

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01811642.6

[51] Int. Cl.

C07K 14/115 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/13 (2006.01)

A61K 39/165 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1298738C

[22] 申请日 2001.6.21 [21] 申请号 01811642.6

[30] 优先权

[32] 2000.6.23 [33] US [31] 60/213,655

[86] 国际申请 PCT/US2001/019806 2001.6.21

[87] 国际公布 WO2002/000694 英 2002.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.23

[73] 专利权人 惠氏控股有限公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 C·L·帕克斯

[56] 参考文献

WO9813501A2 1998.4.2

WO9949017A2 1999.9.30

审查员 林峻凯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

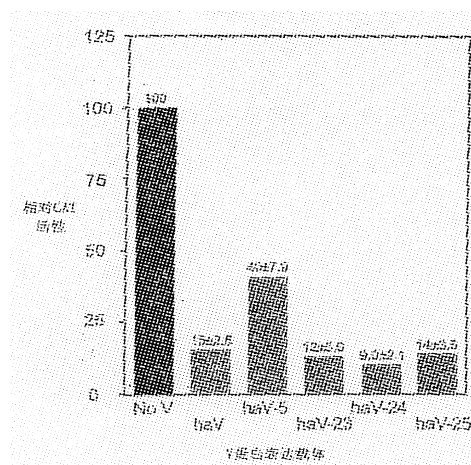
权利要求书 3 页 说明书 44 页 附图 10 页

[54] 发明名称

修饰的麻疹病毒 V 蛋白

[57] 摘要

描述了在对应于麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸 112-134 区域中具有至少一个突变的修饰的麻疹病毒，其中氨基酸 113 或 114 之一或都突变。这种修饰的麻疹病毒显示基因表达减少的抑制。可能包括在基因组其它区域的突变或缺失，包括羧基末端区域。



1.一种分离的、重组产生的无节段反义单链 RNA 麻疹病毒属的病毒，所述病毒选自麻疹病毒、犬瘟病毒、牛瘟病毒和海豚麻疹病毒，其特征在于，所述病毒选自麻疹病毒、犬瘟病毒、牛瘟病毒和海豚麻疹病毒的 V 蛋白氨基酸序列依次为 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3，其中在所述麻疹病毒属病毒的 V 蛋白氨基酸 113 和 114 中有至少一个突变，其中氨基酸 113 的突变是从酪氨酸变为除了天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的其它氨基酸，氨基酸 114 的突变是从天冬氨酸变为除了谷氨酸以外的其它氨基酸。

2. 如权利要求 1 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，所述突变在氨基酸 113 处。

3. 如权利要求 2 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，所述氨基酸 113 处的突变是从酪氨酸变为丙氨酸。

4. 如权利要求 1 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，所述突变在氨基酸 114 处。

5. 如权利要求 4 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，氨基酸 114 处的突变是从天冬氨酸变为丙氨酸。

6. 如权利要求 1 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，在氨基酸 113 和 114 处都有突变。

7. 如权利要求 6 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，所述氨基酸 113 处的突变是从酪氨酸变为丙氨酸，而所述氨基酸 114 处的突变是从天冬氨酸变为丙氨酸。

8. 如权利要求 2 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，所述病毒是麻疹病毒。

9. 如权利要求 8 所述的麻疹病毒属的病毒，其特征在于，所述病毒还在麻疹病毒 V 蛋白的羧基末端区域，即 C 末端区域的至少一部分中具有突变或缺失，其中突变是在氨基酸 233 和 234 处，所述氨基酸 233 和 234 上的各突变是从精氨酸变为丙氨酸或天冬氨酸，和

其中所述缺失选自氨基酸 232-299、279-299、267-299、250-299、243-299

和 236-299 的缺失。

10. 如权利要求 8 所述的病毒，其特征在于，该病毒还包括：

(a)3'基因组启动子区域中的至少一个减毒突变选自核苷酸 26 由 A 到 T，核苷酸 42 由 A 到 T 或 A 到 C 和核苷酸 96 由 G 到 A，其中这些核苷酸存在于正链、反基因组、信使有义链中；

(b)RNA 聚合酶基因中的至少一个减毒突变，选自产生氨基酸改变的核苷酸改变，这些氨基酸改变选自残基 331 由异亮氨酸到苏氨酸，1409 由丙氨酸到苏氨酸，1624 由苏氨酸到丙氨酸，1649 由精氨酸到甲硫氨酸，1717 由天冬氨酸到丙氨酸，1936 由组氨酸到酪氨酸，2074 由谷氨酰胺到精氨酸和 2114 由精氨酸到赖氨酸。

11. 如权利要求 8 所述的病毒，其特征在于，该病毒包括至少一个减毒突变，选自：

(a)对于 N 基因，产生氨基酸改变的核苷酸改变，所述氨基酸改变选自残基 129 由谷氨酰胺到赖氨酸，148 由谷氨酸到甘氨酸，和 479 由丝氨酸到苏氨酸；

(b)对于 P 基因，产生氨基酸改变的核苷酸改变，所述氨基酸改变选自残基 225 由谷氨酸到甘氨酸，275 由半胱氨酸到酪氨酸，和 439 由亮氨酸到脯氨酸；

(c)对于 C 基因，产生氨基酸改变的核苷酸改变，所述氨基酸改变选自残基 73 由丙氨酸到缬氨酸，104 由甲硫氨酸到苏氨酸，和 134 由丝氨酸到酪氨酸；和

(d)对于 F 基因末端信号，改变是核苷酸 7243 由 T 到 C，其中这些核苷酸存在于正链、反基因组，信使有义链中。

12. 如权利要求 9 所述的病毒，其特征在于，该病毒还包括：

(a)3'基因组启动子区域中的至少一个减毒突变，选自核苷酸 26 由 A 到 T，核苷酸 42 由 A 到 T 或 A 到 C 和核苷酸 96 由 G 到 A，其中这些核苷酸存在于正链、反基因组、信使有义链中；和

(b)RNA 聚合酶基因中的至少一个减毒突变，选自产生氨基酸改变的核苷酸改变，这些氨基酸改变选自残基 331 由异亮氨酸到苏氨酸，1409 由丙氨酸到苏氨酸，1624 由苏氨酸到丙氨酸，1649 由精氨酸到甲硫氨酸，1717 由天冬氨酸到丙氨酸，1936 由组氨酸到酪氨酸，2074 由谷氨酰胺到精氨酸和 2114 由精氨酸到赖氨酸。

13. 如权利要求 9 所述的病毒，其特征在于，该病毒还含有至少一种减毒突变，选自：

(a)对于 N 基因,产生氨基酸改变的核苷酸改变,所述氨基酸改变选自残基 129 由谷氨酰胺到赖氨酸, 148 由谷氨酸到甘氨酸, 和 479 由丝氨酸到苏氨酸;

(b)对于 P 基因,产生氨基酸改变的核苷酸改变,所述氨基酸改变选自残基 225 由谷氨酸到甘氨酸, 275 由半胱氨酸到酪氨酸, 和 439 由亮氨酸到脯氨酸;

(c)对于 C 基因,产生氨基酸改变的核苷酸改变,所述氨基酸改变选自残基 73 由丙氨酸到缬氨酸, 104 由甲硫氨酸到苏氨酸, 和 134 由丝氨酸到酪氨酸; 和

(d)对于 F 基因末端信号,核苷酸 7243 由 T 到 C 改变,其中这些核苷酸存在于正链、反基因组,即信使有义链中。

14. 一种免疫原性组合物,其特征在于,该组合物含有稀释剂或载体,以及权利要求 1 所述的分离的、重组产生的无节段反义单链 RNA 麻疹病毒属的病毒。

15.如权利要求 14 所述的免疫原性组合物,其特征在于,该组合物还含有佐剂。

16.权利要求 14 所述的免疫原性组合物的用途,其特征在于,用于制备免疫个体,用于诱导抵抗麻疹病毒属的无节段反义单链 RNA 病毒的保护的药物。

17. 权利要求 15 所述的免疫原性组合物的用途,其特征在于,用于制备免疫个体,用于诱导抵抗麻疹病毒属的无节段反义单链 RNA 病毒的保护的药物。

18.一种分离的编码麻疹病毒属 V 蛋白的核苷酸序列,所述病毒选自麻疹病毒、犬瘟病毒、牛瘟病毒和海豚麻疹病毒,其特征在于,所述病毒选自麻疹病毒、犬瘟病毒、牛瘟病毒和海豚麻疹病毒的 V 蛋白氨基酸序列依次为 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO:3,该序列通过插入至少一个突变而被修饰,所述突变选自氨基酸 113 和 114 的突变,其中氨基酸 113 的突变是从酪氨酸变为除了天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的其它氨基酸,氨基酸 114 的突变是从天冬氨酸变为除了谷氨酸以外的其它氨基酸。

修饰的麻疹病毒 V 蛋白

发明领域

本发明涉及麻疹病毒属的分离的、重组产生的、反义单链 RNA 病毒，具有一个或多个突变和/或缺失，它减少 V 蛋白通常导致的抑制。

发明背景

有包膜、负义单链 RNA 病毒是独特组成和表达的。负义单链病毒的基因组 RNA 对核衣壳起着两种模板作用：作为信使 RNA (mRNA) 的合成模板和作为反基因组(+)链的合成模板。病毒复制在 mRNA 合成后发生，而且需要病毒蛋白质的不断合成。新合成的反基因组(+)链作为产生(-)链基因组 RNA 其余拷贝的模板。

依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶复合物通过结合基因组 3' 末端，特别是启动子区的顺式激活信号，促使并实现转录和复制。然后病毒基因从基因组模板从其 3' 到其 5' 末端单向转录。

根据 1993 年国际委员会对病毒分类学的重新修订分类，建立了命名为单链反义病毒(Mononegavirales)的一个目。该目包括 3 科具有负极性(反义)单链不分区段的 RNA 基因组的包膜病毒。这些科是副粘病毒科(Paramyxoviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)和线状病毒科(Filoviridae)。副粘病毒科还分成两个亚科，副粘病毒亚科(Paramyxovirinae)和肺病毒亚科(Pneumovirinae)。副粘病毒亚科含有 3 个属，呼吸道病毒属(先前的副粘病毒属，Respirovirus)，风疹病毒属(Rubulavirus)和麻疹病毒(Mobillavirus)。肺病毒亚科含有肺病毒属(Pneumovirus)。新分类基于形态学标准、病毒基因组的结构、生物学活性和基因与基因产物的序列相关性。麻疹病毒目前的命名学分类如下：

单链反义病毒目

副粘病毒科

副粘病毒亚科

麻疹病毒属

麻疹病毒

海豚麻疹病毒

犬瘟热病毒

小反刍动物瘟疫病毒

猪瘟疫病毒

牛瘟病毒

这些病毒中的许多种都没有任何可得到的疫苗。因此，需要开发针对这样的人和动物病原体的疫苗。这样的疫苗应能在受体中诱导保护性免疫应答。这种有益应答的质和量特征可从天然感染的幸存者中见到的那些特征来推测，这些幸存者通常在感染后相当长的时间中受到保护，免受同一病毒或高度相关病毒的再次感染。

在搜寻开发这样的疫苗中可考虑各种方法，包括使用(1)纯化的个体病毒蛋白疫苗(亚基疫苗)；(2)灭活的全病毒制备物；和(3)减毒活病毒。

亚基疫苗具有所需的纯净、明确和容易通过不同方法，包括重组 DNA 表达方法大量生产的优点。目前，除了 B 型肝炎表面抗原显著例外，病毒亚基疫苗通常只能诱导短期和/或不充分的免疫力，特别是在原初接种者中。

甲醛灭活的脊髓灰质炎(IPV)和甲型肝炎的全病毒制备物已被证明是安全有效的。相反，用相似的灭活全病毒，例如呼吸道合胞病毒和麻疹病毒疫苗免疫，诱导了不利的免疫应答和/或反应特征，它们在接种者后来遇到天然或“野生型”病毒时会使接种者易于产生夸张或异常的疾病。

野生型病毒的适当减毒活衍生物作为候选疫苗具有明显的优点。作为活的、复制性物质，它们能引起接种者感染，在此期间病毒基因产物被表达，加工，并与接种者的特异 MHC I 类和 II 类分子一起递呈，诱导体液和细胞介导的免疫应答，以及协作的细胞因子和趋化因子模式，它们和天然感染幸存者的保护性免疫情况相同。

这种有益免疫应答模式和灭活或亚基疫苗诱导的有限应答相反，后者通常大多限于体液免疫监督手段。另外，一些甲醛灭活全病毒疫苗，例如 60 年代开发的麻疹和呼吸道合胞病毒疫苗，诱导的免疫应答不仅不能提供持续保护，而且实际上当接种者后来接触野生型病毒时，还导致易于产生异常、夸张、和甚至致命疾病的倾向。

虽然减毒活病毒作为候选疫苗有很理想的特征，但被证明很难开发。困难症结在于需要分离得到丧失致病能力(即，毒性)同时又保留充分复制能力的野生型病毒衍生株，来感染接种者并诱导足够量的有益免疫应答。

历史上，这种毒性和减毒之间的微妙平衡曾通过将野生型病毒分离物在不同宿主组织或细胞中以不同生长条件(例如温度)系列传代而得到过。该过程大概有利于病毒变体(突变体)生长，其中的一些具有减毒的有益特征。偶尔，也通过化学诱变达到进一步减毒。

该增殖/传代方案通常导致病毒衍生株的出现，它们是温度敏感型，冷适应型和/或宿主范围改变的——其中一种或所有的改变来自野生型致病病毒——例如，和减毒有关的改变。

一些活病毒疫苗，包括预防麻疹和腮腺炎(它们是副粘病毒)，和抵抗脊髓灰质炎和风疹病(它们是正链 RNA 病毒)的疫苗，已通过这种方法产生，并提供了全世界现行儿童免疫方案的支柱。

然而，产生候选减毒活病毒疫苗的方法过于冗长，而且至少是不可预测的，主要依赖于具有理想减毒特征随机发生的基因组突变体的选择性生长。得到的病毒可能在体外具有理想表型，甚至看来在动物模型中业已减毒。然而，当它们作为人或动物宿主的候选疫苗时常常显示减毒不足或过度。

即使对现今应用的疫苗来说，仍需要更有效的疫苗。例如，现在的麻疹疫苗提供了相当好的保护。然而，近来的麻疹流行提示现有疫苗的效力有缺陷。尽管母亲作了免疫，高比率的急性麻疹感染仍发生在 1 岁以下的儿童中，反映了疫苗不能诱导与野生型麻疹感染后产生的相当的抗麻疹抗体水平(文献 1,2,3)。结果，接种疫苗的母亲不能提供给她们的婴儿足够的胎盘衍生性被动抗体来保护出生后头几个月的新生儿。

先前免疫过的青少年和年轻成人中的急性麻疹感染提出了额外的问题。这些二次接种失败表明现有疫苗在诱导和保持足量和长期抗病毒保护力上的局限性(4,5,6)。近来，揭示了另一个潜在问题。过去 15 年间分离的野生型麻疹血凝素蛋白显示和疫苗病毒株的不同进行性增加(7)。该“抗原漂移”引起了合理的关注，疫苗病毒株可能不含有提供最适保护所需的理想抗原性组分。因此，需要改进的疫苗。

合理的疫苗设计可从对这些病毒更好的理解得到帮助，特别是，通过鉴别出病毒毒力的编码决定簇，以及导致减毒的那些基因组改变而得到帮助。

由于作为人类发病和死亡的主要原因的重要性，麻疹病毒受到了十分广泛的研究。麻疹病毒是一种相对球形的大包膜颗粒，由两个区室，一层脂蛋白膜和一个核糖核蛋白颗粒核心构成，各具有不同的生物学功能(8)。该病毒颗粒包膜是被三种病毒特异性蛋白修饰的宿主细胞衍生的细胞质膜：血细胞凝集素(H；约 80kD)和融合蛋白(F_{1,2}；约 60kD)糖蛋白突出在病毒颗粒表面，赋予病毒颗粒结合和进入宿主细胞的能力(9)。H 和/或 F 的抗体被视为具有保护性，因为它们中和病毒引发感染的能力(10,11,12)。基质(M；约 37kD)蛋白是两性蛋白，排列在膜的内表面，被认为是配合病毒颗粒的形态产生，因此完成病毒复制(13)。病毒颗粒核心含有长 15,894 个核苷酸的基因组 RNA，它在与约 2600 个分子的约 60kD 长的核衣壳(N)蛋白紧密结合后具有模板作用(14,15,16)。与该 1 微米长的螺旋形核糖核蛋白颗粒松散结合的是酶水平的病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(L；约 240kD)，它与聚合酶辅助因子(P；约 70kD)，以及可能其它病毒特有的和宿主编码的蛋白质一起，转录和复制麻疹病毒基因组序列(17)。

麻疹病毒的 6 个病毒颗粒结构蛋白是由 6 个连续的无重叠基因编码的，其顺序如下：3'-N-P-M-F-H-L-5'。还鉴定到两个额外的麻疹病毒基因产物，其功能尚未确定。这两个非结构蛋白，称为 C(约 20kD)和 V(约 45kD)都是由 P 基因编码的。C 蛋白是由 P mRNA 的第二个阅读框编码的。V 蛋白是由共转录编辑的 P 基因衍生的 mRNA 编码的，该 mRNA 编码具有 P 氨基末端序列和锌指蛋白样富含半胱氨酸羧基末端域(在 P 蛋白中没有)的氨基酸序列的杂交蛋白(9)。

所有麻疹病毒属的病毒产生 V 蛋白(18)，包括麻疹病毒、牛瘟病毒、犬瘟热病毒和猪瘟病毒(19)。麻疹病毒 V 蛋白是 P 基因编码的非结构蛋白(8)。与大多数副粘病毒一样，麻疹病毒编码多种来自 P 基因的蛋白质，包括 V 蛋白、P 蛋白和 C 蛋白(9)。P 和 V 蛋白的翻译都从同一甲硫氨酸密码子开始，导致多肽中的开始 230 个氨基酸相同。V 蛋白的羧基末端(C-末端)与 P 蛋白不同，因为 RNA 编辑在一些 P 基因 mRNA 中发生，导致框架漂移，使得翻译出较短的独特 V 蛋白 C-末端(18)。C 蛋白的氨基酸序列与 V 和 P 蛋白无关，因为它完全是由不同的阅读框翻译的，该阅读框从下游的翻译起始密码子开始(20)。

麻疹病毒的 P 和 V mRNA 具有相同的起始密码子, P 和 V 蛋白开始的 230 个氨基酸相同。V mRNA 含有“G”残基插入, 它是从核苷酸 2496-2498 处的序列“GGG”开始的, 包括第 4 个“G”残基。编码在转录中发生, 当一个额外的非模板指导的“G”残基插入核苷酸 2495 和 2499 之间, 导致阅读框漂移, 从而使 P 蛋白羧基末端的 276 个氨基酸被 V 蛋白富含半胱氨酸的羧基末端的 68 个氨基酸代替。

V 蛋白的功能还未被很好理解, 但所有麻疹病毒都编码 V 蛋白。这表明 V 蛋白执行有益功能, 保留合成 V 蛋白的能力对麻疹病毒来说是有利的。已知 V 蛋白表达在培养的细胞中对于病毒复制不是必需的(19, 21-25), 但是在动物模型系统中 V 蛋白的表达看来影响感染的严重程度。例如, 仙台病毒(非麻疹病毒的副粘病毒)通常在小鼠模型系统中产生肺炎, 但是如果用 V 蛋白表达缺陷型的重组病毒进行感染, 毒性较小(22,26)。如果 D 蛋白表达中的缺陷和 V 蛋白开放阅读框中的缺陷结合重组人副流感病毒 3 型(另一种非麻疹病毒的副粘病毒)也在啮齿类和猴中显示一种减毒表型。

类似的, 用麻疹病毒对动物模型系统研究的结果也提出 V 蛋白在致病性中有作用。如果感染的病毒 V 蛋白表达有缺陷(27)用重组麻疹病毒感染棉鼠肺产生较少的子代病毒。另外, 在移植到 SCID 小鼠的组织中存活的人胸腺细胞对麻疹病毒感染较不敏感, 如果该感染性病毒不表达 V 蛋白(28)。如果麻疹病毒不表达 V 蛋白(29)最后, 用该病毒在颅内接种的 CD46 转基因小鼠具有更高的存活率, 。序列分析也支持了麻疹病毒 V 蛋白在致病性中起到作用的结论, 该分析在致病性较小的变体或疫苗株中发现了 V 蛋白编码区突变(30,31)。总的说, 这些结果支持一种猜想, 即 V 蛋白在决定麻疹病毒和其它几种副粘病毒的毒性中起到了重要作用。

虽然似乎 V 蛋白能影响感染过程是清楚的, 但是并不知道该现象背后的机制。许多研究结果开始确定 V 蛋白的可能功能。例如, 已显示 V 蛋白和 P 蛋白共有的氨基酸序列介导与病毒核衣壳(N)蛋白的相互作用(27,32-39)。V 蛋白和 N 蛋白之间的相互作用似乎影响 N 蛋白的细胞分布(27,40,41), 可能具有一些其它未被识别的功能。还已发现一些 V 蛋白能与细胞蛋白相互作用(42,43), 对于猿病毒 5(SV5), 可能与细胞蛋白的相互作用引起在感染中干扰素信号传递途径的抑制

(44)。除了与 V 蛋白有关的蛋白-蛋白相互作用，几个研究还将 V 蛋白与调节病毒基因表达和复制的控制机制联系起来。在瞬时表达系统中的仙台病毒 V 蛋白表达抑制缺损干扰(DI)颗粒复制(45)，并类似抑制 DI 颗粒在体外转录反应中复制(35)。与这些与具有抑制作用的 V 蛋白有关的观察一致的是，观察到几种 V 蛋白表达缺陷的病毒在感染过程中产生较高水平的基因组 RNA、mRNA 和病毒蛋白(21,26,27)。

除了刚刚描述过的性质，所有病毒 V 蛋白含有富含半胱氨酸的 C-末端。副粘病毒 V 蛋白没有高度的氨基酸相似性，但它们都含有七个位置相同的半胱氨酸残基(46)。该惊人的特征导致推测 B 蛋白可能实际上是锌指蛋白，或至少形成几类与锌配位的二级结构(48,49,50)，而实际上，发现了几种 V 蛋白与锌结合(51,52,53)。对 V 蛋白形成与锌配位的结构的可能性产生了可观的兴趣，因为这类结构通常形成与核酸相互作用或蛋白-蛋白相互作用有关的蛋白结构域(48,49,50)。还值得注意的是，表达缺乏独特 C-末端区域的截短的 V 蛋白的重组仙台病毒致病性也较小，提示 V 蛋白在致病性中的作用需要该结构域(24)。

除了编码该病毒特有蛋白的序列，麻疹病毒基因组含有不同的非蛋白编码结构域，类似指导相关病毒转录和复制的途径(9,54)。这些调控信号位于麻疹病毒基因组的 3'和 5'末端和跨越各顺反子间边界的短内部区域。前者编码可能的指导基因组转录、基因组和反基因组衣壳包装和复制的启动子和/或调控序列元件。后者传递各单顺反子病毒 mRNA 的转录终止和聚腺苷酸化，然后重新引发下一个基因的转录的信号。一般麻疹病毒聚合酶复合物似乎响应这些信号，与其它无节段的负链 RNA 病毒的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶相似(9,54,55,56)。转录从麻疹病毒基因组的 3'末端处或附近开始，然后朝 5'方向进行产生单顺反子 mRNA(16,54,57)。

麻疹病毒似乎将其末端调控域延伸超过了前导和后随编码序列边界(54)。对于麻疹病毒，这些区域包括 107 个 3'基因组核苷酸(“3'基因组启动子区”，还称为“延伸的启动子”，它含有编码前导区的 52 个核苷酸，然后是 3 个基因间核苷酸，和编码 N mRNA 5'非翻译区的 52 个核苷酸)和 109 个 5'末端核苷酸(69 个编码 L mRNA 的 3'非翻译区的核苷酸，基因间三核苷酸和 37 个编码后随序列的核苷酸)。在这些 3'末端中基因组和反基因组的约 100 个核苷酸是具有共享核苷酸序列的两个短区域：基因组和反基因组的绝对 3'末端的 16 个核苷酸中的 14 个核苷酸是相

同的。在这些末端内部，定位了另外具有绝对序列相同性的 12 个核苷酸区域。它们的位置在麻疹病毒基因组转录应该开始以及反基因组的复制应该开始的位点处或附近，提示这些短独特序列结构域含有延伸的启动子区。

这些分散的序列元件可指导转录起始的其它位点—内部结构域指导在 N 基因起始位点开始转录，3'末端结构域指导反基因组产生(54,58,59)。除了其作为转录和复制的顺式激活决定簇的调控作用，这些 3'延伸的基因组和反基因组启动子区域分别编码反基因组和基因组 RNA 的新生 5'末端。在这些新生 RNA 中具有 N 蛋白集结的未鉴定信号，对于核衣壳模板形成和随后转录和复制放大所需的另一种关键调控元件。

在所有麻疹病毒中，主要病毒功能，包括复制、转录和衣壳包装所需的顺式激活信号包含在非编码基因组末端中。功能性的被动反式激活元件包含在 N、P 和 L 基因中。其它反式激活因子，例如 V 和 C 蛋白可能调节功能性。任何这些区域内的突变将导致重要功能的改变，包括病毒转录/复制效率的降低。

V 蛋白表达和致病性之间的明显关系，和在病毒减毒中的持续兴趣(30,60)导致需要更详细检查麻疹病毒 V 蛋白功能。特别是需要利用瞬时表达系统来研究几种 V 蛋白性质，包括 V 蛋白抑制活性、V 蛋白与 N 蛋白之间的相互作用，以及 V 蛋白结合 RNA 的能力。

发明简述

因此，本发明的一个目的是鉴定麻疹病毒基因组中负责这些病毒的 V 蛋白抑制基因表达的区域。本发明的另一个目的是产生麻疹病毒的 V 蛋白突变形式，以这种形式中基因表达的抑制下降。本发明的另一个目的是产生含有一个或多个这种突变的重组产生的麻疹病毒。本发明的另一个目的是配制含有这种重组产生的麻疹病毒的疫苗或免疫原性组合物。在本发明的一个实施例中，V 蛋白来自麻疹病毒。

下面讨论的本发明的这些和其它目的将通过修饰对应于这些麻疹病毒 V 蛋白氨基酸 112-134(保守区 2；见图 2)的区域实现，其中氨基酸 113(酪氨酸)和 114(天冬氨酸)中的一个或两个突变。在本发明的一个实施例中，这些氨基酸突变为丙氨酸。

V 蛋白的另一个修饰可以通过麻疹病毒 V 蛋白的羧基末端(C-末端)区域，对

应于麻疹病毒、犬瘟热病毒和海豚麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸 231-299 和牛瘟病毒的氨基酸 231-303 中至少一部分的突变或缺失进行。

这些修饰具有减少 V 蛋白在小复制体系统中抑制基因表达的作用。结果不难延伸到使用本领域已知和下文描述的“拯救”系统恢复全长感染性麻疹病毒。

在瞬时试验中具有氯霉素乙酰转移酶(CAT)报道基因表达的麻疹病毒小复制体被 V 蛋白强烈抑制。在位于氨基酸 112-134 之间的蛋白质的氨基末端氨基酸取代, 以及通过突变或缺失 V 蛋白富含半胱氨酸 C-末端区域的至少一部分(氨基酸 231-299)消除了抑制作用。

就麻疹病毒情况, 上述突变还可进一步与减毒的突变结合, 如下:

(1)3'基因组启动子区域中的至少一个减毒突变选自核苷酸 26(A→T), 核苷酸 42(A→T 或 A→C)和核苷酸 96(G→A), 其中这些核苷酸存在于正链、反基因组、信使有义中;

(2)RNA 聚合酶基因中的至少一个减毒突变, 选自产生氨基酸改变的核苷酸改变, 这些氨基酸改变选自残基 331(异亮氨酸→苏氨酸), 1409(丙氨酸→苏氨酸), 1624(苏氨酸→丙氨酸), 1649(精氨酸→甲硫氨酸), 1717(天冬氨酸→丙氨酸), 1936(组氨酸→酪氨酸), 2074(谷氨酰胺→精氨酸)和 2114(精氨酸→赖氨酸)。

(3)对于 N 基因, 至少一个减毒突变选自产生氨基酸改变的核苷酸改变, 这些氨基酸改变选自残基 129(谷氨酰胺→赖氨酸), 148(谷氨酸→甘氨酸), 和 479(丝氨酸→苏氨酸);

(4)对于 P 基因, 至少一个减毒突变选自产生氨基酸改变的核苷酸改变, 这些氨基酸改变选自残基 225(谷氨酸→甘氨酸), 275(半胱氨酸→酪氨酸), 和 439(亮氨酸→脯氨酸);

(5)对于 C 基因, 至少一个减毒突变选自产生氨基酸改变的核苷酸改变, 这些氨基酸改变选自残基 73(丙氨酸→缬氨酸), 104(甲硫氨酸→苏氨酸), 和 134(丝氨酸→酪氨酸); 和

(6)对于 F 基因末端信号(顺式激活转录终止信号), 核苷酸 7243(T→C)的改变, 其中这些核苷酸存在于正链、反基因组, 即信使(编码)有义中。

在本发明的另一个实施例中, 这些突变的麻疹病毒用于制备疫苗或免疫原性组合物, 它们引起各病毒的针对野生型的保护性免疫应答。

在本发明的另一个实施例中，描述了一种降低麻疹病毒 V 蛋白导致的抑制的方法，它包括在对应于麻疹病毒 V 蛋白氨基酸 112-134 区域内插入至少一个突变，其中对应于麻疹病毒 V 蛋白氨基酸 112-134 区域内的突变选自氨基酸 113 和 114 的突变。

在本发明的另一个实施例中，描述了一种分离的核苷酸序列，编码麻疹病毒 V 蛋白，它已通过在对应于麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸 112-134 的区域内插入至少一个突变改变，其中对应于麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸 112-134 的区域中的突变选自氨基酸 113 和 114 的突变。

在本发明另一个实施例中，提供了一种组合物，它含有一种转录载体，该载体含有一种编码麻疹病毒基因组或反基因组的分离的核酸分子，其中分离的核酸分子编码 V 蛋白的部分已被进行修饰，使得在对应于麻疹病毒 V 蛋白氨基酸 112-134 的区域内插入至少一个突变，其中对应于麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸 112-134 的区域中的突变选自氨基酸 113 和 114 的突变；和至少一种表达载体，它含有至少一条分离的核酸分子，编码衣壳包装、转录和复制所必需的反式激活蛋白 N、P 和 L，从而用这些载体转化、感染或转染宿主细胞，并在允许这些载体共表达的条件下培养，从而产生所需的麻疹病毒。然后用这些病毒制备引起针对各病毒的野生形式的保护性免疫应答的疫苗或免疫原性组合物。

附图简述

图 1A 描述了用于转染的 4 个质粒表达载体。制备了 T7 RNA 聚合酶依赖性表达载体(61)用于指导 Edmonston 野生型 N、P、L 或 V 基因在被 MVA/T7 感染的细胞中的表达(62)。

图 1B 描述了衍生自 pMV107-CAT 的小复制体(63)。pMV107-CAT 中的 Edmonston 麻疹病毒疫苗前导序列被转化成野生型序列(60)。T7 RNA 聚合酶转录小复制体质粒 DNA 在转染的细胞中产生反义的 RNA 小复制体。

图 1C 描述了一种 CAT 试验，显示瞬时表达试验中 V 蛋白表达对小复制体活性的作用。泳道 1 是从被所有驱动小复制体表达必需的质粒载体(N、P 和 L)转染的细胞获得的阳性对照。泳道 2 与泳道 1 相同，除了细胞被所有质粒，除了 L 聚合酶载体转染。在泳道 3-7 中，在转染中包含增量的 V 蛋白表达载体。通过加入不含插入物的合适量的载体 DNA，维持转染 DNA 的总质量稳定。基于泳道 1

中的 100%活性计算相对 CAT 活性。

图 2 描述了 4 种不同麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸序列比较。Edmonston 野生型麻疹病毒 V 蛋白氨基酸序列(Gene Bank 登录号 AF266288)(SEQ ID NO:1)与犬瘟热病毒(AF014953)(SEQ ID NO:4)、牛瘟病毒(Z30697)(SEQ ID NO:2)和海豚麻疹病毒(Z47758)(SEQ ID NO:3)比较。含有更高水平的相同性的区域用划斜线的条在上面标出。并称为保守区(CR1-CR6)。其它值得注意的序列在下方用黑色条标出。这些序列包括与 V(和 P)蛋白与 N 蛋白的相互作用有关的区域(34)，与 V-N 蛋白复合物胞内定位有关的区域(27,64)，和含有锌结合结构域的富含半胱氨酸的区域(51)。感兴趣的其它序列包括 229-234 之间的碱基区域，225 处的麻疹病毒疫苗氨基酸取代(谷氨酸到甘氨酸)，和回忆 93-107 位之间的亮氨酸拉链的亮氨酸重复区(65,66)。V 和 P 蛋白共有的区域从氨基酸 1 延伸到 230，而独特的 V 蛋白序列(粗体氨基酸字母)从 231 延伸到 299。图中沿列出的序列顶部给出的氨基酸位置对应于麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸的位置。

图 3 描述了突变麻疹病毒 V 蛋白表达载体的图。在这些研究中所用的表位标记的 V 蛋白表达载体如图所示。在表达具有流感病毒 HA 标记(67)代替 V 蛋白起始密码子甲硫氨酸的 V 蛋白的载体质粒骨架中产生突变的 V 蛋白载体。在图顶部显示了 V 蛋白图上重要的序列，相对于上面图 2 的描述更完整。野生型(haV-wt)和突变蛋白质(haV1-11)在 V 蛋白图下所示。在氨基末端绘出了作为划斜线框的 HA 标记，剩余的 V 蛋白序列绘成空心方块。氨基酸取代标为沿氨基酸位置和氨基酸改变的黑点。缺失或截短的突变体用打断的 V 蛋白图绘制。

图 4A 描述了在 CAT 试验形式中，用突变的麻疹病毒 V 蛋白抑制小复制体，显示测试 V 蛋白突变体(haV-1 到 haV-8；见图 3 的描述)的瞬时表达实验的结果。V 蛋白载体量(200 或 400 纳克)和突变体的相同性如图 4A 中 CAT 试验下方所示。相对活性计算成泳道 2 的百分数，它是通过不用任何 V 蛋白表达载体进行的转染得来的。泳道 1 是不用 L 蛋白进行的阴性对照。

图 4B 描述了蛋白质印迹分析，用于监测瞬时表达实验中 V 蛋白表达。泳道 1 和 2 是衍生自在 V 蛋白载体不存在下转染的(泳道 1)或用表达不含标记的 V 蛋白的 V 蛋白载体转染的阴性对照。用抗-HA 抗体探测蛋白质印迹。

图 4C 描述了用增量的表达载体(100ng-1 微克)的 haV-1 抑制小复制体的分析。

图 5 描述了与麻疹病毒 V 蛋白有关的 RNA 结合活性。从转染的细胞通过 NP40 裂解制备粗细胞质抽提物，用与多核糖核苷酸同聚物连接的琼脂糖珠分析 RNA 结合活性。说明过程的流程图如图 5A 所示。图 5B 描述了用于检测捕获在多核糖核苷酸树脂上的蛋白质的蛋白质印迹分析。用小复制体实验所用的相同条件转染细胞(泳道 1-8)，除了在一些转染中细胞仅用 haV 表达载体转染(泳道 9-12)。泳道 1-4 描述了与 4 种不同多核糖核苷酸树脂结合的 N 蛋白的分析。泳道 5-12 描述了对于 haV 蛋白片段的结合片段的分析。类似的，泳道 9-16 描述了在 EGTA(EG)、EDTA(ED) 或酵母 RNA(RNA)存在下与 poly(G)结合的 V 蛋白分析。

图 6 描述了用突变麻疹病毒 V 蛋白结合 RNA。图 5 中描述的多核糖核苷酸同聚物结合试验用于分析突变麻疹病毒 V 蛋白(haV1-11，泳道 3-13；见图 3 的描述)。在该实验中，仅用 V 表达载体转染细胞。在泳道 1 中检测的细胞提取物是一种阴性对照，含有不含表位标记的 V 蛋白。poly(G)用于测试所有突变的蛋白质。

图 7 描述了野生型麻疹病毒 V 蛋白的 CR2(氨基酸 100-140)中的氨基酸序列的比较，称为 haV(SEQ ID NO:7)；一种突变体，其中氨基酸 113 位的酪氨酸和氨基酸 114 位的天冬氨酸被丙氨酸取代，称为 haV-5(SEQ ID NO:8)；一种突变体，其中氨基酸 112-134 缺失，称为 haV-23(SEQ ID NO:9)；一种突变体，其中氨基酸 114 位的天冬氨酸和氨基酸 115 位的组氨酸被丙氨酸取代，称为 haV-24(SEQ ID NO:10)；和一种突变体，其中氨基酸 113 位的酪氨酸、氨基酸 114 位的天冬氨酸和氨基酸 115 位的组氨酸被丙氨酸取代，称为 haV-25(SEQ ID NO:11)。

图 8 描述了图 7 中所述的 CR2 突变在 CAT 实验中的效果，显示在瞬时表达实验中 V 蛋白表达对小复制体活性的影响。条 1 是从被所有驱动小复制体表达必需的质粒载体(N、P 和 L)转染的细胞获得的阳性对照。条 2 与条 1 相同，除了细胞还被编码 haV 的表达载体转染；在条 3-6 中，细胞被编码指定的 CR2 突变的表达载体转染。基于条 1 的 100%活性计算相对 CAT 活性。

图 9 描述了野生型麻疹病毒 V 蛋白的 C 末端 (氨基酸 220-299)的氨基酸序列比较，称为 haV(SEQ ID NO:12)；突变体，其中氨基酸 232-299 缺失，称为 haV-1(SEQ ID NO:13)；突变体，其中氨基酸 251 和 255 处的半胱氨酸被丙氨酸取代，称为 haV-12(SEQ ID NO:14)；突变体，其中氨基酸 269 和 272 处的半胱氨酸被丙氨酸取代，称为 haV-13(SEQ ID NO:15)；突变体，其中氨基酸 279-299 缺失，称为

haV-14(SEQ ID NO:16); 突变体, 其中氨基酸 267-299 缺失, 称为 haV-15(SEQ ID NO:17); 突变体, 其中氨基酸 250-299 缺失, 称为 haV-16(SEQ ID NO:18); 突变体, 其中氨基酸 243-299 缺失, 称为 haV-17(SEQ ID NO:19); 突变体, 其中氨基酸 236-299 缺失, 称为 haV-18(SEQ ID NO:20); 突变体, 其中氨基酸 229-299 缺失, 称为 haV-19(SEQ ID NO:21); 突变体, 其中氨基酸 233 和 234 处的精氨酸被丙氨酸取代, 称为 haV-20(SEQ ID NO:22); 突变体, 其中氨基酸 233 和 234 处的精氨酸分别被天冬氨酸取代, 称为 haV-21(SEQ ID NO:23); 和突变体, 其中氨基酸 229-237 缺失, 称为 haV-22(SEQ ID NO:24)。

图 10 描述了图 9 中所述的 c 末端突变在 CAT 试验中的作用, 显示瞬时表达试验中 V 蛋白表达对小复制体活性的效果。条 1 是从被驱动小复制体表达所需的所有质粒载体(N、P 和 L)转染的细胞获得的阳性对照。除了细胞还被编码 haV 的表达载体转染, 条 2 与条 1 相同; 在条 3-14 中, 细胞被编码指定的 C-末端突变的表达载体转染。基于条 1 的 100%活性计算相对 CAT 活性。

发明详述

虽然用麻疹病毒举例, 本发明还可用于其它麻疹病毒属, 包括但不限于犬瘟热病毒和牛瘟病毒。

考虑对于麻疹病毒减毒和与基因表达和复制有关的机制之间的可能联系(30,60), 导致分析 V 蛋白。V 蛋白表达已与病毒致病性(22,23,26-29)联系还与基因表达和复制的控制联系(21, 26, 27, 35, 45)。目标是进一步分析 V 蛋白对麻疹病毒基因表达的作用。

在构建突变 V 蛋白表达载体之前, 检测了几种不同麻疹病毒的 V 蛋白的氨基酸相似性(图 2)。高氨基酸相同性的区域可能含有重要的功能域, 这些保守区(CR)中的一个或多个可能参与小复制体抑制。Edmonston 野生型麻疹病毒、牛瘟病毒、海豚麻疹病毒和犬瘟热病毒的 V 蛋白排列揭示了具有值得注意的序列相同性的几个保守区, 称为 CR1-6(如图 2 所示), 除了确认更早的观察结果(46), 即在麻疹病毒中 C-末端含有位置相同的含有 7 个半胱氨酸残基。当产生突变的 V 蛋白载体时, 针对几个 CR。

除了鉴定含有高水平相同性的区域, 用计算机分析检索可能的功能性基序, 并检测文献中有关可能的麻疹病毒 V 蛋白功能域的可能位置的额外线索。这些分

析的结果在图 2 的排列上标出。几个研究确定了 V 和 P 蛋白影响与 N 蛋白的相互作用的区域的位置。V 和 P 蛋白的氨基酸最末端(N-末端)位于 CR1 内, 含有在双杂交试验中介导与 N 蛋白相互作用的序列(34)(图 2)。其它与 V-N 蛋白-蛋白相互作用有关的序列被定位在氨基酸 204-230(27, 64)之间, 跨越 CR4。麻疹病毒 V 蛋白锌-结合域(51)在 C 末端, 可能至少需要在 CR5 和 CR6 中发现的几个半胱氨酸残基。在富含半胱氨酸结构域的 N-末端, 有含有碱性氨基酸(229-234)的非常保守的区域, 是 CR5 的一部分。在麻疹病毒 V 蛋白中靠近相同区域(氨基酸 225)的是在 Edmonston 疫苗株中发现的氨基酸取代(野生型谷氨酸到甘氨酸(30))。最后, 在麻疹病毒 V 蛋白中有亮氨酸重复(氨基酸 93-107), 它回忆亮氨酸拉链基序(65,66)。许多这些结构域和基序是吸引人的候选物, 用于小复制体系统和 V 蛋白突变表达载体的进一步研究。

除了制备 V 蛋白表达载体(图 1A), 制备了 T7 表达质粒用于三个基础复制工具成分, 包括 Edmonston 野生型 N、P 和 L 蛋白。为了消除任何由于从 P 和 V 蛋白载体中的下游翻译起始密码子表达 C 蛋白引起的可能融合, 修饰 C 蛋白开放阅读框防止 C 蛋白翻译。C 蛋白 ATG 密码子被转化成 ACG, C 蛋白开放阅读框中的第二个密码子被转化成终止密码子(TCA 到 TAA)。这些修饰对于 P 和 V 蛋白是沉默的。

V 蛋白可能与调控麻疹病毒 mRNA 转录和基因组复制有关的迹象(21,26,27,35,45)提出了测试小复制体系统是否对 V 蛋白表达反应的实验。小复制体系统由 Edmonston 野生型成分构成, 使得能够评估影响野生型 V 基因功能的 V 基因突变, 并可能将这些发现用于使用重组野生型病毒进一步遗传研究病毒减毒。通过将 pMV107-CAT 中的疫苗前导序列转化成 Edmonston 野生型前导序列(60), 从 p107MV-CAT 小复制体(63)衍生出 Edmonston 野生型麻疹病毒-小复制体(图 1B, pMVwt107-CAT)。

为了确定野生型成分是否能驱动可检测的小复制体表达, 用小复制体 DNA 和 N、P 和 L 蛋白表达载体转染 HEp2 细胞, 同时用 MVA/T7(62)感染, 提供 T7 RNA 聚合酶。在转染 48 小时后, 收集细胞并分析细胞提取物的 CAT 活性。Edmonston 野生型小复制体系统不难产生高于在阴性对照中产生的背景水平的 CAT 活性, 该阴性对照是用所有 DNA, 除了 L 聚合酶蛋白表达载体转染的(图 1C, 泳道 1 和 2,

数据未显示)。这表示在瞬时表达试验中产生的 CAT 活性是特异性的,依赖于完整的麻疹病毒复制元件。

然后用小复制体系统确定 V 蛋白表达在瞬时表达试验中是否对小复制体表达具有可检测的作用。小复制体试验转染是用增量的 V 蛋白表达载体进行的。感染的 DNA 总质量通过加入合适量的缺乏插入物的表达载体保持稳定。图 1C 显示了 V 蛋白表达载体量从 0 增加到 400ng 的效果。泳道 1 中的阳性对照显示在 V 蛋白表达不存在的情况下获得的 CAT 活性量(图 1C, 泳道 1)。泳道 2 是阴性对照,显示当缺少 L 蛋白表达载体时, CAT 活性是不可检测的。泳道 3-7 显示 V 蛋白表达量增加的负效果。甚至在最低的 V 蛋白表达载体量(泳道 3 和 4)CAT 活性的抑制也是明显的,在更高量 CAT 活性的抑制非常强,事实上当转染 400ng V 蛋白表达质粒时,消除了可检测的小复制体表达(泳道 7)。泳道 3-7 中所用的 V 蛋白表达载体两倍增加与观察到的相对 CAT 活性的减少密切相关。这些结果清楚的表明可用小复制体试验观察到 V 蛋白功能的一个方面。在小复制体试验中 V 蛋白表达该轻易检测的负效果提供了进一步检测 V 蛋白突变体小复制体抑制表型的便利形式。

为了开始分析 V 蛋白突变体,修饰 V 蛋白表达载体(图 1A),以在 V 蛋白的氨基末端加入表位标记(pMV-haV-wt; 图 3)。这是为了方便在转染细胞的裂解物中进行蛋白质印迹检测,并允许突变 V 蛋白的稳定性和稳态水平的相对比较。用流感血凝素(HA)表位标记替换野生型 V 蛋白表达载体的起始甲硫氨酸密码子(67)。该修饰的 V 蛋白载体(pMV-haV-wt)还维持了防止 c 蛋白表达的基本取代。在小复制体实验中测试 pMV-haV-wt 揭示 N-末端 HA 标记的存在对 V 蛋白抑制小复制体的活性没有可检测的影响(图 4, 泳道 1-4, 数据未显示)。

第一个系列的引入 pMV-haV-wt 的突变针对图 2 所示的一些序列基序部分。这些突变之一得到截短的 V 蛋白,它缺乏含有半胱氨酸残基的独特的 V 蛋白 C 末端(氨基酸 231-299 缺失)(图 3, pMV-haV-1)。质粒 pMV-haV-2 将野生型 V 编码序列转化成 Edmonston 疫苗序列(氨基酸密码子 225; 谷氨酸到甘氨酸)。剩余的 6 个突变(pMV-haV 数目 3-8)是针对 CR 中的一些的氨基酸取代。最初,引入氨基酸取代是尝试改变 V 蛋白中特定结构域的功能,而不完全改变蛋白质结构。用丙氨酸带电法提出的策略(68,69,70),引入主要针对两个连续的氨基酸密码子的突变,这两个密码子是带电或极性的氨基酸残基,将它们转化成编码丙氨酸的密码子。

虽然用具有丙氨酸而不是野生型残基的突变体举例说明了本发明, 其它野生型残基的非保守突变也在本发明的范围内。例如, 天冬氨酸是酸性(带负电)分子。因此, 非保守突变应该用除了谷氨酸(也是酸性分子)外的氨基酸取代。合适的另选氨基酸包括赖氨酸、组氨酸和精氨酸, 它们是碱性(带正电)分子。合适的另选氨基酸还包括具有非极性官能团的氨基酸, 例如丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸, 和具有不带电的极性官能团的氨基酸, 例如天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

类似的, 酪氨酸是不带电的极性分子。因此, 不保守的突变应该是除了也是不带电的极性分子的天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸外的氨基酸取代。合适的另选氨基酸包括赖氨酸、组氨酸和精氨酸, 它们是碱性(带正电的)分子。合适的另选氨基酸还包括具有非极性官能团的氨基酸, 例如丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸, 和具有酸性(带负电的)官能团的氨基酸例如天冬氨酸和谷氨酸。

图 4A 显示了小复制体试验中对于突变 V 蛋白载体 1-8 的分析。结果表明两个载体(pMV-haV-1 和 pMV-haV-5)抑制小复制体活性的能力减弱。一个突变体(haV-1)具有缺失突变, 它缺乏 V 蛋白独特的 C-末端(氨基酸 232-299); 第二个突变体(haV-5)含有在氨基酸 113 和 114 位的取代突变(位于 CR2; 见图 2)。这提示该功能可能部分是由 CR2 和 C-末端独立介导的。与 C-末端截短的突变体相似, CR2 突变体也维持残余的抑制活性。

图 4A 上的泳道 1 和 2 含有对照的样品。泳道 1 中分析的转染缺乏 L 蛋白表达载体并揭示了低水平的背景 CAT 活性。泳道 2 中的阳性对照显示了 V 蛋白不存在下观察到的最大活性。泳道 3 和 4 中显示了含有 HA 标记的 200 和 400ng 野生型 V 蛋白载体(pMV-haV-wt)介导的抑制。如上所述, N-末端 HA 标记几乎对 V 蛋白抑制小复制体的能力没有作用, 在该实验中, 200 和 400ng haV-wt 载体分别抑制小复制体活性约 7 和 16 倍。当转染 200ng V 蛋白载体时, 大部分突变体抑制 CAT 活性的作用几乎与 haV-wt 载体相同, 将 CAT 活性减少到对照活性(泳道 2)的 20%或更低(泳道 3,7,9,11,15,17,19)。两个 V 蛋白载体(pMV-haV-1, 泳道 5 和 6; pMV-haV-5, 泳道 13 和 14)在该实验和重复的实验中抑制小复制体活性的作用非

常小。质粒 pMV-haV-1 缺乏富含半胱氨酸的 V 蛋白 C-末端，而 pMV-haV-5 在 CR2(氨基酸 113-114)中含有双丙氨酸取代。

抑制中有关的两个功能域具有感兴趣的特征。C-末端包括锌结合域，还含有 RNA 结合域(图 5)。CR2 的一级氨基酸序列是值得注意的，因为计算机模型预测，一小簇的带电残基可能位于一个假设的 α 螺旋的一面(残基 114D、118E、121K、125D)。因此，CR2 可能是与在一些转录因子中观察到的序列相似的两性 α 螺旋(71)。

与 CR2 有关的抑制活性是有趣的，因为该氨基酸序列同时存在于 V 和 P 蛋白中。P 蛋白起到的作为聚合酶亚基和核衣壳装配因子(72)的主要作用与 V 蛋白在抑制中的非必需作用是非常不同的。但是，这两种蛋白共有相当量的氨基酸序列。CR2 可以是一个蛋白-蛋白相互作用位点，其功能在 V 和 P 中是不同的。不被理论所限，还可能 V 蛋白的独特 C-末端给予接触 CR2 的 V 蛋白一种三级结构，相反使其起到抑制蛋白结构域的功能，而 P 蛋白中该功能域是隔绝的。

为了确定突变体 haV-1 或 haV-5 导致的抑制中的减少是否简单与蛋白质表达少有关，用抗-HA 抗体进行了蛋白质印迹分析来估计 V 蛋白在转染的细胞中的相对丰度(图 4B)。该实验中的细胞恰如在小复制体实验过程中进行的一样转染，从而使细胞含有 n、P 和 L 蛋白和 V 蛋白。除了两个阴性对照中，加有标记的 V 蛋白可以在全部转染的细胞提取物中检测到。用于制备在泳道 1 和 2 中分析的提取物的细胞中没有转染 V 蛋白载体，用编码不含表位标记的 V 蛋白的载体转染细胞。泳道 3 中检测的蛋白质是 HA-标记的野生型 V 蛋白。泳道 4 中的蛋白质是截短的突变体，它缺乏 C-末端，迁移率显著改变。剩余的蛋白质是含有氨基酸取代的突变体(如上所述，图 4B，泳道 5-11)。这些蛋白质中的几种在该 12%聚丙烯酰胺凝胶中具有小而值得注意的迁移率改变(例如泳道 10 和 11)。然而这不是不可预料的，因为在这些蛋白质中带电和极性的残基被丙氨酸取代。判断所有蛋白质的相对丰度十分相似，除了 haV-1(泳道 4)在该实验中较低，这是可在重复实验中复制的。这提示 haV-1 降低的抑制活性是由于较低的蛋白质水平，虽然 haV-5 降低的抑制活性不是由于不稳定的蛋白导致的。

为了进一步检测 haV-1 抑制的效果差是简单的由于它不稳定的可能性，用增量的 V 蛋白进行了小复制体试验，从而帮助补充胞内 haV-1 蛋白质的量(图 4C)。

该小复制体实验如上所述进行,除了 V 蛋白载体的最大量从 400ng 上升到 1 微克。通过加入合适量的载体骨架 DNA(缺乏插入物),使 DNA 的质量在所有转染物中保持稳定。图 4C,泳道 1 是不加入 V 蛋白载体进行的阳性对照。泳道 2 和 3 显示了以 100(泳道 2)和 400(泳道 3)ng 加入野生型 haV 载体的效果,其活性在该实验中分别降低到 58%和 26%。加入增量的 haV-1 对 MV-CAT 的活性几乎没有作用,将增量的 haV-1 载体和较高水平的抑制相关联也没有观察到明显的倾向。这提示 haV-1 减弱的抑制活性不是简单的由于减少胞内蛋白质水平,相反是由于缺乏 C-末端。

SV5 V 蛋白第三个 N 末端中含有高含量的碱性氨基酸的区域介导 RNA 结合(73)。同源区域在麻疹病毒 V 蛋白中不明显(73),但检测了麻疹病毒 V 蛋白也可能通过 C-末端锌指蛋白样的序列结合 RNA 的可能性(图 5)。

为了评估 V 蛋白的 RNA 结合活性,使用了多核糖核苷酸同聚物结合试验(图 5A),它已被成功的用于研究几种细胞 RNA 结合蛋白(74-77)。许多 RNA 结合蛋白显示了多核糖核苷酸同聚物的特征性亲和力。例如,细胞 hnRNP U 蛋白质与 poly(G)和 poly(U)结合的亲和力较高,但几乎不与 poly(A)或 poly(C)结合(75)。用该概念确定在转染细胞提取物中的 V 蛋白是否能被同聚物树脂捕获。用全部表达载体(N、P、L、V 和小复制体)转染细胞,并用于小复制体转染,然后用 MVA/T7 感染。48 小时后制备胞质细胞裂解物,在 4℃和与 4 种多核糖核苷酸同聚物之一连接的琼脂糖珠一起保温 30-60 分钟。离心收集珠,然后重悬浮并用细胞裂解缓冲液洗涤三次。通过在 SDS-凝胶上样缓冲液中煮沸从珠上洗脱结合的蛋白质。

开始为了进行试验,检测了捕获一种从转染的质粒表达的已知 RNA 结合蛋白质的能力。因此,用对 N 蛋白特异性的单克隆抗体通过蛋白质印迹分析从 4 种不同的树脂上洗脱出蛋白质(图 5B)。在与 poly(G)和 poly(U)结合的样品中轻易检测 N 蛋白(泳道 2 和 4)。与 poly(G)结合的 N 蛋白量在该试验和几个重复试验中普遍较高。poly(A)或 poly(C)几乎未或未捕获 N 蛋白。

如上所述重复实验,以分析 haV 蛋白与同聚物树脂相互作用的能力(图 5B,泳道 5-8)。用抗-HA 抗体进行蛋白质印迹分析揭示了与分析 N 蛋白获得的结果相似的结果(图 5B,泳道 1-4)。poly(G)和 poly(U)树脂都显示了对于 haV 的亲和力(泳道 6 和 8)。V 蛋白与 poly(G)的结合最好,和 poly(U)弱得多,而与 poly(A)或 poly(C)

的结合非常少。在一些实验中，见到一条非常弱的条带，表明与 poly(A)的低亲和力相互作用；然而，通常该相互作用不可检测。

V 蛋白容易与 poly(G)和 poly(U)结合，而与 poly(A)和 poly(C)结合不好的事实表明，该试验不能简单的测量聚阴离子树脂的亲和力，也显示 V 蛋白显示对于两种多核苷酸的倾向性。V 蛋白和 N 蛋白都优选 poly(G)和 poly(U)(图 5)；这是由许多细胞 RNA 结合蛋白显示的特征(74, 76, 77)。

haV 蛋白质结合性质与 N 蛋白十分相似的事实提出了 V 蛋白是通过与 N 蛋白相互作用，而间接被 poly(G)和 poly(U)树脂捕获，而不是直接和 RNA 相互作用的可能性。为了检测这种可能，仅用 haV 蛋白质表达载体转染细胞，制备细胞提取物并如上处理。用蛋白质印迹分析显示，haV 蛋白(图 5B, 泳道 9-12)也与 poly(G)和 poly(U)结合。这表明 V 蛋白与同聚物树脂的反应不需要其它病毒蛋白质。事实上，在不存在其它病毒蛋白质的情况下，与 poly(G)和 poly(U)结合的 V 蛋白量大得多(比较泳道 6-10 和 8-12)。这提示其它病毒蛋白质之一可以轻微影响与 V 蛋白和多核糖核苷酸之间的相互作用。

还进行了对于影响 haV 与 poly(G)结合的条件有限分析(图 5B, 泳道 13-16)。在结合反应中加入 10mM EGTA 或 EDTA(泳道 14-15)减少了 V 蛋白与 poly(G)的结合量。在结合反应中加入酵母 RNA 竞争物(泳道 16)(25 微克/毫升)对结合几乎没有作用。然而，这并不太令人惊奇，因为胞质提取物已含有显著量的细胞 RNA，加入酵母 RNA 等几乎没有影响。这些结果提示 V 蛋白与 poly(G)的结合受到二价阳离子的刺激，并且是相对特异性的相互作用，因为加入非特异性 RNA(酵母 RNA)似乎不减少与树脂结合的 V 蛋白量。

为了确定 RNA 结合是否能与抑制小复制体活性的能力关联起来，接着用 poly(G)结合试验分析 haV 蛋白突变体的 RNA 结合活性。haV 蛋白突变体(图 3)在不含任何其它病毒蛋白质的细胞中表达。制备粗胞质提取物，并与上述 poly(G)树脂结合，用蛋白质印迹分析结合的蛋白质(图 6)。如前所述，haV 被 poly(G)捕获，并且在蛋白质印迹分析中用抗-HA 抗体检测(泳道 2)，而含不具有 HA-标记的 V 蛋白的样品(泳道 1)不产生背景信号。突变蛋白质的分析揭示了大部分 V 蛋白(泳道 4-13)的 poly(G)结合活性水平相似，除了突变的 haV-1,该突变蛋白质与 poly(G)结合的水平非常低。这清楚的表明蛋白质对于结合是有缺陷的(泳道 3)。haV-1 低

但是可检测的结合水平表明 RNA 结合活性大大下降，但是没有完全消失。这些结果证明大部分突变体维持接近野生型 haV 的 RNA 结合活性。两种有小复制体抑制缺陷的突变体之一(haV-5)与 poly(G)的结合与野生型 haV 相同，而另一种突变体(haV-1)显示显著下降的 poly(G)结合活性。这提示小复制体抑制和 V 蛋白的独特 C 末端介导的 RNA 结合活性之间可能有联系。相反，这提示 V 蛋白 RNA 结合活性可能在麻疹病毒基因表达和复制中起到了调节作用。

与 V 蛋白有关的 RNA 结合活性和小复制体抑制之间的可能联系可以从缺乏 C-末端富含半胱氨酸区的 V 蛋白突变体结合 RNA 少，而且是效果较差的小复制体抑制子的结果得出。

在另一个实验中，显示小复制体抑制与 V 蛋白结合 N 蛋白的能力无关。V-N 蛋白复合物的形成不是 V 蛋白介导的小复制体抑制必需的；V 蛋白突变体 haV-9 和 haV-11(图 3)不能与 N 蛋白相互作用，但维持完全的抑制活性(数据未显示)。

V 蛋白突变体的分析提示，C-末端是高亲和力 RNA 结合必需的。除去包含锌结合域的该区域(51)大大减少了可在 poly(G)树脂上收集的蛋白质量，但没有完全消除结合。这可以提示在 V 蛋白中具有第二个弱 RNA 结合域。不被下列所限，一种吸引人的可能性是 C-末端中的锌指蛋白样结构域形成核酸结合域的一个重要部分，V 蛋白中的第二个结构域与 C-末端合作产生具有更高亲和力的结合位点。

这些 RNA 结合的研究还显示 V 蛋白在粗细胞提取物中，可以与 RNA 相互作用，而不与任何其它病毒蛋白质作用。这提示 V 蛋白直接与 RNA 结合。该结论不是绝对的，因为仍可能 V 蛋白与细胞蛋白质相互作用，从而引起与 RNA 的结合。如果该模型是真实的，数据表明 C-末端可能介导负责与细胞因子相互作用的蛋白-蛋白相互作用。纯化的重组 V 蛋白对于进一步检测 V 蛋白是否直接与 RNA 结合是重要的。

虽然突变的 haV-5 蛋白对于小复制体抑制是有缺陷的(图 4)，它和野生型蛋白质一样与 RNA(图 6)结合。因此，与 CR2 有关的小复制体抑制活性不能简单与其它两种分析的活性(RNA 结合和与 N 蛋白作用)联系起来。为了 CR2 能有效作为抑制基序，可能需要在 V 蛋白的 C-末端中具有完整的 RNA 结合域。V 蛋白可能与一些 RNA 聚合酶 II 转录因子类似，具有模式结构(78)。

为了完全测试 CR2 可直接参与抑制的可能性，除去该结构域(氨基酸 112-

134), 产生 haV-23(图 7; SEQ ID NO:9)。惊人的是, 该缺失对抑制活性的影响不大(图 8)。可除去 CR2, 而不影响抑制的事实证明 CR2 不含活跃参与抑制的结构域。相反, 似乎 haV-5 中发现的氨基酸 113 和 114 的取代导致的缺陷(图 7 和 8)产生显性阴性效果(先前的蛋白质印迹分析表明抑制中的缺陷不是由于 haV-5 不稳定性导致的)。

不受理论所限, haV-5 中的 YD-AA 取代在 V 蛋白的三级结构中产生了微小的改变, 部分封闭了抑制活性。另外, V 蛋白和其它病毒蛋白质或细胞蛋白质之间可能有相互作用。双丙氨酸取代可能倾向于抑制抑制活性, 或隔断无活性蛋白质复合物中的 V 蛋白的蛋白-蛋白相互作用。

进一步用产生与 haV-5 中的突变非常相似但不同的氨基酸取代, 测试了弱抑制表型是由双丙氨酸取代造成的显性阴性效果导致的概念(图 7)。haV-5 中的原始 YD-AA 取代工程改造成非常保守的基序, 由位于 CR2 氨基酸边界的 VYDH 组成(图 2)。该基序在麻疹病毒、犬瘟热病毒、牛瘟病毒和海豚麻疹病毒的 V 蛋白序列中是相同的。在突变体 haV-24(SEQ ID NO:10)中, VYDH 序列被转化成 VYAA。在突变体 haV-25 (SEQ ID NO:11)中 VYDH 被转化成 VAAA。这两个突变体都和野生型 haV 蛋白一样抑制 MV 小复制体基因表达(图 8)。这暗示 haV-5 缺陷非常专一的从 VYDH 到 VAAH 取代。

通过在 C-末端中引入成对的半胱氨酸残基的氨基酸取代, 进一步检测 C-末端锌指蛋白样结构域在抑制中起作用的可能性(图 9)。突变体 haV-12(SEQ ID NO:14)是由半胱氨酸残基 1 和 2 转化成丙氨酸产生的(氨基酸 251 和 255)。类似的, 突变体 haV-13(SEQ ID NO:15)是由 C-末端半胱氨酸残基 4 和 5(氨基酸 269 和 272)被丙氨酸替换产生的。半胱氨酸残基成对突变, 预计这可能显著改变 C-末端中的锌指蛋白样结构, 并在抑制活性中产生容易检测的改变。

惊人的是, 这些突变体的 CAT 表达研究(图 10)揭示了它们仅受到半胱氨酸取代的轻微影响; haV-12 和 haV-13 维持了显著比例的野生型 haV 的蛋白质抑制活性(野生型的约 65%)。该结果有些出乎意料; 预测锌-协同的半胱氨酸残基取代应停止抑制。可能仅取代 7 个半胱氨酸残基中的 2 个不完全破坏推定的锌指蛋白核酸结合结构。另外, 可能推测的锌指蛋白基序在抑制中起的作用比先前预测的要小。因此, 制备了两个额外系列的突变, 来进一步检测 C 末端在抑制中的作用。

在一组突变中,从 C-末端(haV-14 到 haV-19; SEQ ID NO:16-21)开始制备了小增量缺失。最小的缺失(haV-14)从 C-末端除去 21 个氨基酸,而最大的缺失(haV-19)除去了 71 个氨基酸残基。构建了突变体 haV-19,即使它接近于与 haV-1 相同(图 9; SEQ ID NO:13),因为 haV-19 中的缺失除去了作为位于氨基酸 229-234 之间的小碱性基序的部分的几个额外的氨基酸,可用 haV-19 的表型来证实 haV-1 中所示的突变表型。

在小复制体试验中的 C-末端突变体分析揭示了大缺失突变体(haV-1 和 haV-19)行为相似;它们抑制小复制体基因表达仅为 2 倍或更低,而野生型 haV 诱导 5-8 倍的抑制(图 10)。有趣的是,大缺失显示的抑制活性消失由所有较小的截短突变体再现。甚至最小的 C-末端缺失(haV-14)也导致仅约 2 倍的抑制。该结果提示最 C-末端的完整性对于完全的抑制活性是必需的。

除了分析 C 末端缺失突变的作用,产生了几额外的突变,以检测独特的 V 蛋白 C-末端开始处,碱性基序(KKGHRR; 氨基酸 229-237, SEQ ID NO:12)在抑制中起到了一些作用的可能性。将两个精氨酸残基转化为丙氨酸(haV-20; SEQ ID NO:22)或天冬氨酸(haV-21; SEQ ID NO:23)具有类似于 C-末端缺失突变的效果。两个取代的突变体抑制小复制体表达平均仅 1.5-3 倍,而野生型 V 蛋白抑制通常范围是 5-8 倍(图 10)。这些结果暗示,碱性基序的干扰还中断了正常 V 蛋白抑制功能。

进一步通过除去该碱性基序检测了该结果(图 9, haV-22; SEQ ID NO:24),而留下完整的剩余 C-末端。惊人的是,一个初步实验表明碱性基序的缺失对抑制活性没有可分辨的效果;haV-22 抑制 CAT 活性约 9 倍(图 10)。合起来,这些结果提示碱性基序中的氨基酸取代对抑制活性产生显性阴性效果,可能是由于在蛋白质三级结构中产生不良改变。另一方面,碱性基序的缺失对于 V 蛋白抑制小复制体基因表达的能力几乎不产生改变。

尚不了解麻疹病毒 V 蛋白小复制体抑制的机制。结果提示该机制不需要与 N 蛋白的相互作用,但确实涉及与 RNA 的相互作用。RNA 结合可能导致通过许多不同机制降低小复制体试验中的 CAT 水平。例如,如果 V 蛋白与病毒 mRNA 结合, RNA 结合活性可抑制翻译。V 蛋白还可以影响衣壳包装的比率,如果它与新生的病毒 RNA 结合,并防止 RNA 与 N 蛋白结合。相反,它也能在某种程度上刺激核衣壳装配,

从而促使小复制体系统过度产生基因组长度的 RNA，消耗 mRNA。V 蛋白还可以被视为与转录因子类似，它在启动子处或邻近结合，抑制转录。如果 V 蛋白类似于转录因子，它可能是平衡基因组合成和 mRNA 合成开关的调节因子。

分析 V 蛋白功能提供了在候选麻疹病毒株中引入减毒突变，用于免疫原性组合物的基础。出版的研究显示了消除 V 蛋白表达导致减毒的病毒复制 (19, 22, 23, 26-29)。通过将氨基酸取代靶向特定的 V 蛋白结构域，而不是消除表达，引入不同减毒的程度。例如，通过使独特 C-末端中一个或多个半胱氨酸残基的突变实现 V 蛋白抑制功能的部分丧失。P 和 V 共有区域中的取代是合适的，例如 CR2 中的丙氨酸取代，如果它对 V 蛋白功能具有影响，而对 P 蛋白没有很大的影响。如领域中所述使用用于“拯救”的反向遗传系统评估了这些突变 (19, 79, 80, 81)。

必须使用反向遗传系统产生含有本发明突变的感染性麻疹病毒，因为裸露的基因组 RNA 不能作为转录和复制的模板。相反，这些基因组序列仅在它们完全被 N 蛋白包装入核衣壳结构中时才被识别。在该情况下，仅识别基因组和反基因组末端启动子序列，来引发转录或复制途径。

反义单链 RNA 病毒基因组的转录和复制是通过多聚蛋白质对于核糖核蛋白核心(核衣壳)的酶活性实现的。所有麻疹病毒需要三种病毒蛋白质：N、P 和 L，使这些途径进行下去。

用定点诱变在麻疹病毒株中引入本文所述的突变。本文所述的一种或多种突变被引入麻疹病毒株。可评估不同突变组合中的累积效应。

用小复制体系统举例说明本发明。可用本领域已知的技术在全长病毒中轻易插入编码麻疹病毒 V 蛋白的 CR2 和 C-末端(和麻疹病毒的启动子区和 L 蛋白，N、P 和/或 C 蛋白和/或 F 基因末端信号)的核苷酸序列中的改变的突变。用标准重组 DNA 方法将突变引入病毒基因组的 DNA 拷贝。这可能是野生型或改良的病毒基因组的背景，从而产生新病毒。用 cDNA 拯救系统产生含有这些突变的感染性克隆或颗粒，该系统被用于各种反义 RNA 病毒，包括仙台病毒(82)；麻疹病毒(83, 88)；呼吸道合胞病毒(84)；PIV-3(85)；狂犬病(86)；水疱性口炎病毒(VSV)(87)；和牛瘟病毒(89)；这些文献在此引入以供参考。

简单说，所有麻疹病毒拯救系统可总结如下：每种系统需要将全长病毒基因

组的克隆 DNA 等价物，置于合适的 DNA-依赖性 RNA 聚合酶启动子(例如，T7 RNA 聚合酶启动子)和自身切开核酶序列(例如，肝炎δ核酶)之间，将其插入可增殖细菌质粒中。该转录载体提供了容易操纵的 DNA 模板，从该模板 RNA 聚合酶可忠实的转录出具有精确或近乎精确的 5'和 3'末端的病毒反义基因组(或基因组)的单链 RNA 拷贝。病毒基因组 DNA 拷贝的方向和侧接的启动子以及核酶序列决定了反基因组和基因组 RNA 等价物是否转录。拯救新病毒子代还需要病毒特异性反式激活蛋白，用来将裸露单链病毒反基因组或基因组 RNA 转录物包装入功能性核衣壳模板：病毒核衣壳(N)蛋白，聚合酶相关的磷蛋白(P)和聚合酶(L)蛋白中。这些蛋白包括活性病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶，它必须结合核衣壳模板来完成转录和复制。

通常，这些病毒反式激活蛋白产生自一或多个编码所需蛋白的质粒表达载体，虽然某些或所有所需反式激活蛋白可以在如下哺乳动物细胞中产生：这些哺乳动物细胞用基因工程改造，而含有并表达这些病毒特异性基因和作为稳定转化体的基因产物。

拯救的典型(尽管不是唯一必须的)环境包括合适的哺乳动物细胞环境，在其中存在 T7 聚合酶来驱动反基因组(或基因组)单链 RNA 的转录，该 RNA 来自含病毒基因组 cDNA 的转录载体。共转录或在那之后不久，该病毒反基因组(或基因组)RNA 转录物被核衣壳蛋白包装入功能性模板中，并被所需聚合酶组分结合，该组分同时产生于编码所需病毒特异性反式激活蛋白的共转染表达质粒。这些事件和过程导致病毒 mRNA 的优先转录，新基因组的复制和扩增以及，因此产生新病毒子代，亦即，拯救。

对于非麻疹病毒属的狂犬病病毒，VSV 和仙台病毒的拯救，通过重组牛痘病毒 VTF7-3 提供 T7 聚合酶。然而该系统需要将拯救病毒和牛痘病毒分离，可通过物理或化学方法，或通过对于牛痘病毒不是良好宿主的细胞或组织中重复传代。对于麻疹病毒 cDNA 拯救(和可能其它麻疹病毒)，通过建立表达 T7 聚合酶，以及 N 和 P 蛋白的细胞系而避开了该要求。拯救通过将基因组表达载体和 L 基因表达载体转染入辅助细胞系来实现。痘病毒宿主范围突变株，MVA-T7 的优点是在哺乳动物细胞中表达 T7 RNA 聚合酶，但几乎不或不产生感染性子代。它被利用来拯救麻疹病毒和其它麻疹病毒属的病毒。同时表达必需的衣壳包装蛋白后，

合成的全长反基因组病毒 RNA 被包装，复制并通过病毒聚合酶蛋白转录，而复制的基因组被包装入感染性病毒粒子中。除了这样的反基因组，仙台病毒和 PIV-3 的基因组类似物现已被成功拯救(85,90)。

该拯救系统因而提供一种组合物，该组合物包括一转录载体，该转录载体包括分离的核酸分子，它编码麻疹病毒基因组或反基因组。该核酸分子包含在应对于麻疹病毒 V 蛋白的氨基酸 112-134 的区域内至少一个突变(和随意的，这里描述的其它突变)，以及至少一个表达载体，它包括至少一个分离的核酸分子，其编码衣壳包装，转录和复制所需的反式激活蛋白(例如，对于麻疹病毒是 N，P 和 L)。然后宿主细胞用刚才描述的至少两种表达载体转化、感染或转染。宿主细胞在允许这些载体共表达的条件下培养，以产生感染性的修饰病毒。

然后首先通过体外方法测试被拯救的感染性病毒有无所需表型(V 蛋白减少抑制，温度敏感型，冷适应型，噬斑形态学，和转录与复制减弱型)。麻疹病毒 N，P 或 C 基因或 F 基因终止信号中的突变也可用小复制体系统测试，其中所需反式激活衣壳包装和聚合酶活性由野生型或疫苗辅助病毒提供，或由表达含有基因特异性减毒突变的 N，P 和不同 L 基因的质粒提供(63,83)。

如果存在拯救病毒的减毒表型，可用合适的动物模型进行攻击实验。非人灵长类提供了人疾病致病机理的优选动物模型。这些灵长类先用减毒的重组产生的病毒免疫，然后用野生型病毒攻击。猴用不同途径感染，包括但不限于鼻内，气管内或皮下接种(91)。实验性感染的恒河猴和猕猴短尾猿也作为研究疫苗诱导的抗麻疹保护的动物模型(92)。

保护力用例如疾病体征和症状、存活、病毒散布和抗体滴度等标准衡量。如果符合所要的标准，重组产生的病毒可考虑作为人体试验的候选活疫苗或免疫原性的组合物。“被拯救的”病毒被认为是“重组产生的”，子代和病毒后代也相同，它们也掺入了减毒突变。

即使“被拯救”病毒和使用疫苗的最适水平相比过度减毒或减毒不足，这也是对研发这样的最适病毒株的有价值的信息。

最适的，含有减毒点突变的密码子可通过在该密码子中引入第二个或第二个加上第三个突变来稳定，而不改变仅带有减毒点突变的密码子编码的氨基酸。含有稳定性突变的感染性病毒克隆也可用如上所述的 cDNA “拯救”系统产生。

先前在出版的国际专利申请 WO98/13501(93)(在此引入以供参考)中,公开了单链反义病毒目的重组产生的减毒无节段反义单链 RNA 病毒(例如麻疹病毒)的产生和分离,该病毒在 3'基因组启动子区具有至少一个减毒突变,和在 RNA 聚合酶基因具有至少一个减毒突变。

特别是这些突变包括:

(1)在 3' 基因组启动子区至少一个减毒的突变选自核苷酸 26(A→T),核苷酸 42(A→T 或 A→C)和核苷酸 96(G→A),其中这些核苷酸存在于正链反基因组的信使链中;和

(2)RNA 聚合酶基因中的至少一个减毒突变,选自产生氨基酸改变的核苷酸改变。这些氨基酸改变选自残基 331(异亮氨酸→苏氨酸), 1409(丙氨酸→苏氨酸), 1624(苏氨酸→丙氨酸), 1649(精氨酸→甲硫氨酸), 1717(天门冬氨酸→丙氨酸), 1936(组氨酸→酪氨酸), 2074(谷氨酰胺→精氨酸)和 2114(精氨酸→赖氨酸)。

另外,在出版的国际专利申请 WO99/49017(94)(在此引入以供参考)中,公开了重组产生的减毒麻疹病毒的产生和分离,其中 N、P 或 C 基因或 F 基因末端信号中具有至少一个减毒突变。

特别是这些突变包括:

(1)对于 N 基因,至少一个减毒突变选自产生氨基酸改变的核苷酸改变,这些氨基酸改变选自残基 129(谷氨酰胺→赖氨酸), 148(谷氨酸→甘氨酸), 和 479(丝氨酸→苏氨酸);

(2)对于 P 基因,至少一个减毒突变选自产生氨基酸改变的核苷酸改变,这些氨基酸改变选自残基 225(谷氨酸→甘氨酸), 275(半胱氨酸→酪氨酸), 和 439(亮氨酸→脯氨酸);

(3)对于 C 基因,至少一个减毒突变选自产生氨基酸改变的核苷酸改变,这些氨基酸改变选自残基 73(丙氨酸→缬氨酸), 104(甲硫氨酸→苏氨酸), 和 134(丝氨酸→酪氨酸);和

(4)对于 F 基因末端信号(顺式激活转录终止信号),核苷酸 7243(T→C)的改变,其中这些核苷酸存在于正链、反基因组,即信使(编码)有义中。

可在本发明的麻疹病毒中掺入这些突变组之一或全部的单个或减毒突变的组合,特别包括那些在对应于 V 蛋白氨基酸 112-134 的区域中具有至少一个突变的,

和那些同时含有氨基酸 112-134 中的突变和至少一部分从氨基酸 231 开始的 C-末端区域的突变和缺失。

本发明的减毒病毒可用来配制疫苗或免疫原性组合物。要这样做，将减毒病毒调节到合适的浓度，并和任何合适的疫苗佐剂，稀释剂或载体一起配方。生理学可接受的培养基可被用作载体和/或稀释剂。这些培养基包括但不限于：水、合适的等渗培养基、甘油、乙醇和其它常规溶剂、磷酸盐缓冲液等。合适的佐剂包括但不限于磷酸铝、氢氧化铝、MPL™(3-O-去乙酰基-磷酸脂 A；RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT 现在是 Corixa)、合成的脂类 A 类似物，例如 529(Corixa)、Stimulon™ QS-21(Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) 和 IL-12(Genestics Institute, Cambridge, MA)。

在本发明的一个实施例中，将含有麻疹病毒的配方用作疫苗或免疫原性组合物。减毒病毒可以和低温保护添加剂或稳定剂例如蛋白(例如清蛋白，明胶)，糖类(例如蔗糖，乳糖，山梨醇)，氨基酸(例如，谷氨酸钠)，盐，或其它保护性试剂混合。该混合物保存在液态，或然后干燥或冻干以运输和储藏并在施用前夕和水混合。

含有本发明的麻疹病毒的配方可用于免疫人或其它脊椎动物个体，来诱导保护力抵抗减毒病毒相对应的野生型病毒的感染。因此，本发明还提供免疫个体以诱导针对麻疹病毒感染的保护的方法，即通过施给个体有效免疫量的含有本文上述病毒产生形式的疫苗或免疫原性组合物配方。

必须施用给个体剂量数合适和充足量的疫苗或免疫原性组合物以诱导免疫应答。本领域技术人员可容易的确定用量和剂量。施用可以通过任何常规有效形式，例如鼻内，肠胃外，口内，或局部施用于任何粘膜表面，例如鼻内，口，眼，肺，阴道内或直肠表面，例如通过气雾剂喷洒。施用的优选途径是鼻内施用。

本文所引用的所有专利和出版物在此引入以供参考。

为了能更好的理解本发明，列出下文的实施例。这些实施例仅用来阐述而不是用来限制本发明的范围。

实施例

实施例 1 细胞和病毒

HEp2 细胞在补充有 10%胎牛血清的 Dulbecco 的改良 Eagles 培养基(DMEM)

中生长。鸡胚成纤维细胞(CEF; SPAFAS, Inc)维持在相同培养基中。表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶(MVA/T7; 62)的痘病毒减毒株在 CEF 中生长。噬菌斑测定也在 CEF 上进行。

实施例 2

重组 DNA

分别从感染的细胞总 RNA 中, 通过反转录和用基因特异性引物 PCR 扩增(RT/PCR), 然后克隆入合适的 T7 RNA 聚合酶依赖性表达载体(61), 制备麻疹病毒 N、P 和 L 蛋白质表达克隆(图 1A)。用麻疹病毒的 Edmonston 野生型病毒株感染 Vero 细胞, 当约 70%或以上的细胞显示细胞病变作用时, 通过钒-苯酚提取法(95)制备 RNA。用一试管 Titan 扩增试剂盒(Roche Molecular Biology)所含的禽成肌病毒 RT 和 *Pwo* 聚合酶进行 RT/PCR。RT 步骤在 47°C 进行 30-60 分钟, 然后进行 30-35 轮 PCR 扩增。扩增的 DNA 片段克隆入在载体 *NcoI* 位点具有翻译起始密码子的 T7 表达质粒(图 1; (61,83))。用循环测序(96)检查克隆的 DNA, 并用寡核苷酸诱变, 使用 Morph 试剂盒(5prime-3prime, Inc.), 或通过用如前所述的新扩增的 DNA 片段替换亚片段纠正核苷酸取代错误(96)。

用侧接 V 蛋白编码区的引物, 从 Edmonston 野生型全长 cDNA 克隆通过 PCR 扩增制备了原始 V 蛋白的表达克隆。将扩增的 DNA 克隆入 T7 表达载体, 在编辑位点(18)通过寡核苷酸定向诱变加入产生 V 基因阅读框漂移必须的其它 G 核苷酸残基。还在氨基末端用流感病毒血凝素表位标记(HA 标记; (67))制备野生型和突变的 V 蛋白表达载体。修饰 T7 载体质粒, 以包含包括起始密码子和编码 HA 表位标记, 然后是多接头(质粒 pT7/HA)的序列(CG ATG GCT TAT CCT TAT GAC GTG CCT GAC TAT GCC)(SEQ ID NO:5)。在氨基末端用 HA 标记克隆 V 蛋白编码区。这用来替换 V 蛋白引发因子的甲硫氨酸密码子, 产生称为 pMV-haV-wt 质粒。在 pMV-haV-wt 骨架中, 通过寡核苷酸指导或缺失诱变制备 V 蛋白突变体。

设计用于扩增 P 和 V 编码区的 5'末端的引物

(CGGCCATGGCAGAAGAGACAGGCACGCCACGTAAAAAACGGAC)(SEQ ID NO:6)含有两个碱基改变(下划线), 来中断下游 C 蛋白开放阅读框。这些改变对于 P 和 V 开放阅读框是沉默的。相同的核苷酸改变对于 pT7MV-haV 构建物进行。

对于全部蛋白质表达构建物, cDNA 插入物被克隆到内部核糖体进入位点

(IRES)的 3', 以促使 T7 RNA 聚合酶转录物的翻译。在 3'末端有 50 个腺苷酸残基的延伸, 然后是 T7 RNA 聚合酶终止子。P 和 V 表达载体含有设计用于从下游 C 蛋白开放阅读框开始中断翻译开始的碱基取代。

麻疹病毒小复制体(pMVwt107-CAT, 图 1B)是一种 pMV107-CAT(63)的衍生物。质粒 pMV107-CAT 含有在麻疹病毒疫苗株(60)中发现的前导序列, 用寡核苷酸定向诱变转化成质粒 pMV107wt-CAT(它含有野生型前导序列)。

实施例 3

瞬时表达实验

如前所述(96)主要用不同量的病毒蛋白质表达载体(图 1B)和含有 CAT 报道基因的麻疹病毒小复制体(图 1B)进行了瞬时小复制体表达分析。

麻疹病毒小复制体是含有 CAT 报道基因和来自麻疹病毒 Edmonston 野生型株的麻疹前导序列(60)的 pMV107-CAT(63)的衍生物。当细胞约 70-90%汇合时, 用 6 孔板中的 HEp2 细胞转染。通过混合小复制体 DNA(50-200ng pMVwt107-CAT)和表达质粒(400ng pMVwt-N, 300ng pMVwt-P[C], 100ng pMVwt-L)在 200 微升无血清 OptiMEM 中制备转染混合物。在该混合物中根据 25-400ng 的量, 如图 1C 中所述加入 V 蛋白表达质粒。在 DNA-培养液混合物中加入 Lipofectace(12-15 微升; Invitrogen/Life Technologies), 并在室温下培育 20-30 分钟。制备足量的单独 MVA/T7 混合物, 以提供含有足量 MVA/T7 的 0.8ml 无血清 OptiMEM, 以 2pfu/细胞感染各孔要转染的细胞。在开始转染前, 将 DNA-培养基-Lipofectace 转染混合物与 800 微升 MVA/T7-培养基混合物混合, 并通过吹洗温和混合。接着, 从细胞单层中除去培养基, 在细胞中加入混合的 1ml 转染混合物。

过夜培养后, 用补充有 10%FBS 的 DMEM 替换转染混合物和培养基, 细胞再培养 1 天。转染开始约 48 小时后, 收集细胞, 如前所述制备提取物用于分析 CAT 活性(96)。CAT 的表达如图 1C 所示。在一些实验中, 粗细胞提取物中的蛋白质用蛋白质印迹分析, 来监测蛋白质表达(97)。用补充有 0.2% NP40 的 TN 缓冲液(50mM Tris[pH7.4], 150mM NaCl)裂解转染的细胞。离心澄清细胞提取物, 以除去核, 在胞质提取物中加入等体积的 Laemmli 样品缓冲液(62.5mM Tris[pH6.8], 25%甘油, 2% SDS, 0.01%溴酚蓝)。调节样品, 使其含有约 2.5%β-巯基乙醇, 然后

煮沸。用标准方法(97)进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和电印迹。用小鼠单克隆抗体 12CA5(Roche Molecular Biology)或大鼠单克隆抗体 3F10(Roche Molecular Biology)检测表位标记的 V 蛋白。用过氧化物酶-偶联的二抗(Sigma)和化学发光试剂(Roche Molecular Biology 或 New England Nuclear)进行了检测。

实施例 4

通过突变的麻疹病毒 V 蛋白抑制小复制体表达

用不同量的麻疹病毒 V 蛋白突变体 haV-1 到 haV-8 重复实施例 3 所述的瞬时小复制体表达 CAT 试验, 它们与野生型序列(haV-wt)具有下列不同(见图 3):

- haV-1 氨基酸 232-299 缺失
- haV-2 氨基酸 225 的谷氨酸到甘氨酸突变
- haV-3 氨基酸 229 和 230 赖氨酸到丙氨酸突变
- haV-4 氨基酸 204 和 209 的赖氨酸和苏氨酸到丙氨酸突变
- haV-5 氨基酸 113 和 114 的酪氨酸和天冬氨酸到丙氨酸突变
- haV-6 氨基酸 100 和 101 的亮氨酸和谷氨酰胺到丙氨酸突变
- haV-7 氨基酸 14 和 15 的谷氨酸和半胱氨酸到丙氨酸突变
- haV-8 氨基酸 3 和 4 的谷氨酸到丙氨酸突变

使用 200 或 400ng 各 V 质粒(编码野生型或 haV-1 到 haV-8 蛋白), 测量相对 CAT 活性, 作为不用任何 V 蛋白表达载体进行的转染(泳道 2)获得的活性百分数。图 4A 表示了结果。减低的百分数与较高程度的 CAT 表达抑制相关。用抗-HA 抗体分析的蛋白质印迹监测 V 蛋白表达(图 4B)。

用增量(100ng 到 1 微克)编码 haV-1 的 V 质粒重复 CAT 试验, 图 4C 描述了相对活性。

实施例 5

RNA 结合试验

进行了 RNA 结合试验(74,76,77)评估麻疹病毒 V 蛋白对 RNA 的结合, 使用与多核糖核苷酸(Sigma)偶联的琼脂糖树脂。如上所述用补充有 0.5% NP40、5%甘油、1mg MgCl₂、1mm ZnCl₂ 和蛋白酶抑制剂混合物(Roche Molecular Biology)的 TN

缓冲液裂解转染的细胞。在澄清的细胞裂解物中加入含有多核糖核苷酸的琼脂糖树脂(约 25-50 微升固定量的珠), 4℃振摇保温 60 分钟。保温后, 洗涤树脂三次除去未结合的蛋白质。通过在补充有 2.5%β-巯基乙醇的 Laemmli 缓冲液中煮沸从树脂上洗脱下蛋白质。用图 5A 的流程图总结该过程。用蛋白质印迹分析如上所述分析多核苷酸树脂捕获的蛋白质。首先用野生型 V 蛋白进行该试验, 然后用 haV-1 到 haV-11 进行试验。突变体 haV-1 到 haV-8 如上所述; haV-9 到 haV-11 与野生型序列(haV-wt)具有下列区别(见图 3):

haV-9 氨基酸 1-20 缺失

haV-10 氨基酸 208-230 缺失

haV-11 氨基酸 1-20 和 208-230 缺失

结果描述于图 5B(野生型)和 6(突变体)。

实施例 6

其它 CR2 突变体麻疹病毒 V 蛋白质对小复制体表达的抑制

用麻疹病毒 V 蛋白 CR2 突变体 haV-5 和 haV-23 到 haV-25 重复实施例 3 和 4 中所述的瞬时小复制体表达 CAT 试验, 它与 CR2(氨基酸 100-140; 见图 7)中的野生型序列(haV)(SEQ ID NO:7)具有下列不同。

haV-5 氨基酸 113 和 114 位的酪氨酸和天冬氨酸到丙氨酸的突变(SEQ ID NO:8)

haV-23 氨基酸 112 到 134 的缺失(SEQ ID NO:9)

haV-24 氨基酸 114 和 115 处的天冬氨酸和组氨酸到丙氨酸的突变(SEQ ID NO:10)

haV-25 氨基酸 113 处的酪氨酸、天冬氨酸和组氨酸到 155 处的突变(SEQ ID NO:11)

使用 400ng 的各 V 质粒(编码野生型、haV-5 或 haV-23 到 haV-25 V 蛋白), 测定相对 CAT 活性, 作为不用任何 V 蛋白表达载体进行的转染的活性百分数(条 1)。结果如图 8 所述。较低百分数与较高程度的 CAT 表达抑制有关。

实施例 7

其它 C-末端突变的麻疹病毒 V 蛋白对小复制体表达的抑制

用麻疹病毒 V 蛋白突变体 haV-1 和 haV-12 到 haV-22 重复实施例 3 和 4 中所述的瞬时小复制体表达 CAT 试验，它与野生型序列(haV)(SEQ ID NO:7)的 C-末端(氨基酸 220-299；见图 9)具有下列不同。

- | | |
|--------|---|
| haV-1 | 氨基酸 232 到 299 缺失(SEQ ID NO:13) |
| haV-12 | 氨基酸 251 和 255 处的半胱氨酸到丙氨酸的突变(SEQ ID NO:14) |
| haV-13 | 氨基酸 269 和 272 处的半胱氨酸到丙氨酸的突变(SEQ ID NO:15) |
| haV-14 | 氨基酸 279-299 缺失(SEQ ID NO:16) |
| haV-15 | 氨基酸 267-299 缺失(SEQ ID NO:17) |
| haV-16 | 氨基酸 250-299 缺失(SEQ ID NO:18) |
| haV-17 | 氨基酸 243-299 缺失(SEQ ID NO:19) |
| haV-18 | 氨基酸 236-299 缺失(SEQ ID NO:20) |
| haV-19 | 氨基酸 229-299 缺失(SEQ ID NO:21) |
| haV-20 | 氨基酸 233 和 234 处的精氨酸到丙氨酸的突变(SEQ ID NO:22) |
| haV-21 | 氨基酸 233 和 234 处的精氨酸到精氨酸的突变(SEQ ID NO:23) |
| haV-22 | 氨基酸 229-237 处的突变体缺失(SEQ ID NO:24) |

使用 400ng 的各 V 质粒(编码野生型、haV-1 或 haV-12 到 haV-22 V 蛋白)，测定相对 CAT 活性，作为不用任何 V 蛋白表达载体进行的转染的活性百分数(条 1)。结果如图 10 所述。较低百分数与较高程度的 CAT 表达抑制有关。

文献

1. Black,F.L.等, Am. J. Epidemiol., 124, 442—452(1986)。
2. Lennon,J.L.和 Black,F.L., J. Pediatrics, 108, 671—676(1986)。
3. Pabst,H.F.等, Pediatr. Infect. Dis. J., 11, 525—529(1992)。
4. Centers for Disease Control, MMWR, 40, 369—372(1991)。
5. Centers for Disease Control, MMWR, 41: S6, 1—12(1992)。
6. King,G.E.等, Pediatr. Infect. Dis. J., 10, 883—887(1991)。
7. Rota,J.S.等, Virology, 188, 135—142(1992)。
8. Griffin,D.E., 和 Bellini,W.J., 卷 1 1267—1312 页, Fields Virology, B.N.Fields, 等编辑(第 3 版, Raven Press,1996)。
9. Lamb,R.A 和 Kolakosky,D., 卷 1 1177—1204 页, Fields Virology, B.N.Fields, 等编辑(第 3 版, Raven Press,1996)。
10. Birrer,M.J., 等, Virology, 108, 381—390(1981)。
11. Birrer,M.J., 等, Nature, 293, 67—69(1981)。
12. Norby,E.等, The Paramyxoviruses, 481—507 页, D.Kingsbury 编辑(Plenum Press,1991)。
13. Peebles,M.E., The Paramyxoviruses, 427-456 页, D.Kingsbury 编辑(Plenum Press,1991)。
14. Egelman,E.H.等, 病毒学杂志, 63, 2233—2243(1989)。
15. Udem,S.A.等, J. Virol. Methods, 8,123-136(1984)。
16. Udem. S. A., 和 Cook. K. A., J. Virol. 49. 57-65 (1984)。
17. Moyer, S. A., 和 Horikami, S. M., pp.249-274. 于 The Paramyxoviruses, D. Kingsburry, 编(Plenum Press. 1991)。
18. Cattaneo. R., 等., Cell. 56. 759-764(1989)。
19. Nagai,Y., Rev. Med. Virol., 9, 83-99(1999)。
20. Bellini. W.J., 等, J. Virol., 53.908-919 (1985)。
21. Baron, M.D., 和 Barrett. T., J. Virol, 74, 2603-2611 (2000)。
22. Delenda. C., 等, Virology 242, 327-337 (1998)。
23. Durbin, A.P., 等, Virology, 261, 319-330 (1999)。
24. Kato. A., 等, J. Virol., 71. 7266-7272 (1997)。

-
25. Scbneider. H., 等, Virology, 227, 314-322 (1997)。
 26. Kato. A., 等, EMBO J., 16. 578-587(1997)。
 27. Tober, C., 等, J. Virol., 72, 8124-8132 (1998)。
 28. Valsamakis, A., 等, J. Virol., 72, 7754-7761 (1998)。
 29. Patterson, J.B., 等, Virology, 267, 80-89(2000)。
 30. Parks, C.L., 等, J. Virol., 75, 910-920 (2001)。
 31. Takeda, M., 等 J. Virol., 72, 8690-8696 (1998)。
 32. Bankamp, B., 等, Virology, 216, 272-277(1996)。
 33. Curran, J., 等, J. Virol., 69, 849-855 (1995)。
 34. Harty, R.N., 和 Palese, P., J. Gen. Virol., 76, 2863-2867 (1995)。
 35. Horikami, S.M., 等, Virology, 222, 383-390 (1996)。
 36. Nishio, M., 等, J. Gen. Virol. 77, 2457-2463 (1996)。
 37. Randall, R. E., 和 Bermingham, A., Virology, 224, 121-129 (1996)。
 38. Shaji, D., 和 Shaila, M. S., Virology, 258, 415-424 (1999)。
 39. Watanabe, N., 等, Medical Microbiology & Immunology, 185, 89-94 (1996)。
 40. Precious, B., 等, J. Virol., 69, 8001-8010 (1995)。
 41. Watanabe. N., 等, J. Gen. Virol., 77, 327-328 (1996)。
 42. Lin, G.Y., 等, Virology, 249, 189-200 (1998)。
 43. Liston. P., 等, Virus Res, 38, 241-259(1995)。
 44. Didcock. L., 等, J. Virol., 73, 9928-9933 (1999)。
 45. Curran. J., 等, EMBO J., 10. 3079-3085 (1991)。
 46. Baron, M.D., 等, J. Gen. Virol., 74. 299-304 (1993)
 47. Thomas, S.M., 等, Cell, 54, 891-902(1988)。
 48. Borden, K.L.B., 和 Freemont. P.S., Curr. Opinion Structural Biol., 6, 395-401 (1996)。
 49. Choo, Y., 和 Klug, A., Curr. Opinion Structural Biol., 7, 117-125(1997)。
 50. O'Halloran, T.V., Science, 261, 715-725(1993)。
 51. Liston, P., 和 Briedis, D.J., Virology, 198, 399-404(1994)。
 52. Paterson, R.G., 等, Virology, 208, 121-131(1995)。
 53. Steward, M. 等, Archives Virol., 140, 1321-1328(1995)。

-
54. Blumberg, B., 等, pp. 235-247 于 The Paramyxoviruses, D. Kingsbury, 编. (Plenum Press, 1991)。
55. Berrett, T., 等, pp. 83-102 于 The Paramyxoviruses, D. Kingsbury 编 (Plenum Press, 1991)。
56. Tordo, N., 等, Sem. 于 Virology, 3, 341-357 (1992)。
57. Cattaneo, R., 等, EMBO J., 6, 681-688 (1987)。
58. Castaneda, S. J., 和 Wong, T. C., J. Virol., 63, 2977-2986 (1989)。
59. Castaneda, S. J., 和 Wong, T. C., J. Virol., 64, 222-230 (1990)。
60. Parks, C. L., 等, J. Virol., 75, 921-933 (2001)。
61. Moss, B., 等, Nature, 348, 91-92 (1990)。
62. Wyatt, L. S. 等, Virology, 210, 202-205 (1995)。
63. Sidhu, M. S., 等, Virology, 208, 800-807 (1995)。
64. Huber, M., 等, Virology, 185, 299-308 (1991)。
65. Alber, T., Curr. Opin. Genetics Dev., 2, 205-210 (1992)。
66. Baxevanis, A. D., 和 Vinson, C. R., Curr. Opin. Genetics Dev., 3, 278-285 (1993)。
67. Kolodziej, P. A., 和 Young, R. A., Methods Enzymology, 194, 508-519 (1991)。
68. Bass, S. H., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4498-4502 (1991)。
69. Diamond, S. E., 和 Kirkegaard, K., J. Virol., 68, 863-876 (1994)。
70. Gibbs, C. S., 和 Zoller, M. J., J. Biol. Chem., 266, 8923-8931 (1991)。
71. Giniger, E., 和 Ptashne, M., Nature, 330, 670-672 (1987)。
72. Sedlmeirer, R., 和 Neubert, W. J., Adv. Virus. Res., 50, 101-139 (1998)。
73. Lin, G. Y., 等, Virology, 238, 460-469 (1997)。
74. Elenbaas, B., 等, Molecular Medicine, 2, 439-451 (1996)。
75. Kiledjian, M., 和 Dreyfuss, G., EMBO J., 11, 2655-2664 (1992)。
76. Siomi, H., 等, Cell, 74, 291-298 (1993)。
77. Swanson, M., 和 Dreyfuss, G., Mol. Cell. Biol., 8, 2237-2241 (1988)。
78. Mitchell, P. 和 Tjian, R., Science, 245, 371-378 (1989)。
79. Conzelmann, K. K., Annual Review of Genetics, 32, 123-162 (1998)。
80. Radecke, F., 和 Billeter, M. A., Rev. Med. Virology, 7, 49-63 (1997)。
81. Roberts, A., 和 Rose, J. K., Virology, 247, 1-6 (1998)。

-
82. Garcin, D., 等, EMBO J., 14, 6087-6094 (1995)。
 83. Radecke, F., 等, EMBO J. 14, 5773-5784 (1995)。
 84. Collins, P.L., 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 11563-11567 (1995)。
 85. Published International Application NO. W098/53078。
 86. Published European Patent Application NO. 702, 085。
 87. Rota, J.S., 等, .Virus Res., 31, 317-330 (1994)。
 88. Published International Application NO. WO 97/06270。
 89. Baron, M.D., 和 Barrett, T., J. Virology, 71, 1265-1271 (1997)。
 90. Kato, A., 等, , Genes to Cells, 1, 569-579 (1996)。
 91. Shaffer. M.F., 等, , J. Immunol., 41, 241-256 (1941)。
 92. Enders, J.F., 等, N. Engl. J. Med. 263, 153-159 (1960)。
 93. Published International Application NO. WO 98/13501。
 94. Published International Application NO. WO 99/49017。
 95. Chomczynski, P., 和 Sacchi, N., Analytical Biochem., 162, 156-159 (1987)。
 96. Parks, C.L., 等, J. Virol., 73, 3560-3566 (1999)。
 97. Ausubel, F.M., 等编, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, NY 1987)。

 序列表

<110> 美国氰胺公司(American Cyanamid Company)

<120> 修饰的麻疹病毒 V 蛋白

<130> AM100239PCT

<140>

<141>

<150> US60/213,655

<151> 2000-06-23

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 299

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 1

```

Met Ala Glu Glu Gln Ala Arg His Val Lys Asn Gly Leu Glu Cys Ile
 1           5           10           15
Arg Ala Leu Lys Ala Glu Pro Ile Gly Ser Leu Ala Ile Glu Glu Ala
      20           25           30
Met Ala Ala Trp Ser Glu Ile Ser Asp Asn Pro Gly Gln Glu Arg Ala
      35           40           45
Thr Cys Arg Glu Glu Lys Ala Gly Ser Ser Gly Leu Ser Lys Pro Cys
      50           55           60
Leu Ser Ala Ile Gly Ser Thr Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ile Arg Gly
      65           70           75           80
Gln Gly Pro Gly Glu Ser Asp Asp Asp Ala Glu Thr Leu Gly Ile Pro
      85           90           95
Pro Arg Asn Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val
      100          105          110
Tyr Asp His Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser
      115          120          125
Ile Met Val Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr Leu Ser Gly Gly
      130          135          140
Asp Asn Glu Ser Glu Asn Ser Asp Val Asp Ile Gly Glu Pro Asp Thr
      145          150          155          160
Glu Gly Tyr Ala Ile Thr Asp Arg Gly Ser Ala Pro Ile Ser Met Gly
      165          170          175
Phe Arg Ala Ser Asp Val Glu Thr Ala Glu Gly Gly Glu Ile His Glu
      180          185          190
Leu Leu Arg Leu Gln Ser Arg Gly Asn Asn Phe Pro Lys Leu Glu Lys
      195          200          205
Thr Leu Asn Val Pro Pro Pro Pro Asp Pro Gly Arg Ala Ser Thr Ser
      210          215          220

```

Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Ser Leu Ile Trp
 225 230 235 240
 Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Met Cys Ser
 245 250 255
 Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys Thr Cys Gly Glu Cys
 260 265 270
 Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr Gly Val Asp Thr Arg
 275 280 285
 Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 290 295

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> 牛瘟病毒

<400> 2

Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Val Asn Lys Gly Leu Glu Cys Ile
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu Arg Ala Arg Pro Leu Asp Pro Leu Val Val Glu Glu Ala
 20 25 30
 Leu Ala Ala Trp Val Glu Thr Ser Glu Gly Gln Thr Leu Asp Arg Met
 35 40 45
 Ser Ser Asp Glu Ala Glu Ala Asp His Gln Asp Ile Ser Lys Pro Cys
 50 55 60
 Phe Pro Ala Ala Gly Pro Gly Lys Ser Ser Met Ser Arg Cys His Asp
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Arg Gly Ser Asn Ser Cys Asp Glu Glu Leu Gly Ala Phe
 85 90 95
 Ile Gly Asp Ser Ser Met His Ser Thr Glu Val Gln His Tyr His Val
 100 105 110
 Tyr Asp His Ser Gly Glu Lys Val Glu Gly Val Glu Asp Ala Asp Ser
 115 120 125
 Ile Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Asp Gly Val Glu Val Trp Gly Gly
 130 135 140
 Asp Glu Glu Ser Glu Asn Ser Asp Val Asp Ser Gly Glu Pro Asp Pro
 145 150 155 160
 Glu Gly Ser Ala Pro Ala Asp Trp Gly Ser Ser Pro Ile Ser Pro Ala
 165 170 175
 Thr Arg Ala Ser Asp Val Glu Thr Val Glu Gly Asp Glu Ile Gln Lys
 180 185 190
 Leu Leu Glu Asp Gln Ser Arg Ile Arg Lys Met Thr Lys Ala Glu Lys
 195 200 205
 Thr Leu Val Val Pro Pro Ile Pro Ser Gln Glu Arg Pro Thr Ala Ser
 210 215 220
 Glu Lys Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Asp Leu Ile Trp
 225 230 235 240
 Asn Asp Gly Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Thr Cys Ser
 245 250 255
 Lys Val Thr Val Gly Thr Val Arg Ala Lys Cys Ile Cys Gly Glu Cys
 260 265 270
 Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Ile Thr Asp Ser Gly Ile Glu Asn Arg

275	280	285
Ile Trp Tyr His Asn Leu Ala Asp Ile Pro Glu		
290	295	

<210> 3
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> 海豚麻疹病毒

<400> 3
 Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Ile Asn Lys Gly Leu Glu Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Ser Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ala Val Glu Ile Lys Glu Ala
 20 25 30
 Gln Ile Ile Arg Ser Lys Ala Ala Cys Glu Glu Ser Ser Glu Ser His
 35 40 45
 His Gln Asp Asn Ser Glu Lys Asp Thr Leu Asp Phe Asp Glu Ser Cys
 50 55 60
 Ser Ser Ala Ile Arg Pro Glu Thr Tyr Arg Met Leu Leu Gly Asp Asp
 65 70 75 80
 Thr Gly Phe Arg Ala Pro Gly Tyr Ile Pro Asn Glu Gly Glu Pro Glu
 85 90 95
 Pro Gly Asp Ile Gly Lys Glu Glu Pro Ala Val Arg Cys Tyr His Val
 100 105 110
 Tyr Asp His Gly Gly Gln Ala Val Glu Gly Val Lys Asp Ala Asp Leu
 115 120 125
 Leu Val Val Pro Thr Gly Ser Asp Asp Ala Glu Phe Arg Asp Gly
 130 135 140
 Asp Glu Ser Ser Leu Glu Ser Asp Gly Glu Ser Gly Thr Val Asp Thr
 145 150 155 160
 Arg Gly Asn Ser Ser Ser Asn Arg Gly Ser Ala Pro Arg Ile Lys Val
 165 170 175
 Glu Arg Ser Ser Asp Val Glu Thr Ile Ser Ser Glu Glu Leu Gln Gly
 180 185 190
 Leu Ile Arg Ser Gln Ser Gln Lys His Asn Gly Phe Gly Val Asp Arg
 195 200 205
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Ile Pro Thr Ser Val Pro Leu Asp Pro Ala
 210 215 220
 Pro Lys Ser Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Ile Ser Leu Ile Trp
 225 230 235 240
 Asp Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Thr Cys Ser
 245 250 255
 Arg Ile Lys Met Gly Ile Val Arg Val Lys Cys Thr Cys Gly Glu Cys
 260 265 270
 Pro Pro Val Cys Asp Glu Cys Arg Glu Asp Pro Glu Thr Pro Thr Arg
 275 280 285
 Ile Trp Tyr His Ser Leu Pro Glu Ile Pro Glu Gln Trp Pro Phe
 290 295 300

<210> 4
 <211> 299
 <212> PRT

<213> 犬瘟热病毒

<400> 4

```

Met Ala Glu Glu Gln Ala Tyr His Val Ser Lys Gly Leu Glu Cys Leu
 1           5           10          15
Lys Ala Leu Arg Glu Asn Pro Pro Asp Ile Glu Glu Ile Gln Glu Val
 20          25          30
Ser Ser Leu Arg Asp Gln Thr Cys Asn Pro Gly Gln Glu Asn Gly Thr
 35          40          45
Thr Gly Met Gln Glu Glu Glu Asp Ser Gln Asn Leu Asp Glu Ser His
 50          55          60
Glu Pro Thr Lys Gly Ser Asn Tyr Val Gly His Val Pro Gln Asn Asn
 65          70          75          80
Pro Gly Cys Gly Glu Arg Asn Thr Ala Leu Val Glu Ala Glu Arg Pro
 85          90          95
Pro Arg Glu Asp Ile Gln Pro Gly Pro Gly Ile Arg Cys Asp His Val
100         105         110
Tyr Asp His Ser Gly Glu Glu Val Lys Gly Ile Glu Asp Ala Asp Ser
115         120         125
Leu Val Val Pro Ala Gly Thr Val Gly Asn Arg Gly Phe Glu Arg Gly
130         135         140
Glu Gly Ser Leu Asp Asp Ser Thr Glu Asp Ser Gly Glu Asp Tyr Ser
145         150         155         160
Glu Gly Asn Ala Ser Ser Asn Trp Gly Tyr Ser Phe Gly Leu Lys Pro
165         170         175
Asp Arg Ala Ala Asp Val Ser Met Leu Met Glu Glu Glu Leu Ser Ala
180         185         190
Leu Leu Arg Thr Ser Arg Asn Val Gly Ile Gln Lys Arg Asp Gly Lys
195         200         205
Thr Leu Gln Phe Pro His Asn Pro Glu Gly Lys Thr Arg Asp Pro Glu
210         215         220
Cys Gly Ser Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu Val Ser Leu Thr Trp
225         230         235         240
Asn Gly Asp Ser Cys Trp Ile Asp Lys Trp Cys Asn Pro Ile Cys Thr
245         250         255
Gln Val Asn Trp Gly Ile Ile Arg Ala Lys Cys Phe Cys Gly Glu Cys
260         265         270
Pro Pro Thr Cys Asn Glu Cys Lys Asp Asp Pro Glu Met Gln Thr Arg
275         280         285
Val Trp His Ala Thr Pro Ser Gln Asp Leu Lys
290         295

```

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 表位标记

<400> 5

ccatggetta tccttatgac gtgcctgact atgcc

35

<210> 6
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 6
 cggccatggc agaagagaca ggcacgccac gtaaaaaacg gac 43

<210> 7
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

<400> 7
 Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Tyr Asp His
 1 5 10 15
 Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
 20 25 30
 Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
 35 40

<210> 8
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

<400> 8
 Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Ala Ala His
 1 5 10 15
 Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
 20 25 30
 Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
 35 40

<210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

<400> 9
 Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Leu Asp Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Thr

<210> 10
 <211> 41
 <212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 10

Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Tyr Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
 20 25 30
 Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
 35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 11

Leu Gln Ala Ser Ser Thr Gly Leu Gln Cys Tyr Tyr Val Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Glu Ala Val Lys Gly Ile Gln Asp Ala Asp Ser Ile Met Val
 20 25 30
 Gln Ser Gly Leu Asp Gly Asp Ser Thr
 35 40

<210> 12

<211> 80

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 12

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1 5 10 15
 Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
 20 25 30
 Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
 35 40 45
 Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
 50 55 60
 Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65 70 75 80

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 13

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly
 1 5 10

<210> 14

<211> 80

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 14

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Ala
      20           25           30
Asn Pro Met Ala Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
      35           40           45
Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
      50           55           60
Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65           70           75           80

```

<210> 15

<211> 80

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 15

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
      20           25           30
Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
      35           40           45
Thr Ala Gly Glu Ala Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
      50           55           60
Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
 65           70           75           80

```

<210> 16

<211> 59

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 16

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
      20           25           30
Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
      35           40           45
Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln
      50           55

```

<210> 17

<211> 47

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 17

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
          20           25           30
Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg
          35           40           45

```

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

```

<400> 18
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg
          20           25           30

```

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

```

<400> 19
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly
          20

```

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

```

<400> 20
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Arg Arg Glu
 1           5           10           15

```

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

```

<400> 21
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile
 1           5

```

<210> 22
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

<400> 22

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Ala Ala Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
          20           25           30
Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
          35           40           45
Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
          50           55           60
Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
65           70           75           80

```

<210> 23

<211> 80

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<400> 23

```

Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Lys Lys Gly His Asp Asp Glu
 1           5           10           15
Ile Ser Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys
          20           25           30
Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys
          35           40           45
Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr
          50           55           60
Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
65           70           75           80

```

<210> 24

<211> 71

<212> PRT

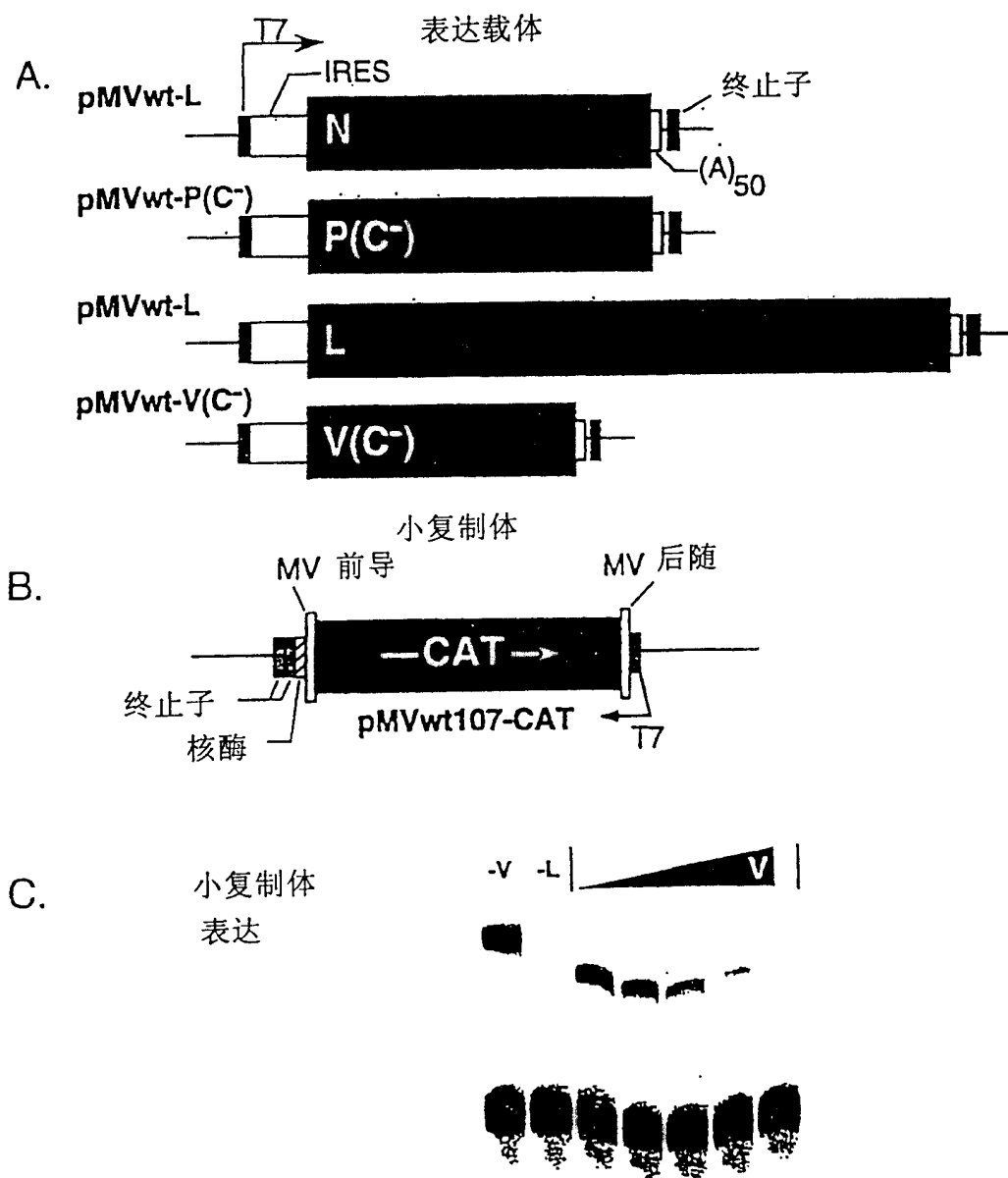
<213> 麻疹病毒

<400> 24

```

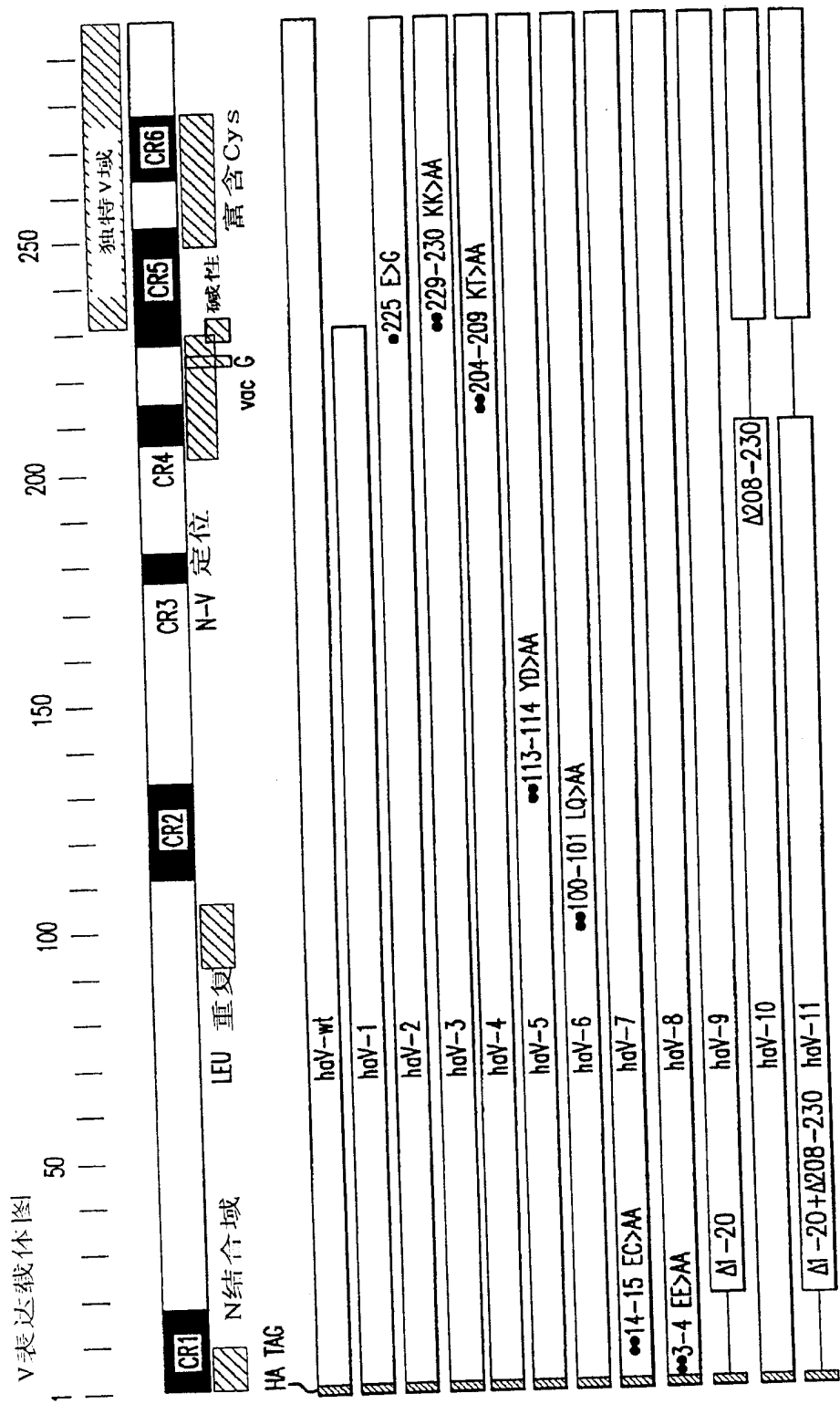
Arg Ala Ser Thr Ser Glu Thr Pro Ile Leu Ile Trp Asn Gly Asp Arg
 1           5           10           15
Val Phe Ile Asp Arg Trp Cys Asn Pro Met Cys Ser Lys Val Thr Leu
          20           25           30
Gly Thr Ile Arg Ala Arg Cys Thr Cys Gly Glu Cys Pro Arg Val Cys
          35           40           45
Glu Gln Cys Arg Thr Asp Thr Gly Val Asp Thr Arg Ile Trp Tyr His
          50           55           60
Asn Leu Pro Glu Ile Pro Glu
65           70

```



泳道	1	2	3	4	5	6	7
相对活性	100	3.0	77	45	21	9.0	6.0
V 表达载体 (ng)	-	-	25	50	100	200	400
L 表达载体	+	-	+	+	+	+	+

图 1



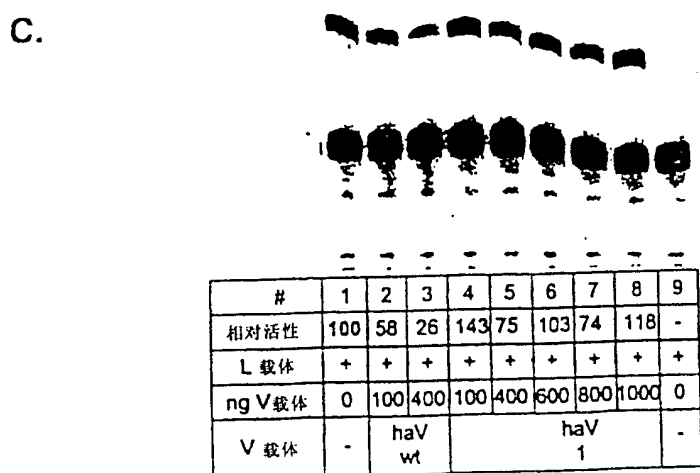
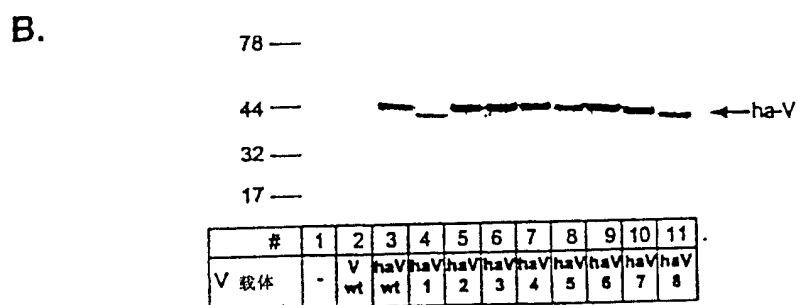
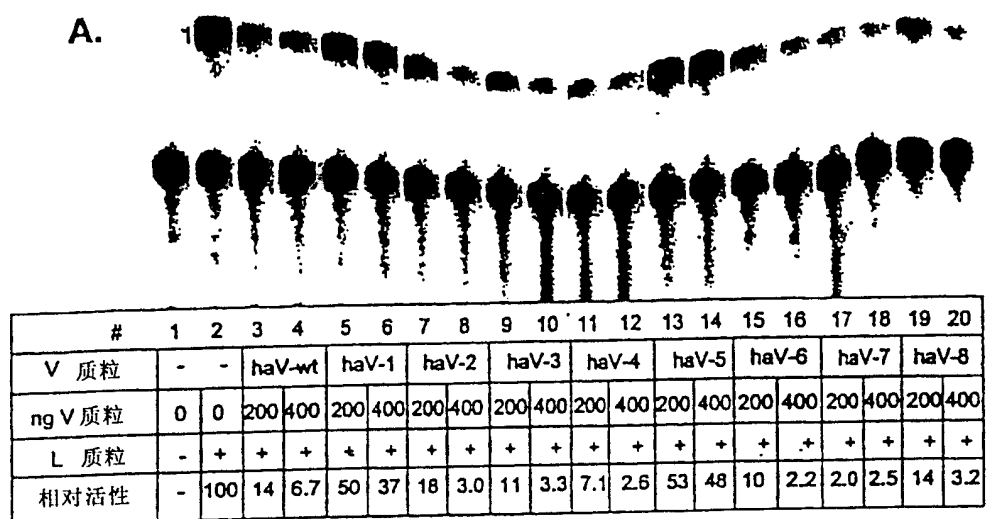


图 4

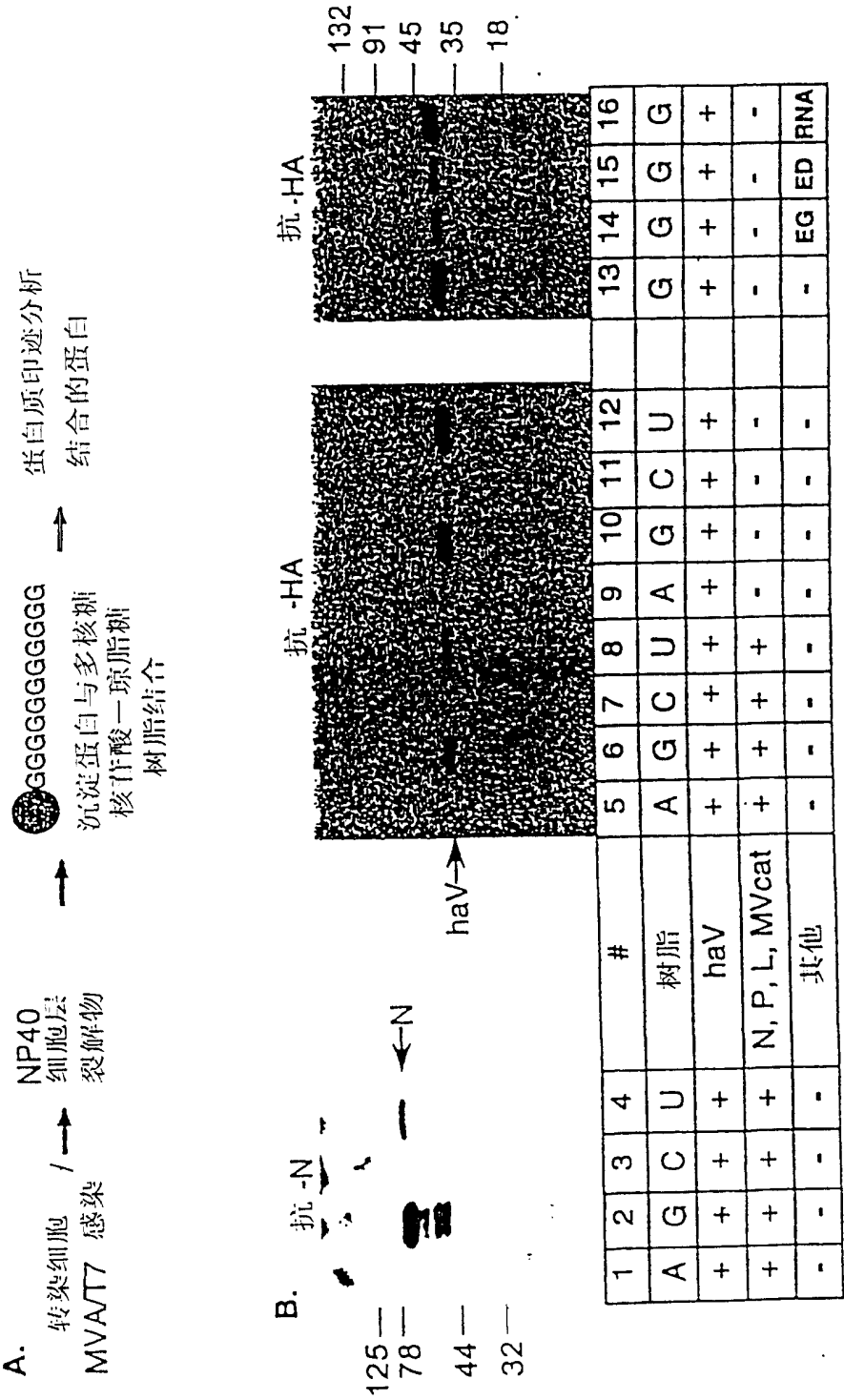


图 5

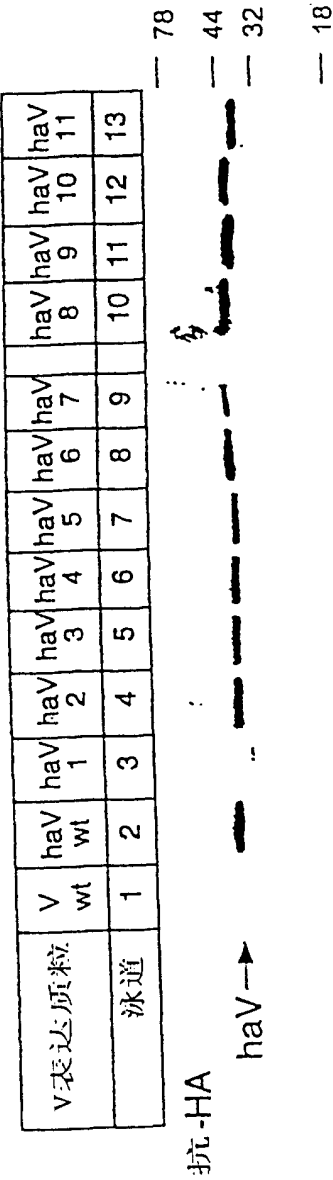


图 6

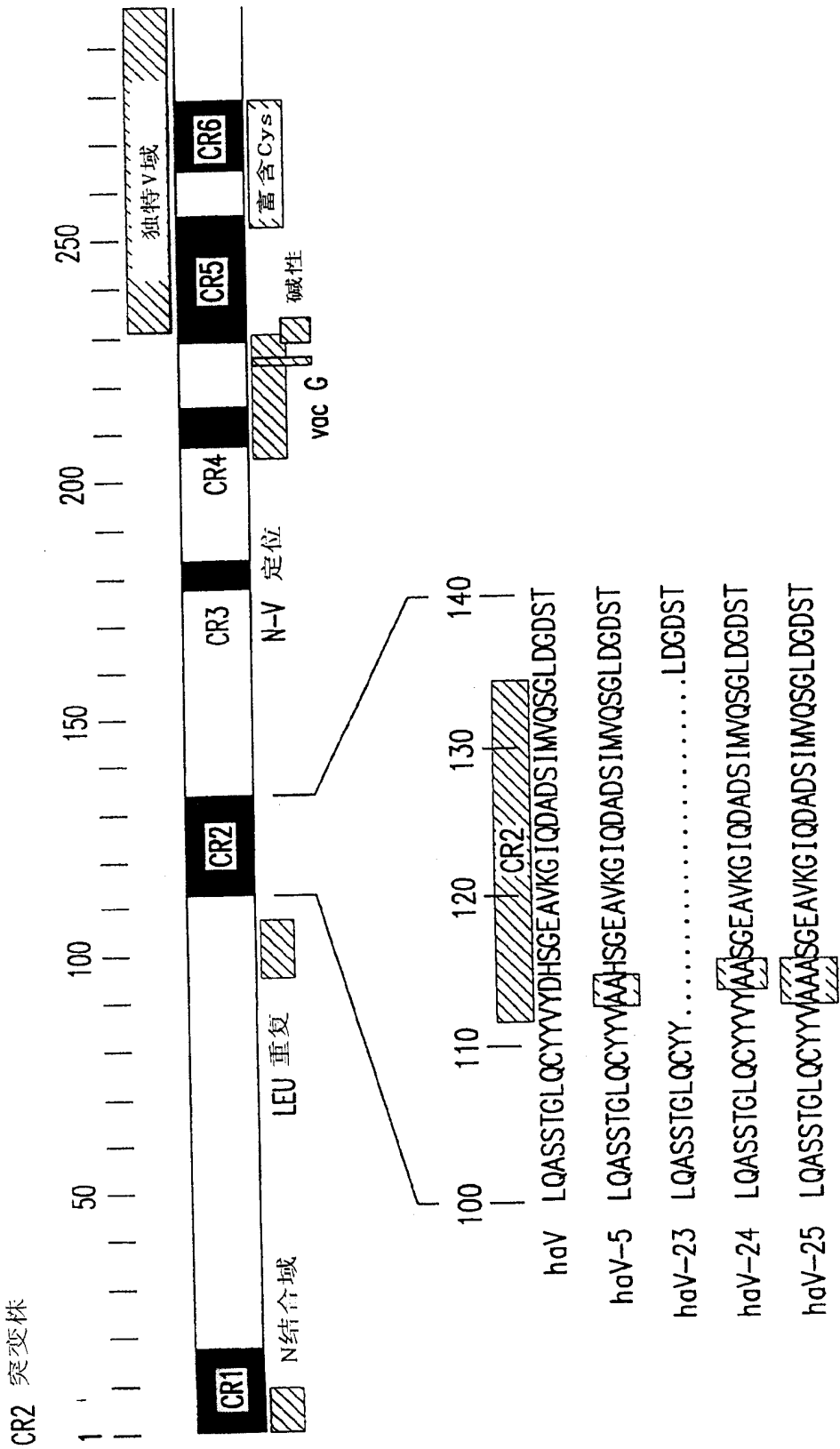


图 7

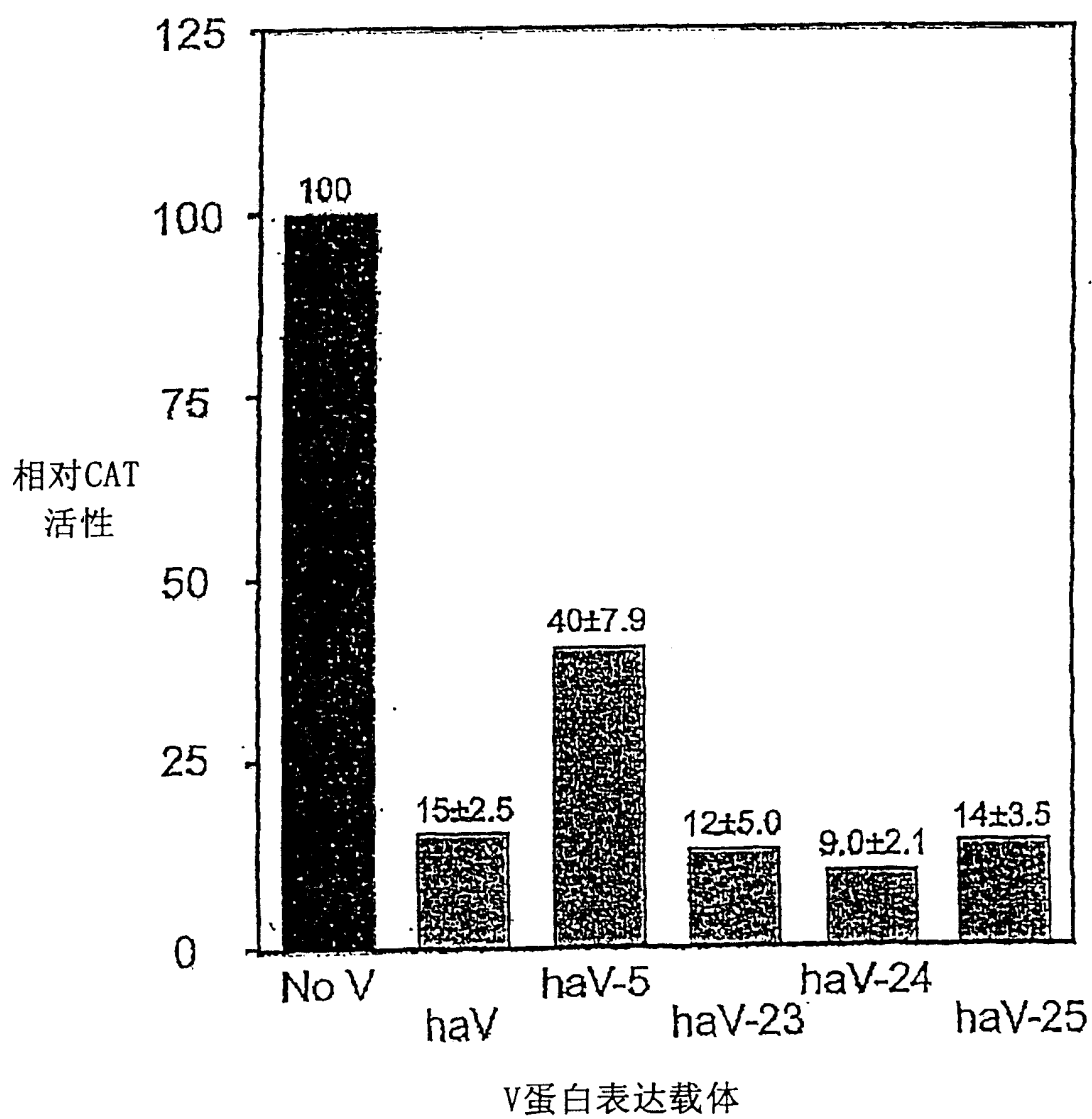
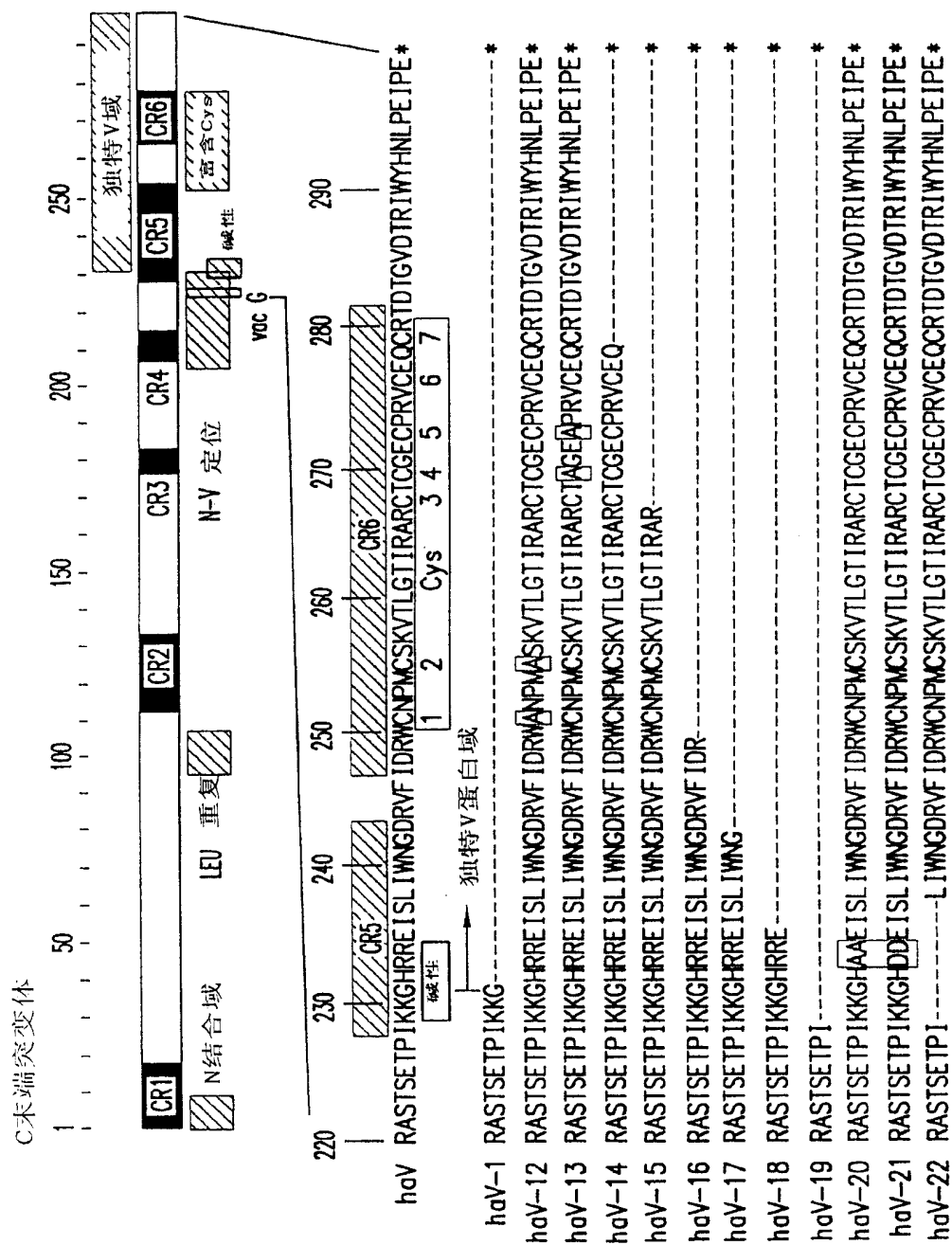


图 8



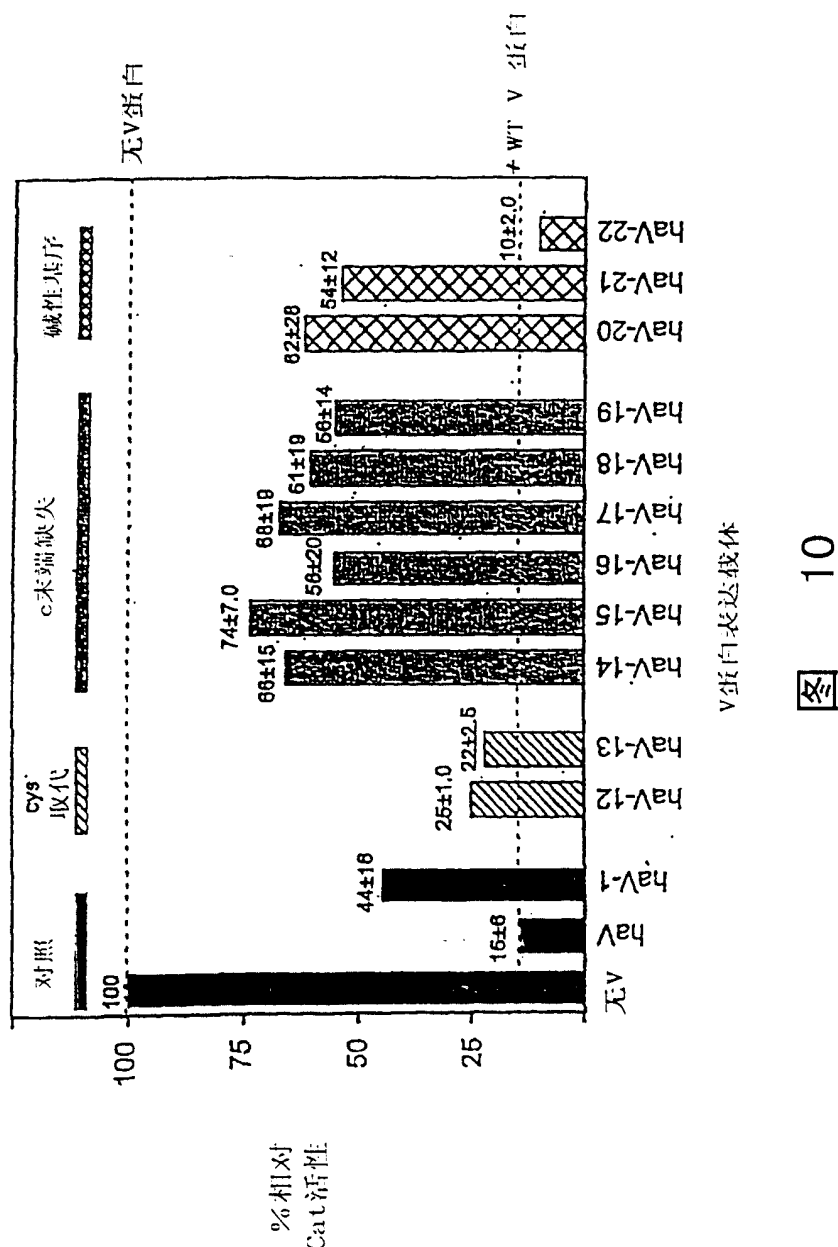


图 10