(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102586199 A
(43)申请公布日 2012.07.18

(21)申请号 201210029571.9
(22)申请日 2005.11.08
(30)优先权数据
04105696.1 2004.11.11 EP
05105708.1 2005.06.27 EP
(62)分案原申请数据
200580038694.7 2005.11.08
(71)申请人 索尔瓦生物学有限公司
地址 荷兰韦斯普
申请人 伊拉斯谟大学鹿特丹医药中心
(72)发明人 E·德维特 M·I·J·斯普隆肯
R·A·M·福切尔
A·D·M·E·奥斯特霍斯
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 孙式洪
(51)Int.Cl.
C12N 7/04(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
A61K 39/145(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)

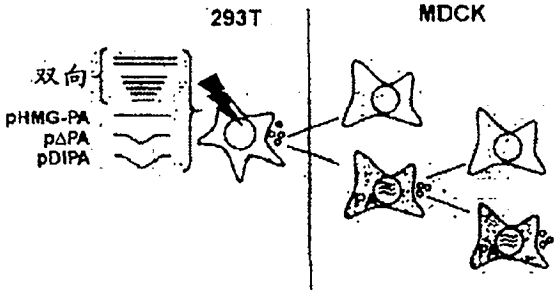
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 2 页

(54)发明名称

有缺陷的流感病毒颗粒

(57)摘要

本发明涉及流感病毒和针对流感的疫苗接种领域。本发明提供了条件性缺陷的流感病毒颗粒，其具有7个不同的流感核酸片段。本发明还提供了条件性缺陷的流感病毒颗粒，其缺少选自基本编码酸性聚合酶(PA)、碱性聚合酶1(PB1)和碱性聚合酶2(PB2)的片段的流感核酸片段。更具体地，本发明提供了有缺陷的流感病毒颗粒，其具有7个不同的流感核酸片段，且缺少基本编码酸性聚合酶的流感核酸片段。另外，本发明提供了包含根据本发明的有缺陷的流感病毒颗粒的组合物在生产旨在生成使对象免受流感病毒感染的免疫保护的药物组合物中的应用，并提供了产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护的方法，包括给需要的对象提供包含这样的有缺陷的流感病毒颗粒的组合物。



CN 102586199 A

1. 一种组合物，其包含条件性缺陷的病毒颗粒或包含细胞或源自所述细胞的物质，所述的病毒颗粒是选自如下组中任一项的病毒颗粒，所述的细胞包含选自如下组中任一项的病毒颗粒：

(1) 通过如下方法所获得的病毒颗粒：一种获得条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，其包括：第一步，用下述物质转染合适的第一细胞：通过在编码流感蛋白的核酸中进行内部删除而生成的一种或多种基因构建体，由此使所述的基因构建体不能生产功能性蛋白，但不阻碍将所述病毒的所述基因片段包装进病毒颗粒；和编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段；和能在所述细胞中表达所述蛋白的一种或多种表达质粒；在感染后合适的时间点，从所述的第一细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒；第二步，用能在所述细胞中表达所述蛋白的一种或多种表达质粒转染合适的第二细胞；第三步，用包含从所述第一细胞得到的至少一个病毒颗粒的上清液转染所述第二细胞；第四步，在感染后合适的时间点，从所述的第二细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒，其中在所述方法中不使用辅助病毒；

(2) 通过如下方法所获得的病毒颗粒：一种获得条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，其包括：用下述物质转染合适的细胞：通过内部删除编码流感聚合酶的核酸而生成的一种或多种基因构建体，由此使所述的基因构建体不能生产功能性聚合酶，但不阻碍将所述病毒的所述基因片段包装进病毒颗粒；和编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段；和能在所述细胞中表达所述聚合酶的一种或多种表达质粒；在感染后合适的时间点，从所述细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒，其中在所述方法中不使用辅助病毒；

(3) 通过如下方法所获得的病毒颗粒：一种获得条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，其包括：第一步，用能在所述细胞中表达流感聚合酶的一种或多种表达质粒转染合适的细胞；第二步，用如上述 (2) 中所定义的包含条件性缺陷的流感病毒颗粒的上清液感染所述细胞；第三步，在感染后合适的时间点，从所述细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒，其中在所述方法中不使用辅助病毒；

(4) 通过如下方法所获得的病毒颗粒：一种获得条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，其包括：第一步，用下述物质转染合适的第一细胞：通过内部删除编码流感聚合酶的核酸而生成的一种或多种基因构建体，由此使所述的基因构建体不能生产功能性聚合酶，但不阻碍将所述病毒的所述基因片段包装进病毒颗粒；和编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段；和能在所述细胞中表达所述聚合酶的一种或多种表达质粒；在转染后合适的时间点，从所述的第一细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒；第二步，用能在所述细胞中表达所述聚合酶的一种或多种表达质粒转染合适的第二细胞；第三步，用包含从所述第一细胞得到的至少一个病毒颗粒的上清液感染所述第二细胞；第四步，在感染后合适的时间点，从所述的第二细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒，其中在所述方法中不使用辅助病毒。

(5) 一种流感病毒颗粒，其包含一个或多个核酸片段，在所述片段中具有内部缺失，从而使得所述片段不能生成功能性的流感聚合酶，但不阻碍将所述病毒的所述基因片段包装进病毒颗粒，其中所述聚合酶选自酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。

(6) 一种流感病毒颗粒，其包含一个或多个核酸片段，在所述片段中具有内部缺失，从而使得所述片段不能生成功能性的流感聚合酶，但不阻碍将所述病毒的所述基因片段包装进病毒颗粒，其中所述聚合酶选自酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶

2(PB2)，并且其中所述内部缺失为如下：对于 PA 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 58 至 207 之间的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 194 之间的 3’- 核苷酸结束；对于 PB1 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 43 至 246 之间的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 24 至 197 之间的 3’- 核苷酸结束；对于 PB2 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 34 至 234 之间的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 209 之间的 3’- 核苷酸结束，上述的核苷酸区间都不包括端点。

2. 根据权利要求 1 中所述的组合物，其中对于 (2) 和 (4) 中任一项的方法，其中通过内部删除编码流感聚合酶的核酸而生成的内部缺失为如下：对于 PA 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 58 至 207 之间的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 194 之间的 3’- 核苷酸结束；对于 PB1 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 43 至 246 之间的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 24 至 197 之间的 3’- 核苷酸结束；对于 PB2 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 34 至 234 之间的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 209 之间的 3’- 核苷酸结束，上述的核苷酸区间都不包括端点。

3. 根据权利要求 1 的组合物，其中对于 (3) 至 (4) 中的任一项的方法，其中要用含有条件性缺陷的流感病毒颗粒的上清液感染的所述细胞已能表达聚合酶，其中所述聚合酶对应于在所述缺陷的病毒颗粒中的非功能性的聚合酶。

4. 根据权利要求 3 的组合物，其中要用含有条件性缺陷的流感病毒颗粒的上清液感染的所述细胞已能表达流感聚合酶，其中所述流感聚合酶对应于在所述条件性缺陷的流感病毒颗粒中的非功能性的聚合酶。

5. 根据权利要求 1 的组合物，其中对于 (2) 至 (4) 中的任一项的方法，其中所述聚合酶是酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。

6. 根据权利要求 2-4 中任一项所述的组合物，其中所述聚合酶是酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。

7. 根据权利要 1 的组合物，其中所述的病毒颗粒具有编码病毒糖蛋白的流感病毒核酸片段。

8. 根据权利要求 1 或 7 的组合物，其中所述的病毒颗粒具有编码核蛋白 (NP)、碱性聚合酶 1(PB1)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段。

9. 根据权利要求 1 或 7 的组合物，其中所述的病毒颗粒具有编码核蛋白 (NP)、酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段。

10. 根据权利要求 1 或 7 的组合物，其中所述病毒颗粒具有编码核蛋白 (NP)、酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段。

11. 根据权利要求 1 或 7 的组合物，其中所述的病毒颗粒具有来自流感病毒 A 的流感病毒核酸片段。

12. 根据权利要求 1 或 7 的组合物，其中所述病毒颗粒具有不编码流感肽的核酸。

13. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中组合物中所含有的细胞具有一种或多种流

感病毒聚合酶，其中所述聚合酶选自酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。

14. 根据权利要求 1-11 和 13 中任一项的组合物在生产旨在产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护的药物组合物中的应用。

15. 产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护的方法，包括给有此需要的对象提供根据权利要求 1-11 和 13 中任一项的组合物。

16. 权利要求 12 所定义的病毒颗粒在生产旨在将不编码流感肽的核酸输送给细胞的组合物中的应用。

17. 权利要求 12 所定义的病毒颗粒在生产旨在将不编码流感肽的核酸输送给对象的细胞的药物组合物中的应用。

18. 将不编码流感肽的核酸输送给细胞的方法，包括为所述细胞提供权利要求 12 所定义的有缺陷的流感病毒颗粒。

19. 将不编码流感肽的核酸输送给对象的方法，包括为所述对象提供权利要求 12 所定义的有缺陷的流感病毒颗粒。

有缺陷的流感病毒颗粒

[0001] 本发明涉及流感病毒和针对流感的疫苗接种的领域。

[0002] 流感病毒（正粘病毒科）是有包膜的具有分段的基因组的负链 RNA 病毒 (Taubenberger 和 Layne，Molecular Diagnosis Vol.6 No.42001)。根据它们的核蛋白和基质蛋白之间的显著的抗原差异，可以将它们分成 2 类：一类包含流感 A 和 B，另一类包含流感 C。这 3 个病毒类型也存在致病性和基因组组织的差异。发现类型 A 广泛存在于恒温动物中，但是类型 B 和 C 主要是人病原体。通过从病毒粒子表面伸出的血细胞凝集素 (HA) 和 NA 表面糖蛋白的抗原特征，进一步细分流感 A 病毒。目前，有 15 种 HA 和 9 种 NA 亚型。流感 A 病毒能感染广泛种类的动物，包括鸟、猪、马、人和其它哺乳动物。水鸟是所有已知亚型的流感 A 的自然宿主，且可能是人流行流感株的遗传物质源。

[0003] 不同于相关的副粘病毒，流感病毒具有分段的 RNA 基因组。流感 A 和 B 病毒具有类似的结构，而流感 C 是更离散的。A 和 B 类病毒都含有 8 个离散的分别编码至少一种蛋白的基因片段，C 类型含有 7 个离散的片段，它组合了 A 和 B 类型的片段 4 和 6。流感 A 和 B 病毒覆盖着 3 种蛋白的突出部分：HA，NA，和基质 2(M2)。流感 C 病毒仅仅具有一种表面糖蛋白。每种流感 RNA 片段由核蛋白 (NP) 包裹成壳，形成核糖核苷酸核蛋白 (RNP) 复合物。这 3 种聚合酶蛋白与 RNP 复合物的一端相连。RNP 被膜围绕，所述的膜含有作为组成部分的基质蛋白（基质 1)。包膜的磷脂部分源自宿主细胞膜。在病毒颗粒内，还发现了非结构性蛋白 2(NS2)。

[0004] 世界卫生组织 (WHO) 关于流感病毒命名法的规则如下。首先，指定病毒的类型 (A，B，或 C)，然后为宿主（如果非人），分离地，分离数目，和分离的年（以斜线分隔）。对于流感 A，在括号中注明了 HA 和 NA 亚型。例如，包含在近期的 2000 至 2001 季的三价疫苗中的株是：A/ 巴拿马 /2007/99(H3N2)，A/ 新喀里多尼亚 /20/99(H1N1)，和 B/Yamanashi/16/98。自 1977 年以来，已经有 2 种流感 A 亚型共存于人类：H1N1 和 H3N2。

[0005] 流感病毒能积累复制过程中的点突变，因为它们的 RNA 聚合酶复合物不具有校对活性。能改变表面糖蛋白的抗原部分中的氨基酸的突变能通过逃避预先存在的免疫而为病毒株提供选择优势。通过结合某些宿主细胞上的受体，HA 分子能启动感染。针对 HA 蛋白的抗体可以阻止受体结合，能非常有效地预防相同株的再次感染。通过抗原性漂移（其中目前循环的 HA 基因的突变会破坏抗体结合）或抗原性转变（其中病毒获得新亚型的 HA)，HA 可以逃避以前获得的免疫。抗原性漂移压力在 HA 分子中是不均等的，阳性选择变化主要发生在 HA 蛋白的球形头上。这些变化在 HA 中的积累程度也大于在 NA 中的。在其它流感蛋白中更慢产生变化。同样地，抗原性漂移压力在人 - 适应的流感株中最大，在猪 - 和马 - 适应的株中中等，在鸟 - 适应的株中最小。

[0006] 因为流感病毒具有分段的基因组，2 种不同株在同一宿主中的共感染可以导致生成新的重新组合的流感株，其含有亲本基因片段的不同组合。已知 15 种 HA 亚型存在于野鸟中，并提供了 HA 的来源，所述 HA 对于人类而言是新的。含有新的亚型（通过抗原性转变）的流感株在人循环中的出现，已经成为 1957 和 1968 年的最近 2 次流感大流行的原因，且极有可能是 1918 年流感大流行的原因。为了与已知的关于流行性流感病毒的出现相一致，流

行株必须具有在抗原性上不同于目前流行的 HA ;该 HA 不得已经在人类中循环了 60 至 70 年 ;且该病毒必须是可以在人间传播的。在 1957 和 1968 年,HA 的转变导致了大流行,且在 2 种情况下,流行株的 HA 与鸟毒株密切相关。尽管大流行的一个绝对条件是 HA 必须变化,尚不清楚病毒的其它部分可以或必须变化的程度。仅仅可以得到 1957 和 1968 年的流行性病毒用于直接研究,使用分子考古学,表征了 1918 年的流行性流感病毒。在 1957 年,3 个基因被替换为鸟类基因 :HA,NA,和聚合酶复合物的亚基 (PB1)。在 1968 年,仅仅替换了 HA 和 PB1。

[0007] 通过病毒分离、血凝抑制 (HI) 实验、免疫测定法检测抗原、血清学实验、验证分泌物中的 NA 活性或基于分子的实验,可以特异性地诊断流感感染。可以将试样收集为唾液、鼻咽拭子或通过口漱缓冲盐水溶液得到的鼻咽洗液。流感诊断的标准是培养后进行免疫学表征。血清学分析能提供精确的、但是可追溯的流感感染方法,因为它需要收集急性期和渐愈期的血清。

[0008] 流感病毒可以在含胚的鸡蛋或许多组织培养系统中生长。加入胰蛋白酶 (用于 HA 的切割活化),会使流感病毒在 Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞和其它系中繁殖。疫苗生产的主要方法仍然是在蛋中培养流感病毒。细胞系的培养物通常用于人流感病毒 (类型 A 和 B) 的初步分离。可以直接在含胚的蛋的尿囊腔中培养许多人流感病毒。有些流感 A 和 B 病毒需要首先在羊膜腔中培养,然后转移到尿囊腔中。培养物分离后,使用免疫测定法或免疫荧光法,确定地鉴别出了大多数流感分离物。流感病毒的 HA 分子能结合呼吸细胞表面上的唾液酸残基,以利于病毒的进入。

[0009] 利用流感病毒体外使红细胞凝集的能力,可以在抗原方面表征流感株。抗 -HA 抗体可以抑制凝集。因而,血凝反应抑制 (HI) 实验是用于表征流感株的标准方法之一。HI 实验可以用于确定样品株是否在免疫学上与近来的疫苗株相关 (即交叉反应性的)。以一系列的 2 倍稀释,向孔中加入分型血清,后者一般在雪貂中生产,实验人员通过观察悬浮的和凝集的红细胞,对实验孔打分。在大多数情况下,一组血清用于匹配针对疫苗的样品株和参照株,且在任何给定的流感季的过程中,通过 HI 实验成功地匹配了大多数样品株。

[0010] 关于鉴别各病毒株的抗原特征,WHO 提供了准则,WHO 协作中心提供了指南。根据免疫学系谱,例如 A/ 莫斯科 /10/99(H3N2)- 样, A/ 新喀里多尼亚 /20/99(H1N1)- 样,和 B/ 北京 /184/93- 样病毒,对样品株进行分类。对于不能在 HI 实验中进行表征的样品株,实验室工作人员必须将它们接种进雪貂中,以生成株特异性的抗血清。当新的抗血清准备好后,再如所述进行 HI 实验。如果新血清在交叉反应性中表现出显著差异 (通常定义为样品和疫苗株之间的 4 倍差异),则将它整合进常规实验室组中,并用于寻找新的流行性株。因而,HI 实验在疫苗株选择的流感病毒监视工作中非常重要,且是最常用的估计抗原性漂移的方法。

[0011] 通过各基因片段的序列对比,可以遗传地表征流感株,WHO 准则和 WHO 协作中心又提供了关于识别包含下述片段的个体性质的指南 :包含流感基因组的 RNA 片段 ;能编码核蛋白 (NP)、碱性聚合酶 1(PB1)、碱性聚合酶 2(PB2)、酸性聚合酶 (PA)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感 A 和 B 病毒核酸片段,和能编码核蛋白 (NP)、碱性聚合酶 1(PB1)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 - 神经氨酸酶样糖蛋白 (HN)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感 C 病毒核酸

片段。关于抗原分析、核酸序列对比和鉴别疫苗病毒的参照株的请求，可以致送 WHO 流感参考和研究协作中心，45 Poplar Road, Parkville, Victoria 3052, Australia(fax :+61 3 9389 1881, web site :http//www.influenzacentre.org) ;WHO 流感参考和研究协作中心，National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan(fax :+81 42 5610812 或 +81 42 5652498) ;WHO 流感监视、流行病学和控制协作中心，Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Mail stop G16, Atlanta, GA 30333, United States of America(fax :+1 404 639 2334) ;或 WHO 流感参考和研究协作中心，National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, England(fax :+44 208 906 4477)。在 WHO 的网站 http://www.who.int/influenza 上，可以得到最新的流行病学信息，在 http://www.who.int/flunet 上，可以得到地理信息系统，FluNet。

[0012] 人们对于流感的影响和预防它的健康和经济益处的认识正在逐步提高，过去十多年已经观察到了疫苗接种的应用和益处，且显著地出现了许多抗流感药物。作为在许多国家更长的寿命预期的结果，更多的人处于并发症的危险中，在流感流行病过程中的保健系统的负担被更广泛地承认，更频繁的国际旅行已经为病毒的传播创造了机会，尽管新产品的出现已经增加了预防和治疗疾病的选择。约 50 个国家具有政府资助的国家流感免疫计划，且在许多其它国家可以得到疫苗。关于使用疫苗的具体推荐是不同的，但是通常包含年老个体和由于以前存在的慢性医学病而处于严重疾病的高危险中的大于 6 个月龄的个体的年度免疫。在有些国家中，疫苗用于减少流感向高危人群中的传播。在它们的总体公共健康优先权的范围内，成员国需要考虑流感预防活动的益处。

[0013] 根据它们是否含有全病毒颗粒，部分打破的病毒颗粒（分裂的疫苗）或纯化的包膜抗原（亚单位疫苗），可以将失活的疫苗分成几种类型。已经将有些亚单位疫苗与佐剂或输送系统相组合。

[0014] 少数国家已经许可了用于某些目标群体的活的减毒的流感疫苗。在俄罗斯联邦，已经将一种疫苗的 2 种不同的制剂用于健康的成年人和儿童，已经广泛测试了另一种活疫苗。但是，在可以更广泛地得到活的减毒疫苗之前，一般仍不推荐将它们用于流感预防。

[0015] 为了预防和治疗流感，已经开发出了 2 类抗病毒药。M2 抑制剂即金刚烷胺和金刚乙胺限于治疗流感 A 病毒，且已经报道它们能有效地预防感染。尽管二种产品都会造成一些副作用，金刚烷胺更常见明显的神经副作用。最近，许多国家已经许可神经氨酸酶抑制剂（例如扎那米韦和奥赛米韦）用于治疗类型 A 和 B 流感，且已经报道它们对于预防也是有效的。已经在接受 2 类抗病毒药的患者中检测到了抗性突变株。尽管目前尚未将其视为重要的公共健康问题，但是如果非常大规模地使用这些药物，情况可能会发生变化。

[0016] WHO 维持着全球国际监视计划，它在位于 82 个国家的 110 个国家流感中心和位于亚特兰大（美国）、伦敦（英国）、墨尔本（澳大利亚）和东京（日本）的 4 个 WHO 流感参考和研究协作中心的合作下运行。这些中心提供关于出现具有流行病潜能的株的早期警告系统。该系统很重要，因为如果流感疫苗不含有目前循环的株，则其功效会降低。WHO 会发布关于疫苗组成的推荐，如可以在由世界卫生组织出版的 Weekly Epidemiological Record(例如见，issue 9, 2004, 79, 第 88 页或 http://www.who.int/wer) 中所见的，2 月发布在北半球使用的疫苗，9 月发布在南半球使用的疫苗。由于流感在赤道区具有不太确定的季节特征，

流行病学的考虑会影响这些推荐中的哪一种（2 月或 9 月）适用于在赤道国家使用的疫苗。

[0017] 协作中心对国家中心提交的流感分离株进行抗原和遗传分析。当观察到抗原变化的证据时，将其与流行病学数据进行比对，以估计该变体的流行病学显著性。使用在疫苗接种之前和之后收集的人血清组，将代表性的分离株与目前的疫苗株进行对比，以确定能否认为现在的疫苗会保护免受这些病毒。在出版 WHO 的年度疫苗推荐后，开发了高生长株，并提供给生产商作为参照病毒，以辅助生成用于疫苗生产的种子病毒。对流感疫苗的安全性和效力的测试，包括病毒失活、微生物灭菌、用于破坏病毒的化学试剂的测量和确认推荐的抗原浓度。推荐疫苗能符合 WHO 的要求，但是，国家控制机关应当批准在每个国家使用的特定疫苗病毒。国家公共卫生机关负责推荐疫苗的使用。另外，WHO 已经出版了关于预防流感的推荐（见 WER No.35，2002，pp.281-288）。

[0018] 已经证实，现在的流感疫苗不能保护未免疫 (naive) 个体，当从未遇到流感感染的许多个体处于危险中并出现流感大流行爆发时，该事实会变得非常重要。病毒一般通过下述方法开始它们的寿命周期：结合到宿主细胞表面受体上，进入细胞，使它们的病毒核酸脱壳，随后复制病毒基因组。在合成了新拷贝的病毒蛋白和基因后，将这些组分包装进后代病毒粒子中，它们然后退出细胞。在装配步骤的过程中，后代病毒必须从存在于细胞质中的大量病毒和细胞核酸中有效地选择它的基因组核酸。将病毒基因组包装进病毒粒子中，典型地包含被病毒核酸中的顺式作用序列的病毒组分所识别，所谓的“包装信号”。定义这样的信号对于理解病毒生命周期是重要的，且为我们提供了可以用于构建表达外来蛋白的病毒载体的信息。实际上，使用逆转录病毒作为表达外来蛋白的基因输送载体的运输工具，可以在很大程度上归因于非常确实地理解将它们的 vRNA 包装进后代病毒粒子的过程。

[0019] 不太理解其它 RNA 病毒的基因组包装信号，阻碍了它们作为表达和输送外来基因的载体的应用进程。例如，流感 A 病毒是有包膜的负链 RNA 病毒，它的分段的基因组具有核蛋白 (NP)、碱性聚合酶 1(PB1)、碱性聚合酶 2(PB2)、酸性聚合酶 (PA)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的编码能力。

[0020] 该病毒在包膜上具有 2 种跨膜糖蛋白，血细胞凝集素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)。HA 蛋白能结合到宿主细胞表面上的含有唾液酸的受体上，并在受体介导的胞吞作用后，介导病毒包膜与内体膜的融合。相反地，NA 蛋白提供下述机理在感染晚期起关键作用：从唾液酸寡糖去除唾液酸，从而从细胞表面释放出新装配的病毒粒子，并阻止病毒粒子的自聚集。在包膜内，包含 8 个不同病毒 RNA(vRNA) 片段的病毒基因组紧密连接到核蛋白 (NP) 和聚合酶蛋白 (PA，PB1，和 PB2) 上，形成核糖核蛋白复合物。为了生成感染性病毒，需要全部 8 个（或者在 C 类型病毒的情况下：全部 7 个）功能性基因片段。已经描述了聚合酶基因中的多个突变 (WO2004/094466，WO2003/091401，US 5578473，Fodor 等，J.Virol.77，5017-5020，2003)，其会改变聚合酶活性，或者以另一种方式改变聚合酶，但不会使它减弱在合成病毒 RNA 中的功能性，以使含有这种突变的聚合酶的病毒不能复制。在 WO2004/094466 中，生成了具有突变的 PA 基因的感染性病毒，由此证实了允许生产和回收具有突变的基因的感染性病毒的选择系统的益处。在 WO2003/091401 中，证实了如何生产具有聚合酶基因突变的感染性病毒，以便生产和回收具有与活的减毒的疫苗病毒生产有关的理想性能（例如温度敏感性或其它类型的减毒）的流感病毒。在 US55788473 中，提出了可以改变多种聚合酶的特异性和降低其活性的聚合酶基因片段。但是，它们没有用于重构病毒，更不用说重构已经

完全丧失了它的聚合酶活性的病毒了。另外，在上述的申请中，都没有生产出有缺陷的已经丧失了它们的复制能力的颗粒。众所周知，当流感 A 病毒以高感染复数传代时，会生成有缺陷的病毒颗粒，其缺少一个或多个功能性基因片段。在这样的病毒颗粒中，由于流感病毒聚合酶造成的错误，一个或多个功能基因被替换为有缺陷的干扰 (DI) 基因片段。由于高感染复数，和因此细胞感染了超过一个病毒颗粒，含有 DI RNA 的病毒的缺陷被含有完整拷贝的丢失的功能基因的病毒所补偿。近来证实，酸性聚合酶基因中的某些突变会提高生成具有缺陷基因的病毒颗粒的效率 (Fodor 2003)。重要的是注意到，在这些实验中的有缺陷的病毒颗粒的生成和互补都在这些实验中随机地发生。该随机的过程会限制 DI RNA 和条件性缺陷的病毒颗粒在实际应用中的使用。而且，当使用这些公开的方法生产有缺陷的病毒颗粒时，除了需要的条件性缺陷的病毒外，还生成了野生型能复制的病毒。这种能复制的病毒可以是完全野生型（辅助病毒）或由辅助病毒和缺陷病毒的遗传混合形成的重排株 (reassortant)。流感病毒的基因片段的包装过程，无论是通过随机的还是特异性的机理，都已经争论了许多年。已经描述了这 2 种选择的一些证据。随机包装的证据是，聚集的病毒颗粒具有比未聚集的病毒颗粒更高的感染性，且当以低传染方式 (moi) 感染细胞培养物时，一些感染的细胞不能表达一个片段，这二者表明存在不含有完整流感病毒基因组的病毒粒子。随机包装的其它证据是，已经在实验中生产了含有 9 个片段的流感病毒。

[0021] 一个支持特异性包装过程的理由是，尽管所有基因片段都等量地存在于病毒原液中，它们以不同的量存在于生产细胞中。另外，当生成了有缺陷的干扰 (DI) 颗粒时，DI vRNA 会替换其所源自的片段（有缺陷的干扰颗粒是其中一个基因片段具有较大的内部缺失的病毒颗粒。当病毒以高 moi 传代时，会出现这些颗粒）。最后，病毒粒子形成的效率随着基因片段数目的增加而增加。

[0022] 发明概述

[0023] 有缺陷的流感病毒颗粒（例如 Mena I. 等.，J. Virol. 70 :5016-24(1996) ;Neumann G. 等.，J. Virol. 74 :547-51(2000).）可以用作疫苗候选品，因为它们会诱导针对除了 HA 和 NA 以外的其它病毒蛋白的抗体，如果它们能进入宿主细胞，因为它们除了体液反应之外还可以诱导针对病毒的细胞免疫反应（例如辅助 T 细胞，细胞毒性 T 细胞）。迄今为止，已经通过转染生产了有缺陷的流感病毒颗粒 (Mena I. 等.，J. Virol. 70 :5016-24(1996) ; Neumann G. 等.，J. Virol. 74 :547-51(2000).)，减少了生产大量这种颗粒的可能性。该方法的一个替代方案是，生产条件性缺陷的病毒颗粒，使它们能在某些生产系统中复制，但是不能在正常细胞或生产系统中复制。为此，修饰了生产系统的细胞，使其能生产一个或多个流感病毒基因或基因产物，能反式互补有缺陷的流感病毒颗粒。本发明首次公开了有缺陷的流感病毒颗粒的确定的反式互补。在实验室中，当携带野生型的有缺陷的干扰基因片段的病毒补偿了同一细胞中的有缺陷的干扰流感病毒时，已经观察到了流感病毒颗粒的反式互补。该反式互补的“自然系统”不能用于生产确定的条件性缺陷的流感病毒颗粒。首先，该系统要求，一种（部分地）有缺陷的病毒被至少一种（部分地）能复制的病毒所补偿，这会导致意外地生成全感染性的病毒。其次，因为不同的基因片段以随机方式生产有缺陷的干扰颗粒，不能生产确定的条件性缺陷的病毒颗粒。

[0024] 条件性缺陷的流感病毒颗粒理论上可以基于完整基因片段或其部分的缺失。如果流感病毒基因组的包装依赖于所有 8 个片段的存在（这是许多争论中的一种版本（见本说

明书中的其它地方)),通过删除完整基因片段(和反式生产编码的基因产物)来生产确定的条件性缺陷的病毒颗粒的能力会受到限制。如果包装过程要求所有 8 个基因片段的存在,不知道是否需要所有的基因片段都以全长形式存在,这使得条件性缺陷的病毒颗粒的生产进一步复杂化。本发明已经解决了这些问题。

[0025] 本发明提供了得到条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法,其包括:第一步,用下述物质转染合适的第一种细胞,例如 293T 细胞:具有内部缺失的基因构建体,例如本文提供的通过内部删除编码流感聚合酶的核酸衍生的 pΔPB2,pΔPB1,pΔPA 或 pDIPA,由此使所述的基因构建体不能生产能拷贝或合成病毒 RNA 的功能聚合酶;和编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段,例如 7 个能编码 A/WSN/33 的互补构建体 (HW181-188,Hoffmann 等.,2000);和能在所述细胞中表达所述聚合酶的表达质粒,例如本文提供的 HMG-PB2,HMG-PB1,HMG-PA 中的一个;在转染后合适的时间点,例如 10-50 小时内、优选地在约 20-30 小时,从所述的第一种细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒;第二步,用能在所述细胞中表达所述聚合酶的表达质粒转染合适的第二种细胞,例如 MDCK 细胞;第三步,用包含从所述的第一种细胞得到的至少一个病毒颗粒的上清液转染所述的第二种细胞;第四步,包括在转染后合适的时间点,例如 24-96 小时、优选 48-72 小时,从所述的第一种细胞的上清液中收获至少一个(现在为条件性缺陷的,因为生成的病毒缺少能表达拷贝或合成病毒 RNA 的功能聚合酶的基因片段,因为它们包装了具有内部缺失的基因片段)病毒颗粒。

[0026] 优选的是能使基因片段不能生产功能蛋白的内部缺失,但是它不得阻止将病毒的基因片段包装进病毒颗粒中。优选地,这些缺失分别从 5' 和 3' 非编码区计算。对于流感 A,对于 PA 蛋白,这些优选的缺失从例如位于核苷酸 58 至 75 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 50 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB1 蛋白,从位于核苷酸 43 至 75 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 24 至 50 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB2 蛋白,从位于核苷酸 34 至 50 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 50 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束。更优选地,这些缺失:对于 PA 蛋白,从位于核苷酸 58 至 100 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 100 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB1 蛋白,从位于核苷酸 43 至 100 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 24 至 100 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB2 蛋白,从位于核苷酸 34 至 100 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 100 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束。甚至更优选地,这些缺失:对于 PA 蛋白,从位于核苷酸 58 至 150 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 150 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB1 蛋白,从位于核苷酸 43 至 150 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 24 至 150 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB2 蛋白,从位于核苷酸 34 至 150 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 150 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束。更优选地,这些缺失:对于 PA 蛋白,从位于核苷酸 58 至 175 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 175 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB1 蛋白,从位于核苷酸 43 至 175 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 24 至 175 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束;对于 PB2 蛋白,从位于核苷酸 34 至 175 之间(不含端点)的 5'- 核苷酸开始,至位于核苷酸 27 至 175 之间(不含端点)的 3'- 核苷酸结束。最优选地,这些缺失:对于

PA 蛋白，从位于核苷酸 58 至 207 之间（不含端点）的 5’- 核苷酸开始，至位于核苷酸 27 至 194 之间（不含端点）的 3’- 核苷酸结束；对于 PB1 蛋白，从位于核苷酸 43 至 246 之间（不含端点）的 5’- 核苷酸开始，至位于核苷酸 24 至 197 之间（不含端点）的 3’- 核苷酸结束；对于 PB2 蛋白，从位于核苷酸 34 至 234 之间（不含端点）的 5’- 核苷酸开始，至位于核苷酸 27 至 209 之间（不含端点）的 3’- 核苷酸结束。

[0027] 在本文中，将互补片段定义为能导致一整套 8 个基因片段（例如流感 A 病毒的）的片段。因而，如果片段 1 已经用于生产有缺陷的片段，则互补（无缺陷的）片段是片段 2,3,4,5,6,7 和 8。如果片段 2 是有缺陷的，则互补片段是片段 1,3,4,5,6,7 和 8。依此类推。

[0028] 有利地，本发明提供了一种方法，由此不需要或不存在辅助病毒。

[0029] 本发明提供了分离的和条件性缺陷的流感病毒颗粒，其缺少编码选自酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 和碱性聚合酶 2(PB2) 的聚合酶的功能性流感病毒核酸片段（在本文中也称作条件性缺陷的流感病毒颗粒），所述的颗粒不能生成聚合酶或不能用作聚合酶的来源，以拷贝或合成病毒 RNA，由此仅仅且有条件地允许在用功能聚合酶反式补偿的细胞中生成可复制的病毒颗粒。另外，本发明提供了得到条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，包括通过用功能性流感病毒聚合酶反式补偿，来提供细胞。

[0030] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的颗粒能在用该颗粒自身缺少的类似核酸片段补偿的细胞中复制，例如缺少功能性流感病毒核酸 PA 片段的颗粒可以在至少已经提供或补偿了功能性流感病毒核酸 PA 片段的细胞中复制，缺少功能性流感病毒核酸 PB1 片段的颗粒可以在至少已经提供了功能性流感病毒核酸 PB1 片段的细胞中复制，缺少功能性流感病毒核酸 PB2 片段的颗粒可以在至少已经提供了功能性流感病毒核酸 PB 片段的细胞中复制。在一个优选的实施方案中，本发明提供了根据本发明的颗粒，其具有能编码病毒糖蛋白的流感病毒核酸片段，更优选地具有能编码核蛋白 (NP)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段。在一个实施方案中，提供了根据本发明的颗粒，其具有源自流感 A 病毒的流感病毒核酸片段。另外，提供了根据本发明的颗粒，其含有不能编码流感肽的核酸。另外，本发明提供了分离的细胞，其包含根据本发明的颗粒，所述细胞不含有野生型流感病毒或辅助病毒，但是优选地已经被提供了或补偿了流感病毒聚合酶或编码它的基因片段。在一个优选的实施方案中，这样的细胞是反式补偿的 293T 或 MDCK 细胞。在一个实施方案中，本发明提供了分离的细胞，其包含缺少功能性流感病毒核酸 PA 片段的颗粒，所述细胞不含有野生型流感病毒或辅助病毒，但是至少已经被提供或补偿了功能性流感病毒核酸 PA 片段或功能性 PA。在另一个实施方案中，本发明提供了分离的细胞，其包含缺少功能性流感病毒核酸 PB1 片段的颗粒，所述细胞不含有野生型流感病毒或辅助病毒，但是至少已经被提供了功能性流感病毒核酸 PB1 片段或功能性 PB1。在另一个实施方案中，本发明提供了分离的细胞，其包含缺少功能性流感病毒核酸 PB2 片段的颗粒，所述细胞不含有野生型流感病毒或辅助病毒，但是至少已经被提供了或补偿了功能性流感病毒核酸 PB2 片段或功能性 PB2。另外，本发明提供了组合物，其包含根据本发明的颗粒或细胞或源自根据本发明的细胞的物质，和这样的组合物在生产药物组合物中的应用，所述的药物组合物能产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护。因此，本发明提供了产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护的方法，包括给需要的对象提供根据本发明的组合物。另外，本发明提供了根据本发明的流感病毒颗粒在生产组合

物中的应用，所述的组合物用于将不编码流感肽的核酸输送进细胞中。另外，本发明提供了根据本发明的颗粒在生产药物组合物中的应用，所述的组合物用于将不编码流感肽的核酸输送进对象的细胞中，和将不编码流感肽的核酸输送进细胞或对象中的方法，包括给所述的细胞或对象提供根据本发明的颗粒。

[0031] 本发明提供了条件性缺陷的流感病毒颗粒，当与它的自然基因组相比较时，其缺少一个功能性流感病毒片段，它是：与野生型或辅助 A 或 B 类型病毒相比时，具有 7 个（而不是 8 个）不同的功能性流感病毒核酸片段，或与野生型或辅助 C 类型病毒相比时，具有 6 个（而不是 7 个）不同的功能性流感病毒核酸片段。当在本文中使用术语“条件性缺陷的”时，它包括但不限于，病毒颗粒，其中一个病毒基因片段具有较大的内部缺失，这导致从它表达无功能的蛋白。感染性病毒的生产，需要所有 8 个基因片段（例如流感 A 病毒的）和它们编码的所有蛋白。因而，含有缺陷基因片段的病毒自身是有缺陷的：它可以感染细胞，且可以经过一个复制周期，因为所有病毒蛋白都存在于该病毒粒子（例如，当生产病毒时，通过表达质粒生产该蛋白）中，但是在感染的细胞中没有生成感染性病毒颗粒，因为该病毒不能生产一种病毒蛋白。但是，当感染的细胞能表达一般由有缺陷的基因片段表达的蛋白时，有缺陷的病毒可以在这些细胞中复制，因为所有的病毒蛋白都存在。因而，这些病毒是条件性缺陷的：直到提供具有正确条件的细胞，它们才可以复制（在该情况下，细胞会表达因为病毒缺少基因片段而不编码的病毒蛋白）。

[0032] 另外，本发明提供了条件性缺陷的流感病毒颗粒，其缺少能编码聚合酶的功能性流感病毒核酸片段。在本文中，功能性流感病毒核酸片段包含能编码功能性流感蛋白的核酸，其允许生成可复制的病毒，且是必需的。例如，流感 A 病毒是负链 RNA 病毒，其具有 8- 段的基因组。8 个基因片段能编码 11 种蛋白；基因片段 1-8 能分别编码碱性聚合酶 2(PB2)、碱性聚合酶 1(PB1) 和 PB1-ORF2(F2)，酸性聚合酶 (PA)，血细胞凝集素 (HA)，核蛋白 (NP)，神经氨酸酶 (NA)，基质蛋白 1 和 2(M1，M2) 和非结构蛋白 1 和 2(NS1，NS2)。8 个基因片段的编码区的侧翼为病毒 RNA 合成必需的非编码区 (NCR)。分别在病毒基因组 RNA 的 5’ 和 3’- 端的末端 13 和 12 个核苷酸在所有流感 A 病毒片段中是保守的，且是部分地互补的，以形成能被病毒聚合酶复合物识别的二级结构。NCR 可以含有至多 60 个其它核苷酸，它们在 8 个基因片段之间是不保守的，但是在不同的流感病毒之间是相对保守的。有效的病毒基因组包装需要 NCR 和编码区中的侧翼序列。因而，功能性流感病毒核酸片段由具有编码功能性流感蛋白的潜力、允许生成可复制的病毒的序列 (1 或 2 个开放读码框 / 片段）、mRNA、病毒 RNA(vRNA) 和与病毒 RNA 互补的 RNA(cRNA) 转录所需的 NCR 和存在于 NCR 和侧翼编码序列中的包装信号组成。

[0033] 优选地，所述的条件性缺陷的缺少一个流感病毒核酸的流感病毒颗粒缺少能编码功能聚合酶 PA、PB1 或 PB2 的片段。另外，对于疫苗目的，所述的颗粒优选地具有能编码病毒糖蛋白的流感病毒核酸片段。

[0034] 在一个实施方案中，本发明提供了流感 A 病毒颗粒，其具有 7 个不同的流感 A 核酸片段。根据本发明的有缺陷的流感病毒颗粒能够复制，虽然在合适的、未补偿的宿主动物或细胞中仅仅一次。

[0035] 在合适的补偿的细胞中，根据本发明的颗粒可以复制多个循环。对于疫苗和基因输送目的，有缺陷的颗粒不能在正常的、未反式补偿的细胞中无限复制是一个很大的优点，

由此减少了疫苗病毒在宿主间扩散的危险，并减少了回复到野生型病毒的危险。

[0036] 这是首次使用反向遗传学生产有缺陷的流感 A 病毒，其仅仅含有 7 个功能性基因片段，且可以经历 1 个周期的复制，或者当反式补偿了有缺陷的基因片段时，可以经历多个周期的复制。在一个实施方案中，本发明提供了条件性缺陷的流感病毒颗粒，其缺少基本编码酸性聚合酶 (PA) 的流感核酸片段。与 PA 的反式互补类似，可以预见其它流感病毒基因的反式互补。但是，由于已经证实 PA 表达水平不如其它流感病毒蛋白的表达水平关键，PA 是缺失的聚合酶组的优选基因片段，也可以生产缺失了 PB2 和 PB1 的病毒，不能反式补偿缺失了 NP 的病毒。在一个优选的实施方案中，本发明提供了条件性缺陷的流感 A 病毒颗粒，其具有 7 个不同的流感 A 核酸片段，且缺少基本编码酸性聚合酶的流感 A 核酸片段。对于疫苗目的，优选的根据本发明的条件性缺陷的流感 A 病毒颗粒具有基本编码血细胞凝集素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 蛋白的流感 A 核酸片段，这些蛋白对于赋予保护是免疫学上最相关的。为了选择合适的包含在疫苗中的基因片段，基因片段优选地选自 WHO 推荐的用于疫苗用途的病毒。当然，根据要接种预防的流感变体的 HA 和 NA 亚型，HA 和 NA 亚型可以变化。最优选地，生产根据本发明的条件性缺陷的流感病毒颗粒，其具有基本编码核蛋白 (NP)、碱性聚合酶 1(PB1)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感 A 核酸片段，“基本编码”在本文中具体指功能性蛋白由各自的基因片段表达。特别地，在具有功能性 PA 或能编码 PA 的功能性基因片段的分离的细胞中提供了这样的颗粒。在另一个实施方案中，在本文中提供了根据本发明的条件性缺陷的流感病毒颗粒，其具有基本编码核蛋白 (NP)、酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感 A 核酸片段，“基本编码”在本文中具体指功能性蛋白由各自的基因片段表达。特别地，在具有功能性 PB1 或能编码 PB1 的功能性基因片段的分离的细胞中提供了这样的颗粒。在另一个实施方案中，在本文中提供了根据本发明的条件性缺陷的流感病毒颗粒，其具有基本编码核蛋白 (NP)、酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感 A 核酸片段，“基本编码”在本文中具体指功能性蛋白由各自的基因片段表达。特别地，在具有功能性 PB2 或能编码 PB2 的功能性基因片段的分离的细胞中提供了这样的颗粒。在另一个实施方案中，本发明提供了根据本发明的颗粒，其另外含有不能编码流感肽的核酸，例如，编码用于引发免疫反应的外来蛋白或肽，或其含有能干扰细胞或病原体在细胞中的功能的核酸。

[0037] 另外，本发明提供了包含根据本发明的流感病毒颗粒的细胞。当没有为颗粒提供基本编码所需的聚合酶的基因片段时，有用的是考虑已经被提供了合适的功能性流感病毒聚合酶的细胞，允许有缺陷的流感病毒颗粒在这样补偿的细胞中复制多个周期。

[0038] 另外，本发明提供了组合物，其包含根据本发明的有缺陷的流感病毒颗粒或细胞或源自根据本发明的细胞的物质；这样的组合物可以例如用于生产旨在生成使对象免受流感病毒感染的免疫保护的药物组合物。另外，本发明提供了产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护的方法，包括给需要的对象提供这样的组合物。除了根据本发明的颗粒作为疫苗或免疫组合物的应用外，优选地将这样的组合物配制成疫苗，即通过混合病毒颗粒或源自这样的颗粒的病毒蛋白（分裂 - 疫苗）与适当的药物载体，例如盐溶液或佐剂（例如常用的铝盐或其它赋形剂（见例如 http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/

Appendices/A/Excipient.pdf.)。根据本发明的条件性缺陷的流感病毒颗粒也是用于外来基因输送和表达外来蛋白的备选载体，因为可以将功能性基因例如插入在 5’和 3’PA 序列之间。考虑到本发明提供了得到条件性缺陷的、可能含有外来或宿主核酸片段或其片段的流感病毒颗粒的方法，其包括：第一步，用下述物质转染合适的第一种细胞：通过内部删除能编码流感蛋白的核酸而衍生的一个或多个基因构建体，由此使所述的基因构建体不能生产功能蛋白，且不能阻止将病毒的基因片段包装进病毒颗粒；和能编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段；和能在所述细胞中表达所述蛋白的一个或多个表达质粒；在转染后合适的时间点，从所述的第一种细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒；第二步，用能在所述细胞中表达所述蛋白的一个或多个表达质粒转染合适的第二种细胞；第三步，用包含从所述的第一种细胞得到的至少一个病毒颗粒的上清液感染所述的第二种细胞；第四步，包括在感染后合适的时间点，从所述的第二种细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒。因此，本发明提供了得到条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，其包括：用下述物质转染合适的细胞：通过内部删除能编码流感聚合酶的核酸而衍生的一个或多个基因构建体，由此使所述的基因构建体不能生产功能聚合酶，且不能阻止将病毒的基因片段包装进病毒颗粒；和能编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段；和能在所述细胞中表达所述聚合酶的一个或多个表达质粒；在转染后合适的时间点，从所述细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒。所述的得到条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，包括：第一步，用能在所述细胞中表达流感聚合酶的一个或多个表达质粒转染合适的细胞；第二步，用包含条件性缺陷的流感病毒颗粒的上清液感染所述的细胞；第三步，包括在感染后合适的时间点，从所述细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒；或得到条件性缺陷的流感病毒颗粒的方法，其包括：第一步，用下述物质转染合适的第一种细胞：通过内部删除能编码流感聚合酶的核酸而衍生的一个或多个基因构建体，由此使所述的基因构建体不能生产功能聚合酶，且不能阻止将病毒的基因片段包装进病毒颗粒；和能编码流感病毒的互补流感病毒核酸片段；和能在所述细胞中表达所述聚合酶的一个或多个表达质粒；在转染后合适的时间点，从所述的第一种细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒；第二步，用能在所述细胞中表达所述聚合酶的一个或多个表达质粒转染合适的第二种细胞；第三步，用包含从所述的第一种细胞得到的至少一个病毒颗粒的上清液感染所述的第二种细胞；第四步，包括在感染后合适的时间点，从所述的第二种细胞的上清液中收获至少一个病毒颗粒。在该方法中，所述的聚合酶可以是例如酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。优选地，本发明提供了通过内部删除能编码流感聚合酶的核酸造成内部缺失的方法，对于 PA 蛋白，所述的内部缺失从位于由非编码区计起的核苷酸 58 至 207 之间（不含端点）的 5’-核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 194 之间（不含端点）的 3’-核苷酸结束；或者对于 PB1 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 43 至 246 之间（不含端点）的 5’-核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 24 至 197 之间（不含端点）的 3’-核苷酸结束；或者对于 PB2 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 34 至 234 之间（不含端点）的 5’-核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 209 之间（不含端点）的 3’-核苷酸结束。在另一个变体中，将外来片段插入该内部缺失中。另外，本发明提供了用包含条件性缺陷的流感病毒颗粒的上清液感染细胞的方法，所述的细胞已经能表达无功能的聚合酶，例如酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)，和可以通过本文所述的方法得到的流感颗粒。例如，要用基因构建体和核酸

片段转染的细胞已经能表达无功能的聚合酶。更具体地，本发明提供了流感病毒颗粒，其包含一个或多个在片段中具有内部缺失的核酸片段，所述缺失使片段不能生产功能性流感聚合酶，且不能阻止将病毒的基因片段包装进病毒颗粒中，其中聚合酶选自酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。优选地，内部缺失 ：对于 PA 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 58 至 207 之间（不含端点）的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 194 之间（不含端点）的 3’- 核苷酸结束 ；对于 PB1 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 43 至 246 之间（不含端点）的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 24 至 197 之间（不含端点）的 3’- 核苷酸结束 ；对于 PB2 蛋白，从位于由非编码区计起的核苷酸 34 至 234 之间（不含端点）的 5’- 核苷酸开始，至位于由非编码区计起的核苷酸 27 至 209 之间（不含端点）的 3’- 核苷酸结束。在一个优选的实施方案中，本发明提供了根据本发明的颗粒，其具有能编码病毒糖蛋白的流感病毒核酸片段。本发明还提供了根据本发明的颗粒，其具有能编码核蛋白 (NP)、碱性聚合酶 1(PB1)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段，或者提供了颗粒，其具有能编码核蛋白 (NP)、酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 2(PB2)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段，或者提供了颗粒，其具有能编码核蛋白 (NP)、酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1)、血细胞凝集素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 的流感病毒核酸片段。更具体地，本发明提供了根据本发明的颗粒，其具有源自流感 A 病毒的流感病毒核酸片段。本发明还提供了根据本发明的颗粒，其含有不编码流感肽的核酸。另外，本发明提供了包含根据本发明的颗粒的细胞，更具体地，细胞已经含有一种或多种流感病毒聚合酶，其中聚合酶选自酸性聚合酶 (PA)、碱性聚合酶 1(PB1) 或碱性聚合酶 2(PB2)。另外，本发明提供了组合物，其包含根据本发明的颗粒或细胞或源自根据本发明的细胞的物质，这样的组合物在生产旨在生成使对象免受流感病毒感染的免疫保护的药物组合物中的应用，和产生使对象免受流感病毒感染的免疫保护的方法，包括给需要的对象提供这样的组合物。另外，本发明提供了根据本发明的颗粒在生产旨在将不编码流感肽的核酸输送给细胞的组合物中的应用，和根据本发明的颗粒在生产旨在将不编码流感肽的核酸输送给对象的细胞中的药物组合物中的应用。这样的核酸（在本文中也称作外来核酸）可以编码外来基因或基因片段，后者能编码合适的抗原表位或蛋白，或者可以编码一段核苷酸，后者能干扰细胞中的核酸转录。在一个实施方案中，本发明提供了根据本发明的流感 A 病毒颗粒在生产旨在将不编码流感肽的核酸输送进细胞或对象的细胞中的组合物中的应用。另外，本发明提供了将不编码流感肽的核酸输送进细胞或对象中的方法，包括给所述细胞或所述的对象提供有缺陷的流感病毒颗粒，其含有根据本发明的外来核酸。

[0039] 附图图例

[0040] 图 1 的图例

[0041] 条件性缺陷的流感 A 病毒的生产和繁殖。首先，用 7 个能编码 A/PR/8/34 的双向质粒、pHMG-PA 和适当时的 pΔPA 或 pDIPA 转染了 293T 细胞。转染后 48 小时，收获转染的细胞的上清液，并用于接种给 MDCK 细胞和提前 24 小时用 HMG-PA 转染的 MDCK 细胞。将病毒复制阳性的 MDCK-PA 细胞的上清液在 MDCK 和 MDCK-PA 细胞中传代 4 次。

[0042] 图 2 的图例

[0043] 用于生产条件性缺陷的病毒颗粒的构建体。上图显示了野生型 PA 基因片段。标示了非编码区 (NCR) 和起始密码子。通过用 StuI 消化 pHW183，一种含有 A/WSN/33 的 PA 的双向质粒 (9)，并随后重新连接，构建了 pΔPA。通过将 A/PR/8/34 的 PA 基因片段的 5'194 和 3'207nts 克隆入 pSP72 中，构建了 pDIPA。然后将插入物转移给双向的反向遗传学载体。如本文所述，构建了 pΔPB1 和 pΔPB2。

[0044] 图 3 的图例

[0045] RT-PCR 分析 PA 基因片段在上清液 rPR8-7，rPR8-ΔPA 和 rPR8-DIPA 中的存在。使 MDCK-PA 第 4 代上清液穿过 22μM 过滤器，并离心浓缩。随后，分离 RNA，并使用针对 PA 片段的非编码区的引物，进行 RT-PCR。使用从野生型 A/PR/8/34 分离出的 RNA 作为对照。泳道 1 :rPR8-7 ；泳道 2 :rPR8-ΔPA ；泳道 3rPR8-DIPA ；泳道 4 :野生型 A/PR/8/34。标记物大小标示在左侧。

[0046] 图 4 的图例

[0047] 再删除 pΔPA 构建体的较大部分，产生了 pΔPA-2，pΔPA-3，pΔPA-4，pΔPA-5。

[0048] 发明详述

[0049] 实施例 1

[0050] 从重组 DNA 生成有缺陷的流感 A 病毒颗粒

[0051] 流感 A 病毒是负链的、分段的病毒。其基因组由 8 个基因片段组成。所有 8 个功能性基因片段是生产感染性病毒所必需的，即所述的感染性病毒是可复制的病毒，其能在通常认为适合流感病毒复制的细胞中复制无限个或至少几个周期。流感 A 病毒的基因片段的包装过程，无论是通过随机的还是特异性的机理，都已经争论了许多年。已经描述了这 2 种选择的一些证据。随机包装的证据是，聚集的病毒颗粒具有比未聚集的病毒颗粒更高的感染性 (6)，且当以低 moi 感染细胞培养物时，一些感染的细胞不能表达一个片段 (8)，这二者表明存在不含有完整流感病毒基因组的病毒粒子。随机包装的其它证据是，已经在实验中生产了含有 9 个片段的流感病毒 (4)。Bancroft 和 Parslow 发现，源自相同的基因片段的 vRNA 之间在包装病毒粒子方面没有竞争 (1)。

[0052] 一个支持特异性包装过程的理由是，尽管所有基因片段都等量地存在于病毒原液中，它们以不同的量存在于生产细胞中 (10)。另外，当生成了有缺陷的干扰 (DI) 颗粒时，DI vRNA 会替换其所源自的片段 (3)(有缺陷的干扰颗粒是其中一个基因片段具有较大的内部缺失的病毒颗粒。当病毒以高 moi 传代时，会出现这些颗粒，且认为其发生的原因是聚合酶酸性蛋白的 R638A 突变 [Fodor 等 ;J.Virol.77,5017-5020,2003])。最后，病毒粒子形成的效率随着基因片段数目的增加而增加 (5)。Fujii 等也证实了 NA 片段区，它是将片段有效地整合进病毒粒子所必需的，后来该研究组也证实了 HA 和 NS 区，其对于包装进病毒颗粒是重要的 [Fujii,2005#256 ;Watanabe,2003#184]。

[0053] 在这里，我们提出了特异性包装的证据。为了生产仅仅含有 7 个功能性基因片段的病毒颗粒，我们必须确定可以省去哪个基因片段，而不妨碍病毒生产。鉴于有复制缺陷的病毒作为疫苗的应用，未省去 HA 和 NA，也未省去 MA 或 NS，因为需要 2 个分开的表达质粒。我们生产了缺少聚合酶基因的病毒。当没有用表达质粒反式补偿缺失的基因片段时，我们不能生产病毒 (表 1,2 和 3,rPR8-7ntc)。在 7 个基因片段和能以非常低的滴度表达通常由缺失的基因片段表达的蛋白的质粒转染后，可以生产病毒 (表 1,2 和 3,rPR8-7)。因此，生

产了流感病毒 A/WSN/33 的基因片段 1,2 和 3 的缺失突变体,其分别携带 1032,528 和 1120 个核苷酸的内部缺失。将这些缺失突变体命名为 pΔPB2,pΔPB1 和 pΔPA(见图 2)。如前所述 (de Wit,E.,M.I.Spronken,T.M.Bestebroer,G.F.Rimmelzwaan,A.D.Osterhaus, and R.A.Fouchier.2004.Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34from eight cDNA fragments.Virus Res 103:155-61),用这些缺失的基因片段中的每一个和 7 个互补的能编码 A/PR/8/34 的双向构建体 (DeWit 等,2004) 和合适的表达质粒,转染了 293T 细胞。在转染后 48 小时,收获上清液。随后,如前所述 (2),用表达质粒 HMG-PB2,HMG-PB1 或 HMG-PA 中的一个,转染了 MDCK 细胞。将这些转染的细胞接种给转染的 293T 细胞的对应上清液(见图 1,其解释了实验方法)。通过 HA- 实验,确定了这些 MDCK 细胞中的病毒复制。开始时,在未转染的 MDCK 细胞中没有病毒复制。在用 HMG-PB2,HMG-PB1 或 HMG-PA 转染的、接种到对应上清液中的 MDCK 细胞中,发现了病毒复制。接着,在从流感序列数据库 (www.flu.lanl.gov,登记号 K00867) 得到的流感病毒 A/PR/8/34 的有缺陷的干扰 PA vRNA 的序列的基础上,我们克隆了有缺陷的 PA 基因片段。PCR- 扩增了 PA 的 5’207nt 和 3’194nt,克隆进源自如前所述 (De Wit 等.,2004) 修饰的 pHW2000(7) 的双向转录载体中。得到的质粒称作 pDIPA(见图 2)。用 pDIPA,HMG-PA 和 7 个能编码剩余的流感病毒 A/PR/8/34 基因片段的双向构建体转染了 293T 细胞(见图 2)。转染后 48 小时,收获上清液,随后,将提前 24 小时用 HMG-PA 转染的 MDCK 细胞接种给该上清液。接种后 72 小时,在这些 MDCK 细胞的上清液中进行 HA- 实验,发现是阳性的,这指示着这些细胞中的病毒复制。如通过 HA- 实验所确定的,接种未转染的 MDCK 细胞也不能导致病毒生产。随后在未转染或转染了 HMG-PA 的 MDCK 细胞上,传代含有 PA- 缺陷的病毒颗粒的上清液,产生了相同的结果(表 1)。直到第 4 代,在用 HMG-PA 转染的 MDCK 细胞中生产了病毒。系列稀释了 MDCKp4 的上清液,得到病毒滴度的示度 (indication),证实它是约 10_4TCID$_{50}$/ml。

[0054] 使用的方法步骤是:用构建体 pΔPB2,pΔPB1,pΔPA,pΔNP 中的一个,7 个能编码 A/PR/8/34 的互补构建体 (De Wit 等.,2004) 和 HMG-PB2,HMG-PB1,HMG-PA 中的一个(表达质粒描述在例如 Pleschka,S.,R.Jaskunas,O.G.Engelhardt,T.Zurcher,P.Palese, and A.Garcia-Sastre.1996.A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus.J Virol 70:4188-92.;获自 A.Garcia-Sastre andP.Palese),转染了 293T 细胞(关于转染方法,见 De Wit 等.,2004)。在转染后 48 小时,收获转染的 293T 细胞的上清液。当生成了病毒时,它们存在于上清液中。同时,用表达质粒 HMG-PB2,HMG-PB1,HMG-PA 中的一个(根据使用的缺失突变体,所以在使用 pΔPB2 的情况下,则用 HMG-PB2 转染 MDCK 细胞)转染了 MDCK 细胞(关于转染方法,见 Basler 等.,2000),因为生产的病毒缺少能表达该蛋白的基因片段,因为它们包装了含有内部缺失的基因片段。在转染后 24 小时,将转染的 MDCK 细胞接种给从转染的 293T 细胞得到的上清液。当病毒存在于 293T 上清液中时,该病毒会在转染的 MDCK 细胞中复制,并生产更多的病毒。在接种后 72 小时,可以再次收集上清液。

[0055] 为了证实没有发生会产生功能性 PA 基因片段的 PA 或 DIPA 重组,从 MDCKp4 的上清液分离出了 RNA。首先,使上清液穿过 22μM 过滤器,并离心浓缩。随后,分离 RNA,并使用针对 PA 片段的非编码区的引物,进行 RT-PCR。使用对 PA vRNA 特异性的引物进行的 RT-PCR 证实了,ΔPA 和 DIPA 经过多次传代后仍然稳定。在感染了 DIPA 病毒颗粒的 MDCK 细胞的

上清液中，出现了约 400bp 的清晰带，在感染了含有 ΔPA 的病毒的 MDCK 细胞的上清液中，出现了 1100bp 的带。在感染了野生型 A/PR/8/34 的 MDCK 细胞的上清液中，可见约 2300nt 的带（图 3）。这些结果表明，ΔPAPR8 基因片段稳定地包装进了病毒粒子中。

[0056] 为了生产缺少 PB2 的病毒，用 7 个能编码流感病毒 A/PR/8/34 的基因片段 2,3,4,5,6,7 和 8(de Wit,E.,M.I.Spronken,T.M.Bestebroer,G.F.Rimmelzwaan,A.D.Osterhaus, 和 R.A.Fouchier.2004.Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34from eight cDNA fragments.Virus Res 103:155-61) 的双向构建体转染了 293T 细胞 (Hoffmann,E.,G.Neumann,Y.Kawaoka,G.Hobom, 和 R.G.Webster.2000.A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc Natl Acad Sci U S A97:6108-13.)，导致了 vRNA 和 mRNA 的表达。共转染了能表达 A/PR/8/34 的 PB2、pHMG-PB2 的质粒 (Pleschka,S.,R.Jaskunas,O.G.Engelhardt,T.Zurcher, P.Palese, 和 A.Garcia-Sastre.1996.Aplasmid-based reverse genetics system for influenza A virus.J Virol70:4188-92.)。作为对照，仅仅转染了能编码 A/PR/8/34 的 7 个双向构建体，省去了 pHMG-PB2。转染后 48 小时，收获上清液，并接种给 MDCK 细胞或提前 24 小时在 100mm 盘中转染了 pHMG-PB2(MDCK-PB2) 的 MDCK 细胞。接种后 3 天，使用火鸡红细胞作为病毒生产的指示剂，测试了接种的 MDCK 细胞的上清液的血细胞凝集活性。在接种了仅仅转染了 7 个基因片段、没有转染 pHMG-PB2(rPR8-7ntc，表 2) 的 293T 细胞的上清液的细胞中，没有检测到病毒。接种了转染了 7 个基因片段和 pHMG-PB2 的 293T 细胞上清液的 MDCK-PB2 细胞上清液是阳性的。随后，使 rPR8-7 上清液在 MDCK 和 MDCK-PB2 细胞中传代。rPR8-7 能在 MDCK-PB2 细胞中复制，但是在 MDCK 细胞中不能（表 2）。我们接着生产了流感病毒 A/WSN/33 的基因片段 1 的 1032nt 缺失突变体，产生了 344 个氨基酸的缺失 (pΔPB2，图 2)。如上所述，生产了含有 ΔPB2(rPR8-ΔPB2) 的重组病毒（图 1）。在 MDCK 细胞中没有检测到病毒，而在接种了 rPR8-ΔPB2 的 MDCK-PB2 细胞中检测到了病毒。传代 rPR8-ΔPB2 后，在 MDCK 细胞中没有病毒生成的证据，这与 MDCK-PB2 细胞相反（表 2）。

[0057] 还生产了缺少 PB1 的病毒。用能编码流感病毒 A/PR/8/34 的基因片段 1,3,4,5,6,7 和 8 的 7 个双向构建体转染了 293T 细胞，导致了 vRNA 和 mRNA 的表达。共转染了能表达 A/PR/8/34 的 PB1 和 pHMG-PB1 的质粒。作为对照，仅仅转染了能编码 A/PR/8/34 的 7 个双向构建体，省去了 pHMG-PB1。转染后 48 小时，收获上清液，并接种给 MDCK 细胞或提前 24 小时在 100mm 盘中转染了 pHMG-PB1(MDCK-PB1) 的 MDCK 细胞 (2)（图 1）。接种后 3 天，使用火鸡红细胞作为病毒生产的指示剂，测试了接种的 MDCK 细胞的上清液的血细胞凝集活性。在接种了仅仅转染了 7 个基因片段、没有转染 pHMG-PB1(rPR8-7ntc，表 3) 的 293T 细胞的上清液的细胞中，没有检测到病毒。接种了转染了 7 个基因片段和 pHMG-PB1 的 293T 细胞上清液的 MDCK-PB1 细胞上清液是阳性的。随后，使 rPR8-7 上清液在 MDCK 和 MDCK-PB1 细胞中传代。rPR8-7 能在 MDCK-PB1 细胞中复制，但是在 MDCK 细胞中不能（表 3）。我们接着生产了流感病毒 A/WSN/33 的基因片段 2 的 528nt 缺失突变体，产生了 178 个氨基酸的缺失 (pΔPB1，图 2)。如上所述，生产了含有 ΔPB1(rPR8-ΔPB1) 的重组病毒（图 1）。在 MDCK 细胞中没有检测到病毒，而在接种了 rPR8-ΔPB1 的 MDCK-PB1 细胞中检测到了病毒。传代 rPR8-ΔPB1 后，在 MDCK 细胞中没有病毒生成的证据，这与 MDCK-PB1 细胞相反（表 3）。

[0058] 因而，我们已经能使用如上所述的 RNA 聚合酶 II- 驱动的 PB2，PB1 或 PA 表达质

粒，通过提供 pΔPB2，pΔPB1，或 pΔPA/pDIPA 构建体和反式互补，生产缺少片段 1，2，或 3 的病毒。这里所述的条件性缺陷的病毒可以在非反式补偿的细胞中仅仅经历 1 个周期的复制，但是可以在反式互补的细胞系中繁殖。这是首次使用反向遗传学生产有缺陷的病毒，其仅仅含有 7 个功能性基因片段，且可以经历 1 个周期的复制，或者当反式补偿了有缺陷的基因片段时，可以经历多个周期的复制。

[0059] 以该方式生产的有缺陷的病毒颗粒是疫苗候选品，因为它们可以经历 1 个周期的复制，而不生成感染性病毒。该单周期复制的结果是，疫苗会诱导体液和细胞免疫反应。尽管这些有缺陷的颗粒不能在正常细胞中复制，为了生产目的，可以使大量病毒在能表达有缺陷的蛋白的细胞系中生长。正如我们已经证实的，多个周期的复制不会影响病毒的基因型。除了有缺陷的病毒颗粒作为疫苗的应用外，它们也是基因输送和表达外来蛋白的候选载体，因为可以将功能性基因插入 5' 和 3' PA，PB2 或 PB1 序列之间。这也得到了 Watanabe 等 (11) 的证实，他们用外来基因替换了 HA 和 NA，仍然能生成病毒。

[0060] pΔPA 的进一步截短

[0061] 另外，删除了 pΔPA 构建体的更大部分，产生了 pΔPA-2，pΔPA-3，pΔPA-4，pΔPA-5（图 4）。如前所述 (De Wit 等.，2004)，用这些缺失的基因片段之一和能编码 A/PR/8/34 的 7 个互补双向构建体 (De Wit 等，2004) 和能表达 PA 的表达质粒转染了 293T 细胞。转染后 48 小时，收获上清液。随后，如前所述 (Basler，C.F.，等.，2000. Proc Natl Acad Sci U S A 97 :12289-94.)，用表达质粒 HMG-PA 转染了 MDCK 细胞。用转染的 293T 细胞的上清液接种了这些转染的细胞和未转染的细胞。通过 HA- 实验，检测了这些 MDCK 和 MDCK-PA 细胞中的病毒复制。在未转染的 MDCK 细胞中没有病毒复制。在接种了任一种上清液的 HMG-PA 转染的 MDCK 细胞中，发现了病毒复制。因而，所有源自这些构建体的 vRNA 都包装进了病毒粒子（表 4）。

[0062] 表 1. 缺少完整的 PA 基因片段的重组流感 A/PR/8/34 病毒在 MDCK 和 MDCK-PA 细胞中的复制

[0063]

病毒	下列的上清液中的血细胞凝集活性								病毒滴度	
	MDCK				MDCK-PA				$TCID_{50}$/ml	
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P4
rPR8-7ntc[1]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rPR8-7	-	-	-	-	+	+	+	+	$5.6x10^1$	$<10^1$
rPR8-deltaPA	-	-	-	-	+	+	+	+	$3.1x10^5$	$3.1x10^4$
rPR8-DIPA	-	-	-	-	+	+	+	+	$3.1x10^4$	$3.1x10^4$
rPR8-wt	+	+	+	+	+	+	+	+	$1.0x10^7$	ND

[0064] ntc :未反式补偿的（在 293T 细胞中没有转染 pHMG-PA）

[0065] 表 2. 缺少完整的 PB2 基因片段的重组流感 A/PR/8/34 病毒在 MDCK 和 MDCK-PB2 细胞中的复制

[0066]

病毒	下列的上清液中的血细胞凝集活性			
	MDCK		MDCK-PB2	
	p1	p2	p1	p2
rPR8-7ntc	-	-	-	-
rPR8-7	-	-	+	+
rPR8-pΔPB2	-	-	+	+
rPR8	+	+	+	+

[0067] ntc :未反式补偿的（在 293T 细胞中没有转染 pHMG-PB2）

[0068] 表 3. 缺少完整的 PB1 基因片段的重组流感 A/PR/8/34 病毒在 MDCK 和 MDCK-PB1 细胞中的复制

[0069]

病毒	下列的上清液中的血细胞凝集活性			
	MDCK		MDCK-PB1	
	p1	p2	p1	p2
rPR8-7ntc	-	-	-	-
rPR8-7	-	-	+	+
rPR8-pΔPB1	-	-	+	+
rPR8	+	+	+	+

[0070] ntc :未反式补偿的（在 293T 细胞中没有转染 pHMG-PB1）

[0071] 表 4. 缺少完整的 PA 基因片段的重组流感 A/PR/8/34 病毒在 MDCK-PA 和 MDCK 细胞中的复制

[0072]

病毒含有	下列细胞中的病毒复制	
	MDCK-PA	MDCK
pΔPA	+	-
pΔPA-2	+	-
pΔPA-3	+	-
pΔPA-4	+	-
pΔPA-5	+	-

[0073] 实施例 2

[0074] 用有缺陷的重组病毒接种疫苗

[0075] 在含有相关流行病病毒（例如 A/ 莫斯科 /10/99）的 HA 和 NA 基因的高通量病毒主链（例如源自疫苗株 A/PR/8/34）的基础上，如本文所述，生产了条件性缺陷的缺少功能性 PA、PB1 或 PB2 基因的重组病毒。通过转染生产了条件性缺陷的病毒，其中通过反式互

补实现了聚合酶蛋白表达。随后，在能稳定表达相关聚合酶的合适细胞基质（例如 MDCK 细胞或 Vero 细胞）中扩增了病毒。通过在 1000xg 离心 10 分钟，澄清了病毒上清液。通过在 20-60％蔗糖梯度中进行超离心，浓缩和纯化了病毒，沉淀后，重新悬浮到磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。使用考马斯亮蓝染色的 12.5％ SDS- 聚丙烯酰胺凝胶，确认了病毒制品的纯度和数量，通过 MDCK 细胞和能表达相关聚合酶的 MDCK 细胞的感染和用抗 - 核蛋白单克隆抗体染色，确定了条件性缺陷的病毒的病毒滴度。使用喷雾器，给小鼠气管内地或鼻内地接种 1x10550％组织 - 培养物感染剂量 (TCID-50)。使用血凝反应抑制实验、神经氨酸酶抑制实验、ELISA 或病毒中和实验，确定了接种疫苗之前和之后收集的血清样品中的针对流感病毒的 HA、NA 和内部蛋白的抗体滴度。通过流式细胞仪、CD4 和 CD8- 阳性细胞的四聚体染色、细胞裂解活性、T- 细胞增殖等，测量细胞内的细胞因子表达，对接种疫苗的动物中的抗原特异性的细胞免疫反应进行了定量。接种疫苗后 6 周，使用 $1x10^6$TCID-50 的流感病毒 A/ 莫斯科 /10/99 或异源病毒分离株，攻击接种疫苗的动物和对照动物。攻击后，每天从动物收集鼻的或咽喉的拭抹样品，进行 10 天，通过定量 PCR 分析或病毒滴定，确定了感染动物排出的病毒的量。通过对抗体滴度的升高进行定量，确定了得到的疫苗诱导的体液免疫，通过对辅助和细胞毒性 T- 细胞反应的升高进行定量，确定了得到的疫苗诱导的细胞免疫，通过确定针对攻击病毒的感染的保护，确定了免疫的总水平。

[0076] 参考文献

[0077] 1. Bancroft, C. T., and T. G. Parslow. 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. J Virol76 :7133-9.

[0078] 2. Basler, C. F., X. Wang, E. Muhlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klen k, A. Garcia-Sastre, and P. Palese. 2000. The Ebola virus VP35protein functions as a type I IFN antagonist. Proc Natl Acad Sci U S A97 :12289-94.

[0079] 3. Duhaut, S. D., and J. W. McCauley. 1996. Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specificmanner. Virology 216 :326-37.

[0080] 4. Enami, M., G. Sharma, C. Benham, and P. Palese. 1991. An influenza virus containing nine different RNA segments. Virology185 :291-8.

[0081] 5. Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida, and Y. Kawaoka. 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. Proc Natl Acad Sci U S A 100 :2002-2007.

[0082] 6. Hirst, G. K., and M. W. Pons. 1973. Mechanism of influenza recombination. II. Virus aggregation and its effect on plaque formation by so-called noninfective virus. Virology 56 :620-31.

[0083] 7. Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc Natl Acad Sci U S A 97 :6108-13.

[0084] 8. Martin, K., and A. Helenius. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins :the viral matrix protein(M1)promotes export and inhibits import. Cell 67 :117-30.

[0085] 9. Neumann, G., T. Watanabe, and Y. Kawaoka. 2000. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. J Virol 74 :547-51.

[0086] 10. Smith, G. L., and A. J. Hay. 1982. Replication of the influenza virus genome. Virology 118 :96-108.

[0087] 11. Watanabe, T., S. Watanabe, T. Noda, Y. Fujii, and Y. Kawaoka. 2003. Exploitation of Nucleic Acid Packaging Signals To Generate a Novel Influenza Virus-Based Vector Stably Expressing Two Foreign Genes. J Virol 77 :10575-10583.

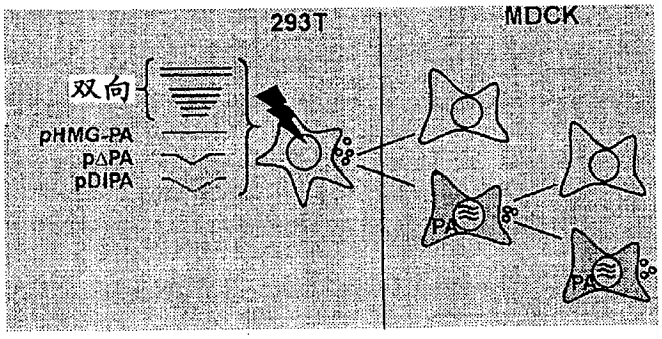

293T
MDCK
双向
pHMG-PA
pΔPA
pDIPA
PA
PA

图 1

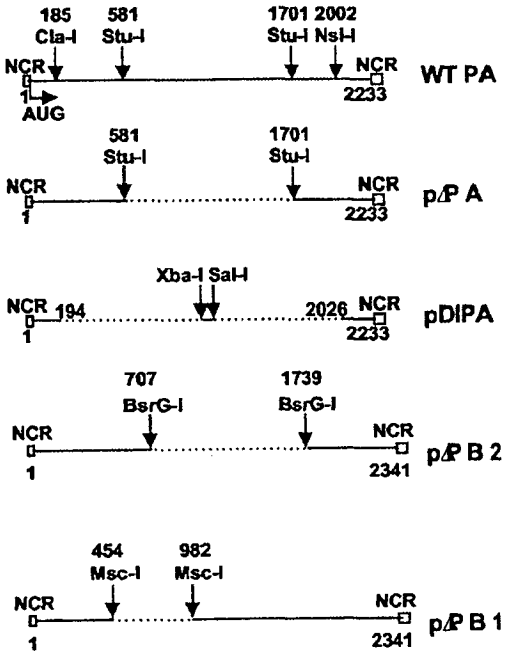

185
Cla-I
581
Stu-I
1701 2002
Stu-I NsI-I
NCR
NCR
1
AUG
2233
WT PA
581
Stu-I
1701
Stu-I
NCR
NCR
1
2233
pΔP A
Xba-I Sal-I
NCR 194
2026 NCR
1
2233
pDIPA
707
BsrG-I
1739
BsrG-I
NCR
NCR
1
2341
pΔP B 2
454
Msc-I
982
Msc-I
NCR
NCR
1
2341
pΔP B 1

图 2

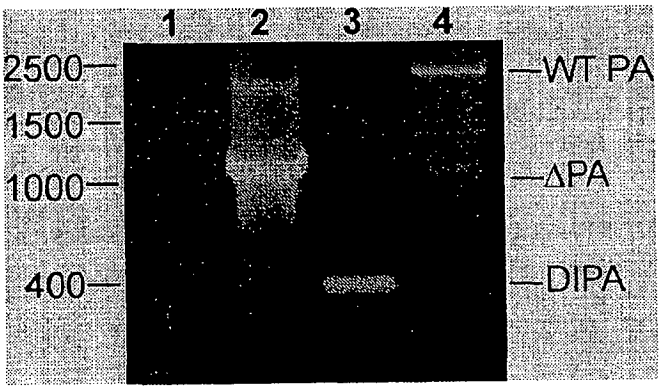

1
2
3
4
2500
1500
1000
400
—WT PA
—ΔPA
—DIPA

图 3

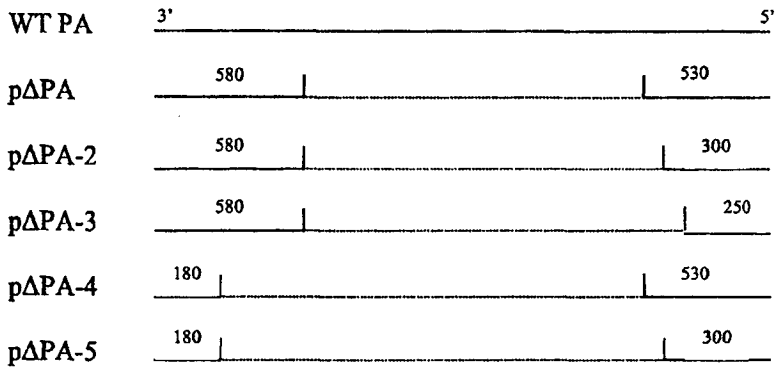

WT PA
3'
5'
pΔPA
580
530
pΔPA-2
580
300
pΔPA-3
580
250
pΔPA-4
180
530
pΔPA-5
180
300

图 4