(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118414349 A
(43)申请公布日 2024.07.30

(21)申请号 202280084451.0
(22)申请日 2022.12.19
(30)优先权数据
63/291,565 2021.12.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/081912 2022.12.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/122523 EN 2023.06.29
(71)申请人 硕腾服务有限责任公司
地址 美国
(72)发明人 O•豪格兰德
M•A•D•F•卡尔森 L•H•豪格
M•罗德
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 李程达
(51)Int.Cl.
C07K 14/11(2006.01)
A61K 39/145(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
A61K 39/155(2006.01)
C07K 14/115(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

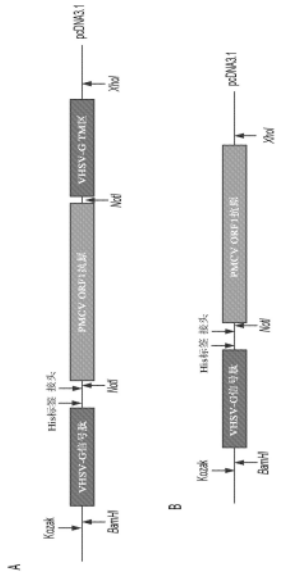
权利要求书5页 说明书36页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

用于在细胞膜上表达抗原的组合物和方法

(57)摘要

公开了一种用于将通过DNA疫苗递送的抗原的表达靶向到细胞表面的系统。还公开了抗原、疫苗和使用这些疫苗预防鱼类感染的方法。



CN 118414349 A

1.一种融合蛋白,其从N末端至C末端包括:

d)分泌蛋白或第一膜结合蛋白的N末端分泌信号序列;

e)来自无包膜病毒的抗原;

f)第二膜结合蛋白的跨膜结构域。

2.根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述第一蛋白选自由以下组成的组:干扰素a、干扰素b、干扰素c、干扰素d、干扰素γ、白介素-2、白介素4、白介素-12传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)的血凝素(HE)蛋白、病毒性出血性败血症病毒G蛋白和大西洋鲑鱼副粘病毒的融合蛋白,并且所述第二蛋白独立地选自由以下组成的组:传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)的血凝素(HE)蛋白、病毒性出血性败血症病毒G蛋白和大西洋鲑鱼副粘病毒的融合蛋白。

3.根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述第一膜结合蛋白与所述第二膜结合蛋白相同。

4.根据权利要求3所述的融合蛋白,其中所述膜结合蛋白是病毒性出血性败血症病毒G蛋白(VHSV-G)。

5.根据权利要求4所述的融合蛋白,其中所述N末端分泌信号序列与SEQ ID NO:7或48至少90%相同,或者其中所述分泌信号序列包括SEQ ID NO:48或与SEQ ID NO:48至少90%相同的序列的一部分,其中所述部分包括SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%相同的序列。

6.根据权利要求5所述的融合蛋白,其中所述N末端分泌信号中的至少一半不同氨基酸是保守取代。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的融合蛋白,其中所述跨膜结构域与SEQ ID NO:8或49至少90%相同,或者其中所述跨膜片段包括SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49至少90%相同的序列的一部分,其中所述部分包括SEQ ID NO:8或与SEQ ID NO:8至少90%相同的序列。

8.根据权利要求7所述的融合蛋白,其中所述跨膜结构域中的至少一半不同氨基酸是保守取代。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白,其中所述无包膜病毒选自由以下组成的组:鱼类正呼肠孤病毒(PRV)、鱼类心肌炎综合征病毒(PMCV)、传染性胰腺坏死病毒(IPNV)和β野田村病毒(betanodavirus)。

10.根据权利要求9所述的融合蛋白,其中所述抗原是PMCV ORF-1抗原。

11.根据权利要求10所述的融合蛋白,其中所述PMCV ORF-1抗原包括蛋白质,所述蛋白质从N末端至C末端包括:

a.与SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35至少90%相同、或至少91%相同、或至少92%相同、或至少93%相同、或至少94%相同、或至少95%相同、或至少96%相同、或至少97%相同、或至少98%相同、或至少99%相同或100%相同的序列,以及

b.与SEQ ID NO:25-33中的任一者至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,

其中,

i)所述氨基酸序列缺乏SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%相同的序列;和/或

ii)ii)与SEQ ID NO:1相比,所述蛋白质包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四

个连续氨基酸。

12.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包含与SEQ ID NO:25至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。

13.根据权利要求12所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%相同的序列。

14.根据权利要求12或权利要求13所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5至少90%相同的序列。

15.根据权利要求14所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4至少90%相同的序列。

16.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。

17.根据权利要求17所述的融合蛋白抗原,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%相同的序列。

18.根据权利要求16或17所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5至少90%相同的序列。

19.根据权利要求16至18中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:24至少90%相同的序列。

20.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包含与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。

21.根据权利要求20所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%相同的序列。

22.根据权利要求20或21所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%相同的序列。

23.根据权利要求20至22中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:24至少90%相同的序列。

24.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包含与SEQ ID NO:28至少90%相同的序列。

25.根据权利要求24所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4至少90%相同的序列。

26.根据权利要求24至25中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3至少90%相同的序列。

27.根据权利要求24至26中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:24至少90%相同的序列。

28.根据权利要求11至14中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:29或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

29.根据权利要求11、16、17中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:30或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

30.根据权利要求29所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:24至少90%相同的序列。

31.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:31或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

32.根据权利要求31所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:24至少90%相同的氨基酸序列中的至少一者。

33.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:32或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

34.根据权利要求33所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15至少90%相同的氨基酸序列中的至少一者。

35.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:33或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

36.根据权利要求35所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:24,与SEQ ID NO:24至少90%相同的氨基酸序列。

37.根据权利要求11至36中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:23或与SEQ ID NO:23至少90%相同的序列。

38.根据权利要求11至37中任一项所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22至少90%相同的序列。

39.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:15或与其至少90%相同的序列,以及SEQ ID NO:4、5、25、26、27、29、30、32(或与SEQ ID NO:4、5、25、26、27、29、30或32至少90%相同的氨基酸序列)中的任一者,其中与SEQ ID NO:1相比,所述蛋白质包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四个连续氨基酸,并且任选地,其中所述蛋白质包括替代所述内部缺失的接头。

40.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13至少90%相同的序列,并且含有SEQ ID NO:25或与SEQ ID NO:25至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

41.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:11、12或46或与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:46至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或100%相同的序列。

42.根据权利要求41所述的融合蛋白,其中与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:46不同的至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95%或100%的氨基酸是保守取代。

43.根据权利要求11所述的融合蛋白,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:9、10或47或与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:47至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%或至少99%相同的序列。

44.根据权利要求43所述的融合蛋白,其中与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:47不同的至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95%或100%的氨基酸是保守取代。

45.一种核酸序列,其编码根据权利要求1至44中任一项所述的权利要求中任一项的融

合蛋白。

46.根据权利要求45所述的核酸序列,其包括SEQ ID NO:16。

47.一种表达盒,其包括在第一启动子的可操作控制下的根据权利要求45或46所述的核酸序列。

48.根据权利要求47所述的表达盒,其中所述第一启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子和启动子。

49.根据权利要求47或48所述的表达盒,其进一步包括编码鲑鱼干扰素的核酸序列,其中所述鲑鱼干扰素在SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:50或与SEQ ID NO:6或50至少95%相同的序列中示出。

50.根据权利要求49所述的表达盒,其中所述核酸序列与SEQ ID NO:18 65-90%相同,或与SEQ ID NO:19 65-90%相同,并且其中密码子频率保留在所述核酸序列中。

51.根据权利要求49或50所述的表达盒,其中所述核酸序列与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19 70-79%相同。

52.根据权利要求49至51中任一项所述的表达盒,其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:50至少98%相同。

53.根据权利要求49至52中任一项所述的表达盒,其中与SEQ ID NO:6或50不同的至少50%的氨基酸是保守取代。

54.根据权利要求49所述的表达盒,其与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:17至少90%相同。

55.根据权利要求54所述的表达盒,其与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:17至少95%相同。

56.根据权利要求49至535中任一项所述的表达盒,其中所述编码鲑鱼干扰素的核酸序列在第二启动子的可操作控制下。

57.根据权利要求56所述的表达盒,其中所述第二启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子和启动子。

58.一种载体,其包括根据权利要求47至57中任一项所述的表达盒。

59.根据权利要求57所述的载体,其是质粒载体。

60.一种宿主细胞,其包括根据权利要求58或权利要求59所述的载体。

61.一种疫苗,其包括根据权利要求58或权利要求59所述的载体。

62.根据权利要求61所述的疫苗,其中所述抗原是PMCV ORF-1抗原。

63.一种预防有需要的鲑科鱼的鱼类心肌炎病毒(PMCV)感染的方法,所述方法包括向所述鲑科鱼施用根据权利要求63所述的疫苗。

64.根据权利要求62所述的方法,其中所述鲑科鱼的重量介于15与200克之间。

65.根据权利要求62所述的方法,其中所述鲑科鱼的重量介于40与110克之间。

66.根据权利要求63至65中任一项所述的方法,其中所述鲑科鱼是大西洋鲑鱼(Atlantic salmon)(大西洋鲑(Salmo salar))、虹鳟鱼(rainbow trout)(麦奇钩吻鲑(Oncorhynchus mykiss))或银鲑鱼(Coho Salmon)(银大麻哈鱼(Oncorhynchus kisutch))。

67.根据权利要求66所述的方法,其中所述鲑科鱼是大西洋鲑。

68.根据权利要求61所述的疫苗,其在保护鲑科鱼免受感染的方法中使用。

69.根据权利要求68所述的疫苗,其中所述载体包括表达盒,所述表达盒包括编码所述

抗原的所述核酸序列,其中所述抗原是无包膜病毒。

70.根据权利要求69所述的疫苗,其中所述无包膜病毒是PMCV。

71.根据权利要求68至70中任一项所述的疫苗,其中所述鲑科鱼的重量介于15与200克之间。

72.根据权利要求68至70中任一项所述的疫苗,其中所述鲑科鱼的重量介于40与110克之间。

73.根据权利要求68至72中任一项所述的疫苗,其中所述鲑科鱼是大西洋鲑鱼(大西洋鲑)、虹鳟鱼(麦奇钩吻鲑)或银鲑鱼(银大麻哈鱼)。

74.根据权利要求73所述的疫苗,其中所述鲑科鱼是大西洋鲑。

用于在细胞膜上表达抗原的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明总体上属于疫苗领域。

背景技术

[0002] 水产养殖在生产方面已经经历巨大的增长,在1990-2018年期间增长>527%。2018年,水产养殖贡献了全球水生生物总产量的大约46%(1.79亿吨)和人类消费的海产品(鱼类、甲壳类动物、软体动物和其它水生动物,不包含水生哺乳动物、爬行动物、海藻和其它水生植物)的52%。

[0003] 商业水产养殖受到主要由细菌、病毒、寄生虫以及在较小程度上由真菌引起的传染性疾病的影响。细菌性疾病会造成重大的生物损失,从而造成经济损失。虽然这些通常可以用抗生素来控制,但由于细菌物种(其中一些也是人类病原体)之间耐药性机制的发展和转移,滥用这些药物最终会对人类健康构成威胁。另外,这些病原体中的一些病原体很难在培养物中生长。因此,保护免受这些病原体影响的经修饰的活疫苗或灭活疫苗在商业上不可行。

[0004] DNA疫苗由于其稳定性和递送的简便性,已经成为用于产生抗原特异性免疫应答的有吸引力的方法。DNA疫苗可以容易地以高纯度大规模制备,重复地施用,并且相对于蛋白质和其它生物聚合物高度稳定。

[0005] 在可以构建的多种形式的核酸疫苗中,环状DNA质粒是最简单的。DNA疫苗接种涉及用含有编码抗原的基因(多个基因)的环状DNA质粒进行免疫。事实上,注射游离DNA(裸DNA)刺激对基因疫苗编码的蛋白质(抗原)的有效且长期免疫应答。当将质粒DNA注射到个体体内时,质粒被细胞吸收并且其遗传信息被翻译成对蛋白进行免疫。这使得宿主免疫系统能够对抗原做出应答。

[0006] 然而,DNA疫苗相对新并且需要提高这些疫苗的效率。

发明内容

[0007] 在第一方面,本发明提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白从N末端至C末端包括:

[0008] a)分泌蛋白或第一膜结合蛋白的N末端分泌信号序列;

[0009] b)来自无包膜病毒的抗原;

[0010] c)第二膜结合蛋白的跨膜结构域。

[0011] 在某些实施例中,所述第一膜结合蛋白与所述第二膜结合蛋白相同。在某些实施例中,所述膜结合蛋白是病毒性出血性败血症病毒G蛋白(VHSV-G)。优选地,所述N末端分泌信号序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:48至少90%相同,或者其中所述分泌信号序列包括SEQ ID NO:48或与SEQ ID NO:48至少90%相同的序列的一部分,其中所述部分包括SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%相同的序列。在一些实施例中,所述N末端分泌信号序列与SEQ ID NO:7至少90%相同,并且所述N末端分泌信号中的至少一半不同氨基酸是保守取代。

[0012] 在某些实施例中,所述跨膜结构域与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:49至少90%相同,或者其中所述跨膜片段包括SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49至少90%相同的序列的一部分,其中所述部分包括SEQ ID NO:8或与SEQ ID NO:8至少90%相同的序列。优选地,所述跨膜结构域与SEQ ID NO:8至少90%相同,并且所述N末端分泌信号中的至少一半不同氨基酸是保守取代。

[0013] 在某些实施例中,所述无包膜病毒是影响鱼类的无包膜病毒,所述无包膜病毒可以选自由以下组成的组:鱼类心肌炎病毒(PMCV)、鱼类正呼肠孤病毒(PRV)、传染性胰腺坏死病毒(IPNV)和β野田村病毒(betanodavirus)。

[0014] 在某些实施例中,所述抗原由鱼类心肌炎病毒(PMCV)的ORF-1编码。在一些实施例中,所述抗原是蛋白质,所述蛋白质从N末端至C末端包括:

[0015] a.与SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35至少90%相同、或至少91%相同、或至少92%相同、或至少93%相同、或至少94%相同、或至少95%相同、或至少96%相同、或至少97%相同、或至少98%相同、或至少99%相同或100%相同的序列,以及

[0016] b.与SEQ ID NO:25-33中的任一者至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,

[0017] 其中,

[0018] i)所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%相同的序列;和/或

[0019] ii)与SEQ ID NO:1相比,所述蛋白质包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四个连续氨基酸。

[0020] 在某些实施例中,所述蛋白质与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12至少90%相同。

[0021] 在某些实施例中,所述蛋白质与SEQ ID NO:25至少95%相同,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。优选地,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0022] 在某些其它实施例中,本发明的蛋白质包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。所述蛋白质可以包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列,并且进一步缺乏SEQ ID NO:5、15或24中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0023] 在其它实施例中,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。所述蛋白质可以包含与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列,并且进一步缺乏SEQ ID NO:3、15或24中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0024] 在其它实施例中,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:28至少90%相同的序列。任选地,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3、4或24中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0025] 在其它实施例中,所述蛋白质包括SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30或与这些序列中的任一者至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。优选地,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:24至少90%相同的氨基酸序列中的至少一者。

[0026] 在其它实施例中,所述蛋白质包括SEQ ID NO:32或与其至少95%、或96%、或

97％、或98％或99％相同的序列,并且任选地缺乏SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15至少90％相同的氨基酸序列中的至少一者。

[0027] 在其它实施例中,所述蛋白质包括SEQ ID NO:33或与其至少95％、或96％、或97％、或98％或99％相同的序列,并且任选地缺乏SEQ ID NO:24,与SEQ ID NO:24至少90％相同的氨基酸序列。

[0028] 在上文所描述的实施例中的任何实施例中,所述蛋白质可以进一步任选地缺乏SEQ ID NO:2和13或与SEQ ID NO:2或13至少90％相同的氨基酸序列中的至少一者。

[0029] 在某些实施例中,所述蛋白质包括SEQ ID NO:11或12或与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12至少90％、或至少91％、或至少92％、或至少93％、或至少94％、或至少95％、或至少96％、或至少97％、或至少98％、或至少99％或100％相同的序列。

[0030] 在某些实施例中,所述蛋白质包含SEQ ID NO:15或与其至少90％相同的序列,以及SEQ ID NO:4、5、25、26 27、29、30、32(或与SEQ ID NO:4、5、25、26 27、29、30或32至少90％相同的氨基酸序列)中的任一者,其中与SEQ ID NO:1相比,所述蛋白质包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四个连续氨基酸,并且任选地,其中所述蛋白质包括替代所述内部缺失的接头。

[0031] 在又其它实施例中,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13至少90％相同的序列,并且含有SEQ ID NO:25或与SEQ ID NO:25至少95％、或96％、或97％、或98％或99％相同的序列。

[0032] 在第二方面,本发明提供了一种核酸序列,所述核酸序列编码根据本发明的第一方面的实施例中的任何实施例的融合蛋白。

[0033] 在第三方面,本发明提供了一种盒,所述盒包括根据第二方面的任何实施例的核酸序列。

[0034] 在本发明的第四方面,提供了一种载体,所述载体包括根据本发明的第三方面的任何实施例的盒。

[0035] 在某些实施例中,所述载体还编码核酸序列,所述核酸序列编码免疫调节剂。在某些实施例中,所述免疫调节剂是如包括SEQ ID NO:6的IFNb型干扰素等干扰素,其中编码干扰素的所述核酸序列与SEQ ID NO:18 65-90％相同,或与SEQ ID NO:19 65-90％相同,并且其中密码子频率保留在所述核酸序列中。在某些实施例中,编码干扰素的核酸序列包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20至少90％相同的核酸序列,其中编码干扰素的所述核酸序列编码SEQ ID NO:6或与或SEQ ID NO:6 95％相同的氨基酸序列。

[0036] 在某些实施例中,所述载体可以是质粒载体或病毒载体。

[0037] 在第八方面,本公开提供了一种疫苗,所述疫苗包括根据本发明的第一方面的任何实施例的融合蛋白或根据本发明的第四方面的载体。在某些实施例中,所述疫苗进一步包括佐剂。在某些实施例中,所述疫苗还提供了载剂。在一个实施例中,所述载剂是脂质或脂质体载剂。

[0038] 在某些实施例中,所述疫苗是多价疫苗,并且包括一种或多种另外的抗原,优选地选自由以下组成的组:SAV(鲑科鱼甲病毒,包含SAV-1、SAV-2、SAV-3、SAV-4、SAV-5和SAV-6)、ISAV(传染性鲑鱼贫血病毒)、IPNV(传染性胰腺坏死病毒)、ASPV(大西洋鲑鱼痘病毒)、

IHNV(传染性造血坏死病毒)、VHSV(病毒性出血性败血症病毒)、PRV(鱼类正呼肠孤病毒)、杀鲑气单胞菌亚种(Aeromonas salmonicida subs.Salmonicida)、O1血清型鳗(利斯顿氏)弧菌(Vibrio(Listonella)anguillarum serotype O1)、O2a血清型鳗(利斯顿氏)弧菌(Vibrio(Listonella)anguillarum serotype O2a)、杀鲑弧菌(Vibrio salmonicida)、粘莫里特拉氏菌(Moritella viscosa)和海虱蛋白。

[0039] 在第六方面,本发明提供了一种保护鲑科鱼免受PMCV感染的方法,所述方法包括向有需要的鲑科鱼施用根据本发明的第六方面的任何实施例的疫苗。在某些实施例中,所述鲑科鱼的重量介于15与200克之间。在某些实施例中,所述鲑科鱼是大西洋鲑鱼(大西洋鲑)、虹鳟鱼(rainbow trout)(麦奇钩吻鲑(Oncorhynchus mykiss))、银鲑鱼(Coho Salmon)(银大麻哈鱼(Oncorhynchus kisutch))或大鳞大麻哈鱼(Chinook salmon)(大鳞钩吻鲑(Oncorhynchus tshawytscha))。

附图说明

[0040] 图1A是单分体病毒科(Totiviridae)的一般病毒体结构。图1B是PMCV的基因组组织的图示。基因组包含三个大的ORF。

[0041] 图2A是用于按路线递送疫苗抗原以在细胞表面上表达的策略的图示。图2B是促进分泌抗原的策略的图示。

[0042] 图3A是证明在非透化细胞中检测到PMCV ORF1的照片。图3B证实了用不同表达盒获得的结果,所述表达盒用于将全长PMCV ORF-1按路线递送到细胞表面。

[0043] 图4A是通过经转染的CHH-1细胞的IF染色对截短的衣壳变体的荧光强度的评估。图4B是通过免疫沉淀(IP-Western)从膜级分进行蛋白质印迹检测的蛋白质表达的图示。两个印迹表示两个不同的实验。

[0044] 图5是通过从经转染的CHH-1细胞的总细胞裂解物中进行免疫沉淀和蛋白质印迹对五种不同质粒主链中的蛋白质表达的评估。

具体实施方式

[0045] 为了更好地解释本发明,提供了以下定义。

[0046] 如应用于参考数字的术语“约”是指所述值加或减百分之10的参考数字。

[0047] 术语“密码子频率在所述核酸序列中保持不变”描述了一种核酸序列,其中本发明的核酸序列中的至少50%的密码子的频率与宿主的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过40%。例如,当宿主基因组中的给定密码子的频率为20%时,如果根据本发明的核酸序列中的相同密码子的频率介于12%(比20%小40%)与28%(比20%大40%)之间,则该密码子被计入其频率与宿主的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过40%的至少50%的密码子中。

[0048] 例如,表1提供了大西洋鲑鱼(大西洋鲑)的基因组中的密码子频率。

[0049] 表1.大西洋鲑鱼的基因组的密码子频率

[0050]

氨基酸	密码子	每1000	频率
GLY	GGG	15.87	21.91
GLY	GGA	20.24	27.94

[0051]

GLY	GGT	14.03	19.37
GLY	GGC	22.3	30.78
ASP	GAT	16.76	32.69
ASP	GAC	34.51	67.31
GLU	GAG	45.67	76.69
GLU	GAA	13.88	23.31
VAL	GTG	29.06	45.71
VAL	GTA	6.19	9.74
VAL	GTT	9.77	15.37
VAL	GTC	18.56	29.19
ALA	GCG	7.2	11.08
ALA	GCA	13.42	20.65
ALA	GCT	17.5	26.92
ALA	GCC	26.88	41.35
ARG	AGG	13.4	26.85
ARG	AGA	10.12	20.28
ARG	CGG	6.61	13.25
ARG	CGA	4.01	8.036
ARG	CGT	5.74	11.50
ARG	CGC	10.02	20.08
SER	AGT	11.2	13.54
SER	AGC	21.01	25.40
SER	TCG	5.31	6.42
SER	TCA	10.15	12.27
SER	TCT	13.86	16.76
SER	TCC	21.18	25.61
LYS	AAG	39.68	69.87
LYS	AAA	17.11	30.13
ASN	AAT	11.42	28.36
ASN	AAC	28.85	71.64
MET	ATG	27.27	100
ILE	ATA	6.37	13.59
ILE	ATT	11.34	24.19
ILE	ATC	29.17	62.22
TRP	TGG	11.53	100
CYS	TGT	11.05	46.80
CYS	TGC	12.56	53.20
TYR	TAT	8.12	27.21
TYR	TAC	21.72	72.79
LEU	TTG	10.16	10.97
LEU	TTA	3.44	3.71
LEU	CTG	45.99	49.65

[0052]

LEU	CTA	7.18	7.75
LEU	CTT	7.87	8.50
LEU	CTC	17.98	19.41
PHE	TTT	12.55	32.54
PHE	TTC	26.02	67.46
GLN	CAG	35.96	81.21
GLN	CAA	8.32	18.79
HIS	CAT	8.63	32.43
HIS	CAC	17.98	67.57
PRO	CCG	5.93	11.09
PRO	CCA	13.3	24.86
PRO	CCT	13.89	25.97
PRO	CCC	20.37	38.08
THR	ACG	6.91	11.85
THR	ACA	14.69	25.18
THR	ACT	12.76	21.88
THR	ACC	23.97	41.09
氨基酸	**密码子**	**每 1000**	**频率**

[0053] 密码子CGC编码精氨酸的频率为20.08%——即大西洋鲑的基因组中的20.08%精氨酸残基由CGC编码。如果核酸序列中介于12.048%与28.112%之间的精氨酸残基由CGC编码,则密码子CGC被计入其频率与大西洋鲑的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过40%的至少50%的密码子中。

[0054] “治疗有效量”是指将在接受抗原或疫苗的受试者体内诱导免疫应答的抗原或疫苗的量,所述量足以预防或减少由如病毒或细菌等病原体的感染所引起的疾病的体征或症状,包含不良健康影响或其并发症。可以诱导体液免疫性或细胞介导的免疫性,或体液和细胞介导的免疫性两者。动物对疫苗的免疫原性应答可以例如通过测量抗体滴度、淋巴细胞增殖测定来间接评估,或通过监测在用野生型病毒株激发之后的体征和症状来直接评估。由疫苗赋予的保护性免疫可以通过测量例如临床体征的减少来评估,所述临床体征如受试者的死亡率、发病率、温度数值、整体身体状况以及整体健康和表现。疫苗的治疗有效量可以根据所使用的特定佐剂、所使用的特定抗原或受试者的病状而改变,并且可以由本领域技术人员确定。

[0055] “治疗”是指预防此类术语所适用的病症、病状或疾病或预防或减少此类病症、病状或疾病的一种或多种症状。

[0056] 本发明提供了允许抗原对细胞表面的改进的靶向的平台。因此,此类经工程化的抗原将定位于细胞表面,在所述细胞表面上,所述经工程化的抗原可以由宿主的免疫系统识别,并且因此将产生保护性免疫应答。因此,在第一方面,本发明提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白从N末端至C末端包括:

[0057] a)分泌蛋白或第一膜结合蛋白的N末端分泌信号序列;

[0058] b)抗原;

[0059] c)第二膜结合蛋白的跨膜结构域。

[0060] 在某些实施例中,所述第一蛋白可以选自由以下组成的组:干扰素a、干扰素b、干

扰素c、干扰素d、干扰素γ、白介素-2、白介素-4、白介素-12。第二蛋白可以独立地选自大西洋鲑鱼副粘病毒的融合蛋白、传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)的血凝素(HE)蛋白或病毒性出血性败血症病毒的G蛋白。

[0061] 第一蛋白和第二蛋白可以彼此相同或不同。在一些实施例中,第一蛋白和/或第二蛋白可以是大西洋鲑鱼副粘病毒的融合蛋白,其信号传导和跨膜结构域序列分别包括SEQ ID NO:38和39。在一些实施例中,第一蛋白和第二蛋白可以是传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)的血凝素(HE)蛋白,其分泌信号传导和跨膜结构域序列分别包括SEQ ID NO:40和41。在其它实施例中,第一蛋白和第二蛋白可以不同。例如,第一蛋白可以包括SEQ ID NO:38,并且第二蛋白可以包括SEQ ID NO:41。在其它实施例中,第一蛋白可以包括SEQ ID NO:40,并且第二蛋白可以包括SEQ ID NO:39。在某些实施例中,第一蛋白选自由以下组成的组:SEQ ID NO:7、38和40,并且第二蛋白独立地选自由以下组成的组:SEQ ID NO:8、39和41,或与相应参考序列至少90%相同的序列,其中优选地,不同的氨基酸是保守取代。

[0062] 在一些实施例中,第一膜蛋白与第二膜蛋白相同,并且是病毒性出血性败血症病毒G蛋白(VHSV-G)。

[0063] 因此,在一些实施例中,所述N末端分泌信号序列与SEQ ID NO:7至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或100%相同。

[0064] 如上文所描述的,优选地,使得与SEQ ID NO:7不同的突变是取代。在某些有利的实施例中,所述N末端分泌信号中的至少一半(或至少60%、或至少70%、或至少80%或至少90%)的不同的氨基酸是保守取代。

[0065] 在实施例中,当VHSV-G蛋白是N末端分泌信号和跨膜结构域两者的来源时,所述跨膜结构域与SEQ ID NO:8至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或100%相同。

[0066] 如上文所描述的,优选地,使得与SEQ ID NO:7和8不同的突变是取代。在某些有利的实施例中,所述跨膜结构域中的至少一半(或至少60%、或至少70%、或至少80%或至少90%)的不同的氨基酸是保守取代。

[0067] 还可以包含第一蛋白和/或第二蛋白的另外的片段。因此,在某些实施例中,SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%相同的蛋白质可以包含在SEQ ID NO:48或与SEQ ID NO:48或其片段至少90%相同的氨基酸序列中。应当理解,所述片段将包含SEQ ID NO:7或与SEQ ID NO:7至少90%相同的序列。

[0068] 独立地,SEQ ID NO:8或与SEQ ID NO:8至少90%相同的蛋白质可以包含在SEQ ID NO:49或与SEQ ID NO:49或其片段至少90%相同的氨基酸序列中。应当理解,所述片段将包含SEQ ID NO:8或与SEQ ID NO:8至少90%相同的序列。

[0069] 与SEQ ID NO:7和8类似,使得与SEQ ID NO:48和49不同的突变是取代。在某些有利的实施例中,所述N末端分泌信号传导序列中和/或跨膜结构域中的至少一半(或至少60%、或至少70%、或至少80%或至少90%)的不同的氨基酸是保守取代。

[0070] 在某些实施例中,无包膜病毒是影响鱼类的无包膜病毒。影响鱼类的此类无包膜病毒的合适实例包含但不限于鱼类心肌炎病毒(PMCV)、鱼类正呼肠孤病毒(PRV)、传染性胰腺坏死病毒(IPNV)和β野田村病毒。来自这些病毒的抗原可以是蛋白质或其免疫有效片段。

特别优选的是表面蛋白或这些表面蛋白的免疫有效片段。

[0071] 在某些实施例中,抗原是无包膜病毒的衣壳蛋白,例如PMCV。因此,在一些实施例中,抗原是鱼类心肌炎病毒(PMCV)ORF-1抗原,如包括SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1至少90%相同,例如与SEQ ID NO:1至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同或至少99%相同的序列的蛋白质。序列可能通过缺失、插入或取代而与SEQ ID NO:1不同。优选地,至少一些取代是保守取代。在某些实施例中,至少50%(即至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95%、或至少99%或100%)的经取代的氨基酸是保守取代。

[0072] 在其它实施例中,抗原包括蛋白质,所述蛋白质从N末端至C末端包括:

[0073] a.与SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35至少90%相同、或至少91%相同、或至少92%相同、或至少93%相同、或至少94%相同、或至少95%相同、或至少96%相同、或至少97%相同、或至少98%相同、或至少99%相同或100%相同的序列;以及

[0074] b.与SEQ ID NO:25-33中的任一者至少95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,

[0075] 其中,

[0076] i)所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15至少90%相同的序列;和/或

[0077] ii)与SEQ ID NO:1相比,所述蛋白质包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四个连续氨基酸。在某些实施例中,蛋白质与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12至少90%相同。

[0078] 在鱼类心肌炎病毒(PMCV)ORF-1抗原缺乏SEQ ID NO:15的实施例中,应当理解,也可以在抗原中进行较大的缺失,例如C末端截短。在一些实施例中,此类较大的C末端截短包括SEQ ID NO:13或由其组成。

[0079] 在某些实施例中,蛋白质与SEQ ID NO:25至少95%相同,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。优选地,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:15中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0080] 在某些其它实施例中,本发明的蛋白质包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。所述蛋白质可以包含与SEQ ID NO:26至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列,并且进一步缺乏SEQ ID NO:5、15或24中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0081] 在其它实施例中,蛋白质包含与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列。所述蛋白质可以包含与SEQ ID NO:27至少95%相同的序列,并且缺乏SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14至少90%相同的序列,并且进一步缺乏SEQ ID NO:3、15或24中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0082] 在其它实施例中,蛋白质包含与SEQ ID NO:28至少90%相同的序列。任选地,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3、4或24中的一者或多者或与其至少90%相同的序列。

[0083] 在其它实施例中,蛋白质包括SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30或与这些序列中的任一者至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。优选地,所述蛋白质缺乏SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:24至少90%相同的氨基酸序列中的至少一者。

[0084] 在其它实施例中,蛋白质包括SEQ ID NO:32或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列,并且任选地缺乏SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15至少90%相同的氨基酸序列中的至少一者。

[0085] 在其它实施例中,蛋白质包括SEQ ID NO:33或与其至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列,并且任选地缺乏SEQ ID NO:24,与SEQ ID NO:24至少90%相同的氨基酸序列。

[0086] 在上文所描述的实施例中的任何实施例中,蛋白质可以进一步任选地缺乏SEQ ID NO:2和13或与SEQ ID NO:2或13至少90%相同的氨基酸序列中的至少一者。

[0087] 在其它实施例中,蛋白质包含SEQ ID NO:15或与其至少90%相同的序列,以及SEQ ID NO:4、5、25、26 27、29、30、32(或与SEQ ID NO:4、5、25、26 27、29、30或32至少90%相同的氨基酸序列)中的任一者,其中与SEQ ID NO:1相比,所述蛋白质包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四个连续氨基酸,并且任选地,其中所述蛋白质包括替代所述内部缺失的接头。

[0088] 与SEQ ID NO:1相比,所述鱼类心肌炎病毒(PMCV)ORF-1抗原可以包括内部缺失,所述内部缺失的长度为至少四个连续氨基酸。通常,内部缺失的长度可以为至多250个氨基酸。优选地,内部缺失的长度为约10个氨基酸或长度为10至250个氨基酸、或长度为25至250个氨基酸、或长度为50至250个氨基酸、或长度为100至250个氨基酸、或长度为150-250个氨基酸、或长度为10至200个氨基酸、或长度为25至200个氨基酸、或长度为50至200个氨基酸、或长度为100至200个氨基酸、或长度为150至200个氨基酸、或长度为约200个氨基酸、或长度为约50个氨基酸、或长度为50至150个氨基酸、或长度为50-100个氨基酸或长度为约100个氨基酸。在某些实施例中,内部缺失包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:14或由其组成。

[0089] 在某些实施例中,接头可以替代所述内部缺失而存在。内部缺失和接头的长度不需要相同。例如,接头的长度可以为3-50个氨基酸、或长度可以为3-40个氨基酸、或长度可以为3-30个氨基酸、或长度可以为3-20个氨基酸、或长度可以为3-10个氨基酸、或长度可以为约5个氨基酸、或长度可以为约10个氨基酸或长度可以为约20个氨基酸。接头的确切序列并不是很重要。通常,优选的氨基酸是极性不带电或带电的残基,其构成天然编码的氨基酸的大约50%。更具体地,苏氨酸、丝氨酸和甘氨酸由于其小尺寸可以提供良好的柔性,并且通过与水形成氢键也有助于维持水性溶剂中的接头结构的稳定性。在某些实施例中,接头富含甘氨酸和/或丝氨酸。在某些实施例中,接头的长度为5个氨基酸并且可以包括SEQ ID NO:36。SEQ ID NO:36可以由SEQ ID NO:37编码。

[0090] 在又其它实施例中,蛋白质缺乏SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13至少90%相同的序列,并且含有SEQ ID NO:25或与SEQ ID NO:25至少95%、或96%、或97%、或98%或99%相同的序列。

[0091] 在某些实施例中,蛋白质包括SEQ ID NO:11、12或46或与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:46至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或100%相同的序列。

[0092] 在某些优选实施例中,融合蛋白包括SEQ ID NO:9、10或47或与SEQ ID NO:9、10或47至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、

或至少97％、或至少98％、或至少99％或100％相同的序列。优选地,不同的氨基酸是取代,并且这些取代中的至少一半(例如至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％)是保守取代。

[0093] 在第二方面,本公开提供了一种核酸序列,所述核酸序列编码根据本发明的第一方面的实施例的任何实施例的蛋白质或根据本发明的第二方面的实施例的任何实施例的融合蛋白。在一些实施例中,根据本发明的第三方面的核酸序列可以包括SEQ ID NO:16或与其至少90％(至少91％、或至少92％、或至少93％、或至少94％、或至少95％、或至少96％、或至少97％、或至少98％或至少99％)相同。

[0094] 在第三方面,本发明提供了一种表达盒,所述表达盒包括根据本发明的第二方面的任何实施例的核酸序列。优选地,根据本发明的第二方面的任何实施例的核酸序列在第一启动子的可操作控制下。第一启动子可以选自此类示例性启动子,如猿猴病毒40早期启动子(SV40)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、人泛素C启动子(UBC)、人延伸因子1α启动子(EF1A)、小鼠磷酸甘油酸激酶1启动子(PGK)和与CMV早期增强子偶联的鸡β-肌动蛋白启动子(CAGG)。通常,本发明的表达盒还包括终止编码抗原的核酸序列的转录的聚腺苷酸化信号。

[0095] 任选地,盒也可以包括在第二启动子的可操作控制下编码分子免疫调节剂的核酸序列。通常,第二启动子应该能够在宿主生物中启动转录。在宿主是如大西洋鲑等鲑科鱼的实施例中,合适的启动子包含但不限于猿猴病毒40早期启动子(SV40)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、人泛素C启动子(UBC)、人延伸因子1α启动子(EF1A)、小鼠磷酸甘油酸激酶1启动子(PGK)和与CMV早期增强子偶联的鸡β-肌动蛋白启动子(CAGG)。通常,本发明的表达盒还包括终止本发明的核酸序列的转录的聚腺苷酸化信号。

[0096] 在第四方面,本申请公开了一种载体,所述载体包括根据本发明的第三方面的实施例中的任何实施例的盒。适用于本发明的不同载体是本领域已知的,包含质粒载体和病毒载体两者。合适的质粒包含但不限于基于pUC的载体、pVAX载体、pcDNA载体、NTC载体。在一组优选实施例中,载体是NTC9385R(自然技术公司(Nature Technology Corporation))或其变体,如实例中所描述的。

[0097] 在其它实施例中,相对新的“doggybone”或dbDNA™质粒可以用作载体。至少在WO 2018033730、WO 2016034849、WO 2019193361、WO 2012017210和WO 2021161051中已经描述dbDNA™质粒以及制备这些质粒的过程。这种方法的优点是载体可以在无细胞过程中合成,从而提高生产效率。无细胞过程优选地涉及通过链置换复制来扩增模板。这种合成释放出单链DNA,进而使用聚合酶将所述单链DNA复制成双链DNA。可替代地,链置换可以通过提供DNA聚合酶和单独的解旋酶来实现。复制性解旋酶可以打开双链DNA并促进前导链聚合酶的发展。将所得双链DNA多联体酶切并连接,从而形成doggybone状DNA构建体。

[0098] 合适的病毒载体包含但不限于如SAV病毒等甲病毒、如VHSV和IHNV等弹状病毒、如ASPV等副粘病毒、腺病毒、如鲑鱼鳃痘病毒等痘病毒等。可以对这些病毒进行基因修饰,以去除病毒基因组中负责复制的部分。因此,所得病毒将对鱼类细胞具有传染性,并且适用于产生抗原,但不是致病性的。

[0099] 在表达盒不含编码分子免疫调节剂的核酸序列的实施例中,此类核酸序列仍然可以存在于载体中。

[0100] 在某些实施例中,适用于该方面的载体和第三方面的盒两者的分子免疫调节剂是干扰素,优选地IFNb等,并且包括SEQ ID NO:6(大西洋鲑干扰素B或IFN-b蛋白)或SEQ ID NO:50(大西洋鲑干扰素B1或IFNb1蛋白)或与SEQ ID NO:6或50至少95%(例如,至少96%、或至少97%、或至少98%或至少99%)相同的序列,其中所述干扰素B由与SEQ ID NO:18 65-90%相同的核酸序列编码,或者其中所述干扰素B1由与SEQ ID NO:19 65-90%相同的核酸序列编码,并且其中密码子频率保留在所述核酸序列中。

[0101] 在某些实施例中,编码干扰素的核酸序列与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19 70-79%或73-77%相同,条件是密码子频率保留在编码干扰素的所述核酸序列中。

[0102] 如上文所公开的,编码干扰素的核酸序列中的至少50%的密码子的频率与宿主的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过40%。在某些实施例中,编码干扰素的核酸序列中的至少40%密码子的频率与宿主的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过30%,和/或编码干扰素的核酸序列中的至少30%密码子的频率与宿主的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过25%,和/或编码干扰素的核酸序列中的至少25%密码子的频率与宿主的基因组中的相同密码子的频率偏差不超过20%。如果宿主是大西洋鲑,则表1中提供了大西洋鲑的密码子频率。

[0103] 在某些实施例中,核酸序列包括SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20中的一者至少90%相同(即,超过91%相同、超过92%相同、超过93%相同、超过94%相同、超过95%相同、超过96%相同、超过97%相同、超过98%相同或超过99%相同),并且所述核酸序列编码SEQ ID NO:6或50或与其至少95%相同的氨基酸序列,如上文所描述的。

[0104] 因此,在某些实施例中,载体包括融合蛋白和分子佐剂两者,其中:

[0105] a.融合蛋白包括SEQ ID NO:9、10或47或与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:47至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%或100%相同的序列。优选地,不同的氨基酸是取代,并且这些取代中的至少一半(例如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%)是保守取代;以及

[0106] b.SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:20;以及任选地

[0107] c.载体是质粒载体,优选地NTC9385R或其变体。

[0108] 在某些实施例中,载体可以含有如上所描述的表达盒和另外的抗原,例如鲑科鱼甲病毒抗原。载体还可能含有编码不同的分子免疫调节剂的另外的核酸序列。

[0109] 根据本发明的该方面的任何实施例的载体可以任选地包含编码另外的抗原的氨基酸序列。通常,这些另外的抗原可能具有病毒、细菌、原生动物或寄生虫来源。合适的病毒包含PMCV、SAV、ISA、IPNV、ASPV(大西洋鲑鱼痘病毒)、IHNV(传染性造血坏死病毒、VHSV(病毒性出血性败血症病毒)和PRV。可以包含来自包膜和无包膜病毒的抗原。在某些实施例中,抗原是病毒结构蛋白或衣壳蛋白或外表面蛋白。能够引发保护性免疫应答的这些蛋白质的片段也是合适的。

[0110] 合适的细菌包含但不限于杀鲑气单胞菌亚种、鳗(利斯顿氏)弧菌、杀鲑弧菌、粘莫里特拉氏菌和鲁氏耶尔森菌(Yersinia ruckeri)。同样,存在于细菌的外表面上的蛋白质是优选的抗原,以及这些能够引发保护性免疫应答的蛋白质。

[0111] 合适的寄生虫包含海虱(鱼虱科(family Caligidae),优选地海虱属或鱼虱属)。已经描述了源自海虱并能够引发保护性免疫应答的蛋白质并且所述蛋白质包含肠肽或其片段,所述肠肽或其片段包含但不限于SEQ ID NO:21或与其至少90%相同的序列。

[0112] 本领域普通技术人员将理解,所描述的氨基酸序列与参考氨基酸序列之间的差异(无论是在根据本发明的第一方面的任何实施例的融合蛋白的上下文中,或者在本发明的第三或第四方面的某些实施例中适用的分子免疫调节剂的上下文中)可以呈插入、缺失或取代的形式。优选地,突变是取代,并且更优选地这些取代中的至少一些取代是保守取代。

[0113] 技术人员将进一步了解,引起核酸序列所编码的蛋白质的氨基酸序列的修饰的核酸序列的改变可以对蛋白质的所得三维结构具有极小(如果有的话)影响。例如,氨基酸丙氨酸,疏水性氨基酸的密码子可以被编码如甘氨酸等另一个更少疏水性的残基或如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸等更多疏水性的残基的密码子取代。类似地,导致一个带负电荷的残基取代另一个残基的变化,如天冬氨酸取代谷氨酸,或一个带正电荷的残基取代另一个残基,如赖氨酸取代精氨酸,也可以预期产生具有基本上相同功能活性的蛋白质。

[0114] 以下六个基团各自含有典型的彼此保守取代的氨基酸:[1]丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);[2]天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);[3]天门冬氨酸(N)、谷氨酰胺(Q);[4]精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H);[5]异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);以及[6]苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)(参见例如美国专利公开20100291549)。

[0115] 在某些实施例中,与参考序列不同的至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95%或全部100%的氨基酸是保守取代。

[0116] 可以使用本领域已知的多种序列比较算法和程序中的任何多种序列比较算法和程序来评估根据本文所描述的实施例中的任何实施例的蛋白质和/或核酸序列同一性。为了进行序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列(例如,本文所公开的序列)。然后,序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0117] 两个氨基酸或两个核酸序列的同一性百分比可以例如通过使用计算机程序GAP,即遗传学计算机组(GCG;威斯康星州麦迪逊(Madison,WI))Wisconsin软件包10.0版程序,GAP比较序列信息来确定(Devereux等人,(1984),《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》12:387-95)。在计算同一性百分比时,进行比较的序列通常以使序列之间的匹配最大的方式比对。GAP程序的优选默认参数包含:(1)核苷酸的一元比较矩阵(对于同一性含有值1并且对于非同一性含有0)的GCG实现,以及Gribskov和Burgess的加权氨基酸比较矩阵,((1986)《核酸研究》14:6745),如《多肽序列和结构图谱(Atlas of Polypeptide Sequence and Structure)》,Schwartz和Dayhoff编辑,国家生物医学研究基金会(National Biomedical Research Foundation),第353-358页(1979)中所描述的矩阵或其它可比比较矩阵;(2)对于氨基酸序列,每个空位8的罚分并且每个空位中每个符号2的另外罚分,或者对于核苷酸序列,每个空位50的罚分并且每个空位中每个符号3的另外罚分;(3)对于端部空位没有罚分;以及(4)对于长空位没有最大罚分。

[0118] 也可以通过使用以下确定序列同一性和/或相似性:Smith和Waterman的局部序列同一性算法,1981,《高等应用数学(Adv.Appl.Math.)》2:482;Needleman和Wunsch的序列同一性比对算法,1970,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》48:443;Pearson和Lipman的相似性

搜索方法,1988,《美国国家科学院院刊(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.)》85:2444;这些算法的计算机化实施方案(威斯康星州麦迪逊市科学大道575号遗传学计算机组的威斯康星州遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.)中的BESTFIT、FASTA和TFASTA)。

[0119] 有用的算法的另一个实例是PILEUP。PILEUP使用渐进的成对比对从相关序列组中创建多序列比对。还可以绘制示出用于创建比对的聚类关系的树。PILEUP使用了Feng和Doolittle的渐进比对方法的简化,1987,《分子进化杂志(J.Mol.Evol.)》35:351-360;所述方法类似于Higgins和Sharp,1989,《生物科学中的计算机应用(CABIOS)》5:151-153中描述的方法。有用的PILEUP参数包含默认空位权重3.00、默认空位长度权重0.10和加权末端空位。

[0120] 有用的算法的另一个实例是在以下中描述的BLAST算法:Altschul等人,1990,《分子生物学杂志》215:403-410;Altschul等人,1997,《核酸研究》25:3389-3402;以及Karin等人,1993,《美国国家科学院院刊》90:5873-5787。特别有用的BLAST程序是从Altschul等人,1996,《酶学方法(Methods in Enzymology)》266:460-480获得的WU-BLAST-2程序。WU-BLAST-2使用若干个搜索参数,其中大部分被设置为默认值。可调整参数被设置为以下值:重叠跨度=1,重叠分数=0.125,单词阈值(T)=II。HSP S和HSP S2参数是动态值并且由程序本身根据特定序列的组成和搜索所关注序列的特定数据库的组成来建立;但是,可以调整值以提高灵敏度。

[0121] 另外的有用的算法是空位的BLAST,如Altschul等人,1993,《核酸研究》25:3389-3402。空位的BLAST使用BLOSUM-62取代评分;阈值T参数设置为9;触发无空位的延伸的两次点击法,电荷空位长度为k,成本为10+k;X_u设置为16,并且对于数据库搜索阶段X_g设置为40并且对于算法的输出阶段设置为67。空位的比对由与约22位相对应的评分触发。

[0122] 本领域普通技术人员将理解,存在多种方法用于制备根据本发明的第一方面的氨基酸序列、根据本发明的第二方面的核酸、本发明的第三方面的表达盒和本发明的第四方面的载体。例如,核酸序列可以使用软件工具,例如CLC主工作台设计,并人工合成或使用靶向诱变产生。可以使用本领域技术人员广泛可用的基因工程技术将这些序列亚克隆到表达盒和载体中。参见例如《分子克隆:实验室手册(Molecular cloning:a laboratory manual)》(Sambrook和Russell:2000,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press);ISBN:0879695773),以及:《当代分子生物学实验指南(Current protocols in molecular biology)》(Ausubel等人,1988+更新,纽约的格林出版协会(Greene Publishing Assoc.,New York);ISBN:0471625949)。

[0123] 在第五方面,本申请公开了一种疫苗,所述疫苗包括根据本发明的第四方面的实施例中的任何实施例的载体。疫苗可以是单价或多价的。通常,一剂量的单价疫苗可以含有至少1μg的根据第四方面的实施例中的任何实施例的载体。在某些实施例中,一剂量的疫苗可以含有介于1μg与约25μg之间的载体。在其它实施例中,一剂量的疫苗可以含有介于1与约20μg之间的载体、或介于约5与约20μg之间的载体、或介于约5与约15μg之间的载体、或介于约10与约20μg之间的载体或介于约5与约10μg之间的载体。

[0124] 上文已经描述了适用于根据本发明的疫苗的多种抗原。在本发明的第三和第四方面中,这些抗原可以以DNA疫苗的形式施用,包含上文所描述的载体和表达盒。在其它实施

例中,这些抗原可以以亚基的形式(即,纯化或部分纯化的蛋白质)施用。在其它实施例中,抗原可以包括灭活或减毒的生物。

[0125] 除了抗原之外,本发明的疫苗可以进一步包括佐剂,即增强或调节免疫应答的物质,以及由SEQ ID NO:6或与其95%相同的氨基酸序列编码的分子免疫调节剂。

[0126] 合适的佐剂是本领域众所周知的。合适的非限制性佐剂包含皂苷(例如,Quil A)、明矾、CpG寡核苷酸、聚I:C、寡核糖核苷酸、细胞因子、如BAY®1005等糖脂、如二甲基双十八烷基溴化铵(下文称为"DDA")等季胺。本领域已经描述了包括皂苷、甾醇(例如,胆固醇)以及任选地磷脂的复合物。据报告,CpG寡核苷酸和皂苷、CpG和胆固醇以及CpG和明矾的组合引发协同作用。

[0127] 除了抗原以及任选地另外的佐剂之外,疫苗还可以包括合适的药物载剂。适当的载剂对本领域技术人员来说是显而易见的,并且将在很大程度上取决于施用途径。本发明中可能存在的另外的组分是佐剂、防腐剂、表面活性剂、化学稳定剂、悬浮剂或分散剂。通常,稳定剂、佐剂和防腐剂经优化以确定针对靶受试者的功效的最佳调配物。

[0128] 在某些实施例中,疫苗可以包含脂质体佐剂和/或载剂以促进载体跨细胞膜转运,并且因此使得抗原和/或分子免疫调节剂的表达增加。此类脂质体佐剂/载剂系统的合适的非限制性实例在例如美国专利10,456,459中有所描述。

[0129] 在第六方面,本申请公开了一种保护鲑科鱼免受感染的方法,所述方法包括向有需要的鲑科鱼施用根据本发明的第五方面的实施例中的任何实施例的疫苗。因此,本公开还提供了根据第五方面的实施例中的任何实施例的疫苗,用于保护鲑科鱼免受感染。

[0130] 本领域普通技术人员应该清楚的是,疫苗中存在的抗原所保护免受的感染决定了本发明的疫苗可以保护免受的感染。因此,例如但不限于,如果疫苗包括编码PMCV抗原的核酸序列,则疫苗将用于抵抗由PMCV引起的感染。

[0131] 根据本发明的疫苗可以通过多种途径施用于鲑科鱼,包含但不限于肌肉内施用。优选地,疫苗以微剂量施用,使得一剂量的体积低于500μl、或低于400μl、或低于300μl、或低于200μl或约100μl、或低于100μl、或约50μl或约25μl。

[0132] 本文所公开的疫苗可以用于保护多种鲑科鱼物种免受感染。合适的鲑科鱼包含但不限于大西洋鲑鱼(大西洋鲑)、银鲑鱼(银大麻哈鱼)、虹鳟鱼(麦奇钩吻鲑)、红大马哈鱼(sockeye salmon)(红大麻哈鱼(Oncorhynchus nerka))、大鳞大麻哈鱼(大鳞钩吻鲑)和其它物种。

[0133] 不同年龄(或体重)的鲑科鱼可以根据本发明进行疫苗接种。在某些实施例中,在疫苗接种时鲑科鱼的重量介于约15与约200克之间。因此,在疫苗接种时鲑科鱼的重量可以介于约25与约150克之间、或介于约40与约110克之间或介于约50与约100克之间。

[0134] 实例

[0135] 实例1:表面靶向表达系统的制备

[0136] 所有成功的大西洋鲑鱼的DNA疫苗已经源自包膜病毒,并且基于膜结合抗原。因此,将抗原暴露在细胞的表面上对功效很重要。

[0137] PMCV是裸病毒,含有具有三个预测的开放阅读框的6.7kb的dsRNA基因组(图1)。衣壳蛋白(CP)翻译自ORF1,而ORF2编码RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)。ORF3蛋白的功能仍然未知,但其编码在细胞培养物中过表达时具有细胞毒性作用的蛋白,并且不是病毒颗粒的组

装所必需的。

[0138] 表达PMCV ORF1(衣壳蛋白)和PMCV ORF3(未知功能的蛋白)的DNA疫苗已经经过测试,但没有提供保护(数据未示出)。由于PMCV是裸病毒,没有预测的PMCV ORF1蛋白的跨膜区,并且证实PMCV ORF1蛋白将仅在细胞内表达(数据未示出),因此假设如果表达的ORF1衣壳蛋白靶向细胞膜,则可能引发应答。

[0139] 该实验的目的是构建表达PMCV衣壳蛋白(或其部分)作为细胞表面表达抗原的DNA疫苗。该策略是根据PMCV ORF1抗原N末端的上游的SEQ ID NO:7融合病毒性出血性败血症病毒G蛋白(VHSV-G)的N末端分泌信号肽。另外地,根据SEQ ID NO:8的VHSV-G的C末端跨膜结构域在抗原C末端的下游融合,以在细胞表面处结合抗原(von Gersdorff Jørgensen等人,2012),如图2A中所展示的。通过仅使用N末端分泌信号肽并省略C末端跨膜结构域的使用,也制备了疫苗抗原的分泌版本(图2B)。

[0140] 与图2A中所展示的构建体类似制备另外的构建体,不同之处在于使用大西洋鲑鱼副粘病毒融合蛋白(分别为SEQ ID NO:38和39)或传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)的血凝素(HE)蛋白(分别为SEQ ID NO:40和41)的信号肽序列和跨膜结构域序列。

[0141] 在用各种DNA疫苗构建体转染CHH-1细胞之后6天,通过免疫荧光(IF)染色研究抗原表达的递送路线。使用LIPOFECTAMIN®3000试剂盒(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher))在12孔板中进行转染。在该实验中利用pVAX1表达载体(英杰公司(Invitrogen))构建DNA疫苗,并使用1μg的质粒DNA进行转染。细胞仅用3.7%甲醛固定用于表面抗原表达,或者用3.7%甲醛固定,然后使用0.1% Triton X-100透化细胞,用于细胞内表达的蛋白质染色。使用针对PMCV ORF1的单克隆抗体和多克隆抗体两者检测疫苗抗原。适当的荧光标记的次级抗体(兔抗小鼠FITC(DAKO F0261))或多克隆山羊抗兔Alexa Fluor Plus 488(英杰公司A32731))用于检测。染色透化细胞检测细胞内表达的抗原常规地包含作为方案的阳性对照。

[0142] 如图3所示,VHSV G蛋白的使用可以用于将PMCV ORF-1抗原的表达按路线递送到细胞表面。使用来自传染性鲑鱼贫血病毒的血凝素(HE)蛋白的信号蛋白和跨膜结构域也使得PMCV ORF1蛋白进行膜染色,而使用来自大西洋鲑鱼副粘病毒的融合蛋白的区没有成功。

[0143] 在接下来的实验中,对大西洋鲑鱼(大西洋鲑)进行了体内测试。测试了抗原的两种变体,全长衣壳蛋白(G-ORF1)和表达衣壳蛋白的前半部分(SEQ ID NO:16的PMCV ORF1位置1-1293)的截短的衣壳蛋白(G-ORF1-δD)。这两种抗原都在标准表达载体(pcDNA3.1)和作为基于鲑科鱼甲病毒3(SAV-3)的甲病毒复制子疫苗中表达。PBS和pcDNA-eGFP包含作为阴性疫苗对照组。

[0144] 对于本研究中的所有疫苗,将抗原编码基因插入真核表达载体pcDNA3.1(+)(英杰公司)中的CMV启动子的下游。将所有质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉注射,并且总剂量为20μg。包含两个未免疫的对照组,一组接受20μg的对照疫苗(pcDNA3.1中的eGFP),并且一组接受2×50μl PBS。

[0145] 表2.

[0146]

疫苗组	描述	详细描述编码抗原的质粒	质粒主链	最终浓度构建体（μg/ml）	剂量μg（2×0.05ml）
1	G-ORF1-δD	G-PMCV_ORF1_1-1293（δD）	pcDNA3.1(+)	200	20
2	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	pcDNA3.1(+)	200	20
3	repSAV-G-ORF1-δD	SAV复制子中的G-PMCV_ORF1_1-1293（δD）	pcDNA3.1(+)	200	20
4	repSAV-G-ORF1	SAV复制子中的G-PMCV_ORF1_全_1-2583_	pcDNA3.1(+)	200	20
5	eGFP	增强型绿色荧光蛋白（对照）	pcDNA3.1(+)	200	20
6	PBS				NA

[0147] 这些鱼类(每组n＝45)保持在淡水中,并且平均重量为48克。在疫苗接种之前,使用三卡因(Tricain)(PHARMAQ)对鱼类进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质脾脏(分离物ID AL V1223脾脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展49天。然后在三个时间点;激发后10天、20天和50天对鱼类进行采样(每组,每采样点n＝15)。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第50天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威卑尔根(Bergen,Norway))的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威卑尔根的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0148] 与对照组相比,表达按路线递送到细胞表面的PMCV的全长ORF1的疫苗证实了显著的抵抗激发保护(单向ANOVA与心房组织学的邓尼特后检验(Dunnett's post test),$p<0.0001$)。这示出为在感染之后的早期肾脏和心脏的Ct值增加(结果未示出),以及在感染之后50天的组织病理学评分降低(表3)。抗原基于衣壳蛋白的前半部分(G-ORF1-δD;PMCV ORF1位置1-1293)不能提供保护,并且与标准表达载体相比,使用鲑鱼甲病毒复制子没有提供另外的保护增加。

[0149] 表3PMCV激发后50天的心房组织病理学评分。

[0150]

疫苗组	描述	平均组织病理学评分，心房	标准偏差，组织病理学评分	N	p值（与PBS相比）
6	PBS	2,29	0,78	15	NA
5	eGFP	2,21	0,67	15	0,99
4	repSAV-G-ORF1	1,49	0,88	15	0,028
3	repSAV-G-ORF1-δ D	2,31	0,69	15	0,99
2	G-ORF1	1,11	0,83	15	0,0005
1	G-ORF1-δ D	2,35	0,83	15	0,99

[0151] PMCV激发后50天的心房组织病理学评分。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0152] 靶向细胞表面的全长抗原的DNA疫苗候选物使组织病理学评分降低大约50％，并伴随有肾脏和心脏中的病毒载量(qPCR)的降低。

[0153] 后续体内试验比较了将PMCV ORF1全长蛋白表达为细胞表面表达的抗原、分泌抗原或细胞内表达的抗原的DNA疫苗的功效。另外，还包含由SEQ ID NO:45编码的全长衣壳蛋白的经密码子优化的版本。研究含有两个平行的免疫罐，每个免疫罐具有五组大西洋鲑鱼(每组，每罐n＝30)。

[0154] 对于本研究中的所有疫苗，将抗原编码基因插入真核表达载体NTC9385R(自然技术公司)中的CMV启动子的下游。将所有质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉注射，并且总剂量为20μg。包含未免疫的对照组，并接受2×50μl PBS，如表4中所汇总的。

[0155] 表4.

[0156]

疫苗组	描述	描述编码抗原的质粒	质粒主链	在以下处表达的抗原	最终浓度构建体（μg/ml）	剂量μg（2×0.05ml）
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	细胞表面	200	20
2	ORF1	PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	细胞内	200	20
3	G-ORF1密码子优化的	G-PMCV_ORF1_全_1-2583-密码子优化的	NTC9385R	细胞表面	200	20

[0157]

4	不具有TM的G-ORF1	不具有TM结构域的G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	分泌	200	20
5	PBS		NA	NA		

[0158] 通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0159] 这些鱼类保持在淡水中，并且在疫苗接种时平均重量为26克。在施用测试疫苗期间，使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行麻醉，通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记，将其分配到一个组中，并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID AL V1273心脏)用传染性PMCV进行激发之前，使

免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展39天。然后在激发后21天和56天对鱼类(每组,每时间点n＝15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第56天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0160] 结果示出,用表达按路线递送到细胞表面的PMCV的全长ORF1(G-ORF1和G-ORF1密码子优化的)的疫苗实现显著的抵抗PMCV病毒感染的保护。PMCV ORF1以其天然形式(细胞内蛋白)的表达不提供可检测的保护。通过分泌表达提供了一些保护(第20天在肾脏中未检测到差异;参见表5、6)。

[0161] 表5.罐1.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0162]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
5	PBS	20,95	0,96	16	NA
1	G-ORF1	23,02	2,17	15	0,0042
3	G-ORF1 密码子优化的	23,09	1,67	15	0,0031
4	不具有 TM 的 G-ORF1	20,74	2,02	15	0,99
2	ORF1	19,92	1,41	15	0,30

[0163] 表6.罐2.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0164]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
5	PBS	20,05	0,73	15	NA
1	G-ORF1	22,12	1,95	15	0,0005
3	G-ORF1 密码子优化的	23,06	1,93	15	< 0,0001
4	不具有 TM 的 G-ORF1	20,06	1,16	15	> 0,99
2	ORF1	19,90	0,67	15	> 0,99

[0165] 实例2:CMS抗原的制备和其抗原活性的确定

[0166] 在细胞膜上表达PMCV ORF1全长蛋白在激发模型中提供了部分保护。尽管有这一发现,但在体外观察到抗原的表达水平明显低于对照GFP构建体的表达水平。项目已经研究了通过缺失区来表达衣壳蛋白的截短的版本是否可以提高疫苗抗原的表达水平和免疫原性。

[0167] 用基于PMCV ORF-1抗原的不同构建体制备实例1中所描述的表达系统(使用VHSV-G信号肽和跨膜结构域序列)。

[0168] 从VHSV-G表达盒表达膜结合PMCV衣壳抗原的首次研究示出,包含PMCV ORF1蛋白

序列的第一部分是成功的关键。当衣壳蛋白被分成三份时,对于包括三分之一的构建体,仅成功地实现膜结合蛋白(数据未示出)。

[0169] 在构建PMCV ORF1衣壳缺失变体之后,通过经转染的细胞的IF染色和蛋白质印迹对其进行测试。对于所有缺失构建体,缺失的PMCV ORF1序列被GGGGS接头(SEQ ID NO:36)替代。产生各种缺失变体的策略如下:

[0170] (1)在第一轮中,测试了相对大的缺失(IntDel 1-7;长度为200个氨基酸,重叠100个氨基酸,除了长度为162个氨基酸的IntDel7之外)。由于发现包含一些N末端序列是成功将表达的蛋白质按路线递送到细胞膜所必需的,因此在PMCV ORF1(SEQ ID NO:16)内的核苷酸位置298-897处进行了第一缺失(IntDel 1)。

[0171] (2)在第二轮中,针对IntDel 4-7覆盖的区(IntDel 11-18,邻近的,长度为非重叠的50个氨基酸,从IntDel 4内开始)产生了较小的缺失变体。这些缺失(IntDel 11)中的第一缺失在PMCV ORF1(SEQ ID NO:16)内的核苷酸位置1384-1533处构建。

[0172] (3)在第三轮中,产生了具有非常小的邻近的重叠的缺失的抗原变体(IntDel 21-42;长度为10个氨基酸,重叠2个氨基酸)。这些缺失(IntDel 21)中的第一缺失在PMCV ORF1(SEQ ID NO:16)内的核苷酸位置1936-1965处构建。

[0173] 通过IF染色和蛋白质印迹在CHH-1细胞中表达PMCV ORF1衣壳缺失变体。细胞的免疫荧光染色的程序如下:将CHH-1细胞胰蛋白酶化并接种到12孔板中(每孔150000个细胞和1ml细胞培养基)。将细胞在15℃ON下在CO2温育箱(5% CO_2)中温育。在接种后第二天,根据制造商的说明,使用1μg质粒/孔和LIPOFECTAMIN®3000(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))转染细胞。在对细胞进行免疫染色之前,将细胞在15℃下在CO2温育箱(5% CO_2)中温育5天。将细胞培养基小心地从所有孔中去除,并将所有孔用PBS小心地洗涤。通过在室温下用3.7%甲醛(在PBS中稀释)温育15分钟来固定细胞。然后将细胞用PBS中的5%脱脂奶粉封闭1小时。小鼠抗HIS(6x-His标签单克隆抗体(4A12E4)飞世尔科技公司(Fisher scientific);稀释度为1:1500的目录编号37-2900)和小鼠抗PMCV ORF1单克隆抗体(mAb编号10;1:200稀释度)用作初级抗体,并在室温下温育1小时。FITC缀合的多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白(DAKO F0261)以1:1000稀释度用作次级抗体,并再温育1小时。通过荧光显微镜评估细胞的染色。

[0174] 通过蛋白质印迹评估PMCV ORF1缺失构建体的表达水平如下进行:将CHH-1细胞胰蛋白酶化并接种到6孔板中(每孔1 000 000个细胞和3ml细胞培养基)。将细胞在15℃ON下在CO_2温育箱(5% CO_2)中温育。在接种后第二天,根据制造商的说明,使用2.5μg质粒/孔和LIPOFECTAMIN®3000(赛默飞世尔科技公司)转染细胞。在进一步分析之前,将细胞放回密封袋中,并在15℃下在CO2温育箱(5% CO_2)中温育六天。然后将板放置在冰上并且去除培养基。首先将细胞用冰冷的PBS洗涤两次。为了制备膜裂解物,首先添加200μl的含蛋白酶抑制剂的20mM Tris-HCl,pH 7.5采集细胞,将细胞小心地刮去并将细胞悬浮液转移到预冷管中。然后每次转染将孔用另外100μl至总共300μl的细胞悬浮液冲洗。由于这是不含洗涤剂的缓冲液,将细胞通过使细胞穿过注射器尖端(25G,约5次)来裂解,并在4℃下以12 000rpm离心10分钟。将上清液丢弃,并且将膜沉淀溶解于含有1x蛋白酶抑制剂混合物的300μl RIPA裂解缓冲液(艾博抗公司(Abcam),编号156034)中,以释放膜结合蛋白。将样品在4℃下温育30分钟,同时偶尔通过轻弹管重新悬浮沉淀。将管在4℃下以12 000rpm离心10分

钟,并将膜级分裂解物转移到新鲜管中并保持在冰上直到免疫沉淀为止。在冰上,向每个样品中添加1μg的小鼠IgG 1抗6x-His单克隆抗体4E3D10H2/E3(飞世尔科技公司编号15442890,1mg/ml)并在旋转器上温育4℃过夜。通过将固定化珠粒用约1ml冷PBST洗涤3-5次来制备蛋白G偶联珠粒(25μl/样品),并按等分试样用蛋白酶抑制剂重新悬浮于25μl的PBST中。在冰上,向每个样品中添加25μl的预平衡的珠粒,并在室温下在旋转的情况下将样品-珠粒混合物温育1小时。将珠粒用含有蛋白酶抑制剂的500μl的冰冷PBST洗涤3-5次,以去除非特异性结合,每次洗涤之间轻轻混合珠粒。在最后一次洗涤之后,从珠粒中去除尽可能多的缓冲液,并添加40μl的1x莱姆利样品缓冲液(伯乐公司(BioRad)编号161-0737)(通过将20μl的2x莱姆利样品缓冲液与2μlβ-巯基乙醇和18μl dH2O混合来制备)。将样品在70℃下温育10分钟,快速离心和磁化,并将洗脱液移动到新的小瓶中。在装载到4-20%Criterion™TGX Stain-Free™凝胶上之前,将所有样品在98℃下变性5分钟。将凝胶在200V下运行大约45分钟,并使用TRANS-BLOT®TURBO™转移系统(伯乐公司)和TRANS-BLOT®TURBO™Midi PVDF转移包编号170-4157进行印迹。使用了7分钟turbo程序。将膜立即放入封闭缓冲液(PBST中的5%脱脂牛奶)中。在室温下进行封闭1小时。将印迹与在1%脱脂牛奶/PBST中以1:500稀释的初级抗体兔抗δPMCV ORF1在4℃下在旋转器中温育过夜。第二天,将印迹用PBST洗涤2x 15分钟,并与在2%脱脂牛奶中以1:1000稀释的次级抗体多克隆猪抗兔(DAKO编号P0217)免疫球蛋白HRP和PRECISION PROTEIN™StrepTactin-HRP缀合物1:10000(以可视化阶梯)在室温下温育1小时。在通过Clarity western ECL底物(伯乐公司编号170-5060)检测信号之前,将印迹用PBST洗涤2x 15分钟。

[0175] 规则可以汇总如下:在第一轮(长度为200个氨基酸的缺失)之后,仅用来自构建体IntDel 4-7的抗原实现细胞膜处的表达。因此,N末端部分是将抗原按路线递送到细胞膜所必需的。因此,在第二轮中产生的构建体(长度为50个氨基酸的缺失)集中在IntDel 4-7覆盖的区。所有这些构建体成功地在细胞膜处表达抗原,除了IntDel 18的细胞表面表达较低之外(构建体缺乏SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列)。缺失构建体(IntDel 15-17)使得膜表达水平增加。还发现来自第一轮的IntDel 6(缺乏SEQ ID NO:1的氨基酸500-699的构建体)具有更高的表达水平。除了IntDel 42(缺乏SEQ ID NO:14中所示的氨基酸的构建体)比其它构建体略好之外,在第三轮中没有发现其它候选物。图4中展示了结果。

[0176] 基于来自免疫荧光染色和蛋白质印迹的评估的组合结果,基于来自项目中的若干项疫苗试验的结果来选择若干个缺失候选物。对于首次研究中的所有疫苗,将抗原编码基因插入真核表达载体NTC9385R(自然技术公司)中的CMV启动子的下游。将所有质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉注射,并且总剂量为20μg。包含未免疫的对照组,并接受2×50μl PBS,如表7中所汇总的。

[0177] 表7

[0178]

疫苗组	描述	描述编码抗原的质粒（位置涉及核苷酸位置 PMCV ORF1）	质粒主链	最终浓度构建体（μg/ml）	剂量 μg（2 × 0.05 ml）
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	200	20
2	G-IntDel-6	G-PMCV ORF1_IntDel6（位置 1798-2397）	NTC9385R	200	20
3	G-IntDel-15	G-PMCV ORF1_IntDel15（位置 1984-2133）	NTC9385R	200	20
4	G-IntDel-16	G-PMCV ORF1_IntDel16（位置 2134-2283）	NTC9385R	200	20
5	G-IntDel-17	G-PMCV ORF1_IntDel17（位置 2284-2433）	NTC9385R	200	20
6	PBS		NA		

[0179] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为20克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n＝30)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID AL V1273心脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展48天。然后在两个时间点;激发后19天和49天对鱼类(每组,每采样点n＝15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第49天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0180] 激发后3周的病毒载量和激发后7周的组织病理学评分的结果分别在表8和9中示出。所有结果的组合数据示出,IntDel变体15、16和17(其中抗原分别缺乏SEQ ID NO:3、4或5中所示的氨基酸序列)的表现优于全长衣壳蛋白(G-ORF1)。

[0181] 表8.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0182]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	20,61	1,49	15	NA
1	G-ORF1	23,77	2,57	15	0,0002
2	G-IntDel-6	21,23	1,41	15	0,86
3	G-IntDel-15	23,13	2,81	15	0,0033
4	G-IntDel-16	22,92	1,20	15	0,0082
5	G-IntDel-17	23,13	1,71	15	0,0032

[0183] 表9.激发后7周的心房的组织病理学病变(组织病理学评分)。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0184]

疫苗组	描述	平均组织病理学评分，心房	标准偏差，组织病理学评分	N	p值（与PBS相比）
6	PBS	1,75	0,84	15	NA
1	G-ORF1	1,60	0,83	15	0,99
2	G-IntDel-6	1,54	0,99	15	0,95
3	G-IntDel-15	0,75	0,75	15	0,012
4	G-IntDel-16	1,10	0,63	15	0,16
5	G-IntDel-17	1,32	0,87	15	0,53

[0185] 进行了另外的临床试验来评估三种新的抗原缺失候选物。对于首次研究中的所有疫苗,将抗原编码基因插入真核表达载体NTC9385R(自然技术公司)中的CMV启动子的下游。将所有质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉注射,并且总剂量为20μg。包含未免疫的对照组,并接受2×50μl PBS,如表10中所汇总的。

[0186] 表10

[0187]

疫苗组	描述	描述编码抗原的质粒（位置涉及核苷酸位置PMCV ORF1）	质粒主链	最终浓度构建体（μg/ml）	剂量μg（2×0.05ml）
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	200	20
2	G-IntDel-5	G-PMCV ORF1_IntDel5（位置1498-2097）	NTC9385R	200	20
3	G-IntDel-7	G-PMCV ORF1_IntDel7（位置2098-2583）	NTC9385R	200	20
4	G-IntDel-42	G-PMCV ORF1_IntDel42（位置2440-2469）	NTC9385R	200	20
5	PBS		NA		

[0188] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在一罐淡水中并且平均重量为28克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n＝30)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID AL V1289)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展58天。然后在两个时间点;激发后3周和7周对鱼类(每组n＝15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第7周)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至4对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且4指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0189] 第3周和第7周的结果分别汇总在表11和12中。

[0190] 表11.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0191]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	N	p 值（与 PBS 相比）
5	PBS	19,44	1,13	15	NA
1	G-ORF1	20,48	1,91	15	0,38
2	G-Del5	22,58	2,69	15	< 0,0001
3	G-Del7	21,12	1,99	15	0,06
4	G-Del42	21,12	1,40	15	0,06

[0192] 表12.激发后7周的心房的组织病理学病变(组织病理学评分)。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0193]

疫苗组	描述	平均组织病理学评分，心房	标准偏差，组织病理学评分	N	p 值（与 PBS 相比）
5	PBS	2,14	0,36	14	NA
1	G-ORF1	2,07	0,70	15	0,99
2	G-Del5	1,64	1,15	14	0,28
3	G-Del7	1,80	0,56	15	0,59
4	G-Del42	1,20	0,94	15	0,0075

[0194] 实例3:疫苗主链选择

[0195] 为了优化疫苗功效,如载体大小等质粒主链的性质和功能元件也很重要。在体外抗原表达方面比较了三种载体候选物。候选物包含pcDNA3.1、pVAX1(INVITROGEN™)、NTC9385R(自然技术公司)和NTC9385R的两种共表达先天免疫刺激元件的变体:用作I型干扰素诱导佐剂的RIG-I激动剂(NTC9385R-eRNA41H)和RIG-I激动剂以及Toll样受体9刺激CpG基序(NTC9385R-eRNA41H-CpG)。NTC9385R NANOPLASMID™的大小比其它传统载体小,允许在经转染的细胞中提高摄取和持久性,并含有据称增强抗原表达的经修饰的启动子。其含有取代了生产过程中抗生素的使用的基于RNA的蔗糖选择无抗生素标志物(RNA-OUT),并含有确保质粒只能在特定的大肠杆菌生产菌株中复制的经修饰的复制来源,这从安全角度来看是有益的。较小的大小可能会影响转染效率和表达水平及持续时间。另外地,一些细菌区蛋白标志物基因,像抗性标志物基因已经示出显著地减少载体表达。已经示出大于1千碱基的细菌区使如肝脏等静止组织中的转基因表达沉默,这可能是由于非转录细菌区介导的异染色质形成扩散到真核区并使启动子失活(Suschak等人,2017)。

[0196] 通过蛋白质印迹评估疫苗抗原G-ORF1在五种不同质粒主链中的体外表达水平如下进行:将CHH-1细胞胰蛋白酶化并接种到6孔板中(每孔1 000 000个细胞和3ml细胞培养基)。将细胞在15℃ON下在CO_2温育箱(5% CO_2)中温育。在接种后第二天,根据制造商的说明,使用2.5μg质粒/孔和LIPOFECTAMIN®3000(赛默飞世尔科技公司)转染细胞。在进一步分析之前,将细胞放回密封袋中,并在15℃下在CO_2温育箱(5%CO_2)中温育五天。然后将板放置在冰上并且去除培养基。首先将细胞用冰冷的PBS洗涤两次。通过向孔中直接添加含有1x蛋白酶抑制剂混合物(罗氏公司(Roche),编号1697498)的150μl NP40裂解缓冲液(英杰公司,编号FNN021)来制备总细胞裂解物。将裂解物转移到预冷的艾本德(Eppendorf)管中,在4℃下温育30分钟,同时通过偶尔轻弹所述管使细胞重新悬浮,在4℃下以12 000rpm离心10分钟,并且将上清液转移到新鲜管中并保持在冰上直到免疫沉淀为止。在冰上,向每个样品中添加1μg的小鼠IgG1抗6x-His单克隆抗体4E3D10H2/E3(飞世尔科技公司编号

15442890,1mg/ml)并在旋转器上温育4℃过夜。通过将固定化珠粒用约1ml冷PBST洗涤3-5次来制备蛋白G偶联珠粒(25μl/样品),并按等分试样用蛋白酶抑制剂重新悬浮于25μl的PBST中。在冰上,向每个样品中添加25μl的预平衡的珠粒,并在室温下在旋转的情况下将样品-珠粒混合物温育1小时。将珠粒用含有蛋白酶抑制剂的500μl的冰冷PBST洗涤3-5次,以去除非特异性结合,每次洗涤之间轻轻混合珠粒。在最后一次洗涤之后,从珠粒中去除尽可能多的缓冲液,并添加40μl的1x莱姆利样品缓冲液(伯乐公司编号161-0737)(通过将20μl的2x莱姆利样品缓冲液与2μlβ-巯基乙醇和18μl dH2O混合来制备)。将样品在70℃下温育10分钟,快速离心和磁化,并将洗脱液移动到新的小瓶中。在装载到4-20% CRITERION™TGX STAIN-FREE™凝胶上之前,将所有样品在98℃下变性5分钟。将凝胶在200V下运行大约45分钟,并使用TRANS-BLOT®TURBO™转移系统(伯乐公司)和TRANS-BLOT®TURBO™Midi PVDF转移包编号170-4157进行印迹。使用了7分钟turbo程序。将膜立即放入封闭缓冲液(PBST中的5%脱脂牛奶)中。在室温下进行封闭1小时。将印迹与在1%脱脂牛奶/PBST中以1:500稀释的初级抗体兔抗δPMCV ORF1在4℃下在旋转器中温育过夜。第二天,将印迹用PBST洗涤2x 15分钟,并与在2%脱脂牛奶中以1:1000稀释的次级抗体多克隆猪抗兔(DAKO编号P0217)免疫球蛋白HRP和PRECISION PROTEIN™StrepTactin-HRP缀合物1:10000(以可视化阶梯)在室温下温育1小时。在通过Clarity western ECL底物(伯乐公司编号170-5060)检测信号之前,将印迹用PBST洗涤2x 15分钟。

[0197] 对于本研究中的所有疫苗,根据下表,将按路线递送用于在细胞膜处表达的全长PMCV ORF1衣壳基因(G-ORF1)插入不同真核表达载体中的CMV启动子的下游。将所有质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉注射,并且总剂量为20μg。包含未免疫的对照组,并接受2×50μl PBS,如表13中所汇总的。

[0198] 表13

[0199]

疫苗组	描述	描述编码抗原的质粒	质粒主链	最终浓度构建体(μg/ml)	剂量μg(2×0.05ml)
1	G-ORF1-pcDNA3.1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	pcDNA3.1(+)	200	20
2	G-ORF1-pVAX1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	pVAX1	200	20
3	G-ORF1-NTC9385R	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	200	20
4	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H-CpG	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R-eRNA41H-CpG	200	20
5	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R-eRNA41H	200	20
6	PBS		NA		

[0200] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为29克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n=30)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪

威现场爆发的均质心脏(分离物ID AL V1273心脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展59天。然后在两个时间点;激发后20天和48天对鱼类(每组n＝15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第48天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0201] 经转染的CHH-1细胞的蛋白质印迹分析证实,与pcDNA3.1和pVAX1质粒主链相比,所有三种NTC9385R质粒变体介导了更优越的抗原表达(图5)。临床试验示出,基于NTC9385R的疫苗至少与基于pcDNA3.1/pVAX1的疫苗具有同样良好的保护(对于三周和七周,分别参见表14和表15)。组合数据集示出了基于NTC9385R的疫苗主链的优越的保护的趋势。具有免疫刺激元件的NTC9385R质粒没有提供另外的效果。

[0202] 表14.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0203]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	21,73	1,25	15	NA
1	G-ORF1-pcDNA3.1	22,66	1,20	15	0,24
2	G-ORF1-pVAX1	22,57	1,51	15	0,35
3	G-ORF1-NTC9385R	23,78	1,71	15	0,0008
4	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H-CpG	23,52	1,42	15	0,0034
5	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H	23,03	1,28	15	0,053

[0204] 表15.激发后7周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0205]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	22,45	1,53	15	NA
1	G-ORF1-pcDNA3.1	23,75	1,73	15	0,26
2	G-ORF1-pVAX1	23,77	2,01	15	0,23
3	G-ORF1-NTC9385R	23,94	2,42	15	0,14
4	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H-CpG	25,63	1,77	15	0,0001
5	G-ORF1-NTC9385R-eRNA41H	24,44	2,02	15	0,031

[0206] 实例4:佐剂选择

[0207] 分子佐剂在增加免疫原性和延长免疫应答的寿命方面示出巨大的前景,并且这些表达细胞因子、趋化因子或共刺激分子的分子佐剂可以与编码抗原的DNA疫苗质粒共同施用。分子佐剂质粒转染的细胞将佐剂分泌到周围区,刺激局部抗原呈递细胞(Suschak等人,2017)。鱼类I型干扰素的佐剂活性已经在大西洋鲑鱼的传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)的病毒

DNA疫苗接种模型中示出(Chang等人,2015)。在该论文中,证实了I型IFN增强了针对ISAV-血凝素蛋白的抗体应答,并提供了抵抗病毒激发的增强保护。

[0208] 以下分子佐剂:IFNa、IFNb、IFNc、IFNd、IFNγ、IL-2、IL-4、IL-12和VHSV-G与全长PMCV ORF1疫苗抗原(G-ORF1)一起在体内进行了佐剂活性测试,使用高通量模型对候选物进行快速功效筛选。

[0209] 该模型基于令人惊讶的发现,即即激发后50天的组织病理学病变的差异可以通过激发后20天的同一组中的心脏和肾脏中的病毒RNA水平来预测。因此,对于许多组的快速筛选,仅需要使用激发后3周的一个采样点。

[0210] 对于佐剂的体内筛选研究中的所有组,疫苗抗原和质粒编码的佐剂在单独的质粒上施用。编码抗原的基因(G-ORF1)和各种质粒编码的佐剂基因都插入真核表达载体pcDNA3.1(+)(罗氏公司)中的CMV启动子的下游。根据下表,将质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉内注射和20μg质粒的总剂量(如果给予抗原加佐剂,则每种质粒20μg)。包含两个未免疫的对照组,一组接受20μg的对照疫苗(pcDNA3.1中的eGFP),并且一组接受2×50μl PBS,如表16中所汇总的。

[0211] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为31克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n=15)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID ALV1223心脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展50天。然后在激发后和21天对鱼类(每组n=15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。

[0212] 在7周的免疫和3周的激发之后,模型发现尽管大多数佐剂策略未能提高功效,但一种佐剂——IFNb显著地提高了效果水平。结果在表17中列出。

[0213] 表16

[0214]

组	描述（抗原）	详细描述构建体A（抗原）	描述（佐剂）	详细描述构建体B（佐剂）	最终浓度构建体A（μg/ml）	最终浓度构建体B（μg/ml）	剂量μg（2×0.05ml）
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	无		200		20
2	eGFP	增强型绿色荧光蛋白（对照）	无		200		20
3	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNa1	IFNa1佐剂构建体	200	200	各自20
4	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNb	IFNb佐剂构建体	200	200	各自20
5	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNc	IFNc佐剂构建体	200	200	各自20
6	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNd	IFNd佐剂构建体	200	200	各自20
7	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	白介素2	IL-2佐剂构建体	200	200	各自20
8	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	白介素4	IL-4佐剂构建体	200	200	各自20
9	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	白介素12	IL-12佐剂构建体	200	200	各自20
10	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNg	IFNγ佐剂构建体	200	200	各自20
11	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	VHSV-G	VHSV-g蛋白DNA疫苗	200	200	各自20

[0215]

12	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	rORF1（PMCV）	重组蛋白PMCV ORF1（大肠杆菌）*	200	NA	20
13	PBS	PBS对照					

[0216] 表17.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与G-ORF1对照组(无佐剂)进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0217]

疫苗组	抗原构建体	佐剂	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与单独的 G-ORF1——第 1 组相比）
13	PBS	无	19,49	0,96	14	0,0002
1	G-ORF1	无	23,12	2,60	31	NA
2	eGFP	无	22,04	1,51	16	0,73
3	G-ORF1	IFNa1	23,17	3,29	15	0,99
4	G-ORF1	IFNb	26,06	3,05	15	0,0033
5	G-ORF1	IFNc	23,53	3,27	14	0,99
6	G-ORF1	IFNd	21,82	2,50	16	0,52
10	G-ORF1	IFNg	21,09	1,69	14	0,11
7	G-ORF1	白介素 2	20,70	3,20	13	0,04
8	G-ORF1	白介素 4	21,72	2,01	15	0,45
9	G-ORF1	白介素 12	23,03	3,24	16	0,99
11	G-ORF1	VHSV-G	20,25	2,52	15	0,004
12	G-ORF1	rORF1（PMCV）	19,42	0,74	10	0,001

[0218] IFNb和IFNc选择用于后续的鱼类试验。对于该试验中的所有组，疫苗抗原和质粒编码的佐剂在单独的质粒上施用。编码抗原的基因(G-ORF1)和质粒编码的佐剂基因(IFNb或IFNc)都插入真核表达载体pcDNA3.1(+)(罗氏公司)中的CMV启动子的下游。根据下表，将质粒在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉内注射和20μg质粒的总剂量(如果给予抗原加佐剂，则每种质粒20μg)。包含未免疫的对照组，并接受2×50μl PBS，如表18中所汇总的。

[0219] 表18

[0220]

组	描述（抗原）	描述（佐剂）	详细描述构建体 A（抗原）	详细描述构建体 B（佐剂）	最终浓度构建体 A（μg/ml）	最终浓度构建体 B（μg/ml）	剂量 μg（2×0.05 ml）

[0221]

1	G-ORF1	无	G-PMCV_ORF1_全_1-2583		200		20
2	G-ORF1	IFNb	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNb 佐剂构建体	200	200	各自 20
3	无	IFNb		IFNb 佐剂构建体		200	20
4	G-ORF1	IFNc	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	IFNc 佐剂构建体	200	200	各自 20
5	无	IFNc		IFNc 佐剂构建体		200	20
6	PBS		PBS 对照				

[0222] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为29克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n＝30)进行麻醉，通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记，将其分配到一个组

中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID ALV1273心脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展59天。然后在两个时间点;激发后20天和48天对鱼类(每组n=15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第48天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0223] 结果示出IFNb优于IFNc(表19)。两种佐剂之间的差异在激发后7周的采样点最为显著(来自较早时间点的数据未示出)。仅接受佐剂的组也受到部分保护,这反映了IFN是先天和适应性免疫应答两者的关键效应子。

[0224] 表19.激发后7周的心脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA=不适用。

[0225]

疫苗组	抗原	佐剂	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	PBS	23,17	2,40	15	NA

[0226]

1	G-ORF1	PBS	25,64	2,61	15	0,40
2	G-ORF1	IFNb	30,77	5,61	15	0,0001
3	无	IFNb	30,38	4,40	15	0,0002
4	G-ORF1	IFNc	25,16	4,79	15	0,64
5	无	IFNc	22,48	2,15	15	0,99

[0227] 实例5-佐剂递送

[0228] 该实验的目的是确定递送抗原和分子佐剂的最佳方式。

[0229] 质粒编码的佐剂可以在单独的质粒上递送,或者可以包含在与编码抗原的质粒相同的质粒上。如果从与抗原相同的质粒中表达,这可以例如通过以下方式实现:

[0230] 1.来自与疫苗抗原分离但相同的启动子。

[0231] 2.来自与疫苗抗原类似(但不相同)的单独的启动子。

[0232] 3.作为与抗原的融合蛋白——通过P2A肽序列分离,以促进自切割。

[0233] 在该实例中,测试了佐剂的不同递送选项。将细胞表面表达的PMCV ORF1抗原(G-ORF1)给予所有组。佐剂通过以下方式提供:

[0234] 1.在单独的质粒上(G-ORF1+IFNb)

[0235] 2.与抗原一起表达,位于同一CMV启动子的下游,并通过自切割2A肽(G-ORF1-P2A-IFNb)与抗原分离

[0236] 3.在与抗原相同的质粒上表达,但位于第二CMV启动子(G-ORF1-CMV-IFNb)的下游。

[0237] 4.一组不接受佐剂,只接受抗原(G-ORF1)。

[0238] 5.接受PBS的未接种对照组也包含在内。

[0239] 对于本研究中的所有疫苗,将基因插入真核表达载体pVAX1(英杰公司)中的CMV启动子的下游。使用的抗原是G-ORF1(G-PMCV_ORF1_全_1-2583)。将所有疫苗在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至每50μl注射体积10μg。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉注射,并且总剂量为20μg。对于在单独的质粒上接受抗原和质粒编码的佐剂的鱼类,每个质粒的剂量为20μg。包含未免疫的对照组,并接受2×50μl PBS。另外,一组接受质粒编码的佐剂的密码子改变的版本,如表20中所汇总的。

[0240] 表20.

[0241]

组	构建体 1	构建体 2	佐剂施用	剂量 μg (2 × 0.05 ml)
1	G-ORF1	改变的 IFNb 密码子	在单独的质粒上提供改变的 IFNb 佐剂密码子	各自 20

[0242]

2	G-ORF1	IFNb	在单独的质粒上提供的 IFNb 佐剂	各自 20
3	G-ORF1-P2A-IFNb		在与抗原相同的质粒上和在相同的启动子下提供的 IFNb	20
4	G-ORF1-CMV-IFNb		在同一质粒上提供但位于第二 CMV 启动子的下游的 IFNb	20
5	G-ORF1		无佐剂对照组	20
6	PBS			

[0243] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为25克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n=30)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID ALV1273心脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展49天。然后在两个时间点;激发后19天和47天对鱼类(每组n=15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第47天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0244] 来自临床试验的结果由激发后7周的来自心脏的组织病理学评分数据例示(表21)。

[0245] 表21.激发后7周的心房的组织病理学病变(组织病理学评分)。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA=不适用。

[0246]

疫苗组	描述	平均组织病理学评分，心房	标准偏差，组织病理学评分	N	p值（与PBS相比）
6	PBS	2,46	0,54	15	NA
5	G-ORF1	1,73	1,00	15	0,20
2	G-ORF1+IFNb	1,00	0,90	15	0,0014
4	G-ORF1-CMV-IFNb	1,13	1,03	15	0,0035
3	G-ORF1-P2A-IFNb	1,73	1,22	15	0,20

[0247]

1	改变的G-ORF1-CMV-IFNb_密码子	1,04	0,96	15	0,003

[0248] 还在体外评估了不同构建体的抗原表达水平和佐剂活性(结果未示出)。组合结果表明,优选的方法是在与抗原相同的质粒上,在与抗原相同但分离的启动子下提供佐剂,但在不同的质粒上递送也是有效的。

[0249] 实例6-疫苗效率的持续时间

[0250] 最初的研究示出,仅接受佐剂的鱼类受到部分保护,这反映了IFN是先天和适应性免疫应答两者的关键效应子。为了研究通过在DNA构建体中包含分子佐剂获得的保护的持续时间,进行了长期随访疫苗试验。

[0251] 对于本研究中的所有疫苗,将基因插入来自自然技术公司(NTC)的真核表达载体中的CMV启动子的下游。主链是NTC9385R或NTC9385R-eRNA41H-CpG。对于接受抗原和质粒编码的佐剂两者的组,这些在单独的质粒上提供(每个质粒20μg),或者在同一质粒上提供(20μg)。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉内注射(0.05ml)。包含未免疫的对照组,并接受2×50μl PBS。关于疫苗组的详细信息,参见下表22。

[0252] 表22

[0253]

组	构建体1	主链构建体1	构建体2	主链构建体2	佐剂施用	剂量μg（2×0.05ml）
1	G-ORF1	NTC9385R	IFNb	NTC9385R	抗原+佐剂-在两个单独的质粒上	各自20
2	G-ORF1	NTC9385R			仅抗原	20
3	IFNb	NTC9385R			仅佐剂	20
4	G-ORF1-CMV-IFNb	NTC9385R			在同一质粒上的抗原+佐剂	20
5	G-ORF1-CMV-IFNb	NTC9385R-eRNA41H-CpG			在同一质粒上的抗原+佐剂	20
6	PBS					

[0254] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为17克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n＝60)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。然后将鱼保持在储器罐中,在所述储器罐中,使免疫力在12C(光照:黑暗12:12)下发展78天、120天或183天。在这些时间点中的每个时间点,将鱼类群组(在时间点78dpv和

183dpv,每组n＝15,并且在时间点120dpv,每组n＝30)移动到激发罐。使用三卡因(PHARMAQ)对其进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID ALV1273心脏)用传染性PMCV进行激发。然后在激发后和3周对鱼类(每组n＝15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。对于在疫苗接种后120天受到激发的群组,在激发后7周进行了另外的采样。除了用于RNALATER®的心脏和肾脏之外,心脏(心室和心房)也在该最后取样点(第7周)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0255] 在至多26周的免疫之后,通过激发来评估疫苗的功效(在免疫后12、18和26周进行激发)。在第18周的激发之后50天,在激发后20天和50天的两个采样点对心脏和肾脏组织进行采样,用于通过qPCR进行分析和如上文所描述评估心脏的组织病理学。

[0256] 结果示出,所有疫苗实现抵抗PMCV感染的显著保护,直到最后一次激发为止,即疫苗接种后183天/2196度天。G-ORF1和IFNb的组合比单独的两种组分提供了更好的保护(表23、24)。总体结果示出,疫苗提供了长期且持久的保护。

[0257] 表23.罐1.激发后3周的心脏中的病毒RNA在激发之前具有三个不同的免疫持续时间。指示了每组的PMCV的平均Ct值和标准偏差。每组,每采样点n＝15。

[0258]

疫苗组	描述	12周免疫	18周免疫	26周免疫
6	PBS	27,42±2,07	29,33±1,62	29,33±1,74
2	G-ORF1	28,70±2,19	30,50±2,38	29,62±3,59
3	IFNb	33,82±3,48	32,65±3,68	28,35±6,22
1	G-ORF1+IFNb	35,88±3,25	33,25±3,36	32,21±1,95

[0259] 表24.罐2.激发后3周的心脏中的病毒RNA在激发之前具有三个不同的免疫持续时间。指示了每组的PMCV的平均Ct值和标准偏差。每组,每采样点N＝15。

[0260]

疫苗组	描述	12周免疫	18周免疫	26周免疫
6	PBS	27,68±2,32	27,58±2,04	28,80±1,90
4	G-ORF1-CMV-IFNb	36,73±4,69	33,75±2,80	32,93±3,31
5	G-ORF1-CMV-IFNb	33,58±3,10	30,70±2,14	32,63±4,13

[0261] 表25.罐1.在18周的免疫时间段之后,激发后7周的心房的组织病理学病变(组织病理学评分)。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0262]

疫苗组	描述	平均组织病理学评分，心房	标准偏差，组织病理学评分	N	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	1,54	1,08	12	NA
2	G-ORF1	0,60	0,74	15	0,01
3	IFNb	0,43	0,78	15	0,0025
1	G-ORF1+IFNb	0,43	0,65	14	0,0028

[0263] 表26.罐2.在18周的免疫时间段之后,激发后7周的心房的组织病理学病变(组织病理学评分)。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0264]

疫苗组	描述	平均组织病理学评分，心房	标准偏差，组织病理学评分	N	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	1,68	0,75	11	NA
4	G-ORF1-CMV-IFNb	0,07	0,18	15	< 0,0001
5	G-ORF1-CMV-IFNb	0,50	0,76	8	0,0002

[0265] 实例7-佐剂效率的优化

[0266] 为了进一步优化IFNb的佐剂潜力,本发明的发明人在大西洋鲑鱼和密切相关的物种中鉴定了同源基因。由于鲑科鱼最近经历了进化的全基因组复制,许多鲑鱼基因被发现是重复的(分化的同源物)。选择了三个与最初测试的IFNb佐剂类似但不相同的新基因(表27)。这些是:

[0267] -大西洋鲑鱼(大西洋鲑)-IFNb1(分化的旁系同源基因)

[0268] -褐鳟(Brown trout)海鳟(Salmo trutta)-IFN a3样基因

[0269] -红大马哈鱼(红大麻哈鱼)-IFNa3样基因。

[0270] 表27

[0271]

基因	基因库登录编号		1	2	3	4
IFNb 大西洋鲑（SEQ ID NO: 6）		1		*6*	*5*	*11*
IFNb1 大西洋鲑	EU768890.1	2	96.74		*9*	*13*
IFNa3 样海鳟	XM_029727364.1	3	97.28	95.11		*11*
IFNa3 样红大麻哈鱼	XM_029635101.1	4	94.02	92.93	94.02	

[0272] 替代性IFNb佐剂的成对比较示出为氨基酸同一性(%)和不同氨基酸的数量(斜体)

[0273] 由于疫苗通过同源重组整合到鲑鱼基因组中可能是一个问题,因此可以通过降低佐剂与鲑鱼基因组之间的序列相似性来降低风险。这是通过首先将质粒编码的佐剂翻译成蛋白质序列来完成的。此后,基于密码子频率分布(根据在大西洋鲑鱼中使用频率给出的概率分配的密码子),将这些序列从蛋白质反向翻译回核苷酸序列(反向翻译)。使用CLC主工作台(凯杰公司(Qiagen))进行反向翻译,软件设置为基于频率分布使用密码子。

[0274] 在该程序之后返回的新佐剂序列在核苷酸水平上与野生型IFNb序列介于74-80％之间相同。然后使用体外测定比较四种原始天然佐剂候选物的活性,包含四种密码子改变的版本(被称为RT)。

[0275] 因此,IFNb的野生型核酸序列(SEQ ID NO:18)与IFNb的RT核酸序列(SEQ ID NO:17)约76％相同,并且IFNb1的野生型核酸序列(SEQ ID NO:19)与IFNb1的RT核酸序列(SEQ ID NO:20)约78％相同。

[0276] 为了促进测试不同的IFNb候选物并评估其佐剂潜力,建立了体外筛选测定。该测试的原理是通过RT-qPCR定量Mx-表达(IFN诱导的基因)。Mx蛋白属于大GTP酶超家族,对多种RNA病毒具有抗病毒活性。在体内,Mx基因的表达受到I型干扰素(IFN)的存在的严格调

节,并且在若干种病毒感染期间已经描述了其诱导。由于CHH-1细胞对IFNb刺激做出应答而不表达Mx(缺乏受体的潜在结果),并且可能不容易转染TO细胞,因此已经以以下列方式建立测定:

[0277] 通过用各种佐剂构建体转染CHH-1细胞来研究IFNb基因的功能/活性,其中非佐剂的构建体包含为阴性对照。在转染后七天,采集含有从CHH-1细胞转染子分泌的IFN分子的细胞培养基,并以不同的稀释度转移到另一种鱼类细胞系(TO细胞)中。用于温育TO细胞的条件培养基的最终比率通常为1:6;1:60,1:600和1:6000,允许体外模型也提供佐剂活性的定量测量。在与条件培养基一起温育三天之后,通过小心地去除细胞培养基并从细胞中提取RNA而对TO细胞进行采样。使用以下引物/探针通过qPCR分析由IFNb诱导的Mx应答:

[0278] SEQ ID NO:42Mx正向:GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA

[0279] SEQ ID NO:43Mx反向:CGGATCACCATGGGAATCTGA

[0280] SEQ ID NO:44Mx探针:6-FAM-CAGGATATCCAGTCAACGTT-MGB

[0281] 下表28中提供了结果:

[0282] 表28

[0283]

构建体	CHH-1 条件培养基转移到 TO 细胞的比率		
	1:6	1:60	1:600

[0284]

大西洋鲑 IFNb 野生型（SEQ ID NO: 18）	21.61	24.29	34.44
大西洋鲑 IFNb RT（SEQ ID NO: 17）	20,86	22,33	26,39
大西洋鲑 IFNb1 野生型（SEQ ID NO: 19）	20,94	21.77	23.66
大西洋鲑 IFNb1 RT（SEQ ID NO: 20）	20,57	21.05	21.84
海鳟 IFNa3 样野生型	20,66	22.17	27.04
海鳟 IFNa3 样 RT	21,49	21.96	26.82
红大麻哈鱼 INFa3 野生型	20,99	24.04	31.26
红大麻哈鱼 INFa3 RT	21,28	22.87	28.13
eGFP	无 Ct	无 Ct	无 Ct
非模板对照	无 Ct		

[0285] 与来自经转染的CHH-1细胞的不同浓度的条件培养基一起温育的TO细胞中的Mx的实时Ct值。较低的Ct值指示较高水平的IFN诱导。

[0286] 这些结果证实,与野生型序列相比,RT构建体具有略高的免疫调节活性。结果还清楚地示出,IFNb1比IFNb具有更高的免疫调节活性。

[0287] 基于体外研究,选择四种RT INFb佐剂作为疫苗佐剂对鱼类进行测试(所有组接受PMCV衣壳抗原(G-ORF1)和两个单独的质粒上的佐剂)。另外,一组接受G-ORF1疫苗抗原加eGFP编码质粒作为阴性佐剂对照组。所有鱼类在鱼类的每一侧接受一次肌肉内注射。所有鱼在单独的质粒上接受抗原和质粒编码的佐剂,每个质粒的剂量为20μg。包含未免疫的对照组,并接受2×50μl PBS,如表29中所汇总的。

[0288] 表29

[0289]

组	描述（抗原）	详细描述抗原	抗原主链	描述（佐剂）	佐剂主链	最终浓度A μg/ml	最终浓度B（μg/ml）	剂量 μg（2×0.05 ml）
1	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	IFNb 大西洋鲑	pVAX1	200	200	各自 20
2	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	IFNb1_大西洋鲑	pVAX1	200	200	各自 20
3	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	IFNb_海鳟 IFNa3 样	pVAX1	200	200	各自 20
4	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	IFNb_红大麻哈鱼 INFa3 样	pVAX1	200	200	各自 20
5	G-ORF1	G-PMCV_ORF1_全_1-2583	NTC9385R	eGFP	pcDNA3.1(+)	200	200	各自 20
6	PBS	PBS 对照	NA					

[0290] 使用三卡因(PHARMAQ)对保持在淡水中并且平均重量为20克的大西洋鲑鱼(大西洋鲑)(每组n＝30)进行麻醉,通过缩短脂肪鳍和/或上颌骨进行标记,将其分配到一个组中,并在同一麻醉时间段内肌肉内注射两次(在鱼类的每一侧注射一次)0.05ml的测试疫苗。在使用三卡因(PHARMAQ)对鱼类进行再次麻醉并通过腹膜内注射0.1ml的源自CMS的挪威现场爆发的均质心脏(分离物ID ALV1273心脏)用传染性PMCV进行激发之前,使免疫力在12℃(光照:黑暗12:12)下发展48天。然后在两个时间点;激发后19天和49天对鱼类(每组n＝15)进行采样。在RNALATER®上从所有采样的鱼类中采集心脏心室和肾脏,用于后续RNA提取。心脏(心室和心房)也在最后取样点(第49天)固定在来自所有鱼类的福尔马林中用于组织病理学分析。从储存在RNALATER®上的所有样品中提取RNA,并使用来自PHARMAQ Analytiq(挪威)的可商购获得的服务通过实时RT-PCR分析PMCV RNA的存在。对储存在福尔马林上的心脏进行切片,并根据严重程度从0至3对组织病理学进行评分,其中0指示没有病理学发现,并且3指示存在严重病理学(由挪威的PHARMAQ Analytiq提供服务)。

[0291] 下表30和31中示出了结果。

[0292] 表30.罐1.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0293]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	19,89	0,79	15	NA
1	G-ORF1＋IFNb 大西洋鲑	25,42	1,51	15	＜0,0001
2	G-ORF1＋IFNb1 大西洋鲑	27,66	1,31	15	＜0,0001
3	G-ORF1＋IFNb a3 海鳟	27,13	1,09	15	＜0,0001
4	G-ORF1＋IFNb a3 红大麻哈鱼	26,74	1,25	15	＜0,0001
5	G-ORF1＋EGFP	23,23	2,10	15	0,028

[0294] 表31.罐2.激发后3周的肾脏中的病毒RNA。通过使用单向ANOVA和邓尼特后检验将

单个组与PBS对照组进行比较来计算指示的p值。NA＝不适用。

[0295]

疫苗组	描述	平均 Ct 值，PMCV	标准偏差，Ct	n	p 值（与 PBS 相比）
6	PBS	20,73	1,44	15	NA
1	G-ORF1 + IFNb 大西洋鲑	26,55	0,94	15	< 0,0001

[0296]

2	G-ORF1 + IFNb1 大西洋鲑	26,27	0,99	15	< 0,0001
3	G-ORF1 + IFNb a3 海鳟	26,72	1,15	15	< 0,0001
4	G-ORF1 + IFNb a3 红大麻哈鱼	26,43	1,09	11	< 0,0001
5	G-ORF1 + EGFP	21,63	1,76	15	0,20

[0297] 总体结论是被测的所有测试的RT佐剂提供了类似的保护,尽管使用IFNb1 RT构建体引发的保护略高于IFNb RT构建体引发的保护。这些佐剂的密码子改变的版本是优选的,以降低同源重组的风险。

[0298] 递送佐剂的最佳方式是在与抗原相同的质粒上,同时使用单独但相同的启动子作为抗原,但是使用不同的质粒递送抗原和佐剂也是有效的。

[0299] 本说明书中引用的所有出版物,专利出版物和非专利出版物两者都指示本发明所属领域技术人员的技术水平。所有这些出版物通过引用的方式全部并入本文,其程度如同明确且单独地指出各个单独的出版物通过引用的方式并入。

[0300] 尽管本文已经参考特定实施例描述了本发明,但是应当理解,这些实施例仅仅是对本发明的原理和应用的说明。因此,应当理解,在不偏离由以下权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下,可以对说明性实施例进行许多修改,并且可以设计其它布置。

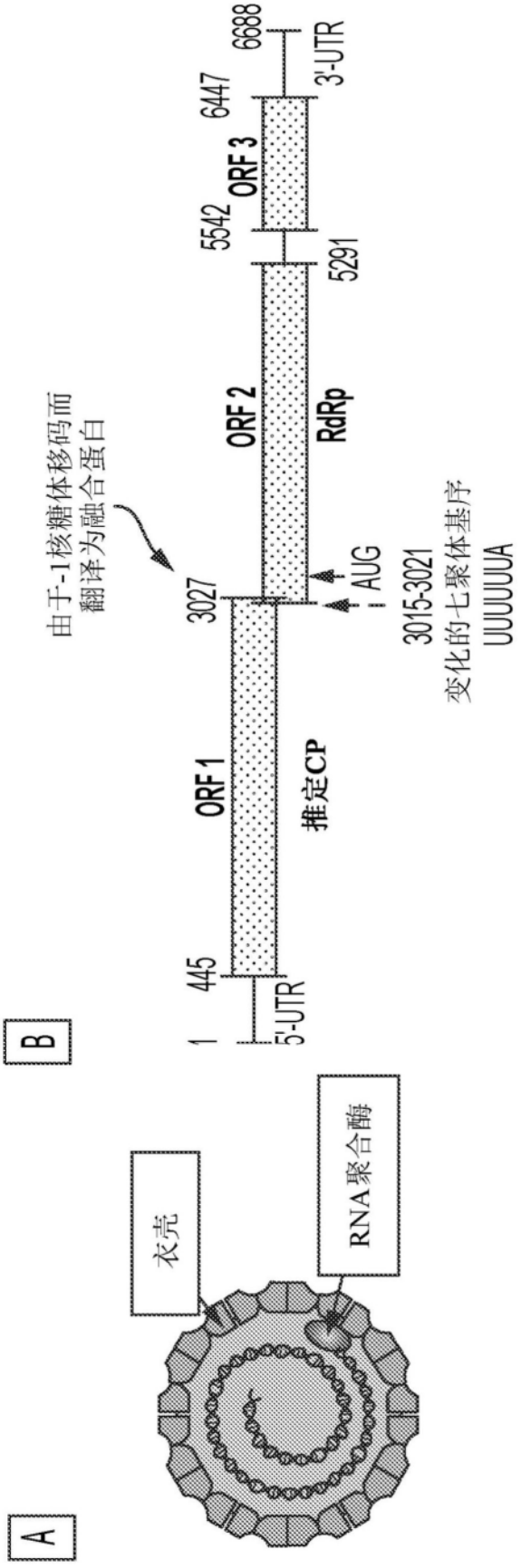

A
衣壳
RNA聚合酶
B
1
445
5'-UTR
ORF 1
推定CP
由于-1核糖体移码而
翻译为融合蛋白
3027
ORF 2
RdRp
5291
5542
ORF 3
6447
6688
3'-UTR
AUG
3015-3021
变化的七聚体基序
UUUUUUA

图1

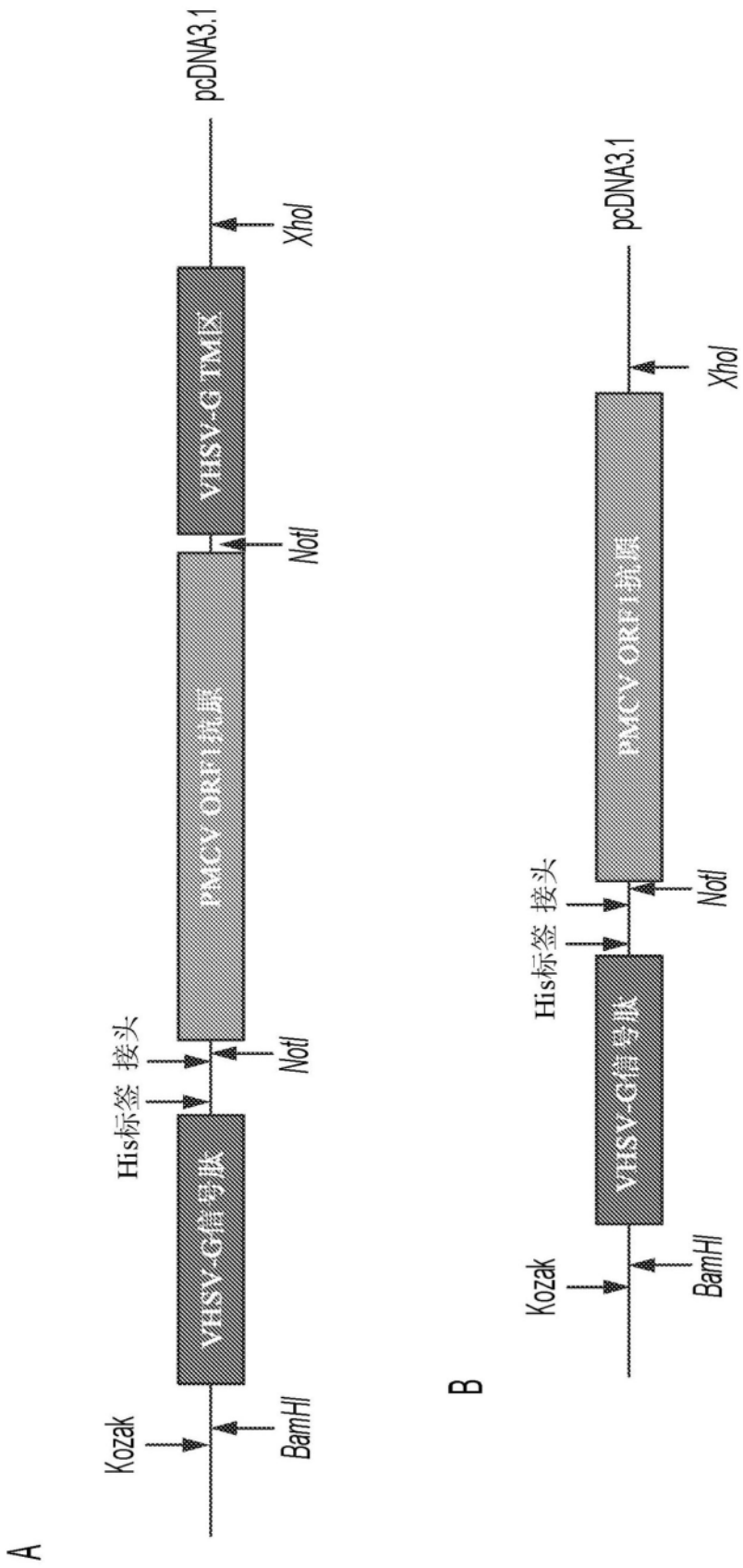

A
pcDNA3.1
XhoI
VHSV-G TM区
NotI
PMCV ORF1编码蛋白
His标签 接头
NotI
VHSV-G信号肽
Kozak
BamHI
B
pcDNA3.1
XhoI
PMCV ORF1编码蛋白
His标签 接头
NotI
VHSV-G信号肽
Kozak
BamHI

图2

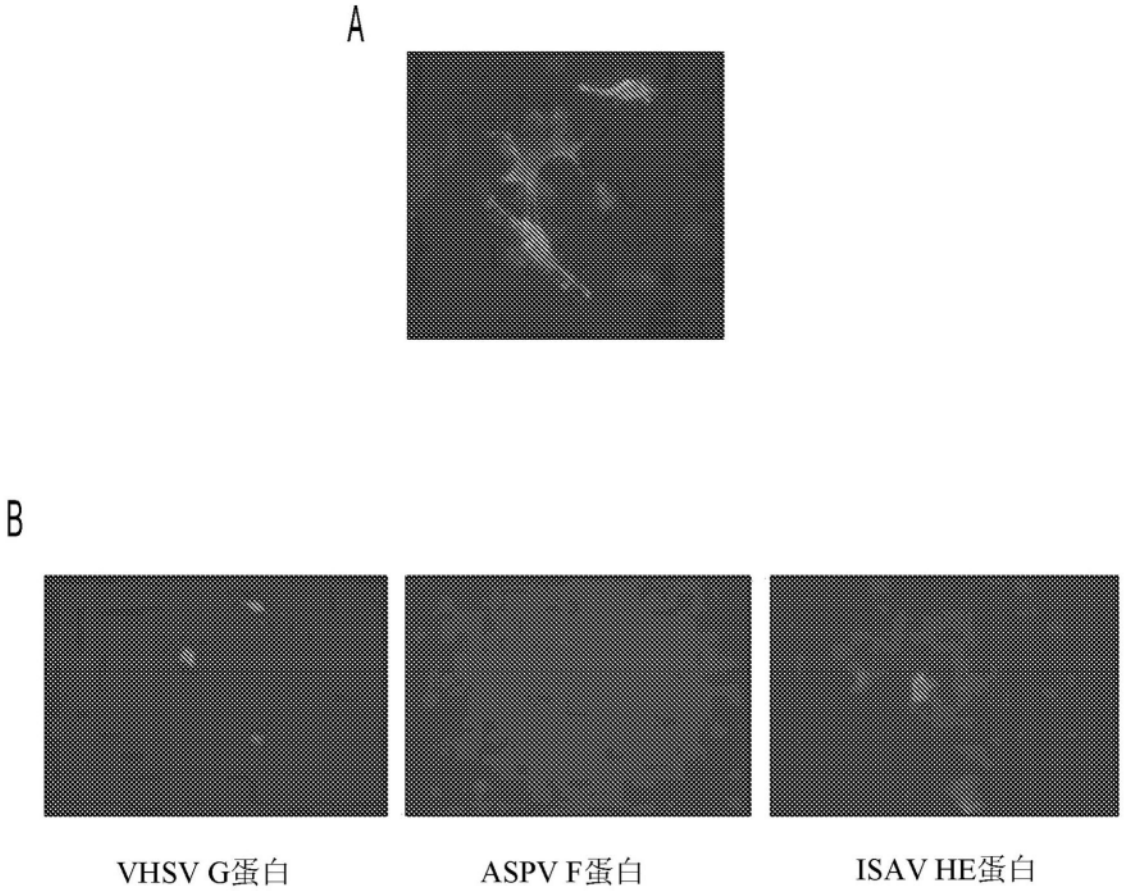


图3

A

描述	荧光强度	
	实验1	实验2
模拟物	-	-
ORF1全	++	++
Del5	++	++
Del6	++	++(+)
Del7	++	++
Del11	++(+)	++
Del12	++	++
Del13	++	++
Del14	++	++
Del15	++	++(+)
Del16	+++	+++
Del17	+++	+++(+)
Del18	(+)	(+)

图4

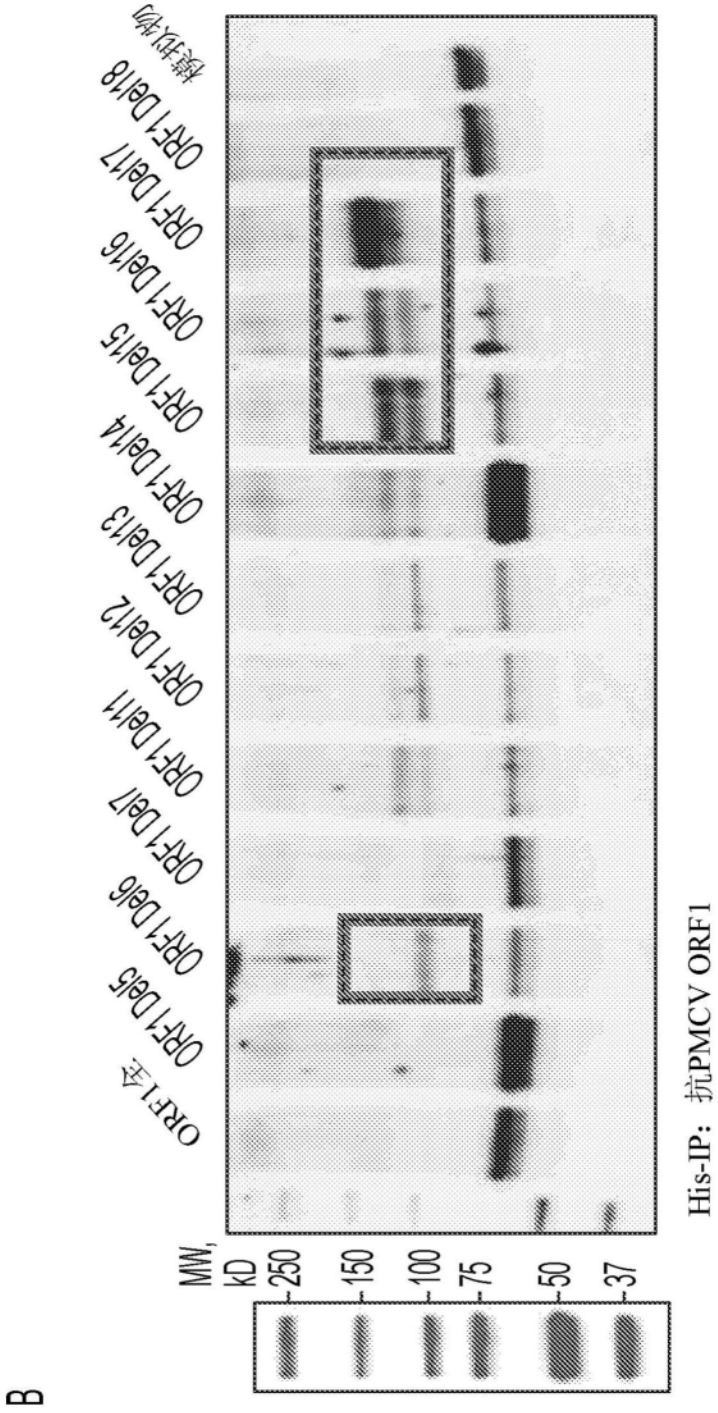

B
MW, kD
250
150
100
75
50
37
His-IP：抗PMCV ORF1
ORF1全
ORF1 Del5
ORF1 Del6
ORF1 Del7
ORF1 Del11
ORF1 Del12
ORF1 Del13
ORF1 Del14
ORF1 Del15
ORF1 Del16
ORF1 Del17
ORF1 Del18
阴性对照

图4续

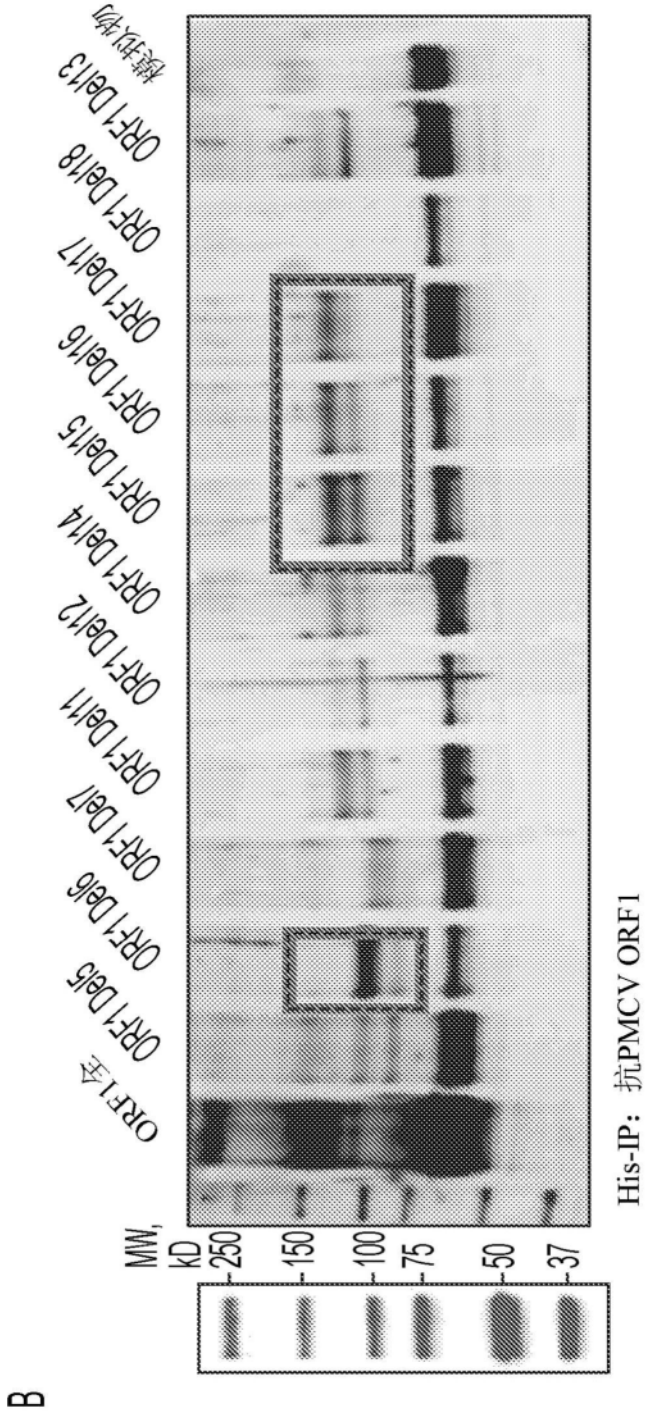

B
MW, kD
250
150
100
75
50
37
His-IP：抗PMCV ORF1
ORF1全
ORF1 Del5
ORF1 Del6
ORF1 Del6
ORF1 Del7
ORF1 Del1
ORF1 Del2
ORF1 Del4
ORF1 Del5
ORF1 Del6
ORF1 Del7
ORF1 Del8
ORF1 Del3
阴性对照

图4续

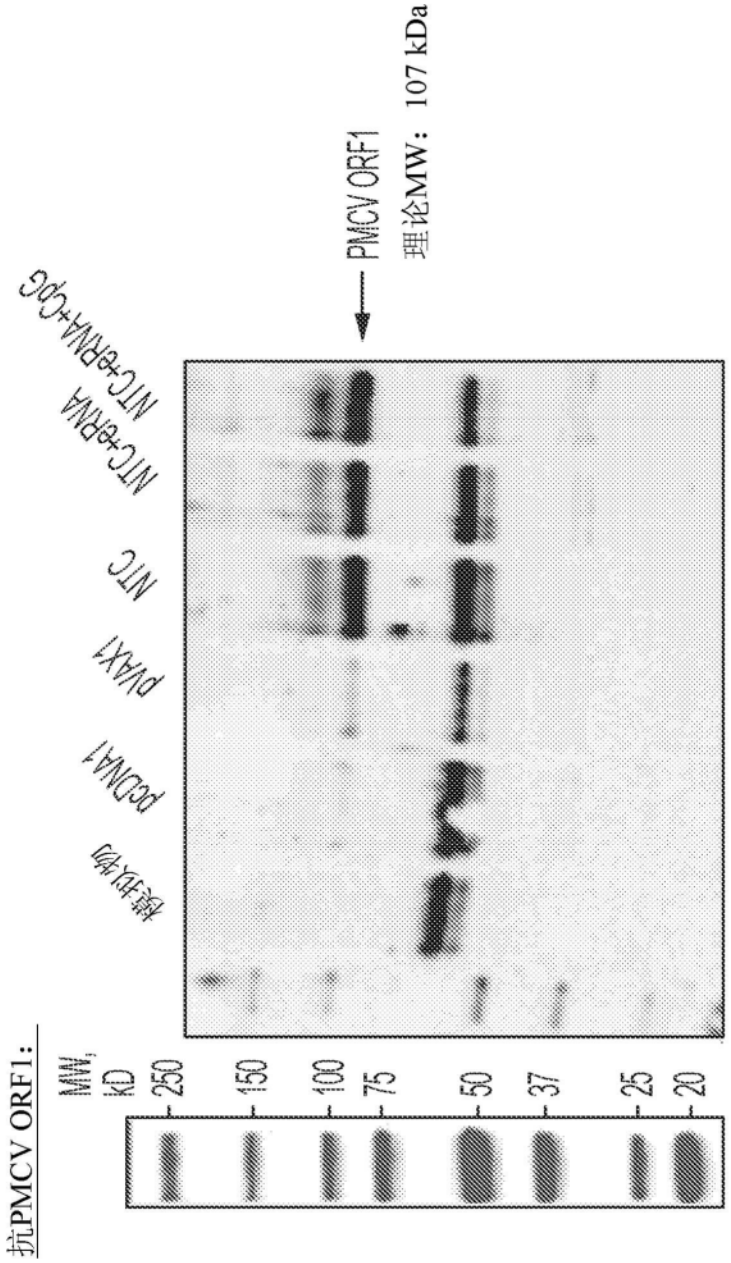

抗PMCV ORF1：
MW, kD
250
150
100
75
50
37
25
20
感染物
pCDNA1
PVAX1
NTC
NTC+eRNA
NTC+eRNA+CpG
PMCV ORF1
理论MW：107 kDa

图5