[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A01N 43/04
A01N 63/00 A61K 39/00
C12N 15/00 G01N 33/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02812950.4

[43] 公开日 2004 年 9 月 29 日

[11] 公开号 CN 1533242A

[22] 申请日 2002.4.26 [21] 申请号 02812950.4
[30] 优先权
[32] 2001. 4.26 [33] US [31] 60/286,345
[32] 2002. 4.24 [33] US [31] 10/128,463
[86] 国际申请 PCT/US2002/013247 2002.4.26
[87] 国际公布 WO2002/087336 英 2002.11.7
[85] 进入国家阶段日期 2003.12.26
[71] 申请人 美国政府农业部
地址 美国华盛顿
[72] 发明人 M·J·格鲁布曼 J·钦桑加兰
M·科斯特 M·P·莫雷斯
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 玥 徐雁漪
权利要求书 2 页 说明书 30 页 序列表 6 页
附图 26 页

[54] 发明名称 口蹄疫病毒疫苗

[57] 摘要

通过对易感动物接种一种含有干扰素 DNA 序列的疫苗，可以实现口蹄疫(FMD)的早期预防。 接种一天后，发现动物能够抵抗致命的口蹄疫病毒的侵染。 与有效的口蹄疫病毒疫苗的合并给药可以在产生特异性免疫之前对动物进行保护，这一特性在口蹄疫爆发时显得尤为必要。

ISSN1008-4274

1. 一种构建体，包括一段能够在口蹄疫易感动物体内表达干扰素的 DNA 序列，其中所述的干扰素通过对所述动物给药而进行表达。

2. 权利要求 1 的构建体，其中所述干扰素是 IFN-α 或 IFN-β。

3. 权利要求 1 的构建体，其中所述口蹄疫易感动物选自猪、牛或羊。

4. 权利要求 1 的构建体，其中所述构建体还包括一段可表达口蹄疫病毒的 DNA 序列，该口蹄疫病毒可通过对口蹄疫易感动物给药刺激免疫应答。

5. 一种载体，包括权利要求 1 所述构建体。

6. 权利要求 5 的载体，其中所述干扰素是 IFN-α 或 IFN-β。

7. 权利要求 5 的载体，其中所述载体包括病毒基因转移载体。

8. 权利要求 7 的载体，其中所述病毒基因转移载体选自腺病毒、腺伴随病毒、细小病毒、牛痘病毒、疱疹病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒和逆转录病毒载体。

9. 权利要求 5 的载体，其中所述口蹄疫易感动物是猪、牛或羊。

10. 一种载体，包含权利要求 4 中的构建体。

11. 权利要求 10 的载体，其中所述干扰素是 IFN-α 或 IFN-β。

12. 权利要求 10 的载体，其中所述载体包括病毒基因转移载体。

13. 权利要求 12 的载体，其中所述病毒基因转移载体选自腺病毒、腺伴随病毒、细小病毒、牛痘病毒、疱疹病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒和逆转录病毒。

14. 权利要求 10 的载体，其中所述口蹄疫易感动物是猪、牛或羊。

15. 一种疫苗，包括权利要求 1 中的构建体和一种生理相容性载体，所述构建体的量可以有效地在口蹄疫易感动物中赋予保护效应。

16. 权利要求 15 的疫苗，其中所述干扰素是 IFN-α 或 IFN-β。

17. 权利要求 15 的疫苗，其中所述口蹄疫易感动物是猪、牛或羊。

18. 一种疫苗，包括权利要求 4 中的构建体和一种生理相容性载体，所述构建体的量可以有效地在口蹄疫易感动物中赋予保护效应。

19. 权利要求 18 的疫苗，其中所述干扰素是 IFN-α 或 IFN-β。

20. 权利要求 18 的疫苗，其中所述口蹄疫易感动物是猪、牛或羊。

21. 权利要求 15 的疫苗，其中所述疫苗是一种组合物，该组合物还包括一种有效的口蹄疫病毒疫苗，它的量可以有效地在口蹄疫易感动物中激发保护效应。

22. 权利要求 21 的疫苗，其中所述的口蹄疫易感动物是猪、牛或羊。

23. 一种保护易感动物免于患上口蹄疫的方法，包括以有效剂量的权利要求 15-22 中任一项的疫苗对上述动物进行接种。

口蹄疫病毒疫苗

发明背景

发明领域

口蹄疫是世界范围内最主要的一种经济性的家畜疾病。这种疾病是由口蹄疫病毒（FMDV）引起的，其具有高度的感染性，可通过接触和空气迅速传播。

由于 FMD 的高度感染性，未发现疾病的国家通常会保持严格的检疫，限制由疫区国家的动物及动物产品的引进以预防疾病的侵入和维系在国际贸易中的主动参与能力。该疾病在美国、加拿大及墨西哥都没有发现，但美国畜牧工业和美国农业部（USDA）依然要首要考虑其今后不会出现。

在传统的 FMD 控制方案中使用灭活的全病毒疫苗，并在疾病的控制中取得了巨大的成功。然而，目前的疫苗还存在着问题，包括需要一些用以生产疫苗制备所需病毒的高容量设备、病毒的抗原性变异会产生的大量的病毒血清型及亚型，以及疫苗不具有快速引发保护性免疫的能力。因此，目前迫切需要开发大量在病毒早期侵染阶段即可提供更好保护作用的有效疫苗。本发明涉及最新的遗传工程抗 FMD 的疫苗，该疫苗较现有的商品化疫苗具有更强的预防作用。

相关技术描述

根据传统的重组步骤生产的基因工程疫苗在本领域已得到很好的建立(如 Current Protocol in Molecular Blology. 1994. Ausubel 等, eds. J. Wiley & Sons, NY 所描述）。另外，包含目的 DNA 序列的载体也最来最多的被应用于真核表达中遗传物质的递送(Ricigliano 等, U.S. Pat. No. 5,795,872）。例如，腺病毒是一种长度约为 36kb 的双链线性 DNA 病毒，由腺病毒构建而来的载体在基因治疗和疫苗开发中通常被应用于表达目的基因（Alkhatib and Briedis. 1988. J. Virol. vol. 62, pp. 2718-2727; Chang 等 1995. Mol. Med. vol. 1, pp. 172-181; Cheng 等, 1992. J.Virol. vol. 66, pp.6721-6727; Chengalvala 等, 1994. J. Gen. Virol.

vol.75, pp. 125-131; Eloit and Adam. 1995. J. Gen. Virol. vol. 76, pp. 1583-1589; Fueyo 等, 1996. oncogene. vol. 12, pp. 103-110; GaherySegard 等, 1997. Eur. J. Immunol. Vol. 27, pp. 653-659; Gonin 等, 1995. Vet. Microbiol. vol. 45, pp. 393-401; Graham and Prevec. 1992. In Vaccines: New Approaches to Immunological Problems. Ellis, R.W., ed., Butterworth-Heinemann, Massachusetts, pp. 363-390; Jacobs 等, 1992. J. Virol. vol. 66, pp. 2086-2095; Karlsson 等, 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 82, pp. 158-162; Konishi 等, 1995. J. Clin. Invest. vol. 96. pp. 1125-1130; Korst 等, 1995. Am. J. Respir. Crit. Care Med. vol. 151, pp. S75-S87; Luback 等, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 86, pp. 6763-6767; Mayr 等, 1999. Virology. vol. 263, pp. 496-506; Mayr 等, 2001. Vaccine. vol. 19, pp. 2152-2162; Muhlhauser 等, 1995. Cric. Res. Vol. 77, pp. 1077-1086; Papp 等, 1997. J. Gen. Virol. vol. 78, pp. 2933-2943; Prevec 等, 1990. J. Infec. Dis. vol. 70, pp.429-434; Rosenfeld 等, 1989. J. Science. Vol. 252, pp. 431-434; Sheppard 等, 1998. Arch. Virol. vol. 143, pp. 915-930; Smith 等, 1991. Mol. Endocrinol. vol. 5, pp. 867-878; Zabner 等, 1993. Cell. vol. 75, pp. 207-216; He 等, U.S. Pat. No. 5,922,576）。大多数这些系统都利用了一种腺病毒，具体的说是人血清 5 型腺病毒(Ad5)。

人复制缺陷型 Ad5 的构建体包含一些 E1 区内的缺失，这种缺失导致病毒只能在某些可通过腺病毒基因组 E1 区进行稳定转染的细胞，即 293 细胞中进行复制（Graham 等, 1977. J. Gen. Virol. vol. 36, pp. 59-74）。同样地，很多这些载体包含一种 E3 区内的缺失，此缺失导致 MHC-I 类应答的抑制丧失，从而增强了被这些病毒感染的动物对表达的外源基因产生免疫应答的能力（Chengalvala 等，同上）。E1 区内缺失的编码序列约为 3000 个碱基对，而在 E3 区内缺失的编码序列约为 2700 个碱基对，再加上腺病毒所能包装的估计为其基因组长度 105%的序列（追加大约 1800 个碱基对），使得载体具有了容纳约 7500 个碱基对大小外源序列的能力。因此，该结构提供了一种有效模型以用于设计需在体内进行基因表达的疫苗。

已知 I 型干扰素，IFN α 和 β 或 IFN α/β，都具有抗病毒活性，并

且是宿主细胞抵御病毒感染的第一道防线（Vilcek and Sen. 1996. In Virology. Fields 等, eds. Lippincott-raven Publishers, Philadelphia）。病毒侵染的细胞会被诱导表达和分泌 IFN α/β，IFN α/β 能结合到临近细胞上的特异受体，经由一系列事件引发细胞进入抗病毒状态从而激活干扰素诱生基因（ISGs）。这些 ISGs 的产物在不同阶段对病毒的复制进行影响，而不同的病毒对不同的 ISG 的产物具有特异的敏感性。得到详尽描述的 ISGs 的实例包括双链 RNA 依赖性蛋白激酶（PKR）、2'-5'A 合成酶、RNase L 及 Mx。

现已证实，FMDV 的复制对 IFN α 或 β 是高度敏感的，并且含有猪或牛的 IFN α/β 的上清液可以抑制 FMDV 的复制（Chinsangaram 等, 1999. J. Virol. vol. 73, pp. 9891-9898）。为了更加直接的研究 IFN α 或 β 对 FMDV 复制的影响，用对每一物种的 IFN α 和 β 的特异性一致序列引物从猪肾（PK）和胎牛肾脏（EBK）细胞中对 IFN α/β 进行了扩增和克隆。每种 IFN 的克隆均在大肠杆菌中进行了测序和表达（Chinsangaram 等, 2001. J. Virol. vol.75, pp. 5498-5503, 参见图一）。在最高诱导下，牛的 IFN α 和 β 与猪的 IFN α 具有相似的表达水平，而猪的 IFN β 在低水平表达(Chinsangaram 等, 同上, 2001, 参见图 1)。当在 PH2.0 条件下对猪和牛的 IFN α 或 β 进行处理，连续稀释，并进行活性测试，可发现其对来自同源物种的细胞，包括一种猪的细胞系（IBRS2）和 EBK 细胞均表现出相似的对 FMDV 复制的抑制作用（Chinsangaram 等，2001. 同上，参见表 1）。与预期一致，做为对照的由大肠杆菌表达的 FMDV 的 3C 蛋白对病毒复制不具有抑制作用（Chinsangaram 等，同上）。猪和牛的 IFN α 或 β 的表达还具有相似的对水泡性口炎病毒（VSV）、脑心肌炎病毒、猪瘟病毒的抗病毒活性。另外，已发现除牛的 IFN β 以外，猪的 IFN α 和 β 及牛的 IFN α 均能抑制来源于其他物种的细胞中的 FMDV 复制（Chinsangaram 等，2001， 同上，参见表 1）。

由于在细胞培养过程中 FMDV 的复制对 IFN α 和 β 的处理是敏感的，所以 I 型 IFN 可作为一种在体内抗 FMDV 的药剂。I 型 IFN 作用迅速，并且将其给药可对 FMDV 所有因抗原性变异而产生的血清型和亚型提供预防作用。但是，IFN α/β 会被快速降解，而且临床上

需要多次进行高剂量注射较长的时间。含有 I 型 IFN 基因的构建体提供了一种可选择的方法来递送 IFN 蛋白，因此使动物能在一段周期内内源地产生 IFN。此外，所递送的 IFN 的量可以用重组病毒的剂量来加以控制。含有这些基因的载体，例如重组的人复制缺陷型腺病毒，对 IFN 的递送和随后的体内基因表达也是有效的。

发明概述

我们构建了一种复制缺陷型重组载体，其包含一种特别适用于赋予易感动物早期防御能力的干扰素基因。用这种载体接种后一天，发现动物能够抵抗致命的口蹄疫病毒（FMDV）的侵染。通过在疫苗中加入 IFN，使得动物在特异性免疫反应发生之前就具有了早期抵抗作用，这种特性在口蹄疫的爆发期显得尤为必要。

因此，本发明的一个目的是提供一种可作为有效疫苗的新构建体，通过表达 IFN α 或 β 早期保护易感动物免受 FMDV 侵染。

本发明的另一个目的是提供一种含有用于在体内表达 IFN α 或 IFN β 的新构建体的载体，可用作一种有效疫苗，通过表达 IFN α 或 β 来早期保护易感动物免受 FMDV 侵染。

本发明的另一目的是提供一种针对 FMDV 的有效疫苗，该疫苗含有新的构建体，该构建体包含在一种生理相容性载体中的编码 IFN α 或 β 的基因，和一种针对 FMDV 的有效疫苗。

本发明的另一目的是提供一种通过施用有效剂量的组合物来免疫易感动物的方法，所述组合物含有新构建体和生理相容性载体。

本发明的另一目的是提供一种通过施用组合物来免疫 FMD 易感动物的方法，所述组合物含有有效剂量的载体(vector)，所述载体含有新构建体和生理相容性载体(carrier)，以及一种针对 FMDV 的有效疫苗。

从下文的描述中将会容易地了解本发明的其它目的和优点。

附图简述

图 1 显示猪干扰素 α (pIFN-α)。图 A 显示了包含有信号序列的 pIFN-α 克隆 7 的序列（SEQ ID NO: 1）。这一克隆在 pTOPO 中进行

测序，被 Pst1 和 BamHI 消化并连接到为同样酶消化的 KSII 中。随后，质粒被 ClaI 和 XbaI 消化并连接到被 ClaI 和 XbaI 消化过的 Ad5-Blue 中。由上述质粒得到的病毒被称为 Ad5-pIFNα7.6.3。表 B 显示了包含有信号序列的 pIFN-α 克隆 9 的序列（SEQ ID NO: 2）。这一克隆在 pTOPO 中进行测序，被 Pst1 和 SpeI 消化并连接到为同样酶消化的 KSII 中。随后，质粒被 ClaI 和 XbaI 消化并被连接到为 ClaI/XbaI 消化过的 Ad5-Blue 中。由上述质粒得到的病毒被称为 Ad5-pIFNα9.9.6。

图 2 显示包含有信号序列的猪干扰素 β（pIFN-β）克隆 1 的 DNA 序列（SEQ ID NO: 3）。这一克隆在 pTOPO 中进行测序，被 RcoRI 和 BamHI 消化并连接到为同样酶消化的 KSII 中。随后，质粒被 ClaI 和 XbaI 并被连接到为 ClaI/XbaI 消化过的 Ad5-Blue 中。由上述质粒得到的病毒被称为 Ad5-pIFNβ1.4.6。

图 3 显示包含有信号序列的牛干扰素 α（bIFN-α）克隆 9 的 DNA 序列（SEQ ID NO: 4）。这一克隆在 pTOPO 中被测序，被 BamHI 和 EcoRV 消化并连接到为同样酶消化的 KSII 中。随后，质粒被 ClaI 和 XbaI 并被连接到为 ClaI/XbaI 消化过的 Ad5-Blue 中。由上述质粒得到的病毒被称为 Ad5-bIFNα9.2.2。

图 4 显示含有信号序列的牛干扰素 β（bIFN-β）克隆 5 的 DNA 序列（SEQ ID NO: 5）。这一克隆在 pTOPO 中被测序，被 BamHI 和 EcoRV 消化并连接到为同样酶消化的 KSII 中。随后，质粒被 ClaI 和 XbaI 并被连接到为 ClaI/XbaI 消化过的 Ad5-Blue 中。由上述质粒得到的病毒被称为 Ad5-bIFNβ5.3.1。

图 5 显示用放射免疫沉淀测定法（RIP）获得的在 Ad5-pIFN-α 侵染的 IBRS 细胞中的 pIFN-α 的表达动力学。分别在侵染 4.5、6、25 和 30 小时后（hpi）取样。

图 6 显示 Ad5pIFN-α 侵染的 IBRS2 细胞中的 pIFN-α 的表达动力学。分别在第 4.5、6、25 和 30 hpi 取样。

图 7 显示 Ad5-bIFN-α 或 Ad5-bIFN-β 侵染的 IBRS2 细胞中的 IFN-α 或 IFN-β 的表达动力学。分别在 5、23、28 和 48 hpi 取样。

图 8 显示将 Ad5-pIFN-α 对猪进行给药以保护猪免受 FMDV 侵染

的效果。记录损伤直到侵染后 14 天。第一组接受 Ad5-Blue（对照），第二组接受低剂量的 Ad5-pIFN-α。

图 9 显示接种了 Ad5-Blue 的动物在侵染后其血清学反应和临床反应。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来显示反应情况。

图 10 显示经低剂量或高剂量的 Ad5-pIFN-α 接种的猪的抗病毒活性。

图 11 显示经低剂量 Ad5-pIFN-α 接种的动物在侵染后的血清学反应和临床反应。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来显示反应情况。

图 12 显示经高剂量 Ad5-pIFN-α 接种的动物在侵染后的血清学反应和临床反应。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来显示反应情况。

图 13 显示经 Ad5-pIFN-α 接种并在一天后被侵染的猪第 14 dpc 的血清的 RIP。

图 14 显示在对照组中，接种 Ad5-pIFN-α 对猪防御 FMDV 侵染的影响。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定效果。

图 15 显示在第 2 组(在侵染 7 天前进行给药)中，接种 Ad5-pIFN-α 对猪防御 FMDV 侵染的影响。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定效果。

图 16 显示在第 2 组(在侵染 5 天前进行给药)中，接种 Ad5-pIFN-α 对猪防御 FMDV 侵染的影响。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定效果。

图 17 显示在第 2 组(在侵染 3 天前进行给药)中，接种 Ad5-pIFN-α 对猪防御 FMDV 侵染的影响。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定效果。

图 18 显示在第 2 组(在侵染 1 天前进行给药)中，接种 Ad5-pIFN-α 对猪防御 FMDV 侵染的影响。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定效果。

图 19 显示在第 2 组(在侵染 1 天后进行给药)中，接种 Ad5-pIFN-α

对猪防御 FMDV 侵染的影响。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定效果。

图 20 显示经 Ad5-pIFN-α 接种并在多日后被侵染的猪第 14 dpc 的血清的 RIP。

图 21 显示接受 Ad5-VSVG 给药的对照组中的猪直接被 FMDV 接种侵染后所产生的防御作用。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定抵抗效果。

图 22 显示猪直接被 FMDV 接种侵染后所产生的防御作用（Ad5-A24 的效应）。可通过抗病毒活性、病毒血、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定抵抗效果。

图 23 显示猪直接被 FMDV 接种侵染后所产生的的防御作用（Ad5-pIFN-α 的效应）。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定抵抗效果。

图 24 显示猪直接被 FMDV 接种侵染后所产生的的防御作用（Ad5-pIFN-α 和 Ad5-A24 的效应）。可通过抗病毒活性、病毒血征、损伤记录和产生的 FMDV 中和抗体来确定抵抗效果。

图 25 显示经 Ad5-pIFN-α、Ad5-A24 或 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-A24 接种并在 5 天后被侵染的猪第 14 dpc 的血清的 RIP。

图 26 显示将 Ad5-bIFN-α 对牛进行给药以保护牛免受 FMDV 侵染的效果。

发明详述

文中定义的疫苗是一种生物药剂，该药剂能在经疫苗递送的动物体内激发防御反应，并能在细胞和体液中促使所有的防御反应，包括，但不局限于，免疫反应。在此应用中，如果由 IFN 赋予的防御反应足以延缓疾病的攻击或减轻疾病的剧烈程度，使得传统的 FMD 疫苗能在未受保护的动物体内刺激出一种后续的保护反应，则可认为此类防御反应是有效的。

重组疫苗包括一种在接种方案中可有效地作为疫苗的构建体，另外包括至少一种的调节元件，例如启动子（如 CMV 启动子）、SV40 聚合酶信号序列、末端序列，该调控元件与编码能引发保护性反应的

药剂的异源 DNA 序列有效连接。上述构建体可根据为本领域所熟知的重组方法来制备，并且能够表达出足够量的免疫药剂以诱发保护性反应。

该构建体可被插入到用于免疫方案或接种方案的载体中。所需序列可以单独地插入到载体中，也可将其相互连接作为一个盒插入到载体中。

本发明的疫苗是由一种构建体或含有该构建体的载体与一种生理相容性载体，如磷酸盐缓冲液、生理盐水，以及培养基，所组成的组合物。该构建体可能含有用于编码 IFN-α、IFN-β 或二者复合结构的序列。编码合适的 FMDV 抗原的序列可包含于构建体中以应用于传统的 IFN 与 FMDV 抗原的合并给药，同时此序列也可以作为单独的构建体存在。这些抗原一般在本领域中是被熟知的。有效的重组疫苗的例证包括有，Grubman 等人描述的（U.S. Pat. No. 5,824,316）去除了口蹄疫病毒的前导肽，以及 Mason 等人描述的人工制备的无感染性的 FMDV。无感染性的病毒是一种突变病毒体，其 VP1 区上的 G-H 环结构中的氨基酸序列 GVRGDF 被去除并为氨基酸序列 NP 所取代。作为选择，该疫苗可以是含有 IFN 的载体与有效的 FMD 疫苗的混合物，也可以作为单独的构建体用于传统给药。

可通过肌肉内、皮内、皮下或鼻内的接种或注射等方法将疫苗给药于动物，该给药量应有效地使该疫苗表达足够的 IFN 以产生抗病毒活性并保护动物免受 FMDV 的致命株的侵染。给药量可根据被接种动物的情况来变化，并且考虑动物的个体大小和重量以及 IFN 的类型。举例说明，用于接种猪的有效量大约为 10^8-10^{10} pfu Ad5-IFN，优选的大约为 10^8-10^9 pfu Ad5-IFN。对牛来说，有效量大约为 10^9-10^{10} pfu Ad5-IFN。如有必要，本领域技术人员可根据下文特定实施例 1-14 中提供的指导来实验测定该有效量。

可通过将 IFN-α 或 IFN-β 的 cDNA 构建体插入到有效的载体中来制备一种含有 IFN 的重组疫苗。插入的构建体中还可包括 FMDV 抗原的编码序列。用于在体内递送遗传物质的有效系统为本领域技术人员所熟知，此外这些系统可包括一些病毒和非病毒转移方法（例如 Ricigliano，同上）。本领域中已经广泛公布了病毒基因转移载体的

应用，包括腺病毒的应用、腺伴随病毒的应用、细小病毒的应用、牛痘病毒的应用、疱疹病毒的应用、痘病毒的应用、脊髓灰质炎病毒的应用和许多逆转录病毒的应用。尽管任意已知的载体都可有效用于IFN的递送，但是为了实验目的而仅将文中描述的腺病毒载体（Ad5）作为实例给出。

此外，本发明的疫苗还应包括在生理相容性载体中含有编码 IFN 的构建体，以及如果需要，含有编码 FMDV 抗原的构建体。作为选择，该疫苗还可以是一种含有 IFN 的编码序列的构建体与一种已知有效的 FMDV 疫苗的混合物。

含有 IFN 的疫苗可根据已知的重组技术来制备。首先，克隆合适的 IFN 基因，然后将其插入到所选载体中。为了给本领域技术人员提供指导，文中给出了一些特定实施例。合适的 IFN 基因是从任意 FMD 易感动物中获得的 I 型 IFN α/β，此类动物包括任意的偶蹄目动物，例如猪、牛和羊。此疫苗产生迅速，可在短期内防御 FMD 和其它病毒试剂。通过将含有 IFN 的疫苗和熟知的传统 FMD 疫苗合并给药，可获得长期和短期的保护作用。

通过直接连接可以将猪的 IFN α 或 IFN β 的 cDNA 插入到复制缺陷型人 5 型腺病毒（Ad5）基因组的 E1 区，并且利用嵌合 DNA 转染可表达 E1 功能区的 293 细胞以产生在实施例 1-5 中所描述的重组腺病毒 Ad5-pIFNα 或 Ad5-pIFNβ。

当用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）和考马斯蓝染色进行检测时，在不支持复制缺陷型腺病毒生产性复制的转染了 Ad5-pIFNα 或 Ad5-pIFNβ 的猪肾脏细胞系（IBRS2）中，两种 IFN 分子均具有高水平的表达。使用兔抗猪 IFN α 或 IFN β 抗体进行放射免疫沉淀测定可确定反应的特异性。用 FMDV 病毒斑减少试验可测定 Ad5-pIFNα 转染的 IBRS2 细胞的上清液对同源细胞提供了超过 10^5 个单位的抗病毒活性。以 10^8 或 10^9 pfu Ad5-pIFNα 对猪进行肌肉内接种，在最初的检测时间，即接种后 16 小时后，可在血样中检测到大于约 400 个单位的抗病毒活性。

试验结果证明，接种 Ad5-pIFNα 可以迅速地使猪免受 FMD 的侵染（见实施例 8）。此外，已证实高剂量的 Ad5-pIFNα 接种后产生的

抗病毒活性至少会维持 5 天，这一数据暗示至少在此周期内动物可以免受病毒的侵染。

以下提供的实施例仅作为本发明的进一步说明，而不意味着本发明局限于权利要求所定义的范围。

文中引用的所有文献都在此完整引入作为参考。

实施例

实施例 1 细菌株和哺乳动物细胞系

在电感受态细胞（Invitrogen One Shot TOP10 Electrocomp™ 细胞， Invitrogen， Carlsbad, CA, USA）中扩增腺病毒质粒和 pAd-Blue（Moraes 等, 2001. BioTechniques. Vol. 31, pp. 1050-1056）。在化学感受态细胞 TOP10 细胞（Invitrogen One Shot TOP10， 同上）中培养其它载体。在 pAd-Blue 载体的设计之前，按照制造商的方案（Quantum Biotechnologies, Montreal, Canada）在感受态 BJ5183 细胞中用同源重组方法构建含有外源基因的前载体。

在 293 细胞（Graham 等, 同上）中培养并纯化来自 pAd-Blue 载体的重组腺病毒。含有 VSV-NJ 糖蛋白基因的质粒（pCR-Blunt II-TOPO-VSV G）由 Luis Rodriguez 博士提供。

实施例 2 I 类干扰素基因的克隆

利用基于有效的 Genebank 序列设计的引物，分别地以来自于猪肾脏细胞（EK）和胎牛肾脏细胞的 DNA（由于 IFN 不含有内含子）和 cDNA 对猪和牛的 IFN α和 IFN β基因进行扩增。该 5'引物含有 IFN 的分泌信号序列，而 3'引物含有一个后续有 BamHI 限制性酶切位点的终止密码子。以 pfu 聚合酶和合适的引物（表 1）进行 25 个循环的聚合酶链式反应（PCR）对基因进行扩增。将 PCR 产物（平末端）连接于线性化的 PCR-BluntII-TOPO 上，并转染到 TOP10 细胞中。通过限制性内切酶消化对克隆进行检测，并对含有合适大小的插入序列的克隆进行测序（图 1-4）。由于所有检测的动物种类均含有大量的 IFN-α 亚科，而且猪和牛都含有至少 5 种相互关连的 IFN-β 基因（Vilcek and Sen， 同上），因而可获得多于一种的 IFN-α 基因和 IFN-β 基因

的克隆。图 1-4 的 IFN 序列对用于生产重组腺病毒（见实施例 4）的基因进行了描述。重组腺病毒 Ad5-pIFNα 7.6.3 来源于图.1a 中的序列（SEQ ID NO: 1），Ad5-pIFNα 9.9.6 来源于图.1b 中的序列（SEQ ID NO: 2），Ad5-pIFNβ 1.4.6 来源于图.2 中的序列（SEQ ID NO: 3），Ad5-bIFNα 9.2.2 来源于图.3 中的序列（SEQ ID NO: 4），而 Ad5-bIFNβ 5.3.1 来源于图.4 中的序列（SEQ ID NO: 5）。

实施例 3 含有 IFN 的质粒的表达

用不同的限制性内切酶对含有猪的 IFN-α 克隆 7 和 9 的质粒进行消化，并将其连接到用同样的内切酶消化的 pBluescript II KS+（pKSII）（Stratagene, LaJolla, CA）中。在一种体外的转录/翻译系统（TNT kit, Promega, Madison, WI）中，通过放射性标记对按正确方向连接的克隆进行检测以用于表达。用多克隆血清对体外表达的 IFN 进行免疫沉淀反应并用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）进行分析。对于猪的 IFN α 和 IFN β 均可发现一条相应条带（结果未给出）。用在一种大肠杆菌系统（Chinsangaram 等, 2001 同上）中先期表达的 IFNs 来制备兔抗猪和牛的 IFNs 的抗血清。

用 EcoRI 和 BamHI 对含有牛 IFN-α 克隆 8 和 9（图 3）及含有牛 IFN-β 克隆 5（图 4）的质粒进行消化，并将其连接到用同样的内切酶消化的 pKS II。用在前文描述过的用于在体外检测猪 IFN 基因.的 TNT 系统对克隆进行检测以用于表达。所有被检测克隆在适宜的位置均可检测到单一的条带（结果未给出）。

表 1 用于扩增牛和猪 IFN 基因的探针

牛 IFN-α正向:	5' CCG ATG GCC CCA GCC TGG TCC (SEQ ID NO: 6)
牛 IFN-α反向:	5' GGA TGG ATC CTC AGT CCT TTC TCC TGA AWY TCT C (SEQ ID NO: 7)
牛 IFN-β正向:	5' CAT CAT GAC CYA CCG GTG CCT CCT CC (SEQ ID NO: 8)
牛 IFN-β反向:	5' GGA TGG ATC CTC AKT CAC GGA SGK AAC CTG TTA G (SEQ ID NO: 9)
猪 IFN-α正向:	5' ATG GCC CCA ACC TCA GCC (SEQ ID NO: 10)
猪 IFN-α反向:	5' TGG ATC CTC ACT CCT TCT TCC TCA GTC TGT C (SEQ ID NO: 11)
猪 IFN-β正向:	5' ATG GCT AAC AAG TGC ATC CTC (SEQ ID NO: 12)
猪 IFN-β反向:	5' GGA TGG ATC CTC AGT TCC GGA GGT AAT CTG TAA G (SEQ ID NO: 13)

K = T 和 G

S = G 和 C

W = A 和 T

Y = C 和 T

实施例 4 Ad5-IFN 载体的构建

现已开发了一套利用复制缺陷型人 5 型腺病毒作为载体的哺乳动物表达系统，即 pAd5-Blue（Moraes, 同上）。这种病毒含有 β-半乳糖苷酶的 α 片断。这种 pAd5-Blue 载体系统可使重组腺病毒在获得合适的外源插入基因后 3 周内进行传代。

用 ClaI/XbaI 将来自猪 IFN α 克隆 7 和 9（见图.1）、猪 IFN β 克隆 1（图.2）、牛 IFN α 克隆 9（图.3），以及牛 IFN β 克隆 5（图.4）的 IFN 基因由 pKSII 上切除，并将这些基因连接到 ClaI/XbaI 消化过并被碱性磷酸酶处理过的 pAd5-Blue 上。通过电穿孔使连接反应在

TOP10 细胞中进行，并在具有合适抗性的含有 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(XgaI)的琼脂平板上筛选出白色克隆。用 HindIII 消化 DNA，并通过琼脂糖凝胶电泳验证构建体中 IFN 基因的存在。将能够在平板上生长并在 HindIII 酶切后具有合适大小基因片断的 pAd5-IFN 载体的 1-2 个克隆进行大规模制备，并通过 CsCl 离心纯化质粒 DNA。

用 PacI 线性化纯化后的 DNA，并通过 $CaPO_4$ 沉降法（Moraes, 同上）将质粒转染到 293 细胞中。每日对细胞进行检测，挑选细胞斑并在 150mm 的培养瓶中对 293 细胞进行感染以进行扩增。根据 Moraes（同上）的描述，由于致细胞病变效应的发展，在感染 2-3 天后病毒将会被分离。提取病毒 DNA 并通过 HindIII 对其进行消化检测以确认合适基因片断的存在。预加工的病毒（Ad5-pIFNα，Ad5-pIFNα，Ad5-pIFNβ，Ad5-bIFNα 和 Ad5-bIFNβ）代表了一些高效价的粗制品，可用来制备大量的病毒，这些病毒可通过连续的 CsCl 梯度离心及之后的非连续的 CsCl 梯度离心得到纯化。通过半数组织培养感染量检测（$TCID_{50}$）方法在 293 细胞中确定病毒的效价，其效价大约为 10^{10} pfu/ml（转化为 pfu 计量的效价后）。

用类似的方案来制备绵羊的 Ad5-IFN 载体（Ad5-oIFNα 和 Ad5-oIFNβ）。

实施例 5 IFN 在哺乳动物细胞中的表达

在 IBRS2 细胞中对 Ad5-pIFNs 进行检测以用于表达，该细胞系对于复制缺陷型的 Ad5 的侵染是敏感的，而对可进行生产性复制的 Ad5 不敏感。在病毒侵染后（Chinsangaram 等, 2001, 同上），IBRS2 细胞不能产生 I 型 IFN 基因的 mRNAs，因此可检测到 IFN 应是 Ad5 侵染的一种结果。在转染后的多个时段用 [^{35}S] 蛋氨酸对细胞进行 1 小时的放射性标记，并用适当的多克隆兔抗体对上清液（S）和细胞溶解物（P）进行免疫沉淀反应，再通过 PAGE 进行检测。如在 Ad5-pIFNα9.9.6 侵染的细胞所显示的结果中，最早发现上清中出现 pIFN-α 是在侵染后 4.5 小时（hpi），并且在 6、25 和 30hpi 也发现了 IFN（图 5）。IFN-α 的表达量比体外翻译的 IFN 的量大（泳道 c1 和 c2），这可能是因为体内的 IFN-α 被糖基化的缘故。由于表达的 IFN 含有

一个信号序列并会为细胞分泌，因此认为在细胞的上清液中应该可以检测到 IFN。用 Ad5-pIFNα 7.6.3 和 Ad5-pIFNβ 1.4.6 感染的细胞进行实验也可得到类似的结果（结果未给出）。这些结果证明了 IFN 的表达开始于 4.5hpi 或更早的时段，并且表达至少可以持续到 30hpi。

同样采用 PAGE 分析和考马斯兰染色的方法对转染后.未标记的 IBRS2 细胞中的 IFN 的表达水平进行监控。表达分析系统中还包括适当的对照，其中包括假转染细胞和其它 Ad 载体（Ad5-FMDV A24）侵染的细胞。在 Ad5-pIFNα 7.6.3 转染细胞的第 4hpi 刚刚能够发现 IFN 条带的迁移滞后于大肠杆菌中 pIFN-α 条带的迁移的现象，在第 6hpi 此现象变得明显起来（图 6）。在假转染细胞和 Ad5-FMDVA24 侵染的细胞中观测不到可供比较的条带（泳道 1 和 2）。在第 25 和第 30hpi. 可检测到两条不同的对应于 pIFN-α 分子量的条带，这可能是由于不同水平糖基化（IFN-α 克隆 7.6.3 含有一个潜在的糖基化位点）的缘故。在 Ad5-pIFNα9.9.6 转染的 IBR2 细胞中也可发现相似的 IFN-α 表达的动力学，尽管最早在第 2hpi 即可检测到 IFN 的表达（结果未给出）。在 Ad5-pIFNβ 1.4.6 感染的细胞中最早可在第 4.5hpi.检测到一条宽的条带，这可能是蛋白不同水平糖基化的反映（pIFN-β 克隆 1.4.6 含有两个潜在的糖基化位点）。初步分析表明每 1 ml 的上清液可生产大约 25μg 的 pIFN-α。而 pIFN-β 的产量要少一些（结果未给出）。

用 Ad5-bIFNα9.2.2 和 Ad5-bIFNβ5.3.1 对 IBRS2 细胞进行转染以用于牛 IFN-α 和 IFN-β 基因的表达，并且在转染后多个时段用[^{35}S] 蛋氨酸对细胞进行 1 小时的放射性标记。用 PAGE 方法和使用兔抗牛 IFN-α 和 IFN-β 的多克隆抗血清进行的免疫沉淀反应直接检测上清液和细胞溶解物。在第 23hpi 可发现蛋白的表达（在第 5hpi.有很低水平的表达），蛋白表达可持续至少 48 小时（图 7）。牛 IFN-α 的免疫沉淀反应的结果显示为单一条带，而牛 IFN-β 的免疫沉淀反应的结果显示为多条条带，这可能表明在 IFN-β 中存在多种水平的糖基化（结果未显示）。此外，还利用 PAGE 分析方法和考马思兰染色方法对转染的 IBRS2 的上清液中的蛋白表达情况进行监控。最早在第 5hpi 观察到 bIFN-α 的相应条带，而在第 23hpi 可检测到显著水平的表达。初步分析表明每 1ml 的上清液可生产大约 12-25μg 的 bIFN-α 和 5μg

的 pIFN-β。

实施例 6 转染细胞中由 IFN-α 和 IFN-β 所诱导的抗病毒活性

为了证实 pIFN-α 和 pIFN-β 的抗病毒活性，用 Centricon 100 滤器对来自于 Ad5-pIFNα 7.6.3、Ad5-pIFNα 9.9.6 和 Ad5-pIFNβ 1.4.6 转染的 IBRS2 细胞的上清液进行过滤以去除大部分残余的 Ad5 疫苗（这一程序可去除 10^4-10^5 pfu 的病毒），在 PH 2 的条件下对上清液进行过夜处理（这一程序可灭活 10^2-10^3 pfu 的病毒），并对上清液进行中和以去除更多的 Ad5 疫苗。对带有 A12 类 FMDV 的 IBRS2 细胞进行病毒斑减少试验以鉴定上清液的抗病毒生物活性（Chinsangaram 等，1999，同上）。最早可在第 2-4hpi.检测到 Ad5-pIFNα 7.6.3、Ad5-pIFNα 9.9.6 和 Ad5-pIFNβ 1.4.6 转染细胞的上清液中的抗病毒活性，并且在第 25hpi.可检测到 64-256,000 单位的抗病毒活性（表 2）。将 Ad5-FMDV A24 转染的 IBRS2 细胞（第 24hpi）和假转染的细胞的上清液作为对照，在其上清中没有检测到抗病毒活性（结果未给出）。

在 IBRS2 细胞和 MDBK 细胞（一种牛的细胞系）中对 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-pIFN-β 转染的 IBRS2 细胞的上清液进行鉴定。如表 3 所显示，在猪和牛的细胞系中，含有 pIFN-α 和 pIFN-β 的上清液具有同等的抗病毒活性。由 pIFN-β 诱导的抗病毒活性低于 pIFN-α，这可能是由于 pIFN-β 的低水平表达所致。

表 2 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-pIFN-β 转染的 IBRS2 细胞的上清液[a]中的抗病毒活性

感染后时间（小时）	Ad5－载体		
	Ad5-pINFα7.6.3	Ad5-pIFNα9.9.6	Ad5-pIFNβ1.4.6
1	<50[b]	<50	<50
2	<50	<50	<50
4	800	400	200
6	3200	3200	1600
25	256,000	128,000	64,000

[a]用 Centricon 100 滤器对上清液进行离心，在 pH 2 的条件下对上清液进行处理并对其进行中和，鉴定上清液的抗病毒活性。

[b]可使 IBRS2 细胞的 FMDV 病毒斑的数目降低到原有的 50％的最高稀释度。

表 3 在猪和牛的细胞系中，Ad5-pIFN-α 和 Ad5-pIFN-β 转染的 IBRS2 细胞的上清液[a]中的抗病毒活性。

感染后时间（小时）	Ad5－载体			
	Ad5-pINFα7.6.3		Ad5-pIFNβ1.4.6	
	细胞类型		细胞类型	
	IBRS2[b]	MDBK[c]	IBRS2	MDBK
1	<50	<50	<50	<50
2	<50	<50	<50	<50
4	800	400	200	100
6	3200	3200	1600	400
25	256,000	128,000	64,000	32,000

[a]用 Centricon 100 滤器对上清液进行离心，在 PH 2 的条件下对上清液进行处理并对其进行中和，鉴定上清液的抗病毒活性。

[b]可使 FMDV A12 病毒斑的数目降低到原有的 50％的最高稀释度。

[c]可使 VSV-NJ 病毒斑的数目降低到原有的 50％的最高稀释度。

采用上文中描述的方法对 Ad5-bIFNα 9.2.2 和 Ad5-bIFNβ 5.3.1 转染的 IBRS2 细胞的上清液进行处理以去除所有残余的 Ad5 来证实 pIFN-α 和 pIFN-β 的抗病毒活性。在 MDBK 和 IBRS2 细胞中对处理后的上清液进行抗病毒活性检测。在第 5hpi 时检测到抗病毒活性，而在第 28-48hpi.抗病毒活性可到达大约 204,000 单位/ml 的水平（表 4）。如表中所证实，bIFN-α 在牛和猪的细胞中具有同等的生理活性，而 bIFN-β 仅在牛的细胞中具有活性（Chinsangaram, 1999, 同上）。

表 4 牛和猪的细胞中 Ad5-bIFNα 和 Ad5-bIFNβ 感染的 IBRS2 细胞上清液的抗病毒活性。

感染后时间（小时）	Ad5－载体			
	Ad5-bINFα9.2.2		Ad5-bIFNβ5.1.3	
	细胞类型		细胞类型	
	MDBK[b]	IBRS2[c]	MDBK	IBRS2
1	<50	<50	50	<50
5	3200	6400	12,800	<50
23	51,200	>51,200	204,800	<50
28	102,400	>102,000	204,800	<50
48	204,800	204,000	51,200	100

[a]用 Centricon 100 滤器对上清液进行离心，在 PH 2 的条件下对上清液进行处理并对其进行中和，鉴定上清液的抗病毒活性。

[b]可使 VSV-NJ 病毒斑的数目降低到原有的 50％的最高稀释度。

[c]可使 FMDV A12 病毒斑的数目降低到原有的 50％的最高稀释度。

实施例 7 猪体内 IFN 的表达：安全性和效力测试

对接种 Ad5-pIFNα 7.6.3 的猪进行剂量-效应试验以验证在接种动物体内是否可以检测到具有生理活性的 IFN。用 10^7、10^8 或 10^9 pfu Ad5-pIFNα 7.6.3 对猪进行肌肉内（IM）接种（每只对应一种剂量），而用 10^8 pfu Ad5-VSVG（含有水泡性口炎病毒基因的腺病毒，Moraes, 同上）对另外的动物进行肌肉内接种。检测 IFN 给药后对动物的有害影响.，并每日测量动物的体温。在第 16、18、20 和 22hpi.提取血样，而在此后的 6 天内每日提取一次。用病毒斑减少试验检验抗病毒活性（Chinsangaram, 1999, 同上）。

在接种后没有发现任何动物出现有害的临床表征，也没有发现接种动物体温升高现象。Ad5-VSVG 接种的动物和 10^7 pfu Ad5-pIFNα 接种的动物均没有产生抗病毒能力。在最早的检测期，例如第 16hpi，以 10^8 或 10^9 pfu Ad5-pIFNα 接种的动物均产生抗病毒能力。在第

16hpi.，以 10^9 pfu Ad5-pIFNα 接种的动物的血样中具有 400 单位/ml 的抗病毒活性，并且活性可至少维持该水平达两天。随时间推进抗病毒活性有所降低，但仍可在第 4dpi.检测到该活性。

实施例 8 接种 Ad5-pIFN-α 的猪对 FMDV 侵染的防御

将几组猪（每组 3 头）关在单独的房间内，对第 2 和 3 试验组采用 10^8 或 10^9 pfu Ad5-pIFN-α7.6.3 的肌肉内注射，而对第 1 试验组采用 10^9 pfu Ad5-Blue 的肌肉内注射以作为对照组。接种一天后，在动物左前足的足管处直接接种 3×10^5 倍的半数牛感染剂量（BID_{50}）的 FMDV A24 以感染动物。对动物进行 FMD 侵染后临床表征的检测，这些表征包括发热、病毒血征、直至侵染后 14 天（dpc）的 FMDV 特异性抗体的诱发现象以及接种后 7 天内（dpi）的抗病毒活性。

表 5 试验设计

组号	动物编号	接种 [a]	侵染 [b]
#1 Ad5-Blue	304-12, 305-2, 305-3	10^9pfu Ad5-Blue	$3x10^5$ BID_{50}
#2 低剂量	186-1, 199-2, 501-3	10^8pfu Ad5-pIFNα7.6.3	$3x10^5$ BID_{50}
#3 高剂量	3-1, 3-2, 7-7	10^9pfu Ad5-pIFNα7.6.3	$3x10^5$ BID_{50}
#4 Ad5-Blue	367-1, 368-1, 402-1	10^9pfu Ad5-Blue	未侵染
#5 低剂量	204-1, 208-6, 365-4	10^8pfu Ad5-pIFNα7.6.3	未侵染
#6 高剂量	202-4, 202-6, 203-3	10^9pfu Ad5-pIFNα7.6.3	未侵染

[a] 用表中指示剂量的 Ad5-载体对猪进行肌肉内接种

[b] 在用 Ad5-载体对猪进行给药后，以表中指示剂量的 FMDV A24 在动物左前足的足管处直接接种

如上图中所示对另外 3 组相同的动物进行接种，但不对其进行

FMDV 的侵染（4-6 试验组）。对这些动物进行发热和抗病毒活性的监测。结果在图 8-13 中给出。

侵染后的临床反应：在第 2dpc，三只对照组动物中的两只，即#305-2 和 305-3，出现了泡状损伤，而在第 3dpc，所有的 3 只动物均出现了损伤现象（图 8）。所有的 3 只动物在 3dpc 均出现严重的症状。猪#305-2 在三天内持续发热（体温超过 104°F），而此组中另两只动物只在一天或两天内出现发热现象（结果未给出）。在以 10^8 pfu Ad5-pIFN-α 接种的第 2 组中，#501-3 在第 4dpc 显示出严重的 FMD 症状，猪#199-2 在第 5dpc 出现一处损伤并在第 7dpc 显示出严重的 FMD 症状，而猪#186-1 仅在第 8dpc 于左足背侧出现一处损伤（图 8）。在以 10^9 pfu Ad5-pIFN-α 接种的第 3 试验组中，在整个试验过程中，即侵染后 14 天内，没有发现任何动物出现任何的 FMD 症状。第 3 组中的猪#7-7 在第 12 天（侵染后）死亡。尸检结果显示没有出现 FMD 感染的症状，并且通过在 BHK 细胞上进行的滴定检测也没有在咽扁桃体、心、肺、左前囊淋巴结或血中发现 FMDV。该死亡动物出现了可能由回肠穿孔所导致的严重的腹膜炎症状。

血清学分析：第 1dpc，可在对照组，即第 1 试验组的所有动物中检测到病毒血征，此现象可持续至第 3dpc 并达到 10^4-10^5 的滴度（图 9）。在第 4dpc，这些动物体内会发生 FMDV 特异性中和抗体的应答。第 2 组中编号为#501-3 的猪仅可在第 1dpi(-1dpc)检测到 100 单位的抗病毒活性，在第 2dpc 出现病毒血征，并且在第 4dpc 出现损伤现象（图 10A 和 11）。编号为#199-2 的猪可在第 1dpi（-1 dpc）检测抗病毒活性，该活性可在之后的一天内持续。该动物在第 5dpc 出现病毒血征并持续 2 天，在第 5dpc 出现一处损伤，并且在 7dpc 时病变进一步恶化。编号为#186-2 的猪可在第 1dpi（-1dpc）检测抗病毒活性，活性在之后一天内持续。该动物没有出现病毒血征，但在第 8dpc 出现一处损伤并在第 7dpc 产生 FMDV 特异性中和抗体的应答。

第 3 试验组的动物在第 1dpi 可检测到 400 单位的高水平的抗病毒活性，并且在之后的 2-3 天内也可检测到此活性（图 10C 和 12）。该组中所有动物均受到彻底的保护作用以免受 FMDV 的侵染。并且该组中无任何动物出现病毒血征。

在没有进行 FMDV 侵染的第 5 和第 6 试验组动物中，通常可产生更高水平的抗病毒活性，该活性可较 FMDV 侵染的同等动物多持续 1-2 天（图 10B 和 10D）。在 Ad5-Blue 接种的作为对照的第 4 试验组中没有检测到抗病毒活性（结果未给出）。第 5 和第 6 组动物都出现持续 2-3 天的发热现象，动物的体温可恢复正常并且动物没有出现其它有害的临床症状（结果未给出）。

用 RIP 方法对来自 1-3 试验组动物的第 4dpc 的血清进行检测，通过对血清中的抗病毒结构蛋白和非结构（NS）蛋白的抗体的存在度的鉴定来证明 IFN 治疗是否可以阻断侵染病毒的复制过程。如来自于感染动物中的血清具有和病毒 NS 蛋白发生免疫沉淀反应的能力，则可证明在该动物体内病毒进行了复制（图 13，9-11 泳道）。与预期一致，第 1 试验组中 3 只动物的血清中均含有抗病毒结构蛋白和 NS 蛋白的抗体。同样地，第 2 试验组中所有动物也都产生了抗病毒结构蛋白和 NS 蛋白的抗体（6-8 泳道）。相反地，在未出现临床症状和病毒血征的第 3 试验组所有动物的血清中都没有产生抗病毒 NS 蛋白的抗体，通过该检测可证明该组中所有动物均受到彻底的保护以阻止 FMDV 的复制(3-5 泳道)。上述动物血清的 3 个 ABC ELISA 检测结果也证实在第 3 试验组中的动物体内没有出现病毒的复制。

实施例 9 用 Ad5-pIFN-α 接种的猪对 FMDV 侵染的防御作用的持久性

实施例 8 中描述的试验证明了在以 10^9pfuAd5-pIFN-α 给药一天后，猪得到了彻底的保护以防御致命的 FMDV A24 的侵染。为证实在接种 Ad5-pIFN-α 多久后动物才可防止临床症状的产生以及已感染的动物能否通过侵染一天后的 Ad5-pIFN-α 给药来防止病毒血征和疾病临床症状的产生，将 10^9pfu pfuAd5-pIFNα7.6.3 对各组动物（3 只/组）进行给药并且在 Ad5-pIFNα 给药前一天以 3.5×10^5 BID_{50} FMDV A24 在 1、3、5 和 7dpi 时在动物左后足（50μl/趾）进行侵染（表 6）。结果在图 14-20 中显示。

与上文中描述的试验一样，将各组动物在分别的房间进行饲养，临床监测 IFN 给药对动物所产生的有害反应症状，例如发热和嗜眠，

并临床监测动物血中的抗病毒活性。FMDV 侵染后，在 14 天内对动物的疾病病征进行检测，这些病征包括体温和损伤，以及病毒血征、FMDV 特异性抗体的应答和抗病毒活性。

表 6 试验设计：保护作用的持久性

组号	动物编号	接种 [a]	接种日期	侵染 [b]
# 1 对照	61-6, 66-11, 69-11	10^9 pfu Ad5-VSVG	7 天 侵染前	$3x10^5$ BID_{50}
# 2 IFN-α	70-4, 70-5, 70-6	10^9 pfu Ad5-pIFNα7.6.3	7 天 侵染前	$3x10^5$ BID_{50}
# 3 IFN-α	70-7, 70-8, 71-4	10^9 pfu Ad5-pIFNα7.6.3	5 天 侵染前	$3x10^5$ BID_{50}
# 4 IFN-α	337-3, 338-6, 342-6	10^9 pfu Ad5-pIFNα7.6.3	3 天 侵染前	$3x10^5$ BID_{50}
# 5 IFN-α	333-4, 335-9, 335-11	10^9 pfu Ad5-pIFNα7.6.3	1 天 侵染前	$3x10^5$ BID_{50}
# 6 IFN-α	81-6, 81-10, 308-9	10^9 pfu Ad5-pIFNα7.6.3	1 天 侵染前	$3x10^5$ BID_{50}

[a] 以表中显示剂量对猪进行肌肉内接种

[b] 以图中所示剂量的 FMDV A24 在 Ad5-载体给药后 7 天（#1 和 #2）、5 天（#3）、3 天（#4）和 1 天（#5）或在 Ad5-载体给药前一天（#6）在动物左前足足管处对各组动物进行侵染。

在侵染前对抗病毒反应进行检测，可发现所有接种 Ad5-pIFN-α 的动物在接种后 1 天均产生了高水平的抗病毒活性，即 200-800 单位/ml（图 14-19，图 A）。该活性在第 2 天时有所衰退但通常在此后两天内仍可维持大约 100 单位/ml 的水平。在接种后 3-5 天仍可检测到抗病毒活性。除了第 2 试验组动物以外，该组动物在接种后 5-6 天出现发热现象，接种了 Ad5-pIFN-α 的动物一般不会出现体温升高的现象（结果未给出）。用致命的 FMDV 对接种 Ad5-pIFN-α 后 1 天的动物组（第 6 试验组）进行直接侵染，可在编号为#81-6 和#308-9 的的

动物体内检测到高水平的抗病毒活性，而在#81-10 动物体内检测不到（图 19，图 A）。一些动物（第 2 组中#70-4 和#70-5，第 3 组中#71-4）在 Ad5-pIFN-α 接种后出现发热现象和轻微的嗜睡现象，但这些病征只持续了 1-2 天。

在侵染后的病毒血征和临床反应方面，对照组中的所有 3 只动物都在第 1dpc 出现病毒血征，并且在第二天出现损伤（图 14，组 B 和 C）。病毒血征可在 4 天内被检测到，其滴度为 9×10^5-3.1×10^7pfu/ml。3 天内所有对照组中的动物都产生严重的临床症状。该组中#69-8 动物在 3 天内持续发热，而组中另两只动物只在一天内出现发热现象。对照组动物#611-6 在 5dpc 时死亡，而#69-8 在 8dpc 时死亡。基于尸检结果的组织病理学结论证实#611-6 和#69-8 动物均出现了典型的 FMD 型心脏损伤，引起两只动物死亡的最可能原因是心肌的坏死。

在侵染前 7 天接受 Ad5-pIFN-α 的试验组在侵染当天没有检测到循环抗病毒活性（图 14，组 A）。该试验组在第 2dpc 时具有病毒血征，比对照组晚一天（图 15，组 B）。病毒滴度为 $1.9x10^4$-$9.1x10^4$pfu/ml，比对照组低 1-3 个对数值。在第 4dpc，该试验组中每三只动物就有两只产生损伤，而第三只动物在第 5 天出现损伤（图 15，组 C）。该试验组的所有动物都出现持续 1-2 天的发热征状。#70-5 动物在第 12dpc 死亡。在其组织病理学报告中发现脑干脓肿、甲状腺脓肿和肺脓肿，并且引起死亡的最可能的原因是与 FMD 无关的脑脓肿和脑肿胀。

第 3 试验组的所有动物在侵染当天可检测到 25-50 单位/ml 的低抗病毒活性（图 16，组 A）。动物在第 7dpc 发现病毒血征并在第 8dpc 出现损伤（图 16，组 B 和 C）。动物在第 7dpc 发现病毒血征并在第 8dpc 出现损伤（图 16，组 B 和 C）。在第 8 和第 9dpc 将产生病毒血征的#70-7 和#71-4 动物分别转移到单独的房间。#70-8 动物即使暴露性地与临床病变动物直接接触也可以至少在两天内不出现病毒血征和损伤现象。

在侵染前 3 天和前 1 天接受 Ad5-pIFN-α 的第 4 和第 5 试验组的所有动物在侵染当天分别具有抗病毒活性（图 17 和 18，组 A）。第 4 试验组动物在侵染后一天可检测到抗病毒活性，而第 5 试验组动物

在侵染后两天内可检测到抗病毒活性。上述两组试验动物即使在进行了 3 次血液盲目传代后的 BHK 细胞中也检测不到病毒血征，并且也检测不到任何疾病的临床病征（图 16 和 18，组 B 和 C）。

第 1dpc 接受 Ad5-pIFN-α 的第 6 试验组的所有动物在一天后出现病毒血征（图 19，组 B）。然而#81-6 动物的最大病毒滴度只有 $7x10^1$pfu/ml。该动物即使暴露地与两只被感染动物接触也至少可以在 7 天内不出现临床病征。但是，#81-6 动物在侵染后第 9 天死亡。在其组织病理学报告发现严重的细菌性脑膜炎，并且引起死亡的最可能的原因是与 FMD 无关的由皮肤脓肿引起的通过血液散步的细菌性脑膜炎。

对上述所有动物的血清进行的鉴定，并且对第 14dpc 的动物血清对抗体的应答进行鉴定以验证血清学反应。第 1 和第 2 实验组的幸存动物均出现显著的 FMDV 特异性中和抗体的应答现象（图 14 和 15），并且都产生了抗病毒 NS 蛋白的抗体（图 20，泳道 3-5）。第 3 实验组的两只临床病变动物产生了抗病毒 NS 蛋白的抗体（图 20，泳道 6 和 8），而另一动物#70-8 没有出现临床病征和病毒血征，并且该动物只产生了抗病毒结构蛋白的抗体而没有产生抗病毒 NS 蛋白的抗体（图 20，泳道 7）。第 4 和第 5 实验组的动物没有出现临床病征和病毒血征，只产生了低水平的抗病毒结构蛋白的抗体而没有产生抗病毒 NS 蛋白的抗体（图 20，泳道 11-16）。第 4 和第 5 实验组的动物血清在 3ABC ELISA 试验中呈阴性也可作为上述结果的支持。这些结果证明了上述动物可阻止病毒的复制。第 6 实验组的动物幸存动物产生了显著的 FMDV 特异性中和抗体的应答现象（图 19），并且产生了抗病毒 NS 蛋白的抗体。

实施例 10 进行 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-A24 合并给药的猪对 FMDV 的侵染的防御

在实施例 14 描述的试验中，在侵染前 1 或 3 天接受 Ad5-pIFN-α 的猪能够防御 FMD 的侵染。由于在侵染前接种 Ad5-pIFN-α 的猪可以受到彻底的保护，如猪#70-8，或可以较对照组中的猪晚 6-7 天出现病毒血征或临床病征，因此，可对猪的 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-FMDV

双接种的潜在性进行研究以作为一种方法，该方法能够在机体对疫苗中所采用的特定血清型 FMDV 的自适应免疫应答之前快速诱导出非特异的防御型抗病毒效应。

已经证实，包含有 FMDV 衣壳蛋白（P1）和 3C 蛋白酶编码区的 Ad5-FMDV 载体能够对猪进行保护以免受致命的 FMDV 的侵染(Mayr 等, 1999. Virology. vol. 2263, pp. 496-506; Mayr 等, 2001. Vaccine. vol. 19, pp. 2152-2162; Mayr 等, 2002. Vaccine. vol. 20, pp. 1631-1639）。因此，可以使用一种含有 A24 Cruziero 病毒株（Ad5-A24）的 P1 编码区的 Ad5-FMDV 载体，该病毒株来自巴西。早在接受该载体一次接种后 7 天，猪即可受到保护以防御同源病毒的直接接种侵染(Moraes 等, 2002, 同上）。

在本试验中，以 Ad5-VSVG（第 1 组）、Ad5-A24（第 2 组）、Ad5-pIFN-α（第 3 组）和 Ad5-A24 加 Ad5-pIFN-α（第 4 组）对试验组动物进行接种（表 7）。5 天后在动物脚垫处以 $3.5x10^5$ BIC_{50} FMDV A24 对动物进行接种侵染。收集血浆、血清和全血样，并如实施例 9 中方法对其进行检测。另外化验鼻拭以监测病毒流出情况。此外还在实验的全程对动物进行临床监测。结果在图 21-25 中显示。

表 7 试验设计：Ad5-pIFN-α 和 Ad5-A24 的影响

组号	动物编号	接种 [a]	侵染 [b]
# 1 Ad5-VSVG	9987-9989	10^9 pfu	$3x10^5$ BID_{50}
#2 Ad5-A24	9981-9983	$5x10^9$ pfu	$3x10^5$ BID_{50}
#3 Ad5-pIFNα7.6.3	9975-9977	10^9 pfu	$3x10^5$ BID_{50}
#4 Ad5-pIFNα7.6.3+Ad5-A24	9972-9974	$6x10^9$ pfu	$3x10^5$ BID_{50}

[a] 以所示剂量 Ad5-载体对猪进行肌肉接种

[b] Ad5-载体给药后第 5 天，以所示剂量 FMDV A24 在动物左前足足管处对猪进行接种侵染

在接种后多个时段收集血浆以测定侵染前的抗病毒应答。接种了 Ad5-pIFN-α（第 3 组和第 4 组）的试验组中所有动物早在第 4dpc 就出现了抗病毒应答，该应答可持续大约 4-5 天（图 23 和 24）。最大

的活性可达 400-800 单位/ml。接受了不含 IFN-α 基因的 Ad5-载体的第 1 和第 2 试验组也在第 4dpc 产生了抗病毒应答，但应答只持续大约一天（图 21 和 22）。后两组接受了 5 倍于第 3 组的病毒侵染。

同样监测侵染后的病毒血征和临床反应。第 1 组（对照）中所有 3 只动物在第 1dpc 都出现了高水平的病毒血征，该组动物鼻拭在第 1dpc 显示 10^1-10^2pfu/ml 的低病毒滴度并在之后 2-3 天内维持该水平，并且动物在第 2dpc 出现损伤现象（图 21）。所有上述动物都出现了严重的疾病病征。动物在第 4dpc 血清转化。

在接受 Ad5-A24 的动物组中仅有#9983 动物出现了一天内的 10^2pfu/ml 的低水平病毒血征（图 22）。但是，该组中所有的 3 只动物的鼻拭都可在 1-2 天内检测到 10^1-10^2pfu/ml 的低水平病毒。可在 3-4dpc 检测到损伤，损伤较对照组晚出现 1-2 天，并且较对照组明显减轻。在侵染当天动物可产生低的，但可检测到的，FMDV 特异性中和抗体的应答。滴度由第 4dpc 起显著提高。

接受 Ad5-pIFN-α 单独给药（第 2 组）或接受 Ad5-pIFN-α 与 Ad5-A24 合并给药（第 4 组）的试验组动物均受到彻底的保护。这些组中 6 只动物中的 5 只在侵染当天产生抗病毒活性。第 4 组中的动物在第 4dpc 可产生低的，但可检测到的，FMDV 特异性中和抗体的应答，该应答由第 4dpc 起显著提升并在第 21dpc 保持高水平。

同时检测血清反应。测试第 14dpc 血清中的抗病毒结构蛋白的抗体和抗病毒 NS 蛋白的抗体。在全体出现临床疾病的第 1 和第 2 组的动物中都产生了抗病毒结构蛋白的抗体和抗病毒 NS 蛋白的抗体（图 25，泳道 3-8）。有趣地是，接受 Ad5-pIFN-α 与 Ad5-A24 合并给药的第 4 组动物比只单独接受 Ad5-pIFN-α 给药的第 3 组动物产生了更高水平的 FMDV 特异性中和抗体（图 23 和 24），并且第 4 试验组动物比第 3 试验组动物产生了更高水平的抗病毒结构蛋白的抗体（图 23，泳道 3-5[以两种载体接种]，泳道 6-8[只以 Ad5-pIFN-α 接种]）。来自于第 3 和第 4 组动物的血清在 3ABC ELISA 实验中均呈阴性，这可作为上述结果的实验支持。

实施例 11 Ad5-bIFN-α 和 Ad5-bIFN-β 在牛中的表达

对接种了 Ad5-bIFN-α 和 Ad5-bIFN-β 的牛进行剂量-反应实验。以 1、2.5 或 $5x10^9$pfu/ml 的每种病毒对牛进行肌肉内接种（每种剂量对应一只动物）。将另一动物作为对照用 $5x10^9$ pfu/ml Ad5-VSVG 进行接种。对动物进行监测以观察 IFN 给药所产生有害临床效应，并且每日提取动物体温。在 7 天内每日提取血样并监测血样中抗病毒活性，并且在第 0 和第 13dpc 采集血清样用以检验其中的 Ad5 特异性中和抗体的应答。

没有动物显示反常行为，并且也没有动物出现体温升高现象。在任何接种了病毒的动物中都监测不到抗病毒反应。所有动物都产生了显著的 Ad5 特异性中和抗体的应答，这一现象证实了上述动物都接触了重组病毒。

有许多种可能性可用来解释为何在牛中监测不到抗病毒活性，这些可能性包括在实验中所选用的猪和牛个体上的差异（35-40lbs 对 400-450lbs）、bIFNα 在牛中的表达要低于 pIFNα 在猪中的表达，以及在使用人 Ad5 病毒时牛的有效转染要低于猪的有效转染。

实施例 12 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-pIFN-β 在牛和猪中的表达

已证实 pIFN-α 和 pIFN-β 在牛细胞培养物中具有生物学活性（Chinsangaram 等, 2001, 同上，表 3）。因此，以不同剂量的两种病毒对猪和牛进行接种，并在 7dpi 中每天对动物进行监测并收集血样（表 8）。

以两种剂量的 Ad5-pIFN-α 接种的猪在 1-2 天内都出现发热现象。以高剂量接种的动物还出现嗜睡和进食困难。其余所有接种的猪或牛都没有出现行为异常和发热现象。

接受低剂量 Ad5-pIFN-α 的猪在第 1dpc 产生抗病毒反应并在之后的 3 天持续进行（表 8）。接受高剂量 Ad5-pIFN-α 的猪在第 1dpc 产生更强的抗病毒反应并在之后的 4 天持续进行。只有以高剂量 Ad5-pIFN-β 接种的猪产生抗病毒应答。在该动物中诱导出的抗病毒活性明显低于以高剂量 Ad5-pIFN-α 接种的动物中的抗病毒活性，并且活性只持续两天。Ad5-pIFN-β 侵染的猪所诱导的抗病毒活性要低于

Ad5-pIFN-α 侵染的猪所诱导的抗病毒活性，这可能是在侵染的 IBRS2 细胞中 pIFN-β 的表达要低于 pIFN-α 的表达所致（参见实施例 5）。

表 8 实验设计：在猪和牛中 Ad5-pIFN-α 和 Ad5-pIFN-β 的剂量-效应

接种[a]	剂量	物种	抗病毒活性[b]							
			0 dpi	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi
Ad5-VSVG	$5x10^9$ pfu	猪	<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND[c]	ND
		牛	<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND	ND
Ad5-pIFNα7.6.3	$1x10^9$ pfu	猪	<25	400	200	100	25	<25	ND	ND
	$5x10^9$ pfu		<25	800	800	400	100	25	25	<25
	$1x10^9$ pfu	牛	<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND	ND
	$5x10^9$ pfu		<25	50	<25	<25	<25	<25	ND	ND
Ad5-pIFNβ1.4.6	$1x10^9$ pfu	猪	<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND	ND
	$5x10^9$ pfu		<25	200	100	<25	25	<25	ND	ND
	$1x10^9$ pfu	牛	<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND	ND
	$5x10^9$ pfu		<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND	ND

[a] 以 1ml 所示剂量的 Ad5-载体在颈部对动物进行肌肉内接种

[b] 使 IBRS2 细胞中 FMDV A12 病毒斑的数目降至原 50%的最高稀释度

[c] 未做

只有以高剂量 Ad5-pIFN-β 接种的牛产生抗病毒应答。该应答明显低于以同等剂量的其他载体接种的猪，并且应答之维持一天。上述结果暗示 IFN 治疗的效力与接种体的剂量和被接种动物的大小是相关的。此外，在猪中人 Ad5 病毒的结合可能比在牛中的更为有效。

实施例 13 Ad5-bIFN-α 和 Ad5-bIFN-β 的表达

前文显示，bIFN-β 在牛和猪的细胞培养物中均具有生物学活性，而 bIFN-α 只在牛的细胞系中具有生物学活性（Chinsangaram 等，2001，同上，表 4）。以不同剂量的 Ad5-bIFN 对猪进行接种以鉴定该病毒是否能够诱导猪的抗病毒反应（表 9）。对动物进行监测，并且在适宜的细胞系中对血样进行检测以观察抗病毒反应。

以 1 或 $5x10^9$pfuAd5-bIFN-α 接种的猪在第 1dpc 产生抗病毒应答。以较高剂量接种的动物具有相对高的活性，但在各病例中都只能在 1 天内检测到抗病毒活性。以 1 或 $5x10^9$pfuAd5-bIFN-β 接种的猪在第 1dpc 产生抗病毒应答。以低剂量接种的动物在之后 3 天内可检测到活性，而以高剂量接种的动物在之后 4 天内可检测到活性。

表 9 实验设计：Ad5-bIFN-α 和 Ad5-bIFN-β 在猪中的剂量-效应

接种[a]	剂量	抗病毒活性[b]							
		0 dpi	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi
Ad5-Blue	$5x10^9$ pfu	<25	<25	<25	<25	<25	<25	ND[c]	ND
Ad5-bIFNα9.2.2	$1x10^9$ pfu	<25	50	<25	<25	<25	<25	ND	ND
	$5x10^9$ pfu	<25	100	<25	<25	<25	<25	ND	ND
Ad5-bIFNβ5.3.1	$1x10^9$ pfu	25	400	200	50	25	<25	ND	ND
	$1x10^9$ pfu	<25	400	200	50	50	25	ND	ND

[a] 以所示剂量 1mlAd5-载体在脖颈处对动物进行肌肉内接种

[b] 使接种 Ad5-bIFN-α 的动物 IBRS2 细胞中 FMDV A12 病毒斑的数目降至原 50%的最高稀释度，或使接种 Ad5-bIFN-β 的动物 IBRS2 细胞中 VSV-NJ 病毒斑的数目降至原 50%的最高稀释度

[c] 未做

实施例 14 接种 Ad5-pIFN-α 的牛对 FMDV 侵染的防御

pIFN-α 在牛细胞中具有生物学活性（表 3），并且对牛进行 Ad5-pIFN-α 给药可诱导低水平的抗病毒活性（表 8）。为证实 Ad5-pIFN-α 是否可对牛进行保护以免受在牛中传代的 FMDV 的侵染，用很高剂量的 Ad5-pIFN-α，即每只动物 $1x10^{10}$ pfu，对称重大约为 200 磅的牛进行接种（表 10）。第 1 实验组动物用对照病毒，即 Ad5-Blue，进行肌肉内接种；第 2 和第 3 组动物用 Ad5-pIFN-α 进行肌肉内接种。对所有的动物以 $2x10^4BID_{50}$ 的牛传代 A24 在舌上进行皮内侵染。第 1 和第 2 组动物在第 1dpc 侵染，而第 3 组动物在第 2dpc 侵染。每隔一天监测动物的疾病临床病征。每日采集体温、血样和鼻拭直至第 8dpc，并且在第 1、4、7 和 14dpc 采集血清样。

表 10 实验设计：Ad5-pIFN-α 的效应

组号	动物编号	接种[a]	侵染日期	侵染[b]
#1 Ad5-Blue	8-10	10^{10} pfu	1 dpi	$2x10^4$ BID_{50}
#2 Ad5-pIFNα7.6.3	11-13	10^{10} pfu	1 dpi	$2x10^4$ BID_{50}
#3 Ad5-pIFNα7.6.3	14-16	10^{10} pfu	2 dpi	$2x10^4$ BID_{50}

[a] 以所示剂量 Ad5-载体对牛进行肌肉内接种

[b] 在 Ad5-载体给药后 1 或 2 天后，以所示剂量的牛传代 Cruziero 株 FMDV A24 在舌上对牛进行皮内侵染

第 2 和第 3 实验组动物从第 1dpi 起产生 50-200 单位/ml 的抗病毒反应，并且此反应在之后的 1-2 天内持续进行。与预期一致，Ad5-Blue 接种的动物没有产生可监测到的抗病毒活性。只有第 2 和第 3 实验组的动物出现 1-2 天的发热现象，之后动物恢复正常，然而在别的方面这些动物看上去却是健康的。

所有 Ad5-Blue 接种的动物在第 1dpc 均产生了低水平的病毒血征，病毒血征在之后增强并持续 1-3 天。在第 2dpc 可在所有动物鼻拭中检测到病毒。侵染后第 2 天，动物的舌上出现小泡，小泡的部位明显开始于侵染位置，并且动物的足上也出现了小泡。随后动物的齿龈和嘴部也出现了小泡，并且动物的四肢也都出现了小泡（图 26）。

第 2 和第 3 组动物的病毒血征延迟至第 2dpc 出现并在之后 2 天内持续。在第 2-3dpc 可在所有动物鼻拭中检测到病毒。第 2 组动物的小泡延迟至第 4dpc 出现并且其病征不如对照组的严重（图 26）。在第 3 组中，动物#16 没有出现小泡，而该组中另两只动物的小泡出现时间也被延迟并且动物的病征没有对照组的严重（图 26）。

在用致命的 FMDV 侵染前 1 天（第 1 组）或前 2 天（第 2 组）接受 Ad5-pIFN-α 接种的牛可受到部分的保护以避免临床疾病的发生。一只接种 Ad5-pIFN-α 的动物没有出现临床病变，而其余的动物的小泡延迟出现并且其病变要轻于 Ad5-Blue 接种的对照组动物。同样地，虽然所有 Ad5-pIFN-α 接种的动物都出现了病毒血征，但血征较对照组要延迟一天出现。

<110> U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service
Grubman, Marvin J.
Chingsamaram, Jarasvech
Koster, Marla
Moraes, Mauro P.

<120> 口蹄疫病毒疫苗

<130> D.N. 0128.01

<150> 60/286,345
<151> 2001-04-26

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 580
<212> DNA
<213> 猪

<400> 1
atggccccaa cctcagcctt tctcacggcc ctggtgctgc tcagctgcaa ggccatctgc 60

tctctgggct gcgacctgcc tcagacccac agcctggctc acaccagggc cctgaggctc 120

ctggcacaaa tgaggagaat ctcccccttc tcctgcctgg accacagaag ggactttggg 180

ttccccaag aggccttggg gggcaaccag gtccagaagg ctcaagccat ggctctggtg 240

catgagatgc tccagcagac cttccagctc ttcagcacag agggctcggc tgctgcctgg 300

aatgagagcc tcctgcacca gttctgcact ggactggatc agcagctcag ggacctggaa 360

gcctgtgtca tgcaggaggt ggggctggaa gggacgcccc tgctggagga ggactccatc 420

ctggctgtga ggaaatactt ccacagactc accctctatc tgcaagagaa gagctacagc 480

ccctgtgcct gggagatcgt cagggcagaa gtcatgagag ccttctcttc ctccagaaac 540

ctgcaagaca gactgaggaa gaaggagtga ggatccatcc 580

<210> 2
<211> 580
<212> DNA
<213> 猪

<400> 2
atggccccaa cctcagcctt cctcacggcc ctggtgctac tcagctgcaa tgccatctgc 60

tctctgggct gtgacctgcc tcagacccac agcctggctc acaccagggc cctgaggctc 120

ctggcacaaa tgaggagaat ctctcccttc tcctgcctgg accacagaag ggactttgga 180

tcccctcatg aggcttttgg gggcaaccag gtccagaagg ctcaagccat ggctctggtg 240

catgagatgc tccagcagac cttccagctc ttcagcacag agggctcggc tgctgcctgg 300

aatgagagcc tcctgcacca gttctgcact ggactggatc agcagctcag ggacctggaa 360

gcctgtgtca tgcaggaggc ggggctggaa gggacccccc tgctggagga ggactccatc 420

ctggctgtga ggaaatactt ccacagactc accctctatc tgcaagagaa gagctacagc 480

ccctgtgcct gggagatcgt cagggcagaa gtcatgagat ccttctcttc ctccagaaac 540

ctgcaagaca gactgaggaa gaaggagtga ggatccatcc 580

<210> 3
<211> 571
<212> DNA

<213> 猪

<400> 3

atggctaaca agtgcatcct ccaaatcgct ctcctgatgt gtttctccac cacagctctt 60

tccatgagct atgatgtgct tcgataccaa caaaggagca gcaatttggc atgtcagaag 120

ctcctgggac agttgcctgg gactcctcaa tattgcctcg aagataggat gaactttgag 180

gtccctgagg agattatgca accaccacaa ttccagaagg aagatgcagt attgattatc 240

cacgagatgc tccagcagat cttcggcatt ctcagaagaa atttctctag cactggctgg 300

aatgaaaccg tcattaagac tatccttgtg gaacttgatg ggcagatgga tgacctggag 360

acaatcctgg aggaaatcat ggaggaggaa aatttcccca ggggagacat gaccattctt 420

cacctgaaga aatattactt gagcattctg cagtacctga agtccaagga gtacagaagc 480

tgtgcctgga cagtcgtcca agtggaaatc ctcaggaact tttctttcct taacagactt 540

acagattacc tccggaactg aggatccatc c 571

<210> 4

<211> 580

<212> DNA

<213> 牛

<400> 4

atggccccag cctggtcctt actcctggcc ctgctgctgc tcagctgcaa cgccatctgc 60

tctctgggct gccacctgcc tcacacccac agcctgccca acaggagggt cctgatgctc 120

ctgagacaac tgaggagggt ctccccttcc tcctgcctgc aggacagaaa tgacttcgca 180

ttccccccagg aggcgctggg tggcagccag ttgcagaagg ctcaagccat ctctgtgctc 240

cacgaggtga cccagcacac cttccagctt ttcagcacag agggctcggc cgctgtgtgg 300

gacaagagcc tcctggacaa gctccatgct gcactggatc agcagctcac tgacctgcaa 360

gcctgtctga ggcaggagga ggggctgcga ggggctcccc tactcaacga ggactccagc 420

ctggctgtga ggaaatactt ccacagactc actgtctatc tgcaagagaa gagacacagc 480

ccttgtgcct gggaggttgt cagagcacaa atcatgagag ccttctcttc ctcaaccaac 540

ttgcaggaga gtttcaggag aaaggactga ggatccatcc 580

<210> 5
<211> 571
<212> DNA
<213> 牛

<400> 5
atgacccacc ggtgcctcct cccgatggtt ctcctgctgt gtttctccac cacagctctt 60

tccaggagct acagcttgct tcgattccaa caacgtcaga gccttaaaga gtgtcagaaa 120

ctcctggggc agttaccttc aacttctcaa cattgcctcg aggccaggat ggacttccag 180

atgcctgagg agatgaagca agaacagcag ttccagaagg aagatgccat attggtcatg 240

tatgagatgc tccagcacat cttcggcatt ctcaccagag acttctccag cactggctgg 300

tctgagacca tcatcgagga cctccttgag gaactctatg ggcagatgaa tcgtctgcag 360

ccaatccaga aggaaataat gcagaagcaa aactccacta cgggagacat gatcgttccc 420

cacctaggga aatattactt caacctcatg cagtacctgg agtccaagga gtacgacagg 480

tgtgcctgga cagtcgtgca agtgcaaata ctcacgaacg tttctttcct gatgagacta 540

acagcttccc tccgtgactg aggatccatc c 571

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 牛

<400> 6
ccgatggccc cagcctggtc c 21

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> 猪

<400> 7
ggatggatcc tcagtccttt ctcctgaawy tctc 34

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> 猪

<400> 8
catcatgacc yaccggtgcc tcctcc 26

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> 猪

<400> 9
ggatggatcc tcaktcacgg asgkaacctg ttag 34

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 猪

<400> 10
atggccccaa cctcagcc 18

<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> 猪

<400> 11
tggatcctca ctccttcttc ctcagtctgt c 31

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 猪

<400> 12
atggctaaca agtgcatcct c 21

<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> 猪

<400> 13
ggatggatcc tcagttccgg aggtaatctg taag 34

ATGGCCCCAACCTCAGCCTTTCTCACGGCCCTGGTGCTGCTCAGCTGCA
AGGCCATCTGCTCTCTGGGCTGCGACCTGCCTCAGACCCACAGCCTGG
CTCACACCAGGGCCCTGAGGCTCCTGGCACAAATGAGGAGAATCTCCCC
CTTCTCCTGCCTGGACCACAGAAGGGACTTTGGGTTCCCCCAAGAGGCC
TTGGGGGGCAACCAGGTCCAGAAGGCTCAAGCCATGGCTCTGGTGCAT
GAGATGCTCCAGCAGACCTTCCAGCTCTTCAGCACAGAGGGCTCGGCTG
CTGCCTGGAATGAGAGCCTCCTGCACCAGTTCTGCACTGGACTGGATCA
GCAGCTCAGGGACCTGGAAGCCTGTGTCATGCAGGAGGTGGGGCTGGA
AGGGACGCCCCTGCTGGAGGAGGACTCCATCCTGGCTGTGAGGAAATA
CTTCCACAGACTCACCCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGCCCCTGT
GCCTGGGAGATCGTCAGGGCAGAAGTCATGAGAGCCTTCTCTTCCTCCA
GAAACCTGCAAGACAGACTGAGGAAGAAGGAGTGAGGATCCATCC

图 1A

ATGGCCCCAACCTCAGCCTTCCTCACGGCCCTGGTGCTACTCAGCTGCA
ATGCCATCTGCTCTCTGGGCTGTGACCTGCCTCAGACCCACAGCCTGGC
TCACACCAGGGCCCTGAGGCTCCTGGCACAAATGAGGAGAATCTCTCCC
TTCTCCTGCCTGGACCACAGAAGGGACTTTGGATCCCCTCATGAGGCTT
TTGGGGGCAACCAGGTCCAGAAGGCTCAAGCCATGGCTCTGGTGCATG
AGATGCTCCAGCAGACCTTCCAGCTCTTCAGCACAGAGGGCTCGGCTGC
TGCCTGGAATGAGAGCCTCCTGCACCAGTTCTGCACTGGACTGGATCAG
CAGCTCAGGGACCTGGAAGCCTGTGTCATGCAGGAGGCGGGGCTGGAA
GGGACCCCCCTGCTGGAGGAGGACTCCATCCTGGCTGTGAGGAAATAC
TTCCACAGACTCACCCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGCCCCTGTG
CCTGGGAGATCGTCAGGGCAGAAGTCATGAGATCCTTCTCTTCCTCCAG
AAACCTGCAAGACAGACTGAGGAAGAAGGAGTGAGGATCCATCC

图 1B

ATGGCTAACAAGTGCATCCTCCAAATCGCTCTCCTGATGTGTTTCTCCAC
CACAGCTCTTTCCATGAGCTATGATGTGCTTCGATACCAACAAAGGAGCA
GCAATTTGGCATGTCAGAAGCTCCTGGGACAGTTGCCTGGGACTCCTCA
ATATTGCCTCGAAGATAGGATGAACTTTGAGGTCCCTGAGGAGATTATGC
AACCACCACAATTCCAGAAGGAAGATGCAGTATTGATTATCCACGAGATG
CTCCAGCAGATCTTCGGCATTCTCAGAAGAAATTTCTCTAGCACTGGCTG
GAATGAAACCGTCATTAAGACTATCCTTGTGGAACTTGATGGGCAGATG
GATGACCTGGAGACAATCCTGGAGGAAATCATGGAGGAGGAAAATTTCC
CCAGGGGAGACATGACCATTCTTCACCTGAAGAAATATTACTTGAGCATT
CTGCAGTACCTGAAGTCCAAGGAGTACAGAAGCTGTGCCTGGACAGTCG
TCCAAGTGGAAATCCTCAGGAACTTTTCTTTCCTTAACAGACTTACAGATT
ACCTCCGGAACTGAGGATCCATCC

图 2

ATGGCCCCAGCCTGGTCCTTACTCCTGGCCCTGCTGCTGCTCAGCTGCA
ACGCCATCTGCTCTCTGGGCTGCCACCTGCCTCACACCCACAGCCTGCC
CAACAGGAGGGTCCTGATGCTCCTGAGACAACTGAGGAGGGTCTCCCCT
TCCTCCTGCCTGCAGGACAGAAATGACTTCGCATTCCCCCAGGAGGCGC
TGGGTGGCAGCCAGTTGCAGAAGGCTCAAGCCATCTCTGTGCTCCACGA
GGTGACCCAGCACACCTTCCAGCTTTTCAGCACAGAGGGCTCGGCCGCT
GTGTGGGACAAGAGCCTCCTGGACAAGCTCCATGCTGCACTGGATCAGC
AGCTCACTGACCTGCAAGCCTGTCTGAGGCAGGAGGAGGGGCTGCGAG
GGGCTCCCCTACTCAACGAGGACTCCAGCCTGGCTGTGAGGAAATACTT
CCACAGACTCACTGTCTATCTGCAAGAGAAGAGACACAGCCCTTGTGCC
TGGGAGGTTGTCAGAGCACAAATCATGAGAGCCTTCTCTTCCTCAACCAA
CTTGCAGGAGAGTTTCAGGAGAAAGGACTGAGGATCCATCC

图 3

ATGACCCACCGGTGCCTCCTCCCGATGGTTCTCCTGCTGTGTTTCTCCA
CCACAGCTCTTTCCAGGAGCTACAGCTTGCTTCGATTCCAACAACGTCAG
AGCCTTAAAGAGTGTCAGAAACTCCTGGGGCAGTTACCTTCAACTTCTCA
ACATTGCCTCGAGGCCAGGATGGACTTCCAGATGCCTGAGGAGATGAAG
CAAGAACAGCAGTTCCAGAAGGAAGATGCCATATTGGTCATGTATGAGAT
GCTCCAGCACATCTTCGGCATTCTCACCAGAGACTTCTCCAGCACTGGC
TGGTCTGAGACCATCATCGAGGACCTCCTTGAGGAACTCTATGGGCAGA
TGAATCGTCTGCAGCCAATCCAGAAGGAAATAATGCAGAAGCAAAACTCC
ACTACGGGAGACATGATCGTTCCCCACCTAGGGAAATATTACTTCAACCT
CATGCAGTACCTGGAGTCCAAGGAGTACGACAGGTGTGCCTGGACAGTC
GTGCAAGTGCAAATACTCACGAACGTTTCTTTCCTGATGAGACTAACAGC
TTCCCTCCGTGACTGAGGATCCATCC

图 4

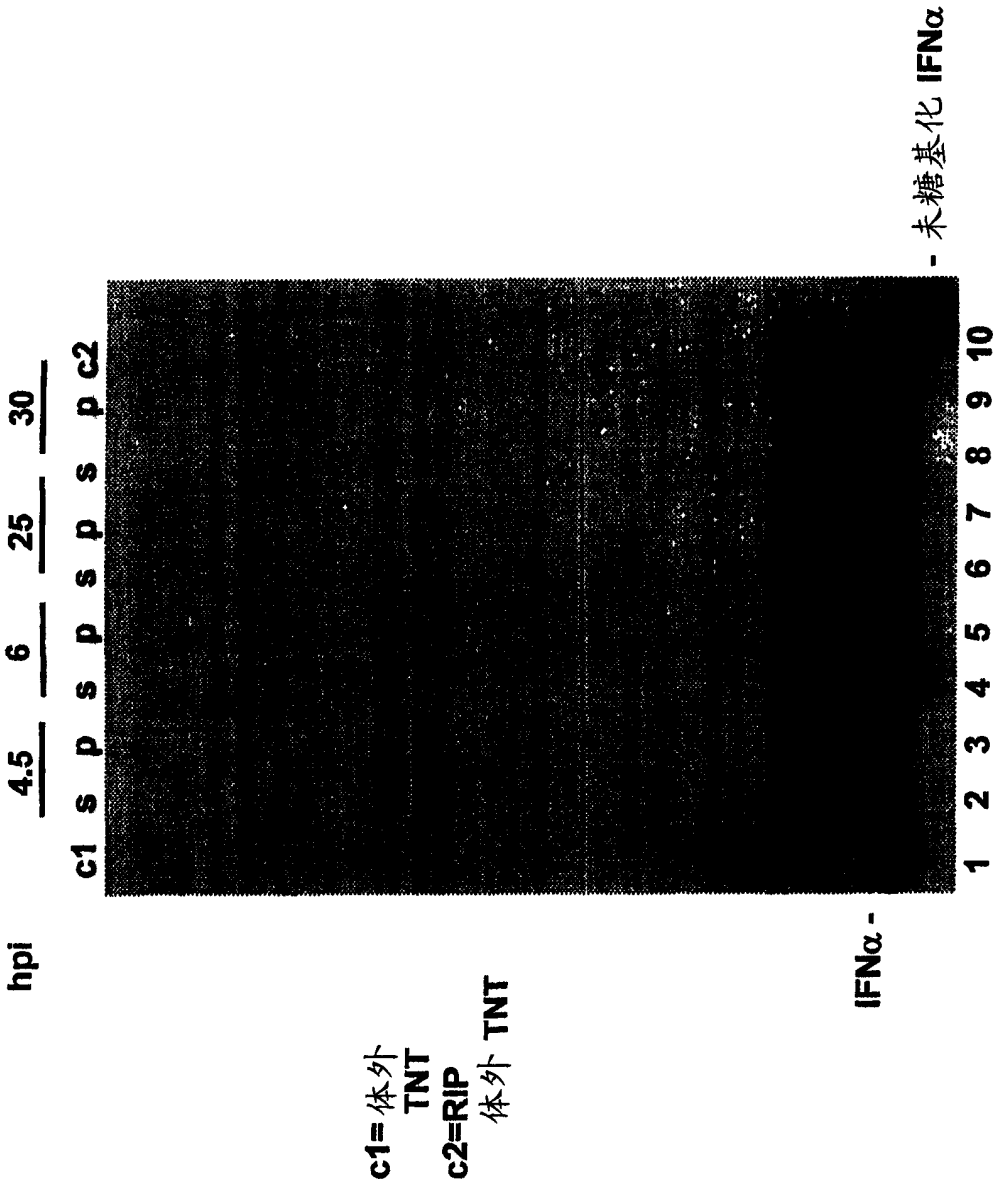

hpi
4.5
6
25
30
c1 s p s p s p s p c2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
IFNα -
- 未糖基化 IFNα
c1= 体外 TNT
c2=RIP 体外 TNT

图 5

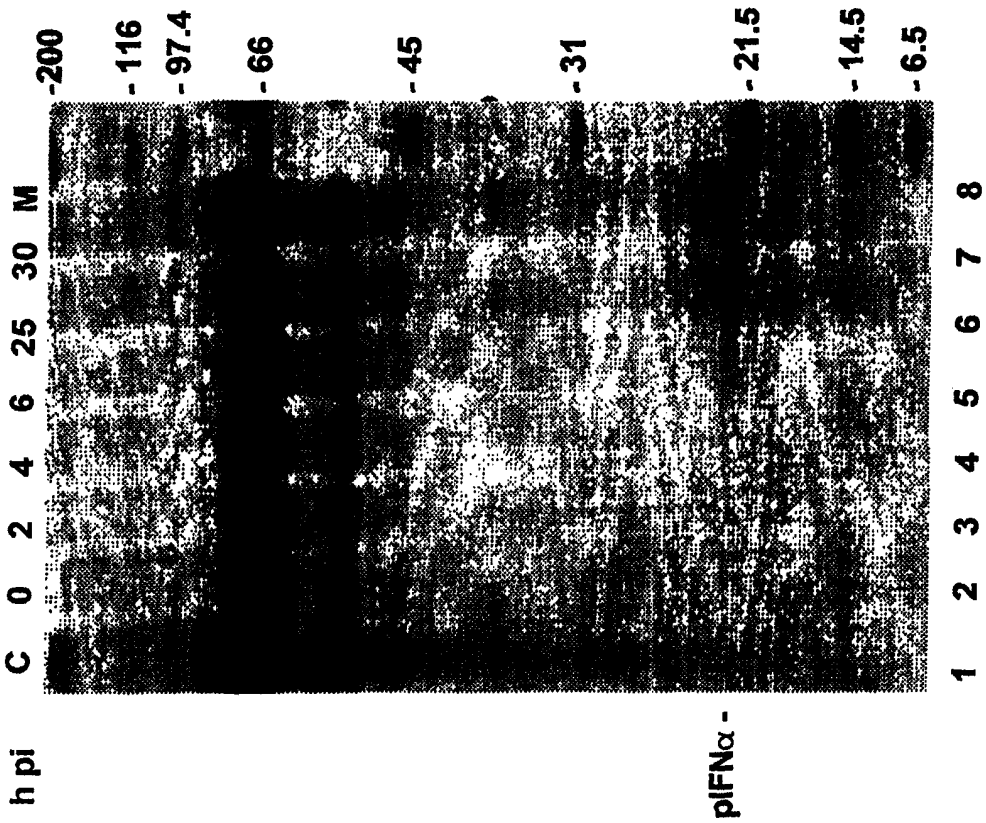

h pi
C 0 2 4 6 25 30 M
-200
-116
-97.4
-66
-45
-31
-21.5
-14.5
-6.5
pIFNα -
1 2 3 4 5 6 7 8
C= Ad5-FMDVA24侵染的
IBRS2细胞，24 hpi
M= kDa 单位分子量标记

图 6

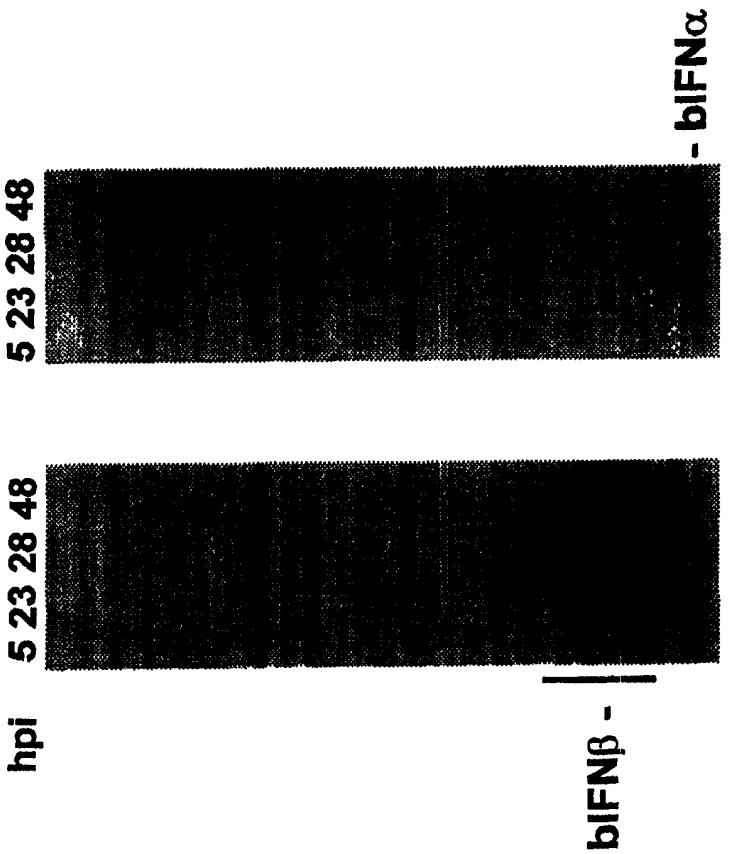


图 7

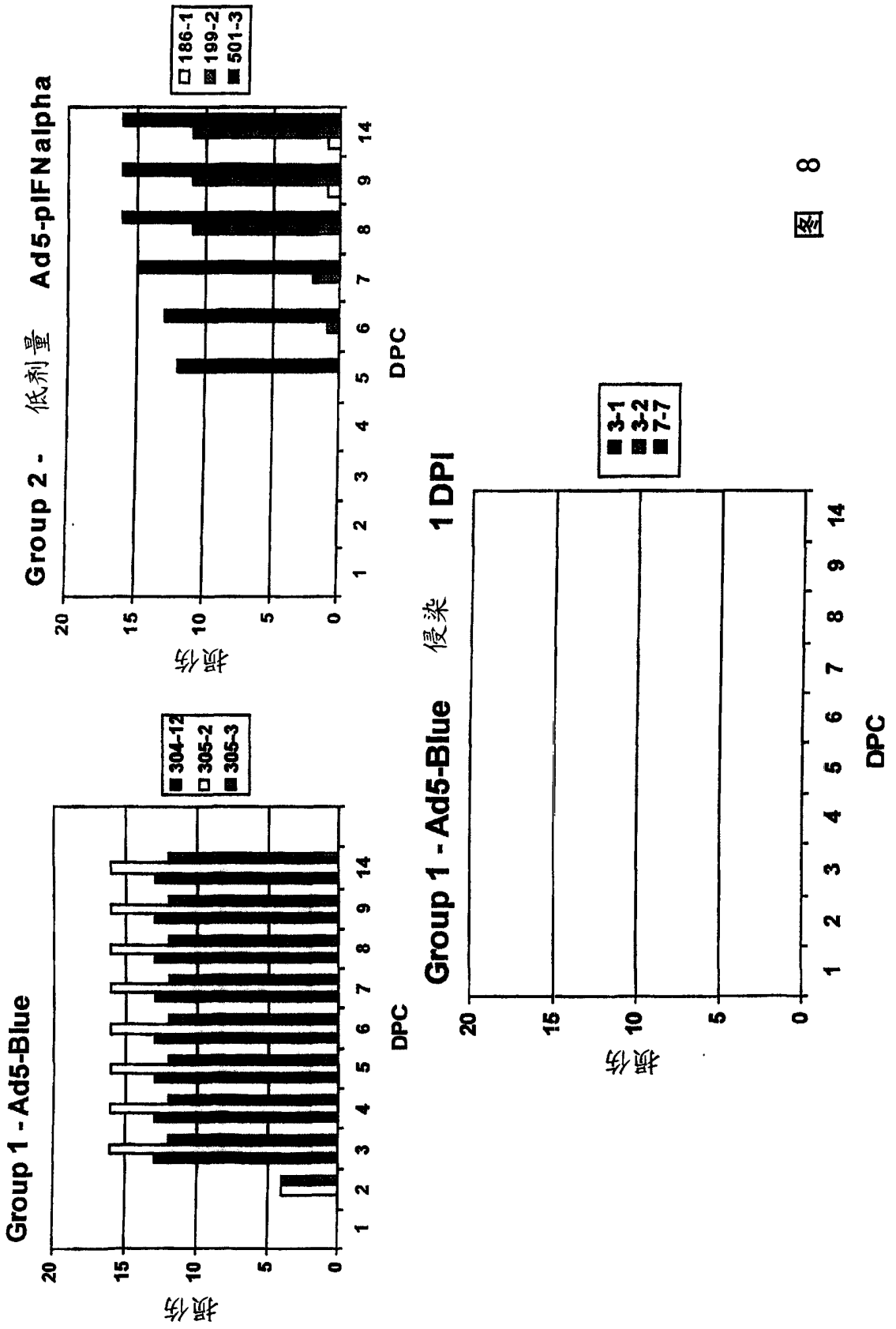

Group 1 - Ad5-Blue
304-12
305-2
305-3
损伤
DPC
Group 2 - 低剂量 Ad5-pIFNalpha
186-1
199-2
501-3
损伤
DPC
Group 1 - Ad5-Blue 侵染 1 DPI
3-1
3-2
7-7
损伤
DPC

图 8

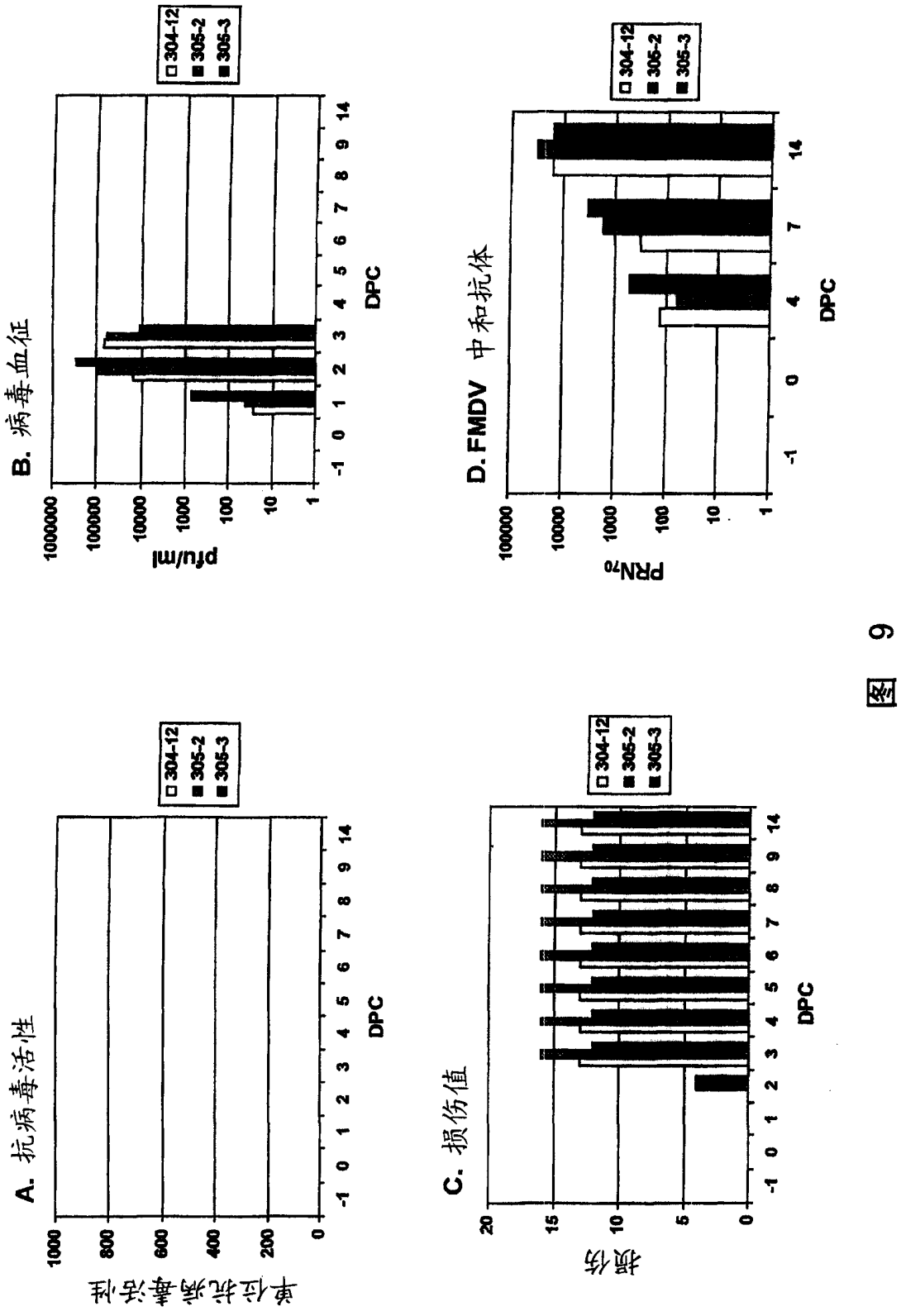

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
304-12
305-2
305-3

图 9

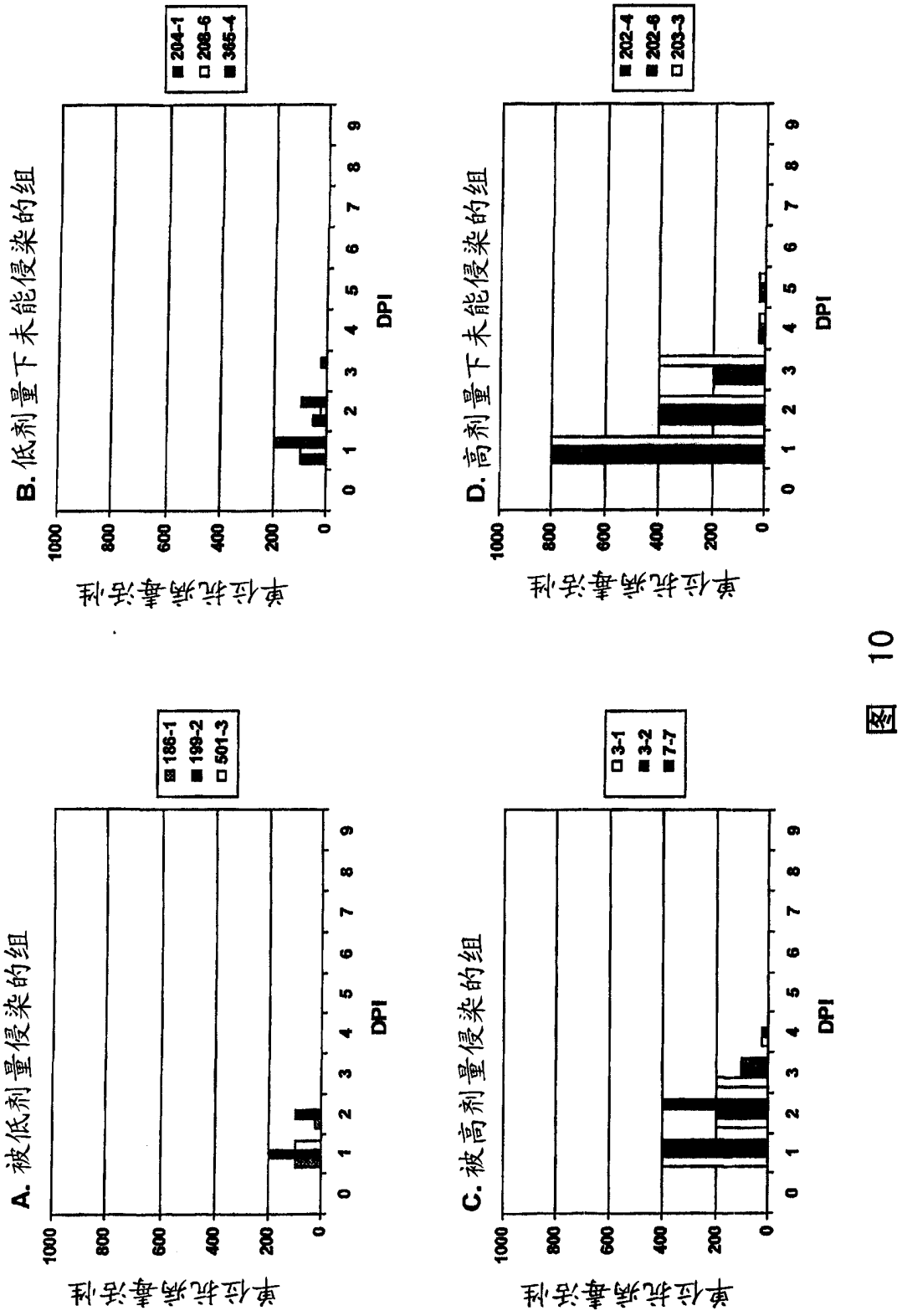

A. 被低剂量侵染的组
B. 低剂量下未能侵染的组
C. 被高剂量侵染的组
D. 高剂量下未能侵染的组
单位抗病毒活性
DPI
186-1
199-2
501-3
204-1
208-6
365-4
3-1
3-2
7-7
202-4
202-6
203-3

图 10

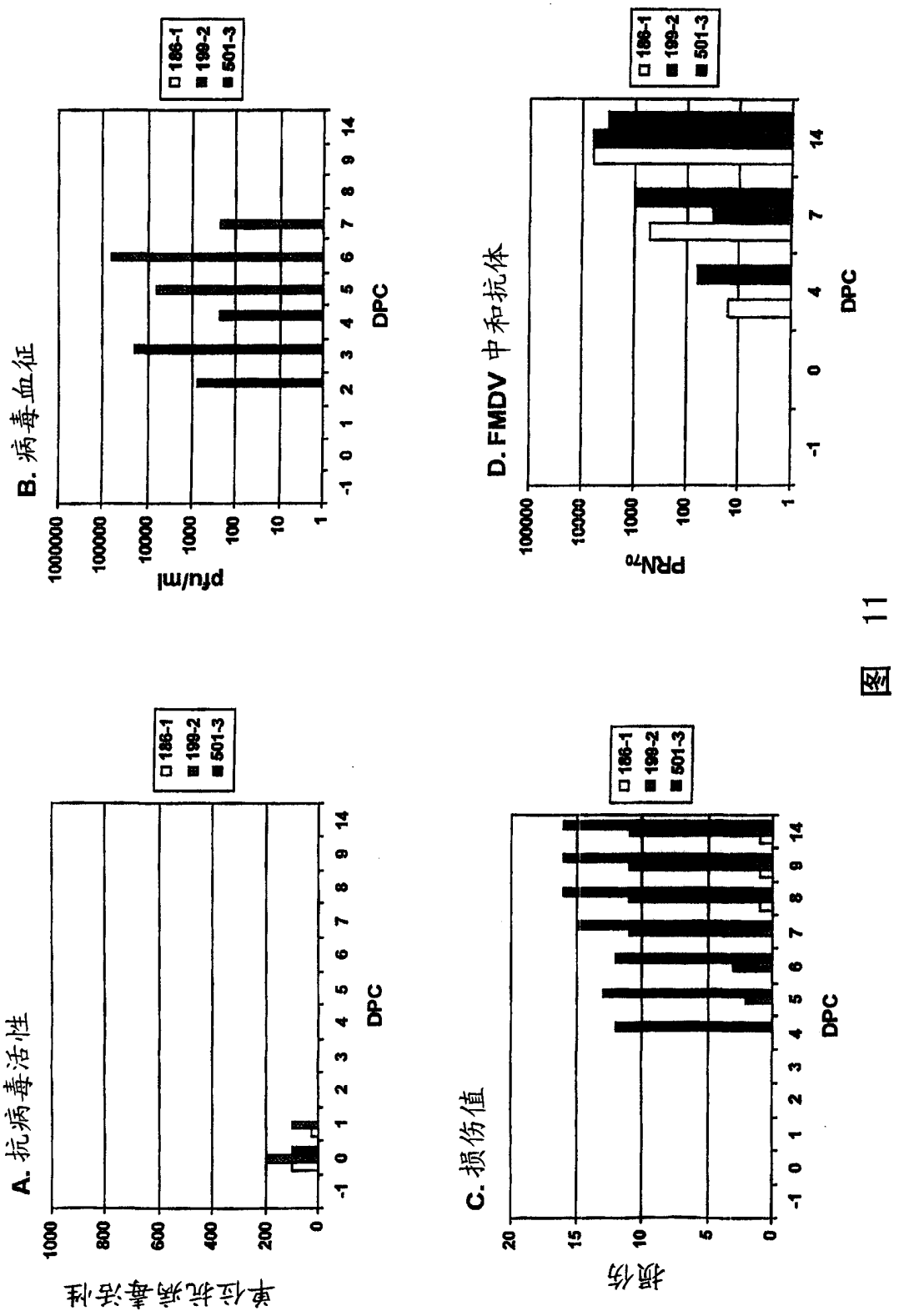

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血症
pfu/ml
C. 损伤值
损伤
D. FMDV 中和抗体
PRN70
186-1
199-2
501-3

图 11

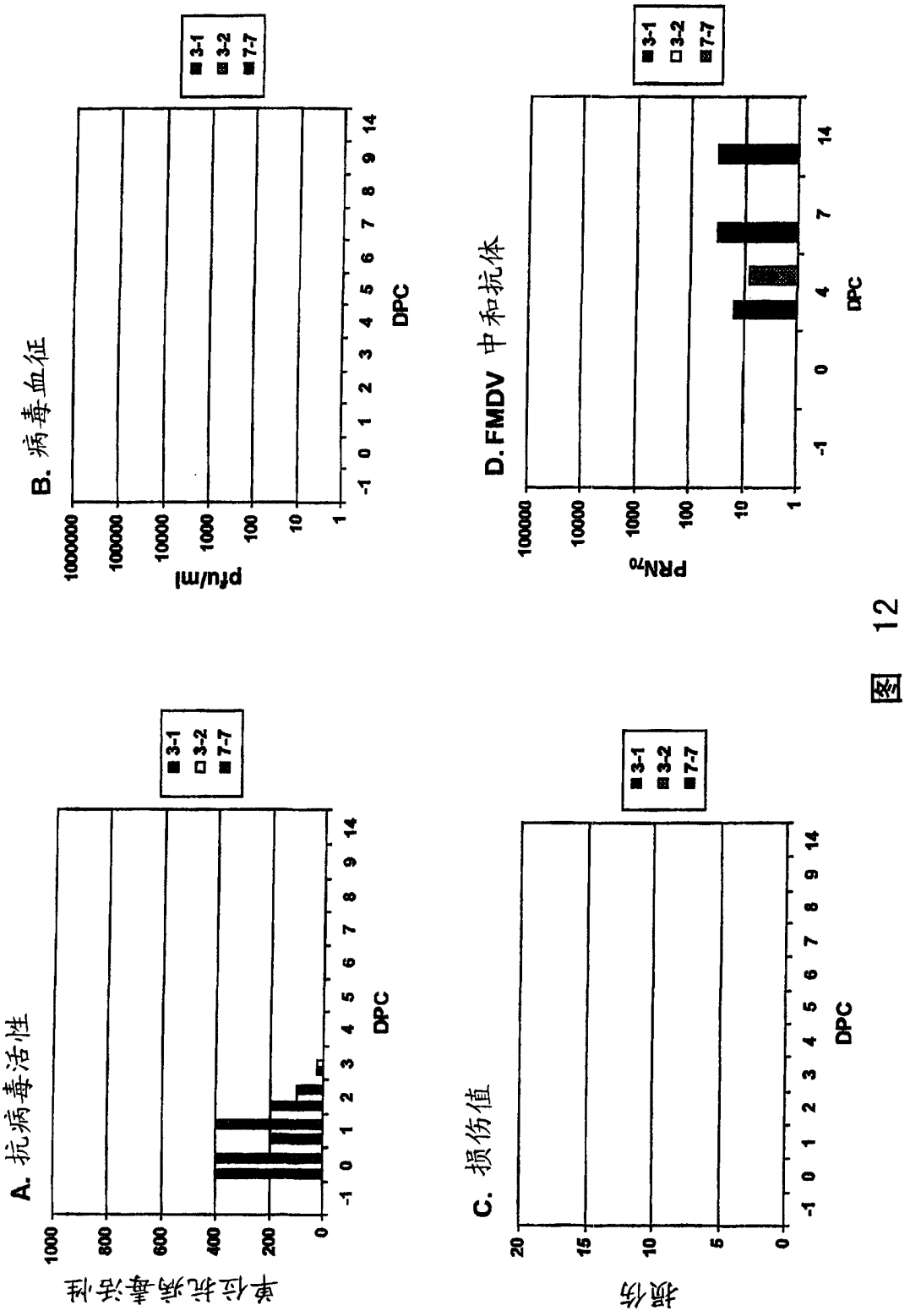

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
3-1
3-2
7-7

图 12

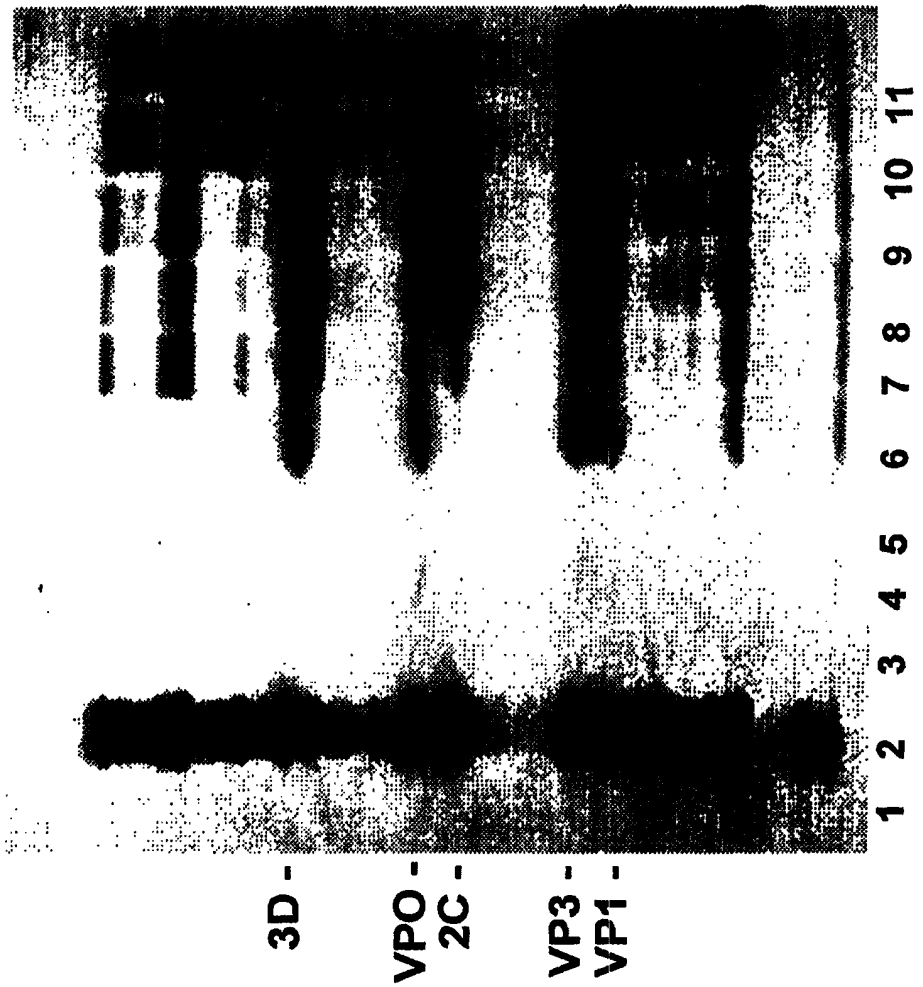


图 13

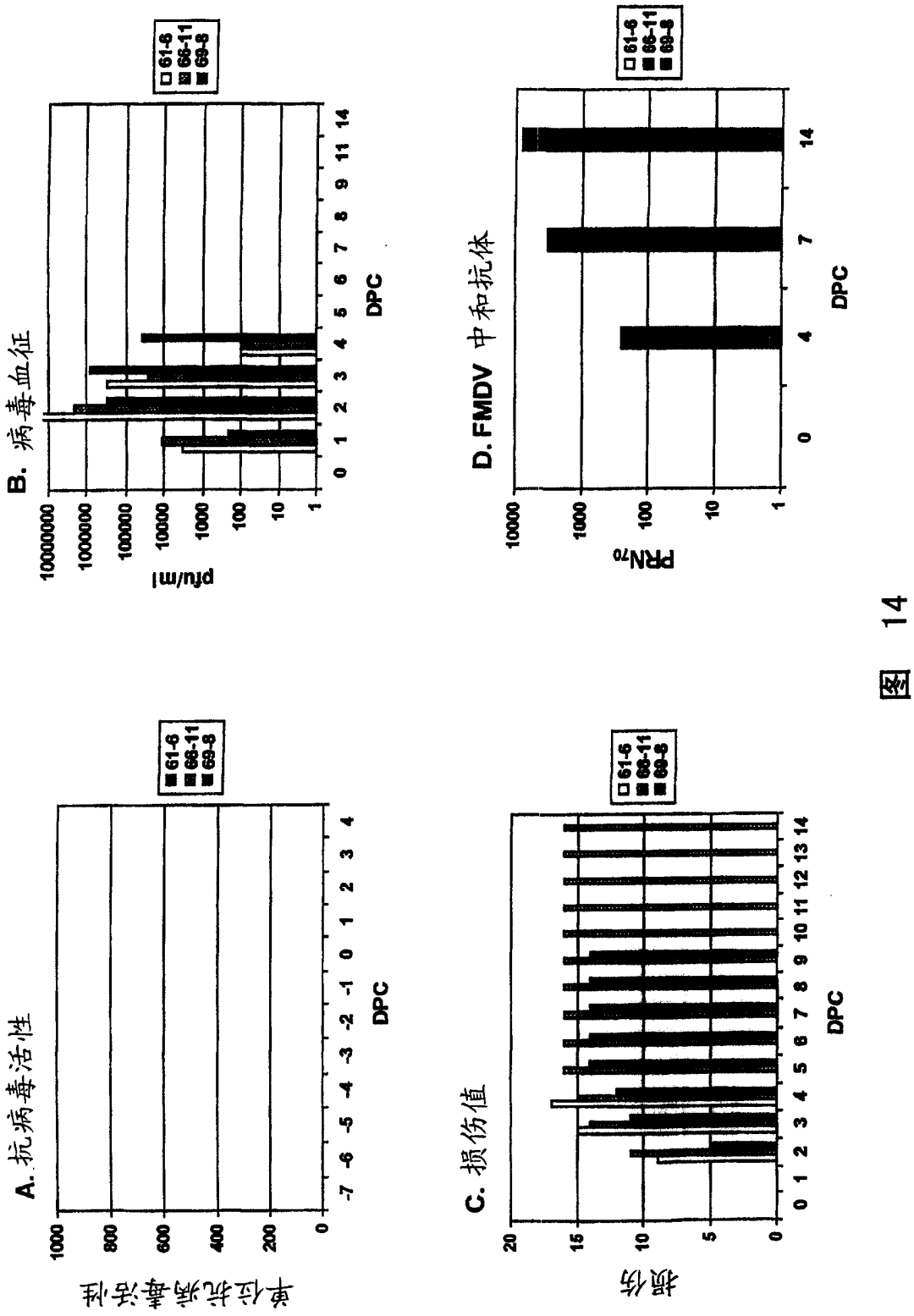

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
61-6
66-11
69-8
B. 病毒血症
pfu/ml
C. 损伤值
损伤
D. FMDV 中和抗体
PRN70

图 14

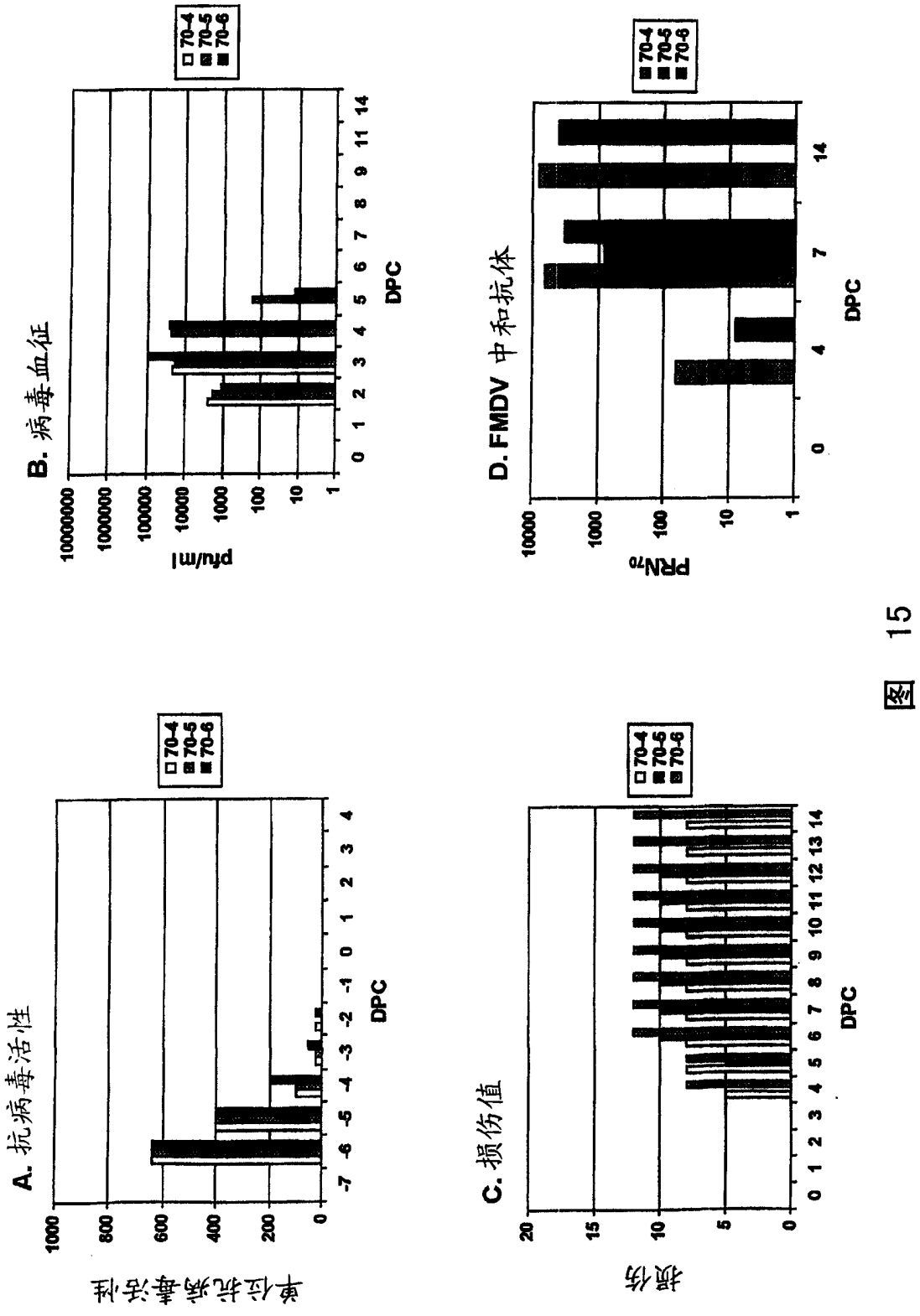

B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
70-4
70-5
70-6
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC

图 15

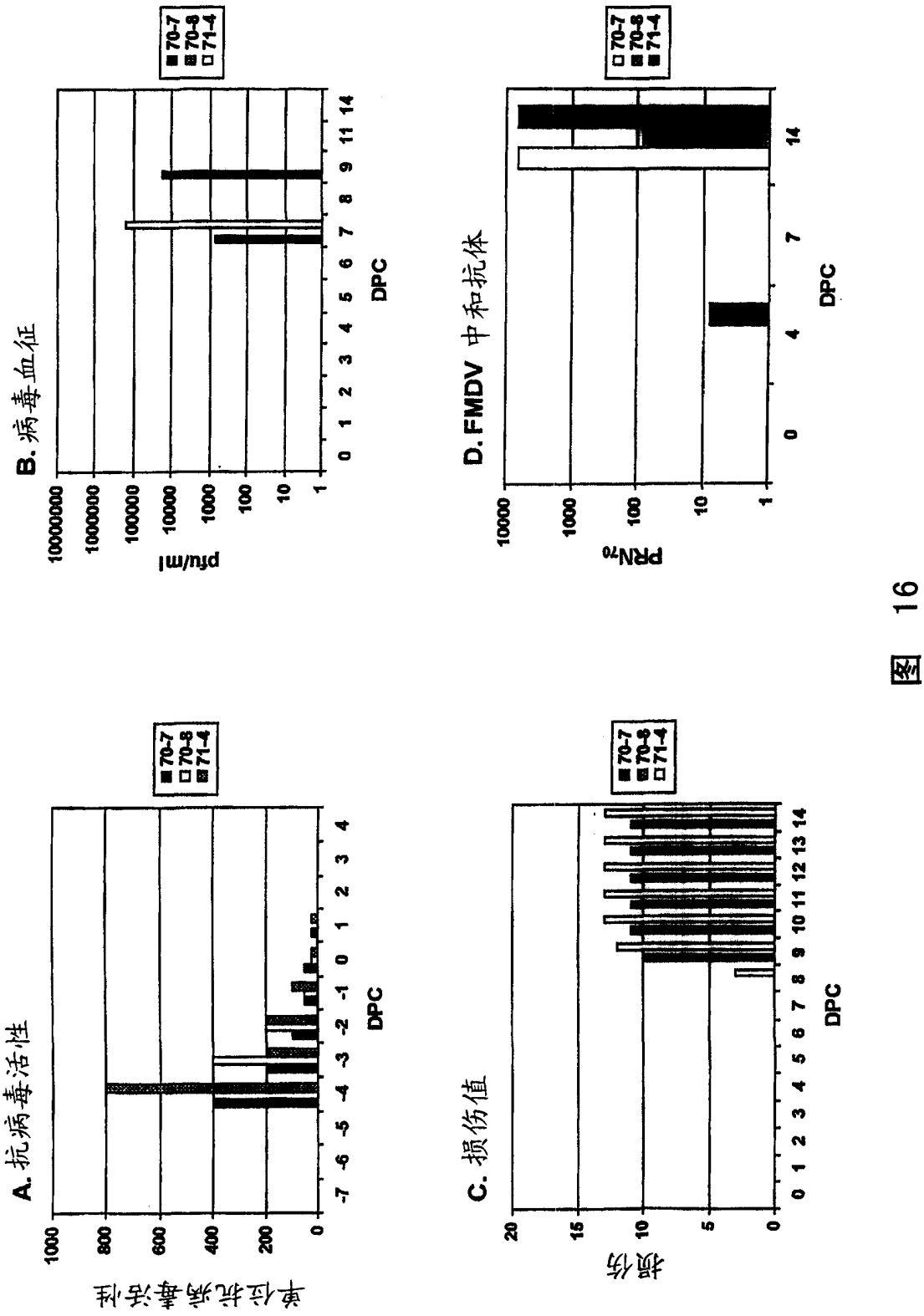

B. 病毒血症
pfu/ml
DPC
70-7
70-8
71-4
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC

图 16

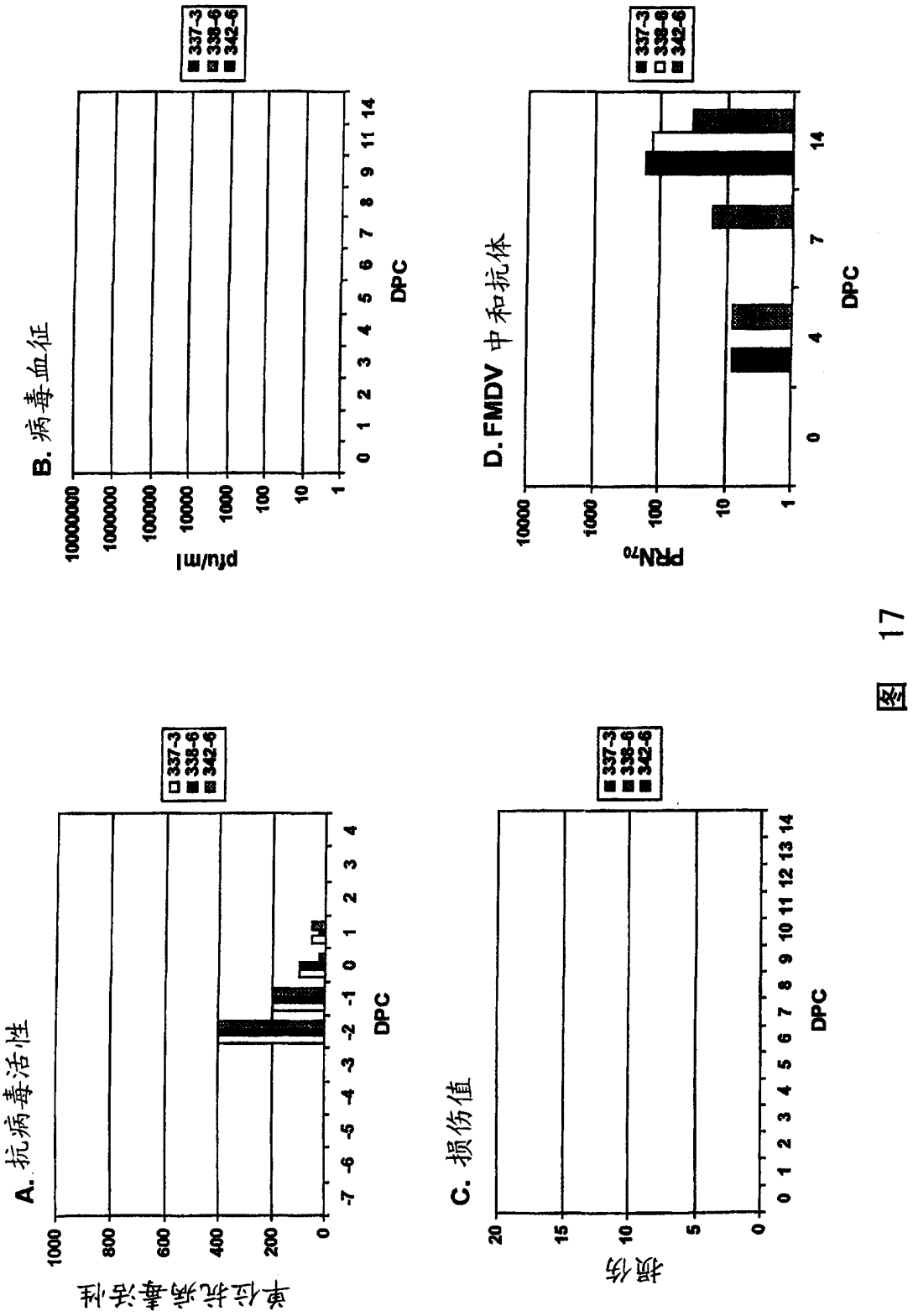

B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
337-3
338-6
342-6
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC

图 17

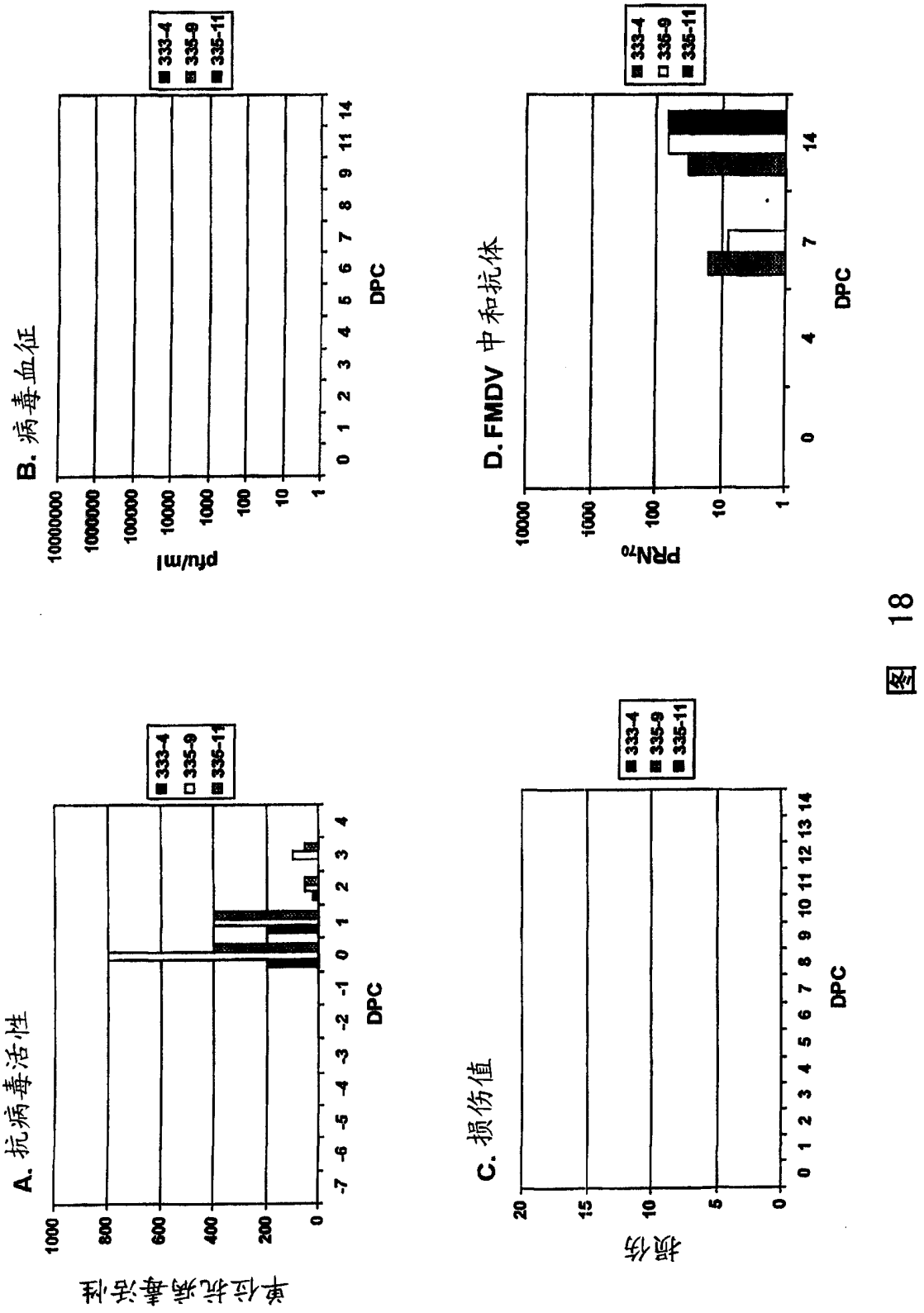

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
333-4
335-9
335-11

图 18

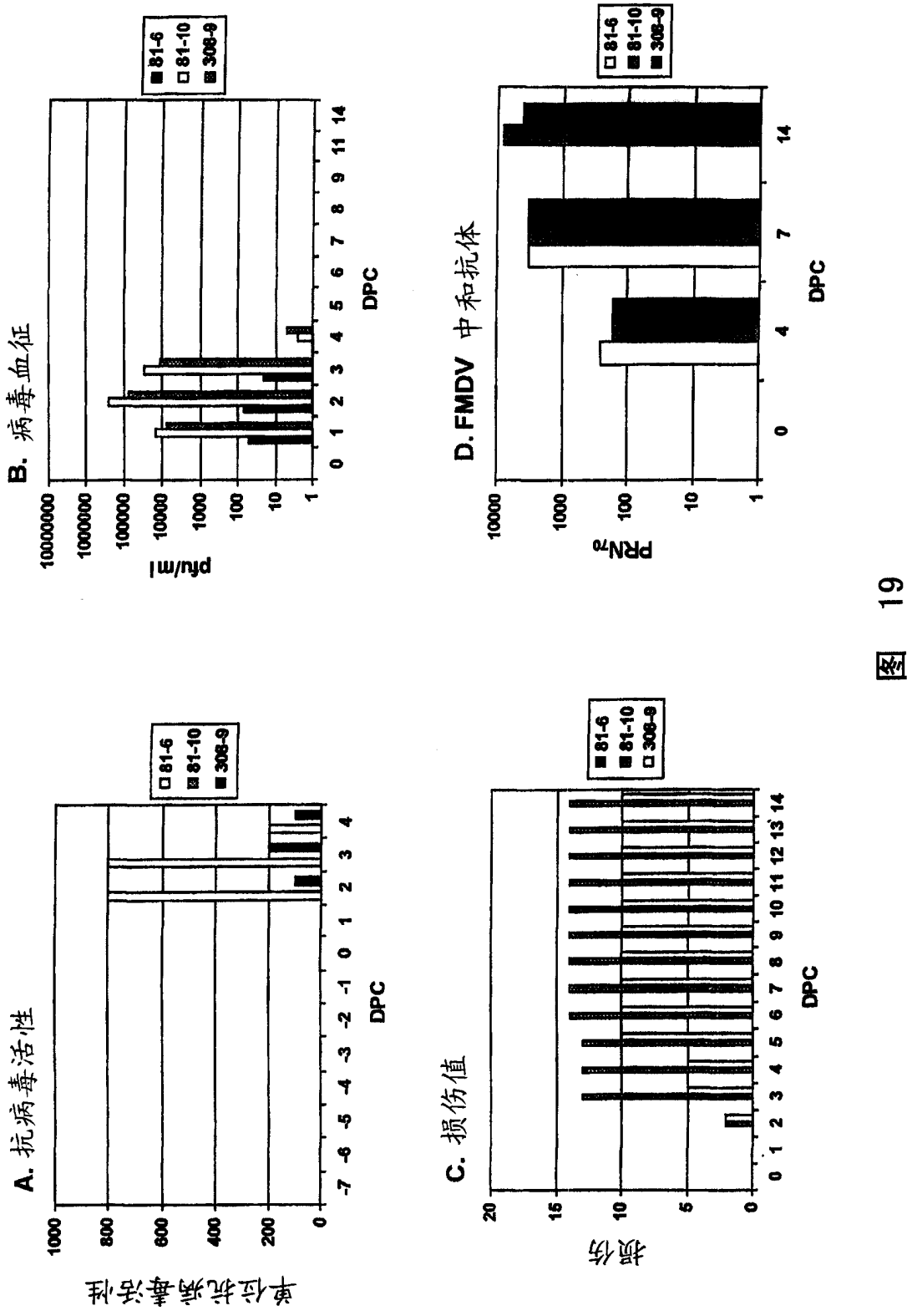

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
81-6
81-10
308-9
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN
DPC

图 19

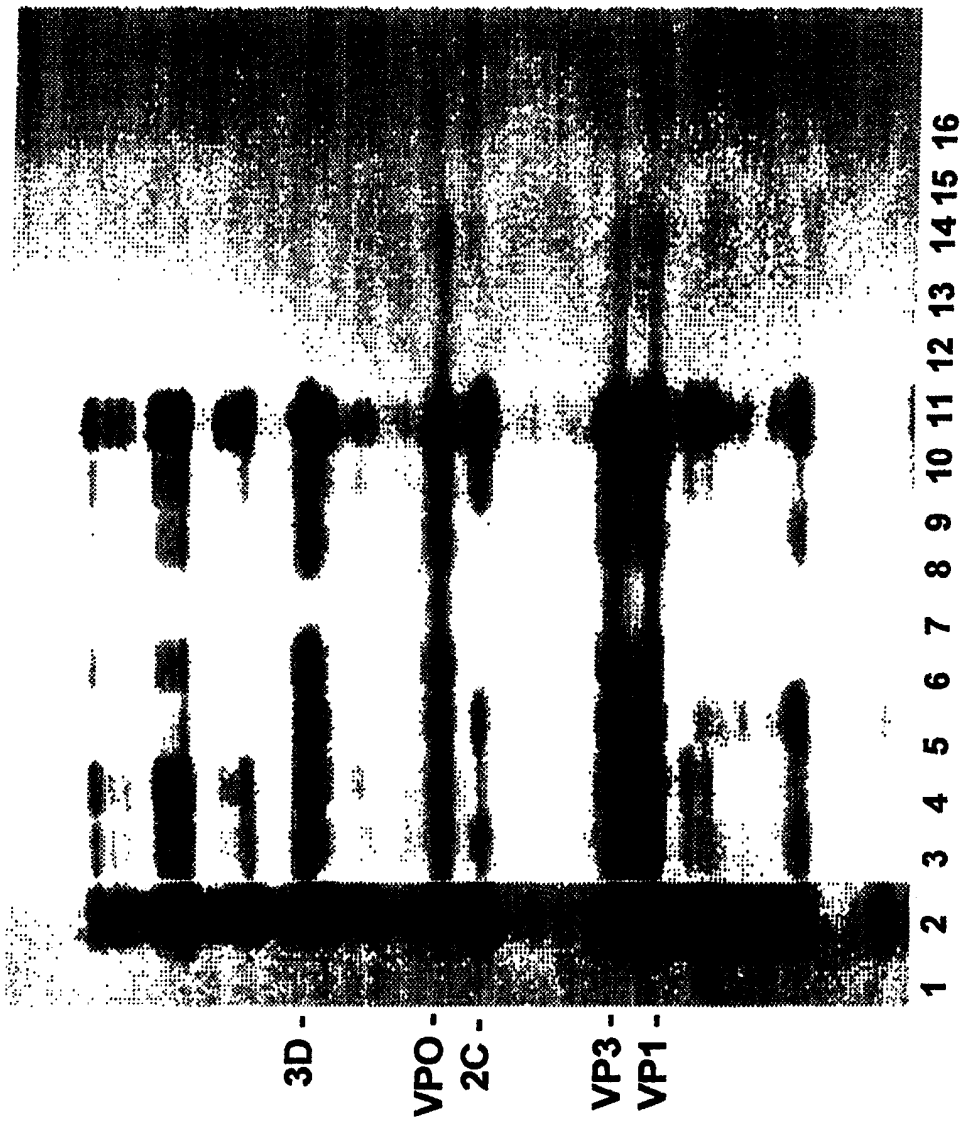


图 20

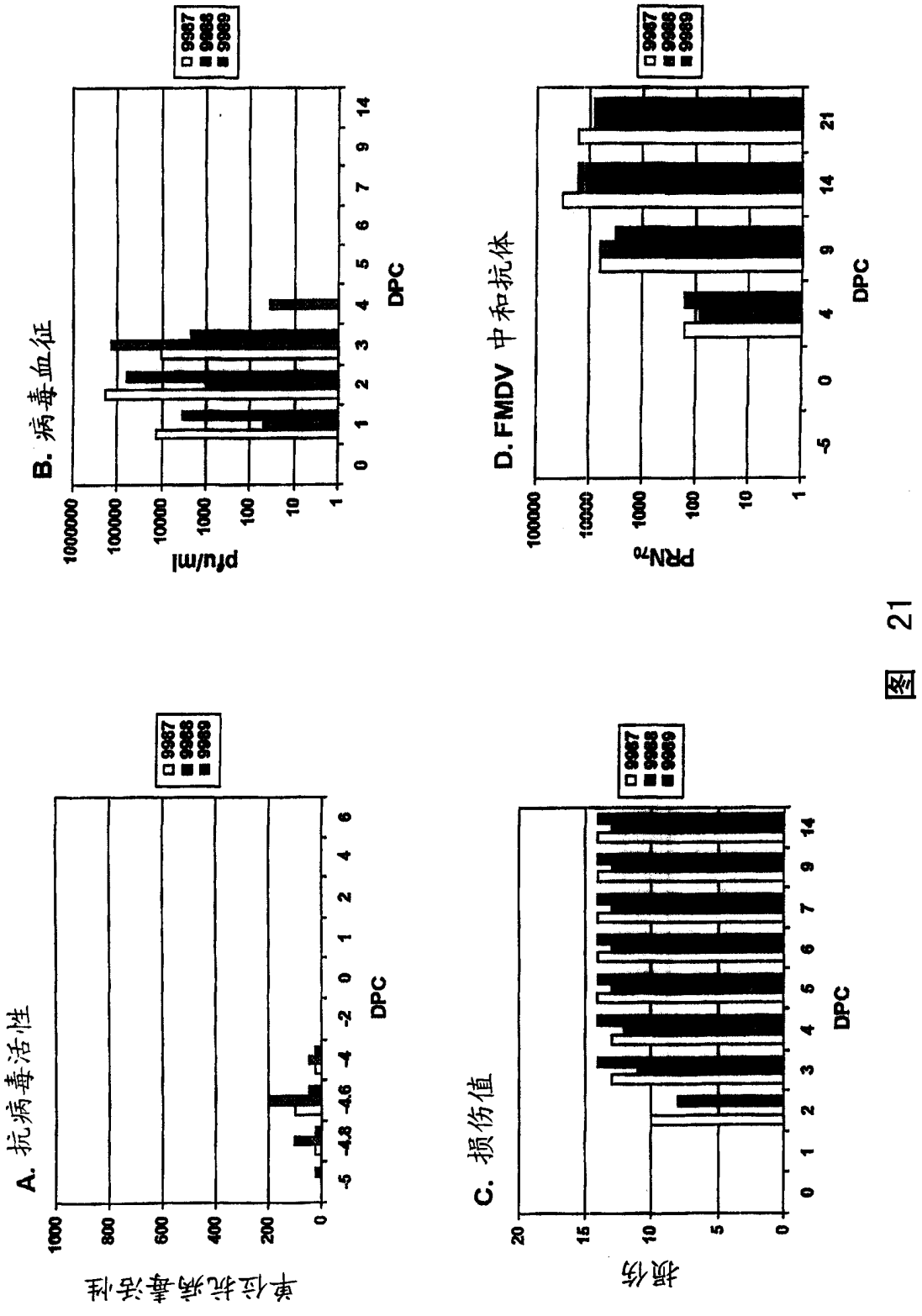

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN75
DPC
9967
9968
9969

图 21

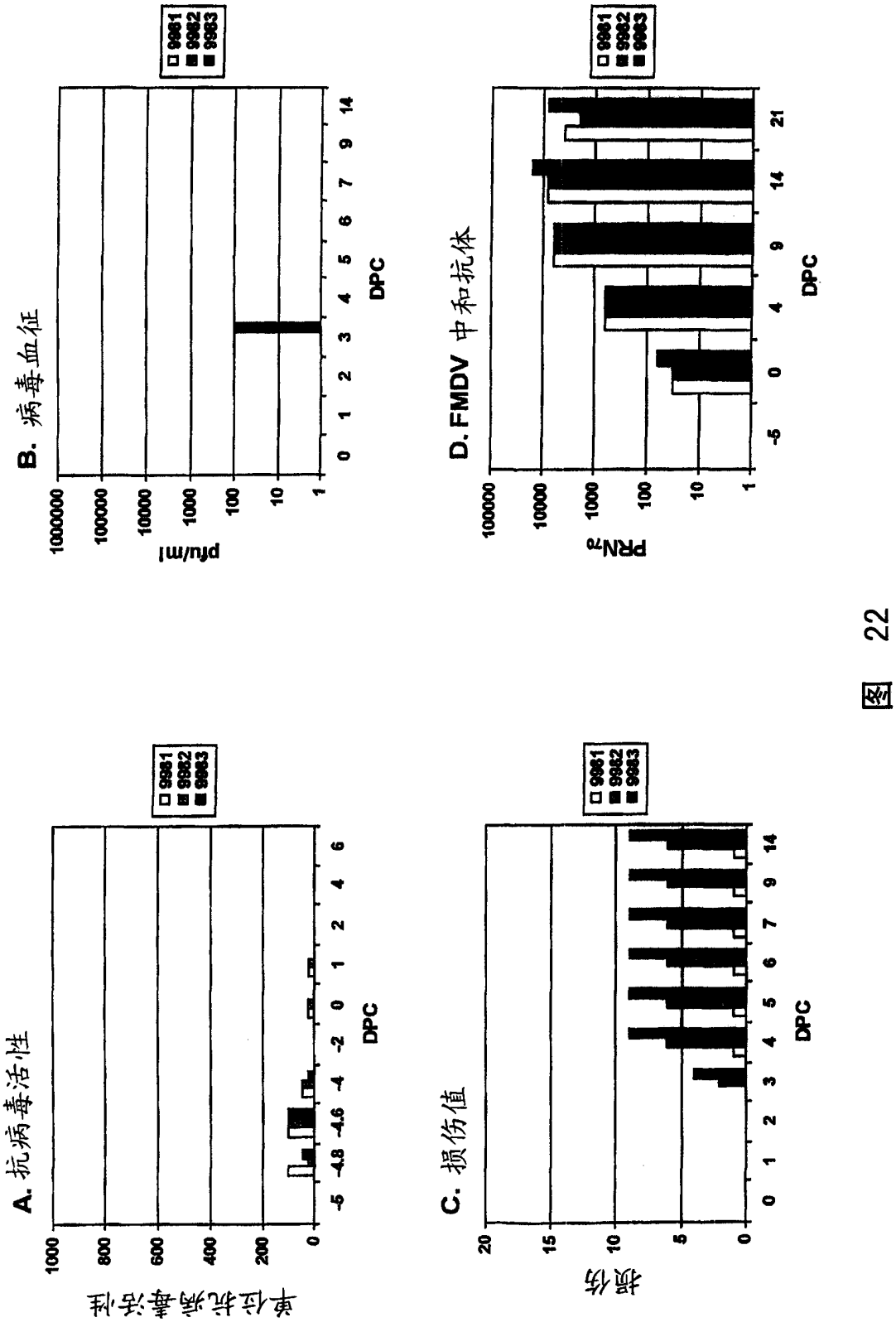

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN
DPC
9861
9862
9863

图 22

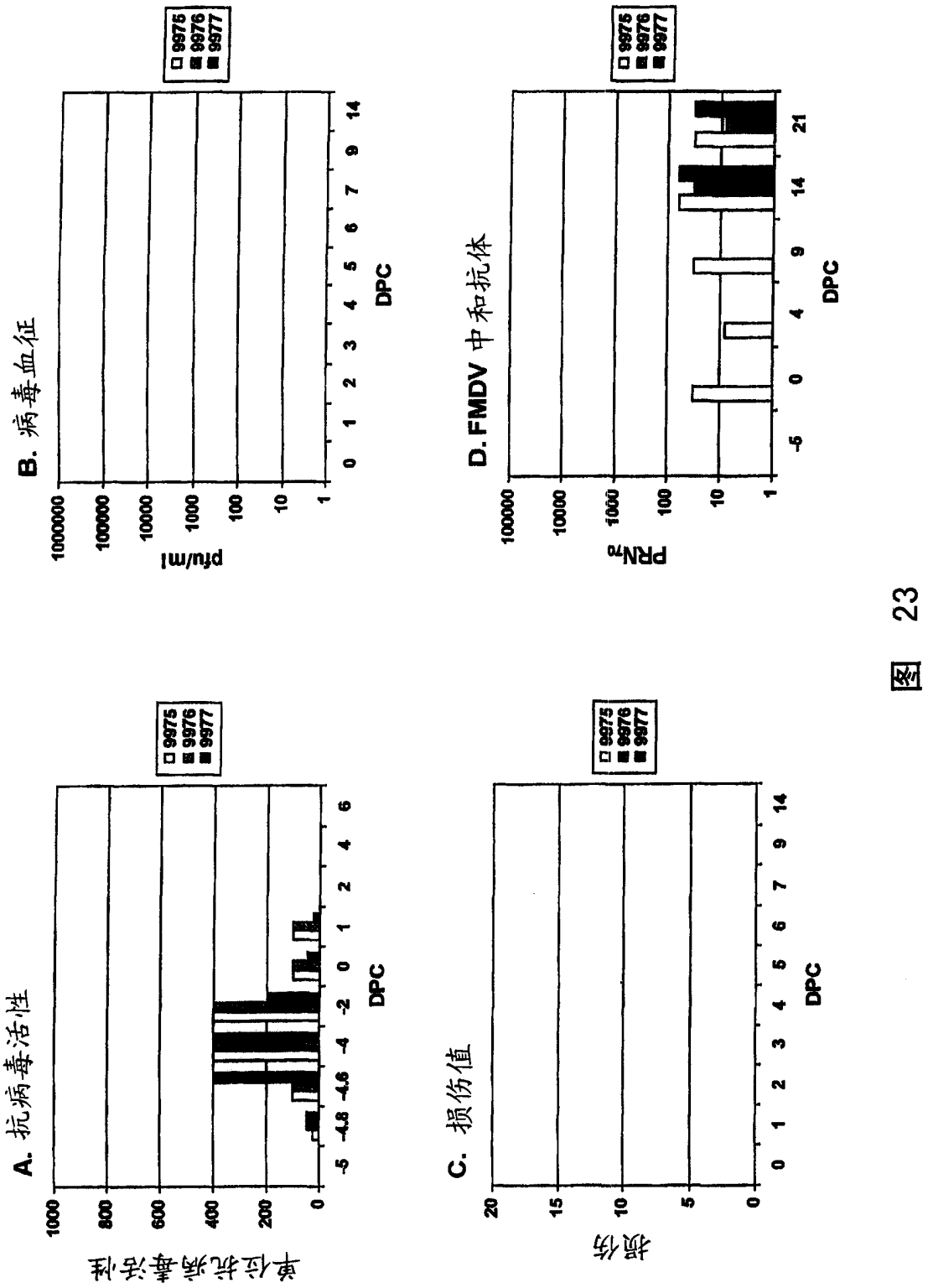

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN
DPC
9975
9976
9977

图 23

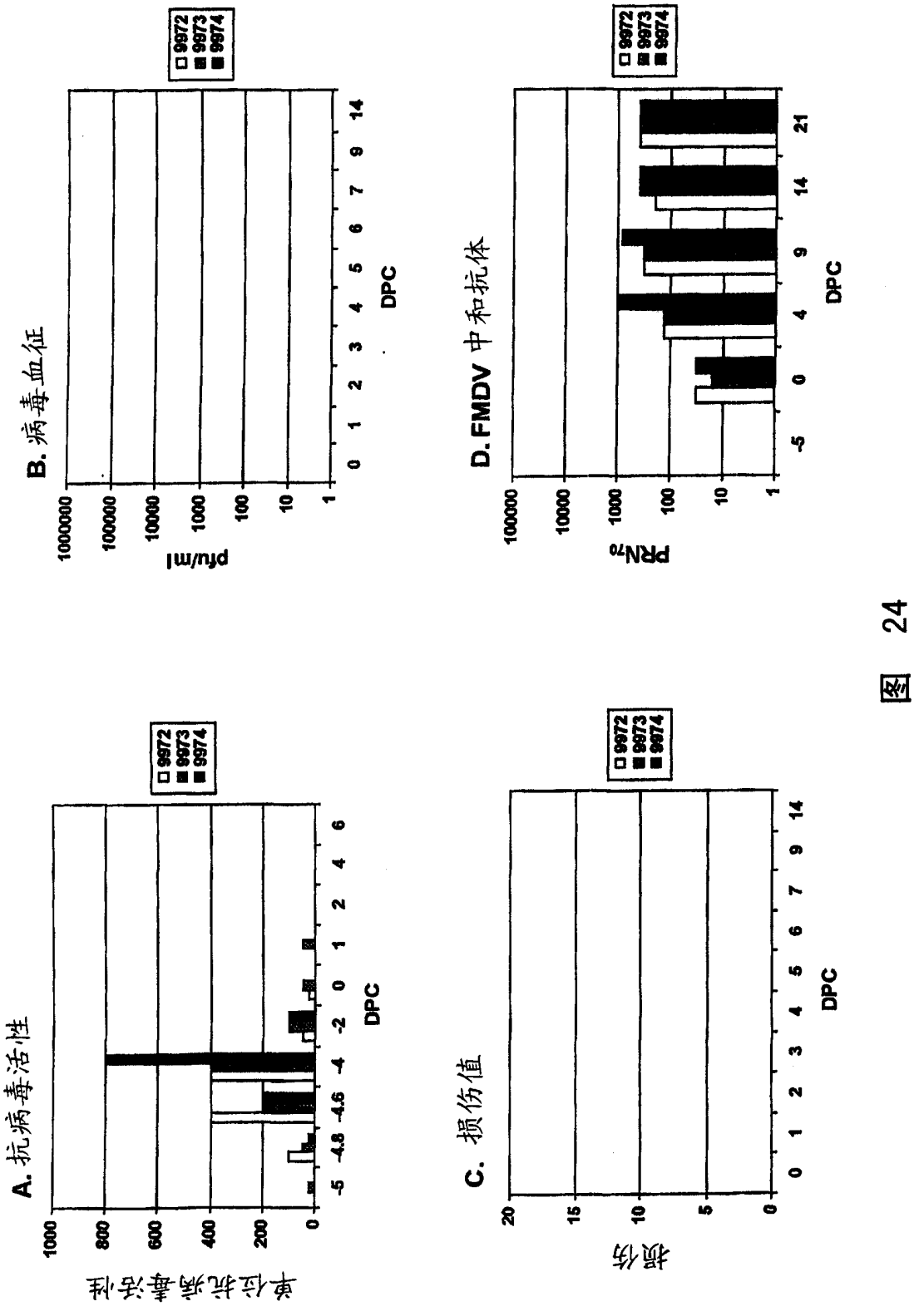

A. 抗病毒活性
单位抗病毒活性
DPC
B. 病毒血征
pfu/ml
DPC
C. 损伤值
损伤
DPC
D. FMDV 中和抗体
PRN70
DPC
9972
9973
9974

图 24

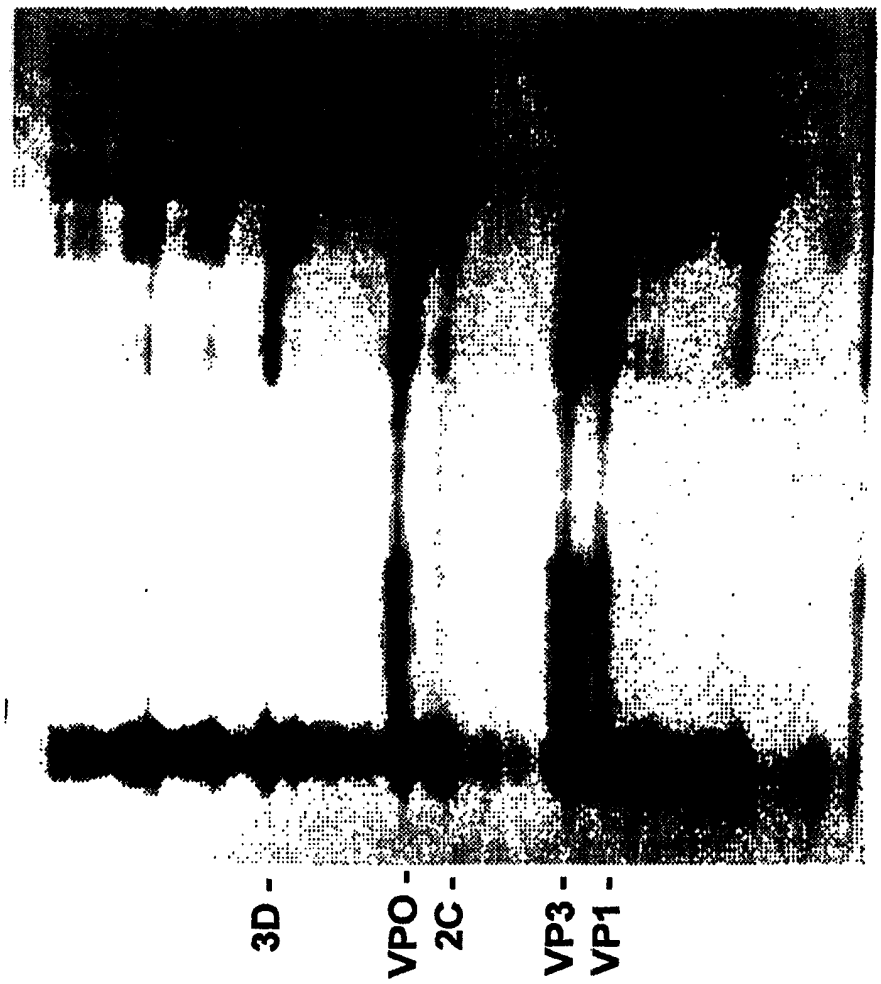


图 25

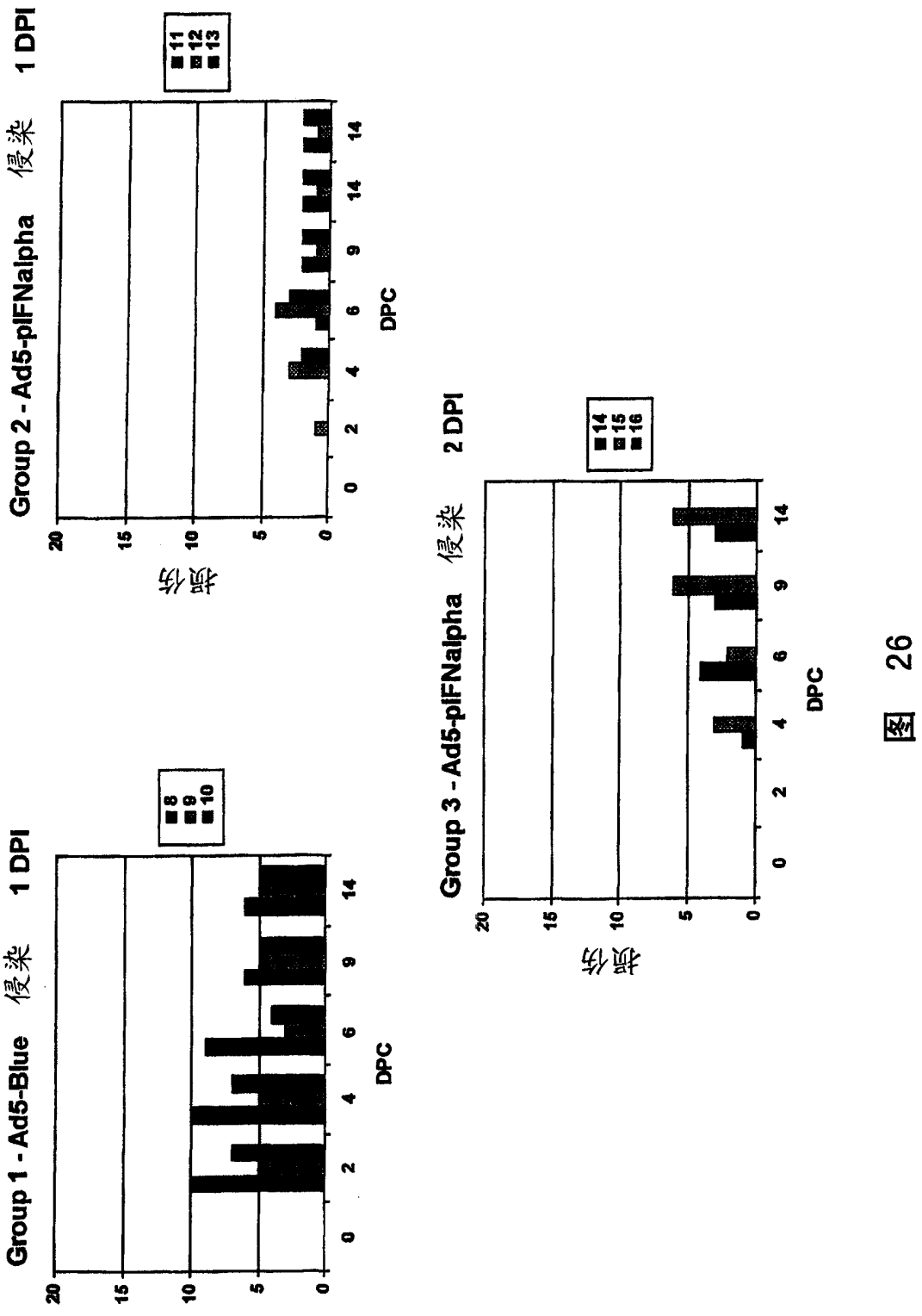

Group 1 - Ad5-Blue 侵染 1 DPI
8
9
10
感染
DPC
Group 2 - Ad5-pIFNalpha 侵染 1 DPI
11
12
13
感染
DPC
Group 3 - Ad5-pIFNalpha 侵染 2 DPI
14
15
16
感染
DPC

图 26