



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119060144 B

(45) 授权公告日 2025.03.18

(21) 申请号 202411534080.9

(22) 申请日 2024.10.31

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 119060144 A

(43) 申请公布日 2024.12.03

(73) 专利权人 南京澄实生物医药科技有限公司  
地址 210000 江苏省南京市江北新区探秘路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

(72) 发明人 韩梯云 徐实 李静 许梦微

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245  
专利代理师 陆惠中

(51) Int. Cl.

C07K 14/13 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/45 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/175 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 119060144 A, 2024.12.03

Liu 等. A Bacterium-like Particle Vaccine Displaying Envelope Proteins of Canine Distemper Virus Can Induce Immune Responses in Mice and Dogs. *viruses*. 2024, 第16卷第2页倒数第1段.

NCBI. hemagglutinin protein [canine distemper virus]. GenBank Database. 2009, Accession NO. ABX84060.1.

Dong 等. Nanoparticles of conformation-stabilized canine distemper virus hemagglutinin are highly immunogenic and induce robust immunity. *Virology Journal*. 2021, 第18卷 (第1期), 第2页右栏第3段, 第3页 Fig. 1.

Schotsaert 等. Long-Lasting Cross-Protection Against Influenza A by Neuraminidase and M2e-based immunization strategies. *SCIENTIFIC REPORTS*. 2016, 第6卷第3页 Figure 1, 第18页第3段.

审查员 郝攀

权利要求书1页 说明书14页  
序列表(电子公布) 附图9页

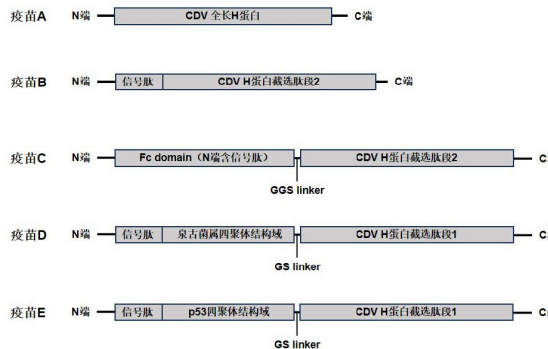
(54) 发明名称

一种预防犬瘟热病毒感染的融合蛋白和疫苗及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种可预防犬瘟热病毒感染的截选肽段、融合蛋白、免疫原性组合物、疫苗、编码其的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、制备方法以及制药用途等。本发明从开发CDV核酸疫苗的角度出发,对CDV H蛋白做出适当截选,并且筛选出合适的四聚体功能元件连接在H蛋白胞外结构域的N端。本发明优选的四聚体元件和截选的CDV H蛋白序列组成的融合蛋白具有良好的免疫原性,能够诱导高水平体液免疫反应,同时还能诱导细胞免疫,并提供针对不同CDV毒株的交叉免疫保护,具有广泛的应用前景。

CN 119060144 B



1. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白从N端到C端,由信号肽、泉古菌属四聚体结构域、GS linker、CDV H蛋白截选肽段1组成,其中,GS linker的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述泉古菌属四聚体结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述CDV H蛋白截选肽段1的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

2. 一种重组核酸分子,其特征在于,编码权利要求1所述的融合蛋白。

3. 一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求2所述的重组核酸分子。

4. 一种重组载体,其特征在于,包含权利要求2所述的重组核酸分子、或权利要求3所述的重组基因表达盒。

5. 一种重组宿主细胞,其特征在于,包含权利要求2所述的重组核酸分子、或权利要求3所述的重组基因表达盒、或权利要求4所述的重组载体。

6. 一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含权利要求1所述的融合蛋白,和/或一种或多种权利要求2所述的重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述的重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述的重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述的重组宿主细胞。

7. 一种重组疫苗,其特征在于,包含权利要求1所述的融合蛋白,和/或一种或多种权利要求2所述的重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述的重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述的重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述的重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求6所述的免疫原性组合物或药物组合物。

8. 根据权利要求7所述的重组疫苗,其特征在于,所述疫苗为核酸疫苗。

9. 一种或多种权利要求1所述的融合蛋白的制备方法,其特征在于,采用权利要求5所述的重组宿主细胞表达权利要求1所述的融合蛋白,并分离权利要求1所述的融合蛋白。

10. 权利要求1所述的融合蛋白,和/或一种或多种权利要求2所述的重组核酸分子,和/或一种或多种权利要求3所述的重组基因表达盒,和/或一种或多种权利要求4所述的重组载体,和/或一种或多种权利要求5所述的重组宿主细胞,和/或一种或多种权利要求6所述的免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种权利要求7或8所述的重组疫苗在制备预防犬瘟热病毒引起的疾病的药物中的用途。

11. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于,所述疾病为犬瘟热疾病。

## 一种预防犬瘟热病毒感染的融合蛋白和疫苗及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,特别是免疫药物技术领域,具体涉及一种预防犬瘟热病毒感染的融合蛋白和疫苗及其应用等。

### 背景技术

[0002] 犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus, CDV)是一种属于副粘病毒科、麻疹病毒属的单股负链RNA病毒,是全球范围内威胁犬科动物健康的主要病原体之一。CDV不仅感染犬类,还可感染其他食肉目动物,如狐狸、狼、浣熊等,甚至对某些灵长类动物也具有感染性。犬瘟热是由CDV引起的一种急性、高度接触性传染病,以发热、呼吸道症状、消化道症状和神经系统症状为主要特征。

[0003] 犬瘟热病毒感染不仅直接危害动物健康,还常与其他病原体如细菌、真菌等形成继发感染,加重疾病程度。近年来,随着宠物数量的增加和野生动物栖息地的破坏,CDV感染在全球范围内呈上升趋势,已成为威胁动物福利和生态平衡的重要问题之一。

[0004] 安全有效的疫苗被认为是预防和控制CDV感染的最佳措施。CDV的主要抗原蛋白包括血凝素蛋白(hemagglutinin protein,H蛋白)、融合蛋白(Fusion glycoprotein,F蛋白)、核蛋白(Nucleoprotein,N蛋白)等。其中,H蛋白是病毒表面的主要糖蛋白,负责病毒与宿主细胞的吸附,是诱导产生中和抗体的主要抗原。CDV的H蛋白结构较为特殊,N端位于病毒内侧,C端位于病毒外侧,类似于真核细胞的II类跨膜蛋白。

[0005] 目前市场上主要的CDV疫苗类型为减毒活疫苗。虽然减毒活疫苗通过多次传代使病毒毒力减弱,但仍有毒力返强的风险,并且目前市售的减毒活疫苗保护效果不佳。为了克服现有疫苗的局限性,研究人员正在积极开发新型CDV疫苗。例如,现有技术专利CN109867713B(授权公告日2022-07-26)公开了一种犬瘟热病毒H蛋白的亚单位疫苗,专利CN108704128B(授权公告日2022-06-21)介绍了一种犬瘟热细小病毒二联亚单位疫苗。这些亚单位疫苗均采用全长H蛋白,利用昆虫细胞-杆状病毒系统进行体外表达、纯化。这种方式存在交叉免疫保护差、成本高、产量低的问题,无法顺利推广。

[0006] 因此,目前仍然迫切需要一种新的犬瘟热疫苗,解决当前疫苗开发中存在的问题。相较于传统疫苗开发,核酸疫苗(nucleic acid vaccine)是更好的选择。目前已有大量研究证明,核酸疫苗具有多项优势:(1)不携带毒力病毒颗粒,也不存在毒力返祖现象,安全性更高;(2)可以在细胞内完成抗原蛋白表达,从而诱发机体对该蛋白的体液免疫和细胞免疫,能够增强免疫效果,延长有效保护的持续时间,无需多次重复加强免疫;(3)可以还原抗原的空间构象,提供更多、更准确的空间表位,增加免疫原性;(4)接种后,抗原蛋白在细胞内表达,能够直接与组织相容性复合物MHC I或II类分子结合,不受母源抗原干扰。

[0007] 因此,本领域亟需一种提供更优的构象表位、具备交叉免疫保护效果、降低生产成本的CDV疫苗,以使得疫苗更容易在全球范围内推广使用。

## 发明内容

[0008] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种新的犬瘟热病毒疫苗分子架构设计和应用,具体提供一种可预防犬瘟热病毒感染的截选肽段、融合蛋白、免疫原性组合物、疫苗、编码其的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、制备方法以及制药用途等。本发明从开发CDV核酸疫苗的角度出发,对CDV H蛋白做出适当截选,并且筛选出合适的四聚体功能元件连接在H蛋白胞外结构域的N端,用以促使其在表达过程中自组装为四聚体形式,还原天然四聚体构象。本发明截选的CDV H蛋白肽段,能够和不同的元件组合,设计而成的核酸疫苗均能在真核细胞中顺利表达,且具有免疫原性。此外,本发明优选的四聚体元件和截选的CDV H蛋白序列组成的融合蛋白具有良好的免疫原性,能够诱导高水平体液免疫反应,同时还能诱导细胞免疫,并提供针对不同CDV毒株的交叉免疫保护。

[0009] 本发明的一方面提供一种犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus, CDV)血凝素蛋白(Hemagglutinin glycoprotein, H蛋白)的截选肽段。

[0010] 进一步地,所述的截选肽段的氨基酸序列如SEQ ID NO.5或SEQ ID NO.9所示。

[0011] 本发明的另一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,包含所述的截选肽段。

[0012] 进一步地,所述融合蛋白从N端到C端,包含如下元件:

[0013] (a) 四聚体结构域;优选地,所述四聚体结构域是来源于泉古菌属(*Staphylothermus*)的四聚体结构域;更优选地,所述泉古菌属(*Staphylothermus*)的四聚体结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;和

[0014] (b) 所述的截选肽段。

[0015] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白的N端含有信号肽;优选地,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0016] 进一步地,其特征在于,所述融合蛋白的N端含有Fc domain;优选地,所述Fc domain的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示。

[0017] 进一步地,其特征在于,所述元件之间可选地通过linker序列连接,优选地,linker序列为GS linker或GGS linker;优选地,所述GS linker的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示,所述GGS linker的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0018] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,编码本发明所述截选肽段和/或融合蛋白。

[0019] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含所述重组核酸分子。

[0020] 本发明的另一方面提供一种重组载体,其特征在于,包含所述重组核酸分子、或所述重组基因表达盒。

[0021] 本发明的另一方面提供一种重组宿主细胞,其特征在于,包含所述重组核酸分子、或所述重组基因表达盒、或所述重组载体。

[0022] 本发明的另一方面提供一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含一种或多种任一项所述截选肽段和/或融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种所述重组基因表达盒,和/或一种或多种所述重组载体,和/或一种或多种所述重组宿主细胞;优选地,所述免疫原性组合物或药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0023] 本发明的另一方面提供一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种任一项所述

截选肽段和/或融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种所述重组基因表达盒,和/或一种或多种所述重组载体,和/或一种或多种所述重组宿主细胞,和/或一种或多种所述免疫原性组合物或药物组合物;优选地,所述疫苗为核酸疫苗。

[0024] 本发明的另一方面提供一种或多种所述截选肽段和/或融合蛋白的制备方法,其特征在于,采用所述的重组宿主细胞表达所述截选肽段和/或融合蛋白,并分离所述截选肽段和/或融合蛋白。

[0025] 本发明的另一方面提供一种或多种所述截选肽段和/或融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种所述重组基因表达盒,和/或一种或多种所述重组载体,和/或一种或多种所述重组宿主细胞,和/或一种或多种所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种所述重组疫苗在制备预防犬瘟热病毒引起的疾病的药物中的用途;优选地,所述疾病为犬瘟热疾病。

[0026] 本发明的另一方面提供一种疾病的预防方法,其特征在于,给予受试者预防有效量的一种或多种所述截选肽段和/或融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种所述重组基因表达盒,和/或一种或多种所述重组载体,和/或一种或多种所述重组宿主细胞,和/或一种或多种所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种所述重组疫苗;优选地,所述疾病为犬瘟热病毒引起的疾病。

[0027] 本发明的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗等具有如下有益技术效果:

[0028] 1. 本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供免疫保护效果,可同时作为核酸疫苗或亚单位疫苗的通用抗原架构。本发明的免疫原性组合物,具有良好的免疫原性,可针对犬瘟热病毒感染提供有效的免疫保护,相较于传统活疫苗,安全性高,制备成本低,有利于市场推广。

[0029] 2. 本发明发现基于CDV全长H蛋白设计的核酸疫苗无法在真核细胞中表达,难以激活动物的体液免疫;而基于本发明的CDV截短肽段能够与不同的元件组合形成新的融合分子,在真核细胞中顺利表达并分泌,并能够有效激活动物的体液免疫。且截短CDV H蛋白截选肽段1为最优选择。

[0030] 3. 本发明从开发CDV核酸疫苗的角度出发,筛选多种功能性元件连接在CDV H蛋白截选肽段的N端,最终选取出还原H蛋白天然四聚体构象的四聚体功能元件,在组成融合蛋白后不仅能够顺利表达,并且具有强免疫原性。本发明从多种不同的四聚体结构域中进行筛选,选出分泌效率最高的泉古菌属四聚体结构域,其与CDV H蛋白截选肽段融合后更有利于抗原呈递和体液免疫的激活。

[0031] 4. 本发明实施例4表明,基于本发明的融合分子能够有效促进CDV的H蛋白在真核细胞中顺利表达、分泌,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递,从而进一步提高免疫保护效果,为麻疹类病毒的通用疫苗设计领域提供新技术。

[0032] 5. 本发明实施例5表明,在豚鼠模型中,基于本发明的疫苗D免疫后能够诱导4/5个体产生中和抗体,且3/5个体产生的中和抗体具有针对CDV1和CDV3的交叉免疫保护效果,即针对不同CDV毒株可提供交叉免疫保护。本发明的重组核酸疫苗B、C能够在豚鼠模型中诱导针对CDV1毒株的有效免疫保护。

[0033] 6. 本发明实施例6表明,在黑貉(犬科)模型中,本发明的融合蛋白具有良好的免疫原性,基于本发明的核酸疫苗能够为靶动物黑貉提供有效的免疫保护,针对犬瘟热病毒

感染有良好的预防效果。虽然基于本发明的核酸疫苗D在实施例5中两次免疫后,只在4/5只黑貉中检测到高水平的中和抗体,但是在实施例6攻毒实验显示5只黑貉均成功存活。推测疫苗D不仅诱导体液免疫,同时还能诱导细胞免疫,在CDV强毒攻击时能获得完全保护。

### 附图说明

[0034] 图1为本发明设计思路及融合蛋白构象示意图。

[0035] 图2为本发明融合蛋白分子结构示意图。

[0036] 图3为实施例中所用疫苗的分子结构示意图。

[0037] 图4为包含本发明的疫苗模板环状质粒示意图。

[0038] 图5A-图5E为实施例中所用疫苗的质量控制峰图以及纯度检测结果;其中图5A为疫苗A质量控制峰图以及纯度检测结果,图5B为疫苗B质量控制峰图以及纯度检测结果,图5C为疫苗C质量控制峰图以及纯度检测结果,图5D为疫苗D质量控制峰图以及纯度检测结果,图5E为疫苗E质量控制峰图以及纯度检测结果。

[0039] 图6A-图6D为实施例中所用疫苗在体外转染HEK293T细胞后的表达效果的WB (Western blot) 检测结果;其中图6A为疫苗A在体外转染HEK293T细胞后的表达效果的WB (Western blot) 检测结果,图6B为疫苗B在体外转染HEK293T细胞后的表达效果的WB (Western blot) 检测结果,图6C为疫苗C在体外转染HEK293T细胞后的表达效果的WB (Western blot) 检测结果,图6D为疫苗D、疫苗E在体外转染HEK293T细胞后的表达效果的WB (Western blot) 检测结果。

[0040] 图7A-图7C为本发明疫苗在豚鼠模型中的免疫及取样流程,以及两次免疫后豚鼠血清中的中和抗体效价;其中图7A为本发明疫苗在豚鼠模型中的免疫及取样流程,图7B为两次免疫后豚鼠血清中的中和抗体效价(测定毒株:CDV1,NJ(12)3株),图7C为两次免疫后豚鼠血清中的中和抗体效价(测定毒株:CDV3,CL株)。

[0041] 图8A-图8C为本发明疫苗在黑貉(犬科)模型中的免疫及取样流程,以及两次免疫后黑貉血清中的中和抗体效价和攻毒保护效果(存活率);其中图8A为本发明疫苗在黑貉(犬科)模型中的免疫及取样流程,图8B为两次免疫后黑貉血清中的中和抗体效价,图8C为两次免疫后攻毒保护效果(存活率)。

### 具体实施方式

[0042] 术语和定义

[0043] 术语“犬瘟热病毒”指Canine Distemper Virus,英文缩写为CDV,在分类上属副黏病毒科(Paramyxoviridae)、麻疹病毒属(Morbillivirus),是一种单链RNA病毒。CDV可感染犬科、鼬科、臭鼬科、鬣狗科、猫熊科、浣熊科、鳍足亚目、一些灵猫科和家猫之外的猫科动物,引发犬瘟热。

[0044] 术语“犬瘟热”指Canine distemper,其由犬瘟热病毒引起的疾病,又称犬瘟、狗瘟。

[0045] 术语“H蛋白”指血凝素蛋白Hemagglutinin glycoprotein,具体是指犬瘟热病毒的血凝素蛋白Hemagglutinin glycoprotein,使病毒附着在细胞受体上,从而引发感染。H蛋白与细胞受体结合诱导构象变化,使F蛋白触发病毒粒子/细胞膜融合。

[0046] 术语“四聚体结构域”指蛋白质中能够促进四个亚基或单体聚合成四聚体的特定结构区域。这种结构域通常由 $\alpha$ -螺旋或 $\beta$ -折叠等二级结构元件组成,它们通过分子间相互作用(如疏水作用、氢键、静电相互作用等)来稳定四聚体的形成。具体四聚体结构域来源于人血管舒张剂刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)的四聚体结构域(tetrameric domain),氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示;或来源于酵母转录因子General Control Nonderepressible 4蛋白四聚体结构域的pII突变体(GCN4-pII tetrameric domain),氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;或来源于泉古菌属(Staphylothermus)的四聚体结构域,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;或来源于p53四聚体结构域,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。优选地,本发明的四聚体结构域来源于泉古菌属(Staphylothermus)的四聚体结构域。

[0047] 术语“免疫应答”指有机体中的体液应答、细胞应答或体液和细胞应答两者。免疫应答可以通过测定进行测量,所述测定包括但不限于测量特异性识别蛋白质或细胞表面蛋白的抗体的存在或量的测定、测量T细胞活化或增殖的测定和/或测量一种或更多种细胞因子活性调节或表达调节的测定。

[0048] 术语“给药”或“接种”指基于本发明核酸疫苗或疫苗组合物优选地经肌内的或皮下的途径给予,尽管其他的给药途径也能被使用,例如,口服、鼻内(例如气雾剂或其他非针剂给药)、淋巴结内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药,或通过联用的途径。在动物的颈部肌内的给药是优选的。可采用加速方案(boosting regimens)将给药方案调节为提供最佳免疫。

[0049] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0050] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多核苷酸可包括在合适的载体中,且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0051] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括,例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合,例如启动子和增强子;(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列;以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建、可以使用任何载体,包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列,例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体,来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。包括自复制型载体和非自复制型载体。

[0052] 术语“mRNA”,指信使RNA、Messenger RNA,中文译名“信使核糖核酸”,是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

[0053] 术语“5' -UTR”,指“5' 非翻译区”或“5' UTR”,为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物,包含内含子和外显子,由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此,mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中,

5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0054] 术语“3' -UTR”,指“3' -非翻译区”或“3' UTR”,涉及位于基因的3' 端,在蛋白质编码区的终止密码子下游,并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域,或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复,可以折叠产生茎环结构,所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如,RNA结合蛋白)相互作用。

[0055] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生基于本发明的重组疫苗的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞。

[0056] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,猪、牛、羊、猫、狗和马等),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),以及啮齿类动物(例如,兔、小鼠和大鼠等)。

[0057] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思,即将外源性的DNA、RNA导入宿主的过程。

[0058] 术语“药物组合”或“药物组合物”是指包含在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物,还在于提供一种方法,以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以是具有惰性的填充剂,也可以是为药用组合提供某种功能(例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解)的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂(或填充剂)、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0059] 术语“预防”是指在罹患疾病之前,通过使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比减轻罹患疾病后的症状,并不意味着必需完全抑制患病。

[0060] 除非另外定义或由背景清楚指示,否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0061] 本发明公开了一种新的CDV疫苗的制备方法及应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,都被视为包括在本发明以内。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和/或应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0062] 本发明提供的融合蛋白和编码核酸及其元件,制备方法及应用中,所用原料及试剂均可由市售获得。

[0063] 下面结合实施例,进一步阐明本发明。其中,作为一种优选,选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗。

[0064] 实施例1 本发明重组核酸疫苗的构建

[0065] 为了制备包含本发明抗原的重组核酸疫苗,并对比基于本发明的疫苗是否具有良好的体外表达效果,实施例中涉及的疫苗分子架构如图2、图3所示。示例性的,图2为本发明融合蛋白分子结构示意图,从N端到C端依次包含如下元件:信号肽、四聚体结构域、CDV H蛋白截选肽段,各元件可直接相连,也可通过不同的linker相连,比如GS linker。图3为实施例中对比实验所用疫苗A、疫苗B、疫苗C、疫苗D、疫苗E的分子结构示意图,用于对比实验。为了制备能够产生如图3所示蛋白的重组核酸疫苗,首先构建一个基因表达盒,用于表达实施例所述的抗原序列。表达盒从5'端到3'端依次包含:5' UTR、CDS区、3' UTR、PolyA,其中,CDS区包含本发明的融合分子架构。随后,基于密码子简并性对完整的基因表达盒序列做优化,通过基因合成的方式直接获得DNA序列(委托金斯瑞公司合成)。最后,将合成的基因表达盒DNA序列插入至可用于体外RNA转录的表达载体环状质粒中,环状质粒如图4所示,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒。

[0066] 根据上述方法,制备用于后续实施例的载体:

[0067] (1) 重组核酸疫苗A制备载体

[0068] 步骤a:合成“CDV 全长H蛋白”基因片段,氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

[0069] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0070] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0071] 步骤c:制备重组质粒。

[0072] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到重组核酸疫苗A制备载体。

[0073] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体

[0074] 步骤a:合成“信号肽- CDV H蛋白截选肽段2”融合基因片段,信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,所述CDV H蛋白截选肽段2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

[0075] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0076] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0077] 步骤c:制备重组质粒。

[0078] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体。

[0079] (3) 基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体

[0080] 步骤a:合成“Fc domain(N端含信号肽)- CDVH蛋白截选肽段2”融合基因片段,二者之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示的GGs linker序列连接,Fc domain(N端含信号肽)的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示,CDV H蛋白截选肽段2的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

[0081] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0082] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0083] 步骤c:制备重组质粒。

[0084] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体。

[0085] (4) 基于本发明的重组核酸疫苗D制备载体

[0086] 步骤a:合成“信号肽-泉古菌属四聚体结构域- CDV H蛋白截选肽段1”融合基因片段,四聚体结构域1、CDV H蛋白截选肽段1之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示的GS linker序列连接,信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,泉古菌属四聚体结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,CDV H蛋白截选肽段1的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0087] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0088] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0089] 步骤c:制备重组质粒。

[0090] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗D制备载体。

[0091] (5) 基于本发明的重组核酸疫苗E制备载体

[0092] 步骤a:合成“信号肽-p53四聚体结构域- CDV H蛋白截选肽段1”融合基因片段,四聚体结构域2、CDV H蛋白截选肽段1之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示的GS linker序列连接,信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,p53四聚体结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,CDV H蛋白截选肽段1的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0093] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0094] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0095] 步骤c:制备重组质粒。

[0096] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗E制备载体。

[0097] 表1本发明所涉及的蛋白氨基酸序列

	氨基酸序列以及序列编号
信号肽	MYKMQLLSCIALTLVLVANS (SEQ ID NO: 1)
p53四聚体结构域	EYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAG (SEQ ID NO: 2)
GCN4-pII四聚体结构域	RMKQIEDKLEEILSKLYHIENELARIKKLLGER (SEQ ID NO: 3)
泉古菌属四聚体结构域	IINETADDIVYRLTVIIDDRYESLKNLITLRAD RLEMIINDNVSTILA (SEQ ID NO: 4)

CDV H蛋白截选肽段1	RFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDV LTPLFKIIGDEIGLRLPQKLNEIKQFILQKTNF FNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTV GVKKSIIASAANPIILSALSGARGDIFPPYRCSG ATTSVGRVFPPLSVLSMSLISRTSEIINMLTAI SDGVYGKTYLLVPDYIEGEFDSQKIRVFEIGFI KRWLNDMPLLQTTNYMVLPEKSKAKVCTIAVGE LTLASLCVDESTVLLYHDSNGSQDGILVVTLGI FGATPMDQVEEVIPIAHPSVERIHITNHRGFIK DSIVTWMVPLVSEKQEEQKNCLESACHRKSYP MCNQTSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQL NISFTYGPVILNGDGMYYESPLDSGWLTIIP KNGTVLGLINKASRGDQFTVTPHVLTFAPRESS GNCYLPIQTSQIMDKDVLTESNLVVLPTQNFRI VIATYDISRGDHAIVYYVYDPIRTISYTYPFRL TTKGRPDFLRIECFVWDDDLWCHQFYRFEANIT NSTTSVENLVRIRFSCNRSKP (SEQ ID NO: 5)
GS linker	GSGSGS (SEQ ID NO: 6)
GGS linker	GGSGGGSGS (SEQ ID NO: 7)
CDV全长H蛋白	MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGG RPPYLLFVLLILLIGILALLAITGVRFHQVSTS NMEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKII GDEIGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFD FRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTVGVKKSIIA SANPIILSALSGARGDIFPPYRCSGATTSVGRV FPLSVLSMSLISRTSEIINMLTAISDGVYGKT YLLVPDYIEGEFDSQKIRVFEIGFIKRWLNDM LLQTTNYMVLPEKSKAKVCTIAVGETLASLCV DESTVLLYHDSNGSQDGILVVTLGIFGATPMDQ VEEVIPIAHPSVERIHITNHRGFIKDSIVTWMV PVLVSEKQEEQKNCLESACHRKSYPMCNQTSW EPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGP VILNGDGMYYESPLDSGWLTIIPKNGTVLGL INKASRGDQFTVTPHVLTFAPRESSGNCYLPIQ TSQIMDKDVLTESNLVVLPTQNFRIVIATYDIS RGDHAIVYYVYDPIRTISYTYPFRLTTKGRPDF LRIECFVWDDDLWCHQFYRFEANITNSTTSVEN LVRIRFSCNRSKP (SEQ ID NO: 8)

<p>CDV H蛋白截选肽段2</p>	<p>PPSKIKVNFTNYCDTVGVKKSIAAANPIILSA LSGARGDIFPPYRCSGATTSVGRVFPLSVLSM SLISRTSEIINMLTAISDGVYGKTYLLVPDYIE GEFDSQKIRVFEIGFIKRWLNDMPLLQTTNYMV LPETSKAKVCTIAVGELTLASLCVDESTVLLYH DSNGSQDGLVVTLGIFGATPMDQVEEVIPIAH PSVERIHITNHRGFIKDSIVTWMVPVLVSEKQE EQKNCLESACHRKSYPMCNQTSWEPFGGGQLPS YGRLLPLDPSIDLQLNISFTYGPVILNGDGM YYESPLLD SGWLTIPPKN GTVLGLINKASRGDQ FTVTPHVLTFAPRESSGNCYLP IQTSQIMDKDV L TESNLVVLPTQNFYVIATYDISRGDHAIVYY VYDPIRTISYTPFRLTTKGRPDFLRIECFVWD DDLWCHQFYRFEANITNSTTSVENLVRIRFSCN RSKP (SEQ ID NO: 9)</p>
<p>Fc domain</p>	<p>MESVFCWVFLVVLKGVQGFNECRCTDTPPCPV PEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPVETCVL DLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFN GTYRVVSVLP IEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPS PIERTISKARGRAHKPSVYVLPSPKELSSSDT VSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNQQEPERKHRM TPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCA VMHETLQNHYTDL SLSHSPGK (SEQ ID NO: 10)</p>
<p>VASP四聚体结构域</p>	<p>PSSSDYSDLQRVKQELLEEVKKELQKVKEEIIIE AFVQELRKRKRGSP (SEQ ID NO: 11)</p>

[0099] 实施例2 本发明重组核酸疫苗制备

[0100] (1) 加帽mRNA疫苗制备

[0101] 步骤a:将实施例1中用于生产加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0102] 步骤b:将线性化的质粒进行体外共转录加帽反应,将7-甲基化鸟苷酸帽结构加至转录的mRNA的5'端,并对模板DNA进行降解。

[0103] (2) 非加帽mRNA疫苗制备

[0104] 步骤a:将实施例1中用于生产非加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0105] 步骤b:将线性化的质粒进行体外非加帽的转录反应,并对模板DNA进行降解。

[0106] (3) DNA疫苗制备

[0107] 步骤a:将实施例1中用于生产DNA疫苗的载体质粒进行扩增,获得大量用于纯化的目的质粒。

[0108] 步骤b:用去内毒素质粒提取及纯化试剂盒对目的质粒进行提取纯化。

[0109] 实施例3 本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

[0110] 以实施例2中的加帽mRNA疫苗制备的方法制备获得疫苗A(重组核酸疫苗A)、疫苗B(基于本发明的重组核酸疫苗B)、疫苗C(基于本发明的重组核酸疫苗C)、疫苗D(基于本发明的重组核酸疫苗D)、疫苗E(基于本发明的重组核酸疫苗E)。对生产的重组核酸进行纯度检测,用于实验的重组核酸纯度均大于80%,基于本发明的重组核酸质量控制峰图如图5A、图5B、图5C、图5D、图5E所示。具体描述为:(1)重组核酸疫苗A,纯度为90.1%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5A;(2)基于本发明的重组核酸疫苗B,纯度为85.9%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5B;(3)基于本发明的重组核酸疫苗C,纯度为82.7%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5C;(4)基于本发明的重组核酸疫苗D,纯度为90.2%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5D;(5)基于本发明的重组核酸疫苗E,纯度为82%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5E。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

[0111] 实施例4 本发明重组核酸的体外表达效果

[0112] 通过细胞转染试剂,将实施例3中的疫苗转染至HEK293T细胞中,体外培养48小时后收集蛋白,进行Western blot检测,并计算疫苗A、疫苗B、疫苗C、疫苗D、疫苗E的蛋白分子量,如表2所示。

[0113] 表2 疫苗A、疫苗B、疫苗C、疫苗D的蛋白分子量

疫苗	蛋白分子量(kDa)
A	71.4
B	91.8
C	118.9
D	73.1
E	71.5

[0115] 图6A-6D展示了疫苗A、B、C、D、E转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果,其中疫苗A表达的蛋白为CDV全长H蛋白,为跨膜蛋白,理论上能够在裂解蛋白中检测到表达;疫苗B、C、D、E所表达的蛋白为分泌蛋白,理论上能够在上清中检测到表达。

[0116] 如图6A所示,然而,与理论预期相反,疫苗A未在裂解蛋白中检测到目的蛋白信号,证明基于CDV全长H蛋白设计的核酸疫苗无法在真核细胞中正常表达。

[0117] 如图6B、6C、6D所示,疫苗B、C、D、E均在上清中检测到目的蛋白信号,且分子量大小均符合预期。这证明相较于全长表达H蛋白,基于本发明的融合蛋白不仅能够在真核细胞中顺利翻译、正确折叠,而且结构稳定、能够分泌到胞外。

[0118] 对于融合蛋白四聚体结构域部分,本发明在前期进行了初步筛选,采用了VASP四聚体结构域、GCN4-pII四聚体结构域、p53四聚体结构域、泉古菌属四聚体结构域,这4种四聚体结构域进行初步筛选。从分泌效率等角度选择,去除效果差的VASP四聚体结构域、GCN4-pII四聚体结构域,本发明采用p53四聚体结构域、泉古菌属四聚体结构域进行后续实验,选出最优的四聚体结构域组分。本发明疫苗D(包含泉古菌属四聚体结构域)、疫苗E(包含p53四聚体结构域)的表达量平行对比显示,疫苗D在上清中的表达量最高,证明相较于p53四聚体结构域,泉古菌属四聚体结构域与CDV H蛋白截选肽段融合后的分泌效率最高,更有利于抗原呈递和体液免疫的激活。

[0119] 上述结果中,疫苗B、C、D的上清表达量最高,因此后续采用疫苗B、C、D进行动物试验,验证三种疫苗是否能有效激活动物的体液免疫应答。

[0120] 实施例5 基于本发明的重组核酸疫苗在豚鼠模型中诱导的中和抗体和交叉免疫效果验证

[0121] 为了验证基于本发明的核酸疫苗是否能够激活动物体液免疫并产生中和抗体,本实施例采用疫苗B、C、D进行豚鼠免疫,第二次免疫后检测血清中的中和抗体效价,并检测是否可对其他基因型CDV病毒产生交叉保护。

[0122] 实验选用SPF级豚鼠共5只,每只豚鼠使用耳标记。具体免疫分组以及流程如图7A、表3所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0123] 表3 实施例5豚鼠免疫实验分组及免疫流程

疫苗	动物数量	免疫剂量	免疫程序
基于本发明的重组核酸疫苗B	5	10 $\mu$ g/只/次	Day0 ,Day21左腿肌注接种
基于本发明的重组核酸疫苗C	5	10 $\mu$ g/只/次	Day0 ,Day21左腿肌注接种
基于本发明的重组核酸疫苗D	5	10 $\mu$ g/只/次	Day0 ,Day21左腿肌注接种

[0125] 将5只豚鼠按照表3的免疫流程进行两次免疫,采血时间点为Day 0(免疫前)、Day 28。每次每只豚鼠取全血2mL以上,分离获得的血清不少于1 mL,每份血清样品作好标记,-80 $^{\circ}$ C保存直至检测。

[0126] 中和效价测定:豚鼠血清检测针对CDV1毒株(NJ(12)3株)和CDV3毒株(CL株,EU726268.1)的中和效价,评估疫苗的免疫保护效果及交叉保护效果,检测结果如图7B、7C所示。

[0127] 根据图7B、7C所示结果,基于本发明的重组核酸疫苗B在两次免疫后可以诱导4/5的豚鼠个体产生针对CDV1毒株的中和抗体,抗体滴度范围在1:64~1:362;诱导3/5的豚鼠个体产生针对CDV3毒株的中和抗体,抗体滴度范围在1:20~1:22.6。

[0128] 根据图7B、7C所示结果,基于本发明的重组核酸疫苗C在两次免疫后可以诱导2/5的豚鼠个体产生针对CDV1毒株的中和抗体,抗体滴度范围在1:40.3~1:90.6;未诱导豚鼠个体产生针对CDV3毒株的中和抗体。

[0129] 根据图7B、7C所示结果,基于本发明的重组核酸疫苗D在两次免疫后可以诱导4/5的豚鼠个体产生针对CDV1毒株的中和抗体,抗体滴度范围在1:90.6~1:724;诱导5/5的豚鼠个体产生针对CDV3毒株的中和抗体,抗体滴度范围在1:22.6~1:181.1。

[0130] 对于CDV病毒,中和抗体滴度大于1:45即可产生有效保护,因此,这一结果证明基于本发明的重组核酸疫苗B、C能够在豚鼠模型中诱导针对CDV1毒株的有效免疫保护;基于本发明的重组核酸疫苗D能够在豚鼠模型中诱导针对CDV1、CDV3毒株的交叉免疫保护。

[0131] 上述中和抗体滴度原始数据如表4所示。

[0132] 表4 实施例5豚鼠免疫实验中和抗体效价测定原始数据

测定毒株	疫苗	Day 0					Day 28				
		1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:80.7	1:2.8	1:64	1:362	1:181.1
[0133] NJ(12)3 株	疫苗 B	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:80.7	1:2.8	1:64	1:362	1:181.1
	疫苗 C	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:90.6	1:2.8	1:12.7	1:40.3	1:16
	疫苗 D	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:2.8	1:181	1:724	1:362	1:90.6
CDV3 CL 株	疫苗 B	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:22.6	1:5.7	1:16	1:22.6	1:20.1
	疫苗 C	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:5.7	1:5.7	1:5.7	1:8	1:5.7
	疫苗 D	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:80.7	1:22.6	1:181.1	1:64	1:25.4

[0134] 分析上述结果,本发明选择的抗原序列来源于CDV1毒株的H蛋白,因此疫苗B、C、D均能诱导产生针对CDV1毒株的中和抗体。其中,疫苗D的N端融合了四聚体结构域,因此在表达过程中能够自行组装成为四聚体,模拟CDV H蛋白的天然构象,提供了更多的空间表位,从而诱导产生针对CDV3的中和抗体。

[0135] 因此,上述结果证明了:(1)基于本发明的疫苗,截选的H蛋白能够提供足够的线性表位,足以诱导动物产生有效的体液免疫反应,且截短CDV H蛋白截选肽段1为最优选择;(2)基于本发明的疫苗,在N端融合四聚体结构域的策略,能够促使H蛋白以天然构象表达,激活针对CDV H蛋白空间表位的体液免疫反应,诱导动物产生针对CDV不同基因型的中和抗体,且泉古菌属四聚体结构域为最优选择。

[0136] 实施例6基于本发明的重组核酸疫苗在黑貉(犬科)模型中的预防效果

[0137] 为了验证基于本发明的核酸疫苗是否能够激活靶标动物(犬科)的体液免疫并产生有效的免疫保护,本实施例采用诱导中和抗体水平最高的疫苗D进行黑貉免疫,第二次免疫后检测血清中的中和抗体效价,并进行攻毒实验,验证保护效果。

[0138] 实验选用8只2月龄以上的黑貉,分为两组,疫苗D免疫组5只,PBS对照组3只。免疫前测定黑貉的犬瘟热病毒中和抗体不高于1:4,每只黑貉使用耳标标记。具体免疫实验分组及免疫流程如图8A、表5所示,本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0139] 表5 实施例6黑貉免疫实验分组及免疫流程

疫苗	动物数量	免疫剂量	免疫程序
基于本发明的重组核酸疫苗D	5	25 $\mu$ g/只/次	Day0 ,Day21后肢外侧肌注
PBS	3	1ml/只/次	Day0 ,Day21后肢外侧肌注

[0141] 将10只黑貉按照表5的免疫流程进行两次免疫,二免后两周,即Day42时采用CDV1毒株(CDV-HBF-1)进行攻毒。

[0142] 采血时间点为Day 0(免疫前)、Day21(二免前)、Day 28。每次每只分离获得的血清不少于0.5 mL,每份血清样品作好标记,-80 $^{\circ}$ C保存直至检测。攻毒后持续观察实验动物的状态,统计存活率,验证本发明疫苗的保护效果。

[0143] 根据图8B所示结果,基于本发明的重组核酸疫苗D在两次免疫后可以诱导4/5的黑貉个体产生针对攻毒毒株的中和抗体,抗体滴度范围在1:161.4~1:256,原始数据如表6所示。从滴度水平判断,可以提供有效的保护。

[0144] 表6 实施例6黑貉免疫实验中和抗体效价测定原始数据

日期	疫苗 D 免疫组	PBS 对照组
	1:4	1:4
	1:4	1:4
<b>Day 0</b>	1:4	1:4
	1:4	/
	1:4	/
[0145]	1:2.8	1:2.8
	1:2.8	1:2.8
<b>Day 21</b>	1:5.7	1:2.8
	1:54.6	/
	1:12.7	/
<b>Day 28</b>	1:4.7	1:2.8

[0146] 攻毒后,持续观察两组黑貉的状态,统计死亡情况,计算存活率。根据图8C所示结果,疫苗D免疫组的5只黑貉全部存活,PBS对照组的3只黑貉分别在攻毒后第7、9、11天死亡。这一结果证明基于本发明的核酸疫苗D能够提供100%的保护率。

[0147] 分析上述结果,虽然基于本发明的核酸疫苗D在两次免疫后,只在4/5只黑貉中检测到高水平的中和抗体,但是攻毒实验显示5只黑貉均成功存活。推测疫苗D不仅诱导体液免疫,同时还能诱导细胞免疫,在CDV强毒攻击时能获得完全保护。

[0148] 综上所述,本发明提供的CDV疫苗设计思路,能够诱导模式动物豚鼠产生高水平中和抗体,并且具有交叉免疫保护效果。此外,基于本发明的核酸疫苗能为靶动物黑貉提供有效的免疫保护,针对犬瘟热病毒感染有良好的预防效果。因此,本发明能够应用于免疫药物的生产和研发,填补当前犬瘟热病毒通用疫苗研发领域的空白,具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

[0149] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例,而并非是对本公开的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。

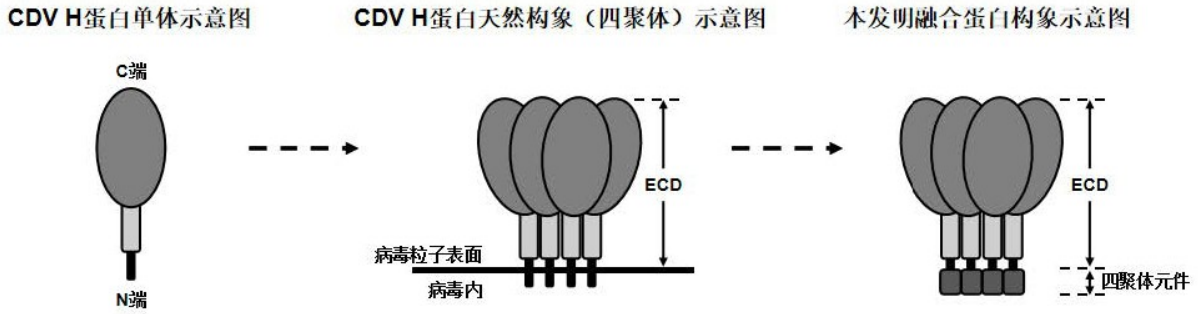


图 1

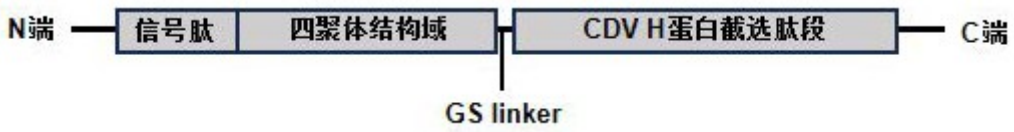


图 2

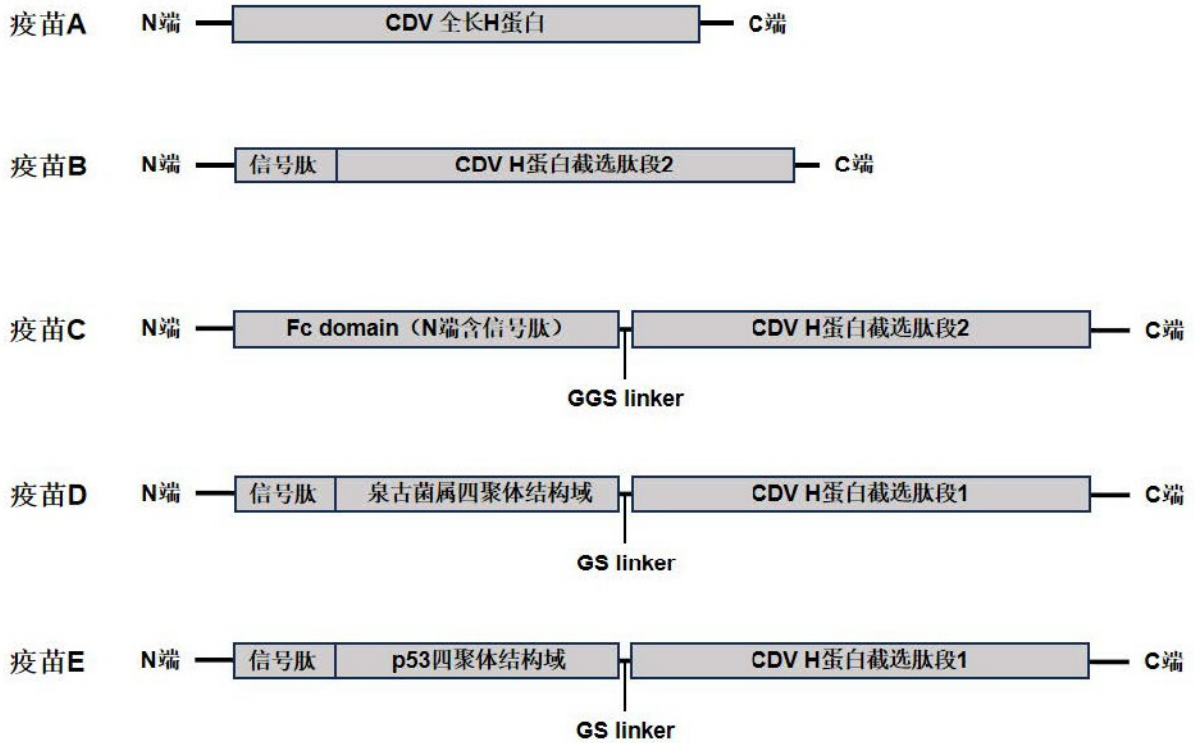


图 3

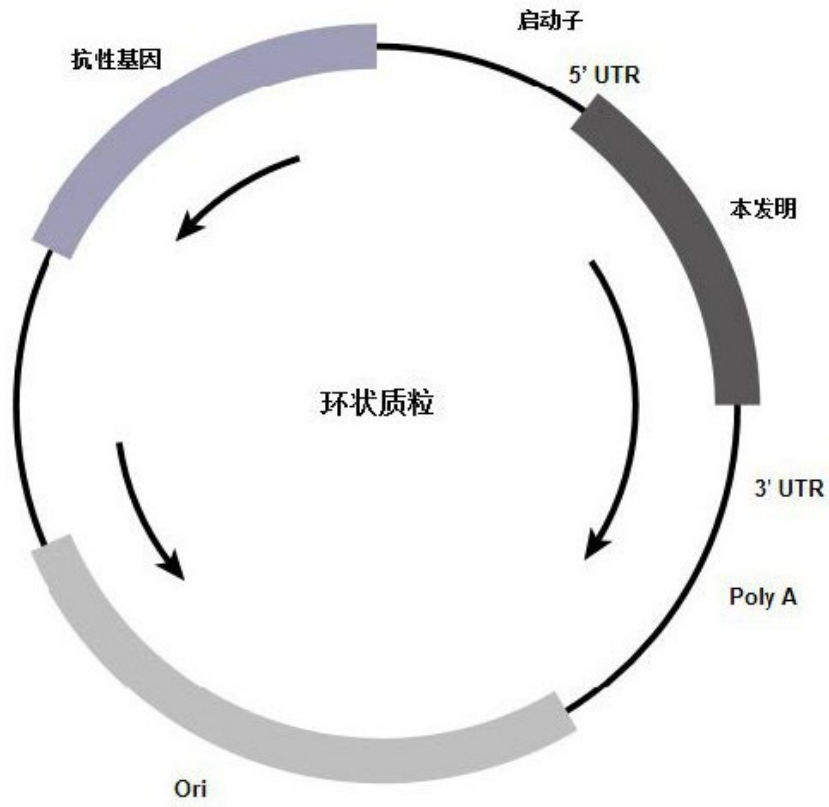


图 4

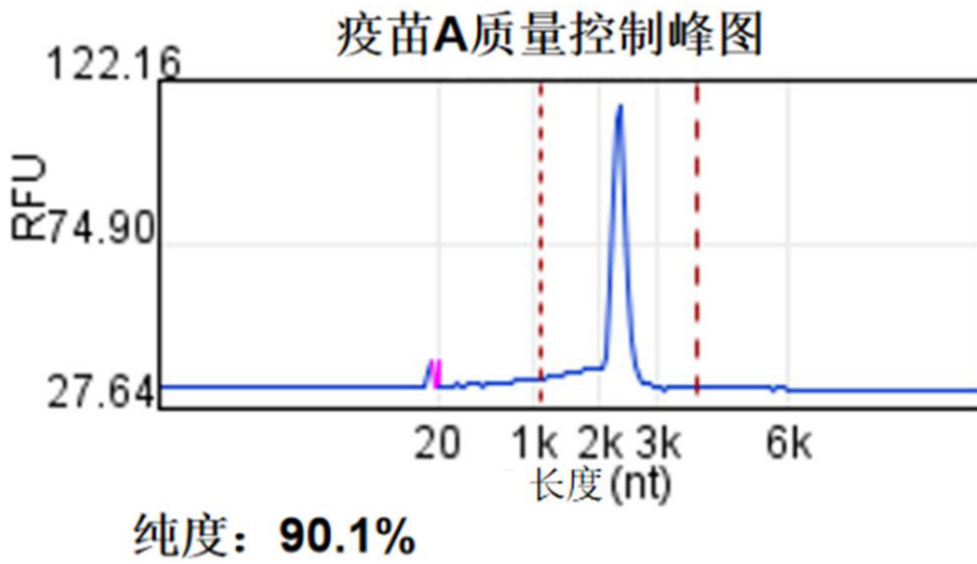


图 5A

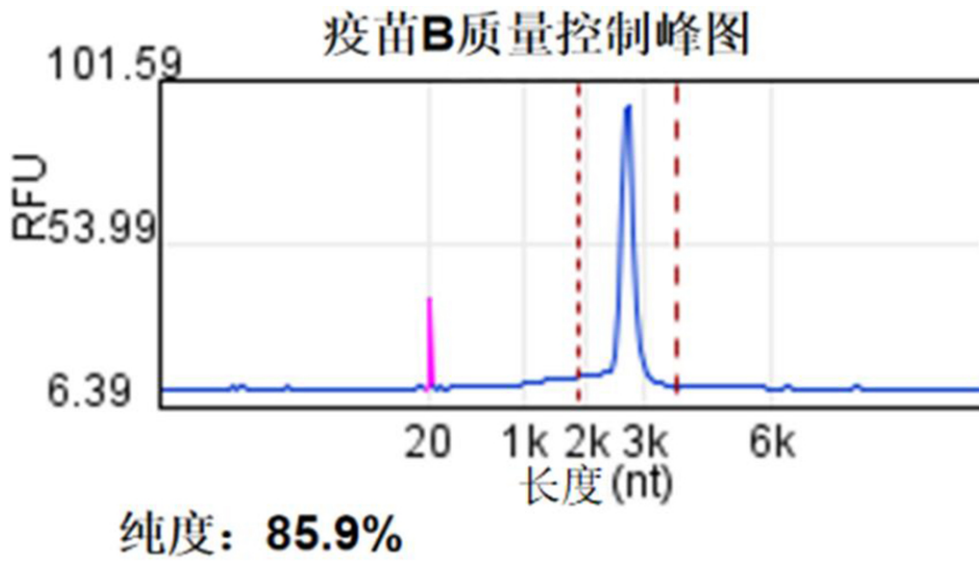


图 5B

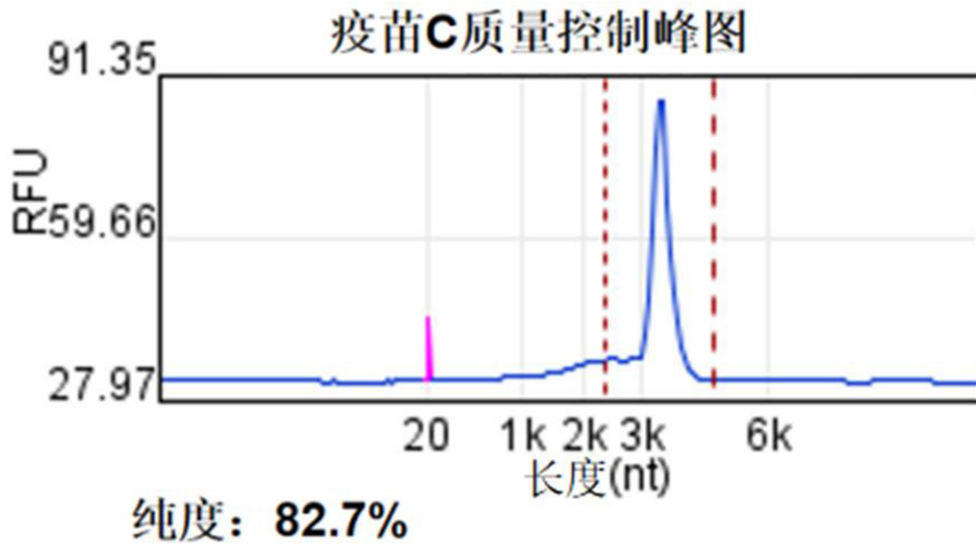


图 5C

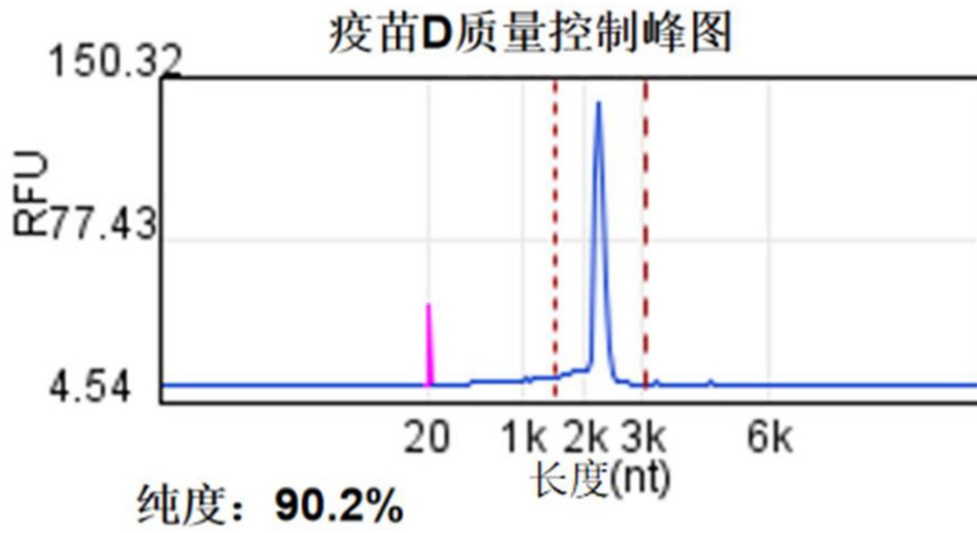


图 5D

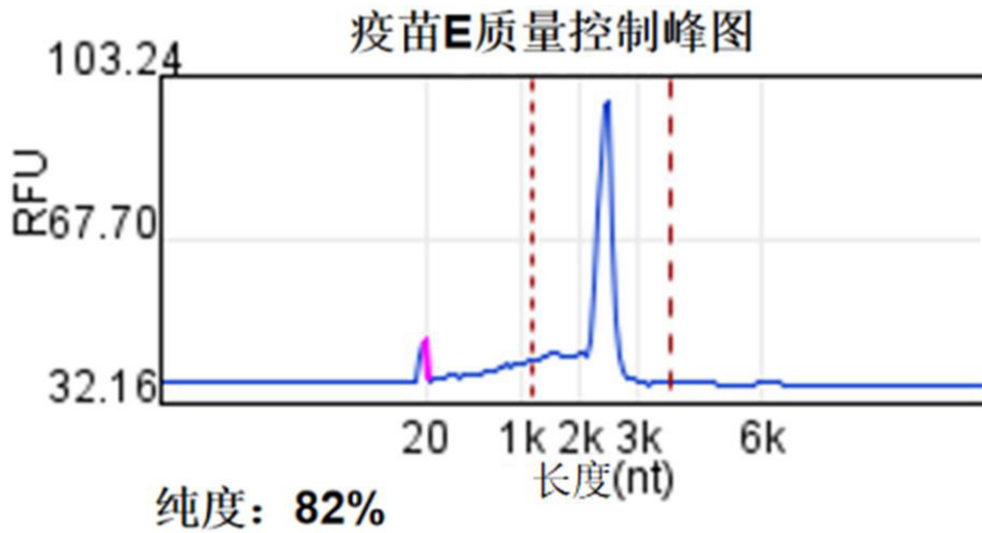


图 5E

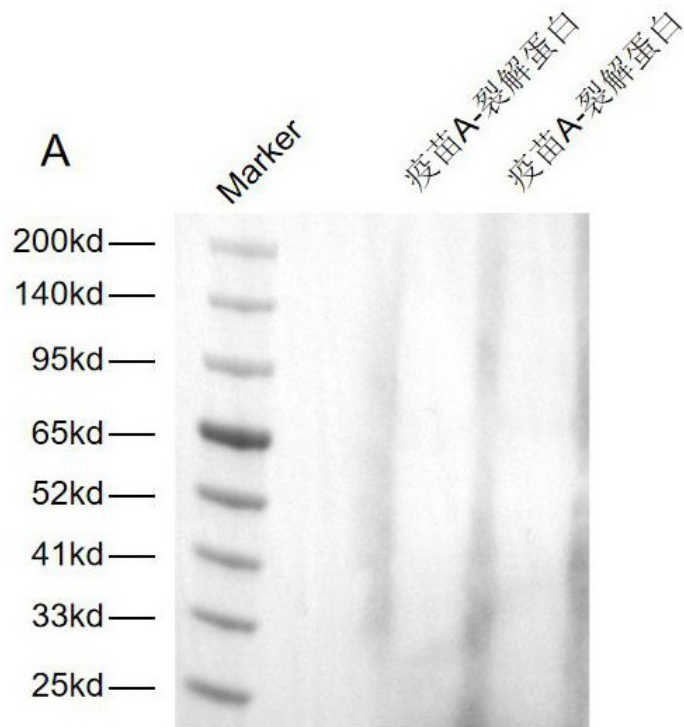


图 6A

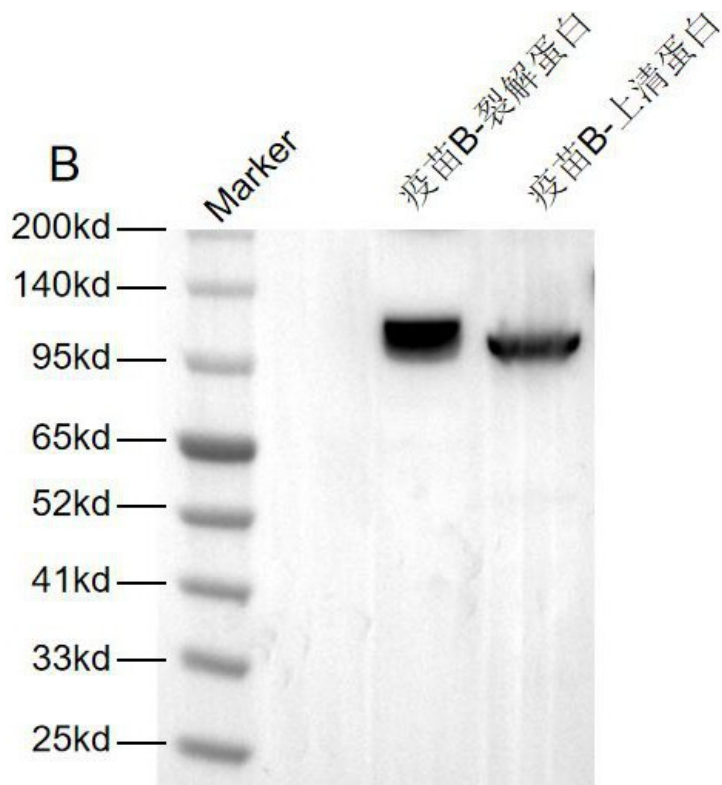


图 6B

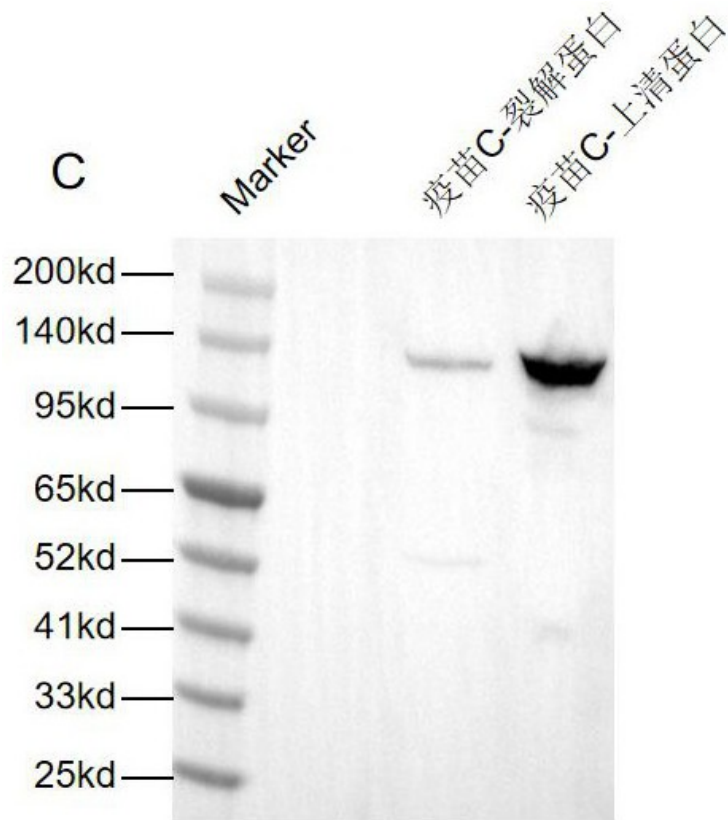


图 6C

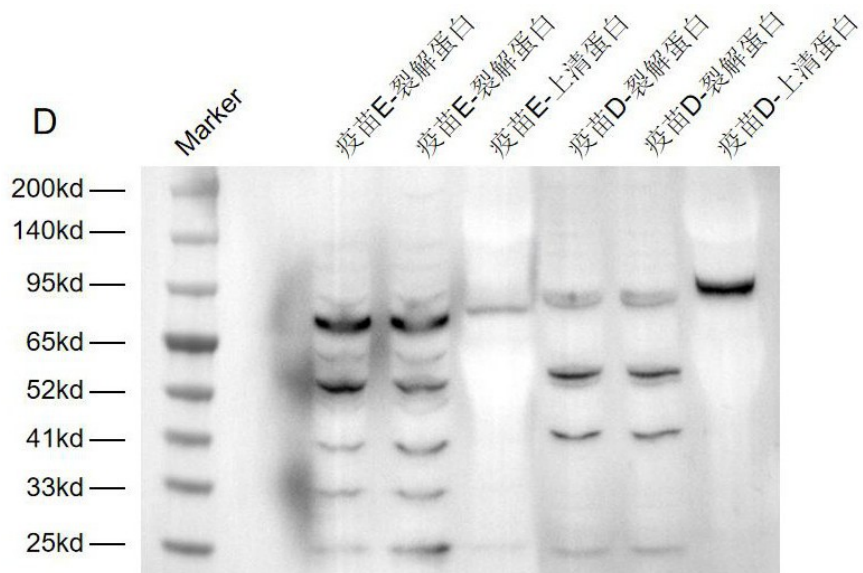


图 6D

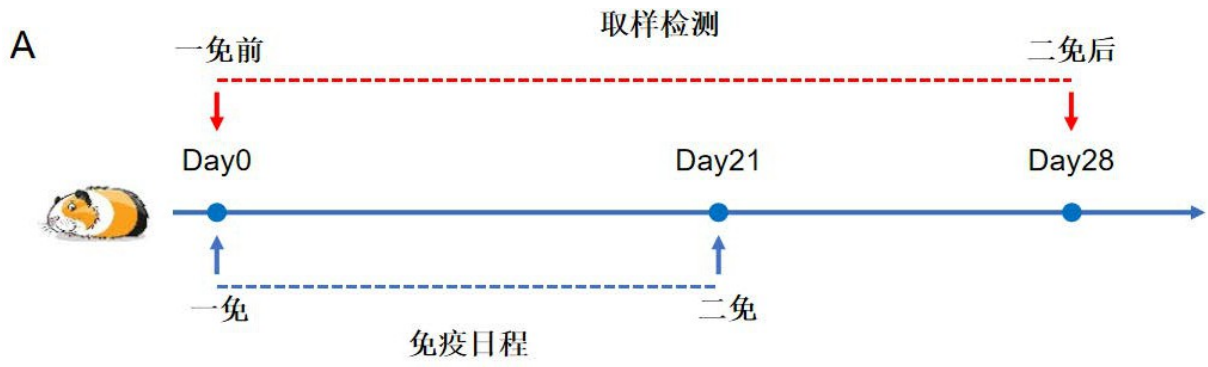


图 7A

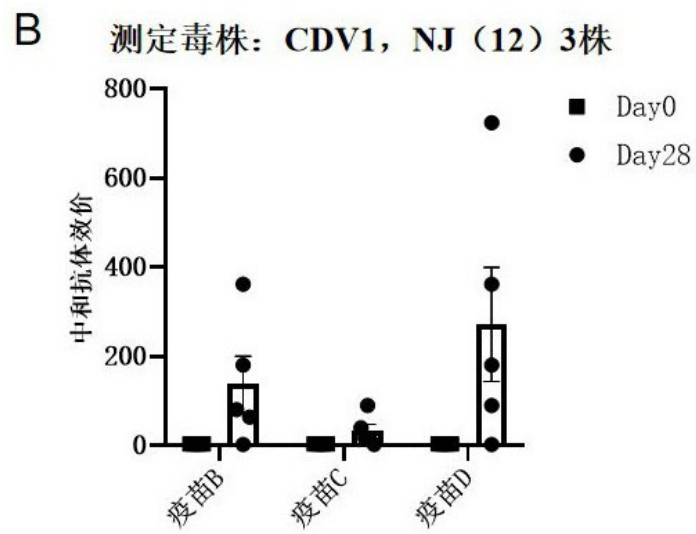


图 7B

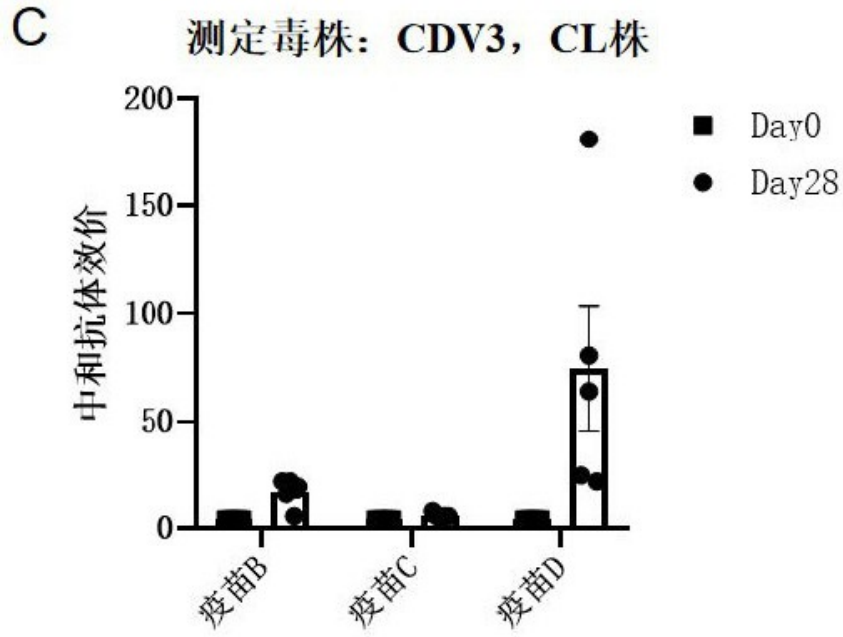


图 7C

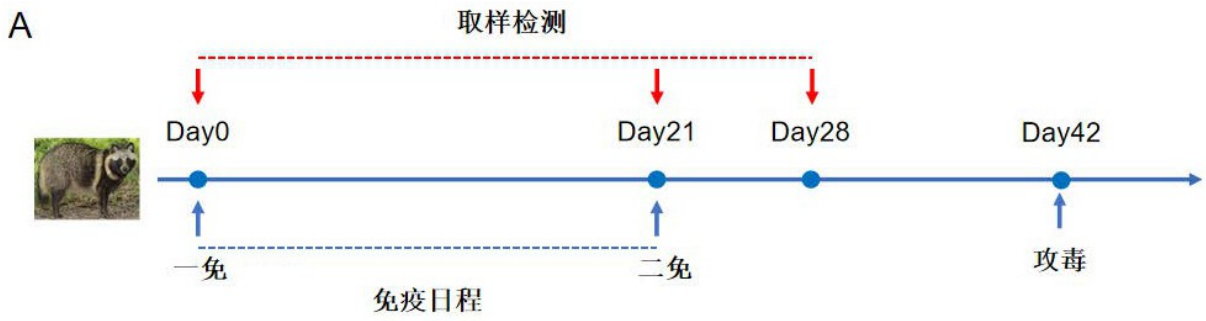


图 8A

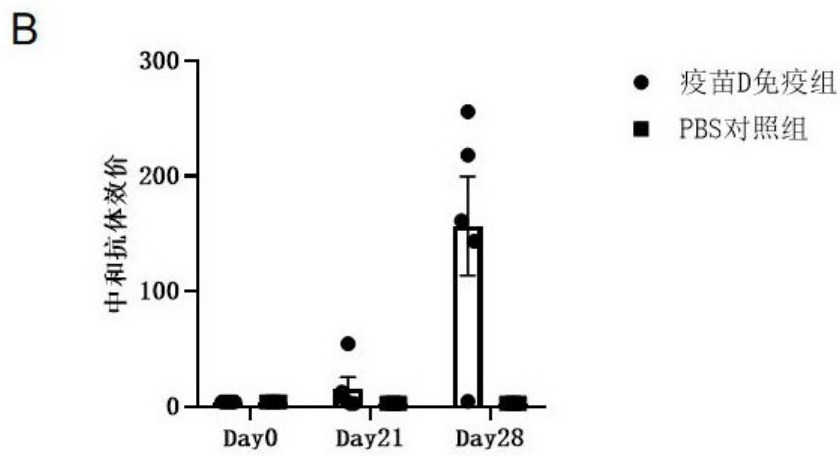


图 8B

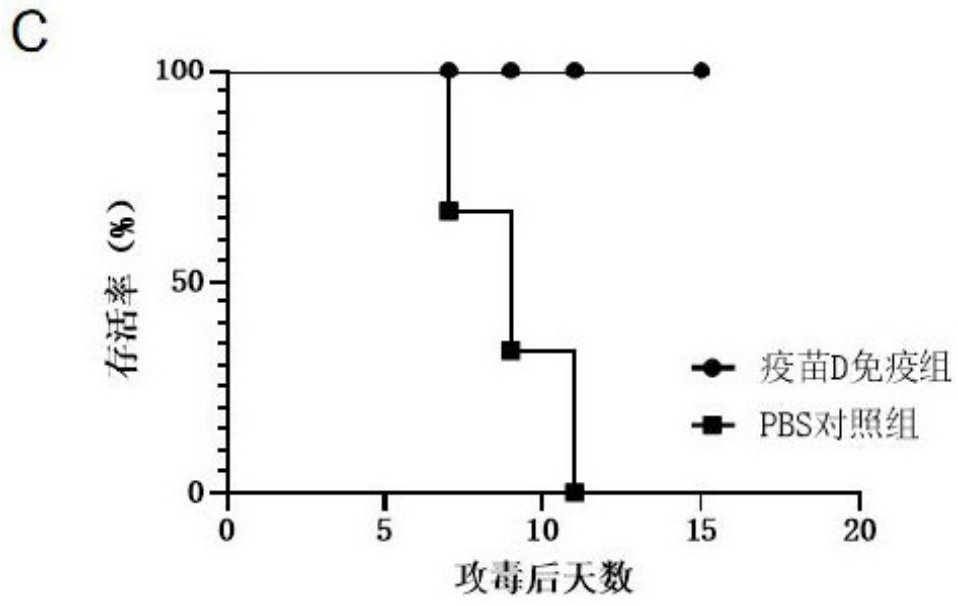


图 8C