

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/34

C07K 14/01 A61K 39/12

C07K 16/08 C12N 15/86

G01N 33/569 C12Q 1/70



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01802989.2

[43] 公开日 2003 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 1437654A

[22] 申请日 2001.9.14 [21] 申请号 01802989.2

[30] 优先权

[32] 2000. 9. 15 [33] EP [31] 00203186.2

[86] 国际申请 PCT/EP01/10679 2001.9.14

[87] 国际公布 WO02/22664 英 2002.3.21

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.31

[71] 申请人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72] 发明人 J·M·弗拉克

M·C·W·范胡尔敦

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

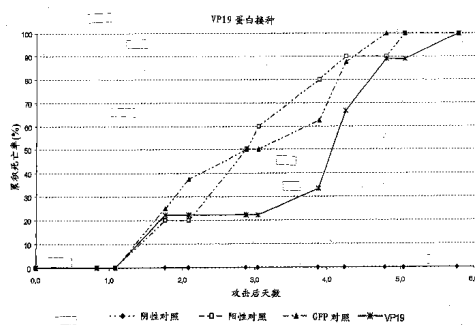
代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 18 页 序列表 4 页
附图 2 页

[54] 发明名称 虾白斑综合征病毒抗原蛋白及其用途

[57] 摘要

本发明涉及衍生自白斑综合征病毒的抗原蛋白，大小约为 19kDa (VP19) 或 13Kda (13)；这些蛋白在疫苗中的应用；和以这些蛋白为基础的疫苗。此外，本发明涉及针对这些蛋白的抗体和抗体在疫苗中的应用；编码这些蛋白的核酸序列及其在疫苗中的应用。本发明还涉及所述蛋白在生产用于预防和/或治疗甲壳类动物中白斑综合征的疫苗中的用途；载体疫苗；和包含所述核酸或抗体的诊断试剂盒。



ISSN 1008-4274

1. 适合免疫甲壳类动物对抗 WSSV 的 WSSV 抗原蛋白，或所述抗原蛋白的免疫原性片段，其特征在于所述抗原蛋白具有与如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列至少 70% 同源的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 的抗原蛋白，或所述抗原蛋白的免疫原性片段，其特征在于其具有与如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列至少 80%，优选 90%，更优选 95% 同源的序列。
3. 能保护虾免受 WSSV 感染的疫苗，其特征在于所述疫苗包含根据权利要求 1 或 2 的蛋白或其免疫原性片段，和药学可接受载体。
4. 编码根据权利要求 1 或 2 的抗原蛋白，或所述蛋白的免疫原性片段的核酸序列。
5. 根据权利要求 4 的核酸序列，其特征在于所述核酸序列包含如 SEQ ID NO 1 或 SEQ ID NO 3 所示的序列。
6. 用于预防或治疗甲壳类动物中白斑综合征的载体疫苗，其特征在于所述疫苗包含活的减毒细菌或活的减毒病毒，所述细菌或病毒在其基因组中包含根据权利要求 4 或 5 的异源核酸序列。
7. 根据权利要求 1 或 2 的抗原蛋白用于疫苗。
8. 根据权利要求 1 或 2 的抗原蛋白在生产对抗 WSSV 感染的疫苗中的用途。
9. 针对根据权利要求 1 或 2 的蛋白产生的抗体。
10. 包含药学可接受载体和至少一种根据权利要求 9 的抗体的疫苗。
11. 包含药学可接受载体和根据权利要求 4 或 5 的核酸序列的疫苗。
12. 检测 WSSV 的诊断试剂盒，其特征在于所述试剂盒包含与如 SEQ ID NO: 1 或 3 所示核酸序列至少 70% 同源的核酸序列，或与该

核酸序列互补的核苷酸序列，或其片段，片段长度为至少 12，优选 15，更优选 18 个核苷酸；根据权利要求 1 或 2 的抗原蛋白，或其免疫原性片段；或根据权利要求 9 的抗体。

虾白斑综合征病毒抗原蛋白及其用途

本发明涉及从白斑综合征病毒中获得的抗原蛋白、这些蛋白在疫苗中的应用、以这些蛋白为基础的疫苗、抗这些蛋白的抗体、这些抗体在疫苗中的应用、编码它们的核酸序列以及所述蛋白在生产预防和/或治疗甲壳类动物白斑综合征疫苗中的用途；本发明还涉及载体疫苗和诊断试剂盒。

白斑综合征病毒 (WSSV) 是遍及世界的虾中的一种主要的病毒性疾病。该病毒在甲壳类动物中具有广泛的宿主范围 (Flegel, 1997), 同时各分离株之间几乎没有遗传变异 (Lo 等, 1999)。电子显微镜 (EM) 研究显示该病毒体有被膜, 外形为杆状到子弹形, 长约 275nm, 宽约 120nm, 在一端有一尾状附器。核壳, 即病毒失去被膜后, 具有网格状外观, 大小约 300nmx70nm (Wongteerasupaya 等, 1995)。此种病毒体形态、其核定位及其形态发生使人联想起昆虫中的杆状病毒 (Durand 等, 1997)。最初, WSSV 被分类为杆状病毒科中的未指定成员 (Francki 等, 1991), 因此该病毒曾被称为系统性外胚层中胚层杆状病毒 (SEMBV) 或白斑杆状病毒 (WSBV)。现在由于缺乏分子信息, WSSV 不再被纳入此科 (Murphy 等, 1995)。从限制性内切核酸酶分析得知, 其双股病毒 DNA 大小远远超过 200kb (Yang 等, 1997)。

在养殖的虾中 WSSV 的爆发流行引起虾大量死亡。该疾病的特征是虾的头胸甲、附器和外皮出现白斑, 肝胰脏颜色变红。受感染的虾显示出昏睡的征象和食物消耗的迅速减少, 3 至 5 天之内, 这些虾就会死亡。一次 WSSV 的爆发流行导致虾养殖业的重大损失, 因而非常需要一种疫苗能保护虾免受 WSSV 感染。对能用于这样的疫苗的主要的 WSSV 蛋白的鉴别和表征会提供开发此疫苗的方法。

已经分离并鉴定了 vp19 和 vp13 两个基因，分别编码蛋白 VP13 (13kDa) 和 VP19 (19kDa)，命名是根据它们在考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶上的迁移率估计出的分子量。VP19 是一种包膜蛋白，而 VP13 是一种核壳蛋白。Vp19 的开放阅读框架含有 366 个核苷酸，如 SEQ ID NO1 所示，以及推导出的由 121 个氨基酸组成的氨基酸序列（另如 SEQ ID NO2 所示）。Vp13 的开放阅读框架含有至少 186 个核苷酸，如 SEQ ID NO3 所示。此 ORF 编码一种核壳蛋白 VP13，含有如 SEQ ID NO4 所示的氨基酸序列。已发现 VP13 的两个变体，其中之一的氨基酸序列如 SEQ ID NO4 所示，而长一些的变异体的氨基酸序列如 SEQ ID NO5 所示。本发明提供一种方法制备重组疫苗以保护甲壳类动物免受 WSSV 的感染。已经鉴别并表征的 WSSV 的包膜蛋白 VP19 和核壳蛋白 VP13 被发现适合用于生产亚单位疫苗以保护甲壳类动物免受 WSSV 的感染。本发明的核苷酸序列的克隆和表征提供利用重组技术生产这些 WSSV 蛋白。这样就能得到 WSSV 蛋白，而基本上不含有其他 WSSV 蛋白。该分离的 WSSV 蛋白能用于生产亚单位疫苗以保护甲壳类动物免受 WSSV 的感染。

本发明的蛋白在标记疫苗中特别有用。此疫苗可含有例如，仅 VP13 和/或 VP19。

或者，编码 WSSV 蛋白的核苷酸序列能用于生产载体疫苗以保护甲壳类动物免受 WSSV 的感染。

此外，本发明的核苷酸序列能用于诊断目的，如检测水域内 WSSV 的存在。

另外，本发明的 WSSV 蛋白能用于制备 WSSV 特异性抗体。这些抗体能用于生产 WSSV 疫苗，用于对甲壳类动物的被动免疫。这些抗体还能用于诊断目的，如检测甲壳类动物或水域中的 WSSV。

因此，本发明的首要的实施方案是提供一种 WSSV 的抗原蛋白，其适合免疫甲壳类动物以对抗 WSSV，该蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列以及

所述蛋白的免疫原性片段至少 70%同源。

以优选形式，该实施方案涉及这样的 WSSV 蛋白，其序列与如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列以及所述蛋白的免疫原性片段至少 80%同源，优选 90%同源，更优选 95%同源。

更优选同源程度达 98%，或甚至 100%。

蛋白质同源程度可用计算机程序“BLAST 2 SEQUENCES”确定，通过选择亚程序：“BLASTP”，其可从以下网址找到：
www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html。

此程序的一项参考文献是 Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS 微生物通讯 (FEMS Microbiol. Letters) 174: 247-250 (1999)。所用模型：“blosum62”，所用参数为默认参数：

开放间隙：11，延伸间隙：1，间隙 x₋下降值：50。

可以理解，对于此处包括的特定蛋白，在各 WSSV 株之间可存在自然变异体。这些变异可显示为全部序列中的氨基酸差异或所述序列中的氨基酸的缺失、置换、插入、倒置或添加。氨基酸的置换基本上不会改变生物学和免疫学活性，例如已由 Neurath 等在“The Proteins” Academic Press New York (1979) 中所述。相关氨基酸之间的替代或在进化中频繁发生的替代，特别是 Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (参见 Dayhof, M.D., 蛋白质序列和结构图谱 (Atlas of protein sequence and structure), Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3)。其他氨基酸的置换包括 Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val 和 Ala/Glu。基于此信息，Lipman 和 Pearson 建立了一种比较蛋白质的快速而敏感的方法 (科学 (Science), 227, 1435-1441, 1985)，并确定同源蛋白之间的功能

相似性。本发明实施方案中的此类氨基酸置换，以及具有缺失和/或插入的变异体，只要其结果蛋白的抗原性或免疫原性特性基本上不受影响，都在本发明范围之内。

这就解释了为什么根据本发明的 WSSV 蛋白，当分离自不同区域分离株时，会有约 70% 的同源程度，而仍旧代表同样的蛋白，具有同样的免疫学特征。

根据本发明，那些特定蛋白氨基酸序列的变异，其仍旧提供一种能诱导对 WSSV 感染或至少对该感染的临床表现的免疫反应的蛋白，被认为是“基本上不影响所述蛋白的抗原性或免疫原性特性”。

当一种蛋白用作例如疫苗目的或使抗体产生，其实并不必要使用完整的蛋白。也有可能使用该蛋白的一个片段，单独或偶联至一个载体，例如 KLH，其有能力诱导对该蛋白的免疫反应，即所谓免疫原性片段。一个“免疫原性片段”被理解为全长蛋白的一个片段，其仍旧保持在脊椎动物宿主体内诱导免疫反应的能力，即包含 B-或 T-细胞表位。脊椎动物宿主体内产生的抗体非常适合于作为虾的被动接种方式。现在，有多种技术可以容易地鉴定编码抗原片段（决定子）的 DNA 片段。由 Geysen 等人描述的方法（专利申请 WO 84/03564，专利申请 WO 86/06487，美国专利号 4, 833, 092，美国国家科学院院报（Proc. Natl Acad. Sci.）81: 3998-4002（1984），免疫学方法杂志（J. Imm. Meth.）102, 259-274（1987）），即所谓 PEPSCAN 方法是一种易于实施，快速而行之有效的检测表位的方法；蛋白的免疫学关键的区域。该方法的使用遍及世界，在本领域广为人知。这一（经验性的）方法特别适合于检测 B-细胞表位。另外，如果给出编码任何蛋白的基因序列，计算机程序就能在其序列和/或结构与现在已知的表位之间的吻合程度的基础之上，指定特定的蛋白片段作为免疫学关键的表位。这些区域的确定是基于结合根据 Hopp 和 Woods 所述的亲水性标准（美国国家科学院院报（Proc. Natl Acad. Sci.）78: 3824-3828（1981）），和按照 Chou 和 Fasman 所述的二级结构方面（酶学进展（Advances in

Enzymology) 47: 45-148 (1987) 和美国专利 4, 554, 101)。同样地, T-细胞表位能在 Berzofsky 两亲性标准的帮助下通过计算机从序列推测(科学(Science) 235, 1059-1062 (1987) 和美国专利申请 NTIS US 07/005, 885)。简缩的概述见: Shan Lu 关于通用原则: Tibtech 9: 238-242 (1991), Good 等关于疟疾表位: 科学(Science) 235: 1059-1062 (1987), Lu 的综述: 疫苗(Vaccine) 10: 3-7 (1992), Berzowsky 关于 HIV-表位: FASEB 杂志(The FASEB Journal 5: 2412-2418 (1991))。

本发明的另一个实施方案涉及能保护虾免受 WSSV 感染的疫苗, 其含有能与上述根据本发明的蛋白或免疫原性片段反应的抗体, 以及一种药学可接受的载体。

本发明的另一个实施方案涉及能保护虾免受 WSSV 感染的疫苗, 其含有上述根据本发明的蛋白或其免疫原性片段, 以及一种药学可接受的载体。

本发明的另一个实施方案涉及编码根据本发明的抗原蛋白或其免疫原性片段的核酸序列。本发明的此实施方案更特别涉及编码含有如 SEQ ID NO. 2、4 或 5 所示氨基酸序列的抗原蛋白或其免疫原性片段的核酸序列。

优选核酸序列具有或含有如 SEQ ID NO 1 或 3 所示的序列。各核苷酸序列始于 ATG 密码子, 编码推出的氨基酸序列的第一个 M 残基, 直到编码 C-末端氨基酸残基的密码子。必须明白, 为了本发明的目的, 具有与如 SEQ ID NO1 或 SEQ ID NO 3 所示序列同源的序列的核酸序列也在本发明范围之内。实现本发明目的的序列同源性被认为至少是 70%, 优选 75%, 更优选 80%, 甚至更优选 85%。高度优选与如 SEQ ID NO1 或 SEQ ID NO 3 所示序列至少 90%同源, 更优选 95%的核酸序列。

同源性达 98%或甚至 100%则更优选。

为实现本发明的目的，序列同源性通过比较所感兴趣的核苷酸序列与如 SEQ ID NO1 或 3 所示序列的相应部分来确定。为实现本发明的目的，序列同源性的百分比定义为被比较序列间相同核苷酸的百分比。

核苷酸同源性程度可用计算机程序“BLAST 2 SEQUENCES”确定，通过选择亚程序：“BLASTN”，其可从以下网址找到：
www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html。

此程序的一项参考文献是 Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS 微生物通讯 (FEMS Microbiol. Letters) 174: 247-250 (1999)。所用参数为默认参数：匹配赏：+1，失配罚：-2。开放间隙：5，延伸间隙：2，间隙 x_下降值：50。

根据本发明具有序列同源性的核酸序列可用如 SEQ ID NO 1 或 3 所示序列之一，或用此序列的片段，用常规克隆和杂交技术从密切相关的 WSSV 株中容易地分离。为实现此目的，杂交在严格的，优选高度严格的条件下进行。严格的杂交条件理解为洗脱条件为 1 ×SSC，0.1%SDS，在 65°C 下；高度严格的条件指洗脱条件中，SSC 的浓度减低至 0.3 ×SSC。为了需要排除错认的碱基，该特定信息不应被如此狭窄地诠释。在此公开的特异性的序列能易于用来从其他株中分离同源的核苷酸序列。

与如 SEQ ID NO 1 或 3 所示序列之一具有序列同源性的核酸序列编码具有与如 SEQ ID No.2、4 或 5 所示氨基酸序列之一相比包含变更的氨基酸序列的蛋白，其中所述变更基本上不影响所述蛋白的抗原性或免疫原特性。

根据本发明的 WSSV 蛋白能通过标准的生物化学分离和纯化方法获得，或通过普通的重组技术制备。根据本发明的核苷酸序列特别适用于 WSSV 蛋白的重组生产，产物基本上不含其他 WSSV 蛋白。

该核苷酸序列被引入一个能表达蛋白的适合的表达载体，用所述表达载体转染适合的宿主细胞，在适合的介质中培养宿主细胞。适合的表达载体特别是质粒、粘粒、病毒和 YAC（酵母人工染色体），其包含对于复制和表达必要的控制区域。表达载体能在宿主细胞内进行表达。适合的宿主细胞是，例如，细菌、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。这样的表达技术在本领域广为人知（Sambrook 等，分子克隆：实验室指南（*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*），Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989；King and Possee, 1992）。

另外，根据本发明的核酸序列能用于生产载体疫苗以接种甲壳类动物对抗 WSSV 感染。载体疫苗被理解为是这样一种疫苗，其中活的、减毒的细菌或病毒经过修饰，以致其含有插入其遗传物质中的一或多个异源性的核苷酸序列。这些所谓的载体细菌或病毒能共表达插入序列编码的异源性蛋白。因此，在第四方面，本发明提供一种用于预防或治疗甲壳类动物中白斑综合征的载体疫苗，该疫苗含有活的减毒细菌或病毒和药学可接受的载体，其中所述细菌或病毒经过修饰从而在其遗传物质中含有一或多个本发明的核苷酸序列。用此 LRCs 感染的虾会产生免疫反应，不仅针对载体的免疫原，而且针对其遗传密码又克隆至 LRC 内的蛋白的免疫原性部分。

作为细菌 LRC 的一个例子，如鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 之类在本领域已知的细菌很吸引人使用。（Singer, J.T. 等，海洋生物技术的新发展（*New Developments in Marine Biotechnology*），p. 303-306, Eds. Le Gal and Halvorson, Plenum Press, New York, 1998）。

LRC 还可用作转运核酸序列到靶细胞中的一种途径。适合此任务的病毒是，例如黄头病毒和鳃相关病毒，两者均属于冠状病毒科。（参见例如 Spann, K.M. 等，*Dis Aquat. Org.* 42: 221-225（2000），和 Cowley, J.A. 等，*Dis Aquat. Org.* 36: 153-157（1999）关于病毒，或 Enjuanes, L. 等，p. 28-31 of the Proceedings of the ESVV, Brescia,

Italia, 27-30 August 2000 关于活的重组载体冠状病毒)。

体内同源重组的技术, 在本领域广为人知, 能用于将重组核酸序列引入所选细菌或病毒的基因组, 能诱导根据本发明的插入核酸序列在宿主动物中的表达。

另一种可供选择的有效的接种方法是直接用编码有关抗原的 DNA 接种。用编码蛋白的 DNA 直接接种在许多不同蛋白中取得成功。(综述于如 Donnelly 等, *The Immunologist* 2: 20-26 (1993))。这种接种的方法对于接种虾免受 WSSV 感染是有吸引力的。因此, 本发明的另一个实施方案涉及疫苗, 其含有药学可接受载体和编码根据本发明的蛋白的核酸序列或其免疫原性片段, 或包含该核酸序列的 DNA 片段, 例如质粒。

本发明的另一个实施方案涉及将根据本发明的蛋白用于疫苗。

本发明的再一个实施方案涉及根据本发明的蛋白在生产用于对抗 WSSV 感染的疫苗中的用途。

根据本发明的疫苗能用于保护甲壳类动物, 如虾, 包括但不限于对虾科 (Penaeidae family) 的成员, 例如 *P.monodon*、*P.vannamei*、*P.chinensis*、墨吉对虾 (*P.merguensis*) 或 *Metapeaeus* spp.; 游泳虾类, 包括但不限于长臂虾科 (Palaemonidae family) 的成员, 例如沼虾属 (*Macrobrachium* spp.)、长臂虾属 (*Palaemon* spp.)、; 龙虾, 包括但不限于龙虾科 (Palinuridae family) 和海螯虾科 (*Nephropidae* family) 的成员, 例如 *Calinectes* spp.、龙虾属 (*Palinurus* spp.)、龙虾属 (*Panuliris* spp.)、螯龙虾属 (*Homarus* spp.); 淡水螯虾, 包括但不限于螯虾科 (*Astacidae* family) 的成员, 其例子是螯虾属 (*Astacus* spp.)、*Procambarus* spp.、和 *Oronectes* spp.; 和蟹, 包括但不限于黄

道蟹科 (Cancridae family)和梭子蟹科 (Portuidae family) 的成员, 其例子是黄道蟹属 (Cancer spp.)、蓝泳蟹属 (Callinectes spp.)、Carcinus spp.、和梭子蟹属 (Portunus spp.)。

根据本发明的疫苗能用本领域技术人员熟知的技术和如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th 版 (1990), eds. A.R. Gennaro 等, 第 72 章, pp. 1389-1404, Philadelphia College of Pharmacy and Science 中描述的技术制备。

根据本发明的疫苗含有有效量的根据本发明的一或多种蛋白、载体细菌或病毒和药学可接受载体。此处所用的术语“有效”定义为其量足够诱导甲壳类动物的保护性反应。载体或蛋白的量取决于载体或蛋白的类型、给药途径、给药时间、接种物种以及年龄、一般健康状况、温度和饮食。

总的说来, 每只动物可用 0.01 至 1000 μ g 蛋白的剂量, 优选 0.5 至 500 μ g, 更优选每只动物 1 至 100 μ g 蛋白。若是病毒载体疫苗, 总的说来, 使用每只动物 10^3 至 10^8 pfu (噬菌斑形成单位) 的剂量可非常有效。细菌载体疫苗可按 10^3 至 10^8 个细菌的剂量有效给予。

对于 DNA 接种, DNA 的量在 0.1 和 10 μ g DNA 之间/每只动物是非常适用的剂量。

适合用于根据本发明疫苗的药学可接受载体是无菌的和生理相容的, 例如无菌水、生理盐水、含水缓冲液如碱金属磷酸盐(如 PBS)、醇类、多羟基化合物类等等。另外根据本发明的疫苗可含有其他添加剂, 如辅助剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂和其他。

适合的辅助剂包括但不限于铝盐或凝胶、卡波姆、非离子嵌断共聚物、生育酚、单磷脂脂 A、胞壁酰二肽、油乳浊液、葡聚糖、细胞因子、皂苷类如 Quil A, 以及诸如此类。加入辅助剂的量取决于辅助剂本身的性质。

适合用于根据本发明疫苗的稳定剂包括但不限于碳水化合物(如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、糊精和葡萄糖)、蛋白质(如白蛋白或酪蛋白)和缓冲液(像碱性磷酸盐)。

适合的防腐剂特别包括乙基汞硫代水杨酸钠和硫柳汞。

根据本发明的疫苗可通过注射、浸渍、浸泡、喷雾或气雾剂、或经口服给药。优选疫苗通过浸渍或口服对甲壳类动物给药，尤其对于商业化的水产养殖场。

为了口服给药，疫苗优选与适合口服给药的载体混合，即纤维素、食物或可代谢物质（如 α -纤维素）或各种来源于植物或动物的油类。特别优选用于口服递送根据本发明的疫苗的食物载体是能包裹疫苗的活饲生物。获得此目的的一个非常适合的途径是用例如昆虫细胞（根据本发明的蛋白在其中表达）来喂养活饲生物。适合的活饲生物包括但不限于类似浮游生物的非选择性滤食动物，优选轮形动物成员，*Artemia* 等等。高度优选海水虾 *Artemia* 属。

使用本领域从业者可用的普通技术可将根据本发明的蛋白用于抗体的产生。优选该蛋白用于产生特异性单克隆抗体。根据本发明的抗体能按照标准技术制备。用蛋白免疫动物（如小鼠）的方法以及筛选产生蛋白特异性单克隆抗体的杂交瘤的方法在本领域广为人知（参见，例如 Cligan 等（eds），免疫学当前的方案（*Current protocols in Immunology*）1992；Kohler 和 Milstein，自然（*Nature*）256, pp. 495-497, 1975；Steenbakkers 等，分子生物学报告（*Mol. Biol. Rep.*）19, pp. 125-134, 1994）。获得的抗体可在诊断学中应用，以检测水域中的 WSSV 或检测甲壳类动物中 WSSV 的存在。根据本发明的核苷酸序列也适用于诊断学。所述序列或其片段能用在如 PCR 技术中，以检测水域，或甲壳类动物中 WSSV 的存在。

检测 WSSV 的诊断性试验是，例如基于从所要测试动物分离的 DNA 与特异性探针的反应，或者是例如 PCR 试验，该试验基于根据本发明蛋白的编码序列，或基于与那些编码序列互补的核酸序列。如果对于根据本发明的 WSSV 蛋白特异性的核酸分子存在于该动物，这些核酸分子会，例如与特异性的 PCR 引物特异性地结合，随后在 PCR

反应中被扩增。该 PCR 反应产物继而可容易地在 DNA 凝胶电泳中检出。PCR 反应在本领域广为人知（参见下面参考文献）。核酸分子最容易从所要测试动物的肝胰脏中分离。标准的 PCR 教科书给出了方法以确定与根据本发明的蛋白特异性的核酸分子进行的选择性的 PCR 反应中所用引物的长度。经常使用含有至少 12 个核苷酸的核苷酸序列的引物，但含超过 15 个核苷酸，更优选 18 个核苷酸的引物更有选择性。尤其是长度至少 20 个核苷酸，优选至少 30 个核苷酸的引物是非常通用的。PCR 技术被广泛描述于（Dieffenbach & Drexler; PCR 引物，实验室指南（PCR primers, a laboratory manual.）ISBN 0-87969-447-5（1995））。

因此编码根据本发明 WSSV 蛋白的核酸分子或那些核酸分子的部分结构也是本发明的一部分，这些核酸分子部分的长度至少为 12、优选 15、更优选 18、甚至更优选 20、22、25、30、35 或 40 个核苷酸（按照上述优选次序），其中核酸分子或其部分与如 SEQ ID NO: 1 或 3 所示的核酸序列，或与如 SEQ ID NO: 1 或 3 所示的核酸序列互补的核酸序列有至少 70% 的同源性。这样的核酸分子能，例如用作 PCR 反应中的引物，以提高编码根据本发明蛋白的核酸的量。这使得特异性核苷酸序列的快速扩增作为诊断工具，用于例如如上指出的检测组织中的 WSSV。

另一项以核酸为基础的试验是基于用放射性标记或颜色标记的蛋白特异性的 cDNA 片段进行的经典杂交。PCR 反应和杂交反应均在本领域广为人知，例如描述于 Maniatis/Sambrook（Sambrook, J. 等，分子克隆：实验室指南（Molecular cloning: a laboratory manual.）ISBN 0-87969-309-6）。

因此，本发明的另一个实施方案涉及一种用于检测 WSSV 的诊断试剂盒，其中，试验含有与如 SEQ ID NO: 1 或 3 所示的核酸序列至少 70% 同源的核酸序列，或与该核酸序列互补的核苷酸序列，或其片

段，长度为至少 12、优选 15、更优选 18 个核苷酸。

基于检测 WSSV 蛋白的抗原物质因而适合于检测 WSSV 感染的诊断试验也可以是，例如标准的夹心式（三明治）-ELISA 试验。在此试验的一个例子中，ELISA 板孔的壁用针对根据本发明蛋白或其免疫原性片段的抗体包被，与待测物质共温育后，将标记的抗-WSSV 抗体加入孔中。继而一种呈色反应显示源自 WSSV 的抗原物质的存在。

因此，本发明的另一个实施方案涉及检测 WSSV 的诊断试验，其特征在于所述试验包含对抗根据本发明蛋白或其免疫原性片段的抗体。

因此，在另一方面，本发明提供一种诊断试剂盒，它包含根据本发明的一或多个核苷酸序列或抗体。针对根据本发明蛋白产生的抗体能进一步用于生产抗体疫苗，对甲壳类动物作被动免疫。因此，在进一个方面，本发明提供用于对抗 WSSV 的被动免疫的疫苗，其中疫苗含有针对包含如 SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 或 SEQ ID NO 5 所示氨基酸序列的蛋白产生的抗体。如上所述，这样一种疫苗能用标准技术制备。优选制备口服给药的抗体疫苗，其中抗体与一种可食用的载体如鱼食混合。更优选，疫苗由在鸡蛋中制备的抗体（IgY 抗体）制备。

大规模生产根据本发明的抗体的方法在本领域也是熟知的。此类方法依赖在丝状噬菌体中克隆编码根据本发明的蛋白的遗传信息（的片段），作噬菌体展示。此类技术在 <http://aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html> 中“丝状噬菌体展示”下的“抗体工程页”和由 Cortese, R.等，（1994）在生物技术趋势（Trends Biotechn.）12: 262-267, Clackson, T. & Wells, J.A.（1994）在生物技术趋势（Trends Biotechn.）12: 173-183, Marks, J.D.等，（1992）在生物化学杂志（J. Biol. Chem.）267: 16007-16010,

Winter, G. 等, (1994) 在免疫学年鉴 (Annu. Rev. Immunol.) 12: 433-455, 以及 Little, M. 等 (1994) 在生物技术进展 (Biotechn. Adv.) 12: 539-555 发表的综述文章中 (缺席) 描述。随后用噬菌体筛选表达 camelid 重链抗体的 camelid 表达文库。 (Muyldermans, S. 和 Lauwereys, M., Journ. 分子识别 (Molec. Recogn.) 12: 131-140 (1999) 和 Ghahroudi, M.A. 等, FEBS 通讯 (FEBS Letters) 414: 512-526 (1997))。来自表达所需抗体文库的细胞被复制, 随后用于抗体的大规模表达。

参考文献

Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., 和 Bonami, J. R. (1997). 白斑综合征杆状病毒 (WSSV) 的超微结构和形态发生 (Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV).) 水生生物疾病 (Diseases Aquat. Organisms) 29, 205-211.

Flegel, T. W. (1997). 泰国黑虎对虾 (*Penaeus monodon*) 的主要病毒疾病 (Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand.) 世界微生物生物技术杂志 (World J. Microbiol. Biotechnol.) 13, 433-442.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., 和 Brown, F. (1991). “病毒的分类和命名: 病毒分类学国际委员会第五次报告” (“Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses”). Springer-Verlag, New York.

Lo, C. F., Hsu, H. C., Tsai, M. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Kou, G. H., 和 Lightner, D. V. (1999). 不同地域虾白斑综合征病毒临床样本的特异性基因组片段分析 (Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome

virus.) 水生生物疾病 (Diseases Aquat. Organisms.) .

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A.,和 Summers, M. D. (1995). “病毒的分类和命名: 病毒分类学国际委员会第六次报告” (“Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.”) .病毒分类学 (Virus Taxonomy) Springer-Verlag, New York.

Sambrook, J., Fritsch, E. F.,和 Maniatis, T. (1989). “分子克隆: 实验室指南” (“Molecular Cloning: A laboratory Manual.”) 2 ed. 冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory) , New York

Wontearasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B.,和 Flegel, T. W. (1995). 发生在外胚层和中胚层起源的细胞中, 并引起黑虎对虾(*Penaeus monodon*)高死亡率的无包含体系统性杆状病毒 (A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*) . 水生生物疾病 (Diseases Aquat. Organisms) 21, 69-77.

Yang, F., Wang, W., Chen, R. Z.,和 Xu, X. (1997). 一种纯化对虾杆状病毒 DNA 的简便有效的方法 (A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA.) 病毒方法学杂志 (J. Virol. Meth.) 67, 1-4.

实施例

实施例 1

用 WSSV 蛋白 VP19 接种 *Penaeus monodon*.

病毒原种的产生

在螯虾 *Procambarus clarkii* 中通过肌肉注射纯化的 WSSV 产生 WSSV 病毒原种。为了确定导致黑虎虾 *P. monodon* 90-100% 死亡率的稀释度，用大约 1 克重的动物进行体内的病毒滴定。在 330mM NaCl 中按步骤稀释病毒原种，从 1×10^5 至 5×10^{11} 倍，对每一稀释度，取 10 μ l 肌肉注射至 10 只虾。用 330mM NaCl 注射的虾，作为感染的阴性对照。所有作为阴性对照的虾（未显示）和那些接受了 5×10^{11} 病毒稀释度的虾存活，而在所有用较低病毒稀释度注射的组中都出现病毒感染引起的死亡。给予 1×10^5 和 1×10^7 病毒稀释度，结果是在 20 天内几乎 100% 的死亡率。当用 1×10^8 和 5×10^9 的病毒稀释度时，观察到死亡的延迟。 1×10^8 稀释度导致 90% 最终死亡率，但死亡时间延迟，历经 40 天。用 1×10^7 、 1×10^8 和 5×10^9 稀释度重复实验，产生相同的结果。选择 1×10^8 稀释度作为下一步实验的病毒剂量，因为预计这一条件在降低死亡率方面会对中和作用产生最佳反应。

WSSV 蛋白 VP19 和 VP13 在昆虫细胞中的表达

用杆状病毒载体在昆虫细胞中表达 VP19 和 VP13 ORF。用 Bac-to-Bac 体系 (GIBCO BRL) 在昆虫细胞中从杆状病毒多角体蛋白启动子生成重组杆状病毒 (AcMNPV)，表达推定的 WSSV 病毒体蛋白 VP19 和 VP13。从 p10 启动子产生重组病毒，表达绿色荧光蛋白 (GFP)，从杆状病毒多角体蛋白启动子产生各个 WSSV 蛋白。

用 AcMNPV-WSSVvp19，和 AcMNPV-WSSVvp13 感染 Sf21 昆虫细胞，MOI 为 5，感染后 72 小时收集细胞。在 15% SDS-PAGE 凝胶中分析受感染 Sf21 细胞的提取液 (图 1)。可观察到 VP13 的清晰的表达产物 (图 1，泳道 5，此处标为 VP15)，其具有与其在 WSSV

病毒体中真正的相应物（图 1，泳道 2）相同的电泳迁移率。可观察到 VP19 的表达产物（不太清晰，但清楚可见）（图 1，泳道 3）。因此，用针对纯化 WSSV 产生的多克隆抗血清进行蛋白质印迹分析。这一分析显示，VP19 在预期位置表达（图 1，泳道 4），因此 vp19 ORF 编码一种 WSSV 病毒体蛋白。

接种和攻击

按照表 1 的计划建立实验。使用四个实验组；两个对照组，阴性对照和阳性对照，一组接受 VP19，一组接受 GFP。在 GFP 组，虾接受与给予 VP19 组相同的混合物，但 VP19 除外。

表 1. 接种实验的组设计

组#	组名	接种	加强	攻击	#虾
1	阴性对照	330mM NaCl	330mM NaCl	330mM NaCl	10
2	阳性对照	330mM NaCl	330mM NaCl	WSSV	10
3	VP19	VP19	VP19	WSSV	10
4	GFP	GFP	GFP	WSSV	10

所有的组注射 20 μ l 它们各自的溶液。对于 VP19 组和 GFP 组，接种和加强均给予总量 15 μ g 的蛋白。使用 330mM NaCl 溶液以稀释蛋白溶液，以及病毒对照。GFP 是绿色荧光蛋白。在 GFP 组，虾接受与给予 VP19 组相同的混合物，但 VP19 除外。

接种后 5 天，给予虾一次加强注射，2 天后再注射 WSSV。

攻击后，对虾进行一周监测，用 ELISA 试验和电子显微镜检查死虾中 WSSV 的存在。组 1，阴性对照中，没有虾死于 WSSV。组 2 中的虾在一天半后开始死于 WSSV 感染，5 天后达到 100% 的死亡率。接种组 3 中首批动物在一天半后死亡，但与组 2 相比持续较慢。组 3

在攻击后 6 天达到 100%的死亡率，显示了与阳性对照相比，死亡率的明显延迟。这证明用 WSSV 蛋白 VP19 接种 *P. monodon* 虾，对用 WSSV 攻击后虾的存活率具有正效应。

附图说明

图 1. 泳道 1 LMW 标记 (Amersham pharmacia biotech), 2 纯化 WSSV 的 SDS-PAGE 凝胶, 3 超表达 VP19 的 SDS-PAGE 凝胶, 4 超表达 VP19 用抗-WSSV 进行的蛋白质印迹, 5 超表达 VP13 的 SDS-PAGE 凝胶 (此处标为 VP15)。

图 2. 这一附图显示接种对于用 WSSV 攻击后虾的死亡率的效应水平: -* = VP19 疫苗, -◆ = 阴性对照, -□ = 阳性对照, -▲ = GFP 对照。

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> 虾白斑综合征病毒抗原蛋白及其用途

<130> 2000558ep/pd

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 白斑综合征病毒

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 1

```

atg gcc acc acg act aac act ctt cct ttc ggc agg acc gga gcc cag      48
Met Ala Thr Thr Thr Asn Thr Leu Pro Phe Gly Arg Thr Gly Ala Gln
   1             5             10             15

gcc gct ggc cct tct tac acc atg gaa gat ctt gaa ggc tcc atg tct      96
Ala Ala Gly Pro Ser Tyr Thr Met Glu Asp Leu Glu Gly Ser Met Ser
             20             25             30

atg gct cgc atg ggt ctc ttt ttg atc gtt gct atc tca att ggt atc     144
Met Ala Arg Met Gly Leu Phe Leu Ile Val Ala Ile Ser Ile Gly Ile
             35             40             45

ctc gtc ctg gcc gtc atg aat gta tgg atg gga cca aag aag gac agc     192
Leu Val Leu Ala Val Met Asn Val Trp Met Gly Pro Lys Lys Asp Ser
             50             55             60

```

gat tct gac act gat aag gac acc gtt gat gat gac gac act gcc aac 240
 Asp Ser Asp Thr Asp Lys Asp Thr Val Asp Asp Asp Asp Thr Ala Asn
 65 70 75 80

gat aac gat gat gag gac aaa tat aag aac agg acc agg gat atg atg 288
 Asp Asn Asp Asp Glu Asp Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Arg Asp Met Met
 85 90 95

ctt ctg gct ggg tcc gct ctt ctg ttc ctc gtt tcc gcc gcc acc gtt 336
 Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Leu Phe Leu Val Ser Ala Ala Thr Val
 100 105 110

ttt atg tct tac ccc aag agg agg cag taa 366
 Phe Met Ser Tyr Pro Lys Arg Arg Gln
 115 120

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> 白斑综合征病毒

<400> 2

Met Ala Thr Thr Thr Asn Thr Leu Pro Phe Gly Arg Thr Gly Ala Gln
 1 5 10 15

Ala Ala Gly Pro Ser Tyr Thr Met Glu Asp Leu Glu Gly Ser Met Ser
 20 25 30

Met Ala Arg Met Gly Leu Phe Leu Ile Val Ala Ile Ser Ile Gly Ile
 35 40 45

Leu Val Leu Ala Val Met Asn Val Trp Met Gly Pro Lys Lys Asp Ser
 50 55 60

Asp Ser Asp Thr Asp Lys Asp Thr Val Asp Asp Asp Asp Thr Ala Asn
 65 70 75 80

Asp Asn Asp Asp Glu Asp Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Arg Asp Met Met
 85 90 95

Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Leu Phe Leu Val Ser Ala Ala Thr Val
 100 105 110

Phe Met Ser Tyr Pro Lys Arg Arg Gln
 115 120

<210> 3

<211> 186

<212> DNA

<213> 白斑综合征病毒

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(186)

<400> 3

atg gtt gcc cga agc tcc aag acc aaa tcc cgc cgt gga agc aag aag 48

Met Val Ala Arg Ser Ser Lys Thr Lys Ser Arg Arg Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

agg tcc acc act gct gga cgc atc tcc aag cgg agg agc cca tca atg 96

Arg Ser Thr Thr Ala Gly Arg Ile Ser Lys Arg Arg Ser Pro Ser Met

20 25 30

aag aag cgt gca gga aag aag agc tcc act gtc cgt cgc cgt tcc tca 144

Lys Lys Arg Ala Gly Lys Lys Ser Ser Thr Val Arg Arg Arg Ser Ser

35 40 45

aag agc gga aag aag tct ggagcc cgc aag tca agg cgt taa 186

Lys Ser Gly Lys Lys Ser Gly Ala Arg Lys Ser Arg Arg

50 55 60

<210> 4

<211> 61

<212> PRT

<213> 白斑综合征病毒

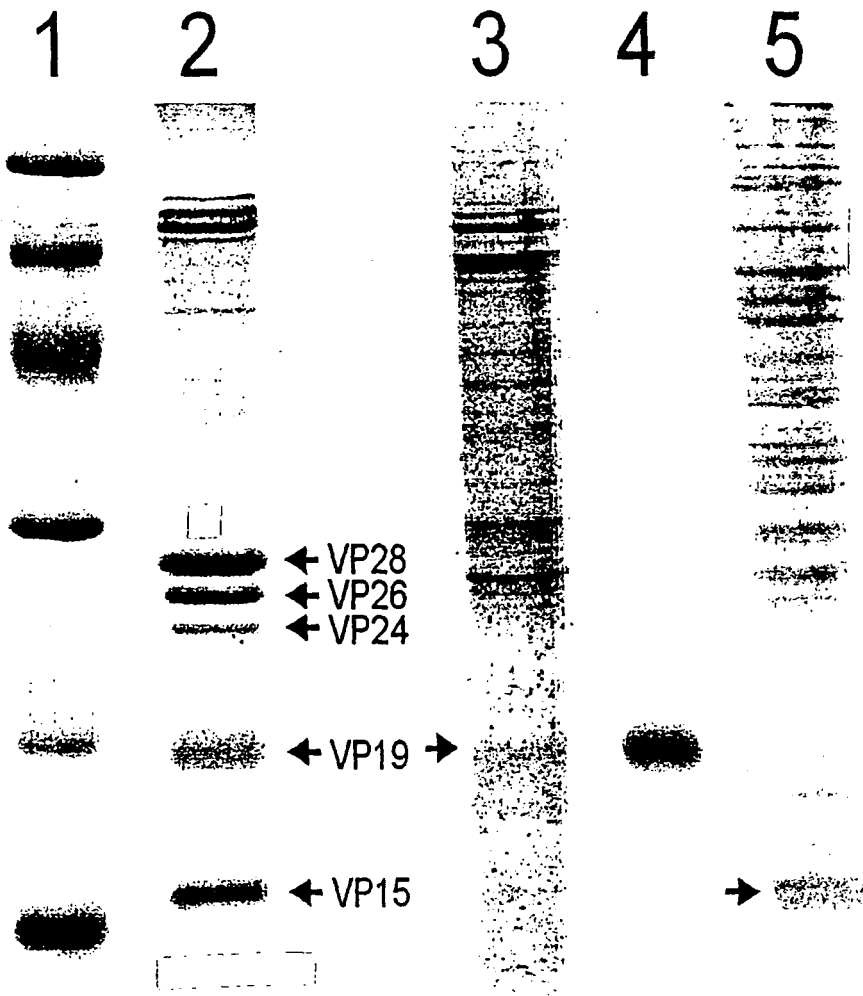
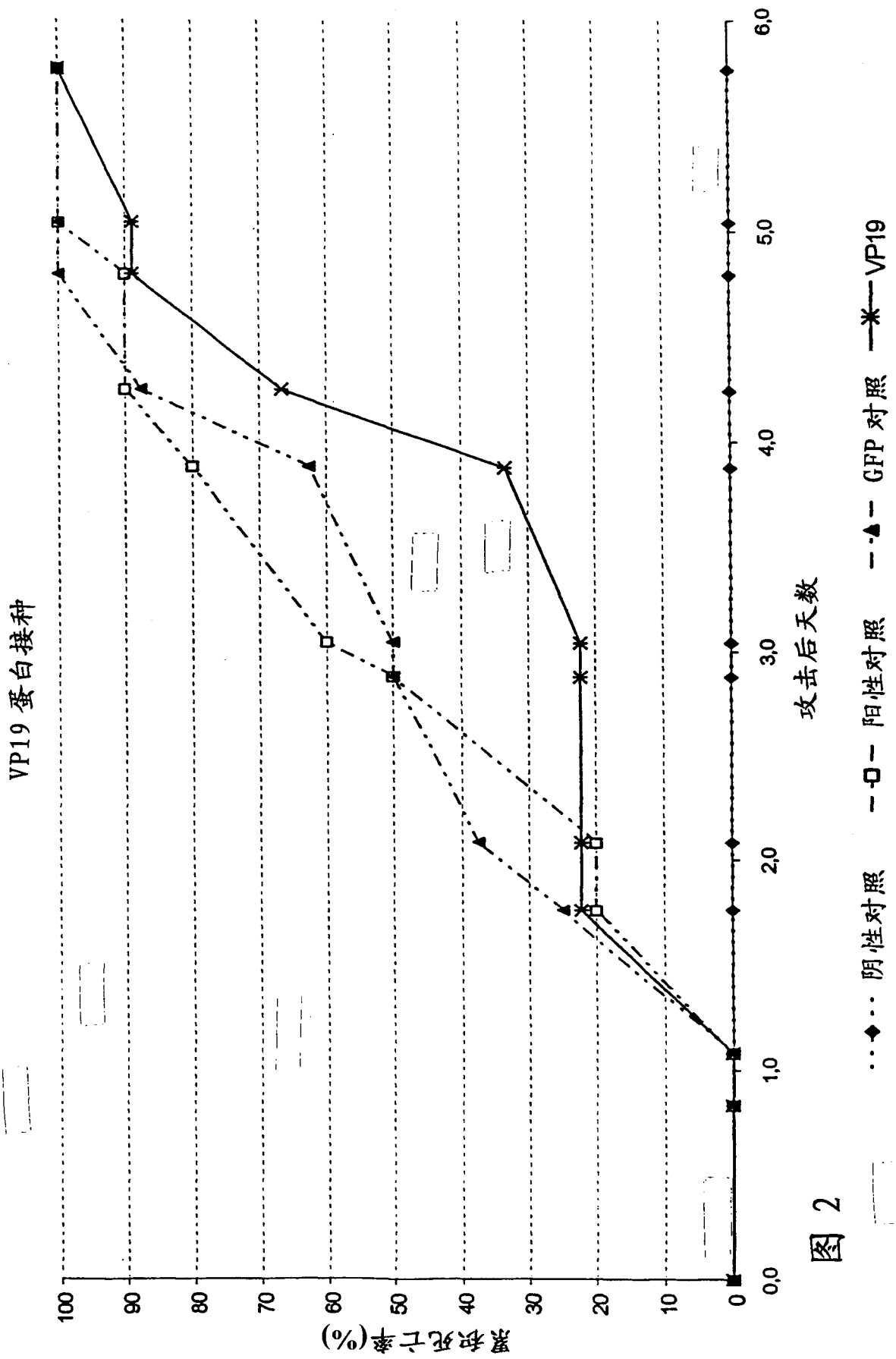


图 1



专利名称(译)	虾白斑综合征病毒抗原蛋白及其用途		
公开(公告)号	CN1437654A	公开(公告)日	2003-08-20
申请号	CN01802989.2	申请日	2001-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
[标]发明人	JM弗拉克 MCW范胡尔敦		
发明人	J·M·弗拉克 M·C·W·范胡尔敦		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K39/00 A61K39/12 A61K48/00 A61P17/00 C07K14/01 C07K16/08 C12N15/09 C12N15/34 C12N15/86 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/523 Y10S424/817 A61K2039/5254 C12N2710/18022 A61K39/00 C07K14/005 A61P17/00		
代理人(译)	李华英		
优先权	2000203186 2000-09-15 EP		
其他公开文献	CN1193094C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及衍生自白斑综合征病毒的抗原蛋白，大小约为19kDa(VP19)或13Kda(13)；这些蛋白在疫苗中的应用；和以这些蛋白为基础的疫苗。此外，本发明涉及针对这些蛋白的抗体和抗体在疫苗中的应用；编码这些蛋白的核酸序列及其在疫苗中的应用。本发明还涉及所述蛋白在生产用于预防 and/或治疗甲壳类动物中白斑综合征的疫苗中的用途；载体疫苗；和包含所述核酸或抗体的诊断试剂盒。

