

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97182517.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1321693C

[22] 申请日 1997.12.5 [21] 申请号 97182517.3

[86] 国际申请 PCT/US1997/023032 1997.12.5

[87] 国际公布 WO1999/029340 英 1999.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2000.8.7

[73] 专利权人 弗吉尼亚科技知识产权有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

共同专利权人 加州大学评议会

[72] 发明人 S·M·波伊勒 S·克拉维洛

L·科尔贝尔 G·G·舒里格

N·斯里尔纳加纳坦

R·维穆拉帕利

[56] 参考文献

US4888170A 1989.12.19

US5468485A 1995.11.21

审查员 王 宏

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种过量表达的同源抗原疫苗及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种过量表达同源抗原疫苗，一种制备该疫苗的方法以及将该疫苗应用于治疗病原性微生物引起的脊椎动物疾病，或用于预防脊椎动物获得上述疾病。该疫苗是减毒的或无毒的病原性微生物，上述微生物过量表达至少一种同源抗原，上述同源抗原由至少一种源自病原性微生物的基因编码；上述微生物可能也表达一种异源性抗原。

1. 一种用于免疫、预防或治疗脊椎动物的疫苗，其中该动物患有布鲁氏菌病或有上述风险，其中所述的疫苗包括布鲁氏菌的一种减毒或无毒的菌株，如果该菌株不减毒或无毒将是病原性的，该菌株过量表达至少一种由至少一种源自上述菌株的基因编码的同源抗原，其中上述至少一种抗原能诱导抵抗布鲁氏菌的保护性或治疗性免疫应答。

2. 权利要求 1 中的疫苗，其中所述的该布鲁氏菌的减毒或无毒衍生物进而表达一种或多种异源抗原，所述的异源抗原来自至少一种其它病原体，并且能够诱导脊椎动物抵抗其它病原体的保护性或治疗性免疫应答。

3. 权利要求 1 中的疫苗，其中该病原体选自由流产布鲁氏菌、马耳他布鲁氏菌、猪布鲁氏菌或狗布鲁氏菌组成的一组病原体。

4. 权利要求 1 中的疫苗，其中布鲁氏菌是流产布鲁氏菌菌株 RB51。

5. 权利要求 4 中的疫苗，其中至少一种基因为 Cu/Zn SOD 基因。

6. 权利要求 5 中的疫苗，其中 Cu/Zn 基因是从流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因组文库里得到的。

7. 权利要求 4 中的疫苗，其中所述基因是 GroES 基因和 GroEL 基因中的一种或两种。

8. 权利要求 7 中的疫苗，其中 GroES 基因和 GroEL 基因是从流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因组文库里得到的。

9. 权利要求 1 中的疫苗，其中脊椎动物为牛。

10. 过量表达至少一种同源抗原的流产布鲁氏菌菌株 RB51 的一种减毒或无毒型的菌株，其中上述抗原能刺激抵抗布鲁氏菌病的保护性免疫。

11. 权利要求 11 中流产布鲁氏菌菌株 RB51 的一种减毒或无毒型菌株，其中至少一种同源抗原是由至少一种选自 Cu/Zn SOD 基因、GroES 基因和 GroEL 基因的基因编码。

12. 一种过量表达同源抗原疫苗在制备用于预防或治疗由病原性微生物导致的脊椎动物风险或疾病的药物中的用途，其中上述疫苗是过量表达至少一种上述病原性微生物的同源抗原的病原性微生物的减毒或无毒型菌株。

13. 权利要求 12 中的用途，其中疫苗进而表达一种异源抗原。

14. 权利要求 12 中的用途，其中脊椎动物是人。

15. 一种疫苗在制备用于预防或治疗脊椎动物布鲁氏菌病的风险或疾病的药物中的用途，其中上述疫苗是一种减毒或无毒的布鲁氏菌病原体，该病原体过度表达至少一种由来自所述的减毒或无毒的病原体的至少一种基因所编码的同源抗原。

16. 权利要求 15 中的用途，其中所述的减毒或无毒型病原体进而表达一种异源抗原。

17. 权利要求 15 中的用途，其中至少一种基因是流产布鲁氏菌菌株 RB51 中的 Cu/Zn SOD 基因。

18. 权利要求 17 中的用途，其中 Cu/Zn 基因是从流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因组文库里得到的。

19. 权利要求 15 中的用途，其中所述基因为流产布鲁氏菌株 RB51 的 GroES 基因和 GroEL 基因之一或两者。

20. 权利要求 19 中的用途，其中 GroES 基因和 GroEL 基因是从流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因组文库里得到的。

21. 权利要求 1 的疫苗在制备用于预防或治疗病原性微生物导致的脊椎动物疾病的风险或疾病的药物中的用途，其中的疫苗的生产过程包括以下步骤：

a) 从病原性微生物中提取脱氧核糖核酸；

b) 从上述脱氧核糖核酸中鉴定至少一种编码至少一种抗原的基因，其中上述至少一种抗原能刺激抵抗该病原性微生物的保护性免疫；

c) 将上述至少一种基因插入到能在该病原性微生物中复制和表达的多拷贝质粒中；

d) 用上述质粒转化病原性微生物的减毒或无毒型以形成疫苗。

22. 权利要求 21 中的用途，其中所述的减毒或无毒型的病原性微生物进而表达一种或多种异源抗原。

一种过量表达的同源抗原疫苗及其制备方法

这里描述的发明是在美国农业部的资助下完成的，因此美国政府对此发明可能具有一些权利。

本发明涉及一种过量表达同源抗原疫苗，一种制备该疫苗的方法以及将该疫苗应用于治疗病原性微生物引起的脊椎动物疾病，或用于预防脊椎动物获得上述疾病的风险。该疫苗是减毒的或无毒的病原性微生物，上述微生物过量表达一种或多种病原基因，因此它提供的抗原性比未过量表达基因的同种病原体的疫苗诱导的抗原性要强。

发明背景

疫苗是用来抵抗病原体造成的疾病。这些病原体是影响动物，包括人，的微生物，如细菌或病毒。疫苗是通过生产和施用：a) 减毒或无毒类型的病原体；b) 灭活的病原体；c) 从病原提取的保护性抗原或抗原混合物；或 d) 表达一种或多种由克隆自不同于疫苗株的微生物病原体的基因编码的保护性抗原（异源性抗原）的微生物。

如 K. Jones 和 M. Sheppard 在疫苗设计，CRC Press (1997) 中所描述，细菌和病毒疫苗都是从表达一种或多种保护性抗原的微生物设计得到的。疫苗的目的是在接受体中产生至少由一种抗体介导的或由 T 细胞介导的免疫应答组成的免疫应答，从而防止将来的病原性感染，或抵抗目前的病原性感染。针对生长在被感染宿主细胞内的兼性细胞内病原体的疫苗需要诱导适当的细胞介导强免疫应答。与此相反，针对专性细胞外病原体的疫苗需要诱导适当的抗体介导的免疫应答。通常，不管病原体是那种，适当的抗体介导和细胞介导的免疫应答一起充分地抵抗或减轻感染。为了达到这种抵抗或减轻感染，疫苗可表达一种或多种同源抗原，异源抗原或联合表达两种抗原。

可对脊椎动物施用疫苗防止或治疗病原体的感染。因此，经常施用疫苗以防止病原体导致的疾病传播。尤其是，畜群，如奶牛、山羊、绵羊和猪经常接种疫苗以防止疾病在畜群的成员之间的传播。进而，由于一些疾病可能在脊椎动物之间传播，包括在不同种动物之间和动物和人之间传播，所以通常通过对邻近的感染动物或未感染动物施用疫苗，从而用疫苗防止疾病在各种种属之间的传播。但是，作为一种

预防手段，该地区的其它不太可能感染该疾病的动物也可接种疫苗。例如，可对一只感染的奶牛和它的尚未感染的牛群接种疫苗以治疗疾病和防止疾病的进一步传播。作为一种预防措施，其它可能从感染的奶牛感染该疾病的动物，如邻近的奶牛、绵羊或人，也可接种疫苗。

已经发现病原体的减毒或无毒株在防止或抵抗由该病原体引起的疾病上是非常有效的。特别是，已知这种减毒或无毒的病原体可被改造以表达异源性抗原（源自不同物种的病原体的抗原）。为了在所需要的减毒或无毒病原体上表达异源性抗原，从一种异源种属的脱氧核糖核酸中鉴定了一种编码抗原的基因，该抗原能提供对病原体的抵抗力。分离了所需的基因并将其插入到能在减毒或无毒病原体中表达的质粒中。然后将该质粒导入减毒或无毒病原体，并在施用到目的脊椎动物时使异源抗原表达。

这样表达异源抗原的一个例子是表达链球菌 *spaA* 蛋白的细菌疫苗沙门氏菌 (*Salmonella*)。参见美国专利 4, 888, 170。这种疫苗包括沙门氏菌属的一种病原性微生物的无毒衍生物，该衍生物表达源自 *Streptococcus mutans* 种的病原体的重组基因，从而产生能在脊椎动物中诱导抗病原体免疫应答的抗原。

异源表达的另一例子是霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*) 疫苗。许多活的霍乱弧菌减毒株已被开发成为人类抗霍乱的疫苗。参见 Kaper, J. B., et al., 在新产生的疫苗中抗霍乱的新改进疫苗 (MM Levin et al. 编著) Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1997。这些菌株中的一部分过量表达异源抗原。参见 Butters, J. R. and S. B. Calderwood, 在新产生的疫苗中减毒的霍乱弧菌作为活载体表达外来抗原 (MM Levin et al. 编著) Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1997。由减毒疫苗株诱导的免疫性是由于诱导了具有抗细菌或抗毒性活性的抗体。一些菌株通过缺失大量编码毒源性成分的基因而被减毒，包括由 *ctxA* 基因编码的霍乱毒素 A 亚基。但是，为了使霍乱毒素疫苗株具有完整的保护性，它需要表达编码 B 亚基 (A 亚基与其结合) 的 *ctxB* 基因，从而允许产生中和霍乱毒素的抗体。在霍乱弧菌中 *ctxB* 基因被过量表达，以产生大量的霍乱毒素 B (CTB) 抗原。收集过量表达的抗原 CTB，纯化并用作亚基疫苗，即提取的 CTB 抗原。参见 Lebens M., et al., 1993, 生物技术 (纽约) 12 月; 11: 1574-1578。但是，尽管过量表达的抗原

自身已被用作疫苗，过量表达 *ctxB* 基因或任何其他同源基因的霍乱弧菌减毒或无毒株还未被用作活体疫苗。

异源表达的另一例子是用于防止人类肺结核的分支杆菌 (*Mycobacterium*) spp. 疫苗。当转染到巨噬细胞中的 *groEL* 基因表达时结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) GroEL 蛋白诱导保护性的免疫力 (Silva, C. L. and Lowrie, D. B., 1994, 免疫学 84:244-248), 这表明 GroEL 蛋白由这种类型的抗原递呈细胞 (APC) 递呈给 T 细胞时是保护性抗原。利用编码多种抗原 (*hsp* 70, 85KDa, 65KDa, 36KDa) 的分支杆菌基因的裸 DNA 疫苗能诱导保护性免疫。参见 Lowrie, D. B. et al., 1997, 疫苗 15: 834-838; Tascon, E. et al., 1996, 自然医学 2: 888-892; and Lozes, E. et al., 1997, 疫苗 15: 880-833. 有人认为裸 DNA 之所以起作用是由于它们转染了 APC (Chattergon, M. et al., 1997, FASEB J. 11:753-763), APC 将抗原适当地递呈给 T 细胞, 从而诱导了保护性细胞介导的免疫。牛结核分支杆菌 BCG, 分支杆菌的一种活的减毒株, 被用于诱导人类抗结核杆菌感染的保护性免疫。Fine, PM. 1988, Br. Med. Bull. 44:91.

抗布鲁氏菌病的抗原疫苗为同源抗原表达提供了例子, 其中抗原是源自于同种减毒病原体。布鲁氏菌病是一种感染性的细菌疾病, 它可通过动物传染至人类。它可由布鲁氏菌 (*Brucella*) 属的多种病原性需氧细菌中的任何一种引起。在动物中布鲁氏菌病可引起流产和不育。在人类中它导致发烧、不适和头痛。这种疾病已被广泛地研究, 并发展了多种疫苗。

已知存在布鲁氏菌的疫苗株, 如流产布鲁氏菌 (*B. abortus*) 菌株 19 和 RB51, 以及马耳他布鲁氏 (*B. melitensis*) 菌株 REV1, 它们能抵抗它们所来源的布鲁氏菌种的感染, 并交叉抵抗其它种, 如流产布鲁氏菌, 马耳他布鲁氏, 羊布鲁氏菌 (*B. ovis*), 猪布鲁氏菌 (*B. suis*), 狗布鲁氏菌 (*B. canis*)、和木鼠布鲁氏菌 (*B. neotomal*) 的感染。参见 Winter, A. J. et al., 1996, Am. J. Vet. Res., 57: 677; P. Nicoletti in 动物布鲁氏菌病 (Animal Brucellosis), CRC Press (1990), pp. 184-296; J. M. Blasco in 动物布鲁氏菌病, CRC Press (1990), PP. 368-370; and G. C. Alton in 动物布鲁氏菌病, CRC Press

(1990), pp. 395-400. 新马耳他布鲁氏菌株 VTRM1 和猪布鲁氏菌株 VTRS1 也交叉抵抗各种布鲁氏菌种。参见 Winter, A. J. et al., Am. J. Vet. Res., 57: 677.

如 P. Nicoletti 在动物布鲁氏菌病, CRC Press (1990) Page 284-296 页中所描述的那样, 过去用来预防牛布鲁氏菌病的一种最常用的疫苗是流产布鲁氏菌菌株 19。这种流产布鲁氏菌的特殊菌株在牛中提供了范围在 65-75% 的保护, 保护的范围依赖于许多变量, 如接种时牛的年龄、施用的剂量、施用的途径和布鲁氏菌病在牛群中流行的程度。

流产布鲁氏菌菌株 RB51, 一种新的减毒布鲁氏菌疫苗 (标记为 RB-51[®]), 是一种被批准在美国使用的稳定疫苗。参见 Schurig, G. G. et al, 1991, Vet. Microbiol. 26: 359; and Colby, L., 1997, M. Sc. Thesis, Virginia Tech, Blacksburg, V. 在小鼠、山羊和牛中进行的研究显示 RB51 菌株的减毒作用。参见 Schurig, G. G., 1991, Vet. Microbiol. 28:171; Palmer R. M. et al., 1997, Am. J. Vet Res. 58: 472; Roop, R. M. et al., 1995, Res. Vet. Science, 51: 359; and Zambrano, A. J. et al., 1995, Archives de Medicina Veterinaria XXVIII, No. extraordinario:119-121. 和菌株 19 提供的保护相比, 菌株 RB51 通过单一接种步骤即在牛中表现出类似的保护性。参见 Cheville, N. F. et al., 1993, Amer. J. Vet Research 53: 1881; and Cheville, N. F. et al., 1996, Amer. J. Vet Research, 57: 1153. 进而, 在小鼠和牛中表明通过口服施用菌株 RB51 产生了保护性免疫。参见 Stevens, M. G. et al., 1996, 传染病免疫 Immun. 64: 534. 尤其是, 小鼠模型表明菌株 RB51 诱导的对布鲁氏菌病的保护性免疫是单一 T 细胞介导的, 因为被动输入 RB51 诱导的抗体并不产生对疾病的抵抗力, 而过继 T 细胞转移则产生。参见 Bagchi, T., 1990, M. Sc. Thesis, Virginia Tech, Blacksburg, Va; Jimenez deBagues, M. P. et al., 1994, 传染病免疫 62: 4990. 人们认为 RB-51[®] 接种诱导了干扰素 γ , 干扰素 γ 激活巨噬细胞和特异性的细胞毒性 T 细胞, 细胞毒性 T 细胞能杀死布鲁氏菌感染的巨噬细胞, 从而产生保护性免疫。

尽管源自流产布鲁氏菌菌株 2308 的 RB-51[®] 是目前抵抗动物布鲁

氏菌病的最好疫苗，它仍然不是 100% 有效的。目前还没有完全有效的布鲁氏菌病疫苗。因此关于有潜力的菌株，如流产布鲁氏菌菌株 RB51 的研究仍然在继续。例如，S. Cravero, et al., 1995, Proceedings 4th Intl. Vet. Immunol. Symposium, July, Davis, Ca., Abstract# 276; and S. Cravero et al., 1996, 动物疾病研究人员会议, Nov., 芝加哥, Abstract # 150 描述了通过流产布鲁氏菌菌株 RB51 表达异源抗原。在流产布鲁氏菌的 HtrA 蛋白的研究中已有报道在布鲁氏菌中过量表达同源抗原，以之作为补充特异缺失突变体的一种研究工具(P. H. Elzer, 传染病免疫, 1994, 62: 4131)，以及，如 R. Wright 1997 年 11 月 9 日在芝加哥, Ill, 召开的布鲁氏菌研究会议上所作的口头报告上所讨论，作为研究生理功能的研究工具。

但是过量表达布鲁氏菌 或其它病原体的同源抗原，同时表达或不表达异源抗原，还未被研究用于疫苗。如上所述，同源抗原的表达过去主要被用作研究工具。被改造来过量表达同源抗原的减毒或无毒病原体还未被用作活疫苗。然而，我们发现，过量表达一种或多种同源抗原，如此处所描述，的减毒或无毒病原体提供的抗病原性疾病的抵抗力要比表达野生型水平的同种同源抗原的减毒病原体提供的抵抗力高很多。

因此，本发明是针对一种疫苗，生产该疫苗的一种方法，以及该疫苗在病原性疾病的预防和治疗中的应用；其中疫苗是一种过量表达至少一种同源抗原的减毒或无毒病原体，从而在受感染的脊椎动物中提供了对由于未减毒的病原体导致的疾病的更强抵抗力和更好疗效。

发明概述

本发明是关于一种活体疫苗，该疫苗为过量表达病原体的一种或多种同源抗原的减毒或无毒病原体，生产该疫苗的方法以及用该疫苗治疗动物，包括人，的方法。与表达野生型水平的病原体同源抗原的减毒病原体相比，这种疫苗提高了对未减毒病原体的抵抗力。通过这种方式，过量表达同源抗原的疫苗将在接种疫苗的受试者中诱导产生强细胞介导的免疫应答和/或体液抗体介导的免疫应答。

本发明的目的尤其是提供一种产生疫苗的方法，该疫苗是过量表达同源抗原的减毒或无毒病原体，以及用该疫苗免疫动物，包括人，的方法，使得该疫苗诱导产生抗病毒性病原体的强细胞介导或抗体介

导的免疫应答,从而提供抵抗病毒性病原体攻击的全面保护,无菌免疫。

本发明的目的进而为提供一种生产疫苗的方法,该疫苗为过量表达同源抗原的一种减毒的或无毒的病原体,以及用该疫苗免疫动物,导致同源抗原的过量表达以及异源抗原的表达方法,在接种疫苗的受试动物中两种抗原都提供抗病毒性病原体的抵抗力。

本发明的目的进而为提供一种过量表达的同源疫苗,一种制造这样疫苗的方法以及将该疫苗用于预防或治疗动物,尤其是牛类动物,的布鲁氏菌病。

附图简述

附图是用于帮助解释以及更具体地指出此处描述的本发明。具体而言:

图 1 是描述从布鲁氏菌种中获得同源抗原,并将该抗原插入到布鲁氏菌种疫苗株;

图 2 描述用于在流产布鲁氏菌菌株 RB51 中过量表达铜/锌 SOD(A) 和 GroES 和 GroEL(B) 的重组质粒的构建。

图 3 示明用过量表达铜/锌 SOD(A) 或 GroES/EL 的流产布鲁氏菌菌株 RB51 免疫接种的小鼠脾脏中清除了流产布鲁氏菌菌株 2308。

图 4 示明用过量表达铜/锌 SOD(A) 或 GroES/EL 的流产布鲁氏菌菌株 RB51 免疫接种的小鼠的淋巴细胞对感染布鲁氏菌的细胞的细胞毒活性。

发明详述

本发明是关于一种用于免疫脊椎动物使之抵抗由病原体导致的疾病的疫苗。其中该疫苗包括一种过量表达一种或多种同源抗原的减毒或无毒病原体,上述同源抗原由至少一种源自上述病原体的基因编码,其中每种抗原能诱导抵抗该病原体的保护性免疫应答。

这种过量表达的同源抗原疫苗是通过将活的减毒微生物进行遗传工程产生的,该方法包括以下步骤: a) 选择一种编码同源抗原的基因,该基因能直接或间接刺激抗病原微生物(病原体)的保护性免疫,以及 b) 将上述基因插入到一种减毒或无毒的病原体中使该同源抗原过量表达。得到的过量表达同源抗原疫苗(OHAV)的制备具体如下:

(a) 从病原微生物中提取脱氧核糖核酸;

(b) 从上述脱氧核糖核酸中鉴定一个基因，上述基因编码至少一个能刺激抗上述病原微生物的保护性免疫应答的抗原；

(c) 将上述基因插入到能在上述病原微生物中复制和表达的质粒中；

(d) 将上述质粒导入到减毒或无毒型的上述病原微生物中。

得到的疫苗合成上述抗原是位于至少两个位点，即基因组和质粒，的上述基因的转录和表达的结果。尤其优选的是，上述质粒是多拷贝型的，这样它就能产生大量的保护性抗原，而不是只产生单一基因组拷贝。

上述方法可被用于制备许多疾病的过量表达同源抗原疫苗。抗原的过量表达通常同时增强 T 细胞和抗体免疫应答，从而大大地增强受试者的保护水平。由于两种类型的免疫应答都增强了，细胞内和细胞外的病原体都受影响，从而提供了对病原体更强的抵抗。

例如，可制备抗病原微生物布鲁氏菌的疫苗。尤其是，该病原体可选自布鲁氏菌的任何种，包括流产布鲁氏菌，马耳他布鲁氏，羊布鲁氏菌，猪布鲁氏菌，狗布鲁氏菌和木鼠布鲁氏菌。用于制造疫苗的病原体优选地选自一种特殊的布鲁氏菌菌株，如流产布鲁氏菌菌株 19，流产布鲁氏菌菌株 RB51，马耳他布鲁氏菌株 VTRM1，猪布鲁氏菌株 VTRS1 和马耳他布鲁氏菌株 REV1。

具有流产布鲁氏菌菌株 RB51 的一种或多种铜/锌 SOD 基因、GroES 基因或 GroEL 基因疫苗是尤其有利的。尤其优选的是上述基因来自流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因组文库。

根据上述说明制备的疫苗对于预防和治疗诸如布鲁氏菌病这样的疾病是尤其有效的。例如，根据本发明用于预防或治疗牛科动物布鲁氏菌病的一种有效疫苗是一种减毒或无毒的流产布鲁氏菌菌株 RB51 衍生物，它能过量表达至少一种同源抗原。尤其优选的是该抗原由一种或多种铜/锌 SOD 基因、GroES 基因或 GroEL 基因编码，优选地上述基因选自流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因组文库。甚至更为优选的是减毒或无毒的衍生物还表达能诱导抗流产布鲁氏菌的保护性免疫的异源抗原。

预防或治疗脊椎动物感染病原性微生物的方法如下：

(a) 从上述病原微生物中提取脱氧核糖核酸；

(b) 从上述脱氧核糖核酸中鉴定至少一个基因，上述基因编码至少一个能刺激抗上述病原微生物的保护性免疫应答的抗原；

(c) 将至少一个基因插入到能在上述病原微生物中复制和表达的质粒中；

(d) 将上述质粒导入到减毒或无毒型的上述病原微生物中以形成疫苗。

(e) 对脊椎动物施用有效剂量的上述疫苗。

用于预防或治疗方法的疫苗可以是原始的疫苗菌株或一种存在的改进疫苗株。例如，流产布鲁氏菌菌株 RB51 可被改进为过量表达一种同源抗原，从而产生一种能用于预防或治疗布鲁氏菌病，特别是牛科动物的布鲁氏菌病，的疫苗的新菌株。

具体而言，新的布鲁氏菌疫苗可这样制备：1) 从布鲁氏菌菌株中选择一种编码保护性抗原的基因；2) 将上述源自病原体的基因插入到能在布鲁氏菌中复制和表达的多拷贝质粒中；并且 3) 通过例如转化这样的方法将上述质粒导入到布鲁氏菌中。可通过这种方式过量表达一种或多种同源抗原。此外，可通过本领域已知的方法在上述疫苗中表达一种或多种异源抗原。

从减毒或无毒的病原体制备得到的疫苗通过过量表达病原体的一种或多种同源抗原，在用疫苗治疗的脊椎动物中刺激产生了抵抗该病原体的更强的 T 细胞和/或抗体免疫应答，提供了针对未减毒病原体的更强的抵抗力。通过本领域中已知的常规技术利用减毒或无毒病原体额外表达一种或多种异源抗原可以提供更进一步的保护作用。

可以对需要接种的脊椎动物施用一定剂量的通过过量表达同源抗原而制备的疫苗，上述剂量能有效促进对由病原体引起的疾病的预防和治疗。根据本领域中的常规技术可知，应根据体重，年龄，环境等因素调节每一受试者的剂量。可通过任何根据待治疗动物的类型、年龄和状况的有效方式施用该有效剂量。

实施例

实施例 1:

通过在流产布鲁氏菌菌株 RB51 中过量表达 Cu/Zn SOD 基因或 GroES 和 GroEL 基因构建了两组 OHAVs。Cu/Zn SOD、GroES 和 GroEL 基因最初是从流产布鲁氏菌菌株 2308 的 pUC19 基因库中得到的。如

图 2 所示, 从 pBA113 (SOD) 和 pBA2131 (GroES GroEL) 区域上切割了包括这些基因以及它们自身的启动子的插入片段, 并亚克隆到 pBBR1MCS, 这是一种通常用于布鲁氏菌研究的广谱宿主质粒。得到的重组质粒被命名为 pBBSOD 和 pBBGroES/EL (Fig. 2)。用这些质粒通过电穿孔转化了流产布鲁氏菌菌株 RB51。将转化细菌涂布到含 $30\mu\text{l/ml}$ 氯霉素的胰酪胨培养基平板上选择含这些质粒的布鲁氏菌。为了检测克隆基因的过量表达, 将抗生素抗性的菌落单独在胰酪胨培养基中培养, 将细菌抽提物用作抗原进行免疫印迹分析。与仅含 pBBR1MCS 的 RB51 菌株 (RB51pBB) 相比, 含 pBBSOD (RB51SOD) 和 pBBGroES/EL (RB51GroESL) 的菌株分别过量表达 Cu/Zn SOD 和 GroEL。

小鼠中的保护性研究:

通过腹膜内接种对由 8 只小鼠组成的实验组接种了悬浮于 0.5ml 溶液的 4×10^8 菌落形成单位 (cfu) 的菌株 RB51SOD, RB51GroEL, RB51pBB 或 RB51。一组小鼠用 0.5ml 盐溶液接种作为对照。6 星期后每组的 5 只小鼠用 2.5×10^4 cfu 的毒性菌株 2308 攻击。每组中剩下的 3 只小鼠用于研究免疫应答特征。用毒性菌株 2308 攻击两星期后杀死小鼠并检测了每个脾脏中菌株 2308 的 cfu 数。和用菌株 RB51 免疫的小鼠相比, 用 RB51SOD 免疫的小鼠细菌数要低很多 (图 3)。用 RB51GroESL 免疫的小鼠中观察到的细菌数在检测方法的下限 ($<20\text{cfu/脾脏}$) (图 3)。

免疫应答的特征研究

通过检测淋巴细胞对感染布鲁氏菌的细胞的细胞毒活性研究了细胞介导的免疫应答的特性。通过和作为刺激细胞的丝裂霉素 C 处理的布鲁氏菌感染巨噬细胞体外共培养, 增强了特异性脾脏淋巴细胞的活性。利用增强的淋巴细胞作为效应细胞 (E), 感染布鲁氏菌的巨噬细胞作为靶细胞 (T) 进行细胞毒性检测。在该检测中, E 和 T 细胞以两

种比例混合，10: 1 和 5: 1。用常规方法计算了每种 E: T 比例的靶细胞特异性裂解百分比（图 4）。与来自盐溶液或菌株 RB51 接种的小鼠的淋巴细胞相比，来自用 RB51SOD 或 RB51GroESL 免疫小鼠的淋巴细胞表现为细胞毒活性增强。这种淋巴细胞细胞毒活性的增强（表现为特异裂解百分比增加）和观察到的小鼠对毒性流产布鲁氏菌 菌株 2308 的抵抗力的增强直接相关，保护水平越高，特异细胞毒活性越高。

实施例 2

通过在霍乱弧菌中过量表达 *ctxB* 基因构建了一种 OHAV。该基因来自于该病原体的脱氧核糖核酸，并被插入的一种能在病原体中复制和表达的质粒中。得到的重组质粒被通过电穿孔转化霍乱弧菌。通过本领域中已知的方法涂布和筛选质粒。得到的过量表达同源抗原疫苗菌株促进了中和霍乱毒素的抗体的额外产生，从而提供了预防和治疗人霍乱病的更强抵抗力。

实施例 3

通过在分支杆菌种中过量表达结核分支杆菌的 *groEL* 基因构建了一种 OHAV。该基因来自于该病原体的脱氧核糖核酸，并被插入的一种能在病原体中复制和表达的质粒中。得到的重组质粒被通过电穿孔转化分支杆菌种。通过本领域中已知的方法涂布和筛选质粒。得到的过量表达同源抗原疫苗菌株促进了 GroEL 蛋白的额外产生，从而提供了预防和治疗人结核病的更强抵抗力。尤其是，在牛分支杆菌 BCG 中 *groEL* 基因的过量表达提供了抵抗结核更强的保护性免疫，因为已知 BCG 疫苗的靶为抗原保护细胞，如巨噬细胞，从而提供了一种将抗原导向 T 细胞的方式，诱导保护性细胞介导的免疫。

以上的实施例仅仅是例证性的。本发明的范围并不限制于这些实施例，而是在说明书和随后的权利要求书中得以描述。本领域中具有普通技术人员能鉴别以上描述的方法和材料的替代方法和材料，应该认为上文的说明书和随后的权利要求书覆盖这些方法和材料。

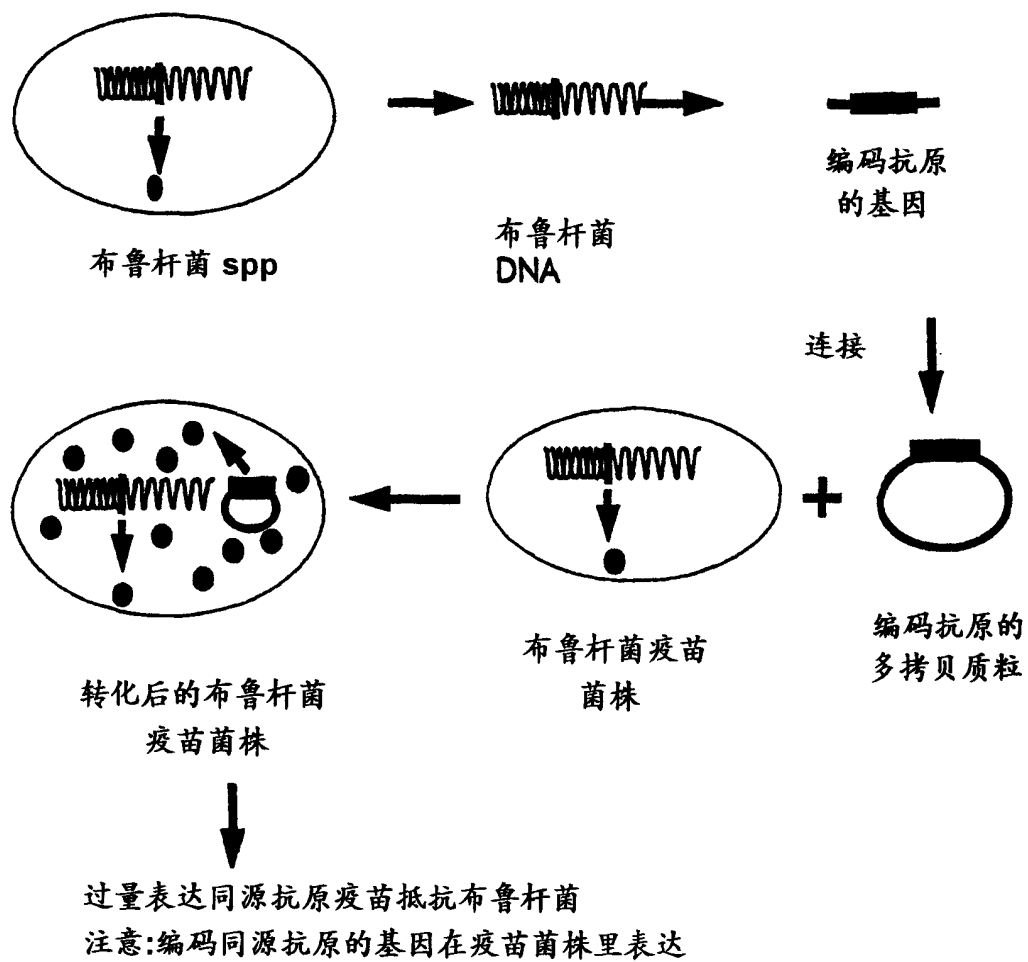


图 1

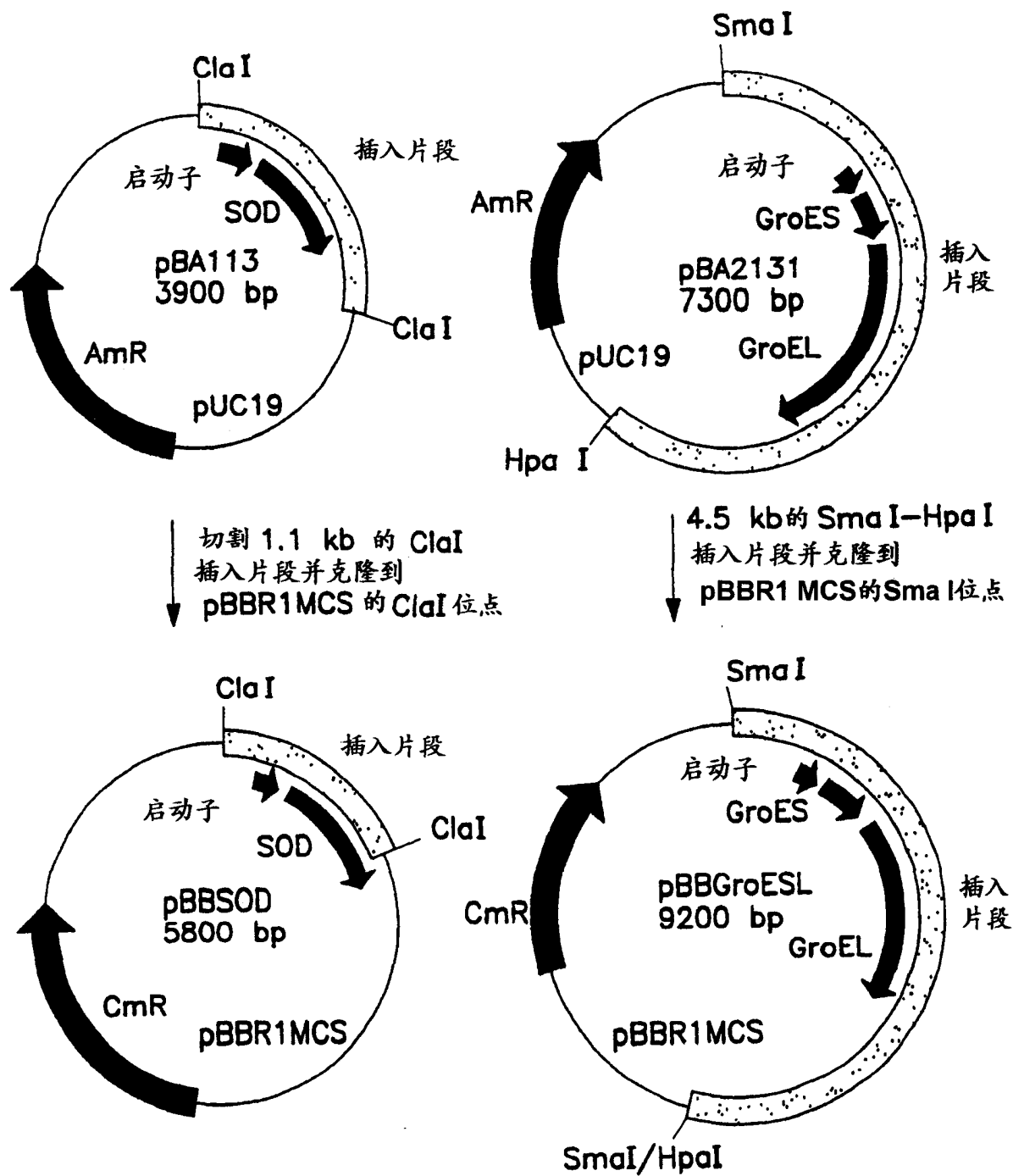


图 2A

图 2B

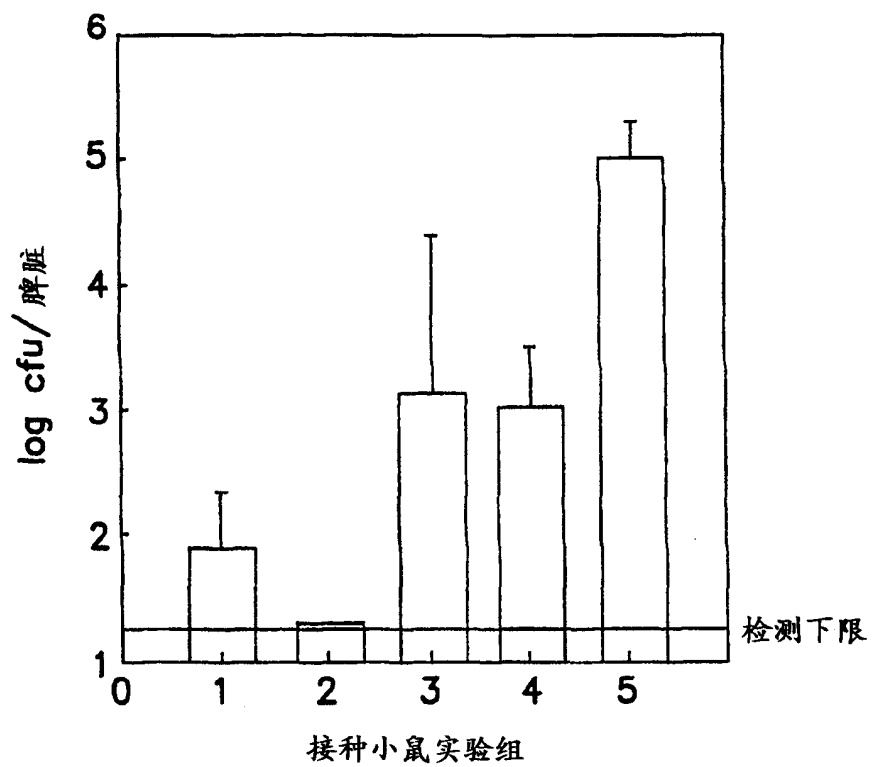


图 3

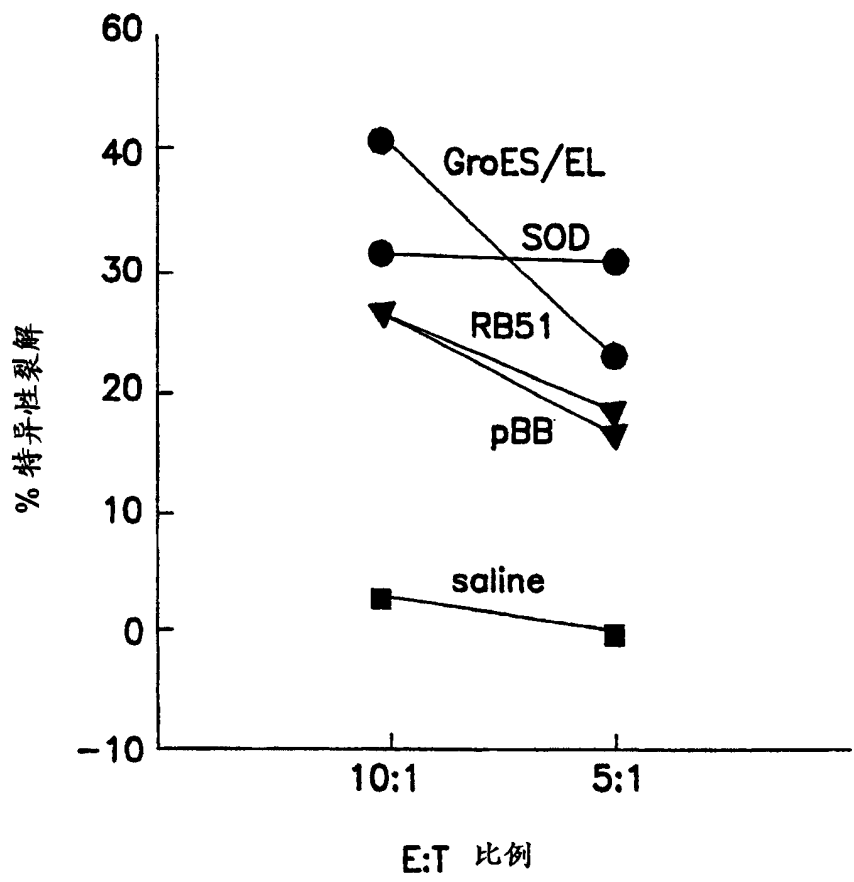


图 4