



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1554764 B

(45) 授权公告日 2012.03.21

(21) 申请号 200410036714.4

A61K 39/285 (2006.01)

(22) 申请日 1996.07.03

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

0782/95 1995.07.04 DK

CN 1042564 A, 1990.05.30, 见全文.

G. Sutter et

al., . Vaccine 12, 1994, 1032-1040.

(62) 分案原申请数据

96195254.7 1996.07.03

审查员 罗霄

(73) 专利权人 赫姆霍尔兹传染病研究中心有限
责任公司

地址 德国诺伊赫伯格

(72) 发明人 格尔德·萨特 马里恩·奥尔曼
沃尔克·厄夫勒

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限
公司 72003

代理人 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C12N 15/48 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

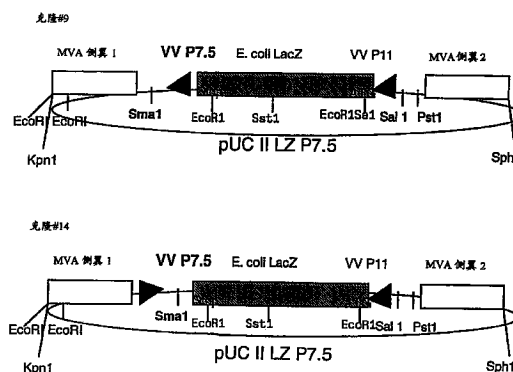
权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 9 页

(54) 发明名称

重组改良安卡拉痘苗病毒及其应用

(57) 摘要

包含并能表达插入改良安卡拉痘苗病毒 (MVA) 基因组天然缺失位点的外源基因的重组 MVA 病毒, 以及应用这类重组 MVA 病毒生产多肽, 例如抗原或治疗剂, 和重组病毒以用作疫苗或产生病毒载体用于基因治疗。



1. 重组 MVA 病毒,它含有并能表达 HIV nef 抗原。
2. 权利要求 1 的重组 MVA 病毒,其中的 HIV nef 基因受痘苗病毒早期 / 晚期启动子 P7.5 的控制。
3. 权利要求 1 或 2 的重组 MVA 病毒,基本上不含有能在人的细胞中进行复制的病毒。
4. 一种真核细胞,被权利要求 1-3 之一的重组 MVA 病毒感染。
5. 一种疫苗,在生理可接受的载体中含有权利要求 1-3 之一的重组 MVA 病毒。
6. 权利要求 1-3 之一的重组 MVA 病毒在疫苗制备中的用途。
7. 权利要求 1-3 之一的重组 MVA 病毒和 / 或权利要求 5 的疫苗用于制备免疫活动物体的药物或疫苗的用途。
8. 权利要求 7 的用途,其中所述动物是指人。
9. 权利要求 1-3 之一所述重组 MVA 病毒和 / 或权利要求 5 所述疫苗用于制备预防或治疗 HIV 感染或 AIDS 的药物或疫苗的用途。
10. 权利要求 1-3 之一的重组 MVA 病毒在制备重组 HIV nef 蛋白中的用途。
11. 权利要求 1-3 之一的重组 MVA 病毒在制备免疫治疗的药物中的用途。

重组改良安卡拉痘苗病毒及其应用

[0001] 本申请是一个分案申请,其母案是向中国专利局提交的中国专利申请 96195254.7。

技术领域

[0002] 本发明涉及从改良安卡拉痘苗病毒 (MVA) 衍生的重组痘苗病毒及其包含且能够表达插入到 MVA 染色体上天然缺失位点上的外源基因;涉及使用这类重组 MVA 病毒产生多肽,例如抗原或治疗剂,或产生用于基因治疗的病毒载体,以及使用这类编码抗原的重组 MVA 病毒作为疫苗。

[0003] 本发明的目的之一是提供一种重组 MVA 病毒,它可作为有效且特别安全的表达载体。

[0004] 本发明的另一种目的是提供一种简单、有效、安全的方法产生多肽,例如抗原或治疗剂,产生重组病毒用作疫苗以及产生病毒载体用于基因治疗。

[0005] 本发明的再一种目的是提供一种基于表达 T7RNA 聚合酶的重组 MVA 病毒的表达系统,以及基于此表达系统产生多肽,例如抗原或治疗药剂,或产生病毒载体用于基因治疗或用作疫苗。

背景技术

[0006] 痘苗病毒是痘病毒科正痘病毒属的一员,曾用作活疫苗免疫人天花病。世界范围用痘苗病毒成功的接种最终导致天花病因 - 天花病毒的绝迹 [天花的全球绝迹。全球天花绝迹鉴定委员会的最后报告。公共卫生历史,第 4 号 (History of Public Health, No. 4), 日内瓦:世界卫生组织,1980]。因而世界卫生组织 (WHO) 宣告,除了有高度危险痘病毒感染的人群 (例如实验室人员) 外,已全世界性地停止接种。

[0007] 最近,痘苗病毒也已用于设计病毒载体,以进行重组基因表达和可能用作重组活疫苗 [Mackett, M., Smith, G. L. 和 Moss, B. [1982 美国国家科学院院报 (P. N. A. S. USA) 79, 7415-7419; Smith, G. L., Mackett, M. 和 Moss, B. [1984] 生物技术和遗传工程评论 2 (Biotechnology and Genetic Engineering Reviews) 2, 383-407]。这必然伴有在 DNA 重组技术帮助下把编码外源抗原的 DNA 序列 (基因) 引入痘苗病毒基因组。如果基因整合到病毒 DNA 中对病毒生活周期非必需的位点,可能新产生的重组痘苗病毒是感染性的,即能够感染外源细胞并从而表达整合的 DNA 序列 [欧洲专利申请 83, 286 号和 110, 385 号 (EP Patent Applications No. 83, 286 and No. 110, 385)]。用这种方法制备的重组痘苗病毒一方面可用作活疫苗预防传染性疾,另一方面可用于在真核细胞中制备异源蛋白质。

[0008] 表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶基因的重组痘苗病毒可以建立广泛应用的表达系统以用于在哺乳动物细胞中合成重组蛋白 (Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A., 和 Fuerst T. R. [1990] 自然 (Nature) 348, 91-92.)。在所有方案中,重组基因表达依赖于真核细胞细胞质中 T7RNA 聚合酶的合成。最普遍的一种方案是用于瞬时表达 (Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. 和 Moss, B. [1986] 美国国家

科学院院报 (Proc. Natl. Acad.) Sci. USA 83,8122-8126 和美国专利申请 (US patent application) 7.648.971)。首先,一种感兴趣的外源基因插入质粒并在 T7 RNA 聚合酶启动子控制之下。随后,质粒引入到细胞的原生质体中,该细胞通过标准转染方法由产生 T7RNA 聚合酶的重组痘苗病毒预先感染。

[0009] 此转染方案非常简单因为不需构建新的重组病毒并且特别有效,有超过 80% 的细胞表达感兴趣的基因 [Elroy-Stein, O. 和 Moss, B. [1990] 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87,6743-6747]。痘苗病毒 /T7RNA 聚合酶杂合系统比其它瞬时表达系统的优势很可能在于它不依赖于质粒到细胞核的转运。在过去,该系统在病毒学和细胞生物学中对检测目的是极其有用的 (Bunocore, L. 和 Rose, J. K. [1990] 自然 (Nature) 345, 625-628, Pattnaik, A. K. 和 Wertz, G. W. [1991] 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 88,1379-1383, Karschin, A., Aiyar, J., Gouin, A., Davidson, N. 和 Lester, H. A. [1991] 欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Lett.) 278,229-233, Ho, B. Y., Karschin, A., Raymond, J., Branche, T., Lester, H. A. 和 Davidson, N. [1992] 欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Lett.) 301,303-306, Buchholz, C. J., Retzler, C., Homann, H. E., 和 Neubert, W. J. [1994] 病毒学 (Virology) 204,770-776)。然而,痘苗病毒 /T7 RNA 聚合酶杂合系统的重要前景应用,例如产生重组蛋白或重组病毒颗粒用于人体的新的治疗或预防方法,可能由于重组痘苗载体的大量复制而受到阻碍。

[0010] 痘苗病毒对人是感染性的并且在根除天花运动中的接种时偶而会观察到严重的并发症。关于并发症发病率的最好综述由一项美国国家调查提供,该调查检测了大约一千二百万接种疫苗的人,接种疫苗基于纽约城市卫生委员会痘苗病毒菌株 (Lane, J., Ruben, F., Neff, J. 和 Millar, J. [1969] 新英格兰医学杂志 (New Engl. J. Med.) 281, 1201-1208)。因而安全性考虑和规范影响了使用痘苗病毒作为载体发展重组活疫苗的最令人鼓舞的可能性。此外,文献中描述的大多数重组痘苗病毒基于西方保藏的痘苗病毒菌株 (Western Reserve strain of vaccinia virus)。另一方面,众所周知此菌株有较高的神经毒性因而不适用于人类和动物 (Morita 等, 疫苗 (Vaccine) 5,65-70 [1987])。对于载体应用,通过使用高度减毒的痘苗病毒菌株可以减小健康危险。特别发展了许多这类痘苗病毒以避免天花接种中的不希望副作用。因而,通过痘苗病毒安卡拉菌株 (CVA) 在鸡胚成纤维细胞中长期的连续传代产生了改良安卡拉痘苗病毒 (MVA) (综述参看 Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. 和 Stickl, H. [1975] 感染 (Infection) 3,6-14; 瑞士专利号 (Swiss Patent No.) 568,392)。MVA 病毒按照布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 于 1987 年 11 月 15 日保藏于 CNCM (巴斯德研究所,微生物菌种国家收藏馆 (Institut Pasteur, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15), 保藏号 1-721。MVA 的特点是强减毒性,也就是说通过减少的毒性或感染性同时保持良好的免疫原性。检测了 MVA 病毒以确定它相对于野生型 CVA 菌株基因组的变化。检测到六个主要的共 31,000 碱基对的基因组 DNA 缺失 (缺失 I, II, III, IV, V 和 VI) (Meyer, H., Sutter, G. 和 Mayr, A. [1991] 普通病毒学杂志 (J. Gen. Virol.) 72,1031-1038)。产生的 MVA 病毒其宿主细胞严格限于禽源细胞。另外,MVA 具有高度减毒的特征。在多种动物模型中的检验证明 MVA 甚至在免疫抑制的动物中都是无毒性的。更重要的是,MVA 菌株的优秀特性已在广泛的临床试验中得到证实 (Mayr 等, Zbl. Bakt. Hyg. 1, Abt. Orig. B 167,

375-390[1987], Stickl 等, Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392[1974])。在这些超过 120,000 人的研究中,包括高危病人,没发现有与 MVA 疫苗相关的副作用。

[0011] 已发现 MVA 在人细胞中的复制在感染后期受到阻碍,防止了成熟感染性病毒粒子的组装。尽管如此, MVA 甚至在非允许细胞中也能高水平表达病毒的和重组的基因,并建议作为有效的和特别安全的基因表达载体 (Sutter, G. 和 Moss, B. [1992] 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89, 10847-10851)。最近,在 MVA 基础上构建了新的痘病毒载体系统,外源 DNA 序列插入 MVA 基因组的缺失 III 或 TK 基因 (Sutter, G. 和 Moss, B. [1995] 发育生物学标准 (Dev. Biol. Stand.) Basel, Karger 84, 195-200 和美国专利 (USpatent) 5, 185, 146)。

[0012] 为了进一步开发 MVA 的应用,发现了一种通过 DNA 重组把外源基因引入痘苗病毒 MVA 菌株的新的可能方法。由于发明不是要改变 MVA 病毒的基因组,因此必需使用符合此需要的方法。依据本发明,一种外源 DNA 序列准确地在 MVA 基因组自然发生发生缺失位点重组到病毒 DNA。

发明内容

[0013] 本发明从而特别地包括单独的下述内容或它们的组合:

[0014] 一种重组 MVA 病毒,包含并能够表达至少一种插入 MVA 基因组天然缺失位点的外源基因;

[0015] 上述重组 MVA 病毒,包含并能够表达至少一种插入 MVA 基因组缺失 II 位点的外源基因;

[0016] 上述重组 MVA 病毒,其中的外源基因编码一种标记,一种治疗基因或一种抗原决定簇;

[0017] 上述重组 MVA 病毒,其中的外源基因编码一种来自于病原性病毒、细菌、或其它微生物,或来自于寄生虫,或肿瘤细胞的抗原决定簇;

[0018] 上述重组 MVA 病毒,其中的外源基因编码一种来自于恶性疟虫 (*Plasmodium falciparum*),分枝杆菌 (*Mycobacteria*),疱疹病毒,流感病毒 (*influenza virus*),肝炎或人免疫缺陷病毒的抗原决定簇;

[0019] 上述重组 MVA 病毒,其中的抗原决定簇是人免疫缺陷病毒 (HIV) 的 *nef* 或人酪氨酸酶;

[0020] 上述重组 MVA 病毒,其为 MVA-LAI *nef* 或 MVA-hTYR;

[0021] 上述重组 MVA 病毒,其中的外源基因编码 T7 RNA 聚合酶;

[0022] 上述重组 MVA 病毒,其为 MVA-T7 *pol*;

[0023] 上述重组 MVA 病毒,其中的外源基因处于痘苗病毒早期/晚期启动子 P7.5 的转录控制之下;

[0024] 上述重组 MVA 病毒,基本上不含能够在人细胞中复制的病毒;

[0025] 上述重组 MVA 病毒的应用,用于在 T7 RNA 聚合酶启动子转录控制之下转录 DNA 序列;

[0026] 由上述任一重组 MVA 病毒感染的真核细胞;

[0027] 由上述重组 MVA 病毒感染的细胞,其中的外源基因编码 T7RNA 聚合酶;

[0028] 由上述重组 MVA 病毒感染的细胞,其中的外源基因编码 T7 RNA 聚合酶,此外还包含载有一种或几种处于 T7 RNA 聚合酶启动子转录控制之下的外源基因的一种或几种表达载体;

[0029] 上述细胞的应用,用于产生由上述外源基因编码的多肽,包括:

[0030] a) 在适宜条件下培养上述的细胞,以及

[0031] b) 分离由上述的外源基因编码的多肽。

[0032] 由上述重组 MVA 病毒感染的细胞,其中的外源基因编码 T7RNA 聚合酶,此外还包含表达载体,该表达载体载有处于 T7 RNA 聚合酶启动子控制之下的病毒基因和/或编码一病毒载体基因组的一种病毒载体构建体;

[0033] 上述细胞的应用,用于产生病毒颗粒,包括:

[0034] a) 在适宜条件下培养上述的细胞,以及

[0035] b) 分离病毒颗粒;

[0036] 由上述 MVA 病毒感染的细胞,其中的外源基因编码 T7 RNA 聚合酶,此外还含有:

[0037] a) 载有一种逆转录病毒载体构建体的表达载体,它能够感染和指导由上述逆转录病毒载体构建体携带的一种或几种外源基因在靶细胞中的表达,以及

[0038] b) 一种或几种表达载体,其载有的基因处于 T7 RNA 聚合酶启动子转录控制之下并编码上述逆转录病毒载体构建体的基因组包装所必需的多肽;

[0039] 上述细胞的应用,用于产生逆转录病毒粒子,包括:

[0040] a) 在适宜条件下培养上述细胞,以及

[0041] b) 分离逆转录病毒颗粒;

[0042] 含有上述重组 MVA 病毒的疫苗,其中的外源基因在生理可接受载体中编码一抗原决定簇;

[0043] 上述重组 MVA 病毒的应用,其中的外源基因编码一种疫苗制剂中的抗原决定簇;

[0044] 上述疫苗的应用,用于免疫活的动物体,包括人;

[0045] 上述含有 MVA-LAI_{nef} 的疫苗的应用,用于预防或治疗人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染或爱滋病 (AIDS);

[0046] 上述含有 MVA-hTYR 的疫苗的应用,用于预防或治疗黑素瘤;

[0047] 一种疫苗,其第一种组分包括一种上述重组 MVA 病毒,其中包括的外源基因在生理可接受载体中编码 T7 RNA 聚合酶;第二种组分包括一种载有在生理可接受载体中处于 T7 RNA 聚合酶启动子转录控制之下的抗原决定簇的 DNA 序列,两种组分可同时包含或分别包含;

[0048] 上述疫苗的应用,用于免疫活的动物体,包括人,包含用疫苗的第一种和第二种组分对上述活的动物体,包括人,进行同时接种或在同一接种部位延时接种;以及

[0049] 术语“基因”表示编码一种蛋白或肽的任何 DNA 序列。

[0050] 术语“外源基因”表示插入一 DNA 序列的基因,该序列中通常未发现该基因。

[0051] 外源基因可以是例如标记基因、治疗基因、编码抗原决定簇的基因或病毒基因。这类基因在本技术领域众所周知。

[0052] 本发明更具体地涉及:

[0053] 1. 重组 MVA 病毒,它含有并能表达 HIV *nef* 抗原或抗原决定簇。

[0054] 2. 项 1 的重组 MVA 病毒, 其中的 HIV nef 基因受痘苗病毒早期 / 晚期启动子 P7.5 的控制。

[0055] 3. 项 1 或 2 的重组 MVA 病毒, 基本上不含有能在人的细胞中进行复制的病毒。

[0056] 4. 一种真核细胞, 被项 1-3 之一的重组 MVA 病毒感染。

[0057] 5. 一种疫苗, 在生理可接受的载体中含有项 1-3 之一所述重组 MVA 病毒。

[0058] 6. 项 1-3 之一的重组 MVA 病毒在疫苗制备中的用途。

[0059] 7. 用于免疫活动物体 (包括人) 的项 1-3 之一所述重组 MVA 病毒和 / 或项 5 所述疫苗。

[0060] 8. 用于预防或治疗 HIV 感染或 AIDS 的项 7 所述重组 MVA 病毒和 / 或疫苗。

[0061] 9. 项 1-3 之一的重组 MVA 病毒在制备重组 HIV nef 蛋白中的用途。

[0062] 本发明还涉及:

[0063] 1. 重组 MVA 病毒, 含有并能表达人酪氨酸酶 (hTyr) 抗原或抗原决定簇。

[0064] 2. 项 1 的重组 MVA 病毒, 其中的 hTyr 基因受痘苗病毒早期 / 晚期启动子 P7.5 的控制。

[0065] 3. 项 1 或 2 的重组 MVA 病毒, 基本上不含有能在人的细胞中进行复制的病毒。

[0066] 4. 一种真核细胞, 被项 1-3 之一的重组 MVA 病毒感染。

[0067] 5. 项 1-3 之一的重组 MVA 病毒在制备重组 hTyr 蛋白中的用途。

[0068] 6. 一种疫苗, 在生理可接受的载体中含有项 1-3 之一的重组 MVA 病毒和 / 或项 5 的重组 hTyr 蛋白。

[0069] 7. 项 1-3 之一的重组 MVA 病毒和 / 或项 5 的重组 hTyr 蛋白在疫苗制备中的用途。

[0070] 8. 用于免疫活动物体 (包括人) 的项 1-3 之一所述重组 MVA 病毒和 / 或项 5 所述重组 hTyr 蛋白和 / 或项 6 所述疫苗。

[0071] 9. 用于预防或治疗黑色素瘤的项 8 所述重组 MVA 病毒, 重组 hTyr 蛋白和 / 或疫苗。

[0072] 10. 项 1-3 之一的重组 MVA 病毒在回体 (ex vivo) 基因治疗中的用途。

[0073] 本发明的改良安卡拉痘苗病毒 (MVA) 是一种宿主范围局限的和高度减毒的痘苗病毒菌株, 它在测试的人和大多数其它哺乳动物细胞系中不能增殖。但由于在非允许细胞中病毒基因表达未受损伤, 依据本发明的重组 MVA 病毒可能用作特别安全和有效的表达载体。

[0074] 编码抗原决定簇的重组 MVA 病毒

[0075] 在一种实施方案中, 本发明涉及重组痘苗病毒, 其含有编码外源抗原, 优选地属于致病病原体的基因, 以及以生理可接受形式包含此类病毒的疫苗。本发明也涉及制备此类重组 MVA 痘苗病毒或疫苗的方法; 涉及应用这些疫苗预防那些致病病原体引起的感染。

[0076] 在本发明的一种优选实施方案中, 插入 MVA 病毒的外源基因是一种编码 HIVnef 的基因。

[0077] 我们已构建了重组 MVA 病毒, 允许 HIV-Inef 基因在痘苗病毒早 / 晚期启动子 P7.5 的控制下进行表达。灵长类慢病毒的调节性 Nef 蛋白合成于病毒复制周期的早期并已表明对高滴度病毒复制和体内疾病诱导起重要作用。这提示 HIV Nef 可能在爱滋病病理中有关键作用。Nef 促进病毒感染性增加和 HIV 致病性的分子机制需要进一步阐明。但是,

Nef 是免疫原性的并且 Nef 特异抗原可用作疫苗防治 HIV 感染和爱滋病。

[0078] 在本文中,表达 HIVnef 基因的重组 MVA 病毒可用于人体免疫,一方面作为预防疫苗防止人 HIV 病毒,另一方面用于 HIV 感染或爱滋病人的免疫治疗。另外,表达 HIVnef 基因的 MVA 病毒也可用于重组 HIV Nef 蛋白的产生。

[0079] 本发明的另一种优选实施方案中,插入 MVA 病毒的外源基因是一编码人酪氨酸酶的基因。

[0080] 我们已构建了重组 MVA 病毒,允许人酪氨酸酶基因在痘苗病毒早 / 晚期启动子 P7.5 的控制下进行表达。近来,人酪氨酸酶被鉴定为黑素瘤特异性肿瘤抗原,它可造成抗肿瘤的溶细胞 T- 淋巴细胞的产生 (Brichard, V. 等 [1993] 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 178, 489-495)。由于正常细胞中看来只有黑素细胞表达酪氨酸酶基因,因而酪氨酸酶成为黑素瘤免疫治疗的有效目标抗原。所以,表达人酪氨酸酶基因的重组 MVA 病毒可用于黑素瘤病人以诱导激发肿瘤排斥或防止转移的免疫反应。表达人酪氨酸酶基因的重组 MVA 病毒可直接用作抗黑素瘤疫苗,或用病毒制备抗黑素瘤疫苗。在一种例子中,表达人酪氨酸酶基因的重组 MVA 病毒可用于产生重组酪氨酸酶蛋白,它作为抗原用于疫苗制剂。在另一种例子中,用表达人酪氨酸酶基因的重组 MVA 病毒作为表达载体,来自肿瘤病人的细胞体外修饰以表达酪氨酸酶并继而转移回病人来诱导抗肿瘤免疫反应。基于表达人酪氨酸酶基因的重组 MVA 病毒的制备疫苗可用于肠胃外或肿瘤部位。可以防止肿瘤转移或肿瘤的诸如大小、形状、稠度、血管形成或其它表型变化。以表达人酪氨酸酶基因的重组 MVA 为基础制备的疫苗可用于手术切除肿瘤前、期间或切除后。

[0081] 为了制备疫苗,依据本发明的 MVA 痘苗病毒要转换成生理可接受形式。这可基于制备 MVA 疫苗以免疫天花的经验进行 (如 Stickl, H. 等 [1974] Dtsch. Med. Wschr. 99, 2386-2392 所述)。典型地,大约 10^6 - 10^8 重组 MVA 颗粒在含 2% 胍和 1% 人白蛋白的 100 毫升磷酸盐缓冲液 (PBS) 中冻干并置于一种安瓿管中,优选地是一玻璃安瓿管。冻干品可含有补充剂 (例如甘露糖醇、葡聚糖、蔗糖、甘氨酸、乳糖或聚乙烯吡咯烷酮) 或其它助剂 (例如抗氧化剂,稳定剂等,以适用于肠胃外给药。玻璃安瓿管继而密封并可优选地在 -20°C 以下贮存几个月。

[0082] 用于接种或治疗的冻干品可溶于 0.1 到 0.5 毫升水溶液,优选地是生理盐水中,并经肠胃外给药例如肌肉内接种或局部给药例如接种到肿瘤或在肿瘤部位局部给药。根据本发明的疫苗或治疗优选地采用肌肉内注射 (Mayr, A. 等 [1978] Zbl, Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167, 375-390)。给药方式,剂量和给药次数可由本领域熟练技术人员对所知方式进行优化。合适的话,在长时间内接种多次以获得对外源抗原合适的免疫反应是适宜的。

[0083] 重组 MVA 病毒用于产生异源多肽的用途

[0084] 依据本发明的重组 MVA 痘苗病毒也可用于在真核细胞中制备异源多肽。这导致产生被重组痘苗病毒感染的细胞。编码异源多肽的基因在细胞中表达,并分离所表达的异源多肽。产生此类异源多肽的方法通常为本领域熟练技术人员熟知 (EP-A-206 和 EP-A-205, 939)。由于 MVA 病毒的特殊属性,在重组 MVA 病毒帮助下产生的多肽非常适于用作人和动物药物。

[0085] 编码 T7RNA 聚合酶的重组 MVA 病毒及其用于在 T7RNA 聚合酶启动子转录控制下表达 DNA 序列的用途

[0086] 在本发明的进一种实施方案中,我们构建了重组 MVA 病毒,允许在痘苗病毒早期/晚期启动子 P7.5 的控制下表达噬菌体 T7RNA 聚合酶。MVA-T7 pol 重组病毒作为表达系统的用途已经过诱导处于 T7 RNA 聚合酶启动子控制之下的重组基因表达的瞬间转染分析得到证实。使用大肠杆菌 (*E. coli*) 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因作为报告基因,我们发现 MVA-T7 聚合酶诱导的 CAT 基因表达就象衍生于痘苗病毒复制型 WR 菌株的痘苗病毒/T7pol 重组体一样有效。

[0087] 依据本发明的 MVA/T7 聚合酶杂合系统从而可用作简单、有效和安全的哺乳动物表达系统,以在缺乏大量痘苗病毒复制的情况下产生多肽。

[0088] 此表达系统也可用于在 T7 RNA 聚合酶启动子转录控制下产生重组病毒粒子以用于免疫接种或基因治疗,上述病毒粒子通过被表达 T7 RNA 聚合酶的重组 MVA 或包含所有或部分基因的 DNA 构建体以及为产生诸如 MVA 粒子或逆转录病毒粒子等的病毒粒子所必需的基因组或重组基因组感染的细胞系的转化来产生。

[0089] 逆转录病毒载体系统由两种组分组成:

[0090] 1) 逆转录病毒载体本身是一种修饰的逆转录病毒(载体质粒),其中编码病毒蛋白的基因被将要传递给靶细胞的治疗基因和标记基因代替。由于编码病毒蛋白的基因替代损坏了病毒,必须在系统中存在第二种组分提供给修饰逆转录病毒丢失的病毒蛋白以拯救该病毒。

[0091] 第二种组分是:

[0092] 2) 产生大量病毒蛋白但又缺乏产生可复制型病毒能力的细胞系。此细胞系称为包装细胞系并含有被一种或多个携带能够包装修饰的逆转录病毒载体的基因(编码 gag, pol 和 env 多肽的基因)的质粒所转染的一细胞系。

[0093] 为了产生包装的载体,载体质粒转染入包装细胞系。在这种情况下,含有插入的治疗和标记基因的改良逆转录病毒基因组从载体质粒转录并包装入改良逆转录病毒粒子(重组病毒粒子)。然后用此重组病毒感染靶细胞,其载体基因组和任何携带的标记或治疗基因整合到靶细胞 DNA。受此重组病毒粒子感染的细胞不能产生新的载体病毒,因为这些细胞中没有病毒蛋白质。但携带治疗 and 标记基因的载体 DNA 整合到了细胞 DNA 并能在感染细胞中表达。

[0094] 依据本发明表达 T7 RNA 聚合酶的重组 MVA 病毒可用于产生包装逆转录病毒载体所需的蛋白。为此目标,把一种逆转录病毒(例如鼠白血病病毒(MLV))的 gag, pol 和 env 基因置于一种或多个表达载体(例如质粒)中 T7RNA 聚合酶启动子转录控制之下。表达载体随后引入用重组 MVA 病毒感染的表达 T7 RNA 聚合酶的细胞中,同时转入载有逆转录病毒载体构建体的一种表达载体,通常处于 T7 RNA 聚合酶启动子的转录控制之下。

[0095] WO 94/29437, WO 89/11539 和 WO 96/07748 描述了不同类型的逆转录病毒载体构建体,它们可用上述包装系统进行包装。

[0096] 表达 T7 RNA 聚合酶的重组 MVA 病毒的再一种应用是产生重组蛋白,非感染性病毒粒子,或感染性突变病毒粒子,以用于生产疫苗或治疗剂(Buchholz 等,病毒学(Virology), 204, 770-776(1994) 和 EP-B1-356695)。为此目的,把病毒基因(例如 HIV-1 的 gag-pol 和 env 基因)置于一种表达载体(例如质粒或其它重组 MVA 病毒)中 T7 启动子的转录控制之下。此构建体随后引入用重组 MVA 病毒感染的表达 T7RNA 聚合酶的细胞

中。重组病毒基因高效转录,重组蛋白大量制造并可纯化。此外,表达的重组病毒蛋白(例如 HIV-1 的 env, gag)可能组装成假病毒粒子从细胞出芽并可从组织培养物中分离。在另一种实施方案中,由 MVA-T7pol 系统表达的病毒蛋白(来源于例如人免疫缺陷病毒(HIV),猴免疫缺陷病毒(SIV),麻疹病毒(Measles virus))通过克服病毒增殖中吸附和感染,脱壳,核酸复制,病毒基因表达,装配,出芽或其它步骤中的缺陷来拯救引入的突变病毒,从而可产生并纯化所述的突变病毒。

[0097] MVA-T7pol 也可与携带感兴趣抗原基因(例如, HIV 的 nef, tat, gag, pol 或 env 或其它基因)的 DNA 序列同时使用进行免疫。首先,给定抗原(例如人免疫缺陷病毒(HIV),丙型肝炎病毒(HCV),人乳头瘤病毒(HPV),单纯疱疹病毒(HSV),麻疹病毒,流感病毒或其它)的编码序列克隆到处于 T7 RNA 聚合酶启动子控制之下优选地是质粒的载体中并使用常规实验室方法扩增和纯化产生的 DNA 构建体。其次,载体 DNA 同时或在适当时间延迟后与 MVA-T7pol 一起免疫接种。在接种部位,感兴趣的重组基因在含有载体 DNA 和 MVA-T7pol 的细胞中瞬时表达并且相应抗原存在于宿主免疫系统刺激了抗原特异性免疫反应。这种使用非复制痘苗载体 MVA-T7pol 的方案代表了一种提供给定抗原有效瞬时表达而又避免了组成型基因表达潜在危险的核酸免疫接种的有前途的新方法。

[0098] 重组 MVA 痘苗病毒可按下文陈述进行制备。

[0099] 一种包含侧翼为 MVA 基因组中邻近自然发生缺失例如缺失 II 的 MVADNA 序列的编码一种外源多肽 DNA 序列的 DNA 构建体,引入到用 MVA 感染的细胞中,以发生同源重组。一旦把 DNA 构建体引入真核细胞并且外源 DNA 与病毒 DNA 重组,就可能通过对所需重组痘苗病毒用已知的方式,优选地在标记帮助下,分离到所需重组痘苗病毒(对比 Nakano 等,美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 79, 1593-1596[1982], Franke 等,分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol.) 1918-1924[1985], Chakrabarti 等,分子细胞生物学(Mol. Cell. Biol.) 3403-3409[1985], Fathi 等,病毒学(Virology) 97-105[1986])。要插入的 DNA-构建体可以是线状的或环状的。环状 DNA 是优选的,特别是质粒。DNA-构建体包含位于 MVA 基因组自然发生缺失例如缺失 II 左方和右方侧翼的序列(Altenburger, W., Suter, C. P. 和 Altenburger J. (1989) 病毒学集刊(Arch. Virol.) 105, 15-27)。外源 DNA 序列插入位于自然发生缺失侧翼的序列之间。外源 DNA 序列可以是编码治疗多肽,例如组织血纤维溶酶原激活剂(t-PA)或干扰素,或来自致病病原体的抗原决定簇的基因。致病病原体可以是导致疾病的病毒、细菌和寄生虫,也可能是在有机体中无限制增殖从而可能导致病理生长的肿瘤细胞。这些致病病原体的例子由 Davis, B. D. 等做过描述(微生物学(Microbiology) 第三版, Harper International Edition)。优选的致病病原体抗原来自人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 和 HIV-2),导致肺结核的分枝杆菌,寄生虫恶性疟虫,以及黑素瘤细胞。

[0100] 为了表达一种 DNA 序列或基因, DNA 中必须存在基因转录必需的调节序列。这些调节序列(称为启动子)为本技术领域技术人员所熟知并包含例如 EP-A-198,328 中所述的痘苗病毒 11 kDa 基因和那些 7.5kDa 基因(EP-A-110,385)。DNA 构建体可通过转染,例如通过磷酸钙沉淀方法(Graham 等,病毒学(Virol.) 52, 456-467[1973]; Wigler 等,细胞(Cell) 777-785[1978])通过电穿孔方法(Neumann 等,欧洲分子生物学组织杂志(EMBO J. I.,) 841-845[1982]),通过微注射方法(Graessmann 等,酶学方法(Meth. Enzymology) 101, 482-492(1983)),通过脂质体方法(Straubinger 等,酶学方法(Methods

in Enzymology 101,512-527(1983),通过原生质球方法 (Schaffner,美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77,2163-2167(1980)) 或其它本技术领域熟知的方法引入到 MVA 感染的细胞。通过磷酸钙沉淀进行转染是优选的方法。

[0101] 下面的详细实施例是为了有助于对本发明的更好理解。但不是说本发明仅局限于实施例内容。

附图说明

[0102] 图 1 :图示 MVA 基因组图谱和用于通过同源重组插入外源 DNA 的质粒图谱 :MVA 基因组中的 Hind III 限制性位点标在上面。显示了重叠 MVA 基因组中缺失 II 接界的 900bp HindIII-HindIII N 片段。邻近缺失 II 的 MVADNA 序列通过 PCR (聚合酶链式反应) 扩增并用于构建插入质粒 pUCIILZ。

[0103] 图 2 :pUCIILZP7.5 :用于插入缺失 II 的 MVA 载体质粒,包含 P11-Lac Z 表达盒和痘苗病毒早期 / 晚期启动子 P7.5 以表达可克隆到质粒 SmaI 位点的感兴趣基因。

[0104] 图 3 :pUCIILZdel P7.5 :用于在 MVA 基因组缺失 II 位点插入外源基因的 MVA 载体质粒,含有自缺失 P11-Lac Z 表达盒和痘苗病毒早期 / 晚期启动子 P7.5 以表达可克隆到质粒 SmaI/NotI 克隆位点的感兴趣基因。

[0105] 图 4 :重组病毒 MVA-T7 pol 的构建 :图示 MVA 基因组 (HindIII 限制性内切核酸酶位点) 图谱以及使 T7 RNA 聚合酶基因插入 MVA 基因组 HingIIIN 片段中缺失 II 位点的载体质粒 pUCIILZT7pol 的图谱。

[0106] 图 5 :MVA-T7pol 病毒 DNA 的 Sourthern 印迹检测

[0107] 图 6 :用 [³⁵S] 甲硫氨酸对蛋白进行代谢标记。SDS 聚丙烯酰胺 (PAGE) 凝胶电泳检测。泳道 1 :MVA T7pol,泳道 2 :MVA,泳道 3 :CV-1 细胞。

[0108] 图 7 :氯霉素乙酰基转移酶 (CAT) 检测 :用含有处于 T7RNA 聚合酶启动子控制下的 CAT 基因的质粒转染的以及用 MVA-T/pol 或 WR-T7pol 感染的 CV-1 细胞。裂解物用于检测 CAT 活性。C 是指氯霉素,1-AcC 和 3-AcC 是指单和三乙酰化形式的氯霉素。Cat 活性用 60 分钟内形成的乙酰化产物百分数表示。

[0109] 图 8 :MVA-LAInef 的构建 :图示 MVA 基因组 (HindIII 限制性内切核酸酶位点) 图谱以及使 HIV-1LAI 的 nef 基因插入 MVA 基因组 HindIIIN 片段中缺失 II 位点上的载体质粒 pUCIILZdel P7.5-LAInef 的图谱。

[0110] 图 9 :MVA-hTYR 的构建 :图示 MVA 基因组 (HindIII 限制性内切核酸酶位点) 图谱以及使人酪氨酸酶基因插入 MVA 基因组 HindIIIN 片段中缺失 II 位点上的载体质粒 pUCIILZdel P7.5-TYR 的图谱。

[0111] 实施例

[0112] 1. 病毒的生长和纯化

[0113] 1. 1MVA 病毒的生长

[0114] MVA 病毒是一种高度减毒的痘苗病毒,它由安卡拉痘苗病毒 (CVA) 通过在原代鸡胚成纤维细胞 (CEF) 培养物中长期连续传代衍生而来。关于产物的历史、特性及 MVA 菌株的应用的概括性综述参考 Mayr 等在感染 (Infection) 3,6-14[1975] 中发表的总结。由于在 CEF 中的减毒, MVA 病毒在这种禽宿主细胞中复制到很高的滴度。然而在哺乳动物细胞

中 MVA 是严格生长局限的,并且检测不到病毒引起的典型噬斑形成。所以,MVA 病毒要生长于 CEF 细胞。为了制备 CEF 细胞,从孵化 11 天的鸡蛋中分离胚,去除末端,并把胚绞碎后在含有 0.25%胰蛋白酶的溶液中 37℃解离 20 分钟。过滤产生的细胞悬液并用 Sorvall RC-3B 离心机在室温下 2000rpm 离心 5 分钟沉淀细胞,重悬于 10 体积培养基 A(Eagle 基础培养基 (MEM Eagle),例如可获取于 Life Technologies GmbH, Eggenstein, Germany),并再用 Sorvall RC-3B 离心机在室温下 2000rpm 离心 5 分钟进行沉淀。细胞沉淀重悬于含 10%胎牛血清 (FCS),青霉素 (100 单位 / 毫升),链霉素 (100 毫克 / 毫升) 和 2mM 谷氨酰胺的培养基 A 中以获得含 500000 细胞 / 毫升的细胞悬液。用这种方法获得的 CEF 细胞铺于细胞培养皿中。把它们放到培养基 A 中,按照所需细胞浓度在二氧化碳培养箱中 37℃生长 1-2 天,并直接或再进行一次细胞传代后用于感染。制备原代培养物的详细描述可在 R. I. Freshney, “动物细胞培养”(“Culture of animal cell”), Alan R. Liss Verlag, New York [1983] 一书中第 11 章 99 页及其下列等等中找到。

[0115] MVA 病毒按下面方法用于感染。CEF 细胞培养在 175 厘米² 细胞培养瓶。在 90% -100%铺满时,去除培养基并且细胞在培养基 A 中与 MVA 病毒悬液 (每个细胞 0.01 感染单位 (IU), 0.02 毫升 / 厘米²) 共培养 1 小时。然后添加更多的培养基 A (0.2 毫升 / 厘米²) 并且把培养瓶在 37℃培养 2-3 天 (直到大约 90%的细胞表现细胞病变效应)。通过刮细胞单层到培养基并在 Sorvall RC-3B 离心机中 4℃ 3000rpm 离心 5 分钟沉淀细胞物质制备粗病毒贮存物。粗病毒制剂在进一步处理 (例如病毒纯化) 前贮存于 -20℃。

[0116] 1.2 病毒的纯化

[0117] 为获得尽可能纯的并且不含对宿主细胞特异组分的病毒所采用的纯化步骤类似于 Joklik 所述 (病毒学 (Virology) 18, 9-18 [1962])。融解贮存于 -20℃的粗病毒保存物并在 PBS 中悬浮一次 (10-20 倍沉淀体积), 悬浮液如上述方式离心。新沉淀悬浮于 10 倍体积 Tris 缓冲液 1 (10mM Tris-HCl pH9.0), 悬浮液用超声波简短处理 (Labsonic L, B. Braun Biotech International, Melsungen Germany; 2×10 秒, 60 瓦, 室温) 以进一步离解细胞碎片并从细胞物质中释放病毒粒子。细胞核和较大细胞碎片继而通过悬浮液的简短离心去除 (获取于杜邦公司 (Du Pont Co.) 的 Sorvall GSA 转头, D-6353 Bad Nauheim, FRG; 3000rpm 10℃离心 3 分钟)。沉淀再一次悬浮于 Tris 缓冲液 1, 用超声波处理并离心, 如上所述。收集的含游离病毒粒子的上清液联合并铺层于 10mM Tris-HCl, pH9.0 的 10 毫升 36%蔗糖垫层上, 在 Beckman SW27/SW 28 离心机转头中 4℃ 13,500rpm 离心 80 分钟。去掉上清液, 含有病毒粒子的沉淀溶解于 10 毫升 pH9.0 的 1mM Tris-HCl, 用超声波简短处理 (室温下 2×10 秒, 仪器如上所述) 均匀, 加样到 20% -40%蔗糖梯度 (蔗糖溶于 1mM Tris-HCl, pH9.0) 以进一步纯化。梯度液在 Beckmann SW 41 离心机转头中 4℃ 13,000rpm 离心 50 分钟。离心后, 含有病毒粒子的分离带在抽吸去带上面体积后用移液管收集。获得的蔗糖溶液用三倍体积 PBS 稀释然后病毒粒子再通过离心沉淀 (Beckmann SW 27/28, 60 分钟, 13,500rpm, 4℃)。现在, 沉淀绝大部分由纯病毒粒子构成, 它重悬于 PBS 并平衡至病毒浓度平均相当于 $1-5 \times 10^9$ IU/ml。纯化的病毒贮存液贮存于 -80℃并直接或用 PBS 稀释后用于随后的实验。

[0118] 1.3 MVA 病毒的克隆

[0119] 为了产生均匀贮存病毒制剂, 获取于 Anton Mayr 教授的 MVA 病毒通过在 96 孔组织培养板上 CEF 培养物中连续三次传代过程中的有限稀释进行克隆化。筛选到 MVA 克隆 F6

并在 CEF 中扩增以获得病毒的工作贮存物,作为产生本发明申请中描述的重组 MVA 病毒以及用于产生以前描述的重组 MVA 病毒的起始材料 (Sutter, G. and Moss, B. [1992] 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 89, 10847-10851; Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. 和 Moss, B. [1994] 疫苗 (Vaccine) 12, 1032-1040; Hirsch, V., Fuerst, T., Sutter, G., Carroll, M., Yang, L., Goldstein, S., Piatak, M., Elkins, W., Alvord, G., Montefiori, D., Moss, B. and Lifson, J. [1996] 病毒学杂志 (J. Virol.) 70, 3741-3752)。

[0120] 2. 重组 MVA 病毒的构建及其特征

[0121] 2.1. 载体质粒构建

[0122] 为了实现重组 MVA 病毒的产生,构建了新的载体质粒。插入到 MVA 基因组的外源基因准确定位于 MVA 基因组自然发生缺失 II 位点。位于 MVA 基因组 HindIII 片段中 2500bp 缺失位点侧翼的 MVA DNA 序列 (Altenburger, W., Suter, C. P. 和 Altenburger, J. [1989], 病毒学集刊 (J. Arch. Virol.) 105, 15-27) 用 PCR 法扩增并克隆到质粒 pUC18 的多克隆位点。用于左方 600 bp DNA 侧翼的引物是 5' -CAGCAGGGTACCCTCATCGTACAGGACGTTCTC-3' 和 5' -CAGCAGCCCGGTATTCGATGATTATTTTAACAAAATAACA-3' (限制性酶 KpnI 和 SmaI 位点下面划线)。用于右方 550bp DNA 侧翼的引物是 5' -CAGCAGCTGCAGGAATCATCCATTCCACTG AATAGC -3' 和 5' CAGCAG

[0123] GCATGCCGACGAACAAGGAAGTGTAGCAGA-3' (限制性酶 PstI 和 SphI 位点下面划线)。在插入到 pUC 18 的 MVA DNA 这两段侧翼之间,利用 BamHI 位点插入处于痘苗病毒晚期启动子 P11 控制之下的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Lac Z 基因 (通过 pIILZ 限制性消化制备, Sutter, G. 和 Moss, B. [1992] 美国国家科学院院报 (PNAS USA) 89, 10847-10851), 从而产生 MVA 插入载体 pUCIILZ [图 1]。接下来一段含有痘苗病毒早期-晚期启动子 P7.5 以及用于克隆的 SmaI 位点的 289bp 片段 (通过 EcoRI 和 XbaI 限制性消化质粒载体 pSCII 制备 [Chakra barti 等, 1985, 分子和细胞生物学 (Molecular and Cellular Biology) 5, 3403-3409]) 插入到 pUCIILZ 的 SmaI 位点产生了 MVA 载体 pUCIILZ P7.5 [图 2]。为了构建一种载体质粒以通过报告酶 β -半乳糖苷酶的瞬时合成实现重组 MVA 病毒的分离,一种来自大肠杆菌 (*E. coli*) Lac Z 开放阅读框 3' 末端的 330bp DNA 片段用 PCR 扩增 (引物是 5' -CAGCAGGTCGACCCGACCGCCTTACTGCCGCC -3' 和 5' -GGGGGGCTGCAGATGGTAGCGACCGGCG CTCAG-3') 并克隆到 pUCIILZ P7.5 的 SalI 和 PstI 位点,获得 MVA 载体 pUCIILZdel P7.5 [图 3]。利用 SmaI 位点,此载体质粒可用于把处于痘苗病毒启动子 P7.5 转录控制之下的编码外源基因的 DNA 序列插入到 MVA 染色体。在通过筛选 β -半乳糖苷酶活性分离到所需重组病毒后,重组病毒的进一步增殖导致通过同源重组产生再改造 P11-Lac Z 表达盒的自缺失。

[0124] 2.2. 重组病毒 MVA T7pol 的构建和特征

[0125] 一种含有处于痘苗病毒早期/晚期启动子 P7.5 控制之下的噬菌体 T7RNA 聚合酶完整基因的 3.1Kbp DNA 片段用 EcoRI 从质粒 pTFF3 上切下 (Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. 和 Moss, B., 1986, 美国国家科学院院报 (P. N. A. S. USA) 83, 8122-8126), 与 Klenow DNA 聚合酶一起温育修饰产生平头末端,并克隆到 pUCIILZ 的单独 SmaI 限制性位点。产生质粒转移载体 pUCIILZ T7pol [图 4]。选择痘苗病毒早期/晚期启动子 P7.5 作为 T7RNA 聚合酶基因表达的转录调节子。与较强的痘苗病毒晚期启动子 (例如 P11) 相反,此启动子系统使重组基因在靶细胞感染后立即表达。指导外源基因插入 MVA 基因组缺失 II

位点的质粒 pUCIILZ T7pol 用于产生重组病毒 MVAT7pol。

[0126] 用 MVA 在每细胞感染复数为 0.05TCID₅₀ 情况下感染的 CEF 细胞,按照前面所述使用质粒 pUCIILZ T7pol DNA 进行转染 (Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. 和 Moss, B. (1994) 疫苗 (Vaccine) 12, 1032-1040)。表达 T7RNA 聚合酶并共表达 β -D-半乳糖苷酶的重组 MVA 病毒 (MVA P7.5-T7pol) 通过在 CEF 细胞中用 5-溴-4-氯-3-吡啶 β -D-半乳糖苷 (300 μ g/ml) 进行连续五轮噬斑纯化选择出来。随后,通过感染 CEF 单层扩增重组病毒,并用 PCR 检测 DNA 以证实病毒贮存物的遗传均一性。MVA-T7pol 病毒 DNA 的 Southern 印迹检测证明了重组基因在 MVA 基因组中缺失 II 位点的稳定整合 [图 5]。

[0127] 为检测重组 MVA T7pol 的 T7RNA 聚合酶表达,测定了来自病毒感染的组织培养物中的 [35S] 甲硫氨酸标记多肽。生长于 12 孔板上的单层猴肾细胞系 CV-1 用病毒以每细胞感染复数 20TCID₅₀ 进行感染。感染 3 到 5 小时后,去除培养基,并用 1 毫升无甲硫氨酸培养基冲洗培养物一次。每孔加入补充有 50 微居里 (μ Ci) [35S] 甲硫氨酸的 0.2 毫升无甲硫氨酸培养基并在 37°C 温育 30 分钟。感染细胞的胞质抽提物通过每孔在 0.2 毫升 0.5% Nonidet P-40 裂解缓冲液中 37°C 温育 10 分钟制备,样品用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。CV-1 细胞与 MVA T7pol 的代谢标记显示了两种额外多肽的合成 (i) 一种大约 116,000 道尔顿的蛋白代表共表达的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶以筛选重组病毒以及 (ii) 一种 98,000 道尔顿的蛋白,同噬菌体 T7RNA 聚合酶预期大小一致 [图 6]。由 MVAT7pol 产生的大量 β -半乳糖苷酶是令人瞩目的。体内实验的结果表明,当插入到 MVA 基因组缺失 II 位点时有 P11-Lac Z 基因构建体的强表达,揭示 MVA 载体病毒中的重组基因当插入到 MVA 基因组的该位置时可能会更有效地表达。

[0128] MVA-T7pol 重组病毒作为表达系统的用途与 WR-T7pol 重组病毒 vTF 7-3 (Fuerst 等 1986) 的比较通过一种质粒载体 DNA 的共转染进行了测定,该质粒载体衍生于 pTM1 (Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A., 和 Fuerst T. R. (1990) 自然 (Nature) 348, 91-92) 并含有 (克隆到 pTM1 多克隆位点的 NcoI 和 BamHI 位点) 处于 T7RNA 聚合酶启动子 (PT7) 控制之下的大肠杆菌氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因。转染和感染的 CV-1 细胞悬浮于 0.2 毫升 0.25M Tris-HCl (pH7.5)。三轮冻融循环后,通过离心澄清裂解液,测定了上清液中蛋白含量,并且含 0.5, 0.25, 0.1 微克总蛋白的样品按 Mackett, M., Smith, G. L. 和 Moss, B. (1984) 病毒学杂志 (J. Virol.) 49, 857-864 所述检测了酶活性。放射自显影后,用 Fuji 成像检测系统定量标记斑点。结果表明通过使用高减毒痘苗载体 MVA,可能利用痘苗病毒-T7RNA 聚合酶系统时就象使用完全的可复制型痘苗病毒重组体一样有效 [图 7]。

[0129] 2.3. 重组病毒 MVA-LAI_{nef} 的构建及鉴定

[0130] 一种含有 HIV-1LAI 完整 nef 基因的 648bp DNA 片段通过 PCR 从质粒 DNA 制备 (pTG 1166 由 M.-P. Kieny, Transgene S. A., Strasbourg 惠赠;PCR 引物为 5' -CAGC AGGJGATCCATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGT-3' 和 5' -CAGCAGGGATCCATGTCAGCAGTTCTTG AAGTAC TCCGG-3'), 用限制性内切核酸酶 BamHI 消化,与 Klenow DNA 聚合酶一起温育修饰以产生平头末端,并克隆到 pUCIIL ZdeI P7.5 的 SmaI 位点以产生载体 pUCIILZdeI P7.5-LAI_{nef} [图 8]。此质粒可用于改造 MVA 重组病毒以在痘苗病毒早期/晚期启动子 P7.5 控制下表达 HIV-1LAI 的 nef 基因。

[0131] 用 MVA 在每细胞感染复数 0.05TCID₅₀ 感染的 CEF 细胞再按前述方法用质粒 pUCIIL Zde1 P7.5-LAInef 的 DNA 进行转染 (Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. 和 Moss, B. [1994] 疫苗 (Vaccine) 12, 1032-1040)。含有 nef 基因和瞬时共表达大肠杆菌 Lac Z 标记基因的重组 MVA 通过在 CEF 细胞中用 5-溴-4-氯-3-吡啶 β-D-半乳糖苷 (300 μg/ml) 染色的连续几轮噬斑纯化选择出来。此后含有 nef 基因和缺失 Lac Z 标记基因的重组 MVA 病毒在 5-溴-4-氯-3-吡啶 β-D-半乳糖苷 (300 μg/ml) 存在下通过三轮附加的连续噬斑纯化筛选以寻找 CEF 细胞中的非染色病毒病灶而得以分离。随后, 重组病毒感染 CEF 单层进行扩增, 并且用 PCR 检测 MVA-LAInef 病毒 DNA 以证实病毒贮存物的遗传均一性。病毒 DNA 的 Southern 印迹检测证实了 MVA-LAInef 的遗传稳定性并精确表明 nef 基因和大肠杆菌 Lac Z 标记基因缺失整合到了病毒基因组缺失 II 位点。

[0132] 重组 Nef 蛋白的有效表达通过对来自 MVA-LAInef 感染的 CEF 细胞的蛋白裂解液使用引导抗 HIV-1 Nef 的鼠单克隆抗体 (由 K. Krohn 惠赠并按照 Ovod, V., Lagerstedt, A., Ranki, A., Gombert, F., Spohn, R., Tahtinen, M., Jung, G., 和 Krohn, K. [1992] 爱滋病 (AIDS) 6, 25-34 所述使用) 进行 Western 印迹检测得以证实。

[0133] 2.4. 重组病毒 MVA-hTYR 的构建及鉴定

[0134] 一种含有编码人酪氨酸酶完整基因的 1.9kb DNA 片段 [酪氨酸酶 C-DNA 克隆 123, B2 分离自病人 SK 29(AV) 的黑素细胞系 SK 29-MEL, GenBank Acc.no.U0 1873; Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., DePlaen, E., Lethe, B., Coulie, P. 和 Boon, B. (1993) 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 178, 489-495] 通过 EcoRI 消化从质粒 pc DNA1/Amp-Tyr [Wolfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Buschenfelde, K. 和 Boon, T. (1994) 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol) 24, 759-764] 制备, 与 Klenow DNA 聚合酶一起温育修饰产生平头末端, 并克隆到 pUCIIL Zde1 P7.5 的 SmaI 位点以产生载体 pUCIIL Zde1 P7.5-TYR [图 9]。此质粒可用于改造 MVA 重组病毒以在痘苗病毒早期 / 晚期启动子 P7.5 控制下表达人酪氨酸酶基因。

[0135] MVA 以每细胞感染复数 0.05 TCI D50 感染的 CEF 细胞用前述的质粒 pUCIIL Zde1 P7.5-TYR 的 DNR 转染 (Sutter, G., Wyatt, L., Foley, P., Bennink, J. 和 Moss, B. (1994) 疫苗 (Vaccine) 12, 1032-1040)。稳定表达人酪氨酸酶基因并瞬时共表达大肠杆菌 Lac Z 基因的重组 MVA 病毒通过在 CEF 细胞中用 5-溴-4-氯-3-吡啶 β-D-半乳糖苷 (300 μg/ml) 染色的连续几轮噬斑纯化选择出来。此后, 表达编码人酪氨酸酶基因并有缺失的 Lac Z 标记基因的重组 MVA 病毒在 5-溴-4-氯-3-吡啶 β-D-半乳糖苷 (300 μg/ml) 存在下通过三轮附加的连续噬斑纯化以筛选 CEF 细胞中的非染色病毒病灶而得以分离。随后, 重组病毒感染 CEF 单层进行扩增, 并且用 PCR 检测 MVA-hTYR 病毒 DNA 以证实病毒贮存物的遗传均一性。病毒 DNA 的 Southern 印迹检测证实了 MVA-hTYR 的遗传稳定性并精确表明重组酪氨酸酶基因和大肠杆菌 Lac Z 标记基因缺失整合到了病毒基因组中缺失 II 位点重组人酪氨酸酶的有效表达通过对来自 MVA-hTYR 感染的 CEF 细胞的蛋白裂解液使用兔多克隆抗体 (由 V. Hearing 惠赠并按照 Jimenez, M., Kameyama, K., Maloy, L., Tomita, Y. 和 Hearing, V. [1988] 美国国家科学院院报 (P. N. A. S. USA) 85, 3830-3834 所述使用) 或引导抗酪氨酸酶的鼠单克隆抗体 (由 L. Old 惠赠并按照 Chen, Y., Stockert, E., Tsang, S., Coplan, K. 和 Old, L. [1995] 美国国家科学院院报 (P. N. A. S. USA) 92, 8125-8129 所述使用) 进行 Western

印迹检测得以证实。

[0136] 序列表

[0137] (1) 一般资料

[0138] (i) 申请人

[0139] (A) 名称 :GSF-Forschungszentrum fuer Umwelt und Gesundheit GmbH

[0140] (B) 街道 :Ingolstaedter Landstr. 1, **Neuherberg**

[0141] (C) 城市 :Oberschleissheim

[0142] (E) 国家 :德国

[0143] (F) 邮编 (ZIP) :85764

[0144] (ii) 发明名称 :重组 MVA 病毒及其应用

[0145] (iii) 系列数目 :8

[0146] (iv) 计算机可读形式 :

[0147] (A) 媒介类型 :软盘

[0148] (B) 计算机 :IBM 兼容 PC

[0149] (C) 操作系统 :PC-DOS/MS-DOS

[0150] (D) 软件 :PatentIn Release#1.0, #1.30 版本 (EPO)

[0151] (vi) 在先申请资料 :

[0152] (A) 申请号 :DK 0782/95

[0153] (B) 申请日 :1995,7,4

[0154] (2) 序列资料 1 :

[0155] (i) 序列特征 :

[0156] (A) 长度 :33 碱基对

[0157] (B) 类型 :核酸

[0158] (C) 链型 :单链

[0159] (D) 拓扑结构 :线性

[0160] (ii) 分子类型 :其它核酸

[0161] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”

[0162] (xi) 序列描述 :序列 1 :

[0163] CAGCAGGGTA CCCTCATCGT ACAGGACGTT CTC 33

[0164] (2) 序列资料 2 :

[0165] (i) 序列特征 :

[0166] (A) 长度 :42 碱基对

[0167] (B) 类型 :核酸

[0168] (C) 链型 :单链

[0169] (D) 拓扑结构 :线性

[0170] (ii) 分子类型 :其它核酸

[0171] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”

[0172] (xi) 序列描述 :序列 2 :

[0173] CAGCAGCCCG GGTATTCGAT GATTATTTTT AACAAAATAA CA 42

- [0174] (2) 序列资料 3 :
- [0175] (i) 序列特征 :
- [0176] (A) 长度 :36 碱基对
- [0177] (B) 类型 :核酸
- [0178] (C) 链型 :单链
- [0179] (D) 拓扑结构 :线性
- [0180] (ii) 分子类型 :其它核酸
- [0181] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”
- [0182] (xi) 序列描述 :序列 3 :
- [0183] CAGCAGCTGC AGGAATCATC CATTCCACTG AATAGC 36
- [0184] (2) 序列资料 4 :
- [0185] (i) 序列特征 :
- [0186] (A) 长度 :36 碱基对
- [0187] (B) 类型 :核酸
- [0188] (C) 链型 :单链
- [0189] (D) 拓扑结构 :线性
- [0190] (ii) 分子类型 :其它核酸
- [0191] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”
- [0192] (xi) 序列描述 :序列 4 :
- [0193] CAGCAGGCAT GCCGACGAAC AAGGAACTGT AGCAGA 36
- [0194] (2) 序列资料 5 :
- [0195] (i) 序列特征 :
- [0196] (A) 长度 :33 碱基对
- [0197] (B) 类型 :核酸
- [0198] (C) 链型 :单链
- [0199] (D) 拓扑结构 :线性
- [0200] (ii) 分子类型 :其它核酸
- [0201] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”
- [0202] (xi) 序列描述 :序列 5 :
- [0203] CAGCAGGTCG ACCCCGACCG CCTTACTGCC GCC 33
- [0204] (2) 序列资料 6 :
- [0205] (i) 序列特征 :
- [0206] (A) 长度 :33 碱基对
- [0207] (B) 类型 :核酸
- [0208] (C) 链型 :单链
- [0209] (D) 拓扑结构 :线性
- [0210] (ii) 分子类型 :其它核酸
- [0211] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”
- [0212] (xi) 序列描述 :序列 6 :

- [0213] GGGGGGCTGC AGATGGTAGC GACCGGCGCT CAG 33
- [0214] (2) 序列资料 7 :
- [0215] (i) 序列特征 :
- [0216] (A) 长度 :39 碱基对
- [0217] (B) 类型 :核酸
- [0218] (C) 链型 :单链
- [0219] (D) 拓扑结构 :线性
- [0220] (ii) 分子类型 :其它核酸
- [0221] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”
- [0222] (xi) 序列描述 :序列 7 :
- [0223] CAGCAGGGAT CCATGGGTGG CAAGTGGTCA AAAAGTAGT 39
- [0224] (2) 序列资料 8 :
- [0225] (i) 序列特征 :
- [0226] (A) 长度 :39 碱基对
- [0227] (B) 类型 :核酸
- [0228] (C) 链型 :单链
- [0229] (D) 拓扑结构 :线性
- [0230] (ii) 分子类型 :其它核酸
- [0231] (A) 描述 :/desc = “DNA- 引物”
- [0232] (xi) 序列描述 :序列 8 :
- [0233] CAGCAGGGAT CCATGTCAGC AGTTCTTGAA GTACTCCGG 39

改良安卡拉痘病毒(MVA)

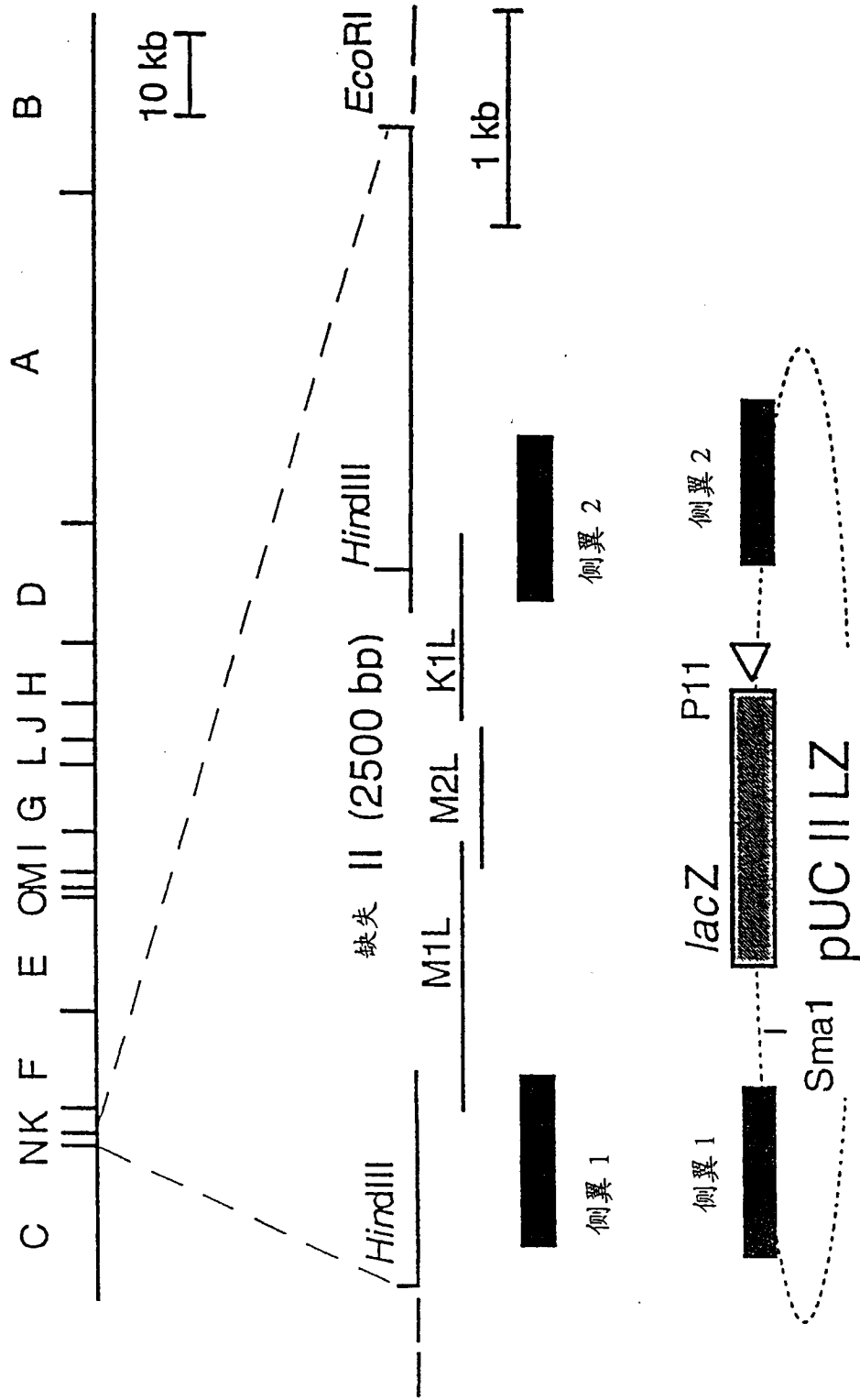
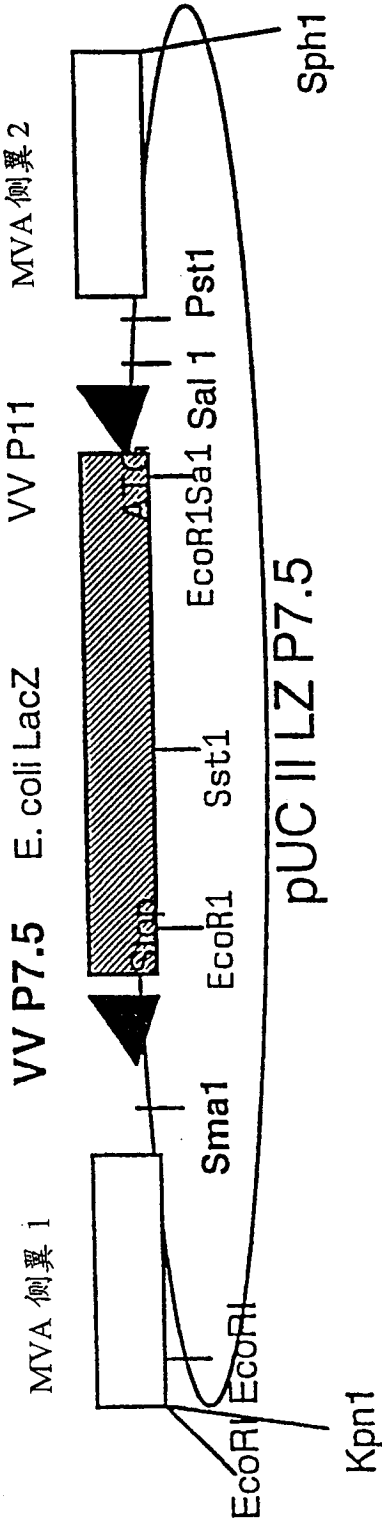


图 1

克隆#9



克隆#14

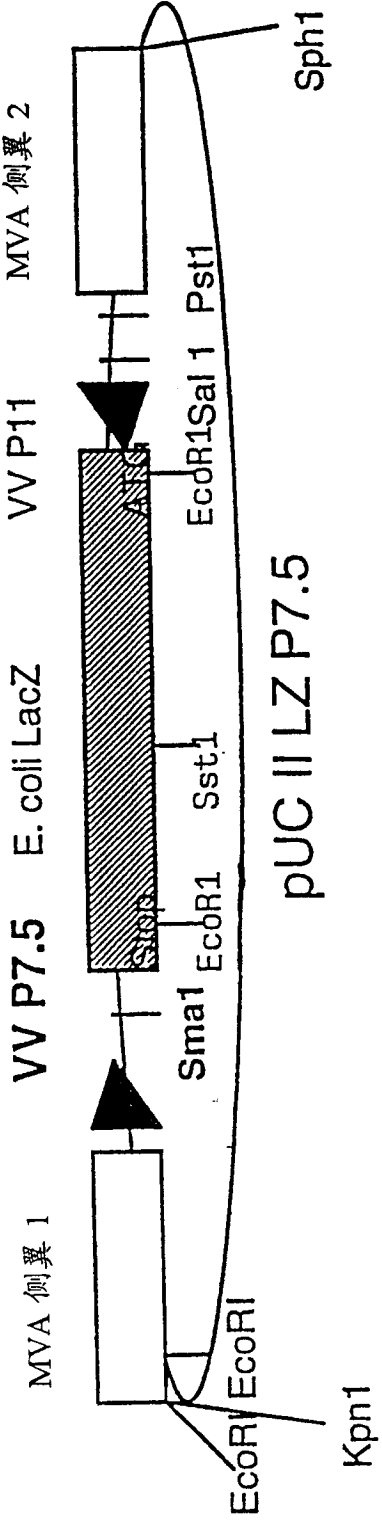


图 2

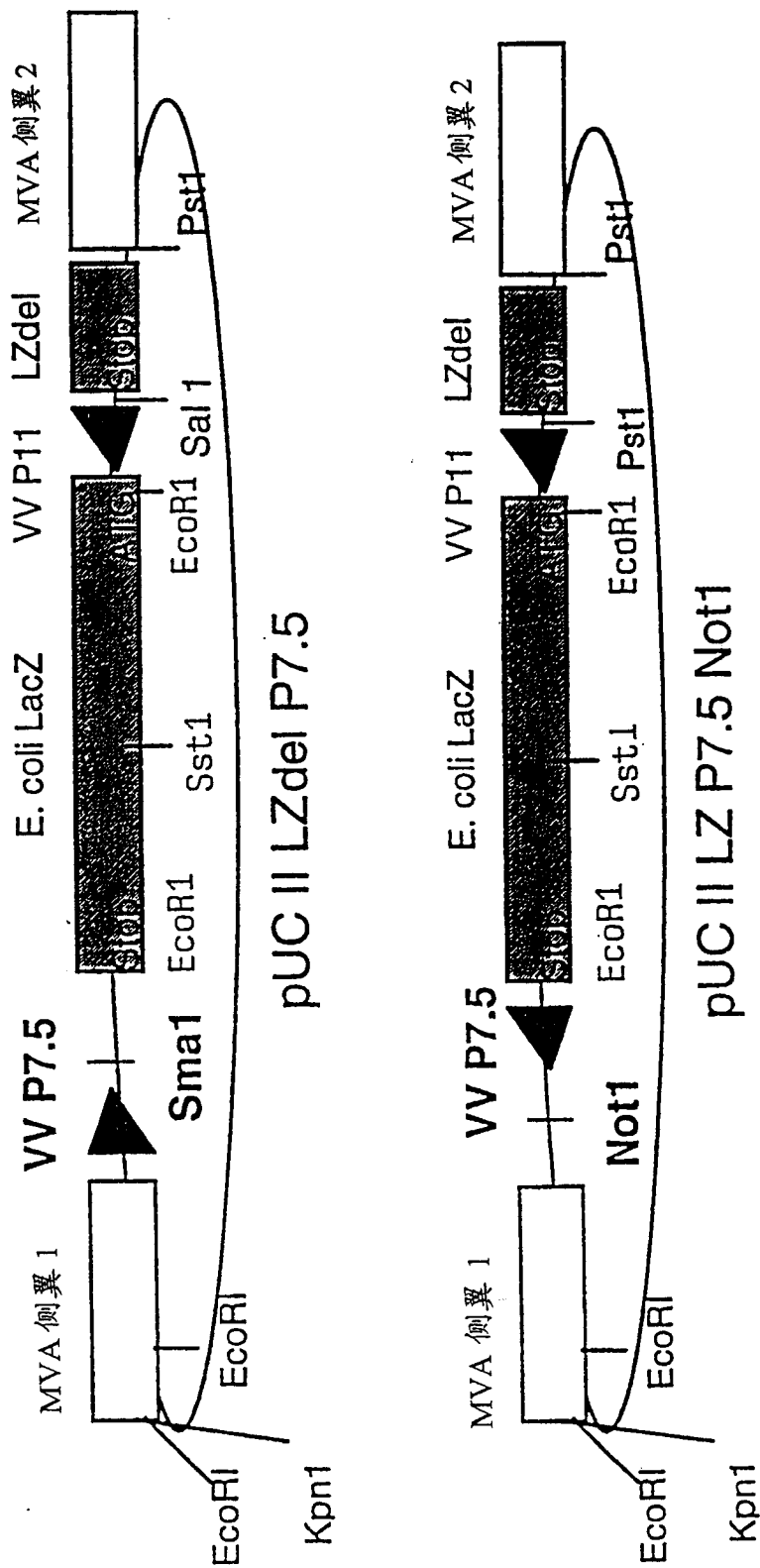


图 3

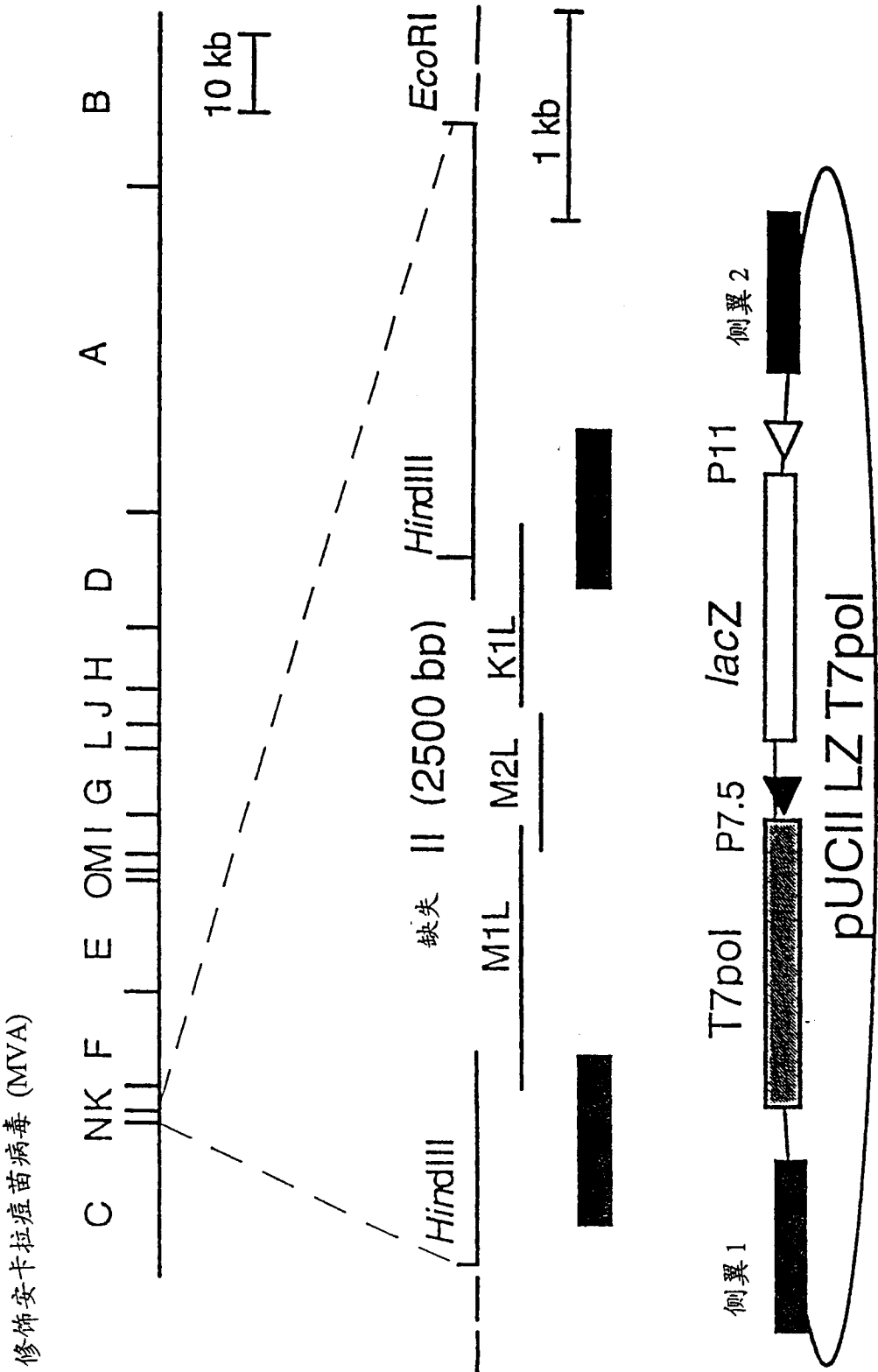


图 4

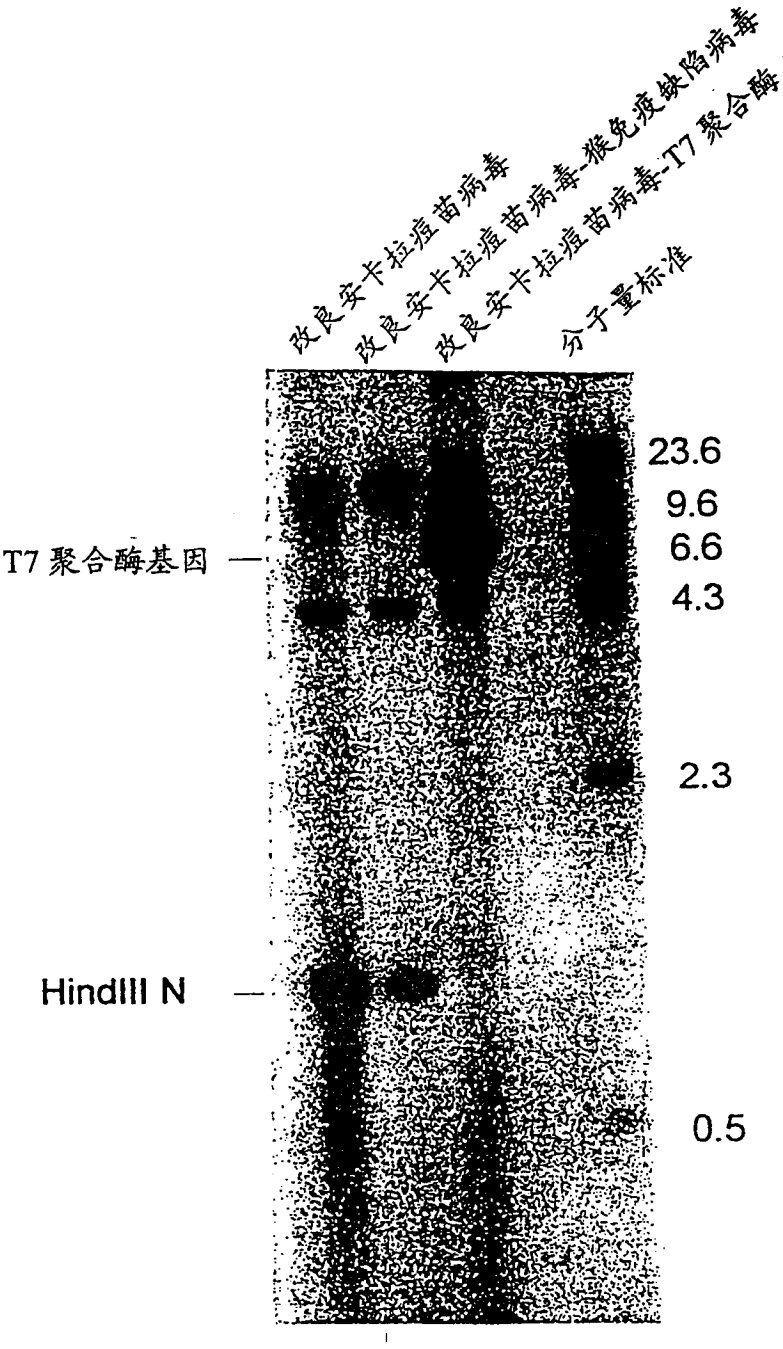


图 5

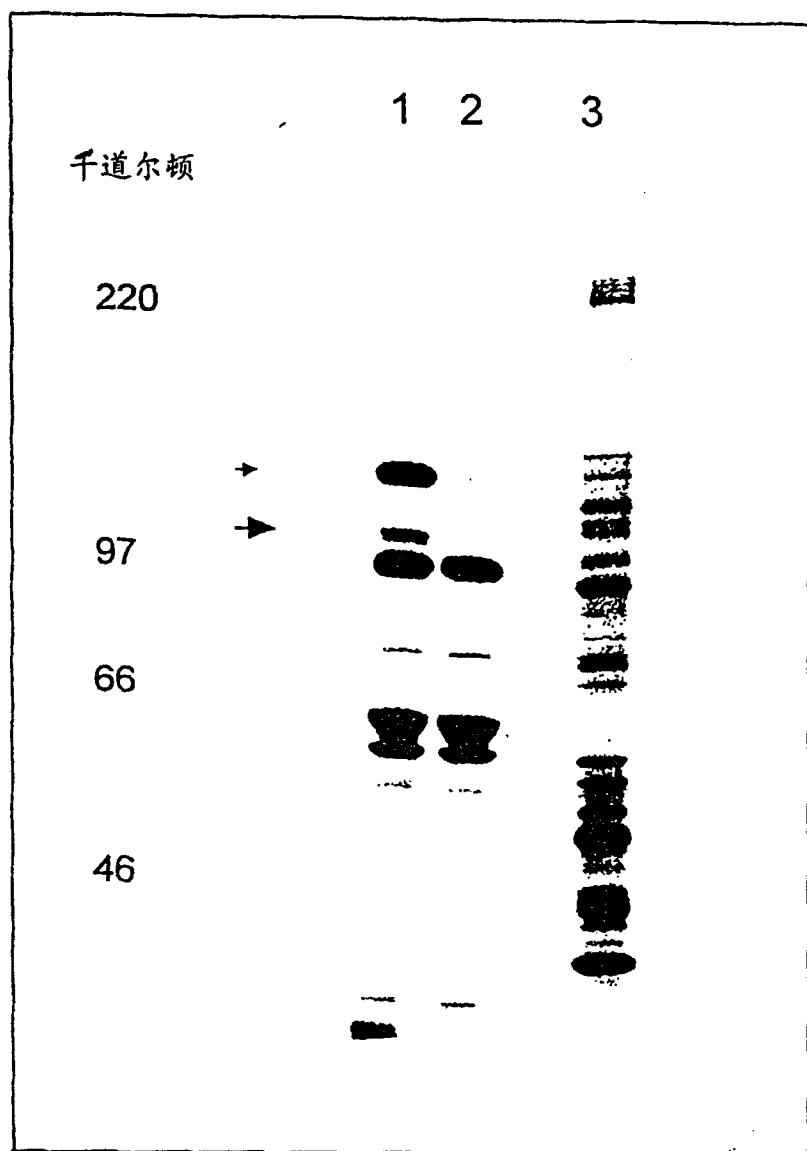


图 6

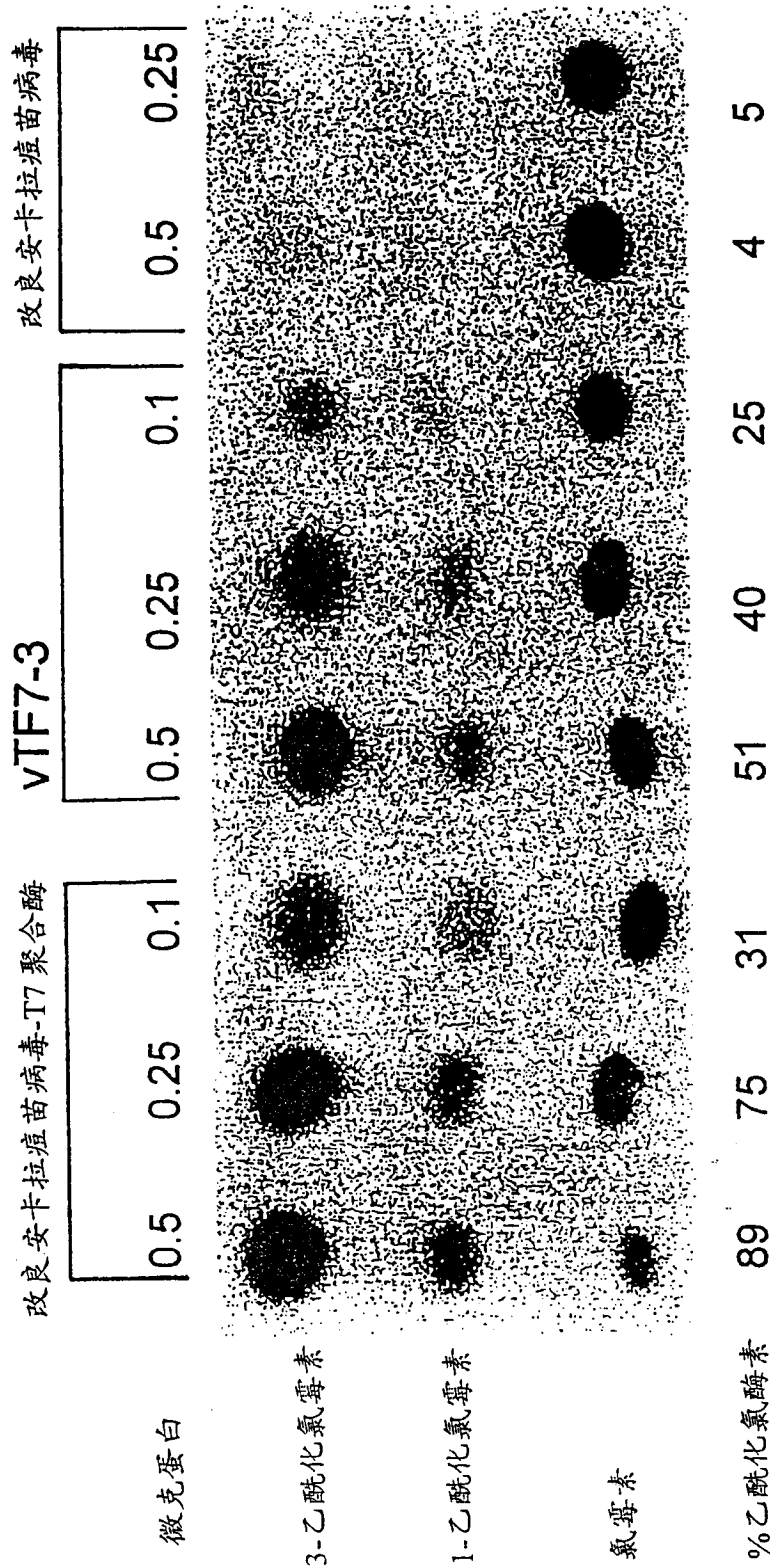


图 7

改良安卡拉痘病毒(MVA)

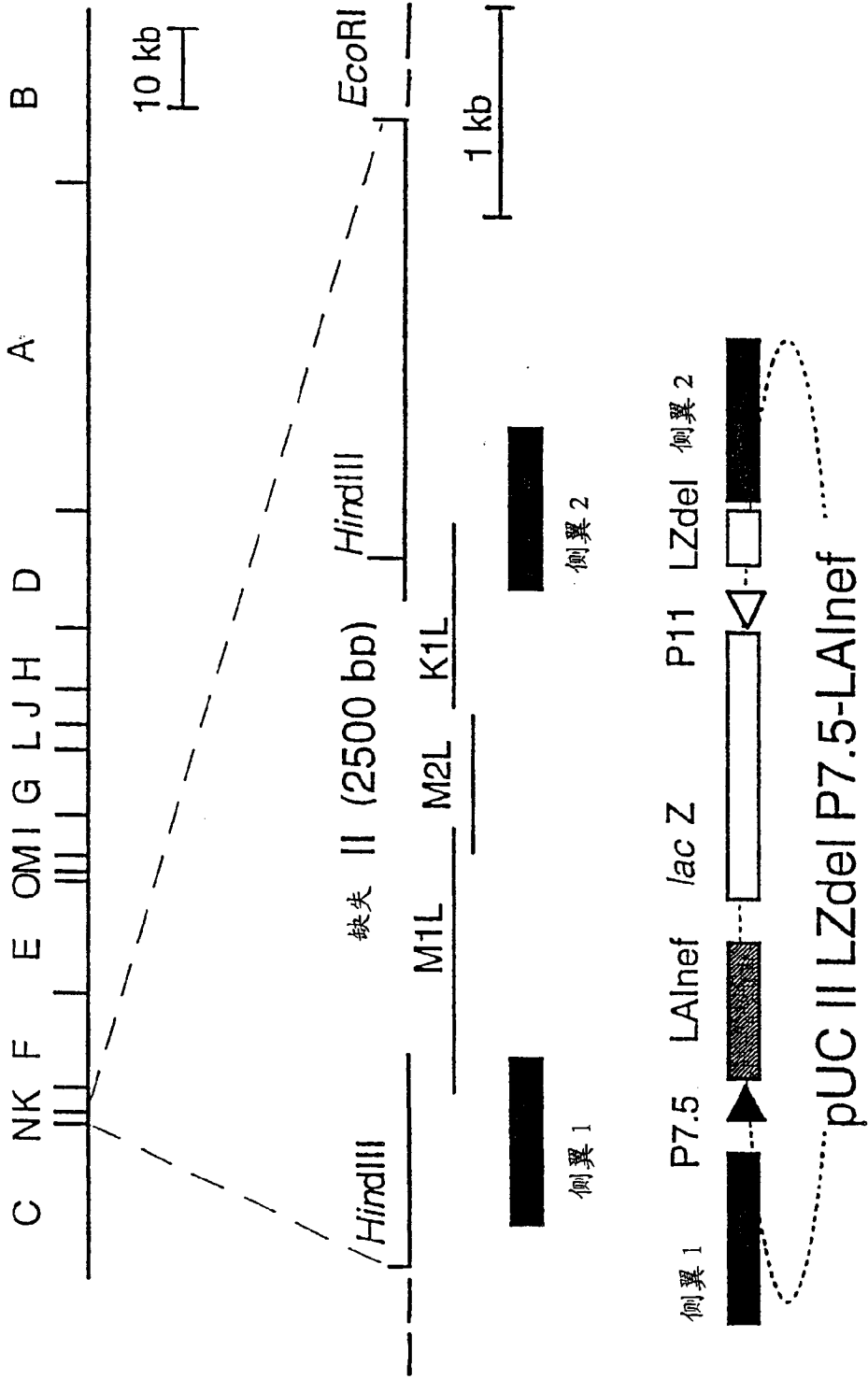


图 8

改良安卡拉痘苗病毒(MVA)

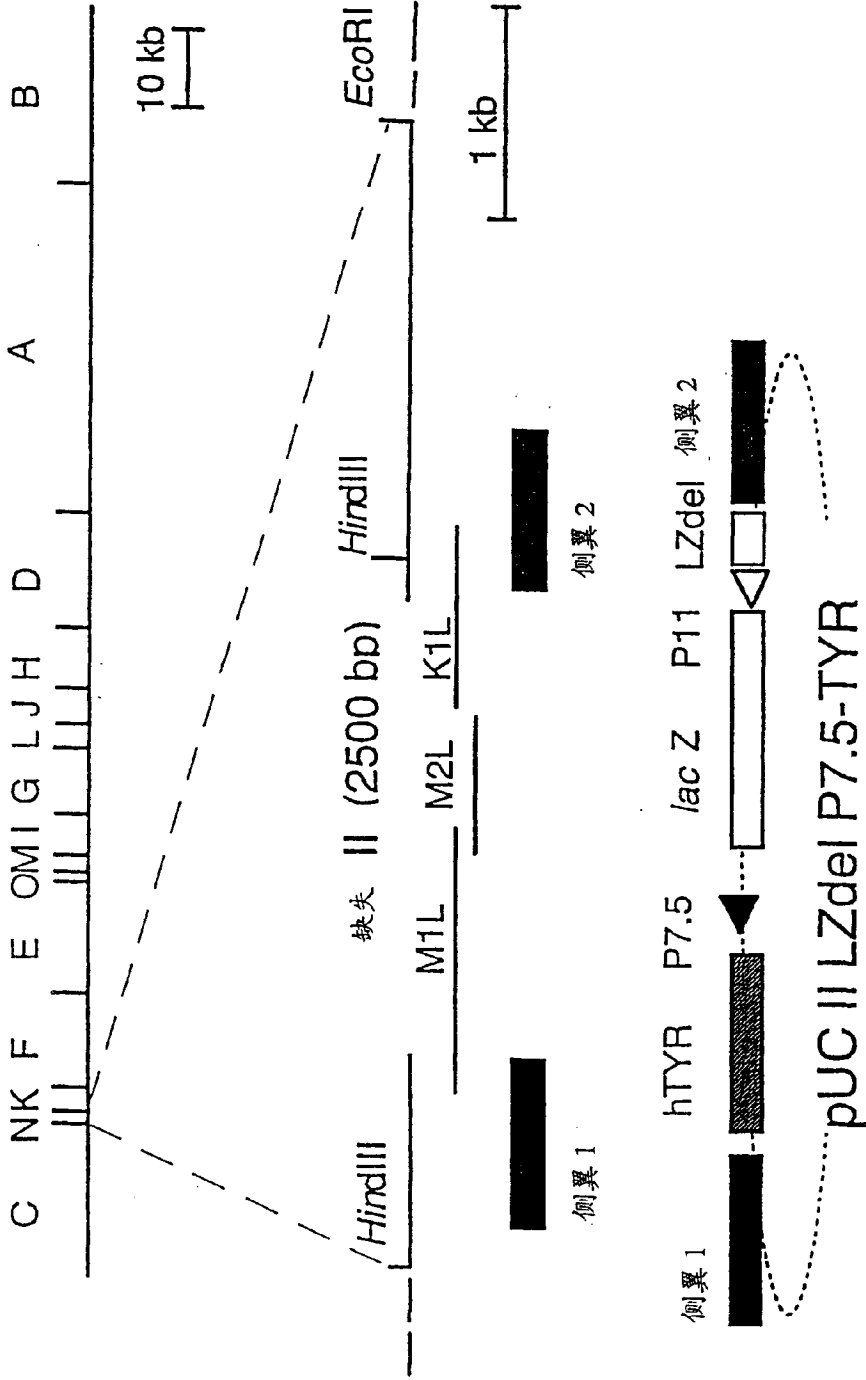


图 9