

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/245

A61K 39/205 A61P 31/12



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 93108005.3

[45] 授权公告日 2003 年 10 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1124159C

[22] 申请日 1993.7.9 [21] 申请号 93108005.3
[30] 优先权
[32] 1992. 7. 9 [33] EP [31] 92202096.1
[71] 专利权人 阿克佐公司
地址 荷兰阿纳姆
[72] 发明人 伯纳德斯·彼得勒斯·休伯特斯皮特斯
简·玛丽亚·安东尼 厄斯波
阿诺德·伦纳德·约瑟夫·吉尔肯斯
罗伯特斯·雅各布斯·玛丽亚·穆尔曼
[56] 参考文献
CN1049519A 1991.02.27 C12N15/10
CN86105450A 1987.03.04 A61K39/245

审查员 王朋飞
[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 程 伟

权利要求书 1 页 说明书 38 页 附图 3 页

[54] 发明名称 一种含有伪狂犬病病毒突变株的疫苗

[57] 摘要

本发明涉及到一种预防和控制动物疾病的疫苗，其中具有糖蛋白 gp50 和 gp50 突变基因的一株伪狂犬病病毒。该疫苗适用于伪狂犬病 (Aujeszky's disease 或 Pseudorabies)，或当它是插入编码某种动物病抗原的同源基因突变株，可用于防制上述相应的动物病。此株伪狂犬病病毒可在其一个其它基因，如 gp63 或 gI 基因中，至少可再增加一个突变。此疫苗不会由免疫动物传播到非免疫动物。

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

1、伪狂犬病病毒 gp50 突变株在制备抵抗人和动物疾病的疫苗中的应用，所述突变株仅能通过病毒诱导的细胞间传递的方式进行扩散，并产生非感染性子代病毒粒子。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其中所述的应用是制备一种抗 Aujeszky 氏病疫苗的应用。

3、如权利要求 1 所述的应用，其中经过将编码一种来自于另一种病原体的抗原或部分抗原的核苷酸序列整合入所述的突变株来制备一种抵抗人或动物疾病的载体疫苗。

4、如权利要求 1 所述的应用，其中经过将编码有来自另一种病原体的抗原或部分抗原的至少一个基因整合入所述的突变株来制备抵抗动物除 Aujeszky 氏病以外疾病的疫苗。

5、一种预防和 / 或控制动物疾病的疫苗，它包含含有糖蛋白 gp50 的伪狂犬病病毒并在其 gp50 基因中有一个突变。

6、如权利要求 5 所述的用于预防和 / 或控制 Aujeszky 氏病的疫苗，其中所述的突变为缺失。

7、如权利要求 5 所述的用于预防和 / 或控制至少一种动物疾病的疫苗，其中所述的突变为一个包含编码对应于所述动物疾病的抗原的异源基因的插入。

8、如权利要求 5 至 7 任一项所述的疫苗，其中伪狂犬病病毒另外在其它基因如 gp63 基因或 gI 基因上还有至少一个突变。

一种含有伪狂犬病病毒
突变株的疫苗

本发明涉及伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus - PRV) 条件性致死突变株。PRV 又称 Aujeszky 氏病病毒 (Aujeszky's disease virus - ADV)。PRV 是一种高度亲神经性疱疹病毒, 可使家养和野生动物患伪狂犬病 (参阅 Mettenleiter, Comp. Immu. Microbiol. Infect. Dis. 14. 151 - 163 [1991]; Wittmann and Rziha, in [G. Wittmann ed.] Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, Kluwer, Boston, 230 - 325 [1989]; Pensaert and Kluge, in [M. B. Pensaert ed.] Virus infections of porcines, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 39 - 64 [1989])。猪对 PRV 是相对地抵抗, 因此认为它是此病毒的自然宿主。病原自然入侵门户是鼻咽部, 病毒可在鼻咽部粘膜细胞中复制。病毒感染外周神经后可转移到中枢神经系统, 此时会导致严重的脑炎, 常常致死仔猪。成年猪感染后通常可以存活, 但有发热及肺炎症状。感觉神经节的感染通常导致潜伏状态。

抗 Aujeszky 氏病免疫接种的应用可以减少由于感染动物死亡和生长抑制所带来的经济损失。为此, 用

致弱活毒疫苗和灭活病毒疫苗进行免疫接种是有效的。一般更愿意选择致弱活毒疫苗，这是由于其容易生产，价格亦比灭活病毒疫苗便宜。此外，致弱病毒活疫苗可以经鼻内接种，较之使用致弱病毒活疫苗或是灭活病毒疫苗经非消化道途经免疫能产生更好的保护力。

早期疫苗所使用的致弱活病毒毒株是通过在细胞培养物上连续传代所获得的，因而具有一些严重的缺陷，这些疫苗是不纯的，其中混有不知毒力及免疫原性的变异株，另外这些疫苗还存在着毒力返强的危险。近来随着对病毒结构及复制分子水平方面知识的增长和精细的分子生物学技术的应用，使科学家能够设计出致弱的疫苗而不仅是依机会来得到。通过病毒遗传学及DNA序列分析，可以识别病毒基因组中的特殊区域，这些区域中的改变能导致病毒致病性的减弱。利用重组DNA技术可以使这些区域改变或缺失，以得到具有确切及稳定改变的致弱病毒。Kit及其同事首先在PRV的致弱上成功地使用了这一方案（Am. J. Vet. Res. 46, 1359-1367 [1985]）。PRV胸苷激酶（thymidine-kinase, TK）基因的灭活可导致此病毒对猪的毒力大大减低（EP-A-141.458）。除了TK基因的改变，在糖蛋白基因中，如gI, gIII和gX已被导入缺失（Kit et al., Am. J. Vet. Res. 48, 780-793 [1987]；Marchioli et al., Am.

J. Vet. Res. 48, 1577-1583 [1987]; Quint et al., J. Gen. Virol. 68, 523-534 [1987]; Moormann et al., J. Gen. Virol. 71, 1591-1595 [1990]; WO-A-(102795) 导致了病毒力进一步减弱, 并且能从血清学上分辨出免疫动物和感染动物 (Platt et al., Vet. Microbiol., 11, 25-40 [1986]; Van Oirschot et al., J. Gen. Virol. 67, 1179-1182 [1986]; Van Oirschot et al., J. Virol. Meth, 22, 191-206 [1988]; Eloit et al., Vet. Rec. 128, 91-94 [1989])。

疫苗研究的一个新方案是把活弱毒疫苗毒株作为载体(病毒疫苗载体)使外源病原基因得到表达。活载体病毒所表达的抗原类似于自然感染后的表达, 将会激发体液和细胞免疫应答。疫苗载体可能用于目前尚无合适的疫苗或不能够安全地、便于生产疫苗的那些疾病的免疫接种。

疫苗载体的研究主要集中在痘苗病毒上 (Moss and Flexner, Ann. Rev. Immunol. 5, 305-324 [1987]; Piccini and Paoletti, Adv. Virus Res, 34, 43-64 [1988])。痘苗病毒曾广泛使用, 根除了人类天花, 表现了很高的效力并相当安全。疫苗病毒有着广泛的宿主范围及容纳大段外源 DNA 的能力, 因而已被选作疫苗载体试验 (

Hruby, Clin. Microbiol. Rev. 3, 153-170 [1990] ; Tartaglia et al., Crit. Rev. Immunol. 10, 13 [1990])。如痘苗病毒一样, 其他痘病毒如浣熊痘病毒、禽痘病毒、绵羊痘病毒和猪痘病毒也已作为疫苗载体进行研究 (Taylor et al., Vaccine 6, 504-508 [1988] ; Lodmell et al., J. Virol. 65, 3400-3405 [1991] ; Letellier et al., Arch. Virol. 118, 43-56 [1991])。

其它被用作疫苗载体的病毒还有腺病毒 (Berker, BioTechniques 6, 6003-6020 [1988]) 和疱疹病毒 (Shih et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5867-5870 [1984] ; Thomsen et al., Gene 57, 261-265 [1987] ; Lowe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 3896-3900 [1987] ; Cole et al., J. Virol. 64, 4930-4938 [1990] ; van Zijl et al., J. Virol. 65, 2761-2765 [1991] ; Kit et al., Vaccine 9, 564-572 [1991])。安全有效的疱疹病毒活疫苗的获得及容纳大片段外源 DNA 的能力, 使这些病毒成为研究疫苗载体有吸引力的选择对象, 使用 PRV 作为疫苗载体是很有希望的。PRV 已被很好地鉴定, 通过定位缺失 (targeted deletions) 已研究出安全有效的活疫苗 (见上述参考文献)。该病毒有广

泛的宿主范围，但对人类无害。将 PRV 作为有效的载体近来已由 Van Zijl et al 验证 (J. Virol. 65, 2761-2765 [1991], WO-A-(100352)。他们指出表达猪瘟疫外膜糖蛋白 E1 的 PRV 重组体既可以抗伪狂犬病又可抗猪瘟 (classical swine fever—古典猪瘟)。

疫苗最重要的特征之一是其安全性。由于常规致弱后疫苗导致其表型改变的精确分子变化是未知的，因此其毒力仍经常有机会返强，这一类可以通过带确切而稳定缺失的重组疫苗加以解决。尽管并非不可能，但有时构建稳定的致弱疫苗是非常困难的。在此情况下，人们只能依靠使用灭活疫苗或使用安全的疫苗载体，经过适当地制备与测试，活的致弱缺失疫苗和疫苗载体对免疫适格 (immunocompetent, 即在抗原性攻击后能发生免疫应答的能力) 宿主通常是安全的，但对免疫致损害 (immunocompromized) 宿主则会引起严重的并发症。因为致弱活疫苗和疫苗载体能够复制，它们会在环境中散播从而可能威胁到免疫致损害宿主。另外，对目标种使用安全的疫苗而对其他种动物可能仍具有毒力。

与疫苗载体整合的目标基因通常编码具有高度免疫原性的病毒结构蛋白，这些蛋白包括病毒糖蛋白、融合蛋白 (fusion proteins) 和血凝素—神经氨酸苷酶 (Hruby, Clin. Microbiol. Rev. 3, 153-170 [1990])。这些蛋白通常参与病毒—细胞相互

作用，决定宿主一和/或细胞一病毒的趋向性。因此，由载体病毒表达的上述基因，在理论上可以改变它的生物特性，如致病性、组织趋向性和宿主特异性，进而通过同源重组，这些改变了的生物学特性可能会由致弱的载体病毒转为有毒力的野生型病毒。

上述种种情况要求活疫苗和疫苗载体是自身限定的，例如接种痘苗者是不会将痘苗毒传播的。理想的是，一种疫苗将产生非感染性的子代，而且与相应的野生型病毒重组后不会产生感染性的病毒。以下我们将阐述满足这些条件的一项发明。

本发明提供条件致死性伪狂犬病病毒 (PRV) 突变株，可用于免疫预防 Aujeszky 氏病，也可用作安全的载体疫苗。本发明的毒株不能够表达 gp50，这是一种病毒的外膜蛋白，是病毒感染性的必要条件。通过插入一段外源寡核苷酸，或者造成缺失，或是两种均有(置换)的方法而使 gp50 基因灭活，尤其是插入一段含有在三个阅读框架中均有翻译终止密码子的人工合成寡核苷酸，或者含有 pg50 基因和 gp63 基因部份的 PRV 基因组的部分缺失，而使 gp50 基因灭活。该变异病毒在一株可表达病毒 gp50 基因的互补细胞系 (Complementing cell line) 中生长，用这些细胞产生的子代病毒粒子在表型上是完整的，它们拥有该互补细胞系提供的 gp50。这些表型完整的突变株病毒粒子可以在体外或体内感染细胞、能够复制并通过细胞间而直接扩散。但由感染细胞释

放的子代病毒粒子是非感染性的，因为它们缺少 gp50。又因为它们不能开始一个新的感染周期，这些病毒不能够由免疫接种动物传播到非接种动物。这一限定使得依赖于这些病毒的（载体）疫苗非常安全。

继之，本发明还涉及为制备抵抗动物疾病的疫苗或者抗伪狂犬病疫苗，或者采用把编码其它相关病原的抗原或部分抗原核苷酸序列整合到上述突变株以制备抗其它动物病的疫苗载体的伪狂犬病毒 gp50 突变株的使用。

本发明进一步涉及到控制动物病的一种疫苗，这种疫苗是由含有糖蛋白 gp50，并在 gp50 基因中有一个突变的伪狂犬病病毒所组成。疫苗如作为抵抗伪狂犬病，在此突变是缺失。如作为抵抗其它动物疾病，则此突变是插入一个包含编码由上述其它动物疾病作为病原抗原或部分抗原的异源核苷酸序列。伪狂犬病病毒可能通过在其基因组中包括其它突变以改变其毒力，或表达其它蛋白，例如在 gp63，gI，gIII，gX，11K，胸苷激酶（TK），核糖核苷酸还原酶（RR），蛋白激酶或28K基因中缺失或/和插入，特别是其 gI 和 gp63 基因。

本发明涉及到 PRV gp50 突变株，以毒株 R122，R332，D560 和 D1200 作为范例（见图1）。毒株 R122 和 R332 不能表达有作用的 gp50，而毒株 D560 和 D1200 不能表达有作用的 gp50 或有作用的 gp63，因为 gp50 是病毒入

侵的基本条件。这些突变体生长在可表达 gp50 的互补细胞系中，尽管所有的毒株都可以在非互补的细胞系中完成一个完整的复制周期，但因为缺少 gp50，这些细胞释放出来的子代病毒粒子是非感性的。观察到 gp50 突变株在非互补细胞系中能产生蚀斑的结果，表明该病毒可以由感染细胞向非感染细胞传播。

按照 de Wind et al 描述的方法，将一为人工合成的具有序列 5' - TAGGCTAGAATTCTAGCCTA - 3' (SEQ ID No 1) 的寡核苷酸插入质粒 pN3HB 的 gp50 基因两个不同位点上，该寡核苷酸含有一个 EcoRI 限制性位点 (GAATTC) 和全部三个阅读框架的翻译终止密码子 (J. Virol. 64, 4691-4696 [1990]) (见图1)，从而获得了 PRV R122 和 R332 毒株。质粒 pN3HB 是由质粒 pR322 克隆出的 PRV 的 Hind III - B 片段组成的 (Van Zijl et al., J. Virol. 65, 2761-2765 [1988])。于 gp50 基因核苷酸位点 366-367，以及 996-997 之间插入了寡核苷酸所产生的质粒分别被命名为 R1 和 322。我们使用 PRV 毒株 Rice 的 gp50 核苷酸序列的序数 (图2, Petrovskis et al., J. Virol. 59, 216-223 [1986])，应该注意到，PRV 毒株 NIA-3 与 Rice 毒株的 gp50 基因核苷酸序列在位点 364 不同 (G→A)，致使 NIA-3 毒株的 gp50 基因上具有了一个 BglII 限

制性位点。

病毒基因组的构建使用重叠重组 (Overlap recombination) (Van Zijl et al., J. Virol. 65, 2761-2765 [1988]), 使用了一个诱变处理的片段 (R1或322) 以及三个由粘粒 (cosmid) 重组子 c-179, c-27 和 c-443 得到的三个重叠的亚基因组野生型 PRV 片段, 同时含有完整病毒基因组。重叠重组是在基本上表达 gp50 的互补细胞系 (G5 细胞系) 中完成的 (Peeters et al, J. Virol. 66, 894-905 [1992]), 获得的病毒分别被命名为 R122 和 R332 毒株。

为得到毒株 D560, 我们使用了质粒 322 (见上) 以及另一个被命名为149的质粒 pN3HB 衍生物 (de Wind et al., J. Virol. 64, 4691-4696 [1990], 是在 pN3HB 的 gp63 基因的核苷酸 352-353 之间插入了寡核苷酸 (序码依照图5, Petrovskis et al., J. Virol. 60, 185-193 [1986]) (见图1)。用质粒322的 Bgl II - Eco RI 片段置换质粒149 的 Bgl II - EcoRI 片段, 得到新质粒的 gp50 基因 996 位点以及 gp63 基因353位点之间的核苷酸序列即被 SEQ ID No 1 序列所替换, (例如诱变寡核苷酸序列), 这一质粒与野生型重叠片段一同被用来在 G5细胞中重叠重组成新病毒, 该病毒株命名为 D560。

为得到 D1200 毒株, 用限制性酶 Bgl II 和

EcoRI 消化质粒 149, 所得到的大片段, 在其末端经 *E. coli* DNA 聚合酶I Klenow 片段处理后, 以T₄ DNA 连接酶环化, 所得质粒的 gp50 基因336位点与 gp63 基因353位点之间的核苷酸序列被序列 AATTCTAGCCTA (SEQ ID No 2; 例如诱变寡核苷酸的残端) 置换, 这个质粒与重叠野生型片段一同被用来在 G5 细胞中重叠重组成新病毒, 该病毒命名为 D1200。

gp50 突变株 R122 和 R332, gp50+gp63 突变株 D560 和 D1200 能在非互补 SK6 细胞上产生蚀斑。R122 株和 R332 株在 SK6 细胞中产生的蚀斑的大小与野生型亲代毒株 NIA-3 相似, 而 D560 和 D1200 毒株在 SK6 细胞上所产生的蚀斑则较小, 这表明 gp63 参与了 PRV 的复制周期。

虽然细胞间的传递传播并不依赖 gp50, 但是并不期望 gp50 突变株病毒在动物体内明显的复制。病毒的毒力通常是在感染的初始位点上复制后, 继之子代病毒粒扩散到身体其他部位, 并通过多重感染循环而大量增殖。因为 gp50 突变株仅仅能够在感染的初始位点上复制, 我们期望这些突变株没有毒力。此外, 这些突变株是否具有免疫原性是有疑问的, 因为已有证据表明 gp50 可以在猪体内引起保护性免疫应答, gp50 本身是具有高度免疫原性的 (Marchioli et al., J. Virol. 61, 3977-3982 [1987]; Mukamoto et al., Vet. Microbiol. 29, 109

-121 [1991] ; Riviere et al., J. Virol. 66, 3424-3434 [1992]。这样, gp50 的灭活将严重降低 gp50 和 gp50+gp63 突变株的免疫原性。同样我们也不期望突变株病毒会到达中枢神经系统, 因为这既包括了病毒由感染组织向外周神经的传递及继之而来的转移到中枢神经系统。若病毒的贯穿突触 (trans-synaptic) 传播包括了感染性子代病毒粒子对后突触神经元 (post-synaptic neurons) 的再感染 (Lycke et al., J. Gen. Virol. 65, [1984] ; Card et al., J. Neurosci. 10, 1974-1994 [1990]) , 突变株病毒向中枢神经系统的转移将在突触被封锁, 这将阻止病毒进入中枢神经系统, 而防止它对脑部的损害。

为测定 gp50 突变体病毒是否能够在动物组织中扩散, 我们在猪鼻粘膜分离块中用免疫组化方法研究 gp50 突变株 R122 和 R332 及 gp50+gp63 突变株 D560 和 D1200 的复制; 另外, 皮下或腹腔接种小鼠, 测试了病毒在体内复制和传播的能力, 结果表明所有的突变株都能够在猪鼻粘膜中复制。

使我们感到惊奇的是: 经皮下或腹腔注射, 证明 gp50 突变株和 gp50+gp63 突变株对小鼠是致命的。R122 毒株的毒力 (以感染动物死亡的平均时间表示) 与野生型毒株 NIA-3 相比仅有较少地减弱; 但 D560 和 D1200 毒株的毒力大大减弱了, 表明

了 gp63 参与了对小鼠的毒性作用。对感染动物死后检查发现突变株能够在脑部复制。腹腔接种动物器官的免疫组化测定证明病毒优先在外周神经中复制。在非互补性细胞中生长的毒株 R122, 因缺少 gp50, 通过腹腔途径接种感染是不成功的。这个发现表明 gp50 对初始感染是必要的。表型完整的 PRV gII 突变株(可产生非感染性子代, 但在非互补性细胞系上不能产生蚀斑)对小鼠是完全无害的, 这一结果证明初始感染之后, 病毒成功的传播依赖于细胞间的传递。由 gp50 或 gp50+gp63 突变株感染动物体再也不能分离到感染性的病毒, 这一结果说明这些突变株在活动物体内产生的子代病毒粒子是非感染性的。

同时, 这些结果也显示出 gp50 对初始感染是必要的, 而对病毒的后期复制和传递是不必要的, 这说明病毒在体内主要传播机制是直接地细胞到细胞传递, 这进一步说明病毒的贯穿突触转移不依赖 gp50, 而且不会导致细胞外病毒粒子引起的后突触神经元的再感染。由于从接种了 gp50 或 gp50+gp63 突变株动物中不能够分离到感染性病毒, 表明由 gp50 突变体在动物体内产生的子代病毒粒子是非感染性的。因此这些突变株的复制仅限于感染/免疫动物体内。以 gp50 突变株为基础制备抗伪狂犬病疫苗或作为重组载体病毒以表达异源基因, 将会成为非常安全的疫苗, 因为此疫苗仅在接种动物体内复制, 并不会传播到包括其它种在内的其它动物中。进而, 如果异源基因插入

到载体病毒的 gp50 基因上与野生型病毒形成的重组子将始终只能产生非感染性重组子。

用 gp50 突变株 R122 接种猪，以野生型强毒株 NIA-3 攻毒后，可以获得完全保护而不出现狂犬病的临床症状。用 gp50+gp63 突变株 D560 和 D1200 接种的猪在以 NIA-3 攻毒后，有短时间的发热及生长迟缓，但没有神经症状出现。这些结果表明只能够通过细胞间传递而传播的 PRV 突变株仍有高度的免疫原性。另外，这些结果最先表明，尽管 gp50 的表达是 PRV 最重要的免疫原性蛋白(见上)但对猪有效地抗伪狂犬病并不是必需的，这一结果出人意料。

依照本发明所制备的预防和控制伪狂犬病感染的疫苗，所含 PRV 的病毒外膜蛋白中有 gp50 和一个如上所述作为一种活性成分的灭活的 gp50 基因。此疫苗中还有一些常规成份，如一种合适的载体，合适的稳定剂，佐剂，溶剂，乳化剂等。疫苗的使用可采取多种方法，如皮内注射，皮下注射，肌肉注射，静脉注射或鼻内接种。优选为鼻内接种。此疫苗还可含有其它相应疾病的免疫原，从而制成多价疫苗。

PRV gp50 突变株用做病毒载体时，除了其本身 gp50 基因有一个突变处，优选在其内部还有一个插入，此插入的遗传信息来自其它病原，可以是病毒，如猪瘟(hog cholera 或 swine fever)病毒，

细小病毒， 传染性胃肠炎病毒， 猪流行性流产及呼吸道综合症 (PEARS, 或神秘猪病 - mystery swine disease MSD, PRRS 或 SIRS), 猪呼吸道冠状病毒 (PRCV), 猪流行性腹泻病毒和流感病毒; 也可以是细菌, 如多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*), 支气管炎博德氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*), 胸膜肺炎放线菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 猪链球菌 (*Streptococcus suis*), 猪痢疾密螺旋体 (*Treponema hyodysenteriae*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和钩端螺旋体 (*Leptospira*) 以及支原体如肺炎支原体 (*M. hyopneumoniae*) 和鼻支原体 (*M. lyorhinis*)。病原核苷酸序列克隆成为 PRV 基因组片段, 以继之整合到 PRV 的基因中, 这一系列方法都早为已知的, Van Zijl et al 已描述过一个实例, 见 J. Virol, 62, 2191 - 2195 [1988]。

尽管 PRV gp50 突变株仍能通过细胞间传递而传播, 但单纯疱疹病毒1型 (HSV-1) 和牛疱疹病毒1型 (BHV-1) 同源基因的突变株却不能通过细胞间传递而传播 (Ligas and Johnson, J. Virol. 62, 1486 - 1494 [1988]; Fehler et al., J. Virol. 66, 831 - 839 [1992])。这表明 PRV 的 gp50 与 HSV-1 的 gD 及 BHV-1 的 gIV 的功能在某些方面存在差异。使用一种与 PRV

gp50 突变株的方法相似的，通过重组 DNA 技术，有可能用此方法修饰 HSV-1，BHV-1 和其它疱疹病毒，使其能够通过细胞间传递而传播，但不产生传染性子代。以此途径可以制成许多安全的疱疹病毒（载体）疫苗，用来预防或控制多种动物及人类疾病。

图示说明如下：

图1

部分 PRV 基因组的物理图。箭头指出早期终止密码子的位置，它是由连接子插入诱变导致的，位于质粒 pN3HB 以及相关的病变突变株 R122，R332，M102 和 M105 的 gp50 基因和 gp63 基因之间（Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992]；de Wind et al., J. Virol. 64, 4691-4696 [1990]）。水平横线显示的是突变株 D560 和 D1200 缺失的位置和宽度。上方的线显示 PRV 的 BstXI-StuI 片段，此片段整合到 G5 细胞中并持续表达 gp50（Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992]）。

图2

包含有猪瘟病毒 (hog cholera virus) E1 基因和人细胞肥大病毒 (human cytomegalovirus) 增强子/启动子的质粒 pEVhis13HCVE1，该质粒用于包含异源基因的 PRV gp50 突变株的构建（见实施例 6）。

图3

包含有猪瘟病毒 (hog cholera virus) E1 基因和人细胞肥大病毒 (human cytomegalovirus) 增强子/启动子的质粒 pBP53E1, 其中 PRV 基因组的一部分在缺失的 gp50 基因的位置, 该质粒用于包含异源基因的 PRV gp50 突变株的构建 (见实施例 6)。

实施例1

PRV 毒株 NIA-3 的 gp50 基因的克隆及表达 gp50 细胞系的构建

所有的重组 DNA 方法均以标准的技术完成 (Maniatis et al., Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York [1982])。pEVhis 14 质粒是来自 pSV2his (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051 [1988]) 后者的 EcoRI-BamHI 片段被含人细胞肥大病毒 (hCMV) 直接的早期增强子 (immediate early enhancer) / 启动子的片段所取代 (Bernard et al., EMBO J. 6, 133-138 [1987]), 随后为一段含有在所有三个阅读框架的终止密码子和多聚腺嘌呤位点的寡核苷酸片段。质粒 pEVhis 10 是 pEVhis14 经过除去含 hCMV 增强子/启动子的 BamHI 片段而得到的。PRV 的 gp50 基因以

BstXI-StuI 片段(缺少 gp50 启动子)克隆到 pEVhis14 的 EcoRV 位点,该位点位于 hCMV 启动子的下游,从而得到质粒 pEVhis14 gp50。对于含有 PRV 重叠亚基因组片段的粘粒 (Cosmid) 重组子 c-179, c-27 和 c-443,以及含有在 pBR322 衍生物的 HindIII 位点有 PRV HindIII-B 片段质粒 pN3HB 的结构和性质已有文献阐述 (van Zijl et al., J. Virol. 65, 2761-2765 [1988])。在 pN3HB 的 gp50 基因的两个不同的位点中,通过连接子插入(插入 R1 和322),使得 gp50 的表达被灭活,也已有文献描述 (de Wind et al., J. Virol. 64, 4691-4696 [1990])。

用电穿孔法 (electroporation) 的方法将质粒 pEVhis 14 gp50 传染到 SK-6 细胞。SK-6 细胞经胰酶消化收获,在室温下用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗一次,以 2×10^7 细胞/毫升将其重悬浮于冰冷的 PBS 中。10 μ g pEVhis 14 gp50 质粒加入到 0.5ml 细胞中,该细胞在灭菌的一次性电穿孔比色杯 (electroporation cuvette, 内部电极距离 0.4cm; Bio Rad Laboratories) 中保持在 0°C,使用 BioRad GenePulsex 在 25 μ F 电容器 1000V 放电器被放电。细胞在 0°C 放置 15 分钟,移到盛有 50ml 培养基的 75cm² 烧瓶中培养过夜。随后转染的细胞经胰酶消化,在 100mm 培氏皿中

用含 2.5mM 组氨酸的培养基做数倍稀释。每隔3-4天换一次培养基，直到可见清晰的细胞克隆（7~10天），把单个克隆挑出来移入多孔培养板中生长。用免疫过氧化物酶单层试验和单克隆抗体 G50N2 的放射免疫沉淀试验测定 gp50 的表达，由放射免疫沉淀试验检测到的一株可表达大量 gp50 的细胞系，命名为 G5 (Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992])。

实施例2

突变株病毒的构建

突变株病毒 R122 和 R332 是用含有重叠野生型 PRV 序列，并分别在 gp50 基因核苷酸位点 366-367 及 996-997 之间含有诱变寡核苷酸 5'-TAGGCTAGAATTCTAGCCTA-3' (SEQ ID No1) 的 pN3HB 衍生物 RI 或322 的 Hind III-B 片段 (de Wind et al., J. Virol. 64, 46991-4696 [1990]) 的三个粘粒 (Cosmid) (c-179, c-27 和 c-443 Van Zijl et al., 等人叙述, J. Virol. 65, 2761-2765 [1988]) 在 G5 细胞中经重叠重组而构建 (图1)。质粒经过 EcoRI 消化 (粘粒, cosmids) 或 Hind III 消化 (克隆 RI 和 322)，使病毒 DNA 片段释放出来，并不再与载体序列作进一步分离。用 BioRad Gene-Pulser 和电容扩大器 (Capacitance Extender) 分别在 250V和 960 μ F

的条件下，用电穿孔法进行转染。细胞接种于6孔板上，37℃培养3小时后，培养基换成加有2%胎牛血清和1%甲基纤维素的 Earle 氏最低营养培养基 (Earle's minimal essential medium) 在37℃培养直到蚀斑出现 (2-3天)。

为了得到 D560 毒株，质粒149 (含有在 gp63 基因的核苷酸位点 352-353 之间有诱变寡核苷酸的 pN3HB 衍生物 (de Wind et al., J Virol. 64, 4691-4696 [1990] ; 序数依图5, Petrovskis et al., J. Virol. 60, 185-193 [1986]) 的 Bgl II - EcoR I 片段被质粒322的 Bgl II - EcoR I 片段 (见图1) 取代，产生的质粒，在gp50 基因核苷酸位点 996 和 gp63 基因位点 353 之间的序列被片段 TAGGCTAGAATTCTAGCCTA (SEQ ID No1; 诱变寡核苷酸序列) 所取代，该质粒同病毒的重叠野生型片段一起，在 G5 细胞中按上述方法以重叠重组法得到重组病毒。

为了得到 D1200 毒株，质粒149 经限制性内切酶 Bgl II 和 EcoR I 消化，生成的大片段再以 E. Coli DNA 多聚酶 I 的 Klenow 片段对产生平末端进行处理，而后自身连接，得到的质粒中 gp50 基因 336 位点和 gp63 基因的353位点之间的核酸序列被片段 AATTCTAGCCTA (SEQ ID No 2; 例如诱变寡核苷酸的残余部分) 所取代，该

质粒再与野生型片段一起，在 G5细胞中如上所述用重叠重组法得到重组病毒。

实施例3

gp50 和 gp50+gp63 突变株在猪鼻粘膜分离块中的复制

为证实这些突变株是否能在动物组织中传播，我们使用了猪鼻粘膜分离块，这些分离块表现为上皮细胞和基质成纤维细胞的天然组合，亦已证实这些分离块的感染与活体鼻粘膜的感染极为相似 (Pol et al., Res. Vet. Sci. 50, 45-53 [1991])。用野生型 PRV NIA-3 毒株，gp50 连接子插入突变株 R122 和 R332，以及 gp50+gp63 缺失突变株 D1200 和 D560 来感染分离块。

感染后24小时用兔抗 PRV 血清进行免疫组化检验 (Immunohistochemical examination, Pol. et al., Res. Vet. Sci. 50, 45-53

[1991])；发现野生型 NIA-3 病毒在感染的粘膜分离块的上皮细胞中大范围的传播。用 gp50 突变株 R122 和 R332 以及 gp50+gp63 突变株 D1200 和 D560 也得到类似的结果。感染后24小时，病毒几乎全部在上皮细胞中复制，但是经过较长时间的培养，所有的毒株都可以感染到下层成纤维细胞。

用兔抗 PRV 血清和单克隆抗体 (G50N2, gp50

特异性) 的特异性免疫染色均证明 gp50+gp63 突变株和 gp50 突变株不能表达 gp50。这些结果表

明gp50 对于病毒在猪鼻粘膜中的传播不是必须的。

实施例4

gp50 和 gp50+ gp63 突变株对小鼠的毒力

a. gp50 + gp63 无效突变株对小鼠是致死性的。

gp50 突变体能够在组织分离块中复制和扩散的结果表明它们也能在机体内复制和扩散。之所以选择小鼠作为实验动物，是因为小鼠对疱疹病毒是高度敏感的，而且已广泛的用于毒力测试及神经传播的模型体 (Fraser and Ramachandran, J. Comp. Path. 79, 435-444 [1969]; Cook and Stevens, Infect, Immun. 7, 272-288 [1973]; Field and Hill, J. Gen. Virol. 23, 145-157 [1974]; Field and Hill, J. Gen. Virol. 26, 145-148 [1975]; Kristenson et al., Brain Res. 69, 189-201 [1978]; Platt et al., Arch. Virol. 63, 107-114 [1980]; Dix et al., Infect. Immun. 40, 103-112 [1983])。在第一个试验中，我们使用了 gp50+ gp63 缺失突变株 D560 和 D1200，而不是连接子插入突变株 R122 或 R332，从而避免了接种物存在野生型返强毒株。这种返强毒株可能是由互补细胞系中的病毒系列与病毒基因组同源重组，连接子插入突变体而得到的 (Cai et al., J. Virol. 62, 2596-2604 [1988];

Peeters et al., J. Virol. 66. 894-905 [1992]; Peeters et al., J. Virol. 66, 3388-3392 [1992])。由于 D560 和 D1200 毒株的 gp50+gp63 缺失的 3' 端序列与互补性 G5 细胞没有同源部分(图1), 这些突变体在互补性 G5 细胞中复制期间产生野生型返强毒株是不可能的。

选择5只6-8周龄的雌性 BALB/C 小鼠 (Charles River, Sulzfeld, FRG) 在颈部皮下注射 10^5 蚀斑形成单位的 NIA-3, D560, D1200 毒株及 gp63 突变株 M105。注射 NIA-3 毒株的小鼠, 发生了伪狂犬病的严重症状, 诸如后肢剧烈抓搔, “洗脸”及瘫痪, 并且在感染后70小时死亡。M105 毒株的感染动物则没有广泛性瘙痒, 但呈弓背散坐 (Sat apart with a crooked back) 并呼吸频率加快, 动物在接种90小时死亡。用 D560 和 D1200 毒株接种的小鼠与接种 M105 毒种的小鼠症状相似, 在进入垂死状态前, 动物表现冷淡, 有麻痹症状, 有时可持续42小时, 直到感染后大约130-140小时死亡(表1, 试验1) 此结果表明 gp50+gp63 无效突变株对小鼠仍是致死性的, 但无论如何, 与野生型病毒或 gp63 突变株病毒相比, 其毒力都明显减低了。

b. gp50+gp63 无效突变株能到达中枢神经系统并在其中复制。

用 gp63 或 gp50+gp63 突变株感染小鼠比用 NIA-3 感染小鼠引起的神经紊乱症状轻，用免疫组化方法检测到感染动物脑组织中病毒的存在。用先前描述的方法 (Pol et al., Microb. Path, 7, 361-371 [1989]) 对感染鼠的脑组织及器官的冰冻切片进行固定及免疫组化试验，然后抗 gp50 的单克隆抗体用作第一抗体，在第二次孵化时使用了结合山羊抗鼠免疫球蛋白G抗体的过氧化物酶 (Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992])。

使我们感到惊讶的是，结果显示用 D1200 和 D560 接种的小鼠脑组织切片中发现了大量感染的神经原，而用 NIA-3 或 M105 感染的小鼠脑组织切片中只有很少量感染的神经原。用免抗 PRV 血清进行各种免疫染色实验 (Pol et al., Res. Vet. Sci. 50, 45-53 [1991]) 证明接种 D1200 和 D560 的动物脑中所出现的病毒都不表达 gp50。从脑部中分离出病毒后在 SK-6 细胞中测定滴度时，很容易从接种 NIA-3 或 M105 的动物中回收到感染的病毒，而从接种 D560 或 D1200 的动物中不容易分离到感染的病毒 (表1, 实验1)。这些结果证明不能够产生感染性病毒的 gp50+gp63 无效突变株仍然可以到达中枢神经系统并在其内复制。

尽管 gp63 对病毒的生长无关紧要 (Petrovskis et al., J. Virol. 60, 1166-

1169 [1986])；但 gp50+gp60 突变株在互补性 G5 细胞和非补性 SK-6 细胞上产生的蚀斑显然较 gp50 突变株产生的蚀斑小。另外已证明 gp63 与对猪的毒力有关 (Kimman et al., J. Gen. Virol. 73, 243-251 [1992])。由于这些发现表明 gp50 突变株比 gp50+gp63 突变株毒力更强，因此我们想检测 gp50 突变株对小鼠的毒力，然而在使用 gp50 突变株免疫小鼠之前，我们必须确证注射物中不含野生型返强毒(见上)。用 R122 在 G5 细胞上产生的单个蚀斑接种 SK-6 细胞，制备了一批无野生型返强毒的表型完整的 R122 病毒。从接种的 SK-6 细胞中提取病毒 DNA 并转染 G5 细胞单层 (这样可以大大降低 PRV 的种入量；Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992])。从转染的细胞中制备病毒批，在 SK-6 细胞上测定，滴定达到 2.1×10^7 蚀斑形成单位 (pfu) / ml。这一批病毒被命名为 R122⁺，表示此病毒是表型完整的。再用 200 μ l (4.2×10^6 pfu) R122⁺ 病毒原液接种 SK-6 细胞，制备一批缺失 gp50 的病毒。收获的病毒滴度为 150pfu / ml，命名为 R122⁻，表示此病毒由非互补性细胞中得到。但是用抗 gp50 的单克隆抗体进行免疫过氧化酶染色检测这些蚀斑 (Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992]) 证明 gp50 阴性，这一结果说明该病毒批中不含有野生型病毒但仍有一部分感染

性病毒粒子。这些病毒粒可能是来自用于制备 $R122^-$ 病毒批的接种物 ($R122^+$)。另一种可能是, $R122^+$ 病毒粒子感染 SK-6 细胞时, gp50 会附着在原生质膜上, 而子代病毒粒子可能会重新结合这些 gp50。其它可能性还有缺少 gp50 的病毒粒子通过细胞摄粒作用被细胞吞噬 (Campadelli-Fiume et al., J. Virol. 62, 159-167 [1988]) 并且偶然地避免了被降解, 从而导致了生产性的感染。 $R122^+$ 和 $R122^-$ 病毒原液的物理滴度则借助于电子显微镜进行测定, 并以乳胶小球 (直径 91nm; Serva) 做为内部标准。

除了测定 $R122^+$ 的毒力外, 我们还测定了不同毒株的毒力是否取决于感染的途径。将5只小鼠分为一组, 皮下或腹腔注射 10^5 pfu 的 NIA-3, M105, $R122^+$ 和 D1200 毒株。接种 $R122^+$ 株的小鼠出现了伪狂犬病的症状, 与 NIA-3 接种的动物症状类似 (见上)。皮下接种 NIA-3 的动物, 在注射后大约34-40小时开始出现明显症状, 而皮下接种 $R122^+$ 的动物则要在大约42小时后才出现症状。小鼠分别在注射后56小时和68小时出现死亡 (表1, 实验2), 这些结果表明 gp50 突变株 $R122^+$ 对小鼠毒力很强, 而且比 gp50 + gp63 突变株 D1200 或 gp63 突变株 M105 毒力强得多。腹腔接种 NIA-3, $R122^+$ 和 M105 株, 比皮下接种的平均死亡时间长10-13小时。D1200 毒株, 腹腔注射比皮下注

射的平均死亡时间大约短25小时(表1, 实验2)。所有测定的毒株的综合症和临床症状与接种途径无关。这样, 尽管接种的时间存在差异, 但两种注射途径都导致了致死性的感染。用免疫组化的方法从实验2所用的所有动物脑组织切片中检测到了病毒(表1)。而且, 与 NIA-3, R122⁺ 或 M105 感染的动物相比, 用 D1200 接种的动物脑组织中的病毒复制更为广泛。

d. 病毒在感染器官的外周神经中的择优复制

用免疫组化法检测组织切片中病毒抗原时, 只有在腹腔注射的动物的组织切片中检测到病毒抗原。检测到病毒的器官有肝脏、脾脏、肾脏、肠道和肾上腺, 但肺脏中则检测不到病毒抗原。器官中的病毒感染几乎完全局限在神经纤维中, 这一结果证明神经组织是 PRV 感染和复制的优选部位, 推测病毒是通过逆轴突传输方法从器官到中枢神经系统的, 与以前报道的一致 (Cook and Stevens, *Infect. Immun.* 7, 272-288 [1973]; Field and Hill, *J. Gen. Virol.* 23, 145-157 [1974]; Field and Hill, *J. Gen. Virol.* 26, 145-148 [1975]; McCracken et al., *J. Gen. Virol.* 20, 17-28 [1973]; Strack and Loewy, *J. Neurosci.* 10, 2139-2147 [1990]; Card et al., *J. Neurosci.* 10, 1974-1994 [1990])。gp50 无效突变株能够

有效地传输到中枢神经系统说明神经传输与 gp50 的存在无关。

从腹腔接种 NIA-3 和 M105 株的动物组织抽提液中可以回收到感染性病毒。正如所料, R122⁺ 或 D1200 接种的动物中不能回收到感染性病毒, 进一步表明这些病毒的子代属非感染性的。奇怪的是皮下接种 NIA-3 的动物中有 3/5 的动物组织抽提液中产生了感染性病毒(表1, 实验2)。这意味着病毒是通过逆向运动从中枢神经系统传到这些器官中。皮下接种 M105 株小鼠器官中缺乏感染性病毒, 说明病毒的传输可能被拖延了。

e. 机体的初始感染需要 gp50

体外试验结果表明 gp50 对病毒的穿透是必须的, 但对细胞间传播为非必须的 (Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992]), 意味着在机体内病毒的感染情况亦相同。尽管 gp50 在机体内对病毒的穿透是必须的这一可能性很大, 但我们必须证明在这种情况下, gp50 对动物初始感染是必要的。为证明 gp50 参与病毒的感染过程而使用了一批生长在非互补性 SK-6 细胞上, 而缺少 gp50 (R122⁻; 见上) 的 R122 病毒。因为 10^5 pfu 的 R122⁺ 相当于 3.3×10^6 个病毒颗粒, 我们用了相同数量的 R122⁻ 病毒颗粒注射小鼠。正如所料, 皮下或腹腔注射 R122⁺ 的小鼠全部死亡(表1, 实验3)。然而, 接种 R122⁻ 的小鼠中, 腹腔接种的全

部存活，而皮下接种的小鼠有五分之一死亡。这些结果表明在病毒的外膜中 gp50 的存在对于成功地感染是必要的。

对接种 R122⁻ 后死亡的动物检验后发现病毒存在脑组织中，证明在接种物中仍有感染性病毒。将该接种物在非互补性 SK-6 细胞中重复滴定后，分别出现了9个或16个蚀斑。这些蚀斑经过免疫组化检验是由 gp50 突变株产生的。这些感染性病毒粒子的可能来源在上文中已讨论过。因为经过腹腔注射后，PRV NIA-3 毒株的 LD₅₀ 大约是 70 pfu，所以 R122⁻ 注射物中存在感染性病毒粒子可能是与个别动物产生致死性感染导致死亡有关。

f. 一株对小白鼠无毒力的病毒，不能产生感染性子代病毒，不能经细胞间传递而传播。

在上文中我们已经指出了 PRV 的 gII 或 gH 无效突变株在非互补性细胞系中的复制，同 gp50 无效突变株一样，也能产生非感染性子代病毒粒子 (Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992]; Peeters et al., J. Virol. 66, 3388-3892 [1992])。但与 gp50 突变株相反，gII 和 gH 突变株不能在非互补性细胞中产生蚀斑。这一结果表明了 gII 和 gH 对病毒在细胞间传递是必须的。为证实细胞间传递是否对病毒在机体内的成功传播是必不可少的，我们采用表型完整的 PRV g II 无效突变株 B14S (Peeters et al.,

表1 不同PRV毒株感染小鼠的平均死亡时间和病毒检测

实验	病毒株	基因型	接种方式	平均死亡时间(h) ($\pm$ S.D.)	病毒存在			
					免疫组化		病毒分离	
					脑	器官	脑	器官
1	NIA-3	野生型	s.c. ^a	70.8 $\pm$ 12.9	+	n.d. ^b	+	n.d.
	M105	gp63-	s.c.	91.2 $\pm$ 18.2	+	n.d.	+	n.d.
	D560	gp50-gp63-	s.c.	132.2 $\pm$ 28.6	++	n.d.	-	n.d.
	D1200	gp50-gp63-	s.c.	141.4 $\pm$ 22.4	++	n.d.	-	n.d.
2	NIA-3	野生型	s.c.	55.6 $\pm$ 6.8	+	-	n.d.	+(3/5)
	R122+	gp50-	s.c.	67.9 $\pm$ 6.8	+	-	n.d.	-
	M105	gp63-	s.c.	78.6 $\pm$ 18.7	+	-	n.d.	-
	D1200	gp50-gp63-	s.c.	160.0 $\pm$ 20.4	++	-	n.d.	-
	NIA-3	野生型	i.p. ^c	67.3 $\pm$ 9.0	+	++	n.d.	+
	R122+	gp50-	i.p.	77.7 $\pm$ 5.6	+	++	n.d.	-
	M105	gp63-	i.p.	91.6 $\pm$ 15.6	+	++	n.d.	+
	D1200	gp50-gp63-	i.p.	134.8 $\pm$ 27.0	++	++	n.d.	-
3	R122+	gp50-	s.c.	60.0 $\pm$ 4.2	+	n.d.	n.d.	n.d.
	R122-	gp50-	s.c.	4x ∞ , 1x 84	+	n.d.	n.d.	n.d.
	B145	gII-	s.c.	∞	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	R122+	gp50-	i.p.	85.2 $\pm$ 5.0	+	n.d.	n.d.	n.d.
	R122-	gp50-	i.p.	∞	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B145	gII-	i.p.	∞	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a皮下接种^b未检出^c腹腔接种^d外周神经

J. Virol. 66, 894-905 [1992]) 接种小鼠。
用 10^5 pfu 的 B145 病毒腹腔或皮下接种小鼠后，任何动物都不产生伪狂犬病的症状（表1，实验3），结果说明，不能产生感染性子代和不能通过细胞间传递的病毒对小鼠是无毒的。

实施例5

gp50 突变株和 gp50+ gp63 突变株对猪的毒力与免疫原性

为检测突变毒株的毒力和免疫原性，用毒株 R122⁺，D560 和 D1200 株接种猪。野生型 M209 毒株和 gp63 突变株 M102（图1）（Kimm an et al., J. Gen. Virol. 73, 243-251 [1992]）则作对照，然后以 PRV 强毒 NIA-3 毒株攻毒测定免疫力。

每5只4-6周龄猪为一组（荷兰中心兽医研究所，兰德拉斯 SPF 猪），每只滴鼻接种 10^5 pfu 的病毒，方法是在呼吸过程中向鼻腔内缓慢滴入 0.5ml 病毒悬液。免疫4周后，用 10^5 pfu 的 PRV 强毒 NIA-3 毒株滴鼻攻毒。每天两次观察猪临床症状，每日测量肛门温度。一周称重3次，记录每只猪的生长停滞的天数，发热以及神经症状。以攻毒之日起直到动物重新开始增重所需的天数定为生长停滞期。肛门温度超过 40°C 为发热。出现搔痒、共济失调、瘫痪、颤抖和抽搐即为神经症状。

用野生型 M209 毒株接种猪发生了伪狂犬病的典

型症状如发热、食欲减退、生长迟缓以及诸如共济失调和瘫痪这样的神经症状(表2)。R122⁺和M102突变株引起短期的发热和生长迟缓,但不表现出神经症状。D560和D1200突变株既不引起任何神经症状也不引起发热和生长迟缓。这些结果表明gp50+gp63突变株D560与D1200对猪完全无毒,而gp50突变株R122⁺及gp63突变株M102较之野生型PRV毒性已大大减低。

用R122⁺和M102毒株免疫的猪在用NIA-3攻毒后,不表现发热或生长迟缓,也不出现临床症状(表3)。用D560和D1200毒株免疫的猪有短时期的发热和生长迟缓,虽有的动物出现有几天反应迟缓且有两只猪出现呕吐,但没有神经症状。未免疫对照组的猪则出现严重的伪狂犬病症状,发热、生长迟缓期相当长,并有两只猪死亡(表3)。这些结果说明,用gp50突变株R122⁺和gp63突变株M102免疫的猪可以完全得到保护,不出现伪狂犬病临床症状,而用gp50+gp63突变株D560和D1200免疫的猪则可部分地得到保护。

表2 不同的 PRV 毒株对猪的免疫试验^Y

免疫毒种	发热*	生长迟缓*	临床症状
M209 (n=3)	5.3 ± 0.6	8.3 ± 7.3	++
M102 (n=4) #	2.4 ± 1.5	2.4 ± 2.2	-
R122 ⁺ (n=5)	3.8 ± 1.6	0.8 ± 1.8	-
D560 (n=5)	0	0	-
D1200 (n=5)	0	0	-

^Y 试验期间没有猪死亡

* 平均天数 (± S. D.)

一头猪死亡，可能是采集血样后的创伤引起的。

++ 出现神经症状，诸如共济失调，抽搐和瘫痪。

表3 免疫猪用 NIA-3 攻毒后的保护

免疫毒株	死亡	发热*	生长迟缓*	临床症状
- (n=6)	2	6.8 ± 0.5	10.3 ± 7.1	++
M102 (n=4)	0	0	0	-
R122 ⁺ (n=5)	0	0	0	-
D560 (n=5)	0	2.6 ± 1.3	4.6 ± 6.5	+ / -
D1200 (n=5)	0	3.6 ± 1.1	1.4 ± 3.1	+ / -

- * 平均天数 ($\pm$ S. D.)
- + + 出现神经症状, 诸如共调失调, 抽搐和瘫痪
- + / - 表示反应迟钝 (有时呕吐, 见文)

以上例子表明 PRV 的 gp50 对病毒的感染 (穿透) 是必须的, 但对细胞间的传递则不然。表型完整的 gp50 突变株和 gp50+gp63 突变株可以在接种动物体内复制与传播。但是, 从感染细胞释放的子代病毒属非感染性的, 因此接种动物亦不能释放感染性的病毒。这一特性加之 PRV 的广泛宿主范围以及容纳大量外源 DNA 的能力, 使得 PRV 的 gp50 突变株相当适合于制备安全的 (载体) 疫苗, 防制伪狂犬病和其他动物疾病。

实施例6

构建表达猪瘟病毒 (Hog Cholera Virus) 外膜糖蛋白 E1 的 gp50 缺失突变体

为试验 gp50 缺失突变体能否作为表达异源基因的载体, 在 hCMV 启动子的转录控制下, 采用含有猪瘟病毒 (Hog Cholera Virus, HChV= 古典猪瘟, classical swine fever) E1 基因的 DNA 片段代替 PRV 毒株 NIA-3 的 gp50 基因。

一个 ScaI-DraI 片段 (ScaI 位于 gX 基因的位点317-322之间, 核苷酸序号同 Rea et al., J. Virol. 54, 21-29 [1985]; DraI 位于

gp63 和 gI 基因之间的位点 1181-1186, 核苷酸序号同 Petrovskis et al., J. Virol. 60, 185-193 [1986]) 位于 PRV 的 Us 区域, 该片段被克隆到质粒 pUC19M 的 NdeI 位点的平头端 (Clontech)。采用体外定点诱变 (Transformer kit, Clontech), 单一的限制酶识别位点即被恰好确定在 gp50 基因之前和 gp50 基因之后。通过采用诱变引物 5' - AGGTTCCCATACACTAGTCCGCCAGCGCCATGC - 3' (SEQ ID No: 3; SEQUENCE TYPE: nucleotide, SEQUENCE LENGTH: 33, STRANDNESS: single, SOURCE: synthetic) 和 5' - CCCGGTCCGTAGCCTAGGCAGTACCGGGCGTCG - 3' (SEQ ID No: 4; SEQUENCE TYPE: nucleotide, SEQUENCE LENGTH: 32, STRANDNESS: single, SOURCE: synthetic), 为限制酶 SpeI (ACTAGT) 和 AvrII (CCTAGG) 的识别序列被分别确定在位点-17至-12和1210至1215上 (gp50 基因的核苷酸序列号同 Petrovskis et al., J. Virol. 59, 216-223 [1986])。gp50 基因经带有 SpeI 和 AvrII 的质粒 DNA 的消化而缺失, 并被一合成的 SpeI-AvrII DNA 片段取代, 该合成的 DNA 片段包含限制酶 EcoRI, EcoRV 和 HindIII 的识

别序列(该合成的 DNA 片段是通过同摩尔量序列分别为 5'-CTAGTGAATTTCGATATCAAGCTTC-3' (SEQ ID No: 5, SEQUENCE TYPE: nucleotide, SEQUENCE LENGTH: 24, STRANDNESS: single, SOURCE: synthetic) 和 5'-CTAGGAAGCTTGATATCGAATTCA-3' (SEQ ID No: 6; SEQUENCE TYPE: nucleotide, SEQUENCE LENGTH: 24, STRANDNESS: single, SOURCE: synthetic) 的两个单螺旋寡核苷酸的退火而得到的)。而后, 一个包含 gp50 缺失的 NcoI-PstI 片段(NcoI 位于 gX 基因的位点883-888之间, 核苷酸序列号见 Rea et al., J. Virol. 54, 21-29 [1985]; PstI 位于 gp63 基因的位点439-444 之间, 核苷酸序列号见 Petrovskis et al., J. Virol. 60, 185-193 [1986])被克隆到经 NcoI 和 PstI 消化的质粒 pGEM5Zf(+) (Promega)中。所得的质粒被命名为 pBP53。

HChV 的 E1 基因源于 HChV 毒株 Brescia 的 cDNA 克隆(Moormann et al., Virology 177, 184-198 [1990])。该基因作为一个 DsaI-EcoRV 片段(DsaI 部位以 E.coli DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段填充, 核苷酸 2337-3804, 根据 Moormann et al., Virology 177,

184-198 [1990] 的核苷酸序列号)克隆到质粒 pEVhis13 的 EcoRI 部位(以 E.coli DNA 聚合酶I的 Klenow 片段填充)和 EcoRV 部位之间。所说的质粒源自质粒 pSV2his (Hartman and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8047-8051 [1988]), 该质粒包含 hCMV 启动子, 启动子后接 ATG 起始编码子, 一特定限制位点数和在三个阅读框架内的转译终止编码 (Peeters et al., J. Virol. 66, 894-905 [1992]; 同时参见实施例1。在得到的质粒中, E1 基因与 pEVhis 13 的起始启动子框架式融合。该质粒被命名为 pEVhis 13HCE1 (见图2)。在质粒 pEVhis 13 HCVE1 被 HpaI 和 PstI 消化以后, 一个含有 hCMV 启动子, E1 基因和一个转译编码子的片段被分离出来。该 HpaI-PstI 片段经 T₄ DNA 聚合酶处理得到一平头端, 继而克隆到 pBP53 的 EcoRV 部位上。E1 基因的转录定向与 pBP53 的 gX 和 gp63 基因的相似, 以此定向插入片段的质粒被分离出来, 并被命名为 pBP53E1 (图3)。

为检验 E1 基因是否克隆正确, 在 G5 细胞中检测了 E1 的瞬间表达(transient expression)。采用 lipofectin (GIBCO BRL)将质粒 pBP53E1 或 pEVhis13 HCVE1 对细胞进行转染。2天后, 单层细胞被固定且通过采用对 HChV 的糖蛋白特异的辣根过氧化酶(horseradish peroxidase)一缀合单克隆

抗体3和4的免疫株对 E1 的表达进行了检验 (Wensvoort, J. Gen. Virol. 70, 2685-2876 [1989])。由 pBP53E1 转染的细胞对 E1 的表达是明显可见的, 其染色能力较 pEVhis13HCVE1 转染细胞的更强一些。这些结果表明, 在 PRV 序列之中, 就 pBP53E1 而言, E1 被有效地表达了。

质粒 pBP53E1 与 PvuII 和 PstI 被消化, 并与 PRV 毒株 NIA-3 的病毒 DNA 一起在 G5 细胞中采用 lipotectin 共转染。2天后, 当蚀斑明显可见时, 单层细胞固定, 并采用上述的瞬时表达检验法对此进行染色。被染色的蚀斑的存在表明借助于同源重组 E1 基因已被转移至病毒基因组, 且 E1 基因被重组病毒表达。为分离出重组病毒, 重复转染实验并分离到400个独立的蚀斑。为鉴别表达了 E1 的重组子, 部分分离物被转移至含有 SK-6 细胞的微量滴定板中。培养2天后, 蚀斑可见, 受感染的单层细胞固定, 并通过免疫染色来检验 E1 的表达。最后, 表达了 E1 的重组病毒为从初始分离物中纯化出来的蚀斑, 该分离物在 SK-6 细胞上产生染色的蚀斑。

可见, 表达了 HChV 的 E1 的 PRV 重组疫苗株能够在猪以 HChV 攻毒-接种之后使之避免古典猪瘟 (classical swine fever) (Van Zijl et al., J. Virol. 65, 2761-2765 [1991])。基于这些发现, 上述的非-传递 E1-表达 gp50 缺

失突变株能够导致防止古典猪瘟的免疫应答。

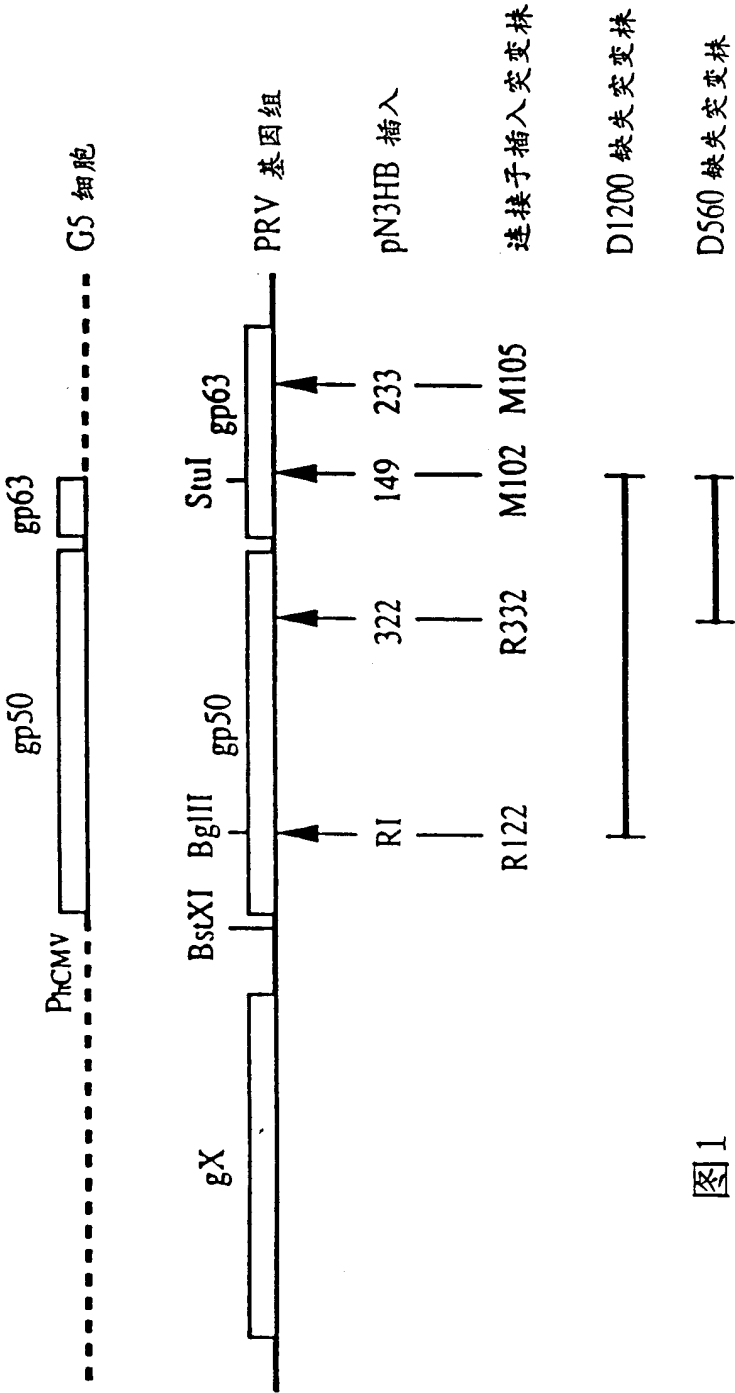


图1

