

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/79

C12N 15/34

C12N 7/00 C07K 14/01

A61K 39/42

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96107334.9

[45]授权公告日 2002年2月27日

[11]授权公告号 CN 1079832C

[22]申请日 1996.3.14 [24]颁证日 2002.2.27

[21]申请号 96107334.9

[30]优先权

[32]1995.3.14 [33]EP [31]95200609.6

[73]专利权人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72]发明人 P·A·M·范沃恩斯

K·K·康泽曼

[56]参考文献

EP 319944 1989. 1. 1 \_

WO 93/14196 1993. 1. 1 \_

审查员 孙广秀

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事  
务所

代理人 杜京英

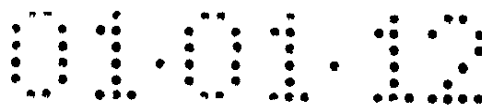
权利要求书2页 说明书19页 附图页数3页

[54]发明名称 在相同细胞中表达猪生殖呼吸综合症病  
毒多肽

[57]摘要

本发明提供了用于 PRRSV ORF3 或 ORF4 蛋白质成熟形式的重组 DNA 生产的方法。它经过以同一细胞共同表达 PRRSV ORF2, ORF3 和 ORF4 蛋白质来实现。

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



## 权 利 要 求 书

---

1. 制备猪生殖呼吸综合症病毒 (PRRSV) ORF3 或 ORF4 蛋白质糖基化形式的方法, 包含下列步骤:

a. 在 ORF2、ORF3 和 ORF4 蛋白质能够表达的条件下培养适当的宿主细胞, 该细胞已被编码 PRRSV ORF2、ORF3 和 ORF4 蛋白质的一个或多个 DNA 片段转化, 或被各含有一个或多个编码 PRRSV ORF2、ORF3 或 ORF4 蛋白质的 DNA 片段的一个或多个载体病毒感染以确保在同一宿主细胞共同表达 PRRSV ORF2、ORF3 和 ORF4 蛋白质;

b. 收获表达的蛋白质。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其特征不在于载体病毒是杆状病毒。

3. 用 PRRSV ORF2, ORF3 和 ORF4 转化的宿主细胞。

4. 含有一个或多个异源 DNA 片段的载体病毒, 其特征不在于, 该 DNA 片段编码 PRRSV ORF2, ORF3 和 ORF4 蛋白质。

5. 根据权利要求 4 的载体病毒, 其特征不在于该病毒是假狂犬病病毒。

6. 一种两个或多个载体病毒的混合物, 每个载体病毒含有一个或多个 PRRSV ORF, 所说的混合物能共同感染宿主细胞并在细胞中表达 PRRSV ORF2、ORF3 和 ORF4 蛋白质。

7. 包含编码 PRRSV ORF2, ORF3 和 ORF4 蛋白质的核酸序列的 DNA 分子, 每种 ORF 与启动子以可操纵的方式相连。

8. 糖基化 PRRSV ORF3 或 ORF4 蛋白质的内糖苷酶 H 抗性形式。

9. 一种诱导猪抗 PRRS 病毒的有效免疫反应的疫苗，其包含以根据权利要求 1 或 2 的方法产生的 ORF 蛋白质，根据权利要求 8 的 ORF3 和/或 ORF4 蛋白质，根据权利要求 4 或 5 的载体病毒或根据权利要求 6 的载体病毒的混合物以及一种药用上可接受的载体或稀释剂。

# 说明书

---

## 在相同细胞中表达猪生殖呼吸综合症病毒多肽

本发明涉及制备 PRRSV ORF3 或 ORF4 蛋白质的糖基化形式的方法,用于该方法的宿主细胞或载体病毒,编码所述 ORF3 或 ORF4 蛋白质的 DNA 分子,所说的 ORF3 或 ORF4 蛋白质的糖基化形式以及包含所说的 ORF3 或 ORF4 蛋白质的疫苗。

猪生殖呼吸综合症病毒(PRRSV)是一种新的猪疾病的病因,从 1990 年底起,它袭击了 5,000 多个北欧养猪农场。现在称作猪生殖呼吸综合症(PRRS)的这种疾病也称为神秘猪疾病。1990 年 12 月首次在德国鉴定后,在 1991 年年初问题变得越来越严重。1991 年 1 月和 2 月,该疾病传播到荷兰和比利时。也有报道蔓延到西班牙。从经济观点来看,预测该疾病的代价将会非常高昂,和 Aujeszky's 疾病差不多甚至比它更坏。

在大母猪中的基本临床症状是厌食和在受孕达 110 天后流产。对于小猪观察到除呼吸困难外的死产和/或病弱小猪的高发病率。在养肥的猪中出现慢性肺炎和死亡率升高。

为了开发保护猪以抵抗 PRRS 的疫苗或开发在猪中检测感染的诊断方法,必须鉴定、分离该疾病的病原体并使其适于作为诊断

试验中疫苗或抗原的免疫原。

常规疫苗可包含化学灭活的病毒疫苗或经修饰的活病毒疫苗。然而,灭活的疫苗需要额外免疫,具有包含佐剂的不利因素,生产昂贵且用药费力。而且,一些感染性病毒颗粒可能在灭活过程中存活并在施用到动物体后引起疾病。

一般来说,优选减毒的活病毒疫苗,因为它们诱发常以体液和细胞反应两者为基础的免疫应答。直到现在,这种以 PRRSV 病毒株为基础的疫苗仅以在巨噬细胞培养物中培养和系列传代有毒病毒株来制备。然而,由于这种处理将无法控制的突变导入了病毒基因组,导致病毒颗粒群体的毒性和免疫特性不均匀。另外,已熟知这类传统的减毒活病毒疫苗可回复突变成有毒型,引起接种的动物发病并可能将病原体传给其它动物。而且在巨噬细胞系上培养 PRRSV 病毒株非常费力从而使所得的病毒产量很低。

根据重组 DNA 技术可构建改进的疫苗(活的和亚单位疫苗)。这些疫苗可仅含有能诱发抗 PRRSV 病原体免疫应答的必须的和相关的 PRRSV 免疫原性物质或编码所述物质的遗传信息而不表现出活的或灭活的疫苗的上述不利情况。

现在已知该疾病的病原体是一种小的被膜 RNA 病毒,Wensvoort 等(*The Vet. Quarterly* 13,121-130,1991)描述了该病毒的欧洲型。Conzelmann 等(*Virology* 193,329-339,1993)和 Meulenberg 等(*Virology* 192,62-72,1993)描述了它与乳酸脱氢酶升高病毒(LDV)和马动脉炎病毒的亲缘关系,因此将该病毒放入动脉炎病毒科(Arteriviridae)的组中。

这种欧洲型的一个病毒株称为"Lelystad 病毒"(LV)以 nr. I-

1102 保藏于法国巴黎的巴斯德研究所并与荷兰 Lelystad 兽医研究中心提交的 PCT WO 92/21375 相联系。

在 EPA no.91.202,646.5 中描述了另一种欧洲病毒株,并以 nr.I-1140 保藏于法国巴黎巴斯德研究所的 Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes(CNCM)。

Conzelmann 等(*Virology* 193,329-339,1993)最近描述了这种欧洲病毒株。

Benfield 等描述了该病毒的美国型(*J.Vet.Diagn.Invest.*4,127-133,1992)。一种美国型的病毒株以 nr.VR-2332 保藏于 ATCC 并在 PCT WO 93103760 和欧洲专利申请 0529584 中提到。在该病毒发现后的早期,当 Wensvoort 等(*J.Vet.Diagn.Invest.*4,134-138,1992)根据其抗原性特征比较美国和欧洲毒株时进行了重要观察并证实欧洲和美国毒株表现出相当大的抗原性差异。

PRRSV 的两个欧洲病毒株的基因组和美国分离物的部分基因组已被分子克隆和测序 (PCT WO92/21375;Meulenberg et al.,*Virology* 192,62-72,1993;Conzelmann et al.,出处同上;Kwang et al.,*J.Vet Diagn,Invest.*6,293-296,1994;Mardassiet al.,*J.Gen.Virol.*75,681-685,1994;Meng et al.,*Proc.13th IPVS Congress*,61,1994)。

PRRSV 基因组的 RNA 包含大约 15kb 并可鉴定其中有 8 个开架阅读框(ORF),即 ORF 1A,B 和 ORF2 到 7。ORF1A,B 编码病毒 RNA 聚合酶,而 ORF2 至 6 编码病毒膜(被膜)蛋白。ORF7 编码病毒核壳蛋白。在欧洲和美国分离株中都证实在感染的细胞中存在一套同 3'末端嵌套的 6 个主要亚基因组 mRNA(Meng et al.,出处同

上)。表 1 概括了编码 PRRSV 结构蛋白质的 ORF 的特征 (Conzelmann et al., 出处同上)。

表 1

ORF	mRNA (kb)	氨基酸	计算的 MW 蛋白质(KD)
2	3.7	249	28.4
3	3.1	265	30.6
4	2.6	183	20.0
5	2.0	201	22.4
6	1.4	173	18.9
7	0.9	128	13.9

ORF 在 PRRSV 基因组中的分布如图 1 所示并与 Meulenberg 等(出处同上)的发现相对应。

对于前述 ORF 表达的 PRRSV 蛋白质知之甚少。在用欧洲或美国 PRRS 分离株接种的细胞溶胞产物中鉴定了大约 15-26KD 的 5 种病毒蛋白质(Nelson et al., J, Clin, Microbiol. 31, 3184-3189, 1993 和 Benfield et al, Proc, 13th IPVS Congress, 62, 1994)。证实 ORF7, ORF6 和 ORF5 蛋白质存在于病毒粒子中(Meulenberg et al., Virology 206, 155-163, 1995)。现在已发现 ORF3 和 ORF4 蛋白质的两种不同

形式(小型和大型)存在于被 PRRSV 感染的细胞中,但只有一种形式存在于从感染细胞上清液中分离的纯化的病毒粒子中。以其碳水化合物链的加工水平区分每种 ORF 蛋白质的两种形式。大型(存在于纯化的病毒粒子中的形式)为内糖苷酶 H(Endo-H)抗性,而小型对 Endo-H 敏感。Endo-H 酶的底物仅仅是糖蛋白的"高甘露糖基化"形式。该酶裂解紧接于同氨基酸天冬酰胺(Asn)偶联的糖基 GlcNac 之后的低聚糖链。更复杂的形式(即糖基化加工完全的形式)对 Endo-H 裂解具抗性。本文使用 Endo-H 抗性测定 ORF3 和 4 蛋白质糖基化加工的阶段并用于区分 ORF 蛋白质的小型("高甘露糖")和其大型("复合物")。肽-N-糖水解酶(PnGase-F)用于获得 ORF3 和 4 的完全去糖基化形式(多肽骨架)。发现掺入病毒粒子的 ORF3 和 4 糖蛋白质是大型("复合物"),它来自经过进一步加工的其前体小型("高甘露糖"),因此所说的大型变成 Endo-H 抗性。经 SDS-PAGE 测定的 ORF3 和 ORF4 蛋白质形式的分子量(MW)如表 2 所示。

表 2

ORF	非糖基化形式的 MW(KD)	小型 1 的 MW(KD)	大型 2 的 MW(KD)
3	26	41-44	55-60
4	15,5	32-35	40-47

1. Endo-H 敏感型

2. Endo-H 抗性型

在用单独的 ORF 转化的真核细胞中表达单独的 ORF 后发现与被病毒感染的细胞相反,仅产生 ORF3 和 ORF4 蛋白的小型形式。由于单独的蛋白质在真核细胞中不完全加工,因此,很可能蛋白质从内质网向高尔基体中央池的运输是不可能的。令人惊奇的是现在已发现为了获得 PRRSV ORF3 和 ORF4 蛋白质的大型形式,只需要在一种细胞中共同表达 ORF2,ORF3 和 ORF4 就足够了。在感染过程中,动物面临的是该蛋白质的成熟形式(大型)。因此,本发明提供了重组 DNA 制备 PRRSV ORF3 和 ORF4 蛋白质成熟大型形式的方法。

因此,本发明提供了一种用于制备 PRRSV ORF3 或 ORF4 蛋白质的糖基化形式的方法,包含在表达蛋白质的条件下培养一种合适的用编码 ORF2 和 ORF4 蛋白质的 DNA 片段转化的宿主细胞或一种用含有编码 ORF3 或 ORF4 蛋白质的 DNA 片段的载体病毒感染的宿主细胞,并收获表达的蛋白质的步骤,其特征在于同一宿主细胞同时表达 PRRSVORF2,ORF3 和 ORF4 蛋白质。

ORF2,ORF3 和 ORF4 定义为在聚合酶编码区 ORF1 下游(3'-方向)的大型蛋白质编码(部分重迭)区,由图 1 所示的显示 ORF 在 PRRSV 基因组上分布的图谱来定义。该图谱与 Meulenberg 等(出处同上)的所示相对应并认为是所有 PRRS 病毒的代表性图谱。ORF5-7 也以它们在前述图谱上的位置来限定。

具体地说,上述 ORF 的特征为 PRRSV 蛋白质的氨基酸序列分别由 Conzelmann 等(出处同上)公开的 ORF 编码。应理解对于特定的 ORF 蛋白质,在不同的 PRRSV 分离株之间可存在天然变异性。这些变异性可用在全部序列上一个或多个氨基酸的差异来证实。这

种 PRRSV 变异体的一个例子和这些 ORF 蛋白质的氨基酸序列由 Meulenberg 等(出处同上)公开。

用于本发明的 ORF 蛋白质优选与 Conzelmann 等(出处同上)公开的氨基酸序列在氨基酸序列水平上表现出至少 55% 的同源性,更优选至少 70% 的同源性。

本发明的一个基本的方面是一种和相同的宿主细胞共同表达 PRRSV ORF2,ORF3 和 ORF4 蛋白质。这可经过用包含所说 3 种 ORF 的 DNA 片段转化宿主细胞或经过用一个以上的 DNA 片段转化细胞以便所有 3 种 ORF 都导入细胞来实现。例如,可共同转化宿主细胞的 3 种 DNA 片段第一种包括 ORF2,第二种包含 ORF3,第三种包含 ORF4。

同样地,只要上述 3 种 ORF 被导入相同细胞,可用一种载体病毒或多种载体病毒来感染(共同感染)宿主细胞。

为了生产 ORF3 和 ORF4 蛋白质的大型成熟形式,尽管在宿主细胞中同时表达 ORF2,ORF3 和 ORF4 是必需的,也是足够的,但如果还需要, PRRSV 的其它 ORF 如 ORF5-7 中的一种或多种,特别是 ORF5 和/或 ORF7,可用所说的宿主细胞来共同表达。

而且,在根据本发明的方法中,所有 ORF2,ORF3 和 ORF4 都受启动子序列的转录调控以便保证所说的 ORF 得以表达。优选每个 ORF 与分离的启动子有效地相连。

用于本发明的 DNA 片段可包含各种影响复制的 DNA 序列(天然情况下, ORF 与之无关或不相连)以产生可用于转化合适宿主的所谓的重组核酸分子。这种杂交 DNA 优选来自例如质粒。可用于克隆 PRRSV ORF 的特异性载体是本领域已知的且特别包括质粒

载体,如 pBR322,各种 pUC,pGEM 和 Bluescript 质粒(也见 Rodriguez.R.L.and D.T.Denhardt,ed.,Vectors;A Survey of molecular cloningvectors and their uses, Butterworths, 1988; Lenstra, J.A.etal, Arch, Virol. 110, 1-24, 1990)。用于构建这种重组核酸分子的方法是本领域的普通技术人员已知的,特别是在 Maniatis,T 等(Molecular Cloning A Laboratory Manual;Cold SpringHarbor Laboratory,Znd edition,1989)中所阐述的方法。

合适的宿主细胞是能被编码 PRRSV ORF 蛋白质的 DNA 片段转化的细胞,它能以糖基化形式表达 PRRSV ORF 蛋白质。本文所用的"转化"指不论使用何种方法(例如直接吸收或转导)将异源核酸序列导入宿主细胞。异源核酸序列可整合进宿主基因组。为了表达异源 DNA 片段,提供了与指定宿主相配伍的且能调控插入的核酸序列表达的合适的表达控制序列。

宿主优选来源于真核生物,如酵母(例如:啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*)或高等真核细胞,例如:昆虫,植物或哺乳动物,包括 HeLa 细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。昆虫细胞包括 *Spodoptera frugiperda* 的 Sf9 细胞系(Luckow et al.,Biotechnology.6,47-55,1988)。至于在真核克隆系统中克隆和表达 PRRSV ORF 的资料可参见 Esser,K 等的著作(Plasmids ofEukaryotes,Springer,Verlag,1986)。

当宿主细胞是酵母时,有用的表达控制序列的例子包括(例如) $\alpha$ -交配因子。对于昆虫细胞,可使用多角体蛋白或杆状病毒 p10 启动子(Smith,G.E et al.,Mol.,Cell,Biot,3,2156-65,1983)。当宿主细胞是哺乳动物来源时,有用的表达控制序列的例子包括(例如)SV-40 启

动子(Berman,P,W,et al.,Science 222,524-527,1983)或(例如)金属硫蛋白启动子(Brinster,R.L.,Nature 296,39-42,1982)或热休克启动子(Voellmy et al.,Proc.Natl.Acad.Sci,USA 82,4949-53,1985)。

作为选择,合适的宿主细胞是易于被含有编码 PRRSV ORF 的 DNA 片段的载体病毒感染的细胞。在载体病毒中,异源 DNA 片段插入病毒的非必要区域,即能用于掺入所说的 DNA 片段而又不会破坏病毒感染或病毒复制所必须的那些基本功能的区域。各种病毒(包括疱疹病毒和痘病毒)的这类区域是本领域公知的。

为了获得大量的 PRRSV ORF 蛋白质,优选的表达系统是杆状病毒表达系统(BVES)。在此系统中,昆虫细胞(如 *Spodoptera frugiperda* ( Sf, IPLB-Sf21)细胞)被保持在细胞培养物中以作为杆状病毒(如 *Autographa californica* 核多角体病毒(AcNPV))的宿主。AcNPV 的有些基因高水平表达,但对病毒感染周期又不是必需的。这些基因是转染细胞中在杆状转移质粒(如 pAcAS<sub>3</sub>)和野生型(wt)AcNPV DNA 之间进行同源重组的靶基因。在 pAcAS<sub>3</sub> (J.Vlaket al.,Virology 179,312-320,1990)中异源基因插入 p10 启动子的下游,以代替非必须的 p10 基因,它被作为重组过程中靶基因的 wt AcNPV 序列包围。为了便于筛选重组子,pAcAS<sub>3</sub> 还含有 lacZ 基因,当向培养基中加入 X-gal 时,它导致重组子斑变兰。

在所要求的方法中,上面限定的宿主细胞可在最适于表达 PRRSVORF2,ORF3 和 ORF4 蛋白质的条件下进行培养。使用粗制培养物,宿主细胞溶胞产物或宿主细胞提取物的样品可制备疫苗或进行诊断试验,尽管在另一实施例中根据其所需用途可制备更纯化的 ORF3 或 ORF4 蛋白质。为了纯化产生的蛋白质,在足够的体积

中培养表达 ORF2,ORF3 和 ORF4 的宿主细胞并从这类细胞或培养基中(如果蛋白质分泌出细胞)分离产生的蛋白质。可用标准技术分离和纯化分泌到培养基中的蛋白质,例如盐分离,离心,超滤,色谱,凝胶过滤免疫沉淀或免疫亲和层析,而分离细胞内的蛋白质可通过下列方法,首先收集所说的细胞,破碎该细胞(例如经声处理或经其它机械破裂方法如 French 压碎),接着如果需要的话从其它细胞内成份中分离该蛋白质。细胞破碎也可用化学(例如 EDTA 处理)或酶方法(如溶菌酶消化)。

根据本发明的另一实施方案,提供了一种载体病毒,所说的载体病毒含有 1 个或多个外源 DNA 片段,其特征在于该 DNA 片段编码 PRRSV ORF2,ORF3 和 ORF4 蛋白质。该载体病毒在上文已作了一般性描述。该载体病毒可用于疫苗开发的新方法,即使用活的减毒病毒疫苗株作载体(病毒疫苗载体)表达外源病原体的基因。由活载体病毒表达抗原可模拟自然感染后的表达并可同时刺激体液和细胞免疫反应。这种载体可用于免疫以抵抗现在没有足够的疫苗可用或疫苗生产不安全或不容易的疾病。正如上面所概括的,发现如果应用根据本发明的载体病毒,由含有 PRRSV ORF3 或 ORF4 的载体病毒表达免疫原仅模拟自然感染。

适于同时表达 PRRSV ORF2,ORF3 和 ORF4 的病毒载体是本领域的技术人员已知的并包括痘病毒,如牛痘病毒 (Piccini and Paoletti, *Aolv. Vir, Res.* 34,43-64,1988; Riviere et al, *J. Virol.* 66,3424-3434,1992, Mengeling et al., *Arch. Virol.* 134,259-269,1994), 猪痘病毒 (Van der Leek et al., *The Vet. Record.* 134,13-18,1994), 腺病毒 (Hsu et al., *Vaccine* 12,607,1994) 和疱疹病毒,如假

狂犬病病毒。

用于本发明的优选的载体病毒来自假狂犬病病毒(PRV)。

例如,已公开了 PRV 的一些非必需区域并用于掺入外源 DNA 序列,如编码 gp50,gp63,gI,gIII,gX,11K,胸苷激酶(TK),核糖核苷酸还原酶(RR),蛋白激酶(PK)或 28K 的基因(Peeters et al.,*J,Virol*,67,170-177,1993,de Wind, N, et al., *J, Virol* 64, 4691-4696, 1990,Moorman, R.J.M.et al.,*J,Gen Virol* 71,1591-1595, 1990, Petrovskis, E,A,et al.,*Virology* 159,193-195,1987;Van Zijl,M,et al.,*J.Gen,Virol* 71,1747-1755,1990;Thomsen,D.R.et al.,*Gene* 57,261-265,1987;Keeler,C.L.et al.,*Gene* 50,215-224,1986;Whealey,M.E.et al.,*J,Virol* 62,4185-4194,1988;VanZijl,M.et al.,*J.Virol* 65,2761-2765,1991;Mettenleiter,Th.C.et al.,*Virology* 179,498-503,1990;美国专利号 4609548,欧洲专利号 0263207,欧洲专利申请号:94203643 和 PCT 申请 WO/94/01573)。

用于将 DNA 序列插入克隆载体和体内同源重组的公知方法或粘粒(cosmid)克隆技术可用于将 ORF 插入疱疹病毒基因组的非必需区(Maniatis,T.et al.,in "Molecular cloning",Cold SpringHarbor Laboratory,1989; 欧洲专利申请号 074808;Roizman,B.and Jenkins,F.J.,*Science* 229,1208,1985;Higuchi,R.et al.,*Nucleic Acids Res*,16,7351,1988,de Wind,N,et al.,*J.Virol.*64,4691-4696,1990;Voun Zijl,M,et al.,*J,Virol*,62,2191-2195,1988;Ackermann,M.,*J,Vet-Med, B.*, 35,379-396,1988,和上段描述的方法)。

编码 PRRSV ORF2,ORF3 或 ORF4 蛋白质的 DNA 片段可插入载体病毒基因组的相同或不同区域。

本发明理所当然还提供了两种或多种(优选两种或三种)载体病毒的混合物,所说的混合物能在体内共同感染宿主细胞以使相同细胞能在体内同时表达 PRRSV ORF2,ORF3 和 ORF4 蛋白质。该混合物也可用作疫苗的活性成份。如果混合物含有两种载体病毒,那么一种病毒含有上述三个 ORF 中的两个,第二种病毒含有第三个所需的 ORF。如果混合物含有三种载体病毒,那么,每种病毒含有所需 ORF 中的一种。如果需要的话,混合物中的一个或多个载体病毒可含有 PRRSV 的 ORF5-7 中的一个或多个。

优选的是掺入所说混合物中的载体病毒来自 PRV 疫苗病毒,优选使用基因型是 gD<sup>-</sup> (如果需要可为 gD<sup>+</sup> 表型)和/或 gE<sup>-</sup> 的 PRV 病毒株(PCT 申请 WO94/01573,EP 申请号,94203643)。

根据本发明的载体病毒或掺入上述混合物的载体病毒可经过培养用载体病毒感染的宿主细胞来制备,然后任选以纯化的形式收集含病毒的细胞和/或生长于细胞中的载体病毒,任选以冻干的形式掺入疫苗中或用于诊断试验。

本发明还提供了含有编码 PRRSV ORF2,ORF3 和 ORF4 蛋白质的核酸序列的 DNA 片段,其中编码所说蛋白质的每种 ORF 与启动子以可操纵的形式相联。这种 DNA 片段可用于制备上面限定的宿主细胞或载体病毒。

本发明的范围还包括纯化的 Endo-H 抗性 PRRSV ORF3 或 ORF4 蛋白质。Endo-H 抗性 ORF3 或 ORF4 蛋白质的一种优选的形式分别具有 55-60KD 或 40-70KD 的分子量。

这些 Endo-H 抗性 ORF 蛋白质可以基本纯化的形式提供,它不含天然情况下与其正常相联的 PRRSV 物质,或以根据本发明的方

法获得的 PRRSV 蛋白质的混合物形式提供。

而且,本发明提供了可诱导猪抗 PRRS 病毒的有效免疫反应的疫苗。该疫苗可以是一种亚单位疫苗,它包含根据本发明的方法生产的 ORF3 和/或 ORF4 蛋白质以及药学上可接受的载体或稀释剂。

作为选择,所提供的载体疫苗包含根据本发明的载体病毒或上面限定的载体病毒与药学上可接受的载体或稀释剂的混合物。

例如,疫苗也可含有一种含水介质或含水悬液,例如通常可与其它组份混合,以便增加活性和/或存储期。这些组份可以是盐,pH 缓冲液,稳定剂(如脱脂乳,酪蛋白水解产物或柠檬酸)或防腐剂(如 thimerosal,硫柳汞和庆大霉素)。

如果需要,根据本发明的疫苗可与一种或多种佐剂配制。合适的例子是皂苷(例如 Quil A),氢氧化铝,霍乱或破伤风类毒素,油乳剂(o/w 或 w/o)和含水维生素 E 分散体。

根据本发明的疫苗可以常规主动免疫方式用药,以与剂量形式相匹配的方式和以预防和/或治疗上有效的和致免疫的量一次性或重复用药。疫苗的用药可经过,例如皮内,皮下,肌肉内,腹膜内,静脉内,鼻内或口服方式进行。

本发明还涉及"免疫化学试剂",该试剂包含根据本发明的方法产生的 PRRSV ORF3 或 ORF4 蛋白质中的至少一种。

术语"免疫化学试剂"指所说的蛋白质结合到合适的支持物上或被提供了一种标记物质。

例如,可使用的支持物是微量试验孔或小池的内壁,试管或毛细管,膜,滤纸,试纸或颗粒的表面,如:乳液颗粒,红细胞,染料溶胶,金属

溶胶或以胶体颗粒存在的金属化合物。

合适的标记物质特别是放射活性同位素,荧光化合物,酶,染料溶胶,金属溶胶或以胶体颗粒存在的金属化合物。

在诊断试验中可使用"免疫化学试剂",其中所说的试剂与怀疑含有抗-PRRSV 抗体的样品保温,然后确定是否存在该抗体。

本发明还涉及用于免疫试验的试验试剂盒,该试剂盒含有至少一种根据本发明的免疫化学试剂。

使用该试剂盒发生的免疫化学反应优选夹心反应,凝集反应,竞争反应或抑制反应。

### 实施例 1

#### 以牛痘病毒在同一细胞中瞬时同时表达 PRRSV ORF

来自 PRRSV 的 cDNA 克隆 pRRSV-T1 的制备和分析在 Conzelmann 等(出处同上)的文章中进行了描述。含 PRRSV 整个 ORF 并起始于接近各自 ATG 起始密码子的片段经 Klenow 聚合酶处理后克隆到载体 pBluescript SKII-(Stratagene)T7 启动子下游的 EcoRV 限制性位点(ORF2 和 5)或 SmaI 限制性位点(ORF3 和 4)。插入片段含下列 PRRSV-T1 序列残基(Conzelmann 等,出处同上):

ORF2:(EcoR I-NdeI,Klenow 补齐) 1602-2381

ORF3:(HTnclI-Hinfl,Klemow 补齐) 2207-3040

ORF4:(BstYI-SpeI,Klenow 补齐) 2673-4920

## ORF5:(BstXI-HindIII,Klenow 补齐),3304-3954

用表达 T7 RNA 聚合酶的 vTF7-3(Fuerst et al.,1986,PNAS 83,8122,8126)以 5 m.o.i 感染后在 BHK-21(仓鼠幼肾)细胞,克隆 BSR 中进行转染实验。根据厂商的说明书使用 Stratagene"哺乳动物转染试剂盒"用 2  $\mu$ g 质粒转染感染后 1 小时的细胞。

转染后用无甲硫氨酸的培养基洗涤细胞 4 小时。饥饿 30 分钟后,每培养皿加入 50  $\mu$  Ci Tran(35S)-标记物并将细胞在 37  $^{\circ}$ C 下培养 24 小时。用 PBS 洗涤细胞,在 1% Triton 中溶胞并以 95  $^{\circ}$ C 和 2% SDS 变性蛋白质。

用抗 ORF4 单克隆抗体(mab35)沉淀粗制蛋白质样品并根据 Kessler(Methods Enzymol,73,442-459,1981)的方法固定金黄色葡萄球菌细胞。离心收集免疫复合物。所得的沉淀重悬于 30  $\mu$  l Laemmli 样品缓冲液中并在 95  $^{\circ}$ C 下培养 5 分钟。离心后,在 SDS-10%聚丙烯酰胺凝胶上分析上清液。固定凝胶,用 En 3 Hance 浸渗,在 Whatman 3MM 滤纸上干燥并在 -70  $^{\circ}$ C 下用 Kodak x-AR5 胶片曝光。

用 Endo-H 对表达的蛋白质去糖基化可按如下方法进行:将已沉淀和洗过的免疫复合物重悬于 NEB 缓冲液(New England Biolabs)中。加入 1.5 单位的 Endo-H 并将样品在 37  $^{\circ}$ C 保温 16 小时,接着重悬于 30  $\mu$  l Laemmli 样品缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

在第一次实验(图 2)中进行一些 ORF 组合的共同表达。证实 ORF2,ORF3 和 ORF4 的共同表达是必需的,并足以支持成熟大型 ORF4(40-47KD)的表达。为了证实观察到的 ORF4 蛋白质分子量形

式与在病毒粒子中所存在的相似,在不同组合的表达产物中用 Endo-H 进行了去糖基化实验(图 3)。表明只有用 ORF2,ORF3 和 ORF4 共同转化的细胞表达 ORF4 蛋白质的大型形式且这些大型形式对 Endo-H 处理具有抗性。

## 实施例 2

### 表达 PRRSV ORF2,3 和 4 的 PRV 载体

#### 病毒混合物

构建 PRV gD<sup>-</sup> 和 gE<sup>-</sup> 载体病毒。

将 PRV NIA-3 菌株的含 gD 的 PstI NcoI 片段亚克隆进 PGEM5ZF(+)载体中。用 Transformer<sup>TM</sup> 方法(clonetech)导入 SpeI 和 AvrII 限制性位点。在 gD ATG 起始密码子上游 17 个核苷酸处导入 SpeI 位点。在 TAG 终止密码子之后的第一个核苷酸处导入 AvrII 位点。导入这些突变后,用 SpeI 和 AvrII 经限制性酶消化去掉全部 gD 基因。在以前的 gD 位置插入含 SpeI, EcoRI, EcoRV, HindIII 和 AvrII 限制性位点的寡核苷酸。然后从质粒中分离 PstI-NcoI 片段并用于以 Peeters 等(J,Virology 66,894-905,1992)所述的方法与 PRV R1 菌株进行同源重组(de Wind et al.,J,Virology 64,4691-4696,1990)。

为了获得 gD<sup>-</sup>和 gE<sup>-</sup>阴性突变体,用含 gD<sup>-</sup>缺失的 NdeI-StuI 片段置换 PRV Hind III-B 片段中的 NdeI-StuI 片段。这个 HindIII 片段也含有包含 gE 的缺失(从 6831 位的 DraI 位点到突变体 324 的 8562 位的连接子插入位点(de Wind et al.,1990,出处同上))。然后,经过与野生型粘粒 c-179,c-27 和 c-443 重组将所得的质粒用于产生

gD-,gE-病毒(Van Zijl et al.,J,Virology 62,2191-2195,1988)。

构建表达 PRRSV ORF2,3 和 4 的 PRV gD 突变体。

将每个 ORF 单独插入上述假狂犬病 gD-,gE-载体 D57 中。下列方法可用于得到重组病毒,通过使用聚合酶链式反应特异地扩增 ORF,然后将扩增的产物克隆进 pCR<sup>tm</sup> II 载体中。接着从该载体中分离 ORF 并克隆进转移载体 pDH  $\beta$  中。再将该载体用于将 PRRSV ORF 转移进 PRV D57 菌株的病毒基因组中。

### PRRSV ORF 的 PCR 扩增

为了扩增特异性 ORF,使用相应于 PRRSV 序列的下列引物对:

ORF2:上部引物;包含核苷酸 1609-1628,

下部引物;包含核苷酸 2351-2370 的互补序列。

ORF3:上部引物;包含核苷酸 2211-2230,

下部引物;包含核苷酸 3025-3044 的互补序列。

ORF4:上部引物;包含核苷酸 2747-2766;

下部引物;包含核苷酸 3296-3315 的互补序列。

涉及 PRRSV 序列的所有核苷酸号由 Conzelmann 等(Virology 193,329-339,1993)提供。

以下面方法从含有 PRRSV 全部结构基因的质粒(pPRRSV)扩增 ORF:

经过加入 5  $\mu$  l(10X)PCR 缓冲液(购自酶供应者),5  $\mu$  l(2mM)dNTP,5  $\mu$  l(10  $\mu$  M)上部引物,5  $\mu$  l(10  $\mu$  M)下部引物,0.2U SuperTaq (Sepharo Q),1  $\mu$  l(1  $\mu$  g/ $\mu$  l)pPRRSV 并加水至总体积

为 50  $\mu$  l 来制备 PCR 混合物。在混合物顶部加上一滴矿物油后, 使用在 94  $^{\circ}$ C 下 1 分钟, 55  $^{\circ}$ C 1 分钟和 72  $^{\circ}$ C 1 分钟的循环达 30 次来进行 PCR。扩增后, 可在含 0.5  $\mu$  g/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上观察产物。

#### 克隆扩增的 ORF:

使用 Invitrogen TA 克隆试剂盒将扩增产物克隆进 pCR<sup>tm</sup> II 载体。按照厂商说明书进行全部程序。将 ORF 从该载体克隆进转移载体 pDH  $\beta$ 。经 BamHI 消化从载体中切下以正确方向克隆的 PCR 产物(ORF 的 ATG 起始密码子位于 pCR<sup>tm</sup> II 载体 T7 启动子一侧), 接着用 Klenow 处理产生钝端, 然后用 xbaI 消化。在 1% 琼脂糖凝胶上分离产物, 根据厂商说明书用 GeneClean 从凝胶上纯化含 ORF 的带。首先用 EcoRI, 接着用 xbaI 消化载体, 在凝胶上分离, 使用 GeneClean 纯化线性载体。使用 T4 连接酶将含 ORF 的所有片段连接到线性化载体上。所有酶都购自 Pharmacia, 所有方法使用标准技术(Current Protocols in Molecular Biology)进行。

#### 含 PRRSV 插入片段的 PRV 突变体的产生:

在补充 gD 的 Vero 细胞上培养 gD 和 gE 基因缺失的 PRV 病毒(D57 株)。在 CPE 最高时收获病毒并根据标准技术提取其 DNA。利用位于正规 gD 座的单一 EcoRI 位点以 EcoRI 裂解病毒 DNA。用 MluI 使含 PRRSV 插入片段的 pDH  $\beta$  载体线性化。根据厂商说明书线性化质粒和切开的病毒 D57 DNA 与 DOTAP(Boehringer Mannheim)混合。在总体积为 500  $\mu$  l 的 20mM HEPES 缓冲液中将总共 5  $\mu$  g DNA 与 10  $\mu$  l DOTAP 混合。对于 DNA, 使用的摩尔比率为 10 拷贝的质粒 DNA 对 1 拷贝的病毒 DNA。混合物在已去掉

培养基的补充 gD 的 Vero 细胞 80% 汇合的单层上 37 ℃ 培养 6 小时。经过这段培养期之后加入培养基, 平板在 37 ℃ 进一步培养。在 CPE 最高时收获培养基。最后, 以有限稀释法从收获的培养基中分离重组病毒, 并使用免疫荧光以插入的 PRRSV 基因的表达来鉴定之。制备表达 ORF2,3 和 4 的载体病毒混合物并用于免疫猪。

附图说明:

图 1:

开架阅读框在测定的 PRRSV 序列中的分布和亚基因组 mRNA(sgmRNA, 方框代表先导 RNA) 的位置。

图 2:

瞬时表达 PRRSV ORF 的放射免疫沉淀。在 10% SDS-PA 凝胶上分离表达的蛋白质。左侧泳道含标记物(M)蛋白质。其他泳道表示用顶端提及的 ORF 转化的宿主细胞表达的标记蛋白的电泳情况。

图 3:

与图 2 相同。用 Endo-H(EH)处理的其它的一些表达产物。

# 说明书附图

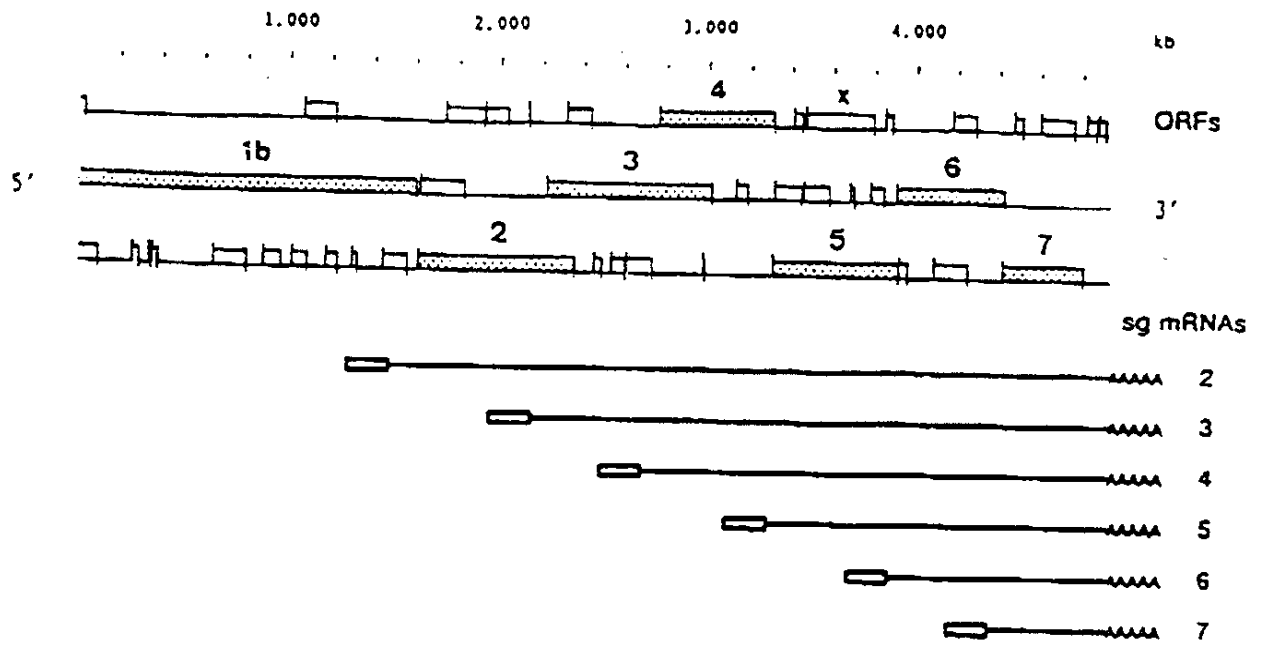


图 1

	2			2	2		2
		3		3		3	3
	4	4	4	4	4	4	4
M			5		5	5	5

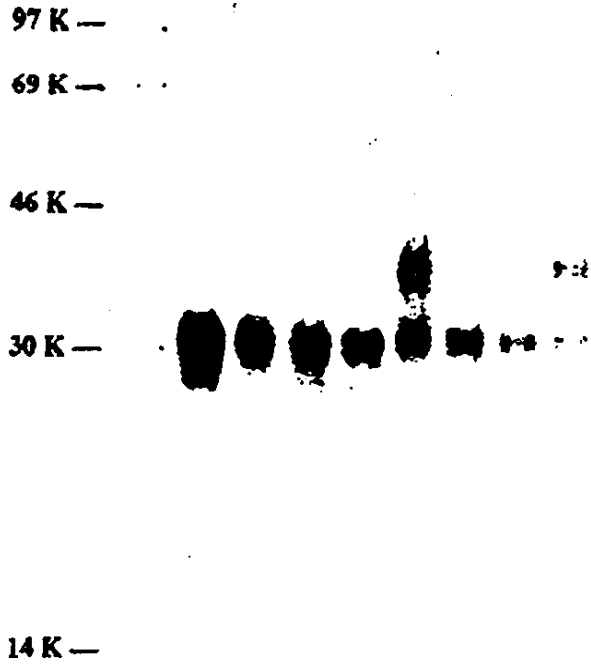


图 2

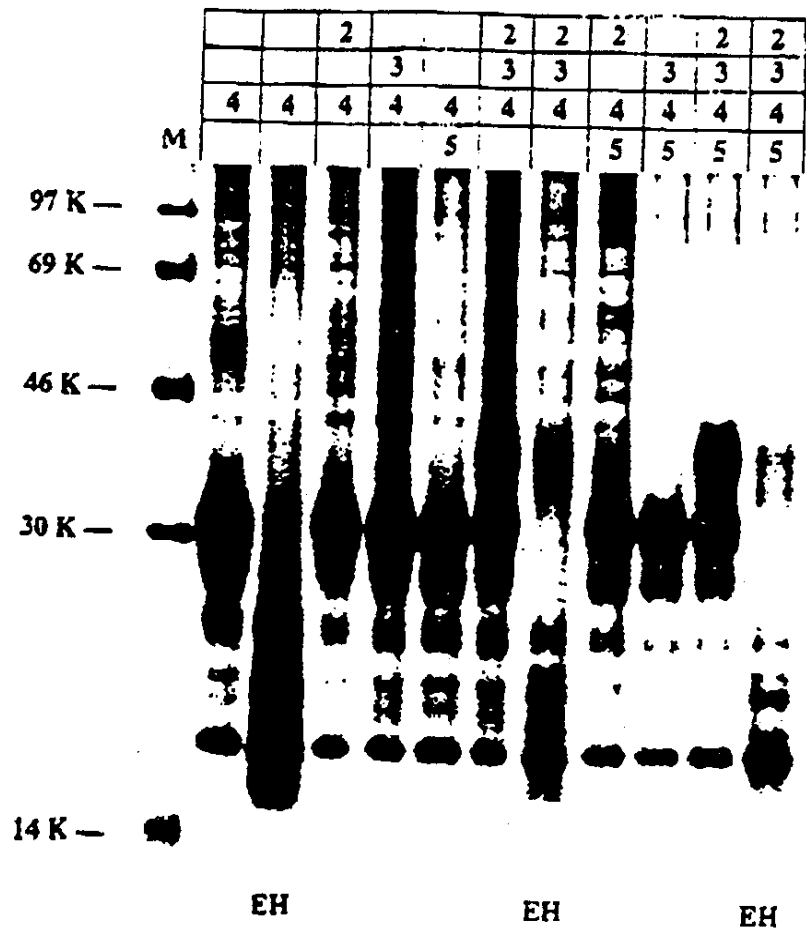


图 3