



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1350578 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 00807495.X

C12N 15/63(2006.01)

(22) 申请日 2000.04.05

C12N 15/87(2006.01)

(30) 优先权数据

60/127,912 1999.04.06 US

60/132,839 1999.05.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2001.11.12

(56) 对比文件

Enami M., et al..Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus..Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 87. 1990, 3802-3804 页左手栏.

审查员 宋智刚

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2000/009021 2000.04.05

(87) PCT申请的公布数据

W000/60050 EN 2000.10.12

(73) 专利权人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 Y·川冈 G·纽曼

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陈剑华

(51) Int. Cl.

C12N 7/00(2006.01)

C07K 14/11(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

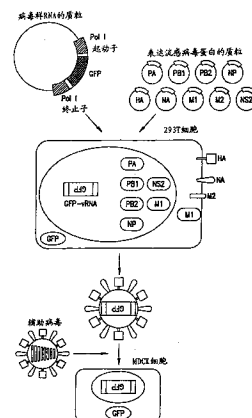
权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 13 页

(54) 发明名称

用于疫苗和基因治疗的重组流感病毒

(57) 摘要

本发明提供一种用于(如在没有辅助病毒的情况下)制备流感A型病毒的组合物。



1. 一种基于质粒的系统,用于从克隆的病毒 cDNA 产生感染性流感病毒,其中,该系统含有在缺少辅助病毒时足以产生所述病毒的多个流感病毒载体,其中,所述载体由以下组成:

- (i) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 的启动子的载体;
- (ii) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 的启动子的载体;
- (iii) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 的启动子的载体;
- (iv) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 的启动子的载体;
- (v) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 的启动子的载体;
- (vi) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 M cDNA 的启动子的载体;
- (vii) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 的启动子的载体;
- (viii) 含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NS2 cDNA 的启动子的载体;
- (ix) 含有操作性连接于编码流感病毒 PA 多肽的 DNA 节段的启动子的载体;
- (x) 含有操作性连接于编码流感病毒 PB1 多肽的 DNA 节段的启动子的载体;
- (xi) 含有操作性连接于编码流感病毒 PB2 多肽的 DNA 节段的启动子的载体;和
- (xii) 含有操作性连接于编码流感病毒 NP 多肽的 DNA 节段的启动子的载体。

2. 如权利要求 1 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述病毒 cDNA 是突变的。

3. 如权利要求 1 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述基于质粒的系统产生至少 1×10^3 pfu/ml 感染性流感病毒。

4. 如权利要求 3 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述基于质粒的系统产生至少 3×10^4 pfu/ml 感染性流感病毒。

5. 如权利要求 1 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述启动子选自 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子。

6. 如权利要求 5 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述启动子是 RNA 聚合酶 I 启动子。

7. 如权利要求 6 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述启动子是人 RNA 聚合酶 I 启动子。

8. 如权利要求 1 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述转录终止序列选自 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列、RNA 聚合酶 III 转录终止序列和核酶。

9. 如权利要求 1 所述的基于质粒的系统,其特征在于,两个或多个载体以物理方法连接。

10. 如权利要求 1 所述的基于质粒的系统,其特征在于,所述一个或多个载体在分开的质粒上。

11. 一种宿主细胞,它含有权利要求 1 所述的基于质粒的系统。

12. 一种生产流感病毒病毒粒子的方法,该方法包括在使病毒蛋白和 vRNA 或 cDNA 生产的条件下培养权利要求 11 所述的宿主细胞。

13. 一种制备流感病毒特异性免疫原性组合物的方法,其特征在于,该方法包括从含有权利要求 1 所述的多个流感病毒载体的宿主细胞中纯化出病毒粒子,其中,所述载体在不存在辅助病毒的情况下或在不存在体外核糖核蛋白复合物的情况下被导入所述宿主中。

14. 一种免疫原性组合物,其特征在于,它含有根据权利要求 13 所述的方法制得的流感病毒病毒粒子。

15. 权利要求 14 所述的免疫原性组合物的用途,其特征在于,用于制备用于免疫个体以抗流感病毒感染的药剂。

16. 一种分离的流感病毒,它由权利要求 12 或 13 的方法制得。

用于疫苗和基因治疗的重组流感病毒

[0001] 政府权利的声明

[0002] 本发明是用美国政府拨款（国立变应性与传染病公共卫生服务研究所，National Institute of Allergy and Infectious Disease Public Health Service）基金AI-29599进行的。政府对本发明拥有一定的权利。

背景技术

[0003] 由克隆的 cDNA 产生感染性 RNA 病毒的能力极大地促进了从生物学角度对这些病原体的理解，因而改进了疾病控制的方法 (Palese 等人, 1996)。然而，与正义 RNA 病毒相比，这种进步对负义 RNA 病毒是相对有限的，因为负义 RNA 病毒的基因组病毒 RNA (vRNA) 或反基因组互补 RNA (cRNA) 都不可能作为蛋白质合成的直接模板。而且，vRNA 在被病毒核蛋白 (NP) 包裹之后，必然被病毒 RNA 多聚酶复合物转录成正义 mRNA。因而，由基因组 vRNA 与 NP 和多聚酶蛋白形成了最小复制单位。尽管存在这些障碍，已建立了反向遗传学方法以产生非区段的负义 RNA 病毒，包括狂犬病毒 (Snell 等人, 1994)、水疱性口炎病毒 (Lawson 等人, 1995)、麻疹病毒 (Radecke 等人, 1995)、呼吸道合胞病毒 (Collins 等人, 1995)、仙台病毒 (Garcin 等人, 1995 ; Kato 等人, 1996)、牛瘟病毒 (Baron 等人, 1997)、人副流感病毒 3 型 (Hoffman 等人, 1997) 和 SV5 (He 等人, 1997)。

[0004] 正粘病毒科 (Orthomyxoviridae)、沙粒病毒科 (Arenaviridae) 和布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 含有区段负链 RNA 基因组，并包括一些人类和动物病原体如流感病毒 A、B 和 C 型（正粘病毒科）、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)（沙粒病毒科）和脑炎病毒和出血热病毒（布尼亚病毒科、沙粒病毒科）。它们的基因组由两条（沙粒病毒科）、三条（布尼亚病毒科）或者六到八条（正粘病毒科）负极性（与 mRNA 互补）单链 RNA 分子组成。vRNA 与 NP 和依赖于病毒 RNA 的 RNA 聚合酶相互反应形成了核糖核蛋白复合物 (RNPs)。RNPs 由宿主细胞的脂肪双分子层包围。嵌在这个包膜中的病毒糖蛋白是受体结合和进入宿主细胞所必需。因此，从克隆的 cDNA 产生区段负义 RNA 病毒提出了一个艰难的挑战，因为各个基因区段必须分别产生一个 vRNA。

[0005] Bridgen 和 Elliott (1996) 从编码反基因组正义 vRNA 的三个区段克隆的 cDNA 制得了布尼奥罗病毒（布尼亚病毒科）。然而，病毒回收率低。没有完全地从克隆 cDNA 中得到一个正粘病毒（包含 6 个 (Thogoto 病毒)、7 个（流感 C 型病毒）或 8 个（流感 A 型和 B 型病毒））的负义 RNA。在控制流感传染的努力中人们已最尖锐地感觉到进步中的这种滞后。

[0006] Palese 和他的同事 (Enami 等人, 1990) 率先采用流感 A 型病毒（图 1A）的反向遗传学和依赖于辅助病毒的系统。在他们的方法中，在纯化的聚合酶和 NP 蛋白的存在下从体外 vRNA 合成产生 RNP 复合物，然后用来转染真核细胞。接着用流感 A 型辅助病毒感染导致产生含有衍生自克隆的 cDNA 一个基因的病毒。另一方法是 Neumann 等人 (1994) 发展的，该方法的基础是以 RNA 聚合酶 I 体内合成 vRNA（图 1B），聚合酶 I (Pol I) 是种能转录缺少 5' 加帽和 3' 聚 A 尾的核糖体 RNA 的胞内酶。用流感病毒感染并用含有侧接小鼠 RNA 聚合

酶 I 启动子和终止子序列的克隆的流感病毒 cDNA 的质粒转染细胞,导致了病毒转染子的产生。然而,在这两种方法中,必须从大量的背景辅助病毒中挑选转染子,这就需要强的选择系统并使产生具有生长缺陷的病毒变得复杂。

[0007] Mena 等人发展了一种产生复制不全病毒样颗粒 (VLP) 的系统 (1996),在该系统中,将编码一报道基因的流感病毒样 vRNA 体外转录,并转染入真核细胞中。在 T7 RNA 聚合酶启动子的控制下,表达了质粒的所有十种流感报道蛋白质。当被转染的细胞用表达 T7 RNA 聚合酶的重组牛痘病毒感染时,它们产生了流感 VLP。然而,该系统效率低:在 25% 的试验中,研究者没有检测到报道基因的表达。而且,牛痘病毒表达 80 种以上的蛋白质,其中的任何一个都可能影响流感病毒的生命周期。

[0008] 因此,需要一种方法来从克隆的 cDNA 中制备区段负链 RNA 病毒,如流感 A 型病毒等正粘病毒科病毒。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供至少一种下列已分离和纯化的载体:即含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 M cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 的启动子的载体。相对于该启动子,该 cDNA 可以是有义或反义取向。因而,本发明的一个载体可编码正粘病毒蛋白质(有义)或 vRNA(反义)。可采用启动子来表达病毒蛋白质。编码 vRNA 的载体所含的较佳启动子包括但不限于 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子。另外,优选 RNA 聚合酶 I 启动子是人 RNA 聚合酶 I 启动子。编码 vRNA 的载体的优选转录终止序列包括但不限于 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列、RNA 聚合酶 III 转录终止序列或者核酶。虽然可以预见病毒的基因可用于本发明的方法中或载体中,但是优选该载体包含流感 cDNA,如流感 A 型(如包括 15HA 或 9NA 亚型之一的流感 A 型基因)、B 型或 C 型 DNA(见 Fields 等人(编辑)的 *Virology* 第 45 章和第 46 章, Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, PA(1996), 本文特别引入作为参考)。

[0011] 本发明提供一种含有多个本发明正粘病毒载体的组合物。在本发明的一个实施例中,该组合物包括:a) 至少两种选自以下的载体,含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PA cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 M cDNA 的启动子的载体、含有操作性连接于已连接了转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 的启动子的载体;b) 至少两种选自以下的载体,编码流感病毒 PA 的载体、编码流感病毒 PB1 的载体、编码流感病毒 PB2 的载体、编码流

感病毒 NP 的载体。优选编码病毒蛋白质的该载体还包括转录终止序列。含有流感病毒 cDNA 的载体的启动子优选包括 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子。同样,含有流感病毒 cDNA 的各载体优选包含转录终止序列,如 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列或 RNA 聚合酶 III 转录终止序列,或者核酶。优选该载体包含流感病毒 DNA,如流感病毒 A、B 或 C 型 DNA。

[0012] 更优选,包含多个正粘病毒载体的该组合物包括:a)至少两种选自以下的载体,含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 PAcDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 PB1 cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 PB2 cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 HA cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 NP cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 NA cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 M cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体、含有操作性连接于已连接了 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的流感病毒 NS cDNA 的 RNA 聚合酶 I 启动子的载体;和 b)至少两种选自以下的载体,编码流感病毒 PA 的载体、编码流感病毒 PB1 的载体、编码流感病毒 PB2 的载体、编码流感病毒 NP 的载体、编码流感病毒 HA 的载体、编码流感病毒 NA 的载体、编码流感病毒 M1 的载体、编码流感病毒 M2 的载体和编码流感病毒 NS2 的载体。

[0013] 本发明另一实施例包括还含有载体的本发明上述组合物,该载体包含连接于正粘病毒 5' 非编码序列的启动子,该非编码序列连接在已连接了转录终止序列的正粘病毒 3' 非编码序列的理想的接头上。在能进行正粘病毒复制的宿主细胞中导入这种组合物产生了重组病毒,该重组病毒包含对应于该载体序列的 vRNA,该载体包含连接于 cDNA 的正粘病毒 5' 非编码序列,而该 cDNA 连接于正粘病毒 3' 非编码序列。较佳的是,该 cDNA 是反义取向的。同样优选该启动子是 RNA 聚合酶 I 启动子、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子。同样优选该转录终止序列是 RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列或 RNA 聚合酶 III 转录终止序列,或者核酶。例如,该 cDNA 可以编码一个免疫原性表位,如用于癌症治疗或疫苗的表位。

[0014] 本发明多个载体可以用物理方法连接或者各载体可以以单个质粒或其他(如线性核酸传送载体)形式存在。

[0015] 本发明还提供一种制备流感病毒的方法。该方法包括使细胞与本发明的多种载体依次或同时接触,例如,使用足以产生感染性流感病毒的量的本发明组合物。本发明还包括从与该组合物接触的细胞中分离出病毒。因而,本发明还提供分离的病毒以及与本发明组合物或分离的病毒接触的宿主细胞。

[0016] 如下所述,流感 A 病毒可完全由克隆的 cDNA 制得。本文所描述的反向遗传方法是高效的,并能用于将突变导入任何基因节段,以及用于发展以流感病毒为基础的基因传送系统。例如,用 8 个质粒转染人胚肾细胞(293T),各个质粒编码 A/WSN/33(H1N1)病毒或 A/PR/8/34(H1N1)病毒的病毒 RNA,两侧连接有人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子,以及用编码病毒核蛋白和 PB2、PB1 和 PA 病毒聚合酶的质粒一起转染。该方法在转

染后 48 小时每毫升上清液中产生了 1×10^3 噬斑形成单位 (pfu) 以上的病毒。取决于所产生的病毒, 加入能表达所有其余病毒结构蛋白质的质粒导致了大量病毒的产生, 产率大于 3×10^4 pfu/ml。还用该反向遗传方法来产生含有 A/PR/8/34 病毒的 PB1 基因以及所有代表 A/WSN/33 其他基因的重辅助病毒。通过此方法产生的其他病毒在 PA 基因中含有突变, 或者在神经氨酸酶蛋白质的头部可有外源表位。

[0017] 而且, 也可以对其他病毒使用同样的方法完全地从克隆的 cDNA 中产生非区段负链 RNA 病毒 (即副粘病毒科、弹状病毒科和线状病毒科), 或者其他区段负链 RNA 病毒, 如沙粒病毒科和布尼亚病毒科。另外, 在细胞中表达 cRNA 而不是 vRNA 可以提高病毒产生的效率。

[0018] 本发明方法基于对流感病毒进行操作, 如将减毒突变导入病毒基因组中。另外, 由于流感病毒能诱导强烈的体液和细胞免疫力, 本发明极大地提高了这些病毒作为疫苗载体的能力, 特别是从该病毒的自然变种的可获得性看, 可以依次使用这些载体, 并允许在基因治疗中反复使用。

[0019] 因而, 本发明提供了分离的和纯化的载体或质粒, 它们表达或编码流感病毒的蛋白质, 或者表达或编码天然或重组的流感 vRNA。因此, 本发明的载体或质粒可包含一个感兴趣的基因或开放读框, 如编码可用作疫苗的免疫原性肽或蛋白质的外源基因。优选表达流感 vRNA 的载体或质粒包含适合于在具体宿主细胞如鸟或哺乳动物 (如犬、猫、马、牛、羊) 或包括人细胞的灵长类动物细胞中表达的启动子, 如 RNA 聚合酶 I 启动子。同样, 该包含用于制备流感 vRNA 的 DNA 的载体或质粒优选包含 RNA 聚合酶 I 转录终止序列。对于含有一个感兴趣的基因或开放读框的载体或质粒, 该基因或开放读框优选两侧连接有流感病毒的 5' 和 3' 非编码序列, 更优选, 该基因或开放读框操作性连接于 RNA 聚合酶 I 启动子和 RNA 聚合酶 I 转录终止序列。

[0020] 如下所述, 用编码流感 A 型病毒结构蛋白的质粒和两侧连接有 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子的含有绿荧光蛋白 (GFP) 报道基因的质粒转染 293T。这些结构在胞内通过 RNA 聚合酶 I 转录, 产生了包装在流感病毒样颗粒中的 GFP vRNA。每毫升上清液产生 10^4 以上感染颗粒的该系统, 可以用来研究流感病毒复制和颗粒的形成。它还可以很好地用于疫苗的生产和开发改进的基因治疗载体。

[0021] 因此, 本发明还提供一种宿主细胞, 该细胞的基因组稳定地增加了 (augment) 至少一种重组 DNA 分子。该重组 DNA 分子至少包括下列分子中的一种: 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 HA 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NA 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M1 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NS2 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接

在已连接于含有转录停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M2 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 PA 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 PB1 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 PB2 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录停止或终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NP 编码区域的第二 lox 位点上。

[0022] 优选该宿主细胞中增加了下述含有在该宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 HA 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NA 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M1 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NS2 编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有转录终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M2 编码区域的第二 lox 位点上。优选该 lox 位点是 loxP 位点。

[0023] 本发明还提供一种制备感染性复制缺陷性流感病毒的方法。该方法包括使经增加了至少一种本发明重组 DNA 分子 (如编码 HA、NA、M1、M2、NS2、PA、PB1、PB2 或 NP) 的宿主细胞与重组流感病毒接触, 该病毒包括含有 Cre 开放读框的 vRNA 以及含有宿主细胞不表达的流感病毒基因的 vRNA。然后从受到接触的细胞中回收病毒。优选该重组病毒还包括含有所需开放读框的 vRNA。或者, 使增加了重组 DNA 分子的宿主细胞与一种载体接触, 该载体包含操作性连接于编码 Cre 的 DNA 节段的在宿主细胞中能发挥功能的启动子, 和与各含有操作性连接于在宿主细胞中不存在的流感病毒 cDNA 的启动子的多个载体接触。然后回收病毒。

[0024] 本发明还提供一种宿主细胞, 该宿主细胞的基因组中增加了一个下述重组 DNA 分子: 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于宿主细胞表面结合蛋白编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于融合蛋白编码区域的第二 lox 位点上; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上,

而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M1 编码区域的第二 lox 位点上 ; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NS2 编码区域的第二 lox 位点上 ; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M2 编码区域的第二 lox 位点上。优选该 lox 位点是 loxP 位点。

[0025] 另一实施例是一种宿主细胞, 在该宿主细胞的基因组中增加了下列一种重组 DNA 分子 : 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于宿主细胞表面结合和融合蛋白编码区域的第二 lox 位点上 ; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M1 编码区域的第二 lox 位点上 ; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 NS2 编码区域的第二 lox 位点上 ; 含有在宿主细胞中能发挥功能的启动子的重组 DNA 分子, 该启动子连接在已连接于含有终止序列的 DNA 节段的第一 lox 位点上, 而该 DNA 节段连接在已连接于流感病毒 M2 编码区域的第二 lox 位点上。优选该 lox 位点是 loxP 位点。

[0026] 上述增加了重组 DNA 分子的宿主细胞可用于制备感染性复制缺陷性流感病毒。例如, 使经编码 HA、NA、M1、M2 和 NS2 的重组 DNA 分子稳定转化的宿主细胞与多个载体接触, 即与表达含有 Cre 开放读框的 vRNA、含有 PA 的 vRNA、含有 PB1 的 vRNA、含有 PB2 的 vRNA 的载体, 以及可任选地表达含有感兴趣基因的 vRNA 的载体 ; 以及编码 PA、PB1、PB2 和 NP 的载体接触。

[0027] 不需要辅助病毒感染的生产本文所述病毒的方法可用于病毒诱变研究、疫苗生产 (如治疗 AIDS、流感、乙型肝炎、丙型肝炎、鼻病毒、线状病毒、疟疾、疱疹及口蹄疫) 和基因治疗载体 (如治疗癌症、AIDS、腺苷脱氨酶缺陷、肌肉营养不良、鸟氨酸转氨甲酰酶缺陷和中枢神经系统肿瘤)。

[0028] 因而, 提供了一种用于医学治疗 (如用于疫苗或基因治疗) 的病毒。例如, 本发明提供了一种免疫接种个体以抵抗病原体如细菌、病毒或寄生生物或恶性肿瘤的方法。该方法包括给予个体一定量的至少一种本发明的分离病毒, 可任选地与能有效增强个体免疫力的佐剂组合给药。该病毒包括含有由病原体编码的多肽或肿瘤特异性多肽的 vRNA。

[0029] 还提供了一种方法, 该方法能提高或增强由于其内源性蛋白质缺乏或量减少而出现疾病或症状的哺乳动物的该内源蛋白质的表达。该方法包括给予哺乳动物一定量的本发明的分离的病毒, 以有效提高或增加该哺乳动物的此内源蛋白质。较佳的是, 哺乳动物是人。

[0030] 本发明还提供重组产生和正链病毒 (如正义 RNA 病毒) 的载体和方法。因而, 本发明提供了一种含有 DNA 节段的载体, 该 DNA 节段包含操作性连接于另一含有正义 RNA 病毒序列的 DNA 节段的 RNA 聚合酶 I 转录起始序列, 任选地操作性连接于含有 RNA 聚合酶 I 转录终止序列的第三个 DNA 节段。本发明还提供了一种使用该载体制备重组病毒的方法。该方法特别可用于克隆的 DNA 和转染技术, 因而避免了 RNA 操作。而且, RNA 聚合酶 I 转录

高效并高度逼真。对于那些基因组 RNA 未加帽 (uncap) 的正义 RNA 病毒 (如瘟病毒、丙型肝炎病毒; 小 RNA 病毒, 包括脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、甲型肝炎病毒, 以及口蹄疫病毒), 将编码全长基因组的 cDNA 以基因组取向方式导入 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子序列之间。将产生的质粒转染到允许的宿主细胞中, 产生用于病毒复制的基因组 RNA。大量的正义 RNA 病毒含有加帽的基因组 RNA (如黄病毒, 包括登革热病毒和几种脑炎病毒)。当 RNA 聚合酶 I 转录物没有加帽结构时, 使编码具有加帽基因组 RNA 的 RNA 病毒的全长基因组的 cDNA, 以反基因组取向方式导入 RNA 聚合酶 I 转录载体中。将所得到的质粒转染后, 胞内 RNA 聚合酶 I 转录了反基因组 (未加帽) RNA。而且, 为了复制所需的蛋白质而进行的蛋白质表达质粒的共转染导致反基因组 RNA 的复制, 由此产生得到基因组 RNA 和最终的传染性病毒。

[0031] 附图的简要说明

[0032] 图 1. 已建立的反向遗传学系统的示意图。在 RNP 转染方法 (A) 中, 用体外合成 vRNA 将纯化的 NP 和聚合酶蛋白质装配到 RNP 中。用 RNP 转染细胞, 接着用辅助病毒转染。在 RNA 聚合酶 I 方法 (B) 中, 将含有 RNA 聚合酶 I 启动子的质粒、编码待拯救的 vRNA 的 cDNA 以及 RNA 聚合酶 I 终止子转染到细胞中。RNA 聚合酶 I 的胞内转录产生了合成的 vRNA, 该 vRNA 被包装在用辅助病毒感染后的子代病毒颗粒中。通过这两种方法, 从辅助病毒种群中选出转染子病毒 (即含有衍生自克隆的 cDNA 的 RNA 的病毒)。

[0033] 图 2. 产生 RNA 聚合酶 I 构建物的示意图。通过 PCR 扩增得自流感病毒的 cDNA, 用 BsmBI 消化并克隆到 pHH21 载体的 BsmBI 位点上 (E. Hoffmann, Ph. D. thesis, Justus, Liebig-University, Giessen, Germany), 该载体含有人 RNA 聚合酶 I 启动子 (P) 和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子 (T)。该终止子序列上游的胸苷核苷酸 (*T) 代表该流感病毒 RNA 的 3' 端。流感 A 型病毒序列用粗体字表示。

[0034] 图 3. 提出了用来产生区段负义 RNA 病毒的反向遗传方法。将含有 RNA 聚合酶 I 启动子的质粒、8 个病毒 RNA 节段每一节段的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子与蛋白质表达质粒一起转染到细胞中。虽然可用表达 PA、PB1、PB2 和 NP 的质粒产生传染性病毒, 但是所有其余结构蛋白质 (列在方括弧中) 的表达提高了依赖于所产生病毒的病毒生产效率。

[0035] 图 4. 检测感染了转染子病毒的细胞中的 FLAG 肽。用抗体染色来鉴别感染了 PR8-WSN-FL79 (A, D) 或 A/WSN/33 野生型病毒 (B, E) 的 MDCK 细胞中, 或者模拟感染的 MDCK 细胞 (C, F) 中的 NA。感染 9 个小时后, 用多聚甲醛固定细胞, 用 Triton X-10 处理并在抗 FLAG (A-C) 或抗 WSN NA (D-F) 单克隆抗体中培育。在阳性样品中 (A、D 和 E) 出现了强烈的高尔基染色 (红色)。

[0036] 图 5. PA 突变体的回收。通过 RT-PCR 用引物扩增了各病毒的 PA 基因, 产生 1226bp 的节段 (mRNA 的第 677 位到 1903 位, 在第 1、3 和 5 泳道), 然后用限制性内切酶 Bsp120I (在 mRNA 的第 846 位, 第 4 和 7 泳道) 或 PvuII (在 mRNA 的第 1284 位, 第 2 和 6 泳道) 消化。PCR 产物中 Bsp120I 或 PvuII 位点的存在分别产生了 169bp 和 1057bp, 或 607bp 和 619bp 的节段。MW = 标记物分子量。

[0037] 图 6. 用于扩增流感病毒序列的引物。

[0038] 图 7. 用于产生编码 GFP 蛋白的流感病毒样 RNA 的 pPoII-GFP 质粒。这个质粒含有在流感 A 型病毒节段 5 的 5' 和 3' 非编码区域之间以反义取向形式存在的 GFP 基因 (从 pEGFP-N1 获得; Clontech, Palo Alto, CA), 该基因两侧连接连有人 RNA 聚合酶 I 启动子和

小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子。

[0039] 图 8. VLP 产生策略示意图。将表达单个蛋白质的质粒和含有 RNA 聚合酶 I 启动子、编码 GFP 报道基因的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子的质粒转染到 293T 细胞中。通过 RNA 聚合酶 I 的胞内转录产生负极性的 GFP vRNA, 以倒写字表示。收集含有 VLP 的上清液, 与流感辅助病毒混合并接种到 MDCK 细胞中。

[0040] 图 9. 流感 A 型病毒的 PA、PB1、PB2 和 NP 蛋白质将 RNA 聚合酶 I 产生的 GFP vRNA 中包入衣壳, 引起了 GFP 的表达。用表达 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白 (A) 的质粒或者用除表达 NP 蛋白 (B) 之外的所有质粒, 和报道基因 vRNA 胞内合成的 RNA 聚合酶 I-GFP 基因质粒一起转染 293T 细胞。转染 48 小时后将细胞固定, 用荧光显微镜测定 GFP 表达。

[0041] 图 10. 传染性流感 VLP 的产生。用各达不同病毒结构蛋白 (A) 的 9 种质粒或者删去 NP (B) 结构的 8 种质粒, 和 RNA 聚合酶 I-GFP 基因质粒一起转染 293T 细胞。转染 48 小时后, 收集含有 VLP 的上清液, 与 A/WSN/33 辅助病毒混合, 并接种到 MDCK 细胞中。感染 10 个小时后将细胞固定, 用荧光显微镜测定 GFP 表达。

[0042] 图 11. 使用 Cre 重组酶在其基因组中增加了重组 DNA 分子的细胞中表达流感 NS2 蛋白的示意图。该细胞的基因组含有一个重组 DNA 分子, 该分子包含连接于一个位点特异性重组位点 (如 loxP) 的一个启动子, 该重组位点连接于转录终止序列上, 该终止序列以与第一个位点特异性重组位点连接于 NS2 基因的同样取向, 连接到第二个位点特异性重组位点上。

[0043] 图 12. 复制缺陷性流感病毒的制备。

[0044] 发明详细描述

[0045] 定义

[0046] 本文所用的“分离的和 / 或纯化的”指在体外制备、分离和 / 或纯化本发明的载体和 / 或质粒, 使其不与体内的物质相结合, 或者主要地从体外物质中纯化。本文所用“重组核酸”或“重组 DNA 序列或节段”指一种核酸 (如 DNA), 该核酸虽衍生于或分离自其来源, 但随后在体外发生了化学变化, 因此其序列不是天然产生的, 或者只是相应于天然产生的序列, 但其所处的位置不是它们在天然基因组中应处的位置。衍生自其来源的 DNA 的例子应是经鉴定认为是有用片段的 DNA 序列, 该序列然后可用化学方法合成成为基本纯的形式。“分离”自某来源的 DNA 的例子是通过化学方法 (如使用限制性核酸内切酶) 从所述来源中切下或取得的有用的 DNA 序列, 这样可通过基因工程方法作进一步处理 (如扩增) 而用于本发明。

[0047] 本文所用“位点特异性重组”包括以下 3 种情况: 1) 删除两侧连接有位点特异性重组位点或序列 (如 loxP 位点) 的靶 DNA 节段; 2) 倒置两侧连接有位点特异性重组位点或序列 (如 loxP 位点) 的靶 DNA 节段的核苷酸序列; 3) 相互交换位于在不同 DNA 分子中最接近位点特异性重组位点或序列 (如 loxP 位点) 的靶 DNA 节段。位点特异性重组酶系统包括但不限于噬菌体 P1 的 Cre/loxP 系统 (美国专利第 5658772 号)。

[0048] 为了补正位点特异性重组反应的可逆性, 可以改变该重组系统的结构。位点特异性重组序列有可能以该重组反应的产物不再被认为是该逆反应的底物的方式来产生突变, 因此使此种整合或切除稳定化。例如, 为去除不需要的序列, 将同样取向的 lox 位点置于该不需要序列的两侧。

[0049] 其他 lox 位点包括从大肠杆菌中分离得到的核苷酸序列的 loxB、loxL 和 loxR 位点 (Hoess 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3398 (1982))。lox 位点还可通过本领域熟知的各种合成技术来产生。例如, 产生 lox 位点的合成技术公开在 Ito 等人 (Nuc. Acid. Res., 10, 1755 (1982)) 和 Ogilvie 等人 (Science, 214, 270 (1981)) 的著作中。

[0050] 本文所用表达“lox 位点”, 指一核苷酸序列, 其中的 cre 基因的基因产物能催化位点特异性重组。loxP 是一个有 34 个碱基对的核苷酸序列, 可通过本领域熟知的方法将其从噬菌体 P1 中分离出来 (见, 如 Hoess 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3398 (1982))。loxP 由被 8 个碱基对间隔区分开的两条 13 个反向重复碱基对所组成。

[0051] 本文所用的表达“cre 基因”, 指编码某酶基因产物的核苷酸序列, 该产物影响真核细胞中 lox 位点外的位点特异性 DNA 重组。可以通过本领域熟知的方法从噬菌体 P1 中分离得到 cre 基因 (见 Abremaid 等人, Cell, 32, 1301-1311 (1983))。

[0052] 流感病毒的复制

[0053] 流感 A 型病毒基因组拥有 8 条编码总共 10 种蛋白质的单链负义病毒 RNA (vRNA)。流感病毒的生命周期始于血凝素 (HA) 与宿主细胞表面含唾液酸的受体相结合, 随后发生受体介导的胞吞作用。晚期 (late) 内体中的低 pH 引发了 HA 构像改变, 因而暴露了 HA2 亚单位 (即所谓的融合肽) 的 N 末端。该融合肽启动了病毒和内体膜的融合, 基质蛋白 (M1) 和 RNP 复合体被释放到细胞质中。RNP 由包裹 vRNA 的核蛋白 (NP) 和 PA、PB1 和 PB2 蛋白形成的病毒聚合酶复合体组成。RNP 被转运到细胞核中, 在那发生转录和复制。RNA 聚合酶复合体催化 3 种不同的反应: 具有 5' 加帽和 3' 聚 A 结构的 mRNA 的合成、全长互补 RNA (cRNA) 的合成和用 cDNA 作为模板的基因组 vRNA 的合成。新合成的 vRNA、NP 和聚合酶蛋白质然后装配到 RNP 中, 从细胞核中运出, 转运到质膜上, 在那里发生子代病毒颗粒出芽。神经氨酸酶 (NA) 蛋白通过去除唾液酸寡糖的唾液酸在以后的感染中起着重要的作用, 从而从细胞表面释放出新装配的病毒颗粒, 并防止病毒颗粒的自我凝集。虽然病毒装配涉及蛋白质-蛋白质和蛋白质-vRNA 之间的相互作用, 但是这些相互作用的性质很大程度上还是未知的。

[0054] Thogoto 病毒

[0055] Thogoto 病毒 (THOV) 代表正粘病毒科的一个新种。它们由蜱传播并已在驯养动物中 (包括骆驼、山羊和牛) 发现, 因此, THOV 能在蜱和脊椎动物中复制。THOV 基因组包含 6 段单链负义 RNA 节段。由 3 条最大节段编码的蛋白质显示与流感病毒聚合酶蛋白质 PB2、PB1 和 PA 有显著的同源性。节段 5 编码一个与流感病毒 NP 有关的蛋白质。节段 4 编码的 THOV 糖蛋白与流感病毒 HA 或 NA 都没有同源性, 但是它的序列显示与杆状病毒糖蛋白有相似性。认为最小节段编码基质蛋白并且不与任何流感病毒蛋白质相似。与流感病毒相似, 启动子活性需要该 vRNA 的 3' 和 5' 端二者, 此活性分别位于该 vRNA 的 3' 和 5' 端的末端 14 和 15 核苷酸上。

[0056] THOV 的 mRNA 合成最初由宿主细胞衍生的帽结构开始。然而, 与流感病毒相反, 只从细胞的 mRNA 中切割下该帽结构 (没有额外的核苷酸) (Albo 等人, 1996; Leahy 等人, 1997; Weber 等人, 1996)。体外的切割试验揭示 vRNA 的 5' 和 3' 端都是核酸内切酶活性所需要 (Leahy 等人, 1998), 但是如流感病毒所显示的那样 (Cianci 等人, 1995; Hagen 等人, 1994), 加入模拟的 cRNA 启动子并不激发核酸内切酶活性 (Leahy 等人, 1998)。已提议对 THOV 使用“钩状”结构 (Leahy 等人, 1997; Weber 等人, 1997), 这与提议对流感病毒使用

螺旋塞结构相类似 (Flick 等人, 1996)。然而, 这种“钩状”结构仅见于 THOV vRNA 启动子中。cRNA 启动子序列不允许其 5' 端的 2 和 9 位之间以及 3 和 8 位之间形成碱基对。替换 3 位或 8 位以允许在这些核苷酸之间形成碱基配对会激发核酸内切酶活性, 这是对提出的“钩状”结构强有力支持的证据 (Leahy 等人, 1998)。而且, 该结构可能对 THOV 生命周期的调控是关键性的; 形成该“钩状”结构的 vRNA 启动子可以激发 PB2 核酸内切酶的活性, 因而可进行转录。相反, cRNA 启动子可能不形成“钩状”结构, 因此可能不能激发核酸内切酶的活性, 因而引起复制。

[0057] 布尼亚病毒科

[0058] 布尼亚病毒科包括导致人出血热或脑炎热 (如裂谷热、汉坦病 (Hantaan)、La Crosse 和 Crimean-Congo 出血热) 几种病毒。球状和有包膜的病毒粒子含有 3 段单链负义 RNA 节段 (见 Elliott, 1997)。最大的节段 (L) 编码病毒 RNA 聚合酶蛋白 (L 蛋白), 而 M 节段编码 G1 和 G2 两个病毒糖蛋白以及一个非结构性蛋白质 (NSm)。最小节段 (S) 编码核衣壳蛋白质 (N) 和另一非结构性蛋白质 (NSs)。病毒的复制和转录发生在细胞质中, 新装配的病毒粒子通过高尔基体的膜出芽产生。

[0059] Bridgen 和 Elliott (1996) 已建立了一种反向遗传系统, 以从克隆的 cDNA 完整地产生传染性布尼亚病毒。他们采用了首先由 Schnell 等人 (1994) 描述的用于狂犬病毒的策略: 在表达病毒聚合酶和核蛋白的细胞中进行编码正义反基因组 RNA (而不是负义基因组 RNA) 的 cDNA 的胞内转录。Bridgen 和 Elliott (1996) 用表达 T7 聚合酶的牛痘病毒转染 HeLaT4+ 细胞, 然后用表达 S、M 和 L 节段编码的蛋白质的质粒转染这些细胞。接着他们用 3 个编码两侧连接 T7 聚合酶启动子和 δ 肝炎病毒核酶的全长反基因组 cDNA 的质粒转染这些细胞。为了增加布尼亚病毒相对于牛痘病毒颗粒的数目, 该作者使用了蚊子细胞, 在该细胞中复制的是布尼亚病毒而不是牛痘病毒。这个方案不仅能用基因工程来改造布尼亚病毒, 还可以产生用不同的布尼亚病毒株共传染不易获得的重配辅助病毒。

[0060] 为了研究转录与复制所需要的布尼亚病毒启动子元件和病毒蛋白质, Dunn 等人 (1995) 以负义取向克隆了布尼亚病毒 S RNA 节段 5' 和 3' 非翻译区域之间的 CAT 基因。用表达 L 和 S 节段编码蛋白质的结构建钩转染细胞, 然后在体内用转录的 RNA 转染, 这样导致了 CAT 活性。布尼亚病毒 S 节段在重叠的读框中编码两种蛋白质, 即 N 和 NSs。为确定这两种蛋白质是否都是转录和复制所需要, 检测了仅表达 N 或 NSs 构建物的 CAT 活性。N 蛋白与 L 蛋白一起表达导致 CAT 活性, 而用 NSs 构建物没有检测到 CAT 活性。因此, 对布尼亚病毒样 RNA 的转录和复制, L 蛋白和 N 蛋白足以发挥作用。

[0061] 对于流感病毒而言, 布尼亚病毒 RNA 的末端序列是互补的且高度保守。也因此假定这些序列建明确定义了布尼亚病毒启动子并且对于启动子活性有关键作用。该病毒 RNA 3' 端 5 个核苷酸的删除极大地减少了 CAT 表达 (Dunn 等人, 1995)。相反, 在 5' 端加入 2 个核苷酸, 或者在 3' 端加入 11 个或 35 个核苷酸并不消除 CAT 表达 (Dunn 等人, 1995)。因此, 与流感病毒聚合酶复合体一样, 布尼亚病毒聚合酶蛋白能明显地在内部启动转录和/或复制。

[0062] 本发明将在下面的实施例中作进一步的描述。

[0063] 实施例 1

[0064] 材料和方法

[0065] 细胞和病毒. 293T 人胚肾细胞和 Madin-Darby 犬肾细胞 (MDCK) 分别培育在增加了 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 中和含有 5% 新生牛血清的改进的 Eagle 培养基中。所有的细胞在 37℃ 和 5% CO₂ 中培养。使流感病毒 A/WSN/22 (H1N1) 和 A/PR/8/34 (H1N1) 在 10 日龄鸡蛋中增殖。

[0066] 质粒的构建. 为产生 RNA 聚合酶 I 构建物, 将从 A/WSN/33 或 A/PR/8/34 病毒 RNA 得到的克隆的 cDNA 导入 RNA 聚合酶 I 的启动子和终止子序列之间。简言之, 通过 PCR 用含有 BsmBI 位点的引物扩增该克隆的 cDNA, 用 BsmBI 消化, 并克隆到含有人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子的 pHH21 载体的 BsmBI 位点中, 再通过 BsmBI 位点分离 (图 2)。通过 PCR 扩增 A/WSN/33 株的 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因, 扩增时分别使用下列质粒: pSCWPB2、pGW-PB1 和 pSCWPA (所有的都从加利福尼亚洛杉矶大学的 DebiNayak 博士得到); pWH17、pWNP152、pT3WNA15 (Castrucci 等人, 1992); pGT3WM 和 pWNS1。使用 pcDNA774 (PB1, Perez 等人, 1998) 作为模板扩增流感 A/PR/8/34 病毒的 PB1 基因。引物的序列见图 6。为确保该基因没有不要的突变, 根据制造商建议的方案用其自动测序仪 (Applied Biosystem Inc., CA, USA) 测序 PCR 得到的节段。如 Huddleston 等人 (1982) 所述克隆了编码 A/WSN/33 病毒的 HA、NP、NA 和 M1 基因的 cDNA, 并亚克隆到真核表达载体 pCAGGS/MCS 中 (由鸡 β -肌动蛋白启动子控制, Niwa 等人, 1991), 分别产生了 pEWSN-HA、pCAGGS-WSN-NP0-14、pCAGGS-WNA15 和 pCAGGS-WSN-M1-2/1。通过 PCR 扩增了 A/PR/8/34 病毒的 M2 和 NS2 基因, 并克隆到 pCAGGS/MCS 中, 产生 pEP24c 和 pCA-NS2。最后, 在巨细胞病毒启动子的控制下, 用 pcDNA774 (PB1)、pcDNA762 (PB2) 和 pcDNA787 (PA) 表达 PB2、PB1 和 PA 蛋白质。

[0067] 传染性流感颗粒的产生. 用最多 17 种质粒以不同的量以及根据制造商的说明书用 Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) 转染 293T 细胞 (1×10^6)。简言之, 将 DNA 和转染试剂混合 (每微克 DNA 用 2 微升 Trans IT-LT-1), 室温共培育 45 分钟, 然后加到细胞中。6 小时之后, 用含有 0.3% 牛血清蛋白和 0.01% 胎牛血清的 Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) 替换该 DNA-转染试剂混合物。在转染后的不同时间里, 从上清液中收集病毒并在 MDCK 细胞上滴定。由于这个步骤不需要辅助病毒, 回收的转染子病毒的分析不必进行麻烦的纯化。

[0068] 质粒-转染细胞产生病毒的百分比的确定. 转染后 24 小时, 用 0.02% EDTA 将 293T 细胞分散成单个细胞。将该细胞悬液稀释 10 倍, 转移到铺满 MDCK 单层细胞的 24 孔板中。用血凝试验检测病毒。

[0069] 免疫染色试验. 细胞用流感病毒感染 9 小时后, 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤两次, 并在室温下用 3.7% 多聚甲醛 (PBS 溶液) 固定 20 分钟。接着, 用 0.1% Triton X-100 处理, 并如 Neumann 等人 (1997) 所述的方法进行操作。

[0070] 结果

[0071] 通过病毒 RNA 节段的表达即 3 种聚合酶亚单位和 NP 蛋白质的质粒驱动的表达, 产生感染性病毒. 虽然用从纯化的病毒颗粒中抽提得到的 RNP 的混合物转染细胞, 产生了感染性流感颗粒, 但是当用 8 种不同的体外产生的 RNP 转染时, 这种策略不可能有效。为了完全从克隆的 cDNA 中产生感染性流感病毒, 在体内产生了 8 种病毒 RNP。因而, 制备了含有 A/WSN/33 病毒的全长病毒 RNA 的 cDNA, 其两侧连接人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合

酶 I 终止子。原理上,将这 8 种质粒转染到真核细胞中应能导致所有 8 种流感 vRNA 的合成。蛋白表达质粒共转染产生的 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白应将 vRNA 装配到可被复制和转录的功能性 vRNP 中,最后形成感染性流感病毒(图 3)。用蛋白表达质粒(1 微克 pcDNA762(PB2)、1 微克 pcDNA774(PB1)、0.1 微克 pcDNA787(PA) 和 1 微克 pCAGGS-WSN-NP0/14) 和 1 微克的各下列 RNA 聚合酶 I 质粒(pPoII-WSN-PB2、pPoII-WSN-PB1、pPoII-WSN-PA、pPoII-WSN-NP、pPoII-WSN-NP、pPoII-WSN-NA、pPoII-WSN-M 和 pPoII-WSN-NS) 转染 1×10^6 个 293T 细胞。使用减少量的 pcDNA787(PA) 的决定是根据以前的观察(Mena 等人,1996) 和产生病毒样颗粒(VLP) 最优化条件的数据(未给数据)。293T 细胞转染 24 小时后,发现在每毫升上清液中有 7×10^3 pfu 的病毒(实施例 1,表 1),这第一次证明了反向遗传方法能够完整地从小质粒中产生流感 A 型病毒。

[0072] 表 1. 用于从克隆的 cDNA 中产生流感病毒的质粒

[0073]

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

[0074] *用所示的质粒转染 293T 细胞。24 小时 (实验 1 或 2) 或 48 小时 (实验 3-8) 后, 测定 MDCK 细胞上清液中的病毒滴度。

[0075] 除非有另外的说明, 质粒用代表 A/WSN/33 病毒 RNA 的 cDNA 构建而成。

[0076] 流感病毒的产生和所有病毒结构蛋白质共表达的效率。虽然病毒 NP 和聚合酶蛋白的表达对质粒驱动产生的流感病毒已足够, 但其效率改进还有可能。在前面的研究中, 所有流感病毒结构蛋白质 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2 和 NS2) 的表达产生了含有编

码报道物氯霉素-乙酰基转移酶基因的人造 VLP (Mena 等人, 1996)。因而, 获得完全互补的结构蛋白质而不是仅仅那些 RNA 复制和转录所需的蛋白质, 可能增加病毒产生的效率。为此, 293T 细胞用下列最优化的病毒蛋白表达质粒转染 (如由 VLP 产物所判断; 未公开数据): 1 微克 pcDNA762 (PB2) 和 pcDNA774 (PB1); 0.1 微克 pcDNA787 (PA), 1 微克 pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NP0/14 和 pCAGGS-WNA15; 2 微克 pCAGGS-WSN-M1-2/1; 0.3 微克 pCA-NS2; 和 0.03 微克 pEP24c (M2), 以及 1 微克各 RNA 聚合酶 I 质粒 (实验 2, 表 1)。用同样一组的 RNA 聚合酶 I 质粒 (但 PB1 基因例外, 其以 pPoII-PR/8/34-PB1 替代来产生重配辅助病毒) 和只表达 PA、PB1、PB2 和 NP 的质粒 (实验 3, 表 1) 或者表达所有流感结构蛋白的那些质粒 (实验 4, 表 1) 一起转染另一批细胞。转染后 24 小时 (实验 1 和 2, 表 1) 或 36 小时 (未给数据) 的 WSN 病毒产量并未有明显的差异。然而, 当提供所有的流感病毒结构蛋白时 (实验 3 和 4, 表 1), 发现 PR/8/34-PB1 的病毒产量增加 10 倍以上。而缺少表达 PA、PB1、PB2 和 NP 蛋白的质粒之一的诸阴性对照都不产生任何病毒 (实验 5-8, 表 1)。因而, 取决于所产生的病毒, 所有流感 A 型病毒结构蛋白的表达明显地促进了该反向遗传系统的效率。

[0077] 接着, 使用用来产生具有 A/PR/8/34-PB1 基因的病毒的一组质粒侧定了细胞转染后病毒产生的动力学。在 3 次实试验的二次中, 转染后 24 小时首先侧到病毒, 该时间测得的滴度为 $> 10^3$ pfu/ml, 转染后 48 小时增加到 $> 10^6$ pfu/ml (表 2)。为评估正在产生病毒的质粒转染的细胞的百分比, 转染后 24 小时用 EDTA (0.02%) 处理 293T 细胞以使其分散, 然后进行有限稀释研究。这一试验中, 在此时间点上没有发现培养上清液中有游离病毒。该结果表明在 $10^{3.3}$ 个细胞中有 1 个细胞产生感染性病毒颗粒。

[0078] 表 2. 质粒转染入 293T 细胞 * 后病毒产生的动力学

[0079]

质粒转染后的时间 (小时)	培养基上清液中的病毒滴度 (pfu/ml)		
	试验		
	1	2	3
6	0	ND	ND
12	0	ND	0
18	0	ND	0
24	00	2×10^3	6×10^3
30	ND	5×10^4	9×10^4
36	6×10^2	$> 1 \times 10^5$	7×10^5
42	ND	$> 1 \times 10^6$	5×10^6
48	8×10^4	$> 1 \times 10^6$	1×10^7

[0080] * 用 8 种编码从 A/WSN/33 病毒 (例外的是 PB1 基因, 它衍生于 A/PR/8/34 病毒) 基因的 RNA 聚合酶 I 质粒和 9 种文中描述的蛋白表达质粒转染 293T 细胞。在不同的时间点滴定 MDCK 细胞培养上清液中的病毒。ND 表示未进行测试。

[0081] 含有 NP 蛋白 FLAG 表位的流感病毒的回收。为验证该新的反向遗传系统能将突变导入流感 A 型病毒的基因组中,产生了含有 NA 蛋白 FLAG 表位 (Castrucci 等人,1992) 的病毒。用 RNA 聚合酶 I 质粒 (pPoII-WSN-NA/FL79) 与所需的 RNA 聚合酶 I 和蛋白表达质粒一起转染 293T 细胞,该 RNA 聚合酶 I 质粒含有编码 NA 蛋白及其头部底端 FLAG 表位的 cDNA。为证实该回收的病毒 (PR8-WSN-FL79) 确实表达 NA-FLAG 蛋白,进行用 PR8-WSN-FL79 或 A/WSN/33 野生型病毒感染细胞的免疫染色试验。用抗 FLAG 表位的单克隆抗体检测感染了 PR8-WSN-FL79 而非感染了野生型病毒的细胞 (图 4)。PR8-WSN-FL79 病毒的回收与未加尾的野生型病毒的回收一样有效 (未给数据)。这些结果表明这种新反向遗传系统允许将诸突变体导入流感 A 型病毒基因组中。

[0082] 含有 PA 基因突变的感染性流感病毒的产生。为测试含有 PA 基因突变的病毒,导入了两个沉默突变,产生了限制性核酸内切酶新的识别序列 (Bsp120I 识别 mRNA 的 846 位、PvuII 识别第 1284 位)。通过反向遗传学修饰这个基因在以前是不可能的,因为缺少可靠的选择系统。回收得到转染子病毒 PA-T846C 和 PA-A1284。用两次连贯的有限稀释生物学方法克隆了该回收的转染子病毒。为证实该回收病毒是真正的具有 PA 基因突变的转染子,通过反转录 PCR 获得 PA 基因的 cDNA。如图 5 所述,PA-T846C 和 PA-A1284C 病毒含有预期的 PA 基因内的突变,如存在新导入的限制性位点所证明的那样。不用反转录步骤而以同样的病毒和引物作 PCR 没有产生任何产物 (未给数据),这表明 PA cDNA 确实起源于 vRNA 而不是用于产生病毒的质粒。这些结果阐明了具有突变基因的病毒可在不使用辅助病毒条件下产生和回收。

[0083] 讨论

[0084] 本文所述的反向遗传学系统允许人们完全从克隆的 cDNA 中有效地产生流感 A 型病毒。Bridgen 和 Elloit (1996) 还使用反向遗传方法产生了布尼奥罗病毒 (布尼亚病毒科),但是它仅含有负义 RNA 的 3 个节段,且产率低,为 10^2 pfu/ 10^7 细胞。虽然在诸实验中病毒产量不同,但是所观察的含有 8 个节段的流感病毒的产量均为 $> 10^3$ pfu/ 10^6 细胞。对于上述反向遗传学系统的高效有几种解释:RNP 不是在体外产生 (Luytjes 等人,1989),而是在体内通过使用 RNA 聚合酶 I 的 vRNA 的胞内合成和病毒聚合酶蛋白与 NP 的质粒驱动的表达而产生。而且,采用易于用质粒转染的 293T 细胞 (Goto 等人,1997) 确保大量的细胞接受了病毒产生所需的所有的质粒。另外,生长细胞表达最丰富的酶中的 RNA 聚合酶 I 产生的大量转录产物可能对该系统的整个效率有贡献。这些特征导致产生了相当丰富量的 vRNA 转录产物和足量的包裹 vRNA 的病毒蛋白、细胞核中 RNP 的形成和这些复合体输出到细胞膜,在那装配并释放新的病毒。

[0085] 先前建立的反向遗传学系统 (Enami 等人,1990;Neumann 等人,1994;Luytjes 等人,1989;Pleschka 等人,1996) 需要辅助病毒感染和为此而建立的允许从大量的辅助病毒中回收少量转染子的选择方法。已采用这些策略来生产具有下列 cDNA 驱动基因之一的流感病毒:PB2 (Subbarao 等人,1993)、HA (Enami 等人,1991;Horimoto 等人,1994)、NP (Li 等人,1995)、NA (Enami 等人,1990)、M (Castrucci 等人,1995;Yasuda 等人,1994) 和 NS (Enami 等人,1991)。除了那些用于 HA 和 NA 基因的选择方法外,大多数选择方法都依赖于生长温度、宿主范围限制或药物敏感性,因而限制了反向遗传方法在基因产物功能分析中的应用。即使具有 HA 和 NA 基因 (可靠的抗体驱动选择系统对此二基因是可利用的),

还是难于测试具有显著生长缺陷的病毒。相反,本文所述的反向遗传系统不需要辅助病毒,并允许产生任一基因节段中具有突变或具有严重生长缺陷的转染子。这个优点显示在图 5 中,该图表示具有 PA 突变基因的转染子病毒的回收。将活的突变导入流感 A 型病毒基因组的技术将使研究者能够说明许多长时间存在的问题,如病毒基因非翻译区域中的调节序列的性质、病毒蛋白的结构-功能关系,以及宿主范围限制和病毒病原性的分子基础。

[0086] 虽然可得到无活的流感疫苗,但是它们的效力是次优的,部分原因是它们引起局部 IgA 和细胞毒 T 细胞应答能力有限。现在正在进行的冷适应活流感疫苗的临床试验提示,这种疫苗已被最佳地减毒,所以它们将不会引起流感症状,但是仍将诱导保护性免疫力(参见 Keitel 和 Piedra 的综述,1998)。然而,初步的结果表明这些活病毒疫苗将不会比最好的无活疫苗有效得多(参见 Keitel 和 Piedra,1998),这留下了进一步改进的空间。一种可能性是用上述反向遗传系统修饰冷适应疫苗。或者,可通过使用反向遗传从零 (scratch) 开始,测试一种在编码内部蛋白的基因中具有多个减毒突变的“主要”流感 A 株。本发明上述的反向遗传系统最引起兴趣的应用是在涉及流感病毒新的 HA 或 NA 亚型的可疑流行性疾病的情况下快速测试减毒活病毒疫苗。

[0087] 这种新反向遗传系统将有可能提高作为疫苗载体的流感病毒的用途。该病毒可进行基因工程改造,以表达除了流感病毒蛋白质之外的外来蛋白质或免疫原性表位。例如可以测试具有作为第九个节段的外来蛋白质的病毒 (Enami 等人,1991) 并使用它们作为活疫苗。流感病毒不仅能激发强烈的细胞介导和体液免疫应答,它们还提供了病毒粒子表面 HA 和 NA 蛋白质的广阔阵列(如 15 种 HA 和 9 种 NA 亚型以及它们的流行性变体),允许对同一靶群反复免疫接种。

[0088] 具有编码报道基因的人造 vRNA 的流感 VLP 已通过用牛痘苗 -T7 聚合酶系统表达病毒结构蛋白和 vRNA 而制得 (Mena 等人,1996)。现在,使用反向遗传系统能产生含有编码 vRNA 转录和复制所需蛋白质(即 PA、PB1、PB2 和 NP) 的 vRNA 以及编码感兴趣蛋白的 vRNA 的 VLP。这样的 VLP 可用作基因传送载体。重要的是,它们缺乏编码病毒结构蛋白的基因将确保不会在 VLP- 基因治疗后产生感染性病毒。由于流感病毒基因组没有整合到宿主细胞的染色体中,该 VLP 系统将适合于只需要细胞短期转导的基因治疗(如癌症治疗)。与腺病毒载体相反 (Kovesdi 等人,1997),流感 VLP 可包含 HA 和 NA 两种变体,允许对靶群体的重复治疗。

[0089] 正粘病毒科包括流感 A 型、B 型和 C 型病毒,以及近来归类的 Thogoto 病毒。本文完全地从克隆的 cDNA 中产生感染性流感 A 型病毒的策略可用于任何正粘病毒,也许还可用于其他区段负义 RNA 病毒(如布尼亚病毒、沙粒病毒)。这种不受技术限制地操纵病毒基因组的能力,在病毒生命周期及其调控、病毒蛋白的功能和病毒致病性的分子机制的研究中有着深远的意义。

[0090] 实施例 2

[0091] 流感病毒蛋白 PB2、PB1、PA 和 NP 的表达导致人造病毒 RNA 的复制和转录。为产生流感 VLP,体内流感病毒 RNA 胞内合成采用了 RNA 聚合酶 I 系统(图 7)。在这个系统中,反义取向的编码报道基因的 cDNA 两侧连接流感病毒 RNA 的 5' 和 3' 非编码区。将这个盒子插在 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子之间。将该构建物转染入真核细胞中导致通过胞内 RNA 聚合酶 I 的作用转录该报道基因,因而产生了流感病毒样 RNA (Neumann 等人,1994)。流感

病毒感染后,病毒聚合酶复合体复制和转录该人造 vRNA,导致该报道基因的表达。

[0092] 为确定 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白的表达是否引起 RNA 聚合酶 I- 衍生的转录产物所编码的报道基因的表达,将在鸡 β 肌动蛋白启动子 (pCAGGS-WSN-NP0/14) 控制下表达 A/WSN/33(H1N1) 的 NP 蛋白的质粒 (各 1 微克)、在巨细胞病毒启动子 (pcDNA762(PB2)、pcDNA774(PB1) 和 pcDNA787(PA)) 控制下表达 A/PR/8/34 病毒的聚合酶蛋白的质粒和 RNA 聚合酶 I 报道基因构建物 (pPoII-GFP) 转染人胚肾细胞 (293T) 中。48 小时后,有 30-40% 的细胞表达 GFP (图 9)。相反,在缺少聚合酶或 NP 蛋白的转染细胞中不能检测到 GFP 的表达。这些结果表明,NP 蛋白和 3 种流感病毒聚合酶蛋白形成了复制和转录 RNA 聚合酶 I- 衍生的 GFP vRNA 的一种功能性复合体。

[0093] 最佳的 vRNA 转录和复制. 为确定最佳报道物 GFP 表达所需的质粒 DNA 的量,我们调整了聚合酶蛋白和 NP 蛋白的表达。先前的研究已表明,大量的 PA 减少了报道基因在转录 / 复制系统中的表达程度 (Mena 等人,1996)。因此,逐步减少质粒中 PA 的表达,确定了 0.1 微克的 pcDNA787(PA) 作为模板产生了最强的 GFP 表达。对 NP 这种 RNP 复合体中的主要结构成分可能需要大量的蛋白表达质粒。然而,更高数量的质粒并没有明显地影响 GFP 阳性 293T 细胞的数量。另外,不同量的 PB2 和 PB1 蛋白表达质粒 (从 1.0 到 0.03 微克) 也没有影响 293T 细胞中的 GFP 表达。因此,在接下来的所有实验中,采用 0.1 微克 pcDNA787(PA) 和 1.0 微克的 pcDNA774(PB1)、pcDNA762(PB2) 和 pcCAGGS-WSN-NP0/14。

[0094] 从克隆的 cDNA 中形成流感 VLP. 前面牛痘苗 T7RNA 聚合酶系统的研究表明,流感 VLP 的形成需要 9 种流感病毒蛋白:PB2、PB1、PA、HA、NA、NP、M1、M2 和 NS2 (Mena 等人,1996)。相反,NS1 蛋白对颗粒形成是不必要的 (Mena 等人,1996)。为建立一个有效的 VLP 产生的质粒驱动系统,制备了编码 HA、NA、M1、M2 和 NS2 基因的 cDNA。将该 cDNA 克隆到真核表达载体 pCAGGS/MCS 中 (受鸡 β -肌动蛋白启动子控制),分别产生了 pEWSN-HA、pCAGGS-WNA15、pCAGGS-WSN-M1-2/1、pEP24c 和 pCA-NS2。通过蛋白质印迹分析证实了各蛋白质的表达。

[0095] 为产生 VLP,采用 1.0 微克的各蛋白表达质粒 (对于 pcDNA787(PA) 例外,采用 0.1 微克) 和 1 微克报道基因构建物 pPoII-GFP 转染 10^6 个 293T 细胞。转染 48 小时后收集培养上清液,并将其与 A/WSN/33 病毒混合,以提供 GFP vRNA 复制和转录所需的流感病毒蛋白。然后将该混合物接种到 MDCK 细胞中。培育 10 小时后,检测到 GFP 阳性 MDCK 细胞,相应于 450 个颗粒 / 毫升上清液 (表 3)。因而,所有流感病毒结构蛋白的质粒 - 驱动表达导致了含有 GFP vRNA 的感染性流感 VLP 的形成。而且,GFP vRNA 被传送到 MDCK 细胞中。

[0096] 流感病毒的最佳装配. 还研究了表达不同量 RNA 聚合酶 I 报道基因构建物以及 HA、NA、M1、M2 和 NS2 质粒 DNA 的细胞中 VLP 的形成。在采用 pPoII-GFP 的实验中,1.0 微克的质粒 DNA 能非常有效地产生 VLP,而 2.0 微克或 3.0 微克效率显著较少。因为在感染后 NS2 和 M2 蛋白表达量低,最佳 VLP 的形成可能需要相对少量的表达质粒。将 M2 表达构建物从 1.0 微克减少到 0.1 微克,导致 GFP 阳性 MDCK 细胞数量增加 10 倍以上 (表 3)。进一步减少质粒到 0.03 微克并不增加 VLP 的数目。对于 NS2,测试的质粒量较低 (0.1 微克),VLP 的形成效率较低 (表 3)。

[0097] M1 蛋白是病毒粒子的主要结构成分。因而,有效形成 VLP 需要 M1 蛋白高水平表达。在用 1.0 微克或 2.0 微克 M1 质粒 DNA 转染的细胞中进行 VLP 形成比较实验中检验了这一预言。如表 3 所示,较大的质粒导致 GFP 阳性 MDCK 细胞增加 10 倍以上。表达 HA 和

NA 蛋白的质粒的两种不同量 (1 微克 :2 微克) 比较, 并没有揭示 VLP 形成有任何显著差异, 因此在接下来的实验中各质粒 (pEWSN-HA 和 pCAGGS-WSN15) 选用 1 微克。总而言之, 这些研究导致了 VLP 形成效率增加 100 倍以上, 并最终导致每毫升上清液中产生 10^4 个以上的感染性流感病毒粒子 (图 10)。

[0098] 表 3. 用于形成感染性 VLP* 的质粒 DNA 的最佳量

[0099]

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

[0100] * 用所有 9 种流感病毒病毒结构蛋白的表达质粒和 RNA 聚合酶 I-GFP 基因质粒转染 293T 细胞。转染 48 小时后, 收集含有 VLP 的上清液, 使其与 A/WSN/33 辅助病毒混合接种到 MDCK 细胞中。感染 10 小时后固定细胞, 并用荧光显微镜检测 GFP 表达。仅改变 M1、M2 和 NS2 质粒的量 (粗体字) 以测定它们在 MDCK 细胞中 GFP 表达的最佳用量。

[0101] 通过计数 5 个显微镜视野中的 GFP 阳性细胞数测定 VLP 形成的相对效率。选择含有 1 微克各种质粒的样品 (产生 450 个感染性 VLP/ 毫升上清液) 作为参照 (值 1)。

[0102] 完全从质粒产生 VLP 的可靠性. 为验证 VLP 以真正流感病毒相同的方式开始感染, 用抗 WSN HA 抗体中和 VLP。将从质粒转染的 293T 细胞得到的含有 VLP 的上清液与抗 WSN HA 混合单克隆抗体或与抗水泡性口炎病毒 (VSV, 负控制) G 蛋白的单克隆抗体室温共培育 1 小时。将没有被抗 WSN HA 混合单克隆抗体中和的 A/PR/8/34 辅助病毒加到该混合物中, 并接种到 MDCK 细胞中。只有抗 -WSN-HA- 特异性单克隆抗体中和了 VLP, 这表明 HA 介导了 VLP 附着和进入细胞。

[0103] 接着, 确定了 VLP 形成所需的最小蛋白组。其他学者已确定 vRNA 复制和转录必需的 3 种流感病毒聚合酶和 NP (Houda 等人, 1988)。因此, 包括了这 4 种蛋白中的每一种, 但顺次删去 HA、NA、M1、M2 或 NS2。排除这些质粒的任何一种都不影响转染 293T 细胞中的 GFP vRNA 的复制 / 转录。从缺少 HA、NA、M1 或 NS2 蛋白的转染 293T 细胞得到的上清液并不促进感染的 MDCK 细胞中的 GFP 表达, 这表明不存在感染性 VLP。删去 M2 能检测到感染性 VLP, 但量少 (与整套结构蛋白相比减少 500 倍)。因而, 与从牛痘苗 - 病毒系统研究得

到的数据一致,有效形成感染性 VLP 需要所有流感病毒结构蛋白。

[0104] VSV 糖蛋白可取代 VLP 产生中的 HA 和 NA 蛋白。用 VSV 的 G 蛋白替换流感病毒 HA 和 NA 蛋白,该 G 蛋白具有受体结合和融合的功能。在转染了 pPoII-GFP 的 293T 细胞中、最佳量的 PB2、PB1、PA、NP、M1、M 和 NS2 表达构建物、1 微克 VSV-G 构建物 (pCAGGS-VSV-G) 中,用 VSV-G 蛋白替换流感病毒糖蛋白并没有对 VLP 的形成有不利的影响。相反,反复发现当用 VSV-G 而不是 HA 和 NA 作为病毒糖蛋白时,产生了较高数量的 GFP 阳性细胞。因而,VSV G 蛋白能有效地掺入流感病毒粒子中,并在病毒的释放和进入中具有与 HA 和 NA 一样的功能。

[0105] 一种产生感染性流感病毒颗粒的有效系统可能是研究该病毒的财富 (asset),并有可能用于疫苗和基因治疗载体的生产。与现有的牛痘病毒系统相反,本文所述的 VLP 产物策略在细胞最初的转染和 VLP 的产量 ($> 10^4$ 感染性颗粒 / 毫升上清液) 都是非常有效的。而且,该系统可完全地由表达流感病毒蛋白的质粒 (即缺少其他病毒蛋白) 所驱动,这极大地简化了结果的解释。另一主要的优点是能够研究病毒粒子形成、RNP 复合体的包裹、病毒复制的出芽和结合与融合过程中致命突变的影响。另外,上述系统的操作可能与其他病毒 (如副粘病毒和弹状病毒) 同等地好。

[0106] 流感病毒 HA 和 NA 蛋白在功能上能被 VSV 糖蛋白 G 替换。先前已报道当用重组 SV40 病毒提供 G 蛋白时流感病毒不能掺入 VSV G 蛋白 (Naim 等人,1993)。本文所描述的结果表明 HA 和 NA 都不是 VLP 形成所必需的,虽然不能排除这些糖蛋白在与病毒其他蛋白的相互作用中起作用,因而影响病毒粒子的结构,正如表达短尾 HA、NA 及两者的形状伸长的病毒所提示的那样 (Garcia-Sastre 等人,1995 ;Jin 等人,1994 ;Jin 等人,1997 ;Mitnaul 等人,1996)。

[0107] 上述以质粒为基础的系统可能特别有利于治疗基因的传送。可制备含有编码转录和复制所需蛋白质 (即 NP 和聚合酶) 的 vRNA 以及编码感兴趣蛋白质的 vRNA 的 VLP。这些颗粒是感染性的并可将指定的基因传送到靶细胞中,在那进行复制和转录。因为这些颗粒不含有完整互补的病毒基因,所以它们不能产生感染性子代病毒。这个特征以及病毒基因组没有整合到宿主染色体中将确保在人和非人类动物中基因传送的生物学安全性。最后,15 种 HA 和 9 种 NA 亚型及其变体的可获得性将允许 VLP 的反复给药,因此克服了对载体产生蛋白质的免疫抗性,这是反复使用其他病毒载体 (如腺病毒) 所面临的主要障碍之一。该质粒驱动系统的另一优点是可在仅需要外来蛋白短期表达的情况下 (如癌症治疗) 使用。

[0108] 实施例 3

[0109] 通过使用 Cre-loxP 系统可产生包装细胞系来进行复制缺陷性病毒的生产。例如,可制备含有转录终止盒和一个病毒基因的蛋白表达载体 (如 pBS302 of LifeTechnologies,Bethesda,Maryland ;和 Sauer 等人,1993 ;Lasko 等人,1992 ;Pichel 等人,1993 ;Bolivar 等人,1977 ;Stuhl 等人,1981 ;Stuhl 等人,1985 ;Fiers 等人,1978),该转录终止盒两侧连接有两个 loxP 位点。从启动子序列开始的转录在转录终止位点被阻断。因而,病毒基因没有被转录和翻译。受这种载体稳定转染的细胞再以缺少 vRNA 其编码克隆到 loxP 系统中的基因的流感病毒感染。此病毒还含有编码 Cre 蛋白的另一 vRNA。因为缺乏自己的 vRNA,此病毒在正常细胞中不能存活。然而,在包装细胞系中,由 vRNA 表达的 Cre 蛋白导致在 loxP 位点产生重组,结果该转录终止位点被删除。因而,各病毒基因现在被转

录和表达,使病毒能在这些细胞中扩增(图 11)。

[0110] 另外,制备了表达受 loxP 系统控制的晚期病毒蛋白(即 HA、NA、M1、M2 和 NS2)的包装细胞系(图 12)。可用其他病毒受体结合和融合蛋白(如埃博拉病毒 GP、马尔堡病毒 GP、布尼亚病毒糖蛋白 GP1 和 GP2、弹状病毒和副粘病毒的 G 和 / 或 F 蛋白、Thogoto 病毒糖蛋白和正链 RNA 病毒的糖蛋白)替换 HA 和 NA。产生了病毒样颗粒,它含有编码复制 / 转录所需蛋白质(即聚合酶和 NP 蛋白)的 vRNA、编码感兴趣基因的 vRNA 和编码 Cre 的 vRNA。在该包装细胞系中这些 vRNA 被包裹到病毒样颗粒里。

[0111] 这些病毒样颗粒可用于疫苗及基因治疗目的,因为(i)它们不含有完整互补的病毒基因,因而不能形成感染性子代病毒,符合严格的安全性要求;(ii)它们将有可能表达高水平的外来蛋白;(iii)它们不表达主要抗原的病毒糖蛋白(HA 和 NA);因此,宿主对病毒蛋白的免疫应答是有限的。

[0112] 参考文献

- [0113] Albo,, C., Martin, J. 和 Protela, A., J.Virol., 70, 9013-9017 (1996)。Baron, M. D. &Barrett, T., J.Virol., 71, 1265-1271 (1997)。
- [0114] Bolivar 等人, Gene, 2, 95 (1977)。
- [0115] Bridgen, A. & Elliott, R. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 15400-15404 (1996)。
- [0116] Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y., J.Virol., 69, 2725-2728 (1995)。
- [0117] Castrucci, M. R., Bilsel, P. & Kawaoka, Y., J.Virol., 66, 4647-4653 (1992)。
- [0118] Collins, P. L., Hill, M. G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M. & Murphy, B. R., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 11563-11567 (1995)。
- [0119] Cozelmann, K. K. & Schnell, M., J.Virol., 68, 712-719 (1994)。
- [0120] Dunn, E. F., Pritlove, D. C., Jin, H. 和 Elliott, R. M., Virology, 211, 133-143 (1995)。
- [0121] Elliott, R. M., Mol. Med., 3, 572-577 (1997)。
- [0122] Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P., Virology, 185, 291-298 (1991)。
- [0123] Enami, M. 和 Palese, P., J.Virol., 65, 2711-2713 (1991)。
- [0124] Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M. 和 Palese, P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, 3802-3805 (1990)。
- [0125] Fiers 等人, Nature, 273, 113 (1978)。
- [0126] Garcia-Sastre, A. 和 P. Palese, Virus Res., 37, 37-47 (1995)。
- [0127] Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J. 和 Kolakofsky, D., EMBO J., 14, 6087-6094 (1995)。
- [0128] Goto, H., Bethell, R. C. 和 Kawaoka, Y., Virology, 238, 265-272 (1997)。
- [0129] Hagen, M. Chung, T. D. Y., Butcher, J. A. 和 Krysal, M., J.Virol., 68, 1509-1515 (1994)。
- [0130] He, B., Paterson, R. G., Ward, C. D. 和 Lamb, R. A., Virology, 237, 249-260 (1997)。
- [0131] Hoffman, M. A. 和 Banerjee, A. K., J.Virol., 71, 4272-4277 (1997)。
- [0132] Honda, A., K. Ueda, K. Nagata 和 A. Ishihama, J.Biochem. (Tokyo), 104,

1021-1026(1988)。

[0133] Horimoto, T. 和 Kawaoka, Y. , J. Virol. , 68, 3120-3128 (1994)。

[0134] Huddleston, J. A. 和 Brownless, G. G. , Nucl. Acids Res. , 10, 1029-1037。

[0135] Jin, H. , G. P. Leser 和 R. A. Lamb. , EMBO J. , 13, 5505-5515 (1994)。

[0136] Jin, H. , G. P. Leser, J. Zhang 和 R. A. Lamb. , EMBO J. , 16, 1236-1247 (1997)。

[0137] Kato, A. , Sakai, Y. , Shioda, T. , Kona, T. , Nakanishi, M. 和 Nagai, Y. , Genes Cells , 1, 569-579 (1996)。

[0138] Keitel, W. A. 和 Piedra, P. A. 在 Textbook of Influenza 中, Nickolson, K. G. , Webster, R. G. 和 Hay, A. (Blackwell, Oxford) 编, pp. 373-390 (1998)。

[0139] Kovesdi, I. , Brough, D. E. , Bruder, J. T. 和 Wickham, T. L. , Curr. Opin. Biotechnol. , 8, 583-589 (1997)。

[0140] Lasko 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 89, 6232 (1992)。

[0141] Lawson, N. D. , Stillman, E. A. , Whitt, M. A. 和 Rose, J. K. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 92, 4477-4481 (1995)。

[0142] Leahy, M. B. , Dessens, J. T. 和 Nuttall, P. A. , J. Virol. , 71, 8347-8351 (1997)。

[0143] Leahy, M. B. , Dessens, J. T. 和 Nuttall, P. A. , J. Virol. , 71, 8352-8356 (1997)。

[0144] Leahy, M. B. , Dessens, J. T. , Pritlove, D. C. 和 Nuttall, P. A. , J. Virol. , 72, 2305-2309 (1998)。

[0145] Li, S. , Xu, M. 和 Coelingh, K. , Virus Res. , 37, 153-161 (1995)。

[0146] Luytjes, W. , Krystal, M. , Enami, M. , Parvin, J. D. 和 Palese, P. , Cell , 59, 1107-1113 (1989)。

[0147] Mena, I. , Vivo, A. , Pérez, E. 和 Portela, A. , J. Virol. , 70, 5016-5024 (1996)。

[0148] Naim, H. Y. 和 M. G. Roth. , J. Virol. , 67, 4831-4841 (1993)。

[0149] Neumann, G. , Castrycci, M. R. 和 Kawaoka, Y. , J. Virol. , 71, 9690-9700 (1997)。

[0150] Neumann, G. Zobel, A. & Hobom, G. , Virology , 202, 477-479 (1994)

[0151] Niwa, H. , Yamamura, K. 和 Miyazaki, J. , Gene , 108, 193-200 (1991)。

[0152] Palese, P. , Zheng, H. Engellhardt, O. G. , Pleschka, S. 和 Garcia-Sastre, A. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 93, 11354-11358 (1996)。

[0153] Perez, D. R. 和 Donis, R. O. , Viroligy , 249, 52-61 (1998)。

[0154] Pichel 等人, Oncogene , 8, 3333 (1993)。

[0155] Pleschka, S. , Jaskunas, S. R. , Engelhardt, O. G. , Zürcher, T. , Palese, P. 和 Garcia-Sastre, A. , J. Virol. , 70, 4188-4192 (1996)。

[0156] Radecke, F. , Spielhofer, P. , Schneider, H. , Kaelin, K. , Huber, M. , Dotsch, C. , Christiansen, G. & Gilleter, M. A. , EMBO J. , 14, 5773-5784 (1995)。

[0157] Schnell, M. J. , Mebatsion, T. 和 Conzelmann, K. K. , EMBO J. , 13, 4195-4203 (1994)。

[0158] Struhl, K. , NAR. , 13, 8587 (1985)。

[0159] Struhl, K. 等人, J. Mol. Biol. , 152, 553 (1985)。

[0160] Subbarao, E. K. , kawaoka, Y. 和 Murphy, B. R. , J. Virol. , 67, 7223-7228 (1993)。

- [0161] Weber, F., Haller, O. 和 Kochs, G., J. Virol., 70, 8361-8367 (1996)。
- [0162] Weder, F., Haller, O. 和 Kochs, G., Arch. Virol., 142, 1029-1033 (1997)。
- [0163] Whelan, S. P., Ball, L. A., Barr, J. N. 和 Wettx, G. T., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 8388-8392 (1995)。
- [0164] Yasuda, J., Bucher, D. J. 和 Ishihama, A., J. Virol., 68, 8141-8146 (1994)。
- [0165] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均作为参考。虽然本发明说明书的前面部分已描述了一些相关的较佳实施例, 以及为了进行解释已作了许多的详细描述, 但是, 本领域熟练技术人员显然明白, 本发明可以允许其他实施例, 并且可在不背离本发明基本原理的情况下对上述某些内容进行相当的变化。

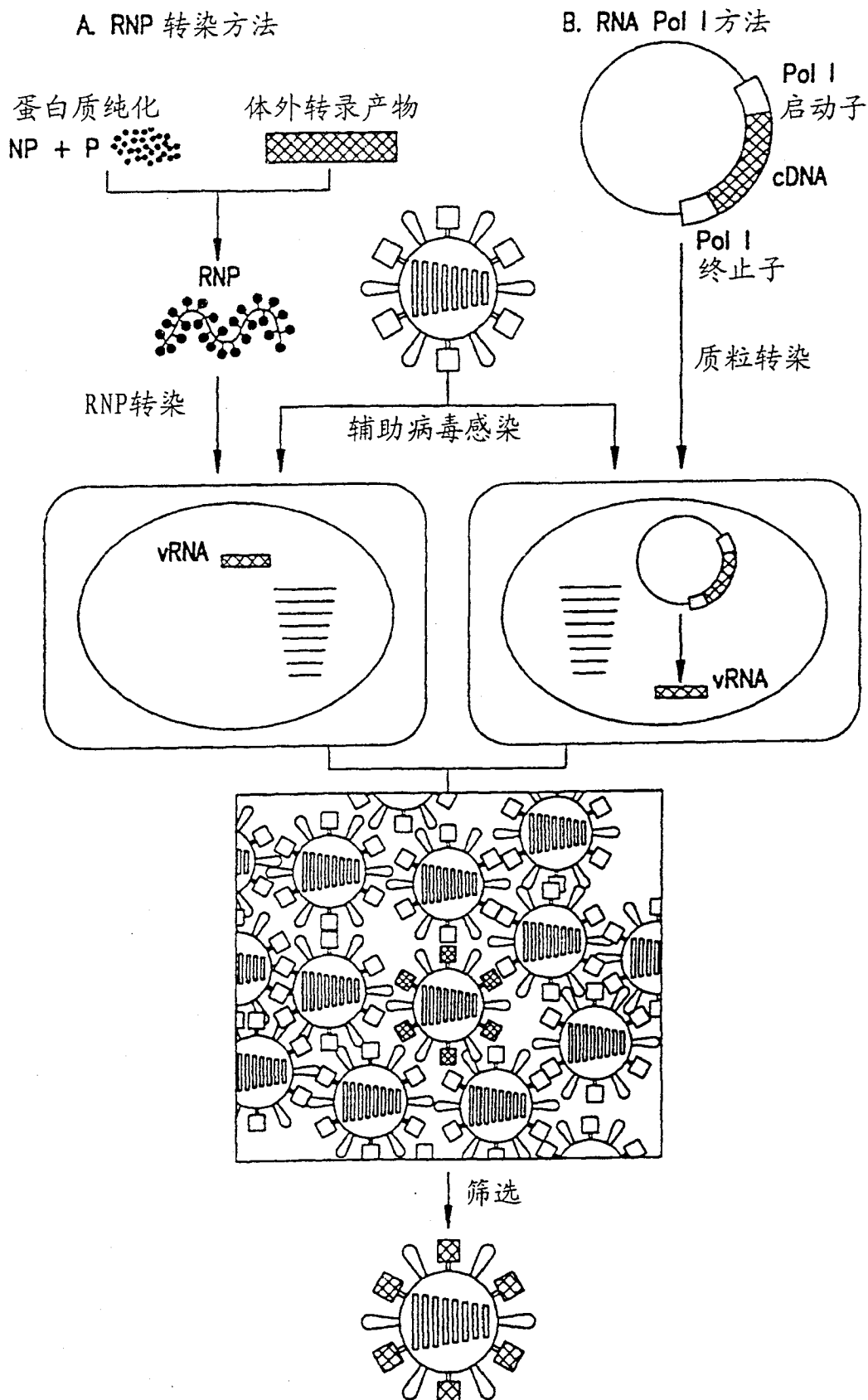


图 1

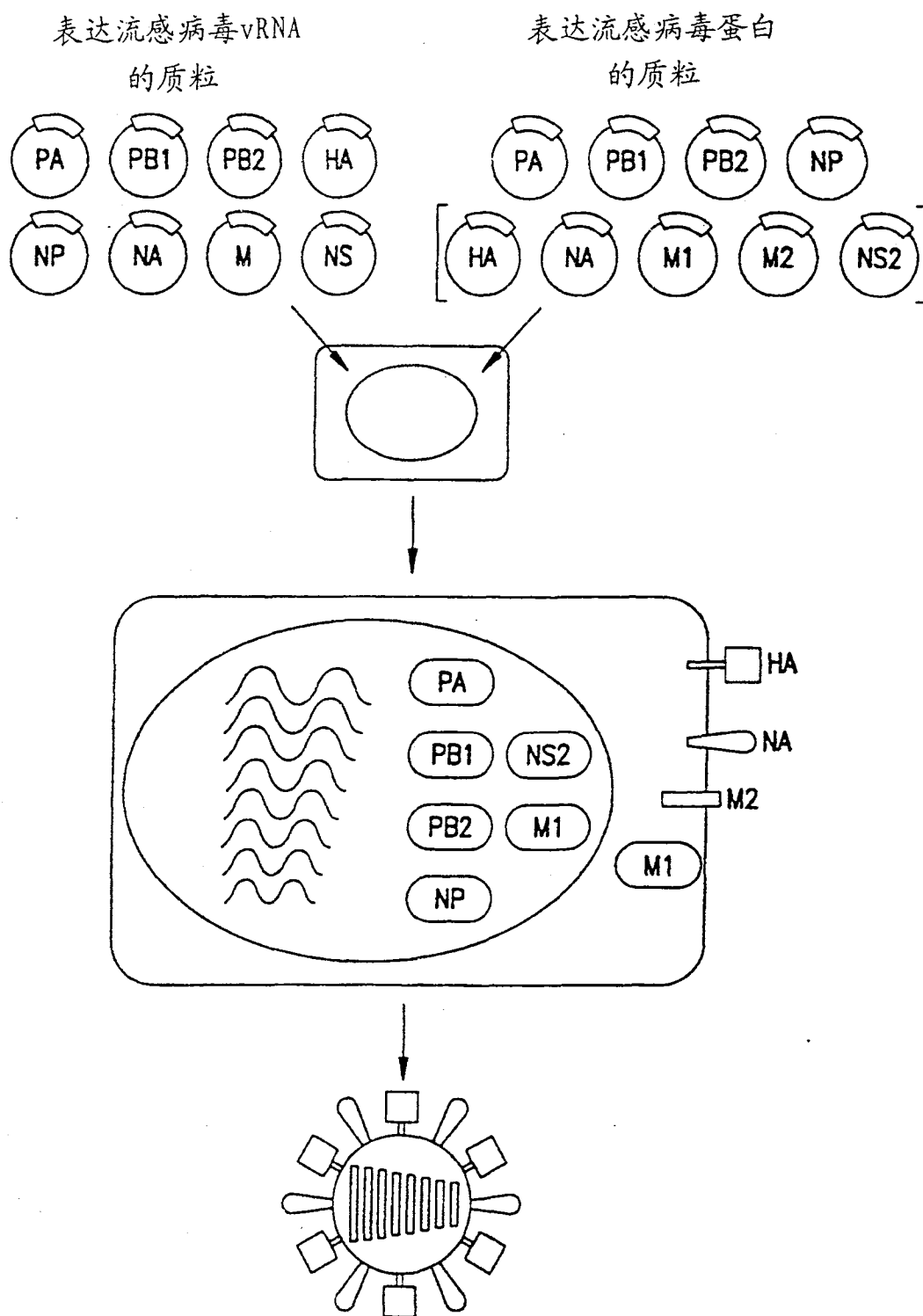


图 3

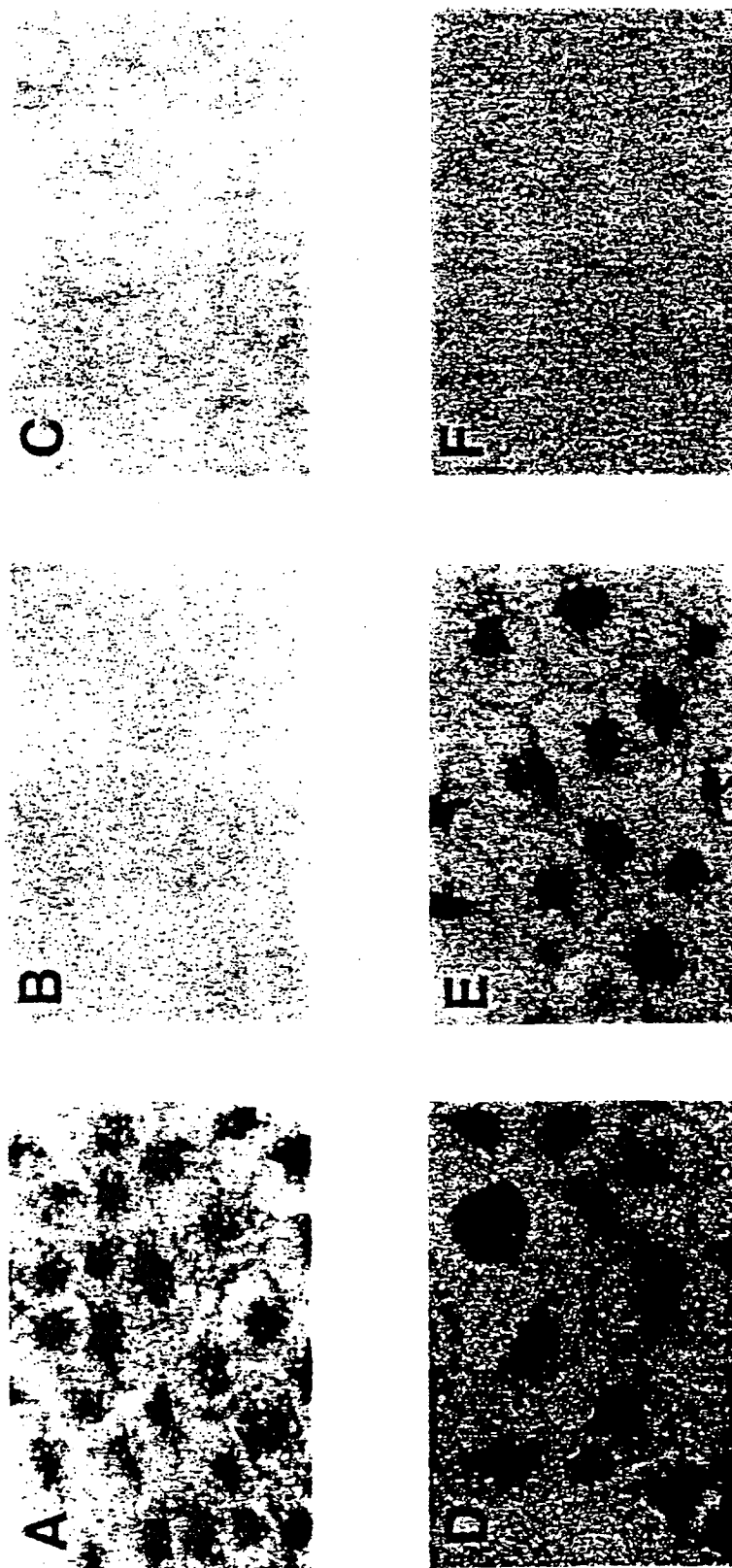


图 4

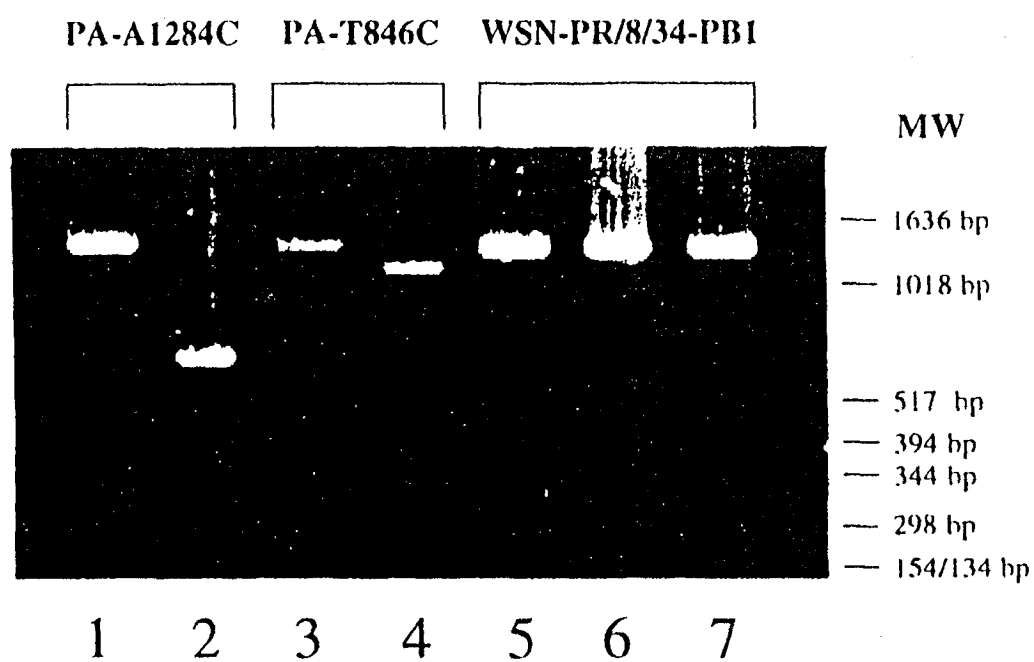


图 5

Poli-5'WPB2

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

长度: 80 nt

重叠序列: 26 nt

Poli-3'WPB2

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

长度: 67 nt

重叠序列: 24 nt

Poli-5'WPB1

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

长度: 89

重叠序列: 26 nt

Poli-3'WPB1

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

长度: 67 nt

重叠序列: 27 nt

Poli-5'WPA

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

长度: 103

重叠序列: 25 nt

Poli-3'WPA

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

长度: 67 nt

重叠序列: 27 nt

Poli-5'WHA

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

长度: 40 nt

重叠序列: 22 nt

Poli-3'WHA

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

长度: 46 nt

重叠序列: 29 nt

图 6A

Poli-5'WNPCAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTA TTT TTC TTT AAT TG

长度: 47 nt

重叠序列: 30 nt

Poli-3'WNPCAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT AGA TAA TCA CTC

长度: 42 nt

重叠序列: 26 nt

Poli-5'WNACAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG AGT TTT TTG AAC AAA C

长度: 46 nt

重叠序列: 29 nt

Poli-3'WNACAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GAG TTT AAA TGA ATC CAA ACC

长度: 48 nt

重叠序列: 32 nt

Poli-5'WMCAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG TAG TTT TTT ACT CCA GC

长度: 47 nt

重叠序列: 30 nt

Poli-3'WMCAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GTA GAT ATT GAA AG

长度: 41 nt

重叠序列: 26 nt

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

长度: 53 nt

重叠序列: 36 nt

Poli-3'WNSCAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT GAC AAA GAC ATA ATG G

长度: 46 nt

重叠序列: 30 nt

斜体:

BsmBI识别序列

下划线:

流感病毒序列

下划线+粗体:

病毒编码区域

图 6B

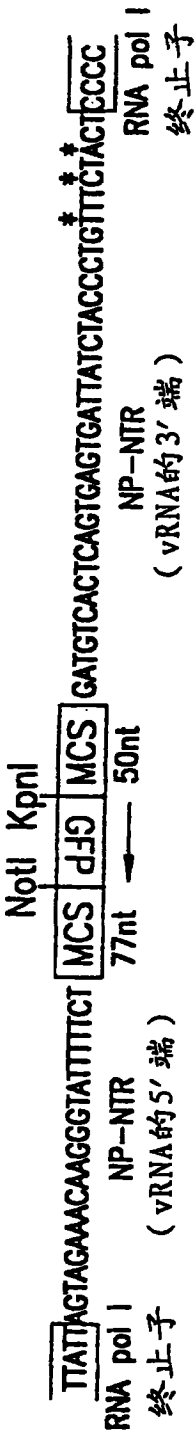


图 7

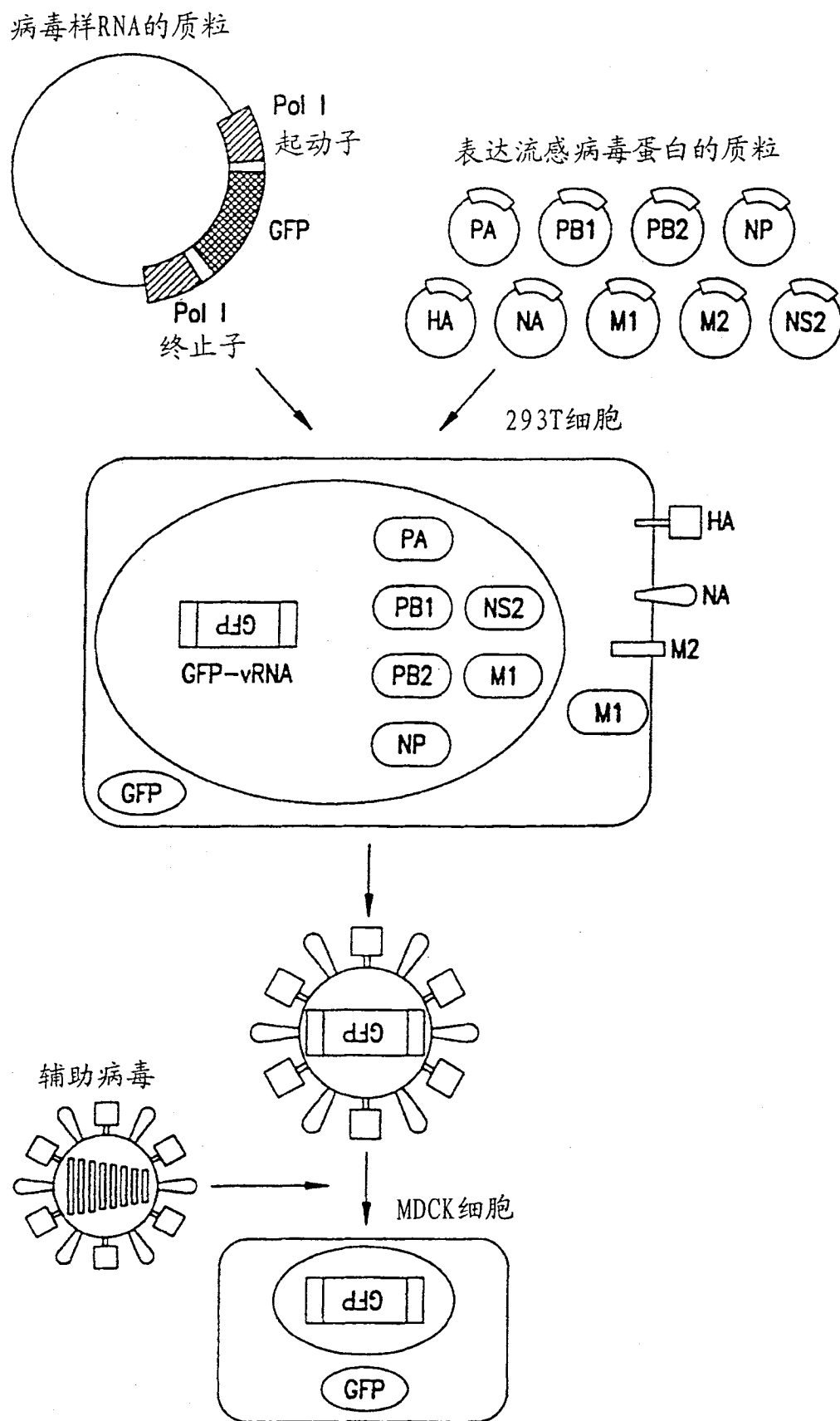


图 8

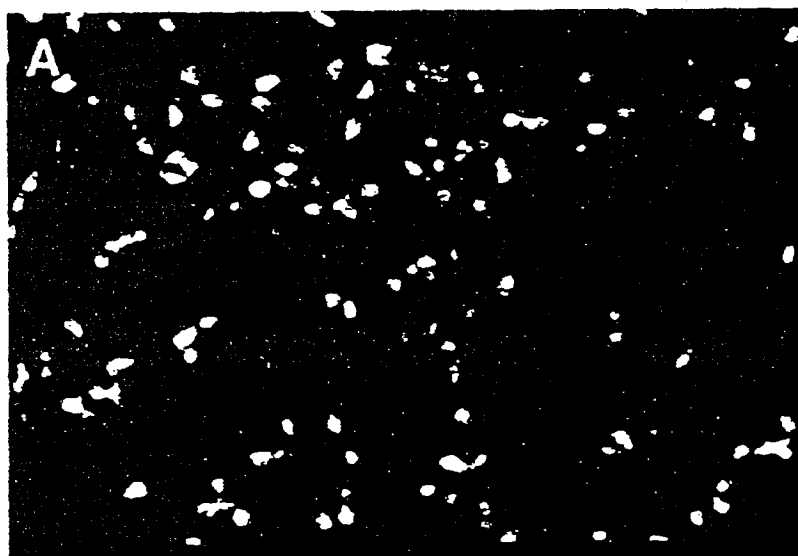


图 9A



图 9B

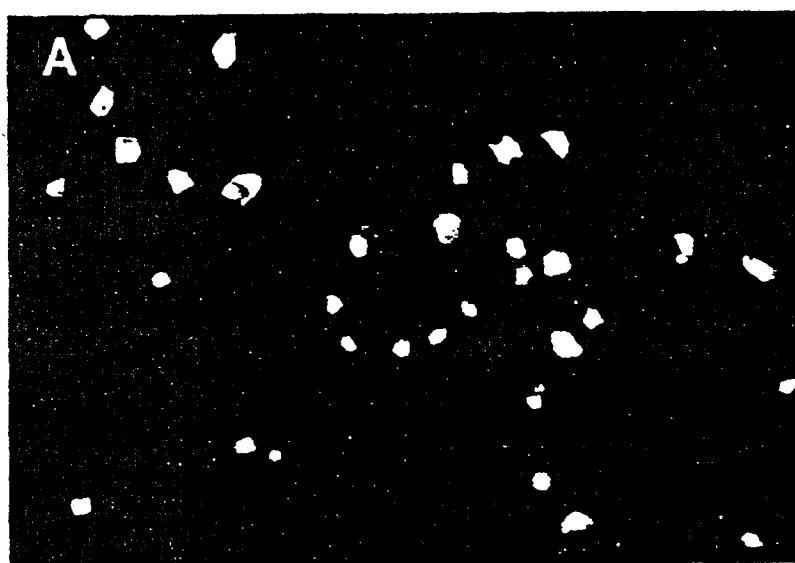


图 10A



图 10B

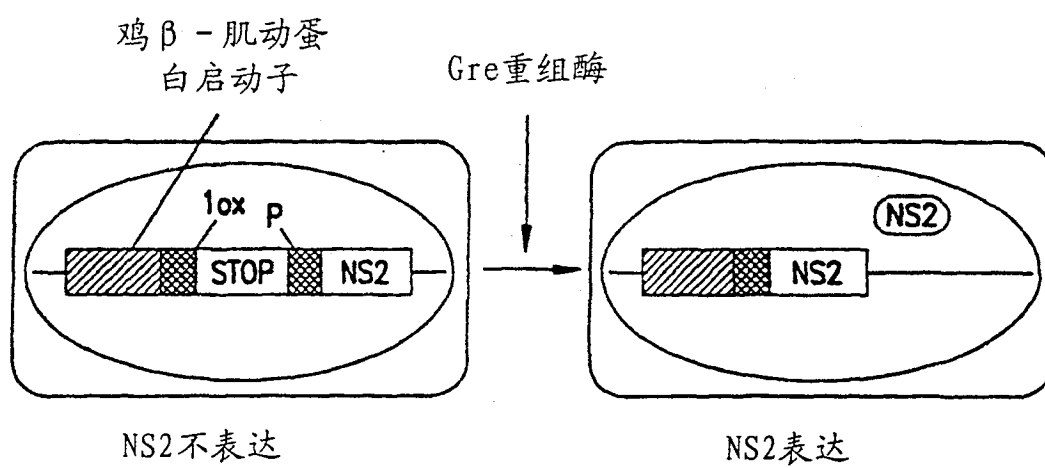


图 11

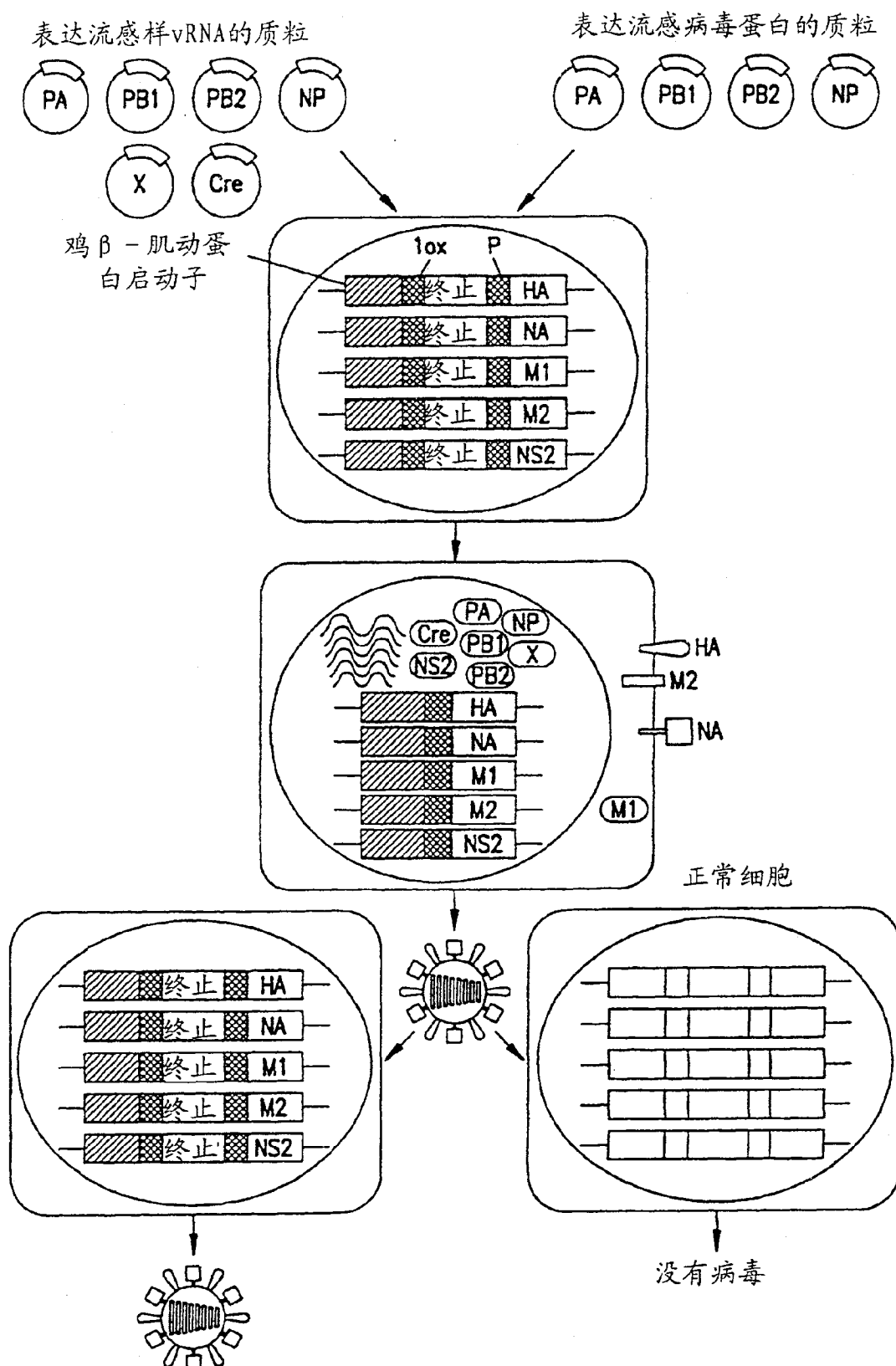


图 12