



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104704112 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380051942. 6

C12N 15/85(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 29

C12N 7/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

12305968. 5 2012. 08. 03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/065920 2013. 07. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/019990 EN 2014. 02. 06

(71) 申请人 赛诺菲巴斯德

地址 法国里昂

(72) 发明人 I · 勒加斯特洛伊斯 J · 麦迪纳

C · 莫斯特

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C12N 7/02(2006. 01)

权利要求书3页 说明书31页

序列表14页 附图2页

(54) 发明名称

传染性流感病毒的生产

(57) 摘要

本发明涉及生产流感传染性病毒的方法, 其中通过用合适的表达载体集转染细胞生成的传染性流感病毒种子转染 CHO 细胞。本发明还涉及重组盒, 以及包含所述重组盒的载体, 其可用于产生传染性病毒的方法中, 且特别是根据本发明的方法中。

1. 一种用于生产传染性流感病毒的方法,其中所述方法包括由下列组成的步骤:

- a) 用表达载体集转染细胞来生成传染性流感病毒种子,
- b) 用所述传染性流感病毒种子感染 CHO 细胞。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中在步骤 a) 的所述细胞是灵长类来源的细胞,灵长类来源的细胞和 CHO 细胞的混合物或由 CHO 细胞组成。

3. 根据权利要求 3 的方法,其中灵长类来源的所述细胞是 Vero 细胞。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项的方法,其中所述 CHO 细胞是 CHO-K1 细胞。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项的方法,其中所述表达载体集包括:

- 表达载体,其使得编码至少流感 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白质的 mRNA 得以表达,以及
- 表达载体,其使得编码至少流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs,或相应的 cRNAs 得以表达,

应该理解的是所述表达载体集的表达使得 (i) 包含流感 vRNA(s) 的核糖核蛋白复合体 (RNP) 得以形成,以及 (ii) 传染性流感病毒在所述转染细胞中得以生成。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中:

(i) 所述使得编码流感 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白质的 mRNA 得以表达的表达式载体包含四种不同的单向质粒,每种质粒包含 cDNA,所述 cDNA 与编码选自 PB1、PB2、PA 和 NP 流感蛋白质的四种不同蛋白质中的一种的 mRNA 互补,受与 RNA 聚合酶 II 结合的启动子控制,且

(ii) 所述使得流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs,或相应的 cRNAs 得以表达的表达式载体包含八种不同的单向质粒,每种质粒包含 cDNA,所述 cDNA 与选自所述 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA 流感 vRNAs 的八种不同 vRNAs 中的一种,或相应的 cRNAs 互补,受与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子控制。

7. 根据权利要求 6 的方法,其中所述每种质粒包含 cDNA,所述 cDNA 与所述流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 中的一种,或相应的 cRNAs 互补,受与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子控制,所述质粒通过将所述 cDNA 序列克隆入载体获得,该载体在 5' 至 3' 方向包括:

a) 与 RNA 聚合酶 I,或 T7RNA 聚合酶结合的启动子;

b) 重组盒,其在 5' 至 3' 方向包括:

- 用于第一限制性内切酶的反向互补识别序列,所述第一限制性内切酶具有在其识别序列外的剪切位点并产生粘性末端;

- 用于第二限制性内切酶的限制性内切酶位点,所述第二限制性内切酶具有在其识别序列内的剪切位点;

- 用于第三限制性内切酶的限制性内切酶位点,所述第三限制性内切酶具有在其识别序列内的剪切位点;以及

- 用于所述第一限制性内切酶的识别序列,所述第一限制性内切酶具有在其识别序列外的剪切位点并产生粘性末端;

其中所述第二和第三限制性内切酶不相同;以及

c) 终止子序列;

应该理解的是:

- 当所述启动子与 RNA 聚合酶 I 结合时,所述终止子序列是丁型肝炎核酶序列;且

- 当所述启动子与 T7RNA 聚合酶结合时,所述终止子序列是 T7 聚合酶终止子序列。

8. 根据权利要求 7 的方法,其中所述载体包含序列 SEQ ID NO:1。

9. 根据权利要求 1 至 6 任一项的方法,其中所述表达载体集包括八种不同的双向质粒,每种质粒包含 cDNA,所述 cDNA 与选自所述 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA 流感 vRNAs 的八种不同 vRNAs 中的一种互补,受到两种启动子的控制,其中所述第一启动子与聚合酶 I 结合且所述第二启动子与聚合酶 II 结合,

应该理解的是所述表达载体集的表达使得 (i) 包含流感 vRNA(s) 的核糖核蛋白复合物 (RNP) 得以形成,以及 (ii) 传染性流感病毒在所述转染细胞中得以生成。

10. 根据权利要求 1 至 9 任一项的方法,其中所述产生的传染性流感病毒是 A 型或 B 型流感病毒。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项的方法,其中所述产生的传染性流感病毒是重配传染性流感病毒,其遗传材料从至少两种供体病毒的遗传材料的组合获得。

12. 根据权利要求 11 的方法,其中供体病毒中的一种是 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR/8/34)、B/Lee/40 或 B/Panama/45/90。

13. 根据权利要求 1 至 12 任一项的方法,其中所述产生的传染性流感病毒是嵌合病毒。

14. 根据权利要求 13 的方法,其中所述嵌合病毒包含嵌合流感 HA 和 / 或 NA vRNAs。

15. 根据权利要求 14 的方法,其中所述嵌合流感 HA vRNA 和 / 或 NA vRNAs 包含来自季节性或大流行性病毒的 HA vRNA 的一个或多个结构域或 NA vRNA 的一个或多个结构域,以及来自另一供体病毒的 HA vRNA 的一个或多个结构域或 NA vRNA 的一个或多个结构域,其中来自所述季节性或大流行性流感病毒的 HA vRNA 的至少一个结构域与编码来自所述季节性或大流行性流感病毒的 HA 如 HA1 和 / 或 HA2 的抗原胞外域的 mRNA 区互补,且来自所述季节性或大流行性流感病毒的 NA vRNA 的至少一个结构域与编码来自所述季节性或大流行性流感病毒的 NA 的抗原胞外域的 mRNA 区互补。

16. 根据权利要求 1 至 15 的任一项的方法,其中所述方法完全在无血清培养基中或在无动物组分的条件下实施。

17. 一种制备流感疫苗组合物的方法,所述方法包括:

- a) 通过根据权利要求 1 至 16 任一项的方法生产流感病毒;
- b) 在 CHO 细胞中增殖后收获所述传染性流感病毒,
- c) 纯化所述收获的传染性流感病毒,
- d) 任选地失活所述纯化的病毒,以及
- e) 将所述的纯化病毒与药物上可接受的载剂混合。

18. 一种 CHO 细胞,其包含如权利要求 5 至 9 任一项中限定的表达载体集。

19. 根据权利要求 18 的 CHO 细胞,其是 CHO-K1 细胞。

20. 一种载体,其在 5' 至 3' 方向包含:

- 与 RNA 聚合酶 I 或与 T7RNA 聚合酶结合的启动子;
- 重组盒,其在 5' 至 3' 方向包含:
 - 用于第一限制性内切酶的反向互补识别序列,所述第一限制性内切酶具有在其识别序列外的剪切位点并产生粘性末端;
 - 用于第二限制性内切酶的限制性内切酶位点,所述第二限制性内切酶具有在其识别

序列内的剪切位点；

– 用于第三限制性内切酶的限制性内切酶位点，所述第三限制性内切酶具有在其识别序列内的剪切位点；以及

– 用于所述第一限制性内切酶的识别序列，所述第一限制性内切酶具有在其识别序列外的剪切位点并产生粘性末端；

其中所述第二和第三限制性内切酶不相同；以及

– 终止子序列；

应该理解的是：

– 当所述启动子与 RNA 聚合酶 I 结合时，所述终止子序列是丁型肝炎核酶序列；

– 当所述启动子与 T7RNA 聚合酶结合时，所述终止子序列是 T7 聚合酶终止子序列。

21. 根据权利要求 20 的载体，其中所述启动子与啮齿动物 RNA 聚合酶 I 或人 RNA 聚合酶 I 结合。

22. 根据权利要求 20 或 21 的载体，其中所述重组盒的所述第一限制性内切酶是 BbsI 或 SapI，且所述重组盒的所述第二和第三限制性内切酶选自下组：NotI 和 SbfI。

23. 根据权利要求 20 至 22 任一项的载体，其中所述重组盒由序列 SEQ ID NO:2 组成。

24. 根据权利要求 20 至 23 任一项的载体，其中所述载体包含序列 SEQ ID NO:1。

25. 一种根据权利要求 20 至 24 任一项的载体，其用于通过反向遗传生产重配 RNA 病毒的方法中的用途。

传染性流感病毒的生产

发明领域

[0001] 本发明涉及用于生产流感传染性病毒的方法,其中用通过使用合适的表达载体集转染细胞生成的传染性流感病毒种子感染 CHO 细胞。本发明还涉及重组盒,以及包含所述重组盒的载体,其可用于生产感染性病毒的方法,特别是根据本发明的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 流感病毒是高度传染的呼吸道疾病,通常称为“流感”,的病原体,其可影响动物和人从而引发健康和经济问题。流感病毒是具有由单链阴性 RNA 片段组成的分割的基因组的包膜 RNA 病毒。流感病毒涵盖三种类型:流感 A、流感 B 和流感 C 病毒。流感 A 和 B 病毒导致人流感流行病,其每年导致超过 50000 人死亡 (Rossman et al, 2011, Virology, 411 (2):229-236)。虽然流感 A 病毒感染人还有多种动物(鸟类、猪、马、狗、猫等),且最大的天然储存体是野生水鸟,流感 B 病毒主要限于人,其部分是由于 B/NS1 蛋白质不能抵消其他品种的先天免疫应答 (Sridharan et al, 2010, J Biol Chem, 285 (11):7852-7856),而流感 C 病毒分离自人和猪。

[0004] A 型病毒具有球形或丝形且具有约 80 至 150nm 的大小。由脂双层组成的病毒包膜来自宿主细胞的脂质膜。作为宿主抗体的主要靶,表面糖蛋白 HA(血凝素)和 NA(神经氨酸酶)形成的针插入该包膜中。同样包埋于所述膜中的 M2 蛋白质是主要在病毒的脱壳作用中发挥功能的离子通道。基质蛋白 M1 位于病毒内缘与脂双层和核糖核蛋白(RNP)相关联。其在 RNPs 的核质运出过程中具有重要作用。在衣壳中,vRNA 片段加工非编码 5' 和 3' 末端,其包含用于病毒基因组转录、复制和壳体化所必需的信号。称为 PA(聚合酶酸性)、PB1(聚合酶碱性蛋白 1)、PB2(聚合酶碱性蛋白 2)、NP(核蛋白)、HA、NA、M 和 NS(非结构蛋白)的流感 A 病毒的八种 vRNA 通过选择性剪接编码一种或多种蛋白质。所述 PA 片段编码 PA 蛋白;所述 PB1 片段编码 PB1、PB1-F2 和 PB1-N40 蛋白;所述 NP 片段编码 NP 蛋白;所述 HA 片段编码 HA 蛋白;所述 NA 片段编码 NA 蛋白;所述 M 片段编码 M1 和 M2 蛋白;所述 NS 片段编码非结构蛋白 NS1 和 NS2 或 NEP(vRNPs 的核输出)。vRNAs 盘绕在 NP 上,NP 的每个单体与 24 个核苷酸结合,所述聚合酶复合体与 RNA 分子的两端结合,形成发夹结构。该复合体由 PB1、PB2 和 PA 组成。所述 RNA、NP 和聚合酶的组合形成核糖核蛋白(RNP)复合体。

[0005] B 型病毒具有除 NA 以外的称为 NB 的糖蛋白,其如蛋白质 M2 具有 III 型结构。

[0006] C 型病毒仅有一个多功能表面糖蛋白,“血凝素-酯酶-融合蛋白”(HEF)。

[0007] 因此,A 和 B 型病毒的基因组包含 8 种病毒 RNA(vRNA)而流感病毒 C 型的基因组仅包含 7 种。

[0008] 流感 A 病毒根据病毒表面糖蛋白的性质也被分成不同亚型,即,目前的血凝素(HA)(H1 至 H17)和神经氨酸苷酶(NA)(N1 至 N9)。

[0009] 由 Burnet 在 1936 年发现的流感病毒能在母鸡含胚卵中生长,该发现使得流感特性得以研究且允许了失活疫苗的发展 (De Ona et al, 1995, J Clin Microbiol, 33 (7):1948-1949)。如世界卫生组织 (WHO) 描述,接种疫苗是预防感染最为有效的方式。幸运的是,已获得安全和有效的疫苗超过 70 年。季节性流感疫苗包含不同

的流感类型和亚型 (A/H1N1、A/H3N2 和 B), 由于抗原修饰其每年更新两次 (一次针对南半球且一次针对北半球)。由于这个原因, WHO 协调全球流感监视网络 (GISN) 监测流感病毒的流行病学。一旦包括于下一季的病毒疫苗被确定, 候选的高度生长种子病毒株必须通过 WHO 合作中心如纽约医学院 (NYMC, US)、生物标准和控制国立研究院 (NIBSC, UK)、CSL 小组 (Australia) 和传染病国立研究院 (NIID, Japon) 制备 (Gerdil et al, 2003, Vaccine, 21(16):1776-1779)。疫苗株随后在卵、MDCK 或 Vero 细胞系上由制造商扩增 (Koudstaal et al, 2009, Vaccine, 27(19):2588-2593)。目前, MDCK (Tree et al, 2001, Vaccine, 19(25-26):3444-3450)、Vero (Kistner et al, 1998, Vaccine, 16(9-10):960-968) 和 **PER.C6®** (Pau et al, 2001, Vaccine, 19(17-19):2716-2721) 是全部的三种可能满足监管需求且已表明成功确保流感 A 和 B 病毒得以复制的细胞系。全部的三种细胞系已适应于在无血清培养基中生长 (Coussens et al, 2011, Vaccine, 29(47):8661-8668)。

[0010] 将流感病毒引入细胞通过流感血凝素 (HA) 表面蛋白和特定的细胞表面受体之间的特异性相互作用发生。特异性针对流感病毒的宿主细胞膜受体由唾液酰乳糖胺链的糖结构生成 (唾液酸 [Sia] α 2-3/6 半乳糖 [Gal] β 1-4/3N- 乙酰氨基葡萄糖) (Suzuki et al, 2011, Adv Exp Med Biol, 705:443-452)。人流感病毒优先与包含 Sia2-6Gal 连接的细胞受体结合, 其中禽病毒优先与 Sia2-3Gal 受体结合 (Coussens et al, 2011, Vaccine, 29(47):8661-8668)。当两种病毒感染相同细胞时, 称为重排的基因组 vRNAs 的不同组合可能发生。该特性已被用于流感 A 疫苗的生产来组合靶循环病毒的 HA 和神经氨酸酶 (NA) 蛋白的抗原特性与对卵适应性病毒有利的生长特性 (内部基因), 称为 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1)。不幸的是, 理想的高产量病毒获取的成功难以预测。此外, 如果分离自未经验证的细胞系, 一些病毒株不能被监管机构接受作为祖疫苗株, 因此不能使用这些病毒株 (Nicolson et al, 2005, Vaccine, 23(22):2943-2952)。关于流感类型 B 病毒, 直至最近, 并没有识别具有 A/PR/8/34 (H1N1) 生长特性的 B 病毒。因此, 可将流行循环 (或季节性) 的 B 病毒直接用于感染母鸡含胚卵并需要数代来改进 B 疫苗株的产量 (Iwatsuki-Horimoto et al, 2008, Virus Res, 135(1):161-165)。

[0011] 自 1999 年, 由于使得传染性流感病毒的生成完全来自克隆的病毒 cDNA 的基于质粒的反向遗传技术, 在速度 and 安全性方面实现了显著改进 (Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682)。基于能够诱导八种 vRNAs 和至少转录所需的聚合酶蛋白质复合体和核蛋白 (NP) 表达的质粒集, 建立了不同的系统。所述聚合酶蛋白质复合体和 NP 也可分别通过四种额外质粒的转染或通过使用能使得 vRNA 和 mRNA 通过 RNA 聚合酶 I (POL 1) 和 II (POL 2) 合成的具有双向启动子的质粒来进行表达 (Jackson et al, 2011, J Gen Virol, 92(Pt1):1-17)。转染的质粒总数可从 16 (Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350), 或 12 (Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682) 变化至 8 (Hoffmann et al, 2002, Vaccine, 20(25-26):3165-3170), 取决于所述策略是单向或双向, 且如果质粒编码多个 vRNA, 则可从 3 (Neumann et al, 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829) 至 1 (Zhang et al, 2009, J Virol, 83(18):9296-9303)。

[0012] 目前的反向遗传系统基于使用 **PER.C6®** (Koudstaal et al, 2009, Vaccine, 27(19):2588-2593)、CEP (Chicken Embryo Primary) 细胞或鸡胚胎成纤维细胞 (CEF) (Zhang et al, 2009, J Virol, 83(18):9296-9303)、293T 细胞自身 (Neuman

et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350) 或伴随进一步在 MDCK 上的扩增 (Hoffmann et al, 2002, Vaccine, 20(25-26):3165-3170; Schickli et al, 2001, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 356(1416):1965-1973)、Vero 细胞自身 (Nicolson et al, 2005, Vaccine, 23(22):2943-2952; Neumann et al, 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829) 或伴随进一步的在 Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) 上的扩增 (Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682)、CEF 细胞或 CEF (Legastelois et al, 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(3):95-104; Whiteley et al, 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(4):157-166)。

[0013] 当使用细胞系的混合物通过反向遗传方法来生产病毒时, 将能被最有效转染的细胞系认为是负责传染性流感病毒生成的细胞系, 同时其他细胞系对传染性病毒的增殖做出贡献。由于通常在允许流感 vRNAs 产生的质粒中使用人 RNA POL I 启动子, 人和类人猿细胞是在反向遗传系统中用作转染细胞系的最合适的细胞系。然而来自犬或鸡源的 POL I 启动子也可分别用于犬科或鸟类细胞 (Massin et al, 2005, J Virol, 79(21):13811-13816; Murakami et al, 2008, 82(3):1605-1609)。另一方面, 使得编码病毒蛋白质的 mRNA 得以产生的质粒通常包含能在任何真核细胞中作用的巨细胞病毒 (CMV) 或 β 肌动蛋白 POLII 启动子 (Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350; Schickli et al, 2001, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 356(1416):1965-1973)。

[0014] 多数情况下, 在上述的反向遗传系统中, 所述细胞通常在含有血清的培养基中进行培养来确保转染前不同细胞类型的旺盛生长。此外, 来自猪源的胰蛋白酶也被用于感染培养基来支持感染后病毒的增殖。为获得足够病毒, 在第一步的转染后在卵或细胞上的多次扩增可能也是需要的。

[0015] 大流行的 A/H1N1 (2009) 病毒证明了流感 A 病毒能够在群体中传播的速度并表明了通过反向遗传加速重配生产的需求。因此, 主要的挑战是确保在最短时间内生产大量的疫苗并在全世界配发, 理想情况下快于病毒的蔓延。

[0016] 用于克隆的常规方法需要限制性内切酶。然而, 限制性内切酶位点通常存在于与 vRNA 互补的不同流感 cDNA 中, 需要实施载体修饰或病毒基因组诱变。之前开发了简化的重组方法用于克隆与 vRNA 互补的流感 cDNA 用于反向遗传目的 (Stech et al, 2008, Nucleic Acid Res, 36(21):e139; Wang et al, 2008, J Virol Methods, 151(1):74-78)。同源重组包括在两 DNA 分子之间的相同 DNA 序列区中的断裂和再结合过程来产生遗传材料的新组合 (Watt et al, 1985, Proc Natl Acad Sci, 82:4768-4772)。这些之前描述的重组克隆系统基于 25 核苷酸重组盒, 其包括位于人 POL I 启动子和终止子之间的流感 A 片段的共有 5' (Uni13) 和 3' (Uni12) 保守非编码末端。其使得任何流感 A 基因组的快速和直接克隆成为可能。然而, 由于流感 B 基因组的 vRNA 5' 和 3' 非编码末端的核苷酸序列与流感 A 的不同, 流感 B 基因组不能基于该重组盒克隆。

[0017] 因此, 对于尽快和尽可能有效地发展用于克隆 RNA 病毒基因组且特别是流感 A、B 和 C 基因组的通用方式存在需求。

[0018] 本发明的目标是提供促进和 / 或加速流感疫苗在最理想的安全条件中生产的有效工具和方法, 特别是当新型循环流感病毒被鉴定且可能造成流行性 or 大流行流感时。

[0019] 为达到这种效果, 本发明的主题涉及用于生产传染性 A 型和 B 型病毒的大集合

(large panel) 的方法,其包括重配或嵌合的病毒,特别是通过反向遗传生成的病毒。这些方法使得流感病毒在更安全的环境中生产更容易。另一方面,本发明提供了通用的重组载体,其使任何类型的来自 A 或 B 型病毒的流感 RNA 片段得以克隆,其被证实是实施反向遗传方法的有效工具。

[0020] 定义

[0021] “启动子”或“启动子序列”是能够与在细胞中存在的 RNA 聚合酶结合且起始下游(3' 方向)编码序列转录的 DNA 调节区。为了对本发明进行限定的目的,启动子序列在其 3' 末端通过转录起始位点结合并向上游(5' 方向)延伸来包括在背景以上的可检测水平起始转录所需最小数目的碱基或元件。在启动子序列之内发现的是转录起始位点(举例来说,通过与核酶 S1 绘图方便定义),以及引起 RNA 聚合酶结合的蛋白质结合域(共有序列)。所述启动子可操作地与其他表达控制序列相关联,包括增强子和阻遏序列。举例来说人 RNA 聚合酶 I 启动子(人 RNA POLI 启动子)是与人 RNA 聚合酶 I 结合的一种启动子;鸟类 RNA 聚合酶 I 启动子是与鸟类 RNA 聚合酶 I 结合的一种启动子,或 T7 聚合酶启动子是一种与噬菌体 T7 的 RNA 聚合酶结合的启动子。

[0022] 术语“载体”、“克隆载体”和“表达载体”意为媒介物,DNA(例如,外源 DNA)通过它可被引入宿主细胞中进而转化宿主并促进引进序列的表达(例如,转录和翻译)。载体包括质粒、噬菌体、重组病毒、噬菌粒、转座子和人工染色体等;其在下文将进行更加详细的描述。

[0023] 载体通常包含微生物的 DNA,外源 DNA 插入其中。将一个 DNA 片段插入另一 DNA 片段的通常方法包括称为限制性内切酶的酶的使用,其在称为限制性内切酶位点的特定的位点(特定核苷酸组)裂解 DNA。通常,外源 DNA 在载体 DNA 的一处或多处限制性内切酶位点插入,且随后由载体携带与可传递的(transmissible)载体 DNA 共同进入宿主细胞。具有插入的或添加的 DNA 的 DNA 片段或序列,如表达载体,也可被称为“DNA 构建体”。载体的常用类型是“质粒”,其通常是双链 DNA 的自足分子(self-contained molecule),经常为细菌来源,其可轻而易举接受额外的(外源的)DNA 且可轻而易举被引入合适的宿主细胞。质粒载体经常包含编码 DNA 和启动子 DNA 且具有一个或多个适于插入外源 DNA 的限制性内切酶位点并经常包含终止序列。编码 DNA 是编码病毒的特定蛋白质或酶的特定氨基酸序列或 vRNA 片段的 DNA 序列。启动子 DNA 是起始、调节或以其他方式介导或控制编码 DNA 表达的 DNA 序列。启动子 DNA 和编码 DNA 可以来自相同基因或来自不同基因,且可以来自相同或不同生物体。大量载体,包括质粒和真菌载体,已被描述用于在多种真核和原核宿主中复制和/或表达。使用本文公开或引用的或以其他方式为相关领域技术人员已知的方法,非限制性的实例包括 pKK 质粒(Clontech)、pUC 质粒、pET 质粒(Novagen, Inc., Madison, WI)、pRSET 或 pREP 质粒(Invitrogen, San Diego, CA),或 pMAL 质粒(New England Biolabs, Beverly, MA)、pVAX1 质粒(Life technology, Cergy Pontoise, FR)和许多合适的宿主细胞。重组克隆载体经常包含一种或多种复制系统,在宿主中一种或多种用于选择的标记,例如,抗生素抗性,以及一种或多种表达盒。重组克隆载体还可包含无抗生素选择系统,如描述于 Peubez et al, 2010, Microbial Cell Factories, 9:65 的系统。

[0024] 本文所用术语“引物”指寡核苷酸的功能。引物是用于扩增靶序列的寡核苷酸,所述扩增通常通过与靶序列杂交后所述寡核苷酸的延伸进行。

[0025] “RNA 聚合酶 II”意为在真核生物中催化 DNA 转录成为 mRNA 或 mRNA 前体的酶。

[0026] “RNA 聚合酶 I”意为在真核生物中催化 DNA 转录成为核糖体 RNA (rRNA) 或 rRNA 前体的酶。

[0027] 术语“单向质粒”指仅包含一个转录盒的 DNA 质粒,如果所述转录盒包含与 RNA 聚合酶 I 结合的聚合酶启动子,那么其使得所述 DNA 转录成为 rRNA,或者如果所述转录盒包含与 RNA 聚合酶 II 结合的聚合酶启动子,那么其使得所述 DNA 转录成为 mRNA。举例来说,这样的质粒包括由 Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96 (16):9345-9350, 和在 US 2009/0246830 或 US 2011/0143424 中描述的那些。

[0028] 术语“双向质粒”指包含两个转录盒的 DNA 质粒,由于第一转录盒包含与 RNA 聚合酶 I 结合的聚合酶启动子且第二转录盒包含与 RNA 聚合酶 II 结合的聚合酶启动子,其使得所述 DNA 转录成为 rRNA 和成为 mRNA。举例来说,这种质粒包括由 Hoffman et al, 2000, PNAS, 97 (11):6108-6113 以及 WO 01/83794 描述的那些。

[0029] 术语“流感病毒”指正粘病毒 (Orthomyxoviridae) 科典型种 (type species)。根据本发明的流感病毒被描述于上文。

[0030] 根据本发明优选的流感病毒是流感 A 或 B 病毒。流感 A 或 B 病毒可以是病毒的任何株。具体地,流感 A 病毒选自下组: H1N1、H2N2、H3N1、H3N2、H3N8、H5N1、H7N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3 和 H10N7 病毒。

[0031] “季节性或大流行性病毒”意为从感染的宿主,如人,中分离的流感病毒的临床分离株。

[0032] “传染性流感病毒”意为能够在允许细胞 (permissive) 中复制的流感病毒。用于确定病毒是否为传染性的方法为本领域的技术人员公知。举例来说,可使用 TCID₅₀测定法来确定病毒是否为传染性的。TCID₅₀是通过将增量稀释的样品引进允许细胞(如 MDCK 细胞)并使用 Spearman-Kärber 统计学方法确定诱导 50% 允许细胞感染的稀释终点来评估样品中(举例来说,感染的细胞培养上清,或感染的尿囊液)传染性病毒的量的方法。

[0033] 在一些实施方案中,所述传染性流感病毒可以是重配流感病毒、嵌合流感病毒、或减毒流感病毒。优选地,所述传染性流感病毒是重配流感病毒,更优选的是,所述传染性流感病毒是重配嵌合流感病毒。

[0034] “允许细胞”意为允许流感病毒穿透所述细胞且实现其完整复制循环直至生产新的感染病毒的细胞。高度允许细胞是流感病毒在其中活跃复制且生成大量传染性病毒的细胞。

[0035] 术语“重配病毒”指代包含至少两种供体病毒的遗传材料的组合产生的遗传材料的病毒。当所述重配病毒被用于制备流感疫苗时,其遗传材料通常至少包含来自季节性和大流行性病毒的 HA 和 NA 基因,而其他基因(骨架基因)来自一种或多种其他供体病毒,选择这些供体病毒是由于它们在用于制造流感疫苗的生产基底上轻而易举生长的能力(如鸡含胚卵的尿囊腔或允许细胞系)和/或对人而言是低病原体或不是病原体。作为骨架基因“提供者”贡献的供体病毒的实施例包括 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (A/PR/8/34)、B/Lee/40 和/或 B/Panama/45/90 病毒。

[0036] 术语“嵌合病毒”指代包含编码嵌合蛋白的嵌合基因的病毒。“嵌合基因和/或蛋白”的意思是所述基因或蛋白质通过至少两种基因组分或两种蛋白质组分的组合获得,适

当的是,其来自至少两种不同的供体病毒。举例来说,在流感病毒 A 或 B 型的情况下,所述嵌合基因和 / 或蛋白质可以是嵌合 HA 和 / 或嵌合 NA vRNA 或蛋白质。

[0037] 术语“减毒病毒”指代在允许细胞中复制但在动物或人中部分或甚至全部丧失复制能力的病毒。因此减毒病毒的毒力在人和动物中大大降低或甚至完全丧失。与减毒病毒感染相关的临床症状在动物或人中是减少的或完全丧失。减毒病毒的实例为本领域熟知。减毒病毒可以从,举例来说,野生型病毒通过系列传代(举例来说,在不同的培养基底上,或在与其最佳复制温度相比较低的温度)、重组 DNA 技术、定点诱变、基因操作来制备。在本发明中有用的减毒病毒可在大多数接种个体中不产生副作用或产生低强度副作用,同时保持其在受试者中诱导保护性免疫应答的能力。

[0038] 术语“失活病毒”指代在允许细胞中不能复制至任何显著程度的病毒。病毒可通过本领域的技术人员已知的多种方式失活。病毒失活方法的实例包括基因操作、化学或物理处理或放射处理(包括甲醛、 β -丙内酯、洗涤剂、热或通常为 X-射线或紫外辐射形式的电磁辐射)。在本发明的框架中,有用的失活流感病毒是在受试者中保持诱导保护性免疫应答的能力的那些。

[0039] 术语“反向遗传”指产生感染性、重配病毒,或来自其互补 DNAs(cDNAs)的减毒病毒的分子方法。这些方法通过在不同流感病毒中 vRNAs 的重配而对用于产生重配流感病毒十分有利。所述反向遗传方法为本领域的技术人员熟知。所述反向遗传方法可以是那些上文描述的方法,例如,使用描述于 Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350; Neumann et al, 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829; Zhang et al, 2009, J Virol, 83(18):9296-9303; Massin et al, 2005, J Virol, 79(21):13811-13816; Murakami et al, 2008, 82(3):1605-1609 的质粒; 和 / 或描述于 Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350; Neumann et al, 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829; Zhang et al, 2009, J Virol, 83(18):9296-9303; Massin et al, 2005, J Virol, 79(21):13811-13816; Murakami et al, 2008, 82(3):1605-1609; Koudstaal et al, 2009, Vaccine, 27(19):2588-2593; Schickli et al, 2001, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 356(1416):1965-1973; Nicolson et al, 2005, Vaccine, 23(22):2943-2952; Legastelois et al, 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(3):95-104; Whiteley et al, 2007, Influenza Other Respi Viruses, 1(4):157-166 的细胞的方法。

[0040] 优选地,所述方法可以是:

[0041] (i) 16 质粒方法,如由 Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350 描述和在 US 2009/0246830 或 US 2011/0143424 中描述的方法,在该方法中所述流感病毒通过使用多胺衍生物(Trans IT-LT1)用如下质粒转染产生:各自包含受到 RNA 聚合酶 I 启动子和 RNA 聚合酶 I 终止子控制的、与一种流感 vRNA 互补的 cDNA 的 8 质粒,和各自包含受到 RNA 聚合酶 II 启动子控制的、与 PA、PB1、PB2、NP、HA、NA、M 和 NS mRNAs 中的一种互补的 cDNA 的 8 质粒。具体地,所述细胞是人肾胚粘附细胞(293T 细胞系);

[0042] (ii) 12 质粒方法,如由 Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682 描述和在 US 2004/0142003、US 2012/0058538 中描述的方法,其中所述流感病毒通过用 8 质粒和 4 质

粒转染第一细胞类型,且进一步在第二细胞类型中扩增所述病毒生成,其中所述 8 质粒各自包含与一种流感 vRNA 互补的、受 RNA 聚合酶 I 启动子和 RNA 聚合酶 I 终止子(丁型肝炎核酶)控制的 cDNA,且所述 4 质粒各自包含与 NP、PA、PB1 和 PB2mRNAs 中的一种互补的、受 RNA 聚合酶 II 启动子控制的 cDNA。具体地,所述第一细胞类型是 Vero 细胞且所述第二细胞类型是 MDBK;

[0043] (iii)13 质粒方法,如由 De Wit et al,2007,Journal of General Virology, 88:1281-1287 描述的方法,其中所述流感病毒通过用 8 质粒、4 质粒和一个质粒转染细胞生成,其中所述 8 质粒各自包含与一种流感 vRNA 互补的、受 T7RNA 聚合酶启动子和 T7RNA 聚合酶终止子控制的 cDNA,所述 4 质粒各自包含与 NP、PA、PB1 和 PB2mRNAs 中的一种互补的、受 RNA 聚合酶 II 控制的 cDNA,且所述一个质粒包含受 RNA 聚合酶 II 控制的与编码 T7RNA 聚合酶的 mRNA 互补的 cDNA 和核定位信号。具体地,转染的细胞是 Vero、293T 或 QT6(来自日本鹌鹑的纤维肉瘤细胞系)细胞。

[0044] (iv)8 质粒方法,如由 Hoffmann et al,2000,PNAS, 97(11):6108-6113 描述和在 WO 01/83794 中描述的方法,其中每种质粒能够表达 mRNA 和 vRNA(s)。因此每种质粒包含与一种流感 vRNA 互补的 cDNA 和两种转录盒而不是如前面情况中的一种。与八种流感病毒 vRNAs 中的每一种互补的 cDNA 被插入聚合酶 I 终止子和聚合酶 I 启动子之间。该聚合酶 I 转录单位两侧具有聚合酶 II 启动子和多腺苷化信号。第一转录盒允许 cDNA 以 vRNA 的形式转录。第二转录盒允许 cDNA 以 mRNA 的形式转录,随后使用细胞机器将其翻译成病毒蛋白质。借助用于转录的该双盒系统,也称为 PoI I-PoI II 系统,相同质粒的 cDNA 以 vRNA 和 mRNA 两种形式转录。这证实了其本身通过 vRNA 的表达使得一种或多种病毒蛋白处于转染细胞的水平。具体地,在粘附 MDCK 细胞与 293T 细胞的共培养中,使用多胺衍生物(顺式 IT-LT1)作为转染剂。

[0045] (v)3 质粒方法,如由 Neumann et al,2005,PNAS, 102(46):16825-16829 描述的方法,其中流感病毒通过用包含与 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS vRNAs 互补的 8 种 cDNA 的一个质粒(其中每种 cDNA 都受到 RNA 聚合酶 I 启动子和聚合酶 I 终止子的控制)和两种质粒(第一种包含与 PB2、PB1 和 PA mRNAs 中的一种互补的 3 种 cDNA 且第二种包含与 NP mRNA 互补的 cDNA,受 RNA 聚合酶 II 启动子的控制)转染细胞生成。具体地,转染的细胞是 293T 或 Vero。

[0046] (vi)1 质粒方法,如由 Zhang et al,J.Virol., 83(18):9296-9303 描述的方法,其中流感病毒通过用一个质粒转染细胞生成,所述质粒包含与 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS vRNA 互补的 8 种 cDNA,其受鼠科动物聚合酶 I 终止子和鸡 RNA 聚合酶 I 启动子控制,并且在 PB2、PB1、PA 和 NP cDNAs 之间具有聚合酶 II 启动子和多腺苷化信号。具体地,转染细胞为 CEF 细胞。

[0047] (vii)描述于 WO 2005/062820 中使用两种不同细胞系统的方法:在第一步中,用 8 种双向质粒与 PoII-PoIII 系统(PoI/PoII)转染细胞且随后在第二步中,转染的细胞与来自另一种对流感病毒允许度非常高的细胞系的细胞共同培养进而扩增所述流感病毒的生产。具体地,所述的第一步中的转染细胞是 Vero 细胞,且所述第二步中的其他细胞系是 CEK 或 CEF 细胞系,其是来自于鸡胚胎细胞的细胞系。

[0048] “流感病毒蛋白”指 A 型流感的 PB1、PB2、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2/NEP 蛋

白, B 型流感的 PB1、PB2、PA、HA、NP、NA、NB、M1、BM2、NS1 和 NS2/NEP 蛋白, 或 C 型流感的 PB1、PB2、PA、HEF、NP、M1、M1'、CM2、NS1 和 NS2/NEP。

[0049] “形成核糖核蛋白复合体所需的流感病毒蛋白”意为用于 A、B 或 C 型流感病毒的蛋白 PA、PB1、PB2 和 NP。

[0050] “vRNA”意为流感病毒的负义病毒 RNA, 其被封装入核糖核蛋白复合体内。当流感病毒是 A 或 B 型, 所述 vRNAs 是 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS vRNAs。当流感病毒是 C 型, 所述 vRNAs 是 PB1、PB2、PA、HEF、NP、M 和 NS vRNAs。

[0051] “cRNA”意为与 vRNA 互补的正义 RNA 中间体。一旦在细胞核中, 进入的负义病毒 RNA (vRNA) 通过引物依赖机制被转录成为信使 RNA (mRNA)。这些 mRNA 产物是 vRNA 模板的不完整拷贝且被加帽和聚腺苷酸化, 而非 vRNA。复制经由两步过程发生。首先生成被称为互补 RNA (cRNA) 的全长的 vRNA 正义拷贝, 随后以其作为模板生成更多的 vRNA。

[0052] 重组盒、载体及其用途

[0053] 本发明的目的之一是提供可用于将与负性单链 RNA 病毒的 vRNAs 互补的 cDNAs 克隆入表达载体中的新型重组盒。因此所述重组盒对克隆与 A 型和 B 型流感病毒的 vRNAs 互补的 cDNAs 特别有用。

[0054] 因此本发明涉及重组盒, 其在 5' 至 3' 方向包含如下或由如下组成:

[0055] - 用于第一限制性内切酶的反向互补识别序列, 所述第一限制性内切酶在其识别序列外具有其剪切位点并产生粘性末端;

[0056] - 用于第二限制性内切酶的限制性内切酶位点, 所述第二限制性内切酶在其识别序列内具有其剪切位点;

[0057] - 用于第三限制性内切酶的限制性内切酶位点, 所述第三限制性内切酶在识别序列内具有其剪切位点; 以及

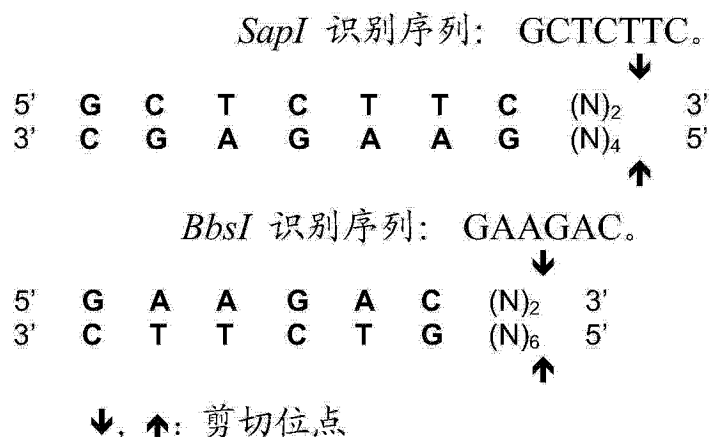
[0058] - 针对所述第一限制性内切酶的识别序列, 所述第一限制性内切酶在其识别序列外具有其剪切位点并产生粘性末端;

[0059] 其中所述第二和第三限制性内切酶不相同。

[0060] “限制性内切酶”指代与识别位点结合且随后在相对于其识别序列固定的位置裂解 DNA 链的核酸内切酶 (II 型限制性内切酶)。所述“识别序列”是在限制性内切酶剪切 DNA 主链之前与之结合的特定核苷酸序列。识别序列通常在长度上为 4 至 8 个碱基对, 且经常为回文序列 - 也就是说, 当他们在 5' - 3' 方向读取时其在反向和正向读取相同, - 且所述识别序列在 DNA 的两条链上经常相同。所述“剪切位点”是限制性内切酶在该处进行剪切的特定核苷酸序列。在一些情况下, 裂解点精确发生在回文限制性内切酶位点的对称轴处, 产生平末端产物。一些限制性核酸酶产生交错切口, 其在每个片段的两端留下短单链尾, 其称作“粘性末端”或“粘末端”。

[0061] 裂解相对于识别序列的位置取决于酶。举例来说, 对于 SapI 或 BbsI 酶 (IIS 型限制性内切酶), 剪切位点在识别序列之外:

[0062]



[0063] 本文所用“限制性内切酶位点”优选地指代由限制性内切酶的识别序列组成的核苷酸序列,且其包含所述酶的剪切位点。

[0064] 在一些实施方案中,所述在其识别序列外具有其剪切位点的第一限制性内切酶可以是 *BbsI*、*SapI*、*AceIII*、*BsaI* 或 *BsmBI*。

[0065] 优选地,所述第一限制性内切酶是 *BbsI* 或 *SapI*。因此,当第一限制性内切酶是 *BbsI* 时,所述反向互补识别序列由序列 5' -GTCTTC-3' 组成,所述 *BbsI* 识别序列由 5' -GAAGAC-3' 序列组成。当所述第一限制性内切酶是 *SapI* 时,所述反向互补识别序列由 5' -GAAGAGC-3' 序列组成,所述 *SapI* 的识别序列由序列 5' -GCTCTTC-3' 组成。

[0066] 为了最小化病毒基因组中存在第二和第三限制性内切酶位点的风险,所述限制性内切酶位点优选地具有长核苷酸序列。在一些实施方案中,所述第二和第三限制性内切酶的限制性内切酶位点是至少,或精确的 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个核苷酸长。优选地,所述第二和第三限制性内切酶的限制性内切酶位点是至少或精确的 7 或 8 个核苷酸长。

[0067] 在一些实施方案中,所述第二和第三限制性内切酶选自下组: *NotI* 和 *SbfI*。仍优选地,所述第二限制性内切酶是 *NotI* 且所述第三限制性内切酶是 *SbfI*。

[0068] 因此,所述第二或第三限制性内切酶的限制性内切酶位点可由序列 5' -GCGGCCGC-3' 或由序列 5' -CCTGCAGG-3' 组成。优选地,第二限制性内切酶的限制性内切酶位点由序列 5' -GCGGCCGC-3' 组成,且所述第三限制性内切酶的限制性内切酶位点由序列 5' -CCTGCAGG-3' 组成。

[0069] 重组盒可在所述第一限制性内切酶的反向和互补的识别序列和第二限制性内切酶的所述限制性内切酶位点之间;和/或在第二限制性内切酶的所述限制性内切酶位点和第三限制性内切酶的所述限制性内切酶位点之间包含额外的核苷酸。在一些实施方案中,所述额外的核苷酸可由至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30 个核苷酸的片段组成。在一些实施方案中,所述额外的核苷酸由至多 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30 个核苷酸的片段组成。

[0070] 因此,所述重组盒为至少,或精确的 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120 个核苷酸长。优选地,所述重组盒为至少,或精确的 28 或 30 个核苷酸长。

[0071] 优选地,所述重组盒由序列 5' -GTCTTCGCGGCCGCCTGCAGGGAAGAC-3' (SEQ ID

NO:2) 组成。

[0072] 应该理解的是所述重组盒是双链核酸,且上文描述的序列与所述核酸的编码链相对应。

[0073] 本发明还涉及载体,其在 5' 至 3' 方向包含:

[0074] - 与 RNA 聚合酶 I 或 T7RNA 聚合酶结合的启动子,

[0075] - 根据本发明的所述重组盒,

[0076] - 终止子序列,

[0077] 应该理解的是:

[0078] - 当所述启动子与 RNA 聚合酶 I 结合时,所述终止子序列为丁肝核酶序列,且

[0079] - 当所述启动子与 T7RNA 聚合酶结合时,所述终止子序列为 T7 聚合酶终止子序列。

[0080] “终止子序列”意为针对转录标记 DNA 上的基因或操纵子结束的序列。所述丁肝核酶序列包含或由 SEQ ID NO:3 序列组成。所述 T7 聚合酶终止子序列包含或由 SEQ ID NO:4 序列组成。

[0081] 在一些实施方案中,所述启动子与啮齿类 RNA 聚合酶 I 或与人 RNA 聚合酶 I 结合。优选地,所述启动子与小鼠或仓鼠 RNA 聚合酶 I 结合。

[0082] 在一些实施方案中,所述与啮齿类 RNA 聚合酶 I 结合的启动子包含或由 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 序列组成。

[0083] 在一些实施方案中,所述与人 RNA 聚合酶 I 结合的启动子包含或由序列 SEQ ID NO:8 组成。

[0084] 优选地,所述载体在 5' 至 3' 方向包含:

[0085] - 与人 RNA 聚合酶 I 结合的启动子,

[0086] - 序列 SEQ ID NO:2 的重组盒,

[0087] - 序列 SEQ ID NO:3 的丁肝核酶序列。

[0088] 更优选地,所述载体包含序列 SEQ ID NO:1。

[0089] 更优选地,所述载体在 5' 至 3' 方向包含:

[0090] - 与啮齿类 RNA 聚合酶 I 结合的启动子

[0091] - 序列 SEQ ID NO:2 的重组盒,

[0092] - 序列 SEQ ID NO:3 的丁肝核酶序列。

[0093] 仍优选地,所述载体在 5' 至 3' 方向包含:

[0094] - 序列 SEQ NO:9 的与 T7 聚合酶结合的启动子,

[0095] - 序列 SEQ ID NO:2 的重组盒,

[0096] - 序列 SEQ ID NO:4 的 T7 聚合酶终止子。

[0097] 在根据本发明的载体中,所述重组盒之前为 RNA 聚合酶 I 或与 T7RNA 聚合酶结合的所述启动子,且终止子序列紧接其后。

[0098] 在一些实施方案中,所述载体也可包含抗生素抗性基因,如卡那霉素抗性基因。相应地,所述载体包含或由序列 SEQ ID NO:10 组成,即,所述载体是所谓的通用 pSP-flu 质粒。

[0099] 在一些实施方案中,根据本发明的所述载体不包含任何抗生素抗性基因,但包含无抗生素选择系统,如描述于 Peubez et al, 2010, Microbial Cell Factories, 9:65 的系

统。

[0100] 根据本发明的所述载体可用于通过反向遗传产生负性单链 RNA 病毒的方法,特别是产生感染性负性单链 RNA 病毒的方法。具体地,所述载体可用于与 vRNA 互补的 cDNA。

[0101] 举例来说,所述负性单链 RNA 病毒可以是沙粒病毒 (Arenaviridae) 科的病毒,如淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 (Lymphocytic choriomeningitis) 病毒;正粘病毒科 (Orthomyxoviridae),如流感病毒,传染性鲑鱼贫血病毒 (Isavirus),以及索戈托病毒 (Thogotovirus);副粘病毒科 (Paramyxoviridae),如麻疹病毒 (Measle virus),腮腺炎病毒 (Mumps virus),呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus),牛瘟病毒 (Rinderpest virus),以及犬瘟热病毒 (Canine distemper virus);布尼亚病毒 (Bunyaviridae) 科,如加利福尼亚脑炎病毒 (California encephalitis virus),以及汉坦病毒 (Hantavirus);弹状病毒 (Rhabdoviridae) 科,如狂犬病毒 (Rabies virus);丝状病毒 (Filoviridae) 科,如埃博拉病毒 (Ebola virus),以及马尔堡病毒 (Marburg virus);博尔纳病毒 (Bornaviridae) 科,如博尔纳病病毒 (Borna disease virus)。

[0102] 优选地,所述负性单链 RNA 病毒可以是重配病毒和/或嵌合病毒。这些病毒可以是减毒病毒,或失活病毒。

[0103] 在特定的优选实施方案中,所述负性单链 RNA 病毒是流感病毒。

[0104] 通过反向遗传产生负性单链 RNA 病毒的方法为本领域的技术人员熟知。举例来说,所述方法是一种方法用于产生如 Schnell et al, 1994, EMBO J, 13(18):4195-4203 中描述的 VSV 病毒;如 Schnell et al, 1994, EMBO J, 13(18):4195-4203 中描述的狂犬病病毒;如 Radecke et al, 1995, EMBO J, 14(23):5773-5784 中描述的麻疹病毒;如 Garcin et al, 1995, EMBO J, 14(24):6087-6094 中描述的仙台病毒 (Sendai virus);如 Hoffman and Banerjee, 1997, J Virol, 71(6):4272-4277 以及 Durbin et al, 1997, Virology, 235(2):323-332 中描述的副流感 3 型病毒 (Parainfluenza type 3);如 He et al, 1997, Virology, 237(2):249-260 中描述的 SV5 病毒;如 Baron and Barrett, 1997, J Virol, 71(2):1265-1271 中描述的牛瘟病毒 (Rinderpest virus);如 Jin et al, 1998, Virology, 251(1):206-014 中描述的 RSV 病毒;如 Peeters et al, 1999, J Virol, 73(6):5001-5009 中描述的新城病毒 (Newcastle virus);如 Neumann et al, 2002, J Virol, 76(1):406-410 中描述的埃博拉病毒;如 Kawano et al, 2001, Virology, 284(1):99-112 中描述的副流感 2 型病毒;如 Herfst et al, 2004, J Virol, 78(15):8264-8270 中描述的 Metapneumovirus;如 Bridgen and Elliott, 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93(26):15400-15404 中描述的布尼亚韦拉病毒 (Bunyamwera virus)。

[0105] 优选地,所述通过反向遗传用于产生负性单链 RNA 病毒的方法是如上文所述用于产生流感病毒的方法。更优选地,所述产生流感病毒的方法可以是描述于 Neuman et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350、US 2009/0246830、US 2011/0143424、Hoffmann et al, 2002, Vaccine, 20(25-26):3165-3170、WO 01/83794、Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682、US 2004/0142003、US 2012/0058538、De Wit et al, 2007, Journal of General Virology, 88:1281-1287 中的方法,或是根据本发明的方法。仍优选地,所述载体用于根据本发明的方法。

[0106] 根据本发明的载体可以在将与 vRNAs 病毒互补的 cDNAs 克隆入一种或多种所述载

体后用于所述方法。

[0107] 克隆策略

[0108] 在本发明的背景下,克隆策略包括在根据本发明的载体和将要克隆的 cDNA 序列之间的同源重组。

[0109] 因此,本发明进一步提供了克隆与 RNA 病毒的 vRNA 互补的 cDNA 的方法,其包括如下步骤:

[0110] (i) 使用包含来自根据本发明载体的启动子序列的核苷酸的正向引物,和包含来自本发明载体的终止子的核苷酸序列的反向引物,通过对病毒的病毒 RNA 进行 RT-PCR(反转录-聚合酶链式反应)产生与 RNA 病毒的 vRNA 互补的 cDNA;

[0111] (ii) 使用重组盒的第一限制性内切酶将根据本发明的载体线性化;

[0112] (iii) 将在步骤 (i) 获得的 cDNA 与用在步骤 (ii) 获得的线性化的载体在使得所述 cDNA 与所述载体之间得以发生同源重组的条件下接触。

[0113] 在步骤 (i),可通过本领域的技术人员熟知的方法实施反转录。优选地,按照实施例 1.8 段的描述实施反转录。

[0114] 在一些实施方案中,所述反向引物在其 5' 侧包含来自根据本发明载体的终止子序列的至少 17 个核苷酸。优选地,所述反向引物在其 5' 侧包含来自丁肝核酶序列的至少 17 个核苷酸。更优选地,反向引物在其 5' 侧包含序列 5'-CTGGGACCATGCCGCC-3'(SEQ ID NO:11)。所述反向引物进一步在来自终止序列的核苷酸的 3' 包含与将被反转录的 vRNA 互补的核苷酸。

[0115] 在一些实施方案中,所述正向引物在其 5' 侧包含来自根据本发明载体的启动子序列的至少 17 个核苷酸。优选地,所述正向引物在其 5' 侧包含来自与人 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的至少 17 个核苷酸。仍然优选地,所述正向引物在其 5' 侧包含序列 5'-TGGGCCGCCGGTTATT-3'(SEQ ID NO:12)。所述正向引物进一步在来自启动子序列的核苷酸的 3' 包含与将被反转录的 vRNA 互补的核苷酸。

[0116] 步骤 (ii) 可通过本领域的技术人员熟知的方法实施。优选地,按照实施例 1.8 段的描述实施步骤 (ii)。

[0117] 步骤 (iii) 可通过本领域的技术人员熟知的方法实施。优选地,按照实施例 1.8 段的描述实施步骤 (iii)。

[0118] 由于在步骤 (ii) 的所述正向和反向引物的使用,获得的 cDNA 在 5' 至 3' 方向包含来自与人聚合酶 I 结合的启动子的核苷酸序列,编码病毒的 vRNA 的 cDNA 以及来自丁肝核酶序列的核苷酸序列。因此,在步骤 (iii),在步骤 (i) 获得的 cDNA 以反义被克隆入根据本发明的载体中。

[0119] 在一些实施方案中,所述克隆策略进一步包括步骤 (iv),其由去除不含在步骤 (i) 获得的 cDNA 的载体组成。步骤 (iv) 可通过用描述于“重组盒、载体和用途”一段中的第二和第三限制性内切酶,例如,如果重组盒包含 NotI 和 SbfI 限制性内切酶位点,通过使用 NotI 和 SbfI 酶,在合适的条件下消化已在步骤 (iii) 与获得的 cDNA 接触的载体来实施。所述合适的条件为本领域的技术人员熟知。

[0120] 由于根据本发明的载体的特征,可实施该克隆策略来插入与来自 A 型以及 B 型流感病毒的 vRNA 互补的 cDNA。根据本发明的载体,由于其使得与来自 A 型和 B 型流感病毒的

vRNA 互补的 cDNA 得以克隆, 因此其代表相比本现有技术改进的工具。

[0121] 产生传染性流感病毒的方法

[0122] 为维持流感疫苗的高剂量生产, 细胞必须在其表面表达 Sia2-6Gal 或 Sia2-3Gal 受体。虽然 CHO-K1 细胞不表达 Sia2-6Gal 受体且仅表达很少的 Sia2-3Gal 受体 (在 30% 的细胞中表达), 但意外发现的是 CHO 细胞系的亚克隆 CHO-K1 细胞系是产生流感病毒非常有效的细胞系, 其已通过分子生物学, 特别是通过反向遗传的方法以合适的表达载体集的方式生成。

[0123] 相应的, 本发明涉及产生传染性流感病毒的方法, 根据该方法病毒的增殖 (扩增) 通过用传染性流感病毒种子来感染 CHO 细胞取得, 所述传染性流感病毒种子用反向遗传使用能够生成传染性流感病毒的表达载体集获得, 且用于产生传染性流感病毒的方法因此包括初级步骤, 根据该步骤用所述表达载体集转染细胞。转染的含有细胞的培养基上清成为有传染性的, 将其收获且用作传染种子来感染 CHO 细胞的分离种群。可替换地, 转染步骤后, CHO 细胞可在原位添加至转染细胞来使得流感病毒得以增殖。

[0124] 本发明的主题因此是用于产生传染性流感病毒的方法 (“反向遗传方法”), 其中所述方法包含的步骤包含或由以下组成:

[0125] a) 用表达载体集转染细胞来生成传染性流感病毒种子,

[0126] b) 用所述传染性流感病毒种子感染 CHO 细胞。

[0127] 在根据本发明的方法中, 传染性流感病毒种子通过用能够生成所述感染性病毒的表达载体集转染细胞获得。

[0128] 通常, 感染 CHO 细胞的步骤 b) 通过将 CHO 细胞添加至用能够生成所述感染性病毒的表达载体集转染的细胞 (所述 “转染细胞”) 实施, 从而使得已生成的感染性病毒增殖。感染 CHO 细胞的步骤 b) 也可通过将步骤 a) 生成的传染性流感病毒种子添加至 CHO 细胞实施。

[0129] 已经知晓的是在本领域的技术人员熟知的使得传染性流感病毒增殖的培养基条件下, 进行用所述传染性流感病毒种子对 CHO 细胞的感染。传染性流感病毒的增殖可进一步通过 CHO 细胞种群或任何其他允许度高的细胞种群的逐次感染, 或通过感染鸡含胚卵的尿囊腔扩增。

[0130] 传染性流感病毒的产生通过用所述传染性流感病毒的种子在本领域的技术人员熟知的条件下活体外 (ex vivo) 或体外感染 CHO 细胞取得。举例来说, 所述感染可在 32 和 38°C 之间的温度实施, 或更通常在 34°C 和 37°C 之间实施, 且伴随 5% 至 10% CO₂。对于具体的实例, 所述感染可在约 35°C 伴随约 8% CO₂ 实施。通常, 将胰蛋白酶或具有丝氨酸蛋白酶活性的酶添加入培养基使得病毒在细胞中复制并确保流感病毒通过 CHO 细胞传播。

[0131] 在特定的优选地实施方案中, 用所述传染性流感病毒种子对 CHO 细胞的感染在无血清培养基的感染培养基中实施。优选地, 所述用于产生传染性流感病毒的方法在完全不存在血清下实施。

[0132] 优选地, 根据本发明的所述方法在不存在辅助病毒下实施, 也就是说使用合适的表达载体集本身就足以通过反向遗传使得传染性流感病毒生成。

[0133] 根据使用的表达载体的结构特征, 用于转染步骤的细胞或细胞系可包含或由 CHO 细胞系、CHO 细胞系与另一细胞系的混合物、或非 CHO 细胞系的细胞系组成。

[0134] 当根据本发明的所述方法通过反向遗传使用包含用于产生 vRNA 的质粒的表达载体集在与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的控制下实施时,优选地用于转染的细胞是灵长类来源的细胞或优选地灵长类来源的细胞和 CHO 细胞的混合物。灵长类来源的细胞可以是,举例来说 PER.C6® 细胞 (CruCell), 293T 细胞或 Vero 细胞。通常,用于转染的细胞是 Vero 细胞或优选地为 Vero 细胞和 CHO 细胞的混合物。

[0135] 以相同的方式,当用于产生 vRNA 的质粒包含与犬科动物或鸟类 RNA 聚合酶 I 结合的启动子时 (Massin et al, 2005, J Virol, 79(21):13811-13816; Murakami et al, 2008, 82(3):1605-1609), 优选地用于转染的细胞分别为犬科来源的细胞,如 MDCK 细胞 (或优选地为犬科来源的细胞和 CHO 细胞的混合物) 或鸡细胞,如 CEF 细胞或 CEP 细胞 (或优选地为鸡来源的细胞和 CHO 细胞的混合物)。

[0136] 最后,当用于产生 vRNA 的质粒包含与啮齿类 RNA 聚合酶 I 如仓鼠或小鼠 RNA 聚合酶 I 结合的启动子时,转染步骤可仅使用 CHO 细胞实施。在这种情况下,CHO 细胞是唯一用于转染和感染两个步骤的细胞类型。因此,从合适的表达载体集产生传染性流感病毒可仅包括 CHO 细胞的使用,其简化了流感病毒的产生过程。仅需要培养一种细胞系。

[0137] 可替换地,当合适的表达载体集包含用于产生 vRNA 的在 T7 聚合酶启动子控制下的质粒以及编码 T7 聚合酶的额外蛋白表达质粒 (如 De Wit et al, 2007, J. Gen. Virol, 88(Pt4):1284-1287 所述) 时,CHO 细胞也可以是唯一的用于转染和感染两个步骤并确保传染性流感病毒产生的细胞类型。

[0138] 在一些实施方案中,用于转染的细胞 (例如, CHO 细胞或 Vero 细胞和 CHO 细胞的混合物) 可以是稳定表达流感 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白质的重组细胞,且即将并入所述重组细胞的载体集是能够表达 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 的表达载体集。

[0139] 因此在一些实施方案中,在步骤 a) 的所述细胞包括或由 Vero 细胞或 Vero 细胞和 CHO 细胞的混合物组成。

[0140] 在一些实施方案中,在步骤 a) 的所述细胞也包括或由 CHO 细胞组成。

[0141] 用于根据本发明的细胞系是 CHO 细胞系。CHO 细胞系广泛用于工业蛋白生产且本领域的技术人员熟知许多 CHO 细胞系。举例来说,这些 CHO 细胞系包括,例如,可在 ATCC 目录获得的在编号 CCL-61 或 CCL-9618 下的 CHO-K1 细胞系、CHO DP-12 细胞系 (ATCC 编号:CRL-12444 和 12445) 以及 CHO 1-15 细胞系 (ATCC 编号 CRL-9606)。根据实施方案,用于本发明目的的细胞系是不在其表面表达 Sia2-6Gal 受体但弱表达 Sia 2-3Gal 受体的 CHO 细胞系,因此少于 50% 的细胞种群在地高辛标记的怀槐凝集素存在下发荧光。优选地用于本发明目的的细胞系是 CHO-K1 细胞系,特别是参考 ATCC 在编号 CCL-61 下的细胞系。仍优选 CHO-K1 细胞系,举例来说参考 ATCC 在编号 CCL-61 下的 CHO-K1 细胞系,其是以细胞悬浮液的形式。举例来说,这种细胞悬浮液可通过在无血清的培养基中通过细胞系的培养获得。

[0142] 当灵长类细胞系与 CHO 细胞系结合用于实施根据本发明的方法时,由于很久之前已被监管部门许可,优选可由 ATCC 目录获得的在编号 CCL-81、CRL-1586、CRL-1587 或 CCL-81.5 下的 Vero 细胞系。优选的 293-T 细胞系包括可由 ATCC 目录获得在编号 CRL-11268 下的细胞系。

[0143] CHO 和转染的细胞,特别是 Vero 细胞,优选地按照 GLP (Good Laboratory Practices) /GMP (Good Manufacturing practices) 的规定或全国监管机构的要求培养。举

例来说,所述细胞可通过历史记录,即细胞来源的信息、其开发方法、用于生产在体外培养的年龄限制来进行鉴定。所述细胞还可以是无可培养的细菌、支原体、真菌、内源病毒。关于针对细胞培养的考量和用于支持细胞培养用于疫苗生产的材料的指导可在以下找到:生物标准化,第 47 报告,对于使用动物细胞在体外基板生产生物制品的要求(WHO technical report series, 1998, 878:19 - 52)、用于针对传染病适应症的病毒疫苗的细胞底物和其它生物材料的表征和授权(针对生物制品评价和研究的美国健康和人类服务部门,食品和药品管理中心[2010,02])、欧洲药典,第 5 版,第 5.2.3 段,或由欧洲药物机构出版的生物技术产品指导记录:用于生产生物技术/生物学产品的细胞底物的来源和表征(cmp/ich/294/95)。

[0144] CHO 和转染的细胞,特别是 Vero 细胞,优选地适于在无血清培养基和/或无动物组分的条件中培养。

[0145] 本领域的技术人员可轻易通过在包含减少的血清量的培养基上逐步传代细胞直至细胞可成功存活并在无血清培养基中增殖来实现细胞对在无血清培养基中培养的适应。

[0146] 当 Vero 细胞或 Vero 细胞和 CHO 细胞的混合物用于转染时,粘附的 Vero 细胞优选地从其支持上脱离,举例来说通过在转染前用胰蛋白酶处理来改进转染的效力。相应地,转染优选地在细胞的悬浮液上实施。然而细胞可在所述方法的过程中形成粘附。可替换地,也可使用如 US 2009/0203112 中描述的适于在悬浮液中生长的 Vero 细胞系,该主题在本文通过提述并入。

[0147] 在根据本发明的方法的框架中,转染可通过任何本领域的技术人员已知的方法实施。举例来说,转染可通过膜电穿孔、核电穿孔实施。优选地,转染(步骤 a)通过核电穿孔实施。表述“核电穿孔”理解为意思是通过一种或多种强度能够足以增加核孔数目和/或其渗透性的电击的方式转染核酸的方法。通常,电击的总强度至少为 2kV/cm 且电击的总持续时间是至少 10 μ s。在悬浮液中的核电穿孔通过一种或多种总强度至少为 2kV/cm 且总电击时间为至少 10 μ s 的电击的方式实施。优选地,电击的总强度在 2 和 10kV/cm 之间且总电击时间在 10 和 1000 μ s 之间。仍更优选地,电击的强度在 2 和 6kV/cm 之间且总电击时间在 100 和 600 μ s 之间。优选地,将通过一个或多个休眠期中断的多次电击递送至细胞。通过提述其主题并入本文的 US 2007/0059834 描述了将电击施用至细胞随后为休眠期的实用模式。电击后,也可能将强度不超过 2.5A 的电流应用于细胞且持续 1 和 50ms 之间的时期。通常,转染步骤如实施例 1.9. 段详细描述实施,即,转染使用 nucleofector 实施,如由 Lonza 销售的使用 U-023 程序的 nucleofector。

[0148] 对转染溶液进行选择进而其针对点击为细胞提供,且进而不阻止表达载体向核的扩散。主题通过提述并入本文的 US 2005/0064596 描述了优化的转染溶液。它们是当处于 25°C 的温度且处于 1 至 8 的 pH 变化范围之内时缓冲能力为至少 20mM pH^{-1} 且具有至少 200mM 离子强度的配方。优选地,Na⁺和 K⁺在这些配方中的摩尔浓度分别为 100 和 150mM 之间以及 2 和 6mM 之间。它们通常还包含 Mg⁺⁺离子。通过实施例的方式给出了本发明的背景中使用的转染培养基:

[0149] - 转染溶液 1 号:4-6mM KCl, 10-20mM MgCl₂, 120-160mM 和 Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.2);

[0150] - 转染溶液 2 号:4-6mM KCl, 10-20mM MgCl₂, 5-25mM HEPES, 120-160mM 和 Na₂HPO₄/

NaH_2PO_4 (pH 7.2) ;

[0151] - 转染溶液 3 号 :4-6mM KCl , 10-20mM MgCl_2 , 50-160mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2) 和 5-100mM 乳糖酸钠或 5-100mM 甘露醇或 5-100mM 琥珀酸钠或 5-100mM NaCl ;

[0152] - 转染溶液 4 号 :4-6mM KCl , 10-20mM MgCl_2 , 5-25mM HEPES, 50-160mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2) 和 5-100mM 乳糖酸钠或 5-100mM 甘露醇或 5-100mM 琥珀酸钠或 5-100mM NaCl ;

[0153] - 转染溶液 5 号 :4-6mM KCl , 10-20mM MgCl_2 , 80-100mM NaCl , 8-12mM 葡萄糖, 0.3-0.5mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 20-25mM HEPES 和 50-100mM tris/HCl 或 30-50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.2) ;

[0154] - 转染溶液 6 号 :0.1-3.0mM MgCl_2 , 50-200mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.5) 和 / 或 1-50mM mannitol 和 / 或 1-50mM 琥珀酸钠 ; 和

[0155] - 转染溶液 7 号 :0.42mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 5.36mM KCl ; 0.41mM MgSO_4 ; 103mM NaCl ; 23.8mM NaHCO_3 ; 5.64mM Na_2HPO_4 ; 11.1mM d(+)-葡萄糖 ; 3.25 μM 谷胱甘肽 ; 20mM HEPES ; pH 7.3 ;

[0156] - 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 。

[0157] 仍优选地电穿孔溶液是由 Lonza 提供的在称为 Amaxa™ Cell line Nucleofector Kit V-VCA-1003 试剂盒中的溶液 V。

[0158] 转染步骤之后, 将培养基以至少 5 培养基体积对 1 转染溶液的比例添加至转染细胞, 优选地 10 体积、更优选地 15 体积培养基对 1 体积转染溶液。优选地培养基是适合于培养 CHO 细胞的培养基。当在转染步骤中使用 Vero 细胞时, 可使用适合用于 CHO 细胞和 Vero 细胞的培养基, 或适用于 CHO 细胞的培养基和适用于 Vero 细胞的培养基的混合物。

[0159] 具体地, 转染如实施例第 1.9 段的描述实施。

[0160] 在感染步骤中使用的培养基 (感染培养基) 可以是适合于培养 CHO 细胞的任何培养基。即使传染性流感病毒在无胰蛋白酶的感染培养基中的细胞内能增殖到一定程度, 非常优选的是其包含或对其添加胰蛋白酶或具有丝氨酸蛋白酶活性的酶来使得病毒在细胞中复制并确保流感病毒通过其他 CHO 细胞增殖。事实上, 必须通过针对病毒的丝氨酸蛋白酶裂解流感病毒的血凝素来使其能够在细胞中复制。优选地, 胰蛋白酶是合成来源或不含任何动物来源的产品。胰蛋白酶或更通常的任何具有丝氨酸蛋白酶活性的酶如可通过基因重组产生的链霉菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、纤维蛋白溶酶或嗜热菌蛋白酶。胰蛋白酶可以具体通过转基因植物 (WO 00/05384)、酵母或细菌的方式产生 (WO 01/55429)。举例来说, 由 Gibco 提供的商品名为 TrypLE Select 或 Invitrogen 的商品名为 TrypLE Express 的重组胰蛋白酶适用于本发明的目的。

[0161] 优选地, 用于本发明背景的包括不含动物来源的血清的培养培养基和感染培养基的培养基优选地无任何动物来源的蛋白质且更优选地无任何动物来源的组分。无动物来源的血清和 / 或无动物来源的原材料适用于本发明的主题的培养基的实例为市场上名为 VP SFM (Invitrogen)、Episerf (Invitrogen)、LC17 (Cambrex)、Pro CHO 5-CDM (Cambrex)、HyQ SFM4CHO (Hyclone)、HyQ SFM4CHO-Utility (Hyclone)、HyQ PF Vero (Hyclone)、Ex cell 325PF CHO Protein free medium (JRH Biosciences)、Ex cell 302serum free medium (JRH Biosciences)、Excell 525、Ex Cell™ CD CHO Fusion (SAFC Biosciences) 的培养基。因

此可使用非动物培养基（例如，无任何动物来源的污染或组分）来实施根据本发明的方法。特别适用于本发明的主题的是由SAFC Biosciences生产的添加了L-谷氨酰胺的Ex CellTM CD CHO Fusion培养基。为通过CHO细胞感染产生传染性流感病毒，向该培养基中添加胰蛋白酶或胰蛋白酶衍生物，优选地不含任何动物来源成分。

[0162] 在一些实施方案中，用于转染的细胞总量为举例来说0.5、1、1.5、2、2.5、3、6或甚至10百万个细胞，或更多。

[0163] 在另一实施方案中，当用于转染的细胞是Vero细胞和CHO细胞的混合物时，Vero细胞和CHO细胞可以Vero:CHO比例为0.5:1至2:1存在，举例来说为1:1、1.5:1、1:0.5或1:1.5。通常，所述Vero:CHO细胞比为1:1，每种类型细胞的量，举例来说，呈现至少0.5、1、1.5、2、2.5、3百万个细胞。

[0164] 在一些实施方案中，在转染步骤后添加的用于实施感染步骤的CHO细胞的量为，举例来说，至少0.5、1、1.5、2、2.5、3百万个细胞。

[0165] 在本发明的方法的一些实施方案中，所述表达载体包括使得一种或多种流感蛋白和一种或多种流感vRNAs均得以表达的表达载体，应当理解的是所述表达载体集的表达使得(i)包含所述病毒的vRNAs的核糖核蛋白复合体(RNP)得以形成，以及(ii)所述蛋白颗粒在所述转染细胞中得以装配。任选地，可添加辅助病毒至所述表达载体集。

[0166] 这种载体为，举例来说促进mRNAs和vRNAs二者表达的双向质粒，每种质粒包含：

[0167] - 一种或多种cDNAs，其与选自流感PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA和NA vRNAs的八种vRNAs中的一种或多种或相应的cRNA互补，其中每种cDNA受到如下控制：

[0168] - 与RNA聚合酶II(POL II启动子)结合的启动子，由此使相应的流感蛋白得以表达，以及

[0169] - 与RNA聚合酶I(POL I启动子)结合的启动子，由此使得相应的vRNA，或所述相应的cRNAs得以表达。

[0170] 在一些实施方案中，与RNA聚合酶II结合的启动子是与人类RNA聚合酶II结合的启动子，和/或所述与RNA聚合酶I结合的启动子是与人类RNA聚合酶I结合的启动子。

[0171] 优选地，如果将表达载体集转入CHO细胞，与RNA聚合酶I结合的启动子是与啮齿类RNA聚合酶I结合的启动子。与啮齿类RNA聚合酶I的启动子优选地与仓鼠或小鼠RNA聚合酶I结合。

[0172] 在一些实施方案中，使得mRNAs和vRNAs二者或相应的cRNAs得以表达的表达载体集包括一、二、三、四、五、六、七、八种如上文定义的双向质粒。优选地，所述表达载体由八种双向质粒组成，每种质粒包含与选自流感PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA和NA的vRNAs的八种vRNAs中的一种或相应的cRNA(s)互补的cDNA。优选地，所述表达载体由描述于Ozawa et al, 2007, J Virol, 81(17):9556-9559中的八种质粒组成。

[0173] 表达载体集也可包含：

[0174] - 使得仅一种或多种编码一种或多种流感蛋白的mRNAs表达的表达载体，以及

[0175] - 使得仅一种或多种流感vRNAs或流感病毒的相应cRNAs表达的表达载体。

[0176] 应该理解的是所述表达载体集的表达使得(i)包含所述病毒的vRNAs的核糖核蛋白复合体(RNP)得以形成，以及(ii)所述蛋白颗粒在所述转染细胞中的装配。

[0177] 仅诱导流感蛋白的载体将至少诱导PB1、PB2、PA和NP蛋白质的表达，但也可诱导

其他流感蛋白 (M、NS、HA 和 A 蛋白) 的表达。优选地,所述表达载药是单向质粒,每种质粒包含一种或多种诱导选自 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白中的一种或多种蛋白表达的 cDNA,其中每种 cDNA 受到与 RNA 聚合酶 II 结合的启动子的控制。相应地,所述表达载体可包含描述于 Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682 的质粒,或 pVAX1 质粒,每种质粒如实施例 1.8 段所述用与 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白质相对应的 cDNA 进行克隆。可替换地,表达载体集包含八种不同的质粒,每种质粒包含一种与编码 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA 蛋白质中的一种明确 (one distinct) 的病毒蛋白的 mRNA 互补的 cDNA,受到与 RNA 聚合酶 II 结合的启动子的控制。相应地,所述表达载体可包含如 Neumann et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350 中描述的八种质粒。

[0178] 使得一种或多种流感 vRNAs 或相应的 cRNAs 得以表达的载体将诱导流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 或相应的 cRNAs 的表达。优选地,所述表达载体是单向质粒,每种质粒包含与一种或多种所述流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 或相应的 cRNAs 互补的一种或多种 cDNAs,每种 cDNA 受到与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的控制。所述表达载体可包含至少一、二、三、四、五、六、七或八种质粒。仍优选地,所述使得流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 或相应的 cRNAs 得以表达的载体包含八种不同质粒,每种质粒包含一种与八种 vRNAs PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA 中的一种互补的 cRNAs,受到 RNA 聚合酶 I 的控制。相应地,所述表达载体集包含描述于 Neumann et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(16):9345-9350 or in Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682 的八种质粒。在另一实施方案中,所述使得流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 或相应的 cRNAs 得以表达的载体集由一种质粒代表,所述质粒包含与 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 互补的、每一种都受到 RNA 聚合酶 I 启动子和聚合酶终止子控制 (如 Neumann et al, 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102(46):16825-16829 所述) 的 8 种 cDNAs。在另一实施方案中,所述使得流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs,或相应的 cRNAs 得以表达的载体集包含,举例来说两种不同质粒,一种质粒包含六种 cDNA,每种所述 cDNA 与 PB1, PB2, PA, NP, M 和 NS vRNAs 的每一种互补并受到 RNA 聚合酶 I 的控制,而一种质粒包含两种 cDNAs,每种所述 cDNAs 与 HA 和 NA vRNAs 中的每一种互补,且每种所述 cDNAs 受到与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的控制。包含与八种 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 中的一种,或相应的 cRNAs 互补且受到与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的控制的一种 cDNA 的质粒,优选地通过将所述 cDNA 克隆入包含序列 SEQ ID NO:2 的载体获得。仍优选地,所述每种质粒通过将所述 cDNA 克隆入包含或由序列 SEQ ID NO:10 的载体获得,即克隆入通用 pSP-flu 质粒。

[0179] 在特定的优选的实施方案中,表达载体集包括:

[0180] - 四种不同的质粒,每种质粒包含一种与编码四种病毒 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白之一的 mRNA 互补且受到与聚合酶 II 结合的启动子控制的 cDNA,如描述于 Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682 的质粒,或如实施例 1.8 段描述的用编码 PB2、PB1、PA 和 NP 的 cDNAs 克隆的 pVAX1 质粒,以及

[0181] - 八种不同的质粒,每种质粒包含一种与八种 PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA 和 NA vRNAs 之一或相应的 cRNAs 互补的、受到与 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的控制的一种 cDNA,所述每种质粒通过将所述 cDNA 克隆入根据本发明的载体获得,如同通用 pSP-flu 载体。

[0182] 优选地,能够表达流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 的载体是根据本发明的在其中分别克隆了 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA cDNAs 的载体。

[0183] 能够表达流感 PB1、PB2、PA 和 NP 的载体则可以是,举例来说 pVAX1 质粒 (Life technology, Cergy Pontoise, FR)。

[0184] 在另一实施方案中,所述根据本发明的方法产生的传染性流感病毒可以是野生型流感病毒,如季节性或大流行性流感病毒、重配流感病毒、嵌合流感病毒或甚至是减毒流感病毒。

[0185] 优选地,所述根据本发明的方法产生的传染性流感病毒是重配流感病毒。

[0186] 仍优选地,所述传染性流感病毒是重配嵌合流感病毒。

[0187] 产生的传染性流感病毒可以是 A 株、B 株或 C 株的任何亚型。其可以是感染人的病毒株,如 A/H1N1、A/H3N2、A/H5N1、A/H7N1 或 B 株。其可以是感染鸟类的病毒株,如 A/H5N1、A/H5N2、A/H5N8、A/H5N9、A/H7N1、A/H7N3、A/H7N7 株。其也可以是感染马 (A/H3N8 株)、猪 (A/H1N1 ;A/H3N2 或 A/H1N2 株) 的病毒株等。

[0188] 产生的传染性流感病毒可以是导致人季节性流感的病毒。具体地,所述根据本发明产生的流感病毒可以是 A/H1N1、A/H3N2 株或 B 株。也可以是导致鸟类流感的病毒。

[0189] 根据本发明产生的传染性流感病毒可导致大流行性流感。具体地,所述产生的流感病毒可以是举例来说 A/H1N1、A/H5N1 或 A/H7N1 株。

[0190] 优选地,所述传染性流感病毒是重配传染性流感病毒,即,它们包括来源于至少两种供体病毒的遗传材料。

[0191] 用于制造 A 型流感疫苗的 A 型重配病毒的实例是 6:2 或 5:3 型,其中 6 或 5 个 vRNAs 分别来自在生产底物上具有良好生长能力的供体病毒,如 A/PR/8/34 (H1N1),同时缺失的 vRNA(s) 是 HA、NA 片段且可能是来自季节性或流行性病毒的 PB1。当所述重配株是 6:2 型的 H1N1 病毒时,其可包含来自 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒的 6 种 vRNAs (PB1、PB2、PA、NP、M、NS) 以及来自季节性或大流行性病毒的 HA 和 NA vRNAs。

[0192] 具体地,在 A 型重配病毒为 6:2 型的情况下,6 个 vRNAs 片段可来自 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒且可包含或由序列 SEQ ID NO:13 的 PA vRNA、序列 SEQ ID NO:14 的 PB1vRNA、序列 SEQ ID NO:15 的 PB2vRNA、序列 SEQ ID NO:16 的 NP vRNA、序列 SEQ ID NO:17 的 M vRNA、序列 SEQ ID NO:18 的 NS vRNA 组成。

[0193] 用于制造 B 型流感疫苗的 B 型重配病毒是,举例来说 2:2:4 型 (由 New York Medical College 提供),其中 PB2 和 NP vRNAs 来自 B/Lee/40 病毒,PA 和 NS vRNA 来自 B/Panama/45/90 病毒且 HA、NA、PB1 和 M vRNAs 来自称为 B/Hubei-Wujiagang/158/209 的季节性 B 病毒。

[0194] 产生的传染性流感病毒还可以是嵌合流感病毒,特别是嵌合重配流感病毒以及更具体地,所述嵌合流感病毒包含嵌合流感 HA 和 / 或 NA vRNAs。

[0195] 在一些实施方案中,所述 HA 或 NA vRNA 是嵌合型。

[0196] 优选地,所述嵌合流感 HA 或 NA vRNAs 编码嵌合 HA 或 NA 蛋白。其包含来自供体病毒 (如 A/PR8/34 (H1N1) 或 B/Lee/40) 的 HA vRNA 或 NA vRNA 片段的一个或多个结构域以及来自季节性或大流行性流感病毒的 HA 或 NA vRNA 的一个或多个结构域。具体地,所述季节性或大流行性病毒的 HA vRNA 的结构域与编码 HA 抗原胞外域,如 HA1 和 / 或 HA2 的

mRNA 互补,或所述季节性或大流行性病毒的 NA vRNA 的结构域与编码所述季节性或大流行性病毒的 NA 抗原胞外域 mRNA 互补。

[0197] 举例来说,所述嵌合 HA vRNA 包含来自供体病毒的两个 NCR(非编码区)结构域、SP(信号肽)结构域、HA2 结构域、TM(跨膜)结构域以及 Cyto(细胞质)结构域,同时 HA1 结构域来自季节性流感病毒或大流行性流感病毒。

[0198] 优选地,在 A 型流感病毒的情况下,嵌合 HA vRNA 包含来自供体 A/PR/8/34(H1N1)病毒的两个 NCRs、SP、HA2、TM 和 Cyto 结构域,以及来自季节性或流行性 A 型流感病毒的 HA1 结构域。

[0199] 仍优选地,在 A 型流感病毒的情况下,嵌合 HA vRNAs 包含来自 A/PR/8/34(H1N1)供体病毒的分别为序列 SEQ ID NO:19、20、21、22、23 和 24 的两个 NCRs、SP、HA2、TM 和 Cyto 结构域,以及来自季节性或大流行性 A 型流感病毒的 HA1 结构域。

[0200] 优选地,在 B 型流感病毒的情况下,嵌合 HA vRNA 包含来自供体病毒如 A/PR/8/34(H1N1)或 B/Lee/40 的结构域 NCRs、SP、HA2、TM、Cyto,以及来自季节性 B 型流感病毒的 HA1 结构域。

[0201] 在嵌合 NA vRNA 的情况下,其包含来自供体病毒的 NCRs、TM、Cyto 和茎部结构域,同时称为胞外域的结构域来自季节性或大流行性流感病毒。优选地,在 A 型流感病毒的情况下,嵌合 NA vRNA 包含来自 A/PR/8/34(H1N1)供体病毒的 NCRs、TM、Cyto 和茎部结构域以及来自季节性或大流行性流感病毒的胞外域。仍优选地,在 A 型流感病毒的情况下,嵌合 NA vRNA 包含来自 A/PR/8/34(H1N1)供体病毒的分别为序列 SEQ ID NO:25、26、27、28 和 29 的 NCRs、TM、茎部和 Cyto 结构域和来自季节性和流行性病毒的胞外域。优选地,在 B 型流感病毒的情况下,嵌合 NA vRNA 包含来自供体病毒如 A/PR/8/34(H1N1)或 B/Lee/40 的 NCRs、TM、茎部和 Cyto 结构域,以及来自季节性 B 型病毒的胞外域。

[0202] 宿主细胞

[0203] 本发明还涉及如上文定义的包含表达载体集的 CHO 细胞。

[0204] 所述 CHO 细胞和传染性流感病毒如上文所述。

[0205] 因此具体的所述 CHO 细胞是如上文所述的 CHO-K1 细胞。

[0206] 在特定的实施方案中,所述表达载体集包括:

[0207] (i) 能够表达流感 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白,且包含四种不同质粒的表达载体,每种质粒包含一种 cDNA,其与编码选自 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白中的一种病毒蛋白的 mRNA 互补且受到与 RNA 聚合酶 II 结合的启动子的控制,以及

[0208] (ii) 能够表达流感 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs,或相应的 cRNAs 且包含八种不同质粒的表达载体,每种质粒包含一种 cDNA,其与选自 8 种 PB1、PB2、PA、NP、M、NS、HA 和 NA vRNAs 或相应的 cRNAs 的一种互补,受到与啮齿类 RNA 聚合酶 I 结合的启动子的控制,且通过将所述 cDNA 序列克隆入根据本发明的载体获得,应该理解的是所述载体包含与啮齿类 RNA 聚合酶 I 结合的启动子。

[0209] 所述能够表达流感 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白的表达载体可包括描述于 Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682 的质粒,或 pVAX1 质粒,每种质粒包含描述于实施例 1.8 段的与编码一种选自 PB2、PB1、PA 和 NP 的病毒蛋白质的 mRNA 互补的 cDNA。

[0210] 优选地,根据本发明的所述载体包含与仓鼠 RNA 聚合酶 I 结合的启动子。可替换

地,包含与 vRNAs 互补的 cDNAs 的八种质粒的启动子是 T7 聚合酶启动子。在这种情况下,表达载体集包含额外的质粒(总数为 13),其含有与编码 T7 聚合酶的 mRNA 互补的 cDNA,如 De Wit et al, 2007, J. Gen. Virol, 88 (Pt4):1284-1287 所述。

[0211] 本发明还涉及稳定表达流感 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白的重组 CHO 细胞。在特定的实施方案中,这样的重组 CHO 细胞还可包含能够表达流感 PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS vRNAs 的表达载体集。

[0212] 优选地,所述重组 CHO 细胞是重组的 CHO-K1 细胞。

[0213] 用于建立稳定的细胞的方法为本领域的技术人员熟知。举例来说,由 Wang et al, 2012, Genet Mol Res, 11(2):1442-1448 或由 Liu et al., 2011, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 27(5):747-754 描述的方法。

[0214] 用于制备药物组合物的方法

[0215] 本发明还涉及用于制备流感疫苗组合物的方法,该方法包括:

[0216] a) 通过根据本发明的如前文所述的任何实施方案的方法产生流感病毒;

[0217] b) 在 CHO 细胞中,优选地在 CHO-K1 细胞中,倍增后收获所述传染性流感病毒,

[0218] c) 纯化收获的传染性流感病毒,

[0219] d) 任选地失活纯化的病毒,以及

[0220] e) 将纯化的病毒与药物上可接受的载剂混合。

[0221] 所述纯化可以是快速的且可能受限于大致纯化(generally clarify)收获的感染性病毒后通过离心来浓缩病毒的步骤。纯化可以通过实施离心步骤举例来说以蔗糖密度梯度(EP 0 7760362)的方式进行补充。也可以实施色谱方法来纯化病毒。由此获得纯化的全病毒的悬浮液,可对其进行进一步加工来获得最终的疫苗组合物。对纯化的病毒悬浮液也可进行后续处理。由此获得流感病毒-衍生的产物。为了制造举例来说基于片段化的或分裂的病毒、病毒小体的疫苗或包含流感病毒血凝素的疫苗亚单位,可根据本领域的技术人员熟知的方法使用去污剂或脂质溶剂对病毒悬浮液进行片段化。从纯化的病毒获得的包含流感病毒血凝素的片段化的或裂解的病毒、病毒小体以及包含流感病毒血凝素的疫苗亚单位被认为是流感病毒的衍生产物。

[0222] 最终的疫苗组合物可以由全失活的流感病毒或减毒的流感病毒组成。

[0223] 病毒悬浮液的失活通过常用的方式使用 β -丙内酯(E. Budowsky et al. 1991, Vaccine, 9:319-325; 1991, Vaccine, 9:398-402; 1993, Vaccine, 11:343-348)、乙烯亚胺或衍生物(D. King 1991, Avian Dis. 35:505-514)或甲醛(EP 0 776 0362)来实施。病毒的失活在纯化步骤之前或之后实施。

[0224] 最终的疫苗组合物通常用药物上可接受的载剂配制。

[0225] “药物上可接受的载剂”意为任何溶剂、分散介质、电荷等,通常用于药物和疫苗的配制物来增强活性作用剂的稳定性、无菌性和递送能力而不产生任何次要反应,举例来说人体的过敏反应。基于选取的药物的形式、使用的方法和途径来选择赋形剂。合适的赋形剂以及药物配制物的相关要求描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”(19th Edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA(1995)),其代表本领域的参考工作。药物可接受的赋形剂的实施例是水、磷酸盐缓冲的盐水溶液、0.3%甘氨酸溶液。

[0226] 基于失活的全病毒的疫苗组合物还可包含一种或多种佐剂。这些疫苗可用铝盐、

如氢氧化铝凝胶、磷酸铝或明矾,或以油包水或水包油乳剂来配制。可使用任何能够增加对流感的体液和 / 或细胞应答的佐剂。作为佐剂配制物的非限制性实施例,提到 **MF59[®]** 乳剂,基于脂质体的配制物,以及基于 MPL、短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)、皂素、溶血卵磷脂、普卢兰尼克的衍生物及其组合的配制物。也可使用 TLR 的激动剂。

[0227] 通过根据本发明的方法的方式获得的疫苗可用于人和动物针对流感的预防。

[0228] 在兽医领域,所述疫苗主要用于鸟类流感的预防领域,但其也可以用于预防和降低马科家族成员,特别是马,犬科动物,特别是狗,猫科家族,特别是猫,猪科动物,特别是猪,鼬,特别是水貂和雪貂,以及鸟类,特别是母鸡、鸭、火鸡、鹌鹑、几内亚鸡、鹅和鸵鸟的流感症状和 / 或病毒分泌。

[0229] 在人体中,疫苗可用于流行性流感和大流行性流感的预防。由于流行性流感影响已经通过接触 (通过感染) 或通过用一 (或多) 株流感病毒致敏的人群,由此存在着与来自导致流行性的 HA 的抗原关系且其中存在一定的免疫力,即使只是部分有效,由于新病毒的 HA 与之前循环的病毒无或仅有很少的抗原关系,大流行性流感影响对病毒的新病毒未致敏的人群。

[0230] 流行性流感疫苗意在预防人群对与之前已经循环的病毒具有抗原关系的循环的季节性流感病毒引发的季节性流感的抵抗。目前,导致流行性流感的流感病毒是 A 型且属于 H1N1 或 H3N2 亚型或是 B 型。

[0231] 流行性流感疫苗意在保护人群对就 HA 而言与之前循环的流感病毒无抗原关系的新流感病毒导致的大流行性流感病毒的感染的抵抗。目前,导致大流行性流感的流感病毒是 A/H1N1 病毒。

[0232] 虽然失活疫苗优选用于大流行性流感的预防,流行性大流行性流感疫苗可以是活减毒疫苗或失活疫苗的形式。疫苗可以是多价疫苗 (从多种流感病毒株制备的疫苗) 的单价疫苗形式 (从单流感病毒株制备的疫苗)。流行性流感疫苗的组合目前是从 H3N2 和 H1N1 病毒以及 B 型病毒制备的三价疫苗形式。失活的疫苗通常是片段化病毒 (分裂病毒) 的全病毒形式,或是包含 HA 的亚单位形式,且任选地包含一种或多种如上所述的佐剂。活的减毒疫苗通常通过口服或鼻道施用来促进粘膜免疫力的建立,同时失活疫苗可以非肠道 (肌肉注射或皮下注射)、皮内或甚至粘膜 (鼻内) 施用,或甚至通过如 WO 01/22992 描述的两种施用路径的组合来施用。免疫计划通常规定注射或注射后进行增强。施用的疫苗剂量取决于个体的年龄和佐剂的存在或不存在。常规上,疫苗剂量包含包括在疫苗中的每种疫苗株的 15 μ g HA 当量。当疫苗具有佐剂时,该剂量可降低至约 1 至 2 μ g HA,或在老年个体和有免疫缺陷的个体中增加至 30 μ g HA 或更多。

[0233] 组合物可使用常规的皮下注射器或安全注射器或射流泵 (如那些 Becton Dickinson Corporation (Franklin Lakes, NJ, USA) 销售的) 进行施用。对于皮内施用,可采用常规的皮下注射器利用结核菌素技术或专门的皮内递送装置如 BD Soluvia (TM) 微注射系统 (Becton Dickinson Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) 进行施用。

[0234] 施用的组合物的体积取决于施用方法。在皮下注射的情况下,体积通常是 0.1 至 1.0ml,优选地约 0.5ml。

[0235] 贯穿本发明,对多个参考文献进行了引用。这些参考文献的公开此处通过提述并入本公开。

[0236] 本发明将进一步通过下图和实施例进行阐述。

[0237] 附图

[0238] 附图 1: 用于快速生成可以用作疫苗重配株的重组流感病毒的精简计划的说明。pSP-flu 与由序列 SEQ ID NO:10 组成的通用载体对应。

[0239] 附图 2: 使用通用 pSP-flu 质粒的克隆策略。卡那霉素抗性基因的位置以空白表示, POL 1 启动子和核酶以深色展示。质粒用 BbsI 进行线性化, 且在转化至感受态大肠杆菌 (*E. coli*) 之前与在末端包含来自启动子和核酶的 17 个核苷酸的病毒 cDNA 混合。cDNA 重组入环状质粒的终端互补区来在 POL 1 启动子和核酶之间引进病毒基因组片段。

实施例

[0240] 1. 材料和方法

[0241] 1.1. 细胞

[0242] CHOK1 细胞 (ATCC 编号 :CCL-61) 的悬浮液在 125mL 摇瓶内补充了 4mM L- 谷氨酰胺(**Gibco®**)的 Ex-Cell CD CHO 融合培养基 (SIGMA-ALDRICH, St Quentin Fallavier, FR) 中在搅拌下培养。粘附 MDCK 细胞 (CCL-34) 和 Vero 细胞 (ATCC 编号 :CCL-81) 分别在补充了 10% FBS(Thermo Scientific) 的 DMEM (**Gibco®**)中或补充了 0.1% 聚维酮 K30 (Sanofi Pasteur) 的 VP-SFM (**Gibco®**)中于组织培养烧瓶 (Becton Dickinson) 中培养。CEP 细胞收集自 10 天大的无特定病原 (SPF) 鸡胚 (Valo Biomedica, Osterholz-Scharmbeck, GE) 并在补充了 5% FBS(Thermo Scientific) 的 DMEMF12+Glutamax I (HAM) (**Gibco®**)中于组织培养烧瓶中培养。所有的细胞培养物都保持在 37°C 在 95% 空气和 5% CO₂ 的大气中。

[0243] 1.2. 受体分析

[0244] Sia2-3Gal 和 Sia2-6Gal 残基在不同细胞类型的表面的表达分析用地高辛聚糖分化试剂盒 (Roche, Mannheim, GE) 进行实施。在 PBS 1x (Eurobio, Courtaboeuf, FR) 中冲洗二百万细胞两次并在包含 0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl、1mM MgCl₂、1mM MnCl₂ 和 1mM CaCl₂、pH 7.5 的缓冲液中冲洗一次。细胞在室温下用特定针对 Sia2-6Gal 残基的地高辛标记的凝集素黑接骨木 (*Sambucus nigra*) 凝集素 (SNA) (1/1000), 或特定针对 Sia2-3Gal 的怀槐 (*Maackia amurensis*) 凝集素 (MAA) (1/300) 温育。对照细胞在无凝集素下温育。细胞在 TBS (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.5) 中冲洗两次并用 1/40 抗地高辛 - 荧光素 Fab 片段 (Roche) 在室温下 (暗处) 处理 1 小时。在 PBS 1x (Eurobio) 中进行两次冲洗后, 在 Guava 毛细管流式细胞仪上对细胞的绿色荧光强度进行分析。

[0245] 1.3. 病毒

[0246] 流感 B/Brisbane/60/08 病毒和重配疫苗病毒 A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116、A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14 和 A/California/07/09 (H1N1) X179A 从 NIBSC (Hertfordshire, UK) 获得。病毒在母鸡含胚卵 (Valo Biomedica) 中进行增殖并从感染的尿囊液中收获。

[0247] 1.4. 病毒感染

[0248] 感染前 4 小时, 细胞以在适于每种细胞类型的无血清培养基中处于 1.6×10^5 细胞 /

cm²的密度, 1ml 终体积, 接种于 6-孔板中 (Corning, NY, US)。感染以不同的感染复数 (MOI) 在 35℃ 实施 1 小时。在没有血清的情况下, 加入 (2ml) 包含猪胰蛋白酶 (SIGMA-ALDRICH) 的适于每种细胞类型的无血清培养基并将细胞在 35℃ 的 8% CO₂ 中温育 4 天。

[0249] 1.5. 血凝实验

[0250] HA 实验通过在 V-底板 (Corning) 中用 PBS 1x (Gibco®) 2 倍系列稀释 50 μl 培养上清实施。随后, 将 50 μl 0.5% 鸡红细胞 (Sanofi Pasteur, Alba-la-Romaine, FR) 添加至每孔中。将所述板在 4℃ 温育 1 小时并单独对每孔的血凝和无血凝进行确定。

[0251] 1.6. TCID₅₀ 实验

[0252] MDCK 细胞以 2.7x 10⁶ 细胞/cm² 的密度接种于 96 孔板 (Corning) 的补充了 1 μg/ml 猪胰蛋白酶 (SIGMA-ALDRICH) 的 DMEM (Gibco®) 中。用 50 μl 1:10 系列稀释感染细胞并在 35℃ 温育 4 天。来自这些培养的上清随后在血凝实验中进行测试。根据 Spearman-Kärber (David John Finney, 1952, Statistical method in biological assay, Hafner editor) 的统计学方法计算 TCID₅₀ 滴度。

[0253] 1.7. 转染效率

[0254] 将二百万细胞在 200x g 离心 10 分钟, 用 100 μl cGMP 溶液 V (Lonza, Basel, CH) 在室温下重悬 (目前良好的制造实践) 并添加 10 μg 的 pGFP (Sanofi Pasteur) 质粒。通过 Nucleofector (Lonza) 使用不同的程序实施核穿孔。在 6 孔板 (Corning) 最适于每种细胞类型的培养基中在 37℃ 温育细胞 24 小时。在 Guava 毛细管流式细胞仪 (Millipore, Bellerica, MA, US) 上对细胞的绿色荧光强度进行分析。

[0255] 1.8. 质粒 DNA

[0256] 用于拯救 (rescue) 感染性 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒的 12 质粒之前已由 Fodor et al, 1999, J Virol, 73(11):9679-9682 描述。下文采用了相同的方法学并具有一定的修饰。

[0257] 将来自 A/WSN/33 (H1N1) (WSN) 病毒的 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白的编码区克隆入 pVAX1 质粒 (Life technology, Cergy Pontoise, FR) 的 CMV 启动子和牛生长激素聚腺苷酸化 (BGH-polyA) 位点之间。对 pVAX1 质粒 (Life technology) 进行修饰用于病毒 RNA 表达。简要地, 将通过包含用于线性化的 BbsI 位点、NotI 和 SbfI 位点的接头隔开的对应人 POL 1 启动子和丁肝核酶序列的 DNA 片段克隆入 pVAX1 质粒并去除 CMV 启动子和 BGH-polyA 位点。所得质粒命名为“通用 pSP-flu”。

[0258] 用 QIAamp 病毒 RNA 迷你试剂盒 (Qiagen, Courtaboeuf, FR) 从感染的尿囊液提取病毒 RNA, 并通过 Superscript III 一步 RT-PCR 系统 (Life technology) 使用分别包含来自丁肝核酶 (5'-ctgggacctgcccggcc) (SEQ ID NO:11) 的 17 核苷酸和来自 POL 1 启动子 (5'-tgggccgcccgggttatt) (SEQ ID NO:12) 的 17 核苷酸的一对引物获得与 vRNAs 互补的基因组 cDNA。

[0259] 温度循环参数为 47℃ 持续 60min, 94℃ 持续 2min 以及随后 40 循环 (94℃ 持续 15 秒, 60℃ 持续 30 秒以及 72℃ 持续 2 分钟) 和 72℃ 持续 5 分钟。每个片段随后用 GenElute Gel 提取试剂盒 (SIGMA-ALDRICH) 纯化并通过使用 In Fusion HD PCR 克隆试剂盒 (Clontech, Takara Bio, Saint Germain en Laye, FR) 的同源重组将其克隆入之前由 BbsI (New England Biolabs, Ipswich, MA, US) 线性化的通用 pSP-flu 质粒。使用 Nucleobond

Maxi EF 试剂盒 (Macherey Nagel, Düren, GE) 生成无内毒素的质粒 DNA 制品。

[0260] 1.9. 反向遗传

[0261] 混合一百万 Vero 和一百万 CHOK1 细胞并在 200x g 离心 10 分钟并在 100 μ l 溶液 V (Lonza) 中在室温下重悬。将 8 种 vRNA 表达质粒各 1 μ g 与 4 种蛋白表达质粒各 0.5 μ g 的混合物添加至细胞且通过 nucleofector (Lonza) 使用 U-023 程序实施核感染。细胞在 6 孔板的添加了 4mM L-谷氨酰胺(Gibco®)的 Ex-cellTM CD CHO 融合培养基 (SIGMA-ALDRICH) 中温育。在 37°C, 5% CO₂ 中温育 2 小时后, 将 2 百万 CHOK1 细胞加入添加了重组胰蛋白酶 (TryLE Select) (Gibco®) 的相同培养基中并在 35°C, 8% CO₂ 在旋转平台上温育。

[0262] 1.10. 抑制血凝试验 (IHA)

[0263] 用来自霍乱壶菌 (Vibrio Cholera) (RDE, Sigma, 10mU/mL) 的 Receptor Destroying Enzyme 在 37°C 处理购自 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) 的特定针对 A/California/07/09 (H1N1) 病毒的 HA 的血清 18 小时。在 56°C 对 RDE 进行失活 1 小时。RDE- 处理血清随后与 5% 的火鸡红细胞在 4°C 温育 2 小时并在 2000rpm 离心 10 分钟。处理的血清的系列稀释随后与待测试的病毒的 4HAU 在室温温育 1 小时并随后在 4°C 用 0.25% 的鸡 RBC 温育 1 小时。通过抑制病毒介导的 RBC 血凝的血清最高稀释确定 IHA 滴度。

[0264] 2. 结果

[0265] 2.1. 细胞生长

[0266] 首先对 MDCK、CHO-K1、Vero 和 CEP 细胞在每种细胞类型的最适培养基中维持生长的能力进行评估, 对于 CHO-K1 在悬浮液中或对于其他细胞类型作为粘附来进行。对于每种细胞类型通过估计一代必需的时期来确定种群倍增水平 (pd1)。如表 1 所示, 与 Vero (38 小时) 和 CEP 细胞 (48 小时) 相比 MDCK 和 CHO-K1 代表较短 pd1 (分别 23 和 18 小时)。重要的是需要注意 CHO-K1 和 Vero 细胞系在无血清下培养。

[0267] 表 1: MDCK、CHO-K1、Vero 和 CEP 细胞的种群倍增水平 (pd1)。

[0268]

细胞类型	种群倍增 (小时)	S. D.
MDCK	23.03	3, 5
CHO-K1	18.0	2, 6
Vero	38.4	5, 1
CEP	47.66	0, 5

[0269] 生长研究在 37°C 实施超过 6 天且种群倍增水平 (pd1) 通过估计一代所必需时间计算。从 T/N 的比例进行计算, 其中 T 是细胞培养的时程而 N 是从下式计算的细胞代数: $C_f = C_i \times 2^N$, 其中 C_i 和 C_f 分别是初始和最终细胞浓度。数值体现为三次独立实验的平均值和标准差 (S. D.)。

[0270] 2.2. 流感受体

[0271] 在感染中, 鸟类病毒以及卵适应的人病毒变体主要与 Sia2-3Gal 连接结合, 而直接从人分离的临床分离株优先与 Sia2-6Gal 连接结合 (Suzuki et al, 2011, Adv Exp Med Biol, 705:443-452)。

[0272] 为检测在不同细胞类型表面上的两种类型的流感病毒受体, 使用了 MAA 凝集素 (特定针对 Sia2-3Gal 连接) 以及 SNA 凝集素 (特定针对 Sia2-6Gal 连接)。细胞在室温与地高辛标记的凝集素黑接骨木凝集素 (SNA) (特定针对 Sia2-6Gal) 或怀槐凝集素 (MAA) (特定针对 Sia2-3Gal) 温育 1 小时。细胞随后与抗地高辛 - 荧光素 Fab 片段温育并使用 Guava 毛细管流式细胞仪系统对绿色荧光强度进行分析。表 2 展示的值代表三次独立实验的平均值和标准差 (S. D.)。

[0273] MAA 和 SNA 与 Vero 和 MDCK 细胞表面强烈结合 (多于 80% 的细胞) 表示两种受体 (Sia2-3Gal 和 Sia2-6Gal) 表达于 MDCK 和 Vero 细胞上 (表 2)。此外, MAA 与 73% 的 CEP 细胞结合而 SNA 仅与 23% 的 CEP 细胞结合表明高数目的 CEP 细胞表达 Sia2-3Gal 受体, 但低数目表达 Sia2-6Gal。鸟类来源的 CEP 细胞可解释为什么其相比人的受体表达多得多的鸟类受体。CHO-K1 细胞不表达 Sia2-6Gal 受体, 且仅弱表达 Sia2-3Gal 受体。

[0274] 表 2: 使用地高辛聚糖分化试剂盒对 MDCK、CHO-K1、Vero 和 CEP 细胞上的流感病毒受体进行分析。

[0275]

细胞类型	凝集素类型	由凝集素结合的活细胞的百分数 (%)	S.D.
MDCK	MAA	93.3	3.0
	SNA	96.4	3.8
CHO-K1	MAA	31.4	3.0
	SNA	0.0	0.0
Vero	MAA	87.2	20.2
	SNA	83.3	11.1
CEP	MAA	63.3	7.4
	SNA	22.8	12.4

[0276] 2. 3. 病毒产生

[0277] 流感病毒的尿囊液在无预先适应的情况下直接与待测试的细胞系接触。对两种流感 A 重配病毒 (A/New/Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116 和 A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14) 以及一种流感 B 病毒 (B/Brisbane/60/08 lineage B/Victoria/2/87) 进行了测试。使用了多种 MOI (10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3}) 和猪胰蛋白酶浓度 (0、1、2、5 和 $8 \mu\text{g/mL}$)。对于每种细胞类型展现了用 10^{-1} 的 MOI 和最适胰蛋白酶浓度在 A 型流感病毒感染 3 天后以及在 B 型流感病毒感染 4 天后的结果 (参见表 3 和 4)。

[0278] 表 3: 用流感 A 病毒感染 MDCK、CHO-K1、Vero 和 CEP 细胞

[0279]

细胞类型	胰蛋白酶浓度	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/Vietnam/1194/04 (H5N1)
MDCK	1 μ g/ml	6.4*	3
CHO-K1	2 μ g/ml	7.4	3.1
Vero	2 μ g/ml	6.7	2.9
CEP	2 μ g/ml	4.4	3.1

[0280] *: 以 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml 表示

[0281] 表 4: 用流感 B 病毒感染 MDCK、CHO-K1 和 Vero 细胞

[0282]

	病毒滴度($\log_{10}$ TCID ₅₀ /ml)
细胞类型	B/Brisbane/60/08
MDCK	5
CHO-K1	4.3
Vero	4.9

[0283] A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116 和 A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14 重配株在不需要预先适应的情况下在四种测试的细胞类型上生长。此外, A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR116 重配病毒的最佳生成发现于产生最高病毒滴度 ($>10^7$ TCID₅₀) 的 CHO-K1 细胞。A/Vietnam/1194/04 (H5N1) rg14 重配病毒的生成在所有细胞类型中都几乎相同 (大概 10^3 TCID₅₀/mL)。

[0284] 关于 B 型病毒的产生, 如表 4 所示, B/Brisbane/60/08 病毒可在无需预先适应的情况下在三种细胞系中复制。

[0285] 2.4. 通过以反向遗传的方法拯救传染性流感病毒来产生病毒

[0286] 2.4.1. 细胞系的被转染能力

[0287] 重要的是通过能够生成传染性流感病毒的表达载体集转染后测试不同细胞类型产生病毒的能力。在第一步中重要的是测试这些不同细胞类型的被转染能力, 以及特别是用不涉及动物来源原材料使用的材料进行的转染。使用由 Amara (Amara, Lonza technology) 提供的靶向核的核穿孔技术来用于细胞的转染, 使用绿色荧光蛋白 (GFP) 表达质粒来评估不同细胞系被转染的能力 (capacity)。细胞在 V 溶液中重悬, 与 pGFP 质粒温育并用 nucleofector 进行核穿孔。对不同程序 (U-023、A-024、V-001、T-030、L-005) 进行了测试。随后在 37°C 将细胞温育一天并通过 Guava 流式细胞仪对绿色荧光细胞的百分数进行分析。由 3 个来计算 GFP 表达细胞的平均百分数和标准差。独立实验和最佳转染程序示于表 5 中。

[0288] 表 5: MDCK、CHO-K1、Vero 和 CEP 细胞对核穿孔的感受性。

[0289]

细胞类型	核穿孔程序	表达 GFP 的活细胞的 %	S. D.
MDCK	A-024	71.2	26.9
CHO-K1	U-023	74.4	15.1
Vero	V-001	70.9	3.4
CEP	V-001	96.4	2.3

[0290] 多于 70% 的细胞表达 GFP, 表示测试的所有细胞系可通过核穿孔进行转染。

[0291] 2.4.2. 流感 cDNA 克隆步骤的优化

[0292] 为实现高效, 必须对通常包含源自两种 A 型病毒和一种 B 型病毒 B 型病毒的抗原材料的流感疫苗每年进行更新, 所述更新依赖于出现的和导致季节性流感或流行性流感的新型循环病毒。重要的是, 必须对 HA 和 NA 抗原材料进行更新, 进而其可对新循环的病毒响应。为实施反向遗传, 必须每年或当新型循环的病毒被表征时, 将 HA 和 NA 编码基因克隆入 vRNA 表达质粒并受到 POL I 启动子的控制。其他编码内置 A/PR/8/34vRNA 的 vRNA 质粒和蛋白质表达质粒通常仅构建一次。由于当对未知的 HA 和 NA 基因实施反向遗传时, 在 vRNA 表达质粒中的克隆步骤可能非常复杂 (tricky), 因此建立了可通过重组任何来自 A 和 B 型病毒的流感片段用于克隆的通用反向遗传质粒。但对于 vRNA 转录子的精确起始和终止的严格需求显著限制了重组区的选择。因此, 使用了新型重组盒 (不特异性针对流感基因组), 其包含 POL1 启动子的最终 17 个核苷酸以及丁肝核酶的最初的 17 个核苷酸。此外, 包含线性化环状质粒的 BbsI、排除空质粒的 NotI 和 SbfI 位点的 28 个核苷酸并入所述 POL 1 启动子和丁肝核酶之间。所得质粒, 称为 “通用 pSP-flu” 相对较小 (2202pb) 且包含卡那霉素抗性基因 (图 2)。为制备用于克隆的流感 cDNA, vRNAs 反向转录成包含重组末端的 cDNAs, 且克隆至 POL 1 启动子和核酶之间。使用该改进的 RNA 生产质粒, 来自流感 A 和 B 病毒的数种基因通过同源重组进行克隆。对于 “简单” 克隆, 阳性克隆的比率大于 90%, 而对于 “困难” 克隆为 30%, 每克隆实验具有平均 150 个克隆。

[0293] 如此开发的通用 pSP-flu 质粒呈现了数种改进, 以供简单和快速的流感基因组克隆。可使用重组盒来克隆每个来自 A 和 B 型病毒的流感 RNA 片段。其次, 由于确定线性化的载体无生成背景集落的空质粒非常困难, 因此通用 pSP-flu 质粒包含三种可用在克隆步骤后去除任何残余空质粒的酶位点 (BbsI、SbfI 和 NotI)。用包含在识别位点外的裂解点的 BbsI 酶线性化, 生成粘合末端并使得质粒重新环化。

[0294] 2.4.3. 流感病毒的拯救

[0295] 基于其良好的生长特性, 通过反向遗传测试了 CHO-K1 和 Vero 细胞系拯救传染性流感病毒的能力。

[0296] 通常通过反向遗传来用于拯救流感病毒的猪胰蛋白酶由来自 Gibco 的高度纯化和无动物来源的酶取代。在第一实验中, 通过将十二种质粒 (4 质粒使得 PB1、PB2、NA 和 NP mRNA 在人 POL II 启动子的控制下得以表达, 而 8 质粒使得 8 种 vRNAs 在人 POL I 启动子的控制下得以表达) 核穿孔入 Vero 和 / 或 CHO-K1 实施了来自 A/WSN/33(H1N1) 病毒的包含 HA 和 NA vRNA 的重配病毒以及来自 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的六种其余病毒基因 (PB1、PB2、

PA、NP、M 和 NS) 的拯救。单独转染 Vero 或 CHO-K1 细胞后未获得病毒颗粒,但当 Vero 细胞与 CHO-K1 细胞混合时,转染后 2 天立刻通过在细胞混合物的上清中的血凝实验检测病毒。

[0297] 此外在核穿孔的 Vero/CHO-K1 混合物中很容易看到感染的征兆。的确,在培养四天后,无质粒转染的细胞明显个体化,而用十二质粒转染的细胞和在上清中脱落的病毒颗粒是聚集的。很多流感病毒重配病毒使用该技术非常快速拯救,其包含 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的内部骨架(PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS) 并且表达来自不同流感病毒如 A/WSN/33(H1N1)、A/PR/8/34(H1N1)、A/NC/20/99(H1N1) IVR116、A/Solomon Island/03/06(H1N1) IVR145、A/Vietnam/1194/04(H5N1) rg14、A/Brisbane/10/07 IVR-147(H3N2)、A/Uruguay/716/07(H3N2) X175C 和 A/Wisconsin/67/05(H3N2) X161b 的 HA 和 NA 蛋白。

[0298] 一个实验和另一个实验获得的结果高度可重复,且大多数的情况下,最理想的滴度在转染后 5 天获得。举例来说,在使用三种不同的核穿孔程序(U-023、U-027、F-014) 对 Vero/CHO-K1 转染后,细胞培养上清中生成了包含来自 A/Vietnam/1194/04(H5N1) rg14 的 HA 和 NA 重配病毒,伴随高达 128HAU/50 μ l 的滴度。其他上文引用的包含来自 A/H1N1 或 A/H3N2 病毒的 HA 和 NA 的重配病毒在转染后五天达到相似的滴度(高达 256-512HAU/50 μ l)。相应的 TCID₅₀ 滴度在 4 和 7log₁₀TCID₅₀/ml 之间变化。

[0299] 改进的反向遗传系统描述于本研究中,其使用适用于人疫苗生产的称为 Vero 和 CHO-K1 的两种细胞系。由病毒感染研究所示,多种 A/H1N1 和 A/H5N1 病毒或重配病毒使用 Vero/CHO-K1 细胞的混合物可轻松恢复。以相同的方式, A/H3N2 病毒也得以拯救证明了该系统可用于任何流行性和季节性病毒的重配的产生。病毒可直接从 Vero/CHO-K1 上清恢复且在转染后两天立即通过 HAU 实验滴定。当病毒将以生产规模产生时,举例来说在人或兽医疫苗生产的框架下,上清可用作进一步感染 CHO-K1 细胞储液的原种。

[0300] 此外如实施例中所示,使用 Vero 和 CHO-K1 的混合物通过反向遗传生成传染性流感病毒,或通过用感染性病毒种子直接感染 CHO-K1 细胞产生病毒并不需要使用动物来源的血清和/或生物材料。由于外来作用剂如病毒、支原体和朊病毒的污染不复存在,如此产生的传染性流感病毒因此更安全。此外在转染和/或感染步骤使用的培养基中血清的缺乏易化了纯化步骤并使得流感疫苗制造更加容易。就我们所知,这是首次对通过反向遗传拯救流感病毒的无动物方法的描述。

[0301] 3. 通过反向遗传产生嵌合流感病毒

[0302] 3.1. HA 和 NA 嵌合基因的构建

[0303] 嵌合构建体首先使用软件 Vector NTI 计算机组装。HA 嵌合基因 A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 包含 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的非编码区(NCR)、信号肽(SP)、HA2 结构域、跨膜(TM) 结构域和 Cyto 结构域以及来自 A/California/07/09(H1N1) 病毒的 HA1 结构域。

[0304] NA 嵌合基因 A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 包含 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的非编码区(NCR)、跨膜(TM) 结构域、Cyto 结构域和杆部,以及来自 A/California/07/09(H1N1) 病毒的胞外域。

[0305] 一旦确定了这些序列,对相应的 HA 和 NA 嵌合基因进行合成并克隆入通用 pSP-flu 质粒中。

[0306] 3.2. 通过反向遗传生成嵌合流感病毒

[0307] 如上文所述通过反向遗传实施嵌合流感病毒的生成,即,通过使用用于表达病毒蛋白 PB1、PB2、PA 和 NA 的四种质粒,和用于表达 vRNAs PB1、PB2、PA、NP、NS、M、嵌合 HA 和嵌合 NA 的八种质粒,将其如上文所述的通过核穿孔引入 CHO-K1/Vero 细胞的混合物。由于其包含两种嵌合基因,产生的病毒为“双嵌合”。其包含来自 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的 PB2、PA、NP、NS 和 M 基因、来自 A/California/07/09(H1N1) 病毒的 PB1 基因、HA 嵌合基因 A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 和 NA 嵌合基因 A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1)。对于每个反向遗传实验使用 A/NC/20/99(H1N1) 病毒作为阳性对照。

[0308] 在第一实验中,确定了使用的胰蛋白酶的浓度。在测试的胰蛋白酶浓度中(1 至 6USP/ml),仅 3 和 4USP/ml 的胰蛋白酶浓度使得嵌合流感病毒得以产生(表 6)。在接下来的实验中表明,由于血凝滴度稍高(64HAU/50 μ l 比 32HAU/50 μ l),4USP/ml 的浓度稍好于 3USP/ml。

[0309] 表 6: 通过反向遗传获得嵌合 A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 流感病毒所必需的胰蛋白酶浓度的确定。

[0310]

反向遗传实验			HAU/50 μ l		
N°	潜在产生的病毒	胰蛋白酶 (USP/ml)	核穿孔后天数		
			D+5	D+6	D+7
1	A/NC/20/99(H1N1) 重配	2	128	128	64
2	嵌合 A/California/07/09-A/PR/8/34 (H1N1)	1	<1	<1	<1
3		2	<1	<1	<1
4		3	2	16	32
5		4	4	32	64
6		5	<1	<1	<1
7		6	<1	<1	<1

[0311] 嵌合重配 A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 的产生是可重复的。嵌合病毒在来自核穿孔后第五天的细胞培养上清中是可检测的,且理想地在核穿孔后第八或第九天产生。

[0312] 包含嵌合 HA 基因或嵌合 NA 基因的“单-嵌合”病毒也成功地通过反向遗传使用嵌合 HA A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 基因和来自 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的 NA 基因,或嵌合 NA A/California/07/09-A/PR/8/34(H1N1) 基因和来自 A/PR/8/34(H1N1) 病毒的 HA 基因产生。

[0313] 3.3. 通过嵌合病毒产生的 HA 蛋白抗原性的评估

[0314] 为验证 HA 嵌合基因的使用没有改变由嵌合病毒表达的 HA 蛋白的抗原性,我们如 1.10 的描述使用作为测试病毒的重配 A/California/07/09(H1N1) 病毒或如 3.2 中获得的“双嵌合”病毒比较了在抑制血凝实验中获得的滴度。在抑制血凝实验中的滴度越高,通过

抗体对 HA 的识别越强。用两种测试的病毒获得的 IHA 滴度高于 10240,也就是说由双嵌合病毒表达的 HA 蛋白的抗原性被充分保留且与 A/California/07/09 (H1N1) 重配株非常相似或相同。

[0315] 4. 在两种细胞混合物中重配流感病毒产生的比较:Vero/CEF 和 Vero/CHO-K1 细胞

[0316] 在室温下将一百万 Vero 细胞在溶液 V (Lonza) 中重悬。将表达 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒的 PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS 的 vRNA 的 6 种 vRNA 表达质粒各 1 μ g、表达 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 病毒的 NA 和 HA 的 vRNA 的 2 种 vRNA 表达质粒各 1 μ g 以及表达 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒的 PB1、PB2、PA、NP 的 mRNA 的 4 种蛋白质表达质粒各 0.5 μ g 的混合物加入至细胞,且通过 nucleofector (Lonza) 使用 V-001 程序实施核感染。细胞在 6 孔板的 1.5ml DMEM-F12® 培养基(Gibco®)中温育。在 37°C, 5% CO₂温育 2 小时后,将一百万 CEF 细胞(鸡胚成纤维细胞)加入相同的添加了猪胰蛋白酶 (Sigma) 的培养基中并在 35°C, 8% CO₂于旋转台上温育。以固定间隔收集 100 μ l 上清培养物进而用血凝实验对病毒滴度进行评估。血凝实验的结果示于下列表 7 中。

[0317] 将五十万 Vero 和五十万 CHO-K1 细胞混合并在室温于溶液 V (Lonza) 中重悬。将表达 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒的 PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS 的 vRNA 的 6 种 vRNA 表达质粒各 1 μ g、表达 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 病毒的 NA 和 HA 的 vRNA 的 2 种 vRNA 表达质粒各 1 μ g,以及表达 A/PR/8/34 (H1N1) 病毒的 PB1、PB2、PA、NP 的 mRNA 的 4 种蛋白质表达质粒各 0.5 μ g 的混合物加入至细胞,且通过 nucleofector (Lonza) 使用 V-001 程序实施核感染。细胞在 6 孔板的添加了 4mM L-谷氨酰胺(Gibco®)的 Ex-cell™CD CHO 融合培养基中 (SIGMA-ALDRICH) 温育。在 37°C, 5% CO₂温育 3 小时后,将一百万 CHOK1 细胞加入添加了猪胰蛋白酶 (Sigma) 的相同的培养基中并在 35°C, 8% CO₂下于旋转台上温育(胰蛋白酶的终浓度则是 2 μ g/ml)。以固定间隔收集 100 μ l 上清培养物进而用血凝实验对病毒滴度进行评估。血凝实验的结果示于下列表 7 中。

[0318] 表 7: 培养上清的病毒滴度 (UHA/50 μ l)

[0319]

	D4	D5	D6	D7	D12
Vero/CEF	<1	<1	4	32	128
Vero/CHO	32	512	64	NT	NT

[0320] D: 转染后的天数. NT: 未测试

[0321] 结果表明 Vero/CHO-K1 细胞系统在转染后仅四天使得重配流感病毒得以产生,而使用 Vero/CEF 系统用于产生相同量的重配流感病毒至少需要 7 天。Vero/CHO-K1 细胞系统也使得高量的重配病毒 (512UHA/50 μ l) 得以产生。因此所述结果证明了 Vero/CHO-K1 细胞系统相比 Vero/CEF 细胞系统用于产生重配流感病毒更加有效。

[0001]

序列表

<110> SANOFI PASTEUR
 <120> 传染性流感病毒的生产
 <130> BET 13P2019
 <150> EPI2305968.5
 <151> 2012-08-03
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 载体
 <400> 1
 cgggcccggcc cctgcgtgtg gcacggggcgg cggggagggc gtccccggcc cggcgtgtgt 60
 cccgcgtgtg tcctgggggtt gaccagaggc ccccgggcgc tccgtgtgtg gtgcgatgg 120
 tggcgttttt ggggacaggt gtccgtgtcg cgcgtcgcc tggcccggcg cgtggtcggt 180
 gacgcgaact cccggcccgc ggggaggtat atctttcgct ccgagtcggc atttgggccc 240
 gccgggttat tgtcttcgag gcgcacctgc agggagaagc gccggcatgg tcccagcctc 300
 ctgcctggcg ccggctgggc aacattccga ggggaccgtc cctcggtaa tggcgaatgg 360
 gac 363
 <210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重组盒
 <400> 2
 gtcttcgagg ccgccttgcg gggaagac 28
 <210> 3
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0002]

<220>		
<223>	丁型肝炎核酶终止子序列	
<400>	3	
ggcggcatg gtcccagcct cctcgcctggc gcggcctggg caacattcgg aggggaccgt		60
ccccctggta atggcgaatg ggac		84
<210>	4	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	T7 聚合酶终止子序列	
<400>	4	
ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttt		47
<210>	5	
<211>	223	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	啮齿动物 RNA pol1 启动子	
<400>	5	
ctcttggtcc tatcacggtt atgaggctga ccagttgttg ctttgatgtt cggttctctc		60
gttgattggg acaatatttg ggccacttcg ccggtccga ctccagaat ttccgtgtgg		120
tctgtgaatt taccacgct acactgcat catattccag ttttgcaate tgcctctctt		180
gtacctgcag ataggtactg acacgttgtt cttgtgagtg ggt		223
<210>	6	
<211>	770	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	啮齿动物 RNA pol1 启动子	
<400>	6	
gtcgaccaga agccttttaa aagtccttca cgtcccgtaa ctgtaactaa cctctggtcc		60
ccggcggttg tctcgcgac ccgagccga gaggaagcgc tgttcccgga ttactagcg		120
ggccgggacc cgggattctc tgggtgcctc ggaacatttt atcttgtgtg cgtcggttag		180

[0003]

ccaccctegg tcatccccc gcggtggtct cggcgacccg aggccgagag gaagcgtgt 240
 tcecggtatc actagcgggc cggggcccgg gatctctgg gtgcctcgga acitctctt 300
 ctgcggaagc cctcggtccc cagcggtcgt ctgcggtct cgaagccgag aggagcgtt 360
 gtctcggccc tcaatgctg ctatgtcccg gtctcttga gggtcagaet ttgtttttt 420
 ttgacgtgt cctccatcc cgggtctct cctcgggtc ctgtcccgag aggatgcgg 480
 tgtgtgcga tctttctgc atgtctacct cgtcttggc ctatccagg ttatgaggt 540
 gaccagtgt tctttgatg ttgggtctc tcttgattg ggacaatatt tggggcactt 600
 cgcgggtccc gaattccaga atttccgtgt ggtctgtga ttatccacc ctacactgc 660
 atcatattcc agttttgaa tctgtctct ttgtacctgc agataggtae tgacacgctt 720
 gtcttctgag tgggtgacat tagtaaagga ctgtctcgg gctttttctg 770

<210> 7

<211> 268

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 啮齿动物 RNA pol1 启动子

<400> 7

gtcgaccagt tgttctttg aggtccggtt cttttcgta tggggtcatt ttggggccac 60
 ctcctccagt atgaattcca ggtattctt gtggtctgc actttctcc ctgtctctt 120
 tatgtttgt atcttttcta tctgttcta ttggacctg agataggtae tgacacgctg 180
 tcttttccct attaacacta aaggacacta taaagagacc ctttcgattt aaggtgttt 240
 tctttgtca gctattctt tttaetgg 268

<210> 8

<211> 251

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 RNA pol1 启动子

<400> 8

cgggcccggc cctgcgtgtg gcacggggcg cggggagggc gtccccggc cggcgtgtg 60
 cccgcgtgtg tctggggtt gaccagagg ccccgggcgc tccgtgtgtg gtgcgattg 120
 tggcgttttt ggggacaggt gtccgtgtg cgcgtgcct ggcccgggc cgtggctgtt 180
 gacgcacct cccggcccg gggaggtat atcttctgt ccgagtcgc atttgggccc 240
 gccgggttat t 251

[0004]

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T7 RNA 聚合酶启动子

<400> 9

tattgtaata cgaactcacta tagggtctt

29

<210> 10

<211> 2202

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 通用 pSP-f1u 质粒

<400> 10

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgtcggggc ggccttcgcg tgtggcacgg 60

gcggccggga gggcgtcccc ggcctggcgc tgcctccgcg tgtgtcctgg ggttgaccag 120

agggcccccg gcgtcccggt tgtggctgcg atggtggcgt ttttggggac aggtgtccgt 180

gtcgcgcgtc gcctggggcg gcggcgttgt cggtagcgcg acctcccgcc ccggggggag 240

gtatatcttt cgtcccgagt cggcattttg ggccgcccgg ttattgtctt cgcggccgcc 300

ctgcagggaa gacggccggc atggtcccag cctcctcgct ggcgcggcgt gggcaacatt 360

ccgaggggac cgtccctcgt gtaattggga atgggactga tcaagagaca ggaigaggat 420

cgttttcgat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tcggcccgct tgggtggaga 480

ggetattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc 540

ggctgtcage gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga 600

atgaactgca agacgaggca gcggcgctat cgtggctggc cagcacgggc gttccttgcc 660

cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggaactg gctgctattg ggcgaagtgc 720

cggggcagga tctcctgtca tctaccttg ctcctgccga gaaagtatcc atcattgctg 780

atgcaatgcg gcggcgtgat acgttgatc cggtacctg cccattcgac caccgaagca 840

aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaagcgg tctgtcgat caggatgatc 900

tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cgcaggctc aaggcgagca 960

tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg 1020

tggaaaatgg ccgtttttct ggattcatcg actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct 1080

atcaggacat agcgttggtt acctgtgata ttgctgaaga gcttggcgcc gaatgggctg 1140

[0005]

```

accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gcctttctate 1200
gcctttcttga cgagttcttc tgaattatta acgtttacaa ttctctgatg cggatatttc 1260
tccttacgca tctgtgeggf atttcacacc gcatacaggt ggcacttttc ggggaaatgt 1320
ggcgaggaaac cctatttggt tatitttcta aatacattca aatatgtatc cgtcatgag 1380
acaataaccc tgataaatgc ttaataata gcaegtgeta aaacttcatt tttaatttaa 1440
aaggatctag gtgaagatec tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 1500
tttgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 1560
ttttctgcgc gtaatctgtc gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag cggtggtttg 1620
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 1680
gataccaaat actgtcttc tagttagcc gtagtaggc caccacttca agaactcgt 1740
agcacgcctt acatacctcg ctctgcta atctgttacca gtggctgtg ccagtggcga 1800
taagtcgtgt ctacccgggt tggactcaag acgatagta ccgataagg cgcagcggtc 1860
gggctgaacg gggggitctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact 1920
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgcacgcctt cccgaaggga gaaaggcgga 1980
caggtatccg gtaagcggca gggctgggac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 2040
aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttgcacc ctctgacttg agcgtcgatt 2100
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cgcccttttt 2160
acggttcctg ggcctttgtc ggccttttgc tcacatgttc tt 2202

```

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<400> 11

ctgggaccat gccggcc 17

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400> 12

tgggcgcgcg ggttatt 17

[0006]

<210>	13	
<211>	2233	
<212>	DNA	
<213>	流感 A 病毒	
<400>	13	
agtagaaaca aggtactttt ttggacagta tggatagcaa atagtagcac tgcacaaact	60	
aactcaatgc atgtgtaagg aaggagtiga accaagaagc attaagcaaa acccagggat	120	
cattaateag geactcctca attgettcac atageccccc aagatcaaag gtcccaggtt	180	
ctaggttgtc cctaagagcc tgaacgataa gaageagttt tcttgattca gtgaaaate	240	
cttctagtgt tggagatgca tacaagctgt tgaataccga ctttgctaataaagtctgtc	300	
agaccttccc aatggaactt tcttccactc ctttggggga ctctccaatg ggccatgttt	360	
ctgatttggt ctcaaagaac tcttttgtca tgtctttctc tttagacagag gactcagett	420	
caateatact ctcaatttgt tgaagtgaact ggaggaggea acgectcate tccattcccc	480	
atttcatttt aatttttgag gttecatgtt ttctcacata caagaacatg ggcccttgaaa	540	
cctggcctat ggcacttctt ataagcatat ctctatctc aagaacacag taettctccc	600	
atttatgttg ttcaagtctt gggtcagtga gagaaaactc catgtctaca aagtattacca	660	
cgtegggtgc attccttaag tgggatcttc cttttatgat gaaaccatac aagtgtgtct	720	
ttcgcttccc ctcttagttt ctacacttgc ttatcattgg aattaattgg aaatcctcca	780	
ttgtctcaca agatgcatta agcaaggcag tatgatgta ccccccttc attatgtatt	840	
ctgttgctct gcagtggagc acctctgatg tgaataaatt ccttctcatg cttgcaatgt	900	
gttcaattgg agccacatct tctccaatct catcgagctc tatccagett gaattctgca	960	
gttcgcatgc cttgttaaac tcattctgaa tccaacttgc aagegacctc aattctgggt	1020	
catcactatc atattgtctc aaatcaccta catctttaca gtctgcaaaag tctacctttt	1080	
ctgggtgcca gtctcacea agtgcacca ttagctgaact tgttttcttc atatttttag	1140	
tctttggaat ttctctctca ttctcaatgt cctgcagttc tgccagtact tgcctcatg	1200	
acagaagata atttggaatt attccctttt cgtgtgggtt aacaacattg ggttcccttc	1260	
atccaaagaa tgttctcatg catttgattg cateatatag cggtatctcc tctcttcat	1320	
gacttgggtc ctcaatgett aattttaagg catecatcag caggaatttg gaccgctgag	1380	
aacagggagg cccattcgga agtetaagtg gtctgtgtgt tgttttcaaa aaaggttcaa	1440	
ttctagcatt taactctttg gacatttgag acagcttgcc ctcaatgtag ccgttcgggt	1500	
cgatccatc cacatagctt ctaaaatttt caagctgga gaagttcgcc gggagacttt	1560	
ggteggcaag cttgcgcatt gtctctgtga tttaaacctt ttcttcaatt gtctctctc	1620	
ctctctcgga ctgacgaaag gaatccaga ggcctctgct ggccatttct tgtcttatgg	1680	
tgaatagctt ggttttgatc ctagccctgc ttcttctate gagagtgtag tctgcctttg	1740	

[0007]

tggeccatttc tteccagtg aacgagaaaa tgtggaatgtg tgttttctca gatttaattt	1800
tattggcett ttecagatag tatatgigaa cttctctect tgtaacteca atttcgatga	1860
atctattctc ctgttaatca tacaaatctg gtagaaaatt tggtttctca gccctgtag	1920
tggtgcaaat actgtttact actgtccagg ccattgtgeg atctcttccc tegattattt	1980
caaatctgtg cttaaaaagt gcatttggat caccaagttc tacgattatt gactcgcttc	2040
gcctatigat gaagtgaaaa tcigaataca tgaagcatac ttccaagtga gtgcataatg	2100
cigcaaaattt gttgttttcg attttcaggt cctcccata ctctttcatt gtttttccg	2160
caagctcgac aatcatcgga ttgaagcatt gtgcacaaa atcttccatt ttggatcagt	2220
acctgcttgc get	2233

<210> 14

<211> 2341

<212> DNA

<213> 流感A 病毒

<400> 14

agtagaaaca aggcattttt tcatgaagga caagctaaat tcactatttt tgccgtctga	60
getcttcaat ggtggaacag atcttcatga tctcagtgaa ctcttcttctc tttatcttc	120
cagattcgaa atcaatccgt gcataatc gggtctctga aaccatagcc tccaccatac	180
tggatatecc gactggtctt ctgtatgaac tgcctgggaa gaatttttca aataaattgc	240
agcaccttgc gtacatttgc tcatctcaca gtactctctc ttgacttgta ttaagatgg	300
atcgatttct tttggggatc caggagtgtg ttgttgcaac agcatcatac tccatgtttt	360
tggtctggacc atgtctggtc atcactactg catgtttcat tgattcaatt tctttatggt	420
tgacaaatgg gtacagtggg ttgcataaac gcccttgga atctcctacc atcaattccc	480
atttttagca gaattcagga atgtggagat ttctaatgtt gtataaattt gggcctccgt	540
cggagaccag cagtcagct ttggaacggg ttgtctccc cagtttcttt attcaaatg	600
atcttccggg ttgtatttgc gtgtcacctc tatggcctgc gtaagtgtac ctgtaattct	660
tgtatgaaca ctgaagggtc atttgagctg ttgtctggacc aagatcattg tttatcatat	720
tgtttttgat gacagtaact ccaatactca tctccgttga ctctgtgac ccagacaccc	780
caaaactggg aagctccatg ctgaaattgg caacaaaccc ataacgatag aaaaaactg	840
tgaattcaaa tgactctgtt ctgtttatgt aagacttttt ctgtctcata ttgattccaa	900
gtagcttaca ggttcgataa aaactgtcga ctccggttg aatcccttca tgattgggtg	960
cattcacaat cagagcaaaa tcttcagagg attgaagacc atcccaccag taagtagtct	1020
tggtgtatct cttttgtcca agattcagga tggagacgcc taatacagtg cttaacatat	1080
tgaacatgcc catcatcatt ccagggtcga atgatgcagt cccctctatt aagagcggtc	1140
ggatttttct aatcttcttt ctgtttgaat catgaaata tttcaaatgc atgtttgcta	1200
gcatttctgc aggtatttga gttctaatgt tcatactctt gtctctcaac atataccctt	1260

[0008]

```

ttcccagttct cgccatttttg ttgagaaca ttattggagc aatacttaga acatttctga 1320
accattcggg ctgattttctg gtcataatg tgatcatggc caaaaacatc cgaggattct 1380
gatttttggtt ccatttgggtg ttatctccag tgatggtgaa agaaagtteg gtgtectgag 1440
aattgggtcat catcttccctt acaacatttg ccaactttgc tttcttctea ttgcctccaa 1500
ctggcaacec tgattgttca agtttctcac atatactctt tgccagtgtc tcaacaaagt 1560
atacaaaace ccttatttgc atccctgggg ttgcaattgc tctcgtttt agcttccctc 1620
tctcagcatc ttgtgtcatt gtgttcaggg tcaatgctct aattagataa ctctttttgt 1680
tcaatctctg cttcttttta cccattgttc tctgtgttat cttttctta gtcataatgt 1740
ctctcacccg tctctttctc tgaanaatgag ttgtgatccc cttttctctt ttgttcattg 1800
actccattac atccttaagg aagtctatga gccttccaga ctcatggcc gtgaggccat 1860
ttgatctgaa cacttctatt gtttggcca atgtctgttc agcaggttgg ttctctatta 1920
gagtcacagc ataggtctgt cgcccttgtg teagcttgtc tactcgtgtt tgcigaacaa 1980
cctccatcgt tcaatacac gagttttcaa aaataccagg atgggattec tcaaggaaag 2040
ccatgcctc caataacaa tctgtttggg cataaccact tggttcattg tcttctggca 2100
gtggcccatc aatcgggttg agttgcggtg ctccagtctc ggtgtttgtt gtccatcttc 2160
cctttcttga gtaactgatg gtctcttga cagtatccat ggtgtatcct gtctctgtcc 2220
catggtctga aggagggtct ccagtataag ggaaagtgtg gcttatagca tttgtgtctg 2280
gcacttttaa gaaaagtaag gtccgattga catccattca aatggtttgc ctgctttcgc 2340
t 2341

```

<210> 15

<211> 2341

<212> DNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 15

```

agtagaaaca aggtcgtttt taaactatc gacactaatt gatggccatc cgaattcttt 60
tggctcgtgt ctggctgtca gtaagtaigc tagagtcccg ttccgtttc attaccaaca 120
ccacgtctcc ttgcccaatt agcacattag ccttctctcc ttccgcaagg ttgtcagtt 180
cattgatgct tagtcttggc ccatactctt tgtcttcttt gcccagaatg aggaatcccc 240
tcagaacagc ggactccact ccagctgtgc ctccatcttg gtcttcagtt aaagtgccag 300
catcctttcc gagaactgtg agtctcttcc tggccttgtt atagttaga acaggagaat 360
tgccctttac aagtattctc attctgac ccctcacatt cacagttaa gaggagaact 420
gcattctact ttgttttgtt ggagcggtg cgaagggaag aagttttatt atctgtcgg 480
tatcaaatgt cccaagcaca tccctcattt gttggaacag agttcttaea aacccaactgt 540
attggcctct aatggcctta ggtactaaag actgaaatgg tteaaattec attttattgt 600

```

[0009]

atagcattgt agggttctgg gaccactgaa ttttaacagt ttcccagttt ctgatgatec	660
attgataggt attgaccaac actgattcag gaccattaat ctcccacate attgacgatg	720
agtaagttat tgteagtttc tetgttccct gtgtttcaet gacctctctg ggagacagta	780
gtacatttcc tegtgtgtcc eggatttcca aaaaaaggte aatgeteace actaccctct	840
cctgtctgga gtaetcatct acacceatit tgcigattct cactcctctc attgacatct	900
cgatgettgg agtcatgtcg ggcaatatcc caatcattcc catcacattg tcataggtt	960
caactcccca attttgaaaa agcaettctg catcctctg aaaatgtctt aaaagttgat	1020
gcataggatt caatcctga ttgcacctat tgacgaaatt cagatcacct ctgactgctt	1080
ttatcataca atcctcttgt gaaaatacca tgcccacaat tatgtcttgg gcaatcgact	1140
gttcgtctct cccactcact atcagctgaa tcaatctctt ggttgccttt ctgagtatgg	1200
ctgttgcctt tctcccaacc attgtgaact ctccataacc ctcatgcaet ctatatctca	1260
atgtttgaag attgcccga agcactcttt cctctctctt gactgatgat ccgcttgttc	1320
tcttaaatgt gaatccacca aaactgaagg atgagctaatt tctcagtcctt attgcagcct	1380
tgcataatc cagcgttgc tcttctgttg gttctgcctt aaggatgtct acctcctaa	1440
ttccaccaat ctgtgtgtcg tggcacatct ccaataaaga tctagtgga tctgctgata	1500
ctgcagctct tctcactatg ttcttagcag caataatcaa gcttttgta acatcactat	1560
tcctcacttc cctcctgga gtatacatct gtcccagca tgttcttga gtcaaatgca	1620
acacttcaat gtacacactg ctgtttccac cagccactgg gaggaatctc gttttgcgga	1680
ccagttctct ctccaacatg tatgcaacca tcaaaggaga aattttgcaa tcttgaggtt	1740
cttctttctt ctcttttggt ategttagtt gcgattccga tgttagtate ctggetccca	1800
cttcgttagg gaaaacaact tccatgatta catcctgtgc ctctttgga ctgagatctg	1860
catgaccagg atttatgtca actctccgac gtattttgac ttggtttcta aaatggacag	1920
ggccaaaggt tccatgcttt agcctttcga ctctttcaaa ataagttttg tagatttttg	1980
gataatgaac tgtatttgtt attgttccat tctatttcca ccattgca ggcagaggtg	2040
ataccatcac tcggctcgat ccgcatcat tcatcttact ccataaagtt tgccttgcct	2100
catttctctc aggaatcatt tccgttatcc tctgtctcgc tctaattgga tatctcattg	2160
ccatcateca ttctactcta agtgcctgggt tcttctctg tcttctgat gtgtactctt	2220
tgattatgga catatggctc acggtgggtt ttgtgagtat ctgcgggtg cgagactgeg	2280
acattagatt tcttagttct ttatttcttt ccataatgaa tataattgac ctgcttctge	2340
t	2341

- <210> 16
 <211> 1565
 <212> DNA
 <213> 流感 A 病毒
 <400> 16

[0010]

agtagaaaca aggtatattt tctttaattg tcgtactcct ctgcattgtc tccgaagaaa	60
taagatccct cattactcat gicaaaggaa ggcacgatcg ggcctgcctc ctcttcgtcc	120
gagagctega agactccccc cccctggaaa gacacatctt ctggtcttgc acttcccatc	180
atccttatga ttctggctct catgtcagat gtctccccc ctgtattccc attgaatgct	240
gccataatgg ttgtttgtc aaaagggaga ttctcttgta ctgagaacgt aggttgtatg	300
ctgatttggc ccgcagatgc cctctgttga ttggtgttcc ctccacttct ggtccctatg	360
gcccagtacc tcttctcag ttaagtgtg ctgtattcca tagtctccat atttccattg	420
gaagcaattt gaactcctct agtggaaagc ttccctcttg ggagcaccct cgtcccttgg	480
atgaagctta atactcttag atcttcaaat ggcgcagaat ggcatgccat ccacaccagt	540
tgactcttgt gtcttggtt ctcatctgtt ctgattagcg tgtacacttg gctgttttga	600
agcagcttga aagggtctat tccgactaga gattatccct ctctttcaaa gtcgtaccga	660
ctggtctacgg caggtccata cacacagcca ggcagcagg acttgtgagc aaccgaccct	720
ctcaatatga gtgcagaccg tcttagaaaa gtgagatctt cgaactcagc attccctggg	780
tctcggtctt ctctcacttg atccatcatt gctttttgtg cagcagtttg aaatttccct	840
ttgagaatgt tgcacattct ttcataagca attcttgttt ttcttccatt ctcccccctc	900
cagaagtacc gatcatgat cccacgttgg atcatctga ccaattccat caccattgtt	960
ccaactcctt tgactgcagc acctgctgct ccagaccctc tagggagagt tgaaccttgc	1020
atcagagagc acatcttggg atccattccg gtgcgaacaa gagctcttgt cctctgataa	1080
gttgcatcat tcaaatttga atgccagatc atcatgtgag tcagaccagc cgttgcacgc	1140
tcaccattat tagcttggcg ccagatttgc ctatttctt ctttgcata aaggatgagt	1200
tctctcatcc acttccgtt tactctctg tatataggc ctccagtttt cttaggactt	1260
tccccgcac tgggatgttc tccaggtat ttatttctcc ttctgtcaaa agcagagagc	1320
accattctct ctattgttaa gtgtttttg atcaaccgtc cctcataatc actgagtttg	1380
agttcgggtc acatttggat gtagaatcgt ccaattccac caatcatttt tccgacggat	1440
gctctgattt cagtggcatt ctggcgttct ccatcagttt ccatctgttc gtaagaccgt	1500
ttggtgcctt gggaagccat gattttgatg tcatcagtg agtgattatc taccctgctt	1560
ttgct	1565

<210> 17

<211> 1027

<212> DNA

<213> 流感 A 病毒

<400> 17

agtagaaaca aggtagtatt ttactccagc tctatgctgg caaaatgacc atcgtcagca	60
tccacagcac tctgtgttc ctctcgatat tcttccctca tagacttttg cacccttccc	120

[0011]

gtagaaggcc ctcctttcag tccgtattta aagcgacggt aaatgcattt gaaaaaaga	180
cgatecaagaa tccacaatgt caagtgaag atcccaatga tatitgcggc aatagtgaga	240
ggateacttg aacggttga ttgaccccc cattcgtttc tgataggcct gaaaattttc	300
aagaagatca tttttcagac cagcactgga gctaggatga gtcccaatgg ttctcctgc	360
ttgcaccatt tctctagcct gactagcaac ctccatgccc tctgtctgtt gctcactcga	420
tccagccatt tctccatag ccttagctgt agtctgtggt aaaaccattc tgttctcctc	480
tctgattagt ggattgttg ttgtacccat ttgcctatga gacgatgct gggagtcaga	540
aatctgttca caggttgcac ataccagccc aaatgccact tcagtgttca cagcccccct	600
cctgttgtat atgagcccca tacaactggc aagtgcacca gcagaataac tgagttagat	660
ttctttggcc ccatggaatg ttatctccct cttagcttcc ctatacagtt taactgtttt	720
gtccatgtta ttggatccc cgttcccatt aagggcattt tggacaaagc gtctacgctg	780
cagtcctcgc tcaactggga cggtagcggt gaacacaaat cctaaaaacc ccttagtcag	840
aggtgacagg attgtctttg tctttagcca ttccatgaga acctcaagat cgggtgtctt	900
ccctgcaaaag acatcttcaa gtctctgtgc gatctcggtt ttgagggggc ctgacgggat	960
gatagagagt acgtacgttt cgacctcggt tagaagaact atctttcaat atctacctgc	1020
tttctgct	1027
<210> 18	
<211> 890	
<212> DNA	
<213> 流感 A 病毒	
<400> 18	
agtagaaaca aggtgtttt ttattactaa ataagctgaa acgagaaaat tcttctctct	60
tgtctcaatt caagcaatag atgtaaggt tgcataaatg ttatttctgc aaaactatct	120
tctgttatct tcagtttgtg tctcacttct tcaatcaacc atcttatttc ttcaaacctc	180
tgacctaatg gtctccgcca ttctctgttt ctgttttga gtgagtggag gtctcccaat	240
ctcattactg cttctccaag cgaatctctg tagagtttca gagactcgaa ctgtgttate	300
attccattca agtctcctga tgaggactcc aactgcattt ttgacatcct cagcagtatg	360
tccctggaaga gaaggcaatg gtaaaatttc gccaacaatt gtccctcttt cggtagaagc	420
ccttagcaat attagagtct ccagccggtc aaaaatcaca ctgaagtctg ctttcagtat	480
gatgttctta tccatgatcg cctggccat ttgatacaa agagggcctg ccactttctg	540
cttgggtatg agcatggacc agtcccttga cttttctca agagtcatgt cagttaggta	600
acgcgacgca ggtacagagg ccatggtcat ttttaagtgc tcatcggttt cttctttcag	660
aatccgctcc actatctgct ttccagcaag ttgtgtctgc tcatgttcca gaccgagagt	720
gtgtcccttt cctcttaggg attcttgatc tcggcgaagc ccatcaagga atggggcact	780
acctagtctt tggcttgeaa ctcttttgcg gacatgccaa agaaageaat ctacctgaaa	840

[0012]

gcttgacaca gtgttttgat ccattatgtt ttgtcacc tgcttttgc	890
<210> 19	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HA 的 NCR 结构域	
<400> 19	
agtagaaaca aggggtgttt tctcctatc tctgaaatc taatc	45
<210> 20	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HA 的 NCR 结构域	
<400> 20	
tttggttgtt ttattttcc cctgttttg ct	32
<210> 21	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HA 的 SP 结构域	
<400> 21	
tgcatttgc gctgcaagt cacataacag gaccagtagg ttgccttca t	51
<210> 22	
<211> 255	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HA 的 HA2 结构域	
<400> 22	
ctgatatgc ccattgatt ccaatttcc tccattacc ttctccctgt tcaacttga	60

[0013]

ctcttctgaa tatttgggat aatcataagt cccatttctt acactttcca tgcattcatt 120
gtcacacttg tggtagaact caaaacatcc atttccgatt tctttggcat tattctttaa 180
ttggcttttt acittctcat acagattctt cacatttgag tcatggaaat ccagagtcct 240
ttcattttcc agtag 255

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HA 的 TM 结构域

<400> 23

catcagaaa ctgattgccc ccaggagac caaaagcacc agtgaactgg cgacagtga 60
gtagatcgcc agaat 75

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HA 的 Cyto 结构域

<400> 24

tcatgtgcat attctgcact gcaaagatcc attagaaca 39

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NA 的 NCR 结构域

<400> 25

agtagaaaca aggagttttt tgaacaga 28

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0014]

<220>	
<223> NA 的 NCR 结构域	
<400> 26	
tttaaactec tgetttcgct	20
<210> 27	
<211> 93	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NA 的 TM 结构域	
<400> 27	
tgaatggeta atccatattg agattatatt cccatattgc aatattagge taattagtee	60
gactaccaga cagattgate caatggttat tat	93
<210> 28	
<211> 105	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NA 的 Stalk 结构域	
<400> 28	
gcgggttaat atcactgaag tigtgtcctt taccaggtg ctatttttat aggtaatgat	60
gttttggttg catattccag tatggttttg acttccagtt tgaat	105
<210> 29	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NA 的 Cyto 结构域	
<400> 29	
tttctgattt ggattcat	18



图 1

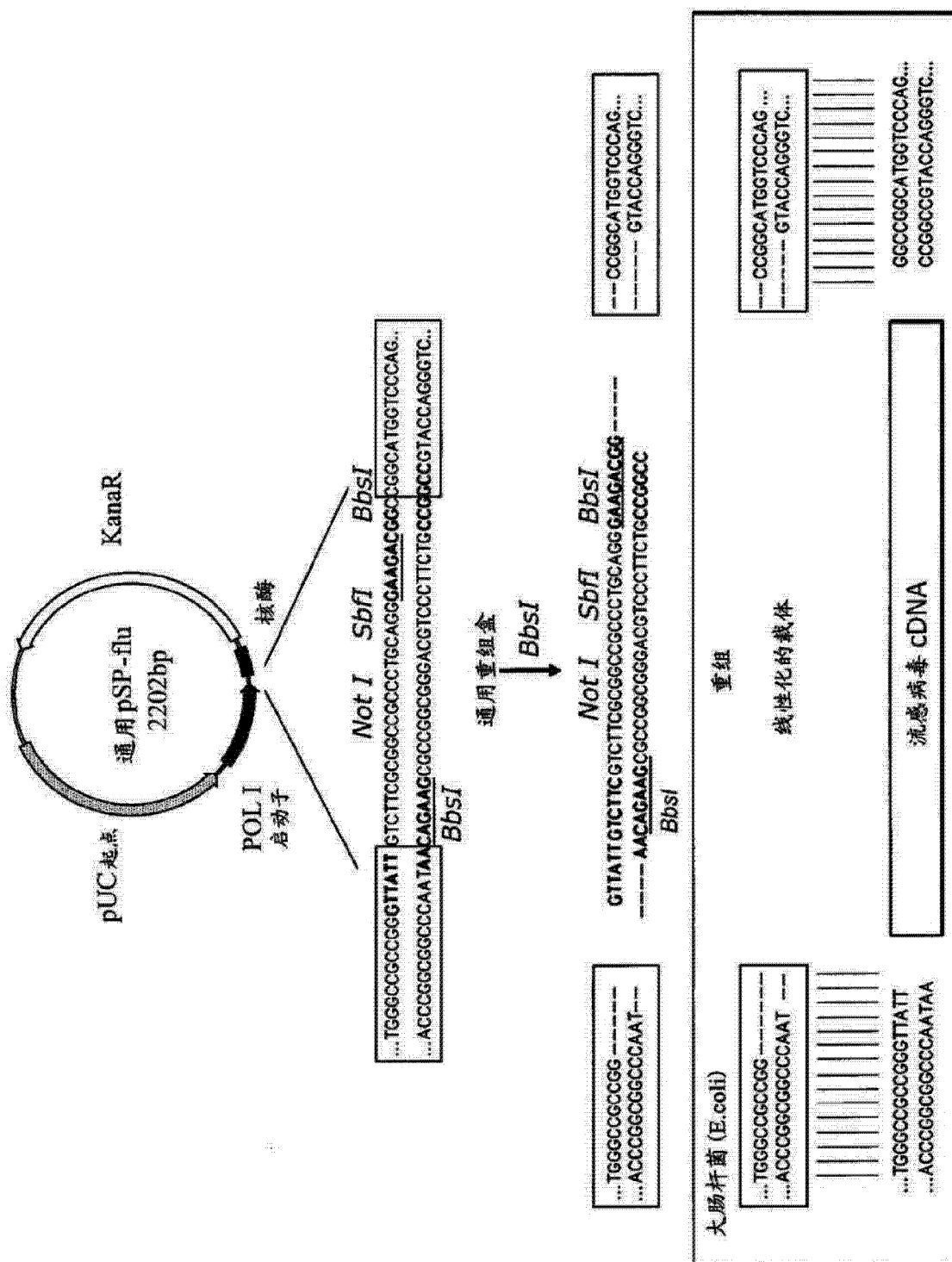


图 2