



(12) PATENT

(19) NO

(11) 337372

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/205 (2006.01)
C07K 14/145 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20051840	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.09.16 PCT/EP2003/10305
(22)	Inng.dag	2005.04.15	(85)	Videreføringsdag	2005.04.15
(24)	Løpedag	2003.09.16	(30)	Prioritet	2002.09.17, GB, 0221552 2002.09.17, GB, 0221553
(41)	Alm.tilgj	2005.06.16			
(45)	Meddelt	2016.03.29			
(73)	Innehaver	Novartis Tiergesundheit AG, Schwarzwaldallee 215, CH-4058 BASEL, Sveits			
(72)	Oppfinner	Nathalie C Simrad, 91 Piercy Crescent, CA-NBE3B7G2 FEDERICTON, Canada			
		Linda M Bootland, 125 Beach Light Road, RR2, CA-PEC0A1J0 CRAPAUD, Canada			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	DNA-ekspresjonsvektor som koder for en del av den infeksjose hematopoietiske nekrosevirus IHNV G-proteinkodende sekvensen og fusjonsprotein omfattende en del av IHNV G-proteinet, samt nukleinsyrevaksine omfattende disse og anvendelse av en DNA-ekspresjonsvektor for fremstilling av et medikament for forebyggelse eller behandling av patogen infeksjon hos fisk.			
(56)	Anførte publikasjoner	DESMÉZIÈRES E. et al., Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines, Journal of General Virology, 1999, Vol. 80, side 2343-2351 BOUDINOT P. et al., Combined DNA Immunization with the Glycoprotein Gene of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Induces Double-Specific Protective Immunity and Nonspecific Response in Rainbow Trout, Virology, 1998, Vol. 249, side 297-306			
(57)	Sammendrag				

En vaksine som omfatter en del av IHNV G-protein og en del av et andre protein fra et fiskepatogen, og deres respektive nukleinsyrekodende sekvenser. Tilstedeværelsen av IHNV G-proteinet starter immunresponsen til det andre proteinet, noe som resulterer i en beskyttende effekt mot infeksjon av fiskepatogenet som det andre proteinet er utledet fra.

Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører anvendelse av en ny klasse vaksiner for å hindre infeksjøs sykdommer, spesielt i fisk. Oppfinnelsen vedrører også en vaksine som omfatter en del av nukleinsyresekvensen som koder for G-proteinet til IHN

5 (infeksiøs haematopoietisk nekrosevirus) og en del av nukleinsyresekvensen som koder for et andre peptid, det andre peptidet er utledet fra et patogen.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Rekombinante vaksiner blir nå og da brukt i human og veterinærmedisin som et

10 alternativ til mer tradisjonelle behandlingsmåter basert på drepte eller svekkede patogener. Mange fremmede antigener som avleveres systemisk til kroppen på denne måten er i stand til å aktivere bare en del av immunsystemet, ved å stimulere den humorale immunresponsen for å danne antistoffer ved hjelp av hoved histokompatibilitetskompleks (MHC) klasse II reaksjonsveien. En ideell vaksine bør

15 imidlertid også indusere en cellulær respons ved å ødelegge infiserte celler gjennom aktivering av MHC klasse I reaksjonsveien. Den sistnevnte responsen oppnås gjennom cytosolisk degradering av fremmed protein i infiserte celler, slik at fragmenter av det fremmede materialet blir assosiert med MHC klasse I-molekyler og forflyttet til celleoverflaten for presentasjon til CD8⁺ cytotoksiske T-celler (CTL).

20 Nukleinsyrevaksiner (NAVer) er en relativt ny teknologiform som er nyttig for å avlevere patogene antigener, spesielt virale antigener. Etter som de virale proteinene som kodes for av vaksinene uttrykkes *in situ* av vertens cellulære apparat, så antyder teorien at de bør fremkalle en cellestyrt immunrespons som er i stand til å beskytte

25 dyrene når de blir smittet. Resultatene har imidlertid vært blandet: i fisk så er NAVer som uttrykker det infeksjøs haematopoietiske nekroseviruset (IHN) G-proteinet (overflate glykoprotein), og det virale blødnings septicemivirus G-proteinet effektive mot henholdsvis IHN og VHSV-infeksjoner. Det har imidlertid vært vanskelig å demonstrere overbevisende beskyttelse av fisk ved å anvende NAVer basert på andre

30 virale antigener.

For eksemplel, i Boundinot et. al (Virology, 1998, Vol. p.249, s.297-306) der regnbueørret ble dobbelt-immunisert ved koekspresjon av G-proteiner fra IHN og VHSV på separate plasmider. Kinetikken og intensiteten til responsen på

35 kombinasjonen av G-proteins var tilsvarende den som ble induert ved ekspresjon av et enkelt G-protein.

Desmézières E. et al. (Journal of General Virology, 1999, Vol. 80, s2343-2351), beskriver lyssavirus-glycoproteiner som uttrykker immunologisk potente fremmede B-celle og cytotoksiske T-lymfocyt epitoper som prototyper for multivalente vaksiner,

- 5 Det er en hensikt med den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe forbedrede vaksiner som er effektive mot en rekke sykdommer i fisk og andre dyr som er forårsaket av infeksjon med patogener.

Oppsummering av oppfinnelsen

- 10 I et første aspekt så tilveiebringer oppfinnelsen en DNA-ekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter en sekvens som koder for en del av den infeksjose hematopoietiske nekrosevirus IHNV G-proteinkodende sekvensen, og som videre omfatter en del av en andre proteinkodende sekvens fra en patogen organisme forskjellig fra IHNV, der den delen av den IHNV G-proteinkodende sekvensen og den
15 delen av den andre proteinkodende sekvensen er fusert i leseramme på samme DNA-ekspresjonsvektor.

- Oppfinnelsen tilveiebringer videre nukleinsyrevaksine kjennetegnet ved at den omfatter en DNA-ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen sammen med en farmasøytisk
20 akseptabel bærer.

- Oppfinnelsen tilveiebringer videre et fusjonsprotein kjennetegnet ved at det omfatter en del av IHNV G-proteinet og en del av et andre protein utledet fra en fiskepatogen organisme forskjellig fra IHNV.

- 25 Oppfinnelsen tilveiebringer videre en nukleinsyrevaksine kjennetegnet ved den omfatter en sekvens som koder for et fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

- 30 Oppfinnelsen tilveiebringer videre anvendelse av en DNA-ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen eller et fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for forebyggelse eller behandling av patogen infeksjon hos fisk.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- 35 Oppfinnelsen er basert på observasjonen at nærværet av IHNV G-proteinet eller dets ledersekvens (også kalt signalsekvens) uttrykt fra en nukleinsyrevaksine i leseramme

med et andre antigen kan øke immunresponsen, og dermed øke beskyttelse mot patogenet som det andre antigenet er utledet fra. Forklaringen på denne effekten er ikke funnet ennå, men den kan henge sammen med eksistensen av immunsimulatoriske motiver på G-proteinet. Det er også trolig at fusjonen av det antigene proteinet til G-proteinet eller dens ledersekvens resulterer i translokaliseringen av antigenet til celleoverflaten, og dermed øker eksponeringen av peptidet til vertens immunsystem. Alternativt så kan en økning i beskyttelse skyles synergier fra en kombinasjon av disse effektene.

IHNV G-proteinet er blitt anvendt i rekombinant form som basis for vaksinasjon av fisk mot IHNV (US 5 534 555). Aminosyre og nukleinsyresekvensene til G-proteinet er kjent for eksempel fra Koener et al. (1987) J. Virol. 61: 1342-1349.

IHNV er et medlem av familien til rhabdovirus, som deler "G"-glykoproteinet. Rhabdovirus inkluderer vesikulovirus (for eksempel vesikulær stomatittvirus (VSV)), lyssavirus (for eksempel rabies virus), efemovirusene (for eksempel bovint efemeralt febevirus) og novirhabdovirusene.

Den immunforsterkende effekten av rhabdovirus G-proteinsekvenser kan brukes for å behandle eller å forebygge sykdom i ethvert dyr som har både humorale og cellulære forgreninger til immunsystemet. Slike dyr inkluderer pattedyr av alle varianter (inkludert mennesker), fisk, fugler og krypdyr.

Vi rapporterer i et eksperiment (Eksempel 1) hvor IHNV G-proteinet og VP2 antigenet fra IPNV (infeksiøs pankreatisk nekrosevirus) blir uttrykt sammen som et fusjonsprotein på et enkelt DNA-plasmid *in vivo* i fisk. Rekombinant IPNV VP2 har tidligere blitt uttrykt i organismer slik som *E. coli* og anvendt for vaksinerings av fisk mot IPNV, med en viss grad av suksess. US 5 165 925 vedrører en vaksine mot IPNV som omfatter VP2 polypeptidet.

Denne kombinasjonsnukleinsyrevaksine (NAV) ble injisert inn i fisk som deretter ble smittet med IPNV som beskrevet i Eksempel 1. Vi observerte en markert forbedring i overlevelse sammenlignet med immunisering ved å anvende et konvensjonelt viruspreparat, nemlig et drept virus i olje-hjelpstoff. Faktisk så var den relative prosent overlevelsen (RPS) med fusjons-G-protein-VP2 protein NAV over 50% sammenlignet med den PBS-negative kontroll, mens det drepte viruset hadde RPS på ca. 25%.

Konstruksjonen som bærer IPNV VP2-proteinet uten IHN V G-proteinet resulterte i en gjennomsnitt RPS på bare 31% sammenlignet med den PBS-negative kontrollen.

Derfor har innlemmingen av IHN V G-proteinet i konstruksjonen den effekten med å øke immunresponsen på IPNV VP2-proteinet for å lage et beskyttelsesnivå som er 67% sterkere enn med VP2-proteinet alene.

Den immunstimulerende effekten til IHN V G-proteinet ble verifisert i et andre eksperiment (Eksempel 2) hvor ledersekvensen til IHN V G-proteinet ble fusert 5' for ISAV hemagglutinin (HA)-genet på en DNA-ekspresjonssektor og vektoren ble anvendt til å vaksinere fisk mot ISAV-infeksjon i et smitteforsøk. Tilstedeværelsen av IHN V G-protein ledersekvensen økte signifikant den beskyttende effekten av ISAV HA-antigenet i en DNA-vaksine.

Oppfinnelsen vedrører både nukleinsyrevaksiner og vaksiner basert på rekombinante antigener. En rekombinant antigenvaksine omfatter isolert eller renset IHN V G-protein (eller en del av den) og en isolert eller renset del av et andre antigen fra et fiskepatogen forskjellig fra IHN V. Den delen av IHN V G-proteinet og den delen av det andre antigenet er tilveiebrakt sammen i form av et fusjonsprotein.

Et "isolert" eller "renset" protein er definert som å være vesentlig fri for cellulært materiale eller andre kontaminerende proteiner fra cellen eller vevskilden som proteinet er utledet fra, eller vesentlig fri fra kjemiske forløpere eller andre kjemikalier når de er syntetisk laget.

En foretrukket vaksine er en nukleinsyrevaksine som bærer en del av IHN V G-proteingenet fusert i leseramme med en del av et andre gen fra et patogen forskjellig fra IHN V på den samme DNA-ekspresjonsvektoren. Nukleinsyresekvensen som koder for delen av G-proteinet eller et fragment av det, og det andre antigenet eller et fragment av det, er fusert i leseramme.

Når genene er fusert i leseramme byr det at listen av trippeltkoden i nukleinsyresekvensene som gjenkjennes av tRNA-molekyler er identisk til listen i de naturlig forekommende genene slik at den resulterende translaterede aminosyresekvensen er et peptid som omfatter en del av IHN V G-proteinet og en del av det andre peptidet.

Helst så blir disse to genene eller genfragmentene fusert direkte uten noen mellomliggende sekvens. Når IHN V G-protein og de andre proteingensekvensene eller deler

av dem blir fusert i leseramme så kan IHNV G-proteinsekvensen eller delen av den være 5' for den andre proteinsekvensen, 3' for den andre proteinsekvensen eller innesluttet innen den sekvens.

- 5 For foreliggende formål så betyr en "del" av et protein et hvert peptidmolekyl som har minst 7, valgfritt minst 15 eller minst 25 eller minst 50 eller minst 100 etterfølgende aminosyrer til referanseproteinet. En "del" av et gen eller nukleinsyresekvens er enhver del av den gensekvensen som omfatter minst 20, valgfritt minst 50 eller minst 100, eller minst 200 etterfølgende nukleotider av den fullstendige kodende sekvensen. En "del"
- 10 av et gen eller protein kan være fullengde gensekvensen eller aminosyresekvensen. I en foretrukket utførelsesform så omfatter delen av IHNV G-proteinet som er anvendt ifølge oppfinnelsen den ytre membran målrettede ledersekvensen til G-proteinet, eller dets kodende nukleinsyresekvens. Valgfritt så omfatter denne del ledersekvensen til eksklusjonen av resten av G-proteinet. Den fullstendige ledersekvensen (lest fra den N-
- 15 terminale enden) er: MDTMITTPLILILITCGANS (SEKV. ID. NR. 1). En avkortet, men funksjonell versjon av ledersekvensen kan brukes istedenfor den fullstendige ledersekvensen.

- Når referanse blir gjort til IHNV G-proteinet eller det andre proteinet, eller deres
- 20 respektive kodende sekvenser så bør det forstås at dette uttrykk inkorporerer proteiner eller kodende sekvenser med vesentlig homologi. "Vesentlig homolog" i denne sammenheng betyr at en sekvens, når den sammenlignes med en referansesekvens, har minst 60% homologi, helst minst 70% homologi, mer ønskelig minst 80% homologi, mer ønskelig minst 90% homologi og mest ønskelig minst 95% homologi til
- 25 referansesekvensen.

- For å bestemme prosenthomologien av to aminosyresekvenser eller av to nukleinsyresekvenser så blir sekvensene oppstilt for optimale sammenligningsformål (for eksempel så kan gap introduseres i sekvensen av en første aminosyre eller
- 30 nukleinsyresekvens for optimal oppstilling med en andre aminosyre eller nukleinsyresekvens og den mellomliggende ikke-homologe sekvensen i gapet kan ignoreres for sammenligningsformål).

- Når en posisjon i den første (referanse) sekvensen okkuperes av det samme
- 35 aminosyreresidiet eller nukleotidet som den korresponderende posisjonen i sekvensen, er molekylene homologe ved den posisjon (dvs. det er identitet ved den posisjonen). I

tilfellet med nukleinsyresekvenssammenligning så er det også homologi ved en viss posisjon hvor kodontripletten som inkluderer nukleotidet koder for den samme aminosyren i begge molekylene som sammenlignes, på grunn av degenereringen av den genetiske koden.

5

Prosent homologien mellom to sekvenser er en funksjon av antall homologe posisjoner som deles av sekvensene (dvs. % homologi = antall homologe posisjoner/totalt antall posisjoner). Valgfritt så kan sammenligningen av sekvenser og bestemmelser av prosthomologi utføres ved å anvende en matematisk algoritme. Passende algoritmer er inkorporert i NBLAST og XBLAST programmene til Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 430-10.

10

Videre så kan aminosyrer med identisk ladning substitueres for hverandre. For eksempel så kan lysin og arginin substitueres med hverandre. Glutaminsyre og asparbinsyre kan substitueres for hverandre. Glutamat og aspartat kan også substitueres for hverandre. Slike ladningsnøytrale forandringer for aminosyrer i et protein er anerkjent i fagfeltet og det resulterende proteinet vil fremdeles dekkes av denne oppfinnelse.

15

Det er mange forskjellige geografiske isolater av IHNV og andre patogener. Det er en viss grad av variasjon i nukleinsyresekvensen av disse patogener og i aminosyresekvensen av proteinene de uttrykker. IHNV G-proteinet og andre proteinet anvendt ifølge oppfinnelsen er ikke begrenset til noe spesifikk isolatkilde. Det kan være en fordel å avstemme den andre proteinvarianten med de prevalente isolatene i en bestemt geografisk sone når man designer en vaksine for det området.

25

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir det tilveiebrakt en DNA-ekspresjonsvektor hvor nukleinsyresekvensene for IHNV G-protein og et andre protein er operativt koblet til transkripsjonelle, regulatoriske sekvenser, og en nukleinsyrevaksine som omfatter DNA-ekspresjonsvektoren og en farmasøytisk akseptabel bærer. Nukleinsyresekvenser for IHNV G-proteinet og det andre proteinet kan kobles for å uttrykkes under kontrollen av den samme transkripsjonelle regulatoriske sekvensen eller sekvensene, eller de kan uttrykkes uavhengig fra hverandre under kontrollen av separate transkripsjonelle, regulatoriske sekvenser. Som anvendt her så refererer uttrykket "DNA-ekspresjonsvektor" seg til et nukleinsyremolekyl som er i stand til å transportere en annen nukleinsyre som det er blitt koblet til. Helst så er DNA-ekspresjonsvektoren en

30

35

eukaryotisk ekspresjonsvektor. En type vektor er et "plasmid" som referer seg til en sirkulær dobbelttrådet DNA-sløyfe som tilleggs DNA-segmenter kan liggeres inn i. En annen type vektor er en virusvektor, hvor tilleggs DNA-segmenter kan liggeres inn i virusgenomet. Innen en rekombinant ekspresjonsvektor er "operativt koblet" ment å

5 bety at nukleotidsekvensen av interesse er koblet til den eller de regulatoriske sekvensene på en måte som tillater ekspresjon av nukleotidsekvensen.

Transkripsjonsregulatoriske sekvenser inkluderer promotere og polyadenyleringssekvenser. Immunresponsen kan økes ved å anvende andre

10 nukleotidsekvenser slik som immunstimulerende oligonukleotider som har umetylerte CpG dinukleotider eller nukleotidsekvenser som koder for andre antigene proteiner eller medvirkende cytokiner. Regulatoriske sekvenser inkluderer de som dirigerer konstitutiv eller induserbar ekspresjon av en nukleotidsekvens i mange typer vertsceller og de som dirigerer ekspresjon i nukleotidsekvensen bare i visse vertsceller (for

15 eksempel vevs-spesifikke regulatoriske sekvenser). DNA kan være tilstede i naken form eller det kan gis sammen med et middel for å fremme cellulært opptak (for eksempel liposomer eller kationiske lipider). Teknologien til DNA-vaksinasjon blir gjennomgått for eksempel i WO 90/11092.

20 For optimal *in vivo* ekspresjon i fisk kan det være foretrukket å selektere transkripsjonelle regulatoriske sekvenser som er endogene for fisken som skal vaksineres. For eksempel så kan endogent cytokin eller aktin genpromotere overveies, eller andre regulatoriske sekvenser kan være utledet fra fiske-DNA-virus. DNA-vaksinering som brukt til fisk blir forklart i mer detalj i US 5 780 448.

25 Rekombinant IHNV og andre patogene proteiner har vellykket blitt uttrykt i en rekke organismer inkludert *E. coli* og *Pichia pastoris* ved å anvende vektorer som inneholder konstitutive eller induserbare promotere. I en rekombinant vaksine så kan renset IHNV G-protein og andre protein blandes sammen for å gis samtidig. Alternativt så kan en

30 ekspresjonsvektor som omfatter en fusjon av deler av disse to genene konstrueres ved standard teknikker og uttrykkes innen en vertscelle for å fremstille et renset rekombinant fusjonsprotein. Konvensjonelle fremgangsmåter for proteinrensing kan brukes for å fremstille det rekombinante proteinet for anvendelse i en vaksine. Valgfritt så kan et lysat av vertsceller som uttrykker rekombinant protein anvendes istedenfor

35 rekombinant protein som har gjennomgått videre rensingsprosedyrer.

På basis av resultatene som er demonstrert her så beskrives en fremgangsmåte for å behandle eller å forebygge infeksjons sykdom i dyr slik som i fisk, som omfatter å gi til dyret en sammensetning som omfatter en del av nukleotidsekvensen av G-proteinet til IHNV (eller den kodede proteinsekvensen), og en del av nukleotidsekvensen av et andre antigen fra patogenet som forårsaker den infeksjøs sykdommen (eller den kodede proteinsekvensen). Vi krever også anvendelsen av en sammensetning som omfatter en del av G-proteinet fra IHNV eller dets kodende nukleotidsekvens og en del av et andre protein fra en patogen organisme, eller dets kodende nukleotidsekvens, i produksjonen av et medikament (vaksine) for behandlingen eller forebyggingen av en infeksjons sykdom i et dyr (for eksempel en fisk) som forårsaket av nevnte patogene organisme og/eller for behandlingen eller forebyggingen av infeksjon i nevnte patogene organisme.

Det "andre" (heterologe) proteinet ifølge oppfinnelsen kan være et protein (eller peptid eller antigen) fra et fiskepatogen forskjellig fra IHNV. Det andre proteinet kan være fra en sopp, virus, protozoan eller bakteriell fiskepatogen som forårsaker infeksjøs sykdomssyndromer. Det andre proteinet er valgfritt fra et virus forskjellig fra rhabdovirus eller forskjellig fra VHSV. For eksempel så kan det andre proteinet være utledet fra infeksjons lakseanemi virus (ISAV), infeksjons pankreatisk nekrosevirus (IPNV), iridovirus, nervøs nekrosevirus (NNV), laksepankreas sykdomsvirus (SPDV), vår viremia fra karpevirus (SVCV), viralt blødningsseptikemi virus (VHSV), *Renibacterium salmoninarum* (årsaksmiddel for bakteriell nyresykdom), *Piscirickettsia salmonis* (årsaksmiddel for salmonid rikettsial septikemi), *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp, *Yersinia ruckerii*, *Nocardia* spp., *Pseudomonas* spp., *Photobacterium damsela* osv. I en foretrukket utførelsesform så er det andre proteinet av virusopprinnelse. Et stort og voksende antall polypeptider fra disse og andre patogene organismer er blitt rensset og/eller klonet og uttrykt og er tilgjengelige for å bli eller tilveiebrakt sammen med IHNV G-protein eller dets kodende sekvens i en vaksinesammensetning. Foretrukne eksempler inkluderer IPNV-proteinene VP1, VP2, VP3 og NS og deres kodende nukleotidsekvenser; ISAV-proteiner utgreies i WO 01/01469 inkluderer hemagglutinin, nukleokapsid, polymerase og segment 7 P4 og P5-proteinet og deres kodende nukleotidsekvenser; *P. salmonis* proteiner utgreiet i WO 01/68865 inkludert OspA og IcmE og deres kodende nukleotidsekvenser; nodavirusproteiner slik som nukelokapsidet; og strukturelle peptider fra SPDV og deres kodende nukleotidsekvenser (utgreiet i WO 99/58639). En foretrukket vaksinesammensetning ifølge oppfinnelsen omfatter en DNA-ekspresjonsvektor som bærer en del av IHNV G-protein nukleotidsekvensen fusert i leseramme med en del av IPNV VP2-sekvensen eller en del

av IHNV G-protien ledersekvensen fusert i leseramme med en del av ISAV hemagglutininsekvensen.

Start kandidatfisk artene for å motta vaksinen ifølge oppfinnelsen er salmonid fisk, inkludert laks- og ørret-arter, spesielt sølv laks (*Oncorhynchus kisutch*), bekkørret (*Salvelinus fontinalis*), bekkeørret (*Salmo trutta*), ”chinook” laks (*Oncorhynchus tshawytscha*), masu laks (*Oncorhynchus masou*), rosa laks (*Oncorhynchus gorbuscha*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), arktisk ”charr” (*Salvelinus alpinus*) og laks (*Salmo salar*). Imidlertid så kan enhver annen fiskeart som er mottagelig for infeksjons sykdom være gunstig, slik som dekorasjons-fiskearter, koi, gullfisk, karpe, steinbitt, ”yellowtail”, sjøbrasme, havaborr, gjedde, kveite, kolje, tilapia, piggvar, grå steinbitt osv.

”Det andre” (heterologe) proteinet ifølge oppfinnelsen kan også være et antigen fra et patogen av dyr forskjellig fra fisk, spesielt pattedyr slik som mennesker. Det andre proteinet kan være fra et sopp, virus, protozoan eller bakterielt patogen som forårsaker infeksjøs sykdomssyndromer i dyr. En ikke-begrensende liste av mulige patogener inkluderer: hepatitt virus (for eksempel HBV, HCV), HIV og andre immundefisiente virusgener, influensavirus, mesling virus, koronavirus, herpesvirus, poliovirus, rhinovirus, rotavirus, adenovirus, papillomavirus, hantavirus, parvovirus og de spesifikke virusene bovint, viralt diaré virus (BVDV), bovint herpesvirus (BHV), munn- og klovsyke virus, bovint respiratorisk syncytal virus (BRSV), parainfluenza type 3 virus (PI3), infeksjøs bovint rinotrakeitt (IBR), griserespiratorisk og reproduktivt syndromvirus (PRRSV); arter fra *Giardia*, *Yersinia*, *Leishmania*, *Amoeba*, *Entamoeba*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Cryptosporidia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Eimeria*, *Clostridia*, *Pasteurella*, *Brachyspira*, *Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma* (for eksempel *M. bovis*, *M. hyopneumoniae*), *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Neospora*, *Fusobacterium*, *E. coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus sommus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Anaplasma* osv.

Ethvert virveldyr kan immuniseres med vaksinen ifølge oppfinnelsen. Spesielt kan nevnes mennesker, hovedartene av husdyr, nemlig storfe, hester, sauer, svin og fjerfe og kjeledyr.

To komponentvaksiner kan lages sammen i en enkel vaksinesammensetning eller så kan de lages separat for separat administrering eller for samtidig administrering. Valgfritt så blir individuelle komponenter tilveiebrakt i formen av et kitt for sekvensiell, separat eller samtidig administrering. De to komponentene kan blandes sammen rett før administrering.

For fisk så er den foretrukne administreringsmåten for vaksinen ifølge oppfinnelsen injeksjon inn i muskelen (spesielt inn i den epaksiale muskelen). Alternative valg er injeksjon inn i den peritoneale hulen (for større fisk), oralt i mat, eller ved nedsenking i sjøvann eller i ferskvann. Det er anbefalt at fisken er 2 gram eller større i kroppsvekt for administrering av vaksinen ifølge oppfinnelsen ved injeksjon, helst 10 gram eller større. For nedsenking eller oral administrering, er det foretrukket at fisk har en kroppsvekt på minst 0,1 gram, helst minst 0,5 gram, vanligvis minst 2 gram.

I dyr forskjellig fra fisk så blir ofte vaksiner spesielt nukleinsyrevaksiner avlevert ved intramuskulær injeksjon eller ved avlevering til de mukosale membranene; avleveringsteknikker er inkludert, men er ikke begrenset til: elektroporering, subkutan eller transdermal injeksjon, mikroinjeksjon, jetinjeksjon, kalsiumfosfat-DNA ko-presipitering, DEAE-dekstranstyrt transfeksjon, polybren-styrt transfeksjon, liposomfusjon, lipofeksjon, protoplas fusjon, virusinfeksjon, mikropartikler, bakterielle bærere og biolistisk (partikkel bombardement, for eksempel ved å anvende en genpistol).

Vaksinen ifølge oppfinnelsen kan gis til dyr for profylaktiske eller terapeutiske formål. Vaksinen er i stand til å indusere langtids beskyttelse mot målinfeksjonssykdommen. "Langtids" beskyttelse i tilfellet fisk betyr en beskyttende immunrespons i mer enn 7 dager. Mer ønskelig lenger enn 20 dager, og mest ønskelig lenger enn 70 dager etter vaksinerings.

Den effektive dosen av vaksinen kan variere avhengig av størrelsen og arten til individet, og i henhold til administreringsmåten. Den optimale dosen kan bestemmes gjennom utprøving og feiling av en doktor, veterinær eller en spesialist på akvakultur. For fisk så kan vaksiner omfatte mellom 0,01 og 0,5 g, helst mellom ca. 0,05 og 0,2 g av rekombinant protein i en enkel dosering. Et passende doseringsområde for nukleinsyrevaksiner kan være så lavt som pikogram, eller så høyt som milligram mengder, men er normalt fra ca. 0,01 til 100 µg, helst 0,1 µg til 50 µg per enhetsdose,

mer ønskelig ca. 1 µg til 20 µg og mest ønskelig ca. 5 µg til 10 µg per enhetsdose. På grunn av stresset som fisk lider av som respons på vaksinen, er det å foretrekke at vaksinen blir tilveiebragt som en enkel skuddvaksine, i enkel doseringsform. For injiserbare vaksiner så er en enkel doseenhets som passer 0,025 til 0,5 ml, helst 0,05 til 0,2 ml, valgfritt ca. 0,1 ml i volum.

Vanligvis så blir vaksiner laget som flytende løsninger, emulsjoner eller suspensjoner for injeksjon eller avlevering i vann. Faste (for eksempel pulver) former som er passende for løsning i, eller suspensjon i, flytende verktøy eller for å blandes med fast mat før administrering kan også lages. Vaksinen kan være lyofilisert, valgfritt frysetørket, i en klar til bruk form for rekonstitusjon med en steril fortynner. For eksempel så kan lyofilisert vaksine rekonstitueres i 0,9% saltvann (valgfritt tilveiebrakt som del av det pakkede vaksineproduktet). Nukleinsyrevaksiner er spesielt egnet for lyofilisering på grunn av stabiliteten og lang oppbevaringstid for molekylene. Alternativt så kan vaksinen tilveiebringes i en saltløsning. Flytende eller rekonstituerte former av vaksinen kan videre fortynnes i et lite volum vann (1 til 10 volumer) før tilsetningen til en penn, tank eller bad for administrering til fisk ved nedsenking. De farmasøytiske vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen kan gis i en form for øyeblikkelig frigjøring eller forlenget frigjøring.

Farmasøytisk akseptable bærere eller verktøy inkluderer konvensjonelle hjelpemidler og kan for eksempel være løsemidler slik som vann, olje eller saltvann, dekstrose, glyserol, sukrose, trikain, bløtnings- eller emulgerende midler, svellingsmidler, overtrekkere, bindere, fyllere, oppløsere, fortynnere, smøremidler, pH-buffermidler eller konvensjonelle hjelpemidler slik som muramyl dipeptider, avridin, aluminiumhydroksid, oljer, sponiner, blokk kopolymerer og andre substanser som er kjent i fagfeltet. I tilfellet med nukleinsyrevaksiner så kan DNA-ekspresjonsvektoren avleveres naken, eller den kan tilveiebringes i form av kationiske lipid-DNA-komplekser, liposomer, kalsiumfosfat ko-presipitater, adsorbent på mikropartikler osv.

I noen tilfeller kan det være ønskelig å kombinere vaksinen ifølge oppfinnelsen med en konvensjonell vaksine mot et infeksiosøst patogen (drept patogen eller rekombinant patogen antigenvaksine eller patogen nukleinsyre vaksine) i en kombinasjonsvaksine, eller i et kitt som omfatter begge komponentene for separat, sekvensiell eller samtidig administrering, for behandling eller forebygging av infeksiosø sykdom forårsaket av patogenet.

Eksempel 1**Evaluerings av nukleinsyrevaksiner mot infeksiøs pankreatisk nekrosevirus i laks, *Salmo salar***

5

Vaksinering

Laks, unglaks (kroppsvikt 9-26 g) blir holdt i to 1 meter diameter sirkulære tanker med ferskvann ved 8°C og fastet i 24 timer før vaksinering. For vaksinering så blir fisk bedøvet i 3-aminobenzosyreetyler (MS222, Sigma, Poole, UK) ved en konsentrasjon på ca. 0,5 g/liter. Nukleinsyrevaksiner (10 µg DNA/50 µl dose) blir gitt ved intramuskulær injeksjon på den venstre siden bak på ryggen, i et område rett under den bakre finnen. Olje hjelpestoffet med drept IPNV-vaksine, og PBS-kontroll ble gitt ved intraperitoneal injeksjon (100 µl). Hver behandlingsgruppe har 40 fisk og det er 2 replikater per vaksine for hver av 6 vaksiner.

15

Testgruppene mottar de følgende sammensetningene:

- (1) pUK-vektoren: en kloningsvektor som bærer kanamycin resistensgenet, den CMV ubetinget tidlig promotoren, et multipelt kloningssete, og det bovine veksthormon polyadenyleringssignal (BGH polyA).
- (2) pUK + VP2: pUK-vektoren som har inkorporert hele den kodende sekvensen til IPNV VP2 innen vektorens multiple kloningssete.
- (3) pUK + IHNG: pUK-vektoren som har inkorporert hele den kodende sekvensen til IHNV G-proteinet innen vektorens multiple kloningssete.
- (4) pUK + IHNG + VP2: pUK-vektoren som har inkorporert hele den kodende sekvensen til IPNV VP2-proteinet fusert i leseramme med glykoproteinet (G) til IHN-viruset innen det multiple kloningssete slik at G-proteinet er 5' for VP2.
- (5) IPNV + olje: et inaktivert preparat av IPN-virus, med oljeadjuvans.
- (6) PBS (negativ kontroll)

35

Nesten 6 uker etter vaksinerings blir fisken smoltet over en periode på 5 dager. Sjøvannstrømmen inn i fisketankene blir gradvis øket mens ferskvannstrømmen blir redusert, slik at ved slutten av de 5 dagene så er fisken i fullstendig sjøvann.

5 Ko-habitasjonssmitte

807 grad-dager etter vaksinerings, blir en frossen passasje 2 supernatant av IPN-virus "Cole-Deep"-stamme fortynnet 5 ganger i steril PBS for å gi en sluttkonsentrasjon på 1×10^7 TCID₅₀/ml. Fisk ble bedøvet i MS222 og smittet i grupper med intraperitoneal injeksjon av 100 µl virussuspensjon, slik at hver fisk mottar en dose på 10^6 TCID₅₀.

10 Sjøvannstemperaturen ved smitte er ca. 11°C og vannstrømningshastigheten er ca. 5 liter per minutt i hver tank.

Døde blir fjernet to ganger dagen på første observering. Utprøvingen blir avsluttet 8 uker etter smitte.

15

Konklusjoner

Vaksine	Gjennomsnittsdødelighets %	SD	Gjennomsnittlig RPS i forhold til PBS
PBS	42,6	10,4	n/a
pUK	39,7	10,4	6,90
pUK + IHNG	35,3	8,3	17,24
pUK + VP2	29,4	4,2	31,03
pUK + IHNG + VP2	20,6	4,2	51,72
IPNV + olje	31,7	5,1	25,65

20 Smittemodellen basert på kohabitasjon med intraperitoneale injiserte laksesmolter er vellykket: kumulative dødeligheter i intraperitonealt injiserte kohabitanter når et gjennomsnitt på 41,25% og dette blir nært reproduert i de 4 smittetankene med standard avvik på 3,95%.

25 Yteevnen til den drepte IPNV-vaksinen gitt med olje ble undersøkt i forhold til PBS-vaksinerte kontroller. Den drepte vaksinen gir noe beskyttelse med en relativ prosent overlevelse (RPS) sammenlignet med de PBS-vaksinerte kontrollene på mer enn 25%.

Yteevnen til nukleinsyrevaksinene blir sammenlignet med enten det tomme plasmidet eller plasmidet som inneholder genet for IHNV G-proteinet. Kontrollplasmidene blir

sammenlignet med de immitert vaksinerte PBS-kontrollene for å bestemme om det tomme plasmidet eller plasmidet som inneholder IHN V G-proteinet har noen beskyttende effekt. Plasmidvektoren pUK gir en ikke signifikant beskyttende effekt. Når IPNV VP2-proteinet er inkludert i vektoren, så blir signifikant beskyttelse (31% RPS) gitt sammenlignet med PBS-vaksinekontroller. Når IHN V G-proteingenet inkluderes i vektoren uten IPNV-gener, så er den beskyttende effekten 17% RPS sammenlignet med PBS.

Vaksine med den meste enestående yteevnen er en NAV som inneholder genet for IHN V G-proteinet i leseramme med IPNV VP2. Fisk vaksinert med denne vaksine viser en relativ prosent overlevelse på 52% RPS sammenlignet med de PBS-vaksinerte kontrollene. Som konklusjon så yter det standard drepte viruspreparatet med oljehjelpstoff adekvat i denne utprøvingen, men yteevnen til NAV er som inneholder VP2 mye større. Spesielt så er NAV som inneholder VP2 i leseramme med IHN V G-protein mest effektiv.

Eksempel 2: Evaluering av nukleinsyrevaksiner mot ISAV

Unglaks med gjennomsnittsvekt 10 g (< 6 måneder gamle) ble aklimatisert i minst 7 dager til vann ved 12±1°C med strømningshastighet på 2,5 l/min. Fisken blir føret med en kommersiell pellettdiett ved en daglig dose på 1,5% kroppsvekt.

Før vaksinering blir fisken bedøvet i 30 mg/l benzokain. Nukleinsyrevaksiner (10 µg DNA/50 µl dose) blir gitt ved intramuskulær injeksjon inn i den epaksiale muskelen rett før den dorsale finnen. Oljeemulsjonsvaksine ble gitt ved intraperitoneal injeksjon (150 µl). Hver replika vaksinegruppe har 55 fisk og det er 2 replikater per vaksine for hver av de 5 vaksinene.

Testgruppene mottar de følgende sammensetningene:

- (1) pUK-vektoren: en kloningsvektor som bærer kanamycin resistensgenet, CMV umiddelbart tidlig promoteren, et multipelt kloningssete, og det bovine veksthormon polyadenyleringssignalet (BGH polyA).
- (2) pUK-HA: pUK-vektoren som har inkorporert hele den kodende sekvensen til ISAV heagglutininproteinet i det multiple kloningssetet.

(3) pUK-IHN_g: pUK-vektoren som har inkorporert hele sekvensen til IHN_V G-proteinet i det multiple kloningssettet.

(4) pUK-HA-IHN_g: pUK-vektoren som har inkorporert hele den kodende sekvensen til ISAV heagglutininprotein i det multiple kloningssettet og fusert ved sin 5' ende til IHN_V G-protein ledersekvensen.

(5) ISAV + olje: et inaktivt preparat av ISA-virus, med oljeadjuvans.

Fisken blir smittet ved 850,5 grad-dager. En kohabitasjonssmitte blir anvendt hvor laks fra den samme beholdningen får klippet a fettfinnen, gitt en i.p. injeksjon med 0,1 ml dyrket ISAV (ca. 10^4 TCID₅₀ per fisk) og tilsatt til hver tank med behandlet fisk.

Fisk i hver tank blir målt to ganger på dagen for dødelighet i 31 dager. Den relative prosent overlevelse (RPS) ble beregnet som følger:

15

$$RPS = 1 - (\% \text{ dødelighet av vaksiner} / \% \text{ dødelighet av pUK-kontroll}) \times 100$$

Resultater:

Den kumulative dødeligheten til den negative kontrollgruppen (pUK-plasmid) er 94%.
 Den beste beskyttelse blir induisert ved injeksjon av den positive kontrollmonovalente inaktiverte ISAV-vaksinen (94% RPS). Injeksjon av pUK-IHN_g plasmidet som en negativ kontroll induiserte noe ikke-spesifikk beskyttelse (RPS 26%). pUK-HA utviser et høyt nivå av beskyttelse (RPS 49%). Denne beskyttelse blir signifikant forsterket ved tilsetningen av IHN_V G-protein ledersekvensen i den 3' enden (pUK-HA-IHN_g) (RPS 60%). Disse resultatene tilveiebringer videre støtte for fordelene med å inkludere IHN_V G-proteinsekvensen (eller minimalt, ledersekvensen av den) i en nukleinsyrevaksine for å starte immunitet for en infeksjøs sykdom forskjellig fra IHN_V. Ledersekvensen til G-proteinet kan være ansvarlig for å målrette det heterologe antigenet til celleoverflaten innen fisken, eller det kan være spesielle motiver innen proteinet som ikke spesifikt stimulerer fiskens immunsystem.

Testgruppe	Gjennomsnittlig dødelighet %	Standardfeil	RPS (i forhold til pUK)
pUK	94	2	-
ISAV-olje	6	6	94
pUK-HA	48	4	49
pUK-IHN _g	70	6	26
pUK-HA-IHN _g	38	6	60

P a t e n t k r a v

1.

DNA-ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
 5 omfatter en sekvens som koder for en del av den infeksjøs hematopoietiske
 nekrosevirus IHNV G-proteinkodende sekvensen, og som videre omfatter en del av en
 andre proteinkodende sekvens fra en patogen organisme forskjellig fra IHNV, der den
 delen av den IHNV G-proteinkodende sekvensen og den delen av den andre
 proteinkodende sekvensen er fusert i leseramme på samme DNA-ekspresjonsvektor.

10

2.

DNA-ekspresjonsvektor ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at nevnte andre proteinkodende sekvens er fra et fiskepatogen.

15 3.

DNA-ekspresjonsvektor ifølge ethvert av kravene 1-2, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d at den inneholder ledersekvensen til IHNV G-proteinet.

4.

20 DNA-ekspresjonsvektor ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at ledersekvensen til IHNV G-proteinet har SEKV. ID. NR. 1.

5.

DNA-ekspresjonsvektor ifølge ethvert av de foregående kravene 1-4, k a r -
 25 a k t e r i s e r t v e d at den omfatter den fullstendige IHNV G-
 proteinkodende sekvensen.

6.

DNA-ekspresjonsvektor ifølge ethvert av kravene 1-5, k a r a k t e r i -
 30 s e r t v e d at det andre proteinet er fra et patogen valgt fra: ISAV, IPNV,
 VHSV, NNV, iridovirus, SVCV, SPDV, *Renibacterium*, *salmoninarum*, *Piscirickettsia*
salmonis, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Yersinia ruckerii*, *Pseudomonas* spp., *Nocardia*
spp. og *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

35

7.

DNA-ekspresjonsvektor ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det andre proteinet er VP2-proteinet fra IPNV eller hemagglutininproteinet
5 fra ISAV.

8.

Nukleinsyrevaksine, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
en DNA-ekspresjonsvektor ifølge ethvert av kravene 1-7 med en farmasøytisk
10 akseptabel bærer.

9.

Fusjonsprotein, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en
del av IHNV G-proteinet og en del av et andre protein utledet fra en fiskepatogen
15 organisme forskjellig fra IHNV.

10.

Fusjonsprotein ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte
andre protein er fra et patogen valgt fra: ISAV, IPNV, VHSV, NNV, iridovirus, SVCV,
20 SPDV, *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas*
spp., *Yersinia ruckerii*, *Pseudomonas spp.*, *Nocardia spp.* og *Photobacterium damsela*
subsp. *piscicida*.

11.

Fusjonsprotein ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
25 andre proteinet er VP2 fra IPNV.

12.

Fusjonsprotein ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
30 andre proteinet er hemagglutinin fra ISAV.

13.

Nukleinsyrevaksine, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
en sekvens som koder for et fusjonsprotein ifølge ethvert av kravene 10-12 med en
35 farmasøytisk akseptabel bærer.

14.

Anvendelse av en DNA-ekspresjonsvektor ifølge ethvert av kravene 1-7 eller et fusjonsprotein ifølge ethvert av kravene 9-12 for fremstilling av et medikament for forebyggelse eller behandling av patogen infeksjon hos fisk.

5

15.

Anvendelse ifølge krav 14, for fremstilling av et medikament for forebyggelse eller behandling av en bakteriell, viral, fungal eller protozo infeksjon hos fisk.

10

16.

Anvendelse ifølge krav 14 eller 15 for fremstilling av et medikament for å boostre immunresponsen for dermed å øke beskyttelsen mot patogenet fra hvilket det andre proteinet er avledet.

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis Tiergesundheit AG

<120> IHNV G protein for Immune Stimulation

<130> E39917

<140> NO 20051840

<141> 2003-09-16

<150> GB 0221552.3

<151> 2002-09-17

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Infectious hematopoietic necrosis virus

<400> 1

Met	Asp	Thr	Met	Ile	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Ile	Thr	Cys
1				5					10					15	

Gly	Ala	Asn	Ser
			20