(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105264076 A
(43)申请公布日 2016.01.20

(21)申请号 201480018972.1

(22)申请日 2014.01.28

(30)优先权数据
61/757,538 2013.01.28 US
61/916,784 2013.12.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/013460 2014.01.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/117185 EN 2014.07.31

(71)申请人 堪萨斯州立大学研究基金会
地址 美国堪萨斯州
申请人 美国政府(美国农业部代表)

(72)发明人 乔根·A·里希特 邦恩特·法布瑞
威廉·威尔逊 马文军

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.
C12N 15/40(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C07K 14/175(2006.01)
C07K 16/10(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

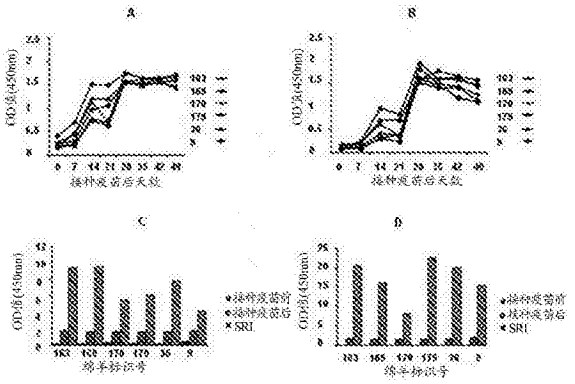
权利要求书2页 说明书33页
序列表10页 附图6页

(54)发明名称

裂谷热病毒糖蛋白GN和GC及其用途

(57)摘要

本发明描述了亚单位疫苗，所述亚单位疫苗包含裂谷热病毒的Gn和Gc糖蛋白，包括编码此类糖蛋白的核酸、宿主细胞、载体和用所述糖蛋白产生的免疫试剂、接种疫苗的方法、诊断的方法和试剂盒。



CN 105264076 A

1. 一种分离的核酸分子，所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:1所列的核苷酸序列，其中所述分离的核酸分子编码基本上由SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6所列的氨基酸序列组成的多肽或蛋白。

2. 如权利要求1所述的分离的核酸分子，其中所述编码的多肽或蛋白在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒(RVFV)的中和抗体。

3. 如权利要求2所述的分离的核酸分子，其中所述分子编码所述编码的多肽或蛋白的功能片段。

4. 如权利要求1所述的分离的核酸分子，其中所述核酸分子选自由以下组成的组：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、其功能片段、和与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5具有至少约90％同源性的序列，其中所述核酸分子编码在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体的多肽或蛋白。

5. 如权利要求1所述的分离的核酸分子，其中所述核酸分子还包含选自由以下组成的组的一种或更多种调控核酸序列：Kozak序列、启动子序列、转录增强子、聚腺苷酸化位点、TATA盒、起始子、CpG岛、启动子近端元件、操纵子，及其组合。

6. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含如权利要求1所述的核酸分子，其中所述宿主细胞选自由以下组成的组：哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、或昆虫细胞。

7. 一种载体，所述载体包含如权利要求1所述的核酸分子，其中所述载体在哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞中发挥作用或在所述细胞之间发挥穿梭功能。

8. 一种分离的蛋白或多肽，所述分离的蛋白或多肽包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6所列的氨基酸序列、与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有至少90％同源性的氨基酸序列、或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的功能片段，其中所述多肽或蛋白不包含跨膜结构域，且其中所述蛋白或多肽在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体。

9. 一种裂谷热病毒(RVFV)特异性免疫试剂，所述裂谷热病毒(RVFV)特异性免疫试剂与如权利要求8所述的分离的多肽或蛋白结合。

10. 如权利要求9所述的RVFV特异性免疫试剂，其中所述免疫试剂选自由以下组成的组：单克隆抗体、来自多克隆血清的抗体、Fab、F(ab')2和Fv片段。

11. 如权利要求10所述的免疫试剂，其中所述单克隆抗体或所述来自多克隆血清的抗体是中和抗体。

12. 包含分离的蛋白或多肽的组合物的用途，所述分离的蛋白或多肽包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6所列的氨基酸序列、与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有至少90％同源性的氨基酸序列，或SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的功能片段，其中所述多肽或蛋白不包含跨膜结构域，且其中所述蛋白或多肽在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体，以产生用于在需要其的受试者中治疗裂谷热的药物。

13. 如权利要求12所述的用途，其中所述受试者是反刍动物。

14. 如权利要求12所述的用途，其中所述组合物还包含佐剂。

15. 如权利要求12所述的用途，其中所述组合物还包含运载体和药物赋形剂。

16. 如权利要求12所述的用途，其中施用是经由肠胃外注射、局部应用或气道表面。

17. 组合物用于诊断受试者中裂谷热(RVF)的用途，包括：

使来自所述受试者的第一样品与第一蛋白或多肽接触，其中所述第一蛋白或多肽是如

权利要求 8 所述的分离的蛋白或多肽 ;

使来自所述受试者的第二样品与包含 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸的蛋白或多肽、与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸具有至少 90％同源性的蛋白或多肽、或包含 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸序列的功能片段接触 ;和

在所述第一和第二样品中检测免疫复合物的形成,

其中免疫复合物在所述第一和第二样品中的检测与 RVF 病毒感染的存在相关。

18. 如权利要求 17 所述的用途,其中免疫复合物仅在所述第一样品中的检测与所述受试者暴露于包含所述第一蛋白或多肽的疫苗相关。

19. 如权利要求 17 所述的用途,其中未能在所述第一或第二样品中检测到免疫复合物与所述受试者没有暴露于 RVF 病毒或包含所述第一蛋白或多肽的疫苗相关。

20. 一种试剂盒,所述试剂盒包括 :

a) 分离的蛋白或多肽,所述分离的蛋白或多肽包含 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列、与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列具有至少 90％同源性的氨基酸序列、或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 所列的氨基酸的功能片段,其中所述多肽或蛋白不包含跨膜结构域,且其中所述蛋白或多肽在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体 ;

b) 第一裂谷热病毒 (RVFV) 特异性免疫试剂,所述第一裂谷热病毒 (RVFV) 特异性免疫试剂与 (a) 的所述分离的多肽或蛋白结合,其中所述免疫试剂选自由以下组成的组 :单克隆抗体、来自多克隆血清的抗体、Fab、F(ab')2 和 Fv 片段 ;

c) 任选地,蛋白或多肽,所述蛋白或多肽包含 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸序列、与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 具有至少 90％同源性的氨基酸序列、或 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸序列的功能片段 ;

d) 任选地,第二 RVFV 特异性免疫试剂,所述第二 RVFV 特异性免疫试剂选自由以下组成的组 :单克隆抗体、来自多克隆血清的抗体、Fab、F(ab')2、和 Fv 片段,所述第二 RVFV 特异性免疫试剂与 (c) 的蛋白或多肽特异地结合 ;

e) 容器 ;

f) 一种或更多种缓冲液 ;和

g) 使用说明。

裂谷热病毒糖蛋白 GN 和 GC 及其用途

[0001] 本研究根据由国土安全部的针对新兴人畜共患动物疾病的卓越中心 (Department of Homeland Security Center of Excellence for Emerging and Zoonotic Animal Diseases) 授予的授权号 2010-ST0-AG0001，在政府支持下做出。政府在本发明中拥有一定的权利。

[0002] 发明背景

发明领域

[0003] 本发明通常涉及免疫试剂，并且更具体地涉及裂谷热病毒 (RVFV) 糖蛋白和它们作为疫苗组分和作为用于疾病诊断和检测的部分的用途，包括使用这样的糖蛋白的方法。

[0004] 背景信息

[0005] 裂谷热病毒 (RVFV) 是蚊子传播的人畜共患病原体，其在牲畜和人类两者中引起高发病率和死亡率。该病毒已在非洲和阿拉伯半岛在反刍动物和人类中引起爆发，并被疾病控制及预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention，CDC) 和美国农业部 (United States Department of Agriculture，USDA) 归类为管制物质 (select agent) 和第三级危险病原体。

[0006] 在反刍类牲畜中，裂谷热 (RVF) 特征在于在幼畜尤其是羔羊中的高死亡率、胎儿畸形和分布广泛的流产风暴；绵羊是最易受影响的，具有初生仔畜死亡率接近 100％。人类感染的特征通常在于良性发热，但在小比例个体中可导致更严重的并发症，诸如视网膜炎、脑炎、神经疾患、肝坏死、或致死性出血热。尽管人类致死性出血病例已在历史上被评价为在感染的个体中的 2％，但致死率已显著增加，在最近几年高达 20％，包括在毛里塔尼亚的最近的爆发。

[0007] 为了保护人类和动物健康，对用于人畜共患病原体包括 RVFV 的灵敏且安全的诊断性测试以及有效的疫苗存在日益增加的需求。RVFV 越过其在非洲的传统的地方性流行界限至阿拉伯半岛的最近传播 (Jupp 和 Cornet1988，Abdo-Salem，等人，2011，Ikegami and Makino 2009) 已导致对 RVFV 疫苗、快速诊断和相关的免疫试剂的增加的兴趣。

[0008] RVFV 属于布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 中的白蛉病毒 (Phlebovirus) 属，所述布尼亚病毒科包括超过 350 种命名的分离株。其具有由小 (S)、中 (M) 和大 (L) RNA 区段组成的负极性的三重单链 RNA 基因组。M 区段编码两个结构性糖蛋白，Gn/Gc，78-kDa 蛋白和非结构性蛋白 NSm；且 S 区段编码核衣壳蛋白 (N) 蛋白和非结构性蛋白 NSs。L 区段编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶。N 和 L 蛋白是病毒 RNA 合成所需的；且 NSs 蛋白是主要毒力因子并且已被证明通过广义转录下调包括抑制 IFN-β 和降解蛋白激酶 R 来抑制宿主转录免疫应答。NSm 蛋白发挥抑制病毒诱导的凋亡的作用。糖蛋白 Gn 和 Gc，是在病毒附着以引发感染中起作用的表面蛋白并已被证明携带引发中和抗体、保护性免疫的相关物的产生的表位。

[0009] 核衣壳 (N) 蛋白是 RVF 病毒粒子的最丰富且高度免疫原性的组分并已被用于开发用于在人类和动物血清中检测 RVFV 特异性抗体的诊断性测定。尽管 N 蛋白被证明在布尼亚病毒科的成员间是高度保守的，先前的基于重组蛋白的间接 ELISA 未显示与其他非洲白

蚊热病毒 (Phleboviruses) 的交叉反应性，所述交叉反应性可妨碍使用该蛋白在用于血清诊断 RVFV 感染的测定中的可靠性。然而，在来自美国和加拿大绵羊的某些血清中，N 蛋白确实显示与未鉴定的物质 (agent) 的血清学交叉反应性。

[0010] 目前，不存在完全批准的 RVFV 疫苗用于在 RVFV 在非洲和阿拉伯半岛中的地方性流行区域范围之外使用。鉴于病毒传播至其他地方，包括美国大陆的潜力，对安全且有效的疫苗存在迫切需求。用于在非地方性流行区域中使用的疫苗所必需的属性包括在易受影响的宿主中的安全性和产生快速（通过初次接种疫苗）保护性免疫应答的能力。目前，在地方性流行区域中，RVFV 使用活的减毒的 Smithburn 毒株或灭活的全病毒被控制在牲畜中。该 Smithburn 疫苗是高度免疫原性的，但在妊娠的绵羊和牛中是致畸的。全病毒福尔马林灭活的疫苗是安全的，但免疫原性较低。处于评价中的其他活疫苗候选物是 Clone 13（被批准用于在南非使用）、来自中非共和国的良性 RVF 病例的自然减毒的分离株、和来源于埃及野生型分离株 ZH548 的化学减毒的病毒 MP12。已在多种动物物种中评价了这些候选疫苗的免疫原性和致病性；且尽管两种疫苗候选物显示有希望的结果，但 MP12 在妊娠最初三个月诱发胎儿畸形。然而，最近的研究报道了，在接种病毒的妊娠母羊中不存在胎儿畸形。开发 RVFV 疫苗的策略包括亚基、DNA、病毒样颗粒、病毒复制子颗粒、病毒载体、使用反向遗传工程化修饰的活疫苗、活的减毒的病毒疫苗和灭活的全病毒疫苗。

[0011] 尽管这些疫苗中的一些已显示有希望的结果，但它们的免疫原性和效力在天然宿主物种中未被确定，也未显示以单次免疫诱导保护性中和抗体滴度。另一方面，活疫苗的产生需要高水平的生物安全性；并且它们的使用与潜在的副作用相关。因此，具有 DIVA 相容性的安全、便宜的疫苗的普遍可用性将对非洲以外的非地方性流行的国家包括美国将是非常有价值的。

[0012] 目前，RVFV 感染的诊断使用多种技术来实现，所述多种技术包括病毒分离、抗原检测、核酸扩增技术、以及 RVFV 特异性抗体的检测。病毒分离的使用不是用户友好的，耗费延长的时间周期，并且对实验室人员还是不安全的；在动物的血液中抗原或核酸的检测仅在宿主病毒血症的情况下有效，所述在动物的血液中抗原或核酸的检测在 RVFV 感染的情况下，是狭窄的病毒血症窗口，持续平均约 3 天。

[0013] 用于检测 RVFV 的抗体的经典方法包括多种形式的病毒中和以及血细胞凝集抑制测试。这些技术的缺点包括对实验室人员的健康风险，以及对它们在 RVF 地方性流行区域范围之外的使用的高生物封存实验室的限制。另一方面，应用 ELISA 检测 RVFV 的 IgG 抗体很大程度上依赖于灭活的全病毒裂解物的使用，其也与潜在的健康风险相关。

[0014] 需要的是，作为针对 RVFV 的有效疫苗的有效的病毒中和抗体应答诱导物，包括可用作用于有效的 RVFV 检测和疾病诊断的部分的免疫试剂。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明公开了在治疗和诊断裂谷热病毒感染中有用的免疫试剂。

[0017] 在实施方案中，公开了分离的核酸分子，所述分离的核酸分子包含如 SEQ ID NO:1 所列的核苷酸序列，其中分离的核酸分子编码基本上由如 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列组成的多肽或蛋白。

[0018] 在一个方面，编码的多肽或蛋白在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒 (RVFV) 的中和抗体。在相关方面，分子编码所述编码的多肽或蛋白的功能片段。

[0019] 在另一个方面，核酸分子包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、其功能片段、和与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:5 具有至少约 90％同源性的序列，其中核酸分子编码在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体的多肽或蛋白。

[0020] 在一个方面，核酸分子还具有一种或更多种调控核酸序列，包括 Kozak 序列、启动子序列、转录增强子、聚腺苷酸化位点、TATA 盒、起始子、CpG 岛、启动子近端元件、操纵子、及其组合。

[0021] 在另一个实施方案中，公开了宿主细胞，所述宿主细胞包含以上核酸，其中宿主细胞包括哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、或昆虫细胞。

[0022] 在实施方案中，公开了载体 (vector)，所述载体包含以上核酸，其中载体在哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞中发挥作用或在细胞之间发挥穿梭功能。

[0023] 在实施方案中，公开了分离的蛋白或多肽，所述分离的蛋白或多肽包含如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列、与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 具有至少 90％同源性的氨基酸序列、或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的功能片段，其中多肽或蛋白不包含跨膜结构域，且其中蛋白或多肽在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体。

[0024] 在一方面，公开了裂谷热病毒 (RVFV) 特异性免疫试剂，所述裂谷热病毒 (RVFV) 特异性免疫试剂与以上分离的多肽或蛋白结合。在相关方面，免疫试剂包括单克隆抗体、来自多克隆血清的抗体、Fab、F(ab')2、和 Fv 片段。在另外的相关方面，单克隆抗体或来自多克隆血清的抗体是中和抗体。

[0025] 在实施方案中，公开了在需要其的受试者中接种疫苗的方法，所述方法包括施用免疫原性有效量的组合物，所述组合物包含分离的蛋白或多肽，所述分离的蛋白或多肽包含如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列、与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 具有至少 90％同源性的氨基酸序列、或 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 的功能片段，其中所述多肽或蛋白不包含跨膜结构域，且其中所述蛋白或多肽在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体。在相关方面，受试者是反刍动物。在另一个相关方面，组合物还包含佐剂。在另一个相关方面，组合物还包含运载体 (carrier) 和药物赋形剂。在另外的相关方面，施用经由肠胃外注射、局部应用或气道表面。

[0026] 在另一个实施方案中，公开了一种用于诊断受试者中裂谷热 (RVF) 的方法，所述方法包括使来自受试者的第一样品与第一蛋白或多肽接触，其中第一蛋白或多肽是以上分离的蛋白或多肽；使来自受试者的第二样品与包含如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸的第二蛋白或多肽、与如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸具有至少 90％同源性的蛋白或多肽、或包含如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸序列的功能片段接触；和在第一和第二样品中检测免疫复合物的形成，其中免疫复合物在第一和第二样品中的检测与 RVF 病毒感染的存在相关。

[0027] 在一个方面，免疫复合物仅在第一样品中的检测与受试者暴露于包含第一蛋白或多肽的疫苗相关。在另一个方面，未能在第一或第二样品中检测到免疫复合物与受试者没有暴露于 RVF 病毒或包含第一蛋白或多肽的疫苗相关。

[0028] 在实施方案中，公开了试剂盒，所述试剂盒包括分离的蛋白或多肽，所述分离的蛋白或多肽包含如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列、与如 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:6 所列的氨基酸序列具有至少 90％同源性的氨基酸序列、或如 SEQ ID NO:4 或 SEQ

ID NO:6 所列的氨基酸的功能片段，其中多肽或蛋白不包含跨膜结构域，且其中蛋白或多肽在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体；第一裂谷热病毒 (RVFV) 特异性免疫试剂，所述第一裂谷热病毒 (RVFV) 特异性免疫试剂与以上分离的多肽或蛋白结合，其中免疫试剂包括单克隆抗体、来自多克隆血清的抗体、Fab、F(ab')2、和 Fv 片段；任选地，第二蛋白或多肽，所述第二蛋白或多肽包含如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸序列，与 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 具有至少 90％同源性的氨基酸序列，或如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:10 所列的氨基酸序列的功能片段；任选地，第二 RVFV 特异性免疫试剂，所述第二 RVFV 特异性免疫试剂包括单克隆抗体、来自多克隆血清的抗体、Fab、F(ab')2、和 Fv 片段，所述第二 RVFV 特异性免疫试剂特异地结合第二蛋白或多肽；容器；一种或更多种缓冲液；和使用说明。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 示出了杆状病毒表达的裂谷热病毒蛋白的电泳图。将蛋白纯化并使用抗 His(C- 末端)HRP 单克隆抗体进行检测。Gn ＝ 54kDa；Gc ＝ 60kDa；NSs ＝ 34kDa；N ＝ 31kDa；NSm ＝ 14kDa；M ＝标志物 (A)。将分别针对 N 和 Gn 的单克隆抗体 IDE8 和 4D4 用于证实各蛋白的表达 (B)。纯化的蛋白的考马斯蓝染色 (C)。N ＝核蛋白；NSs ＝非结构蛋白 S 区段；NSm ＝非结构蛋白 m 区段；Gn ＝ N- 末端糖蛋白；Gc ＝ C- 末端糖蛋白；M ＝分子量标志物。

[0031] 图 2 示出了免疫荧光抗体测定的结果，证实了重组蛋白 Gn 和 N 在 Sf9 细胞中的表达。将单克隆抗体 4D4 和 ID8 分别用于检测 Gn 和 N 的表达。观察到在表达 Gn 的细胞的细胞核周围的特异性绿色荧光信号，指示了重组蛋白在细胞内分泌。对照 (Gn) 或抗 N 对照示出了阴性染色，所述对照 (Gn) ＝用 Gn 单克隆抗体 (4D4) 染色的未感染的 Sf9 细胞；所述抗 N 对照＝用 N 单克隆抗体 (ID8) 染色的未感染的 Sf9 细胞。细胞核染为蓝色。

[0032] 图 3 示出了裂谷热糖蛋白，Gc 和 Gn 的体外 (in virtro) 糖基化测定的结果。(A) Gc 重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞用不同浓度的衣霉素 (0.5pg/ml-10pg/ml) 的处理导致糖基化的抑制，其通过在电泳迁移中的位移示出。(B)Gn 的类似处理 (8pg/ml 和 10pg/ml) 导致边际分子量位移 (与未处理的 nt 比较)，由于该蛋白具有一个推定的 N- 糖基化位点；Gc 具有 4 个推定的 N 糖基化位点。表达绵羊朊病毒蛋白 (PrP) 的杆状病毒用不同浓度的衣霉素 (1μg/ml-10pg/ml) 的处理导致蛋白的糖基化的抑制 (C)。nt ＝未处理的对照；m ＝分子量标志物。

[0033] 图 4 示出了蛋白印迹，显示表达具有来自绵羊的 RVFV 抗血清的蛋白的纯化的杆状病毒的免疫反应性。反应性表明，该蛋白以正确的构象被表达。Gn ＝ N- 末端糖蛋白；N ＝核蛋白；NSs ＝非结构蛋白 S 区段；Gc ＝ C- 末端糖蛋白；CL ＝未感染的细胞裂解物；m ＝分子量标志物；pv ＝接种疫苗后；pi ＝感染后。

[0034] 图 5 示出了重组 RVFV 蛋白、核蛋白 N(A)、非结构蛋白 NSs(B)、糖蛋白 Gn(C)、糖蛋白 Gc(D) 和具有来自接种 MP12 的绵羊的抗血清的非结构蛋白 NSm(E) 的反应性。第 0 天是接种疫苗前血清；PC ＝来源于用 RVFV 野生型 ZH501 攻击的绵羊的阳性对照血清；P1-P6 是来自用 MP12RVFV 毒株 (Laramie,WY) 接种的绵羊的第 28 天血清；P7-P10 是来自用野生型病毒 (ZH501) 感染的绵羊的第 28 天血清。星号 (*) 指示统计学显著性水平，并表明对每个时间点进行测试的血清的 OD 值中的差异显著不同 (P<0.05) 于第 0 天 (接种疫苗前) 血清。每个 ELISA 的临界 (cut-off)OD 值通过从接种前 / 未感染的绵羊获得的血清的平均 OD 值的

加上 2 个标准差来确定 (N = 0.320 ;NSs = 0.358 ;Gn = 0.395 ;Gc = 0.387 ;NSm = 0.208。

[0035] 图 6 示出了从用重组 RVFV Gn 和 Gc 蛋白接种的绵羊获得的抗血清的免疫反应性。存在免疫血清与 Gn 和 Gc 的特异性反应性，对于绵羊 169 号、170 号、163 号分别（箭头）示出了估计的 52kDa 和 60kDa 条带。重组 RVFV N 蛋白未显示与任何免疫血清的特异性反应性。阳性对照显示了重组 N 蛋白与从用 MP12RVFV 毒株感染的绵羊获得的抗血清的特异性反应性 (31kDa)。

[0036] 图 7 示出了通过抗原特异性间接 ELISA，Gn-ELISA(A) 和 Gc-ELISA(B) 分析疫苗诱导的 IgG 宿主抗体应答描述了特异性抗体滴度中的时间依赖性增加。使用采血前的血清对比第 28 天 pv 血清分析血清反应性指数 (SRI)，显示了特异性抗体滴度的显著增加 (P<0.05)，其通过 Gn-ELISA(C) 和 Gc-ELISA(D) 两者中的高 SRI 值证明。Prevac ＝接种疫苗前血清 ;postvac ＝接种疫苗后血清 ;SRI ＝血清反应性指数。Gn-ELISA 中对于个体绵羊的临界值 :163 号＝ 0.354 ;169 号＝ 0.167 ;170 号＝ 0.507 ;179 号＝ 0.365 ;36 号＝ 0.252 ;9 号＝ 0.668。Gc-ELISA 中的临界值 :163 号＝ 0.215 ;169 号＝ 0.151 ;170 号＝ 0.309 ;179 号＝ 0.104 ;36 号＝ 0.7135 ;9 号＝ 0.259。如在材料和方法中所述的，确定每只绵羊的临界值。

[0037] 图 8 示出了间接 IgG ELISA，显示 RVFV 抗 Gn 和抗 N 抗体在接种的绵羊中的应答。A) 血清与 Gn 抗原的反应性指示抗体应答中的时间依赖性增加，然而，在 N-ELISA 中，在所有时间点，对于从测试的三只绵羊，169N 号、163N 号和 170N 号获得的全部血清，反应性保持在接种疫苗前的基线水平。B) 将从用基于糖蛋白的亚单位疫苗接种的绵羊获得的血清的反应性与从 RVFV MP12 感染的绵羊获得的血清的反应性，阳性对照血清 (PC) 的反应性进行比较。N 抗原仅与阳性对照血清明确地反应，其通过高的平均 OD 值指示 ;从 169 号绵羊获得第 0 天至第 49 天血清。Gn-ELISA 中对于个体绵羊的临界值 :163 号＝ 0.354 ;169 号＝ 0.167 ;170 号＝ 0.507 ;179 号＝ 0.365 ;36 号＝ 0.252 ;9 号＝ 0.668。N-ELISA 中对于测试的个体绵羊的临界值 :169N 号＝ 0.288 ;163N 号＝ 0.237 ;170N 号＝ 0.212。如在材料和方法中所述的，确定每只绵羊的临界值。

[0038] 图 9 示出了蚀斑减少中和测试 (PRNT80)，显示阴性 (A) 和阳性 (B) 结果。中和抗体滴度的保护性水平（≥ 1:40) 在接种疫苗后 2 周内在动物中是可检测的。在施用第二次疫苗剂量后，在所有动物中检测到中和抗体应答中的显著增加 (C)。

[0039] 图 10 示出了用于接种绵羊的纯化的重组 RVFV 蛋白的电子显微图。Gn、Gc 和重构的 GnGc 显示为在结构上与 RVF VLP 不同的蛋白聚集体的团块。

[0040] 图 11 示出了使用 ISA25、ISA206、ISA206-InAc 和 ISA-206InAc-hisTag 佐剂通过抗原特异性间接 ELISA 分析针对 Gn 的疫苗诱导的 IgG 宿主抗体应答。

[0041] 图 12 示出了使用 ISA25、ISA206、ISA206-InAc 和 ISA-206InAc-hisTag 佐剂通过抗原特异性间接 ELISA 分析针对 Gc 的疫苗诱导的 IgG 宿主抗体应答。

[0042] 发明详述

[0043] 在描述本组合物、方法和方法论之前，要理解本发明不限于所描述的特定组合物、方法和实验条件，如此组合物、方法和条件可变化。还要理解本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的，且并非旨在限制，因为本发明的范围将仅在所附的权利要求书中被限制。

[0044] 除非上下文另外清楚地指明，否则如该说明书和所附的权利要求书中使用的单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”包括复数指示物。因此，例如，提及“一个 (a) 核酸”包括一个或更多个核酸、和 / 或本文讨论的类型的多种组成，其对本领域技术人员而言在阅读本公开内容等后将是明显的。

[0045] 除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。与本文所描述的那些方法和材料相似或等价的的任何方法和材料可被用于本发明的实践或测试，如将理解，修改和变化被包括在本公开内容的精神和范围内。

[0046] 如本文所用，“约”、“大约”、“基本上”和“显著地”将被本领域普通技术人员理解，并将依据于其中它们被使用的上下文而在一定程度上变化。如果存在对于本领域普通技术人员考虑其中术语被使用的上下文不清楚的术语的使用，则“约”和“大约”将意指特定术语的正或负 <10％，且“基本上”和“显著地”将意指特定术语的正或负 >10％。

[0047] 术语“分离的”当关于核酸或氨基酸使用时，指从在其天然环境中核酸或氨基酸通常与之缔合的至少一种污染物核酸鉴定并分离的序列。即，分离的核酸是以不同于在自然界中它被发现的形式或环境存在的核酸。分离的序列还包括已被修饰（例如，经由添加或缺失）和合成 / 表达的序列。

[0048] 关于 RVFV 核酸和蛋白，提及“功能特性”是指序列的免疫原性和 / 或抗原性。

[0049] 术语“片段”、“衍生物”和“同源物”当提及根据本发明的多肽时，意指基本上保留与所述多肽相同的生物学功能或活性，即，充当抗原决定簇和 / 或提供 RVFV 感染的治疗和 / 或免受其感染的多肽。此类片段、衍生物和同源物可基于保留 RVFV 多肽的一种或更多种生物活性，即，充当抗原决定簇和 / 或提供 RVFV 感染的治疗和 / 或免受其感染的能力来选择。本发明的多肽疫苗可以是重组多肽、天然多肽或合成的多肽。

[0050] 除非另有指明，否则“抗原决定簇”是能够在特定动物或物种中引发免疫应答的分子。抗原决定簇包括蛋白性分子，即，聚氨基酸序列、多肽、片段、衍生物或可包括其他部分例如碳水化合物部分的变体，所述碳水化合物部分诸如葡聚糖，和 / 或脂质部分。

[0051] 如本文所用的“N”是指 RVFV 的核衣壳蛋白或多肽。如本文所用的术语“N”还包括可提供与 RVFV 毒株的交叉反应性的片段、其衍生物或同源物。如本文公开的序列由 SEQ ID NO:8 表示。NSs 和 NSm 代表两种非结构蛋白，并分别被表示为 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10。

[0052] 如本文所用的“Gn”是指 RVFV 的结构蛋白，其包含 C 末端高尔基体定位信号。如本文所用的术语“Gn”还包括可提供与 RVFV 毒株的交叉反应性并在本文被表示为 SEQ ID NO:4 的片段、其衍生物或同源物。

[0053] 如本文所用的术语“Gc”是指携带基于 C 末端赖氨酸的 ER 滞留信号并在本文被表示为 SEQ ID NO:6 的 RVFV 的蛋白。

[0054] 如本文所用，Gn 蛋白的胞外域具有大约 54kDa 的 Mw。另外，作为本公开内容的一部分的是包含导致该蛋白的糖基化的 Gn 的胞外域的序列的修饰（参见 SEQ ID NO:4）。例如，Gn 与 Gc 的融合将形成包含另外的糖基化位点的融合多肽。

[0055] 如文本公开的 Gn 的跨膜结构域和胞质尾区通过 SEQ ID NO:7 所示的核酸序列来表示。

[0056] 如本文所用，“基本由 . . . 组成”意指包含特定组分和不实质上影响组合物的基本和新颖特性的那些组分（例如，在多肽或蛋白的末端处添加 (His)n 氨基酸，其中 n 是从 1 至 6 的整数，将表示基本由多肽或蛋白组成的组合物）。

[0057] 如本文所用，“初级剂量”意指免疫试剂（例如，抗原或疫苗）向受试者的第一次施用，与次级剂量或“加强”剂量相对，其中后者是在初级剂量后疫苗的另外的施用。例如，在接种疫苗后的最初 14 天内产生的中和抗体将与初级剂量相关。

[0058] 如本文所用，“裂谷热病毒特异性免疫试剂”意指特异性地与 RFVF 病毒组分结合并显示出与非 RVFV 病毒组分基本上没有交叉反应性的蛋白性部分。

[0059] 短语“生物样品”是指通常包含抗体或病毒颗粒的哺乳动物（例如，反刍动物，诸如牛、山羊、绵羊、长颈鹿、牦牛、鹿、骆驼、美洲驼、羚羊，等）的体液或组织。此类组分是本领域已知的，并且包括但不限于血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、呼吸道、肠道或泌尿生殖道的分泌物、眼泪、唾液、乳汁、白血细胞和骨髓瘤。

[0060] 如本文所用，“ADP”意指包含抗原决定簇的多肽（例如，RVFV 的 N、Gn、Gc、NSs 或 NSm）。

[0061] 如本文所用，“抗体”被定义在与本领域中公认的术语一致的术语中：它们是由响应抗原攻击的哺乳动物生物体产生的多亚基蛋白。本发明的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体，以及此类抗体的片段，包括但不限于 Fab 或 F(ab')2 和 Fv 片段。

[0062] 如本文所用，术语“亚基”指是自身抗原性的，即，能够在动物中诱导免疫应答的 RVFV 的一部分。术语应该被解释为包括通过重组和生物化学方法两者获得的亚基。

[0063] 如本文所用，术语“多价”意指包含来自 RVFV 的多于一种分离株的疫苗，所述多于一种分离株来自相同物种（即，RVFV 的不同分离株）或来自不同的 RVFV。即使对于给定的属和物种的 RVFV，每个分离株可与其他分离株共享一些抗原（即，“共同”抗原），而其他抗原对于该分离株将是独特的。因为多价疫苗为宿主的免疫系统提供了更多种类的抗原，所以在宿主中刺激的免疫应答比仅由单个分离株刺激的免疫应答更广泛。

[0064] 如本文所用，术语“分离株”是指从特定来源获得的病毒。分离株与术语“毒株”可互换使用。

[0065] 如本文所用，术语“毒性的”是指在动物宿主中保留其感染性的能力的分离株。

[0066] 如本文所用，术语“灭活的”意指包含不再能够复制和 / 或生长的感染性生物体的疫苗。

[0067] 如本文所用，如本文所用的术语 "RVFV" 是指属于布尼亚病毒科中的白蛉病毒属的 RVFV 物种的所有病毒。

[0068] 如本文所用，如本文所用的术语“疫苗”是指包含在动物中诱导免疫应答的至少一种免疫抗原决定簇，和增强所述决定簇的免疫活性的可能但不必需的一种或更多种另外的组分的药物组合物。疫苗可另外地包含对于药物组合物典型的另外的组分。疫苗的免疫活性组分可包括为其原始形式的或在所谓的修饰的活疫苗中作为减弱病毒的完整活病毒或在所谓的死疫苗中通过适当方法灭活的病毒。在另一种形式中，疫苗的免疫活性组分可包括所述病毒的适当的元件（亚单位疫苗），其中这些元件通过以下来生成：破坏此类病毒的整个生物体或生长培养物并在随后的纯化步骤产生期望的结构；或通过适当操作合适的系统诸如但不限于细菌、昆虫、哺乳动物或其他物种诱导的合成过程，加上随后的分离

和纯化程序；或通过利用合适的药物组合物（多核苷酸接种疫苗）直接并入遗传材料来在需要疫苗的动物中诱导所述合成步骤。疫苗可包含一种或同时多于一种的以上所述的元件。在实施方案中，疫苗可包含来自表达亚基的宿主细胞的组分。在一个方面，疫苗可包含来自裂解物的 Sf9 组分。在相关方面，由 _____ 保藏号 _____ 表示的草地贪夜蛾 (Spodoptera frugiperda)(Sf9) 细胞系被用来产生 Gn 蛋白，所述细胞系基于布达佩斯条约关于 _____ 的条款以 _____，_____ 保藏。在另外的相关方面，由 _____ 保藏号 _____ 表示的草地贪夜蛾 (Sf9) 细胞系被用来产生 Gc 蛋白，所述细胞系基于布达佩斯条约关于 _____ 的条款以 _____，_____ 保藏。在另一个相关方面，由 _____ 保藏号 _____ 表示的草地贪夜蛾 (Sf9) 细胞系被用来产生 N 蛋白，所述细胞系基于布达佩斯条约关于 _____ 的条款以 _____，_____ 保藏。

[0069] 如本文所用的“保护 (protecting)”、“保护 (protection)”、“保护性免疫”或“保护性免疫应答”意图指宿主反刍动物发动对本公开内容的疫苗或多肽的主动免疫应答，以使得在随后暴露于病毒或毒性病毒攻击后，反刍动物能够对抗感染。因此，保护性免疫应答将在宿主反刍动物之中减少由于随后暴露于病毒导致的发病和致死的发生率。本领域技术人员将理解，在商业的反刍动物环境中，保护性免疫应答的产生可通过评价接种疫苗对作为整体的畜群的效应来评价，例如，在少数的接种疫苗反刍动物中可仍存在发病率和死亡率。

[0070] 如本文所用，术语“活病毒”是指保留感染适当的受试者的能力的病毒，（与灭活（死）疫苗或亚单位疫苗相对）。

[0071] 如本文所用，“免疫原性有效量”是指在减少、消除、治疗、预防或控制 RVFV 感染、疾病、紊乱或状况的症状上有效的量。

[0072] RVF 爆发在非洲和阿拉伯半岛的影响，和病毒传播至非地方性流行区域的潜在可能使开发安全并有效的疫苗变的迫切。RVFV 是用于通过动物接种疫苗预防牲畜和人类两者的疾病的一体化健康关注方法 (one-health focused approach) 的唯一合适的候选者。但是尽管存在许多潜在的候选疫苗，目前在地方性流行区域之外没有足够的得到的许可的疫苗用于人类或牲畜使用。用于人类或牲畜使用的 RVFV 疫苗的基本属性包括安全性和高免疫原性，和在易感宿主物种中用单次接种疫苗在施用的至多两周内诱导保护性应答的快速起始的能力；以及，另外，应该是 DIVA 相容的。

[0073] 在本文中，公开了基于杆状病毒表达的重组 RVFV Gn 和 Gc 糖蛋白的候选疫苗在目标物种绵羊中的免疫原性。Gn 和 Gc 作为糖基化蛋白在 RVF 病毒颗粒的表面上展示，并已显示出携带引发中和抗体 - 针对病毒感染的保护性免疫的唯一确定的相关物 (correlate) 的表位。

[0074] Gn 和 Gc 还被病毒用来附着至靶细胞。因此，这些表面糖蛋白代表了疫苗开发的理想靶；并且，不被理论所束缚，靶向两种结构糖蛋白上的表位的抗体可产生有效的病毒中和效应。

[0075] 在实施方案中，疫苗免疫原 Gn 和 Gc 可使用被设计为在其 N 末端处包含信号肽、包含唯一的信号肽裂解位点的表达构建体来产生，所述唯一的信号肽裂解位点确保 (a) 通过转位进入 ER 和细胞糖基化途径加工和 (b) 增强蛋白表达。

[0076] 例如，如本文所示，绵羊用纯化的杆状病毒表达的用 montanide ISA25 佐剂化的 Gn 和 Gc 蛋白进行免疫，导致在所有接种的动物中产生强的病毒中和抗体应答。在六只动物中的五只中，以单次接种疫苗，在接种疫苗后两周内，疫苗诱导保护性（即≥ 1:40）病毒中和滴度。这些结果与最近报道的使用以下的接种疫苗的成果比较从优：基于 RVFV 糖蛋白诸如 GnGc-VLP 和 Gn- 胞外域的疫苗以及新城病 (Newcastle Disease) 病毒的装载 (vectored) 的疫苗 (NDFL-GnGc) 和已显示在免疫的动物中引发中和抗体的病毒复制子颗粒。例如，由 GnGc-VLP 和 Gn- 胞外域疫苗诱导的中和抗体的结果是基于小鼠模型，其中 Gn- 胞外域疫苗需要两次接种疫苗以诱导血清转化。Gn- 胞外域在接种疫苗后约三周时在六只绵羊中的仅四只中引发中和抗体；相似地，NDFL-GnGc 也需要两次接种疫苗以诱导中和抗体。相比之下，如本文公开的基于 GnGc 的重组蛋白疫苗在接种疫苗的两周内在 80％ (5/6) 的绵羊中诱导保护性中和抗体滴度并且在接种疫苗后三周时在 100％ (6/6) 的绵羊中诱导保护性中和抗体滴度。

[0077] 然而不被理论所束缚，由如本文公开的 RVFV 疫苗引发的稳健的中和抗体应答可归因于 Gn 和 Gc 蛋白作为疫苗免疫原的并存使用。已知 Gn 包含病毒中和表位；但是，建议在疫苗中包含 Gc 以提供另外的靶用于中和抗体。重要地，中和抗体滴度在加强剂量后在所有动物中剧烈增加；而且，该高回忆应答在所有动物中维持持续超过三周。如本文所公开，早发性疫苗诱导的 IgG 抗体对 Gn 的应答在接种疫苗后七天内在一半的绵羊中发生，随后在接种疫苗后两周时在 100％的动物中对 Gn 和 Gc 两者血清转化。加在一起，这些结果支持以下结论：基于 RVFV 重组 GnGc 糖蛋白的候选疫苗是高度免疫原性的，在最易受 RVFV 感染的目标物种绵羊中引起强的免疫应答。

[0078] 在 RVF 疾病爆发期间区分受感染的动物和疫苗的动物 (DIVA) 对于基本流行病学是重要的。因此，在当疫苗，特别用于在非 RVFV 地方性流行区域的国家或地区中使用时，疫苗的 DIVA 相容性和伴随的诊断测试代表了要考虑的重要因素。使用 RVFV 糖蛋白和核衣壳蛋白作为诊断抗原，将绵羊中的疫苗诱导的抗体应答与 RVFV MP12 感染区分开是可能的。畜牧业国际贸易的增加加上在非地方性流行区域的 RVFV 爆发的潜在可能提供了开发 DIVA 疫苗的强有力动机。在候选疫苗中核蛋白的不存在提供使用重组 N 和 Gn/Gc ELISA 开发 DIVA 疫苗和伴随的诊断测定 (companion diagnostic assay)。

[0079] 因为 N 蛋白是最丰富的病毒蛋白并且是高免疫原性的，在感染后第一天内诱导抗体，所以 N 蛋白代表了合适的诊断抗原。此外，如所公开的重组 GnGc 糖蛋白亚单位疫苗在天然宿主中引起强的中和和 IgG 抗体应答，其可通过 ELISA 测定容易地检测。如本文所公开，通过电子显微术的疫苗免疫原的结构形态的分析证实该蛋白在重组后形成为团块或聚集体，其与 VLP 非常不同。

[0080] RVFV VLP 组装已被报道通过由哺乳动物细胞和昆虫细胞两者同时产生 Gn 和 Gc，以及在所涉及的所有情况中共表达非组蛋白标记的蛋白而发生。然而，在目前的疫苗制剂中使用的 Gn 被截短缺乏跨膜结构域和细胞质结构域；并且两种重组蛋白 (Gn 和 Gc) 在其 C 末端处携带六个组氨酸标签。

[0081] 如由本公开内容所支持的，强中和抗体应答在天然宿主中的快速起始表明用亚单位 GnGc 疫苗的免疫可在两周内赋予保护，所述两周内是在爆发期间预防病毒扩散所需的根本重要属性。然而不被理论所束缚，RVFV 具有低遗传多样性和由单个血清型组成的事实

表明重组 Gn 和 Gc 糖蛋白疫苗可能赋予保护免于该病毒的所有毒株。

[0082] 本公开内容提供了分离的核酸和氨基酸序列，使用这些序列产生亚单位疫苗或其它免疫原性组合物、免疫试剂、诊断测定等的方法。在实施方案中，本公开内容提供了分离的核酸分子，所述分离的核酸分子包含包括 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5 的核苷酸序列、其功能片段、和与前述的任何一个具有至少约 90％同源性并保留其功能特性的序列。

[0083] 在实施方案中，本公开内容提供了分离的核酸分子，所述分离的核酸分子编码与信号肽连接的免疫原性 RVFV 蛋白或其功能片段，其中所述信号肽包含 SEQ ID NO:2、其功能片段、或与其具有至少约 90％同源性的序列，或所述信号肽由包含 SEQ ID NO:1 的序列、其功能片段和与其具有至少约 90％同源性并保留其功能特性的序列的核酸序列编码。示例性的免疫原性 RVFV 蛋白包括 Gn、Gc、N、NSs、和 / 或 NSm。

[0084] 在实施方案中，还描述了重组蛋白，其包含包括 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 的氨基酸序列、其功能片段、和与前述的任何一个具有至少约 90％同源性并保留其功能特性的序列。本公开内容还提供了信号肽，所述信号肽包含包括 SEQ ID NO:2 的序列、其功能片段、或与其具有至少约 90％同源性的序列，以及编码此类肽包括 SEQ ID NO:1 的核酸序列、其功能片段、和与其具有至少约 90％同源性并保留其功能特性的序列。

[0085] 包含以上提及的蛋白和 / 或信号肽作为活性剂（连同合适的运载体、佐剂等）的重组疫苗也被本公开内容所包括。

[0086] 如本文所公开，描述了包含 RVFV 蛋白的免疫原性组合物，包括使用此类免疫原性组合物诱导针对 RVFV 的免疫应答方法和对需要其的受试者施用包含一个或更多个以上描述的蛋白或编码此类蛋白的重组载体的组合物的方法。

[0087] 在实施方案中，还公开了靶序列的有效杆状病毒表达的方法，所述方法包括使用信号肽，所述信号肽由 SEQ ID NO:1 表达或包含 SEQ ID NO:2、其功能片段、或与其具有至少约 90％同源性并保留其功能特性的序列。信号肽编码序列可附接于靶序列的上游，并连着 Kozak 序列，可被用于获得在杆状病毒系统中的有效表达。

[0088] 重组蛋白提供了用于开发改进的诊断和在一些情况下用于亚单位疫苗的安全平台。如本文所公开，提供了使用杆状病毒表达系统的一组 RVFV 蛋白 (N、NSs、NSm、Gn 和 Gc)，该蛋白用作诊断的靶和疫苗组分。然而不被理论所束缚，使用杆状病毒表达系统的优势之一是按比例放大表达并允许翻译后蛋白修饰的能力，其在糖蛋白的情况下，可增强抗原性和免疫原性。

[0089] Gn(N- 末端）和 Gc(C- 末端）糖蛋白是布尼亚病毒科的成员裂谷热病毒 (RVFV) 的表面蛋白。该蛋白由病毒基因组的中 (M) 区段所编码并已显示携带引发病毒中和抗体 - 用于保护性免疫的相关物的产生的表位。Gn 和 Gc 编码序列的未修饰的形式在真核表达系统中无法有效表达，并且可能不被糖基化，所述糖基化是对增强抗原性和免疫原性来说是关键的的翻译后蛋白修饰。在实施方案中，对 Gn 的分子修饰可通过表达无跨膜结构域和细胞溶质区域的编码序列来引入。

[0090] Gn 和 Gc 分别携带 1 个和 4 个糖基化位点。在相关方面，为确保 Gn 和 Gc 转位进入 ER 并被糖基化，可添加信号肽序列，所述信号肽序列携带在编码序列的 5’ 末端的上游的信

号肽裂解位点。在另外的相关方面，此类修饰确保正确的蛋白运输通过真核表达系统的内质网 (ER) 的内腔。在另外的相关方面，对 Gn 和 Gc 做出的序列修饰导致强表达，包括包含此类修饰的 Gn 蛋白存在于质膜的周边。

[0091] 在实施方案中，通过蛋白印迹和间接 ELISA，重组蛋白与 RVFV 抗血清的抗体反应显示该蛋白是有免疫反应性的，并且，然而不被理论所束缚，这提供了正确的结构构象的强指示。

[0092] 如本文所公开，使用接种 MP12 的和野生型攻击的血清，RVFV 核衣壳 (N) 蛋白是最有反应性的。作为 RVFV 病毒颗粒的最丰富和高度免疫原性的结构组分，N 蛋白已被认为是开发用于抗原检测测定的免疫试剂的最佳选择。针对 N 蛋白与接种 MP12 的血清的早期免疫应答和强的抗体反应性表明 N 蛋白通过对 RVFV 感染提供保护性免疫在疫苗产品中具有实用性。

[0093] 如本文所公开，糖蛋白 Gn 还在蛋白印迹和 ELISA 中显示出与接种 MP12 的血清的早期应答反应性（接种免疫后第 3 天），并通过来自所有野生型感染的绵羊的感染后第 28 天的血清来检测。此外，除了 N 蛋白之外，Gn 还被鉴定为诊断性抗原。而且，用接种 MP12 的绵羊发现的对 Gn 的早期且特异的抗体应答使该蛋白同样适合于疫苗。重要地，已显示 RVFV 糖蛋白 Gn 和 Gc 包含诱导中和抗体 - 针对 RVFV 感染的保护性免疫的相关物的产生的表位。

[0094] 如本文所公开，单独的杆状病毒表达的重组 Gn 或与重组 N 组合可在与其他布尼亚病毒 / 白蛉热病毒 (Phleboviruses) 交叉反应性可能是问题的区域改进牲畜对 RVFV 感染的敏感性和特异性。重组 Gc 还显示出与绵羊血清的强反应性，但当与 Gn 比较时，似乎有较少的免疫原性。但是，在接种 MP12 的动物中，与 N 和 Gn 比较，对 Gc 的强抗体应答的诱导出现得较迟。在实施方案中，改进的 RVFV 检测可通过使用 RVFV 核酸与抗体检测并行来实现，以鉴定早期感染的反刍动物。

[0095] 在实施方案中，重组蛋白在诊断测定中具有实用性，或重组蛋白可被用于产生免疫试剂诸如单克隆抗体，其中后者可被用于除了其他的以外，诊断测定。如本文所公开，重组蛋白还具有作为针对 RVFV 的疫苗组分的实用性。

[0096] 在实施方案中，Gn 编码序列不包含跨膜结构域。因此，Gn 可在 Sf9 细胞中使用杆状病毒表达系统容易地被产生，然而，全长 Gn 不可被产生。此外，54 个核苷酸的信号肽序列 (SEQ ID NO:2) 融合至 Gn 和 Gc 的 5' 末端确保了两种蛋白在真核表达系统中的 N- 糖基化 ;Gn/Gc 序列的未修饰的版本则不可被 N- 糖基化。

[0097] 区分感染的动物和接种疫苗的动物 (DIVA) 的诊断工具的开发在 RVFV 的非地方性流行的区域中是非常需要的。不被理论所束缚，RVFV NSm 在如本文公开的反刍动物宿主中的明显弱的免疫原性，使得 NSm 作为靶用于开发 DIVA 诊断测试的用途变得可疑。在另一方面，NSs 特异的抗体在 RVFV 感染的 / 接种疫苗的绵羊中一致地被检测到，其证实 NSs 蛋白可用作用于 DIVA 诊断测定的候选者。

[0098] 还公开了用于在生物样品中体外检测和诊断 RVFV 感染的方法，所述方法使用本文描述的 RVFV 蛋白。在实施方案中，所述方法可包括使生物样品与本文描述的 RVFV 蛋白在允许所述蛋白与所述样品中存在的 RVFV 特异的抗体反应的适当的条件下接触，和在所述样品中检测此反应（即，检测在所述样品中形成的任何免疫复合物的存在）。可选地，抗体可针对本文描述的 RVFV 蛋白产生，并用于检测样品中的 RVFV 抗原。因此，在实施方案中，

本公开内容提供了针对本文描述的重组RVFV蛋白产生的抗体。在实施方案中，以上描述的蛋白的组合用于多路复用测定，所述多路复用测定对于针对RVFV感染筛选受试者具有增加的灵敏性和特异性。

[0099] 如本文公开的重组NSs蛋白显示了与MP12血清的早发性反应性，但具有比N蛋白整体更低的反应性。然而不被理论所束缚，这可归因于RVFV感染后针对NSs蛋白引起的通常低的抗体滴度。RVFV NSs蛋白是宿主转录机器的一般性抑制包括I型干扰素的原因。与NSs相比，另一个非结构蛋白NSm在蛋白印迹中显示出与来自MP12接种的动物和野生型攻击的动物的血清的弱反应性。其反应性在ELISA测试中的进一步评价显示出与MP12接种的血清很少的或无反应性，由非常低的OD值表明。来自3只绵羊(2只野生型感染的，P7和P10；和1只MP12接种的，P5)的血清在感染后第28天时，当与第0天的血清比较时，显示出相对高的反应性。在相关方面，在使用ELISA的毒性RVFV攻击实验中，在3只对照绵羊中检测到NSs抗体血清阳性，然而3只动物中的仅2只对于NSm是血清阳性的；这是第一次在天然宿主物种中检测到针对NSm的免疫反应性(Bird，等人2011)。同样，然而不被理论所束缚，这可指示当与NSs比较时，NSm有较少的免疫原性或以较低的水平表达，导致在哺乳动物宿主中较低抗体应答。

[0100] 旨在开发并验证基于RVFV重组抗原的新一代安全且准确的诊断免疫试剂和测定的研究工作是至关重要的。在实施方案中，本文公开了数个RVFV蛋白的表达以及它们针对来自天然宿主的一组免疫血清的反应性的评价。在相关方面，抗体反应性的分析显示该蛋白在杆状病毒表达系统中以正确的构象表达。将融合信号肽序列添加至结构糖蛋白Gn和Gc确保了蛋白通过细胞糖基化途径的加工，意味着它们增强的抗原性的先决条件。

[0101] 在实施方案中，杆状病毒表达的N、Gn、Gc和NSs可被用作潜在的血清学诊断的靶，用于监测宿主体液对感染和/或接种疫苗的免疫应答。在一个方面，针对NSm的免疫反应性是相当弱的，使得该RVFV抗原成为不太期望的诊断靶。在另一个方面，一般性免疫反应性谱表明N和Gn将代表用于开发高度灵敏的血清学诊断测定的期望的靶。

[0102] 在实施方案中，疫苗制剂可需要与伴随的诊断DIVA测试的DIVA相容性。如本文所示，取决于疫苗组合物的杆状病毒表达的N和NSs测定，可用于此类伴随测定。

[0103] 如本文所用，“裂谷热病毒”或"RVFV"是指引起裂谷热疾病的病毒，包括这些病毒的可能已出现和在未来将出现的紧密相关的变体。

[0104] 未受影响的动物是未暴露于RVF感染物质，或已暴露于RVF感染物质诸如RVF但未显示出该疾病的症状的动物。受影响的动物是显示出RVF的症状或可从其分离出RVFV的动物。

[0105] 如本文所用，术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指减少或缓解RVFV感染的至少一种不利影响或症状。

[0106] 如本文所用，“ORF”是从包含RVFV基因组的病毒基因组分离的开放阅读框、或编码多肽的区段。在本多核酸中，ORF可部分地(作为片段)或整个地被包含，且可与相邻ORF的5'-序列或3'-序列重叠。

[0107] “载体”是用于将核酸转移进入宿主细胞中的任何工具。载体可以是另一个DNA区段可附接至其以便引起所附接区段的复制的复制子。“复制子”是起DNA体内复制的自主单位的作用，即，能够在其自身控制下复制的任何遗传元件(例如，质粒、噬菌体、粘粒、染

色体、病毒）。术语“载体”包括用于在体外、离体或在体内将核酸引入细胞的病毒工具和非病毒工具两者。病毒载体包括 α 病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、痘病毒 (pox)、杆状病毒、牛痘病毒、单纯疱疹病毒、埃伯斯坦－巴尔病毒和腺病毒载体。非病毒载体包括但不限于质粒、脂质体、带电脂质（细胞转染剂）、DNA- 蛋白复合体、和生物聚合物。除核酸以外，载体还可包含一个或更多个调控区域，和 / 或可用于选择、测量和监测核酸转移结果（转移至哪些组织、表达的持续时间等）的可选择的标志物。

[0108] “盒”是指可在特定的限制性位点处被插入进载体的 DNA 的区段。DNA 的区段编码感兴趣的多肽，且盒和限制性位点被设计为确保在用于转录和翻译的适当的阅读框中插入盒。

[0109] 当此类 DNA 已被引入该细胞内时，细胞已被外源性或异源性 DNA “转染”。

[0110] 当该转染的 DNA 产生表型变化时，细胞已被外源性或异源性 DNA“转化”。转化 DNA 可被整合（共价连接）进入染色体 DNA 组成细胞的基因组。

[0111] “核酸分子”是指核糖核苷（腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷 ;“RNA 分子”）或脱氧核糖核苷（脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷、或脱氧胞苷 ;“DNA 分子”）的单链形式、或双链螺旋的磷酸酯聚合物形式，或其任何磷酸酯类似物，诸如硫代磷酸酯和硫酯。双链 DNA-DNA、DNA-RNA 和 RNA-RNA 螺旋是可能的。术语核酸分子，并且特别是 DNA 或 RNA 分子，仅指该分子的初级和二级结构，并且不将其限于任何特定的三级形式。因此，该术语包括在直链 DNA 分子或环状 DNA 分子（例如，限制性片段）、质粒和染色体、以及其他中发现的双链 DNA。在讨论特定的双链 DNA 分子的结构时，可根据仅给出沿着 DNA 的非转录链 5’ 至 3’ 方向的序列（即，具有与 mRNA 同源的序列的链）的一般惯例描述序列。“重组 DNA 分子”是经历了分子生物学操作的 DNA 分子。

[0112] 如本文所用，“多肽”通常是指具有多于 8 个氨基酸的肽和蛋白。

[0113] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列，保守修饰的变体是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸，或当所述核酸不编码氨基酸序列时，指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性，大量功能相同的核酸编码任何给定的多肽。例如，密码子 CGU、CGC、CGA、CGG、AGA 和 AGG 全部编码氨基酸精氨酸。因此，在其中精氨酸被密码子指定的每个位置处，该密码子可被更改为所描述的不改变编码的多肽的相应密码子中的任一个。此类核酸变异是“沉默取代”或“沉默变化”，其是一种类型的“保守修饰的变异”。除非另有说明，本文所述的编码多肽的每个多核苷酸序列也描述每个可能的沉默变异。因此，沉默取代是编码氨基酸的每个核酸序列的隐含特征。技术人员将认识到核酸中的每个密码子（除了 AUG 之外，蛋氨酸通常是甲硫氨酸的唯一密码子）可通过标准技术被修饰以产生功能上相同的分子。在一些实施方案中，编码抗原决定簇的核苷酸序列被优化用于在特定的宿主细胞（例如，酵母、哺乳动物、植物、真菌等）中表达。

[0114] 对于氨基酸序列，技术人员将认识到改变、添加或缺失编码的序列中的单个氨基酸或小百分率的氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白序列的单独的取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”，在本文中称为“变体”，其中该改变导致氨基酸取代为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。参见，例如，Davis 等人，″Basic Methods in Molecular Biology″Appleton&Lange, Norwalk, Conn. (1994)。此类保守修饰的变体本发明的多态变体、种间同源物、和等位基因以外的但不排除其。

[0115] 以下八组各自包含彼此保守取代的氨基酸：1) 丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G)；2) 天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)；3) 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)；4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)；5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V)；6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)；7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)；和 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M)(参见，例如，Creighton,1984,Proteins)。

[0116] 在两个或更多个核酸序列或多肽序列的上下文中，术语“同一”或“同一性”百分比是指如利用具有以下所述的缺省参数的 BLAST 或 BLAST 2.0 序列比较算法或通过手动比对和目测测量的，相同或具有指定的百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的两个或更多个序列或子序列（即，当在比较窗或指定的区域上比较并比对最大对应时，在指定的区域（例如，RVFV 的 Gn 蛋白的表位的序列），约 70％的同一性，优选地 75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、或更高的同一性）。此类序列然后被称为是“基本同一的”。该定义还指测试序列的称赞。该定义还包括具有缺失和 / 或添加的序列，以及具有取代的那些序列。如以下所述，优选的算法可解释缺口等。优选地，同一性跨越至少约 25 个氨基酸或核苷酸长度的区域、或更优选地跨越 50-100 个氨基酸或核苷酸长度的区域存在。

[0117] 当在指定的比较窗上比对最大对应时，序列同源性描述两个或更多个核酸或氨基酸序列之间的序列关系。“同源性”的百分比通过在比较窗上比较两个最佳比对的序列来确定。对于两个序列的“最佳比对”，将领会在比较窗口中的序列的部分与不包含添加或缺失的参考序列相比可包括缺口（例如，缺失或添加）。比对之后，匹配位置（即，在两个序列中均出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置）的数目被确定，并且然后除以在比较窗中位置的总数目。然后使该结果乘以 100，以计算同源性的百分比。

[0118] 对于序列比较，通常一个序列充当参考序列，测试序列与其比较。当使用序列比较算法时，将测试序列和参考序列输入计算机中，如需要则指定序列坐标，并指定序列算法程序参数。可使用缺省程序参数，或可指定替代参数。然后序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0119] 如本文所用，“比较窗”包括，在两个序列进行最佳比对后，提及选自由从 20 个至 600 个、通常约 50 个至约 200 个、更通常约 100 个至约 150 个组成的组的连续位置的数目的任何一个的区段，所述区段中序列可与相同数目的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对的方法是本领域熟知的。用于比较的最佳序列比对可如下进行，例如，通过 Smith&Waterman,1991, Adv.Appl.Math.2:482 的局部同源性算法，通过 Needleman 和 Wunsch,1970, J.Mol.Biol.48:443 的同源性比对算法，通过 Pearson&Lipman,1988,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444 的相似度检索方法，通过这些算法的计算机化执行（在 Wisconsin Genetics 软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA，Genetics Computer Group,575 Science Madison 博士，Wis.），或通过手动比对和目测（参见，例如，Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel 等人编著，1995 增刊）。

[0120] 两个核酸序列或多肽基本相同的指示是由第一核酸编码的多肽与针对第二核酸编码的多肽的抗体免疫学上交叉反应，如以下所述的。因此，多肽通常与第二多肽基本相同，例如，其中两个多肽仅通过保守取代而不同。

[0121] 两个核酸序列基本相同的另一个指示是两个分子或其补体在严格条件下彼此杂

交，如以下所述的。两个核酸序列基本相同的又另一个指示是可使用相同的引物扩增序列。本发明的变体肽可被纯化至均质或其他程度的纯度。纯化的水平将基于预期用途。关键特征是即使在相当大的量的其他组分的存在下，该制品允许变体肽的期望的功能。

[0122] 在一些用途中，“基本上不含细胞物质”包括具有少于约 30％（按干重计）其他蛋白（即，污染蛋白）、小于约 20％其他蛋白、小于约 10％其他蛋白、或小于约 5％其他蛋白的变体肽的制品。当该变体肽被重组产生时，其还可基本上不含培养基，即培养基占蛋白制品的体积的少于约 20％。

[0123] 分离的变体蛋白可从天然表达它的细胞中纯化，从已被改变来表达它（重组）的细胞纯化或使用已知的蛋白合成方法合成。例如，将编码变体蛋白的核酸分子克隆进表达载体，将该表达载体引入宿主细胞，并且该变体蛋白在所述细胞中表达。然后该变体蛋白可通过适当的纯化方案使用标准蛋白纯化技术从细胞分离。这些技术中的许多在以下被详细描述。

[0124] 本公开内容的蛋白可被附接至异源序列，以形成嵌合蛋白或融合蛋白。此类嵌合蛋白和融合蛋白包含变体蛋白，所述变体蛋白可操作地连接至具有与该变体蛋白不基本上同源的氨基酸序列的异源蛋白。“可操作地连接”表示例如该变体蛋白和该异源蛋白符合读框地 (in-frame) 融合。该异源蛋白可被融合至该变体蛋白的 N 末端或 C- 末端。

[0125] 嵌合蛋白或融合蛋白可通过标准重组 DNA 技术产生。例如，编码不同蛋白序列的 DNA 片段根据常规技术符合读框地连接在一起。在另一个实施方案中，融合基因可通过常规技术包括自动化 DNA 合成仪来合成。可选地，基因片段的 PCR 扩增可使用锚定引物进行，所述锚定引物在两个连续的基因片段之间产生互补突出端，所述两个连续基因片段随后可退火并再扩增以生成嵌合基因序列（参见，Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology，1992）。此外，已编码融合部分（例如，GST 蛋白）的许多表达载体是商业上可得的。编码变体蛋白的核酸可被克隆进此类表达载体中，以使得融合部分符合读框地连接至变体蛋白。

[0126] 多肽有时包含除了通常称为 20 种天然存在的氨基酸的 20 种氨基酸以外的氨基酸。此外，许多氨基酸，包括末端氨基酸，可通过天然过程，诸如加工和其他翻译后修饰，或通过本领域中熟知的化学修饰技术来修饰。多肽中天然发生的常见修饰，在基本文件、详细的专著、以及研究文献中被描述，且它们为本领域技术人员所熟知。因此，本发明的变体肽还包括其中取代的氨基酸残基不是由遗传密码编码的氨基酸残基的衍生物或类似物，其中取代基团被包括，其中成熟多肽与另一种化合物诸如增加该多肽的半衰期的化合物（例如，聚乙二醇）融合，或其中另外的氨基酸被融合至该成熟的多肽，诸如前导序列或分泌序列或用于纯化该成熟多肽的序列或原蛋白序列。

[0127] 已知的修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP- 核糖基化、酰胺化、黄素的共价附接、血红素部分的共价附接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸 / 焦谷氨酸盐的形成、甲酰化、γ- 羧化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化 (selenoylation)、硫酸化、转移 RNA 介导的氨基酸至蛋白的添加诸如精氨酰化、和泛素化。

[0128] 本公开内容还提供了本发明的变体蛋白的片段，以及包含此类片段和由此类片段

组成的蛋白和肽，条件是此类片段如由本发明提供的充当抗原决定簇和 / 或提供治疗 RVFV 感染和 / 或保护免受其感染。

[0129] 如本文所用，片段包含来自 RVFV 多肽或变体蛋白的至少 8 个或更多个连续的氨基酸残基。

[0130] 在一个实施方案中，本发明涉及多肽，所述多肽包含 RVFV 的抗原决定簇，所述多肽在本文被称为包含抗原决定簇的多肽 (ADP)。所述多肽可以是抗原决定簇的同源物、衍生物、或变体、或其免疫活性片段或功能片段。该多肽可被分离、合成、或使用本文所述的编码抗原决定簇的核酸重组表达。

[0131] 本公开内容的抗原决定簇的实例包括但不限于如 (SEQ ID NO:4、6、8、9 和 10) 所示的氨基酸序列。这些 ADP 可根据本文所述的免疫方案作为具有 Gn 的胞外域的期望的糖基化的片段、多肽、或蛋白被施用。

[0132] 本公开内容还提供了编码如本文所述的 ADP 的分离和 / 或重组的核酸。根据本发明的实施方案，ADP 的核苷酸序列编码中和表位。另外，基于本领域的一般现有技术应当理解 ADP 的核苷酸序列或氨基酸序列的其他等同序列被本公开内容所涵盖。例如，除非此类突变废除 ADP 诱导生成中和抗体的能力，否则 Gn 的胞外域的氨基酸序列中的一些缺失、插入和取代被本公开内容所涵盖。

[0133] 本发明的编码 ADP 的核酸对数个目的有用，包括重组表达相应的 ADP 多肽。

[0134] 本发明的核酸包括编码整个 ADP 的那些以及编码 ADP 多肽的子序列的那些。例如，本公开内容包括编码多肽的核酸，所述多肽不是全长 ADP，但尽管如此具有针对 RVFV 感染的保护性抗原活性。本发明不仅包括，包含如本文所示的核苷酸序列的核酸，而且还包括，与例证的实施方案基本上相同或基本上互补的核酸。例如，本发明包括包含与本文所示的核苷酸序列至少约 70％同一、与例证的核苷酸序列至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、和至少约 95％同一的核苷酸序列的核酸。核苷酸序列可如本文所述被修饰，只要编码的多肽能够诱导中和抗体的生成。

[0135] 编码本发明的 ADP 多肽的核酸可使用本领域技术人员已知的方法来获得。合适的核酸 (例如，cDNA、基因组、或子序列) 可通过体外方法诸如使用合适的引物的聚合酶链式反应 (PCR)、连接酶链式反应 (LCR)、基于转录的扩增系统 (TAS)、自持续序列复制系统 (SSR) 来克隆或扩增。各种各样的克隆和体外扩增方法论是本领域技术人员熟知的。通过许多克隆练习足以指导本领域技术人员的这些技术和说明的实例参见 Berger 和 Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology 152Academic Press，有限公司，San Diego,Calif.(Berger) ;Sambrook 等人，(1989) Molecular Cloning--A Laboratory Manual(第 2 版) 第 1-3 卷，Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Press,NY,(Sambrook 等人) ;Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel 等人，编著，Current Protocols,a joint venture between Greene Publishing Associates，有限公司，和 John Wiley&Sons，有限公司，(1994Supplement)(Ausubel) ;Cashion 等人 ;美国专利号 5,017,478 ;和 Carr 欧洲专利号 0,246,864。通过体外扩增方法足以指导本领域技术人员的技术的实例参见 Berger、Sambrook 和 Ausubel，以及 Mullis 等人，(1987) 美国专利号 4,683,202 ;PCR Protocols A Guide to Methods and Applications(Innis 等人，编著)Academic Press 有限公司 San

Diego,Calif.(1990)(Innis) ;Amheim&Levinson(Oct.1,1990)C&EN 36-47 ;The Journal Of NIH Research(1991)3:81-94 ;(Kwoh 等人 (1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173 ;Guatelli 等 人 (1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,1874 ;Lomell 等 人 (1989)J.Clin.Chem.,35:1826 ;Landegren 等 人,(1988)Science 241:1077-1080 ;Van Brunt(1990)Biotechnology 8:291-294 ;Wu 和 Wallace(1989)Gene 4:560 ;和 Barringer 等人 (1990)Gene 89:117。克隆体外扩增的核酸的改进的方法描述于 Wallace 等人,美国专利号 5,426,039 中。编码本发明的 ADP 多肽的核酸,或这些核酸的子序列可通过如以上所述的任何合适的方法,包括例如适当的序列的克隆和限制来制备。

[0136] 编码 ADP 的核酸然后通过使用载体、质粒或构建体等引入原核宿主细胞或真核宿主细胞,以产生本发明的 ADP 多肽。典型表达盒包含被可操作地连接至编码糖基转移酶或其他感兴趣的酶的核酸的启动子。表达盒通常包含在被引入合适的宿主细胞的表达载体上,所述合适的宿主细胞,包括例如,细菌、昆虫、真菌、植物或动物细胞。可在本发明中使用组成型启动子或调控启动子。适合于在真核宿主细胞中使用的启动子是本领域技术人员熟知的。本发明的表达载体可通过本领域普通技术人员已知的方法转移进所选择宿主的细胞中,所述本领域普通技术人员已知的方法包括例如磷酸钙转染、DEAE- 葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、刮载、射击引入、感染或其他方法。(参见 Molecule Cloning:A Laboratory Manual, 最高第 2 版,第 1-3 卷,编著, Sambrook 等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))。转化的细胞可例如通过由包含在质粒上的基因诸如 amp、gpt、neo 和 hyg 基因赋予的对抗生素的抗性来选择。

[0137] ADP、其同源物、片段或其他衍生物、或变体、或表达它的细胞可被用作产生针对其的抗体的抗原。本发明包括例如单克隆抗体和多克隆抗体、嵌合体的、单链和 Fab 片段。因此,本公开内容还包括生成针对以上所述的一个或更多个 ADP 的抗体的方法,所述方法包括提供所述 ADP 或其生物学上的功能同源物或衍生物或变体,和以足够诱导对生成针对该 ADP 多肽的抗体的免疫应答的量对动物受试者施用该多肽。因此,本发明包括用于生成针对 RVFV 的 ADP 的抗体的方法。

[0138] 在实施方案中,如 SEQ ID NO:2 中所示的表示 RVFV 中的 Gn 的信号序列的氨基酸与 Gc 组合使用作为 ADP。如本文公开的 ADP 可根据如所述的免疫方案被施用。

[0139] 在实施方案中,本公开内容提供了与 ADP 多肽、其衍生物、同源物或变体以及片段选择性地结合的抗体。此类抗体可被用于定量或定性地检测如所述的 ADP 或变体。

[0140] 用于生成和 / 或鉴定针对给定靶肽诸如 ADP 的抗体的许多方法是已知的。数种此类方法已被 Harlow, Antibodies,Cold Spring Harbor Press,(1989) 描述。可使用全长 ADP、衍生物、同源物或变体或片段或融合蛋白。

[0141] 为了制备单克隆抗体,可使用本领域已知的提供由传代细胞系培养物产生的抗体的任何方法。实例包括多种技术,诸如在以下中的那些 :Kohler,G. 和 Milstein,C.,Nature 256:495-497(1975) ;Kozbor 等 人, Immunology Today 4:72(1983) ;(Cole 等 人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,有限公司 (1985) 中的 77-96 页。单克隆抗体可通过为能够分泌特定的单克隆抗体的无限增殖化的细胞系的杂交瘤来产生。无限增殖化的细胞系可在体外通过融合两种不同的细胞类型来创建,所述两种不同的细胞类型通常是淋巴细胞,其之一是肿瘤细胞。

[0142] 抗ADP抗体可包括来自多克隆血清的抗体（即，多克隆抗体）。制备多克隆抗体的方法是本领域技术人员已知的。多克隆抗体可在哺乳动物中饲养(raised)，例如，通过一次或更多次注射免疫试剂和如果需要，佐剂。通常，免疫试剂和/或佐剂将在哺乳动物中通过多次皮下或腹膜内注射注入。免疫试剂可包括ADP、其衍生物、同源物或变体以及片段或融合蛋白。将免疫试剂缀合至已知在被免疫的哺乳动物中是免疫原性的蛋白可以是有用的。此类免疫原性蛋白的实例包括但不限于匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、和大豆胰蛋白酶抑制剂。可采用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂（单磷酰脂质A、合成的海藻糖二棒状杆菌枝菌酸酯(trehalose dicorynomycolate)。

[0143] 根据本发明的组合物可包含水包油(O/W)、油包水(W/O)或水包油包水(W/O/W)型乳剂，该O/W/、W/O或W/O/W型乳剂充当佐剂。在一个方面，所述乳剂可以是O/W乳剂。根据本公开内容的乳剂可根据制备乳剂的传统方法，特别是根据专利申请EP-A-489,181和EP-A-481,982中描述的方法来制备。

[0144] 根据本公开内容的乳剂可包含按重量计从约5％至约95％的油相和约95％至约5％的水相，和从约25％至约75％的油相和约75％至约25％的水相。所述乳剂当其被存储在约4℃的温度下时持续至少约12个月应该是稳定的。

[0145] 构成油相的油可以是矿物油、非矿物油或矿物油和非矿物油的混合物。矿物油可以是天然的或合成的，和从植物、动物或合成来源制成。所有这些油相对于对其施用本公开内容的组合物的所述宿主身体来说缺乏毒性效应。它们在存储温度下可以是液体（参见以上），或至少使在所述温度下实现液体乳剂成为可能。在实施方案中，根据本公开内容的矿物油可由包含直链碳链、不含芳香族化合物的油组成，所述直链碳链具有大于16的碳原子数目。此类油可以是，例如以名称MARCOL 52TM（由Esso France生产的）或DRAKEOL 6VRTM（由Penreco USA生产的）市售的那些，两者均具有直链烃链、不含芳香族化合物的商用矿物油。当作合成的有机油，聚异丁烯或聚异戊二烯可被使用。在植物油中，可使用可生物降解的富含油酸的不饱和油，例如，来自花生油、橄榄油、芝麻油、大豆油或小麦胚芽油的那些油可被包括。

[0146] 动物油可包括但不限于角鲨烯油或鲸油。

[0147] 除了油相和水相以外，组合物可包含免疫刺激试剂诸如阿夫立定(avridine)。此外，组合物可包含表面活性剂，其中后者显示表征为在约1和约19之间的HLB（亲水亲油平衡）值的亲脂特性或亲水特性。

[0148] 在实施方案中，表面活性剂可包含通过使脂肪酸与糖或甘油缩合获得的酯，该脂肪酸在20℃下是液体。所述糖包括但不限于葡萄糖、蔗糖或甘露糖醇。在一个方面，糖是甘露糖醇，且酯是甘露糖醇酯。在一个方面，甘露糖醇酯是通过使在位置1-4或2-6处被环化的甘露糖醇的多羟基化的碳原子酸酐化(anhydridizing)获得的油酸酯。

[0149] 还可采用这些酯的衍生物。衍生物表现出处亲水性，所述衍生物通过移植亲水官能团诸如醇、多元醇、环氧乙烷、环氧丙烷、羧酸、胺或酰胺被修饰。

[0150] 为了作为可注射制剂使用，本公开内容的表面活性剂可以是药学上可接受的，所述表面活性剂可不含重金属并具有非常低的酸或过氧化值。在实施方案中，表面活性剂在形成乳液之前与油结合。与表面活性剂结合的油是由SEPPIC（法国）市售的那些，诸如MONTANIDE（油和表面活性剂的混合物），例如MONTANIDE ISA 25和ISA 206。

[0151] 除了以上所述之外，包含佐剂的菊粉，包括但不限于菊粉乙酸盐 / 酯可被添加或用于包封疫苗 - 佐剂组合物，其中此类菊粉或菊粉乙酸盐 / 酯 (InAcT) 可如通过引用以其整体并入本文的美国专利公布号 20130195930 中描述的来制备。

[0152] 免疫方案可由本领域技术人员选择而无需过度实验。

[0153] 在本发明的另一个实施方案中，提供了用于制备针对 RVFV 的疫苗的方法。在一个方面，所述方法包括提供 ADP、其衍生物、同源物或变体或片段。可选地，用于制备针对 RVFV 的疫苗的方法可包括将所述 ADP 多肽与生理学上可接受的运载体或稀释剂混合。通常，疫苗以水溶液或悬浮液的形式被制备作为可注射剂。油基中的疫苗也是被熟知的诸如用于吸入。还可配制在使用之前溶解或混悬的固体形式。通常添加药学或生理学运载体，所述药学或生理学运载体与活性成分相容并且用于药学用途是可接受的。此类载体的实例包括，但不限于，水、盐溶液、右旋糖或甘油。还可使用载体的组合。本领域普通技术人员将熟悉药学或生理学上可接受的运载体或稀释剂。

[0154] 鉴于以上所述，本公开内容还提供了疫苗。在另一个实施方案中，提供包含至少一种 ADP、其衍生物、同源物或变体或片段的疫苗。在另一个方面，所述疫苗包含编码 ADP 多肽、其衍生物、同源物或变体或片段的核酸。

[0155] 有用的载体是本领域熟知的，并包括例如水、缓冲的水、盐水、甘氨酸、透明质酸等。所得水溶液可被包装用于原样使用、或被冻干，所述冻干的制剂在施用前再水化，如以上所述。所述组合物可根据需要包含药学上可接受的辅助物质以接近生理条件，所述药学上可接受的辅助物质诸如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等，例如、乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺，等。

[0156] 如本文公开的亚单位疫苗的施用可通过任何合适的方法进行，所述任何合适的方法包括以下两者 ：肠胃外注射（如腹膜内、皮下、或肌肉内注射），和通过将疫苗（通常在药物制剂中携带）局部应用至气道表面。将疫苗局部应用至气道表面可通过鼻内施用进行（例如，通过鼻内使用储存药物制剂的滴管、棉签、或吸入器）。将疫苗局部应用至气道表面还可通过吸入施用进行，诸如通过产生包含疫苗的药物制剂的可吸入颗粒（包括固体颗粒和液体颗粒两者）作为气雾型混悬剂，并然后使受试者吸入该可吸入多肽。用于施用药物制剂的可吸入多肽的方法和装置是熟知的，并且可采用任何常规技术。作为接种疫苗的结果，宿主变得至少部分地或完全地对施用的血清型的 RVFV 感染免疫，或抵抗发展中度或严重的 RVFV 感染。

[0157] 病毒亚单位可使用生物化学方法从 RVFV 获得，或它们可在合适的细胞例如真核细胞中通过重组方式被表达。表达病毒亚基的方法是本领域常见的。例如，表达病毒亚基的方法在以下文章和在其中引用的文献中被描述 ：Possee, 1986, Virus research 5:43 ；Kuroda 等 人，1986, EMBO J. 5:1359 ；Doerfler, 1986, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 131:51 ；Rigby, 1983, J. Gen. Virol. 64:255 ；Mackett 等 人 1985, In:DNA Cloning, A Practical Approach, Vol II, D.M. Glover, 编著，IRL 出版社 , Washington, D.C. ；Rothestein, 1985, In:DNA Cloning, A Practical Approach, 同 上 ；Kinney 等 人，1988, J. Gen. Virol. 69:3005 ；Panical 等 人，1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5364 ；Small 等人，1985, In:Vaccinia Viruses as Vectors for Vaccine Antigens, 175-178 页，J. Quinnan, 编著，Elsevier, N.Y。

[0158] 在本发明的一个实施方案的实践中，N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基，或其组合可在体外通过重组技术以足够用于在亚单位疫苗中使用的大的量来产生。

[0159] 在另一个方面，N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基、或其组合可通过重组载体、病毒载体或病毒来表达。在另一个方面，表达所述亚基的重组载体、病毒载体、或病毒本身可用作疫苗组分充当作为抗原或佐剂并引发或增强受试者对 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基的免疫应答。

[0160] 为了制备表达 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基抗原或其免疫原性片段的重组病毒载体，将编码 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基抗原或其免疫原性片段的 cDNA 插入病毒载体的基因组中，所述病毒载体例如活的腺病毒、痘病毒、杆状病毒、伪狂犬病病毒 (PRV)、委内瑞拉马脑炎 (VEE) 载体诸如毒株 V3526 或 TC-83、和源自 VEE 的病毒复制子颗粒 (VRP)、马动脉炎病毒 (EAV)、或传染性胃肠炎病毒 (TGE)。重组病毒载体可通过本领域技术人员已知的用于将核苷酸变化引入克隆的 DNA 中的任何标准重组 DNA 技术 (Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing Associates&Wiley Interscience，New York，1989) 来产生。病毒基因组然后可被连接入适当的载体用于转染进宿主细胞以产生病毒后代。

[0161] 在实施方案中，疫苗可包含分离并纯化的 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基抗原或其免疫原性片段。在一个方面，N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基抗原或其免疫原性片段在重组细菌表达载体或真核细胞表达载体中产生，所述重组细菌表达载体或真核细胞表达载体产生被分离并纯化以制备疫苗的抗原。例如，N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基抗原或其免疫原性片段在以下中被产生：微生物体诸如细菌、酵母或真菌；真核细胞诸如哺乳动物细胞或昆虫细胞；或重组病毒载体诸如腺病毒、痘病毒、疱疹病毒、Simliki 森林病毒、杆状病毒、噬菌体、辛德毕斯病毒、仙台病毒、活委内瑞拉马脑炎 (VEE) 载体诸如毒株 V3526 或 TC-83、和源自 VEE 的病毒复制子颗粒 (VRP)、马动脉炎病毒 (EAV)、或传染性胃肠炎病毒 (TGE)。用于产生 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基抗原或其免疫原性片段的合适的细菌包括大肠杆菌 (Escherichia)、枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)、或能够表达异源多肽的任何其他细菌。用于表达 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs、NSm 亚基抗原或其免疫原性片段的合适的酵母类型包括酿酒酵母 (Sacharomyces cerevisiae)、粟酒裂殖酵母 (Schizosaccharomyces pombe)、假丝酵母 (Candida)、或能够表达异源多肽的任何其他酵母。用于使用上述细菌、重组病毒载体、真核细胞产生用于疫苗的抗原的方法是本领域熟知的。

[0162] 为了产生由 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段组成的疫苗，编码 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段的核酸在质粒中，且该核酸被可操作地连接至启动子，所述启动子影响 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段在微生物中的表达。合适的启动子包括，但不限于，T7 噬菌体启动子、T3 噬菌体启动子、β - 半乳糖苷酶启动子、和 SP6 噬菌体启动子。N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段在微生物中的表达使 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原能够利用发酵技术被产生，所述发酵技术被商业地使用用于产生大量的重组抗原多肽。用于分离和纯化抗原的方法是本领域熟知的，并且包括诸如凝胶过滤、亲和层析、离子交换层析、或离心分离的方法。

[0163] 为了便于 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段的分离，可制备融合多肽，其中所述亚基被连接至另一个多肽，所述多肽使能够通过亲和层析分离。在实施方案

中，融合多肽使用以下表达系统之一制备。例如，编码 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段的 cDNA 核酸序列被在 5’末端或 3’末端连接至编码多肽的核酸。核酸在适当的密码子阅读框中被连接以使融合多肽能够产生，在所述融合多肽中 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 或其部分的氨基末端和 / 或羧基末端被融合至允许该抗原作为融合多肽简化地回收的多肽。

[0164] 用于产生用于在疫苗中使用的 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基或其免疫原性片段的原核生物表达系统的实例是从 Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J. 可得的谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 基因融合系统，其使用 pGEX-4T-1 表达载体质粒。编码 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 亚基或其免疫原性片段的 cDNA 在适当的密码子阅读框中与编码 GST 的 DNA 融合。融合多肽的 GST 部分允许使用谷胱甘肽琼脂糖 4B 亲和层析术快速纯化融合多肽。纯化后，融合多肽的 GST 部分可通过用位点特异的蛋白酶诸如凝血酶或因子 Xa 裂解来除去，以产生不含 GST 多肽的抗原决定簇。不含 GST 多肽的 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段通过第二轮谷胱甘肽琼脂糖 4B 亲和层析术来产生。

[0165] 用于产生包含 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段的疫苗的另一种方法是这样的方法：符合读框地将编码聚组氨酸的 DNA 密码子与编码抗原决定簇的 cDNA 连接。聚组氨酸通常包含六个组氨酸残基，其允许融合多肽通过金属亲和层析术、优选地镍亲和层析术纯化。为了产生不含聚组氨酸的 N、Gn、Gc、Gn/Gc、NSs 或 NSm 抗原或其免疫原性片段，裂解位点诸如肠激酶裂解位点在适当阅读框中被融合在编码聚组氨酸的密码子和编码抗原的密码子之间。不含聚组氨酸的抗原通过用肠激酶裂解除去聚组氨酸来制备。不含聚组氨酸的抗原通过结合游离的聚组氨酸的第二轮金属亲和层析术来产生。参见 Motin 等人 Infect. Immun. 64. 4313-4318(1996)。从 Invitrogen, Carlsbad, Calif. 可得的 Xpress 系统是对于制备并然后分离聚组氨酸多肽融合蛋白可得的商品化试剂盒的实例。

[0166] 包含疫苗的免疫原性组合物可以以多种制剂例如可注射剂、液体溶液或乳剂来制备。此类赋形剂可包括水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇，及其组合。免疫原性组合物和疫苗还可包含辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂、或佐剂以增强其效力。

[0167] 免疫原性组合物和疫苗可通过皮下或肌内注射或以任何其他合适的方式来肠胃外施用。免疫原性制剂和疫苗以与该剂型相容的方式、并以如将是治疗有效的、免疫原性的和保护性的此类量被施用。待施用的量取决于待治疗的受试者，包括，例如，个体的免疫系统合成抗体，并且，如果需要，产生细胞介导的免疫应答的能力。待施用的需要的活性成分的精确量取决于医师的判断。然而，适当的剂量范围由本领域技术人员容易地确定并且可以是免疫原的微克量级。用于初始施用及加强剂量的合适方案也是可变的，但可包括初始施用然后后续施用。该剂量还可取决于施用途径，并将根据宿主的大小而变化。

[0168] 免疫原在根据本发明的免疫原性组合物中的浓度通常是约 1％至约 95％。如果抗原与通常在磷酸盐缓冲盐水中作为 0.005％至 0.5％的溶液使用的佐剂共施用，则免疫原性可被显著地提高。佐剂增强了抗原的免疫原性但不一定增强免疫原性的抗原自身。佐剂可通过以下起作用：在施用的位点附近局部地保留抗原，以产生储库效应利于抗原缓慢、持续的释放至免疫系统的细胞。佐剂还可将免疫系统的细胞吸引至抗原储库并刺激此类细胞引发免疫应答。

[0169] 免疫刺激剂或佐剂已被使用了许多年来改善宿主对例如疫苗的免疫应答。本发明

的疫苗可连同佐剂一起使用，所述佐剂例如，脂多糖、氢氧化铝和磷酸铝（明矾）、与膜蛋白抗原复合的皂角苷（免疫刺激复合物）、带有矿物油的普朗尼克聚合物、矿物油中死的分枝杆菌、弗氏完全佐剂、细菌产物诸如胞壁酰二肽（MDP）和脂多糖（LPS）、以及脂质 A 和脂质体。理想的佐剂的期望的特性包括：(1) 没有毒性；(2) 刺激持久免疫应答的能力；(3) 制造的简单性和长期保存的稳定性；(4) 引发通过多种路径施用的抗原的 CMI 和 HIR 两者的能力；(5) 与其他佐剂的协同作用；(6) 与抗原呈递细胞（APC）的群体选择性地相互作用的能力；(7) 特异地引发适当的 T 细胞辅助细胞 1(TH1) 或 TH2 细胞 - 特异性免疫应答的能力；和 (8) 选择性地增加针对抗原的适当的抗体同种型水平（例如，IgA）的能力。与本发明一起使用的佐剂不必具有待与本发明一起使用的所有这些特性。

[0170] 用于本发明的疫苗的任何一个实施方案的施用路径包括，但不限于，口鼻、肌内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及经皮或通过吸入或栓剂。疫苗可通过任何装置来施用，所述任何装置包括，但不限于，注射器、喷雾器（nebulizer）、雾化器（mister）、无针注射设备、或微粒轰击基因枪（Biolistic 轰击枪）。

[0171] 本发明还涉及诊断试剂盒和药物试剂盒，所述诊断试剂盒和药物试剂盒包含一个或更多个容器，所述一个或更多个容器填充本发明的上述组合物的一种或更多种成分，例如编码 ADP 的核酸，ADP、其衍生物、同源物或变体或片段，或针对 ADP 的抗体、其衍生物、同源物或变体或片段，或包含 ADP 或编码 ADP 的核酸的疫苗。因此，本公开内容的多核苷酸、多肽和抗体、和疫苗可被采用作为用于治疗和诊断 RVFV 的研究试剂和材料。特别地，预期试剂盒可用于确定受试者是否已成功接种疫苗以使得针对 ADP 的抗体存在于所收集的样品中。例如，来自动物例如用以上所述的 ADP 接种的绵羊的生物样品被收集并与 ADP 或其他抗 ADP 的抗体制品一起温育持续足够使抗体结合发生的时间。与 ADP 结合的抗体或其他抗 ADP 的抗体制品使用本领域普通技术人员已知的方法例如蛋白印迹分析和 / 或 ELISA 测定来检测。

[0172] 如本文公开的抗体可以是单克隆抗体，所述单克隆抗体可以是具有针对本公开内容的两种或更多种抗原的特异性的任何类型的完整免疫球蛋白例如 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE、嵌合抗体或杂交抗体。它们还可以是例如 F(ab')2、Fab'、Fab、Fv 等的片段，包括杂交片段。

[0173] 制备单克隆抗体的方法是本领域熟知的，并且可包括脾细胞与骨髓瘤细胞的融合（Kohler 和 Milstein 1975Nature 256；495；Antibodies-a laboratory manual Harlow 和 Lane 1988）。可选地，单克隆 Fv 片段可通过筛选合适的噬菌体展示文库来获得（Vaughan T J 等人 1998 Nature Biotechnology 16；535）。单克隆抗体可通过已知的方法人源化或部分人源化。

[0174] 本发明的抗 ADP 抗体具有多种用途。例如，抗 ADP 抗体可用于在针对 RVFV 的诊断测定中使用，例如，检测其在特定细胞、组织、或血清中的表达。可使用本领域已知的多种诊断测定技术，诸如在异质相或同质相中进行的竞争性结合测定、直接或间接夹心测定及免疫沉淀测定（Zola, Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques, CRC 出版社，Inc.（1987）147-158 页）。在诊断测定中使用的抗体可用可检测的部分来标记。本发明的抗体的检测可通过将抗体与可检测的部分偶联（即，物理连接）来便利化。可检测的部分的实例包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、和放射性材料。合适的酶的实例

包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪氨基荧光素(dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的实例包括鲁米诺；生物发光材料的实例包括荧光素酶、萤光素、和水母发光蛋白；以及合适的放射性材料的实例包括I^{125}、I^{131}、S^{35}或H^{3}。可检测的部分应能够直接或间接产生可检测的信号。可采用本领域已知的用于将抗体缀合至可检测的部分的任何方法，包括由以下描述的那些方法：Hunter等人，Nature,144:945(1962)；David等人，Biochemistry,13:1014(1974)；Pain等人J.ImmunolMeth.,40:219(1981)；和Nygren,J.Histochem.和Cytochem.,30:407(1982)。本发明人预期此类诊断试剂盒在多层次包括但不限于个体的(畜牧场)、地区和/或国家层次上的针对RVFV的根除计划中将是有价值的。

[0175] 抗ADP抗体还可用于从重组细胞培养物或天然来源亲和纯化ADP。在该过程中，使用本领域熟知的方法将针对ADP的抗体固定在合适的支撑物，诸如Sephadex树脂或滤纸上。固定化的抗体然后与待纯化的包含ADP的样品接触，并且此后用合适的溶剂洗涤支撑物，所述合适的溶剂将基本上除去样品中除了被结合至固定化的抗体的ADP之外的所有材料。最后，用将从抗体释放ADP的另一种合适的溶剂洗涤支撑物。

[0176] 虽然本发明已关于ADP被描述，但要理解，这涵盖了其衍生物、同源物或变体或片段和具有基本不影响该重组蛋白的保护性抗原性质的添加、缺失或取代的相似蛋白。

[0177] 足够赋予对RVFV的免疫的疫苗的量通过本领域技术人员熟知的方法来确定。该量将基于该疫苗接受者的特征和所需的免疫水平来确定。通常，待施用的疫苗的量或剂量将基于技术兽医的判断来确定，或可通过常规实验容易地确定。每种毒株的病毒疫苗的量可被调整，即增加或减少，以产生提供足够保护免于期望的RVFV的感染的制剂。如本文所公开，在疫苗制剂中不同的毒株可以经确定在预防或治疗毒株的RVFV感染上有效的任何量组合，并且如果存在交叉保护，可能的其他菌株被组合。对由其他RVFV菌株的感染的交叉保护可取决于其中RVFV菌株被施用或受试者是否已经历如以上所述的在先RVFV感染的量级。

[0178] 可用于表达嵌合蛋白并产生根据本发明的病毒样颗粒的宿主细胞是特定的真核细胞，和特定的昆虫细胞，例如草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0179] 可在这些昆虫细胞中使用的载体是源自杆状病毒的特定载体。用于在可用于进行这些方法的杆状病毒/昆虫细胞系统和载体中克隆和表达重组蛋白的方法是本领域技术人员已知的，并例如在BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS:A LABORATORY MANUAL Freeman和Cie,New York,(1992)中被描述。也可被使用的其他方法和其他载体例如，在以INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE和CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE的名义的申请EP 0 345152、申请EP 0 651 815或申请EP 0 638 647中和在PCT申请WO 95/20672中被描述。

[0180] 以下实施例旨在说明但不限制本发明。

实施例

[0181] 材料和方法

[0182] 克隆并构建重组杆粒

[0183] RVFV 核蛋白 (N) 和非结构蛋白 (NSs) 的全长编码序列使用校正 DNA 聚合酶 Pfx50(Life Technologies/Invitrogen,Carlsbad,CA) 和从公开的序列 RVFV 毒株 ZH548(登录号 DQ380151) 设计的引物 (表 1) 通过 PCR 扩增。

[0184] 表 1. 用于扩增 RVFV 蛋白编码区的引物

[0185]

引物	方向	序列	靶
JAR979*	正向	CACCATGGACAACTATCAAGACCTTGCGATCC (SEQ ID NO:11)	N cds
JAR980*	反向	GGCTGCTGTCTTGTAAGCCTGAGCG (SEQ ID NO:12)	Ncds
JAR981*	正向	CACCATGGATTACTTTCCTGTGATATCTGTTGATTTG (SEQ ID NO:13)	NSs cds
JAR982*	反向	ATCAACCTCAACAAATCCATCATCATCACTCTCC (SEQ ID NO:14)	NSs cds
JAR975*	正向	CACCATGATTGAAGGAGCTTGGGATTC (SEQ ID NO:15)	NSm cds
JAR976*	反向	AGCAAAAACAACAGGTGCCAAAGC (SEQ ID NO:16)	NSm cds

[0186]

JAR996[a]*	正向	CACCATGACAGTCCTTCCAGCCTTAG (SEQ ID NO:17)	Gne 或 Gc cds
JAR111*	反向	GGCACTGAGAGCAGTGTGACACTG (SEQ ID NO:18)	Gne cds
JAR987*	反向	TGAGGCCTTCTTAGTGGCAGCAAG (SEQ ID NO:19)	Gc cda
JAR990±	正向	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG (SEQ ID NO:20)	M13 序列引物
JAR991±	反向	AGCGGATAACAATTTCACACAGG (SEQ ID NO:21)	M13 序列引物

[0187] [a]结构糖蛋白 Gne 和 Gc 的共有的信号肽特异性引物。

[0188] * 内部 (in house) 设计的引物。±Heidecker 等人,Gene(1980)10:69-73.

[0189] N,核蛋白 ;cds,编码序列 ;NSs,非结构蛋白 S ;NSm,非结构蛋白 m ;Gne,Gn 糖蛋白的胞外域,Gc,Gc 糖蛋白。

[0190] 包含 ZH548 的 S 区段的整个编码区的质粒 pET30 Ek/LIC 被使用作为 PCR 模板。病毒结构糖蛋白 Gn 和 Gc 以及非结构蛋白 NSm 的胞外域和全长编码序列根据 ZH548 毒株的公开的序列来合成 (Genewiz,San Diego,CA)。另外,对于 Gn,使胞质尾区从编码序列中缺失。扩增子使用 Qiagen 凝胶或 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen,Valencia,CA) 来纯化。将纯化的产物克隆进 pFastBac/CT-TOPO 载体 (Life Technologies/Invitrogen,Carlsbad,CA)。将 TOPO 克隆反应物转化进 One Shot Mach1 T1 化学感受态大肠杆菌 (E.coli) 以产生各自的供体质粒,pRF-N、pRF-NSs、pRF-Gn、pRF-Gc 和 pRF-NSm。插入片段在供体质粒中的大小和序列使用基因特异性引物 (表 1) 通过 PCR 证实、通过限制性内切酶分析和 DNA 测序证实。包含感兴趣的基因的供体质粒使用 Qiagen 小量提取试剂盒 (Qiagen,Valencia,CA) 从大肠杆菌转化株来纯化。将构建体转化进 MAX Efficiency DH10Bac 感受态大肠杆菌以通过位点特异性转座产生重组杆粒。重组杆粒使用 HiPure 质粒小量提取试剂盒来纯化。感兴趣的基因向重组杆粒中的转座使用 M13F 和 M13R 引物通过 PCR 来证实 (Heidecker,等人 1980)。

[0191] Gn 和 Gc 的信号肽预测和修饰

[0192] 编码包膜糖蛋白 Gn 和 Gc 的 RVFV M 区段具有在从 M 区段转录的单个 mRNA 内的至少四个翻译起始位点。我们假设，从起始密码子 (ATG) 的一个开始至 Gn 的起点的序列可用作信号肽，并引导多蛋白从细胞质转位至内质网 (ER)。信号肽和信号肽酶裂解位点的预测使用隐马尔可夫模型 (hidden Markov model) 和神经网络模型预测程序以 SignalP 3.0 来进行。Gn 编码序列上游的从 RVFV M 区段的第五个 ATG 开始的 54 个核苷酸的序列 (SEQ ID NO:1)，被鉴定作为具有单个信号肽酶裂解位点的强信号肽。为确保糖基化形式的蛋白的表达，该信号序列被融合至 Gn 和 Gc 的 N 末端并使用表 1 中所列的引物通过 PCR 扩增。将序列克隆进重组杆粒并在杆状病毒表达系统 (LifeTechnologies/Invitrogen, Carlsbad, CA) 中表达。

[0193] 重组 RVFV 蛋白的表达和纯化

[0194] 为了表达重组 RVFV 蛋白，将高度纯化的重组杆粒使用 Cellfectin II 试剂 (Life Technologies/Invitrogen Carlsbad, CA) 转染进在补充有 10％胎牛血清和 100U/ml-100pg/ml 青霉素－链霉素的 Sf-900 II SFM 培养基 (Life Technologies/lnvitrogen, Carlsbad, CA) 中生长的草地贪夜蛾 (Spodoptera frugiperda) Sf9 细胞 (Life Technologies/Invitrogen) 中。蛋白表达使用 P2 或更高代重组杆状病毒储液 (>10^7pfu/ml) 在 T75 或 T175Biolite 烧瓶 (ThermoFisher Scientific, Dubuque, IA) 中进行。为了可视化重组蛋白的表达，通过在 12％ Bis-Tris 聚丙烯酰胺凝胶上分离并使用抗 His-HRP 抗体检测使样品经历蛋白印迹分析。蛋白被表达为具有 C 末端 6xHis- 标签，并且重组蛋白的纯化使用 Ni-NTA 超流树脂 (Novagen, Rockland, MA) 根据制造商的使用说明进行。重组蛋白用包含 300mM NaCl、50mM Na_2PO_4(pH 8.0) 和 250mM 咪唑的洗脱缓冲液来洗脱，并针对存储缓冲液 PBS(pH 7.4) 和 5％甘油透析过夜。纯化的蛋白用考马斯蓝染色，并且蛋白浓度使用二喹啉甲酸 (BCA) 测定 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 以 562nm 的吸光度、使用牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) 作为蛋白标准品来确定。将等分试样存储于 -80℃下直至使用。

[0195] 免疫荧光抗体测定

[0196] 为了证实重组 RVFV 蛋白的表达，进行免疫荧光抗体测定。简言之，Sf9 细胞用携带 RVFV N 或 Gn 编码序列的重组杆状病毒来感染。约 36 小时后，将细胞收获并使用细胞离心器，Cytopro(Wescor, Logan, UT) 根据制造商的使用说明附着至载玻片，并在 -20℃下在丙酮中固定 5min。载玻片在包含 1％ BSA 的 PBS 中在 37℃下封闭 45min，并然后与分别针对 N 和 Gn 蛋白的小鼠单克隆抗体 ID8 和 4D4(由美国陆军传染病医学研究所 (the United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases, USAMRIID) 的 Connie W. Schmaljohn 博士所提供) 在 37℃下温育 30min。载玻片在 1X 荧光抗体 (FA) 冲洗缓冲液 (2.85g Na_2CO_3、8.4g $NaHCO_3$、2.125g NaCl、蒸馏水至 1000ml ;pH 9 至 9.5) 中冲洗 10min，并且用抗小鼠 FITC 缀合的二抗在 37℃下探测 30min(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA)。载玻片在 1X FA 冲洗缓冲液中冲洗 10min 并且用包含封固介质的 DAPI(Invitrogen, Molecular Probes) 复染。载玻片在荧光显微镜 (Nikon, Eclipse 90i®) 下以 100x 放大倍率来检查。

[0197] 衣霉素测定

[0198] 使用杆状病毒表达系统产生糖基化的重组蛋白质，翻译后修饰显示增强抗原性 /

免疫原性(Gavrilov等人,2011)。为证实修饰的Gn和Gc蛋白被糖基化,进行衣霉素糖基化抑制测定。为此,将六孔板用每孔2 x 10^6个Sf9细胞来接种,并且用表达RVFV Gn或Gc糖蛋白的重组杆状病毒以1的MOI来感染。感染之后,将衣霉素以0.5μg/ml、1μg/ml、3μg/ml、6μg/ml、8μg/ml和10μg/ml的不同浓度立即添加至每个孔。感染后(pi)5天收获细胞,并重悬在包含1x完全蛋白酶抑制剂(Roche Diagnostics®, Indianapolis, IN)的PBS pH 7.4中。样品通过SDS-PAGE在NuPAGE 12% Bis-Tris凝胶(Life Technologies/Invitrogen)中分离,并转移在聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(GE Healthcare, Amersham Hybond-P)上。膜使用抗His(C-末端)-HRP单克隆抗体(Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA)如以上所述被探测。反应性使用AEC(3-氨基-9-乙基咔唑)过氧化物酶底物系统(Abcam, Cambridge, MA)来检测。

[0199] 裂谷热病毒抗血清

[0200] 绵羊(兰布莱绵羊(Rambouillet))用10^6 pfu的RVFV疫苗毒株MP12皮下接种。这些研究在堪萨斯州立大学(生物安全研究所(Biosecurity Research Institute, BRI)BSL-3Ag设施)或在拉勒米,WY的节肢动物传播的动物疾病研究单位(Arthropod-Borne Animal Diseases Research Unit, ABADRU)大型动物隔离建筑(large animal isolation building, LAIB)中进行(第28天绵羊血清,P1-P6)。为了获取血清,血液样品在接种疫苗后(pv)的特定时间点(天)从个体动物收集。接种疫苗前血液样品在接种疫苗之前从每个个体绵羊收集,其被用作免疫前的对照血清。感染后(pi)第28天抗血清在加拿大温尼伯的CFIA BSL-3Ag设施中从在先以野生型RVFV ZH501毒株攻击的绵羊获得(绵羊P7-P10)。所有血清存储于-80℃并热灭活(56℃持续30min),然后从BSL-3Ag实验室移出。实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)方案在堪萨斯州立大学(BRI)和怀俄明州立大学(ABADRU-LAB)被批准。

[0201] 蛋白印迹分析

[0202] 简言之,将约5pg的每种重组RVFV蛋白在1x MOPS运行缓冲液中在12% Bis-Tris聚丙烯酰胺凝胶(Life Technologies/Invitrogen)中进行电泳。蛋白根据标准方案通过电印迹转移到PVDF膜上。将膜在包含3%牛血清白蛋白(BSA)的PBS(pH 7.4)中的0.1%吐温-20中在室温下封闭1小时。将印迹在PBS中的0.1%吐温-20中洗涤3次,每次5min。所有随后的洗涤步骤如以上所述来进行。为了分析重组蛋白表达,将膜与在封闭溶液中以1:5,000稀释的抗-His-(C-末端)-HRP(Life Technologies/Invitrogen)一起温育。重组蛋白N和Gn的表达分别使用以1:2,000稀释的一抗,小鼠抗N(R3-ID8)和小鼠抗Gn单克隆抗体(4D4)进一步证实。为了分析针对绵羊血清的反应性,将膜与1:100稀释的每种测试血清一起在室温下温育1小时。洗涤后,将膜与1:25,000稀释的蛋白G-HRP(Abcam, Cambridge, MA)一起在室温下温育1小时。在最终的洗涤步骤后,特异性反应性使用AEC(3-氨基-9-乙基咔唑)过氧化物酶底物(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)来检测。

[0203] 间接酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0204] 将96孔板(Nunc, Maxisorp®)用于间接ELISA。用100μl杜尔贝科包被缓冲液(Dulbecco's coating buffer), pH 7.4(Life Technologies/Invitrogen)中的100ng重组蛋白在4℃下过夜包被每个孔。将板用包含0.1%吐温和1%脱脂牛奶的PBS(pH 7.4)

在37℃下封闭15min。用PBS中的0.1％吐温-20洗涤三次后，添加200μl体积的在封闭溶液中以1:200稀释的测试血清，并在37℃下温育1小时。所有随后的洗涤步骤如以上所示进行三次。每个血清样品一式两份被测试。每个测试包括从用RVFV的强毒毒株(ZH501)攻击的绵羊获得的阳性对照，和从接种疫苗前的各绵羊获得的阴性对照。洗涤后，将板与在封闭溶液中以1:50,000稀释的蛋白G-HRP(Abcam,Cambridge,MA)一起在37℃下温育1小时。蛋白G具有对来自绵羊、山羊、马和兔的IgG的高结合亲和力，对IgM具有很少或没有结合亲和力。洗涤后，添加100pl包含0.1mg/ml 3,3',5,5'-四甲基-联苯胺(TMB)(Thermo Scientific,Rockford,IL)和H_2O_2的底物缓冲液，并且将板在黑暗中温育25min。反应用2M H_2SO_4终止，并在450nm处测量光密度(OD)。对于每个ELISA，临界OD值通过向从接种前/未感染的绵羊获得的血清的平均OD值加上2个标准差来确定。

[0205] 细胞培养物

[0206] 将非洲绿猴细胞，Vero E6(ATCC,Manassas,VA)维持在补充有10％胎牛血清、L-谷氨酰胺和青霉素-链霉素(Invitrogen-Life Technologies,Carlsbad,CA)的伊格尔最低必需培养基(Eagle's minimal essential medium)(Corning Cellgro,Manassas,VA)中。将培养物维持在37℃下在加湿的5％ CO_2气氛中。将草地贪夜蛾(Sf9)细胞(Invitrogen/Life Technologies)维持在补充有10％胎牛血清和青霉素-链霉素(Invitrogen/Life Technologies)的SFM 900 II培养基中。将这些细胞维持在27℃。

[0207] 重组蛋白表达的检测和免疫反应性的分析

[0208] 将约5μg的每种纯化的重组蛋白在1x MOPS运行缓冲液中在12％ Bis-Tris聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen-Life Technologies)中进行电泳。根据标准方案将蛋白转移到PVDF膜上。将膜在包含PBS(pH 7.4)中的0.1％吐温-20和3％牛血清白蛋白(BSA)的封闭溶液中在室温下封闭1小时或在4℃下过夜封闭。此后，将膜在PBS中的0.1％吐温-20中洗涤3次，每次5min，并然后与在封闭溶液中以1:5,000稀释的抗-His-(C-末端)-HRP(Invitrogen-Life Technologies)一起温育。重组蛋白N和Gne的表达分别使用以1:2,000稀释的一抗，小鼠抗N(R3-ID8)和小鼠抗Gn单克隆抗体4D4(来自美国陆军传染病医学研究所的Connie Schmaljohn博士的惠赠)进一步证实。为了探测从用重组RVFV Gn和Gc糖蛋白亚单位疫苗接种的绵羊获得的抗血清或感染RVFV MP12的对照血清的免疫反应性，将印迹与以1:100稀释的个体绵羊血清一起在室温下温育1小时。洗涤后，将膜与1:25,000稀释的蛋白G-HRP(Abcam,Cambridge,MA)一起在室温下温育1小时。在最终的洗涤步骤后，特异性反应性使用AEC(3-氨基-9-乙基咔唑)过氧化物酶底物(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)或ECL增强型化学发光检测系统来检测。

[0209] 疫苗的制备和动物免疫

[0210] 根据制造商的使用说明将纯化的糖蛋白在montanide ISA25油包水佐剂(Seppic,France)中配制，以获得每疫苗剂量50μg每种免疫原的浓度。六只绵羊(9号、36号、163号、169号、170号、179号)各自用50μg纯化的Gn和50μg纯化的Gc的初次剂量皮下免疫。初次接种疫苗后(在以下简单称为疫苗接种后(pv))第21天，给予每只绵羊相同量的疫苗(第二剂量)的加强接种(booster)。在接种疫苗之前(第0天)从每只绵羊颈静脉收集血液样品用于分离血清，以确立基线接种疫苗前免疫应答状态。此后，在pv第7天、14天、21天、28天、35天、42天和49天从每只绵羊每周收集血清样品。将所有血清存

储于 -80℃下直至被使用。动物实验获得南达科他州立大学的实验动物使用与管理委员会(IACUC)的批准。

[0211] 免疫原特异性抗体应答

[0212] 血清中的特异性抗体应答使用镍柱纯化的杆状病毒表达的 RVFV Gn、Gc 和大肠杆菌表达的 RVFV N 蛋白通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量。N 蛋白使用由德国马尔堡大学的 Friedeman Weber 友好提供的表达构建体在大肠杆菌中表达,并用作阴性诊断标志物抗原,以评价重组亚单位疫苗的 DIVA 相容性。为了进行 ELISA,96 孔板(Nunc, Maxisorp®)格式中的每个孔用 100μl 杜尔贝科包被缓冲液(pH 7.4)(Invitrogen-Life Technologies)中约 100ng 的各自纯化的重组蛋白在 4℃下包被过夜。将板用包含 0.1%吐温和 1%脱脂牛奶的 PBS(pH 7.4)在 37℃下封闭 15min。用在 PBS 中的 0.1%吐温 -20 洗涤三次后,添加 200μl 体积的在封闭溶液中 1:200 稀释的测试血清,并在 37℃下温育 1 小时。所有随后的洗涤步骤如以上所示进行三次。每个血清样品一式两份被测试。阳性对照血清和阴性对照血清被包括在每个测定中。将板与在封闭溶液中 1:50,000 稀释的蛋白 G-HRP(Abcam,Cambridge,MA)一起在 37℃下温育 1 小时,洗涤,并将 TMB 过氧化物酶底物和过氧化物酶溶液 B(Thermo Scientific,Rockford,IL)和 H_2O_2的 100-μl 等分试样添加至每个孔。将板在黑暗中保持 15-20min。颜色显影通过添加 2M H_2SO_4至每个孔来终止;并且使用酶标仪(FluoStar Omega,BMG LABTECH Inc.,Cary,NC)在 450nm 处测量光密度(OD)。每个 ELISA 中的临界点,通过向接种疫苗前血清的相应平均 OD 值加上两个标准偏差来确定。平均 OD 值等于或大于临界值被认为是阳性。

[0213] 抗 RVF 病毒 PRNT80

[0214] MP12 RVFV 的储液在 250μl 的包含 4%牛血清白蛋白的 1x MEM(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)中稀释至 50PFU。分别地,将来自每个接种的绵羊的血清的等分试样如下稀释:在包含 2%牛血清白蛋白和 1%青霉素链霉素的 1x MEM 中的 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 和 1:1280。将稀释的血清(250μl)与等体积的稀释的 MP12 病毒混合并在 37℃下温育 1 小时。此后,将每一种血清加 RVFV 的混合物用于在 12 孔板中感染 Vero E6 细胞的汇合单层。在 37℃和 5% CO_2下吸附 1 小时后,将混合物移出,并将 1.5ml 的营养琼脂糖覆盖物(1x MEM,4%牛血清白蛋白、0.9% SeaPlaque 琼脂)添加至该单层上。温育 5 天后,将细胞用 10%中性缓冲的福尔马林固定 3 小时,然后除去琼脂糖覆盖物。将该单层用 PBS 中的 0.5%结晶紫染色,并计数蚀斑。计算出的 PRNT80 相应于最高血清稀释物的倒数滴度,导致相对于病毒对照蚀斑数目中 80%的减少。

[0215] 电子显微术

[0216] 为了检查或排除在将蛋白混合为疫苗制剂后重组 Gn 和 Gc 可能组装为 VLP,进行了透射电子显微术(TEM)。简言之,将等量的纯化的 Gn 和 Gc 在单管中混合在一起,并在室温下温育 30min。并行地,还将纯化的 Gn 和 Gc 的等分试样制备在单独的管中,并如以上描述的温育 30min 作为对照。随后,将蛋白雾化在铜 Formar-碳包被的网格(cupper Formar-carbon coated grids)(Tedd Pella Inc.,Redding,CA)上,在室温下干燥 30min,并用磷钨酸(PTA)染色。图像使用电子显微镜(FEI Technai G2 Spirit biot,Hillsboro,Ore)以 30,000x 或 60,000x 的校准倍率来记录。

[0217] 统计分析

[0218] 使用具有方差齐性或非齐性的独立样本的 t 检验进行分析数据。为了减少可变个体宿主免疫应答对反应性的影响，我们计算了 OD 值的几何平均数并分析差异的统计显著性。为了确定在接种疫苗前和接种疫苗后血清的光密度 (OD) 值中观察到的差异的显著性，确定了每只绵羊的血清反应性指数 (SRI)，定义为接种疫苗后血清 OD 值与接种疫苗前血清 OD 值的比。

[0219] 实施例 1. RVFV 重组蛋白的表达

[0220] 使用重组杆状病毒，将各自在它们的 C- 末端处包含六个组氨酸标签的 RVFV 结构 (Gc、Gn 和 N) 蛋白和非结构蛋白 (NSs 和 NSm)，使用 Sf9 细胞在真核表达系统中表达。为了确保结构糖蛋白 Gn 和 Gc 转位进入 ER 并糖基化，将信号肽融合在两种蛋白的 N 末端的上游。将 Sf9 细胞用携带全长 Gn 编码序列的重组杆状病毒感染，导致无 Gn 蛋白或低量的 Gn 蛋白。为了最小化全长 Gn 与细胞膜的相互作用，仅表达了 Gn 蛋白的胞外域，而不含跨膜区和细胞溶质区。蛋白使用抗 His-HRP 单克隆抗体通过蛋白印迹来检测 (图 1a)。期望的分子量的重组蛋白被表达 (Gc ＝ 60kDa、Gn ＝ 54kDa、N ＝ 30kDa、NSs ＝ 33kDa、NSm ＝ 17kDa)。N 和 Gn 蛋白的表达用抗 N 或抗 Gn 小鼠单克隆抗体通过免疫反应被进一步证实 (图 1b)。考马斯染色的纯化的蛋白的凝胶示于图 1c 中。使用针对 Gn 和 N 蛋白的小鼠单克隆抗体的免疫荧光抗体测定进一步证实了该蛋白在 Sf9 细胞中的表达 (图 2)。在表达重组 Gn 的细胞的外围的附近的表面上观察到特异性绿色荧光信号，而对于 N，观察到在细胞质和表面两者的染色 (图 2)。

[0221] 实施例 2. 杆状病毒表达的蛋白的蛋白糖基化状态的确定 .

[0222] 已知的是，RVFV Gn 和 Gc 糖蛋白分别携带一个和四个推定的 N 糖基化位点 (Gerrard 和 Nichol 2007)。为了表征 Gn 和 Gc 的糖基化模式，进行了 N 糖基化通过用衣霉素处理细胞的生物化学抑制，所述衣霉素是细菌和真核生物 N- 乙酰氨基葡糖转移酶的有效抑制剂。当与未处理的对照相比时，将用重组 Gc 或 Gn 杆状病毒感染的 Sf9 细胞用不同浓度的衣霉素 (0.5pg-10pg) 处理，导致这些蛋白的糖基化的抑制，其通过反应蛋白的较低分子量显示。当与已知具有仅一个糖基化位点的 Gn(显示边缘位移)(图 3b) 相比时，对于已知具有四个推定的糖基化位点的 Gc(图 3a)，位移是更明显的。作为对照，使用在 Sf9 细胞中表达的杆状病毒表达的绵羊朊病毒蛋白 (PrP)。用衣霉素的处理导致 N- 糖基化的显著抑制 (图 3c)。

[0223] 实施例 3. 针对重组蛋白的抗体反应性

[0224] 针对重组蛋白 N、NSs、NSm、Gn 和 Gc 的抗体反应性，使用在接种疫苗后 (pv) 的不同时间点 (第 3、10 和 28 天) 从接种 MP12 的绵羊收集的血清来检查。重组 N 与 pv 第 3 天血清反应，且 N 和 NSs 蛋白两者显示与 pv 第 10 天和 pv 第 28 天血清的抗体反应性，N 始终显示比 NSs 更强的反应性 (图 4)。结构糖蛋白 Gn 和 Gc 的反应性显示了 Gn 与 pv 第 3 天的 2 个血清样品中的 1 个反应。此后，它与在 pv 第 10 天和第 28 天获得的所有血清始终保持反应 (表 2)。

[0225] 表 2. 通过蛋白印迹确定的杆状病毒表达的裂谷热病毒蛋白与绵羊抗血清的反应性。

[0226]

重组蛋白	接种 MP12 的绵羊血清：pv 天数			野生型(ZH501)攻击的绵羊血清：pi 28
	第 3 天	第 10 天	第 28 天	(Nsp/测试的总样品)
	(nsp/测试的总样品)			
Gne	1/2	4/4	10/10	4/4
Gc	0/2	1/4	9/10	4/4
N	2/2	4/4	10/10	4/4
NSs	0/2	4/4	9/10	4/4
NSm	0/2	0/4	0/10	0/4

[0227] pv ＝接种疫苗后 ;pi ＝感染后 ;nsp ＝测试的样品呈阳性的数目 ;Gne ＝ Gn 糖蛋白的胞外域 ;Gc ＝ Gc 糖蛋白 ;N ＝核蛋白 ;NSs ＝非结构蛋白 S ;NSm ＝非结构蛋白 m。

[0228] Gc 蛋白显示在 pv 第 3 天时无反应性，且与 pv 第 10 天血清的弱的反应性，其中测试的 4 个血清样品中仅 1 个呈阳性 ;它与 pv 第 28 天血清 90％反应。为了进一步检查 RVFV 蛋白的反应性，我们使用从用 RVFV 的野生型毒株 ZH501 感染的绵羊获得的 pi 第 28 天血清进行了免疫印迹分析。重组 N 和 Gn 蛋白显示针对所有血清 (4/4) 的一致和强的反应性，NSs 和 Gc 也针对所有血清 (4/4) 反应，但具有相对较低的信号强度。我们没有检测到 NSm 蛋白与接种 MP12 的绵羊血清或 ZH501 感染的绵羊血清的特异性反应性。

[0229] 实施例 4. 重组蛋白针对用 RVFV 接种的绵羊血清的抗体反应性 .

[0230] 开发间接 ELISA 以评价重组蛋白针对从用 RVFV MP12 疫苗毒株接种或用野生型 ZH501RVFV 毒株攻击的绵羊获得的血清的抗体反应性。对于接种 MP12 的绵羊血清，重组蛋白 N、NSs、NSm、Gc 和 Gn 显示了反应性中的时间依赖性的增加，其通过 OD 值的增加所示 (图 5a-e)。观察到所有蛋白与第 28 天血清的一致的强反应性。在 pv 第 3 天时，存在与 N 的特别强的抗体反应性，且与 Gn 的程度较轻 (图 5a 和 5c)。与 NSs 的反应性水平也是强的，但具有相对较低的 OD 值 (图 5b)。与 Gc 的反应性在 pv 第 10 天时是高的，并在第 28 天时最强 (图 5d)。对于野生型暴露来源的绵羊血清，重组蛋白 N、NSs、Gn 和 Gc 与 pi 第 28 天反应。相比之下，NSm 显示与来自 MP12 和野生型感染的绵羊两者血清低的反应性，其通过相对低的 OD 值所示 (图 5e)。与阴性对照 (第 0 天血清) 相比，来自三只绵羊 (用野生型 ZH501 感染的 P7 和 P10，和 MP-12 免疫的绵羊 P5) 的血清显示显著的反应性 ($P<0.05$)。阳性血清从用野生型裂谷热病毒 ZH501pi 第 28 天的绵羊获得。

[0231] 实施例 5. Gn 和 Gc 糖蛋白的免疫原性

[0232] 为了检查疫苗诱导的免疫反应性，通过免疫印迹分析检查了来自绵羊 169 号、170 号和 163 号的 pv 第 28 天抗血清。来自所有三只绵羊的抗血清显示与疫苗抗原 Gn 和 Gc(图 6) 的特异性反应性，但未显示与对照 N 蛋白的特异性反应性。在接种疫苗之前获得的第 0 天血清，未显示与任何蛋白的特异性反应性。作为阳性对照，MP12 感染后第 28 天绵羊血清显示与杆状病毒表达的 N 蛋白的特异性反应性，证实重组蛋白的特异性 (图 6)。

[0233] 为了检查疫苗诱导的血清转化和抗体应答的动力学，在 Gn 和 Gc 特异性间接 ELISA 中测试了在 pv 不同时间点 (第 0、7、14、21、28、35、42 和 49 天) 从接种的绵羊收集的血清。在 pv 第 7 天在三只绵羊中检测到与 Gn 抗原的抗体反应性 (图 7a)。在 pv 第 14 天，所有血清转化的绵羊在 Gn 和 Gc 特异性 ELISA 中显示与 Gn 特异性抗体的反应性，显示相对较强的早发性 (early-onset) 反应性 (图 7a 和 b)。在 pv 第 21 天的第二疫苗剂量，显著 ($P<0.05$) 增加了在 pv 第 28 天时与两种抗原的特异性反应性 (图 7)。血清反应性指数 (SRI)(一种

用于在接种的动物中疫苗诱导的抗体应答的度量），显示OD值的增加，对于Gn抗原（图7c）范围从4至9.6倍，且对于Gc抗原（图7d）范围从8至22.4倍。对于两种抗原，在pv第28时观察到抗体应答的峰值诱导（图7a和b）。

[0234] 实施例6. 重组RVFV GnGc糖蛋白亚单位疫苗的DIVA相容性.

[0235] 通过间接ELISA的DIVA概念分析，使用Gn蛋白作为阳性诊断抗原以及N蛋白作为阴性标志物来进行，以检测接种疫苗的绵羊中的特异性抗体。为了排除ELISA中由于与共纯化的杆状病毒和/或昆虫细胞蛋白的反应性的过度背景，使用大肠杆菌表达的N蛋白作为阴性标志物抗原。使用来自接种疫苗的绵羊的血清，从pv第7天至pv第28天观察到与Gn抗原的免疫反应性的增加，其稍后达到平稳期直到实验的结束（图8a）。相比之下，与N抗原的免疫反应性是几乎不可检测的，在整个实验中保持在基线水平（图8a）。为了证实在ELISA中作为合适的标志物抗原的大肠杆菌表达的N蛋白的特异性免疫反应性，在ELISA中测试了MP12感染后第28天抗血清（阳性对照）与从用基于糖蛋白的疫苗接种的绵羊169号获得的血清（图8b）。与这些血清的反应性在所有时间点保持在基线阴性水平，而MP12对照血清显示了强反应性，如由高OD值所示的（$P<0.05$）。

[0236] 实施例7. 重组RVFV糖蛋白引发强烈的中和抗体应答.

[0237] 为了评价疫苗诱导的中和抗体应答，进行了蚀斑减少中和测定（图9）。使用减毒的RVFV病毒毒株，MP12。1:40的血清中和抗体滴度被认为是保护性应答。六只接种的绵羊中的五只在pv第14天显示保护性中和滴度，对应于以从1:40至1:160范围的抗体滴度的初次接种；一只绵羊9号早在pv第7天显示了1:40的保护性中和滴度（表3）。

[0238] 表3. 绵羊中响应以RVFV重组GnGc糖蛋白亚单位疫苗接种的倒数$PRNT_{80}$滴度。

[0239]

绵羊ID号	倒数PRNT$_{80}$滴度							
	接种疫苗前第0天	pv第7天	pv第14天	pv第21天	pv第28天	pv第35天	pv第42天	pv第49天
169	0	0	40	40	>1,280	>1,280	>1,280	>1,280
9	0	0	80	320	>1,280	640	>1,280	>1,280
170	0	0	40	80	>1,280	>1,280	>1,280	>1,280
179	0	0	40	80	>1,280	>1,280	>1,280	>1,280
9	0	40	160	80	>1,280	>1,280	>1,280	>1,280
36	0	0	80	160	>1,280	>1,280	>1,280	>1,280
平均值	0	nd	82	77	>1,280	nd	>1,280	>1,280
范围	0	nd	40-160	20-160	>1,280	640-1,280	>1,280->1,280	>1,280->1,280

[0240] Prevac＝接种疫苗前；pv＝接种疫苗后；nd＝不可确定。

[0241] 病毒中和滴度的保护性水平在所有绵羊中保持直到pv第21天，五只绵羊中的三只（170号、179号、36号）显示滴度增加。在pv第21天时施用的第二疫苗剂量在一周后在pv第28天时显著增强所有六只绵羊中的应答高于1:1,280的滴度（表3）。中和抗体滴

度在所有绵羊（除了 163 号绵羊，其在 pv 第 35 天时显示 1:640 的滴度）中保持为高的，范围从 1,280 至 >1,280 直到实验结束（表 3）。

[0242] 实施例 8. 电子显微术

[0243] 为了证实重组蛋白 Gn 和 Gc 在将该重组蛋白混合为疫苗制剂后不会再组装形成 VLP，通过透射电子显微术分析了这些蛋白。图片示出了未显示与 VLP 相似的蛋白聚集体的团块（图 10）。

[0244] 实施例 9. 佐剂组合配方 .

[0245] 用总计 1ml 的疫苗进行绵羊的免疫，所述疫苗包含以表 4 中所述的佐剂乳化的 50ug 的 Gc 和 Gn 重组蛋白。

[0246] 表 4 佐剂配方

[0247]

佐剂	来源	特征	审批状态
ISA25	Seppic	在初步研究中使用的油包水	CVB 批准的商业使用。
ISA206	Seppic	油包水，与弗氏不完全佐剂类似	强免疫性，与 ISA25 类似，但预期 10-100 倍更大的应答
ISA206+InAcT	Seppic/Medgene	油包水，加 TLR4 激动剂	预期对 ISA206 的免疫性的增强。
ISA206+InAcT-hisTAG	Seppic/Medgene	油包水，加 TLR4 激动剂，加调理作用诱导剂。	预期对 ISA206 的免疫性的增强。

[0248]

[0249] 对于该实施例，将总计 3 只动物随机分配至 4 组中的每组（总计 12 只动物）。驯化一周后，将动物用根据制造商的说明制备的在 ISA25、ISA206、ISA206 加 InAcT（菊粉乙酸盐 / 酯）或 ISA206+InAcT-hisTAG 佐剂中乳化的 50 μ g 的 Gc/Gn 蛋白的每种（总计 100 μ g）进行皮下免疫。注射的总体积是 1ml，分为 2x 0.5ml 剂量。

[0250] 实施例 10. 对接种疫苗的抗体应答的表征 .

[0251] 在免疫前 1 周开始每周将血液样品收集在 vacutainer 血清制备管（总计 30ml）中，并连续直至接种疫苗后 3 周。抗体滴度通过直接 ELISA 在 Medgene 实验室确定，并将存档的样品提供给 KSU 用于病毒中和测定。简言之，将整个重组抗原 (Gc、Gn) 用于包被 Immunolon ELISA 板过夜。封闭板，并然后将血清的连续稀释液以一式三份加至每个孔。通过缀合至 HRP 的同种型特异性二抗血清和商品化的 TMB 底物 (Pierce Biotechnology) 检测血清结合。主要目标是确定起始速率、最大血清滴度、和免疫衰减速率。测定的结果可见于图 11 和 12。如图中所示，ISA206 提供了最佳的整体诱导，包括 InAcT 的添加也导致与 ISA25 相比增加的应答。效力的顺序 :ISA206+InAcT>ISA206>ISA206+InAcT+HisTag 抗体 >ISA25。

[0252] 实施例 11. 对接种疫苗的 T 细胞应答的表征 .

[0253] 在第 0、4、7、14 和 21 天，从每只动物将收集总计 50ml 的血液在 EDTA 中，细胞通过梯度沉降纯化，并放置在具有靶抗原的培养物中。T 细胞增殖将在培养后第 3 天使用基于比色 BrdU 的 ELISA(Roche Life Sciences) 进行评价。标准化的增殖将使用制备的 T 细胞系进行评价，以确定 T 细胞对每种抗原的反应性的特异性。另外，T 细胞亚群和产生的特定细胞因子谱的比例将使用在我们实验室可用的绵羊特异性单克隆抗体的板通过流式细胞术

来评价。

[0254] 实施例 12. 体外保护性应答的证实

[0255] 为了证实由通过每种佐剂产生的免疫应答提供的保护，从测试动物收获的血清样品将被发送至在堪萨斯州立大学的合作者用于使用 MP12 或野生型 RVFV 测试血清中和测定。这将证实以每种佐剂制剂观察到的免疫反应性体现在对病毒感染的明显的保护。

[0256] 依从性要求

[0257] 所有实验可在 BSL2 中进行，并且现有设备和基础设施是可用的。目前批准的 SDSU 动物协议涵盖所描述的实验（协议号 12-037A）。

[0258] 应当理解，本文描述的特定实施方案通过说明而非作为本公开内容的限制被显示。本公开内容的主要特征可在不同的实施方案中被采用而不偏离本公开内容的范围。本领域技术人员使用不超过常规研究将认识到，或能够确定本文描述的具体过程的许多等同物。此类等同物被认为在本公开内容的范围内，并且由权利要求书所覆盖。在本说明书中提及的所有出版物和专利申请表示本公开内容所属领域的技术人员的技术水平。所有出版物和专利申请在此通过引用并入，其程度如同每个单独出版物或专利申请被具体和单独指明通过引用并入的相同程度。

[0001]

序列表

<110> 堪萨斯州立大学研究基金会
<120> 裂谷热病毒糖蛋白 GN 和 GC 及其用途
<130> KSURF 公开内容 13-02
<150> US 61/757,538
<151> 2013-01-28
<150> US 61/916,784
<151> 2013-12-16
<160> 21
<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 54
<212> DNA
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(54)
<400> 1
atgacagtcc ttccagcctt agcagttttt gctttggcac ctgttgtttt tgct 54

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> signal
<222> (1)..(18)
<400> 2
Met Thr Val Leu Pro Ala Leu Ala Val Phe Ala Leu Ala Pro Val Val
1 5 10 15
Phe Ala

<210> 3
<211> 1354
<212> DNA
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> Kozak
<222> (1)..(4)
<220>
<221> sig_peptide
<222> (5)..(58)
<400> 3
caccatgaca gtccttccag ccttagcagt ttttgctttg gcacctgttg tttttgctga 60
agacccccat ctcagaaaca gaccagggaa ggggcacaac tacattgacg ggatgactca 120
ggaggatgcc acatgcaaac ctgtgacata tgctggggca tgtagcagtt ttgatgtctt 180
gcttgaaaag ggaaaatttc ccctttcca gtcgtatgct catcatagaa ctctactaga 240
ggcagttcac gacaccatca ttgcaaaggc tgatccacct agctgtgacc ttctgagtgc 300
tcatgggaac ccctgcatga aagagaaact cgtgatgaag acacactgtc caaatgacta 360

[0002]

```
ccagtcagct cattacctca acaatgacgg gaaaatggct tcagtcaagt gccctcctaa      420
gtatgagctc actgaggact gcaacttttg taggcagatg acaggtgcta gcctgaagaa      480
ggggtcttat cctctccaag acttgttttg tcagtcaagt gaggatgatg gatcaaaatt      540
aaaaacaaaa atgaaagggg tctgcgaagt gggggttcaa gcactcaaaa agtgtgatgg      600
ccaactcagc actgcacatg aggttgtgcc ctttgcagtg tttaagaact caaagaaggt      660
ttatcttgat aagcttgacc ttaagactga ggagaatctg ctaccagact catttgtctg      720
tttcgagcat aagggacagt acaaaggaac aatggactct ggtcagacta agagggagct      780
caaaagcttt gatatctctc agtgccccaa gattggagga catggtagta agaagtgcac      840
tggggacgca gcattttgct ctgcttatga gtgcactgct cagtacgcca atgcctattg      900
ttcacatgct aatgggtcag ggattgtgca gatacaagta tcaggggtct ggaagaagcc      960
tttatgtgta gggtatgaga gagtggttgt gaagagagaa ctctctgcca agcccatcca     1020
gagagttgag ccttgcacaa cttgtataac caaatgtgag cctcatggat tggttgtccg     1080
atcaacaggg ttcaagatat catcagcagt tgcttgtgct agcggagttt gcgtcacagg     1140
atcgcagagt ccttccaccg agattacact caagtatcca gggatatccc agtcttctgg     1200
gggggacata ggggttcaca tggcacacga tgatcagtca gttagctcca aaatagtagc     1260
tcactgccct ccccaggacc cgtgcttagt gcatgactgc atagtgtgtg ctcatggcct     1320
gataaattac cagtgtcaca ctgctctcag tgcc                                 1354
```

<210> 4
<211> 450
<212> PRT
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(18)
<400> 4

```
Met Thr Val Leu Pro Ala Leu Ala Val Phe Ala Leu Ala Pro Val Val
1               5                  10                  15
Phe Ala Glu Asp Pro His Leu Arg Asn Arg Pro Gly Lys Gly His Asn
            20                  25                  30
Tyr Ile Asp Gly Met Thr Gln Glu Asp Ala Thr Cys Lys Pro Val Thr
        35                  40                  45
Tyr Ala Gly Ala Cys Ser Ser Phe Asp Val Leu Leu Glu Lys Gly Lys
    50                  55                  60
Phe Pro Leu Phe Gln Ser Tyr Ala His His Arg Thr Leu Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80
Val His Asp Thr Ile Ile Ala Lys Ala Asp Pro Pro Ser Cys Asp Leu
                85                  90                  95
Leu Ser Ala His Gly Asn Pro Cys Met Lys Glu Lys Leu Val Met Lys
            100                 105                 110
Thr His Cys Pro Asn Asp Tyr Gln Ser Ala His Tyr Leu Asn Asn Asp
        115                 120                 125
Gly Lys Met Ala Ser Val Lys Cys Pro Pro Lys Tyr Glu Leu Thr Glu
    130                 135                 140
Asp Cys Asn Phe Cys Arg Gln Met Thr Gly Ala Ser Leu Lys Lys Gly
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Pro Leu Gln Asp Leu Phe Cys Gln Ser Ser Glu Asp Asp Gly
                165                 170                 175
Ser Lys Leu Lys Thr Lys Met Lys Gly Val Cys Glu Val Gly Val Gln
            180                 185                 190
Ala Leu Lys Lys Cys Asp Gly Gln Leu Ser Thr Ala His Glu Val Val
```

[0003]

```
        195                 200                 205
Pro Phe Ala Val Phe Lys Asn Ser Lys Lys Val Tyr Leu Asp Lys Leu
    210                 215                 220
Asp Leu Lys Thr Glu Glu Asn Leu Leu Pro Asp Ser Phe Val Cys Phe
225                 230                 235                 240
Glu His Lys Gly Gln Tyr Lys Gly Thr Met Asp Ser Gly Gln Thr Lys
                245                 250                 255
Arg Glu Leu Lys Ser Phe Asp Ile Ser Gln Cys Pro Lys Ile Gly Gly
            260                 265                 270
His Gly Ser Lys Lys Cys Thr Gly Asp Ala Ala Phe Cys Ser Ala Tyr
        275                 280                 285
Glu Cys Thr Ala Gln Tyr Ala Asn Ala Tyr Cys Ser His Ala Asn Gly
    290                 295                 300
Ser Gly Ile Val Gln Ile Gln Val Ser Gly Val Trp Lys Lys Pro Leu
305                 310                 315                 320
Cys Val Gly Tyr Glu Arg Val Val Val Lys Arg Glu Leu Ser Ala Lys
                325                 330                 335
Pro Ile Gln Arg Val Glu Pro Cys Thr Thr Cys Ile Thr Lys Cys Glu
            340                 345                 350
Pro His Gly Leu Val Val Arg Ser Thr Gly Phe Lys Ile Ser Ser Ala
        355                 360                 365
Val Ala Cys Ala Ser Gly Val Cys Val Thr Gly Ser Gln Ser Pro Ser
    370                 375                 380
Thr Glu Ile Thr Leu Lys Tyr Pro Gly Ile Ser Gln Ser Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400
Asp Ile Gly Val His Met Ala His Asp Asp Glu Ser Val Ser Ser Lys
                405                 410                 415
Ile Val Ala His Cys Pro Pro Gln Asp Pro Cys Leu Val His Asp Cys
            420                 425                 430
Ile Val Cys Ala His Gly Leu Ile Asn Tyr Gln Cys His Thr Ala Leu
        435                 440                 445
Ser Ala
    450
```

<210> 5
<211> 1579
<212> DNA
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> Kozak
<222> (1)..(4)
<220>
<221> sig_peptide
<222> (5)..(58)
<400> 5

```
caccatgaca gtccttccag ccttagcagt ttttgctttg gcacctgttg tttttgcttg      60
ttcagaactg attcaggcaa gctccagaat caccacttgc tctacagagg gtgttaacac     120
caagtgtaga ctgtctggca cagcattgat cagagcaggg tcagttgggg cagaggcttg     180
tttgatgttg aaggggqtca aggaagatca aaccaagttc ttaaagataa aaactgtctc     240
aagtgagcta tcatgcaggg agggccagag ttattggact gggtcctttа gccctaaatg     300
tttgagctca aggagatgcc accttgtcgg ggaatgccat gtgaataggt gtctgtcttg     360
```

[0004]

gagggacaat gaaacttcag cagagtttte atttgttggg gaaagcacga ccatgcgaga 420
gaataagtgt tttgagcaat gtggaggatg ggggtgtggg tgtttcaatg tgaacccatc 480
ttgcttattt gtgcacacgt atctgcagtc agttagaaaa gaggcccttg gagttttaa 540
ctgtatcgac tgggtgcata aactcactct agagatcaca gactttgatg gctctgtttc 600
aacaatagac ttgggagcat catctagccg tttcacaaac tggggttcag ttagcctctc 660
actggacgca gagggcattt caggctcaaa tagcttttct ttcattgaga gcccaggcaa 720
agggtatgca attgttgatg agccattctc agaaattcct cggcaagggt tcttgggga 780
gatcaggtgc aattcagagt cctcagtcct gagtgctcat gaatcatgcc ttagggcacc 840
aaaccttatc tcatacaagc ccatgataga tcaattggag tgcacaacaa atctgattga 900
tccctttgtt gtctttgaga ggggttctct gccacagaca aggaatgaca aaacctttgc 960
agcttcaaaa ggaaatagag gtgttcaagc tttctctaag ggctctgtac aagctgatct 1020
aactctgatg tttgacaatt ttgaggtgga ctttgtggga gcagccgtat cttgtgatgc 1080
cgccttctta aatttgacag gttgctattc ttgcaatgca ggggccaggg tctgcctgtc 1140
tatcacatcc acaggaactg gatctctctc tgcccacaat aaggatgggt ctctgcatat 1200
agtccttcca tcagagaatg gaacaaaaga ccagtgtcag atactacact tcactgtgcc 1260
tgaagtagag gaggagttta tgtactcttg tgatggagat gagcggcctc tgttggtgaa 1320
ggggacccig atagccattg atccattiga tgataggcgg gaagcagggg gggaatcaac 1380
agttgtgaat ccaaaatctg gatcttggaa tttctttgac tggttttctg gactcatgag 1440
ttggtttgga gggcctctta aaactatact cctcatttgc ctgtatgttg cattatcaat 1500
tgggctcttt ttcctcctta tatatcttgg aagaacaggc ctctctaaaa tgtggcttgc 1560
tgccactaag aaggcctca 1579

<210> 6
<211> 525
<212> PRT
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(18)
<400> 6

Met Thr Val Leu Pro Ala Leu Ala Val Phe Ala Leu Ala Pro Val Val
1 5 10 15
Phe Ala Cys Ser Glu Leu Ile Gln Ala Ser Ser Arg Ile Thr Thr Cys
20 25 30
Ser Thr Glu Gly Val Asn Thr Lys Cys Arg Leu Ser Gly Thr Ala Leu
35 40 45
Ile Arg Ala Gly Ser Val Gly Ala Glu Ala Cys Leu Met Leu Lys Gly
50 55 60
Val Lys Glu Asp Gln Thr Lys Phe Leu Lys Ile Lys Thr Val Ser Ser
65 70 75 80
Glu Leu Ser Cys Arg Glu Gly Gln Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Phe Ser
85 90 95
Pro Lys Cys Leu Ser Ser Arg Arg Cys His Leu Val Gly Glu Cys His
100 105 110
Val Asn Arg Cys Leu Ser Trp Arg Asp Asn Glu Thr Ser Ala Glu Phe
115 120 125
Ser Phe Val Gly Glu Ser Thr Thr Met Arg Glu Asn Lys Cys Phe Glu
130 135 140
Gln Cys Gly Gly Trp Gly Cys Gly Cys Phe Asn Val Asn Pro Ser Cys
145 150 155 160
Leu Phe Val His Thr Tyr Leu Gln Ser Val Arg Lys Glu Ala Leu Arg

[0005]

165 170 175
Val Phe Asn Cys Ile Asp Trp Val His Lys Leu Thr Leu Glu Ile Thr
180 185 190
Asp Phe Asp Gly Ser Val Ser Thr Ile Asp Leu Gly Ala Ser Ser Ser
195 200 205
Arg Phe Thr Asn Trp Gly Ser Val Ser Leu Ser Leu Asp Ala Glu Gly
210 215 220
Ile Ser Gly Ser Asn Ser Phe Ser Phe Ile Glu Ser Pro Gly Lys Gly
225 230 235 240
Tyr Ala Ile Val Asp Glu Pro Phe Ser Glu Ile Pro Arg Gln Gly Phe
245 250 255
Leu Gly Glu Ile Arg Cys Asn Ser Glu Ser Ser Val Leu Ser Ala His
260 265 270
Glu Ser Cys Leu Arg Ala Pro Asn Leu Ile Ser Tyr Lys Pro Met Ile
275 280 285
Asp Gln Leu Glu Cys Thr Thr Asn Leu Ile Asp Pro Phe Val Val Phe
290 295 300
Glu Arg Gly Ser Leu Pro Gln Thr Arg Asn Asp Lys Thr Phe Ala Ala
305 310 315 320
Ser Lys Gly Asn Arg Gly Val Gln Ala Phe Ser Lys Gly Ser Val Gln
325 330 335
Ala Asp Leu Thr Leu Met Phe Asp Asn Phe Glu Val Asp Phe Val Gly
340 345 350
Ala Ala Val Ser Cys Asp Ala Ala Phe Leu Asn Leu Thr Gly Cys Tyr
355 360 365
Ser Cys Asn Ala Gly Ala Arg Val Cys Leu Ser Ile Thr Ser Thr Gly
370 375 380
Thr Gly Ser Leu Ser Ala His Asn Lys Asp Gly Ser Leu His Ile Val
385 390 395 400
Leu Pro Ser Glu Asn Gly Thr Lys Asp Gln Cys Gln Ile Leu His Phe
405 410 415
Thr Val Pro Glu Val Glu Glu Glu Phe Met Tyr Ser Cys Asp Gly Asp
420 425 430
Glu Arg Pro Leu Leu Val Lys Gly Thr Leu Ile Ala Ile Asp Pro Phe
435 440 445
Asp Asp Arg Arg Glu Ala Gly Gly Glu Ser Thr Val Val Asn Pro Lys
450 455 460
Ser Gly Ser Trp Asn Phe Phe Asp Trp Phe Ser Gly Leu Met Ser Trp
465 470 475 480
Phe Gly Gly Pro Leu Lys Thr Ile Leu Leu Ile Cys Leu Tyr Val Ala
485 490 495
Leu Ser Ile Gly Leu Phe Phe Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Arg Thr Gly
500 505 510
Leu Ser Lys Met Trp Leu Ala Ala Thr Lys Lys Ala Ser
515 520 525

<210> 7
<211> 315
<212> DNA
<213> 裂谷热病毒
<220>

[0006]

<221> misc structure
<222> (1)..(57)
<223> 跨膜结构域
<220>
<221> misc_structure
<222> (58)..(315)
<223> 细胞溶质结构域
<400> 7

tttgttgttg tgtttgtatt cagttctatt gcaataattt gtttagctat tctttatagg 60
gtgcttaagt gcctgaagat tgccccaagg aaagttctga atccactaat gtggatcaca 120
gccttcatca gatggatata taagaagatg gttgccagag tggcagacaa cattaatcaa 180
gtgaacaggg aaataggatg gatggaagga ggtcagttgg ttctagggaa ccctgccccc 240
attcctcgtc atgccccaat cccacgttat agcacatacc tgatgttatt attgattgtc 300
tcatatgcat cagca 315

<210> 8
<211> 244
<212> PRT
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(244)
<223> N蛋白
<400> 8

Met Asp Asn Tyr Gln Glu Leu Ala Ile Gln Phe Ala Ala Gln Ala Val
1 5 10 15
Asp Arg Asn Glu Ile Glu Gln Trp Val Arg Glu Phe Ala Tyr Gln Gly
20 25 30
Phe Asp Ala Arg Arg Val Ile Glu Leu Leu Lys Gln Tyr Gly Gly Ala
35 40 45
Asp Trp Glu Lys Asp Ala Lys Lys Met Ile Val Leu Ala Leu Thr Arg
50 55 60
Gly Asn Lys Pro Arg Arg Met Met Met Lys Met Ser Lys Glu Gly Lys
65 70 75 80
Ala Thr Val Glu Ala Leu Ile Asn Lys Tyr Lys Leu Lys Glu Gly Asn
85 90 95
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Leu Ser Arg Val Ala Ala Ala Leu Ala
100 105 110
Gly Trp Thr Cys Gln Ala Leu Val Val Leu Ser Glu Trp Leu Pro Val
115 120 125
Thr Gly Thr Thr Met Asp Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Pro Arg His Met
130 135 140
Met His Pro Ser Phe Ala Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Pro Gly Asp
145 150 155 160
Tyr Leu Arg Ala Ile Leu Asp Ala His Ser Leu Tyr Leu Leu Gln Phe
165 170 175
Ser Arg Val Ile Asn Pro Asn Leu Arg Gly Arg Thr Lys Glu Glu Val
180 185 190
Ala Ala Thr Phe Thr Gln Pro Met Asn Ala Ala Val Asn Ser Asn Phe
195 200 205
Ile Ser His Glu Lys Arg Arg Glu Phe Leu Lys Ala Phe Gly Leu Val

[0007]

210 215 220
Asp Ser Asn Gly Pro Ser Ala Ala Val Met Ala Ala Ala Gln Ala Tyr
225 230 235 240
Lys Thr Ala Ala

<210> 9
<211> 265
<212> PRT
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(265)
<223> NSs蛋白
<400> 9
Met Asp Tyr Phe Pro Val Ile Ser Val Asp Leu Gln Ser Gly Arg Arg
1 5 10 15
Val Val Ser Val Glu Tyr Phe Arg Gly Asp Gly Pro Pro Arg Ile Pro
20 25 30
Tyr Ser Met Val Gly Pro Cys Cys Val Phe Leu Met His His Arg Pro
35 40 45
Ser His Glu Val Arg Leu Arg Phe Ser Asp Phe Tyr Asn Val Gly Glu
50 55 60
Phe Pro Tyr Arg Val Gly Leu Gly Asp Phe Ala Ser Asn Val Ala Pro
65 70 75 80
Pro Pro Ala Lys Pro Phe Gln Arg Leu Ile Asp Leu Ile Gly His Met
85 90 95
Thr Leu Ser Asp Phe Thr Arg Phe Pro Asn Leu Lys Glu Ala Ile Ser
100 105 110
Trp Pro Leu Gly Glu Pro Ser Leu Ala Phe Phe Asp Leu Ser Ser Thr
115 120 125
Arg Val His Arg Asn Asp Asp Ile Arg Arg Asp Gln Ile Ala Thr Leu
130 135 140
Ala Met Arg Ser Cys Lys Ile Thr Asn Asp Leu Glu Asp Ser Phe Val
145 150 155 160
Gly Leu His Arg Met Ile Ala Thr Glu Ala Ile Leu Arg Gly Ile Asp
165 170 175
Leu Cys Leu Leu Pro Gly Phe Asp Leu Met Tyr Glu Val Ala His Val
180 185 190
Gln Cys Val Arg Leu Leu Gln Ala Ala Lys Glu Asp Ile Ser Asn Ala
195 200 205
Val Val Pro Asn Ser Ala Leu Ile Val Leu Met Glu Glu Ser Leu Met
210 215 220
Leu Arg Ser Ser Leu Pro Ser Met Met Gly Arg Asn Asn Trp Ile Pro
225 230 235 240
Val Ile Pro Pro Ile Pro Asp Val Glu Met Glu Ser Glu Glu Glu Ser
245 250 255
Asp Asp Asp Gly Phe Val Glu Val Asp
260 265

<210> 10

[0008]

<211> 115
<212> PRT
<213> 裂谷热病毒
<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(115)
<223> NSm蛋白
<400> 10

```
Met Ile Glu Gly Ala Trp Asp Ser Leu Arg Glu Glu Glu Met Pro Glu
1               5                  10                  15
Glu Leu Ser Cys Ser Ile Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Thr Ser Ser
            20                  25                  30
Gln Glu Leu Tyr Arg Ala Leu Lys Ala Ile Ile Ala Ala Asp Gly Leu
        35                  40                  45
Asn Asn Ile Thr Cys His Gly Lys Asp Pro Glu Asp Lys Ile Ser Leu
    50                  55                  60
Ile Lys Gly Pro Pro His Lys Lys Arg Val Gly Ile Val Arg Cys Glu
65                  70                  75                  80
Arg Arg Arg Asp Ala Lys Gln Ile Gly Arg Glu Thr Met Ala Gly Ile
                85                  90                  95
Ala Met Thr Val Leu Pro Ala Leu Ala Val Phe Ala Leu Ala Pro Val
            100                 105                 110
Val Phe Ala
        115
```

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物N cds
<400> 11

```
caccatggac aactatcaag accttgcgat cc                                32
```

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反向引物N cds
<400> 12

```
ggctgctgtc ttgtaagcct gagcg                                        25
```

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物NSs cds
<400> 13

```
caccatggat tactttcctg tgatatctgt tgatttg                           37
```

[0009]

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反向引物 NSs cds
<400> 14
atcaacctca acaaatccat catcatcact ctcc 34

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物 NSm cds
<400> 15
caccatgatt gaaggagctt gggattc 27

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反向引物 NSm cds
<400> 16
agcaaaaaca acaggtgcca aagc 24

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物 Gne 或 Gc cds
<400> 17
caccatgaca gtccttccag ccttag 26

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反向引物 Gne cds
<400> 18
ggcactgaga gcagtgtgac actg 24

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

[0010]

<223> 反向引物 Gc cds
<400> 19
tgaggccttc ttagtggcag caag 24

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 正向引物 M13 序列引物
<400> 20
cccagtcacg acgttgtaaa acg 23

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 反向引物 M13 序列引物
<400> 21
agcggataac aatttcacac agg 23

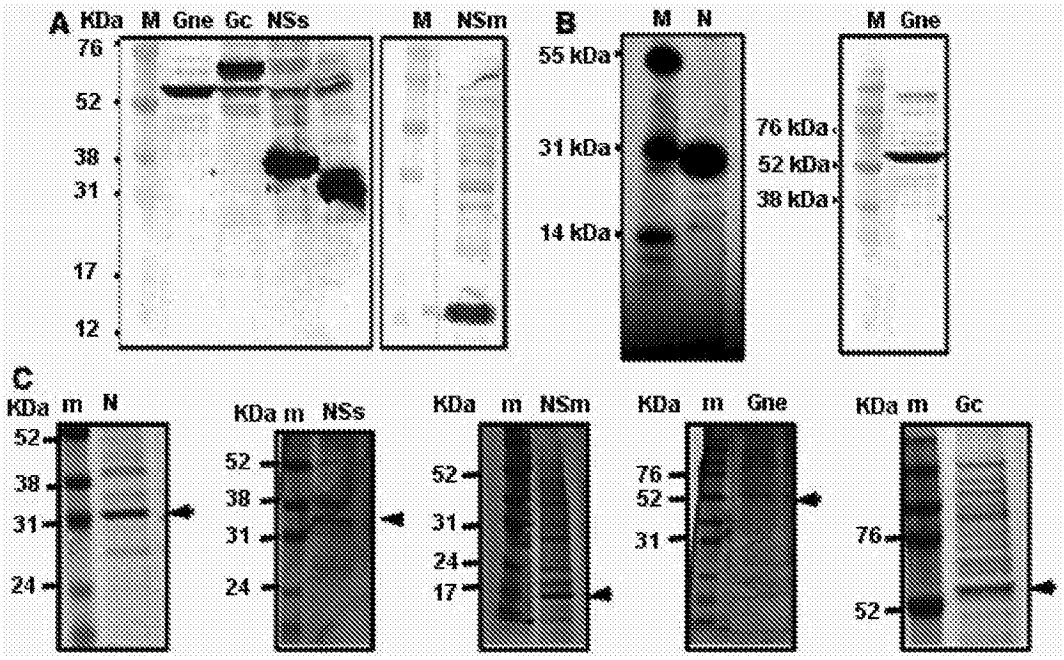

A
KDa M Gne Gc NSs
76
52
38
31
17
12
M NSm
B
M N
55 kDa
31 kDa
14 kDa
M Gne
76 kDa
52 kDa
38 kDa
C
KDa m N
52
38
31
24
KDa m NSs
52
38
31
24
KDa m NSm
52
31
24
17
KDa m Gne
76
52
31
KDa m Gc
76
52

图 1

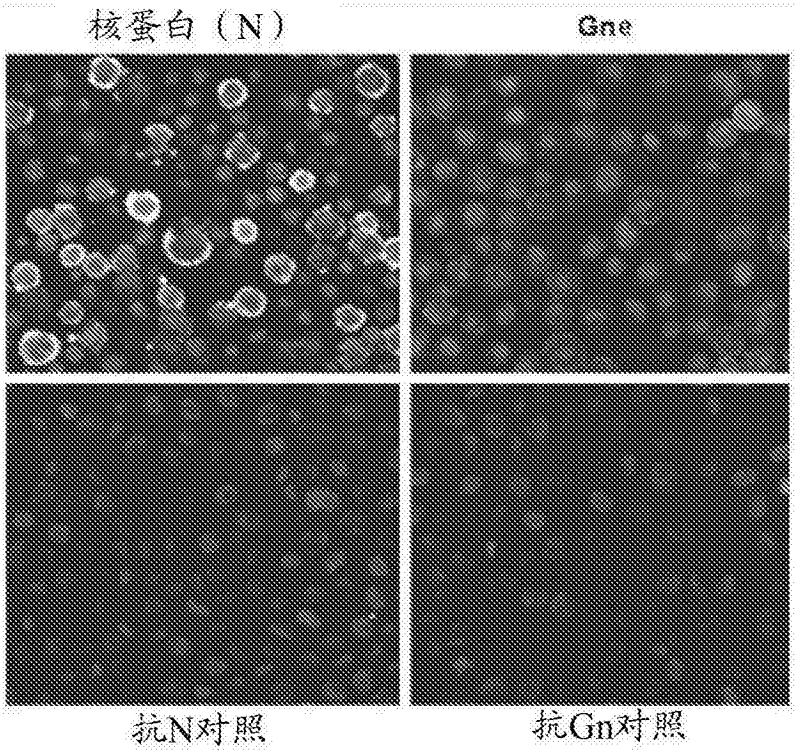

核蛋白（N）
Gne
抗N对照
抗Gn对照

图 2

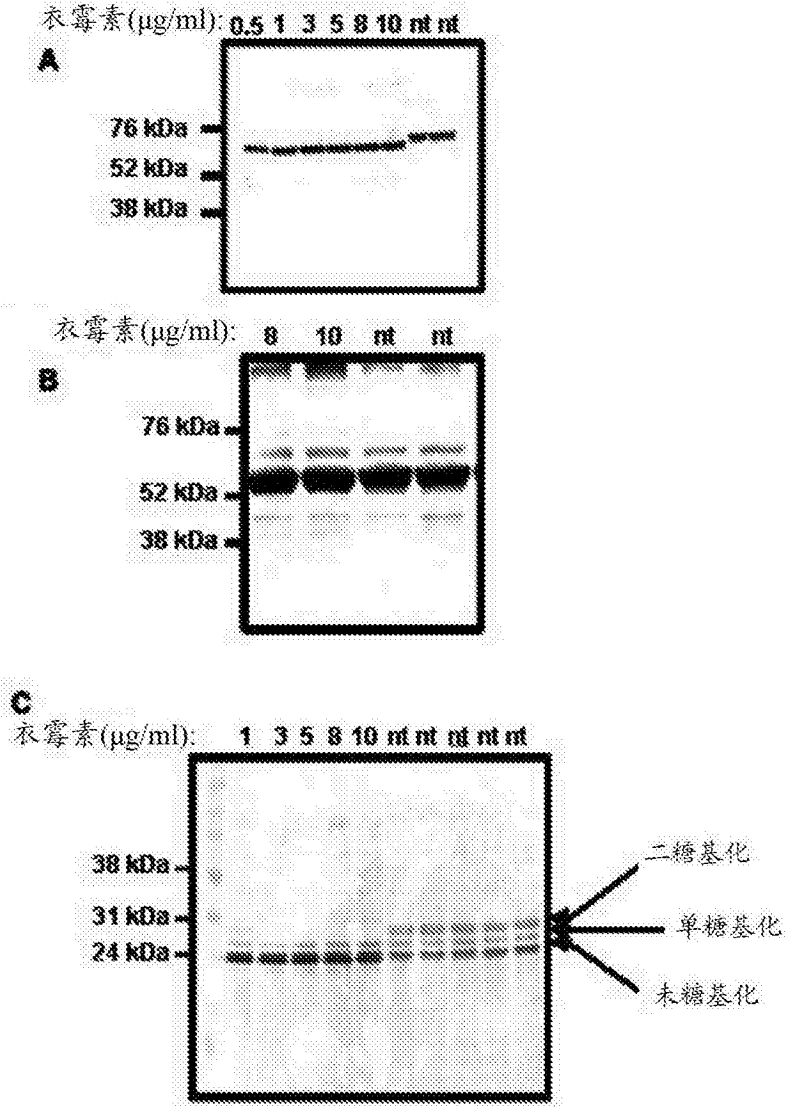

衣霉素(μg/ml): 0.5 1 3 5 8 10 nt nt
A
76 kDa
52 kDa
38 kDa
衣霉素(μg/ml): 8 10 nt nt
B
76 kDa
52 kDa
38 kDa
C
衣霉素(μg/ml): 1 3 5 8 10 nt nt nt nt nt
38 kDa
31 kDa
24 kDa
二糖基化
单糖基化
未糖基化

图 3

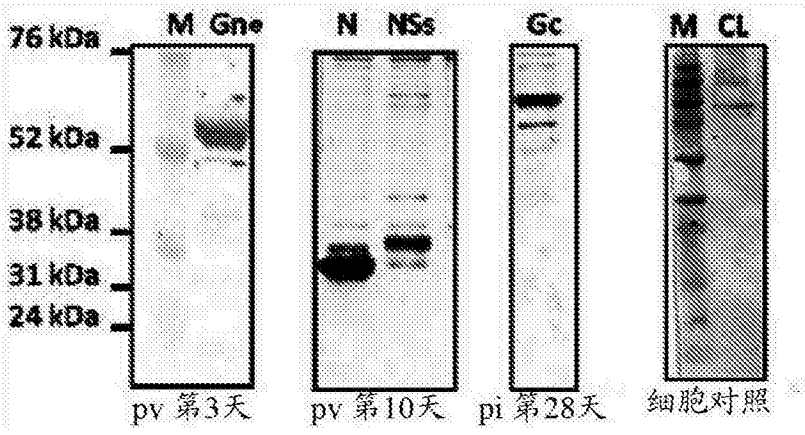

76 kDa
52 kDa
38 kDa
31 kDa
24 kDa
M Gne
N NSs
Gc
M CL
pv 第3天
pv 第10天
pi 第28天
细胞对照

图 4

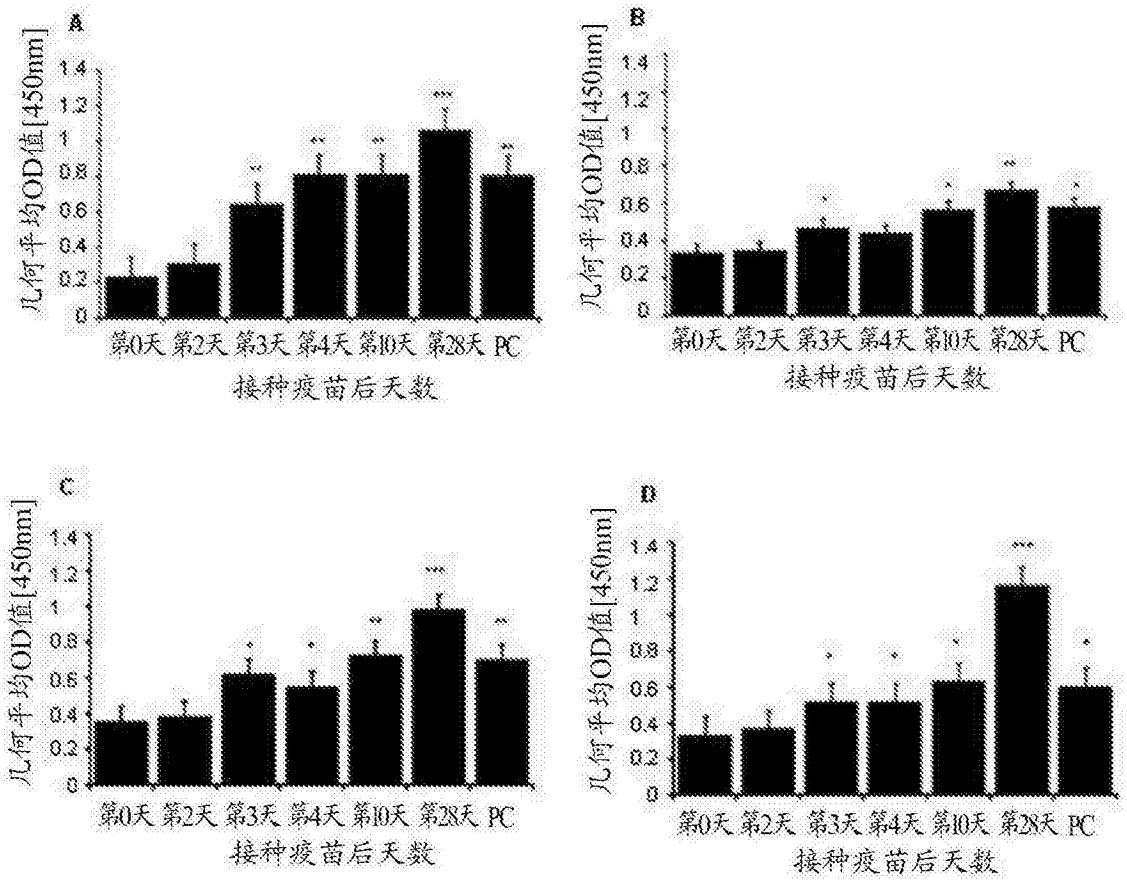

A
B
C
D
几何平均OD值[450nm]
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
第0天 第2天 第3天 第4天 第10天 第28天 PC
接种疫苗后天数

图 5

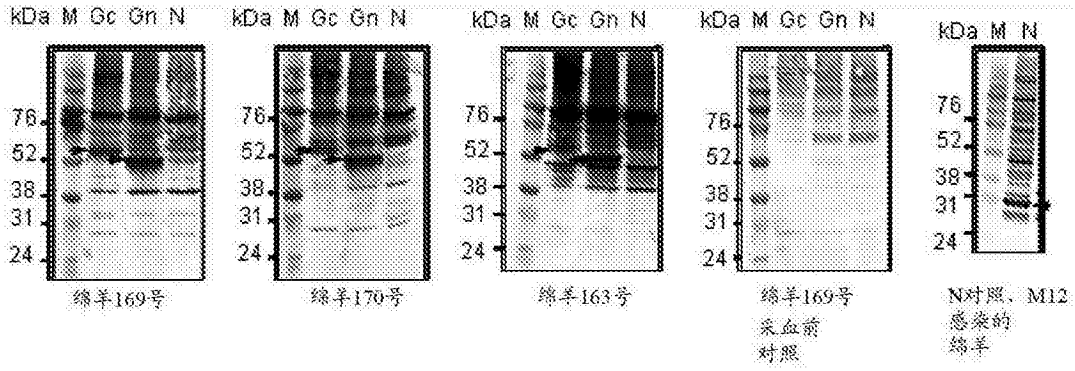

kDa M Gc Gn N
76
52
38
31
24
绵羊169号
绵羊170号
绵羊163号
绵羊169号
采血前
对照
kDa M N
N对照、M12
感染的
绵羊

图 6

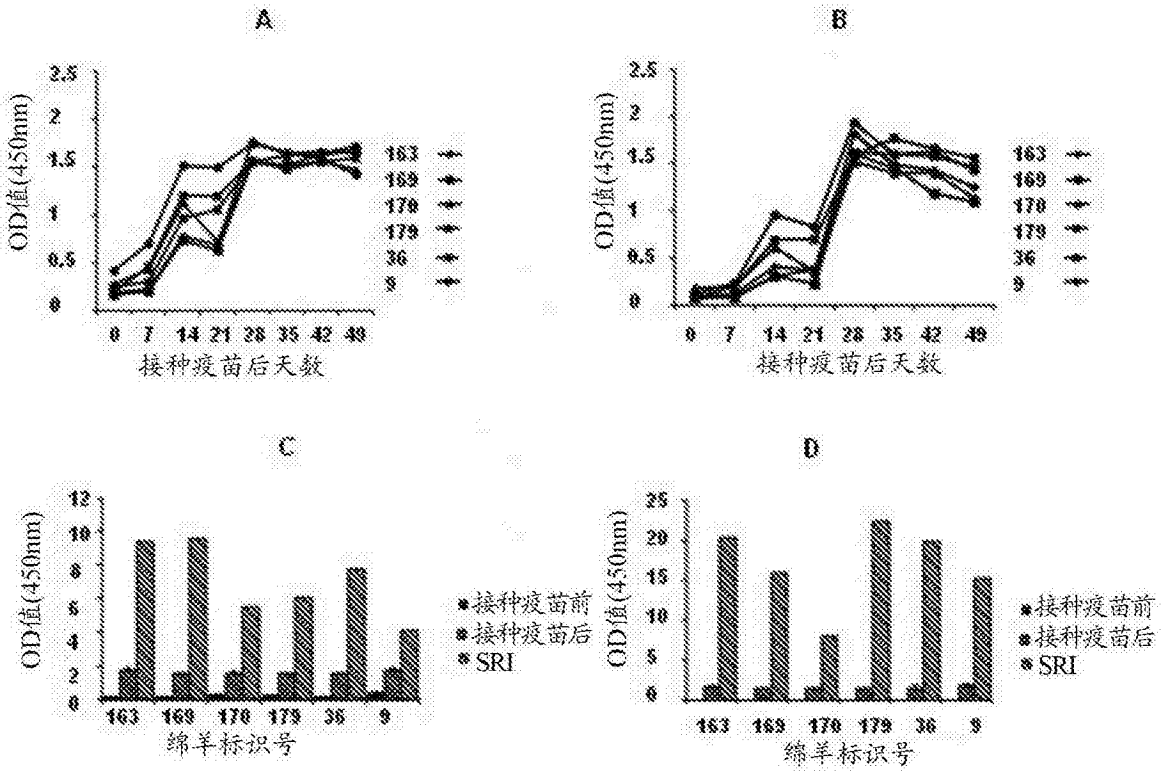

A
B
C
D
OD值(450mm)
接种疫苗后天数
163
169
170
179
36
9
接种疫苗前
接种疫苗后
SRI
绵羊标识号

图 7

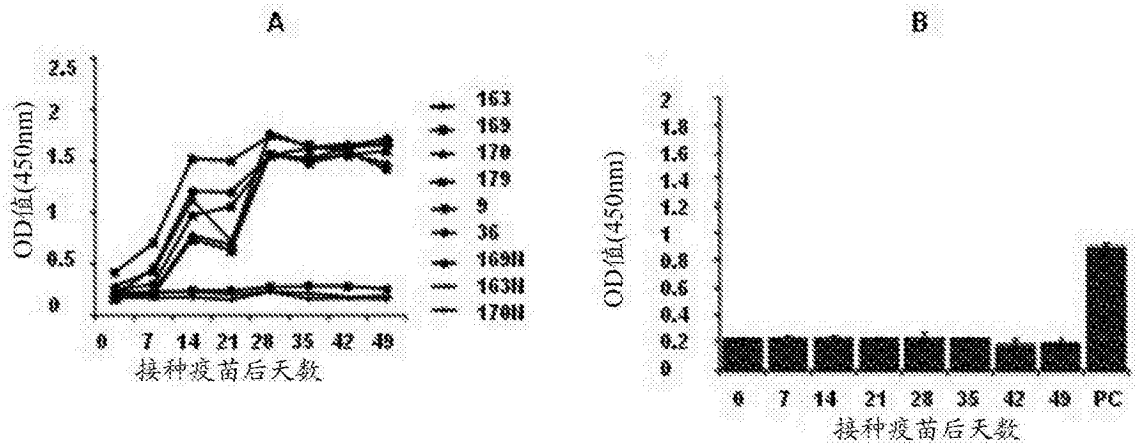

A
B
OD值(450mm)
接种疫苗后天数
163
169
170
179
9
36
169H
163H
170H
PC

图 8

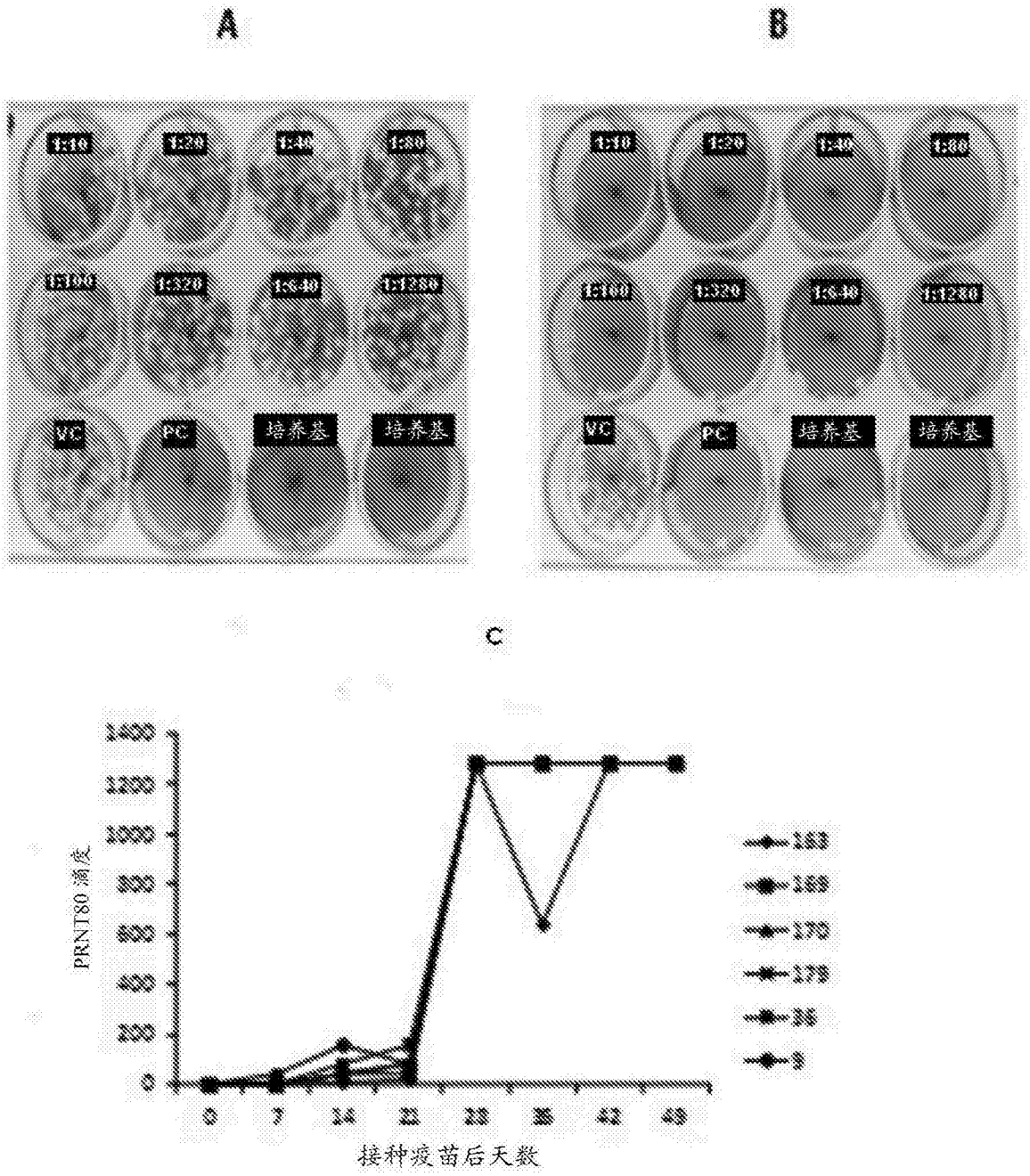

A
B
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
1:640
1:1280
VC
PC
培养基
培养基
C
PRNT80 滴度
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
35
42
49
接种疫苗后天数
163
169
170
173
35
3

图 9

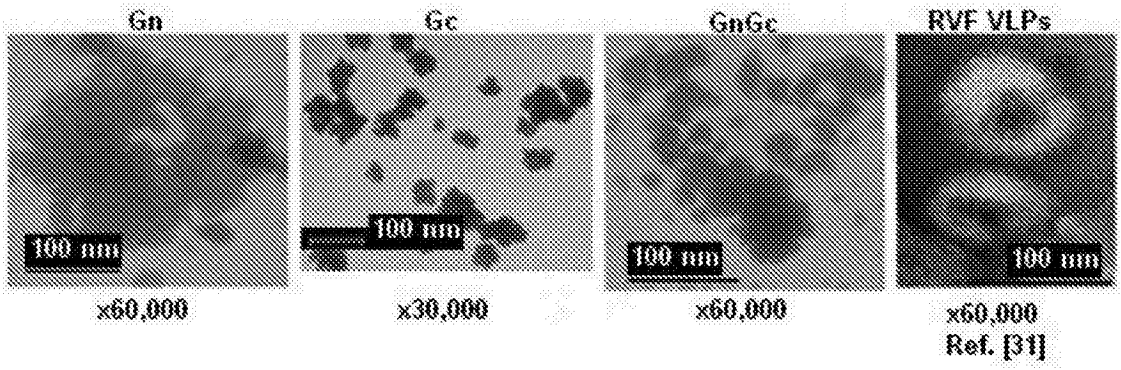

Gn
Gc
GnGc
RVF VLPs
100 nm
100 nm
100 nm
100 nm
x60,000
x30,000
x60,000
x60,000
Ref. [31]

图 10

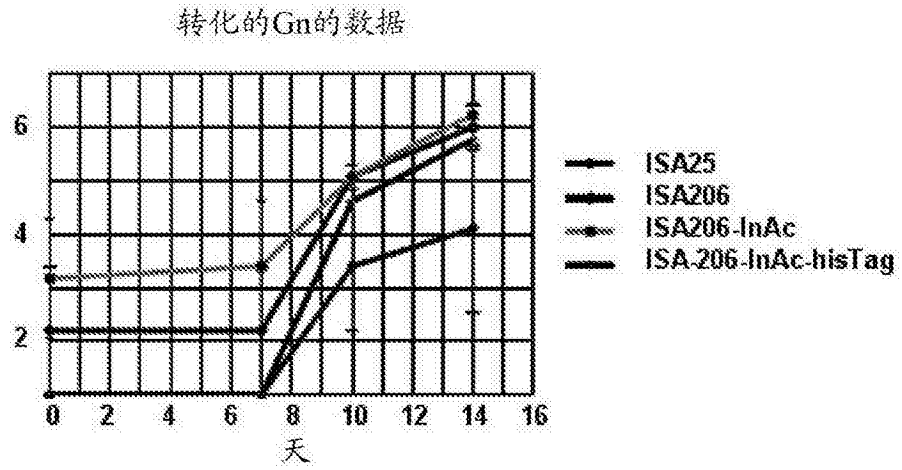

转化的Gn的数据
6
4
2
0 2 4 6 8 10 12 14 16
天
ISA25
ISA206
ISA206-InAc
ISA-206-InAc-hisTag

图 11

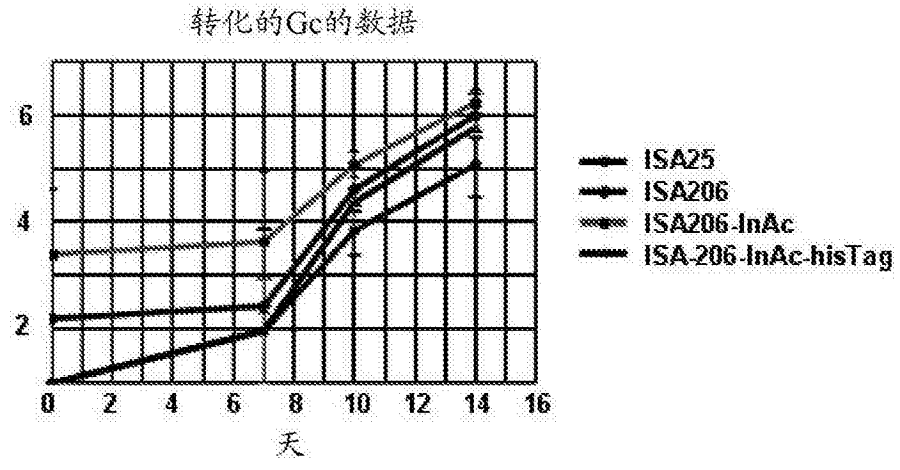
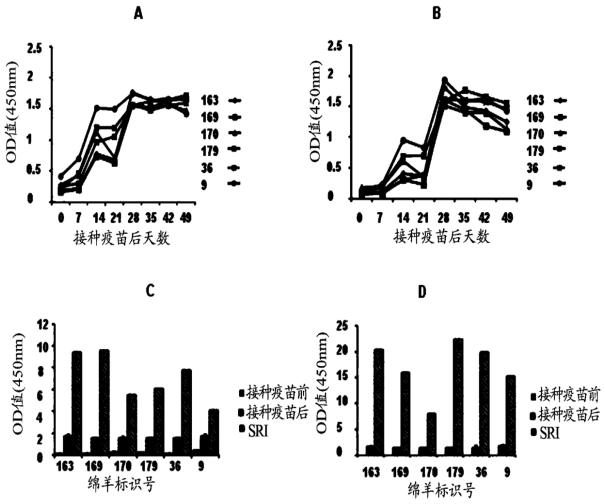

转化的Gc的数据
6
4
2
0 2 4 6 8 10 12 14 16
天
ISA25
ISA206
ISA206-InAc
ISA-206-InAc-hisTag

图 12

专利名称(译)	裂谷热病毒糖蛋白GN和GC及其用途		
公开(公告)号	CN105264076A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201480018972.1	申请日	2014-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府(美国农业部代表)		
申请(专利权)人(译)	堪萨斯州立大学研究基金会 美国政府(美国农业部代表)		
当前申请(专利权)人(译)	堪萨斯州立大学研究基金会 美国政府(美国农业部代表)		
[标]发明人	乔根A里希特 邦恩特法布瑞 威廉威尔逊 马文军		
发明人	乔根·A·里希特 邦恩特·法布瑞 威廉·威尔逊 马文军		
IPC分类号	C12N15/40 C12N15/63 C12N5/10 C07K14/175 C07K16/10 A61K39/12 A61P31/14 G01N33/53		
代理人(译)	王玮玮 郑霞		
优先权	61/757538 2013-01-28 US 61/916784 2013-12-16 US		
其他公开文献	CN105264076B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了亚单位疫苗，所述亚单位疫苗包含裂谷热病毒的Gn和Gc糖蛋白，包括编码此类糖蛋白的核酸、宿主细胞、载体和用所述糖蛋白产生的免疫试剂、接种疫苗的方法、诊断的方法和试剂盒。