

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 2/00
C07K 19/00 A61K 39/12
A61K 39/15 A61K 39/44
A61K 47/42 A61P 37/02
C12N 15/12 C12N 15/866

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814551.2

[43] 公开日 2002 年 11 月 27 日

[11] 公开号 CN 1382153A

[22] 申请日 2000.8.18 [21] 申请号 00814551.2
[30] 优先权
[32] 1999.8.19 [33] AU [31] PQ2337
[86] 国际申请 PCT/AU00/00988 2000.8.18
[87] 国际公布 WO01/14411 英 2001.3.1
[85] 进入国家阶段日期 2002.4.19
[71] 申请人 新南威尔士省农业及水土保持部长
地址 澳大利亚新南威尔士省
[72] 发明人 A·D·尚农 C·A·L·S·科拉科
M·J·弗罗斯特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗宏 王其灏

权利要求书 2 页 说明书 57 页 附图 4 页

[54] 发明名称 重组亚单位疫苗
[57] 摘要

提供了一种生产含有与异源抗原性多肽结合的热激蛋白(hsp)的免疫原性复合体的方法,该方法包括:(a)在一种细胞中表达所述抗原性多肽,该细胞受到过一种刺激,这种刺激能导致在该细胞中诱导热激反应;和(b)从所述细胞或培养介质中回收与一个或多个 hsps 结合的所述抗原性多肽。还提供了一种免疫原性组合物,该组合物含有与异源抗原性多肽结合的源于非哺乳真核生物的热激蛋白(hsp),该组合物能够在人或动物体内诱导对所述抗原性多肽的免疫反应。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种生产含有与异源抗原性多肽结合的热激蛋白(hsp)的免疫原性组合物的方法, 该方法包括:

5 (a) 在一种细胞中表达所述抗原性多肽, 该细胞受到过一种刺激, 这种刺激能导致在该细胞中诱导热激反应; 和

(b) 从所述细胞或培养介质中回收与一个或多个 hsps 结合的抗原性多肽。

2. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述细胞是非哺乳动物细胞, 而所述 hsp 是非哺乳动物 hsp。

10 3. 如权利要求 2 的方法, 其中, 所述细胞是非哺乳动物真核细胞, 而所述 hsp 是非哺乳动物真核 hsp。

4. 如权利要求 3 的方法, 其中, 所述细胞是昆虫细胞, 而所述 hsp 是昆虫 hsp。

15 5. 如上述权利要求中任一项的方法, 其中, 所述抗原性多肽是病原生物的抗原, 或其片段或衍生物。

6. 如权利要求 5 的方法, 其中, 所述病原生物是病毒或细菌。

7. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述病毒是瘟病病毒。

8. 如权利要求 7 的方法, 其中, 所述病毒是牛病毒性腹泻病毒(BVDV)。

20 9. 如上述权利要求中任一项的方法, 其中, 所述抗原性多肽是通过以下方式在所述细胞中表达的: 将编码所述抗原性多肽的多核苷酸导入所述细胞, 所述多核苷酸可操作地连接于能够指导所述多肽在所述细胞中表达的控制序列上。

25 10. 如权利要求 9 的方法, 其中, 所述多核苷酸是病毒或病毒载体的一部分。

11. 如权利要求 10 的方法, 其中, 所述细胞是昆虫细胞, 而所述病毒或病毒载体是杆状病毒或杆状病毒载体。

30 12. 一种含有免疫原性复合体的组合物, 该复合体包括通过权利要求 1-11 中任一项的方法获得的与异源抗原性多肽结合的热激蛋白(hsp)。

13. 一种含有与异源抗原性多肽结合的源于非哺乳真核生物的热激蛋白(hsp)的组合物, 该组合物能够在动物或人体内诱导对所述抗

原性多肽的免疫反应。

14. 如权利要求 13 的组合物，其中，所述 hsp 是昆虫 hsp。

15. 如权利要求 13 或 14 的组合物，其中，所述抗原性多肽是病原生物的抗原，或者其片段或衍生物。

5 16. 如权利要求 13-15 中任一项的组合物，其中，所述病原生物是病毒或细菌。

17. 如权利要求 16 的组合物，其中，所述病毒是瘟病病毒。

18. 如权利要求 17 的组合物，其中，所述病毒是牛病毒性腹泻病毒（BVDV）。

10 19. 一种组合物，含有与热激蛋白结合的瘟病病毒抗原。

20. 一种药用组合物，含有免疫原性剂量的权利要求 12-19 中任一项的组合物和可以药用的载体或稀释剂。

21. 一种在动物体内诱导针对一种病原体的免疫反应性的方法，该方法包括以下步骤：给动物服用有效治疗剂量的如权利要求 20 的药用
15 组合物。

重组亚单位疫苗

本发明领域

- 5 本发明总体上涉及用于包括哺乳动物、人类、禽类和鱼在内的动物的治疗剂及其开发领域。更具体地讲，本发明涉及能有效抗引起感染的病原体的亚单位疫苗，该疫苗可用于包括哺乳动物、人类、禽类和鱼在内的动物。

背景技术

10 科学背景

- 治疗剂的开发，特别是针对诸如病毒、细菌、原生动物、真菌的疫苗的开发正在进行中。业已证实，所述研究在预防包括人类在内的动物中疾病的传播方面具有不可估量的价值。实际上，在现代医学中，包括免疫接种在内的免疫疗法已经根除了天花，并且基本上根除了诸如脊髓灰质炎、破伤风、结核病、水痘和麻疹的疾病。

 一般，理想的疫苗具有长的货架寿命，能够诱导针对预定的病原体及所有表型变体的长期的免疫性，不会导致该疫苗所要针对的疾病，在治疗方面和预防方面是有效的，容易用经济的标准方法制备并且可以用本领域方法方便的服用。

- 20 有四种主要类型的商业化疫苗。其中，包括无生命的完整生物疫苗，有生命的减毒疫苗，载体疫苗，和亚单位疫苗。用诸如蛋白的无生命材料接种典型的会导致抗体反应或 CD4+辅助 T 细胞反应，而用有生命的材料（例如，感染性病毒）接种典型的会导致 CD8+细胞毒性 T-淋巴细胞（CTL）反应。对于传染性病毒和细菌的病原体防护来说，CTL 反应是关键。由此产生的实际问题是，CTL 反应的为数不多的某些途径是使用有生命的试剂，这些试剂本身就是致病性的。这一问题典型的是通过使用减毒的病毒和细菌菌株或者通过对可用于接种的完整细胞进行灭活而克服的。上述策略一直是有效的，但使用减毒的菌株总是具有风险，因为减毒的试剂可能在宿主中发生遗传重组，并转变成有毒的菌株。因此，能够通过用诸如蛋白这样的无生命的材料，以特定方式免疫接种导致 CD8+CTL 反应的治疗剂和方法是需要的。

 亚单位疫苗业已提供了解决上述某些问题的一种方式。这种疫苗

典型的包括源于感兴趣的病原体的亚细胞成分。亚单位成分可以是由病原体的特定亚细胞部分产生的，可以是纯化的蛋白，核酸或多糖。上述所有因子都具有能够刺激针对感兴趣的病原体的免疫反应的抗原性决定子。一般，所述亚单位疫苗的亚细胞成分是通过纯化破碎的病原体5 原体制备物而获得的，或者用已知方法合成。

不过，亚单位疫苗具有某些局限。首先，生产所述疫苗的前提条件是所述抗原决定子必须是确定的和鉴定过的。这对它的应用造成了局限，特别是针对高度变性的抗原决定子。其次，亚单位疫苗在刺激毒性 T 细胞反应方面典型的是无效的。第三，由亚单位疫苗所产生的免疫性典型的是短寿命的，并因此需要连续的强化注射。只有极少数的重组表达的亚单位疫苗被证实能在接种过的动物（包括人）体内诱导有效的和长期的免疫性。一个突出的例外是用于人体的重组乙型肝炎表面抗原疫苗。与使用所述疫苗相关的一个问题是，将所述抗原正确呈递给所述免疫系统，以便诱导强烈的体液免疫性和强烈的细胞介10 导的免疫性。具体地讲，现有的重组（亚单位）疫苗似乎不能产生有效的‘记忆’反应，因此接种过的动物，在暴露于由病原体所产生的天然感染时会很快作出反应。

仅仅是举例来说，业已大量报导了由瘟病病毒样牛病毒性腹泻病毒（BVDV）所制备的现有亚单位疫苗的缺陷。这些研究业已证实，即使20 在疫苗中使用大量的重组蛋白，所产生的保护作用也很差。这表明这种疫苗不能保护由有生命的 BVDV 分离物所产生的刺激（同源性保护或异源性保护）。

本发明试图提供一种改进的治疗用疫苗，它能减轻现有技术中的至少某些缺陷。

25 一般背景

本领域技术人员可以理解的是，可以对本文所描述的发明进行除了这些具体说明以外的改变和改进。应当理解的是，本发明包括所有这样的改变和改进。本发明还包括在说明书中单独或统一提到或指明的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及其任意的和所有的组合和30 任何两个或两个以上步骤或特征。

尽管一般来说本文所提到的技术在本领域中是公知的，可以特别参考 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册（1989）和 Ausubel 等，

分子生物学简明方法(1999)第4版, John Wiley&Sons 公司。

本发明并不局限于由本文所描述的具体实施方式所确定的范围。这些实施方式只是用于实例说明目的的。功能性等价产物、组合物和方法明显属于本发明所描述的发明的范围。

5 在本说明书中所提到的出版物的参考文献的细节在说明书的最后统一给出。所引用的所有文献都被收作本文参考。不可以将任何一份参考文献作为现有技术。

10 在本说明书中,除了文本另有需要,术语“包括”或者其变体被理解成包括特定的整体或整体组合,但不排除任何其他整体或整体组合。

发明概述

本发明总体上涉及一种生产含有与异源抗原性多肽结合的热激蛋白(hsp)的免疫原性组合物的方法,该方法包括:

15 (a)在一种细胞中表达所述抗原性多肽,该细胞受到过一种刺激,这种刺激能导致在该细胞中诱导热激反应;和

 (b)从所述细胞或培养介质中回收与一个或多个 hsps 结合的抗原性多肽。

20 所述细胞优选是非哺乳真核细胞,更优选是昆虫细胞。典型的,所述抗原性多肽是通过将编码所述抗原性多肽的多核苷酸导入所述细胞中而在该细胞中表达的,所述多核苷酸可操作地连接于能够指导所述多肽在该细胞中表达的调控序列。所述多核苷酸优选是病毒或病毒载体的一部分,如杆状病毒。

25 本发明还提供了一种含有与异源抗原性多肽结合的 hsp 的组合物,该组合物是通过本发明的方法生产的。理想的是,该组合物能够增强动物对一种病原体的免疫反应力。所述 hsp 优选源于非哺乳动物真核细胞,更优选昆虫细胞。

30 与至少一种抗原性肽/多肽结合的 hsps,如昆虫 hsps,提供了作为在背景技术部分所讨论的疫苗的替代性治疗疫苗,用于刺激动物的免疫系统,以便引起针对外源病原体的免疫反应。尽管 hsps 已经包括在治疗制剂中,就申请人所知,还没有人把与至少一种抗原性肽/多肽结合的源于非哺乳动物真核细胞的 hsps,特别是昆虫细胞 hsps,用于对诸如家养动物和人类的哺乳动物进行治疗。

用本发明的昆虫细胞/杆状病毒实施方法所生产的不同亚单位疫苗的综合特征包括:

(1) 该复合体是完全没有传染性的。

5 (2) 该复合体在用于动物时是安全的, 因为杆状病毒不会感染动物细胞。

(3) 本发明所生产的治疗剂的生产成本较低, 因为与相当的系统相比, 杆状病毒感染的昆虫细胞培养物能产生更高产量的抗原性蛋白。

10 (4) 业已发现本发明所开发的治疗剂能在动物体内产生非常强的记忆反应。因此, 当一种动物随后在受到一种病原体刺激攻击时, 它会产生针对该病原体的非常迅速而有效的反应。

因此, 本发明还提供了一种含有与异源抗原性多肽结合的源于非哺乳真核细胞的热激蛋白(hsp)的组合物, 该组合物能够在哺乳动物中诱导针对抗原性多肽的免疫反应。

15 优选的 hsp 是昆虫热激蛋白。因此, 在一种优选实施方法中, 本发明提供了能够在动物体内诱导免疫反应的改进的亚单位疫苗, 它包括: 与抗原性异源肽或多肽结合的昆虫细胞 hsps。

所述 hsp 和抗原性多肽优选是通过非共价方式结合的。

20 所述抗原性多肽优选是一种病原体生物的抗原或其抗原性片段或衍生物。所述抗原性多肽更优选是一种病毒或细菌的抗原, 或其抗原性片段或衍生物。在一种优选实施方法中, 所述抗原性多肽源于诸如 BDVD 的瘟病病毒(pestivirus), 特别是 E1/E2 或 NS3/NS4a 多肽或其片段或衍生物。

25 在一种高度优选的实施方法中, 所述组合物可以通过这样一种方法获得, 包括:

(a) 在一种非哺乳动物真核细胞中表达所述抗原性多肽, 该细胞受到过一种刺激, 这种刺激能导致在该细胞中诱导热激反应; 和

(b) 从所述细胞或培养介质中回收与一个或多个 hsps 结合的抗原性多肽。

30 因此, 本发明还提供了制备 hsp-抗原性异源肽或多肽复合体的方法, 包括: (a) 将编码至少一种抗原性肽或多肽的核苷酸序列导入所述细胞, 所述核苷酸序列是以这样一种方式导入该细胞的, 当该序列

位于所述细胞内时该核苷酸序列可以翻译；(b)在能表达所述肽或多肽的条件下培养所述细胞；(c)让所述细胞接受一种能够在该细胞中启动热激蛋白产生的胁迫；(d)回收所表达的复合体。该方法还可以包括以下步骤：通过本领域所公知的任何方法纯化所述复合体。在一种优选实施方法中，用所述方法所生产的复合体是从昆虫细胞多肽中分离。

本发明的组合物可用于治疗方法中，用于诱导针对抗原性异源肽或多肽的免疫反应。

本发明还提供了一种药用组合物，该组合物含有免疫原性剂量的本发明的组合物和一种可以药用的载体或稀释剂。

在另一种实施方法中，本发明提供了一种在动物体内诱导针对一种病原体的免疫反应力的方法，该方法包括以下步骤：给一种动物服用有效剂量治疗的与抗原性肽或多肽结合的非哺乳真核细胞 hsp 和可以药用的载体。

本发明的方法优选包括，通过服用含有治疗有效量的复合体的组合物，在需要治疗或预防传染病的个体内引起免疫反应的方法，其中，所述复合体主要包括与一种抗原性分子非共价结合的 hsps，可以使用任何方便的服用方法。可以使用多种服用技术，其中包括口服、鼻腔和其他形式的经黏膜服用，肠胃外技术，如皮下、静脉和腹膜内注射和导管插入术等。

本发明的详细说明

本发明基于这样的发现，即用以受到过热激的昆虫细胞中的杆状病毒系统所表达的 BVDV 为基础的重组亚单位疫苗，在预防奶牛和绵羊感染 BVDV 方面是高度有效的，包括一种与 BVDV 菌株的亲源关系很远的攻击菌株 (challenge strain)，其多肽亚基被用作该疫苗的基础。这一点并不与以前所披露的针对 BVDV 的亚单位疫苗完全矛盾，那些亚单位疫苗不能产生针对来自多种不同菌株的 BVDV 感染的广泛保护。

该系统不仅能产生高度有效的疫苗组合物，而且比现有的其他疫苗便宜和安全。

30 热激蛋白和抗原性多肽

热激蛋白 (hsps) 是细胞在受到热激和其他形式的细胞胁迫时产生的。主要的 hsps 在胁迫的细胞中能积累到很高的水平，但它在未受

到胁迫的细胞中以低的至中等水平存在。用于本发明的热激蛋白是这样的蛋白 (i) 当细胞受到胁迫刺激时其细胞内浓度提高, (ii) 它可以结合其他蛋白或肽, 和 (iii) 在存在腺苷三磷酸 (ATP) 或低 pH 条件下能够释放所结合的蛋白或肽。适用于本发明的范围的热激蛋白的具体例子包括被称为分子伴侣的一类蛋白的某些。

包括陪伴蛋白在内的分子伴侣是能通过非酶促方式促进蛋白折叠的多肽, 其中, 它不会催化折叠中的多肽在结构上发生任何化学修饰, 但能够通过促进正确的结构排列促使多肽正确折叠。分子伴侣为本领域所公知, 业已鉴定了其中的若干家族。不同生物之间的分子伴侣是高度保守的。分子伴侣的例子包括 hsp70 家族 (DnaK 型), hsp60 家族 (GroEL 型), ER 相关分子伴侣, hsp90 家族, Hsc70, hsp40 家族 (DnaJ), 线粒体 hsp70, 线粒体 mAAA 和酵母 Ydj1。特别优选的是使用 hsp60、hsp70 和 hsp90 家族的成员, 其分子内浓度会根据胁迫刺激而增加。

热激蛋白存在于原核细胞和真核细胞中, 并且当所述免疫原性组合物通过本发明的热激方法产生时存在有热激蛋白, 存在于 hsp/抗原复合体中的 hsps 可以来自任何来源, 包括原核细胞或真核细胞。不过, hsps 优选源于非哺乳动物细胞, 更优选非哺乳真核细胞, 如昆虫细胞。

因此, 存在于本发明组合物中的 hsps 典型的源于非哺乳真核细胞。

“非哺乳真核细胞”是除了哺乳动物细胞以外的所有真核细胞。例如, 非哺乳动物真核细胞包括酵母细胞、真菌细胞、无脊椎动物细胞, 如昆虫细胞, 和非哺乳脊椎动物细胞, 如两栖动物细胞。优选使用能够对在所述细胞中表达的异源多肽进行糖基化的细胞, 而其他翻译后修饰典型的是在哺乳动物细胞的内质网/高尔基体中进行的。不过, 没有必要象在哺乳动物细胞中那样, 需要所述细胞进行精确的相同翻译后修饰。例如, 昆虫细胞与哺乳动物细胞相比, 倾向于将更少的复合糖类结合到新合成的氨基酸链上。

“非哺乳动物细胞”包括上文所披露的非哺乳动物真核细胞以及原核细胞。原核细胞包括真细菌, 如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和任何其他适用于表达异源多肽的真细菌。原核细胞可能更适用于表达除了

病毒抗原以外的细菌抗原。可用于本发明方法中的“哺乳动物细胞”包括诸如 CHO 细胞, HeLa 细胞的细胞系, 和适用于表达异源多肽的任何其他类型的哺乳动物细胞。

5 本文所使用的术语“hsp 抗原性肽/多肽复合体”, 是指可以从细胞培养物中分离的任何复合体, 它包括与至少一种异源肽或多肽结合的 hsps, 它具有至少一个抗原决定子。所述结合优选是通过非共价键实现的。

10 本文所使用的术语“非哺乳动物 hsp-抗原性肽/多肽复合体”, 是指可以能够从非哺乳动物细胞的培养物中分离的任何复合体, 它包括与至少一种异源肽或多肽结合的非哺乳动物 hsps, 具有至少一个抗原决定子。所述结合优选是通过非共价键实现的。

15 本文所使用的术语“异源多肽”是指对诸如非哺乳动物细胞的细胞来说不是内源性的肽或多肽, 即不是由该细胞的基因组所编码的。它优选是在正常情况下在体内不与 hsps 内源结合的物质, 并且正常情况下不能与诸如非哺乳真核细胞 hsps 共同纯化。

20 本文所使用的术语“多肽”是指长度超过一个氨基酸的任何氨基酸序列, 因此包括长度为两个或两个以上氨基酸的肽, 典型的具有 5、10 或 20 个以上的氨基酸, 这些氨基酸可以通过化学方法修饰过的或未修饰过的。本文所使用的术语“多肽”还包括蛋白, 蛋白是一个包括单链多肽分子和多个多肽复合体的术语, 其中, 单一的组成多肽通过共价方式或非共价方式连接。

25 当一种分子能够与免疫系统的抗原识别分子, 如免疫球蛋白(抗体)或 T 细胞抗原受体专一性地相互作用时, 该分子是“抗原性的”。抗原性多肽包括至少大约 5 个, 优选至少大约 10 个氨基酸。一个分子的抗原性部分可以是抗体或 T 细胞受体识别的免疫显性部分, 或者它可以是用于产生该分子抗体的部分。

30 抗原性分子可以从本领域已知的分子中筛选, 或者通过其结合抗体或 MHC 分子或产生免疫反应的能力筛选。它包括可以诱导针对感染剂的免疫反应的任何分子, 感染剂例如, 病毒、细菌、真菌、寄生物等的抗原。在本发明的一种优选实施方式中, 所述抗原性分子可以源于, 但不限于: (1) 病毒蛋白, 如任何免疫缺陷病毒的蛋白, 包括 I 型人类免疫缺陷病毒(HIV-I)和 II 型人类免疫缺陷病毒(HIV-II),

黄病毒，瘟病病毒样牛病毒性腹泻病毒（BVDV），边界病病毒（border disease virus）（BDV）和经典猪热病毒（CSFV）、甲型肝炎，乙型肝炎，丙型肝炎，戊型肝炎，庚型肝炎（GB），流感，水痘，腺病毒，I型单纯疱疹（HSV-I），II型单纯疱疹（HSV-II），牛瘟病病毒，鼻病毒，艾柯病毒（echovirus），轮状病毒，呼吸道合胞体病毒，乳头瘤病毒，乳多空病毒，组病毒，巨细胞病毒，海胆病毒，虫媒病毒，汉坦病毒，柯萨奇病毒，腮腺炎病毒，麻疹病毒，风疹病毒和脊髓灰质炎病毒；（2）抗原性细菌蛋白，选自但不限于分支杆菌属，立克次氏体，支原体，奈瑟菌属和军团（legionella）菌属；（3）抗原性原生动物蛋白，选自但不限于利什曼原虫属，球虫属和锥虫属；和（4）抗原性寄生物蛋白选自，但不限于衣原体和立克次氏体。

特别优选的是使用源于瘟病病毒蛋白的抗原性多肽，如 C/E0，E1/E2，NS3/NS4A 和/或 NS5A/B。瘟病病毒优选选自 BVDV（I型和/或II型）和 BDV。

15 本发明的组合物可以含有一种以上不同的 hsp/抗原性多肽复合体。例如，可以用两种或两种以上不同的抗原性多肽增强本发明的免疫原性。所述两种或两种以上抗原性多肽可源于相同的蛋白或不同的蛋白。对于瘟病病毒来说，特别优选的是使用至少一种源于一种结构蛋白的抗原性多肽和至少一种源于非结构多肽的抗原性多肽。例如，
20 在一种高度优选的实施方案中，本发明的组合物包括 hsp-瘟病病毒 E1/E2 复合体和 hsp-瘟病病毒 NS3/NS4A 复合体。

当本发明的组合物中存在一种以上抗原时，至少有一种抗原性多肽当作为 hsp 复合体的一部分给人或动物服用时，应当能够产生保护性免疫反应。不过，也希望包括一种 hsp/抗原性多肽，当接种过的宿
25 主随后被相应的天然病原体感染时，不会引起抗体反应和抑制或减弱针对特定抗原的免疫反应的产生。这为疫苗接种者提供了有用的标记。举例来说，业已在实施例部分证实了一种截短的 BVDV NS3/NS4A 抗原能够提供这种用途。

制备含有与抗原性多肽结合的 hsps 的组合物

30 含有与抗原性多肽结合的 hsps 的本发明的组合物可以通过多种方法制备。

例如，通过重组方法、化学合成获得的和/或从诸如非哺乳动物真

核细胞的细胞裂解物这样的天然来源中获得的纯化的或部分纯化的非哺乳动物真核 hsps，可以在合适的容器中的体外与一种或一种以上抗原性多肽混合，所述抗原性多肽可以通过重组方法、化学合成获得，和/或从合适的天然来源的细胞裂解物中获得，如病毒感染过的哺乳动物细胞或病原体细菌的培养物。在与抗原性多肽结合之前，可以用 ATP 或低 pH 对 hsps 进行预处理，以便除去有可能与感兴趣的 hsps 结合的任何肽。可以通过添加腺苷三磷酸双磷酸酶从所述制剂中除去多余的 ATP。当采用低 pH 时，应当将 pH 重新调整到中性 pH。通过在合适的容器中将预处理过的 hsp 和抗原性肽混合并培养 10 分钟至若干小时，hsps 可以与所述抗原性肽结合。典型的使用的抗原性多肽与 hsps 的比例大于 1。可以选择性地纯化所述混合物，以便除去未结合的抗原性肽。

在本发明的一种高度优选的实施方案中，所述 hsps/抗原性多肽复合物是通过在一种条件下表达所述抗原性多肽而制备的，在所述条件下，可以诱导细胞的胁迫反应并且内源热激蛋白的细胞内含量增加。该方法是特别方便的，因为它不必纯化或合成 hsps，当使用其 hsps 没有充分鉴定的细胞时这是有利的。另外，在存在内源 hsps 时，在细胞内环境中表达抗原性多肽，有可能导致比无细胞系统更有效的结合。

优选使用非哺乳动物细胞，如非哺乳动物真核细胞或原核细胞，更优选非哺乳动物真核细胞。

因此，在本发明的一种优选方法中，本发明的组合物是通过首先将编码感兴趣的抗原性多肽的多核苷酸导入细胞而制备的。所述多核苷酸可以包括调控序列，如启动子，一个或多个增强子和其他转录/翻译控制序列，以便可以在所述细胞中表达所述抗原性多肽。有可能需要使用能够使所述抗原性多肽进行诱导型表达的调控序列，例如，根据服用外源分子或实际上受到诸如热激这样的刺激而表达。这样可以确保在通过热激刺激将热激蛋白上调到所述水平之前，不会合成所述抗原性多肽。另外，只是在需要表达所述多肽时将所述多核苷酸导入所述细胞，可以临时控制所述抗原性多肽的表达。

还可以方便地包括一个 N-末端分泌信号，以便所述抗原性多肽被分泌到细胞介质中，正如在实施例中所披露的 E1/E2 BVDV 多肽的情

况。

在一种优选实施方法中，所述多核苷酸是病毒载体的一部分，如杆状病毒载体或传染病毒，如杆状病毒。这样提供了一种方便的系统，因为不仅可以在使用之前保持并保存重组病毒母液，而且，已知对于诸如杆状病毒的病毒来说，可以推迟感染后蛋白表达，这样便可以方便地确定并再现对宿主细胞进行休克的最佳时间。可以将编码所述抗原性肽或多肽的核苷酸序列插入重组杆状病毒中，该病毒业已进行过遗传工程改造，能产生抗原性肽或多肽，例如，按照 Smith 等 (1983) 的方法进行改造，分子细胞生物学 (Mol Cell Biol) 12: 2156-2165。

10 有多种病毒转移载体可以将一个以上编码多肽的多核苷酸序列插入同一个载体上，以便可以由相同的重组载体对它们进行共表达。

本发明的方法不局限于在所述宿主细胞中一次产生一种抗原性多肽。可将编码感兴趣的不同抗原性多肽的多种多核苷酸导入同一种宿主细胞中。所述多核苷酸可以是同一种核酸分子的部分或单独的核酸分子。

15

一旦将所述编码感兴趣的抗原性多肽的多核苷酸导入所述宿主细胞，就在合适的条件下培养该细胞，以便表达所述蛋白。然后对所述细胞进行热激，以便诱导内源 hsp 的表达 (或增强其表达)。对多种宿主细胞进行热激的条件为本领域所公知。例如下面提供了昆虫细胞的特定条件。

20

一旦将所述细胞培养了一段合适的时间使得蛋白表达，就可以从细胞中回收抗原性多肽/hsp 复合体。就此而言，所述复合体可以存在于细胞内部和/或存在于细胞介质中。细胞内复合体可以用标准裂解和纯化方法回收。分泌的复合体可以从外部介质中回收，并通过诸如用 Centricon 试管浓缩的方法进行纯化。当本发明的复合体被分泌到介质中时，优选让所述宿主细胞在无血清介质中生长。

25

然后，典型的将回收的 hsp/抗原性多肽复合体与一种可以药用的载体或稀释剂和/或其他成分混合，以便生产药用组合物/疫苗组合物。

30 尽管根据本发明的方法，有多种非哺乳动物真核细胞，如酵母细胞、真菌细胞、无脊椎动物细胞和非哺乳脊椎动物细胞可以用作宿主细胞，但优选使用昆虫细胞。优选的昆虫细胞来自鳞翅目，例如，草

地滩夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)，如 Sf9 和 Sf21 细胞系。

- 例如，抗原性蛋白与昆虫细胞 hsps 在体外的简单结合可以很简单地完成，在感染 24-48 小时之间，将受感染的细胞放入例如 43℃ 的水浴中（放在容器中），处理大约 10 分钟，以便对所述细胞进行热激。
- 5 然后在大约 27.5℃ 下将所述细胞再培养 2-24 小时，以便表达结合的重组蛋白和 hsps。在所有感染之后 72-96 小时结束，收获重组蛋白培养物。

- 本领域技术人员可以容易地确定在各种合适的宿主细胞中诱导热激反应并进行抗原性多肽的最佳表达的最佳时间和温度，例如通过进行一定时间过程，或者对于很多细胞系来说已经测定过。
- 10

典型的，所述热激反应是在诱导所述抗原性多肽表达之后或者大体上同时诱导的，更优选在之后诱导。

- 在给人类或动物对象服用之前，可以选择使用本领域所公知的体外测定方法，如混合淋巴细胞靶培养物测定 (MLTC)，对 hsp/抗原性多肽组合物的免疫原性进行测定。
- 15

组合物

- 优选将含有与抗原性多肽结合的 hsps 的本发明的组合物与各种成分混合，以便生产本发明的组合物。优选将所述组合物与可以药用的载体或稀释剂混合，以便生产药用组合物（该组合物可用于人类或动物）。还可将含有与抗原性多肽结合的 hsps 的本发明的组合物与适合的成分混合，以便获得疫苗组合物。
- 20

- 因此，本发明提供了含有非哺乳动物真核 hsp-抗原性肽或多肽复合体的药用/疫苗组合物，该组合物能增强宿主个体的免疫能力并诱导针对病原体的特定免疫性。以下描述了本发明的治疗方法和药用组合物。据信，所述组合物具有预防传染性疾病发作和发展的能力。
- 25

一般，本发明的药用组合物和/或疫苗组合物，含有有效治疗剂量的与一种抗原性多肽结合的 hsp。

- 术语“可以药用的载体或稀释剂”是指在给人服用以后生理上可以承受，并且典型的不会产生过敏性或类似的不适反应，如胃肠不适和头昏等的分子实体和组合物。在本文中，术语“可以药用的”优选是指获得了联邦或州政府的管理机构的批准或被列在了用于动物，尤其是用于人类的美国药典或其他被普遍认可的药典上。术语“载体”
- 30

是指用它来服用有关化合物的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。所述药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括石油、动物油、植物油或合成的油，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。优选将水或可溶的盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液用作载体，特别是用作注射溶液。合适的药用载体披露于以下文献中 Martin, Remington's 药物科学，第 18 版，Mack 出版公司，Easton, PA, 1990。

本文所使用的术语“治疗有效量”是指足于对动物免疫系统产生至少大约 15%，优选至少 50%，更优选至少 90%，最优选产生完全刺激的量，使它产生针对所述抗原性决定子的免疫记忆。

一般，本发明包含的药用组合物含有本发明的有效治疗剂量和可以药用的稀释剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、佐剂和/或载体。所述组合物可以包括各种缓冲成分的稀释剂（例如，Tris-HCl，乙酸盐、磷酸盐），pH 和离子强度；添加剂，例如去垢剂和增溶剂（例如，Tween80，Polysorbate80）、抗氧化剂（例如，抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠）、防腐剂（例如，Thimersol，苧醇）和填充物质（例如，乳糖、甘露糖）；将所述材料掺入聚合化合物的颗粒制剂中，如聚乳酸、聚乙醇酸等或掺入脂质体中。还可以使用透明质酸。所述组合物可以影响该复合体的物理状态、稳定性、体内释放速度和体内清除速度。参见例如，Martin, Remington's 药物科学，第 18 版（1990，Mack 出版公司，Easton, PA, 18042），1435-1712 页，该文献被收作本文参考。所述组合物可以制成液体形式或者是干粉形式，如冻干的形式。

药用组合物可以通过注射使用，或者制备成用于口服、肺吸入、鼻腔或其他服用形式。按照本发明制备的复合体的服用方式必须取决于以下因素，如该复合体在生理条件下的稳定性，所需要的免疫反应强度，和病原体的类型等。

所述复合体优选标准方法服用，例如，静脉内、皮下、肌肉、眼眶内、眼内、心室内、头盖骨内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、口腔内、直肠内、阴道内、鼻腔内、口服或通过喷雾剂服用。

还可以用本发明的一种或多种 hsp/抗原性多肽复合体制备疫苗。对于含有免疫原性复合体作为活性成分的疫苗的制备，是本领域技术人员所公知的。典型的，所述疫苗被制备成可注射形式，作为液体溶液或悬浮液；还可以制备成适合在注射之前溶解在或悬浮在液体中的

固体形式。还可以对该制剂进行乳化，或者将所述蛋白胶囊化于脂质体中。所述活性免疫原性成分典型的与赋形剂混合，所述赋形剂是可以药用的并且与所述活性成分兼容。例如，合适的赋形剂有水、盐溶液、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。

- 5 另外，如果需要，所述疫苗含有微量辅助物质，如湿润剂、乳化剂、pH 缓冲剂，和/或能增强该疫苗效力的佐剂。

本文所使用的术语“佐剂”是指能增强针对一种组合物的免疫反应的化合物或混合物，该组合物含有与具有至少一个抗原决定子的肽或多肽结合的 hsp。佐剂可以起着组织仓库的作用，它能缓慢释放所述
10 抗原，并且还可以起着淋巴系统激活剂的作用，它能非专一性地增强免疫反应。

可能有用的佐剂的例子包括，但不限于：氢氧化铝、N-乙酰-肉桂酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)，N-乙酰-正-肉桂酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺 (CGP11637，被称为正-MDP)，N-乙酰肉桂酰-L-丙
15 氨酸-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺 (CGP19835A，被称为 MTP-PE)，和 RIBI，它含有从细菌中提取的三种成分，单磷酸脂 A，海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨骼 (MPL+TDM+CWS)，溶解在 2%角鲨烯/Tween80 乳液中。

佐剂和其他试剂的另外的例子包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝钾
20 (矾)、硫酸铍、二氧化硅、高岭土、碳、油包水乳液、水包油乳液、肉桂酰二肽、细菌内毒素、脂类 X、小棒杆菌 (疮疱丙酸杆菌)、百日咳杆菌、聚核糖核苷酸、藻酸钠、羊毛脂、溶血卵磷脂、维生素 A、皂草苷、免疫刺激复合体 (ISCOMs)、脂质体、左旋咪唑、DEE-葡聚糖、嵌段共聚物或其他合成佐剂。所述佐剂可以通过商业渠道从各种来源
25 获得，例如，Merck 佐剂 65 (Merck 公司，Rahway, N.J.) 或弗氏不完全佐剂和完全佐剂 (Difco 实验室，Detroit, Michigan)。

典型的，使用诸如 Amphigen (水包油)、Alhydrogel (氢氧化铝) 的佐剂，或 Amphigen 和 Alhydrogel 的混合物。只容许将氢氧化铝用于人类。

30 免疫原和佐剂的比例可以在很大范围内波动，只要这两者都以有效量存在即可。例如，氢氧化铝可以占疫苗混合物量的大约 0.5% (以氧化铝为基础计算)。典型的将疫苗制备成含有终浓度为 0.2-200 微

克/毫升的免疫原，优选 5-50 微克/毫升，最优选 15 微克/毫升。

在制备之后，可以将疫苗装入无菌容器中，然后将容器密封并在诸如 4℃ 的低温下保存，或者冷冻干燥。冷冻干燥可以以稳定形式长期储存。

- 5 佐剂的效果可以通过测定抗本发明的免疫原性复合体的抗体的量测定，这种抗体是通过服用含有该复合体以及各种佐剂的疫苗而产生的。

- 所述疫苗典型的以注射方式通过肠胃外途径服用，例如皮下注射或肌内注射。适用于其他服用方式的其他制剂包括栓剂，以及在某些
10 场合下为口服制剂。对于栓剂来说，传统的粘结剂和载体可以包括，例如，聚亚烷基二醇或甘油三酯；所述栓剂可以由含有 0.5%-10%，优选 1%-2% 的活性成分的混合物制成。口服制剂包括常用的赋形剂，例如，药用等级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁等。所述组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓
15 式制剂或粉剂形式，并含有 10-95% 的活性成分，优选 25-70%。当所述疫苗组合物是冻干的时，可以在服用之前对冻干的材料进行重建，例如，重建成悬浮液。重建优选在缓冲液中进行。

- 用于给患者口服的胶囊、片剂和丸剂，可以具有一个肠溶衣，例如，包括 Eudragit “S”、Eudragit “L”、乙酸纤维素、乙酸纤维素
20 邻苯二甲酸酯或羟丙基甲基纤维素。

- 可以将本发明的复合体制成中性或盐形式的疫苗。可以药用的盐包括酸加成盐（由肽的游离氨基基团形成），这种盐是由无机酸形成的，例如，盐酸或磷酸，或由有机酸形成的，由乙酸、草酸、酒石酸和马来酸。由游离羧基基团所形成的盐还可源于无机碱，例如，氢氧化
25 钠、钾、铵、钙、或铁，以及有机碱，如异丙基胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸和鱼精蛋白。

其他活性成分

- 本发明的组合物还可以包括不与 hsps 结合的抗原性多肽，和/或其主要目的不是用作抗原，而是用作调节某些其他方面的免疫反应的
30 生物学活性分子。用于调节动物或人类对象的免疫系统的生物学分子
的例子包括细胞因子。

术语“细胞因子”是指能影响介导免疫反应的其他细胞的功能的

任何分泌型多肽。细胞因子的某些例子包括，但不限于白介素-1. α (IL-1. α)、白介素-1. β (IL-1. β)、白介素-2 (IL-2)、白介素-3 (IL-3)、白介素-4 (IL-4)、白介素-5 (IL-5)、白介素-6 (IL-6)、白介素-7 (IL-7)、白介素-8 (IL-8)、白介素-9 (IL-9)、白介素-10 (IL-10)、白介素-11 (IL-11)、白介素-12 (IL-12)、干扰素- α (IFN. α)、干扰素- β (IFN. β)、干扰素- γ (IFN. γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、肿瘤坏死因子 β (TNF β)、粒细胞克隆刺激因子 (G-CSF)、粒细胞/巨噬细胞克隆刺激因子 (GM-CSF)、转化生长因子 β (TGF- β)。

10 治疗用途

本发明的组合物可用于使动物和人对传染性疾病进行免疫。术语“动物”包括：哺乳动物，如家畜，包括绵羊、山羊、猪、奶牛 (cow)、马、IIAMAS，家养宠物，如狗和猫，以及灵长类动物；禽类，如鸡、鹅和鸭；鱼类；和爬行动物，如鳄鱼和短吻鳄。

15 因此，本发明提供了一种在动物或人体内诱导针对一种病原体的保护性免疫反应的方法，该方法包括所述动物或人类服用有效量的本发明的组合物。

因此，本发明还提供了用于增强动物的免疫能力和免疫效应细胞针对一种病原体的活性的方法。所述方法典型的包括以下步骤：服用含有治疗有效量的昆虫细胞 hsp-抗原性肽/多肽复合体的组合物，其中，该复合体主要包括与一种异源肽或多肽抗原分子结合的 hsp。

20 在一种高度优选的实施方法中，本发明提供了由源于瘟病病毒的蛋白和多肽制备的 hsps 复合体，优选牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、更优选 BVDV E1/E2 和/或 NS3/NS4A 和/或其抗原性片段。hsp 可来自任何来源，但优选来自非哺乳动物真核细胞。

25 本文所使用的术语“疫苗”是指本发明的含有与具有至少一个抗原决定子的肽或多肽结合的 hsp 的任何组合物，该组合物在给动物服用时能够刺激针对所述抗原决定子的免疫反应。可以理解的是，术语疫苗不一定意味着该组合物可以提供全面的保护反应。只要有治疗效果就足够了。

30 术语“免疫反应”是指在受到抗原刺激之后在动物体内所产生的任何细胞过程，这些过程是朝向从动物体内消除病原的方向的。免疫

反应典型的是由一群或多群细胞介导的，其特征是淋巴细胞和/或吞噬细胞。

针对所导入的 hsp-抗原性肽或多肽复合体所产生的免疫反应，是由位于该复合体的肽或多肽上的抗原决定簇的氨基酸组成决定的。所述决定簇可以确定体液或细胞介导的抗原区。不受任何特定作用模式的局限，希望由所述昆虫细胞 hsp-抗原性肽或蛋白复合体所产生的免疫反应优选包括液体和细胞介导的免疫反应。当细胞能有效介导免疫反应时，它优选引起 T 细胞级联反应，更具体地讲是通过细胞毒性 T 细胞级联反应进行。

10 本文所使用的术语“细胞毒性 T 细胞”是指能表达细胞表面糖蛋白标记 CD8+的任何 T 淋巴细胞，它能够寻找并裂解在其细胞表面上具有主要组织相容性 I 型 (MHC I 型) 复合体并且受到细胞内病原体感染的靶细胞。

15 可以通过本发明的方法治疗或预防的疾病，是由包括，但不限于病毒、细菌、真菌、原生动物和寄生生物的病原体引起的。

可以用本发明方法治疗或预防的病毒性疾病包括，但不限于由以下病毒所引起的疾病：免疫缺陷病毒，包括 I 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-I) 和 II 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-II)，甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、黄病毒、瘟病病毒样牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)，边界病病毒 (BDV) 和经典猪热病毒 (CSFV)、流感、水痘、腺病毒、I 型单纯疱疹 (HSV-I)、II 型单纯疱疹 (HSV-II)、牛瘟病病毒、鼻病毒、艾柯病毒、轮状病毒、呼吸道合胞体病毒、乳头瘤病毒、组病毒、乳多空病毒、巨细胞病毒、海胆病毒、虫媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒和脊髓灰质炎病毒。

25 可以用本发明方法治疗或预防的细菌性疾病是细菌引起的，这些细菌包括，但不限于分支杆菌属、立克次氏体、支原体，奈瑟菌属和军团菌属。

可以用本发明方法治疗或预防的原生生物疾病是由原生生物引起的，所述原生生物包括，但不限于利什曼原虫属、球虫属、和锥虫属。

30 可以用本发明方法治疗或预防的寄生生物疾病是由寄生生物引起的，所述寄生生物包括，但不限于衣原体和立克次氏体。

根据一种高度优选的实施方案，提供了一种针对牛群的 BVDV 感染

的亚单位治疗剂，它能够在牛体内诱导免疫反应，该治疗剂含有：与抗原性 BVDV 肽或多肽结合的 hsp。hsps 优选与所述抗原性 BVDV 肽或多肽进行非共价结合。

5 所有现代病毒传染治疗的主要目的都是基于其预防病毒通过胎盘传递的能力，因此阻断了在牛群中的循环传染。胚胎保护指数是 BVDV 疫苗效力的唯一客观标准。该标准在海外日益被采纳作为未来 BVDV 疫苗注册的必需条件。

10 本发明的该实施方法的一个另人吃惊的前途是在 BVDV 感染之前在牛体内观察到了 100% 的保护作用。所述保护作用是由于仅仅短间接接触活病毒刺激之后所出现的针对 BVDV 的异常高水平的中和抗体所产生的。该亚单位疫苗所产生的中和抗体水平是申请人从来所没有见到过的。另外，所述亚单位疫苗产生了另人吃惊的有效记忆细胞毒性 T 细胞反应。另外，所述亚单位疫苗首次产生了对病毒从母兽到胎儿的跨胎盘转移的 100% 的有效抑制。

15 除了上述优点之外，按照本发明的该实施方法所生产的疫苗具有优于其他 BVDV 疫苗的特别优点，特别是优于其他 BVDV 亚单位疫苗。使用活的减毒疫苗或完整生物疫苗的一个缺陷是，在生产疫苗期间有可能感染细胞培养物。相反，亚单位疫苗是非传染性的。具体地讲，本发明的亚单位疫苗不需要用血清生产，因此降低了与处理诸如胎牛血清的血清制品相关的危险。

20 所述疫苗的另一个优点是在对诸如牛这样的商业化动物群进行免疫接种以使其抗 BVDV 时的安全性。本发明的亚单位疫苗可以安全地用于动物，而没有传染（活的减毒病毒）或由病毒感染动物细胞的危险。因此，可将其安全用于所有动物，包括怀孕的动物。

25 根据本发明所生产的 BVDV 亚单位疫苗的另一个优点是生产这种亚单位疫苗的成本高效的特点。可以获得高产量的抗原性蛋白。具体地讲，在本发明的一种优选实施方法中，亚单位疫苗是通过用载体杆状病毒感染昆虫细胞培养物，产生能有效抗 BVDV 的亚单位疫苗而生产的。所得到的疫苗具有抗更多种抗原多样性 BVDV 分离物的效力。

30 源于 BVDV 的任何抗原区都可用于所确定的亚单位疫苗。所述抗原性肽或多肽优选源于主要免疫原区 E0、E1/E2、NS3/NS4A。在本发明该实施方法的一种高度优选的形式中，所述亚单位疫苗是利用 BVDV 分

离物的截短的 NS3/NS4A 蛋白生产的。另人吃惊的是, NS3/NS4A 蛋白抗原在用所述亚单位疫苗接种过的牛血清中, 不会导致可检测含量的抗体的产生。因此, 将 NS3/NS4A 蛋白掺入所述亚单位疫苗中可以提供一种有用的标记, 可以在牛群中区分受感染的牛和接种过的牛。在欧洲和美国的优选做法是, 在疫苗中包含一种标记, 以便识别受感染的动物和接种过的动物。因此, 本发明的亚单位疫苗提供了一种用于区分受群中的受感染的动物和接种过的动物的良好的标记。

服用

肠胃外递送

10 可以通过与可以药用的无毒赋形剂或载体混合, 而将本文所提供的化合物制成药用组合物, 并通过任何肠胃外技术服用, 如皮下、静脉内或腹膜内注射。另外, 该制剂可以选择性地含有一种或多种佐剂。

口服

本文还涉及口服固体剂型, 该剂型被披露于收作本文参考文献的以下文献中: Martin, Remington's 药物科学, 第 18 版 (1990, Mack 出版公司, Easton, PA18042), 第 89 章。固体剂型包括片剂、胶囊、丸剂、糖锭或酞剂、扁胶囊或小药丸。另外, 可将脂质体或类蛋白质胶囊化用于制备这些组合物 (例如, U. S. Patent No. 4, 925, 673 中报道的类蛋白质微球体)。可以使用脂质体胶囊化, 而脂质体可以来自各种聚合物 (例如, U. S. Patent No. 5, 013, 556)。用于治疗的可行的固体剂型披露于被收作本文参考文献的以下文献中: Marshall, 现代药理学, 第 10 章, Banker 和 Rhodes 著, 1979。一般, 所述制剂可以包括 hsp-抗原性肽/多肽复合体 (或其化学修饰形式), 以及能在胃肠环境保护并在肠道中释放生物活性材料的惰性成分。

25 另外, 特别关注上述衍生的 hsp-抗原性肽/多肽复合体的口服剂型。在这一方面, 所述复合体可以是化学修饰过的, 以便口服有效。一般, 所述化学修饰包括将至少一个成分结合到所述蛋白 (或肽) 分子本身上, 其中, 所述成分能够 (a) 抑制蛋白分解; 和 (b) 从胃或肠中吸收到血液中。还希望提高该蛋白的总体稳定性, 并延长在体内的循环时间。所述成分的例子包括: 聚乙二醇, 乙二醇和丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯基醇、聚乙烯吡咯烷酮和聚葡氨酸。Abuchowski 等, 1981, 同上; Newmark 等, 应用生物化学杂志,

4: 185-189, 1982。可以使用的其他聚合物有聚-1, 3-二恶烷和聚-1, 3, 6-tioxocane。对于上述药用用途来说, 优选聚乙二醇成分。

对于 hsp-抗原性肽/多肽复合体来说, 释放的部位可以是胃、小肠 (十二指肠、空肠或回肠), 或大肠。本领域技术人员可以获得这样的制剂, 该制剂不会溶解在胃中, 但能将材料释放到十二指肠或小肠的其他部位。所述释放应当避免胃环境的有害影响, 这一目的可以通过保护复合体来实现, 或者通过在胃环境以外的部位释放生物学活性材料而实现, 例如肠道。

为了确保全面的胃部抵抗性, 至少 pH5.0 不能渗透的包衣是必需的。被用作肠衣的更常用的惰性成分的例子是纤维素乙酸苯三酸酯 (CAT)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯 (HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP55、聚乙烯乙酸邻苯二甲酸酯 (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、纤维素乙酸邻苯二甲酸酯 (CAP)、Eudragit L、Eudragit S 和 Shellac。所述包衣剂可以用作混合的薄膜。

还可将包衣剂或包衣剂的混合物用在片剂上, 这种包衣剂不是用于保护胃的破坏作用的。这些包衣剂可以包括糖衣、或使得片剂更容易吞咽的包衣。胶囊可以用硬的外壳组成 (如凝胶), 用于服用干的治疗剂, 如粉剂; 对于液体形式来说, 可以使用软凝胶外壳。胶囊的外壳材料可以是厚的淀粉或其他可以食用的纸。对于丸剂、酏剂、模制的片剂或片剂粉来说, 可以使用湿成块技术。

所述治疗剂可以以颗粒大小大约为 1 毫米的颗粒或丸形式的多个细小颗粒包含在所述制剂中。用于胶囊服用的材料的制剂还可以是粉剂、压紧的栓剂甚至是片剂。所述治疗剂可以通过压缩制备。

还可以含有着色剂和芳香剂。例如, 可以制备 hsp-抗原性肽/多肽复合体 (如通过脂质体或微球体胶囊化), 然后进一步包含在可食用的产品中, 如含有着色剂和芳香剂的冷冻饮料。

人们可以用惰性材料稀释或增加治疗剂的体积。所述稀释剂可以包括糖类, 特别是甘露糖醇、 α -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、改性的葡聚糖和淀粉。可以用作填料的某些无机盐包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠。某些商业化的稀释剂有 Fast-Flo、Emdex、STA-Rx1500、Emcompress 和 Avicell。

在制成固体剂型的治疗剂中可以含有分散剂。用作分散剂的材料

包括，但不限于淀粉，包括基于淀粉的商业化分散剂 Explotab。淀粉乙醇酸钠、Amberlite、羧甲基纤维素钠、ultramylopectin、藻酸钠、明胶、橙皮、酸性羧甲基纤维素、天然海绵和硼润土都可以使用。另一种形式的分散剂是不溶性阳离子交换树脂。粉末状的树胶可以用作分散剂和粘接剂，这些树胶可以包括诸如琼脂、刺梧桐和黄耆胶。还可将藻酸及其钠盐用作分散剂。

粘接剂可用于将治疗剂粘接在一起，以便形成硬的片剂，粘接剂包括来自天然产品的材料，如金合欢胶、黄耆胶、淀粉和明胶。其他的包括甲基纤维素（MC）、乙基纤维素（EC）和羧甲基纤维素（CMC）。聚乙烯吡咯烷酮（PVP）和羟丙基甲基纤维素（HPMC）都可用于醇溶液中，以便使治疗剂成粒。

在所述治疗剂的制剂中可以含有润滑剂，以便避免在制备过程中发生粘接。润滑剂可以作为层状材料用作治疗剂和模具壁之间，润滑剂可以包括，但不限于：硬脂酸，包括其镁盐和钙盐，聚四氟乙烯（PTFE）、液体石蜡、植物油和蜡。还可以使用可溶性润滑剂，如月桂酰硫酸钠、月桂酰硫酸镁、各种分子量的聚乙二醇和 Carbowax4000 和 6000。

可以添加能够改善在制备期间所述复合体的流动特性并有助于在压缩期间重新排列的润滑剂。所述润滑剂可以包括淀粉、滑石、焦化二氧化硅和水合硅铝酸盐。

为了有助于将所述治疗剂溶解在水环境中，可以添加一种表面活性剂作为湿润剂。表面活性剂可以包括阴离子去垢剂，如月桂酰硫酸钠、二辛基硫代琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。可以使用阳离子洗涤剂，并且可以包括氯化苯甲烃铵（benzalkonium）或氯化 benzethonium。可以作为表面活性剂添加到该制剂中的潜在的非离子洗涤剂包括 lauromacrogol400、聚羟氧基 40 硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油 10、50 和 60、硬脂酸单甘油酯、聚山梨酸酯（polysorbate）40、60、65 和 80，蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。所述表面活性剂可以单独或者作为不同比例的混合物存在于所述复合体的制剂中。

可以增强所述复合体的吸收的添加剂有例如脂肪酸、油酸、亚油酸和亚麻酸。

可能需要控制释放制剂。可将所述复合体掺入可以通过扩散或渗

露机制允许释放的惰性介质中，即树胶。还可将缓慢降解的介质掺入该制剂中。该治疗剂的另一种形式的控制释放是通过基于 Oros 治疗系统的方法（Alza 公司），即将药物包在半透膜中，该膜容许水进入并且通过渗透压作用经过单一的小孔将药物排出。某些肠衣材料也具有缓释作用。

5 其他包衣剂也可用于所述制剂。其中包括可用于包衣盘中的多种糖类。所述治疗剂还可以以薄膜包衣片剂的形式提供；在这种情况下所使用的材料分成两类。第一类是非肠溶衣材料，包括甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、甲基羟基乙基纤维素、羟丙基纤维素、
10 羟丙基-甲基纤维素、羧基甲基纤维素钠、providone 和聚乙二醇。第二类包括肠溶衣材料，这种材料典型的是磷苯二甲酸酯。

可以用各种材料的混合物提供最佳的膜包衣。膜包衣可以在喷式包衣装置或在硫化床中进行或通过压缩包衣。

肺递送

15 本发明还涉及所述复合体的肺递送。所述 hsp-抗原性肽/多肽复合体可以通过吸入递送到动物的肺，并通过肺上皮层进入血液中。

本发明的实施涉及多种为了肺递送治疗产品而设计的机械装置，包括，但不限于喷雾器、定量吸入器、粉末吸入器、所有这些装置为本领域技术人员所熟悉。

20 适用于本发明的商业化装置的某些具体例子有由 Mallinckrodt 公司（St. Louis, Missouri）生产的 Ultravent 喷雾器；由 Marquest 医学制品（Englewood, Colorado）所生产的 Acorn II 喷雾器；由 Glaxo 公司（Research Triangle Park, North Carolina）所生产的 Ventolin 定量吸入器；和由 Fisons 公司（Bedford, Massachusetts）所生产
25 的 Spinhaler 粉末吸入器。

所有上述装置需要使用适合分散所述复合体的制剂。典型的，每一种制剂是专门适用于所采用类型的装置的，除了并可用于治疗常用稀释剂、佐剂和/或载体之外，还可以包括使用合适的推进材料。另外，还涉及使用脂质体、微型胶囊或微球体，包含复合体或其他类型的
30 的载体。根据化学修饰的类型或所采用装置的类型，化学修饰过的蛋白还可以制成不同的制剂。

适用于喷雾器，喷射喷雾器或超声波喷雾器的制剂典型的包含悬

浮在水中的复合体，其浓度为每毫升溶液含有 0.1-25 毫克的生物学活性蛋白。该制剂还可以含有一种缓冲液和简单的糖类（例如，用于蛋白的稳定和调节渗透压）。喷雾器制剂还可以含有一种表面活性剂，以便降低或避免由于在形成气溶胶的过程中雾化该溶液所导致的表面诱导蛋白的聚合。

用于定量吸入装置的制剂典型的含有一种很细的粉末，该粉末在表面活性剂的帮助下将所述复合体悬浮在推进剂中。推进剂可以是用于该目的的任何常规材料，如氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃或烃，包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇、和 1, 1, 1, 2-四氟乙烷，或其组合。合适的表面活性剂包括山梨聚糖三油酸酯和大豆卵磷脂。还可将油酸用作表面活性剂。

用于从粉末吸入器中分配的制剂，可以含有其中包含所述复合体的很细的干粉，并可以含有填充剂，如乳糖、山梨醇、蔗糖或甘露糖醇，其用量有利于该粉末从所述装置中分散，例如，占该制剂重量的 50-90%。所述蛋白（或衍生物）最好被制成颗粒形式，其平均颗粒大小小于 10 微米，最优选 0.5-5 微米，以便最有效地递送到很深的肺里面。

鼻腔递送

还涉及所述复合体的鼻腔递送。鼻腔递送在治疗产品服用到鼻腔以下可以直接将所述蛋白递送到血液中，而没有必要使该产品沉积在肺里。用于鼻腔递送的制剂包括含有葡聚糖或环化葡聚糖的制剂。

与其他化合物服用

本发明的治疗方法和药用组合物还可以与其他免疫反应增强剂或生物学反应改性剂同时服用，包括，但不限于细胞因子 IFN- α 、IFN- γ 、IL-II、IL-IV、IL-VI、TNF、或其他细胞因子影响的免疫细胞。根据本发明的这一方面，hsp 和抗原性分子的复合体，在组合治疗中与治疗有效量的一种或多种上述细胞因子同时使用。在本文中，术语“细胞因子”表示能影响介导免疫反应的其他细胞的功能的任何分泌多肽。因此，预计所述复合体可以与一种细胞因子同时服用，以便增强针对肿瘤的免疫反应。优选的细胞因子包括，但不限于白介素-1. α (IL-1 α)、白介素-1. β (IL-1 β)、白介素-2 (IL-2)、白介素-3 (IL-3)、白介素-4 (IL-4)、白介素-5 (IL-5)、白介素-6 (IL-6)、

白介素-7 (IL-7)、白介素-8 (IL-8)、白介素-9 (IL-9)、白介素-10 (IL-10)、白介素-11 (IL-11)、白介素-12 (IL-12)、干扰素- α (IFN α)、干扰素- β (IFN β)、干扰素- γ (IFN γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、肿瘤坏死因子 β (TNF β)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、转化生长因子 β (TGF- β)。

另外,常用的抗生素可以与所述胁迫蛋白-肽复合体同时使用。不过,合适抗生素的选择取决于有关的疾病。

剂量

10 对于上述所有分子来说,随着进一步研究的展开,将会得到用于治疗各种患者的各种症状的合适的剂量水平的信息,并且普通技术人员可以根据治疗方法、受体的年龄和总体健康状况确定适当的剂量。

典型的,所述复合体的服用量应当足以在动物随后受到刺激之后能够启动针对有关病原体的免疫反应。昆虫细胞 hsp 抗原性肽/多肽复合体的服用量优选在大约 0.1-1.0 微克复合体/每公斤动物体重/服用范围内服用。最优选大约 0.2-0.5 微克复合体/每公斤动物体重/服用。

对于体重大约为 75 公斤的人类受试者来说,典型的剂量在大约 0.5 至大约 50 微克范围内。另外,通过给所述个体反复服用所述复合体可以增强其免疫反应的强度。因此,在一种例子中,动物可以合适的月份间隔接受至少两个剂量的昆虫细胞 hsp 抗原性肽/多肽复合体。如果必要,可以在以后的时间通过服用所述复合体加强免疫反应。不过,可以理解的是,本领域技术人员通过常规实验可以发现最佳剂量和免疫方法。

25 试剂盒

本发明还提供了用于实施本发明治疗方法的试剂盒。所述试剂盒包括一个或多个容器,其中含有治疗或预防有效剂量的可以药用形式的昆虫细胞 hsp 抗原性肽/多肽复合体。在本发明的试剂盒的小瓶里的 hsp 抗原性分子复合体可以是可以药用的溶液形式,例如,与无菌盐水混合、葡萄糖溶液或缓冲液、或其他可以药用的无菌液体。另外,可以将所述复合体冻干或脱水,在这种情况下,所述试剂盒还选择性地
30 在容器中装有一种可以药用的溶液(例如盐水、葡萄糖溶液等),优

选是无菌的溶液，以便重建所述复合体形成用于注射的溶液。

- 在另一种实施方法中，本发明的试剂盒还包括一个针或注射器，优选以无菌形式包装，用于注射所述复合体，和/或包装好的酒精棉球。还选择性地包括说明书，以便指导临床医生或患者服用 hsp-抗原性分子复合体。

实施本发明的最佳方法

- 在下面的非限定附图和实施方法中将对本发明的其他特征作更全面的说明。不过，应当理解的是，这些说明仅仅是用于说明本发明的目的的。不应当以任何方式将其理解为对所提供的本发明的范围的限定。在附图中：

图 1 表示在活病毒攻击 (C) 之前和之后，在小母牛的接种组 (-○-) 和对照组 (-■-) 中抗-E2 (中和) 抗体浓度的发展。

图 2 表示在活病毒攻击 (C) 之前和之后，在小母牛的接种组 (-○-) 和对照组 (-■-) 中抗-NS3 (中和) 抗体浓度的发展。

- 图 3 表示在活病毒攻击 (C) 之前和之后，在绵羊的接种组 (-○-) 和对照组 (-■-) 中抗-E2 (中和) 抗体浓度的发展。

图 4 表示在活病毒攻击 (C) 之前和之后，在绵羊的接种组 (-○-) 和对照组 (-■-) 中抗-NS3 (中和) 抗体浓度的发展。

- 在以下实施例中沒有作明确说明的分子克隆方法和蛋白质化学方法报道于有关文献中，并且被本领域技术人员所公知。介绍本领域技术人员所公知的常用分子生物学、微生物学、和重组 DNA 技术的一般教科书包括，例如：Sambrook 等 (1989)；Glover (1985)；和 Ausubel 等当代分子生物学方法。

例 1

- 重组杆状病毒的生产 and 重组瘟病病毒蛋白的表达
- #### 瘟病病毒

- 瘟病病毒分离物 Trangie-D10、Bega 和 Clover Lane 是在 Eligabeth Macarthur 农业研究所 (EMAI) 的病毒学系分离并鉴定的。BVDV 分离物 Trangie-D10 和 Bega 表示牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) I 型瘟病病毒，而 Clover Lane 分离物是边界病病毒 (BDV) 分离物。

用于所述亚单位疫苗中的澳大利亚病毒分离物 GenBank 保藏号和所使用的基因组片段相对参考菌株 BVDV NADL 的相对位置 (保藏号

M31182) 如下: Bega (AF049221) E0 部分序列编码完整病毒基因组的 1171-1897; Trangie (AF049222) E0 部分序列编码完整病毒基因组的 1171-1897; Bega (AF049225) E1 和 E2 部分序列编码完整病毒基因组的 2253-3490; Trangie (AF049223) E1 和 E2 部分序列编码完整病毒基因组
5 基因组的 2290-3490; Clover Lane (AF037405, Becher 等, 1998) E1 和 E2 部分序列编码完整病毒基因组的 2360-3510; Bega (AF052303) NS3、NS4a 部分序列编码完整病毒基因组的 5416-7591; Trangie (AF052304) NS3、NS4a 部分序列编码完整病毒基因组的 5675-7528。

10 病毒 RNA 的提取

用标准技术由所有主要免疫原区 (E0、E1/E2 和 NS3、NS4A) 的澳大利亚 BVDV 分离物转录 cDNA。简单地讲, 用 RNazol (Biotex 实验室公司) 或 TRIzol[®] 试剂 (Gibco BRL) 按照生产商的说明从受感染的细胞和/或病毒沉淀中提取病毒 RNA。在 10 微升或 20 微升用无菌焦碳酸二乙酯 (DEPC) (Sigma) 处理过的水中重建干燥的 DNA 沉淀 (Sambrook
15 等, 1989)。

逆转录生产 E1/E2、NS3 和 E0 免疫原区的 cDNA

通过按表 1 所示制备 E1/E2 逆转录酶 (RT) 混合物, 进行逆转录生产 E1/E2 的 cDNA。在 37℃ 下在 FTS-960 热循环仪 (Corbett Research)
20 中加热试管 50 分钟, 然后在 70℃ 下加热 10 分钟, 以便使逆转录酶变性。在通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 cDNA 之前在 5℃ 下将 RT 混合物冷却 2 分钟。

同样按照表 2 制备 NS3RT 混合物, 通过 RT 制备 NS3 的 cDNA。在 37℃ 下在 FTS-960 热循环仪中加热试管 59 分钟, 然后在 94℃ 下加热
25 15 分钟, 以便使逆转录酶变性, 然后通过 PCR 扩增 cDNA。

通过按表 3 所示制备 RT 混合物生产 E0 的 cDNA。在 37℃ 下在 FTS-960 热循环仪中加热试管 50 分钟, 然后在 70℃ 下加热 10 分钟, 以便使逆转录酶变性。在通过 PCR 扩增 cDNA 之前在 5℃ 下将 RT 混合物冷却 2 分钟。

表 1

试剂	体积	终浓度	供应商
X10 PCR 缓冲液 [100 mM Tris-HCl; 15 mM MgCl ₂ ; 500 mM KCl; pH 8.3]	2.0 μ L	X1 [10 mM Tris-HCl; 1.5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; pH 8.3]	Boehringer Mannheim
25 mM MgCl ₂	2.8 μ L	3.5mM	Sigma molecular biology grade
三磷酸二核苷酸 含有dATP, dGTP, dCTP 和dTTP各5mM的dNTP	4 μ l	dNTP各1mM	Boehringer Mannheim
随机六聚体 (50 μ M in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3;	1 μ l	2.5 μ M	Perkin Elmer
RNase- 抑制剂	10 单位	-	Boehringer Mannheim
M-MLV	12.5 单位	-	Gibco BRL
RNA 制剂	1 μ l	-	-
	20 μ l	-	-

5

10

15

表 2

试剂	体积	终浓度	供应商
X5 第一股链缓冲液 (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)	4 μ L	X1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 55 mM KCl; 3 mM MgCl ₂ .)	Gibco BRL
0.1 M DTT (二硫苏糖醇)	2 μ L	0.01m	Gibco BRL
三磷酸二核苷酸 dNTP溶液 (含有dATP, dGTP, dCTP和dTTP 各5mM)	2 μ L	0.5 Mm	Boehringer Mannheim
随机六聚体 (50 μ M in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3)	1 μ L	2.5 μ M	Perkin Elmer
RNase-抑制剂	20单位	-	(Boehringer Mannheim)
Superscript™ II (RNase H ⁻ 逆转录酶)	50 或 100 单位	-	Gibco BRL
在使用之前, 将RNA 制剂加热到65 °C 保持 5分钟使其变性, 并 迅速冷却	1 μ L	-	-
总体积	20 μ L	-	-

5

10

15

表 3

试剂	体积	终浓度	供应商
X10 PCR 缓冲液 [100 mM Tris-HCl; 15 mM MgCl ₂ ; 500 mM KCl; pH 8.3]	2.0 μ L	X1 [10 mM Tris-HCl; 1.5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; pH 8.3]	Boehringer Mannheim
25 mM MgCl ₂	2.8 μ L	3.5mM	Sigma molecular biology grade
三磷酸二核苷酸 含有dATP, dGTP, dCTP 和dTTP各5mM的dNTP	4 μ l	dNTP各1mM	Boehringer Mannheim
随机六聚体 (50 μ M in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3;	1 μ l	2.5 μ M	Perkin Elmer
RNase-抑制剂	10 单位	-	Boehringer Mannheim
M-MLV	12.5 单位	-	Gibco BRL
RNA 制剂	1 μ l	-	-
	20 μ l	-	-

PCR 寡聚核苷酸引物

- 5 BVDV 分离物 Trangie 和 Bega 的 PCR 引物基于海外瘟病病毒分离物的公开序列的保守区。BDV 分离物 Clover Lane 的引物是用其公开序列 (Becher 等, 1998) 制备的。引物是用计算机程序 'Primer Designer-2.0 版' (科学和教育软件, 1990, 1991) 设计的, 并包括整合在里面的限制位点, 以便能够定向克隆该 cDNA (表 4 和 5)。

通过聚合酶链式反应扩增 cDNA

- 10 按照类似方法扩增来自 E1/E2、NS3/NS4A 和 E0 的 cDNA。扩增反应是在 100 微升的总体积中进行的。向 20 微升 RT 中添加 8 毫升 10 倍 PCR 缓冲液 (100mM Tris-HCl; 15mM 氯化镁; 500mM 氯化钾; pH8.3: Boehringer Mannheim), 7.2 毫升 25mM 氯化镁 (使氯化镁的最终浓度为 3.3mM; Sigma, 分子生物学级), 2.5 单位 Taq DNA (Boehringer Mannheim) 和有义和反义引物各 1 微升 (每毫升 30 皮摩尔)。

15 首先在 95℃ 下将 E1/E2 cDNA 变性 2 分钟, 然后进行 35 个循环的 95℃ 变性 30 秒, 在 55℃ 下退火 30 秒, 并在 72℃ 下延伸 1 分钟。包括一个在 72℃ 下进行 5 分钟的最终延伸步骤。然后将试管冷却到 5℃ 保持 2 分钟。

表 4

瘟病 病毒蛋白	引物序列 ^a	引物在NADL 序列上的 位置 ^h
Trangie E1/E2 ^{b*}	5' - CGCGGATCC AGTGCTGGCATTGAAGA-3' Bam HI	2290
Bega E1/E2 ^{c*}	5' - CGCGGATCC CAGACTGGTGGCCTTATGA-3' Bam HI	2253
CloverLane E1/E2 ^{d*}	5' - CACGGATCC AGTGCATCAACAACAGCCT-3' Bam HI	2360
Trangie E0 ^{e*}	5' - CGCGGATCC AGTTTTGTTTCAAGTTACAATG-3' BamHI	1171
Bega E0 ^{f*}	5' - CGCGGATCC AGTTTTGTTTCAAGTTACAATG-3' BamHI	1171
Trangie NS3/NS4A ^{g*}	5' - AACTGCAGACTAGAGTGGTTTGCCAAAGCAACA -3' Pst I	5675

- 5 ^a 限制酶位点用粗体表示, ^b GenBank 保藏号为 AF049223, ^c GenBank 保藏号为 AF049225, ^d GenBank 保藏号为 AF037405, Becher 等 (1998), ^e GenBank 保藏号为 F049222, ^f GenBank 保藏号为 F049221, ^g GenBank 保藏号为 F052304, ^h GenBank 保藏号为 M31182 Collett 等 (1988), ^{*} E1/E2 片段编码含有 69 个氨基酸的蛋白, 从 E1 开始并在 E2 末端之前 35 个氨基酸处结束, [♦] 编码完整长度的 E0 蛋白, ^{*} 编码 NS3 蛋白, 没有丝氨酸蛋白酶, 并且包括编码存在于 CSFV 中的 T-细胞表位的区域 (Pauly 等, 1995)。
- 10

15

20

表 5

瘟病 病毒蛋白	引物序列 ^{a b}	引物在NADL 序列上的 位置 ^e
Trangie E1/E2 ^c	5'-GCGA AAGCTT AGGACTCTGCGAAGTAATC-3' Hind III Stop	3490
Bega E1/E2 ^d	5'-CATGCCATGG TTAGG ACTCTGCGAAGTAATC-3' NcoI Stop	3490
CloverLane E1/E2 ^e	5'-CGCA AAGCTT ACGCTACCACTGCCAACATGA-3' HindIII Stop	3510
Trangie E0 ^f	5'-CGCA AAGCTT AGACATCACAGTAAGGGGA-3' HindIII Stop	1897
Bega E0 ^g	5'-CGCA AAGCTT AGACATCACAGTAAGGGGA-3' HindIII Stop	1897
Trangie NS3 ^{h*}	5'-ACGTCCATGG TTAAG CTTGATAGCCTACGTACC-3' NcoI Stop	7528

- ^a限制酶位点用粗体表示, ^b在框架中, 终止密码子在反义引物下面划线表示, ^cGenBank 保藏号为 AF049223, ^dGenBank 保藏号为 AF049225, ^eGenBank 保藏号为 AF037405, Becher 等 (1998), ^fGenBank 保藏号为 F049222, ^gGenBank 保藏号为 F049221, ^hGenBank 保藏号为 F052304, ⁱGenBank 保藏号为 M31182Collett 等 (1988), ^{*}E1/E2 片段编码含有 69 个氨基酸的蛋白, 从 E1 开始并在 E2 末端之前 35 个氨基酸处结束, ^o编码完整长度的 E0 蛋白, [♦]编码 NS3 蛋白, 没有丝氨酸蛋白酶, 并且包括编码存在于 CSFV 中的 T-细胞表位的区域 (Pauly 等, 1995)。

Clover Lane (BDV) PCR 混合物不需要氯化镁, 并且只需要一个单位的 Taq DNA 聚合酶进行扩增。

- 按照扩增 E1/E2 的方法扩增 E0, 所不同的是, 开始的变性步骤是 94℃ 下进行 2 分钟。

NS3 cDNA 的扩增是在 50 微升的总体积中进行的, 使用来自逆转录反应的共 20 微升反应物, 向其中添加了 3 微升 10 倍 PCR 缓冲液 (100mM Tris-HCl; 15mM 氯化镁; 500mM 氯化钾; pH8.3; Boehringer Mannheim), 2 微升 25mM 氯化镁 (使氯化镁的最终浓度为 3mM; Sigma,

- 分子生物学级)，1-2 单位 Taq DNA (Boehringer Mannheim) 和有义和反义引物各 1 微升 (每毫升 25-30 皮摩尔)。在进行 94℃ 3 分钟最初的变性步骤之后，进行 30 轮变性：94℃ 30 秒，在 55℃ 下退火 30 秒，并在 72℃ 下延伸 2 分钟。在将试管冷却到 4℃ 之前还要在 72℃ 下进行 5 分钟的最终延伸步骤。

PCR 片段的克隆

- 用 PCR SPINCLEAN™ 柱 (Prigen Industries, Limited) 按照生产商的说明纯化 PCR 产物。如果 PCR 除了所需要的产物之外还产生了非专一性带，或者必须从其他质粒中亚克隆的话，使用 Heery (1990) 描述的改进方法从 0.8% 的琼脂糖凝胶中洗脱对 DNA 作进一步的纯化。

- 使用标准克隆方法 (SamBrook 等, 1989; 当代分子生物学方法, 1991) 消化纯化的 PCR 片段，并连接到含有匹配的粘性末端的 pBlueBacHis A、B 或 C 杆状病毒转化载体 (MaxBac 杆状病毒表达系统, Invitrogen 公司) 上。A、B 或 C 载体提供三种不同的读框，以便在所述杆状病毒表达系统中实现蛋白表达 (表 6)。

表 6

痘病毒蛋白	pBlueBacHis A, B 或 C 转移载体
Trangie E1/E2	C
Bega E1/E2	C
Clover Lane E1/E2	A
Trangie E0	B
Bega E0	B
Trangie NS3/NS4A	B

20

业已证实难于将 NS3/NS4A 直接克隆到 pBlueBacHis 杆状病毒转化载体上，因此首先用 Invitrogen TA 克隆试剂盒将其克隆到 pCR™II 质粒 (Invitrogen 公司) 上。该过程的方法是按照生产商的说明进行的。然后按照克隆该基因组的其他片段的方法将 NS3 片段亚克隆到

pBlueBacHis B 载体上。

用含有 PCR 片段的杆状病毒质粒转化

将粘接产物转入感受态大肠杆菌菌株 Top10 (Invitrogen 公司)，基因型:

F⁻mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG,

5 和/或 Sure®大肠杆菌 (Stratagene)，基因型:

e14⁻(McrA⁻)D (mcrCB-hsdSMR-mrr)₁₇₁ endA1 supE44 thi-1 gyrA96 rel A1 lac recB recJ sbcc umuc::Tn5 (kan^r) uurC[F' proAB lac^PZ D m15 Tn10(Tet^r)]^c.

制备感受态细胞和转化细菌的方法是从 InvitrogenMaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版获得的。

筛选细菌克隆寻找含有 PCR 片段的质粒和纯化用于转染的质粒

10 按以下方法鉴定含有 pBlueBacHis+PCR 片段的细菌克隆: 生长克隆, 用在 SamBrook 等 (1989) 所披露的煮沸微量制备方法提取质粒, 然后对所述质粒进行限制性消化, 以便确定含有正确大小的插入片段。用质粒纯化试剂盒 (QIAGEN Pty 有限公司, tip-20 或 tip-100 柱) 按照生产商的说明将重组质粒纯化到适合转染反应的水平。

15 通过用于生产重组杆状病毒的对 Sf9 细胞的阳离子脂质体转染, 生产纯化的重组杆状病毒

通过阳离子脂质体介导的转染, 将线性化的野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) DNA 和含有 PCR 片段的杆状病毒转化载体共转染到 Sf9 细胞中生产重组杆状病毒。这是按照 InvitrogenMaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版进行的。对体积作了一些小的改进, 但对所采用的总体方法来说这种改变是不明显的。

20 噬菌斑纯化重组杆状病毒

在制备病毒原种之前对重组病毒进行 3 次噬菌斑纯化, 以确保所述病毒是由单一的颗粒克隆的, 并且不存在野生型病毒。噬菌斑测定是按照 InvitrogenMaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版建立的。

在每一轮噬菌斑纯化之后, 用改进的瘟病病毒抗原捕获 ELISA (PACE) 筛选重组病毒 (Shannon 等, 1991)。所述改进的方法包括将上清液+细胞 (50 微升/孔) 直接添加到封闭的、洗涤过的 ELISA 平

板上,并在 37℃下培养平板 1 小时。然后加入抗体溶液(50 微升/孔)。所使用的抗体是生物素化的山羊抗瘟病病毒抗血清或单一的抗 E2 或抗 NS3 单克隆抗体(mAbs)。在 22℃下培养所述平板过夜,然后按照 Shannon 等所述方法发展(1991),对于与生物素化的山羊抗血清起反应的样品来说,省略与生物素化的抗小鼠 IgG 的孵育。应当指出的是,在 PACE 中未检测到重组的杆状病毒表达的 E0。

重组杆状病毒原种、种子母液和工作母液

所构建的每一种杆状病毒的病毒原种是按照 InvitrogenMaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版制备的。如上所述母液的效价是按照上述噬菌斑测定确定的,所不同的是,用 1.5%的羧甲基纤维素(CMC, BDH; 溶解在去离子化水中的 6%的 CMC,以 1:4 的比例用完全 TC100+X-gal 稀释[125 微克/毫升,Boehringer Mannheim])覆盖所述细胞。7 天之后,统计兰色噬菌斑,得出病毒的效价。

组织母液和工作母液是用 0.1-0.5pfu/毫升的低 MOI 分别由原种和种子母液制备的。所有病毒母液在 4℃下保存以便用于疫苗生产。为了长期保存原种、种子母液和工作母液,将每一种重组病毒装在安培瓶中并在-80℃下冷冻。

重组蛋白生产的优化

将适应于 Gibco BRL 所披露方法的 Sf-900II 无血清培养基(1995)的 Sf9 昆虫细胞悬浮液,用于优化重组蛋白表达。用 0.1-5.0 之间的高和低 MOI 的重组杆状病毒,感染装有 50 毫升细胞的两个锥形烧瓶(1.5×10^6 细胞/毫升)。第三个烧瓶被用作未感染的对照培养物。在 28℃下对这三个烧瓶进行摇动培养,并以 24 小时的间隔取出 5 毫升的样品,一直持续 7 天。

在室温(RT)下以 $900 \times g$ 对样品进行 10 分钟的离心,并小心除去上清液。在-20℃下保存沉淀和上清液,直到每天的取样结束。然后用上述改进的 PACE 测定样品中特定重组瘟病病毒蛋白的量。将细胞沉淀重建在 200 微升或 250 微升 NP-40(1%[v/v],溶解在 PBS 中),旋转搅拌,并在室温下以 $900 \times g$ 的速度离心 10 分钟。对沉淀提取物的系列稀释液(溶解在 1%[v/v] NP40 中)进行。对未稀释过的培养上清液进行测定,并且对系列稀释过的上清液进行测定(溶解在 1%[v/v] NP40 中)。

发现细胞生活力在较高感染率的情况下降低。因此，0.1-2MOI 是更为合适。优化表达时间以及重组蛋白在昆虫细胞悬浮培养物中的位置，在上清液或细胞沉淀部分中的位置如表 7 所示。

5

表 7

重组蛋白	感染后收获时间 (小时)	重组蛋白在感染 培养物中的位置
Trangie E1/E2	48	上清液
Bega E1/E2	48	上清液
Clover Lane E1/E2	48	上清液
Bega E0	48 ^a	上清液+细胞 ^b
Trangie E0	48 ^a	上清液+细胞 ^b
Trangie NS3/NS4A	48	仅有细胞

^a 在 PACE 不能检测到这些蛋白，因此，收获的时间取决于收获其他重组蛋白的时间。

10 ^b 上清液和细胞都需要收获，因为在昆虫细胞悬浮培养物中的位置无法精确确定。

对于表达的 E1/E2 蛋白来说，在构建所述基因组的编码该部分的 cDNA 时，以及在制备决定昆虫细胞培养物中蛋白表达的重组杆状病毒时，故意去掉了该蛋白的疏水性‘尾巴’。这会导致上述蛋白的大部分通过正常的蛋白分泌途径从昆虫细胞中转运出来，并分泌到细胞培养介质中。因此，大多数蛋白是从昆虫细胞培养物的上清液部分回收的。

相反，所表达的 NS3/NS4A 蛋白被“约束”在昆虫细胞内，因此，是在培养时间结束时从沉淀的细胞中收获的。用台式离心机以 2000 × g 的速度离心 10 分钟使细胞沉淀，并以小的体积使这种重组蛋白的收获最大化。对于 E0 (E^{trns}) 重组表达蛋白来说，其位置无法确定，因此，要收获培养上清液和昆虫细胞。

例 2

在体外将免疫遗传学 BVDV 蛋白结合在昆虫细胞 hsps 上

在该实施例中所使用的昆虫细胞是草地滩夜蛾 9 (Sf9) 细胞。
(Invitrogen 公司, 美国)。

建立单层 Sf9 昆虫细胞

该方法基于 InvitrogenMaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版。

- 5 在 37℃ 下将冷冻的细胞样品 (典型的是保存在液氮箱中的 1.0 毫升的小瓶) 快速解冻, 用 70% (v/v) 乙醇洗涤所述小瓶, 在室温 (RT) 下将所述细胞转移到装有 15 毫升完全 TC100 培养基 (GIBCO BRL TC100, 补充了 10% FCS [Trace 生物科学 Pty 有限公司] 并含有青霉素和链霉素 [各 100 单位/毫升] 75cm² 的组织培养瓶中。

- 10 在 28℃ 下培养所述烧瓶 1 小时使细胞结合 (Clayson 培养箱, Edwards 仪器公司), 然后用 20 毫升新的完全 TC100 取代所述培养基。每隔 48 小时更换培养基, 直到细胞铺满, 在此阶段按以下方法进行传代。除去培养基并更换 5 毫升新的培养基, 将细胞轻轻地从烧瓶底部刮下, 并在室温下将 1 毫升细胞悬浮液转移到装有 19 毫升完全 TC100
15 的新的 75 平方厘米的组织培养烧瓶中。转动烧瓶使细胞均匀分布在其底部, 然后将烧瓶放置在 28℃ 下并使细胞按上述方式生长。

Sf9 昆虫细胞的悬浮培养

该方法基于 InvitrogenMaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版。

- 在细胞作为单层培养物传代 3-4 之后, 将其作为悬浮物生长。用于该
20 培养物的培养基是含有 1% (v/v) pluronic F-68 (10% 溶液; Gibco BRL) 的完全 TC100。为了生产该悬浮培养物, 首先取出铺满单层的细胞的培养基, 并马上换上 5 毫升的新的培养基。将细胞轻轻地从烧瓶底部刮下, 并将细胞悬浮液转移到装有 25 毫升含有 pluronic 的培养基的 100 毫升罗纹盖锥形烧瓶中, 该烧瓶在 28℃ 下培养在定轨摇床上 (Bio-
25 Line; Edwards 仪器公司) 以 80rpm 的速度至少摇动 1 小时, 然后在剩余的生长时间内将摇动速度提高到 110rpm。当细胞密度达到大约 2×10^6 细胞/毫升时, 再添加 30 毫升培养基。让细胞在 50 毫升体积继续生长, 并在细胞密度达到 2×10^6 细胞/毫升时传代。此时, 用培养基稀释细胞达到大约 0.52×10^6 细胞/毫升, 并在 28℃ 下培养, 以 110rpm
30 的速度摇动, 直到再次传代。

使 Sf9 昆虫细胞适应在由无血清培养基制成的悬浮培养物中生长

按照 Gibco BRL (1995) 所披露的方法, 使昆虫细胞适应在由无

血清培养基制成的悬浮培养物中生长。将在含有 pluronic 的完全 TC100 中生长的细胞，以 5×10^5 细胞/毫升的密度转移到 50 毫升含有青霉素和链霉素（各 100 单位/毫升）的无血清培养基（Sf-900II SFM; Gibco BRL）中让细胞继续生长到密度为 2×10^6 细胞/毫升，然后以 5×10^5 细胞/毫升的密度传代。这一过程一直持续到细胞密度为 2×10^6 细胞/毫升，细胞的生活力达到至少 80%。然后就认为该细胞适应在无血清培养基中生长，然后用无血清培养基按照细胞在含有 pluronic F-68 的完全 TC100 培养基中生长的相同方法进行传代，如在悬浮液中培养 Sf9 昆虫细胞所描述的那样。

10 用于表达重组痘病病毒蛋白的 Sf9 细胞的要求

用于表达重组痘病病毒蛋白的存在于无血清培养基中的 Sf9 细胞，在培养物中必须低于 30 代。以 0.5×10^6 细胞/毫升的密度用 Sf9 细胞接种锥形烧瓶（500 毫升），最终体积为 150 毫升。当该烧瓶中的细胞达到 $1.0-1.5 \times 10^6$ 细胞/毫升的密度时，用编码所需要表达的痘病病毒蛋白的合适的重组杆状病毒感染细胞。

生产编码痘病病毒蛋白的重组杆状病毒

重组杆状病毒的生产和重组痘病病毒蛋白的表达如例 1 所示。

感染复数

根据各种重组杆状病毒母液的效价，以 0.1-2.0 的感染复数 (MOI) 感染 Sf9 昆虫细胞。结果如表 8 所示。

在用重组杆状病毒感染过的 Sf9 细胞培养物中诱导热激蛋白

如下说明的，对于能表达特殊痘病病毒重组蛋白的 Sf9 昆虫细胞培养物，优化其用于诱导在该昆虫细胞培养物中生产热激蛋白的实验时间和温度。

25 NS3/NS4A 重组杆状病毒感染过的培养物的热激条件

在 28℃ 下，培养被表达截短的痘病病毒 NS3/NS4A 蛋白的重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞，以 110rpm 的速度摇动培养 48 小时。将感染细胞培养物的烧瓶连同类似的‘模拟’细胞培养物烧瓶一起放入 43℃ 的水浴中，所述模拟烧瓶中装有放在 150 毫升水中的温度计。当温度计达到 43℃ 时开始 10 分钟的培养，然后每隔 2 分钟通过搅拌烧瓶里的培养基和细胞进行轻柔的混合。该条件被确定为表达痘病病毒重组蛋白的 Sf9 细胞的最佳热激条件。然后将细胞培养烧瓶放回培养箱

中 (28℃)，以 110rpm 的速度摇动再培养 2 小时，使得所述昆虫细胞表达热激蛋白 (hsps)，并与瘟病病毒 NS3 重组蛋白结合。

表 8

5

重组杆状病毒	EMAI 病毒编号	母液	效价 (pfu/ml)	感染复数
AcMNPV+ Trangie E1/E2	Z044	原种培养物	2.8×10^7	- 1.0
AcMNPV+ Bega E1/E2	Z376	种子培养物	1.0×10^7	1.0
AcMNPV+ Clover lane E1/E2	Z361	工作培养物	4.35×10^7	2.0
AcMNPV+ Bega E0	Z341	原种培养物	3.2×10^6	0.2
AcMNPV+ Trangie E0	Z293	种子培养物	2.2×10^7	1.0
AcMNPV+ Trangie NS3/NS4A	Z346	原种培养物	2.0×10^6	0.2

E1/E2 和 E0 重组杆状病毒感染的培养物的热激条件

在 28℃ 下培养用表达 E1/E2 或 E0 瘟病病毒蛋白的重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞，以 110rpm 的速度摇动培养 24 小时。然后按照与上述完全相同的方法对感染的细胞培养物进行热激 (43℃ 10 分钟)。然后将装在烧瓶中的细胞培养物送回到培养箱 (28℃) 中，并以 110rpm 的速度摇动培养细胞 24 小时。在该系统中，在 24 小时对表达 E1/E2 蛋白的培养物进行热激，这一点与 NS3/NS4A 蛋白的 48 小时不同，以确保 E1/E2 重组蛋白在从 Sf9 细胞中转运出去并进入细胞培养基之前与昆虫细胞 hsps 结合。由于尚未确定重组 E0 瘟病病毒蛋白是否是从昆虫细胞中分泌的，或者是保留在细胞内部，同样在用所述重组杆状病毒感染 24 小时之后对能产生 E0 瘟病病毒蛋白的 Sf9 培养物进行热激。

未感染过的对照细胞培养物的热激条件

在 28℃ 下培养 (以 110rpm 的速度摇动) 未感染过的 Sf9 昆虫细胞培养物 48 小时。完全按上文所述对该对照细胞培养物进行热激。然

后将细胞培养烧瓶送回到 28℃ 的培养箱中，以 110rpm 的速度摇动培养 2 小时，以便由受到胁迫的细胞产生昆虫细胞热激蛋白。

从 Sf9 细胞培养物中收获单一的重组瘟病病毒蛋白 [NS3 重组蛋白+热激蛋白 (hsps)]

- 5 通过以 2000 × g 的速度离心 10 分钟，从培养基中分离细胞然后将含有 NS3/NS4A 抗原的细胞沉淀，重新悬浮在体积为原始体积 1/6 的含有 5 微克/毫升亮抑蛋白酶肽（蛋白酶抑制剂，ICN 生物医学公司）的无血清培养基中（Sf900II SFM; Gibco BRL）。由此得到了有效的 6 倍浓度的细胞+重组 NS3/NS4A 抗原。然后在 -80℃ 下对所述细胞进行两次冷冻/解冻，以便破坏细胞膜，并将 NS3 重组蛋白连同重组杆状病毒一起释放到培养基中。

从 Sf9 细胞培养物中收获单一的重组瘟病病毒蛋白 [E1/E2 重组蛋白+热激蛋白 (hsps)]

- 15 通过以 2000 × g 的速度离心 10 分钟，从培养基中除去细胞。再次向含有表达的 E1/E2 蛋白的上清液中添加亮抑蛋白酶肽（蛋白酶抑制剂），使最终浓度为 5 微克/毫升。添加该蛋白酶抑制剂能抑制所表达的蛋白降解。

从 Sf9 细胞培养物中收获单一的重组瘟病病毒蛋白 [E0 重组蛋白+热激蛋白 (hsps)]

- 20 对于表达这种特殊蛋白的昆虫细胞培养物来说，收获所有的培养物（细胞和培养基），并以 5 微克/毫升的最终浓度添加亮抑蛋白酶肽。然后对该培养物进行两次冷冻/解冻，以便破坏细胞膜，将重组杆状病毒和所有与细胞相关的 E0 蛋白释放到培养基中。

- 25 从 Sf9 细胞培养物中收获单一的重组瘟病病毒蛋白 [对照细胞+热激蛋白 (hsps)]

与上述收获 NS3/NS4A 相同的方法收获对照（未感染过的）培养物。不过，将对照细胞浓缩 10 倍。

重组杆状病毒的 β-丙内酯 (β PL) 失活

- 30 对通过杆状病毒载体表达载体系统所生产的所有重组蛋白制剂进行两次 β PL 失活（使用 β-丙内酯，Sigma Aldrich Fine Chemicals），并对对照细胞制剂进行两次 β PL 失活。在所有场合下都使用由 Commonwealth 血清实验室所采用的标准方法（CSL，“用 β-丙内酯使

杆状病毒失活，1998”）。为了确保残余的传染性杆状病毒留在“失活的”材料中，每一种制剂在 Sf9 单层中传代 3 次。最后的传代在 Sf9 噬菌斑测定中进行滴定，用含有 125 毫克/毫升 X-gal (Boehringer Mannheim) 的 1.5% 羧甲基纤维素 (CMC, BDH; 用去离子水制备的 6% CMC, 以 1:4 的比例用完全 TC100 稀释) 覆盖。噬菌斑测定是按照 Invitrogen MaxBac 杆状病毒表达系统手册 1.8 版建立的，并且噬菌斑测定在第 7 天读数。没有用于制备所述亚单位疫苗的任何制剂中存在活的有传染性的杆状病毒的证据。因此，符合将实验疫苗用于食品生产动物中的澳大利亚检疫检测机构 (AQIS) 要求。

10 重组 E0 和 E1/E2 蛋白制剂的浓度

在失活 (如上文所述) 之后，通过以 $2000 \times g$ 的速度离心 10 分钟，从培养基中分离表达 E0 重组蛋白的 Sf9 细胞，并将这些细胞在 4°C 下保存待用。然后按照生产商的说明，在单独的 Amicon Ultrafiltration Cell 步骤中，将含有重组 E0 蛋白的上清液浓缩 5 倍。然后将含有浓缩的 E0 蛋白的上清液再次与 E0 Sf9 细胞混合，以便制备最终的浓缩制剂。

对于失活的 E1/E2 重组蛋白来说，仅用 Amicon Ultrafiltration Cell 对上清液部分进行浓缩。所述蛋白都是从重组杆状病毒感染过的细胞中分离出来的，因此弃掉细胞部分。

20 在瘟病病毒抗原捕获 ELISA (PACE) 中通过滴定测定每一种制剂中重组瘟病病毒蛋白的含量

通过改进的 PACE (参见 Shannon 等, 1991) 滴定每一种重组蛋白制剂，测定在 β PL 失活之后重组蛋白的含量。对公开方法的改进包括，将样品 (50 微升/孔) 直接加到封闭的、洗涤过的 ELISA 平板上，并在 37°C 下培养平板 1 小时。然后添加抗体溶液 (50 微升/孔)。所使用的抗体是生物素化的山羊抗瘟病病毒抗血清 (pAb) 或单一的抗 E2 或抗 NS3 单克隆抗体 (mAbs)。在 22°C 下将平板培养过夜，然后按照 Shannon 等所述方法 (1991) 进行发展，对于能与生物素化的山羊抗血清反应的样品来说，省略了与生物素化的抗小鼠 IgG 孵育的步骤。

应当指出的是，在该测定系统中不能检测到重组 E0 蛋白，因为该蛋白既不能与多克隆抗体又不能与单克隆抗体起反应。因此推测该蛋白的浓度与所测定的类似的 E1/E2 表达的结构糖蛋白的浓度相似。

掺入亚单位疫苗中的重组蛋白概述

通过该实施例所披露的方法制备重组瘟病病毒蛋白

Trangie NS3/NS4A, Trangie E0, Bega E0,
Trangie E1/E2, Bega E1/E2, Clover Lane E1/E2,

- 5 和对照细胞。不过，不对 Bega Trangie E1/E2 进行热激，将 Trangie E1/E2 浓缩 6 倍而不是 5 倍，并按照处理重组 E0 蛋白制剂的方法处理 BDV Clover Lane E1/E2 重组蛋白。

重组实验亚单位疫苗

- 在表 9 中示出了例 4 中使用的疫苗制剂的组成。总之，每一剂重
10 组瘟病病毒疫苗包括：1 毫升 Bega E0, 1 毫升 Trangie E0, 1 毫升
Clover Lane E1/E2, 0.5 毫升 Trangie E1/E2, 1 毫升 Bega E1/E2
和 0.3 毫升 Trangie NS3/NS4A。将硫柳汞(汞化合物, Sigma Aldrich)
添加到疫苗混合物中, 以避免细菌污染, 它在疫苗中的最终浓度为 0.1%
(w/v)。以每一剂疫苗中 2 毫克的用量添加 Isocomatrix 佐剂
15 (Commonwealth 血清实验室, 澳大利亚)。所制成的疫苗在 4℃ 下保
存, 直到注射到牛体内 (在首次用药之后 4 周进行第 2 次用药)。

对照疫苗

- 在表 9 中还示出了对照疫苗的配方。总之，每一剂对照疫苗含有
4.8 毫升的对照细胞制剂。同样将硫柳汞添加到对照疫苗中, 以避免细
20 菌污染, 在疫苗中的最终浓度为 0.1% (w/v)。以每剂疫苗 2 毫克的
用量添加 Isocomatrix 佐剂 (CSL), 与实验疫苗中的用量相同。在 4
℃ 下保存对照疫苗制剂待用。在试验中, 在给接种动物使用实验亚单
位疫苗的同一天, 给对照动物使用两剂对照疫苗。

25

30

表 9

亚单位表达的-蛋白疫苗制剂概述	
Trangie NS3/NS4A	标记过的: TNS3 8/4/98 MOI 0.2, 在 SFM 中生长 48 小时 在 43℃ 下热激 10 分钟 放回培养箱中摇动 2 小时 仅有收获细胞 (弃掉 S/N), 因此 [] 添加 6 × 亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 2 次 在 -80℃ 下保存 (Block5)
Trangie E0	标记过的: TE0 23/4/98 MOI1, 在 SFM 中生长 48 小时 在 43℃ 下热激 10 分钟 放回培养箱中摇动 24 小时 收获细胞+S/N, 添加亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 2 次 AMICON 浓度 5 × 在 -80℃ 下保存 (Block5)
Bega E0	标记过的: BE0 23/4/98 MOI 0.2, 在 SFM 中生长 48 小时 在 43℃ 下热激 10 分钟 放回培养箱中摇动 24 小时 收获细胞+S/N, 添加亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 2 次 AMICON 浓度 5 × 在 -80℃ 下保存 (Block5)

Clover E1/E2	Lane	标记过的: CLE2 23/4/98 MOI 2, 在 SFM 中生长 48 小时 在 43℃ 下热激 10 分钟 放回培养箱中摇动 24 小时 收获细胞+S/N, 添加亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 2 次 AMICON 浓度 5 × 在 - 80℃ 下保存 (Block5)
Trangie E1/E2		标记过的: TN2 8/5/98 MOI 1, 在 SFM 中生长 48 小时 仅收获 S/N 添加亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 2 次 AMICON 浓度 6 × 在 - 80℃ 下保存 (Block5)
Bega E1/E2		标记过的: BE2 8/5/98 MOI 1, 在 SFM 中生长 48 小时 仅收获 S/N 添加亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 2 次 AMICON 浓度 5 × 在 - 80℃ 下保存 (Block5)
对照疫苗		标记过的: SFM-Sf9 24/6/98 在 SFM 中生长 48 小时 在 43℃ 下热激 10 分钟 放回培养箱中摇动 24 小时 收获细胞并放入 50 毫升 SFM 中, 因此[]添加 10 × 亮抑蛋白酶肽达到 5 微克/毫升 冷冻/解冻 2 次 用 CSL 标准方法 BPL 失活 1 次 在 - 80℃ 下保存 (Block5)

表 9 (续)
混合重组蛋白以便生产亚单位疫苗

	<u>反应抗原</u>	<u>1 × 剂量</u>	<u>27 × 剂量</u>
	BE0	1 毫升	27 毫升
5	TE0	1 毫升	27 毫升
	CLE1/E2	1 毫升	27 毫升
	TE1/E2	0.5 毫升	13.5 毫升
	TNS3/NS4A	0.3 毫升	8.1 毫升
	BE1/E2	1 毫升	27 毫升
10	总体积		129.6 毫升

将 1.29 毫升硫柳汞添加到 129.6 毫升疫苗混合物中，取出 9.6 毫升，并以 1 毫升的等份试样在-20℃下保存。

向其余的 120 毫升混合物中添加 32.5 毫升 Iscomatrix 佐剂，并搅拌 2 分钟以便充分混合。

- 15 将其等分到两个容器中，即每个容器 68 毫升，并在 4℃下保存。
在具有 18 号针头的 10 毫升注射器中建立疫苗-每个剂量的最终体积为 6 毫升。

对照疫苗

	<u>1 个剂量</u>	<u>16 个剂量</u>
--	--------------	---------------

20	对照细胞制剂	4.8 毫升	28.8 毫升
	Iscomatrix 佐剂	3 毫升	7.8 毫升
	硫柳汞	0.048 毫升	0.29 毫升

在具有 18 号针头的 10 毫升注射器中建立对照疫苗-每个剂量的最终体积为 6 毫升。

- 25 例 3

亚单位疫苗对澳大利亚牛的影响

亚单位胚胎保护实验方法

- 一共选择 22 头瘟病病毒抗体阴性、未怀孕的小母牛用于该实验。
用按照例 1 和例 2 所制备的亚单位疫苗（6 毫升）对一组动物（n=10）
30 接种两次，中间间隔 4 周。用对照制剂（6 毫升）对另一组动物（n=12）
进行接种。以规定的间隔对所有动物进行放血，并使用复合体-跟踪-
封闭 ELISA（CTB-ELISA）方法测定抗 E2 和抗 NS3 的流动，该测定方

法是由 Elizabeth Macarthur 农业研究所 (EMAI) 建立的。

在第 2 次接种之后, 使这些动物同时发情。在检测出发情之后马上进行人工受精。在第 2 次接种之后 11 周, 所有动物都被判定为受孕, 并发育了超过 6 周的胚胎, 这一时间点被认为是容易受 BVDV 感染的时间。然后用一个剂量 ($3 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$) 的活的异源 BVDV 分离物 Gien Innes 刺激这些小母牛。

在病毒刺激之后 6 周, 在出口屠宰场 (Mudgee) 分两组宰杀所有的小母牛。从怀孕的小母牛体内收集胚胎。就是说, 在接种组中有来自 10 个动物的 7 个胚胎, 而在对照组中有来自 12 个动物的 9 个胚胎。

10 在无茵条件下收集每一个胚胎组织。采用了若干方法来测试 BVDV 感染的存在。首先使用了对 E2 抗原或 NS3 抗原专一的两种抗原捕获 ELISA。其次, 用一组单克隆抗体检测用标准技术分离的受感染的细胞, 并进行免疫过氧化物酶 (IPX) 染色。最后, 使用 5'-UTR 病毒专一性 RT-PCR。上述方法的组合可以灵敏地和专一地检测从所述小母牛
15 中收集到的受感染的和未感染的胚胎。

E2 亚单位疫苗对牛对 BVDV 免疫反应的影响

在图 1 中示出了接种过的和对照组的小母牛, 在接种之前和之后以及在活的病毒刺激之后, 抗 E2 (中和) 抗体的平均浓度。

抗 E2 抗体的平均浓度对时间作图表明, 该亚单位疫苗在接种组中
20 产生了极高浓度的抗 E2 抗体。高效价的抗体在服用第 2 剂疫苗 2 周之后便出现了。接种过的小母牛体内的抗 E2 抗体的浓度明显高于对照组的浓度。在随后的 9 周时间内, 接种组的抗 E2 的浓度略有降低, 但仍然明显高于对照组的小母牛。

在用活的 BVD 病毒刺激 7 天之后, 在接种组中观察到了 E2 抗体浓度的快速的记忆性升高, 该抗体的浓度持续升高到刺激后 9 天, 此后, 保持持续的最大浓度。与这一趋势相反, 在对照组中, 只是在用活的病毒刺激之后观察到抗 E2 抗体浓度的升高。然后在对照组中观察到了正常反应的发生, 抗 E2 抗体的平均浓度在刺激之后 14 天开始发展。不过, 直到刺激之后 3-4 周还没有达到最强的反应。

30 因此, 用所述亚单位疫苗接种怀孕的小母牛, 在病毒感染之后的最初 4-7 天产生免疫反应。这是一个重要阶段, 在此期间活的病毒穿过胎盘达到发育中的胚胎。上述结果清楚地表明, 在亚单位疫苗接种

过的小母牛组 ($n=10$)，活的病毒的复制受到拮抗。这是首次报导一种亚单位疫苗的这种反应。

NS 亚单位疫苗对牛对 BVDV 免疫反应的影响

在图 2 中示出了接种过的和对照组小母牛中抗 NS3 抗体的浓度随时间的变化。另人吃惊的是，在接种之后在接种过的小母牛中没有检测到抗 NS3 抗体。出现这一结果的原因尚不清楚。不过，这一结果具有开发“标记”疫苗的巨大潜力。所有“自然感染”动物在感染 BVDV 之后 21 天产生了抗 NS3 抗体。由于用所述亚单位疫苗接种过的动物不产生抗 NS3 抗体（如下文所述），这些动物很容易与“天然感染的”动物区分。

很有可能抗 NS3 蛋白通过诱导 CD8+细胞毒性 T 细胞导致了强的细胞介导的免疫反应的产生，尽管没能诱发抗体反应。

在用活的病毒刺激之后，接种过的小母牛（10 头中的 7 头）直到刺激之后 5-6 周才出现明显的抗 NS3 抗体。其余的 3 头接种过的小母牛在刺激之后 3-6 周出现了抗 NS3 抗体。不过，抗体的浓度明显低于对照组小母牛的。相反，对照组小母牛 ($n=12$) 在刺激之后 14-18 天出现了正常的抗体反应，在刺激之后 4 周达到高峰（图 2）。

以上结果清楚地表明，在亚单位疫苗接种过的小母牛组 ($n=10$) 中，活病毒的复制受到抑制。这是首次报导亚单位疫苗的这种反应。很显然，针对受感染细胞的推测的 CTL 反应的早期发生抑制了所述病毒的复制。因此，在接种过的动物中没有足够的病毒循环以便通过胎盘并感染胚胎。

由亚单位疫苗诱导的中和抗体的浓度

用不同的 BVDV 分离物进行血清中和实验 (SNTs)，以便研究由亚单位疫苗所诱导的中和抗体的浓度，并测定由活病毒刺激所产生的记忆反应。

该实验的结果示于表 10 中。正如由图 1 所示结果所预料的，在接种过的小母牛组中，在接种之前没有观察到抗体反应。不过，在 2 次接种之后，在与疫苗相关的两种 BVDV 分离物 (Trangie 和 Bega) 中观察到了很好的抗 E2 中和抗体反应（平均效价为 1: 1000）。相反，对绵羊 BDV 分离物 (Clover Lane) 的中和抗体反应很低（平均效价为 1: 50），即使将来自该病毒的重组 E2 蛋白掺入所述疫苗中与 hsp90 组合

也是如此。不过，由该亚单位疫苗所获得的中和抗体的浓度，大于在以前的实验中用失活的完整（Clover Lane）病毒所获得的浓度（结果未公布）。

5 在第二次使用疫苗 4 周后，对异源攻击病毒 Glen Innes 进行的 SNTs 表现出了极高的交叉反应性（平均效价为 1: 1200）。这一发现证实，E2 蛋白的组合能产生对异源病毒的很好的交叉保护。一种亲源关系更远的 BVD 病毒 Braidwood 表现出更低的中和抗体浓度（平均效价为 1: 400），但这与抗这种病毒感染的有效抗体产生相关。

10 在攻击之后 7 天和 14 天，对从接种过的动物体内收集的血清进行的 SNT 测定（表 10）更为惊人。用亚单位疫苗中的三种病毒的每一种进行测定。结果可以看出，在攻击之后仅 7 天在抗 E2 抗体水平就存在极高的记忆反应。在第 7 天，Trangie 和 Bega BVDV 病毒的平均 SNT 在 1: 14000-16000 范围内，但在攻击之后 14 天升高到异乎寻常的浓度。在攻击之后 14 天，抗 Trangie 的平均效价为 1: 180000，有两只
15 动物的效价高达 1: 512000。类似地，在 14 天抗 Bega 的平均效价为 1: 100000，有 3 只动物抗 Bega 的效价为 1: 256000。这样高的效价在“自然感染”的动物上是罕见的。

20

25

30

表 10

接种过的 动物数	用亚单元疫苗第二次接种4周后的SNT -+					用Glen Innes病毒刺激 7日后的SNT -+			用Glen Innes病毒刺激 14日后的SNT -+		
	Trangie	Bega	Clover Lane	Glen Innes	Braid- wood	Trangie	Bega	Clover Lane	Trangie	Bega	Clover Lane
Q239	>2056	>2056	32	>2056	1024	12800	12800	800	12800	64000	8000
Q269	512	128	16	256	64	3200	3200	~4	16000	16000	64
Q300	256	512	128	512	128	6400	12800	800	64000	32000	8000
Q306	1028	256	16	1028	256	12800	51200	1600	64000	64000	4000
Q324	1028	512	128	1028	256	3200	1600	400	64000	16000	4000
Q354	128	64	<4	128	16	3200	1600	100	64000	64000	2000
Q355	1028	>2056	32	2056	512	12800	12800	1600	512000	256000	16000
Q379	2056	>2056	32	>2056	1024	25600	12800	1600	128000	64000	8000
Q382	512	512	64	>2056	64	6400	6400	100	256000	256000	8000
R346	>2056	>2056	64	>2056	1024	51200	51200	3200	512000	256000	64000
Mean Titre (Range)	1028 (128- 2056)	1020 (64-> 2056)	50 (0-128)	1200 (128- >2056)	436 (16- 1024)	13700 (3200- 51200)	16600 (1600- 51200)	1024 (~4- 3200)	18000 (16000- 512000)	108000 (16000- 256000)	12250 (64- 64000)

(◆) = 血清稀释始于1: 4; 结束时为2倍稀释液
(☆) = Trangie和Bega的血清稀释液始于1: 1000, Clover Lane始于1: 100;
结束时为2倍稀释液

表 11

接种的 动物数	SNT (NPLA) 效价的倒数 (在两个试验的第二次接种后4周)					
	失活的疫苗 1112/96 (T+B+CL)			亚单位疫苗 584/98 (T+B+CL)		
	Trangie ^φ	Glen Innes [∴]	Clover Lane ^φ	Trangie ^φ	Glen Innes [∴]	Clover Lane ^φ
1	1024	512	10	>2048	>2048	32
2	256	512	20	512	256	16
3	256	512	20	256	512	128
4	40	64	10	1024	1024	16
5	50	50	10	1024	1024	128
6	200	256	8	128	256	<4 (0)
7	-	-	-	1024	2048	32
8	-	-	-	2048	>2048	32
9	-	-	-	512	>2048	64
10	-	-	-	>2048	>2048	64
平均效价	300	300	12	1028	1200	50
(范围)	(40- 1024)	(50- 512)	(8-20)	(128- 2048)	(128- >2048)	(0-128)

- 5 在用失活的、完整病毒疫苗或含有重组蛋白的非传染性亚单位疫苗接种 4 周之后,比较在牛上测定的针对三种病毒的中和效价。把(φ) Trangie 和 (BVDV 分离物) Clover Lane (BDV 分离物) 添加到两种疫苗中。在亚单位疫苗中, Clover Lane E2 重组蛋白在体内与热激蛋白 (hsps) 结合; (∴) =Glenn Innes 是用于两种实验刺激活的病毒)
- 10 (BVDV 分离物明显不同于所述疫苗病毒。)

因此，可以得出这样的结论，亚单位疫苗在“启动”动物对以前未观察到的活的病毒刺激做出反应方面具有显著作用。

SNT 测定发现了对 BDV 分离物 Clover Lane 的强的“启动”反应（表 10）。在用完全不相关的活病毒（BVDV Glen Innes）刺激之后 7 天，对 Clover Lane 的 SNT 表现出 1: 1024 的效价（从接种之后测得的 1:50 提到到这一效价）。对 Clover Lane 的效价在第 14 天提高到平均为 1: 12000，其中一只动物抗绵羊分泌物的效价为 1: 640000。由此提供了该亚单位疫苗能够对所有澳大利亚牛和绵羊瘟病病毒提供广谱保护的进一步的证据。这种保护作用远远大于用目前失活的完整病毒疫苗所能获得的保护。

对三种澳大利亚瘟病病毒进行另外的 SNTs。用来自 Trangie+ Bega+ Clover Lane+分离物的两种不同的疫苗对两种动物进行接种，并直接进行比较。在第一组，用实验性失活的完整病毒疫苗进行接种。第二组动物用亚单位疫苗（+hsps）进行接种。在接种第二剂疫苗之后 4 周，从这两组的接种过的牛上采集血清。

抗这三种病毒的 SNTs 的结果如表 11 所示。对这三种病毒的比较发现，亚单位疫苗所产生的效价比由失活的疫苗所诱导的相应的效价至少高 4 倍。另外，这两种疫苗都对完全不相关的 BVDV 分离物“Braidwood”产生了交叉中和，与失活的疫苗相比（结果未显示），在用亚单位疫苗接种 4 周之后的效价同样提高了差不多 4 倍。

因此，通过开发这种亚单位疫苗可以满足所有牛生产国对范围更广的疫苗的需求。

亚单位对 BVDV 向胚胎转移的影响

按上文所述，用三种不同的 BVDV-专一性测定（表 12）在 EMAI 测试从怀孕的接种过的小母牛体内获得的胚胎（n=7）上采集的组织样品和从怀孕的对照小母牛体内获得的胚胎（n=9）上采集的组织样品。从所有三种测试可以看出，在从怀孕的接种过的小母牛体内获得的 7 个胚胎中的任一个上都没有 BVDV 感染。相反，如通过病毒分离和 RT-PCR 测定所显示的，在对照组的 9 个胚胎中有 5 个受到感染。

因此，可以认为在有最大的可能使病毒转移到发育中的胚胎的时候，接种能对活的异源 BVDV 刺激产生 100%的保护作用。

表 12

从动物上 收获的 胚胎	抗原ELISA (PACE) 结果 (S/N比例)				病毒分离物 & 5' UTR RT-PCR 结果	
	E2 ^Δ	NS3	E2 + NS3	最终结果	VI 2nd Pass	RT- PCR (+/-)
接种						
Q239	1.0	1.1	-ve	-ve	-ve	-ve
Q306	1.0	0.9	-ve	-ve	-ve	-ve
Q324	1.0	1.2	-ve	-ve	-ve	-ve
Q354	1.0	1.1	-ve	-ve	-ve	-ve
Q355	0.9	1.0	-ve	-ve	-ve	-ve
Q379	1.2	1.1	-ve	-ve	-ve	-ve
R346	1.0	0.9	-ve	-ve	-ve	-ve
对照						
Q240	1.2	1.1	1.0	-ve	-ve	-ve
Q316 ^Φ	0.7	0.6	<1.0	-ve	+ve ^l	+ve
Q352	1.0	1.0	1.0	-ve	-ve	-ve
Q373	0.9	1.1	1.0	-ve	-ve	-ve
Q388	2.9	13.6	15.8	+ve	+ve	+ve
R298	4.9	10.8	11.1	+ve	+ve	+ve
Q337	1.0	0.9	1.0	-ve	-ve	-ve
Q372	3.2	12.8	14.1	+ve	+ve	+ve
Q385	2.3	16.2	17.6	+ve	+ve	+ve

5 (∴)=信噪比。比例>2.0在PACE中对胎盘组织是有效的。(Δ)
=有效的E2结果很低。通过高S/N比例和NS3单克隆对阳性组织所证
实的结果。(Φ)=在子宫中明显死亡的胚胎。结果证实胚胎是受到感

染的。（[] 弱的病毒分离阳性-仅有单细胞附着在微量平板上。因此在该死亡的胚胎中病毒的效价较低。通过诊断性 RT-PCR 证实的结果。

例 4

亚单位疫苗对澳大利亚绵羊的影响

- 5 用绵羊对亚单位蛋白进行另外两种实验，以便进一步研究所述疫苗的保护作用。进行该实验是为了与热激蛋白的结合/不结合的单一病毒蛋白相比较，检验蛋白的组合（与热激蛋白结合）在针对用于牛实验的相同的活的异源瘟病病毒转移中所提供胚胎保护的作用。尽管用相同的 BVDV 分离物（Glen Innes）刺激绵羊，其剂量降低到每只绵羊
10 2×10^5 TCID₅₀，或者比用于刺激牛的活的病毒量低 50 倍。

- 在上述第一个实验中包括 24 只绵羊，用两种不同的商业化佐剂制剂制备相同的牛亚单位疫苗。分别给 2 组 8 只绵羊使用 2 剂亚单位蛋白，而给 8 只绵羊注射含有昆虫细胞但没有瘟病病毒蛋白的对照制剂。在研究过程中，以与牛亚单位实验相同的方式对接种过的和对照绵羊
15 的血清抗 E2 和 NS3 抗体进行抗体测定。在第二次接种之后立即让公羊对母羊进行配种。在接种 10 周之后，在所有的母羊都怀孕以后，用活的异源瘟病病毒（Glen Innes 病毒）对其进行刺激。5 周之后，将所有母羊宰杀，并收集胚胎进行测定，以便确定是否在其胚胎组织中出现瘟病病毒感染。在胚胎组织中没有任何可检测到的瘟病病毒表明没有病毒从母羊转移到其胚胎中。这一结果相当于产生了完全保护，并且仅在 2 组接种过的动物中检测到（参见下文）。

- 在图 3 和图 4 中示出了接种组和对照组绵羊的抗体反应。可以看出，接种过的动物的反应是产生大量抗 E2 抗体（相当于中和抗体），在第二次接种疫苗之后 2 周开始。这一反应与在用相同亚单位疫苗接种过的牛上的抗 E2 抗体反应相似。不过，值得注意的是，通过 ELISA
25 在接种过的绵羊上测出的抗 E2 抗体的绝对含量（图 3）低于在接种过的牛上测定的相当的含量。与牛一样，在接种过的绵羊上也有立即出现的记忆反应，在用活的病毒攻击之后仅 7 天就测出高水平的抗 E2 抗体。这是一个好的证据，表明亚单位疫苗接种过的绵羊能在早期产生保护性抗体反应，就像例 3 中所示的接种过的牛一样。

30 与牛一样，绵羊在接种之后不产生任何 NS3 抗体（图 4），证实了该亚单位制剂是一种‘标记疫苗’。在活的病毒刺激接种过的绵羊之

后,很明显的是,在刺激 5 周之后将这些母羊宰杀 16 只绵羊中有 14 只没有产生任何抗 NS3 抗体。其余的 2 只绵羊与在同一时间点上与对照组的未保护过绵羊的抗 NS3 抗体含量相比,仅产生中等含量的抗 NS3 抗体(参见图 4)。总之上述结果明确证实,在绵羊中用亚单位疫苗接种,能降低在受到活的 BVD 病毒刺激之后病毒在母羊体内的复制。因此,在绵羊上所获得的抗 NS3 抗体结果证实并扩展了在亚单位疫苗接种过的牛上面所获得的结果。因此,重要的是要了解绵羊上病毒复制的减弱是否等同于保护了病毒不向接种过的母羊胚胎中的转移。

胚胎分析结果表明,在两个接种过的组之间胚胎保护指数没有差别。因此,改变这两种疫苗制剂中所使用的佐剂没有作用。可以对来自这两组的接种进行综合,得到来自接种过的母羊的 16 个胚胎,用于与来自对照的未保护过的母羊的 8 个胚胎进行比较。对所有结果进行分析发现,总体上讲,在接种过的母羊中有 56%的完全胚胎保护(9/16 的胚胎得到保护),而在对照母羊中有 100%的感染比例(8/8 胚胎受到感染)。不过,与从对照母羊上获得的胚胎相比,在从接种过的母羊上收集到的阳性胚胎中活的瘟病病毒转移的比例为 5/7,这是显著的降低。这意味着在接种母羊的 16 个胚胎中仅有 2 个与对照组胚胎病毒含量相似的胚胎。因此,有 87%的接种过的母羊要么没有病毒的转移,要么严格限制了其转移。

这一结果表明,亚单位疫苗在绵羊上尽管不如在牛上有效,但仍对接种过的母羊产生高水平的保护作用。这两个实验明确表明了该亚单位疫苗制剂的强的保护作用。如下文所讨论的,在牛和绵羊上的结果的差异有可能是由于绵羊对牛瘟病病毒刺激的承受能力较低。这是病毒的种间转移,并且绵羊所具有的其免于通过种间障碍传播的病毒的方法效果较差。

表 13

从亚单位接种过的和对照（未保护的）母羊体内收集的胚胎组织病毒含量（50%组织-培养感染剂量-TCID₅₀）

5

胚胎数	每克胚胎组织的 Log ₁₀ 痘病病毒 TCID ₅₀	
	接种过的母羊	对照（未保护的）母羊
阳性数量	7/16 = 44%	8/8 = 100%
1	<2.3	6.7
2	<2.3	5.9
3	4.9	7.0
4	3.0	6.3
5	3.0	7.4
6	5.4	6.8
7	2.5	3.4
8	其余的9个胚胎 (56%) = 无病毒	6.7
平均值 (Log ₁₀) ± SD	3.34 ± 1.2 ^{□□} (7)	6.2 ± 1.2 (8)

□□组织中病毒含量的统计学上的显著降低 ($P < 0.01$)

备注:

在来自接种过的母羊的 7 个胚胎中的病毒含量比来自未保护的母羊的 8 个胚胎的平均含量几乎低 1000 倍。

在亚单位疫苗接种过的母羊的 16 个胚胎中，有 14 个要么完全受到保护（9），要么每克组织的病毒颗粒少于 10^3 （5 个胚胎）。因此，在接种过的母羊上对病毒胚胎转移的完全或部分保护=87%。

用 24 只绵羊进行的第 2 次实验，研究了仅用来自牛痘病病毒的一种免疫原蛋白的保护作用。将 16 只绵羊分成 2 组，每一组 8 只，用外被糖蛋白的与热激蛋白 (hsps) 结合或没有 hsps 的痘病病毒两种不同制剂进行接种。给另外 8 只绵羊既不含痘病病毒蛋白又不含 hsps 的对照制剂。该实验方法与前面的实验方法相同，并且胚胎分析结果表明，

将单一的瘟病病毒亚单位糖蛋白掺入疫苗中只能对相同的活的 BVD 病毒 (Glen Innes) 向胚胎的转移产生弱的保护作用。总体上讲, 在接种的母羊中仅有 29% 的保护作用, 其余 71% 的胚胎受到感染。不过, 值得注意的是, E2 糖蛋白与 hsp90 结合的疫苗所产生的保护作用几乎是不采用 hsp90 的疫苗的两倍。尽管由于受到保护的胚胎的数量低而使得这一结果不明显, 但其趋势表明 hsp90 确实具有增强疫苗效力的作用。在对照母羊中同样有 100% 的感染比例 (7/7)。该实验清楚地表明, 为了产生高水平的保护作用需要来自瘟病病毒的一种以上的蛋白。从牛和绵羊实验上可以看出, 亚单位疫苗的关键成分是与热激蛋白结合的非结构蛋白 NS3/NS4A。较小的外被糖蛋白 E0 的作用还不太清楚, 但也有可能起着保护作用。

例 5

瘟病病毒的多表达系统

为提高亚单位瘟病病毒疫苗的商用存活力, 必需在重组杆状病毒中表达多于一种蛋白。这样省去了单一蛋白表达所固有的耗时、昂贵的培养系统。为达到以下目的, 即将最初的亚单位制备所用的 6 种不同的表达体系降低到最多为两种培养物, 我们研究了遗传工程化的杆状病毒多表达载体的可性能。

商业化的 Multiple Transfer Plasmid pBAC4x-1 是从 Novagen 购买的 (目录号 70045-3), 并将两种 BVD 病毒的 4 个不同的基因组区成功地插入该质粒。按以下顺序将来自澳大利亚病毒 Trangie 和 Bega 的 E1/E2 片段以及来自 Trangie 病毒的截短的 NS3 片段和来自相同病毒的壳体/E0 片段插入所述质粒的 4 个多限制位点上, 使 TC/E0 和 BE1/E2 受杆状病毒 P10 启动子的控制, 而 TE1/E2 和 TNS3/NS4A 受杆状病毒多角体启动子的控制。随后证实所有 4 个基因组片段都处在正确的方向上, 得到了含有 4 种不同 BVDV 蛋白的正确遗传信息的转移质粒。

在克隆到一系列噬菌斑分析之前, 通过用 pBAC4x-1 转移质粒转染构建重组杆状病毒。在克隆过程的每一阶段对所制备的重组杆状病毒进行检测, 以便证实其是否能在 Sf9 昆虫细胞培养物高水平表达所有四种蛋白。有一种重组病毒在通过三轮噬菌斑纯化和在 Sf9 培养物中进行三次克隆病毒的传代之后表现出稳定的高水平表达所有四种蛋白。通过用特定的单克隆抗体滴定测定四种蛋白中每一种的表达水

平。在表 14 中示出了在上清液和细胞中蛋白含量的结果。可以看出，所有四种蛋白在单一培养系统中都以很高的含量产生，每一种滴定的终止点在 1: 64 至 1: 4096 范围内。

表 14. 通过限制稀释克隆三次并在 Sf9 细胞中传代三次的多蛋白表达杆状病毒。重组杆状病毒是稳定的并且能够以高水平表达所有蛋白。

抗原	终点稀释	检测抗体
Trangie 和 Bega E2 (上清液)	1 in 4096	E2 mAb 混合物 (R1465)
Trangie E0 (上清液)	1 in 256	E0 mAb 15c5 (R495)
Trangie NS3 (上清液)	1 in 64	NS3 mAb 混合物 (R1526)
Trangie 和 Bega E2 (细胞)	1 in 1024	E2 mAb 混合物 (R1465)
Trangie E0 (细胞)	1 in 4096	E0 mAb 15c5 (R495)
Trangie NS3 (细胞)	1 in 256	NS3 mAb 混合物 (R1526)

为了进一步研究该多表达系统是否适用于疫苗生产，同样对用重组 4X-蛋白感染过的 Sf9 细胞进行热激 (43℃ 10 分钟)。然后在该培养物中生产蛋白，并在第 4 天确定适合于掺入疫苗中的蛋白的最终产量。与在不进行热激处理的培养物中生产的产量进行比较。下面的表 15 提供了分析来自每一种培养物的上清液和细胞的收获物中蛋白含量的结果：

15

20

表 15. 从多表达系统的上清液和细胞中收获的 E2、E0 和 NS3 蛋白的滴定终点水平。培养物在 27.5℃ 下生长 4 天，并对一种培养物进行热激，以便使瘟病病毒蛋白与 hsps 结合。显示了有/没有 hsps 的对比含量。

表达的瘟病病毒蛋白	滴定终点无 hsps	滴定终点有结合的 hsps
E1/E2 (Trangie+Bega)	1: 1024	1: 2048
壳体/E0 (Trangie)	1: 1024	1: 2048
截短的 NS3 (Trangie)	1: 1024	1: 1024

值得注意的是，在含有多蛋白表达重组瘟病病毒的热激培养物中，蛋白的产量不受热激处理的影响。因此，杆状病毒不会降低蛋白产量并且在该系统中大量蛋白与 hsps 结合是可能的。因此，该系统非常适用于疫苗生产目的。

作为另一个例子，构建了第二个 Multiple transfer plasmid，它含有编码其他瘟病病毒蛋白的 cDNA，即 Trangie E1/E2、Clover Lane E1/E2 和 Clover Lane NS3/NS4A，并选择性地编码 Clover Lane E2/Bega E0。认为，这些额外的蛋白可以拓宽亚单位疫苗的保护作用，以便覆盖由本领域的 BVDV 分离物所表现出的更宽的抗原多样性的范围。具体地讲，包括来自 Clover Lane 分离物的两种边界病病毒 (PDV) 蛋白可以拓宽其保护作用，以便与含有 6 种蛋白的原始亚单位疫苗匹配。这样仅对两种培养物进行短时间热处理就能产生 6 种与 hsps 结合的瘟病病毒蛋白。可以用与例 3 所述相同的方法，在牛身上测试其在防止活的瘟病病毒向发育中的胚胎转移方面的效力。

20

25

参考文献:

Abuchowski *et al.*, 1981, *supra*;

Ausubel, *et al.* *Current protocols in molecular biology*

Becher P., Orlich, M. and Thiel, H.-J. (1998). *Journal of Virology* **72**, 5165-5173.

Collett, MS, Anderson DK and Retzel E (1988). *Journal of General Virology*, **69**, 2637-2643.

Current Protocols in Molecular Biology (1991):. Supplement 15, K.Janssen (ed).
Current Protocols, Wiley,. p. 8.5.3.

Gibco BRL (1995): Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and
Insect Cell Culture Techniques.

Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II, MRL Press, Ltd.,
Oxford, U.K. (1985)

Heery DM. (1990). *Trends in Genetics* **6**, 173.

Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co.,
Easton, PA, (1990)

Newmark *et al.*, *J. Appl. Biochem.*, **4**:185-189 (1982).

Pauly T, Elbers K, Konig M, Lengsfeld T., Saalmuller A and Theil HJ (1995).
Journal of General Virology, **76**, 3039-3049.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A
Laboratory Manual*. second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shannon AD, Richards SG, Kirkland PD and Moyle A. (1991). *Journal of
Virological Methods* **34**, 1-12.

Smith *et al* (1983) *Mol Cell Biol* **12**: 2156-2165

EMAI 亚单位疫苗试验 584/98
CTB-ELISA 抗-E2抗体

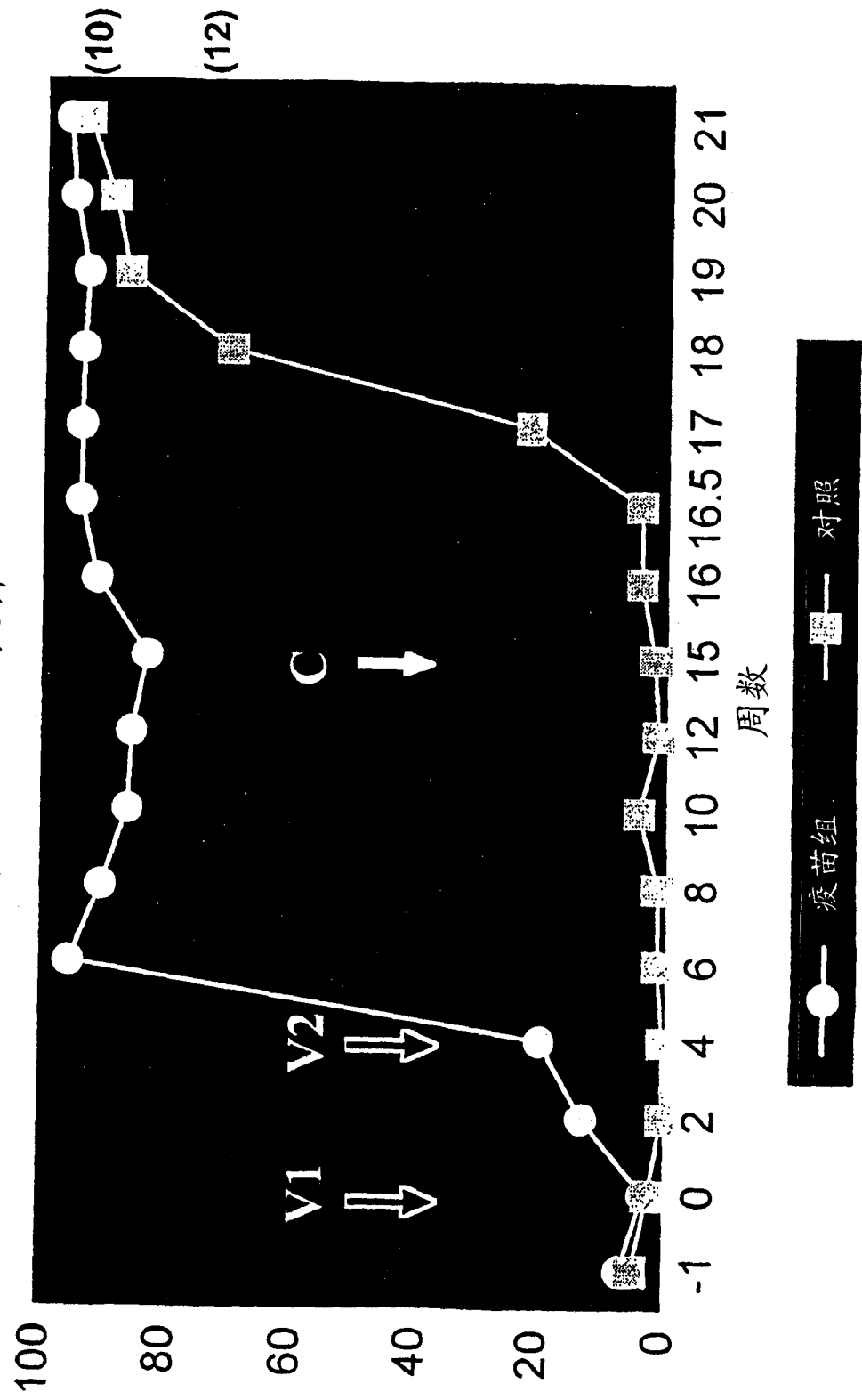


图 1

EMA I 亚单位疫苗试验 584/98
CTB-ELISA 抗-NS3抗体

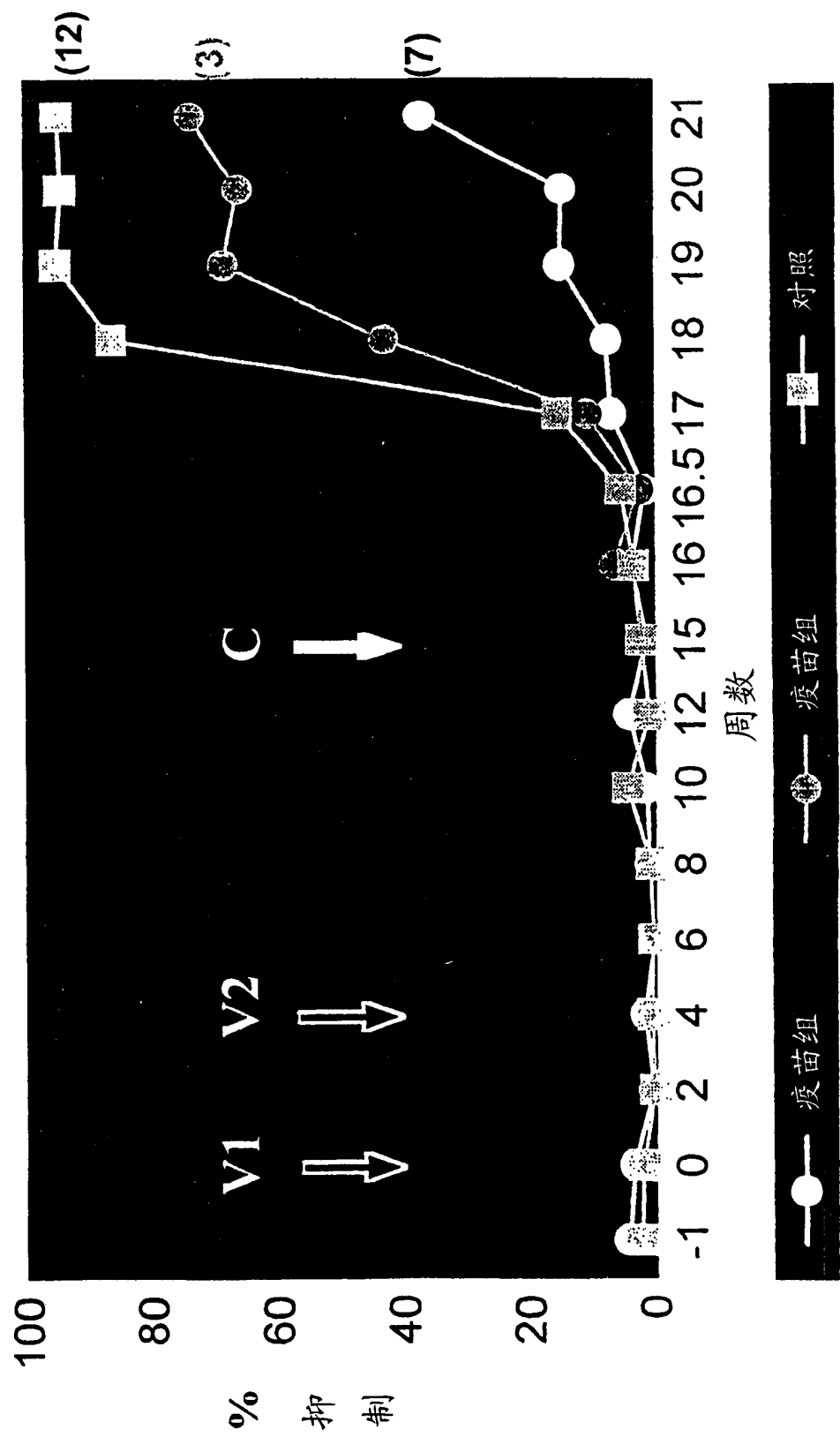


图 2

EMA I 亚单位疫苗绵羊试验 458/99
CTB-ELISA 抗-E2抗体

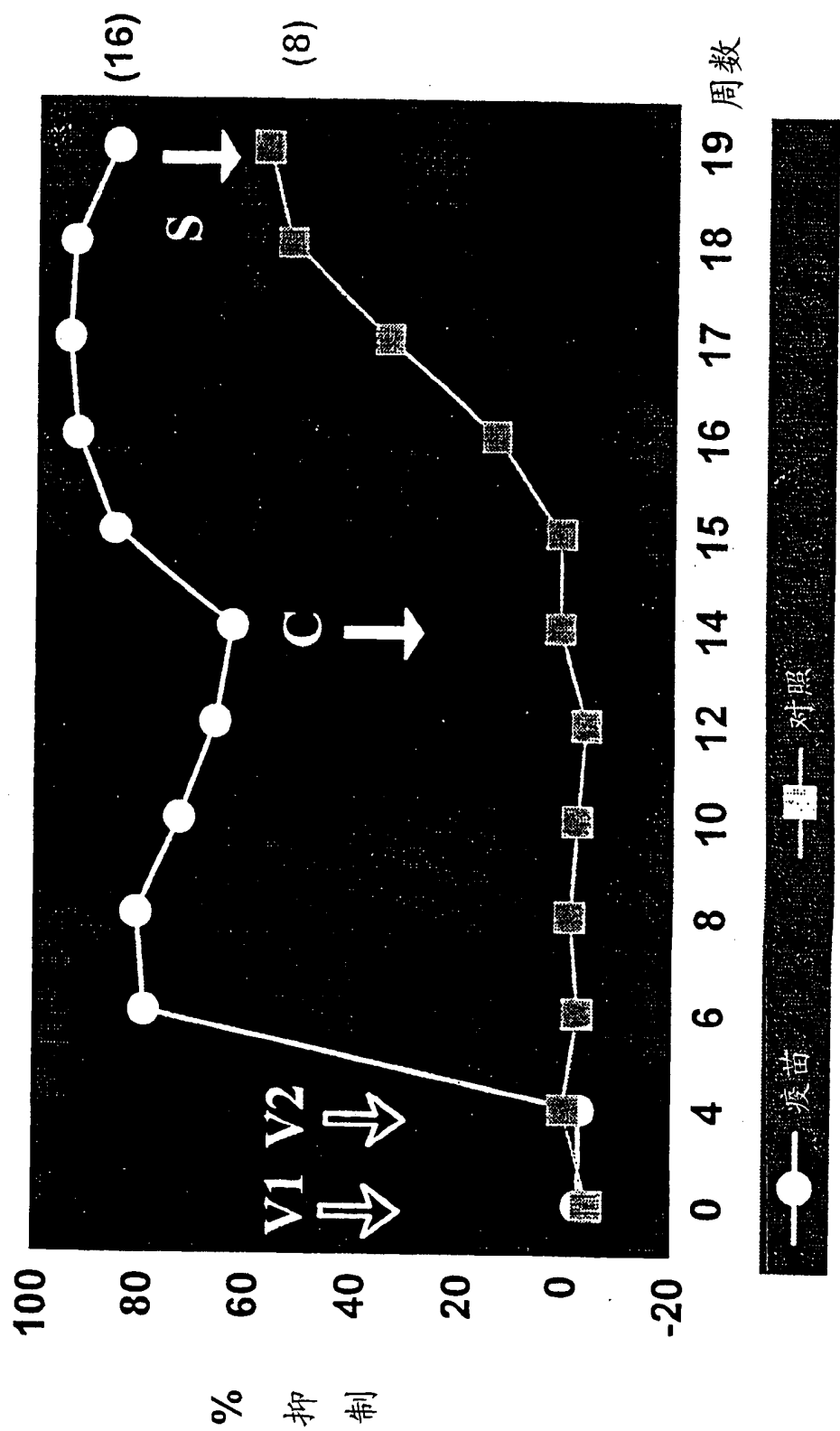


图 3

EMAI 亚单位疫苗绵羊试验 458/99
CTB-ELISA 抗-NS3抗体

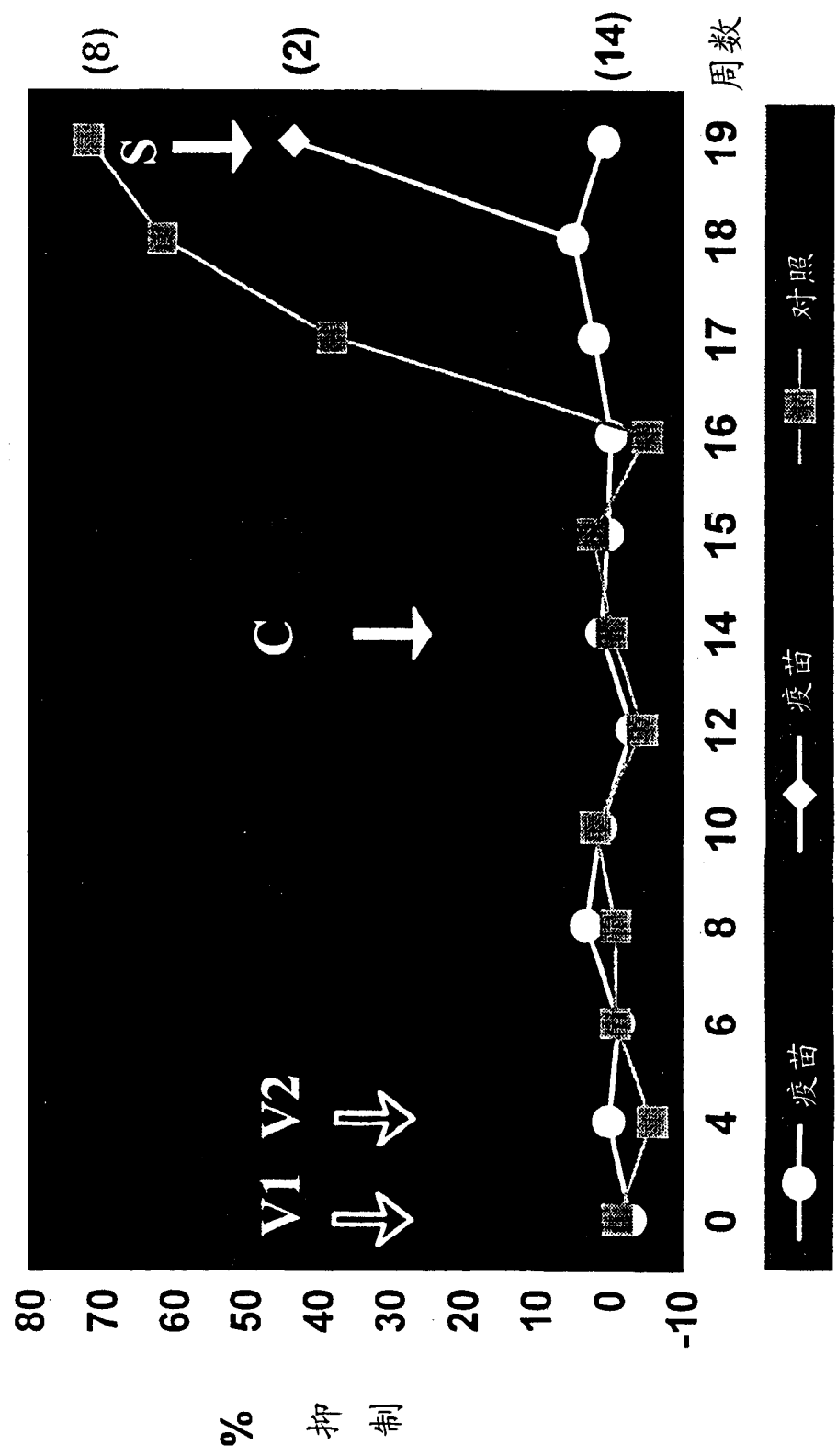


图 4