



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113454102 A

(43) 申请公布日 2021.09.28

(21) 申请号 202080001395.0

A·兹维

(22) 申请日 2020.06.26

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

(30) 优先权数据

72002

62/868,483 2019.06.28 US

代理人 王健 林晓红

62/941,381 2019.11.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2020.07.31

C07K 14/01 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 15/34 (2006.01)

PCT/US2020/039846 2020.06.26

A61K 39/12 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 36/54 (2006.01)

W02020/264312 EN 2020.12.30

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(71) 申请人 辉宝动物保健公司

地址 美国新泽西

申请人 以色列生命科学研究有限公司

权利要求书7页 说明书101页

(72) 发明人 A·芬格 A·兹拉齐亚 O·科亨

序列表(电子公布) 附图16页

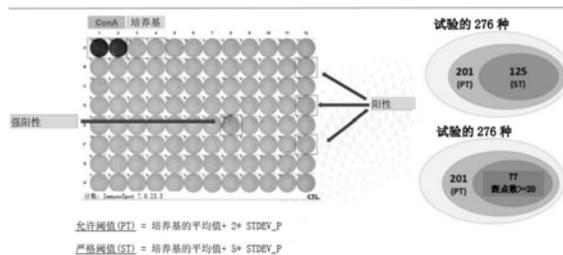
(54) 发明名称

非洲猪瘟疫苗

(57) 摘要

本文公开了预测对非洲猪瘟病毒(ASFV)具有免疫原性的肽和包含所述肽的疫苗组合物。在某些实施方案中,这些组合物包含一种或多种肽或由一种或多种肽组成,所述肽包含在SEQ ID NO:2-2273中所示的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述组合物包含含有一种或多种所述肽的病毒载体或宿主细胞、或它们的组合。在其它实施方案中,所述组合物包含核酸分子,其包含一种或多种所述肽。公开的组合物可以包含一种或多种另外组分,例如,但不限于,载体、佐剂、额外的治疗剂或它们的组合。描述了包含所述组合物的容器和试剂盒。组合物的应用可以包括施用给动物以在动物中诱导免疫应答,或针对ASFV来免疫动物。使用如本文中所述的各种方法中的一种或多种,诸如肌肉内或鼻内施用,可以完成施用。

ELISpot 结果- 阳性库分离



1. 一种肽,其包含选自SEQ ID NO:2-2273的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的肽,其中所述肽是:
 - 5至50个氨基酸长度;
 - 6至40个氨基酸长度;
 - 8至30个氨基酸长度;
 - 10至20个氨基酸长度;或
 - 8至11个氨基酸长度。
3. 根据权利要求1所述的肽,其中所述肽基本上由选自SEQ ID NO:2-2273的氨基酸序列组成。
4. 根据权利要求1所述的肽,所述肽包含选自SEQ ID NO:2310-2335的氨基酸序列。
5. 根据权利要求4所述的肽,其中所述肽基本上由选自SEQ ID NO:2310-2335的氨基酸序列组成。
6. 根据权利要求1-5所述的肽,其中所述肽被糖基化、聚乙二醇化、脂质化、环化、乙酰化、酰胺化或缀合,已经经历D-氨基酸掺入,或它们的组合。
7. 一种免疫原性组合物,其包含至少一种根据权利要求1至6所述的肽。
8. 根据权利要求3所述的组合物,所述组合物进一步包含治疗有效量的肉桂提取物溶液、肉桂提取物溶液的级分、肉桂提取物溶液的沉淀物和/或它们的组合。
9. 根据权利要求7-8所述的组合物,所述组合物进一步包含至少一种另外组分,所述另外组分选自佐剂、载体、至少一种额外的治疗剂或它们的组合。
10. 根据权利要求7-9所述的组合物,其中所述组合物包含至少一种选自以下的物质:油佐剂、水包油佐剂、油包水佐剂、水包油包水佐剂、免疫刺激复合物 (ISCOM)、脂质体、多糖、衍生化的多糖、寡核苷酸、细胞因子、细菌衍生物、病毒衍生物、氢氧化铝、氢氧化钾、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂苷、角鲨烯、凝胶佐剂或基于卡波姆的佐剂。
11. 根据权利要求7-10中任一项所述的组合物,其配制成用于通过注射、气雾剂递送、鼻内施用、口服施用、局部施用或它们的组合来施用。
12. 根据权利要求7-11所述的组合物,其配制成用于施用给猪。
13. 根据权利要求7-12所述的组合物,其包含两种或更多种肽。
14. 根据权利要求7-13中任一项所述的组合物,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO: 2、3、7、11、17、18、21、57、67、69、70、94、95、97、98、99、100、102、103、109、110、113、124、138、139、147、149、154、159、161、162、163、169、171、172、179、186、187、188、189、191、195、198、201、202、205、231、234、241、247、251、253、257、266、269、270、274、275、278、279、280、283、287、293、294、297、309、321、328、329、330、333、335、343、345、357、370、371、375、379、385、386、389、425、429、435、437、447、462、463、467、469、471、477、478、481、517、527、554、555、557、559、563、569、570、573、608、609、619、621、625、633、646、647、651、655、661、662、665、675、687、701、703、711、713、724、725、726、735、746、750、756、762、769、770、771、784、788、790、810、815、816、818、819、823、825、826、827、842、848、849、860、863、865、869、872、880、896、908、917、918、920、921、923、925、926、931、934、954、955、960、962、963、971、972、986、991、1000、1006、1009、1010、1013、1026、1028、1035、1047、1048、1049、1064、1065、1090、1091、1092、1094、1101、1102、1106、1107、1118、1129、1139、1141、1156、1184、1187、1193、

1194、1196、1202、1203、1204、1210、1227、1228、1231、1239、1248、1264、1265、1276、1277、1278、1279、1285、1286、1287、1288、1295、1296、1302、1318、1319、1323、1329、1338、1340、1345、1347、1348、1366、1368、1369、1370、1372、1375、1377、1378、1379、1382、1385、1388、1389、1390、1394、1399、1400、1413、1415、1426、1432、1436、1437、1438、1441、1448、1452、1454、1460、1461、1468、1469、1470、1471、1472、1480、1482、1483、1484、1485、1488、1491、1492、1499、1500、1501、1503、1507、1508、1509、1510、1511、1512、1514、1517、1518、1523、1528、1531、1541、1543、1544、1556、1557、1564、1566、1567、1571、1573、1574、1576、1577、1580、1592、1601、1619、1627、1628、1630、1631、1633、1648、1649、1651、1658、1666、1668、1669、1684、1685、1693、1698、1701、1706、1719、1736、1744、1749、1750、1758、1759、1760、1761、1776、1785、1823、1824、1828、1835、1836、1840、1849、1850、1852、1853、1863、1864、1868、1872、1873、1875、1877、1880、1882、1896、1897、1905、1908、1911、1912、1916、1923、1929、1941、1942、1944、1945、1953、1960、1969、1982、1986、1989、1991、2032、2034、2036、2037、2038、2044、2052、2053、2061、2068、2075、2076、2080、2087、2092、2097、2099、2103、2104、2118、2125、2126、2127、2128、2129、2134、2144、2146、2153、2159、2166、2175、2183、2185、2205、2211、2213、2214、2218、2220、2221、2222、2223、2225、2228、2229、2236、2239、2241、2242、2245、2247、2251、2252、2253、2255、2262、2265、2266或它们的组合。

15. 根据权利要求7-13中任一项所述的组合物,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO: 56、64、66、69、70、84、85、241、275、278、279、280、283、285、297、309、321、328、329、335、357、369、386、439、447、449、458、467、469、478、523、534、554、557、565、585、607、608、625、633、635、641、647、653、703、724、725、726、743、744、756、757、769、784、827、835、836、839、842、847、848、849、857、860、865、869、872、880、884、888、889、896、906、908、920、921、923、925、926、931、954、960、962、963、971、977、1001、1006、1019、1020、1024、1033、1049、1065、1080、1090、1091、1106、1107、1111、1120、1127、1129、1139、1141、1150、1151、1159、1172、1184、1187、1188、1196、1204、1205、1207、1212、1227、1228、1264、1265、1278、1279、1287、1288、1295、1296、1345、1347、1348、1370、1372、1375、1379、1388、1390、1394、1400、1413、1436、1437、1454、1459、1461、1468、1472、1483、1484、1488、1491、1499、1501、1503、1507、1509、1510、1511、1512、1514、1517、1519、1523、1528、1531、1543、1544、1556、1566、1567、1571、1573、1580、1619、1627、1628、1630、1631、1633、1648、1649、1651、1658、1685、1693、1701、1706、1718、1736、1749、1750、1753、1759、1761、1767、1783、1810、1814、1823、1824、1828、1830、1835、1836、1840、1841、1852、1864、1873、1875、1880、1912、1923、1941、1950、1952、1955、1982、1986、1989、1991、2037、2038、2075、2092、2118、2125、2126、2127、2134、2137、2139、2140、2141、2142、2146、2159、2166、2171、2175、2181、2183、2185、2193、2194、2197、2205、2211、2213、2222、2223、2225、2241、2242、2251、2252、2265、2266或它们的组合。

16. 根据权利要求7-13中任一项所述的组合物,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO: 1、2、3、8、9、18、26、32、36、37、67、69、70、81、84、87、89、93、94、99、100、101、118、124、128、129、159、173、180、185、186、187、192、193、210、220、221、265、268、271、272、275、277、278、279、283、284、285、294、302、308、312、313、343、357、360、363、364、365、369、370、371、375、377、386、394、400、404、405、435、447、449、452、455、456、457、461、462、463、467、468、469、478、486、492、496、497、527、529、541、544、547、548、549、553、554、559、561、570、578、584、

588、589、619、621、633、636、639、640、645、647、651、652、653、662、670、680、681、711、713、728、731、732、743、773、796、822、828、885、888、914、927、957、1012、1019、1049、1064、1069、1096、1104、1106、1111、1141、1156、1188、1196、1203、1233、1248、1253、1256、1280、1282、1288、1295、1325、1340、1345、1348、1372、1374、1380、1437、1440、1464、1472、1512、1531、1543、1556、1560、1561、1584、1623、1635、1652、1653、1676、1715、1740、1744、1745、1823、1832、1836、1860、1865、1911、1924、1929、1952、1991、2020、2021、2044、2049、2112、2113、2136、2204、2205或它们的组合。

17. 根据权利要求7-13中任一项所述的组合物,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO: 32、67、69、70、101、128、187、278、279、363、377、400、404、435、447、449、455、456、457、461、462、463、467、468、469、478、486、492、496、497、527、529、541、544、547、548、549、553、554、561、578、584、589、619、621、633、636、639、640、645、651、652、653、662、670、711、713、743、1049、1106、1156、1248、1253、1280、1282、1288、1437、1440、1531、1556、1560、1561、1584、1991、2021、2112、2204或它们的组合。

18. 根据权利要求7-13中任一项所述的组合物,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO: 67、69、70、279、435、461、469、478、486、547、548、549、561、589、639、652、653、1253或它们的组合。

19. 根据权利要求7-18中任一项所述的免疫原性组合物,其包含:

2-500种根据权利要求1-9所述的肽;

2-250种根据权利要求1-9所述的肽;

2-100种根据权利要求1-15所述的肽;或者

8-15种根据权利要求1-15所述的肽。

20. 一种分离的核酸分子,其编码至少一种包含选自SEQ ID NO:2-2273的氨基酸序列的肽。

21. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO:2、3、7、11、17、18、21、57、67、69、70、94、95、97、98、99、100、102、103、109、110、113、124、138、139、147、149、154、159、161、162、163、169、171、172、179、186、187、188、189、191、195、198、201、202、205、231、234、241、247、251、253、257、266、269、270、274、275、278、279、280、283、287、293、294、297、309、321、328、329、330、333、335、343、345、357、370、371、375、379、385、386、389、425、429、435、437、447、462、463、467、469、471、477、478、481、517、527、554、555、557、559、563、569、570、573、608、609、619、621、625、633、646、647、651、655、661、662、665、675、687、701、703、711、713、724、725、726、735、746、750、756、762、769、770、771、784、788、790、810、815、816、818、819、823、825、826、827、842、848、849、860、863、865、869、872、880、896、908、917、918、920、921、923、925、926、931、934、954、955、960、962、963、971、972、986、991、1000、1006、1009、1010、1013、1026、1028、1035、1047、1048、1049、1064、1065、1090、1091、1092、1094、1101、1102、1106、1107、1118、1129、1139、1141、1156、1184、1187、1193、1194、1196、1202、1203、1204、1210、1227、1228、1231、1239、1248、1264、1265、1276、1277、1278、1279、1285、1286、1287、1288、1295、1296、1302、1318、1319、1323、1329、1338、1340、1345、1347、1348、1366、1368、1369、1370、1372、1375、1377、1378、1379、1382、1385、1388、1389、1390、1394、1399、1400、1413、1415、1426、1432、1436、1437、1438、1441、1448、1452、

1454、1460、1461、1468、1469、1470、1471、1472、1480、1482、1483、1484、1485、1488、1491、1492、1499、1500、1501、1503、1507、1508、1509、1510、1511、1512、1514、1517、1518、1523、1528、1531、1541、1543、1544、1556、1557、1564、1566、1567、1571、1573、1574、1576、1577、1580、1592、1601、1619、1627、1628、1630、1631、1633、1648、1649、1651、1658、1666、1668、1669、1684、1685、1693、1698、1701、1706、1719、1736、1744、1749、1750、1758、1759、1760、1761、1776、1785、1823、1824、1828、1835、1836、1840、1849、1850、1852、1853、1863、1864、1868、1872、1873、1875、1877、1880、1882、1896、1897、1905、1908、1911、1912、1916、1923、1929、1941、1942、1944、1945、1953、1960、1969、1982、1986、1989、1991、2032、2034、2036、2037、2038、2044、2052、2053、2061、2068、2075、2076、2080、2087、2092、2097、2099、2103、2104、2118、2125、2126、2127、2128、2129、2134、2144、2146、2153、2159、2166、2175、2183、2185、2205、2211、2213、2214、2218、2220、2221、2222、2223、2225、2228、2229、2236、2239、2241、2242、2245、2247、2251、2252、2253、2255、2262、2265、2266或它们的组合。

22. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO:56、64、66、69、70、84、85、241、275、278、279、280、283、285、297、309、321、328、329、335、357、369、386、439、447、449、458、467、469、478、523、534、554、557、565、585、607、608、625、633、635、641、647、653、703、724、725、726、743、744、756、757、769、784、827、835、836、839、842、847、848、849、857、860、865、869、872、880、884、888、889、896、906、908、920、921、923、925、926、931、954、960、962、963、971、977、1001、1006、1019、1020、1024、1033、1049、1065、1080、1090、1091、1106、1107、1111、1120、1127、1129、1139、1141、1150、1151、1159、1172、1184、1187、1188、1196、1204、1205、1207、1212、1227、1228、1264、1265、1278、1279、1287、1288、1295、1296、1345、1347、1348、1370、1372、1375、1379、1388、1390、1394、1400、1413、1436、1437、1454、1459、1461、1468、1472、1483、1484、1488、1491、1499、1501、1503、1507、1509、1510、1511、1512、1514、1517、1519、1523、1528、1531、1543、1544、1556、1566、1567、1571、1573、1580、1619、1627、1628、1630、1631、1633、1648、1649、1651、1658、1685、1693、1701、1706、1718、1736、1749、1750、1753、1759、1761、1767、1783、1810、1814、1823、1824、1828、1830、1835、1836、1840、1841、1852、1864、1873、1875、1880、1912、1923、1941、1950、1952、1955、1982、1986、1989、1991、2037、2038、2075、2092、2118、2125、2126、2127、2134、2137、2139、2140、2141、2142、2146、2159、2166、2171、2175、2181、2183、2185、2193、2194、2197、2205、2211、2213、2222、2223、2225、2241、2242、2251、2252、2265、2266或它们的组合。

23. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO:1、2、3、8、9、18、26、32、36、37、67、69、70、81、84、87、89、93、94、99、100、101、118、124、128、129、159、173、180、185、186、187、192、193、210、220、221、265、268、271、272、275、277、278、279、283、284、285、294、302、308、312、313、343、357、360、363、364、365、369、370、371、375、377、386、394、400、404、405、435、447、449、452、455、456、457、461、462、463、467、468、469、478、486、492、496、497、527、529、541、544、547、548、549、553、554、559、561、570、578、584、588、589、619、621、633、636、639、640、645、647、651、652、653、662、670、680、681、711、713、728、731、732、743、773、796、822、828、885、888、914、927、957、1012、1019、1049、1064、1069、1096、1104、1106、1111、1141、1156、1188、1196、1203、1233、1248、1253、1256、1280、1282、1288、1295、1325、1340、1345、1348、1372、1374、1380、1437、1440、1464、1472、1512、1531、

1543、1556、1560、1561、1584、1623、1635、1652、1653、1676、1715、1740、1744、1745、1823、1832、1836、1860、1865、1911、1924、1929、1952、1991、2020、2021、2044、2049、2112、2113、2136、2204、2205或它们的组合。

24. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO:32、67、69、70、101、128、187、278、279、363、377、400、404、435、447、449、455、456、457、461、462、463、467、468、469、478、486、492、496、497、527、529、541、544、547、548、549、553、554、561、578、584、589、619、621、633、636、639、640、645、651、652、653、662、670、711、713、743、1049、1106、1156、1248、1253、1280、1282、1288、1437、1440、1531、1556、1560、1561、1584、1991、2021、2112、2204或它们的组合。

25. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其中所述至少一种肽选自SEQ ID NO:67、69、70、279、435、461、469、478、486、547、548、549、561、589、639、652、653、1253或它们的组合。

26. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其中至少一种肽由SEQ ID NO:2274-2309中的任意一个或多个的核酸序列编码。

27. 根据权利要求20所述的分离的核酸分子,其编码至少一种包含选自SEQ ID NO:2310-2335的氨基酸序列的肽。

28. 根据权利要求27所述的分离的核酸分子,其进一步编码另外至少一种包含选自SEQ ID NO:2-2273的氨基酸序列的肽。

29. 根据权利要求20-28所述的分离的核酸分子,其中所述核酸是DNA,其中所述核酸是RNA,或其中所述核酸包含DNA和RNA两者。

30. 根据权利要求20-29所述的分离的核酸分子,其进一步包含位于一种或多种所述肽之间的一种或多种间隔物序列,其中所述间隔物序列包含GPGPG、AAY或它们的组合。

31. 根据权利要求20-30所述的分离的核酸分子,其中所述核酸分子可操作地连接至表达控制序列、选择相关的序列、包含多克隆位点的序列或它们的组合。

32. 一种载体,其包含根据权利要求20-31中任一项所述的分离的核酸分子。

33. 根据权利要求32所述的载体,其中所述载体是病毒载体,并且所述病毒是疱疹病毒、腺病毒、圆环病毒、 α 病毒、正痘病毒、禽副黏液病毒或痘病毒。

34. 根据权利要求33所述的病毒载体,其中所述病毒是假性狂犬病病毒、猪环状构象病毒、辛德毕斯病毒、痘苗病毒、新城病毒或猪痘病毒。

35. 一种分离的宿主细胞,其包含根据权利要求32-34所述的载体。

36. 根据权利要求35所述的分离的宿主细胞,其中所述细胞是:

重组酵母细胞;

选自酵母属 (*Saccharomyces*) 或毕赤酵母属 (*Pichia*) 的重组酵母细胞;或者

选自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 的重组酵母细胞。

37. 根据权利要求35所述的分离的宿主细胞,其中所述细胞是:

重组细菌细胞;

选自沙门氏菌属 (*Salmonella*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、李斯特菌属 (*Listeria*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、博德特氏菌属 (*Bordetella*)、芽孢杆

菌属 (*Bacillus*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 或弧菌属 (*Vibrio*) 的重组细菌细胞;或

选自肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、大肠杆菌 (*Escherichiacoli*)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)、牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 或鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的重组细菌细胞。

38. 一种组合物,其包含:

权利要求20-31的分离的核酸分子,权利要求32-34的载体;权利要求35-37的宿主细胞,或它们的组合;以及

另外组分,所述另外组分选自佐剂、载体、另一种治疗剂和它们的组合。

39. 根据权利要求38所述的组合物,所述组合物进一步包含治疗有效量的肉桂提取物溶液、肉桂提取物溶液的分离级分、来自肉桂提取物溶液的沉淀物和/或它们的组合。

40. 根据权利要求38-39中任一项所述的组合物,其配制成为用于通过注射、气雾剂递送、鼻内施用、口服施用、局部施用或它们的组合来施用。

41. 根据权利要求38-40中任一项所述的组合物,其配制成为用于施用给猪。

42. 一种方法,其包括给动物施用有效量的根据权利要求1-41中任一项所述的一种或多种肽、组合物、分离的核酸、载体、宿主细胞或它们的组合。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述动物是猪。

44. 根据权利要求42-43所述的方法,所述方法进一步包括在施用有效量的根据权利要求1-41中任一项所述的一种或多种肽、组合物、分离的核酸、载体、宿主细胞或它们的组合之前、同时或之后,给所述动物施用治疗剂、活减毒ASFV疫苗、治疗有效量的肉桂提取物溶液、肉桂提取物溶液的级分、肉桂提取物溶液的沉淀物和它们的组合。

45. 根据权利要求42-44所述的方法,其中所述方法:

减轻或预防所述动物中的ASFV感染;

减轻或改善至少一种与ASF有关的症状;或者

二者。

46. 根据权利要求42-45所述的方法,所述方法包括:通过注射、气雾剂递送、鼻内施用、口服施用、局部施用或它们的组合,施用所述一种或多种肽、组合物、分离的核酸、载体、宿主细胞或它们的组合。

47. 一种容器,其包含根据权利要求1-41所述的一种或多种肽、组合物、分离的核酸、载体、宿主细胞或它们的组合。

48. 根据权利要求47所述的容器,其中所述容器是注射器、管形瓶、试管、安瓿、胶囊或瓶子。

49. 一种试剂盒,其包含根据权利要求47-48所述的容器。

50. 根据权利要求49所述的试剂盒,其进一步包含所述一种或多种肽、组合物、分离的核酸、载体、宿主细胞或它们的组合的施用说明书、或其组分的描述、或二者。

51. 根据权利要求49-50所述的试剂盒,其进一步包含用于将所述一种或多种肽、组合

物、分离的核酸、载体、宿主细胞或它们的组合施用给动物的一种或多种装置。

52. 根据权利要求7-19和38-41所述的组合物,其中所述肉桂提取物的一种或多种活性抗病毒级分具有在15至200.D.之间的在280nm的吸光度,和/或包含一种或多种具有大于10kDa的分子量的物质。

53. 一种用于治疗被病毒感染的受试者的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用:

治疗有效量的至少一种根据权利要求1-6所述的肽;

治疗有效量的根据权利要求7-19和38-41中任一项所述的免疫原性组合物;

治疗有效量的根据权利要求32-34所述的载体;

治疗有效量的根据权利要求35-37所述的宿主细胞;或它们的组合。

54. 根据权利要求53所述的方法,其进一步包括组合地提供肉桂提取物、肉桂提取物的一种或多种级分、肉桂提取物的一种或多种沉淀物或它们的组合。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中提供包括:

形成肉桂提取物、肉桂提取物的一种或多种级分、肉桂提取物的一种或多种沉淀物或它们的组合;

形成组合物,其包含(a)肉桂提取物、肉桂提取物的一种或多种级分、肉桂提取物的一种或多种沉淀物或它们的组合,和(b)根据权利要求1-6所述的一种或多种肽、根据权利要求7-19和38-41所述的组合物、根据权利要求20-31所述的分离的核酸分子、根据权利要求32-34所述的载体、根据权利要求35-37所述的宿主细胞、或它们的组合;以及

给所述受试者提供组合物,所述组合物包含(a)肉桂提取物、肉桂提取物的一种或多种级分、肉桂提取物的一种或多种沉淀物或它们的组合,和(b)根据权利要求1-6所述的一种或多种肽、根据权利要求7-19和38-41所述的组合物、根据权利要求20-31所述的分离的核酸分子、根据权利要求32-34所述的载体、根据权利要求35-37所述的宿主细胞或它们的组合。

56. 一种中和的病毒组合物,其包含ASFV病毒和肉桂提取物。

57. 一种方法,其包括:

提供肉桂提取物中和的AFSV病毒组合物;以及

给受试者接种所述组合物。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述受试者是猪。

非洲猪瘟疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月28日提交的美国临时申请号62/868,483和2019年11月27日提交的美国临时申请号62/941,381的较早提交日期在美国法典第35篇第119(e)条下的权益。临时申请号62/868,483和62/941,381通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及包含与非洲猪瘟病毒 (ASFV) 有关的肽或肽混合物或者包含含有一种或多种这类肽的一种或多种载体的组合物的实施方案,和用于施用这样的组合物以引起针对ASFV的免疫应答和/或减轻或抑制与病毒感染有关的症状的方法的实施方案。

[0004] 联合研究协议参与者

[0005] 在本申请公开和要求保护的主题的日期当天或之前,Phibro Animal Health Holdings, Inc.和Life Science Research Israel Ltd.完成了联合研究协议,并且这样的主题作为在联合研究协议的范围内进行的活动而做出。

背景技术

[0006] 由非洲猪瘟病毒 (ASFV) 造成的非洲猪瘟 (ASF) 是影响家养猪的最严重病毒性疾病之一,部分地由于高传染性和死亡率。ASFV感染经常以接近100%的死亡率在家养猪中导致急性出血性疾病。所述病毒可以通过摄取、接触或通过钝缘蜱属 (Ornithodoros) 的蜱而传播。

[0007] ASFV最初在二十世纪二十年代在肯尼亚鉴定,并在非洲流行,在那里野生猪物种充当病毒的蓄池。在二十世纪五十年代,ASFV在欧洲(包括西班牙、葡萄牙、意大利和法国)蔓延,但是在二十世纪九十年代中期之前从这些国家根除,意大利的Sardinia岛除外。但是,该疾病在2007年输入乔治亚州,然后蔓延遍布东欧和俄罗斯。该病毒继续在世界范围内蔓延,现在已经在37个国家或区域有所报道。在2018年,至少四个国家(包括匈牙利、保加利亚、比利时和中国)向世界动物健康组织(OIE;<http://www.oie.int/>)报告了它们的第一例曾经的ASFV爆发。

[0008] 在中国的第一个ASF病例报道于2018年8月3日。在2019年1月19日之前,至少100个ASF病例已经发生在全国的23个省或地区(<http://www.oie.int/>)。ASF继续在中国蔓延,严重威胁国家的家养猪群体,这占全球猪群体的超过50%。ASFV是非洲猪瘟病毒科(非洲猪瘟病毒科)的唯一成员,并具有直链双链DNA基因组。目前在中国通过使用实时PCR和部分基因组序列分析检测病毒基因来诊断ASF。目前没有有效疫苗来预防ASF,因此该疾病对猪产业和全球食品安全造成重大威胁。

发明内容

[0009] 本公开内容的某些实施方案涉及与ASFV有关的免疫原性肽,和包含一种或多种选自SEQ ID NO.2-2273的这类肽的组合物。在特定实施方案中,所述肽由ASFV株China/2018/

AnhuiXCGQ表达。组合物可以包含编码选自SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的核酸分子、宿主细胞和/或载体,诸如病毒或细菌载体。

[0010] 本公开内容的一些实施方案涉及SEQ ID NO.2-2273的一种或多种免疫原性肽,一种或多种构建体(例如,SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种氨基酸序列),一种或多种结构域(在本文中也被称作“热点”,如在实施例3中所述;例如,SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种氨基酸序列),和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。组合物可以包含一种或多种载体和/或细胞和/或核酸分子,其包含或编码肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白中的一种或多种。

[0011] 还提供了使用公开的肽、构建体、组合物、分离的核酸、载体和/或宿主细胞的方法的实施方案。例如,可以向动物(诸如蹄动物,和甚至更具体地猪)施用一种或多种肽、组合物、分离的核酸、载体和/或宿主细胞,诸如通过口服、肌肉内、局部和/或粘膜施用,以刺激免疫应答,在动物中诱导免疫,和/或减少或改善与病毒感染有关的至少一种症状,诸如与ASF有关的病毒感染。这样的方法可以用于治疗或预防性地接种成年和/或青少年动物。在某些实施方案中,组合物可以包括药学上可接受的载体、佐剂、额外的治疗剂或它们的组合。额外的治疗剂可以包括减少或减轻ASF的症状的化合物或组合物,或其它组合物,诸如针对在猪中常见的其它感染的疫苗,特别是可能被ASF加重的感染或病症。

[0012] 某些实施方案包含SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽,其中肽的一个或多个氨基酸被另外一个或多个氨基酸置换,或其中肽中的氨基酸被插入或删除,或它们的组合,前提条件是,得到的肽能够诱导免疫应答和/或改善与ASFV有关的一种或多种症状。可以通过任意合适的技术生产肽,包括化学合成和/或使用重组技术的细胞内合成。一些实施方案包含5到至少50个氨基酸长度(例如,6-40、8-30、10-20或8-11个氨基酸长度)的一种或多种肽。可以修饰公开的免疫原性肽,例如,为了以下目的:稳定肽构象,提高抗酶降解的肽稳定性,提高体内肽稳定性,或它们的组合。这样的修饰可以包括,例如,糖基化、聚乙二醇化、脂质化、环化、乙酰化、酰胺化、缀合、D-氨基酸掺入、类似的修饰或它们的组合。

[0013] 一些公开的实施方案涉及一种或多种分离的核酸分子,其编码SEQ ID NO 2-2273的一种或多种肽的氨基酸序列,或其源自其它核苷酸对一种或多种核酸分子的一些或任意核苷酸的置换,或源自这类核苷酸中的一个或多个的插入或缺失,前提条件是,得到的肽能够诱导免疫应答和/或改善与ASF有关的一种或多种症状。一些实施方案涉及包含一种或多种核酸分子的组合物,所述核酸分子编码SEQ ID NO.2-2273的至少一种肽。编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的核酸分子也可以编码另外组分,例如,表达控制序列、选择相关的序列、多克隆位点、类似的序列或它们的组合。

[0014] 使用各种生物信息学方案可以鉴定本文中公开的肽,例如,基于预测的MHC结合亲和力可以鉴定假定免疫原性肽的高密度簇和/或可以鉴定潜在免疫原性肽的预测算法。使用用于测量体外或体内免疫应答的各种方法(包括、例如,ELISA和/或ELISpot测定),和/或在疫苗接种以后观察在受攻击的猪中的症状发展,可以验证公开的肽的免疫原性。这样的方法是本领域普通技术人员已知的,且本发明不限于使用特定测定。

[0015] 存在多种类型和形式:编码和/或表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的载体、核酸分子和宿主细胞,一种或多种构建体(例如,SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种氨基

酸序列),一种或多种结构域(在本文中也称作“热点”,如在实施例3中所述;例如,SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种氨基酸序列),和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。在某些实施方案中,将编码一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的一种或多种核酸分子掺入病毒载体、宿主细胞和/或更大核酸构建体(诸如质粒)中,用于施用给动物。生产载体、核酸分子和宿主细胞的方法是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于使用特定载体、核酸分子或宿主细胞生产方法,或特定载体、核酸分子或细胞类型。

[0016] 也公开了包含含有一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的一种或多种载体和/或宿主细胞和/或核酸分子的组合物,所述组合物用于施用给动物,诸如哺乳动物,包括有蹄动物,且在特定实施方案中施用给猪。在某些实施方案中,一种或多种组合物可以用于引起针对ASFV的免疫应答和/或针对ASFV来免疫受试者。组合物可以呈液体溶液或混悬液,诸如在PBS、水、有机溶剂或混悬助剂或另一种可接受的载体中。组合物可以呈干燥的片剂或粉末形式,诸如经低压冻干或冷冻干燥,用于直接施用给动物,或可替换地可以重构,例如用PBS、水、有机溶剂或另一种可接受的载体。组合物还可以呈凝胶或糖浆形式。

[0017] 公开的免疫原性组合物可以包括其它试剂。一些实施方案涉及药物组合物,其包含治疗有效量的编码一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的DNA构建体,或编码一种或多种所述肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的载体,或包含一种或多种肽的细胞,以及一种或多种另外组分。另外组分可以包括、但不限于一种或多种佐剂、载体和/或其它治疗剂,例如,减少或减轻ASF的症状或被ASF加重的病症或感染的其它疫苗和/或化合物或组合物。

[0018] 组合物可以包括SEQ ID NO.2-2273的两种或更多种肽,其使用一种或多种化学方法、重组技术和/或酶反应通过聚合而组合以形成免疫原性聚合物。免疫原性聚合物中的根据SEQ ID NO.2-2273的肽可以直接邻近,或可以被其它序列隔开。组合物可以包括两种或更多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白,其使用一种或多种化学方法、重组技术和/或酶反应通过聚合而组合以形成免疫原性聚合物。免疫原性聚合物中的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白可以直接邻近,或可以被其它序列隔开。

[0019] 还提供了肉桂衍生的组合物,其包含肉桂提取物、肉桂提取物的一种或多种级分和/或肉桂提取物的一种或多种沉淀物。某些实施方案涉及桂皮(樟属(*Cinnamomum* sp.))的水性提取物,但是也可以使用其它极性溶剂。通过任意合适的方法可以制备有用的提取组合物。某些实施方案涉及水溶液的形成,然后可以将其离心,并收集包含抗病毒活性级分的上清液。也可以形成来自溶液的沉淀物,诸如通过蒸发或通过加入沉淀助剂,例如,盐,诸如盐酸盐。

[0020] 某些实施方案涉及用于治疗感染的药物组合物或营养制品组合物,其包含有效量的肉桂提取物、肉桂提取物的一种或多种级分和/或肉桂提取物的一种或多种沉淀物,以及适合用于药物或营养制品组合物的载体。这样的组合物还可以包括肽、载体、宿主细胞和/或核酸分子中的一种或多种,其包含本文中公开的一种或多种免疫原性肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白。这样的组合物还可以包括其它组分,诸如至少一种额外的治

疗或营养组分。如此形成的化合物和/或组合物具有抗病毒活性且可以通过本领域普通技术人员会理解的任意合适的方法施用,诸如口服地、鼻地、胃肠外地、皮下地和/或肌肉内地。

[0021] 还提供了用本文中公开的一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白、和/或包含一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的一种或多种核酸、载体、宿主细胞或组合物或它们的组合治疗可能具有或处于具有ASF的风险中的受试者(诸如动物,特别是猪)的方法的实施方案。通过本领域普通技术人员已知的一种或多种方法可以给动物施用这样的组合物。示例性的施用方法包括、但不限于局部的、口服的、皮下的、透皮的、鞘内的、肌肉内的、静脉内的、腹膜内的和类似的施用途径,或它们的组合。在某些实施方案中,组合物可以作为单剂量或作为多剂量(例如,增强剂量)施用。不同的施用可以包括一种或多种不同的组合物,组合物的组合,或其量。例如,第二次施用可以具有与施用的第一组合物相同或不同的组成。

[0022] 施用给受试者的剂量应当足以随时间在受试者中诱导有益的治疗应答,或抑制ASFV感染。有益的治疗应答可能需要一个或多个剂量,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个剂量,且更典型地2-4个剂量,将其在相同的或不同的时间施用。在某些实施方案中,可以将包含本文描述的肽、载体、核酸分子或宿主细胞或它们的组合的一种或多种组合物施用给动物以产生针对ASFV的免疫应答,和/或针对ASFV免疫动物。所述剂量可以随受试者而变化,或可以是相同的。本领域普通技术人员使用例行实验可以确定适当的剂量。

[0023] 还提供了向动物施用一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白、或包含一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的一种或多种核酸、载体、宿主细胞或组合物或它们的组合以在动物中引起或刺激免疫应答的方法的实施方案。在一个实施方案中,所述方法包括使用包含病毒载体的组合物针对ASFV接种或免疫动物,所述病毒载体表达一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白。在其它实施方案中,给动物施用包含病毒载体的一种或多种组合物,所述病毒载体表达一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白,并随后施用包含活减毒ASFV的疫苗。确定是否已经引起或刺激免疫应答的方法是本领域的普通技术人员已知的。在某些实施方案中,如果观察到疾病的减轻(诸如症状的减轻或改善)、病毒滴度的下降、死亡率的下降或它们的组合,则实现了免疫应答。

[0024] 某些公开的实施方案涉及中和的病毒组合物,特别是中和的AFSV病毒,其中所述病毒通过接触肉桂提取物而中和。中和的病毒组合物可以用于接种受试者。例如,所述方法可以包括提供肉桂提取物中和的AFSV病毒组合物,和给受试者接种所述组合物。所述受试者可以是哺乳动物,诸如有蹄动物,和甚至更具体地可以是猪。

[0025] 还提供了容器,其包含一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白,或包含或编码一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的一种或多种核酸、载体、宿主细胞或组合物,或它们的组合。容器可以是可重复使用的或一次用弃的。还提供了试剂盒,其包括一个或多个这样的容器。试剂盒中的一个或多个容器可以包括一种或多种另外组分。在某些实施例中,试剂盒也包括允许将一种或多种组合物、或一种或多种另外组分或它们的组合施用给动物的一个或多个装置。

[0026] 参考附图,从下述详细描述会更明白本发明的前述和其它目标、特征和优点。

附图说明

[0027] 图1关于Yorkshire、Landrace和Duroc猪繁殖系的已知SLA I类等位基因,针对CD8+表位筛选了ASFV China/2018/AnhuiXCGQ株的完整基因组(GenBank登记号MK128995.1)。根据四个标准评价了候选肽:(1)肽对SLA I类分子的预测结合亲和力;(2)在假定表位的高稠密簇中的位置,作为富集阳性应答者的方法;(3)SLA等位基因的覆盖和高流行等位基因的优化;和(4)源蛋白的性质(产生免疫原优先)。在212,394种假定肽中,选择2,272种用于进一步评价。使用ELISpot测定进一步筛选2,272种肽。

[0028] 图2提供了Elispot结果-阳性库分离-涉及使用ELISpot测定筛选的肽库(大约8-9种肽/库),所述ELISpot测定使用来自8只猪(称作2S、3S、5S、7S、10S、14S、6H、7H)的淋巴细胞进行。选择了共238个“阳性”库中的三十三三个库(其斑点数目满足或超过阈值的那些库)。33个阳性库含有267种肽,向其中加入9种在完全筛选中被鉴定为阳性的单独肽(对于共276种肽),用于进一步试验。

[0029] 图3提供了Elispot结果-阳性库分离-涉及使用ELISpot测定单个评估的库筛选中鉴定的276种肽(图2)。将伴刀豆球蛋白A(ConA)用作阳性对照,并使用阴性对照(仅培养基)计算允许的和严格的阈值(其中“培养基的平均值”表示仅培养基的孔中的平均斑点数目,分别为每个猪平板计算,且“STDEV_P”表示基于整个群体的标准差)。在试验的276种肽中,201种满足或超过为这些ELISpot测定计算的允许阈值(附件IV),且在201种肽中,125种满足或超过严格阈值(附件VIII)。在125种满足或超过严格阈值的肽中,鉴定出77种,为其计数至少20个斑点(附件V)。

[0030] 图4将图3中描述的77种肽映射至它们在ASFV蛋白内的位置(附件V-VI)。77种肽中的四十四种簇集在七种ASFV蛋白内(附件VII)。将SEQ ID NO:619、621、633、636、639、640、645、651、652、653和662的肽映射至ASFV蛋白A238L,一种I κ B-样蛋白(GenBank登记号AYW34011.1)。

[0031] 图5将SEQ ID NO:496、497、527、529、541和544的肽映射至ASFV蛋白A224L(IAP-样蛋白p27;GenBank登记号AYW34004.1)(附件VII)。

[0032] 图6将SEQ ID NO:377、400、404、435、447、449、455、456、457、461、462、463和467的肽映射至ASFV蛋白MGF_505-7R(GenBank登记号AYW34001.1)(附件VII)。

[0033] 图7将SEQ ID NO:553、554、561、578、584和589的肽映射至ASFV蛋白MGF_360-15R(GenBank登记号AYW34010.1)(附件VII)。

[0034] 图8将SEQ ID NO:1248、1253和1280的肽映射至ASFV锌指蛋白B385R(GenBank登记号AYW34052.1)(附件VII)。

[0035] 图9将SEQ ID NO:468、469和478的肽映射至ASFV蛋白MGF_505-9R(GenBank登记号AYW34002.1)(附件VII)。

[0036] 图10将SEQ ID NO:67和69的肽映射至ASFV蛋白MGF_110-3L(GenBank登记号AYW33963.1)(附件VII)。

[0037] 图11-34显示了在22°C(图11-21)或37°C(图22-34)在大肠杆菌中表达的54种构建体中的每一种的考马斯蓝染色的凝胶和蛋白质印迹结果,以及每种构建体的预期分子量和一种或多种特异性标签。标记为1-54的构建体的序列提供在SEQ ID NO.2310-2330中。尽管每种构建体包括用于检测目的的His-标签,某些构建体也包括至少一种额外的融合蛋白,

诸如HLT、Sumo或MBP。在图11、14、17、18、21、22、25、27、30和33中,如果仅“His”显示在表的第三列中,该构建体包括His-标签,但是不包括融合蛋白(显示为包括融合蛋白的构建体也包括His-标签)。收集蛋白,然后使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。如在考马斯蓝染色的凝胶和蛋白质印迹中所示,“M”显示了指示带分子量的标志物泳道,“S”代表从细胞培养物上清液收集的蛋白,且“P”代表从细胞沉淀物收集的蛋白。

[0038] 图11显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图11中列出的构建体(构建体1-14)的表达分析结果显示在图12的考马斯蓝染色的凝胶和图13的蛋白质印迹中。

[0039] 图12提供了考马斯蓝染色的凝胶的图像,其显示了从在22°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体1-14之一(图11)。

[0040] 图13显示了与图12的考马斯蓝染色的凝胶对应的蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体1-14的相对表达水平(图11)。

[0041] 图14显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图14中列出的构建体(构建体15-28)的表达分析结果显示在图15的考马斯蓝染色的凝胶和图16的蛋白质印迹中。

[0042] 图15提供了考马斯蓝染色的凝胶的图像,其显示了从在22°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体15-28之一(图14)。

[0043] 图16显示了与图15的考马斯蓝染色的凝胶对应的蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体15-28的相对表达水平(图14)。

[0044] 图17显示了考马斯蓝染色的凝胶和对应的蛋白质印迹的表和图像。表(底部)提供了与第1列的每种构建体(构建体29-32)有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。考马斯蓝染色的凝胶(左)显示了从在22°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。蛋白质印迹(右)显示了使用抗-His抗体检测的构建体29-32的相对表达水平。

[0045] 图18显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图18中列出的构建体(构建体33-47)的表达分析结果显示在图19的考马斯蓝染色的凝胶和图20的蛋白质印迹中。

[0046] 图19提供了考马斯蓝染色的凝胶的图像,其显示了从在22°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体33-47之一(图18)。

[0047] 图20显示了与图19的考马斯蓝染色的凝胶对应的蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体33-47的相对表达水平(图18)。

[0048] 图21显示了考马斯蓝染色的凝胶和对应的蛋白质印迹的表和图像。表(底部)提供了与第1列的每种构建体(构建体48-54)有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。考马斯蓝染色的凝胶(左)显示了从在22°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。蛋白质印迹(右)显示了使用抗-His抗体检测的构建体48-54的相对表达水平。

[0049] 图22显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图22中列出的构建体(构建体5-14)的表达分析结果显示在图23的考马斯蓝染色的凝胶和图24的蛋白质印迹中。

[0050] 图23提供了考马斯蓝染色的凝胶的图像,其显示了从在37°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体5-14之一(图22)。

[0051] 图24显示了与图23的考马斯蓝染色的凝胶对应的蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体5-14的相对表达水平(图22)。

[0052] 图25显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图25中列出的构建体(构建体15-24)的表达分析结果显示在图26的蛋白质印迹中。

[0053] 图26显示了蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体15-24的相对表达水平(图25)。

[0054] 图27显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图27中列出的构建体(构建体25-37)的表达分析结果显示在图28的考马斯蓝染色的凝胶和图29的蛋白质印迹中。

[0055] 图28提供了考马斯蓝染色的凝胶的图像,其显示了从在37°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体25-37之一(图27)。

[0056] 图29显示了与图28的考马斯蓝染色的凝胶对应的蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体25-37的相对表达水平(图27)。

[0057] 图30显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图30中列出的构建体(构建体1-4、38-39和41-48)的表达分析结果显示在图31的考马斯蓝染色的凝胶和图32的蛋白质印迹中。

[0058] 图31提供了考马斯蓝染色的凝胶的图像,其显示了从在37°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体1-4、38-39和41-48之一(图30)。

[0059] 图32显示了与图31的考马斯蓝染色的凝胶对应的蛋白质印迹的图像。显示了使用抗-His抗体检测的构建体1-4、38-39和41-48的相对表达水平(图30)。

[0060] 图33显示的表提供了与第1列的每种构建体有关的预期分子量(kDa)(第2列)和标签和/或融合蛋白(第3列)。在图30中列出的构建体(构建体49-54)的表达分析结果显示在图34的考马斯蓝染色的凝胶和蛋白质印迹中。

[0061] 图34显示了考马斯蓝染色的凝胶和对应的蛋白质印迹的图像。考马斯蓝染色的凝胶(左)显示了从在37°C培养的大肠杆菌培养物的细胞沉淀物(P)或上清液(S)收集的蛋白。大肠杆菌培养物各自表达构建体49-54之一(图33)。蛋白质印迹(右)显示了使用抗-His抗体检测的构建体49-54的相对表达水平。

[0062] 序列表

[0063] 使用在37C.F.R.§1.822中定义的氨基酸的标准三字母代码和核苷酸碱基的标准字母缩写,显示在伴随的序列表中列出的核酸和氨基酸序列。仅显示每个核酸序列的一条

链,但是互补链理解为通过参考显示的链而被包括。序列表作为于2020年1月23日创建的0.68MB的ASCII文本文件呈递,并通过引用并入本文。

[0064] SEQ ID NO.1是ASFV株China/2018/AnhuiXCGQ的基因组核酸序列。

[0065] SEQ ID NO.2-2273是与ASFV有关的肽、特别是刺激对ASFV的免疫应答的免疫原性肽的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO.2274-2291是可以编码附件VI的18种肽的示例性DNA序列。SEQ ID NO.2274的核酸可以编码SEQ ID NO:67的肽。SEQ ID NO.2275的核酸可以编码SEQ ID NO:69的肽。SEQ ID NO.2276的核酸可以编码SEQ ID NO:70的肽。SEQ ID NO.2277的核酸可以编码SEQ ID NO:279的肽。SEQ ID NO.2278的核酸可以编码SEQ ID NO:435的肽。SEQ ID NO.2279的核酸可以编码SEQ ID NO:461的肽。SEQ ID NO.2280的核酸可以编码SEQ ID NO:469的肽。SEQ ID NO.2281的核酸可以编码SEQ ID NO:478的肽。SEQ ID NO.2282的核酸可以编码SEQ ID NO:486的肽。SEQ ID NO.2283的核酸可以编码SEQ ID NO:547的肽。SEQ ID NO.2284的核酸可以编码SEQ ID NO:548的肽。SEQ ID NO.2285的核酸可以编码SEQ ID NO:549的肽。SEQ ID NO.2286的核酸可以编码SEQ ID NO:561的肽。SEQ ID NO.2287的核酸可以编码SEQ ID NO:589的肽。SEQ ID NO.2288的核酸可以编码SEQ ID NO:639的肽。SEQ ID NO.2289的核酸可以编码SEQ ID NO:652的肽。SEQ ID NO.2290的核酸可以编码SEQ ID NO:653的肽。SEQ ID NO.2291的核酸可以编码SEQ ID NO:1253的肽。在每个示例性DNA序列中,字母‘R’代表腺嘌呤或鸟嘌呤;‘K’代表鸟嘌呤或胸腺嘧啶;‘H’代表腺嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶;‘D’代表腺嘌呤、鸟嘌呤或胸腺嘧啶;‘Y’代表胞嘧啶或胸腺嘧啶;‘S’代表胞嘧啶或鸟嘌呤;B代表胞嘧啶、鸟嘌呤或胸腺嘧啶;‘N’代表腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶;‘M’代表腺嘌呤或胞嘧啶;‘W’代表腺嘌呤或胸腺嘧啶;和‘V’代表腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤。

[0067] SEQ ID NO.2292-2309是可以编码附件VI的18种肽的示例性RNA序列。SEQ ID NO.2292的核酸可以编码SEQ ID NO:67的肽。SEQ ID NO.2293的核酸可以编码SEQ ID NO:69的肽。SEQ ID NO.2294的核酸可以编码SEQ ID NO:70的肽。SEQ ID NO.2295的核酸可以编码SEQ ID NO:279的肽。SEQ ID NO.2296的核酸可以编码SEQ ID NO:435的肽。SEQ ID NO.2297的核酸可以编码SEQ ID NO:461的肽。SEQ ID NO.2298的核酸可以编码SEQ ID NO:469的肽。SEQ ID NO.2299的核酸可以编码SEQ ID NO:478的肽。SEQ ID NO.2300的核酸可以编码SEQ ID NO:486的肽。SEQ ID NO.2301的核酸可以编码SEQ ID NO:547的肽。SEQ ID NO.2302的核酸可以编码SEQ ID NO:548的肽。SEQ ID NO.2303的核酸可以编码SEQ ID NO:549的肽。SEQ ID NO.2304的核酸可以编码SEQ ID NO:561的肽。SEQ ID NO.2305的核酸可以编码SEQ ID NO:589的肽。SEQ ID NO.2306的核酸可以编码SEQ ID NO:639的肽。SEQ ID NO.2307的核酸可以编码SEQ ID NO:652的肽。SEQ ID NO.2308的核酸可以编码SEQ ID NO:653的肽。SEQ ID NO.2309的核酸可以编码SEQ ID NO:1253的肽。在每个示例性RNA序列中,字母‘R’代表腺嘌呤或鸟嘌呤;‘K’代表鸟嘌呤或尿嘧啶;‘H’对应于腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶;‘D’代表腺嘌呤、鸟嘌呤或尿嘧啶;‘Y’代表胞嘧啶或尿嘧啶;‘S’代表胞嘧啶或鸟嘌呤;B代表胞嘧啶、鸟嘌呤或尿嘧啶;‘N’代表腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶;‘M’代表腺嘌呤或胞嘧啶;‘W’代表腺嘌呤或尿嘧啶;和‘V’代表腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤。

[0068] SEQ ID NO.2310-2330是使用一种或多种质粒载体(诸如pHLT、pSumo和/或pMBP)或病毒载体(诸如假性狂犬病病毒载体)或类似载体可以例如在宿主细胞中表达的构建体。

因而,SEQ ID NO.2310-2330的每种构建体可以进一步包含N-端融合蛋白,诸如HLT、Sumo或MBP。可以连接至SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体的示例性融合蛋白序列提供在SEQ ID NO.2336-2338中。进一步,每种构建体可以包含His-标签,诸如与以下N-端连接的N-端His-标签:构建体的N-端(如果构建体不包括融合蛋白),或与构建体连接的融合蛋白的N-端。构建体还可以进一步包括C-端接头(GSSG)和HiBiT标签(GSGWRLFKKLS)。对于每种构建体,结构域(在ASFV蛋白内的肽簇集区域,也称作“热点”,如在实施例3中所述,并单独提供为SEQ ID NO.2331-2335)、全长度和/或部分长度ASFV蛋白(如在SEQ ID NO.2323-2329中提供的)和/或SEQ ID NO.2-2273的肽以它们在构建体序列中出现的次序提供。

[0069] SEQ ID NO.2310包含结构域10.1和1.1,并对应于构建体1和2。

[0070] SEQ ID NO.2311包含结构域3.1和11.1,并对应于构建体3和4。

[0071] SEQ ID NO.2312包含结构域10.1、3.1d、11.1和1.1,并对应于构建体5和6。

[0072] SEQ ID NO.1213包含结构域10.1、3.1d、1.1和11.1,并对应于构建体7和8。

[0073] SEQ ID NO.2314包含结构域10.1;SEQ ID NO.70、478、469和486的肽;结构域3.1d;SEQ ID NO.547、548、549、1253和279的肽;和结构域1.1、11.1,并对应于构建体9、10和55。

[0074] SEQ ID NO.2315包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、561、461、279、547、435、478、652、486、1253、70、469和549的肽,并对应于构建体11-14。

[0075] SEQ ID NO.2316包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、561、461、279、547、435、478、652、486、1253、70、469和549的肽,具有隔开每个单独肽序列的间隔物(GPGPG),并对应于构建体15-18。

[0076] SEQ ID NO.2317包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、561、461、279、547、435、478、652、486、1253、70、469和549的肽,具有隔开每个单独肽序列的间隔物(AAY),并对应于构建体19-22。

[0077] SEQ ID NO.2318包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、486、561、461、279、547、435、478、1253、70、652、469和549的肽,对应于构建体23-26。

[0078] SEQ ID NO.2319包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、486、561、461、279、547、435、478、1253、70、652、469和549的肽,具有隔开每个单独肽序列的间隔物(GPGPG),并对应于构建体27-30。

[0079] SEQ ID NO.2320包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、486、561、461、279、547、435、478、1253、70、652、469和549的肽,具有隔开每个单独肽序列的间隔物(GPGPG),并对应于构建体31-34。

[0080] SEQ ID NO.2321包含SEQ ID NO.478、279、652、1253、469、363、462、377、400、187、404、461、463、496、589、70、486、32、278、128、435、653、456、492、561、548、468、67、447、549、449、69、639、547、455、467、101和457的肽,并对应于构建体35-37。

[0081] SEQ ID NO.2322包含SEQ ID NO.478、279、652、1253、469、363、462、377、400、187、404、461、463、496、589、70、486、32、278、128、435、653、456、492、561、548、468、67、447、549、449、69、639、547、455、467、101、457、640、645、670、553、711、662、621、633、651、541、584、529、497、544、527、636、578、619、554、1156、1248、1280、1288、1440、2021、2204、1561、1437、1106、1584、1556、1560、743、1531、2112和1049的肽,具有隔开肽101和457的间隔物

(GPGPG),且具有隔开肽619和554的间隔物(AAY),并对应于构建体38-40。

- [0082] SEQ ID NO.2323包含GenBank登记号AYW33963.1的ASFV蛋白,并对应于构建体41和48。
- [0083] SEQ ID NO.2324包含GenBank登记号AYW34001.1的ASFV蛋白,并对应于构建体42和49。
- [0084] SEQ ID NO.2325包含GenBank登记号AYW34002.1的ASFV蛋白,并对应于构建体43和50。
- [0085] SEQ ID NO.2326包含GenBank登记号AYW34004.1的ASFV蛋白,并对应于构建体44和51。
- [0086] SEQ ID NO.2327包含GenBank登记号AYW34010.1的ASFV蛋白,并对应于构建体45和52。
- [0087] SEQ ID NO.2328包含GenBank登记号AYW34011.1的ASFV蛋白,并对应于构建体46和53。
- [0088] SEQ ID NO.2329包含GenBank登记号AYW34052.1的ASFV蛋白,并对应于构建体47和54。
- [0089] SEQ ID NO.2330是构建体56,其包含SEQ ID NO.639、548、653、589、67、69、561、461、279、547、435、478、652、486、1253、70、469和549的肽,具有在肽653和589、652和486以及1253和70之间的GPGPG间隔物序列,且具有在69和56、279和547肽序列之间的AAY间隔物序列。
- [0090] SEQ ID NO.2331是结构域1.1。
- [0091] SEQ ID NO.2332是结构域3.1。
- [0092] SEQ ID NO.2333是结构域3.1d。
- [0093] SEQ ID NO.2334是结构域10.0。
- [0094] SEQ ID NO.2335是结构域11.1。
- [0095] SEQ ID NO.2336是一种示例性的Sumo融合蛋白。
- [0096] SEQ ID NO.2337是一种示例性的MBP融合蛋白。
- [0097] SEQ ID NO.2338是来自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)E2p的硫辛酰基(lipoyl)结构域,其被完全地或部分地包含在HLT融合蛋白中。
- [0098] SEQ ID NO.2339是编码GenBank登记号AYW33963.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。
- [0099] SEQ ID NO.2340是编码GenBank登记号AYW34001.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。
- [0100] SEQ ID NO.2341是编码GenBank登记号AYW34002.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。
- [0101] SEQ ID NO.2342是编码GenBank登记号AYW34004.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。
- [0102] SEQ ID NO.2343是编码GenBank登记号AYW34010.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。
- [0103] SEQ ID NO.2344是编码GenBank登记号AYW34011.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。
- [0104] SEQ ID NO.2345是编码GenBank登记号AYW34052.1的ASFV蛋白的核苷酸序列。

具体实施方式

[0105] 部分地由于T细胞群体的异质性和猪白细胞抗原(SLA) I类抗原结合特异性的变异,与通过疫苗接种在猪中诱导保护性免疫有关的ASFV细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位的鉴

定具有挑战性。但是,需要有效疫苗来减少ASF在猪群体中的传播和影响。

[0106] ASFV基因组包括保守的中央区域(CCR)以及左和右可变区,所述可变区各自含有五个多基因家族(MGF)基因的不同数目。CCR基因产物参与病毒的复制和组装以及调节免疫逃避和宿主细胞功能。在ASFV基因组中的变异性主要源自MGF成员丢失或获得。

[0107] 猪可以从ASFV的低毒力分离物感染中存活下来,且可以变成慢性感染。存活动物对该病毒的有关分离物攻击具有抗性,从而指示家养猪可以产生针对ASFV的保护性免疫。在无症状的非有毒力ASFV感染期间,猪中的天然杀伤细胞活性增加,从而提示,该细胞类型在ASFV免疫中起作用。此外,从ASFV免疫猪除去CD8+淋巴细胞会废除针对有关有毒力病毒的保护性免疫。这提示,单独ASFV-特异性抗体的存在不足以保护免于ASFV感染,并且CD8+淋巴细胞子集在ASFV保护性免疫中起重要作用。

[0108] 本公开内容涉及免疫原性肽,和包含这类肽的组合物。公开的肽用于形成免疫原性肽组合物、和/或基于核酸、病毒或细菌载体、或宿主细胞的疫苗和/或它们的组合,它们会引起或刺激针对ASFV的免疫应答。这样的免疫原性组合物可以与额外治疗剂(诸如目的在于缓解或减轻ASF的症状的化合物或组合物)或其它组合物(诸如针对在猪中常见的其它感染的疫苗)联合施用给动物。

[0109] I. 缩写

[0110]	ASF	非洲猪瘟
[0111]	ASFV	非洲猪瘟病毒
[0112]	CCID ⁵⁰	细胞培养物感染剂量50%
[0113]	CCR	保守的中央区域
[0114]	CTL	细胞毒性T淋巴细胞
[0115]	dpv	(最初)疫苗接种以后的天数
[0116]	ELISA	酶联免疫吸附测定
[0117]	ELISpot	酶联免疫吸附斑点测定
[0118]	INF- γ	干扰素- γ
[0119]	MDA	母体衍生的抗体
[0120]	MGF	多基因家族
[0121]	MHC	主要组织相容性复合物
[0122]	MS	质谱法
[0123]	PBMC	外周血巨噬细胞
[0124]	PCR	聚合酶链式反应
[0125]	qPCR	定量聚合酶链式反应
[0126]	SLA	猪白细胞抗原

[0127] II. 术语和定义

[0128] 除非另外指出,否则根据常规用法使用技术术语,如本领域普通技术人员会理解的。分子生物学中的普通术语的定义可以参见:Lewin's Genes X, Krebs等人编, Jones and Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 0763766321); Kendrew等人(编), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (编), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, Wiley,

John&Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); 和 George P. Rédei, Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics, 第3版, Springer, 2008 (ISBN: 1402067534)。

[0129] 提供术语和缩写的以下解释来更好地描述本公开内容和指导本领域普通技术人员实践本公开内容。本文中使用的“包含”是指“包括”，且单数形式“一个”或“一种”或“所述”表示一个/种或超过一个/种，除非上下文另外清楚地指明。术语“或”表示所述备选要素中的单个要素，或两个或更多个要素的组合，除非上下文另外清楚地指出。

[0130] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入用于所有目的。在本申请的优先权日期之前，所有与本文提及的GenBank登记号有关的序列通过引用整体并入。在冲突的情况下，以本说明书(包括术语的解释)为准。

[0131] 尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本公开内容，但是下面描述了合适的方法和材料。所述材料、方法和实施例仅仅是示例性的，且无意成为限制性的。本领域普通技术人员从下述详细描述和权利要求会明白本公开内容的其它特征。

[0132] 除非另有说明，否则如在本说明书或权利要求中使用的表达组分、分子量、百分比、温度、时间、诸如此类的量的所有数字应理解为被术语“约”修饰。因此，除非另外含蓄地或明确地说明，否则阐述的数字参数是近似值，其可能取决于寻求的期望性能和/或在标准试验条件/方法下的检测限度。当将实施方案与讨论的现有技术直接地和明确地区分时，实施方案数字不是近似值，除非列出词语“约”。

[0133] 在公开的序列列表中的氨基酸残基可以被具有类似性能和特征的另一个残基保守地置换或替换。通常，保守置换对得到的肽的活性几乎没有影响或根本没有影响。在一个非限制性实施例中，在组合物的一个肽中的酪氨酸残基被色氨酸残基置换。可以如下产生肽：通过化学置换以包括一个或多个保守氨基酸置换，或通过操纵编码该肽的核酸序列，例如，使用标准规程诸如PCR或定位诱变。下面表1提供了明确地公开的肽序列的保守氨基酸置换，其在本公开内容的范围内。

[0134] 表1

[0135] 保守氨基酸置换

	定义	氨基酸	符号	
[0136]	具有脂族 R-基团的氨基酸	甘氨酸	Gly—G	
		丙氨酸	Ala—A	
		缬氨酸	Val—V	
		亮氨酸	Leu—L	
		异亮氨酸	Ile—I	
	具有羟基 R-基团的氨基酸	丝氨酸	Ser—S	
		苏氨酸	Thr—T	
	具有含硫的 R-基团的氨基酸	半胱氨酸	Cys—C	
		甲硫氨酸	Met—M	
	酸性的氨基酸	天冬氨酸	Asp—D	
		天冬酰胺	Asn—N	
		谷氨酸	Glu—E	
	[0137]		谷氨酰胺	Gln—Q
		碱性的氨基酸	精氨酸	Arg—R
			赖氨酸	Lys—K
组氨酸			His—H	
具有芳族环的氨基酸		苯丙氨酸	Phe—F	
		酪氨酸	Tyr—Y	
		色氨酸	Trp—W	
亚氨基酸		脯氨酸	Pro—P	

[0138] 为了方便本公开内容的各个实施方案的评论,提供了具体术语的以下解释:

[0139] 佐剂:本文中使用的术语“佐剂”是指可以增强公开的免疫原性组合物的有效性的任何物质或媒介物,诸如通过增强动物的免疫系统(诸如哺乳动物免疫系统)对抗原(例如ASFV抗原)的免疫应答。佐剂可以用于形成本文中公开的组合物,例如作为ASFV疫苗组合物的部分。在本文公开的组合物的某些实施方案中包括的佐剂可以包括、但不限于:铝盐,诸如磷酸铝或氢氧化铝;不同类型的油,诸如植物油、矿物油或肉桂油(参见美国专利号2006/0275515,“Antiviral preparations obtained from a natural cinnamon extract”,其通过引用并入本文);基于水包油的佐剂,诸如 Emulsigen[®]、Emulsigen[®]-D、Emulsigen[®]-DL90、Emulsigen[®]-P、Emulsigen[®]-BCL、Emulsimune[®]或TS6; Amphigen[®]; pluronic多元醇;基于皂苷的佐剂,诸如皂苷、Quil A和QS-21;非离子嵌段共聚物;微流态化的乳剂,诸如MF59;油包水佐剂,诸如ISA720、ISA 71VG、ISA 35、ISA 51或ISA 50V;基于水包油包水的佐剂,诸如ISA 206或ISA 201(诸如Montanide ISA 201VG);弗氏完全佐剂;弗氏不完全佐剂;聚丙交酯乙交酯(PLGA);基于toll-样受体(TLR)配体的佐剂,诸如TLR7/8佐剂,诸如

R848 (瑞喹莫德); 基因卡波姆的佐剂, 诸如含有934P或971P的那些; 基于聚合物的佐剂, 诸如CarbigenTM或PolygenTM; 免疫刺激复合物 (ISCOM); 脂质体; 多糖; 衍生化的多糖; 寡核苷酸; 细胞因子; 细菌衍生物, 诸如海藻糖-6,6-二山嵛酸酯 (TDB) 或环状二鸟苷酸酯单磷酸酯 (c-二-GMP); 病毒衍生物, 诸如聚肌苷酸-聚胞苷酸 (聚 (I:C)); 或它们的组合。

[0140] “粘膜佐剂的”或“粘膜佐剂”表示可以与粘膜相互作用并可以刺激免疫应答的佐剂或其它化合物, 例如, 聚合物。关于粘膜佐剂的额外信息由美国专利号10,279,031 (其通过引用并入本文) 提供。粘膜包括眼 (眼睛) 膜、口膜、鼻咽膜、肛门膜或阴道膜。可以刺激的免疫应答可以包括IgM、IgG、IgA或它们的组合。包含这类佐剂的组合物可以应用于动物的粘膜。粘膜佐剂可以是“粘膜粘着的”, 因为它们可以粘附 (通常非共价地) 至粘膜。具有粘膜粘着性能的具体佐剂包括、但不限于包含聚合物的佐剂, 诸如包含聚丙烯酸的那些, 诸如卡波姆和聚羧乙烯, 或基于水包油的佐剂。另外, 含有纳米颗粒的佐剂可以用于鼻内施用。本领域普通技术人员会理解, 粘膜粘着佐剂可以含有以上佐剂之一或其任意组合。

[0141] 施用: 如本文中使用的, 向动物施用组合物 (例如免疫原性组合物) 是指, 应用、提供或使组合物与动物接触。施用可以通过多种途径完成, 例如, 局部、口服、皮下、透皮、鞘内、肌肉内、静脉内、腹膜内、鼻内和类似途径或它们的组合。

[0142] 如本文中使用的, 粘膜地施用组合物包括向动物直接施用组合物, 诸如通过直接将组合物放置 (例如, 喷和/或滴) 在动物的口、鼻通道或眼中。粘膜地施用组合物也包括提供组合物, 使得动物将组合物施用给自己, 诸如提供组合物以供动物摄入。提供组合物的示范性方法包括、但不限于: 将组合物喷在动物上和/或以其它方式局部地将组合物应用于皮肤, 或以动物将摄入的形式提供组合物。本领域普通技术人员会理解, 喷雾也可能方便直接施用, 因为喷雾微滴可以直接进入猪的口、鼻腔和/或眼。向动物施用组合物的另一种示范性方法是通过肌肉内施用, 例如, 通过注射组合物的液体制剂。

[0143] 可以配制公开的组合物用于胃肠外施用, 例如, 通过真皮内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下或静脉内途径或它们的组合。组合物的胃肠外制剂的例子包括、但不限于: 可以注射的混悬液, 可以注射的溶液, 乳剂, 和可以溶解或悬浮在用于注射的可接受媒介物中的干燥产物。另外, 可以制备或/和施用组合物的控释胃肠外制剂。用于这类施用的合适材料包括醇或醇的混合物, 诸如C₁-C₁₀醇, 诸如乙醇、丙醇、丁醇、戊烷醇、己烷醇、庚烷醇、辛烷醇、壬醇和/或癸烷醇; 多元醇, 诸如聚乙二醇; 无菌水; 葡萄糖溶液; 盐水溶液; 水性媒介物, 例如, 但不限于, 氯化钠、右旋糖、右旋糖注射液、氯化钠注射液、林格氏注射液或含乳酸盐的林格氏注射液或它们的组合; 非水性的媒介物, 例如, 但不限于, 油酸乙酯、花生油、玉米油、棉籽油、芝麻油或肉豆蔻酸异丙酯或它们的组合; 水性的和非水性的等渗无菌注射溶液, 其可以含有抑菌剂、缓冲剂、抗氧化剂或使得制剂与接受者的血液等渗的溶质, 或它们的组合; 和非水性的和水性的悬浮液, 其可以是无菌的且可以包括增溶剂、稳定剂、增稠剂、助悬剂和防腐剂或它们的组合。组合物的制剂可以存在于单位剂量或多次剂量容器 (诸如瓶子、安瓿、注射器、试管、胶囊和管形瓶) 中。

[0144] 非洲猪瘟 (ASF): “非洲猪瘟”由ASFV造成, 且通常表现为出血热。ASF是在全世界影响家养和野生猪的高度接触传染的和致命的疾病, 在家养猪中具有接近100%的死亡率。

[0145] 非洲猪瘟病毒 (ASFV): “非洲猪瘟病毒”是在猪中造成ASF的病毒。所述病毒可以通过摄取、接触或通过钝缘蜱属 (Ornithodoros) 的蜱而传播。ASFV是非洲猪瘟病毒科 (非洲猪

瘟病毒科)的唯一成员,并具有直链双链DNA基因组。在某些实施方案中,ASFV基因组是170-193kbp并编码151-167个基因。ASFV基因组包括大约125kbp的保守中央区域(CCR)以及左和右可变区,所述可变区各自含有五个多基因家族(MGF)基因的不同数目。CCR基因产物参与病毒的复制和组装以及调节免疫逃避和宿主细胞功能。在ASFV基因组中的变异性主要源自MGF成员丢失或获得。

[0146] 已经鉴定了多个ASFV株,且ASFV的核酸序列是公众可得到的。例如,被鉴定为Ken06.Bus (GenBank登记号KM111295.1;在本申请的优先权日期之前,通过引用并入正如存在于GenBank中)的ASFV株提供了一种示例性的ASFV基因组序列。

[0147] 动物:“动物”表示活的多细胞脊椎动物生物,该类别包括,例如,哺乳动物和禽类。术语哺乳动物包括人和非人哺乳动物,诸如有蹄动物,和特别是猪。“猪”(在本文中也被称作“猪”)包括Sus属的成员,诸如野猪(*Sus scrofa*),诸如家猪(*Sus scrofa domesticus*),诸如Yorkshire、Duroc和/或Landrace猪品种。

[0148] 抗体:“抗体”是由B淋巴样细胞产生的免疫球蛋白分子。特定抗原(免疫原)在人类或其它动物中诱发抗体。抗体的特征在于,以某种可证实的方式与抗原特异性地反应。“引起抗体应答”表示抗原或其它分子的诱导抗体产生的能力。

[0149] 抗原:“抗原”表示可以在动物中刺激抗体或T-细胞应答的产生的化合物、组合物或物质,包括被注射或吸收进动物中的组合物。

[0150] 适合用于用在本技术中的病毒抗原包括灭活的(或杀死的)病毒和/或可以从病毒分离、纯化或衍生出的病毒肽或蛋白。可以从在底物(诸如细胞培养物或其它底物)上繁殖的病毒衍生出病毒抗原,或可以重组地衍生或表达它们,或可以合成它们。通常,病毒抗原包括、但不限于在生命周期的至少一个阶段暴露于病毒的表面上的表位。病毒抗原可以是在多个血清型或分离物之间保守的。病毒抗原包括从本文中公开的一种或多种病毒衍生出的抗原。

[0151] 减弱的、减弱:“减弱的”病毒是与病毒的非减弱形式相比减弱和/或具有更小毒力的病毒,其可能能够造成疾病。减弱的病毒可以刺激免疫应答和/或免疫,但是不能造成疾病。减弱的病毒在培养物和/或接受者中的复制可以与所述减弱的病毒的来源株相同、相似或不同。通过使用一种或多种包括单个步骤和/或多个步骤的方法改变病毒,可以实现减弱。例如,通过定位诱变、化学方法、辐照和/或重组技术,可以将减弱遗传修饰(例如,减弱突变和/或遗传重排列)引入病毒基因组的编码区和/或非编码区。这样的方法是本领域普通技术人员众所周知的。否则造成疾病的病毒的减弱形式也可以通过培养技术(诸如传代)来鉴定,和/或可以源自通过人干预未诱导、建立或造成的病毒基因组中的遗传差别。确定减弱的病毒与减弱的病毒的来源株相比是否维持类似或减小的抗原性的方法也是本领域普通技术人员众所周知的。这样的方法可以包括,例如,化学选择和/或核酸筛选,例如,通过探针杂交或PCR。减弱的病毒,例如,本文中公开的病毒载体的某些实施方案,可以用于在接受者(诸如动物,诸如猪)中刺激免疫应答和/或诱导免疫。

[0152] 肉桂:术语“肉桂”表示从樟属(樟属)的一个或多个成员衍生出的一种或多种产物,例如肉桂提取物、肉桂提取物的级分和/或肉桂提取物的沉淀物。这样的成员可以包括,例如,*C. zeylanicum*,*C. cassia* (*C. aromaticum*),*C. camphora*,*C. burmannii*,*C. verum*,*C. loureiroi*,*C. citriodorum*,*C. dubium*,*C. japonicum*,*C. kanehirae*,*C. virens*,*C. tamala*,

C.parthenoxylon, *C.mercadoi*, *C.glaucescens*, *C.malabattrum*, *C.cambodianum*, 樟属的任意其它成员, 或它们的组合。通常, 通过一种或多种适当的提取、分级分离和/或沉淀方法和/或类似的方法, 从樟属的一个或多个成员的皮和/或叶衍生出一种或多种产物。

[0153] 组合: 组合包括两种或更多种组分, 它们的施用使得至少一种组分的有效时间段与至少一种其它组分的有效时间段重叠。组分可以是组合物。在某些实施方案中, 施用的所有组分的有效时间段彼此重叠。在包含三种组分的组合的一个示例性实施方案中, 施用的第一种组分的有效时间段可以与第二种组分和第三种组分的有效时间段重叠, 但是第二种组分的有效时间段独立地与或不与第三种组分的有效时间段重叠。在包含四种组分的组合的一个示例性实施方案中, 施用的第一种组分的有效时间段与第二种、第三种和第四种组分的有效时间段重叠; 第二种组分的有效时间段与第一种和第四种组分的有效时间段重叠, 但是不与第三种组分的有效时间段重叠; 且第四种组分的有效时间段仅与第二种组分和第三种组分的有效时间段重叠。组合可以是包含组分的组合物, 包含两种或更多种单独组分的组合物, 或包含一种或多种组分和另外单独一种组分(或多种组分)的组合物, 或包含其余组分的组合物。在某些实施方案中, 两种或多种组分可以包含基本上同时或以任意次序依次施用的两种或多种不同组分, 在两个或更多个不同时间施用的相同组分, 或它们的组合。

[0154] 足以……的条件: 术语“足以……的条件”表示允许期望的活性的任何环境, 例如, 允许两种核酸分子之间的特异性结合或杂交, 或允许核酸的扩增和/或检测。这样的环境可以包括、但不限于, 特定温育条件(诸如时间和/或温度), 或特定因子的存在和/或浓度, 例如在溶液中(诸如缓冲剂、盐、金属离子、去污剂、核苷酸、酶、诸如此类)。

[0155] 有效量: 术语“有效量”或“治疗有效量”或“免疫刺激量”表示足以诱导期望的生物学结果的试剂(诸如本文提供的一个或多个实施方案, 其单独地、与其它治疗剂组合地或可能组合地)的量。该结果可以是疾病的迹象、症状或原因、或生物系统的任意其它期望改变的改善或减轻。所述量可以随正在治疗的病症、病症的进展阶段和应用的制剂的类型和浓度而变化。在某些实施方案中, 免疫刺激性组合物的有效量是这样的量: 当施用给受试者时, 其足以引起可检测的免疫应答。这样的应答可以包含, 例如, 对在免疫刺激性组合物中提供的一种或多种表位特异性的抗体的产生。可替换地, 应答可以包含对在免疫刺激性组合物中提供的一种或多种表位的T-辅助或基于CTL的应答。这些应答中的所有三种可以源自原初或记忆细胞。在其它实施方案中, 免疫刺激性组合物的“保护有效量”是这样的量: 当施用给受试者时, 其足以给受试者赋予保护性免疫。在任何给定情况下的适当量是本领域普通技术人员容易明白的, 或能够通过例行实验来确定, 诸如疫苗接种并观察抗体应答, 或疫苗接种并随后攻击, 其中接种的动物的表现优于类似地攻击的非接种动物。

[0156] 编码: “编码”表示多核苷酸中的特定核苷酸序列(诸如基因、cDNA或mRNA)在生物学过程中充当其它聚合物和大分子的合成模板的固有性质, 所述其它聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(例如、rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列和由此产生的生物学特性。因而, 如果由基因产生的mRNA的转录和翻译能够产生蛋白, 诸如在细胞或其它生物系统中, 那么该基因编码该蛋白。基因或cDNA的编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同且经常提供在序列表中)和非编码链(用作转录模板)可以被称作编码该基因或cDNA的蛋白或其它产物。除非另外指出, “编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括作为彼此的简并形式且编码相同

氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白和RNA的核苷酸序列可以包括内含子、外显子或二者。

[0157] 表位：“表位”是抗原决定簇。这些是在分子上的化学基团或肽序列，其具有抗原性，即其引起免疫应答。T细胞表位出现在抗原呈递细胞的表面上，在那里它们结合MHC分子。专业抗原呈递细胞诸如巨噬细胞、树突细胞和B细胞专门呈递MHC II类肽，而大多数有核体细胞呈递MHC I类肽。由MHC I类分子呈递的T细胞表位通常是8至11个氨基酸长度的肽，而MHC II类分子呈递13-17个氨基酸长度的更长肽。抗体特异性地结合肽上的特定抗原性表位，诸如选自SEQ ID NO.2-2273的一种或多种免疫原性肽。在某些实施例中，公开的肽是表位。

[0158] 表达：“表达”表示核酸序列的转录和/或翻译。例如，当基因的DNA被转录成RNA或RNA片段时，可以表达该基因，所述RNA或RNA片段在某些实施例中被加工以形成mRNA。当基因的mRNA翻译成氨基酸序列（诸如蛋白或蛋白片段）时，也可以表达该基因。在一个具体实施例中，当异源基因被转录成RNA时则它被表达。在另一个具体实施例中，当异源基因的RNA被翻译成氨基酸序列时则它被表达。表达的调节可以包括对转录、翻译、RNA运输和加工、中间分子诸如mRNA的降解的控制，或通过特定蛋白分子在产生以后的活化、灭活、隔离或降解。

[0159] 表达控制序列：“表达控制序列”是调节它们可操作地连接的异源核酸序列的表达的核酸序列。当表达控制序列控制和调节核酸序列的转录和（适当时）翻译时，表达控制序列可操作地连接到核酸序列。因而，表达控制序列可以包括在蛋白编码基因前面的适当启动子、增强子、转录终止子、起始密码子（ATG），内含子的剪接信号，该基因的正确读码框的维持（以允许mRNA的适当翻译），和终止密码子。术语“控制序列”意图最少包括其存在可以影响表达的组分，且也可以包括其存在是有利的另外组分，例如，前导序列和融合配偶体序列。表达控制序列可以包括启动子。

[0160] 表达载体：“表达载体”是包含重组多核苷酸的载体，所述重组多核苷酸包含可操作地连接到要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含表达的充分元件；表达的其它元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有表达载体，诸如粘粒、质粒（例如，裸露或包含在脂质体中）和包含重组多核苷酸的病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

[0161] 宿主细胞：“宿主细胞”表示可以在其中扩增载体和表达它的DNA的一种或多种细胞。细胞可以是真核的或原核的。细胞可以是哺乳动物细胞，诸如猪细胞。“宿主细胞”也包括受试者宿主细胞的任何后代。应当理解，所有后代可以与亲本细胞相同或不同，因为突变可能发生在复制过程中。当使用术语“宿主细胞”时，理解为包括这样的后代。

[0162] 免疫应答：“免疫应答”是免疫系统的细胞（诸如B-细胞、T-细胞、巨噬细胞或多形核白细胞）对刺激（诸如抗原肽）的应答。免疫应答可以包括参与宿主防御应答的身体的任何细胞，包括例如，分泌干扰素或细胞因子的上皮细胞。免疫应答包括、但不限于先天性免疫应答或炎症。本文中使用的保护性免疫应答表示保护受试者免于感染（预防感染或预防与感染有关的疾病的发展）的免疫应答。测量免疫应答的方法是本领域普通技术人员已知的，且包括，例如，测量淋巴细胞（诸如B或T细胞）的增殖和/或活性，细胞因子或趋化因子的分泌，炎症，抗体产生等。

[0163] 免疫刺激性组合物:术语“免疫刺激性组合物”和“免疫原性组合物”在本文中用于指可用于在受试者中刺激或引起免疫应答(或免疫原性应答)的组合物。免疫刺激性组合物可以是蛋白抗原、用于表达蛋白抗原的核酸分子(诸如载体)、或它们的组合。在某些实施方案中,所述免疫原性应答是保护性的或提供保护性免疫,因为它使受试者能够更好地抵抗由所述免疫刺激性组合物所针对的病毒引起的感染或疾病进展。

[0164] 免疫:通过刺激受试者的免疫系统(诸如通过疫苗接种),使受试者(诸如哺乳动物,和特别是猪)得到保护免于传染性疾病(诸如ASFV)的感染。

[0165] 免疫原:可以在动物中刺激免疫应答(诸如抗体或T-细胞应答的产生)的化合物、组合物或物质,包括注射或吸收进动物中的组合物。免疫原的具体非限制性实施例包括SEQ ID NO.2-2273的免疫原性肽、SEQ ID NO.2310-2330的构建体、SEQ ID NO:2331-2335的结构域、和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种蛋白)和/或编码这类肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白的核酸、载体和/或宿主细胞。

[0166] 灭活的:在本公开内容的上下文中,“灭活的”病毒是已经被改变到它不能在宿主或宿主细胞中建立感染的程度的病毒。可以将病毒灭活,例如,使用化学物质、热、pH的改变和/或辐照(诸如紫外或 γ 辐照)。灭活的病毒也被称作“杀死”。“化学灭活的”病毒是已经使用化学方法灭活的病毒,诸如用 β 丙内酯、甲醛、戊二醛、2,2'-二硫二吡啶或双亚乙基胍胺处理。关于病毒疫苗的灭活方法的综述,参见Delrue等人(Expert Rev Vaccines 11(6):695-719,2012)。

[0167] 感染:感染或攻击是指受试者已经暴露于可能产生疾病的生物,当他们已经暴露于这样的生物时,所述疾病造成受试者遭受所述疾病的一种或多种临床迹象。

[0168] 分离,分离的:“分离的”生物组分(诸如核酸)已经从生物组分或其它组分(例如所述组分天然地伴随存在的生物组分,诸如染色体和染色体外DNA、RNA和蛋白)基本上分离或纯化出。已经“分离”的核酸包括通过标准纯化方法纯化的核酸。该术语也包括通过在宿主细胞中重组表达并随后纯化而制备的核酸,以及化学合成和纯化的核酸分子。分离不要求绝对纯度,且可以包括,例如,这样的核酸分子,其中在含有期望物质的原始混合物中的至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.9%的组分被除去。作为另一个例子,分离的生物组分是这样的:其中所述生物组分比在细胞或其它生产容器内的其天然环境中的生物组分更富集。分离的核酸可以是在溶液(例如,水或水溶液)中或经干燥。

[0169] 肽:“肽”是具有至少两个通过肽键连接的氨基酸(且更典型地超过2个通过酰胺键连接在一起的氨基酸)的聚合物。某些肽,诸如具有25个或更多个氨基酸的肽,可以被称作多肽。当氨基酸是 α -氨基酸时,可以使用L-光学异构体、D-光学异构体或它们的组合。本文中使用的术语“肽”意图包括任何氨基酸序列,且包括经修饰的序列诸如糖蛋白,并覆盖天然存在的氨基酸序列,以及重组地或合成地生产的那些。术语“残基”或“氨基酸残基”表示掺入肽中的氨基酸。本文中公开的示例性肽包括SEQ ID NO.2-2273的肽、SEQ ID NO.2310-2330的构建体、SEQ ID NO:2331-2335的结构域和例如SEQ ID NO.2323-2329的ASFV蛋白。

[0170] 多核苷酸,核酸分子:术语“核酸分子”或“多核苷酸”表示至少两个碱基长度的核苷酸的聚合形式,除非另外指出。核酸分子可以包括cDNA的有义链和反义链、基因组DNA、

RNA和/或以上的混合聚合物和/或合成形式。本文中使用的术语“核酸分子”与“核酸”和“多核苷酸”是同义的。该术语包括DNA的单链和双链形式,除非另有说明。多核苷酸可以包括通过天然存在的和/或非天然存在的核苷酸键连接在一起的天然存在的核苷酸和修饰的核苷酸中的任一种或两种。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或任一种核苷酸的修饰形式。

[0171] 重组多核苷酸包括不与两个编码序列(一个在5'末端和一个在3'末端)直接邻近的多核苷酸,它在来源生物的天然存在的基因组中与所述编码序列直接邻近。重组核酸分子还可以是非天然存在的核酸分子,或者具有通过两个否则分离的序列区段的人工组合而制成的序列。该人工组合通过化学合成或通过分离的核酸区段的人工操纵(例如,通过本领域普通技术人员已知的基因工程技术)完成。该术语因此包括,例如,掺入以下对象中的重组DNA分子:载体;自主复制的质粒或病毒;或原核生物或真核生物的基因组DNA,或其作为独立于其它序列的单独分子(例如,cDNA)存在。

[0172] 预防:预防疾病表示抑制疾病的完全发展。

[0173] 治疗:表示治疗干预,其改善疾病或病理学状况在它已经开始发展以后的迹象或症状。

[0174] 改善:表示疾病的一种或多种迹象或症状的数目或严重程度的减轻。

[0175] 启动子:“启动子”是足以指导转录的最小核酸序列。启动子通常位于邻近基因的转录起始位点的5'区域(和其上游),且通常含有指导基因的表的功能性TATA框。启动子通常含有结构和功能元件,并提供用于调节有关基因的转录的控制点。也包括这样的启动子元件:其足以使得启动子依赖性的基因表达在细胞类型特异性、组织特异性方面是可控的或可被外部信号或试剂诱导;这样的元件可以位于基因的5'或3'区域。包括组成型和诱导型启动子(参见例如,Bitter等人,Methods in Enzymology 153:516-544,1987)。例如,当在细菌系统中克隆时,可以使用诱导型启动子诸如细菌噬菌体λ的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂合启动子)等。在一个实施方案中,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可以使用从哺乳动物细胞的基因组(诸如金属硫蛋白启动子)或从哺乳动物病毒(诸如逆转录病毒长末端重复序列;腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)衍生出的启动子。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可以用于提供核酸序列的转录。

[0176] 可以将多核苷酸插入含有启动子序列的表达载体中,其促进宿主的插入遗传序列的有效转录。表达载体通常含有复制起点、启动子、以及允许转化的细胞的表型选择的特定核酸序列。

[0177] 纯化:术语“纯化”不要求绝对纯度;相反,它意图作为相对术语。因而,例如,纯化的蛋白、病毒、核酸或其它化合物是从有关蛋白和其它污染物完全地或部分地分离的物质。在某些实施方案中,术语“基本上纯化的”表示已经从细胞、细胞培养基或其它粗制品分离并进行纯化以除去最初制品的各种组分(诸如蛋白、细胞碎片和其它组分)的蛋白、病毒、核酸或其它化合物。

[0178] 重组的:重组的核酸、蛋白或病毒是具有非天然存在的序列或具有通过两个否则分离的序列区段的人工组合而制备的序列的核酸、蛋白或病毒。该人工组合经常通过化学合成或更常见地通过操纵分离的核酸区段(例如,通过基因工程技术)完成。术语重组包括通过添加、置换或删除天然核酸分子、蛋白或病毒的一部分已经唯一地改变的核酸、蛋白和

病毒。

[0179] 样品：“样品”（或“生物样品”）表示从生物得到的样本，在某些实施方案中，其包含DNA（例如，基因组DNA或cDNA）、RNA（包括mRNA）、蛋白或它们的组合。例子包括、但不限于分离的核酸、细胞、蛋白、肽、细胞裂解物、染色体制品、组织和体液（诸如血液、血液的衍生物和级分（诸如血清））、提取的胆汁、活组织检查或外科手术取出的组织（包括例如未固定、冷冻、在福尔马林中固定和/或包埋在石蜡中的组织）、尸体剖检材料、泪液、奶、皮肤刮痕、表面洗液、尿、痰、脑脊液、前列腺流体、脓汁、骨髓抽吸物、中耳流体、支气管肺泡灌洗液、气管抽吸物、鼻咽拭子或抽吸物、口咽拭子或抽吸物、鼻洗液或唾液。在一个实施例中，样品包括病毒肽，例如，对ASFV特异性的。在特定实施例中，将样品直接使用（例如，新鲜的或冷冻的），或可以在使用前操纵，例如，通过提取（例如核酸）、固定（例如，使用福尔马林）和/或包埋在石蜡中（诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的组织样品）。

[0180] 序列同一性/相似性：以序列之间的同一性或相似性的方式表达两个或更多个核酸序列之间、或两个或更多个氨基酸序列之间的同一性/相似性。可以以同一性百分比的方式测量序列同一性；百分比越高，序列越同一。可以以相似性百分比（其考虑保守的氨基酸置换）的方式测量序列相似性；百分比越高，序列越相似。当使用标准方法比对时，核酸或氨基酸序列的同系物或直系同源物具有相对高的序列同一性/相似性程度。在某些实施方案中，一种或多种公开的肽可能包含与SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的氨基酸序列具有至少80%序列同一性（例如，80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%）的一个或多个氨基酸序列。在某些实施方案中，编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的一种或多种公开的核酸分子可以包含与编码所述一种或多种肽的SEQ ID NO.1的对应一种或多种核酸序列具有至少80%序列同一性（例如，80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%）的一种或多种核酸序列。

[0181] 用于对比和确定序列同一性或相似性的序列比对方法是本领域普通技术人员已知的。各种程序和比对算法描述在：Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981；Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970；Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988；Higgins和Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988；Higgins和Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989；Corpet等人, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988；Huang等人, *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992；和Pearson等人, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994。Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990呈现了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0182] The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) 可得自几个来源，包括国家生物信息中心 (NCBI, 国立医学图书馆, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) 和在因特网上，用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。在NCBI网站上可以发现另外的信息。

[0183] 使用BLASTN来对比核酸序列，而使用BLASTP来对比氨基酸序列。如果两个对比的

序列具有同源性,那么指定的输出文件将那些同源性区域呈现为比对的序列。如果两个对比的序列不具有同源性,那么指定的输出文件不会呈现比对的序列。

[0184] 受试者:“受试者”是任何多细胞脊椎动物生物,该类别包括人和非人哺乳动物(诸如小鼠、大鼠、兔、绵羊、猪、马、牛和非人灵长类动物)。本发明的某些公开的实施方案具体地涉及有蹄动物,甚至更具体地涉及Suidae科的成员,包括Sus属,诸如野猪和家猪,且猪至少包括Sus属,其具体实例是野猪和家猪。

[0185] 转化的:“转化的”细胞是在其中已经使用本领域普通技术人员已知的分子生物学技术引入了核酸分子的细胞。该术语包括可能将核酸分子引入细胞中的所有技术,包括用质粒载体转染、用病毒载体转化、和通过脂转染、电穿孔和/或颗粒枪加速引入裸露DNA。

[0186] 疫苗:“疫苗”表示能够刺激免疫应答的免疫原性材料或包含免疫原性材料的组合物。可以施用疫苗来预防、改善或治疗传染性疾病或其它类型的疾病。免疫原性材料可以包括减弱的或灭活的微生物(诸如细菌或病毒),或抗原蛋白(包括VLP)、肽或从它们衍生出或编码它们的DNA,或它们的组合。减弱的疫苗是已经被修饰以产生更低毒力形式的有毒力生物,尽管如此其保留引起针对有毒力形式的抗体和免疫应答的能力。灭活的疫苗是已经用化学物质或热杀死的以前有毒力的微生物,但是其引起针对有毒力微生物的抗体。疫苗可以引起预防性的(防止性的)和治疗性的应答。施用方法随疫苗而变化,但是可以包括接种、摄取、吸入或其它施用形式。疫苗可以与佐剂一起施用以强化免疫应答。

[0187] 载体:载体是允许外来核酸插入的核酸分子,不会破坏载体在宿主细胞中复制和/或整合的能力。载体可以包括允许它在宿主细胞中复制的核酸序列,诸如复制起点。插入载体能够将它自身插入宿主核酸中。载体还可以包括一种或多种可选择的标记基因和其它遗传元件。表达载体是含有调节序列的载体,所述调节序列允许转录和翻译插入的基因。

[0188] 病毒样颗粒(VLP):病毒样颗粒由一种或多种病毒蛋白构成,但是缺乏病毒基因组。因为VLP缺乏病毒基因组,它们是非传染性的。

[0189] III. 实施方案的概述

[0190] 公开了与ASFV有关的免疫原性肽,且在某些实施方案中包括SEQ ID NO:2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域(在本文中也被称作“热点”,如在实施例3中所述)和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种蛋白)、或包含所述肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白中的至少一种的一种或多种载体;包含所述肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白中的至少一种的一种或多种细胞;或编码所述肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白中的至少一种的核酸构建体。在某些实施方案中,公开的组合物可以包括药学上可接受的载体、佐剂、额外的治疗剂或它们的组合。

[0191] 可以将公开的组合物配制用于通过通常用于向动物递送组合物的各种途径施用给动物,特别是猪。在某些实施方案中,将所述组合物配制用于鼻内施用。在其它实施方案中,将所述组合物配制用于肌肉内施用。

[0192] 还提供了包括本文中公开的一种或多种组合物的容器。所述容器可以是可重复使用的或一次用弃的。在某些实施方案中,所述容器是注射器。在某些实施例中,所述注射器是可重复使用的。在其它实施例中,所述注射器是一次用弃的。一次性注射器通常含有单剂

量的组合物。在某些实施方案中,所述容器是管形瓶或瓶子,例如玻璃或塑料瓶或瓶子。在某些实施方案中,所述管形瓶包括单剂量的组合物。在其它实施方案中,所述管形瓶包括超过一个剂量的组合物,诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个剂量的组合物。所述管形瓶可以在加入组合物之前灭菌。

[0193] 还提供了包括本文中公开的一个或多个容器的试剂盒。在某些实施方案中,所述试剂盒包含瓶子(诸如含有组合物的瓶子)、注射器、针头或它们的任意组合。在一个非限制性实施例中,所述试剂盒可以包含含有组合物的注射器。在另一个非限制性实施例中,所述试剂盒可以包含空的注射器。组合物可以在液体溶液或混悬液中,诸如在PBS或水、或另一种可接受的载体中。本文中公开的组合物可以呈干燥的、片剂和/或粉末形式,诸如低压冻干和/或冷冻干燥。干燥的、粉末和/或低压冻干形式还可以重构,例如用PBS、水、有机溶剂或另一种可接受的载体。组合物还可以呈凝胶或糖浆形式。在试剂盒中的一个或多个容器可以包括一种或多种另外组分,例如,佐剂、载体、稳定剂、额外的治疗剂或它们的组合,或另外的一种或多种组分可以是在试剂盒内的一个或多个单独容器中。在某些实施例中,试剂盒也包括允许将一种或多种组合物、或一种或多种另外组分或它们的组合施用给动物的一个或多个装置。这样的装置的例子包括注射器或注射器雾化器,例如,鼻药物递送装置或肌肉内药物递送装置。试剂盒可以包括(例如,在相同盒子中或单独地)含有一种或多种组合物的细节的文件,例如,关于施用和/或描述组合物内的肽、载体、细胞、核酸构建体或它们的组合的信息的说明书。

[0194] 也公开了向动物施用一种或多种公开的肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白、和/或一种或多种核酸、载体、宿主细胞、和/或包含一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白的组合物的方法的实施方案。还提供了通过向动物施用治疗有效量的一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白、和/或一种或多种核酸、载体、宿主细胞、和/或包含本文中公开的一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白的组合物在动物中引起免疫应答和/或针对ASFV免疫动物的方法的实施方案。在某些实施方案中,肌内地施用所述组合物。在其它实施方案中,鼻内地施用所述组合物。在某些实施方案中,所述动物是哺乳动物。在某些实施方案中,所述哺乳动物是猪。在某些实施方案中,所述猪是家猪。

[0195] 公开的组合物可以用于治疗(诸如疫苗接种)成年和/或青少年动物。因而,在某些实施方案中,所述动物是成年动物。在其它实施方案中,所述动物是青少年动物。

[0196] A. 非洲猪瘟病毒分离物

[0197] 在某些实施方案中,公开的组合物包含一种或多种免疫原性的ASFV肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白。在特定实施方案中,公开的组合物包含通过化学合成、肽分离和/或重组方法生产的SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽。SEQ ID NO.2-2273的天然肽由ASFV株China/2018/AnhuiXCGQ表达。ASFV株China/2018/AnhuiXCGQ基因组由SEQ ID NO.1提供,其通过引用并入本文。本领域普通技术人员会明白,本文中公开的技术适用于除了China/2018/AnhuiXCGQ以外的ASFV株。可以用于制备ASFV免疫原性肽(诸如SEQ ID NO.2-2273的肽)的其它示例性的(非限制性的)ASFV株显示在表2中。在一个非限制性实施例中,组合物包括表达选自SEQ ID NO 2-2273的1-100、或2-100、或1-50、或2-50、或2-25、或5-25种肽(诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、

23、24或25种肽)的病毒载体,其中所述肽是由ASFV株诸如China/2018/AnhuiXCGQ ASFV株(登记号MK128995.1)表达或被其包含的预测免疫原性表位。

[0198] 包含SEQ ID NO.2-2273的一种或多种免疫原性肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白的组合物可以引起或刺激针对一种或多种ASFV株的免疫应答,或导致针对一种或多种ASFV株的免疫接种,诸如针对2、3、4、5、10、20或25种株(例如,针对1-40种ASFV株)。在一个非限制性实施例中,包含表达选自SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的病毒载体的组合物可以用于针对一种或多种ASFV株(诸如在表2中列出的那些)免疫动物。

[0199] 表2

[0200] 示例性的非洲猪瘟病毒

[0201]

株	大小(Kb)	登录号
BA71V	170.101	NC_001659.2/U18466.2
L60	182.362	KM262844.1
BA71	180.365	KP055815.1
NHV	172.051	KM262845.1
Kenya 1950	193.886	AY261360.1
Ken05/Tk1	191.058	KM111294.1
Ken06.Bus	184.368	KM111295.1
26544/OG10	182.906	KM102979.1
Odintsovo_02/14	189.333	KP843857.1
Warthog	186.528	AY261366.1
Warmbaths	190.773	AY261365.1
Tengani 62	185.689	AY261364.1
Pretorisuskop/96/4	190.324	AY261363.1
Mkuzi 1979	192.714	AY261362.1
Malawi Lil-20/1 (1983)	187.612	AY261361.1
47/Ss/2008	184.638	KX354450.1
Benin 97/1	182.284	AM712239.1
OURT 88/3	171.719	AM712240.1
E75	181.187	FN557520.1
Georgia 2007/1	189.344	FR682468.1
R8	188.627	MH025916.1
R7	188.628	MH025917.1
R25	188.63	MH025918.1
N10	188.611	MH025919.1
R35	188.629	MH025920.1
ASFV/POL/2015/Podlaskie	189.394	MH681419.1

	Pol16_20186_o7	189.401	MG939583.1
	Pol16_20538_o9	189.399	MG939584.1
	Pol16_20540_o10	189.405	MG939585.1
	Pol16_29413_o23	189.393	MG939586.1
	Pol17_03029_C201	189.405	MG939587.1
	Pol17_04461_C210	189.401	MG939588.1
[0202]	ASFV-SY18	189.354	MH766894.1
	Kashino 04/13	189.387	KJ747406.1
	China/2018/AnhuiXCGQ	189.393	MK128995.1
	Pig/HLJ/2018	189.404	MK333180.1
	DB/LN/2018	189.404	MK333181.1
	Estonia 2014	182.446	LS478113.1
	Pol17_05838_C220	189.393	MG939589.1

[0203] B. 核酸分子

[0204] 某些公开的实施方案包括编码以下对象的氨基酸序列的一种或多种核酸分子：SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽，SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体，SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域，和/或SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白（诸如SEQ ID NO.2339-2345的一种或多种核酸），或其源自其它核苷酸对一种或多种核酸分子的一些或任意核苷酸的置换，或其源自这类核苷酸的一种或多种的插入或缺失，前提条件是，得到的肽仍然适合用于诱导免疫应答或改善感染的迹象或症状，且优选地在免疫原学上与对应的一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白等同。基于该信息，本领域普通技术人员可以鉴定在ASFV基因组内的核酸序列或与例如SEQ ID NO:3的肽、或SEQ ID NO:29的肽、或SEQ ID NO:1092的肽对应的其它ASFV核酸序列（例如，DNA、cDNA或RNA序列）。这可以例如如下完成：将附带的SEQ ID NO:1中提供的ASFV基因组，诸如ASFV株China/2018/AnhuiXCGQ的基因组，与一种或多种公开的肽序列对比，例如通过使用逐对序列比对工具，诸如GeneWise，其由European Bioinformatics Institute of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) 提供。

[0205] 一些公开的实施方案涉及一种或多种分离的核酸分子，诸如一种或多种DNA、cDNA和/或RNA分子。在某些实施方案中，组合物可以包含一种或多种核酸分子（诸如SEQ ID NO.2339-2345的一种或多种核酸），其编码SEQ ID NO.2-2273的至少一种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白。本文中公开的编码一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白的核酸分子也可以编码另外组分，例如，一种或多种多克隆位点、一种或多种表达控制序列（例如，异源启动子）、和/或一种或多种选择相关的序列，诸如能够通过抗生素抗性进行选择的核酸序列。在一个非限制性实施例中，将编码超过一种（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或30种）SEQ ID NO.2-

2273的肽的核酸分子掺入包含所述肽和另外组分的更大核酸分子中,其由细胞和/或由病毒或细菌载体表达。在另一个非限制性实施例中,将编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的核酸分子掺入DNA疫苗中,所述DNA疫苗可以施用给动物以刺激或引起针对一种或多种表达的肽的免疫应答。

[0206] C. 肽

[0207] 某些公开的实施方案涉及选自SEQ ID NO.2-2273的免疫原性肽、选自SEQ ID NO.2310-2330的构建体、选自SEQ ID NO:2331-2335的结构域和/或选自SEQ ID NO:2323-2329的全长度和/或部分长度ASFV蛋白。一些实施方案包含一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白,其中肽的至少一个氨基酸被另外一个或多个氨基酸置换,或肽中的氨基酸被插入或删除,或它们的组合,前提条件是,得到的肽能够诱导免疫应答或改善病毒感染的迹象或症状。一些实施方案包含完整蛋白,或一种或多种1至200个氨基酸的肽,包括具有在该范围内的任意氨基酸数目的肽,诸如5到至少50个氨基酸长度,例如,6-40、7-30或8-20个氨基酸长度,其中特定实施方案具有8至11个氨基酸。

[0208] 在某些实施方案中,免疫原性组合物包含选自SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽。在一个非限制性实施例中,使用本领域普通技术人员众所周知的技术合成和化学生产组合物的一种或多种肽。在另一个非限制性实施例中,使用本领域普通技术人员已知的重组技术从细胞内合成得到组合物的一种或多种肽。在其它实施方案中,在组合物中包括的一种或多种肽由核酸构建体、一种或多种载体、一种或多种细胞或它们的组合表达或被包含在其中,或二者兼有。在其它实施方案中,所述肽可以是分离的肽。

[0209] 可以修饰公开的免疫原性肽,例如为了稳定肽构象,提高抗酶降解的肽稳定性,提高体内肽稳定性,或它们的组合。这样的修饰可以包括,例如,糖基化、聚乙二醇化、脂质化、环化、乙酰化、酰胺化、缀合、D-氨基酸掺入、类似的修饰或它们的组合。

[0210] 猪主要组织相容性复合物(MHC),在猪中也称为猪白细胞抗原(SLA),与对病毒感染和疫苗接种的猪免疫应答有关。SLA I类糖蛋白存在于所有有核细胞中并呈递内源性抗原,所述内源性抗原最常见地起源于受感染的细胞的细胞质。SLA I类基因簇包括三种组成性地表达的基因:SLA-1、SLA-2和SLA-3,它们都是高度多晶型的。这些基因的不同等位基因形式产生对不同的肽种类具有结合特异性的蛋白。由受感染的细胞的表面上的SLA I类分子呈递的肽通常是8-11个氨基酸长度。细胞毒性T细胞上的CD8共受体对SLA I类糖蛋白的识别会导致受感染的细胞的破坏并启动适应性免疫应答的细胞介导的免疫应答组分。细胞介导的免疫应答与体液应答(即,B淋巴细胞对病毒特异性抗体的合成)一起导致存活更久的“记忆细胞”的产生,后者允许对相同或紧密相关病毒的后续感染的更快速免疫应答(和免疫)。

[0211] 目的在于预测高亲和力免疫原性肽的更新代算法不再单单聚焦于结合亲和力(例如对MHC分子,其代表单个事件),因而不大可能产生包括显著数目的假阳性的巨大假定肽列表。本文中公开的肽可以使用各种生物信息学方案产生,例如,基于预测的MHC结合亲和力可以鉴定假定免疫原性肽的高密度簇和/或可以鉴定潜在免疫原性肽的预测算法。例如,Zvi等人(PLoS ONE7(5):e36440,2012;通过引用并入本文)评估了细菌土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*)的假定免疫原性表位引起T-细胞应答的能力,这部分地通过映射重叠的预测表位簇和根据表位的密度将这样的“热点”区域排序完成。该方法补充了经

典的基于结合亲和力的算法。类似地,NetMHCpan-4.0算法通过积分计算机环境衍生的结合亲和力信息和从质谱法(MS)衍生出的洗脱配体来预测肽与MHC I类分子的相互作用(Jurtz,等人.J.Immunol199(9):3360-3368,2017;通过引用并入本文)。该方案整合了关于MHC I类呈递途径中的肽加工步骤的MS-衍生的信息的增加的可用性和呈递的肽的长度分布,以减少从单独的计算机环境衍生的结合亲和力信息通常产生的假阳性命中的数目。

[0212] 使用用于测量体外或体内免疫应答的各种方法可以验证公开的肽的免疫原性。这样的方法是本领域普通技术人员众所周知的,且本发明不限于使用特定测定。在一个非限制性实施例中,可以合成有关肽,并然后使用酶联免疫吸附斑点(ELISpot)测定针对外周血淋巴细胞或脾衍生的细胞进行筛选。在另一个非限制性实施例中,可以在一个或多个不同的时间间隔给动物施用不同浓度的一种或多种给定组合物一次或多次,且使用酶联免疫吸附测定(ELISA)可以确定抗-肽抗体在治疗过相对于未治疗过的动物血清中的存在。在另一个非限制性实施例中,可以在一个或多个不同的时间间隔给动物施用不同浓度的一种或多种给定组合物一次或多次,用ASFV株攻击,并随时间观察ASF症状发展。

[0213] D. 构建体

[0214] 在某些实施方案中,将SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域(也被称作“热点”,参见实施例3)和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白)掺入更大的氨基酸构建体中。示例性的构建体提供为SEQ ID NO.2310-2330。这样的构建体可以进一步包含,例如,N-端HLT、Sumo和/或MBP融合蛋白。这样的构建体可以包含N-端His-标签。例如,如果构建体包含HLT、Sumo和/或MBP融合蛋白,那么可以将His-标签附加至融合蛋白的N-端。

[0215] 在某些实施方案中,在一种或多种构建体中包含的SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白)可以进一步包含在全部或一些(诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25)编码一种或多种肽、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白的序列之间的一种或多种间隔物序列(诸如GPGPG和/或AAY)。可以用在本文公开的构建体中的另外的间隔物序列是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于本文中公开的特定间隔物序列。

[0216] 在某些实施方案中,构建体包含编码一种或多种检测序列和任选的接头(诸如GSSG)的一种或多种核苷酸序列。接头和检测序列可以位于,例如,编码一种或多种肽、结构域、全长度和/或部分长度ASFV蛋白和/或间隔物序列的序列的C-端,使得接头位于构建体的C-端和检测序列的N-端之间。接头和检测序列以及例如标记表达的序列以检测宿主细胞中、裂解物中、上清液中、受试者中和/或得自受试者的样品中的蛋白的方法,是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于一种或任何具体检测序列,或一种或任何具体接头序列。一种示例性的检测序列是HiBiT(Promega)序列GSGWRLFKKLS,(或具有任选的示例性接头的GSSGGSGWRLFKKLS),其可用于检测例如由一种或多种核酸分子的表达产生的蛋白产物,诸如在从宿主细胞培养物(诸如从包含用一种或多种核酸分子转化的大肠杆菌细胞的宿主细胞培养物)收集的裂解物和/或上清液中。另一种示例性的检测序列是编码组氨酸标签(His-标签)的序列(诸如编码氨基酸序列HHHHHH的核苷酸序列,其中每个H由CAC或CAT密码子编码),其可用于检测例如由一种或多种核酸分子的表达产生的蛋白产物,诸如在从宿

主细胞培养物(诸如从包含用一种或多种核酸分子转化的大肠杆菌细胞的宿主细胞培养物)收集的裂解物和/或上清液中。

[0217] E. 载体和宿主细胞

[0218] 包含SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的载体、核酸分子和细胞的多种类型和形式是在本发明范围内。生产所述载体、核酸分子和细胞的方法是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于使用一种或多种具体的载体、核酸分子或宿主细胞生产方法,或具体的载体、核酸分子或细胞类型。通常,包括或生产SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的载体和宿主细胞包含编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的一种或多种核酸分子(诸如SEQ ID NO.2286-2309的一种或多种核酸分子),且通常制备以表达所述肽。通常生产裸核酸分子(例如,为了用在DNA疫苗中而制备的质粒)以在用所述核酸分子转化细胞后表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽。因而,包含本文描述的至少一种载体、核酸分子或宿主细胞或它们的组合的一种或多种组合物可以施用给动物,例如,以产生针对ASFV的免疫应答,和/或针对ASFV免疫动物,或改善或消除与ASF有关的一种或多种症状。

[0219] 在某些实施方案中,将编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的一种或多种核酸分子掺入更大的核酸构建体中用于测量一种或多种核酸分子的表达,例如,在宿主细胞中。示例性的构建体提供为SEQ ID NO.2310-2330。这样的构建体可以进一步包含,例如,一种或多种质粒载体诸如pHLT、pSumo和/或pMBP质粒,例如以附加N-端HLT、Sumo和/或MBP融合蛋白。这样的构建体可以包含N-端His-标签。例如,如果构建体包含HLT、Sumo和/或MBP融合蛋白,那么可以将His-标签附加至融合蛋白的N-端。

[0220] 在某些实施方案中,在一种或多种构建体中包含的编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的核酸分子进一步包含在全部或一些(诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25)编码一种或多种肽、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白的核苷酸序列之间的一种或多种间隔物序列(诸如GPGPG和/或AAY)。可以用在本文公开的核酸分子中的另外的间隔物序列是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于本文中公开的特定间隔物序列。

[0221] 在某些实施方案中,构建体包含编码一种或多种检测序列和任选的接头(诸如GSSG)的一种或多种核苷酸序列。接头和检测序列可以位于,例如,编码一种或多种肽、结构域、全长度和/或部分长度ASFV蛋白和/或间隔物序列的核苷酸序列的C-端,使得接头位于构建体的C-端和检测序列的N-端之间。接头和检测序列以及例如标记表达的序列以检测宿主细胞中、裂解物中、上清液中、受试者中和/或得自受试者的样品中的核酸分子或蛋白的方法,是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于一种或任何具体检测序列,或一种或任何具体接头序列。一种示例性的检测序列是编码(Promega)序列GSGWRLFVKLS(或具有任选的示例性接头的GSSGGSGWRLFVKLS)的核酸分子,其可用于检测例如由一种或多种核

酸分子的表达产生的蛋白产物,诸如在从宿主细胞培养物(诸如从包含用一种或多种核酸分子转化的大肠杆菌细胞的宿主细胞培养物)收集的裂解物和/或上清液中。另一种示例性的检测序列是编码组氨酸标签(His-标签)的序列(诸如编码氨基酸序列HHHHHH的核苷酸序列,其中每个H由CAC或CAT密码子编码),其可用于检测例如由一种或多种核酸分子的表达产生的蛋白产物,诸如在从宿主细胞培养物(诸如从包含用一种或多种核酸分子转化的大肠杆菌细胞的宿主细胞培养物)收集的裂解物和/或上清液中。

[0222] 在某些实施方案中,将编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的一种或多种核酸分子掺入更大的核酸构建体,诸如质粒,例如,用于直接引入动物。通过任意合适的技术,诸如通过盐水注射、颗粒枪加速、任意合适的已知的或将来发现的给受试者施用DNA或RNA疫苗的方法、或它们的组合,可以将这样的核酸构建体引入动物,并且这样的方法是本领域普通技术人员已知的或会理解的。在一个非限制性实施例中,将编码一种或多种(例如,1、2、3、4、5、8、10、15或20种)SEQ ID NO.2-2273的肽的一种或多种核酸分子掺入质粒中,并将包含所述质粒的组合物施用给猪。

[0223] 在某些实施方案中,可以将编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的一种或多种核酸分子掺入病毒载体中。在某些实施方案中,所述病毒载体可以是疱疹病毒、腺病毒、圆环病毒、 α 病毒、正痘病毒、禽副黏液病毒、猪痘病毒或它们的任意组合。在一个非限制性实施例中,所述病毒载体是假性狂犬病病毒、猪环状构象病毒、辛德毕斯病毒、痘苗病毒、新城病毒或猪痘病毒。在一个具体的非限制性实施例中,将编码一种或多种(例如,1、2、3、4、5、8、10、15或20种)SEQ ID NO.2-2273的肽的核酸分子掺入牛痘病毒载体中,并将包含所述载体的组合物施用给猪。

[0224] 在其它实施方案中,可以将编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的一种或多种核酸分子掺入宿主细胞中。在一个非限制性实施例中,所述宿主细胞是重组酵母,例如,毕赤酵母属(*Pichia*)或酵母属(*Saccharomyces*)的酵母。在具体的非限制性实施例中,所述重组酵母是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在另一个非限制性实施例中,所述宿主细胞是重组原核生物,例如,沙门氏菌属(*Salmonella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、李斯特菌属(*Listeria*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)或弧菌属(*Vibrio*)的细菌。在具体的非限制性实施例中,所述重组细菌是肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌

(*Yersinia enterocolitica*)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)或鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)。通过可能用于将核酸分子引入细胞中的几种技术之一,可以将一种或多种核酸分子掺入宿主细胞中。技术,例如,用编码SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽的质粒转化,是本领域普通技术人员通常已知的。在一个具体的非限制性实施例中,将编码一种或多种(例如,1、2、3、4、5、8、10、15或20种)SEQ ID NO.2-2273的肽的质粒掺入酿酒酵母宿主细胞中,并将包含转化的宿主细胞的组合物施用给猪。在另一个具体的非限制性实施例中,将编码一种或多种(例如,1、2、3、4、5、8、10、15或20种)SEQ ID NO.2-2273的肽的质粒掺入肠道沙门氏菌宿主细胞,并将包含转化的宿主细胞的组合物施用给猪。

[0225] IV. 组合物

[0226] 本文中公开了组合物,其包含SEQ ID NO.2-2273的一种或多种免疫原性肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),和/或包含一种或多种载体和/或细胞和/或核酸分子,它们包含或编码所述的肽、构建体、结构域和/或全长度和/或部分长度ASFV蛋白中的一种或多种。可以将公开的组合物施用给动物,尤其是猪。一种或多种组合物可以用于,例如,引起针对ASFV的免疫应答,针对ASFV来免疫受试者,改善和/或消除与ASFV有关的一种或多种症状,和/或通过充当爆发前疫苗来减轻将来爆发。

[0227] 在某些实施方案中,所述组合物包括SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。在其它实施方案中,所述组合物包括一种或多种载体,例如,病毒或细菌载体,所述载体包含公开的一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白。在一个非限制性实施例中,所述病毒载体是假性狂犬病病毒。在另一个非限制性实施例中,所述病毒载体是经修饰的牛痘Ankara病毒。在其它实施方案中,所述组合物包括编码一种或多种肽、构建体、结构域和/或全长或部分长ASFV蛋白的DNA质粒和/或其它核酸构建体。在另一个实施方案中,本发明涉及SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽,所述肽可通过核酸构建体和/或其它编码序列的表达得到。在另一个实施方案中,本发明涉及含有编码公开的肽的基因构建体的细胞和/或载体。在一个非限制性实施例中,在细胞中和/或由一种或多种载体表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、一种或多种构建体(例如,SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种氨基酸序列)、一种或多种结构域(在本文中也称作“热点”,如在实施例3中所述;例如,SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种氨基酸序列)和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO:2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。因而,表达和/或生产根据SEQ ID NO.2-2273的肽的方法构成本发明的另一个方面。如本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的,还可以合成地生产这样的肽。在一个非限制性实施例中,所述组合物包括化学合成的肽或使用本领域普通技术人员众所周知的重组技术从细胞内合成得到的肽。

[0228] 公开的免疫原性组合物可以包括其它试剂。一些实施方案涉及包含治疗有效量的DNA或RNA构建体或载体或细胞以及一种或多种另外组分的药物组合物,所述构建体包含

SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),所述载体包含所述肽、结构域和/或ASFV蛋白中的一种或多种,所述细胞包含所述肽、结构域和/或ASFV蛋白中的一种或多种。在非限制性实施例中,另外组分是适当的载体(例如,PBS)和适当的佐剂。在某些实施方案中,所述肽、核酸构建体、载体和/或细胞存在于可接受的载体诸如盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、油、乙醇或它们的组合中。载体或含有载体的组合物或二者可以无菌的。所述组合物还可以包含合适量的pH缓冲剂或润湿剂或乳化剂。所述组合物还可以包含常规药物材料,例如,可接受的缓冲剂、防腐剂、用于调节渗透压的盐和类似物。所述组合物还可以含有辅料,例如,油佐剂、水包油佐剂、油包水佐剂、水包油包水佐剂、氢氧化铝、氢氧化钾、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂苷、角鲨烯、免疫刺激复合物(ISCOM)、脂质体、多糖、衍生化的多糖、寡核苷酸、细胞因子、细菌衍生物、病毒衍生物、凝胶佐剂,例如,Emulsigen-D,或基于卡波姆的佐剂,例如,Carbigen。所述组合物可以包括通过化学缀合与一种或多种佐剂组合的SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽,例如,通过脲连接、天然化学连接、硫醚连接、醛基和肼($\text{NH}_2\text{NH}-$)基团之间肼连接、马来酰亚胺-巯基反应、CuAAC反应或类似方式。所述组合物可以包括使用一种或多种化学方法、重组技术和/或酶反应通过聚合而组合的SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽。公开的组合物还可以包括SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽,其已经经历修饰,例如,糖基化、聚乙二醇化、脂质化、环化、乙酰化、酰胺化、缀合、D-氨基酸掺入或类似的修饰或它们的组合。所述组合物可以是液体溶液或混悬液、糖浆剂、乳剂、微乳剂、气雾剂、片剂、丸剂、胶囊、凝胶、持续释放制剂或粉末。在一个非限制性实施例中,所述组合物是低压冻干的或冷冻干燥的粉末,或液体。利用传统的粘合剂和载体,例如甘油三酯,可以将组合物配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体,例如,淀粉、甘露醇、糖精钠、乳糖、纤维素、硬脂酸镁、碳酸镁或它们的组合。粘膜制剂可以包括粘膜粘着聚合物,例如,壳聚糖。公开的组合物还可以包括一种或多种额外的治疗剂,例如,其它疫苗,包括、但不限于,亚单位疫苗、活减毒病毒疫苗、DNA疫苗、RNAi疫苗、灭活疫苗、细菌疫苗、酵母疫苗或它们的组合。这样的疫苗还可以包括,例如,猪生殖和呼吸综合征病毒疫苗、猪环状构象病毒-2疫苗、免疫去势疫苗、其它特定疫苗或它们的组合。其它治疗剂还可以包括目的在于减轻或缓解ASF的症状的化合物或组合物,例如,抗炎药、止泻药、食欲刺激剂、抗恶心药物、呼吸治疗剂、右旋糖酐铁或它们的组合。

[0229] V. 刺激和测量免疫应答的方法

[0230] 公开的发明也涉及使用公开的组合物的方法的实施方案。例如,一个实施方案包括提供本文描述的至少一种肽、载体、核酸分子和/或组合物,和将有效量的它施用给动物,诸如猪。根据本公开内容的方法的一个非限制性实施例包括在动物中引起或刺激针对SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的免疫应答。在另一个非限制性实施例中,所述方法包括使用包含病毒载体的组合物针对ASFV接种或免疫动物,所述病毒载体表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或一种或多种全长度和/

或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。在某些实施方案中,使用任意合适的施用途径,例如,肌肉内或鼻内施用,施用所述组合物。可以施用至少一种公开的组合物的动物的例子包括可以(或正)被ASFV感染的动物。这样的动物的例子包括、但不限于哺乳动物受试者,有蹄动物,诸如猪,例如,在妊娠期间的母猪。施用组合物的动物可以是成年的或幼年的。

[0231] 公开的组合物可以用于在动物中刺激或引起针对ASFV的免疫应答。在某些实施例中,所述方法包括向动物、尤其是猪施用治疗有效量的组合物,其包含SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),以在所述动物中引起针对ASFV的免疫应答。确定是否已经引起或刺激免疫应答的方法是本领域普通技术人员已知的。在某些实施例中,如果观察到疾病的减轻(诸如症状的减轻)、病毒滴度的下降、死亡率的下降或它们的组合,则实现了免疫应答。在某些实施例中,公开的方法使施用组合物的动物中的ASFV感染的症状完全减轻或减轻至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%,例如相对于没有施用所述组合物的等同动物。在某些实施例中,公开的组合物或方法或二者会降低施用组合物的动物中的病毒滴度,诸如降低至少10%到至少100%、20%到至少100%、30%到至少100%、40%到至少100%、50%到至少100%、60%到至少100%、70%到至少100%、80%到至少100%、90%到至少100%、至少2倍、至少3倍、至少4倍或至少5倍,例如相对于没有施用所述组合物的等同动物。在某些实施例中,公开的方法使施用组合物的动物中在随后病毒攻击以后的存活率增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%,例如相对于没有施用所述组合物的等同动物。

[0232] 在某些实施例中,所述方法包括施用治疗有效量的包含病毒载体的组合物,所述病毒载体表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),由此针对ASFV免疫所述动物。在某些实施例中,如果观察到疾病的减轻(诸如症状的减轻)、病毒滴度的下降、保护免于死亡或它们的组合,则实现了免疫应答。

[0233] 在某些实施方案中,可以给动物施用(诸如肌肉内地)治疗有效量的约1至约100 μ g以下每一种:SEQ ID NO.2-2273的至少一种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。在某些实施方案中,可以给动物施用(诸如肌肉内地)治疗有效量的约 10^3 至约 10^9 CCID⁵⁰(诸如约 10^6 CCID⁵⁰)的至少一种病毒载体中的每一种,例如,假性狂犬病病毒或经修饰的牛痘Ankara病毒,其表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。但是,本领域普通技术人员能够确定以下物质的治疗有效量(例如,提供免于ASFV感染的保护的量)以施用给动物:例如,SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、

SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),或表达所述肽、结构域和/或ASFV蛋白中的一种或多种的病毒载体。

[0234] 用于确定本文中公开的组合物是否可以刺激或引起免疫应答(诸如实现成功免疫保护)的方法是本领域普通技术人员已知的,且本公开内容不限于特定测定的应用。在施用本文提供的组合物以后,可以执行一种或多种测定以评估得到的免疫应答。在一个非限制性实施例中,还在施用组合物之前执行一种或多种测定以提供基线或对照。在施用组合物以后,可以从动物收集样品,诸如血液、血清和/或外周血巨噬细胞(PBMC)样品。在某些实施例中,在第一次施用以后至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少8周或至少10周(诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周),收集一个或多个样品。还可以得到另外样品,例如在随后施用一种或多种相同或不同的组合物以后。

[0235] VI. 施用方法

[0236] 通过通常用于将一种或多种药物组合物引入动物中的途径中的任一种,可以将肽、免疫原性组合物、载体、细胞和/或核酸构建体的实施方案施用给动物。施用方法包括,但不限于肌肉内、口服、静脉内、真皮内、腹膜内、皮下、胃肠外、粘膜、直肠、阴道、吸入、鼻内或它们组合。胃肠外施用,例如,肌肉内、静脉内或皮下施用,通常通过注射实现。施用可以是局部的或全身性的,或它们的组合。可以制备注射剂,例如,作为乳剂,作为适合用于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式,或作为液体混悬液或溶液。可以从无菌粉剂、片剂、颗粒或类似形式或它们的组合制备注射混悬液或溶液。

[0237] 施用给动物的一种或多种组合物可以与至少一种可接受的载体一起施用。可接受的载体部分地取决于要施用的特定组合物,以及用于施用组合物的特定方法。因而,存在本公开内容的组合物的多种可接受的制剂。

[0238] 用于胃肠外施用的制品包括无菌的水性或非水性溶液、混悬液和/或乳剂,例如,水包油和/或油包水乳剂。用于胃肠外施用的制品还可以包括佐剂和/或聚合物,例如,CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)、Carbigen、Polygen、ISA 201或206(诸如Montanide ISA 201VG)、Quil-A、海藻糖-6,6-二山嵛酸酯(TBD)、基于toll-样受体(TLR)配体的佐剂(诸如TLR7/8佐剂,诸如R848(瑞喹莫德))、环状二鸟苷酸酯单磷酸酯(c-二-GMP)、聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))或它们的组合。非水性溶剂的例子是醇类或二醇类,诸如丙二醇、聚乙二醇,植物油诸如橄榄油,和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳剂或混悬液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、含乳酸盐的林格氏溶液、或不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养物补充剂、电解质补充剂(诸如基于林格氏右旋糖的那些)和类似媒介物。防腐剂和其它添加剂也可以存在,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体和类似试剂。

[0239] 在某些实施例中,将公开的实施方案配制成用于粘膜疫苗接种,诸如口服、鼻内、肺、直肠和阴道。在一个非限制性实施例中,这通过鼻内施用实现。例如,公开的组合物可以包括一种或多种可生物降解的聚合载体,其与一种或多种粘膜相互作用。可以包括聚合物诸如聚丙交酯-共聚-乙交酯(PLGA)、壳聚糖(例如以壳聚糖纳米颗粒的形式,诸如基于N-三甲基壳聚糖(TMC)的纳米颗粒)、海藻酸盐(诸如海藻酸钠)、聚羧乙烯和基于聚羧乙烯的聚

合物。所述组合物可以包括一种或多种亲水聚合物,诸如海藻酸钠或聚羧乙烯,例如与淀粉组合。可以将所述组合物配制为用于鼻施用的微粒递送系统。因而,所述组合物可以包括脂质体、免疫刺激复合物 (ISCOM) 和/或聚合颗粒,诸如病毒体。所述组合物还可以包括细菌起源的一种或多种脂肽,或它们的合成衍生物,诸如Pam3Cys、(Pam2Cys、单链/多链棕榈酸和脂氨基酸 (LAA))。所述组合物还可以包括一种或多种佐剂,例如CpG寡脱氧核苷酸 (CpG ODN)、Flt3配体、Carbigen、c-二-GMP、聚(I:C)和单磷酸脂质A (MLA)中的一种或多种。

[0240] 本文中公开的组合物可以施用给母体衍生的抗体 (MDA) 阳性的动物。如果给定的疫苗刺激体液免疫应答,母猪可以将MDA转移给小猪,并且这可能延迟接种小猪的机会。但是,MDA不可能延迟T细胞表位疫苗。

[0241] A. 施用时机

[0242] 公开的组合物可以作为单剂量或作为多剂量(例如,增强剂量)施用。在某些实施例中,第一次施用之后是第二次施用。例如,第二次施用可以使用与施用的第一组合物相同或不同的组合物。在一个具体的非限制性实施例中,第二次施用使用与施用的第一组合物相同的组合物。在另一个具体的非限制性实施例中,第二次施用使用与施用的第一组合物不同的组合物。例如,如果第一组合物包含10种选自SEQ ID NO:2-2273的肽,第二组合物可以包括20种选自SEQ ID NO:2-2273的不同肽,其中所有30种肽是不同的。在某些实施例中,给动物施用包含病毒载体的一种或多种组合物,所述病毒载体表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),并随后施用包含活减毒ASFV的一种或多种疫苗。

[0243] 在某些实施例中,以多剂量施用一种或多种组合物,诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个剂量(诸如2-4个剂量)。在这些实施例中,剂量之间的时间可以是至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少6周、至少8周、至少12周、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少5年或至少10年,诸如1-4周、2-3周、1-6个月、2-4个月、1-10年或2-5年或它们的组合。在一个非限制性实施例中,其中存在至少三次施用,第一和第二剂量以及第二和第三剂量之间的时间可以是相同的或不同的。

[0244] B. 剂量

[0245] 在本公开内容的上下文中,施用给受试者的剂量应当足以随时间在受试者中诱导有益的治疗应答,或抑制ASFV感染。剂量可以随受试者不同而变化,取决于受试者的物种、年龄、重量和一般状况,正在治疗的感染的严重程度,是否将剂量用于针对感染进行治疗、减轻或接种,正在使用的特定组合物,和/或施用模式。本领域普通技术人员使用例行实验可以确定适当的剂量。

[0246] 在某些实施方案中,给动物施用(例如,肌肉内地)约0.1至约100 μ g在组合物中的给定肽,诸如约1 μ g至约5 μ g、约1 μ g至约50 μ g、约1 μ g至约25 μ g、约5 μ g至约20 μ g或约10 μ g至约15 μ g的组合物中的至少一种肽中的每一种。在一个具体的非限制性实施例中,给受试者施用(例如,肌肉内地)约10 μ g、约15 μ g、约20 μ g或约30 μ g的至少两种不同肽中的每一种。在一个非限制性实施例中,在第一施用量给动物施用一种组合物,在第二施用量施用第二组合物,和在第三施用量施用第三组合物。此外,每次施用的一种或多种组合物可以是相同的或

不同的。

[0247] 在某些实施方案中,给动物施用(例如,肌肉内地)约 10^2 至约 10^9 CCID 50 的伪狂犬病毒载体或经修饰的牛痘Ankara病毒载体,其表达SEQ ID NO.2-2273的至少一种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域、和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸),诸如约 10^3 至约 10^5 、约 10^4 至约 10^6 、约 10^5 至约 10^7 、约 10^6 至约 10^8 或约 10^7 至约 10^9 的在单剂量内的病毒载体。在一个具体的非限制性实施例中,给受试者施用(例如,肌肉内地)约 10^4 、约 10^5 、约 10^6 或约 10^7 CCID 50 的至少两种病毒载体中的每一种,所述病毒载体表达相同的或不同的SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体、SEQ ID NO:2331-2335的一种或多种结构域和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV蛋白(例如,SEQ ID NO.2323-2329的一种或多种蛋白和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)。在另一个非限制性实施例中,在第一施用量给动物施用一种病毒载体,在第二施用量施用第二病毒载体,和在第三施用量施用第三病毒载体。

[0248] VII. 肉桂提取物佐剂

[0249] 在本文公开的组合物的一些实施方案中包括的佐剂可以包括肉桂衍生的产物,诸如肉桂油(参见美国专利号2006/0275515,“Antiviral preparations obtained from a natural cinnamon extract”,其通过引用并入本文)。某些肉桂衍生的佐剂涉及通过提取或通过分级分离提取组合物而产生的组合物。特定实施方案涉及桂皮(Cinnamomum sp.)的水性提取物,但是也可以使用其它极性溶剂,例如,醇类和二醇类。可以加工在提取物中或在提取物级分中的一种或多种化合物以形成沉淀物。例如,提取物的活性抗病毒级分可能具有15至200.D.的在280nm的吸光度,和/或可能包含具有大于10kDa的分子量的一种或多种物质,诸如在约150.D.在一个优选的实施方案中,具有抗病毒活性的桂皮的分离的活性级分另外具有一种或多种下述化学性质:

[0250] 1. 它被多种盐酸盐诸如KCl、NaCl、MgCl $_2$ 、SrCl $_2$ 、CuCl $_2$ 或ZnCl $_2$ 沉淀。

[0251] 2. 它表现出150.D/mg.cm的在280nm的吸光度。

[0252] 3. 它在0.1M NaOH或0.1M HCl或0.1M H $_2$ SO $_4$ 中温育以后维持它的大部分活性。

[0253] 4. 它可以以相对廉价且简单的方式提取进水溶液或有机溶液诸如醇溶剂或丙酮中。

[0254] 5. 它可以作为稳定粉末或在溶液中在冰箱中或在室温维持长时间(至少两年);

[0255] 6. 它是热稳定的,因而可以在高达至少134°C的温度灭菌。

[0256] 通过任意合适的方法可以制备有用的提取组合物。一种合适的实施方案包括形成桂皮粉,和形成包含桂皮粉的溶液或混悬液。所述方法可以包括使用水性溶剂或有机溶剂形成适当的溶液。某些实施方案涉及形成水溶液,然后可以将溶液离心并收集包含抗病毒活性级分的上清液。也可以形成沉淀物,诸如通过蒸发或通过加入沉淀助剂,诸如盐,更具体地盐酸盐,诸如KCl、NaCl、MgCl $_2$ 、SrCl $_2$ 、CuCl $_2$ 、ZnCl $_2$ 或它们的组合。

[0257] 可以将沉淀物进一步分级分离或纯化。一种这样的方法是色谱方法。例如,可以将沉淀物在约7的pH溶解在水中。可以将溶液加入Sepharose柱并用缓冲液和糖洗脱。一种更具体的方法包括使用pH 7.0的0.02M水性磷酸盐缓冲液以形成溶液,通过加入0.15M KCl或0.08M MgCl $_2$ 形成沉淀物,将沉淀物溶解在水或pH 7.0的0.01M磷酸盐缓冲液中,将沉淀物

溶液加给Sephacrose 4B柱并使用磷酸盐缓冲液和半乳糖执行逐步洗脱,其中活性抗病毒物质用0.15M半乳糖从柱洗脱。

[0258] 在一个优选的实施方案中,使用下述方法得到肉桂提取物:

[0259] (i) 将桂皮碾磨成粉末并将它搅拌进水性缓冲液中以得到溶液;

[0260] (ii) 离心所述溶液和分离上清液;和

[0261] (iii) 引入盐,例如,盐酸盐,以得到沉淀物。

[0262] 所述方法可以进一步包括下述步骤:

[0263] (iv) 将在上面步骤(iii)中得到的沉淀物在基本上中性pH溶解在水或缓冲液中;

[0264] (v) 在sephacrose或Sephadex柱上分离所述溶液;和

[0265] (vi) 用合适的缓冲液和不同浓度的糖(优选半乳糖)洗脱所述溶液,以得到抗病毒级分。

[0266] 在另一个优选的实施方案中,使用下述方法从桂皮Cinnamomum sp.得到肉桂提取物:

[0267] (i) 将桂皮碾磨成粉末;

[0268] (ii) 将桂皮在pH 7.0的0.01M或0.02M水性磷酸盐缓冲液中搅拌;

[0269] (iii) 通过离心分离上清液,以用作粗制的中和提取物;

[0270] (iv) 使用0.15M KCl或0.08M MgCl₂沉淀粗提取物中的活性成分;

[0271] (v) 将沉淀物溶解在水或pH 7.0的0.01M磷酸盐缓冲液中;

[0272] (vi) 将溶液加载到sephacrose 4B柱上,随后用磷酸盐缓冲液和不同浓度的半乳糖逐步洗脱;和

[0273] (vii) 用0.15M半乳糖从柱洗脱活性抗病毒物质。

[0274] 使用有效量的提取物溶液、其单独级分、沉淀物、包含沉淀物的组合物和/或它们的组合,通过加入药学上或营养学上可接受的载体,可以形成营养制品和/或药物组合物。这样的组合物还可以包括本文中公开的肽、核酸、载体、宿主细胞或其组合物中的一种或两种或更多种。这样的组合物还可以包括其它组分,诸如至少一种额外的治疗或营养组分。

[0275] 如此形成的化合物和/或组合物具有抗病毒活性。一般而言,所述病毒可以有包膜病毒,诸如非洲猪瘟病毒、正粘病毒、副粘病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、冠状病毒、嗜肝性DNA病毒、痘病毒、披膜病毒、黄病毒、纤丝病毒、弹状病毒和布尼亚病毒。因此,公开的实施方案也涉及用于治疗病毒感染的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的肉桂提取物组合物、肉桂提取物沉淀物组合物或与本文中公开的一种或多种ASFV肽组合的这样的组合物。如本领域普通技术人员会理解的,通过任意合适的方法可以施用这样的组合物,诸如口服地、鼻地、胃肠外地、皮下地和/或肌肉内地。

[0276] 某些公开的实施方案涉及生产中和病毒用于免疫接种的方法,和使用中和病毒生产的中和病毒疫苗。一个这样的实施方案包括使天然病毒(诸如ASFV)与有效量的肉桂提取物组合物和/或肉桂提取物沉淀物组合物接触。包含中和病毒的疫苗制剂可以施用给如上面讨论的受试者。

[0277] 桂皮的分离的活性级分可以表现出150.D./mg·cm³的在280nm的吸光度。活性级分在酸或碱(诸如0.1M NaOH或0.1M HCl)中温育以后保留活性。固体活性级分和包含这样的活性组分的溶液可以在室温或以下储存较长时间段,诸如几年。活性沉淀物级分是热稳

定的,且可以在大于100℃和可能高达至少134℃的温度灭菌。

[0278] 本发明的组合物可以保护受感染的红细胞免于预吸附在红细胞上的病毒的活性。因而,本发明的肉桂提取物可以视作已经预吸附病毒的细胞的有效治疗剂。此外,本发明的肉桂提取物在细胞上的预吸附可能在保护细胞免于随后病毒感染中具有预防作用。另外,本发明的组合物可以保护受感染的红细胞免于预吸附在肉桂提取物上和/或本文中公开的一种或多种组合物的一种或多种其它组分上的病毒的活性,所述一种或多种组合物然后接触所述细胞。

[0279] 本发明还涉及包含本发明的肉桂提取物以及药学上或营养学上可接受的载体的组合物,其可以是营养制品或药物组合物。所述组合物可以呈液体、固体或半固体状态。

[0280] 此外,本发明涉及用于治疗感染的药物组合物或营养制品组合物,其包含有效量的肉桂提取物作为活性成分以及适合用于药物或营养制品组合物的载体。

[0281] 本发明进一步涉及用于治疗遭受病毒感染的受试者的方法。所述方法包括给需要这种治疗的受试者施用有效量的本文公开的组合物。所述病毒感染优选地是有包膜病毒感染;更优选正粘病毒、副粘病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、冠状病毒、嗜肝性DNA病毒、痘病毒、披膜病毒、黄病毒、纤丝病毒、弹状病毒或布尼亚病毒中的病毒;最优选由选自禽流感病毒、流感病毒、副流感病毒(在本文中也被称作“仙台病毒”)、NDV病毒(副粘病毒)、HIV病毒、HSV-1病毒、HSFV病毒、ASFV、TILV(正粘病毒)和KHV(疱疹病毒)的病毒造成病毒感染。

[0282] 如下通过三个步骤分离活性物质:a)在市场上购买桂皮并碾磨成粉末,然后将它在pH 7.0的0.01M-0.02M水性磷酸盐缓冲液中搅拌过夜。将上清液离心分离并用作粗制的中和提取物;b)将粗提取物中的活性物质用0.15M KCl或0.08M MgCl₂沉淀,并将沉淀物溶解在水或pH 7.0的0.01M磷酸盐缓冲液(CE ppt.)中;c)将该溶液上Sephacrose 4B柱,随后用磷酸盐缓冲液和不同浓度的半乳糖逐步洗脱。活性抗病毒物质可以用0.15M半乳糖从柱洗脱。

[0283] 使用4%洗涤过的人红血细胞可以确定血凝单位(HAU)。已经如下在体外试验了病毒溶血活性:首先在室温将游离病毒附着在1ml的4%洗涤过的人红血细胞上15分钟,然后将受感染的细胞在37℃温育3小时,随后离心。已经通过测量上清液在540nm的吸光度来确定病毒的溶血活性。

[0284] 在一个特定实施方案中,可以将肉桂提取物沉淀物溶解在水或0.01M磷酸盐缓冲液中并加入10ml用pH 7.0的0.01M磷酸盐缓冲液预洗涤的Sephacrose 4B柱。所述柱可以用缓冲液洗涤,随后用0.15M、0.3M半乳糖和不同浓度的乙腈逐步洗脱。已经在用0.15M半乳糖从柱洗脱的级分b或级分II中发现了活性抗病毒物质。

[0285] 已经将不同量的粗提取物与甲型流感PR8病毒的256HAU样品一起温育,以试验对病毒的溶血活性的抑制作用。250μg粗提取物完全抑制了病毒的溶血活性。

[0286] 已经将不同量的粗提取物与仙台病毒的256HAU样品一起温育,以试验对病毒的溶血活性的抑制作用。单独的病毒或单独的粗提取物已经用作对照。250μg粗提取物完全抑制了病毒的溶血活性。

[0287] 已经在水中透析肉桂提取物级分。已经发现活性组分具有大于10KDa(透析袋截止值)的分子量。

[0288] 已经使用小鼠确定了体内抗病毒活性。已经给小鼠注射250μl含有单独甲型流感

病毒的128HAU或与250 μ g粗提取物或单独的粗提取物混合的甲型流感的PBS。被单独的病毒感染的小鼠丢失体重,且大多数在7-10天内死亡。注射了病毒和粗提取物的混合物的小鼠继续增加重量,与注射单独的粗提取物的那些等同。

[0289] 小鼠已经吸入50 μ l的水,其含有64HAU的单独仙台病毒、与125 μ g粗提取物混合的病毒或单独的粗提取物。以2-3天间隔对小鼠称重。被单独的病毒感染的小鼠丢失体重,且大多数在7-10天内死亡。用病毒和粗提取物的混合物鼻内地处理的小鼠恢复并增加重量。每组包括10只小鼠。

[0290] 已经给小鼠注射128HAU的甲型流感PR8,其与250 μ g肉桂提取物抑制剂一起在室温预温育了30分钟。每2-3天对小鼠称重持续3周。在与抑制剂一起预温育的病毒所感染的小鼠中没有发生死亡。

[0291] 将HSV1的100PFU等分试样与50 μ g根据本发明的肉桂提取物沉淀物混合。将具有单独HSV的细胞脱离并从平板洗涤。具有与50 μ g肉桂提取物沉淀物混合的HSV的细胞不受影响。这确定,本发明的提取物保护Vero细胞免于HSV-1感染。

[0292] 试验还已经确定,在抑制和递增量的根据本发明的肉桂提取物和/或肉桂提取物沉淀物之间存在直接关联。

[0293] 还已经将小鼠用与125 μ g肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物一起预温育20分钟的32HAU的仙台病毒感染,或在病毒感染以后立即用肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物处理。用抑制剂处理的小鼠在感染后8天开始增加重量($P=0.017$),而没有用抑制剂处理的对照组继续丢失重量。

[0294] 已经用与125 μ g肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物混合的32HAU的仙台病毒鼻内地免疫小鼠。对照组仅接受水。在免疫接种后三周,用64HAU的单独仙台病毒感染两组小鼠。免疫的小鼠不受随后病毒感染影响且保持增加重量($P=0.013$)。

[0295] 已经用与肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物混合的仙台病毒口服地或皮下地免疫小鼠。在病毒+肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物的第三次施用以后两周,用80HAU的仙台病毒感染两组的小鼠,同样处理对照小鼠。免疫的小鼠不受随后病毒感染影响并继续增加重量,在口服或皮下施用之间没有观察到差异。

[0296] 已经在细胞培养物中使用合胞体形成的模型在MT2细胞(CD4+T-细胞)上试验了HIV-1活性。在室温以200 μ l RPMI培养基的终体积将肉桂提取物沉淀物的20-120 μ l等分试样(0.5mg/ml)与50 μ l病毒一起温育5分钟。将90 μ l每种混合物一式两份地加给细胞。3天以后,在95-100%的没有肉桂提取物沉淀物的对照孔中观察到合胞体,并充当其它孔所对比的100%传染性。但是,在8-10 μ l中的8-10 μ g肉桂提取物沉淀物完全地中和病毒。

[0297] 如以前那样(Borkow和Ovadia,1994,1999),已经通过体外溶血测定试验了VNF对禽流感H9N2的抑制。在人红细胞上检查了流感病毒的溶血活性(血红蛋白从红血细胞的释放)。将洗涤过的稀释的红细胞与以下病毒混合:单独的病毒,或与肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物一起在室温预温育20分钟的病毒。将多余的病毒通过用PBS洗涤来除去,随后加入200 μ l的0.1M柠檬酸钠缓冲液(pH 4.6)三分钟以使病毒与红细胞融合。然后将混合物在PBS中洗涤,离心并在0.8ml PBS中在37 $^{\circ}$ C温育3小时。将完整的红细胞通过离心除去,并将来自每个样品的上清液的300 μ l等分试样放入ELISA板的孔中用于在ELISA平板读数器中在540nm测量吸光度。根据本发明的肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物以剂量依赖性的方式中

和病毒的溶血活性。

[0298] 肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物在它附着于受感染的细胞上(正如它对游离病毒所做)以后也已经抑制禽流感病毒的溶血活性。

[0299] 还已经试验了新城疫病毒(NDV)的血凝集活性。病毒(108EID₅₀)与10mg根据本发明的肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物一起的预温育导致血凝集抑制。

[0300] 还已经试验了肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物对禽流感H9N2的体内(In-ova)中和。将含有4.5mg根据本发明的肉桂提取物沉淀物和107EID₅₀的流感H9N2的一毫升在室温温育20分钟,然后从该混合物制备10倍稀释物。将0.1ml每种稀释物注射进10个含胚鸡SPF卵的每个尿囊腔。将单独的病毒或肉桂提取物沉淀物的稀释物用作对照(每组10个卵)。肉桂提取物沉淀物使病毒传染性下降了5log,并以类似的比率增加了胚胎存活率。

[0301] 还已经试验了肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物对新城疫病毒的体内中和。将含有5mg根据本发明的肉桂提取物沉淀物和108EID₅₀的新城疫病毒的一ml在室温温育20分钟,然后从该混合物制备10倍稀释物。将0.1ml每种稀释物注射进10个鸡SPF卵的每个尿囊腔。将单独的病毒和单独的肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物用作对照。肉桂提取物或肉桂提取物沉淀物使病毒传染性下降了5log,并类似地增加了胚胎存活率。

[0302] 已经评论了与肉桂提取物沉淀物组合的NDV接种以后鸡的血清滴度。通过在胚胎发育的第18天将含有105.3EID₅₀的NDV(与1mg VNF一起预温育过)的0.1ml PBS注射进SPF鸡卵中,进行第一组的卵内疫苗接种。在1-2天以后给第二组眼内地接种。未接种的鸡用作对照。定期抽取血液样品,并通过每份血清的系列稀释物的血凝集抑制测定来确定血清滴度。在卵内疫苗接种以后的血清滴度与眼内疫苗接种一样好。

[0303] VIII. 实施例

[0304] 提供下述实施例来举例说明本公开内容的某些特征和/或实施方案。这些实施例不应解释为将本公开内容限于描述的特定特征或实施方案。本领域普通技术人员会明白在权利要求的范围所定义的本发明的精神内包括的其中的变化和其它用途。

[0305] 实施例1

[0306] 肽预测和合成

[0307] 本实施例描述了用于预测对ASFV免疫原性的假定肽和用于合成所述肽进行体外和体内效力研究的方法。

[0308] 关于Yorkshire、Landrace和Duroc猪繁殖系的已知SLA I类等位基因,针对CD8+表位筛选了ASFV China/2018/AnhuiXCGQ株的完整基因组(GenBank登记号MK128995.1)。根据四个标准评价了候选肽:(1)肽对SLA I类分子的预测结合亲和力;(2)在假定表位的高稠密簇中的位置,作为富集阳性应答者的方法;(3)SLA等位基因的覆盖和高流行等位基因的优化;和(4)源蛋白的性质(产生免疫原优先)。在212,394种假定肽中,选择2,272种用于进一步评价(图1)。

[0309] 首先,鉴定在Yorkshire、Landrace和Duroc繁殖系中发现的共49个SLA等位基因并使用MHC簇工具在功能上分簇进29个超型。在功能重叠的情况下,将来自给定超型的一个代表性等位基因选择用于用在肽结合预测中(代表性等位基因以粗体显示在表3中)。代表性等位基因的选择是基于通过簇映射分析产生的预测准确度值。使用整个ASFV China/2018/AnhuiXCGQ株蛋白质组(179种开放读码框产物)进行计算分析来鉴定预测会结合SLA I类分

子的肽。NetMHCpan-4.0算法通过积分计算机环境衍生的结合亲和力信息和从MS数据衍生出的洗脱配体来预测肽与MHC I类分子的相互作用(Jurtz, 等人. J. Immunol 199 (9) :3360-3368, 2017)。因而, NetMHCpan-4.0算法可以产生预测对ASFV具有免疫原性的肽。关于在表3中以粗体显示的29个代表性等位基因中的每一个, 使用该算法预测从ASFV China/2018/AnhuiXCGQ株 (GenBank登记号MK128995.1) 的179个开放读码框衍生出的8、9、10或11个氨基酸长的肽 (共212, 394种肽) 的结合亲合力。在212, 394种肽中, 31, 868种肽具有一种或多种超型的等位基因覆盖 (图1)。

[0310] 表3

[0311] 有关的SLA等位基因在功能上簇集在29个超型中, 以粗体显示代表性等位基因。

超型	等位基因	预测准确度
S1	SLA-3:0101	0.879
S1	SLA-1:1103	0.66
S2	SLA-3:0601	0.868
S2	SLA-3:0701	0.954
S2	SLA-3-0401	1
S2	SLA-3:0402	0.912
S2	SLA-3-0404	0.868
S3	SLA-2:060201	ND
S4	SLA-3:0306	0.587
S4	SLA-3:0502	0.739
S4	SLA-3:0503	0.739
S4	SLA-3:0506	0.739
S5	SLA-2:1603	ND
S6	SLA-1:0703	0.749
S6	SLA-1:0705	0.811
S7	SLA-1:0811	0.582
S8	SLA-2:1005	ND
S9	SLA-1:0806	0.663
S9	SLA-1:0807	0.683
S10	SLA-2:1002	0.656
S11	SLA-1:1401	0.572

[0312]

	S12	SLA-2:0903	ND
	S13	SLA-2:1001	0.589
	S13	SLA-2:1004	ND
	S14	SLA-1:0901	0.711
	S15	SLA-2:0202	0.647
	S16	SLA-1:0704	0.615
	S17	SLA-1:0805	0.584
	S17	SLA-2:1006	ND
	S17	SLA-1:0808	0.67
	S18	SLA-1:0701	0.653
	S18	SLA-1:0702	0.653
	S19	SLA-1:0401	1
	S19	SLA-1:1301	0.842
	S19	SLA-1:1701	0.824
[0313]	S20	SLA-1:0801	0.791
	S20	SLA-1:0812	0.791
	S21	SLA-2:0401	1
	S21	SLA-2:0402	0.903
	S22	SLA-1:1501	0.741
	S23	SLA-1:1201	0.727
	S23	SLA-2:0102	0.776
	S24	SLA-2:0101	0.683
	S25	SLA-2:0501	0.667
	S25	SLA-2:0503	0.574
	S26	SLA-2:0504	ND
	S27	SLA-1:0101	0.771
	S28	SLA-2:0502	0.688
	S29	SLA-2:0505	ND

[0314] SLA-1*0401、SLA-2*0402、SLA-3*0402、SLA-1*0702和SLA-2*0502等位基因在猪群体中是高流行的,包括在Duroc、Yorkshire和Landrace繁殖系内。关于这五个常见等位基因的覆盖试验了计算确定的31,867种肽,共2,559种肽提供了五个等位基因中的至少三个的覆盖。为了进一步减少用于评价的肽的数目,仅总体上覆盖至少15个等位基因的肽(在49个与Yorkshire、Landrace和Duroc繁殖系有关的SLA等位基因中)选自2,556的列表。该1,190肽列表表示为子集C(通过覆盖选择的肽)。

[0315] 将31,868种预测结合SLA I类分子的肽进一步用在使用HotSpots程序包(在

Israel Institute for Biological Research开发)进行的簇映射分析中。将簇定义为具有8个氨基酸的最小长度(最短预测肽长度)和25个氨基酸的最大长度的肽。簇含有两种或更多种肽,其中每种肽与另一种肽重叠或串联。映射分析产生了9,654个簇,它们含有31,815种独特肽(除去由簇区域之间的重叠引起的重复以后)。定义簇密度,并计算为每单位长度的表位的数目,且得到的密度是在0.11-1.56的范围内。选择位于高密度(1.21-1.56)簇中的肽用于进一步分析。524种选择的肽命名为子集H(选自HotSpots的肽)。

[0316] 某些ASFV蛋白是已知的免疫原和/或在猪中参与免疫调节和/或毒力。因此,关于等位基因覆盖,评估了从17种这样的ASFV蛋白衍生出的8-11个氨基酸长的肽(共2,666种肽)。将覆盖五个流行等位基因中的至少一个和与Yorkshire、Landrace和Duroc繁殖系有关的49个SLA等位基因中的至少六个的肽选择用于进一步表征。这750种肽表示为子集A(选自抗原的肽)。

[0317] 从上述三个子集(子集C、H和A)编辑用于实验评价的假定表位的最终列表。除去冗余(两个或更多个子集共有的肽,或在子集内的冗余)以后,最终的列表由2,272种独特肽组成(图1)。

[0318] 可以使用一种或多种合成化学方法合成肽,和/或可以使用一种或多种重组技术从细胞内合成得到肽。在该实施例中,使用固相合成方法预测对ASFV具有免疫原性的肽,其中第一个氨基酸的C-端偶联至活化的固体支持物,诸如聚丙烯酰胺。输入氨基酸的羧基偶联至增长中的氨基酸链的N-端(C-N合成)。逐步合成向每个肽链每次添加一个氨基酸。采用化学基团阻断在肽合成过程中的非特异性反应。使用碳二亚胺活化输入氨基酸上的C-端羧酸,并使用1-羟基苯并三唑(HOBt)减小在氨基酸偶联过程中外消旋化的风险。在给定肽的合成结束时,使用酸解除去保护基。使用反相色谱法纯化合成的肽,并确定>90%纯度。

[0319] 实施例2

[0320] 肽验证

[0321] 本实施例描述了用于筛选对ASFV具有免疫原性的假定肽的有效体外方法。使用生物信息学方法预测在该实施例中描述的肽,并然后使用如在实施例1中所述的化学合成方法生产。使用在该实施例中描述的体外选择方法,减少潜在表位的数目,以允许进一步评价仅最有前途的候选物的可工作数目。

[0322] 在ELISpot测定中针对外周血淋巴细胞筛选预测对ASFV具有免疫原性的合成肽,所述ELISpot测定允许在与肽的反应中检测(在单细胞水平)来自以前暴露的淋巴细胞(从暴露于ASFV的猪收集的淋巴细胞)的干扰素分泌。从以前已经用低剂量的减弱的ASFV China/2018/AnhuiXCGQ株攻击或已经暴露于活ASFV China/2018/AnhuiXCGQ的猪收集外周血淋巴细胞。在原代猪肺泡巨噬细胞中繁殖用于攻击猪的ASFV,并使用qPCR和红细胞吸附测定进行定量。

[0323] 在微量培养板中执行检测干扰素- γ (IFN- γ)的ELISpot测定。现成即可使用的猪IFN- γ ELISpot测定试剂盒可商购得自多个供应商。将对猪IFN- γ 特异性的抗体预包被在PVDF支持的微量培养板上。将用给定合成肽刺激的淋巴细胞(以前暴露于ASFV)移入微量培养板的孔中,并用每个细胞紧邻处的固定化抗体捕获由刺激过的细胞分泌的IFN- γ 。将细胞通过洗涤从孔除去,并将IFN- γ 结合的固定化抗体与生物素化的检测抗体一起温育,随后与缀合至抗生蛋白链菌素的碱性磷酸酶一起温育。深蓝黑色沉淀物形成在孔内固定化

的抗体已经结合被刺激过的细胞分泌的IFN- γ 的每个位置。使用为此目的设计的自动化平板计数器计数得到的斑点。

[0324] 关于预测对ASFV具有免疫原性的每种肽的ELISpot测定结果的分析鉴定出显著更小数目的候选肽,其各自产生超过由该研究设定的特定阈值的强免疫应答。认为这些候选物是用于进一步开发组合物以在猪中刺激针对ASFV的免疫应答或针对ASFV来免疫猪的最有前途的肽。

[0325] 在该研究进行了两种分析:评估了所有2,272种生物信息学上鉴定的候选肽的“完全筛选”,和使用每个库含有八或九种肽的肽库进行的“库筛选”。使用从两只猪收集的淋巴细胞进行完全筛选,所述猪表示为9H(动物9来自农场H)和14S(动物14来自农场S)。如下使用阴性对照(NC)背景计算允许阈值和严格阈值:

[0326] $\text{允许阈值(PT)} = \text{培养基的平均值} + 2 * \text{STDEV_P}$

[0327] $\text{严格阈值(ST)} = \text{培养基的平均值} + 5 * \text{STDEV_P}$

[0328] 其中“培养基的平均值”表示仅含有培养基的孔中的平均斑点数目,分别为每个猪平板计算,和“STDEV_P”表示基于整个群体的标准差。为每只猪计算的阈值显示在表4中。认为“阳性”肽(即,具有超过阈值的斑点数目的肽)是用于进一步开发和实验分析的最有前途的肽。

[0329] 表4

[0330] 每只猪的允许阈值和严格阈值(斑点数目)。

[0331]

猪	允许阈值	严格阈值
10S	10	18
14S	12	20
2S	17	28
3H	15	23
5H	13	18
6H	12	20
7H	14	20
7S	2	3
8H	13	19

[0332] 表5显示了使用从动物14S和9H收集的淋巴细胞在所有2,272种生物信息学上鉴定的肽的完全筛选中鉴定的阳性肽的数目。在完全筛选中鉴定的阳性肽以及ELISpot测定结果(为每种肽计数的斑点的数目)显示在附件II(动物14S)和III(动物9H)中。在动物14S和动物9H共有的允许阈值以上鉴定出十三种阳性肽,而46种是猪9H独有的,且198种是猪14S独有的。没有超过严格阈值的阳性肽被鉴定为共有;14种是猪14S独有的,且七种是猪9H独有的。

[0333] 表5

[0334] 在完全筛选中鉴定的阳性肽的数目

[0335]	阈值	阳性肽的数目	
		猪 14S (PT=12,	猪 9H (PT=16,
[0336]		ST=20)	ST=26)
	允许(PT)	211	59
	严格(ST)	14	7

[0337] 用选自2,272种肽中的8-9种肽的库进行第一库筛选,并使用来自9只猪(表示为3H、5H、6H、7H、8H、2S、7S、10S、14S)的淋巴细胞。该第一库筛选鉴别出共238个超过允许阈值的“阳性”肽库(即,具有超过阈值的斑点数目的肽库)和128个超过严格阈值的“阳性”肽库。表6显示了在每只猪中鉴定的阳性肽库(各自含有八或九种肽)的数目(为表4中的每只猪显示了阈值)。

[0338] 表6

[0339] 在每只猪中鉴定的超过每个阈值的阳性肽库的数目。

猪	允许阈值	严格阈值
10S	26	11
14S	117	9
2S	37	6
3H	3	1
5H	77	20
6H	26	10
7H	84	12
7S	125	92
8H	70	14

[0341] 表7显示了在一只或多只动物中鉴定为阳性的库的数目。

[0342] 表7

[0343] 在一只或多只动物中鉴定为阳性的超过每个阈值的库的数目。

[0344]	猪的数目	允许阈值	严格阈值
--------	------	------	------

[0345]	8	1	-
	7	2	1
	6	-	-
	5	12	1
	4	20	1
	3	63	6
	2	74	22
	1	66	97

[0346] 将238个阳性库中超过允许阈值的三十三个选择用于进一步分析。在这33个库中，选择22个，因为它们八只选择的猪(3S、5S、14S、6H、7H、2S、7S和10S)中的至少五只中表现出交叉反应性，选择八个库，因为它们共15只筛选的猪中的七只中表现出交叉反应性，并选择三个库，因为它们各自含有至少三种单独的被证实完全筛选中与猪14S反应的肽。使用concanavilin A (ConA) 作为阳性对照，通过ELISpot筛选单个地评估了来自33个阳性库的共276种肽(图2和3)。在这276种肽中，鉴定出201种超过允许阈值(附件IV)，且在201种肽中，鉴定出125种超过严格阈值(图3, 附件VIII)。进一步，在严格阈值以上鉴定出的77种肽在ELISpot测定中产生了大于或等于20个斑点(图1, 附件V)。在这77种肽中，在ELISpot测定中产生最多斑点的18种肽被命名为“顶”肽(图1, 附件VI)。

[0347] 实施例3

[0348] 免疫原性构建体组装和表达

[0349] 本实施例描述了氨基酸构建体的组装和表达，所述氨基酸构建体包含SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽、在下面该实施例中定义的一种或多种“结构域”、和/或编码一种或多种ASFV免疫原性蛋白的一种或多种全长或部分长氨基酸序列。

[0350] 如在实施例2中所述，在ELISpot测定中在严格阈值以上鉴定的77种肽产生了大于或等于20个斑点/孔(图1, 附件V)。将这77种肽映射至它们在ASFV蛋白内的位置(附件V-VI)。77种肽中的四十四种簇集(附件VII)在七种具有以下GenBank Accession No.的ASFV蛋白中: AYW34011.1 (A238L, 含有I κ B-样锚蛋白重复; 图4; SEQ ID NO.2366-2367), AYW34004.1 (A224L, IAP-样蛋白p27; 图5; SEQ ID NO:2368-2369), AYW34001.1 (MGF_505-7R; 图6; SEQ ID NO.2370-2371), AYW34010.1 (MGF_360-15R; 图7; SEQ ID NO.2372-2373), AYW34052.1 (锌指蛋白B385R; 图8; SEQ ID NO.2374-2375), AYW34002.1 (MGF_505-9R; 图9; SEQ ID NO.2376-2377), 和AYW33963.1 (MGF_110-3L; 图10; SEQ ID NO.2378-2379)。在该实施例中的“结构域”是在七种ASFV蛋白内的肽簇集区域(也被称作“热点”)。

[0351] 将选自附件VII的一种或多种肽、一种或多种ASFV结构域(如在SEQ ID NO.2331-2335中所示的“热点”)、和/或一种或多种全长度和/或部分长度ASFV免疫原性蛋白(如在SEQ ID No.2323-2329中所示和/或SEQ ID NO.2339-2345的核酸)的各种组合组装进SEQ ID NO.2310-2330的表达构建体中。每种构建体包括在C-端的组氨酸标签(His-标签)以通过蛋白质印迹分析来检测表达, 和用于裂解物中的表达检测的N-端接头序列(GSSG)和HiBiT序列(GSGWRLFKLS)。某些包含肽的构建体也包括在各个肽序列之间的间隔物序列

(GPGPG或AAY)。包含选自44种肽(发现簇集在七种ASFV蛋白内(附件VII))的肽序列的构建体也包括在N-端的HLT、Sumo或麦芽糖结合蛋白(MBP)序列以支持表达。示例性的Sumo和MBP序列分别提供在SEQ ID NO.2336(对应于和2337(对应于NP_418458.1,其通过引用并入本文)。对于具有MBP融合蛋白的构建体,使用来自pMAL-c2载体的MBP序列将MBP合成地克隆进双螺旋载体中。对于具有Sumo融合蛋白的构建体,使用来自Champion pET SUMO载体(Thermofisher)的Sumo序列将Sumo合成地克隆进双螺旋载体中。HLT蛋白是来自嗜热脂肪芽孢杆菌E2p的硫辛酰基(lipoyl)结构域(SEQ ID NO.2338),以及N-端His-标签和经优化的烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶切割位点。关于来自嗜热脂肪芽孢杆菌E2p(B.Stearothermophilus)的硫辛酰基(lipoyl)结构域(SEQ ID NO.2338)的额外信息,可以参见Packman等人,Amino acid sequence analysis of the lipoyl and peripheral subunit-binding domains in the lipoate acetyltransferase component of the pyruvate dehydrogenase complex from Bacillus stearothermophilus,Biochem.J., 1988,252:79-86,其通过引用整体并入本文。关于HLT融合蛋白和可以增强包括天然混乱区域的蛋白的可溶性的类似融合蛋白的额外信息,可以参见Lebediker和Danieli, Production of prone-to-aggregate proteins,FEBS Letters,2014,588(2):236-246,其通过引用整体并入本文。在双螺旋克隆载体中购买构建体55和56用于用在假性狂犬病病毒载体中。

[0352] 在22°C和37°C在大肠杆菌中表达每种构建体。独立地对于每种构建体,使用热激方法转化聚乙二醇(PEG)感受态大肠杆菌细胞。简而言之,将100μL感受态细胞转移至在冰上的试管。将包含给定构建体的质粒加入试管,并将混合物在4°C在冰上温育,随后在42°C保持45秒和在冰上保持2分钟。将室温SOC培养基(0.9mL)加入试管,然后将其在37°C在振荡器中温育一小时至90分钟。然后将转化的细胞铺板(每板100μL)。平板可以含有适当的选择抗生素,其取决于使用的载体。

[0353] 尽管在22°C的细胞生长会促进可溶性表达使得表达产物可以从培养物上清液收集,但是在37°C的生长会促进包涵体形式的构建体表达,其可以收集为细胞沉淀物的组分。通过从培养物上清液和从沉淀的细胞分离蛋白,评估了每种构建体的表达水平。简而言之,使用下述方案从细胞分离在包涵体中的蛋白:将细胞沉淀物首先用Triton X-100洗涤,其次用Triton X-114洗涤,第三用1%CHAPS试剂洗涤,和第四用6摩尔尿素洗涤。然后将沉淀物冷冻和在-80°C保存备用。

[0354] 使用考马斯蓝染色和免疫印迹法评估从培养物上清液和细胞沉淀物收集的蛋白。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将凝胶用考马斯蓝染色和拍摄图像以后,将蛋白转移到PVDF膜上并使用抗-His抗体通过蛋白质印迹法检测。图11-34显示了在22°C(图11-21)或37°C(图22-34)在大肠杆菌中表达的54种构建体中的每一种的凝胶染色和蛋白质印迹结果,以及每种构建体的预期分子量和一种或多种特异性标签。标记为1-54的构建体的序列提供在SEQ ID NO.2310-2330中。而构建体1-54各自包括用于检测目的的N-端His-标签,某些构建体也包括直接连接至构建体序列的N-端的至少一种融合蛋白,诸如HLT、Sumo或MBP。对于包括融合蛋白的构建体,将His-标签连接至融合蛋白的N-端。在该实施例中试验的构建体包括下述融合蛋白:构建体1:HLT;2:Sumo;3:HLT;4:Sumo;5:HLT;6:Sumo;7:HLT;8:Sumo;9:HLT;10:Sumo;11:无融合蛋白;12:HLT;13:Sumo;14:MBP;15:无融合蛋白;16:HLT;

17:Sumo;18:MBP;19:无融合蛋白;20:HLT;21:Sumo;22:MBP;23:无融合蛋白;24:HLT;25:Sumo;26:MBP;27:无融合蛋白;28:HLT;29:Sumo;30:MBP;31:无融合蛋白;32:HLT;33:Sumo;34:MBP;35:无融合蛋白;36:HLT;37:Sumo;38:无融合蛋白;39:HLT;40:Sumo;41-47:HLT;48-54:Sumo。

[0355] 在显示考马斯蓝染色的凝胶和/或蛋白质印迹的图11-34中的每个图中,“M”显示了指示带分子量的标志物泳道,“S”代表从细胞培养物上清液收集的蛋白,和“P”代表从细胞沉淀物收集的蛋白。

[0356] 表8提供了评估的54种构建体中的每一种的表达发现的总结。表8的第2列描述了在哪里(在细胞沉淀物中或在培养物上清液/可溶性级分中)检测到给定的表达的构建体。蛋白质印迹法主要在细胞沉淀物中检测到来自大肠杆菌中的构建体表达的蛋白产物。在培养物上清液中检测到构建体41-47的蛋白,尽管以比相同构建体在细胞沉淀物中更低的水平。构建体1、3、6、9、10、11、13、16、24、27、28和31表现出强表达并被选择用于进一步优化。关于在大肠杆菌中的表达再次评估这些构建体,这次在两类培养基中,自诱导培养基(AI)和Terrific液体培养基(TB)。表8中的“用于优化的构建体”列提供了每种评估的构建体的表达的定性评估(强表达或弱表达),以及用于在大肠杆菌中表达该构建体的最佳培养基(AI和/或TB)。进一步选择构建体用于体内验证研究,其基于培养基优化研究中的强表达。因为某些构建体仅差别在于它们的融合蛋白(MBP、Sump或HLT),对于否则具有序列同一性的构建体的给定组,为每种构建体选择仅一种融合蛋白用于验证研究。

[0357] 表8

[0358] 构建体表达结果(IB:包涵体;AI:自诱导培养基;TB:Terrific液体培养基)

[0359]

构建体 编号	表达(构建体 1-40 在 37°C, 且构建 体 41-54 在 22°C 或 以下)	用于优化的构建 体	用于纯化的 构建体
1	沉淀物	强表达 IB (AI)	经验证
2	沉淀物		
3	沉淀物	强表达 IB (AI)	经验证
4	沉淀物		
5	沉淀物		
6	沉淀物	强表达 IB (AI)	经验证
7	沉淀物		
8	沉淀物		
9	沉淀物	强表达 IB (AI)	经验证

[0360]

10	沉淀物	强表达 IB (AI)	?
11	沉淀物	弱表达 IB	
12	沉淀物		
13	沉淀物	强表达 IB (AI)	经验证
14	沉淀物		
15	沉淀物		
16	沉淀物	强表达 IB (AI/TB)	经验证
17	沉淀物		
18	沉淀物		
19	无表达		
20	无表达		
21	无表达		
22	无表达		
23	无表达		
24	沉淀物	弱表达 IB	
25	沉淀物		
26	沉淀物		
27	沉淀物	强表达 IB (AI)	经验证
28	沉淀物	强表达 IB (AI)	?
29	沉淀物		
30	无表达		
31	沉淀物	弱表达 IB	
32	无表达		
33	无表达		
34	无表达		
35	无表达		
36	无表达		
37	无表达		
38	无表达		
39	无表达		
40	未试验?		

[0361]	41	沉淀物(可以是可溶性的)		
	42	沉淀物(可以是可溶性的)		
	43	沉淀物(可以是可溶性的)		
	44	沉淀物(可以是可溶性的)		
	45	沉淀物(可以是可溶性的)		
	46	沉淀物(可以是可溶性的)		
	47	沉淀物(可以是可溶性的)		
	48	沉淀物		
	49	沉淀物		
	50	沉淀物		
	51	沉淀物		
	52	沉淀物		
	53	沉淀物		
	54	沉淀物		

[0362] 实施例4

[0363] 组合物施用和体内分析

[0364] 本实施例描述了体内验证研究,其目的在于评估包含病毒载体的一种或多种组合物在在猪中诱导针对ASFV的免疫应答和针对ASFV来免疫(接种)猪的能力,所述病毒载体表达SEQ ID NO.2-2273的一种或多种肽和/或SEQ ID NO.2310-2330的一种或多种构建体。

[0365] 在该实施例中由选择的载体(伪狂犬病病毒载体)表达的肽选自:(1) SEQ ID NO.2-2273,基于所述肽产生超过指定阈值的免疫应答的能力,如在实施例2中所述使用ELISpot测定在猪外周血淋巴细胞中测量,和/或(2) SEQ ID NO.2310-2330,基于表达水平,如在实施例3中所述。

[0366] 基于ELISpot测定结果选择十种最有前途的候选肽。生产各自表达每种肽的伪狂犬病病毒载体,还生产包含这些载体的疫苗组合物。在猪中的初步试验中,十种组合物中的一些诱导了适当的体液免疫应答,如通过液相阻断ELISA所测量的。然后生产新的伪狂犬病病毒载体,其表达诱导适当体液免疫应答的组合物的每种肽。生产两种包含新载体的组合物:一种加佐剂和一种不加佐剂,但是在其它方面包含相同组分。

[0367] 类似地,基于表达分析选择了SEQ ID NO.2310-2330的五种最有前途的候选构建

体,以及构建体55和56。生产单独表达每种构建体的伪狂犬病病毒载体,并生产包含新载体的组合物:一种加佐剂和一种不加佐剂,但是在其它方面包含相同组分。

[0368] 评价了组合物在猪中刺激免疫应答和提供针对ASFV攻击的保护的能力。对于生产的每种病毒载体,肌肉内地或鼻内地接种两组猪。第一组接受包含病毒载体的无佐剂组合物,且第二组接受包含病毒载体的含佐剂组合物。在初次施用后的某种间隔,诸如(最初)疫苗接种后28天(dpv),给来自每组的接种过的猪的一个子集施用第二剂相同组合物。在初次施用后的不同间隔,诸如180dpv,给接种过的猪的第二个子集施用第二剂。在28dpv给接种过的猪的第三个子集施用第二剂,并在180dpv施用第三剂。为了评估治疗过的猪的免疫应答,在疫苗接种前(第0天)、以及第一次施用后4、7、14、28、56、180、208、270和298天从猪收集血清样品。另外,为了研究母体衍生的抗体(MDA)滴度,从接种过的母猪生产的21和42天龄小猪收集血清样品。

[0369] 使用在原代猪肺泡巨噬细胞中繁殖的ASFV China/2018/AnhuiXCGQ株,在第一次疫苗施用以后50天攻击来自每组的接种过的猪的子集,并使用qPCR和红细胞吸附测定进行量化。按与未攻击的(仅接种的)猪相同的计划,从受攻击的猪收集血清样品。

[0370] 为了检测肽特异性抗体,使用液相阻断ELISA分析来自该研究中的所有动物的血清样品。从4dpv开始,IFN- γ 在血清中是可检测的。在第0、28和180天接种的猪在298dpv表现出最高的肽特异性抗体滴度,而在仅施用一次疫苗(在第0天)的猪中,抗体在第270天之前是不可检测的。与施用未加佐剂的疫苗的猪相比,施用含佐剂疫苗的猪具有更高的肽特异性抗体滴度。而从免疫过的母猪出生的小猪在第21天表现出高被动抗体滴度,滴度在第42天之前已经下降,从而提示,从免疫过的母猪出生的小猪应当在约两个月龄之前接受增强剂量。在受攻击的动物中,ASFV基因组和传染性病毒在攻击后第5和10天是可检测的。对照(未接种的)猪发生急性ASF的迹象,而接种过的动物未出现症状或仅出现轻度症状。ASFV基因组在接种过的猪中攻击后60天是可检测的,尽管水平在第60天之前已经显著下降。在攻击后第35天之前,传染性病毒在受攻击的猪中是不可检测的。所有接种过的动物较好地耐受组合物,且没有观察到可归因于组合物的不利副作用。该研究的结果支持表达一种或多种ASFV-特异性肽的病毒载体在开发疫苗以保护猪免于ASFV感染中的应用。

[0371] 实施例5

[0372] 组合物施用和体内分析

[0373] 本实施例描述了体内验证研究,其用于评估包含病毒载体的一种或多种组合物在猪中诱导针对ASFV的免疫应答和针对ASFV来免疫猪的能力,所述病毒载体表达一种或多种附件V的肽和/或一种或多种附件VI的肽。

[0374] 化学合成肽用于用在该试验中。该试验的主要目的是在使用包含合成肽和不同佐剂的组合物进行激发-强化疫苗接种后评价细胞免疫应答。进一步,评价了动物CD8应答,并对比了使用几种经批准的佐剂的动物免疫应答。

[0375] 1. 研究设计

[0376] 1. 将三只怀孕的雌性猪在单独的笼中定位在动物设备中。大约30只新出生的小猪在设备内出生。

[0377] 2. 出生后三天,在每只小猪的右腿给小猪施用铁注射剂(例如,Ferinject 200, Eurovet Animal Health)。

[0378] 3. 出生后两周,将小猪称重,并选择最高重量的小猪用于实验。将小猪分成5组,每组3只小猪,每组具有来自每位母亲的1只小猪以增加品种差异性。

[0379] 4. 出生后三周,从三只小猪收集血液,所述小猪没有被包括在用于ELISpot优化的试验中。

[0380] 5. 给十二(12)只标记了耳朵的4周龄猪接种下述疫苗。

[0381] 组1:给三(3)只猪各自接种以下组合物:在左腿中肌肉内地接种包含在Emulsigen P中的77种附件V的肽的组合物,和鼻内地接种包含在Carbigen+c-二-GMP中的77种附件V的肽的组合物。

[0382] 组2:给三(3)只猪各自接种以下组合物:在左腿中肌肉内地接种包含在Emulsigen P中的18种附件VI的肽的组合物,和鼻内地接种包含在Carbigen+c-二-GMP中的18种附件VI的肽的组合物。

[0383] 组3:给三(3)只猪各自接种以下组合物:在左腿中肌肉内地接种包含在ISA 201+Quil-A+R848+TDB中的77种附件V的肽的组合物,和鼻内地接种包含在Carbigen+c-二-GMP+聚(I:C)中的77种附件V的肽的组合物。

[0384] 组4:给三(3)只猪各自接种以下组合物:在左腿中肌肉内地接种包含在ISA 201+Quil-A+R848+TDB中的18种附件VI的肽的组合物,和鼻内地接种包含在Carbigen+c-二-GMP+聚(I:C)中的18种附件VI的肽的组合物。

[0385] 组5(对照猪):两(2)只猪用作未接种的对照。

[0386] 表9

[0387] 试验组

[0388]

组	配方	途径	肽混合物	猪的数目
1	Emulsigen P	肌肉内	77种肽	3
	Carbigen + c-di-GMP + poly (I:C)	鼻内		
2	Emulsigen P	肌肉内	18种肽	3
	Carbigen + c-di-GMP + poly (I:C)	鼻内		
3	ISA 201 + Quil-A + R848 + TDB	肌肉内	77种肽	3
	Carbigen + c-di-GMP + poly (I:C)	鼻内		
4	ISA 201 + Quil-A + R848 + TDB	肌肉内	18种肽	3
	Carbigen + c-di-GMP + poly (I:C)	鼻内		

[0389]	5	未注射组	不适用	不适用	2
--------	---	------	-----	-----	---

[0390] 6. 在第一次疫苗接种以后3周进行第二次疫苗接种(强化)(每只猪相同剂量)。在第一次疫苗接种后34、35、55、56、62和63天,在试验过程中收集全血样品。在第62和63天的收集是任选的,并根据需要进行。

[0391] 7. 以每个试管8mL全血,将所有抽血放入CPT试管。组1和组3各三个CPT试管。组2、4和5各两个CPT试管。

[0392] 表10

[0393] 试验时间线

年龄(周)	3W	4W	7W	9W		12W		13W (任选的)	
试验(天)	-1	1	21	34	35	55	56	62	63
活性 1		V	V						
活性 2	*B 3 只 猪			B 组 1+3	B 组 2+4+5	B 组 1+3	B 组 2+4+5	B 组 1+3	B 组 2+4+5
活性 3							E		E

[0395] 活性1:V=疫苗接种

[0396] 活性2:B=抽血

[0397] 活性3:E=安乐死

[0398] *全血取自3只猪,所述猪未被包括在试验组中。

[0399] 表11

[0400] 试验事件

试验天	动作
-1	从3只未被包括在试验组中的小猪抽血用于 ELISpot 优化
0	第1次疫苗接种(激发)
21	第2次疫苗接种(强化)
34、35、55、56和62(任选的)、63(任选的)	抽血 PBMC 分离
63	结束(猪安乐死)

[0403] 2. 研究动物-动物选择和鉴定

[0404] 将三只怀孕的雌性猪在单独的笼中定位在动物设备中。大约30只新生的小猪在设备内出生。

[0405] 出生后三天,给每只小猪在右腿中施用铁注射剂。如在表9中所示接种十四(14)只

标记了耳朵的3周龄猪。

[0406] 3.材料

[0407] 3.1佐剂:

[0408] MONTANIDE ISA 201VG:是基于矿物油的佐剂,其已经被开发用于配制水包油包水(W/O/W)乳剂。它是基于特定的富集的轻矿物油和高度精炼的乳化剂,后者得自甘露醇和来自植物起源的经纯化油酸。MONTANIDE ISA 201VG不含动物起源成分。含有MONTANIDE ISA 201VG的疫苗制剂会诱导短期和长期免疫。与传统的双乳剂相比,MONTANIDE ISA 201VG乳剂是稳定的,具有低粘度,且容易注射。

[0409] 疫苗制备:

[0410] 用一步法制备100g疫苗:

[0411] 1.MONTANIDE ISA 201VG 50g

[0412] 2.水性抗原介质50g

[0413] 为了按体积制备,MONTANIDE ISA 201VG密度在20℃为约0.83。

[0414] 将每个相加热至31℃,然后混合。通过在低剪切搅拌(维持温度高于30℃)下将水性介质混合进MONTANIDE ISA 201VG中,得到稳定的制品。配制以后,将乳剂冷却。

[0415] CARBIGEN™和POLYGEN™(Carbigen)是MVP的聚合物型佐剂。因为它的粘膜粘着性能,CARBIGEN特别适用于将灭活的抗原呈递给粘膜(例如,鼻内)。包含灭活的抗原和CARBIGEN的鼻内疫苗已经成功地用在马、猪和小动物中。还已经证实在辅助PCV2抗原中的特殊表现。

[0416] 使用说明:

[0417] 1.对于酸稳定的抗原,将1-10%(v/v)的CARBIGEN加入抗原,混合均匀1-8小时,并小心地用10N NaOH将pH升高至大约7.0。*混合另外12-24小时。如果必要的话,将pH重新调至6.8和7.2之间。

[0418] 2.对于酸不稳定的抗原,将10%(v/v)的CARBIGEN加入配备混合器的容器。使用10N NaOH将CARBIGEN的pH调至抗原在不受损伤的情况下可耐受的最低pH。*抗原可耐受的pH越低,佐剂特征越好。当将佐剂调至适当pH时,加入约10%的总抗原体积并混合至少30分钟。pH可能下降。重新调节pH并加入剩余的抗原。调节最终的pH至6.8和7.2之间。混合至少另外12小时(过夜)并如果必要的话重新调节pH。在填充之前重新检查pH。也可以将少量的NaCl或PBS加入抗原或CARBIGEN以降低粘度。

[0419] *警告:不要使pH高于7.5。加入HCl或其它酸使pH下降,如果加入过多的NaOH,可能降低佐剂的有效性。

[0420] **EMULSIGEN®**, MVP产品,被用在含有水包油佐剂的第一个疫苗中,该疫苗被USDA批准用于猪的肌肉内和皮下注射。自从在1982年批准以来,它在全球已经用在45个国家,并具有经证实的在所有动物物种中一致地安全且有效的跟踪记录。

[0421] 使用说明:

[0422] 1.对于大多数抗原,我们推荐以10%到20%(v/v)使用EMULSIGEN-P。

[0423] 2.应当将EMULSIGEN-P轻轻混合2小时,然后加入抗原中。在向抗原加入过程中,推荐使用标准设备(例如Lightning混合器或磁力搅拌器)的轻轻混合持续2-24小时。

[0424] 3.在填充过程中继续轻轻混合产品以确保一致性。

[0425] 4.可以在多种动物中肌内地或皮下地施用含有EMULSIGEN-P的产品。

[0426] 5.最终疫苗通常在贮存过程中在顶部形成乳状层。这不会不利地影响抗原性或免疫原性。在注射之前管形瓶的简单倒置足以重新混合所有组分。

[0427] Quil-A[®]佐剂是由Brenntag Biosector(全球疫苗佐剂市场的领导者)按照GMP生产的皂苷佐剂,并由他们通过确保一致性和免疫刺激潜力的专有方法纯化。Quil-A佐剂被用在多种兽用疫苗中,以及用于人和兽应用的免疫学研究中。Quil-A佐剂含有来自南美洲树皂树(Quillaja saponaria Molina)的皂苷的水可提取级分。

[0428] 储备溶液的制备(10mg/ml)

[0429] 1.称量100mg Quil-A佐剂。放入干净容器中。

[0430] 2.将10ml蒸馏水加入100mg Quil-A佐剂。

[0431] 3.使用磁力搅拌器混合,直到所有材料已经溶解。

[0432] 4.溶解低压冻干的粉末以后,立即在B级环境中在层流(A级)下使它穿过0.22-微米无菌过滤器进入无菌容器中。

[0433] 5.无菌过滤以后,应当将Quil-A佐剂溶液冷冻储存备用。制备等分试样以避免重复的冻融循环。

[0434] 6.由于碱性水解的风险,不得将Quil-A佐剂暴露于高于8.5的pH。

[0435] TDB:海藻糖-6,6-二山萆酸酯(TDB)是分枝杆菌细胞壁组分海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM,也被称作索状因子)的无毒合成类似物。

[0436] 储备混悬液的制备(1mg/mL)

[0437] 1.将100 μ L DMSO加入1mg TBD VacciGrade,在60 $^{\circ}$ C加热(约15-30秒)和涡旋。

[0438] 2.一旦重新悬浮,立即加入900 μ L无菌生理水(提供)或磷酸盐缓冲盐水(不含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS),在60 $^{\circ}$ C加热10-15分钟并通过涡旋30秒来均质化。

[0439] 3.在4 $^{\circ}$ C储存或使用缓冲溶液制备稀释物用于立即使用。重新悬浮的产品可以在4 $^{\circ}$ C储存6个月。在每次使用前,使混悬液达到室温并通过涡旋30秒来均质化。

[0440] R848(瑞喹莫德):一种小分子量咪唑并喹啉化合物,是具有有效抗病毒和抗肿瘤活性的免疫应答调节剂。R848在FDA批准的临床疫苗试验中被评价为佐剂。

[0441] 无菌储备溶液的制备(1mg/mL)

[0442] 1.将5mL不含内毒素的生理水加入5mg R848 VacciGrade管形瓶以得到1mg/mL的溶液。

[0443] 2.通过上下抽吸混合溶液。

[0444] c-二-GMP:环状二鸟苷酸酯单磷酸酯(c-二-GMP)是由细菌产生的细胞内信号传递分子。c-二-GMP的施用可以诱导体外和体内强免疫应答。

[0445] 无菌储备溶液的制备(1mg/mL)

[0446] 1.将1mL不含内毒素的生理水加入1mg c-二-GMP VacciGrade管形瓶以得到1mg/mL的溶液。

[0447] 2.通过上下抽吸混合溶液。

[0448] 聚(I:C)HMW:聚肌苷酸-聚胞苷酸是双链RNA(dsRNA)的合成类似物,一种与病毒感染有关的分子结构。已知天然的和合成的dsRNA会诱导I型干扰素(INF)和其它细胞因子产生。聚(I:C)被TLR3识别。

[0449] 无菌储备溶液的制备 (1mg/mL)

[0450] 1. 将10mL不含内毒素的生理水加入10mg聚 (I:C) 管形瓶以得到1mg/mL的溶液。

[0451] 2. 通过上下抽吸混合溶液。

[0452] 3. 将混合物在65-70°C加热10分钟。允许溶液在室温冷却1小时以确保适当退火。

[0453] 3.2肽:

[0454] 通过ELISpot筛选鉴别的77种ASFV阳性肽由JPT (柏林) 化学合成到至少70%纯度。在这77种阳性肽 (其中每种在ELISpot测定中产生大于或等于20个斑点) 中, 18种肽关于它们的ELISpot评分被定义为“顶”阳性 (图1-3)。在该试验中, 试验了两种肽混合物: 第一种混合物含有所有77种肽; 第二种混合物仅含有18种“顶”肽。

[0455] 以5mg/mL的浓度生产每种肽的储备溶液。将每种肽溶解在1mL注射用水中, 但是肽554除外, 将它溶解在100µL DMSO+900µL注射用水中。制备了两个储备板, 并在-70°C冷冻直到疫苗制备。在无菌条件下进行工作。

[0456] 4. 疫苗制备:

[0457] 在研究过程中, 根据每组的疫苗接种指令, 每组执行疫苗接种两次 (关于疫苗接种时间点, 参见表10和11)。另外, 按照每个疫苗接种事件描述了疫苗制备指令。

[0458] 组1-在Emulsigen P疫苗中的77种肽

[0459] 肌肉内疫苗: 将125µg每种肽与Emulsigen P佐剂混合以达到5mL的总体积 (5个剂量)。最终剂量含有在1mL注射体积中的25µg每种肽。将1mL疫苗注射进每只猪的左腿。

[0460] 表12

[0461] 组1-疫苗制备 (肌肉内剂量)

肌肉内疫苗	物质	每剂浓度	储备溶液	体积(mL)
1	77x 肽	25µg (各)	5 mg/mL	25µL (各) 1.925 mL (总)
2	Emulsigen P	12%(v/v)	准备好使用	0.6
3	不含 Ca 和 Mg 的 PBS	NA	准备好使用 (x1)	2.475
最终体积 (mL)				5

[0462] 组2-在Emulsigen P疫苗中的18种肽

[0464] 肌肉内疫苗: 将125µg每种肽与Emulsigen P佐剂混合以达到5mL的总体积 (5个剂量)。最终剂量含有在1mL注射体积中的25µg每种肽。将1mL疫苗注射进每只猪的左腿。

[0465] 表13

[0466] 组2-疫苗制备 (肌肉内剂量)

肌肉内疫苗	物质	每剂浓度	储备溶液	体积(mL)
[0467] 1	18x 肽	25 μ g	5 mg/mL	25 μ L (各) 0.45 mL (总)
2	Emulsigen P	12%(v/v)	准备好使用	0.6
3	不含 Ca 和 Mg 的 PBS	NA	准备好使用 (x1)	3.95
最终体积 (mL)				5

[0468] 组3-在ISA 201+Quil-A+R848+TDB疫苗中的77种肽

[0469] 肌肉内疫苗:将125 μ g每种肽与ISA 201 (50%、w/w)、150 μ g Quil-A、50 μ g R848和50 μ g TDB混合达到5mL的总体积 (5个剂量)。最终剂量含有在1mL注射体积中的25 μ g每种肽。将1mL疫苗注射进每只猪的左腿。

[0470] 表14-组3疫苗制备 (肌肉内剂量)

肌肉内疫苗	物质	每剂浓度	储备溶液	体积(mL)
[0471] 1	77x 肽	25 μ g	5 mg/mL	25 μ L (各) 1.925 mL (总)
2	ISA 201	50/50 (w/w)	准备好使用	2.5
3	Quil-A	150 μ g	10 mg/mL	0.075
4	R848	50 μ g	1 mg/mL	0.25
5	TDB	50 μ g	1 mg/mL	0.25
最终体积(mL)				5

[0472] 组4-在ISA 201+Quil-A+R848+TDB疫苗中的18种肽

[0473] 肌肉内疫苗:将125 μ g每种肽与ISA 201 (50%、w/w)、150 μ g Quil-A、50 μ g R848和50 μ g TDB混合达到5mL的总体积 (5个剂量)。最终剂量含有在1mL注射体积中的25 μ g每种肽。将1mL疫苗注射进每只猪的左腿。

[0474] 表15-组4疫苗制备 (肌肉内剂量)

肌肉内疫苗	物质	每剂浓度	储备溶液	体积(mL)
1	18x 肽	25 μ g	5 mg/mL	25 μ L (各) 0.45 mL (总)
2	ISA 201	50/50 (w/w)	准备好使用	2.5
3	Ouil-A	150 μ g	10 mg/mL	0.075
4	R848	50 μ g	1 mg/mL	0.25
5	TDB	50 μ g	1 mg/mL	0.25
6	不含 Ca 和 Mg 的 PBS	NA	准备好使用 (x1)	1.475
最终体积 (mL)				5

[0475]

[0476] 组1和3-在Carbigen+C-二-GMP疫苗中的77种肽

[0477] 鼻内疫苗:将120 μ g每种肽与10% (v/v) Carbigen、50 μ g c-二-GMP和50 μ g聚(I:C)混合达到8mL的总体积(8个剂量)。最终剂量含有在1mL注射体积中的15 μ g每种肽。使用MAD鼻药物递送装置(Teleflex)将0.5mL疫苗施用进每只猪的鼻孔(每只猪共1.0mL)。

[0478] 表16-组1和3疫苗制备(鼻内剂量)

鼻内(IN)疫苗	物质	每剂浓度	储备溶液	体积(mL)
1	77x 肽	15 μ g	5 mg/mL	24 μ L (各) 1.848 mL (总)
2	Carbigen	10%(v/v)	准备好使用	0.8
3	c-二-GMP	50 μ g	1 mg/mL	0.4
4	聚(I:C)	50 μ g	1 mg/mL	0.4
5	不含 Ca 和 Mg 的 PBS	NA	准备好使用 (x1)	4.552
最终体积 (mL)				8

[0479]

[0480]

[0481] 组2和4-在Carbigen+c-二-GMP疫苗中的18种肽

[0482] 鼻内疫苗:将120 μ g每种肽与10% (v/v) Carbigen、50 μ g c-二-GMP和50 μ g聚(I:C)混合达到8mL的总体积(8个剂量)。最终剂量含有在1mL注射体积中的15 μ g每种肽。使用MAD鼻药物递送装置(Teleflex)将0.5mL疫苗施用进每只猪的鼻孔。

[0483] 表17-组2和4疫苗制备(鼻内剂量)

鼻内疫苗	物质	每剂浓度	储备溶液	体积(mL)
1	18x 肽	15µg	5 mg/mL	24µL (各) 0.432 mL (总)
[0484] 2	Carbigen	10%(v/v)	准备好使用	0.8
3	c-二-GMP	50µg	1 mg/mL	0.4
4	聚 I:C	50µg	1 mg/mL	0.4
5	不含 Ca 和 Mg 的 PBS	NA	准备好使用 (x1)	5.968
最终体积 (mL)				8

[0485] 5. 抽血规程:

[0486] 在表10所示的抽血时间点(疫苗接种后),从组1-4的动物收集全血(8mL)到CPT试管中。

[0487] 1.尽可能在无菌条件下进行工作。准备:70%酒精,纱布,真空采血管(20G),CPT试管(容积:8mL),在室温。

[0488] 2.用圈套器限制动物,靠墙或角落牢固地控制;可替代地,可以将猪放在吊索中,可以将较小的猪保持或放在v-槽中。

[0489] 3.根据需要清洁以除去浅表污物和碎片。定位颈部沟并与肩膀点和垂管点对齐。斜面朝上,将针头垂直于皮肤插入。

[0490] 4.如果使用真空采血管,一旦插入针头,就稳定针头并推动真空采血管进入针座。如果你已经命中静脉,血液会自由地流入管。通过取下填充的管和用新管替换,可以填充多个管。

[0491] 5.如果你已经错过静脉,你可以小心地重新定位针头,并连接真空采血管,直到穿透血管。血管比较深,可能错开针头。通常,一次应当作出不超过二至三次尝试,以使对动物的折磨和对静脉的潜在损伤最小化。

[0492] 6.可替代地,你可以使用针头和注射器。通过在使用前轻轻向后拉,破坏注射器上的密封。

[0493] 7.清除空气,并将针头连接至注射器,以90°角牢固地插入针头,并抽吸注射器以证实插入和收集血液。

[0494] 8.一旦收集结束,取出真空采血管。然后,在注射部位上施加压力,取出针头。在经批准的Sharps容器中处置针头。

[0495] 9.将CPT试管中所含的血液保持在室温。通过IIBR或Phibro成员在一小时内收集血液样品。

[0496] 10.为了确保适当止血,施加压力30至60秒。

[0497] 6.包含/排除标准和包含后除去标准:

[0498] 包含:临床和行为健康的动物,没有任何疾病迹象。动物在顺应最小一周后开始实验。在顺应期中,动物经过检查,且仅在它们继续看起来健康的情况下,它们才开始实验。

[0499] 排除:具有与实验无关的大面积创伤和/或疾病的动物。由疫苗接种规程引起的疾病(诸如厌食)。

[0500] 不利事件报告和记录:每天两次检查猪。记录不利事件并报告研究负责人。

[0501] 7. 动物管理和圈舍:

[0502] 在研究的开始点之前一周,在进入顺应期之前确定在研究中使用的动物的健康状况。在研究开始之前,仅让处于良好健康的动物适应实验室条件7天。将猪保持在组笼中(根据实验组)。

[0503] 根据National Institute of Health(NIH)和Israeli Council for Experiments on Animals的指南进行动物操作。在混凝土地板围栏内,将动物圈养在受限接近Large Animal单元(Biotech Farm Site)内。每天清洁围栏一次,每周六天。

[0504] 每天以给定猪的体重的大约2-4%,每天两次,给动物提供商购可得的小猪饮食,供给小猪的医药前启动物(medical pre-starter)(Kefar yeoshua'feedmil,Kefar yeoshua',Israel),并允许猪自由接近由自动化供水阀供应的饮用水。设定环境条件以维持 $24 \pm 6^\circ\text{C}$ 的温度和约30-70%的相对湿度(RH)和12小时光照/12小时黑暗周期。每天记录RH和温度。

[0505] 8. 研究人员的安全:

[0506] 在该研究中使用的规程被认为对操作人员是低风险的。所有规程用所有必要的保护设备执行。为了防止任何穿透溅出,使用面罩。

[0507] 研究产品的处置:根据Biotech农场批准的规程。

[0508] 研究动物的处置:根据Biotech农场批准的规程。

[0509] 9. 疫苗接种的评估:

[0510] 在疫苗接种后几个时间点,将血液收集进CPT试管中,并分离外周血单核细胞(PBMC)用于测量细胞免疫应答。将细胞(2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 /孔)与每种肽一起温育。阳性对照是伴刀豆球蛋白A(ConA),且阴性对照是仅培养基。使用CTL或MabTech IFN γ ELISPOT试剂盒执行ELISpot测定。

[0511] 考虑到公开的发明的原理可以应用的许多可能实施方案,本领域普通技术人员会认识到,解释的实施方案仅仅是本发明的优选例子,且不应视作限制本发明的范围。相反,本发明的范围由下述权利要求限定。因此,我们声明落入这些权利要求的范围和精神内的所有内容作为我们的发明。

[0512] 附件I

[0513]

	SEQ ID NO.	氨基酸序列
1	2	NEMDIVQIFY
2	3	EMDIVQIFY
3	7	RAMVTSVKNFY
4	11	SSNVSLLSL
5	17	ANANRAMLI
6	18	KTLADIYGY
7	21	YANHCRFCW
8	57	RYTQIYKYPLI
9	67	YMENCKFCW
10	69	KSMPLIVENSY
11	70	CTYAKSCDF
12	94	NIDEVHHAY
13	95	RALERLISF
14	97	STYKNTESF
15	98	STYKNTESFY
16	99	KNTESFYPF
17	100	KMIKNTYVL
18	102	NVDEIHHAYF
19	103	SNVHFCISL
20	109	KNYSLSTLY
21	110	YSLSTLYCIF
22	113	RSDIDHMYAF
23	124	FEIYFARLY
24	138	LYVYSKTFYRK
25	139	LYVYSKTFY
26	147	SKTFYRKSWEY
27	149	KTFYRKSWEY
28	154	TFYRKSWEY

[0514]

29	159	RKSWYWFCIF
30	161	RKSWYWFCIFM
31	162	KSWYWFCIF
32	163	KSWYWFCIFM
33	169	KMLSYGMEW
34	171	KVRTFVCCY
35	172	YTLGGTASL
36	179	CLKRAISFFY
37	186	LLSDNPLFL
38	187	TLDNISFNEM
39	188	TLDNISFNEML
40	189	DNISFNEML
41	191	ISFNEMLTR
42	195	SFNEMLTRYW
43	198	NEMLTRYWY
44	201	EMLTRYWYSM
45	202	EMLTRYWYS
46	205	LTRYWYSMAI
47	231	AARQQIAVY
48	234	KTLPSIQNL
49	241	MNFFCNIKL
50	247	YHQKKIWTPY
51	251	QAMFHSIQF
52	253	AMFHSIQFY
53	257	SAMLACVRFY
54	266	MGANINQAM
55	269	LAWEGNLYY
56	270	YSKFRVLLY
57	274	ATYNHRKILY
58	275	KISHYVATY
59	278	KTDLLNNEF

[0515]

60	279	SLSTLLLKY
61	280	YAIIRYNL
62	283	NVFDLHEAY
63	287	YTDLNEWRL
64	293	KSCAGVLLGY
65	294	ALRHNFTKAI
66	297	RHNFTKAIHY
67	309	TKAIHYFYK
68	321	KRHKNHLYWR
69	328	ASLDYGMNL
70	329	NNNTLNMFF
71	330	YMYNLSNIF
72	333	RAYLHETLF
73	335	TMYSLGYIF
74	343	STCSLKCLF
75	345	VSIKGLLPF
76	357	HVIQRLGLY
77	370	QIQDWHILL
78	371	MAIDNGLLPF
79	375	KQIVHTIKY
80	379	KHTLHLLGL
81	385	RTENYNLVCEY
82	386	HSQIQDWHVL
83	389	QIQDWHVLL
84	425	KTLNLLLSY
85	429	STLVIRLLL
86	435	STYFQVKEF
87	437	MQDFSISPEKF
88	447	IIHTIYQSY
89	462	IMQAYALEY
90	463	MQAYALEYAM

[0516]

91	467	QAYALEYAMY
92	469	RQYDLIQKY
93	471	VTCTFQCLF
94	477	STYTEIVKY
95	478	HNITGYTYL
96	481	AVHNATCLF
97	517	KMIDSYNDY
98	527	LANAFIPPY
99	554	VLIEFLTGF
100	555	LIEFLTGFFY
101	557	EFLTGFFYLY
102	559	TGFFYLYGK
103	563	RLFSISKVM
104	569	MDMICLDYY
105	570	YTIIPAPLAM
106	573	LAMMLAARL
107	608	KHDARMLINY
108	609	ARMLINYCV
109	619	HIRNGNLTFL
110	621	KTDPWIVNR
111	625	GRIDFLKFLF
112	633	KAAIRGRSL
113	646	GADPTQKDY
114	647	HRGFTAWDW
115	651	FTAWDWAVF
116	655	SLNHDYQNL
117	661	GGLRKSPKL
118	662	LRKSPKLLL
119	665	AVNIMSMKNF
120	675	LSMKNRELF
121	687	YINDISEHEL

[0517]

122	701	ESTVITTAY
123	703	TVITTAYNF
124	711	FLAFSLHSDMY
125	713	LAFSLHSDMY
126	724	SDMYSVIFNI
127	725	DMYSVIFNIKY
128	726	DMYSVIFNI
129	735	VIFNIKYFLSK
130	746	QMDKLGFL
131	750	TNFFTLHEL
132	756	CFMMQCKSIY
133	762	SSFSKAVRL
134	769	AMDEAIHAALY
135	770	AAMQGLRNGY
136	771	AMQGLRNGY
137	784	SKQASISSIL
138	788	KQASISSI
139	790	ASISSILNF
140	810	FFFYIMEYF
141	815	IMDVFYETY
142	816	YSLPYNINL
143	818	RTSPSYCEI
144	819	GTNNFVETY
145	823	RTYNILQRF
146	825	SHFNNVSYYW
147	826	NNVSYYWGL
148	827	QTISNHQLSF
149	842	SSMHSGMLYK
150	848	FLKKNIYLY
151	849	HSKALATLLY
152	860	RFNTLHIHY

[0518]

153	863	MMRRVHAS Y
154	865	RVHASYPGY
155	869	CTQPARVTY
156	872	RVDMNRFFQFY
157	880	KTVEPTNFL
158	896	ITNKIYMFF
159	908	VGYNNAV CYF
160	917	ESNYWVNYSL
161	918	SNYWVNYSL
162	920	SVLLRDSGYY
163	921	SVLLRDSGY
164	923	KKQKHVSLLY
165	925	KQKHVSLLY
166	926	KQKHVSLLYI
167	931	VSFNKTIIL
168	934	VSWNFFNNSF
169	954	ISTSNETTL
170	955	STSNETTLI
171	960	TTLINCTYL
172	962	TLINCTYLTL
173	963	LINCTYLTL
174	971	LTLSSNYFYTF
175	972	LTLSSNYFYT
176	986	SNYFYTFF
177	991	YFYTFFKLY
178	1000	FKLYYIPLSI
179	1006	LLPKPYSRY
180	1009	SRYQYNTPI
181	1010	SRYQYNTPIYY
182	1013	RYQYNTPIY
183	1026	GSFSPETLGY

[0519]

184	1028	FTHQYIELY
185	1035	LLYDLYRAGY
186	1047	ASLEFNFTFY
187	1048	SLEFNFTFYAF
188	1049	AVIEAIGAM
189	1064	KTRGTRLFF
190	1065	KTLKTVYPEY
191	1090	LFPQYISYY
192	1091	FPQYISYY
193	1092	FPQYISYYTKY
194	1094	FPQYISYYTK
195	1101	LIPKHLWSY
196	1102	WIRNNFSISY
197	1106	RTIPVAWDRF
198	1107	MTSLLKTFD
199	1118	FTRFANTSPF
200	1129	ITSNVLTF
201	1139	SILAEYVYSY
202	1141	YSYNGMLEHY
203	1156	YGVETHWPLY
204	1184	SSIPKNKLF
205	1187	VSNILHSVF
206	1193	MLDSFYKYF
207	1194	ITTEKMLPF
208	1196	KEMQDYSLTFL
209	1202	MQDYSLTFLK
210	1203	MQDYSLTF
211	1204	QDYSLTFLK
212	1210	YSLTFLK
213	1227	SSYNRSLLH
214	1228	RSSTSKSSY

[0520]

215	1231	KTFNQSGLF
216	1239	RLIMTSFIGY
217	1248	KTLISEMMHY
218	1264	INRNYYPYY
219	1265	INRNYYPYYI
220	1276	NYYPYYIYK
221	1277	NYYPYYIY
222	1278	YPYYIYKIF
223	1279	YIYKIFDAI
224	1285	HLVHFNAHF
225	1286	VHFNAHFKPY
226	1287	HFNAHFKPY
227	1288	KPYVPVGFY
228	1295	HGQLQTFPR
229	1296	QLQTFPRNGY
230	1302	TKNAYRNLVY
231	1318	ITDATYLDI
232	1319	YLDIRRVHY
233	1323	AIPSVSIPF
234	1329	SRRNIRFKPW
235	1338	FVTPEIHNLF
236	1340	VTPEIHNLF
237	1345	KLMSALKWPI
238	1347	LMSALKWPIEY
239	1348	MSALKWPIEY
240	1366	FCSSYIPFHY
241	1368	KTPDDPGAMM
242	1369	GAMMITFAL
243	1370	FALKPREEY
244	1372	VSRAREFYI
245	1375	EFYISWDTDY

[0521]

246	1377	YISWDTDYV
247	1378	VVSASAINF
248	1379	VSASAINFL
249	1382	SASAINFLLL
250	1385	LLQNGSAVL
251	1388	ATSHVATSY
252	1389	QQMLTRHIY
253	1390	NLAGITTLM
254	1394	KTVPKFVPTY
255	1399	KESAETIYTF
256	1400	ESAETIYTF
257	1413	SSMSVSTFW
258	1415	SMSVSTFWPY
259	1426	KAANTPQYY
260	1432	QQNKANKAF
261	1436	KANKAFYINH
262	1437	KANKAFYI
263	1438	KANKAFYINHL
264	1441	NKAFYINHLY
265	1448	AFYINHLYK
266	1452	YINHLYKFL
267	1454	INHLYKFLLI
268	1460	YTLLSPLQSY
269	1461	LLSPLQSYTY
270	1468	AADDTTTCYY
271	1469	KSSEWTTIL
272	1470	MSLFWHQKL
273	1471	KVDLPYHLM
274	1472	GILSYTSLY
275	1480	GQYNLKL VY
276	1482	KTIKHYEQL

[0522]

277	1483	GTSYLRMAY
278	1484	IAHVNTPNF
279	1485	KNLPIDILFY
280	1488	HLQAFLDSY
281	1491	IADAINQEF
282	1492	ASICRQIVLY
283	1499	FLNKSTQAY
284	1500	ALDLSLIGFY
285	1501	KTDPNFKNLY
286	1503	NQAINTFMYY
287	1507	RALEGLDLY
288	1508	TLAQVFESF
289	1509	FTDNAPAGHYY
290	1510	RSLSNFQAL
291	1511	QIYKTLLEY
292	1512	ETEDVFFTF
293	1514	RLAEFYQKL
294	1517	RTMNDFGMM
295	1518	FGMMNQTNV
296	1523	SLMADTKYF
297	1528	RVFSRLVYF
298	1531	FSQAVMEMGY
299	1541	RSIPLANIY
300	1543	GSLYPTQFDY
301	1544	SLYPTQFDY
302	1556	VVFHAGSLY
303	1557	HAGSLYNWF
304	1564	SARIYAGQGY
305	1566	QAQEEWNMIL
306	1567	AQEEWNMIL
307	1571	EQYGKAPDF

[0523]

308	1573	IRAHNFIQTI
309	1574	IRAHNFIQTIY
310	1576	RAHNFIQTIY
311	1577	AHNFIQTIY
312	1580	MKQFCKISVW
313	1592	KTLESLILPF
314	1601	IMESGSMPL
315	1619	DFDPLVTFY
316	1627	SAMLEFKKF
317	1628	SAMLEFKKFF
318	1630	FTQITRQTF
319	1631	TQITRQTFM
320	1633	IADSATKEV
321	1648	TLMDQPTY
322	1649	RNLRFSPRG
323	1651	RFSRPGNNYI
324	1658	FINSTDFLY
325	1666	RAQQTVRNIL
326	1668	RNILSNDCL
327	1669	RTHLITTLDY
328	1684	NINRLMPYF
329	1685	RQYPGCSRVI
330	1693	ATQQLALNY
331	1698	ALSTSSTGY
332	1701	SSTSGVLPF
333	1706	SVSEPLTQY
334	1719	VVTPKHLTY
335	1736	NQNYFPVQF
336	1744	SFKDWIPEF
337	1749	SMSYFDGKTEY
338	1750	MSYFDGKTEY

[0524]

339	1758	VQLANSSVYY
340	1759	QLANSSVYY
341	1760	SVYHVQEEL
342	1761	RAFFPCDPY
343	1776	TVLNTFEAY
344	1785	MQDGIRWFYLF
345	1823	SMMDFERVHY
346	1824	MMDFERVHY
347	1828	YVGKGTIIYY
348	1835	GKTMPVEFY
349	1836	KTMPVEFY
350	1840	SMFKHFDNM
351	1849	SLNRIVEEF
352	1850	GIIEFNTYY
353	1852	KALQGCYTY
354	1853	FLIDFSNLF
355	1863	SMPMSMIGPY
356	1864	SMIGPYLNVY
357	1868	FVQKLWAAY
358	1872	KLYTAALGVY
359	1873	YSDYVGSGY
360	1875	TMDPQVLNL
361	1877	SHLNNFLPI
362	1880	MTVFPFMIPF
363	1882	AVSDVNGMQY
364	1896	MVAVNLFRF
365	1897	YLKEVYEKY
366	1905	RQVHILEPY
367	1908	ANQKMFYSI
368	1911	KQFEMFNMVY
369	1912	KIHKLLSPY

[0525]

370	1916	ISFKHMTSI
371	1923	ILNHICHQY
372	1929	MDSEFFQPV
373	1941	YQDQQWVEV
374	1942	VTDNPVTDRL
375	1944	SAPAHPAEPY
376	1945	TASQTMSAI
377	1953	RTASSAELY
378	1960	SNLNNSCFI
379	1969	ATNFFIQPI
380	1982	LTHNHILFTY
381	1986	ATQFVQHGIY
382	1989	HIYETNLYL
383	1991	YAANLLTNY
384	2032	RSNTPTYLY
385	2034	RSNTPTYL
386	2036	MCGKRNCPY
387	2037	CGKRNCPYY
388	2038	CGKRNCPY
389	2044	RNCPLYYFLL
390	2052	KRLPQFFLRRI
391	2053	KRLPQFFLRR
392	2061	FSNNNTFLYHF
393	2068	RTKFPEINI
394	2075	KSCYPLVF
395	2076	SILCSCISF
396	2080	KSSHNYIPL
397	2087	TTSANSPIVY
398	2092	IAFPPEYPY
399	2097	KIYRQVLTF
400	2099	MVGEYPMCY

[0526]

401	2103	CALYFNDPF
402	2104	KNVSTVFTYY
403	2118	MQTAIQKNY
404	2125	TAIQKNYFRF
405	2126	AIQKNYFRF
406	2127	AIQKNYFRFFK
407	2128	AIQKNYFRFF
408	2129	IQKNYFRFFK
409	2134	KNYFRFFK
410	2144	KLLTHFNIY
411	2146	LLTHFNIYR
412	2153	QMAPGGSYF
413	2159	RIHTRFGQY
414	2166	KIDDFIRLYP
415	2175	RLYPHIFY
416	2183	PHIFYRPLY
417	2185	HIFYRPLYR
418	2205	MTSSEWIAEY
419	2211	SLVTVNTEY
420	2213	ELFSNNLLF
421	2214	FILDDISFSEM
422	2218	DDISFSEML
423	2220	ISFSEMLTR
424	2221	ISFSEMLTRYW
425	2222	SFSEMLTRY
426	2223	SFSEMLTRYWY
427	2225	FSEMLTRYWY
428	2228	SEMLTRYWYSM
429	2229	SEMLTRYWYS
430	2236	AILYNLTEAI
431	2239	YNLTEAIQYFY

[0527]	432	2241	YNLTEAIQY
	433	2242	NLTEAIQYF
	434	2245	TEAIQYFYQRY
	435	2247	TEAIQYFYQR
	436	2251	AIQYFYQRYR
	437	2252	IQYFYQRYR
	438	2253	IQYFYQRY
	439	2255	QYFYQRYRHF
	440	2262	RYRHFKDWR
	441	2265	YRHFKDWRLL
	442	2266	YRHFKDWRLLI

[0528] 附件II

[0529] 通过完全筛选鉴定的阳性肽,以及动物14S(猪14来自农场S)的ELISpot测定结果(为每种肽计数的斑点的数目)

[0530]

	SEQ ID NO.	氨基酸序列	斑点的 数目
1	69	KSMPLIVENSY	255
2	70	CTYAKSCDF	35
3	241	MNFFCNIKL	16
4	275	KISHYVATY	21
5	278	KTDLLNNEF	15
6	279	SLSTLLLKY	17
7	280	YAIIRYNL	12
8	283	NVFDLHEAY	18
9	285	AMLSSIQYY	14
10	297	RHNFTKAIHY	16
11	309	TKAIHYFYK	12
12	321	KRHKNHLYWR	14
13	328	ASLDYGMNL	13
14	329	NNNTLNMFF	12
15	335	TMYSLGYIF	12
16	357	HVIQRLGLY	13
17	386	HSQIQDWHVL	110
18	447	IIHTIYQSY	331
19	467	QAYALEYAMY	17
20	469	RQYDLIQKY	14
21	478	HNITGYTYL	33
22	523	FSKPFMRFIL	12
23	534	FTFKFAAHL	12
24	557	EFLTGFFYLY	16
25	585	RAQKRELLR	12

[0531]

26	607	INCFNYCILY	12
27	608	KHDARMLINY	13
28	625	GRIDFLKFLF	15
29	633	KAAIRGRSL	14
30	635	RGRSLNMLSL	12
31	641	RSLNMLSLI	16
32	647	HRGFTAWDW	14
33	703	TVITTAYNF	13
34	724	SDMYSVIFNI	15
35	725	DMYSVIFNIKY	15
36	726	DMYSVIFNI	14
37	769	AMDEAIHAALY	13
38	784	SKQASISSIL	12
39	827	QTISNHQLSF	13
40	842	SSMHSGMLYK	13
41	848	FLKKNIYLY	19
42	849	HSKALATLLY	13
43	860	RFNTLHIHY	14
44	865	RVHASYPGY	15
45	869	CTQPARVTY	13
46	872	RVDMNRFFQF Y	15
47	880	KTVEPTNFL	66
48	888	MMHYPTFNW	12
49	896	ITNKIYMFF	18
50	906	WVGYNVCY	12
51	920	SVLLRDSGY	17
52	921	SVLLRDSGY	14
53	923	KKQKHVSLLY	14
54	925	KQKHVSLLY	14
55	926	KQKHVSLLYI	16

[0532]

56	931	VSFNKTIIL	12
57	954	ISTSNETTL	15
58	960	TTLINCTYL	13
59	962	TLINCTYLTL	12
60	963	LINCTYLTL	19
61	971	LTLSSNYFYTF	12
62	1006	LLPKPYSRY	13
63	1049	AVIEAIGAM	15
64	1065	KTLKTVYPEY	36
65	1090	LFPQYISYY	106
66	1106	RTIPVAWDRF	130
67	1107	MTSLLKTFD	18
68	1111	LSYMPPNIF	13
69	1120	FSYEKNLLF	13
70	1127	RALKMYEDY	12
71	1129	ITSNVLTF	14
72	1139	SILAEYVYSY	12
73	1141	YSYNGMLEHY	18
74	1150	NLSEVVTAY	12
75	1159	RSIETYYPEW	12
76	1172	SEDFQYWTF	12
77	1187	VSNILHSVF	15
78	1188	TSIKPVSPF	13
79	1196	KEMQDYSLTFL	17
80	1204	QDYSLTFLK	17
81	1227	SSYNRSLH	12
82	1228	RSSTSKSSY	15
83	1264	INRNYYPPY	12
84	1265	INRNYYPPYI	12
85	1278	YPYYIYKIF	16
86	1279	YIYKIFDAI	12

[0533]

87	1287	HFNAHFKPY	14
88	1288	KPYVPVGFY	16
89	1295	HGQLQTFPR	17
90	1345	KLMSALKWPI	16
91	1347	LMSALKWPIEY	17
92	1348	MSALKWPIEY	12
93	1370	FALKPREEY	14
94	1372	VSRAREFYI	12
95	1375	EFYISWDTDY	15
96	1379	VSASAINFL	13
97	1388	ATSHVATSY	14
98	1390	NLAGITTLM	12
99	1394	KTVPKFVPTY	14
100	1400	ESAETIYTF	14
101	1413	SSMSVSTFW	12
102	1436	KANKAFYINH	13
103	1437	KANKAFYI	12
104	1454	INHLYKFLLI	12
105	1461	LLSPLQSYTY	13
106	1468	AADDTCYY	13
107	1472	GILSYTSLY	16
108	1483	GTSYLRMAY	12
109	1484	IAHVNTPNF	14
110	1488	HLQAFLDSY	13
111	1491	IADAINQEF	13
112	1499	FLNKSTQAY	14
113	1501	KTDPNFKNLY	14
114	1503	NQAINTFMYY	13
115	1507	RALEGLDLY	13
116	1509	FTDNAPAGHYY	17
117	1510	RSLSNFQAL	15

[0534]

118	1511	QIYKTLLEY	17
119	1512	ETEDVFFTF	21
120	1514	RLAEFYQKL	15
121	1517	RTMNDFGMM	13
122	1519	MMNQTNYSI	13
123	1523	SLMADTKYF	14
124	1528	RVFSRLVYF	13
125	1531	FSQAVMEMGY	12
126	1543	GSLYPTQFDY	12
127	1544	SLYPTQFDY	14
128	1556	VVFHAGSLY	13
129	1566	QAQEEWNMIL	14
130	1567	AQEEWNMIL	13
131	1571	EQYGKAPDF	14
132	1573	IRAHNFIQTI	12
133	1580	MKQFCKISVW	12
134	1619	DFDPLVTFY	16
135	1627	SAMLEFKKF	12
136	1628	SAMLEFKKFF	12
137	1630	FTQITRQTF	12
138	1631	TQITRQTFM	12
139	1633	IADSATKEV	14
140	1648	TLMDQPTY	14
141	1649	RNLRFSPRG	18
142	1651	RFSRPGNNYI	17
143	1658	FINSTDFLY	12
144	1685	RQYPGCSRUY	12
145	1693	ATQQLALNY	12
146	1701	SSTSGVLPF	13
147	1706	SVSEPLTQY	13
148	1718	KAQFIKEGY	15

[0535]

149	1736	NQNYFPVQF	13
150	1749	SMSYFDGKTEY	15
151	1750	MSYFDGKTEY	17
152	1753	FANAMQAYL	13
153	1759	QLANSSVYY	15
154	1761	RAFFPCDPY	12
155	1767	RIFAGKMLSY	13
156	1783	MQDGIRWFYL	13
157	1810	KIKNSVPSY	13
158	1814	KASPSPMEM	17
159	1823	SMMDFERVHY	25
160	1824	MMDFERVHY	14
161	1828	YVGKGTIYY	14
162	1830	MALAKMYTL	12
163	1835	GKTMPVEFY	21
164	1836	KTMPVEFY	17
165	1840	SMFKHFDNM	14
166	1852	KALQGCYTY	15
167	1864	SMIGPYLNVY	13
168	1873	YSDYVGSGY	12
169	1875	TMDPQVLNL	12
170	1880	MTVFPFMIPF	12
171	1912	KIHKKLLSPY	12
172	1923	ILNHICHQY	13
173	1941	YQDQQWVEV	12
174	1955	RTARHNLSL	14
175	1982	LTHNHILFTY	14
176	1986	ATQFVQHGIY	13
177	1989	HIYETNLYL	14
178	1991	YAANLLTNY	29
179	2037	CGKRNCPLY	12

	180	2038	CGKRNCPLY	12
	181	2075	KSCYPLVF	12
	182	2092	IAFPPEYPY	17
	183	2118	MQTAIQKNY	13
	184	2125	TAIQKNYFRF	14
	185	2126	AIQKNYFRF	13
	186	2127	AIQKNYFRFFK	15
	187	2134	KNYFRFFK	16
	188	2137	NYFRFFKKL	12
	189	2141	RFFKLLTH	12
	190	2142	KKLLTHFNI	12
	191	2146	LLTHFNIYR	16
	192	2159	RIHTRFGQY	15
	193	2166	KIDDFIRLYP	13
[0536]	194	2175	RLYPHIFY	16
	195	2181	YPHIFYRPL	12
	196	2183	PHIFYRPLY	15
	197	2185	HIFYRPLYR	15
	198	2193	RSCDYAPGFY	12
	199	2194	TTADLQSPF	12
	200	2205	MTSSEWIAEY	13
	201	2211	SLVTVNTEY	12
	202	2213	ELFSNNLLF	12
	203	2222	SFSEMLTRY	12
	204	2223	SFSEMLTRYWY	12
	205	2225	FSEMLTRYWY	12
	206	2241	YNLTEAIQY	14
	207	2242	NLTEAIQYF	12
	208	2251	AIQYFYQRYS	12
	209	2252	IQYFYQRYS	13
	210	2265	YRHFKDWRL	13
[0537]	211	2266	YRHFKDWRLI	14

[0538] 附件III

[0539] 通过完全筛选鉴定的阳性肽,以及动物9H(猪9来自农场H)的ELISpot测定结果(为

每种肽计数的斑点的数目)

[0540]

	SEQ ID NO.	氨基酸序列	斑点的 数目
1	56	RYTQIYKYPL	23
2	64	VSRWYNQCTY	32
3	66	HVMDCSDPV	62
4	84	KSELSYWCTY	16
5	85	SMECLHPRPY	20
6	369	HTLQWLGLY	16
7	439	KRNVLIKGI	16
8	449	EILKLATFY	19
9	458	VSEYINYL	16
10	478	HNITGYTYL	19
11	554	VLIEFLTGFF	16
12	565	KVMDMICLDY	17
13	653	AVFTGNMEL	16
14	743	SKFCNHMFFR	16
15	744	NHMFFRSCV	18
16	756	CFMMQCKSIY	19
17	757	FMMQCKSIY	16
18	835	RSEWASSNTF	26
19	836	SEWASSNTF	31
20	839	ASSSMHSGMLY	16
21	842	SSMHSGMLYK	23
22	847	KTFYISPKNKY	21
23	848	FLKKNIYLY	71
24	857	KQMFNVDITY	17
25	860	RFNTLHIHY	19

	26	872	RVDMNRFFQFY	18
	27	884	SAINHFNYTM	19
	28	889	ALEDHYGLY	16
	29	896	ITNKIYMFF	26
	30	908	VGYNNAVCCYYF	16
	31	920	SVLLRDSGYY	35
	32	923	KKQKHVSLLY	16
	33	977	LSSNYFYTFF	18
	34	1001	KLYYIPLSI	21
	35	1019	QTNCQLYFF	21
	36	1020	IITAMTHLM	18
	37	1024	LVDEIYSTL	20
	38	1033	FTSGYMPLLY	16
	39	1080	FRDHFIALF	16
	40	1091	FPQYISYY	17
[0541]	41	1151	SVLEKYLQW	16
	42	1184	SSIPKNKLF	16
	43	1187	VSNILHSVF	16
	44	1205	QDYSLTFL	17
	45	1207	DYSLTFLK	17
	46	1212	FLLKKRMEL	19
	47	1296	QLQTFPRNGY	16
	48	1437	KANKAFYI	16
	49	1454	INHLYKFLLI	18
	50	1459	SVTEFYTKL	19
	51	1461	LLSPLQSYTY	17
	52	1767	RIFAGKMLSY	21
	53	1841	SMFKHFDNMVY	17
	54	1950	LVDHIFNYL	16
	55	1952	SRTASSAELY	17
	56	2139	YFRFFKLL	19
	57	2140	RFFKLLTHF	16
[0542]	58	2171	IRLYPHIFYR	18
	59	2197	KAIELYWVF	17

[0543] 附件IV

[0544] 201种来自ELISpot筛选的阳性肽

[0545]

	SEQ ID NO.	氨基酸序列
1	1	STNEDNQLM
2	2	NEMDIVQIFY
3	3	EMDIVQIFY
4	8	AMVTSVKNFY
5	9	MVTSVKNFY
6	18	KTLADIYGY
7	26	YIKIHQHYY
8	32	HQHYYINI
9	36	HYYINIYMYL
10	37	YYINIYMYL
11	67	YMENCKFCW
12	69	KSMPLIVENSY
13	70	CTYAKSCDF
14	81	YISQCSIARY
15	84	KSELSYWCTY
16	87	VLNRPLSIFY
17	89	YMNCSLPTYF
18	93	MTRNTLVLFK
19	94	NIDEVHHAY
20	99	KNTESFYPF
21	100	KMIKNTYVL
22	101	NVDEIHHAY
23	118	GANEKFAHY
24	124	FEIYFARLY
25	128	IYFARLYVY
26	129	IYFARLYVYSK

[0546]

27	159	RKSWYWFCIF
28	173	YQNERYMIM
29	180	RAISFFYQTY
30	185	SMVDCCHKNY
31	186	LLSDNPLFL
32	187	TLDNISFNEM
33	192	ISFNEMLTRYW
34	193	SFNEMLTRY
35	210	RYWYSMAIL
36	220	YSMAILYK
37	221	MAILYKLTEAI
38	265	SYSAIYYCF
39	268	KLPEFFDEY
40	271	WIYENLHIY
41	272	HIYNMIDTF
42	275	KISHYVATY
43	277	MRIEIFWEL
44	278	KTDLLNNEF
45	279	SLSTLLLY
46	283	NVFDLHEAY
47	284	QAMLSSIQYY
48	285	AMLSSIQYY
49	294	ALRHNFTKAI
50	302	HNFTKAIHY
51	308	FTKAIHYFYKR
52	312	KAIHYFYK
53	313	KAIHYFYKRHK
54	343	STCSLKCLF
55	357	HVIQRLGLY
56	360	KKTLNLLLSY
57	363	YMVDFMREF

[0547]

58	364	RLHYLKSLVY
59	365	KEMFNLARFY
60	369	HTLQWLGLY
61	370	QIQDWHILL
62	371	MAIDNGLLPF
63	375	KQIVHTIKY
64	377	NTFFLPSDF
65	386	HSQIQDWHVL
66	394	NMLSILVKY
67	400	RKLEILTWM
68	404	EMFSLGYKI
69	405	SLGYKIVFEY
70	435	STYFQVKEF
71	447	IIHTIYQSY
72	449	EILKLATFY
73	452	RRTESKKLFL
74	455	SIVSEYINY
75	456	IVSEYINYL
76	457	IVSEYINYLF
77	461	EIMQAYALEY
78	462	IMQAYALEY
79	463	MQAYALEYAM
80	467	QAYALEYAMY
81	468	HVVQRLGLY
82	469	RQYDLIQKY
83	478	HNITGYTYL
84	486	AAAGGLLNF
85	492	IVDDYIRFLF
86	496	ISLRLFVK
87	497	RLFVKPKY
88	527	LANAFIPPY

[0548]

89	529	RKYIHKIIL
90	541	CNACKTLNY
91	544	LNYKHVKTL
92	547	SHLEGFMRTY
93	548	EGFMRTYLL
94	549	RYIWSGLVY
95	553	VLIEFLTGF
96	554	VLIEFLTGFF
97	559	TGFFLYGK
98	561	KRLFSISKVM
99	570	YTIIPAPLAM
100	578	KNYDLMKRL
101	584	VVDDVPSIDY
102	588	KYLMNCSGF
103	589	KNIKELVF
104	619	HIRNGNLTLF
105	621	KTDPWIVNR
106	633	KAAIRGRSL
107	636	RGRSLNMLSLI
108	639	GRSLNMLSL
109	640	GRSLNMLSLI
110	645	SLNMLSLIKF
111	647	HRGFTAWDW
112	651	FTAWDWAVF
113	652	WAVFTGNMEL
114	653	AVFTGNMEL
115	662	LRKSPKLLL
116	670	YTLCDSPAY
117	680	SIIPFADAL
118	681	RTVEICCRY
119	711	FLAFSLHSDMY

[0549]

120	713	LAFSLHSDMY
121	728	MYSVIFNIK
122	731	YSVIFNIKYF
123	732	SVIFNIKYF
124	743	SKFCNHMFFR
125	773	VSQSMSLNY
126	796	ISSILNFFF
127	822	YFAPSFAIF
128	828	ISNHQLSFTY
129	885	AINHFNYTM
130	888	MMHYPTFNW
131	914	KTLNLTKTY
132	927	VSLLYICKS
133	957	NETTLINCTY
134	1012	RYQYNTPIYY
135	1019	QTNCQLYFF
136	1049	AVIEAIGAM
137	1064	KTRGTRLFF
138	1069	YLMQHFRDH
139	1096	QYISYYTKY
140	1104	SISYIPLIY
141	1106	RTIPVAWDRF
142	1111	LSYMPPNIF
143	1141	YSYNGMLEHY
144	1156	YGVETHWPLY
145	1188	TSIKPVSPF
146	1196	KEMQDYSLTFL
147	1203	MQDYSLTF
148	1233	RQTMMSIY
149	1248	KTLISEMMHY
150	1253	RTDLNNCVSL

[0550]

151	1256	KGRINRNY
152	1280	TTNRRILQY
153	1282	ASGGAFCLI
154	1288	KPYVPVGFY
155	1295	HGQLQTFPR
156	1325	VSIPFGERF
157	1340	VTPEIHNLF
158	1345	KLMSALKWPI
159	1348	MSALKWPIEY
160	1372	VSRAREFYI
161	1374	RAREFYISW
162	1380	VSASAINFL
163	1437	KANKAFYI
164	1440	ANKAFYINHL
165	1464	LTQRPVMGY
166	1472	GILSYTSLY
167	1512	ETEDVFFTF
168	1531	FSQAVMEMGY
169	1543	GSLYPTQFDY
170	1556	VVFHAGSLY
171	1560	SGRIVTTAI
172	1561	VTTAIKTL
173	1584	MLGNLSAAKY
174	1623	FLIPETILF
175	1635	YSDPETVHSY
176	1652	FSRPGNNYI
177	1653	ELNITSPAM
178	1676	VVIMAIMLY
179	1715	RVYLDGELY
180	1740	ASSIVSNLF
181	1744	SFKDWIPEF

[0551]	182	1745	FQNFSKSLY
	183	1823	SMMDFERVHY
	184	1832	KTHYSIPSSF
	185	1836	KTMPVEFY
	186	1860	AAFNQYIF
	187	1865	FMNFDPAHNEY
	188	1911	KQFEMFNMVY
	189	1924	GVKHFLHEY
	190	1929	MDSEFFQPV
	191	1952	SRTASSAELY
	192	1991	YAANLLTNY
	193	2020	KTFQDIRII
	194	2021	CGMKNISEI
	195	2044	RNCPLYFLL
	196	2049	YLRKLPQFF
	197	2112	IISMQTAI
	198	2113	ISMQTAIQK
	199	2136	KNYFRFFKKL
	200	2204	SVEELLSAV
	201	2205	MTSSEWIAEY

[0552] 附件V

[0553] 77种来自ELISpot筛选的阳性肽和对应的ASFV蛋白

[0554]

	SEQ ID NO.	氨基酸序列	对应的 ASFV 蛋白
1	32	HQHYYINI	AYW33961.1
2	67	YMENCKFCW	AYW33963.1
3	69	KSMPLIVENSY	AYW33963.1
4	70	CTYAKSCDF	AYW33964.1
5	101	NVDEIHHAY	AYW33969.1
6	128	IYFARLYVY	AYW33971.1
7	187	TLDNISFNEM	AYW33974.1
8	278	KTDLLNNEF	AYW33992.1
9	279	SLSTLLLKY	AYW33992.1
10	363	YMVDFMREF	AYW33999.1
11	377	NTFFLPSDF	AYW34001.1
12	400	RKLEILTWM	AYW34001.1
13	404	EMFSLGYKI	AYW34001.1
14	435	STYFQVKEF	AYW34001.1
15	447	IIHTIYQSY	AYW34001.1
16	449	EILKLATFY	AYW34001.1
17	455	SIVSEYINY	AYW34001.1
18	456	IVSEYINYL	AYW34001.1
19	457	IVSEYINYLF	AYW34001.1
20	461	EIMQAYALEY	AYW34001.1
21	462	IMQAYALEY	AYW34001.1
22	463	MQAYALEYAM	AYW34001.1
23	467	QAYALEYAMY	AYW34001.1
24	468	HVVQRLGLY	AYW34002.1
25	469	RQYDLIQKY	AYW34002.1
26	478	HNITGYTYL	AYW34002.1

[0555]

27	486	AAAGLLNF	AYW34003.1
28	492	IVDDYIRFLF	AYW34003.1
29	496	ISLRLFVK	AYW34004.1
30	497	RLFVKPKY	AYW34004.1
31	527	LANAFIPPY	AYW34004.1
32	529	RKYIHKIL	AYW34004.1
33	541	CNACKTLNY	AYW34004.1
34	544	LVYKHYKTL	AYW34004.1
35	547	SHLEGFMRTY	AYW34005.1
36	548	EGFMRTYLL	AYW34005.1
37	549	RYIWSGLVY	AYW34007.1
38	553	VLIEFLTGF	AYW34010.1
39	554	VLIEFLTGFF	AYW34010.1
40	561	KRLFSISKVM	AYW34010.1
41	578	KNYDLMKRL	AYW34010.1
42	584	VVDDVPSIDY	AYW34010.1
43	589	KNIKELVF	AYW34010.1
44	619	HIRNGNLTFL	AYW34011.1
45	621	KTDPWIVNR	AYW34011.1
46	633	KAIRGRSL	AYW34011.1
47	636	RGRSLNMLSLI	AYW34011.1
48	639	GRSLNMLSL	AYW34011.1
49	640	GRSLNMLSLI	AYW34011.1
50	645	SLNMLSLIKF	AYW34011.1
51	651	FTAWDWAVF	AYW34011.1
52	652	WAVFTGNMEL	AYW34011.1
53	653	AVFTGNMEL	AYW34011.1
54	662	LRKSPKLLL	AYW34011.1
55	670	YTLCDSPAY	AYW34012.1
56	711	FLAFSLHSDMY	AYW34013.1
57	713	LAFSLHSDMY	AYW34013.1

[0556]	58	743	SKFCNHMFFR	AYW34013.1
	59	1049	AVIEAIGAM	AYW34032.1
	60	1106	RTIPVAWDRF	AYW34037.1
	61	1156	YGVETHWPLY	AYW34044.1
	62	1248	KTLISEMMHY	AYW34052.1
	63	1253	RTDLNNCVSL	AYW34052.1
	64	1280	TTNRRILQY	AYW34052.1
	65	1282	ASGGAFCLI	AYW34053.1
	66	1288	KPYVPVGFY	AYW34053.1
	67	1437	KANKAFYI	AYW34060.1
	68	1440	ANKAFYINHL	AYW34060.1
	69	1531	FSQAVMEMGY	AYW34063.1
	70	1556	VVFHAGSLY	AYW34064.1
	71	1560	SGRIVTTAI	AYW34064.1
	72	1561	VTTAIKTLL	AYW34064.1
	73	1584	MLGNLSAAKY	AYW34065.1
	74	1991	YAANLLTNY	AYW34108.1
	75	2021	CGMKNISEI	AYW34111.1
76	2112	IISMMQTAI	AYW34117.1	
77	2204	SVEELLSAV	AYW34126.1	

[0557] 附件VI

[0558] 18种来自ELISpot筛选的“顶”肽和对应的ASFV蛋白

	SEQ ID NO.	氨基酸序列	对应的 ASFV 蛋白	
	1	67	YMENCKFCW	AYW33963.1
	2	69	KSMPLIVENSY	AYW33963.1
	3	70	CTYAKSCDF	AYW33964.1
	4	279	SLSTLLLKY	AYW33992.1
	5	435	STYFQVKEF	AYW34001.1
	6	461	EIMQAYALEY	AYW34001.1
	7	469	RQYDLIQKY	AYW34002.1
[0559]	8	478	HNITGYTYL	AYW34002.1
	9	486	AAAGLLNF	AYW34003.1
	10	547	SHLEGFMRTY	AYW34005.1
	11	548	EGFMRTYLL	AYW34005.1
	12	549	RYIWSGLVY	AYW34007.1
	13	561	KRLFSISKVM	AYW34010.1
	14	589	KNIKELVF	AYW34010.1
	15	639	GRSLNMLSL	AYW34011.1
	16	652	WAVFTGNMEL	AYW34011.1
	17	653	AVFTGNMEL	AYW34011.1
	18	1253	RTDLNNCVSL	AYW34052.1

[0560] 附件VII

[0561] 簇集在七种ASFV蛋白内的附件V和/或VI的四十四种肽

[0562]

	ASFV 蛋白	肽 SEQ ID NO.	肽氨基酸序列
1	AYW34011.1	619	HIRNGNLTLF
		621	KTDPWIVNR
		633	KAAIRGRSL
		636	RGRSLNMLSLI
		639	GRSLNMLSL
		640	GRSLNMLSLI
		645	SLNMLSLIKF
		651	FTAWDWAVF
		652	WAVFTGNMEL
		653	AVFTGNMEL
		662	LRKSPKLLL
2	AYW34004.1	496	ISLRLFVVK
		497	RLFVVKPKY
		527	LANAFIPPY
		529	RKYIHKIIL
		541	CNACKTLNY
		544	LNYKHYKTL
3	AYW34001.1	377	NTFFLPSDF
		400	RKLEILTWM
		404	EMFSLGYKI
		435	STYFQVKEF
		447	IIHTIYQSY
		449	EILKLATFY
		455	SIVSEYINY
		456	IVSEYINYL

[0563]		457	IVSEYINYLF	
		461	EIMQAYALEY	
		462	IMQAYALEY	
		463	MQAYALEYAM	
		467	QAYALEYAMY	
		4	AYW34010.1	553
		554	VLIEFLTGFF	
		561	KRLFSISKVM	
		578	KNYDLMKRL	
		584	VVDDVPSIDY	
		589	KNIIKELVF	
	5	AYW34052.1	1248	KTLISEMMHY
			1253	RTDLNNCVSL
			1280	TTNRRILQY
	6	AYW34002.1	468	HVVQRLGLY
			469	RQYDLIQKY
			478	HNITGYTYL
	7	AYW33963.1	67	YMENCKFCW
			69	KSMPLIVENSY

[0564] 附件VIII

[0565] 满足或超过严格阈值的附件IV的肽(共125种)

[0566]

	SEQ ID NO.	氨基酸序列
1	1	STNEDNQLM
2	2	NEMDIVQIFY
3	3	EMDIVQIFY
4	8	AMVTSVKNFY
5	9	MVTSVKNFY
6	18	KTLADIYGY
7	26	YIKIHQHYY
8	36	HYYINIYMYL
9	67	YMENCKFCW
10	69	KSMPLIVENSY
11	70	CTYAKSCDF
12	81	YISQCSIARY
13	84	KSELSYWCTY
14	87	VLNRPLSIFY
15	89	YMNCSLPTYF
16	93	MTRNTLVLFK
17	101	NVDEIHHAY
18	124	FEIYFARLY
19	128	IYFARLYVY
20	129	IYFARLYVYSK
21	159	RKSWYWFCIF
22	185	SMVDCCHKNY
23	186	LLSDNPLFL
24	187	TLDNISFNEM
25	210	RYWYSMAIL
26	221	MAILYKLTEAI

[0567]

27	268	KLPEFFDEY
28	272	HIYNMIDTF
29	275	KISHYVATY
30	278	KTDLLNNEF
31	279	SLSTLLLKY
32	285	AMLSSIQYY
33	294	ALRHNFTKAI
34	357	HVIQRLGLY
35	360	KKTLNLLLSY
36	363	YMVDFMREF
37	365	KEMFNLARFY
38	369	HTLQWLGLY
39	371	MAIDNGLLPF
40	394	NMLSILVKY
41	400	RKLEILTWM
42	404	EMFSLGYKI
43	435	STYFQVKEF
44	447	IIHTIYQSY
45	449	EILKLATFY
46	456	IVSEYINYL
47	457	IVSEYINYLF
48	461	EIMQAYALEY
49	462	IMQAYALEY
50	463	MQAYALEYAM
51	467	QAYALEYAMY
52	468	HVVQRLGLY
53	469	RQYDLIQKY
54	478	HNITGYTYL
55	486	AAAGLLNF
56	492	IVDDYIRFLF
57	496	ISLRLFEVK

[0568]

58	497	RLFVVKPKY
59	527	LANAFIPPY
60	541	CNACKTLNY
61	544	LNYKHYKTL
62	547	SHLEGFMRTY
63	548	EGFMRTYLL
64	549	RYIWSGLVY
65	553	VLIEFLTGF
66	554	VLIEFLTGFF
67	561	KRLFSISKVM
68	570	YTIIPAPLAM
69	578	KNYDLMKRL
70	588	KYLMNCSGF
71	589	KNIKELVF
72	619	HIRNGNLTLF
73	621	KTDPWIVNR
74	633	KAIRGRSL
75	639	GRSLNMLSL
76	640	GRSLNMLSLI
77	645	SLNMLSLIKF
78	651	FTAWDWAVF
79	652	WAVFTGNMEL
80	653	AVFTGNMEL
81	662	LRKSPKLLL
82	711	FLAFSLHSDMY
83	713	LAFSLHSDMY
84	728	MYSVIFNIK
85	743	SKFCNHMFFR
86	773	VSQSMSLNY
87	885	AINHFNYTM
88	888	MMHYPTFNW

[0569]

89	957	NETTLINCTY
90	1012	RYQYNTPIYY
91	1049	AVIEAIGAM
92	1064	KTRGTRLFF
93	1069	YLMQHFRDH
94	1106	RTIPVAWDRF
95	1111	LSYMPPNIF
96	1233	RQTMMSIY
97	1248	KTLISEMMHY
98	1253	RTDLNNCVSL
99	1256	KGRINRNY
100	1280	TTNRRILQY
101	1282	ASGGAFCLI
102	1288	KPYVPVGFY
103	1295	HGQLQTFPR
104	1325	VSIPFGERF
105	1345	KLMSALKWPI
106	1348	MSALKWPIEY
107	1437	KANKAFYI
108	1440	ANKAFYINHL
109	1531	FSQAVMEMGY
110	1556	VVFHAGSLY
111	1560	SGRIVTTAI
112	1561	VTTAIKTLL
113	1715	RVYLDGELY
114	1860	AAFNQYIF
115	1865	FMNFDPAHNEY
116	1911	KQFEMFNMVY
117	1929	MDSEFFQPV
118	1952	SRTASSAELY
119	1991	YAANLLTNY

[0570]	120	2021	CGMKNISEI
	121	2049	YLKRLPQFF
	122	2112	IISMMQTAI
	123	2113	ISMMQTAIQK
	124	2136	KNYFRFFKKL
	125	2204	SVEELLSAV

肽选择方法

肽编号	理性	工具
212,394	基于 179 个病毒基因的 8-11 聚体	生物信息学
31,867	1. 预测的结合亲和力(1000nM 以下) 2. 至少一个等位基因覆盖	生物信息学
2,272	1. 热点密度(预测的表位) 2. 来自 5 个等位基因覆盖的至少 3 个 3. 已知的抗原	多肽库
276	来自阳性库的肽	ELISpot 筛选
201	具有允许阈值的阳性肽	ELISpot 筛选
125	具有严格阈值的阳性肽	ELISpot 筛选
77*	具有严格阈值的阳性肽 (>= 20 个斑点)	ELISpot 筛选
18	顶肽	ELISpot 筛选

*鉴定出具有高密度表位区域的七(7)种 ASFV 蛋白

图1

ELISpot 结果- 阳性库分离

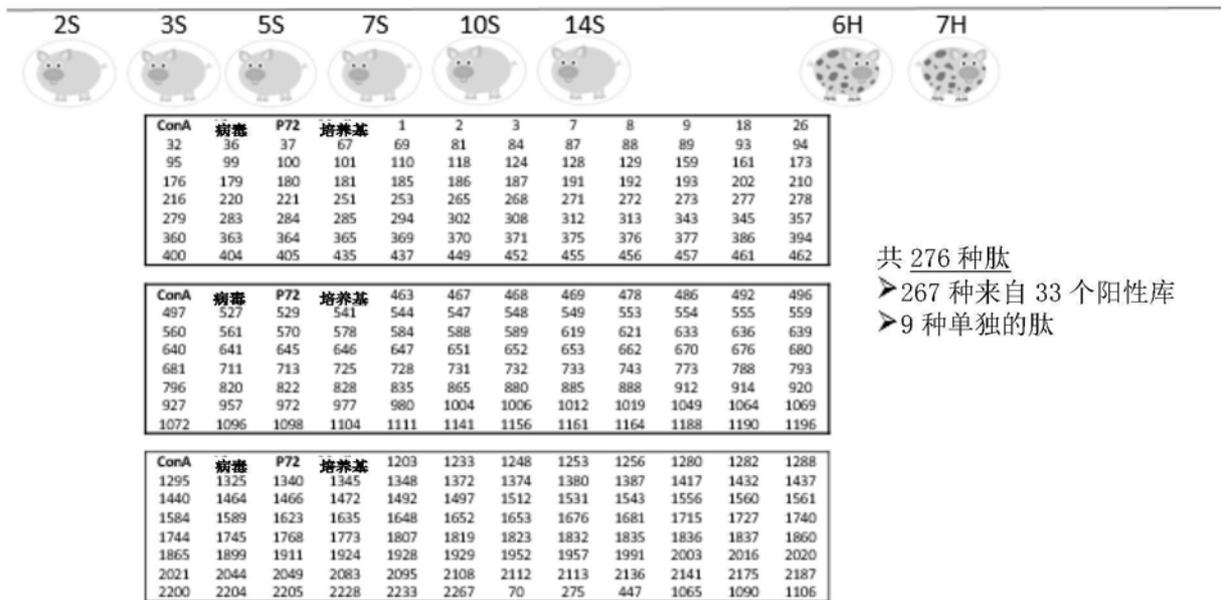


图2

ELISpot 结果- 阳性库分离

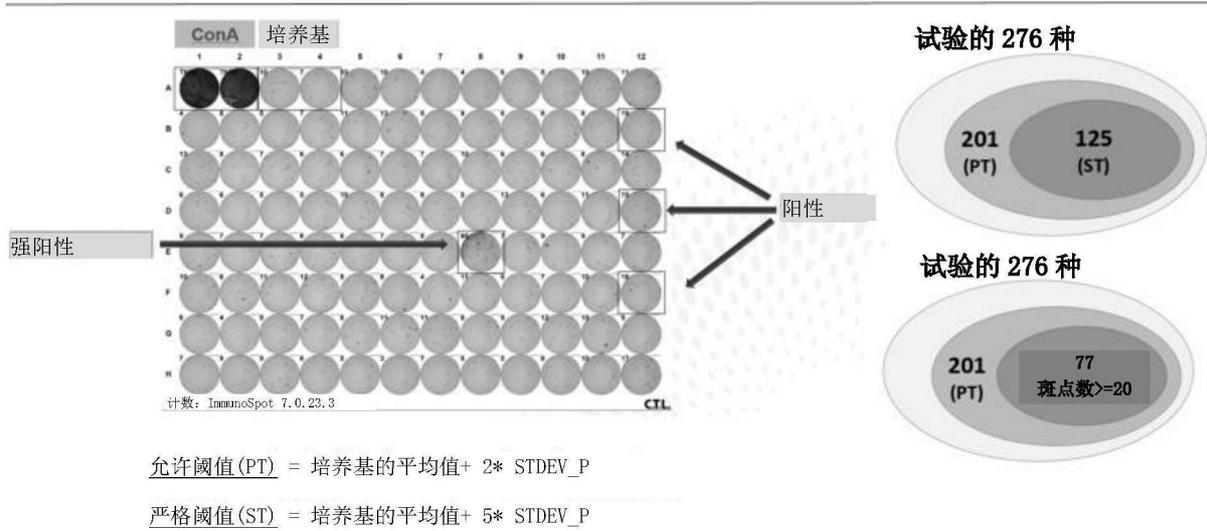


图3

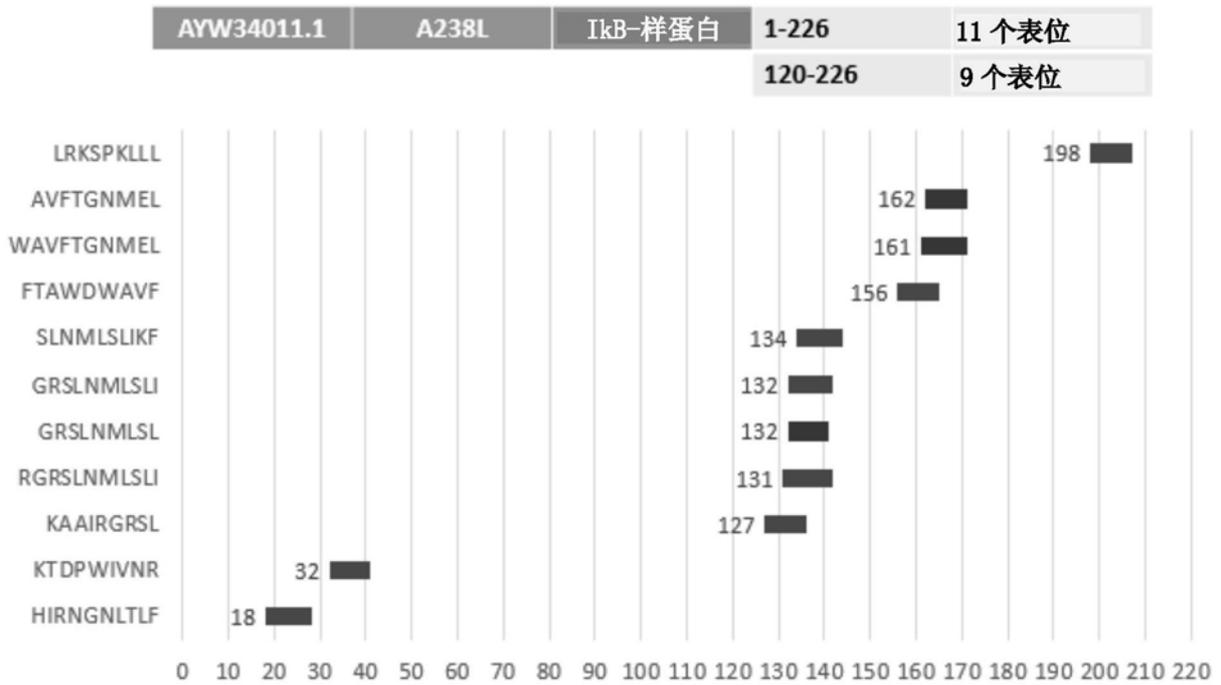


图4

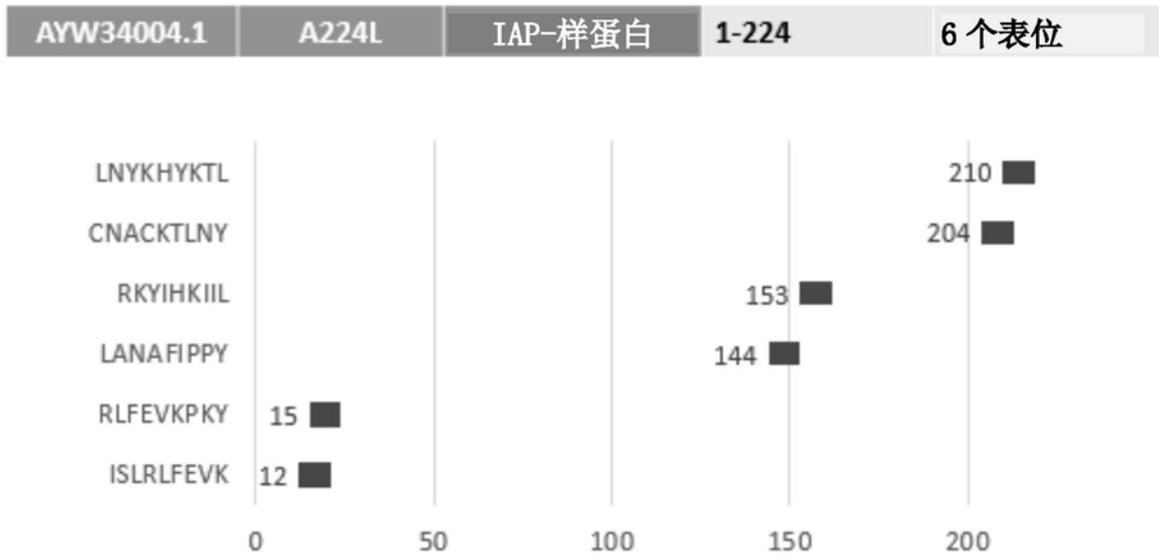


图5

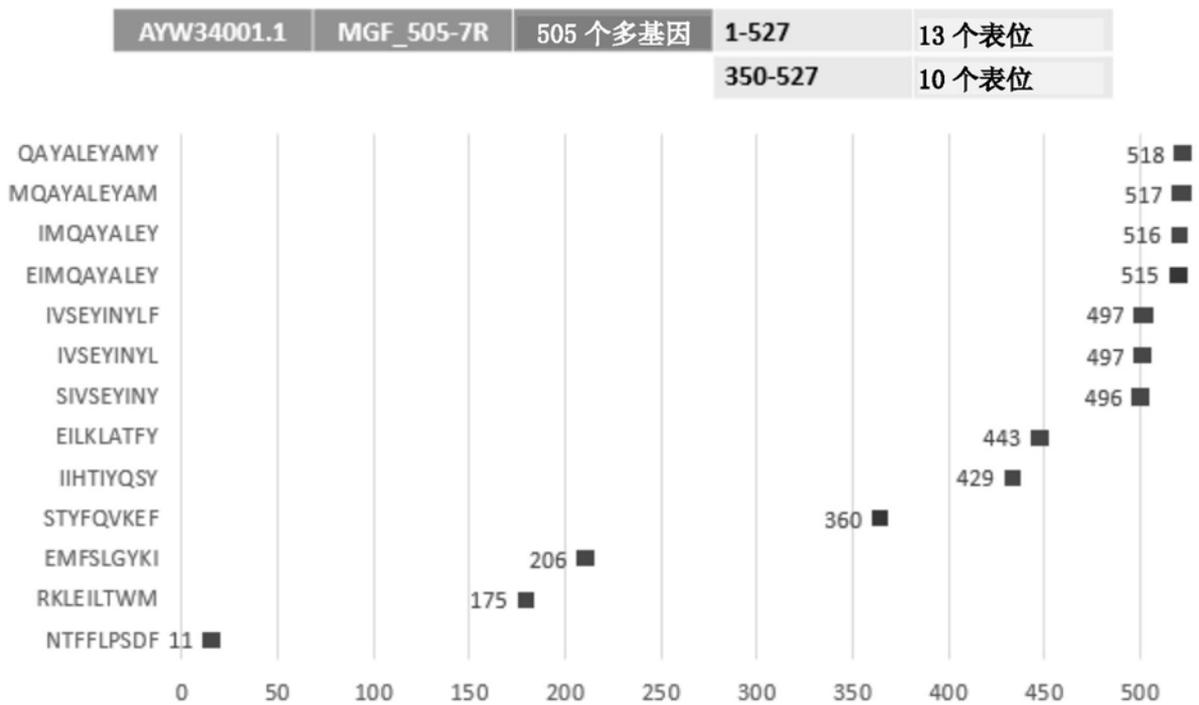


图6

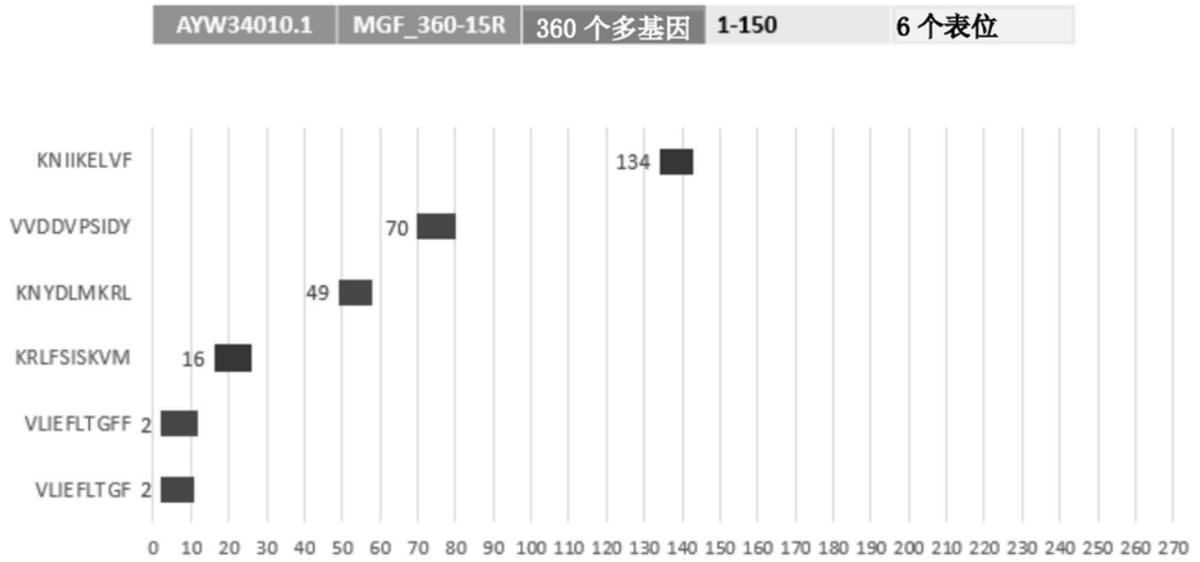


图7

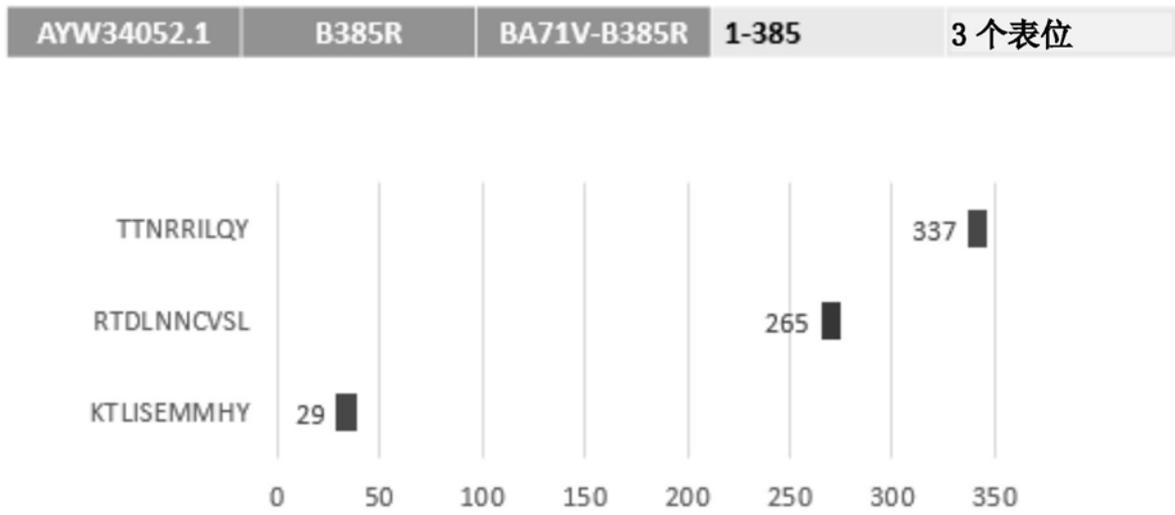


图8

AYW34002.1 **MGF_505-9R** **505 个多基因** **1-506** **3 个表位**

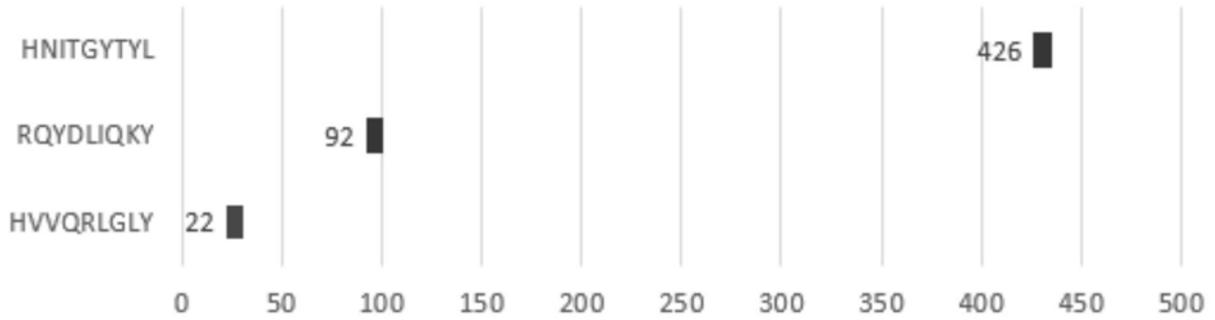


图9

AYW33963.1 **MGF_110-3L** **110 个多基因** **1-124** **2 个表位**

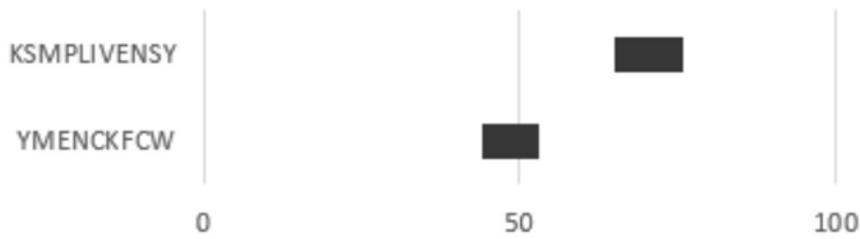


图10

编号	预期的分子量 (kDa)	标签
1	52.6	HLT
2	53.1	Sumo
3	39.85	HLT
4	40.44	Sumo
5	68.75	HLT
6	69.3	His-Sumo
7	69.3	HLT
8	70	His-Sumo
9	79	HLT
10	79.67	Sumo
11	24.2	His
12	33.16	HLT
13	33.75	Sumo
14	66.6	His-MBP

图11

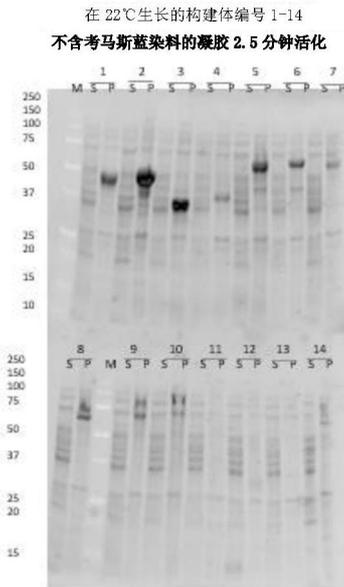


图12

在 22°C 生长的构建体编号 1-14
在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹 (12 秒曝光)

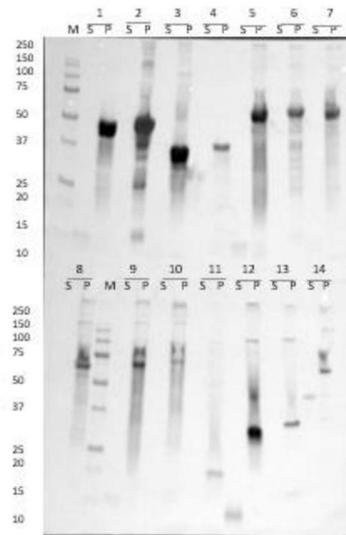


图13

编号	预期的分子量 (kDa)	标签
15	30.4	His
16	39.37	HLT
17	40	His-Sumo
18	72.8	His-MBP
19	29.39	His
20	38.35	HLT
21	39	His-Sumo
22	71.8	His-MBP
23	24.2	His
24	33.1	HLT
25	33.8	His-Sumo
26	66.6	His-MBP
27	30.4	His
28	39.4	HLT

#23 几乎不生长- 裂解 3ml (其它 X2)

图14

在 22℃ 生长的构建体编号 15-28
不含考马斯蓝染料的凝胶 2.5 分钟活化

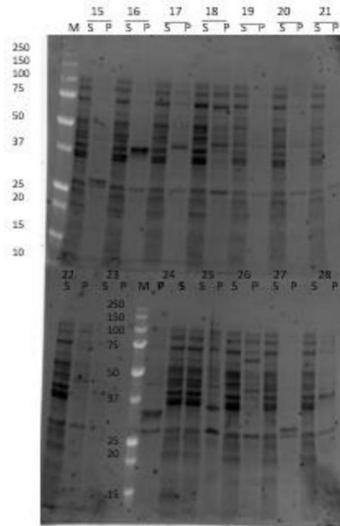


图15

在 22℃ 生长的构建体编号 15-28
 在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹(12 秒曝光)

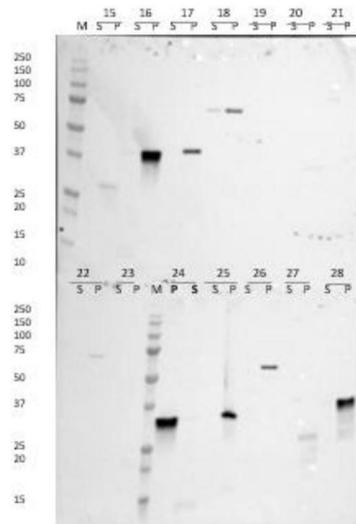
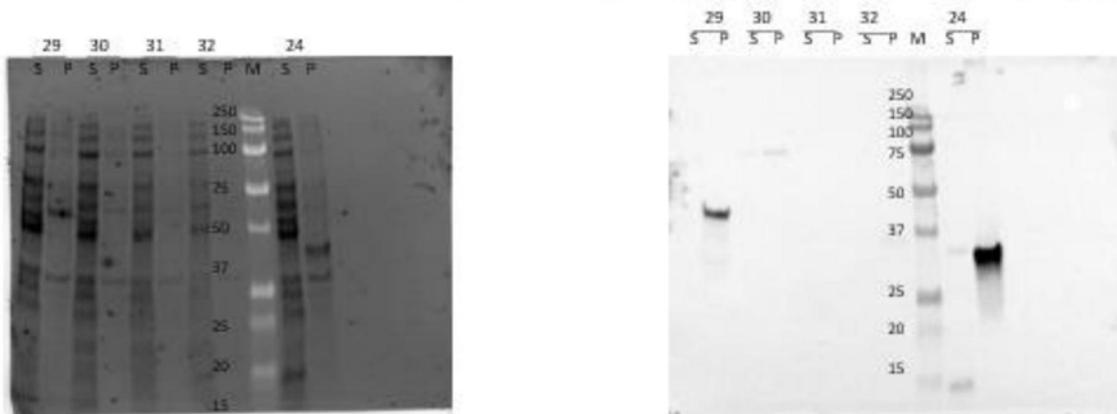


图16

在 22℃ 生长的构建体编号 29-32

不含考马斯蓝染料的凝胶 2.5 分钟活化

在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹(12 秒曝光)



编号	预期的分子量(kDa)	标签
29	40	His-Suma
30	72.8	His-MBP
31	29.4	His
32	38.4	HLT

图17

编号	预期的分子量(kDa)	标签
33	39	His-Sumo
34	71.8	His-MBP
35	46.8	His
36	55.8	HLT
37	56.4	His-Sumo
38	89.9	His
39	98.8	HLT
40	99.4	His-Sumo
41	27.5	HLT
42	75	HLT
43	72.6	HLT
44	40	HLT
45	45	HLT
46	39.5	HLT
47	58.6	HLT

图18

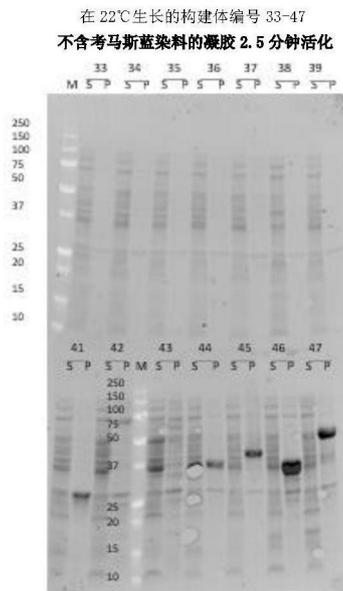


图19

在 22°C 生长的构建体编号 33-47
 在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹 (12 秒曝光)

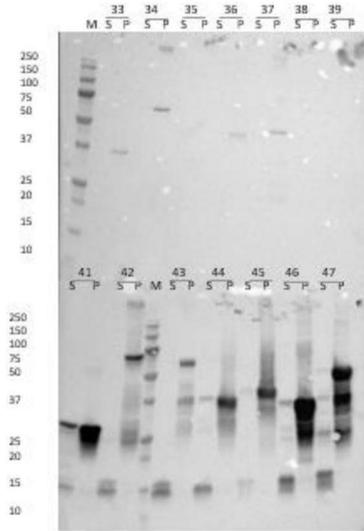
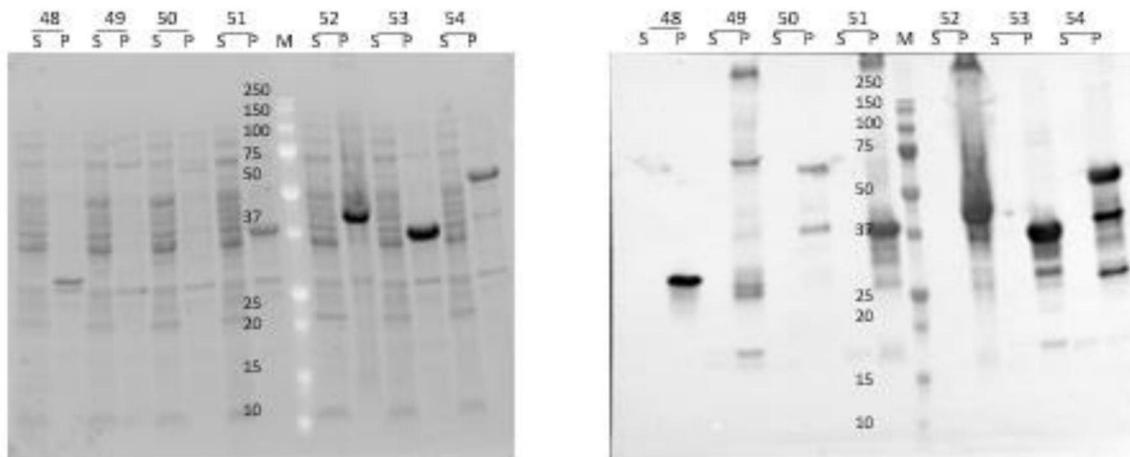


图20

在 22°C 生长的构建体编号 48-54

不含考马斯蓝染料的凝胶 2.5 分钟活化

在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹 (12 秒曝光)



编号	预期的分子量 (kDa)	标签
48	28	His-Sumo
49	75.5	His-Sumo
50	73.2	His-Sumo
51	40.5	His-Sumo
52	45.6	His-Sumo
53	40	His-Sumo
54	59.2	His-Sumo

图21

编号	预期的分子量(kDa)	标签
5	68.75	HLT
6	69.3	His-Sumo
7	69.3	HLT
8	70	His-Sumo
9	79	HLT
10	79.67	Sumo
11	24.2	His
12	33.16	HLT
13	33.75	Sumo
14	66.6	His-MBP

图22

在 37°C 生长的构建体编号 5-14

不含考马斯蓝染料的凝胶 2.5 分钟活化

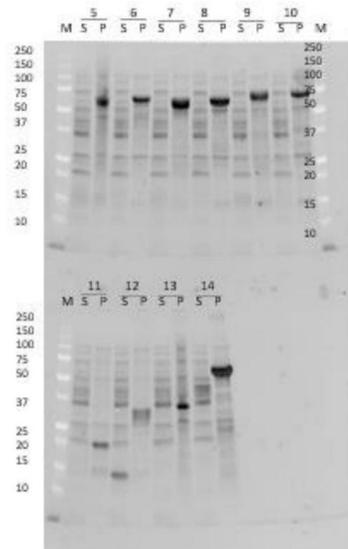


图23

在 37°C 生长的构建体编号 5-14
 在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹 (12 秒曝光)

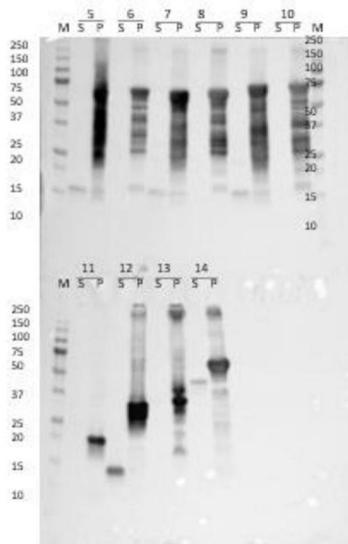


图24

编号	预期的分子量 (kDa)	标签
15	30.4	His
16	39.37	HLT
17	40	His-Sumo
18	72.8	His-MBP
19	29.39	His
20	38.35	HLT
21	39	His-Sumo
22	71.8	His-MBP
23	24.2	His
24	33.1	HLT

图25

在 37°C 生长的构建体编号 15-24
 在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹(12 秒曝光)

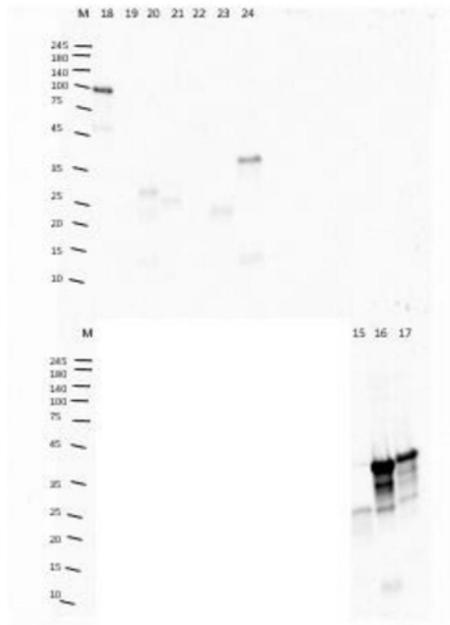


图26

编号	预期的分子量 (kDa)	标签
25	33.8	His-Sumo
26	66.6	His-MBP
27	30.4	His
28	39.4	HLT
29	40	His-Sumo
30	72.8	His-MBP
31	29.4	His
32	38.4	HLT
33	39	His-Sumo
34	71.8	His-MBP
35	48.8	His
36	55.8	HLT
37	56.4	His-Sumo

图27

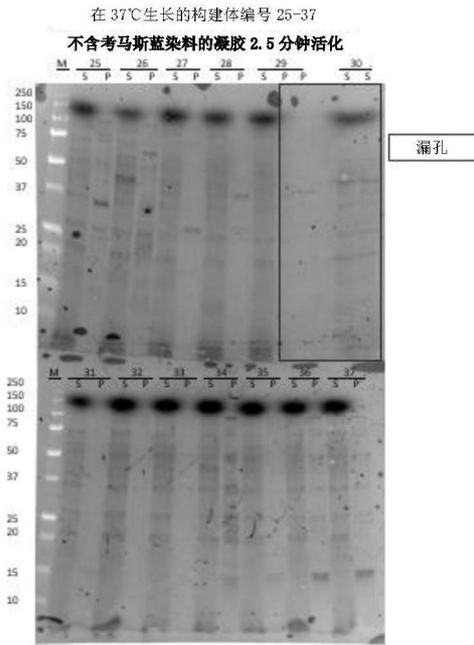


图28

在 37°C 生长的构建体编号 25-37
在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹 (12 秒曝光)

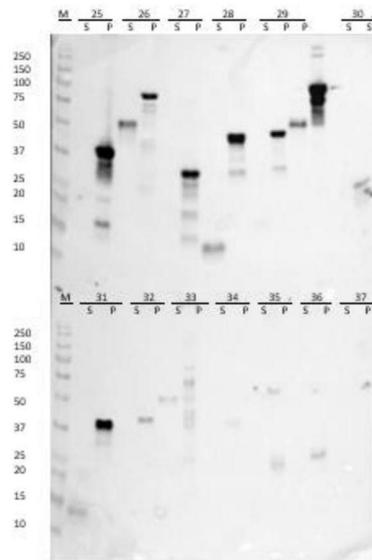


图29

编号	预期的分子量(kDa)	标签
1	52.6	HLT
2	53.1	Sumo
3	39.85	HLT
4	40.44	Sumo
38	89.9	His
39	88.8	HLT
41	27.5	HLT
42	75	HLT
43	72.6	HLT
44	40	HLT
45	45	HLT
46	39.5	HLT
47	58.6	HLT
48	28	His-Sumo

图30

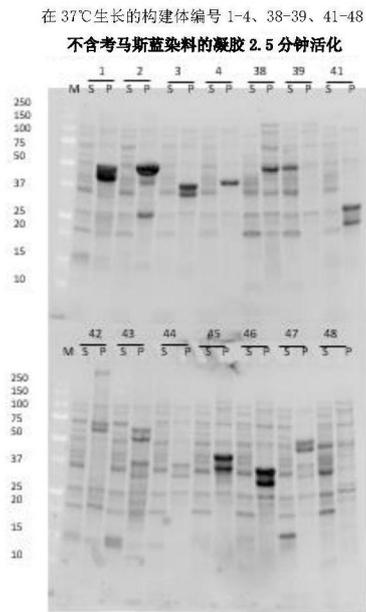


图31

在 37°C 生长的构建体编号 1-4、38-39、41-48
 在裂解物上用小鼠抗 His (1:2000) 的蛋白质印迹 (12 秒曝光)

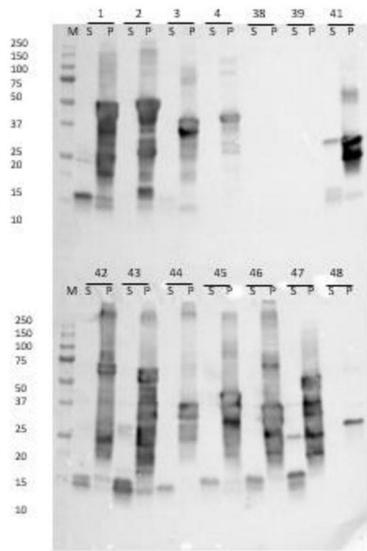


图32

编号	预期的分子量 (kDa)	标签
49	75.5	His-Sumo
50	73.2	His-Sumo
51	40.5	His-Sumo
52	45.6	His-Sumo
53	40	His-Sumo
54	59.2	His-Sumo

图33

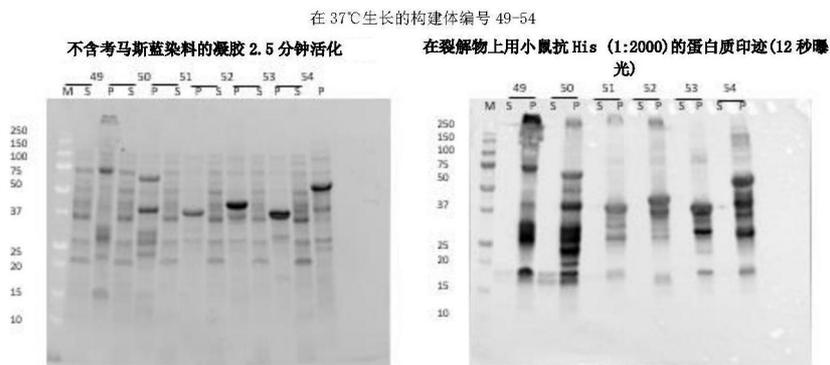


图34