



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104862335 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510264548. 1

(22) 申请日 2010. 07. 30

(30) 优先权数据

61/273, 151 2009. 07. 31 US

(62) 分案原申请数据

201080041918. 0 2010. 07. 30

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 P·道米策 M·弗兰蒂 P·马森

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

C12N 15/86(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书20页
序列表5页

(54) 发明名称

反向遗传系统

(57) 摘要

本发明提供各种用于生产分段 RNA 病毒的反向遗传系统, 其中所述系统不需要细菌增殖其所有表达构建体。

1. 一种非细菌表达构建体,所述构建体含表达分段 RNA 病毒的至少两种不同基因组区段的编码序列。
2. 如权利要求 1 所述的构建体,其特征在于,所述构建体缺失细菌复制起点和细菌选择标记。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的构建体,其特征在于,所述构建体为线性。
4. 如前述权利要求中任一项所述的构建体,其特征在于,所述构建体含用于表达 A 型或 B 型流感病毒的所有 8 种基因组区段的编码序列。
5. 一种含前述权利要求中任一项所述的非细菌表达构建体的真核宿主细胞。
6. 一种表达构建体的集合,所述集合包括 (i) 含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 PB2、PB1、PA、NP 和 NS 的编码序列的第一非细菌表达构建体和 (ii) 含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 HA 的编码序列的第二非细菌表达构建体。
7. 如权利要求 6 所述的构建体集合,其特征在于,所述第一或第二非细菌表达构建体还包含 NA 和 M 基因组区段。
8. 一种表达构建体集合,所述集合含 (i) 至少一种含分段 RNA 病毒的一种或更多种基因组区段的编码序列的质粒和 (ii) 至少一种含所述 RNA 病毒的一种或多种基因组区段编码序列的非细菌表达构建体,其中细菌和非细菌构建体的组合提供所述 RNA 病毒的至少两种不同基因组区段。
9. 一种含权利要求 8 所述的构建体集合的真核宿主细胞。
10. 一种含线性表达构建体的宿主细胞,所述构建体含分段 RNA 病毒的至少两种不同基因组区段的编码序列。

反向遗传系统

[0001] 本申请是 2010. 07. 30 提交的 CN201080041918. 0, 题为“反向遗传系统”的分案申请。

[0002] 本专利申请要求 2009 年 7 月 31 日提交的美国临时专利申请 61/273, 151 号的优先权, 其全部内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及反向遗传领域。此外, 其涉及制备病毒, 所述病毒例如用于制造防御各种病毒的疫苗。

背景技术

[0004] 反向遗传可在细胞培养中重组表达和操作病毒。它是病毒学和疫苗制造的有效工具, 因为能快速生产和突变病毒, 包括重排列生产。所述方法涉及用一种或多种编码所述病毒基因组的质粒转染宿主细胞然后从所述细胞中分离 (或“拯救”) 所述病毒。其可用于生产各种 RNA 病毒, 包括正链 RNA 病毒 [1, 2], 负链 RNA 病毒 [3, 4] 和双链 RNA 病毒 [5]。

[0005] 已知方法的缺陷在于其依赖质粒。产生这些质粒需要在细菌中进行克隆步骤, 这需要数天或数周来形成和验证分段 RNA 病毒。这种延迟干扰了季节性流感疫苗的年度生产时间表并阻止了对大流行爆发的快速响应。此外, 所述质粒用于转染宿主细胞生产病毒时, 使用细菌导致引入细菌污染物的风险。这些缺点在参考文献 6 中通过使用线性表达构建体代替质粒来处理。所述线性表达构建体不含在细菌增殖中使用的扩增和 / 或选择序列, 且几乎总是造成病毒准种的单一代表的分子克隆。该线性表达构建体可用于直接转染宿主细胞, 产生更快的反向遗传系统: 参考文献 6 提示所述线性构建体的转染可在收到病毒分离物后数小时内实现, 避免分子克隆所需要的时间并可接触原始病毒准种群体的有用成员。

发明内容

[0006] 对于分段病毒, 参考文献 6 中使用的方法每病毒区段用一种线性构建体。因此本方法的反向遗传病毒生产需要用八种不同的构建体转染宿主细胞。本发明的目的是避免使用该多重转染。更一般地, 本发明的目的是进一步提供和改善对分段 RNA 病毒实施反向遗传的方法, 具体地是进一步提供不需要使用细菌的方法。本发明提供各种用于生产分段 RNA 病毒的反向遗传系统, 其中所述系统不需要细菌增殖其所有表达构建体。理想地, 完全不需要细菌。

[0007] 在第一方面, 反向遗传系统基于编码至少两种病毒基因组区段的非细菌表达构建体。该系统降低需转染到宿主细胞中用于生产完整病毒基因组的构建体数量。例如, 单一构建体可用于编码 8 种流感病毒区段, 因此转染复杂性比参考文献 6 降低 8 倍。因此本发明提供非细菌表达构建体, 所述构建体含表达分段 RNA 病毒的至少两种不同基因组区段的编码序列。本发明还提供包含所述非细菌表达构建体的真核宿主细胞。本发明还提供两种或多种该非细菌表达构建体集合, 其中所述集合编码完整分段 RNA 病毒基因组。

[0008] 在第二方面,反向遗传系统基于 (i) 至少一种细菌表达构建体和 (ii) 至少一种非细菌表达构建的组合。这两种类型的构建体各提供至少一种病毒基因组区段。尽管本方面不能完全避免使用细菌制备所述系统,但其仍非常有效。例如,利用可获得的各种方便的分子生物学技术,表达所述病毒区段的子集的构建体可在细菌中增殖并操纵。该子集的区段可为那些通常不需要在株系之间变化的区段。剩余病毒区段可由非细菌表达构建体编码,且这些构建体可在短时间内快速制备而不需要细菌工作。因此该组合表示可在短时间内将注意力集中于感兴趣的区段,且所述构建体可与已获得的已有“背景”区段相结合。因此本发明提供表达构建体集合,所述集合含 (i) 至少一种含分段 RNA 病毒的一种或更多基因组区段的编码序列的质粒和 (ii) 至少一种含所述 RNA 病毒的一种或多种基因组区段编码序列的非细菌表达构建体,其中细菌和非细菌构建体的组合提供所述 RNA 病毒的至少两种不同基因组区段。本发明还提供包含所述构建体集合的真核宿主细胞。

[0009] 第三方面,本发明提供含线性表达构建体的宿主细胞,所述构建体含分段 RNA 病毒的至少两种不同基因组区段的编码序列。所述细胞可为细菌但优选真核细胞。

[0010] 第四方面,本发明提供含流感病毒的 8 种不同基因组区段的编码序列的细菌质粒,其中各区段的表达受到 (i) 哺乳动物 pol-I 启动子或 (ii) 噬菌体聚合酶启动子的控制。本发明还提供含所述构建体的细胞,该细胞可为细菌或真核细胞。

[0011] 本发明还提供制备本发明宿主细胞的方法,所述方法包括将上述一种或多种表达构建体插入所述细胞的步骤。

[0012] 本发明还提供在本发明的真核宿主细胞中表达 RNA 的方法,所述方法包括在从所述表达构建体发生所述 RNA 病毒区段表达的条件下培养所述宿主细胞的步骤。

[0013] 本发明还提供了生产分段 RNA 病毒的方法,所述方法包括在从所述表达构建体发生所述 RNA 病毒区段表达的条件下培养所述宿主细胞的步骤以生产所述病毒。然后从所述宿主细胞或所述宿主细胞的培养物中纯化所述方法生产的病毒。本发明还提供了通过此方法得到的病毒。所述病毒可用于感染蛋或细胞以培养病毒用于疫苗制造。因此本发明提供制备病毒疫苗的方法,所述方法包括用本发明的病毒感染培养宿主(如蛋或细胞)、培养所述病毒、然后从所培养的病毒中制备疫苗。

[0014] 本发明还提供制备 DNA 分子的方法,所述分子含表达分段 RNA 病毒基因组的至少两种不同区段编码序列(如本发明的非细菌表达构建体),其中至少部分所述 DNA 通过化学方法制备。

[0015] 本发明还提供制备 DNA 分子的方法,所述分子含表达分段 RNA 病毒基因组的至少两种不同区段编码序列(如本发明的非细菌表达构建体),其中所述方法包括步骤:(i) 合成所述 DNA 分子的多种重叠片段,其中所述重叠片段跨越所述完整 DNA 分子;和(ii) 连接所述片段以提供所述 DNA 分子。然后可回收所述 DNA 分子并用于本发明的反向遗传方法,如其可插入真核细胞用于产生所述分段 RNA 病毒。所述 DNA 分子在回收和插入所述真核细胞之间优选不插入细菌细胞,即所述构建体直接用于病毒拯救而不用任何中间的细菌扩增。

[0016] 本发明还提供分段 RNA 病毒的表达构建体库,其中各表达构建体含所述病毒的至少一种基因组区段的编码序列。所述库包括所述基因组的各区段至少一种构建体,从而所述完整基因组可被选择所述库的子集所代表。一些病毒区段可比其他更通常地代表,如流感病毒库可包括比平均更多的 HA 和 NA 区段。为了构建所需的感兴趣的病毒基因组,选择

编码各所需区段的库成员然后表达以产生所需的病毒。所述库对流感病毒更有效,通过允许骨架基因组区段与感兴趣的 HA 和 NA 区段的快速重配以产生有用的病毒用于疫苗生产。

[0017] 非细菌表达构建体

[0018] 本发明的所述第一、第二和第三方面利用一种或多种“非细菌表达构建体”。该术语表示所述构建体可在真核细胞中驱动其内编码的病毒 RNA 区段的表达,但其不包括用于所述构建体在细菌中增殖所需的组分。因此所述构建体不含细菌复制起点(ori),且通常不含细菌选择标记(如抗生素抗性标记)。真核宿主细胞中驱动所需的病毒 RNA 表达不需要这些组分,所以不用细菌增殖所述构建体时其多余。没有这些增殖组分表明所述构建体导入细菌中不会复制。

[0019] 所述非细菌构建体可为线性或环形。线性构建体更常用(如参考文献 6 中所示),但也可使用环形构建体。环形构建体可通过环化线性构建体制成,反之亦然。所述环化方法如参考文献 6 所述。环形构建体的线性化可用各种容易的方法实现,如利用一种或多种限制性内切酶,或通过用核酸扩增技术(如 PCR)从模板(包括环形模板)中扩增。

[0020] 非细菌构建体含一种或多种病毒 RNA 区段的编码序列。所述第一和第三方面的构建体编码至少 2 种不同的病毒 RNA 区段。所述编码区段可表达然后行使病毒 RNA 的功能,其可包装入病毒体中以产生重组表达病毒。因此所述构建体适于通过反向遗传单独或与其他构建体结合生产 RNA 病毒。

[0021] 所述构建体通常由双链 DNA 构成。该构建体可通过已知的 DNA 合成和组装方法方便地制成。现代技术可提供编码完整病毒的合成 DNA 分子,即使其含有许多基因组区段。例如,表达所述流感病毒基因组的所有 8 种区段的构建体需要约 25000 碱基对(25kbp)的 DNA,其处于现有构建体合成能力范围之内,如参考文献 7 报道的通过组装各约 5kbp 合成片段而化学合成 32kbp 基因,和参考文献 8 报道的通过约 5kbp、7kbp、24kbp、72kbp 或 144kbp 长的中间阶段生产 583kbp 合成染色体。详见下述。

[0022] 该合成方法是提供构建体(且具体地为提供线性构建体)的优选方法。然而,不使用化学合成,构建体 DNA 可通过逆转录提供 cDNA 从 RNA 病毒制备,然后额外的 DNA 序列可连接 cDNA(如通过连接)或 cDNA 可整合入到更大的 DNA 构建体中。在一些实施方式中,酶学和化学方法混合使用,如逆转录后化学添加末端突出。

[0023] 除了不含任何细菌增殖组件,所述非细菌构建体还可不含任何细菌 DNA 修饰。因此所述构建体可不含甲基化腺嘌呤残基,且任何甲基化胞嘧啶残基会在 CpG 二核苷酸基序中,即不会有甲基化胞嘧啶不在胍基后。

[0024] 所述构建体可通过任何合适的转染方法导入宿主细胞,如通过电穿孔、脂质转染、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂质体、基因枪、微粒轰击或微注射。一旦转染后,所述宿主细胞会识别所述构建体中的遗传元件并开始表达编码的病毒 RNA 区段。

[0025] 构建体合成

[0026] 如上所述,至少部分 DNA 表达构建体可通过化学合成制备。所述构建体包含表达分段 RNA 病毒基因组的至少两种不同区段(优选表达分段 RNA 病毒的完整基因组)的编码序列,且可方便地用参考文献 8 公开的合成方法制备。

[0027] 所述合成方法理论上涉及将所需的 DNA 序列分裂为片段。这些片段理论上还可分裂一或多次,最终得到的片段集合中各尺寸可通过选择的 DNA 合成方法如亚磷酰胺化学法

来制备。然后合成这些片段并连接以从理想的分裂水平产生更长的片段,然后这些更长的片段连接等等,直到最终制备完整的序列。参考文献 8 用此方法通过在不同水平组装约 10^4 个 50 聚体寡核苷酸制备了 583kbp 基因组。所述 50 聚体组装到 5-7kb 长的盒中,然后这些盒组装到约 24kbp 片段中,所述片段然后组装到约 72kbp 片段中,然后约 144kbp,然后得到两种约 290kbp 构建体,最后所述构建体连接为完整基因组。

[0028] 所述片段设计为有重叠,从而他们以正确的顺序组装。例如,所述盒重叠至少 80bp,从而使他们能组装到所述约 24kbp 片段中等。因此,本方法涉及合成所需 DNA 分子的多种重叠片段,从而所述重叠的片段跨越完整 DNA 分子。各片段的两末端与相邻的 5' 或 3' 片段重叠,除了线性分子的末端片段不需要重叠(但为了合成环形分子,所述两个末端片段需重叠)。各水平的片段可保持为载体中的插入部分如在质粒或 BAC 或 YAC 载体中。合成过程中的片段组装可包括体外和 / 或体内重组。对于体外方法,用 3' 外切核酸酶消化可用于暴露片段末端的突出端,然后退火重叠片段中的互补突出端,之后连接修复(“钝化组装”)。对于体内方法,可用例如参考文献 8 中公开的 TAR 克隆方法组装重叠克隆。对于 <100kbp 的片段(如容易地足够编码流感病毒基因组的所有区段),可仅依赖体外重组方法。

[0029] 可用其他合成方法。例如,参考文献 7 公开了通过常规克隆方法合成约 5kbp 的片段然后组装入更长序列中的方法。通过基于自动化 PCR 的基因合成法将未纯化的 40 碱基的合成寡核苷酸构建到 500-800bp 合成子中,且这些合成子用少量内切核酸酶和“选择性连接”连接成约 5kb 的多重合成子区段。这些大片段随后可通过常规克隆组装到更长的序列中。这些方法可容易地提供 32kbp DNA 分子,其足以编码完整流感病毒。

[0030] 同样地,参考文献 9 公开了从跨越所述完整序列的 7 种 DNA 片段组装 32kb 分子的方法。所述 7 种 DNA 的末端用独有接头工程改造,从而仅相邻片段可以组装。各 DNA 末端互相连接的限制性位点接头被系统地移出组装。

[0031] 一旦所述完整 DNA 分子组装后,将其纯化并可直接插入真核细胞用于生产病毒,而没有将所述 DNA 放入细菌中的中间步骤。

[0032] 通过这些方法制备时,本发明的 DNA 表达构建体可包括一种或多种“水印”序列。这些序列可用于鉴定或编码所述 DNA 中的信息。其可为非编码或编码序列。最常见地,其编码编码序列中的信息而不改变氨基酸序列。对于 DNA 编码的分段 RNA 病毒基因组,任何水印序列理想地包括在基因间位置,由于同义密码子改变可对编码的 RNA 区段具有显著的生物学效应。

[0033] 质粒

[0034] 本发明的所述第二和第四方面涉及使用质粒。这些质粒可方便地在细菌中增殖且因此含细菌复制起点(ori),且通常还含细菌选择标记(如抗生素抗性标记)。因此所述质粒容易与上述非细菌表达构建体区别(序列上和功能上)。总的来说,所述质粒可与本领域已知的用于反向遗传的质粒相同,但现有技术没有公开其与非细菌表达构建体结合使用用于病毒拯救。

[0035] 所述质粒还含有必需遗传元件以在真核宿主细胞中存活,其中可发生病毒生产。因此所述质粒是可在细菌宿主中增殖、操纵和 / 或扩增,但可在真核宿主中驱动病毒 RNA 表达的穿梭质粒。

[0036] 所述质粒编码至少一种病毒 RNA 区段（第四方面的 8 种流感病毒片段）且在真核宿主细胞中这些编码序列可表达然后行使病毒 RNA 的功能，其可被包装入病毒体以产生重组表达病毒。

[0037] 所述质粒可通过任何合适的转染方法导入真核细胞，如通过电穿孔、脂质转染、基因枪或微注射。一旦转染后，所述宿主细胞会识别所述构建体中的遗传元件并开始表达编码的病毒 RNA 区段。

[0038] 质粒编码多 RNA 片段时，可采取步骤以最小化质粒内重组。多重相同启动子和终止子（pol-I 和 pol-II）的存在会增加此风险，由于可使用在细菌增殖期间提供高拷贝数的 ori。因此质粒存在与细菌中时优选具有相对低拷贝数，如 <50 拷贝 / 大肠杆菌细胞。可获得各种低拷贝数载体如参考文献 10 中所用的载体，包括 p15a ori 或质粒 F ori 的载体 [11] 等。用具有不同序列的启动子和 / 或避免带有提供额外启动子的多余编码区域也有效。诸如此的步骤可提高质粒的稳定性。

[0039] 表达构建体

[0040] 本文所用非细菌和质粒表达构建体编码病毒 RNA 区段。这些编码序列可在合适的真核宿主细胞中表达以提供可包装入病毒体中以产生重组表达病毒的病毒 RNA。

[0041] 病毒 RNA 区段的表达会受到 RNA 编码序列上游的启动子的控制。动物细胞中表达病毒 RNA 区段的启动子会被 DNA 依赖的 RNA 聚合酶识别且通常为 pol-I 启动子（见下）。然而可使用其他系统，且已知使用与所述聚合酶的原位来源相关的噬菌体或细菌 RNA 聚合酶启动子，如 T7RNA 聚合酶 [12]。各病毒区段有其自身启动子，且这些可彼此相同或不同。

[0042] 所述病毒为正链 RNA 病毒时，用仅编码所述病毒区段的表达构建体转染细胞通常已足够。例如，编码所述脊髓灰质炎病毒基因组的质粒转染引起传染性脊髓灰质炎病毒的复苏 [1, 2]。负链 RNA 病毒的反向遗传具有额外的挑战性，因为所述反义病毒 RNA 通常无感染性且因此需要病毒蛋白来完成生命周期。因此，病毒蛋白如病毒聚合酶作为蛋白或用于原位蛋白表达的基因提供。

[0043] 因此表达构建体可包含在真核细胞中表达病毒蛋白的编码序列，具体为负链病毒。合适的蛋白表达启动子包括来自巨细胞病毒（CMV）的启动子。所述病毒区段和病毒蛋白的共表达原位产生所有必需元件用于病毒在所述宿主细胞中重组组装。可以在同一构建体上包含所述蛋白编码序列作为 RNA 编码序列，但也可用不同构建体表达 RNA 和蛋白。蛋白编码和 RNA 编码序列在同一构建体上时，其可为不同序列，但其也可用两个不同启动子驱动表达以从同一 DNA 序列中提供 RNA 和蛋白表达。

[0044] 本领域已知用双向构建体从连接同一 DNA 序列的 pol-I 启动子来表达病毒 RNA 和 pol-II 启动子来表达病毒蛋白（如参见参考文献 13）。所述两种启动子从同一构建体中驱动不同方向（即 5' -3' 和 3' -5'）的表达，且可位于同一双链 DNA 中的不同链上。使用共有 DNA 序列降低所述宿主细胞需要的表达构建体的总数和 / 或全长。双向表达构建体可包含位于上游 pol-II 启动子和下游 pol-II 启动子之间的基因或 cDNA。从所述 pol-II 启动子转录所述基因或 cDNA 产生可翻译为病毒蛋白的加帽正义病毒 mRNA，而从所述 pol-I 启动子的转录产生未加帽的负义 vRNA。

[0045] 表达构建体各转录单元通常包括 RNA 转录终止序列。所述终止序列可为内源终止序列或对所述宿主细胞非内源的终止序列。本领域技术人员清楚合适的终止序列，其包括

但不限于, RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列和核酶。此外, 所述表达构建体可包括针对 mRNA 的一种或多种聚腺苷酸化信号, 尤其在用于蛋白表达的基因的末端。病毒 RNA 区段的编码序列通常在一端侧接 pol-I 启动子和另一端侧接 pol-II 启动子, pol-I 启动子和末端序列侧接所述区段编码序列, 所述序列又被 pol-II 启动子和末端序列侧接。这些各种序列元件相互的间隔对所述聚合酶正确起始和终止复制很重要, 但这不难实现。

[0046] 表达构建体可包括可选的标记用于在真核细胞中选择。

[0047] 表达构建体可包括一种或多种多克隆位点以方便导入 DNA 序列。

[0048] 分离的编码序列用于病毒 RNA 和蛋白时可用不同序列, 例如所述蛋白编码序列可针对具体宿主细胞优化密码子, 而所述 RNA 编码序列使用所研究的病毒的天然密码子。RNA 编码序列的密码子优化用处不大, 因为所述 RNA 需针对病毒体包装最优化, 而不是重组蛋白表达。

[0049] 表达宿主为犬细胞如 MDCK 细胞系时, 蛋白编码区可针对犬表达优化, 如使用来自野生型犬基因或来自犬病毒的 pol-II 启动子, 和 / 或使用更适于犬细胞而不是人细胞的密码子。例如, 人基因较偏好将 UUC 用作 Phe 的密码子 (54%), 在犬细胞中该偏好更强 (59%)。相似地, Ile 密码子在人细胞中没有明显偏好, 而 53% 的犬密码子将 AUC 用于 Ile。犬病毒, 如犬细小病毒 (ssDNA 病毒) 也可作为密码子优化提供指导, 如犬细小病毒序列中 95% 的 Phe 密码子为 UUU (对比犬基因组中的 41%), 68% 的 Ile 密码子为 AUU (对比 32%), 46% 的 Val 密码子为 GUU (对比 14%), 72% 的 Pro 密码子为 CCA (对比 25%), 87% 的 Tyr 密码子为 UAU (对比 40%), 87% 的 His 密码子为 CAU (对比 39%), 92% 的 Gln 密码子为 CAA (对比 25%), 81% 的 Glu 密码子为 GAA (对比 40%), 94% 的 Cys 密码子为 UGU (对比 42%), 仅 1% 的 Ser 密码子为 UCU (对比 24%), CCC 从不用于 Phe 且 UAG 从不用作终止密码子。因此蛋白编码基因可做得更像已为在犬细胞中表达而自然优化的基因, 从而方便表达。

[0050] RNA 聚合酶 I 启动子

[0051] 大多数反向遗传方法使用含 RNA 聚合酶 I (RNA pol-I) 启动子驱动病毒 RNA 区段转录的表达载体。所述 pol-I 启动子产生的转录物具有许多病毒如流感病毒完全感染性所必须的未修饰 5' 和 3' 末端。

[0052] 天然 pol-I 启动子为二分式, 具有两个分离的区域: 核心启动子和上游启动子元件 (UPE)。尽管这种常见结构与大多数物种的 pol-I 启动子是相同的, 但是启动子的实际序列有很大不同。所述核心启动子围绕转录起始点, 从约 -45 延伸至 +20, 且足以起始转录。所述核心启动子通常富含 GC。尽管所述核心启动子单独足以起始转录, 但 UPE 能大幅提高所述启动子的效率。所述 UPE 通常从约 -180 延伸至 -107 且也富含 GC。所述启动子的活性可由远端存在的增强子样序列进一步增强, 所述增强子样序列可通过稳定预启动复合物来行使功能。

[0053] 已在各物种包括人、狗和鸡中鉴定 pol-I 启动子的序列。本发明一般使用宿主细胞内源的 pol-I 启动子, 因为 pol-I 启动子的活性可限制在较窄的宿主范围内。然而, 在一些情况中, pol-I 启动子可在其天然宿主外激活, 例如人 pol-I 启动子可在猴细胞和一些狗细胞中激活。

[0054] 表达构建体可包括至少一种核心启动子;优选还包括至少一种 UPE,且还可包括一种或多种增强子元件。也可用天然启动子的片段,只要这些片段可以起始转录。可依本发明使用的人 pol-I 启动子可包括 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示序列或其变体。依本发明使用犬启动子时,其可包括 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示序列或其变体。反向遗传的犬 pol-I 启动子在参考文献 14 和 15 中公开。

[0055] 所述 pol-I 启动子可包括 (i) 具有与 SEQ ID NO:1-5 中任一项的序列同一性至少为 p% 的序列,和 / 或 (ii) SEQ ID NO:1-5 中任一项的片段,只要在感兴趣的宿主细胞内所述启动子能起始并驱动转录操作性连接的 RNA 编码序列。p 值可为 75、80、85、90、95、96、97、98、99 或更大。所述片段自身可具有足够的长度以驱动表达(如 SEQ ID NO:4 是 SEQ ID NO:3 的片段)或所述片段可连接其他序列且这种组合会驱动表达。此类 pol-I 启动子在感兴趣的宿主细胞内驱动表达的能力可容易地评估,如用上述试验使用所述启动子控制下的反义报告基因。

[0056] 病毒制备

[0057] 本发明用于生产病毒株系,包括修饰或重配株系。所述技术可用 DNA 构建体的体外操控以产生病毒区段的组合、以便于操控病毒区段中的编码序列或非编码序列、以引入突变等。生产重配病毒株是有用的,因为这样可显著减少获得重配种病毒所需的时间,这在需要快速生产疫苗以抵抗流行病的情况中尤其有用。因此表达构建体优选用于表达来自或源自至少两种不同野生株系的病毒区段。

[0058] 为了生产重组病毒,细胞必须表达组装病毒粒子所需病毒基因组的所有区段,克隆到本发明表达构建体内的 DNA 优选提供所述病毒所有 RNA 和蛋白,但也可使用辅助病毒以提供一些所述病毒和蛋白,尽管优选不使用辅助病毒的系统。

[0059] 为了从本发明的构建体提供所有病毒区段,可用各种排列。根据第一方面,所有病毒区段可编码在非细菌表达构建体上,只要这些构建体中至少一种编码至少两种病毒基因组区段(不同于参考文献 6);且理想地,所有病毒基因组区段编码在单一非细菌构建体上,从而用该单一构建体的转染足以给宿主细胞提供生产感兴趣的病毒的能力。相反,根据第二方面,所述病毒区段在细菌和非细菌表达构建体之间分裂,且其在细胞中的组合存在提供了所有病毒区段的表达。

[0060] 即使在第一方面,优选在一个以上表达构建体之间分裂所述病毒区段。以 A 型流感病毒株系生产疫苗为例,8 种区段中 6 种一般数年不改变,且每季该稳定的病毒骨架被加上了季节性 HA 和 NA 区段。在此情况下,在一构建体上编码所述 6 种骨架区段并将其他 2 种可变区段一起编码在第二构建体上或分别编码在第二和第三构建体上是有帮助的。这使所述季节性变化在更小的构建体上实现,还使所述骨架构建体针对骨架表达特别优化。

[0061] 病毒

[0062] 本发明的方法可用任何分段 RNA 病毒实施。所述病毒可为正义链、负义链或双链。

[0063] 所述病毒为负链 RNA 病毒时,所述病毒可来自选自下组的科:副粘病毒科 (Paramyxoviridae)、肺炎病毒亚科 (Pneumovirinae)、弹状病毒科 (Rhabdoviridae)、纤丝病毒科 (Filoviridae)、博尔纳病毒科 (Bornaviridae)、正粘病毒科 (Orthomyxoviridae)、本扬病毒科 (Bunyaviridae)、或沙粒病毒科 (Arenaviridae)。此外,所述病毒可来自选自下组的属:副粘病毒属 (Paramyxovirus)、正粘病毒属 (Orthomyxovirus)、呼吸道病毒

属 (Respirovirus)、麻疹病毒属 (Morbillivirus)、腮腺炎病毒属 (Rubulavirus)、亨尼病毒属 (Henipavirus)、禽副粘病毒属 (Avulavirus)、肺炎病毒属 (Pneumovirus)、偏肺病毒属 (Metapneumovirus)、水泡病毒属 (Vesiculovirus)、狂犬病病毒属 (Lyssavirus)、短暂热病毒属 (Ephemerovirus)、质型弹状病毒属 (Cytorhabdovirus)、核型弹状病毒属 (Nucleorhabdovirus)、粒外弹状病毒属 (Novirhabdovirus)、马堡病毒属 (Marburgvirus)、埃博拉病毒属 (Ebolavirus)、博尔纳病毒属 (Bornavirus)、A 型流感病毒 (Influenzavirus A)、B 型流感病毒 (Influenzavirus B)、C 型流感病毒 (Influenzavirus C)、托高土病毒属 (Thogotovirus)、蛙传贫病毒属 (Isavirus)、正本雅病毒属 (Orthobunyavirus)、汉坦病毒属 (Hantavirus)、内罗病毒属 (Nairovirus)、白蛉病毒属 (Phlebovirus)、番茄斑萎病毒属 (Tospovirus)、沙粒病毒属 (Arenavirus)、蛇形病毒属 (Ophiovirus)、纤细病毒属 (Tenuivirus)、或 δ 病毒属 (Deltavirus)。在具体实施方式中,所述负链 RNA 病毒选自下组:仙台病毒 (Sendai virus)、麻疹病毒 (Measles virus)、腮腺炎病毒 (Mumps virus)、亨德拉病毒 (Hendra virus)、新城疫病毒 (Newcastle disease virus)、人呼吸道合胞病毒 (Human respiratory syncytial virus)、禽肺病毒 (Avian pneumovirus)、水泡性口炎印第安那病毒 (Vesicular stomatitis Indiana virus)、狂犬病病毒 (Rabies virus)、牛暂时热病毒 (Bovine ephemeral fever virus)、莴苣坏死黄化病毒 (Lettuce necrotic yellows virus)、马铃薯黄矮病毒 (Potato yellow dwarf virus)、传染性造血组织坏死病毒 (Infectious hematopoietic necrosis virus)、维多利亚湖马尔堡病毒 (Lake Victoria marburgvirus)、扎伊尔埃波拉病毒 (Zaire ebolavirus)、博纳病病毒 (Borna disease virus)、流感病毒 (Influenza virus)、托高土病毒 (Thogoto virus)、蛙传染性贫血病毒 (Infectious salmon anemia virus)、布尼安维拉病毒 (Bunyamwera virus)、汉坦病毒 (Hantaan virus)、达格毕病毒 (Dugbe virus)、裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus)、番茄斑萎病毒 (Tomato spotted wilt virus)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (Lymphocytic choriomeningitis virus)、柑桔鳞皮病毒 (Citrus psorosis virus)、水稻条纹病毒 (Rice stripe virus)、和丁型肝炎病毒 (Hepatitis delta virus)。在优选实施方式中,所述病毒为流感病毒(如下)。

[0064] 所述病毒为正链 RNA 病毒时,所述病毒可来自选自下组的科:动脉炎病毒科 (Arteriviridae)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 和杆套病毒科 (Roniviridae)。此外,所述病毒可为选自下组的属的病毒:动脉炎病毒属 (Arterivirus)、冠状病毒属 (Coronavirus)、肠道病毒属 (Enterovirus)、环曲病毒属 (Torovirus)、头甲病毒属 (Okavirus)、鼻病毒属 (Rhinovirus)、肝病毒属 (Hepatovirus)、心病毒属 (Cardiovirus)、口蹄疫病毒属 (Aphthovirus)、副肠孤病毒属 (Parechovirus)、马鼻病毒属 (Erbovirus)、崙病毒属 (Kobuvirus) 和捷申病毒属 (Teschovirus)。在具体实施方式中,所述病毒选自下组:严重急性呼吸道综合症病毒 (severe acute respiratory syndrome (SARS) virus)、脊髓灰质炎病毒 (polio virus)、A 型人肠病毒 (Human enterovirus A) (HEV-A)、B 型人肠病毒 (Human enterovirus B) (HEV-B)、C 型人肠病毒 (Human enterovirus C)、D 型人肠道病毒 (Human enterovirus D)、A 型肝炎病毒 (Hepatitis A) 和 A 型与 B 型人鼻病毒 (Human rhinovirus)。

[0065] 所述病毒为双链 RNA 病毒时,所述病毒可来自选自下组的科:双核糖核酸病毒

科 (Birnaviridae)、囊病毒科 (Cystoviridae)、减毒病毒科 (Hypoviridae)、分体病毒科 (Partitiviridae)、呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 和整体病毒科 (Totiviridae)。此外,所述病毒可为选自下组的属的病毒:水生双 RNA 病毒属 (Aquabirnavirus)、禽双 RNA 病毒属 (Avibirnavirus)、昆虫双 RNA 病毒属 (Entomobirnavirus)、囊状病毒属 (Cystovirus)、分病毒 (Partitivirus)、 α 潜隐病毒属 (Alphacryptovirus)、 β 潜隐病毒属 (Betacryptovirus)、水生呼肠孤病毒属 (Aquareovirus)、科罗拉多壁虱热病毒属 (Coltivirus)、质型多角体病毒属 (Cypovirus)、斐济病毒属 (Fijivirus)、虫源呼肠孤病毒属 (Idnoreovirus)、苍蝇呼肠病毒属 (Mycoreovirus)、环状病毒属 (Orbivirus)、正呼肠孤病毒属 (Orthoreovirus)、水稻病毒属 (Oryzavirus)、植物呼肠病毒属 (Phytoreovirus)、轮状病毒属 (Rotavirus) 和东南亚十二节段 RNA 病毒属 (Seadornavirus)。

[0066] 本发明特别适于经历快速突变的病毒和所述重组方法使所述病毒更快分离的情况,所述病毒然后可进一步繁殖以获得合适的疫苗。因此,在优选的实施方式中所述病毒为流感病毒。

[0067] 流感病毒

[0068] 本发明具体适于使用 A 型流感病毒和 B 型流感病毒,其反向遗传已被充分鉴定。流感病毒为分区段负链 RNA 病毒。A 型和 B 型流感病毒具有 8 种区段 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS),而 C 型流感病毒具有 7 种 (无 NA 区段)。所述病毒通常需要存在至少 4 种病毒蛋白 (PB1、PB2、PA 和核蛋白) 来起始复制。因此蛋白编码表达构建体至少应提供这四种病毒蛋白。

[0069] 优选 A 型流感病毒的表达系统编码衍生自多种不同野生型株系的基因组区段。所述系统可编码 PR/8/34 株系 (A/Puerto Rico/8/34) 的 1 或多个 (如 1、2、3、4、5 或 6 个) 基因组区段,但通常这 / 这些区段不包括所述 PR/8/34HA 区段且通常不包括 PR/8/34NA 区段。因此所述系统可编码 PR/8/34 的 NP、M、NS、PA、PB1 和 / 或 PB2 中至少一个区段 (可能全部六个)。

[0070] A 型流感病毒的其他有用的表达系统可编码 AA/6/60 流感病毒 (A/Ann Arbor/6/60) 的 1 或多个 (如 1、2、3、4、5 或 6 个) 基因组区段,但通常这 / 这些区段不包括所述 AA/6/60HA 区段且通常不包括 AA/6/60NA 区段。因此所述系统可编码 AA/6/60 的 NP、M、NS、PA、PB1 和 / 或 PB2 中至少一个区段 (可能全部六个)。

[0071] B 型流感病毒的表达系统可编码衍生自多种不同野生型株系的基因组区段。所述系统可编码 AA/1/66 流感株系 (B/Ann Arbor/1/66) 的 1 个或多个 (如 1、2、3、4、5 或 6 个) 基因组区段,但通常这 / 这些片段不包括所述 AA/1/66HA 区段且通常不包括 AA/1/66NA 区段。因此所述系统可编码 AA/1/66 的 NP、M、NS、PA、PB1 和 / 或 PB2 中至少一个区段。

[0072] A/PR/8/34、A/AA/6/60 和 B/AA/1/66 株系的病毒片段和序列广泛可得。其序列可在公共数据库上获得,如 GI:89779337、GI:89779334、GI:89779332、GI:89779320、GI:89779327、GI:89779325、GI:89779322、GI:89779329。

[0073] 在一些实施方式中,优选提供基因组不编码 NS1 病毒蛋白或 NS1 蛋白被截短的流感病毒。参考文献 16 描述了 NS1 敲除突变。本领域已知截短 (例如参见参考文献 17 和 18) 且所述截短包括仅剩余 NS1 第一 N 末端 126 氨基酸的截短。这些 NS1 突变病毒株系尤其适于制备活减毒流感疫苗。

[0074] 流感病毒（和某些其他病毒）的反向遗传系统可包括导致所述宿主细胞中表达辅助蛋白的表达构建体。例如，表达非病毒丝氨酸蛋白酶（如胰蛋白酶）可具有优势。

[0075] 如上所述，优选在数种表达构建体之间分裂病毒区段。流感病毒也是如此。

[0076] 在一个实施方式中，第一非细菌表达构建体含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 PB2、PB1、PA、N 和 NS 的编码序列。第二非细菌构建体含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 HA 的编码序列。所述 NA 和 M 基因组区段编码在所述第一构建体（产生“7:1”系统）或所述第二构建体上（产生 5:3 系统），或者所述 M 片段在所述第一构建体上且所述 NA 区段在所述第二构建体上（6:2）。对于 A 型流感病毒，所述第一构建体理想地编码来自 PR/8/34、AA/6/60 或 AA/1/66 株系的区段。编码在所述第二构建体上的区段可来自所述第一构建体上的区段的不同株系，从而有助于通常在流感疫苗制造前实施的所述株系重配。所述 8 种病毒区段的编码序列各自具有驱动其表达为 vRNA 的启动子，如 pol-I 启动子。所述第一构建体还需含至少表达所述 PB1、PB2、PA 和 NP 病毒蛋白的编码序列，例如在 pol-II 启动子的控制下。有用的是，为了减少所述构建体的总长度（因此增加稳定性），所述至少编码 PB1、PB2、PA 和 NP 区段的编码序列在一端侧接 pol-I 启动子并在另一端侧接 pol-II 启动子，从而双向表达可从同一 DNA 编码序列提供所述病毒区段和所述病毒蛋白。因此 pol-I 启动子和终止子序列可侧接编码所述病毒区段的序列，且这些可被 pol-II 启动子和终止子序列围绕。所述线性构建体对可转染到识别所述 pol-I 和 pol-II 启动子的动物细胞中（例如哺乳动物细胞如 MDCK 或 PER. C6 细胞）以产生感染性流感病毒。

[0077] 在另一实施方式中，细菌质粒含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 PB2、PB1、PA、NP 和 NS 的编码序列。非细菌构建体（优选线性）含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 HA 的编码序列。所述 NA 和 M 基因组区段编码在所述质粒（产生“7:1”系统）或所述非细菌构建体上（产生 5:3 系统），或者所述 M 片段在所述质粒上且所述 NA 区段在所述非细菌构建体上（6:2）。对于 A 型流感病毒，所述质粒理想地编码来自 PR/8/34、AA/6/60 或 AA/1/66 株系的区段。编码在所述非细菌构建体上的区段可来自所述质粒上的区段的不同株系，从而有助于通常在流感疫苗制造前实施的所述株系重配。所述 8 种病毒区段的编码序列各自具有驱动其表达为 vRNA 的启动子，如 pol-I 启动子。所述质粒还需含至少表达所述 PB1、PB2、PA 和 NP 病毒蛋白的编码序列，例如在 pol-II 启动子的控制下。有用的是，为了减少所述质粒的总长度，所述至少编码 PB1、PB2、PA 和 NP 区段的序列在一端侧接 pol-I 启动子并在另一端侧接 pol-II 启动子，从而双向表达可从同一 DNA 编码序列提供所述病毒区段和所述病毒蛋白。因此 pol-I 启动子和终止子序列可侧接编码所述病毒区段的序列，且这些可被 pol-II 启动子和终止子序列围绕。所述质粒和所述非细菌构建体使用前单独维持，但都可转染到识别所述 pol-I 和 pol-II 启动子的动物细胞中（例如哺乳动物细胞如 MDCK 或 PER. C6 细胞）以产生感染性流感病毒。

[0078] 在另一实施方式中，非细菌构建体（优选线性）含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 PB2、PB1、PA、NP 和 NS 的编码序列。细菌质粒含 A 型或 B 型流感病毒基因组区段 HA 的编码序列。所述 NA 和 M 基因组区段编码在：所述非细菌构建体上（产生“7:1”系统）；或所述质粒上（产生 5:3 系统）；或分离质粒上（产生 5:1:1:1 系统）；或所述 NA 区段和 HA 在同一质粒上而所述 M 区段在所述非细菌构建体上（6:2）；或所述 NA 区段在第二质粒上和所述 M 区段在所述非细菌构建体上（6:1:1）。对于 A 型流感病毒，所述非细菌构建体理想地编码来

自 PR/8/34、AA/6/60 或 AA/1/66 株系的区段。编码在所述质粒上的区段可来自所述非细菌构建体上的区段的不同株系,从而有助于通常在流感疫苗制造前实施的所述株系重配。所述 8 种病毒区段的编码序列各自具有驱动其表达为 vRNA 的启动子,如 pol-I 启动子。所述非细菌构建体还需含至少表达所述 PB1、PB2、PA 和 NP 病毒蛋白的编码序列,例如在 pol-II 启动子的控制下。有用的是,为了减少所述非线性构建体的总长度,所述至少编码 PB1、PB2、PA 和 NP 区段的序列在一端侧接 pol-I 启动子并在另一端侧接 pol-II 启动子,从而双向表达可从同一 DNA 编码序列提供所述病毒区段和所述病毒蛋白。因此 pol-I 启动子和终止子序列可侧接编码所述病毒区段的序列,且这些可被 pol-II 启动子和终止子序列围绕。所述质粒和所述非细菌构建体使用前单独维持,但都可转染到识别所述 pol-I 和 pol-II 启动子的动物细胞中(例如哺乳动物细胞如 MDCK 或 PER. C6 细胞)以产生感染性流感病毒。

[0079] 然而,在一些实施方式中,用单一构建体编码所述完整病毒基因组。因此本发明提供含表达所有 8 种 A 型或 B 型流感病毒基因组区段的编码序列的非细菌表达构建体。该构建体理想地为如 22-26kbp 的线性构建体。所述 8 种病毒区段的编码序列各自具有驱动其表达为 vRNA 的启动子,如 pol-I 启动子。所述构建体还需含至少表达所述 PB1、PB2、PA 和 NP 病毒蛋白的编码序列,例如在 pol-II 启动子的控制下。有用的是,为了减少所述构建体的总长度,所述 PB1、PB2、PA 和 NP 区段(且优选所有 8 种病毒区段)的编码序列在一端侧接 pol-I 启动子并在另一端侧接 pol-II 启动子,从而双向表达可从同一 DNA 编码序列提供所述病毒区段和所述病毒蛋白。因此 pol-I 启动子和终止子序列可侧接编码所述病毒区段的序列,且这些可被 pol-II 启动子和终止子序列围绕。所述线性构建体可转染到识别所述 pol-I 和 pol-II 启动子的动物细胞中(例如哺乳动物细胞如 MDCK 或 PER. C6 细胞)以产生感染性流感病毒。

[0080] 细胞

[0081] 本发明可在能在所述表达构建体感染后表达感兴趣的病毒的任何细胞中实施。本发明通常使用细胞系,但原代细胞可用作替代。所述细胞通常为哺乳动物细胞,但也可使用禽类或昆虫细胞。合适的哺乳动物细胞包括但不限于仓鼠、牛、灵长类(包括人和猴),以及犬细胞。可使用各种细胞类型,例如肾细胞、成纤维细胞、视网膜细胞、肺细胞等。合适仓鼠细胞的例子是名为 BHK21 或 HKCC 的细胞系。合适的猴细胞包括例如,非洲绿猴细胞,例如 Vero 细胞系中的肾细胞[19-21]。合适的犬细胞为例如肾细胞,如 CLDK 和 MDCK 细胞系。合适的禽类细胞包括衍生自鸡胚胎干细胞的 EBx 细胞系、EB45、EB14 和 EB14-074[22]。

[0082] 其他合适的细胞包括但不限于:CHO;293T;MRC 5;PER. C6[23];FRhL2;WI-38;等。合适的细胞系可由各种来源获得,例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)[24]、Coriell 细胞库[25]或欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)。例如,ATCC 提供各种不同 Vero 细胞,目录号为 CCL81、CCL81.2、CRL1586 和 CRL-1587,并提供目录号为 CCL34 的 MDCK 细胞。PER. C6 可获自 ECACC,保藏号为 96022940。

[0083] 本发明使用的细胞优选源自马达二氏(Madin Darby)犬肾的 MDCK 细胞[26-28]。原始 MDCK 细胞可以 CCL 34 获自 ATCC。优选使用这些的衍生细胞或其他 MDCK 细胞。该衍生物如参考文献 26 所述,其公开了适合悬浮培养的 MDCK 细胞('MDCK 33016'或'33016-PF',保藏号 DSM ACC 2219)。此外,参考文献 29 公开了在无血清培养基中悬浮培养的 MDCK 衍生细胞('B-702',保藏号 FERM BP-7449)。在一些实施方式中,所使用的 MDCK 细胞系可为致

瘤性的,但也可考虑使用非致瘤性 MDCK 细胞。例如,参考文献 30 公开了非致瘤性 MDCK 细胞,包括 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500)、'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501)、'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) 和 'MDCK-SF103' (PTA-6503)。参考文献 31 公开了具有高度易感性的 MDCK 细胞,包括 'MDCK. 5F1' 细胞 (ATCC CRL 12042)。

[0084] 可使用一种以上细胞类型的混合物用于病毒拯救,但优选使用单一细胞类型如使用单克隆细胞。所述细胞优选来自单一细胞系。同一细胞系可在下游使用用于所述病毒随后的增殖,如病毒生长期间。

[0085] 所述细胞优选在无血清中培养以避免常见污染源。本领域技术人员已知用于真核细胞培养的各种无血清培养基(如伊可夫氏(Iscove's)培养基、超 CHO 培养基(BW 公司(BioWhittaker))、EX-CELL(JRH 生物科学公司(JRH Biosciences))。此外,可用无蛋白培养基,如 PF-CHO(JRH 生物科学公司)。另外,用于复制的细胞也可在常规含血清培养基中(如含 0.5% -10% 胎牛血清的 MEM 或 DMEM 培养基)培养。

[0086] 所述细胞可贴壁培养或悬浮培养。

[0087] 疫苗

[0088] 本发明提供由本发明的宿主细胞生产的流感病毒。该流感病毒可以各种方式使用如作为疫苗制造的种子病毒。

[0089] 因此本发明可利用拯救的病毒生产疫苗。

[0090] 疫苗(特别是流感病毒)通常基于活病毒或灭活病毒,例如参见参考文献 32 的 17 和 18 章。灭活疫苗可基于全病毒颗粒、裂解病毒颗粒或基于纯化的表面抗原。抗原也可以病毒体形式存在。可使用本发明制造任意这些类型的疫苗。

[0091] 采用灭活病毒时,所述疫苗可包含完整的病毒颗粒、裂解病毒颗粒或纯化的表面抗原(对于流感,包括血凝素,通常也包括神经氨酸酶)。灭活病毒的化学方法包括用有效量的以下一种或多种试剂处理:去污剂、甲醛、 β -丙内酯、亚甲基蓝、补骨脂素、羧基富勒烯(C60)、二元乙胺、乙酰基乙烯亚胺或其组合。本领域已知病毒灭活的非化学方法,例如 UV 射线或 γ 射线辐射。

[0092] 可通过各种方法由含病毒液体如尿囊液或细胞培养物上清收获病毒颗粒。例如,纯化方法可包括用含有去污剂以破坏病毒颗粒的线性蔗糖梯度溶液进行区带离心。任选稀释后,可通过渗滤纯化抗原。

[0093] 用去污剂(如乙醚、聚山梨醇酯 80、脱氧胆酸盐、三正丁基磷酸盐、曲通(Triton) X100、曲通 N101、溴化十六烷基三甲铵、特吉托 NP9 等)处理纯化的病毒颗粒以获得裂解病毒颗粒,从而产生亚病毒颗粒制品,包括'吐温-醚'裂解方法。裂解流感病毒的方法为本领域熟知,例如参见参考文献 33-38 等。一般使用破坏浓度的裂解剂破坏或片段化完整病毒来裂解所述病毒,无论该病毒有无感染性。这种破坏导致病毒蛋白的完全或部分溶解,改变病毒的完整性。优选的裂解剂是非离子型和离子型(例如阳离子)表面活性剂,如烷基糖苷、烷基硫苷、酰基糖、磺基甜菜碱、甜菜碱、聚氧乙烯烷基醚、N,N'-二烷基-葡萄糖酰胺、6-O-(N-庚甲酰)-甲基- α -D-葡萄糖苷(Hecameg)、烷基苯氧基-聚乙氧基乙醇、NP9、季铵化合物、肌氨酰、CTAB(溴化十六烷基三甲铵)、三正丁基磷酸酯、塞塔隆(Cetavlon)、十四烷基三甲铵盐、脂质转染试剂、脂质转染胺试剂(lipofectamine)和 DOT-MA、辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如曲通表面活性剂,如曲通 X100 或曲通 N101)、聚氧乙烯去水山梨糖醇酯

(吐温表面活性剂)、聚氧乙烯醚、聚氧乙烯酯等。一种有用的裂解方法利用脱氧胆酸钠和甲醛的连续作用,并且裂解可在病毒颗粒初始纯化期间(例如在蔗糖密度梯度溶液中)进行。因此,裂解过程可包括:澄清含病毒颗粒的材料(以去除非病毒颗粒物质),浓缩收获的病毒颗粒(例如使用吸附方法,如 CaHPO_4 吸附),从将全病毒颗粒与非病毒颗粒材料分离,用裂解剂在密度梯度离心步骤中裂解病毒颗粒(例如,用含有裂解剂如脱氧胆酸钠的蔗糖梯度),然后过滤(例如超滤)以去除不需要的物质。可将裂解的病毒颗粒重悬于磷酸钠缓冲的等渗氯化钠溶液中。

[0094] 纯化的流感病毒表面抗原疫苗包含表面抗原血凝素,一般还包含神经氨酸酶。制备这些蛋白质纯化形式的方法是本领域熟知的。FLUVIRINTM、AGRIPPALTM和 INFLUVACTM产品是流感亚基疫苗。

[0095] 另一种形式的灭活抗原是病毒体 [39] (不含核酸的病毒样脂质体颗粒)。病毒体可通过用去污剂溶解病毒,然后去除核衣壳和重建含病毒糖蛋白的膜来制备。另一种制备病毒体的方法包括将病毒膜糖蛋白加入至过量磷脂,得到膜中具有病毒蛋白质的脂质体。

[0096] 本发明也可用于生产活疫苗。此类疫苗通常通过从含病毒颗粒的液体中纯化病毒颗粒来制备。例如,所述液体可通过离心澄清并用缓冲液(例如含蔗糖、磷酸钾和谷氨酸单钠)稳定。

[0097] 所述病毒可被减毒。所述病毒可为温度敏感型。所述病毒可为冷适应性病毒。使用活病毒作为抗原时这三种特征特别适用,且反向遗传特别适用于制备所述株系。

[0098] HA 是灭活流感疫苗中的主要免疫原,且参照一般由 SRID 测定的 HA 水平来标准化疫苗剂量。现有的疫苗一般含有约 $15 \mu\text{g}$ HA/毒株,但也可使用更低的剂量,例如儿童或大流行情况下,或者是使用佐剂时。分数剂量如 $1/2$ (即 $7.5 \mu\text{g}$ HA/毒株)、 $1/4$ 和 $1/8$ 以及较高剂量(如 $3x$ 或 $9x$ 剂量 [40, 41]) 已有应用。因此,疫苗可包含 0.1 – $150 \mu\text{g}$ HA/流感毒株,优选 0.1 – $50 \mu\text{g}$,例如 0.1 – $20 \mu\text{g}$ 、 0.1 – $15 \mu\text{g}$ 、 0.1 – $10 \mu\text{g}$ 、 0.1 – $7.5 \mu\text{g}$ 、 0.5 – $5 \mu\text{g}$ 等。具体剂量包括例如,约 45、约 30、约 15、约 10、约 7.5、约 5、约 3.75、约 1.9、约 1.5 μg 等/毒株。

[0099] 对于活疫苗,利用组织培养感染剂量中值 (TCID_{50}) 而非 HA 含量来衡量剂量,且 TCID_{50} 一般为 10^6 – 10^8 (优选为 $10^{6.5}$ – $10^{7.5}$)/毒株。

[0100] 本发明所用的流感株系可以具有野生型病毒中的天然 HA,或具有修饰 HA。例如,已知修饰 HA 以去除使病毒在禽类动物中具有高致病性的决定簇(如 HA1/HA2 切割位点周围的超碱性区域(hyper-basic region))。采用反向遗传促进这类修饰。

[0101] 用于疫苗的流感病毒株随季节而变。在大流行间期,疫苗一般包括两种 A 型流感株系(H1N1 和 H3N2) 和一种 B 型流感株系,且一般为三价疫苗。本发明也可采用大流行毒株(即疫苗接受者和普通人群没有与其发生过免疫接触的毒株,特别是 A 型流感病毒),如 H2、H5、H7 或 H9 亚型毒株,且大流行株系的流感疫苗可以是单价疫苗或者可以基于补充有大流行株系的正常三价疫苗。然而,根据季节和疫苗中所含抗原的特性,本发明可保护抵御 HA 亚型 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 中的一种或多种。本发明可保护抵御 A 型流感病毒 NA 亚型 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8 或 N9 中的一种或多种。

[0102] 与针对大流行间期株系的免疫相同,本发明组合物特别有助于免疫抵御大流行或

潜在大流行株系。可能引起大流行爆发的流感毒株的特征是：(a) 与目前流通的人毒株中的血凝素相比，它含有新的血凝素，即十年来在人群中未见的血凝素（如 H2），或者从未在人群中发现的血凝素（如通常只出现在鸟群体中的 H5、H6 或 H9），以至于人群未曾免疫接触过该毒株的血凝素；(b) 它能够在人群中横向传播；和 (c) 它对人有致病性。优选含 H5 血凝素类型的病毒免疫以抵御大流行流感，如 H5N1 毒株。其它可能的株系包括 H5N3、H9N2、H2N2、H7N1 和 H7N7，以及任何其它可能出现的大流行株系。本发明特别适于保护抵御可以或已经从非人动物群体传播给人类的潜在大流行毒株，如猪源 H1N1 流感株系。因此本发明适于给人类以及非人动物接种疫苗。

[0103] 其抗原可用于包含在所述组合物中的其它株系是对抗病毒治疗有抗性（例如对奥塞米韦 [42] 和 / 或扎那米韦有抗性）的毒株，包括抗性大流行株系 [43]。

[0104] 本发明组合物可包含来自一种或多种（如 1、2、3、4 或更多）流感病毒株系的抗原，包括 A 型流感病毒和 / 或 B 型流感病毒。疫苗包含一种以上流感毒株时，一般单独培养不同毒株，收获病毒后将它们混合在一起，然后制备抗原。因此，本发明方法可包括混合一种以上流感毒株的抗原的步骤。通常为三价疫苗，其包含来自两种 A 型流感病毒毒株和一种 B 型流感病毒毒株的抗原。也可用四价疫苗 [44]，其包含来自 2 种 A 型流感病毒毒株和 2 种 B 型流感病毒毒株、或者 3 种 A 型流感病毒毒株和一种 B 型流感病毒毒株的抗原。

[0105] 用于制备流感疫苗的病毒可在蛋或细胞培养物中生长。目前培养疫苗用流感病毒的标准方法采用含胚的 SPF 鸡蛋，由鸡蛋内容物（尿囊液）纯化病毒。细胞培养物用于制作所述 OPTAFU™ 产品。细胞优选在无血清或无蛋白培养基中培养以培养用于疫苗生产的病毒。细胞培养优选在 30-40℃ 的温度进行。细胞可在病毒生长期间于 30-36℃ 或 32-34℃ 或 33℃ 的温度培养。在此温度范围内孵育感染细胞导致产生用于疫苗用途的改良流感病毒 [45]。可以在贴壁或悬浮培养的细胞中培养病毒。可采用微载体培养。在一些实施方式中，细胞可能适合悬浮培养。细胞培养物中的生长可使用与所述反向遗传所用的同一细胞类型，所述细胞类型产生所述病毒。

[0106] 方法可包括生长后的步骤：从培养液中收获和分离所述病毒或其抗原。分离病毒或蛋白期间，通过标准方法如分离、过滤或超过滤从所述培养基中分离所述细胞。之后按照本领域技术人员熟知的方法如梯度离心、过滤、沉淀、层析等浓缩所述病毒或其抗原，然后纯化。按照本发明优选在纯化期间和之后灭活所述病毒。可在所述纯化过程中任何点用例如 β -丙内酯或甲醛进行病毒灭活。

[0107] 宿主细胞 DNA

[0108] 用细胞系分离和 / 或培养病毒时，标准实践是最小化最终疫苗中残留的细胞系 DNA 含量，以最小化该 DNA 的致癌活性。因此，按照本发明制备的疫苗组合物优选含有每剂量低于 10ng（优选低于 1ng，更优选低于 100pg）残留的宿主细胞 DNA，但可能存在痕量宿主细胞 DNA。

[0109] 任何残留宿主细胞 DNA 的平均长度优选小于 500bp，例如小于 400bp、小于 300bp、小于 200bp、小于 100bp 等。

[0110] 在疫苗制备过程中可采用标准纯化方法，如层析法等去除污染的 DNA。可通过核酸酶处理，例如 DNA 酶处理来提高对残留宿主细胞 DNA 的清除效果。参考文献 46 和 47 公开了一种减少宿主细胞 DNA 污染的方便方法，该方法包括两步处理，先使用可在病毒生长过

程中使用的 DNA 酶（如 Benzonase）处理，然后使用可在病毒颗粒破坏过程中使用的阳离子去污剂（如 CTAB）处理。也可利用烷化剂如 β -丙内酯处理来去除宿主细胞 DNA，其也可适合用于灭活病毒颗粒 [48]。

[0111] 药物组合物

[0112] 如本发明所述制备的疫苗组合物是药学上可接受的。它们通常还包含抗原外的其它组分，例如它们一般包含一种或多种药物载体和 / 或赋形剂。如下所述，也可包含佐剂。对这类组分的充分讨论参见参考文献 49。

[0113] 疫苗组合物通常是水性形式。然而，一些疫苗可为干燥形式，如可注射固体或贴片上的干燥或聚合制品的形式。

[0114] 疫苗组合物可含有防腐剂，如硫柳汞。然而，疫苗优选应基本不含（即小于 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）含汞物质，如不含硫柳汞 [37, 50]。更优选不含汞的疫苗，可包含琥珀酸 α -生育酚以替代含汞化合物 [37]。可用不含防腐剂的疫苗。

[0115] 为了控制张度，优选包含生理性盐如钠盐。优选氯化钠 (NaCl)，其浓度可为 $1\text{--}20\text{mg}/\text{ml}$ 。可存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。

[0116] 疫苗组合物的渗透压通常为 $200\text{mOsm}/\text{kg}\text{--}400\text{mOsm}/\text{kg}$ ，优选 $240\text{--}360\text{mOsm}/\text{kg}$ ，更优选 $290\text{--}310\text{mOsm}/\text{kg}$ 。虽然以前报道过渗透压对疫苗接种引起的疼痛无影响 [51]，但优选将渗透压保持在此范围内。

[0117] 疫苗组合物可含有一种或多种缓冲剂。疫苗组合物的 pH 通常为 $5.0\text{--}8.1$ ，更典型为 $6.0\text{--}8.0$ ，例如 $6.5\text{--}7.5$ ，或者 $7.0\text{--}7.8$ 。

[0118] 所述疫苗组合物优选无菌。所述疫苗组合物优选无热原，如每剂量含有 $<1\text{EU}$ （内毒素单位，标准量度），优选每剂量 $<0.1\text{EU}$ 。所述疫苗组合物优选不含谷蛋白。

[0119] 本发明疫苗组合物可包含去污剂，如聚氧乙烯去水山梨糖醇酯表面活性剂（称为‘吐温’）、辛苯聚醇（如辛苯聚醇-9（曲通 X100）或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇）、溴化十六烷基三甲铵（‘CTAB’）或脱氧胆酸钠，特别用于裂解疫苗或表面抗原疫苗。去污剂可仅以痕量存在。因此，疫苗中辛苯聚醇-10 和聚山梨醇酯 80 各自的含量可以小于 $1\text{mg}/\text{ml}$ 。其它痕量残留组分可以是抗生素（如新霉素、卡那霉素、多粘菌素 B）。

[0120] 疫苗组合物可含有一次免疫的物质，或者可含有多次免疫的物质（即‘多剂量’药盒）。多剂量配置优选含有防腐剂。作为多剂量组合物中包含防腐剂的替代方案（或补充方案），所述组合物可包含在装有无菌接头以取出物质的容器中。

[0121] 流感疫苗的给药剂量体积一般为约 0.5ml ，但可将一半剂量（即约 0.25ml ）给予儿童。

[0122] 适用于本发明组合物（或药盒组分）的容器包括药瓶、注射器（如一次性预填充注射器）、鼻喷雾等。这些容器应无菌。药瓶可包含单一剂量的疫苗，或者可以包含一个以上剂量（‘多剂量’药瓶），如 10 个剂量。药瓶优选由无色玻璃制成。药瓶，特别是多剂量药瓶可装有允许无菌地取出其内含物的瓶帽。容器可标注显示半剂量体积，例如以利于递送给儿童。例如，含有 0.5ml 剂量的注射器可标有 0.25ml 体积的标记。

[0123] 采用玻璃容器（如注射器或药瓶）时，优选采用由硼硅酸盐玻璃，而非钠钙玻璃制成的容器。

[0124] 某组分包装到注射器中时，该注射器可连有针头。如果未连接针头，可随注射器提

供单独的针头以便组装和使用。这种针头可装在护罩中。优选安全性针头。一般是 1- 英寸 23 号、1- 英寸 25 号和 5/8- 英寸 25 号针头。

[0125] 佐剂

[0126] 本发明的疫苗组合物宜包含佐剂,其作用是增强在接受组合物的患者中引起的免疫应答(体液免疫和/或细胞免疫)。优选的佐剂包含水包油乳液。已知各种这类乳液,其通常包含至少一种油和至少一种表面活性剂,所述油和表面活性剂是生物可降解(可代谢)和生物相容的。乳剂中的油滴直径通常小于 5 μm ,理想情况下具有亚微米直径,通过微流化床实现这种小尺寸以提供稳定乳剂。优选尺寸小于 220nm 的液滴,因为其可进行过滤灭菌。

[0127] 本发明所用的具体水包油乳液佐剂包括但不限于:

[0128] • 角鲨烯、吐温 80(Tween 80)和司盘(Span)85的亚微米乳液。所述乳液的体积组成可以是约 5%角鲨烯、约 0.5%聚山梨酯 80 和约 0.5%司盘 85。以重量计,这些比例为 4.3%鲨烯、0.5%聚山梨酯 80 和 0.48%司盘 85。这种佐剂称为‘MF59’[52-54],参考文献 55 的第 10 章和参考文献 56 的第 12 章更详细地描述了该佐剂。所述 MF59 乳液宜包含柠檬酸根离子,例如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0129] • 鲨烯、DL- α -生育酚和聚山梨酯 80(吐温 80)的乳液。所述乳液可包含磷酸盐缓冲盐水。其还可包含司盘 85(例如 1%)和/或卵磷脂。这些乳液可含有 2-10%鲨烯、2-10%生育酚和 0.3-3%吐温 80,且鲨烯:生育酚的重量比优选 <1,因为这能使乳液更稳定。角鲨烯和吐温 80 的体积比可以约为 5:2,或者重量比约为 11:5。可通过下述方法制备一种此类乳液:将吐温 80 溶解于 PBS 得到 2%溶液,然后将 90ml 该溶液与 5g DL- α -生育酚和 5ml 鲨烯的混合物混合,然后微流体化该混合物。得到的乳液可含有如平均直径为 100-250nm,优选约 180nm 的亚微米油滴。所述乳液也可含有 3-脱-0-酰化单磷酸脂质 A(3d-MPL)。此种类型的另一有用乳液可包含(每人剂量)0.5-10mg 鲨烯、0.5-11mg 生育酚和 0.1-4mg 聚山梨酯 80[57]。

[0130] • 鲨烯、生育酚和曲通去污剂(如曲通 X-100)的乳液。该乳液也可包含 3d-MPL(见下)。所述乳液可包含磷酸盐缓冲液。

[0131] • 含有聚山梨酯(如聚山梨酯 80)、曲通去污剂(如曲通 X-100)和生育酚(如琥珀酸 α -生育酚)的乳液。该乳液可包含这三种组分,其质量比约为 75:11:10(如 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 聚山梨酯 80、110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曲通 X-100 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 琥珀酸 α -生育酚),这些浓度应包括抗原中这些组分的贡献。所述乳液还可包含鲨烯。该乳液也可包含 3d-MPL(见下)。所述水相可包含磷酸盐缓冲液。

[0132] • 鲨烷、聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 401(“普流罗尼克™L121”(Pluronic™L121))的乳液。所述乳液可用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水配制。该乳液是一种有用的胞壁酰二肽递送载体,已与用“SAF-1”佐剂[58](0.05-1% Thr-MDP、5%鲨烯、2.5% Pluronic L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80)配的苏氨酰基-MDP 一起使用。也可不与 Thr-MDP 一起使用,例如用“AF”佐剂[59](5%鲨烯、1.25% Pluronic L121 和 0.2% 聚山梨酸酯 80)。优选微流体化。

[0133] • 含有鲨烯、水性溶剂、聚氧乙烯烷基醚亲水性非离子型表面活性剂(如聚氧乙烯(12)十六十八醚)和疏水性非离子型表面活性剂(如去水山梨糖醇酯或二缩甘露醇酯,如去水山梨糖醇单油酸酯或‘司盘 80’)的乳液。该乳液优选为热可逆的和/或其中

至少 90 % 油滴（以体积计）的尺寸小于 200nm[60]。该乳液也可含有以下一种或多种物质：糖醇；低温保护剂（例如，糖，如十二烷基麦芽苷和 / 或蔗糖）；和 / 或烷基聚糖苷（alkylpolyglycoside）。该乳液可包含 TLR4 激动剂 [61]。这类乳液可冻干。

[0134] • 鲨烯、泊洛沙姆-105 和 Abil-Care 的乳液 [62]。含佐剂疫苗中这些组分的终浓度（重量）是 5% 鲨烯、4% 泊洛沙姆-105（普流罗尼多元醇）和 2% Abil-Care 85（双-PEG/PPG-16/16PEG/PPG-16/16 二甲硅油；辛酸 / 癸酸甘油三酯）。

[0135] • 含有 0.5-50 % 油、0.1-10 % 磷脂和 0.05-5 % 非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献 63 所述，优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。优选亚微米液滴尺寸。

[0136] • 皂苷（如 QuilA 或 QS21）和固醇（如胆固醇）结合成螺旋胶束的乳液 [64]。

[0137] 在一些实施方式中，可在递送时临时将乳液与抗原混合，因此所述佐剂和抗原可单独地保存在包装或分销的疫苗中，以便在使用时配制成最终制剂。在其它实施方式中，在生产过程中将乳液与抗原混合，因此所述组合物以液体佐剂形式包装。

[0138] 治疗方法和所述疫苗给予

[0139] 本发明提供按本发明制备的疫苗。这些疫苗组合物适合给予人类或非人动物对象如猪，且本发明提供了引起对象免疫应答的方法，该方法包括将本发明组合物给予所述对象的步骤。本发明还提供用作药物的本发明组合物，并提供本发明组合物在生产引起对象免疫应答药物的应用。

[0140] 这些方法和应用引起的免疫应答通常包括抗体应答，优选保护性抗体应答。

[0141] 可以各种方式给予本发明组合物。最优选的免疫途径是肌肉内注射（如注射到上肢或下肢），但其它可用的途径包括皮下注射或鼻内 [65-67]。

[0142] 可用按照本发明制备的疫苗治疗儿童和成年人。

[0143] 可通过单剂量方案或多剂量方案进行治疗。多剂量可以用于初次免疫方案和 / 或加强免疫方案。一般以至少 1 周（例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 10 周、约 12 周、约 16 周等）的间隔给予多个剂量。

[0144] 可在与其它疫苗基本相同的时间（例如在向医疗保健专业人员或疫苗接种中心的同一次医疗咨询或就诊期间），将本发明生产的疫苗给予患者。

[0145] 相似地，可将本发明疫苗与抗病毒化合物，具体是对流感病毒有活性的抗病毒化合物（如奥塞米韦和 / 或扎那米韦）基本上同时给予患者（在对健康护理专业人员进行的同一用药咨询或访问期间）。

[0146] 概述

[0147] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”，例如，“包含”X 的组合物可以仅由 X 组成或可以包括其它物质，例如 X+Y。

[0148] 术语“基本上”不排除“完全”，如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。如有需要，“基本上”一词可以从本发明的定义中省略。

[0149] 与数值 x 相关的术语“约”是任选的并表示例如 $x \pm 10\%$ 。

[0150] 除非另有说明，包括混合两种或多种组分的步骤的过程不要求任何特定的混合顺序。因此，组分可以任何顺序混合。在有三种组分时，可将两种组分相互合并，然后可将合并组分再与第三种组分混合等。

[0151] 将动物（特别是牛）材料用于培养细胞时，其应获自未患传染性海绵状脑病（TSE），特别是未患牛海绵状脑病（BSE）的来源。总之，优选在完全不含动物来源物质的条件下培养细胞。

具体实施方式

[0152] 流感病毒来源，HA 和 NA 区段来自 S-OIV 株系 A/California/4/09，剩下 6 种骨架区段来自 PR/8/34。制备编码这 8 种区段的 DNA 序列，各区段可在一端侧接人 pol-I 启动子并在另一端侧接 pol-I 终止子。这些 pol-I 元件被 pol-II 启动子（来自 CMV）和 pol-II 终止子序列和 polA 信号围绕。所述 pol-I 启动子驱动具有保真的野生型 vRNA 末端突出的负义病毒 RNA 区段的转录。所述 pol-II 启动子驱动编码所述病毒蛋白的 mRNA 的转录。DNA 区段的各区段相连以产生约 24kbp 的单一线性 DNA 分子，编码所述完整重配流感病毒基因组。该分子的总合成按照参考文献 8 中 Gibson 等公开的一般方法。

[0153] 所述线性 DNA 构建体转染到 MDCK 33016 细胞的培养物中。已发现该细胞系能识别人 pol-I 启动子用于流感病毒反向遗传拯救。孵育所转染的细胞导致重配流感病毒在所述培养基中出现。可用常规方法纯化该株系（“RG-lin-CA-1”）且其可用作疫苗制造的种子。

[0154] 应理解，仅以举例的方式描述了本发明，可对之进行修改而仍在本发明的范围和精神内。

[0155] 参考文献

- [0156] [1] Racaniello 和 Baltimore (1981) Science 214:916-919.
- [0157] [2] Kaplan 等 (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:8424-8428.
- [0158] [3] Fodor 等 (1999) J. Virol 73(11):9679-9682.
- [0159] [4] Hoffmann 等 (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:11411-6.
- [0160] [5] Kobayashi 等 (2007) Cell Host Microbe 19 ;1(2):147-57.
- [0161] [6] W02009/000891.
- [0162] [7] Kodumal 等 (2004) Proc Natl Acad Sci U S A. 101(44):15573-8.
- [0163] [8] Gibson 等 (2008) Science 319(5867):1215-20.
- [0164] [9] Yount 等 (2002) J Virol 76:11065-78.
- [0165] [10] Wang 和 Kushner (1991) Gene 100:195-9.
- [0166] [11] Shi 和 Biek (1995) Gene 164:55-8.
- [0167] [12] W02006/067211.
- [0168] [13] W001/83794.
- [0169] [14] W02007/002008.
- [0170] [15] W02007/124327.
- [0171] [16] US-6468544.
- [0172] [17] W099/64068.
- [0173] [18] Efferson 等 (2006) J Virol. 80(1):383-94.
- [0174] [19] Kistner 等 (1998) Vaccine 16:960-8.
- [0175] [20] Kistner 等 (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.

- [0176] [21] Bruhl 等 (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [0177] [22] W02006/108846.
- [0178] [23] Pau 等 (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [0179] [24] <http://www.atcc.org/>
- [0180] [25] <http://locus.umdj.edu/>
- [0181] [26] W097/37000.
- [0182] [27] Brands 等 (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [0183] [28] Halperin 等 (2002) Vaccine 20:1240-7.
- [0184] [29] EP-A-1260581 (W001/64846).
- [0185] [30] W02006/071563.
- [0186] [31] W02005/113758.
- [0187] [32] Vaccines. (《疫苗》) (Plotkins 和 Orenstein 编). 第 4 版, 2004, ISBN:0-7216-9688-0.
- [0188] [33] W002/28422.
- [0189] [34] W002/067983.
- [0190] [35] W002/074336.
- [0191] [36] W001/21151.
- [0192] [37] W002/097072.
- [0193] [38] W02005/113756.
- [0194] [39] Huckriede 等 (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
- [0195] [40] Treanor 等 (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- [0196] [41] Keitel 等 (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [0197] [42] Herlocher 等 (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
- [0198] [43] Le 等 (2005) Nature 437(7062):1108.
- [0199] [44] W02008/068631.
- [0200] [45] W097/37001.
- [0201] [46] EP B 0870508.
- [0202] [47] US 5948410.
- [0203] [48] W02007/052163.
- [0204] [49] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. (《雷明顿药剂科学和实践》) 第 20 版, ISBN:0683306472.
- [0205] [50] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
- [0206] [51] Nony 等 (2001) Vaccine 27:3645-51.
- [0207] [52] W090/14837.
- [0208] [53] Podda 和 Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [0209] [54] Podda (2001) Vaccine 19:2673-2680.
- [0210] [55] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (《疫苗设计: 亚基和佐剂方法》) (Powell 和 Newman 编) 普莱努出版社 (Plenum Press) 1995 (ISBN0-306-44867-X).

- [0211] [56]Vaccine Adjuvants:Preparation Methods and Research Protocols(《疫苗佐剂:制备方法和研究方案》)(Methods in Molecular Medicine(《分子药物方法》)系列第 42 卷). ISBN:1-59259-083-7. O' Hagan 编.
- [0212] [57]W02008/043774.
- [0213] [58]Allison 和 Byars(1992)Res Immunol 143:519-25.
- [0214] [59]Hariharan 等 (1995)Cancer Res 55:3486-9.
- [0215] [60]US 2007/0014805.
- [0216] [61]US-2007/0191314.
- [0217] [62]Suli 等 (2004)Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [0218] [63]W095/11700.
- [0219] [64]W02005/097181.
- [0220] [65]Greenbaum 等 (2004)Vaccine 22:2566-77.
- [0221] [66]Zurbriggen 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [0222] [67]Piasecik(2003)J Am Pharm Assoc(华盛顿特区). 43:728-30.

[0001]

序列表

<110> 诺华有限公司 (NOVARTIS AG)

<120> 反向遗传系统

<130> P054929W0

<140> PCT/IB2010/xxxx

<141> 2010-07-31

<150> US61/273,151

<151> 2009-07-31

<160> 5

<170> SeqWin99, 1.02 版

<210> 1

<211> 499

<212> DNA

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 1

```
tttccgagtc cccgtgggga gccggggacc gtcccgcccc cgtcccccgg gtgccgggga 60
ggggtccccg ggccgggccc cggccccctc gcccgatacc ttcttggega gtccccgtgc 120
ggagtccgag agcgtccctc gagcgcgcgt ggcccccag aggtcgcgcc tggccggcct 180
tcggtccttc gtgtgtcccg gtcttaggag ggcccgcccg aaaatgcttc cggctccccg 240
tctggagaca cgggcccggc cctgcgtgtt ggcacggggg gccgggaggg cgtcccccgg 300
```

[0002]

ccggcgtgc tcccgctgt gtctgggggt tgaccagagg gccccgggcg ctccgtgtgt 360
 ggctgcgatg gtggcgtttt tggggacagg tgtccgtgtc gcgcgtcgcc tgggccggcg 420
 gcgtggtcgg tgacgcgacc tcccgccccc gggggaggta tatctttegc tccgagtcgg 480
 cattttgggc cgcccggt 499

<210> 2

<211> 219

<212> DNA

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 2

gccgggaggg cgccccggc ccggcgtgc tcccgctgt gtctgggggt tgaccagagg 60
 gccccgggcg ctccgtgtgt ggctgcgatg gtggcgtttt tggggacagg tgtccgtgtc 120
 gcgcgtcgcc tgggccggcg gcgtggtcgg tgacgcgacc tcccgccccc gggggaggta 180
 tatctttegc tccgagtcgg cattttgggc cgcccggt 219

<210> 3

<211> 1814

<212> DNA

<213> 犬属 (Canis spec.)

<220>

<221> 杂项特征

<222> 1647

<223> N = A、T、C 或 G

<400> 3

agcgtgagca ggagaattct ggagaaacag attgtgtat aagaaagaaa gaaagaaaga 60
 aagaaagaaa gaaagagaaa atccttatgt tctttgagcc tccccccccc ccagaattg 120

[0003]

agttcctctt ccacgacete ttctcattca acccaataga caagtatttg gggggggggg	180
gtcaggtccc agacgcttaa aggggtggaag tgaaagtggg gcgggggaag ggggggggca	240
caccgtcttc tccagcgcc t tgggttcaaa cctccttcgt gacctccctc cctccctccc	300
tccttctgt tataaatata taaataaaat cctaaagaaa aagaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaggaagga cagcagaaaa aacgggtgat cgttgccgt cctaagagtc ctgcctggg	420
ttcggtctta cgttccctcc ctgacctcgg aaacgtgcct gagtcgtccc gggagccccg	480
cgcgggcagc gcgacccct ttccggggcg cagcgggccc ggacggaagg acggacggac	540
ggacgggttt tccaaggctc ccccgccccg ggaggacggg ggttcgcgcg gtgcgcggcc	600
gtgtgtccc ggggcccctc gccgtcccg ggccgagagg cgagatccga ggcgccctga	660
cggcctcgc gcccggtat gtcccgtgt cgttcgcgc ggttgtggg tgcacctgg	720
cggcgcctt tatagagct gtccctccg gaggtcggc ggcgacagc aaggaacagc	780
tttgggtgct gtttccggg gccgagttc aggaggagg cggtccggc gcgagcgtc	840
ggctgtcgc ggggcctcgg cgcgcgatgc gtcgcggga gattggacct ccggagctgc	900
gaggaggtgt cgcgtgcgc gctgtgcgc ctgtgcctc cgcctcgtc ccggaggagg	960
ccgtcgggac gcctgggtg ggtcgaccg caccgcggc tggctcctc tcccccgcg	1020
cggaccgacc tgggcgcct cggggggggg ggacagggtg tgtccgcgc tccgtctgt	1080
ggctccggc gatcttcgg ccttccctc gtgtcactc gttgtctcc gtgtcacgc	1140
cctggcgaag gggaccgtc tgagcctgga ggggaagccc gtgggtggcg cgacagacc	1200
ggctcgggac acgtgtggg gtccggggc tcggacgca tttctcccc ttgttcgag	1260
gcccgtgcg gaggtgggtc cggggcggtc ggaccgggtg ccacgcggg gtgggcggc	1320
cgtccgttc gggtccgcg cccgtggcg attccgggt aggtgcctc tgcgcgcgt	1380
ggcctccac ctcccctgg ccgagccggg gttggggac gcggtaggca cggggcggtc	1440
ctgagggcg cgggggacg cctccgcac gtgcctgcct ccggagaact ttgatgatt	1500
ttcaaagct cctcccggg atcactggc tggcgcggt gcggcgtgc ggcgtggcg	1560
cgtggcgtc ccaccgaag cgtatgcgc cctccacc cccccccc ccgggttacc	1620
tggggcgacc agaaagccct gggggcnggg ggtccgttg ggtgggggtg gggggcgcc	1680
gtgggcagg ttttgggtac agttggcgt gtcacgtcc cggaggtcg cgtgacctg	1740
tgggtgttc ccgcggcag gcgcggttat tttctgcgc gaaatgaaca tttttgtg	1800
ccaggtagg gtgtg	1814

[0004]

<210> 4
 <211> 474
 <212> DNA
 <213> 犬属 (Canis spec.)

<220>
 <221> 杂项特征
 <222> 307
 <223> N = A、T、C 或 G

<400> 4
 cccgggtggcg attcccggtg aggcctgcctc tgccgcgcgt ggccctccac cteccctggc 60
 ccgagccggg gttggggacg gcggtaggca cggggcggtc ctgaggccg cgggggacgg 120
 cctccgaeg gtgcctgect ccggagaact ttgatgattt ttcaaagtct cctcccgag 180
 atcaactggcg tggcggcgtg gggcggtg gcgctggcgg cgtggcgtct ccaccgaccg 240
 cgtatcgccc ctctcacc ccccccccc cggggttacc tggggegacc agaaagccct 300
 gggggcnggg ggtcccggtg ggtgggggtg ggggggcgcc gtggggcagg ttttgggtac 360
 agttggcgt gtcacggtcc cgggaggtcg cggtgacctg tggtgtgtcc ccgccgcag 420
 gcgcggttat tttcttgcgc gaaatgaaca tttttgttg ccaggtaggt getg 474

<210> 5
 <211> 288
 <212> DNA
 <213> 犬属 (Canis spec.)

<220>
 <221> 杂项特征
 <222> 121

[0005]

<223> N = A、T、C 或 G

<400> 5

```
ggcgtggcgg cgtggcggcg tggcggcgtg gcggcgtggc gtctccaccg accgcgtatc 60
gcccctcctc accccccccc cccccgggt tacctggggc gaccagaaag ccctgggggc 120
ngggggctcc gtgggggtggg ggtggggggg cgccgtgggg caggttttgg gtacagttgg 180
ccgtgtcacg gtcccgaggag gtcgcggtga cctgtggtg gtccccgcgc gcaggcgcgg 240
ttattttctt gcccgaaatg aacatttttt gttgccaggt aggtgctg 288
```