



(21)申請案號：105138385

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 23 日

(51)Int. Cl. : C07K14/09 (2006.01)

C12N15/66 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A61K39/135 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/23 美國

62/259,043

(71)申請人：梅里亞有限公司 (美國) MERIAL INC. (US)

美國

(72)發明人：亞多納特 真 克利斯多夫 AUDONNET, JEAN-CHRISTOPHE (FR)；瑞那德 費德里克 REYNARD, FREDERIC (FR)；波姆西 娜塔莉亞 BOMCHIL, NATALIA (FR)；西葛悠克勞 賽西 SIGOILLOT-CLAUDE, CECILE (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：11 共 73 頁

(54)名稱

FMDV 及 E2 融合蛋白及其用途

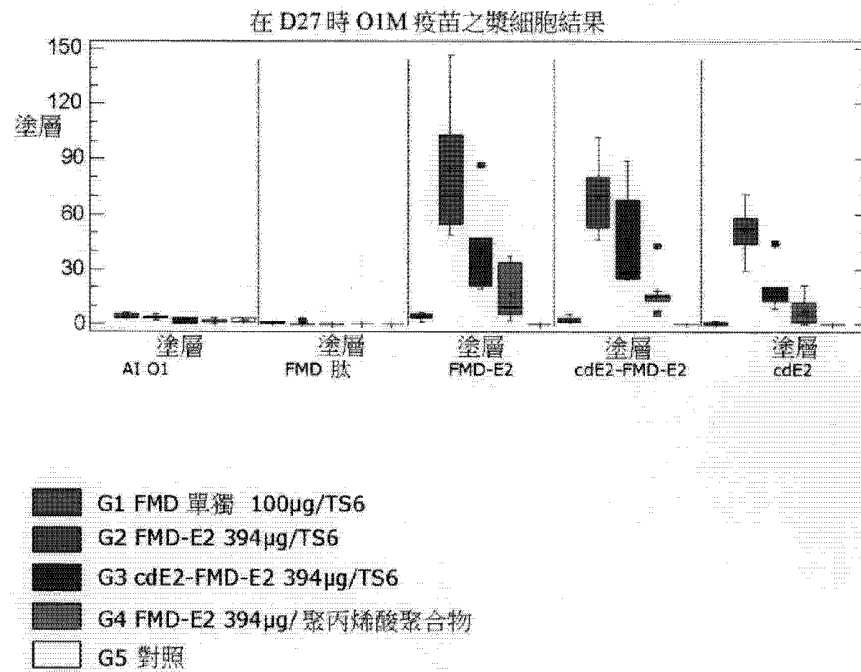
FMDV AND E2 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明涵蓋 FMDV 疫苗或組合物。該疫苗或組合物可為含有 FMDV 抗原之疫苗或組合物。本發明亦涵蓋編碼及表現 FMDV 抗原、表位或免疫原之重組體載體，其可用於保護動物、尤其綿羊、牛、山羊或豬免於 FMDV。本發明進一步涵蓋製造或產生抗原性多肽或抗原之方法。

The present invention encompasses FMDV vaccines or compositions. The vaccine or composition may be a vaccine or composition containing FMDV antigens. The invention also encompasses recombinant vectors encoding and expressing FMDV antigens, epitopes or immunogens which can be used to protect animals, in particular ovines, bovines, caprines, or swines, against FMDV. The invention further encompasses methods of making or producing antigenic polypeptides or antigens.

指定代表圖：



【圖7】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

FMDV及E2融合蛋白及其用途

【英文發明名稱】

FMDV AND E2 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明係關於用於防治動物之口蹄疫病毒(FMDV)感染之組合物。本發明提供包含FMDV抗原之醫藥組合物、對抗FMDV之疫苗接種方法、產生抗原之方法及與該等方法及組合物一起使用之套組。

【先前技術】

口蹄疫(FMD)係影響農場動物之最致命及接觸性傳染病中之一者。此疾病在世界上、尤其非洲、亞洲及南美洲之許多國家中流行。另外，爆發流行可週期性地出現。此疾病在國家中出現可具有由生產力損失、受感染畜群之重量及乳產量損失以及強加於該等國家之貿易禁運造成之極嚴重的經濟後果。所採取對抗此疾病之措施由以下組成：嚴格實施進口限制、衛生控制及檢疫、屠宰患病動物，及在國家或區域層面上作為預防措施或當爆發流行發生時週期性地使用不活化疫苗進行疫苗接種程序。

FMD之特徵在於其短潛伏期、其高度接觸性傳染性質、在口及蹄中形成潰瘍及有時幼畜之死亡。FMD影響許多動物、尤其牛、豬、綿羊及山羊。造成此疾病之試劑係核糖核酸(RNA)病毒，其屬小核糖核酸病毒科(*Picornaviridae* family)之口蹄疫病毒屬(*Aphthovirus* genus) (Cooper等人，1978, *Intervirology* 10, 165-180)。目前，已知至少七種類型之口蹄疫病毒(FMDV)：歐洲型(A、O及C)、非洲型(SAT1、SAT2及SAT3)及亞

洲型(Asia 1)。已辨別出許多亞型(Kleid等人，1981, Science 214, 1125-1129)。

FMDV係直徑約25 nm之裸二十面體病毒，其含有由約8500個核苷酸組成之單鏈RNA分子且具有正極性。此RNA分子包含單一開放閱讀框(ORF)，該開放閱讀框編碼尤其含有衣殼前體(亦稱為蛋白質P1或P88)之單一多蛋白。蛋白質P1在其胺基末端經肉豆蔻基化。在成熟過程期間，蛋白質P1藉由蛋白酶3C裂解成三種稱為VP0、VP1及VP3之蛋白(或分別稱為1AB、1D及1C；Belsham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261)。在病毒體中，蛋白質VP0然後裂解為兩種蛋白質VP4及VP2 (或分別為1A及1B)。關於蛋白質VP0轉化為VP1及VP3及關於成熟病毒體之形成的機制尚未得知。蛋白質VP1、VP2及VP3之分子量為約26,000 Da，而蛋白質VP4較小，為約8,000 Da。

已研發許多假說、研究途徑及建議試圖設計對抗FMD之有效疫苗。Cao 等人 (Antiviral Research, 2013, 97:145-153 ; Veterinay Microbiology, 2014, 168:294-301)報告具有對抗FMDV挑戰之免疫原性之特定表位蛋白質之設計。已證實，對應於來自亞洲血清型之一個T表位及兩個B表位之融合之合成多肽誘導保護性反應(Ren等人，Vaccine, 2011, 29:7960-7965)。

當前，市場上之唯一疫苗包含不活化病毒。關於FMDV疫苗之安全性存在問題，此乃因FMD在歐洲之爆發與疫苗製造中之缺點相關聯(King, A.M.Q.等人，1981, Nature, 293: 479-480)。不活化疫苗不能賦予長期免疫性，由此需要每年進行加強注射或在爆發流行事件中更頻繁。另外，存在與不活化疫苗生產期間不完全失活及/或病毒逃逸關聯之風險(King,

A.M.Q., 如上)。

最近，使用去氫酶複酶複合物之E2亞單位作為骨架來產生HIV-1蛋白(Caivano等人，2010, Virology, 407:296-305；Krebs等人，PLOS One, 2014, DOI:10.1371/journal.pone.0113463；Schiavone等人，2012, Int. J. Mol. Sci., 13:5674-5699)。丙酮酸去氫酶(PDH)複合物係含有三種基本酶之多功能酶：硫胺素依賴性丙酮酸去羧酶(E1)、二氫硫辛醯基乙醯基轉移酶(E2)及黃素蛋白二氫硫辛醯基去氫酶(E3) (Lengyel等人，Structure, 16:93-103, 2008)。已觀察到，來自脂肪嗜熱芽孢桿菌(*Bacillus stearothermophilus*)之PDH複合物的六十個E2多肽拷貝組裝以形成五角十二面體骨架，且骨架可經修飾以在其表面上呈現外來肽及蛋白質(Domingo等人，2001, J. Mol. Biol., 305:259-267)。Dalmau等人(Biotechnology and Bioengineering, 101(4):654-664, 2008)闡述經最佳化用於在大腸桿菌(*E. coli*)中表現之PDH之E2突變體。D'Apice等人(Vaccine, 25:1993-2000, 2007)討論了T輔助表位在三種遞送載體中之表現：絲狀噬菌體fd、來自PDH複合物之E2蛋白及蛋白質CotC。

考慮到動物(包括人類)對FMDV之易感性，因此預防FMDV感染及保護動物之方法係必要的。因此，業內需要有效、安全且簡單的生產對抗FMDV之疫苗。

【發明內容】

相關申請案之交叉參照

本申請案主張2015年11月23日提出申請之美國申請案第62/259,043號之優先權。

提供包含抗原性FMDV多肽及其片段及變體之組合物。FMDV抗原

及其片段及變體具有免疫原性及保護性。FMDV抗原可作為與來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌(*Geobacillus stearothermophilus*)之E2之融合蛋白產生。本發明之FMDV融合蛋白組裝成類似於天然FMDV病毒體或VLP之粒子。

抗原性多肽及其片段及變體可調配成疫苗及/或醫藥組合物。該等疫苗可用於對動物進行疫苗接種並提供保護免於至少一種FMDV菌株。

本發明之方法包括製作抗原性多肽之方法。方法包括製作融合至來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2的抗原或抗原性多肽之方法。本發明提供用以構築缺少感染性FMDV基因體之構象上正確之免疫原的方法以製作有效且安全之疫苗。該等方法有助於在活體外簡單且容易的表現FMDV抗原，該等FMDV抗原複製並模擬複雜且難以生產之天然及真正FMDV病毒體或VLP之構象。

方法亦包括使用方法，其包括向動物投與有效量之抗原性多肽或其片段或變體以產生保護性免疫原性反應。產生之後，抗原性多肽可部分或實質上經純化以用作疫苗。

亦提供包含至少一種抗原性多肽或其片段或變體及使用說明書之套組。

【圖式簡單說明】

以下詳細說明以實例方式給出但並不意欲將本發明僅限制為本文所述具體實施例，結合附圖可最佳地理解該詳細說明，其中：

圖1繪示匯總DNA及蛋白質序列之表。

圖2A-2F繪示DNA及蛋白質序列及序列比對。

圖3繪示經表現FMDV-E2融合蛋白之西方墨點(Western blot)及圓點墨點(dot blot)。

圖4A-4C繪示FMDV-E2粒子之產生。

圖5繪示E2-FMDV粒子之間接ELISA。

圖6繪示在D27時O1M疫苗之漿細胞結果。

圖7繪示在D42時O1M疫苗之漿細胞結果。

圖8繪示在D27時O1M疫苗之IFN γ ELISPOT。

圖9繪示在D42時O1M疫苗之IFN γ ELISPOT。

圖10繪示在D42時O1M疫苗之記憶B細胞結果。

圖11繪示FMDV O1 Manisa SN。

【實施方式】

提供包含FMDV多肽、抗原及其片段及變體之組合物，其在動物中引發免疫原性反應。抗原性多肽或其片段或變體係作為與來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2之融合蛋白或嵌合蛋白產生。抗原性多肽或片段或變可調配成疫苗或醫藥組合物且用於在動物中引發或刺激保護性反應。在一個實施例中，多肽抗原係FMDV合成抗原VP1或其活性片段或變體。

已認識到，本發明之抗原性多肽或抗原可為全長多肽或其活性片段或變體。「活性片段」或「活性變體」意欲指片段或變體保留多肽之抗原性。因此，本發明涵蓋在動物中引發免疫原性反應之任何FMDV多肽、抗原、表位或免疫原。FMDV多肽、抗原、表位或免疫原可為在動物(例如綿羊、牛、山羊或豬)中引發、誘導或刺激反應之任何FMDV多肽、抗原、表位或免疫原(例如但不限於蛋白質、肽或其片段或變體)。

特定FMDV抗原性多肽包括FMDV之VP1。FMDV係直徑約25 nm之裸二十面體病毒，其含有由約8500個核苷酸組成之單鏈RNA分子且具有正極性。此RNA分子包含單一開放閱讀框(ORF)，該開放閱讀框編碼尤其

含有衣殼前體(亦稱為蛋白質P1或P88)之單一多蛋白。蛋白質P1在其胺基末端經肉豆蔻基化。在成熟過程期間，蛋白質P1藉由蛋白酶3C裂解成三種稱為VP0、VP1及VP3之蛋白(或分別稱為1AB、1D及1C；Belsham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261)。在病毒體中，蛋白質VP0然後裂解為兩種蛋白質VP4及VP2 (或分別稱為1A及1B)。關於蛋白質VP0轉化為VP1及VP3及關於成熟病毒體之形成的機制尚未得知。蛋白質VP1、VP2及VP3之分子量為約26,000 Da，而蛋白質VP4較小，為約8,000 Da。

衣殼蛋白之簡單組合形成單元體或5S分子，其係FMDV衣殼之基本組成部分。此單元體然後編譯成五聚體以形成12S分子。病毒體係由藉由十二個12S五聚體之組裝衣殼化基因體RNA分子而形成，由此構成146S粒子。亦可形成在其內部不存在RNA分子之病毒衣殼(下文中「空衣殼」)。空衣殼亦命名為粒子70S。空衣殼之形成可在病毒複製期間自然地發生或可藉由化學處理人工產生。

本發明係關於牛、綿羊、山羊或豬疫苗或組合物，其可包含有效量之FMDV抗原及醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或媒劑。

在一些實施例中，疫苗進一步包含佐劑，例如美國專利7,371,395中所闡述之水包油(O/W)乳液。

在其他實施例中，佐劑包括EMULSIGEN、氫氧化鋁及皂素、及CpG或其組合。

在一些實施例中，動物中之反應係保護性免疫反應。

「動物」意欲指哺乳動物、鳥類及諸如此類。動物或宿主包括哺乳動物、偶蹄動物及人類。動物可選自由以下組成之群：馬科動物(例如，

馬)、犬科動物(例如,狗、狼、狐狸、郊狼、胡狼)、貓科動物(例如,獅子、老虎、家貓、野貓、其他大型貓及其他貓科動物,包括獵豹及山貓)、綿羊(ovine)(例如,綿羊(sheep))、牛科動物(例如,牛)、豬(swine)(例如,豬(pig))、山羊(caprine)(例如,山羊(goat))、禽類(例如,雞、鴨、鵝、火雞、鵪鶉、雉、鸚鵡、雀、鷹、烏鴉、鴛鴦、鸚鵡及鶴鴒)、靈長類動物(例如,原猴、眼鏡猴、猴、長臂猿、猿)及魚類。術語「動物」亦包括處於所有發育階段(包括胚胎及胎兒階段)之個別動物。

除非另有解釋,否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬領域技術者通常所理解相同之意義。除非上下文另外明確指示,否則單數形式「一(a, an)」及「該(the)」包括複數個指示物。類似地,除非上下文另外明確指示,否則單詞「或」意欲包括「及」。

應注意,在此揭示內容且特定地在申請專利範圍及/或段落中,諸如「包含(comprises, comprised, comprising)」及諸如此類之術語可具有在美國專利法中所賦予其之含義;例如,其可意指「包括(includes, included, including)」及諸如此類;且諸如「基本上由...組成(consisting essentially of及consists essentially of)」之術語可具有在美國專利法中所賦予其之含義,例如,其允許未明確列舉之要素,但排除在先前技術中所發現或影響本發明之基本或新穎特徵之要素。

本發明之抗原性多肽能夠保護免於FMDV。亦即,其能夠刺激動物中之免疫反應。「抗原」或「免疫原」意指在宿主動物中誘導特異性免疫反應之物質。抗原可包含經殺死、減毒或活的整個生物體;生物體之亞單位或蛋白質;含有具有免疫原性之插入物之重組載體;在呈遞至宿主動物時能夠誘導免疫反應之DNA之片或片段;多肽、表位、半抗原或其任一

組合。或者，免疫原或抗原可包含毒素或抗毒素。

本文所用之術語「免疫原性蛋白質、多肽或肽」包括在一旦投與給宿主即能夠引起針對蛋白質之體液型及/或細胞型之免疫反應之意義上具有免疫活性之多肽。較佳地，蛋白質片段係使得其具有實質上與總蛋白質相同之免疫活性。因此，本發明之蛋白質片段包含至少一個表位或抗原決定子，或基本上由其組成或由其組成。如本文所用，「免疫原性」蛋白質或多肽包括蛋白質之全長序列、其類似物或其免疫原性片段。「免疫原性片段」意指包括一或多個表位且由此引發上述免疫反應之蛋白質片段。可使用許多業內熟知表位映射技術來鑒定該等片段。例如，參見，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*，第66卷(Glenn E. Morris編輯，1996)。舉例而言，可藉由以下來確定線性表位：例如在固態支撐體上同時合成大量肽，該等肽對應於蛋白質分子之各部分，及使該等肽與抗體反應，同時該等肽仍附接至支撐體上。該等技術已為業內已知且闡述於(例如)美國專利第4,708,871號；Geysen等人，1984；Geysen等人，1986中。類似地，構象表位係藉由(例如)藉由x射線結晶學及二維核磁共振確定胺基酸之空間構象來容易地鑑別。參見(例如)上文*Epitope Mapping Protocols*。

如所討論，本發明涵蓋抗原性多肽之活性片段及變體。因此，術語「免疫原性蛋白質、多肽或肽」進一步涵蓋序列之缺失、添加及取代，只要多肽起到產生本文所定義之免疫反應之作用即可。術語「保守性變異」表示胺基酸殘基由另一生物上相似之殘基替代，或核酸序列中之核苷酸經替代使得所編碼胺基酸殘基不改變或為另一生物上相似之殘基。就此而言，尤佳取代通常在本質上將係保守的，即，在胺基酸家族內發生之彼等

取代。舉例而言，胺基酸通常分為四個家族：(1) 酸性--天冬胺酸鹽及麩胺酸鹽；(2) 鹼性--離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3) 非極性--丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；及(4) 無電荷極性--甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸。苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸有時分類為芳香族胺基酸。保守性變異之實例包括用一個疏水性殘基(例如異白胺酸、纈胺酸、白胺酸或甲硫胺酸)取代另一疏水性殘基、或用一個極性殘基取代另一極性殘基(例如用精胺酸取代離胺酸，用麩胺酸取代天冬胺酸，或用麩醯胺酸取代天冬醯胺及諸如此類)；或胺基酸用對生物活性不具有主要效應之結構上相關胺基酸之類似保守替換。因此，具有實質上與參考分子相同之胺基酸序列但具有不會實質上影響蛋白質之免疫原性之微小胺基酸取代之蛋白質在參考多肽之定義內。藉由該等修飾產生之所有多肽皆包括在本文中。術語「保守性變異」亦包括使用經取代胺基酸代替未經取代親代胺基酸，前提條件係所產生針對經取代多肽之抗體亦與未經取代多肽發生免疫反應。

術語「表位」係指特異性B細胞及/或T細胞與之反應之抗原或半抗原上之位點。術語亦與「抗原決定子」或「抗原決定子位點」互換使用。識別相同表位之抗體可在顯示一種抗體阻斷另一抗體與靶標抗原之結合的能力的簡單免疫分析中鑑別。

對組合物或疫苗之「免疫反應」係細胞宿主及/或抗體介導之對所關注組合物或疫苗之免疫反應的發展。通常，免疫反應包括(但不限於)一或多種下述效應：產生特定針對所關注組合物或疫苗中所包括之一或多種抗原之抗體、B細胞、輔助性T細胞及/或細胞毒性T細胞。較佳地，宿主將展示治療性或保護性免疫反應以增強對新感染之抵抗及/或降低疾病之臨

床嚴重程度。此保護將藉由受感染宿主通常展示之症狀減少或缺乏、更快之恢復時間及/或受感染宿主中降低之病毒效價來證明。

合成抗原亦包括在定義內，例如，多表位、側翼表位及其他重組或經合成衍生之抗原。出於本發明之目的，免疫原性片段通常將包括分子之至少約3個胺基酸、至少約5個胺基酸、至少約10-15個胺基酸或約15-25個胺基酸或更多個胺基酸。片段之長度無關鍵上限，其將包含蛋白質序列之幾乎全長或甚至包含蛋白質之至少一個表位之融合蛋白。

因此，表現表位之多核苷酸的最小結構在於其包含編碼FMDV多肽之表位或抗原決定子之核苷酸或基本上由其組成或由其組成。編碼FMDV多肽之片段的多核苷酸可包含編碼該多肽之序列的最少15個核苷酸、約30-45個核苷酸、約45-75或至少57、87或150個連續或鄰接核苷酸，或基本上由其組成或由其組成。

術語「核酸」及「多核苷酸」係指為直鏈或具支鏈、單鏈或雙鏈之RNA或DNA或其雜合物。術語亦涵蓋RNA/DNA雜合物。以下係多核苷酸之非限制性實例：基因或基因片段、外顯子、內含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重組多核苷酸、具支鏈多核苷酸、質體、載體、任何序列之經分離DNA、任何序列之經分離RNA、核酸探針及引子。多核苷酸可包含經修飾核苷酸(例如甲基化核苷酸及核苷酸類似物)、尿嘧啶基、其他糖及連接基團(例如氟核糖及硫醇鹽)及核苷酸支鏈。核苷酸之序列可在聚合後(例如)藉由與標記組份偶聯進一步修飾。此定義中包括之其他類型之修飾係加帽、將一或多個天然核苷酸取代成類似物及引入使多核苷酸與蛋白質、金屬離子、標記組份、其他多核苷酸或固體支撐物附接之手段。多核苷酸可藉由化學合成獲得或衍生自微生物。

術語「基因」廣泛地用於指與生物學功能相關之多核苷酸的任何區段。因此，基因包括如基因體序列中一樣內含子及外顯子、或如cDNA中一樣僅編碼序列及/或其表現所需之調節序列。例如，基因亦指表現mRNA或功能性RNA、或編碼特定蛋白質並包括調節序列之核酸片段。

術語「蛋白質」、「肽」、「多肽」及「多肽片段」在本文中可互換使用，係指任何長度之胺基酸殘基之聚合物。聚合物可為線性或具支鏈，其可包含經修飾胺基酸或胺基酸類似物，且其可雜有除胺基酸以外之化學部分。該等術語亦涵蓋已經天然或藉由干預修飾之胺基酸聚合物；例如，二硫鍵形成、醣基化、脂質化、乙醯化、磷醯化或任何其他操作或修飾(例如，與標記或生物活性組份偶聯)。

如本文所用，術語「融合蛋白」或「嵌合蛋白」係指藉助將兩個或更多個異源基因接合所產生之任何重組蛋白質。異源基因之表現產生具有源自每一原始蛋白質之功能性質之一個單一多肽。

「經分離」生物學組份(例如核酸或蛋白質或細胞器)係指一種組份，該組份已實質上與其中該組份天然存在之生物之細胞中的其他生物學組份(例如，其他染色體及染色體外DNA以及RNA、蛋白質及細胞器)分離或純化。「經分離」核酸及蛋白質包括藉由標準純化方法純化之核酸及蛋白質。該術語亦包含藉由重組技術以及化學合成法製備之核酸及蛋白質。

如本文所用，術語「經純化」並不要求絕對純淨；而是，其意欲作為相對術語。因此，舉例而言，經純化多肽製劑係其中多肽比該多肽在其自然環境中豐富者。換言之，將多肽自細胞組份分離。「實質上經純化」意欲使得多肽代表去除至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、或至少98%或更多細胞組份或材料之若干實施例。同樣，多肽可部

分地經純化。「部分地經純化」意欲去除小於60%之細胞組份或材料。相同情況適用於多核苷酸。本文所揭示之多肽可藉由此項技術中已知之任何方式純化。

如上所述，抗原性多肽或其片段或變體係作為融合蛋白產生之FMDV抗原性多肽。所揭示多核苷酸及由其編碼之多肽之片段及變體亦由本發明涵蓋。「片段」意指多核苷酸之一部分或由其編碼之抗原性胺基酸序列之一部分。多核苷酸之片段可編碼保留天然蛋白質之生物活性且因此具有本文中別處所提及之免疫原性活性之蛋白質片段。多肽序列之片段保留在動物中誘導保護性免疫反應之能力。

「變體」意欲指實質上相似序列。關於多核苷酸，變體包含天然多核苷酸內一或多個位點處之一或多個核苷酸之缺失及/或添加及/或天然多核苷酸中一或多個位點處之一或多個核苷酸之取代。如本文所用，「天然」多核苷酸或多肽分別包含天然核苷酸序列或胺基酸序列。本發明特定多核苷酸(即，參照多核苷酸)之變體亦可藉由比較由變體多核苷酸編碼之多肽與由參照多核苷酸編碼之多肽之間之序列一致性%來評估。「變體」蛋白質意欲指自天然蛋白質藉由天然蛋白質中一或多個位點處之一或多個胺基酸之缺失或添加及/或天然蛋白質中一或多個位點處之一或多個胺基酸之取代衍生之蛋白質。本發明涵蓋之變體蛋白質具有生物活性，亦即其具有引發免疫反應之能力。

在一態樣中，本發明提供來自綿羊、牛、山羊或豬之FMDV多肽。在另一態樣中，本發明提供具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12及14中所闡述序列之多肽、及其變體或片段。

此外，來自綿羊、牛、山羊或豬之FMDV多肽之同系物意欲在本發

明之範圍內。如本文所用，術語「同系物」包括異種同源物、類似物及同種同源物。術語「類似物」係指具有相同或類似功能、但在不相關生物體中單獨演化之兩種多核苷酸或多肽。術語「異種同源物」係指來自不同物種、但自共同祖先基因藉由物種演變演化之兩種多核苷酸或多肽。正常情況下，異種同源物編碼具有相同或類似功能之多肽。術語「同種同源物」係指藉由在基因體內複製相關之兩種多核苷酸或多肽。同種同源物通常具有不同功能，但該等功能可相關。野生型FMDV多肽之類似物、異種同源物及同種同源物可因轉譯後修飾、胺基酸序列差異或二者而不同於野生型FMDV多肽。具體而言，本發明之同系物通常將與野生型FMDV或多核苷酸序列之所有或一部分展現至少80-85%、85-90%、90-95%、或95%、96%、97%、98%、99%序列一致性，且將展現類似功能。變體包括等位基因變體。術語「等位基因變體」係指含有導致蛋白質之胺基酸序列中之改變且存在於自然群體(例如，病毒物種或變種)內之多型性之多核苷酸或多肽。該等自然等位基因變異通常可導致多核苷酸或多肽之1-5%變化。等位基因變體可藉由在若干不同物種中對所關注核酸序列進行測序來鑑別，此可藉由使用雜交探針以鑑別彼等物種中相同基因遺傳基因座容易地實施。因天然等位基因變異而產生且不改變所關注基因之功能活性之任一及所有該等核苷酸變異及所得胺基酸多型性或變異皆意欲在本發明範圍內。

在另一態樣中，FMDV抗原融合至脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2。

如本文所用，術語「衍生物」或「變體」係指多肽或編碼多肽之核酸，其具有一或多個保守胺基酸變異或其他微小修飾，使得：(1) 相應多肽與野生型多肽相比具有實質上等效功能或(2) 針對該多肽所產生之抗體

與野生型多肽具有免疫反應性。該等變體或衍生物包括具有FMDV多肽一級胺基酸序列之微小修飾之多肽，該等微小修飾可產生與未經修飾之對應物多肽相比具有實質上等效活性之肽。該等修飾可係有意的(如藉由定點誘變)，或可係自發的。術語「變體」進一步涵蓋序列之缺失、添加及取代，只要多肽起到產生本文所定義之免疫反應之作用即可。

術語「保守性變異」表示胺基酸殘基由另一生物上相似之殘基替代，或核酸序列中之核苷酸經替代使得所編碼胺基酸殘基不改變或為另一生物上相似之殘基。就此而言，尤佳取代通常在性質上將係保守的，如上所述。

本揭示內容之多核苷酸包括作為遺傳密碼之結果簡並(例如針對特定宿主之最佳化密碼子利用)之序列。如本文所用，「最佳化」係指經遺傳改造以增加其在既定物種中之表現之多核苷酸。為提供編碼FMDV多肽之最佳化多核苷酸，FMDV蛋白質基因之DNA序列可經修飾以1)包含在特定物種中由高度表現基因優選之密碼子；2) 包含在該等物種中實質上發現之核苷酸鹼基組合物之A+T或G+C含量；3) 形成該等物種之起始序列；或4) 消除導致去穩定、不適當多聚腺苷酸化、RNA之降解及終止或形成二級結構髮卡或RNA剪接位點之序列。該等物種中FMDV蛋白質之增加的表現可藉由利用在真核生物及原核生物、或特定物種中密碼子利用之分佈頻率達成。術語「優選的密碼子」指稱由核苷酸密碼子來特定給定胺基酸的。術語「較佳密碼子利用頻率」係指由利用核苷酸密碼子來指定既定胺基酸之特定宿主細胞展現之偏好。存在20種天然胺基酸，其中大多數由多於一種密碼子指定。因此，所有簡並核苷酸序列皆包括在揭示內容中，只要由核苷酸序列編碼之FMDV多肽之胺基酸序列功能上無變化即可。

兩個胺基酸序列之間之序列一致性可由NCBI (國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information))配對blast及blosum62矩陣、使用標準參數建立(例如, 參見在「國家生物技術資訊中心」(NCBI, Bethesda, Md., USA))伺服器上、以及Altschul等人利用之BLAST或BLASTX演算法; 且因此, 此文獻說明藉由術語「blasts」使用演算法或BLAST或BLASTX及BLOSUM62矩陣)。

關於序列之「一致性」可係指具有相同核苷酸或胺基酸之位置數除以2個序列中較短者中之核苷酸或胺基酸之數目, 其中2個序列之比對可根據Wilbur及Lipman演算法測定(Wilbur及Lipman), 例如, 使用20個核苷酸之窗口大小、4個核苷酸之字長及4之空位罰分, 且包括比對之序列數據的電腦輔助分析及解釋解析可便捷地使用市售程序(例如, Intelligenetics™ Suite, Intelligenetics Inc. CA)實施。當認為RNA序列與DNA序列類似、或具有一定程度之序列一致性或同源性時, DNA序列中之胸苷(T)視為等同於RNA序列中之尿嘧啶(U)。因此, RNA序列藉由將DNA序列中之胸苷(T)視為等同於RNA序列中之尿嘧啶(U)而在本發明的範圍內且可源於DNA序列。

兩個胺基酸序列之序列一致性或序列相似性或兩個核苷酸序列間之序列一致性可使用Vector NTI軟體包(Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA)測定。

雜交反應可在具有不同「嚴格度」條件下實施。增加雜交反應之嚴格度之條件已熟知。參見例如「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 第二版(Sambrook等人, 2014)。

本發明進一步涵蓋載體分子或表現載體中所包含且可操作連接至啟

動子元件及視情況增強子之FMDV多核苷酸。

「載體」係指包含欲在活體外或活體內遞送至靶細胞之異源多核苷酸之重組DNA或RNA質體或病毒。異源多核苷酸可包含用於預防或治療目的之所關注序列，且可視情況成表現盒形式。如本文所用，載體無需能夠在最終靶細胞或個體中複製。該術語包括選殖載體及病毒載體。

術語「重組體」意指並非天然存在或以自然中未發現之排列連接至另一多核苷酸之半合成或合成起源之多核苷酸。

「異源」意指源自與所比較之其餘實體遺傳上不同之實體。舉例而言，多核苷酸可藉由遺傳改造技術置於源自不同來源之質體或載體中，且係異源多核苷酸。自其天然編碼序列去除且可操作地連接至不同於天然序列之編碼序列的啟動子係異源啟動子。

本發明係關於綿羊、牛、山羊及豬疫苗或醫藥或免疫組合物，其可包含有效量之FMDV抗原及醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或媒劑。

本文所述之標的物部分地係關於涉及將FMDV抗原製備成融合蛋白或嵌合蛋白之組合物及方法，該蛋白質具有高度免疫原性且保護動物免於來自同源及異源FMDV菌株之攻擊。

組合物

本發明係關於FMDV疫苗或組合物，其可包含有效量之FMDV抗原及醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或媒劑。在一個實施例中，FMDV抗原表現為具有來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2的融合蛋白或嵌合蛋白。

在實施例中，本文所述之標的物係關於包含FMDV抗原之融合或嵌

合蛋白。

在實施例中，本文所述之標的物係關於包含融合至來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2之FMDV抗原的疫苗或組合物。

在實施例中，本文所述之標的物係關於疫苗或組合物，其包含在原核生物或真核生物中產生之FMDV及E2融合或嵌合蛋白。本發明涵蓋在動物(例如綿羊、牛、山羊或豬)中引發免疫原性反應之任何FMDV多肽、抗原、表位或免疫原。FMDV多肽、抗原、表位或免疫原可為在動物(例如綿羊、牛、山羊或豬)中引發、誘導或刺激反應之任何FMDV多肽、抗原、表位或免疫原(例如但不限於蛋白質、肽或其片段或變體)。

在一個實施例中，FMDV抗原可為自序列比對中設計之合成抗原。多個B及T表位闡述於FMD VP1衣殼蛋白中。已證實對應於來自亞洲血清型之一個T表位及兩個B表位之融合的合成多肽以誘導保護性反應(Ren等人，Vaccine 2011)。序列比對之後，可針對所有其他血清學定義等效多肽。在另一實施例中，FMDV抗原可為VP1多肽。在又一實施例中，FMDV抗原可為P1-3C多肽。在另一實施例中，FMDV抗原可為P1單獨或P1-2A/2B1。在另一實施例中，FMDV抗原可為VP0-VP3。在另一實施例中，FMDV抗原可為VP4-VP2。在另一實施例中，FMDV抗原可為3C。

在另一實施例中，FMDV抗原或多肽或蛋白質係融合或嵌合蛋白。在另一實施例中，FMDV抗原或多肽或蛋白質融合至來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2之核心C-末端催化結構域。

在另一實施例中，FMDV抗原可源自FMDV菌株 *O1 Manisa*、*O1 BFS*或*Campos*、*A24 Cruzeiro*、*Asia 1 Shamir*、*A Iran'96*、*A22 Iraq*、*SAT2 Saudi Arabia*。

本發明係關於FMDV疫苗，其可包含有效量之重組體或融合或嵌合FMDV抗原或蛋白質及醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

在另一實施例中，FMDV抗原係融合或嵌合FMDV及E2蛋白質。FMDV-E2融合或嵌合蛋白可在原核生物或真核生物中產生。在另一實施例中，醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、佐劑、賦形劑或媒劑可為油包水乳液。在另一實施例中，醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、佐劑、賦形劑或媒劑可為水包油乳液。在另一實施例中，油包水乳液可為水/油/水(W/O/W)三重乳液。

本發明進一步涵蓋載體分子或表現載體中所包含且可操作連接至啟動子元件及視情況增強子之FMDV多核苷酸。

在一態樣中，本發明提供FMDV多肽、特定地具有SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12或14中所闡述序列之綿羊、牛、山羊或豬多肽、及其變體或片段。

在另一態樣中，本發明所提供之多肽與本發明之抗原性多肽、尤其具有SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12或14中所闡述序列之多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

在又一態樣中，本發明提供以上所鑑別FMDV多肽(SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12及14)之片段及變體，其可由熟習此項技術者使用熟知分子生物技術容易地製備。

在又一態樣中，本發明提供包含FMDV抗原及來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2結構域之融合或嵌合蛋白。FMDV-E2融合或嵌合蛋白所包含之

多肽可與具有SEQ ID NO:6、10或14中所述序列之多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

變體係同源多肽，其具有與SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12及14中所闡釋之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列。

FMDV多肽之免疫原性片段包括具有SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12及14中所述序列之FMDV多肽之至少8、10、15或20個連續胺基酸、至少21個胺基酸、至少23個胺基酸、至少25個胺基酸或至少30個胺基酸或其變體。在另一實施例中，FMDV多肽之片段包括在FMDV多肽上發現之特定抗原性表位。

在另一態樣中，本發明提供編碼FMDV多肽之多核苷酸，例如編碼具有SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12及14中所述序列之多肽之多核苷酸。在又一態樣中，本發明提供編碼與具有SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12及14中所述序列之多肽、或保守性變體、等位基因變體、同系物或包含該等多肽中之一者之至少八個或至少十個連續胺基酸之免疫原性片段或該等多肽之組合具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之多肽之多核苷酸。

在又一態樣中，本發明提供編碼與具有SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12及14中所述序列之多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之FMDV-E2融合或嵌合蛋白之多核苷酸。

在另一態樣中，本發明提供具有SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11及13中所闡釋核苷酸序列之多核苷酸或其變體。在又一態樣中，本發明提供與具有SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11及13中所述序列之多核苷酸具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之多核苷酸或其變體。

在又一態樣中，本發明提供E2蛋白質(SEQ ID NO:4)及DNA (SEQ ID NO:3)序列以及E2連接體序列(SEQ ID NO:15)。

本發明之多核苷酸可包含額外序列(例如同一轉錄單元內之額編碼序列)、控制元件(例如啟動子、核糖體結合位點、5'UTR、3'UTR、轉錄終止子、多聚腺苷酸化位點)；在相同或不同啟動子控制下之額外轉錄單元；允許選殖、表現、同源重組及宿主細胞之轉形之序列及可期望提供本發明實施例之任何此類構築體。

用於FMDV多肽、抗原、表位或免疫原之表現之元件有利地存在於本發明載體中。以最小方式，此包含用於某些載體(例如質粒)及某些病毒載體(例如，不同於痘病毒之病毒載體)之起始密碼子(ATG)、終止密碼子及啟動子及視情況亦多聚腺苷酸化序列，基本上由其組成或由其組成。當多核苷酸編碼多蛋白片段(例如FMDV肽)時，有利地在載體中，ATG置於閱讀框之5'處，且終止密碼子置於3'處。可存在用於控制表現之其他元件，諸如增強子序列、穩定化序列(例如內含子)及允許蛋白分泌之信號序列。

本發明亦係關於包含載體(例如表現載體)之組合物，例如治療組合物。組合物可包含一或多種載體(例如表現載體，例如活體內表現載體)，其包含及表現一或多種FMDV多肽、抗原、表位或免疫原。在一個實施例

中，於醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或媒劑中，載體含有及表現多核苷酸，其包含編碼(且有利地表現)FMDV抗原、表位或免疫原之多核苷酸、基本上由其組成或由其組成。因此，根據本發明之實施例，組合物中之其他一或多種載體包含編碼及在適當環境下載體表現FMDV多肽、抗原、表位或免疫原或其片段之一或多種其他蛋白之多核苷酸，基本上由其組成或由其組成。

根據又一實施例，一或多種載體包含編碼來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之E2之多核苷酸，或基本上由其組成或由其組成。

根據本發明之又一實施例，表現載體係質體載體或DNA質體載體，尤其原核生物或真核生物中之活體內表現載體。在特定、非限制性實例中，pET30a、pET30b及pET30c (Novagen)可用作用於插入多核苷酸序列之載體。pET-30a-c載體攜載T7啟動子及N-末端His•Tag/凝血酶/S•Tag/腸激酶構形加上可選C-末端His•Tag序列。在另一非限制性實例中，可將pVR1020或1012質體(VICAL Inc.；Luke等人，1997；Hartikka等人，1996，參見例如美國專利第5,846,946號及第6,451,769號)用作用於插入多核苷酸序列之載體。pVR1020質體係源自pVR1012且含有人類tPA信號序列。在一個實施例中，人類tPA信號包含基因庫中登錄號HUMTPA14之自胺基酸M(1)至胺基酸S(23)。在另一特定、非限制性實例中，用作用於插入多核苷酸序列之載體之質體可含有基因庫中登錄號U28070之胺基酸M(24)至胺基酸A(48)之馬IGF1的信號肽序列。關於在實踐中可參考或採用之DNA質體之額外資訊見於美國專利第6,852,705號；第6,818,628號；第6,586,412號；第6,576,243號；第6,558,674號；第6,464,984號；第6,451,770號；第6,376,473號及第6,221,362號。

術語質體涵蓋任何DNA轉錄單元，其包含本發明之多核苷酸及其在期望宿主或靶標之一或多個細胞中活體內表現必需之元件；且，就此而言，應注意超螺旋或非超螺旋、環狀質粒以及線性形式意欲在本發明之範圍內。

每一質體包含或含有編碼FMDV抗原、表位或免疫原之多核苷酸、或基本上由其組成，除編碼FMDV抗原、表位或免疫原之多核苷酸以外視情況與異源肽序列、變體、類似物或片段融合、可操作連接至啟動子或在啟動子之控制下或依賴於啟動子。一般而言，有利的係採用在真核細胞中起作用之強啟動子。強啟動子可為(但不限於)人類或鼠類來源或視情況具有另一來源(例如大鼠或天竺鼠)之立即早期巨細胞病毒啟動子(CMV-IE)、超級啟動子(Ni, M.等人, Plant J. 7, 661-676, 1995.)。CMV-IE啟動子可包含實際啟動子部分，其可或可不與增強子部分相關聯。參考文獻可見EP-A-260 148、EP-A-323 597、美國專利第5,168,062號、第5,385,839號及第4,968,615號以及PCT申請案第WO87/03905號。CMV-IE啟動子有利地係人類CMV-IE (Boshart等人, 1985, Cell 41(2): 521-30)或鼠類CMV-IE。

更通常而言，啟動子具有病毒、植物或細胞來源。可用於本發明之實踐的不同於CMV-IE之強病毒啟動子係SV40病毒之早期/晚期啟動子或勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)之LTR啟動子。可用於本發明實踐之強細胞啟動子係細胞骨架基因之啟動子，例如，結蛋白啟動子(Kwissa等人, 2000, Vaccine 18(22): 2337-44)或肌動蛋白啟動子(Miyazaki等人, 1989, Gene 79(2): 269-77)。

關於用於質體及除痘病毒以外的病毒載體之多聚腺苷酸化信號

(polyA)，更多的可以使用牛生長激素(bGH)基因之聚(A)信號(參見U.S. 5,122,458)或兔 β -球蛋白基因之聚(A)信號或SV40病毒之聚(A)信號。

「宿主細胞」表示已藉由投與外源多核苷酸(例如重組質體或載體)經遺傳改變、或能夠遺傳改變之原核生物或真核細胞。當提及遺傳改變之細胞時，術語係指原本改變之細胞及其後代。

本發明中涵蓋之原核生物可包括鳥桿菌屬(*Avibacterium*)、布魯氏菌屬(*Brucella*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、嗜血桿菌屬(*Haemophilus*) (例如，豬型嗜血桿菌(*Haemophilus suis*))、沙門桿菌屬(*Salmonella*) (例如，腸炎沙門桿菌(*Salmonella enteritidis*)、鼠傷寒沙門桿菌(*Salmonella typhimurium*)、嬰兒沙門桿菌(*Salmonella infantis*))、乳酸乳球菌屬(*Lactococcus lactis*)、乳桿菌屬(*Lactobacillus*)、志賀桿菌屬(*Shigella*)、巴氏桿菌屬(*Pasteurella*)及瑞莫桿菌屬(*Rimeirella*)。

在原核系統中，有許多表現載體可選擇。該等載體包括(但不限於)多功能大腸桿菌選殖及表現載體，例如PBLUESCRIPT (Stratagene)及pET載體(Novagen)；piN載體(Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989))；及諸如此類；PGEX載體(Promega, Madison, Wis.)。在真核系統中，細胞株可係酵母(例如啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*))、桿狀病毒細胞、哺乳動物細胞、植物細胞。真核系統之表現載體包括(但不限於) pVR1020或pVT1012載體(Vical Inc., San Diego, CA)、PichiaPink載體(Invitrogen, CA, USA)、pFasBac TOPO載體(Invitrogen)。

使用方法及製造方法

在實施例中，本文所述之標的物係關於產生或製造抗原性多肽或抗

原之方法。該方法包含以下步驟：i) 將編碼抗原之多核苷酸連接至編碼E2蛋白之多核苷酸；ii) 在宿主中表現融合蛋白；及iii) 自宿主分離該融合蛋白。在一個實施例中，抗原連接至E2之N-末端。在另一實施例中，E2蛋白係來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌。

在另一實施例中，本文所述之標的物係關於對綿羊、牛、山羊或豬進行疫苗接種之方法，其包含向綿羊、牛、山羊或豬投與有效量之疫苗，該疫苗可包含有效量之重組體或融合或嵌合FMDV抗原或蛋白質及醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或媒劑。

在本發明之一個實施例中，方法包含單次投與根據本發明利用乳液調配之疫苗組合物。舉例而言，在一個實施例中，免疫或疫苗組合物包含包括多肽及VLP (類病毒顆粒)在內之FMDV抗原，而替代實施例提供包含FMDV-E2融合或嵌合蛋白之疫苗。電子顯微術指示FMDV-E2融合或嵌合蛋白產生類似於真實FMDV病毒體或VLP之FMDV-E2粒子，且因此本發明之免疫或疫苗組合物涵蓋包含FMDV-E2粒子之彼等。

在實施例中，本文所述之標的物係關於對綿羊、牛、山羊或豬進行疫苗接種之方法，其包含向綿羊、牛、山羊或豬投與綿羊、牛、山羊或豬FMDV抗原。在另一實施例中，本文所述之標的物係關於引發免疫反應之方法，其包含向綿羊、牛、山羊或豬投與包含綿羊、牛、山羊或豬FMDV抗原之疫苗。在另一實施例中，本文所述之標的物係關於保護及/或預防綿羊、牛、山羊或豬之疾病之方法，其包含向綿羊、牛、山羊或豬投與包含綿羊、牛、山羊或豬FMDV抗原之疫苗。

投與可係皮下或經肌內。投與可係無針的(例如Pigjet或Bioject)。

在本發明之一個實施例中，可採用初免-加強策略，其包含使用至少

一種共同多肽、抗原、表位或免疫原之至少一次初免投與及至少一次加強投與。通常，用於初免投與之免疫組合物或疫苗性質上不同於用作加強劑之彼等。然而，應注意相同組合物可用作初免投與及加強。此投與方案稱為「初免-加強」。

本發明之初免-加強可包括重組病毒載體，其用於表現編碼抗原性多肽或其片段或變體之FMDV編碼序列或其片段。具體而言，病毒載體可表現編碼抗原性多肽之FMDV基因或其片段。本文所涵蓋之病毒載體包括(但不限於)痘病毒[例如，牛痘病毒或經減毒牛痘病毒、鳥類痘病毒或經減毒鳥類痘病毒(例如，金絲雀痘、雞痘、鵠痘、鵠痘、鵠鵠痘、ALVAC、TROVAC；參見例如US 5,505,941、US 5,494,8070)、浣熊痘病毒、豬痘病毒等]、腺病毒(例如，人類腺病毒、犬腺病毒)、疱疹病毒(例如犬疱疹病毒、火雞之疱疹病毒、馬立克病(Marek's disease)病毒、傳染性喉氣管炎病毒、貓疱疹病毒、喉氣管炎病毒(ILTV)、牛疱疹病毒、豬疱疹病毒)、桿狀病毒、反轉錄病毒等。在另一實施例中，鳥類表現載體可係金絲雀痘載體，例如，ALVAC。在另一實施例中，鳥類表現載體可係雞痘載體，例如，TROVAC。欲表現之本發明FMDV抗原係插入於特定痘病毒啟動子(例如，桑燈蛾昆蟲病毒(entomopoxvirus *Amsacta moorei*)) 42K啟動子控制之下(Barcena等人2000, J Gen Virol 81(Pt 4): 1073-85)，尤其牛痘啟動子7.5 kDa (Cochran等人，1985, J Virol 54(1): 30-7)、牛痘啟動子I3L (Riviere等人，1992, J Virol 66(6): 3424-34)、牛痘啟動子HA (Shida, 1986, Virology 150(2): 451-62)、牛痘啟動子ATI (Funahashi等人，1988, J Gen Virol 69 (Pt 1): 35-47)、牛痘啟動子H6 (Taylor等人，1988, Vaccine 6(6): 504-8；Guo等人，1989, J Virol

63(10): 4189-98 ; Perkus等人, 1989, J Virol 63(9): 3829-36)。

在另一實施例中，鳥類表現載體可係金絲雀痘載體，例如，ALVAC。FMDV抗原、表位或免疫原可為FMDV P1-3C。表現FMDV抗原之病毒載體可為金絲雀痘病毒(例如vCP2186、vCP2181或vCP2176)、或雞痘病毒(例如vFP2215)(參見US 7,527,960)或腺病毒(US2016/0220659)。

本發明之初免-加強可包括在植物或藻類(參見US 2011/0236416)或昆蟲細胞(US2016/0220659)中產生之重組FMDV抗原或蛋白質。

在本發明初免-加強方案之另一態樣中，投與包含本發明FMDV抗原之組合物，隨後投與包含含有且活體內表現FMDV抗原之重組病毒載體之疫苗或組合物、或包含FMDV抗原之不活化病毒疫苗或組合物或含有或表現FMDV抗原、或在植物、藻類或昆蟲細胞中產生之重組FMDV抗原之DNA質體疫苗或組合物。同樣，初免-加強方案可包含投與包含含有且活體內表現FMDV抗原之重組病毒載體之疫苗或組合物、或包含FMDV抗原之不活化病毒疫苗或組合物或含有或表現FMDV抗原、或在植物、藻類或昆蟲細胞中產生之重組FMDV抗原之DNA質體疫苗或組合物，隨後投與包含本發明FMDV抗原之組合物。進一步應注意，初次及二次投與二者可包含含有本發明FMDV抗原之組合物。

初免-加強方案包含使用至少一種共同多肽及/或變體或其片段之至少一次初免投與及至少一次加強投與。用於初免投與之疫苗性質上可不同於用作隨後加強疫苗之彼等。初免投與可包含一或多次投與。類似地，加強投與可包含一或多次投與。

用於哺乳動物之靶標物種之組合物的劑量體積(例如基於病毒載體之

綿羊、牛、山羊或豬組合物之劑量體積，例如基於非-痘病毒-病毒-載體之組合物)通常介於約0.1 ml至約5.0 ml之間、介於約0.1 ml至約3.0 ml之間且介於約0.5 ml至約2.5 ml之間。

疫苗之效能可在最後一次免疫後約2至4週藉由利用FMDV之有毒菌株、有利地FMDV *O1 Manisa*、*O1 BFS*或*Campos*、*A24 Cruzeiro*、*Asia 1 Shamir*、*A Iran'96*、*A22 Iraq*、*SAT2 Saudi Arabia*菌株攻擊動物(例如綿羊、牛、山羊或豬)來測試。

其他菌株可包括FMDV 菌株A10-61、A5、A12、A24/Cruzeiro、C3/Indaial、O1、C1-Santa Pau、C1-C5、A22/550/Azerbaijan/65、SAT1-SAT3、A、A/TNC/71/94、A/IND/2/68、A/IND/3/77、A/IND/5/68、A/IND/7/82、A/IND/16/82、A/IND/17/77、A/IND/17/82、A/IND/19/76、A/IND/20/82、A/IND/22/82、A/IND/25/81、A/IND/26/82、A/IND/54/79、A/IND/57/79、A/IND/73/79、A/IND/85/79、A/IND/86/79、A/APA/25/84、A/APN/41/84、A/APS/44/05、A/APS/50/05、A/APS/55/05、A/APS/66/05、A/APS/68/05、A/BIM/46/95、A/GUM/33/84、A/ORS/66/84、A/ORS/75/88、A/TNAn/60/947/Asia/1、A/IRN/05、Asia/IRN/05、O/HK/2001、O/UKG/3952/2001、O/UKG/4141/2001、O/UKG/7039/2001、O/UKG/9161/2001、O/UKG/7299/2001、O/UKG/4014/2001、O/UKG/4998/2001、O/UKG/9443/2001、O/UKG/5470/2001、O/UKG/5681/2001、O/ES/2001、HKN/2002、O5India、O/BKF/2/92、K/37/84/A、KEN/1/76/A、GAM/51/98/A、A10/Holland、O/KEN/1/91、O/IND49/97、O/IND65/98、

O/IND64/98、O/IND48/98、O/IND47/98、O/IND82/97、O/IND81/99、
O/IND81/98、O/IND79/97、O/IND78/97、O/IND75/97、O/IND74/97、
O/IND70/97、O/IND66/98、O/IND63/97、O/IND61/97、O/IND57/98、
O/IND56/98、O/IND55/98、O/IND54/98、O/IND469/98、
O/IND465/97、O/IND464/97、O/IND424/97、O/IND423/97、
O/IND420/97、O/IND414/97、O/IND411/97、O/IND410/97、
O/IND409/97、O/IND407/97、O/IND399/97、O/IND39/97、
O/IND391/97、O/IND38/97、O/IND384/97、O/IND380/97、
O/IND37/97、O/IND352/97、O/IND33/97、O/IND31/97、
O/IND296/97、O/IND23/99、O/IND463/97、O/IND461/97、
O/IND427/98、O/IND28/97、O/IND287/99、O/IND285/99、
O/IND282/99、O/IND281/97、O/IND27/97、O/IND278/97、
O/IND256/99、O/IND249/99、O/IND210/99、O/IND208/99、
O/IND207/99、O/IND205/99、O/IND185/99、O/IND175/99、
O/IND170/97、O/IND164/99、O/IND160/99、O/IND153/99、
O/IND148/99、O/IND146/99、O/SKR/2000、A22/India/17/77。

該等FMDV菌株之其他細節可見於歐洲生物資訊學資訊(European Bioinformatics Information) (EMBL-EBI)網頁。

將同源及異源株二者用於攻擊，以測試疫苗效能。動物可藉由經真皮內、經皮下、噴霧、經鼻內、經眼內、經氣管內及/或經口來攻擊。

初免-加強投與可有利地以1至6週間隔實施。根據一實施例，亦設想有利地使用基於病毒載體之疫苗的半年加強或一年加強。

包含本發明之重組抗原性多肽用於初免-加強方案中之組合物包含於

醫藥上或獸醫學上可接受之媒劑、稀釋劑、佐劑或賦形劑中。本發明之方案保護動物免於綿羊、牛、山羊或豬FMDV及/或阻止受感染動物之疾病進展。

熟習此項技術者應理解，以實例方式提供本文揭示內容且本發明並不限於此。根據本文揭示內容及此項技術中之知識，熟習此項技術者可確定投與次數、投與途徑及用於每一注射方案之劑量，而無需過多試驗。

本發明涵蓋至少一次向動物投與有效量之根據本發明製造之治療組合物。動物可為雄性、雌性、懷孕的雌性及新生兒。此投與可經各種途徑，包括(但不限於)經肌內(IM)、真皮內(ID)或皮下(SC)注射或經鼻內或經口投與。根據本發明之治療組合物亦可藉由無針裝置投與(例如利用Pigjet、Dermojet、Biojector、Avijet (Merial, GA, USA)、Vetjet或Vitajet裝置(Bioject, Oregon, USA))。投與質體組合物之另一途徑係使用電穿孔(參見例如Tollefsen等人，2002；Tollefsen等人，2003；Babiuk等人，2002；PCT申請案第WO99/01158號)。

在一個實施例中，本發明提供用於在靶細胞中遞送及表現FMDV抗原或表位之治療有效量之調配物的投與。治療有效量本領域技術人員的。在一個實施方式中，製劑包括包含表達流感抗原或表位的多核苷酸的表達載體和藥學或獸醫學可接受的載質、媒質或賦形劑。在另一實施方式中，藥學或獸醫學可接受的載質、媒質或賦形劑輔助轉染或感染和/或改善載體或蛋白在宿主中的保留。治療有效量之確定係熟習此項技術者之常規實驗。在一個實施例中，調配物包含含有表現FMDV抗原或表位之多核苷酸的表現載體及醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、媒劑、佐劑或賦形劑。在另一實施例中，醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、媒劑、佐劑或賦形劑促

進多核苷酸至宿主動物之轉染或其他轉移途徑及/或改良載體或蛋白質於宿主中之保藏。

在一個實施例中，本文所述之標的物提供用於區分受感染與疫苗接種動物(DIVA)之檢測方法。

本文揭示本發明疫苗或組合物之使用允許檢測動物中之FMDV感染。本文揭示本發明疫苗或組合物之使用允許藉由區分受感染與疫苗接種動物(DIVA)來檢測動物中之感染。本文揭示用於使用FMDV免疫原性檢測方法(例如ELISA)診斷動物中之FMDV感染。

製造物件

在實施例中，本文所述之標的物係關於用於實施引發或誘導免疫反應之方法的套組，其可包含重組FMDV免疫組合物或疫苗、或不活化FMDV免疫組合物或疫苗、重組FMDV病毒組合物或疫苗中之任一者及實施該方法之說明書。

本發明之另一實施例係用於實施在動物中誘導針對FMDV之免疫性或保護性反應之方法的套組，其包含含有本發明FMDV抗原之組合物或疫苗及重組FMDV病毒免疫組合物或疫苗及用於實施遞送在動物中引發免疫反應之有效量之方法的說明書。

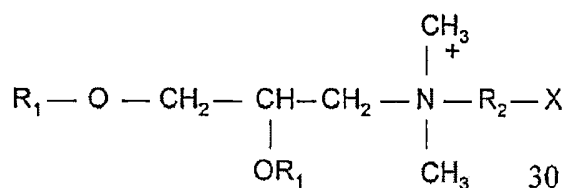
本發明之另一實施例係用於實施在動物中誘導針對FMDV之免疫性或保護性反應之方法的套組，其包含含有本發明FMDV抗原之組合物或疫苗及不活化FMDV免疫組合物或疫苗及用於實施遞送在動物中引發免疫反應之有效量之方法的說明書。

本發明之再一態樣係關於用於上述本發明初免-加強疫苗接種之套組。套組可包含至少兩種病毒：含有用於本發明之初免-疫苗接種之疫苗

或組合物的第一病毒及含有用於本發明之加強-疫苗接種之疫苗或組合物的第二病毒。套組可有利地含有額外的第一或第二病毒用於額外初免-疫苗接種或額外的加強-疫苗接種。

醫藥上或獸醫學上可接受之載劑或佐劑或媒劑或賦形劑已為熟習此項技術者熟知。舉例而言，醫藥上或獸醫學上可接受之載劑或媒劑或佐劑或賦形劑可為0.9% NaCl (例如，鹽水)溶液或磷酸鹽緩衝液。可用於本發明方法之其他醫藥上或獸醫學上可接受之載劑或媒劑或賦形劑包括(但不限於)聚-(L-麩胺酸鹽)或聚乙烷基吡咯啉酮。醫藥上或獸醫學上可接受之載劑或媒劑或佐劑或賦形劑可為促進載體(或自本發明載體活體外表現之蛋白質)之投與的任何化合物或化合物組合；載劑、佐劑、媒劑或賦形劑可促進載體(或蛋白質)之轉染及/或改良其保藏。劑量及劑量體積在本文之一般描述中討論，且亦可由熟習此項技術者自此揭示內容結合現有知識確定，而無需過多試驗。

含有四級銨鹽之陽離子脂質(其有利地但非唯一適於質粒)有利地係具有下式之彼等：



其中R1係具有12至18個碳原子之飽和或不飽和直鏈脂肪族基團，R2係含有2或3個碳原子之另一脂肪族基團且X係胺或羥基，例如DMRIE。在另一實施例中，陽離子脂質可與中性脂質(例如DOPE)締合。

在該等陽離子脂質中，較佳者係DMRIE (N-(2-羥基乙基)-N,N-二甲基-2,3-雙(十四烷基氧基)-1-丙烷銨；WO96/34109)，其有利地與中性脂質、有利地DOPE (二油醯基-磷脂醯基-乙醇胺；Behr, 1994)締合以形成

DMRIE-DOPE。

當DOPE存在時，DMRIE:DOPE莫耳比係約95:約5至約5:約95或約1:約1，例如1:1。

DMRIE或DMRIE-DOPE佐劑:質體重量比可介於約50:約1與約1:約10之間，例如約10:約1及約1:約5、及約1:約1及約1:約2，例如1:1及1:2。

在另一實施例中，醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、佐劑、賦形劑或媒劑可為油包水乳液。適宜油包水乳液之實例包括穩定且於4°C下為流體之基於油之油包水病毒乳液，其含有：6至50 v/v%含抗原之水相(較佳12至25 v/v%)、50至94 v/v%含總體或部分非可代謝油(例如，礦物油，例如石蠟油)及/或可代謝油(例如，植物油、或脂肪酸、多元醇或醇酯)之油相、0.2至20 p/v%表面活性劑(較佳3至8 p/v%)，後者總體或部分地、或以混合物形式為聚甘油酯(該聚甘油酯優選為聚甘油(聚)蓖麻醇酸酯)、或聚氧乙烯蓖麻毒蛋白油或氫化聚氧乙烯蓖麻毒蛋白油。可在油包水乳液中使用之表面活性劑的實施例包括乙氧基化山梨糖醇酐酯(例如，聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐單油酸酯(TWEEN 80®)，自AppliChem, Inc., Cheshire, CT購得)及山梨糖醇酐酯(例如，山梨糖醇酐單油酸酯(SPAN 80®)，自Sigma Aldrich, St. Louis, MO購得)。另外，關於油包水乳液，亦參見美國專利第6,919,084號。在一些實施例中，含抗原之水相包含含有一或多種緩衝劑之鹽水溶液。適宜緩衝溶液之實例係磷酸鹽緩衝鹽水。在有利的實施例中，油包水乳液可為水/油/水(W/O/W)三重乳液(美國專利第6,358,500號)。其他適宜乳液之實例闡述於美國專利第7,371,395號中。

本發明之免疫組合物及疫苗可包含一或多種佐劑或基本上由一或多種佐劑組成。適用於本發明實踐之佐劑係(1)丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合

物、馬來酸酐及烯基衍生物聚合物馬來酸酐，(2)具有一或多個非甲基化CpG單元之免疫刺激序列(ISS)，例如寡去氧核糖核苷酸序列(Klinman等人，1996；WO98/16247)，(3)水包油乳液，例如由M. Powell、M. Newman, Plenum Press 1995出版之「Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach」之第147頁闡述之SPT乳液及同一著作之第183頁闡述之乳液MF59，(4)含有四級銨鹽之陽離子脂質，例如DDA，(5)細胞介素，(6)氫氧化鋁或磷酸鋁，(7)皂素，或(8)所列舉且以引用的方式併入本申請案之任何文獻中所討論之其他佐劑，或(9)任何組合或其混合物。

水包油乳液(3)可基於以下：輕液體石蠟油(歐洲藥典類型(European pharmacopoeia type))、類異戊二烯油(例如，角鯊烷、角鯊烯)、由烯烴(例如，異丁烯或癸烯)寡聚產生之油、具有直鏈烷基之酸或醇之酯(例如，植物油、油酸乙酯、丙二醇、二(辛酸酯/癸酸酯)、甘油三(辛酸酯/癸酸酯)及丙二醇二油酸酯)或具支鏈脂肪醇或酸之酯、尤其異硬脂酸酯。

油係與乳化劑組合使用以形成乳液。乳化劑可為非離子型表面活性劑，例如一方面係山梨糖醇酐、二縮甘露醇(例如無水甘露醇油酸酯)、甘油、聚甘油或丙二醇之酯且另一方面係油酸、異硬脂酸、蓖麻醇酸或羥基硬脂酸之酯(該酯視情況經乙氧基化)或係聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物，例如，Pluronic，例如L121。一些乳液(例如，TS6、TS7、TS8及TS9乳液)闡述於US 7,608,279及US 7,371,395中。

丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合物(1)較佳經交聯，尤其與糖或多元醇之聚烯基醚交聯。該等化合物以名稱卡波姆(carbomer)已知(Pharmeuropa，第8卷，第2期，1996年6月)。熟習此項技術者亦可參考美國專利第2,909,462號，其提供藉由聚羥基化合物交聯之該等丙烯酸聚合物，該聚

羥基化合物具有至少3個、較佳不超過8個該等基團，至少3個羥基之氫原子由具有至少2個碳原子之不飽和脂肪族基團置換。較佳基團係含有2至4個碳原子之彼等，例如乙烯基、烯丙基及其他烯系不飽和基團。不飽和基團亦可含有諸如甲基等其他取代基。以名稱卡波普(Carbopol) (BF Goodrich, Ohio, USA)出售之產品尤其適合。其藉由烯丙基蔗糖或烯丙基新戊四醇交聯。在其中，提及卡波普974P、934P及971P。

在馬來酸酐及烯基衍生物之共聚物中，較佳係EMA™ 共聚物(Monsanto)，其係馬來酸酐與乙烯之共聚物且係直鏈或經交聯，例如與二乙烯基醚交聯。

可使用佐劑之比例已熟知且熟習此項技術者易於獲得。舉例而言，丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合物或馬來酸酐與烯基共聚物在最終疫苗組合物中之濃度應係0.01%至1.5% W/V、更特定0.05至1% W/V、較佳0.1至0.4% W/V。

在一個實施例中，佐劑可包括TS6 (US7,371,395)、LR2、LR3及LR4 (US7,691,368)、TSAP (US20110129494)、TRIGENT™ (Newport Labs)、合成 dsRNA (例如聚 -IC、聚 -ICLC [HILTONOL®]) 及 MONTANIDE™ 佐劑(W/O、W/O/W、O/W、IMS及凝膠；所有均由 SEPPIC生產)。

細胞介素(5)可以蛋白質形式存於免疫或疫苗組合物中，或可與免疫原或其表位共表現欲宿主中。較佳者係細胞介素藉由與表現免疫原或其表位之相同載體或藉由其單獨載體共表現。

本發明包含製備該等組合組合物；例如藉由將活性組份有利地混合在一起且與佐劑、載劑、細胞介素及/或稀釋劑混合。

可用於本發明之細胞介素包括(但不限於)顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、顆粒球/巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、干擾素 α (IFN α)、干擾素 β (IFN β)、干擾素 γ 、(IFN γ)、介白素-1 α (IL-1 α)、介白素-1 β (IL-1 β)、介白素-2 (IL-2)、介白素-3 (IL-3)、介白素-4 (IL-4)、介白素-5 (IL-5)、介白素-6 (IL-6)、介白素-7 (IL-7)、介白素-8 (IL-8)、介白素-9 (IL-9)、介白素-10 (IL-10)、介白素-11 (IL-11)、介白素-12 (IL-12)、腫瘤壞死因子 α (TNF α)、腫瘤壞死因子 β (TNF β)及轉形生長因子 β (TGF β)。應理解，細胞介素可與本發明之免疫或疫苗組合物共投與及/或依序投與。因此，例如，本發明之疫苗亦可含有在活體內表現適宜細胞介素(例如，與此欲進行疫苗接種或欲在其中引發免疫學反應之宿主匹配之細胞介素(例如，用於欲投與給豬之製劑的豬細胞介素))之外源性核酸分子。

本發明之免疫組合物及/或疫苗包含有效量之引發治療性反應之一或多種本文所討論之活體外表現多肽，或基本由其組成或由其組成；且有效量可根據此揭示內容(包括本文所併入之文獻)及此項技術中之知識來確定，而無需過多試驗。

組合物或疫苗可含有約 10^2 至約 10^{20} 、約 10^3 至約 10^{18} 、約 10^4 至約 10^{16} 、約 10^5 至約 10^{12} 之劑量之在活體外或活體內自病毒載體、質體或桿狀病毒產生之VLP (類病毒顆粒)。病毒載體可基於任何病毒滴定方法來滴定，其包括(但不限於) FFA (灶形成分析)或FFU (灶形成單元)、TCID₅₀ (50%組織培養感染劑量)、PFU (噬菌斑形成單位)及FAID₅₀ (50%螢光抗體感染劑量)，且活體外產生之VLP (例如質體或桿狀病毒)可藉由血球凝集分析、ELISA及電子顯微術來滴定。視VLP之類型而定，其他方法亦可適用。

劑量體積可介於約0.1 ml與約10 ml之間、介於約0.2 ml與約5 ml之間。

現將經由以下非限制性實例進一步闡述本發明。

實例

DNA插入物、質體及重組病毒載體之構築係使用J. Sambrook等人 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2014)闡述標準分子生物技術之實施。

實例1 FMDV-E2融合蛋白之選殖及表現

將來自O1 Manisa血清型之FMDV VP1基因(編碼SEQ ID NO:2之SEQ ID NO:1)藉由PCR擴增並選殖於pET30b載體(Novagen)中。所得質體pPX216含有FMDV-E2融合蛋白，其在5'端具有FMDV VP1基因且在3'端具有E2基因(編碼SEQ ID NO:4之SEQ ID NO:3)之核心結構域。

將來自A24血清型之FMDV VP1基因(編碼SEQ ID NO:8之SEQ ID NO:7)藉由PCR擴增並選殖於pET30b載體(Novagen)中。所得質體pPX236含有FMDV-E2融合蛋白，其在5'端具有FMDV VP1基因且在3'端具有E2基因(編碼SEQ ID NO:4之SEQ ID NO:3)之核心結構域。

將來自亞洲Shamir血清型之FMDV VP1基因(編碼SEQ ID NO:14之SEQ ID NO:13)藉由PCR擴增並選殖於pET30b載體(Novagen)中。所得質體pPX237含有FMDV-E2融合蛋白，其在5'端具有FMDV VP1基因且在3'端具有E2基因(編碼SEQ ID NO:4之SEQ ID NO:3)之核心結構域。

藉由所產生構築體及相應空載體轉形化學勝任表現菌株BLR(DE3) (Novagen)。根據製造商說明書使細菌生長。將培養物於3200 g 4°C下離

心15 min。將上清液與沈澱物分離。將沈澱物重懸浮於一定體積之緩衝液中：50 mM Tris-HCl緩衝劑pH 8、300 mM NaCl、2mM MgCl₂、1 µg/mL亮抑肽酶、1 µg/mL胃酶抑素及0.1 mg/mL溶菌酶，以達到8.0之最終OD_{600nm}。藉由3個冷凍/解凍循環實施細胞溶解。將溶解產物與1 µL全能核酸酶(Benzonase Nuclease)(Novagen)/升培養物一起於4℃下培育15分鐘。將10 µL來自溶解產物之蛋白質藉由SDS-PAGE 4-12% Bistris電泳、隨後考馬斯藍(Coomassie blue)染色及西方墨點分析進行分析以測定表現程度。對於每一條件，分析兩種純系。

FMDV-E2融合蛋白係作為無His標籤之不可溶部分產生並在重摺疊之前藉由IEX及SEC進一步純化。西方墨點及圓點墨點(參見圖3)顯示FMDV-E2融合蛋白產生正確大小且所表現FMD-E2與利用FMDV疫苗進行疫苗接種之豬血清反應。

實施FMDV-E2奈米粒子之物理及生物化學表徵，如圖4及5中所示。藉由電子顯微術針對奈米粒子結構之存在檢查所表現抗原。圖4A顯示僅E2之蛋白質的粒子。圖4B顯示E2-FMDV-E2融合蛋白之粒子。圖4C顯示cdE2-FMDV蛋白之粒子，其含有2:1比率之單獨E2蛋白與FMDV-E2融合蛋白之混合物。結果證明FMDV-E2融合形成類似於野生型E2核心結構域之60聚體粒子。

使用間接ELISA測試藉由三種對FMDV粒子具有不同特異性之抗FMDV VHH奈米抗體(146S之完整衣殼，或變性衣殼 = 12S次蛋白衣)進一步評價奈米粒子之識別(參見表1)。

表1 FMDV VHH奈米抗體

生物素化之奈米抗體	血清型	所識別之FMDV粒子
VHH M8	O1M特異性	50% 146S / 50% 12S

VHH M170	O1M特異性	100% 146S粒子
VHH M3	所有血清型	100% 12S粒子

結果(參見圖5)顯示，特定針對FMDV O1M 146S完整衣殼之M170 VHH奈米抗體僅在嵌合肽融合至E2蛋白並組裝成奈米粒子時才獲得強信號。此指示，嵌合FMDV VP1肽以與在野生型FMDV病毒顆粒上相同之構象展示於E2奈米粒子上。

實例2 經疫苗接種動物之臨床及血清學研究

實例2.1 O1 Manisa疫苗之臨床及血清學研究

該研究之目的係評價中FMD O1 Manisa疫苗在普通豬中之免疫原性。將疫苗於TS6及聚丙烯酸聚合物調配物中進行測試。每一調配物係以兩次注射間隔三週(D0 – D21)投與給豬(參見表2)。豬在D0時為8-9週齡。藉助血清學研究及細胞介導之免疫性(CMI)分析(D27, D42)評價免疫原性，如表3中所列舉。所監測之參數包括：在用於隨機化之D1及安樂死之前之D42時之體重、在D1、D20及D42時之血清學、在D27及D42時之CMI分析、臨床症狀(自D1至D21及D21至D23之全身反應)及豎著位點處之局部反應(D0至D2及D21至D23)。

表2 在D0及D21時O1 Manisa疫苗兩次注射之疫苗接種方案

群組	抗原	佐劑	Ag ug/ 劑量	體積/ 劑量	在D0 時注射	在D21 時注射
G1 (n=6)	表現於大腸桿菌中之A24 之VP1的FMDV B1-B2表 位	TS6*	100	1mL	IM – 頸部左 側	IM -頸 部右側
G2 (n=6)	FMDV-E2抗原(FMDV- E2融合粒子)	TS6	394	1mL		
G3 (n=6)	E2+ FMDV-E2	TS6	394	1mL		

G4 (n=6)	FMDV-E2抗原(FMDV-E2融合粒子)	聚丙烯酸聚合物	394	1mL		
G5 (n=3)	未處理對照	/	/	/		

TS6*：TS6 佐劑/乳液，如US 7,608,279及US 7,371,395中所述

表2.1 TS6乳液(US 7,608,279及US 7,371,395中所述之預乳液)

油相(120 ml)	
山梨糖醇酐單油酸酯(SPAN 80 [®])	1.8% w/v
山梨糖醇酐三油酸酯(20 OE) (TWEEN 85 [®])	10.2% w/v
石蠟油(MARCOL 82 [®])	88% v/v
水相(120 ml)	
20% (w/v)山梨糖醇酐單油酸酯溶液(20 OE) (TWEEN 80 [®])	11.25% w/v
磷酸二鈉及單鉀0.02M等滲緩衝液(pH7.8)	85.75% v/v
硫柳汞酸鈉(Thionersal [®])，1%於水中	1.5% v/v

表3 細胞免疫反應監測

分析	PBMC再刺激	D27	D42
IFN γ ELISPOT	活性成份： -不活化AI O1 Manisa -不活化貓杯狀病毒(陰性對照)	X	X
	蛋白質： -肽FMDV單獨 -蛋白質FMDV-E2 -蛋白質E2+FMDV-E2 -蛋白質GapC (貓杯狀病毒，陰性對照)	X	X
LUMINEX細胞介素	蛋白質： -肽FMDV單獨 -蛋白質FMDV-E2		X

	-蛋白質E2+FMDV-E2 -蛋白質GapC			
漿細胞	板用以下塗覆： -不活化AI O1 Manisa -不活化貓杯狀病毒(陰性對照) -肽FMDV單獨 -蛋白質FMDV-E2 -蛋白質E2+FMDV-E2 -蛋白質GapC		x	
記憶B細胞	利用FMDV-E2再刺激7天	板用以下塗覆： -肽FMDV單獨 -蛋白質FMDV-E2 -蛋白質E2+FMDV-E2 -蛋白質GapC		x

血清學結果顯示於表4及圖11中。

表4 FMDV O1 Manisa血清中和(SN)

陽性動物之數目，藉由SN					
日期	G1	G2	G3	G4	G5
D1	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3
D20	3*/6	1*/6	1+3*/6	2*/6	0/3
D42	3+3*/6	6/6	5+1*/6	1+3*/6	1*/3

*：不確定效價

表3及圖10中之結果顯示存在有利於組G2及G3之組間顯著差異(p=0.001)。

圖6及7中之結果顯示在所有FMDV-E2組中檢測到特定漿細胞，其中G1 (僅FMDV)具有極弱反應。與G3及G4相比，利用G2獲得較好反應。G2組使用FMDV-E2塗層顯示顯著反應。

圖8及9顯示所有疫苗接種組使用任何再刺激均檢測到特異性IFN γ 反應，其中所有組使用FMDV-E2再刺激檢測到最高IFN γ 反應。

圖10顯示利用蛋白質FMDV-E2再刺激7天後之結果(分泌記憶B細胞之抗體的數目)。結果顯示所有FMDV-E2組均檢測到特異性B細胞，且G1(僅FMDV)之反應弱。與G3及G4相比，利用G2獲得較好的反應。使用塗層FMDV肽及AI O1M獲得較低或無反應。在使用FMDV-E2塗層之組G2及G3中獲得最好的結果。

總之，O1M疫苗誘導體液性及細胞性反應以及強、血清型特異性、中和抗體反應、特異性IFN γ 反應之一致比例、記憶B細胞之存在，此指示良好的保護免於同源及異源FMDV感染之程度。在血清學上藉由FMDV血清中和測試且免疫上藉助細胞免疫反應分析評價所測試產物之效能。利用TS6輔助之FMDV-E2粒子獲得最佳結果。

在FMDV研究領域中已知，呈現真正FMD構象表位之完全組裝病毒體或VLP係動物中FMD保護所需的。ELISA結果顯示，與E2+ FMDV-E2或FMDV肽單獨相比，FMDV-E2粒子產生類似於病毒體表面構象。結果證明在三個候選者中，FMDV-E2在誘導中和抗體方面最佳。總之，結果指示FMDV-E2融合蛋白可引發足以保護免於FMDV攻擊之免疫反應。

實例2.2 A24 Cruzeiro及Asia1 Shamir疫苗之臨床及血清型研究

該研究之目的係評價A24 Cruzeiro及Asia1 Shamir疫苗在普通豬中之免疫原性。在動物中藉由疫苗接種攻擊針對FMDV病原體評估由組合物或疫苗誘導之保護性效能。保護性效應係藉由臨床觀察及/或特定病原體在組織及血液中之病毒負荷來評價。在各個階段獲得來自經疫苗接種動物之血液試樣並針對血清學及CMI分析進行測試。結果顯示，本發明之組合物

或疫苗係免疫原性的且在動物中提供保護。

* * * * *

儘管已如此詳細地闡述本發明之實施例，但應理解，由上述段落界定之本發明並不限於上文說明中所闡釋之特定細節，此乃因在不背離本發明之精神或範圍之情形下，許多明顯改良係可能的。

在申請案所引用文獻中所引用或參考之所有文獻、及本文中所引用或參考之所有文獻(「本文引用之文獻」)、及在本文所引用之文獻中所引用或參考之所有文獻以及本文中或以參考方式併入本文之任何文獻中所提及之任何產品之任何製造商說明書、說明、產品說明書及產品頁均以參考方式併入本文中，且可用於本發明之實踐中。

【序列表】

<110> 美商梅里亞有限公司
真 克利斯多夫 亞多納特
費德里克 瑞那德
娜塔莉亞 波姆西
賽西 西葛悠克勞

<120> FMDV 及 E2 融合蛋白及其用途

<130> MER 15-283.PCT

<150> 62/259,043

<151> 2015-11-23

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 246

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 編碼對應於 FMDV O1 Manisa 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原之多核苷酸

<400> 1

```
atggaaaatt atggiggtga aaccagggt cagcgtcgtc agcataccga tgtagcttt      60
attctggatc gttttgttaa agtgaccccg tataatggca atagcaaata tggatgatggc    120
accgttgcaa atgttcgtgg tgatctgcag gttctggcac agaaagcagc acgtgcactg    180
ccgaccagtc cggatcaggg acgicataaa cagaaaattg ttgcaccggt taaacagctg    240
ctgtaa                                           246
```

<210> 2

<211> 81

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對應於 FMDV O1 Manisa 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原

<400> 2

```
Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr
1           5           10           15
Asp Val Ser Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Tyr Asn
20          25          30
Gly Asn Ser Lys Tyr Gly Asp Gly Thr Val Ala Asn Val Arg Gly Asp
35          40          45
Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Ala Leu Pro Thr Ser Pro
50          55          60
```

Asp Gln Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Leu
65 70 75 80

Leu

<210> 3
<211> 768
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之 E2 之連接體及核心 C 末端催化結構域的多核苷酸序列

```
<400> 3
aagcttgcag cagcagaaga aaaagcagca ccggcagcag caaaaccggc aaccaccgaa      60
ggatgaatttc cggaaacccg tgaanaaatg agcggatattc gtcgtgcaat tgcanaagca      120
atggttcata gcaaacatac cgcaccgcac gttaccctga tggatgaagc agatgttacc      180
aaactgggttg cccaccgcaa aaaattcaaa gcaattgcag cagagaaagg cattaaactg      240
accittctgc cgtatgttgt taaagcactg gttacgcac tgcgtgaata tccggttctg      300
aataccagca ttgatgatga aaccgaagag atcatccaga aacactatta caatatggc      360
attgcagcag ataccgatcg tggctgctg gttccggta ttaaacaatgc agatcgtaaa      420
ccgatttttg caetggccca agaaattaat gaactggcag aaaaagcacg tgaatgtaaa      480
ctgacaccgg gtgaatgaa aggtgcaagc tgtaccatta caaatatigg tagtgccggt      540
ggicagtggt ttacaccggt tattaatcat ccggaagttg ccattctggg tatgtgtcgt      600
attgcagaaa aaccgattgt tegtatggt gaaattgtg cagcaccgat gctggcactg      660
agcctgagct ttgatcatcg tatgatgat ggtgcaaccg cacagaaagc actgaatcat      720
attaaacgtc tctgagcga tccggaactg ctgctgatgg aagcatga      768
```

<210> 4
<211> 255
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之 E2 之連接體及核心 C 末端催化結構域的蛋白質序列

<400> 4

Lys Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys Pro
1 5 10 15

Ala Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser Gly
20 25 30

Ile Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr Ala
35 40 45

Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val Ala
50 55 60

His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys Leu
65 70 75 80

Thr Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg Glu
85 90 95

Tyr Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile Ile
100 105 110

Gln Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg Gly
115 120 125

Leu Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe Ala
130 135 140

Leu Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly Lys
145 150 155 160

Leu Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn Ile
165 170 175

Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro Glu
180 185 190

Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val Arg
195 200 205

Asp Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser Phe
210 215 220

Asp His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn His
225 230 235 240

Ile Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala
245 250 255

<210> 5
<211> 1011
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼 FMDV-E2 融合蛋白之多核苷酸

<400> 5
atggaaaatt atggttggtga aaccaggtt cagcgtcgtc agcataccga tgitagcttt 60
attctggaic gttttgttaa agtgaccccg tataatggca atagcaata tggatgagc 120
accgttgcaa atgttcgtgg tgatctgcag gttctggcac agaaagcagc acgtgcactg 180

```

ccgaccagtc cggatcaggc acgtcataaa cagaaaattg ttgcaccggt taaacagctg      240
ctgaagcttg cagcagcaga agaaaaagca gcaccggcag cagcaaaacc ggcaaccacc      300
gaaggtgaat ttccggaaac ccgtgaaaaa atgagcggta ttctcgtgc aattgcaaaa      360
gcaatggttc atagcaaca taccgcaccg catgttacc tcatggatga agcagatgtt      420
accaaactgg ttgccaccg caaaaaattc aaagcaattg cagcagagaa aggcattaaa      480
ctgacctttc tgcctatgt tgttaagca ctggttagcg cactgcgtga atatccggtt      540
ctgaatacca gcatgatga tgaaccgan gagatcatcc agaaacacta ttacaatatt      600
ggcattgcag cagataccga tctgtgtctg ctggttccgg ttattaaaca tgcagatcgt      660
aaaccgattt ttgcactggc ccaagaaatt aatgaactgg cagaaaaagc acgtgatggt      720
aaactgacac cgggtgaat gaaagggtga agctgtacca ttacaatat tggtagtgcc      780
ggtgttcagt ggtttacac ggttattaat catccggaag ttgccattct ggttatiggt      840
cgtattgcag aaaaaccgat tgttcgtgat ggtgaaattg ttgcagcacc gatgtcggca      900
ctgagcctga gctttgatca tctatgatg gatgttgcaa ccgcacagaa agcactgaat      960
catattaaac gtctgtctg cgatccgga ctcgtctga tggagcatg a      1011

```

<210> 6
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FMDV-E2 融合蛋白序列

<400> 6

```

Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Val Gln Arg Arg Gln His Thr
1           5           10          15

```

```

Asp Val Ser Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Val Thr Pro Tyr Asn
20          25          30

```

```

Gly Asn Ser Lys Tyr Gly Asp Gly Thr Val Ala Asn Val Arg Gly Asp
35          40          45

```

```

Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Ala Ala Arg Ala Leu Pro Thr Ser Pro
50          55          60

```

```

Asp Gln Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Leu
65          70          75          80

```

```

Leu Lys Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys
85          90          95

```

```

Pro Ala Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Gln Thr Arg Glu Lys Met Ser
100         105         110

```

Gly Ile Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr
115 120 125

Ala Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val
130 135 140

Ala His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys
145 150 155 160

Leu Thr Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg
165 170 175

Glu Tyr Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile
180 185 190

Ile Gln Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg
195 200 205

Gly Leu Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe
210 215 220

Ala Leu Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly
225 230 235 240

Lys Leu Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn
245 250 255

Ile Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro
260 265 270

Glu Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val
275 280 285

Arg Asp Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser
290 295 300

Phe Asp His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn
305 310 315 320

His Ile Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala
325 330 335

<210> 7

<211> 246

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pET30b 中編碼對應於 FMDV A24 菌株之 VP1 之合成 FMDV 抗原的多核苷酸

<400> 7

```

atggaaaatt atgggtgga aaccagatt cagcgtcgtc atcataccga tattggcttt      60
attatggatc gcttcgtgaa aatccagagc tataatggca ccagcaaata tgcagttggt      120
ggtagcggtc gtcgtggtga tatgggtagc ctggcagcac gtgtgtgtaa acagctgcct      180
gcaagcgita gcagccagga tcgtcataaa cagaaaatta tcgcaccggc aaaacaactg      240
ctgtga                                          246

```

<210> 8
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pET30b (pPX238)中對應於 FMDV A24 菌株之 VP1 之合成 FMDV 抗原

<400> 8

```

Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr
1          5          10          15

```

```

Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Tyr Asn
20          25          30

```

```

Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met
35          40          45

```

```

Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Val Ser
50          55          60

```

```

Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu
65          70          75          80

```

Leu

<210> 9
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pET30b (pPX236)中編碼 FMDV (FMDV A24 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白之
 多核苷酸

```

<400> 9
atggaaaatt atgggtgga aaccagatt cagcgtcgtc atcataccga tattggcttt      60
attatggatc gcttcgtgaa aatccagagc tataatggca ccagcaaata tgcagttggt      120
ggtagcggtc gtcgtggtga tatgggtagc ctggcagcac gtgtgtgtaa acagctgcct      180
gcaagcgita gcagccagga tcgtcataaa cagaaaatta tcgcaccggc aaaacaactg      240
ctgaagcttg cagcagcaga agaaaaagca gcaccggcag cagcaaaacc ggcaaccacc      300
gaaggtgaat ttccggaaac ccgtgaaaaa atgagcggta ttcgtcgtgc aattgcanaa      360

```

```

gcaatggttc atagcaaaac taccgcaccg catgttacc tgaaggatga agcagatggt 420
accaaactgg ttgccaccg caaaaaattc aaagcaatig cagcagagaa aggcattaaa 480
ctgaccttcc tgcgtaatgt tgttaaagca ctggttagcg cactgcgtga atatccggtt 540
ctgaatacca gcaatgatga tgaaccgaa gagatcatcc agaaacacta ttacaatatt 600
ggcattgcag cagataccga tcgtggctcg ctggttccgg ttattaaaca tgcagatcgt 660
aaaccgattt ttgcactggc ccaagaaatt aatgaactgg cagaaaaagc acgtgatggt 720
aaactgacac cgggtgaaat gaaaggigca agctgtacca ttacaaatat tggtagtgcc 780
ggtggtcagt ggtttacacc ggtttattaat catccggaag ttgccattct gggatttggt 840
cgtattgcag aaaaaccgat tgttcgtgat ggtgaaatg ttgcagcacc gatgcaggca 900
ctgagcciga gctttgatca tcgtatgatt gatggtgcaa ccgcacagaa agcactgaat 960
catattaaac gtctgtgag cgatccggaa ctgctgtcga tggaaagcatg a 1011

```

<210> 10
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pET30b (pPX236)中 FMDV (FMDV A24 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白

<400> 10

Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Ile Gln Arg Arg His His Thr
1 5 10 15

Asp Ile Gly Phe Ile Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Gln Ser Tyr Asn
20 25 30

Gly Thr Ser Lys Tyr Ala Val Gly Gly Ser Gly Arg Arg Gly Asp Met
35 40 45

Gly Ser Leu Ala Ala Arg Val Val Lys Gln Leu Pro Ala Ser Val Ser
50 55 60

Ser Gln Asp Arg His Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys
85 90 95

Pro Ala Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser
100 105 110

Gly Ile Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr
115 120 125

Ala Pro His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val
130 135 140

Ala His Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys
145 150 155 160

Leu Thr Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg
165 170 175

Glu Tyr Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile
180 185 190

Ile Gln Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg
195 200 205

Gly Leu Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe
210 215 220

Ala Leu Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly
225 230 235 240

Lys Leu Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn
245 250 255

Ile Gly Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro
260 265 270

Glu Val Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val
275 280 285

Arg Asp Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser
290 295 300

Phe Asp His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn
305 310 315 320

His Ile Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala
325 330 335

<210> 11
<211> 240
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pET30b (pPX239)中編碼對應於FMDV Asia Shamir 菌株之 VP1 之合成FDMV
抗原之多核苷酸

<400> 11
atggaaaatt atgggtgga aaccagacc gcacgtcgtc tgcataccga tgttgcattt 60
attctggatc gttttgtaa actgaccgcc tataatggta aaaccgccta tggtagaaca 120
accagccgtc gtggtgatat ggcagcactg gcacagcgtc tgagcgcacg tctgccgacc 180

agcaccaccc aggatcgtcg taaacaagaa attattgcac cggaaaaaca ggtgctgtga 240

<210> 12
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> pET30b (pPX239)中對應於 FMDV 菌株之 Asia Shamir VP1 之合成 FDMV 抗原

<400> 12

Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr
 1 5 10 15

Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Tyr Asn
 20 25 30

Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala
 35 40 45

Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Thr Thr Gln
 50 55 60

Asp Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu
 65 70 75

<210> 13
 <211> 1005
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> pET30b (pPX237)中編碼 FMDV (FMDV Asia Shamir 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白之多核苷酸

<400> 13

atggaaaatt atggtggtga aaccagacc gcacgtcgtc tgcataccga tgttgcat	60
attctggatc gttttgttaa actgaccgcc tataatggta aaaccgccia tggatgaaaca	120
accagccgtc gtggtgatal ggcagcactg gcacagcgtc tgagcgcacg tctgccgacc	180
agcaccaccc aggatcgtcg taaacaagaa attattgcac cggaaaaaca ggtgctgaag	240
cttcagcagc cagaagaaaa agcagcaccg gcagcagcaa aaccggcnac caccgaaggt	300
gaatttccgg aaaccctga aaaaatgagc ggtattcgtc gtgcaattgc aaaagcaatg	360
gttcatagca aacataccgc accgcatgtt acctgatgg atgaagcaga tgttaccana	420
ctggttgccc accgcaaaaa attcaagca attgcagcag agaaaggcat taaactgacc	480
ttctgccgt atgttgttaa agcactgggt agcgcactgc gtgaatatcc gggtctgaat	540
accagcattg atgatgaac cgaagagatc atccagaaac actatfacaa tattggcaat	600
gcagcagata ccgatcgtgg tctgctgggt ccggttatta aacatgcaga tcgtaaaccg	660

atttttcac tggcccaaga aattaatgaa ctggcagaaa aagcacgiga tggtaaactg 720
 acaccgggtg aaatgaaagg tgcaagctgt accattacaa atattggtag tgccggtggt 780
 cagtggttta caccggttat taatcatccg gaagtggcca ttctgggtat tggtcgtatt 840
 gcagaaaaac cgattggtcg tgatggigaa attgttcag caccgatgct ggcactgagc 900
 ctgagctttg atcatcgtaf gattgatggt gcaaccgcac agaaagcact gaatcatatt 960
 aaacgtctgc tgagcgatcc ggaactgctg ctgatggaag catga 1005

<210> 14
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> pET30b (pPX237)中 FMDV (FMDV Asia Shamir 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白

<400> 14

Met Glu Asn Tyr Gly Gly Glu Thr Gln Thr Ala Arg Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Asp Val Ala Phe Ile Leu Asp Arg Phe Val Lys Leu Thr Ala Tyr Asn
20 25 30

Gly Lys Thr Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Ser Arg Arg Gly Asp Met Ala
35 40 45

Ala Leu Ala Gln Arg Leu Ser Ala Arg Leu Pro Thr Ser Thr Thr Gln
50 55 60

Asp Arg Arg Lys Gln Glu Ile Ile Ala Pro Glu Lys Gln Val Leu Lys
65 70 75 80

Leu Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys Pro Ala
85 90 95

Thr Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser Gly Ile
100 105 110

Arg Arg Ala Ile Ala Lys Ala Met Val His Ser Lys His Thr Ala Pro
115 120 125

His Val Thr Leu Met Asp Glu Ala Asp Val Thr Lys Leu Val Ala His
130 135 140

Arg Lys Lys Phe Lys Ala Ile Ala Ala Glu Lys Gly Ile Lys Leu Thr
145 150 155 160

Phe Leu Pro Tyr Val Val Lys Ala Leu Val Ser Ala Leu Arg Glu Tyr
165 170 175

Pro Val Leu Asn Thr Ser Ile Asp Asp Glu Thr Glu Glu Ile Ile Gln
180 185 190

Lys His Tyr Tyr Asn Ile Gly Ile Ala Ala Asp Thr Asp Arg Gly Leu
195 200 205

Leu Val Pro Val Ile Lys His Ala Asp Arg Lys Pro Ile Phe Ala Leu
210 215 220

Ala Gln Glu Ile Asn Glu Leu Ala Glu Lys Ala Arg Asp Gly Lys Leu
225 230 235 240

Thr Pro Gly Glu Met Lys Gly Ala Ser Cys Thr Ile Thr Asn Ile Gly
245 250 255

Ser Ala Gly Gly Gln Trp Phe Thr Pro Val Ile Asn His Pro Glu Val
260 265 270

Ala Ile Leu Gly Ile Gly Arg Ile Ala Glu Lys Pro Ile Val Arg Asp
275 280 285

Gly Glu Ile Val Ala Ala Pro Met Leu Ala Leu Ser Leu Ser Phe Asp
290 295 300

His Arg Met Ile Asp Gly Ala Thr Ala Gln Lys Ala Leu Asn His Ile
305 310 315 320

Lys Arg Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Leu Leu Met Glu Ala
325 330

<210> 15
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> E2之連接體

<400> 15

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Ala Ala Pro Ala Ala Ala Lys Pro Ala Thr
1 5 10 15

Thr Glu Gly Glu Phe Pro Glu Thr Arg Glu Lys Met Ser Gly Ile Arg
20 25 30

Arg Ala Ile Ala Lys Ala
35

201726708

【發明摘要】

【中文發明名稱】

FMDV及E2融合蛋白及其用途

【英文發明名稱】

FMDV AND E2 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

【中文】

本發明涵蓋FMDV疫苗或組合物。該疫苗或組合物可為含有FMDV抗原之疫苗或組合物。本發明亦涵蓋編碼及表現FMDV抗原、表位或免疫原之重組體載體，其可用於保護動物、尤其綿羊、牛、山羊或豬免於FMDV。本發明進一步涵蓋製造或產生抗原性多肽或抗原之方法。

【英文】

The present invention encompasses FMDV vaccines or compositions. The vaccine or composition may be a vaccine or composition containing FMDV antigens. The invention also encompasses recombinant vectors encoding and expressing FMDV antigens, epitopes or immunogens which can be used to protect animals, in particular ovines, bovines, caprines, or swines, against FMDV. The invention further encompasses methods of making or producing antigenic polypeptides or antigens.

【指定代表圖】

圖7

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種組合物，其包含FMDV抗原或多肽。

【第2項】

如請求項1之組合物，其中該FMDV抗原係FMDV-E2融合蛋白。

【第3項】

如請求項2之組合物，其中該FMDV-E2融合蛋白與具有如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12或14中所述序列的多肽具有至少90%序列一致性。

【第4項】

如請求項1之組合物，其中該FMDV抗原與具有如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12或14中所述序列的多肽具有至少90%序列一致性。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之組合物，其中該FMDV抗原部分地經純化。

【第6項】

如請求項1至4中任一項之組合物，其中該FMDV抗原實質上經純化。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之組合物，其中該FMDV抗原係由與如SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11或13中所述序列具有至少70%序列一致性之多核苷酸編碼。

【第8項】

如請求項1至7中任一項之組合物，其進一步包含醫藥上或獸醫學上可接受之載劑、賦形劑、佐劑或媒劑。

【第9項】

一種對易感綿羊、牛、山羊或豬FMDV之宿主進行疫苗接種、或保護或阻止該宿主免於FMDV感染或在宿主中引發保護性免疫反應之方法，其包含至少一次投與如請求項1至8中任一項之組合物。

【第10項】

如請求項9之方法，其中該方法包含初免-加強投與策略。

【第11項】

如請求項10之方法，其中該初免-加強投與包含如請求項1至8中任一項之組合物之初免投與及以下之加強投與：包含含有且在活體內表現FMDV抗原之重組病毒載體之疫苗或組合物、或包含該FMDV抗原之不活化病毒疫苗、或含有或表現該FMDV抗原之DNA質體疫苗或組合物或在植物或藻類中產生之重組FMDV抗原。

【第12項】

如請求項10之方法，其中該初免-加強投與包含以下之初免投與：包含含有且在活體內表現FMDV抗原之重組病毒載體之疫苗或組合物、或包含該FMDV之不活化病毒疫苗、或含有或表現該FMDV抗原之DNA質體疫苗或組合物或在植物或藻類中產生之重組FMDV抗原，以及如請求項1至8中任一項之組合物之加強投與。

【第13項】

如請求項10之方法，其中該初免-加強投與包含如請求項1至8中任一項之組合物之初免投與及如請求項1至8中任一項之組合物之加強投與。

【第14項】

如請求項9至13中任一項之方法，其中該宿主係綿羊、牛、山羊或豬。

【第15項】

一種實質上經純化FMDV抗原或多肽，其與具有如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12或14中所述序列之多肽具有至少90%序列一致性。

【第16項】

一種實質上經純化FMDV-E2融合蛋白，其與具有如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12或14中所述序列之多肽具有至少90%序列一致性。

【第17項】

一種質體，其包含編碼與如SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12或14中所述序列具有至少90%序列一致性之多肽的多核苷酸。

【第18項】

如請求項17之質體，其中該多核苷酸與如SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11或13中所述之多核苷酸序列具有至少70%序列一致性。

【第19項】

一種宿主細胞，其經如請求項17之質體轉形。

【第20項】

一種產生抗原之方法，其包含以下步驟：i) 將編碼該抗原之多核苷酸連接至編碼E2蛋白之多核苷酸；ii) 在宿主中表現融合蛋白；及iii) 自該宿主中分離該融合蛋白。

【發明圖式】

SEQ ID NO:	類型	基因說明
1	DNA	編碼對應於 FMDV O1 Manisa 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原之多核苷酸
2	蛋白質	對應於 FMDV O1 Manisa 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原
3	DNA	編碼來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之 E2 的多核苷酸
4	蛋白質	來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之 E2
5	DNA	編碼 FMDV (FMDV O1 Manisa 之合成 VP1)-E2 融合蛋白之多核苷酸
6	蛋白質	FMDV (FMDV O1 Manisa 之合成 VP1)-E2 融合蛋白
7	DNA	編碼對應於 FMDV A24 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原之多核苷酸
8	蛋白質	對應於 FMDV A24 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原
9	DNA	編碼 FMDV (FMDV A24 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白之多核苷酸
10	蛋白質	FMDV (FMDV A24 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白
11	DNA	編碼對應於 FMDV Asia Shamir 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原之多核苷酸
12	蛋白質	對應於 FMDV Asia Shamir 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原
13	DNA	編碼 FMDV (FMDV Asia Shamir 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白之多核苷酸
14	蛋白質	FMDV (FMDV Asia Shamir 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白
15	蛋白質	E2 之連接體

【圖1】

編碼對應於 FMDV O1 Manisa 菌株之 VP1 之合成 FDMV

抗原之多核苷酸(SEQ ID NO:1)

atggaaaattatggtggtgaaacccagggttcagcgtcgtcagcataccgatgttagctt
tattctggatcggttttgttaaagtaccccgataatggcaatagcaaatatggtgatg
gcaccgttgcaaatgttcgtggtgatctgcagggttctggcacagaaagcagcacgtgca
ctgccgaccagtcgggatcaggcacgtcataaacagaaaattggtgcaccgggttaaaca
gctgctgtaa

對應於 FMDV O1 Manisa 菌株之 VP1 之合成 FDMV 抗原

(SEQ ID NO:2) (81aa)

MENYGGGTQVQRROHTDVSFILDRFVKVTPYNGNSKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARA
LPSPDQARHKQKIVAPVKQLL

表位 T; 表位 B1; 表位 B2

來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之 E2 之連接體及核心 C 末端催化
結構域的多核苷酸序列(SEQ ID NO:3)

aagcttgcagcagcagaagaaaaagcagcaccggcagcagcaaaaccggcaaccaccga
aggtgaatttccggaaacccgtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaattgcaaaag
caatgggttcatagcaaacataccgcaccgcatgttacccctgatggatgaagcagatgtt
accaaactgggttggccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaaggcattaa
actgacctttctgccgtatgttggttaaagcactgggttagcgcactgcgtgaatatccgg
ttctgaataccagcattgatgatgaaaccgaagagatcatccagaaacactattacaat
attggcattgcagcagataccgatcgtggtctgctgggttccgggttattaaacatgcaga
tcgtaaaccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaagcacgtg
atggtaaactgacaccgggtgaaatgaaaggtgcaagctgtaccattacaaatattggt
agtgccgggtgggtcagtggtttacaccgggttattaatcatccggaagttgccattctggg
tattggtcgtattgcagaaaaaccgattgttcgtgatgggtgaaattggtgcagcaccga
tgctggcactgagcctgagctttgatcatcgtatgattgatgggtgcaaccgcacagaaa
gcaactgaatcatattaaacgtctgctgagcgatccggaactgctgctgatggaagcatg
a

來自脂肪嗜熱地芽孢桿菌之 E2 之連接體及核心 C 末端催化

結構域的蛋白質序列(SEQ ID NO:4) (255aa)

KLAAAEKKAAPAAKPAATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAPHVTLMDEADV
TKLVAHRKKFKAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEEIIQKHYYN
IGIAADTDRLLPVVIKHADRKPIFALAQEINELA EKARDGKLTPGEMKGASCTITNIG
SAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQK
ALNHIKRLLSDPPELLLMEA

選殖殘基

來自 E2 之天然連接體

E2 之核心 C 末端催化結構域

【圖2A】

編碼 FMDV-E2 融合蛋白之多核苷酸(SEQ ID NO:5)

atggaaaattatggtggtgaaacccaggttcagcgtcgtcagcataccgatgtagctt
tattctggatcggttttgttaaagtgaccccgatataatggcaatagcaaatatggtgatg
gcaccgttgcaaatgttcgtggtgatctgcaggttctggcacagaaagcagcacgtgca
ctgccgaccagtcggatcaggcacgtcataaacagaaaattgttgaccgggttaaaca
gctgctgaagcttgacgacgagagaagaaaaagcagcaccggcagcagcaaaaccggcaa
ccaccgaaggtgaatttccggaaacccgtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaatt
gcaaaagcaatggttcataagcaaacataccgcaccgcattaccctgatggatgaagc
agatgttaccaaactggttgccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaag
gcattaaactgacctttctgccgtatgttggttaaagcactggttagcgcactgctgaa
tatccggttctgaataccagcattgatgatgaaaccgaagagatcatccagaaacacta
ttacaatatgtgcatcgcagcagataccgatcgtggtctgctggttccgggttattaaac
atgcagatcgtaaaccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaa
gcacgtgatggttaaactgacaccgggtgaaatgaaaggtgcaagctgtaccattacaaa
tattggtagtgcgggtggtcagtgggttacaccgggttattaatcatccggaagttgcca
ttctgggtattggtcgtattgcagaaaaaccgattgttcgtgatggtgaaattggtgca
gcaccgatgctggcactgagcctgagctttgatcatcgtatgattgatggtgcaaccgc
acagaaagcactgaatcatattaaacgtctgctgagcgatccggaactgctgctgatgg
aagcatga

FMDV-E2 融合蛋白序列 (SEQ ID NO:6) (336aa)

MENYGGGETQVQRROHTDVSFILDRFVKVTPYNGNSKYGDGTVANVRGDLQVLAQKAARALPTSPDQ
ARHKQKIVAPVKQLLKLA AAEFEKAAPAAAKPATTEGEFFETREKMSGIRRAIAKAMVHSKHTAP
HVTLMDEADVTKLVAHRKKFKALAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTSIDDETEEH
QKHYYNIGIAADTDRGLLVPVIKHADRKPIFALAOEINELAEKARDGKLTGEMKGGASCTIT
NIGSAGGQWFTFPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQKA
LNHIKRLLSDPPELLLMFA

表位 T 表位 B1 表位 B2 選殖殘基 來自 E2 之天然連接體
E2 之核心 C 末端催化結構域

pET30b (pPX238)中編碼對應於 FMDV A24 菌株之 VP1 之合成 FMDV 抗原的多核苷酸(SEQ ID NO:7)

atggaaaattatggtggtgaaacccagattcagcgtcgtcatcataccgatattggctt
tattatggatcgcttcgtgaaaatccagagctataatggcaccagcaaatatgcagttg
gtggttagcggtcgtcgtggtgatatgggtagcctggcagcacgtgttggttaaaccagctg
cctgcaagcgttagcagccaggatcgtcataaacagaaaattatcgccaccgggcaaaaca
actgctgtga

pET30b (pPX238)中對應於 FMDV A24 菌株之 VP1 之合成 FMDV 抗原(SEQ ID NO:8) (81aa)

MENYGGGETQIQRRHHTDIGFIMDRFVKIQSYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASVSS
QDRHKQKIIAPAKQLL

【圖2B】

pET30b (pPX236)中編碼 FMDV (FMDV A24 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白之多核苷酸(SEQ ID NO:9)

atggaaaattatggtggtgaaacccagattcagcgtcgtcatcataccgatattggctt
tattatggatcgcttcgtgaaaatccagagctataatggcaccagcaaatatgcagttg
gtggtagcgggtcgtcgtggtgatatgggtagcctggcagcacgtgtgttaaacagctg
cctgcaagcgttagcagccaggatcgtcataaacagaaaattatcgccacggcaaaaaca
actgctgaagccttgcagcagcagaagaaaaagcagcaccggcagcagcaaaacgggcaa
ccacogaaggtgaatttccggaaaacccgtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaatt
gcaaaagcaatggttcatagcaaacataccgcacogcatgttaccotgatggatgaagc
agatgttaccaaactggttgcacacogcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaag
gcattaaaactgaactttctgcogtatgtttgttaaagcaactggttagcgcactgcgtgaa
tatccgggttctgaataccagcattgatgatgaaacogaagagatcatccagaaacaacta
ttacaatatgtgcaattgcagcagataccgatcgtggtctgctggttccgggttattaaac
atgcagatcgtaaacogatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaa
gcacgtgatggttaaactgaacacgggtgaaatgaaaggtgcaagctgtaccattacaaa
tattggtagtgcoggtggtcagtggtttacacoggttattaatcatccoggaagttgcca
ttctgggtattggtcgtattgcagaaaaacogattgttcgtgatggtgaaattgttgca
gcaccgatgctggcactgagcctgagccttgcacatcgtatgattgatggtgcaacccg
acagaaagcaactgaatcatattaaacgtctgctgagcogacccggaactgotgotgatgg
aagcatga

A24 FMDV 多核苷酸 選殖殘基 E2

pET30b (pPX236)中 FMDV (FMDV A24 菌株之合成 VP1)-E2 融合蛋白(SEQ ID NO:10) (336aa)

MENYGGETQIQRRHHTDIGFIMDRFVKIQSYNGTSKYAVGGSGRRGDMGSLAARVVKQLPASVSS
QDRHKQKI IAPAKQLLKLAAAEKAAAPAAAKPATTEGEFFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAP
HVTLMDEADVTKLVHRKKFKAIKAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYFVLNNTSIDDETEEIIQK
HYYNIGIAADTDRLIVPVIKHADRPKIFALAQEINELA EKARDGKLTGEMRGASCTITNIGSA
GGQWFTFVINHPEVAILGIGRIA EKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQKALNHIKRL
LSDPELLLMEA

pET30b (pPX239)中編碼對應於 FMDV Asia Shamir 菌株之 VP1 之合成 FMDV 抗原之多核苷酸(SEQ ID NO:11)

atggaaaattatggtggtgaaacccagaccgcacgtcgtctgcataccgatgttgcat
tattctggatcggtttgttaaactgaccgcctataatggtaaaacgcctatggtgaaa
caaccagccgtcgtggtgatatggcagcactggcagcagcgtctgagcgcacgtctgccg
accagcaccacccaggatcgtcgtgtaaacagaattattgcaccggaaaaacaggtgct
gtga

【圖2C】

pET30b (pPX239)中對應於 FMDV Asia Shamir 菌株之 VP1 之合成**FDMV 抗原(SEQ ID NO:12) (79aa)**

MENYGGETQTARRLHTDVAFILDRFVKLTAYNGKTAYGETTSRRGDMALAQLSARLPTSTTQD
RRKQEIIAPEKQVL

pET30b (pPX237)中編碼 FMDV (FMDV Asia Shamir 菌株之合成**VP1)-E2 融合蛋白之多核苷酸(SEQ ID NO:13)**

atggaaaattatggtggtgaaacccagaccgcacgtcgtctgcataccgatggtgcatt
tattctggatcggttttggtaaactgaccgctataatggtaaaacgcctatggtgaaa
caaccagccgtcgtggtgatatggcagcactggcacagcgtctgagcgcacgtctgccg
accagcaccacccaggatcgctcgtaaacagaattattgcaccggaaaaacaggtgct
gaagcctgcagcagcagaagaaaaagcagcacccggcagcagcaaaacccggcaaccacccg
aaggtgaatttcoggaaaacccgtgaaaaaatgagcgggtattcgtcgtgcaattgcaaaa
gcaatggttcatagcaaacataccgcaccgcacgttaccctgatggatgaagcagatgt
taccaaactggttgcccaccgcaaaaaattcaaagcaattgcagcagagaaaggaatta
aactgacctttctgccgtatgttggtaaagcaactggttagcgcactgogtgaatatccg
gttotgaataaccagcattgatgatgaacccgaagagatcatccagaaacactattacaa
tattggcattgcagcagataccgatcgtggtctgctggttccggttattaaacatgcag
atcgtaaacccgatttttgcactggcccaagaaattaatgaactggcagaaaaagcacgt
gatggtaaaactgacacccgggtgaaatgaaaggtgcaagctgtaccattacaaatattgg
tagtgccgggtggtcagtggtttacacccggttattaatcatccggaagttgccattctgg
gtattggtcgtattgcagaaaaacccgattgttccgtgatggtgaaattggtgcagcaccg
atgctggcactgagcctgagctttgatcatcgatgattgatggtgcaacccgcacagaa
agcactgaatcatattaaacgtctgctgagcgatccggaaactgctgctgatggaagcat
ga

Asia Shamir FMDV 多核苷酸 選殖殘基 E2

pET30b (pPX237)中 FMDV (FMDV Asia Shamir 菌株之合成**VP1)-E2 融合蛋白(SEQ ID NO:14) (334aa)**

MENYGGETQTARRLHTDVAFILDRFVKLTAYNGKTAYGETTSRRGDMALAQLSARLPTSTTQDRRKQEIIA
PEKQVLKLAAEEKAAPAAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAPHVTLMDADVTKLVAHR
KKFKAIAAEKGKILFLPYVVKALVSALREYPVLNNTSIDDETEEIIQKHYYNIGIAADTDRLLPVVIKHADRPKIFA
LAQEINELA EKARDGKLTPGEMKGASCTITNIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPML
ALSLSFDHRMIDGATAQKALNHIKRLLSDPELLLMEA

E2 之連接體 (SEQ ID NO:15)

AAAEKKAAPAAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKA

【圖2D】

