



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104694553 B

(45)授权公告日 2018.04.17

(21)申请号 201410740099.9

(22)申请日 2014.12.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104694553 A

(43)申请公布日 2015.06.10

(66)本国优先权数据

201310653369.8 2013.12.05 CN

(73)专利权人 长春百克生物科技股份公司

地址 130012 吉林省长春市高新区火炬路1260号

(72)发明人 姜春来 孔维 刘微

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51)Int.Cl.

C12N 15/38(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

A61K 39/245(2006.01)

A61P 31/22(2006.01)

(54)发明名称

生殖器疱疹疫苗

(57)摘要

本发明为新型生殖器疱疹疫苗，提供了一种经人源密码子优化的编码HSV-2糖蛋白D的基因gD2，其序列为SEQ ID NO:1。还提供了一种上述gD2基因与截短的编码HSV-2衣壳蛋白UL25的基因融合的基因gD2ΔUL25，其序列为SEQ ID NO:2。本发明还提供了分别包含上述两种基因的两种重组腺病毒、重组修饰的安卡拉株痘苗病毒和重组水痘一带状疱疹病毒以及其制备方法。还提供了所述两种基因以及重组病毒在制造用于预防和/或治疗由HSV-2引起的病症(例如生殖器疱疹)的制剂中的用途。本发明还提供了一种联合

(56)对比文件

WO 2013/173590 A1, 2013.11.21,

WO 2004/009021 A2, 2004.01.29,

CN 102078607 A, 2011.06.01,

US 2012/0027789 A1, 2012.02.02,

US 2012/0288515 A1, 2012.11.15,

Ronald L. Veselenak等.“A Vaxfectin-adjuvanted HSV-2 plasmid DNA vaccine is effective for prophylactic and therapeutic use in the guinea pig model of genital herpes”.《Vaccine》.2012, 第30卷第7046-7051页。

Lasky, L.A.等.“glycoprotein-D[Human alphaherpesvirus 2], Accession No: AAA45842.1”.《GenBank》.1993, 全文.

Lasky, L.A.等.“glycoprotein-D[Human alphaherpesvirus 2], Accession No: AAA45842.1”.《GenBank》.1993, 全文.

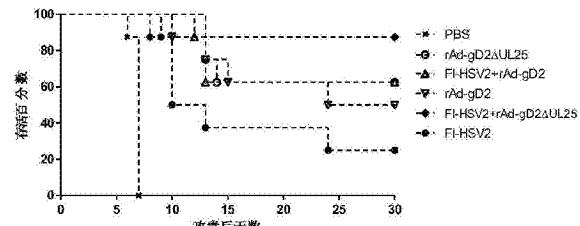
张华捷等.“II型单纯疱疹病毒疫苗的研究进展”.《中国生物制品学杂志》.2010, 第23卷(第6期), 第660-664页.

审查员 樊艳爽

权利要求书2页 说明书22页

序列表6页 附图8页

疫苗，其含有灭活的HSV-2病毒和上述重组病毒的不同组合。



1. 一种密码子优化的编码HSV-2糖蛋白D的基因,其序列为SEQ ID NO: 1。
2. 一种权利要求1的基因与截短的编码HSV-2衣壳蛋白UL25的基因融合的基因,其序列为SEQ ID NO: 2。
3. 一种重组腺病毒,其包含权利要求1或2的基因。
4. 权利要求3的重组腺病毒,其为复制缺陷的5型腺病毒。
5. 一种制备权利要求3或4的重组腺病毒的方法,包括如下步骤:
 - (1) 将权利要求1或2的基因插入到腺病毒穿梭载体中得到重组穿梭载体;
 - (2) 使用步骤(1)得到的重组穿梭载体与携带腺病毒基因的包装质粒共转染细胞,包装得到所述重组腺病毒。
6. 权利要求5的方法,其中所述腺病毒穿梭载体为pDC316。
7. 权利要求5的方法,其中所述细胞为HEK293细胞。
8. 权利要求1或2的基因或者权利要求3或4的重组腺病毒在制造用于预防和/或治疗由HSV-2引起的病症的制剂中的用途。
9. 权利要求8的用途,其中由HSV-2引起的病症是生殖器疱疹。
10. 一种联合疫苗,含有灭活的HSV-2病毒和权利要求3或4的重组腺病毒。
11. 一种包含基因gD2的重组的安卡拉株痘苗病毒(MVA),所述基因gD2的序列为SEQ ID NO: 1。
12. 权利要求11的重组MVA,其为MVA-gD2。
13. 一种包含基因gD2 Δ UL25的重组的安卡拉株痘苗病毒(MVA),所述基因gD2 Δ UL25的序列为SEQ ID NO: 2。
14. 权利要求13的重组MVA,其为MVA-gD2 Δ UL25。
15. 一种制备权利要求11或13的重组MVA的方法,包括如下步骤:
 - (1) 将序列为SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的基因插入到痘苗病毒穿梭载体中得到重组穿梭载体;和
 - (2) 使用步骤(1)得到的重组穿梭载体转染已感染MVA的细胞,分别得到权利要求11或13的重组MVA。
16. 权利要求15的方法,其中所述痘苗病毒穿梭载体为pSC11M1。
17. 权利要求15的方法,其中所述细胞为BHK21-TK-细胞。
18. 权利要求11-14中任一项的重组MVA在制备用于预防和/或治疗由HSV-2引起的病症的制剂中的用途。
19. 权利要求18的用途,其中所述病症为生殖器疱疹。
20. 一种包含基因gD2的重组水痘一带状疱疹病毒(VZV),所述基因gD2的序列为SEQ ID NO: 1。
21. 权利要求20的重组VZV,其为VZV-gD2。
22. 一种包含基因gD2 Δ UL25的重组水痘一带状疱疹病毒(VZV),所述基因gD2 Δ UL25的序列为SEQ ID NO: 2。
23. 权利要求22的重组VZV,其为VZV-gD2 Δ UL25。
24. 一种制备权利要求20或22所述的重组VZV的方法,包括如下步骤:
 - (1) 将载体pUSF-5与VZV Oka株共同电转至MRC-5细胞,通过绿色荧光蛋白筛选得到含

有BAC的VZV 0ka株VZV-BAC；

(2) 将序列为SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2的基因插入到质粒pUC19-TKL中得到重组质粒pUC19-TKL-gD2与pUC19-TKL-gD2 Δ UL25；

(3) 将步骤(2)得到的重组质粒pUC19-TKL-gD2与pUC19-TKL-gD2 Δ UL25分别与步骤(1)得到的VZV-BAC共同电转入大肠杆菌DY380，分别得到VZV-gD2-BAC和VZV-gD2 Δ UL25-BAC；和

(4) 用步骤(3)得到的重组质粒VZV-gD2-BAC和VZV-gD2 Δ UL25-BAC分别转染MRC-5细胞，在Cre酶作用下分别得到权利要求20或22所述的重组VZV。

25. 权利要求20-23中任一项的重组VZV在制备用于预防和/或治疗由HSV-2引起的病症的制剂中的用途。

26. 权利要求25的用途，其中所述病症为生殖器疱疹。

27. 一种联合疫苗，其包含：

- (1) 灭活的HSV-2病毒和权利要求3或4的重组腺病毒；或
- (2) 灭活的HSV-2病毒和权利要求11-14中任一项的重组MVA；或
- (3) 灭活的HSV-2病毒和权利要求20-23中任一项的重组VZV；或
- (4) 权利要求3或4的重组腺病毒和权利要求11-14中任一项的重组MVA；或
- (5) 权利要求3或4的重组腺病毒和权利要求20-23中任一项的重组VZV；或
- (6) 权利要求11-14中任一项的重组MVA和权利要求20-23中任一项的重组VZV。

生殖器疱疹疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗及免疫领域,具体涉及一种生殖器疱疹疫苗。

背景技术

[0002] 在全球范围内,生殖器疱疹(Genital Herpes, GH)已经成为最广泛的性传播疾病(STD)之一。生殖器疱疹主要发生于生殖器部位,由脓疱进而形成糜烂或溃疡,并且导致一系列并发症,如:疱疹性脑脊髓膜炎、脊髓脊神经根病、盆腔炎等。生殖器疱疹发病率高,亦可通过胎盘及产道感染新生儿,导致严重的新生儿后遗症甚至死亡,并且它与宫颈癌的发生相关,另外有研究表明GH能够增加HIV(人免疫缺陷病毒)的感染率,并能加速病情发展,引起严重的局部和播散性感染,因此,生殖器疱疹已经成为一个严重危害人类身心健康的公共卫生问题。

[0003] 单纯疱疹病毒(Herpes simplex Virus, HSV)是生殖器疱疹的主要病原体,HSV属于疱疹病毒科a病毒亚科,是双链DNA病毒。病毒颗粒呈球型,直径约为180–200nm,由核心、衣壳、包膜和被膜组成,病毒衣壳由162个病毒壳微体组成,主要由VP5、VP19、VP23、VP26四种蛋白组装而成,包膜由糖蛋白、脂质和聚多胺组成,目前已经发现的糖蛋白有11种,依次被命名为gB(glycoprotein B)、gC、gD、gE、gG……gM。病毒基因组由两个互相连接的长片段(L)和短片段(S)组成,L和S的两端有反向重复序列,编码至少84个ORFs(开放阅读框)。根据血清型可以把HSV分成两个型别:HSV-1和HSV-2,HSV-1主要引起口唇疱疹、咽炎、角膜结膜炎和散发性脑炎,HSV-2主要引起生殖器疱疹且与宫颈癌相关。

[0004] HSV是一种典型的嗜神经病毒,主要通过性接触传播引起生殖器官的炎症和疱疹,初次感染多为隐性感染,初次感染后多转为潜伏感染,以非活化的状态存在于机体的神经节中,可在人体终生存在,当受外界因素刺激后引起复发,目前尚无特效药物控制HSV-2的感染和复发。因此研制有效的单纯疱疹病毒疫苗是防治疱疹病毒感染的理想方法。国内外研究较多的HSV-2疫苗按其作用机理和作用特点可分为灭活疫苗,减毒活疫苗、DISC (Disabled infectious single cycle, 无感染性单周期) 疫苗、亚单位疫苗、多肽疫苗、核酸疫苗等。现有的临床疫苗试验结果发现,体液免疫应答能降低病毒滴度,但是T细胞免疫对于抑制HSV复制、神经系统感染和复发感染有着至关重要的作用,采用病毒载体疫苗可以引起高强度的细胞免疫记忆,这些疫苗单独使用或作为加强疫苗使用时,可以产生明显的保护力提升。

[0005] 糖蛋白是HSV-2主要的免疫原,可诱导较强的体液和细胞免疫应答,大量研究指出HSV-2的11种糖蛋白中gD能诱导产生相对较高的中和抗体水平和CD4+T细胞增殖,另外,有文献表明衣壳蛋白UL25上具有多个表位能够激活CD8+T细胞应答,是未来疱疹疫苗的理想抗原候选。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种经人源密码子优化的编码HSV-2糖蛋白D的基因gD2,其序列为

SEQ ID NO:1。

[0007] 本发明还提供了一种上述gD2基因与截短的编码HSV-2衣壳蛋白UL25的基因融合的基因gD2 Δ UL25,其序列为SEQ ID NO:2。

[0008] 本发明还提供了分别包含上述两种基因的两种重组腺病毒rAd-gD2和rAd-gD2 Δ UL25。所述两种重组腺病毒感染HEK293细胞后分别可高效地表达gD蛋白和gD Δ UL25融合蛋白。经动物实验验证,发明人发现,所述两种重组腺病毒疫苗都产生了较好的对HSV的免疫效果。

[0009] 所述两种重组腺病毒是通过将上述两种基因使用Admax腺病毒包装系统(Microbix Biosystems Inc.)重组到复制缺陷型的5型腺病毒载体(E1和E3缺失)中而制备的,具体步骤包括:

[0010] (1) 将上述的序列为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的基因插入到腺病毒穿梭载体中得到重组穿梭载体;

[0011] (2) 使用步骤(1)得到的重组穿梭载体与携带腺病毒基因的包装质粒共转染细胞,包装得到重组腺病毒。

[0012] 其中所述腺病毒穿梭载体为pDC316,所述细胞为HEK293细胞。

[0013] 本发明还提供了所述两种基因以及两种重组腺病毒在制造用于预防和/或治疗由HSV-2引起的病症(例如生殖器疱疹)的制剂中的用途。

[0014] 将灭活的HSV-2病毒与本发明的重组腺病毒rAd-gD2或rAd-gD2 Δ UL25联合使用(初免-加强策略)产生了很好的HSV免疫效果。该联合免疫方案在初免后能够引起足够强度的细胞免疫记忆,产生针对单纯疱疹病毒的具有记忆性的T细胞,而加强的内源性的重组腺病毒载体疫苗中含有与初免疫苗相同的抗原表位信息,它再次进入机体,激活并特异性增殖存在于机体内的特异性的记忆性细胞,并在效应阶段产生足够强度的IFN-γ(γ-干扰素)等细胞因子,这极大地增强了疫苗保护力。两种疫苗联合使用,还可以避免针对载体本身的预存免疫,提升加强免疫效果。

[0015] 本发明还提供了分别包含所述基因gD2 (SEQ ID NO:1) 和gD2 Δ UL25 (SEQ ID NO:2) 的两种重组修饰的安卡拉株痘苗病毒(MVA,Modified vaccinia virus Ankara)。在一个优选的实施方案中,所述重组MVA分别为MVA-gD2和MVA-gD2 Δ UL25。

[0016] 所述重组MVA是将上述两种基因重组到MVA中而制备的,具体步骤包括:

[0017] (1) 将上述的序列为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的基因插入到痘苗病毒穿梭载体中得到重组穿梭载体;

[0018] (2) 使用步骤(1)得到的重组穿梭载体转染已感染MVA的细胞,得到重组MVA疫苗。

[0019] 其中所述痘苗病毒穿梭载体为pSC11M1,所述细胞为BHK21-TK-细胞(痘苗病毒TK基因缺失)。

[0020] 本发明还提供了分别包含所述基因gD2 (SEQ ID NO:1) 和gD2 Δ UL25 (SEQ ID NO:2) 的两种重组水痘一带状疱疹病毒(varicella-zoster virus,VZV)。在一个优选的实施方案中,所述重组水痘一带状疱疹病毒分别为VZV-gD2和VZV-gD2 Δ UL25。

[0021] 所述重组水痘一带状疱疹病毒是将上述两种基因重组到VZV Oka株中而制备的,具体步骤包括:

[0022] (1) 将载体pUSF-5与VZV Oka株共同电转至MRC-5细胞,通过绿色荧光蛋白筛选得

到含有BAC(细菌人工染色体)的VZV 0ka株VZV-BAC;

[0023] (2) 将上述的序列为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的基因插入到质粒pUC19-TKL中得到重组质粒pUC19-TKL-gD2与pUC19-TKL-gD2 Δ UL25;

[0024] (3) 将步骤(2)得到的重组质粒pUC19-TKL-gD2与pUC19-TKL-gD2 Δ UL25分别与步骤(1)得到的VZV-BAC共同电转入大肠杆菌DY380, 分别得到VZV-gD2-BAC和VZV-gD2 Δ UL25-BAC;

[0025] (4) 用步骤(3)得到的重组质粒VZV-gD2-BAC和VZV-gD2 Δ UL25-BAC分别转染MRC-5细胞, 在Cre酶作用下分别得到重组疱疹疫苗VZV-gD2和VZV-gD2 Δ UL25。

[0026] 本发明还提供了所述两种重组MVA以及两种重组水痘一带状疱疹病毒在制造用于预防和/或治疗由HSV-2引起的病症(例如生殖器疱疹)的制剂中的用途。

[0027] 本发明还提供了一种联合疫苗, 其含有:

[0028] (1) 灭活的HSV-2病毒和所述两种重组腺病毒之一; 或

[0029] (2) 灭活的HSV-2病毒和所述两种重组MVA之一; 或

[0030] (3) 灭活的HSV-2病毒和所述两种重组水痘一带状疱疹病毒之一; 或

[0031] (4) 所述两种重组腺病毒之一和所述两种重组MVA之一; 或

[0032] (5) 所述两种重组腺病毒之一和所述两种重组水痘一带状疱疹病毒之一; 或

[0033] (6) 所述两种重组MVA之一和所述两种重组水痘一带状疱疹病毒之一。

附图说明

[0034] 图1示出了实施例2中制备的重组腺病毒特异性及插入片段的鉴定, 其中M为10kb DNA marker, 购自Invitrogen, 共有10条带, 从上到下依次为10000bp, 8000bp, 6000bp, 5000bp, 4000bp, 3000bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 500bp, 其中最亮的条带为3000bp;

[0035] 图1A为rAd-gD2阳性重组腺病毒特异性及插入片段的鉴定, 其中各泳道为:

[0036] 泳道1:gD2片段(主带), 说明rAd-gD2中有gD2基因;

[0037] 泳道2:AD-E2b(主带), 说明rAd-gD2中有腺病毒的E2b基因;

[0038] 泳道3:rAd-gD2(主带)中的E1基因, 条带明显暗于泳道7, 说明重组rAd-gD2中E1基因含量很低;

[0039] 泳道4:gD2(次带), 说明rAd-gD2中有gD2基因;

[0040] 泳道5:AD-E2b(次带), 说明rAd-gD2中有腺病毒的E2b基因;

[0041] 泳道6:rAd-gD2(次带)中的E1基因, 几乎没有条带, 说明重组rAd-gD2中几乎没有E1基因;

[0042] 泳道7:野生腺病毒E1基因阳性对照, 2μl上样量, 其中野生腺病毒来自上海白泽生物科技有限公司;

[0043] 泳道8:野生腺病毒E1基因阳性对照, 10μl上样量

[0044] 图1B为rAd-gD2 Δ UL25阳性重组腺病毒特异性及插入片段的鉴定, 其中各泳道为:

[0045] 泳道1:gD2 Δ UL25片段(主带), 说明rAd-gD2 Δ UL25中有gD2 Δ UL25基因;

[0046] 泳道2:AD-E2b片段(主带), 说明rAd-gD2 Δ UL25中有腺病毒的E2b基因;

[0047] 泳道3:rAd-gD2 Δ UL25(主带)中的E1基因, 没有条带, 说明重组rAd-gD2 Δ UL25中几乎没有E1基因;

- [0048] 沸道4:未加模板的PCR阴性对照；
[0049] 沸道5:野生腺病毒E1基因阳性对照,10μl上样量；
[0050] 沸道6:gD2 Δ UL25片段(次带),说明rAd-gD2 Δ UL25中有gD2 Δ UL25基因；
[0051] 沸道7:AD-E2b(次带),说明rAd-gD2 Δ UL25中有腺病毒的E2b基因；
[0052] 沸道8:rAd-gD2 Δ UL25(次带)中的E1基因,没有条带,说明重组rAd-gD2 Δ UL25中没有E1基因；
[0053] 沸道9:未加模板的PCR阴性对照。
[0054] 图2分别示出了实施例2中两种重组腺病毒感染细胞后目的蛋白gD Δ UL25融合蛋白(A)和gD蛋白(B)表达的蛋白质印迹(western blot)鉴定,蛋白Marker:#SM0431,Fermentas。
[0055] 图3示出了实施例5细胞因子检测实验中各免疫组小鼠脾细胞刺激上清中Th1细胞因子(IL-2和IFN-γ)分泌水平(图中FI即为FI-HSV2灭活疫苗)。
[0056] 图4示出了实施例6攻毒实验中攻毒后各组小鼠生存率。
[0057] 图5示出了实施例6攻毒实验中攻毒后各组小鼠阴道损伤评分。
[0058] 图6示出了psc11M1-gD2质粒的构建鉴定,其中各泳道为:
[0059] 泳道1:psc11M1-gD2质粒小提的产物。
[0060] 泳道2:psc11M1-gD2质粒双酶切的产物。
[0061] 图7示出了MVA-gD2重组痘苗病毒的构建鉴定,其中各泳道为:
[0062] 泳道1:MVA-gD2重组痘苗病毒的内在蛋白。
[0063] 泳道2:MVA-gD2重组痘苗病毒的gD片段。
[0064] 泳道3:MVA-gD2重组痘苗病毒的TK基因。
[0065] 泳道4:野生型痘苗病毒的内在蛋白。
[0066] 泳道5:野生型痘苗病毒的gD片段。
[0067] 泳道6:野生型痘苗病毒的TK基因。
[0068] 图8示出了MVA-gD2的Western blot鉴定。
[0069] 图9示出了psc11M1-gD2 Δ UL25的构建鉴定,其中各泳道为:
[0070] 泳道1:psc11M1-gD2 Δ UL25质粒小提的产物。
[0071] 泳道2:psc11M1-gD2 Δ UL25质粒双酶切的产物。
[0072] 图10示出了MVA-gD2 Δ UL25重组痘苗病毒的鉴定,其中各泳道为:
[0073] 泳道1:MVA-gD2 Δ UL25重组痘苗病毒的内在蛋白。
[0074] 泳道2:MVA-gD2 Δ UL25重组痘苗病毒的gD2 Δ UL25片段。
[0075] 泳道3:MVA-gD2重组痘苗病毒的TK基因。
[0076] 泳道4:野生型痘苗病毒的内在蛋白。
[0077] 泳道5:野生型痘苗病毒的gD2 Δ UL25片段。
[0078] 泳道6:野生型痘苗病毒的TK基因。
[0079] 图11示出了MVA-gD2 Δ UL25的Western blot鉴定。
[0080] 图12示出了VZV-gD2和VZV-gD2 Δ UL25重组病毒构建鉴定,其中各泳道为:
[0081] 泳道1:VZV-gD2重组痘苗病毒的gD片段。
[0082] 泳道2:VZV-gD2重组痘苗病毒的TK基因。

- [0083] 液道3:VZV-gD2 Δ UL25重组痘苗病毒的gD2 Δ UL25片段。
- [0084] 液道4:VZV-gD2 Δ UL25重组痘苗病毒的TK基因。
- [0085] 图13示出了VZV-gD2的Western blot鉴定。
- [0086] 图14示出了VZV-gD2 Δ UL25的Western blot鉴定。
- [0087] 图15-18示出了实施例10的细胞因子检测实验中各免疫组小鼠脾细胞刺激上清中Th1细胞因子(IL-2和IFN-γ)分泌水平(图中FI即为FI-HSV2灭活疫苗)。
- [0088] 图19-20示出了实施例10的攻毒实验中攻毒后各组小鼠生存率。

具体实施方式

[0089] 以下结合实施例对本发明进行详细说明。但应理解,以下实施例仅是对本发明实施方式的举例说明,而非是限定本发明的范围。

- [0090] 实施例

- [0091] 实施例1:HSV-2 G病毒株以及甲醛灭活疫苗(FI-HSV2)的制备

- [0092] 1.Vero细胞(ATCC编号:CCL-81)的复苏及培养

[0093] (1)从液氮中取出冻存管,直接置于37℃恒温水浴槽中,并不时摇动使其尽快融化。

[0094] (2)从37℃水浴中取出冻存管,吸出细胞悬液,加到细胞离心管并补加适量MEM培养基(Invitrogen),混匀。

- [0095] (3)室温条件下离心,500~800r/min,离心5min。

[0096] (4)弃去上清液,加入含10%新生胎牛血清(FBS,Gibco)的MEM培养基(血清加入培养基中时为体积比,下同)重悬细胞,计数,调整细胞密度为 5×10^5 细胞/mL,接种 25cm^2 一次性细胞培养瓶,37℃培养箱静置贴壁培养。

- [0097] (5)12~24h后更换一次培养基,继续培养至细胞80%汇合。

- [0098] 2.HSV-2 G株在Vero细胞中的培养与收获

[0099] (1)HSV-2 G株(ATCC编号:VR734)病毒接种液的制备:向95mL无血清MEM中加入5mL HSV-2 G株病毒悬液(病毒滴度约为 $10^7\text{TCID}_{50}/\text{mL}$),轻轻混匀。

[0100] (2)病毒感染细胞:Vero细胞单层生长到80%~90%汇合后,弃去培养基,用4℃预冷PBS溶液洗涤细胞两遍,将配制好的病毒接种液接种到细胞瓶中,5mL/瓶,置于37℃孵育2h,孵育完成后弃除病毒接种液,加入5mL含2%FBS的MEM培养基,37℃培养56~60h,约有75%细胞发生病变。

[0101] (3)病毒的收集:将细胞培养瓶反复置于-80℃和37℃快速冻融3次,收集病毒悬液,室温4000r/min离心10min,收集离心上清液,即为粗病毒液。

- [0102] 3.HSV-2G株浓缩与纯化

[0103] (1)将收集的粗病毒液分装于超速离心管中,每管12mL,在4℃以40000r/min离心2h。

- [0104] (2)弃去离心上清,用适量MEM重悬。

[0105] (3)高速离心管底部开始加入6mL 36%(质量分数)的蔗糖再加入上一步骤中的6mL MEM重悬的病毒,4℃下以60000g离心3h(对应Beckman离心机sw40转头,22000rpm),收集沉淀,用pH=7.4的PBS重悬,得到纯化的HSV-2G病毒株。

[0106] 4.HSV-2G病毒半数组织感染量(TCID₅₀)的测定

[0107] (1) 将状态良好的Vero细胞以 2×10^4 细胞/孔接种于96孔细胞培养板中,37℃、5% CO₂中培养12~24h。

[0108] (2) 用MEM培养基将上步中纯化的HSV-2G病毒株进行一系列的10倍比稀释,设置 $10^{-3}\sim10^{-10}$ 8个稀释梯度。

[0109] (3) 将96孔板中培养的Vero细胞弃去培养基,用4℃预冷的灭菌PBS(pH7.4)冲洗细胞3次,以将培养基中的血清清洗干净,避免血清对病毒吸附的影响。

[0110] (4) 将每个稀释度的病毒液吸取100μl接种于Vero细胞,每个稀释度接种10孔;设立2个孔的正常细胞对照(不加病毒),37℃孵育2h左右。

[0111] (5) 用4℃预冷的灭菌PBS(pH7.4)洗涤Vero细胞1次,加入细胞维持液(含2%FBS的MEM),37℃、5%CO₂中进行培养,每隔12h观察1次。

[0112] (6) 待到细胞病变(CPE)不再发生变化时,用Reed-Muench公式(Virology: Principles and Applications, John Wiley&Sons Inc; 2nd Revised edition)计算得到HSV-2G病毒株的滴度为 2×10^9 TCID₅₀/ml。

[0113] 5.HSV-2G株病毒灭活及蛋白定量

[0114] (1) 病毒灭活:将上步中离心纯化后的病毒在BSL-2(生物安全2级实验室)进行分装,然后按1:1的体积比加入甲醛水溶液(1:2000,体积比),于37℃水浴,灭活72h,即得到HSV-2G甲醛灭活疫苗(FI-HSV2)。

[0115] (2) 考马斯亮蓝法测定全病毒蛋白含量,具体操作如下:

[0116] a. 用1mg/ml的BSA(牛血清白蛋白,Takara)作为标准蛋白母液,用去离子水将其分别稀释为0.5、0.4、0.3、0.2和0.1mg/ml;并将上一步骤5.(1)中得到的灭活疫苗FI-HSV2取5μL用去离子水将其稀释10倍;

[0117] b. 在96孔板中每孔加入10μL稀释的BSA标准品或灭活疫苗,并且都设置两个复孔,同时以去离子水做为调零孔。

[0118] c. 每孔加入110μL考马斯亮蓝G-250染色液(2.5g R250溶于450ml水、450ml甲醇和100ml冰醋酸中),室温作用5min。

[0119] d. 用酶标仪(ELX800,Bio-TEK)在595nm检测吸光度,计算得到灭活病毒疫苗FI-HSV2蛋白浓度为3.2mg/ml。

[0120] 实施例2:重组腺病毒rAd-gD2 Δ UL25和rAd-gD2的制备和纯化

[0121] 1. 构建pDC316-gD2 Δ UL25和pDC316-gD2穿梭质粒

[0122] (1) 用Bgl II 和Xho I (购自Takara) 酶切PGH-gD2 Δ UL25(设计真核化gD2 Δ UL25基因(SEQ ID NO:2),委托上海捷瑞生物工程技术服务有限公司合成至PGH载体),37℃反应2小时,胶回收试剂盒(购自Takara)回收gD2 Δ UL25片段。

[0123] SEQ ID NO:2:

[0124]

atgaagtacgccctggccgatccctcacttaaaatggcagatcctaaccgggtccgaggtaaaaattgccggtgct
ggatcagctgaccgatccctccaggcgtaagagagtgttatcatatatccagcccagcctcgaagaccggtccagccac
cgccatccgatcaccgttactatgccgtctggAACGCGCTGCGTCCGTCTGCTGATGCTCCGTCTGAG
GCCCGCCAGATCGTGCACGGTGATCCGACGAAGCAAGAAACATACTTACAATCTGACCATCGCTTGGTACAGGAT

gggggacaactgtgccattcaatcaccgtatggagtatacagagtgccttacaataagagtctgggtttgtc
 ctatccggacgcagccacgctggcttactatgattccttcgcgtttagaggacaatctggttttgtat
 cacgctccagctttgagacagccggacttacccgttggataaaatcaatgactggacagaaattaccagtt
 catccttgaacacagagcacggcctctgcaaatacgccctgcaactgcgcacccctccggcagccctgcctgacta
 gcaaggcctaccagcagggtgtcagggtggactctatcggatgtgccaaggttcactcctgaaaatcagcgaacg
 gttgctctgtatagtctgaaaattcaggctggcatggaccgaagcccatataccagcacactctgccaccgga
 gttgagcgatacgaactaaccgaaccccagcccgagcttgtccggaggatccagaggatagcgcactctggaggacc
 ccgcgcaccggcggtggagggtccggaggtagcggtagccgggttagtcgtacgaacacggtgactg
 gccacacac gtggttatgccacttggtaggcacggcgttctgccgcagctccggagacgtgccccggaca
 cgtccactagggtgaatccggatgacgtggcccaccggatgacgtaatcgagccgtccgcgttccctggctaga
 ggccataatctgttccgtggaaatcagacactgtcggcaacagccaacacaattacggcttgcgtt
 gcgcagactgctgccaacggtaatgttacgctgaccgcctggataatagactgcagctggaatgctgatcccc
 gagccgtccggctgaagcaatcgccggaggcatccggctggattccggagccattaagtcaaggcataacaat
 ttggaggcttgcgtgaactacgtgtcgctctaccaggctgaccctactgtcgagctactcagttttcc
 cggtctcgccgactgtgtcgacgcccaggctggcgaccgctggcatccacgcggcgagtggatatgtcat
 ctggagccggcaggctgcacttgtgcgcctgacagccctggactgatccaaccggacgcacgaacacaactccc
 gtggagaaatcatcaatgccatgtatgcgtcggcattcgttatgagcagggtccggactctggcccgaggc
 ccggattggactggcatctaacaactaaagattgccaccttaacgtcggtatgtattacgacgtctacttcc
 tttgcctgggatatccgcagtatctgtcagtggctaa

[0125] (2) 以PGH-gD2 Δ UL25为模板,gD-Rn 5'-3' (SEQ ID NO:3):ttctcgaggcgccgctta
 ggtgcggcggttc,gD-F 5'-3' (SEQ ID NO:4):gtcgacagatctatgaagtacgcctggcccg为引物
 扩增gD2片段 (SEQ ID NO:1),50 μ L PCR反应体系:1×Taq酶缓冲液、50mM MgSO₄、50mM
 dNTPs、1 μ L模板、两条引物各0.5 μ M和2.5U Taq DNA聚合酶。反应条件为94℃5分钟后进入循
 环,94℃变性30秒,60℃30秒,72℃延伸1分钟,共循环30次,最后72℃延伸10分钟。PCR得到的
 的gD2产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定大小,使用胶回收试剂盒(Takara)回收gD2片段,将其
 与克隆载体pGEM-T-easy按3:1(摩尔比)在4.0℃下连接16h(T载体连接试剂盒购自Takara,
 操作按说明书进行),得到pGEM-T-easy-gD2质粒。将该连接产物转化大肠杆菌感受态细胞
 TOP10(Takara),提取质粒(提取方法按试剂盒:天根生化科技有限公司DP103-02质粒小提
 试剂盒),用Bgl II 和Xho I (Takara)进行双酶切和单酶切鉴定,将筛选出的阳性克隆测序(由
 上海生工公司完成测序),将测序正确的pGEM-T-easy-gD2质粒用Bgl II 和Xho I 酶切,37℃反
 应2小时,胶回收试剂盒回收gD2片段。

[0126] SEQ ID NO:1:

[0127]

atgaagtacgccctggccgatccctactaaaaatggcagatcctaaccgggtccgaggtaaaaattgcgggtgct
 ggatcagctgaccgatccctcaggcgtaagagaggtgtatcatatccagcccgccatgcgtccgtctgcatgcgtccgtctgag
 cgtccatcccgatcaccgttactatgcgcgttgcacgcgcctgtcggtccgtctgcatgcgtccgtctgag
 gccccccagatcgtgcgcggtgcatccgacgaagcaagaaaacatacttacaatctgaccatcggttgcgttgc
 ggggacaactgtgccattcaatcaccgtatggagtatacagagtgccttacaataagagtctgggtttgtc
 ctatccggacgcagccacgctggcttactatgattccttcgcgcgttgcgttgcgtccgtctgcatgcgtccgtctgag

gcacgctccagctttgagacagccggacttacccgttgtaaaatcaatgactggacagaaaattaccagt
tcatcctgaacacagacacggcctcctgcaaatacgccctgcccactgcgcacccctccggcagcgcctgact
agcaaggcctaccaggcagggtgtcacggtgactctatcggtatggatgtgccaagggttactcctgaaaatcagcgaac
ggttgctctgtatagtcgtaaaattgcaggctggcatggaccgaagcccatataccagcacacttctgccaccgg
agttgagcgatacgactaacgcaacccagccgagcttgcggaggatccagaggatgcgcactctggaggac
taa

[0128] (3) 用Bgl II 和Sal I (Xho I与Sal I是同尾酶) (Takara) 酶切pDC316(来自Microbix Biosystems Inc:AdMax Adenovirus Vector Creation Kits试剂盒)载体,37℃反应2小时,胶回收试剂盒回收线性化pDC316载体。

[0129] (4) 将回收的片段gD2 Δ UL25和gD2分别与线性化pDC316载体在4℃下连接过夜,连接体系为:2μl线性化pDC316载体、5μl gD2 Δ UL25(或gD2)片段、1μl T4连接酶(Takara)、2μl 10×T4连接酶缓冲液和10μl去离子水。将连接产物转化大肠杆菌(TOP10),经酶切筛选鉴定后送上海生工生物工程股份有限公司测序鉴定,得到pDC316-gD2 Δ UL25和pDC316-gD2穿梭质粒。

[0130] 2. 使用含10%FBS的DMEM培养基(Invitrogen)传代HEK293细胞(ATCC编号:CRL-1573),使其汇合率达90%。

[0131] 3. 利用腺病毒AD5的包装质粒(Microbix Biosystems Inc:AdMax Adenovirus Vector Creation Kits)分别与pDC316-gD2 Δ UL25或pDC316-gD2穿梭质粒共转染HEK293细胞,通过Cre/loxP系统位点特异性重组,使gD2 Δ UL25或gD2基因插入到腺病毒基因组的左端ITR(反向末端重复序列)的3'端的包装信号(Ψ)与loxP位点之间(参见厂商的说明书,使用Microbix Biosystems Inc:AdMax Adenovirus Vector Creation Kits),在HEK293细胞中包装出重组腺病毒,将细胞反复置于-80℃和37℃快速冻融3次,收集细胞悬液,室温4000r/min离心10min,收集离心上清,上清即为重组型rAd-gD2 Δ UL25和rAd-gD2病毒液。

[0132] 4. 空斑筛选rAd-gD2 Δ UL25和rAd-gD2阳性克隆:

[0133] (1) 将在六孔板中培养至汇合率80-90%的HEK293细胞,吸出DMEM培养基,在5个孔中分别加入1mL用DMEM稀释10¹、10²、10³、10⁴和10⁵倍的rAd-gD2 Δ UL25或rAd-gD2病毒液,剩余的一个孔加入1mL DMEM作为阴性对照,37℃培养4小时。

[0134] (2) 吸出病毒液,每孔加入4mL含1% (体积比) 低融点琼脂糖(Gibco) 和2.5%FBS的DMEM,室温凝固,37℃培养。

[0135] (3) 5天过后查找空斑挑取,加入到1mL含2.5%FBS的DMEM中,-80℃保存。

[0136] 5. 大量扩增阳性重组腺病毒:使用上步中挑取的阳性病毒克隆感染HEK293细胞,48h后收获,将细胞悬液用移液管转移至50-mL离心管中,1200g 4℃离心10分钟,弃上清,在细胞沉淀中加入1mL含2.5%FBS的DMEM并重悬震荡,用液氮和37℃水浴冻融裂解细胞,震荡,反复3次,然后于冰上超声1分钟,4000rpm离心30分钟,上清于-70℃保存,取该上清感染HEK293细胞,如上述大量扩增重组病毒,获得足量待纯化的病毒上清。

[0137] 6. 重组腺病毒的纯化:每20mL病毒上清中加入10mL 20% (质量分数) 溶于2.5M NaCl中的PEG8000(上海生物工程公司),混匀后冰浴1h。然后在4℃12500g离心30min,弃上清,收集沉淀,溶于5mL 1.1g/mL CsCl(北京鼎国生物技术有限责任公司)中。在超速离心管中依次加入2mL 1.4g/mL CsCl、3mL 1.3g/mL CsCl以及5mL上述溶于1.1g/mL CsCl中的重

组腺病毒。4℃下以60000g离心3h(对应Beckman离心机sw40转头,22000rpm),吸出病毒带。

[0138] 7.透析:将离心获得的病毒带转入透析卡(PIERCE: **Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette**) ,4℃透析过夜,过6小时更换一次透析液(透析液配制:10ml 50mM MgCl₂、100ml 甘油、100ml 10×PBS,加入双蒸水定容至1000ml),透析结束将病毒分装保存于-80℃。

[0139] 8.鉴定

[0140] (1) 阳性重组腺病毒特异性的鉴定:取纯化后的两种重组病毒1-3μl,用PBS稀释到200μl,用病毒基因组提取试剂盒(sangon/SK1371)提取病毒基因组DNA,溶于30μl水中,取5μl做模板,扩增腺病毒基因组E2b区特异性片断,阴性对照不加模板,E2b区的引物为SEQ ID NO:5:tcg ttt ctc agc agc tgt tg,和SEQ ID NO:6:cat ctg aac tca aag cgt gg,PCR用LA Taq(Takara/DRR20AG),50μl体系加0.2μl酶,扩增得到0.86kb的E2b片段(图1),其中括号内主带表示以梯度离心后主带提取的病毒基因组DNA为模板,括号内次带表示以梯度离心后次带提取的病毒基因组DNA为模板。

[0141] (2) 阳性重组腺病毒插入片断的鉴定:分别以上述提取的两种重组病毒基因组DNA为模板,对于rAd-gD2△UL25,以gD-F4 (SEQ ID NO:7) : ggaagatctatgaagtacgccctggccg和gDT-Rn4 (SEQ ID NO:8) :

[0142] ccgcctcgaggccgcgttaagccactgacagatactgc为引物,对于rAd-gD2,以gD-F (SEQ ID NO:9) : gtcgacagatctatgaagtagccctggccg和gD-Rn (SEQ ID NO:10) : ttctcgaggccgcgttaggtgccgcgggtc为引物,进行PCR扩增鉴定插入片段,阴性对照不加模板,50μl体系加0.2μl LA Taq酶(Takara),扩增分别得到gD2△UL25和gD2片段,结果示于图1,其中括号内主带表示以梯度离心后主带提取的病毒基因组DNA为模板,括号内次带表示以梯度离心后次带提取的病毒基因组DNA为模板。

[0143] (3) 重组腺病毒中含E1的复制型病毒的鉴定:以上述提取的两种重组病毒基因组DNA为模板,以WVF (SEQ ID NO:11) : cctgcgagtgtggcgtaaa,和WVR (SEQ ID NO:12) : cacaaggcgctccaagtt为引物,进行PCR扩增E1基因(约1200bp),以检测重组腺病毒中含有E1的复制型病毒的含量。

[0144] (4) 阳性重组腺病毒表达蛋白鉴定:分别取纯化后的两种重组病毒感染正常293细胞,以10MOI加入病毒,48h后如上述收获细胞冻融离心后取上清用western blot检测蛋白表达,一抗:实验室自制的gD多克隆兔抗(制备方法参考,六邻体嵌合型重组5型腺病毒载体逃避预存免疫的研究,于彬,博士论文,Knob蛋白兔多克隆血清制备部分),二抗:AP(碱性磷酸酶)标记的兔二抗(Jackson, E030220),结果(图2)表明本发明的两种重组腺病毒分别可成功表达gD△UL25融合蛋白和gD蛋白,具有免疫原性。

[0145] (5) 重组腺病毒半数组织感染量(TCID₅₀)的测定

[0146] a. 将状态良好的HEK293细胞以2×10⁴细胞/孔接种于96孔细胞培养板中,37℃、5%CO₂中培养12~24h。

[0147] b. 用DMEM培养基将实施例2步骤7得到的重组腺病毒rAd-gD2△UL25或rAd-gD2进行一系列的10倍比稀释,设置10⁻³~10⁻¹⁰个稀释梯度。

[0148] c. 将96孔板中培养的HEK293细胞弃去培养基,用4℃预冷的灭菌PBS(pH7.4)冲洗细胞3次,以将培养基中的血清清洗干净,避免血清对病毒吸附的影响。

[0149] d. 将每个稀释度的病毒液吸取100μl接种于Vero细胞,每个稀释度接种10孔;设立

2个孔的正常细胞对照(不加病毒),37℃孵育2h左右。

[0150] e. 用4℃预冷的灭菌PBS(pH7.4)洗涤细胞1次,加入细胞维持液(含2%FBS的DMEM),37℃、5%CO₂中进行培养,每隔12h观察1次。

[0151] f. 待到细胞病变(CPE)不再发生变化时,用Reed-Muench公式计算TCID₅₀,rAd-gD2ΔUL25为10^{11.8}TCID₅₀/ml,rAd-gD2为10^{11.1}TCID₅₀/ml。

[0152] 实施例3:gD蛋白的原核表达及纯化

[0153] 使用原核表达方法制备gD蛋白用于刺激脾细胞检测细胞因子分泌情况,制备步骤如下:

[0154] 1. 以实施例2中所述的PGH-gD2ΔUL25为模板,以gDF26 (SEQ ID NO:13) : 5' -ccggaaattcatgcattaccatcaccatcac catcacaaggtaacgcctggccg-3' 和gDR306 (SEQ ID NO:14) : 5' -ccc aagcttcttagtcctc cagaagtgcgcgt-3' 为引物,按实施例2所述方法通过PCR扩增gD2,将产物回收,酶切(EcoRI和HindIII,Takara)连接(T4连接酶,Takara)到pET-28a表达载体(Novagen),经由上海生工生物工程股份有限公司测序确认,得到重组表达质粒pET-28a-gD306。

[0155] 2. 将pET-28a-gD306转化大肠杆菌BL21 (Takara),接种于100ml含卡那霉素的LB培养基中37℃、250rpm摇动培养过夜,次日按1%体积比转接于1L含卡那霉素的LB培养基,37℃、250rpm摇动培养至对数生长期(OD600=0.8)时,加入IPTG(异丙基-β-D-硫代毗喃半乳糖苷,购自Takara,浓度为1mM)诱导表达,于37℃继续培养6h。然后4000g离心30min收集菌体。将菌体存于-80℃过夜,次日取出于室温迅速融化,使用40ml基础纯化缓冲液(50mM NaH₂PO₄,0.5M NaCl,pH 8.0)重悬后进行超声破碎(功率100W,总时间40min,超声破碎5s,间隔5s),然后12000g离心20min,收集沉淀。将沉淀用变性缓冲液(8M尿素,200mM NaCl,pH 8.0)充分溶解过夜以将包涵体溶解,12000g离心20min,收集上清(即包涵体溶解液)。

[0156] 3. 用Ni-NTA亲和层析柱纯化包涵体

[0157] (1) 使用AKTA Explorer 100蛋白纯化仪(GE),用2-5个柱体积的缓冲液1(8M尿素,200mM NaCl,pH8.0)以2ml/min流速平衡Ni-NTA亲和层析柱(GE);

[0158] (2) 将本实施例步骤2得到的包涵体溶解液以1ml/min流速上柱,用缓冲液1再洗2-5个柱体积,流速为2ml/min;

[0159] (3) 分别用含有20mM咪唑和50mM咪唑的洗脱液(8M尿素,20或50mM咪唑,200mM NaCl,pH8.0)以2ml/min流速洗脱30个柱体积去除杂蛋白,最后用含100mM咪唑的洗脱液(8M尿素,100mM咪唑,200mM NaCl;pH8.0)以2ml/min流速洗脱3个柱体积,收集蛋白峰;

[0160] (4) 对纯化后的蛋白进行复性:将纯化后的gD蛋白用上述变性缓冲液稀释5倍后于4℃透析24h(透析液配方(4L):24.22g Tris,0.74g EDTA,11.69g NaCl,40ml甘油和40g甘氨酸),

[0161] 复性后的蛋白用微量分光光度计(Nanodrop2000,Thermo)在280nm测蛋白浓度,计算得到gD蛋白浓度为0.1mg/ml,分装,于-80℃保存备用。

[0162] 实施例4:疫苗免疫以及效果检测

[0163] 1. 使用6-8周龄的Balb/c雌鼠(长春生物制品研究所,小鼠饲养条件:SPF级),分为6组,每组15只。对对照组注射PBS。

[0164] 根据1TCID₅₀≈0.7PFU(Virology:Principles and Applications,John Wiley&

Sons Inc; 2nd Revised edition)计算疫苗用量。

[0165] 分别对各组中的每只小鼠按下表1进行免疫:

[0166] 表1小鼠免疫方案

[0167]

分组	疫苗	免疫过程
1	rAd-gD2	第 0、2、4 周肌肉注射 1×10^8 pfu rAd-gD2; 第 6 周皮下注射 2mg 甲羟醋酸孕酮 (DepoProvera)
2	rAd-gD2 Δ UL25	第 0、2、4 周肌肉注射 1×10^8 pfu

[0168]

		rAd-gD2 Δ UL25; 第 6 周皮下注射 2mg 甲羟醋酸孕酮
3	FI-HSV2	第 0、2、4 周皮下注射 12.5 μ g FI-HSV2; 第 6 周皮下注射 2mg 甲羟醋酸孕酮
4	FI-HSV2+ rAd-gD2	初次免疫 (prime)，第 0、2、4 周皮下注射 12.5 μ g FI-HSV2; 加强免疫 (boost)，第 6、8 周肌肉注射 1×10^8 pfu rAd-gD2;
5	FI-HSV2+ rAd-gD2 Δ UL25	初次免疫，第 0、2、4 周皮下注射 12.5 μ g FI-HSV2; 加强免疫，第 6、8 周肌肉注射 1×10^8 pfu rAd-gD2 Δ UL25;
6	PBS	第 0、2、4 周肌肉注射 0.1 ml PBS; 第 6 周皮下注射 2mg 甲羟醋酸孕酮

[0169] 在第9周对各组的每只小鼠分别皮下注射2mg甲羟醋酸孕酮(DepoProvera)。

[0170] 2. IFN- γ ELISPOT实验:

[0171] (1) 抗体包被板

[0172] 在ELISPOT实验第1天(第10周杀鼠取脾前一天),在5ml PBS中加入25 μ l浓度为1mg/ml的纯化的抗小鼠IFN- γ 的mAb单克隆抗体(purified anti-mouse IFN- γ mAb, BD 51-2525KC),使浓度达5 μ g/ml,然后将其加入elispot 96孔板(96-well filter plates(BD 51-2447KC))中,每孔加入50 μ l。加盖4℃过夜。

[0173] (2) 在ELISPOT实验第2天,杀鼠取脾,脾细胞处理方案如下:

[0174] a. 在第10周拉颈处死Balb/c小鼠,75%酒精浸泡后拿入细胞室准备取脾;

[0175] b. 无菌操作取脾, 尽量将结缔组织去除。将脾放在每孔含有2ml RPMI-10 (RPMI Medium 1640, Invitrogen) 培养基的六孔板中, 每个脾放置在一个孔内, 作好标记。

[0176] c. 将脾放置在纱网(200目, 去掉大块组织)中一起置于预先加有5ml RPMI-10培养基的平皿内, 用纱网包裹脾用5ml注射器内塞研磨。用一新纱网再过滤一遍至50ml离心管(作好分组标记), 用4ml RPMI-10洗涤培养皿, 如果必要重复操作。每个管中加入3ml RPMI-10培养基, 终体积约15ml。

[0177] d. 将以上获得的脾细胞液在20℃以200g离心10min, 去除上清。用RPMI-10培养基重悬细胞沉淀, 再以每个脾2-3ml的量加入红细胞裂解液(ACK缓冲液(NH₄Cl-0.15M、KHC₀3-10.0mM、Na₂EDTA-0.1mM, pH 7.2-7.4)), 培养基与ACK缓冲液体积比为1:2, 室温放置5min, 时而振动。

[0178] e. 将上一步骤的脾细胞液在20℃以200g离心10min。红细胞裂解完全的细胞沉淀应呈乳黄色, 如果红细胞裂解不彻底可重复裂解。将离心后的细胞沉淀用20ml RPMI-10培养基重悬洗涤2次(其中离心条件为20℃, 200g离心5min)。最后用7.5ml RPMI-10培养基重悬。

[0179] f. 用滤网(200目)再过滤一遍。

[0180] g. 将脾细胞计数后, 用RPMI-10培养基稀释脾细胞至 1×10^7 细胞/ml。

[0181] (3) 板的封闭

[0182] 弃去包被抗体, 用含10%FBS的完全培养基(RPMI-10)洗涤一次, 每孔加入200μl含10%FBS的完全培养基(RPMI-10), 加盖于室温封闭2小时或37℃1小时, 弃去培养基。

[0183] (4) 细胞激活

[0184] a. 每孔加入100μl步骤2所述稀释的脾细胞, 每孔脾细胞数量为 1×10^6 个。

[0185] b. 疫苗组和PBS对照组的细胞每孔加入25μl刺激物(刺激物分别为表2所示的DP1、DP6、LP2和gD, 终浓度都为1μg/ml)。

[0186] c. 疫苗组和PBS对照组的阳性对照每孔加入ConA(刀豆蛋白A, 终浓度为1μg/ml)。

[0187] d. 疫苗组和PBS对照组的阴性对照加入15μl含有10%血清的1640培养基。混匀后, 于37℃, 5%CO₂培养箱中培养24小时。

[0188] (5) 在ELISPOT实验第3天按照ELISPOT试剂盒(BD ELISPOT Set, R D cat#EL485)说明书操作进行显色

[0189] a. 将ELISPOT板中培养的细胞弃去, 用无菌水洗板2次, 将每孔用200μl PBST(含0.5% (体积) 吐温-20的PBS)洗涤6次, 每次洗涤时浸洗1~2min。

[0190] b. 将试剂盒中生物素化抗小鼠IFN-γ的mAb(biotinylated anti-mouse IFN-γ mAb, BD 51-1818KZ)加至12ml(10组量)的稀释缓冲液1中, 终浓度为2μg/ml, 以每孔50μl加入到ELISPOT板中, 然后室温静置2小时, 然后将每孔用100μl PBST洗涤3次。

[0191] c. 将链亲和素-HRP浓缩物A(streptavidin-HRP, BD51-9000209)加至稀释缓冲液1中, 体积比为1:100, 然后以每孔50μl加入板中, 室温静置2小时(或4℃过夜)。

[0192] d. 将每孔用100μl PBST洗涤4次, 然后每孔用100μl PBS洗涤2次。

[0193] e. 每孔加入50μl elispot染色液(BD AEC substrate Reagent set, cat no: 551951, 20μl的色原体(chromogen)加入到1ml的AEC底物溶液中), 避光室温放置5-60分钟。

[0194] f. 弃去染色液, 用蒸馏水洗涤, 室温在空气中干燥2小时或过夜干燥, 保存数据。

[0195] ELISPOT实验结果:

[0196] 表2:对 1×10^6 细胞刺激24小时,产生斑点的情况如下(ConA阳性对照刺激得到的点太多数不清)

[0197]

	刺激物	DP1		DP6		LP2		gD		无抗原	
分组	疫苗	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
1	rAd-gD2	1948	154	1837	133	37	11	485	21	3	2
2	rAd-gD2 Δ UL25	1912	132	767	89	565	45	541	54	0	0
3	FI-HSV2	202	14	413	28	163	24	298	26	8	5
4	FI-HSV2+										
	rAd-gD2	1356	104	471	69	213	46	631	55	5	2
	FI-HSV2+										
5	rAd-gD2 Δ UL25	1388	156	216	19	631	56	565	12	6	5
6	PBS	8	2	13	5	7	5	5	2	5	7

[0198] 其中,LP2为CD8+T细胞特异小肽,能够刺激CD8+T细胞分泌IFN- γ ;DP1和DP6为CD4+T细胞特异小肽,能够刺激CD4+T细胞分泌IFN- γ ,LP2、DP1、DP6的氨基酸序列见表3。

[0199] 表3本研究中所使用的肽刺激物

[0200]

名称	SEQ ID NO:	肽段在蛋白序列中的位置	长度	序列
DP1	SEQ ID NO: 15	gD: 53-65	13aa	LTDPPGVKRVYHI
DP6	SEQ ID NO: 16	gD: 270-284	15aa	KPPYTSTLLPPELSD
LP2	SEQ ID NO: 17	UL25: 364-372	9aa	FLARGHNLF

[0201] DP1、DP6和LP2肽由上海吉尔多肽有限公司合成。

[0202] gD为实施例3所制备,其氨基酸序列为SEQ ID NO:18:

[0203] MGRLTSGVGTALLVVAVGLRVVCAKYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDQLTDPPGVKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPITVYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMGDNCIPIITVMEYTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVALYSLKIAGWHGPKPYYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNNWHIPSIQDVAPHAPAAPSNPGLIIGALAGSTLAVLVIGGIWFVRRRAQMAPKRLRLPHIRDDDAAPPShQPLFY

[0204] 由表2中实验结果可以看出,重组rAd-gD2 Δ UL25和rAd-gD2病毒载体疫苗,无论单独使用还是与FI-HSV2联合使用,均能引起显著的特异性强烈的T淋巴细胞IFN- γ 分泌,预示疫苗的有效性。

[0205] 实施例5.细胞因子检测实验:

[0206] (1) 按实施例4步骤1和2所述,免疫小鼠并取脾,获得脾细胞。

[0207] (2) 用RPMI-10培养基稀释脾细胞至 2×10^7 细胞/ml,加入到24孔板中,1 $\times10^7$ 细胞/孔,每孔体积为500 μ l。

[0208] (3) 实验组每孔加入25 μ l刺激物gD(终浓度为1 μ g/ml),阳性对照孔加入ConA(终浓度为1 μ g/ml),阴性对照孔加入15 μ l含有10%血清的1640培养基,,37℃孵育48h。

[0209] (4) 吸取培养基上层清夜,13200rpm离心5min后取上清,-20℃冻存备用。

[0210] (5) Luminex检测细胞因子分泌(使用Bio-Rad Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Assay试剂盒,1×96-well TH1/TH2GroupI,M60-00003J7),按试剂盒说明书操作,步骤简述如下:

[0211] a. 调节真空泵(Millipore WP 6122050),使其可在3-4s将100 μ l液体吸干(真空泵有两个阀门,将铁质阀门调至最大,塑料调节阀与管子垂直时压力最小,平行时压力最大,一般60°为宜);

[0212] b. 使用试剂盒提供的96孔板,分配样品孔,计算点孔数,设计板布局如下表4,不用的孔用密封条封好;

[0213] 表4. 细胞因子检测96孔板布局

空白对照-1	标准品 IL-12(p70)
空白对照-2	标准品 GM-CSF
标准品 TNF- α	样品 PBS
标准品 INF- γ	样品 rAd-gD2
标准品 IL-2	样品 rAd-gD2ΔUL25
标准品 IL-4	样品 FI-HSV2
标准品 IL-5	样品 FI-HSV2+ rAd-gD2
标准品 IL-10	样品 FI-HSV2+ rAd-gD2ΔUL25

[0214] [0215] c. 用100 μ l测定缓冲液(试剂盒中提供)将96孔板预湿,抽干;

[0216] d. 将试剂盒提供的微珠快速离心,在冰预冷的管中将微珠用测定缓冲液稀释为1 \times ,涡旋振荡30s,以每孔50 μ l(多配20%)加入到96孔板中,注意微珠需要避光,然后用试剂盒提供的洗涤缓冲液洗板2次;

[0217] e. 将用测定缓冲液稀释的标准品(来自上述试剂盒)、空白对照(测定缓冲液)、上述步骤(4)中冻存的细胞上清涡旋振荡1-3s,以每孔50 μ l加入到96孔板中,室温下摇床上孵育1h(先1100rpm 30s,然后以300rpm完成剩余时间,此步骤最长4h);

[0218] f.加入检测抗体:在使用前15min制备检测抗体(来自上述kit,针对待检测细胞因子的抗体),将检测抗体中速涡旋15-20s,离心30s,使其沉于瓶底,将其用测定缓冲液稀释为1×,以每孔25μl加入96孔板中,用新的密封条覆盖,室温摇床上以300rpm孵育30min,然后吸干孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次;

[0219] g.加入二抗:在使用前10min准备荧光素PE标记的二抗,将盛装二抗的管在使用前涡旋15-20s,将PE标记的二抗用测定缓冲液稀释为1×,涡旋3-5s后每孔加入50μl,室温摇床上以300rpm孵育10min,然后吸干孔内溶液,用洗涤缓冲液洗涤三次;

[0220] h.每孔加入125μl测定缓冲液,用密封条密封,室温下在摇床上以1100rpm孵育30s,移除密封条,使用Luminex 200TM(美国Luminex公司)按说明书操作进行检测。

[0221] 细胞因子检测结果(图3)显示,经过本发明的疫苗rAd-gD2、rAd-gD2△UL25和FI-HSV2的单独或联合免疫后,小鼠产生了细胞免疫的Th1型细胞因子,这意味着本发明疫苗的细胞免疫强度及免疫原性较好,作用更广泛,对HSV-2感染将起到有效的预防及治疗作用。

[0222] 实施例6攻毒实验程序

[0223] 1.制备4% (质量分数) 甲基纤维素(CMC):将4g CMC粉末溶于100ml去离子水中。

[0224] 2.将2×10⁵pfu的实施例1步骤3制备的HSV-2G病毒(8μl)与4%CMC(2μl)均匀混合。

[0225] 3.将按照实施例4步骤1免疫方案免疫的小鼠在第10周时麻醉,腹部朝上放置,用无齿镊轻轻夹住小鼠四周阴道壁,将上述步骤2制备的病毒-CMC混合物10μl/只,灌注于小鼠阴道内。用无齿镊轻轻夹住小鼠四周阴道壁,使病毒最大程度滞留。

[0226] 4.每天观察攻毒小鼠阴道损伤。

[0227] 在HSV-2攻毒实验结果(图4和图5)中,重组病毒载体疫苗rAd-gD2△UL25和rAd-gD2单独使用时对小鼠生殖道产生明显的保护,效果显著优于灭活疫苗FI-HSV2。FI-HSV2+rAd-gD2△UL25产生的保护力最高,其次是FI-HSV2+rAd-gD2。使用灭活疫苗FI-HSV2进行初次免疫,并使用重组病毒载体疫苗rAd-gD2△UL25或rAd-gD2加强免疫的联合免疫策略能够显著提高FI-HSV2对生殖道的保护。

[0228] 实施例7 MVA-gD2重组痘苗病毒的构建

[0229] 1.pSC11M1-gD2的构建与制备

[0230] 将pGEM-T-easy-gD2用Apa1/Not1双酶切得gD2目的片段,pSC11M1用Apa1/Not1双酶切作为载体,将回收目的基因片段和载体片段进行连接,转化,挑取阳性克隆,获得pSC11M1-gD2质粒,经测序确认pSC11M1-gD2构建正确(图6)。

[0231] 2.MVA-gD2的构建、筛选、扩增

[0232] 使用10%DMEM培养基传代BHK tk-细胞(ATCC Number:CRL-1632tk-ts13),使其融合率达90%。先以空MVA感染细胞,2~4小时后换液,再以pSC11M1-gD2进行转染,使MVA与pSC11M1-gD2在BHK tk-细胞中发生同源重组,4~6小时后,换液培养2~3天,获得重组重组型MVAgD2。蓝白斑筛选阳性克隆,使用固体及液体体系均加入1%体积的5mg/ml Brdu作筛选用以控制非重组克隆生长。六孔板培养好的BHK tk-细胞,吸出培养液,将同源重组细胞液加入2ml,感染4小时。吸出细胞液,加入2ml含1%低融点琼脂糖-2.5%胎牛血清的DMEM,室温凝固,37℃培养。2天过后,加入2ml 1%X-gal含1%低融点琼脂糖-2.5%胎牛血清的DMEM,室温凝固,37℃培养。1-2天,显示蓝斑,挑取,加入含2.5%胎牛血清的DMEM,-80℃保

存。使用重组型MVA85B-E6感染BHK tk-细胞,48h后收获将细胞悬液用移液管转移至50ml离心桶中,1200×g 4℃离心10min。弃上清,并加入1ml完全DMEM-2.5培养基中重悬震荡。用液氮和37℃水浴冻融裂解细胞,震荡。反复3次。于冰上超声1min,4000rpm离心5min,取上清感染细胞。重复释放、感染、回收,使病毒扩增。

[0233] 3.MVA-gD2的纯化

[0234] 收集足量待纯化病毒,1200×g 4℃离心10min。细胞用10mmol/L Tris-HCl重悬,冻融裂解细胞,震荡,超声。反复3次。1200×g 4℃离心10min。收集上清,沉淀用10mmol/L Tris-HCl重悬,震荡,超声,离心,合并上清。加入36%蔗糖至超离管一半体积形成垫层,加入相同体积病毒悬液。30000g 4℃离心60min。弃上清,重悬病毒沉淀于1mmol/L Tris-HCl,分装保存于-80℃。

[0235] 4.MVA-gD2的滴度测定

[0236] 解剖鸡胚,接种培养瓶。传96孔板(以5×104细胞/孔传板),24小时后感

[0237] 染MVA。稀释病毒:10倍系列稀释,可以依据估算滴度选择感染的稀释度;弃去孔内液体,每孔加入稀释好的病毒100微升,以病毒稀释液做对照,置于37℃,5%CO₂培养箱中过夜培养(20-24小时)。固定:弃去96孔板内液体,用1×PBS洗1次,以固定液甲醇-丙酮(1:1)固定,每孔100μl,-20℃固定20min(常温下固定10min)。封闭:固定后弃固定液,用1×PBS洗一遍,每孔滴加100μl含10%小牛血清的PBS液,37℃封闭30min。弃封闭液,用1×PBS洗3次,用1×PBS 1:1000稀释一抗(兔源抗痘苗病毒抗体)每孔滴加50μl,37℃孵育1小时。弃液,用1×PBS洗3次,用1×PBS稀释二抗(AP偶联抗兔IgG抗体)(1:1000)每孔加100μl,37℃孵育1小时。用1×PBS洗3次每孔加底物液100μl,显色15-30min,显微镜下见斑点出现,弃掉底物液,1×PBS清洗一次,加入少量的1×PBS至每孔,保持孔内的湿润,镜下观察,MVAgD2滴度为1×10¹⁰PFU/ml。

[0238] 5.MVA-gD2的鉴定

[0239] 用病毒基因组提取试剂盒提取病毒基因组作为模板,以MVA-TK正/反为引物扩增痘苗病毒基因组特异性片段鉴定痘苗病毒;以野毒引物TKnew正/反鉴定有无野毒污染;以外源基因引物扩增gD2鉴定重组成功(图7)。

[0240] 在小瓶中,以适当病毒感染细胞,48h收获细胞,用45μl RIPA(50mM Tris-HCl pH7.4,150mM NaCl,1%Triton x-100,0.1%SDS)和15μl 4×Loading Buffer(含β-巯基乙醇)重悬沉淀,沸水煮5min,12000rpm离心30min,每个样品取10μl上样,进行SDS-PAGE分离。电泳完成后,进行Western blot,鉴定重组gD2的表达(图8)。

[0241] 实施例8 MVA-gD2△UL25重组痘苗病毒的构建

[0242] 1.pSC11M1-gD2△UL25的构建与制备

[0243] 将pGH-gD2△UL25用Apa1/Not1双酶切得gD2△UL25目的片段,pSC11M1用Apa1/Not1双酶切作为载体,将回收目的基因片段和载体片段进行连接,转化,挑取阳性克隆,获得pSC11M1-gD2质粒,经测序确认pSC11M1-gD2△UL25构建正确(图9)。

[0244] 2.MVA-gD2△UL25的构建、筛选、扩增

[0245] 方法同MVAgD2的构建、筛选、扩增方法。

[0246] 3.MVA-gD2△UL25的纯化

[0247] 方法同MVAgD2的纯化方法。

[0248] 4.MVA-gD2 Δ UL25的滴度测定

[0249] 方法同MVAgD2的滴度测定方法,MVAgD2 Δ UL25滴度为 1.2×10^{10} PFU/ml。

[0250] 5.MVA-gD2 Δ UL25的鉴定

[0251] 用病毒基因组提取试剂盒提取病毒基因组作为模板,以MVA-TK正/反为引物扩增痘苗病毒基因组特异性片段鉴定痘苗病毒;以野毒引物TKnew正/反鉴定有无野毒污染;以外源基因引物扩增gD2 Δ UL25鉴定重组成功(图10)。

[0252] 在小瓶中,以适当病毒感染细胞,48h收获细胞,用45 μ l RIPA (50mM Tris-HCl pH7.4,150mM NaCl,1% Triton x-100,0.1% SDS) 和15 μ l 4 \times Loading Buffer (含β-巯基乙醇) 重悬沉淀,沸水煮5min,12000rpm离心30min,每个样品取10 μ l上样,进行SDS-PAGE分离。电泳完成后,进行Western blot,鉴定重组gD2 Δ UL25的表达(图11)。

[0253] 实施例9 VZV-gD2和VZV-gD2 Δ UL25的制备

[0254] (1) 将载体pUSF-5电转至已感染VZV v0ka株的MRC-5细胞,通过绿色荧光蛋白筛选得到含有BAC(细菌人工染色体)的VZV v0ka株VZV-BAC;

[0255] (2) 将VZV-BAC的基因组电转入DY380,抗性筛选阳性株。

[0256] (3) 将上述的序列为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的基因插入到质粒pUC19-TKL中得到重组质粒pUC19-TKL-gD2与pUC19-TKL-gD2 Δ UL25;

[0257] (4) 将步骤(3)得到的重组质粒pUC19-TKL-gD2与pUC19-TKL-gD2 Δ UL25分别电转入含有VZV-BAC的DY380中,抗性筛选分别得到VZV-gD2-BAC和VZV-gD2 Δ UL25-BAC;

[0258] (5) 用步骤(4)得到的重组菌株VZV-gD2-BAC和VZV-gD2 Δ UL25-BAC,提取重组的VZV基因组,分别转染MRC-5细胞,在Cre酶作用下分别得到重组疱疹疫苗VZV-gD2和VZV-gD2 Δ UL25。

[0259] (6) 用病毒基因组提取试剂盒提取病毒基因组作为模板,以TK基因正/反为引物扩增痘苗病毒基因组特异性片段鉴定痘苗病毒;以外源基因引物扩增gD2/gD2 Δ UL25片段,鉴定重组成功(图12)。

[0260] (7) 分别取纯化后的两种重组病毒感染正常MRC-5细胞,48h后如上述收获细胞冷冻离心后取上清用western blot检测蛋白表达情况(图13和14)。

[0261] 实施例10疫苗免疫以及效果检测

[0262] 1. 使用6-8周龄的Balb/c雌鼠(中国科学院武汉病毒研究所,小鼠饲养条件:SPF级),分为6组,每组15只。对对照组注射PBS。

[0263] 根据 $1\text{TCID}_{50} \approx 0.7\text{PFU}$ (*Virology: Principles and Applications*, John Wiley & Sons Inc; 2nd Revised edition)计算疫苗用量。

[0264] 分别对各组中的每只小鼠按下表1进行免疫:

[0265] 表5小鼠免疫方案:

[0266]

分组	疫苗	免疫过程
1	FI-HSV2+VZV-gD2	初次免疫 (prime) , 第 0、2、4 周皮下注射 12.5 µg FI-HSV2; 加强免疫 (boost) , 第 6、8 周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2;
2	FI-HSV2+VZV-gD2ΔUL25	初次免疫 (prime) , 第 0、2、4 周皮下注射 12.5 µg FI-HSV2; 加强免疫 (boost) , 第 6、8 周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2ΔUL25;
3	FI-HSV2+MVA-gD2	初次免疫 (prime) , 第 0、2、4 周皮下注射 12.5 µg FI-HSV2; 加强免疫 (boost) , 第 6、8 周肌肉注射 2×10^7 pfu MVA-gD2;
4	FI-HSV2+MVA-gD2ΔUL25	初次免疫 (prime) , 第 0、2、4 周皮下注射 12.5 µg

[0267]

		FI-HSV2; 加强免疫（boost），第6、8周肌肉注射 2×10^7 pfu gD2ΔUL25；
5	rAd-gD2+MVA-gD2	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 2×10^7 pfu MVA-gD2；
6	rAd-gD2+MVA-gD2ΔUL25	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 2×10^7 pfu MVA-gD2ΔUL25；
7	rAd-gD2ΔUL25+MVA-gD2	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2ΔUL25； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 2×10^7 pfu MVA-gD2；
8	rAd-gD2ΔUL25+MVA-gD2ΔUL25	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2ΔUL25； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 2×10^7 pfu MVA-gD2ΔUL25；
9	rAd-gD2+VZV-gD2	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2；
10	rAd-gD2+VZV-gD2ΔUL25	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2ΔUL25；
11	rAd-gD2ΔUL25+VZV-gD2	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2ΔUL25； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2；
12	rAd-gD2ΔUL25+VZV-gD2ΔUL25	初次免疫，第0、2周皮下注射 1×10^8 pfu rAd-gD2ΔUL25； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2ΔUL25；
13	MVA-gD2+VZV-gD2	初次免疫，第0、2周皮下注射 2×10^7 pfu MVA-gD2； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2；
14	MVA-gD2+VZV-gD2ΔUL25	初次免疫，第0、2周皮下注射 2×10^7 pfu MVA-gD2； 加强免疫，第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2ΔUL25；

[0268]

15	MVA-gD2ΔUL25+VZV-gD2	初次免疫, 第0、2周皮下注射 2×10^7 pfu MVA-gD2ΔUL25; 加强免疫, 第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2;
16	MVA-gD2ΔUL25+VZV-gD2ΔUL2 5	初次免疫, 第0、2周皮下注射 2×10^7 pfu MVA-gD2ΔUL25; 加强免疫, 第4、6周肌肉注射 1×10^8 pfu VZV-gD2ΔUL25;

[0269] 2. IFN- γ ELISPOT实验:

[0270] 方法与实施例4的方法相同。

[0271] ELISPOT实验结果:

[0272] 表6: 对 1×10^6 细胞刺激24小时, 产生斑点的情况如下(ConA阳性对照刺激得到的点大多数不清)

[0273]

分组	刺激物	DP1		DP6		LP2		gD		无抗原	
		平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
1	rAd-gD2	1948	154	1837	133	37	11	485	21	3	2
2	rAd-gD2ΔUL25	1912	132	767	89	565	45	541	54	0	0
3	FI-HSV2	202	14	413	28	163	24	298	26	8	5
4	FI-HSV2+rAd-gD2	1356	104	471	69	213	46	631	55	5	2
5	FI-HSV2+rAd-gD2ΔUL25	1388	156	216	19	631	56	565	12	6	5
6	PBS	8	2	13	5	7	5	5	2	5	7
7	FI-HSV2+VZV-gD2	879	45	785	36	23	3	455	21	1	0
8	FI-HSV2+VZV-gD2ΔUL25	1012	56	914	42	455	34	476	33	4	1
9	FI-HSV2+MVA-gD2	768	71	566	43	36	4	561	31	7	2
10	FI-HSV2+MVA-gD2ΔUL25	988	79	578	98	465	35	454	21	6	1
11	rAd-gD2+MVA-gD2	1124	134	912	87	55	11	667	55	0	0
12	rAd-gD2+MVA-gD2ΔUL25	986	115	1137	81	356	23	621	24	11	3
13	rAd-gD2ΔUL25+MVA-gD2	1988	187	1790	146	231	21	594	53	3	1

[0274]

14	rAd-gD2ΔUL25+ MVA-gD2ΔUL25	1675	102	1541	121	655	32	576	24	4	1
15	rAd-gD2+VZV-gD2	1966	203	1790	154	44	5	551	34	6	4
16	rAd-gD2+ VZV-gD2ΔUL25	2014	146	1680	90	456	44	345	31	14	7
17	rAd-gD2ΔUL25+ VZV-gD2	1821	127	1354	89	491	46	543	21	5	2
18	rAd-gD2ΔUL25+ VZV-gD2ΔUL25	1655	98	1217	79	761	71	702	67	21	9
19	MVA-gD2+VZV-gD2	1751	89	1793	89	23	7	605	3	5	1
20	MVA-gD2+ VZV-gD2ΔUL25	1563	68	1531	90	568	36	613	16	6	1
21	MVA-gD2ΔUL25+ VZV-gD2	1344	76	984	71	432	24	566	24	7	2
22	MVA-gD2ΔUL25+ VZV-gD2ΔUL25	1239	86	1679	87	751	41	765	46	8	2

[0275] 其中,LP2为CD8+T细胞特异小肽,能够刺激CD8+T细胞分泌IFN- γ ;DP1和DP6为CD4+T细胞特异小肽,能够刺激CD4+T细胞分泌IFN- γ ,LP2、DP1、DP6的氨基酸序列见表3。

[0276] 表7本研究中所使用的肽刺激物

[0277]

名称	SEQ ID NO:	肽段在蛋白序列中 的位置	长度	序列
DP1	SEQ ID NO: 15	gD: 53-65	13aa	LTDPPGVKRVYHI
DP6	SEQ ID NO: 16	gD: 270-284	15aa	KPPYTSTLLPPELSD
LP2	SEQ ID NO: 17	UL25: 364-372	9aa	FLARGHNLF

[0278] DP1、DP6和LP2肽由上海吉尔多肽有限公司合成。

[0279] 3. 细胞因子检测实验:

[0280] 方法与实施例5的方法相同。

[0281] 细胞因子检测结果参见图15-18。结果显示经过本发明的疫苗单独或联合免疫后,小鼠产生了细胞免疫的Th1型细胞因子,这意味着本发明疫苗的细胞免疫强度及免疫原性较好,作用更广泛,对HSV-2感染将起到有效的预防及治疗作用。

[0282] 4. 攻毒实验程序

[0283] 方法与实施例6的方法相同。

[0284] 攻毒实验结果参见图19-20。结果显示在HSV-2攻毒实验结果中,本发明的疫苗及其组合对小鼠生殖道产生明显的保护,显著提高了存活率,效果显著优于灭活疫苗FI-HSV2。

序列表

<110> 长春百克生物科技股份公司
 <120> 新型生殖器疱疹疫苗
 <130> CP1141976/CB
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 849
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0001] <400> 1
 atgaagtacg ccctggcga tccctcaactt aaaaatggcag atcctaaccg gttccgaggt 60
 aaaaatttgc cggtgctgga tcagctgacc gatectccag gcgtcaagag agtgttatcat 120
 atccagccca gcctcgaaga cccgttccag ccaccgtcca tcccgtac acgtttactat 180
 gccgtccctgg aacgcgcctg tcggtccgtc ctgctgcatg ctccgtctga ggccccccag 240
 atcgtgcgcg gtgcattccga cgaaggcaaga aaacataactt acaatctgac catgcgttgg 300
 tacaggatgg gggacaactg tgccattcca atcaccgtga tggagtatac agagtgcggc 360
 tacaataaga gtctgggtgt ttgtcctate cggacgcage caegctggc ttactatgat 420
 tccttcctcg ccgtttcaga ggacaatctg gttttttga tgcacgtcc agcttttag 480
 acagccggga cttacccttcg cttggtaaaa atcaatgact ggacagaaat taccctggc 540
 atccttgaac acagagcacg ggcctccctgc aaatacgcc tgcactgac catccctccg 600
 gcagccgtcc tgactagcaa ggcctaccag cagggtgtca cgggtggactc tatcggatg 660
 ttgccaagggt tcacteetgaa aatcagcga acgggtgtc tgtatagtct gaaaattgca 720
 ggctggcatg gaccgaagcc gccatataacc agcacacitc tgccaccgga gttgagcgt 780
 acgactaactg caacccagcc cgagcttggtt ccggaggatc cagaggatag cgcacttctg 840
 gaggactaa 849

<210> 2
 <211> 1734
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 2
 atgaagtacg ccctggcga tccctcaactt aaaaatggcag atcctaaccg gttccgaggt 60
 aaaaatttgc cggtgctgga tcagctgacc gatectccag gcgtcaagag agtgttatcat 120
 atccagccca gcctcgaaga cccgttccag ccaccgtcca tcccgtac acgtttactat 180
 gccgtccctgg aacgcgcctg tcggtccgtc ctgctgcatg ctccgtctga ggccccccag 240
 atcgtgcgcg gtgcattccga cgaaggcaaga aaacataactt acaatctgac catgcgttgg 300

tacaggatgg	gggacaactg	tgccattcca	atcacctgt	tggagtatac	agagtgc	360
tacaataaga	gtctgggtgt	ttgtcttatac	cggacgc	cacgetggtc	ttactatgtat	420
tccttctccg	cggtttcaga	ggacaatctg	gggttttta	tgcacgc	tc agctttttag	480
acageccggga	cttacacctcg	cttggtaaaa	atcaatgact	ggacagaaat	tacccagttc	540
atccttgaac	acagagc	acg ggccttgc	aaatacgc	cttgc	actcctccg	600
gcagcctg	tgacttagcaa	ggccttaccag	cagggtgtca	cgg	tatcggatgt	660
ttggccaaagg	gtt	actctgt	aaatcagcga	acggttgctc	tgtatagtct	720
ggttggcatg	gaccgaagcc	gccatataacc	agcacacttc	tgccaccg	gtttagc	780
acgactaacg	caacccagcc	cgagcttgg	ccggaggatc	caggatag	cgcacttctg	840
gaggaccccg	ccggcacccg	cgg	tggaggg	tccggaggt	gggttagc	900
atgcgttacg	aacacgg	tgc	actggcaca	cacgtgtt	tgc	960
ggcggttgc	cggcagctc	ggg	agacgt	ccccc	acttag	1020
atgtacgtgg	cccacccgg	tgacgtt	aat	cgacgt	ccgtt	1080
cataatctgt	tctgtgg	agatcagaca	ctgtt	gggg	caacagccaa	1140
gcttgc	tgttgc	actgtc	gac	aacgtt	ccgttggat	1200
aatagactgc	agctgg	gctgat	cccc	ggagcc	ggc	1260
[0002]	ggagc	atccg	gcctgg	atc	gggg	1320
tgctgt	gact	acgt	gtgt	gtt	gtt	1380
tttcccg	gtccgc	tct	ctgt	ggac	ggat	1440
cggc	gact	gtgt	ctgg	gtt	gtt	1500
ctggaa	ctgt	atct	ggag	ggc	ggat	1560
catgtgt	tccgtt	gtat	gagc	gtt	gtt	1620
attggactgg	catcta	acac	aaaa	gat	gggg	1680
ctgtctact	tcttt	gggtt	ttatc	ccg	gtt	1734
<210>	3					
<211>	34					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<400>	3					
ttctcgaggc	ggccgc	ttag	gtgc	gggg	gg	34
<210>	4					
<211>	31					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<400>	4					
gtcgacat	ctat	gaagta	cgc	cgttggc	g	31

<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	tcgtttctca gcagctgttg	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	6	
	catctgaact caaagcgtgg	20
<210>	7	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	7	
	ggaagatcta tgaagtacgc cctggccg	28
<210>	8	
<211>	39	
<212>	DNA	
[0003]	人工序列	
<400>	8	
	ccgctcgagg cggccgccta agecactgac agataactgc	39
<210>	9	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	9	
	gtcgacagat ctatgaagta cgccctggcc g	31
<210>	10	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	10	
	ttctcgaggc ggccgccttag gtgccggcgg ggtc	34
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	11	
	cctgcgagtg tggcggtaaa	20

<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	12	
	cacaaggcg tctccaagg	20
<210>	13	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	13	
	ccggaattca tgcacatcacca tcaccatcac catcacaagt acgccctggc cg	52
<210>	14	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	14	
	cccaagttc tagtcctcca gaagtgcgt	30
<210>	15	
<211>	13	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
[0004]		
<400>	15	
Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Lys Arg Val Tyr His Ile		
1	5	10
<210>	16	
<211>	15	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<400>	16	
Lys Pro Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Asp		
1	5	10
15		
<210>	17	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<400>	17	
Phe Leu Ala Arg Gly His Asn Leu Phe		
1	5	
<210>	18	
<211>	393	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	

<400> 18

Met	Gly	Arg	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Val	Val
1				5				10						15	
Ala Val Gly Leu Arg Val Val Cys Ala Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Pro															
20 25 30															
Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asn Leu Pro															
35 40 45															
Val Leu Asp Gln Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Lys Arg Val Tyr His															
50 55 60															
Ile Gln Pro Ser Leu Glu Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Ile Pro Ile															
65 70 75 80															
Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu															
85 90 95															
His Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Asp Glu															
100 105 110															
Ala Arg Lys His Thr Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Met Gly															
115 120 125															
[0005] Asp Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Pro															
130 135 140															
Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Val Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp															
145 150 155 160															
Ser Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe															
165 170 175															
Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu															
180 185 190															
Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His															
195 200 205															
Arg Ala Arg Ala Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro															
210 215 220 225															
Ala Ala Cys Leu Thr Ser Lys Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp															
230 235 240															
Ser Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val															
245 250 255															

Ala Leu Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Pro Pro
260 265 270

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Asp Thr Thr Asn Ala
275 280 285

Thr Gln Pro Glu Leu Val Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
290 295 300

Glu Asp Pro Ala Gly Thr Val Ser Ser Gln Ile Pro Pro Asn Trp His
305 310 315 320

[0006] Ile Pro Ser Ile Gln Asp Val Ala Pro His His Ala Pro Ala Ala Pro
325 330 335

Ser Asn Pro Gly Leu Ile Ile Gly Ala Leu Ala Gly Ser Thr Leu Ala
340 345 350

Val Leu Val Ile Gly Gly Ile Ala Phe Trp Val Arg Arg Arg Ala Gln
355 360 365

Met Ala Pro Lys Arg Leu Arg Leu Pro His Ile Arg Asp Asp Asp Ala
370 375 380

Pro Pro Ser His Gln Pro Leu Phe Tyr
385 390

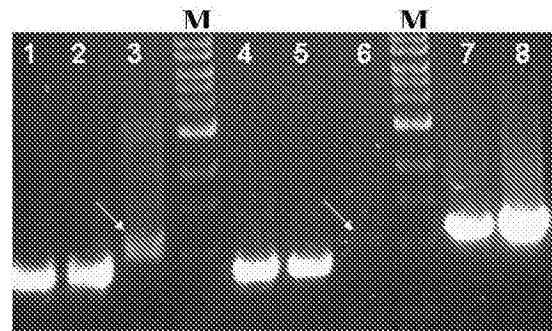


图1A

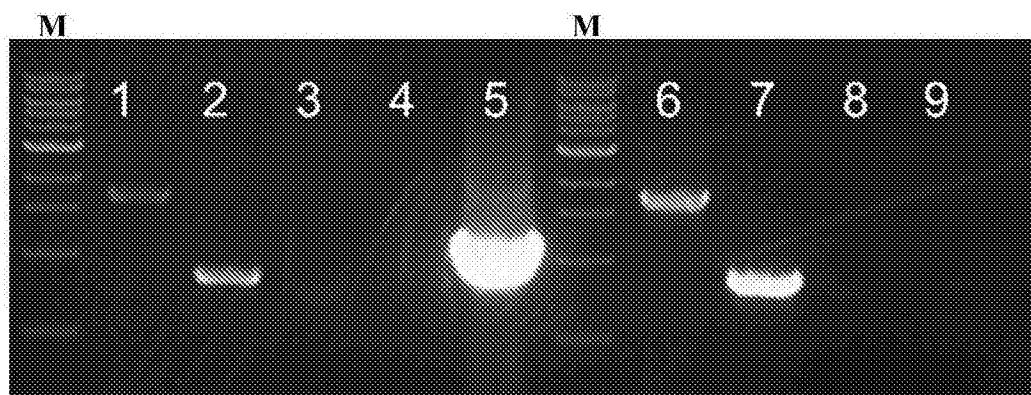


图1B

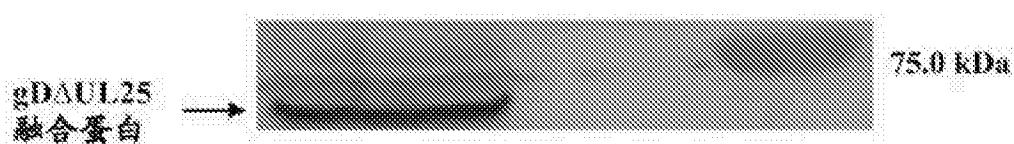


图2A

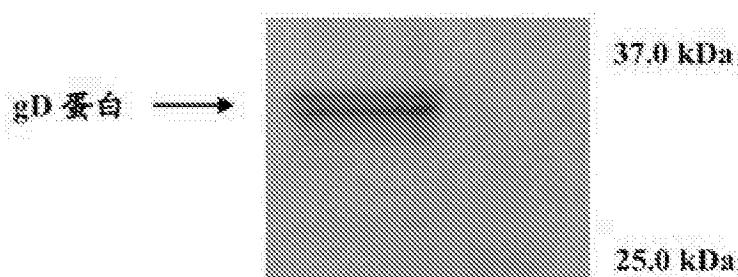


图2B

Th1 细胞因子

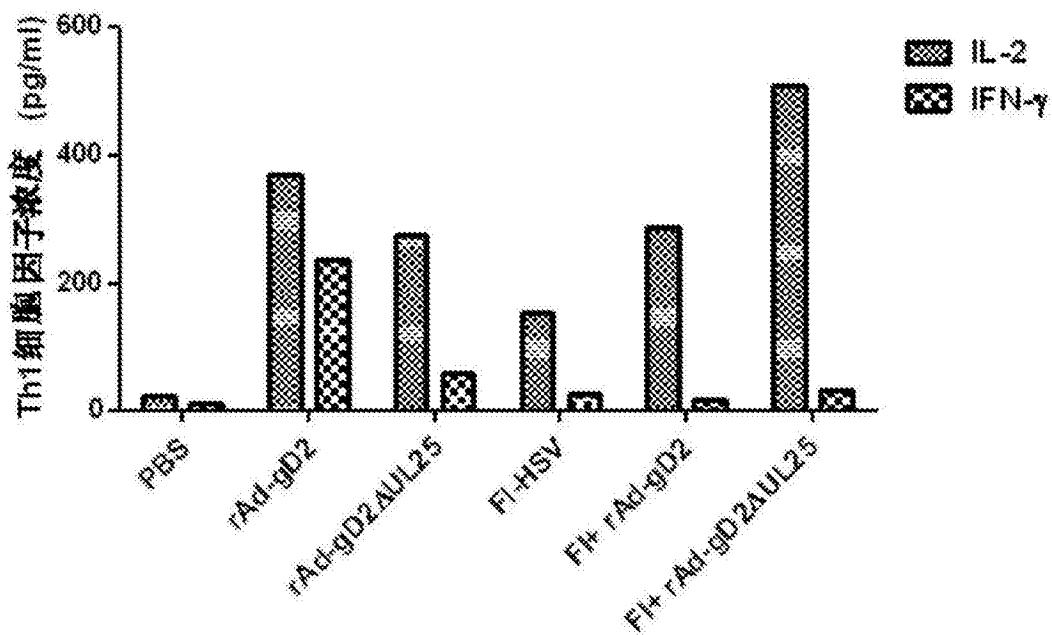


图3

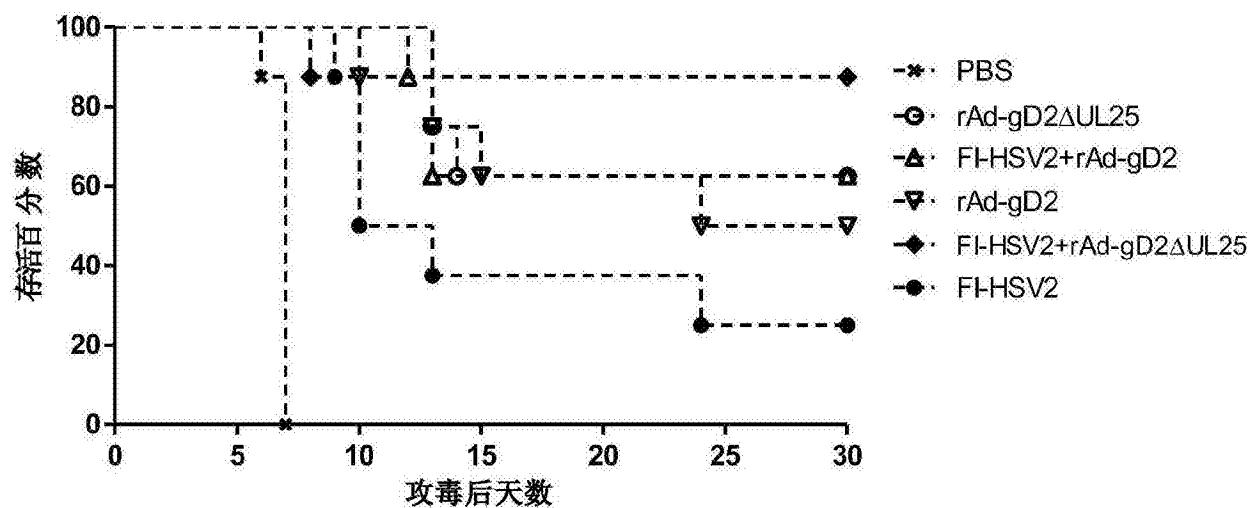


图4

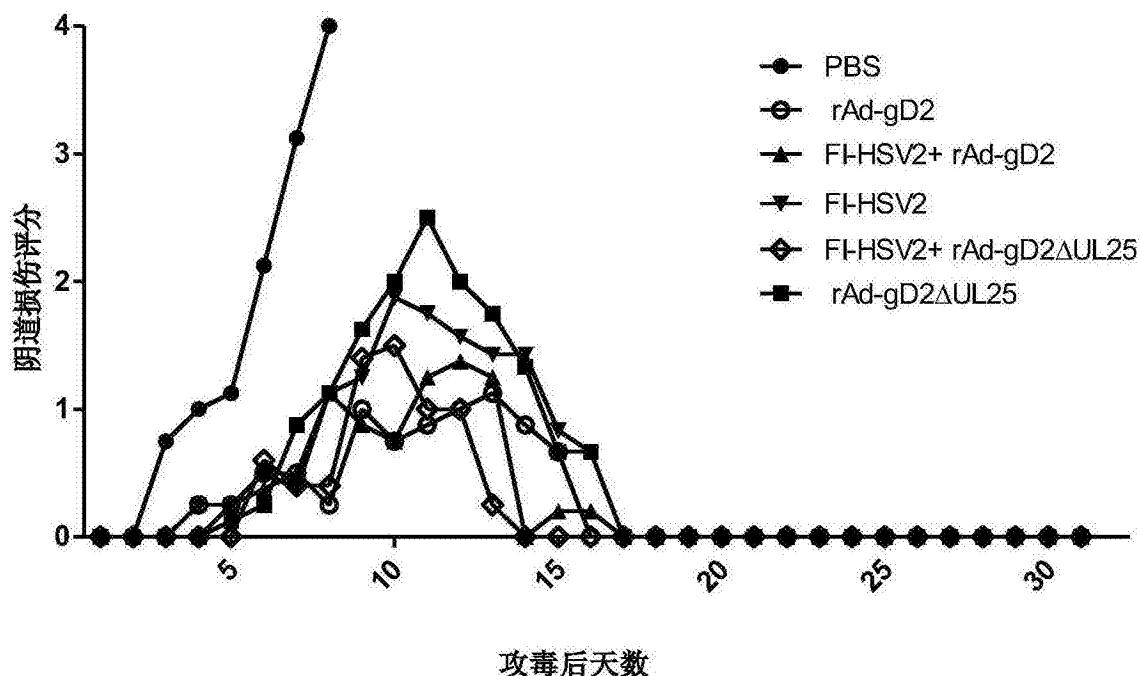


图5

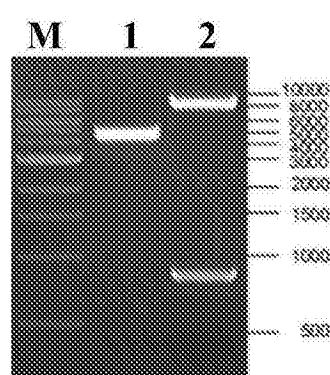


图6

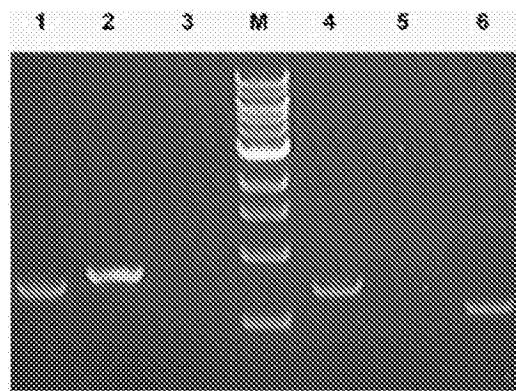


图7

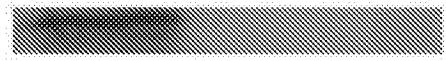


图8

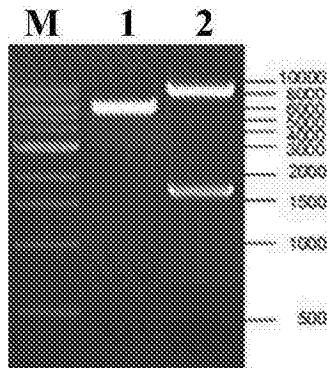


图9

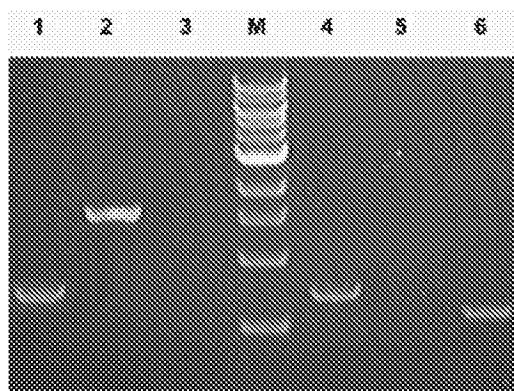


图10

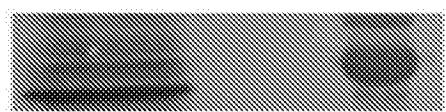


图11

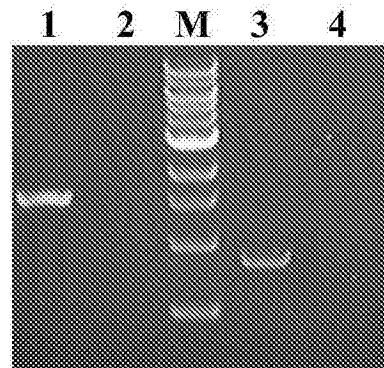


图12

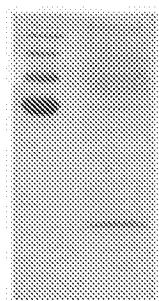


图13

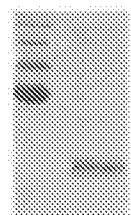


图14

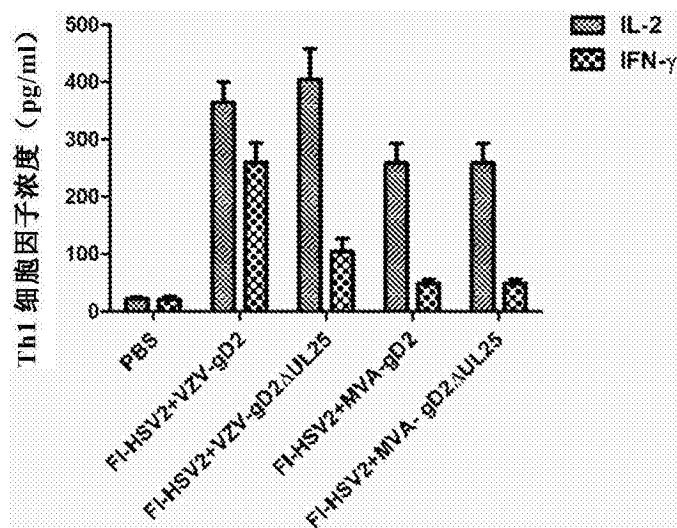


图15

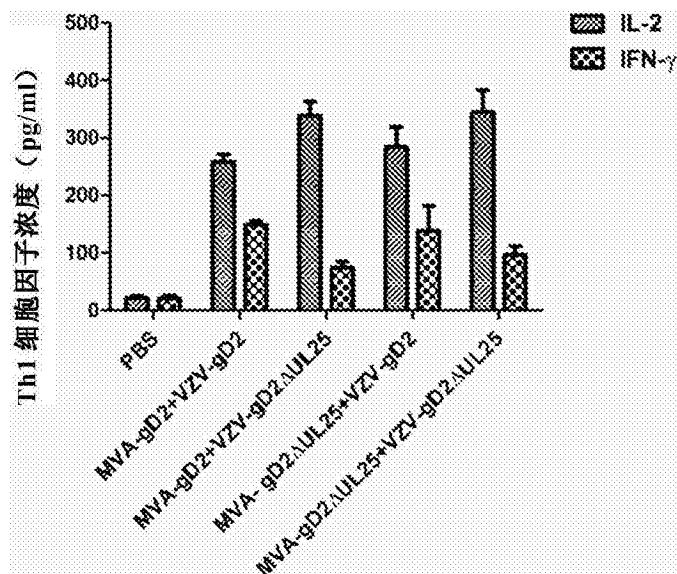


图16

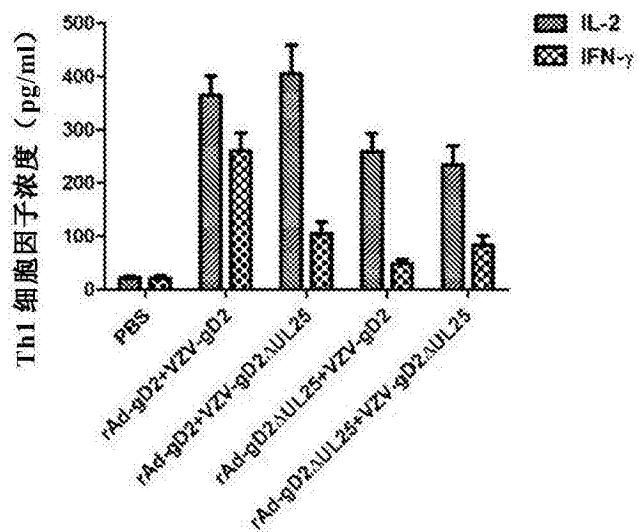


图17

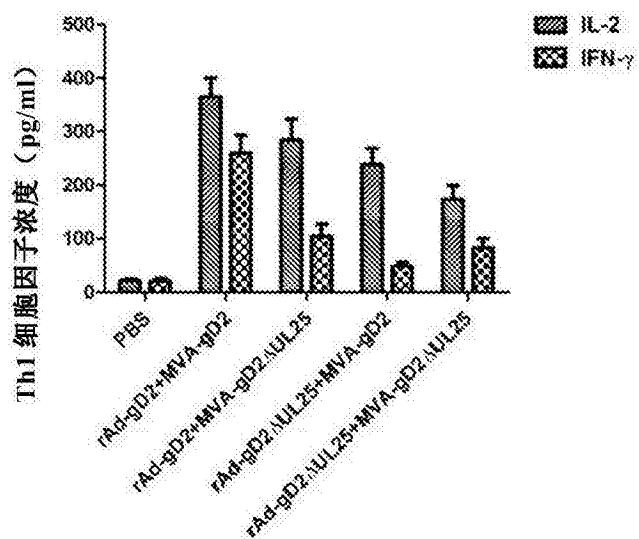


图18

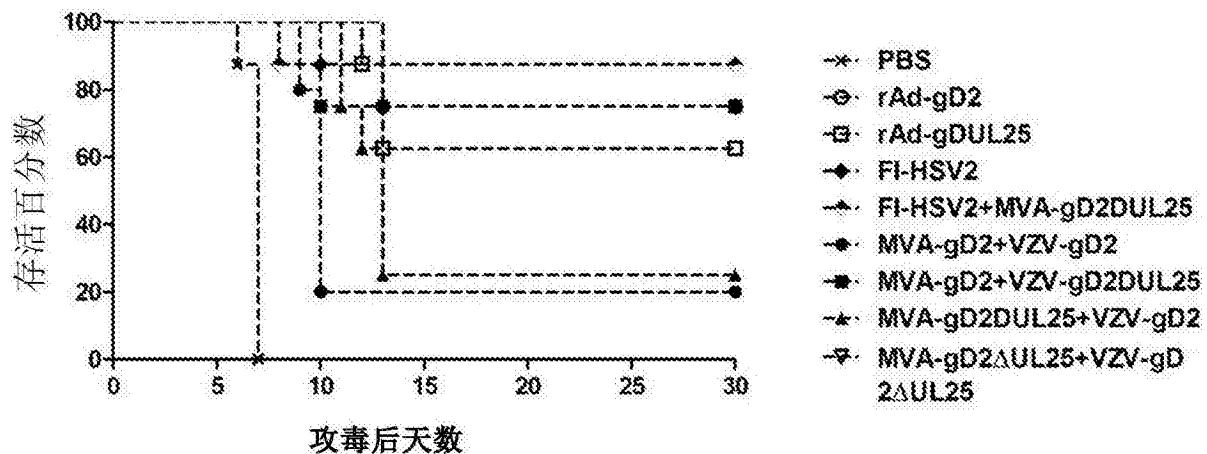


图19

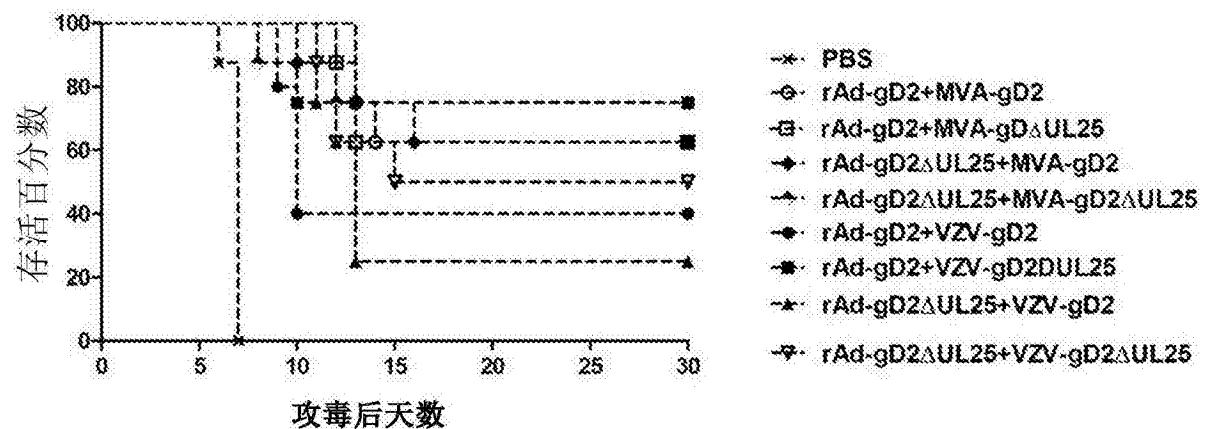


图20