



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108210921 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201711499584.1

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 广州恩宝生物医药科技有限公司  
地址 510000 广东省广州市高新技术产业  
开发区瑞发路1号自编1栋二楼201室

(72)发明人 陈凌 冯立强

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限  
公司 44202

代理人 宋静娜 郝传鑫

(51) Int. Cl.

A61K 39/12(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

C12N 15/40(2006.01)

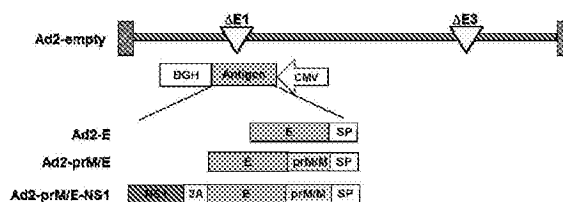
权利要求书1页 说明书7页  
序列表6页 附图7页

(54)发明名称

一种寨卡病毒疫苗及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种寨卡病毒疫苗,所述寨卡病毒疫苗含有或者能够表达寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1。本发明还公开了一种寨卡病毒疫苗的制备方法。本发明的寨卡病毒疫苗具有更强的免疫原性,能更加有效地预防寨卡病毒感染。



1. 一种寨卡病毒疫苗,其特征在于,所述寨卡病毒疫苗含有或者能够表达寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1。

2. 根据权利要求1所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗为能够表达寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的基因载体。

3. 根据权利要求2所述的疫苗,其特征在于,所述载体为DNA载体、重组病毒载体或纳米材料载体。

4. 根据权利要求2所述的疫苗,其特征在于,所述载体包含非结构蛋白NS1的开放阅读框。

5. 根据权利要求2所述的疫苗,其特征在于,所述载体包含依次排列的寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列,所述编码序列依据哺乳动物密码子偏好进行优化。

6. 根据权利要求5所述的疫苗,其特征在于,所述编码序列的5'端连接有分泌信号肽的核苷酸序列。

7. 根据权利要求6所述的疫苗,其特征在于,所述分泌信号肽来自日本脑炎病毒。

8. 根据权利要求5所述的疫苗,其特征在于,所述包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列之间插入有2A自剪切序列。

9. 一种寨卡病毒疫苗的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 通过全基因合成的方法合成依次排列的日本脑炎病毒信号肽的编码序列、膜蛋白prM/M的编码序列、包膜蛋白E的编码序列、2A自剪切序列和非结构蛋白NS1的编码序列的重组序列,其中,寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列依据哺乳动物密码子偏好进行优化;

(2) 通过酶切、连接操作将所述重组序列插入穿梭质粒pGA1,通过同源重组得到重组腺病毒质粒pAd2-prM/E-NS1,即所述的寨卡病毒疫苗。

## 一种寨卡病毒疫苗及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗技术领域,尤其是一种寨卡病毒疫苗及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 寨卡病毒(Zika Virus,ZIKV)属黄病毒科(Flaviviridae),是单股正链RNA病毒。历史上,寨卡病毒仅在非洲及亚洲的热带地区小范围流行,而且感染健康成人后症状轻微。自2007年开始,寨卡病毒在拉美地区持续流行。在这些疫情中,寨卡病毒感染可导致严重的神经系统疾病,包括小头症以及格林巴利综合症等。更为值得关注的是,寨卡病毒不仅可经蚊媒传播,还可经过性接触等途径传播。寨卡病毒疫情已给疫区人群带来严重的健康威胁和经济损失。目前,临床尚无有效的抗寨卡病毒药物,也没有获批使用的寨卡病毒疫苗。因此,新型寨卡病毒疫苗是防控寨卡病毒疫情的迫在眉睫的需求。

[0003] 寨卡病毒基因组含一个大的阅读框,编码一个大的多聚蛋白。该多聚蛋白可经信号肽酶、furin蛋白酶等剪切形成10个病毒蛋白,包括三种结构蛋白:衣壳蛋白C、膜蛋白prM/M、包膜蛋白E,以及7种非结构蛋白:NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5。衣壳蛋白C负责与病毒基因组RNA结合形成核心颗粒;prM/M蛋白与E蛋白则锚定与病毒包膜上,介导病毒黏附、入侵宿主细胞等。E蛋白单体或二聚体形成的四级构象含有主要的中和抗体表位。非结构蛋白NS2到NS5可形成蛋白复合物,介导病毒RNA的复制以及多聚蛋白的剪切等。非结构蛋白NS1则至少存在3种形式:位于细胞内的单体、位于细胞膜的二聚体以及分泌至细胞外的六聚体等。细胞内NS1参与病毒基因组复制,而细胞膜及细胞外NS1则被认为参与病毒的免疫逃逸及免疫损伤等。

[0004] 当前正处于临床前或临床试验阶段的寨卡病毒疫苗主要有以下几类:1)灭活寨卡病毒疫苗;2)寨卡病毒减毒活疫苗;3)纯化的E蛋白亚单位疫苗;4)病毒样颗粒(Viral-like-particle,VLP)疫苗;5)DNA载体、RNA载体以及重组病毒载体疫苗等。这些疫苗主要以E蛋白作为靶抗原,试图诱导特异性针对E蛋白的抗体或细胞免疫以达到预防病毒感染的目的。为促进E蛋白翻译后的正确折叠与二聚体组装,研究者常常加入prM/M蛋白一起共表达。尽管有报道显示NS1特异性免疫反应有可能对黄病毒科病毒感染具有保护作用,但当前尚无寨卡病毒候选疫苗以NS1作为主要的抗原靶标。

### 发明内容

[0005] 基于此,本发明的目的在于克服上述现有技术的不足之处而提供一种预防寨卡病毒感染效果更好的疫苗。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案包括:

[0007] 作为本发明的第一个方面,本发明提供一种寨卡病毒疫苗,所述寨卡病毒疫苗含有或者能够表达寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1。由此,所述重组寨卡病毒疫苗包含三种抗原:寨卡病毒膜蛋白prM/M,包膜蛋白E,以及非结构蛋白NS1,相对于仅含E或者含有prM/M和E的疫苗,包含NS1抗原的重组寨卡病毒疫苗可诱导更强的抵抗寨卡

病毒感染的抗体反应以及更为广谱的细胞免疫反应;该疫苗可潜在地应用于预防寨卡病毒感染。

[0008] 优选地,所述疫苗为能够表达寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的基因载体。

[0009] 优选地,所述载体为DNA载体、重组病毒载体或纳米材料载体。更优选地,所述载体为穿梭质粒pGA1。

[0010] 优选地,所述载体包含非结构蛋白NS1的开放阅读框。其中,寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列插入NS1的开放阅读框中。

[0011] 优选地,所述载体包含依次排列的寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列。更优选地,为提升抗原基因的表达水平,所述编码序列依据哺乳动物密码子偏好进行优化。更优选地,所述寨卡病毒prM/M蛋白、E蛋白、NS1蛋白编码基因以融合方式进行表达。

[0012] 在一个实施例中,所述寨卡病毒prM/M蛋白、E蛋白、NS1蛋白编码基因放置于CMV启动子与BGH polyA信号之间组成真核表达框。

[0013] 优选地,所述编码序列的5'端连接有分泌信号肽的核苷酸序列。更优选地,所述分泌信号肽来自日本脑炎病毒。由此,所述分泌信号有利于prM/M、E蛋白表达后分泌至细胞外。

[0014] 优选地,所述包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列之间插入有自剪切肽自剪切序列。由此,所述自剪切肽编码序列在翻译后有助于E蛋白与NS1蛋白断开,形成游离的NS1蛋白。更优选地,所述自剪切肽编码序列为2A自剪切肽编码序列。

[0015] 作为本发明的第二个方面,本发明提供一种寨卡病毒疫苗的制备方法,包括如下步骤:

[0016] (1)通过全基因合成的方法合成依次排列的日本脑炎病毒信号肽的编码序列、膜蛋白prM/M的编码序列、包膜蛋白E的编码序列、2A自剪切序列和非结构蛋白NS1的编码序列的重组序列,其中,寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列依据哺乳动物密码子偏好进行优化;

[0017] (2)通过酶切、连接操作将所述重组序列插入穿梭质粒pGA1,得到重组腺病毒质粒pAd2-prM/E-NS1,即所述的寨卡病毒疫苗。

[0018] 所述疫苗的制备方法还可潜在地应用于预防其他黄病毒科病毒感染的疫苗研制。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了包含NS1抗原的重组寨卡病毒疫苗在预防寨卡病毒感染中的应用。

[0020] 在另一个方面,本发明提供了包含NS1抗原的重组寨卡病毒疫苗制备方法在制备其他黄病毒疫苗中的应用。

[0021] 在本发明中,将NS1蛋白纳入寨卡病毒疫苗,有助于诱导更为强效的免疫反应,从而达到更好的预防效果。因为NS1作为寨卡疫苗抗原靶标具有如下优势:1)寨卡病毒NS1与登革病毒NS1同源性较低,最近有研究显示NS1抗体可作为甄别寨卡病毒与登革病毒感染的诊断方法;2)NS1蛋白不出现在病毒颗粒中,因此抗NS1蛋白的抗体不会引起“抗体依赖的感染增强”(Antibody-dependent-enhancement of infection,ADE)现象;3)NS1具有较强的免疫原性,可诱导抗体及细胞免疫反应,有助于病毒感染靶细胞的快速清除;4)有报道显示

NS1分泌至血清中可提升寨卡病毒的感染性,因此抗NS1免疫反应有助于快速清除血清中NS1从而更好的预防病毒感染与传播。

[0022] 综上所述,本发明的有益效果为:

[0023] (1) 本发明的重组寨卡病毒疫苗包含NS1抗原,比已报道的不含NS1蛋白的寨卡病毒疫苗具有更强的免疫原性;

[0024] (2) 本发明的重组寨卡病毒疫苗包含NS1抗原,比已报道的不含NS1蛋白的寨卡病毒疫苗可以更加有效地预防寨卡病毒感染;

[0025] (3) 本发明的疫苗制备方法还可潜在地应用于制备预防其他黄病毒感染的疫苗。

## 附图说明

[0026] 图1是包含NS1抗原的重组寨卡病毒疫苗的基因结构示意图;

[0027] 图2是包含NS1抗原的重组寨卡病毒疫苗接种至Vero细胞后各主要抗原在培养上清及细胞中的表达情况;

[0028] 图3是重组寨卡病毒疫苗接种小鼠后诱导的特异性结合抗体反应结果;

[0029] 图4是重组寨卡病毒疫苗接种小鼠后诱导的特异性中和抗体反应结果;

[0030] 图5是重组寨卡病毒疫苗接种小鼠后诱导的特异性细胞免疫反应结果;

[0031] 图6是重组寨卡病毒疫苗接种母鼠后,其所产子鼠受寨卡病毒感染后的体重变化情况;

[0032] 图7是重组寨卡病毒疫苗接种母鼠,其所产子鼠受寨卡病毒感染后子鼠的神经系统疾病症状评分;

[0033] 图8是重组寨卡病毒疫苗接种母鼠,其所产子鼠受寨卡病毒感染后子鼠脑组织病毒载量检测结果;

[0034] 图9是重组寨卡病毒疫苗接种母鼠,其所产子鼠受寨卡病毒感染后雄性子鼠睾丸组织病毒载量检测结果。

## 具体实施方式

[0035] 本发明提供了一种新型重组寨卡病毒疫苗,为达到更高效的预防效果,本发明一方面对主要抗原编码基因进行了密码子优化;另一方面在prM/M以及E抗原基础上,融合表达NS1抗原,表达后NS1可经2A自剪切序列释放从而保留天然抗原结构。本发明的新型寨卡病毒疫苗的制备方法和构建思路适用于寨卡病毒感染的预防,也适用于其他黄病毒疫苗的制备。

[0036] 本发明中术语“寨卡病毒”指本领域普通技术人员已知的寨卡病毒,实施例中所用的寨卡病毒抗原蛋白即来源于这些已知的寨卡病毒。本发明所述寨卡病毒疫苗不局限于实施例所采用的特定临床分离株。

[0037] 本发明中术语“基因载体”是指可携带特定蛋白编码序列进入靶细胞的任何载体。本领域普通技术人员应当理解,基因载体可以是但不限于DNA载体、重组病毒载体、纳米材料载体等。

[0038] 本发明中术语“序列优化”是指根据特定物种基因组密码子偏好性,对寨卡病毒天然基因进行改造但不改变其编码的蛋白序列。本领域普通技术人员应当理解,序列优化可

以是但不限于依据哺乳动物基因组密码子偏好性。

[0039] 在以下实施例中,根据本领域技术人员的理解,所述prM/M蛋白、E蛋白、NS1蛋白可以删除或者改造部分或少量片段但不影响其免疫原性。这些无实质性提升的改造均包含于本发明的限制范围。

[0040] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容,特举以下实施例结合附图详细说明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0041] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。

[0042] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。

[0043] 实施例1寨卡病毒疫苗及其制备方法

[0044] 本发明的寨卡病毒疫苗的一种实施例,所述寨卡病毒疫苗为能够表达寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的基因载体,其中,载体为穿梭质粒pGA1;载体包含依次排列的日本脑炎病毒信号肽的编码序列、膜蛋白prM/M的编码序列、包膜蛋白E的编码序列、2A自剪切序列和非结构蛋白NS1的编码序列的重组序列,所述重组序列插入非结构蛋白NS1的开放阅读框中,所述膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列依据哺乳动物密码子偏好进行优化。

[0045] 上述寨卡病毒疫苗的制备方法,包括如下步骤:

[0046] (1)通过全基因合成的方法合成依次排列的日本脑炎病毒信号肽的编码序列、膜蛋白prM/M的编码序列、包膜蛋白E的编码序列、2A自剪切序列和非结构蛋白NS1的编码序列的重组序列,其中,寨卡病毒的膜蛋白prM/M、包膜蛋白E和非结构蛋白NS1的编码序列依据哺乳动物密码子偏好进行优化;

[0047] (2)通过酶切、连接操作将所述重组序列插入穿梭质粒pGA1,通过同源重组得到重组腺病毒质粒pAd2-prM/E-NS1(如图1所示),即所述的寨卡病毒疫苗。

[0048] 实施例2构建携带寨卡病毒主要抗原编码序列的重组腺病毒载体

[0049] 1.重组腺病毒载体质粒构建。

[0050] 寨卡病毒E蛋白、prM/M蛋白、NS1蛋白序列来自于寨卡病毒分离株1\_0080\_PF(GenBank No:AN046313.1)。这些蛋白的编码基因序列依据哺乳动物细胞密码子进行优化后通过全基因合成获得(金斯瑞,中国)。融合基因序列Ad2-prM/E-NS1构成为(5'末端到3'末端):JEV(日本脑炎病毒)信号肽,prM/M,E,2A自剪切序列,NS1;Ad2-prM/E-NS1序列的图谱如图1所示,融合后的prM/E-NS1的碱基序列如SEQ ID NO.1所示,对应的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0051] 为对比包含NS1抗原的重组寨卡病毒的有益效果,本实施例还同时构建了仅携带E抗原,以及携带prM/M和E抗原的重组腺病毒载体(分别命名为Ad2-E,Ad2-prM/E)。三种不同的融合基因分别经过酶切-连接操作插入至穿梭质粒pGA1得到pGA1-E、pGA1-prM/E、及

pGA1-prM/E-NS1。然后,pGA1-E、pGA1-prM/E、pGA1-prM/E-NS1分别以BstZ17I+SgrAI (New England Biolabs,美国)双酶切线性化,与SnaBI线性化的pAd2  $\Delta$  E1  $\Delta$  E3分别在大肠杆菌BJ5183中进行同源重组,得到pAd2-E、pAd2-prM/E、pAd2-prM/E-NS1(如图1所示),其中,SP代表信号肽。

[0052] 2. 重组腺病毒载体的生产纯化。

[0053] 纯化步骤为:pAd2-E、pAd2-prM/E、pAd2-prM/E-NS1分别以PacI线性化后,使用乙醇沉淀法回收。以Lipofectamine2000 (Invitrogen,美国)转染293细胞,转染8h后,将培养基更换为含5%FBS的DMEM培养基进行培养,培养第7天开始每天注意观察细胞是否发生了病变;当发现细胞明显病变后,收集细胞及培养上清,在液氮罐和37℃水浴锅中进行反复冻融3次,离心去除细胞碎片,取适量上清感染10cm细胞培养皿中的293细胞;感染2-3天观察到出毒现象后,收集细胞和上清,反复冻融3次后,离心去除细胞碎片收集上清。取上清去感染8-10个15cm细胞培养皿中的293细胞进行扩大培养,感染2-3天观察到出毒现象后,收集细胞和上清,反复冻融3次后,离心去除细胞碎片收集上清。将上清加入到氯化铯梯度离心管中,配平后,4℃,30000rpm离心4h;离心后小心吸出病毒条带,脱盐,分装;取适量病毒进行病毒定量,测定OD260浓度,病毒浓度=OD260×稀释倍数×36/基因组长度(Kb);纯化获得的病毒于-80℃储存。

[0054] 实施例3重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗的抗原表达鉴定

[0055] Vero细胞以Ad2-E,Ad2-prM/E,Ad2-prM/E-NS1以及Ad2-empty空载体对照分别感染,感染剂量为每个细胞100病毒颗粒(viral particles, vp)。感染后48小时,收取感染细胞及培养上清。以Western-blot检测抗原蛋白的表达情况。蛋白样品以SDS-PAGE凝胶电泳后,转移至PVDF膜,以含5%脱脂奶粉的PBST室温封闭1小时,然后以抗寨卡病毒E蛋白抗体或者抗寨卡病毒NS1蛋白抗体室温孵育1小时。然后,以辣根过氧化物酶标记的山羊抗人二抗进行孵育。最后以辣根过氧化物酶底物进行显色。

[0056] 实验结果:如图2所示,Ad2-E、Ad2-prM/E、Ad2-prM/E-NS1感染细胞均有效表达E蛋白。有趣的是,Ad2-prM/E、Ad2-prM/E-NS1感染细胞表达的E蛋白有相当部分形成2聚体,显示prM/M蛋白对E蛋白的翻译后折叠及修饰至关重要。仅Ad2-prM/E-NS1感染细胞可表达NS1蛋白。在感染细胞及培养上清中均可检测到寨卡病毒抗原,显示这些抗原蛋白可有效分泌至细胞外。

[0057] 实施例4重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗免疫小鼠诱导较强的结合抗体反应

[0058] 为检测重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗的免疫原性,以Ad2-E、Ad2-prM/E、Ad2-prM/E-NS1、Ad2-empty分别免疫六周龄雌性Ba1b/C小鼠,免疫方式为肌肉注射,免疫剂量为 $1 \times 10^{10}$  vp/每小鼠。初次免疫后3周,以相同接种方式及接种剂量加强免疫一次。加强免疫后3周或12周,小鼠眼眶采血,分离血清。

[0059] 以ELISA技术检测小鼠血清结合抗体的滴度。具体为:96孔ELISA板以E蛋白或者NS1蛋白进行包被(1 $\mu$ g/ml)。以含5%脱脂奶粉的PBST室温封闭1小时后,以PBST洗板至少3次。小鼠免疫血清4倍梯度稀释后加入到ELISA板中,37℃孵育2小时。洗板后,以辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗室温孵育1小时。最后,各实验孔以辣根过氧化物酶底物进行显色,并以1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色后测定OD450值。

[0060] 实验结果:如图3所示,加强免疫后3周,Ad2-prM/E诱导了最强的E蛋白特异性结合

抗体。Ad2-prM/E-NS1诱导的E蛋白抗体滴度稍低,而Ad2-E则诱导最低水平的E蛋白抗体。仅Ad2-prM/E-NS1可诱导NS1蛋白特异性结合抗体。加强免疫后12周,各实验组小鼠产生抗体的趋势类似,但抗体滴度总体低于3周的结果。该结果显示,Ad2-E、Ad2-prM/E、Ad2-prM/E-NS1均诱导E蛋白抗体,而Ad2-prM/E-NS1还可诱导NS1蛋白抗体。

[0061] 实施例5重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗免疫小鼠诱导较强的中和抗体反应

[0062] 为检测重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗免疫后诱导的中和抗体反应,各组小鼠的免疫血清稀释后,与 $4 \times 10^4$ PFU的寨卡病毒共孵育。37℃孵育1小时后,感染至96孔板细胞培养中( $2 \times 10^4$ 细胞/孔)。感染后2天,细胞以细胞固定/破膜液进行固定和破膜,并以抗寨卡病毒单克隆抗体进行孵育(克隆号:4G2)。细胞洗涤以后,以PE标记的二抗进行染色,然后以流式细胞仪分析感染细胞数。中和滴度为能够将细胞感染率降低50%的血清稀释度。

[0063] 实验结果:如图4所示,Ad2-prM/E-NS1免疫小鼠产生了最强的中和抗体反应;Ad2-prM/E免疫小鼠的中和抗体滴度则弱于Ad2-prM/E-NS1免疫小鼠;而Ad2-E免疫小鼠诱导的中和抗体反应最弱。这些结果显示NS1抗原的纳入可进一步提升疫苗诱导中和抗体反应的能力。

[0064] 实施例6重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗免疫小鼠诱导显著的特异性细胞免疫反应

[0065] 为检测重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗免疫后诱导的细胞反应,各免疫组小鼠在加强免疫后第3周进行处死,解剖后取出脾脏,以研磨法分离单个脾脏细胞,然后以小鼠淋巴细胞分离液离心分离脾脏淋巴细胞。以酶联免疫斑点实验(ELISpot)检测寨卡病毒特异性淋巴细胞的比率。PVDF膜96孔板经乙醇活化处理后,以抗IFN- $\gamma$ 的抗体进行包被。以R10培养基封闭后,加入脾脏淋巴细胞( $3 \times 10^5$ 细胞/孔)。然后加入E蛋白或者NS1蛋白的多肽(15氨基酸/条,重叠10氨基酸,终浓度2ug/ml)。刺激24小时后,弃去细胞及培养液。洗涤后以生物素标记的抗IFN- $\gamma$ 抗体进行孵育,进而加入辣根过氧化物酶标记的链亲和素,然后以NBT/BCIP试剂进行显色。每个分泌IFN- $\gamma$ 的细胞即会形成一个斑点。

[0066] 实验结果:如图5所示,Ad2-E、Ad2-prM/E、Ad2-prM/E-NS1三种疫苗诱导相当的特异性针对E蛋白的细胞免疫反应,而仅有Ad2-prM/E-NS1可诱导特异性针对NS1的细胞免疫反应。因此,Ad2-prM/E-NS1诱导的细胞免疫反应更具有广谱性。

[0067] 实施例7重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗免疫可使子鼠生长发育免受寨卡病毒感染的影响

[0068] 为评估重组腺病毒载体寨卡病毒疫苗的免疫保护效果,以Ad2-E、Ad2-prM/E、Ad2-prM/E-NS1三种疫苗以及空腺病毒载体分别免疫雌鼠。加强免疫后第3周或者第12周,免疫雌鼠与雄鼠进行交配。交配后3周,初生子鼠以寨卡病毒进行攻毒(腹腔, $1 \times 10^3$ PFU/只)。攻毒后每天检测子鼠的体重变化。

[0069] 实验结果:如图6所示,母鼠免疫Ad2-prM/E-NS1后所生子鼠的体重增长情况类似于健康子鼠对照(未攻毒),而母鼠免疫Ad2-prM/E或Ad2-E后所生子鼠在寨卡病毒感染后其体重增长速度显著变慢,显示Ad2-prM/E-NS1诱导的母体免疫反应可以保护初生子鼠的发育免受寨卡病毒感染的影响。免疫后12周交配产生的子鼠,其攻毒结果与免疫后3周交配产生的子鼠类似。这些结果显示,相对于Ad2-E和Ad2-prM/E,Ad2-prM/E-NS1可在母体中诱导更加有效的保护性免疫反应。

[0070] 实施例8接受疫苗免疫的母鼠所生子鼠可有效抵抗寨卡病毒引起的神经系统疾病



[0071] 进一步,本实施例评估了子鼠受寨卡病毒感染后导致的神经系统疾病的严重程度。评分表设计如下所述。前后肢:无症状,0分;无力或步履改变,1分;部分瘫痪,2分;完全瘫痪,3分。尾巴:无症状,0分;半瘫痪,1分;完全瘫痪,2分。小鼠如死亡,则记为15分。

[0072] 结果如图7所示,对于免疫后第3周交配产生的子鼠,Ad2-prM/E-NS1免疫可完全阻止神经症状的发生,Ad2-prM/E免疫可在大多数小鼠中阻止神经症状的发生,而Ad2-E免疫则仅能减轻症状但不能完全抑制症状的产生。免疫后第12周交配产生的子鼠,Ad2-prM/E-NS1免疫可显著减轻神经症状,甚至在部分小鼠中完全抑制神经症状;Ad2-prM/E仅能减轻神经症状;而Ad2-E免疫则对神经症状无显著抑制作用。这些结果说明,Ad2-prM/E-NS1免疫可更加有效地控制寨卡病毒感染后神经症状的产生及其严重程度。

[0073] 实施例9接受疫苗免疫的母鼠所生子鼠可有效抵抗寨卡病毒在脑部及睾丸的感染复制

[0074] 进一步,本实施例评估了各组子鼠受寨卡病毒感染后脑部和睾丸的病毒载量。感染后18天,各组子鼠安乐死,解剖分离脑以及睾丸。组织匀浆处理后,提取组织内总RNA。利用寨卡病毒特异性引物进行RT-PCR,评估寨卡病毒基因组拷贝数。

[0075] 实验结果:如图8所示,对于免疫后第3周交配产生的子鼠,Ad2-prM/E-NS1免疫可完全抑制寨卡病毒在脑部的感染;Ad2-prM/E免疫可有效降低脑组织病毒载量,但不能完全抑制感染;Ad2-E免疫则未能降低脑组织病毒载量。对于免疫后第12周交配产生的子鼠,Ad2-prM/E-NS1免疫可有效抑制寨卡病毒在脑部的增殖;Ad2-prM/E免疫也可有效降低脑组织病毒载量,但效果较Ad2-prM/E-NS1稍差;Ad2-E免疫则仍未能降低脑组织病毒载量。

[0076] 对于睾丸病毒载量,如图9所示,Ad2-prM/E-NS1免疫可完全抑制寨卡病毒在睾丸的感染;Ad2-prM/E免疫亦可有效降低睾丸病毒载量,但仅在部分子鼠完全抑制感染;Ad2-E免疫也可在免疫后3周交配产生的子鼠中降低睾丸病毒载量,但效果较Ad2-prM/E明显要差。这些结果显示,Ad2-prM/E-NS1免疫最为有效地抑制寨卡病毒对子鼠脑组织及睾丸的感染。

[0077] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 广州恩宝生物医药科技有限公司

&lt;120&gt; 一种寨卡病毒疫苗及其制备方法

&lt;130&gt; 2017

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3246

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

```

atgggcagga agcagaacaa gaggggcggc aatgagggt ccatcatgtg gctggcctcc 60
ctggctgtgg tgattgcctg tgetggcget gctgaagtga ccaggagggg ctctgcctat 120
tatatgtacc tggacaggaa tgatgetgge gaggccatct ccttccccac caccctgggc 180
atgaacaagt gctacatcca gatcatggac ctgggccaca tgtgtgatgc caccatgtcc 240
tatgagtgcc ccatgctgga tgagggcgtg gagcctgatg atgtggactg ctggtgcaac 300
accacctcca cctgggtggt ctatggcacc tgccatcaca agaagggcga ggccaggagg 360
tccaggaggg ctgtgaccct gccatccccac tctacaagga agctgcagac acgtctcag 420
acctggctgg agtccaggga gtacaccaag catctgatca ggggtggagaa ctggatcttt 480
aggaaccctg gctttgccct ggctgetget gccattgcct ggctgetggg ctctccacc 540
tccaaaaaag tgatctacct ggtgatgatc ctgetgattg cccctgccta ctccaagctt 600
atcaggtgca ttggcgtctc caacaggac tttgtggagg gcatgtctgg cggcacctgg 660
gtggatgtgg tgctggagca tggcggctgt gtacagtga tggcccagga caagcccaca 720
gtggatattg agctggtgac aactacagtc tctaactagg ctgaagtgag gtcttattgc 780
tatgaggcct ccatctctga catggcctct gactccagat gccccacca gggcgaggcc 840
tacctggaca agcagtctga tacacaatat gtctgcaaga ggaccctggt ggacaggggc 900
tggggcaatg gctgtggcct gtttggcaag ggctccctgg tgacctgtgc caagtttgcc 960
tgctccaaaa agatgacagc caagtccatc cagcctgaga acctggagta caggatcatg 1020
ctgtctgtgc atggctccca gactctggc atgattgtga atgacacagg ccatgagacc 1080
gatgagaaca gggccaaggt ggagatcacc cccaactccc ctgggctga ggccaccctg 1140
ggcggctttg gctccctggg cctggactgt gageccagga caggcctgga cttctctgac 1200
ctgtactacc tgaccatgaa caacaagcac tggtggtgc acaaggagtg gttccatgac 1260
atccccctgc catggcatgc tggcgetgac acaggcacc cccactggaa caacaaggag 1320
gccctggtgg agttcaagga tgcccatgce aagaggcaga cagtgggtgg gctgggctct 1380
caagagggcg ctgtgcacac agccctgget ggcgcctgg aggctgagat ggatggcgcc 1440
aagggcagge tgcctctgg ccatctgaag tgcaggetga agatggaaa gctgaggctg 1500
aagggcgtct cctactccct gtgcaccget gccttacct tcacaaaat cctgctgag 1560
accctgcatg gcacagtgac agtggaggtg cagtatgctg gcacagatgg cccatgcaaa 1620

```

gtgcctgccc agatggctgt ggacatgcag accctgacce ctgtgggcag gctgatcaca 1680  
 gccaaccttg tgatcaccga gtccacagag aactccaaga tgatgctgga gctggacccc 1740  
 ccatttggcg actcctacat tgtgattggc gtgggcgaga agaagatcac ccatcactgg 1800  
 caccgctctg gctccacat tggcaaggcc tttgaggcta cagtgagggg cgccaagagg 1860  
 atggctgtgc tgggcgacac agcctgggac tttggctctg tgggcggcgc cctgaactcc 1920  
 ctgggcaagg gcatccatca gatctttggc gctgcettca agtccctgtt tggcgcatg 1980  
 tcctggttct cccaaatcct gattggcacc ctgctgatgt ggctgggcct gaacaccaag 2040  
 aatggctcca tctccctgat gtgcctggcc ctgggcggcg tgctgatctt cctgtccaca 2100  
 gctgtctctg ccggatccgg cgccaccaac ttctccctgc tgaagcaggc tggcgatgtg 2160  
 gaggagaacc ctggccctct cgaggtgggc tgctctgtgg acttctccaa gaaggagacc 2220  
 cgctgtggca caggcgtctt tgtctacaat gatgtggagg cttggaggga taggtataag 2280  
 taccatcctg actctcctcg gaggetgget gctgctgtga agcaggcctg ggaggatggc 2340  
 atctgtggca tctcctctgt ctctcggatg gagaacatca tgtggcgctc tgtggagggc 2400  
 gagctgaatg ccatcctgga ggagaatggc gtgcagctga cagtggttgt gggctctgtg 2460  
 aagaacccca tgtggagggg cccccagagg ctgcctgtgc ctgtgaatga gctgccccat 2520  
 ggctggaagg cctggggcaa gtccacttt gtgagggctg ccaagaccaa caactccttt 2580  
 gtgggtgatg gcgacaccct gaaggagtgc ccctgaagc acagggcctg gaactccttc 2640  
 ctgggtgagg accatggctt tggcgtcttc cacacctctg tctggctgaa agtgagggag 2700  
 gactactccc tggagtgtga ccctgctgtg attggcacag ctgtgaaggg caaggaggct 2760  
 gtgcactctg acctgggcta ctggatcgag tctgagaaga atgacacctg gaggctgaag 2820  
 agggcccatc tgattgagat gaagacctgc gactggccca agtcccacac cctgtggaca 2880  
 gatggcattg aggagtctga cctgatcatc cccaagtecc tggctggccc cctgtcccat 2940  
 cacaacacca gggaggggcta caggaccag atgaagggcc catggcactc tgaggagctg 3000  
 gagatccgct ttgaggagtg tcctggcaca aaggtgcatg tggaggagac ctgtggcacc 3060  
 aggggcccac ccctgaggtc caccacagcc tctggacgcg tgattgagga gtgggtctgc 3120  
 agggagtgca ccatgcctcc cctgtccttt cgggctaagg atggctgttg gtatggcatg 3180  
 gagatcaggc ccaggaagga gctgagtcc aacctggtga ggtccatggt gacagctggc 3240  
 tcctaa 3246

<210> 2

<211> 1081

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Met	Gly	Arg	Lys	Gln	Asn	Lys	Arg	Gly	Gly	Asn	Glu	Gly	Ser	Ile	Met
1				5					10					15	
Trp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Ala	Glu
				20					25					30	
Val	Thr	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Leu	Asp	Arg	Asn	Asp
				35					40					45	

Ala Gly Glu Ala Ile Ser Phe Pro Thr Thr Leu Gly Met Asn Lys Cys			
50	55	60	
Tyr Ile Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys Asp Ala Thr Met Ser			
65	70	75	80
Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val Glu Pro Asp Asp Val Asp			
	85	90	95
Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val Val Tyr Gly Thr Cys His			
	100	105	110
His Lys Lys Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg Arg Ala Val Thr Leu Pro			
	115	120	125
Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg Ser Gln Thr Trp Leu Glu			
	130	135	140
Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Arg Val Glu Asn Trp Ile Phe			
145	150	155	160
Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ile Ala Trp Leu Leu			
	165	170	175
Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr Leu Val Met Ile Leu Leu			
	180	185	190
Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Lys Leu Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn			
	195	200	205
Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val			
	210	215	220
Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr			
225	230	235	240
Val Asp Ile Glu Leu Val Thr Thr Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val			
	245	250	255
Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser			
	260	265	270
Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr			
	275	280	285
Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly			
	290	295	300
Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Ala			
305	310	315	320
Cys Ser Lys Lys Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu			
	325	330	335
Tyr Arg Ile Met Leu Ser Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile			
	340	345	350
Val Asn Asp Thr Gly His Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu			

355	360	365
Ile Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly		
370	375	380
Ser Leu Gly Leu Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp		
385	390	395
Leu Tyr Tyr Leu Thr Met Asn Asn Lys His Trp Leu Val His Lys Glu		
405	410	415
Trp Phe His Asp Ile Pro Leu Pro Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly		
420	425	430
Thr Pro His Trp Asn Asn Lys Glu Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala		
435	440	445
His Ala Lys Arg Gln Thr Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala		
450	455	460
Val His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ala Glu Met Asp Gly Ala		
465	470	475
Lys Gly Arg Leu Ser Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp		
485	490	495
Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe		
500	505	510
Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val		
515	520	525
Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln		
530	535	540
Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr		
545	550	555
Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu		
565	570	575
Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly		
580	585	590
Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly		
595	600	605
Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Val Leu		
610	615	620
Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Ala Leu Asn Ser		
625	630	635
Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala Phe Lys Ser Leu		
645	650	655
Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile Gly Thr Leu Leu		
660	665	670

Met Trp Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile Ser Leu Met Cys  
 675 680 685  
 Leu Ala Leu Gly Gly Val Leu Ile Phe Leu Ser Thr Ala Val Ser Ala  
 690 695 700  
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val  
 705 710 715 720  
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro Leu Glu Val Gly Cys Ser Val Asp Phe Ser  
 725 730 735  
 Lys Lys Glu Thr Arg Cys Gly Thr Gly Val Phe Val Tyr Asn Asp Val  
 740 745 750  
 Glu Ala Trp Arg Asp Arg Tyr Lys Tyr His Pro Asp Ser Pro Arg Arg  
 755 760 765  
 Leu Ala Ala Ala Val Lys Gln Ala Trp Glu Asp Gly Ile Cys Gly Ile  
 770 775 780  
 Ser Ser Val Ser Arg Met Glu Asn Ile Met Trp Arg Ser Val Glu Gly  
 785 790 795 800  
 Glu Leu Asn Ala Ile Leu Glu Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val  
 805 810 815  
 Val Gly Ser Val Lys Asn Pro Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro  
 820 825 830  
 Val Pro Val Asn Glu Leu Pro His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser  
 835 840 845  
 Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp Gly  
 850 855 860  
 Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro Leu Lys His Arg Ala Trp Asn Ser Phe  
 865 870 875 880  
 Leu Val Glu Asp His Gly Phe Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp Leu  
 885 890 895  
 Lys Val Arg Glu Asp Tyr Ser Leu Glu Cys Asp Pro Ala Val Ile Gly  
 900 905 910  
 Thr Ala Val Lys Gly Lys Glu Ala Val His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp  
 915 920 925  
 Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp Thr Trp Arg Leu Lys Arg Ala His Leu  
 930 935 940  
 Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Thr  
 945 950 955 960  
 Asp Gly Ile Glu Glu Ser Asp Leu Ile Ile Pro Lys Ser Leu Ala Gly  
 965 970 975  
 Pro Leu Ser His His Asn Thr Arg Glu Gly Tyr Arg Thr Gln Met Lys

980	985	990
Gly Pro Trp His Ser Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Glu Glu Cys Pro		
995	1000	1005
Gly Thr Lys Val His Val Glu Glu Thr Cys Gly Thr Arg Gly Pro		
1010	1015	1020
Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala Ser Gly Arg Val Ile Glu Glu Trp		
1025	1030	1035
Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro Pro Leu Ser Phe Arg Ala Lys		
1040	1045	1050
Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg Pro Arg Lys Glu Pro		
1055	1060	1065
Glu Ser Asn Leu Val Arg Ser Met Val Thr Ala Gly Ser		
1070	1075	1080

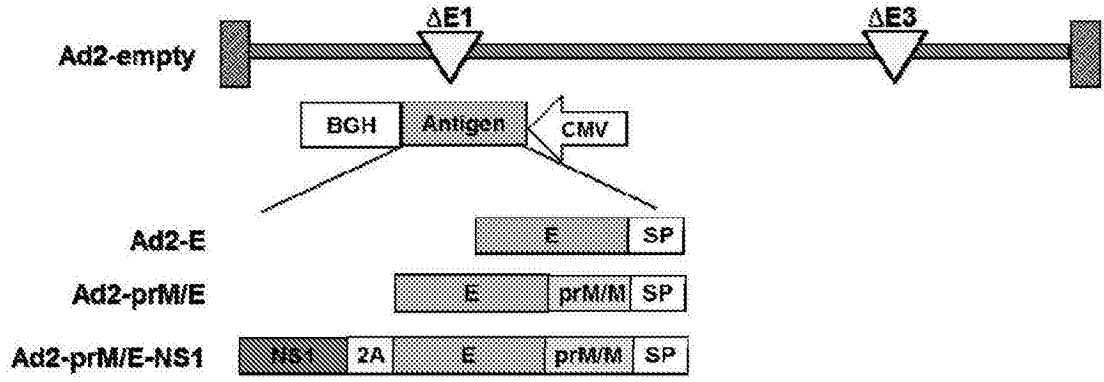
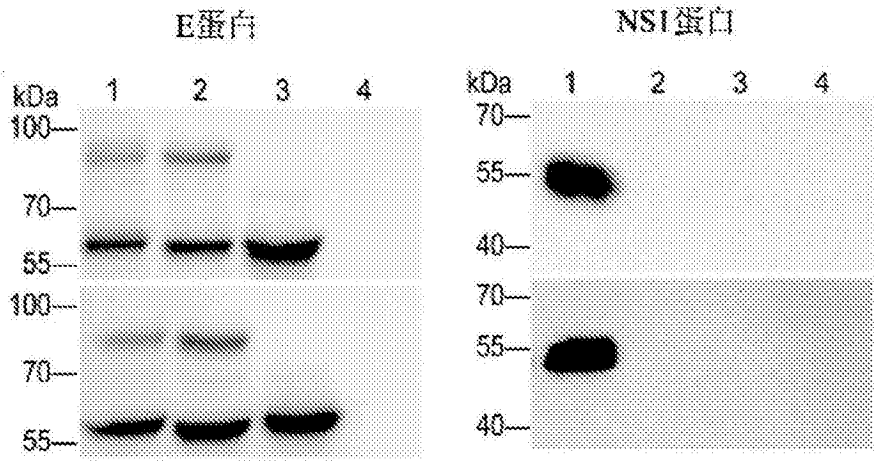


图1



- 1: Ad2-prME-NS1
- 2: Ad2-prME
- 3: Ad2-E
- 4: Ad2-emptyp

图2



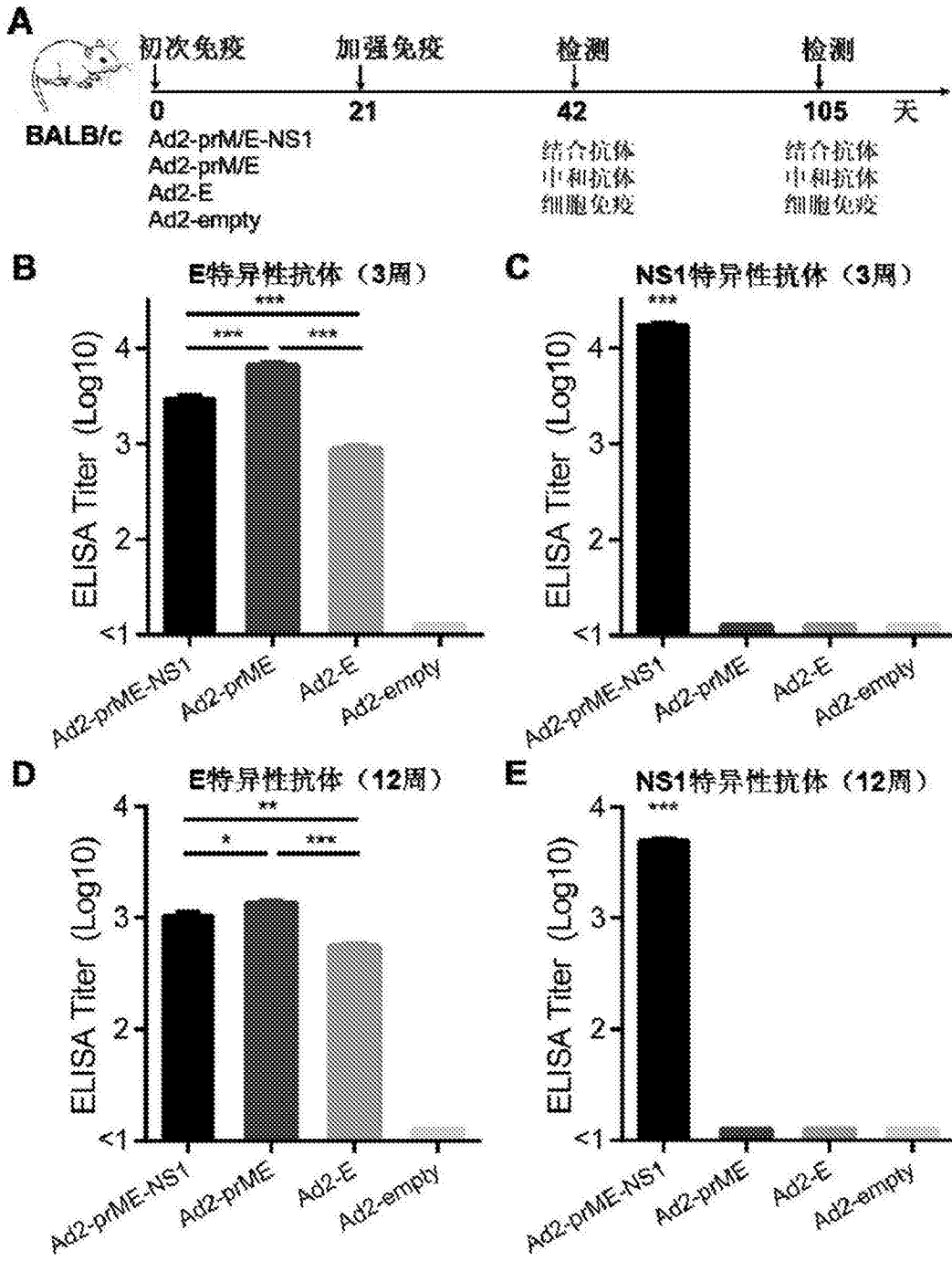


图3

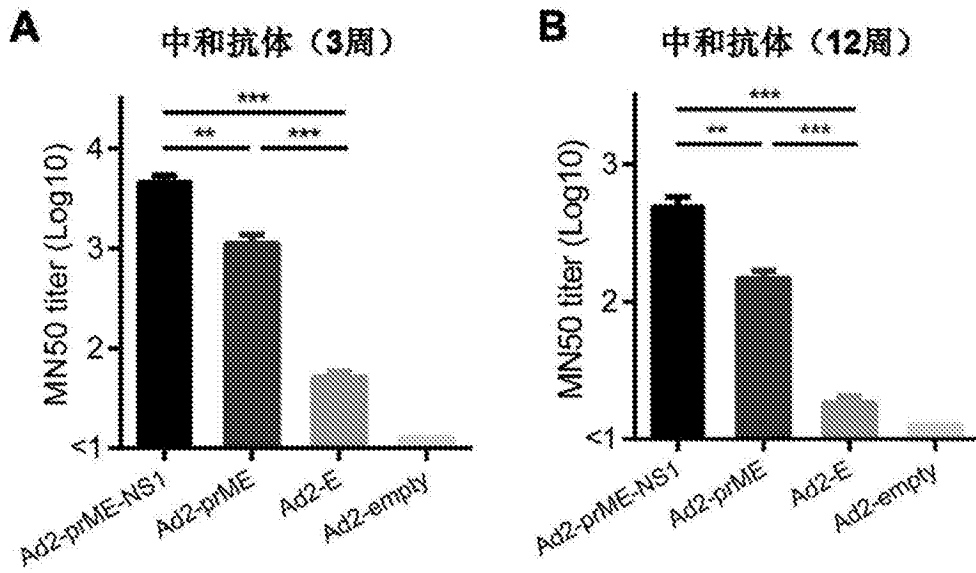


图4

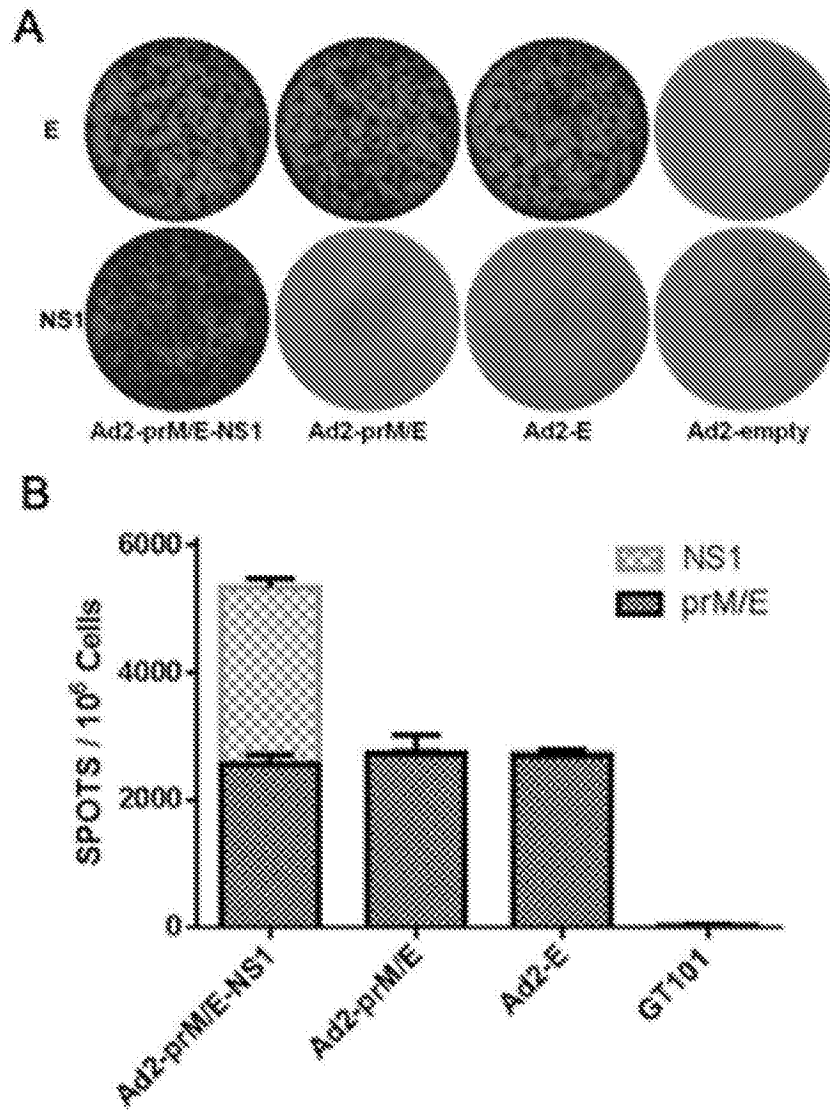


图5

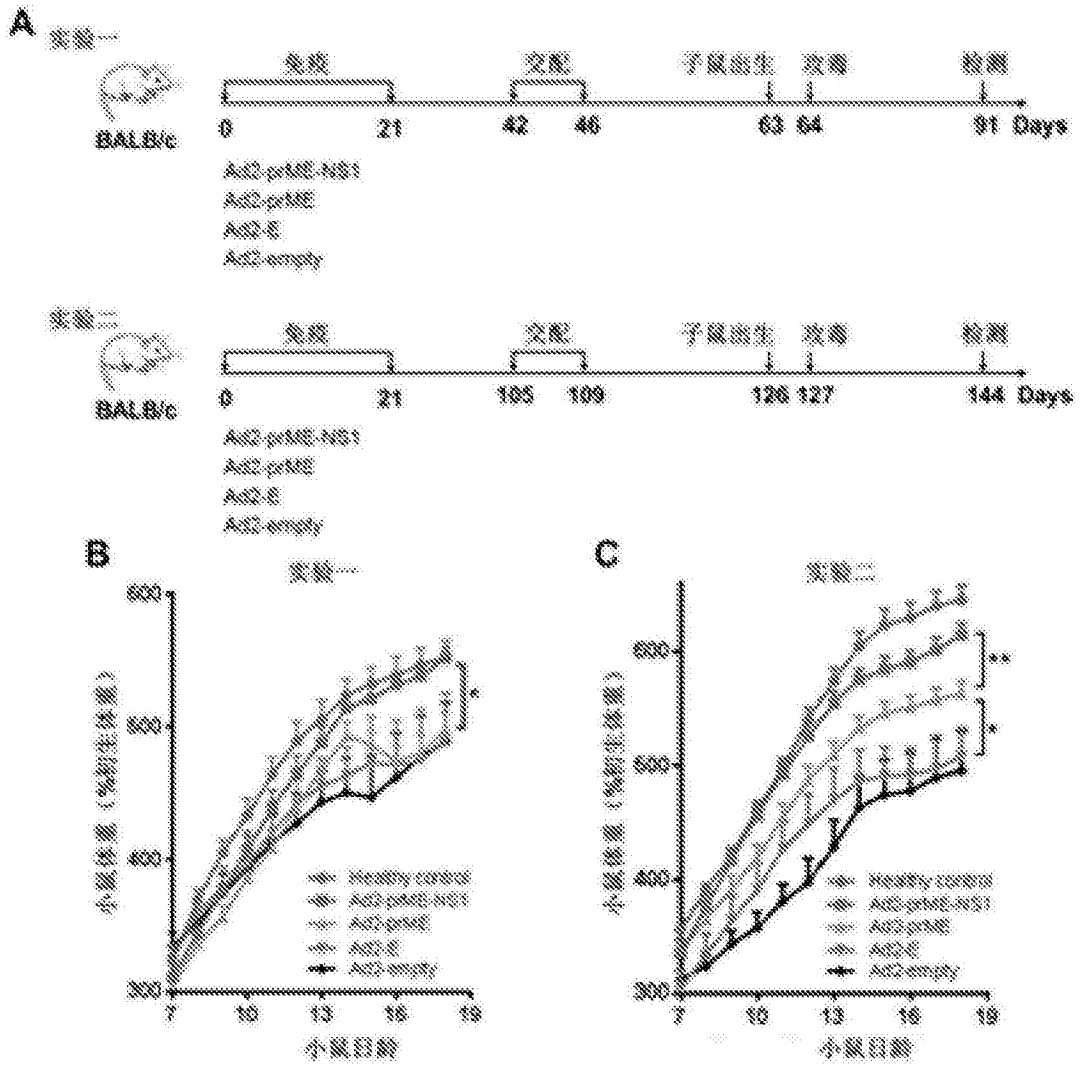


图6

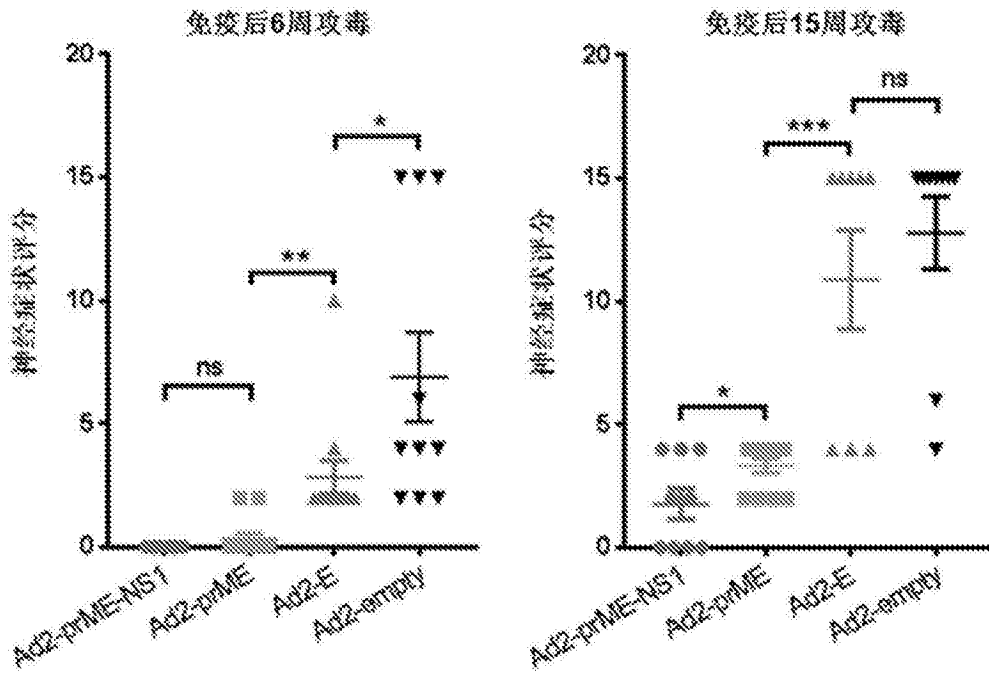


图7

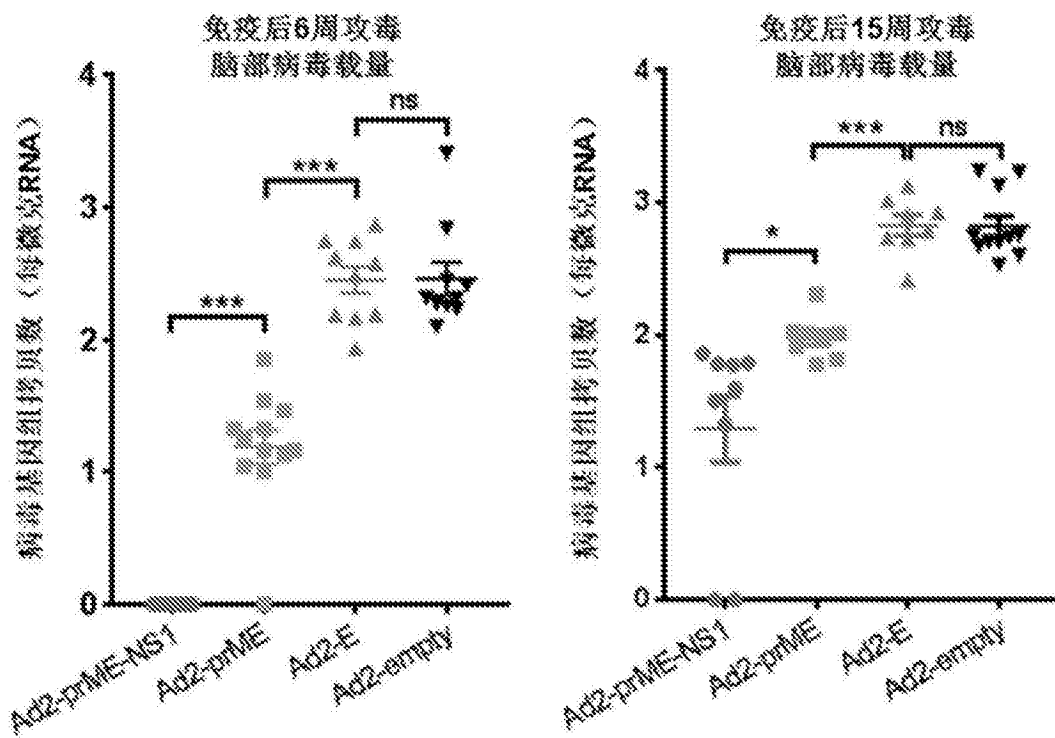


图8

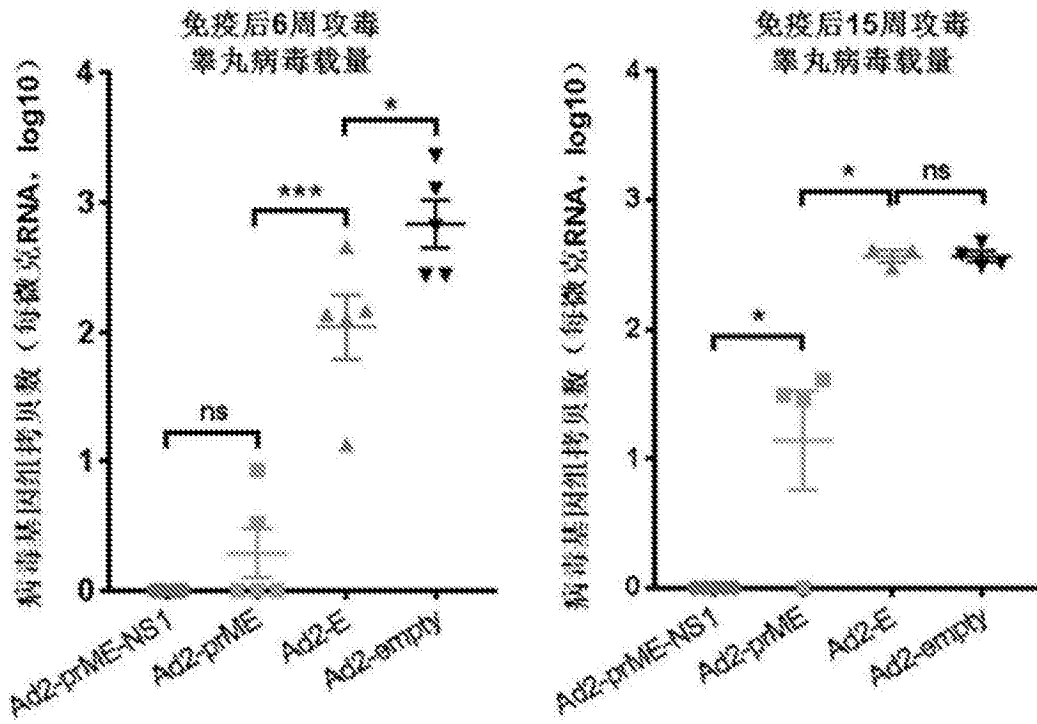


图9