



(12) 发明专利申请公开说明书

(11) CN 86 1 05450 A

(43) 公开日 1987年3月4日

(21) 申请号 86 1 05450

(22) 申请日 86.7.29

(30) 优先权

(32) 85.7.29 (33) 美国 (31) 760,130

(71) 申请人 厄普约翰公司

地址 美国密歇根州卡拉马祖亨里埃塔街301号

(72) 发明人 伦纳德·E·波斯特 达雷尔·R·汤姆森

(74) 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 王 巍

(54) 发明名称 病毒疫苗

(57) 摘要

提供一种病毒疫苗,包括功能适当残缺的病毒缺乏野生型病毒的抗原,此疫苗在血清学上区别免疫动物与感染动物中是有用的,提供区别免疫动物与感染动物的方法以及多价疫苗的方法。

CN 86 1 05450

242/87102810/04

1. 一种生产疱疹病毒疫苗的方法, 此疫苗含有适当缺残的病毒, 具有缺失编码分泌糖蛋白的基因, 此糖蛋白能使血清学鉴别接种病毒和其野生型原始病毒。

2. 按照权利要求1的方法, 其中的病毒是从由假狂犬病病毒, 马立克氏病病毒和传染性牛鼻气管炎病毒组成的类群中选育出来的。

3. 按照权利要求2的方法, 其中的病毒是假狂犬病病毒。

4. 按照权利要求1的方法, 其中的病毒是假狂犬病病毒以及其中的分泌性糖蛋白是糖蛋白^X。

5. 产生一种包含缺失至少一个编码分泌性糖蛋白基因的突变型疱疹病毒的方法。

6. 按照权利要求5的一种方法, 其中疱疹病毒是从由假狂犬病病毒, 马立克氏病病毒及传染性牛鼻气管炎病毒组成的类群中选育的。

7. 按照权利要求5的方法, 其中疱疹病毒是假狂犬病病毒。

8. 按照权利要求7的方法, 其中分泌性的糖蛋白是糖蛋白^X。

9. 按照权利要求8的疱疹病毒, 其中的病毒不产生胸苷激酶的功能。

10. 一种能区别被病毒感染的和用抗所说病毒接种过动物的方法, 包括用疫苗接种对病毒敏感的动物, 接种的疫苗包含至少编码野生型原始病毒的一种抗原基因有缺失的所说病毒, 然后, 在血清学上区别这些免疫的动物和用致病性病毒感染过的动物, 而不必杀死动物。

11. 按照权利要求10的一种方法, 其中的病毒是疱疹病毒。

12. 按照权利要求10的一种方法, 其中的病毒是从由假狂犬病病毒, 马立克氏病病毒及传染性牛鼻气管炎病毒组成的病毒类群中

选育出来的。

13. 按照权利要求10的一种方法, 其中的病毒是假狂犬病病毒。

14. 按照权利要求10的一种方法, 其中抗原是一种糖蛋白。

15. 按照权利要求10的一种方法, 其中的抗原是一种分泌性的糖蛋白。

16. 按照权利要求10的一种方法, 其中的病毒是假狂犬病病毒以及糖蛋白是糖蛋白X。

17. 一种生产多价疫苗的方法, 包括功能适当残缺的病毒, 插入在编码抗原的基因内, 一个编码能提高免疫反应的异原多肽的DNA序列。

18. 按照权利要求17的方法, 其中的病毒是一种疱疹病毒以及抗原是一种分泌性的糖蛋白。

19. 按照权利要求17的方法, 其中的病毒是从由假狂犬病病毒, 马立克氏病病毒以及传染性牛鼻气管炎病毒组成自病毒类群中选育出的。

20. 按照权利要求18的方法, 其中的疱疹病毒是假狂犬病病毒, 以及其中的分泌糖性蛋白系糖蛋白X。

21. 按照权利要求20的方法。其中能提高免疫反应的多肽是从一组包括可传染胃肠炎病毒或猪微小病毒的多肽中选到的。

病 毒 疫 苗

本发明是与血清学上可鉴定的病毒疫苗有关。本发明的疫苗可用以鉴别被有毒的野生型病毒感染的动物和用血清学上与疫苗病毒不同的病毒接种过的动物。

假狂犬病病毒(P R V)是一种能感染全球的多种动物的病毒。P R V感染被不同地称为传染性延髓麻痹, 假狂犬病以及狂痒病(mad itch)。已经知道它是在重要的家畜中传染, 如猪, 牛, 狗, 猫, 羊, 大鼠及水貂。宿主范围很广, 包括大多数哺乳类动物以及至少在实验上还包括多种鸟类。(宿主详见D.P.Gustafson, "Pseudorabies", in Diseases of Swine, 5th ed., A.D.Leman et al., eds., (1981))。此病对大多数被感染动物是致命的。但成年猪, 可能还有大鼠感染此病但并不死亡, 因此是此病的带毒者。

猪群对P R V特别敏感。尽管成年猪感染此病后极少出现症状或死亡, 但当小猪感染时则急性发病。结果常于24-48小时内死亡, 且常无特异的临床病症。(T.C.Jones and R.D.Hunt, Veterinary Pathology, 5th ed., Lea & Febiger (1983))。

已用种种技术生产P R V疫苗并在欧洲流行地区接种已进行15年以上。接种后可使损失减少, 但接种使在环境中仍保留病毒。尚未生产出预防感染的疫苗。把接过种的动物暴露于有毒性的病毒中可免

于感染，然后散发更多的有毒性的病毒。由此接过种的动物可以怀有一个潜伏感染，它能再次突然发作（D.P.Gustafson, 上述）。

PRV的减毒活疫苗或失活疫苗在美国已有市售，已被USDA批准，（见C.E.Aronson, ed., *Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals*, (1983)）。

由于成年猪是PRV的带毒者，许多国家已建立测试感染动物的筛选方案。问题在于如何区别携带有毒性病毒的动物和接种过的动物。毒性病毒与疫苗中所用的病毒在抗原外形上是相同的，故不可能在感染动物与接种过的动物间加以区别。因此，对于血清学阳性的猪的处理的一些规定，将也适用于接种过的和以前感染PRV的猪两者（C.E.Aronson, 上述）。

PRV是一种疱疹病毒，通常疱疹病毒是属于动物病毒中最复杂的。其基因组至少编码50种病毒特异性蛋白质，并含有150,000个以上的核苷酸。

糖蛋白是疱疹病毒中免疫活性最强的蛋白质，其中在病毒粒膜以及被感染的细胞膜中发现。论述PRV糖蛋白的文献涉及至少四种病毒糖蛋白（T.Ben-porat and A.S.Kaplan, *Virology*, 41, pp. 265-73 (1970); A.S.Kaplan and T.Ben--Porat, *Proc. Natl.Acad. Sci.USA*, 66, pp.799-806 (1970)）。

报导有几种疱疹病毒分泌糖蛋白，进入被感染的细胞的培养基里。单纯疱疹病毒（HSV）释放糖蛋白C和糖蛋白D的几种截断形式至培养基。（B.Norrild and B.F.Vestergaard, *Intervi-
rology*, 11, pp.104-10(1979); R.E.Randall,

et al., J. Gen. Virol., 48, pp. 297-310(1980)). Marek 病病毒释放相当量的病毒粒子的糖蛋白 A 至培养基 (D. Van Zaane, et al., 病毒学, 121, 116-32 页 (1982)); saimiri 疱疹病毒也释放一种病毒粒子糖蛋白至培养基 (R.E. Randall and R.W. Honess, J. Gen. Virol., 51, pp. 445-49(1980))。有报导 PRV 释放出进入介质的一种糖蛋白并不与病毒颗粒结合 (T. Ben-porat and A.S. Kaplan, Virology, 41, pp. 265-73 (1970)); T.J. Rea, et al., J. Virol., 54, pp. 21-29 (1985))。

分泌至介质的 PRV 蛋白已被称为 3a (T. Ben-Porat and A.S. Kaplan, 上述), 也被称为糖蛋白 X (gx) (T.J. Rea, et al., 上述), 由 PRV 感染的细胞中分离到的 gx, 具有以下特征:

- (1) 它在 PRV 感染动物细胞培养的培养基中是主要蛋白质。
- (2) 它是一种糖蛋白。
- (3) 其分子量在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上约为 95 Kd。
- (4) 它是一种硫酸化的蛋白质。
- (5) 它溶于约 1% 过氯酸, 以及
- (6) 它在标准的实验小鼠上是致免疫的。

本发明克服前述有关的问题, 例如在筛选 PRV 感染猪时, 通过提供一种免疫学不同于野生型病毒的 PRV 毒株, 以区别被接种与受感染的动物, 而不必杀死受试的动物。

这些抗原与疫苗病毒的不同是由于缺失一个或更多的可测定的抗

原性多肽的结果。这些遗传改变的结果，使有可能在血清形象的基础上从免疫学上区别感染与接种过的动物，而不需杀死受试动物。

(M.W.Wathen and L.K.Watnen, J.Virol., 51, pp. 57-62 (1984) 提到一种 PRV, 含有突变病毒糖蛋白 (gp 50) 以及应用中针对 GP 50 单克隆抗体的选择突变体的方法。Wathen and Wathen 并未叙述使用这种病毒做为疫苗。此外, 被该病毒免疫的动物与受感染的动物在血清学上是难以区别的。

T.C.Holland, 等, J.Virol., 45, pp.672-82 (1983) 提到用特异性糖蛋白单克隆抗体选出的 HSV 的抗原变种。两种不能表达 HSV 糖蛋白 g_c 的变种是包括在选出的变种中。Holland 等也未讲到或建议这些变种用作疫苗。

欧洲专利公开号 0 1 3 3 2 0 0 述及, 一种诊断性抗原因子与某种外源凝集素结合的 PRV 糖蛋白亚单位疫苗一起, 用于区别 PRV 的带毒者与非带毒者。

欧洲专利公开号 0 0 7 4 8 0 8 提及, 在通过采用包括疱疹性病毒胸苷激酶基因的可选择的 DNA 序列, 特异性的 DNA 序列的插入、缺失或取代, 可以稳定地在真核生物细胞或病毒基因组中稳定地产生。PRV 位于所列举容易操作的基因组中。其它有关的出版物也提出类似方法 [L.E.Post and B.Roizman, “在大基因组中删除特异基因的通用技术: 1 型单纯疱疹病毒的 α -基因 2 2 对生长是不必需的”, Cell, 25, 227-232 (1981)], 这些文件中提出的方法被用于生产本发明的 PRV, 见下述。

A.J.M.Berns 和 A.L.J.Gielkens, 欧洲专利公开号 0 1 4 1 4 5 8 报导, PRV 的缺失突变体, 此项缺失不是在编码分

泌的糖蛋白的基因里。此外，Berns 既未建议也未描述这类突变体用于在血清学上区别疫苗及野生型病毒。

A. L. J. Gielkere 等, “假狂犬病病毒的野外分离株及疫苗株的基因组差异”。*J. Gen. Virol.*, 66, pp. 69-82 (1985) 报导, 通过 BamHI 酶切图谱比较 PRV 的修改活病毒疫苗株与不同的野外分离株的基因组, 他们观察到两种变种, (1) PRV 基因组的 TR_S 及 IR_S 区衍生的片断中加入和/或缺失核苷酸序列, (2) 在基因组的 UL 区内失去或获得 BamHI 酶切位点。他们推测用限制性核酸内切酶分析病毒 DNA, 可能提供区别 PRV 野外株的方法。

我们如同 Mettenleiter 等在 *J. Virol.*, 56, pp. 307-11 (1985) 已报导的那样, 确定了一种目前市售的 PRV 疫苗, 含有缺失糖蛋白 I 密码的基因。我们也指出另一种市售毒株 (Bartha) 缺少 gp63。这些疫苗在下述本发明的某些实施例中也许是有用的。

B. Lomniezi, 等, “假狂犬病病毒疫苗株的基因组缺失以及基因组的四种异构体的存在”。*J. Virol.*, 49 pp. 970-79 (1984) 中 报导了两种来自 Bartha 及 Norden 的市售的 PRV 疫苗株的特性, 显示它们在独特的 PRV 基因组短序列中 0.855-0.882 图单位之间是缺失的。这一区域位于 PRV 的 BamHI 7 的片段中。这些论文任何地方都没有叙述或提到有缺乏分泌糖蛋白的 PRV, 一种含有这类突变体的疫苗或提出利用这种 PRV 突变体区别接种疫苗的动物和感染动物的方法。

美国专利 4,574,497 提到 PRV tk⁻ 缺失, 但未提出有缺失的 PRV 能在血清学上区别野生型病毒感染的动物和接种疫苗

的那些动物。

本发明中表达“功能适当缺损的病毒”及该表达的变种以及“无毒体”都系指灭活的以及减毒的病毒而言。

本发明中“分泌糖蛋白”系指培养被感染细胞培养基中积累的糖蛋白。

本发明与疫苗有关，该疫苗包含一个至少缺失野生型病毒的可检查出的抗原的功能缺损的病毒，它可供在血清学上区别接种疫苗的动物与被感染的动物。

更具体地说，本发明与一种假狂犬病病毒有关，该病毒缺少一种野生型病毒 P R V 的血清学上可检查出的多肽。

更精确地说，本发明是与一种缺少野生型病毒 P R V 分泌的糖蛋白的假狂犬病病毒有关。

更精确地说，本发明是与一种缺少糖蛋白 X 的假狂犬病病毒有关。

本发明还提供区别接种疫苗的动物和被感染的动物的方法，以及提供一种包含上述病毒及疫苗在内的多价疫苗。

本发明是关于一种疫苗，它能从血清学上鉴别接种的和被感染的动物，而不需杀死受试动物。该疫苗包含的一种病毒是缺少抗原性多肽的，具体地说是缺失分泌性多肽的，更具体地说是缺失分泌性糖蛋白的。

我们通过重组 D N A 技术生产这种 P R V。从一种易得的含有希望缺失的 g_x 基因的质粒 (p_{PRXh1} , 亦称 p_{UC1129}) 以及另一种公开能得的质粒 ($p_{ACYC184}$) 起始，我们组建一个带有亚克隆操作方便的 g_x 基因的质粒 (p_{PRXK4})。然后，从 p_{PRXK4} 除去 g_x 启动子，并将它克隆到另一个公开可得到的质粒 p_{UC9} ，以组建质粒 p_{PGX1} 。随后，我们从质粒 p_{RB103}

除去 HSV 胸苷激酶 (tk) 基因, 并将其插入 p P G X 1 每一个位点上使与 gx 启动子融合, 以产生质粒 p G X T K 2。然后, 我们从 p P R X h 1 除去含有 gx 基因 C-端编码区的 PRV 的 BamH I 7 片段, 并将它插入于 p G X T K 2 的 tk 基因下游, 生成一种质粒 (p G X T K 3), 在其中 HSV tk 基因的侧翼具有 PRV gx 启动子及 gx 基因的 C-端编码区。然后, 我们用 tk⁻ gx⁺ PRV 和 p G X T K 3 (tk⁺ gx⁻) 通过 L. E. Port 及 B. Roizman 的方法 (下文) 共-转染兔皮细胞, 以产生- tk⁺ gx⁻ PRV 最后, 将 tk⁺ gx⁻ PRV 转变为 tk⁻ gx⁻ PRV 使之减毒用做疫苗。我们还证实了这种 tk⁻ gx⁻ PRV 作为抗假狂犬病疫苗的效能。

图 A - K 表示的是本发明的质粒构建的插图, 为说明质粒及 DNA 片段采用如下的某些常规表示方法:

- (1) 单线表示环形及线形双链 DNA
- (2) 星号 (*) 表示该分子为环形, 无星号者表示为线性分子。
- (3) 限制性核酸内切酶位点在线上表明。
- (4) 基因在线下方表示。
- (5) 基因与限制性酶切位点间的距离未标尺度, 图上只表明其相对位置。

质粒构建所用的方法是标准的 重组 DNA 方法, 为对这方面技术熟练者所熟知。

这些方法在 T. Maniatis 等, 分子克隆, [Cold Spring Harbor Laboratory (1982)] 以及 B. Perbal 分子克隆实用指南, [John Wiley & Sons (1984)], 都有叙述, 此二书在此已被编入作为参考资料。

此处用到的许多特殊方法在 L. E. Post 和 B. Roizman 的, “大基因组缺失特异基因的通法: 单纯疱疹 1 型 HSV 的 α 基因 2 2 不是生长所必需的”, [Cell, 25, pp 227-32 (1981)] 文中有叙述, 此书在此处也被编入作为参考。特别是可在那里找到共转染和筛选的方法。

例 1

1. pPRXK₄ 的构建

现在参照图 A, 我们叙述亚克隆完整 *g_x* 基因的质粒的构建。

质粒 pPRXh1 [也称 pUC1129, 来自 Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, 其保存号码 B-15772)] 含有由 PRV 来的 *g_x* 基因及 *g_x* 启动子, 用限制性核酸内切酶 *Xho*I 及 *Kpn*I 酶解。以产生的四个片段中, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离得到。片段 1 用 T4DNA 多聚酶将末端变成齐头, 并加入 *ECORI* 连接子。

运载体 PACYC184

(ava-

lable as deposit No. 37033 from the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852)

用 *ECORI* 酶解, 并再用细菌碱性磷酸酯酶 (BAP) 处理, 生成片段 2, *ECORI* 切断 C_m^r 基因。

然后连接片段 1 和 2, 生成质粒 pPRXK₄, 此质粒含有完整的 *g_x* 基因, 包括可能的 *g_x* 启动子 (见 Rea 等, 上文)。

2. pPGX1 的构建

现在参照图 B, 我们叙述 *g_x* 启动子的亚克隆。

被限制性核酸内切酶 MstI (T G C G C A) 识别的核苷酸顺序位于推测的编码 β x mRVA 的 5' 端未翻译区的 DNA 顺序中 (Rea 等, 上述)。用 MstI 酶解 pP R X K₄, 分离出第二大片段 (片段 3, 约 2.1 Kb), 片段 3 再用 EcoRI 酶切, 分离出较小片段 (片段 4, 约 400 bp)。质粒 P U C 9 (可从 Pharmacia P / L, Inc, Piscataway, NJ, USA 得到) 用 EcoRI 及 SmaI 酶解, 分离到较大片段 (片段 5, 约 2.6 kb)。然后将片段 4 及 5 于 EcoRI 位点上连接, 再行 MstI / SmaI 融合, 生成 pP G X I, 此质粒含有在紧接其下游带有 BamHI 酶切位点的 β x 启动子。

3. P G X T R 2 的构建

现在参阅图 C, 我们描述一种质粒的构建, 在其中 β x 启动子与 HSV tk 基因融合。

上述的 pP G X 1 用 BamHI 酶解, BAP 处理, 生成片段。质粒 pP B 1 0 3 含有从 HSV-1 株 F 来的 BamHI Q 片段 (L. E. Post, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4201-05 (1980))。(或用质粒 P H S V 1 0 6, 市售品来自 Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA, 也含有 BamHI Q 片段, 并能应用在这个构建中), pR B 1 0 3 用 BamHI 加上 Bgl II 酶解, 分离出第二大片段 (片段 7, 约 2.9 kb), 此片段含有无 tk 启动子的 HSV tk 基因。将酶解的 pP G X 1 (片段 6) 与含有 tk 基因的片段 (片段 7) 于 BamHI 位点连接, 并用 Bgl II / BamHI 融合, 得到两种含有 tk 片段方向相反的质粒。通过 BamHI 加 EcoRI 酶解式样的检查, 筛选到带有紧接 β x 启动子下游的 TK 基因的

质粒，并称为 pG X T K 2。

4. pG X T K 3 的构建

现在参照图 D，我们描述一种包含 H S V tk 基因和位于侧面的 P R V 序列的质粒。

pP R X h 1 (见 1, 上述) 用 Bam H I 酶解，分离出片段 8 (约 6.9 kb)，〔此片段于文献中称 Bam H I 7 (见 Rea 等, 上述)〕。

pG X T K 2 经 Bam H I 酶解，B A P 处理，产生片段 9，片段 8 连接到 pG X T K 2 (片段 9) 的 Bam H I 位点上，最后生成的质粒含有与启动子 g x 方向相同的片断 8 称为 pG X T K 3，此质粒具有紧接在 g x 启动子下游的 tk 基因 以替代编码 g x 的 N-端氨基酸的 D N A。

5. 共转染 (Co-transfection)

现在参照图 E，pG X T K 3 用 Cla I 切断，这样生成的 D N A 片段，含有 g x (实际为 g x⁻) C-端区，以及与 g x 启动子融合 的整个 H S V tk 基因，连同来自 P R V 的 tk⁻ g x⁺ 突变体的 D N A 共转染兔皮细胞，而 P R V 的 tk⁻ g x⁺ 突变体 (称为 P R V H R) 是按 T b t a r o v, Z e n t r a l b l a t t V e t e r i n a r m e d i z i n, 15, p p . 8 4 7 - 5 3 (1 9 6 8) 的方法通过生长在 碘苷存在下而选育到的。

此 tk⁺ g x⁻ 病毒重组体 (经适当减活后，可用做疫苗) 系在 tk⁻ 人 1 4 3 细胞在 H A T 培养基 (L. E. Post 和 B. Roizman, 上述) 中筛选到的，(J. P. Weir, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, p p . 1 2 1 0 - 1 4 (1 9 8 2) ; Panicali and Paoletti, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 79, pp. 4927-31 (1982); Campione-Piccardo, et al., J. Virol., 31, pp. 281-87 (1982); K. L. Poffenberger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci.-USA, 80, pp. 2690-94 (1983); M. F. Stinski, et al., J. Virol., 55, pp. 431-41 (1985)] 我们称由此生长的病毒为 PRV $\Delta g x 1$ 或 DT-A。DT-A 系 tk⁺, 并完全有杀死小鼠的能力。

在 HAT 中选择生长的病毒 (例如 DT-A) 用 ³⁵S-蛋氨酸或 ¹⁴C-葡萄糖胺标记的病毒蛋白, 接着用抗 *g x* 血清进行免疫沉淀以分析其 *g x* 的合成。未测出 *g x*。

tk⁺ *g x*⁻ 病毒感染的细胞的蛋白质, 以抗 *g x* 血清 Western 印渍法进行分析, 在突变病毒感染的细胞中未测出 *g x*。

除去整个 *g x* 基因也是可能的, 例如, 片段 8 用 *Nar I* 酶解, 可生成一种 *g x* 基因完全缺失的片段 (见图 D), 然后用此片段可替代片段 8, 以产生一种 *g x* 基因完全缺失的 *g x*⁻ PRV。

已有相当时间知道 tk⁻ PRV 是无毒的, 可制成优良疫苗, 故用 Tatarov 方法诱变和筛选 tk⁻ PRV, 使 DT-A 功能适当缺损制作用为疫苗的 tk⁻ 病毒 (例如见 G. Tatarov “假狂犬病毒在 5-碘昔 (IU DR) 诱导下的非病原突变体”, Zentralblatt Veterinarmedizin, 15, pp. 847-53 (1968); G. Tatarov 等 “MK 株假狂犬病毒无害性及免疫原理的研究”。Vet. Nauhi. 6, pp. 49-54 (1969); G. Tatarov “活疫苗 MK-25 用于抗假狂犬病的结果”。Vat. Sbirka, 7, pp. 10-12 (1974), G. Tatarov “保加利亚 MK-25 疫苗 抗假狂犬病”, Cah. Med.

Vet, 43, pp. 347-52 (1974); G. Tatarov 等
“在5-溴脱氧尿苷的影响下, 假狂犬病毒的无毒突变体的发育。
Veterinary Science, 18, pp. 3-12 (1981);
V. Khristova 等“假狂犬病毒的毒力株及疫苗株的胸苷激酶
活性”。Vetrinary Science, 22, pp. 15-22
(1985); 或用类似技术(W. C. Topp, Virology,
113, pp. 408-11 (1981); S. Kit 等; Exp.
Cell Res., 31, pp. 297-312 (1963); S.
Kit 等; Virology, 130, pp. 381-89 (1983))。

含有HSV tk基因的PRV $\Delta g x 1$ 也可通过重组法, 用 tk^+
 gx^- PRV及一种带有 gx 缺损的质粒共转染兔皮细胞, 除去HSV
tk基因, 并用ara T按照L.E. Post及B. Roizman的方法,
(上述)选择 tk^- 重组基因, 而转变成 tk^- PRV, 方法如下:

现在参照图F, 质粒 $pPGX1$ 经BamHI酶解并用BAP处理,
如图C, 步骤(a)所述, 产出包含 gx 启动子的片段6。如同前述
和在图D, 步骤(a), 质粒 $pPRXh1$ 经BamHI酶解, 产生包
含 gx 的C-端编码区的片段8, 此片段也称做PRV BamHI片
段7, 然后把片段6和8连接一起, 对大肠杆菌进行转化, 再用
EcoRI和PvuII酶解, 筛选出附合方位要求的BamHI片段7。
通过酶解产生2.0 kb片段表明方位适宜, 这样产生的质粒称做
 $P\Delta GXB7$ 。

质粒 $P\Delta GXB7$ 与PRV $\Delta g x 1$ 病毒的DNA用磷酸钙转染
技术(Mocarski等, Cell, 22, 243 (1980))对兔细
胞按上面Mocarski等所描述, 把转染所得到的病毒, 铺盖在有100

$\mu\text{g/ml}$ araT 存在下的 Vero 细胞上。挑出个别的空斑，并按上面 Mocarski 等所述的方法用限制性内切酶酶解 DNA 以分析所要的 tk⁻ 重组病毒。此病毒称作 PRV Δ GX TK⁻ 或 DT-B (图 G)，如下面例 2 所述这些 tk⁻ PRV 可以做疫苗有用的减毒病毒。

为应用这些病毒以区别被感染动物与接种的动物，可采用，例如 ELISA 测定法。通常，例如通过 DNA 重组技术 (Rea 等上述) 把大肠杆菌中所产生的 g_x 蛋白质，加到合适的塑料板的孔中，允许足够的时间吸附在塑料上 (过夜，20-25°C)，将塑料板洗涤后，加入阻断剂 (例如 BSA)，以中和在塑料板表面上任何未反应位点，接着洗涤，再将猪血清加至孔中，于 20-25°C 温孵约 1 小时后，洗孔，每孔中加入蛋白质 A-辣根过氧化酶结合物，并于 20-25°C 温孵 1 小时。再洗涤，向孔内加酶的底物 (邻苯二胺)，用酸终止反应，于 492 毫微米波长处测吸光度，以测定血清中 g_x 的含量。若无 g_x 抗体，说明该动物未被感染。测试其它抗原，则能决定该动物是否接种过疫苗。

虽然 PRV Δ GX TK⁻ 是一种有效的疫苗，但在碘苷中生长选得的 PRV tk⁻ 突变则是一种点突变。假设它是一种点突变，则可以回复到 tk⁺，而可能成为毒力株，因此一种具有缺失的 tk⁻ PRV 是更好的。美国专利 4,514,497 述及在那里应用的标记挽救方法以制作 tk⁻ PRV，首次在单纯疱疹病毒中应用以制作 tk⁻ 的缺失 [(J.R. Smiley, Nature, 285: 333-35 (1980) 和 L.E. Post 等, Cell, 24: 555-65 (1981)]。

现在参照图 H，PRV tk⁻ 基因已绘于 PRV 的 BamHI 111 片段处 (T. Benportt 等, Virology, 127: 194-204

(1980))。BamHI 11 片段系由 PRV Rice 株经 BamHI 酶解的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳而分离到的，并把它克隆到 PBR 322 上以产生质粒 PTK11。PTK11 在 tk 基因内有一个单 XhoI 酶切位点，PTK11 用 XhoI 切断，并用核酸外切酶 Bal 31 不同时间酶解，用连接酶再使环化，并对大肠杆菌 DH1 进行转化 (Maniatis 如上述 p. 505) 这就产生带有 tk 基因缺失不同的一组质粒。

选用其中两个质粒，以 CsCl 密度梯度离心提纯并以 Maxam 及 Gilbert 的方法，(酶学的方法, 65 (部分 I), pp. 497-559 (1980)) 测定顺序。质粒 P Δ tk-3 在 tk 基因中缺失 329 碱基对，质粒 P Δ tk-4 缺失 275 碱基对。

在 tk 缺失可被杂交到 g_x⁻ 病毒以前，首先必需制作病毒 tk⁺，这样 tk⁻ 缺失重组体才能被选择出来。PRV Δ GXtk⁻ DNA 与质粒 pTK11 共转染到兔皮细胞。分离出所产生的重组病毒，并使在培养基 HAT 及 143 细胞中生长，所选出的 tk⁺ 病毒，我们称之为 PRV Δ GXtk⁺ PRV，然后把此病毒的 DNA 与 P Δ tk-4 DNA 共转染到兔皮细胞。产生的病毒在 ara T 存在下，放在 Vero 细胞上，以选育 tk⁻ 重组体。通过用 DNA 制备及限制性内切酶分析法，从得到的病毒中筛选合适的重组体。这些重组体已经掺入 tk 缺失。其中一个病毒我们称之为 PRV Δ gX Δ tk 或 DT-C。它包含有期望的 tk 缺失及一种 g_x 缺失。我们测定 DT-C 对小鼠 LD₅₀ 大于 10⁷ 空斑单位，相比之下，PRV Δ gXPRVtk⁺ 的 LD₅₀ 为 3 空斑单位。

虽然这里叙述的特别的实施方案和重组 DNA 技术的应用，但对

熟悉此技术者很清楚，采用其它技术以及应用其它病毒，例如 Marek 氏病病毒及传染性牛鼻气管炎病毒也能生产类似的含有分泌性糖蛋白缺损的疫苗。

虽然这里公开的主要是 PRV，但这里应用的技术，可用于产生血清上独特的疱疹病毒，在任何情况下象 PRV 那样，有利于区别接种疫苗的动物和被感染的动物。包括例如 马立克氏病病毒及传染性牛鼻气管炎病毒。

当我们将 HSV tk 基因置于 θ X 启动子的控制之下，含 tk DNA 片断能被插入，如此使其受另一个 PRV 启动子或能表达 tk 基因功能的任何一个启动子控制。例如，其它 HSV 启动子，例如，亦能用 HSV ICP 4 启动子，后者能在 PRV-感染的细胞中表达。例如，可将 PRV tk 基因插入到 θ X 基因或不启动子的控制下任何其它 tk 基因中，都能在 PRV-感染的细胞中表达。

在我们用 tk 基因作为插入的标记基因中，任何标记基因也都能被插入 θ X 基因以使之失活，只要该标记基因允许把携带该标记的病毒从不带标记的病毒选出。例如，耐抗生素的抗药性基因可用作抗 G₄₁₈ 或潮霉素的标记基因。

除可选择的标记外，亦可插入其它基因到 θ X 基因中。为构建这类病毒也可以把外源基因插入象 PGXTK3 的质粒中，以外源基因替换 tk 序列。此质粒可与图 E 中所述的来自 tk⁺ θ X⁻ 病毒的 DNA 共转染。以 araT 选择，可得到带有外源基因插入并表达的病毒重组体。这种基因能编码其他类型病毒的抗原，例如，可传播的肠胃炎病毒或猪微小病毒或编码一种细菌，例如大肠杆菌，它能产生对抗其它病毒的免疫原反应。故本发明的施例已生产出一种“多价疫苗”，它

包含有两种或更多的病毒或其它病原体的抗原。

作为上述的一个例子，我们用下法将组织血清蛋白溶酶原激活因子 (t_{pA}) 基因插入 g_x 基因中：

pPSA18 是含有 t_{pA} 完整密码区的质粒，在编码区的 5' 末端翻译区具有一特异的 BamHI 切点，它可按同时未决的美国专利申请 SN 758,517，于七月 26, 1985 提出申请中所述的方法构建。参照图 I，pPSA18 用 BalI 切断，加入 BamHI 连接子以生成片段 11，然后片段 11 用 BamHI 酶解，生成含有 t_{pA} 的整个编码区的 1.95Kb 片段 (片段 12)。然后质粒 pPGX1 (图 B) 用 BamHI 酶切，生成片段 6。片段 12 和 6 连接生成质粒 pGXTPA。采用 EcoRI 进行酶解测定 t_{pA} cDNA 与 g_x 启动子有关的合适方向。当方向正确时则产生 1:1 Kb 片段。

参照图 J，质粒 pGXTPA 用 Hind III 酶解，产生片段 13，PRV DNA 的 BamHI 7 片段按以上所述 (片段 8) 分离得到。加 Hind III 连接子以产生片段 14，把片段 13 及 14 连接在一起，生成 pGXTPA-B7。BamHI 7 片段插入此质粒的合适方向可以用 EcoRI 和 SphI 进行酶解来测定。当方向正确时则生成 5.8Kb 片段。

把质粒 pGXTPA-B7 与来自 PRV Δ GX1 的病毒 DNA 共转染入兔皮细胞。在 araT 存在下，生成的病毒铺盖在 Vero 细胞上，以选育 tk⁻ 重组体我们称照此选得的一个病毒为 PRV-GXTPA。当此病毒感染细胞时，通过用以 T_{pA} 抗血清的免疫沉淀法检查细胞产生并分泌 t_{pA} ，以纤维蛋白溶解法测定在 20 毫微克/毫升 t_{pA} 活性 (Unkeless, et al., J. Exp. Med., 137, pp. 85-111 (1973); Luscutoff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3903-07 (1977))。

例2

在本例中我们叙述用胸苷激酶缺损及糖蛋白X缺失的PRV炎变体 ($tk^+g^-x^-$) 为疫苗接种以保护小鼠及猪由PRV所引起的死亡。

1. 动物

雌性CF-1小鼠, 5-6周龄, 来自Charles River公司。

18只交叉繁殖的猪, 5-6周龄的雌和雄性, 来自J. Gilmore企业公司。随机将猪分别置于三个房间内, 每间六头猪。

猪和小鼠喂予无药食料和水任意摄取。

2. 病毒及细胞

PRV缺失炎变体DT-A ($HSV\ tk^+g^-x^-$) 及DT-B (tk^-gx^+) 均来自上述的亲代PRV (HR株; tk^-gx^+)。DT-B不能合成胸苷激酶, 所以也不能合成 g_x 。由于缺失 g_x 基团, 全部保护研究中均用致病的PRV (Rice株) 作为攻击病毒。病毒在vero细胞或猪肾-15 (PK-15) 细胞中繁殖。

3. 微量中和分析法

微量中和分析系按T. C. Hollard等叙述的方法进行的。(J. Vriol, 45, pp 672-82 (1983))。鼠血清与病毒及10%兔补体于37°C温孵3小时, 但猪血清则与病毒在无补体存在下, 于37°C温孵1小时。中和滴度以保护50%以上的细胞不发生致病效应的血清最大稀释度的倒数表示。

4. 酶连免疫吸附分析法 (ELISA)

用Voller氏缓冲液 (50毫摩尔 $NaHCO_3$, 0.03% NaN_3 , 用NaOH调pH到9.6) 稀释 g_x 融合蛋白 (p60-11, 如美共同未决专利申请号SN 853 087, 1986年4月17日提交

的专利申请中所述的方法生产)到20微克/毫升以制备抗原稀释液。此溶液通过0.45微米无菌过滤器(Sartorius SM 165 55K),过沪,如需要,过滤液可在使用前再用Voller氏缓冲液稀释。

将100微升蛋白p60-11的缓冲液(浓度约2微克/毫升)加至96孔培养板的每个孔中(Costar 3590, EIA)。于室温下温孵过夜时发生吸附,每孔约用300微升Dulbecco氏PBS(8克/升NaCl, 0.2克/升KCl, 0.2克/升 KH_2PO_4 , 和1.14克/升 Na_2HPO_4 ; 最终PH 7.3-7.4)洗三次。于塑料表面未反应部位在与3%BSA的在Dulbecco氏PBS中(每孔200微升)于37°温孵2小时期间得以中和。每孔用300微升Dulbecco氏PBS液洗一次。然后,吸附的抗原与在100微升的稀释血清中的抗体反应(由暴露于PRV的猪中得到的)在4°C温孵过夜。未反应的抗体用Dulbecco氏PBS(300毫升/每孔)洗三次而除去的。然后每孔加入100μl蛋白A-辣根过氧化酶结合体(对小鼠血清稀 1/800,对猪血清稀释, 1/15.00; 稀释在50毫克分子Tris, 0.05%吐温20, 1%BSA, 0.02% NaN_3 , pH8.0的液中)于37°温孵2小时,孔再用Dulbecco氏PBS液洗3次(300毫升/每孔),每孔加入100微升底物溶液,此溶液由10毫克邻苯二胺(事先溶于0.5毫升甲醇)和25微升30%(w/v) H_2O_2 加至49.5毫升缓冲液(17毫克分子柠檬酸, 65毫克分子磷酸盐及0.01%硫柳汞用NaOH调节pH至6.3)配制。酶反应于室温持续十分钟,然后每孔加入100微升4.5克分子 H_2SO_4 ,用Titartek Multiokan仪于492nm波

长处测定生色团的吸光度。

5. 鼻拭子的病毒分离

试验猪的鼻拭子分别置于1毫升加有用3%胎牛血清(FBS)及抗生素补充的Eagles基本培养基(BME; M. A. 生物制品)中。拭子在检查其病毒的存在试验前存贮于 -70° 。进行病毒分离鉴定时,鼻拭子于BME中解冻,弃去拭子,将样品(0.1毫升)接种至单层猪肾-15-细胞(PK-5; ATCC CCL33)中,重复两份,于 37° 温孵1小时,使病毒吸附,于细胞培养物上续加培养基-199(Flow实验室)补充以4% FBS,抗生素,1%琼脂的复盖物。三天后,单层细胞用中性红染色,空斑计数。

6. 用于小鼠研究的实验设计

四株PRV的毒力由测定各病毒株的小鼠的半数致死值(LD_{50})来评定的。四株PRV为:1)野生型(Rice株) 2)DT-A 3)DT-B及4)HR。每一株病毒以不同剂量给予5或6组小鼠(每组10只)。小鼠由脚垫途径给予50微升相应病毒10天。给病毒后14天(第14天)测定其 LD_{50} 值,对接受最高剂量的相应病毒的存活动物组取其血清,用Spearman-Karber法计算各株病毒的 LD_{50} 值。

LD_{50} 毒力试验中存活动物于第14天再由腹腔给予十倍于 LD_{50} (由腹腔途径测定)的PRV Rice株病毒($10 LD_{50}=5.4 \times 10^2$ pfu/小鼠)本实验于给毒株后第14天(第28天)结束。

7. 对猪研究的实验设计

实验猪于第0天肌肉注射2毫升DT-B株(约 1.5×10^7 pfu/猪只),按制造者的建议给2毫升Norden活疫苗(PR-Vac),

或生理盐水，所有的猪均于第20天给以大约 $40 \times LD_{50}$ 毒力的PRV (Rice株) ($40LD_{50} = 1.1 \times 10^5$ pfu/猪只) 研究于第34天结束。

取得血清样品，并于第1, 20及34天分别对每只猪称体重，于第19天至34天期间，每天取鼻拭子。

8. 效价评定的标准

PRV DT-B株 (tk^-gx^-) 作为疫苗，其效价的评定基于对PRV诱发的死亡率的保护作用以及在血清学上区别PRV-DT-B处理的猪以及暴露于野型病毒的猪只的能力。

表1中相应 LD_{50} 测定值来表示四株PRV对小鼠的相对毒力。

DT-B及HR与野生型株及DT-A相比，毒力大为降低，至少低1000倍。

给予各种PRV株病毒后存活的小鼠，于第14天由腹腔用十倍于 LD_{50} (5.4×10^2 pfu/小鼠) 的剂量的毒力的野生型PRV进行攻击。如表2所示，给予 1×10^3 pfu或更高剂量的DT-B的小鼠，以及给予 2.3×10^3 pfu或更高剂量的HR能保护小鼠对有毒力的野生型PRV的攻击。此外，对接受DT-B的小鼠，于攻击前取的血清中和抗体滴度较高 (中和滴度=1024)，但根据ELISA数据与gx抗原决定子反应则意义较小，(ELISA吸光度=0.05)，对接受HR的小鼠，于攻击前取的血清中和抗体滴度 (中和滴度=2048)。但与gx抗原决定子反应是显著的 (ELISA吸光度=0.60)。

为评价PRV DT-B株的保护效能以及诊断意义，给猪肌肉接种DT-B. Norden活疫苗 (PR-Vac) 或生理盐水 (0天)，于

14天从鼻内用野生型Rice株攻击，表3所示的结果表明在引起有意义的中和抗体反应以及对毒力型Rice株的攻击提供保护方面DT-B株与Norden活疫苗(PR-Vac)两者相类似，ELISA用gX融合蛋白所得数据表明用DT-B免疫的猪不产生抗gX抗体，曾暴露于野生型Rice株的恢复期猪血清则产生该抗体。本研究中，由给予Norden活疫苗(PR-Vac)的猪取出的血清与gX抗原决定子的反应无统计学意义($P > 0.05$)。但基于前面的研究，给予Norden活疫苗(PR-Vac)的猪可能产生抗gX抗体。这是因为Norden株具有编码gX的基因，因此由接种Norden活疫苗(PR-Vac)的猪取出的血清对gX抗原决定子的反应性可以变动。

用DT-B及Norden活疫苗处理的猪于攻击后，偶而散发病毒，而生理盐水处理的猪，大多数都不断地散发病毒，直至死亡。在用DT-B处理的一个猪以及一个用Norden活疫苗(PR-Vac)处理的猪的鼻排泄物中未检出病毒，这些结果表示免疫的猪不像未免疫的猪那样快地散发病毒。

用DT-B处理的猪在第20天时(攻击前)的体重平均值与用生理盐水处理的猪的体重平均值无明显差别($P > 0.05$)，这表明用DT-B免疫对猪的生长无不利影响。

这些结果表明DT-B对毒力型PRV攻击的猪有保护作用，并可在血清学上对免疫的猪以及曾暴露于毒力型PRV的恢复期猪加以鉴别。DT-B并不降低处理猪的生长。此外，对小鼠的毒力学研究表明在猪以外的动物中，DT-B较tk⁺PRV株毒力低。

表 1
小鼠 LD50

病毒株	基因特征	LD 50
Rice 株	PRVtk ⁺ gX ⁺	40 pfu/小鼠
DT-A	HSVtk ⁺ gX ⁻	34 pfu/小鼠
DT-B	tk ⁻ gX ⁻	9.4×10^4 pfu/小鼠
HR	tk ⁻ gX ⁺	$> 2.3 \times 10^6$ pfu/小鼠

表 2

用减弱的 PRV 株接种小鼠的保护作用

病毒株	基因特征	剂 量 (pfu/小鼠)	攻击后的 死亡率	中和 滴度	ELISA 吸光度 ^b
DT-B	tk ⁻ gX ⁻	1.0×10^5	0/6	1024	0.05
		1.0×10^4	0/10		
		1.0×10^3	0/10		
		1.0×10^2	4/10		
		1.0×10^1	7/10		
		1.0×10^0	9/10		
HR	tk ⁻ gX ⁺	2.3×10^6	0/10	2048	0.60
		2.3×10^5	0/10		
		2.3×10^4	0/10		
		2.3×10^3	0/10		
		2.3×10^2	2/10		
对照		-----	10/10		0.00

a. 中和滴度 = 存活动物 (用 PRV Rice 株攻击前) 的血清保护 50% 以上细胞不受致细胞病变作用的最大稀释度的倒数

b. 用血清 1/10 稀释度的代表 ELISA 反应的吸光值。血清与中和试验时所用的相同。

表 3

用减毒 PRV DT-B 接种猪的保护作用

制 品	死亡率	几何平均值滴度 ^b	ELISA 吸光度的 算术平均值
DT-B	0/6	91	0.072 ± 0.016 ^e
PR-Vac	0/6	36	0.130 ± 0.061 ^e
Saline	6/6	<4 ^c	0.093 ± 0.024
Rice ^a	-----	-----	0.942 ± 0.228 ^f

a. 前一实验中, 对五只存活的暴露于 Rice 株的恢复期猪取血。他们包括在这里以提供在 ELISA 中作对照用的 gx 反应性血清。

b. 几何平均滴度系对各组六只中每只动物于被攻击前所得的中和滴度的几何平均值。中和滴度则是保护 50% 以上细胞不受致细胞病变作用的最大稀释度的倒数值。

c. 没有可检出的抗体。

d. ELISA 吸光度的算术平均值系对各组六只动物的每只在被攻击前所取血清的 ELISA 吸光度。(血清稀释至 1/40) 的算术平均值, 最后的数值除外(见上面的注 a)。

e. 与生理盐水处理猪无显著差别 ($P > 0.05$; 双尾 T 试验)。

f. 与生理盐水处理猪有显著差别 ($P < 0.05$ 双尾 T 测定)

例 3 .

按照前面例 2 所述大致相同的方法，我们还对 PRV 的 DT-C 进行了类似实验，DT-C 缺失 PRV tk 基因，因而是本发明的更好的实例。这些实验的结果述于表 4 - 8，表 4 及 8 表明 DT-C 在猪，羊，及小牛中毒力降低，表 5 及 6 表明 DT-C 的保护能力。表 7 表明 DT-C 对猪的剂量滴定。

表 4
小鼠 LD50

病毒株	基因特征	LD50
Rice 株	PRVtk+gX+	9 pfu/小鼠
DT-C	tk ⁻ gX ⁻	> 1.0 × 10 ⁷ pfu/小鼠
HR	tk ⁻ gX ⁺	> 1.5 × 10 ⁷ pfu/小鼠

表 5

用减毒的 PRV 株免疫对小鼠的保护作用

病毒株	基因特征	剂 量 (pfu/小鼠)	攻击后的 中和		ELSA 吸光度 ^b
			死亡率	滴度 ^a	
DT-C	tk ⁻ gX ⁻	1.0 × 10 ⁷	0/8	5120	0.051
		1.0 × 10 ⁶	0/8		
		1.0 × 10 ⁵	0/8		
		1.0 × 10 ⁴	0/8		
		1.0 × 10 ³	0/8		
		1.0 × 10 ²	2/7		
		1.0 × 10 ¹	7/8		

表5 (续)

病毒株	基因特征	剂量 (pfu/小鼠)	攻击后的 死亡率	中和 滴度 ^a	ELISA 吸光度 ^b
HR	tk ⁻ gX ⁺	1.5 × 10 ⁷	0/6	2560	0.974
		1.5 × 10 ⁶	0/7		
		1.5 × 10 ⁵	0/8		
		1.5 × 10 ⁴	0/8		
		1.5 × 10 ³	0/8		
		1.5 × 10 ²	3/8		
		1.5 × 10 ¹	5/8		
对照		---	7/8	<20	0.000

表 6

用减毒的 PRV DT-C 免疫对猪的保护作用

制品 ^a	死亡率	几何平均滴度 ^b	ELISA 吸光度 ^c 的 算术平均值
DT-C	0/6	26	0.072 ^d 0.388 ^e
PR-Vac	0/6	16	0.105 ^e 0.645 ^e
BME	3/6	<8	0.059 ^d 0.250 ^e

a. 接受 DT-C, PR-Vac 及 BME 的猪于本试验的 0 - 35 天内存活的猪体重分别由 8.1 增至 27.1, 6.5 增至 23.0, 及 6.0 增至 11.4 kg.

b. 在攻击前各组六只猪的每一只所得的中和滴度的几何平均值, 每个中和滴度系保护 50% 以上细胞不受细胞病变作用的血清最高稀释度的倒数。

c. 在攻击前各组六只猪中每只所取的血清，（血清 1 / 40 稀释度）的 ELISA 吸光值的算术平均值。不同注的平均值与第 20 天的 BME 对照值（Eagle 基本培养基）有显著不同（ $P < 0.05$ ），第一数是攻击前的，第二数是攻击后的。

表 7

剂 量 (pfu / 猪)	死亡率 ^a (Rice 免疫后)	几何平均值 滴度 ^b
1×10^7	0/6	23
1×10^6	0/6	25
1×10^5	0/6	18
1×10^4	0/6	18
1×10^3	0/6	18
1×10^2	0/6	20
对照	5/6	< 4

a. 于第 0 天时，按所示剂量给猪肌肉注射各制剂 2 毫升，于第 21 天用大约 $80 \times LD_{50}$ (2.2×10^6 pfu / 只猪) PRV Rice 株进行攻击。

b 见表 6 注 b .

表 8

DT-C 对羊和小牛的致病力

动物	接种物 (pfu / 动物)	方法 ^a	死亡数 / 受试数	阳性 鼻拭子 ^b
羊	4×10^7	鼻内	1/3 ^c	0/3

表8(续)

动物	接种物 (pfu/动物)	方法 ^a	死亡数/受试数	阳性 鼻拭子 ^b
小牛	4×10^7	肌肉	0/3	0/3
	4×10^7	鼻内	0/3	0/3
	4×10^7	肌肉	0/3	0/3

a. 鼻内或肌肉途径给予总体积为 2 毫升(每个鼻孔 1 毫升)的病毒悬液, 给药后的动物 21 天内, 观察其假狂犬病症状。

b. 试验结束时每只动物取鼻粘膜拭子, 照上述方法试验 PRV。

c. 14 天时死亡一只羊, 但无假狂犬病症状, 也未散发病毒。此动物的可能死因是球虫病。两实验组的其它羊中, 均诊断出此病。

本发明的另一方面, 为保证 $g_x^- tk^+$ 有毒性 PRV 不是由在理论上可能是本发明 $g_x^- tk^-$ PRV 与野生型 PRV 间的重组的结果, 所以将 $g_x^- tk^-$ PRV 进一步工程化, 按照前述一般方法, 在 PRV gp50 基因的原始座位造成缺失, 将一种 gp50 基因副本插至 tk 基因闭合连锁中或插至 tk 基因之内, 为造成原始 gp50 基因缺失, 可用片段 8 (见图 D) 的 Pvu II/Bam HI 片段照前述的方法进行标志营救试验, 产生的病毒将是 $g_x^- tk^-$ 和具有与 tk 基因序列的残留部分紧密相连或者在残留物内的 gp 基因的副本。由于 gp50 对病毒的活力是必要的, 重组所得的任何 g_x^- 病毒也会是 $gp50^-$, 但是无活力。因此, 不可能用重组法将野外生成有毒性的 g_x^- PRV 使 g_x^- 及 tk^- 缺失分开。

参照图 K, 进一步的细节为上面得到的 P Δ TK-4 用 SPHI 及 BamHI 酶解, 产生含 tk 缺失的片断, 然后分离该片断。PUC19

(可由Pharmaia/PL得到)用Bam HI及SphI酶解,可分离出由此生成的较大的片断。然后连接此两片断生成一个单一SalI位点毗邻于tk缺失的质粒PUCΔTK4-V。然后PUCΔTK4-V用SalI切割,末端用T₄ DNA多聚酶处理变成齐头,生成片断A。

上面得到的片断8(Bam HI7)用NdeI(它在gx和gp50基因之间切割)和StuI(它在gp63基因内切割)酶解,生成一含有gp50基因(片断B,约1.8kb)的NdeI/StuI片断,用T₄ DNA多聚酶把这段末端补齐,然后连接片断A及B,生成质粒PΔTK4gp50-8。

质粒PΔTK4gp50-8用HindIII切断,再与PRV DNA共转染入兔皮细胞。生成的病毒在含有araT的选择培养基中生长以分离出具有图K(C)所示结构的tk⁻重组体。我们称此病毒为PRVΔTKgp50。

然后把PRVΔTKgp50再与上面得到的PGXTK3共转染,并在HAT培养基中143细胞上选择tk⁺病毒,此病毒称为PRVΔTKgp50 tk⁺(HSV),为gx⁻。

然后用含经这些酶酶解BamHI7制得的gp63及gI基因的PvuII/BamHI片断亚克隆化至PBR322的PvuII/BamHI片断上,以产生质粒pPR28-1(见共同未决的U.S.专利申请SN844,113,申请日3月26,1986)。质粒pPR-28-1用PvuII切割加入BamHI连接子,由此生成的片断再用BamHI酶解,将5kb PvuII/BamHI片断转变成一BamHI片断。然后把此BamHI片断克隆到pPGXI(上面所得的)的BamHI位点上。把生成的质粒与PRVΔTKgp50tk⁺(HSV)共转染,生成的病毒在araT上生

长，筛选 tk^- 表型。选得的病毒具有插入在 tk 基因的保留部分上的 $gp50$ 基因以及在其正常座位上缺失的。他们也系 gx^- 。故与产生 tk^-gx^- 病毒的野型病毒进行任何重组将产生缺失 $gp50$ 基因的病毒。因为 $gp50$ 是一必要的基因，这样的病毒是无活力的。

虽然我们的例子与 PRV 有关，但这对熟练这项技术者该是清楚的，这同样的技术在对其他疱疹病毒生产类似的防重组病毒疫苗是有用的。一般地，步骤包括 1) 在邻近授予无毒性突变处插入重要基因，及 2) 使必要的基因从正常座位上丢失，此座位是与缺失的分泌蛋白质基因相连接。更为普遍的是，从正常位置上，移去必要基因，将使减少与野生型病毒重组的可能性，为构成一种缺乏 gx 的 PRV，不是绝对需要插入一个可选择的标记，例如，包含在 gx 编码区有缺失的质粒可在 gx 基因内使缺失碱基对 Bam HI 片断制备出来。然后把此质粒与 PRV DNA 共转染。接着从转染产生的病毒中用核酸杂化法筛选出短少 DNA 缺失小片断的病毒或用抗体筛选法筛选出 gx 缺乏的病毒。(Holland 等, J.Virol., 46, 649-52 页 (1983))。

本发明疫苗中应用的缺失多肽(如 gx^-) 病毒也可由其它方法产生，如诱变接着筛选缺失多肽的病毒(如 gx) 或用其它使产生有缺失的病毒的任何技术，该缺失使疫苗病毒在血清学上能与野生型病毒区别。例如，虽然人们不能选出 gx^-PRV (抗 gx 抗体并不中和 PRV)，但人们可用上述 Holland 等方法选出在本发明的疫苗中有用的缺失 gI 或 $gIII$ 的 PRV (Wathen J.Virol 58, 173-78 (1986))。

虽然通过灭活或缺失 tk 基因 (Tatarov, 上述; Post 及

Roizman 上述) 来减毒是较好的方法。但是本发明中的 g_x^- 病毒可经过普通的化学或物理的灭活过程, 而使病毒无致病性但仍保留其抗原性。这些灭活疫苗可以用适当的佐剂配制, 例如, 明矾, 各种疫苗制备技术的一般叙述见 J. I. Duffy。疫苗制备技术, Noyes Data Corporation(1980) 及 G. W. Warr, “抗原的制备及免疫原理”。J. J. Marchalonis & G. W. Warr 编。工具抗体—免疫化学的应用。21—58页, John Wiley & Sons. (1982)。

毒力型 PRV 可在动物组织培养中传代, 直至病毒无致病性, 即无毒力的。PRV 可在许多种类组织培养系统中增殖, 包括例如鸡胚, 鸭胚, 猪肾, 猪睾丸, 牛胚肾, 猫肾, 犬肾, 及猴肾, 也可在已建立的细胞系如 Madin Darby 牛肾 (MDBK) 及 Madin Darby 犬肾 (MDCK)。

PRV 的减毒化可由标准的连续传代法完成, 包括终端稀释传代技术, 于此采用在易感染的组织培养中进行足够数的传代。直至病毒无致病性而不失去免疫原性。

传代时间间隔应当使病毒在两代间有足够的时间复制, 温孵温度宜在约 $30 \sim 38^\circ\text{C}$ 。最佳传代时间视不同病毒, 培养系统及所用温度而不同。

最终疫苗产品应含有一定量的无毒的 PRV, 而其量足以刺激易感动物产生免疫反应并仍是无致病性的。推荐用于易感动物的病毒滴度大约为 $10^3 \sim 10^5$ 空斑形成单位以 10^4 空斑形成单位更相宜。

本发明的病毒制剂可用水稀释以调节其效力, 可加入稳定剂诸如右旋糖, 乳糖或其它无毒物质。此病毒制剂为储存目的亦能例如再冷

冻干燥使之干燥，或随后配成液体疫苗。

疫苗可由种种途径给予动物，包括肌肉，静脉，皮下，气管内及鼻内，较好的途径是肌肉。

给大母猪接种，可用双剂量方案，第一剂可在下小猪前约数月甚至约5~7周给予。第二剂疫苗则在第一剂后数周给予，例如约2~4周后给予，然后疫苗能一直给到下小猪但在下小猪前。或者，可单次给予2毫升剂量的疫苗，例如在产前约5~7周给予。但为使猪仔最有效的免疫认为双剂给药法是较好的。对生育的动物建议半年后再接种。公猪可在任何时间再接种，同样，母猪可在生育前再接种。未接种的母猪所生的小猪可在约第三天接种。

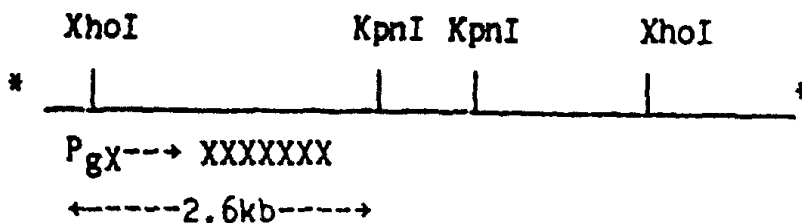
疫苗也可与其他疾病的疫苗合并，产生多价疫苗并可用前述的任何途径接种，它可与其他药物例如抗生素合用。

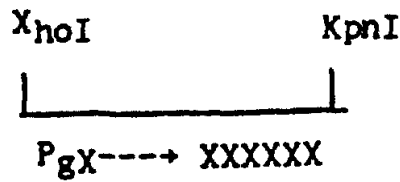
按照本发明制备的疫苗可刺激对此疾病易感的动物产生免疫反应而不发生任何明显的由毒力型病毒所致的临床症状。药物学有效疫苗量可与药物学接受的载体或稀释剂一起应用，于接种动物，例如猪，牛，羊，山羊，以及其它哺乳动物。

图A. pPRXK4 的构建

(a) pPRXh1 用 *Xho*I 和 *Kpn*I 酶解，生成片段 1

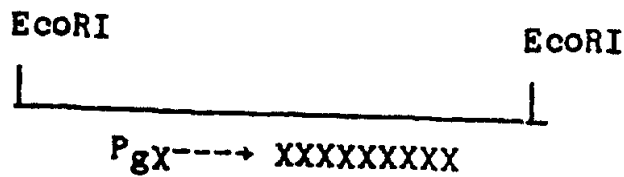
(2.6 kb)



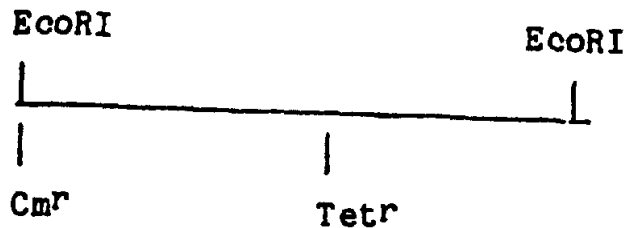


片断 1

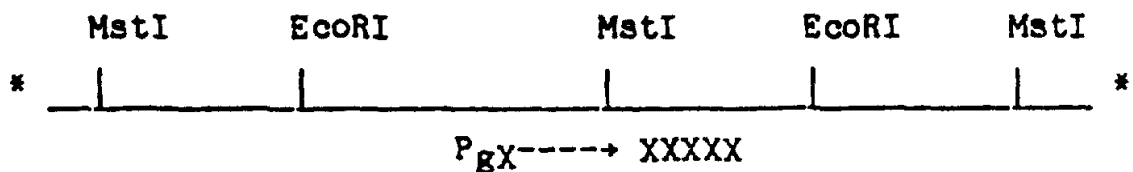
(b) 用 T4 DNA 多聚酶使片段 1 成齐头末端并加入 EcoRI 连接子。



(c) PACYC184 用 EcoRI 酶解, 并用 BAP 处理, 生成片断 2。



(d) 连接片断 1 和 2, 生成 pPRXK4



X = 糖蛋白 X 基因

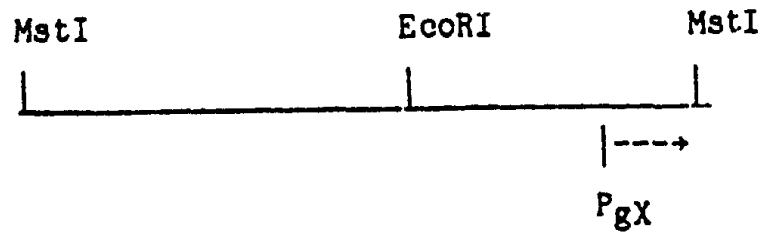
cm^r = 氯霉素抗性基因

Tet^r = 四环素抗性基因

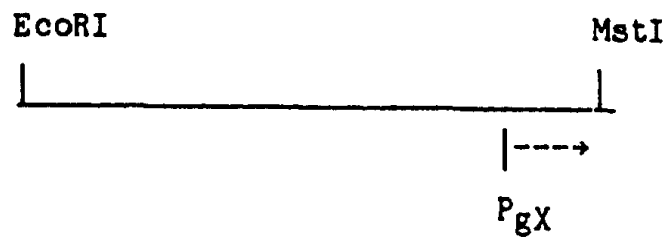
P_{gX} = gX 启动子

图 B. pPGX1 构建

(a) pPRXK4 用 MstI 酶解, 生成片断 3 (2.1kb)



(b) 片断 3 用 EcoRI 切割以生成片断 4 (400 bp)



(c) PUC9 用 EcoRI 和 SmaI 酶解, 生成片断 5 (2.6 kb)

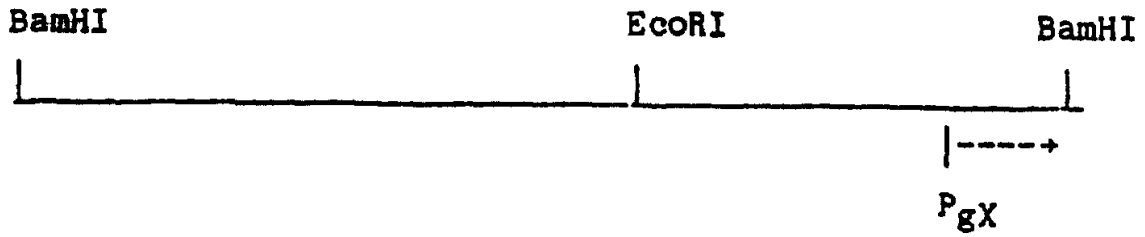


(d) 连接片断 4 和 5, 生成 pPGXI

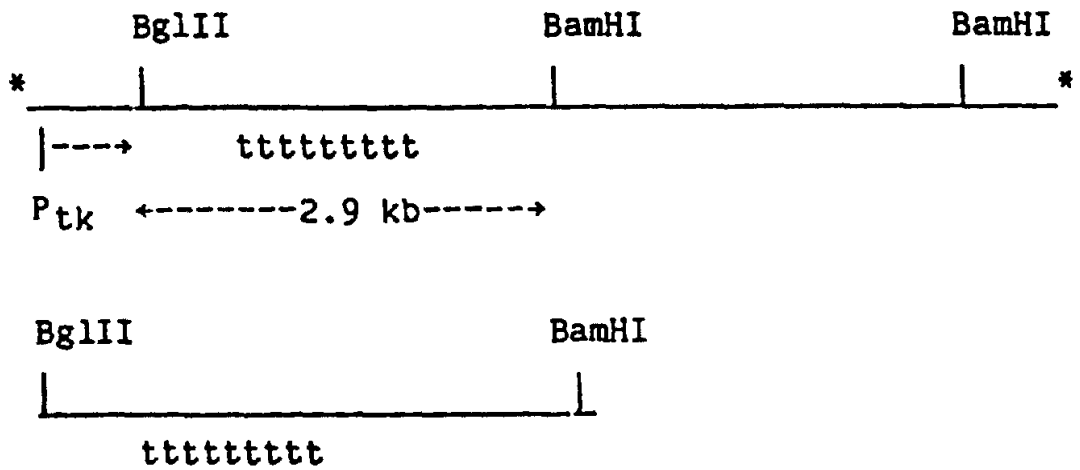


图 C. pGXTK2 的构建

(a) pPGXI 用 BamHI 酶解, 用 BAP 处理, 生成片断 6 .

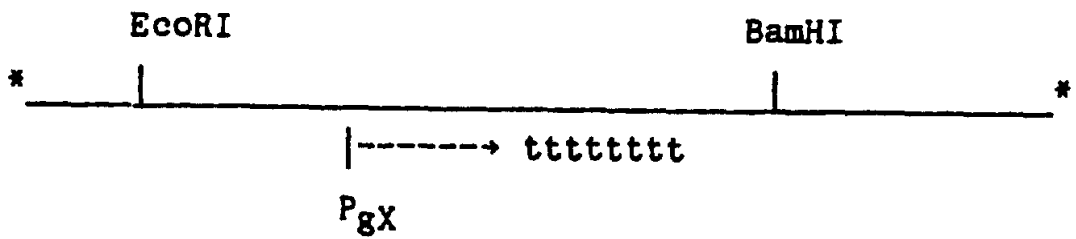


(b) pRB103 用 BamHI 和 BglIII 酶解, 生成片断 7 (2.9kb)



片断 7

(c) 片断 6 和 7 相连接, 生成 pGXTK2

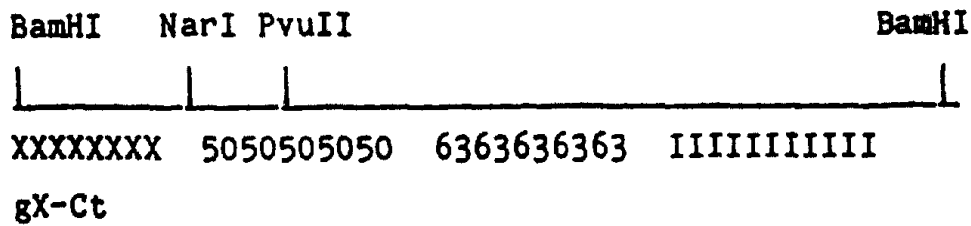


P_{tk} = 胸苷激酶启动子

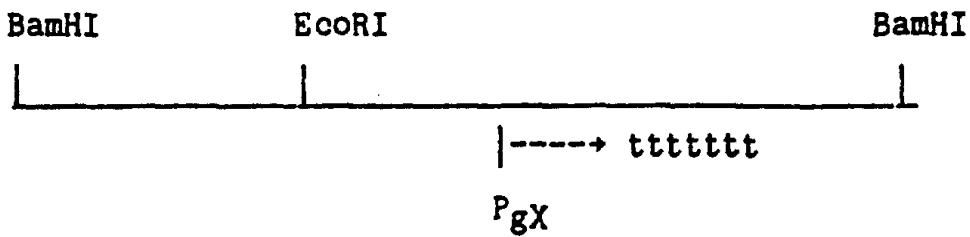
t = 胸苷激酶基因。

图 D. pGXTK3 构建

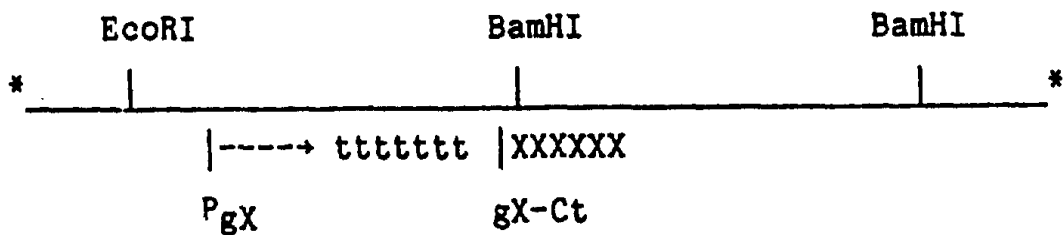
(a) pPRX h1 用 BamHI 酶解, 生成片断 8 (6.9kb)



(b) pGXTK2 用 BamHI 酶解, 用 BAP 处理, 产生片断 9



(c) 片断 8 和 9 相连接, 生成 pGXTK3



gX-Ct = gX 基因的 C- 端编码区

50 = 糖蛋白 50 基因

63 = 糖蛋白 63 基因

I = 糖蛋白 I 基因

图 E. 用 pGXTK3 和一个 tk⁻ PRV 共转染

(a) pGXTK3 和一个 tk⁻gX-PRV 共转染生成产物 tk⁺gX⁻ 的 PRVΔgX1 (或 DT-A)。

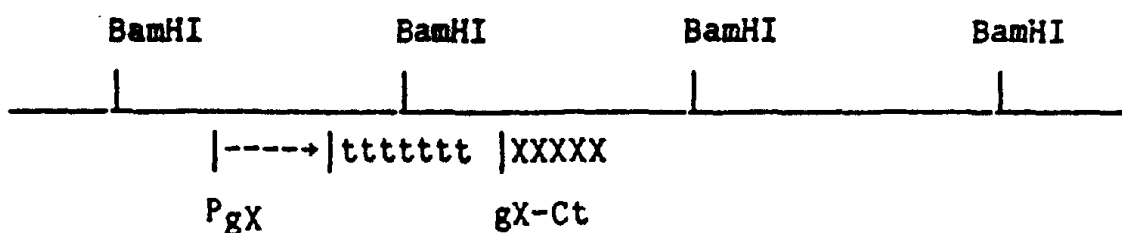
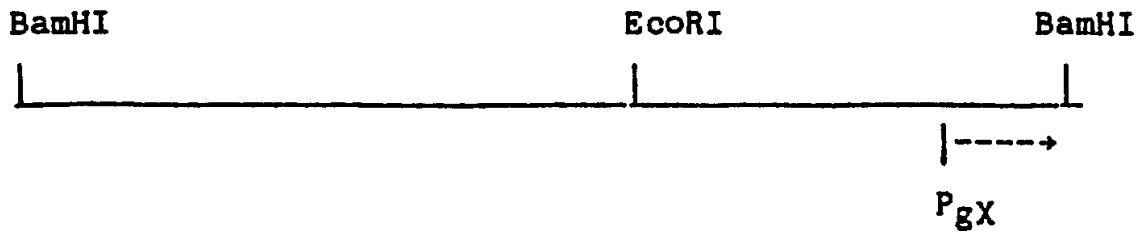
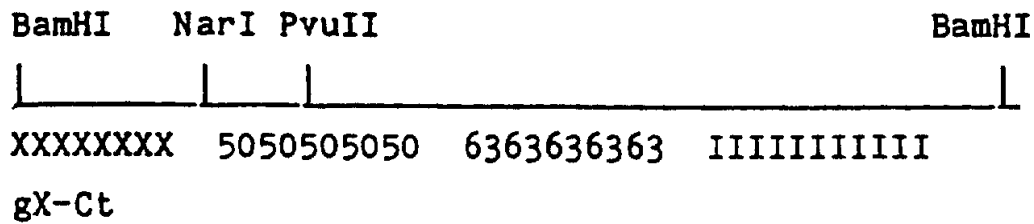


图 F. pΔGXB7 构建

(a) pPGXI 用 BamHI 酶解, 并用 BAP 处理, 生成片段 6



(b) pPRXh1 用 BamHI 酶解, 产生片段 8 (6.9kb)



(c) 片段 6 和 8 连接, 生成质粒 pΔGXB7

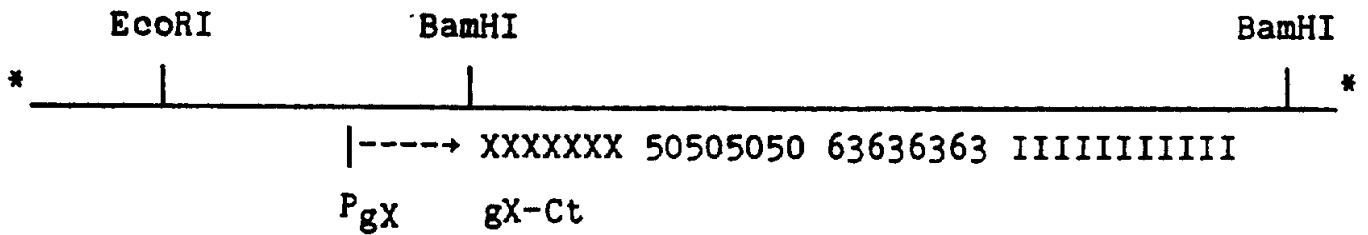
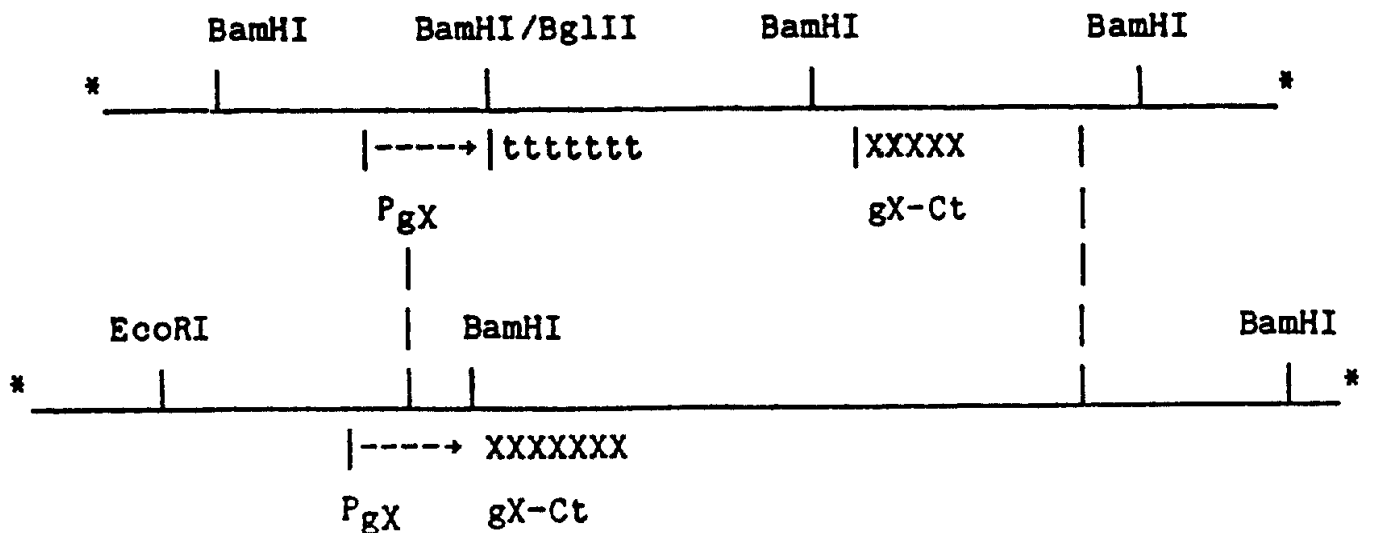


图 G. 用重组法构建 PRΔGXTK⁻

(a) PRVΔGX1 和 pΔGXB7 共转染, 并重组, 生成

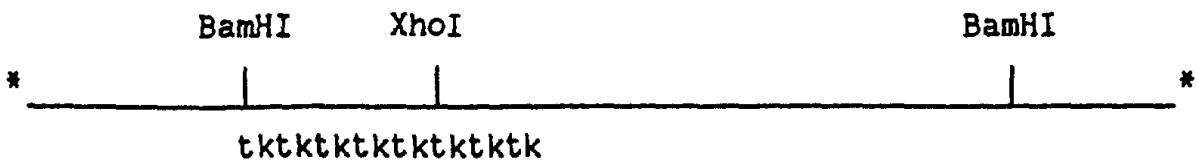
PRVΔGXTK⁻



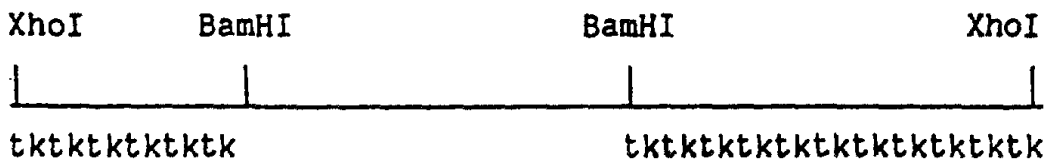
| = 交换区, (右边交换区的比例非常不正常)

图 H. tk 缺失质粒的构建

(a) BamHI 11 克隆到 PBR322 中, 生成质粒 PTK11



(b) PTK11 用 XhoI 酶解, 产生片断 10



(c) 片断 10 用 Bal 31 酶解, 然后再环接生成在 tk 基因中, 有不同长度缺失的质粒.



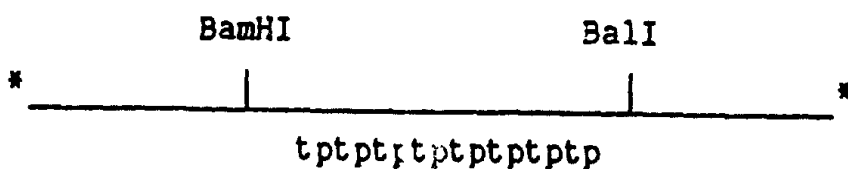
tk = 胸苷激酶基因

d = 在胸苷激酶基因中缺失.

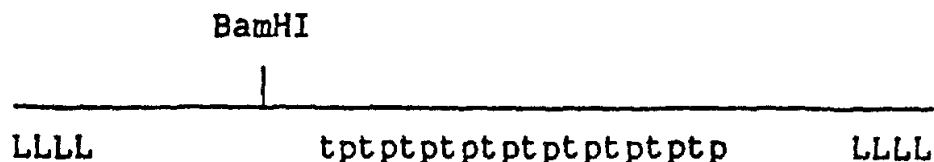
图 I. PGXTPA 的构建

(a) 质粒 PPSA18 用 Bal I 切割, 加入 BamHI 连接子, 生成片断 11.

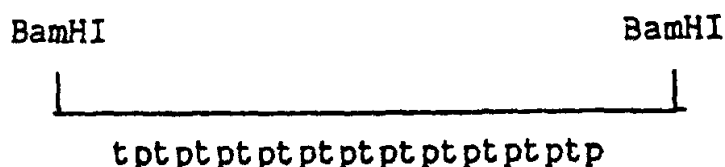
PPSA18:



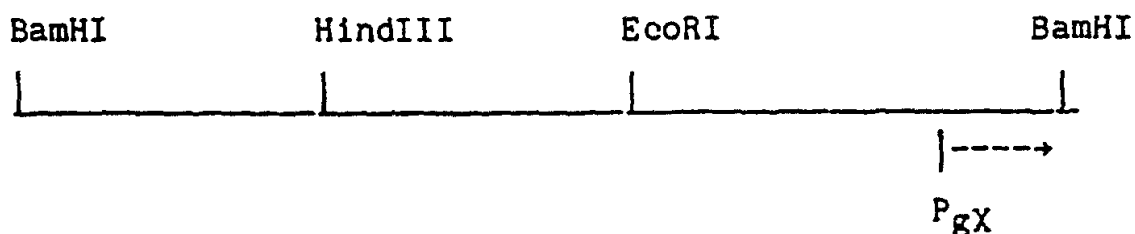
Fragment 11:



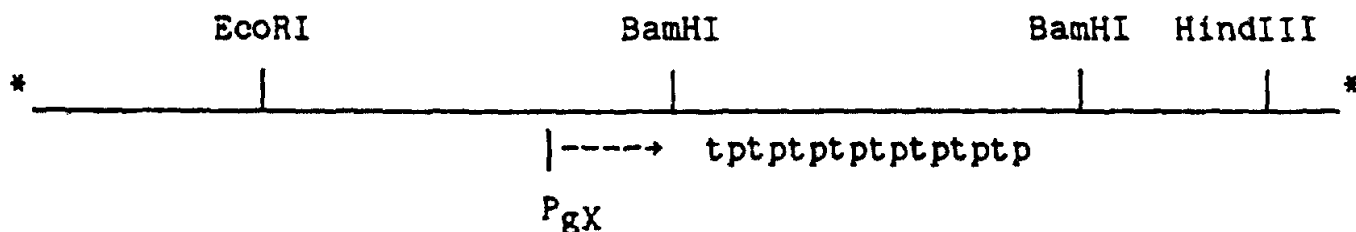
(b) 片断 1 1 用 BamHI 酶解, 生成片断 1 2 (1.95 kb).



(c) 质粒 pPGXI (图 B) 用 BamHI 切割, 生成片断 6.



(d) 片断 6 和 1 2 连接, 生成质粒 PGXTPA.

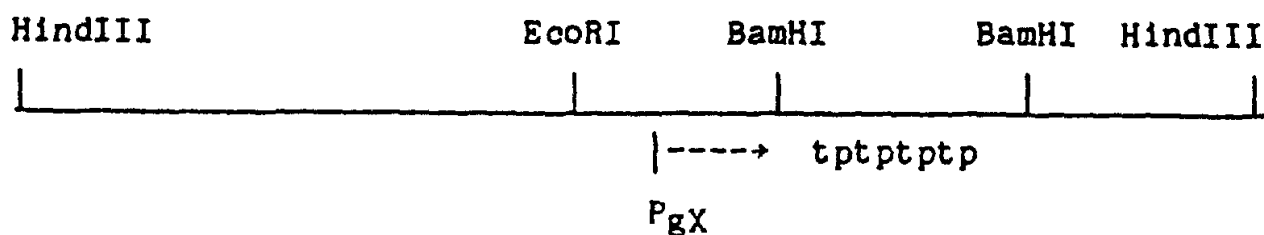


tp = 纤维蛋白溶酶原组织激活因子基因

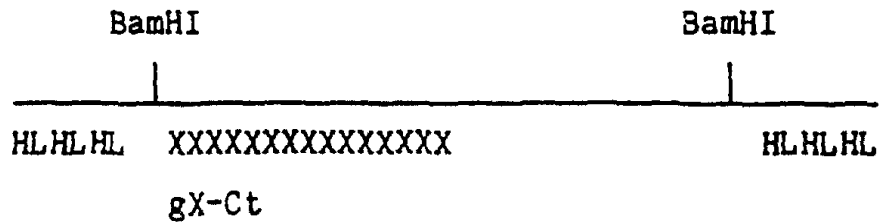
L = BamHI 连接子

图 J. 质粒 PGXTPA-B7 的构建

(a) 质粒 PGXTPA 用 HindIII 酶解, 生成片断 1 3.



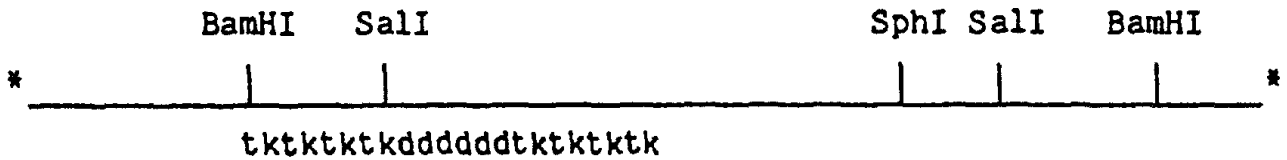
(b) HindIII 连接子加到片断 8 中 (图 D), 生成片断 14.



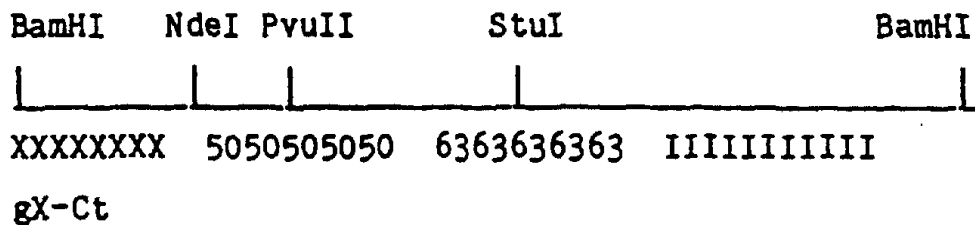
HL = HindIII 连接子

图 K. 抗重组病毒的生产

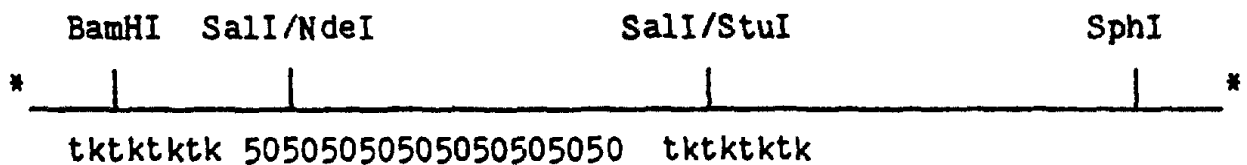
(a) p Δ TK-4



(b) BamHI 7



(c) PRV Δ TKgp50



勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	2	7	毒性病毒	毒性 PRV 病毒
		1 2	疱疹病毒	疱疹病毒
	1 7	1 3	} 基团	} 基因
		1 2		
		2 1 9		
	3	倒 8	聚丙烯酰胺	聚丙烯酰胺
		倒 6	过氯酸	高氯酸
	4	3	L.K.Wathen	L.K.Wathen
		5	GP 5 0	gp50 中和
		6	Wathen and Wathen	M.W.Wathen and L.K.Wathen
	5	1	糖蛋	糖蛋白
		3	Gielkere	Gielkene
		1 2	密码	编码
	7	1 5	B.Lomniezi,	B Lomniczi,
		倒 2	574	514
		7	Port	Post
	8	2	I 型 HSV	I 型病毒
		1 4	得到。	得到片段 1, 约 2.6 kb。
1 6		(ava-	(avai-	

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	9	2	mRVA	mRNA
		1 0	PGXTR ₂	p ^{GXTK2}
		1 3	p ^{PGX1}	p ^{PGX1} 质粒
			生成片段。	生成片段 6。
		1 4	pPB	pRB
		1 0 倒 8	Tbtarov,	Tatarov,
		倒 5	系在	系生长在
		1 1 倒 7	5-碘苄	5-碘代-2-脱氧 尿嘧啶核苄
		1 2 5	Vetrinary	Ve terinary
		1 3	重组基因,	重组体,
		倒 6	符合方位要求的	符合方位要求的克隆
		倒 2	22, 243	22: 243
			对兔细	共转染入兔皮细
		1 3 1 3	gX 的	gX 抗体的
		1 4	抗原,	抗原,
		倒 6	述及	述及 PRVtK 缺失,
倒 1	Benportt	Ben-Porat		
1 4 1	(1980)	(1983)		
5	DHI	DH1		
6	Maniatin	Maniatis		

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	1 4	8	CsCl	氯化铯
		9	(部分 I)	(部分 1)
		倒 9	p ^R V△GX	p ^R V△gX
		倒 1	叙述的特别的	叙述的针对 PRV 特别的
	1 5	1 0	任何一个	任何其它
		1 2	或不启动子	或在启动子
		1 4	基因中,	基因时,
		1 6	G 418	G418
	1 6	2	血清蛋白溶酶原	血纤维蛋白溶酶原
	4,8,11	倒 4	} tPA	} tPA
	1 2	1: 1 kb	1.1 kb	
	倒 4	用以	用抗	
		以纤	以血纤	
	1 7	2,10	炎变体	突变体
		3	(tk ⁺ gx ⁻)	(tk ⁻ gx ⁻)
	1 1	(tk ⁻ gx ⁺)	(tk ⁻ gx ⁻)	
	1 6	Hollard	Holland	
	1 8	2	Sartorius	Sartorius

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	1 8	3	过沪,	(删掉)
		5	的缓冲液	的Voller氏缓冲液
		倒9	1/15.00;	1/15,000;
		倒8	吐温20	聚环氧乙烷山梨糖醇 单月桂酸酯(Tween -20)
	1 9	倒1	Multikan	Multiskan
		7	PK-5	PK-15
		倒10	10天。	(第0天)。
	2 0	10	表1m	表1表明
		倒5	滴度(中和滴定=	滴度较高(中和滴度 =
	2 1	倒6	猪的体重	对照猪的体重
	2 2	1 1	滴度	滴度 ^a
	2 3	3	吸光值	吸光度
		7	吸光度的	吸光度 ^d 的
		倒9	中和滴度	每个中和滴度
	2 5	倒1	双尾T试验	双尾斯氏t试验
		倒2		
	2 5	11下	(漏打)	“a”“b”注解见表2
2 6	2	吸光值	吸光度值	

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	26	5	表7	表7 DT-C对猪的剂量滴定
	27	倒8	标志	标记
		倒2	SPHI	SP ϕ I
	28	4,7	T ₄	T ₄
		倒7	克隆化至	克隆至
		倒3	转变成 λ mHI	转变成 BamHI
		倒2	p ^P PGXI	p ^P PGXI
	29	6	防重组	抗重组
		倒4	HOLLAND	T. C. Holland
	33	倒1	p ^P PGXI	p ^P PGXI
		倒4		
	36	2		
	34	2	BgIII	BgIII
	36	倒5	构建 PR Δ GXTK	构建 PRV Δ GXTK
	37	8	有不同长度缺失的质粒。	有不同长度缺失的质粒，例如，p Δ tk-3 和 p Δ tk-4
权 利 要 求 书	1	2	病毒	病毒
		6	要求2的方法	要求2的方法

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
权利要求书	1	10	型疱疹	体疱疹

勘 误 表

文件名称	页	行	修正前	补 正 后
说明书	39	3下	(gx-ct 下行漏打)	<p>(c) 然后, 将片段 13 和片段 14 连接到一起, 生成_P GXTPA-B7。</p> <pre> EcoRI BamHI BamHI HindIII HindIII * -----> cptcptp XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX PgX </pre>