



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119144656 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 17

(21) 申请号 202411481536.X

(22) 申请日 2020.07.29

(30) 优先权数据

1910804.2 2019.07.29 GB

(62) 分案原申请数据

202080054858.X 2020.07.29

(71) 申请人 英国卫生与社会保障部

地址 英国伦敦

(72) 发明人 罗杰·休森 斯图尔特·道尔

艾玛·肯尼迪 迈尔斯·卡罗尔

(74) 专利代理机构 北京骥驰知识产权代理有限公司

公司 11422

专利代理师 唐晓峰

(51) Int. Cl.

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

权利要求书2页 说明书42页

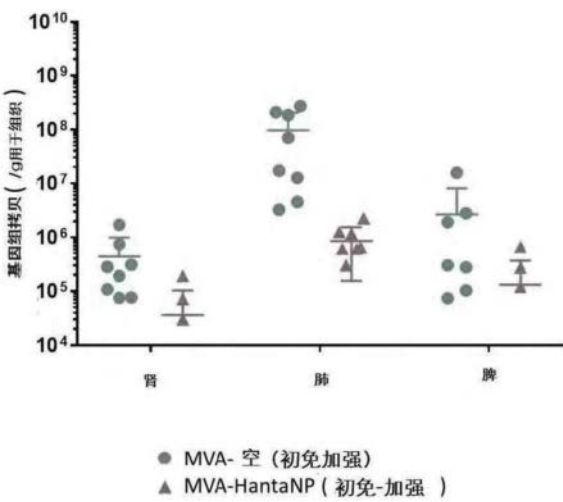
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

汉坦病毒抗原组合物

(57) 摘要

本发明提供了病毒载体或细菌载体,所述载体包含编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列;其中所述载体能够在受试者中诱导免疫应答。本发明还提供了组合物以及载体在药物治疗方法中的用途。



1. 一种病毒载体或细菌载体,
 - (A) 所述载体包含:
 - (i) 选自SEQ ID NO:17和24的第一核酸序列;和
 - (ii) 选自SEQ ID NO:21和28的第二核酸序列;和/或
 - (B) 所述载体包含与SEQ ID NO:29或30具有至少90%序列同一性的核酸序列;其中所述第一和第二核酸序列能够在受试者中诱导免疫应答;和其中所述与SEQ ID NO:29或30具有至少90%序列同一性的核酸序列能够在受试者中诱导免疫应答。
2. 权利要求1 (A) 的载体,其中载体包含与SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30具有至少70%序列同一性的核酸序列。
3. 权利要求1或权利要求2的载体,其中载体包含SEQ ID NO:29的核酸序列。
4. 权利要求1或权利要求2的载体,其中载体包含SEQ ID NO:30的核酸序列。
5. 之前任一项权利要求的载体,其中免疫应答是保护性免疫应答。
6. 之前任一项权利要求的载体,其中载体是病毒载体。
7. 权利要求6的载体,其中载体是非复制型痘病毒载体。
8. 权利要求7的载体,其中非复制型痘病毒载体选自:修饰的安卡拉痘苗病毒 (MVA) 载体、NYVAC痘苗病毒载体、金丝雀痘 (ALVAC) 载体和禽痘 (FPV) 载体。
9. 权利要求7或权利要求8的载体,其中非复制型痘病毒载体是MVA载体。
10. 权利要求7或权利要求8的载体,其中非复制型痘病毒载体是禽痘载体。
11. 权利要求6的载体,其中载体是腺病毒载体。
12. 权利要求11的载体,其中腺病毒载体是非复制型腺病毒载体。
13. 权利要求11或权利要求12的载体,其中腺病毒载体选自:人腺病毒载体、猿猴腺病毒载体、B组腺病毒载体、C组腺病毒载体、E组腺病毒载体、腺病毒6载体、PanAd3载体、腺病毒C3载体、ChAdY25载体、AdC68载体和Ad5载体。
14. 权利要求6的载体,其中载体是麻疹病毒载体。
15. 权利要求14的载体,其中麻疹病毒载体是非复制型麻疹病毒载体。
16. 一种编码根据权利要求1-15任一项的病毒载体的核酸序列。
17. 一种制备病毒载体的方法,包括:

提供核酸,其中所述核酸包含编码根据权利要求1-15任一项的载体的核酸序列;

用所述核酸转染宿主细胞;

在适于载体增殖的条件下培养所述宿主细胞;和

从所述宿主细胞获得载体。
18. 一种宿主细胞,其包含权利要求16的核酸序列。
19. 一种组合物,其包含根据权利要求1-15任一项的载体和药学上可接受的载体。
20. 权利要求19的组合物,还包含佐剂。
21. 根据权利要求1-15任一项的载体或根据权利要求19或权利要求20的组合物,其用于药物中。
22. 根据权利要求1-15任一项的载体或根据权利要求19或权利要求20的组合物,其用于在受试者中诱导免疫应答的方法中。
23. 根据权利要求22使用的载体,其中免疫应答包括T细胞应答。

24. 根据权利要求1-15任一项的载体,或根据权利要求19或权利要求20的组合物,其用于预防或治疗受试者汉坦病毒感染的方法中。

25. 根据权利要求24的载体,或根据24所述的组合物,其用于预防或治疗受试者肾综合征出血热的方法中。

汉坦病毒抗原组合物

[0001] 本申请是申请日为2020-07-29、申请号为202080054858X的分案申请。

[0002] 本发明涉及包含汉坦病毒抗原的病毒载体和细菌载体及其在免疫原性和抗原组合物中的用途。本发明还涉及所述组合物的预防性用途。本发明还涉及用于产生治疗性抗体的免疫原,以及生产所述免疫原的方法。

[0003] 汉坦病毒是一种新出现的人畜共患病病毒,分布广泛。存在许多汉坦病毒株,大致分成三个血清群。汉坦病毒是汉坦病毒肺综合征(HPS)的病原体,汉坦病毒肺综合征是人类严重的呼吸系统疾病,通常在36%的病例中是致命的,并且在一些爆发期间记录到50%的死亡率。它也是肾综合征出血热(HFRS)的病原体,HFRS是一组临床上相似的疾病,其在高达15%的病例中可能是致命的。汉坦病毒通常通过暴露于受感染的小型哺乳动物(通常是啮齿动物)的雾化体液或粪便而传播给人。人与人的传播也已经有报道。

[0004] 根据疾病控制和预防中心(CDC),与汉坦病毒感染相关的症状包括发烧、头痛、肌肉疼痛和严重呼吸困难。与HPS相关的症状还可以包括疲劳、发冷、头晕、非生产性咳嗽、恶心、呕吐和其他胃肠道症状,以及不适、腹泻、轻度头痛、关节痛、背痛和腹痛。与HFRS相关的症状包括剧烈头痛、背痛和腹痛、发烧、发冷、恶心、视力模糊、脸红、眼睛发炎或发红、皮疹。HFRS的后期症状可包括低血压、急性休克、血管渗漏和急性肾衰竭,这可导致严重的体液超负荷。

[0005] 目前还没有针对汉坦病毒的许可疫苗。根据CDC,对于汉坦病毒感染、HPS或HFRS没有特异性治疗或治愈。患有HPS的患者进入重症监护病房,并在严重呼吸窘迫期间用插管和氧气疗法治疗以帮助患者。HPS治疗的成功取决于呼吸窘迫的严重程度和感染的早期检测。HFRS的治疗可能涉及管理患者的体液和电解质水平、氧气和血压水平、透析以纠正严重的体液超负荷和治疗任何继发感染。抗病毒药物利巴韦林已显示如果在HFRS临床疾病过程中非常早期使用,则可减少疾病和死亡。然而,对于HPS患者没有发现利巴韦林的益处。

[0006] 因此,非常需要针对汉坦病毒感染的保护性疫苗。还迫切需要用于预防、治疗和抑制汉坦病毒感染的其他治疗剂。

[0007] 本发明通过提供编码汉坦病毒核蛋白(NP)或其抗原性片段的病毒载体和细菌载体,以及相应的组合物和所述载体和组合物在预防和治疗汉坦病毒感染中的用途,解决了以上的一个或多个问题。

[0008] 本发明的载体和组合物能够在个体(即受试者)中刺激(即诱导)针对汉坦病毒的免疫应答,并提供改善的免疫原性和功效。

[0009] 在一个方面中,本发明提供了病毒载体或细菌载体,所述载体包含编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的核酸序列;其中所述载体能够在个体中诱导免疫应答。本发明人已经发现了通过使用病毒载体或细菌载体向受试者递送编码汉坦病毒NP(或其抗原性片段)的核酸序列,可以在个体中产生针对汉坦病毒的高效免疫应答。

[0010] 在优选实施方案中,本发明的载体是病毒载体。

[0011] 汉坦病毒属是属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)的包膜、单链、三节段、负义RNA病毒属。已经描述了超过20种的对人致病的汉坦病毒株,其中每种株适应于单一啮齿动物

物种。汉坦病毒株被宽泛地分类为旧世界或新世界。旧世界株包括首尔病毒(“SEOV”, 全世界分布)、普马拉病毒(主要在欧洲分布)、汉滩病毒(“HNT”, 主要再亚洲分布)和多布拉瓦病毒(主要在欧洲分布), 并且通常与引起HFRS相关。新世界株包括Sin Nombre病毒(主要在北美分布)和Andes病毒(主要在拉丁美洲分布), 并且通常与HPS相关。

[0012] 汉坦病毒基因组由三个单链RNA区段组成, 称为小(S)、中(M)和大(L)。S区段在1和3kb之间并且编码核衣壳蛋白(NP)。M区段在3.2和4.9kb之间并且编码糖蛋白(GP)、Gn和Gc。L区段在6.8至12kb之间并且编码病毒RNA依赖性RNA聚合酶。

[0013] 汉坦病毒糖蛋白Gn和Gc通过与特异性进入受体(例如整联蛋白)的相互作用在靶细胞感染中起重要作用。汉坦病毒NP与病毒聚合酶形成核糖核蛋白复合物, 并在病毒增殖中起多种作用。还报道了NP在增强宿主细胞对病毒RNA的翻译、下调细胞凋亡、抑制干扰素信号传导应答和阻断TNF α 诱导的NF- κ B活化中起作用。

[0014] 首尔病毒可用作参考汉坦病毒株。GenBank登录号KM948598.1提供了汉坦病毒属NP的参考核酸序列(参见SEQ ID NO:1)和汉坦病毒属NP的参考多肽序列(SEQ ID NO:4)。

[0015] TAGTAGTAGGCTCCCTAAAGAGCTACTACACTAACAAGGAAAATGGCAACT

[0016] ATGGAAGAAATCCAGAGAGAAATCAGTGCGCACGAGGGGCAGCTTGTAAT

[0017] AGCACGCCAGAAGGTCAAGGATGCAGAAAAGCAGTATGAGAAGGATCCTG

[0018] ATGACCTAAATAAGAGGGCACTGCATGATCGGGAGAGTGTGCGCAGCTTCAA

[0019] TACAATCAAAAATTGATGAATTGAAGCGCCAACCTTGCTGACAGGATTGCAG

[0020] CAGGGAAGAACATCGGGCAAGACCGGGATCCTACAGGGGTAGAGCCGGGT

[0021] GATCATCTCAAGGAAAGATCAGCACTAAGCTACGGGAATACACTGGACCTG

[0022] AATAGCCTTGACATTGATGAACCTACAGGACAGACAGCTGATTGGTTGACC

[0023] ATAATTGTCTATTTGACATCATTCGTGGTCCCGATCATCTTGAAGGCACTGTA

[0024] CATGTTGACAACAAGAGGCAGGCAGACTTCAAAGGACAACAAGGGAATG

[0025] AGGATCAGATTCAAGGATGACAGCTCATATGAAGATGTCAATGGAATCAGA

[0026] AAGCCCAAACATCTGTATGTGTCAATGCCAAACGCCCAATCAAGCATGAAG

[0027] GCTGAAGAGATAACACCTGGAAGATTCCGCACTGCAGTATGTGGGCTATAC

[0028] CCTGCACAGATAAAGGCAAGGAACATGGTAAGCCCTGTCATGAGTGTAGTT

[0029] GGGTTTTTGGCACTGGCAAAAGACTGGACATCTAGAATTGAAGAATGGCTT

[0030] GGTGCACCCTGCAAGTTCATGGCAGAGTCTCCCATTGCCGGGAGCTTATCT

[0031] GGGAATCCTGTGAATCGTGATTATATCAGACAGAGACAAGGTGCACTTGCA

[0032] GGGATGGAGCCAAAAGAATTTCAAGCTCTCAGGCAACATTCAAAGGATGC

[0033] TGGATGTACACTGGTTGAACATATTGAGTCACCATCATCAATATGGGTATTT

[0034] GCTGGGGCCCCTGATAGGTGCCACCGACATGCCTGTTTGTGGAGGGATG

[0035] GCTGAGTTAGGTGCTTTCTTTTCTATACTTCAGGATATGAGGAACACAATCA

[0036] TGGCTTCAAAGACTGTGGGAACAGCTGATGAAAAGCTTCGAAAGAAGTCA

[0037] TCATTCTATCAATCATACCTCAGACGCACACAATCAATGGGAATACAACCTGG

[0038] ACCAGAGGATAATTGTTATGTTTATGGTTGCCTGGGGAAAGGAGGCAGTGG

[0039] ACAACTTTCATCTCGGTGATGACATGGATCCAGAGCTTCGCAGCCTGGCTC

[0040] AGATCCTGATTGACCAGAAAGTGAAGGAAATCTCAAACCAGGAACCTATG

[0041] AAATTATAAGTACATAATTATGTAATCCATACTAACTATAGGTTAAGAAATAC
[0042] TAATCATTAGTTAATAAGAATATAGATTTATTGAATAATCATATTAAATAATTA
[0043] GGTAAGTTAACTATTAGTTAGTTAAGTTAGCTAATTGATTTATATGATTATCAC
[0044] AATTGAATGTAATCATAAGCACAACTCACTGCCATGTATAATCACGGGTATAC
[0045] GGGTGGTTTTTCATATGGGGAACAGGGTGGGCTTAGGGCCAGGTCACCTTAA
[0046] GTGACCTTTTTTGTATATATGGATGTAGATTTCAATTGATCGAGTACTAATCCT
[0047] ACTGTTCTCTTTTCTTTCTTTCTCTTTCTTTACTAACAACAACAACTACC
[0048] TCACAACCTTCTACCTCAACACATACTACCTCATTGAGTTGTTTCTTTTGTCTTTTATAGGGAGCATA
CTACTA (SEQ ID NO:1)。

[0049] SEQ ID NO:1的编码序列对应于其中的核酸残基43-1332,并且由SEQ ID NO:2表示:

[0050] ATGGCAACTATGGAAGAAATCCAGAGAGAAATCAGTGCGCACGAGGGGCA
[0051] GCTTGTAATAGCACGCCAGAAGGTCAAGGATGCAGAAAAGCAGTATGAGA
[0052] AGGATCCTGATGACCTAAATAAGAGGGCACTGCATGATCGGGAGAGTGTCG
[0053] CAGCTTCAATACAATCAAAAATTGATGAATTGAAGCGCCAACCTTGCTGACA
[0054] GGATTGCAGCAGGGAAGAACATCGGGCAAGACCGGGATCCTACAGGGGTA
[0055] GAGCCGGGTGATCATCTCAAGGAAAGATCAGCACTAAGCTACGGGAATAC
[0056] ACTGGACCTGAATAGCCTTGACATTGATGAACCTACAGGACAGACAGCTGA
[0057] TTGGTTGACCATAATTGTCTATTTGACATCATTCGTGGTCCCGATCATCTTGA
[0058] AGGCACTGTACATGTTGACAACAAGAGGCAGGCAGACTTCAAAGGACAAC
[0059] AAGGGAATGAGGATCAGATTCAAGGATGACAGCTCATATGAAGATGTCAAT
[0060] GGAATCAGAAAGCCCAAACATCTGTATGTGTCAATGCCAAACGCCCAATCA
[0061] AGCATGAAGGCTGAAGAGATAACACCTGGAAGATTCCGCACTGCAGTATGT
[0062] GGGCTATACCCTGCACAGATAAAGGCAAGGAACATGGTAAGCCCTGTCATG
[0063] AGTGTAGTTGGGTTTTTGGCACTGGCAAAAGACTGGACATCTAGAATTGAA
[0064] GAATGGCTTGGTGCACCCTGCAAGTTCATGGCAGAGTCTCCCATTTGCCGGG
[0065] AGCTTATCTGGGAATCCTGTGAATCGTGATTATATCAGACAGAGACAAGGT
[0066] GCACTTGCAAGGATGGAGCCAAAAGAATTTCAAGCTCTCAGGCAACATTC
[0067] AAAGGATGCTGGATGTACACTGGTTGAACATATTGAGTCACCATCATCAATA
[0068] TGGGTATTTGCTGGGGCCCCTGATAGGTGCCACCGACATGCCTGTTTGTG
[0069] GAGGGATGGCTGAGTTAGGTGCTTTCTTTTCTATACTTCAGGATATGAGGAA
[0070] CACAATCATGGCTTCAAAGACTGTGGGAACAGCTGATGAAAAGCTTCGAA
[0071] AGAAGTCATCATTCTATCAATCATACCTCAGACGCACACAATCAATGGGAAT
[0072] ACAACTGGACCAGAGGATAATTGTTATGTTTATGGTTGCCTGGGGAAAGGA
[0073] GGCAGTGGACAACTTTCATCTCGGTGATGACATGGATCCAGAGCTTCGCAG
[0074] CCTGGCTCAGATCCTGATTGACCAGAAAGTGAAGGAAATCTCAAACCAGGAACCTATGAAATTA (SEQ ID NO:2)。

[0075] 发明人已经生成了编码汉坦病毒NP的核酸序列,其被优化用于在智人中表达(参见SEQ ID NO:3):

[0076] ATGGCCACAATGGAAGAGATCCAGAGAGAGATCAGCGCCACGAGGGACA
[0077] GCTGGTTATCGCCAGACAGAAAGTGAAGGACGCCGAGAAGCAGTACGAG
[0078] AAGGACCCCGACGATCTGAACAAGAGAGCCCTGCACGACAGAGAAAGCG
[0079] TGGCCGCCTCTATCCAGAGCAAGATCGATGAGCTGAAGAGACAGCTGGCC
[0080] GACAGAATCGCCGCTGGCAAGAATATTGGCCAGGACAGAGATCCCACAGG
[0081] CGTGGAACCTGGCGATCACCTGAAAGAGAGAAGCGCCCTGTCCTATGGCA
[0082] ACACCCTGGACCTGAACAGCCTGGACATTGATGAGCCTACCGGCCAGACA
[0083] GCCGACTGGCTGACAATCATTGTGTACCTGACCAGCTTCGTGGTCCCCATC
[0084] ATCCTGAAGGCCCTGTACATGCTGACCACCAGAGGCAGACAGACCAGCAA
[0085] GGACAACAAGGGCATGAGAATCCGGTTCAAGGATGACAGCAGCTACGAGG
[0086] ACGTGAACGGCATTAGAAAGCCCAAGCACCTGTACGTGTCCATGCCTAACG
[0087] CTCAGAGCAGCATGAAGGCCGAGGAAATCACCCCTGGCAGATTCAGAACA
[0088] GCCGTGTGCGGACTGTACCCCGCTCAGATCAAGGCCAGAAACATGGTGTC
[0089] CCCAGTGATGAGCGTCGTGGGATTTCTGGCCCTGGCTAAGGACTGGACCAG
[0090] CAGGATTGAGGAATGGCTGGGAGCCCTTGCAAGTTTATGGCCGAGTCTCC
[0091] TATCGCCGGCAGCCTGTCTGGCAACCCCGTGAATAGAGACTACATCAGACA
[0092] GAGGCAGGGCGCTCTGGCCGGAATGGAACCCAAAGAATTTACAGGCCCTGC
[0093] GGCAGCACTCTAAGGATGCCGGATGTACCCTGGTGGAACACATTGAGAGC
[0094] CCCAGCAGCATCTGGGTTTTCTGCTGGCGCTCCTGATAGATGCCCTCCTACCT
[0095] GTCTGTTTGTGGCGGAATGGCCGAGCTGGGCGCCTTCTTTAGCATTCTGC
[0096] AGGACATGCGGAATACCATCATGGCCAGCAAGACCGTGGGCACCGCCGAT
[0097] GAGAAGCTGAGAAAGAAGTCCAGCTTCTACCAGAGCTACCTGCGGAGAAC
[0098] CCAGAGCATGGGCATTGAGCTGGACCAGAGAATCATCGTGATGTTTCATGGT
[0099] GGCCTGGGGCAAAGAAGCCGTGGACAATTTTACCTGGGCGACGACATGG
[0100] ACCCCGAGCTGAGATCTCTGGCCCAGATCCTGATCGACCAGAAAGTCAAAGAGATCTCCAATCAAGAG
CCCATGAAGCTG (SEQ ID NO:3)。

[0101] SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的核酸序列的翻译产生汉坦病毒NP多肽序列,其由 (SEQ ID NO:4) 来表示:

[0102] MATMEEIQREISAHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDL NKRALHDRESVAA
[0103] SIQSKIDELKRQLADRIAAGKNIGQDRDPTGVEPGDHLKERSALSYGNTLDLN
[0104] SLDIDEPTGQTADWLTIIIVYLT SFVVP IILKALYMLTTRGRQTSKDNKGMRIRFK
[0105] DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSM PNAQSSMKAEEITPGRFR TAVCGLYPAQIKAR
[0106] NMVSPVMSVVGFLALAKDWTSRIE EWLGAPCKFMAESPIAGSLSGNPVNRD
[0107] YIRQRQ GALAGMEPK EFQALRQHSKDAGCTLVEHIESPSSIWVFAGAPDRCPP
[0108] TCLFVGGM AELGAFFS ILQDMRNTIMASKTVGTADEKL RKKSSFYQSYLRRT
[0109] QSMGIQLDQRIIVFMVAVWGKEAVDNFHLGDDMDPELRS LAQILIDQKVKEISNQEPMKL (SEQ ID NO:4)。

[0110] 汉滩病毒可以用作参考汉坦病毒株。GenBank登录号KC570390.1提供了汉坦病毒NP的参考核酸序列 (参见SEQ ID NO:5) 和汉坦病毒属NP的参考多肽序列 (参见SEQ ID NO:

7)。

[0111] TAGTAGTAGACTCCCTAAAGAGCTACTAGAACAACGATGGCAACTATGGAG
[0112] GAATTGCAGAGGGAAATCAATGCCCATGAGGGTCAACTGGTGATAGCCAG
[0113] GCAGAAGGTGAGGGATGCAGAAAAGCAGTATGAAAAGGATCCAGATGAGT
[0114] TAAACAAGAGAGCATTGACAGATCGAGAGGGTGTTCAGTATCCATTCAAG
[0115] CAAAGATTGATGAGTTAAAGAGGCAATTGGCAGATAGGATTGCAACCGGG
[0116] AAGAACCTTGGAAGGAACAAGACCCAACAGGGGTAGAACCTGGAGATC
[0117] ATCTGAAAGAGAGATCAATGCTCAGTTATGGAAATGTTCTTGACTTAAACC
[0118] ACCTGGATATTGATGAGCCAACAGGACAGACAGCAGACTGGCTGGGCATT
[0119] GTTATCTATCTCACATCCTTTGTTGTCCCGATACTTCTGAAAGCCCTGTACAT
[0120] GTTAAACAACAAGAGGGAGGCAGACCACCAAGGACAATAAAGGAACTCGG
[0121] ATTCGATTCAAGGATGATAGCTCCTTCGAGGATGTCAATGGCATTGGAAGC
[0122] CGAAACATCTATATGTGTCTTACCAAATGCACAGTCAAGTATGAAAGCAG
[0123] AAGAGATTACACCTGGTAGATATAGAACAGCAATTTGTGGACTTTACCCTGC
[0124] ACAAATTAAGGCAAGACAGATGATTAGTCCAGTCATGAGTGTAATCGGATT
[0125] CTTGGCTTTGGCAAAAGATTGGAGTGACCGCATTGAGCAGTGGTTAAGTGA
[0126] ACCGTGTAAGCTTCTTCCAGATACAGCAGCAGTTAGCCTTCTTGGTGGTCC
[0127] TGCAACCAACAGGGACTATTTACGGCAGCGACAAGTAGCATTGGGCAACAT
[0128] GGAAACAAAAGAGTCTAAGGCTATACGCCAACATGCAGAAGCAGCAGGCT
[0129] GTAGTATGATTGAGGACATTGAGTCACCATCATCAATATGGGTGTTTGCTGG
[0130] GGCACCGGACCGCTGTCCACCAACATGTCTCTTTATTGCAGGTATGGCTGA
[0131] GCTTGGGGCATTTTTTTCCATCCTGCAGGACATGCGAAATACAATTATGGCA
[0132] TCCAAGACAGTTGGAACCTCTGAGGAGAAGCTACGGAAGAAATCCTCATT
[0133] CTATCAGTCTTATCTCAGGAGAACAATCAATGGGAATACAACCTGGATCA
[0134] GAGGATAATTGTGCTCTTCATGGTAGCCTGGGGGAAAGAAGCAGTGGATAA
[0135] CTTCCACCTAGGAGATGATATGGACCCTGAGCTGCGAACACTAGCACAGAG
[0136] CCTGATTGATGTAAAGTGAAGGAAATTTCCAACCAAGAGCCTTTAAACT
[0137] ATAATCAGTGAATGTATAACCCTCATTATGTGATTATTATATACTACTGAATCA
[0138] TTATCAATCATATTTGCACTATTATTATCAGGGGAATTAGTATATCAGGGTAA
[0139] GGGCACATTTATGGGTGGGAATCATTACTCAGAGGGTGGGTCAGTTAATCC
[0140] GTTGTGGGTGGGTTTAGTTCTGGCTGCCTTAAGTAGCCTTTTTTTGTATATA
[0141] TGGATGTAGATTTTCAATTTGATCTTTAACTAATCTTGCTCTTTTCTTTTCCT
[0142] CCTGCTTTCTCTGCTTACTAACAACAACATTCTACCTCAACACACAACCTACC
[0143] TCAACTAACTACCTCATTGTATTGCTCCTTGATTGTCTCTTTAGGGAGTCTACTACTA (SEQ ID NO:5)。

[0144] SEQ ID NO:5的编码序列对应于其中的核酸残基37-1323,并且由SEQ ID NO:6来表示。

[0145] ATGGCAACTATGGAGGAATTGCAGAGGGAAATCAATGCCCATGAGGGTCA
[0146] ACTGGTGATAGCCAGGCAGAAGGTGAGGGATGCAGAAAAGCAGTATGAAA

[0147] AGGATCCAGATGAGTTAAACAAGAGAGCATTGACAGATCGAGAGGGTGT
[0148] GCAGTATCCATTCAAGCAAAGATTGATGAGTTAAAGAGGCAATTGGCAGAT
[0149] AGGATTGCAACCGGAAGAACCTTGAAAGGAACAAGACCCAACAGGGG
[0150] TAGAACCTGGAGATCATCTGAAAGAGAGATCAATGCTCAGTTATGGAAATG
[0151] TTCTTGACTTAAACCACCTGGATATTGATGAGCCAACAGGACAGACAGCAG
[0152] ACTGGCTGGGCATTGTTATCTATCTCACATCCTTTGTTGTCCCGATACTTCTG
[0153] AAAGCCCTGTACATGTTAACAACAAGAGGGAGGCAGACCACCAAGGACAA
[0154] TAAAGGAACTCGGATTGATTCAAGGATGATAGCTCCTTCGAGGATGTCAA
[0155] TGGCATTTCGGAAGCCGAAACATCTATATGTGTCCTTACCAAATGCACAGTCA
[0156] AGTATGAAAGCAGAAGAGATTACACCTGGTAGATATAGAACAGCAATTTGT
[0157] GGACTTTACCCTGCACAAATTAAGGCAAGACAGATGATTAGTCCAGTCATG
[0158] AGTGTAAATCGGATTCTTGGCTTTGGCAAAAGATTGGAGTGACCGCATTGAG
[0159] CAGTGGTTAAGTGAACCGTGTAAGCTTCTTCCAGATACAGCAGCAGTTAGC
[0160] CTTCTTGGTGGTCCTGCAACCAACAGGGACTATTTACGGCAGCGACAAGTA
[0161] GCATTGGGCAACATGGAAACAAAAGAGTCTAAGGCTATACGCCAACATGC
[0162] AGAAGCAGCAGGCTGTAGTATGATTGAGGACATTGAGTCACCATCATCAAT
[0163] ATGGGTGTTTGCTGGGGCACCAGCGCTGTCCACCAACATGTCTCTTTATT
[0164] GCAGGTATGGCTGAGCTTGGGGCATTTTTTTCCATCCTGCAGGACATGCGA
[0165] AATACAATTATGGCATCCAAGACAGTTGGAACCTCTGAGGAGAAGCTACGG
[0166] AAGAAATCCTCATTCTATCAGTCTTATCTCAGGAGAACACAATCAATGGGAA
[0167] TACAACCTGGATCAGAGGATAATTGTGCTCTTCATGGTAGCCTGGGGGAAAG
[0168] AAGCAGTGGATAACTTCCACCTAGGAGATGATATGGACCCTGAGCTGCGAA
[0169] CACTAGCACAGAGCCTGATTGATGTTAAAGTGAAGGAAATTTCCAACCAAGAGCCTTTAAACTA (SEQ ID NO:6)。

[0170] SEQ ID NO:6的核酸序列的翻译产生汉坦病毒属NP多肽序列,其由 (SEQ ID NO:7) 来表示:

[0171] MATMEELQREINAHEGQLVIARQKVRDAEKQYEKDPDELNKRALTDREGVAV
[0172] SIQAKIDELKRQLADRIATGKNLKEQDPTGVEPGDHLKERSMLSYGNVLDL
[0173] NHLDIDEPTGQTADWLGIYIYLTSTFVVPILLKALYMLTTRGRQTKDNKGTRIR
[0174] FKDDSSFEDVNGIRKPKHLYVSLPNAQSSMKAEIITPGRYRTAICGLYPAQIKA
[0175] RQMISPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWLSEPCKLLPDAAVSLGPGPATNRDY
[0176] LRQRQVALGNMETKESKAIRQHAEAAAGCSMIEDIESPSSIWVFAGAPDRCPPT
[0177] CLFIAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEKLRKKSSFYQSYLRRTQS
[0178] MGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRTLAQSLIDVKVKEISNQEPLKL (SEQ ID NO:7)。

[0179] 汉坦病毒属NP的参考核酸序列可以由SEQ ID NO:8提供,其对应于SEQ ID NO:5的核酸残基319-1323。

[0180] ATGCTCAGTTATGGAAATGTTCTTGACTTAAACCACCTGGATATTGATGAGC
[0181] CAACAGGACAGACAGCAGACTGGCTGGGCATTGTTATCTATCTCACATCCT

[0182] TTGTTGTCCCGATACTTCTGAAAGCCCTGTACATGTTAACAACAAGAGGGA
[0183] GGCAGACCACCAAGGACAATAAAGGAACTCGGATTTCGATTCAAGGATGAT
[0184] AGCTCCTTCGAGGATGTCAATGGCATTTCGGAAGCCGAAACATCTATATGTGT
[0185] CCTTACCAAATGCACAGTCAAGTATGAAAGCAGAAGAGATTACACCTGGTA
[0186] GATATAGAACAGCAATTTGTGGACTTTACCCTGCACAAATTAAGGCAAGAC
[0187] AGATGATTAGTCCAGTCATGAGTGTAATCGGATTCTTGGCTTTGGCAAAAGA
[0188] TTGGAGTGACCGCATTGAGCAGTGGTTAAGTGAACCGTGTAAGCTTCTTCC
[0189] AGATACAGCAGCAGTTAGCCTTCTTGGTGGTCTCTGCAACCAACAGGGACTA
[0190] TTTACGGCAGCGACAAGTAGCATTGGGCAACATGGAAACAAAAGAGTCTA
[0191] AGGCTATACGCCAACATGCAGAAGCAGCAGGCTGTAGTATGATTGAGGACA
[0192] TTGAGTCACCATCATCAATATGGGTGTTTGTCTGGGGCACCGGACCGCTGTC
[0193] CACCAACATGTCTCTTTATTGCAGGTATGGCTGAGCTTGGGGCATTTTTTTC
[0194] CATCCTGCAGGACATGCGAAATACAATTATGGCATCCAAGACAGTTGGAAC
[0195] CTCTGAGGAGAAGCTACGGAAGAAATCCTCATTCTATCAGTCTTATCTCAG
[0196] GAGAACACAATCAATGGGAATACAACCTGGATCAGAGGATAATTGTGCTCTT
[0197] CATGGTAGCCTGGGGGAAAGAAGCAGTGGATAACTTCCACCTAGGAGATG
[0198] ATATGGACCCTGAGCTGCGAACACTAGCACAGAGCCTGATTGATGTAAAGTGAAGGAAATTTCCAAC
CAAGAGCCTTTAAACTA (SEQ ID NO:8)。

[0199] 发明人已经生成了编码汉坦病毒NP的核酸序列,其被优化用于在智人中表达 (参见SEQ ID NO:9):

[0200] ATGCTGAGCTACGGCAACGTGCTGGATCTGAACCACCTGGATATCGACGAG
[0201] CCAACAGGACAGACCGCTGATTGGCTGGGCATCGTGATCTACCTGACCTCC
[0202] TTTGTGGTGCCTATTCTGCTCAAAGCCCTCTATATGCTGACAACACGCGGAA
[0203] GGCAGACCACCAAAGATAACAAAGGCACCCGGATCAGGTTTAAGGACGAC
[0204] AGCTCCTTTGAGGATGTCAACGGCATCCGGAACCTAAGCACCTCTATGTG
[0205] TCTCTGCCCAATGCACAGTCTCCATGAAGGCAGAAGAGATCACACCAGG
[0206] CCGGTACAGAACCGCCATCTGTGGACTGTATCCTGCACAAATCAAAGCCCG
[0207] GCAGATGATCAGCCCCGTGATGTCCGTTATCGGATTCTGGCTCTGGCCAA
[0208] AGATTGGAGCGACAGGATCGAGCAGTGGCTGAGCGAGCCTTGCAAGCTGC
[0209] TTCCTGATACAGCCGCTGTGTCACTGCTTGGCGGCCCTGCCACAAACAGAG
[0210] ATTACCTGAGACAGAGACAGGTGGCACTGGGCAACATGGAAACAAAAGA
[0211] GAGCAAGGCCATCCGGCAGCATGCCGAAGCTGCTGGCTGTAGCATGATCG
[0212] AGGATATCGAGTCCCCTAGCTCCATTTGGGTGTTTCGAGGGGCCCCAGATA
[0213] GATGTCCACCAACATGCCTGTTTATTGCCGGCATGGCTGAACTGGGAGCTT
[0214] TTTTCAGCATCCTCCAGGATATGCGCAACACGATTATGGCCTCCAAGACAGT
[0215] GGGAAACCAGCGAGGAAAAGCTGCGGAAGAAAAGCAGCTTTTACCAGTCTT
[0216] ACCTGAGGCGGACCCAGTCCATGGGGATCCAACCTGGATCAGCGGATCATTG
[0217] TGCTGTTTATGGTCGCTTGGGGAAAAGAGGCTGTGATAACTTCCACCTGG
[0218] GAGATGATATGGATCCTGAACTGCGGACCCTGGCTCAGTCCCTGATCGATGTGAAAGTGAAGAAATT

AGTAATCAAGAACCCCTCAAGCTG (SEQ ID NO:9)。

[0219] 包含SEQ ID NO:8或9的核酸序列特别适合用于本发明的载体中,所述载体还编码来自汉滩病毒以外的汉坦病毒株的核蛋白,如来自首尔病毒的核蛋白。本发明人确定野生型汉滩病毒核蛋白的94个N-末端氨基酸与来自首尔病毒的野生型核蛋白的N-末端显示出高序列相似性,并且在这个区域内存在序列差异时,本发明人确定两个序列都含有密切相关的氨基酸。野生型汉滩病毒核蛋白序列的第95个残基被鉴定为与来自首尔病毒的野生型核蛋白序列中的相应残基显著不同的第一个残基。发明人认为编码汉滩病毒野生型核蛋白的94个N-末端氨基酸的核酸当存在于也编码来自首尔病毒的核蛋白(或来自首尔病毒的野生型核蛋白的至少94个N-末端氨基酸,或其抗原性片段)的载体中时基本上是抗原性冗余的。因此,发明人认为编码野生型汉滩病毒核蛋白的94个N-末端氨基酸的核酸可以从也编码来自首尔病毒的核蛋白(或来自首尔病毒的野生型核蛋白的至少94个N-末端氨基酸,或其抗原性片段)的载体中省略,而不牺牲抗原多样性。去除不必要的核酸序列通常在载体构建体(例如MVA构建体)的设计中是有利的,因为它可以增强载体稳定性。

[0220] 由于上述原因,发明人认为省略编码首尔病毒核蛋白的94个N-末端氨基酸的核酸时,特别是从编码汉滩病毒核蛋白(或来自汉滩病毒的野生型核蛋白的至少94个N-末端氨基酸,或其抗原性片段)的载体中省略时,可以实现类似的优点。

[0221] SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的核酸序列的翻译产生汉坦病毒属NP多肽序列,其由 (SEQ ID NO:10) 来表示:

[0222] MLSYGNVLDLNHLIDIDEPTGQTADWLGIVIIYLTSTFVVPILLKALYMLTTRGRQ

[0223] TTKDNKGTRIRFKDDSSFEDVNGIRKPKHLYVSLPNAQSSMKAEEITPGRYRT

[0224] AICGLYPAQIKARQMISPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWLSEPCKLLPDTAAVS

[0225] LLGGPATNRDYLRRQVALGNMETKESKAIRQHAEAGCSMIEDIESPSSIWV

[0226] FAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEKLRKKSSF

[0227] YQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRTLAQSLIDVKVKEISNQEPLKL (SEQ ID NO:10)。

[0228] 如本文所用,术语“抗原性片段”是指汉坦病毒NP的肽或蛋白质片段,其与参考汉坦病毒NP相比,保留在个体中诱导免疫应答的能力。因此,抗原性片段可以包括参考蛋白的至少一个表位。举例来说,本发明的抗原性片段可以包含具有至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300个氨基酸的肽序列(或由其组成),其中肽序列与参考蛋白的(连续)氨基酸的相应肽序列具有至少70%的序列同源性。抗原性片段可以包含来自参考蛋白序列的至少10个连续氨基酸残基(或由其组成)(例如,所述参考蛋白的至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275或300个连续氨基酸残基)。

[0229] 参考蛋白的抗原性片段可以具有与参考蛋白共同的抗原交叉反应性和/或基本上相同的体内生物活性。例如,能够结合参考蛋白的抗原性片段的抗体也能够结合参考蛋白本身。作为进一步的实例,参考蛋白及其抗原性片段可以具有诱导T淋巴细胞(例如CD4+、CD8+、效应T细胞或记忆T细胞,如TEM或TCM)的“回忆应答”的共同能力,所述T淋巴细胞先前已经暴露于汉坦病毒感染的抗原性组分。

[0230] 在一个方面中,本发明提供了病毒载体或细菌载体,所述载体包含编码汉坦病毒

核蛋白或其抗原性片段的核酸序列;其中所述载体能够在受试者中诱导免疫应答。

[0231] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与选自 SEQ ID NO:1、2和3的核酸序列具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0232] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:3的核酸序列具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0233] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与选自 SEQ ID NO:5、6、8和9的核酸序列具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0234] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:9的核酸序列具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0235] “肽库4”诱导非常强的抗原特异性T细胞应答(参见实施例)。肽库4表示的氨基酸序列对应于SEQ ID NO:11。

[0236] L Y P A Q I K A R N M V S P V M S V V G F L A L A K D W T S R I E E W L G A P C K F M A E S P I A G S L S G N P V N R D Y I R Q R Q G A L A G M E P K E F Q A (SEQ ID NO:11)

[0237] SEQ ID NO:11的氨基酸序列由SEQ ID NO:1的核酸残基655-891(参见SEQ ID NO:15);SEQ ID NO:2的残基613-849(参见SEQ ID NO:16);和SEQ ID NO:3的残基613-849(参见SEQ ID NO:17)编码。

[0238] CTATACCCTGCACAGATAAAGGCAAGGAACATGGTAAGCCCTGTCATGAGT

[0239] GTAGTTGGGTTTTTGGCACTGGCAAAAGACTGGACATCTAGAATTGAAGAA

[0240] TGGCTTGGTGCACCCTGCAAGTTCATGGCAGAGTCTCCCATTGCCGGGAGC

[0241] TTATCTGGGAATCCTGTGAATCGTGATTATATCAGACAGAGACAAGGTGCACTTGCAGGGATGGAGCC AAAAGAATTTCAAGCT (SEQ ID NO:15)

[0242] CTATACCCTGCACAGATAAAGGCAAGGAACATGGTAAGCCCTGTCATGAGT

[0243] GTAGTTGGGTTTTTGGCACTGGCAAAAGACTGGACATCTAGAATTGAAGAA

[0244] TGGCTTGGTGCACCCTGCAAGTTCATGGCAGAGTCTCCCATTGCCGGGAGC

[0245] TTATCTGGGAATCCTGTGAATCGTGATTATATCAGACAGAGACAAGGTGCACTTGCAGGGATGGAGCC AAAAGAATTTCAAGCT (SEQ ID NO:16)

[0246] CTGTACCCCGCTCAGATCAAGGCCAGAAACATGGTGTCCCCAGTGATGAGC

[0247] GTCGTGGGATTTCTGGCCCTGGCTAAGGACTGGACCAGCAGGATTGAGGA

[0248] ATGGCTGGGAGCCCCTTGCAAGTTTATGGCCGAGTCTCCTATCGCCGGCAG

[0249] CCTGTCTGGCAACCCCGTGAATAGAGACTACATCAGACAGAGGCAGGGCGCTCTGGCCGGAATGGAAC CCAAAGAATTTCAAGCC (SEQ ID NO:17)

[0250] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:15、16或17的核酸序列具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0251] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含(或由

其组成)来自SEQ ID NO:15、16或17的序列的至少10个连续核酸残基(例如,SEQ ID NO:15、16或17的至少10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60或65个核酸)。

[0252] “肽库9”也诱导非常强的抗原特异性T细胞应答。肽库9表示的氨基酸序列对应于SEQ ID NO:12。

[0253] IKARQMISPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWLSEPCKLLPDTAAVSLLGGPATN RDYLRQRQVALGNMETKESKAIRQHA (SEQ ID NO:12)。

[0254] SEQ ID NO:12的氨基酸序列由SEQ ID NO:5的核酸残基664-900(参见SEQ ID NO:18);SEQ ID NO:6的残基628-864(参见SEQ ID NO:19);SEQ ID NO:8的残基346-582(参见SEQ ID NO:20);和SEQ ID NO:9的残基346-582(参见SEQ ID NO:21)来编码。

[0255] ATTAAGGCAAGACAGATGATTAGTCCAGTCATGAGTGTAATCGGATTCTTGG

[0256] CTTTGGCAAAAGATTGGAGTGACCGCATTGAGCAGTGGTTAAGTGAACCG

[0257] TGTAAGCTTCTTCCAGATACAGCAGCAGTTAGCCTTCTTGGTGGTCCTGCA

[0258] ACCAACAGGGACTATTTACGGCAGCGACAAGTAGCATTGGGCAACATGGAAACAAAAGAGTCTAAGGC TATACGCCAACATGCA (SEQ ID NO:18) ATTAAGGCAAGACAGATGATTAGTCCAGTCATGAGTGTAATCGGAT TCTTGGCTTTGGCAAAAGATTGGAGTGACCGCATTGAGCAGTGGTTAAGTGAACCGTGTAAGCTTCTTCCAGATAC AGCAGCAGTTAGCCTTCTTGGTGGTCCTGCAACCAACAGGGACTATTTACGGCAGCGACAAGTAGCATTGGGCAAC ATGGAAACAAAAGAGTCTAAGGCTATACGCCAACATGCA (SEQ ID NO:19) ATTAAGGCAAGACAGATGATTAG TCCAGTCATGAGTGTAATCGGATTCTTGGCTTTGGCAAAAGATTGGAGTGACCGCATTGAGCAGTGGTTAAGTGAA CCGTGTAAGCTTCTTCCAGATACAGCAGCAGTTAGCCTTCTTGGTGGTCCTGCAACCAACAGGGACTATTTACGGC AGCGACAAGTAGCATTGGGCAACATGGAAACAAAAGAGTCTAAGGCTATACGCCAACATGCA (SEQ ID NO:20) ATCAAAGCCCGCAGATGATCAGCCCCGTGATGTCCGTTATCGGATTCTTGGCTCTGGCCAAAGATTGGAGCGACA GGATCGAGCAGTGGCTGAGCGAGCCTTGCAAGCTGCTTCTGATACAGCCGCTGTGTCACTGCTTGGCGGCCCTGC CACAAACAGAGATTACCTGAGACAGAGACAGGTGGCACTGGGCAACATGGAAACAAAAGAGAGCAAGGCCATCCGG CAGCATGCC (SEQ ID NO:21)

[0259] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:18、19、20或21的核酸序列具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0260] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含(或由其组成)来自SEQ ID NO:18、19、20或21的序列的至少10个连续核酸残基(例如,SEQ ID NO:18、19、20或21的至少10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60或65个核酸)。

[0261] 如本文所证明的,肽库4和9诱导非常强的抗原特异性T细胞应答。通过将由“肽库4”表示的多肽序列与由“肽库9”表示的多肽序列进行比对,发明人鉴定出高序列同一性的区域,分别由SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14来表示。不希望受理论束缚,发明人认为SEQ ID NO:13和14的氨基酸序列在引发分别用肽库4和9观察到的特别强的抗原特异性T细胞应答中起重要作用。

[0262] SPVMSVVGFLALAKD (SEQ ID NO:13)

[0263] PVMSVIGFLALAKDW (SEQ ID NO:14)

[0264] SEQ ID NO:13尤其由SEQ ID NO:1的核酸残基691-735(参见SEQ ID NO:22);SEQ ID NO:2的残基649-693(参见SEQ ID NO:23);和SEQ ID NO:3的残基649-693(参见SEQ ID

NO:24) 来编码。

[0265] AGCCCTGTCATGAGTGTAGTTGGGTTTTTGGCACTGGCAAAAGAC (SEQ ID NO:22)

[0266] AGCCCTGT CAT GAGT GT AGTT GGGTTTTTGGC ACTGGC A AAAGAC (SEQ ID NO:23)

[0267] TCCCCAGTGATGAGCGTCGTGGGATTTCTGGCCCTGGCTAAGGAC (SEQ ID NO:24)

[0268] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:22、23或24的核酸序列具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0269] SEQ ID NO:14尤其由SEQ ID NO:5的核酸残基688-732 (参见SEQ ID NO:25); SEQ ID NO:6的残基652-696 (参见SEQ ID NO:26); SEQ ID NO:8的残基370-414 (参见SEQ ID NO:27); 和SEQ ID NO:9的残基370-414 (参见SEQ ID NO:28) 来编码。

[0270] CCAGTCATGAGTGTAATCGGATTCTTGGCTTTGGCAAAAGATTGG (SEQ ID NO:25)

[0271] CCAGTCATGAGTGTAATCGGATTCTTGGCTTTGGCAAAAGATTGG (SEQ ID NO:26)

[0272] CCAGTCATGAGTGTAATCGGATTCTTGGCTTTGGCAAAAGATTGG (SEQ ID NO:27)

[0273] CCCGTGATGTCCGTTATCGGATTCTTGGCTCTGGCCAAAGATTGG (SEQ ID NO:28)

[0274] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:25、26、27或28的核酸序列具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0275] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:

[0276] (A) 第一核酸序列由与SEQ ID NO:1、2或3具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列提供;和

[0277] (B) 第二核酸序列由与SEQ ID NO:5、6、8或9具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列提供。

[0278] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:

[0279] (A) 第一核酸序列由与SEQ ID NO:15、16、17、22、23或24具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列提供;和

[0280] (B) 第二核酸序列由与SEQ ID NO:18、19、20、21、25、26、27或28具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列提供。

[0281] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:

[0282] (A) 第一核酸序列与选自SEQ ID NO:15、16、17、22、23或24的核酸序列具有至少70%序列同一性;和

[0283] (B) 第二核酸序列与选自SEQ ID NO:18、19、20、21、25、26、27或28的核酸序列具有至少70%序列同一性。

[0284] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:

[0285] (A) 第一核酸序列与SEQ ID NO:24的核酸序列具有至少70%序列同一性;和

- [0286] (B) 第二核酸序列与SEQ ID NO:28的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0287] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0288] (A) 第一核酸序列与选自SEQ ID NO:22或23的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0289] (B) 第二核酸序列由与选自SEQ ID NO:25、26或27的核酸序列具有至少70%序列同一性的核酸序列提供。
- [0290] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0291] (A) 第一核酸序列与SEQ ID NO:17的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0292] (B) 第二核酸序列与SEQ ID NO:21的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0293] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0294] (A) 第一核酸序列与选自SEQ ID NO:15或16的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0295] (B) 第二核酸序列与选自SEQ ID NO:18、19或20的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0296] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0297] (A) 第一核酸序列与选自SEQ ID NO:1、2或3的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0298] (B) 第二核酸序列与选自SEQ ID NO:5、6、8或9的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0299] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0300] (A) 第一核酸序列与SEQ ID NO:3的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0301] (B) 第二核酸序列与SEQ ID NO:9的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0302] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0303] (A) 第一核酸序列与SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0304] (B) 第二核酸序列与SEQ ID NO:8的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0305] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0306] (A) 第一核酸与SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0307] (B) 第二核酸序列与SEQ ID NO:6的核酸序列具有至少70%序列同一性。
- [0308] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含第一核酸序列和第二核酸序列,其中:
- [0309] (A) 第一核酸序列与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少70%序列同一性;和
- [0310] (B) 第二核酸序列与SEQ ID NO:5的核酸序列具有至少70%序列同一性。

[0311] 在一个实施方案中,第一核酸序列位于第二核酸序列的5'。在一个实施方案中,第二核酸序列位于第一核酸序列的5'。

[0312] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:29具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0313] ATGGCCACAATGGAAGAGATCCAGAGAGAGATCAGCGCCACGAGGGACA
[0314] GCTGGTTATCGCCAGACAGAAAGTGAAGGACGCCGAGAAGCAGTACGAG
[0315] AAGGACCCCGACGATCTGAACAAGAGAGCCCTGCACGACAGAGAAAGCG
[0316] TGGCCGCCTCTATCCAGAGCAAGATCGATGAGCTGAAGAGACAGCTGGCC
[0317] GACAGAATCGCCGCTGGCAAGAATATTGGCCAGGACAGAGATCCACAGG
[0318] CGTGGAACCTGGCGATCACCTGAAAGAGAGAAGCGCCCTGTCCTATGGCA
[0319] ACACCCTGGACCTGAACAGCCTGGACATTGATGAGCCTACCGGCCAGACA
[0320] GCCGACTGGCTGACAATCATTGTGTACCTGACCAGCTTCGTGGTCCCCATC
[0321] ATCCTGAAGGCCCTGTACATGCTGACCACCAGAGGCAGACAGACCAGCAA
[0322] GGACAACAAGGGCATGAGAATCCGGTTCAAGGATGACAGCAGCTACGAGG
[0323] ACGTGAACGGCATTAGAAAGCCCAAGCACCTGTACGTGTCCATGCCTAACG
[0324] CTCAGAGCAGCATGAAGGCCGAGGAAATCACCCCTGGCAGATTGAGAACA
[0325] GCCGTGTGCGGACTGTACCCCGCTCAGATCAAGGCCAGAAACATGGTGTC
[0326] CCCAGTGATGAGCGTCGTGGGATTTCTGGCCCTGGCTAAGGACTGGACCAG
[0327] CAGGATTGAGGAATGGCTGGGAGCCCCCTTGCAAGTTTATGGCCGAGTCTCC
[0328] TATCGCCGGCAGCCTGTCTGGCAACCCCGTGAATAGAGACTACATCAGACA
[0329] GAGGCAGGGCGCTCTGGCCGAATGGAACCCAAAGAATTTACAGGCCCTGC
[0330] GGCAGCACTCTAAGGATGCCGGATGTACCCTGGTGGAACACATTGAGAGC
[0331] CCCAGCAGCATCTGGGTTTTCTGCTGGCGCTCCTGATAGATGCCCTCCTACCT
[0332] GTCTGTTTGTGGCGGAATGGCCGAGCTGGGCGCCTTCTTTAGCATTCTGC
[0333] AGGACATGCGGAATACCATCATGGCCAGCAAGACCGTGGGCACCGCCGAT
[0334] GAGAAGCTGAGAAAGAAGTCCAGCTTCTACCAGAGCTACCTGCGGAGAAC
[0335] CCAGAGCATGGGCATTGAGCTGGACCAGAGAATCATCGTGATGTTTCATGGT
[0336] GGCCTGGGGCAAAGAAGCCGTGGACAATTTTACCTGGGCGACGACATGG
[0337] ACCCCGAGCTGAGATCTCTGGCCAGATCCTGATCGACCAGAAAGTCAAA
[0338] GAGATCTCCAATCAAGAGCCCATGAAGCTGATGCTGAGCTACGGCAACGTG
[0339] CTGGATCTGAACCACCTGGATATCGACGAGCCAACAGGACAGACCGCTGAT
[0340] TGGCTGGGCATCGTGATCTACCTGACCTCCTTTGTGGTGCCTATTCTGCTCA
[0341] AAGCCCTCTATATGCTGACAACACGCGGAAGGCAGACCACCAAAGATAAC
[0342] AAAGGCACCCGGATCAGGTTTAAGGACGACAGCTCCTTTGAGGATGTCAA
[0343] CGGCATCCGGAAACCTAAGCACCTCTATGTGTCTCTGCCCAATGCACAGTC
[0344] CTCCATGAAGGCAGAAGAGATCACACCAGGCCGGTACAGAACCGCCATCT
[0345] GTGGACTGTATCCTGCACAAATCAAAGCCCGGCAGATGATCAGCCCCGTGA
[0346] TGTCCGTTATCGGATTCTGGCTCTGGCCAAAGATTGGAGCGACAGGATCG

[0347] AGCAGTGGCTGAGCGAGCCTTGCAAGCTGCTTCCTGATACAGCCGCTGTGT
[0348] CACTGCTTGGCGGCCCTGCCACAAACAGAGATTACCTGAGACAGAGACAG
[0349] GTGGCACTGGGCAACATGGAACAAAAAGAGAGCAAGGCCATCCGGCAGC
[0350] ATGCCGAAGCTGCTGGCTGTAGCATGATCGAGGATATCGAGTCCCCTAGCT
[0351] CCATTTGGGTGTTTCGAGGGGCCCCAGATAGATGTCCACCAACATGCCTGT
[0352] TCATTGCCGGCATGGCTGAACTGGGAGCTTTTTTCAGCATCCTCCAGGATAT
[0353] GCGCAACACGATTATGGCCTCCAAGACAGTGGGAACCAGCGAGGAAAAGC
[0354] TGCGAAGAAAAGCAGCTTTTACCAGTCTTACCTGAGGCGGACCCAGTCC
[0355] ATGGGGATCCAAGTGGATCAGCGGATCATTGTGCTGTTTATGGTCGCTTGGG
[0356] GAAAAGAGGCTGTCGATAACTTCCACCTGGGAGATGATATGGATCCTGAAC
[0357] TCGCGACCCTGGCTCAGTCCCTGATCGATGTGAAAGTGAAGAAATTAGTA
[0358] ATCAAGAACCCTCAAGCTG (SEQ ID NO:29)

[0359] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段的核酸序列包含与SEQ ID NO:30具有至少70% (例如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的核酸序列。

[0360] ATGCTGAGCTACGGCAACGTGCTGGATCTGAACCACCTGGATATCGACGAG
[0361] CCAACAGGACAGACCGCTGATTGGCTGGGCATCGTGATCTACCTGACCTCC
[0362] TTTGTGGTGCCTATTCTGCTCAAAGCCCTCTATATGCTGACAACACGCGGAA
[0363] GGCAGACCACCAAAGATAACAAAGGCACCCGGATCAGGTTTAAGGACGAC
[0364] AGCTCCTTTGAGGATGTCAACGGCATCCGGAACCTAAGCACCTCTATGTG
[0365] TCTCTGCCCAATGCACAGTCTCCATGAAGGCAGAAGAGATCACACCAGG
[0366] CCGGTACAGAACCGCCATCTGTGGACTGTATCCTGCACAAATCAAAGCCCG
[0367] GCAGATGATCAGCCCCGTGATGTCCGTTATCGGATTCTGGCTCTGGCCAA
[0368] AGATTGGAGCGACAGGATCGAGCAGTGGCTGAGCGAGCCTTGCAAGCTGC
[0369] TTCCTGATACAGCCGCTGTGTCACTGCTTGGCGGCCCTGCCACAAACAGAG
[0370] ATTACCTGAGACAGAGACAGGTGGCACTGGGCAACATGGAACAAAAAGA
[0371] GAGCAAGGCCATCCGGCAGCATGCCGAAGCTGCTGGCTGTAGCATGATCG
[0372] AGGATATCGAGTCCCCTAGCTCCATTTGGGTGTTTCGAGGGGCCCCAGATA
[0373] GATGTCCACCAACATGCCTGTTTATTGCCGGCATGGCTGAACTGGGAGCTT
[0374] TTTTCAGCATCCTCCAGGATATGCGCAACACGATTATGGCCTCCAAGACAGT
[0375] GGGAACCAGCGAGGAAAAGCTGCGGAAGAAAAGCAGCTTTTACCAGTCTT
[0376] ACCTGAGGCGGACCCAGTCCATGGGGATCCAAGTGGATCAGCGGATCATTG
[0377] TGCTGTTTATGGTCGCTTGGGGAAAAGAGGCTGTCGATAACTTCCACCTGG
[0378] GAGATGATATGGATCCTGAACTGCGGACCCTGGCTCAGTCCCTGATCGATG
[0379] TGAAAGTGAAAGAAATTAGTAATCAAGAACCCTCAAGCTGATGGCCACA
[0380] ATGGAAGAGATCCAGAGAGAGATCAGCGCCACGAGGGACAGCTGGTTAT
[0381] CGCCAGACAGAAAGTGAAGGACGCCGAGAAGCAGTACGAGAAGGACCCC
[0382] GACGATCTGAACAAGAGAGCCCTGCACGACAGAGAAAGCGTGGCCGCCT
[0383] CTATCCAGAGCAAGATCGATGAGCTGAAGAGACAGCTGGCCGACAGAATC

[0384] GCCGCTGGCAAGAATATTGGCCAGGACAGAGATCCCACAGGCGTGGAACC
[0385] TGGCGATCACCTGAAAGAGAGAAGCGCCCTGTCCTATGGCAACACCCTGG
[0386] ACCTGAACAGCCTGGACATTGATGAGCCTACCGGCCAGACAGCCGACTGG
[0387] CTGACAATCATTGTGTACCTGACCAGCTTCGTGGTCCCCATCATCCTGAAGG
[0388] CCCTGTACATGCTGACCACCAGAGGCAGACAGACCAGCAAGGACAACAAG
[0389] GGCATGAGAATCCGGTTCAAGGATGACAGCAGCTACGAGGACGTGAACGG
[0390] CATTAGAAAGCCCAAGCACCTGTACGTGTCCATGCCTAACGCTCAGAGCAG
[0391] CATGAAGGCCGAGGAAATCACCCCTGGCAGATTCAGAACAGCCGTGTGCG
[0392] GACTGTACCCCGCTCAGATCAAGGCCAGAAACATGGTGTCCCCAGTGATGA
[0393] GCGTCGTGGGATTTCTGGCCCTGGCTAAGGACTGGACCAGCAGGATTGAG
[0394] GAATGGCTGGGAGCCCTTGCAAGTTTATGGCCGAGTCTCCTATCGCCGGC
[0395] AGCCTGTCTGGCAACCCCGTGAATAGAGACTACATCAGACAGAGGCAGGG
[0396] CGCTCTGGCCGGAATGGAACCCAAAGAATTTAGGCCCTGCGGCAGCACT
[0397] CTAAGGATGCCGGATGTACCCTGGTGAACACATTGAGAGCCCCAGCAGCA
[0398] TCTGGGTTTTCTGCTGGCGCTCCTGATAGATGCCCTCCTACCTGTCTGTTGT
[0399] TGGCGGAATGGCCGAGCTGGGCGCCTTCTTTAGCATTCTGCAGGACATGCG
[0400] GAATACCATCATGGCCAGCAAGACCGTGGGCACCGCCGATGAGAAGCTGA
[0401] GAAAGAAGTCCAGCTTCTACCAGAGCTACCTGCGGAGAACCCAGAGCATG
[0402] GGCATTAGCTGGACCAGAGAATCATCGTGATGTTTCATGGTGGCCTGGGGC
[0403] AAAGAAGCCGTGGACAATTTTCACCTGGGCGACGACATGGACCCCGAGCT
[0404] GAGATCTCTGGCCAGATCCTGATCGACCAGAAAGTCAAAGAGATCTCCAATCAAGAGCCCATGAAGC
TG (SEQ ID NO:30)

[0405] 发明人已经发现了由本发明的核酸序列编码的汉坦病毒NP可以用于在个体中产生针对汉坦病毒的有效免疫应答。特别地,发明人已经发现了使用细菌载体或病毒载体(如非复制痘病毒载体或腺病毒载体)将汉坦病毒NP递送至受试者时,获得针对汉坦病毒的高效免疫应答。

[0406] 载体是可用作将遗传物质递送到靶细胞中的载体的工具。举例来说,病毒载体充当抗原递送介质,并且还具有通过结合识别病毒元件的细胞表面分子来激活先天免疫系统的能力。可以产生携带编码给定抗原的核酸的重组病毒载体。然后可以使用病毒载体将核酸递送至靶细胞,在那产生编码的抗原,然后通过靶细胞自身的分子机制将其呈递给免疫系统。作为“非自身的”,所产生的抗原在目标受试者中产生获得性免疫应答。有利地,本文已经证明了本发明的载体提供保护性免疫应答。

[0407] 适用于本发明的病毒载体包括痘病毒载体(如非复制型痘病毒载体)、腺病毒载体和流感病毒载体。

[0408] 在某些实施方案中,“病毒载体”可以是病毒样颗粒(VLP)。VLP是含有病毒蛋白的脂质包膜颗粒。某些病毒蛋白具有固有的自组装能力,并且在这个过程中作为独立的包膜颗粒从细胞膜中出芽。VLP易于纯化,并且可以例如用于呈递病毒抗原。因此,VLP适用于免疫原性组合物中,如下文所述的那些。在某些实施方案中,病毒载体不是病毒样颗粒。

[0409] 细菌载体也可用作抗原递送介质。可以产生携带编码给定抗原的核酸的重组细菌

载体。重组细菌载体可以在其表面上表达抗原。施用于受试者后,细菌载体定殖抗原呈递细胞(例如树突细胞或巨噬细胞)。诱导抗原特异性免疫应答。免疫应答可以是细胞(T细胞)免疫应答,或者可以包括体液(例如B细胞)和细胞(T细胞)免疫应答。适合用作重组细菌载体的细菌的实例包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、志贺氏菌(*Shigella*)、沙门氏菌(*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*))和李斯特菌(*Listeria*)细菌。在一个实施方案中,本发明的载体是细菌载体,其中细菌是革兰氏阴性细菌。在一个实施方案中,本发明的载体是选自大肠杆菌载体、志贺氏菌载体、沙门氏菌载体和李斯特菌载体的细菌载体。

[0410] 不希望受任何一种特定理论的束缚,发明人认为使用本发明的载体的抗原递送刺激受试者中的T细胞应答以及其他应答。因此,发明人认为本发明提供针对汉坦病毒感染的保护的一种方式是通过刺激T细胞应答和细胞介导的免疫系统。此外,还可以实现基于体液(抗体)的保护。

[0411] 本发明的病毒载体可以是非复制型病毒载体。

[0412] 如本文所用,非复制型病毒载体是在感染靶细胞后缺乏有效复制能力的病毒载体。因此,非复制型病毒载体在感染靶细胞(如用非复制型病毒载体接种的个体中的人靶细胞)后产生其自身拷贝的能力高度降低或不存在。这种病毒载体也可以称为减毒或复制缺陷型。原因可以是靶细胞中复制所必需的基因的丢失/缺失。因此,非复制型病毒载体在感染靶细胞后不能有效地产生其自身的拷贝。因此,与有复制能力的病毒载体相比,非复制型病毒载体可以有利地具有改善的安全性特征。非复制型病毒载体可以保留在不是靶细胞的细胞中复制的能力,从而允许病毒载体产生。举例来说,非复制型病毒载体(例如非复制型痘病毒载体)可能缺乏在靶细胞(如哺乳动物细胞(例如人细胞))中生产性复制的能力,但保留在禽类细胞(例如鸡胚成纤维细胞或CEF细胞)中复制(并因此允许载体产生)的能力。

[0413] 本发明的病毒载体可以是非复制型痘病毒载体。因此,在一个实施方案中,编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的病毒载体是非复制型痘病毒载体。

[0414] 在一个实施方案中,非复制型痘病毒载体选自:改良安卡拉痘苗病毒(MVA)载体、NYVAC痘苗病毒载体、金丝雀痘(ALVAC)载体和禽痘(FPV)载体。MVA和NYVAC都是痘苗病毒的减毒衍生物。与痘苗病毒相比,MVA缺乏大约200个开放阅读框中的大约26个。

[0415] 在一个实施方案中,非复制型痘病毒载体是FPV载体。

[0416] 在一个优选的实施方案中,非复制型痘病毒载体是MVA载体。

[0417] 本发明的病毒载体可以是腺病毒载体。因此,在一个实施方案中,编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的病毒载体是腺病毒载体。

[0418] 在一个实施方案中,腺病毒载体是非复制型腺病毒载体(其中非复制如上所定义)。腺病毒可以通过缺失E1或E1和E3两个基因区而变得非复制。或者,通过改变E1或E1和E3基因区,使得所述基因区无功能,可以使腺病毒变得非复制。例如,非复制型腺病毒可能缺少功能性E1区或可能缺少功能性E1和E3基因区。以这种方式,腺病毒在大多数哺乳动物细胞系中不能复制,并且在免疫的哺乳动物中不复制。最优选,E1和E3基因区域缺失都存在于腺病毒中,从而允许插入更大尺寸的转基因。这对于允许表达较大的抗原,或在单个载体中表达多种抗原时,或使用大的启动子序列(如CMV启动子)时,是特别重要的。E3以及E1区的缺失对于重组Ad5载体是特别有利的。任选,也可以将E4区工程化。

[0419] 在一个实施方案中,腺病毒载体选自:人腺病毒载体、猿猴腺病毒载体、B组腺病毒载体、C组腺病毒载体、E组腺病毒载体、腺病毒6载体、PanAd3载体、腺病毒C3载体、ChAdY25载体、AdC68载体和Ad5载体。

[0420] 本发明的病毒载体可以是麻疹病毒载体。因此,在一个实施方案中,编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的病毒载体是麻疹病毒载体。

[0421] 在一个实施方案中,包含编码汉坦病毒NP(或其抗原性片段)的核酸序列的表达盒小于9kb(如小于9.0、8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、5.9、5.8、5.7、5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1、5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0kb)。

[0422] 在一个实施方案中,包含编码汉坦病毒属NP(或其抗原性片段)的核酸序列的表达盒小于8kb(如小于5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1、5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0kb)。

[0423] 在一个实施方案中,包含编码汉坦病毒属NP(或其抗原性片段)的核酸序列的表达盒小于7kb(如小于6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1、5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0kb)。

[0424] 在一个实施方案中,包含编码汉坦病毒属NP(或其抗原性片段)的核酸序列的表达盒小于6kb(如小于5.7、5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1、5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0kb)。

[0425] 在一个实施方案中,包含编码汉坦病毒属NP(或其抗原性片段)的核酸序列的表达盒小于5kb(如小于4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0kb)。

[0426] 在一个实施方案中,包含编码汉坦病毒NP(或其抗原性片段)的核酸序列的表达盒小于4.5kb(如小于4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0kb)。

[0427] 在一个实施方案中,其中载体是病毒载体,病毒(即病毒载体)不是假型病毒。因此,在一个实施方案中,病毒载体的包膜不包含外源糖蛋白(即,不是所述病毒载体天然的糖蛋白)。

[0428] 在一个实施方案中,其中载体是非复制型痘病毒载体(如MVA载体),编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的核酸序列包含编码汉坦病毒糖蛋白的核酸序列。

[0429] 在一个实施方案中,其中载体是非复制型痘病毒载体(如MVA载体),编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的核酸序列包含编码汉坦病毒糖蛋白(GP)表位的核酸序列。

[0430] 在一个实施方案中,其中载体是非复制型痘病毒载体(如MVA载体),编码汉坦病毒

NP或其抗原性片段的核酸序列不包含编码汉坦病毒糖蛋白(GP)的核酸序列。

[0431] 在一个实施方案中,其中载体是非复制型痘病毒载体(如MVA载体),编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的核酸序列不包含编码汉坦病毒糖蛋白(GP)表位的核酸序列。

[0432] 在一个实施方案中,汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段是载体中唯一的汉坦病毒核酸序列。

[0433] 在一个实施方案中,其中载体是非复制型痘病毒载体,载体是稳定的,表达汉坦病毒NP产物,并且在受试者中诱导保护性免疫应答。

[0434] 在一个实施方案中,其中载体是腺病毒载体,载体是稳定的,表达汉坦病毒NP产物,并且在受试者中诱导保护性免疫应答。

[0435] 如上所述的核酸序列可以包含编码汉坦病毒属NP的核酸序列,其中所述NP包含融合蛋白。融合蛋白可以包含与一个或多个其他多肽(例如表位标签、另一种抗原或增加免疫原性的蛋白质(例如鞭毛蛋白))融合的汉坦病毒NP多肽。

[0436] 在一个实施方案中,编码汉坦病毒NP(如上所述)的核酸序列还编码组织纤溶酶原激活物(tPA)信号序列和/或V5融合蛋白序列。在某些实施方案中,tPA信号序列的存在可以提供增加的免疫原性;V5融合蛋白序列的存在可以通过免疫标记提供对表达的蛋白质的鉴定。

[0437] 在一个实施方案中,载体(如上所述)还包含编码佐剂(例如霍乱毒素、大肠杆菌致死毒素或鞭毛蛋白)的核酸序列。

[0438] 在一个实施方案中,载体不包含编码佐剂的核酸序列。在一个实施方案中,载体不包含编码Hsp70的核酸序列。

[0439] 本发明的细菌载体可以通过使用本领域已知的用于操纵和产生重组细菌的任何技术来产生。

[0440] 在另一个方面中,本发明提供了编码如上所述的病毒载体的核酸序列。因此,核酸序列可以编码如上所述的非复制型痘病毒载体。或者,核酸序列可以编码如上所述的腺病毒载体。

[0441] 编码病毒载体的核酸序列(如上所述)可以通过使用本领域已知的用于操纵和产生重组核酸的任何技术来产生。

[0442] 在一个方面中,本发明提供了一种制备病毒载体(如上所述)的方法,其包括提供核酸,其中核酸包含编码载体(如上所述)的核酸序列;用核酸转染宿主细胞;在适于载体增殖的条件下培养宿主细胞;和从宿主细胞获得载体。

[0443] 如本文所用,“转染”可以意指将核酸引入细胞中的任何非病毒方法。核酸可以是适于转染宿主细胞的任何核酸。因此,在一个实施方案中,核酸是质粒。宿主细胞可以是载体(例如如上所述的非复制型痘病毒载体或腺病毒载体)可以在其中生长的任何细胞。如本文所用,“在适于载体繁殖的条件下培养宿主细胞”意指使用本领域已知的适于所选宿主细胞并且能够在宿主细胞中产生载体的任何细胞培养条件和技术。如本文所用,“获得载体”意指使用本领域已知的适合于从宿主细胞分离载体的任何技术。因此,可以裂解宿主细胞以释放载体。随后可以使用本领域已知的任何合适的一种或多种方法分离和纯化载体。

[0444] 在一个方面中,本发明提供了包含编码如上所述的病毒载体的核酸序列的宿主细胞。宿主细胞可以是病毒载体(例如如上所述的非复制型痘病毒载体或腺病毒载体)可以在

其中生长或繁殖的任何细胞。在一个实施方案中,宿主细胞选自:293细胞(也称为HEK或人胚肾细胞)、CHO细胞(中国仓鼠卵巢)、CCL81.1细胞、Vero细胞、HELA细胞、Per.C6细胞、BHK细胞(幼仓鼠肾)、原代CEF细胞(鸡胚成纤维细胞)、鸭胚成纤维细胞、DF-1细胞或大鼠IEC-6细胞。

[0445] 本发明还提供了包含如上所述的载体的组合物。

[0446] 在一个方面中,本发明提供了包含载体(如上所述)和药学上可接受的载体的组合物。

[0447] 适合用作药学上可接受的载体的物质是本领域已知的。药学上可接受的载体的非限制性实例包括水、盐水和磷酸盐缓冲盐水。然而,在一些实施方案中,组合物是冻干形式,在这种情况下,它可以包含稳定剂,如牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方案中,可能需要用防腐剂(如硫柳汞或叠氮化钠)配制组合物,以促进长期储存。缓冲剂的实例包括但不限于琥珀酸钠(pH 6.5)和磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)。

[0448] 除了药学上可接受的载体之外,本发明的组合物还可以与盐、赋形剂、稀释剂、佐剂、免疫调节剂和/或抗微生物化合物中的一种或多种组合。

[0449] 有利地,已经证明了本发明的载体即使在不使用佐剂的情况下也提供保护性免疫应答。因此,在一个实施方案中,本发明的组合物不包含佐剂。

[0450] 组合物可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与无机酸(如,例如盐酸或磷酸)或与有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、马来酸等)形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,如,例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及此类有机碱,如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0451] 在一个实施方案中,组合物(如上所述)还包含至少一种汉坦病毒NP抗原(即以多肽形式存在于组合物中的抗原)。因此,组合物可包含载体和多肽两者。在一个实施方案中,多肽抗原是汉坦病毒NP。在一个实施方案中,多肽抗原是汉坦病毒GP。在一个实施方案中,多肽抗原的存在意味着在向受试者施用组合物后,可以实现改善的同时T细胞和抗体应答。在一个实施方案中,所实现的T细胞和抗体应答超过单独使用载体或多肽抗原时所实现的T细胞和抗体应答。

[0452] 在一个实施方案中,多肽抗原不与载体结合。在一个实施方案中,多肽抗原是载体的单独组分。在一个实施方案中,多肽抗原与载体分开提供。

[0453] 在一个实施方案中,多肽抗原是由载体编码的抗原的变体。在一个实施方案中,多肽抗原是由载体编码的抗原的片段。在一个实施方案中,多肽抗原包含由载体的核酸序列编码的多肽序列的至少一部分。因此,多肽抗原可以对应于由载体编码的抗原的至少一部分。

[0454] 在一个实施方案中,多肽抗原是汉坦病毒NP,其包含(或由其组成)与选自SEQ ID NO:4、7和10的氨基酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0455] 在一个实施方案中,多肽抗原是汉坦病毒NP,其包含(或由其组成)与选自SEQ ID NO:11和12的氨基酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0456] 在一个实施方案中,多肽抗原是汉坦病毒NP,其包含(或由其组成)。与选自SEQ ID

N0:13和14的氨基酸序列具有至少70% (如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的氨基酸序列。

[0457] 在一个实施方案中,多肽抗原是汉坦病毒NP,其包含(或由其组成)与选自SEQ ID N0:31和32的氨基酸序列具有至少70% (诸如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%) 序列同一性的氨基酸序列。

[0458] MATMEEIQREISAHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDLNRALHDRESVAA

[0459] SIQSKIDELKRQLADRIAAGKNIGQDRDPTGVEPGDHLKERSALSYGNTLDLN

[0460] SLDIDEPTGQTADWLTIIIVYLTSFVVP IILKALYMLTTRGRQTSKDNKGMIRIRFK

[0461] DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSMNAQSSMKAEEITPGRFRTAVCGLYPAQIKAR

[0462] NMVSPVMSVVGFLALAKDWTSRIEEWLGAPCKFMAESPIAGSLSGNPVNRD

[0463] YIRQRQAGALAGMEPKEFQALRQHSKDAGCTLVEHIESPSSIWVFAGAPDRCP

[0464] TCLFVGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTADKLRKKSSFYQSYLRRT

[0465] QSMGIQLDQRIIVFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRSLAQILIDQKVKEIS

[0466] NQEPMKLMLSYGNVLDLNLHDIDEPTGQTADWLGIVIYLT SFVVP ILLKALYM

[0467] LTTRGRQTTKDNKGTRIRFKDDSSFEDVNGIRKPKHLYVSLPNAQSSMKAEEI

[0468] TPGRYRTAICGLYPAQIKARQMISPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWLSEPCPLL

[0469] PDTAAVSLLGGPATNRDYLRRQVALGNMETKESKAIRQHAEAAGCSMIEDIE

[0470] SPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEK

[0471] LRKKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRSLAQSLIDVKVKEIS
NQEPLKL (SEQ ID N0:31)

[0472] MLSYGNVLDLNLHDIDEPTGQTADWLGIVIYLT SFVVP ILLKALYMLTTRGRQ

[0473] TTKDNKGTRIRFKDDSSFEDVNGIRKPKHLYVSLPNAQSSMKAEEITPGRYRT

[0474] AICGLYPAQIKARQMISPVMSVIGFLALAKDWSDRIEQWLSEPCPLLPTAAVS

[0475] LLGGPATNRDYLRRQVALGNMETKESKAIRQHAEAAGCSMIEDIESPSSIWV

[0476] FAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTSEEKLRKKSSF

[0477] YQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRSLAQSLI

[0478] DVKVKEISNQEPLKLMATMEEIQREISAHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPD

[0479] DLNRALHDRESVAASIQSKIDELKRQLADRIAAGKNIGQDRDPTGVEPGDHL

[0480] KERSALSYGNTLDLNSLDIDEPTGQTADWLTIIIVYLTSFVVP IILKALYMLTTRG

[0481] RQTSKDNKGMIRIRFKDDSSYEDVNGIRKPKHLYVSMNAQSSMKAEEITPGR

[0482] FRTAVCGLYPAQIKARNMVSPVMSVVGFLALAKDWTSRIEEWLGAPCKFMAE

[0483] SPIAGSLSGNPVNRDIYIRQRQAGALAGMEPKEFQALRQHSKDAGCTLVEHIESP

[0484] SSIWVFAGAPDRCPPTCLFVGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTADKLR

[0485] RKKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRSLAQILIDQKVKEIS
QEPMKL (SEQ ID N0:32)

[0486] 多肽抗原可以与由组合物的载体的核酸序列编码的多肽抗原相同(或相似)。因此,施用包含载体和多肽抗原的组合物可用于实现增强的针对单一抗原的免疫应答,其中所述增强的免疫应答包括组合的T细胞和抗体应答,如上所述。

[0487] 在一个实施方案中,本发明的组合物(如上所述)还包含至少一种编码汉坦病毒NP

或其抗原性片段的裸DNA(即,与本发明的病毒载体分开而不是其一部分的DNA分子)。在一个实施方案中,裸DNA包含(或由其组成)与选自SEQ ID NO:1、2、3、5、6、8、9和15-30的核酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%)序列同一性的核酸序列。在一个实施方案中,裸DNA编码汉坦病毒NP,所述汉坦病毒NP包含(或由其组成)与选自SEQ ID NO:4、7、10-14、31和32的氨基酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0488] 在一个实施方案中,本发明的组合物(如上所述)还包含佐剂。适用于本发明组合物的佐剂的非限制性实例包括磷酸铝、氢氧化铝和相关化合物;单磷酰脂质A和相关化合物;来自细菌的外膜囊泡;水包油型乳液,如MF59;脂质体佐剂,如病毒体、弗氏佐剂和相关混合物;聚乳酸-共-乙醇酸(PLGA)颗粒;霍乱毒素;大肠杆菌致死毒素;和鞭毛蛋白。

[0489] 本发明的载体和组合物(如上所述)可用作疫苗。因此,本发明的组合物可以是疫苗组合物。

[0490] 如本文所用,疫苗是施用于动物受试者(如哺乳动物(例如人、牛、猪、绵羊、山羊、马、鹿、犬或猫受试者,特别是人受试者)时刺激针对感染性疾病的保护性免疫应答的制剂。免疫应答可以是体液和/或细胞介导的免疫应答。因此,疫苗可以刺激B细胞和/或T细胞。

[0491] 术语“疫苗”在本文中可与术语“治疗/预防性组合物”、“免疫原性组合物”、“制剂”、“抗原组合物”或“药物”互换使用。

[0492] 在一个方面中,本发明提供了用于医学中的载体(如上所述)或组合物(如上所述)。

[0493] 在一个方面中,本发明提供了用于诱导受试者免疫应答的方法中的载体(如上所述)或组合物(如上所述)。免疫应答可以针对汉坦病毒抗原(例如汉坦病毒NP)和/或汉坦病毒感染。因此,本发明的载体和组合物可用于诱导受试者针对汉坦病毒NP的免疫应答(例如,作为免疫原性组合物或作为疫苗)。

[0494] 在一个实施方案中,免疫应答包括T细胞应答。

[0495] 在一个实施方案中,诱导受试者免疫应答的方法包括向受试者施用有效量的载体(如上所述)或组合物(如上所述)。

[0496] 在一个方面中,本发明提供了用于预防或治疗受试者汉坦病毒感染的方法中的载体(如上所述)或组合物(如上所述)。

[0497] 在一个实施方案中,本发明提供了用于预防或治疗受试者HFRS的方法中的载体(如上所述)或组合物(如上所述)。

[0498] 本发明的载体和组合物理想地适用于HFRS的预防或治疗,特别是汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段来自首尔病毒时。如上所述,首尔病毒通常与引起HFRS有关。

[0499] 本发明的载体和组合物理想地适用于HFRS的预防或治疗,特别是汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段来自汉滩病毒时。如上所述,汉滩病毒通常与引起HFRS有关。

[0500] 本发明的载体和组合物理想地适用于HFRS的预防或治疗,特别是汉坦病毒核蛋白或其抗原性片段是包含首尔病毒核蛋白(或其抗原性片段)和汉滩病毒核蛋白(或其抗原性片段)的嵌合体的嵌合序列时,例如如实施例中所证明的。

[0501] 如本文所用,术语“预防”包括预防汉坦病毒感染的开始和/或降低汉坦病毒感染的严重程度或强度。因此,“预防”包括疫苗接种。

[0502] 如本文所用,术语“治疗”包括治疗性和防止性/预防性措施(包括暴露后预防),并且包括感染后治疗和汉坦病毒感染的改善。

[0503] 在一个实施方案中,汉坦病毒感染是首尔病毒感染。在一个实施方案中,汉坦病毒感染是汉滩病毒感染。在一个实施方案中,汉坦病毒感染是首尔病毒和/或汉滩病毒感染。

[0504] 上述方法中的每一种可以包括向受试者施用有效量(如治疗有效量)的本发明的载体或组合物的步骤。

[0505] 在这个方面中,如本文所用,有效量是足以实现所需生物学结果的剂量或含量。如本文所用,治疗有效量是在向受试者(如哺乳动物受试者,特别是人受试者)单剂量或多剂量施用后有效用于治疗、预防、抑制治愈、延迟、降低病症或复发性病症的严重性、改善病症或复发性病症的至少一种症状,或延长受试者的存活超过在没有这种治疗的情况下预期的存活的含量。

[0506] 因此,待施用的活性成分的量取决于待治疗的受试者、受试者的免疫系统产生保护性免疫应答的能力和所需的保护程度。需要施用的活性成分的精确量可以取决于从业者的判断,并且可以特定于每个受试者。

[0507] 向受试者施用可包括向受试者施用载体(如上所述)或组合物(如上所述),其中组合物依次施用多次(例如,其中组合物施用两次、三次或四次)。因此,在一个实施方案中,向受试者施用载体(如上所述)或组合物(如上所述),然后在不同时间再次施用相同的载体或组合物(或基本上相似的载体或组合物)。

[0508] 在一个实施方案中,向受试者施用包括向受试者施用载体(如上所述)或组合物(如上所述),其中所述组合物基本上在另一种免疫原性组合物之前、同时或之后施用。

[0509] 下面更详细地讨论在前、同时和依次施用方案。

[0510] 在某些实施方案中,上述方法还包括向受试者施用第二载体,其中第二载体包含编码汉坦病毒属NP的核酸序列。优选,第二载体是如上所述的本发明的载体(如病毒载体,例如如上所述的非复制痘病毒载体或腺病毒载体)。

[0511] 在一个实施方案中,第一和第二载体具有相同的载体类型。在一个实施方案中,第一和第二载体具有不同的载体类型。在一个实施方案中,第一载体是腺病毒载体(如上所述),第二载体是非复制型痘病毒载体(如上所述)。在一个实施方案中,第一载体是非复制痘病毒载体(如上所述),并且第二载体是腺病毒载体(如上所述)。

[0512] 在一个实施方案中,第一和第二载体以任何顺序依次施用。因此,第一(“1”)和第二(“2”)载体可以以1-2的顺序或以2-1的顺序施用于受试者。

[0513] 如本文所用,“依次施用”具有如下定义的“依次施用”的含义。因此,第一和第二载体在(基本上)不同的时间相继施用。

[0514] 在一个实施方案中,第一和第二载体作为初免-加强施用方案的一部分施用。因此,第一载体可以作为“初免”施用于受试者,并且第二载体随后作为“加强”施用于同一受试者。下面讨论初免-加强方案。

[0515] 在一个实施方案中,上述方法中的每一种还包括向受试者施用汉坦病毒多肽抗原的步骤。在一个实施方案中,汉坦病毒多肽抗原是如上所述的汉坦病毒NP(或其抗原性片段)。在一个实施方案中,汉坦病毒多肽抗原是汉坦病毒NP,其包含与选自SEQ ID NO:4、7、10-14、31和32的氨基酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、

96、97、98、99或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0516] 在一个实施方案中,多肽抗原与载体的施用分开施用;优选,依次施用多肽抗原和载体。在一个实施方案中,载体(“V”)和多肽抗原(“P”)可以以V-P的顺序或以P-V的顺序施用。

[0517] 在一个实施方案中,上述方法中的每一种还包括向受试者施用编码汉坦病毒NP或其抗原性片段的裸DNA的步骤。在一个实施方案中,裸DNA包含(或由其组成)与选自SEQ ID NO:1、2、3、5、6、8、9和15-30的核酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%)序列同一性的核酸序列。在一个实施方案中,裸DNA编码汉坦病毒NP,所述汉坦病毒NP包含(或由其组成)与选自SEQ ID NO:4、7、10-14、31和32的氨基酸序列具有至少70%(如至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、95、96、97、98、99或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0518] 在一个实施方案中,裸DNA与载体的施用分开施用;优选,裸DNA和载体依次施用。在一个实施方案中,载体(“V”)和裸DNA(“D”)可以按V-D的顺序或按D-V的顺序施用。

[0519] 在一个实施方案中,将裸DNA(如上所述)作为初免-加强方案的一部分施用于受试者。

[0520] 异源初免-加强方法可以通过允许重复疫苗接种而不增加抗载体免疫来改善免疫应答。汉坦病毒NP或其抗原性片段可以通过不同的载体(如上所述)或裸DNA载体(如上所述)连续递送。在任何异源初免-加强疫苗接种方案中,与使用单一载体相比,NP特异性抗体应答增加,NP特异性T细胞应答增加,和/或临床疾病减少。载体的合适组合包括但不限于:

[0521] DNA初免,MVA加强

[0522] DNA初免,禽痘加强

[0523] 禽痘初免,MVA加强

[0524] MVA初免、禽痘加强免疫

[0525] DNA初免、禽痘加强、MVA加强

[0526] MVA初免、腺病毒加强

[0527] 如本文所用,术语多肽包括肽和蛋白质。

[0528] 在某些实施方案中,上述方法还包括向受试者施用佐剂。佐剂可以与第一载体、第二载体、多肽抗原和裸DNA中的一种、两种、三种或全部四种一起施用。

[0529] 本发明的免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)可以以单剂量方案给予(即基本上一次给予全剂量)。或者,本发明的免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)可以以多剂量方案给予。

[0530] 多剂量方案是如下的方案:其中主要疗程(例如疫苗接种)可以是1-6个分开的剂量,然后以维持和或增强免疫应答所需的后续时间间隔给予其他剂量,例如(对于人受试者),在1-4个月给予第二剂量,并且如果需要,在另外1-4个月后再给予后续剂量。

[0531] 剂量方案将至少部分地由个体的需要确定,并且取决于从业者(例如医生或兽医)的判断。

[0532] 同时施用意指(基本上)同时施用。

[0533] 两种或更多种组合物/治疗剂/疫苗的依次施用意指组合物/治疗剂/疫苗在(基本上)不同的时间相继施用。

[0534] 例如,依次施用可以包括在不同时间施用两种或更多种组合物/治疗剂/疫苗,其中不同的时间间隔数天(例如,至少1、2、5、10、15、20、30、60、90、100、150或200天)。

[0535] 例如,在一个实施方案中,本发明的疫苗可以作为“初免-加强”疫苗接种方案的一部分施用。

[0536] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物、治疗性制剂、药物、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)可以与一种或多种选自例如免疫球蛋白、抗生素、白介素(例如IL-2、IL-12)和/或细胞因子(例如IFN γ)的免疫调节剂(同时或依次)联合施用于受试者,如哺乳动物(例如人、牛、猪、绵羊、山羊、马、鹿、熊、犬或猫受试者)。

[0537] 免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)可以含有5%至95%的活性成分,如至少10%或25%的活性成分,或至少40%的活性成分或至少50、55、60、70或75%的活性成分。

[0538] 免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)以与剂量制剂相容的方式施用,并且以预防和/或治疗有效的量施用。

[0539] 免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)的施用通常是通过常规途径,例如静脉内、皮下、腹膜内或粘膜途径。施用可以通过肠胃外施用;例如,皮下或肌内注射。

[0540] 因此,本发明的免疫原性组合物、治疗性配制品、药剂、药物组合物和预防性配制品(例如疫苗)可以制备为可注射剂,作为液体溶液或悬浮液。或者,可以制备适于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。还可以将制剂乳化,或者将肽包封在脂质体或微胶囊中。

[0541] 活性成分通常与药学上可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。此外,如果需要,免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)可含有少量辅助物质,如润湿剂或乳化剂和/或pH缓冲剂。

[0542] 通常,载体是药学上可接受的载体。药学上可接受的载体的非限制性实例包括水、盐水和磷酸盐缓冲盐水。然而,在一些实施方案中,组合物是冻干形式,在这种情况下,它可以包括稳定剂,如牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方案中,可能需要用防腐剂(如硫柳汞或叠氮化钠)配制组合物,以促进长期储存。

[0543] 缓冲剂的实例包括但不限于琥珀酸钠(pH 6.5)和磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 6.5和7.5)。

[0544] 适用于其他给药方式的其他制剂包括栓剂,并且在一些情况下,口服制剂或适于作为气溶胶分布的制剂。对于栓剂,传统的粘合剂和载体可包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯;这种栓剂可以由含有0.5%至10%,优选1%-2%范围内的活性成分的混合物形成。

[0545] 口服制剂包括此类通常使用的赋形剂,如,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉末的形式。

[0546] 可能需要将本发明的组合物(如上所述)引导至受试者的呼吸系统。治疗/预防组合物或药物向肺部感染部位的有效传递可以通过口服或鼻内施用来实现。

[0547] 用于鼻内施用的制剂可以是鼻液滴或鼻喷雾的形式。鼻内制剂可包含具有100-5000 μm ,如500-4000 μm 、1000-3000 μm 或100-1000 μm 范围内的近似直径的液滴。或者,就体积

而言,液滴可以在约0.001-100 μ l的范围内,如0.1-50 μ l或1.0-25 μ l或如0.001-1 μ l。

[0548] 或者,治疗性/预防性制剂或药物可以是气溶胶制剂。气溶胶制剂可以采取粉末、悬浮液或溶液的形式。气溶胶颗粒的尺寸与气溶胶的递送能力有关。较小的颗粒可以比较大的颗粒沿呼吸气道向下朝向肺泡行进得更远。在一个实施方案中,气溶胶颗粒具有促进沿着支气管、细支气管和肺泡的整个长度递送的直径分布。或者,可以选择粒度分布以靶向呼吸气道的特定部分,例如肺泡。在药剂的气溶胶递送的情况下,颗粒的直径可以在0.1 μ m-50 μ m,优选1 μ m-25 μ m,更优选1 μ m-5 μ m的近似范围内。

[0549] 气溶胶颗粒可以使用喷雾器(例如通过口)或鼻喷雾递送。气溶胶制剂可任选地含有推进剂和/或表面活性剂。

[0550] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)包含药学上可接受的载体,以及任选地盐、赋形剂、稀释剂和/或佐剂中的一种或多种。

[0551] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物、治疗性制剂、药剂、药物组合物和预防性制剂(例如疫苗)可包含选自例如免疫球蛋白、抗生素、白介素(例如IL-2、IL-12)和/或细胞因子(例如IFN γ)的一种或多种免疫调节剂。

[0552] 本发明包括与基于本申请中鉴定的任何一种多肽抗原(包括其片段)的多肽基本上同源的多肽。术语“序列同一性”和“序列同源性”在本说明书中被认为是同义的。

[0553] 举例来说,目标多肽可包含与参考多肽的氨基酸序列具有至少70、75、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、99或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0554] 有许多已建立的算法可用于比对两个氨基酸序列。通常,一个序列充当参考序列,可以将测试序列与其进行比较。序列比较算法基于指定的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。用于比较的氨基酸序列的比对可以例如通过计算机实施的算法(例如GAP、BESTFIT、FASTA或TFASTA)或BLAST和BLAST 2.0算法进行。

[0555] 以下所示的BLOSLIM62表是源自蛋白质序列区段的约2,000个局部多重比对的氨基酸取代矩阵,所述蛋白质序列区段代表超过500组相关蛋白质的高度保守区域(Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. LISA89:10915-10919, 1992;通过引用并入本文)。氨基酸由标准的单字母代码表示。同一性百分比计算如下:

相同匹配的总数

x 100

[较长序列的长度加上为了比对两个序列引入较长的序列中的缺口的数量]

[0556] BLOSUM62表

[0557] A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

[0558] A-4

[0559] R-15

[0560] N-2 0 6

[0561] D-2-2 1 6

[0562] C 0-3-3-3 9

[0563] Q-1 1 0 0-3 5

[0564] E-1 0 0 2-4 2 5

[0565] G 0-2 0-1-3-2-2 6
[0566] H-2 0 1-1-3 0 0-2 8
[0567] I-1-3-3-3-1-3-3-4-3 4
[0568] L-1-2-3-4-1-2-3-4-3 2 4
[0569] K-1 2 0-1-3 1 1-2-1-3-2 5
[0570] M-1-1-2-3-1 0-2-3-2 1 2-1 5
[0571] F-2-3-3-3-2-3-3-3-1 0 0-3 0 6
[0572] P-1-2-2-1-3-1-1-2-2-3-3-1-2-4 7
[0573] S1-1 1 0-1 0 0 0-1-2-2 0-1-2-1 4
[0574] T 0-1 0-1-1-1-1-2-2-1-1-1-1-2-1 15
[0575] W-3-3-4-4-2-2-3-2-2-3-2-3-11-4-3-2 11
[0576] Y-2-2-2-3-2-1-2-3 2-1-1-2-1 3-3-2-2-2 7
[0577] V 0-3-3-3-1-2-2-3-3 3 1-2 1-1-2-2 0-3-1 4

[0578] 在同源性比较中,同一性可以存在于长度为至少10个氨基酸残基(例如,长度为至少15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550或570个氨基酸残基-例如高达参考序列的整个长度)的序列区域上。

[0579] 基本上同源的多肽具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。在许多实施方案中,这些变化具有较小的性质,例如,仅涉及保守性氨基酸取代。保守性取代是通过用以下组内的另一种氨基酸替换一种氨基酸而进行的那些:碱性:精氨酸、赖氨酸、组氨酸;酸性:谷氨酸、天冬氨酸;极性:谷氨酰胺、天冬酰胺;疏水性:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸;芳香族:苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸;小的:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸。基本上同源的多肽还涵盖包含不显著影响多肽的折叠或活性的其他取代的那些多肽;小缺失,通常为1至约30个氨基酸(例如1-10个或1-5个氨基酸);和小的氨基或羧基末端延伸,如氨基末端甲硫氨酸残基、多达约20-25个残基的小接头肽或亲和标签。

[0580] 如本文所用,术语“核酸序列”和“多核苷酸”可互换使用,并不意味着任何长度限制。如本文所用,术语“核酸”和“核苷酸”可互换使用。术语“核酸序列”和“多核苷酸”包括DNA(包括cDNA)和RNA序列。

[0581] 本发明的多核苷酸序列包括已经从其天然存在的环境中移出的核酸序列、重组或克隆的DNA分离物,以及化学合成的类似物或由异源系统生物合成的类似物。

[0582] 本发明的多核苷酸可以通过本领域已知的任何方式制备。例如,可以通过在合适的宿主细胞中复制来产生大量的多核苷酸。编码所需片段的天然或合成的DNA片段将结合到能够引入原核或真核细胞中并在其中复制的重组核酸构建体(通常为DNA构建体)中。通常,DNA构建体将适合于在单细胞宿主(如酵母或细菌)中自主复制,但也可以用于引入和整合到培养的昆虫、哺乳动物、植物或其他真核细胞系的基因组内。

[0583] 本发明的多核苷酸也可以通过化学合成产生,例如通过亚磷酰胺法或三酯法,并且可以在商业自动化寡核苷酸合成仪上进行。双链片段可以通过合成互补链并在适当的条件下将链退火在一起或通过使用DNA聚合酶与适当的引物序列添加互补链而从化学合成的单链产物获得。

[0584] 应用于核酸序列时,在本发明内容中的术语“分离的”表示多核苷酸序列已经从其天然遗传环境中移出,因此不含其他外来的或不需要的编码序列(但可包括天然存在的5'和3'非翻译区,例如启动子和终止子),并且是适用于遗传工程化蛋白质生产系统的形式。此类分离的分子是从其天然环境中分离的那些。

[0585] 鉴于遗传密码的简并性,在本发明的多核苷酸中相当大的序列变异是可能的。包含给定氨基酸的所有可能密码子的简并密码子如下所示:

	氨基酸	密码子	简并密码子
	Cys	TGC TGT	TGY
	Ser	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
	Thr	ACA ACC ACG ACT	ACN
	Pro	CCA CCC CCG CCT	CCN
	Ala	GCA GCC GCG GCT	GCN
	Gly	GGA GGC GGG GGT	GGN
	Asn	AAC AAT	AAY
	Asp	GAC GAT	GAY
	Glu	GAA GAG	GAR
[0586]	Gln	CAA CAG	CAR
	His	CAC CAT	CAY
	Arg	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
	Lys	AAA AAG	AAR
	Met	ATG	ATG
	Ile	ATA ATC ATT	ATH
	Leu	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
	Val	GTA GTC GTG GTT	GTN
	Phe	TTC TTT	TTY
	Tyr	TAC TAT	TAY
	Trp	TGG	TGG
	Ter	TAA TAG TGA	TRR
	Asn/ Asp		RAY
[0587]	Glu/ Gln		SAR
	任意		NNN

[0588] 本领域普通技术人员将理解,确定简并密码子时存在灵活性,简并密码子代表编码每个氨基酸的所有可能的密码子。例如,简并序列包含的一些多核苷酸可以编码变体氨

基酸序列,但是本领域普通技术人员可以通过参考本发明的氨基酸序列容易地鉴定此类变体序列。

[0589] “变体”核酸序列与参考核酸序列(或其片段)具有基本同源性或基本相似性。如果与另一核酸(或其互补链)最佳比对(具有适当的核苷酸插入或缺失)时,在至少约70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%或99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性,则核酸序列或其片段与参考序列“基本上同源”(或“基本上相同”)。用于核酸序列的同源性测定的方法是本领域已知的。

[0590] 或者,如果“变体”和参考序列能够在严格(例如高度严格)杂交条件下杂交,则“变体”核酸序列与参考序列(或其片段)基本上同源(或基本上相同)。如本领域技术人员将容易理解的,除了碱基组成、互补链的长度和杂交核酸之间的核苷酸碱基错配的数目之外,核酸序列杂交将受到如盐浓度(例如NaCl)、温度或有机溶剂的条件的影响。优选使用严格的温度条件,并且通常包括超过30℃的温度,通常超过37℃,且优选超过45℃。严格的盐条件通常小于1000mM,通常小于500mM,且优选小于200mM。pH通常在7.0和8.3之间。参数的组合比任何单个参数重要得多。

[0591] 确定核酸序列同一性百分比的方法是本领域已知的。举例来说,评估核酸序列同一性时,可以将具有限定数目的连续核苷酸的序列与来自本发明的核酸序列的相应部分的核酸序列(具有相同数目的连续核苷酸)比对。本领域已知的用于确定核酸序列同一性百分比的工具包括核苷酸BLAST。

[0592] 本领域普通技术人员理解,不同的物种表现出“优先密码子使用”。如本文所用,术语“优先密码子使用”是指在某些物种的细胞中最常使用的密码子,因此有利于编码每种氨基酸的可能密码子的一个或几个代表。例如,氨基酸苏氨酸(Thr)可以由ACA、ACC、ACG或ACT编码,但在哺乳动物宿主细胞中,ACC是最常用的密码子;在其他物种中,不同的Thr密码子可能是优先的。可以通过本领域已知的多种方法将特定宿主细胞物种的优先密码子引入本发明的多核苷酸中。将优先密码子序列引入重组DNA中可以例如通过使特定细胞类型或物种内的蛋白质翻译更有效来增强蛋白质的产生。

[0593] 因此,在本发明的一个实施方案中,针对在宿主细胞中表达来优化核酸序列的密码子。

[0594] 目的多核苷酸的“片段”包含来自所述全长多核苷酸的序列的一系列连续核苷酸。举例来说,目的多核苷酸的“片段”可以包含(或由其组成)来自所述多核苷酸的序列的至少30个连续核苷酸(例如所述多核苷酸的至少35、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700或1710个连续核酸残基)。片段可以包括至少一个抗原决定簇和/或可以编码相应目的多肽的至少一个抗原表位和/或可以具有与目的多肽共同的抗原交叉反应性和/或基本上相同的体内生物活性。

[0595] 图例

[0596] 图1A-B. 示例MVA载体构建。图1A提供了盒“MVAHantaNP”的示意图。图1B提供了质粒17ACNHBP_MVA-SEOV-HNT-NP_pMS-RQ(pMVAHantaNP)的示意图。

[0597] 图2. PCR确认纯重组核蛋白-琼脂糖凝胶证实了MVAHantaNP构建体的存在。侧翼到侧翼引物(SEQ ID NO: 46和47)覆盖整个插入物,并从疫苗插入物任一端的MVA侧翼区运行,

产生预期的扩增产物大小。孔的内容物如下(从左到右编号):1.阶梯;2.阳性对照(MVA-HantaNP质粒)GFP至侧翼引物-预期大小3260bp;3.MVA-HantaNP“批次1”;4.MVA-HantaNP“批次2+3”;5.MVA-HantaNP“批次4+5+6”;6.阴性对照;7.阶梯;8.阳性对照(MVA-HantaNP质粒)侧翼至侧翼引物-预期大小3788bp;9.MVA-HantaNP“批次1”;10.MVA-HantaNP“批次2+3”;11.MVA-HantaNP“批次4+5+6”;12.阴性对照;13.阶梯。

[0598] 图3.Western印迹证实了NP/Flag标签的表达。蛋白质的预期大小为89kDa。孔的内容物如下(从左到右编号):1.阶梯;2.“第3代”P3(1.1.1);3.P3(4.1.1);4.P3(4.1.2);5.疫苗批次1;6.疫苗批次2+3组合;7.疫苗批次4+5+6组合。

[0599] 图4.免疫研究期间的临床评分(每日增重%):初免(第一箭头,第0天)和加强免疫(第二箭头,第14天)后小鼠的(a)重量和(b)温度。

[0600] 图5.来自接种疫苗和未接种疫苗的小鼠的总ELISPOT应答。

[0601] 图6.对单个肽库(其中的“NP1”-“NP11”)的脾细胞IFN- γ ELISPOT再刺激应答。i)第1组表示用MVA-HantaNP初免和加强免疫接种的小鼠;ii)第2组表示用单剂量MVA-HantaNP接种的小鼠;iii)第3组表示用空MVA野生型初免和加强免疫接种的小鼠;和iv)第4组表示PBS对照、初免和加强免疫。

[0602] 图7.小鼠血清中对汉坦病毒NP的IgG应答。吸光度读数提供了对重组汉坦病毒NP的抗体结合活性的读数。

[0603] 图8.用汉坦病毒肌内攻击(左栏)或鼻内攻击(右栏)后小鼠的重量和温度。

[0604] 图9.在(a)肌内攻击后第5天;(b)鼻内攻击后第5天;(c)鼻内攻击后第14天的小鼠血液、肺、肾、脾和肝中的病毒载量。

[0605] 图10.鼻内攻击后第5天小鼠肾、肺和脾中的病毒载量。与使用空MVA野生型载体免疫相关的结果由圆圈表示;与使用MVA-HantaNP免疫相关的结果用三角形表示。

实施例

[0606] 实施例1:制备示例MVA-NP(核蛋白)载体

[0607] MVAHantaNP的盒(表示为“MVAHantaNP”)由GeneArt(Thermofisher)产生,其含有p11启动子、绿色荧光蛋白(GFP)和MH5启动子,然后是NP序列上游的kozak序列。核蛋白序列是含有首尔和汉滩两个不同序列的嵌合序列。下游是24个残基的接头序列,随后是Flag标签表位和终止密码子。图1(A)中提供了MVAHantaNP的示意图。

[0608] 将该盒插入质粒pMS-RQ-Bb的SfiI/SfiI克隆位点以产生质粒17ACNHBP_MVA-SEOV-HNT-NP_pMS-RQ(pMVAHantaNP)。

[0609] 图1(B)中提供了pMVAHantaNP的示意图,并且在SEQ ID NO:33中提供了pMVAHantaNP的核酸序列。

[0610] GTTGGTGGTCGCCATGGATGGTGTATTGTATACTGTCTAAACGCGTTAGTA

[0611] AAACATGGCGAGGAAATAAATCATATAAAAAATGATTTTCATGATTAAACCAT

[0612] GTTGTGAAAAAGTCAAGAACGTTACATTGGCGGACAATCTAAAAACAAT

[0613] ACAGTGATTGCAGATTTGCCATATATGGATAATGCGGTATCCGATGTATGCAA

[0614] TTCCTGTATAAAAAGAATGTATCAAGAATATCCAGATTTGCTAATTTGATAA

[0615] AGATAGATGACGATGACAAGACTCCTACTGGTGTATATAATTATTTTAAACCT

[0616] AAAGATGCCATTCTGTTATTATATCCATAGGAAAGGATAGAGATGTTTGTG
[0617] AACTATTAATCTCATCTGATAAAGCGTGTGCGTGTATAGAGTTAAATTCATAT
[0618] AAAGTAGCCATTCTTCCCATGGATGTTTCCTTTTTTACCAAAGGAAATGCAT
[0619] CATTGATTATTCTCCTGTTTGATTCTCTATCGATGCGGCACCTCTCTTAAGA
[0620] AGTGTAACCGATAATAATGTTATTATATCTAGACACCAGCGTCTACATGACG
[0621] AGCTTCCGAGTTCCAATTGGTTCAAGTTTTACATAAGTATAAAGTCCGACTA
[0622] TTGTTCTATATTATATATGTTGTTGATGGATCTGTGATGCATGCAATAGCTGA
[0623] TAATAGAACTTACGCAAATATTAGCAAAAATATATTAGACAATACTACAATTA
[0624] ACGATGAGTGTAGATGCTGTTATTTGAACCACAGATTAGGATTCTTGATAG
[0625] AGATGAGATGCTCAATGGATCATCGTGTGATATGAACAGACATTGTATTATG
[0626] ATGAATTTACCTGATGTAGGCGAATTTGGATCTAGTATGTTGGGGAAATATG
[0627] AACCTGACATGATTAAGATTGCTCTTTCGGTGGCTGGGTACCAGGCGCGCC
[0628] TTTCATTTTGTTTTTTTCTATGCTATAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
[0629] TTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
[0630] CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
[0631] AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGG
[0632] CCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTTCAGCCGCTAC
[0633] CCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGG
[0634] CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
[0635] CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAG
[0636] CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT
[0637] GGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGA
[0638] AGAACGGCATCAAGGTGAAC TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
[0639] AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGG
[0640] CCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA
[0641] GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
[0642] ACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGAGCT
[0643] CCGGCCCGCTCGAGGCCGCTGGTACCCAACCTAAAAATTGAAAATAAATAC
[0644] AAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATA
[0645] AGCCCGGTGCCACCATGGCCACAATGGAAGAGATCCAGAGAGAGATCAGC
[0646] GCCCACGAGGGACAGCTGGTTATCGCCAGACAGAAAGTGAAGGACGCCG
[0647] AGAAGCAGTACGAGAAGGACCCCGACGATCTGAACAAGAGAGCCCTGCA
[0648] CGACAGAGAAAGCGTGGCCGCCTCTATCCAGAGCAAGATCGATGAGCTGA
[0649] AGAGACAGCTGGCCGACAGAATCGCCGCTGGCAAGAATATTGGCCAGGAC
[0650] AGAGATCCCACAGGCGTGGAACCTGGCGATCACCTGAAAGAGAGAAGCG
[0651] CCCTGTCCTATGGCAACACCCTGGACCTGAACAGCCTGGACATTGATGAGC
[0652] CTACCGGCCAGACAGCCGACTGGCTGACAATCATTGTGTACCTGACCAGCT
[0653] TCGTGGTCCCATCATCCTGAAGGCCCTGTACATGCTGACCACCAGAGGCA
[0654] GACAGACCAGCAAGGACAACAAGGGCATGAGAATCCGTTCAAGGATGA

[0655] CAGCAGCTACGAGGACGTGAACGGCATTAGAAAGCCCAAGCACCTGTACG
[0656] TGTCCATGCCTAACGCTCAGAGCAGCATGAAGGCCGAGGAAATCACCCCT
[0657] GGCAGATTGAGAACAGCCGTGTGCGGACTGTACCCCGCTCAGATCAAGGC
[0658] CAGAAACATGGTGTCCCCAGTGATGAGCGTCGTGGGATTTCTGGCCCTGGC
[0659] TAAGGACTGGACCAGCAGGATTGAGGAATGGCTGGGAGCCCCTTGCAAGT
[0660] TTATGGCCGAGTCTCCTATCGCCGGCAGCCTGTCTGGCAACCCCGTGAATA
[0661] GAGACTACATCAGACAGAGGCAGGGCGCTCTGGCCGGAATGGAACCCAAA
[0662] GAATTTGAGGCCCTGCGGCAGCACTCTAAGGATGCCGGATGTACCCTGGTG
[0663] GAACACATTGAGAGCCCCAGCAGCATCTGGGTTTTCTGCTGGCGCTCCTGAT
[0664] AGATGCCCTCCTACCTGTCTGTTTGTGGCGGAATGGCCGAGCTGGGCGCC
[0665] TTCTTTAGCATTCTGCAGGACATGCGGAATACCATCATGGCCAGCAAGACC
[0666] GTGGGCACCGCCGATGAGAAGCTGAGAAAGAAGTCCAGCTTCTACCAGAG
[0667] CTACCTGCGGAGAACCCAGAGCATGGGCATTGAGCTGGACCAGAGAATCA
[0668] TCGTGATGTTTCATGGTGGCCTGGGGCAAAGAAGCCGTGGACAATTTTCACC
[0669] TGGGCGACGACATGGACCCCGAGCTGAGATCTCTGGCCCAGATCCTGATCG
[0670] ACCAGAAAGTCAAAGAGATCTCCAATCAAGAGCCCATGAAGCTGATGCTG
[0671] AGCTACGGCAACGTGCTGGATCTGAACCACCTGGATATCGACGAGCCAAC
[0672] AGGACAGACCGCTGATTGGCTGGGCATCGTGATCTACCTGACCTCCTTTGT
[0673] GGTGCCTATTCTGCTCAAAGCCCTCTATATGCTGACAACACGCGGAAGGCA
[0674] GACCACCAAAGATAACAAAGGCACCCGGATCAGGTTTAAGGACGACAGCT
[0675] CCTTTGAGGATGTCAACGGCATCCGGAACCTAAGCACCTCTATGTGTCTC
[0676] TGCCCAATGCACAGTCTCCATGAAGGCAGAAGAGATCACACCAGGCCGG
[0677] TACAGAACCGCCATCTGTGGACTGTATCCTGCACAAATCAAAGCCCGGAG
[0678] ATGATCAGCCCCGTGATGTCCGTTATCGGATTCTGGCTCTGGCCAAAGATT
[0679] GGAGCGACAGGATCGAGCAGTGGCTGAGCGAGCCTTGCAAGCTGCTTCCT
[0680] GATACAGCCGCTGTGTCACTGCTTGGCGGCCCTGCCACAAACAGAGATTAC
[0681] CTGAGACAGAGACAGGTGGCACTGGGCAACATGGAAACAAAAGAGAGCA
[0682] AGGCCATCCGGCAGCATGCCGAAGCTGCTGGCTGTAGCATGATCGAGGATA
[0683] TCGAGTCCCCTAGCTCCATTTGGGTGTTTCGAGGGGCCCCAGATAGATGTC
[0684] CACCAACATGCCTGTTTCATTGCCGGCATGGCTGAACTGGGAGCTTTTTTCA
[0685] GCATCCTCCAGGATATGCGCAACACGATTATGGCCTCCAAGACAGTGGGAA
[0686] CCAGCGAGGAAAAGCTGCGGAAGAAAAGCAGCTTTTACCAGTCTTACCTG
[0687] AGGCGGACCCAGTCCATGGGGATCCAAGTGGATCAGCGGATCATTGTGCTG
[0688] TTTATGGTCGCTTGGGGAAAAGAGGCTGTGATAACTTCCACCTGGGAGAT
[0689] GATATGGATCCTGAACTGCGGACCCTGGCTCAGTCCCTGATCGATGTGAAA
[0690] GTGAAAGAAATTAGTAATCAAGAACCCCTCAAGCTGGACCTGGAAGGCCC
[0691] TAGATTCGAGGACTACAAGGACGATGACGACAAGTGAAGTGCACCTGCAGT
[0692] TTTTATGGAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGAACAAAATACATAATTTTGTA
[0693] AAATAAATCACTTTTTATACTAATATGACACGATTACCAATACTTTTGTTACT

[0694] AATATCATTAGTATACGCTACACCTTTTCCTCAGACATCTAAAAAATAGGT
[0695] GATGATGCAACTTTATCATGTAATCGAAATAATACAAATGACTACGTTGTTAT
[0696] GAGTGCTTGGTATAAGGAGCCCAATTCCATTATTCTTTTAGCTGCTAAAAGC
[0697] GACGTCTTGTATTTTGATAATTATACCAAGGATAAAATATCTTACGACTCTCC
[0698] ATACGATGATCTAGTTACAACATATCACAATTAATCATTGACTGCTAGAGAT
[0699] GCCGGTACTTATGTATGTGCATTCTTTATGACATCGCCTACAAATGACACTGA
[0700] TAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGAGTTGATTGTAAATACAGATAGT
[0701] GAATCGACTATAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTCACCGGAAACTAGTTG (SEQ ID NO:
33)
[0702] pMVAHantaNP包含:
[0703] DelIII左侧翼:
[0704] GTTGGTGGTCGCCATGGATGGTGTATTGTATACTGTCTAAACGCGTTAGTA
[0705] AAACATGGCGAGGAAATAAATCATATAAAAAATGATTTTCATGATTAAACCAT
[0706] GTTGTGAAAAAGTCAAGAACGTTACATTGGCGGACAATCTAAAAACAAT
[0707] ACAGTGATTGCAGATTTGCCATATATGGATAATGCGGTATCCGATGTATGCAA
[0708] TTCCTGTATAAAAAAGAATGTATCAAGAATATCCAGATTTGCTAATTTGATAA
[0709] AGATAGATGACGATGACAAGACTCCTACTGGTGTATATAATTATTTTAAACCT
[0710] AAAGATGCCATTCTCTGTTATTATATCCATAGGAAAGGATAGAGATGTTTGTG
[0711] AACTATTAATCTCATCTGATAAAGCGTGTGCGTGTATAGAGTTAAATTCATAT
[0712] AAAGTAGCCATTCTTCCCATGGATGTTTCCTTTTTTACCAAAGGAAATGCAT
[0713] CATTGATTATTCTCTCTGTTTGATTTCTCTATCGATGCGGCACCTCTCTTAAGA
[0714] AGTGTAACCGATAATAATGTTATTATATCTAGACACCAGCGTCTACATGACG
[0715] AGCTTCCGAGTTCCAATTGGTTCAAGTTTTACATAAGTATAAAGTCCGACTA
[0716] TTGTTCTATATTATATATGGTTGTTGATGGATCTGTGATGCATGCAATAGCTGA
[0717] TAATAGAACTTACGCAAATATTAGCAAAAAATATATTAGACAATACTACAATTA
[0718] ACGATGAGTGTAGATGCTGTTATTTGAACCACAGATTAGGATTCTTGATAG
[0719] AGATGAGATGCTCAATGGATCATCGTGTGATATGAACAGACATTGTATTATG
[0720] ATGAATTTACCTGATGTAGGCGAATTTGGATCTAGTATGTTGGGGAAATATGAACCTGACATGATTAA
GATTGCTCTTTTCGGTGGCTGG (SEQ ID NO:34) 第一接头:
[0721] GTACAGGCGCGCC (SEQ ID NO:35)
[0722] P11:
[0723] TTTCAATTTGTTTTTTTCTATGCTATAA (SEQ ID NO:36)
[0724] GFP:
[0725] ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGT
[0726] CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG
[0727] GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACC
[0728] ACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTAC
[0729] GCGGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTT
[0730] CTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTT

- [0731] CAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC
- [0732] GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA
- [0733] CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
- [0734] TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGA
- [0735] TCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG
- [0736] CAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTA
- [0737] CCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
- [0738] ACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
(SEQ ID NO:37)
- [0739] 第二接头:
- [0740] GAGCTCCGGCCCGCTCGAGGCCGCTGGTACCCAACCT (SEQ ID NO:38) MH5启动子:
- [0741] AAAAAATTGAAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAG
CGAGAAATAATCATAAATA (SEQ ID NO:39)
- [0742] 第三接头:
- [0743] AGCCCGGT Kozak序列:
- [0744] GCCACCATGG (SEQ ID NO:41)。Kozak序列的3'末端与SEQ ID NO:29的5'末端的四个核酸重叠。
- [0745] 核蛋白 (SEQ ID NO:29)
- [0746] 第四接头:
- [0747] GACCTGGAAGGCCCTAGATTCGAG (SEQ ID NO:42)
- [0748] Flag标签: GACTACAAGGACGAT GACGAC AAG (SEQ ID NO:43)
- [0749] 终止:
- [0750] TGA
- [0751] 第五接头:
- [0752] CTCGACCTGCAGTTTTTATG (SEQ ID NO:44)
- [0753] De11111右侧翼:
- [0754] GAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGAACAAAATACATAATTTTGTA AAAATAAATCACTTTTTATACTA
ATATGACACGATTACCAATACTTTTGT TACTAATATCATTAGTATACGCTACACCTTTTCCTCAGACATCTAAAA
AATAGGTGATGATGCAACTTTATCATGTAATCGAAATAATACAAATGACTACGTTGTTATGAGTGCTTGGTATAAG
GAGCCCAATTCCATTATTCTTTTAGCTGCTAAAAGCGACGTCTTGATTTTGATAATTATACCAAGGATAAAATAT
CTTACGACTCTCCATACGATGATCTAGTTACAACATATCACAATTAAATCATTGACTGCTAGAGATGCCGGTACTTA
TGTATGTGCATTCTTTATGACATCGCCTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGAGTTG
ATTGTAAATACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTCACCGGAAACTAGTTG
(SEQ ID NO:45)
- [0755] 从转化的细菌(大肠杆菌K12 DH10BTMT1R)纯化质粒DNA,并通过GeneArt
(ThermoFisher)通过UV光谱法测定浓度。
- [0756] BHK-21细胞用MVA1974以0.05的感染复数感染。按照制造商的指导,使用
lipofectamine (Life Technologies)用pMVAHantaNP转染感染的细胞。基于GFP表达,将所
得重组MVAHantaNP在鸡胚成纤维细胞(“CEF”)细胞中连续噬斑纯化4次。MVAHantaNP在CEF

细胞上扩增,通过蔗糖垫离心纯化,并在体内使用之前通过CEF细胞上的噬斑测定来滴定。使用GFP荧光并通过用兔抗痘苗抗体 (AbD Serotec,UK) 和Vectastain Universal ABC-AP试剂盒 (Vector laboratories,USA) 免疫染色来显现噬斑。使用Wizard SV基因组DNA纯化系统 (Promega,USA) 提取来自感染细胞的基因组DNA,并在PCR中用作模板,用KAPA2G Fast HotStart PCR试剂盒 (KAPABiosystems,USA) 进行基因型分析。

[0757] 聚合酶链式反应 (PCR) 证实了MVAHantaNP构建体的存在。特异性地设计了一组引物以检查预期大小为3260bp的MVA侧翼区的Hanta NP-这在图2中示出。

[0758] 表达的蛋白质的测序证实了非常高的序列保真度。然后通过组织培养将重组纯化的MVAHantaNP分阶段填充到尺寸递增的烧瓶中。最初,使MVAHantaNP在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 细胞的小瓶中生长,并在感染到稍大的CEF细胞瓶中之前收获。在越来越大的烧瓶中重复该过程,直到MVAHantaNP成功感染 $10\times$ 大烧瓶的CEF细胞。进行蔗糖垫离心;将病毒沉淀重悬于PBS中,准备用于免疫原性研究。总共生产了六批。将批次2+3和4+5+6合并成单个样品并滴定病毒浓度。

[0759] 将纯化的疫苗批次与阳性对照 (来自Geneart的原始接受的质粒) 比对。设计第二组引物以鉴定来自两个MVA侧翼区的整个插入物。结果表明在所有疫苗批次中存在纯重组MVA (含有插入片段的MVA)。再次将原始质粒用作阳性对照,并且所有疫苗批次具有与阳性对照相同的预期大小产物。

[0760] 引物细节如下:

[0761] SEQ ID NO:46:CGGCACCTCTCTTAAGAAGT (Fwd靶标Del III左侧翼)

[0762] SEQ ID NO:47:GTGTAGCGTATACTAATGATATTAG (Rev靶标Del III右侧翼)

[0763] SEQ ID NO:48:GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG (Fwd靶标GFP)

[0764] GFP Fwd引物结合GFP序列,并且当与Rev Del III右侧翼引物组合使用时,通过核蛋白覆盖GFP至右侧MVA侧翼,并且特异性地鉴定NP基因的存在。

[0765] 蛋白质表达的检测

[0766] 用MVAHantaNP以0.05的感染复数感染CEF细胞,并在 37°C 下在补充有2%FBS (Sigma-Aldrich,UK) 的改良伊格尔培养基 (MEM) 中孵育。一旦在显微镜下观察到良好的GFP荧光和CPE,在48小时后除去培养基。用 $1\times$ LDS Nupage®还原样品缓冲液 (含有 $1\times$ Nupage®样品还原缓冲液的Nupage®LDS样品缓冲液) (Thermofisher,UK) 裂解细胞,转移到Eppendorf管中并在 70°C 下加热10分钟。以与阴性对照相同的方式处理未感染的细胞。将MVAHantaNP裂解物在4-12%Bis-Tris凝胶 (Life technologies) 上进行SDS-PAGE并将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。使用5%奶粉 (Merck Millipore) 封闭硝酸纤维素膜,然后在一抗 (在PBS-0.05%Tween中 $1/1000$ 的兔抗V5多克隆 (Invitrogen)) 存在下摇动孵育1-2小时,然后在含有0.05%Tween-20 (Sigma-Aldrich) 的PBS中洗涤3次。将膜在HRP缀合的二抗 (抗兔IgG过氧化物酶 (Sigma-Aldrich) 以 $1/1000$ 在PBS-0.05%Tween中) 存在下摇动孵育1小时,并如前所述洗涤。根据制造商的说明,通过使用Pierce ECL WB底物试剂盒 (Thermofisher) 检测结合的抗体来确定蛋白质表达,并在化学发光成像仪 (Syngene) 中可视化。使用分子阶梯MagicMark XP Western蛋白质标品 (Invitrogen) 作为参考测定分子量。

[0767] Western印迹分析 (参见图3) 证实了位于NP下游的flag标签的表达。蛋白质 (NP+接

头和flag标签)的预期大小为89kDa,并且蛋白质序列提供于SEQ ID NO:49中。从第3代挑取到疫苗批次观察到表达(发明人观察到低水平的蛋白质降解,不认为是显著的)。目的条带位于蛋白质的预期大小,这再次表明良好的表达。

[0768] MATMEEIQREISAHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDL NKRALHDRESVAA
[0769] SIQSKIDELKRQLADRIAAGKNIGQDRDPTGVEPGDHLKERSALSYGNTLDLN
[0770] SLDIDEPTGQTADWLTIIVYLTSFVVP IILKALYMLTTRGRQTSKDNKGMRIRFK
[0771] DDSSYEDVNGIRKPKHLYVSM PNAQSSMKAEEITPGRFRTAVCGLYPAQIKAR
[0772] NMVSPVMSVVGFLALAKDWT SRIEEWLGAPCKFMAESPIAGSLSGNPVNRD
[0773] YIRQRQ GALAGMEPK EFQALRQH SKDAGCTLVEHIESPSSIWVFAGAPDRCPP
[0774] TCLFVGGM AELGAFFS ILQDMRNTIMASKTVGTAD EKL RKKSSFYQSYLRRT
[0775] QSMGIQLDQRIIVFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPEL RSLAQILIDQKVKEIS
[0776] NQEPMKLMLS YGNVLDLNLHDIDEPTGQTADWLGIV IYLT SFVVP ILLKALYM
[0777] LTTRGRQTTKDNKGTRIRFKDDSSFEDVNGIRKPKHLYVSLPNAQSSMKAEEI
[0778] TPGRYRTAICGLYPAQIKARQMISPVM SVIGFLALAKDWS DRIEQWLSEPC KLL
[0779] PDTA AVSLLG GPATNRDYL RQRQVALGNMETKESKAIRQHAE AAGCSMIEDIE
[0780] SPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFS ILQDMRNTIMASKTVGTSEEK
[0781] LRKKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVLFMVAWGKEAVDNFHLGDDMDPELRTLAQSLIDVKVKEIS
NQEPLKLDLEGPRFEDYKDDDDK (SEQ ID NO:49)

[0782] SEQ ID NO 49的氨基酸序列对应于SEQ ID NO:31的氨基酸序列加上表达的第四接头和flag标签。

[0783] 实施例2.MVAHantaNP在A129小鼠中的免疫原性

[0784] 将80只雄性6-8周龄A129小鼠随机分成4组,并在接种前进行耳标记。

[0785] 第1组在第0天和第14天接受每只动物 1×10^7 PFU的MVAhantaNP无内毒素磷酸盐缓冲盐水(PBS)的两剂疫苗接种。

[0786] 第2组在第14天接受每只动物 1×10^7 个噬斑形成单位(pfu)的不含内毒素的PBS中的MVAHantaNP的单次疫苗注射。

[0787] 第3组在第0天和第14天接受每只动物 1×10^7 PFU的无内毒素PBS中的MVA空载体的两剂量疫苗接种。

[0788] 第4组在第0天和第14天接受无内毒素PBS的两剂疫苗接种作为阴性对照。

[0789] 将所有小鼠肌肉注射到尾部大腿中。在每次接种时施用100 μ l(每条大腿中施用50 μ l)。在整个研究中每天记录动物重量。将每组5只动物安乐死,并在初次接种后第28天收集脾组织和血液。所有努力都是为了使动物痛苦最小化。这些研究由英国Porton Down的PHE和英国内政部的伦理审查过程通过项目许可证号30/2993批准。根据1986年动物(科学程序)法案和内政部(UK)科学程序中使用的动物饲养和护理实践规范(1989)进行工作。

[0790] 在整个研究中,没有观察到关于疫苗接种的临床体征,并且所有小鼠都如预期的那样增加体重(参见图4a)。如所预期的,所有四个组在整个研究中体重增加,并且第4组体重始终低于第1-3组。在研究结束时,所有组观察到类似的重量增加%。这些临床数据表明小鼠耐受疫苗而没有副作用。

[0791] 为了确定免疫动物中的T细胞应答,使用干扰素- γ ELISPOT测定来测量用汉坦病

毒特异性肽刺激后应答性T细胞的频率。

[0792] 无菌收集来自测试动物的脾脏,匀浆,并裂解红细胞。将脾细胞重悬于补充有5% FBS、2mM L-谷氨酰胺、100U青霉素和0.1mg/ml链霉素、50mM 2-巯基乙醇和25mM HEPES溶液 (Sigma-Aldrich) 的RPMI培养基 (Sigma-Aldrich) 中。通过IFN- γ ELISPOT (Mabtech, Sweden) 评估脾细胞的抗原回忆应答,根据制造商的说明书进行。将细胞以每孔 2×10^6 接种在PVDF微量滴定板中,并用肽库 (JPT, Berlin) 再刺激。

[0793] 跨越Hanta NP蛋白序列的肽为15个残基长,肽之间重叠11个残基。总共产生189种肽,在11个肽库中测试 (参见表1)。

[0794] 表1:肽库(起始氨基酸 (“AA”) 编号对应于SEQ ID NO:31中的氨基酸编号)

[0795]

SEQ ID NO	起始 AA	序列	库编号
50	1	MATMEEIQREISAHE	1
51	5	EEIQREISAHEGQLV	
52	9	REISAHEGQLVIARQ	
53	13	AHEGQLVIARQKVKD	
54	17	QLVIARQKVKDAEKQ	
55	21	ARQKVKDAEKQYEKD	
56	25	VKDAEKQYEKDPDDL	
57	29	EKQYEKDPDDLNKRA	
58	33	EKDPDDLNKRALHDR	
59	37	DDLNKRALHDRESVA	
60	41	KRALHDRESVAASIQ	
61	45	HDRESVAASIQSKID	
62	49	SVAASIQSKIDELKR	
63	53	SIQSKIDELKRQLAD	
64	57	KIDELKRQLADRIAA	
65	61	LKRQLADRIAAGKNI	
66	65	LADRIAAGKNIGQDR	
67	69	IAAGKNIGQDRDPTG	2
68	73	KNIGQDRDPTGVEPG	
69	77	QDRDPTGVEPGDHLK	
70	81	PTGVEPGDHLKERSA	
71	85	EPGDHLKERSALSYG	
72	89	HLKERSALSYGNTLD	
73	93	RSALSYGNTLDLNSL	
74	97	SYGNTLDLNSLDIDE	
75	101	TLDLNSLDIDEPTGQ	
76	105	NSLDIDEPTGQTADW	
77	109	IDEPTGQTADWLTII	
78	113	TGQTADWLTIIIVYLT	
79	117	ADWLTIIIVYLTsfvV	
80	121	TIIVYLTsfvVPIIL	
81	125	YLTsfvVPIILKALY	
82	129	FVVPILKALYMLTT	
83	133	IILKALYMLTTRGRQ	3
84	137	ALYMLTTRGRQTSKD	
85	141	LTTRGRQTSKDNKGM	
86	145	GRQTSKDNKGMIRIF	
87	149	SKDNKGMIRIFKDDSD	
88	153	KGMIRIFKDDSSYED	

[0796]

89	157	IRFKDDSSYEDVNGI	
90	161	DDSSYEDVNGIRKPK	
91	165	YEDVNGIRKPKHLYV	
92	169	NGIRKPKHLYVSPN	
93	173	KPKHLYVSPNAQSS	
94	177	LYVSPNAQSSMKA	
95	181	MPNAQSSMKAEEITP	
96	185	QSSMKAEEITPGRFR	
97	189	KAEEITPGRFRTAVC	
98	193	ITPGRFRTAVCGLYP	
99	197	RFRTAVCGLYPAQIK	4
100	201	AVCGLYPAQIKARNM	
101	205	LYPAQIKARNMVSPV	
102	209	QIKARNMVSPVMSVV	
103	213	RNMVSPVMSVVGFLA	
13	217	SPVMSVVGFLALAKD	
104	221	SVVGFLALAKDWTSR	
105	225	FLALAKDWTSRIEEW	
106	229	AKDWTSRIEEWLGAP	
107	233	TSRIEEWLGAPCKFM	
108	237	EEWLGAPCKFMAESP	
109	241	GAPCKFMAESPIAGS	
110	245	KFMAESPIAGSLSGN	
111	249	ESPIAGSLSGNPVNR	
112	253	AGSLSGNPVNRDYIR	
113	257	SGNPVNRDYIRQRQG	
114	261	VNRDYIRQRQGALAG	5
115	265	YIRQRQGALAGMEPK	
116	269	RQGALAGMEPKFQQA	
117	273	LAGMEPKFQALRQH	
118	277	EPKEFQALRQHSKDA	
119	281	FQALRQHSDAGCTL	
120	285	RQHSDAGCTLVEHI	
121	289	KDAGCTLVEHIESPS	
122	293	CTLVEHIESPSSIWV	
123	297	EHIESPSSIWVFAGA	
124	301	SPSSIWVFAGAPDRC	
125	305	IWVFAGAPDRCPTC	
126	309	AGAPDRCPTCLFVG	
127	313	DRCPTCLFVGMAE	
128	317	PTCLFVGMAELGAF	
129	321	FVGMAELGAFFSIL	
130	325	MAELGAFFSILQDMR	

[0797]

131	329	GAFFSILQDMRNTIM	
132	333	SILQDMRNTIMASKT	
133	337	DMRNTIMASKTVGTA	
134	341	TIMASKTVGTADDEKL	6
135	345	SKTVGTADDEKLRRKS	
136	349	GTADEKLRRKSSFYQ	
137	353	EKLRRKSSFYQSYLR	
138	357	KKSSFYQSYLRRTQS	
139	361	FYQSYLRRTQSMGIQ	
140	365	YLRRTQSMGIQLDQR	
141	369	TQSMGIQLDQRIVM	
142	373	GIQLDQRIVMFMVA	
143	377	DQRIVMFMVAWGKE	
144	381	IVMFMVAWGKEAVDN	
145	385	MVAWGKEAVDNFHLG	
146	389	GKEAVDNFHLGDDMD	
147	393	VDNFHLGDDMDPELR	
148	397	HLGDDMDPELRSLAQ	
149	401	DMDPELRSLAQILID	
150	405	ELRSLAQILIDQKVK	
151	409	LAQILIDQKVKEISN	7
152	413	LIDQKVKEISNQEPM	
153	417	KVKEISNQEPMKLML	
154	421	ISNQEPMKLMLSYGN	
155	425	EPMKLMLSYGNVLDL	
156	429	LMSYGNVLDLNLHD	
157	433	YGNVLDLNLHLDIDEP	
158	437	LDLNLHDIDEPGQT	
159	441	HLDIDEPGQTADWL	
160	445	DEPTGQTADWLGIVI	
161	449	GQTADWLGIVIYLS	
162	453	DWLGIVIYLSFVVP	
163	457	IVIYLSFVVPILLK	
164	461	LTSFVVPILLKALYM	
165	465	VVPILLKALYMLTTR	
166	469	LLKALYMLTTRGRQT	
167	473	LYMLTTRGRQTTKDN	8
168	477	TTRGRQTTKDNKGTR	
169	481	RQTTKDNKGTRIRFK	
170	485	KDNKGTRIRFKDDSS	
171	489	GTRIRFKDDSSFEDV	
172	493	RFKDDSSFEDVNGIR	
173	497	DSSFEDVNGIRKPKH	

[0798]

174	501	EDVNGIRKPKHLYVS	
175	505	GIRKPKHLYVSLPNA	
176	509	PKHLYVSLPNAQSSM	
177	513	YVSLPNAQSSMKAAEE	
178	517	PNAQSSMKAAEITPG	
179	521	SSMKAAEITPGRYRT	
180	525	AEEITPGRYRTAICG	
181	529	TPGRYRTAICGLYPA	
182	533	YRTAICGLYPAQIKA	
183	537	ICGLYPAQIKARQMI	
184	541	YPAQIKARQMISPVM	
185	545	IKARQMISPVM SVIG	9
186	549	QMISPVM SVIGFLAL	
14	553	PVMSVIGFLALAKDW	
187	557	VIGFLALAKDWSDRI	
188	561	LALAKDWSDRIEQWL	
189	565	KDWS DRIEQWLSEPC	
190	569	DRIEQWLSEPC KLLP	
191	573	QWLSEPC KLLPD TAA	
192	577	EPCKLLPD TAAV SLL	
193	581	LLPD TAAV SLLG GPA	
194	585	TAAV SLLG GPATNRD	
195	589	SLLG GPATNRD YLRQ	
196	593	GPATNRD YLRQRQVA	
197	597	NRD YLRQRQVALGNM	
198	601	LRQRQVALGNMETKE	
199	605	QVALGNMETKESKAI	
200	609	GNMETKESKAIRQHA	10
201	613	TKESKAIRQHAEAAAG	
202	617	KAIRQHAEAAAGCSMI	
203	621	QHAEAAAGCSMIEDIE	
204	625	AAGCSMIEDIESPSS	
205	629	SMIEDIESPSSIWVF	
206	633	DIESPSSIWVFAGAP	
207	637	PSSIWVFAGAPDRCP	
208	641	WVFAGAPDRCPPTCL	
209	645	GAPDRCPPTCLFIAG	
210	649	RCPTCLFIAGMAEL	
211	653	TCLFIAGMAELGAFF	
212	657	IAGMAELGAFFSILQ	
213	661	AELGAFFSILQDMRN	
214	665	AFFSILQDMRNTIMA	
215	669	ILQDMRNTIMASKTV	

[0799]	216	673	MRNTIMASKTVGTSE	11
	217	677	IMASKTVGTSEEKLR	
	218	681	KTVGTSEEKLRKKSS	
	219	685	TSEEKLRKKSSFYQS	
	220	689	KLRKKSSFYQSYLRR	
	221	693	KSSFYQSYLRRTQSM	
	222	697	YQSYLRRTQSMGIQL	
	223	701	LRRTQSMGIQLDQRI	
	224	705	QSMGIQLDQRIIVLF	
	225	709	IQLDQRIIVLFMVAW	
	226	713	QRIIVLFMVAWGKEA	
	227	717	VLFMVAWGKEAVDNF	
	228	721	VAWGKEAVDNFHLGD	
	229	725	KEAVDNFHLGDDMDP	
	230	729	DNFHLGDDMDPELRT	
	231	733	LGDDMDPELRTLAQS	
	232	737	MDPELRTLAQSLIDV	
	233	741	LRTLAQSLIDVKVKE	
	234	745	AQSLIDVKVKEISNQ	
	235	749	IDVKVKEISNQEPLK	
	40	753	DVKVKEISNQEPLKL	

[0800] 将它们以每种肽2.5μg/ml的终浓度应用于细胞,在库1至10中的每一个中具有17种肽,并且在库11中具有19种肽。在37℃、5%CO₂下在加湿培养箱中18小时后使板显色。在自动ELISPOT读数器(Cellular Technologies Limited,USA)上目测计数斑点。减去来自含有细胞和培养基但不含肽的孔的背景值,并将数据呈现为对各个库的响应或跨靶蛋白的总和。结果表示为每10⁶个细胞的斑点形成单位(SFU)。

[0801] 用所有Hanta NP库刺激时,MVA-WT组和PBS组(第3组和第4组)是阴性的。在初免/加强和初免组中,检测到对几个肽库的IFN-γ应答,并且特别强的应答针对NP的2个不同区域(对应于库4和9)。

[0802] 发明人发现了关于SEQ ID NO:11和12,T细胞(IFN-γ)刺激大大增加。

[0803] 与对照组相比,对于初免/加强和初免组,还检测到针对库2、3、5、7、8和10的应答增加。图5中提供了来自接种疫苗和未接种疫苗的小鼠的总ELISPOT应答;和图6显示了对单个肽库的ELISPOT应答。

[0804] 为了测量免疫小鼠中的抗体应答,进行ELISA分析以评估抗体与汉坦病毒特异性蛋白的结合。将作为粗裂解物的重组Hanta NP(Native Antigen Company,UK)在0.2M碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液pH 9.4(Thermo Scientific)中稀释,并用于以100μL中的10μg/ml涂覆在Maxisorp 96孔板(Nunc,丹麦),在4℃下孵育过夜,然后用PBS+0.01%Tween-20(Sigma-Aldrich)洗涤,并在37℃下用PBS+0.01%Tween-20中的100μl的5%奶粉(Merck, Millipore)封闭1小时,然后在PBS+0.01%Tween-20中再洗涤。将样品在PBS+0.01%Tween-20缓冲液中的5%奶粉中1:50稀释,一式三份添加到板中(100μl/孔)并在37℃下孵育1小

时。将正常小鼠血清 (Sigma-Aldrich) 和多克隆抗汉坦病毒超免疫小鼠腹水样品 (BEI Resources, USA) 分别用作阳性和阴性对照样品。将板用 PBS+0.01 % Tween-20 洗涤, 并将 100 μ l 在 5 % 奶 PBS+0.01 % Tween-20 中 1:20,000 稀释的多克隆抗小鼠 HRP 缀合物 (Sigma-Aldrich) 加入每个孔中。在 37°C 下再孵育 1 小时后, 用 PBS+0.01 % Tween-20 洗涤板, 并向每个孔中加入 100 μ l TMB 底物 (Surmodics), 然后在 20°C 下孵育 1 小时。通过添加根据制造商的说明书制备的 100 μ l 终止溶液 (Surmodics) 终止反应, 并使用 Molecular Devices 板读数器和 Softmax Pro version 5.2 软件 (Molecular Devices) 在 450nm 处读板。从样品值中减去背景吸光度值, 并将结果报告为 1:50 稀释的吸光度 (450nm)。使用 Graph Pad Prism 7 说明和分析数据 (参见图 7)。

[0805] MVA-WT 和 PBS 对照组显示出非常小的吸光度, 其值与空白孔中的那些相似。初免和初免/加强接种组中所有小鼠的应答均显著更高。仅初免组记录的平均吸光度为 ~ 2.3 , 初免/加强组记录的平均 OD 为 ~ 1.5 。

[0806] 因此, 本发明的载体证明了非常理想的细胞和体液免疫应答诱导。

[0807] 实施例 3. 功效测试

[0808] 将 60 只体重为 19-21g 的雄性 A129 小鼠预先随机分成 4 组, 然后进行耳标记和微芯片化以进行鉴定、重量监测和温度监测。

[0809] 在第 28 天用 Hanta SE0V 攻击用于免疫原性研究的在第 28 天未被剔除的剩余小鼠。在每组中, 以 1.36×10^6 TCID₅₀/剂量经由鼻内途径攻击 $n=10$ 只动物, 并且经由肌内途径攻击 $n=5$ 只动物。

[0810] 在第 33 天对肌内攻击的动物实施安乐死。在第 33 天 (每组 5 只) 或第 42 天 (每组 5 只) 对鼻内攻击的小鼠实施安乐死。收集血液、唾液、肝、肾、肺和脾用于组织学和病毒负荷分析。所有努力都是为了使动物痛苦最小化。这些研究由英国 Porton Down 的 PHE 和英国内政部的伦理审查过程通过项目许可证号 30/2993 批准。根据 1986 年动物 (科学程序) 法案和内政部 (UK) 科学程序中使用的动物饲养和护理实践规范 (1989) 进行工作。

[0811] 临床体征:

[0812] 在整个研究中每天记录动物重量和温度。所有受攻击的动物保持健康, 并且在用汉坦病毒攻击后未观察到临床体征。整个研究中的温度和体重报告于图 8 中。

[0813] 病毒载量:

[0814] 在攻击后 5 天和 14 天评估病毒载量。如图 9 所示, 在第 5 天, 用 MVAHantaNP 免疫已经实现了测试组织的汉坦病毒的减少或完全清除。在攻击后 14 天, 在大多数组织中也观察到高度有利的病毒载量的降低。

[0815] 病毒载量-随访研究:

[0816] 在随访研究中, 将 28 只雌性 A129 小鼠预先随机分成两组, 然后进行耳标记和微芯片化以进行鉴定、重量监测和温度监测。

[0817] 在这 28 只小鼠中, 16 只第 0 天用 GLP 级 MVAHantaNP 初免, 然后在第 14 天进行加强免疫 (“组 A”); 并且 12 只小鼠分别第 0 天和第 14 天接受用空 MVA 野生型载体的初免和加强免疫 (“B 组”)。根据上述实施例 2 进行了免疫。

[0818] 在第 28 天, 以 3×10^6 TCID₅₀/小鼠的剂量用 Hanta SE0V 鼻内攻击 A 组小鼠中的 8 只和 B 组小鼠中的 8 只。

[0819] 在该后续研究中,在攻击后5天评估病毒载量。如图10所示,用MVAHantaNP免疫实现了测试组织中汉坦病毒的有利减少,即使当攻击剂量超过两倍时也是如此。

[0820] 实施例4:示例性腺病毒载体的制备

[0821] 将非复制型腺病毒工程化以表达本发明的汉坦病毒NP核酸或其片段。将汉坦病毒NP的遗传序列插入腺病毒载体的基因组中。汉坦病毒NP的表达通过如下Western印迹或ELISA通过NP特异性抗体和腺病毒产物之间的反应性来指示:

[0822] 与阴性对照相比,用重组腺病毒感染的细胞的细胞裂解物,进行使用汉坦病毒NP特异性抗体的SDS-PAGE和Western印迹,显示出特异性反应性。

[0823] 或者,将来自用重组腺病毒感染的细胞的产物用于涂覆ELISA板。汉坦病毒特异性抗体与涂层结合并通过化学反应检测。

[0824] 实施例5:汉坦病毒疫苗提供交叉毒株保护

[0825] 将在腺病毒或非复制型痘病毒载体中表达本发明的汉坦病毒NP核酸或其片段的疫苗通过肠胃外途径递送到易患由汉坦病毒引起的疾病的小鼠中。用致死剂量的Hanta病毒攻击它们,所述Hanta病毒来自与疫苗所基于的毒株不同的毒株。受攻击的动物不显示或显示轻微的疾病临床体征,并且不需要安乐死。接受相同攻击剂量的Hanta病毒但未接受疫苗的对照动物显示严重的疾病迹象,达到人道的临床终点并需要安乐死。

[0826] 实施例6.重组流感病毒载体的制备及其功效

[0827] 使用反向遗传学来构建在神经氨酸酶茎中携带汉坦病毒NP的保护性表位的重组流感病毒。在鼻内或肠胃外施用后,在小鼠中诱导汉坦病毒特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。这些CTL在用Hanta病毒攻击后提供了病毒载量和临床疾病的减少。

[0828] 实施例7.重组细菌载体的制备和功效

[0829] 本发明的汉坦病毒NP核酸或其片段在遗传减毒的革兰氏阴性细菌的表面上表达。在鼻内或肠胃外施用于小鼠后,细菌载体定殖于抗原呈递细胞(例如树突细胞或巨噬细胞)。诱导体液和细胞汉坦病毒特异性免疫应答。这些免疫应答在用Hanta病毒攻击后提供了病毒载量和临床疾病的减少。

(a)



(b)

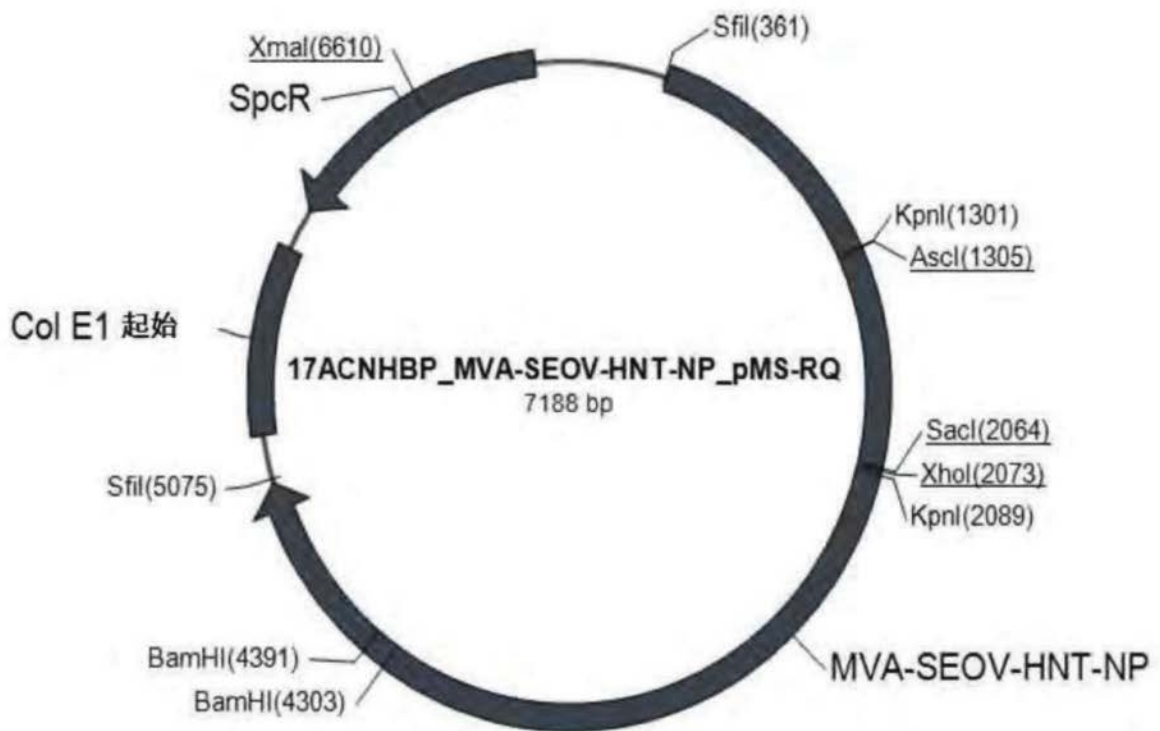


图1

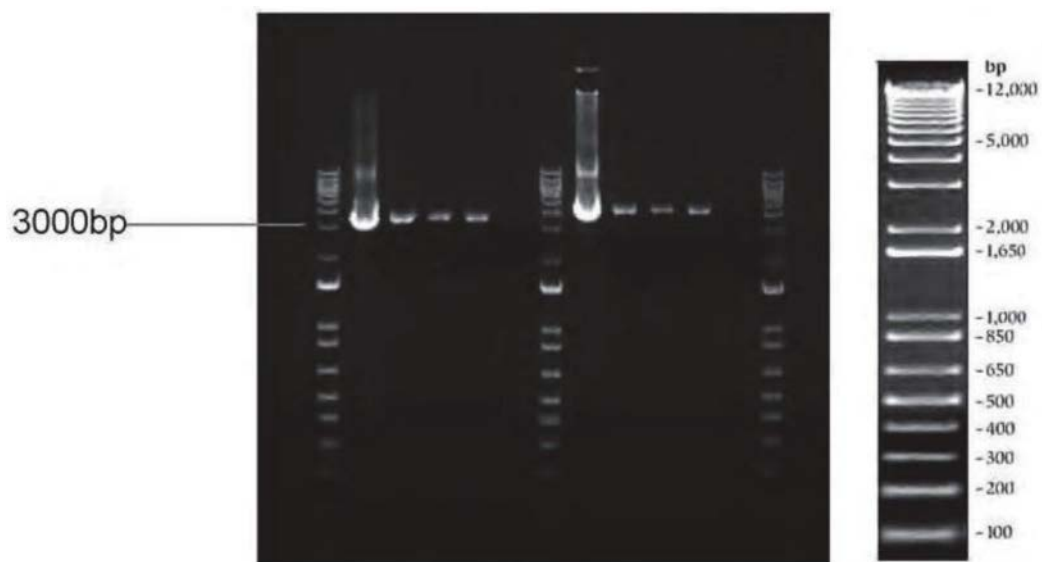


图2



图3

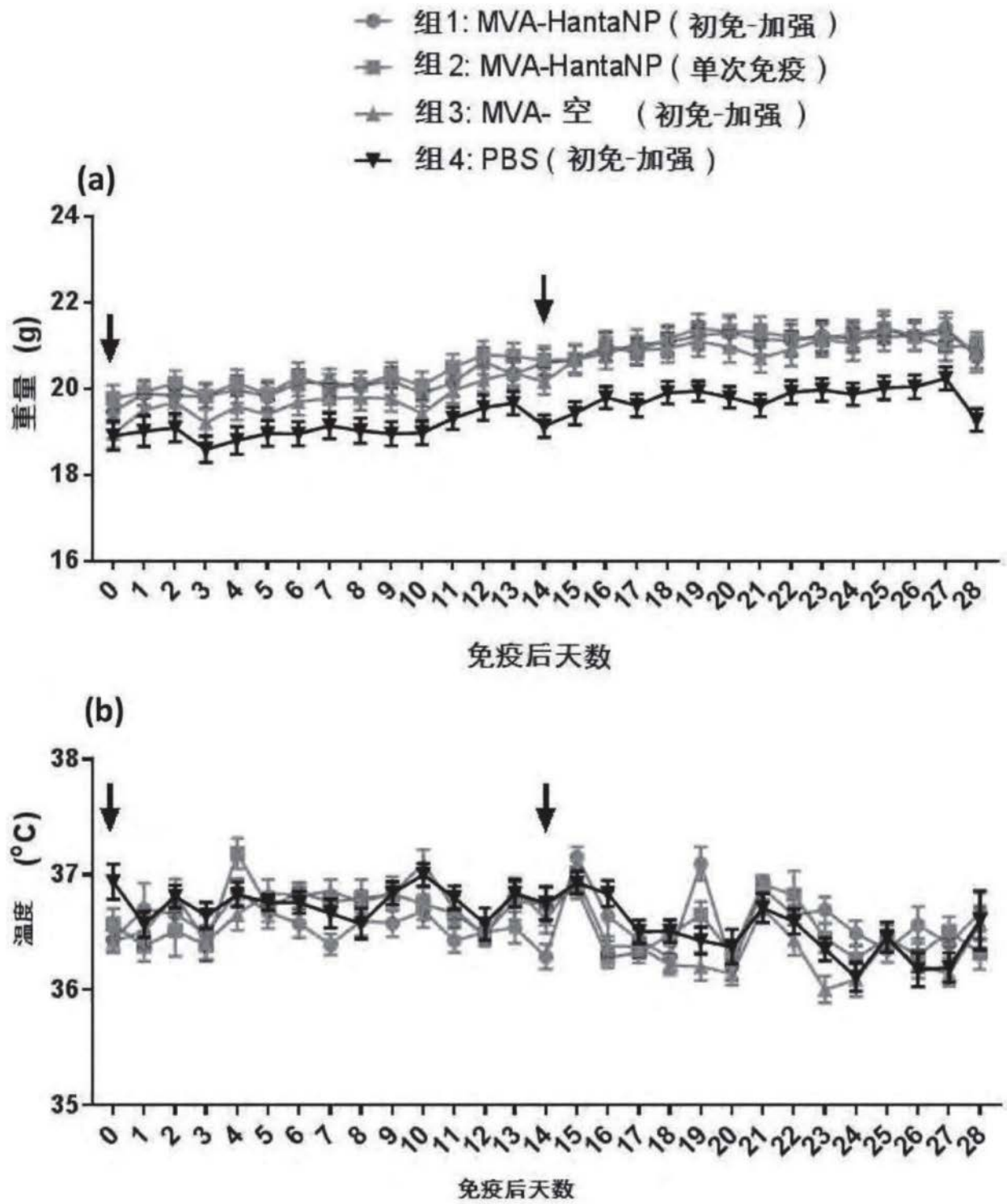


图4

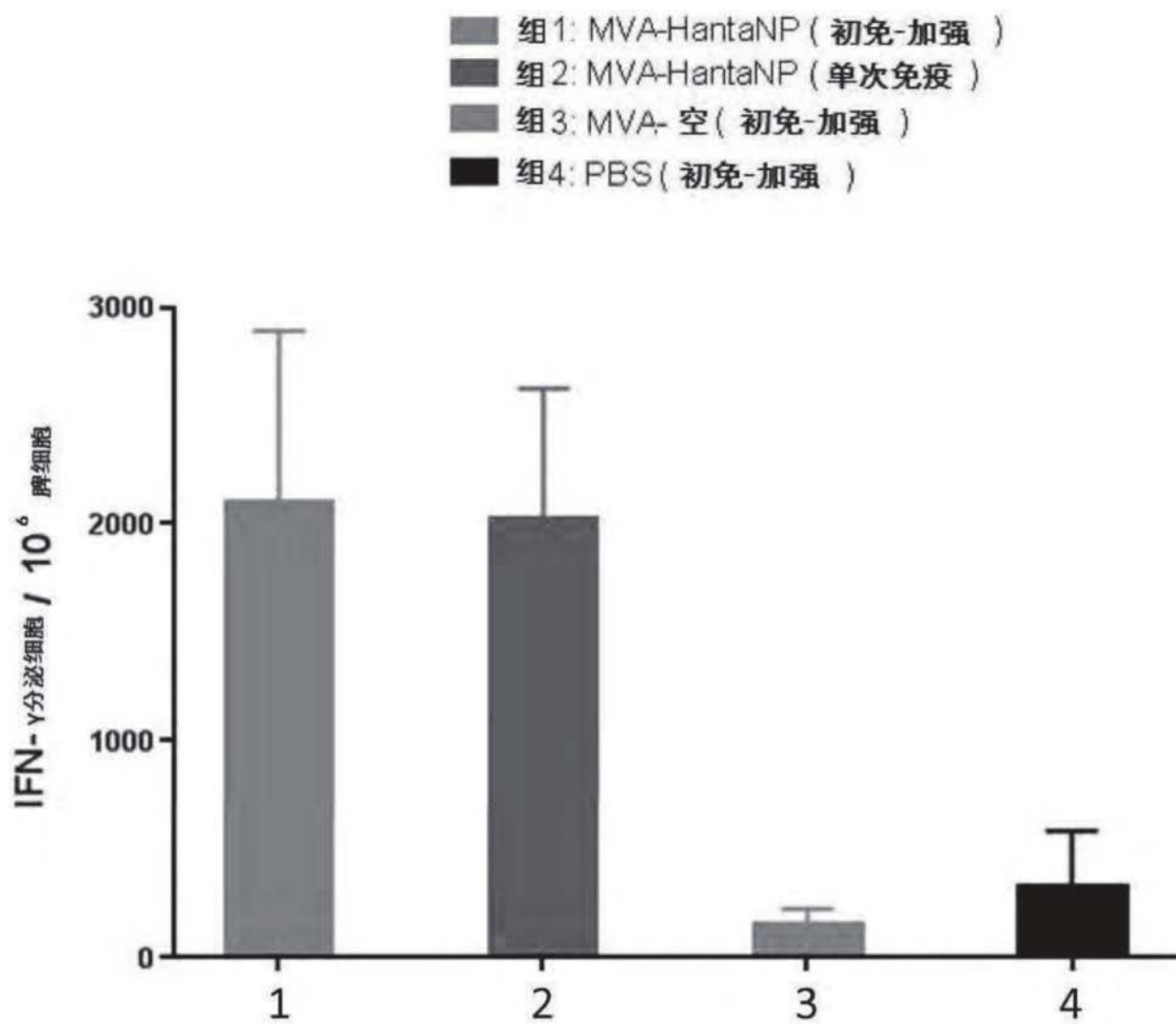


图5

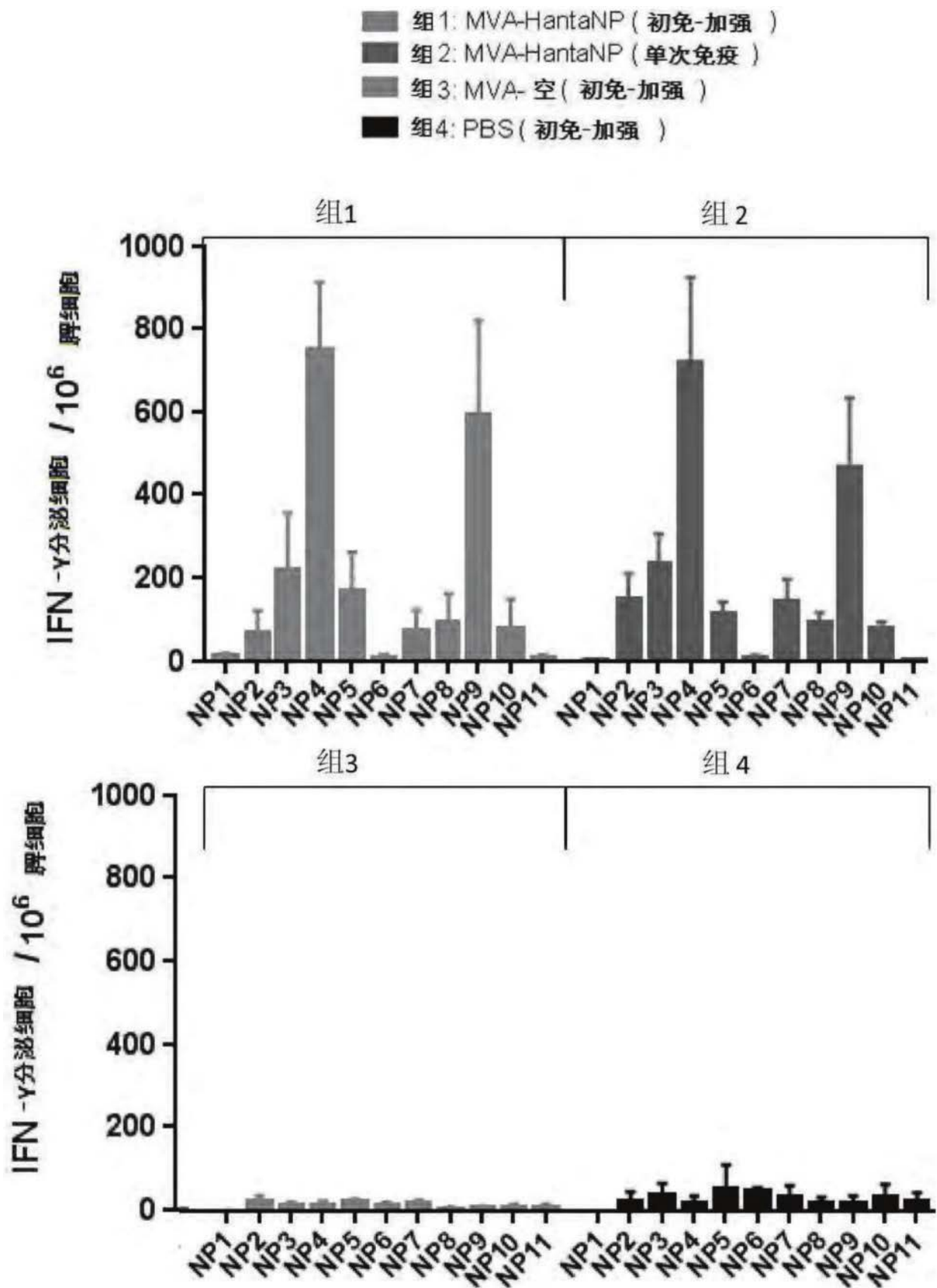


图6

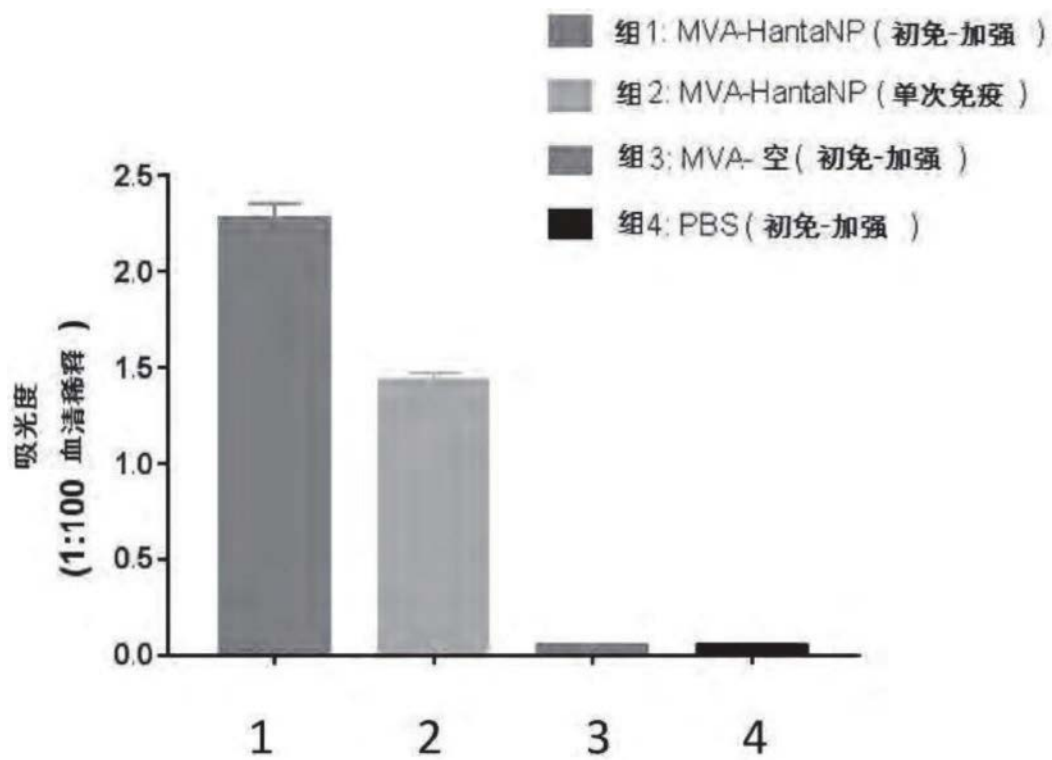


图7

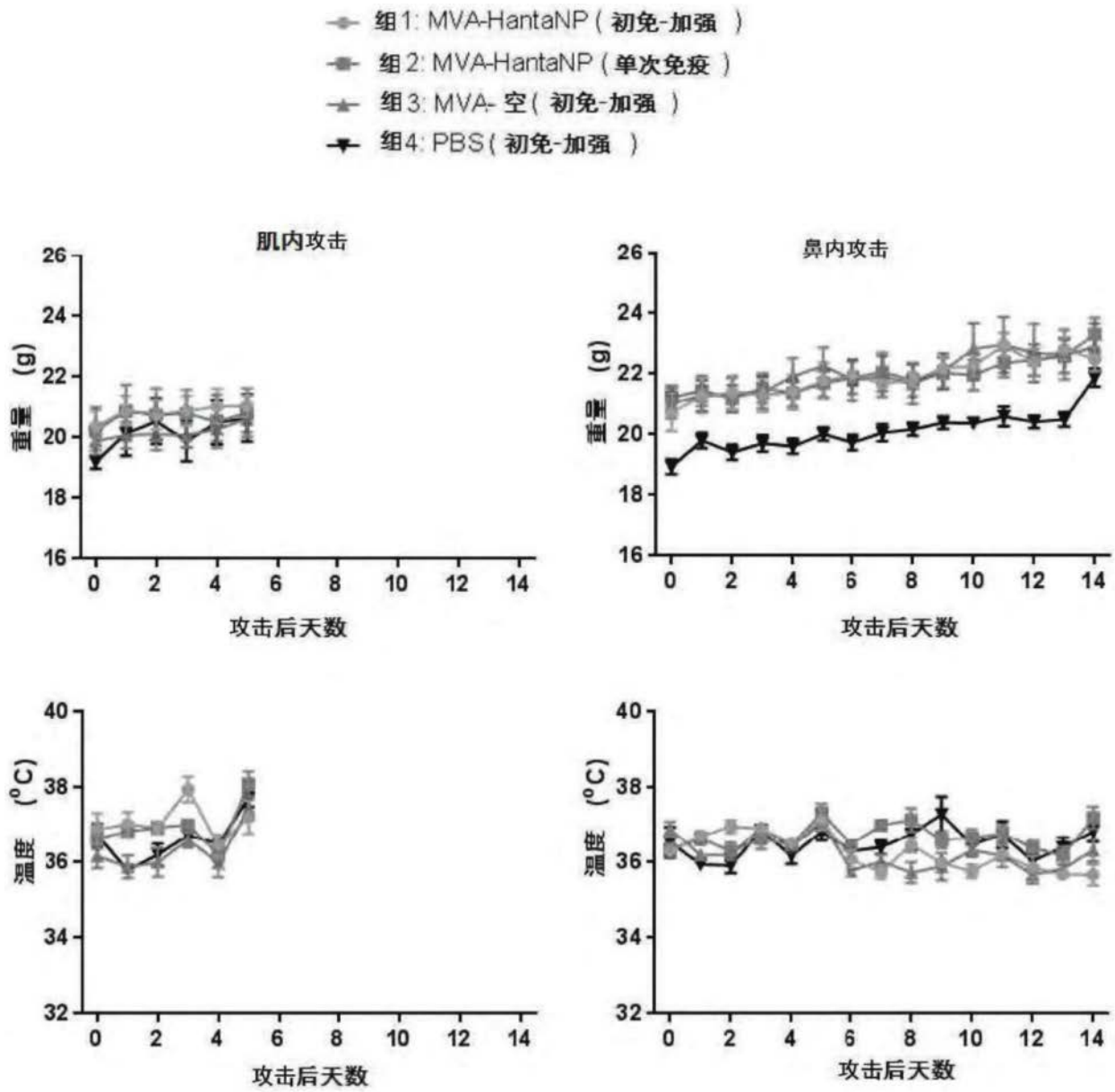


图8

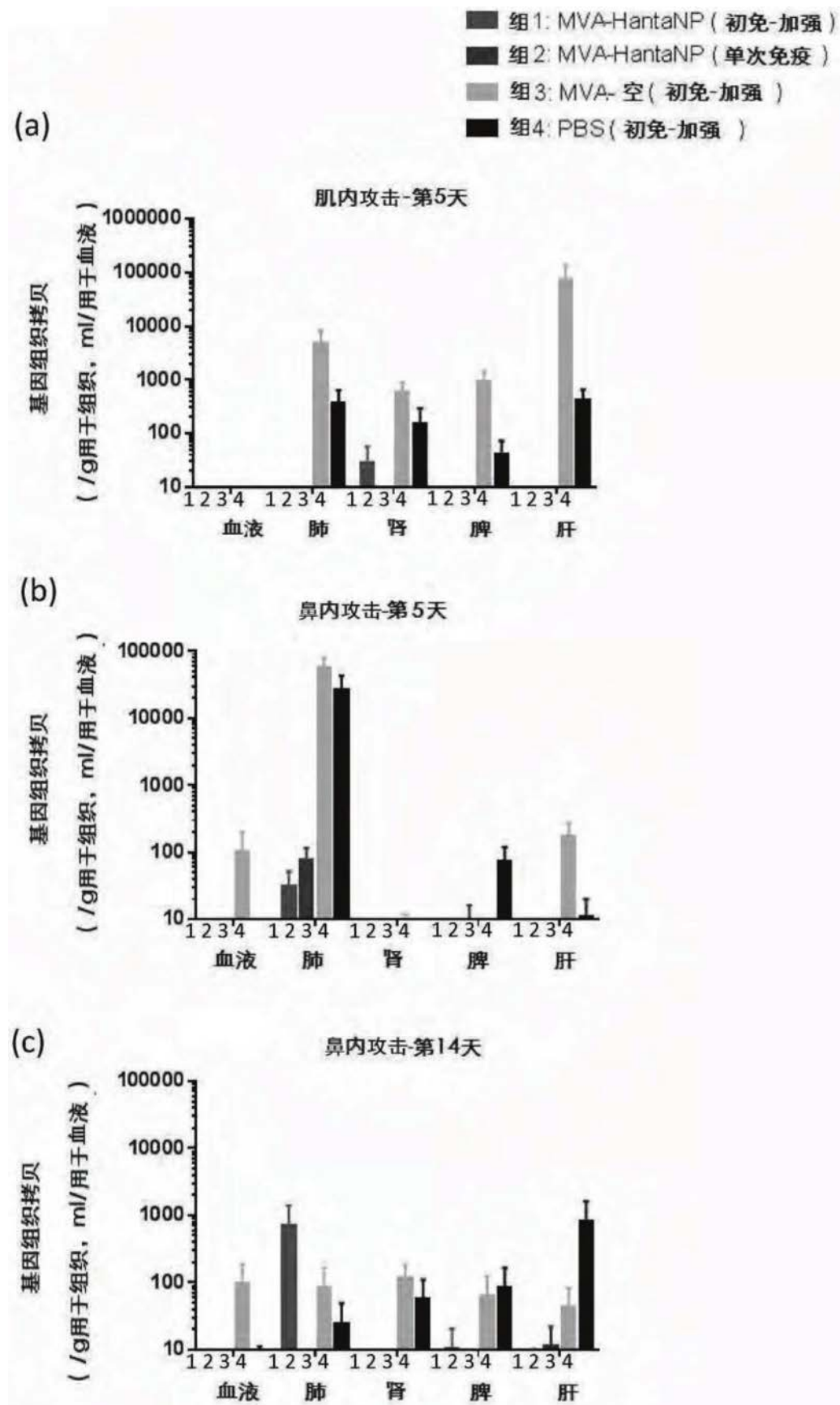


图9

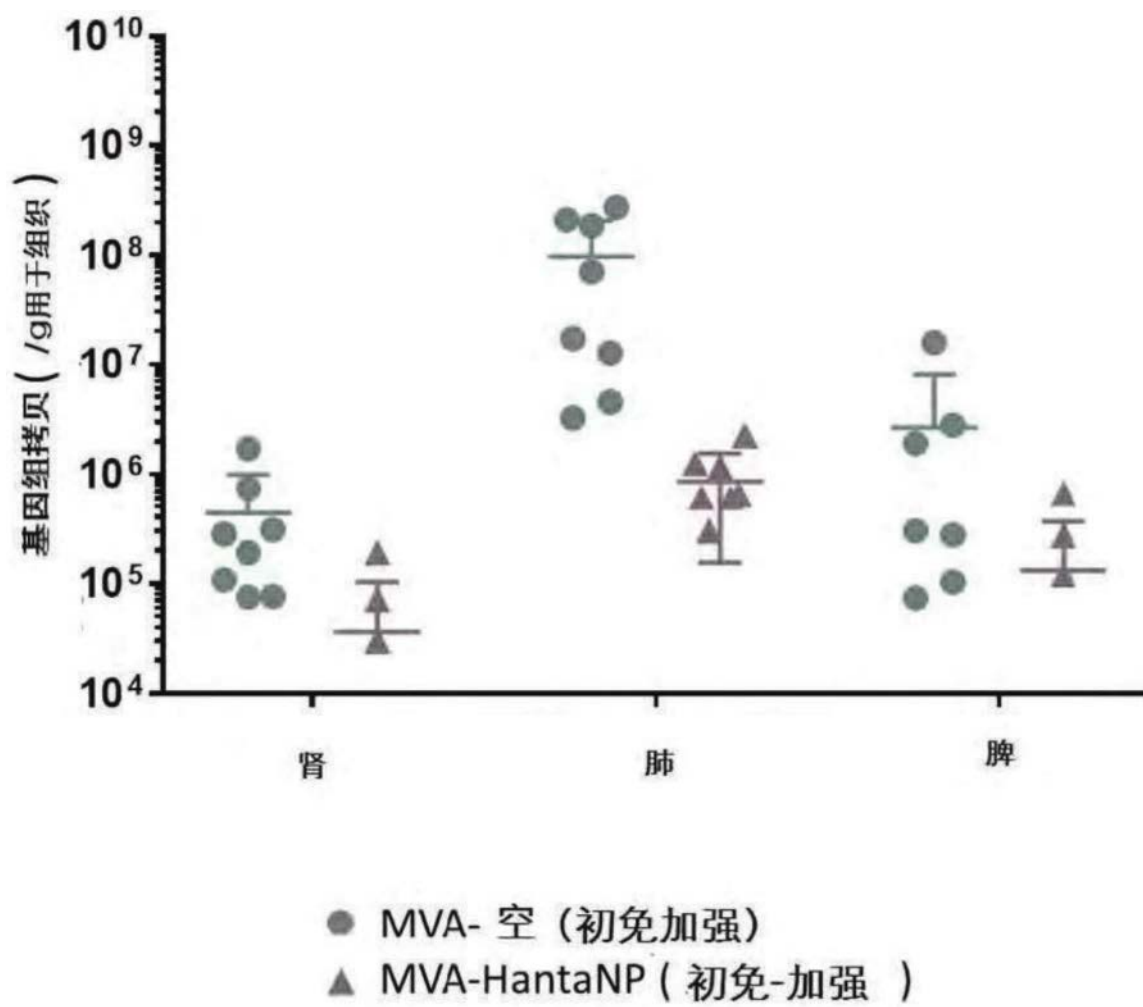


图10