

虫媒黄病毒嵌合疫苗研究进展

俞永新

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

Progress of Arbo-Flavivirus Chimeric Vaccines

YU Yong-xin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

关键词: 黄病毒; 嵌合疫苗

中国分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0413-05

黄病毒科黄病毒属包括 70 多种病毒, 分为几种抗原复合组, 大多数黄病毒为节肢动物传播的, 其中 40% 以上的病毒对人有致病性, 最重要的疾病有登革热/登革出血热(DEN/DHF), 日本脑炎(乙型脑炎, JE), 黄热(YF), 西尼罗热(WNF) 和蜃虱传播脑炎(森林脑炎, TBE)等。登革热每年约有数千万至 1 亿病人, 数十万人发生严重的登革出血热。乙脑每年约发生 4~5 万病例, 病死率 25%, 45% 的患者发生神经学或生理学上的后遗症。当前对黄热病已有减毒活疫苗, 对登革热还没有疫苗, 对乙脑已有鼠脑和地鼠肾细胞灭活疫苗和减毒活疫苗, 对蜃虱脑炎已有灭活疫苗, 但各种疫苗都还存在一定的不足, 有必要进一步改进和提高。

已知黄病毒为直径 45~50nm 的有膜 RNA, 单股正链, 基因组约 11kb, 基因结构为含 5' 和 3' 非编码区, 3 个结构基因编码 3 种结构蛋白和 7 个非结构基因编码 7 种非结构蛋白, 其排列顺序为 5' -UTR-C-PrM/M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-UTR-3', 其中 E 基因编码的 E 蛋白为糖基化蛋白, 具有与细胞表面受体结合, 介导膜融合, 诱导产生保护性中和抗体并对病毒毒力起重要作用, 因此是重要的抗原成份。非结构基因主要与病毒复制有关。因此多年前就有研究人员考虑以一种弱毒病毒为基因骨架(即载体)将另一种病毒的 PrME 结构基因(目的基因)替换载体病毒的相应基因构建有感染性的嵌合体病毒, 这种嵌合体保留载体病毒原来的弱毒特性而具有嵌入病毒的抗原性。嵌合体应对人体无毒力(安全)而又能诱导针对嵌入病毒的抗体并对以后该病毒的感染有保护作用。基因替换嵌合一般在作为基因背景病毒的 cDNA 中进行, 将嵌

入病毒结构基因 C-PrM-E 或 PrM-E 与 cDNA 相应基因替换, 在体外转录为 RNA 后转染 Vero 或其他细胞, 培养后出现细胞病变或空斑, 经检定证实为感染性嵌合体病毒后则可继续传代保存。

目前选择作为基因背景的病毒主要有黄热疫苗 17D 病毒, II 型登革热狗肾细胞传代弱毒株 DEN-2 PDK-53 和对乳鼠毒力很弱的登革热 4 型野毒株 DEN-4 814669 株。用以上三种弱毒构建成功的嵌合体已有 10 多种, 其中有几种嵌合体经小鼠和猴体试验显示毒力很低并有较好的免疫性, 正在进一步研究中, 有希望作为候选疫苗。其中有一种以黄热 17D 为基因背景的黄热乙脑病毒嵌合体(YF/JESA14-14-2)已进行 I、II 期临床观察。现将嵌合体构建现状及其特性综述介绍如下。

1 森林(蜃虱)脑炎嵌合体病毒

用 DEN-4 814669 株为基因背景已构建三种蜃虱(TBE 森林)脑炎的嵌合体病毒, Pletner 等^[1,2]最早将 TBE 病毒 Sofjun(sof)野毒株的 PrM-E 取代 DEN-4 814669 相应基因构建成功有感染性的 DEN-4/TBE 嵌合体。嵌合体仍保留 TBE 母株对成鼠的脑内毒力, 但对神经外的皮内或腹腔感染则毒力降低, 对小白鼠无致病性存活的小鼠 21d 后以 10^3 TBESof 野毒株腹腔攻击, 动物均获得保护未死亡。而以 DEN-4 同样感染的小白鼠则对 Sof 株攻击全部死亡, 表明嵌合体中 TBE 的 ME 具有保护性的抗原决定簇。由于 DEN-4/TBE 对小鼠脑内感染仍有较高的致病力, 为了对人体更安全 Pletner 等认为有必要继续构建毒力更低的嵌合体。

以后该小组^[3-5]又应用 TBE 的减毒株进行构

建,一株是1956年分离自马来西亚的天然减毒株 Langat TP21(LGT Tp21),其对小鼠脑内毒力较低,另一株是由LGT-TP21在鸡胚内传42代后进一步减弱的毒株(LGT E5)。构建的二株嵌合体 DEN-4/TP21 和 DEN-4/E5 对乳鼠脑内致病力均较其LGT亲代株低,下降约5500~6250倍,对3周龄成鼠的神经外(腹腔)毒力也显著降低,以 $>10^5$ PFU 病毒接种正常瑞士小鼠或 10^7 病毒接种免疫缺陷的 SCID 小鼠均测不出毒力。

以 10^5 pfu 腹腔接种这二株嵌合体病毒的小鼠各40只,小鼠全部存活,3周后产生对TP21的高滴度中和抗体(288和327),并对TP21腹腔内攻击获得全部保护,对照小鼠则80%死亡。进一步将这二株适应可用于制备疫苗的Vero细胞后证实对SCID小鼠腹腔接种完全无致病性。免疫小鼠对TBE病毒东亚型和欧洲亚型毒株均有保护作用,但应接种2针才可获得较好保护,其中DEN-4/TP21的保护率为100%,较DEN-4/E₅(67%)高。因此选择前者为候选疫苗株进一步作猴体试验。猴体试验以 10^3 , 10^5 , 10^7 PFU 的DEN-4/TP21病毒皮下接种,每组4只,接种后每日测病毒血症至第6天,结果除 10^7 的一只猴于第1天时测出一个空斑外其余猴全部为阴性,而接种TP21母株(10^5 , 10^7)的8只猴和DEN-4 10^5 的4只猴均出现毒血症,持续1~5d。免疫后42d TP21母株和DEN-4/TP21免疫猴均产生对TP21和Sof株较高的中和抗体,GMT分别为320~2344(DEN-4/TP21免疫猴)和160~3311(TP21免疫猴),但对DEN-4均为阴性。免疫后43d以TP21 10^5 PFU病毒皮下攻击,结果TP21和DEN-4/TP21免疫猴病毒血症全部阴性,而DEN-4免疫的4只猴均出现4d的毒血症。以上猴体试验表明DEN-4/TP21嵌合体的毒力明显降低,有免疫性和保护作用。为了解嵌合体病毒能否通过蚊虫而感染人,将病毒胸内接种对登革热高度敏感的巨蚊*T.splendens*,14d后用免疫荧光法检测蚊头组织内的病毒抗原,结果所有接种DEN-4/TP21的蚊子均未查出抗原,而DEN-4感染的大多数蚊则测出病毒抗原,滴度 $10^{2.8}$ PFU。因此DEN-4/TP21嵌合体病毒有希望作为TBE的人用候选疫苗,正在进一步研究中。

2 登革热嵌合体病毒

对登革热病毒的嵌合体构建,主要选择上述三种毒力较弱的病毒株作为基因背景,由美国三个研究组进行。

美国NIH变态反应和传染病研究所一组人员^[6,7]

最早设想进行登革热病毒型间的嵌合,他们以DEN-4 814669株为背景构建成功DEN-4/DEN-1, DEN-4/DEN-2, DEN-4/DEN-3嵌合体。其中嵌入的DEN-1(WP)、DEN-3 CH53489为野毒株, DEN-2(NGC)为有神经毒力的鼠脑适应株。这三株嵌合体经单克隆抗体检定表明为登革热型特异性结构蛋白,与登革热母株比较在细胞内复制能力下降,空斑变小,但DEN-2 NGC嵌合体仍保留DEN-2对小鼠的脑内毒力。用DEN-4/DEN-1和DEN-4/DEN-2嵌合体分别皮下免疫恒河猴后均能产生对DEN-1和DEN-2的抗体(滴度640~1280),但不产生对DEN-4抗体。经用DEN-1或DEN-2野毒株攻击后均获保护(8只试验猴仅一只出现毒血症),而用DEN-4免疫的对照猴则无保护,均产生病毒血症。进一步用这二种嵌合体病毒混合后免疫恒河猴,结果每只猴均产生对DEN-1和DEN-2两个型的中和抗体并对这两个型DEN野毒株攻击都有保护(8只猴病毒血症均阴性)。现在考虑将3个型的嵌合体加上DEN-4 814669本身制成4联活疫苗进一步实验观察。

美国疾病和预防中心与泰国Mahido大学合作,应用泰国在狗肾细胞传53代的DEN-2减毒株(DEN-2PDK)作基因载体,构建嵌合体^[8]。DEN-2PDK-53减毒株具有空斑小,温度敏感,在C6/36细胞复制受限,以及对新生乳鼠毒力低的减毒特征,其基因变异主要发生在5'端非编码区(5'NCR-57),NS₁-53和NS₃-250。人体观察表明安全而且免疫性较好。研究组人员以DEN-2PDK-53作为基因背景将DEN-1 16007野毒株和DEN-1狗肾细胞减毒株PDK-13的C-PrM-E分别与载体相应基因替换构建成功二株嵌合体。二株嵌合体均保留DEN-2PDK-53载体的弱毒各项特征。用DEN-2/DEN-1 16007嵌合体腹腔免疫3周龄小鼠1针和2针,免疫后血清中和抗体对DEN-1本株为40-80(1针)和 ≥ 2560 (2针),而以DEN-2/DEN-1 PDK-13同样免疫后的抗体水平明显低于前者,分别为10~40和80~160。该结果与以往泰国研制的4联活疫苗在人体观察时DEN-1PDK-13株的免疫性差的结果相一致。因此考虑选用DEN-2PDK-53/DEN-116007嵌合体更换DEN-1PDK-13作为目前登革热4联活苗中的DEN-1型弱毒株。另外还设想以DEN-2PDK-53为基因背景再构建DEN-3和DEN-4的嵌合体,加上已构建的DEN-1嵌合体和DEN-2PDK-53本身作为登革热新一代4联减毒活疫苗。

美国Acambis公司的一组人员以黄热17D疫苗株病毒为基因背景,构建4个型的登革热病毒嵌合

体, 进展的比较快, 并已制成 4 个型嵌合体的 4 联候选疫苗, 进行了猴体试验。首先构建成功的是 DEN-2 型与 17D 的嵌合体^[9], DEN-2 为 1980 年分离自泰国的 PUO-218 株, 该株对乳鼠脑内无致病性。将该株的 PrM-E 取代 17D 黄热病毒的相应基因区, 在 Vero 细胞转染成感染性病毒(嵌合体)。嵌合体与 DEN-2 母株序列比较, 在 PrM 无变化, 在 E 区发生一处氨基酸变化(E484 I → V)。与 17D 核苷酸比较在 NS2A, NS3, NS4A, NS4B, NS5 和 3' NCR 共 6 个核苷酸发生变化, 导致二处氨基酸变化(NS2-104 V → M, NS4B-7 E → K)。嵌合体对成鼠脑内无致病力, 低于黄热 17D(YF 17D 有较强的致病力, 100PFU 引起 50% 成鼠死亡)。嵌合体以不同剂量(2~5log PFU)皮下接种 16 只恒河猴后仅产生很低的病毒血症(1.3~1.6log pfu), 30d 后均产生高滴度中和抗体(GMT 320~380), 60d 后用 DEN-2 野毒株 5.0 log PFU 病毒皮下攻击, 结果全部猴均未出现病毒血症, 而对照猴则产生持续 5d 的病毒血症, 表明嵌合体致病力低而具有很好的免疫应答和保护作用。随后又构建成功 DEN-1、DEN-3、DEN-4 三个型与 17D 黄热病毒的嵌合体^[10], 所用 DEN-1 为 1980 年分离自泰国的 PUO-359 株, DEN-3 为 1988 年分离自泰国的 PaH881/88 株, DEN-4 为 1978 年分离自印尼的 1228 株, 均为野毒株。这三个型嵌合体病毒在 Vero 细胞复制的病毒滴度可达 7.5logpfu/ml, 对 3~4 周龄 ICR 小鼠脑内接种无神经毒力, 对恒河猴皮下接种后产生的病毒血症水平(0.7~1.4 log PFU)和持续时间与 YF 17D(1.9)相似, 但较其 3 个型 DEN 母株(2.2~3.0 log PFU)低。免疫后 22 只猴均产生了中和抗体。

将上述 4 个型嵌合体混合制成四联嵌合体疫苗并在猴体重新评价其安全性和免疫性^[11]。以 4 联嵌合体和 4 联野毒株(登革 4 个型野毒株混合病毒)在猴体进行了比较, 结果 4 联野毒株的病毒血症和持续时间均高于 4 联嵌合体。抗体应答结果, 4 联嵌合体免疫 1 针后均产生对 4 个型的嵌合体病毒和其他 4 个型野毒株病毒的中和抗体, 第 2 针免疫后则抗体进一步提高。

另外, 实验还表明对 YF 17D 免疫过的猴再用 YF/DEN-1~4 四联疫苗免疫, 30d 后仍可产生对四个型登革热病毒的中和抗体, GMT 滴度分别为 254, 1016, 350, 80, 与 YF 未免疫猴滴度(180, 1280, 36, 63)比较无明显差别, 表明黄热病毒抗体的存在对登革热 4 联的免疫无干扰。

以上结果表明尽管是用登革热的野毒株与 17D

嵌合, 所形成的嵌合体对猴体的毒力(病毒血症)较登革热母株的毒力降低, 仅保留 17D 的低毒血症水平, 而嗜神经毒力则较 17D 株更低。由于 17D 黄热疫苗已在人体广泛应用数十年证明是安全的, 因此预计 DEN-1~4 型与 17D 的 4 联嵌合体疫苗对人体应是安全的, 该 4 联疫苗已计划进行 I 期临床观察。

3 乙型脑炎嵌合体病毒

美国 Acambis 公司一组人员^[12-14]将我国应用 10 多年安全有效的乙脑弱毒 SAI4-14-2 株和分离自日本的 Nak 乙脑野毒株的 PrM-E 分别与 YF-17DcDNA 的相应基因置换而构成二种嵌合体, 前者为 YF/JE SA₁₄₋₁₄₋₂(YF/JE-S)后者为 YF/JE Nak (YF/JE-N)。小鼠试验表明 YF/JE-S 对 4 周龄小鼠脑内感染不致病, 不但保留 SAI4-14-2 原株的弱毒特性, 而且较 YF-17D 原株的毒力更低(YF-17D 原株对小鼠的致病力约 log3.0LD₅₀), 而 YF/JE-N 的脑内毒力与 Nak 原株相似, 对小鼠脑内仍有较强的毒力, 但腹腔感染的毒力较原株降低。

在恒河猴脑内接种 YF/JE-S 嵌合体和 YF-17D 活疫苗进行神经毒力比较, 每组 10 只, 结果嵌合体 10 只猴均未出现发病症状, 而 YF-17D 疫苗 10 只中 4 只(40%)在接种后 15-19d 出现神经症状, 持续 4-15d 后恢复。对脑和脊髓的病理检查结果显示接种 YF-17D 猴的病变显著重于接种嵌合体病毒, 病变记分分别前者为 1.17 和后者为 0.29。脑内接种的猴, 血液中的病毒滴度 YF-17D 高于嵌合体约 2~4 倍。恒河猴皮下接种 YF/JE-S 后产生低水平短暂病毒血症并产生对乙脑病毒的中和抗体, 但不产生对 YF/17D 的抗体。但进一步对 4 只免疫猴血清用 6 株不同地区乙脑分离株作中和抗体测定则发现其中有的猴血清对一些毒株的抗体很低或测不出滴度(<20)。免疫猴用乙脑野毒株脑内攻击后, 均不产生病毒血症, 除 1 只死亡外均活存, 而未免疫猴全部产生较高的病毒血症并且发生脑炎死亡。以上结果表明 YF/JE-S 嵌合体的神经毒力很低, 与 SAI4-14-2 原株相似, 并较 17D 原株更低。神经外毒力(毒血症)与 17D 原株相似。免疫动物对乙脑病毒有较好的抗体应答, 经乙脑野毒株脑内攻击后有明显的保护作用。可以用作人用候选疫苗。

YF/JE-S PrM-E 嵌合体制备的疫苗(Chimeri Vax-JE)已进行 I、II 期临床观察^[15,16]。I 期临床以 5.0、4.0logPFU 的 Chimeri Vax-JE 和 5.0log 的黄热疫苗(YF-VAX)各接种有黄热抗体和无黄热抗体的成年志愿者, 每组各 6 名, 接种后观察局部和全身副反

应,不同时间病毒血症和抗体应答水平。结果在接种部位出现轻度短暂的疼痛,红斑肿等反应,各组间无显著差别。全身副反应在 Chimeri Vax-JE 低剂量有黄热抗体组和 YF-VAX 无黄热抗体组,各发生 1 例体温为 102.1° F(14d)和 100.4° F(15d)的反应,研究人员考虑与疫苗本身无关。但另有二例在接种 Chimeri Vax-JE 高剂量和低剂量疫苗后 1-11d 出现体温升高(>99° F),考虑与疫苗有关。病毒血症检查结果,10/12 无黄热抗体和 11/12 有黄热抗体者接种 Chimeri Vax-JE 后产生低滴度短暂病毒血症。而 YE-VAX 接种的 6 名无黄热抗体者均产生毒血症,另 6 名有黄热抗体者均未测出毒血症。毒血症水平和持续时间二种疫苗无显著差异。抗体检查结果,24 名接种 Chimeri Vax-JE 者在接种后 31d 均产生对嵌合体病毒的中和抗体,抗体水平高剂量组比低剂量组高,有黄热免疫组比无黄热免疫组高,但无显著差异。6 名无黄热免疫者接种黄热疫苗后抗体均阳转,而 6 名有黄热免疫者则只有 3/6 阳转。

II 期临床以双盲法对 119 名 18~59 岁健康成人进行观察,其中包括不同病毒量(1.8~5.8 log) Chimeri Vax-JE 疫苗和 YF-Vax 等不同免疫程序组。结果显示未发生严重的副反应,但发生 5 例发热反应认为与 Chimeri Vax-JE 疫苗有关,另 2 例与 YF-Vax 有关,另外一例在接种后引起严重的肌痛,认为与疫苗有关。一例在第 2 针 4.8log 接种后 3 周患胆囊炎而住院,认为与疫苗接种无关。接种不同病毒量的 Chimeri Vax-JE 和 YF-Vax 均产生短暂低滴度病毒血症,二种疫苗间无差异,但不同病毒量间无剂量关系,1.8 log 组的滴度反而高于 5.8 log 组。免疫后 30d 时的中和抗体阳转率对嵌合体 Chimeri Vax-JE 病毒为 82%~100%(GMT103~299),也无剂量关系。加强一针未显示抗体增长应答。但是嵌合体疫苗免疫对其他乙脑野毒株的中和抗体水平较低,抗体阳转率对 Beijing-1 株为 70%~100%(GMT19~74),对 Nak 株为 73%~91%(GMT38~132),对 902/97 株(1997 年分离自越南)为 82%~100%(GMT59~160)。实验还证实经 YF17D 免疫的人对 Chimeri Vax-JE 免疫无干扰作用。

以上人体初步观察显示乙脑嵌合体疫苗对人体的安全性与 17D 黄热疫苗相似,并具有刺激机体诱生中和抗体的作用,但仍存在一些问题。

4 西尼罗热嵌合体病毒

在美国有二组研究人员正在研究西尼罗热病毒(WNV)与其他黄病毒的嵌合体。一组是美国 NIH

变态反应和传染病研究所^[17],他们以 DEN-4 814669 野毒株及其 3' 去除 30 个核苷酸的减毒株(DEN4 3' Δ30)为基因背景,将 WNV NY99 野毒株的 PrM-E 分别替换入以上两株的相应基因区,而获 DEN4/WN 和 DEN4-3' Δ30/WN)二种嵌合体。经小鼠试验表明二种嵌合体对小鼠的毒力均有显著下降,WNVNY99 亲代株病毒对 3 周龄小鼠腹腔感染时,10FFU 病毒即可致死,而嵌合体病毒以 10⁴ 或 10⁵ 病毒同样感染,对小鼠不致死,约降低 10000 倍;WNV-NY99 亲代株对 3 日龄乳鼠脑内感染,约 0.35FFU 可致死,而嵌合体病毒以 10⁴FFU 感染时仅引起少数动物死亡,约降低 28500 倍。嵌合体病毒对乳鼠的脑内毒力也较 DEN4 亲代株低,后者对乳鼠脑内 LD₅₀ 为 407 FFU。免疫力试验则表明以 10⁵FFU 病毒腹腔免疫小鼠,一个月后产生对 WNV 的中和抗体,以 100ipLD₅₀WNV 腹腔攻击后 90%~100% 获得保护。

进一步对 12 只猴用 10⁵ 和 10⁶FFU 病毒皮下感染试验,结果 DEN4/WN 嵌合体对猴的病毒血症较其 WN 或 DEN4 原株感染的猴降低 100 倍,而 DEN4-3' Δ30/WN 嵌合体对猴不产生毒血症,表明其对猴的毒力更加减弱。尽管毒力高度减弱,二种嵌合体均产生中等水平至高水平滴度的中和抗体(GMT 186 至 661),特别是当用 WNV 野毒株 10⁵FFU 皮下攻击后所有 12 只猴全部未产生病毒血症,表明获得完全保护。由于 DEN4-3' Δ30/WN 嵌合体对动物高度减弱,能产生中等度中和抗体并对 WN 野毒株攻击具有很强的保护作用,表现该嵌合体有望作为人用活疫苗的候选疫苗,已计划今年内进行人体临床试验^[18]。

另一组美国 Acambis 公司的研究人员^[19-20],他们以 YF/17D 为基因背景将 WNV 的 PrM-E 嵌入相应基因区也构建成功 YF-17D/WN 的嵌合体。以地鼠为模型进行感染和免疫实验显示对地鼠无致病性,以 10^{3.3} 和 10^{6.3} TCID₅₀ 嵌合体肌内免疫动物后 1 月均产生对 WNV 的 HI,CF 和空斑减少中和抗体(1:80~≥640),以 10⁴WNV 野毒株腹腔攻击动物未发病和死亡。

以上两研究组的工作均证明 WN 嵌合体病毒的毒力较亲代株低并可诱生对 WNV 的抗体应答和保护作用,已计划进一步作猴体试验验证嵌合体疫苗的安全性和免疫性。

5 小结

总结以上黄病毒间嵌合体构建结果,可看出嵌

合体具有以下特性 (1) 核苷酸序列除个别外基本上与各自的二个亲代株病毒一致。(2) 嵌合体基本保留作为基因背景亲代株(载体)病毒的弱毒特性, 但其神经毒力尤其是神经外致病力和毒力(病毒血症)则较二个亲代株都更低。这可能是由于二种病毒基因间的不相容性的关系。(3) 嵌合体抗原性表现为嵌入病毒的抗原性, 即免疫动物后诱生针对嵌入病毒的抗体并对其攻击有保护, 而对载体病毒则无抗体和保护作用。(4) 载体病毒抗体的存在对嵌合体免疫无干扰作用, 即嵌合体对存在载体病毒抗体的动物仍可免疫成功。

因此嵌合体疫苗较其他基因重组活疫苗或基因亚单位疫苗具有一定的优点, 它在细胞培养内能高效复制, 病毒释放在培养液中的滴度高, 收获病毒液即可制备疫苗不必通过纯化加工, 生产工艺简单; 具有减毒活疫苗的特性, 在体内能有限复制, 诱生体液和细胞免疫; 其载体在免疫中不起作用, 对嵌合体疫苗免疫无干扰作用, 既可对存在载体抗体的人免疫也可对嵌合体疫苗免疫后的人再作加强免疫。但目前还存在一些问题如作为基因载体的弱毒株的安全性是否可靠, 目前用的最多的是 YF-17D 病毒, 但 17D 疫苗近来接种后已出现多例与疫苗相关的嗜神经和嗜内脏的严重病例, 其他弱毒载体虽然对动物的毒力低, 但在人体上的应用例数还不多, 安全尚难肯定, 另外嵌合体病毒多次传代或人体大面积应用后的毒力稳定性以及嵌合体疫苗是否对不同野毒株均有保护作用等还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Pletnev A G, Bray M, Huggins J, *et al.* Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10532-10536.
- [2] Pletnev A G, Bray M, Lai C J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice[J]. *J Virol*, 1993, 67(8): 4956-4963.
- [3] Pletnev A G, Men R. Attenuation of the Langat tick-borne flavivirus by chimerization with mosquito-borne flavivirus dengue type 4[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(4): 1746-1751.
- [4] Pletnev A G, Karganova G G, Dzhivanyan T I, *et al.* Chimeric Langat/Dengue viruses protect mice from heterologous challenge with the highly virulent strains of tick-borne encephalitis virus[J]. *Virology*, 2000, 274(1): 26-31.
- [5] Pletnev A G, Bray M, Hanley K A, *et al.* Tick-borne Langat/mosquito-borne dengue flavivirus chimera, a candidate live attenuated vaccine for protection against disease caused by members of the tick-borne encephalitis virus complex: evaluation in rhesus monkeys and in mosquitoes[J]. *J Virol*, 2001, 75(17): 8259-8267.
- [6] Bray M, Men R, Lai C J. Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge[J]. *J Virol*, 1996, 70(6): 4162-4166.
- [7] Chen W, Kawamo H, Men R, *et al.* Construction of intertypic chimeric dengue viruses exhibiting type 3 antigenicity and neurovirulence for mice[J]. *J Virol*, 1995, 69(8): 5186-5190.
- [8] Huang C Y, Butrapet S, Pierro D J, *et al.* Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine[J]. *J Virol*, 2000, 74(7): 3020-3028.
- [9] Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers T J, *et al.* Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates[J]. *J Virol*, 2000, 74(12): 5477-5485.
- [10] Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, *et al.* Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates[J]. *Virology*, 2002, 298(1): 146-159.
- [11] Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev K V, *et al.* Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine[J]. *J Virol*, 2001, 75(16): 7290-7304.
- [12] Chambers T J, Nestorowicz A, Mason P W, *et al.* Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties[J]. *J Virol*, 1999, 73(4): 3095-3101.
- [13] Monath T P, Soike K, Levenbook I, *et al.* Recombinant, chimeric live, attenuated vaccine (Chimerivax) incorporating the envelope genes of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever(17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates[J]. *Vaccine*, 1999, 17(15-16): 1869-1882.
- [14] Guirakhoo F, Zhang Z X, Chambers T J, *et al.* Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus(ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis[J]. *Virology*, 1999, 257(2): 363-372.
- [15] Monath T P, McCarthy K, Bedford P, *et al.* Clinical proof of principle for chimerivax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections[J]. *Vaccine*, 2002, 20(7-8): 1004-1018.
- [16] Monath T P, Guirakhoo F, Nichols R, *et al.* Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(8): 1213-1230.
- [17] Pletnev A G, Putnak R, Speicher J, *et al.* West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 3036-3041.
- [18] Alexander G, Pletnev A G, Marisa St. Claire, *et al.* Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus[J]. *Virology*, 2003, 314: 190-195.
- [19] Monath T P. Prospects for development of a vaccine against the West Nile virus[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 951:1-12.
- [20] Tesh R B, Arroyo J, Amelia P A, *et al.* Efficacy of killed virus vaccine, live attenuated chimeric virus vaccine, and passive immunization for prevention of West Nile virus encephalitis in hamster model[J]. *Emerging Infectious Diseases* 2002, 8(12): 1392-1397.