



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105264076 B

(45)授权公告日 2019.09.13

(21)申请号 201480018972.1

(22)申请日 2014.01.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105264076 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(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
W02014/117185 EN 2014.07.31(73)专利权人 堪萨斯州立大学研究基金会
地址 美国堪萨斯州
专利权人 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
(续)(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) (续)

(56)对比文件

WO 2009/150146 A1,2009.12.17,

US 4735800 A,1988.04.05,

Bhardwaj N et al..vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or Alphavirus replicons expression Gn proetcts mice against rift valley fever virus.《plos neglected tropical diseases》.2010,第4卷(第6期),

Bhardwaj N et al..vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or Alphavirus replicons expression Gn proetcts mice against rift valley fever virus.《plos neglected tropical diseases》.2010,第4卷(第6期),

Bhardwaj N et al..vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or Alphavirus replicons expression Gn proetcts mice against rift valley fever virus.《plos neglected tropical diseases》.2010,第4卷(第6期),

S.M.de Boer et al..Rift vally fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge.《vaccine》.2010,第28卷

审查员 吴丹阳

权利要求书1页 说明书32页

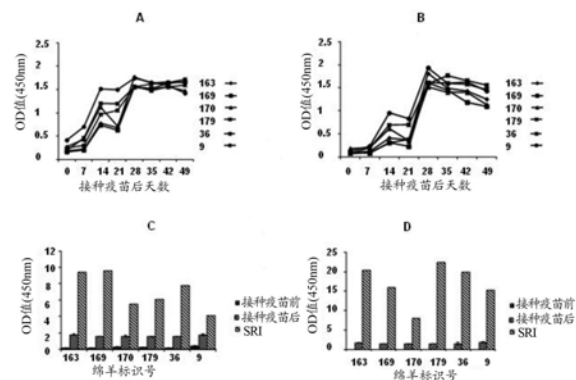
序列表10页 附图6页

(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。



[转续页]

[接上页]

(72)发明人 马文军

C07K 14/175(2006.01)

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

1. 一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子编码由带有六个羧基末端组氨酸残基的TEV识别位点与SEQ ID NO:4所列的氨基酸序列经可操作地连接而组成的融合蛋白,其中所述的被编码的蛋白在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 一种分离的蛋白,由融合蛋白组成,所述融合蛋白由带有六个羧基末端组氨酸残基的TEV识别位点与SEQ ID NO:4所列的氨基酸序列经可操作地连接而组成,其中所述蛋白在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体。

6. 包含分离的蛋白的组合物在制备用于在需要其的受试者中治疗裂谷热的药物中的用途,所述分离的蛋白由融合蛋白组成,该融合蛋白由带有六个羧基末端组氨酸残基的TEV识别位点与SEQ ID NO:4所列的氨基酸序列经可操作地连接而组成,其中当所述药物被施用,所述蛋白在受试者中以初次剂量诱导针对裂谷热病毒的中和抗体。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述组合物还包含佐剂。

8. 如权利要求6所述的用途,其中所述组合物还包含运载体和药物赋形剂。

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流行界限至阿拉伯半岛的最近传播 (Jupp和Cornet 1988, 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蛉

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。发明概述

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 在一方面,公开了裂谷热病毒(RVFP)特异性免疫试剂,所述裂谷热病毒(RVFP)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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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(RVFPV)特异性免疫试剂,所述第一裂谷热病毒(RVFPV)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RVFPV特异性免疫试剂,所述第二RVFPV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RVFPV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。

[0028] 附图简述

[0029] 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ID8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。

[0030] 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。

[0031] 图3示出了裂谷热糖蛋白,Gc和Gn的体外(in vitro)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)导致边缘分子量位移(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。

[0032] 图4示出了蛋白印迹,显示表达具有来自绵羊的RVFPV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。

[0033] 图5示出了重组RVFPV蛋白、核蛋白N(A)、非结构蛋白NSs(B)、糖蛋白Gn(C)和糖蛋白Gc(D)的反应性。第0天是接种疫苗前血清;PC=来源于用RVFPV野生型ZH501攻击的绵羊的阳性对照血清;P1-P6是来自用MP12 RVFPV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)。

[0034] 图6示出了从用重组RVFPV 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MP12 RVFV毒株感染的绵羊获得的抗血清的特异性反应性(31kDa)。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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($\geq 1:40$) 在接种疫苗后2周内动物中是可检测的。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)。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 发明详述

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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%。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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)。

[0056] 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。

[0057] 如本文所用,“裂谷热病毒特异性免疫试剂”意指特异性地与RVFV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。

[0058] 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。

[0059] 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)。

[0060] 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。

[0061] 如本文所用,术语“亚基”指的是自身抗原性的,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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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動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。

[0068] 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。

[0069] 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)。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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 $\geq 1:40$)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。

[0076] 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。

[0077] 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)。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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蛋白可用作作用于DIVA诊断测定的候选者。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] “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。

[0107] “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。

[0108] 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”。

[0109] 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。

[0110] “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。

[0111] 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。

[0112] “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。

[0113] 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。

[0114] 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)。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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)）。

[0119] 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。

[0120] 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存在下，该制品允许变体肽的期望的功能。

[0121] 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%。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 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酸酰化、和泛素化。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] 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。

[0134] 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 152 Academic 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, (1994 Supplement) (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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 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。

[0140] 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。

[0141] 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(单磷酸脂质A、合成的海藻糖二棒状杆菌枝菌酸酯(trehalose dicorynomycolate))。

[0142] 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。

[0143] 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°C的温度下时持续至少约12个月应该是稳定的。

[0144] 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。

[0145] 动物油可包括但不限于角鲨烯油或鲸油。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 免疫方案可由本领域技术人员选择而无需过度实验。

[0152] 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。

[0153] 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。

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] 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.

[0157] 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。

[0158] 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。

[0159] 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,Green 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。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 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。

[0163] 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。

[0164] 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系统对于制备并随后分离聚组氨酸多肽融合蛋白可得的商业化试剂盒的实例。

[0165] 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。

[0166] 免疫原性组合物和疫苗可通过皮下或肌肉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。

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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、肌肉、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)。

[0170] 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 and 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。

[0171] 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。

[0172] 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 1975 Nature 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。

[0173] 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 I¹²⁵、I¹³¹、S³⁵ 或 H³。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. Immunol Meth., 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 的根除计划中将是具有价值的。

[0174] 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。

[0175] 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。

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 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 0 345 152、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。

[0179] 以下实施例旨在说明但不限制本发明。

实施例

[0180] 材料和方法

[0181] 克隆并构建重组杆粒

[0182] 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。

[0183] 表1. 用于扩增RVFV蛋白编码区的引物

[0184]

引物	方向	序列	靶
JAR979*	正向	CACCATGGACAACCTATCAAGACCTTGCGATCC (SEQ ID NO:11)	N cds
JAR980*	反向	GGCTGCTGTCTTGTAAGCCTGAGCG (SEQ ID NO:12)	Ncds
JAR981*	正向	CACCATGGATTACTTTCCTGTGATATCTGTTGATTG (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
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	AGCGGATAACAATTCACACAGG (SEQ ID NO:21)	M13 序列引物

[0185] ^a结构糖蛋白Gne和Gc的共有的信号肽特异性引物。

[0186] *内部 (in house) 设计的引物。±Heidecker等人, Gene (1980) 10:69-73。

[0187] 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。

[0188] 包含ZH548的S区段的整个编码区的质粒pET30Ek/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-TOP0载体 (Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad, CA)。将TOP0克隆反应物转化进One Shot Mach1T1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)。

[0189] Gn和Gc的信号肽预测和修饰

[0190] 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。

[0191] 重组RVFV蛋白的表达和纯化

[0192] 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-900II SFM培养基 (Life Technologies/Invitrogen, 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 ($>10^7$ pfu/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 Na₂PO₄ (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。

[0193] 免疫荧光抗体测定

[0194] 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机,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,并随后与分别针对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 Na₂CO₃、8.4g NaHCO₃、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。

[0195] 衣霉素测定

[0196] 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 2×10^6 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 (GEHealthcare, 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。

[0197] 裂谷热病毒抗血清

[0198] 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°C 并热灭活(56°C 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。

[0199] 蛋白印迹分析

[0200] 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。

[0201] 间接酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0202] 将96孔板 (Nunc, **Maxisorp**[®]) 用于间接ELISA。用100 μ l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°C 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°C 下封闭15min。用PBS中的0.1%吐温-20洗涤三次后, 添加200 μ l体积的在封闭溶液中以1:200稀释的测试血清, 并在 37°C 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°C 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100 μ l包含0.1mg/ml 3,3',5,5'-四甲基-联苯胺 (TMB) (ThermoScientific, 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。

[0203] 细胞培养物

[0204] 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%CO₂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 900II培养基中。将这些细胞维持在27℃。

[0205] 重组蛋白表达的检测和免疫反应性的分析

[0206] 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, 并随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 (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。

[0207] 疫苗的制备和动物免疫

[0208] 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。

[0209] 免疫原特异性抗体应答

[0210] 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H₂O₂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 H₂SO₄至每个孔来终止;并且使用酶标仪 (FluoStarOmega, 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。

[0211] 抗RVF病毒PRNT80

[0212] 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%CO₂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。

[0213] 电子显微术

[0214] 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) (Ted 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。

[0215] 统计分析

[0216] 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。

[0217] 实施例1. RVFV重组蛋白的表达

[0218] 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)。

[0219] 实施例2.杆状病毒表达的蛋白的蛋白糖基化状态的确定。

[0220] 已知的是,RVFPV 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-乙酰氨基葡萄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)。

[0221] 实施例3.针对重组蛋白的抗体反应性

[0222] 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)。

[0223] 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。

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)			
[0224] 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

[0225] 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。

[0226] 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RVFPV蛋白的反应性,我们使用从用RVFPV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。

[0227] 实施例4.重组蛋白针对用RVFPV接种的绵羊血清的抗体反应性。

[0228] 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-D)。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。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。

[0229] 实施例5. Gn和Gc糖蛋白的免疫原性

[0230] 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)。

[0231] 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)。

[0232] 实施例6. 重组RVFV GnGc糖蛋白亚单位疫苗的DIVA相容性.

[0233] 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($P<0.05$)。

[0234] 实施例7. 重组RVFV糖蛋白引发强烈的中和抗体应答.

[0235] 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)。

[0236] 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PRNT₈₀滴度。

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	1280>	1280>	1280>	1280
163	0	0	10	20	1280>	640	1280>	1280
170	0	0	40	80	1280>	1280>	1280>	1280>
179	0	0	40	80	1280>	1280>	1280>	1280
9	0	40	160	80	1280>	1280>	1280	1280
36	0	0	80	160	1280>	1280	1280	1280
平均值	0	nd	62	77	1280>	nd	1280>	1280>
范围	0	nd	10-160	20-160	1280>	640-1280>	1280-1280>	1280-1280>

[0238] Prevac=接种疫苗前;pv=接种疫苗后;nd=不可确定。

[0239] 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)。

[0240] 实施例8.电子显微术

[0241] 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)。

[0242] 实施例9.佐剂组合配方.

[0243] 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。

[0244] 表4.佐剂配方.

[0245]

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。

[0246] 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。

[0247] 实施例10.对接种疫苗的抗体应答的表征。

[0248] 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。

[0249] 实施例11.对接种疫苗的T细胞应答的表征。

[0250] 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。

[0251] 实施例12.体外保护性应答的证实

[0252] 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。

[0253] 依从性要求

[0254] 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)。

[0255] 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。

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_peptid
<222>	(5).. (58)
<400>	3

caccatgaca	gtccttcag	ccttagcagt	ttttgctttg	gcacctgttg	tttttgc tga	60
agacccccat	ctcagaaaca	gaccagggaa	ggggcacaaac	tacattgacg	ggatgactca	120
ggaggatgcc	acatgcaaac	ctgtgacata	tgtctggggca	tgtagcagtt	ttgatgtctt	180
gcttgaaaag	ggaaaatttc	cccttttcca	gtcgtatgct	catcatagaa	ctctactaga	240
ggcagttcac	gacaccatca	ttgcaaaggc	tgatccacct	agctgtgacc	ttctgagtc	300
tcatgggaac	ccctgcatga	aagagaaact	cgtgatgaag	acacactgtc	caaatgacta	360

```

ccagtcagct cattacctca acaatgacgg gaaaatggct tcagtcaagt gccctcctaa 420
gtatgagctc actgaggact gcaacttttg taggcagatg acagggtgcta gcctgaagaa 480
ggggctttat 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 aaggacagct acaaaggaac aatggactct ggtcagacta agaggagct 780
caaaagcttt gatatctctc agtgcccaa gattggagga catggtagta agaagtgcac 840
tggggacgca gcattttgct ctgcttatga gtgcactgct cagtacgcca atgcctattg 900
ttcacatgct aatgggtcag ggatttgtca gatacaagta tcaggggtct ggaagaagcc 960
ttttatgtga gggatatgaga gagtgttgt gaagagagaa ctctctgcc aagccatcca 1020
gagagttgag ccttgcacaa cttgtataac caaatgtgag cctcatggat tggttgtccg 1080
atcaacaggg ttcaagatat catcagcagt tgcttgtgct agcggagttt gcgtcacagg 1140
atcgcagagt ccttcaccg agattacact caagtatcca gggatatccc agtcttctgg 1200
gggggacata ggggttcaca tggcacacga tgatcagta gtagctcca aaatagtagc 1260
tactgccct cccaggacc cgtgcttagt gcactgactgc atagtgtgtg ctcatggcct 1320
gataaattac cagttgcaca ctgctctcag tgcc 1354

```

```

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

```

[0002]

```

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

```

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
 [0003] Asp Ile Gly Val His Met Ala His Asp Asp Gln 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 ttttgcttg 60
 ttcagaactg attcaggcaa gctccagaat caccacttgc tctacagagg gtgttaacac 120
 caagtgtaga ctgtctggca cagcattgat cagagcaggg tcagttgggg cagaggcttg 180
 tttgatgttg aaggggggtca aggaagatca aaccaagttc tttaaagataa aaactgtctc 240
 aagttagcta tcatgcaggg agggccagag ttatttgact gggtccttta gccctaaatg 300
 tttgagctca aggagatgcc accttgctcg ggaatgccat gtgaataggt gtctgtcttg 360

```

gagggacaat gaaacttcag cagagttttc atttgttggg gaaagcacga ccatgcgaga 420
gaataagtgt tttgagcaat gtggaggatg ggggtgtggg tgtttcaatg tgaacccatc 480
ttgcttattt gtgcacacgt atctgcagtc agttagaaaa gaggccctta gattttttaa 540
ctgtatcgac tgggtgcata aactcactct agagatcaca gactttgatg gctctgtttc 600
aacaatagac ttgggagcat catctagccg ttccacaaac tggggttcag ttagcctctc 660
actggacgca gagggcattt caggctcaaa tagcttttct ttcattgaga gcccaggcaa 720
agggtatgca attgttgatg agccattctc agaaattcct cggcaagggt tcttggggga 780
gatcagggtc aattcagagt cctcagtcct gagtgctcat gaatcatgcc ttagggcacc 840
aaaccttate tcatacaagc ccatgataga tcaattggag tgcacaacaa atctgattga 900
tccctttgtt gtctttgaga ggggttctct gccacagaca aggaatgaca aaacctttgc 960
agcttcaaaa ggaaatagag gtgttcaagc tttctctaag ggctctgtac aagctgatct 1020
aactctgatg ttgacaatt ttgaggtgga ctttgtggga gcagccgtat ctttgtatgc 1080
cgcttcttta aatttgacag gttgctattc ttgcaatgca ggggccaggg tctgcctgtc 1140
tatcacatcc acaggaactg gatctctctc tgcccacaat aaggatgggt ctctgcatat 1200
agtccttcca tcagagaatg gaacaaaaga ccagtgtcag atactacact tcaactgtgcc 1260
tgaagtagag gaggagtta tgtactcttg tgatggagat gagcggcctc tgttggtgaa 1320
ggggaccctg atagccattg atccatttga tgataggcgg gaagcagggg gggaatcaac 1380
agtttgtaat ccaaaatctg gatcttggaa tttctttgac tggttttctg gactcatgag 1440
ttggtttgga gggcctctta aaactatact cctcatttgc ctgtatgttg cattatcaat 1500
tgggctcttt ttctcctta tatatcttgg aagaacagge ctctctaaaa tgttgcttgc 1560
tgccactaag aaggcctca
1579

```

<210> 6

<211> 525

<212> PRT

[0004] <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]

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

<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	
	tttgtgtgtg tgtttgtatt cagttctatt gcaataattt gtttagctat tctttatagg	60
	gtgcttaagt gcctgaagat tgccccaagg aaagttctga atccactaat gtggatcaca	120
	gccttcatca gatggatata taagaagatg gtggccagag tggcagacaa cattaatcaa	180
	gtgaacaggg aaataggatg gatggaagga ggtcagttgg ttctagggaa cctgcccct	240
	attcctcgtc atgcccacat 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	

[0006]

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

<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

[0007]

Met Asp Tyr Phe Pro Val Ile Ser Val Asp Leu Gln Ser Gly Arg Arg		
1	5	10
Val Val Ser Val Glu Tyr Phe Arg Gly Asp Gly Pro Pro Arg Ile Pro		15
	20	25
Tyr Ser Met Val Gly Pro Cys Cys Val Phe Leu Met His His Arg Pro		30
	35	40
Ser His Glu Val Arg Leu Arg Phe Ser Asp Phe Tyr Asn Val Gly Glu		45
	50	55
Phe Pro Tyr Arg Val Gly Leu Gly Asp Phe Ala Ser Asn Val Ala Pro		60
65	70	75
Pro Pro Ala Lys Pro Phe Gln Arg Leu Ile Asp Leu Ile Gly His Met		80
	85	90
Thr Leu Ser Asp Phe Thr Arg Phe Pro Asn Leu Lys Glu Ala Ile Ser		95
	100	105
Trp Pro Leu Gly Glu Pro Ser Leu Ala Phe Phe Asp Leu Ser Ser Thr		110
	115	120
Arg Val His Arg Asn Asp Asp Ile Arg Arg Asp Gln Ile Ala Thr Leu		125
	130	135
Ala Met Arg Ser Cys Lys Ile Thr Asn Asp Leu Glu Asp Ser Phe Val		140
145	150	155
Gly Leu His Arg Met Ile Ala Thr Glu Ala Ile Leu Arg Gly Ile Asp		160
	165	170
Leu Cys Leu Leu Pro Gly Phe Asp Leu Met Tyr Glu Val Ala His Val		175
	180	185
Gln Cys Val Arg Leu Leu Gln Ala Ala Lys Glu Asp Ile Ser Asn Ala		190
	195	200
Val Val Pro Asn Ser Ala Leu Ile Val Leu Met Glu Glu Ser Leu Met		205
	210	215
Leu Arg Ser Ser Leu Pro Ser Met Met Gly Arg Asn Asn Trp Ile Pro		220
225	230	235
Val Ile Pro Pro Ile Pro Asp Val Glu Met Glu Ser Glu Glu Glu Ser		240
	245	250
Asp Asp Asp Gly Phe Val Glu Val Asp		255
	260	265

<210> 10

<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

[0008]

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

	<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	
[0009]	<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 gtccttcag 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>	

	<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	
[0010]	<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

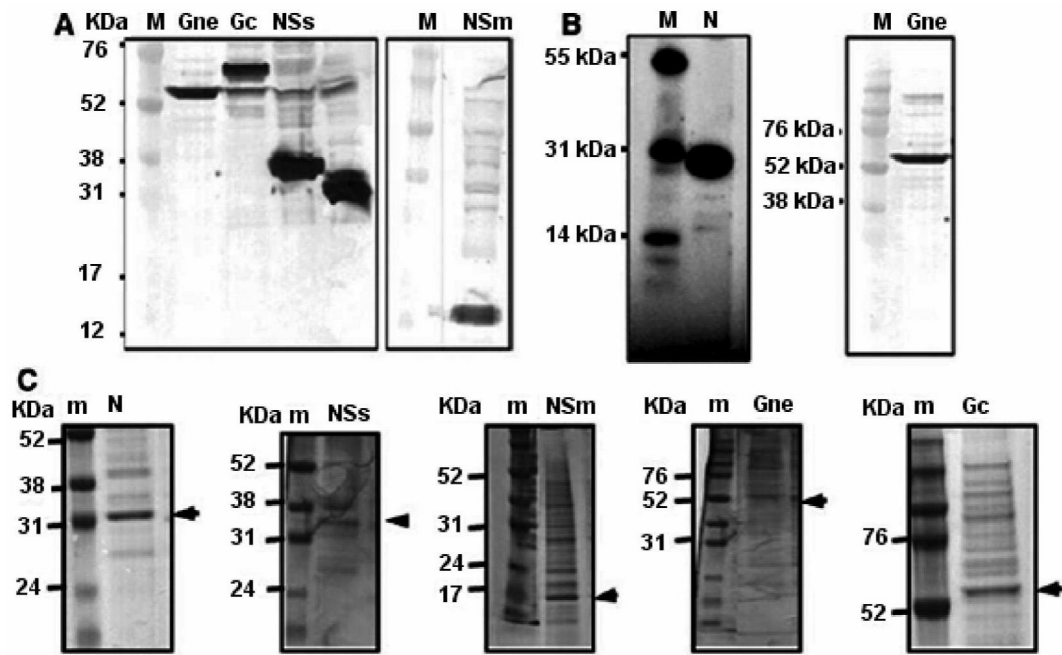


图1

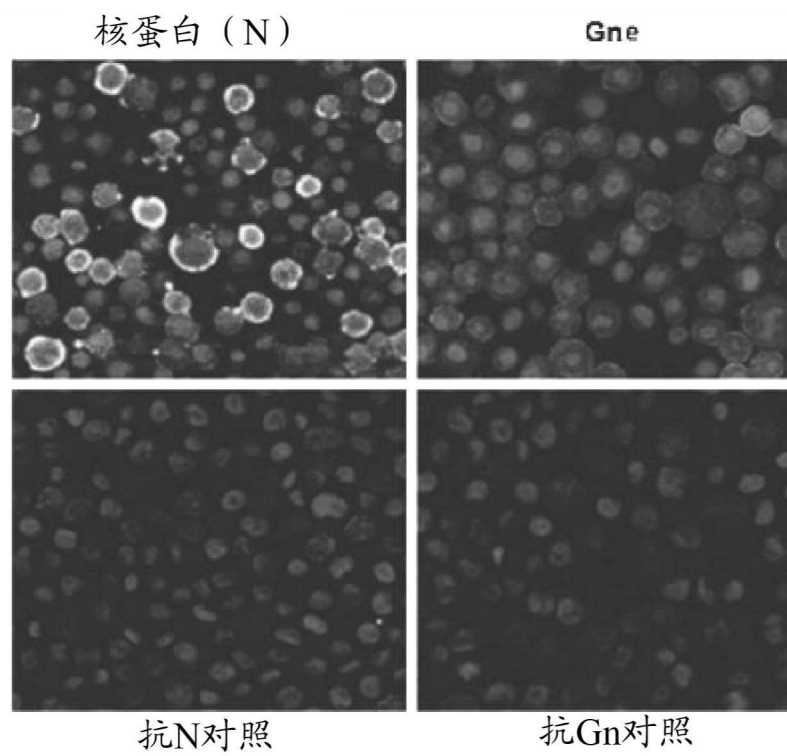


图2

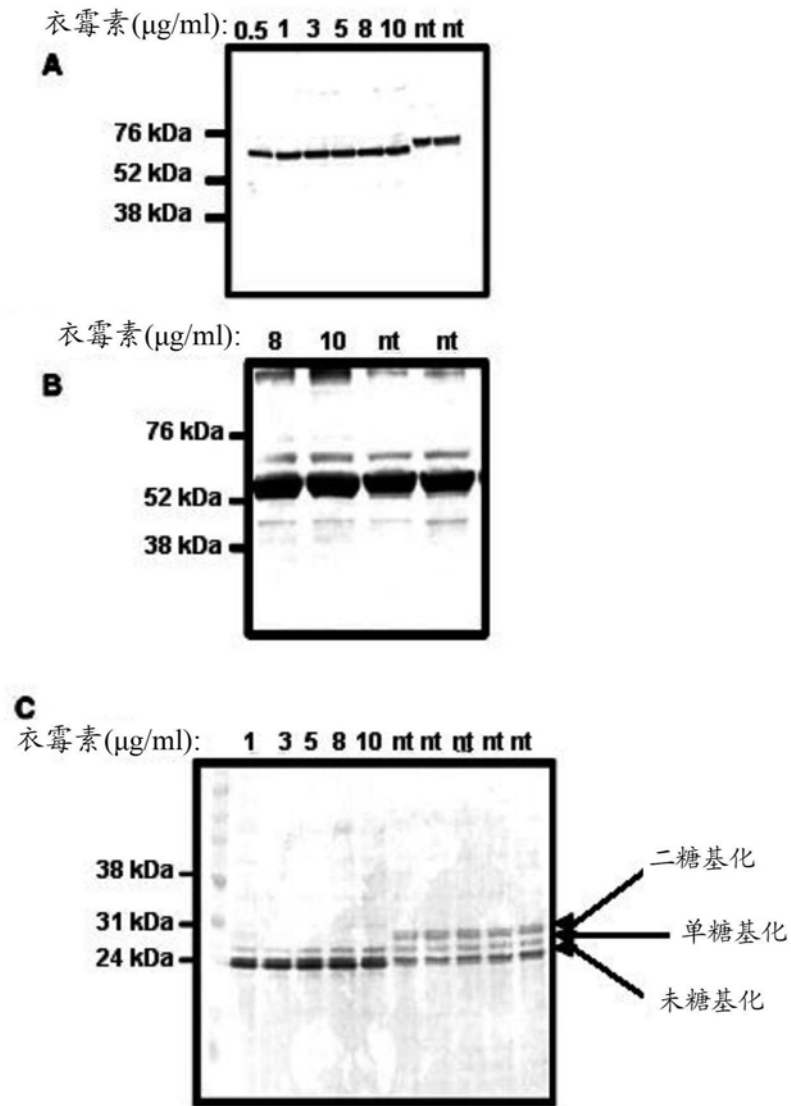


图3

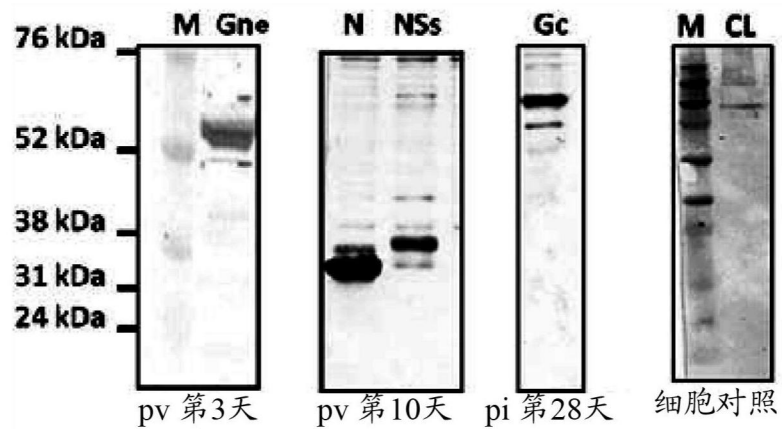


图4

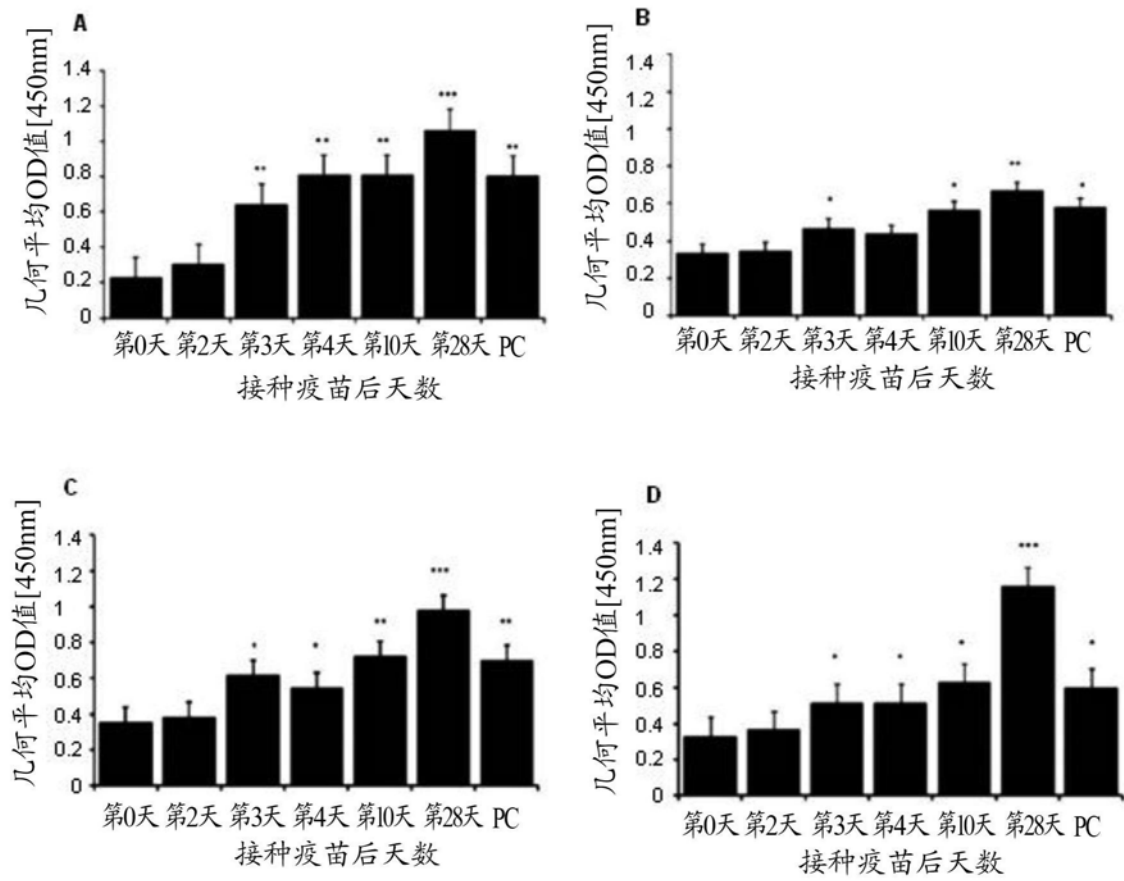


图5

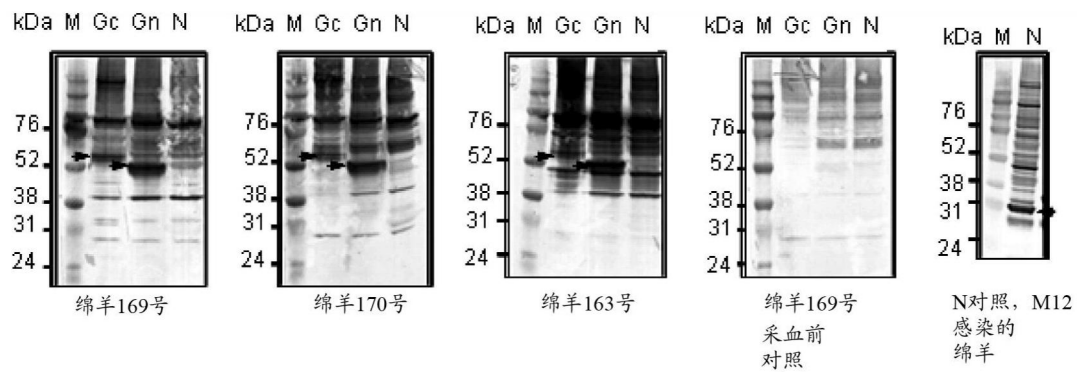


图6

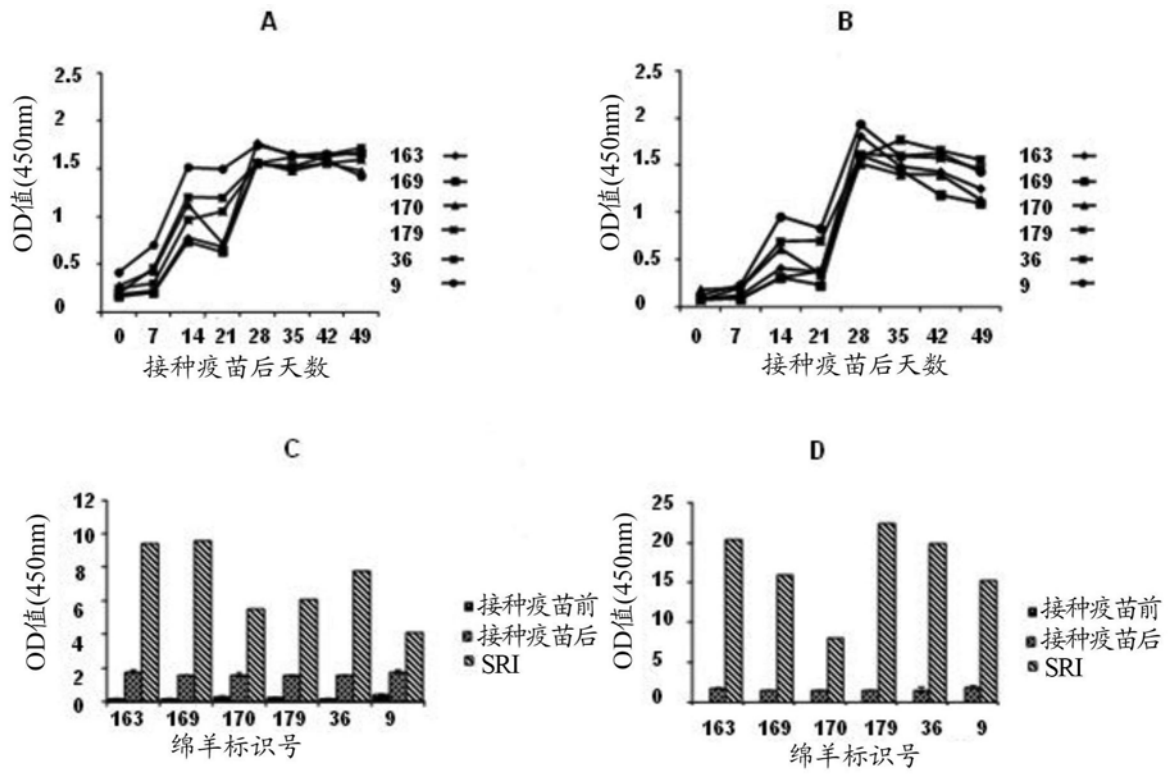


图7

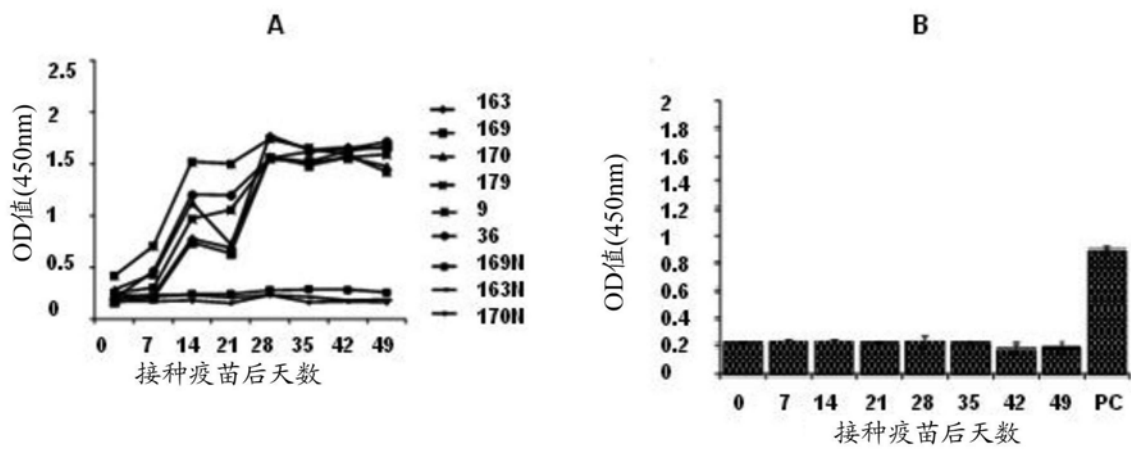


图8

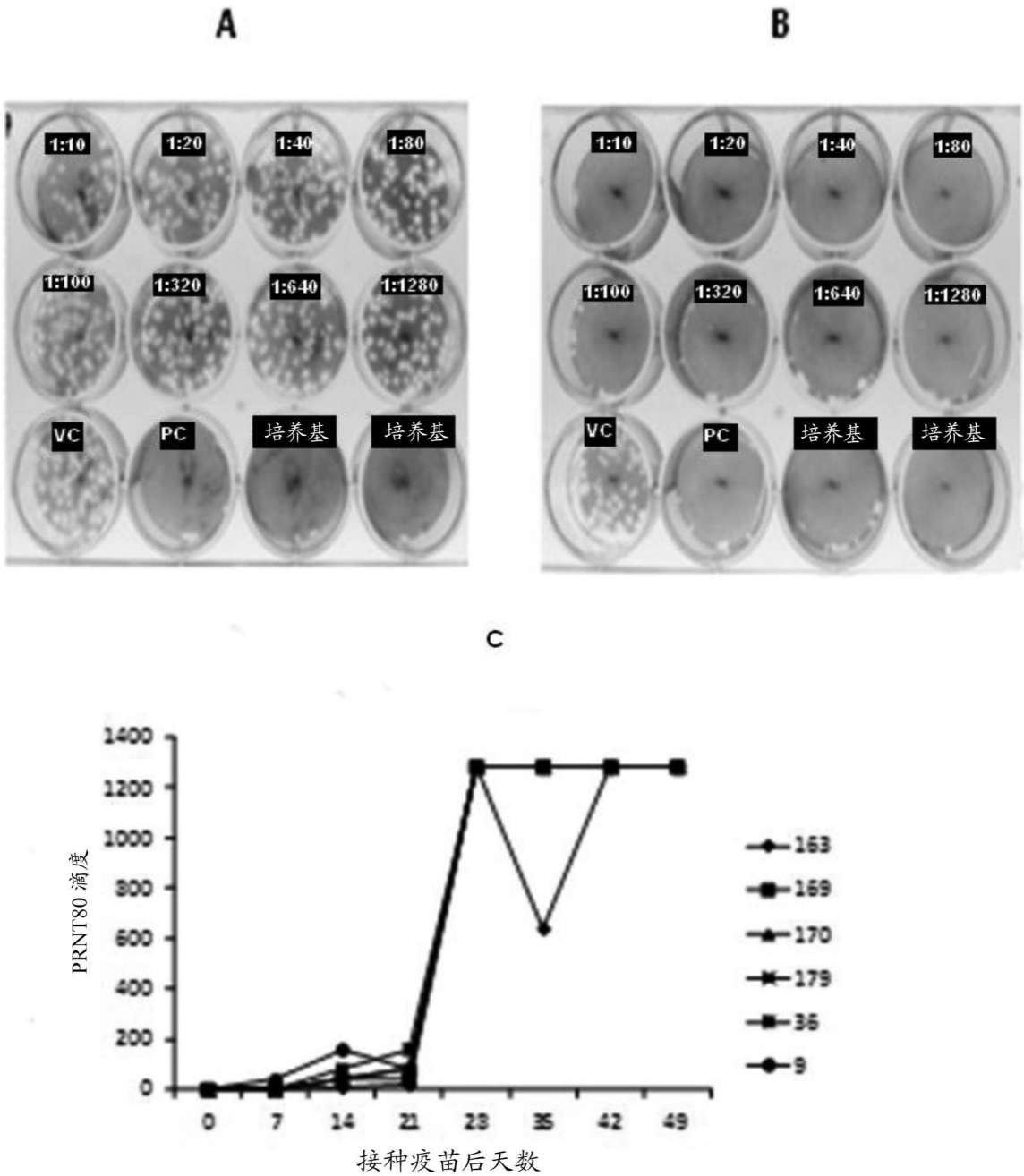


图9

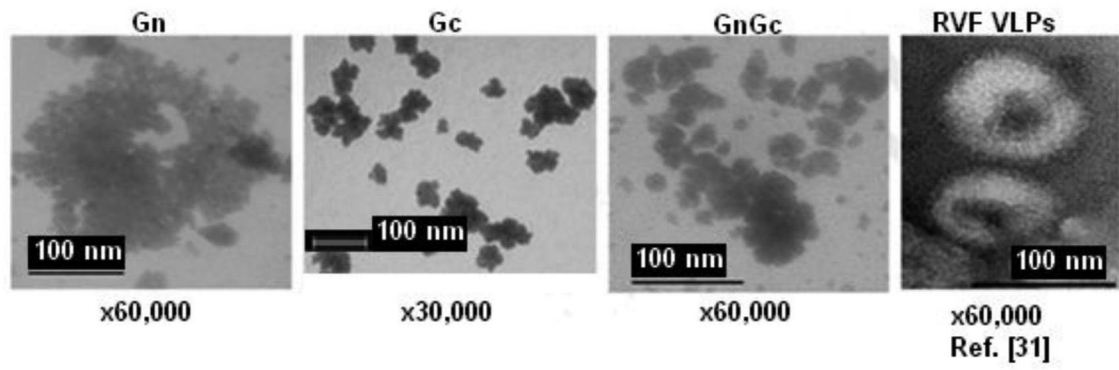


图10

转化的Gn的数据

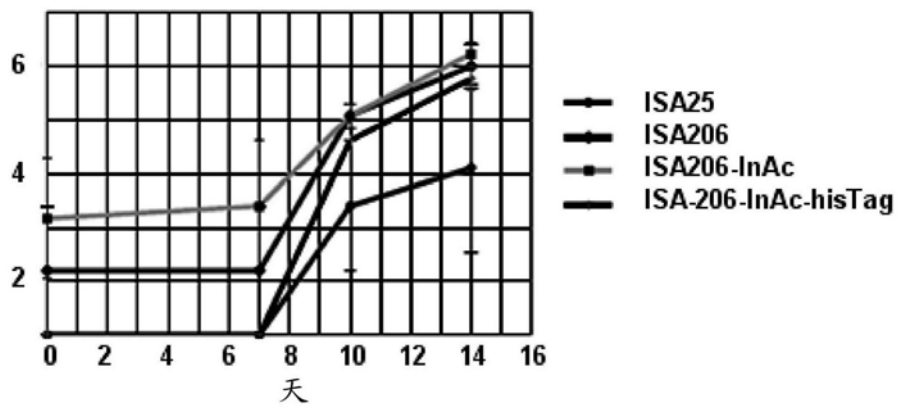


图11

转化的Gc的数据

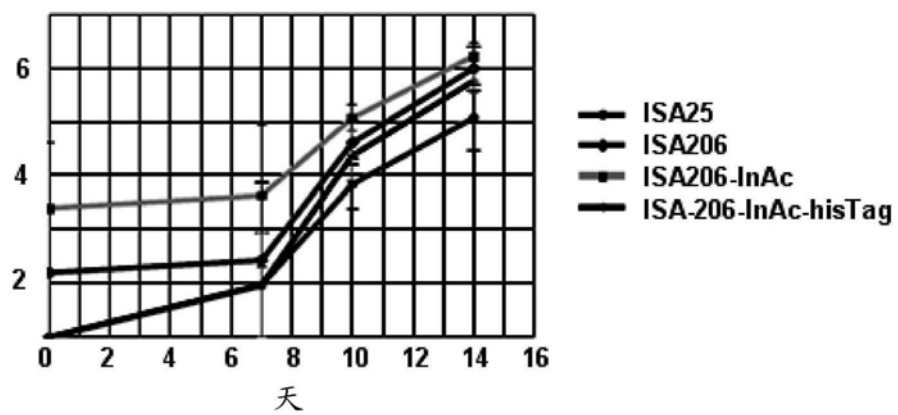


图12

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	CN105264076B	公开(公告)日	2019-09-13
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		
审查员(译)	吴丹阳		
优先权	61/757538 2013-01-28 US 61/916784 2013-12-16 US		
其他公开文献	CN105264076A		
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。

