、易患感染、癌症或过敏反应或有其风险的任何年龄组的对象。在一个具体实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予的免疫系统受损对象、妊娠对象、进行器官或骨髓移植的对象、服用免疫抑制药的对象、进行血液透析的对象、患有癌症的对象或患有、易患感染、癌症或过敏反应或有其风险

的对象。在一个更具体的实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予对象,对象是患有、易患感染、癌症或过敏反应或有其风险,年龄为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17岁的儿童。在再一个具体实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或变应原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予对象,对象是患有、易患感染、癌症或过敏反应或有其风险的婴儿。在再一个具体实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予对象,对象是患有、易患感染、癌症或变态反应或有其风险,年龄为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周的婴儿。在再一个具体实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予对象,对象是患有、易患感染、癌症或过敏反应或有其风险。在一个更具体的实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予对象,其是年龄为65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90岁的年长对象。

[0377] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予弥散性感染、癌症或过敏反应风险提高的受试者。在一个具体实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予处于新生儿期具有新生儿免疫系统故具有不成熟免疫系统的对象。

[0378] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予患有潜伏性感染、癌症或过敏反应的对象。在一个具体实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒或其组合物给予患有可在免疫系统受损时可再激活的潜伏感染、潜伏癌症或潜伏过敏反应的对象。因此,本文提供防止感染、癌症或过敏反应再激活的方法。

[0379] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予患有复发性感染、癌症或过敏反应的受试者。

[0380] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或变应原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予有感染、癌症或过敏反应遗传倾向性的受试者。在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予受试者。在另一个实施方案中,将表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒给予有风险因子的对象。示例性风险因子包括衰老、烟草、日光暴露、辐射暴露、化学品暴露、家族史、酒精、不良饮食、缺乏身体活动或体重超重。

[0381] 在另一个实施方案中,给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒降低症状性感染、癌症或过敏反应。在另一个实施方案中,给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或

三区段Pichinde病毒颗粒减轻症状性感染、癌症或过敏反应。

[0382] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予被以下病毒的一个或多个毒株感染的对象或动物:流感病毒、传染性法氏囊疾病病毒(infectious bursal disease virus)、轮状病毒、感染性支气管炎病毒、感染性喉气管炎病毒、鸡贫血病毒、马立克氏病病毒、禽类白血病病毒、禽类腺病毒或禽类肺病毒、引发SARS的病毒、人呼吸道合胞病毒、人免疫缺陷的病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、亨德拉病毒、尼帕病毒、人副流感3病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、西尼罗病病毒、日本脑炎病毒、登革热病毒、汉坦病毒、裂谷热病毒、拉沙热病毒、单纯疱疹病毒和黄热病毒。

[0383] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述癌症的抗原Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物将给予患有的一种或多种类型的癌症的对象。在其它实施方案中,可以靶向对用本文所述疫苗治疗敏感的任何癌症类型。在一个更具体的实施方案中,将表达来源于本文所述癌症的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予患有例如以下癌症的对象:黑素瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、成神经细胞瘤、肝细胞癌、宫颈癌和胃癌、伯基特淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤;鼻咽癌(鼻咽上部的癌症)、白血病、黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤。

[0384] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予患有的一种或多种过敏反应的对象。在一个更具体的实施方案中,将表达来源于本文所述过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予患有例如以下过敏反应的对象:季节性过敏反应、学年性过敏反应、鼻结膜炎、哮喘、湿疹、食物过敏反应。

[0385] 在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予赋予针对感染、癌症或过敏原的细胞介导免疫(CMI)的对象。虽不受理论束缚,但在另一个实施方案中,表达来源于本文所述感染性生物、癌症、过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物在宿主的抗原呈递细胞(APC)(例如巨噬细胞、树突细胞或B细胞)中感染并表达目标抗原用于在主要组织相容性复合体(MHC)I和II类上的抗原直接呈递。在另一个实施方案中,将表达来源于本文所述感染性生物、癌症、过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予对象诱导多功能细胞溶解性以及共同产生大量CMV特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞应答的IFN- γ 和TNF- α 以治疗或预防感染、癌症或过敏反应。

[0386] 在另一个实施方案中,与在所述治疗不存在时发生感染、癌症或过敏反应的风险相比,给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物降低个体将发生感染、癌症、过敏反应的风险达至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更高。

[0387] 在另一个实施方案中,与在所述治疗不存在时感染、癌症、过敏反应的症状的表现相比,给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物降低感染、癌症或变态反应的症状达至少约10%、至少约

20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更高。

[0388] 在某些实施方案中,优选以多次注射(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、40、45或50次注射)或通过连续输注(例如使用泵)在多个部位(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12或14个部位)给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,以一次或多次单独注射在6个月时期、12个月时期、24个月时期或48个月时期内给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。在某些实施方案中,在所选日期以第1剂、在第1剂之后至少2个月以第2剂和在第1剂之后6个月以第3剂给予表达来源于感染性生物、癌症或变应原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。

[0389] 在一个实例中,皮肤注射在多个身体部位进行以减轻局部皮肤反应的程度。在规定的接种日,患者接受3-5次单独的皮内注射剂量(例如至少0.4ml、0.2ml或0.1ml),每次在肢体上在针进入距最近的相邻注射相隔至少约5cm(例如至少4.5、5、6、7、8、9或cm)从一支注射器中给予的指定的总剂量。在随后的接种日,注射部位以顺时针或反时针方式旋转至四肢。

[0390] 在另一个实施方案中,给予新生儿对象表达CMV抗原的感染性复制缺陷型Pichinde病毒或其组合物因此在免疫系统诱导针对感染、癌症或过敏反应的细胞介导免疫(CMI)应答,超过这类治疗不存在时针对感染、癌症或过敏反应的CMI应答的至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更高。

[0391] 在某些实施方案中,给予对象表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导可检出抗体滴度最低至少4周。在另一个实施方案中,给予对象表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒增加抗体滴度至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%。

[0392] 在某些实施方案中,首次抗原暴露诱导来自感染-免疫人类受试者的平均对照血清的至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%的功能性(中和性)和最小抗体滴度。在更具体的实施方案中,首次中和性几何平均抗体滴度在免疫后至少4周内提高直到至少1:50、至少1:100、至少1:200或至少1:1000的峰值。在另一个实施方案中,用表达来源于本文所述感染性生物、癌症或变态反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒免疫,在单次给予疫苗后,或在两次或多次后续免疫后,产生免疫后持续至少4周、至少8周、至少12周、至少6个月、至少12个月、至少2年、至少3年、至少4年或至少5年的高滴度抗体。

[0393] 在又一个实施方案中,二次抗原暴露提高抗体滴度达至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%。在另一个实施方案中,二次抗原暴露诱导来自感染-免疫人类受试者的平均对照血清的至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%的功能性(中和性)和最小抗体滴度。在更具体的实施方案中,二次中和性几何平均抗体滴度在免疫后至少4周内提高直到至少1:50、至少1:100、至

少1:200或至少1:1000的峰值。在另一个实施方案中,用表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的第二次免疫产生免疫后持续至少4周、至少8周、至少12周、至少6个月、至少12个月、至少2年、至少3年、至少4年或至少5年的高滴度的抗体。

[0394] 在又一个实施方案中,第三次加强免疫提高抗体滴度达至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%。在另一个实施方案中,加强免疫诱导来自感染-免疫人类受试者的平均对照血清的至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%的功能性(中和性)和最小抗体滴度。在更具体的实施方案中,第三次加强免疫诱导来自感染-免疫人类受试者的平均对照血清的至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少1000%的功能性(中和性)和最小抗体滴度。在另一个实施方案中,第三次加强免疫延长免疫后的抗体滴度达至少4周、至少8周、至少12周、至少6月、至少12月、至少2年、至少3年、至少4年或至少5年。

[0395] 在某些实施方案中,表达来源于感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导T细胞非依赖性或T细胞依赖性应答。在其它实施方案中,表达来源于感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导T细胞应答。在其它实施方案中,表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导T辅助细胞应答。在另一个实施方案中,表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导Th1-定向应答或Th2-定向应答。

[0396] 在更具体的实施方案中,IgG2抗体相对于IgG1的优势表明Th1-定向应答。在其它实施方案中,IgG2:IgG1的比率大于1:1、大于2:1、大于3:1或大于4:1。在另一个实施方案中,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA或IgE抗体的优势表明表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的感染性Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。

[0397] 在一些实施方案中,表达CMV抗原或其片段的感染性复制缺陷型Pichinde病毒诱导CD8+T细胞应答。在另一个实施方案中,与抗体组合与否,表达来源于感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导CD4+和CD8+T细胞应答两者。

[0398] 在某些实施方案中,表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导高滴度的中和抗体。在另一个实施方案中,表达来源于本文所述感染性生物、癌症或变态反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导比各自表达蛋白质复合物组分高的中和抗体滴度。

[0399] 在另一个实施方案中,表达1、2、3、4、5或更多种来源于感染性生物、癌症或过敏反应的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒诱导比表达1种来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒高的中和抗体滴度。

[0400] 在某些实施方案中,所述方法另包括共同给予Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和至少一种另外的疗法。在某些实施方案中,共同给予是同时的。在另一个实施方案中,在给予另外的疗法之前给予Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。在其它实施方案中,在给予另外的疗法之后给予Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde

病毒颗粒。在某些实施方案中,给予Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和另外的疗法为约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时或约12小时。在某些实施方案中,给予Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和所述另外的疗法之间的间隔为约1天、1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周。在某些实施方案中,给予Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和另外的疗法之间的间隔为约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月或约6个月。

[0401] 在某些实施方案中,给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或其组合物降低患者血液样品或血清样品中检出的抗体的数目。在某些实施方案中,给予表达来源于感染性生物、癌症或过敏原的抗原Pichinde病毒颗粒或其组合物减少尿液、唾液、血液、眼泪、精液、脱落细胞样品或乳汁中检出的感染性生物、癌症或过敏反应的量。

[0402] 在另一个实施方案中,表达来源于本文所述感染生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或组合物可另包含报道蛋白。在一个更具体的实施方案中,将表达来源于本文所述感染生物、癌症或过敏原和报道蛋白的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒给予对象用于治疗 and/或预防感染、癌症或对象反应。在再一个具体实施方案中,报道蛋白可用于体内、原位和实时监测基因表达、蛋白质定位和疫苗递送。

[0403] 在另一个实施方案中,表达来源于本文所述感染生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或组合物可另包含荧光蛋白。在一个更具体的实施方案中,将表达来源于本文所述感染生物、癌症或过敏原和报道蛋白的抗原的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒给予对象用于治疗 and/或预防感染、癌症或过敏反应。在再一个具体实施方案中,荧光蛋白可以是报道蛋白,可用于体内、原位和实时监测基因表达、蛋白质定位和疫苗递送。

[0404] 对象中通过给予表达来源于感染性生物、癌症、过敏原的抗原Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物诱导的针对感染、癌症或过敏反应的CMI应答功能的改变可通过本领域技术人员已知任何测定法测量,包括但不限于流式细胞术(参见例如Perfetto S.P.et al.,2004,Nat Rev Immun.,4(8):648-55)、淋巴细胞增殖测定法(参见例如Bonilla F.A.et al.,2008,Ann Allergy Asthma Immunol,101:101-4;和Hicks M.J.et al.,1983,Am J Clin Pathol.,80:159-63)、测量淋巴细胞活化(包括测定测量T淋巴细胞的细胞因子活化后表面标志表达的改变)的测定法(参见例如Caruso A.et al.,Cytometry.1997;27:71-6)、ELISPOT测定法(参见例如Czerkinsky C.C.et al.,1983,J Immunol Methods,65:109-121;和Hutchings P.R.et al.,1989,J Immunol Methods,120:1-8)或天然杀伤细胞细胞毒性测定法(参见例如Bonilla F.A.et al.,2006,Ann Allergy Asthma Immunol.,94(5Suppl 1):S1-63)。

[0405] 癌症患者的成功治疗可被评价为预期生存期的延长、抗肿瘤免疫应答的诱导或癌症特定性质的改善。可改善的癌症性质的实例包括肿瘤大小(例如T0、T_{is}或T1-4)、转移状况(例如M0、M1)、可观察的肿瘤数、结节受累情况(例如N0、N1-4、Nx)、等级(即1、2、3或4级)、期(例如0、I、II、III或IV)、细胞上或体液中某些标志物的存在或浓度(例如AFP、B2M、beta-

HCG、BTA、CA 15-3、CA 27.29、CA 125、CA 72.4、CA 19-9、降钙素、CEA、嗜铬粒蛋白A、EGFR、激素受体、HER2、HCG、免疫球蛋白、NSE、NMP22、PSA、PAP、PSMA、S-100、TA-90和甲状腺球蛋白)和/或相关病理(例如腹水或水肿)或症状(例如恶病质、发热、厌食症或疼痛)。如果通过百分比可测量,则改善可以是至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80或90%(例如生存率,或肿瘤的体积或线性尺寸)。

[0406] 在另一个实施方案中,本文描述了与表达来源于本文所述感染性生物、癌症或过敏原的抗原的Pichinde病毒颗粒一起使用的方法,其中编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的至少一种ORF被编码来源于感染性生物、癌症、过敏原的抗原或其抗原片段的核苷酸序列置换。

[0407] 4.7组合物、给药和剂量

[0408] 本申请此外涉及包含本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的疫苗、免疫原性组合物(例如疫苗制剂)和药物组合物。这类疫苗、免疫原性组合物和药物组合物可按照本领域的标准规程配制。

[0409] 对于相关领域普通技术人员而言将是显而易见的是,本文所述方法和应用的适当修改和改动可能是明显的,并且可以进行修改而不偏离本发明或其任何实施方案的范围。

[0410] 在另一个实施方案中,本文提供包含本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的组合物。这类组合物可用于疾病的治疗和预防方法。在一个具体实施方案中,本文所述组合物用于感染或易于感染的对象的治疗。在其它实施方案中,本文所述组合物用于易感或显示癌症或肿瘤发生的特有症状或诊断为癌症的对象的治疗。在另一个具体的实施方案中,本文提供的免疫原性组合物可用于诱导向其给予组合物的宿主的免疫应答。本文所述免疫原性组合物可用作疫苗,因此可配制为药物组合物。在一个具体实施方案中,本文所述免疫原性组合物用于对象(例如人类对象)的感染或癌症的预防。在其它实施方案中,疫苗、免疫原性组合物或药物组合物适用于兽医和/或人类给药。

[0411] 在某些实施方案中,本文提供包含本文所述Pichinde病毒载体的免疫原性组合物。在某些实施方案中,这类免疫原性组合物另包含药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,这类免疫原性组合物另包含佐剂。可在给予所述组合物之前、同时或之后给予用于与本文所述组合物组合给予的佐剂。在某些实施方案中,术语“佐剂”是指与本文所述组合物联合或作为本文所述组合物的部分给予时增加、提高和/或加强对Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和最重要的是其载体化的基因产物的免疫应答的化合物,但当该化合物单独给予时不产生对Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和被后者载体化的基因产物的免疫应答。在一些实施方案中,佐剂产生对Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和被后者载体化的基因产物的免疫应答,并且不产生过敏反应或其它不良反应。佐剂可通过若干机制(包括例如淋巴细胞募集、B和/或T细胞刺激和巨噬细胞或树突细胞刺激)提高免疫应答。当本发明的疫苗或免疫原性组合物包含佐剂或与一种或多种佐剂一起给予时,可使用的佐剂包括但不限于天然盐佐剂或天然盐凝胶佐剂、粒子佐剂、微粒佐剂、粘膜佐剂和免疫刺激佐剂。佐剂的实例包括但不限于铝盐(明矾)(例如氢氧化铝、磷酸铝和硫酸铝)、3脱-O-酰化单磷酰脂质A(MPL)(参见GB 2220211)、MF59(Novartis)、AS03(GlaxoSmithKline)、AS04(GlaxoSmithKline)、聚山梨醇酯80(Tween 80; ICL Americas, Inc.)、咪唑并吡啶化合物(参见以国际公布号W02007/109812公开的国际申请号PCT/US2007/064857)、咪唑并喹啉化合物(参见以国际公布号W02007/109813公开的国际

申请号PCT/US2007/064858)和皂苷,例如QS21(参见Kensil et al.,1995,载于Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(eds.Powell&Newman,Plenum Press,NY);美国专利号5,057,540)。在一些实施方案中,佐剂是弗氏佐剂(完全或不完全)。其它佐剂是任选与免疫刺激剂(例如单磷酸脂质A)组合的水包油乳液(例如角鲨烯或花生油)(参见Stoute et al.,1997,N.Engl.J.Med.336,86-91)。

[0412] 组合物包含单独的本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或连同药学上可接受的载体。可以使用Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的混悬液或分散体,尤其是等渗的水性混悬液或分散体。药物组合物可被灭菌和/或可包含赋形剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂和/或乳化剂、增溶剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂,并且按本身已知的方式制备,例如通过常规分散和悬浮方法。在某些实施方案中,这类分散体或混悬液可包含粘度调节剂。将混悬液或分散体保持在2°C-8°C左右的温度下,或优先可冷冻以用于较长期储存,然后在用前不久融化,或者可冻干保存。对于注射,可在水性溶液中,优选在生理上相容的缓冲液(例如Hanks溶液、林格氏液或生理盐水缓冲液)中配制疫苗或免疫原制备物。溶液剂中可含有调配剂(formulatory agent),例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0413] 在某些实施方案中,本文所述组合物还包含防腐剂,例如汞衍生物硫柳汞。在一个具体的实施方案中,本文所述药物组合物包含0.001%-0.01%硫柳汞。在其它实施方案中,本文所述药物组合物不含防腐剂。

[0414] 药物组合物包含约 10^3 -约 10^{11} 病灶形成单位的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。

[0415] 在一个实施方案中,药物组合物的给药是胃肠外给药。胃肠外给药可以是静脉内或皮下给药。因此,胃肠外给药的单位剂型是例如安瓿或小瓶,例如装有约 10^3 - 10^{10} 病灶形成单位或 10^5 - 10^{15} 物理颗粒的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的小瓶。在某些实施方案中,术语“ 10^x ”意指10的X次方。

[0416] 在另一个实施方案中,通过包括但不限于口服、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、局部、皮下、经皮、鼻内和吸入途径,以及通过划痕(例如使用分岔针通过皮肤顶层刻痕),将本文提供的疫苗或免疫原性组合物给予受试者。具体地讲,可使用皮下或静脉内途径。

[0417] 对于鼻内或通过吸入给药,可适宜地在使用合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体)的同时以从喷雾器(pressurized pack)或雾化器提供的喷雾剂的形式递送按照本发明使用的制剂。在压缩气雾剂的情况下,可通过提供递送计量的阀确定剂量单位。可配制含有化合物和合适的粉末基料(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物的例如明胶的药囊和药盒用于吸入器或吹入器。

[0418] 活性成分的剂量取决于疫苗接种的类型和受试者及其年龄、体重、个体条件、各个药代动力学数据和给药方式。在某些实施方案中,采用体外测定法以助于鉴定最适剂量范围。有效剂量可从获自体外或动物模型试验系统的剂量反应曲线推算。

[0419] 在某些实施方案中,包含Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的疫苗、免疫原性组合物或药物组合物可用作活的接种。活的Pichinde病毒颗粒的示例性剂量可自每剂10-100或更高PFU的活病毒变化。在一些实施方案中,Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的合适剂量为 10^2 、 5×10^2 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 或 10^{12} pfu,可

按需以通常的间隔给予受试者一次、两次、三次或更多次。在另一个实施方案中,配制活的Pichinde病毒使得0.2-mL剂量含有 $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ 荧光病灶单位的活的Pichinde病毒颗粒。在另一个实施方案中,配制灭活疫苗使得它含有约15 μ g-约100 μ g、约15 μ g-约75 μ g、约15 μ g-约50 μ g或约15 μ g-约30 μ g的Pichinde病毒。

[0420] 在某些实施方案中,对于给予儿童,将相隔至少一个月给予的2剂本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予儿童。在具体的实施方案中,对于给予成人,给予单剂量的本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物。在另一个实施方案中,将2剂本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予成人。在另一个实施方案中,第一次可将相隔1个月给予的2剂本文所述Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒或其组合物给予年幼儿童(6个月-9岁)。在一个具体实施方案中,在其接种的第一年只接受1剂的儿童应在次年接受2剂。在一些实施方案中,相隔4周给予的2剂对于第一次给予本文所述免疫原性组合物的2-8岁儿童是优选的。在某些实施方案中,对于6-35个月龄的儿童,一半剂量(0.25ml)可能是优选的,与对超过3岁的受试者是优选的0.5ml形成对比。

[0421] 在某些实施方案中,可以包含治疗有效量的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的单剂量将组合物给予患者。在一些实施方案中,可以包含治疗有效量的Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒和各为治疗有效量的一种或多种药物组合物的单剂量,将Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒给予患者。

[0422] 在某些实施方案中,将组合物作为单剂量接着3-6周后的第2剂给予患者。根据这些实施方案,可在第二接种后以6-12个月间隔将加强接种给予受试者。在某些实施方案中,加强接种可使用不同的Pichinde病毒或其组合物。在某些实施方案中,本文所述相同组合物的给药可以重复且间隔至少1天、2天、3天、4天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天、3个月或至少6个月。

[0423] 本文还提供Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒用于制备呈药物制剂形式的疫苗的方法和用途,所述药物制剂包含Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒作为活性成分。可以本身已知方法,例如通过常规混合和/或分散方法,制备本申请的药物组合物。

[0424] 4.8测定法

[0425] 4.8.1Pichinde病毒检测测定法

[0426] 如本文所述,技术人员可采用本领域已知技术检测Pichinde病毒基因组区段或三区段Pichinde病毒颗粒。例如,可采用RT-PCR与对Pichinde病毒有特异性的引物检出和定量测定经改造在ORF野生型位置以外的位置携带ORF的Pichinde病毒基因组区段或三区段Pichinde病毒颗粒。可采用蛋白质印迹、ELISA、放射免疫测定法、免疫沉淀、免疫细胞化学或免疫细胞化学连同FACS定量测定Pichinde病毒基因组区段或三区段Pichinde病毒颗粒的基因产物。

[0427] 4.8.2测量感染性的测定法

[0428] 可采用技术人员已知的任何测定法测量Pichinde病毒载体制备物的感染性。例如,病毒/载体滴度的测定可通过“病灶形成单位测定法”(FFU测定法)进行。简单地说,将补给细胞(例如MC57细胞)铺板,并接种不同稀释度的病毒/载体样品。在温育期后,允许细胞

形成单层,并允许病毒与细胞连接,将单层用甲基纤维素覆盖。当使板进一步温育时,原始感染细胞释放病毒子代。由于甲基纤维素覆盖层,新病毒的铺展局限于邻近的细胞。因此,各感染性颗粒产生感染细胞的圆形区称为病灶。可使这类病灶可见,并籍此使用针对Pichinde病毒的抗体-NP或由Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒表达的另一种蛋白质和基于HRP的颜色反应使之可数。病毒/载体的滴度可以每毫升病灶形成单位 (FFU/mL) 计算。

[0429] 4.8.3Pichinde病毒颗粒的生长

[0430] 本文所述Pichinde病毒颗粒的生长可通过本领域已知或本文描述的任何方法评价(例如细胞培养物)。病毒生长可通过将连续稀释的本文所述Pichinde病毒颗粒接种至细胞培养物(例如BHK-21细胞)中来测定。在温育病毒规定时间后,采用标准方法分离病毒。

[0431] 4.8.4血清ELISA

[0432] 动物(例如小鼠、豚鼠)疫苗接种时体液免疫应答的测定可通过抗原特异性血清ELISA(酶联免疫吸附测定法)进行。简单地说,将板用抗原(例如重组蛋白质)包被、封闭以避免抗体的非特异性结合,并与连续稀释的血清一起温育。在温育后,例如使用酶偶联的抗物种(例如小鼠、豚鼠)特异性抗体(检测总的IgG或IgG亚类)和随后的颜色反应,可检测结合的血清-抗体。抗体滴度可测定为例如终点几何平均滴度。

[0433] 4.8.5测量诱导抗体的中和活性的测定法

[0434] 使用来自ATCC的ARPE-19细胞和GFP标记的病毒,用以下列细胞测定法进行血清中诱导抗体的中和活性的测定。另外使用补充的豚鼠血清作为外源补体的来源。该测定始于用前1或2天在384孔板中接种 6.5×10^3 个细胞/孔($50 \mu\text{l}$ /孔)用于中和。中和在96孔无菌组织培养板中在无细胞时在 37°C 下进行1小时。在中和温育步骤后,将混合物加入细胞中,再温育4天用于用读板仪进行GFP检测。阳性中和人血清用作各板上的测定阳性对照以检查所有结果的可靠性。滴度(EC50)采用4参数对数曲线拟合测定。作为另外的测试,用荧光显微镜检查各孔。

[0435] 4.8.6噬斑减少测定法

[0436] 简单地说,可通过使用用绿色荧光蛋白标记的可复制型或缺陷型Pichinde病毒进行用于Pichinde病毒的噬斑减少(中和)测定法,使用5%兔血清作为外源补体的来源,并通过荧光显微镜术清点噬斑。中和滴度定义为与对照(免疫前)血清样品的相比,导致噬斑50%、75%、90%或95%减少的血清的最高稀释度。

[0437] qPCR:按照生产商提供的方案,使用QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN),分离Pichinde病毒RNA基因组。通过用**SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit** (Invitrogen)和对Pichinde NPP编码区的部分或Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的另一个基因组序列段有特异性的引物和探针(FAM报道分子和NFQ-MGB Quencher)在StepOnePlus Real Time PCR System(Applied Biosystems)中进行的定量PCR,检测Pichinde病毒RNA基因组当量。反应的温度概况为:在 60°C 下30分钟,在 95°C 下2分钟,接着在 95°C 下15秒钟45个循环,在 56°C 下30秒钟。通过将样品结果与标准曲线进行比较,来定量测定RNA,所述标准曲线从分光光度定量的体外转录的RNA片段(相当于含有引物和探针结合位点的NP编码序列的片段或Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒的另一个基因组序列段)的 \log_{10} 稀释系列制备。

[0438] 4.8.7蛋白质印迹法

[0439] 使用RIPA缓冲液(Thermo Scientific),使生长在组织培养瓶或悬液中的感染细胞在感染后的规定时间点裂解,或感染细胞直接使用而无需细胞裂解。将样品与还原剂和NuPage LDS样品缓冲液(NOVEX)一起加热至99℃10分钟,冷却到室温后,加载到4-12% SDS-凝胶中用于电泳。使用Invitrogens iBlot Gel转移装置将蛋白质印在膜上,并通过Ponceau染色观察。最后,将制备物用针对目标蛋白质的第一抗体和碱性磷酸酶缀合的第二抗体探测,接着用1-Step NBT/BCIP溶液(INVITROGEN)染色。

[0440] 4.8.8用于检测抗原特异性CD8+T细胞增殖的MHC-肽多聚体染色测定法

[0441] 技术人员已知的任何测定法可用来测试抗原特异性CD8+T细胞应答。例如,可采用MHC-肽四聚物染色测定法(参见例如Altman J.D.et al.,Science.1996;274:94-96;和Murali-Krishna K.et al.,Immunity.1998;8:177-187)。简单地说,该测定法包括下列步骤:采用四聚物测定法检测抗原特异性T细胞的存在。为了T细胞检测对之有特异性的肽,必须同时识别该肽和针对规定抗原特异性和T细胞的MHC单体型(通常荧光标记的)定制的MHC分子的四聚物。然后通过荧光标记的流式细胞术,检测四聚物。

[0442] 4.8.9用于检测抗原特异性CD4+T细胞增殖的ELISPOT测定法

[0443] 技术人员已知的任何测定法可用来测试抗原特异性CD4+T细胞应答。例如,可采用ELISPOT测定法(参见例如Czerkinsky C.C.et al.,JImmunol Methods.1983;65:109-121;和Hutchings P.R.et al.,J Immunol Methods.1989;120:1-8)。简单地说,该测定法包括下列步骤:将免疫斑点板(immunospot plate)用抗细胞因子抗体包被。使细胞在免疫斑点板上温育。细胞分泌细胞因子,然后洗出细胞。然后将板用第二生物化抗细胞因子抗体包被,并用抗生物素蛋白-HRP系统观察。

[0444] 4.8.10用于检测CD8+和CD4+T细胞应答功能性的胞内细胞因子测定法

[0445] 技术人员已知的任何测定法可用来测试CD8+和CD4+T细胞应答的功能性。例如,可采用与流式细胞术联合的胞内细胞因子测定法(参见例如Suni M.A.et al.,J Immunol Methods.1998;212:89-98;Nomura L.E.et al.,Cytometry.2000;40:60-68;和Ghanekar S.A.et al.,Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.2001;8:628-63)。简单地说,该测定法包括下列步骤:加入通过抑制蛋白质转运的特殊肽或蛋白质(例如布雷菲德菌素A)激活的细胞中,以使细胞因子保留在细胞内。在规定的温育时间(通常5小时)后,接着洗涤步骤,可将抗其它细胞标志物的抗体加入细胞中。然后使细胞固定并透化。加入荧光染料缀合的抗细胞因子抗体,并可通过流式细胞术分析细胞。

[0446] 4.8.11用于证实病毒载体复制缺陷的测定法

[0447] 技术人员已知的测定感染性和可复制型病毒颗粒的浓度的任何测定法还可用来测量样品的复制缺陷型病毒颗粒。例如,用非补给细胞的FFU测定法可用于此目的。

[0448] 此外,基于噬斑的测定法是用来测定以噬斑形成单位(PFU)为单位的病毒样品中的病毒浓度的标准方法。具体地讲,非补给宿主细胞的汇合单层用不同稀释度的病毒感染,并用半固体培养基(例如琼脂)覆盖以防止病毒感染不加区别的扩散。当病毒成功感染,并且在固定细胞单层内的细胞中自我复制并扩散到周围细胞时,形成病毒噬斑(参见例如Kaufmann,S.H.;Kabelitz,D.(2002).Methods in Microbiology Vol.32:Immunology of Infection.Academic Press.ISBN 0-12-521532-0)。噬斑形成可耗时2-14天,这取决于所

分析的病毒。一般对噬斑进行手工计数,结果以及用于制备板的稀释因子用来计算每样品单位体积噬斑形成单位的数目(PFU/mL)。PFU/mL结果表示样品内感染性可复制颗粒的数目。当使用C细胞时,可采用同一测定法滴定复制缺陷型Pichinde病毒颗粒或三区段Pichinde病毒颗粒。

[0449] 4.8.12用于表达病毒抗原的测定法

[0450] 技术人员已知的任何测定法可用于测量病毒抗原的表达。例如,可进行FFU测定法。对于检测,使用针对各病毒抗原的单克隆或多克隆抗体制备物(转基因特异性FFU)。

[0451] 4.8.13动物模型

[0452] 为了研究本文所述Pichinde病毒颗粒体内的重组和感染性,可使用动物模型。在某些实施方案中,可用来研究三区段Pichinde病毒颗粒的重组和感染性的动物模型包括小鼠、豚鼠、兔和猴。在一个优选的实施方案中,可用来研究Pichinde病毒的重组和感染性的动物模型包括小鼠。在一个更具体的实施方案中,可用来研究Pichinde病毒的重组和感染性颗粒的小鼠为I型干扰素受体,II型干扰素受体和重组活化基因1(RAG1)三重缺陷的。

[0453] 在某些实施方案中,动物模型可用来测定Pichinde病毒感染性和转基因稳定性。在一些实施方案中,病毒RNA可自动物模型的血清分离。技术很容易为本领域技术人员所知。病毒RNA可被反转录,携带Pichinde病毒ORF的cDNA可用基因特异性引物进行PCR扩增。流式细胞术还可用来研究Pichinde病毒感染性和转基因稳定性。

5. 实施例

[0454] 这些实施例证实了Pichinde病毒型载体技术可用来成功地开发1)在ORF野生型位置以外的位置具有病毒ORF的Pichinde病毒基因组区段,和(2)不产生可复制型二区段病毒颗粒的三区段Pichinde病毒颗粒。

[0455] 5.1材料与方法

[0456] 5.1.1细胞

[0457] 将BHK-21细胞培养在补充10%热灭活胎牛血清(FCS;Biochrom)、10mM HEPES(Gibco)、1mM丙酮酸钠(Gibco)和1x胰蛋白胨磷酸盐液体培养基的高葡萄糖Dulbecco's Eagle培养基(DMEM;Sigma)中。将细胞培养在37℃、潮湿的5% CO₂培养箱中。将293-T细胞培养在补充10%热灭活胎牛血清(FCS)的Dulbecco's Eagle培养基(DMEM,含有Glutamax;Sigma)中。

[0458] 5.1.2转基因

[0459] (1)用于无缝克隆的邻接BsmBI位点将绿色荧光蛋白(GFP)合成为GFP-Bsm(SEQ ID NO.:9)。(2)由以下组成的融合蛋白:i)水泡性口炎病毒糖蛋白(VSVG)信号肽,ii)P815小鼠肥大细胞瘤肿瘤细胞系的P1A抗原,iii)GSG接头,iv)肠病毒2A肽,和v)小鼠GM-CSF。该融合蛋白可称为sP1AGM。我们用邻接BsmBI位点将它合成为sP1AGM-Bsm(SEQ ID NO.:10)用于无缝克隆。(3)Pichinde病毒GP,其含用于无缝克隆以重构野生型Pichinde病毒S区段表达质粒(没有BbsI位点的S区段)(SEQ ID NO.:8)的邻接BsmBI位点。

[0460] 5.1.3质粒

[0461] 我们合成了Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18(Genbank登记号EF529747.1)的L ORF的修饰的cDNA,其中引入非编码突变以剔除BsmBI限制位点。将这种含

适当邻接的BsmBI以及EcoRI和NheI限制位点的合成ORF(L Δ BsmBI;SEQ ID NO:3)引入聚合酶-II(pol-II)表达载体pCAGGS,得到pC-PIC-L-Bsm(图3)用于在真核细胞中表达Pichinde L蛋白。

[0462] 我们合成了Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18(Genbank登记号EF529747.1)的修饰的L区段(PIC-L-GFP-Bsm;SEQ ID NO:4),其中L ORF被剔除并被在每端含邻接BsmBI位点的GFP ORF置换。将此合成cDNA引入小鼠聚合酶I(pol-I)表达盒(Pinschewer et al.J Virol.2003Mar;77(6):3882-7),得到pol-I-PIC-L-GFP-Bsm(图3)。

[0463] 我们用BsmBI消化PIC-L-Bsm,将BsmBI突变的L ORF插入同样消化的pol-I-PIC-L-GFP-Bsm主链,因此将GFP ORF用L ORF替换以无缝重构Pichinde病毒L区段cDNA,其用于克隆目的全部限制位点被剔除。所得pol-I-PIC-L质粒(图3)被设计用于真核细胞中全长Pichinde病毒L区段(PIC-L-seg;SEQ ID NO.:2)的胞内表达。

[0464] 我们合成了Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18(Genbank登记号:EF529746.1)的修饰的S区段cDNA,称为PIC-miniS-GFP(SEQ ID NO:5),其中GP ORF被2个BsmBI限制位点替换,NP ORF被含两个邻接BbsI限制位点的GFP替换。将此合成cDNA引入小鼠聚合酶I(pol-I)表达盒(Pinschewer et al.J Virol.2003Mar;77(6):3882-7),得到pol-I-PIC-miniS-GFP(图3)。

[0465] 我们合成了Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18(Genbank登记号EF529747.1)的NP ORF的修饰的cDNA,其中引入非编码突变以剔除两个BbsI限制位点。将这种含适当邻接的BbsI以及EcoRI和NheI限制位点(NP Δ BbsI;SEQ ID NO:6)的合成ORF引入聚合酶-II(pol-II)表达载体pCAGGS,得到pC-PIC-NP-Bbs(图3)用于真核细胞中Pichinde NP蛋白的表达。

[0466] 我们用BbsI消化NP Δ BbsI,将BbsI突变的NP ORF插入同样消化的pol-I-PIC-miniS-GFP主链,因此将GFP ORF用NP ORF替换以无缝重构Pichinde病毒S区段cDNA的3' UTR-NP-IGR部分,其用于克隆目的全部限制位点被剔除。所得pol-I-PIC-NP-Bsm质粒(图3),表达在pol-I控制下的PIC-NP-Bsm(SEQ ID NO:7),被设计通过无缝替换BsmBI位点用于接受将插入5' UTR和IGR之间的目标转基因,用于在真核细胞中表达所得重组Pichinde病毒S区段。

[0467] 我们合成了Pichinde病毒毒株Munchique CoAn4763分离株P18(Genbank登记号EF529747.1)的GP ORF的修饰的cDNA,其中引入非编码突变以剔除两个BbsI限制位点。与NP Δ BbsI类似,将这种合成ORF引入pol-I-PIC-miniS-GFP主链,因此将GFP ORF用GP ORF替换以无缝重构Pichinde病毒S区段cDNA的3' UTR-GP-IGR部分,其用于克隆目的全部限制位点被剔除。所得的表达PIC-GP-Bsm(SEQ ID NO:8)的pol-I-PIC-GP-Bsm质粒(图3),被设计成通过无缝替换BsmBI位点用于接受将插入5' UTR和IGR之间的目标转基因,用于真核细胞中表达所得重组Pichinde病毒S区段。

[0468] 我们然后将pol-I-PIC-NP-Bsm插入下列基因和转基因:1.GFP,2.sP1AGM和3.全部具有邻接BsmBI位点的Pichinde GP。所得质粒名为pol-I-PIC-NP-GFP(表达PIC-NP-GFP,亦称为S-NP/GFP;SEQ ID NO:11)和pol-I-PIC-NP-sP1AGM(表达PIC-NP-sP1AGM;SEQ ID NO:12)和pol-I-PIC-S(表达PIC-S,SEQ ID NO:1)。类似地,我们将GFP或sP1AGM插入pol-I-PIC-GP-Bsm,得到pol-I-PIC-GP-GFP(表达PIC-GP-GFP,亦称为S-GP/GFP;SEQ ID NO:

13)和pol-I-PIC-GP-sP1AGM(表达PIC-GP-sP1AGM;SEQ ID NO:14)。

[0469] 5.1.4细胞的DNA转染和重组病毒的拯救

[0470] 将稳定转染以表达淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒的糖蛋白的BHK-21细胞(BHK-GP细胞,Flatz et al.Nat Med.2010Mar;16(3):339-45)以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种至6孔板,按照生产商说明书使用任一种脂质转染胺(约 $3 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA;Invitrogen)用不同量的DNA感染24小时后。对于全部从质粒DNA拯救重组二区段病毒,两种最小病毒反式作用因子NP和L从pol-II驱动质粒($0.8 \mu\text{g}$ pC-PIC-NP-Bbs, $1.4 \mu\text{g}$ pC-PIC-L-Bsm)递送,用 $1 \mu\text{g}$ pol-I-PIC-L和 $0.8 \mu\text{g}$ pol-I-PIC-S共感染。在拯救由一个L和两个S区段组成的三区段r3PIC的情况下,将 $0.8 \mu\text{g}$ 的两种pol-I驱动的S区段包括在转染混合物中。在转染后72小时,将细胞和上清液转移到75cm²组织培养瓶中,再经48-96小时后收获上清液。在病灶形成测定法中测定病毒感染性,使病毒在正常BHK-21细胞中再传代48用于进一步扩增(感染复数=0.01持续48小时)。通过病灶形成测定法再次测定如此获得的病毒原液中的病毒滴度。

[0471] 5.1.5病毒和病毒的生长动力学

[0472] 野生型和重组病毒原液通过以0.01的感染复数(moi)感染BHK-21或293-T细胞产生,感染后48小时收获上清液。以T75细胞培养瓶形式体外制成病毒的生长曲线。以 5×10^6 个细胞/培养瓶的密度接种BHK021细胞,通过将细胞连同5ml、moi为0.01的病毒接种物在摇动板上在37℃和5% CO₂下温育90分钟感染24小时。加入新鲜培养基,使细胞在37℃/5% CO₂下温育。在规定时间点(通常24、48、72小时)取出上清液,通过病灶形成测定法分析病毒滴度。

[0473] 5.1.6病灶形成测定法

[0474] 接下来,通过病灶形成测定法测定Pichinde病毒的滴度。如没有明确规定,则使用293-T细胞或3T3细胞用于病灶形成测定法。将细胞以 3×10^4 细胞/孔的密度接种在96孔板中,与MEM/2% FCS中制备的 $100 \mu\text{l}$ 13.17倍连续稀释的病毒混合。在37℃下温育2-4小时后,每孔加入 $80 \mu\text{l}$ 粘性培养基(含2%甲基纤维素的2x补充DMEM),确保病毒颗粒只扩散到相邻细胞。在37℃下48小时后,轻轻弹去上清液,通过在室温下加入 $100 \mu\text{l}$ 甲醇20分钟使细胞固定(所有以下步骤均在室温下进行)。将细胞用 $100 \mu\text{l}$ /孔BSS/1% Triton X-100(Merck Millipore)透化20分钟,随后用PBS/5% FCS封闭60分钟。对于抗NP染色,将大鼠抗Pichinde-NP单克隆抗体用作第一染色抗体,在PBS/2.5% FCS中稀释60分钟。将板用自来水洗涤3次,以PBS/2.5% FCS中的1:100稀释度加入第二HRP-山羊-抗大鼠-IgG,温育1小时。将板再次用自来水洗涤3次。加入颜色反应($0.5 \text{g}/\text{l}$ DAB(Sigma D-5637),含 $0.5 \text{g}/\text{l}$ 硫酸镍铵的PBS/0.015% H₂O₂),10分钟后用自来水终止反应。清点染色的病灶,根据稀释度计算最终滴度。

[0475] 5.1.7小鼠

[0476] BALB/c小鼠购自Charles River Laboratories并关养在无特定病原体(SPF)的条件下用于实验。所有动物实验根据瑞士动物保护法律和相应责任州当局的许可,在巴塞尔大学进行。以 1×10^5 FFU/小鼠的剂量静脉内进行小鼠感染。

[0477] 5.1.8流式细胞术

[0478] 血液用与抗CD8a和抗B220抗体组合的负载免疫显性P1A-来源的H-2L^d-限制性表位LPYLGWLVF(Aa35-43)的MHC I类四聚物染色,在BD LSRFortessa流式细胞仪上测定表位

特异性CD8⁺T细胞频率,数据应用FlowJo软件(Tree Star,Ashland,OR)处理。

[0479] 5.1.9统计分析

[0480] 统计显著性应用Graphpad Prism软件(6.0d版本)通过双尾不配对t检验测定。

[0481] 5.2结果

[0482] 5.2.1具有人工基因组结构的三区段Pichinde病毒型载体的设计

[0483] 野生型Pichinde病毒的基因组由负极性的2个单链RNA区段(一个L,一个S区段)组成(图1A)。根据允许精选转基因无缝插入重复S区段的5'非翻译区(5'UTR)和基因间区(IGR)之间的盒系统,我们设计了具有人工基因组结构的可复制型三区段Pichinde病毒载体的聚合酶-I/II驱动的cDNA拯救系统(r3PIC-art,图1B、1C和1D)。Pinschewer et al.Proc Natl Acad Sci U S A.2003Jun 24;100(13):7895-900在附图4中详细描述了转基因利用BsmBI位点无缝插入(即没有来源于分子克隆的残余核苷酸序列段,因此没有额外的限制性内切酶识别位点)沙粒病毒S区段的分子克隆策略,所述BsmBI位点在转基因插入时被全部剔除,因此不存在于所得重组病毒中。如Flick et al.J Virol.2001Feb;75(4):1643-55的概述,类似地使用BbsI酶用于无缝克隆。这些Pichinde病毒型r3PIC-art基因组由野生型Pichinde病毒L区段连同人工重复S区段组成,被设计成携带在3'UTR控制下(即在3'UTR和IGR之间)的核蛋白(NP)或糖蛋白(GP)。这在各S区段留下一个位置用于插入转基因,即一个转基因各可分别插入两个S区段每个的5'UTR和IGR之间。

[0484] 5.2.2从具有人工基因组结构的三区段重组病毒载体拯救的感染性GFP-表达病毒

[0485] 为了产生三区段重组Pichinde病毒,我们合成了第5.1.3节描述的多种质粒。我们用如下质粒组合感染BHK-21细胞:

[0486] (A)S区段小基因组:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-miniS-GFP;

[0487] (B)L区段小基因组:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-L-GFP-Bsm;

[0488] (C) r3PIC-GFP^{art}:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-L、pol-I-PIC-NP-GFP、pol-I-PIC-GP-GFP;

[0489] (D) rPIC^{wt}:pC-PIC-L-Bsm、pC-PIC-NP-Bbs、pol-I-PIC-L、pol-I-PIC-S

[0490] 我们发现在S和L区段小基因组转染后48小时GFP表达(图4,如上文所列质粒组合A和B),表明作为核糖核蛋白(RNP)的功能性Pichinde病毒S和L区段类似物的胞内重构,其在基因表达中是有活性的。类似地,目的在于产生r3PIC-GFP^{art}的转染C在转染后48小时证实为GFP阳性细胞,而正如预期,用于产生rPIC^{wt}的质粒组合D无明显的绿色荧光。在转染后168小时,GFP阳性细胞大部分在S和L区段小基因组转染中消失,但在具有r3PIC-GFP^{art}的细胞中充足,表明感染性GFP表达病毒自cDNA重构,并在细胞培养物中扩散。

[0491] 5.2.3生长至比野生型Pichinde病毒低滴度的重组三区段病毒

[0492] 用rPIC^{wt}和r3PIC-GFP^{art}获得的病毒实现比较生长曲线(图2)。收集自第5.2.2节的转染C和D的上清液,在BHK-21细胞中平行传代(感染复数=0.01,图2)。对于两种病毒,在48小时后达到峰值感染性,然而对于r3PIC-GFP^{art}大大低于rPIC^{wt}。这表明了与其二区段野生型亲代病毒相比三区段r3PIC-GFP^{art}毒性减弱。

[0493] 5.2.4表达sP1AGM的重组r3PIC诱导快速强有力的多功能P1A特异性CD8⁺T细胞应答

[0494] 为了检验r3PIC^{art}载体递送技术用于接种目的的效用,我们用与r3PIC-GFP^{art}类似

的基因组结构(图1C)产生了r3PIC-sP1AGM^{art}疫苗载体(图1D)。我们通过类似于针对r3PIC-GFP^{art}的上述方法,但分别使用质粒pol-I-PIC-NP-sP1AGM和pol-I-PIC-GP-sP1AGM代替pol-I-PIC-NP-GFP和pol-I-PIC-GP-GFP,建造了表达sP1AGM的病毒(r3PIC-sP1AGM^{art})。我们静脉内用10e5病灶形成单位(FFU) r3PIC-sP1AGM^{art} i.v.使BALB/c小鼠免疫,8天后使用MHC I类四聚物的流式细胞术测量免疫显性P1A衍生H-2Ld限制性表位LPYLGWLVF(Aa35-43)的CD8⁺T细胞应答。r3PIC-sP1AGM^{art}免疫小鼠显示外周血中相当可观的P1A35-43特异性CD8⁺T细胞群,这是未免疫小鼠血液中所缺乏的(图5A和5B)。这些观察结果表明r3PIC-art型病毒载体是高度免疫原性的,使它们成为用于免疫疗法和接种的有希望的工具。

[0495] 5.2.5当在自cDNA拯救后的早期传代测试时,设计成在其各自天然位置的表达其糖蛋白和核蛋白基因的重组三区段病毒以及人工设计成在3'非翻译区(UTR)启动子控制下表达其糖蛋白的重组三区段病毒生长至比野生型Pichinde病毒低的滴度

[0496] 我们产生了分别在5'和3'UTR启动子控制下,即在由S-GP/GFP^{nat}(SEQ ID NO:15)和S-NP/GFP(亦称为PIC-NP-GFP;SEQ ID NO:11)组成的人工重复S区段情况下在其各自的“天然”位置表达其糖蛋白(GP)和核蛋白(NP)基因的三区段Pichinde病毒(图6)。通过类似于上文三区段r3PIC-GFP^{art}病毒概括的方法,创建了这种r3PIC-GFP^{nat}病毒。如图6中图解概述,r3PIC-GFP^{nat}表达GFP。当BHK-21细胞在培养基中生长时(感染复数=0.01,在48小时收获),r3PIC-GFP^{nat}达到比rPIC^{wt}低的滴度,比针对r3PIC-GFP^{art}观察到的一样低的滴度(图7;符号显示各平行细胞培养孔的滴度;误差条表示均值+/-SD)。这表明了与其二区段野生型亲代病毒相比,三区段r3PIC-GFP^{nat}毒性减弱。

[0497] 5.2.6在免疫缺陷型小鼠持续感染期间,具有人工基因组结构的重组三区段病毒(r3PIC-GFP^{art})保持转基因GFP表达并且在血液中保持比野生型Pichinde病毒(rPIC^{wt})持续更低的病毒滴度,而设计成在其各自的天然位置表达其糖蛋白和核蛋白基因的三区段病毒(r3PIC-GFP^{nat})最终失去GFP表达且在血液中的病毒滴度与用rPIC^{wt}感染的动物相当的病毒载量。

[0498] 我们在第0天用10e5病灶形成单位(“FFU”)的r3PIC-GFP^{art}、r3PIC-GFP^{nat}或rPIC^{wt}病毒静脉内(i.v.)的任一种感染了I型和II型干扰素受体以及RAG1三重缺陷的小鼠(AGR小鼠;Grob et al,1999,Role of the individual interferon systems and specific immunity in mice in controlling systemic dissemination of attenuated pseudorabies virus infection.J Virol,4748-54)。我们在7、14、21、28、35、42、56、77、98、120和147天收集血液,通过FFU测定法测定病毒感染性。在这些测定法中,我们检测了Pichinde病毒核蛋白(NP FFU;图8)或r3PIC-GFP^{nat}和r3PIC-GFP^{art}中的病毒GFP转基因(GFP FFU;图9)。我们从这些值计算各动物和时间点的NP:GFP FFU比例(图10)。

[0499] 在感染后的前21天,r3PIC-GFP^{nat}和r3PIC-GFP^{art}整体感染性(通过NP FFU测定法测定)在AGR小鼠血液中保持相似水平,大约是rPIC^{wt}感染对照的1/10(图8)。然而,从第28天起,通过NP FFU测定法测定的r3PIC-GFP^{nat}感染性,达到与rPIC^{wt}无区别的水平。相反地,r3PIC-GFP^{art} NP FFU滴度在147天的观察期间内保持在大约rPIC^{wt}的1/10水平(图8)。

[0500] 除了检测用于测定整体病毒感染性的病毒结构蛋白NP以外(图8),我们进行了FFU测定法以评价r3PIC-GFP^{nat}和r3PIC-GFP^{art}感染AGR小鼠血液中GFP表达转基因表达的感染性(GFP FFU,图9)。与NP FFU滴度形成鲜明对照(图8),r3PIC-GFP^{nat}感染AGR小鼠的GFP FFU滴度从第28天起下降,从第120天起检测不出(图9)。这与r3PIC-GFP^{art}感染小鼠血液中

十分恒定的GFP FFU滴度形成对比(图9)。通过计算“NP:GFP FFU比例”(图10),我们确定在r3PIC-GFP^{art}-感染小鼠中,几乎所有感染性(NP FFU)还表达GFP转基因。这被在整个147天的观察期“NP:GFP FFU比例”为1所证实(图10)。完全不同的是,r3PIC-GFP^{nat}感染小鼠血液中的“NP:GFP FFU比例”开始为大约1,但从第28天起达到几百及以上(图10)。这就表明在第28天和之后在r3PIC-GFP^{nat}感染小鼠血液中循环的病毒粒群100个中仅约1个或更少仍表达GFP转基因,GFP-表达感染性最终下降到低于可检出水平。因此,在AGR小鼠中整个147天的持续感染中r3PIC-GFP^{art}保持GFP转基因表达。

[0501] 5.2.7与来自r3PIC-GFP^{nat}-感染动物的病毒(其达到与自r3PIC^{wt}-感染动物分离的病毒相似的滴度)相比,从r3PIC-GFP^{art}感染小鼠血清中回收的病毒保持毒性减弱

[0502] 为了评价持续感染AGR小鼠血清中循环的病毒的生长特性,我们使在感染后第147天在BHK-21细胞中收集的病毒血症血清传代,48小时后通过NP FFU测定法测定了病毒感染性。自r3PIC-GFP^{nat}感染小鼠血清生长的病毒达到类似或高于来自rPIC^{wt}病毒-感染动物的病毒的IFF滴度(图11;符号显示各小鼠血清来源病毒的滴度;误差条表示均值+/-SD)。相反地,从r3PIC-GFP^{art}感染小鼠血清分期传代后获得的病毒滴度大大低于上述任一组别的滴度(图11)。

[0503] 从传代48小时的这些病毒中,我们随机选出4组用于细胞培养物生长的进一步分析。与图11所示实验(感染性从血清的直接传代)不同,使该实验(图12)对输入感染性归一化,因此排除了输入感染性的差异量,其作为在评价培养中所达到的病毒滴度时可能的混淆变量。因此,我们以标准感染复数=0.01感染BHK-21细胞,48小时后测定病毒滴度(图12;符号显示各小鼠血清来源病毒的滴度;误差条表示均值+/-SD)。与在从血清直接离体传代后存在的滴度类似,r3PIC-GFP^{nat}衍生病毒达到至少与rPIC^{wt}衍生病毒的滴度相当的滴度。相反地,来源于体内传代的r3PIC-GFP^{art}的病毒所达到的滴度大大低于前述两组的滴度。

[0504] 这就表明r3PIC-GFP^{nat}-感染动物血清回收的病毒的毒性不再减弱,而r3PIC-GFP^{art}感染小鼠血液中循环的病毒与rPIC^{wt}衍生病毒相比仍明显毒性减弱。因此,如在AGR小鼠的整个实验中r3PIC-GFP^{art}病毒血症比rPIC^{wt}病毒血症轻(参见第5.2.6节)以及从当从细胞培养物的血液再次扩增时r3PIC-GFP^{art}滴度比rPIC^{wt}滴度低断定的,在小鼠整个体内复制147天时间内,r3PIC-GFP^{art}保持减毒。

[0505] 5.2.8与r3PIC-GFP^{nat}不同,具有人工基因组结构的重组三区段病毒(r3PIC-GFP^{art})不使其两个S区段重组并保留其转基因

[0506] 我们希望测定在AGR小鼠持续感染的进程中,r3PIC-GFP^{nat}是否使其两个S区段重组以使NP和GP基因在单一RNA区段上再次结合,因此清除GFP转基因。为了检验这种可能性,我们在病毒感染后第147天从自每只动物收集的的血清样品中提取病毒RNA。我们使用以下引物进行了RT-PCR:分别设计成与Pichinde病毒NP和GP结合,且跨越Pichinde病毒S区段的基因间区(“IGR”)使得预期它们产生在rPIC^{wt}基因组模板上357碱基对的PCR扩增子。当使用rPIC^{wt}或r3PIC-GFP^{nat}感染的动物的病毒RNA时确实获得这类扩增子,但当使用来自r3PIC-GFP^{art}感染小鼠血液的病毒RNA时则没有(图13;各泳道表示来自图8-10所示实验每只小鼠的RT-PCR产物)。

[0507] 总之,这些数据表明在AGR小鼠持续感染的进程中,r3PIC-GFP^{nat}使其两个S区段(S-GP/GFP^{nat},S-NP/GFP)重组,将NP和GP可读框在一个单一RNA区段中再次结合。因此它失

去GFP转基因的表达,并扩大其生长能力至rPIC^{wt}的生长能力,两者在小鼠中在病毒血症和细胞培养物中的水平与自血液收获和细胞培养物再扩增所见一样明显。相反地,r3PIC-GFP^{art}未能使其两个S区段重组,因为显然缺乏跨越NP和GP基因的RT-PCR扩增子。

[0508] 6.等同内容

[0509] 本文公开的病毒、核酸、方法、宿主细胞和组合物不限于本文所述具体实施方案的范围。实际上,从前面的描述和附图来看,除所描述的以外,所述病毒、核酸、方法、宿主细胞和组合物的不同修改对本领域技术人员将是显而易见的。这类修改欲落入随附权利要求书的范围内。

[0510] 本文引用了不同的出版物、专利和专利申请,其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0511] 本文引用了不同的出版物、专利和专利申请,其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0512] 以下为本发明的一些示例性实施方案:

[0513] 1.一种Pichinde病毒基因组区段,其中基因组区段经改造以在ORF野生型位置以外的位置携带病毒可读框(“ORF”),其中所述Pichinde病毒基因组区段选自:

[0514] (i)S区段,其中编码核蛋白(“NP”)的ORF在Pichinde病毒5'非翻译区(“UTR”)的控制下;

[0515] (ii)S区段,其中编码基质蛋白Z(“Z蛋白”)的ORF在Pichinde病毒5'UTR的控制下;

[0516] (iii)S区段,其中编码RNA依赖性的RNA聚合酶L(“L蛋白”)的ORF在Pichinde病毒5'UTR的控制下;

[0517] (iv)S区段,其中编码病毒糖蛋白(“GP”)的ORF在Pichinde病毒3'UTR的控制下;

[0518] (v)S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒3'UTR的控制下;

[0519] (vi)S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3'UTR的控制下;

[0520] (vii)L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒5'UTR的控制下;

[0521] (viii)L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5'UTR的控制下;

[0522] (ix)L区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5'UTR的控制下;

[0523] (x)L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3'UTR的控制下;

[0524] (xi)L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒3'UTR的控制下;和

[0525] (xii)L区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3'UTR的控制下。

[0526] 2.实施方案1的Pichinde病毒基因组区段,其中所述Pichinde病毒3'UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的3'UTR,且其中所述Pichinde病毒5'UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的5'UTR。

[0527] 3.实施方案1的Pichinde病毒基因组区段的cDNA。

[0528] 4.一种DNA表达载体,其包含实施方案3的cDNA。

[0529] 5.一种宿主细胞,其包含实施方案1的Pichinde病毒基因组区段、实施方案3的cDNA或实施方案4的载体。

[0530] 6.一种Pichinde病毒颗粒,其包含实施方案1的Pichinde病毒基因组区段和第二Pichinde病毒基因组区段使得Pichinde病毒颗粒包含S区段和L区段。

[0531] 7.实施方案6的Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒颗粒是感染性和可复

制型的。

[0532] 8.实施方案6的Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒颗粒的毒性减弱。

[0533] 9.实施方案6的Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能在非补给细胞中进一步产生感染性子代。

[0534] 10.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除或使之功能失活。

[0535] 11.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的至少一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0536] 12.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码GP、NP、Z蛋白和L蛋白的4种ORF的仅仅一种去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0537] 13.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码GP的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0538] 14.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码NP的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0539] 15.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码Z蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0540] 16.实施方案9的Pichinde病毒颗粒,其中将编码L蛋白的ORF去除并用来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF替换。

[0541] 17.实施方案11-16中任一项的Pichinde病毒颗粒,其中所述异源ORF编码报道蛋白。

[0542] 18.实施方案11-16中任一项的Pichinde病毒颗粒,其中所述异源ORF编码来源于感染性生物、肿瘤或变应原的抗原。

[0543] 19.实施方案18的Pichinde病毒颗粒,其中编码抗原的异源ORF选自人免疫缺陷病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、水痘-带状疱疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、结核杆菌抗原、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原(例如肿瘤新抗原和肿瘤新表位)。

[0544] 20.实施方案11-18中任一项的Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒颗粒的生长或感染性不受来自Pichinde病毒以外的生物的异源ORF影响。

[0545] 21.一种产生实施方案1的Pichinde病毒基因组区段的方法,其中所述方法包括使实施方案3的cDNA转录。

[0546] 22.一种产生实施方案6的Pichinde病毒颗粒的方法,其中所述方法包括:

[0547] (i) 使实施方案3的cDNA转染至宿主细胞;

[0548] (ii) 使包含第二Pichinde病毒基因组区段的cDNA的质粒转染至宿主细胞;

[0549] (iii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和

[0550] (iv) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0551] 23.实施方案22的方法,其中L区段和S区段的转录使用双向启动子进行。

[0552] 24.实施方案22的方法,其中所述方法进一步包括使编码Pichinde病毒聚合酶的一个或多个核酸转染至宿主细胞。

[0553] 25.实施方案24的方法,其中所述Pichinde病毒聚合酶是L蛋白。

[0554] 26.实施方案22或24的方法,其中所述方法进一步包括使编码NP蛋白的一个或多

个核酸转染至宿主细胞。

[0555] 27. 实施方案22的方法,其中L区段和S区段的转录各自在选自以下的启动子的控制下:

[0556] (i) RNA聚合酶I启动子;

[0557] (ii) RNA聚合酶II启动子;和

[0558] (iii) T7启动子。

[0559] 28. 一种疫苗,其包含实施方案6-19的Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体。

[0560] 29. 一种药物组合物,其包含实施方案6-19的Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体。

[0561] 30. 实施方案1的Pichinde病毒基因组区段或实施方案6的Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒基因组区段或Pichinde病毒颗粒来源于病毒株Munchique CoAn4763分离株P18或P2毒株。

[0562] 31. 一种包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因1 (RAG1) 且用 10^4 PFU的所述三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后所述三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0563] 32. 实施方案31的三区段Pichinde病毒颗粒,其中两个S区段的区段间重组,使2种Pichinde病毒ORF在仅仅一个而非两个单独的区段上结合,消除了病毒启动子活性。

[0564] 33. 一种包含两个L区段和一个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中在缺乏I型干扰素受体、II型干扰素受体和重组活化基因1 (RAG1) 且用 10^4 PFU的三区段Pichinde病毒颗粒感染的小鼠中在持续感染70天后三区段Pichinde病毒颗粒的增殖不产生可复制型二区段病毒颗粒。

[0565] 34. 实施方案33的三区段Pichinde病毒颗粒,其中两个L区段的区段间重组,使2种Pichinde病毒ORF在仅仅一个而非两个单独的区段上结合,消除了病毒启动子活性。

[0566] 35. 实施方案31的三区段Pichinde病毒颗粒,其中两个S区段之一选自:

[0567] (i) S区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0568] (ii) S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0569] (iii) S区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0570] (iv) S区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0571] (v) S区段,其中编码L的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0572] (vi) S区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0573] 36. 实施方案33的三区段Pichinde病毒颗粒,其中两个L区段之一选自:

[0574] (i) L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0575] (ii) L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0576] (iii) L区段,其中编码L蛋白的ORF在Pichinde病毒5' UTR的控制下;

[0577] (iv) L区段,其中编码GP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;

[0578] (v) L区段,其中编码NP的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下;和

[0579] (vi) L区段,其中编码Z蛋白的ORF在Pichinde病毒3' UTR的控制下。

[0580] 37. 实施方案35或36的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒3' UTR是

Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的3' UTR,且其中所述Pichinde病毒5' UTR是Pichinde病毒S区段或Pichinde病毒L区段的5' UTR。

[0581] 38.实施方案31的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述两个S区段包含(i)来自Pichinde病毒以外的生物的一种或两种异源ORF;或(ii)一种或两种重复的Pichinde病毒ORF;或(iii)来自Pichinde病毒以外的生物的一种异源ORF和一种重复的Pichinde病毒ORF。

[0582] 39.实施方案33的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述两个L区段包含(i)来自Pichinde病毒以外的生物的一种或两种异源ORF;或(ii)两种重复的Pichinde病毒ORF;或(iii)来自Pichinde病毒以外的生物的一种异源ORF和一种重复的Pichinde病毒ORF。

[0583] 40.实施方案38或39的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述异源ORF编码来源于感染性生物、肿瘤或变应原的抗原。

[0584] 41.实施方案40的三区段Pichinde病毒颗粒,其中编码抗原的异源ORF选自人免疫缺陷病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、水痘-带状疱疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、结核杆菌抗原、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原(例如肿瘤新抗原和肿瘤新表位)。

[0585] 42.实施方案38或39的三区段Pichinde病毒颗粒,其中至少一种异源ORF编码荧光蛋白。

[0586] 43.实施方案42的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白。

[0587] 44.实施方案31-41中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒包含所有4种Pichinde病毒ORF,且其中所述三区段Pichinde病毒颗粒是感染性和可复制型的。

[0588] 45.实施方案31-43中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒缺乏4种Pichinde病毒ORF的一种或多种,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能够在非补给细胞中进一步产生感染性子代。

[0589] 46.实施方案31-43中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒缺乏4种Pichinde病毒ORF之一,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒是感染性的但不能够在非补给细胞中进一步产生感染性子代。

[0590] 47.实施方案44或45的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒缺乏GP ORF。

[0591] 48.一种包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中第一S区段经改造携带在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码GP的ORF和在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码第一目标基因的ORF,第二S区段经改造携带在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码NP的ORF和在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码第二目标基因的ORF。

[0592] 49.一种包含一个L区段和两个S区段的三区段Pichinde病毒颗粒,其中第一S区段经改造携带在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码GP的ORF和在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码第一目标基因的ORF,第二S区段经改造携带在Pichinde病毒5' UTR控制下的位置中的编码NP的ORF和在Pichinde病毒3' UTR控制下的位置中的编码第二目标基因的ORF。

[0593] 50. 实施方案48或49的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述目标基因编码来源于感染性生物、肿瘤或变应原的抗原。

[0594] 51. 实施方案50的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述目标基因编码选自以下的抗原:人免疫缺陷病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、水痘-带状疱疹病毒抗原、巨细胞病毒抗原、结核杆菌抗原、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原(例如肿瘤新抗原和肿瘤新表位)。

[0595] 52. 实施方案48或49的三区段Pichinde病毒颗粒,其中至少一个目标基因编码荧光蛋白。

[0596] 53. 实施方案52的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白或红色荧光蛋白。

[0597] 54. 实施方案31、33、35、36、48或49中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒基因组的cDNA。

[0598] 55. 一种DNA表达载体,其包含实施方案54的cDNA。

[0599] 56. 一种宿主细胞,其包含实施方案31或33的三区段Pichinde病毒颗粒、实施方案54的cDNA或实施方案55的载体。

[0600] 57. 实施方案31-49中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒的毒性减弱。

[0601] 58. 一种产生实施方案31的三区段Pichinde病毒颗粒的方法,其中所述方法包括:

[0602] (i) 使L区段和两个S区段的一个或多个cDNA转染至宿主细胞;

[0603] (ii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和

[0604] (iii) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0605] 59. 一种产生实施方案33的三区段Pichinde病毒颗粒的方法,其中所述方法包括:

[0606] (i) 使两个L区段和一个S区段的一个或多个cDNA转染至宿主细胞;

[0607] (ii) 将宿主细胞保持在适于病毒形成的条件下;和

[0608] (iii) 收获Pichinde病毒颗粒。

[0609] 60. 实施方案58的方法,其中一个L区段和两个S区段的转录使用双向启动子进行。

[0610] 61. 实施方案59的方法,其中两个L区段和一个S区段的转录使用双向启动子进行。

[0611] 62. 实施方案58或59的方法,其中所述方法进一步包括使编码Pichinde病毒聚合酶的一个或多个核酸转染至宿主细胞。

[0612] 63. 实施方案62的方法,其中所述Pichinde病毒聚合酶是L蛋白。

[0613] 64. 实施方案58、59、60或61的方法,其中所述方法进一步包括使编码NP蛋白的一个或多个核酸转染至宿主细胞。

[0614] 65. 实施方案58的方法,其中所述L区段和两个S区段的转录各自在选自以下的启动子的控制下:

[0615] (i) RNA聚合酶I启动子;

[0616] (ii) RNA聚合酶II启动子;和

[0617] (iii) T7启动子。

[0618] 66. 实施方案59的方法,其中两个L区段和S区段的转录各自在选自以下的启动子的控制下:

[0619] (i) RNA聚合酶I启动子;

[0620] (ii)RNA聚合酶II启动子;和

[0621] (iii)T7启动子。

[0622] 67.实施方案31-49中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒具有与二区段Pichinde病毒颗粒一样的向性。

[0623] 68.实施方案31-49中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述三区段Pichinde病毒颗粒是复制缺陷型的。

[0624] 69.一种疫苗,其包含实施方案31-49、67或68中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体。

[0625] 70.一种药物组合物,其包含实施方案31-49、67或68中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒和药学上可接受的载体。

[0626] 71.实施方案31-49、67或68中任一项的三区段Pichinde病毒颗粒,其中所述Pichinde病毒是病毒株Munchique CoAn4763分离株P18或P2毒株。

[0627] 7.序列表

[0628]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|---|
| 1 | PIC-S: Pichinde 病毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号 EF529746.1)区段 S, 全序列。基因组区段 | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa agatgggaca agttgtgact ttgatccagt ctatacccca agtcctgcag gaggtcttca atgtgcctt aatcattgtc tcaaccctat gcatcatcaa aggatttgtc aatctgatga gatgtggcct attccaactc atcaccttcc tcattttggc |

[0629]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---|--|
| | 是 RNA, SEQ ID NO: 1 的序列显示 DNA; 然而, 把 SEQ ID NO:1 中的所有胸苷(“T”)换成尿苷(“U”)得到 RNA 序列。 | tggcagaagt tgtgatggca tgatgattga taggaggcac aatctcaccc acgttgagtt caacctcaca agaatgtttg acaacttgcc acaatcatgt agcaagaaca acacacatca ttactacaaa ggaccatcta acacaacatg gggaattgaa ctcactttga caaacacatc cattgcaaat gaaactactg gaaacttttc caacatcaga agccttgcac atggtaacat tagtaattgt gataagacag aagaagcagg tcacacatta aaatggttgc ttaatgagtt acacttcaat gtgctccatg tcactcgtca tgtaggtgcc agatgcaaaa cagttgaggg tgctgggggtg ttgatccagt acaacttgac agttggggat agaggaggtg aggttggcag acatcttatt gcgtcgttg ctcaaatcat tggggaccca aaaattgcgt gggttggaaa atgtttcaat aactgtagtg gagggtcttg cagactaaca aactgtgaag gtgggacaca ttacaatttc ctgatcatac agaacaccac atgggaaaat cactgtacat atactccaat ggcaacaata aggatggctc tccaaaaaac tgcttatagt tctgtgagca ggaaactcct tggctttttc acttgggact tgagtgaactc tactgggcaa catgtcccag gtggttactg tttggagcaa tgggctattg tttgggctgg aataaaatgt tttgataaca ctgtgatggc aaaatgcaac aaagatcaca atgaagaatt ttgcgatacg atgaggttat ttgatttcaa tcagaatgct atcaaaacct tacaacttaa tgttgagaat tcgttgaatc tctttaaaaa gactatcaac ggacttattt ctgactcact tgtgattaga aacagtctca aacagcttgc caaaatccct tattgcaact atacaaaatt ttggtacatc aatgatacca tcacaggaag acattcttta ccgcagtgtt ggtagttca caatggctcg tacctcaatg aaacgcattt |

[0630]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | taagaatgat tggttgtggg agagccagaa tctgtacaat gaaatgctga taaaagaata tgaagaaaga caaggtaaga ctccactagc attgacagac atttgcttct ggtctttggt gttttacacc atcacagtgt ttctccactt agttggaata cccactcata ggcacatcat tggtgatggc tgtccgaagc cacataggat tactaggaac tctctttgca gctgtgggta ttataaaaac ccaaagaaac cctacaaatg ggtgagactg ggtaaataag ccctagcctc gacatgggcc tcgacgtcac tccccaatag gggagtgacg tcgaggcctc tgaggacttg agctcagagg ttgatcagat ctgtgttggt cctgtacagc gtgtcaatag gcaagcatct catcgcttc tggtcctaa cccagcctgt cactgttgca tcaaacatga tggatatcaag caatgcacag tgaggattcg cagtggtttg tgcagcccc ttcttcttct tctttatgac caaaccttta tgtttggtgc agagtagatt gtatctctcc cagatctcat cctcaaaggt gcgtgcttgc tcggcactga gtttcacgtc aagcactttt aagtctcttc tcccatgcat ttcgaacaaa ctgattatat catctgaacc ttgagcagtg aaaaccatgt tttgaggtaa atgtctgatg attgaggaaa tcaggcctgg ttgggcatca gccaagtcct ttaaaagaag accatgtgag tacttgcttt gctctttgaa ggacttctca tcgtggggaa atctgtaaca atgtatgtag ttgcccggtg caggctggta gatggccatt tccaccgat catttggtgt tccttcaatg tcaatccatg tggtagcttt tgaatcaagc atctgaattg aggacacaac agtgctctct ttctccttag ggatttggtt aaggtecggt gatcctccgt ttcttactgg tggttgata gcactcggtc tcgaatctaa atctacagtg gtgttatecc aagccctccc |

[0631]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----------------------|---|
| | | ttgaacttga gaccttgagc caatgtaagg ccaaccatcc cctgaaagac aaatcttgta tagtaaattt tcataaggat ttctctgtcc ggggtgtagtg ctcacaaaca taccttcacg attcttttatt tgcaatagac tctttatgag agtactaaac atagaaggct tcacctggat ggtctcaage atattgccac catcaatcat gcaagcagct gctttgactg ctgcagacaa actgagattg taccctgaga tgtttatggc tgatggctca ttactaatga tttttagggc actgtgttgc tgtgtgagtt tctctagatc tgtcatgttc gggaacttga cagtgtagag caaaccaagt gcactcagcg cttggacaac atcattaagt tgttcacccc cttgctcagt catacaagcg atggttaagg ctggcattga tccaaattga ttgatcaaca atgtattatc cttgatgtcc cagatcttca caaccccatc tctgttgcct gtgggtctag cattagcgaa ccccatlgag cgaaggattt cggctctttg ttccaactga gtgtttgtga gattgcccc ataaacacca ggctgagaca aactctcagt tctagtgact ttctttctta acttgtecaa atcagatgca agctccatta gctcctcttt ggctaagect cccaccttaa gcacattgtc cctctggatt gatctcatat tcatcagagc atcaacctct ttgttcatgt ctcttaactt ggtcagatca gaatcagtcc ttttatcttt gcgcatcatt ctttgaactt gagcaacttt gtgaaagtca agagcagata acagtgtctt tgtgtccgac aacacatcag ctttcacagg atgggtccag ttggatagac ccctcctaag ggactgtacc cagcggaatg atgggatgtt gtcagacatt ttggggttgt ttgcacttcc tccgagtcag tgaagaagtg aacgtacagc gtgatctaga atcgctagg atccactgtg cg |
| 2 | PIC-L-seg : Pichinde | gcgcaccggg gatcctagge atctttgggt |

[0632]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|--|
| | 病毒毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号 EF529747.1) 区段 L, 具有引入以剔除 BsmBI 限制位点的非编码突变的全序列。基因组区段是 RNA; 然而, 将 SEQ ID NO:4 中的所有胸苷(“T”)换成尿苷(“U”)得到 RNA 序列。 | cacgcttcaa atttgtccaa tttgaaccca gctcaagtcc tgggtcaaaac ttgggatggg actcagatat agcaaagagg tcaggaagag acatggcgac gaagatgtgg tgggaagggt ccccatgacc ctcaatctac cacagggcct gtatggcagg ttcaactgca aatcttgctg gttcgtcaac aaaggtctca tcaggtgcaa agaccactat ctgtgtcttg ggtgcttaac caaaatgcac tccagaggca atctctgcga gatatgcggc cactcactgc caaccaagat ggagtcccta gaaagcccct ctgcaccacc ctacgagcca taaaccaggg cccctgggcg cacccccctc cgggggtgcg cccggggggc cccgccccca tggggccggt tgtttactcg atctccactg actcattgtc ctcaaacaac tttcgacacc tgattccctt gatcttgaag ggtcctgtct cgtctgcaat cataacagat cctagagtct tacttcttat tataactaaag tgaccacaat tcaaccaatc tttggcatca tgcaacatgt gttcaaacac ttcggggaaa ttttcaatca tgagtcttaa atcctgctcg ttcatactta ttcccttggt gtgagactgt gcacttgaaa ggtactgaaa aaggttggca ataaatcttg gccttttctc aggttctaata gcttccagtgc caatgatgac cacctttgag tctaagttca ctccaatct agaaaccact ctgttgccct ctttgatcaa cccaccctct aaaatgaggg gttgcatccc aacatcagga ccaatcaact tataggaaaa tttgtttttc aaatccttga aacgattttt caaatctatt ctcaccttct ggaacacagt tgaccttgac ttgaagtga tgtcttgacc ttccaataga tcattgaagt ctagaacatc ttttcggttg atgagaggat tcagaaccaa aagtgcacac ccatccagac ttatgtgatt cccggaagat tgagaaacat aatactcaac agaatggggg |

[0633]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | ttcaacaata ggtaaccatc agagtccaat gagtccagca atgactccct ttcaataaga aatcttaatt ttaatatgta attggtagac ctctcatatc taaatttgtg gtcactctc ttatgagaaa atgttaggtt gagtcaatg ggaatgacct cagaaggtga tgctaaaatg agttgttcaa tgttctcata gttatctcta ttcacccagt caagttcatt aataaataca ctaatgttca aattaacaca ggacaaaatc agtttgctgc ttacaaagcc aacatccaag tcatccagat tcattgtcct agaagtgtta ttctttttgc agtcacaaat gaactgggtt aattgtttca gatcatgttg tgcattgttt ggcaacaatt caagctcacc aaaccaaaaa tatttcttga actgagatgt tgacataatc acaggcacca acattgactc aaacaaaatc tgtatcaaga aatttgtgca cacttcttct ggttcaaggt tgaatcctct ctccagtgga tgagactctc tgctatggga cattgcaagc tcatttttgc ttacaatata caattcttct ctgcgatgtt ttataatatg actaacaata ccaagacatt ctgatgttat atcaattgcc acacaaaggt ctaagaactt tatectctga acccatgata gcctcagcat attcaaatca gacaggaaag gggatatgtg ttcatcaaat agtgtaggga agttcctcct gattgagtaa agtatgtggt tgatgcccac cttgtcctca agctcagaat gtgtgcttgg ttttattggc cagaagtgat tgggattgtt taggtgagtg actatcttgg gtacttcagc tttttgaaac acccagttac ccaactcgca agcatttggtt aacacaagag caaaataatc ccaaattaag ggtctggagt actcacttac ttcaccaagt gctgctttac aataaacacc tttgcgctga ttacaaaagt gacaatcacg gtgtaagata atcttgcttg taatatecct gatatactta |

[0634]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | aatcctcctt tcccatctct tacacatttt gagcccatatc ttttgcaaac tcctatgaat cctgatgcta tgctgctctg aaaagctgat ttgttgatag catcagccaa aatcttctta gccccctctga catagtctct tgataatttg gactgtacgg atttgacaag actgggtatt tcttctcgct gcacagttct tgttgctctc attaacttag tacgaagcac caatctgaga tcaccatgaa cccttaaatt taaccaccta atattaagag catcctcaat agcctcagtc tcgacatcac aagtctctaa taactgtttt aagcagtcac cgggtgattg ctgaagagtt gttacaatat aactttcttc cagggtccca gactgtattt tgtaaaatat tttcctgcat gcctttctga ttattgaaag tagcagatca tcaggaaata gtgtctcaat tgatcgctga agtctgtacc ctctcgaccc attaacccaa tcgagtacat ccatttcttc caggcacaaa aatggatcat ttggaaaccc actatagatt atcatgctat ttgttcgttt tgcaatggcc cctacaacct ctattgacac cccgttagca acacattggc ccagtattgt gtcaattgta tctgcttgct gattgggtgc tttagccttt atgttggtga gagctgcagc aacaaacttt gtaaggaggg ggacttcttg tgaccaaatg aagaatctcg atttgaactc acttgcaaag gtccccacaa ctgttttagg gtcacaaac ttgttgagtt tgtctgatag aaagtagtga aactccatac agtccaatac caattcaaca ttcaactcat ctctgtcctt aaatttgaaa ccctcattca aggataacat gatctcatca tcactcgaag tatatgagat gaaccgtgct ccataacaaa gctccaatgc gtaattgatg aactgctcag tgattagacc atataagtca gaggtgttgt gtaggatgcc ctgaccata tctaagactg aagagatgtg tgatggtacc |

[0635]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | ttgcccttct caaagtaccc aaacataaat tcctctgcaa ttgtgcaccc ccctttatcc atcataccca accccctttt caagaaacct ttcattgtatg cctcaacgac attgaagggc acttccacca tcttgtgaat gtgccatagc aatatgttga tgactgcagc attgggaact tctgacccat ctttgagttt gaactcaaga ccttttaata atgcggcaaa gataaccggc gacatgtgtg gccccattt tgaatggtcc attgacaccg caagaccact ttgcctaaca actgacttca tgtctaataa tgctctctca aactctttct cgttgttcag acaagtatac ctcatgtttt gcataaggga ttcagagtaa tcctcaatga gtctggttgt gagtttagta tttaaatcac cgacataaag ctccctgttg ccaccacct gttctttata agaaagacca aatttcaatc tccctacatt ggtggataca ccagacctct ctgtgggaga ctcatctgaa tagaaacaga gatttcgtaa ggatgagttg gtaaaaaagc tttgatccaa tcttttagct atcgattcag aattgctctc tcttgagctt atacgtgatg tctctctaat ttgtagtgtc gcatctgtga acccaagtct gcttctactt ttgtgatcat atcttccgac tcgattatca taatcgcttg caatgagaat gtatttaaag cactcaaaat aatcagcttc tttgtacgcc ttcaatgtga ggttctttat taaaaactcc agaggacacg gattcattag tctgtctgca aagtacactg atctagcagt gacatctca tagatcaagt ttacaagatc ctcatacact tctgctgaaa acaggctgta atcaaaatcc tttacatcat gaagtgaagt ctctcttttg atgacaacca ttgtcgattt gggccataat ctctctagtg gacatgaagt ctttaaggttg gttttgacat tgggtgtcaac cttagacaat acttttgcaa ctctgggtctc aatttcttta |

[0636]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | agacagtcac cctgatcttc tgatagtaac tcttcaactc catcaggctc tattgactcc ttttttattt ggatcaatga tgacaacctc ttcagaatct tgaaatttac ctcttttgga tctaacttgt atttaccctt agttttgaaa tgttcaatca tttccacaac aacagcagac acaatggaag agtaatcata ttcagtgatg acctcaccaa cttcattgag ttttggaacc accacacttt tgttgctgga catatccaag gctgtacttg tgaaggaggg agtcataggg tcacaaggaa gcagggttt cacttccaat gagctactgt taaatagtga tagacaaaca ctaagtacat ccttattcaa ccccggcctt ccctcacatt tggattccag ctttttacca agtagtctct ctatatcatg caccatcttc tcttcttctt cagtaggaag ttccatacta ttagaagggt tgaccaagac tgaatcaaac ttttaactttg gttccaagaa cttctcaaaa catttgattt gatcagttaa tctatcaggg gtttcttttg ttataaaatg gcataaatag gagacattca aaacaaactt aaagatctta gccatatctt cctctctgga gttgctgagt accagaagta tcaaatcatc aataagcatt gctgtctgcc attctgaagg tgtagcata acgactttca atttctcaaa caattcttta aaatgaactt catttacaaa ggccataatg taatatctaa agccttgcaa gtaaacttga atacgcttgg aagggttgca cagtatgcag agaataagtc gtctgagtaa atcagaaaca gaatccaaga ggggttgga cataaagtc aaccaggata acatctccac acaagtcctt tgaatcacat ctgcactaaa gatcggtgag aaaaatctct tgggatcaca gtaaaaagac gcttttggtt catacaaacc cccacttttg gatctataag caacagcata acacctggac ctctcccttg tcttctggta cagtagtgtg |

[0637]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | agagaacctc cttctccaaa tcgctggaag aaaacttcgt cacagtaaac ctteccataa aactcatcag cattgttcac cttcatctta ggaactgctg ctgtcttcat gctattaatg agtgacaaac tcaaacttga caatgttttc agcaattcct caaactcact ttcgccccatg atggtataat caggctgccc tcttcctggc ctacccccac acatacactg tgactttgtc ttgtattgaa gacagggttt agcaccccat tcatctaaca ctgatgtttt cagattgaag taatattcaa catcaggttc ccgtagaaga gggagaatgt catcaagggg aagttcacca cagaccgagc tcagtctctt cttagccttc tctaaccagt tggggttttt aatgaatttt ttagtgattt gttccatcag gaagtcgaca ttaatcaacc tgtcatttac agacggtaac ccttgcattha ggagcacctc tctgaacaca gcacctggag aagacttgtc caagtcacac aaaatgttgt acatgataag gtccagaacc aacatggtgt tcctccttgt gttaaaaacc ttttgagact taattttgtt gcatattgaa agtactctaa aatattctct gctttcagtt gatgaatgct tgacctcaga ttgcctgagt tggcctatta tgcccaaaat gtgtactgag caaaactcac ataatctgat ttctgattta ggtacatctt tgacagaaca ttggataaat tcatggttct gaagtctaga aatcatatct tccttatctg tagcctgcag ttccctatcg agttgaccag caagttgcaa cattttaaat tgctgaaaga tttccatgat tttgtttcta cattgatctg ttgtcagttt attattaatg ccagacatta atgccttttc caacctcact ttgtaaggaa gtcccctttc ctttacagca agtagtgact ccagaccgag actctgattt tctaaggatg agagggaact tataaggcgt tcgtactcca actcctcaac ttcttcacca |

[0638]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|---|
| | | gatgtcetta atccatccat gagttttaaa agcaaccacc gaagtctctc taccacccaa tcaggaacaa attctacata ataactggat ctaccgtcaa taacaggtac taaggttatg ttctgtctct tgagatcaga actaagctgc aacagcttca aaaagtctct gttgtatttc ttctcaaatg cttcttgact ggtcctcaca aacacttcca aaagaatgag gacatctcca accatacagt aaccatctgg tgtaacatcc ggcaatgtag gacatgttac tctcaactcc ctaaggatag cattgacagt catctttgtg ttgtgtttgc aggagtgttt cttgcatgaa tccacttcca ctagcatgga caaaagcttc aggccctcta tcgtgatggc cctatctttg acttgtgcaa gaacgttggt tttctgttca gatagctctt cccattcggg aaccattttt ctgactatgt ctttaagtgc gaaaacgtat tctccatga tcaagaaatg cctaggatcc tcggtgcg |
| 3 | LABsmBI : Pichinde 病毒毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号 EF529747.1)的 L ORF 的代表性 cDNA, 其中 引入非编码突变以去 除 BsmBI 限制位点。 ORF 还含有邻接 BsmBI (bold) 以及 EcoRI (大写字母)和 NheI (大写字母和斜 体字)限制位点。 | GAATTC cgtc tct gatcatg gaggaatacg ttttcgaact taaagacata gtcagaaaat gggttcccga atgggaagag ctatctgaac agaaaaacaa cgttcttgca caagtcaaag atagggccat cacgatagag ggctgaagc ttttgtccat gctagtggaa gtggattcat gcaagaaaca ctctgcaaa cacaacacaa agatgactgt caatgctatc cttaggaggt tgagagtaac atgtcctaca ttgccgatg ttacaccaga tggttactgt atggttggag atgtcctcat tcttttgga gtgtttgtga ggaccagtca agaagcattt gagaagaaat acaaccagga ctttttgaag ctgttgcagc ttagttctga tctcaagaga cagaacataa ccttagtacc tgttattgac ggtagatcca gttattatgt agaatttggt cctgattggg |

[0639]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | tggtagagag acttcggtgg ttgcttttaa aactcatgga tggattaagg acatctggtg aagaagttga ggagttggag tacgaacgcc ttataagttc cctctcatcc ttagaaaatc agagtctcgg tctggagtca ctacttgctg taaaggaaag gggacttcct taaaaagtga ggttggaaaa ggcattaatg tctggcatta ataataaact gacaacagat caatgtagaa caaaaatcat ggaaatcttt cagcaattta aaatgttgca acttgctggt caactcgata ggaaactgca ggctacagat agggaagata tgatttctag acttcagaac catgaattta tccaatgttc tgtcaaagat gtacctaaat cagaaatcag attatgtgag ttttgctcag tacacatttt gggcataata ggccaactca ggcaatctga ggtcaagcat tcatcaactg aaagcagaga atatttttaga gtactttcaa tatgcaacaa aattaagtct caaaaggttt ttaacacaag gaggaacacc atgttggttc tggaccttat catgtacaac attttgtgtg acttggacaa gtcttctcca ggtgctgtgt tcagagaggt gtcctaata caagggttac cgtctgtaaa tgacaggttg attaatgtcg acttccatgat ggaacaaatc actaaaaaat tcattaaaaa cccaactgg ttagagaagg ctaagaagag actgagctcg gtctgtggtg aacttcccc tcatgacatt ctccctcttc tacgggaacc tgatgttgaa tattacttca atctgaaaac atcagtgtta gatgaatggg gtgctaaacc ctgtcttcaa tacaagacaa agtcacagtg tatgtgtggg ggtaggccag gaagagggca gcctgattat accatcatgg gcgaaagtga gtttgaggaa ttgctgaaaa cattgtcaag tttgagtttg tcaactcatta atagcatgaa gacagcagca gttcctaaga tgaaggtgaa caatgctgat gagttttatg |

[0640]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | ggaaggttta ctgtgacgaa gttttcttcc agcgatttgg agaaggaggt tctctcacac tactgtacca gaagacaggg gagaggtcca ggtgttatgc tgttgcttat agatccaaaa gtgggggttt gtatgaaaca aaagcgtctt tttactgtga tcccaagaga tttttcttac cgatctttag tgcagatgtg attcaaagga cttgtgtgga gatgttatcc tggttggact ttatgtccca acccctcttg gattctgttt ctgatttact cagacgactt attctctgca tactgtgcac cccttccaag cgtattcaag tttacttgca aggctttaga tattacatta tggcctttgt aaatgaagtt cattttaaag aattgtttga gaaattgaaa gtcgttatgc taacaccttc agaatggcag acagcaatgc ttattgatga ttgatactt ctggtactca gcaactccag agaggaagat atggctaaga tctttaagtt tgttttgaat gtctcctatt tatgccattt tataacccaa gaaacccttg atagattaac tgatcaaatc aaatgttttg agaagttcct ggaaccaaag ttaaagtttg attcagtcctt ggtcaaccct tctaatagta tggaacttcc tactgaggaa gaagagaaga tggtgcatga tatagagaga ctacttggtta aaaagctgga atccaaatgt gagggaaggc cggggttgaa taaggatgta cttagtgttt gtctatcact atttaacagt agctcattgg aagtgaacc cctgcttcct tgtgacccta tgactccctc cttcacaagt acagccttgg atatgtccag caacaaaagt gtggtggttc caaaactcaa tgaagttggt gaggtcatca ctgaatatga ttactcttcc attgtgtctg ctgttggttg ggaaatgatt gaacatttca aaactaaggg taaatacaag ttagatccaa aggaggtaaa tttcaagatt ctgaagaggt tgtcatcatt gatccaaata aaaaaggagt |

[0641]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | caatagagcc tgatggagtt gaagagttac tatcagaaga tcagggtgac tgtcttaaag aaattgagac cagagttgca aaagtattgt ctaaggttga caccaatgtc aaaaccaacc ttaagacttc atgtccacta gagagattat ggcccaaadc gacaatgggt gtcacaaaa gagagacttc acttcattgat gtaaaggatt ttgattacag cctgttttca gcagaagtgt atgaggatct tgtaaacttg atctatgagg atgtcactgc tagatcagtg tactttgcag acagactaat gaatccgtgt cctctggagt ttttaataaa gaacctcaca ttgaaggcgt acaaagaagc tgattatttt gaggcttta aatacattct cattgcaagc gattatgata atcgagtcgg aagatatgat cacaaaagta gaagcagact tgggttcaca gatgcagcac tacaaattag agagacatca cgtataagct caagagagag caattctgaa tcgatagcta aaagattgga tcaaagcttt ttaccaact catccttacg aaatctctgt ttctattcag atgagtcctc cacagagagg tctggtgtat ccaccaatgt agggagattg aaatttggtc tttcttataa agaacagggt ggtggcaaca gggagcttta tgcgggtgat ttaaatacta aactcacaac cagactcatt gaggattact ctgaatccct tatgcaaac atgaggtata cttgtctgaa caacgagaaa gaggttgaga gagcattatt agacatgaag tcagttgtta ggcaaagtgg tcttgcgggt tcaatggacc attcaaatg ggggccacac atgtcgccgg ttatctttgc cgcattatta aaaggtcttg agttcaaact caaagatggg tcagaagttc ccaatgctgc agtcacaaac atattgctat ggcacattca caagatgggt gaagtgcctt tcaatgtcgt tgaggcatac atgaaaggtt tcttgaaaag ggggttgggt atgatggata |

[0642]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | aaggggggtg cacaattgca gaggaattta tgtttggtta ctttgagaag ggcaaggtag catcacacat ctcttcagtc ttagatatgg gtcagggcat cctacacaac acctctgact tatatggtct aatcactgag cagttcatca attacgcatt ggagctttgt tatggagcac ggttcattct atatacttcg agtgatgatg agatcatggt atccttgaat gagggtttca aatttaagga cagagatgag ttgaatgttg aattggtatt ggactgtatg gagtttctact actttctatc agacaaactc aacaagtttg tgagccctaa aacagttgtg gggaccttg caagtgagtt caaatcgaga ttcttcattt ggtcacaaga agtccccctc cttacaaagt ttgttgctgc agctctacac aacataaagg ctaaagcacc caatcagcaa gcagatacaa ttgacacaat actggacca tgtgttgcta acgggggtgc aatagagggt gtaggggccca ttgcaaaacg aacaaatagc atgataatct atagtgggtt tccaaatgat ccatttttgt gcctggaaga aatggatgta ctcgattggg ttaatgggtc gagagggtac agacttcagc gatcaattga gacactattt cctgatgac tgctactttc aataatcaga aaggcatgca ggaaaatatt ttacaaaata cagtctggag ccctggaaga aagttatatt gtaacaactc ttcagcaatc accggatgac tgcttaaaac agttattaga gacttgtgat gtcgagactg aggctattga ggatgctctt aatattaggt ggttaaattt aagggttcat ggtgatctca gattggtgct tcgtactaag ttaatgagca caacaagaac tgtgcagcga gaagaaatac ccagtcttgt caaatccgta cagtccaaat tatcaaagaa ctatgtcaga ggggctaaga agattttggc tgatgctatc aacaaatcag cttttcagag cagcatagca tcaggattca |

[0643]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | taggagtttg caaaagtatg ggctcaaaat gtgtaagaga tgggaaagga ggatttaagt atatcaggga tattacaagc aagattatct tacaccgtga ttgtcacttt tgtaatcagc gcaaaggtgt ttattgtaaa gcagcacttg gtgaagtaag tgagtactcc agacccttaa tttgggatta ttttgctctt gtgttaacca atgcttgcga gttgggtaac tgggtgtttc aaaaagctga agtacccaag atagtcactc acctaacaac tcccaatcac ttctggccaa taaaaccaag cacacattct gagcttgagg acaaggtggg catcaaccac atactttact caatcaggag gaacttccct acactatttg atgaacacat atcccctttc ctgtctgatt tgaatatgct gaggtatca tgggttcaga ggataaagtt cttagacctt tgtgtggcaa ttgatataac atcagaatgt cttggtattg ttagtcatat tataaaacat cgcagagaag aattgtatat tgtaaagcaa aatgagcttg caatgtccca tagcagagag tctcatccac tgagagagg attcaacctt gaaccagaag aagtgtgcac aaatttcttg atacagattt tgtttgagtc aatgttggtg cctgtgatta tgtcaacatc tcagttcaag aaatattttt ggtttggtga gcttgaattg ttgccaaaca atgcacaaca tgatctgaaa caattaaccc agttcatttg tgactgcaa aagaataaca cttctaggac aatgaatctg gatgacttgg atgttggtt tgtaagcagc aaactgattt tgtcctgtgt taatttgaac attagtgtat ttattaatga acttgactgg gtgaatagag ataactatga gaacattgaa caactcattt tagcatcacc ttctgaggtc attccattg agctcaacct aacattttct cataagagag tgagccacaa atttagatat gagaggtcta ccaattacat attaaaatta agatttctta |

[0644]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---|---|
| | | ttgaaaggga gtcattgctg gactcattgg actctgatgg ttacctattg ttgaaccccc attctgttga gtattatgtt tctcaatctt ccgggaatca cataagtctg gatgggtgtg cacttttggg tctgaatcct ctcatcaacg gaaaagatgt tctagacttc aatgatctat tggaaggtca agacattcac ttcaagtcaa ggtcaactgt gttccagaag gtgagaatag atttgaaaaa tcgtttcaag gatttgaaaa acaaattttc ctataagttg attggctctg atgttgggat gcaaccctc attttagagg gtgggttgat caaagagggc aacagagtgg tttctagatt ggaagtgaac ttagactcaa aggtgggtcat cattgcactg gaagcattag aacctgagaa aaggccaaga tttattgcc acctttttca gtacctttca agtgcacagt ctcaacaaca gggaataagt atgaacgagc aggatttaag actcatgatt gaaaatttcc ccgaagtgtt tgaacacatg ttgcatgatg ccaaagattg gttgaattgt ggtcacttta gtataataag aagtaagact ctaggatctg ttatgattgc agacgagaca ggacccttca agatcaaggg aatcaggtgt cgaaagtgtg ttgaggacaa tgagtcagtg gagatcgagt aaacaa agag acgGCTAGC |
| 4 | PIC-L-GFP-Bsm : Pichinde 病毒毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号 EF529747.1)的 修饰 L 区段的代表性 cDNA, 其中 L ORF 被剔除并用每侧具有 邻接 BsmBI 位点(粗体 字)的 GFP ORF 置换。 | gcgcaccgag gatcctaggc atttcttgat cagagacgat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtgggtgcc atcctggteg agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgcctt ggcccaccct cgtgaccacc ttgacctacg gcgtgcagtg cttcgteccg tacccegacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca |

[0645]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---|---|
| | | ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcaca gctggagtac aactacaaca gccacaaggt ctatatcacc gccgacaagc agaagaacgg catcaagggtg aacttcaaga cccgccaca catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccatcgccga cggccccgtg ctgctgccc acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag aagcgcgac acatggctct gctggagttc gtgaccgccg cgggatcac tctcgcatg gacgagctgt acaagtaacg tctct acaac cggccccatg gggccggggg cccccgggcg ccccccgga gggggggtgcg ccagggggcc ctggtttatg gctcgtaggg tgggtgcagag gggctttcta ggaactccat cttggttggc agtgagtggc cgcatatctc gcagagattg cctctggagt gcattttggt taagcaccca agacacagat agtgtcttt gcacctgatg agacctttgt tgacgaacca gcaagatttg cagttgaacc tgccatacag gccctgtggt agattgaggg tcatggggac cttcccacc acatcttcgt cgccatgtct ctctctgacc tctttgctat atctgagtcc catcccaagt tttgaccagg acttgagctg ggttcaaatt ggacaaattt gaagcgtgac ccaaagatgc ctaggatccc cgggtgcg |
| 5 | PIC-miniS-GFP : Pichinde 病毒毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号: EF529746.1) 的修饰的 S 区段 | gcgcaccggg gatcctagge ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa ag agagacga ggcct cgtct ct gccctagc ctcgacatgg gcctcgacgt cactcccaaa taggggagtg acgtcgaggc ctctgaggac ttgagcatgt cttctt actt gtacagctcg tccatgccga |

[0646]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---|---|
| | cDNA 的代表性 cDNA, 其中 GP ORF 被两个 BsmBI 限制位点(粗体字)替换, NP ORF 被具有两个邻接 BbsI 限制位点(斜体字)的 GFP 替换。 | gagtgatecc ggcggcgggc acgaactcca gcaggaccat gtgatcgccg ttctcgttgg ggtctttgct cagggcgagc tgggtgctca ggtagtggtt gtcgggcagc agcacggggc cgtcgccgat gggggtgttc tgctggtagt ggtcggcgag ctgcacgctg ccgtcctcga tgttgtagcg ggtcttgaag ttcaccttga tgccgttctt ctgcttgctg gcggtgatata agaccttggt gctgttgtag ttgtactcca gcttggtgcc caggatgttg ccgtcctcct tgaagtcgat gcccttcagc tcgatgcggt tcaccagggt gtcgccctcg aacttcacct cggcgcgggg cttgtagttg ccgtcgtcct tgaagaagat ggtgcgctcc tggacgtagc cttegggcac ggcggaactg aagaagtcgt gctgcttcat gtggtcgggg tagcggacga agcactgcac gccgtaggtc aaggtggtca cgagggtggg ccagggcacg ggcagcttgc cgggtggtgca gatgaacttc agggtcagct tgccgtaggt ggcatcgccc tcgccctcgc cggacacgct gaacttgtag ccgtttacgt cgccgtccag ctgcaccagg atgggcacca ccccggtgaa cagctcctcg cccttgctca ccatgaagac attttggggg tgtttgcaact tcctccgagt cagtgaagaa gtgaacgtac agcgtgatct agaatcgcc aggatccact gtgcg |
| 6 | NPΔBbsI: Pichinde 病毒毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号 EF529747.1)的修饰的 NP ORF 的代表性 cDNA, 其中引入非编码突变以剔除两个 | GAATTCgaag acatcaaaat gtctgacaac atcccatcat tccgctgggt acagtcctt aggaggggtc tatccaactg gaccatcct gtgaaggctg atgtgttgct ggacacaaga gcactgttat ctgctcttga ctttcacaaa gttgctcaag ttcaaagaat gatgcgcaaa gataaaagga ctgattctga tctgaccaag ttaagagaca tgaacaaaga ggttgatgct ctgatgaata tgagatcaat ccagagggac |

[0647]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|--|
| | BbsI 限制位点(斜体字)。 这个 ORF 还有邻接 BbsI 以及 EcoRI (大写字母)和 NheI (大写字母和斜体字)限制位点 | aatgtgctta aggtgggagg cttagccaaa gaggagctaa tggagcttgc atctgatttg gacaagttaa gaaagaaagt cactagaact gagagtttgt ctcagcctgg tgtttatggg ggcaatctca caaacactca gttggaacaa agagccgaaa tccttcgctc aatgggggttc gctaattgcta gaccacaggg caacagagat ggggttgtga agatctggga catcaaggat aatacattgt tgatcaatca atttggatca atgccagcct taaccatcgc ttgtatgact gagcaagggg gtgaacaact taatgatgtt gtccaagcgc tgagtgcact tggtttgctc tacactgtca agttcccgaa catgacagat ctagagaaac tcacacagca acacagtgcc ctaaaaatca ttagtaatga gccatcagcc ataaacatct cagggtacaa tctcagtttg tctgcagcag tcaaagcagc tgcttgcatg attgatgggtg gcaatatgct tgagaccatc caggtgaagc cttctatgtt tagtactctc ataaagagtc tattgcaaat aaagaatcgt gaaggtatgt ttgtgagcac tacacccgga cagagaaatc cttatgaaaa ttactatac aagatttgtc tttcagggga tggttggcct tacattggct caaggtctca agttcaaggg agggcttggg ataacaccac tgtagattta gattcgaagc cgagtgctat ccagccacca gtaagaaacg gaggatcacc ggaccttaaa caaatcccta aggagaaaga agatactgtt gtgtcctcaa ttcagatgct tgattcaaaa gctaccacat ggattgacat tgaaggaaca ccaaatgata cggtggaaat ggccatctac cagcctgaca cgggcaacta catacattgt tacagatttc cccacgatga gaagtccttc aaagagcaaa gcaagtactc acatggtctc cttttaaagg acttggtgta tgcccaacca ggcttgattt cctcaatcat cagacattta |

[0648]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---|--|
| | | cctcaaaaca tggttttcac tgctcaaggt tcagatgata taatcagttt gttcgaaatg catgggagaa gagacttaaa agtgcttgac gtgaaactca gtgccgagca agcacgcacc tttgaggatg agatctggga gagatacaat ctactctgca ccaaacataa aggtttggtc ataaagaaga agaagaaggg ggctgcacaa accactgcca atcctcactg tgcattgctt gataccatca tgtttgatgc aacagtgaca ggctgggtta gggaccagaa gccgatgaga tgcttgcccta ttgacacgct gtacaggaac aacacagatc tgatcaacct ctgagctcat <i>gtcttcGCTA GC</i> |
| 7 | PIC-NP-Bsm : 当 NPΔBbsI 用 BbsI 消化 以将 BbsI 突变的 NP ORF 插入同样消化的 pol-I-PIC-miniS-GFP 主链时获得的代表性 cDNA, 因此将 GFP ORF 用 NP ORF 替换。 | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttggga cgcgcatatt acttgatcaa ag agagacga ggcct cgctct ctgccctagc ctcgacatgg gcctcgacgt cactcccca taggggagtg acgtcgaggc ctctgaggac ttgagctcag aggttgatca gatctgtgtt gttcctgtac agcgtgtcaa taggcaagca tctcatcggc ttctgggtccc taaccagcc tgtcactgtt gcatcaaaca tgatggtatc aagcaatgca cagtgaggat tcgcagtggg ttgtgcagcc cccttcttct tcttctttat gaccaaacct ttatgtttgg tgcagagtag attgtatctc tcccagatct catcctcaaa ggtgcgtgct tgctcggcac tgagtttcac gtcaagcact ttaaagtctc ttctcccatg catttcgaac aaactgatta tatcatctga accttgagca gtgaaaacca tgttttgagg taaatgtctg atgattgagg aaatcaggcc tggttgggca tcagccaagt cttttaaag gagaccatgt gagtacttgc ttgctcttt gaaggacttc tcatcgtggg gaaatctgta acaatgtatg tagttgcccg tgtcaggctg gtagatggcc atttcaccg gatcatttgg tgttccttca |

[0649]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | atgtcaatcc atgtggtagc ttttgaatca agcatctgaa ttgaggacac aacagtatct tctttctcct tagggatttg ttttaaggtec ggtgatcctc cgtttcttac tggtaggctgg atagcactcg gcttcgaatc taaatctaca gtggtgttat cccaagccct cccttgaact tgagaccttg agccaatgta aggccaacca tcccctgaaa gacaaatctt gtatagtaaa ttttcataag gatttctctg tccgggtgta gtgctcacia acataccttc acgattcttt atttgcaata gactctttat gagagtacta aacatagaag gcttcacctg gatggtctca agcatattgc caccatcaat catgcaagca gctgctttga ctgctgcaga caaactgaga ttgtaccctg agatgtttat ggctgatggc tcattactaa tgatttttag ggcactgtgt tgctgtgtga gtttctctag atctgtcatg ttcgggaact tgacagtgta gagcaaacca agtgcactca gcgcttggac aacatcatta agttgttcac ccccttgctc agtcatacaa gcgatggtta aggctggcat tgatccaaat tgattgatca acaatgtatt atccttgatg tcccagatct tcacaacccc atctctgttg cctgtgggtc tagcattagc gaacccatt gagcgaagga tttcggctct ttgttccaac tgagtgtttg tgagattgcc ccataaaca ccaggctgag acaaactctc agttctagt actttctttc ttaacttgct caaatcagat gcaagctcca ttagctcctc tttggctaag cctcccacct taagcacatt gtccctctgg attgatctca tattcatcag agcatcaacc tctttgttca tgtctcttaa cttggtcaga tcagaatcag tccttttata tttgcgcac attctttgaa cttgagcaac tttgtgaaag tcaagagcag ataacagtgc tcttgtgtcc gacaacacat cagccttcac aggatgggtc |

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---|--|
| | | cagttggata gacccctcct aagggactgt accagcgga atgatgggat gttgtcagac atthttgggt tgtttgcact tcctccgagt cagtgaagaa gtgaacgtac agcgtgatct agaatcgctt aggateccact gtgctg |
| 8 | PIC-GP-Bsm : 当 GPΔBbsI 用 BbsI 消化 以将 BbsI 突变的 GP ORF 插入同样消化的 pol-I-PIC-miniS-GFP 主链时获得的代表性 cDNA, 因此将 GFP ORF 用 GP ORF 替换。 | gcgcaccggg gatcctagge ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa ag agagacga ggcct cgctct ctgccctagc ctgcacatgg gcctcgacgt cactcccaaa taggggagtg acgtcgaggc ctctgaggac ttgagcttat ttaccagtc tcaccattt gtagggtttc tttgggattt tataataccc acagctgcaa agagagttcc tagtaatcct atgtggcttc ggacagccat caccaatgat gtgcctatga gtgggtattc caactaagtg gagaaacact gtgatggtgt aaaacaccaa agaccagaag caaatgtctg tcaatgctag tggagtctta ccttgtcttt ctccatattc ttttatcagc atttcattgt acagattctg gctctccac aaccaatcat tcttaaaatg cgtttcattg aggtacgagc cattgtgaac taaccaacac tgcggtaaag aatgtctccc tgtgatggta tcattgatgt accaaaattt tgtatagttg caataaggga ttttggcaag ctgtttgaga ctgtttctaa tcacaagtga gtcagaaata agtcggttga tagtcttttt aaagagattc aacgaattct caacattaag ttgtaaggtt ttgatagcat tctgattgaa atcaaataac ctcatcgat cgcaaaattc tcatttgtga tctttgttgc attttgccat cacagtgtta tcaaaacatt ttattccagc ccaaacaata gcccattgct ccaaacagta accacctggg acatgttgcc cagtagagtc actcaagtc caagtgaana agccaaggag tttcctgctc acagaactat aagcagtttt ttggagagcc atccttattg ttgccattgg agtatatgta |

[0650]

[0651]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|---|
| | | cagtgat ttt cccatgtggt gttctgtatg atcaggaaat tgtaatgtgt cccaccttca cagtttg tta gtctgcaaga ccctccacta cagttattga aacattttcc aacccacgca at ttttgggt cccaatgat ttgagcaagc gacgcaataa gatgtctgcc aacctcacct cctctatccc caactgtcaa gttgtactgg atcaacaccc cagcacccctc aactgttttg catctggcac ctacatgacg agtgacatgg agcacattga agtgtaactc attaagcaac cattttaatg tgtgacctgc ttcttctgtc ttatcacaat tactaatgtt accatatgca aggcttctga tgttgga aaa gttccagta gtttcatttg caatggatgt gtttgtcaaa gtgagttcaa ttcccatgt tgtgttagat ggtcctttgt agtaatgatg tgtgttggtc ttgctacatg attgtggcaa gttgtcaaac attcttgtga ggttgaactc aacgtgggtg agattgtgcc tcctatcaat catcatgcca tcacaacttc tgccagccaa aatgaggaag gtgatgagtt ggaataggcc acatctcatc agattgacaa atcctttgat gatgcatagg gttgagacaa tgattaaggc gacattgaac acctcctgca ggacttcggg tatagactgg atcaaagtca caacttg tcc cattttgggg ttgtttgcac ttctccgag tcagtgaaga agtgaacgta cagcgtgatc tagaatcgcc taggatccac tgtgcg |
| 9 | GFP-Bsm：用邻接 BsmBI 位点(粗体字)合成的绿色荧光蛋白(GFP)。 | cg ttctctaaa gatggtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccacctc cggcaagctg accctgaagt tcattctgcac caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accttgacct acggcgtgca gtgcttcgtc cgctaccccg |

[0652]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|---|
| | | accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa ggtctatata accgccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agacccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgga cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc acccagtcgc ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggg cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta agccc agaga cg |
| 10 | sPIAGM-Bsm: 融合蛋白由以下组成: i) 水泡性口炎病毒糖蛋白(VSVG) 信号肽, ii) P815 小鼠肥大细胞瘤肿瘤细胞系的 P1A 抗原, iii) GSG 接头, iv) 肠病毒 2A 肽, 和 v) 用邻接 BsmBI 位点(粗体字) 合成的小鼠 GM-CSF。 | cg tctctaa gatgaaatgc ctctctacc ttgcatttct cttcattgga gtcaactgca tgagtgaaca caagaagcct gacaaggccc actctggcag tggaggagat ggtgatggca acagatgcaa cctgctgcac agatacagcc tggaagagat cctgccctac ctgggctggc tgggtgtttgc tgtggtgaca acaagcttcc tggccctgca gatgttcatt gatgccctgt atgaggaaca gtatgagagg gatgtggcct ggattgccag acagagcaag agaatgagca gtgtggatga ggatgaggat gatgaggatg atgaagatga ctactatgat gatgaggatg atgatgatga tgccttctat gatgatgagg atgatgaaga ggaagaactg gaaaacctga tggatgatga gtctgaggat gaggctgagg aagagatgag tgtggaaatg ggggctgggg cagaagagat gggagcaggt gccaaactgtg cttgtgtgcc aggacaccac ctgagaaaga atgaagtga gtgcaggatg atctacttct |

[0653]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|--------------------------|---|
| | | tccatgaccc caactttctg gtgtccatcc ctgtgaaccc caaagaacag atggaatgca gatgtgagaa tgcagatgaa gaggtggcca tggaagaaga agaggaagag gaagaagaag aagaagagga agaaatgggc aaccagatg gcttcagccc tggaagtggc caccatcacc accatcatgg cagtggggca accaacttca gcctgctgaa acaggctggg gatgtggaag aaaatcctgg ccccatgtgg ctccagaatc tgctttttct gggcattgtg gtttacagcc tgagtgcacc cacaagatct cccatcacag tgacaagacc ttggaagcat gtggaagcaa tcaaagaggc cctgaatctg cttgatgaca tgccagtgac cctgaatgaa gaagtggaag tggtgtcaaa tgagttcagc ttcaaaaaac tgacctgtgt gcagaccagg ctgaaaattt ttgaacaggg cctgagagga aacttcacaa agctgaaggg agctctgaac atgactgcca gtactacca gacctactgc cccccaccc cagagacaga ttgtgagaca caagtgacca cctatgctga cttcattgac agcctgaaaa ccttcctgac tgacatcccc tttgagtgca agaaacctgt gcagaagtga agaa agagac g |
| 11 | PIC-NP-GFP (S-NP/GFP) | gcgcaccggg gatcctagge ataccttga cgcgcatatt acttgatcaa agatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatactg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca cctcgtgac caccttgacc tacggcgtgc agtgcttcgt ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga |

[0654]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggatgaaccg catcgagctg aagggcacgc acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca aggtctatat caccgccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagacccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtcgc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aagccctagc ctcgacatgg gcctcgacgt cactcccaaa taggggagtg acgtcgaggc ctctgaggac ttgagctcag aggttgatca gatctgtgtt gttcctgtac agcgtgtcaa taggcaagca tctcatcggc ttctgggtccc taaccagcc tgtcactgtt gcatcaaaca tgatgggtatc aagcaatgca cagtgaggat tcgcagtggg ttgtgcagcc cccttcttct tcttctttat gaccaaacct ttatgtttgg tgcagagtag attgtatctc tcccagatct catcctcaaa ggtgcgtgct tgctcggcac tgagtttcac gtcaagcact tttaagtctc ttctcccatg catttcgaac aaactgatta tatcatctga accttgagca gtgaaaacca tgttttgagg taaattgtctg atgattgagg aaatcaggcc tggttgggca tcagccaagt cctttaaaag gagaccatgt gactacttgc tttgctcttt gaaggacttc tcatcgtggg gaaatctgta acaatgtatg tagttgcccc tgtcaggctg gtagatggcc atttccaccg gatcatttgg tgttccttca atgtcaatcc atgtggtagc ttttgaatca agcatctgaa ttgaggacac |

[0655]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | aacagtatct tctttctcct tagggatttg ttttaaggtcc ggtgatectc cgtttcttac tgggtggctgg atagcactcg gcttcgaatc taaatctaca gtggtgttat cccaagccct cccttgaact tgagaccttg agccaatgta aggccaacca tcccctgaaa gacaaatctt gtatagtaaa ttttcataag gatttctctg tccgggtgta gtgctcacia acataccttc acgattcttt atttgcaata gactctttat gagagtacta aacatagaag gcttcacctg gatggtctca agcatattgc caccatcaat catgcaagca gctgctttga ctgctgcaga caaactgaga ttgtaccctg agatgtttat ggctgatggc tcattactaa tgatttttag ggcactgtgt tgctgtgtga gtttctctag atctgtcatg ttcgggaact tgacagtgtg gagcaaacca agtgcactca gcgcttggac aacatcatta agttgttcac ccccttgctc agtcatacaa gcgatgggta aggctggcat tgatccaaat tgattgatca acaatgtatt atccttgatg tcccagatct tcacaacccc atctctgttg cctgtgggtc tagcattagc gaaccccat t gagcgaagga tttcggtctt ttgttccaac tgagtgtttg tgagattgcc ccataaaca ccaggctgag acaaactctc agttctagtg actttctttc ttaacttgtc caaatcagat gcaagctcca ttagctcctc tttggctaag cctccacact taagcacatt gtccctctgg attgatctca tattcatcag agcatcaacc tctttgttca tgtctcttaa cttggtcaga tcagaatcag tccttttata tttgcgcata attctttgaa cttgagcaac tttgtgaaag tcaagagcag ataacagtgc tcttgtgtcc gacaacacat cagccttcac aggatgggtc cagttggata gaccctctct aagggactgt acccagcgga atgatgggat |

[0656]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|---------------|--|
| | | gttgtcagac attttggggt tgtttgcaact tcctccgagt cagtgaagaa gtgaacgtac agcgtgatct agaatcgctt aggatccact gtgcg |
| 12 | PIC-NP-sP1AGM | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa agatgaaatg cctcctctac cttgcatttc tcttcattgg agtcaactgc atgagtgaca acaagaagcc tgacaaggcc cactctggca gtggaggaga tggtgatggc aacagatgca acctgctgca cagatacagc ctggaagaga tcctgcccta cctgggctgg ctggtgtttg ctgtggtgac aacaagcttc ctggccctgc agatgttcat tgatgccctg tatgaggaa agtatgagag ggatgtggcc tggattgcca gacagagcaa gagaatgagc agtgtggatg aggatgagga tgatgaggat gatgaagatg actactatga tgatgaggat gatgatgatg atgccttcta tgatgatgag gatgatgaag aggaagaact ggaaaacctg atggatgatg agtctgagga tgaggctgag gaagagatga gtgtggaaat gggggctggg gcagaagaga tgggagcagg tgccaactgt gcttgtgtgc caggacacca cctgagaaag aatgaagtga agtgcaggat gatctacttc ttccatgacc ccaactttct ggtgtccatc cctgtgaacc ccaaagaaca gatggaatgc agatgtgaga atgcagatga agaggtggcc atggaagaag aagaggaaga ggaagaagaa gaagaagagg aagaaatggg caaccagat ggcttcagcc ctggaagtgg tcaccatcac caccatcatg gcagtggggc aaccaacttc agcctgctga aacaggctgg ggatgtggaa gaaaatcctg gcccttggt ccagaatctg ctttttctgg gcattgtggt ttacagcctg agtgcacca caagatctcc catcacagtg acaagacctt ggaagcatgt |

[0657]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | ggaagcaatc aaagaggccc tgaatctgct tgatgacatg ccagtgaccc tgaatgaaga agtggaagtg gtgtcaaagt agttcagctt caaaaaactg acctgtgtgc agaccaggct gaaaattttt gaacagggcc tgagaggaaa cttcacaaag ctgaaggagg ctctgaacat gactgccagc tactaccaga cctactgccc ccccacccca gagacagatt gtgagacaca agtgaccacc tatgctgact tcattgacag cctgaaaacc ttctgactg acatccccct tgagtgaag aaacctgtgc agaagtgage cctagcctcg acatgggcct cgacgtcact ccccaatagg ggagtgcagt cgaggcctct gaggacttga gctcagaggt tgatcagatc tgtgttggtc ctgtacagcg tgtcaatagg caagcatctc atcggtctct gtccctaac ccagcctgtc actgttgcat caaacatgat ggtatcaagc aatgcacagt gaggattcgc agtggtttgt gcagccccct tcttcttctt ctttatgacc aaacctttat gtttggtgca gagtagattg tatctctccc agatctcatc ctcaaagggt cgtgcttgct cggcactgag tttcacgtca agcactttta agtctcttct cccatgcatt tcgaacaaac tgattatata atctgaacct tgagcagtga aaacctggtt ttgaggtaaa tgtctgatga ttgaggaaat caggcctggg tgggcatcag ccaagtcctt taaaaggaga ccatgtgagt acttgctttg ctctttgaag gacttctcat cgtggggaaa tctgtaacaa tgtatgtagt tgcccgtgtc aggctggtag atggccattt ccaccgcatc atttggtggt cttcaatgt caatccatgt ggtagctttt gaatcaagca tctgaattga ggacacaaca gtatcttctt tctccttagg gatttgttta aggtccggtg atcctccgtt tcttactggg ggctggatag cactcggctt |

[0658]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | cgaatctaaa tctacagtgg tgttatccca agccctccct tgaacttgag accttgagcc aatgtaaggc caaccatccc ctgaaagaca aatcttgtat agtaaatttt cataaggatt tctctgtccg ggtgtagtgc tcacaaacat accttcacga ttctttattt gcaatagact ctttatgaga gtactaaaca tagaaggctt cacctggatg gtctcaagca tattgccacc atcaatcatg caagcagctg ctttgactgc tgcagacaaa ctgagattgt accctgagat gtttatggct gatggctcat tactaatgat ttttagggca ctgtgttgct gtgtgagttt ctctagatct gtcatgttcg ggaacttgac agtgtagagc aaaccaagtg cactcagegc ttggacaaca tcattaagtt gttcaccccc ttgctcagtc atacaagcga tggttaaggc tggcattgat ccaaattgat tgatcaacaa tgtattatcc ttgatgtccc agatcttcac aaccatct ctgttgccctg tgggtctagc attagcgaaac ccattgagc gaaggatttc ggctctttgt tccaactgag tgtttgtgag attgccccca taaacaccag gctgagacaa actctcagtt ctagtgactt tctttcttaa cttgtecaaa tcagatgcaa gctccattag ctcctctttg gctaagcctc ccaccttaag cacattgtcc ctctggattg atctcatatt catcagagca tcaacctctt tgttcatgtc tcttaacttg gtcagatcag aatcagtcct tttatctttg cgcacattc tttgaacttg agcaactttg tgaaagtcaa gagcagataa cagtgtctct gtgtccgaca acacatcagc cttcacagga tgggtccagt tggatagacc cctcctaagg gactgtaccc agcggaatga tgggatgttg tcagacattt tggggttggt tgcacttcct ccgagtcagt gaagaagtga acgtacagcg tgatctagaa tcgcctagga |

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|-----------------------------|--|
| | | tccactgtgc g |
| 13 | PIC-GP-GFP (S-GP/GFPart) | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa agatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccttgacc tacggcgtgc agtgcttcgt ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacacct tggatgaaccg catcgagctg aagggcacgc acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca aggtctatat caccgccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagacccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagtc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga gtctgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aagccctagc ctgcacatgg gcctcgacgt cactcccaa taggggagtg acgtcgaggc ctctgaggac ttgagcttat ttaccagtc tcaccattt gtagggtttc tttgggattt tataataccc acagctgcaa agagagttcc tagtaatcct atgtggcttc ggacagccat caccaatgat gtgcctatga gtgggtattc caactaagtg gagaaacact gtgatggtgt aaaacaccaa |

[0659]

[0660]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | agaccagaag caaatgtctg tcaatgctag tgagagtctta ccttgtcttt cttcatattc ttttatcagc atttcattgt acagattctg gctctccac aaccaatcat tcttaaaatg cgtttcattg aggtacgagc cattgtgaac taaccaacac tgcggtaaag aatgtctccc tgtgatggta tcattgatgt accaaaattt tgtatagttg caataaggga ttttggaag ctgtttgaga ctgtttctaa tcacaagtga gtcagaaata agtccgttga tagtcttttt aaagagattc aacgaattct caacattaag ttgtaagggt ttgatagcat tctgattgaa atcaaataac ctcatcgtat cgcaaaattc ttcattgtga tctttgttgc attttgccat cacagtgtta tcaaaacatt ttattccagc ccaacaata gccattgct ccaaacagta accacctggg acatgttgcc cagtagagtc actcaagtcc caagtgaaaa agccaaggag tttctgctc acagaactat aagcagtttt ttggagagcc atccttattg ttgccattgg agtatatgta cagtgatttt cccatgtggt gttctgtatg atcaggaaat tgtaatgtgt cccaccttca cagtttgta gtctgcaaga ccctccacta cagttattga aacattttcc aaccacgca atttttgggt cccaatgat ttgagcaagc gacgcaataa gatgtctgcc aacctcacct cctctatecc caactgtcaa gttgtactgg atcaacaccc cagcaccctc aactgttttg catctggcac ctacatgacg agtgacatgg agcacattga agtgtaactc attaagcaac cattttaatg tgtgacctgc ttcttctgtc ttatcacaat tactaatgtt accatatgca aggcttctga tgttgaaaa gtttccagta gtttcatttg caatggatgt gtttgtcaaa gtgagttcaa tccccatgt tgtgttagat ggtcctttgt agtaatgatg |

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|---------------|---|
| | | tgtgttggtc ttgctacatg attgtggcaa gttgtcaaac attcttgtga ggttgaactc aacgtgggtg agattgtgcc tcctatcaat catcatgcca tcacaacttc tgccagccaa aatgaggaag gtgatgagtt ggaataggcc acatctcatc agattgacaa atcctttgat gatgcatagg gttgagacaa tgattaaggc gacattgaac acctcctgca ggacttcggg tatagactgg atcaaagtca caacttgtcc cattttgggg ttgtttgcac ttcctccgag tcagtgaaga agtgaacgta cagcgtgatc tagaatcgcc taggatccac tgtgcg |
| 14 | PIC-GP-sP1AGM | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttggga cgcgcatatt acttgatcaa agatgaaatg cctcctctac cttgcatttc tcttcattgg agtcaactgc atgagtgaca acaagaagcc tgacaaggcc cactctggca gtggaggaga tggatgatggc aacagatgca acctgctgca cagatacagc ctggaagaga tctgccccta cctgggctgg ctggtgtttg ctgtggtgac aacaagcttc ctggccctgc agatgttcat tgatgccctg tatgaggaaac agtatgagag ggatgtggcc tggattgcca gacagagcaa gagaatgagc agtgtggatg aggatgagga tgatgaggat gatgaagatg actactatga tgatgaggat gatgatgatg atgccttcta tgatgatgag gatgatgaag aggaagaact ggaaaacctg atggatgatg agtctgagga tgaggctgag gaagagatga gtgtggaaat gggggctggg gcagaagaga tgggagcagg tgccaactgt gcttgtgtgc caggacacca cctgagaaag aatgaagtga agtgcaggat gatctacttc ttccatgacc ccaactttct ggtgtccatc cctgtgaacc ccaaagaaca gatggaatgc agatgtgaga atgcagatga agaggtggcc atggaagaag aagaggaaga |

[0661]

[0662]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | ggaagaagaa gaagaagagg aagaaatggg caaccagat ggcttcagcc ctggaagtgg tcaccatcac caccatcatg gcagtggggc aaccaacttc agcctgctga aacaggctgg ggatgtggaa gaaaatcctg gcccctggct ccagaatctg ctttttctgg gcattgtggt ttacagcctg agtgcaccca caagatctcc catcacagtg acaagacctt ggaagcatgt ggaagcaatc aaagaggccc tgaatctgct tgatgacatg ccagtgacct tgaatgaaga agtggaagtg gtgtcaaagt agttcagctt caaaaaactg acctgtgtgc agaccaggct gaaaattttt gaacagggcc tgagaggaaa cttcacaaag ctgaaggagg ctctgaacat gactgccagc tactaccaga cctactgccc ccccaccca gagacagatt gtgagacaca agtgaccacc tatgctgact tcattgacag cctgaaaacc ttctgactg acatcccctt tgagtgaag aaacctgtgc agaagtgagc cctagcctcg acatgggcct cgacgtcact ccccaatagg ggagtgcagt cgaggcctct gaggacttga gcttatttac ccagtctcac ccattttagt ggtttctttg ggattttata ataccacag ctgcaaagag agttcctagt aatcctatgt ggcttcggac agccatcacc aatgatgtgc ctatgagtgg gtattccaac taagtggaga aacactgtga tgggtgtaaaa caccaaagac cagaagcaaa tgtctgtcaa tgctagtga gtcttacctt gtctttcttc atattctttt atcagcattt cattgtacag attctggctc tcccacaacc aatcattctt aaaatgcgtt tcattgaggt acgagccatt gtgaactaac caacactgcg gtaaagaatg tctccctgtg atggtatcat tgatgtacca aaattttgta tagttgcaat aagggatttt ggcaagctgt ttgagactgt ttctaatac |

[0663]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|---|
| | | aagtgagtca gaaataagtc cgttgatagt ctttttaag agattcaacg aattctcaac attaagttgt aaggttttga tagcattctg attgaaatca aataacctca tcgtatcgca aaattcttca ttgtgatctt tgttgcatit tgccatcaca gtgttatcaa aacattttat tccagcccaa acaatagccc attgctccaa acagtaacca cctgggacat gttgccagtg agagtcactc aagtcccaag tgaaaaagcc aaggagtttc ctgctcacag aactataagc agtttttttg agagccatcc ttattgttgc cattggagta tatgtacagt gattttccca tgtggtgttc tgtatgatca ggaaattgta atgtgtccca cttcacagt ttgttagtct gcaagaccct ccactacagt tattgaaaca ttttccaacc cacgcaattt ttgggtcccc aatgatttga gcaagcgacg caataagatg tctgccaacc tcacctctc tatccccaac tgtcaagttg tactggatca acacccagc accctcaact gttttgcac tggcacctac atgacgagtg acatggagca cattgaagtg taactcatta agcaaccatt ttaatgtgtg acctgttct tctgtcttat cacaattact aatgttacca tatgcaaggc ttctgatgtt ggaaaagtgt ccagtagttt catttgcaat ggatgtgttt gtcaaagtga gttcaattcc ccatgttgtg ttagatgggc cttttagta atgatgtgtg ttgttcttgc tacatgattg tggaagttg tcaaaccatt ttgtgaggtt gaactcaacg tgggtgagat tgtgcctct atcaatcacc atgccatcac aacttctgcc agccaaaatg aggaaggtga tgagttggaa taggccacat ctcatcagat tgacaaatcc tttgatgatg catagggttg agacaatgat taaggcgaca ttgaacacct cctgcaggac ttcgggtata gactggatca aagtcacaac |

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|-------------|---|
| | | ttgtcccatt ttggggttgt ttgcacttcc tccgagtcag tgaagaagtg aacgtacagc gtgatctaga atcgcctagg atccactgtg cg |
| 15 | S-GP/GFPnat | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttgga cgcgcatatt acttgatcaa agatgggaca agttgtgact ttgatccagt ctatacccg agtccctgcag gaggtgttca atgtcgcctt aatcattgtc tcaaccctat gcatcatcaa aggatttgtc aatctgatga gatgtggcct attccaactc atcaccttcc tcattttggc tggcagaagt tgtgatggca tgatgattga taggaggcac aatctcaccc acgttgagtt caacctcaca agaatgtttg acaacttgcc acaatcatgt agcaagaaca acacacatca ttactacaaa ggaccatcta acacaacatg gggaattgaa ctcactttga caaacacatc cattgcaaat gaaactactg gaaacttttc caacatcaga agccttgcat atggtaacat tagtaattgt gataagacag aagaagcagg tcacacatta aaatggttgc ttaatgagtt acacttcaat gtgctccatg tcactcgtca tgtaggtgcc agatgcaaaa cagttgaggg tgctgggggtg ttgatccagt acaacttgac agttggggat agaggagggtg aggttggcag acatcttatt gcgtcgttg ctcaaatcat tggggacceca aaaattgcgt gggttgga atgtttcaat aactgtagtg gaggtcttg cagactaaca aactgtgaag gtgggacaca ttacaatttc ctgatacatc agaacaccac atgggaaaat cactgtacat atactccaat ggcaacaata aggatggctc tccaaaaaac tgcttatagt tctgtgagca ggaaactcct tggttttttc acttgggact tgagtgaactc tactgggcaa catgtcccag gtggttactg tttgagcaa tgggctattg tttgggctgg aataaaatgt tttgataaca ctgtgatggc |

[0664]

[0665]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | aaaatgcaac aaagatcaca atgaagaatt ttgcgatacg atgaggttat ttgatttcaa tcagaatgct atcaaaacct tacaacttaa tgttgagaat tcgttgaatc tctttaaaaa gactatcaac ggacttatit ctgactcact tgtgattaga aacagtctca aacagcttgc caaaatccct tattgcaact atacaaaatt ttggtacatc aatgatacca tcacagggag acattcttta ccgcagtgtt ggtagttca caatggctcg tacctcaatg aaacgcattt taagaatgat tggttgtggg agagccagaa tctgtacaat gaaatgctga taaaagaata tgaagaaaga caaggtaaga ctccactagc attgacagac atttgcttct ggtctttggg gttttacacc atcacagtgt ttctccactt agttggaata cccactcata ggcacatcat tggtgatggc tgtccgaagc cacataggat tactaggaac tctctttgca gctgtgggta ttataaaatc ccaaagaaac cctacaaatg ggtgagactg ggtaaataag ccctagcctc gacatgggcc tcgacgtcac tccccaatag gggagtgcg tcgaggcctc tgaggacttg agcatgtctt cttacttgta cagctcgtec atgccgagag tgatcccggc ggcggtcacg aactccagca ggaccatgtg atcgcgcttc tcgttggggc ctttgctcag ggcgactgg gtgctcaggt agtggttgtc gggcagcagc acggggccgt cgccgatggg ggtgttctgc tggtagtggt cggcgagctg cacgctgccg tctcgatgt tgtggcgggt cttgaagttc accttgatgc cgttcttctg cttgtcggcg gtgatataga cttgttggt gttgtagttg tactccagct tgtgccccag gatgttgccg tcctccttga agtcgatgcc cttcagctcg atgcggttca ccagggtgtc gccctcgaac ttcacctcgg cgcggtctt gtagttgccg |

[0666]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------|--|--|
| | | tcgtccttga agaagatggt gcgctcctgg acgtagcctt cgggcatggc ggacttgaag aagtcgtgct gcttcattgtg gtcggggtag cggacgaagc actgcacgcc gtaggtcaag gtggtcacga ggggtgggcca gggcacgggc agcttgccgg tgggtgcagat gaacttcagg gtcagcttgc cgtaggtggc atcgccctcg ccctcgccgg acacgctgaa cttgtggccg tttacgtcgc cgtccagctc gaccaggatg ggcaccaccc cggatgaacag ctccctgccc ttgctcacca tgaagacatt ttggggttgt ttgcacttcc tccgagtcag tgaagaagtg aacgtacagc gtgatctaga atcgccctagg atccactgtg cg |
| 16 | SΔBbsI-Pichinde 病毒株 Munchique CoAn4763 分离株 P18 (Genbank 登记号 EF529746.1) 区段 S, 其中引入非编码突变以剔除 4 个 BbsI 限制位点。基因组区段是 RNA, SEQ ID NO: 16 的序列显示 DNA; 然而, 把 SEQ ID NO:1 中的所有胸苷(“T”)换成尿苷(“U”)得到 RNA 序列。 | gcgcaccggg gatcctaggc ataccttggg cgcgcatatt acttgatcaa agatgggaca agttgtgact ttgatccagt ctataccga agtcctgcag gaggtgttca atgtcgcctt aatcattgtc tcaaccctat gcacatcaa aggatttgtc aatctgatga gatgtggcct attccaactc atcaccttcc tcattttggc tggcagaagt tgtgatggca tgatgattga taggaggcac aatctcacc acgttgagtt caacctcaca agaatgtttg acaacttgcc acaatcatgt agcaagaaca acacacatca ttactacaaa ggaccatcta acacaacatg gggaattgaa ctcaacttga caaacacatc cattgcaaat gaaactactg gaaacttttc caacatcaga agccttgcat atggtaacat tagtaattgt gataagacag aagaagcagg tcacacatta aaatggttgc ttaatgagtt acacttcaat gtgctccatg tcactcgtea tgtaggtgcc agatgcaaaa cagttgaggg tgctgggggtg ttgatccagt acaacttgac agttggggat agaggaggtg aggttggcag acatcttatt gcgtcgcttg ctcaaatcat |

[0667]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | tggggaccca aaaattgcgt gggttggaaa atgtttcaat aactgtagtg gaggttcttg cagactaaca aactgtgaag gtgggacaca ttacaatttc ctgatcatac agaacaccac atgggaaaat cactgtacat atactccaat ggcaacaata aggatggctc tccaaaaaac tgcttatagt tctgtgagca ggaaactcct tggttttttc acttgggact tgagtgactc tactgggcaa catgtcccag gtggttactg tttgagcaa tgggctattg tttgggctgg aataaaatgt tttgataaca ctgtgatggc aaaatgcac aaagatcaca atgaagaatt ttgcgatacg atgaggttat ttgatttcaa tcagaatgct atcaaacct tacaacttaa tgttgagaat tcgttgaatc tctttaaaaa gactatcaac ggacttattt ctgactcact tgtgattaga aacagtctca aacagcttgc caaaatccct tattgcaact atacaaaatt ttggtacatc aatgatacca tcacagggag acattcttta ccgcagtgtt ggtagttca caatggctcg tacctcaatg aaacgcattt taagaatgat tggttgtggg agagccagaa tctgtacaat gaaatgctga taaaagaata tgaagaaaga caaggtaaga ctccactagc attgacagac atttgcttct ggtctttggt gttttacacc atcacagtgt ttctccactt agttggaata cccactcata ggcacatcat tggtgatggc tgtccgaagc cacataggat tactaggaac tctctttgca gctgtgggta ttataaaatc ccaaagaaac cctacaaatg ggtgagactg ggtaaataag ccctagcctc gacatgggcc tcgacgtcac tccccaatag gggagtgacg tcgaggcctc tgaggacttg agctcagagg ttgatcagat ctgtgttgtt cctgtacage gtgtcaatag gcaagcatct catcggttc tggtcctaa cccagcctgt |

[0668]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | cactgttgca tcaaacatga tggatatcaag caatgcacag tgaggattcg cagtggtttg tgcagccccc ttcttcttct tctttatgac caaaccttta tgtttggtgc agagtagatt gtatctctcc cagatctcat cctcaaaggt gcgtgcttgc tcggcactga gtttcacgtc aagcactttt aagtctcttc tcccatgcat ttcgaacaaa ctgattatat catctgaacc ttgagcagtg aaaaccatgt ttgaggttaa atgtctgatg attgaggaaa tcaggcctgg ttgggcatca gccaaagtcct ttaaaaggag accatgtgag tacttgcttt gctctttgaa ggacttctca tcgtggggaa atctgtaaca atgtatgtag ttgcccgtgt caggctggta gatggccatt tccaccggat catttggtgt tccttcaatg tcaatccatg tggtagcttt tgaatcaagc atctgaattg aggacacaac agtatcttct ttctccttag ggatttgttt aaggctccgt gatcctccgt ttcttactgg tggttgata gcactcggct tcgaatctaa atctacagtg gtgttatccc aagccctccc ttgaacttga gaccttgagc caatgtaagg ccaaccatcc cctgaaagac aaatcttgta tagtaaattt tcataaggat ttctctgtcc gggtgtagtg ctcaaaaca taccttcacg attctttatt tgcaatagac tctttatgag agtactaaac atagaaggct tcacctggat ggtctcaagc atattgccac catcaatcat gcaagcagct gctttgactg ctgcagacaa actgagattg taccctgaga tgtttatggc tgatggctca ttactaatga tttttagggc actgtgttgc tgtgtgagtt tctctagatc tgtcatgttc gggaacttga cagtgtagag caaaccaagt gcactcagcg cttggacaac atcattaagt tgttcacccc cttgctcagt catacaagcg atggttaagg ctggcattga |

[0669]

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|------------------|----|--|
| | | tccaaattga ttgatcaaca atgtattatc cttgatgtcc cagatcttca caaccccatc tctgttgccct gtgggtctag cattagecgaa ccccattgag cgaaggattt cggctctttg ttccaactga gtgtttgtga gattgcccc ataaacacca ggctgagaca aactctcagt tctagtgact ttctttctta acttgtecaa atcagatgca agctccatta gtcctctttt ggctaagcct cccaccttaa gcacattgtc cctctggatt gatctcatat tcatcagagc atcaacctct ttgttcatgt ctcttaactt ggtcagatca gaatcagtcc ttttatcttt gcgcatcatt ctttgaactt gagcaacttt gtgaaagtca agagcagata acagtgtctt tgtgtccgac aacacatcag cttcacagg atgggtccag ttggatagac ccctcctaag ggactgtacc cagcggaatg atgggatgtt gtcagacatt ttggggttgt ttgcacttcc tccgagtcag tgaagaagtg aacgtacagc gtgatctaga atcgctagg atccactgtg cg |

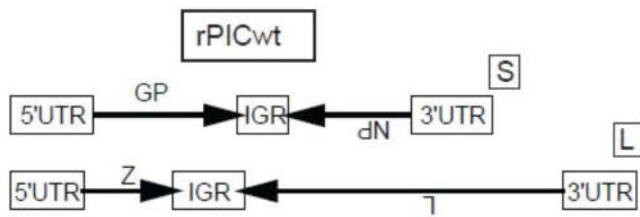
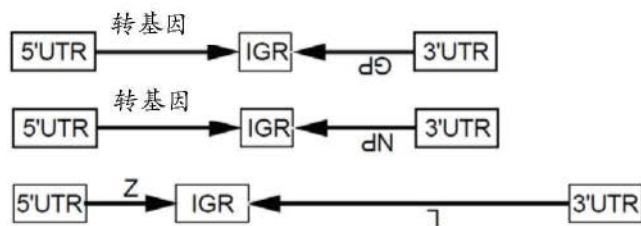
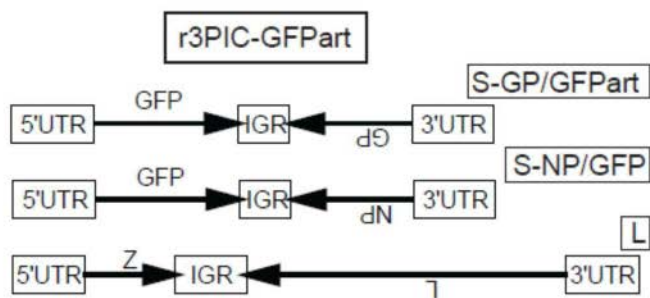
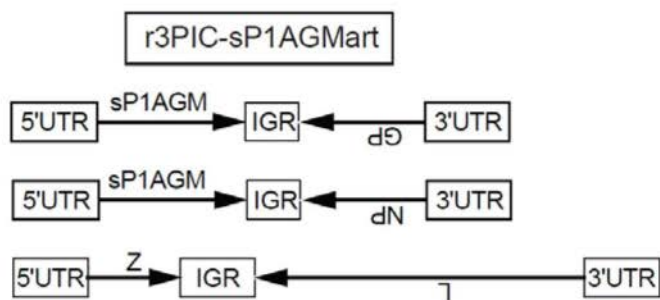
A**B****C****D**

图1A-1D

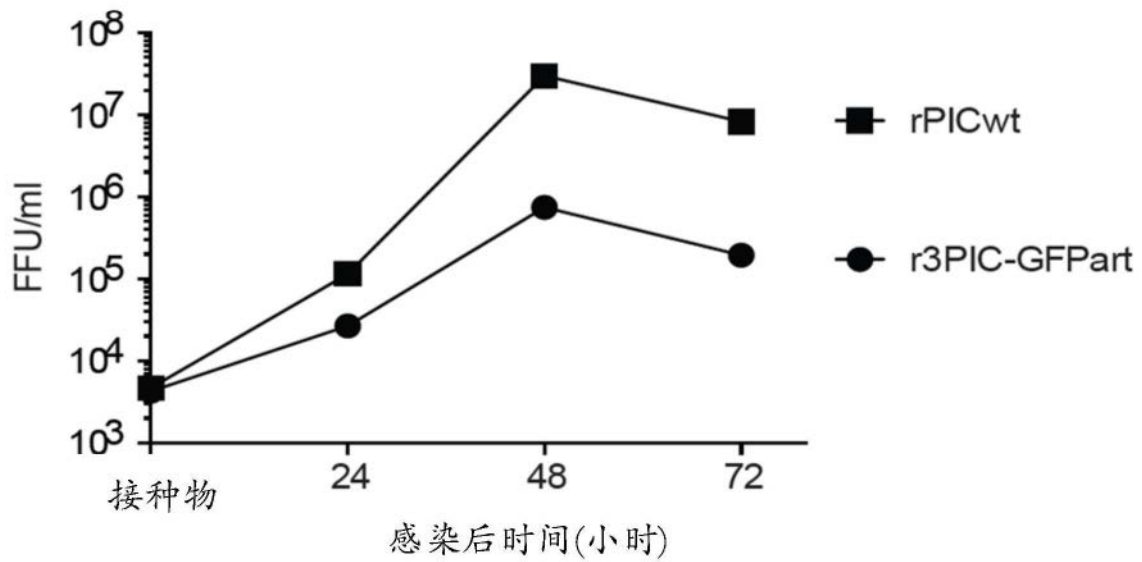


图2

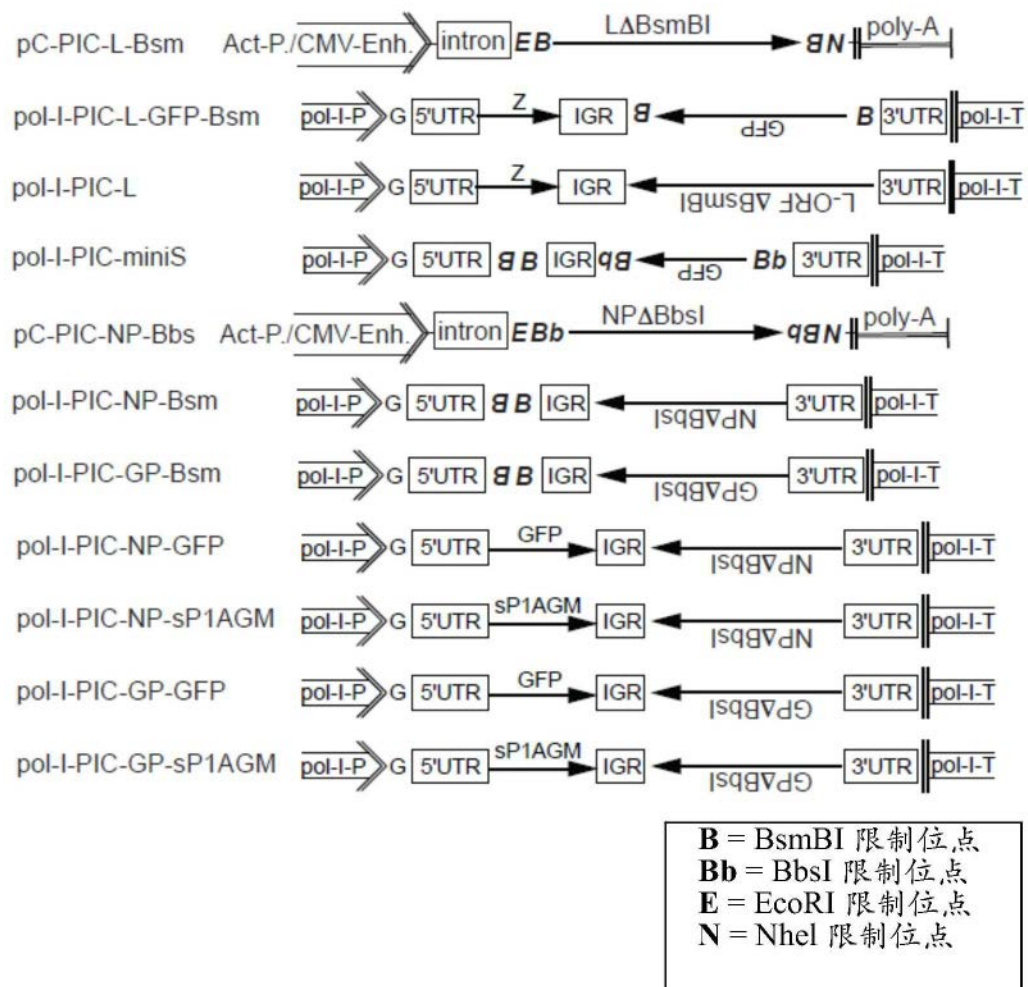


图3

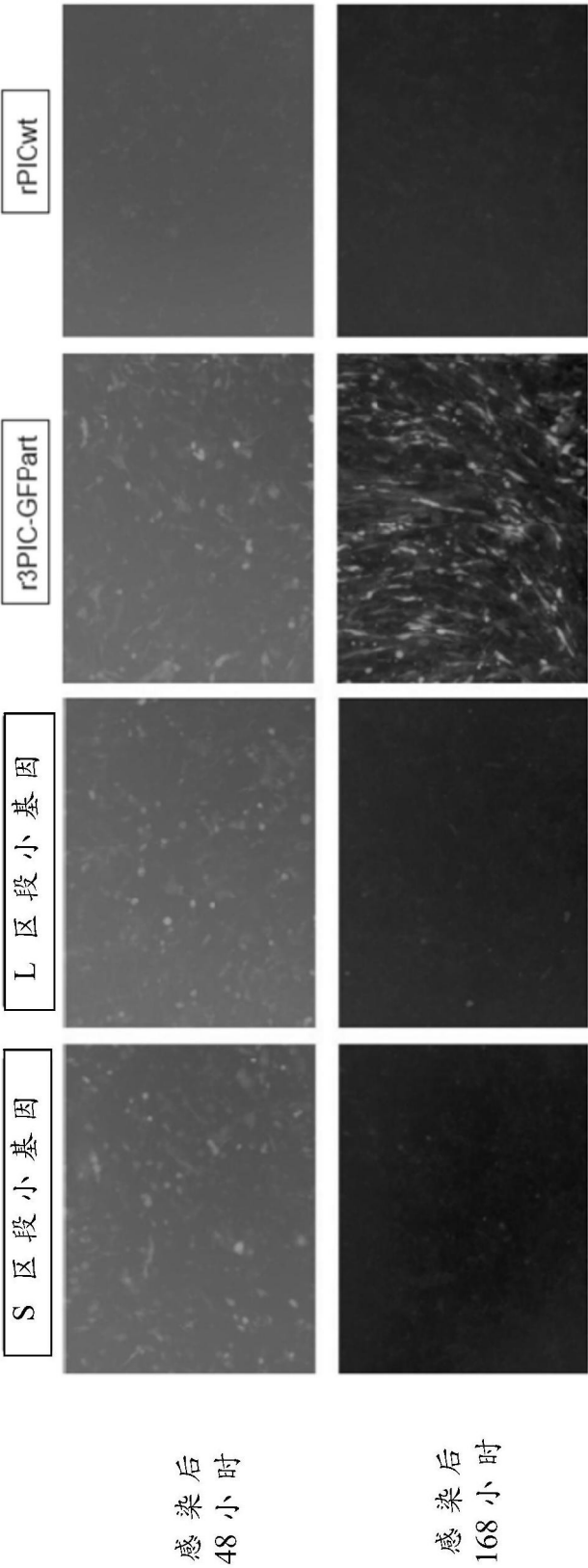


图4

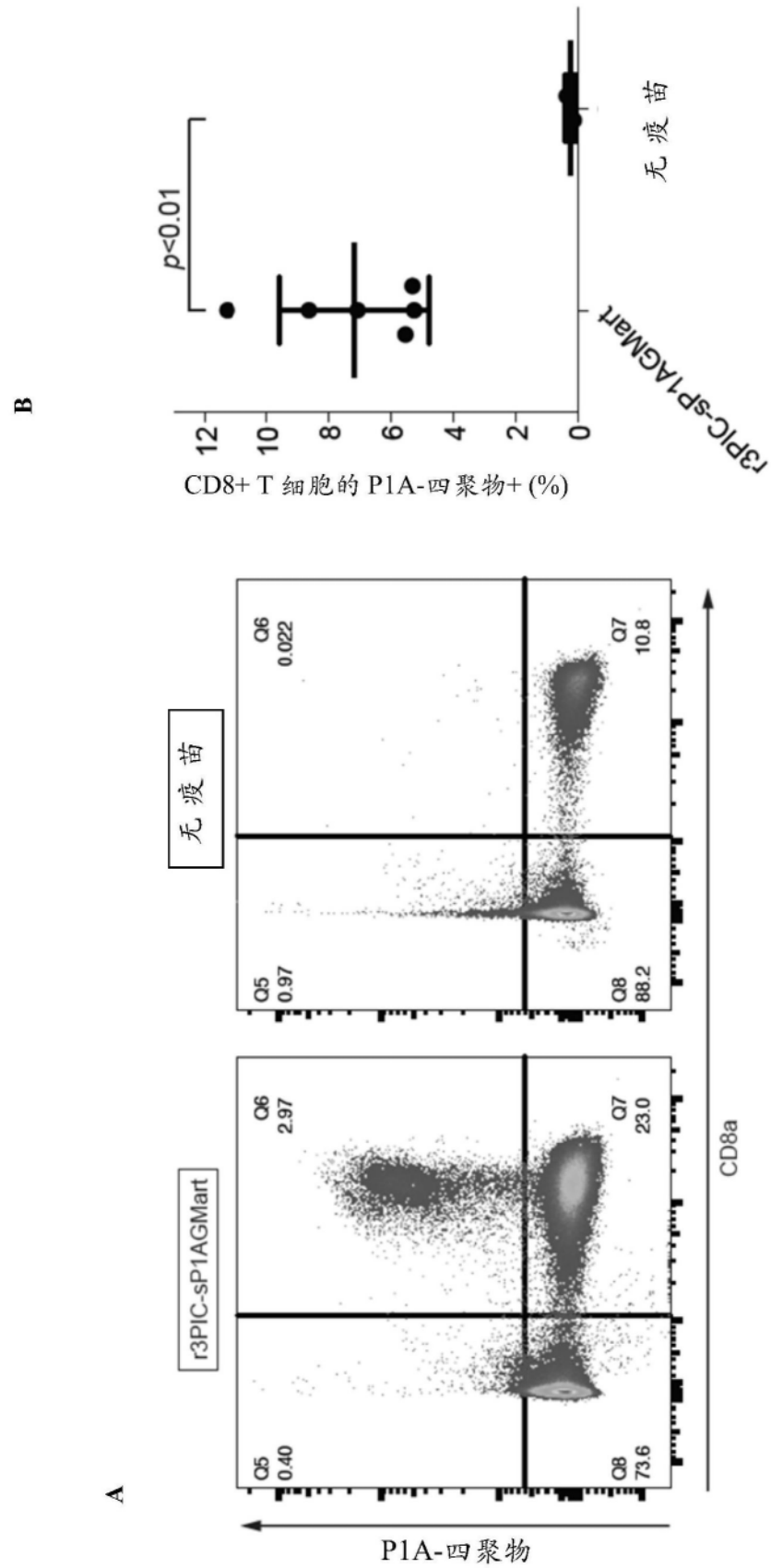


图5A-5B

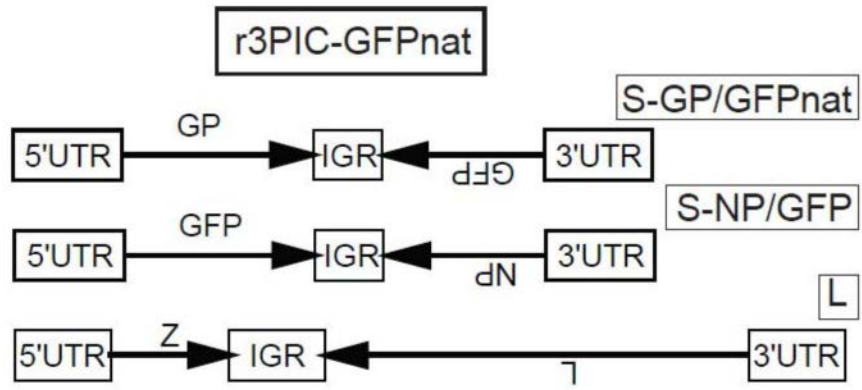


图6

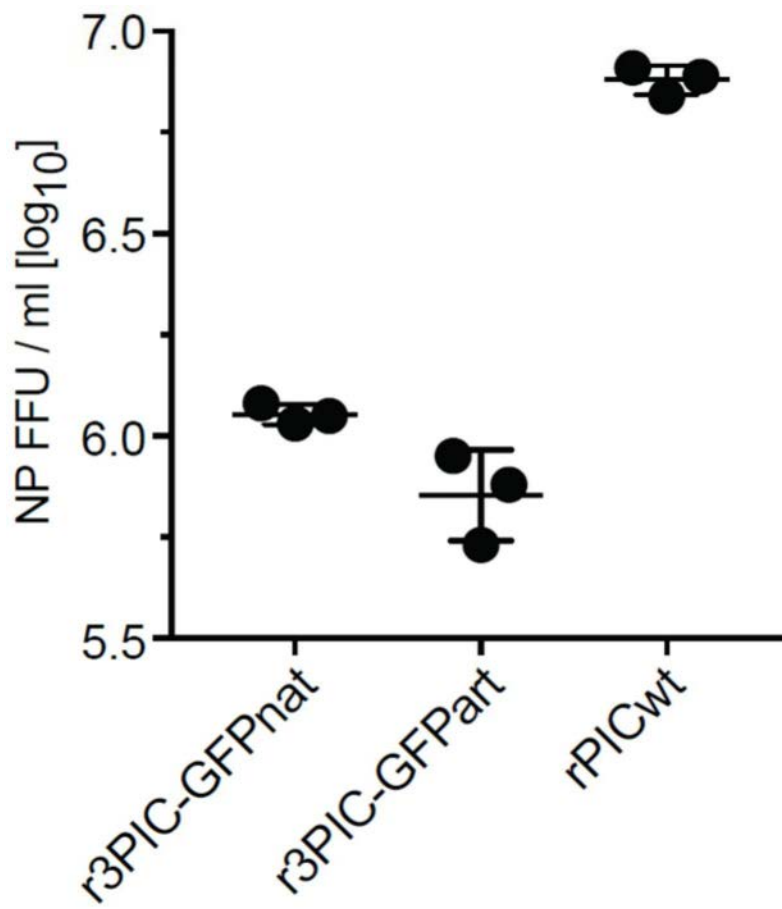


图7

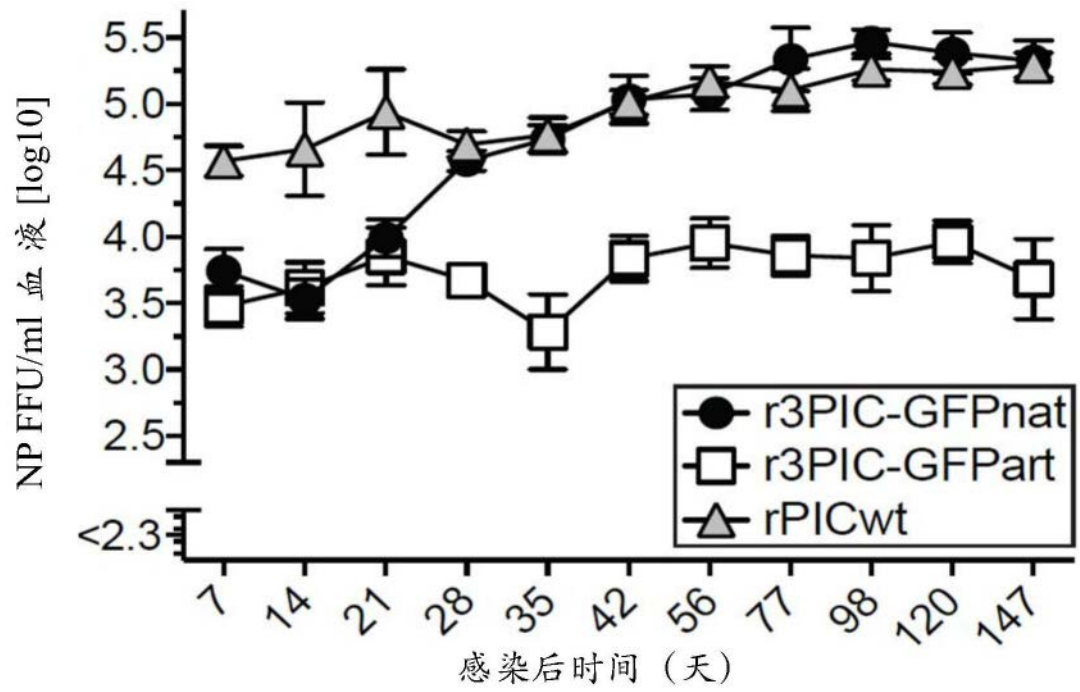


图8

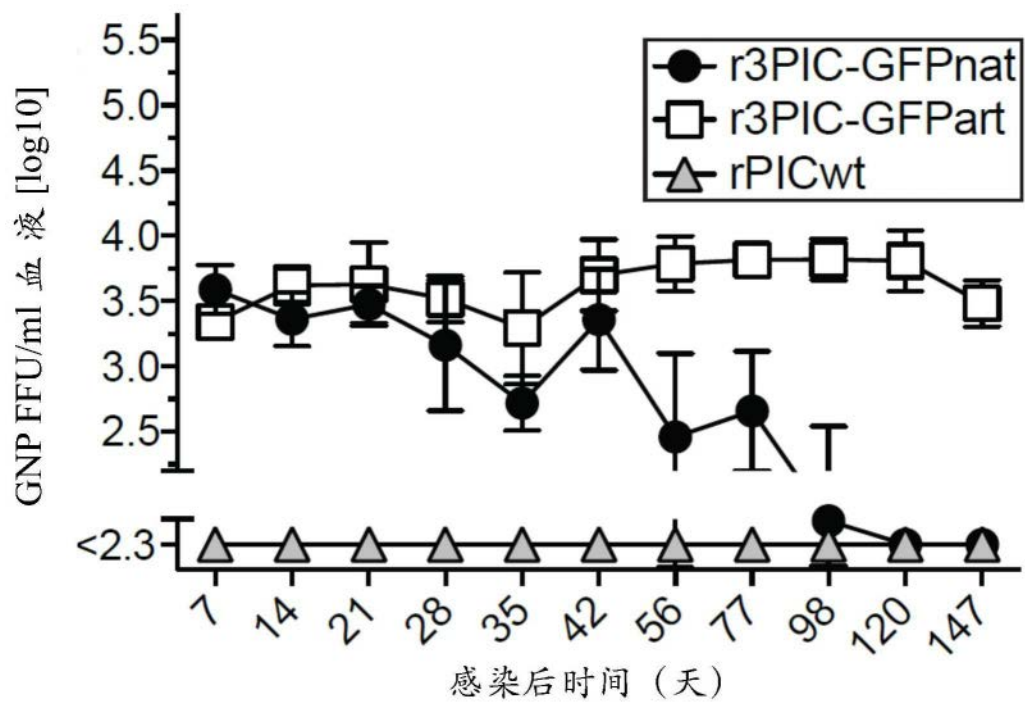


图9

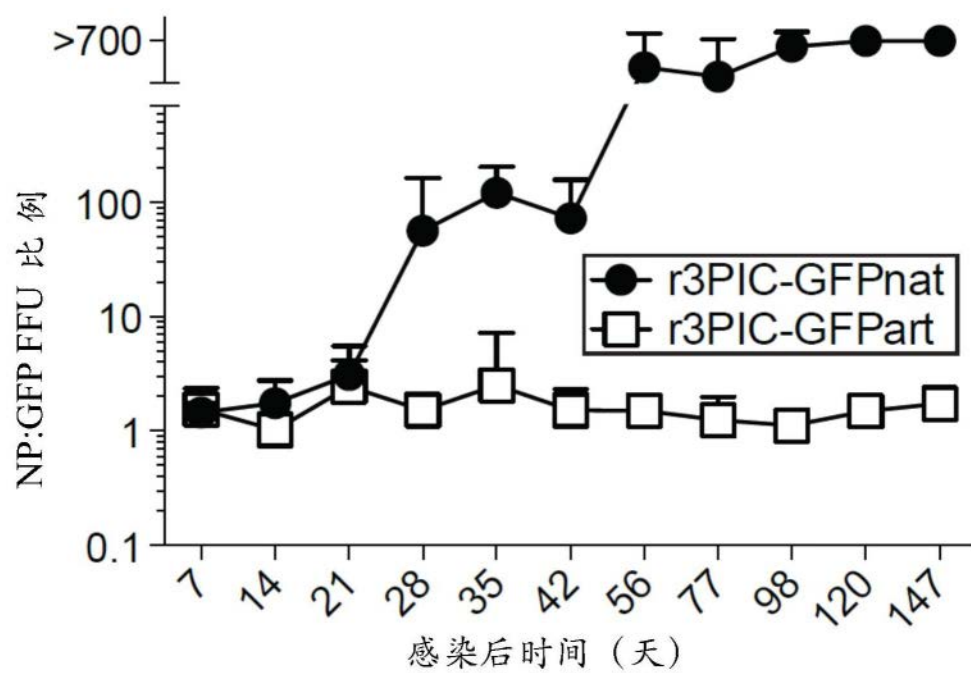


图10

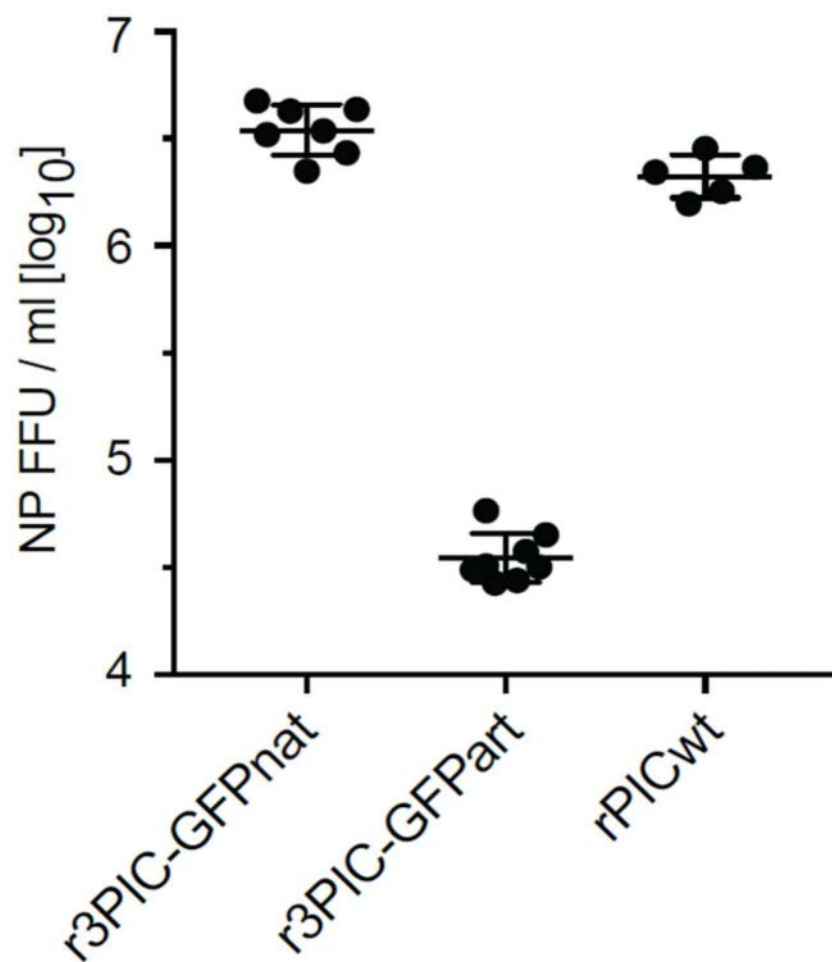


图11

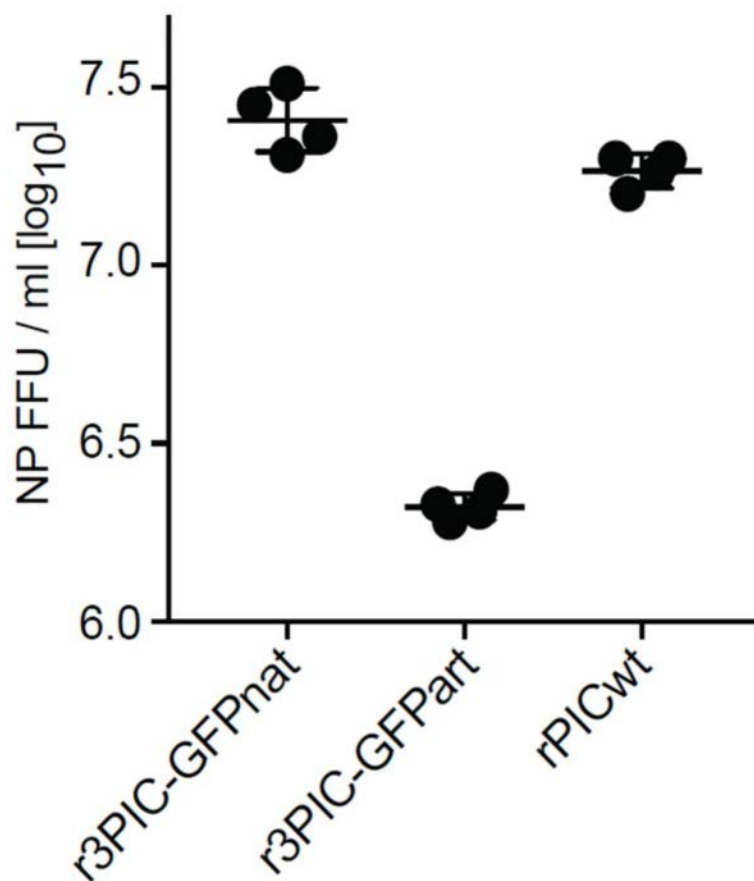


图12

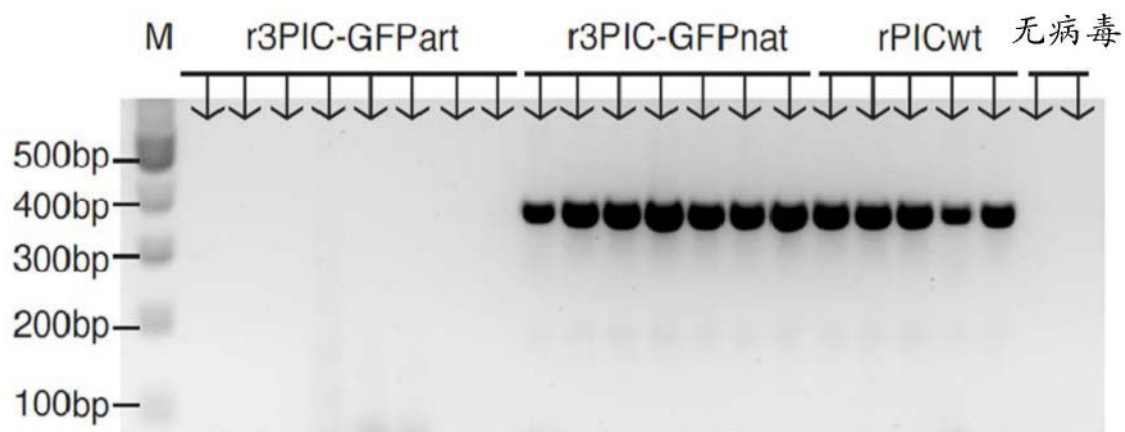


图13