(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105209067 A
(43)申请公布日 2015.12.30

(21)申请号 201480017901.X
(22)申请日 2014.03.25
(30)优先权数据
13161139.4 2013.03.26 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/055904 2014.03.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/154655 EN 2014.10.02
(71)申请人 皮尔布赖特研究所
地址 英国沃金
(72)发明人 A. 科特查 D. 斯图亚尔特 E. 弗赖 R. 埃斯瑙夫
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 翟建伟 万雪松
(51)Int.Cl.
A61K 39/135(2006.01)
C07K 14/005(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页
序列表1页 附图9页

(54)发明名称

稳定的FMDV衣壳

(57)摘要

本发明涉及通过特异性取代FMDV VP2的特定区域中的氨基酸而稳定口蹄疫病毒(FMDV)衣壳。本发明提供了稳定的FMDV衣壳和针对FMD的疫苗。

CN 105209067 A

1. 口蹄疫病毒 (FMDV) VP2 蛋白突变体，其特征在于所述 VP2 蛋白突变体包含位于 VP2 蛋白的 αA 螺旋中的至少一个氨基酸取代为选自 Q、N、V、I、L、M、F、Y、W 和 H 的氨基酸。

2. 口蹄疫病毒 (FMDV) VP2 蛋白突变体，其特征在于所述 VP2 蛋白突变体包含位于 VP2 蛋白的 αA 螺旋中的 1 至 4 个氨基酸取代为选自 Q、N、V、I、L、M、F、Y、W 和 H 的氨基酸。

3. 根据权利要求 1 或 2 的 FMDV VP2 蛋白突变体，其中所述取代涉及在选自 87、90、91、93、94、97 和 98 的至少一个位置的氨基酸，其中所有位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

4. 根据权利要求 3 的 FMDV VP2 蛋白突变体，其包含至少一个选自以下的氨基酸取代：

— 87V、87M，

— 90N、90L，

— 91F，

— 93Y、93F、93W、93H、93V、93L、93I、93M、93Q，

— 94V，

— 97I、97M、97V、97Q，

— 98F 和 98H，

其中所有位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

5. FMDV 衣壳，其包含根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体。

6. 用于增强 FMDV 衣壳的稳定性的方法，其包括提供具有根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳的步骤。

7. 分离的核酸分子，其编码根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体。

8. 宿主细胞，其包含根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体、根据权利要求 5 的 FMDV 衣壳、和 / 或根据权利要求 7 的分离的核酸分子。

9. 活重组载体微生物 (LRCM)，其包含根据权利要求 7 的分离的核酸分子。

10. 根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体、根据权利要求 5 的 FMDV 衣壳、根据权利要求 7 的分离的核酸分子、根据权利要求 8 的宿主细胞、和 / 或根据权利要求 9 的 LRCM，其用作针对 FMD 的疫苗。

11. 针对 FMD 的疫苗，其包含根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体、根据权利要求 5 的 FMDV 衣壳、根据权利要求 7 的分离的核酸分子、根据权利要求 8 的宿主细胞、和 / 或根据权利要求 9 的 LRCM、以及药学上可接受的载体。

12. 根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体、根据权利要求 5 的 FMDV 衣壳、根据权利要求 7 的分离的核酸分子、根据权利要求 8 的宿主细胞、和 / 或根据权利要求 9 的 LRCM 用于制备针对 FMD 的疫苗的用途。

13. 用于制备根据权利要求 11 的针对 FMD 的疫苗的方法，所述方法包括混合根据权利要求 1-4 中任一项的 FMDV VP2 蛋白突变体、根据权利要求 5 的 FMDV 衣壳、根据权利要求 7 的分离的核酸分子、根据权利要求 8 的宿主细胞、和 / 或根据权利要求 9 的 LRCM 与药学上可接受的载体。

14. 用于制备口蹄疫病毒 (FMDV) VP2 蛋白突变体的方法，其特征在于所述 VP2 蛋白突变体通过 VP2 蛋白的亲本 αA 螺旋中的至少一个氨基酸取代为选自 Q、N、V、I、L、M、F、Y、W 和 H 的氨基酸以生成非野生型 αA 螺旋而制备。

15.用于制备口蹄疫病毒(FMDV) VP2蛋白突变体的方法,其特征在于所述VP2蛋白突变体通过位于VP2蛋白的αA螺旋中的1至4个氨基酸的取代来制备,其中这些1至4个氨基酸中的每个被取代为选自Q、N、V、I、L、M、F、Y、W和H的氨基酸。

16.用于针对FMD接种易感FMDV的动物的方法,其包括用根据权利要求11的疫苗接种动物的步骤。

稳定的 FMDV 衣壳

[0001] 本发明涉及兽医学和病毒学的领域。具体而言，本发明涉及口蹄疫病毒 (FMDV) VP2 蛋白突变体，包含 FMDV VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳，分离的核酸分子，宿主细胞，活重组载体微生物，和针对 FMD 的疫苗。此外，本发明涉及用于这些实施方案和使用这些实施方案的几种方法。

[0002] 口蹄疫 (FMD) 是影响偶蹄类哺乳动物；偶蹄目的一种急性、全身性和高度感染性的疾病。许多野生生物物种下一步，主要相关目标是家畜诸如牛、水牛、猪、绵羊和山羊。典型症状是舌和蹄上的水疱；因此得到该疾病的名称。这不仅引起许多不适和继发性感染，而且引起发烧和偶尔死亡率。此外，该疾病引起显著的经济损失，因为受影响的动物将停止移动和进食。FMD 是一种应申报的疾病，许多国家将拒绝进口来自 FMD 阳性地区的动物；这由出口认证的国际系统执行 (Paton 等人 . 2009, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., vol. 364, p. 2657)。

[0003] FMD 由口蹄疫病毒 (FMDV) 引起，所述口蹄疫病毒 (FMDV) 是小核糖核酸病毒科的病毒，并且是口疮病毒属的类型种。病毒粒子包含约 8 kb 的单链正链 RNA 基因组，其包含于无包膜衣壳中。衣壳的直径为约 30 nm，且具有二十面体对称。衣壳由四种结构病毒蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 中每一种的 60 个拷贝的高度规则排列组成。这些组织于含有 VP1-4 中每一个的具有 5S 的沉降系数的原聚体亚单位中；这些原聚体中的五个形成 12S 的五聚体，且完整的衣壳由 12 个五聚体组成。这可以是约 70S 的非感染性空衣壳，或具有病毒 RNA 内容物的约 146S 的病毒粒子衣壳，其可以是感染性的 (Fry 等人 , 2005, Curr. Top. Microbiol. Imm., vol. 288, p. 71)。

[0004] 作为二十面体结构，FMDV 衣壳具有三个天然类型的对称轴：5 重轴 (5-fold axis)，其中原聚体满足组装成五聚体；以及两个轴，其中五聚体亚单位满足：对称性的 2 重轴，其中相邻 VP2-VP2 蛋白相互作用，和 3 重轴，其中 VP2-VP3 蛋白相互作用；参见图 1。

[0005] 在天然复制中，FMDV 病毒蛋白被表达为命名为 P1 的长多蛋白前体，其包含 VP4-2-3-1。这也是为什么 FMDV VP 有时通过它们在 P1 上的顺序来命名的原因，由此：VP1 是 1D，VP2 是 1B，VP3 是 1C 且 VP4 被命名为 1A。P1 的翻译后切割成较小部分通过非结构 FMDV 编码的蛋白 2 A-C 和 3 A-D 进行。(Chapter: Picornaviridae,: Fields Virology, 第 4 版 , Lippincott Williams & Wilkins, ISBN-10: 0781718325)。

[0006] 为了减少 FMD 的发病率或严重度以及 FMDV 的传播，典型措施是接种、选择性剔除 (selective culling) 和运动限制。然而，一些国家允许只在爆发条件下接种，因为出口认证系统通过动物是否是 FMDV 血清学阳性来淘汰 (condemn) 动物。因此正在研究允许区分接种和野生型感染的标记疫苗。

[0007] 传统的 FMD 疫苗是灭活的完整病毒制备物的佐剂化乳剂，其诱导保护水平的病毒中和抗体。然而，因为 FMDV 颗粒的高感染性，病毒的操作和此类疫苗的产生需要在高水平生物安全条件下进行，且需要有效的质量控制，特别是对病毒灭活。

[0008] FMDV 是高度可变的病原体，且目前具有七种主要的血清型：O、A、C、SAT(南非地区)-1、SAT-2 和 SAT-3 和 Asia 1。在这些血清型内，存在许多抗原性变体、亚型和准种。提

供信息的是Carrillo等人(2005, J. of Gen. Virol., vol. 79, p. 6487),其已经比对了来自所有血清型的超过100种FMDV分离株的翻译的基因组序列。

[0009] 因为主要血清型之间存在较少交叉保护,通常FMD疫苗包含FMD疫苗需要针对其保护的每种血清型的单独组分,通常作为组合疫苗。

[0010] 关于流行性,血清型A和O几乎全世界存在,而血清型C从2004年以来没有任何爆发。三种SAT血清型在非洲和中东的几个区域中发生,且血清型Asia 1在亚洲和中东发生。

[0011] 七种血清型在生物物理特性(主要是它们的稳定性)方面也不同。这作为FMDV是相关的,除了具有高度感染性,也是相当不稳定的,且容易被热、酸度、剪切等灭活。尽管如此,所有FMD疫苗需要在严格冷链物流下运送和储存。这在FMD流行的世界的(亚)热带和发展中地区中是特殊障碍。在这方面,血清型A和Asia 1的病毒粒子比其他血清型的病毒粒子相对更稳定,且具有6个月或更长的更可行的储存期。然而,血清型O疫苗具有非常有限的生物半衰期,通常只有几个月。甚至更差的是三种SAT血清型的状况,显著低稳定性仅得到针对其具有低保护能力的疫苗,甚至当施用多次时。

[0012] 因此,持续需要开发和改进安全、稳定和有效的FMD疫苗。

[0013] 通过重组DNA表达技术制备的FMD疫苗也已经研究了许多年。例如,通过在各种系统中表达FMDV亚单位或表位,诸如无细胞表达,或在原核或真核细胞(包括植物细胞)中的基于细胞的表达。

[0014] 另一种选择是使用空FMDV衣壳;这些比完整病毒更安全生产,并且被认为是有效的免疫原(Rweyemamu,等人, 1979, Arch. Virol., vol. 59, p. 69)。此类空衣壳可以在以下中有效地产生:重组表达系统,诸如基于大肠杆菌(Lewis等人, 1991, J. of Virol., vol. 65, p. 6572; Lee等人, 2009, J. Biomed. Sci., vol. 16, p. 69)或病毒表达系统,例如,使用重组牛痘病毒(Abrams等人, 1995, J. of Gen. Virol., vol. 76, p. 3089);重组杆状病毒,使用昆虫细胞(Cao等人, 2009, Vet. Microbiol., vol. 137, p. 1; Charleston等人, WO 2011/048353; Subramanian等人, 2012, Antivir. Res., vol. 96, p. 288),或桑蚕(Li等人, 2012, PLoS One. 2012;7(8): e43849);或活重组载体,诸如重组腺病毒(Lu等人, 2008, vaccine, vol. 26, Suppl. 6, p. G48)。

[0015] 不幸地,经常发现空衣壳甚至比病毒粒子衣壳更加不稳定;显然,病毒RNA基因组本身为FMDV衣壳结构提供了一些稳定作用。

[0016] 几个组已经研究了FMDV衣壳的稳定性特征,所述FMDV衣壳在高于生理温度和低于生理pH迅速解离成五聚体。对于疫苗使用,这是不利的,因为12S五聚体比完整衣壳的免疫原性小得多。参见:Doel等人(1981, Arch. of Virol., vol. 70, p. 21),和Hegde等人(2009, : Editorial, Vaccine, vol. 27, p. 2199)。Twomey等人(1995, Virology, vol. 206, p. 69)研究了FMDV A血清型的天然变体,其不那么酸敏感,这是由于VP2蛋白的位置131和133的氨基酸取代导致的。

[0017] 为了改善FMDV衣壳的热和/或酸稳定性,几个组已经将突变引入一种或多种病毒结构蛋白,然后使用此类VP突变体以产生FMDV病毒粒子衣壳,且测试这些的生物物理特性;这是所谓的衣壳工程改造。

[0018] 通常,成功不同;在一定程度上,酸敏感性可以通过对VP3的位置140 - 145中

的组氨酸残基突变来降低：Martin-Acebes 等人，(2011, J. of Virol., vol. 85, p. 2733)，Liu 等人 (CN 101270155) 和 Ellard 等人 (1999, J. of Gen. Virol., vol. 80, p. 1911)。Martin-Acebes 等人（同上）取代 :VP1 N17D（意指 :VP1 中的位置 17 的天冬酰胺被天冬氨酸取代）。

[0019] 以类似的方式，FMDV 衣壳热稳定性可以通过突变 VP2 和 VP3 蛋白的许多区域中的氨基酸而得到一定改善 :Mateo 等人 (2008, J. of Virol., vol. 82, p. 12232)，King 等人 (WO 2002/000251) 和 Fowler 等人 (WO 2011/032348)。对于综述 :Mateu (2011, Prot. Eng., Des. & Sel., vol. 24, p. 53)。Mateo 等人（同上）应用取代 VP2 A65H，和组合的取代 :VP3 D69E / VP2 T188A。Fowler 等人（同上）在 VP2 中取代 :L78S、E79A、K80R、T88A、E131K 或 A193S ；且在 VP3 中取代 :H85P 或 E196A。

[0020] King 等人（同上）的方法与本工作的不同之处在于，他们试图通过引入除了非共价键以外的共价键稳定 FMDV 衣壳。通过用 VP2 氨基酸取代为半胱氨酸，他们在对称的 2 重轴处的两个相邻 VP2 蛋白之间引入非天然二硫键。但是，该方法只适用于稳定空衣壳，而不能用于稳定病毒粒子衣壳。这是因为，在该方法中，所得衣壳是永久固定的，且病毒粒子衣壳在感染宿主细胞之后不再可以脱衣壳。

[0021] King 等人（同上）取代的氨基酸位于 VP2 蛋白的位置 93（其作为其序列标识符编号 38 的氨基酸编号 179 描述于 WO 2002/000251)。该氨基酸位置在 VP2 蛋白的区域中，在其天然结构中，所述区域折叠成 α 螺旋 :VP2 蛋白 αA 螺旋，覆盖（对于 O 血清型）VP2 氨基酸 88-98（参见 :Acharya 等人，1989, Nature, vol. 337, p. 709)。还关于另一种小核糖核酸病毒人肠道病毒的脱包衣机制研究该区域 (Wang 等人，2012, Nature Str.& Mol. Biol., vol.19, p.424)，然而，该机制不同于 FMDV 的机制。Wang 等人没有进行或暗示该区域中的任何突变。

[0022] 尽管现有技术中进行了所有努力，但当前没有普遍适用且免疫有效的基于工程改造的 FMDV 衣壳的 FMD 疫苗可用。

[0023] 本发明的一个目的是提供替代的 FMD 疫苗，其适用于所有 FMDV 血清型，且可以基于 FMDV 空衣壳，或 FMDV 病毒粒子衣壳。一个进一步目的是提供改进的 FMD 疫苗。

[0024] 当本发明人尝试应用 King 等人（同上）描述的技术时，他们失望地无法应用该方法以生成除了 A 型以外的血清型的空 FMDV 衣壳。例如，在来自血清型 O 的 FMDV 的 VP2 蛋白的 αA 螺旋中的位置 93 或该螺旋中的其他位置进行半胱氨酸取代。尝试产生空衣壳，然而，完全没有形成衣壳，或衣壳将严重聚集，使它们无法用于疫苗目的。

[0025] 令人惊讶地发现，通过提供在 VP2 蛋白的 αA 螺旋的区域中包含特定氨基酸取代的 FMDV VP2 蛋白突变体，而不需要引入共价键，可以满足该目的，且因此可以克服现有技术的缺点。

[0026] 此类 FMDV VP2 蛋白突变体现在可以引入 FMDV 衣壳，其然后获得显著改善的生物物理稳定性。所得稳定的 FMDV 衣壳现在可以用于产生基于病毒粒子衣壳或空衣壳的有利 FMD 疫苗。

[0027] 尽管不知道确切的作用机制，且不限于任何理论或模型，本发明人推测，该区域中的此类取代的有利效果是，这为 FMDV 衣壳提供了分子水平的疏水和 / 或静电稳定作用。据推测，这通过增强 FMDV 衣壳的 2 重对称轴的区域中两个相邻 VP2 蛋白之间的分子间相互作

用而发生。这增强相邻五聚体之间的相互作用，这导致FMDV衣壳作为整体的显著改进的稳定性。

[0028] FMDV衣壳的改进的稳定性导致相比于具有未修饰的亲本VP2蛋白的FMDV衣壳的许多优点：可以产生更高量的含有VP2蛋白突变体的衣壳，它们可以在对冷链物流具有较低严格要求的情况下运输，且它们提供改善的免疫应答。

[0029] 这都是意料之外的，因为先前没有描述VP2蛋白的该特定区域的非共价键突变，或者可以预期其导致对FMDV衣壳稳定性和由此产生的FMD疫苗的此类显著改善。

[0030] 因此，在一个方面，本发明涉及口蹄疫病毒(FMDV) VP2蛋白突变体，其特征在于VP2蛋白突变体包含位于VP2蛋白的αA螺旋中的至少一个氨基酸取代为选自Q、N、V、I、L、M、F、Y、W和H的氨基酸。

[0031] 本发明的“口蹄疫病毒”是具有分类种FMDV的成员的表征特征的病毒。这还包括以任何方式由其细分，例如为亚种、准种、毒株、分离株、基因型、血清型、血清变体、变体或亚型等的FMDV。对于技术人员显而易见的是，尽管微生物目前可以命名为FMDV，这是当新见解导致重新分类为新的或不同的分类组时可以进行改变的分类学分类。然而，由于这不改变涉及的微生物或其表征特征，只有其名称或分类，此类重新分类的生物体被认为仍在本发明的范围之内。

[0032] 本发明的“VP2蛋白”是指FMDV的病毒蛋白编号2，这被称为FMDV衣壳的结构蛋白。其具有约218个氨基酸，约24 kDa的分子量。如技术人员容易理解，FMDV固有的变异性意味着，VP2蛋白的大小和氨基酸序列的变化将天然存在。来自大量FMDV分离株的VP2蛋白的氨基酸序列可公开得自序列数据库诸如GenBank™或Swiss Prot™。

[0033] 根据本发明的VP2蛋白突变体可以是生物或合成来源的，并且可以通过分离、纯化、组装等获得。优选地，VP2蛋白突变体通过使用重组表达技术，通过表达编码VP2蛋白突变体的核苷酸序列而获得。

[0034] 用于本发明的VP2蛋白可以获得自FMDV，例如通过从FMDV获得编码VP2蛋白的核酸，或其核苷酸序列。此类FMDV进而可以获得（具有适当的生物安全措施）自各种来源，例如，作为原始野外分离株，或保藏机构，诸如ATCC或CNCM，或各个实验室和（参考）机构，诸如Pirbright Institute (Pirbright, Woking, UK)，这是FAO和WHO口蹄疫世界参考实验室 (FMD WRL)。

[0035] 用于本发明的FMDV是A、O、C、SAT-1、SAT-2、SAT-3或Asia1血清型中的一种或多种FMDV；优选地，用于本发明的FMDV是在特定时间在野外循环的一种或多种FMDV。

[0036] 更优选的是来自O、SAT-1、SAT-2或SAT-3血清型的一种或多种FMDV，因为这些血清型缺乏稳定性的问题在野外具有最大影响。

[0037] 或者，优选的FMDV是WRL FMD推荐为高优先疫苗候选的那些；例如，在其最近报道中，这些是：O Manisa、O PanAsia-2、O BFS、O Campos、A 24 Cruzeiro、Asia 1 Shamir、A Iran-05、A 22 Iraq、SAT-2 Saudi Arabia和SAT-2 Eritrea，或任何这些的等效物(WRL FMD季度报道，2012年10月-12月)。

[0038] 本发明的“突变体”是从自然界或从实验室先前未众所周知或可用的实体。根据本发明的FMDV VP2蛋白突变体因此不同于本发明之前的现有技术中描述的VP2蛋白。具体而言，迄今已知的FMDV VP2蛋白氨基酸序列没有资格作为根据本发明的VP2蛋白突变体。

尽管如此，根据本发明的 VP2 蛋白突变体可以获得自自然界，但优选为人造的。

[0039] 因此，在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体包含位于 VP2 蛋白的 αA 螺旋中的至少一个氨基酸取代为选自 Q、N、V、I、L、M、F、Y、W 和 H 的氨基酸，条件是所述取代不会导致具有现有技术中已知的氨基酸序列的 VP2 蛋白。

[0040] 因此，在一个进一步实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体包含位于 VP2 蛋白的 αA 螺旋中的至少一个氨基酸取代为选自 Q、N、V、I、L、M、F、Y、W 和 H 的氨基酸，条件是所述取代不会导致具有以下氨基酸序列中的一种或多种（或所有）的 VP2 蛋白：

— 血清型 O 的 FMDV 中的 90V（例如，如毒株 O1BFS 和 / 或 O1M_87 中），和 / 或 (and/or not) 血清型 C 中的 90V（例如，CS8c1），和 / 或血清型 Asia 1 中的 90V（例如，ASIA1_Bar2003），和 / 或血清型 A 中的 90V（例如，A22_Iraq_95），和 / 或血清型 SAT-1 中的 90I（例如，SAT1_bot），和 / 或血清型 SAT-2 中的 90I（例如，SAT2_ZIM7_83），和 / 或血清型 SAT-3 中的 90I（例如，SAT3_KNP10_90）。

— 91Y。

— 血清型 A 的 FMDV 中的 93H（例如，如毒株 A22_Iraq_95 中），和 / 或血清型 SAT-1 中的 93Q（例如，SAT1_bot）。

— 血清型 O 的 FMDV 中的 94L（例如，如毒株 O1BFS 和 / 或 O1M_87 中），和 / 或血清型 C 中的 94L（例如，CS8c1），和 / 或血清型 Asia 1 中的 94L（例如，ASIA1_Bar2003），和 / 或血清型 A 中的 94L（例如，A22_Iraq_95），和 / 或血清型 SAT-1 中的 94L（例如，SAT1_bot），和 / 或血清型 SAT-2 中的 94L（例如，SAT2_ZIM7_83），和 / 或血清型 SAT-3 中的 94M（例如，SAT3_KNP10_90）。

— 血清型 C 的 FMDV 中的 95V（例如，如毒株 CS8c1 中），和 / 或血清型 Asia 1 中的 95M（例如，如毒株 ASIA1_Bar2003 中），和 / 或血清型 A 中的 95V（例如，A22_Iraq_95），和 / 或血清型 SAT-1 中的 95V（例如，SAT1_bot），和 / 或血清型 SAT-3 中的 95L（例如，SAT3_KNP10_90）。

— 血清型 O 的 FMDV 中的 98Y（例如，如毒株 O1BFS 和 / 或 O1M_87 中），和 / 或血清型 C 中的 98Y（例如，CS8c1），和 / 或血清型 Asia 1 中的 98Y（例如，ASIA1_Bar2003），和 / 或血清型 A 中的 98F（例如，A22_Iraq_95），和 / 或血清型 SAT-1 中的 98H（例如，SAT1_bot），和 / 或血清型 SAT-2 中的 98Y（例如，SAT2_ZIM7_83），和 / 或血清型 SAT-3 中的 98H（例如，SAT3_KNP10_90）。

[0041] 获得根据本发明的此类 VP2 蛋白突变体的方法可以基于随机或定向方法；例如，可以从随机野外分离株鉴定和选择突变体。此外，可以进行病毒 - 细胞传代以诱导突变，例如，通过在诱变物质存在的情况下传代 FMDV，随后选择根据本发明的包含 VP2 蛋白突变体的 FMDV，导致更稳定的衣壳。此类稳定性可以通过以下测试：应用酸度、温度、剪切、化学品等的选择性水平，关于完整性和感染性比较传代至未传代的分离株，例如，如本文中描述和例举。

[0042] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的 VP2 蛋白突变体使用用于结构分析的计算机芯片上的方法排名，且使用定向分子生物学技术（涉及，例如，克隆、转染、重组、选择和扩增）制备。此类技术广泛描述于众所周知的手册，诸如：Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989); Basic Methods in Molecular

Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y. (1986);和：Sambrook & Russell, 2001, :'Molecular cloning: a laboratory manual', 第3版. New York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press。

[0043] 本文还描述和例举用于突变VP2蛋白的详细方法。因此,本领域技术人员将能够容易地仅仅使用常规的方法和材料应用、改变、修改和改进这些技术。

[0044] 如本文所使用的术语"包含"(以及变体诸如"包含(comprise)"、"包含(comprised)"和"包含(comprising)")意指其中使用该术语的文本部分、段落、权利要求等覆盖或其中包括的可考虑用于本发明的所有元素和任何可能的组合,即使未明确记载此类要素或组合;且不排除任何此类要素或组合。因此,任何此类文本部分、段落、权利要求等也可以涉及一种或多种实施方案,其中术语"包含"(或其变体)被替换为术语诸如"由...组成(consist of)"、"由...组成(consisting of)"或"基本上由...组成(consist essentially of)"。

[0045] "取代"是一个要素替换为另一个要素;对于本发明,这是涉及一种氨基酸或核酸被另一种氨基酸或核酸替换的突变,这取决于对象是否是蛋白、DNA或RNA分子。替换的要素是存在于蛋白或核酸的未修饰的亲本或野生型版本中的要素。作为结果,根据本发明的取代导致不同于其亲本或野生型αA螺旋的αA螺旋,即,其导致不同于αA螺旋野生型版本的修饰的αA螺旋。任何野生型αA螺旋具有此处上面解决的稳定性问题。本发明导致从自然界未知且关于其稳定空衣壳的特性方面改善的αA螺旋。

[0046] "αA螺旋"是可以折叠成呈天然衣壳构象的α螺旋结构的FMDV VP2蛋白的区域。

[0047] 为了充当本发明的参考,"SEQ ID NO:1"呈现取自以GenBank登录号:AAT01758公开的FMDV血清型O、毒株1BFS的P1蛋白的VP2蛋白的氨基酸序列;VP2蛋白是完整P1多蛋白的氨基酸编号287 - 504的区段。在SEQ ID NO:1中,αA螺旋为12个氨基酸长,且位于氨基酸位置87直至且包括位置98。

[0048] FMDV的固有变异性意指其他FMDV分离株或血清型的VP2蛋白中该αA螺旋的位置不在完全相同的位置,例如,其可以在N末端或C末端方向偏移一个或多个氨基酸。尽管如此,可以使用例如用于分子生物学分析的标准计算机程序容易地鉴定VP2氨基酸序列中的αA螺旋。因此,对于本发明,相对于SEQ ID NO:1指定VP2αA螺旋的氨基酸位置编号,但在不同的FMDV分离株中,这些可位于不同的位置编号。

[0049] 因此,对于本发明,VP2蛋白的αA螺旋为约12个氨基酸长的区域,其位于对应于VP2氨基酸位置编号87和98之间的范围的区域,由此这些位置编号相对于SEQ ID NO:1中呈现的氨基酸的编号。

[0050] 优选地,VP2蛋白的αA螺旋位于氨基酸位置编号87直至且包括位置98,由此这些位置编号相对于SEQ ID NO:1中呈现的氨基酸的编号。

[0051] 仅仅为了说明在申请日已知的不同FMDV分离株之间发生的序列变异性的水平,图2呈现了许多代表性FMDV分离株的VP2蛋白的αA螺旋的氨基酸序列的多重比对。Carrillo等人(同上)表明,VP2蛋白αA螺旋区域中的仅通常保守的氨基酸是位置89和92的甘氨酸(相对于SEQ ID NO:1中呈现的氨基酸的编号)。

[0052] 氨基酸"Q、N、V、I、L、M、F、Y、W和H"根据IUPAC标准以众所周知的1字母代码代

表。在 3 字母 IUPAC 标准代码中，该总和应为：“Gln、Asn、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp 和 His”。这些氨基酸中，Q 和 N 具有极性、不带电的侧链，H 也通常如此；V、I、L、M、F、Y 和 W 具有疏水侧链；且氨基酸 F、Y、W 和 H 具有芳香族侧链。

[0053] 待取代的优选氨基酸是选自 V、I、L、M、F、Y 和 W 的一种或多种具有疏水性侧链的氨基酸，或选自 F、Y、W 和 H 的一种或多种具有芳香族侧链的氨基酸。待取代的更优选氨基酸是选自 F、Y、W 和 H 的一种或多种具有芳香族侧链的氨基酸。

[0054] 该优先性基于以下令人惊讶的发现，即具有疏水性侧链的氨基酸，特别是具有芳香族侧链的氨基酸，即使相对大，意料之外地良好适合于 FMDV 衣壳的 2 重对称轴的区域，且发现为包含具有此类取代的 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳提供显著稳定作用。

[0055] 对于本发明，芳香族氨基酸是具有芳香族侧链的氨基酸。当侧链包含符合休克尔规则 (Hückel’s rule) 的环状结构，其是芳香族的。

[0056] 在 VP2 蛋白 αA 螺旋的一些位置，根据本发明的氨基酸取代是特别有利的。

[0057] 因此，在根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的一个优选实施方案中，本发明涉及在选自 87、90、91、93、94、97 和 98 的至少一个位置的氨基酸的取代，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

[0058] 在一个优选的实施方案中，用于本发明的取代的 VP2 蛋白 αA 螺旋中的位置是 VP2 蛋白 αA 螺旋的 87 和 / 或 98 的一个或多个位置，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。在这些氨基酸位置，令人惊讶地发现位于 VP2 蛋白 αA 螺旋的 N 末端和 C 末端的取代能够稳定含有此类 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳。

[0059] 在一个优选的实施方案中，用于本发明的取代的 VP2 蛋白 αA 螺旋中的位置是 90、93 和 97 中的一个或多个，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。本发明人已经发现，VP2 蛋白 αA 螺旋中的这些位置中的氨基酸的侧链跨越 2 重对称轴朝向相反 VP2 蛋白。这允许这些位置中的所选突变具有对衣壳的稳定作用。

[0060] 因此，这些位置中的氨基酸取代诱导的非共价分子相互作用在跨越 2 重对称轴的稳定中有效地发挥作用。

[0061] 在一个更优选的实施方案中，用于本发明的取代的 VP2 蛋白 αA 螺旋中的位置是相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号的位置编号 93。发现该氨基酸位置位于 VP2 蛋白 αA 螺旋的中间，其中其氨基酸侧链朝向相对 VP2 蛋白的等同残基。因此，当对该位置中的 FMDV VP2 蛋白的氨基酸序列进行取代时，这可以形成跨越 2 重对称轴的非共价相互作用，其可以相当稳定含有此类 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳。

[0062] 作为说明，图 3 呈现包含 VP2 93W 取代的 FMDV 衣壳中跨越两重对称轴中形成的非共价（疏水堆积）相互作用的 3D 图像。

[0063] 对于本发明，非共价化学相互作用是借助原子力诸如离子、氢、范德华或疏水相互作用的的分子间相互作用。

[0064] 在根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的一个进一步优选实施方案中，VP2 蛋白突变体包含选自 87V、87M；90N、90L；91F；93Y、93F、93W、93H、93V、93L、93I、93M、93Q；94V；97I、97M、97V、97Q；98F 和 98H 的氨基酸的至少一个取代，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

[0065] 如上所述，本实施方案也在以下条件下：VP2 中的氨基酸的取代不会导致 FMDV

VP2 蛋白上的现有技术已知的以下氨基酸序列的一个或多个（或所有）：

— 血清型 A 的 FMDV 中的 93H，和 / 或血清型 SAT-1 中的 93Q，

— 血清型 A 中的 98F，和 / 或血清型 SAT-1 中的 98H，和 / 或血清型 SAT-3 中的 98H。

[0066] 对于本发明，注释诸如“VP2 93F”，意欲表明 VP2 中的氨基酸位置编号 93（相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号）的任何亲本氨基酸取代为所示氨基酸（这里：苯丙氨酸）。

[0067] 优选的氨基酸取代中的多于一个的组合也在本发明的范围之内。因此，例如，本发明的 VP2 蛋白突变体可以包含 93Y、93F 或 93H 取代连同 97I 或 97M 和 / 或 90N 取代。在本发明的范围之内的取代的特定组合的其他实例包括具有选自以下的双重取代的 VP2 蛋白突变体：93Y 和 97I；90N 和 93Y；87V 和 93F；93H 和 98F；93F 和 98F；91F 和 98F；95V 和 98F；以及 87V 和 98F。在一个实施方案中，本发明包括具有选自以下的三重取代的 VP2 蛋白突变体：93H、95V 和 98F；93F、94V 和 98F；87V、90L 和 93Q；90L、93Q 和 98F；以及 90A、93Q 和 98F。具有 4 个取代的 VP2 蛋白突变体的一个实例是具有以下的 VP2 蛋白突变体：87V、90L、93Y 和 97I。所有 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

[0068] 在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体包含选自以下的氨基酸的至少一个取代：93Y、93F、93W、93H、93V、93L、93I、93M 和 93Q，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号，条件是所述取代不会导致具有以下氨基酸序列中的一种或多种（或所有）的 VP2 蛋白：血清型 A 的 FMDV 中的 93H，和 / 或血清型 SAT-1 中的 93Q。

[0069] 在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体包含选自 93Y、93F、93W、93V、93L、93I 和 93M 的氨基酸的至少一个氨基酸取代，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

[0070] 在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体包含选自以下的氨基酸的至少一个取代：93Y、93F、93W 和 93H，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号，条件是所述取代不会导致具有血清型 A 的 FMDV 中的氨基酸序列 93H 的 VP2 蛋白。

[0071] 在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体包含选自以下的氨基酸的至少一个取代：98F 和 98H，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号，条件是所述取代不会导致具有以下氨基酸序列中的一种或多种（或所有）的 VP2 蛋白：血清型 A 的 FMDV 中的 98F，和 / 或血清型 SAT-1 中的 98H，和 / 或血清型 SAT-3 中的 98H。

[0072] 在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体是来自选自以下血清型的血清型的 FMDV 的 VP2 蛋白：O、Asia 1、SAT-1、SAT-2 和 SAT-3，所述 VP2 包含选自以下的氨基酸的氨基酸取代：93Y、93F、93W 和 93H，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

[0073] 在一个实施方案中，根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体是来自选自以下血清型的血清型的 FMDV 的 VP2 蛋白：A、O、Asia 1、SAT-2 和 SAT-3，所述 VP2 包含选自以下的氨基酸的氨基酸取代：93Y、93F、93W、93H 和 93Q，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号。

[0074] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的FMDV VP2蛋白突变体是来自任何血清型的FMDV的VP2蛋白，所述VP2蛋白突变体包含选自以下的氨基酸的氨基酸取代：93Y、93F和93W，其中VP2蛋白氨基酸位置编号相对于SEQ ID NO:1中呈现的氨基酸的编号。如下所述，该位置中的这些取代提供了包含此类具有最高相对稳定性的VP2蛋白突变体的FMDV衣壳。

[0075] 根据本发明的VP2蛋白突变体的有利的氨基酸取代已经通过计算机芯片上、体外和体内实验的方法的组合来鉴定。

[0076] 小图A、B和C中的表1列出不同FMDV血清型的包含VP2蛋白突变体 的FMDV衣壳的稳定性的评价的结果。包含不同VP2突变体的衣壳的相对稳定性通过任意值表明："0"、" - "或"+"，由此，零代表具有未取代的亲本VP2蛋白的衣壳的稳定性的水平，负号表明相对不稳定的衣壳，即比亲本衣壳不太稳定，且正号表明相对稳定的衣壳，即比亲本衣壳更稳定。突变体衣壳之间的相对差异通过正或负号表明，例如，'++++'比'+'稳定得多。

[0077] 为了说明，表1A还呈现不被考虑稳定FMDV衣壳的VP2蛋白的一些取代的相对稳定性，例如：尽管O血清型的FMDV中的取代VP2 H87V对于衣壳的稳定性是有利的(+的相对得分)，然而，取代H87D是非常不利的(---的相对得分)。类似地，呈现在αA螺旋之外的VP2蛋白的区域的取代的所得相对稳定性：VP2 Q57E、Q57L、R60G和R60L。由于这些具有--和---之间的相对稳定性，所以这些取代对于包含具有此类取代的VP2蛋白突变体的FMDV衣壳的稳定性是不利的。

[0078] 表1A：来自O血清型的FMDV的衣壳的相对稳定性：

	突变	相对稳定性
血清型O		
	VP2 wt	0
	VP2 H87V	+
	VP2 H87D	---
	VP2 V90N	+
	VP2 Y91F	++
	VP2 S93H	++
	VP2 S93Y	+++
	VP2 S93F	+++
	VP2 S93W	++
	VP2 S93Q	++
	VP2 L94V	++
	VP2 S97V	++
	VP2 S97I	++
	VP2 S97Q	++
	VP2 Y98F	+++
	VP2 R60G	---
	VP2 R60L	---
	VP2 Q57E	--
	VP2 Q57L	--

。

[0079] 表 1B :来自 A 血清型的 FMDV 的衣壳的相对稳定性 :

	突变	相对稳定性
血清型A		
	VP2 wt	0
	VP2 H93F	++
	VP2 H93Q	+

。

[0080] 表 1C :来自 SAT-2 血清型的 FMDV 的衣壳的相对稳定性 :

	突变	相对稳定性
血清型 SAT-2		
	VP2 wt	0
	VP2 S93H	++
	VP2 S93Y	+++
	VP2 S93W	++++
	VP2 S93F	+++
	VP2 Y98F	++

。

[0081] 为了生成包含FMDV VP2蛋白突变体的衣壳，体外重组DNA方法用于生成编码包含期望氨基酸取代的根据本发明的蛋白VP2突变体的重组核酸分子。方便地，这通过以下进行：制备和亚克隆PCR片段，和在其他FMDV蛋白的背景下体外蛋白表达，例如，作为P1-2A多蛋白，和共表达FMDV 3C蛋白酶。

[0082] 所需分子生物学技术都是技术人员众所周知的，例如，如描述于众所周知的手册，诸如：‘Current Protocols in Molecular Biology’和‘Molecular cloning:a laboratory manual’，两者同上。

[0083] 为了生成包含根据本发明的VP2蛋白突变体的感染性FMDV病毒粒子衣壳，几种技术是可用的，例如使用FMDV的感染性克隆构建体，其可以被操纵为cDNA以编码期望的VP2蛋白取代，然后转染至适当的宿主细胞中。已经长时间知道FMDV的感染性克隆，例如Zibert等人(1990, J. of Virol., vol. 64, p. 2467)；Liu等人(2004, Virus Res., vol. 104, p. 157)；和：Blignaut等人(2010, J. of Gen. Virol., vol. 92, p. 849)。

[0084] 或者，FMDV空衣壳可以通过在重组表达系统中表达适当的核酸来产生，诸如下面描述。

[0085] 通过这些技术，FMDV衣壳可以形成为空衣壳或病毒粒子衣壳，且包含根据本发明的VP2蛋白突变体。

[0086] 根据本发明的包含VP2蛋白突变体的FMDV病毒粒子衣壳从细胞培养分离，纯化，且测试稳定性，例如，响应于升高的温度，降低的pH，和化学灭活。随后测试处理的病毒粒子衣壳的完整性，其通过蔗糖梯度，随后通过电子显微镜或通过凝胶电泳，通过12S Elisa(Harmsen等人，2011, Vaccine, vol. 29, p. 2682)，或通过thermofluor测定(Walter等人，2012, J. of Virol.Meth., vol. 185, p. 166)。还在嗜斑测定中测试病毒粒子衣壳的活力。结果表明，根据本发明的VP2蛋白突变显著增强衣壳稳定性。

[0087] 例如，获得SAT-2血清型的包含根据本发明的FMDV VP2蛋白突变体的感染性FMDV病毒粒子衣壳，其包含取代VP2 S93H或VP2 S93Y。这些突变病毒在thermofluor测定中测试，且发现是非常稳定的：所述S93H突变体直至51℃是稳定的，且S93Y突变体直至53℃是稳定的。与仅直至47℃是稳定的感染性SAT-2亲本病毒的稳定性相比，这是令人印象深刻的。包含这些VP2蛋白突变体的感染性FMDV病毒粒子衣壳的确也在BHK-21细胞上良好复制，与野生型病毒完全相当。

[0088] 结果描述于下文实施例部分中。用于进行此类程序的方法和材料是本领域众所周知的，并且在本文中详细描述。因此，这些可以由技术人员仅仅使用常规的方法和材料容易地应用。

[0089] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及包含根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳。

[0090] 用于本发明的 FMDV “衣壳”是本领域已知的，并且是二十面体对称的大分子结构，其由 FMDV 结构病毒蛋白的高度规则排列组成。根据本发明的 FMDV 衣壳可以是 FMDV 空衣壳，或含有 FMDV RNA 的病毒粒子衣壳。此类 FMDV 病毒粒子衣壳可以是或不是感染性的，其取决于其包含的病毒遗传物质的状况。

[0091] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的 FMDV 衣壳是 FMDV 病毒粒子衣壳。

[0092] 根据本发明的 FMDV 病毒粒子衣壳可以是任何血清型的，并且可以包含任何根据本发明的 VP2 蛋白突变体。

[0093] 在一个进一步优选的实施方案中，根据本发明的 FMDV 病毒粒子衣壳包含根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体，所述 VP2 蛋白突变体包含选自以下的氨基酸的氨基酸取代：93Y、93F、93W 和 93H，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号，条件是所述取代不会导致具有血清型 A 的 FMDV 中的氨基酸序列 93H 的 VP2 蛋白。

[0094] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的 FMDV 衣壳是 FMDV 空衣壳。

[0095] 根据本发明的 FMDV 空衣壳可以是任何血清型的，并且可以包含任何根据本发明的 VP2 蛋白突变体。

[0096] 在一个进一步优选的实施方案中，根据本发明的 FMDV 空衣壳包含根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体，所述 VP2 蛋白突变体包含选自以下的氨基酸的氨基酸取代：93Y、93F、93W 和 93H，其中 VP2 蛋白氨基酸位置编号相对于 SEQ ID NO:1 中呈现的氨基酸的编号，条件是所述取代不会导致具有血清型 A 的 FMDV 中的氨基酸序列 93H 的 VP2 蛋白。

[0097] 根据本发明的 FMDV 衣壳可以以各种方式获得。例如，根据本发明的 FMDV 病毒粒子衣壳可以通过以下生成：操作 FMDV 遗传物质，转染入适当的宿主细胞，和在适当的宿主细胞（例如，BHK-21 细胞）中扩增包含根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的所得感染性 FMDV 病毒。

[0098] 或者，根据本发明的 FMDV 空衣壳可以经由体外基于细胞的表达系统来产生，因为这提供在得率和安全性方面的优点。表达系统可以基于原核或真核细胞；当真核细胞可以基于来自酵母、哺乳动物、昆虫或植物的宿主细胞，所有都如现有技术中所述。

[0099] 用于根据本发明的 FMDV 空衣壳的优选的体外表达系统是杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统 (BVES)，因为在该系统中，可以充分利用根据本发明衣壳的有利特性。这是因为通常用于 BVES 的昆虫细胞的培养基是相当酸性的，通常在约 6.5 的 pH。此外，在昆虫细胞上的典型表达运行在 27℃需要 5 天。两种情况对于非稳定的 FMDV 空衣壳本质上是不利的。

[0100] 事实上，发现在 BVES 中表达 O 血清型或 SAT 血清型之一的野生型 FMDV 空衣壳不是非常有效的，并且产生较少衣壳抗原。然而，当它们在 BVES 中表达包含根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的 FMDV 空衣壳，可以获得显著产量的空衣壳抗原。因此，发现稳定化的根据本发明的 FMDV 衣壳能够更好地抵抗 BVES 的条件。

[0101] 根据本发明的空 FMDV 衣壳的表达和组装可以以各种方式设置，条件是 FMDV 结构

蛋白，VP 1、3、4 和 VP2 蛋白突变体，以使得它们能够组装为完整的空衣壳的方式组合。在实践中，这可以通过同时或分开表达 VP 和在相同或不同宿主细胞中表达来设置。在用于本发明的表达系统的一个优选实施方案中，根据本发明的 FMDV 空衣壳的表达是借助在相同的宿主细胞中共表达所有 FMDV VP。这提供对所得衣壳产物的最佳控制。

[0102] 当根据本发明的 FMDV 衣壳以任何这些方式产生，所以通过病毒粒子衣壳的复制，或者通过空衣壳的表达，则那些衣壳中的 VP2 蛋白原则上完全由根据本发明的 VP2 蛋白突变体组成。这提供了此类衣壳的最稳定的组成。

[0103] 因此，在根据本发明的 FMDV 衣壳的优选实施方案中，衣壳中的 VP2 蛋白基本上由根据本发明的 VP2 蛋白突变体组成。

[0104] 尽管如此，本发明还允许生成 FMDV 衣壳，其中不是所有衣壳中的 VP2 蛋白是根据本发明的 VP2 蛋白突变体。通过混入或通过共表达，还可以并入野生型 VP2 蛋白的一些分子，导致 VP2 嵌合衣壳的形成。这可以是有利的，特别是当用根据本发明的感染性 FMDV 病毒粒子衣壳起作用时，因为这是微调根据本发明的所得 FMDV 病毒粒子衣壳的稳定性的方便方式。可以想象，在病毒粒子衣壳中仅包含 VP2 蛋白突变体可以制备此类对于 FMDV 太稳定而不能复制的衣壳。因此，提供了将一些野生型 VP2 蛋白引入 FMDV 病毒粒子衣壳可以将稳定性降低至可接受的水平。然而，优选含有尽可能多的根据本发明的 VP2 蛋白突变体，以便保留对于该感染性 FMDV 可允许的最高稳定性。

[0105] 因此，在根据本发明的 FMDV 衣壳的优选实施方案中，FMDV 病毒粒子衣壳中的 VP2 蛋白由多于 50% 的根据本发明的 VP2 蛋白突变体组成。更优选地，多于 60、70、80、90、95 或 99%，以该优先顺序。

[0106] 所述技术的使用导致生成包含根据（一些或更多）本发明的 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳。这为衣壳提供了源自其增强的生物物理稳定性的有益的特性和有利的效用。

[0107] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及用于增强 FMDV 衣壳的稳定性的方法，其包括提供包含根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳的步骤。

[0108] “增强的稳定性”是指与含有野生型 VP2 蛋白的衣壳相比，含有 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳的改善的生物物理稳定性。稳定性可以在不同的物理参数诸如温度、酸度、剪切和 FMDV 衣壳在其生成和其用作疫苗抗原过程中可以暴露的其他挑战方面得到改善。

[0109] 正常疫苗技术中的此类挑战的实例是，例如在病毒粒子衣壳的情况下化学灭活，在不同温度储存和转运，以及用佐剂配制。

[0110] 获得的稳定性改善的水平可以使用多种方法来评价，所述方法例如蔗糖梯度、凝胶电泳、电子显微镜、thermofluor 测定等，如本文中所述。

[0111] 上面已经描述了“提供具有 FMDV VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳”的步骤的细节和实施方案，并且可以使用各种重组 DNA 技术诸如共表达和相互混合来方便地进行，同时形成 FMDV 衣壳。

[0112] 对于生成和应用根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的这种和其他效用，优选的方法是通过重组 DNA 技术，其涉及使用可以表达此类根据本发明的 VP2 蛋白突变体的核酸分子。

[0113] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及编码根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体的分离的核酸分子。

[0114] 术语“分离的”应当理解为：通过有意动作或人为干预；例如通过用于生物化学纯化的体外过程，从其天然背景分离。

[0115] 通常，“编码”蛋白（此处：根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体）的核酸分子是开放阅读框 (ORF)，表明不存在过早终止翻译为蛋白的不期望的终止密码子。对于本发明，核酸分子编码完整 FMDV VP2 蛋白，并且它可以是天然或合成来源的。

[0116] 对于本发明，根据本发明的核酸分子的确切核苷酸序列不是关键的，条件是所述核苷酸序列允许表达期望的氨基酸序列，此处：期望的 FMDV VP2 蛋白突变体。然而，如本领域众所周知，由于’遗传密码的简并性’，不同的核酸可以编码相同的蛋白。因此，两种不同的核酸可以具有高达 30％的核苷酸序列异质性，同时仍编码相同的蛋白。

[0117] 对于本发明，核酸分子可以是 DNA 或 RNA 分子。这取决于用于其分离的源材料，和预期用途。技术人员非常知道从各种起始材料分离一种或其他类型的分子的方法，和将一种类型转化为另一种类型的方法。

[0118] 根据本发明的分离的核酸分子可以在载体诸如 DNA 质粒（当其呈 DNA 形式时）的背景下方便地操作。这使得能够通过各种分子生物学技术扩增分离的核酸分子，例如，在细菌培养物中，和操作分离的核酸分子。各种各样的合适的质粒载体是可商购的。

[0119] 为了允许根据本发明的分离的核酸分子以实际表达根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体，其需要适当的表达控制信号和合适的环境。例如，核酸分子需要可操作地连接至上游启动子元件，且需要在编码序列的末端含有翻译终止。通常，在特定表达系统的背景下使用的质粒和载体将提供此类信号。此外，转录和翻译的生物分子机器通常由用于此类表达的宿主细胞提供。通过修饰这些各种元件，根据本发明的 VP2 蛋白突变体的表达可以在例如时机、水平和质量方面进行优化；这都在技术人员的常规能力之内。

[0120] 因此，在一个优选的实施方案中，根据本发明的分离的核酸分子另外包含表达控制信号。

[0121] 用于本发明中的重组表达系统通常采用宿主细胞，其可以在体外培养。本领域众所周知的是来自细菌、酵母、真菌、植物、昆虫或脊椎动物细胞表达系统的宿主细胞。

[0122] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及包含根据本发明的FMDV VP2蛋白突变体、根据本发明的 FMDV 衣壳和 / 或根据本发明的分离的核酸分子的宿主细胞。

[0123] 通过表达根据本发明的分离的核酸分子，根据本发明的宿主细胞可以方便地用于产生根据本发明的FMDV VP2 蛋白突变体。优选地，根据本发明的宿主细胞还表达其他 FMDV VP，并且允许组装根据本发明的 FMDV 空衣壳。根据表达系统的特征和设置，然后可以使用下游处理和纯化从宿主细胞（例如通过裂解）或从其培养基获得空衣壳。或者，包含均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体或 FMDV 空衣壳的宿主细胞可以用作此，例如用作疫苗。

[0124] 将均根据本发明的FMDV VP2蛋白突变体、FMDV 衣壳和 / 或分离的核酸分子表达和 / 或递送至目标动物的一种众所周知且有效的方式是借助活重组载体微生物 (LRCM)。LRCM 可以感染目标动物和在动物或其细胞中复制。通过该方式，均根据本发明的核酸分子、FMDV VP2 蛋白突变体或 FMDV 衣壳以与作为配制的疫苗注射后发生的不同方式递呈于目标动物的免疫系统。这可以提供更有效的免疫刺激。

[0125] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及包含根据本发明的分离的核酸分子的活重组载体微生物 (LRCM)。

[0126] 此类 LRCM 是例如能够在待针对 FMD 接种的动物目标中存活的重组细菌、寄生虫、病毒或酵母细胞。根据本发明的核酸分子的递送可以例如刺激目标的抗原递呈细胞以表达目标，且将所得蛋白递呈至在 MHC1 和 / 或 MHC2 的背景下的其免疫系统，诱导有效的免疫应答。

[0127] LRCM 的一个进一步优点是它们的自我繁殖，使得仅低量的重组载体对于免疫是必需的。

[0128] 因此，本发明的优选的 LRCM 是可以在需要针对 FMD 接种的目标动物（优选地，牛、水牛、猪、绵羊和山羊）中复制的微生物。此外，LRCM 不应当对于目标动物（太）致病。此类适当的 LRCM 的实例是以下的减毒或非致病性分离株 ：细菌 ：大肠杆菌、沙门氏菌属 ；寄生虫 ：弓形虫属或新孢子虫属 ；或病毒 ：痘病毒（痘苗 (Vaccinia)，牛痘 (cowpox)）、腺病毒、疱疹病毒或狂犬病毒。技术人员能够针对特定目标动物进行适当的选择和适应。

[0129] 对于 LRCM 的构建，体外同源重组的众所周知技术可用于将根据本发明的分离的核酸分子稳定地引入 LRCM 的基因组。或者，根据本发明的分离的核酸分子还可以染色体外引入 LRCM，以允许瞬时或附加体表达。

[0130] 如上所述，本发明的实施方案的优选效用是兽医医学应用中，特别是用于针对 FMD 的接种。

[0131] 如本领域众所周知，在体外更稳定的 FMDV 衣壳还将提供用作疫苗之后改善的体液免疫应答。原因是，样品中存在更完整衣壳 ；有效地这导致更高剂量的改善的免疫原性质量的抗原。

[0132] 然而，为了证实且为了说明本发明的有利效用，使用含有 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳作为空衣壳或作为病毒粒子衣壳（其被配制为 FMD 疫苗且用于动物接种）进行许多体内实验。下面描述详情。

[0133] 从类似的 SAT-2 血清型 FMDV VP2 蛋白突变体衣壳制备的 FMD 疫苗，能够在豚鼠中诱导 - 甚至储存 1 个月之后 - 与其野生型 SAT-2 亲本毒株的疫苗诱导的相比显著更大数目的接种者中的病毒中和免疫应答 ：10/10 具有中和水平的抗体，相比之下，接受未取代的 VP2 蛋白衣壳的目标只有 2/10。

[0134] 用类似的突变型和野生型 SAT-2 疫苗重复该实验，除了它们现在已经储存 6 个月。接种豚鼠，且在接种后 12 天测试血清转化。血清学显示，接受含有野生型 VP2 蛋白的衣壳疫苗的豚鼠没有血清转化，而 6/10 接受含有 VP2 蛋白突变体的衣壳疫苗的豚鼠具有显著水平的病毒中和抗体。对于详情和结果，参见实施例。

[0135] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳、分离的核酸分子、宿主细胞和 / 或 LRCM，其用作针对 FMD 的疫苗。

[0136] 在一个进一步方面，本发明涉及均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳、分离的核酸分子、宿主细胞和 / 或 LRCM，其用于针对 FMD 接种。

[0137] 在一个进一步方面，本发明涉及针对 FMD 的疫苗，其包含均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳、分离的核酸分子、宿主细胞和 / 或 LRCM，和药学上可接受的载体。

[0138] 在一个进一步方面，本发明涉及均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳、分离的核酸分子、宿主细胞和 / 或 LRCM 用于制备针对 FMD 的疫苗的用途。

[0139] “疫苗”在目标动物中诱导免疫应答，其有助于预防、改善、降低由微生物感染导致的疾病或病症的敏感性，或治疗由微生物感染导致的疾病或病症。作为施用至少一种源自该微生物的抗原分子的结果，实现了疫苗诱导的保护。这将引起目标显示微生物引起的临床体征的数目或严重度的降低。这可以是微生物侵袭或感染率降低的结果，导致由微生物或由目标针对其的响应引起的病变和效果的数目或严重度的降低。

[0140] 术语“疫苗”暗示使用免疫有效量的抗原化合物，和存在药学上可接受的载体。用于本发明的抗原化合物是均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳、宿主细胞和 / 或 LRCM。

[0141] 在根据本发明的分离的核酸分子的情况下，该核酸本身不是抗原，但当在适当条件下表达时将产生抗原。

[0142] 何者构成免疫有效量的根据本发明的针对 FMD 的疫苗取决于正在使用的疫苗的期望效果和具体特征。有效量的确定完全在常规操作者的技术之内，例如通过监测接种后或攻击感染后的免疫应答，例如通过监测目标的疾病的临床体征，血清学参数，或通过病原体的重新分离，且将这些与模拟接种的动物中看到的应答进行比较。

[0143] 在比较接种和模拟接种的目标动物之后，根据本发明的疫苗的效力变得明显。评价此类疫苗效力的方法是本领域众所周知的。

[0144] “FMD”是特征在于众所周知的症状的疾病，并且可以通过本领域均众所周知的各种诊断或微生物技术进行诊断。

[0145] 通过监测通常由 FMDV 引起的疾病的症状，例如以临床评分表达，使得然后可以比较接种对于感染后接种和模拟接种的目标动物的临床得分的效果，技术人员可以容易地观察到根据本发明的针对 FMD 的疫苗引起的对目标动物的 FMD 的临床体征的水平的差异。

[0146] “药学上可接受的载体”有助于活性疫苗化合物的有效施用，而不会对施用的目标动物的健康引起（重度的）不利影响。此类载体可以例如是无菌水或无菌生理盐溶液。以更复杂的形式，载体可以例如是缓冲剂，其可以包含进一步添加剂，诸如稳定剂或防腐剂。细节和实例例如描述于众所周知的手册，诸如：“Remington: the science and practice of pharmacy”(2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472)，和：“Veterinary vaccinology”(P. Pastoret 等人编，1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681)。

[0147] 如描述用于本发明的一个进一步有利效果是预防或减少 FMDV 在地理区域或群体中的传播，感染的所谓的水平传播。因此，这导致 FMDV 的流行率的降低。在本实施方案中，所述疫苗阻断，或至少降低 FMDV 传播。

[0148] 因此，在一个优选的实施方案中，根据本发明的针对 FMD 的疫苗可用于降低地理区域中 FMDV 的流行率。

[0149] 根据本发明的针对 FMD 的疫苗，当含有呈 DNA 形式的根据本发明的核酸分子时，有效地是所谓的“DNA 疫苗”。在此实施方案中，将 DNA 分子引入目标动物；当它被吸收入细胞时，其得到表达，且所得蛋白被递呈至目标的免疫系统，生成免疫应答。在该情况下，表达的蛋白优选地是根据本发明的 FMDV 空衣壳。DNA 疫苗可以以各种方式引入，并且可以呈不同的形式，作为裸 DNA 或修饰 DNA，或附着至载体（例如金颗粒）或被载体（例如金颗粒）封装。

[0150] 对于许多不同的蛋白，用 DNA 直接接种已经成功，如综述于例如 Donnelly 等人

(1993, The Immunologist, vol. 2, p. 20-26)。对于FMDV,参见Kim等人(2006, J. of Gene Med., vol. 8, p. 1182)。

[0151] 尽管根据本发明的FMDV衣壳具有增强的生物物理稳定性,但根据本发明的针对FMD的疫苗可以包含稳定剂,例如以保护敏感组分免于降解,以增强疫苗的储存期,和/或改善冷冻干燥效率。通常,稳定剂是高分子量的大分子,诸如脂质、碳水化合物或蛋白;例如乳粉、明胶、血清白蛋白、山梨糖醇、海藻糖、亚精胺、葡聚糖或聚乙烯吡咯烷酮,和缓冲剂,诸如碱金属磷酸盐。

[0152] 优选地,稳定剂无动物来源的化合物,或者甚至:化学确定的化合物,如公开于WO 2006/094,974。

[0153] 还可以添加防腐剂,诸如硫汞撒(thimerosal)、硫柳汞(merthiolate)、酚类化合物和/或庆大霉素。

[0154] 不用说,将其他化合物诸如载体、稀释剂、乳剂等混合至根据本发明的疫苗也在本发明的范围之内。此类添加剂描述于众所周知的手册诸如:“Remington”和“Veterinary Vaccinology”(两者都同上)。

[0155] 出于例如稳定性或经济的原因,根据本发明的针对FMD的疫苗可以进行冷冻干燥。通常,这将使得能够在高于零℃(例如在4℃)的温度的储存延长。

[0156] 用于冷冻干燥的程序是本领域技术人员已知的,且用于以不同规模冷冻干燥的设备是可商购的。

[0157] 因此,在一个更优选的实施方案中,根据本发明的针对FMD的疫苗的特征在于,所述疫苗呈冷冻干燥的形式。

[0158] 为了重构冷冻干燥的疫苗组合物,将其悬浮于生理上可接受的稀释剂中。这通常在临使用前进行,以验证疫苗的最佳质量。稀释剂可以例如是无菌水或生理盐溶液。待用于重构疫苗的稀释剂本身可以含有额外化合物,诸如佐剂。在另一个实施方案中,冷冻干燥的疫苗可以悬浮于如EP 382.271中所示的乳剂中。

[0159] 在冷冻干燥的根据本发明的疫苗的一个进一步实施方案中,用于疫苗的稀释剂与包含疫苗的剩余部分的冷冻干燥饼分开供应,并且优选为缓冲的稀释剂。在该情况下,冷冻干燥的疫苗和稀释剂组合物形成一起实施本发明的试剂盒的部分。

[0160] 因此,在冷冻干燥的根据本发明的针对FMD的疫苗的一个优选的实施方案中,疫苗包含于具有至少两种类型的容器的部分的试剂盒中,一种容器包含冷冻干燥的疫苗,一个容器包含含水稀释剂。

[0161] 根据本发明的针对FMD的疫苗可以额外包含所谓的“媒介物”;这是均根据本发明的蛋白、核酸、宿主细胞和/或LRCM粘附、而非与其共价结合的化合物。此类媒介物一般是本领域均已知的生物微囊、微海藻酸盐、脂质体、大分子溶胶(macrosol)、氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝或氧化铝、二氧化硅、高岭土™和膨润土™。

[0162] 一个实例是其中抗原部分嵌入免疫刺激复合物的媒介物,所谓的ISCOM™(EP 109.942,EP 180.564,EP 242.380)。

[0163] 此外,根据本发明的针对FMD的疫苗可以包含一种或多种合适的表面活性化合物或乳化剂,例如来自Span™或Tween™家族的组分。

[0164] 根据本发明的针对FMD的疫苗的目标显然是易受FMDV感染的动物,如上所述。然

而，待接种的目标动物的年龄、体重、性别、免疫状态和其他参数不是关键的。然而，接种健康目标且尽可能早接种以防止任何野外感染显然是有利的。根据本发明的针对FMD的疫苗的目标动物对于FMDV或针对FMDV的抗体可以是血清阳性或阴性的。由于FMDV的感染可以在幼龄已经建立，因此，可以在出生后第2周内应用根据本发明的针对FMD的疫苗；然而，对于在幼龄有效接种，需要考虑母体来源的抗体的存在。

[0165] 根据本发明的针对FMD的疫苗同样可以用作预防性和治疗性治疗，且干扰FMDV感染或其疾病的临床体征的建立和/或进展。

[0166] 根据本发明的针对FMD疫苗可以有效地充当引发接种，其以后可以通过用根据本发明的相同疫苗或用灭活的完整FMDV病毒疫苗的加强接种跟随和放大。

[0167] 将根据本发明的针对FMD的疫苗应用于目标动物的方案可以呈单个或多个剂量，其可以与所需剂量和制剂相容的方式且以此类对于目标动物免疫有效的量同时或相继给予。

[0168] 用于施用根据本发明的针对FMD的疫苗的方案理想地并入用于该目标动物的其他疫苗的现有接种时间表。

[0169] 在其中FMD接种常见的区域中，标准程序是以6个月间隔再接种。因此，根据本发明的针对FMD的疫苗有利地以半年剂量应用。

[0170] 根据本发明的针对FMD的疫苗可以含有0.1至1000 μg根据本发明的FMDV衣壳的剂量施用。原则上可以使用较小或较大的剂量；优选地，疫苗剂量含有10至1000 μg根据本发明的FMDV衣壳。

[0171] 根据本发明的针对FMD的疫苗可以对于目标动物可接受的体积施用，例如，一个疫苗剂量可以是0.1至10 ml。优选地，一个剂量的体积为0.25至5 ml。

[0172] 根据本发明的针对FMD的疫苗可以根据本领域已知的方法施用于目标动物。优选的应用是通过肠胃外途径，诸如通过注射至皮肤或通过皮肤注射的所有途径：例如，肌肉内、静脉内、腹膜内、皮内、粘膜下或皮下。

[0173] 不用说，应用的最佳途径将取决于使用的特定疫苗制剂和目标动物的具体特征。

[0174] 根据本发明的针对FMD的疫苗的优选应用途径是通过肌肉内或皮下注射。

[0175] 当疫苗基于根据本发明的FMDV空衣壳时，根据本发明的针对FMD的疫苗可以有利地用作标记疫苗。标记疫苗被称为允许区别接种和感染的受试者的疫苗（所谓：DIVA原理）。区别可以例如通过检测标记疫苗特征性抗体谱来进行，所述标记疫苗特征性抗体谱与被野生型感染病原体感染引起的抗体谱不同。对于本发明，可以例如进行在针对FMDV非结构蛋白的抗体方面的该差异；此类抗体可以在被复制FMDV病毒粒子感染的情况下、但不是在用空衣壳接种之后产生。这可以通过血清学测定诸如ELISA或免疫荧光测定来方便地检测。

[0176] 因此，在一个优选的实施方案中，根据本发明的针对FMD的疫苗是标记疫苗。

[0177] 进一步优化根据本发明的针对FMD的疫苗完全在技术人员所及之内。通常，这涉及微调疫苗的效力，使得其提供了足够的免疫保护。这可以通过以下进行：调整疫苗剂量、体积或抗原含量；使用另一种形式的疫苗或制剂；调整疫苗的其他成分（例如稳定剂或佐剂）；或者经由不同的途径应用。

[0178] 根据本发明的针对FMD的疫苗可以额外包含其他化合物，诸如佐剂，额外抗原，细

胞因子等。或者，根据本发明的针对 FMD 的疫苗可以有利地与药物组分诸如抗生素、激素或抗炎药组合。

[0179] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的针对 FMD 的疫苗的特征在于其包含佐剂。

[0180] “佐剂”是众所周知的疫苗成分，其通常是以非特异性方式刺激目标的免疫应答的物质。许多不同的佐剂是本领域已知的。佐剂的实例是：弗氏完全和不完全佐剂，维生素 E，非离子型嵌段聚合物和多胺诸如硫酸葡聚糖，卡波普和吡喃，铝化合物，诸如磷酸铝或氢氧化铝，皂苷，优选 QuilA ™等。

[0181] 此外，肽诸如胞壁酰二肽，二甲基甘氨酸，特夫素 (tuftsin)，通常用作佐剂，且可以有利地使用矿物油，例如 Bayol ™或 Markol ™，Montanide ™或轻质石蜡油，植物油或组合产品诸如来自 Seppic ™的 ISA ™或 DiluvacForte ™。乳剂可以是例如油包水 (w/o)、水包油 (o/w)、水包油包水 (w/o/w) 或双油乳剂 (DOE)。

[0182] 用于根据本发明的针对 FMD 的疫苗的优选佐剂是包含明矾组合物或油乳剂的佐剂。更优选的是明矾组分和油乳剂的组合。

[0183] 不用说，佐剂化、添加媒介物化合物或稀释剂，乳化或稳定疫苗的其他方式也在本发明的范围之内。此类添加例如描述于众所周知的手册。

[0184] 根据本发明的针对 FMD 的疫苗可以与另一种抗原有利地组合。

[0185] 因此，在一个更优选的实施方案中，根据本发明的针对 FMD 的疫苗是包含额外的免疫活性组分的组合疫苗。

[0186] “额外的免疫活性组分”可以是抗原、免疫增强物质和 / 或疫苗；这些中任一种可以包含佐剂。

[0187] 呈抗原形式的额外的免疫活性组分可以由具有兽医重要性的任何抗原组分组成。其可以例如包含生物或合成的分子，诸如蛋白、碳水化合物、脂多糖、或编码蛋白抗原的核酸分子。此外，包含此核酸的宿主细胞，或含有此核酸分子的 LRCM，可以是递送核酸分子或额外免疫活性组分的方式。或者，其可以包含分级或杀灭的微生物，诸如寄生虫，细菌或病毒，或任何这些的亚单位。

[0188] 额外免疫活性组分可以是免疫增强物质，例如趋化因子，或包含 CpG 基序的免疫刺激核酸的形式。或者，根据本发明的针对 FMD 的疫苗可以自身添加至疫苗。

[0189] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的疫苗可以是均根据本发明的一种或多种 VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳和 / 或疫苗的组合，以允许针对特定 FMDV 血清型的有效的免疫保护。

[0190] 在一个进一步优选的实施方案中，根据本发明的疫苗可以是均根据本发明的源自不同 FMDV 血清型的一种或多种 VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳和 / 或疫苗的组合，以提供针对多于一种 FMDV 血清型的有效且广泛的免疫保护。

[0191] 在一个进一步优选的实施方案中，根据本发明的疫苗可以与不是根据本发明的疫苗的 FMDV 疫苗诸如灭活的 FMDV 或 FMDV 亚单位疫苗组合，以形成针对 FMD 的广泛组合疫苗。

[0192] 在一个进一步优选的实施方案中，根据本发明的 FMD 疫苗包含来自多于一种 FMDV 血清型的抗原；更优选地，FMD 疫苗是多价的，因为其保护免于来自特定 FMDV 血清型的多于一种变体的感染，由此抗原的实际组合通过在地理区域中的流行率来确定。

[0193] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的组合疫苗的特征在于，额外免疫活性组分或编码所述额外免疫活性组分的核酸分子是或获得自感染也是根据本发明的针对 FMD 的疫苗的目标动物的动物的微生物。

[0194] 此类根据本发明的组合疫苗的优点是，其不仅诱导针对 FMD 的免疫应答，而且诱导针对其他病原体的免疫应答，而仅需要单一操作接种的动物目标，由此防止对目标动物的不必要的接种应激，以及时间和劳动成本的降低。

[0195] 此类额外免疫活性组分的实例在原则上是适于接种动物的所有病毒、细菌和寄生虫病原体，所述动物也是根据本发明的针对 FMD 的疫苗的目标动物。

[0196] 例如，对于猪：猪圆环病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、伪狂犬病毒、猪细小病毒、经典猪瘟病毒、猪肺炎支原体、胞内劳森氏菌 (Lawsonia intracellularis)、大肠杆菌、链球菌，沙门氏菌、梭状芽胞杆菌、胸膜肺炎放线杆菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae)、巴斯德氏菌、嗜血杆菌、丹毒杆菌 (Erysipelothrix)、博代氏杆菌、弓形虫、等孢子球虫 (Isospora)、旋毛虫等。

[0197] 对于牛：新孢子虫 (Neospora)、网尾线虫 (Dictyocaulus)、隐孢子虫 (Cryptosporidium)、奥斯特线虫 (Ostertagia)、巴贝西虫 (Babesia)、泰勒虫 (Theileria)、无浆体 (Anaplasma)、锥虫 (Trypanosoma)、考德里氏体 (Cowdria)、弓形虫 (Toxoplasma)、牛轮状病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛冠状病毒、牛感染性鼻气管炎病毒（牛疱疹病毒）、牛副粘病毒、牛副流感病毒、牛呼吸道合胞病毒、狂犬病病毒、蓝舌病病毒、溶血巴斯德氏菌、大肠杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌、分枝杆菌、布鲁氏菌、梭状芽胞杆菌、曼氏杆菌、嗜血杆菌、梭状杆菌等。

[0198] 对于绵羊或山羊：弓形虫、新孢子虫、考德里氏体、巴贝西虫、泰勒虫、无浆体、艾美耳球虫、锥虫、peste des petit 反刍动物病毒、蓝舌病病毒、施马伦贝格病毒、分枝杆菌、布鲁氏菌、梭状芽胞杆菌、柯克斯体、大肠杆菌、衣原体、梭状芽胞杆菌、巴斯德氏菌、曼氏杆菌等。

[0199] 根据本发明的针对 FMD 的疫苗通过技术人员众所周知的方式制备。

[0200] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及用于制备根据本发明的针对 FMD 的疫苗的方法，其包括混合均根据本发明的 FMDV VP2 蛋白突变体、FMDV 衣壳、分离的核酸分子、宿主细胞和 / 或 LRCM，和药学上可接受的载体。

[0201] 根据本发明的针对 FMD 的疫苗可以通过如本文所述的本领域技术人员容易适用的方法来制备。例如，根据本发明的 FMDV 衣壳可以通过以下在较小或较大体积中工业生产：在适当的宿主细胞上复制病毒粒子衣壳，或在表达系统中的宿主细胞中表达空衣壳。此类培养物收获为全细胞或细胞裂解物。

[0202] 在感染性 FMDV 病毒粒子衣壳的情况下，通常首先灭活体外培养的最终产物。这可以几种方式来完成，通常通过化学灭活，诸如用福尔马林、β - 丙内酯 (BPL)、二乙烯亚胺 (BEI) 或 β - 乙醇胺 (BEA)。

[0203] 裂解物可以通过物理 (French 压碎、超声仪）或化学（去污剂）方式来产生。悬浮液可以进一步纯化，或浓缩，例如通过离心或过滤。所得抗原制剂然后与药学上可接受的赋形剂组合，配制为疫苗，且填充入适当大小的容器中。制备过程的各个阶段通过足够测试来监测，例如通过针对抗原的质量和数量的免疫学测试；通过针对外来剂的灭活、无菌和不

存在的微生物测试；且最终通过针对疫苗有效性和安全性的动物研究。所有这些都是技术人员众所周知的。针对质量、数量和无菌广泛测试之后，此类疫苗产品发布用于销售。

[0204] 应用于制备疫苗的通用技术和考虑是本领域众所周知的，并且描述于例如政府法规（药典）和手册诸如："Veterinary vaccinology"和："Remington"（两者都同上）。

[0205] 根据本发明的针对 FMD 的疫苗可以采用适于施用于目标动物且匹配期望的应用途径和期望效果的任何形式。

[0206] 优选地，以适合于注射的形式（因此可注射的液体，诸如悬浮液、溶液、分散液或乳剂）配制根据本发明的针对 FMD 的疫苗。通常无菌制备此类疫苗。

[0207] 用于本发明中的乳剂可以例如是 w/o、o/w、w/o/w 或 DOE。

[0208] 如所述，根据本发明的针对 FMD 的疫苗可以各种方式应用于适当的目标动物。

[0209] 因此，在一个进一步方面，本发明涉及用于针对 FMD 接种易感 FMDV 的动物的方法，其包括用根据本发明的针对 FMD 的疫苗接种动物的步骤。

[0210] 本发明现在将参考以下非限制性实施例进一步描述。

实施例

[0211] 1. 材料和方法

1.1. 细胞和病毒

根据标准程序维持幼仓鼠肾 (BHK) 克隆 13 细胞（株系 21；ATCC CCL-10）。使用标准程序在 BHK-21 细胞中扩增和滴定 FMDV 储备物。培养的 BHK-21 细胞也用于 RNA 转染和病毒回收。此外，在 IB-RS-2 (Instituto Biologico renal suino) 细胞或中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞（株系 K1; ATCC CCL-61）中进行噬斑测定，所述 IB-RS-2 (Instituto Biologico renal suino) 细胞或中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞（株系 K1; ATCC CCL-61）分别在补充 10％胎牛血清 (FCS, Delta Bioproducts) 的 RPMI 培养基 (Sigma) 和 Ham's F-12 培养基 (Invitrogen) 中繁殖。

[0212] 在 BHK-21 细胞中进行 FMDV 病毒粒子衣壳的一步生长动力学分析。简而言之：BHK-21 细胞被病毒以 2 - 4 pfu/细胞的 m.o.i. 感染 1 小时，用 MBS-缓冲液 (25mM 吗啉-乙磺酸，145 mM NaCl, pH 5.5) 洗涤。在 37℃孵育指定时间间隔之后，在感染后 (p.i.) 2、4、6、8、10、12、16 和 20 小时收获被感染的细胞，且随后冷冻在 -70℃。测定病毒滴度，且表示为噬斑形成单位 / 毫升 (pfu/ml)。

[0213] 在原代猪肾 (PK) 细胞上进行感染性拷贝克隆之后病毒的分离，如 Maree 等人 (2010, Virus Res., vol. 153, p. 82) 中所述。在 BHK-21 细胞上进行野生型和重组 FMD 病毒的培养、传代和扩增；冷冻和解冻被感染或转染的 35 mm BHK-21 细胞单层，且 1/10 的体积用于接种新鲜的 BHK-21 单层。病毒吸附（在 37℃周期性摇动 60 分钟）之后，添加病毒生长培养基 (VGM；具有 1% FCS、1% HEPES 和抗生素的 Eagle 氏基础培养基 (BME))，且将培养物在 37℃孵育不超过 48 小时，其后冷冻被感染细胞，用于随后的病毒传代。

[0214] 1.2.FMDV 的感染性克隆

感染性克隆技术用作生成包含特异性 VP2 蛋白突变体的感染性病毒粒子衣壳的方便方法。应用的程序基本上如 Rieder 等人 (1994, J. Virol., vol.68, p. 7092) 中所述。简而言之：

1.2.1.结论：

遵循交换盒策略使用用于模板的FMDV A12基因组全长克隆构建SAT-2疫苗株ZIM/7/83的基因组长度cDNA拷贝，如所述(Rieder等人，1993, J. of Virol., vol. 67, p. 5139; Van Rensburg等人，2002, Ann. N Y Acad. Sci., vol. 969, p. 83)。该初始构建体用于转染体外合成的RNA转录物，随后回收感染性病毒粒子。这随后进行优化以允许用DNA直接转染BHK-21细胞和交换外衣壳编码区域。该系统用于制备合成的RNA或质粒DNA，用于转染BHK-21细胞和生成可行的SAT-2 FMDV。

[0215] 1.2.2.定点诱变：

使用扩增子重叠-延伸PCR和定点诱变，使用QuickChange XLII™诱变试剂盒(Clontech)根据制造商的说明(Papworth等人，1996, Strategies, vol. 9, p. 4)进行感染性克隆质粒的定点诱变。简而言之，每种PCR方法涉及使用两个基因组特异性重叠(反向互补)寡核苷酸，以便将突变引入不同的PCR产物。设计诱变引物为40至49个核苷酸长，编码具有匹配突变两侧的病毒序列的重叠序列的约15至20个核苷酸的期望突变。PCR用Pfu Ultra Taq™聚合酶进行，循环条件使用：95℃持续50秒，60℃持续60秒，68℃持续6分钟(18个循环)。

[0216] PCR扩增子用适当的限制性酶切出，且用于转染超感受态XL10-Gold™大肠杆菌细胞。通过测序证实引入的核苷酸突变之后，将含有编码VP2蛋白突变体的区域的DNA片段插入DNA克隆质粒用于进一步使用。

[0217] 1.2.3.体外 RNA合成、转染和病毒回收

用MEGAscript™ T7试剂盒(Ambion)从线性化质粒DNA模板合成RNA。通过琼脂糖凝胶电泳检查转录物RNA以评估它们的完整性，且分光光度测定RNA浓度。用体外生成的RNA使用Lipofectamine2000™ (InVitrogen)转染35 mm细胞培养孔(Nunc™)中的BHK-21细胞单层。转染培养基在3-5小时后去除，且替换为病毒生长培养基，随后在37℃在5 % CO_2流入的情况下孵育长达48小时。一个冷冻-解冻循环之后，转染上清液用于在BHK-21细胞上连续传代。使用1/10的澄清的感染上清液感染35 mm细胞培养孔中的BHK-21细胞单层，且在37℃孵育48小时。随后通过冷冻-解冻循环从感染的细胞收获病毒，且使用10％来自前代的上清液，在BHK-21细胞上传代四次。回收可行(重组)病毒之后，使用ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 (Perkin Elmer Applied Biosystems)用自动化测序再次验证收所述病毒的完整性。通常在分析之前将病毒传代四次。

[0218] 1.2.4.RNA提取、cDNA合成和 PCR扩增。

[0219] 使用标准的基于胍的核酸提取方法或TRIzol™试剂(Life Technologies)根据制造商的说明从感染的细胞裂解物提取RNA，且用作用于cDNA合成的模板。病毒cDNA用SuperScript III™ (Life Technologies)合成，如Bastos等人(2001, Arch. Virol., vol. 146, p. 1537)中所述。

[0220] 1.3. 病毒中和测试

通过使用基本上如OIE Manual of Standards (2009)中所述的微量中和试验进行接种动物中的病毒中和抗体反应的检测。通过用与针对其检测到抗体反应的病毒相同或相当的FMDV连续两次接种(在第0天接种，在第28天加强，且在第38天采血)制备参考牛血

清。IB-RS-2 细胞用作中和试验中的指示系统。针对同源和异源病毒的血清的终点滴度被计算为中和 50 %孔中的 100 TCID50 病毒的血清的最后稀释度的倒数。计算野生型和工程改造的 FMDV 病毒相对于参考血清的单因素抗原关系 (R1- 值),且表示为异源 / 同源血清滴度之间的比率。所有中和滴度测定重复至少两次。

[0221] 1.4. 蔗糖密度梯度纯化

蔗糖密度梯度分离用于纯化病毒粒子衣壳,以及空衣壳,和在产生、灭活或收获的不同阶段。

[0222] 收获来自表达系统诸如牛痘或杆状病毒的 FMDV 空衣壳,上样至 15-45%蔗糖梯度且在 12℃以 22.000 rpm (SW41 转子, Beckman) 离心 20 小时。

[0223] 收获来自细胞培养的 FMDV 病毒粒子衣壳,澄清,在 4℃用 8 % (w/v) PEG 6000 浓缩。将沉淀溶解于具有 200 mM NaCl 和 1 % NP40 的 50 mM HEPES (pH 8.0) 中,且在 4℃通过以 36.000xg 速率区带离心在 HEPES/NaCl 中的 10-50 % (w/v) 蔗糖密度梯度上解析。

[0224] 接下来,分级每个梯度,且通过测量 260nm 处的吸光度分光光度分析级分。含有 146S 病毒粒子的级分基于吸收进行定量,且合并用于分析。通过琼脂 - 凝胶蛋白电泳使用标准的 SDS-PAGE 方案或 Western 印迹验证外衣壳蛋白的存在。通过 RT-PCR 和 VP1 编码区的测序验证病毒粒子衣壳中的 RNA 的完整性。

[0225] 1.5. 杆状病毒表达系统

杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统 (BVES) 用于表达具有亲本 VP2 或 VP2 蛋白突变体的 FMDV 空衣壳。程序基本上如以下所述 (Porta 等人, 2013, J. Virol. Methods, vol. 187, p. 406)。简而言之: 使 Sf9 细胞在 27.5℃在补充 2 % FCS 和抗生素的 Insect-XPRESS™ (Lonza) 中生长。将转移载体和 AcMNPV 杆粒 KO1629 (各 0.5 μg) 在室温在 3 μl Fugene™ (Roche) 存在的情况下混合 20 分钟,且用于在 6 孔板中以 1.2 x 10^6/ 孔的密度转染 Sf9 细胞。

[0226] 由于敲除基因 1629 的杆状病毒 DNA 不起始感染,除非通过用杆状病毒转移载体重组来拯救,所以 5 天后培养物上清液中收获的 AcMNPV 是 100%重组病毒。病毒储备物通过用 200 μl 重组病毒接种物 /175 cm^2烧瓶感染 70 %汇合度的 Sf9 细胞单层产生,且在 5 天后从培养上清液收获。或者,使用滚瓶中的粘附的细胞培养物,和 2 1 悬浮培养物。对于空衣壳的表达,1-2 10^6/ml 的密度的 SF9 细胞用 1/10 体积的杆状病毒储备物感染。3 天之后,用 1 % Triton X-100 在 5 μl/ml 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma) 存在的情况下进行病毒提取。

[0227] 1.6. 牛痘表达系统

牛痘病毒表达系统用于表达包含野生型 VP2 蛋白或 VP2 蛋白突变体的 FMDV 空衣壳。程序基本上如 King 等人 (同上) 中所述,这些已经应用于血清型 O、SAT2 和 A。简而言之,A22 例举的程序如下。

[0228] 1.6.1. 牛痘病毒转移载体

设计基于 FMDV A22 Iraq 的序列的表达盒,从头合成 (Geneart™),且克隆入 T7 启动子下游的牛痘病毒转移载体 pBG200。用编码 VP2 H93F 突变的序列取代 BstEII-SpeI 片段将 pBG200-A22-wt 质粒转化为 pBG200-A22-H93F。

[0229] 1.6.2. 牛痘病毒重组体的生成和选择

通过将质粒 pBG200-A22-wt 和 pBG200-A22 - H93F 转染至用牛痘病毒 (VV) 毒株 WR 感染的 CV-1 细胞而制备重组牛痘病毒。使用 5- 溴 -2- 脱氧尿苷在 HuTK-143 细胞中选择重组的 VV(具有中断的胸苷激酶基因)。实施三轮噬斑纯化以及使用 FMDV 特异性引物通过 PCR 筛选,以获得稳定的重组 VV。将这些在 RK13 细胞中扩增,且通过在 BS-C-1 细胞上的噬斑测定滴定病毒储备物。所有哺乳动物细胞在 37℃在补充 10％ FCS 和适当抗生素的 DMEM 中生长。

[0230] 1.6.3. 经由牛痘病毒表达产生的空衣壳的沉降

175 cm^2 烧瓶的 RK13 细胞用 vA22-wt 或 vA22-H93F 以 MOI 10 感染,且用 vTF7.3 以 MOI 5 感染。24 小时后,通过在 4℃以 2.000xg 离心 5 分钟收获细胞,且将沉淀悬浮于 1 ml 40 mM 磷酸钠、100 mM NaCl pH 7.6 中的 0.5 % Ipegal™ (Sigma) 中。将样品在冰上孵育 20 分钟,澄清,上样至 15-45％蔗糖梯度上,且在 12℃以 22.000 rpm (SW41 转子, Beckman) 离心 20 小时。将每个梯度分级为 12 个 1 ml 的级分,且通过 Western 印迹分析等分试样。

[0231] 1.7. 衣壳分离测定

将通过蔗糖梯度纯化的细胞培养物上清液或样品中存在的含有野生型和 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳溶入标准 TNE 缓冲液中,且经受不同的 pH 或温度的条件,以评价其稳定性。

[0232] 1.7.1. 病毒粒子衣壳的 pH稳定性 :

简而言之 :将 10^6 至 10^7 pfu/ml 的感染性 FMDV 衣壳与 TNE 缓冲液 (优选高于 7 的 pH) 分别以 1:50 v/v 的比率混合。随后将混合物在室温孵育 30 分钟。作为对照,还将病毒粒子与病毒生长培养基以相同比率混合。样品随后用 1 M Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl 中和,且在 BHK-21 细胞上滴定。或者,在 TNE 缓冲液中 1:50 稀释之后,将具有 4-8 x 10^6 pfu/ml 的近似滴度的蔗糖梯度纯化的颗粒在 pH6.0 处理不同的时间间隔。

[0233] 1.7.2. 病毒粒子衣壳的温度稳定性 :

或者,将 TNE 缓冲液 (pH7.4) 中的 FMDV 病毒粒子衣壳在水浴中在 25、37、45 或 55℃的温度处理 30 分钟,其后将样品在冰上冷却,且滴定。蔗糖梯度纯化的颗粒的 1:50 稀释确保对蔗糖的任何稳定化效果是微不足道的。此外,将具有 4-8 x 10^6 pfu/ml 的近似滴度的蔗糖梯度纯化的颗粒加热至 42℃或 49℃,持续不同的时间间隔。

[0234] 通过在 BHK-21 细胞上的噬斑滴定测定低 pH 计或高温处理后剩余的感染性 FMDV 病毒粒子衣壳的数目。线性拟合在不同时间点的病毒滴度的各对数值,且测定斜率。还计算剩余感染性颗粒的百分数,且连同用于计算灭活率常数的指数下降作图。

[0235] 1.7.3. 空衣壳的稳定性测定 :

将 200 μl 含有空衣壳的级分的等分试样 (i) 用磷酸盐缓冲液 pH 7.6 1:3 稀释,且在 56℃在水浴中孵育 2 小时,或 (ii) 用 50 mM 乙酸钠缓冲液 pH 4.6 1:3 稀释,以得到 5.2 的最终 pH 且在室温孵育 15 分钟,然后用 NaOH 中和。将处理的样品上样至 15-45％蔗糖梯度上,且离心。在 4℃将各级分用等体积的饱和硫酸铵沉淀过夜。通过在 4℃以 16.000xg 离心 15 分钟收集沉淀,且通过 western 印迹分析。

[0236] 1.8.ELISA 测定

ELISA 如 Harmsen 等人 (同上) 所述进行。简而言之,这涉及用于使用对于 146S 病毒粒子衣壳 (抗体 M170) 或 12S 五聚体结构 (抗体 M3) 的 FMDV 结构特异性的两个单域美洲

驼来源的抗体片段之一定量 FMDV 衣壳的双抗体夹心 ELISA。在 146S 特异性 ELISA 中只能检测到 O 血清型毒株，而在 12S 特异性 ELISA 中检测到大多数血清型的毒株。然而，血清型 A 和 Asia 1 FMDV 毒株的 146S 浓度可以使用 12S 特异性 ELISA 通过事先由热处理将 146S 转化为 12S 颗粒而间接测量。通过 thermofluor 测定法测定稳定性。

[0237] 1.9. 电子显微镜：

EM 用于研究化学灭活后的病毒粒子衣壳和热处理后的空衣壳的完整性的水平。

[0238] 在 4℃ 10 天的储存期后，通过电子显微镜检查野生型和 VP2 S93Y 的纯化的化学灭活的病毒粒子衣壳。使样品粘附在碳涂覆的弗姆瓦网格 (formvar)30 秒，随后通过用水洗涤两次，然后用 1％乙酸双氧铀染色 45 秒。通过印迹去除过量染料，且在以 80 KeV 运行的 FEI T12 电子显微镜上检查网格。对于空衣壳，将纯化的野生型和 VP2 S93F 衣壳加热至 56℃持续 2 小时，然后通过 EM 检查。

[0239] 1.10.Thermofluor 测定

如所述 (Walter 等人， 2012, 同上) 进行 Thermofluor 迁移测定以测量和比较感染性 FMDV 病毒粒子衣壳的温度稳定性；包含 VP2 蛋白突变体或野生型 VP2 蛋白的 FMDV 用于通过检测病毒 RNA 的释放，通过监测 RNA 特异性荧光染料 SYBR Green™来测试衣壳稳定性。用于 25 - 95℃的温度梯度，且通过当衣壳解离为五聚体时的荧光增加来检测病毒基因组释放。

[0240] 1.11.FMDV 灭活

突变体和野生型 FMDV 收获自感染的 BHK-21 细胞单层，且在 26℃用 5 mM 二乙烯亚胺 (BEI) 灭活 26 小时。接下来，将它们 PEG 浓缩且在蔗糖梯度上纯化。BEI 灭活的蔗糖梯度纯化的抗原用于配制为用于动物接种的疫苗。

[0241] 1.12. 动物接种实验

在标准 FMDV 血清学模型豚鼠中测试从 FMDV 衣壳制备的疫苗，以评估它们的免疫原性效力和抗体反应的持续时间，作为其抗原稳定的函数。疫苗抗原是野生型 FMDV 衣壳，或包含 VP2 S93Y 取代突变体的野生型毒株的衣壳。这些作为灭活病毒粒子衣壳和空衣壳两者进行测试，且分别测试 SAT-2 血清型或 O 血清型。完全符合法律和动物福利法规进行所有动物实验。10 只豚鼠的组通过肌肉内接种接受 0.2 ml 剂量的测试或对照疫苗，且在实验进程过程中的第零天和不同的时间点采血。使用病毒中和 (VN) 测试根据 OIE 准则分析血清中的 FMDV 中和抗体。

[0242] 2. 结果和结论

2.1. 温度稳定性测定

2.1.1. 感染性病毒粒子衣壳的稳定性：

解离动力学：

感染性病毒粒子衣壳经受解离动力学测定，比较含有野生型和 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳。将约 2-10 x10^5pfu/ml 的滴度的两种类型的病毒粒子衣壳在 49℃孵育 2 小时。测定该处理之后保持完整的感染性颗粒的数目。颗粒的温度灭活概况遵循线性动力学，且不同病毒的不稳定性反映为发现的灭活速率常数值；这些是：野生型 SAT-2：0.0155/min；SAT-2 VP3 E198A：0.0163/min；和 SAT-2 VP2 S93Y：0.0075/min。

[0243] 这显示，野生型和 (对照)VP3 取代突变体的灭活速率基本上是相同的，而 VP2

S93Y 突变体的灭活速率显著降低。这反映当与具有野生型 VP2 蛋白的衣壳或含有具有任意取代的 VP2 蛋白的衣壳相比时根据本发明的包含 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳的改善的热稳定性。

[0244] 当测定热处理后剩余的感染性FMDV病毒粒子衣壳的百分数，发现在49℃孵育2小时之后剩余约15％的SAT-2 VP2 S93Y病毒粒子衣壳，相比之下，野生型SAT-2和SAT-2 VP3 E198A 替代突变体病毒剩余仅 1.4％。

[0245] *Thermofluor测定：*

Thermofluor 迁移测定用作响应于温度变化的 FMDV 衣壳稳定性的直接测量。该测定检测衣壳解离之后 RNA 的释放，其通过结合病毒基因组的 RNA 特异性荧光染料来监测。病毒粒子通过蔗糖梯度纯化，且用 BEI 灭活。病毒粒子样品具有 140 至 420 μg/ml 的浓度。作为对照，包括 FMDV 血清型 A，分离株 24 病毒。

[0246] 因为在稳定加热下观察荧光的一阶导数的通常尖锐清楚的峰，峰温度被取作该病毒构建体的解离温度的直接指标。发现的值是：SAT-2 VP2 S93Y 在 53℃解离，SAT-2 VP2 S93H 在 51℃解离，且野生型 SAT-2 在 47℃解离，参见图 4。

[0247] 对照样品是：FMDV A24 病毒，其具有 55℃的总体最高解离温度，然而这仅比 SAT-2 VP2 S93Y 突变体高 2 度。SAT-2 VP2 S113G 取代－突变体病毒衣壳（图 4 中未呈现）充当阴性对照。这显示解离温度降低至 45℃，甚至比野生型 SAT-2 病毒低几度。

[0248] 病毒粒子衣壳SAT-2 VP2 S93Y的解离温度因此与其野生型病毒的6℃的解离温度相比具有最高增加。这与热灭活动力学测定（同上）中观察到的稳定化程度完全一致。

[0249] 还使用 thermofluor 分析测定血清型 O，分离株 O1 Manisa 的 FMDV 病毒粒子衣壳的稳定性。在 pH 7.0 的不同缓冲液中运行这些测定，因此它们的基础水平不同于图 4 的基础水平。结果呈现于图 10 中，分为两个小图，以防止弄乱图像。发现的峰值是：

小图 A：wt O1M：40℃；93F：43℃；93Y：44℃。

[0250] 小图 B：wt O1M：40℃；93W：42℃；97Q：42℃；98F：44℃。

[0251] 2.1.2.空衣壳的稳定性：

以各种方式测试FMDV空衣壳的稳定性。首先，蔗糖梯度纯化已经提供衣壳完整性的可靠指示：当衣壳已经分解时，使用蔗糖梯度离心无法获得清楚条带。

[0252] 接下来，使用凝胶电泳和 Western 印迹测试热稳定性：将蔗糖梯度纯化的空衣壳加热至 45℃持续 1 小时（图 5，小图 A），或加热至 56℃持续 2 小时（图 5，小图 B）。接下来，将样品上样至进一步 15-45％蔗糖密度梯度，离心，且将梯度收集至 12 个 1 ml 的级分中。用 500μl 饱和硫酸铵从各级分沉淀 500 μl，且在 SDS 凝胶上运行沉淀。最后，将凝胶印迹，且将印迹与针对 VP1 的抗体孵育。

[0253] 热孵育后保持完整的空衣壳恰好聚集在蔗糖梯度的中间下方，在级分 4 和 5 结束，并且在对应于这些级分的凝胶泳道中出现。而（部分）分解的衣壳不那么致密且仍然接近梯度的顶部，且发现于对应于级分 10 和 11 的凝胶泳道中。

[0254] 结果显示，对于两种温度，来自血清型 O，亚型 1 Manisa 的野生型 FMDV 的空衣壳迅速分解，且发现于级分 10-11 中。令人惊讶地，含有 VP2 蛋白突变体的衣壳对于热处理的耐受性可以好得多：含有具有取代 S93H 和 S93F 的 VP2 蛋白突变体的 FMDV 衣壳在 45℃ 1 小时之后均完全完整（图 5，小图 A）。在 56℃ 2 小时之后，突变体 S93H 是不稳定的（级分

10-11 中的所有材料；图 5，小图 B）；突变体 S93Y 是部分稳定的（约 10％在级分 10 中，其余在级分 4 中）；且 S93F 是完全稳定的（所有均在级分 4 中）。

[0255] 还通过电子显微镜研究来自 2 小时 56℃处理的包含空衣壳材料的 VP2 S93F 蛋白突变体的样品，这证实了凝胶电泳结果：所有这些衣壳被发现是完整的，且没有看到五聚体（图 6，参见下文）。

[0256] 当经由杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统表达血清型 O，分离株 O1 Manisa 的 FMDV 空衣壳时，标准 5 天培养条件之后无法获得野生型 O1M 空衣壳。然而，可以在任一滚瓶中或在 2 升悬浮培养物中产生具有 S93F 取代的含有突变体 VP2 蛋白的空衣壳。这得到足量的稳定的突变体衣壳，用于分析，诸如 Western 印迹，蔗糖梯度，ELISA，和 EM，以及用于豚鼠中的接种研究。

[0257] 2.2. ELISA 测定

ELISA 测定用于检测在 49℃孵育 1 小时过程中的活感染性 FMDV 的解离水平。比较的是野生型血清型 O FMDV（图 7，小图 A），和含有 VP2 蛋白突变体的血清型 O FMDV，即 VP2 S93Y（图 7，小图 B）。该线对应于空白对照样品旁边随着时间检测的 146S 或 12S 颗粒的总量。更多 12S 信号表明更高的衣壳分解。

[0258] 对于野生型 FMDV，病毒粒子衣壳水平降低，且 12S 水平在 1 小时孵育过程中稳步增加。空白样品如预期保持在阈值水平。然而，对于含有 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳，没有检测到 12S 颗粒水平的升高，表明与野生型病毒粒子衣壳相比大大改善的热稳定性。

[0259] 2.3. 化学灭活后的稳定性

FMDV 病毒粒子衣壳经受标准的用 BEI 的化学灭活，且通过电子显微镜分析。这在化学灭活之后直接进行，或者在 4℃再储存 10 天之后进行。测试的 FMDV 衣壳是血清型 O 亚型 1 Manisa 的野生型 FMDV，或相应的具有取代 VP2 S93Y 的含有 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳。

[0260] EM 分析显示，最初，五聚体的量与完整病毒粒子衣壳的量的比率对于野生型病毒粒子衣壳为 10:90％，且对于含有 VP2 蛋白突变体的衣壳为 0:100 ％。冷藏之后，差异变得大得多；野生型材料为 80:20％五聚体相比于完整病毒粒子衣壳（图 8，小图 A），相比之下，对于含有突变体 VP2 的病毒粒子衣壳为 10:90％（图 8，小图 B）。

[0261] 2.4. 来自动物接种研究的结果

2.4.1. 用空衣壳接种：

在杆状病毒 / 昆虫细胞系统中表达血清型 O，亚型 1 Manisa 的 FMDV 空衣壳；空衣壳是野生型的，或包含具有 VP2 S93F 取代的 VP2 蛋白突变体。不幸地，亲本血清型 O1M 空衣壳是如此不稳定的，它们在昆虫细胞表达之后几乎无法检测（在 27℃ 5 天，使用标准的 pH 6.5 昆虫细胞培养基）。因此，只有含有 VP2 蛋白突变体的空衣壳用于接种豚鼠。以等于 5 或 20 μg 146S 抗原 / 最终疫苗剂量的剂量在标准 w/o/w 乳剂中配制衣壳抗原。作为对照，还接种 O1M 型的标准灭活的全病毒 FMDV 疫苗。

[0262] 在接种后 3 和 4 周的病毒中和结果显示，由 S93Y 突变空衣壳疫苗导致的豚鼠 VN 滴度与用经典 FMDV 疫苗获得的滴度相当。结论是，基于体外表达的包含 VP2 蛋白突变体的 FMDV 空衣壳的疫苗的效价已表明了概念验证。

[0263] 2.4.2. 用灭活的病毒粒子衣壳接种：

在豚鼠中测试来自野生型和携带 VP2 S93Y 取代的包含 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳的 FMDV SAT-2 血清型的病毒粒子衣壳。病毒粒子衣壳已经用 BEI 灭活。首先测定完整病毒粒子衣壳抗原的量，且稀释样品，使得最终疫苗浓度为 5 μg/ml。在标准 w/o/w 乳剂中配制样品，且配制之后，将样品在 4℃储存 1 个月。免疫两个 10 只豚鼠的组，且在第 0 天和免疫后 1 和 6 个月取血液样品。IB-RS-2 细胞用作指示系统，且野生型 FMDV SAT-2/ZIM/7/83 用作参考病毒。在该设置中，5 和更高的 Log2 病毒中和滴度被认为是保护性的。

[0264] 在接种日无法检测到 FMDV 中和抗体。接受野生型 FMDV 病毒粒子衣壳的接种者没有高于保护水平的血清反应，而接受具有 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳的所有动物在接种后 1 和 6 个月显示保护水平的血清反应。在两个时间点的组平均中和抗体滴度的差异是显著的 (P> 0.05)(误差条 = SEM)。结果呈现于图 9 中。

[0265] 野生型 FMDV 病毒粒子衣壳的疫苗没有诱导保护性血清反应的事实最可能由灭活后且 1 个月储存之后的天然衣壳的不稳定性引起。

[0266] 然而，根据本发明的包含 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳是如此稳定的，它们在化学灭活和储存之后完好，且仍然能够诱导可靠的保护性体液免疫，甚至在仅单次接种之后，甚至接种后多达 6 个月。本发明人惊讶地发现，这甚至对于 SAT-2 血清型的 FMDV 疫苗都是可能的。

[0267] 3. 正在进行和计划的实验 :

3.1. 豚鼠接种实验

豚鼠接种实验在制备物中进行，所述制备物使用含有亲本空衣壳或包含具有 VP2 S93Y 取代的 VP2 蛋白突变体的血清型 O 1 Manisa 的 FMDV 空衣壳的疫苗。将包括几个测试和对照组 ;5 只豚鼠的组各接受在用轻质矿物油佐剂化的 w/o 乳剂中配制的不同的衣壳抗原 (野生型或突变体)。

[0268] 此外，计划类似的豚鼠实验用于测试不同的佐剂制剂 :血清型 O 和可能血清型 A 的 FMDV 衣壳使用轻质石蜡油配制为单一水包油乳剂。

[0269] 3.2. 牛接种 - 攻击研究

计划在适当的高度封闭设施中进行两个独立的牛接种 - 攻击研究。

[0270] 第一研究是使用有或没有 VP2 蛋白突变体 VP2 S93Y 的 SAT-2 血清型 FMDV 的灭活病毒粒子衣壳的接种。根据该方案，未怀孕小母牛接受单一剂量的疫苗，并且用野生型 SAT-2 FMDV 毒株攻击。

[0271] 我们计划将 26 只牛分为五组 :

组 1 :6 只牛将用商业佐剂中的野生型 FMDV SAT-2 疫苗接种 ;

组 2 :6 只牛将接受商业佐剂中的 SAT-2 93Y VP2 蛋白突变抗原 ;

组 3 :6 只牛将接受商业佐剂中的 SAT-2 93H VP2 蛋白突变体 ;

组 4 :6 只牛将接受具有替代佐剂的 SAT-2 93H VP2 蛋白突变体。

组 5 :2 只牛接受模拟接种。

[0272] 定期收集血清，最初，每 2 天，然后每周和每个月，且使用 VN 测试进行评价。一旦 VN 滴度开始下降，在高度封闭 (high containment) 的条件下用 10^4 只牛调整的活 FMDV 病毒粒子皮内向舌 (intradermolingually) 攻击动物。

[0273] 在相当实验中，如欧洲药典规定，使用有或没有包含 VP2 S93Y 取代的 VP2 蛋白突

变体的血清型 O 1 Manisa 的 FMDV 空衣壳，根据标准 PD50 型方案接种牛。作为对照，一组接受标准的血清型 O FMDV 疫苗。该方案并入接种，和随后血清型 O 野生型 FMDV 毒株攻击感染。实验分析包括全血清学，以及攻击病毒重新分离。

[0274] 图注：

图 1：

二十面体 FMDV 衣壳的示意结构。指示 VP：1=VP1，2= VP2，且 3=VP3。五聚体亚单位由粗线描述。

指示二十面体对称轴：5 重：五边形，3 重：三角形，和 2 重：椭圆形。

（来自：Mateo 等人，2003，J. Biol. Chem.，vol. 278，p. 41019，图 1，小图 A.）。

[0275] 图 2：

许多代表性 FMDV 分离株的 VP2 蛋白 αA 螺旋区域的氨基酸序列的多重比对；在顶部，指示来自 FMDV 血清型 O 分离株 1 BFS 的编号和氨基酸序列，其以 SEQ ID NO:1 代表。

[0276] 图 3：

FMDV 衣壳的两重对称轴的三维模型结构的图形表示，显示具有 93W 取代的两个相邻 VP2 蛋白突变体之间的疏水堆积相互作用。

[0277] 图 4：

使用来自血清型 SAT-2 的活 FMDV 病毒粒子衣壳的 Thermofluor 测定的说明性结果。峰表明通过 RNA 特异性荧光染料监测的 RNA 的最大释放、因此 FMDV 病毒粒子衣壳完全解离的温度。这标记解离温度。

A24= 野生型 FMDV 血清型 A，分离株 24；93Y= FMDV SAT-2 VP2 S93Y；93H= FMDV SAT-2 VP2 S93H；WT= 野生型 FMDV SAT-2。

[0278] 图 5：

血清型 O，亚型 1 Manisa 的热稳定 FMDV 空衣壳的 Western 印迹分析，所述热稳定 FMDV 空衣壳被加热至 45℃持续 1 小时（小图 A），或加热至 56℃，持续 2 小时（小图 B），然后上样至 15-45 ％蔗糖密度梯度。

具有 VP2 S93F 或 VP2 S93H VP2 蛋白突变体的 FMDV 空衣壳在 45℃保持完整（小图 A）且通过梯度迁移至级分 4 和 5，而含有衣壳的野生型 VP2 蛋白在热处理时破裂，在级分 10 和 11 中仍然在梯度上部附近。当重复实验时，含有 S93F VP2 蛋白突变体的空衣壳是显著稳定的，甚至在 56℃持续 2 小时之后；含有 VP2 S93Y 的衣壳具有约 10％降解，且含有 VP2 S93H 的衣壳是不稳定的。

[0279] 图 6：

热处理的含有具有 S93F 取代的 VP2 蛋白突变体的空 FMDV 衣壳的电子显微照片。将突变体衣壳在 56℃孵育 2 小时，且通过电子显微镜检查样品。发现衣壳完好无损。

条表明大小参考。

[0280] 图 7：

检测在 49℃孵育 1 小时过程中的感染性 FMDV 病毒粒子的解离水平的 ELISA 测定的结果。比较的是野生型血清型 O FMDV（小图 A），和含有 VP2 蛋白突变体的血清型 O FMDV，即 VP2 S93Y （小图 B）。该线对应于空白对照样品旁边随着时间检测的 146S 或 12S 颗粒的量。

[0281] 图 8 ：

化学灭活的已经在灭活后在 4℃储存 10 天后的血清型 O 亚型 1 Manisa 的 FMDV 病毒粒子衣壳的电子显微镜照片。小图 A 显示野生型 FMDV 的样品，且小图 B 显示包含具有取代 S93Y 的 VP2 蛋白突变体的相应的病毒粒子衣壳的类似初始量的样品。发现约 80％的野生型灭活衣壳解离为五聚体。然而，灭活的 VP2 S93Y 突变体衣壳为约 90％完整。

[0282] 图 9 ：

来自用灭活的包含具有 VP2 S93Y 取代的 VP2 蛋白突变体的 SAT-2 FMDV 病毒粒子衣壳的动物接种试验的结果的图形表示。绘制的是在接种后 1 个月和 6 个月的 10 只豚鼠的组的平均 Log2 病毒中和滴度。误差条表明标准 s.e.m。

所述疫苗基于灭活的野生型 SAT-2 的 SAT2 血清型 FMDV 病毒粒子衣壳或具有 VP2 S93Y 取代的包含 VP2 蛋白突变体的病毒粒子衣壳。

5 和更高的 Log2 病毒中和滴度被认为是保护性的。

SAT S93Y= SAT-2 VP2 S93Y ;SAT wt= 野生型 SAT-2。

[0283] 图 10 ：

用血清型 O，分离株 O1 Manisa 的 FMDV 病毒粒子衣壳的 thermofluor 分析的结果。所述图分为两个小图，以防止弄乱图像。这些测定在 pH 7.0 的缓冲液中运行。

WT = 野生型 FMDV 血清型 O，分离株 1 Manisa ;93Y = FMDV 血清型 O，分离株 1 Manisa VP2 S93Y ;93F = FMDV 血清型 O，分离株 1 Manisa VP2 S93F ;93W = FMDV 血清型 O，分离株 1 Manisa VP2 S93W ;97Q = FMDV 血清型 O，分离株 1 Manisa VP2 S97Q ;98F = FMDV 血清型 O，分离株 1 Manisa VP2 Y98F。

[0001]

序列表

<110> Isis Innovation Limited

<120> 稳定的FMDV衣壳

<130> FMD

<160> 1

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 218
<212> PRT
<213> 口蹄疫病毒

<400> 1

Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu Glu Asp Arg Ile Leu Thr
1 5 10 15

Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr Gln Ser Ser Val Gly Val
20 25 30

Thr Tyr Gly Tyr Ala Thr Ala Glu Asp Phe Val Ser Gly Pro Asn Thr
35 40 45

Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala Glu Arg Phe Phe Lys Thr
50 55 60

His Leu Phe Asp Trp Val Thr Ser Asp Ser Phe Gly Arg Cys His Leu
65 70 75 80

Leu Glu Leu Pro Thr Asp His Lys Gly Val Tyr Gly Ser Leu Thr Asp
85 90 95

Ser Tyr Ala Tyr Met Arg Asn Gly Trp Asp Val Glu Val Thr Ala Val
100 105 110

Gly Asn Gln Phe Asn Gly Gly Cys Leu Leu Val Ala Met Val Pro Glu
115 120 125

Leu Cys Ser Ile Gln Lys Arg Glu Leu Tyr Gln Leu Thr Leu Phe Pro
130 135 140

His Gln Phe Ile Asn Pro Arg Thr Asn Met Thr Ala His Ile Thr Val
145 150 155 160

Pro Phe Val Gly Val Asn Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Val His Lys Pro
165 170 175

Trp Thr Leu Val Val Met Val Val Ala Pro Leu Thr Val Asn Thr Glu
180 185 190

Gly Ala Pro Gln Ile Lys Val Tyr Ala Asn Ile Ala Pro Thr Asn Val
195 200 205

His Val Ala Gly Glu Phe Pro Ser Lys Glu
210 215

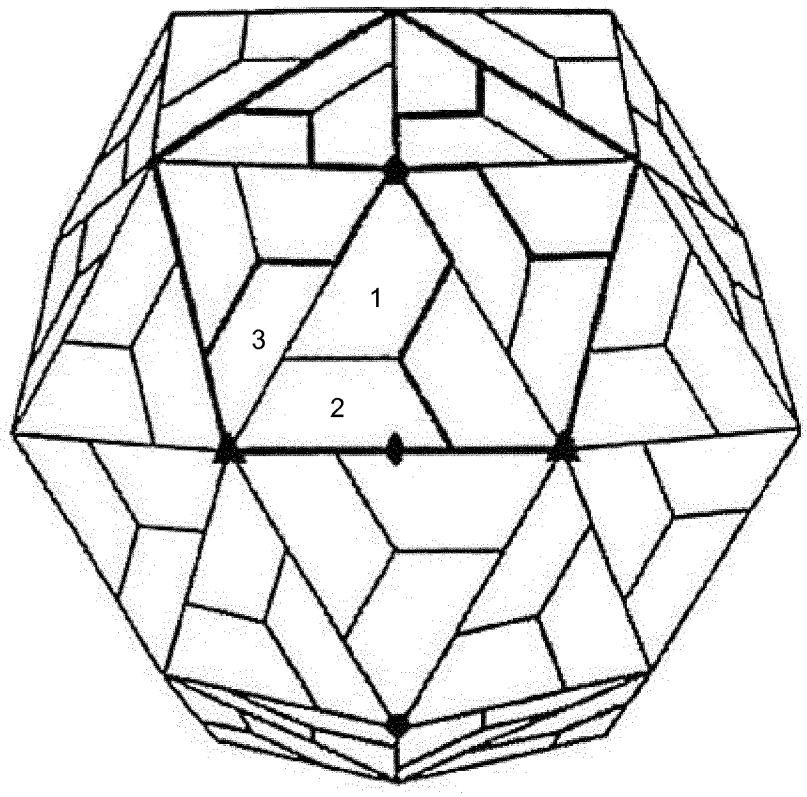


图 1

FMDV 血清型	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
O1BFS	H	K	G	V	Y	G	S	L	T	D	S	Y
O1M_87	H	K	G	V	Y	G	S	L	T	D	S	Y
CS8c1	P	K	G	V	Y	G	G	L	V	K	S	Y
ASIA1_Bar2003	H	K	G	V	Y	G	G	L	M	A	S	Y
A22_Iraq_95	H	K	G	V	Y	G	H	L	V	D	S	F
SAT1_bot	H	K	G	I	Y	G	Q	L	V	D	S	H
SAT2_ZIM7_83	H	K	G	I	Y	G	S	L	T	D	A	Y
SAT3_KNP10_90	H	K	G	I	Y	G	A	M	L	D	S	H

图 2

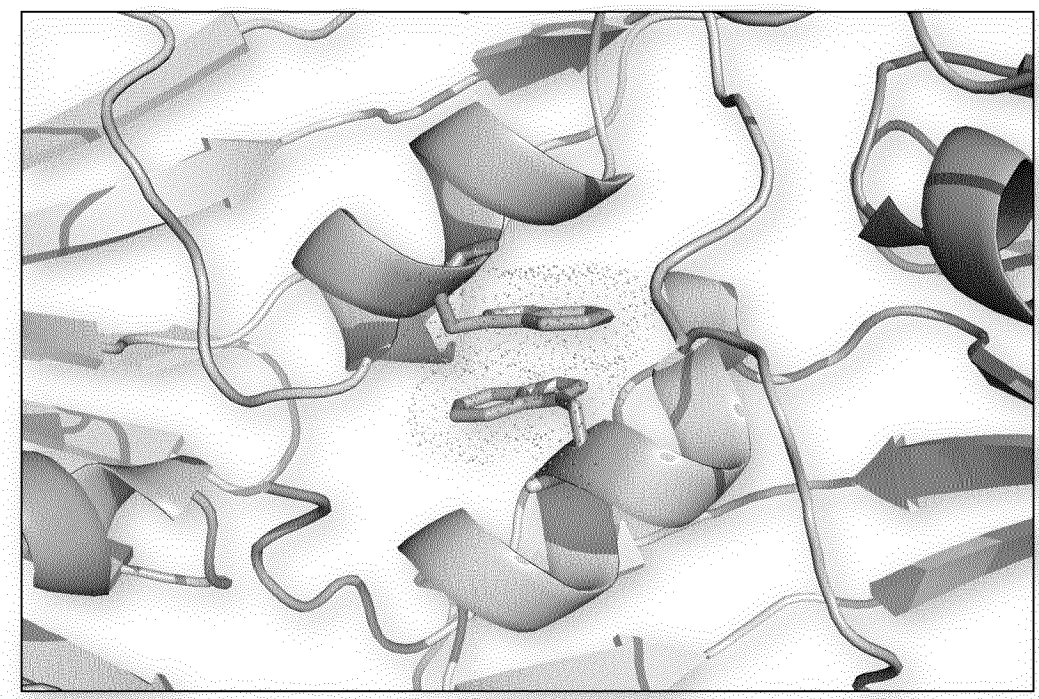


图 3

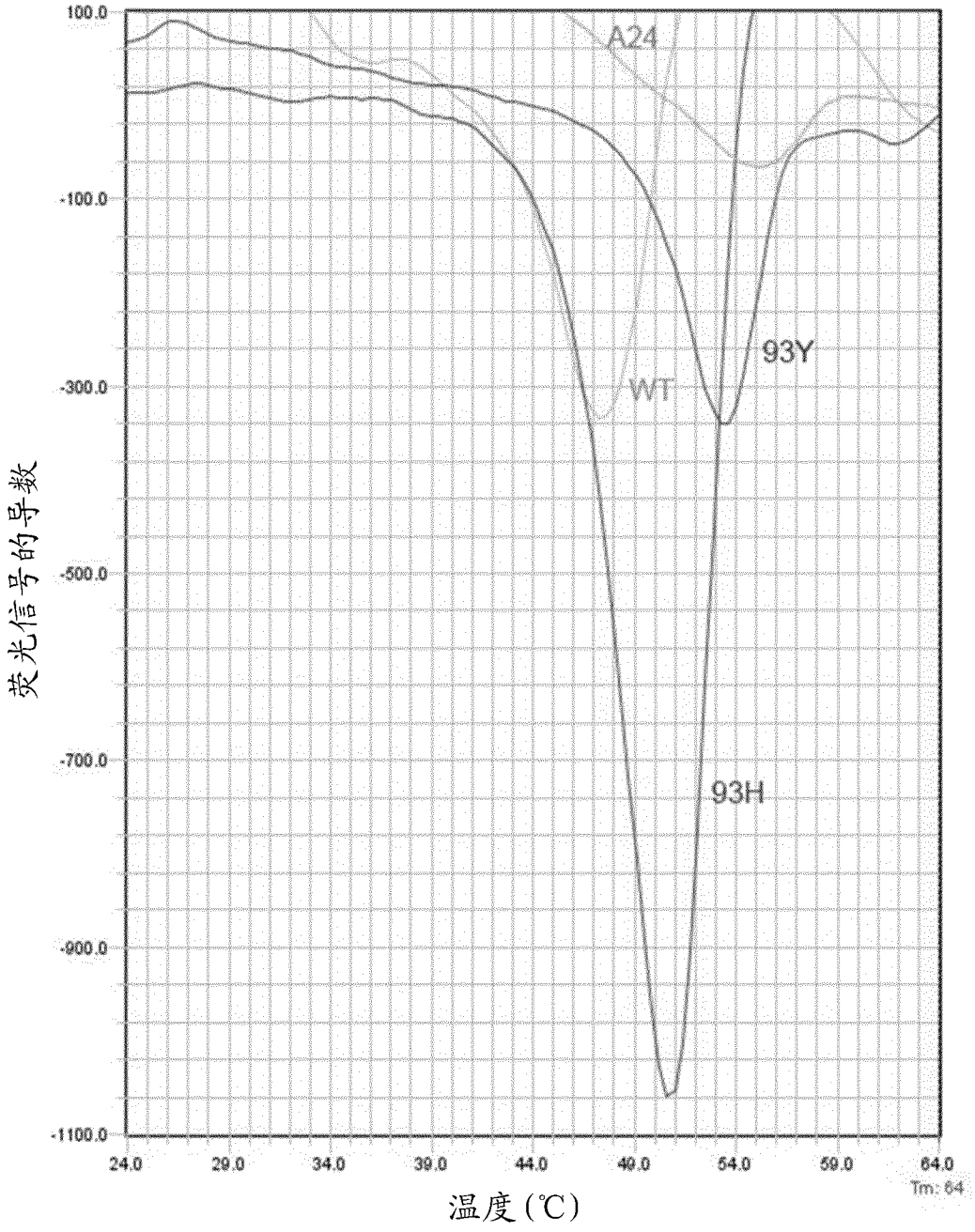

100.0
-100.0
-300.0
-500.0
-700.0
-900.0
-1100.0
荧光信号的导数
24.0
29.0
34.0
39.0
44.0
49.0
54.0
59.0
64.0
Tm: 64
温度(℃)
A24
93Y
WT
93H

图 4

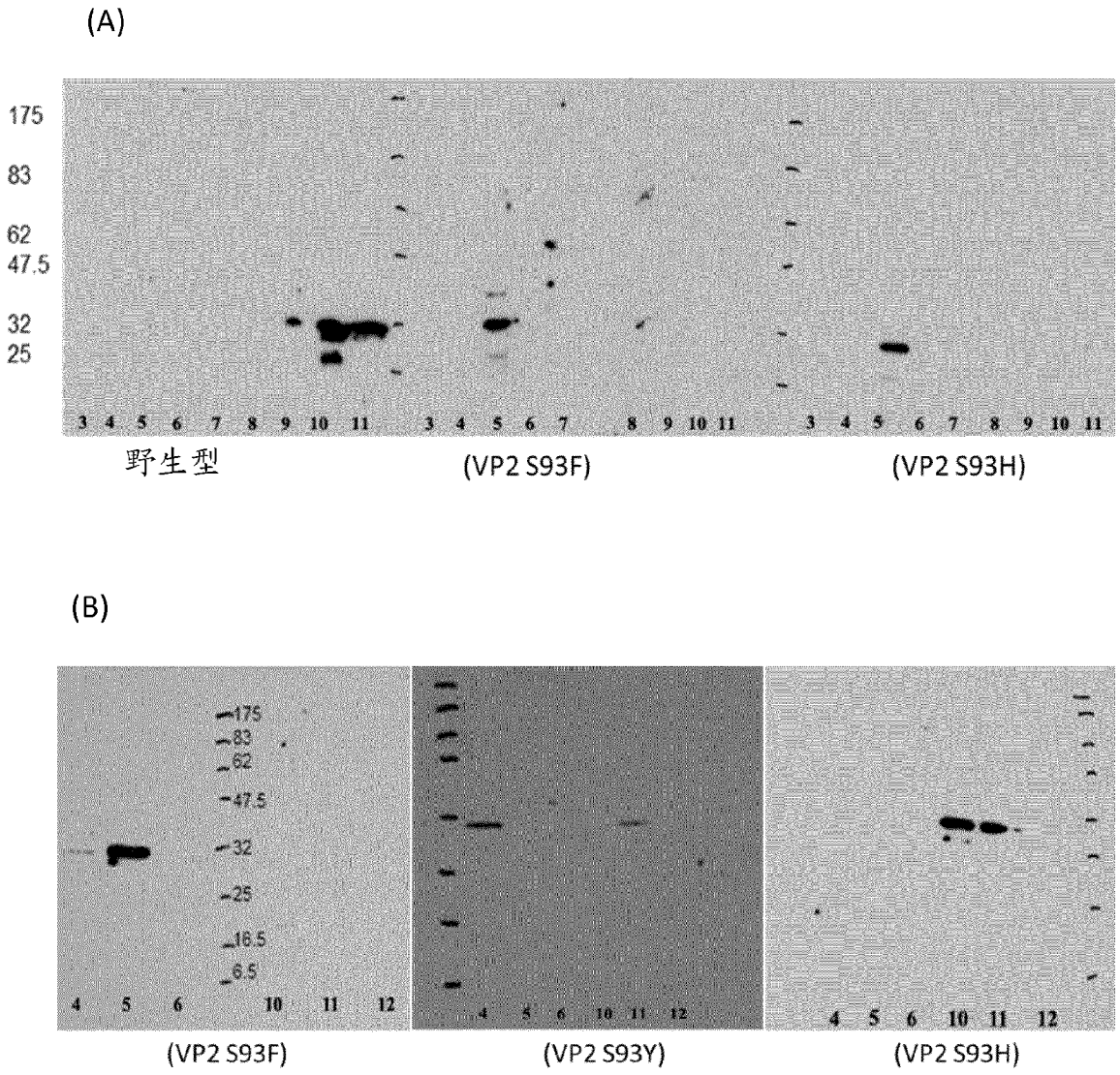

(A)
175
83
62
47.5
32
25
3 4 5 6 7 8 9 10 11 3 4 5 6 7 8 9 10 11 3 4 5 6 7 8 9 10 11
野生型
(VP2 S93F)
(VP2 S93H)
(B)
175
83
62
47.5
32
25
16.5
6.5
4 5 6 10 11 12
4 5 6 10 11 12
4 5 6 10 11 12
(VP2 S93F)
(VP2 S93Y)
(VP2 S93H)

图 5

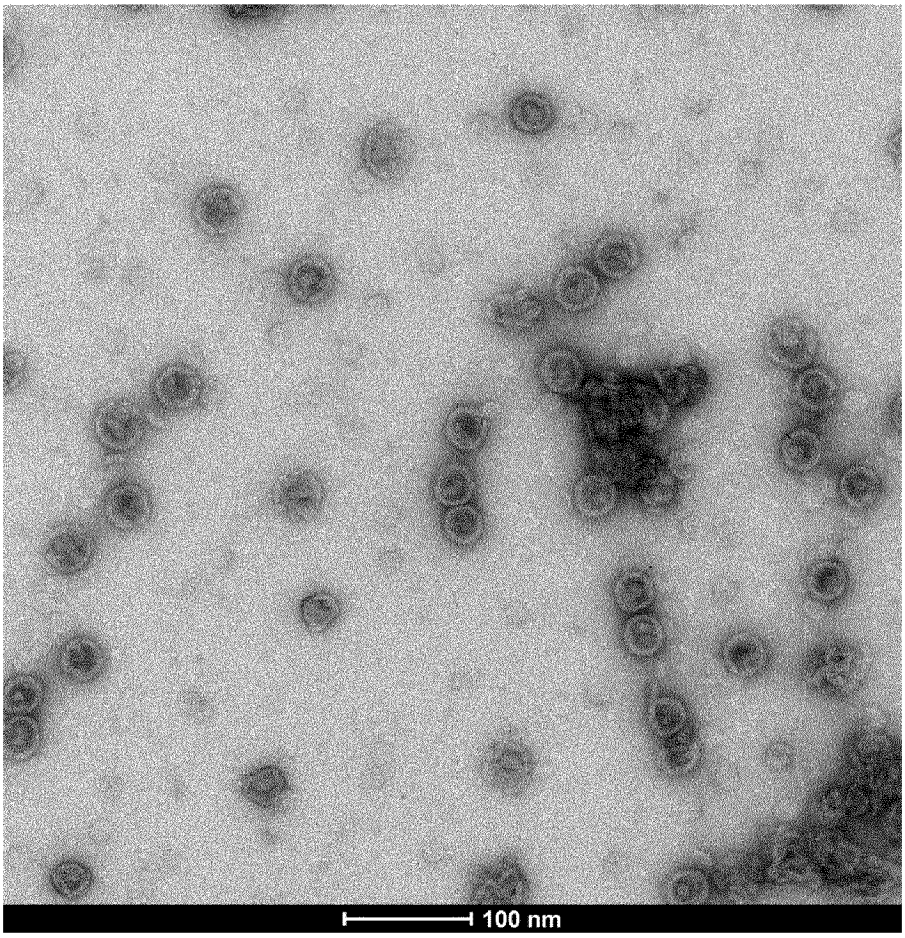
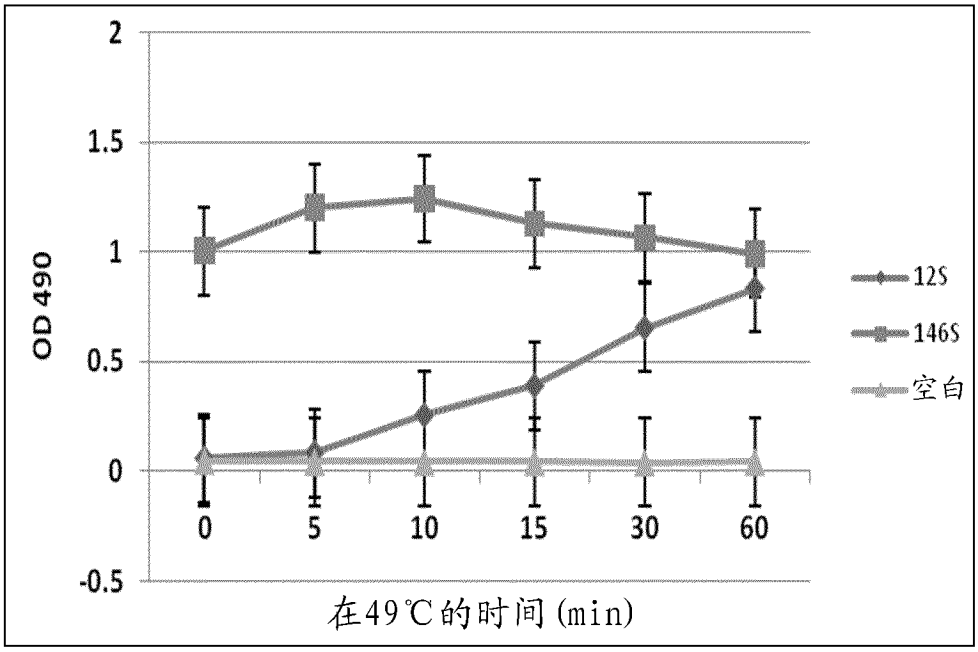


图 6

(A)


2
1.5
1
0.5
0
-0.5
OD 490
0
5
10
15
30
60
在49℃的时间(min)
12S
146S
空白

(B)

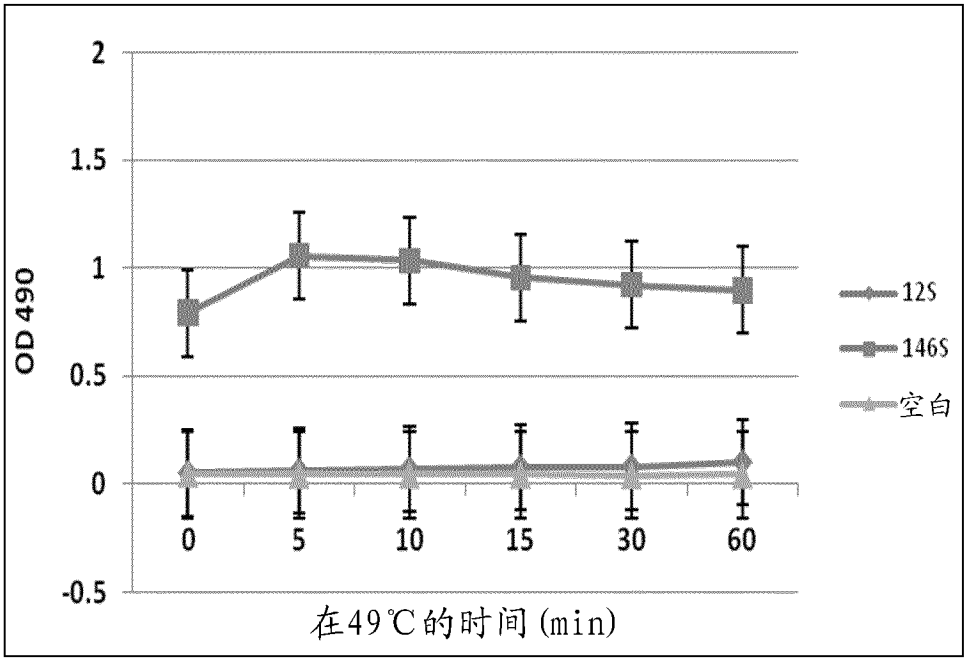

2
1.5
1
0.5
0
-0.5
OD 490
0
5
10
15
30
60
在49℃的时间(min)
12S
146S
空白

图 7

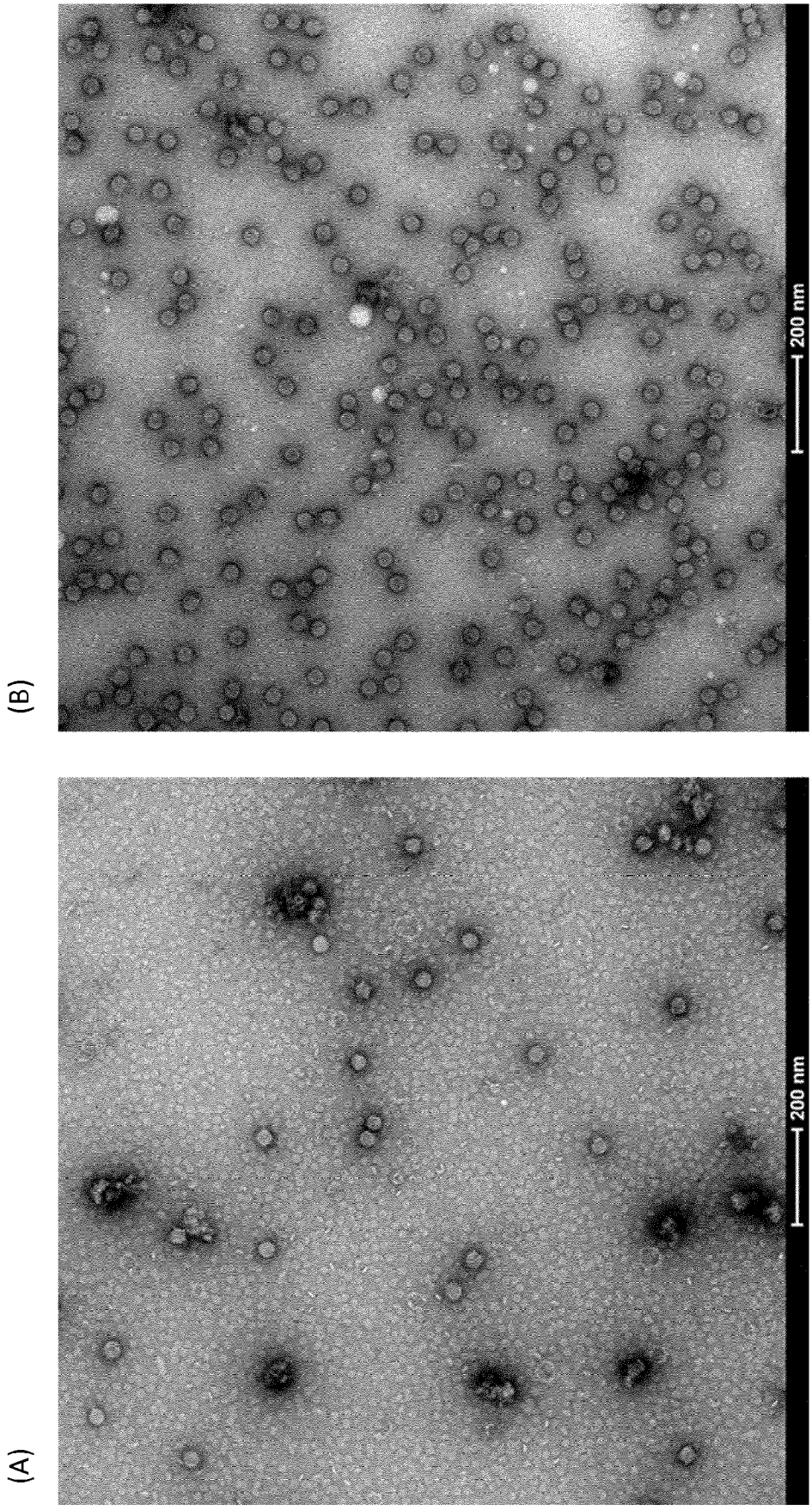


图 8

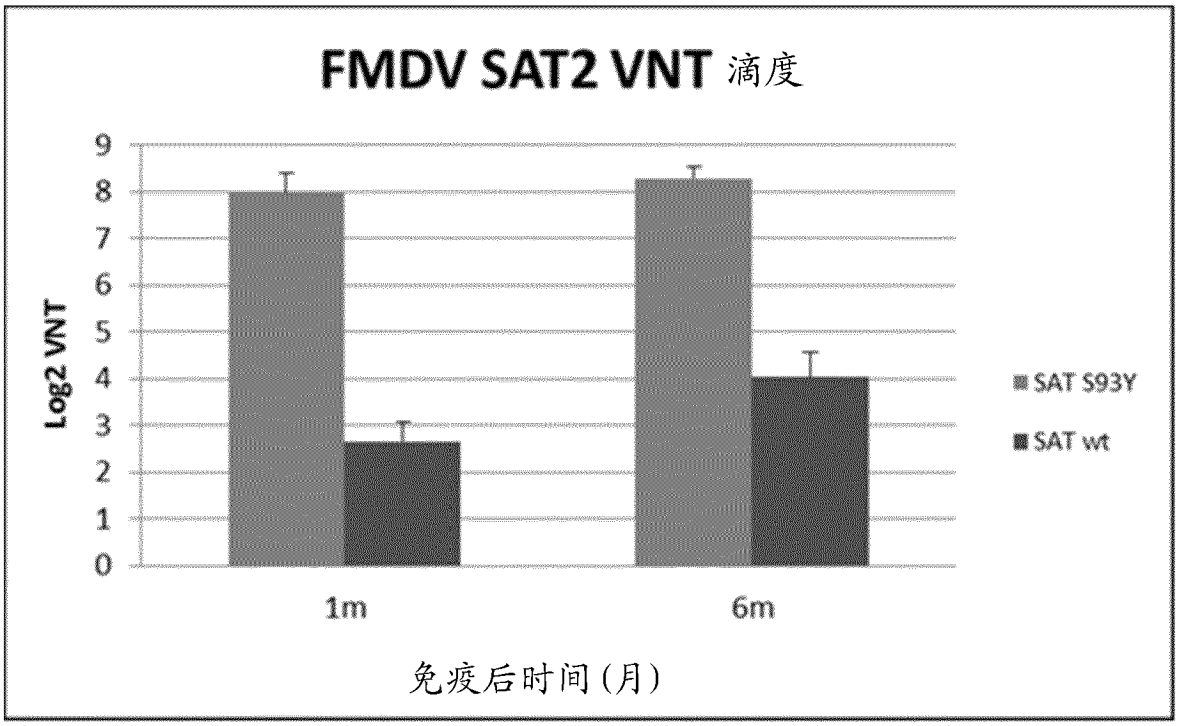
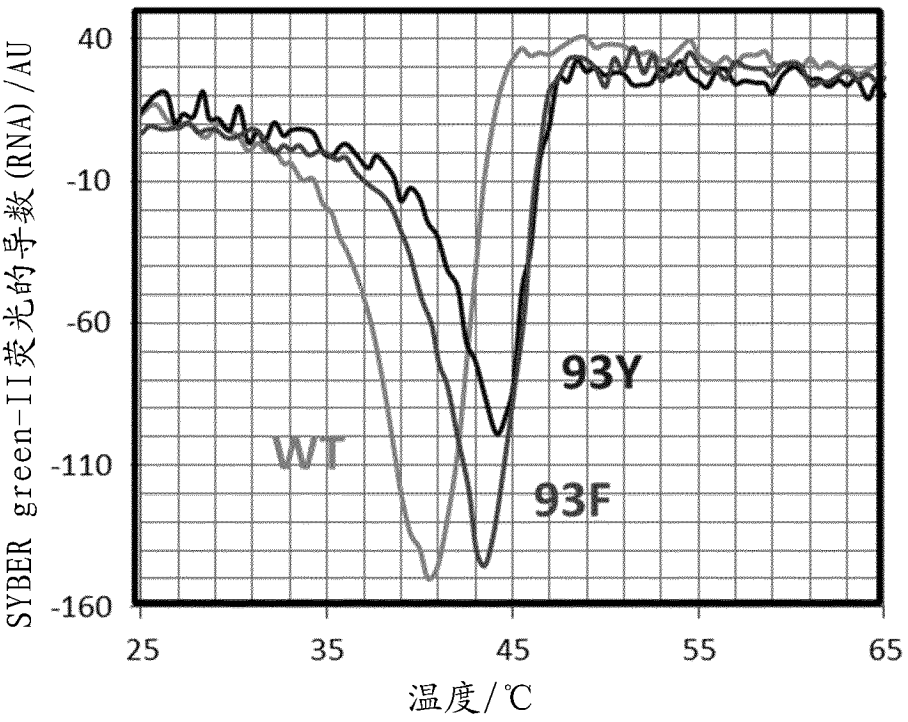

FMDV SAT2 VNT 滴度
Log2 VNT
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1m
6m
SAT S93Y
SAT wt
免疫后时间(月)

图 9

A


40
-10
-60
-110
-160
SYBER green-II荧光的导数(RNA)/AU
25
35
45
55
65
温度/℃
93Y
WT
93F

B

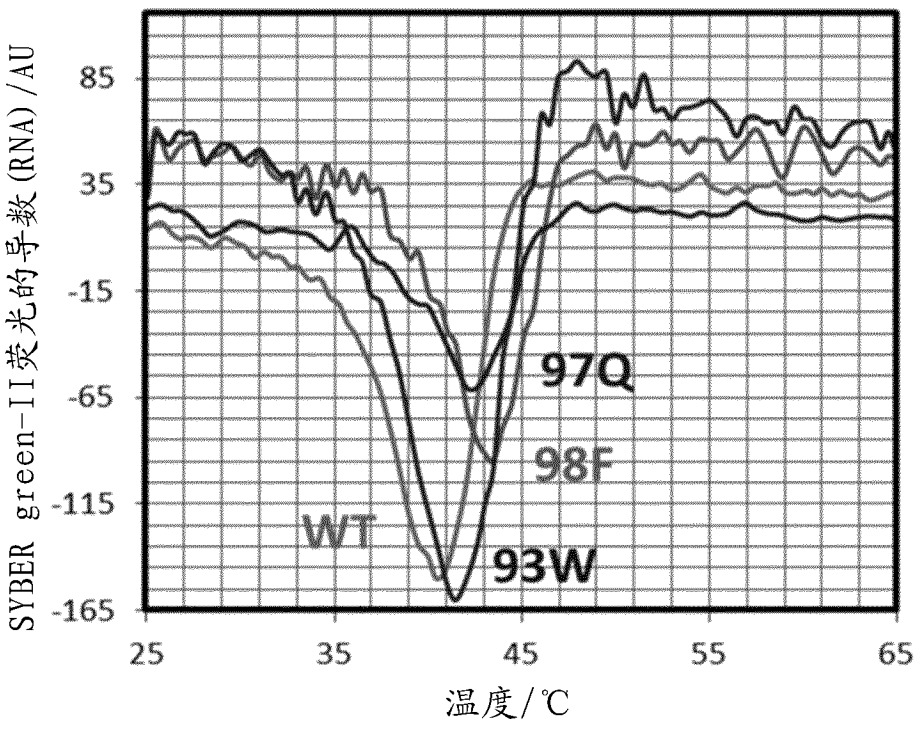

85
35
-15
-65
-115
-165
SYBER green-II荧光的导数(RNA)/AU
25
35
45
55
65
温度/℃
97Q
98F
WT
93W

图 10