



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116904489 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 19

(21) 申请号 202311177182.5

A61K 39/12 (2006.01)

(22) 申请日 2023.09.13

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116904489 A

(56) 对比文件

CN 114015723 A, 2022.02.08

CN 105039268 A, 2015.11.11

CN 106520710 A, 2017.03.22

(43) 申请公布日 2023.10.20

(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

Linlin Li et al. The truncated E protein of DTMUV provide protection in young ducks. Veterinary Microbiology. 2020, 第240卷第1-4页.

(72) 发明人 韩梯云 徐实 李静 费才溢

Juan Huang et al. Oral Delivery of a DNA Vaccine Expressing the PrM and E Genes: A Promising Vaccine Strategy against Flavivirus in Ducks. SciEntIfIc REPOrtS. 2018, 第8卷第1-10页.

(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

审查员 殷岑楠

权利要求书1页 说明书12页
序列表(电子公布) 附图3页

(51) Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

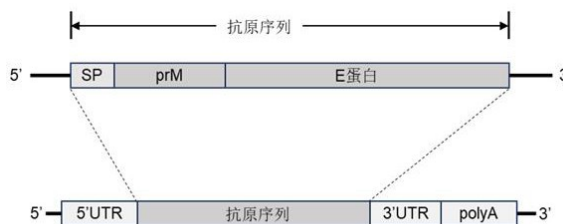
C12N 15/85 (2006.01)

(54) 发明名称

一种鸭坦布苏病毒核酸疫苗及应用

(57) 摘要

本发明涉及鸭坦布苏病毒核酸疫苗及应用。基于密码子简并性并对序列进行优化,将信号肽和鸭坦布苏病毒的prM和E蛋白的编码序列进行融合,构建获得鸭坦布苏病毒的mRNA疫苗。本发明的mRNA疫苗具有诱导鸭产生中和抗体的效果,从而可以用较少的疫苗剂量达到保护效果。能够在DTMUV强毒株的攻毒下表现出优秀的保护作用,且保护成功的个体不存在细胞持续排毒的情况。基于本发明的核酸疫苗有利于减少接种剂量,进而减少脂质体递送所产生的细胞毒性,在保证免疫效果的同时降低了疫苗的毒副作用。本发明可作为核酸疫苗的通用抗原架构,具有强免疫原性,在动物体内有效且高水平的分泌,从而诱导产生更高水平的针对DTMUV的特异性中和抗体,能够实现理想的免疫效果。



核酸疫苗架构

1. 一种鸭坦布苏病毒的mRNA疫苗,其特征在于,所述mRNA的编码序列如SEQ ID NO:7所示。
2. 如权利要求1所述的鸭坦布苏病毒的mRNA疫苗,其特征在于,所述mRNA经过加帽处理。
3. 表达载体,其特征在于,所述表达载体表达权利要求1所述的mRNA分子。
4. 根据权利要求3所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体为pUC57载体。
5. 细胞,其特征在于,所述细胞包含权利要求3-4任一所述的表达载体。
6. 一种鸭坦布苏病毒的mRNA疫苗,其特征在于,所述mRNA采用权利要求3-4任一所述的表达载体和/或权利要求5所述的细胞制备。
7. 权利要求1-2任一所述的mRNA在制备抗鸭坦布苏病毒的疫苗组合物中的应用。
8. 权利要求3-4任一所述的表达载体在制备抗鸭坦布苏病毒的疫苗组合物中的应用。
9. 疫苗组合物,其特征在于,所述疫苗组合物包括权利要求1-2任一所述的mRNA和/或权利要求3-4任一所述的表达载体。
10. 权利要求1-2任一所述的mRNA疫苗和/或权利要求3-4任一所述的表达载体在以下的用途:制备治疗或预防鸭坦布苏病毒感染引起的疾病的药物。
11. 权利要求1-2任一所述的mRNA疫苗和/或权利要求3-4任一所述的表达载体在以下的用途:制备治疗或预防鸭坦布苏病毒病的药物。
12. 权利要求1-2任一所述的mRNA疫苗和/或权利要求3-4任一所述的表达载体在以下的用途:制备在施用对象体内诱导产生针对鸭坦布苏病毒的特异性免疫反应的药物。

一种鸭坦布苏病毒核酸疫苗及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域。具体涉及到一种鸭坦布苏病毒核酸疫苗的抗原设计及应用,属于动物免疫药物技术领域。

背景技术

[0002] 鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu virus, DTMUV)感染引起的一种病毒性传染病,临床症状主要表现为产蛋鸭产蛋量急剧下降,雏鸭高热、生长迟缓并伴有神经症状。

[0003] 目前,接种疫苗是生产上防控鸭坦布苏病毒病的主要手段。现有的DTMUV商品化疫苗主要为灭活疫苗和弱毒活疫苗两类,已在全国各地主要养鸭地区种鸭场大范围推广使用。灭活疫苗和弱毒活疫苗作为传统疫苗,在工业生产和免疫效力方面具有一定的优势,但在实际应用中仍存在一些问題:灭活疫苗只能引起体液免疫,因此使用的免疫剂量大、需多次免疫,且免疫效果维持时间短;弱毒活疫苗具有免疫剂量小、免疫反应产生迅速、免疫维持期长等优点,但其安全性较低,存在遗传突变和毒力返强风险。此外,灭活疫苗和弱毒活疫苗都容易诱导产生抗体依赖增强作用(Antibody-dependent enhancement, ADE),不利于为接种个体提供长期且有效的免疫保护。

[0004] 因此,开发一种安全、高效的新型鸭坦布苏病毒病疫苗势在必行。在疫苗设计过程中,抗原是激发动物产生特异性抗体的关键因素,其架构设计尤为重要。DTMUV为黄病毒属成员,其E蛋白(Envelope protein)作为病毒的囊膜蛋白,富含中和抗体靶向表位,是主要的保护性抗原。已有多项黄病毒相关研究表明,截短的E蛋白能够在保持免疫表位富集的形态下,以分泌形式表达,同时,膜蛋白M的前体(Pre-membrane protein, prM)能够协同E蛋白的折叠、稳定性和保护性免疫,同时促进E蛋白的分泌。此外,prM-E蛋白可以自我组装成一个病毒样颗粒(Virus like particles, VLP),该颗粒显示出与野生型病毒相似的结构特征和相同的表位,进一步提高免疫原性。因此,在针对黄病毒的疫苗开发研究中,prM-E蛋白的融合表达是提高免疫原性的关键。

[0005] 当前已有专利构建了表达prM-E蛋白的重组新城疫活病毒疫苗,用来解决灭活疫苗或者弱毒活疫苗存在的问题。如公开号为CN106520710A的中国专利,公开了表达鸭坦布苏病毒prM和E蛋白重组新城疫病毒活载体疫苗的制备及应用,通过将prM蛋白和E蛋白插入新城疫病毒的表达框架中,构建了重组新城疫活病毒疫苗。该方法能够利用prM和E蛋白成功诱导蛋鸭产生DTMUV特异性中和抗体,改善灭活疫苗和弱毒疫苗效价不高的情况。但新城疫病毒能够自然感染鸭等禽类,用其作为活病毒载体疫苗存在母源抗体干扰的潜在风险,在连续使用过程中会降低疫苗的保护作用。此外,该疫苗免疫后的鸭虽然自体不再产生临床症状,但存在持续带毒的问题,免疫成功的个体能够继续感染其他健康个体。

[0006] 核酸疫苗(nucleic acid vaccine),也称基因疫苗(genetic vaccine),是指将含有编码抗原蛋白核酸序列的载体,经肌肉注射等方法导入宿主体内,通过宿主细胞表达抗原蛋白,诱导宿主细胞产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防和治疗疾病的目的。

[0007] 核酸疫苗是利用现代生物技术免疫学、生物化学、分子生物学等研制成的,分为DNA疫苗和RNA疫苗两种。与传统的灭活疫苗、亚单位疫苗和基因工程疫苗相比,核酸疫苗具有多项优势:(1)核酸疫苗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)核酸疫苗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)核酸疫苗接种后,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。

[0008] 综上所述,选择足够有效的抗原架构,结合更为安全高效的疫苗体系,将成为解决当前鸭坦布苏病毒疫苗各项问题的关键,并且为预防包含鸭坦布苏病毒在内的多种黄病毒提供通用的疫苗设计思路。

发明内容

[0009] 本发明为了克服现有DTMUV灭活疫苗、弱活病毒疫苗、重组病毒载体疫苗等技术或效果的缺陷,本发明提供一种同时表达DTMUV的prM和E蛋白的串联抗原融合蛋白、编码其的核酸、包含所述核酸的疫苗,以及相关制备方法和应用等。相对于基于病毒载体的疫苗架构,本发明提供更安全、更有效的针对DTMUV毒株的核酸疫苗架构更有利于产业生产及应用。此外,本发明的抗原融合蛋白融合了协助VLP形成的信号肽,因此显著地增加了prM和E蛋白的联合表达的免疫原性,提高了适用对象体内产生的针对DTMUV的中和抗体水平。同时,由本发明描述的核酸疫苗抗原架构所生产的疫苗,能有效抑制感染后细胞持续排毒现象,达到预防和治疗的双重效果。

[0010] 本发明公开了一种鸭坦布苏病毒的mRNA疫苗,所述mRNA的编码序列如SEQ ID NO: 7所示。

[0011] 优选的,所述mRNA经过加帽处理。

[0012] 本发明公开了所述表达载体表达所述的mRNA分子。

[0013] 优选的,所述表达载体为pUC57载体。

[0014] 本发明公开了一种细胞,其特征在于,所述细胞包含所述的表达载体。

[0015] 本发明公开了一种鸭坦布苏病毒的mRNA疫苗,所述mRNA采用所述的表达载体和/或所述的细胞制备。

[0016] 本发明公开了所述的mRNA在制备抗鸭坦布苏病毒的疫苗组合物中的应用。

[0017] 本发明公开了所述的表达载体在制备抗鸭坦布苏病毒的疫苗组合物中的应用。

[0018] 本发明公开了一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包括所述的mRNA和/或所述的表达载体。

[0019] 本发明公开了所述的mRNA疫苗和/或所述的表达载体在以下任一项中的用途:(1)制备治疗或预防DTMUV感染引起的疾病的药物;或者,(2)制备治疗或预防鸭坦布苏病毒病的药物;或者,(3)制备在施用对象体内诱导产生针对DTMUV的特异性免疫反应的药物。

[0020] 优选的,所述施用对象为鸭、鹅、鸡或麻雀。

[0021] 本发明公开了一种分离的mRNA,所述mRNA的编码序列如SEQ ID NO: 7所示,所述mRNA用于针对鸭坦布苏病毒的核酸疫苗。

[0022] 本发明的一个方面提供了一种DTMUV抗原片段,其特征在于,包含信号肽(SP)、鸭

坦布苏病毒prM蛋白和鸭坦布苏病毒E蛋白;位于SP下游的prM和E蛋白可以在表达后形成VLP。

[0023] 进一步地,包含的信号肽序列位于鸭坦布苏病毒prM蛋白和鸭坦布苏病毒E蛋白序列的上游,可以来源于多种真核生物;优选地,所述信号肽序列可以来源于鸭;更优地,所述信号肽的核酸序列如SEQ ID NO.5所示,其编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0024] 本发明的一个方面提供了一种DTMUV抗原融合片段,其特征在于,包含信号肽(SP)与鸭坦布苏病毒prM蛋白和/或鸭坦布苏病毒E蛋白中的一种或多种融合。

[0025] 进一步地,所述的抗原融合片段,其特征在于,从N端到C端,依次包含信号肽(SP)片段、鸭坦布苏病毒prM蛋白片段和鸭坦布苏病毒E蛋白片段。

[0026] 本发明的一个方面提供了一种DTMUV抗原融合蛋白,包含如下任一序列:

[0027] DTMUV的prM蛋白氨基酸序列,如SEQ ID NO.1所示;

[0028] DTMUV的E蛋白氨基酸序列,如SEQ ID NO.2所示;

[0029] 如SEQ ID NO.1和/或SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸残基获得的氨基酸序列,且与(1)和/或(2)所示的氨基酸序列具有相同的功能;或者,

[0030] 与(1)和/或(2)所述序列具有至少90%序列一致性的氨基酸序列,且与(1)和/或(2)所示的氨基酸序列具有相同的功能。

[0031] 本发明的一个方面提供了一种重组核酸,包含编码所述DTMUV抗原片段、或所述DTMUV抗原融合片段、或所述DTMUV抗原融合蛋白的核酸。

[0032] 进一步地,所述的重组核酸,包含如下任一序列:

[0033] 编码prM蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO.3所示;

[0034] 编码E蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO.4所示;

[0035] 如SEQ ID NO.3和/或SEQ ID NO.4所示的核酸序列经取代、缺失或添加一个或多个核苷酸获得的核酸序列,且与(1)和/或(2)所示的核酸序列具有相同的功能;或者,

[0036] 与(1)和/或(2)所述序列具有至少90%序列一致性的核酸序列,且与(1)和/或(2)所示的核酸序列具有相同的功能。

[0037] 本发明的一个方面提供了一种重组DNA,其特征在于,包含编码所述DTMUV抗原片段、或所述DTMUV抗原融合片段、或所述DTMUV抗原融合蛋白的DNA。

[0038] 进一步地,所述的重组DNA,包含原核或真核的转录或表达元件,能够用于重组DNA的转录或表达。

[0039] 本发明的一个方面提供了一种重组mRNA,包含编码所述DTMUV抗原片段、或所述DTMUV抗原融合片段、或所述DTMUV抗原融合蛋白的mRNA。

[0040] 进一步地,所述的重组mRNA,所述mRNA还包含5' -UTR, 3' -UTR, polyA序列, IRES序列中的一种或多种。

[0041] 本发明的一个方面提供了一种表达盒,包含所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA。

[0042] 本发明的一个方面提供了一种载体,包含所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA、或所述表达盒;优选地,所述载体可以用于原核细胞复制或真核细胞表达。

[0043] 本发明的一个方面提供了一种细胞,包含所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述

重组mRNA、或所述表达盒、或所述载体；优选地，所述细胞可以是原核细胞或真核细胞。

[0044] 本发明的一个方面提供了一种重组菌，包含所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA、或所述表达盒、或所述载体；优选地，所述菌为大肠杆菌；更优选地，所述大肠杆菌为E. coli BL21(DE3)、E. coli Origami B(DE3)或E. coli Rosetta Blue(DE3)中的一种；最优选地，所述大肠杆菌为E. coli BL21(DE3)。

[0045] 本发明的一个方面提供了一种组合物，包含所述DTMUV抗原片段、或所述DTMUV抗原融合片段、或所述DTMUV抗原融合蛋白、或所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA、或所述表达盒、或所述载体、或所述细胞、或所述重组菌。

[0046] 本发明的一个方面提供了一种试剂盒，包含所述DTMUV抗原片段、或所述DTMUV抗原融合片段、或所述DTMUV抗原融合蛋白、或所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA、或所述表达盒、或所述载体、或所述细胞、或所述重组菌、或所述组合物。

[0047] 本发明的一个方面提供了一种DTMUV核酸疫苗，包含：

[0048] (a) 所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA；和

[0049] (b) 药学上可接受的载体；优选地，所述载体包含脂类；更优选地，所述脂类包括阳离子脂质、可电离脂质、辅助脂质、胆固醇、DMG-PEG2000中的一种或多种。

[0050] 本发明的一个方面提供所述DTMUV抗原片段、或所述DTMUV抗原融合片段、或所述DTMUV抗原融合蛋白、或所述重组核酸、或所述重组DNA、或所述重组mRNA在以下任一项中的用途：(1) 制备治疗或预防DTMUV感染引起的疾病的药物；或者，(2) 制备治疗或预防鸭坦布苏病毒病的药物；或者，(3) 制备在施用对象体内诱导产生针对DTMUV的特异性免疫反应的药物。

[0051] 本发明提供的鸭坦布苏病毒核酸疫苗具有以下一种或多种有益的技术效果：

[0052] 本发明将信号肽和鸭坦布苏病毒的prM和E蛋白序列进行融合表达，显著地增强了prM和E蛋白的免疫原性，有效提高了体内产生的针对DTMUV的中和抗体，从而可以用较少的疫苗剂量达到保护效果。因此，基于本发明的核酸疫苗有利于减少接种剂量，进而减少脂质体递送所产生的细胞毒性，在保证免疫效果的同时降低了疫苗的毒副作用。

[0053] 本发明可作为核酸疫苗的通用抗原架构，具有强免疫原性，在动物体内有效且高水平的分泌，从而诱导产生更高水平的针对DTMUV的特异性中和抗体，能够实现理想的免疫效果。

[0054] 基于本发明的核酸疫苗在鸭免疫实验中，二次免疫后表现出很强的免疫反应，远高于当前所有的鸭坦布苏病毒疫苗。

[0055] 基于本发明的核酸疫苗在鸭免疫后的攻毒保护实验中，能够在DTMUV强毒株(JS804, GeneBank ID: JF895923)的攻毒下表现出优秀的保护作用，且保护成功的个体不存在细胞持续排毒的情况。

[0056] 基于本发明的核酸疫苗能够有效诱导细胞免疫，从细胞内部自行表达抗原蛋白，从而避免ADE或母体抗原干扰。

[0057] 基于本发明的核酸疫苗是利用线性化的质粒DNA为模板，在体外进行酶转录反应合成的，该合成策略避免了活细胞培养生产方式，不需要考虑的安全性以及复杂的生产工艺等问题。

[0058] 基于本发明的核酸疫苗涉及核酸通用性疫苗平台，可以根据毒株的年度或季节性

变异选择新的抗原序列,在不改变工艺流程的情况下快速开发新的疫苗。

附图说明

- [0059] 图1为包含本发明抗原序列的核酸疫苗架构示意图。
 [0060] 图2为包含本发明的核酸疫苗模板质粒示意图。
 [0061] 图3为体外合成加帽mRNA纯度检测。
 [0062] 图4为体外合成mRNA琼脂糖凝胶电泳图。
 [0063] 图5为包含本发明的核酸疫苗转染HEK293T细胞后抗原蛋白表达的Western blot图。
 [0064] 图6为包含本发明的核酸疫苗进行鸭免疫和采样过程示意图。
 [0065] 图7为包含本发明的两种核酸疫苗免疫后鸭血清中和抗体滴度变化。
 [0066] 图8为包含本发明的两种核酸疫苗免疫并攻毒后对鸭的保护效果。

具体实施方式

[0067] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。除非另有指明,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0068] 本发明使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的不同含义。

[0069] 实施例1:鸭坦布苏病毒核酸疫苗抗原序列构建

[0070] 从NCBI上查询DTMUV的prM和E蛋白序列信息,按照图1所示的顺序进行融合抗原架构的构建。然后基于密码子简并性对序列做优化,最后通过合成直接获得DNA序列(序列如SEQ ID NO.7所示)(委托金斯瑞公司合成)。

[0071] 将合成的目的基因最后插入至pUC57载体的多克隆位点上,得到质粒pUC57-SP_prM_E。构建获得的质粒示意图如图2所示。编码获得DTMUV抗原融合蛋白多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。

[0072] 质粒pUC57-SP_prM_E可作为生产核酸疫苗的模板,用于多种核酸疫苗的体外制备。

[0073] 表1 本发明鸭坦布苏病毒核酸疫苗抗原架构涉及的具体序列

[0074] SEQ ID NO.1	LKLGNYNRVLATLNKTDVSDLLVIPTTAGSNGCVVRALDVGLMCQDD ITYLCPKLEYGYPEDIDWCNETEYIYIHGRCTPSRHGRSRRSVNV HHHGESLLEAKNTPWMDSTKATKYLTKVENWALRNPYALAAIFIGWN LGTTRSQKIIFTIMLMLIAPAYS
--------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>SEQ ID NO.2</p>	<p>FSCLGMQNRDFVEGVNGVEWIDVVLEGGSCVTITAKDRPTIDVKMMNM EATELAVVRSYCYEPKVS DVTTESRCPTMGEAHNPKATYA EYICKKDF VDRGWNGCGLFGKGS IQTCAKFDCTKKA EGRIVQKENVQFEVAVFIH GSTEASTYHNYS AQQLKHAARFVITPKSPVYTAEMEDYGTVILECEP RSGVDMGQFYVFTMNTKSWLVNRDWFHDLNLPWTGSSAGTWQNKESLI EFEEAHATKQSVVALASQEGALHAALAGAI PVKYSKLEMTSGHLKC RVKMQLKLGMTYPMCSNTFSLVKNPTDTGHGTVVVELSYAGTDGPC RVPI SMSADLNDMTPVGR LITVNPYVSTSSTGAKIMVEVEPPFGDSFI LVGSGKGQIRYQWHRSGSTIGKAFSTLKG AQRMVALGDTAWDFG SVG GVLTSIGKGIHQVFGSAFKSLFGGMSWITQ GMLGALLLWMGLNARDRS ISMTFLAVGGILVFLAVNVNA</p>
<p>SEQ ID NO.3</p>	<p>CTGAAGCTGGGCAACTACAACGGCCGGGTGCTGGCCACCCTGAACAAG ACCGACGTGAGCGACCTGCTGGTGATCCCACCACCGCCGAGCAAC GGCTGCGTGGTGGGGCCCTGGACGTGGGCCTGATGTGCCAGGACGAC ATCACCTACCTGTGCCCAAGCTGGAGTACGGCTACGAGCCCGAGGAC ATCGACTGCTGGTGCAACGAGACCGAGATCTACATCCACTACGGCCGG TGCACCCCAGCCGGCACGGCCGGGAGCCGGCGGAGCGTGAACGTG CACCACCACGGCGAGAGCCTGCTGGAGGCCAAGAACACCCCTGGATG GACAGCACCAAGGCCACCAAGTACCTGACCAAGGTGGAGAACTGGGCC CTGCGGAACCCCGCTACGCCCTGGCCGCATCTTCATCGGCTGGAAC CTGGGCACCACCCGGAGCCAGAAGATCATCTCACCATCATGCTGATG CTGATCGCCCCGCCTACAGC</p>

SEQ ID NO.4	<p>TTCAGCTGCCTGGGCATGCAGAACCGGGACTTCGTGGAGGGCGTGAAC GGCGTGGAGTGGATCGACGTGGTGTGGAGGGCGCAGCTGCGTGACC ATCACCGCCAAGGACCGGCCACCATCGACGTGAAGATGATGAACATG GAGGCCACCGAGCTGGCCGTGGTGCAGGACTACTGCTACGAGCCCAAG GTGAGCGACGTGACCACCGAGAGCCGGTGCCCCACCATGGCGAGGCC CACAAACCCAAGGCCACCTACGCCGAGTACATCTGCAAGAAGGACTTC GTGGACCGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGCCTGTTGCGCAAGGGCAGC ATCCAGACCTGCGCCAAGTTCGACTGCACCAAGAAGGCCGAGGGCCGG ATCGTGCAGAAGGAGAACGTGCAGTTCGAGGTGGCCGTGTTCCATCCAC GGCAGCACCGAGGCCAGCACCTACCACAACCTACAGCGCCAGCAGAGC CTGAAGCACGCCGCCGGTTCGTGATCACCCCAAGAGCCCGTGTAC ACCGCCGAGATGGAGGACTACGGCACCGTGACCCTGGAGTGCAGGCC CGGAGCGGCGTGGACATGGCCAGTTCACGTGTTACCATGAACACC AAGAGCTGGCTGGTGAACCGGACTGGTTCACGACCTGAACCTGCCC TGGACCGGCAGCAGCGCCGGCACCTGGCAGAACAAGGAGAGCCTGATC GAGTTCGAGGAGGCCACGCCACCAAGCAGAGCGTGGTGGCCCTGGCC AGCCAGGAGGGCGCCCTGCACGCCCCCTGGCCGGCCCATCCCCGTG AAGTACAGCGGCAGCAAGCTGGAGATGACCAGCGGCCACCTGAAGTGC CGGGTGAAGATGCAGGGCCTGAAGCTGAAGGGCATGACCTACCCCATG TGCAGCAACACCTTCAGCCTGGTGAAGAACCCACCGACACCGGCCAC GGCACCGTGGTGGTGGAGCTGAGCTACGCCGGCACCGAGGCCCTGC CGGGTGGCCATCAGCATGAGCGCCGACCTGAACGACATGACCCCGTG GGCCGGCTGATCACCGTGAACCCCTACGTGAGCACCAGCAGCACCGGC GCCAAGATCATGGTGGAGTGGAGCCCCCTTCGGCGACAGTTCATC CTGGTGGGCGAGCGCAAGGGCCAGATCCGGTACCAGTGGCACCGGAGC GGCAGCACCATCGGCAAGGCCCTTACCAGCACCCCTGAAGGGCGCCAG CGGATGGTGGCCCTGGGCGACACCGCTGGGACTTCGGCAGCGTGGGC GGCGTGTGACCAGCATCGGCAAGGGCATCCACCAGGTGTTGCGCAGC GCCTTCAAGAGCCTGTTGCGCGCATGAGCTGGATCACCCAGGGCATG CTGGGCGCCCTGCTGCTGTGGATGGGCCTGAACGCCCGGACCGGAGC ATCAGCATGACCTTCTGGCCGTGGGCGGCATCCTGGTGTCTCTGGCC GTGAACGTGAACGCC</p>
SEQ ID NO.5	<p>ATGGCCGCCTGGCCCCCGCCTGCGGCTGCTGCTGGCCCTGGGCGCC TGGGCCATCTGCAGCCACCGGGCGCCGCC</p>
SEQ ID NO.6	<p>MAAWPPALRLLLALGAWAICSHRGAA</p>

SEQ ID NO.7	ATGGCCGCTGGCCCCCGCCCTGCGGCTGCTGCTGGCCCTGGGGCGCC TGGCCATCTGCAGCCACCGGGGCGCCCTGAAGCTGGGCAACTAC AACGGCCGGGTGCTGGCCACCCTGAACAAGACCGACGTGAGCGACCTG CTGGTGATCCCACCACCGCCGGCAGCAACGGCTGCGTGGTGGGGCC CTGGACGTGGGCTGATGTGCCAGGACGACATCACCTACCTGTGCCCC AAGCTGGAGTACGGCTACGAGCCGAGGACATCGACTGCTGGTGCAAC GAGACCGAGATCTACATCCACTACGGCCGGTGACCCCCAGCCGGCAC GGCCGGGGAGCCGGGAGCGTGAACGTGCACCACCACGGCGAGAGC CTGCTGGAGGCCAAGAACCCCTGGATGGACAGCACCAGGCCACC AAGTACCTGACCAAGGTGGAGAACTGGGCCCTGCGGAACCCCGGCTAC GCCCTGGCCGCATCTTCATCGGCTGGAACCTGGGACCACCCGGAGC CAGAAGATCATCTTCACCATCATGCTGATGCTGATCGCCCCGCCTAC AGCTTCAGCTGCCTGGCATGCAGAACCGGGACTTCGTGGAGGGCGTG AACGGCGTGGAGTGGATCGACGTGGTGTGGAGGGCGGACGTGCGTG ACCATCACCGCAAGGACCGGCCACCATCGACGTGAAGATGATGAAC ATGGAGGCCACCGAGCTGGCCGTGGTGGGAGCTACTGTACGAGCCC AAGGTGAGCGACGTGACCACCGAGAGCCGGTCCCCACCATGGGCGAG GCCACAACCCCAAGGCCACCTACGCCGAGTACATCTGCAAGAAGGAC TTCGTGGACCGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGCTGTTTCGCAAGGGC AGCATCCAGACCTGCGCCAAGTTCGACTGCACCAAGAAGGCCGAGGGC CGGATCGTGCAGAAGGAGAAGTGCAGTTCGAGGTGGCCGTGTTTCATC CACGGCAGCACCGAGGCCAGCACCTACCACAACACAGCGCCAGCAG AGCCTGAAGCACGCCCGCCGGTTCGTGATCACCCCCAAGAGCCCGTG TACACCGCCGAGATGGAGGACTACGGCACCGTGACCCTGGAGTGCAG CCCCGAGCGGCGTGGACATGGGCCAGTTCACGTGTTACCATGAAC ACCAAGAGCTGGCTGGTGAACCGGACTGGTTCACGACCTGAACCTG CCCTGGACCGGCAGCAGCGCCGCACCTGGCAGAACAAGGAGACCTG ATCGAGTTCGAGGAGGCCACGCCACCAAGCAGAGCGTGGTGGCCCTG GCCAGCCAGGAGGGCGCCCTGCACGCCCTGGCCGGCCATCCCC GTGAAGTACAGCGCAGCAAGCTGGAGATGACCAGCGCCACCTGAAG TGCCGGGTGAAGATGCAGGGCTGAAGCTGAAGGGCATGACCTACCCC ATGTGCAGCAACACCTTCAGCCTGGTGAAGAACCCACCGACACCGGC CACGGCACCGTGGTGGAGCTGAGCTACGCCGGCACCAGCGCCCC TGCCGGGTGCCCATCAGCATGAGCGCCACCTGAACGACATGACCCCC GTGGCCGGCTGATCACCGTGAACCCCTACGTGAGCACCAGCAGCACC GGCCCAAGATCATGGTGGAGTGGAGCCCCCTTCGGCGACAGTTC ATCCTGGTGGCAGCGCAAGGGCCAGATCCGGTACCAGTGGCACCGG AGCGGCAGCACCATCGCAAGGCCTTACCAGCACCTGAAGGGCGCC CAGCGGATGGTGGCCCTGGGCGACACCGCTGGGACTTCGGCAGCGTG GGCGGCGTGCTGACCAGCATCGCAAGGGCATCCACCAGGTGTTTCGGC AGCGCCTTCAAGAGCCTGTTTCGGCGCATGAGCTGGATCACCAGGGC ATGCTGGGCGCCCTGCTGCTGTGGATGGGCTGAACGCCGGGACCGG AGCATCAGCATGACCTTCTGGCCGTGGGCGCATCCTGGTGTCTCTG GCCGTGAACGTGAACGCC
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

SEQ ID NO.8	MAWPPALRLLALGAWAICSHRGAALKLGNYNRVLATLNKTDVSDL LVIPTTAGSNGCVVRALDVGLMCQDDITYLCPKLEYGYEPEDIDWCN ETEIYIHYGRCTPSRHGRRSRRSVNVHHHGESLLEAKNTPWMDSTKAT KYLTKVENWALRNPYALAAIFIGWNLGTTTSQKIIFTIMLMLIAPAY SFSCLGMQNRDFVEGVNGVEWIDVVLEGGSCVTITAKDRPTIDVKMMN MEATELAVVRSYCYEPKVSVDVTESRCPTMGEAHNPKATYAEYICKKD FVDRGWNGCGLFGKGSIQTCAKFDCTKKAEGRIVQKENVQFEVAVFI HGSTEASTYHNYSAAQSLKHAARFVITPKSPVYTAEMEDYGTVTLCE PRSGVDMGQFYVFTMNTKSWLVNRDWFHDLNLPWTGSSAGTWQNKESL IEFEEAHATKQSVVALASQEGALHAALAGAI PVKYSKLEMTSGHLK CRVKMQGLKLGMTYPMCSNTFSLVKNPTDTGHGTVVVELSYAGTDGP CRVPISMSADLNDMTPVGRLLITVNPYVSTSSTGAKIMVEVEPPFGDSF ILVSGKGQIRYQWHRSGSTIGKAFSTLKGQRMVALGDTAWDFGSV GGVLTSIGKGIHQVFGSAFKSLFGGMSWITQGMLGALLWMGLNARDR SISMTFLAVGGILVFLAVNVNA
-------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0075] 实施例2:体外转录合成鸭坦布苏病毒核酸疫苗

[0076] 1. 获得线性化质粒模板

[0077] 将上述质粒pUC57-SP_prM_E进行单酶切,反应体系如下:

[0078] 表2:质粒单酶切反应体系

组分	体积/ μ l
Plasmid	40
BspQ1	10
BspQ1 buffer	10
RNase-free ddH ₂ O	Up to 100

[0080] 在50℃条件下孵育2小时,获得线性化质粒模板。

[0081] 2. 体外转录反应

[0082] 按照下表所示反应体系进行加帽或非加帽mRNA的体外转录:

[0083] (1) 加帽

[0084] 表3:加帽mRNA体外转录反应体系

组分	体积/ μ l
T7 RNA Polymerase (50 U/ μ l)	2
10 × Transcription Buffer	4
Pyrophosphatase, Inorganic (0.1 U/ μ l)	1
Murine RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1
CAP101	1.3
ATP/UTP/GTP/CTP(100mM each)	1.625 each
线性化模板 DNA	2.5
RNase-free ddH ₂ O	Up to 40

[0086] (2) 非加帽

[0087] 表4:非加帽mRNA体外转录反应体系

组分	体积/ μl
T7 RNA Polymerase (50 U/ μl)	2
10 \times Transcription Buffer	4
Pyrophosphatase, Inorganic (0.1 U/ μl)	1
[0088] Murine RNase Inhibitor (40 U/ μl)	1
ATP/UTP/GTP/CTP(100mM each)	1.625 each
线性化模板 DNA	2.5
RNase-free ddH ₂ O	Up to 40

[0089] 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后, 加入 1 μl DNaseI 和 2 μl DNaseI buffer, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15min 去除 DNA 模板。

[0090] 3. 产物纯化

[0091] 将 VAHTS RNA Clean Beads 提前 30 min 从 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 取出, 平衡至室温, 颠倒或旋涡振荡使磁珠充分混匀;

[0092] 根据原 RNA 溶液体积加入对应体积的 VAHTS RNA Clean Beads (RNA Clean Beads 体积 = 1.5 \times 原 RNA 溶液体积), 用移液器吹打十次以充分混匀;

[0093] 室温孵育 5 min, 使 RNA 结合到磁珠上。将样品置于磁力架 5 min, 待溶液澄清后, 小心移除上清;

[0094] 保持样品始终处于磁力架中, 加入 500 μl 新鲜配制的 80% 乙醇 (需用 Nuclease-free H₂O 配制) 漂洗磁珠, 注意不要吹散磁珠, 室温孵育 30 sec, 小心移除上清;

[0095] 重复上一步骤, 总计漂洗 2 次;

[0096] 保持样品始终处于磁力架中, 开盖空气干燥磁珠 5 - 10 min;

[0097] 将样品从磁力架上取出, 加入适量体积的 THE RNA Storage Solution, 用移液器吹打 10 次以充分混匀, 室温静置 5 min;

[0098] 将样品置于磁力架 5 min, 待溶液澄清后, 小心转移上清至一个新的 Nuclease-free 离心管中, 即为可用于制作疫苗的 mRNA。

[0099] 对合成的 mRNA 进行纯度和电泳检测, 按此方法合成的 DTMUV 加帽 mRNA 纯度为 98.2% (图 3), 没有出现聚体现象 (图 4)。

[0100] 实施例 3: 体外合成的鸭坦布苏病毒核酸疫苗在体外表达的验证

[0101] 将实施例 1 中获得的 50 μg 载体质粒转染进 HEK293T 细胞 (T75 培养瓶, 15 mL 培养基)。转染后 48 h 取细胞及上清样本, 提取蛋白并测定浓度。以 40 μg 总蛋白量进行上样, Western blot 检测蛋白表达。

[0102] Western blot 检测结果如图 5 所示, 目的蛋白的分子量为 54.4 kDa, 泳道中的样品依次为 marker、细胞样品、上清浓缩样品, 一抗为 E 蛋白抗体。左图为曝光 1-2s, 右图为曝光 5s。可以看出, 细胞和上清中均检测出 prM-E 融合蛋白, 并且为单一条带。这一结果表明, 本发明设计的抗原序列可以在 HEK293T 细胞中完整表达, 并且可以形成 VLP 释放到上清中, 和预期相符。

[0103] 实施例 4: 动物实验验证鸭坦布苏病毒核酸疫苗在体内的免疫效果

[0104] 本实施例中, 通过加帽和非加帽两种 mRNA 疫苗架构进行免疫实验。所使用 mRNA 疫苗均为实施例 2 制备。

[0105] 实验选用7日龄的雏鸭共15只,包含实验组10只,对照组5只。具体分组如表5所示。

[0106] 表5 免疫实验动物分组及处理方式

组别	疫苗	动物数量	免疫剂量	免疫程序
A	加帽DTMUV mRNA	5只	20 μ g (0.5mL) /只/次	Day 7 prime 肌注 Day 28 boost 肌注
B	非加帽DTMUV mRNA	5只	20 μ g (0.5mL) /只/次	Day 7 prime 肌注 Day 28 boost 肌注
C	对照	5只	-	-

[0107] 分别在第7天(免疫前)、第28天(加强免疫前)、第35天、第42天、第49天(攻毒前)对实验组和对照组进行采血,分离血清,检测免疫后中和抗体滴度。操作流程示意图如图6所示。

[0109] 实验样品命名方式:组别动物号/日龄/样品类型,例如:A1/D7/BA,指实验组A中No.1雏鸭,D7表示7日龄(Day7)采样,BA表示采血测中和抗体。

[0110] 检测结果如表6所示。

[0111] 表6 DTMUV核酸疫苗免疫鸭血清中和抗体效价

血清样本	中和效价	血清样本	中和效价	血清样本	中和效价	血清样本	中和效价	平均中和效价
A1/D28/BA	<1:4	A1/D35/BA	1:45	A1/D42/BA	1:45	A1/D49/BA	1:34	
A2/D28/BA	<1:4	A2/D35/BA	1:44	A2/D42/BA	1:40	A2/D49/BA	1:63	
A3/D28/BA	<1:4	A3/D35/BA	1:22	A3/D42/BA	1:17	A3/D49/BA	1:18	1:44.6
A4/D28/BA	<1:4	A4/D35/BA	1:53	A4/D42/BA	1:55	A4/D49/BA	1:53	
A5/D28/BA	<1:4	A5/D35/BA	1:44	A5/D42/BA	1:48	A5/D49/BA	1:55	
B1/D28/BA	<1:4	B1/D35/BA	1:18	B1/D42/BA	1:11	B1/D49/BA	1:8	
B2/D28/BA	<1:4	B2/D35/BA	1:23	B2/D42/BA	1:24	B2/D49/BA	1:12	
B3/D28/BA	<1:4	B3/D35/BA	1:5	B3/D42/BA	<1:4	B3/D49/BA	<1:4	1:8
B4/D28/BA	<1:4	B4/D35/BA	1:12	B4/D42/BA	1:13	B4/D49/BA	1:4	
B5/D28/BA	<1:4	B5/D35/BA	<1:4	B5/D42/BA	<1:4	B5/D49/BA	<1:4	
C1/D28/BA	<1:4	C1/D35/BA	<1:4	C1/D42/BA	<1:4	C1/D49/BA	<1:4	
C2/D28/BA	<1:4	C2/D35/BA	<1:4	C2/D42/BA	<1:4	C2/D49/BA	<1:4	
C3/D28/BA	<1:4	C3/D35/BA	<1:4	C3/D42/BA	<1:4	C3/D49/BA	<1:4	<1:4
C4/D28/BA	<1:4	C4/D35/BA	<1:4	C4/D42/BA	<1:4	C4/D49/BA	<1:4	
C5/D28/BA	<1:4	C5/D35/BA	<1:4	C5/D42/BA	<1:4	C5/D49/BA	<1:4	

[0112] 从中和抗体效价结果可以看出,使用本发明构建的mRNA疫苗都具有诱导鸭产生中和抗体的效果。二次免疫后,加帽的mRNA疫苗效果更佳,产生中和抗体的比例为100%,最低1:18、最高1:63,平均值为1:44.6;非加帽的mRNA疫苗效果较弱,产生中和抗体的比例为3/5,最低<1:4、最高1:12,平均值为1:8。

[0114] 和对照组相比,使用本发明构建的加帽mRNA疫苗能够诱导高滴度的中和抗体,并且在二次免疫之后能够持续检测到高滴度的中和抗体(图7)。

[0115] 实施例5:动物实验验证鸭坦布苏病毒核酸疫苗免疫后的病毒保护作用

[0116] 对照组和实验组在第49天,同时使用DTMUV强毒株(JS804, GeneBank ID: JF895923)进行攻毒实验。并在攻毒后48h采集血样,噬斑计数试验检测血液中病毒含量,计算攻毒保护率(表7),验证鸭坦布苏病毒核酸疫苗的保护作用。

[0117] 表7攻毒后血液中病毒含量统计

组别	编号	血液病毒含量 (PFU/ml)	病毒阳性率	保护率
A组	A1	0	0/5	100%
	A2	0		
	A3	0		
	A4	0		
	A5	0		
B组	B1	0	3/5	40%
	B2	0		
	B3	1000		
	B4	500		
	B5	33000		
C组	C1	3500	5/5	0%
	C2	1000		
	C3	15000		
	C4	11000		
	C5	10000		

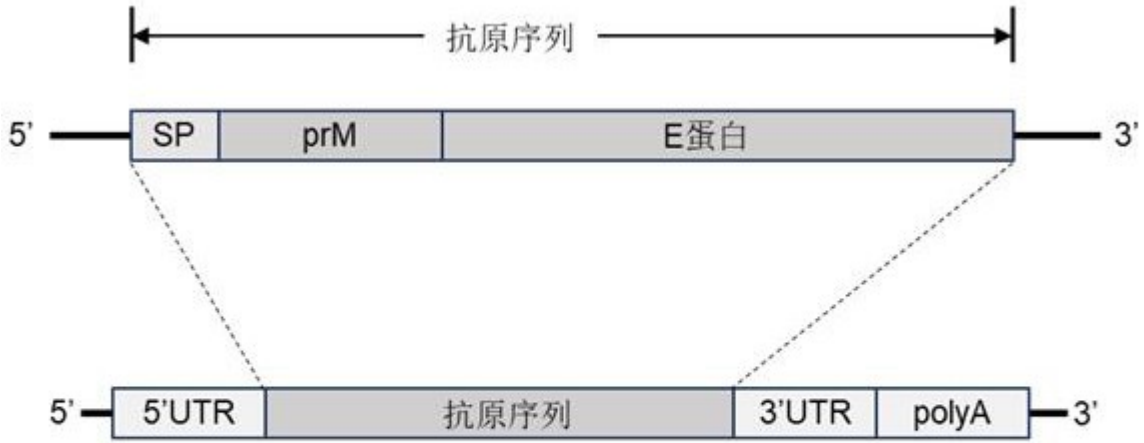
[0119] 如图8的统计结果显示,使用本发明构建的两种核酸疫苗均有保护作用,加帽mRNA疫苗保护作用更强,达到100%保护率;非加帽mRNA疫苗保护作用较弱,达到40%保护率。并且,经检测攻读后血液中的病毒含量,发现受到保护的个体细胞病毒均为阴性,证明该疫苗提供了有效的细胞免疫保护。

[0120] 这一结果和中和抗体滴度检测结果一致,说明通过本发明生产的疫苗能够成功诱导鸭产生鸭坦布苏病毒抗体,并提供高效的免疫保护,同时抑制感染后排毒。

[0121] 相较于公开号为CN106520710A的中国专利,其所述的重组新城疫病毒活载体鸭坦布苏疫苗,肌肉注射诱导的中和抗体滴度平均值为1:24。而基于本发明设计的核酸疫苗,肌肉注射后诱导的中和抗体滴度更高,约为重组活病毒疫苗的2倍。此外,重组活病毒疫苗在攻毒后不能有效抑制细胞排毒,感染后的鸭会持续感染其他健康个体,极为不利于整体防控。本发明所述的疫苗能激活细胞免疫,有效避免细胞持续排毒的问题和ADE带来的负面效果。

[0122] 综上所述,本发明提供了一项能够全面预防鸭坦布苏病毒病的核酸疫苗抗原设计及应用策略,不仅诱导的中和抗体滴度远高于当前所有的鸭坦布苏病毒疫苗,同时验证了基于本发明所生产的核酸疫苗能够成功激活细胞免疫,同时具备预防和治疗的功能,有效抑制病毒的继续传播。

[0123] 本发明通过上述实施例来说明本发明的工艺方法,但本发明并不局限于上述工艺步骤,即不意味着本发明必须依赖上述工艺步骤才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。



核酸疫苗架构

图1

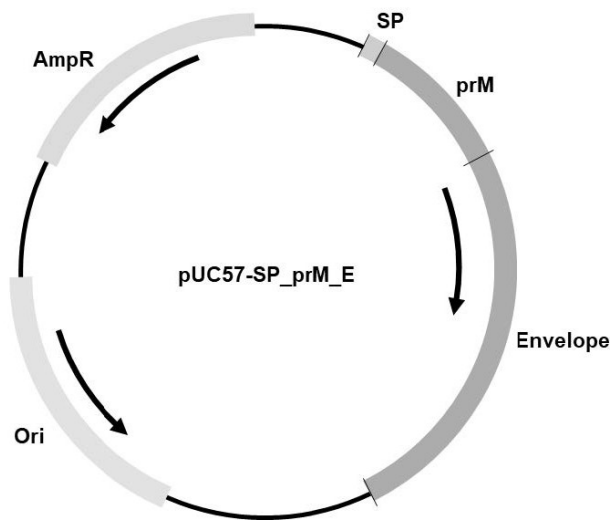
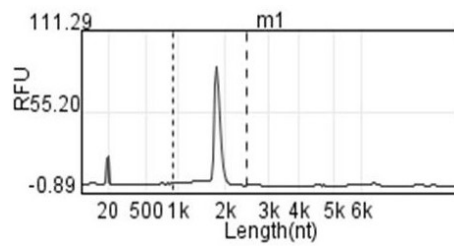


图 2



纯度: 92.8 %

图 3

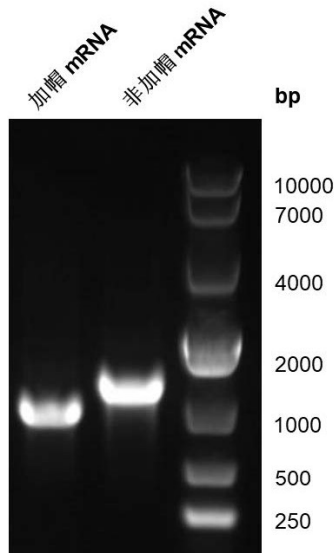


图 4

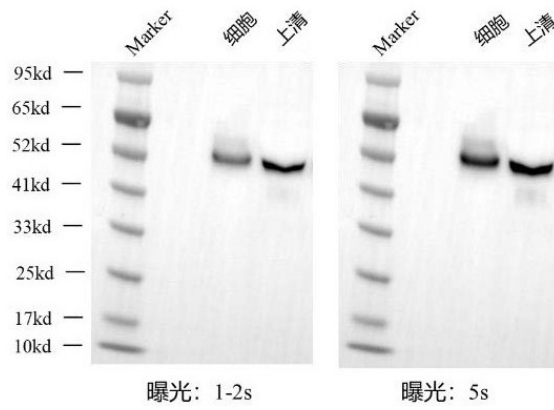


图 5

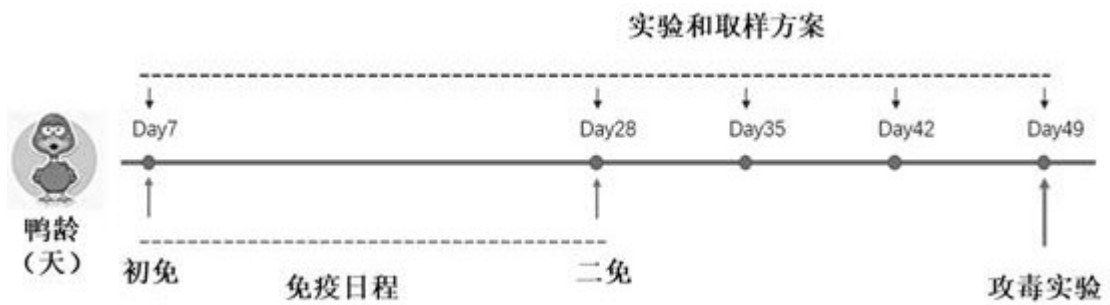


图 6

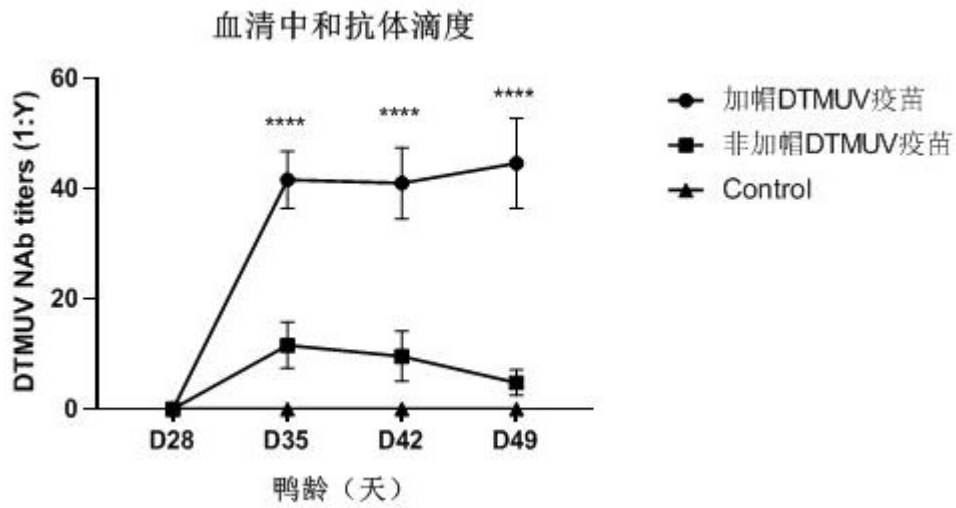


图 7

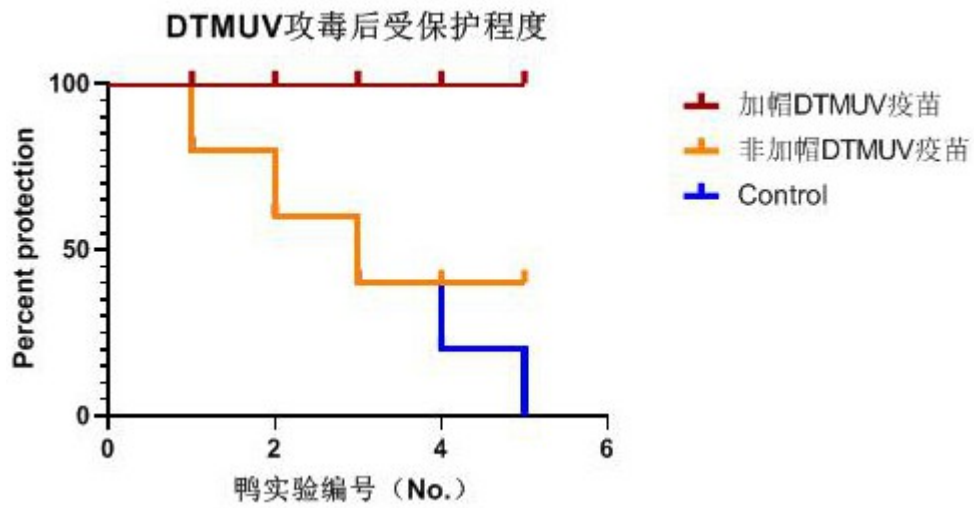


图 8