

[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 98809116. X

[51] Int. Cl.

A61K 39/235 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100366292C

[22] 申请日 1998.8.14 [21] 申请号 98809116. X
[30] 优先权

[32] 1997. 8. 14 [33] AU [31] P08560

[86] 国际申请 PCT/AU1998/000648 1998.8.14

[87] 国际公布 WO1999/008706 英 1999.2.25

[85] 进入国家阶段日期 2000.3.15

[73] 专利权人 联邦科学和工业研究组织

地址 澳大利亚澳大利亚首都直辖区

共同专利权人 猪研究开发公司

[72] 发明人 M·A·约翰逊 J·M·哈蒙德

[56] 参考文献

CN1113390A 1995.12.13

WO9720036A1 1997.6.5

审查员 丁海

[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 陈文平

权利要求书 15 页 说明书 24 页 附图 14 页

[54] 发明名称

重组的猪腺病毒载体

[57] 摘要

本发明涉及包括稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒的重组载体。核苷酸序列优选地是编码猪霍乱病毒或假狂犬病病毒的抗原决定簇的序列。本发明进一步涉及产生重组载体的方法、制备基于载体的疫苗的方法、给药策略及保护猪抵抗疾病的方法。

1. 一种能表达目的 DNA 的重组猪腺病毒, 该目的 DNA 稳定整合到复制非必需的区域中, 所述区域选自 3 型猪腺病毒的图距单位 81 到 84 和图距单位 97 到 99.5。

2. 一种重组载体, 包括稳定整合并能表达目的 DNA 的重组猪腺病毒, 其中所述的目的 DNA 整合到复制非必需的区域中, 所述区域选自 3 型猪腺病毒的图距单位 81 到 84 和图距单位 97 到 99.5。

3. 根据权利要求 2 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒能表达至少一种异源核苷酸序列。

4. 根据权利要求 2 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒包括与所述重组猪腺病毒来源的天然猪腺病毒的病毒粒子相比结构蛋白未改变的活的猪腺病毒。

5. 权利要求 3 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒能表达至少一种异源核苷酸序列。

6. 根据权利要求 3 所述的重组载体, 其中所述至少一种异源核苷酸序列能表达成抗原性多肽。

7. 权利要求 5 所述的重组载体, 其中所述至少一种异源核苷酸序列能表达成抗原性多肽。

8. 根据权利要求 3 所述的重组载体, 其中所述至少一种异源核苷酸序列能表达成免疫增强分子。

9. 权利要求 5 所述的重组载体, 其中所述至少一种异源核苷酸序列能表达成免疫增强分子。

10. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码在猪中引发肠道疾病的感染体的抗原决定簇。

11. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码在猪中引发肠道疾病的感染体的抗原决定簇。

12. 权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码在猪中引发呼吸系统疾病的感染体的抗原决定簇。

13. 根据权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码在猪中引发呼吸系统疾病的感染体的抗原决定簇。

14. 权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码假狂犬病病毒或 Aujeszky's 病病毒的抗原决定簇。

15. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码假狂犬病病毒或 Aujeszky's 病病毒的抗原决定簇。

16. 根据权利要求 14 所述的重组载体, 其中异源序列编码假狂犬病病毒的糖蛋白 D 的抗原决定簇。

17. 根据权利要求 15 所述的重组载体, 其中异源序列编码假狂犬病病毒的糖蛋白 D 的抗原决定簇。

18. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪呼吸和生殖综合症病毒的抗原决定簇。

19. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪呼吸和生殖综合症病毒的抗原决定簇。

20. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪霍乱病毒的抗原决定簇。

21. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪霍乱病毒的抗原决定簇。

22. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪细小病毒的抗原决定簇。

23. 根据权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪细小病毒的抗原决定簇。

24. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪冠状病毒的抗原决定簇。

25. 根据权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪冠状病毒的抗原决定簇。

26. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪轮状病毒的抗原决定簇。

27. 根据权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编

码猪轮状病毒的抗原决定簇。

28. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪副流感病毒的抗原决定簇。

29. 根据权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪副流感病毒的抗原决定簇。

30. 根据权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪肺炎支原体的抗原决定簇。

31. 根据权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪肺炎支原体的抗原决定簇。

32. 根据权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码 FLT-3 配体。

33. 根据权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码 FLT-3 配体。

34. 根据权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码白介素 3。

35. 根据权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码白介素 3。

36. 根据权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪白介素 4。

37. 根据权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪白介素 4。

38. 根据权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码 γ 干扰素 (γ IFN)。

39. 根据权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码 γ 干扰素 (γ IFN)。

40. 根据权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。

41. 根据权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。

42. 根据权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

43. 根据权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码猪粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

44. 根据权利要求 3 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码抗原性多肽和免疫增强分子。

45. 权利要求 5 所述的重组载体, 其中所述异源核苷酸序列编码抗原性多肽和免疫增强分子。

46. 根据权利要求 2 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

47. 权利要求 3 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

48. 权利要求 4 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

49. 权利要求 5 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

50. 权利要求 6 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

51. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

52. 权利要求 8 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

53. 权利要求 9 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

54. 权利要求 10 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

55. 权利要求 11 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

56. 权利要求 12 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清

型 3 和 4。

57. 权利要求 13 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

58. 权利要求 14 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

59. 权利要求 15 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

60. 权利要求 16 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

61. 权利要求 17 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

62. 权利要求 18 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

63. 权利要求 19 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

64. 权利要求 20 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

65. 权利要求 21 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

66. 权利要求 22 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

67. 权利要求 23 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

68. 权利要求 24 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

69. 权利要求 25 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

70. 权利要求 26 所述的重组载体，其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

71. 权利要求 27 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

72. 权利要求 28 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

73. 权利要求 29 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

74. 权利要求 30 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

75. 权利要求 31 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

76. 权利要求 32 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

77. 权利要求 33 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

78. 权利要求 34 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

79. 权利要求 35 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

80. 权利要求 36 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

81. 权利要求 37 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

82. 权利要求 38 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

83. 权利要求 39 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

84. 权利要求 40 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

85. 权利要求 41 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清

型 3 和 4。

86. 权利要求 42 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

87. 权利要求 43 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

88. 权利要求 44 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

89. 权利要求 45 所述的重组载体, 其中所述重组猪腺病毒选自血清型 3 和 4。

90. 根据权利要求 2 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

91. 权利要求 3 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

92. 权利要求 4 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

93. 权利要求 5 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

94. 权利要求 6 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

95. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

96. 权利要求 8 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

97. 权利要求 9 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

98. 权利要求 10 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

99. 权利要求 11 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

100. 权利要求 12 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

101. 权利要求 13 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

102. 权利要求 14 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

103. 权利要求 15 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

104. 权利要求 16 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

105. 权利要求 17 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

106. 权利要求 18 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

107. 权利要求 19 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

108. 权利要求 20 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

109. 权利要求 21 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

110. 权利要求 22 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

111. 权利要求 23 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

112. 权利要求 24 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

113. 权利要求 25 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

114. 权利要求 26 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97

到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

115. 权利要求 27 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

116. 权利要求 28 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

117. 权利要求 29 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

118. 权利要求 30 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

119. 权利要求 31 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

120. 权利要求 32 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

121. 权利要求 33 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

122. 权利要求 34 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

123. 权利要求 35 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

124. 权利要求 36 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

125. 权利要求 37 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

126. 权利要求 38 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

127. 权利要求 39 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

128. 权利要求 40 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

129. 权利要求 41 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

130. 权利要求 42 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

131. 权利要求 43 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

132. 权利要求 44 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

133. 权利要求 45 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

134. 权利要求 46 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 97 到 99.5 稳定整合到基因组右手端。

135. 根据权利要求 2 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

136. 权利要求 3 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

137. 权利要求 4 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

138. 权利要求 5 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

139. 权利要求 6 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

140. 权利要求 7 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

141. 权利要求 8 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

142. 权利要求 9 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

143. 权利要求 10 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84

稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

144. 权利要求 11 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

145. 权利要求 12 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

146. 权利要求 13 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

147. 权利要求 14 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

148. 权利要求 15 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

149. 权利要求 16 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

150. 权利要求 17 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

151. 权利要求 18 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

152. 权利要求 19 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

153. 权利要求 20 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

154. 权利要求 21 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

155. 权利要求 22 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

156. 权利要求 23 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

157. 权利要求 24 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

158. 权利要求 25 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

159. 权利要求 26 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

160. 权利要求 27 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

161. 权利要求 28 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

162. 权利要求 29 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

163. 权利要求 30 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

164. 权利要求 31 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

165. 权利要求 32 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

166. 权利要求 33 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

167. 权利要求 34 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

168. 权利要求 35 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

169. 权利要求 36 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

170. 权利要求 37 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

171. 权利要求 38 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

172. 权利要求 39 所述的重组载体,其中目的 DNA 在图距单位 81-84

稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

173. 权利要求 40 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

174. 权利要求 41 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

175. 权利要求 42 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

176. 权利要求 43 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

177. 权利要求 44 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

178. 权利要求 45 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

179. 权利要求 46 所述的重组载体, 其中目的 DNA 在图距单位 81-84 稳定整合到基因组的右手端的 E3 区。

180. 一种产生用作疫苗的重组猪腺病毒载体的方法, 包括在复制非必需的区域中插入至少一种与有效启动子序列相连的异源核苷酸序列, 所述区域选自图距单位 81 到 84 和图距单位 97 到 99.5。

181. 根据权利要求 180 所述的方法, 其中在插入所述异源核苷酸序列之前, 将限制性酶切位点插入到所述猪腺病毒基因组的右手端。

182. 一种重组疫苗, 用于产生和/或优化抗体或细胞介导的免疫, 从而在猪中提供或增强抵抗感染生物体感染的保护, 所述疫苗包括至少一种稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体, 及适当的载体和/或赋形剂, 其中所述异源核苷酸序列整合到复制非必需的区域中, 所述区域选自图距单位 81 到 84 和图距单位 97 到 99.5。

183. 根据权利要求 182 所述的重组疫苗, 其中所述至少一种异源核苷酸序列能表达成抗原性多肽。

184. 根据权利要求 182 所述的重组疫苗, 其中所述至少一种异源核苷酸序列能表达成免疫增强分子。

185. 根据权利要求 182 所述的重组疫苗, 其中所述异源核苷酸序列编码抗原性多肽和免疫增强因子。

186. 根据权利要求 182 所述的重组疫苗, 其中选择所述载体和/或赋形剂使所述疫苗以喷雾剂、肠衣剂量单位或接种体的形式来传递。

187. 权利要求 183 所述的重组疫苗, 其中选择所述载体和/或赋形剂使所述疫苗以喷雾剂、肠衣剂量单位或接种体的形式来传递。

188. 权利要求 184 所述的重组疫苗, 其中选择所述载体和/或赋形剂使所述疫苗以喷雾剂、肠衣剂量单位或接种体的形式来传递。

189. 权利要求 185 所述的重组疫苗, 其中选择所述载体和/或赋形剂使所述疫苗以喷雾剂、肠衣剂量单位或接种体的形式来传递。

190. 产生根据权利要求 182 所述的重组疫苗的方法, 包括将至少一种稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体与适当的载体和/或赋形剂混合。

191. 产生权利要求 183 所述的重组疫苗的方法, 包括将至少一种稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体与适当的载体和/或赋形剂混合。

192. 产生权利要求 184 所述的重组疫苗的方法, 包括将至少一种稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体与适当的载体和/或赋形剂混合。

193. 产生权利要求 185 所述的重组疫苗的方法, 包括将至少一种稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体与适当的载体和/或赋形剂混合。

194. 第一种稳定整合并能表达至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体在制备用于治疗猪疾病的药物中的用途, 其中该异源核苷酸序列整合到猪腺病毒基因组的复制非必需的区域中并编码所述疾病的抗原决定簇, 其中所述区域选自 3 型猪腺病毒的图距单位 81 到 84 和图距单位 97 到 99.5。

195. 根据权利要求 194 所述的用途, 其中所述药物进一步包含第二种猪腺病毒载体, 该载体包括与整合到所述第一种重组猪腺病毒载体的

所述至少一种异源核苷酸序列不同的至少一种异源核苷酸序列。

196. 根据权利要求 195 所述的用途，其中所述第二种猪腺病毒载体包含与所述第一种猪腺病毒载体不同的血清型。

197. 根据权利要求 196 所述的用途，其中所述第二种猪腺病毒载体整合并能表达编码免疫增强分子的至少一种异源核苷酸序列。

重组的猪腺病毒载体

发明领域

本发明涉及用于在易于被疾病大量杀死的商品猪中产生免疫应答的抗原产生基因(异源基因序列或其片段)的传递载体。该载体对制备易于大范围给药以保护猪抵抗疾病的疫苗特别有用。本发明还涉及产生适当的传递载体的方法,制备基于该载体的疫苗的方法,给药策略及保护猪免生疾病的方法。

背景

集约猪工业的生产率依赖于对传染病的控制。虽然疾病由较好的卫生和检疫措施而部分得到控制,该工业仍依赖于免疫来保护畜群。在商业角度,每个动物在饲料和流行病控制花费中的费用很高并且因此,通过任何新提出的疫苗对疾病的预防和控制必须是便宜、有效并易于提供的。

传统上,由活病毒颗粒组成的疫苗是通过病毒传代及选择减毒形式来制备的。此外,死疫苗是从毒性病毒制备。

关于在猪中控制疾病而使用病毒载体的最新描述是用于控制假狂犬病的假狂犬病病毒的缺失突变。用疱疹病毒作为载体具有能刺激体液和细胞介导的应答的优点,因此可能提供终生保护。另一个优点是在此载体中插入其它异源序列的能力,该序列可从适当的启动子表达,产生的抗原暴露于动物的免疫系统,从而可保护动物抵抗两种疾病。此系统也有缺点。首先,存在潜伏期的问题。疱疹病毒具有在动物的存活期中整合入神经节中的神经元的能力。它仅需在动物身上施加适当的应激就能引起病毒的再活化并最终导致疾病的产生。然而,现在

已知特定基因-糖蛋白E-的缺失可使该病毒减毒并可防止病毒从潜伏期再活化。因此,此缺失载体目前广泛用作假狂犬病的消灭载体,随后不能用作传递其它抗原的适当载体。

因此本发明的目的是提供特别适于大范围给药的遗传物质异源序列的传递载体。

具体地说,本发明的目的是提供或改善产生和/或优化抗体或细胞介导的免疫的措施,从而保护动物抵抗常见猪疾病的感染。另一个目的是提供制备用于产生和/或优化抗体或细胞介导的免疫的适当工具的方法,从而可保护猪抵抗常见猪疾病的感染。进一步的目的是提供保护策略。

发明概述

在一个实施方案中,本发明提供能表达目的DNA的重组猪腺病毒,该目的DNA稳定整合到上述重组猪腺病毒基因组的适当位点。

在另一个实施方案中,本发明提供包括重组猪腺病毒的重组载体,该腺病毒稳定整合了至少一种异源核苷酸序列。优选地,异源核苷酸序列能表达抗原多肽。由至少一种核苷酸序列编码的抗原多肽对宿主载体来说优选是外源的。

在本发明进一步的实施方案中,异源核苷酸序列能表达免疫增强分子。

也可以理解异源核苷酸序列可编码和/或表达抗原多肽及免疫增强分子。

重组载体可包含活的重组猪腺病毒,其中病毒粒子的结构蛋白与产生重组猪腺病毒的天然猪腺病毒中的蛋白相比没有改变。

本发明是部分基于这样的发现:在猪腺病毒基因组中有非必要区,其与以前在其它腺病毒中鉴定的那些并不相关,因此使该病毒特别适于传递异源序列。

本发明还基于如下发现：猪腺病毒在猪中产生长期应答，因而其很适合作为疫苗的载体。并且，对呼吸道或胃肠道特异性的大量血清型的存在可使我们选出适合靶器官和所需的免疫应答类型的疫苗载体。

本发明还基于发现：猪腺病毒可包装大于中等大小基因组哺乳动物腺病毒中105%的基因组DNA，并且最终包装出的病毒粒子在体外和体内均是稳定的。

腺病毒是较大的并且多变化的家族，已从许多活的物种包括人和其它哺乳动物及多种鸟类中分离出来。结果将腺病毒分成至少2个属，乳腺病毒属（*Mastadenoviridea*）和禽腺病毒属（*Aviadenoviridae*），并且最近已提出了第三个属，*Atadenoviridae*，包括一些牛和鸟类的腺病毒(egg drop综合症)(Benkö和Harrach, *Archives of Virology* 143, 829-837, 1998)。

猪腺病毒是猪的广泛传染性致病体，目前已识别出4种不同的血清型(Adair和McFerran, 1976)并有存在至少另一种血清型的证据(Derbyshire等, 1975)。在发现的4种血清型中，有3种(血清型1到3)是从胃肠道中分离出来的而第四种是从呼吸系统发现的。认为猪腺病毒是较低致病性的广泛感染剂，尽管一般都是从生病的动物中分离到该病毒，但该病毒还是很可能仅作为继发感染存在。已从患有腹泻和呼吸系统感染的猪中分离出它们，但认为至少胃肠系统的腺病毒感染经常是无症状的(Sanford和Hoover, 1983)。猪腺病毒通过消化或吸入进行传播并且经口、鼻内和气管内接种的实验性感染可导致病毒的摄入。实验致病性研究已表明感染的初级位点是下部小肠，还可能有扁桃体(Sharpe和Jessett, 1967; Shadduck等, 1968)。对于血清型4的感染，似乎在实验感染中可发展出病毒血症。然而，这可能是胃肠系统血清型感染猪腺病毒的不太常见的表现(Shadduck等, 1968)。粪便排泄是猪腺病毒(PAV)传播最常见的原因，在感染后持续数周。在实验条件下还会发生从鼻释放。已表明PAV在肺炎中的作用是诱病因素或者是

增强剂(Kasza等, 1969; Schiefer等, 1974), 但实验中的血清型4肺炎并不需要第二种致病剂来产生疾病(Smith等, 1973)。

猪腺病毒有待进行大量的详细检查, 对于它们在疾病中的作用或它们的常见程度知之甚少。这是因为它们在畜群中并不产生任何重大的疾病并且不会由于产量的降低引起工业界的兴趣。可能猪腺病毒的血清型数目远远多于4种并且它可能作为正常的共生体存在于大多数猪畜群中。

对于猪腺病毒在形态学和分子生物学方面的研究已显示它与所检测的其它腺病毒的一些相似性。它的形态学特征是所检测的其它腺病毒都具有的含有双链DNA基因组核心的二十面体衣壳。极少针对PAV基因组特性的工作的报道(Benkö等, 1990, Kleiboeker等, 1993, Reddy等, 1993, Kleiboeker, 1994)。PAV基因组的大小(约为34.8 kb)略小于人腺病毒的基因组(约为35.9 kb)。用来自2型人腺病毒全基因组的DNA探针通过杂交进行的一项研究表明在猪和人的腺病毒之间具有相当的DNA同源性(Benkö等, 1990)。近期关于血清型4 PAV的报道证明它的基因组分布在L4和E3区(包括33K和pVIII基因)也与人腺病毒相似, 尽管它们的序列同源性不象预期的那样强(Kleiboeker, 1994)。

当选择适当的PAV作为活的载体将疫苗传递给猪时, 考虑血清型的天然丰富程度是重要的。那些在本领域中不太常见的血清型比那些经常暴露给猪以及猪已对其发展出免疫性的血清型相比具有明显的优点。

进一步的考虑是载体在超越初乳中的母体抗体保护刚出生的小猪这一阶段之后在猪中保持活性的能力。

在选择可能的PAV载体中的其它重要的考虑是致病性和免疫原性。优选地, 活载体病毒应该是高感染性但非致病性的(或至少是减毒的), 从而它们自身不会对靶物种造成不利影响。

疫苗载体的优选候选者是血清型4(呼吸的)和血清型3(胃肠的)的非致病性分离株。选择血清型3是因为它在连续猪肾细胞系中出色的生长能

力。其它血清型的分离，可能会大大改变此选择。值得注意的是毒性更强的毒株会产生更强的抗体应答。

可整合到病毒基因组非必需区并可编码感染性生物体的抗原决定簇（需要产生抵抗它的抗体或细胞介导的免疫）的异源核苷酸序列可以是表达由胃肠病毒例如轮状病毒或细小病毒，或呼吸病毒例如副流感病毒，或日本脑炎病毒引起的肠道感染的抗原决定簇的异源核苷酸序列。

可整合的异源核苷酸序列包括下列病原体的抗原决定簇：

猪细小病毒

肺炎支原体

猪副流感病毒

传染性胃肠炎(猪冠状病毒)

猪轮状病毒

猪瘟病毒(经典猪霍乱病毒)

猪痢疾

非洲猪瘟病毒

假狂犬病病毒(Aujesky's病病毒)，特别是假狂犬病病毒的糖蛋白D

猪呼吸和生殖综合症病毒(PRRSV)

整合于本发明载体中的更优选的异源核苷酸序列是那些表达猪细小病毒、猪轮状病毒、猪冠状病毒和经典猪霍乱病毒的抗原决定簇的异源核苷酸序列。

还可以设想整合的异源核苷酸序列可以是免疫增强分子如细胞因子或生长促进剂，例如猪白介素4(IL4)、 γ 干扰素(γ IFN)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、FLT-3配体和白介素3(IL-3)。

由候选载体的刺激引起的免疫应答类型可影响对插入其中的异源核苷酸序列的选择。天然经肠道感染的PAV血清型1、2和3可诱导局部黏膜免疫并因此更适合于肠道感染(例如经典猪霍乱病毒)。天然经呼吸系

统感染的PAV血清型4更适合于呼吸道感染(例如猪副流感病毒),也可诱导较好的局部免疫。

包含编码抗原决定簇或免疫增强分子的异源基因的目的DNA可位于病毒基因组的至少一个非必需区中。

可能适于替换或插入异源核苷酸序列的病毒基因组的非必需区可以是位于基因组右末端图距单位97到99.5的非编码区。优选的非编码区包括PAV基因组图距单位81-84的早期区(E3)。

异源基因序列可与启动子及先导序列相连从而核苷酸序列可在原位尽可能有效地表达。优选地,异源基因序列与猪腺病毒的主要晚期启动子和剪接先导序列相连。哺乳动物腺病毒的主要晚期启动子位于腺病毒遗传学图图距单位16-17附近并含有经典的TATA序列基元(Johnson, D.C., Ghosh-Chondhury, G., Smiley, J.R., Fallis, L.和Graham, F.L. (1988), 用腺病毒载体实现的单纯疱疹病毒糖蛋白gB的高丰度表达, 病毒学 164, 1-14)。

所考虑的猪腺病毒血清型的剪接先导序列是剪接到所有晚期基因mRNA 5'末端的三联体序列。

异源基因序列还可能与多聚腺苷酸化序列相连。

除了猪腺病毒主要晚期启动子,还可使用其它适当的真核启动子。例如,可使用SV40病毒、巨细胞病毒(CMV)或人腺病毒的启动子。

还可考虑猪腺病毒以外的加工和多聚腺苷酸化信号,例如SV40的。

在本发明进一步的方面中,提供重组疫苗以产生和/或优化抗体或细胞介导的免疫,从而提供或增强猪抗感染性生物体感染的保护能力,该疫苗包括与适当的载体和赋形剂配制的至少一种稳定整合了至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体。优选地,该核苷酸序列能表达抗原多肽或免疫增强分子。更优选地,该异源核苷酸序列可编码和/或表达抗原多肽和免疫增强分子。

优选地,由至少一种核苷酸序列编码的抗原多肽对宿主载体来说是

异源的。至少一种核苷酸序列可与启动子/先导序列和poly A序列相连。

重组疫苗可包含活的重组猪腺病毒载体，其中病毒粒子的结构蛋白与产生重组猪腺病毒的天然猪腺病毒中的病毒粒子结构蛋白相比并未改变。

用于重组疫苗的优选载体候选者是血清型3和4的PAV分离株。根据牲畜中存在的免疫及其环境也可使用其它血清型。

该疫苗可以是针对由多种病原体引起的呼吸及肠道感染的。为使疫苗针对特定的感染性生物体，可将编码感染性生物体的抗原决定簇的异源基因序列整合入含有载体的猪腺病毒基因组的非必需区。如果要使疫苗用于优化抵抗疾病的保护，适当的异源核苷酸序列可以是那些编码免疫增强剂如细胞因子或生长促进剂的序列。

疫苗可包含其它组分，例如稳定剂、赋形剂、其它药学上可接受的化合物或任何其它抗原或其部分。疫苗可以是冻干制剂或悬浮制剂的形式，所有这些形式在疫苗生产的领域中都是常见的。

用于例如疫苗的适当载体可以是等渗的缓冲盐溶液。

在本发明进一步的方面中，提供制备疫苗的方法，该疫苗用于产生和/或优化抗体或细胞介导的免疫从而诱导或增强猪抗感染性生物体的保护，该方法包括构建稳定整合了至少一种异源核苷酸序列的重组猪腺病毒载体，并将上述重组的猪腺病毒载体置于适合进行给药的形式中。优选地，核苷酸序列能表达抗原多肽，尽管它也可表达免疫增强分子。更优选地，核苷酸序列可编码和/或表达抗原多肽和免疫增强分子。核苷酸序列对于宿主载体是异源的为宜。

进一步更优选地，核苷酸序列与启动子/先导序列和poly A序列相连。

给药形式可以是肠衣剂量单位，用于腹膜内、肌肉内或皮下给药的接种物，喷雾剂，通过口服或鼻内使用的剂型。还可以在饮用水或饲料块中进行给药。

在本发明的另一方面中，提供产生猪腺病毒疫苗载体的方法，该方法包括在猪腺病毒中插入至少一种异源核苷酸序列。优选地，上述异源核苷酸序列能表达抗原多肽，尽管它还可表达免疫增强分子。更优选地，核苷酸序列可编码和/或表达抗原多肽和免疫增强分子。

优选地，由至少一种核苷酸序列编码的抗原多肽对于宿主载体是异源的。

更优选地，异源核苷酸序列与启动子/先导序列和poly A序列相连。

在构建适当载体的一个方法中，要进行改变以整合外源DNA的非必需区可通过同源重组来进行构建。通过此方法，非必需区得到克隆并且外源DNA与启动子、先导序列和多聚腺苷酸化序列优选地通过同源重组插入到侧翼序列之间。通过此方法还可使非必需区部分缺失创造出适于超出了病毒的一般包装限制的更大DNA插入体的额外空间。

通过此方法，含有适当的PAV启动子及外源基因序列及先导序列和多聚腺苷酸化识别序列的DNA表达盒可通过盒侧翼的使之易于插入PAV基因组的单一限制性内切酶位点来进行构建。

在本发明的另一方面中，提供将本发明的疫苗进行给药的策略。

在一个策略中，异源抗原和免疫调节分子如细胞因子可在同一重组体中表达并作为单一的疫苗进行传递。

在根据本发明所述的一个策略中，基于PAV载体的疫苗可以以“鸡尾酒”的形式进行给药，其中包含2种或多种带有不同外源基因或免疫增强剂的病毒载体。

在本发明优选的接种策略中，“鸡尾酒”或同时策略，使用基于PAV血清型3和血清型4的疫苗。

在另一个优选的策略中，构建基本的重组血清型3猪腺病毒，并用血清型4的纤维基因代替血清型3中的纤维基因或将血清型4的纤维也克隆入疫苗中从而扩大了本发明的靶向传递范围，可同时传递到肠及呼吸系统。

在根据本发明所述的另一个策略中，基于PAV载体的疫苗可进行连续给药，在进行首次PAV接种之后的某个阶段接种加强疫苗或新的疫苗。优选地，所用的疫苗基于异源PAV分离株。

在“连续”策略的优选形式中，选择那些基于不相关的血清型分离株的疫苗从而获得抵抗感染的最大保护效应。在这一策略的一个例子中，使基于PAV血清型3的疫苗在接种基于PAV血清型4的疫苗之前或之后进行给药。

根据本发明便于对猪在任何年龄进行载体疫苗的接种。可在小猪一天大的时候进行接种，对繁殖的猪可在晚至生育及生育以后有规律地进行接种。

优选地，不论根据连续给药策略还是鸡尾酒策略，猪都是在仍不具有充分的免疫活性时进行接种的。更方便地，一天大的猪可在首次接种的4周以后再进行接种以保护猪来抵抗重复感染。

在本发明进一步的实施方案中，提供在猪中产生免疫应答的方法，包括将有效量的本发明的重组疫苗对猪进行给药。有效量是足以引起免疫应答的量，优选地为每剂至少 10^4 TCID₅₀。

本发明的疫苗当然还可在给药时与抗其它病毒或生物体如细小病毒或假狂犬病的疫苗相结合。

在本发明此实施方案的优选方面中，给药是通过口服或鼻内使用来进行。

根据本发明构建或检测重组载体和疫苗的方法为本领域技术人员所熟知的。内切酶消化、连接和电泳的常规方法按照制造商或供应商的说明来进行。对常规技术不再进行详述，它们为本领域技术人员所熟知。

附图简述

图1表示PAV血清型3整个基因组的DNA限制性内切酶图谱。

图2表示PAV血清型3的序列特性和主要晚期启动子及剪接先导序列

的克隆。

图3表示主要晚期启动子的序列、上游增强子序列和剪接先导序列1、2和3。

图4表示基因组右手端末端720个碱基。

图5表示E3的启动子区和重叠的L4区。

图6表示构建PAV载体的优选方法。

图7表示用基于PAV的疫苗接种的猪在用CSFV抗原攻击后的体温值。

图8图示通过ELISA检测的在用基于PAV的疫苗接种之前和之后的猪中的抗PAV的抗体水平。

图9图示用基于PAV的疫苗接种的猪在用CSFV抗原攻击之前和之后的中和抗体的发展。

图10图示用表达猪G-CSF的重组PAV疫苗接种的猪中的平均白细胞(WBC)计数。

图11图示用表达猪G-CSF的重组PAV疫苗接种后的白细胞(WBC)计数的变化百分率。

图12图示用重组PAV-G-CSF接种后的单核细胞群的变化百分率。

图13图示用重组PAV-G-CSF接种后的淋巴细胞群的变化百分率。

图14图示用重组PAV-G-CSF接种后的T细胞刺激的变化。

优选的实施方案

现在讨论本发明基于PAV血清型3和血清型4分离株的优选实施方案。尽管由于在猪中发生感染的位点而选出这两个分离株，应当理解如果符合上述选择标准，其它猪腺病毒的分离株可能会更适合疫苗载体的构建。

一般地，认为PAV的致病性较低在本领域中不会产生严重的后果。PAV的致病性程度在Derbyshire, 1989中进行了综述。对PAV分离的首

次报道是来自患有腹泻的12天龄的猪 (Haig等, 1964)。两年以后, 4型PAV被首次报道, 它是从患有由未知原因引起的脑炎的猪的脑中分离的(Kasza, 1966)。更晚一些的报道将PAV主要与本领域中的腹泻关联起来, 尽管这一般是低水平的。PAV也可规律地从健康没有疾病体征的动物中分离出来, 它从患病动物中的分离很可能是与其流行性的巧合而不是作为致病性的指示物。然而, 已有报道称在血清型4和呼吸疾病之间有关联(Watt, 1978), 并且还有实验感染支持此结论(Edington等, 1972)。用病毒的胃肠血清型(例如血清型3)进行的实验感染产生了腹泻, 但所产生的病理改变在临床上并不显著。

通过传统方法可确定所选的PAV血清型3基因组的特性。完整基因组的DNA限制性内切酶图谱如图1所示。基因组的方向是从左向右。按约定腺病毒基因组一般如此定向, 不合成晚期mRNA转录物的末端区域位于左端。用于产生图谱的酶在每张图的边缘列出。

PAV血清型3的主要晚期启动子(MLP)和剪接先导序列(LS)的鉴定

PAV MLP的鉴定和克隆

通过使用限制性酶和PAV血清型3基因组的遗传学图, 得以定位含有MLP和先导序列的区域(图1)。将在此区域中鉴定的片段克隆入质粒载体中并测序。

MLP启动子序列被鉴定为含有经典的在测序的区域中是唯一的TATA序列及上游因子, 然后通过先导序列和转录起点的定位得到确证。

图2和图3说明了PAV血清型3的主要晚期启动子和剪接先导序列的序列特性。

为测定剪接到晚期mRNA的先导序列的结构和序列, 用PAV感染猪肾细胞并使感染进行到感染周期的晚期(经常为20-24小时p.i.)。此时用RNAagents总RNA纯化试剂盒(Promega)从感染细胞中纯化总RNA。将分离的RNA用异丙醇沉淀并于-70℃贮存于200μl等分试样中直至使用时。通过使用Poly AT序列系统(Promega, 美国)从总RNA中分离Poly

A(mRNA)。分离的mRNA用于产生cDNA。

为产生cDNA，制备了六邻体基因和五邻体碱基基因互补链的寡核苷酸，上述两个基因都是MLP的转录本。进一步制备了覆盖所提出的主要晚期转录本的加帽位点、TATA盒下游的24个碱基的寡核苷酸。该寡核苷酸用于与在Taq聚合酶链式反应中用来产生cDNA的寡核苷酸联合使用。用适当的限制性酶消化从阳性克隆产生的DNA从而测定插入片段的大小。用改良的链终止测序法对这些插入片段进行DNA测序(Sanger, F., Nichlen, S和Gulson, A.R., 1977, 用链终止抑制剂进行DNA测序 美国国家科学院院报 74: 5463-5467), 从而进行Taq DNA聚合酶延伸(Promega, 美国)。

为确认先导序列的加帽位点，制备新鲜的cDNA并在此时将dGTP残基尾巴加入其中。简言之，使cDNA与1mM dGTP和大约15单位的末端脱氧核苷酸转移酶(Promega) 在2mM CaCl_2 缓冲液中于37℃温育60分钟。通过加热到70℃持续10分钟来终止反应。然后用乙醇沉淀DNA并将其重悬于适合用于聚合酶链式反应(PCR)的体积中。用在5'端具有XbaI位点的poly(dC)寡核苷酸按照前面所描述的过程进行PCR。在过量的核苷酸存在下通过T4 DNA聚合酶于37℃作用30分钟使得到的片段变为平端并将其克隆入pUC18载体的SmaI位点。如上所述在通过杂交显示为阳性的克隆上进行DNA制备和测序。

图3表示从cDNA研究中确定的包括主要晚期启动子、上游增强子序列和剪接先导序列1、2和3的各个序列。图2表示完整的启动子盒及与之相连接的组分的DNA序列。

病毒基因组非必需区的鉴定

通过对约1.8 Kbp的PAV血清型3的ApaI片段进行克隆和完全测序来鉴定右端。通过比较RHE序列和左手端的序列测定了反向末端重复序列(ITR)。ITR有144个碱基长并且代表起点，在其中可进行插入。图4表示末端720碱基的序列。用来插入外源DNA的目的限制性内切酶位点在末

端序列中已标明。鉴定了E4启动子的推定的TATA位点，这是用来插入的可能位点的最左端。起始的插入可在SmaI或EcoRI位点进行。

已将该基因组的E3区（也是非必需区域）定位并克隆。已鉴定出E3区的启动子，重叠的L4区已被测序（图5）。L4多腺苷酸化信号后的E3区也是可能的插入位点，也可用于缺失来为更大的盒插入创造更大的空间。

PAV载体的构建

图6说明了构建PAV载体的一种优选方法。克隆PAV血清型3的右手端ApaI片段J并将唯一的距离反向重复序列230 bp的SmaI限制性内切酶位点用作插入位点。

将经典猪霍乱病毒(猪瘟病毒)的含有E2(gp55)基因的主要晚期启动子表达盒克隆入RHE片段的SmaI位点。

同源重组的优选方法是用HpaI（基因组中单一位点）切割PAV 3的基因组DNA，并用以ApaI切割的含有gp55的表达盒质粒转染此DNA。

通过常规的氯化钙沉淀技术将DNA混合物优选地转染入初级猪肾细胞中。

转染的优选方法是通过在基因组PAV 3和质粒之间的同源重组产生重组病毒(图6)。

发明详述

PAV载体的构建

下列实施例表示本发明中具代表性的重组猪腺病毒的构建。重组病毒在初级猪肾细胞上繁殖并测定滴度。

1. PAV-gp55的构建

将含有猪腺病毒主要晚期启动子、经典猪霍乱病毒(CSFV)基因(gp55)和SV 40 polyA的表达盒插入猪腺病毒血清型3的右手端(MU 97-

99.5)的SmaI位点并用于在猪初级肾细胞中产生重组的PAV 3。表达盒的大小是2.38 kb。在PAV 3的基因组中未产生缺失。具有中等基因组(~36kb)的哺乳动物腺病毒已表现出最多能容纳野生型基因组长度的105%，大于此大小的基因组不能包装或极为不稳定，常常会发生DNA重排(Betts, Prevec和Graham, 病毒学杂志 67, 5911-5921, (1993), 人腺病毒5型载体的包装能力和稳定性: Parks和Graham, 病毒学杂志, 71, 3293-3298, (1997), 产生腺病毒载体的辅助病毒依赖系统有助于确定有效DNA包装的下限)。在本发明中, PAV基因组的长度为34.8 kb, 其中插入了2.38 kb的表达盒而没有任何其它缺失。得到的本发明的重组猪腺病毒的基因组DNA长度为106.8%, 从而超过了所推定的构建稳定重组体的最大限度。重组病毒经噬斑纯化3次并在初级猪肾细胞中稳定传代。通过Southern印迹杂交显示出重组体含有gp55。通过用重组猪腺病毒感染在盖玻片上生长的初级PK细胞系证明了gp55的表达。24小时后, 免疫荧光染色(IF)显示出表达gp55的感染细胞。

2. 重组PAV-G-CSF的构建

将含有猪腺病毒主要晚期启动子、编码猪粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的基因和SV40 polyA的表达盒插入猪腺病毒血清型3的右手端(MU 97-99.5)的SmaI位点并用于在猪初级肾细胞中产生重组的PAV 3。表达盒的大小是1.28 kb。在PAV 3的基因组中未制造缺失。将重组病毒进行噬斑纯化2次并在初级猪肾细胞中稳定传代。通过Southern印迹杂交和聚合酶链式反应(PCR)表明重组体含有G-CSF。通过用重组的PAV-G-CSF感染初级肾细胞证明了G-CSF的表达。然后将来自感染的初级肾细胞的组织培养上清液在SDS-PAGE中进行电泳并转移到膜上。在Western印迹中用抗纯化重组大肠杆菌表达的猪G-CSF的兔多克隆抗血清来检测表达G-CSF的感染细胞。

3. 重组PAV-gp55T/GM-CSF的构建

将含有猪腺病毒主要晚期启动子、与编码猪粒细胞/巨噬细胞集落刺

激因子(GM-CSF)全长或其成熟形式的基因同阅读框融合的经典猪霍乱病毒基因gp55的截短形式和SV40 polyA的表达盒插入猪腺病毒血清型3的右手端(MU 97-99.5)的SmaI位点并用于在猪初级肾细胞中产生重组的PAV 3。表达盒的大小是2.1 kb。在PAV 3的基因组中未制造缺失。将重组病毒进行噬斑纯化2次并且通过PCR表明含有gp55和GM-CSF。

4. 重组PAV-gp55/E3的构建

将含有猪腺病毒主要晚期启动子、经典猪霍乱病毒基因gp55和SV40 polyA的表达盒插入猪腺病毒血清型3的E3区(MU 81-84)的BsrGI/SnaBI位点之间并用于在猪初级肾细胞中产生重组的PAV 3。表达盒的大小是2.38 kb。在PAV 3的基因组中制造620个碱基对的缺失。将重组病毒进行噬斑纯化2次并且通过PCR表明含有gp55。

接种策略

1. 接种PAV-gp55

在此实验中用5-6周龄的小猪来代表具免疫力正常的猪。对一组小猪(#2, 6和7)接种重组的PAV-gp55, 以每只小猪 1×10^7 pfu的剂量进行皮下给药。对照组的小猪(#3, 8, 11, 12, 13和14)不进行接种。在接种组的小猪中未观察到临床体征(体温没有升高)(表1)。

表1 接种rPAV::gp55的猪的体温

用rPAV::gp55CSFV接种后的体温 (℃)								
猪号码	天 0	1	2	3	6	9	10	13
2	39.7	39.2	39.4	39.8	39.6	39.8	39.6	39.2
3对照	39.5	39.2	39.4	39.0	38.8	39.3	39.0	39.7
6	39.7	39.1	39.1	39.0	39.1	39.8	39.1	39.8
7	39.4	39.8	39.8	39.4	39.9	38.9	39.6	39.7
8对照	39.6	39.5	39.4	39.0	40.5	39.4	39.1	39.7

用重组的PAV-gp55接种5周后以致命剂量($1 \times 10^{3.5}$ TCID₅₀)的毒性猪瘟病毒(经典猪霍乱病毒)以皮下给药的方式攻击这两组猪。

监测猪的体温, 结果在表2中列出并在图7中以图形的方式显示。

表2 用CSFV攻击后的体温 (℃)

猪号码	天																
	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2	39.6	39.9	40.1	40.3	40.1	39.2	39.7	39.5	39.5	39.7	39.4	39.1	39.5	39.1	40.0	39.4	38.9
3	39.6	40.4	39.6	40.0	40.7	40.7	41.9	40.7	40.9	42.0+							
6	39.5	39.5	40.0	40.0	39.6	40.5	39.9	39.2	39.2	38.8	39.3	38.8	38.9	39.6	39.3	39.1	38.9
7	39.8	39.9	40.4	40.6	40.3	39.7	39.7	39.7	39.5	39.3	39.1	39.3	39.6	40.6	39.7	39.8	39.7
8	39.9	40.6	40.5	40.3	40.0	41.4	39.8	41.0	40.6	39.0+							
11	39.6	39.9	40.0	40.3	40.7	40.5	40.0	41.8	41.5	41.3+							
12	39.8	39.9	40.9	41.0	41.2	40.6	40.1	41.0	41.7	40.3+							
13	39.7	40.0	41.2	41.5	41.6	41.0	39.7+										
14	39.3	40.0	39.6	39.8	40.3	40.7	41.2	40.8	40.2	41.7+							

结果表明到第5天对照组体温升高(高于40.5℃)并表现出疾病的临床体征。接种组未表现出疾病的临床体征。到第9天对照组的猪死亡或被进行安乐死。接种组的猪到第16天进行安乐死。在后期所有对照组的猪表现出严重的临床疾病,而接种组的猪未表现出疾病的临床体征。

结果表明皮下接种重组PAV-gp55的猪能在致死剂量的经典猪霍乱病毒攻击下存活。

收集两组猪的血清并用ELISA检测抗PAV抗体的存在。这些检测表明在接种之前就预先存在抗PAV的抗体。这些抗体的水平在接种重组PAV-gp55后28到36天后上升到顶峰。这些结果在图8中列出。

在用CSFV攻击之前和之后收集接种组的血清并检测CSFV的中和性抗体的存在。在接种重组PAV-gp55后的第0天和第28天(攻击前)检测血清,然后再在攻击后的第16天(接种后第52天)检测血清。图9中的结果表明在第0天未检测到中和性抗体,在第28天检测到低水平的中和性抗体,在第52天检测到高水平的抗体。这些结果表明重组PAV-gp55能在抗PAV的抗体预先存在时保护猪抵抗致命攻击。

2. 接种PAV-G-CSF

在此实验中用5-6周龄的小猪来代表具免疫力正常的猪。对一组小猪(n=4)接种重组的PAV-G-CSF,以每只小猪 1×10^7 pfu的剂量进行皮下给药。对第二组小猪(n=4)接种野生型(wt) PAV,以每只小猪 1×10^7 pfu的剂量进行皮下给药。对照组小猪(n=4)不进行接种。在接种后的104小时内每间隔8小时给猪放一次血。测定全血计数并监测每组的平均白细胞(WBC)计数。这些结果在图10中表示,平均WBC计数的变化百分率在图11中表示。

接种PAV wt或PAV-G-CSF的小猪在接种后24-72小时表现出轻微腹泻的疾病临床体征。两组小猪在接种后80-96小时都完全恢复。对照组的猪未表现出疾病的临床体征。

全血筛选结果表明对照组猪的平均WBC计数在实验过程中有所升

高。

接种PAV wt的猪也显示白细胞记数增加在接种后48-80小时白细胞降低，在80-96小时开始恢复。

接种重组PAV-G-CSF的猪的WBC计数在实验过程中有显著下降。这些结果的统计分析在表3中列出。分析表明平均WBC计数之间的差异(对照与PAV-G-CSF; PAV wt与PAV-G-CSF)是显著的，这说明重组PAV-G-CSF改变了与免疫相关细胞的比例。

表3 接种野生型 (wt) PAV、重组表达G-CSF的PAV (PAV-G-CSF) 或未接种的对照猪小组的平均WBC计数之间的t-检验结果

	接种前0小时	8-24小时	32-48小时	56-72小时	80-104小时
对照与 PAV-G-CSF ^a	$p > 0.2^b$	$p > 0.2$	$p > 0.2$	$p > 0.2$	$p < 0.005$
对照与PAV wt	$p > 0.1$	$p > 0.01^c$	$p > 0.02$	$P > 0.2$	$p < 0.05$
PAV-G-CSF 与PAV wt	$p > 0.2$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.001$

a: 零假设; 在平均WBC计数之间无差异。

b: $p > 0.05$, 在95%的置信水平不足以反对零假设, 得出结论在平均白细胞水平之间无差异。

c: $p < 0.05$, 在95%的置信水平反对零假设, 得出结论在平均白细胞水平之间有差异。

d: 每组中的4只小猪每隔8小时进行采血。

还监测了每个组测定了白细胞分类计数。平均单核细胞群的变化百分率在图12中表示, 平均淋巴细胞群的变化百分率在图13中表示。图12显示出猪中的单核细胞群在接种PAV wt后快速增加, 但在接种重组

体的PAV-G-CSF之后减少。此效应是因为由重组体产生的G-CSF的表达。这些结果的统计分析在表4中列出。分析表明在接种后32到96小时在PAV wt 与PAV-G-CSF之间有显著差异。图13显示出接种重组PAV-G-CSF之后淋巴细胞群数目有变化。未接种的对照在实验过程中表现出稳定的淋巴细胞数目，而接种PAV wt的猪由于感染表现出淋巴细胞群的显著增加。接种重组PAV-G-CSF的猪表现出淋巴细胞群体的减少。这些结果的统计分析在表5中列出。分析表明在接种后8到96小时在PAV wt 和重组PAV-G-CSF之间有显著差异。接种重组PAV-G-CSF和PAV wt后在淋巴细胞增殖中的不同应答是因为由重组体产生的G-CSF的表达。这些结果表明接种重组PAV-G-CSF导致与免疫相关的细胞亚群发生变化。

表4 在接种重组PAV - G - CSF、野生型PAV (PAVwt) 的猪或未接种的对照猪的平均单核细胞群间的t - 检验结果

	接种前	8-24小时 ^d	32-48小时	56-72小时	80-96小时	104小时
对照与 PAV - G - CSF ^a	$p > 0.1^b$	$p > 0.2$	$p > 0.2$	$p > 0.2$	$p > 0.2$	$p > 0.2$
对照与PAV wt	$p > 0.2$	$p < 0.002^c$	$p > 0.2$	$p < 0.001^c$	$p > 0.2$	$p > 0.2$
PAV wt与 PAV - G - CSF	$p > 0.2$	$p < 0.001^c$	$p > 0.2$	$p > 0.2$	$p > 0.1$	$p > 0.05$

a: 零假设；在平均单核细胞计数之间无差异。

b: $p > 0.1$ ，在90%的置信水平不足以反对零假设，得出结论在平均单核细胞水平之间无差异。

c: $p < 0.05$ ，在95%的置信水平反对零假设，得出结论在平均单核细胞水平之间有差异。

d: 每组中的4只小猪每隔8小时进行采血。

表5 在接种重组PAV-G-CSF、野生型PAV (PAV wt) 的猪或未接种的对照猪的平均淋巴细胞群间的t-检验结果

	接种前	8-24小时 ^d	32-48小时	56-72小时	80-96小时	104小时
对照与 PAV-G-CSF ^a	p > 0.2	p > 0.05 ^b	p > 0.2	p > 0.2	p > 0.2	p > 0.2
对照与PAV wt	p > 0.2	p > 0.2	p < 0.01 ^c	p < 0.001 ^c	p < 0.001 ^c	p > 0.2
PAV wt与 PAV-G-CSF	p > 0.2	p < 0.05 ^c	p < 0.002 ^c	p < 0.005 ^c	p < 0.001 ^c	p > 0.05

a: 零假设; 在平均WBC计数之间无差异。

b: p>0.05, 在95%的置信水平不足以反对零假设, 得出结论在平均白细胞水平之间无差异。

c: p<0.05, 在95%的置信水平反对零假设, 得出结论在平均白细胞水平之间有差异。

d: 每组中的4只小猪每隔8小时进行采血。

图14是图示在用伴刀豆凝集素A(Con A)刺激后每组T细胞增殖的变化。这些结果确证在接种PAV wt后2天出现T细胞的显著增殖, 而接种重组PAV-G-CSF则在第3天导致T细胞增殖的下降。

接种表达猪G-CSF的重组PAV的结果表明G-CSF对细胞的免疫应答有显著效应。

可以理解虽然本说明书确定了本发明的界限和范围, 所有在此范围内的实施方案例如异源基因、插入位点、启动子类型和血清型不必要都在这里特别举出, 尽管按照本发明它们应在保护范围之内。

图2

包括加入的USF 5' (上游)核苷酸的PAV主要晚期启动子盒的全序列。

核苷酸碱基记数: 76A, 143C, 187G, 96T, 总共502bp.

```

1      GGTGCCGCGG TCGTCGGCGT AGAGGATGAG GGCCCAGTCG GAGATGAAGG CACGCGCCCA
61     GGCGAGGACG AAGCTGGCGA CCTGCGAGGG GTAGCGGTCG TTGGGCACTA ATGGCGAGGC
121    CTGCTCGAGC GTGTGGAGAC AGAGGTCCTC GTCGTCCGCG TCCAGGAAGT GGATTGGTCG
181    CCAGTGGTAG TCCACGTGAC CGGCTTGCGG GTCGGGGGGT ATAAAAGGCG CGGGCCGGGG
241    TCGTGCGCCG TCAGTTGCTT CGCAGGCCTC GTCACCGGAG TCCGCGTCTC CGGCGTCTCG
301    CGCTGCGGCT GCATCTGTGG TCCCGGAGTC TTCAGGTCCT TGTTGAGGAG GTACTCCTGA
361    TCGCTGTCCC AGTACTTGGC GTGTGGGAAG CCGTCCTGAT CGCGATCCTC CTGCTGTTGC
421    AGCGCTTCGG CAAACACGCG CACCTGCTCT TCGGACCCGG CGAAGCGTTC GACGAAGGCG
481    TCTAGCCAGC AACAGTCGCA AG

```

上游刺激因子(USF)和TATA基元用黑体表示。完整的先导序列用斜体表示, 各个先导序列之间的加帽位点和剪接位点分别用双下划线或单下划线标出。

图3

启动子盒成分的各个序列:

I.包含在长盒中的5' (上游)序列

```

1      GGTGCCGCGG TCGTCGGCGT AGAGGATGAG GGGCCAGTCG GAGATGAAGG CACGCGCCCA
61     GGCGAGGACG AAGCTGGCGA CCTGCGAGGG GTAGCGGTCG TTGGGCACTA ATGGCGAGGC
121    CTGCTCGAGC GTGTGGAGAC AGAGGTCCTC GTCGTCCGCG TCCAGGAAGT GGATTGGTCG
181    CCAGTGGTAG

```

II.包括USE、TATA基元和加帽位点序列的序列

```

1      CCACGTGACC GGCTTGCGGG TCGGGGGGTA TAAAAGGCGC GGGCCGGGGT GCGTGGCCGT
61     C

```

III.第一先导序列

```

1      AGTTGCTTCG CAGGCCTCGT CACCGGAGTC CGCGTCTCCG GCGTCTCGCG CTGCGGCTGC
61     ATCTGTGGTC CCGGAGTCTT CAG

```

IV.第二先导序列

```

1      GTCCTTGTTG AGGAGGTACT CCTGATCGCT GTCCCAGTAC TTGGCGTG1G GGAAGCCGTC
61     CTGATCG

```

V.第三先导序列

```

1      CGATCCTCCT GCTGTTGCAG CGCTTCGGCA AACACGCGCA CCTGCTCTTC GGACCCGGCG
61     AAGCGTTCGA CGAAGGCGTC TAGCCAGCAA CAGTCGCAAG

```

图4

PAV基因组的右手端序列，此区域是计划插入表达盒的位点。

核苷酸碱基记数：183A，255C，306G，204T，总共948bp。

```

1 CATCATCAAT AATATACCGC ACACTTTTAT TGCCCCTTTT GTGGCGTGGT GATTGGCGGA
61 GAGGGTTGGG GCGGGCGGGC GGTGATTGGT GGAGAGGGGT GTGACGTAGC GTGGGAACGT
121 GACGTCGCGT GGGAAAAATAA CGTGGCGTGG GAACGGTCAA AGTCCGAGGG GCGGGGTCAA
181 AGTCCGCAGT CGCGGGGCGG AGCCGGCTGG CGGGAATTCC CGGGACTTTC TGGGCGGGTA
      HpaI      EcoRI      SmaI
241 ATCGTTAACG CGGAGGCGGG GGAATTCCGA TCGGACGATG TGGTACTGAT TAACCGACCG
      HpaI      EcoRI
301 CAGGCGTGTC CACATCCGCT GTGGGTATAT CACCGGCGCT CGCGGTGTTC GCTCACACTC
361 GTCTCGGCGC TGTCACAGAG AGAGACACTG AGAGCGAGAC GAGGAGAAAC CGAAAGCGGG
421 GCAGGAGGAG TCACCGGGCC ATCTTCCCAT CAGAGCCCTC TCATGGCCCA CGACCGACTG
481 CTGCTGGCCG CGGTGGCTGA CTGTTGCTCG CCGTGCTCTA TCTGTACTTC GCCTACCTCG
541 CGTGGCAGGA TCGGGACACT CTTACACTC AGGAGGCCGC CTCTCCTCGC TTCTTCATCG
601 GGTCCAACCA CCAGCCCTGG TGCCCGGATT TTGATTGGCA GGAGCAGGAC GAGCACACTC
661 ACTAGACGTT TAGAAAAAAG ACACACATTG GAACTCATAT ATGTCTGCGG GACCGCATCA
721 GCAGCCCGGT CTGCTGTTGG CTGCGGGTGA GAGGCCTCCG GTAATTCATC AGAACCGCAT
      StuI
781 TCATCTGCGC CACGTCCCGA CATATGGTGC TGACGTCAGA ACAGCCCAGC GTGATCCTTT
      SacIII
841 TAATGTGCTA GTCTACGTGC CCACTGGGTT TGCTGTGTTT GTGCCGACTG AGCGAGATTT
901 TCAGAGGAGG GATCTGGTCC GTTTCAGAC CTGCTGCTTC CGGCATCA

```

反向末端重复序列(ITR)用黑体显示。相关酶位点用下划线注明，酶的名称标在下方。图中还显示了E4区推定的TATA。

图 1

PAV3 基因组的限制性酶图谱

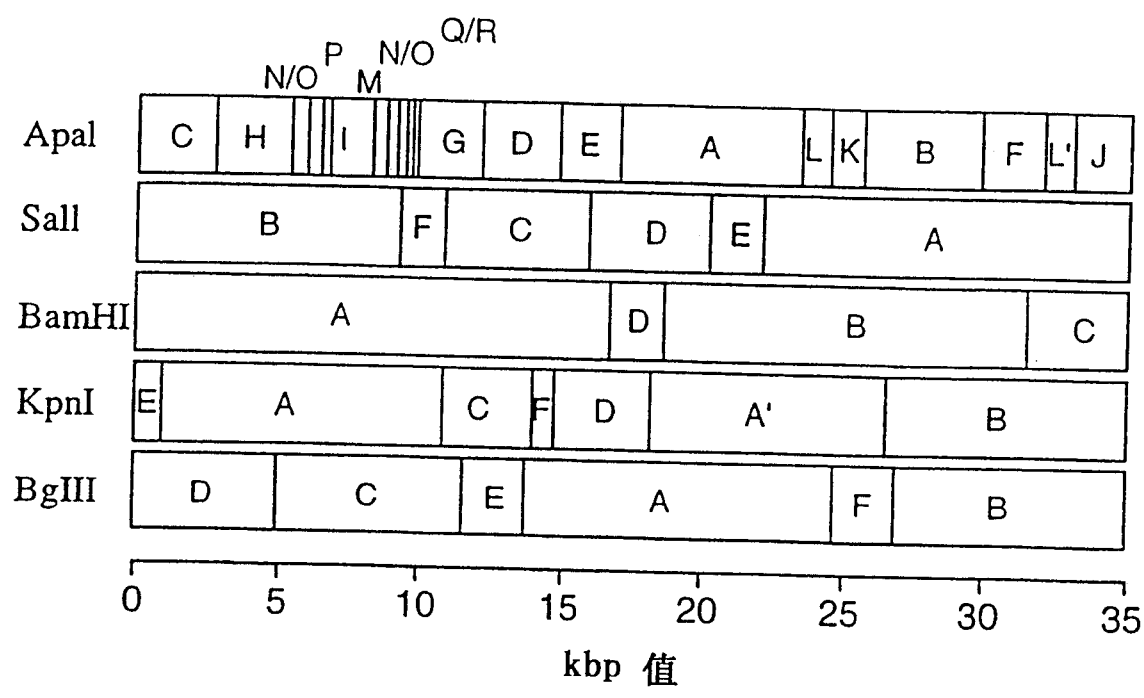


图 2

包括加入的 USF5'（上游）核苷酸的 PAV 主要晚期启动子盒的全序列

核苷酸碱基计数： 76 A 143 C 187 G 96 T 总共 502bp

1	GGTGCCGCGG	TCGTCGCGT	AGAGGATGAG	GGCCCAGTCG	GAGATGAAGG	CACGCGCCCCA
61	GGCGAGGACG	AAGCTGSCGA	CCTGCGAGGG	GTAGCGGTCG	TTGGGCACTA	ATGGCGAGGC
121	CTGCTCGAGC	GTGTGGAGAC	AGAGGTCCTC	GTCGTCCGCG	TCCAGGAAGT	GGATTGGTCG
181	CCAGTGGTAG	TCCACGTGAC	CGGCTTGCGG	GTCGSGGGGT	ATAAAAGGCG	CGGGCCGGGG
241	TGCGTGGCCG	TCAGTTGCTT	CGCAGGCCCTC	GTCACCGGAG	TCCGCGTCTC	CGGCGTCTCG
301	CGCTGCGGCT	GCATCTGTGG	TCCC GGAGTC	TTCAGGTCCT	TGTTGAGGAG	GTA CTCTGA
361	TCGCTGTCCC	AGTACTTGGC	GTGTGGGAAG	CCGTCCCTGAT	CAGGATCCTC	CTGCTGTTGC
421	AGCGCTTCGG	CAAAACACGG	CACCTGCTCT	TCGGACCCCG	CGAAGCGTTC	GACGAAGGCG
481	TCTAGCCAGC	AACAGTCGCA	AG			

上游刺激因子（USF）和 TATA 基元用黑体表示。完整的先导序列用斜体表示，各个先导序列之间的加帽位点和剪接位点分别用双下划线或单下划线来标出。

图 3

启动子盒成分的各个序列

I. 包含在长盒中的 5' (上游) 序列

```
1      GGTGCCGCGG TCGTCGGCGT AGAGGATGAG GGCCCAGTCG GAGATGAAGG CACGCGCCCA
61     GGCAGGACG AAGCTGGCGA CCTGCGAGGG GTAGCGGTCG TTGGGCACTA ATGGCGAGGC
121    CTGCTCGAGC GTGTGGAGAC AGAGGTCCTC GTCGTCCGCG TCCAGGAAGT GGATTGGTCG
181    CCAGTGGTAG
```

II. 包括 USF、TATA 基元和加帽位点序列的序列

```
1      CCACGTGACC GGCTTGCGGG TCGGGGGGTA TAAAAGGCGC GGGCCGGGGT GCGTGGCCGT
61     C
```

III. 第一先导序列

```
1      AGTTGCTTCG CAGGCCTCGT CACCGGAGTC CGCGTCTCCG GCGTCTCGCG CTGCGGCTGC
61     ATCTGTGGTC CCGGAGTCTT CAG
```

IV. 第二先导序列

```
1      GTCCTTGTTG AGGAGGTACT CCTGATCGCT GTCCAGTAC TTGGCGTGTG GGAAGCCGTC
61     CTGATCG
```

V. 第三先导序列

```
1      CGATCCTCCT GCTGTTGCAG CGCTTCGGCA AACACGCGCA CCTGCTCTTC GGACCCGGCG
61     AAGCGTTCGA CGAAGGCGTC TAGCCAGCAA CAGTCGCAAG
```

图 4

PAV 基因组的右手端序列、此区域是计划插入表达盒的位点

核苷酸碱基计数 183 A 255 C 306 G 204 T 总共 948 碱基

```

1 CATCATCAAT AATATACCGC ACACCTTTTAT TGCCCCCTTTT GTGGCGTGGT GATTGGCGGA
61 GAGGGTTGGG GCGGCGGGGC GGTGATTGGT GGAGAGGGGT GTGACGTAGC GTGGGAACGT
121 GACGTCGCGT GGGAAATAA CGTGCGGTGG GAACGGTCAA AGTCCGAGGG GCGGGGTCAA
181 AGTCCGCAGT CGCGGGCGG AGCCGGCTGG CCGGAATCC EcorI SmaI TGGCGGGTA
241 ATCGTTAAG HpaI EcoRI TCGGACGATG TGGTACTGAT TAACCGACCG
301 CAGGCGTGTG CACATCCGCT GTGGGTATAT CACCGGCGCT CGCGGTGTTT GCTCACACTC
361 GTCTCGGCGC TGTCACAGAG AGAGACACTG AGAGCGAGAC GAGGAGAAAC CGAAGCGGG
421 GCAGGAGGAG TCACCGGCC ATCTTCCCAT CAGAGCCCTC TCATGGCCCA CGACCGACTG
481 CTGCTGGCCG CGGTGGCTGA CTGTTGCTCG CCGTGCTCTA TCTGTACTTC GCCTACCTCG
541 CGTGGCAGGA TCGGGACACT CTTCACACTC AGGAGGCCGC CTCCTCTCGC TTCTTCATCG
601 GGTCCAACCA CCAGCCCTGG TGCCCGGATT TTGATTGGCA GGAGCAGGAC GAGCACACTC
661 ACTAGACGTT TAGAAAAAG ACACACATTG GAACTCATAT ATGCTGCGG GACCGCATCA
721 GCAGCCCGGT CTGCTGTTGG CTGCGGGTGA GAGGCCCTCG Stul GTAATTGATC AGAACCGCAT
781 TCATCTGCGC CACGTCCCGA CATATGGTGC TGACGTCAGA ACAGCCGAGC GTGATCCTTT
841 TAATGTGCTA GTCTACGTGC CCACTGGGTT TGCTGTGTTT GTGCCGACTG AGCGAGATTT
901 TCAGAGGAGG GATCTGGTCC GTTCCAGAC CTGCTGCTTC CGGCATCA

```

反向末端重复序列 (ITR) 用黑体显示。相关酶位点用下划线注明，酶的名称标在下方。图中还显示了 E4 区推定的 TATA。

图 5

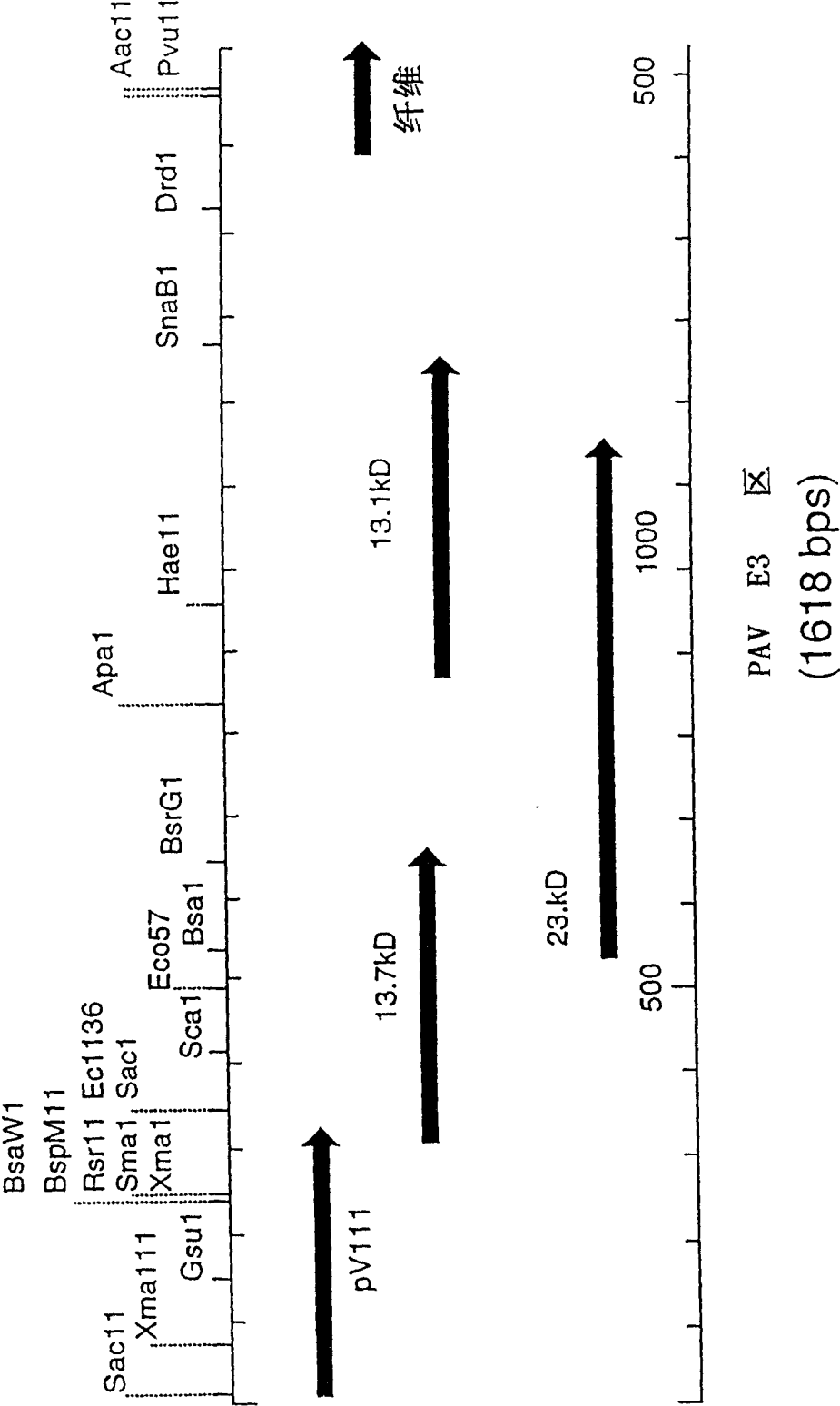


图 6

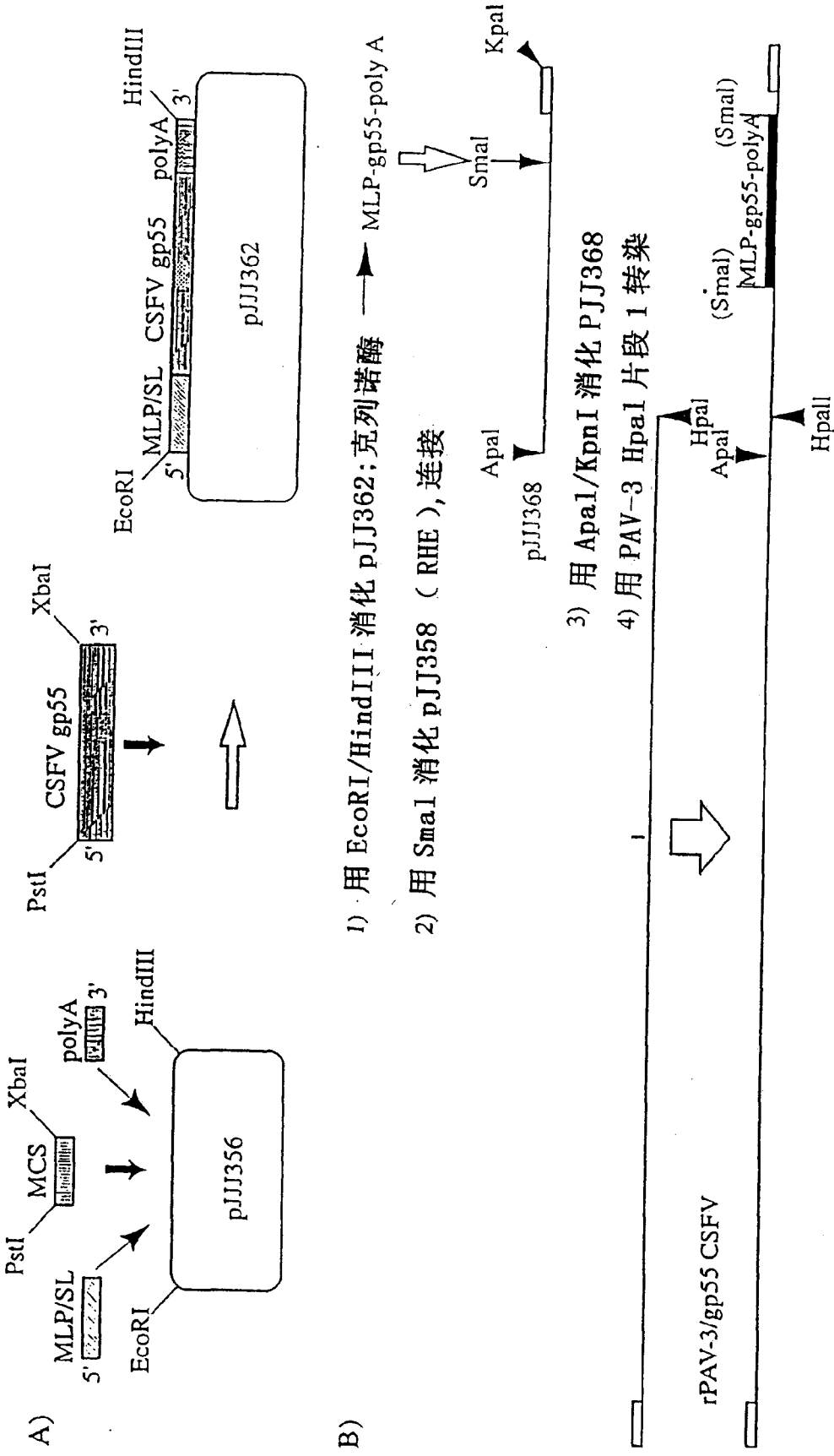


图 7

用 CSFV 攻击后猪的体温

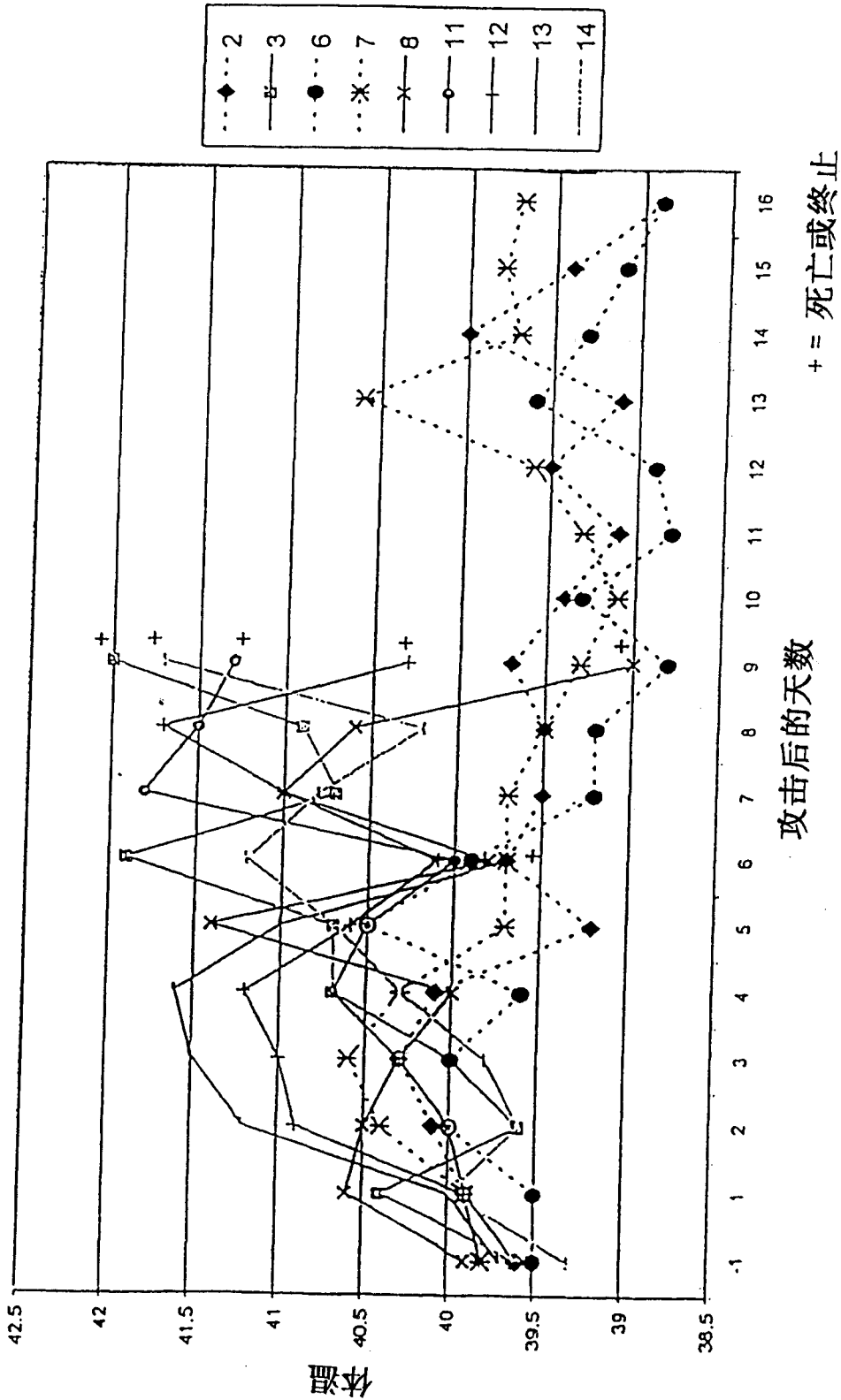


图 8

rPAV-gp55 接种后猪中的抗 PAV ELISA 滴度



图 9

猪血液中的 CSFV SN 抗体滴度

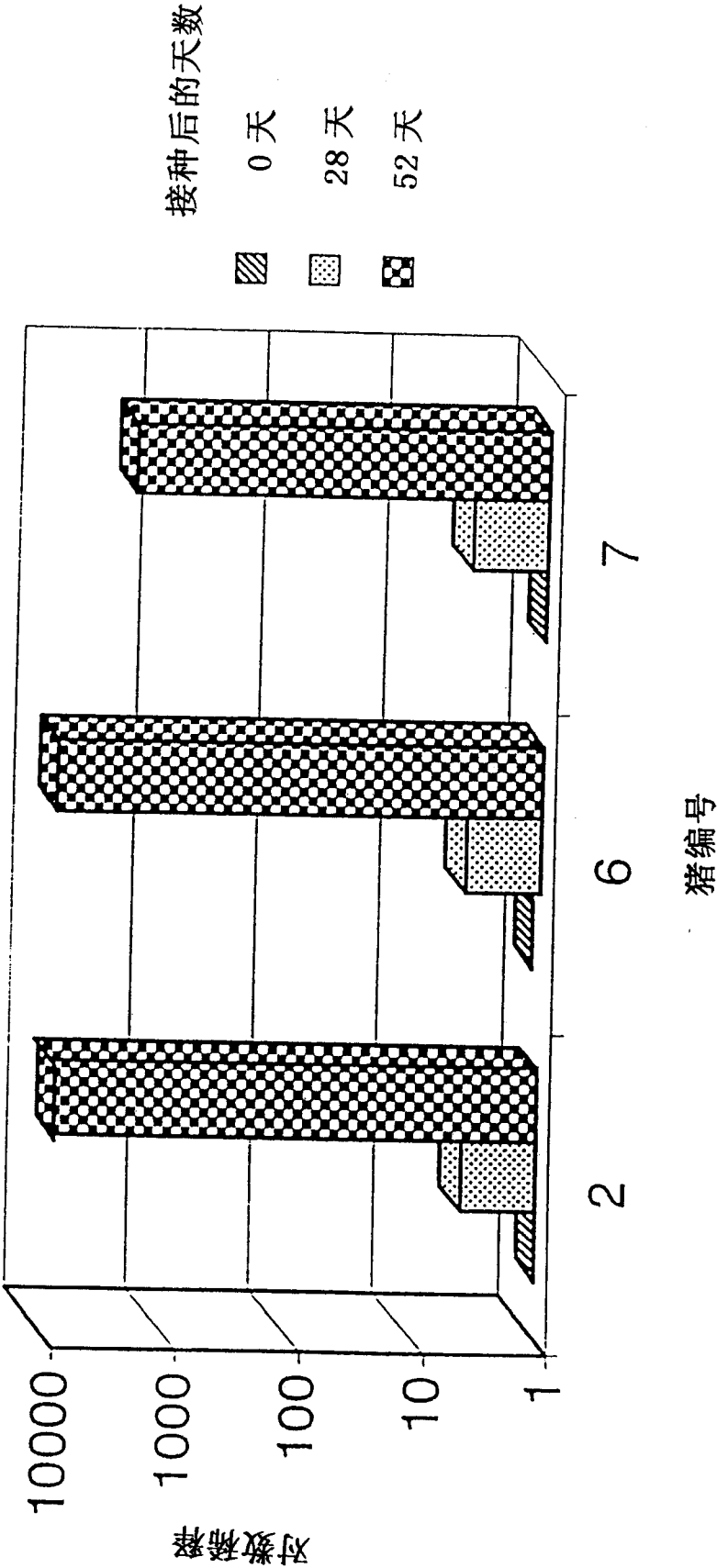
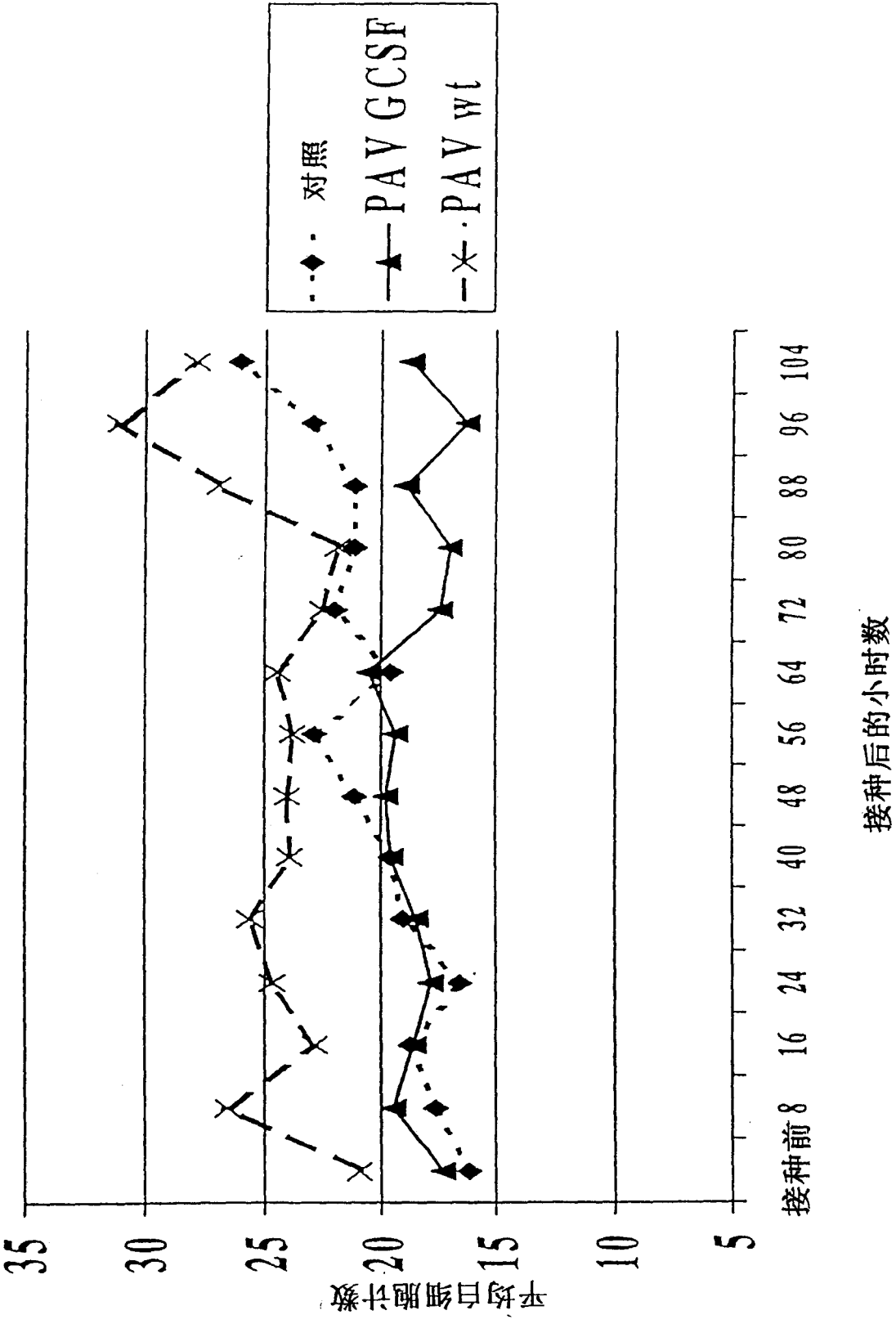


图 10



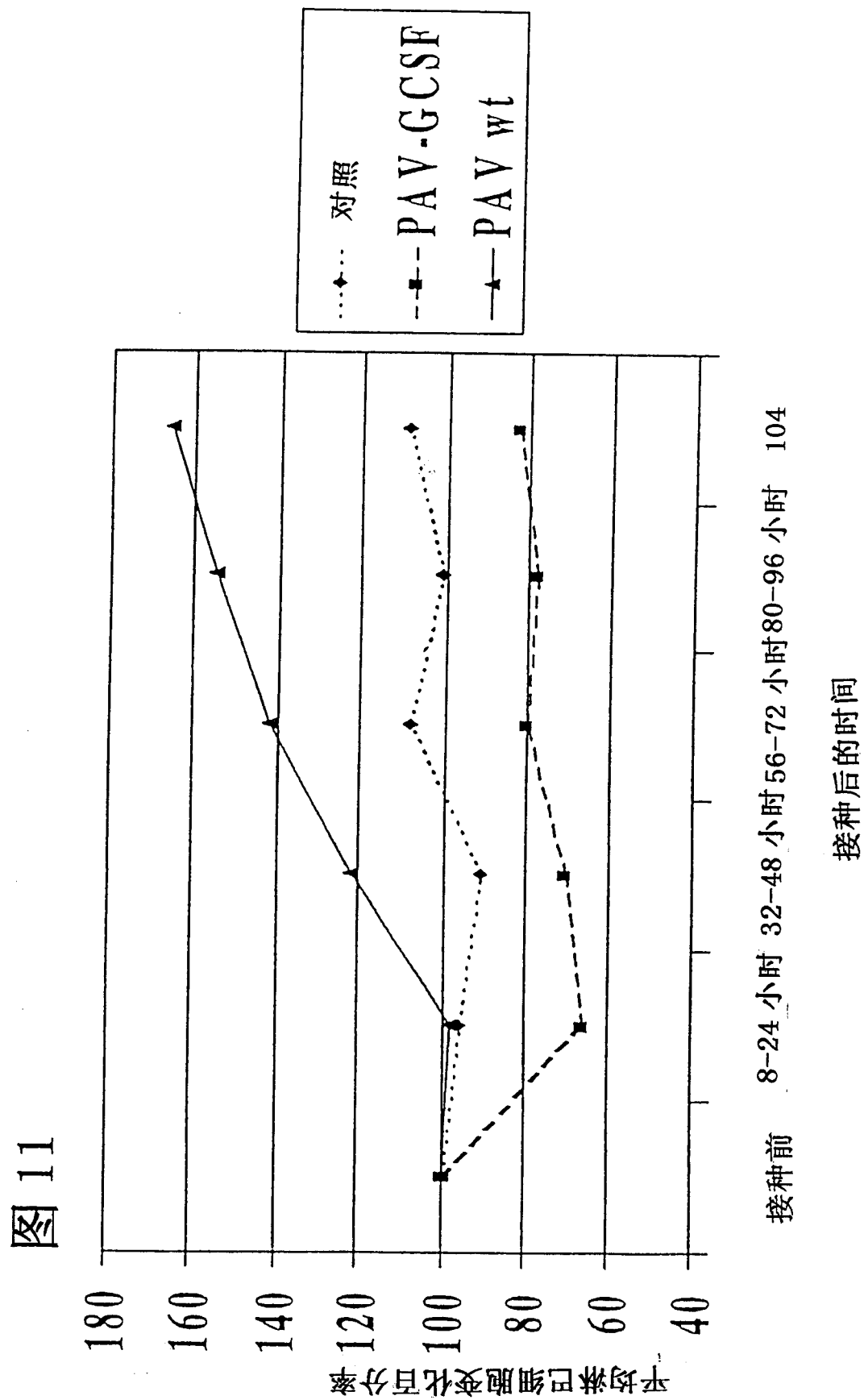


图 12

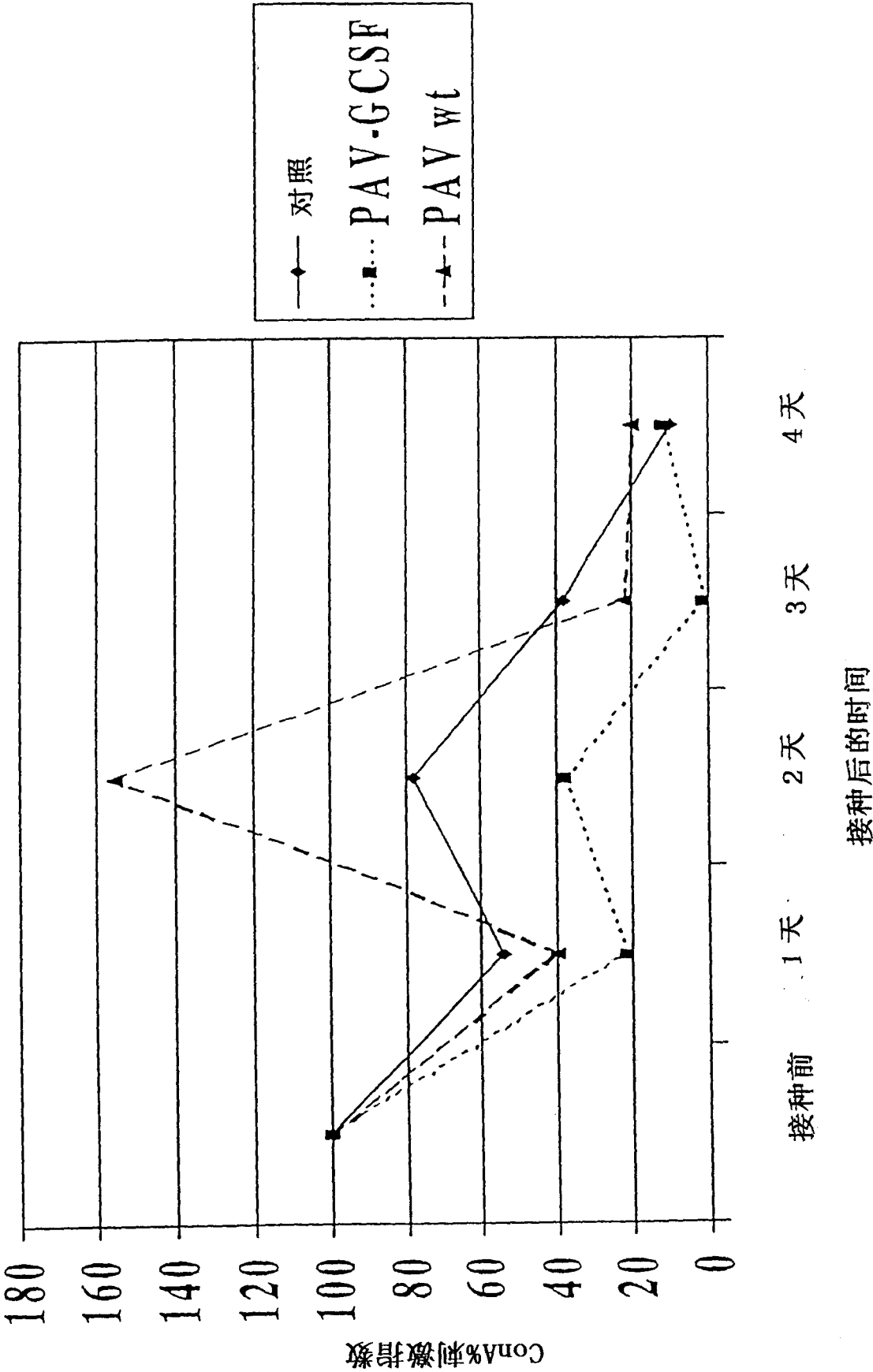


图 13

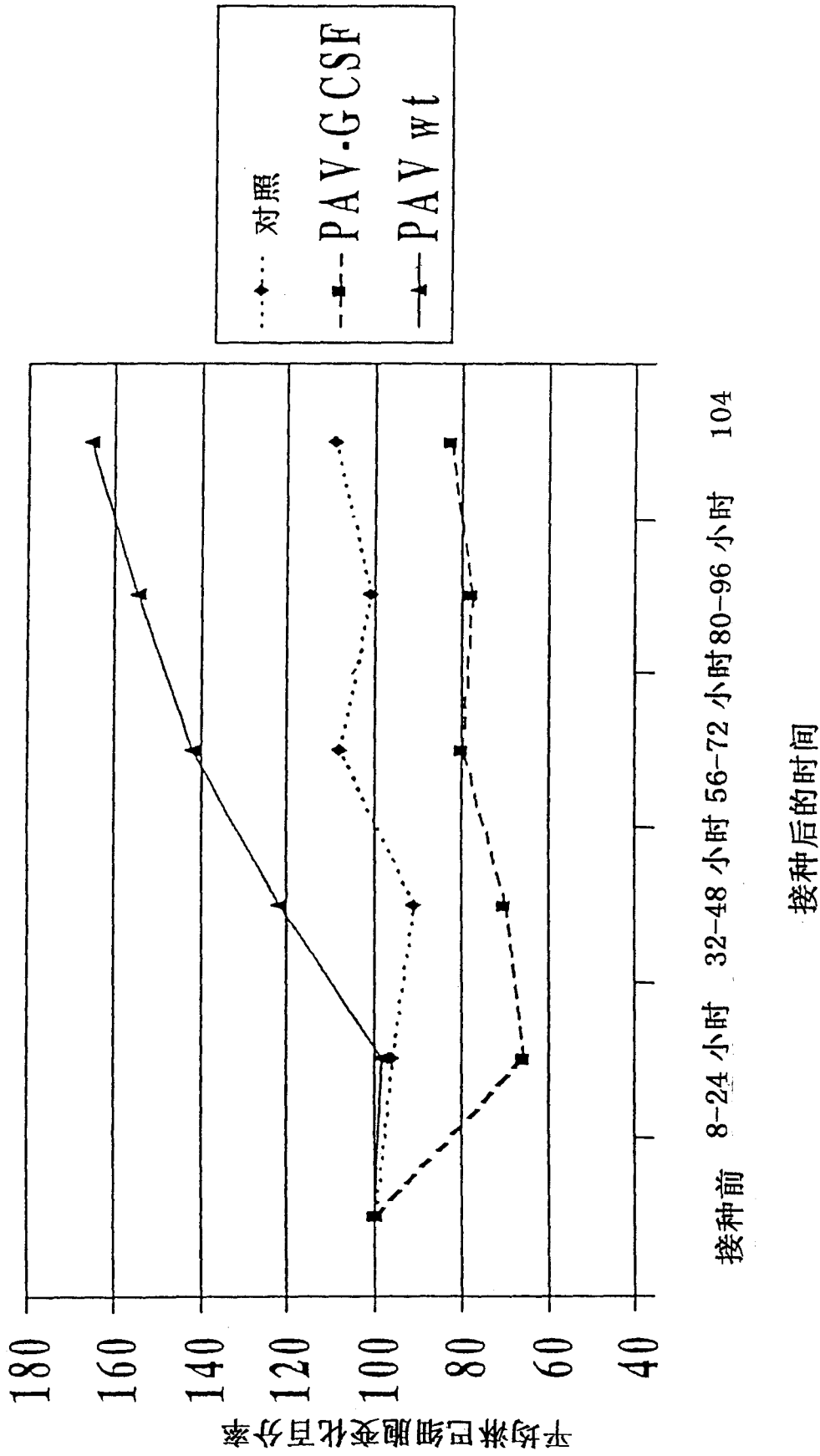


图 14

