

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508818
(P2004-508818A)

(43) 公表日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00 1 7 1	4 C O 8 7
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 52 頁) 最終頁に続く

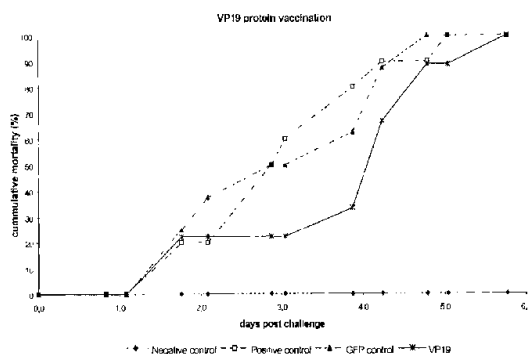
(21) 出願番号	特願2002-526914 (P2002-526914)	(71) 出願人	394010986 アクゾ・ノベル・エヌ・ベー オランダ国、6 8 2 4 ・ ベー ・ エム ・ アー ネム、フエルペルウエビ・7 6
(86) (22) 出願日	平成13年9月14日 (2001. 9. 14)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(85) 翻訳文提出日	平成14年5月14日 (2002. 5. 14)	(74) 代理人	100105131 弁理士 井上 満
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010679	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
(87) 国際公開番号	W02002/022664	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002. 3. 21)	(74) 代理人	100117053 弁理士 相馬 貴昌
(31) 優先権主張番号	00203186. 2		
(32) 優先日	平成12年9月15日 (2000. 9. 15)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小エビ白斑病症候群 (White Spot Syndrome) ウイルスの抗原性蛋白質及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、19 kDa (VP19) 又は13 kDa (VP13) の推定サイズを持つ、白斑病症候群 (White Spot Syndrome) ウイルスから誘導される抗原性蛋白質、ワクチンにおけるこれらの蛋白質の使用及びこれらの蛋白質に基づくワクチンに関する。さらに、本発明は、これらの蛋白質に対する抗体とワクチンにおける抗体の使用、これらの蛋白質をコードする核酸配列及びワクチンにおけるそれらの使用に関する。また、本発明は、甲殻類における白斑病症候群の予防及び/又は治療のためのワクチンの製造における当該蛋白質の使用、ベクターワクチン及び当該核酸又は抗体を含む診断キットに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

W S S V に対して甲殻類を免疫するのに適した W S S V の抗原性蛋白質であって、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 5 に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 相同であるアミノ酸配列を持つことを特徴とする前記抗原性蛋白質又はかかる抗原性蛋白質の免疫原性断片。

【請求項 2】

配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 5 に示すアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 90%、より好ましくは 95% の配列相同性を持つことを特徴とする請求項 1 に記載の抗原性蛋白質又はかかる抗原性蛋白質の免疫原性断片。

10

【請求項 3】

W S S V 感染に対して小エビを防護することができるワクチンであって、請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質又はその免疫原性断片と製薬上許容される担体を含むことを特徴とする前記ワクチン。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質又はかかる蛋白質の免疫原性断片をコードする核酸配列。

【請求項 5】

前記核酸配列が配列番号 1 又は配列番号 3 に示す配列を含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の核酸配列。

【請求項 6】

甲殻類における白斑病症候群の予防又は治療において使用するためのベクターワクチンであって、該ワクチンが生弱毒化細菌又は生弱毒化ウイルスを含み、かかる細菌又はウイルスがそのゲノム内に請求項 4 又は 5 に記載の異種核酸配列を含むことを特徴とする、前記ベクターワクチン。

20

【請求項 7】

ワクチンにおいて使用するための請求項 1 又は 2 に記載の抗原性蛋白質。

【請求項 8】

W S S V 感染に対抗するためのワクチンの製造のための、請求項 1 又は 2 に記載の抗原性蛋白質の使用。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質に対して惹起される抗体。

30

【請求項 10】

製薬上許容される担体と少なくとも 1 つの請求項 9 に記載の抗体を含むワクチン。

【請求項 11】

製薬上許容される担体と請求項 4 又は 5 に記載の核酸配列を含むワクチン。

【請求項 12】

配列番号 1 又は 3 に示す核酸配列又はその核酸配列に相補的なヌクレオチド配列と少なくとも 70% 相同である核酸配列、若しくは少なくとも 12 個、好ましくは 15 個、より好ましくは 18 個のヌクレオチドの長さを持つその断片、請求項 1 又は 2 に記載の抗原性蛋白質若しくはその免疫原性断片、又は請求項 9 に記載の抗体を含むことを特徴とする、W S S V の検出のための診断キット。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、白斑病症候群 (White Spot Syndrome) ウイルスから誘導される抗原性蛋白質、ワクチンにおけるこれらの蛋白質の使用、これらの蛋白質に基づくワクチン、当該蛋白質に対する抗体、ワクチンにおけるこれらの抗体の使用、それらをコードする核酸配列及び甲殻類における白斑病症候群の予防及び/又は治療のためのワクチンの製造における当該蛋白質の使用、ベクターワクチン及び診断キットに関する。

【0002】

白斑病症候群ウイルス (W S S V) は世界中で小エビ (shrimp) における主要なウ

50

イルス性疾患である。かかるウイルスは甲殻類において広い宿主対象を有しており (F l e e g e l , 1 9 9 7)、分離体の中で遺伝的変異はほとんど存在しない (L o r a , 1 9 9 9)。電子顕微鏡 (E M) 検査は、ビリオンがエンベロープに包まれており、長さ約 2 7 5 n m、幅 1 2 0 n m の杆状から弾丸形の外觀で、一方の端に尾状付属器を持つことを示した。エンベロープを喪失したヌクレオカプシドは、網目の陰影のある外觀を持ち、約 3 0 0 n m x 7 0 n m の大きさである (W o n g t e e r a s u p a y a r a , 1 9 9 5)。このビリオンの形態、その核局在及び形態発生は、昆虫におけるバキュロウイルスを想起させる (D u r a n d r a , 1 9 9 7)。もともと、W S S V はバキュロウイルス科 (B a c u l o r i r i d a e) ファミリーの割り当てられない (u n a s s i g n e d) 成員として分類されており (F r a n c k i r a , 1 9 9 1)、それ故このウイルスは、S y s t e m i c E c t o d e r m a l M e s o d e r m a l B a c u l o v i r u s (S E M B V) 又は W h i t e S p o t B a c u l o v i r u s (W S B V) と称されてきた。現在 W S S V は、分子情報が欠如していることからもはやこのファミリーとしては認められない (M u r p h y r a , 1 9 9 5)。二本鎖ウイルス DNA は、制限エンドヌクレアーゼ分析から推論して 2 0 0 k b をはるかに越える大きさを持つ (Y a n g r a , 1 9 9 7)。

10

【0003】

養殖小エビにおける W S S V の発生は小エビの大量の死亡を引き起こす。この疾病は、小エビの甲、付属器及び小皮上の白い斑点と肝臓の赤みがかかった変色を特徴とする。感染した小エビは嗜眠の徴候を示し、食餌摂取が急速に低下して、3 - 5 日以内に R ほらの小エビは死亡する。W S S V の発生は小エビ養殖産業における重大な損失を導き、それ故 W S S V 感染に対して防護することができるワクチンが強く求められている。かかるワクチンにおいて使用することができる主要 W S S V 蛋白質の同定と特性指摘は、そのようなワクチンを開発するための手段を提供するであろう。

20

【0004】

クマシーブリリアントブルー染色 S D S - P A G E ゲルでの移動度から推定した分子量により、それぞれ蛋白質 V P 1 3 (1 3 k D a) と V P 1 9 (1 9 k D a) をコードする 2 つの遺伝子が単離され、v p 1 9 及び v p 1 3 として同定された。V P 1 9 はエンベロープ蛋白質であり、一方 V P 1 3 はヌクレオカプシド蛋白質である。v p 1 9 のオープンリーディングフレーム (O R F) は配列番号 1 に示すように 3 6 6 個のヌクレオチドを含み、合わせて 1 2 1 個のアミノ酸から成る演繹アミノ酸配列を示す (配列番号 2 として別途に表示する)。遺伝子 v p 1 3 のオープンリーディングフレームは、配列番号 3 に示すように少なくとも 1 8 6 個のヌクレオチドを含む。この O R F は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含むヌクレオカプシド蛋白質 V P 1 3 をコードする。蛋白質 V P 1 3 の 2 つの変異体が認められており、1 つは配列番号 4 に示すアミノ酸配列を持ち、より長い変異体は配列番号 5 に示すアミノ酸配列を持つ。

30

【0005】

本発明は、W S S V による感染に対して甲殻類を防護するための組換えワクチンを作製する手段を提供する。同定され、特性付けられた W S S V のエンベロープ蛋白質 V P 1 9 及びヌクレオカプシド蛋白質 V P 1 3 は、W S S V による感染に対して甲殻類を防護するためのサブユニットワクチンの製造における使用に適することが認められた。本発明のヌクレオチド配列のクローニングと特性指摘は、組換えテクノロジー手法を用いた W S S V のこれらの蛋白質の生産を提供する。この方法では、他の W S S V 蛋白質を実質的に含まない W S S V 蛋白質が入手できる。単離した W S S V 蛋白質は、W S S V 感染に対して甲殻類を防護するためのサブユニットワクチンを製造するために使用できる。

40

【0006】

本発明の蛋白質はマーカーワクチンにおいて特に有用である。そのようなワクチンは、例えば V P 1 3 及び / 又は 1 9 だけを含みうる。

【0007】

代替的に、W S S V の蛋白質をコードするヌクレオチド配列は、W S S V による感染に対

50

して甲殻類を防護するためのベクターワクチンを製造するために使用できる。

【0008】

本発明のヌクレオチド配列はさらに、診断目的、例えば圃場においてWSSVの存在を検出するために使用できる。

【0009】

さらに、本発明のWSSV蛋白質はWSSV特異的抗体を産生するために使用できる。これらの抗体は、甲殻類の受動免疫のためのWSSVワクチンを生産するために使用できる。抗体はまた、甲殻類における又は圃場におけるWSSVの検出のような診断目的にも使用できる。

【0010】

従って本発明の最初の実施形態は、配列番号2、配列番号4又は配列番号5に示すようなアミノ酸配列と少なくとも70%相同であるアミノ酸配列を持つ、WSSVに対して甲殻類を免疫するのに適したWSSVの抗原性蛋白質及びかかる抗原性蛋白質の免疫原性断片を提供する。

【0011】

好ましい形態では、実施形態は、配列番号2、配列番号4又は配列番号5に示すようなアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の配列相同性を持つWSSV蛋白質及びそのような蛋白質の免疫原性断片に関する。

【0012】

98%、さらには100%の相同性レベルがさらに一層好ましい。

【0013】

蛋白相同性のレベルは、コンピュータプログラム「BLAST 2 SEQUENCES」を用いて、サブプログラム：「BLASTP」を選択することによって決定することができ、このプログラムはwww.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.htmlで検索できる。

【0014】

このプログラムについての参考文献は、Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999)である。使用するマトリックス：「blosum62」。使用するパラメータはデフォルトパラメータ：

オープンギャップ：11。エクステンションギャップ：1。ギャップx__ドロップオフ：50である。

【0015】

ここに含まれる特定蛋白質について、個々のWSSV株の間で天然の変異が存在しうるとは明白であろう。これらの変異は、全体配列中でのアミノ酸の相違、若しくは当該配列におけるアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位又は付加によって明らかにされうる。生物学的及び免疫学的活性を基本的に変化させないアミノ酸置換は、例えばNeurathらにより「蛋白質(The Proteins)」Academic Press New York (1979)の中で述べられている。関連アミノ酸の間でのアミノ酸置換又は進化の過程でしばしば起こる置換は、中でも特に、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valである(Dayhof, M.D., 蛋白質配列と構造のアトラス(Atlas of protein sequence and structure)、Nat. Biomed. Res. Found. Washington D.C., 1978, 第5巻、補遺3参照)。他のアミノ酸置換は、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val及びAla/Gluを含む。この情報に基づき、LipmanとPearsonは、迅速で感受性の高い蛋白質比較(Science, 227, 1435-1441, 1985)と、相同蛋白質間の機能的類似性を決定するための方法を開発した。本発明の例示的实施形態のそのようなアミノ酸置換ならびに欠失及び/又は挿入を持つ変異体は、生じる

10

20

30

40

50

蛋白質がその抗原性又は免疫原性に本質的に影響を受けていないかぎり、本発明の範囲内である。

【0016】

これは、本発明に従ったWSSV蛋白質が、種々の圃場分離株から単離したとき、同じ免疫特性を持つ同じ蛋白質のままでありながら、なぜ約70%の相同性レベルを持ちうるかという理由を説明する。

【0017】

WSSVによる感染に対して又は少なくとも感染の臨床症状発現に対して免疫応答を誘導することができる蛋白質を依然として提供する、本発明に従ったある種の蛋白質のアミノ酸配列におけるそれらの変異は、「当該蛋白質の抗原性又は免疫原性に本質的に影響を及ぼさない」とみなされる。

10

【0018】

蛋白質を、例えばワクチン接種のため又は抗体を惹起するために使用するとき、蛋白質全体を使用する必要はない。それ自体で又は例えばK L Hのような担体と結合して、その蛋白質に対する免疫応答を誘導することができる当該蛋白質の断片、いわゆる免疫原性断片を使用することも可能である。「免疫原性断片」とは、脊椎動物宿主において免疫応答を誘導するその能力をまだ保持している完全長蛋白質の断片と理解され、すなわちB又はT細胞エピトープを含む。脊椎動物宿主において惹起される抗体は、小エビにおけるワクチン接種の受動手段として非常に適する。現在、抗原性断片(抗原決定基)をコードするDNA断片を容易に同定するために様々な手法が使用できる。Geysenら(特許願WO 84/03564号、特許願WO 86/06487号、米国特許第4,833,092号、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3998-4002(1984); J. Imm. Meth. 102, 259-274(1987))が述べた方法、いわゆるPEPSCAN法は、蛋白質の免疫学的に重要な領域であるエピトープの検出のための、実施しやすく、迅速で広く確立された方法である。かかる方法は世界中で使用されており、それ自体当業者には周知である。この(経験的)方法はB細胞エピトープの検出に特に適する。また、何らかの蛋白質をコードする遺伝子の配列が与えられれば、コンピュータアルゴリズムが、現在既知のエピトープとそれらの配列及び/又は構造上の一致に基づいて特定蛋白質断片を免疫学的に重要なエピトープとして選定することができる。これらの領域の決定は、HoppとWoods(Proc. Natl. Acad. Sci. 78:38248-3828(1981))に従った疎水性判定基準と、ChouとFasman(Advances in Enzymology 47:45-148(1987))及び米国特許第4,554,101号)に従った二次構造局面の組合せに基づく。T細胞エピトープは同様に、Berzofskyの両親媒性判定基準(Science 235, 1059-1062(1987))及び米国特許願NTIS US07/005,885号)を用いてコンピュータにより配列から予測できる。要約された概要が次の参考文献に認められる:一般原理に関しては、Shan Lu: Tibtech 9:238-242(1991)、マラリアエピトープに関しては、Goodら: Science 235:1059-1062(1987)、総説については、Lu: Vaccine 10:3-7(1992)、HIVエピトープについては、Berzowsky: The FASEB Journal 5:2412-2418(1991)。

20

30

40

【0019】

本発明のもう1つの実施形態は、上述したような本発明に従った蛋白質又は免疫原性断片と反応性の抗体を製薬上許容される担体と共に含む、WSSV感染に対して小エビを防護することができるワクチンに関する。

【0020】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、上述したような本発明に従った蛋白質又はその免疫原性断片を製薬上許容される担体と共に含む、WSSV感染に対して小エビを防護することができるワクチンに関する。

【0021】

50

本発明のさらにもう1つの実施形態は、本発明に従った抗原性蛋白質をコードする核酸配列又はその免疫原性断片に関する。

【0022】

より好ましくは本発明のこの実施形態は、配列番号2、4又は5に示すようなアミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をコードする核酸配列又はその免疫原性断片に関する。

【0023】

好ましくは、核酸配列は配列番号1又は3に示すような配列を持つか又は含む。それぞれのヌクレオチド配列は、推定アミノ酸配列の最初のM残基をコードするATGコドンから始まり、C末端アミノ酸残基をコードするコドンまでに及ぶ。本発明のために、配列番号1又は配列番号3に示す配列と配列相同性を持つ核酸配列も本発明の範囲内であることは明白であろう。本発明のために、配列相同性は少なくとも70%、好ましくは75%、より好ましくは80%、さらは一層好ましくは85%であるとみなされる。配列番号1又は3に示す配列と少なくとも90%、より好ましくは95%の配列相同性を持つ核酸配列が極めて好ましい。

10

【0024】

98%、さらには100%の相同性がさらは一層好ましい。

【0025】

本発明のために、配列相同性は、対象とするヌクレオチド配列を配列番号1又は3に示す配列の対応する部分と比較することによって決定される。本発明のために、パーセンテージ配列相同性は、比較される配列間での同一ヌクレオチドのパーセンテージと定義される。

20

【0026】

ヌクレオチド相同性のレベルは、コンピュータプログラム「BLAST 2 SEQUENCES」を用いて、サブプログラム：「BLASTN」を選択することによって決定することができ、このプログラムはwww.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.htmlで検索できる。

【0027】

このプログラムについての参考文献は、Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999)である。使用するマトリックス：「blosum62」。使用するパラメータはデフォルトパラメータである：適合についてのリワード：+1。不適合についてのペナルティ：-2。オープンギャップ：5。エクステンションギャップ：2。ギャップx_ドロップオフ：50。

30

【0028】

本発明に従った配列相同性を持つ核酸配列は、常套的クローニング及びハイブリダイゼーション手法を用いて緊密に関連するWSSV株から配列番号1又は3に示す配列の1つ又はこの配列の断片で容易に単離することができる。このためには、ストリンジェント条件下、好ましくは高いストリンジェント条件下でハイブリダイゼーションを実施する。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、65の温度で1xSSC、0.1%SDSの洗浄条件と理解される；高いストリンジェント条件は、SSC濃度を0.3xSSC近くまで低下させた洗浄条件を指す。特定情報は、誤って同定された根拠を排除する必要が生じるほど狭義に解釈すべきではない。ここで開示する特定配列は、他の菌株から相同ヌクレオチド配列を単離するために容易に使用できる。

40

【0029】

配列番号1又は3に示す配列の1つと配列相同性を持つ核酸配列は、配列番号2、4又は5に示すアミノ酸配列の1つと比較して変異を含むアミノ酸配列を持つ蛋白質をコードするが、但しかかる変異は当該蛋白質の抗原性又は免疫原性に本質的に影響を及ぼさない。

【0030】

本発明に従ったWSSV蛋白質は、標準的な生化学的分離及び精製法を通して入手するか、若しくは一般的組換えテクノロジーによって調製することができる。本発明に従った又

50

クレオチド配列は、実質的に他のWSSV蛋白質を含まないWSSV蛋白質の組換え産生のために使用するのに特に適する。ヌクレオチド配列を、当該蛋白質を発現することができる適当な発現ベクターに組み込み、かかる発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換して、適当な培地中で宿主細胞を培養する。発現された蛋白質を細胞又は培地から分離し、精製することができる。適当な発現ベクターは、中でも特に、複製と発現のために必要な制御領域を含むプラスミド、コスミド、ウイルス及びYAC（酵母人工染色体）である。発現ベクターは宿主細胞上で発現することができる。適当な宿主細胞は、例えば細菌、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞である。そのような発現手法は当該技術において周知である（Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: a Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989; KingとPossee, 1992）。

10

20

30

40

50

【0031】

さらに、本発明に従った核酸配列は、WSSV感染に対して甲殻類にワクチン接種するためのベクターワクチンを製造するために使用できる。ベクターワクチンは、生弱毒化細菌又はウイルスが、その遺伝物質内に挿入された1つ又はそれ以上の異種ヌクレオチド配列を含むように修飾されているワクチンと理解される。これらのいわゆるベクター細菌又はウイルスは、挿入されたヌクレオチドによってコードされる異種蛋白質を同時発現することができる。それ故第四の局面では、本発明は、生弱毒化細菌又はウイルスと製薬上許容される担体を含み、かかる細菌又はウイルスがその遺伝物質内に本発明のヌクレオチド配列の1つ又はそれ以上を含むように修飾されている、甲殻類における白斑病症候群の予防又は治療において使用するためのベクターワクチンを提供する。そのようなLRCに感染した小エビは、担体の免疫原に対してのみならず、遺伝子コードがLRCに付加的にクローニングされている蛋白質の免疫原性部分に対しても免疫応答を生じる。

【0032】

細菌LRCの例として、当該技術において既知の*Vibrio anguillarum*のような細菌が好都合に使用できる（Singer, J. T. ら、「海洋バイオテクノロジーにおける新しい開発（New Developments in Marine Biotechnology）」、p. 303 - 306, Le GalとHalvorsen編集、Plenum Press, New York, 1998）。

【0033】

また、LRCウイルスは核酸配列を標的細胞内に運搬する手段としても使用しうる。この役割に適したウイルスは、例えばYellow Headウイルス及びGill関連ウイルスであり、これらはどちらもコロナウイルス科のファミリーに属する（例えば、ウイルスについてはSpann, K. M. ら、Dis. Aquat. Org. 42: 221 - 225 (2000)、及びCowley, J. A. ら、Dis. Aquat. Org. 36: 153 - 157 (1999)、又は生組換え担体コロナウイルスについてはEnjua nes, L. ら、ESVV議事録、p. 28 - 31, Brescia, Italia, 2000年8月27 - 30日参照）。

【0034】

当該技術において周知の生体内相同期組換えの手法を使用して、宿主動物において本発明に従った挿入核酸配列の発現を誘導することができる選択した細菌又はウイルスのゲノム内に組換え核酸配列を導入することができる。

【0035】

ワクチン接種の代替的で効率的な方法は、関連抗原をコードするDNAによる直接ワクチン接種である。蛋白質をコードするDNAの直接ワクチン接種は多くの異なる蛋白質について成功を収めてきた。（例えばDonnellyら、The Immunologist 2: 20 - 26 (1993)で検討されている）。このワクチン接種の方法は、WSSVに対する小エビのワクチン接種にとって魅力的である。それ故、本発明のさらにもう1つの実施形態は、製薬上許容される担体と、本発明に従った蛋白質をコードする核酸配

列又はその免疫原性断片、若しくはそのような核酸配列を含むDNA断片、例えばプラズミドを含有するワクチンに関する。

【0036】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、ワクチンにおいて使用するための本発明に従った蛋白質に関する。

【0037】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、WSSV感染に対抗するためのワクチンの製造のための、本発明に従った蛋白質の使用に関する。

【0038】

本発明に従ったワクチンは、例えば *P. monodon*、*P. vannamei*、*P. chinensis*、*P. merguensis*、又は *Metapeaeus spp.* のような *Penaeidae* ファミリーからの成員を含むがこれらに限定されない小エビ (*shrimps*)、例えば *Macrobrachium spp.* 又は *Palaemon spp.* のような *Palaemonidae* ファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないクルマエビ・テナガエビ類 (*prawns*)、例えば *Calinectes spp.*、*Palinurus spp.*、*Panuliris spp.* 又は *Homarus spp.* のような *Palinuridae* 及び *Nephropidae* ファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないウミザリガニ (*lobsters*)、*Astacus spp.*、*Procambarus spp.* 及び *Oronectes spp.* を例とする *Astacidae* ファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないザリガニ・イセエビ類 (*crayfish*)、そして *Cancer spp.*、*Callinectes spp.*、*Carcinus spp.* 及び *Portunus spp.* を例とする *Cancridae* 及び *Portunidae* ファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないカニ (*crab*) などの甲殻類を防護するために使用できる。

【0039】

本発明に従ったワクチンは、当業者に周知であり、例えば「レミントンの製薬科学 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*)」、第18版、*A. R. Gennaro* 編集、72章、p. 1389 - 1404、*Philadelphia College of Pharmacy and Science* に述べられている手法に従って調製することができる。

【0040】

本発明に従ったワクチンは、本発明に従った有効量の1つ又はそれ以上の蛋白質、ベクター細菌又はウイルス、及び製薬上許容される担体を含む。ここで使用する「有効」の語は、甲殻類において防護応答を誘導するのに十分な量と定義される。ベクター又は蛋白質の量は、ベクター又は蛋白質の種類、投与経路、投与時間、ワクチン接種する種ならびに年齢、全身状態、温度及び食事に依存するであろう。

【0041】

一般に、動物当り 0.01 から 1000 μ g 蛋白質の投与量、好ましくは動物当り 0.5 から 500 μ g、より好ましくは 1 から 100 μ g 蛋白質の投与量を使用できる。ウイルスベクターワクチンの場合には、一般に動物当り 10^3 から 10^8 pfu (ブランク形成単位) の投与量が非常に効率的に使用できる。細菌ベクターワクチンは、 10^3 から 10^8 細菌の用量で非常に効率的に投与することができる。

【0042】

DNA ワクチン接種については、動物当り 0.1 から 10 μ g DNA の DNA 量が非常に有用な用量である。

【0043】

本発明に従ったワクチンにおける使用に適した製薬上許容される担体は、例えば滅菌水、食塩水、アルカリ金属リン酸塩 (例えば PBS)、アルコール、ポリオール等のような水性緩衝液のように、無菌であり、生理的に適合性である。さらに、本発明に従ったワクチンは、アジュバント、安定剤、抗酸化剤、防腐剤その他のような他の添加物を含みうる。適

当なアジュバントは、アルミニウム塩又はゲル、カルボマー、非イオン性ブロック共重合体、トコフェロール、モノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド、油性乳剤、グルカン、サイトカイン、Quil Aのようなサポニン等を含むがこれらに限定されない。加えるアジュバントの量はアジュバント自体の性質に依存する。

【0044】

本発明に従ったワクチンにおける使用のための適当な安定剤は、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストリン、及びグルコース、アルブミン又はカゼインのような蛋白質、ならびにアルカリリン酸塩のような緩衝剤を含むがこれらに限定されない。適当な防腐剤は、中でも特に、チメロサル及びmerthiolateを含む。

【0045】

本発明に従ったワクチンは、注射、液浸、浸漬、噴霧又はエアロゾルによって、又は経口的に投与することができる。好ましくはワクチンは、特に商業的水産養殖場の場合、液浸によって又は経口的に甲殻類に投与する。

【0046】

経口投与については、好ましくはワクチンを経口投与のための適当な担体、すなわちセルロース、食餌、又は - セルロース又は植物又は動物由来の様々な油のような代謝性物質と混合する。本発明に従ったワクチンの経口送達のための特に好ましい食餌担体は、ワクチンを被包することができる生体飼料生物である。これを得るための非常に適切な方法は、例えば本発明に従った蛋白質が発現されている昆虫細胞を生体飼料生物に給餌することである。適切な生体飼料生物は、プランクトン様の非選択性濾過摂食体(non-selective filter feeder)、好ましくはRotifera、Artemia等の成員を含むがこれらに限定されない。brine shrimp Artemia sp. が極めて好ましい。

【0047】

本発明に従った蛋白質は、当業者に使用可能な一般的手法を用いた抗体産生のために使用できる。好ましくは蛋白質を使用して特異的モノクローナル抗体を産生する。本発明に従った抗体は標準的手法に従って調製することができる。動物、例えばマウスを蛋白質で免疫するための手順及び蛋白質特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択のための手順は当該技術において周知である(例えばCliganら(編集)、「免疫学における現在のプロトコル(Current protocols in Immunology)」、1992; KohlerとMilstein, Nature 256, p. 495 - 497, 1975; Steenbakkersら, Mol. Biol. Rep. 19, p. 125 - 134, 1994参照)。得られた抗体は、圃場でWSSVを検出するため又は甲殻類におけるWSSVの存在を検出するための診断において使用しうる。本発明に従ったヌクレオチド配列はまた、診断における使用にも適する。当該配列又はその断片は、例えば圃場で又は甲殻類におけるWSSVの存在を検出するためのPCRテクノロジーにおいて使用できる。

【0048】

WSSVの検出のための診断試験は、例えば検査する動物から分離したDNAの特異的プローブとの反応に基づくか、若しくは本発明に従ったコード配列に基づくPCR試験又はそれらのコード配列に相補的な核酸配列に基づくPCR試験である。本発明に従ったWSSV蛋白質に特異的な核酸分子が動物中に存在する場合、これらは、例えば特異的PCRプライマーに特異的に結合し、その後PCR反応において増幅される。次にDNAゲル電気泳動においてPCR反応産物を容易に検出することができる。PCR反応は当該技術において周知である(下記の参考文献参照)。核酸分子は、検査する動物の肝臓から最も容易に分離することができる。標準的なPCRテキストが、本発明に従った蛋白質に特異的な核酸分子を持つ選択的PCR反応のためのプライマーの長さを決定する方法を教示する。少なくとも12個のヌクレオチドから成るヌクレオチド配列を持つプライマーがしばしば使用されるが、15個以上、より好ましくは18個のヌクレオチドのプライマーがいくぶんより選択的である。特に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個のヌク

10

20

30

40

50

レオチドの長さを持つプライマーが非常に一般的に適用できる。PCR手法は、(Dieffenbach & Drexler, PCR primers, a laboratory manual, ISBN 0-87969-447-5 (1995))において広汎に記述されている。

【0049】

当該核酸分子又はその部分が、配列番号1又は3に示すような核酸配列又は配列番号1又は3に示すような核酸配列に相補的な核酸配列と少なくとも70%の相同性を持つ、本発明に従ったWSSV蛋白質をコードする核酸分子、又は少なくとも12個、好ましくは15個、より好ましくは18個、さらに一層好ましくは、好ましい順に20、22、25、30、35又は40個のヌクレオチドの長さを持つそれらの核酸分子の部分も、それ故、本発明の一部である。そのような核酸分子は、例えば本発明に従った蛋白質をコードする核酸の量を高めるためにPCR反応におけるプライマーとして使用することができる。これは、例えば上述したような組織におけるWSSVの検出のための診断ツールとして使用するための特異的ヌクレオチド配列の速やかな増幅を可能にする。

10

【0050】

もう1つの核酸ベースの試験は、放射能又は着色標識した蛋白質特異的cDNA断片との古典的ハイブリダイゼーションに基づく。PCR反応とハイブリダイゼーション反応のいずれもが当該技術において周知であり、中でも特に、Maniatis/Sambrook (Sambrook, J.ら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: a laboratory manual)」、ISBN 0-87969-309-6)に記述されている。

20

【0051】

それ故、本発明のもう1つの実施形態は、試験が、配列番号1又は3に示すような核酸配列又はその核酸配列に相補的なヌクレオチド配列と少なくとも70%相同である核酸配列、若しくは少なくとも12個、好ましくは15個、より好ましくは18個のヌクレオチドの長さを持つその断片を含む、WSSVの検出のための診断キットに関する。

【0052】

WSSV蛋白質の抗原性物質の検出に基づく、そしてそれ故WSSV感染の検出に適する診断試験は、例えば同時に標準サンドイッチELISA試験でありうる。そのような試験の一例では、ELISAプレートのウェルの壁を本発明に従った蛋白質又はその免疫原性断片に対する抗体で被覆する。試験する物質とのインキュベーション後、標識抗WSSV抗体をウェルに加える。その後呈色反応によってWSSVからの抗原性物質の存在を明らかにする。

30

【0053】

それ故、本発明のさらにもう1つの実施形態は、当該試験が本発明に従った蛋白質又はその免疫原性断片に対する抗体を含むことを特徴とする、WSSVの検出のための診断試験に関する。

【0054】

そこで、もう1つの局面では、本発明は、本発明に従った1つ又はそれ以上のヌクレオチド配列又は抗体を含む診断キットを提供する。

40

【0055】

本発明に従った蛋白質に対して惹起される抗体は、さらに、甲殻類の受動免疫のための抗体ワクチンを製造するために使用できる。それ故、さらなる局面では、本発明は、配列番号2、配列番号4又は配列番号5に示すようなアミノ酸配列を含む蛋白質に対して惹起される抗体を含む、WSSVに対する受動免疫のためのワクチンを提供する。そのようなワクチンは、上述したような標準的手法を用いて調製することができる。好ましくは、抗体が魚類飼料 (fish food) のような食用担体と混合されている、抗体の経口投与のためのワクチンを調製する。より好ましくは、鶏卵において調製される抗体 (IgY抗体) からワクチンを調製する。

【0056】

50

本発明に従った抗体の大規模生産のための方法も当該技術において既知である。そのような方法は、ファージディスプレイのための線状ファージにおける、本発明に従った蛋白質をコードする遺伝情報(の断片)のクローニングに基づく。そのような手法は、中でも特に、「抗体エンジニアリングページ(Antibody Engineering Page)」において「線状ファージディスプレイ」として <http://axim11.imt.unimarbun.de/~rek/aepphage.html> に述べられており、また Cortese, R. ら(1994)により Trends Biotechnol. 12:262-267において、Clackson, T. & Wells, J. A. (1994)により Trends Biotechnol. 12:173-183において、Marks, J. D. ら(1992)により J. Biol. Chem. 267:16007-16010において、Winter, G. ら(1994)により Annu. Rev. Immunol. 12:433-455において、そして Little, M. ら(1994)により Biotechnol. Adv. 12:539-555において、総説論文として記述されている。ファージはその後、camelid重鎖抗体を発現する camelid発現ライブラリーをスクリーニングするために使用される。(Muyldermaans, D. と Lauwereys, M., Journ. Molec. Recogn. 12:131-140(1999)及び Grahroudi, M. A. ら、FEBS Letters 414:512-526(1997))。所望する抗体を発現するライブラリーからの細胞を複製し、その後抗体の大規模発現のために使用することができる。

【0057】

(実施例)

実施例1

WSSV蛋白質VP19による *Penaeus monodon* のワクチン接種
ウイルス株の産生

ザリガニ・イセエビ類の *Procambarus clarkii* において精製WSSVの筋肉内注射によりWSSVウイルス株を産生した。ブラックタイガーエビ *P. monodon* において90から100%の死亡率をもたらす希釈を調べるため、体重約1グラムの動物を用いて生体内ウイルス滴定を実施した。NaCl 330mM中 1×10^5 から 5×10^{11} 倍までの段階でウイルス株を希釈し、各々の希釈について10 μ lを10匹のエビに筋肉内注射した。NaCl 330mMを注射したエビを感染の陰性対照として使用した。陰性対照として使用したすべてのエビ(示していない)及び 5×10^{11} ウイルス希釈を投与したエビは生存したが、それより低いウイルス希釈を摂取したすべての群においてウイルス感染による死亡が発生した。 1×10^5 から 1×10^7 のウイルス希釈の投与は、20日の期間中にほぼ100%の死亡率をもたらした。 1×10^8 と 5×10^9 のウイルス希釈を使用したときには死亡の遅延が認められた。 1×10^8 希釈は90%の最終的死亡率をもたらしたが、死亡期間は遅延し、40日の期間にわたった。 1×10^7 、 1×10^8 、及び 5×10^9 希釈に関して実験を反復し、基本的に同じ結果を得た。 1×10^8 希釈をその後の実験のためのウイルス用量として選択した。この条件が、死亡率の低下という見地から中和に対する至適応答をもたらすと予想されたからである。

【0058】

昆虫細胞におけるWSSV蛋白質VP19及びVP13の発現

バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞においてVP19及びVP13 ORFを発現した。Bac-to-Bacシステム(GIBCO BRL)を使用して、昆虫細胞においてバキュロウイルスポリヒドロプロモーターから推定上のWSSVビリオン蛋白質VP19及びVP13を発現する組換えバキュロウイルス(AcMNPV)を生成した。p10プロモーターからグリーン蛍光蛋白質(GFP)を発現する組換えウイルスを、またバキュロウイルスポリヒドロプロモーターから各々のWSSP蛋白質を発現する組換えウイルスを生成した。

【0059】

Sf21昆虫細胞を5の感染多重度(MOI)でAcMNPV-WSSVvp19及びA 50

c M N P V - W S S V v p 1 3 に感染させ、感染後 7 2 時間目に採集した。感染 S f 2 1 細胞の抽出物を 1 5 % S D S - P A G E ゲル中で分析した (図 1) 。 V P 1 3 (図 1 、 レーン 5 、 ここでは V P 1 5 と表示している) については明瞭な発現産物が認められ、これは W S S V ビリオンにおけるその真正対 (図 1 、 レーン 2) と同じ電気泳動移動度を持つ。 V P 1 9 (図 1 、 レーン 3) については、 (明瞭度はより低い) が、明らかに目に見える) 発現産物が認められた。それ故、精製 W S S V に対して惹起したポリクローナル抗血清を使用してウエスタン分析を実施した。この分析は、 V P 1 9 が予想された位置 (図 1 、 レーン 4) で発現されたこと、それ故 v p 1 9 O R F が W S S V ビリオン蛋白質をコードすることを示した。

【 0 0 6 0 】

ワクチン接種と攻撃誘発

表 1 に示す計画に従って実験を設定した。 4 つの実験群を使用した：陰性対照と陽性対照の 2 つの対照群、 V P 1 9 を摂取する 1 つの群及び G F P を摂取する 1 つの群。 G F P 群では、エビは、 V P 1 9 を除いて、 V P 1 9 群に与えられたのと同じ混合物を摂取した。

【 0 0 6 1 】

【 表 1 】

表 1 . ワクチン接種実験における群の設定

群番号	群の名称	ワクチン接種	ブースター	攻撃誘発	エビの数
1	陰性対照	300mM NaCl	300mM NaCl	300mM NaCl	10
2	陽性対照	300mM NaCl	300mM NaCl	WSSV	10
3	VP19	VP19	VP19	WSSV	10
4	GFP	GFP	GFP	WSSV	10

【 0 0 6 2 】

すべての群にそれぞれの溶液 2 0 μ l を注射した。 V P 1 9 群と G F P 群に関しては、ワクチン接種とブースターの両方について総量 1 5 μ g の蛋白質を投与した。蛋白質溶液ならびにウイルス対照の希釈のために、 N a C l 3 3 0 m M 溶液を使用した。 G F P はグリーン蛍光蛋白質 (G r e e n F l u o r e s c e n t P r o t e i n) である。 G F P 群では、エビは、 V P 1 9 を除いて、 V P 1 9 群に与えられたのと同じ混合物を摂取した。

ワクチン接種から 5 日後に、エビにブースター注射を行い、その 2 日後に W S S V の注射を行った。

【 0 0 6 3 】

攻撃誘発後、エビを 1 週間モニターし、 E L I S A アッセイと電子顕微鏡検査によって死亡したエビを W S S V の存在に関して検査した。陰性対照である 1 群においては、 W S S V のために死亡したエビはなかった。 2 群のエビは、 1 日半後から W S S V 感染による死亡が始まり、 5 日後に死亡率が 1 0 0 % に達した。ワクチン接種群 3 の最初の動物が 1 日半後に死亡したが、 2 群に比べてその後の死亡はより緩慢であった。 3 群は攻撃誘発から 6 日後に 1 0 0 % の死亡率に達し、陽性対照と比べて死亡率の明らかな遅延を示す。これは、 W S S V 蛋白質 V P 1 9 による P . m o n o d o n エビのワクチン接種が、 W S S V による攻撃誘発後のエビの生存率に明確な作用を及ぼすことを明らかにしている。

【 0 0 6 4 】

(参考文献)

【 0 0 6 5 】

【 表 2 】

10

20

30

40

Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., and Bonami, J. R. (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases Aquat. Organisms* 29, 205-211.

Flegel, T. W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 433-442.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. (1991). "Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Springer-Verlag, New York.

10

Lo, C. F., Hsu, H. C., Tsai, M. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Kou, G. H., and Lightner, D. V. (1999). Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *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., and Summers, M. D. (1995). "Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.". Virus Taxonomy Springer-Verlag, New York.

20

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual." 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Wonteerapupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamom, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnakul, B., and Flegel, T. W. (1995). 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*. *Diseases Aquat. Organisms* 21, 69-77.

Yang, F., Wang, W., Chen, R. Z., and Xu, X. (1997). A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. *J. Virol. Meth.* 67, 1-4.

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

レーン 1 : LMW マーカー (Amersham pharmacia biotech)、2 : 精製 WSSV の SDS-PAGE ゲル、3 : 過剰発現 VP19 の SDS-PAGE ゲル、4 : 過剰発現 VP19 の抗 WSSV によるウエスタンブロット、5 : 過剰発現 VP13 (ここでは VP15 と表示している) の SDS-PAGE ゲル。

【図 2】

この図は、WSSV による攻撃誘発後のエビの死亡率へのワクチン接種の影響のレベルを示す : - * - = VP19 ワクチン、- - = 陰性対照、- - = 陽性対照、- - = GFP 対照。

40

【 図 1 】

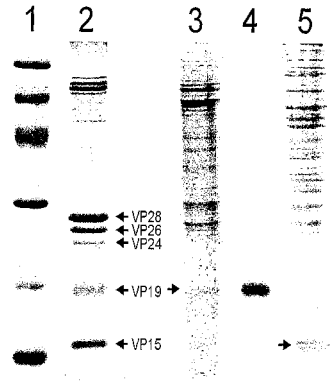


Figure 1

【 図 2 】

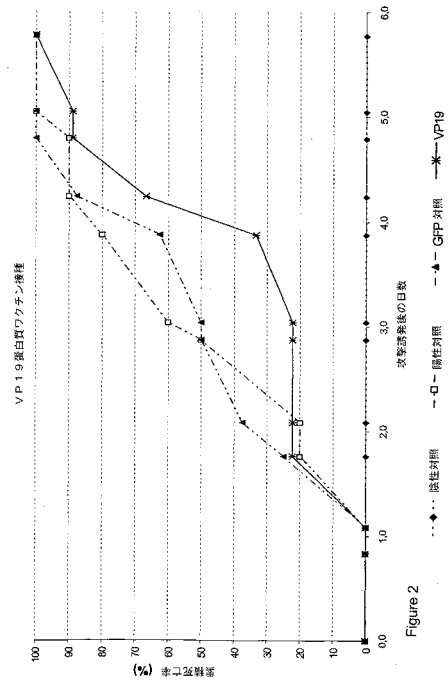


Figure 2

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22664 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/01 (74) Agent: KEUS, Jacobus, A.R., P.O. Box 20, NL-5340 BH Oss (NL).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/10679
- (22) International Filing Date: 14 September 2001 (14.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00203186.2 15 September 2000 (15.09.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): AKZO NOBEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Arnhem (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

- (72) Inventors: and
Inventors/Applicants (for US only): VLAK, Justinus, Maria [NL/NL]; Nieuwe Veenendaalseweg 214, NL-3911 Mr Rhemen (NL); VAN HULSTEN, Maria, Cornelia, Wilhelmina [NL/NL]; Salverdaaplein 10, NL-6701 DB Wageningen (NL).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/22664 A2

(54) Title: ANTIGENIC PROTEINS OF SHRIMP WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to antigenic proteins derived from White Spot Syndrome virus having an estimated size of 19 kDa (VP 19) or 13 kDa (VP13), to the use of these proteins in vaccines and to vaccines on the basis of these proteins. Furthermore, the invention relates to antibodies against these proteins and to the use of antibodies in vaccines, to nucleic acid sequences encoding these proteins and to their use in vaccines. Also, the invention relates to the use of said proteins in the manufacture of a vaccine for prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in crustaceans, to vector vaccines and to diagnostic kits comprising said nucleic acids or antibodies.

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

ANTIGENIC PROTEINS OF SHRIMP WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND USES THEREOF

The present invention relates to antigenic proteins derived from White Spot Syndrome virus, the use of these proteins in vaccines, to vaccines on the basis of these proteins, to antibodies against the proteins, to the use of these antibodies in vaccines, nucleic acid sequences encoding them and use of said proteins in the manufacture of a vaccine for prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in crustaceans, to vector vaccines and to diagnostic kits.

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is a major viral disease in shrimp world-wide. The virus has a wide host range among crustaceans (Flegel, 1997) and there is little genetic variation among isolates (Lo et al., 1999). Electron microscopy (EM) studies showed that the virions are enveloped and have a rod to bullet shaped appearance of about 275 nm in length and 120 nm wide with a tail-like appendage at one end. Nucleocapsids, which have lost their envelope, have a crosshatched appearance and a size of about 300 nm x 70 nm (Wongteerasupaya et al., 1995). This virion morphology, its nuclear localisation and its morphogenesis are reminiscent of baculoviruses in insects (Durand et al., 1997). Originally, WSSV has been classified as an unassigned member of the Baculoviridae family (Francki et al., 1991) hence the virus has been referred to as Systemic Ectodermal Mesodermal Baculovirus (SEMBV) or White Spot Baculovirus (WSBV). At present WSSV is no longer accepted into this family (Murphy et al., 1995) due to lack of molecular information. The double stranded viral DNA has a size of well over 200kb as derived from restriction endonuclease analysis (Yang et al., 1997).

An outbreak of WSSV in cultured shrimp causes mass mortality among shrimp. The disease is characterised by white spots on the carapace, appendages and cuticle and reddish coloration of the hepatopancreas of the shrimp. The infected shrimps show signs of lethargy and a rapid reduction in food consumption and within 3 to 5 days these shrimps die. An outbreak of WSSV leads to heavy losses in the industry of cultured shrimp and as a consequence there is a strong need for vaccines that can protect against WSSV infections. The identification and characterisation of major WSSV

CONFIRMATION COPY

proteins that can be used in such a vaccine would provide the means to develop such vaccines.

Two genes have been isolated and identified as *vp19* and *vp13*, coding for the respective proteins VP13 (13 kDa) and VP19 (19 kDa) due to their molecular weight estimated from their mobility in Coomassie Brilliant Blue-stained SDS-PAGE gels. VP19 is an envelope protein, whereas VP13 is a nucleocapsid protein. The open reading frame of *vp19* comprises 366 nucleotides as shown in SEQ ID NO1 together with the deduced amino acid sequence consisting of 121 amino acids (separately depicted as SEQ ID NO 2). The open reading frame of the gene *vp13* comprises at least the 186 nucleotides as depicted in SEQ ID NO 3. This ORF encodes a nucleocapsid protein VP13 comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO4. Two variants of protein VP13 were found, one having the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO 4, and a longer variant having the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO 5. The present invention provides a means to produce recombinant vaccines to protect crustaceans against infection with WSSV. The envelope protein VP19 and the nucleocapsid protein VP13 of WSSV which have been identified and characterised were found to be suitable for use in the manufacture of a subunit vaccine to protect crustaceans against infections with WSSV. The cloning and characterisation of the nucleotide sequences of the present invention provides for the production of these proteins of WSSV using recombinant technology techniques. In this way, WSSV proteins can be obtained, which are substantially free from other WSSV proteins. The isolated WSSV proteins can be used to manufacture subunit vaccines to protect crustaceans against infection of WSSV.

The proteins of the present invention are especially useful in marker vaccines. Such vaccines may comprise e.g. only VP13 and/or 19.

Alternatively the nucleotide sequences encoding the proteins of the WSSV can be used to manufacture vector vaccines to protect crustaceans against the infection with WSSV. The nucleotide sequences of the present invention can furthermore be used for diagnostic purposes, for instance to detect the presence of WSSV in the field. Additionally, the WSSV proteins of the present invention can be used to produce WSSV specific antibodies. These antibodies can be used to produce WSSV vaccines for

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

3

passive immunisation of crustaceans. The antibodies can also be used for diagnostic purposes such as the detection of WSSV in crustaceans or in the field.

Thus a first embodiment of the invention provides for an antigenic protein of WSSV that is suitable for immunising crustaceans against WSSV that has an amino acid sequence that is at least 70 % homologous to the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 and to immunogenic fragments of said protein.

In a preferred form, the embodiment relates to such WSSV proteins that have a sequence homology of at least 80 %, preferably 90 %, more preferably 95 % homology to the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 and to immunogenic fragments of such proteins.

Even more preferred is a homology level of 98% or even 100%.

The level of protein homology can be determined with the computer program "BLAST 2 SEQUENCES" by selecting sub-program: "BLASTP", that can be found at www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html.

A reference for this program is Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999). Matrix used: "blosum62". Parameters used are the default parameters:

Open gap: 11. Extension gap: 1. Gap x_dropoff: 50.

It will be understood that, for the particular proteins embraced herein, natural variations can exist between individual WSSV strains. These variations may be demonstrated by (an) amino acid difference(s) in the overall sequence or by deletions, substitutions, insertions, inversions or additions of (an) amino acid(s) in said sequence. Amino acid substitutions which do not essentially alter biological and immunological activities, have been described, e.g. by Neurath et al in "The Proteins" Academic Press New York (1979). Amino acid replacements between related amino acids or replacements which have occurred frequently in evolution are, inter alia, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (see Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res.

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

4

Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3). Other amino acid substitutions include Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val and Ala/Glu. Based on this information, Lipman and Pearson developed a method for rapid and sensitive protein comparison (Science, 227, 1435-1441, 1985) and determining the functional similarity between homologous proteins. Such amino acid substitutions of the exemplary embodiments of this invention, as well as variations having deletions and/or insertions are within the scope of the invention as long as the resulting proteins are not essentially affected in their antigenic or immunogenic properties.

This explains why WSSV proteins according to the invention, when isolated from different field isolates, may have homology levels of about 70%, while still representing the same protein with the same immunological characteristics.

Those variations in the amino acid sequence of a certain protein according to the invention that still provide a protein capable of inducing an immune response against infection with WSSV or at least against the clinical manifestations of the infection are considered as "not essentially affecting the antigenic or immunogenic properties of said protein".

When a protein is used for e.g. vaccination purposes or for raising antibodies, it is however not necessary to use the whole protein. It is also possible to use a fragment of that protein that is capable, as such or coupled to a carrier such as e.g. KLH, of inducing an immune response against that protein, a so-called immunogenic fragment. An "immunogenic fragment" is understood to be a fragment of the full-length protein that still has retained its capability to induce an immune response in a vertebrate host, i.e. comprises a B- or T-cell epitope. Antibodies raised in a vertebrate host are very suitable as passive means of vaccination in shrimps. At this moment, a variety of techniques is available to easily identify DNA fragments encoding antigenic fragments (determinants). The method described by Geysen et al (Patent Application WO 84/03564, Patent Application WO 86/06487, US Patent NR. 4,833,092, Proc. Natl Acad. Sci. 81: 3998-4002 (1984), J. Imm. Meth. 102, 259-274 (1987), the so-called PEPSCAN method is an easy to perform, quick and well-established method for the detection of epitopes; the

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

5

immunologically important regions of the protein. The method is used world-wide and as such well-known to man skilled in the art. This (empirical) method is especially suitable for the detection of B-cell epitopes. Also, given the sequence of the gene encoding any protein, computer algorithms are able to designate specific protein fragments as the immunologically important epitopes on the basis of their sequential and/or structural agreement with epitopes that are now known. The determination of these regions is based on a combination of the hydrophilicity criteria according to Hopp and Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 38248-3828 (1981)), and the secondary structure aspects according to Chou and Fasman (Advances in Enzymology 47: 45-148 (1987) and US Patent 4,554,101). T-cell epitopes can likewise be predicted from the sequence by computer with the aid of Berzofsky's amphiphilicity criterion (Science 235, 1059-1062 (1987) and US Patent application NTIS US 07/005,885). A condensed overview is found in: Shan Lu on common principles: Tibtech 9: 238-242 (1991), Good et al on Malaria epitopes; Science 235: 1059-1062 (1987), Lu for a review; Vaccine 10: 3-7 (1992), Berzowsky for HIV-epitopes; The FASEB Journal 5:2412-2418 (1991).

Another embodiment of the invention relates to vaccines capable of protecting shrimp against WSSV infection, that comprise an antibody reactive with a protein or immunogenic fragment according to the invention as described above, together with a pharmaceutically acceptable carrier.

Still another embodiment of the invention relates to vaccines capable of protecting shrimp against WSSV infection, that comprise a protein or immunogenic fragment thereof according to the invention as described above together with a pharmaceutically acceptable carrier.

Still another embodiment of the invention relates to a nucleic acid sequence encoding an antigenic protein according to the invention, or an immunogenic fragment thereof. More particularly this embodiment of the invention relates to a nucleic acid sequence encoding an antigenic protein or an immunogenic fragment thereof comprising an amino acid sequence as depicted in SEQ ID No.'s 2, 4, or 5.

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

6

Preferably, the nucleic acid sequence has or comprises the sequence as depicted in SEQ ID NO 1 or 3. The respective nucleotide sequences start with the ATG codon encoding the first M residue of the deduced amino acid sequence up to the codon encoding the C-terminal amino acid residue. It must be understood that for the purpose of this invention nucleic acid sequences that have sequence homology with the sequences depicted in SEQ ID NO1 or SEQ ID NO 3 are also within the scope of the invention. The sequence homology for the purpose of this invention is considered to be at least 70%, preferably 75%, more preferably 80%, even more preferably 85%. Highly preferred are nucleic acid sequences that have sequence homology with the sequences depicted in SEQ ID NO 1 or 3 of at least 90% more preferably 95%. Homologies of 98 % or even 100% are even more preferred.

For the purpose of this invention sequence homology is determined by comparing the nucleotide sequence of interest with the corresponding part of the sequence depicted in SEQ ID NO 1 or 3. For the purpose of this invention the percentage sequence homology is defined as the percentage of identical nucleotides between the compared sequences.

The level of nucleotide homology can be determined with the computer program "BLAST 2 SEQUENCES" by selecting sub-program: "BLASTN" that can be found at www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html.

A reference for this program is Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999). Parameters used are the default parameters: Reward for a match: +1. Penalty for a mismatch: -2. Open gap: 5. Extension gap: 2. Gap x_dropoff: 50.

Nucleic acid sequences having sequence homology according to the invention can easily be isolated with one of the sequences depicted in SEQ ID NO 1 or 3 or with fragments of this sequence from closely related WSSV strains using routine cloning and hybridisation techniques. For this purpose hybridisation is carried out under stringent, preferably highly stringent conditions. Stringent hybridisation conditions are understood to be washing conditions of 1 x SSC, 0.1%SDS at a temperature of 65°C; highly stringent conditions refer to washing conditions in which the concentration SSC is being

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

7

lowered towards 0.3 x SSC. The specific information should not be so narrowly interpreted so as to require exclusion of erroneously identified bases. The specific sequences disclosed herein can be readily used to isolate homologous nucleotide sequences from other strains.

5 A nucleic acid sequence that has sequence homology with one of the sequences depicted in SEQ ID NO 1 or 3 encodes a protein having an amino acid sequence which comprises alterations compared to one of the amino acid sequences depicted in SEQ ID No.'s 2, 4, or 5, whereby said alterations do not essentially affect the antigenic or immunogenic properties of said protein.

10 The WSSV proteins according to the invention can be obtained via standard biochemical isolation and purification methods or they can be prepared via general recombinant technology. The nucleotide sequences according to the invention are particularly suitable to be used for the recombinant production of WSSV proteins, substantially free from other WSSV proteins. The nucleotide sequences are incorporated into a suitable expression vector capable of expressing the proteins, transforming a suitable host cell with said expression vector and culturing the host cell in a suitable medium. The expressed proteins can be isolated and purified from the cells or the medium. Suitable expression vectors are, amongst others, plasmids, cosmids, viruses and YAC's (Yeast Artificial Chromosomes) which comprise the necessary control regions for replication and expression. The expression vector can be brought to expression on a host cell. Suitable host cells are, for instance, bacteria, yeast cells, insect cells and mammalian cells. Such expression techniques are well known in the art (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989; King and Possee, 1992).

25 In addition, the nucleic acid sequences according to the invention can be used to manufacture a vector vaccine to vaccinate crustaceans against WSSV infections. A vector vaccine is understood to be a vaccine in which a live, attenuated bacterium or virus has been modified so that it contains one or more heterologous nucleotide sequences inserted into its genetic material. These so called vector bacteria or viruses are capable of co-expressing the heterologous proteins encoded by the inserted

30

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

8

nucleotides. Thus in a fourth aspect the invention provides for a vector vaccine for use in prophylaxis or treatment of White Spot Syndrome in crustaceans comprising a live attenuated bacteria or virus and a pharmaceutically acceptable carrier, in which said bacteria or virus has been modified to comprise in its genetic material one or more of the nucleotide sequences of the present invention. Shrimp infected with such LRCs will produce an immunological response not only against the immunogens of the carrier, but also against the immunogenic parts of the protein(s) for which the genetic code is additionally cloned into the LRC.

As an example of bacterial LRCs, bacteria such as *Vibrio anguillarum* known in the art can attractively be used. (Singer, J.T. et al., *New Developments in Marine Biotechnology*, p. 303-306, Eds. Le Gal and Halvorson, Plenum Press, New York, 1998).

Also, LRC viruses may be used as a way of transporting the nucleic acid sequence into a target cell. Viruses suitable for this task are e.g. Yellow Head virus and Gill Associated virus, both belonging to the family coronaviridae. (see e.g. Spann, K.M. et al., *Dis. Aquat. Org.* 42: 221-225, (2000), and Cowley, J.A. et al., *Dis. Aquat. Org.* 36: 153-157 (1999) for the virus, or Enjuanes, L. et al., p. 28-31 of the Proceedings of the ESVV, Brescia, Italia, 27-30 August 2000 for live recombinant carrier corona viruses).

The technique of *in vivo* homologous recombination, well-known in the art, can be used to introduce a recombinant nucleic acid sequence into the genome of a bacterium or virus of choice, capable of inducing expression of the inserted nucleic acid sequence according to the invention in the host animal.

An alternative and efficient way of vaccination is direct vaccination with DNA encoding the relevant antigen. Direct vaccination with DNA encoding proteins has been successful for many different proteins. (As reviewed in e.g. Donnelly et al., *The Immunologist* 2: 20-26 (1993)). This way of vaccination is attractive for the vaccination of shrimp against WSSV infection. Therefore, still another embodiment of the invention relate to vaccines comprising a pharmaceutically acceptable carrier and nucleic acid

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

9

sequences encoding a protein according to the invention or immunogenic fragments thereof, or DNA fragments, e.g. plasmids, that comprise such nucleic acid sequences.

5 Still another embodiment of the present invention relates to a protein according to the invention for use in a vaccine.

Again another embodiment of the invention relates to the use of a protein according to the invention for the manufacturing of a vaccine for combating WSSV infections.

10 A vaccine according to the invention can be used to protect crustaceans such as shrimps including but not limited to members from the *Penaëidae* family such as for example *P.monodon*, *P.vannameti*, *P.chinensis*, *P.merguensis*, or *Metapeaëus spp.*; prawns including but not limited to members from the *Palaemonidae* family such as for example *Macrobrachium spp.* or *Palaemon spp.*; lobsters including but not limited to
15 members from the *Palinuridae* and *Nephropidae* family such as for example *Callinectes spp.*, *Palinurus spp.*, *Panuliris spp.* or *Homarus spp.*; crayfish including but not limited to members from the *Astacidae* family examples of which are *Astacus spp.*, *Procambarus spp.*, and *Oronectes spp.*; and crab including but not limited to members from the *Cancridae* and *Portuidae* family, examples of which are *Cancer spp.*, *Callinectes spp.*,
20 *Carcinus spp.* and *Portunus spp.*

A vaccine according to the invention can be prepared according to techniques well known to the skilled practitioner and described for instance in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition (1990), eds. A.R. Gennaro et al., chapter 72, pp. 1389-1404, Philadelphia College of Pharmacy and Science.

25 Vaccines according to the invention comprise an effective amount of one or more proteins, vector bacteria or virus according to the invention, and a pharmaceutical acceptable carrier. The term "effective " as used herein is defined as the amount sufficient to induce a protective response in the crustaceans. The amount of vector or protein will depend on the type of vector or protein, the route of administration, the time
30 of administration, the species to be vaccinated as well as age, general health, temperature and diet.

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

10

- In general, a dosage of 0.01 to 1000 µg protein per animal, preferably 0.5 to 500 µg, more preferably 1 to 100 µg protein per animal can be used. In case of viral vector vaccines in general a dosage of 10^3 to 10^8 pfu (plaque forming units) per animal can very efficiently be used. Bacterial vector vaccines can be given very efficiently in doses of 10^3 to 10^8 bacteria.
- 5 For DNA vaccination, amounts of DNA between 0.1 and 10 µg DNA per animal are very usefull doses.
- Pharmaceutically acceptable carriers that are suitable for use in a vaccine according to the invention are sterile and physiologically compatible such as for example sterile
- 10 water, saline, aqueous buffers such as alkali metal phosphates (e.g. PBS), alcohol's, polyols and the like. In addition a vaccine according to the invention may comprise other additives such as adjuvants, stabilisers, anti-oxidants, preservatives and others. Suitable adjuvants include but are not limited to aluminium salts or gels, carbomers, non-ionic block copolymers, tocopherols, monophosphoryllipid A, muramyl dipeptide, oil
- 15 emulsions, glucans, cytokines, saponins such as Quil A, and the like. The amount of adjuvant added depends on the nature of the adjuvant itself.
- Suitable stabilisers for use in a vaccine according to the invention include but are not limited to carbohydrates such as sorbitol, mannitol, starch, sucrose, dextrin, and glucose, proteins such as albumin or casein, and buffers like alkaline phosphates.
- 20 Suitable preservatives include amongst others thimerosal and merthiolate.
- The vaccines according to the invention can be administered via injection, immersion, dipping, spray or aerosol, or per oral. Preferably the vaccine is administered to the crustaceans via immersion or per oral, especially in case of commercial aqua culture farms.
- 25 For oral administration the vaccine is preferably mixed with a suitable carrier for oral administration i.e. cellulose, food or a metabolisable substance such as alpha-cellulose or different oils of vegetable or animals origin. Particularly preferred food carriers for oral delivery of the vaccine according to the invention are live-feed organisms which are able to encapsulate the vaccine. A very suitable way of obtaining this is to feed e.g. insect
- 30 cells in which a protein according to the invention has been expressed, to live-feed organisms. Suitable live-feed organisms include but are not limited to plankton-like non-

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

11

selective filter feeders preferably members of Rotifera, *Artemia*, and the like. Highly preferred is the brine shrimp *Artemia sp.*

The proteins according to the invention can be used for the production of antibodies, using the general techniques available to the practitioner in the field. Preferably the proteins are used to produce specific monoclonal antibodies. Antibodies according to the invention can be prepared according to standard techniques. Procedures for immunising animals, e.g. mice with proteins and procedures for selection of hybridomas producing protein-specific monoclonal antibodies are well known in the art (see for example Cligan et al. (eds), Current protocols in Immunology 1992; Kohler and Milstein, Nature 256, pp. 495-497, 1975; Steenbakkers et al., Mol. Biol. Rep. 19, pp. 125-134, 1994). The obtained antibodies may be utilised in diagnostics to detect WSSV in the field or to detect the presence of WSSV in the crustaceans. The nucleotide sequences according to the invention are also suitable for use in diagnostics. Said sequences or fragments thereof can be used in for instance PCR technology to detect the presence of WSSV in the field, or in the crustaceans.

A diagnostic test for the detection of WSSV is e.g. based upon the reaction of DNA isolated from the animal to be tested, with specific probes or it is e.g. a PCR test based upon the coding sequences for the proteins according to the invention or based upon nucleic acid sequences that are complementary to those coding sequences. If nucleic acid molecules specific for the WSSV proteins according to the invention are present in the animal, these will e.g. specifically bind to specific PCR-primers and will subsequently become amplified in PCR-reaction. The PCR-reaction product can then easily be detected in DNA gel electrophoresis. PCR reactions are well-known in the art (see reference below). The nucleic acid molecules can most easily be isolated from the hepatopancreas of the animal to be tested. Standard PCR-textbooks give methods for determining the length of the primers for selective PCR-reactions with nucleic acid molecules specific for proteins according to the invention. Primers with a nucleotide sequence of at least 12 nucleotides are frequently used, but primers of more than 15, more preferably 18 nucleotides are somewhat more selective. Especially primers with a

CONFIRMATION COPY

length of at least 20, preferably at least 30 nucleotides are very generally applicable. PCR-techniques are extensively described in (Dieffenbach & Drexler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-5 (1995)).

5 Nucleic acid molecules encoding a WSSV protein according to the invention or parts of those nucleic acid molecules having a length of at least 12, preferably 15, more preferably 18, even more preferably 20, 22, 25, 30, 35 or 40 nucleotides in that order of preference, wherein the nucleic acid molecules or parts hereof have at least 70 % homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1 or 3 or a nucleic acid sequence that is complementary to nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID
10 NO: 1 or 3 are therefore also part of the invention. Such nucleic acid molecules can e.g. be used as primers in PCR-reactions in order to enhance the amount of nucleic acid that encodes the proteins according to the invention. This allows the quick amplification of specific nucleotide sequences for use as a diagnostic tool for e.g. the detection of WSSV in tissue as indicated above.

15 Another nucleic acid-based test is based upon classical hybridisation with radioactively or colour labelled protein-specific cDNA-fragments. Both PCR-reactions and hybridisation reactions are well-known in the art and are i.a. described in Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6).
20

Thus, another embodiment of the invention relates to a diagnostic kit for the detection of WSSV wherein the test comprises a nucleic acid sequence that is at least 70 % homologous to the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1 or 3 or a
25 nucleotide sequence that is complementary to that nucleic acid sequence, or a fragment thereof having a length of at least 12, preferably 15, more preferably 18 nucleotides.

A diagnostic test based upon the detection of antigenic material of WSSV proteins and therefore suitable for the detection of WSSV infection can e.g. also be a standard
30 sandwich-ELISA test. In one example of such a test the walls of the wells of an ELISA plate are coated with antibodies directed against the protein according to the invention

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

13

or immunogenic fragments thereof. After incubation with the material to be tested, labelled anti-WSSV antibodies are added to the wells. A colour reaction then reveals the presence of antigenic material from WSSV.

Therefore, still another embodiment of the present invention relates to a diagnostic test for the detection of WSSV, characterised in that said test comprises antibodies against a protein or an immunogenic fragment thereof according to the invention.

Thus, in another aspect, the present invention provides for a diagnostic kit comprising one or more nucleotide sequences or antibodies according to the invention.

The antibodies raised against the proteins according to the invention can further be used to manufacture antibody vaccines for the passive immunisation of the crustaceans. Thus, in a further aspect, the present invention provides for a vaccine for passive immunisation against WSSV wherein the vaccine comprises antibodies raised against a protein comprising an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 or SEQ ID NO 5. Such a vaccine can be prepared using standard techniques, as mentioned above. Preferably a vaccine for oral administration of the antibodies is prepared, in which the antibodies are mixed with an edible carrier such as fish food. More preferably, the vaccine is prepared from antibodies prepared in chicken eggs (IgY antibodies).

Methods for large-scale production of antibodies according to the invention are also known in the art. Such methods rely on the cloning of (fragments of) the genetic information encoding the protein according to the invention in a filamentous phage for phage display. Such techniques are described i.a. at the "Antibody Engineering Page" under "filamentous phage display" at <http://axim11.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html>, and in review papers by Cortese, R. et al., (1994) in Trends Biotechn. 12: 262-267., by Clackson, T. & Wells, J.A. (1994) in Trends Biotechn. 12: 173-183, by Marks, J.D. et al., (1992) in J. Biol. Chem. 267: 16007-16010, by Winter, G. et al., (1994) in Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455, and by Little, M. et al., (1994) Biotechn. Adv. 12: 539-555. The phages are subsequently used to screen camelid expression libraries expressing camelid heavy chain antibodies. (Muyldermans,

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

14

S. and Lauwereys, M., *Journ. Molec. Recogn.* 12: 131-140 (1999) and Ghahroudi, M.A. et al., *FEBS Letters* 414: 512-526 (1997)). Cells from the library that express the desired antibodies can be replicated and subsequently be used for large scale expression of antibodies.

5

REFERENCES

- Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., and Bonami, J. R. (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases Aquat. Organisms* 29, 205-211.
- Flegel, T. W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 433-442.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. (1991). "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., and Lightner, D. V. (1999). Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *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., and Summers, M. D. (1995). "Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Virus Taxonomy Springer-Verlag, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual." 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Wontearasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamom, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnamkul, B., and Flegel, T. W. (1995). 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*. *Diseases Aquat. Organisms* 21, 69-77.

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

15

Yang, F., Wang, W., Chen, R. Z., and Xu, X. (1997). A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. *J. Virol. Meth.* 67, 1-4.

CONFIRMATION COPY

EXAMPLES**Example 1****Vaccination of *Penaeus monodon* with WSSV protein VP19.****5 Virus stock production**

A WSSV virus stock was produced in the crayfish *Procambarus clarkii* by intramuscular injection of purified WSSV. In order to determine the dilution resulting in 90-100% mortality in the black tiger shrimp *P. monodon*, an *in vivo* virus titration was performed using animals of approximately 1 gram in weight. The virus stock was diluted in steps from 1×10^6 to 5×10^{11} times in 330 mM NaCl and for each dilution 10 μ l was injected intramuscularly into 10 shrimps. Shrimps that were injected with 330 mM NaCl, served as negative control for the infection. All shrimps serving as negative control (not shown) and those having received the 5×10^{11} virus dilution survived, whereas mortality due to virus infection occurred in all groups with a lower virus dilution. Administration of virus dilutions of 1×10^6 and 1×10^7 resulted in almost 100% mortality in a period of 20 days. A delay in mortality was observed when virus dilutions of 1×10^8 and 5×10^8 were used. The 1×10^8 dilution resulted in 90% final mortality, but the time of mortality was delayed and spanned a period of 40 days. The experiment was repeated with the 1×10^7 , the 1×10^8 , and the 5×10^8 dilution yielding essentially the same results. The dilution of 1×10^8 was chosen as the virus dose for further experiments as this condition was expected to give the optimal response to the neutralisation in terms of mortality reduction.

Expression of WSSV proteins VP19 and VP13 in insect cells

The VP19 and VP13 ORFs were expressed in insect cells using a baculovirus vector. The Bac-to-Bac system (GIBCO BRL) was used to generate recombinant baculoviruses (AcMNPV) expressing the putative WSSV virion proteins VP19 and VP13 from the baculovirus polyhedrin promoter in insect cells. Recombinant viruses were generated expressing the Green Fluorescent Protein (GFP) from the p10 promoter and each of the WSSV proteins from the baculovirus polyhedrin promoter.

30 Sf21 insect cells were infected with AcMNPV-WSSVvp19, and AcMNPV-WSSVvp13 with a MOI of 5 and harvested at 72 h. post infection. Extracts of infected Sf21 cells

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

17

were analysed in a 15% SDS-PAGE gel (Fig. 1). Clear expression products can be observed for VP13 (Fig. 1, lane 5, and indicated here as VP15), which has the same electrophoretic mobility as its authentic counterpart in the WSSV virion (Fig. 1, lane 2). A (less clear, but clearly visible) expression product could be observed for VP19 (Fig. 1, lane 3). Therefore, a western analysis was carried out using a polyclonal antiserum raised against purified WSSV. This analysis showed that VP19 was expressed at the expected position (Fig. 1, lane 4), and hence that the *vp19* ORF encoded a WSSV virion protein.

10 **Vaccination and challenge**

The experiment was set up according to the plan in table 1. Four experimental groups were used; two control groups, the negative and positive control, one group receiving VP19 and one group receiving GFP. In the GFP group, shrimps received the same mixture that was given to the VP19 group, with the exception of VP19.

15

Table 1. Group set-up of vaccination experiment

Group #	Group name	Vaccination	Booster	Challenge	# shrimp
1	Neg. control	330 mM NaCl	330 mM NaCl	330 mM NaCl	10
2	Pos. control	330 mM NaCl	330 mM NaCl	WSSV	10
3	VP19	VP19	VP19	WSSV	10
4	GFP	GFP	GFP	WSSV	10

All groups were injected with 20 μ l of their respective solutions. For the VP19 group and the GFP group a total amount of 15 μ g of protein was administered for both the vaccination and booster. For dilution of the protein solutions, as well as the virus controls, a 330 mM NaCl solution was used. GFP is Green Fluorescent Protein. In the GFP group, shrimps received the same mixture that was given to the VP19 group, with the exception of VP19.

Five days after the vaccination, the shrimp were given a booster injection, two days later followed by injection of WSSV.

25

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

18

After the challenge, the shrimp were monitored for one week and dead shrimp were examined for the presence of WSSV by ELISA assays and electron microscopy.

None of the shrimp in group 1, the negative control, died of WSSV. Group 2 shrimps started dying of WSSV infection after one and a half-day and a mortality of 100% was reached after 5 days. The first animals in vaccination groups 3 died after one and a half day, but continued slower compared to group 2. Group 3 reached 100% mortality after six days post challenge and shows a clear delay in mortality compared to the positive control. This demonstrates that vaccination of *P. monodon* shrimp with the WSSV protein VP19 has a positive effect on the survival rate of the shrimps after challenge with

5

10 WSSV.

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

19

Legend to the figures

- Figure 1.** Lane 1 LMW Marker (Amersham pharmacia biotech), 2 SDS-PAGE gel of Purified WSSV, 3 SDS-PAGE gel of over-expressed VP19, 4 Western blot with anti-WSSV of over-expressed VP19, 5 SDS-PAGE gel of over-expressed VP13 (indicated here as VP15).
- 5
- Figure 2.** This figure shows the level of effect of vaccination on mortality of shrimps after challenge with WSSV; -* = VP19 vaccine, -◆ = negative control, -□ = positive control, -▲ = GFP control.
- 10

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

20

Claims:

- 1) Antigenic protein of WSSV suitable for immunising crustaceans against WSSV, characterised in that said antigenic protein has an amino acid sequence that is at least 70 % homologous to the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 or an immunogenic fragment of said antigenic protein.
- 2) Antigenic protein according to claim 1, characterised in that it has a sequence homology of at least 80 %, preferably 90 %, more preferably 95 % homology to the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 or an immunogenic fragment of said antigenic protein.
- 3) Vaccine capable of protecting shrimp against WSSV infection characterised in that said vaccine comprises a protein or immunogenic fragment thereof according to claim 1 or 2 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 4) Nucleic acid sequence encoding an antigenic protein according to claim 1 or 2, or an immunogenic fragment of said protein.
- 5) Nucleic acid sequence according to claim 4, characterised in that said nucleic acid sequence comprises a sequence as depicted in SEQ ID NO 1 or SEQ ID NO 3.
- 6) Vector vaccine for use in prophylaxis or treatment of White Spot Syndrome in crustaceans, characterised in that said vaccine comprises a live attenuated bacterium or live attenuated virus, said bacterium or virus comprising in its genome a heterologous nucleic acid sequence according to claim 4 or 5.
- 7) Antigenic protein according to claim 1 or 2 for use in a vaccine.
- 8) Use of an antigenic protein according to claim 1 or 2 for the manufacturing of a vaccine for combating WSSV infections.
- 9) Antibodies raised against a protein according to claim 1 or 2.
- 10) Vaccine comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least an antibody according to claim 9.
- 11) Vaccine comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a nucleic acid sequence according to claim 4 or 5.

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

21

- 12) Diagnostic kit for detection of WSSV characterised in that said kit comprises a nucleic acid sequence that is at least 70 % homologous to the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1 or 3 or a nucleotide sequence that is complementary to that nucleic acid sequence, or a fragment thereof having a length of at least 12, preferably 15, more preferably 18 nucleotides, an antigenic protein according to claim 1 or 2 or an immunogenic fragment thereof, or an antibody according to claim 9.

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

1/2

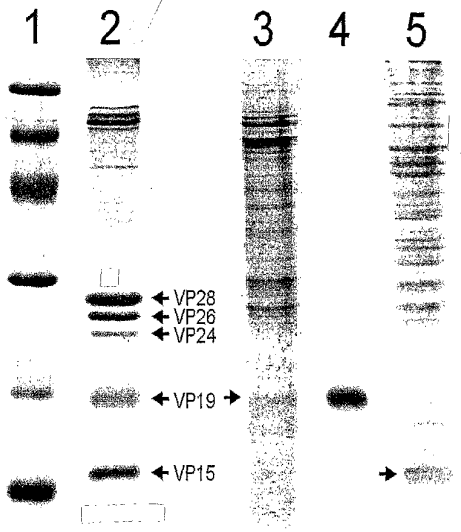


Figure 1

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

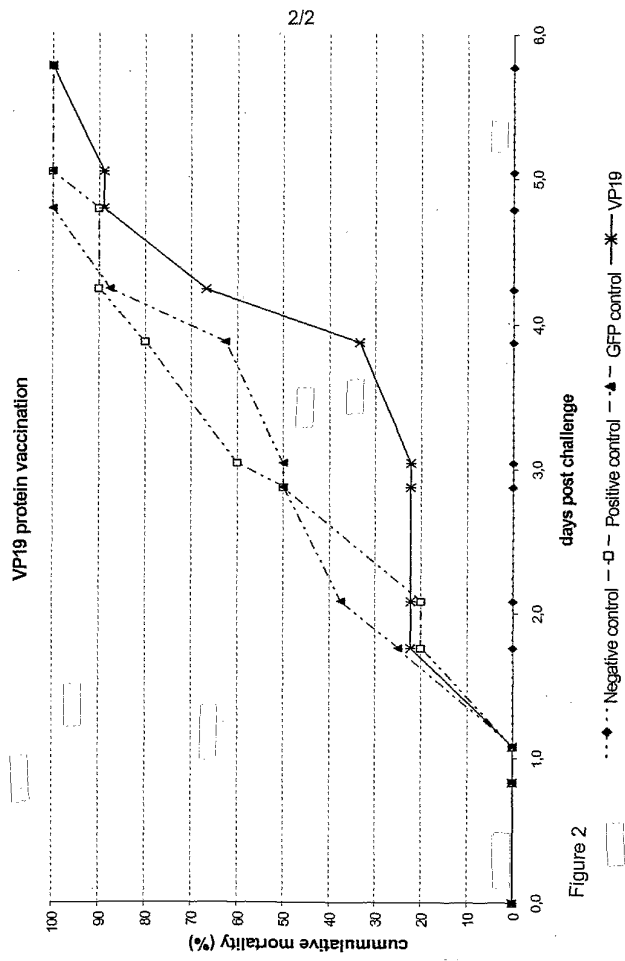


Figure 2

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

1

SEQUENCE LISTING

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> Antigenic proteins of Shrimp White Spot Syndrome virus
and uses thereof

<130> 2000558ep/pd

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> white spot syndrome virus

<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

```

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

2

PCT/EP01/10679

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> white spot syndrome virus

<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

CONFIRMATION COPY

WO 02/22664

3

PCT/EP01/10679

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> white spot syndrome virus

<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 gga gcc 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> white spot syndrome virus

WO 02/22664

PCT/EP01/10679

4

<400> 4

Met Val Ala Arg Ser Ser Lys Thr Lys Ser Arg Arg Gly Ser Lys Lys
 1 5 10 15

Arg Ser Thr Thr Ala Gly Arg Ile Ser Lys Arg Arg Ser Pro Ser Met
 20 25 30

Lys Lys Arg Ala Gly Lys Lys Ser Ser Thr Val Arg Arg Arg Ser Ser
 35 40 45

Lys Ser Gly Lys Lys Ser Gly Ala Arg Lys Ser Arg Arg
 50 55 60

<210> 5

<211> 80

<212> PRT

<213> white spot syndrome virus

<400> 5

Met Thr Lys Tyr Pro Glu Asn Lys Arg Leu Leu Ser Arg Asn Lys Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Lys Met Val Ala Arg Ser Ser Lys Thr Lys Ser Arg Arg Gly
 20 25 30

Ser Lys Lys Arg Ser Thr Thr Ala Gly Arg Ile Ser Lys Arg Arg Ser
 35 40 45

Pro Ser Met Lys Lys Arg Ala Gly Lys Lys Ser Ser Thr Val Arg Arg
 50 55 60

Arg Ser Ser Lys Ser Gly Lys Lys Ser Gly Ala Arg Lys Ser Arg Arg
 65 70 75 80

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/022664 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/34, C07K 14/01, A61K 39/12, C07K 16/08, C12N 15/86, G01N 33/569, C12Q 1/70 (74) Agent: KEUS, Jacobus, A.R., Intervet International B.V., Patent Department, Wim de Koverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer (NL).

(21) International Application Number: PCT/EP01/10679 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NG, NZ, NI, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(22) International Filing Date: 14 September 2001 (14.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

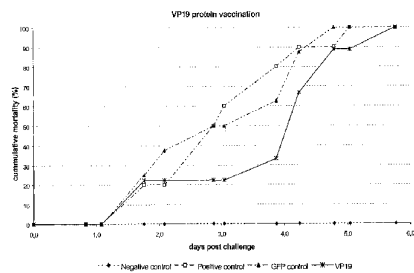
(30) Priority Data: 002031862 15 September 2000 (15.09.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): AKZO NOBEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Arnhem (NL). (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: with international search report

(72) Inventors: and (75) Inventors/Applicants (for US only): VLAK, Justinus, Maria [NL/NL]; Nieuwe Veenendalseweg 214, NL-5911 Mr Rhenen (NL); VAN HULSTEN, Maria, Cornelia, Wilhelmina [NL/NL]; Salverdaplein 10, NL-6701 DB Wageningen (NL). (88) Date of publication of the international search report: 9 October 2003 For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTIGENIC PROTEINS OF SHRIMP WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND USES THEREOF



(57) Abstract: The present invention relates to antigenic proteins derived from White Spot Syndrome virus having an estimated size of 19 kDa (VP 19) or 13 kDa (VP13), to the use of these proteins in vaccines and to vaccines on the basis of these proteins. Furthermore, the invention relates to antibodies against these proteins and to the use of antibodies in vaccines, to nucleic acid sequences encoding these proteins and to their use in vaccines. Also, the invention relates to the use of said proteins in the manufacture of a vaccine for prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in crustaceans, to vector vaccines and to diagnostic kits comprising said nucleic acids or antibodies.

WO 02/022664 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/10679
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/34 C07K14/01 A61K39/12 C07K16/08 C12N15/86 601N33/569 C12Q1/70		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, Q. ET AL.: "Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus" ARCHIVES OF VIROLOGY, 17 February 2000 (2000-02-17), page 263 XP001004539 the whole document	1,2
X	VAN HULTEN MC, WESTENBERG M, GOODALL SD, VLAK JM.: "Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp." VIROLOGY. 2000 JAN 20;266(2):227-36., XP002155538 the whole document	1,2,4,5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see applicant) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art ** document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 January 2003		Date of mailing of the international search report 20. 01. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 800 nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Chambonnet, F

Form PCTISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 01/10679

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LO C -F ET AL: "SPECIFIC GENOMIC DNA FRAGMENT ANALYSIS OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL CLINICAL SAMPLES OF SHRIMP WHITE SPOT SYNDROME VIRUS" DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS,XX,XX, vol. 35, no. 3, 26 February 1999 (1999-02-26), pages 175-185, XP000878518 cited in the application the whole document	4
X	VAN HULTEN MC, TSAI MF, SCHIPPER CA, LO CF, KOU GH, VLAK JM.: "Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions." J GEN VIROL. 2000 FEB;81 PT 2:307-16., XP001004422 the whole document	4
X	YANG F ET AL: "A SIMPLE AND EFFICIENT METHOD FOR PURIFICATION OF PRAWN BACULOVIRUS DNA" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS,NL,AMSTERDAM, vol. 67, no. 1, 1997, pages 1-4, XP000878721 ISSN: 0166-0934 cited in the application the whole document	4
X	EP 0 785 255 A (WANG CHUNG HSIUNG ;LU CHU FANG (TW); KOU GUANG HSIUNG (TW)) 23 July 1997 (1997-07-23) the whole document	4
A	E CESAR B NADALA ET AL: "A COMPARATIVE STUDY OF THREE DIFFERENT ISOLATES OF WHITE SPOT VIRUS" DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS,XX,XX, vol. 33, no. 3, 30 July 1998 (1998-07-30), pages 231-234, XP000989432 cited in the application the whole document	8
T	WO 01 09340 A (VLAK JUSTINUS MARIA ;AKZO NOBEL NV (NL); HULTEN MARIA CORNELIA WIL) 8 February 2001 (2001-02-08) page 1, paragraph 4 -page 4, paragraph 3; figure SEQ.ID.NO6 page 5, paragraph 3 -page 8, paragraph 3; claims 1,3-5,7-11 -/-	1-12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 01/10679
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	VAN HULTEN MARIELLE C W; REIJNS MARTIN; VERMEESCH ANGELA M G; ZANDBERGEN FOKKO; VLAK JUST M: "Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) " JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 83, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 257-265, XP002226302 the whole document	1
T	YANG, F., HE, J., LIN, X., LI, Q., PAN, D., ZHANG, X., XU, X.: "Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. " J. VIROL. 75:11811-11820, vol. 75, no. 3, December 2001 (2001-12), pages 11811-11820, XP002226303 the whole document	1
X.P	HULTEN VAN M C W ET AL: "THREE FUNCTIONALLY DIVERGED MAJOR STRUCTURAL PROTEINS OF WHITE SPOTSYNDROME VIRUS EVOLVED BY GENE DUPLICATION" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 81, no. PART 10, October 2000 (2000-10), pages 2525-2529, XP001004423 ISSN: 0022-1317 the whole document	1
A.P	TSAI M-F ET AL: "TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENES OF SHRIMP WHITE SPOT SYNDROME VIRUS" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 277, no. 1, 10 November 2000 (2000-11-10), pages 92-99, XP000993593 ISSN: 0042-6822 the whole document	1
A	MAEDA M ET AL: "EFFECT OF VARIOUS TREATMENTS ON WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) FROM PENAEUS JAPONICUS (JAPAN) AND P. MONODON (THAILAND)" FISH PATHOLOGY, XX, JP, vol. 33, no. 4, 1998, pages 381-387, XP000924908 the whole document	3,8
	--- -/-	

Form PCT/ISA/216 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/10679

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NUNAN L M ET AL: "DEVELOPMENT OF A NON-RADIOACTIVE GENE PROBE BY PCR FOR DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, AMSTERDAM, NL vol. 63, no. 1/2, 1997, pages 193-201, XP000878720 ISSN: 0166-0934 the whole document ----	12
A	HSU H-C ET AL: "STUDIES ON EFFECTIVE PCR SCREENING STRATEGIES FOR WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) DETECTION IN PENAEUS MONODON BROODERS" DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS, XX, XX, vol. 39, no. 13-19, 22 December 1999 (1999-12-22), pages 13-19, XP001009704 the whole document -----	12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/10679
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 01 10679

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claim : Partially 1 to 12

Vaccine for use in prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in Crustaceans comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; vector vaccine for use in prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in crustaceans characterised in that said vaccine comprises an attenuated bacterium or attenuated virus, said bacterium or virus comprising in its genome a heterologous nucleic acid sequence encoding at least a protein comprising the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO 2; nucleic acid encoding said protein, and particularly comprising the nucleic acid sequence depicted in SEQ ID NO 1; antigenic protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV) suitable for immunising Crustaceans against WSSV characterised in that said protein comprises the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; use of said protein as a medicament; pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least said protein or at least said nucleic acid sequence; antibodies raised against said protein; vaccine or pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle and at least said antibody; diagnostic kit for detection of WSSV characterised in that said kit comprises a nucleic acid that is at least 70% homologous to said sequence SEQ ID NO 1 or complementary thereof or a fragment having a length of at least 12 nucleotides, said antigenic protein or a fragment thereof or sequence or said antibody.

2. Claim : Partially 1 to 12

Vaccine for use in prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in Crustaceans comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5; vector vaccine for use in prophylaxis and/or treatment of White Spot Syndrome in Crustaceans characterised in that said vaccine comprises an attenuated bacterium or attenuated virus, said bacterium or virus comprising in its genome a heterologous nucleic acid sequence encoding at least a protein comprising the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO 4 or SEQ ID NO:5; antigenic protein derived from White Spot Syndrome Virus suitable for immunising Crustaceans against WSSV characterised in that said protein comprises the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5; nucleic acid encoding said protein, and particularly comprising the nucleic acid sequence depicted in SEQ ID NO 3; use of said protein as a medicament; pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least said protein or at least

International Application No. PCT/EP 01 /0679

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

said nucleic acid sequence; antibodies raised against said protein; vaccine or pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle and at least said antibody; diagnostic kit for detection of WSSV characterised in that said kit comprises a nucleic acid that is at least 70% homologous to said sequence SEQ ID NO 3 or complementary thereof or a fragment having a length of at least 12 nucleotides, said antigenic protein or a fragment thereof or said antibody.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/10679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 0785255	A	23-07-1997	US 5824535 A EP 0785255 A2 US 6190862 B1	20-10-1998 23-07-1997 20-02-2001
WO 0109340	A	08-02-2001	AU 6832000 A BR 0012919 A CN 1367834 T WO 0109340 A1 EP 1206550 A1	19-02-2001 23-04-2002 04-09-2002 08-02-2001 22-05-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/01	C 0 7 K 14/01	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 16/08	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	L
// C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, CZ, DM, DZ, EC, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

(72) 発明者 ビラーク, ジュステイヌス・マリア

オランダ国、エヌ・エル - 3 9 1 1 ・メースター・レーネン、ニーペー・ペーネンダールスウエヒ
・ 2 1 4

(72) 発明者 パン・ヒュールテン, マリア・コーネリア・ウイルヘルミーナ

オランダ国、エヌ・エル - 6 7 0 1 ・デー・ペー・ワーゲニンゲン、サルバーダブレイン・1 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA31 CA02 HA17
4B063 QA19 QQ02 QQ58 QR55 QR62 QS34
4C084 AA13 NA14 ZC652
4C085 AA03 BA51 CC05 CC08 DD01 EE01
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZC65
4H045 AA11 AA30 BA20 BA21 CA01 DA86 EA31 EA53

专利名称(译)	虾白斑病综合征 (WhiteSpot Syndrome) 病毒的抗原蛋白及其应用		
公开(公告)号	JP2004508818A	公开(公告)日	2004-03-25
申请号	JP2002526914	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)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	ビラークジュステイヌスマリア バンヒュールテンマリアコーネリアウシルヘルミーナ		
发明人	ビラーク,ジュステイヌス・マリア バン・ヒュールテン,マリア・コーネリア・ウシルヘルミーナ		
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	A61K39/00 A61K2039/523 A61K2039/5254 A61P17/00 C07K14/005 C12N2710/18022 Y10S424/817		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/12 A61K48/00 A61P17/00.171 C07K14/01 C07K16/08 G01N33/53.D G01N33/569.L C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ58 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZC652 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/CC05 4C085/CC08 4C085/DD01 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZC65 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA20 4H045/BA21 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53		
代理人(译)	井上充 Masarushin大崎		
优先权	2000203186 2000-09-15 EP		
其他公开文献	JP3780256B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及衍生自白斑综合症病毒的抗原蛋白，其估计大小为19kDa (VP19) 或13kDa (VP13)，这些蛋白质在疫苗中的用途和基于这些蛋白质的疫苗。此外，本发明涉及针对这些蛋白质的抗体，以及抗体在疫苗中的用途，编码这些蛋白质的核酸序列及其在疫苗中的用途。此外，本发明涉及所述蛋白质在制备用于预防和/或治疗甲壳类白斑综合症疫苗中的用途，载体疫苗和包含所述核酸或抗体的诊断试剂盒。

