

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/145 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480013316.9

[43] 公开日 2007年3月7日

[11] 公开号 CN 1925870A

[22] 申请日 2004.4.16

[21] 申请号 200480013316.9

[30] 优先权

[32] 2003.5.15 [33] US [31] 60/470,843

[86] 国际申请 PCT/US2004/011998 2004.4.16

[87] 国际公布 WO2005/014778 英 2005.2.17

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.15

[71] 申请人 俄克拉荷马州大学评议会

地址 美国俄克拉荷马州

[72] 发明人 A·赖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李波 刘玥

权利要求书2页 说明书16页 序列表2页
附图4页

[54] 发明名称

表达马-2型流感病毒 HA1 的 DNA 疫苗

[57] 摘要

本发明涉及表达马-2型流感病毒血凝素(HA1)基因的DNA疫苗。通过工程化HA1内的终止密码子确保HA1表达。通过将DNA疫苗包囊在脂质体中并通过鼻内接种,与表达全长HA基因的DNA疫苗相比,在显著更低的剂量足以引起保护性免疫。更低剂量降低诱导抗DNA抗体的风险。直接鼻内接种到呼吸道上皮细胞降低DNA整合的风险。本发明疫苗具有超过当前灭活或减毒活疫苗的优点,因为疫苗的更新只要求用新病毒替换编码序列。

1. 马流感病毒疫苗，其中含有有效免疫量的分离 DNA 和药理学可接受的载体或稀释剂，所述分离 DNA 含有马-2 型流感病毒株的 HA1 编码序列。
2. 根据权利要求 1 的疫苗，其中 HA1 编码序列选自以下毒株：A/Eq/Kentucky/98, A/Eq/Miami/63, A/Eq/Kentucky/81, A/Eq/Fontainebleau/79, A/Eq/Kentucky/94, A/Eq/Newmarket/2/93, A/Eq/New York/99, 和 A/Eq/Oklahoma/2000。
3. 根据权利要求 1 的疫苗，其中 HA1 编码序列是用于 A/Eq/Kentucky/98 毒株的。
4. 根据权利要求 1 的疫苗，其中 HA1 编码序列含有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列。
5. 根据权利要求 1 的疫苗，其中还含有其它抗原性成分、其它抗原性成分的编码序列和其它疫苗中的一种或多种。
6. 根据权利要求 1 的疫苗，其中还含有用于包含 HA1 编码序列的载体。
7. 根据权利要求 6 的疫苗，其中所述载体是真核表达载体。
8. 根据权利要求 7 的疫苗，其中所述载体选自 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 和 pVAX1。
9. 根据权利要求 1 的疫苗，其中还含有佐剂。
10. 根据权利要求 9 的疫苗，其中佐剂选自完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂苷、矿物凝胶、表面活性物质、Pluronic 多元醇、聚阴离子、肽、油或烃乳液、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚。
11. 根据权利要求 9 的疫苗，其中佐剂是 METASTIM®。
12. 根据权利要求 1 的疫苗，其中还含有包囊有 HA1 编码序列的脂质体。
13. 诱导抗马流感病毒免疫应答的方法，包括向马给予有效免疫量的权利要求 1 的疫苗。
14. 根据权利要求 13 的方法，还包括将 HA1 编码序列插入载体中并经鼻递送疫苗到呼吸道的步骤。
15. 根据权利要求 14 的方法，其中载体是真核载体。
16. 根据权利要求 15 的方法，其中载体选自 pcDNA3.1/V5-His-

TOP0 和 pVAX1。

17. 根据权利要求 15 的方法，其中载体是脂质体。

18. 根据权利要求 13 的方法，其中给予疫苗的剂量为至少 0.01 μg DNA/g 体重。

19. 根据权利要求 13 的方法，其中给予疫苗的剂量范围为 0.001 μg DNA/kg 体重至 0.01 μg DNA/g 体重。

表达马-2型流感病毒 HA1 的 DNA 疫苗

发明背景

技术领域

本发明涉及马流感病毒的疫苗，更具体的，涉及含马 2 型流感病毒的 HA1 编码序列的 DNA 疫苗，所述疫苗可以鼻内给予比典型剂量更低的剂量，而仍引起良好粘膜免疫。

背景：

马流感病毒 (EIV) 是马上呼吸道感染的首要致病剂。它已经被认为是几个世纪来马呼吸道疾病流行性爆发的原因。该病毒传播迅速且发病率极高。感染马出现典型“流感”症状：快速发作呼吸窘迫、咳嗽、发热和粘液流出。在罕见情况下，由于继发性细菌性支气管肺炎导致死亡。尽管死亡率低，马流感病毒感染的影响是显著的。估计在 1992 年香港爆发中暂停赛马导致 1 亿 2 千万美元的收入损失。其它马术运动的经济重要性可能较低，但马流感爆发几次中断国际马术赛事。没有临床体征但经历勤奋训练的感染马可能要忍受长期后果如肺功能降低。临床疾病的马要忍受丧失培训时间的明显缺点。

马流感病毒是甲型流感病毒，正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae*) 的成员。病毒基因组由八段负链 RNA 组成。病毒衣壳包裹在脂质包膜内，包膜上锚定两个表面病毒糖蛋白：血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)。HA 被认为是 EIV 最具有抗原性的病毒蛋白。HA 分子量约 77kD。该病毒蛋白合成为 HA0，并经蛋白酶作用切割，随后还原单个二硫键成氨基末端 HA1 部分 (50kD) 和羧基末端 HA2 部分 (27kD)。HA2 部分锚定于膜的脂双层上，而 HA1 部分通过非共价键结合到 HA2 上。血凝素参与结合病毒到宿主细胞膜上的受体，导致随后病毒穿透和脱壳，从而启动病毒复制。疫苗接种的主要目的是诱导针对这种病毒编码分子的免疫。

有两种马流感病毒亚型。1 型或马-1 型流感病毒 (H7N7)，最近 15 年已经没有在发达国家中分离到。然而，马-2 型流感病毒 (H3N8) 连续在世界流行，尽管有大量疫苗接种计划。H3N8 病毒的成功可能是由于抗原性漂移：通过氨基酸替换连续变化 HA 的抗原性 [1]。最近

分离的马-2型流感病毒可分类成“美洲”谱系或“欧亚”谱系。另外，更近的马-2型流感病毒已经分叉成多个谱系[2]，并且至少在北美，两个进化谱系隔年流行[3]。

当前的EIV疫苗一般由福尔马林或 β -丙内酯灭活的完整病毒组成。抗原性组分由马流感病毒1型和2型组成。A/Eq/Prague/56是唯一的1型疫苗株，而2型组分是原型A/Eq/Miami/63和更晚的毒株如A/Eq/Kentucky/81或A/Eq/Fontainebleau/79。最近的WHO/OIE控制马流感协商会议肯定了较早的推荐方案，其中疫苗应包括“美洲”病毒(A/Eq/Kentucky/94)和“欧亚”病毒(A/Eq/Newmarket/2/93)，并且应该中断原型(A/Eq/Miami/63)[4]。

在最近的前瞻性研究中，Morley等人[5]已经表明当前的商业疫苗不防止病毒感染，而仅有少量的抑制临床症状的作用。当前商业疫苗的保护性缺乏是由于一个或多个以下因素的组合：

- 缺乏免疫原性；
- 疫苗株选择差；和/或
- 引起不适当的免疫。

马-2型流感病毒(H3N8)的连续进化要求定期更新疫苗株以诱发保护性免疫。然而，在不同疫苗制造商中间有广泛的疫苗株选择谱。

由于氨基酸替换(抗原性漂移)的一个结果即HA抗原性的改变由早期EIV产生的免疫将不能预防后期分离株。病毒的这种特性是“fail-proof”有效疫苗的主要障碍。已经推荐通过用更近的病毒株替换和以更频繁的间隔来更新疫苗[6]。一些制造商仍在其产品中保留过时的病毒株。尽管特异性针对马流感病毒的抗体仍可被诱导，然而这些疫苗是有问题的。首先，血清抗体水平不是好的保护指标。其次，因为流行病毒株与疫苗株足够不同，它们有最小的交叉活性。由这种过时疫苗诱发的“部分”免疫使受感染宿主成为无症状携带者，也就是说，宿主被感染，但因为部分免疫而使临床症状被抑制。这些受感染宿主不被识别，这有助于病毒的扩散。

流感病毒通过附着于呼吸道的纤毛上皮细胞而启动感染。因此，粘膜抗体提供对病毒的有效防御。实际上，认识到鼻抗体在预防马流感病毒中的重要性已经有很多年。在小鼠模型中，已经表明转移IgA提供抗流感病毒感染的保护[7]。

尽管当前的疫苗诱导血清抗体，却没有目标粘膜免疫。由于缺乏针对抗原和抗体的标准化测量方法，血清抗体水平和疫苗功效的相关性不清楚 [8]。

几种策略，包括使用免疫刺激复合物 (ISCOM) [9]、以及通过直接接种到粘膜区 [10]，已经用于加强对当前马流感疫苗的粘膜免疫应答。然而，结果显示使用这些策略只有很有限的改善。

基于重组冷适应 (温度敏感突变体) 和减毒马流感病毒，近来批准的 Heska Corp. (Fort Collins, Colorado) 的疫苗是诱发粘膜免疫的一个尝试。所述疫苗通过鼻内接种以诱发粘膜免疫。直接鼻内接种冷适应的减毒病毒到粘膜位点提供对粘膜相关淋巴组织 (MALT) 的强烈刺激。因此这种疫苗是高度免疫原性的并诱发粘膜免疫。然而，因为该疫苗基于通过再分配而得的重组病毒，更新疫苗要求再次工程化冷适应的减毒病毒。在更新疫苗被许可之前不得不进行所有必需的安全和效能测试。

DNA 疫苗或遗传免疫领域是快速出现的技术。这是一个偶然发现，当含蛋白质编码序列的 DNA 质粒肌肉注射给小鼠时，不仅表达抗原，而且针对该抗原的免疫应答也被诱发 [11, 12]。已经相信细胞以和体外 DNA 转染相似的方式体内摄入 DNA 质粒。所述 DNA 质粒不在宿主细胞内复制但编码的抗原被宿主细胞转录并翻译。所述抗原也表达在细胞表面或分泌，并诱发免疫应答 [13]。这种新免疫方法已经被很多研究人员显示为有效，并且可用于宽范围的感染性物质，通常包括流感病毒 [14]，并特异性针对马流感病毒 [15]。已经表明表达 A/Eq/Kentucky/81 的 HA 基因的 DNA 疫苗在通过皮肤和粘膜给予后保护马免受同源病毒侵袭 [15]。

在专利领域，抗 EIV 的疫苗和方法在以下美国专利中描述：6,482,414； 6,436,408； 6,398,774； 6,177,082； 6,045,790； 4,920,213； 4,693,893； 4,689,224； 4,683,137； 4,631,191； 和 4,619,827，所有这些都在此引作参考。美国专利 4,920,213 和 4,631,191 涉及免疫马抵抗马流感病毒的重组疫苗。编码来自两株的 HA 和 HN 糖蛋白的 DNA 序列被用于构建牛痘携带的疫苗，设计合成肽用于激发和加强给药，并允许重组合成 HA 和 / 或 NA 蛋白基的疫苗。

通过解决当前疫苗的以上缺陷，马流感病毒的理想疫苗应该具有高度免疫原性，诱发粘膜免疫，并可易于“更新”。

发明内容

本发明基于以下发现，当鼻内给予时含马-2型流感病毒 HA 糖蛋白的 HA1 片段编码序列的 DNA 疫苗可提供保护性免疫。表达 HA1 的 DNA 疫苗被包囊在脂质体载体中并接种到 Balb/c 小鼠的鼻腔。两次加强免疫后，用亚致死剂量的传染性同源病毒侵袭小鼠。对于非免疫对照组，观察到 7.9% 最大体重丧失。对于 DNA 疫苗免疫组和阳性对照组（用灭活的同源病毒免疫），观察到的体重丧失分别是 1.8% 和 1.6%。此外，病毒特异性 IgG 和 IgA 抗体被诱发。HA 前体被切割成 HA1 和 HA2。HA1 是免疫原性病毒糖蛋白，因为免疫原性位点位于所述病毒蛋白的此部分。上述这些结果表明，单独表达 HA1 足以诱发保护性免疫。进而，已经发现与表达全长 HA 基因的 DNA 疫苗相比，提供保护作用要求剂量低得多的 HA1 DNA 疫苗。

本发明的 DNA 疫苗具有超过当前灭活疫苗或减毒活疫苗的其它优点，其中如更新疫苗只要求通过在新病毒中插入 HA1 编码序列而替换抗原。还有，所述疫苗可以鼻内接种以靶向粘膜免疫。所述疫苗也能被工程化以优化所表达抗原的免疫原性。

本发现超过现有技术的另一个主要优点在于对于通过基因枪、肌肉内或皮内注射递送 DNA 疫苗，有将所导入 DNA 整合到宿主细胞染色体上的风险。不利结果的突变或产生癌症是潜在的风险。对于脂质体包囊后的鼻内接种，DNA 疫苗被直接递送到呼吸道的上皮细胞。因为上皮细胞以高速替换，整合入染色体的风险显著减小。从而如下述，单独使用 HA1（带工程化终止密码子）降低需要的剂量，进一步降低整合风险以及降低诱发抗 DNA 抗体的风险。

因此，在本发明的一个实施方案中提供 DNA 疫苗组合物，其中含有编码马-2型流感病毒 HA1 或其表位的序列的 DNA，其中所述疫苗进一步含有药理学可接受的载体或稀释剂。编码 HA1 的序列可以选自马-2型流感病毒的已知毒株，并在一个实施方案中优选来自毒株 A/Equ/Kentucky/98。在一个具体实施例中，编码 HA1 的序列含有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列。

在本发明另一个实施方案中，DNA 疫苗与佐剂组合以增强免疫应答

和/或接种后促进恰当的吸收速率。

在本发明的另一个实施方案中，提供在马中诱导免疫应答以预防马流感病毒感染或降低其严重程度的方法，所述方法包单独或与佐剂或其它抗原性成分或编码序列组合给予有危险的动物有效免疫量的本发明疫苗，以提供控制马流感病毒感染的方法，其中疫苗还含有药理学可接受的载体或稀释剂。

优选的，所述 DNA 疫苗包括载体，更优选的，所述 DNA 疫苗包囊在脂质体中并鼻内递送入处理对象的呼吸道以诱发良好的粘膜免疫。

从以下详细描述中，本领域的技术人员明显可以理解本发明和其目标及优点，其中简单通过举例说明欲实施本发明的最佳方式的方式，仅描述本发明的优选实施方案。可以意识到，本发明可以在多种显而易见的方面修改，而全部都不偏离本发明的范围和精神。因此，所述描述本质上应该被当作举例说明而非限制性的。

附图说明

图 1 是本发明 DNA 疫苗的实施方案实例的示意图。A/Eq/Kentucky/98 的 HA1 基因插入以下真核表达载体中：pcDNA3.1/V5-His-TOPO 或 pVAX1，它们都可以从 Invitrogen (Carlsbad, California) 获得。在构建的表达马-2 型流感病毒 (A/Eq/Kentucky/98 作为例子) HA1 的载体中，pTOPO/KY98-6 使用载体提供的终止密码子，而 pTOPO/KY98-11 和 pVAX/KY98-11 的终止密码子由反向引物在 PCR 过程中提供。插入：A/Eq/Kentucky/98 的 HA1 的氨基酸序列 (GenBank Accession No. AF197241)。信号肽在第一行显示。框中的序列：抗原性位点 A (132-146)；位点 B (187-199)；位点 C (51-55, 273-278)；和位点 D (171-174, 209-217, 241-246)。V5: V5 表位；His6: 6 组氨酸标记；BGHpA: 牛生长激素多腺苷酸信号。

图 2 表示所述体重丧失研究的试验结果。受感染小鼠体重丧失百分率对病毒侵袭后天数作图。灭活 KY98: 阳性对照组；PBS 和 pGFP: 阴性对照组。pTOPO/KY98-6 和 pTOPO/KY98-11: DNA 疫苗免疫组。PBS 对照组和 pTOPO/KY98-6 与 pTOPO/KY98-11 免疫组之间 Student's t 检验的 P 值分别是 0.001 和 0.006。

图 3A 表示所述血清病毒特异性 IgG 的 ELISA 试验结果。第 21 和

35 天给予加强免疫。第二次加强免疫后 15 天即第 50 天、和感染后 15 天给予病毒侵袭，以*表示。

图 3B 是所述另一个血清病毒特异性 IgA 的 ELISA 试验结果。第 21 和 35 天给予加强免疫。第二次加强免疫后 15 天即第 50 天、和感染后 15 天给予病毒侵袭，以*表示。

发明详述

详细解释本发明之前，明白以下内容很重要，即本发明不限制其应用到此处描述的步骤和举例说明的构建细节。本发明可以有其它实施方案并可以多种方式实现或实施。还应该明白，此处所用的词组和术语的目的仅是描述而非限制。

本发明提供设计用于预防 EIV 的新 DNA 疫苗和方法。本发明涉及 DNA 介导的疫苗接种并优选涉及通过直接导入编码选自任何当前株的 HA1 或其表位的分离 DNA 的载体，然后在接种的马细胞中表达。本发明疫苗可单独给予或与其它抗原性成分或编码序列组合或与其它疫苗组合一起给予，这些对本领域技术人员是已知的。

优选的，分离 HA1 编码序列选自以下毒株：A/Eq/Kentucky/98, A/Eq/Miami/63, A/Eq/Kentucky/81, A/Eq/Fontainebleau/79, A/Eq/Saskatoon/90, A/Eq/Kentucky/92, A/Eq/Kentucky/94 和 A/Eq/Newmarket/2/93, A/Eq/New York/99, A/Eq/Oklahoma/00, 和更优选的选自毒株 A/Eq/Kentucky/98。最优选的，HA1 编码序列含有来自 Kentucky/98 的 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列。但如此处意思表示，本发明包括其它株的 HA1 编码序列及其类似物、片段、突变体、替换、合成产物或变体，它们可有效编码 HA1、其表位和 / 或模拟物。（例如，见以下参考文献 [2]、表 1 和 3，引入此处作为参考，参见其中多种病毒株的列表及其对应 GenBank 编号，从中可以获得 HA1 基因的核苷酸序列）。作为结果，本发明包括在适当转化细胞中编码和 / 或表达的蛋白，所述蛋白可以是全长抗原、抗原片段、这种抗原的抗原衍生物或这种抗原、抗原片段或抗原衍生物与另一种蛋白的融合产物。本发明也包括具有分离重组毒株的 DNA 疫苗，所述毒株具有当前毒株的免疫原特性，其中包括此处描述的毒株。

如此处定义“分离”DNA 是与天然伴随天然序列的其它细胞成分基本分离的 DNA。该术语包括已经从其天然存在环境中去除的核酸序列，

还包括重组或克隆的 DNA 分离物和化学合成的类似物或生物合成的类似物。

术语“载体”一般表示任何 DNA 疫苗载体，它们中的很多在本领域已知，它们自身是“惰性的”（不诱发对自身的免疫），容易导入接受对象（以诱发对插入物的免疫），并且不整合到宿主染色体中。请参考美国专利 6,468,984 和 6,339,068，所述专利在此引入作为参考，其中描述本领域已知的多种载体和递送系统。优选载体是 pVAX1 和 pcDNA3.1/V5-His-TOPO，它们是由 Invitrogen, Carlsbad, California 商业供应的真核表达载体。

本发明疫苗可以包括与 HA1 编码序列可操作连接并调节其表达的核酸序列。当表达调控序列控制和调节一段核酸序列的转录及适当的翻译时，表达调控序列可操作连接到这段核酸序列上。因此表达调控序列可包括适当的启动子、增强子、转录终止子、蛋白编码基因前面的起始密码子（即 ATG）、内含子剪接信号、维持该基因正确的读码框以允许正确翻译 mRNA、和终止密码子。

本发明疫苗还含有药理学可接受的载体或稀释剂。所述疫苗的合适载体对本领域技术人员是公知的，并包括但不限于蛋白质、糖等。这些载体可以是水或非水溶液、悬液和乳液。非水性载体的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水性溶液、乳液或悬液，包括盐水和缓冲介质。肠道外载体包括氯化钠溶液、Ringer's 右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化 Ringer's 液或不挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂如基于 Ringer's 右旋糖的那些等。也可以有防腐剂和其添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。优选的防腐剂包括福尔马林、硫柳汞、新霉素、多粘菌素 B 和两性霉素 B。

术语“佐剂”表示接种后增强免疫应答和/或促进适当吸收速率的化合物或混合物，并且如此处所用，包括任何促进摄入的物质。可接受的佐剂包括但不限于完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂苷、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、Pluronic 多元醇、聚阴离子、肽、油或烃乳液、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和其它。优选佐剂是 Fort Dodge Animal Health 的 METASTIM®佐剂。

所述方法包括向动物给予有效免疫剂量的本发明疫苗。对于本发

明目的,“有效免疫剂量”的本发明疫苗是至少 0.001 μ g DNA/kg 体重,优选范围在 0.001 μ g DNA/kg 体重到 0.01 μ g DNA/g 体重。在包囊于如上述的脂质体/佐剂中后,优选经鼻内给予疫苗,以诱发预期的粘膜免疫,但如果需要另外也可通过任何本领域公知的方法给药,例如,经肌内、皮下、腹膜内、静脉内、口腔、皮内或眼。

本发明进一步用以下实施例举例说明,这是为了帮助理解本发明,但不应该认为和不应该解释为是以任何方式限制随后权利要求书所陈述的本发明。

实施例 材料和方法

病毒和病毒扩增

马-2 型流感病毒 A/Eq/Kentucky/98 是肯塔基大学的 Thomas Chambers 博士的慷慨礼物。如前述方法进行病毒扩增和表征 [2]。简单的说,在 9 到 11 日龄的具有胚的鸡卵中 37 $^{\circ}$ C 下培养病毒 72 小时。如 Mahr 等人 [16] 所述收获尿囊液。1000 g 离心 15 min 澄清后,用鸡红细胞通过凝血测试来测量病毒滴度。

DNA 疫苗构建

为合成克隆用 DNA 模板,通过逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 制备 HA1 开放读码框。提取病毒 RNA,并用 uni-12 引物 (5' AGCAAAAGCAGG3') (SEQ. ID NO: 2) 和 MMLV 逆转录酶 (Stratagene, La Jolla, California) 合成 cDNA。使用引物 EH3-29+ (5' CATGAAGACAACCATTATTTT3') (SEQ. ID NO: 3) 和 EH3-1061- (5' TCTGATTTGCTTTTCTGGTA3') (SEQ. ID NO: 4) 或 EH3-29+ 和 EH3-1061STOP (5' TCATCTGATTTGCTTTTCTGGTA3') (SEQ. ID NO: 5) 经 PCR 合成模板。在 95 $^{\circ}$ C 1 min, 45 $^{\circ}$ C 2 min, 和 72 $^{\circ}$ C 3 min, 并使用 Taq DNA 聚合酶 (Stratagene, La Jolla, California) 进行 25 轮 PCR。根据制造商说明,将 PCR 产物连接到 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 真核载体中。鉴定两个克隆并用于随后的试验中: pTOPO/KY98-6 和 pTOPO/KY98-11 (带有在反向引物中建立的终止密码子)。经 PCR 和使用来自感染马的恢复期血清的 Western 印迹杂交确认 HA1 表达。用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 消化 pTOPO/KY98-11 以切出 HA1 插入片段,随后连接该插入片段到 pVAX1 的 BamHI 和 XhoI 位点之间,创建

pVAX/KY89-11, 从而构建另一个克隆。

DNA 免疫和病毒侵袭

在大肠杆菌中扩增质粒 DNA 并用 MaxiProp 试剂盒 (Qiagen, Valencia, California) 提取和纯化。用分光光度分析并用限制性内切酶消化随之琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 制备物的浓度和纯度。对于 DNA 疫苗接种, 将 DNA 制备物在 Dulbecco's 改进的 Eagle's 培养基 (DMEM) (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana) 中稀释到 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。接种前将悬液与等体积 Lipofectamine (Roche) 溶液 (以 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DMEM) 室温混合 20 分钟。

4 到 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) 分成四组。对于鼻内接种, 用异氟烷 (forane, 1-氯-2, 2, 2-三氟乙基二氟甲醚) 麻醉每只小鼠。用微量移液管, 将 25.0 μl DNA 悬液 (剂量 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重) 滴注进鼻腔。两组小鼠接受 DNA 疫苗, 一组用 pTOP0/KY98-6, 另一组用 pTOP0/KY98-11。包括两个阴性对照组, 一组接种磷酸盐缓冲液 (PBS) 而另一组接种表达绿色荧光蛋白的不相关质粒 DNA 载体 (pGFP/Green Lantern, Gibco, BRL)。还有一组接种 8.0 HA 单位 (等价于 1.6×10^7 卵感染剂量 50% [EID₅₀], 或 1×10^6 噬斑形成单位 [pfu]) / 小鼠的剂量的紫外线灭活的 A/Eq/Kentucky/98 作为阳性对照组。以相同剂量, 在第 21 天和 35 天给予两次加强接种。在第 50 天给予病毒侵袭 (第二次加强后 15 天)。每只小鼠鼻内接种 16 HA 单位 (等价于 3.2×10^7 卵感染剂量 EID₅₀, 或 2×10^6 pfu) 同源病毒 (A/Eq/Kentucky/98), 每 10 天测量每只小鼠体重。

另外, 为调查 DNA 疫苗接种是否诱发特异性抗体, 通过在第 0、21、35、50 和 65 天眶后取血 (麻醉后) 收集血清。这些时间点分别对应“取血前”、第一次和第二次加强免疫、病毒侵袭和侵袭后 15 天。

测定病毒特异性 IgG 和 IgA

使用蔗糖梯度纯化的同源马流感病毒 A/Eq/Kentucky/98 悬液制备 ELISA 板。病毒在 50 mM NaHCO₃ 缓冲液中稀释到 0.6 HA 单位/ml, ELISA 板的每孔中加入 100 μl 该病毒悬液。板子在室温放置 24 小时使抗原“包被”到板上。用 PBS 洗涤 ELISA 板三次然后加入封闭缓冲液 [PBS 中含 2.0% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 1.0% 脱脂奶], 并在室

温温育 1 小时。再用 PBS 洗涤后加入 100 μ l 稀释小鼠血清 (1:10 稀释于含 2.0% BSA 的 PBS) 并如上温育。室温温育 1 小时并用 PBS 洗涤后, 加入 100 μ l 稀释 (1:2000 稀释于含 2.0% BSA 的 PBS) 偶联碱性磷酸酶的兔抗鼠 IgG 或 IgA 抗血清 (Sigma, St. Louis, Mo.)。室温温育 1 小时并用 PBS 再次洗涤板子后, 加入 100 μ l “底物” [1.0 mg/ml 4-硝基苯基磷酸酯溶液 (pNPP), Sigma]。室温温育 2.5 小时后用微板阅读仪 (Biotek Instruments, Winooski, Vermont) 测量 405 nm 吸光度。所有血清样品重复测量三次。从免疫血清的吸光度值中扣除“取血前”血清的平均吸光度, 所得结果表达为 405 nm 光密度的增量 (Δ OD405)。

结果

验证 DNA 疫苗

构建并鉴定三种 DNA 疫苗载体。用 PCR 和限制性消化表征这些载体。PCR 和限制性分析显示, 如图 1 所示, 正确大小的插入片段 (约 1.0kb) 和正确定向到 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 和 pVAX1 载体的 CMV 启动子。EH3-1061STOP 引物中的终止密码子引起 HA1 基因插入片段在 pTOPO/KY98-11 载体中编码 V5 表位和 His6 标记的序列之前终止。pVAX/KY98-11 使用 HA1 内“加入”的终止密码子。而对于载体 pTOPO/KY98-6, 插入片段终止依赖于载体中的终止密码子, 因而产物羧基端连接到 V5 和 His6 标记上。使用恢复期马血清的 Western 印迹杂交证明转染入 MDBK 细胞中后, 两种载体都产生约 50kD 的蛋白, 这与 HA1 的正确表达一致 (数据未给出)。

DNA 免疫和病毒侵袭:

因为小鼠没发展出明显的流感病浓度感染特征性呼吸系统症状, 使用体重丧失模型评价 DNA 疫苗的功效。病毒侵袭后体重丧失和随后的恢复被用作比较症状严重程度, 以及 DNA 疫苗提供的保护水平的标准。病毒侵袭后每日称重每只小鼠, 结果表示为与病毒侵袭前相比的体重变化百分率。每组的平均体重丧失加平均值标准误 (SEM) 对感染后天数做图并表示于图 2。

值得注意的是, 疫苗接种小鼠 (用两种 DNA 疫苗载体或用紫外灭活的病毒) 表现很少或没有临床症状如食欲减退、“茸毛状皮毛”外表 (作为发热的指标) 和病毒侵袭后不活跃。对于用 PBS 免疫的阴性

对照组，它们显示严重感染的体征并在第 1 天开始体重丧失，病毒侵袭后 8 天最大失重 7.9%。体重丧失持续 10 天以上。第 2 个阴性对照组 (pGFP) 也在前 3 天显示显著体重丧失 (4.6% 体重)，然后开始恢复。比较而言，免疫组没有显示显著体重丧失。

对体重变化进行成对 Student's t 检验以确定是否具有任何统计学显著性。pTOPO/KY98-6 与 pTOPO/KY98-11 免疫组与 PBS 对照组相比的 P 值分别是 0.001 和 0.006。这与阳性对照组 (用紫外灭活的病毒免疫) 和 PBS 组之间的 P 值 0.0001 可比。因此，对于两种 DNA 疫苗载体，都诱发与灭活病毒诱发的免疫相似的保护性免疫。

滴定病毒特异性 IgG 和 IgA:

ELISA 结果表示于图 3A 和 3B。如上所述，推出对照血清的 OD_{405nm}，结果表示为 OD₄₀₅ 增加值加上三个重复孔的标准误。在第 21 和 35 天给予加强免疫，并在第 50 天用活病毒侵袭小鼠。在病毒侵袭 15 天后也测验血清。

对于用紫外灭活的病毒免疫的小鼠 (阳性对照组)，病毒特异性 IgG 早在第 21 天即检测到并伴随 OD 增加 0.49 (图 3A)。然而 IgA 仅仅能检测到并伴随 OD 增加 0.09 (图 3B)。在第 35 天，第一次加强后两周，IgG 水平增加超过 3 倍。有趣的是，第二次加强接种后不是进一步增加，第 50 天 IgG 水平实际上低于第 35 天。然而，正如预期，活病毒侵袭后 IgG 水平从 OD1.2 增加到约 OD1.7。对于 IgA，观察到相似的模式。然而水平显著更低。

对于 DNA 疫苗免疫组，都可以检测到病毒特异性 IgG 和 IgA 应答且其模式与紫外灭活病毒诱发的相似。第一次加强接种后，IgG 和 IgA 增加 1.5 到 2 倍 (对于 pTOPO/KY98-6 接种组，分别从 0.31 增加到 0.55 和从 0.17 增加到 0.36)。与之相似，第二次加强免疫不进一步增加 IgG 和 IgA 水平。然后在病毒侵袭后 IgG 增加超过 3 倍。IgA 也有增加，尽管小于 2 倍。

有趣的是，对于用非特异性载体 pGFP 接种的阴性对照组，病毒侵袭前“检测”到病毒特异性 IgG 或 IgA。然而增加小于 0.20D 可能是非特异性结果。病毒侵袭后，IgG 和 IgA 都可检测到，这正如初次感染中预期 (图 3A 和图 3B)。相似的，对于 PBS 免疫组，病毒侵袭后 15 天 IgG 和 IgA 的 OD 分别是 1.68 ± 0.12 和 0.35 ± 0.03 (数据未示出)。

讨论

更少 DNA 的保护

流感病毒已经被用作研究 DNA 疫苗的模式生物。早在 1993 年, 已经显示 HA 表达质粒能提供对流感的预防作用 [17][18][19][13]。然而, 这些调查使用由全长 HA 基因组成的 DNA 构建体。HA 是受体结合和膜融合的病毒糖蛋白, 而 HA2 分子的主体是整合膜蛋白。血凝素被合成作为 HA0 前体, 随后蛋白酶切割成 HA1 和 HA2。HA1 包含主要保护性抗原性位点, 同时它与 HA2 非共价连接, HA2 则锚定入病毒包膜中 [20]。我们在此报道, 单独表达 HA1 足以诱发保护性免疫。省略 HA2 可避免酶促加工的需要, 因为切割前体 HA0 成 HA1 和 HA2 需要组织特异性蛋白酶。进而, 缺乏 HA2 时, 合成 HA1 不结合到膜上, 因而允许释放更多 HA1 分子并被抗原呈递细胞摄入以诱发更强的免疫应答。因此, 该 DNA 疫苗的免疫原性显著增强。此外, 免疫接种需要更少量的该 DNA 疫苗。低到 0.01 μg DNA / g 体重即可诱发保护性免疫, 这比 Wong 等人报道的结果少 10 倍 [21], 并比用基因枪接种少 2 倍 [17]。应该注意, 如果 Fynan 等人报道的相同剂量应用于平均大小 400 kg 的马, 所需 DNA 量将是 4.0 mg/接种。

另外, 通过包囊 DNA 疫苗、用更少 DNA 免疫接种和通过在粘膜位点接种, DNA 整合到体细胞或生殖细胞中的潜在风险显著降低。

IgA 的作用

流感病毒在呼吸道启动感染。如许多以前的研究已经表明, 粘膜免疫在预防流感病毒或其它呼吸道感染中很重要 [22, 23]。分泌型 IgA 在粘膜免疫中具有显著作用。已经表明 IgA 负责预防流感病毒感染 [24]。另外, 被动转移流感特异性 IgA 保护接受的小鼠免受流感病毒感染 [7]。Lunn 等人已经在小马中调查马流感病毒的 DNA 疫苗 [15]。用基因枪将 DNA 疫苗递送到几个粘膜位点, 包括舌、结膜、和第三眼睑。在每种情况下, 都刺激产生强 IgG 应答。然而, 诱发的 IgA 应答很差。

结果表明通过将 DNA 疫苗包囊在脂质体中并递送所述 DNA 疫苗入呼吸道, 诱发更好的粘膜免疫。呼吸道 (一种粘膜位点) 中保护可能由 IgA 介导, 因为血清病毒特异性 IgA 有相应增加。

加强和非特异性免疫

结果提示第二次加强可能不必要，因为这不导致病毒特异性 IgG 或 IgA 滴度的增加。可能第一次加强疫苗接种后滴度可保持几周，使得第二次加强不再必要。另外，病毒特异性抗体的存在进一步中和第二次加强疫苗接种导入的抗原。

有趣的是，对于两个 DNA 疫苗接种组在病毒侵袭后 IgG 水平增加超过 3 倍（图 3A 对于 pTOPOKY98-6 和 pTOPOKY98-11）。比较而言，增加小于紫外灭活病毒的 1 倍。这种观察可比得上其他人以前的报道，其中 DNA 疫苗诱发良好的激发应答。所述 DNA 疫苗的这种“回忆”应答可能是由于灭活抗原诱发的动力学和抗原呈递途径差异。另外，对于 DNA 疫苗诱导的免疫应答，难以测定可用抗原的真实量，这种由 DNA 疫苗增强的“激发作用”的机制有待阐明。

有趣的是，对于用 pGFP 免疫的小鼠（用作阴性对照），重量丧失的峰值在第 3 天，并在第 4 天开始恢复，显著早于其它阴性对照组（PBS）。对 PBS 组的成对 Student's t 检验得到 0.033 的 P 值。然而，这些小鼠与 PBS 对照组有相似的临床特征。另外，对于病毒侵袭后前 3 天，体重丧失与 PBS 组相似。如果真实保护的标准是完全没有临床症状，尽管 P 值显著，这些小鼠没有被“保护”。这种“更早恢复”不是由于特异性免疫，因为病毒侵袭前没有检测到病毒特异性抗体（吸光度值接近背景水平）。众所周知 DNA 疫苗载体中的某些基序诱发非特异性免疫。在粘膜位点导入脂质体也可能诱导非特异性免疫。

其它数据

为在马中建立粘膜免疫的操作程序，用本发明 DNA 疫苗鼻内接种几匹马，并在几周后收集的鼻冲洗物显示病毒特异性抗体的阳性信号。

参考文献

以下出版物引入此处作为参考：

1. Daly JM, Lai AC, Binns MM, Chambers TM, Barrandeguy M, Mumford JA: Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J Gen Virol* 1996, 77 (Pt 4):661-671.

2. Lai AC, Chambers TM, Holland RE, Jr., Morley PS, Haines DM, Townsend HG, Barrandeguy M: Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch Virol* 2001, 146:1063-1074.
3. Lai AC, Rogers KM, Glaser A, Tudor L, Chambers T: Alternate circulation of recent equine-2 influenza viruses (H3N8) from two distinct lineages in the United States. *Virus Res* 2004, 100:159-164.
4. Mumford J, Wood J: WHO/OIE meeting: consultation on newly emerging strains of equine influenza. 18-19 May 1992, Animal Health Trust, Newmarket, Suffolk, UK. *Vaccine* 1993, 11:1172-1175.
5. Morley PS, Townsend HG, Bogdan JR, Haines DM: Efficacy of a commercial vaccine for preventing disease caused by influenza virus infection in horses [see comments]. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 215:61-66.
6. Mumford JA: The equine influenza surveillance program. *Adv Vet Med* 1999, 41:379-387.
7. Renegar KB, Small PA, Jr.: Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol* 1991, 146:1972-1978.
8. Mumford JA, Wood J: Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev Biol Stand* 1992, 79:137-146.
9. Mumford JA, Jessett D, Dunleavy U, Wood J, Hannant D, Sundquist B, Cook RF: Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine* 1994, 12:857-863.
10. Kuno-Sakai H, Kimura M, Ohta K, Shimojima R, Oh Y, Fukumi H: Developments in mucosal influenza virus vaccines. *Vaccine* 1994, 12:1303-1310.
11. Tang DC, DeVit M, Johnston SA: Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992, 356:152-154.
12. Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA: Immunization with DNA. *J Immunol Methods* 1994, 176:145-152.

13. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG: Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993, 11:957-960.
14. Webster RG, Fynan EF, Santoro JC, Robinson H: Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 1994, 12:1495-1498.
15. Lunn DP, Soboll G, Schram BR, Quass J, McGregor MW, Drape RJ, Macklin MD, McCabe DE, Swain WF, Olsen CW: Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine* 1999, 17:2245-2258.
16. Mahy B, Kangro, HO: *Virological Methods Manual*: Academy Press, Harcourt Brace & Company, Publishers; 1996.
17. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL: DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:11478-11482.
18. Fynan EF, Robinson HL, Webster RG: Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol* 1993, 12:785-789.
19. Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martinez D, Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA: Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 1993, 12:777-783.
20. Skehel JJ, Wiley DC: Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 2000, 69:531-569.
21. Wong JP, Zabielski MA, Schmaltz FL, Brownlee GG, Bussey LA, Marshall K, Borralho T, Nagata LP: DNA vaccination against respiratory influenza virus infection. *Vaccine* 2001, 19:2461-2467.
22. Ada GL, Jones PD: The immune response to influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986, 128:1-54.

23. Freihorst J, Ogra PL: Mucosal immunity and viral infections. *Ann Med* 2001, 33:172-177.
24. Liew FY, Russell SM, Appleyard G, Brand CM, Beale J: Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. *Eur J Immunol* 1984, 14:350-356.

根据以上所述，可以看到达到本发明的几个目标并获得其它有利结果。因为不偏离本发明的范围可以作多种变化，可以明白以上说明书中包含的或表示于附图中的所有材料将解释为举例说明而不是限制性的。尽管本发明已经某种具体程度的描述，可以明白本发明不限于此处所述的仅为举例说明的实施方案，而仅受限于附属权利要求的范围，其中包括与其中每个元件等价的全部范围。

<110> Lai, Alexander

<120> 表达马-2型流感病毒HA1的DNA疫苗

<130> 57657/04-265

<150> US 60/470,843

<151> 2003-05-15

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1061

<212> DNA

<213> A/Eq/Kentucky/98

<400> 1

```

agcaaaagca ggggatattt ctgtcaatca tgaagacaac cattatatttg atactactga      60
cccattgggt ctacagtcaa aacccaacca gtggaacaa cacagccaca ttatgtctgg      120
gacaccatgc agtagcaaat ggaacattgg taaaaacaat aactgatgac caaattgagg      180
tgacaaatgc tactgaatta gttcagagca tttcaatagg gaaaatatgc aacaactcat      240
ataaagttct agatggaaga aattgcacat taatagatgc aatgctagga gacccccact      300
gtgatgtctt ccagtatgag aatigggacc tcttcataga aagaagcagc gctttcagca      360
attgctaccc atatgacatc cctgactatg catcgtctcg gtccattgta gcatcctcag      420
gaacattaga attcacagca gagggattca catggacagg tgtcactcaa aacggaagaa      480
gtggagcctg caaaagggga tcagccgata gtttctttag ccgactgaat tggctaacaa      540
aatctgaaa ctcctacccc acattgaatg tgacaatgcc taacaataaa aatttcgaca      600
aactatacat ctgggggatt catcacccga gctcaaacca acagcagaca gaattgtaca      660
tccaagaatc aggacgagta acagtctcaa caaaaagaag tcaacaacg atagtcacct      720
atatcggatc tagaccgtgg gttaggggtc aatcaggcag gataagcata tactggacca      780
ttgtaaaacc tggagatatt ctaatgataa acagtaatgg caacttagtt gcaccgctgg      840
gatattttaa attgaaaaca gggaaaagct ctgtaatgag atcagatgca cccatagaca      900
tttgtgtgtc tgaatgtatt acaccaaag gaagcatccc caacgacaaa ccatttcaaa      960
atgtgaacaa agttacatat ggaaaatgcc ccaagtatat caggcaaac actttaaagc     1020
tggccactgg gatgaggaat ataccagaaa agcaaatcag a                               1061

```

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工的

<220>
 <223> 寡核苷酸引物
 <400> 2
 agcaaaagca gg 12

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 寡核苷酸引物
 <400> 3
 catgaagaca accattattt t 21

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 寡核苷酸引物
 <400> 4
 tctgatttgc ttttctggta 20

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 寡核苷酸引物
 <400> 5
 tcacttgatt tgcttttctg gta 23

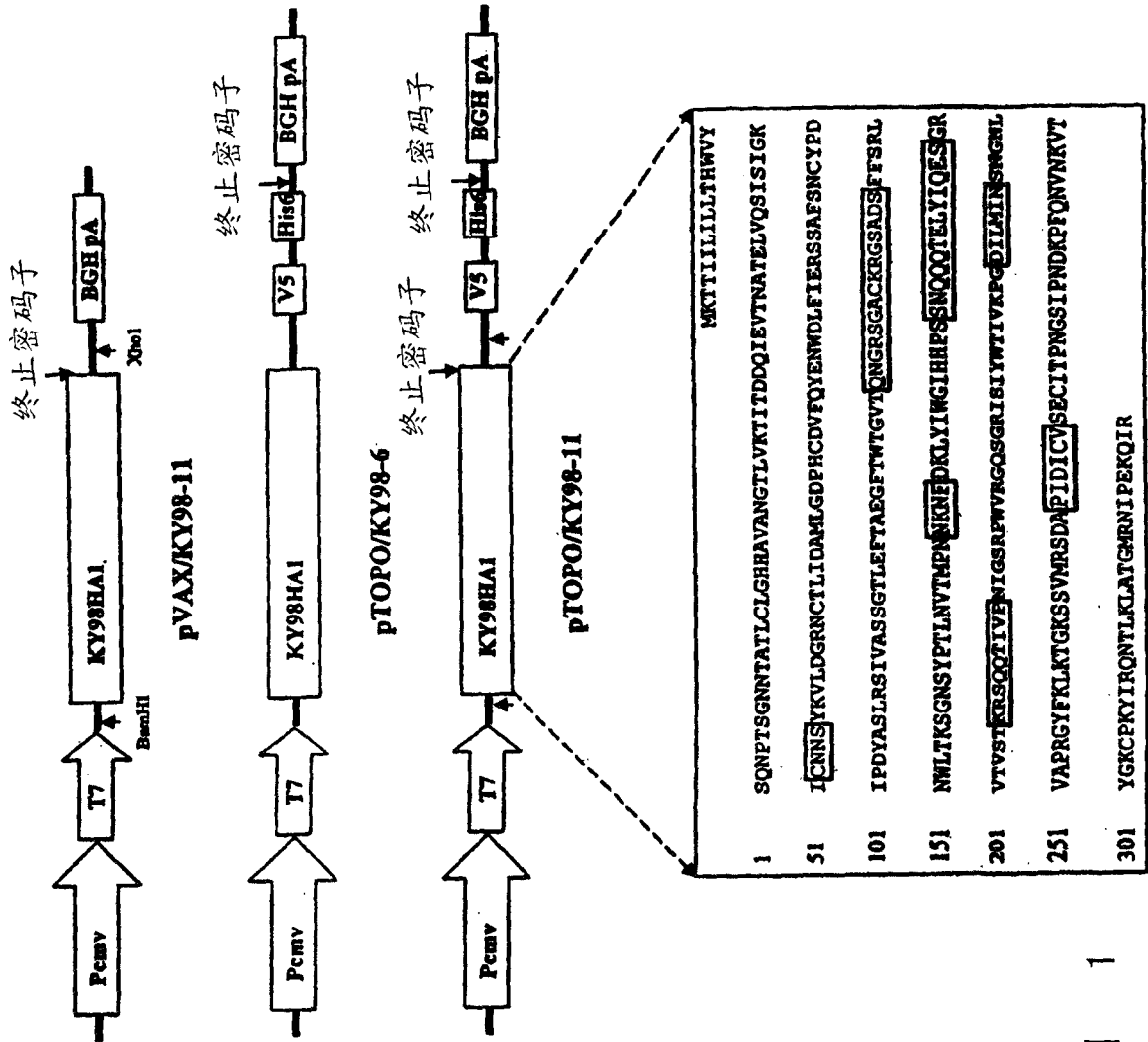


图 1

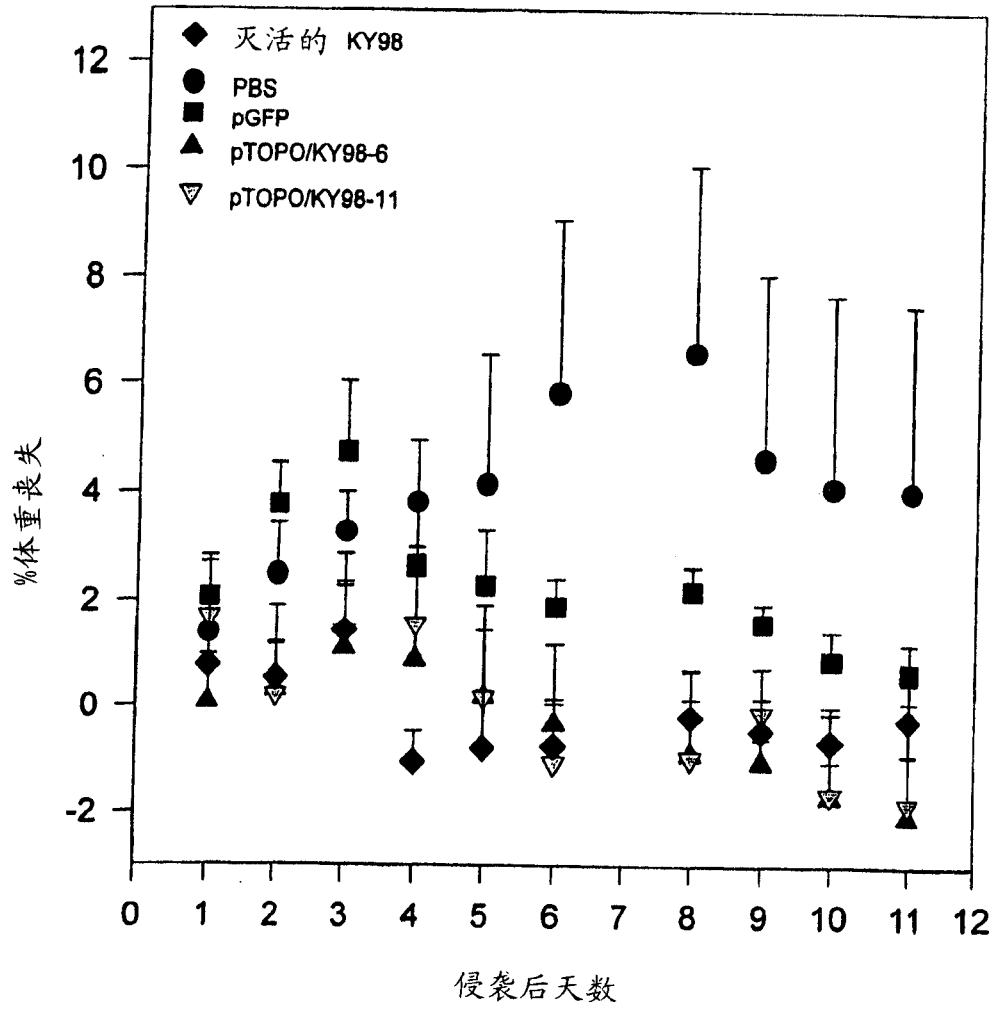


图 2

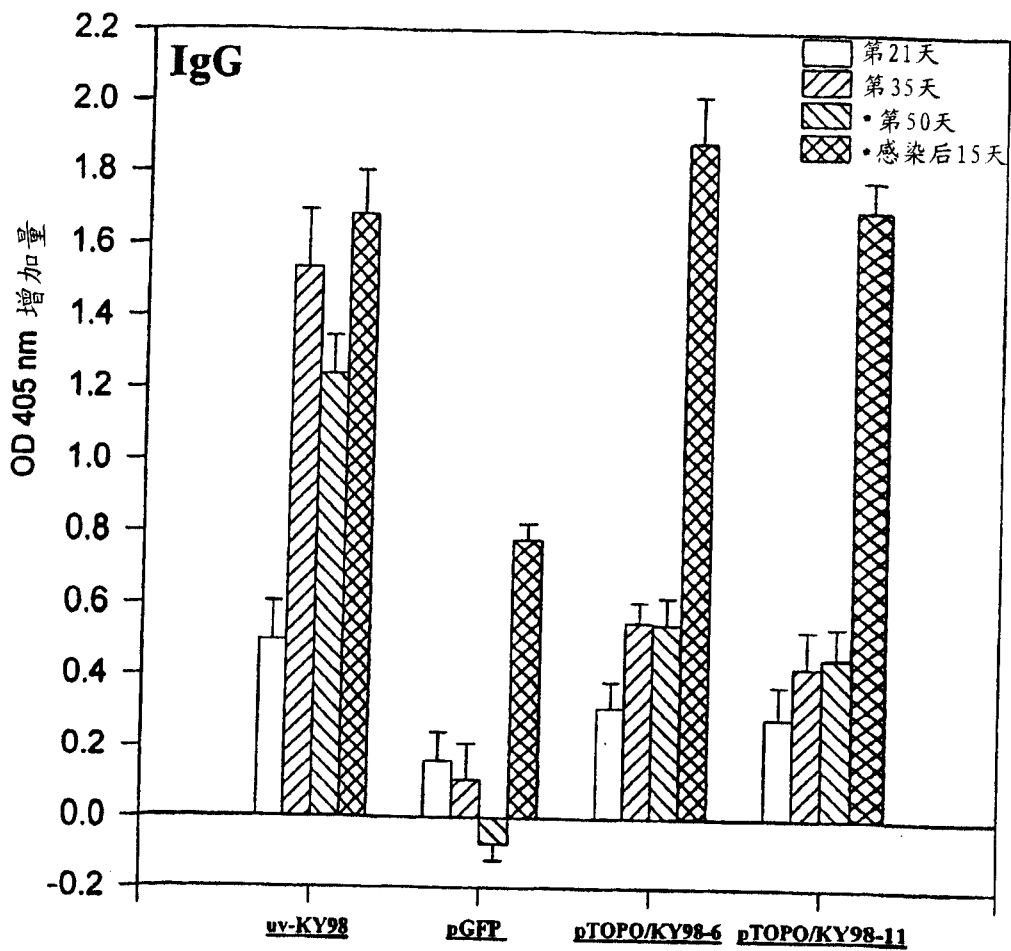


图 3A

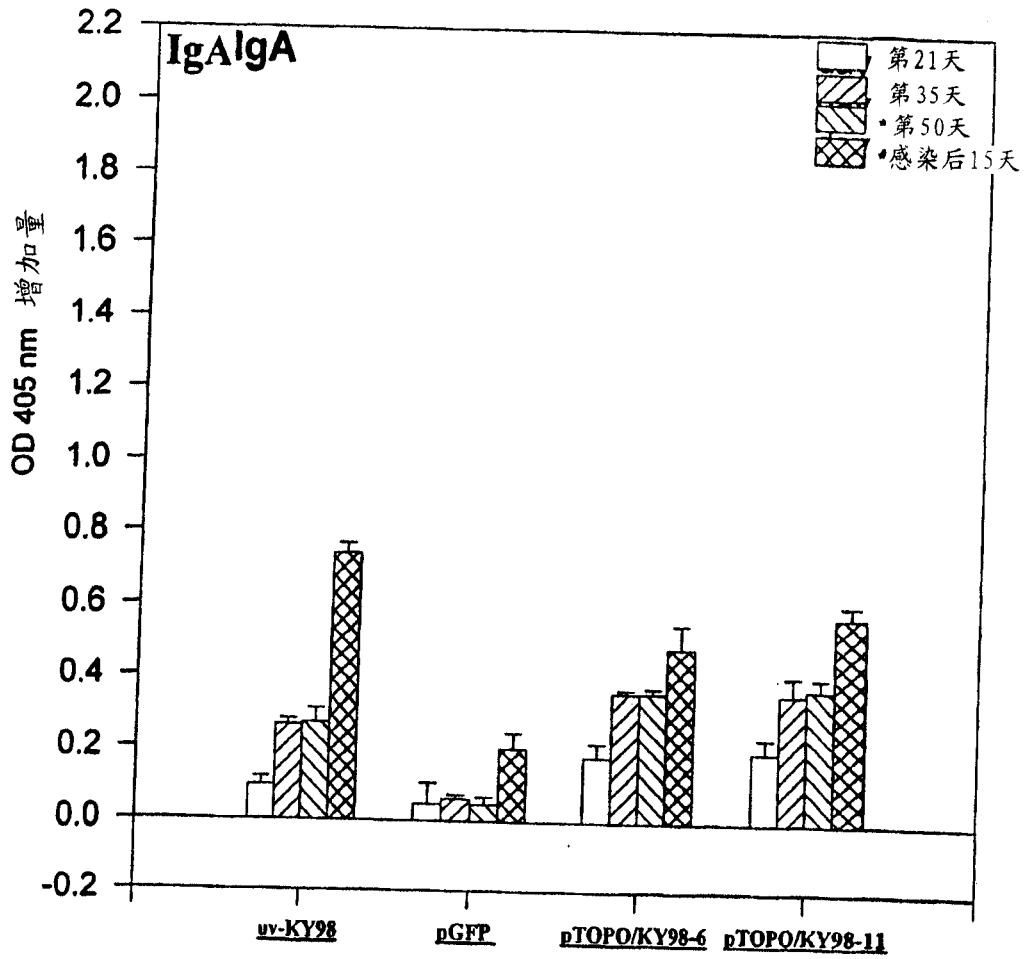


图 3B