

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810009294.9

[51] Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月30日

[11] 公开号 CN 101230336A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2001.2.15

[21] 申请号 200810009294.9

分案原申请号 01805141.3

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 17 [33] EP [31] 00103241.6

[71] 申请人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司

地址 德国英格海姆

[72] 发明人 克里斯琴·西博尔特
尼古劳斯·奥斯特里德
克努特·埃尔伯斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 闵丹 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 4 页

[54] 发明名称

gM - 阴性 EHV 突变体

[57] 摘要

本发明涉及马疱疹病毒 (Equine Herpes Viruses, EHV), 其中蛋白 gM 被基本缺失或修饰, 并且其免疫调节能力无功能。本发明进一步的方面涉及编码所述病毒的核酸, 包含这些病毒或核酸的药物组合物及其用途。本发明也涉及增强由 EHV 疫苗所诱发的抗野生型 EHV 感染的免疫应答的方法, 涉及 EHV 感染的预防和治疗方法以及将野生型 EHV 感染的动物与用本发明 EHV 处理的动物区分的方法。

- 1、一种马疱疹病毒，其中蛋白 gM 基本缺失。
- 2、一种马疱疹病毒，其中蛋白 gM 被修饰并且无功能。
- 3、一种权利要求 1 或 2 的马疱疹病毒，其特征是蛋白 gM 通过编码蛋白 gM 的基因中的缺失、突变或插入而被基本缺失或修饰。
- 4、权利要求 1 到 3 中任一项的马疱疹病毒，其特征是编码蛋白 gM 的基因被缺失或修饰，并且编码 UL9 同系物的基因(基因 53)的表达未受到影响。
- 5、权利要求 1 到 4 中任一项的马疱疹病毒，其中病毒株 EHV-1 Ab4p 的核苷酸 93254 到 94264 或其他 EHV 毒株中相应区段被缺失，其中的核苷酸编号仅为举例。
- 6、马疱疹病毒 H Δ gM-3b1 株，其保藏号为 EACC 99101536。
- 7、权利要求 1 到 6 中任一项的马疱疹病毒，其中所述病毒是 1 型或 4 型马疱疹病毒。
- 8、权利要求 1 到 7 中任一项的马疱疹病毒，所述马疱疹病毒带有一个或多个异源基因。
- 9、一种核酸，其编码权利要求 1 到 8 中任一项的马疱疹病毒。
- 10、一种药物组合物，其包含权利要求 1 到 8 中任一项的马疱疹病毒。
- 11、一种药物组合物，所述药物组合物包含权利要求 9 的核酸。
- 12、权利要求 1 到 8 中任一项的马疱疹病毒的用途，其用于制备一种药物组合物。
- 13、权利要求 9 的核酸的用途，其用于制备一种药物组合物。
- 14、一种方法，所述方法可增强马疱疹病毒疫苗所诱导的抗野生型感染的免疫应答，该方法的特征是所述疫苗包含权利要求 1 到 7 中任一项的马疱疹病毒。
- 15、一种预防和/或治疗动物的方法，所述方法的特征是给予所述动物以权利要求 10 或 11 的药物组合物。
- 16、一种方法，所述方法用于区分野生型马疱疹病毒感染的动物和权利要求 1 到 7 中任一项的经修饰的马疱疹病毒处理的动物，其特征是确认野生型病毒的蛋白 gM 或经修饰病毒中表达的蛋白 gM 或经修饰病毒中蛋白

gM 的基本缺失。

17、权利要求 16 的方法，其特征是：

- a)目的样品被加入一种分离的 gM 或其修饰的衍生物中，
- b)加入特异于所述分离的 gM 蛋白或其修饰的衍生物的抗体，
- c)确定所述抗体的结合。

18、一种用来实施权利要求 16 和 17 的方法的试剂盒，其特征是所述试剂盒包含分离的蛋白 gM 或其分离的修饰衍生物和/或抗体，所述抗体或者特异于野生型 gM 蛋白或者特异于经修饰的蛋白 gM。

19、一种方法，所述方法用于区分野生型马疱疹病毒感染的动物和权利要求 1 到 7 中任一项的修饰的马疱疹病毒处理的动物，其特征是确认编码病毒野毒株蛋白 gM 的核酸和编码经修饰的 gM 蛋白的核酸或其基本缺失之间的差异。

20、一种用于实施权利要求 19 的方法的试剂盒，其特征是所述试剂盒包含一或多种核苷酸序列特异性探针，所述探针或者结合编码野生型蛋白 gM 的核苷酸，或者结合编码经修饰的 gM 蛋白的核苷酸。

gM-阴性 EHV 突变体

本申请是中国申请 01805141.3 的分案申请，该母案于 2001 年 2 月 15 日以国际申请号 PCT/EP01/01672 提交，于 2002 年 8 月 16 日进入中国国家阶段，本分案采用了与该母案一致的发明名称

发明领域

本发明涉及马疱疹病毒(Equine Herpes Viruses, EHV)，其中蛋白 gM 基本缺失或其中 gM 被修饰，并且其免疫调节能力无功能。本发明进一步的方面涉及编码所述病毒的核酸，包含这些病毒或核酸的药物组合物及其用途。本发明也涉及增强由 EHV 疫苗所诱发的抗野生型 EHV 感染的免疫应答的方法，涉及 EHV 感染的预防和治疗方法以及将野生型 EHV 感染的动物与用本发明 EHV 处理的动物区分的方法。

发明背景

马疱疹病毒 1(EHV-1)是 α -疱疹病毒亚科(*Alphaherpesvirinae*)的一个成员，是马的病毒诱导性流产的主要原因，并能引起呼吸和神经病症。EHV-1 毒株 Ab4p 的完整 DNA 序列已被确定(Telford, E. A. R.等, 1992); 然而，仅确定有少数几个基因和基因产物与 EHV 的毒性相关。

采用了两种不同的方式以控制 EHV-1 的感染。首先，开发了经修饰的活疫苗(MLVs)，包括在欧洲和美国广泛使用的病毒株 RacH(Mayr, A. 等, 1968; Hubert, P.H. 等, 1996)。其次，评估灭活疫苗和独立表达的病毒糖蛋白的免疫原性和保护潜能。用重组杆状病毒表达的糖蛋白中，糖蛋白(g)B, C, D 和 H 在鼠模型中诱导对后续 EHV-1 攻击的部分保护(Awan, A.R. 等, 1990; Tewari, D. 等, 1994; Osterrieder, N. 等, 1995; Strokes, A. 等, 1996)。然而，使用 MLVs 比灭活疫苗和亚单位疫苗更有优势。MLVs 对于诱导细胞介导的免疫应答是高效的，而细胞介导的免疫应答最有可能提供抗疾病的保护(Allen, G.P.等, 1995; Mumford, J.A.等, 1995)。

疱疹病毒糖蛋白主要涉及感染的早期，病毒粒子从细胞中的释放，以及通过相邻细胞间融合导致的病毒粒子的直接细胞到细胞传播。目前已确立了 11 种单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 编码的糖蛋白，定名为 gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, 和 gM。缺乏 gC, gE, gG, gI, gJ, 和 gM 的 HSV-1 突变体是具有活性的，显示这些基因对培养细胞的复制是非必需的。

HSV-1 和马疱疹病毒 1 的核苷酸序列对比表明,所有已知的 HSV-1 糖蛋白在 EHV-1 中都是保守的。根据目前的命名法,这些糖蛋白都根据其 HSV-1 同系物定名。已知 EHV-1 的 gC, gE, 和 gI 不是细胞培养物生长所必需的,而 gB 和 gD 对于病毒在培养细胞中的生长是必需的。其他 EHV-1 糖蛋白对于病毒在培养细胞中复制的作用仍未知(Flowers, C.C.等, 1992)。利用 λ gt11 表达文库和抗纯化 EHV-1 的单克隆抗体(MAbs)对 EHV-1 的六种包膜糖蛋白进行作图(Allen, G.P.等, 1987)。此外,转录分析和蛋白分析表明糖蛋白 gB, gC, gD, gG, gH 和 gK 在 EHV-1 感染的细胞中表达。糖蛋白 gM 是最近被详细分析的 HSV-1 糖蛋白(由基因 UL10 编码, Braines, J.D.等, 1991; Baines, J.D.等, 1993)。其是被报道的唯一的在所有疱疹病毒亚科中都保守的非必需糖蛋白,对人和鼠巨细胞病毒以及 γ -疱疹病毒亚科(*Gammaherpesvirinae*)成员 EHV-2, herpesvirus saimiri, 和 Epstein-Barr 病毒中的这种糖蛋白已有描述。如同许多疱疹病毒糖蛋白一样, HSV-1 的 gM 存在于病毒粒子和被感染细胞的膜中。只缺少 gM 的 HSV-1 突变体的效价比野生型病毒效价降低约 10 倍,并且在鼠模型中表现出毒性降低(Baines, J. D.等, 1991; MacLean, C.A.等, 1993)。EHV-1 的 gM 同系物(gp21/22a;从现在起作为 EHV-1 gM)最初由 Allen 和 Yeargan 说明(Allen, G.P. 等, 1987),证明是一种病毒包膜的主要组分。进一步的研究表明基因 52, 即与 HSV-1 UL10 同源的基因,编码 450 个氨基酸的 EHV-1 gM 多肽(Pilling, A.等, 1994; Telford, E.A.R.等, 1992)。EHV-1 gM 代表一种多疏水蛋白,其包含 8 个预期的跨膜结构域,并有报道表明其作为 M_r45000 蛋白存在于感染的细胞和纯化的病毒粒子中(Pilling, A.等, 1994; Telford, E.A.R.等, 1992)。

1996 年 Osterrieder 等将大肠杆菌 lac Z 基因插入到 EHV-1 毒株 RacL11 的 gM 基因(开放阅读框 52)中,把带有这种基因的病毒突变体(L11 Δ gM)的穿透特性与亲本 EHV-1 RacL11 的穿透特性相比,从实验中得出结论:EHV-1 gM 对于病毒穿透进入靶细胞以及所述病毒在细胞到细胞的传播有重要作用。1997 年,Neubauer 等通过对被免疫小鼠脾脏中的病毒中和抗体和 EHV-1 特异性 T 细胞的检验,表明上述 EHV-1 的 gM 插入突变体是减毒的,并诱导保护性免疫。

本发明要解决的技术问题是提供新的修饰的马疱疹病毒,当用于预防和治疗 EHV 感染时,所述马疱疹病毒表现显著增强的免疫原性。

发明公开

对于上述技术问题的解答通过权利要求中定义的说明和实施方案实现。

我们惊讶地发现如果蛋白 gM 基本缺失或所述蛋白被修饰，从而使其本可能具有的免疫调节能力无功能，则对于马疱疹病毒的保护性免疫力会有显著的增强。因此，这是首次表明蛋白 gM 调节 EHV 的免疫原性。有意思的是，先前讨论的病毒突变体 L11 Δ gM 和 H Δ gM-Ins 也诱导亲本毒株 RacL11 和 RacH 的免疫原性。尽管 Osterrieder 等，1996 和 Neubauer 等，1997 的作者没有用当时可得的抗体检测 H Δ gM-Ins 病毒的 gM，但 H Δ gM-Ins 突变体仍表现与产生 gM 的亲本毒株相似的免疫调节潜能。其原因可能是，尽管在公开的实验中 Western 印迹证明了 lacZ 的插入，但 H Δ gM-Ins 中 gM 的残留部分得以表达。因此 gM 的这一残留部分一定与 gM 的免疫调节活动有关。因此，本发明首次提供了一种 EHV，其蛋白 gM 基本缺失或所述蛋白被修饰，从而其在病毒宿主中的免疫调节能力无功能。

一个方面，本发明涉及马疱疹病毒，其中蛋白 gM 基本缺失。

另一个同样重要的方面，本发明涉及马疱疹病毒，其中所述蛋白被修饰并且无功能。

此处所用术语“基本缺失”是因为相邻必需蛋白 UL9 同系物基因(基因 53)的位置，其方向以及与编码 gM 蛋白的基因的重叠，因此需要保留最短的 gM 基因的核苷酸序列以使基因 53 能够表达，从而保留病毒活性。一个优选的实施方案涉及 EHV，其中 gM 基因的至少 70%缺失，而一个更优选的实施方案中对一种 EHV 要求了权利，其中 gM 基因的至少 80%缺失，而一个更优选的实施方案中对一种 EHV 要求了权利，其中 gM 基因的至少 90%缺失。

术语“无功能”蛋白 gM 应被理解是所述蛋白相关于病毒-宿主间相互作用的免疫调节力。本发明的 EHV 与其他表达功能性 gM 的 EHV 毒株间免疫原性的差异，可通过兽医病毒学现有领域普通专家可得的标准动物模型进行确定。确定 EHV 表达功能性或非功能性 gM 的一个可能方法在实施例 1 中给出。所述方法提供了一种精确并且直接的实验方案，用于确定修饰的目的 EHV 毒株与其他毒株之间免疫调节能力的差异，所述其他毒株与

目的毒株相比，差异仅在于其他毒株表达完整的未修饰的功能性 gM 蛋白。实施例 1 中所述方法特别合适，因为在 BALB/c 小鼠中 EHV 毒株的行为与天然宿主中单个病毒的相一致(Mayr, A.等, 1968; vanWoensel, P.A.M.等, 1995; Colle, C.F. 等, 1996; Hubert, P.H.等, 1996; Matsumura, T.等, 1996)。

对于从 EHV 中缺失蛋白 gM 或使其无功能，可有多种方法(Sambrook, J.等, 1989)。非限制性例子包括在编码蛋白 gM 的基因中的缺失、突变或插入。所述病毒中相应的完整或部分核苷酸序列的缺失可能导致 gM 蛋白的完全缺失或无功能表达。通过在该基因或其调节区域中突变核苷酸序列或插入额外的核苷酸，也可获得同样的结果。在上述两个方面的一个优选实施方案中，本发明涉及 EHV，其根据本发明在编码蛋白 gM 的基因中因缺失、突变或插入而改变。

gM ORF 与 UL9 ORF 和启动子序列重叠(位置 94389 到 97052, Ori 结合蛋白, Telford 等, 1992)。由 UL9 ORF 编码的蛋白对于病毒生长是必需的，如在 HSV-1 中例示(Carmichael 等, 1988; Malik 等, 1992)。因此，一个更优选的实施方案中，本发明涉及根据本发明的 EHV，其特征在于编码蛋白 gM 的基因被缺失或修饰，并且编码 UL9 同系物的基因(基因 53)的表达不受影响。术语“不受影响”并不涉及 UL9 的特定数量或质量特征，而仅仅指该基因的表达不受影响，只要病毒表达所述蛋白，并且所述蛋白对于病毒活性基本足够的量存在。

本发明公开了一种实施本发明最优选的 EHV，其中病毒株 EHV-1 Ab4p 的核苷酸 93254 到 94264(Telford, E.A.R 等, 1992)或其他毒株中相应位置被缺失，其中的核苷酸编号仅为举例。共有 1352 个核苷酸的 gM ORF 上这 1010 个核苷酸的缺失，导致任何可检测的 gM 多肽的基本缺失。这种 gM 基因核苷酸的几乎完全缺失仍然产生活病毒，所述活病毒基本不表达 gM 蛋白衍生物，因此所有其他 EHV-1 基因的表达不受影响。这种部分的缺失不影响 UL9 ORF 的表达。

上述核苷酸的位置参照 Telford 等, 1992(GenBank/EMBL 数据库(接入号 M86664))针对 EHV-1 毒株 Ab4p 的编号。这些核苷酸位置决不仅限于 Ab4p EHV-1 毒株中定义的确切位置，而只以举例的方式用来指出在这些位置的核苷酸或其他 EHV 毒株中相应于 gM 基因这些位置的核苷酸。对于不同的 EHV 病毒，优选核酸的位置编号可能有所不同，但对于 α -疱疹病毒科的病毒分子生物学领域专家可通过其相对于所述序列的其他核苷酸的位置，容

易地识别这些优选的核苷酸。与 gM 基因相邻的基因的功能性表达对于病毒的活性是重要的。

根据本发明最优的 EHV 毒株是 EHV-1 毒株 H Δ gM-3b1，其保藏在 ECACC(欧洲细胞培养物保藏中心，Salisbury, UK)，保藏号 99101536。

本发明特别适用于 EHV 的 1 型和 4 型，因为这二者亲源关系极近(Telford,E.A.R.等, 1992 和 1998)。

本发明的 EHV 特别适用于基因治疗，适用于携带一般性的异源物质，尤其适合于携带外源抗原用于活疫苗(对于 EHV 作为异源载体，参见 EP 507179，WO 9827216，WO 9400587，WO 9827216)。当本发明的 EHV 在动物中表达异源物质时，对于与 gM 相关的免疫特性没有影响。将针对其它病原体具有相关免疫特性的相应核苷酸序列插入本发明 EHV 病毒的基因组后，该抗原被表达时，EHV 特别适用于针对所述其他病原体进行免疫。疱疹病毒载体疫苗属于现有技术(参见 Schmitt, J.等, 1999; Peeters, B.等, 1997, Yoloyama 等, 1998)。因此，在优选实施方案中本发明也涉及携有一或多种异源基因的本发明 EHV。

本发明另一方面也涉及编码本发明 EHV 的核酸。所述核酸适用于进一步改变 EHV 或用于重组产生本发明的 EHV。它们也可用于产生基于核酸的疫苗。

由于表达修饰的无功能 gM 或根本不表达 gM 的 EHV 具有增强的免疫特性，本发明的 EHV 特别适合作为预防和治疗 EHV 感染的药物组合物的活性成分。因此，另一方面，本发明涉及包含本发明 EHV 的药物组合物。

本发明的核苷酸也可用于制备 DNA 载体疫苗。这些疫苗中，核苷酸直接给予动物或通过除起始病毒以外的其他载体间接给予。核苷酸疫苗和载体疫苗是现有技术中众所周知的，因此不进一步地详述。

一个实施方案中，本发明涉及一种包含本发明核酸的药物组合物。本发明还涉及一种包含本发明 EHV 的药物组合物。

包含本发明 EHV 的药物组合物一个非限制性实例可通过以下方法制备：将感染的细胞培养物上清与一种稳定剂(如亚精胺和/或 BSA(牛血清白蛋白))混合，接着通过其他方法使该混合物冻干或脱水。接种之前，所述混合物在水相(如盐水，PBS(磷酸缓冲盐溶液))或非水相溶液(如油乳液，基于铝的佐剂)中重新水合。

EHV 和其核苷酸特别适合用于制备药物组合物。

“药物组合物”基本上包含一种或多种下述成分，所述成分可修饰用其给药的生物，或在其表面内或表面上生活但不受制于抗生素或抗寄生虫剂的生物的生理功能(如免疫功能)，还包含用于其它目的的其他组分，所述目的例如但不限于，加工特性，无菌性(sterility)，稳定性，通过胃肠或胃肠外途径(如口服、鼻内、静脉、肌内、皮下、经皮或其他适当的途径)给药的便利性，给药后的耐受性，控释特性。

其他实施方案中，本发明涉及增强马疱疹病毒疫苗所诱导的抗野生型病毒感染免疫应答的方法，其特征在于所述疫苗包含本发明的马疱疹病毒。

另一方面涉及一种预防和/或治疗动物的方法，其特征在于本发明的一种药物组合物被给予所述动物。

现有 EHV 活疫苗的另一方面是其与野生型病毒区分的能力。本发明的 EHV 至少在一个重要的特性上不同于野生型分离株。其提供一种显著改变的 gM 蛋白。gM 基本缺失或者被修饰到一定程度，使得该特异性抗原靶与野生型病毒的 gM 显著不同。

一个优选实施方案涉及区分野生型马疱疹病毒感染的动物和用本发明修饰的马疱疹病毒处理的动物的方法，其特征在于确认病毒野毒株的 gM 蛋白或在修饰病毒中表达的 gM 蛋白或所述蛋白的基本缺失。

一个更优选的实施方案涉及上述提及的方法，其特征在于

- a) 目的样品被加入一种分离的 gM 或其经修饰的衍生物中，
- b) 加入特异于所述分离的 gM 或其经修饰的衍生物的抗体，
- c) 确定所述抗体的结合。

一种更优选的实施方案涉及区分野生型马疱疹病毒感染的动物和用本发明改变的马疱疹病毒处理的动物的方法，其特征在于确认编码病毒野毒株的 gM 蛋白的核酸与编码修饰的 gM 蛋白的核酸或所述核酸的缺失之间的差异。

本发明另一个方面涉及试剂盒，所述试剂盒可实施区分野生型马疱疹病毒感染的动物和本发明改变的马疱疹病毒处理的动物的优选方法。一个方便使用的试剂盒优选包含一种或多种必需的分析工具，缓冲液，标记和解读工具，溶剂以及机械装置。优选的特异性分析工具是分离的野生型蛋白 gM，分离的修饰蛋白 gM，特异于野生型蛋白 gM 的抗体，特异于分离的修饰蛋白 gM 的抗体，以及与编码野生型蛋白 gM 的核苷酸结合的核苷酸特异性探针和与编码修饰蛋白 gM 的核苷酸结合的核苷酸特异性探针。

参考文献

Allen, G.P., Yeargan, M., Costa, L.R.R. and Cross, R., 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **69**, 606-612.

Allen, G.P., Yeargan, M.R., 1987. Use of λ gt11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glycoproteins of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **61**, 2454-2461.

Awan, A.R., Chong, Y.-C. and Field, H.J., 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: A new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* **71**, 1131-1140.

Baines, J.D. and Roizman, B., 1991. The opening reading frames UL3, UL4, UL10 and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J. Virol.* **65**, 938-944.

Baines, J.D. and Roizman, B., 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* **67**, 1441-1452.

Carmichael, E.P., Kosovsky M.J., and Weller, S.K., 1988. Isolation and characterization of herpes simplex virus type 1 host range mutants defective in viral DNA synthesis. *J. Virol.* **62**(1), 91-99.

Day, L., 1999. Characterization of selected glycoproteins of equine herpesvirus-1: immune responses in the murine model. PhD thesis, Department of Microbiology, University of Leeds, UK.

Flowers C.C. and O' Callaghan, D.J., 1992. The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) homolog of herpes simplex virus type 1 US9 and the nature of a major deletion within the unique short segment of the EHV-1 KyA strain genome. *Virology* **190**, 307-315.

Hubert, P.H., Birkenmaier, S., Rziha, H.J. and Osterrieder, N., 1996. Alterations in the equine herpesvirus type-1(EHV-1) strain RacH during attenuation. *J. Vet. Med. B* **43**, 1-14.

Kyhse-Andersen, J., 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-210.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

MacLean, C.A., Robertson, L.M. and Jamieson, F.E., 1993. Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *J. Gen. Virol.* **74**, 975-983.

Malik, A.K., Martinez, R., Muncy, L., Carmichael, E.P. and Weller, S.K., 1992. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL9 gene: isolation of a LacZ insertion mutant and expression in eukaryotic cells. *Virology* **190(2)**, 702-715.

Mayr, A., Pette, J., Petzoldt, K. and Wagener, K., 1968. Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. *J. Vet. Med.* **B15**, 406-418.

Meindl, A. and Osterrieder, N., The equine herpesvirus 1 Us2 homolog encodes a nonessential membrane-associated virion component *J. Virol.*, **73(4)**:3430-7, 1999.

Mumford, J.A., Hannant, D.A., Jessett, D.M., O' Neill, T., Smith, K.C. and Ostlund, E.N., 1995. Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with liquid herpesvirus-1. In "Proceedings 7th International Conference of Equine Infectious Disease" (H. Nakajima and W. Plowright, Eds.) pp. 261-175. R&W Publ. Newmarket, U.K.. United Kingdom.

Neubauer, A., Beer, M., Brandmuller, C., Kaaden, O.-R., and Osterrieder, N., 1997. Equine herpesvirus 1 mutants devoid of glycoprotein B or M are apathogenic for mice but induce protection against challenge infection. *Virology* **239**, 36-45.

Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Braun, B., Kaaden, O.-R. and Baines, J.D., 1996. The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of virology*, June 1996, p. 4110-4115.

Osterrieder, N., Wagner, R., Brandmuller, C., Schmidt, P., Wolf, H. and Kaaden, O.-R., 1995. Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14(gB). *Virology* **208**, 500-510.

Peeters, B., Biendowska-Szewcyk, K., Hulst, M., Giellens, A. and

Kimman, T., 1997. Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J. Gen. Virol.* **78**, 3311-3315.

Pilling, A., Davison, A.J., Telford, E.A.R. and Meredith, D.M., 1994. The equine herpesvirus type 1 glycoprotein homologous to herpes simplex virus type 1 glycoprotein M is a major constituent of the virus particle. *J. Gen. Virol.* **75**, 439-442.

Sambrook, J., Fritsch, D.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schmitt, J., Becher, P., Thiel, H.J. and Keil, G.M., 1999. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions. *J. Gen. Virol.* **80**, 2839-2848.

Stokes, A., Alber, D.G., Greensill, J., Amelial, B., Carvalho, R., Taylor, L.A., Doel, T.R., Killington, R.A., Halliburton, I.W. and Meredith, D.M., 1996. The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res.* **40**, 91-107.

Telford, E.A.R., Watson, M.S., McBride, K. and Davison, A.J., 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189**, 304-316.

Telford, E.A.R., Watson, M.S., Perry, J., Cullinane, A.A. and Davison, A.J., 1998. The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *Journal of Gen. Virol.* **79**, 1197-1203.

Tewari, D., Whallery, J.M., Love, D.N., and Field, H.J., 1994. Characterisation of immune responses to baculovirus expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *J. Gen. Virol.* **75**, 1735-1741.

Yoloyama, N., Fujita, K., Damiani A., Sato, E., Kurosawa, K., Miyazawa, T., Ishiguro, S., Mochizuki, M., Maeda, K. and Mikami, T., 1998. Further development of a recombinant feline herpesvirus type 1 vector expressing feline calicivirus immunogenic antigen. *J. Vet. Med. Sci.* **60**, 717-723.

附图说明

图 1: 平均体重分析

图 1 是平均体重分析, 以相对于感染攻击当天组的平均体重的百分比表示。

H Δ gM-3b1 免疫组(第 7 到 9 组)与其他所有的免疫组比较, 以分析该病毒与其他两种病毒相比的潜在优势, 因为该病毒的糖蛋白 M 基本上完全的缺失(氨基酸 70 到 406 被缺失), 而对于 H Δ gM-Ins(第 4 到 6 组), gM 开放阅读框因 LacZ 盒的插入而被破坏。然而, 这种病毒突变体仍能表达 gM 开放阅读框的羧基末端部分(可能开始于 226 位的甲硫氨酸残基)。RacH(组 1 到组 3)是 H Δ gM-3b1 和 H Δ gM-Ins 的亲本病毒, 代表一种广泛使用的疫苗株。

接种了 H Δ gM-3b1 的动物在以 10^3 PFU 接种的小鼠(第 9 组)中, 与接种 10^3 PFU H Δ gM-Ins(第 6 组)或 10^3 PFU RacH(第 3 组)相比, 有最低的暂时体重下降。与接种 H Δ gM-Ins(第 4-6 组)或 RacH(第 1-3 组)相比, 接种 H Δ gM-3b1 的组(第 7-9 组)预防攻击后体重降低的剂量依赖性降低。

图 2: 病毒效价分析

对每组中感染后(p. i.)1 天的 2 只动物、感染后 3 天的 3 只动物、和感染后 5 天的 2 只动物进行尸检。制备鼠肺, 用海沙匀浆, 用 1 ml 的 DMEM-10%FCS 重悬。通过 Neubauer 等, 1997 年所述的噬斑试验确定肺匀浆物中的病毒效价。数据表明用 H Δ gM-3b1 免疫后(第 7-9 组), 从肺组织(每个肺单独制备, 每个肺的平均病毒效价如图所示)中重新分离的 EHV 病毒的量, 与 H Δ gM-Ins(第 4-6 组)或 RacH(第 1-3 组)免疫的组相比, 是降低的。这种效果在各种病毒各自的最低接种剂量(10^3 PFU)比较高接种剂量(10^4 或 10^5 PFU)时更强烈。与 H Δ gM-Ins 或 RacH 免疫的小鼠相比, 病毒血症的持续时间也缩短, 表现为 5 天后从 H Δ gM-3b1 免疫的动物中重新分离的病毒量显著降低, 特别是在用 10^3 PFU 剂量接种的组中。

图 3: Western 印迹分析

利用抗 gB 单克隆抗体 3F6(Allen 和 Yeargan, 由 Dr. G. Allen, Lexington,

Ky, U.S.A.惠赠)(A)或抗 gM 单克隆抗体 A8(由 Dr. R.A. Killington, Leeds, UK 惠赠)(B)对被感染细胞的裂解物进行 Western 印迹分析。将细胞裂解物悬浮在样品缓冲液中, 并立即用 SDS-10%-PAGE 分离。将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 与单抗一同孵育, 如材料和方法一节所述进行检测。1 泳道: RacH 感染的细胞; 2 泳道: H Δ gM-Ins(插入突变体)感染的细胞; 3 泳道: H Δ gM-3b1 感染的细胞; 4 泳道: 用 H Δ gM-3b1 在 Rk13 细胞中生长的第二代感染的细胞。A 组中, 被 RacH, H Δ gM-Ins 和 H Δ gM-3b1 感染的细胞中 gB 的特异性识别清楚地表明感染细胞中病毒蛋白的表达和病毒的复制。gB 的二聚体和寡聚体清晰可见, 表明进行了适当的糖蛋白加工。B 组中, 单克隆抗体 A8 识别 RacH 感染的细胞中具有预期表观分子量的 gM 蛋白(1 泳道)。H Δ gM-Ins 中, 开放阅读框因插入 LacZ 基因而被中断。相应地, 被特异性识别的 gM 蛋白的表观分子量更低(2 泳道)。H Δ gM-Ins 表达的 gM 蛋白的 Western 印迹信号强度与在 RacH 感染的细胞中获得的信号相当, 这清楚地表明这种截短并不能导致 gM 蛋白在感染细胞中表达的失败或所述蛋白的立即降解。此外, gM 的羧基末端部分似乎在 H Δ gM-Ins 的情况下表达, 因为 A8 抗体直接靶向 gM 羧基末端的亲水部分。在 3 和 4 泳道, 如上所述在 H Δ gM-3b1 中缺失相应核苷酸序列后并未如预期那样检测出 gM 蛋白。

材料和方法(Western 印迹分析):

Western 印迹分析中, 感染细胞的裂解物用 BCATM 分析(Pierce)调整到相同的蛋白浓度, 悬浮于样品缓冲液(终浓度: 50 mM Tris-Cl, pH6.8; 3.2% 十二烷基磺酸钠(SDS); 5%2-巯基乙醇; 10%甘油)中。整个过程中都将样品放置在冰上, 不能受热。通过不连续的 SDS-10%-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)(Laemmli, 1970)分离蛋白, 通过半干法(Kyhse-Andersen, 1984)转移到硝酸纤维素膜(Schleicher & Schull)上。转膜后, 将膜温育于 10%脱脂乳的磷酸缓冲盐溶液(含 0.05% Tween20, PBS-T)中, 4^o C 16 小时。室温(RT)下用 PBS-T 洗膜两次, 每次 10 分钟, 接着以在 PBS-T 中指定的稀释度加入抗 gB 单克隆抗体(mab)3F6(Allen 和 Yeargan, 1987)或抗 gM mab A8(Day, 1999), 硝酸纤维素膜与单克隆抗体在室温下温育 1 小时, 然后用 PBS-T 洗膜两次(室温, 10 分钟)。用过氧化物酶偶联的抗小鼠免疫球蛋白 G 抗体(Sigma), 按照供应商的说明, 在室温下作用 1 小时以检测结合的单克隆抗

体。两次最后的洗膜步骤(PBS-T, 10 分钟)后, 通过增强的化学发光(ECL™, Amersham-Pharmacia)按照供应商的说明使反应性条带可见。

图 4: HΔgM-3b1 基因组的图示

EHV-1 RacH 病毒的 gM 区的 BamHI 限制性酶切图谱和基因组组构(organization), 以及 gM 阴性 RacH 病毒 HΔgM-3b1 的结构。给出了克隆中使用的限制性酶切位点, 并且是按比例的。

实施例

实施例 1: 检测 gM 对于病毒免疫原性的影响

实验设计:

将 3-4 周龄 BALB/c 小鼠(Charles River)随机分为 10 组, 各组包含 14 只动物, 鼻内(i.n.)分别免疫接种 RacH(第 1 到第 3 组), gM 阴性插入突变体 HΔgM-Ins(Neubauer 等, 1997)(第 4 到第 6 组)或缺少几乎整个 gM 开放阅读框的 HΔgM3b1 病毒(第 7 到第 9 组)。小鼠被一次性给予 20 μl 溶液进行免疫, 所述溶液中分别含有 1×10^5 噬斑形成单位(PFU)(第 1, 4, 7 组), 1×10^4 PFU(第 2, 5, 8 组), 或 1×10^3 PFU(第 3, 6, 9 组), 如所示。用 20 μl 的 DMEM-10%FCS 对小鼠进行模拟物感染(第 10 组)。免疫 29 天后, 用悬浮于 20 μl 溶液中的 1×10^4 PFU 的 RacL11 毒株鼻内感染小鼠。从感染当天(0 天)到第 13 天, 每日对各小鼠的体重进行评分。根据以下公式计算第 0 天到第 13 天的相对体重(以%表示): 第 n 天的体重/第 0 天的体重 $\times 100\%$ 。感染后(p.i.)第一天的 2 只动物、感染后第 3 天的 3 只动物、和感染后第 5 天的 2 只动物进行尸检。制备鼠肺, 用海沙匀浆, 用 1 ml 的 DMEM-10%FCS (Meindl & Osterrieder, 1999)重悬。鼠肺中的病毒效价在 Rk13 细胞中测定(Neubauer 等, 1997)。如下所述对每日记录的体重进行统计学分析。

研究目的:

本研究的主要目的是表明 HΔgM-3b1 免疫(第 7-9 组)与 RacH(第 1-3 组)或 HΔgM-Ins(第 4-6 组)免疫相比, 保护潜力的差异, 这种比较是通过用毒性 EHV-1 株感染攻击后的体重参数来确定的。第二个目的是将第 1 到 9 组与模拟物感染的组(组 10)进行比较。HΔgM-3b1 免疫的组(第 7-9 组)与所有

其他免疫组进行比较，以分析这种病毒与其他两种病毒相比的有利效果，因为这种病毒的糖蛋白 M 几乎完全缺失，而对于 H Δ gM-Ins(第 4-6 组)，gM 开放阅读框仅因为 LacZ 盒的插入而被中断。然而，这种病毒突变体仍可表达 gM 开放阅读框的羧基末端部分。RacH(第 1-3 组)是 H Δ gM-3b1 和 H Δ gM-Ins 二者的亲本病毒，并且代表一种广泛使用的疫苗株。

统计学方法

使用 SAS(Heidelberg)软件包 Win Version 6.12 在个人电脑上进行统计学分析。

为了评估初级终点，用 SAS 的 PROC GLM 重复方差分析，使用 CONTRAST 声明(statement)以便在选定组间进行针对性比较。为了将不平衡的情况考虑在内(在不同天数时动物的数量不同)，使用 PROC GLM(概括性(Generalized)线性模式)替代 PROC ANOVA。程序：

```
proc glm data=maus.obser;
class group;
model coll--coll14=group;
repeated time 14 (1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14) /summary;

contrast 'group 10 vs others' group -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1
9;
contrast 'group 7 vs group 4' group 0 0 0 -1 0 0 1 0 0
0;
contrast 'group 7 vs group 1' group -1 0 0 0 0 0 1 0 0
0;
contrast 'group 8 vs group 2' group 0 -1 0 0 0 0 0 1 0
0;
contrast 'group 8 vs group 5' group 0 0 0 0 -1 0 0 1 0
0;
contrast 'group 9 vs group 3' group 0 0 -1 0 0 0 0 0 1
0;
contrast 'group 9 vs group 6' group 0 0 0 0 0 -1 0 0 1
0;
means group / waller;
run; quit;
```

体重评估的结果:

小鼠的平均重量 (克)										
组内标准差以斜体表示										
DPI *	组号									
	1		2		3		4		5	
0	16,58	<i>0,8469</i>	17,67	<i>1,1585</i>	17,12	<i>1,0871</i>	16,94	<i>1,0603</i>	16,80	<i>1,1350</i>
1	16,68	<i>0,8432</i>	17,69	<i>0,9844</i>	17,04	<i>1,0058</i>	17,00	<i>1,1754</i>	16,94	<i>1,0867</i>
2	16,64	<i>0,8437</i>	17,36	<i>0,9459</i>	16,44	<i>1,0390</i>	16,91	<i>1,2538</i>	16,74	<i>0,9904</i>
3	15,02	<i>0,8451</i>	15,41	<i>1,0361</i>	14,71	<i>0,9307</i>	15,92	<i>1,5361</i>	15,76	<i>1,2168</i>
4	14,66	<i>1,2315</i>	14,57	<i>1,1995</i>	13,73	<i>0,9326</i>	15,52	<i>1,8727</i>	15,58	<i>1,2695</i>
5	15,51	<i>1,7635</i>	15,42	<i>1,3433</i>	13,92	<i>1,2286</i>	16,31	<i>1,6221</i>	16,61	<i>1,1692</i>
6	16,19	<i>1,4357</i>	16,02	<i>1,2215</i>	14,54	<i>1,5804</i>	16,68	<i>1,1977</i>	16,69	<i>1,1357</i>
7	16,52	<i>1,2090</i>	16,66	<i>1,2205</i>	15,26	<i>1,5153</i>	16,91	<i>1,3459</i>	16,70	<i>0,9209</i>
8	16,70	<i>1,0296</i>	17,26	<i>0,9693</i>	15,84	<i>1,2634</i>	17,14	<i>1,4034</i>	16,68	<i>0,8931</i>
9	16,60	<i>1,2506</i>	17,33	<i>1,0436</i>	16,31	<i>1,2655</i>	17,04	<i>1,0628</i>	16,75	<i>0,7635</i>
10	16,88	<i>1,0685</i>	17,54	<i>1,0293</i>	16,44	<i>1,0114</i>	17,39	<i>1,1305</i>	16,82	<i>0,8035</i>
11	16,55	<i>1,0747</i>	17,50	<i>0,9092</i>	16,81	<i>0,9634</i>	17,40	<i>1,2689</i>	16,78	<i>0,6706</i>
12	16,67	<i>0,9004</i>	17,63	<i>0,9517</i>	16,87	<i>0,8118</i>	17,31	<i>0,8494</i>	16,92	<i>0,7808</i>
13	16,73	<i>0,8066</i>	17,86	<i>1,0130</i>	16,93	<i>1,1191</i>	17,31	<i>0,9100</i>	16,92	<i>0,5811</i>
14	17,13	<i>0,9873</i>	17,99	<i>1,3184</i>	17,06	<i>1,0518</i>	17,56	<i>0,8080</i>	17,10	<i>0,7099</i>
* DPI = 感染后的天数										

小鼠的平均重量(克)										
组内标准差以斜体表示										
DPI*	组号									
	6		7		8		9		10	
0	17,27	<i>1,1339</i>	17,36	<i>0,9500</i>	17,14	<i>2,3207</i>	16,72	<i>0,9839</i>	16,71	<i>1,0418</i>
1	17,67	<i>0,7016</i>	17,53	<i>1,0266</i>	17,21	<i>2,2860</i>	16,81	<i>0,9841</i>	16,96	<i>0,8949</i>
2	17,73	<i>0,8097</i>	17,35	<i>1,0713</i>	17,27	<i>2,2001</i>	16,83	<i>1,0572</i>	16,46	<i>0,8653</i>
3	16,76	<i>1,0424</i>	16,33	<i>1,7499</i>	16,29	<i>2,5749</i>	16,08	<i>1,6208</i>	15,04	<i>0,8039</i>
4	16,22	<i>1,2952</i>	16,52	<i>2,2320</i>	16,05	<i>2,7071</i>	15,78	<i>2,1063</i>	13,97	<i>0,4880</i>
5	14,88	<i>1,6816</i>	17,56	<i>1,6396</i>	16,81	<i>2,8616</i>	16,64	<i>2,1378</i>	13,39	<i>0,4947</i>
6	15,31	<i>1,8380</i>	17,83	<i>1,1386</i>	16,92	<i>2,8217</i>	16,87	<i>1,4950</i>	12,85	<i>0,6285</i>
7	16,77	<i>2,0265</i>	18,20	<i>1,1437</i>	16,69	<i>2,8737</i>	17,10	<i>1,4787</i>	12,70	<i>1,2629</i>
8	17,00	<i>1,6817</i>	18,10	<i>1,1331</i>	16,93	<i>2,8099</i>	17,19	<i>1,1922</i>	12,66	<i>1,9100</i>
9	17,38	<i>1,4892</i>	18,18	<i>1,0759</i>	17,01	<i>2,5142</i>	17,31	<i>1,0699</i>	13,80	<i>2,0347</i>
10	17,52	<i>1,6130</i>	18,27	<i>1,0893</i>	17,07	<i>2,4635</i>	17,51	<i>1,0885</i>	14,15	<i>2,1142</i>
11	17,55	<i>1,5333</i>	18,32	<i>1,1179</i>	17,11	<i>2,1721</i>	17,44	<i>1,0706</i>	14,40	<i>1,9849</i>
12	17,77	<i>1,5410</i>	18,28	<i>1,0962</i>	17,24	<i>2,2693</i>	17,49	<i>1,0007</i>	14,78	<i>1,8945</i>
13	17,72	<i>1,5211</i>	18,55	<i>1,0095</i>	17,37	<i>2,4432</i>	17,47	<i>1,0128</i>	15,40	<i>1,5033</i>
14	17,68	<i>1,4959</i>	18,53	<i>1,0093</i>	17,43	<i>2,3915</i>	17,43	<i>1,1086</i>	15,83	<i>1,1615</i>
* DPI =	感染后的天数									

1、 模拟物感染的动物(第 10 组)与免疫动物的对比

下表证实,用模拟物免疫的动物的平均体重与所有其他的组相比,在攻击感染后有统计学上显著的降低(第 3 天)或统计学上极其显著的降低(第 4 到 13 天)。

表 1

	F-值 ¹	P-值
第 10 组比其它组		
第 1 天 ²	2.56	0.1156
第 2 天	1.33	0.2541
第 3 天	9.03	0.0040*
第 4 天	20.46	0.0001**
第 5 天	54.83	0.0001**
第 6 天	72.31	0.0001**
第 7 天	84.82	0.0001**
第 8 天	61.62	0.0001**
第 9 天	52.91	0.0001**
第 10 天	40.47	0.0001**
第 11 天	35.21	0.0001**
第 12 天	24.18	0.0001**
第 13 天	18.52	0.0001**

1=检验统计

2=从第 1 天到第 13 天的统计;第 0 天时,所有计算都相同(重量设定为 100%)

*=为统计学显著的(<0.05)

**=为统计学上极其显著的(<0.0001)

2、 HΔgM-3b1 免疫的动物(第 7 组, 10⁵ PFU/每只动物)与 RacH(第 1 组, 10⁵ PFU)和 HΔgM-Ins(第 4 组, 10⁵ PFU)免疫的动物,在感染攻击后阻止体重降低的效力参数方面的比较

下表中给出的结果表明,无论免疫使用的是何种病毒,在高剂量病毒免疫的组中,平均体重没有统计学上显著的差异。

表 2

	F-值 ¹	P-值
第 7 组比第 4 组		
第 1 天 ²	0.00	0.9452
第 2 天	0.27	0.6047
第 3 天	1.50	0.2257
第 4 天	1.85	0.1800
第 5 天	0.82	0.3693
第 6 天	0.82	0.3683
第 7 天	0.06	0.8112
第 8 天	0.38	0.5396
第 9 天	0.00	0.9765
第 10 天	0.01	0.9246
第 11 天	0.03	0.8552
第 12 天	0.65	0.4228
第 13 天	0.03	0.8535
第 7 组比第 4 组		
第 1 天	0.50	0.4831
第 2 天	2.54	0.1167
第 3 天	3.22	0.0782
第 4 天	1.23	0.2719
第 5 天	0.40	0.5281
第 6 天	0.27	0.6030
第 7 天	0.01	0.9287
第 8 天	0.12	0.7288
第 9 天	0.03	0.8720
第 10 天	0.45	0.5048
第 11 天	0.13	0.7213
第 12 天	0.64	0.4266
第 13 天	0.03	0.8588

1=检验统计

2=从第 1 天到第 13 天的统计; 第 0 天时, 所有计算都相同(重量设定为 100%)

*=为统计学显著的(<0.05)

**=为统计学上极其显著的(<0.0001)

3、 HΔgM-3b1 免疫的动物(第 8 组, 10^4 PFU/每只动物)与 RacH(第 2 组, 10^5 PFU)和 HΔgM-Ins(第 5 组, 10^4 PFU)免疫的动物, 在感染攻击后阻止体重降低的效力参数方面的比较。下表显示了对接受 10^4 PFU/每只动物的小鼠组的统计学分析, 显示: 第 8 组动物(10^4 PFU HΔgM-3b1)和第 5 组动物(HΔgM-Ins)在第 1 天和第 11 到第 13 天, 其平均体重的差异在统计学上显著。但 RacH 免疫的动物(第 2 组)与 HΔgM-3b1 免疫的动物(第 8 组)相比, 在感染之后所有的天中, 其平均体重差异都有显著或极其显著的降低。

表 3

	F-值 ¹	P-值
第 8 组比第 5 组		
第 1 天 ²	6.91	0.0112*
第 2 天	3.23	0.0782
第 3 天	3.08	0.0849
第 4 天	0.85	0.3614
第 5 天	1.67	0.2014
第 6 天	0.75	0.3911
第 7 天	2.62	0.1113
第 8 天	3.23	0.0779
第 9 天	3.19	0.0800
第 10 天	4.00	0.0506
第 11 天	4.20	0.0453*
第 12 天	5.75	0.0200*
第 13 天	4.98	0.0299*
第 8 组比第 2 组		
第 1 天	11.06	0.0016*
第 2 天	10.75	0.0018*
第 3 天	18.26	0.0001**
第 4 天	14.56	0.0004*
第 5 天	13.66	0.0005*
第 6 天	12.44	0.0009*
第 7 天	9.87	0.0028*
第 8 天	11.07	0.0016*
第 9 天	8.75	0.0046*
第 10 天	10.08	0.0025*
第 11 天	10.83	0.0018*
第 12 天	10.36	0.0022*
第 13 天	10.50	0.0021*

1=检验统计

2=从第 1 天到第 13 天的统计; 第 0 天时, 所有计算都相同(重量设定为 100%)

*=为统计学显著的(<0.05)

**=为统计学上极其显著的(<0.0001)

4、HΔgM-3b1 免疫的动物(第 9 组, 10^3 PFU/每只动物)与 RacH(第 3 组, 10^3 PFU)和 HΔgM-Ins(第 6 组, 10^3 PFU)免疫的动物, 在感染攻击后阻止体重降低的效力参数方面的比较

下表显示了用最低剂量免疫的结果。总结来说, 接种最低剂量 HΔgM-3b1 的动物与接种相同剂量的 HΔgM-Ins 或 RacH 的动物相比, 在第 4 天到第 9 天表现(极其)显著的较高平均体重。此外, 在感染攻击后第 1 天到第 3 天, RacH 免疫的动物与 HΔgM-3b1 免疫的动物相比, 其体重有显著的降低。

表 4

	F-值 ¹	P-值
第 9 组比第 6 组		
第 1 天 ²	0.00	0.9505
第 2 天	1.55	0.2193
第 3 天	2.51	0.1190
第 4 天	22.95	0.0001**
第 5 天	24.34	0.0001**
第 6 天	8.23	0.0059*
第 7 天	6.81	0.0118*
第 8 天	4.22	0.0449*
第 9 天	4.87	0.0316*
第 10 天	3.60	0.0631
第 11 天	2.64	0.1103
第 12 天	3.33	0.0735
第 13 天	3.45	0.0687
第 9 组比第 3 组		
第 1 天	16.62	0.0002*
第 2 天	15.11	0.0003
第 3 天	32.13	0.0001**
第 4 天	35.92	0.0001**
第 5 天	36.46	0.0001**
第 6 天	23.68	0.0001**
第 7 天	14.81	0.0003*
第 8 天	9.03	0.0041*
第 9 天	9.45	0.0033*
第 10 天	3.77	0.0574
第 11 天	3.88	0.0542
第 12 天	3.87	0.0543
第 13 天	2.55	0.1161

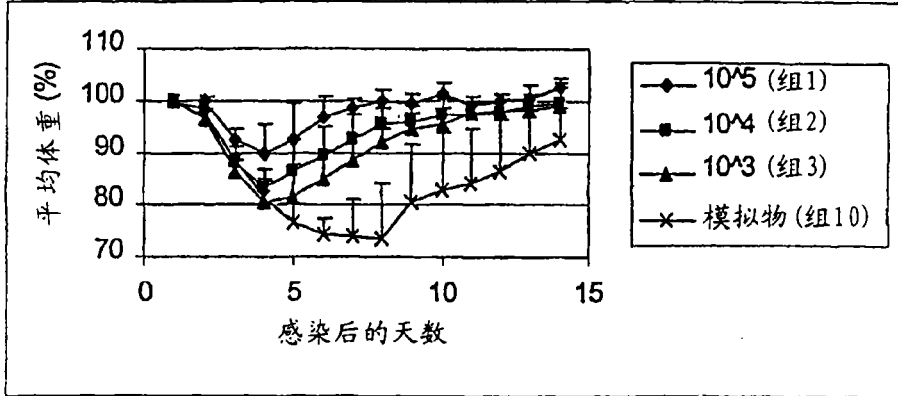
1=检验统计

2=从第 1 天到第 13 天的统计; 第 0 天时, 所有计算都相同(重量设定为 100%)

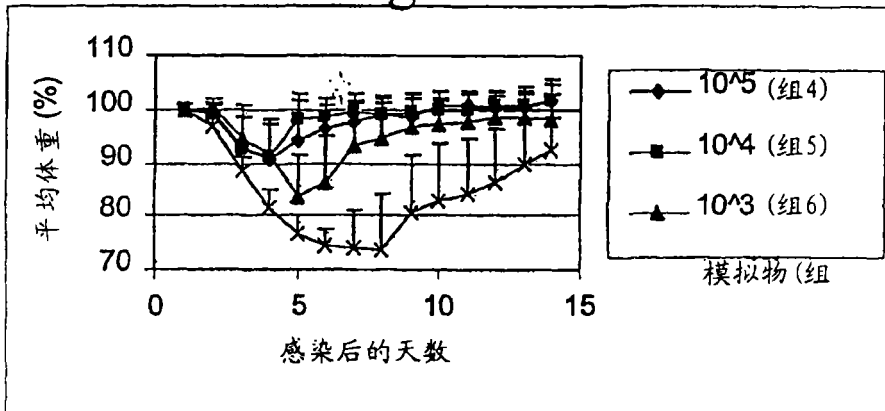
*=为统计学显著的(<0.05)

**=为统计学上极其显著的(<0.0001)

RacH



HΔgM-Ins



HΔgM3b1

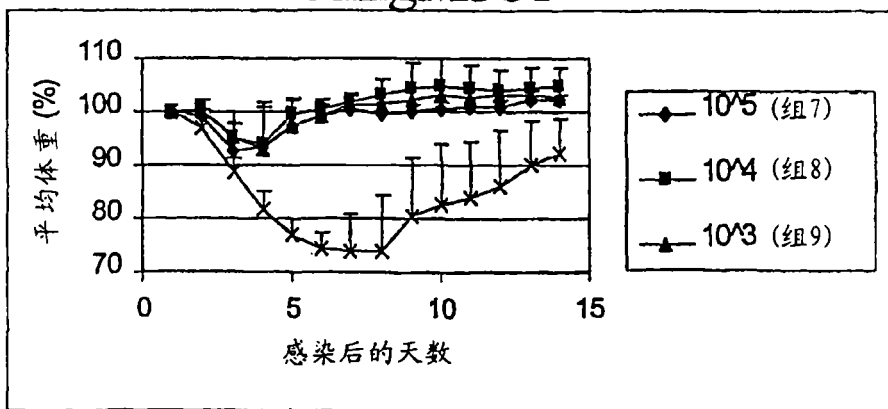


图 1

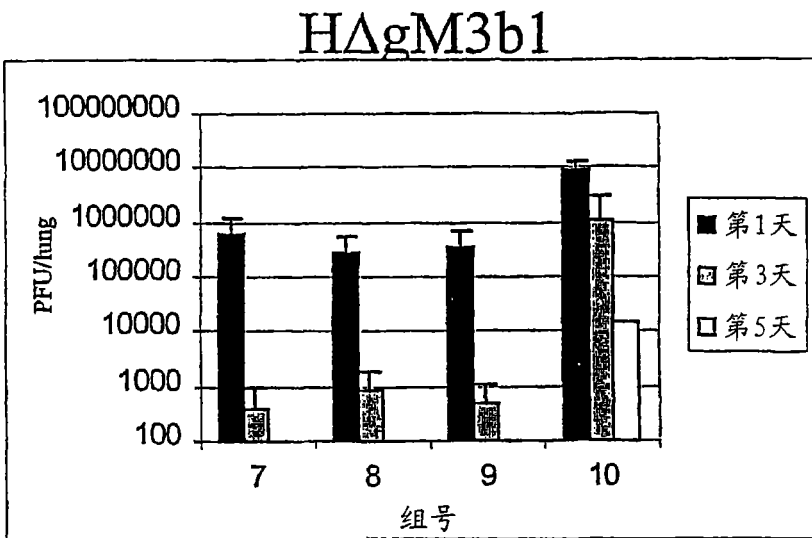
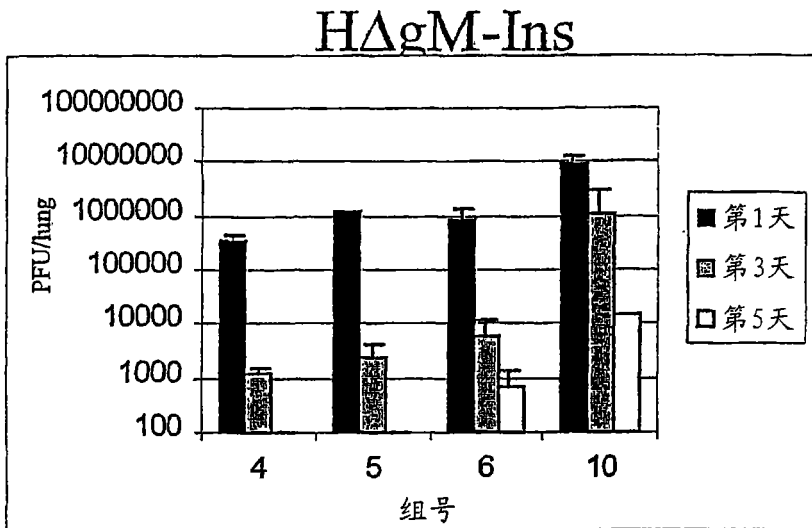
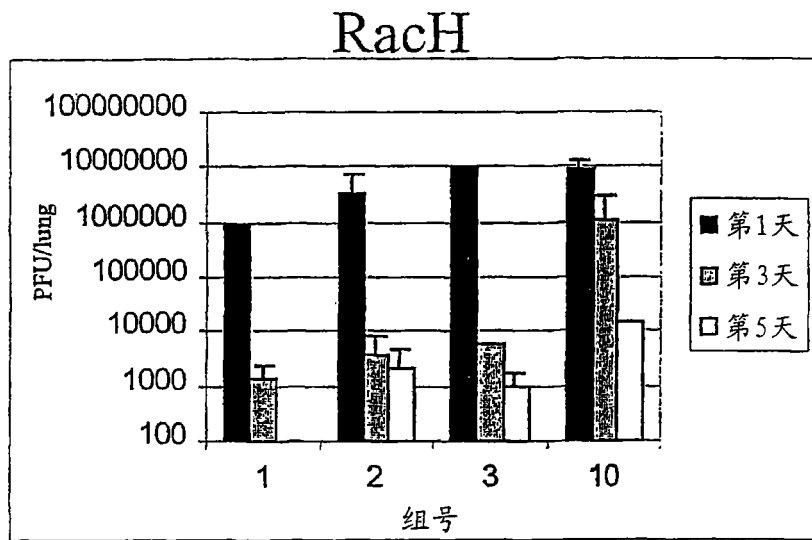


图 2

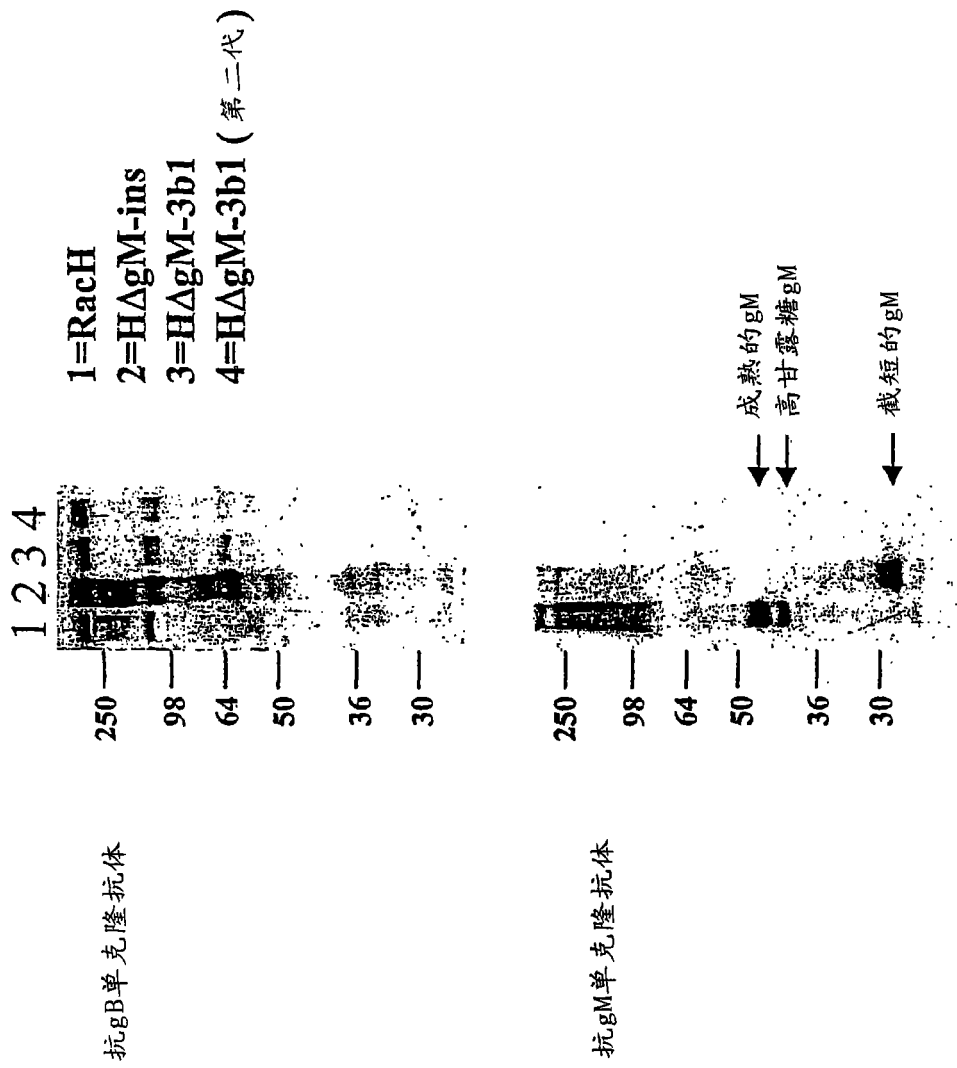


图 3

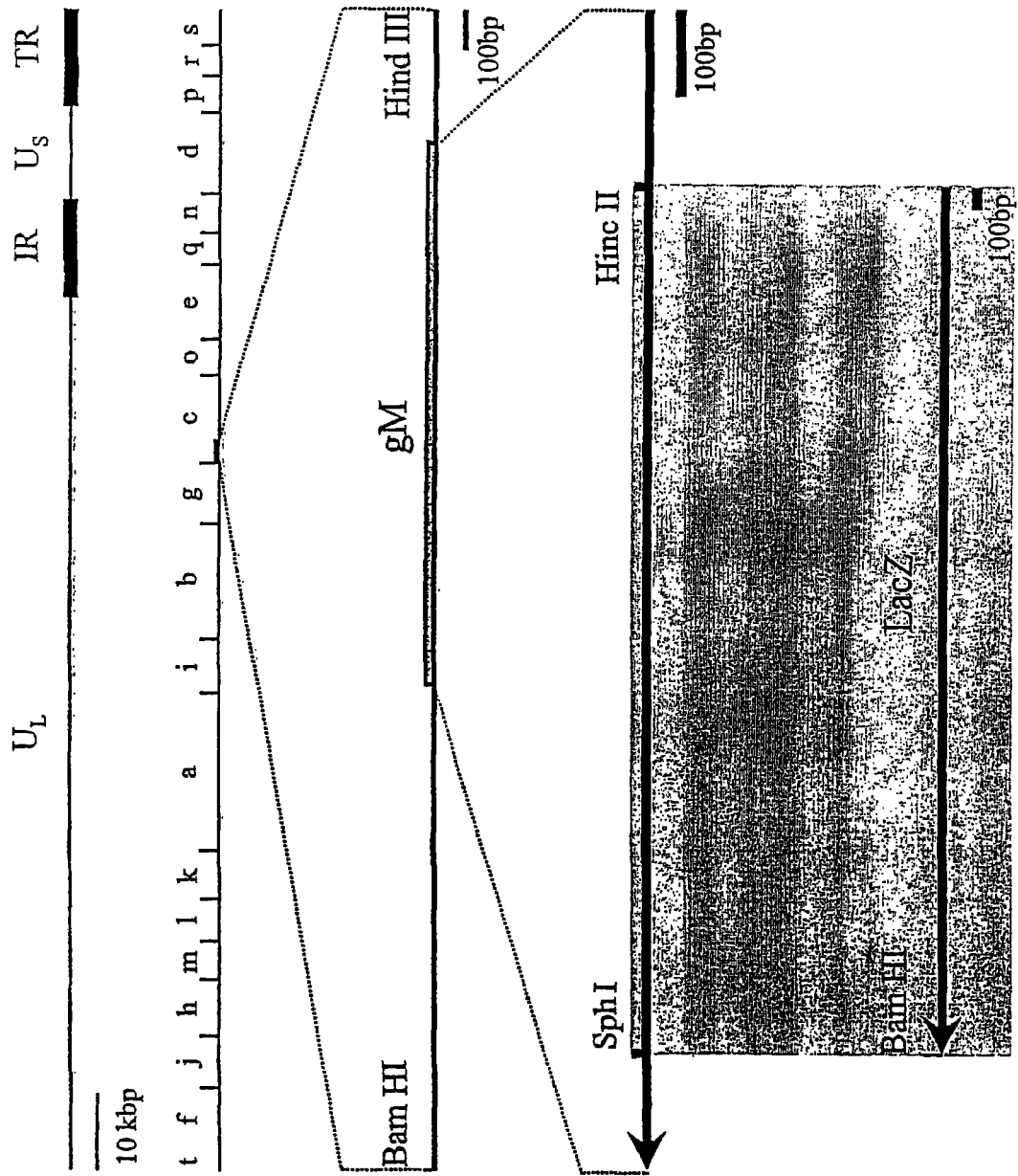


图 4

专利名称(译)	gM - 阴性EHV突变体		
公开(公告)号	CN101230336A	公开(公告)日	2008-07-30
申请号	CN200810009294.9	申请日	2001-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
[标]发明人	克里斯琴西博尔特 尼古劳斯·奥斯特里德 克努特·埃尔伯斯		
发明人	克里斯琴·西博尔特 尼古劳斯·奥斯特里德 克努特·埃尔伯斯		
IPC分类号	C12N7/01 C12N15/38 C12Q1/68 A61K39/245 A61K31/7088 A61P31/22 G01N33/53 C12N15/09 A61K39/27 A61K48/00 C07K14/03 C12N7/00 C12N7/04 C12N15/869		
CPC分类号	C12N2710/16734 C12N2710/16761 C12N2710/16743 A61K39/27 C12N7/00 C07K14/005 C12N2710/16722 C12N15/86 A61K39/12 A61K2039/5254 A61K2039/552		
代理人(译)	闵丹		
优先权	2000103241 2000-02-17 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及马疱疹病毒(Equine Herpes Viruses, EHV), 其中蛋白gM被基本缺失或修饰, 并且其免疫调节能力无功能。本发明进一步的方面涉及编码所述病毒的核酸, 包含这些病毒或核酸的药物组合物及其用途。本发明也涉及增强由EHV疫苗所诱发的抗野生型EHV感染的免疫应答的方法, 涉及EHV感染的预防和治疗方法以及将野生型EHV感染的动物与用本发明EHV处理的动物区分的方法。

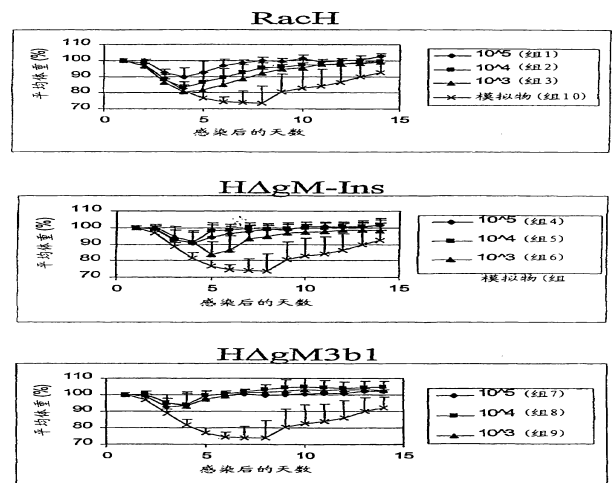


图 1