



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109152826 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 04

(21) 申请号 201780017976.1
 (22) 申请日 2017.02.24
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109152826 A
 (43) 申请公布日 2019.01.04
 (30) 优先权数据
 62/300,030 2016.02.25 US
 62/305,183 2016.03.08 US
 62/396,742 2016.09.19 US
 62/417,100 2016.11.03 US
 62/462,249 2017.02.22 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.09.17
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2017/019407 2017.02.24
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/147458 EN 2017.08.31
 (73) 专利权人 宾夕法尼亚大学理事会
 地址 美国宾夕法尼亚州
 专利权人 威斯塔解剖学和生物学研究所

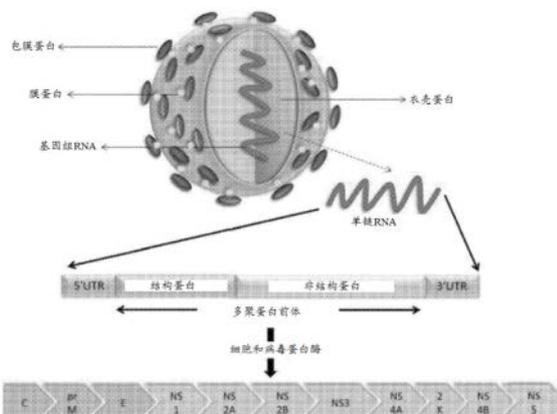
(72) 发明人 卡鲁皮亚·穆苏马尼 大卫·韦纳
 (74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240
 专利代理师 沈敬亭 陈知宇
 (51) Int.Cl.
 A61K 39/12 (2006.01)
 A61P 31/14 (2006.01)
 C07K 14/18 (2006.01)
 C12N 15/40 (2006.01)
 C12N 15/62 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CA 2341354 A1,2000.03.16
 CN 102821790 A,2012.12.12
 Rodolphe Hamel等.Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells.《Journal of Virology》.2015,第89卷(第17期),第8880-8896页.
 审查员 高又文
 权利要求书1页 说明书42页
 序列表23页 附图46页

(54) 发明名称

新抗寨卡病毒疫苗

(57) 摘要

本发明的一方面涉及能够表达寨卡抗原的核酸构建体,及其使用方法,所述寨卡抗原引发哺乳动物中的针对寨卡病毒的免疫应答。另外,存在能够在哺乳动物中产生针对寨卡病毒的免疫应答的DNA质粒疫苗,及其使用方法,所述疫苗包含DNA质粒和药学上可接受的赋形剂。所述DNA质粒能够在所述哺乳动物的细胞中以一定量表达寨卡抗原,所述寨卡抗原的量有效地在所述哺乳动物中引发与所有寨卡株发生交叉反应的免疫应答。



1. 一种分离的核酸分子,其中所述核酸分子编码共有寨卡抗原,所述共有寨卡抗原的氨基酸选自由以下组成的组:

SEQ ID NO:3;和

SEQ ID NO:3的缺少IgE前导序列SEQ ID NO:12的片段。

2. 根据权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所述共有寨卡抗原的氨基酸是SEQ ID NO:3。

3. 根据权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:2的缺少编码IgE前导序列SEQ ID NO:12的片段。

4. 根据权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所述分离的核酸分子是质粒。

5. 一种包含核酸分子的组合物,其中所述核酸分子编码共有寨卡抗原,所述共有寨卡抗原的氨基酸选自由以下组成的组:

SEQ ID NO:3;和

SEQ ID NO:3的缺少IgE前导序列SEQ ID NO:12的片段。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述共有寨卡抗原的氨基酸是SEQ ID NO:3。

7. 根据权利要求5所述的组合物,其被配制用于使用电穿孔递送至个体。

8. 根据权利要求5所述的组合物,还包含编码一个或多个选自由以下组成的组的蛋白质的核酸序列:IL-12、IL-15和IL-28。

9. 权利要求5所述的组合物在制备用于诱导针对寨卡病毒的免疫应答的药物中的应用。

10. 权利要求5所述的组合物在制备用于预防寨卡病毒感染的药物中的应用。

新抗寨卡病毒疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请享有2016年2月25日提交的美国临时申请No. 62/300,030、2016年3月8日提交的美国临时申请No. 62/305,183、2016年9月19日提交的美国临时申请No. 62/396,742、2016年11月3日提交的美国临时申请No. 62/417,100和2017年2月22日提交的美国临时申请No. 62/462,249的优先权,每个临时申请以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及寨卡(Zika)疫苗,用于诱导免疫应答,以及用于对个体进行预防性和/或治疗性抗寨卡病毒免疫的改进方法。

背景技术

[0004] 寨卡病毒(ZIKAV)是一种小型带包膜的正义链RNA病毒,属于黄病毒科(Flaviviridae)的黄病毒(Flavivirus)属。已知该病毒通过白天活跃的伊蚊(Aedes),诸如埃及伊蚊(A. aegypti)和白纹伊蚊(A. albopictus)传播。其名字来自1947年首次分离该病毒的地点乌干达的寨卡森林(Zika Forest)。

[0005] 其感染称为寨卡热,通常不会引起或只会引起轻度症状,该症状类似于登革热的轻度形式。自从20世纪50年代以来,人们就知道它在从非洲到亚洲的狭窄赤道带内发生。该病毒在2013年和2014年期间向东跨过太平洋传播到法属波利尼西亚、新喀里多尼亚、库克群岛和复活节岛,并且在2015年传播到墨西哥、中美洲、加勒比海和南美洲,这些地方寨卡病毒的爆发已达到流行水平。截至2016年,该疾病仍不能通过药物或疫苗来预防。截至2016年2月,有证据表明孕妇的寨卡热可通过母婴传播导致胎儿的大脑发育异常,从而可导致流产或小头畸形。

[0006] 该病毒的全球传播日益增加,加上缺乏针对该病毒的任何治疗或疫苗,使寨卡病毒成为全球健康问题。

[0007] 所以,仍然需要开发提供针对寨卡病毒的广泛免疫力的疫苗,优选地在所有血清型中经济且有效的疫苗。另外,仍然需要将疫苗(诸如DNA疫苗或DNA质粒疫苗)施用于哺乳动物,以提供预防性或治疗性抗寨卡病毒免疫的有效方法。

发明内容

[0008] 本发明的一个方面提供能够表达引发哺乳动物中的针对寨卡病毒的免疫应答的多肽的核酸构建体。核酸构建体由编码核苷酸序列和可操作地连接至编码核苷酸序列的启动子构成。编码核苷酸序列表达多肽,其中所述多肽包括共有寨卡抗原,该共有寨卡抗原包括前体膜-包膜(prM+Env或prME)。启动子调控哺乳动物中多肽的表达。

[0009] 本发明的另一个方面提供能够在哺乳动物中产生针对寨卡病毒的免疫应答的DNA质粒疫苗。DNA质粒疫苗由能够在哺乳动物中表达共有寨卡抗原的DNA质粒和药学上可接受的赋形剂构成。DNA质粒由可操作地连接至编码序列的启动子构成,所述编码序列编码共有

寨卡抗原。共有寨卡抗原由共有prME构成。

[0010] 本发明的另一个方面提供引发哺乳动物中的针对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述方法包括将DNA质粒疫苗递送至哺乳动物的组织,所述DNA质粒疫苗包含能够在哺乳动物的细胞中表达寨卡病毒的共有抗原,以引发哺乳动物中的免疫应答的DNA质粒,以及对组织的细胞进行电穿孔,以允许DNA质粒进入细胞。

附图说明

[0011] 图1示出了寨卡病毒颗粒、寨卡RNA基因组及其翻译的基因的图示。

[0012] 图2示出了寨卡疫苗的质粒图,其示出了编码寨卡抗原的插入片段(表达盒)的位点。

[0013] 图3示出了多种寨卡抗原设计的线性结构的图示。

[0014] 图4示出了寨卡抗原-前导序列+prME的注释氨基酸序列。

[0015] 图5和图6示出了多种寨卡病毒株之间的亲缘关系:图5示出了分离株之间的遗传距离,图6示出了系统发生树。

[0016] 图7示出了寨卡疫苗的质粒图,其示出了编码寨卡-prM+Env的插入片段(表达盒)的位点。

[0017] 图8示出了表达盒存在的凝胶电泳图像。

[0018] 图9A和图9B示出了寨卡-包膜蛋白的蛋白质印迹凝胶:图9A示出了细胞裂解物中与抗血清的非特异性结合;图9B示出了细胞裂解物中与抗泛黄病毒的特异性结合。

[0019] 图10A示出了寨卡-包膜蛋白纯化的SDS-PAGE凝胶。

[0020] 图10B示出了寨卡-包膜蛋白纯化的蛋白质印迹凝胶。

[0021] 图11和图12示出了通过IFN- γ ELISpot分析针对覆盖pre-M+包膜抗原的肽库评估的加标特异性CD8 T淋巴细胞应答的柱状图。图11为单只小鼠。图12为各组平均值。每组中的平均应答在第三次免疫后一周。

[0022] 图13A和图13B示出了表示样品的结合ELISA的图示,其示出小鼠的寨卡prM+Env疫苗接种引发与寨卡-包膜抗原发生反应的阳性抗体应答。

[0023] 图14A和图14B示出了ZV-prME免疫原引发与寨卡-包膜抗原发生特异性反应的显著抗体应答的图示。抗登革热1、2、3和4抗原包膜的ZpME血清的交叉反应性为阴性,而抗寨卡包膜显示出强结合。

[0024] 图15A-图15E示出了表明ZV-prME疫苗产生的血清不与登革热1-4重组包膜发生交叉反应的分析。分析还支持抗CHIKV疫苗诱导的血清不结合至寨卡包膜。

[0025] 图16包括图16A至图16E,描绘了展示ZV-prME共有DNA疫苗的构建的实验结果。图16A描绘了ZIKV分离株和包膜株之间的ZIKV包膜序列在氨基酸水平上的系统发生树。ZIKV-prME共有序列采用共有区设计策略。比例尺表示每个位点的氨基酸距离。使用MEGA第5版软件进行分析。红星表示ZIKA-prME共有区。图16B描绘了ZIKV-prME DNA疫苗的示意图,该图表明prME(prM+Env)被克隆至pVax1哺乳动物表达载体pGX0001。prME构建体的密码子优化的合成基因包括IgE前导序列。整个基因构建体被插入在CMV启动子的控制下的pVax1载体的BamH1和Xho1位点。图16C描绘了ZIKV-prME DNA疫苗的琼脂糖凝胶电泳分析。第1道示出了未消化的疫苗构建体;第2道,用BamH1/Xho1限制性消化质粒;第3道,DNA分子大小标记物

(以kb计)。图16D描绘了使用蛋白质印迹评估和IFA检测进行的293T细胞中ZIKV prME蛋白表达的SDS-PAGE表达分析。用ZIKV-prME质粒转染293T细胞,并分析细胞裂解物和上清液的表达。第1道含有蛋白质分子量标记物(kDa);第2道,pVax1对照细胞裂解物;第3道,来自ZV prME转染细胞的细胞裂解物;第4道,来自ZIKV-prME转染细胞的上清液;第5道,重组prME阳性对照。图16E描绘了293T细胞中ZIKV-prME蛋白表达的免疫荧光分析测定(IFA)。用5 μ g ZIKV-prME质粒转染293T细胞。转染后二十四小时,用来自免疫小鼠和抗小鼠IgG FITC的血清(1:100)进行免疫荧光标记。图中示出了ZIKV-prME和pVax1免疫小鼠的血清的染色。

[0026] 图17包括图17A至图17C,描绘了展示在使用ZIKV-prME DNA疫苗进行疫苗接种之后,鉴定小鼠中的细胞免疫应答的实验结果。图17A描绘了测定脾细胞中的IFN- γ 分泌的ELISpot分析。用25 μ g pVax1或ZIKV-prME DNA疫苗肌肉内免疫C57/BL6小鼠(n=5只/组)三次,然后进行体内电穿孔(EP)。通过IFN- γ ELISPOT来测定IFN- γ 产生,IFN- γ 产生是细胞免疫应答诱导的标志。在存在六个肽库之一的情况下温育第三次免疫后7天收集的脾细胞,这些肽库跨越整个prM和包膜蛋白。结果如堆叠柱状图所示。数据代表每百万个脾细胞的SFU(斑点形成单位)平均数,其中数值代表每组(n=4)中的平均应答 \pm SEM。图17B描绘了第三次免疫后一周通过使用矩阵肽库刺激来测定的ZIKV-prME特异性IFN- γ 应答的表位组成。数值代表每组(n=4)中的平均应答 \pm SEM。实验独立进行至少三次,得到类似的结果。图17C描绘了,当用ZIKV肽刺激时,用ZIKV-prME进行的免疫诱导了更多数量的IFN- γ 和TNF- α 分泌细胞。用ZIKV-prME疫苗进行最后一次免疫后一周,在存在合并ZIKV肽(5 μ M)或仅组织培养基的情况下培养脾细胞。通过荧光活化细胞分选(FACS)测定来测定ZIKV肽特异性IFN- γ 和TNF- α 分泌细胞的频率。根据阴性对照(未刺激)样品设置单功能门,并且在样品之间一致地放置。示出了总CD8+T细胞应答的百分比。这些数据代表两个独立的免疫实验。

[0027] 图18包括图18A至图18D,描绘了脾细胞产生的IFN- γ 的分析以及从pZIKV-prME(MR766)和pZIKV-prME(Brazil)免疫小鼠收集的血清中的抗体水平。如材料和方法所述免疫六周龄C57/BL6小鼠。第3次免疫后一周收集血清和脾细胞,并用ZIKV特异性prME肽温育,通过ELISPOT测定每百万个细胞的IFN- γ SFU数。图18A描绘了从MR766免疫小鼠收集的血清的ELISpot分析。图18B描绘了从Brazil免疫小鼠收集的血清的ELISpot分析。通过ELISA测定血清中的抗ZIKV包膜抗体水平(C&D)。图18C描绘了在MR766免疫小鼠中通过ELISA测定血清中的抗ZIKV包膜抗体水平。图18D描绘了在Brazil免疫小鼠中通过ELISA测定血清中的抗ZIKV包膜抗体水平。

[0028] 图19包括图19A至图19E,描绘了展示由ZIKV-prME质粒疫苗接种诱导的抗ZIKV抗体应答的实验结果。用25 μ g ZIKV-prME质粒或pVax1以2周间隔肌肉内免疫C57BL/6小鼠三次。用不同稀释度的免疫后不同时间点的动物血清分析与包膜抗原的结合。用疫苗匹配的重组ZIKV-包膜蛋白涂覆ELISA板。图19A描绘了2个独立实验中的1个提供的结果。在第二实验中获得类似的结果。图19B描绘了,在每次加强后在免疫动物的血清中分析响应于ZIKV-prME免疫原而产生的抗ZIKV终点滴度的差异。图19C描绘了ZIKV-包膜抗原表达的蛋白质印迹分析。如图所示,在12.5%SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳多个浓度的重组ZIKV-Env蛋白,并用pVax1或ZIKV-prME免疫小鼠的血清进行蛋白质印迹分析。ZIKV-Env蛋白的表达以箭头表示。图19D描绘了在用ZIKV-prME或pVax1免疫小鼠的血清进行温育后,ZIKV-MR766感染或模拟感染的Vero细胞的免疫荧光分析。通过噬菌斑减少中和(PRNT)测定法来测试pZIKV-prME

免疫小鼠的血清样品体外中和ZIKV感染性的能力。PRNT50被定义为可抑制50%的输入病毒的血清稀释因子。括号中的数值表示PRNT50。对照质粒pZIKV-Capsid和pVax1血清用作阴性对照。

[0029] 图20包括图20A至图20E,描绘了展示在NHP的ZIKV-prME DNA疫苗接种之后,ZIKV特异性细胞免疫应答的诱导的实验结果。图20A描绘了,在第0周和第4周给恒河猴皮内免疫(ID) 2mg ZIKV-prME质粒,两个部位各施用1mg,免疫之后立即进行皮内EP。在免疫前和第6周分离PBMC,并用于ELISPOT分析,以检测响应于ZIKV-prME肽刺激的IFN- γ 分泌细胞。针对六个肽库获得的每百万个PBMC的产生IFN- γ 的细胞的数量在疫苗接种组的y轴上表示,这些肽库涵盖整个prME蛋白。数值代表每组(n=5)中的平均应答 \pm SEM。图20B描绘了DNA疫苗接种后ZIKV-prME特异性抗体应答的检测。在免疫前和第6周通过ELISA测定抗ZIKV IgG抗体。图20C描绘了在第一次和第二次免疫之后示出的抗ZIKV-包膜抗体的终点ELISA滴度。图20D描绘了使用第6周合并猴血清进行的蛋白质印迹分析,证实了其与重组包膜蛋白的结合。图20E描绘了ZIKV MR766以10PFU感染的Vero细胞的免疫荧光分析。使用第6周合并猴血清以1:100感染后24小时探测细胞,然后用抗人IgG-AF488二抗检测。

[0030] 图21包括图21A至图21C,描绘了展示来自ZIKV-prME免疫的恒河猴的血清的噬菌斑减少中和活性的实验结果。如材料和方法所述免疫恒河猴。图21A描绘了,通过噬菌斑减少中和(PRNT)测定法来测试来自个体猴的免疫前和第6周免疫血清的体外中和ZIKV感染性的能力。PRNT50被定义为可抑制50%的输入病毒的血清稀释因子。列出每只猴的计算IC50值。图21B和图21C描绘了Vero、SK-N-SH和U87MG细胞中ZIKV MR766和PR209的细胞病变作用。图21B描绘了模拟感染或用MR766或PR209病毒感染Vero细胞。图21C描绘了,在存在ZIKV-prME疫苗免疫的合并NHP血清(第6周)的情况下以0.001PFU/细胞的MOI模拟或用MR766感染SK-N-SH和U87MG细胞。感染后48小时使用免疫的NHP血清通过间接免疫荧光测定法(IFA)分析合胞体形成(CPE)和prME蛋白表达的诱导。图片以4 \times 物镜采集。

[0031] 图22包括图22A至图22C,描绘了展示缺乏I型干扰素 α 、 β 受体的小鼠中,IFN- γ 的分析以及从pZIKVprME分离的脾细胞产生抗体的实验结果。图22A描绘了,用25 μ g pZIKV-prME或pVax1质粒以2周间隔肌肉内免疫IFN α 、 β 受体敲除小鼠(四至六只)三次。在最后一次免疫后两周收集脾细胞,并用prME肽温育,通过ELISPOT测定产生IFN- γ 的细胞的数量。图22B描绘了,在免疫后的不同天通过ELISA测定免疫动物中的ZIKV Env蛋白特异性血清抗体。图22C描绘了免疫后0、1、2、3、4和5周的终点滴度。

[0032] 图23包括图23A至图23F,描绘了展示寨卡病毒感染后缺乏I型干扰素 α 、 β 受体的免疫小鼠的存活率数据的实验结果。寨卡感染后IFN- α / β 受体敲除小鼠的存活率。图23A描绘了,免疫小鼠一次并在2周后用106PFU ZIKV-PR209进行激发。图23B描绘了,以2周间隔免疫小鼠两次并在第二次免疫后7天用106PFU ZIKV-PR209进行激发。图23C描绘了,以2周间隔免疫小鼠两次并在第二次免疫后7天用2 \times 106PFU ZIKV PR209激发。使用来自两个单独实验的数据构建的存活率曲线。图23D描绘了,免疫2 \times 的动物的体重变化;数据反映了两个独立的实验的结果,每个实验每组10至15只小鼠。图23E描绘了图23B中的动物的临床评分。图23F描绘了图23C中的动物的临床评分。临床评分表示的含义如下:1-无疾病,2-行动减少;3-驼背姿势和行动减少;4-后肢指节行走(部分麻痹),5-一条后肢麻痹以及6-两条后肢麻痹。

[0033] 图24包括小图a至e,描绘了展示ZIKV-prME共有DNA疫苗的构建的实验结果。图24的小图a描绘了ZIKV-prME DNA疫苗的示意图,该图表明rME被克隆至pVax1哺乳动物表达载体。ZIKV-prME共有序列采用共有区设计策略。prME构建体的密码子优化的合成基因包括合成IgE前导序列。优化的基因构建体被插入在CMV启动子的控制下的修饰pVax1载体的BamH1和Xho1位点。图24的小图b描绘了,ZIKV-E蛋白的模型构造展示了疫苗靶标与潜在相关表位区的重叠。为疫苗设计目的而作出的许多变化位于域II和III内(位于左中部插图的虚线内)。这些区域中的疫苗特异性残基变化在E(包膜)蛋白二聚体的带状骨架展示图(每条链分别以浅绿色和深绿色表示)上以紫色CPK形式示出。对应于确定的EDE的区域以青色表示,融合环以蓝色表示。疫苗E蛋白的残基Ile156(T156I)建模为暴露于150环的表面,是几个其他ZIKV株中以及多个登革热病毒株中N-连接糖基化基序NXS/T的一部分。图24的小图c描绘了使用蛋白质印迹分析进行的293T细胞中ZIKV-prME蛋白表达的SDS-PAGE表达分析。用ZIKV-prME质粒转染293T细胞,并用泛黄病毒免疫血清分析细胞裂解物和上清液的疫苗构建体表达。如图所示加入蛋白质分子量标记物(kDa);ZIKV-prME转染细胞的细胞裂解物和上清液和rZIKV-E阳性对照。图24的小图d描绘了使用蛋白质印迹分析进行的293T细胞中ZIKV-prME蛋白表达的SDS-PAGE表达分析。用ZIKV-prME质粒转染293T细胞,并用ZIKV-prME免疫血清分析细胞裂解物和上清液的疫苗构建体表达。如图所示加入蛋白质分子量标记物(kDa);ZIKV-prME转染细胞的细胞裂解物和上清液和rZIKV-E阳性对照。图24的小图e描绘了293T细胞中ZIKV-prME蛋白表达的免疫荧光测定(IFA)分析。用5 μ g ZIKVprME质粒转染细胞。转染后二十四小时,通过加入ZIKV-prME免疫小鼠的血清(1:100)来进行免疫荧光标记,然后通过加入抗小鼠IgG-AF488抗体二抗来进行检测。图中示出了ZIKV-prME和pVax1免疫小鼠的血清的染色。DAPI图板示出了细胞核的对照染色。重叠图板是抗小鼠IgG-AF488和DAPI染色图案的组合。DAPI,4',6-二脒基-2-苯基吡啶;ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0034] 图25包括小图a至小图d,描绘了展示在使用ZIKV-prME DNA疫苗进行疫苗接种之后,鉴定小鼠中的细胞免疫应答的实验结果。图25的小图a描绘了研究中所用的疫苗免疫和免疫分析的时间线。图25的小图b描绘了测定响应于ZIKV-prME免疫的脾细胞中的IFN- γ 分泌的ELISpot分析。用25 μ g pVax1或ZIKV-prME DNA疫苗肌肉内免疫C57BL/6小鼠(n=4只/组)三次,然后进行电穿孔。通过IFN- γ ELISpot分析来测定IFN- γ 产生,IFN- γ 产生是细胞免疫应答诱导的标志。在存在六个肽库之一的情况下温育第三次免疫后1周收集的脾细胞,这些肽库跨越整个prM和包膜蛋白。结果如堆叠柱状图所示。数据代表每百万个脾细胞的SFU(斑点形成单位)平均数,其中数值代表每组中的平均应答 \pm s.e.m.。图25的小图c描绘了第三次免疫后1周通过使用矩阵肽库刺激来测定的ZIKVprME特异性IFN- γ 应答的表位组成。数值代表每组中的平均应答 \pm s.e.m.。实验独立进行至少三次,得到类似的结果。图25的小图d描绘了T细胞应答的流式细胞分析。当用ZIKV肽刺激时,用ZIKV-prME进行的免疫诱导了更多数量的IFN- γ 和TNF- α 分泌细胞。用ZIKV-prME疫苗进行最后一次免疫后一周,在存在合并ZIKV肽(5 μ M)或仅R10的情况下培养脾细胞。通过流式细胞术测定ZIKV肽特异性IFN- γ 和TNF- α 分泌细胞的频率。根据阴性对照(未刺激)样品设置单功能门,并且在样品之间一致地放置。示出了总CD8⁺T细胞应答的百分比。这些数据代表两个独立的免疫实验。IFN,干扰素;TNF,肿瘤坏死因子;ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0035] 图26包括图26A至图26E,描绘了展示由ZIKV-prME疫苗接种诱导的抗ZIKV抗体应答的实验结果。图26A描绘了测定免疫小鼠中产生结合抗体(通过OD450值测定)的ELISA分析。用25 μ gZIKV-prME质粒或pVax1以2周间隔肌肉内免疫C57BL/6小鼠(n=4)三次。用不同稀释度的免疫后不同时间点(第21、35和50天)的动物血清分析与rZIKV-E的结合。所示数据代表至少三个单独实验。图26B描绘了终点结合滴度分析。在每次加强后在免疫动物的血清中分析响应于ZIKV-prME免疫原而产生的抗ZIKV终点滴度的差异。图26C描绘了ZIKV-prME免疫诱导的rZIKV-E特异性抗体的蛋白质印迹分析。在12.5%SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳rZIKV-E蛋白,并用ZIKV-prME免疫小鼠(第35天)的合并血清进行蛋白质印迹分析。箭头指示了与rZIKV-E的结合。图26D描绘了ZIKV-prME免疫诱导的ZIKV特异性抗体的免疫荧光分析。用ZIKV-prME免疫小鼠(第35天)的合并血清对ZIKV-MR766感染或模拟感染的Vero细胞进行染色,然后用抗小鼠-AF488二抗进行检测。图26E描绘了ZIKV-prME免疫诱导的中和抗体的噬菌斑减少中和(PRNT)测定分析。测试ZIKV-prME免疫小鼠的血清样品体外中和ZIKV感染性的能力。PRNT50被定义为可抑制50%的输入病毒的血清稀释因子。括号中的数值表示PRNT50。对照ZIKV-Cap(表达ZIKV衣壳蛋白的DNA疫苗)和pVax1血清用作阴性对照。ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0036] 图27包括图27A至图27E,描绘了展示在非人灵长类动物(NHP)的ZIKV-prME疫苗接种之后,ZIKV特异性细胞免疫应答的诱导的实验结果。图27A描绘了测定响应于ZIKV-prME免疫的外周血单核细胞(PBMC)中的IFN- γ 分泌的ELISpot分析。在第0周和第4周给恒河猴皮内免疫2mg ZIKV-prME质粒,两个部位各施用1mg,免疫之后立即进行皮内电穿孔。如“材料和方法”部分所述,在免疫前和第6周分离PBMC,并用于ELISPOT分析,以检测响应于ZIKV-prME肽刺激的IFN- γ 分泌细胞。示出了针对六个肽库获得的每百万个PBMC的产生IFN- γ 的细胞的数量,这些肽库涵盖整个prME蛋白。数值代表每组(n=5)中的平均应答 \pm s.e.m.。图27B描绘了DNA疫苗接种后ZIKV-prME特异性抗体应答的检测。在免疫前和第6周通过ELISA测定抗ZIKV IgG抗体。图27C描绘了在第一次和第二次免疫之后示出的抗ZIKV-包膜抗体的终点ELISA滴度。图27D描绘了使用第6周RM免疫血清进行的蛋白质印迹分析,证实了其重组包膜蛋白的结合。图27E描绘了ZIKV-prME免疫的RM的血清的PRNT活性。通过噬菌斑减少中和(PRNT)测定法来测试来自个体猴的免疫前和第6周免疫血清的体外中和ZIKV感染性的能力。PRNT50被定义为可抑制50%的输入病毒的血清稀释因子。列出每只猴的计算(PRNT50)值。IFN,干扰素;ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0037] 图28包括图28A至图28F,描绘了展示ZIKV感染后缺乏I型干扰素 α 、 β 受体的免疫小鼠的存活率数据的实验结果。图28A描绘了ZIKV感染后IFNAR^{-/-}小鼠的存活率。以2周间隔用25 μ gZIKV-prME DNA疫苗免疫小鼠两次,并在第二次免疫后1周用ZIKV-PR209病毒以 1×10^6 个噬菌斑形成单位进行激发。图28B描绘了ZIKV感染后IFNAR^{-/-}小鼠的存活率。以2周间隔用25 μ gZIKV-prME DNA疫苗免疫小鼠两次,并在第二次免疫后1周用ZIKV-PR209病毒以 2×10^6 个噬菌斑形成单位进行激发。图28C描绘了以 1×10^6 个噬菌斑形成单位免疫的动物的体重变化。图28D描绘了以 2×10^6 个噬菌斑形成单位免疫的动物的体重变化。图28E描绘了以 1×10^6 个噬菌斑形成单位免疫的动物的临床评分。图28F描绘了以 2×10^6 个噬菌斑形成单位免疫的动物的临床评分。临床评分表示的含义如下:1:无疾病,2:行动减少;3:驼背姿势和行动减少;4:后肢指节行走(部分麻痹);5:一条后肢麻痹;以及6:两条后肢麻痹。数据反映了

两个独立的实验的结果,每个实验每组10只小鼠。ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0038] 图29包括图29A至图29d,描绘了展示用ZIKV-prME疫苗单次免疫在缺乏I型干扰素 α 、 β 受体的小鼠中提供了针对ZIKV激发的保护的实验结果。免疫小鼠一次,并在单次免疫后2周用 2×10^6 噬菌斑形成单位的ZIKV-PR209进行激发。存活率曲线描绘了每个实验每组10只小鼠。图29A证实了,ZIKV-prME疫苗预防小鼠大脑中寨卡诱导的神经异常。图29B描绘了,在激发后7-8天收集pVax1和ZIKV-prME疫苗接种组的大脑切片,并用H&E(苏木精和伊红)进行组织学染色。从代表性未受保护的pVax1对照动物采集的切片显示出病理学。(i):大脑皮层的神经纤维网内的核片段(插图示出了更高的放大倍数,箭头突出显示了核片段);(ii):皮层内血管的管周成套,淋巴细胞浸润和细胞退变;(iii):大脑皮层内的管周成套、细胞退变和核片段;以及(iv):海马体内的神经元退变(箭头)。ZIKV-prME疫苗接种的小鼠的正常组织的实例显示出在正常范围内(v和vi)。图29C描绘了在感染后的指定天疫苗接种和病毒激发后小鼠血浆样品中ZIKV RNA的水平。结果以每毫升血浆的基因组当量表示。图29D描绘了,在感染后第28天分析大脑组织中的ZIKV-RNA的水平。结果以每克组织的基因组当量表示。ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0039] 图30包括图30A和图30B,描绘了展示ZIKV激发后抗ZIKV免疫血清的被动转移后缺乏I型干扰素 α 、 β 受体的小鼠的保护的实验结果。在用寨卡病毒皮下激发(10^6 个噬菌斑形成单位/小鼠)后1天,将抗寨卡病毒IgG滴定的合并NHP抗ZIKV免疫血清腹膜内施用于小鼠($150\mu\text{l}$ /小鼠)。作为对照,正常猴血清和磷酸盐缓冲盐水(PBS)对照施用于年龄匹配的小鼠($150\mu\text{l}$ /小鼠)。图30A描绘了感染和治疗过程期间的小鼠体重变化。每个点代表每只小鼠的计算激发前(第0天)体重百分比的平均值和标准误差。图30B描绘了NHP免疫血清的施用后小鼠的存活率。ZIKV-prME,寨卡病毒的前体膜和包膜。

[0040] 图31包括图31A至图31D,描绘了展示鉴定C57BL/6小鼠中ZIKV-prME-MR766或ZIKV-prME Brazil疫苗的免疫应答的实验结果。图31A描绘了用ZIKV-prME-MR766或ZIKV-prME-Brazil DNA疫苗接种后测定细胞和抗体应答的ELISpot和ELISA分析。用 $25\mu\text{g}$ ZIKV-prME-MR766肌肉内免疫C57BL/6小鼠($n=4$ 只/组)三次,然后进行体内EP。通过IFN- γ ELISpot来测定IFN- γ 产生,IFN- γ 产生是细胞免疫应答诱导的标志。在存在六个肽库之一的情况下温育第三次免疫后一周收集的脾细胞,这些肽库跨越整个prM和E蛋白。结果如堆叠柱状图所示。数据代表每百万个脾细胞的SFU(斑点形成单位)平均数,其中数值代表每组中的平均应答 \pm SEM。图31B描绘了用ZIKV-prME-MR766或ZIKV-prME-Brazil DNA疫苗接种后测定细胞和抗体应答的ELISpot和ELISA分析。用 $25\mu\text{g}$ ZIKV-prME-Brazil肌肉内免疫C57BL/6小鼠($n=4$ 只/组)三次,然后进行体内EP。通过IFN- γ ELISpot来测定IFN- γ 产生,IFN- γ 产生是细胞免疫应答诱导的标志。在存在六个肽库之一的情况下温育第三次免疫后一周收集的脾细胞,这些肽库跨越整个prM和E蛋白。结果如堆叠柱状图所示。数据代表每百万个脾细胞的SFU(斑点形成单位)平均数,其中数值代表每组中的平均应答 \pm SEM。图31C描绘了测定免疫C57BL/6小鼠中产生结合抗体的ELISA分析。在免疫后第35天用不同稀释度的小鼠血清分析与rZIKV-E的结合。图31D描绘了测定免疫C57BL/6小鼠中产生结合抗体的ELISA分析。在免疫后第35天用不同稀释度的小鼠血清分析与rZIKV-E的结合。

[0041] 图32包括图32A至图32D,描绘了展示ZIKV-包膜蛋白的表达、纯化和鉴定的实验结果。图32A描绘了用于rZIKV E表达的克隆质粒。图32B描绘了通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分

析进行的重组ZIKV-E (rZIKV-E) 蛋白的鉴定。第1道-BSA对照;第2道-通过镍金属亲和树脂柱纯化pET-28a载体质粒转化的大肠杆菌 (*E. coli*) 培养物的裂解物,并在IPTG诱导后通过SDS-PAGE分离。第3道,使用抗His标签抗体通过蛋白质印迹分析37重组ZV-E纯化蛋白。第M道,蛋白质分子量标记物。图32C描绘了,评估纯化rZIKV-E蛋白的抗原性。用rZIKV-E涂覆ELISA板,然后用不同稀释度的ZIKV-prME疫苗或泛黄病毒抗体阳性对照免疫的小鼠的免疫血清温育。如实验实施例所述,通过加入过氧化物酶缀合的抗小鼠抗体,然后是四甲基联苯胺底物来检测结合的IgG。图32D描绘了用ZIKV prME免疫小鼠的免疫血清进行的纯化rZIKV-E蛋白的蛋白质印迹检测。如本文所述,将不同浓度的纯化rZIKV-E蛋白加入到SDS-PAGE凝胶上。在室温下使用1:100稀释度的免疫血清和1:15,000的山羊抗小鼠1小时。在洗涤后,在Odyssey红外成像仪上对膜成像。使用Odyssey蛋白质分子量标准品。箭头表示rZIKV-E蛋白的位置。

[0042] 图33包括图33A至图33C,描绘了展示对IFNAR^{-/-}小鼠中的ZIKA-prME的免疫应答鉴定的实验结果。ELISpot和ELISA分析测定对IFNAR^{-/-}小鼠中的ZIKV-prME的细胞和抗体应答。用25μgZIKV-prME肌肉内免疫小鼠 (n=4只/组) 三次,然后进行体内EP。图33A描绘了,通过IFN-γ ELISPOT来测定IFN-γ产生,IFN-γ产生是细胞免疫应答诱导的标志。图33B描绘了,测定免疫IFNAR^{-/-}小鼠中产生结合抗体的ELISA分析。在免疫后的不同时间点用小鼠血清分析与rZIKV-E的结合。图33C描绘了免疫IFNAR^{-/-}小鼠中产生的抗ZIKV抗体的终点滴度分析。

[0043] 图34包括图34A至图34D,描绘了展示针对ZIKV-prME免疫的恒河猴的免疫血清的中和活性的实验结果。在存在ZIKV-prME疫苗免疫的合并NHP血清(第6周)的情况下以0.01PFU/细胞的MOI模拟感染或用MR766感染SK-N-SH和U87MG细胞。在感染后4天使用ZIKV-prME疫苗接种NHP的血清通过间接免疫荧光测定(IFA)分析寨卡病毒感染性。图34A描绘了以20×物镜采集的染色组织样品切片的照片,其展示了Vero、SK-N-SH和U87MG中ZIKV病毒MR766和PR209感染的抑制。图34B描绘了以20×物镜采集的染色组织样品切片的照片,其展示了Vero、SK-N-SH和U87MG中ZIKV病毒SK-N-SH和U87MG感染的抑制。图34C描绘了感染的百分比的柱状图(GFP阳性细胞),其展示了Vero、SK-N-SH和U87MG中ZIKV病毒MR766和PR209感染的抑制。图34D描绘了感染的百分比的柱状图(GFP阳性细胞),其展示了Vero、SK-N-SH和U87MG中ZIKV病毒SK-N-SH和U87MG感染的抑制。

[0044] 图35包括图35A至图35E,描绘了展示ZIKV对IFNAR^{-/-}小鼠有毒性的实验结果。这些数据确认,ZIKV在IFNAR^{-/-}中是有毒的,导致发病和死亡。图35A描绘了经由颅内接种10⁶pfu ZIKV-PR209病毒的IFNAR^{-/-}小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线。图35B描绘了经由静脉内接种10⁶pfu ZIKV-PR209病毒的IFNAR^{-/-}小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线。图35C描绘了经由腹膜内接种10⁶pfu ZIKV-PR209病毒的IFNAR^{-/-}小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线。图35D描绘了经由皮下接种10⁶pfu ZIKV-PR209病毒的IFNAR^{-/-}小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线。图35E描绘了所有途径的感染过程期间的小鼠体重变化。

[0045] 图36包括图36A至图36C,描绘了展示在非人灵长类动物(NHP)的ZIKV-prME疫苗接种之后,ZIKV特异性细胞免疫应答的诱导的实验结果。图36A是NHP免疫研究的示意图。图36B描绘了单次免疫后的结果。图36C描绘了两次免疫后的结果。ELISpot分析测定响应于ZIKV-prME免疫的PBMC中的IFN-γ分泌。在第0周和第4周给恒河猴皮内(i.d.)免疫2mg

ZIKV-prME质粒,两个部位各施用1mg,免疫之后立即进行皮内电穿孔。如材料和方法所述,在免疫前和第6周分离PBMC,并用于ELISPOT分析,以检测响应于ZIKV-prME肽刺激的IFN- γ 分泌细胞。示出了针对六个肽库获得的每百万个PBMC的产生IFN- γ 的细胞的数量,这些肽库涵盖整个prME蛋白。数值代表每组(n=5)中的平均应答 \pm SEM。

[0046] 图37包括图37A和图37B,描绘了展示由非人灵长类动物(NHP)的ZIKV-prME疫苗接种诱导抗ZIKV抗体应答的实验结果。图37A描绘了单次DNA疫苗接种后ZIKV-prME特异性抗体应答的检测。在免疫前和第6周通过ELISA测定抗ZIKV IgG抗体。图37B描绘了两次DNA疫苗接种后ZIKV-prME特异性抗体应答的检测。在免疫前和第6周通过ELISA测定抗ZIKV IgG抗体。

[0047] 图38包括图38A至图38D,描绘了展示寨卡-prME免疫赋予针对寨卡激发的保护的实验结果。图38A是NHP寨卡激发研究的示意图。在第0周和第4周使用EP经由ID途径用pZV-prME DNA给恒河猴进行疫苗接种两次。在第8周,用寨卡-PR209病毒株皮下激发动物。作为对照,用ZV-PR209病毒感染5只未暴露的动物。图38B描绘了未暴露的NHP中的个体动物的连续病毒载量测定。图38C描绘了NHP疫苗接种一次中的个体动物的连续病毒载量测定。图38D描绘了NHP疫苗接种两次中的个体动物的连续病毒载量测定。图板示出了每只动物的峰值病毒载量,并示出了三个组的标准误差棒(病毒RNA拷贝/mL血浆的对数)。

[0048] 图39包括图39A和图39B,描绘了1期寨卡DNA疫苗研究的实验结果。图39A描绘了结合ELISA研究的实验结果。图39B描绘了展示被动转移和保护的实验结果。

[0049] 图40包括图40A和图40B,描绘了免疫荧光分析的实验结果。

[0050] 图41包括图41A和图41B,描绘了展示结合响应者的百分比鉴定的实验结果。

[0051] 图42描绘了展示剂量2后中和的实验结果。

具体实施方式

[0052] 给出以下缩写或缩短的定义以帮助理解本发明的优选的实施方案。此处给出的缩写定义决不是穷举,也不与本领域所理解的定义或字典含义相矛盾。此处给出的缩写定义补充或更清晰地定义了本领域已知的定义。

[0053] 定义

[0054] 如本文所用,核苷酸和氨基酸的序列同源性可以使用FASTA、BLAST和Gapped BLAST(Altschul等人,Nuc.Acids Res.,1997,25,3389,该文献以引用的方式整体并入本文)以及PAUP*4.0b10软件(D.L.Swofford,Sinauer Associates,Massachusetts)来确定。简而言之,BLAST算法是Basic Local Alignment Search Tool(基本局部比对搜索工具)的缩写,适用于确定序列相似性(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403-410,该文献以引用的方式整体并入本文)。执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与另一个核酸的比較的最小和概率小于约1、优选地小于约0.1、更优选地小于约0.01以及最优选地小于约0.001,则该核酸被认为与另一个核酸相似。“相似性百分比”可使用PAUP*4.0b10软件(D.L.Swofford,Sinauer Associates,Massachusetts)来计算。共有序列的平均相似性通过与系统发生树中的所有序列比较来计算。

[0055] 如本文所用,术语“核酸构建体”是指包含编码蛋白质的核苷酸序列的DNA或RNA分子。编码序列或“编码核酸序列”可包括可操作地连接至调控元件的起始和终止信号,包括能够引导在核酸分子施用的个体的细胞中表达的启动子和多腺苷酸化信号。

[0056] 如本文所用,术语“可表达形式”是指含有可操作地连接至编码蛋白质的编码序列的必需调控元件的核酸构建体,以使得当所述编码序列存在于个体的细胞中时将会表达。

[0057] 术语“恒定电流”在本文中用于定义组织或定义所述组织的细胞在递送至相同组织的电脉冲的持续时间中接收或经受的电流。电脉冲从本文所述的电穿孔装置递送。因为本文提供的电穿孔装置具有反馈元件,优选地具有即时反馈,所以该电流在电脉冲的持续时间内以恒定电流强度保持在所述组织中。反馈元件可在整个脉冲持续时间中测定组织(或细胞)的电阻,并使电穿孔装置改变其电能输出(例如,增加电压),所以相同组织中的电流在整个电脉冲期间(大约几微秒)和不同的脉冲之间保持恒定。在一些实施方案中,反馈元件包括控制器。

[0058] 术语“反馈”或“电流反馈”可互换使用,并且意指所提供的电穿孔装置的主动响应,其包括测定电极之间的组织中的电流,以及相应地改变EP装置递送的能量输出,以将电流维持在恒定水平。该恒定水平由使用者在脉冲序列或电治疗起始之前预设。优选地,反馈通过电穿孔部件,例如电穿孔装置的控制器来实现,因为其中的电路能够连续监测电极之间的组织中的电流,并且将监测电流(或组织内的电流)与预设电流相比较,以及不断作出能量输出调整,以将监测电流维持在预设水平。在一些实施方案中,反馈回路是即时的,因为它是模拟闭环反馈。

[0059] 术语“电穿孔”、“电渗透”或“电动力学增强”(“EP”)在本文中可互换使用,是指使用跨膜电场脉冲在生物膜中诱导显微通道(孔);它们的存在允许生物分子诸如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子和/或水从细胞膜的一侧传递到另一侧。

[0060] 术语“分散电流”在本文中用于定义从本文所述的电穿孔装置的多个针状电极阵列递送的电流模式,其中该模式最小化或优选地消除电穿孔相关热应激在被电穿孔的组织上的任何区域上的发生。

[0061] 如本文所用,术语“反馈机制”是指由软件或硬件(或固件)执行的过程,该过程接收期望组织的阻抗(在能量脉冲的递送之前、期间和/或之后)并将其与当前值(优选地电流)相比较,并调整递送的能量脉冲达到预设值。术语“阻抗”在本文讨论反馈机制时使用,并且可根据欧姆定律转换为电流值,从而使其能够与预设电流相比较。在优选的实施方案中,“反馈机制”由模拟闭环回路执行。

[0062] 术语“免疫应答”在本文中用于表示响应于通过所提供的DNA质粒疫苗的寨卡抗原(例如,通用寨卡抗原)的引入而活化宿主的免疫系统(例如哺乳动物的免疫系统)。免疫应答可以为细胞或体液应答或它们二者兼有的形式。

[0063] 术语“共有区”或“共有序列”在本文中用于表示根据多个寨卡基因株的比对分析构建的合成核酸序列或对应的多肽序列。共有通用寨卡可用于诱导针对多种寨卡病毒亚型或血清型的广泛免疫性。

[0064] 术语“佐剂”在本文中用于表示加入本文所述的DNA质粒疫苗,以增强下文所述的DNA质粒和编码核酸序列编码的寨卡抗原的抗原性的任何分子。

[0065] 术语“亚型”或“血清型”在本文中可互换并结合病毒(例如寨卡病毒)使用,意指该

病毒抗原的遗传变体,使得一种亚型被除另一种亚型之外的免疫系统识别。例如,寨卡病毒亚型1可在免疫学上与寨卡病毒亚型2区分。

[0066] 本发明的一个方面提供能够表达引发哺乳动物中的针对寨卡病毒的免疫应答的多肽的核酸构建体。核酸构建体由编码核苷酸序列和可操作地连接至编码核苷酸序列的启动子构成。编码核苷酸序列表达多肽,其中所述多肽包括共有寨卡抗原,该共有寨卡抗原包括prME。启动子调控哺乳动物中多肽的表达。

[0067] 在一些实施方案中,核酸构建体还可包括可操作地连接至编码序列的N-末端并且可操作地连接至启动子的IgE前导序列。优选地,IgE前导具有SEQ ID NO:12的序列。核酸构建体还可包含连接至编码序列的C-末端的多腺苷酸化序列。优选地,核酸构建体是密码子优化的。

[0068] 在优选的实施方案中,核酸序列和氨基酸序列可以选自:

[0069] SEQ ID NO描述

[0070] 1 共有寨卡IgE前导-prME蛋白

[0071] 2 共有寨卡IgE前导-prME(构建体1)DNA

[0072] 3 共有寨卡IgE前导-prME(构建体1)蛋白

[0073] 4 共有寨卡IgE前导-NS1 DNA

[0074] 5 共有寨卡IgE前导-NS1蛋白

[0075] 6 共有寨卡IgE前导-衣壳DNA

[0076] 7 共有寨卡IgE前导-衣壳蛋白

[0077] 8 寨卡IgE前导-prME MR766 DNA

[0078] 9 寨卡IgE前导-prME MR766蛋白

[0079] 10 寨卡IgE前导-prME Brazil DNA

[0080] 11 寨卡IgE前导-prME Brazil蛋白

[0081] 12 IgE前导

[0082] 13 共有寨卡IgE前导-NS1 DNA (pGX7211)

[0083] 14 共有寨卡IgE前导-衣壳DNA (pGX7212)

[0084] 15 寨卡IgE前导-prME Brazil DNA (pGX7213)

[0085] 16 寨卡IgE前导-prME MR766 DNA (pGX7214)

[0086] 17 无衣壳DNA的寨卡preEnv (MR766) (pGX7210)

[0087] 18 无衣壳蛋白的寨卡preEnv (MR766) (pGX7210)

[0088] 在一些实施方案中,本文的DNA序列可从IgE前导序列(编码SEQ ID NO:12的核苷酸序列)的5'末端移除,本文的蛋白质序列可从SEQ ID NO:12的IgE前导序列的N-末端移除。

[0089] 本发明的另一个方面提供能够在哺乳动物中产生针对寨卡病毒的免疫应答的DNA质粒疫苗。DNA质粒疫苗由能够在哺乳动物中表达共有寨卡抗原的DNA质粒和药学上可接受的赋形剂构成。DNA质粒由可操作地连接至编码序列的启动子构成,所述编码序列编码共有寨卡抗原。共有寨卡抗原由共有prME、NS1、衣壳或一个或多个前述抗原的融合体构成。在一个实施方案中,DNA质粒编码共有寨卡抗原。在一个实施方案中,DNA质粒编码具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:

18的氨基酸序列的共有寨卡抗原。

[0090] 在一个实施方案中,DNA质粒含有包括但不限于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的序列。

[0091] 在一些实施方案中,DNA质粒包括编码寨卡抗原的编码序列减去该编码序列的N-末端上的IgE前导序列。在一些实施方案中,DNA质粒还包含连接至编码序列的N-末端并且可操作地连接至启动子的IgE前导序列。优选地,IgE前导具有SEQ ID NO:12的序列。

[0092] DNA质粒还可包括连接至编码序列的C-末端的多腺苷酸化序列。优选地,DNA质粒是密码子优化的。

[0093] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是佐剂。优选地,佐剂选自:IL-12和IL-15。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是转染促进剂。优选地,转染促进剂是聚阴离子、聚阳离子或脂质,更优选地聚-L-谷氨酸。优选地,聚-L-谷氨酸的浓度小于6mg/ml。优选地,DNA质粒疫苗具有1mg/ml或更大的总DNA质粒浓度。

[0094] 在一些实施方案中,DNA质粒包括多个独特的DNA质粒,其中所述多个独特的DNA质粒中的每个编码包含共有prME蛋白、共有prME(构建体1)、共有NS1 DNA或共有衣壳蛋白的多肽。

[0095] DNA质粒疫苗可包括编码包括但不限于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的DNA质粒。

[0096] 在一个实施方案中,DNA质粒疫苗可包括这样的DNA质粒:其具有包括但不限于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的序列。

[0097] 在一些实施方案中,DNA质粒疫苗在其中产生免疫应答的哺乳动物是灵长类。优选地,哺乳动物是灵长类。免疫应答可以是体液应答或细胞应答,优选地它们二者。

[0098] 本发明的另一个方面提供引发哺乳动物中的针对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述方法包括将DNA质粒疫苗递送至哺乳动物的组织,所述DNA质粒疫苗包含能够在哺乳动物的细胞中表达寨卡病毒的共有抗原,以引发哺乳动物中的免疫应答的DNA质粒,以及对组织的细胞进行电穿孔,以允许DNA质粒进入细胞。

[0099] 在一些实施方案中,引发免疫应答的方法包括将DNA质粒疫苗注射到皮内、皮下或肌肉组织的递送步骤。

[0100] 在一些实施方案中,引发免疫应答的方法还可包括预设期望递送至组织的电流;并且用一个等于预设电流的恒定电流的能量脉冲对组织的细胞进行电穿孔。

[0101] 在一些实施方案中,引发免疫应答的方法还包括测定电穿孔细胞中的阻抗;相对于测定阻抗调整能量脉冲的能量水平,以维持电穿孔细胞中的恒定电流。测定和调整步骤优选地在能量脉冲的持续时间内发生。

[0102] 在一些实施方案中,电穿孔步骤包括根据以分散模式递送能量脉冲的脉冲序列模式将能量脉冲递送至多个电极。

[0103] 在本发明的一些实施方案中,DNA质粒疫苗还可包括佐剂。在一些实施方案中,佐剂选自: α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生生长因子(PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、皮肤T细胞趋化因子(CTACK)、上皮胸腺表达趋化因子(TECK)、粘膜相关上

皮趋化因子(MEC)、IL-12、IL-15、MHC、CD80、CD86(包括具有信号序列缺失并且任选地包括IgE的信号肽的IL-15)。可为有用佐剂的其他基因包括编码以下蛋白质的那些:MCP-1、MIP-1- α 、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I κ B、失活NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素应答基因、NF κ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配体、Ox40、Ox40配体、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及其功能片段。在一些优选的实施方案中,佐剂选自IL-12、IL-15、CTACK、TECK或MEC。

[0104] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是转染促进剂,其可以包括:表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCOMS)、弗氏不完全佐剂、LPS类似物(包括单磷脂脂质A)、胞壁酰肽、醌类似物、囊泡(诸如角鲨烯和鲨烯)、透明质酸、脂质、脂质体、钙离子、病毒蛋白、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒或其他已知的转染促进剂。优选地,转染促进剂是聚阴离子、聚阳离子,包括聚-L-谷氨酸(LGS)或脂质。优选地,转染促进剂是聚-L-谷氨酸,更优选地,聚-L-谷氨酸以小于6mg/ml的浓度存在于DNA质粒疫苗中。在一些实施方案中,DNA质粒疫苗中聚-L-谷氨酸的浓度小于4mg/ml、小于2mg/ml、小于1mg/ml、小于0.750mg/ml、小于0.500mg/ml、小于0.250mg/ml、小于0.100mg/ml、小于0.050mg/ml或小于0.010mg/ml。

[0105] 在一些实施方案中,DNA质粒疫苗可以递送至哺乳动物,以引发免疫应答;优选地哺乳动物是灵长类,包括人和非人灵长类、奶牛、猪、鸡、狗或雪貂。更优选地,哺乳动物是人类灵长类。

[0106] 本发明的一个方面涉及引发哺乳动物中的针对寨卡病毒的免疫应答的方法。所述方法包括将DNA质粒疫苗递送至哺乳动物的组织,并用恒定电流的能量脉冲对组织的细胞进行电穿孔,该电脉冲能够有效地允许DNA质粒进入细胞。DNA质粒疫苗包含能够表达在哺乳动物的细胞中寨卡抗原(优选地共有抗原)以引发哺乳动物中的免疫应答的DNA质粒。引发免疫应答的方法包括用恒定电流的能量脉冲对组织的细胞进行电穿孔,该电脉冲能够有效地允许DNA质粒进入细胞。

[0107] 在一些实施方案中,本发明的方法包括递送步骤,其包括将DNA质粒疫苗注射到皮内、皮下或肌肉组织。优选地,这些方法包括使用体内电穿孔装置来预设期望递送至组织的电流;并且用一个等于预设电流的恒定电流的能量脉冲对组织的细胞进行电穿孔。在一些实施方案中,电穿孔步骤还包括:测定电穿孔细胞中的阻抗;相对于测定阻抗调整能量脉冲的能量水平,以维持电穿孔细胞中的恒定电流;其中测定和调整步骤在能量脉冲的持续时间内发生。

[0108] 在一些实施方案中,电穿孔步骤包括根据以分散模式递送能量脉冲的脉冲序列模式将能量脉冲递送至多个电极。

[0109] 本发明还包括编码能够引发哺乳动物中的免疫应答的多肽的DNA片段,所述免疫应答基本上类似于寨卡抗原的非片段。DNA片段是选自本发明的多个编码核苷酸序列(包括编码SEQ ID NO:1的核苷酸序列,即SEQ ID NO:2;编码SEQ ID NO:3的核苷酸序列,即SEQ

ID NO:4;编码SEQ ID NO:5的核苷酸序列,即SEQ ID NO:6;编码SEQ ID NO:7的核苷酸序列,即SEQ ID NO:8;编码SEQ ID NO:9的核苷酸序列,即SEQ ID NO:10;编码SEQ ID NO:11的核苷酸序列,即SEQ ID NO:17;以及编码SEQ ID NO:18的核苷酸序列,即SEQ ID NO:14-16)中的至少一个的片段,并且可以是任何以下所述DNA片段,因为它适用于本文提供的特定编码核酸序列。在一些实施方案中,DNA片段可以包含30个或更多个、45个或更多个、60个或更多个、75个或更多个、90个或更多个、120个或更多个、150个或更多个、180个或更多个、210个或更多个、240个或更多个、270个或更多个、300个或更多个、320个或更多个、340个或更多个或360个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,DNA片段可以包含免疫球蛋白E(IgE)前导序列的编码序列。在一些实施方案中,DNA片段可以包含少于60个、少于75个、少于90个、少于120个、少于150个、少于180个、少于210个、少于240个、少于270个、少于300个、少于320个、少于340个或少于360个核苷酸。

[0110] 本发明包括由编码核苷酸序列编码的多肽,并且可包括具有SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、18的氨基酸序列的多肽。本发明还包括能够引发哺乳动物中的免疫应答的多肽片段,所述免疫应答基本上类似于寨卡抗原的非片段。多肽片段选自本发明的多个多肽序列(包括SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、18)中的至少一个,并且可以是任何以下所述多肽片段,因为它适用于本文提供的特定多肽序列。在一些实施方案中,多肽片段可以包含15个或更多个、30个或更多个、45个或更多个、60个或更多个、75个或更多个、90个或更多个、100个或更多个、110个或更多个或120个或更多个氨基酸。在一些实施方案中,多肽片段可以包含少于30个、少于45个、少于60个、少于75个、少于90个、少于100个、少于110个或少于120个氨基酸。

[0111] 普通技术人员可以容易地确定引发哺乳动物中的免疫应答(所述免疫应答基本上类似于寨卡抗原的非片段)的功能片段。如可公开获得的数据库,诸如美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)所提供,该片段可被分析为含有至少一个,优选地更多个抗原表位。此外,免疫应答研究可使用小鼠和抗体滴度和ELISpots分析(诸如以下实施例所示)常规评估。

[0112] 疫苗

[0113] 在一些实施方案中,本发明通过提供具有表位的蛋白质和编码蛋白质的遗传构建体,使它们能够作为特别有效的免疫原(可诱导针对该免疫原的免疫应答)来提供改进疫苗。因此,可以提供疫苗以诱导治疗性或预防性免疫应答。

[0114] 根据本发明的一些实施方案,将根据本发明的疫苗递送至个体,以调节个体的免疫系统的活性,从而增强免疫应答。当编码蛋白质的核酸分子被个体的细胞摄取时,核苷酸序列在细胞中表达,从而将蛋白质递送至个体。本发明的多个方面提供在核酸分子(诸如质粒)上递送蛋白质的编码序列的方法。

[0115] 根据本发明的一些方面,提供了预防性和/或治疗性免疫个体的组合物和方法。

[0116] 当DNA质粒被细胞摄取时,它们可作为单独的遗传物质保留在细胞中。或者,可将RNA施用于细胞。还设想了以线性微型染色体提供遗传构建体,所述微型染色体包括着丝粒、端粒和复制起点。遗传构建体包括核酸分子的基因表达必需的调控元件。所述元件包括:启动子、起始密码子、终止密码子和多腺苷酸化信号。此外,增强子通常是编码靶蛋白或免疫调节蛋白的序列的基因表达必需的。这些元件可操作地连接至编码所需蛋白质的序列,并且调控元件可在其施用的个体中操作也是必需的。

[0117] 起始密码子和终止密码子通常被视为编码所需蛋白质的核苷酸序列的一部分。然而,这些元件在核酸构建体所施用的哺乳动物中发挥功能是必需的。起始和终止密码子必须与编码序列同框。

[0118] 所用的启动子和多腺苷酸化信号必须在个体的细胞内发挥功能。

[0119] 用于实践本发明,特别是产生用于人类的遗传疫苗的启动子的实例包括但不限于猿猴空泡病毒40 (SV40) 的启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 诸如牛免疫缺陷病毒 (BIV) 长末端重复序列 (LTR) 启动子、莫洛尼 (Moloney) 病毒、家禽白血病毒 (ALV)、巨细胞病毒 (CMV) 诸如CMV立即早期启动子、爱泼斯坦-巴尔 (Epstein Barr) 病毒 (EBV)、劳斯 (Rous) 肉瘤病毒 (RSV) 以及人类基因 (诸如人类肌动蛋白、人类肌球蛋白、人类血红蛋白、人类肌肉肌酸和人类金属硫蛋白) 的启动子;在其他实施方案中,启动子可以是天然的或合成的组织特异性启动子,诸如肌肉或皮肤特异性启动子。这些启动子的实例如美国申请公开no.US20040175727所述,该申请公开据此整体并入。

[0120] 用于实践本发明,特别是产生用于人类的遗传疫苗的多腺苷酸化信号的实例包括但不限于SV40多腺苷酸化信号、LTR多腺苷酸化信号、牛生长激素 (bGH) 多腺苷酸化信号、人类生长激素 (hGH) 多腺苷酸化信号和人类 β -珠蛋白多腺苷酸化信号。具体地讲,可使用pCEP4质粒 (Invitrogen, San Diego, CA) 中的SV40多腺苷酸化信号,该信号称为SV40多腺苷酸化信号。

[0121] 除DNA表达所需的调控元件之外,其他元件也可以包含在DNA分子中。这些另外的元件包括增强子。增强子可以选自包括但不限于以下各项的组:人类肌动蛋白、人类肌球蛋白、人类血红蛋白、人类肌肉肌酸和病毒增强子,诸如来自CMV、RSV和EBV的那些增强子。

[0122] 遗传构建体可以具有哺乳动物复制起点,以在染色体外维持构建体,并且在细胞中产生多个构建体拷贝。Invitrogen (San Diego, CA) 的质粒pVAX1、pCEP4和pREP4含有爱泼斯坦-巴尔病毒复制起点和核抗原EBNA-1编码区,它们在不整合的情况下产生高拷贝附加体复制。

[0123] 为了使蛋白产生最大化,可以选择调控序列,这些调控序列非常适合在构建体施用的细胞中进行基因表达。此外,可以选择编码所述蛋白质的密码子,这些密码子在宿主细胞中最有效地转录。本领域的普通技术人员可以产生在细胞中发挥功能的DNA构建体。

[0124] 在一些实施方案中,可以提供其中本文所述的蛋白质的编码序列连接至IgE前导肽,或移除这种IgE前导的核酸构建体。在一些实施方案中,本文所述的蛋白质连接至IgE信号肽,或移除这种IgE前导。

[0125] 在使用蛋白质的一些实施方案中,例如本领域的普通技术人员可以使用熟知的技术来产生和分离本发明的蛋白质。在使用蛋白质的一些实施方案中,例如本领域的普通技术人员可以使用熟知的技术来将编码本发明的蛋白质的DNA分子插入可商购获得的用于熟知表达系统的表达载体。例如,可商购获得的质粒pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) 可以用于在大肠杆菌中产生蛋白质。可商购获得的质粒pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) 可以例如用于在酵母菌菌株酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中产生。可商购获得的MAXBAC™完全杆状病毒表达系统 (Invitrogen™, San Diego, Calif.) 可以例如用于在昆虫细胞中产生。可商购获得的质粒pcDNA或pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) 可以例如用于在哺乳动物细胞 (诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞) 中产生。本领域的普通技术人

员可以使用这些商业化表达载体和系统等等通过常规技术和易于获得的起始物料来产生蛋白质。(参见例如Sambrook等人, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Press (1989))。因此, 所需蛋白质可以在原核和真核系统中制备, 产生加工形式的蛋白质谱。

[0126] 本领域的普通技术人员可以使用其他可商购获得的表达载体和系统, 或者使用熟知的方法和易于获得的起始物料来产生载体。含有必需控制序列, 诸如启动子和多腺苷酸化信号以及优选地增强子的多个宿主的表达系统是易于获得和本领域已知的。参见例如Sambrook等人, *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Press (1989)。遗传构建体包括在构建体所转染的细胞系或靶向组织的细胞中发挥功能的可操作地连接至启动子的蛋白质编码序列。组成型启动子的实例包括巨细胞病毒 (CMV) 或SV40的启动子。诱导型启动子的实例包括小鼠乳腺白血病病毒或金属硫蛋白启动子。本领域的普通技术人员可易于从易于获得的起始物料产生用于使用编码本发明的蛋白质的DNA转染细胞的遗传构建体。包括编码蛋白质的DNA的表达载体用于转化相容的宿主, 然后在其中发生外源DNA的表达的条件下培养和维持该宿主。

[0127] 适当地以及如本领域所已知, 通过裂解细胞从培养物, 或从培养基回收所产生的蛋白质。本领域的普通技术人员可使用熟知的技术分离使用这些表达系统产生的蛋白质。如上所述使用特异性结合至特定蛋白质的抗体从天然来源纯化蛋白质的方法可同样适用于纯化重组DNA方法产生的蛋白质。

[0128] 除通过重组技术产生蛋白质之外, 还可以使用自动肽合成仪产生分离的基本上纯的蛋白质。这些技术是本领域的普通技术人员熟知的, 并且如果在DNA编码的蛋白质产生中未提供具有置换的衍生物, 则这些技术是有用的。

[0129] 核酸分子可以使用任何几种熟知的技术递送, 包括使用和不使用体内电穿孔、脂质体介导、纳米颗粒促进、重组载体 (诸如重组腺病毒、重组腺病毒相关病毒和重组牛痘) 的DNA注射 (也称为DNA疫苗接种)。优选地, 通过DNA注射以及体内电穿孔递送本文所述的核酸分子 (诸如DNA质粒)。

[0130] 施用途径包括但不限于肌肉内、鼻内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及局部、透皮、通过吸入或栓剂或施用至粘膜组织 (诸如通过灌洗至阴道、直肠、尿道、面颊和舌下组织)。优选的施用途径包括肌肉内、腹膜内、皮内和皮下注射。遗传构建体可以通过工具 (包括但不限于传统注射器、无针注射装置、“微粒轰击基因枪”) 或其他物理方法 (诸如电穿孔 (“EP”)、“流体动力学方法”或超声) 来施用。

[0131] 用于促进本发明的DNA疫苗递送的优选电穿孔装置和电穿孔方法的实例包括授予Draghia-Akli等人的美国专利No. 7, 245, 963、Smith等人提交的美国专利公开2005/0052630描述的那些, 这些专利的内容据此以引用的方式整体并入。2007年10月17日提交的共同待决和共同拥有的美国申请序列号11/874072提供的用于促进DNA疫苗的递送的电穿孔装置和电穿孔方法也是优选的, 该申请根据35USC 119 (e) 要求2006年10月17日提交的美国临时申请序列号60/852, 149和2007年10月10日提交的美国临时申请序列号60/978, 982的权益, 所有这些临时申请据此整体并入。

[0132] 授予Draghia-Akli等人的美国专利No. 7, 245, 963描述了模块化电极系统及其用于促进生物分子引入身体或植物内的选定组织的细胞的用途。模块化电极系统包括多个针

状电极；皮下注射针；提供从可编程恒定电流脉冲控制器至多个针状电极的导电性连接的电连接器；以及电源。操作者可抓住安装在承载结构上的多个针状电极并将它们牢固地插入身体或植物内的选定组织中。然后可通过皮下注射针将生物分子递送至选定组织。激活可编程恒定电流脉冲控制器，并将恒定电流脉冲施加到多个针状电极。所施加的恒定电流脉冲促进生物分子引入多个电极之间的细胞中。美国专利No.7,245,963的全部内容据此以引用的方式并入。

[0133] Smith等人提交的美国专利公开2005/0052630描述了可用于有效地促进生物分子引入身体或植物内的选定组织的细胞中的电穿孔装置。电穿孔装置包括电动装置（“EKD装置”），这些电动装置的操作由软件或固件指定。EKD装置根据用户控制和脉冲参数的输入在阵列中的电极之间产生一系列可编程恒定电流脉冲模式，并允许存储和获取电流波形数据。电穿孔装置还包括具有针状电极阵列的可更换电极盘、注射针用中心注射通道和可移动导向盘。美国专利公开2005/0052630的全部内容此以引用的方式并入。

[0134] 美国专利No.7,245,963和美国专利公开2005/0052630所述的电极阵列和方法不仅可适用于深入穿透组织（诸如肌肉），也可以深入穿透其他组织或器官。由于电极阵列的构造，注射针（递送所选的生物分子）也完全插入靶器官中，并且注射垂直施用于靶组织电极所预描绘的区域中。美国专利No.7,245,963和美国专利公开2005/005263所述的电极的长度优选地为20mm，规格为21号。

[0135] 以下是本发明的方法的实例，并且在上文讨论的专利参考文献中更详细地讨论：电穿孔装置可构造为将能量脉冲递送至哺乳动物的所需组织，所述能量脉冲产生类似于使用者输入的预设电流的恒定电流。电穿孔装置包括电穿孔部件和电极组零件或操作组零件。电穿孔部件可包括和结合电穿孔装置的多个元件中的一个或多个，包括：控制器、电流波形发生器、阻抗测试器、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端口、存储器部件、电源和电源开关。电穿孔部件可作为电穿孔装置的一个的元件发挥功能，并且其他元件是与电穿孔部件通信的单独元件（或部件）。在一些实施方案中，电穿孔部件可作为电穿孔装置的多于一个元件发挥功能，这些元件与电穿孔装置的与电穿孔部件分离的另外元件通信。本发明不受作为一个机电或机械装置的部分存在的电穿孔装置的元件的限制，因为元件可作为一个装置或作为彼此通信的单独元件发挥功能。电穿孔部件能够递送能量脉冲，并且包括反馈机制，所述能量脉冲在所需的组织中产生恒定电流。电极组零件包括在空间排列上具有多个电极的电极阵列，其中所述电极组零件接收来自电穿孔部件的能量脉冲，并且通过电极将其递送至所需的组织。多个电极中的至少一个在能量脉冲的递送期间是中性的，并测定所需组织中的阻抗，使阻抗与电穿孔部件通信。反馈机制可接收测定阻抗，并且可调整电穿孔部件递送的能量脉冲以维持恒定电流。

[0136] 在一些实施方案中，多个电极可以分散模式递送能量脉冲。在一些实施方案中，多个电极可通过在编程序列下控制电极来以分散模式递送能量脉冲，并且编程序列由使用者输入至电穿孔部件。在一些实施方案中，编程序列包括按顺序递送的多个脉冲，其中所述多个脉冲的每个脉冲通过至少两个有源电极（具有一个测定阻抗的中性电极）递送，并且其中所述多个脉冲的后续脉冲通过至少两个有源电极（具有一个测定阻抗的中性电极）的另一个递送。

[0137] 在一些实施方案中，反馈机制由硬件或软件执行。优选地，反馈机制由模拟闭环回

路执行。优选地,该反馈每50 μ s、20 μ s、10 μ s或1 μ s发生,但优选地为实时反馈或即时反馈(即,基本上即时的,如通过用于测定响应时间的可用技术所测定)。在一些实施方案中,中性电极测定所需组织中的阻抗,使阻抗与反馈机制通信,并且反馈机制对阻抗产生响应,并调整能量脉冲以将恒定电流维持在类似于预设电流的值。在一些实施方案中,反馈机制在能量脉冲的递送期间连续和即时维持恒定电流。

[0138] 药学上可接受的赋形剂可包括诸如媒介物、佐剂、载剂或稀释剂的功能分子,它们是已知的和易于公开获得的。优选地,药学上可接受的赋形剂是佐剂或转染促进剂。在一些实施方案中,核酸分子或DNA质粒与多核苷酸功能增强子或遗传疫苗促进剂(或转染促进剂)的施用一起递送至细胞。多核苷酸功能增强子如美国序列号5,593,972、5,962,428和1994年1月26日提交的国际申请序列号PCT/US94/00899所述,这些专利各自以引用的方式并入本文。遗传疫苗促进剂如1994年4月1日提交的美国序列号021,579所述,该专利以引用的方式并入本文。转染促进剂可作为与核酸分子的混合物结合核酸分子施用,或在核酸分子的施用同时、之前或之后单独施用。转染促进剂的实例包括表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCOMS)、弗氏不完全佐剂、LPS类似物(包括单磷酸脂质A)、胞壁酰肽、醌类似物和囊泡(诸如角鲨烯和鲨烯),并且透明质酸也可用于结合遗传构建体施用。在一些实施方案中,DNA质粒疫苗也可包括转染促进剂,诸如脂质、脂质体(包括卵磷脂脂质体或本领域已知的其他脂质体,作为DNA-脂质体混合物)(参见例如W09324640)、钙离子、病毒蛋白、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒或其他已知的转染促进剂。优选地,转染促进剂是聚阴离子、聚阳离子,包括聚-L-谷氨酸(LGS)或脂质。

[0139] 在一些优选的实施方案中,DNA质粒与作为蛋白质的基因的佐剂一起递送,所述佐剂还增强针对此类靶蛋白的免疫应答。这些基因的实例为编码其他细胞因子和淋巴因子的那些,诸如 α -干扰素、 γ -干扰素、血小板衍生生长因子(PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MHC、CD80、CD86和IL-15(包括信号序列缺失的IL-15,并且任选地包括IgE的信号肽)。可用的其他基因包括编码以下蛋白质的那些:MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I κ B、失活NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素应答基因、NF κ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配体、Ox40、Ox40配体、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及其功能片段。

[0140] 根据本发明的DNA质粒疫苗包含约1纳克至10毫克;约1微克至约10毫克;或优选地约0.1微克至约10毫克;或更优选地约100微克至约1毫克的DNA量。在一些优选的实施方案中,根据本发明的DNA质粒疫苗包含约5纳克至约1000微克DNA。在一些优选的实施方案中,DNA质粒疫苗含有约10纳克至约800微克DNA。在一些优选的实施方案中,DNA质粒疫苗含有约0.1至约500微克DNA。在一些优选的实施方案中,DNA质粒疫苗含有约1至约350微克DNA。在一些优选的实施方案中,DNA质粒疫苗含有约25至约250微克DNA。在一些优选的实施方案

中,DNA质粒疫苗含有约100微克至约1毫克DNA。

[0141] 根据本发明的DNA质粒疫苗根据所用的施用模式配制。在其中DNA质粒疫苗是可注射组合物的情况下,它们是无菌的和/或无热原的和/或无微粒的。优选地使用等渗制剂。一般来讲,等渗性添加剂可包括氯化钠、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇和乳糖。在一些情况下,等渗溶液(诸如磷酸盐缓冲盐水)是优先的。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实施方案中,将血管收缩剂添加至制剂中。在一些实施方案中,将允许制剂在室温或环境温度下长时间稳定的稳定剂,诸如LGS或其他聚阳离子或聚阴离子加入到制剂中。

[0142] 在一些实施方案中,引发哺乳动物中的针对共有寨卡抗原的免疫应答的方法包括诱导粘膜免疫应答的方法。这些方法包括将CTACK蛋白、TECK蛋白、MEC蛋白及其功能片段或其可表达编码序列中的一者或多者,与包括上述共有寨卡抗原的DNA质粒组合施用于哺乳动物。CTACK蛋白、TECK蛋白、MEC蛋白及其功能片段中的一者或多者可在本文提供的DNA质粒寨卡疫苗施用之前、同时或之后施用。在一些实施方案中,将编码一个或多个选自以下的蛋白质的分离的核酸分子施用于哺乳动物:CTACK、TECK、MEC及其功能片段。

[0143] 实施例

[0144] 通过以下实施例进一步展示了本发明。应当理解,这些实施例虽然表明了本发明的优选的实施方案,但仅以说明的方式给出。从上文讨论和这些实施例,本领域的技术人员可确定本发明的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可对本发明作出多个变化和修改,以使其适应于多种用途和条件。因此,除本文所示和所述之外,本发明的多个修改对于本领域的技术人员从上文描述中将是显而易见的。这些修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0145] 优选地,与本文所述的肌肉或皮肤EP装置一起使用的DNA制剂具有高DNA浓度,优选地在递送至皮肤最佳的小体积,优选地小注射体积,理想地25-200微升(μL)内包括微克至几十毫克的量,优选地毫克的量的DNA的浓度。在一些实施方案中,DNA制剂具有高DNA浓度,诸如1mg/ml或更高(mg DNA/体积的制剂)。更优选地,DNA制剂具有提供200 μL 配方中的DNA克数并且更优选地100 μL 配方中的DNA克数的DNA浓度。

[0146] 与本发明的EP装置一起使用的DNA质粒可使用已知装置和技术的组合配制或制造,但优选地它们使用美国申请no.12/126611所述的优化质粒制造技术来制造,该申请在2009年1月1日公布为美国公开No.20090004716。在一些实施例中,这些研究所用的DNA质粒可以大于或等于10mg/mL的浓度配制。除美国公开No.20090004716所述和2007年7月3日公开的美国专利No.7,238,522所述之外,制造技术还包括或结合本领域的普通技术人员熟知的多个装置和方案。与本文所述的皮肤EP装置和递送技术一起使用的高浓度质粒允许质粒以合理的小体积施用至ID/SC空间中,并有助于增强表达和免疫效果。公开,即美国公开No.20090004716和美国专利No.7,238,522据此整体并入。

[0147] 实施例1:寨卡prME疫苗

[0148] 寨卡疫苗方法

[0149] 如图2所示,寨卡抗原表达构建体使用其中所示的骨架产生。将表达盒插入CMV启动子之后,并且具有拖尾的多腺苷酸化尾。盒可包括图3所示的抗原的编码序列,包括prME、NS1和衣壳。

[0150] 寨卡prME的系统发生分析和疫苗设计

[0151] 如图5和图6所示进行系统发生分析。星号示出了共有prME序列SEQ ID NO:3的位置。根据图7所示,该共有prME示出为插入表达载体中的克隆位点。

[0152] 如图9A和图9B所示,通过蛋白质印迹分析表征表达蛋白,这些图示出了与抗黄病毒抗体的特异性结合。

[0153] 然后如图10A和图10B所示,纯化蛋白质。

[0154] 小鼠免疫

[0155] 动物-Balb/C小鼠(8只一组)

[0156] 质粒-寨卡-prME(包括SEQ ID NO:2的编码序列)

[0157] 装置-3P电穿孔装置(Inovio Pharmaceuticals,Plymouth Meeting,PA)

[0158] 免疫时间表:

[0159] 用DNA免疫小鼠总共3次:第0天一次(初始),并在第14天和第28天加强。DNA第3次免疫后一周进行免疫分析。

[0160] 注射方法-肌肉内

[0161] 采血时间表-采血前和第14天、第28天和第35天

[0162] 采血方法-眼眶后

[0163] 分组和动物-10只动物/组 \times 3组=30只

[0164] 1) pVax1

[0165] 2) pVax-1寨卡preME(SEQ ID NO:2)

[0166] 细胞免疫应答由寨卡prME疫苗引发

[0167] 通过IFN-g ELISpot测定针对覆盖prME抗原的肽库来评估加标特异性CD8 T淋巴细胞应答。参见图11和图12。每组中的平均应答在第三次免疫后一周。误差棒表示标准误差。示出了对pVax对照的应答。

[0168] 小鼠中的抗体诱导

[0169] 小鼠的寨卡prME疫苗接种引发与寨卡包膜抗原反应的阳性抗体应答。参见图13和图14。

[0170] 基于与重组蛋白质E抗原的结合,发现寨卡prME疫苗在小鼠中具有免疫原性。通过蛋白质印迹分析和ELISA在免疫动物中观察到血清转变。

[0171] 实施例2:抗寨卡病毒prME的新型DNA疫苗诱导体内保护性免疫

[0172] 本文描述了一种靶向寨卡病毒的前体膜+包膜蛋白的新型合成DNA共有区-基疫苗。在构建体表达确认后,通过电穿孔免疫小鼠和非人灵长类动物,示出了在疫苗接种动物中诱导具有中和活性的细胞和体液免疫。在IFN- α / β R^{-/-}小鼠中,单次或两次注射免疫在该致死性攻击模型中对体重下降或死亡具有100%保护性。这代表第一个被批准用于人类试验的寨卡病毒疫苗。

[0173] 现在描述材料和方法。

[0174] 细胞、病毒和动物

[0175] 将人胚胎肾(HEK)293T(美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)(ATCC)#CRL-N268,Manassas,VA)和Vero CCL-81(ATCC#CCL-81)细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素和链霉素的达尔伯克氏改良的伊格尔培养基(DMEM; Gibco-Invitrogen)中并在汇合后传代。将神经元肿瘤细胞系SK-N-SH(ATCC HTB-11)和

U87MG (ATCC HTB-14) 维持在补充有10%胎牛血清 (FBS) 和1%青霉素和链霉素的伊格尔最低基础培养基 (MEM; Corning-cellgro) 中并在汇合后传代。在Vero细胞中扩增寨卡病毒株MR766 (由Susan Weiss博士慷慨惠赠) 和PR209 (Bioqual, MD) 二者, 并通过标准噬菌斑测定法滴定Vero细胞上的原种。

[0176] C57/BL6和IFNAR^{-/-}小鼠和恒河猴程序在氯胺酮麻醉下进行。在受控的湿度、温度和光照 (12小时光照/12小时黑暗循环) 条件下, 将动物圈养在相邻的单个灵长类笼, 允许它们进行社会互动。自由获取食物和水。每日监测动物两次, 并且每日两次喂食商业化猴食、零食和水果。

[0177] DNA疫苗构建体和合成

[0178] 寨卡-prM+Env质粒DNA构建体编码全长膜前体 (prM) 和包膜 (E) 蛋白。利用共有区策略, 并通过当前寨卡prM+E蛋白序列的比对确定共有序列。为了在人类中增强表达, 对疫苗插入物进行了遗传优化 (即密码子和RNA优化), 并添加IgE前导序列以促进表达。构建体通过商业化合成 (Genscript, NJ), 然后将其亚克隆至在如上文所述的巨细胞病毒立即早期启动子的控制下的经修饰的pVax1表达载体, (Muthumani等人, 2015, Sci Trans Med 7: 301ra132)。最终构建体命名为ZIKV-prME疫苗, 并且对照质粒骨架为pVax1。此外, 还设计了多个其他编码来自MR766和2016年巴西疫情爆发株的prM和Env基因的匹配DNA构建体, 以进行进一步评价。DNA构建体的大规模扩增由Inovio (Plymouth Meeting, PA) 进行, 并在水中配制经纯化的质粒DNA以用于免疫。将DNA插入物的大小通过琼脂糖凝胶电泳确认。使用MEGA第5版软件通过ClustalW多重比对进行系统发生分析 (Muthumani等人, 2015, Sci Trans Med 7:301ra132)。

[0179] DNA免疫和电穿孔

[0180] 小鼠免疫原性研究: 用溶于总体积20或30 μ l水中的25 μ g DNA免疫雌性C57BL/6小鼠 (6至8周龄) 和IFNAR^{-/-}小鼠 (5至7周龄) (n=4), 所述DNA通过体内EP递送来递送至胫前肌肉。在免疫后立即在相同的位点, 使用CELLECTRA自适应恒定电流EP装置 (Inovio Pharmaceuticals, PA) 递送体内EP。将三叉CELLECTRA微创装置插入肌肉内~2mm。通过三角形3电极阵列递送方波脉冲, 该电极阵列由26号实心不锈钢电极构成, 并且两个0.1安培的恒定电流脉冲以52微秒/脉冲, 间隔1秒延迟来递送。此前已经详细描述使用EP的其他方案。以两周间隔免疫小鼠三次, 并在最后免疫后1周处死。在每次免疫后收集血液, 用于分析细胞和体液免疫应答 (Muthumani等人, 2015, Sci Trans Med 7:301ra132)。恒河猴免疫原性研究: 用2mg ZIKV-prME疫苗在2个位点ID免疫5只恒河猴两次 (相隔4周)。使用针对小鼠免疫所述的相同装置立即递送EP。

[0181] IFNAR^{-/-}小鼠中的激发研究

[0182] 将IFNAR^{-/-}小鼠分成三组。免疫第一组小鼠一次并在免疫后2周用10⁶PFU ZIKV PR209进行激发。以两周间隔免疫第二组小鼠两次, 并在第二次免疫后1周用10⁶PFU ZIKV PR209进行激发。以两周间隔免疫第三组小鼠两次, 并在第二次免疫后1周用2 \times 10⁶PFU ZIKV PR209进行激发。在激发后, 对动物进行称重并且每日通过皮下定位的温度芯片测定体温。此外, 每日两次观察它们的疾病临床体征 (行动减少; 驼背姿势; 后肢指节行走 (部分麻痹), 一条后肢或两条后肢麻痹)。基于福利理由的安乐死标准包括20%体重下降或观察到任何异常临床体征。

[0183] 蛋白质印迹和免疫荧光测定

[0184] 对于体外表达研究,使用GeneJammer试剂根据制造商的方案(Agilent)进行转染。简而言之,使细胞在35-mm培养皿中生长至50%汇合,并用1 μ g寨卡preME疫苗转染。在转染后2天收集细胞,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤两次,并用细胞裂解缓冲液(Cell Signaling Technology)裂解。如前所述(Muthumani等人,2015,Sci Trans Med 7:301ra132)使用蛋白质印迹验证来自收集的细胞裂解物的寨卡preM+Env蛋白的表达。

[0185] 使用蛋白质印迹分析确认小鼠和RM免疫血清的特异性。将5 μ g或1 μ g ZIKV Env重组蛋白和Odyssey蛋白质分子量标记物(产品#928-40000)上样至3-12%Bis-Tris NuPAGE凝胶(Life Technologies)。在MOPS缓冲液中以200V跑凝胶50分钟。使用iBlot 2凝胶转移装置(Life Technologies)将蛋白质转移到硝基纤维素膜上。在室温下,在PBS Odyssey阻断缓冲液(LI-COR Biosciences)中阻断膜1小时。以1:500稀释抗黄病毒组抗原(MAB10216-Clone D1-4G2-4-15)抗体以检测疫苗表达,并且在含0.2%Tween 20(Bio-Rad)的Odyssey阻断缓冲液中以1:50稀释小鼠和RM的免疫血清,并在4 $^{\circ}$ C下与膜一起温育过夜。用PBST洗涤膜,然后用适当的二抗[对于小鼠血清和黄病毒抗体,山羊抗小鼠IRDye680CW(LICOR);并且对于RM血清,山羊抗人IRDye800CW(LICOR)]在室温下对于小鼠血清以1:15,000稀释度温育1小时。在洗涤后,在Odyssey红外成像仪(LI-COR)上对膜成像。

[0186] 对于免疫荧光测定,使HeLa或Vero细胞在盖玻片上生长,并用5 μ g寨卡preM+Env疫苗转染。在转染后两天,用4%PFA固定细胞15min。然后在室温下用在PBS中稀释的正常山羊血清阻断非特异性结合1小时。然后在PBS中洗涤载玻片5min,随后用免疫小鼠或RM的血清以1:100稀释度在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。如上所述洗涤载玻片并用适当的二抗[对于小鼠血清,山羊抗小鼠IgG-AF488(Sigma),对于RM血清,山羊抗人IgG-AF488]以1:200稀释度在室温下温育1小时。在洗涤后,加入含DAPI(Abcam)的Fluoroshield封固介质以对所有细胞的核进行染色。其后,封固盖玻片并在显微镜下观察载玻片(EVOS细胞成像系统;Life Technologies)(Muthumani等人,2015,Sci Trans Med 7:301ra132)。另外,使Vero、SK-N-SH或U87-MB细胞在四室组织培养物处理的载玻片(Falcon cat#354114)上生长,并用MR766 ZV以0.01的MOI感染4-6天,然后根据描述进行染色。

[0187] 脾细胞和PBMC分离

[0188] 从所有小鼠制备脾细胞的单细胞悬浮液。简而言之,在5ml补充有10%FBS(R10)的RPMI 1640中单独收集小鼠的脾脏,然后用Stomacher 80桨式搅拌器(A.J.Seward and Co.Ltd.)以高速处理30秒。通过45-mm尼龙过滤器过滤处理的脾脏样品,然后在4 $^{\circ}$ C下以1500rpm离心10min。在室温下将细胞沉淀物重悬于5ml ACK(氯化铵-钾)裂解缓冲液(Life Technologies)中5min,然后加入PBS以终止反应。在4 $^{\circ}$ C下以1500rpm再次离心样品10min。将细胞沉淀物以 1×10^7 个细胞/ml的浓度重悬于R10中,然后在用于ELISpot测定和流式细胞分析前使其通过45-mm尼龙过滤器(Muthumani等人,2015,Sci Trans Med 7:301ra132)。对于RM,将血液(每个时间点20ml)收集于EDTA管中,并且使用标准Ficoll-Hypaque程序以及Accuspin管(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)分离外周血单核细胞(PBMC)。

[0189] ELISpot分析

[0190] 简而言之,用抗小鼠IFN- γ 捕获抗体(R&D Systems)涂布96孔ELISpot板(Millipore)并在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。第二天,用PBS洗涤板并用PBST+1%BSA阻断2h。将pZV-

prM+Env免疫小鼠的二十万个脾细胞加入每个孔,并在存在单独培养基(阴性对照)、含PMA/离子霉素(阳性对照)的培养基或含肽库(1 μ g/ml)的培养基的情况下,在37 $^{\circ}$ C下5%CO₂中温育过夜,所述肽库由15-聚体(其中有9个氨基酸重叠)组成并且跨越寨卡包膜蛋白(Genscript)的长度。在24小时后,洗涤细胞,然后在4 $^{\circ}$ C下与生物素酰化抗小鼠IFN- γ 抗体(R&D Systems)一起温育过夜。在洗涤后将链霉亲和素-碱性磷酸酶(R&D Systems)加入每个孔,然后在室温下温育2h。洗涤板,然后加入5-溴-4-氯-3'-吡啶基磷酸对甲苯胺盐和氯化硝基四氮唑蓝(色原显色试剂;R&D Systems)。最后,用蒸馏水冲洗板,在室温下干燥,通过自动化ELISpot读取器(CTL Limited)定量斑点形成单位,并将原始值归一化为每百万个脾细胞的SFU。对于RM样品,如制造商所述使用猴IFN- γ 试剂盒(MABTECH)的ELISPOTPRO,用肽库刺激二十万个PBMC,洗涤板并使斑点形成,如上所述计数(Muthumani等人,2015,Sci Trans Med 7:301ra132;Mallilankaraman等人,2011,PLoS Negl Trop Dis 5:e928)。

[0191] 体液免疫应答:抗体结合ELISA

[0192] 如上所述使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定小鼠和RM血清的滴度(Muthumani等人,2015,Sci Trans Med 7:301ra132)。简而言之,使用1 μ g/ml纯化的寨卡包膜蛋白涂布96孔微量滴定板(Nalgene Nunc International,Naperville,IL),在4 $^{\circ}$ C下过夜。在用溶于PBS的10%FBS阻断至少一小时后,用0.05%PBST(溶于PBS的Tween20)洗涤板4次。免疫小鼠和RM的血清样品在1%FBS、0.2%PBST中连续稀释,加入板,然后在室温下温育1h。在0.05%PBST中再次洗涤板4次,然后用HRP缀合的抗小鼠IgG(Sigma)在室温下对于小鼠血清以1:35000稀释度温育1h。对于RM血清,在室温下以1:5000稀释度使用抗猴IgG HRP(Southern Biotech)1h。根据制造商的说明(Sigma Aldrich),通过添加SIGMAFASTTMOPD(邻苯二胺二盐酸盐)片剂来检测结合的酶。15分钟后通过添加1N H₂SO₄来终止反应。然后以450nm的光密度读板。一式两份测定所有小鼠血清和RM血清样品。使用Frey等人所述的方法测定终点滴度(Frey等人,1998,J Immunol Methods 221:35-41)。

[0193] 中和(PRNT₅₀)测定

[0194] 上文描述了涉及MR766和Vero细胞的噬菌斑减少中和试验(PRNT)(Sun等人,2006,J Infect Dis 193:1658-65)。简而言之,在无血清DMEM中连续稀释小鼠或RM血清(1:10至1:1280),并用等体积的MR766寨卡病毒(100pfu)在37 $^{\circ}$ C下温育两小时。将混合物加入Vero细胞的汇合层,并留在37 $^{\circ}$ C下吸收两小时。将2 \times DMEM培养基:软琼脂(1:1)覆盖物加入到细胞之上,在37 $^{\circ}$ C下温育板5天。从孔移除琼脂覆盖物,并将细胞用4%多聚甲醛固定,用1 \times PBS洗涤,用结晶紫溶液染色,用1 \times PBS洗涤,并保持板的干燥。对24孔板中进行的测定中的噬菌斑手动计数。用自动免疫斑点读取器(CTL Limited)扫描96孔板中进行的测定中的噬菌斑,使用ELISpot读取器提供的自动化软件对样品孔中的噬菌斑以及阴性对照(仅DMEM)和阳性对照(仅100pfu MR766寨卡病毒)中的噬菌斑计数。如下所述计算噬菌斑减少百分比:减少%=100 \times [1-(每个稀释度的噬菌斑平均数/阳性对照孔中的噬菌斑平均数)]。使用GraphPad Prism软件进行噬菌斑减少%与每个单独血清稀释度的对数转换的非线性回归分析,以促进疫苗接种响应后峰值时的实际50%PRNT滴度的线性插值。每个中和目标总体和通过疫苗处理组计算50%中和时的中值和四分位距;还计算几何平均滴度。滴度代表引起噬菌斑数减少50%的最高稀释度的倒数。

[0195] 流式细胞术和细胞内细胞因子染色(ICS)测定

[0196] 将脾细胞加入96孔板(2×106个/孔),在37℃/5%CO₂下,存在蛋白质转运抑制剂混合物(布雷非德菌素A和莫能菌素)(eBioscience)的情况下用寨卡prM和包膜合并肽刺激5小时。细胞刺激混合物(加上蛋白质转运抑制剂)(佛波醇12-十四烷酰13-乙酸酯(PMA)、离子霉素、布雷非德菌素A和莫能菌素)(eBioscience)用作阳性对照,并且R10培养基用作阴性对照。然后如制造商的说明(BD, San Diego, CA)所述对所有细胞的表面和细胞内蛋白质进行染色。简而言之,在FACS缓冲液(含有0.1%叠氮化钠和1%FCS的PBS)中洗涤细胞,然后用荧光染料缀合的抗体进行表面染色。根据制造商的方案,用FACS缓冲液洗涤细胞,使用BD Cytotfix/Ctyoperm™(BD, San Diego, CA, USA)固定和透化,然后进行细胞内染色。使用以下抗体进行表面染色:活/死可固定紫色死细胞染色试剂盒(Invitrogen)、CD19(V450;克隆1D3;BD Biosciences)CD4(FITC;克隆RM4-5;ebioscience)、CD8(APC-Cy7;克隆53-6.7;BD Biosciences);CD44(BV711;克隆IM7;Biolegend)。对于细胞内染色,使用以下抗体:IFN-γ(APC;克隆XMG1.2;Biolegend)、TNF-α(PE;克隆MP6-XT22;ebioscience)、CD3(PerCP/Cy5.5;克隆145-2C11;Biolegend);IL-2(PeCy7;克隆JES6-SH4;ebioscience)。使用LSRII流式细胞仪(BD Biosciences)收集所有数据并使用FlowJo软件(Tree Star, Ashland, OR)进行分析。

[0197] 统计学分析

[0198] 利用Graphpad, Prism 4(Graphpad software, Inc. San Diego, CA)进行统计学分析。将Log₁₀转换应用于终点结合ELISA滴度和全病毒PRNT₅₀滴度。

[0199] 现在描述这些实验的结果。

[0200] ZIKV-prME共有DNA疫苗的构建

[0201] 使用在1952年和2015年之间分离的引起人类中的感染的多种寨卡的prM和E序列产生寨卡prM(前体膜)和E(包膜)基因(ZIKV-prME)的共有序列(图16A)。在进行另外的修饰和优化以改善其体内表达,包括添加高效免疫球蛋白E(IgE)前导肽序列后,将ZIKA-prME共有序列克隆至pVax1载体(图16B)。使用核酸内切酶限制性消化和基因测序来验证最终疫苗质粒(图16C)。通过在84转染后48小时从疫苗转染的293T细胞进行蛋白质分析和间接免疫荧光测定来确认质粒的ZIKA-prME蛋白的表达(图16D和图16E)。

[0202] 寨卡-prME DNA疫苗诱导小鼠中的抗原特异性T细胞或功能体液应答

[0203] 评价ZIKA-prME质粒疫苗诱导细胞免疫应答的能力。使用对照质粒骨架(pVax1)或ZIKA-prME质粒疫苗通过肌肉内注射以2周间隔免疫五只C57/BL6小鼠的组三次,然后如本文所述在92个递送位点进行电穿孔(EP)(Muthumani等人,2015, Sci Trans Med 7: 301ra132)。在第三次注射后一周处死动物,并在离体暴露至涵盖ZIKA-Env的肽库后,以标准酶联免疫斑点测定评价从每只动物收集的大量脾细胞分泌干扰素-γ的能力。测定结果显示,在用多个ZIKA-Env肽库刺激后,ZIKA-prME免疫小鼠的脾细胞产生显著的细胞免疫应答(图17A)。使用22个肽库通过作图分析ELISpot以矩阵形式评价引发一种或多种最强细胞应答的ZIKA-Env的一个或多个区域,所述肽库由跨越整个ZIKA-prME蛋白的15-聚体(其中有11个氨基酸重叠)组成。如图17B所示,几个库诱导升高的T细胞应答,但肽库15诱导最高SFU/10⁶应答。作图数据揭示了一个显性prME表位的序列‘IRCIGVSNRDFVEGM(SEQ ID NO: 18)’。使用免疫表位数据库分析资源IDEP共有区工具确认所列出的显性肽含有一个H2-Db限制性表位,表明了该抗原的有效加工。

[0204] ZIKA-prME疫苗的细胞免疫原性的进一步评价需要确定最后免疫后一周收集的CD8⁺T细胞的多功能特性。结果显示,ZIKA-prME疫苗提高了表达肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和IFN- γ 的双功能疫苗特异性T细胞的比例(图17C)。重要的是,ZIKA-prME疫苗接种表现出强大的扩大T细胞功能的能力。使用质粒115进行进一步疫苗研究,所述质粒115编码最近鉴定的巴西寨卡株或用于比较研究的原始MR766寨卡株的prME序列。在第三次注射后一周在使用与图17A所用相同的ZIKA-preME肽库刺激脾细胞之后通过IFN- γ ELISpot来测量任一质粒免疫的小鼠中的细胞免疫应答的诱导。结果显示,新型共有ZIKA-prME DNA疫苗构建体诱导的T细胞应答和抗体应答比这两种非共有质粒疫苗中的一种产生的高至少两倍(图18A和图18B)。巴西或MR766 prME疫苗诱导的细胞应答的详细作图分析揭示,它们二者还诱导对显性Env特异性CTL表位(在图17B中针对共有ZIKA-prME质粒鉴定)的最显著细胞应答(数据未示出)。总体而言,共有免疫原在这些测定中似乎始终更稳健,并用于进一步研究。

[0205] 评价共有ZIKA-prME疫苗诱导小鼠中的体液免疫应答的能力。使用25 μ g空对照质粒或共有ZIKA prME疫苗质粒通过肌肉内注射以2周间隔免疫C57/BL6小鼠组三次,然后进行EP。在第0天(在第一次免疫前)、第14天(在第一次免疫后两周)、第21天(在第二次免疫后一周)和第35天(第三次免疫后一周)从每只注射小鼠获取血清。使用固定化rZIKA-Env作为捕获抗原通过ELISA测试每次收集的血清的寨卡特异性IgG应答。在第21天观察到抗寨卡特异性IgG显著增加,并观察到第35天血清的血清IgG水平进一步加强(图19A)。第138天来自疫苗接种动物的60份血清显示,在最终加强后第35天血清中观察到的高抗体应答长期维持。最重要的是,如终点滴度所示,来自疫苗接种小鼠的血清含有非常高水平的抗体(图19B)。通过筛选第35天合并血清来进行疫苗诱导的抗体的特异性的另外评估,以评估其通过Western分析检测rZIKA-E(图19C)以及通过免疫荧光测定法对寨卡感染的细胞染色(图19D)的能力。这两项分析的结果确认了特异性。

[0206] 此外,还评估编码上述巴西株和MR766株的prME序列的质粒免疫的小鼠的寨卡特异性结合抗体应答。在ELISA中分析假免疫或疫苗免疫小鼠的第35天血清的rZIKA-E结合。该分析表明,两种质粒均诱导显著抗体结合(图18C和图18D),并且使用共有ZIKA-prME DNA疫苗的免疫产生良好的体液应答,并且对异源性寨卡包膜的亲和力增加。

[0207] 使用适用于分析DV、WNV和其他黄病毒的前述技术的方法,对空pVax1、共有ZIKA-prME质粒疫苗或共有ZIKA-衣壳质粒疫苗免疫三次的小鼠的第35天合并血清执行噬菌斑减少中和试验(PRNT)测定。如图19E所示,在第三次疫苗接种后,抗寨卡PRNT50稀释度的倒数滴度,在160接收ZIKA-prME疫苗的小鼠中显著高于接收ZIKA-衣壳DNA疫苗或对照DNA pVax1的那些小鼠。该实验所用的ZIKA-prME疫苗诱导的中和抗体具有的PRNT50滴度=456。底部示出了1:100稀释度的血清的病毒噬菌斑的代表性照片。

[0208] ZIKA-prME DNA疫苗在非人灵长类动物中引发细胞和体液应答

[0209] 通过皮内(ID)免疫来免疫NHP,然后根据前述研究进行电穿孔,这显示该方法可通过DNA疫苗来增强抗原特异性体液免疫应答。给恒河猴(RM;n=5只/组) ID施用2.0mg疫苗质粒以及EP,并在第0天(在第一次免疫前)、第2周(在第一次免疫后2周)、第6周(在第二次免疫后2周)从RM收集血清和PBMC。为了测定疫苗诱导的细胞免疫应答,对第6周PBMC进行ELISpot分析,所述PBMC用图17A所用的ZIKA-E肽库离体刺激。结果显示,在所有RM中,ZIKA prME免疫加强的抗寨卡T细胞应答,并且与免疫前血清的应答相比,扩大了其抗原识别(图

20A)。

[0210] 通过ELISA评估来自ID+EP疫苗接种RM的血清181的特异性抗寨卡病毒抗体应答。在初次疫苗接种后,在第一次免疫后两周,在RM中检测到ZIKA-Env特异性结合抗体,并通过后续免疫进一步加强(图20B)。稀释相同的免疫后时间点的疫苗接种RM的血清,以研究终点滴度,并再次测定rZIKA-Env(图20C)。通过Western分析使用疫苗接种组的合并RM血清确认ELISA结果(图20D)。另外,免疫RM的血清也能够在免疫荧光测定中识别ZIKA-MR766感染的Vero细胞(图20E)。然后,尝试检测寨卡免疫RM的血清中的中和抗体(nAb)应答。使用PRNT50(50%对照寨卡感染受到抑制的血清稀释度的倒数)测试NAb活性,并对每个单独的免疫动物进行。对每组动物分配抗体滴度 <10 (这是测定法的检测限)的样品。有趣的是,ZIKA-prME免疫猴具有161至1380的滴度范围(平均 501 ± 224) (图21A)。

[0211] NHP免疫血清阻断寨卡感染的成神经细胞瘤细胞(SK-N-SH细胞)和重要的神经祖细胞(U-87MG)中的感染的能力。MR766或PR209与对照或疫苗血清的细胞系,并在24小时分析感染。疫苗接种RM的血清抑制感染后两种细胞系中的任一种病毒(感染的多重性为1.0)(图21B和图21C)。这些数据支持了ZIKA-prME DNA疫苗接种RM的血清抑制寨卡感染的有效性。

[0212] 寨卡特异性功能免疫应答以及保护ZIKA prME DNA疫苗免疫的缺乏I型干扰素受体(IFNAR)的小鼠免受寨卡病毒的感染

[0213] 寨卡诱导的疾病和免疫的机制不明确,并且对寨卡感染的免疫应答的保护性与假设致病性质仍不清楚。大多数小鼠品系对寨卡感染具有耐受性,然而,据发现缺乏IFN- α / β 受体(IFNAR)的小鼠对感染和疾病敏感,大多数在激发16的6-7天内死亡。研究共有ZIKA-prME质粒疫苗诱导该小鼠品系中的细胞和体液免疫应答的能力。用空对照质粒或用共有ZIKA-prME质粒通过EP以2周间隔免疫IFNAR小鼠组3次。在第0天、第14天、第21天和第35天从免疫小鼠收集血清,在最后免疫后一周从小鼠收集脾细胞。疫苗免疫的IFNAR小鼠的脾细胞产生显著的细胞免疫应答,如ELISpot分析中每10⁶个细胞的SFU水平所示(图22A)。使用rZIKA-Env作为捕获抗原的ELISA的结果显示,在第14天动物具有可检测的抗寨卡血清IgG,并且这些水平在随后的收集时间中得到加强(图22B)。如终点滴度所示,疫苗接种小鼠的血清含有显著水平的抗体(图22B)。结果表明,共有ZIKA-prME疫苗免疫的IFNAR小鼠能够引发抗寨卡细胞和体液免疫应答,这支持了该潜在激发模型中疫苗保护的进一步研究。

[0214] 在探索性研究中,用皮下(s.c.);腹膜内(i.v);颅内(i.c.)和静脉内(i.v)施用的 1×10^6 PFU的PR209分离株激发IFNAR小鼠。在激发后,监测所有动物的临床体征,包括常规体重、记录体温测定值以及濒死病症的其他体征,诸如后肢无力和麻痹。在接种后前2天内观察到小鼠的总体外观变化。然而,在第三天,全部四条感染途径显示出活性减少、行动减少、驼背姿势;伴随有后肢无力以及水摄入和明显的体重下降。与激发位点无关的动物在第6天和第8天之间死于感染,并使用该激发剂量进行后续研究。

[0215] 对两组疫苗接种动物(10只/组)或两组pVax1免疫对照在第0天和第14天各进行疫苗接种 $1 \times$,并在第21天用 1×10^6 PFU或 2×10^6 PFU的PR209进行激发(图23B和图23C)。100%的疫苗接种动物存活,而仅有30%的 1×10^6 PFU或10%的 2×10^6 PFU激发对照存活。然后,对一组动物进行免疫 $1 \times$,并在免疫后第14天对它们进行激发。100%的这些动物存活,而10%的对照动物存活。所有用ZIKA-prME进行疫苗接种一次然后用寨卡病毒激发的小鼠均在致

死性攻击中存活(图23A)。在所有激发中,疫苗接种动物也不表现出疾病的症状,并且不出现体重下降(图23D)。用寨卡病毒感染对照小鼠引起体重显著下降,通常结合有行动减少、驼背姿势、后肢指节行走和/或两条后肢麻痹伴有大量死亡(图23E和图23F)。总之,这些数据展示了,ZV-prME DNA疫苗介导保护小鼠免于寨卡激发的免疫应答。

[0216] 在本研究中,在啮齿动物和非人灵长类动物中记录了使用prME作为抗原从基于DNA的疫苗+电穿孔产生的体液和细胞应答。通过EP递送方法进行的优化的增强DNA疫苗技术能有效地刺激稳健和广泛的免疫应答,并且IFNAR小鼠中的单次免疫诱导免于疾病和死亡的免疫。本研究支持这样的概念:可使用灵活且可快速临床实施的DNA疫苗接种策略针对此大规模爆发的病毒感染产生保护性免疫。

[0217] 实施例3:针对ZIKV感染的体内保护和发病机理通过被动抗体转移和prMEnv DNA疫苗的主动免疫进行

[0218] 在本研究中,产生靶向ZIKV的前体膜+包膜蛋白(prMEnv)的新型合成DNA疫苗并评价体内功效。在质粒构建体的初始体外发展和评价研究之后,使用此prMEnv DNA-基免疫原通过电穿孔介导的增强DNA递送来免疫小鼠和非人灵长类动物。据发现,疫苗接种动物产生抗原特异性细胞和体液免疫以及中和活性。在缺乏干扰素(IFN) - α/β 受体的小鼠(称为IFNAR^{-/-})中,除预防大脑组织中的病毒病理学之外,在体内病毒激发后,用此DNA疫苗免疫还诱导了100%保护免受感染相关的体重下降或死亡。此外,非人灵长类动物抗ZIKV免疫血清的被动转移保护IFNAR^{-/-}小鼠免受后续病毒激发。致病性小鼠模型中的该ZIKV疫苗的这种初始研究支持了ZIKV感染中靶向prME的免疫应答的重要性,并且表明对该疫苗方法的另外研究可与人类中的ZIKV对照有关。

[0219] 现在描述材料和方法。

[0220] 细胞、病毒和动物

[0221] 将人胚胎肾293T(美国模式培养物保藏所(ATCC) #CRL-N268, Manassas, VA, USA) 和 Vero CCL-81 (ATCC#CCL-81) 细胞维持在补充有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素和链霉素的DMEM(达尔伯克氏改良的伊格尔培养基; Gibco-Q3 Invitrogen) 中并汇合后时传代。在Vero细胞中扩增ZIKV病毒株MR766(由Susan Weiss博士慷慨惠赠)和PR209(Bioqual, MD)二者,并通过标准噬菌斑测定法滴定Vero细胞上的原种。根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)、Wistar和加拿大公共卫生署IACUC(机构动物护理和使用委员会)(Wistar and the Public Health Agency of Canada IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee)) 准则,在温度控制的光循环设施中对五至六周龄雌性C57BL/6 (The Jackson Laboratory) 和IFNAR^{-/-} (MMRRC仓库-The Jackson Laboratory) 小鼠进行圈养和处理/疫苗接种。

[0222] 在美国马里兰州的Bioqual (Bioqual, MD, USA) 对RM进行圈养和处理/疫苗接种。本研究严格根据美国国立卫生研究院(NIH)、动物福利办公室(Office of Animal Welfare) 和美国农业部(U.S. Department of Agriculture) 的实验动物护理和使用指南(Guide for Care and Use of Laboratory Animals) 所述的建议进行。所有动物免疫工作均由Bioqual动物护理和使用委员会(Bioqual Animal Care and Use Committee) (IACUC) 批准。Bioqual获得美国实验动物护理认证协会(American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care) 的认可。所有程序均在兽医工作人员的监督下由经过培训的人

员在氯胺酮麻醉下进行,并且根据“Weatherall非人灵长类动物使用报告(Weatherall report for the use of non-human primates)”建议,进行所有努力以保护动物的福利并尽量减少动物的痛苦。在受控的湿度、温度和光照(12h光照/12h黑暗循环)条件下,将动物圈养在相邻的单个灵长类动物笼中,允许它们进行社会互动。自由获取食物和水。由经过培训的人员每日监测动物两次,并且每日两次喂食商业化猴食、零食和水果。

[0223] ZIKV-prME DNA疫苗的构建

[0224] 合成编码全长膜前体(prM)+包膜(E)和衣壳蛋白的ZIKV-prME质粒DNA构建体。利用共有区策略,并通过当前ZIKV prME蛋白序列的比对确定共有序列。为了在人类中增强表达,对疫苗插入物进行了遗传优化(即密码子和RNA优化),并添加IgE前导序列以促进表达。构建体通过商业化合成(Genscript,NJ,USA),然后亚克隆至修饰pVax1表达载体,在巨细胞病毒立即早期启动子的控制下,如上文所述(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。最终构建体命名为ZIKV-prME疫苗,并且对照质粒骨架为pVax1。此外,还设计了多个其他编码来自MR766(DQ859059.1)和2016年巴西(AMA12084.1)疫情爆发株的prM和E基因的匹配DNA构建体,以进行进一步评估。DNA构建体的大规模扩增由Inovio Pharmaceuticals Inc.(Plymouth Meeting,PA,USA)进行,在水中配制纯化的质粒DNA以用于免疫。DNA插入物的大小通过琼脂糖凝胶电泳确认。使用MEGA第5版软件通过ClustalW多重比对进行系统发生分析(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。

[0225] DNA免疫和电穿孔介导的递送增强

[0226] 用溶于总体积20或30 μ l水的25 μ g DNA免疫雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄)和IFNAR^{-/-}小鼠(5-6周龄),所述DNA通过体内电穿孔施加来递送至胫前肌肌肉。在DNA注射后立即在相同的位点,使用CELLECTRA自适应恒定电流电穿孔装置(Inovio Pharmaceuticals)施加体内电穿孔。将三叉CELLECTRA微创装置插入肌肉内 \sim 2mm。通过三角形三电极阵列递送方波脉冲,该电极阵列由26号实心不锈钢电极构成,并且两个0.1安培的恒定电流脉冲以52 μ s/脉冲,间隔1s延迟来递送。此前已经详细描述使用电穿孔的其他方案(Flingai等人,2015,Sci Rep 5:12616)。以2周间隔免疫小鼠三次,并在最后免疫后1周杀死。在每次免疫后收集血液,用于分析细胞和体液免疫应答(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。恒河猴免疫原性研究:用2mg ZIKV-prME疫苗在两个位点以5周间隔皮内免疫五只恒河猴两次。使用针对小鼠免疫所述的相同装置立即施加电穿孔。

[0227] 蛋白质印迹分析

[0228] 对于体外表达研究,使用GeneJammer试剂根据制造商的方案(Agilent)进行转染。简而言之,使细胞在35mm培养皿中生长至50%汇合,并用1 μ g ZIKV-prME疫苗转染。在转染后2天收集细胞,用PBS洗涤两次,并用细胞裂解缓冲液(Cell Signaling Technology)裂解。如前所述(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132),使用蛋白质印迹验证来自收集的细胞裂解物的ZIKV-prME蛋白的表达,并且通过使用来自ZIKV-prME疫苗接种小鼠的抗黄病毒或免疫血清来验证小鼠和RM血清的免疫特异性。简而言之,将5 μ g或1 μ g ZIKV包膜重组蛋白(rZIKV-E);转染的细胞裂解物或上清液和Odyssey蛋白质分子量标记物(产品#928-40000)加入3-12%Bis-Tris NuPAGE凝胶(Life Technologies)。在MOPS缓冲液中以200V运行凝胶50min。使用iBlot 2凝胶转移装置(Life Technologies)将蛋白质转移到硝基纤维素膜上。在室温下,在PBS Odyssey阻断缓冲液(LI-COR Biosciences)中阻断膜

1h。为了检测疫苗表达,以1:500稀释抗黄病毒组抗原(MAB10216-Clone D1-4G2-4-15)抗体,并且在含0.2%Tween 20(Bio-Rad)的Odyssey阻断缓冲液中以1:50稀释小鼠和RM的免疫血清,在4℃下与膜一起温育过夜。用PBST洗涤膜,然后用适当的二抗(对于小鼠血清和黄病毒抗体,山羊抗小鼠IRDye680CW;(LI-COR Biosciences);对于RM血清,山羊抗人IRDye800CW(LI-COR Biosciences))在室温下对于小鼠血清以1:15,000稀释度温育1h。在洗涤后,在Odyssey红外成像仪(LI-COR Biosciences)上对膜成像。

[0229] 免疫荧光测定

[0230] 对于免疫荧光测定,使细胞在盖玻片上生长,并用5 μ g ZIKV-prME疫苗转染。在转染后两天,用4%多聚甲醛固定细胞15min。然后在室温下用在PBS中稀释的正常山羊血清阻断非特异性结合1h。然后在PBS中洗涤载玻片5min,随后用免疫小鼠或RM的血清以1:100稀释度在4℃下温育过夜。如上所述洗涤载玻片并用适当的二抗(对于小鼠血清,山羊抗小鼠IgGAF488;对于RM血清,山羊抗人IgG-AF488;Sigma)以1:200稀释度在室温下温育1h。在洗涤后,加入含DAPI(Abcam)的Fluoroshield封固介质以对所有细胞的细胞核进行染色。其后,安装盖玻片并在显微镜下观察载玻片(EVOS细胞成像系统;Life Technologies)(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。此外,使Vero、SK-N-SH或U87-MB细胞在四室组织培养物处理的载玻片上生长,并用ZIKV-MR766或PR209以0.01的MOI感染,ZIKV-MR766或PR209与/不与RM免疫血清(1:200)一起预温育,根据描述使用泛黄病毒抗体在ZIKV感染后4天染色(Rossi等人,2016,J Rop Med Hyg 94:1362-9)。

[0231] 组织病理学分析

[0232] 对于组织病理学,将福尔马林固定的石蜡包埋大脑组织切成5 μ m厚的矢状切片,置于Superfrost显微镜载玻片(Fisher Scientific)上并在37℃下支持过夜。使用两次更换的二甲苯对切片进行脱石蜡,并通过浸入100%、90%然后70%乙醇中再水化。使用Harris苏木精(Surgipath)对切片进行核结构染色2min,然后在1%酸性醇(Surgipath)中分化并用Scott自来水处理2min。随后,使用伊红(Surgipath)对切片进行细胞质结构复染2min。将载玻片用70%、90%和100%乙醇脱水,在二甲苯中澄清并使用Permount(Fisher Scientific)安装。

[0233] 脾细胞和PBMC分离

[0234] 从所有小鼠制备脾细胞的单细胞悬浮液。简而言之,在5ml补充有10%FBS(R10)的RPMI 1640中单独收集小鼠的脾脏,然后用Stomacher 80桨式搅拌器(A.J.Seward and Co.Ltd.)以高速处理30s。通过45mm尼龙过滤器过滤处理的脾脏样品,然后在4℃下以1,500g离心10min。在室温下将细胞沉淀物重悬于5ml ACK(氯化铵-钾)裂解缓冲液(Life Technologies)中5min,然后加入PBS以终止反应。在4℃下以1,500g再次离心样品10min。将细胞沉淀物重悬于R10,然后在用于ELISpot分析和流式细胞分析前使其通过45mm尼龙过滤器(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。对于RM,将血液(每个时间点20ml)收集于EDTA管中,并且使用标准Ficoll-hypaque程序以及Accuspin管(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA)分离PBMC。还在每个时间点将五毫升血液收集到血清管中以进行血清分离。

[0235] 流式细胞术和细胞内细胞因子染色测定

[0236] 将脾细胞加入96孔板(2×10^6 个/孔),在37℃/5%CO₂下,存在蛋白质转运抑制剂

混合物(布雷非德菌素A和莫能菌素;eBioscience)的情况下用ZIKV-prME合并肽刺激5h。细胞刺激混合物(加上蛋白质转运抑制剂;PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)、离子霉素、布雷非德菌素A和莫能菌素;eBioscience)用作阳性对照,R10培养基用作阴性对照。然后如制造商的说明(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)所述对所有细胞的表面和细胞内蛋白质进行染色。简而言之,在FACS缓冲液(含有0.1%叠氮化钠和1%FBS的PBS)中洗涤细胞,然后用荧光染料缀合的抗体进行表面染色。根据制造商的方案,用FACS缓冲液洗涤细胞,使用BD Cytotfix/Ctyoperm™(BD Biosciences)固定和透化,然后进行细胞内染色。使用以下抗体进行表面染色:LIVE/DEAD可固定紫色死细胞染色试剂盒(Invitrogen)、CD19(V450;克隆1D3;BD Biosciences)CD4(FITC;克隆RM4-5;eBioscience)、CD8(APC-Cy7;克隆53-6.7;BD Biosciences);CD44(BV711;克隆IM7;BioLegend)。对于细胞内染色,使用以下抗体:IFN- γ (APC;克隆XMG1.2;BioLegend)、TNF- α (PE;克隆MP6-XT22;eBioscience)、CD3(PerCP/Cy5.5;克隆145-2C11;BioLegend);IL-2(PeCy7;克隆JES6-SH4;eBioscience)。使用LSRII流式细胞仪(BD Biosciences)收集所有数据并使用FlowJo软件(Tree Star, Ashland, OR, USA)进行分析。

[0237] ELISpot分析

[0238] 简而言之,用抗小鼠IFN- γ 捕获抗体(R&D Systems)涂布96孔ELISpot板(Millipore)并在4°C下温育过夜。第二天,用PBS洗涤板并用PBST+1%BSA阻断2h。将免疫小鼠的二十万个脾细胞加入每个孔,并在存在单独培养基(阴性对照)、含PMA/离子霉素(阳性对照)的培养基或含肽库(1 μ g/ml)的培养基的情况下,在37°C下5%CO₂中温育过夜,所述肽库由15聚体(其中有九个氨基酸重叠)组成并且跨越ZIKV prME蛋白(Genscript)的长度。在24小时后,洗涤细胞,然后温育在4°C下与生物素酰化抗小鼠IFN- γ 抗体(R&D Systems)一起过夜。在洗涤后将链霉亲和素-碱性磷酸酶(R&D Systems)加入每个孔,然后在室温下温育2h。洗涤板,然后加入5-溴-4-氯-3'-吡啶基磷酸对甲苯胺盐和氯化硝基四氮唑蓝(色原显色试剂;R&D Systems)。最后,用蒸馏水冲洗板,在室温下干燥,并通过自动化ELISpot读取器(CTL Limited)定量SFU,并将原始值归一化至每百万个脾细胞的SFU。对于RM样品,如制造商所述使用猴IFN- γ 试剂盒(MABTECH)的ELISPOT^{PRO};用肽库刺激二十万个PBMC;并洗涤板并使斑点形成,并如上所述计数(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。

[0239] 体液免疫应答:抗体结合ELISA

[0240] 如上所述使用ELISA测定小鼠和RM血清的滴度(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。简而言之,使用1 μ g纯化的rZIKV-E蛋白在4°C下涂布96孔微量滴定板(Nalgen Nunc International, Naperville, IL, USA)过夜。在用于PBS中的10%FBS阻断至少一小时后,用0.05%PBST(于PBS中的Tween20)洗涤板四次。将免疫小鼠和RM的血清样品在1%FBS中连续稀释,加入板,然后在室温下温育1h。在0.05%PBST中再次洗涤板四次,然后用HRP缀合的抗小鼠IgG(Sigma)在室温下对于小鼠血清以1:35,000稀释度温育1h。对于RM血清,在室温下以1:5,000稀释度使用抗猴IgG HRP(Southern Biotech)1h。根据制造商的说明书(Sigma-Aldrich),通过添加SIGMAFAST OPD(邻苯二胺二盐酸盐)底物溶液来检测结合的酶。15min后通过添加1N H₂SO₄来终止反应。在Synergy读板器上读取450nm下的光密度。一式两份测定所有小鼠和RM血清样品。使用如上所述的方法测定终点滴度(Frey等人,

1998, J Immunol Methods 21:35-41)。

[0241] 中和 (PRNT₅₀) 测定

[0242] 上文描述了涉及MR766和Vero细胞的噬菌斑减少中和试验 (PRNT) (Sun等人, 2006, J Infect Dis 193:1658-65)。简而言之, 在无血清DMEM中连续稀释热失活小鼠或RM血清 (1:10至1:1280) 并用等体积的ZIKV MR766 (100PFU) 在37°C下温育2h。将混合物加入Vero细胞的汇合层, 并留在37°C下吸收2h。将2×DMEM培养基:软琼脂 (1:1) 覆盖物加入到细胞之上, 并在37°C下温育板5天。移除琼脂覆盖物, 并用4%多聚甲醛固定细胞, 用1×PBS洗涤, 用结晶紫溶液染色, 用1×PBS洗涤, 并保持板的干燥。用自动免疫斑点读取器 (CTL Limited) 扫描24孔板中进行的测定中的噬菌斑, 并使用ELISpot读取器提供的自动化软件对样品孔中以及阴性对照 (仅DMEM) 和阳性对照 (仅100PFU MR766 ZIKV病毒) 孔中的噬菌斑计数。如下计算噬菌斑减少百分比: 减少% = 100 × {1 - (每个稀释度的噬菌斑平均数/阳性对照孔中的噬菌斑平均数)}。使用GraphPad Prism软件进行噬菌斑减少%相对于每个单独血清稀释度的对数转换的非线性回归分析, 以促进疫苗接种响应后峰值时的实际50% PRNT滴度的线性插值。每个中和目标总体和通过疫苗处理组计算50%中和时的中值和四分位距; 还计算几何平均滴度。滴度代表引起噬菌斑数减少50%的最高稀释度的倒数。

[0243] IFNAR^{-/-}小鼠中的ZIKV激发研究

[0244] 对于寨卡激发研究, 用ZIKA-prME疫苗或pVax1免疫IFNAR^{-/-}小鼠 (n=10只/组) 一次或两次。在第15天 (单次免疫组) 或第21天 (两次免疫组) (第二次免疫后一周) 用1×10⁶PFU或2×10⁶PFU ZIKV-PR209病毒激发小鼠。另外, 免疫另外的IFNAR^{-/-}小鼠组 (n=10只/组) 一次, 并在第15天用2×10⁶PFU ZIKV-PR209病毒激发。在激发后, 对动物进行称重并且每日通过皮下定位的温度芯片测量体温。此外, 观察它们的疾病临床体征每日两次 (行动减少; 驼背姿势; 后肢指节行走 (部分麻痹), 一条后肢或两条后肢麻痹), 并抽血以进行病毒载量测定。基于福利理由的杀死标准包括20%体重下降或一条或两条后肢麻痹。

[0245] 用于测量ZIKV载量的实时RT-PCR测定

[0246] 将处理的小鼠的脑浸入4°C RNAlater (Ambion) 中1周, 然后保存在-80°C下。然后对脑组织称重, 并使用TissueLyser (Qiagen) 与不锈钢珠在2ml冷冻小瓶中的600μl RLT缓冲液中以30个循环/s匀化6min。还使用RNeasy Plus微型试剂盒 (Qiagen) 从血液分离病毒RNA。利用ZIKV特异性实时RT-PCR测定法检测主题动物的病毒RNA。使用引物ZIKV 835和ZIKV 911c和探针ZIKV 860FAM以及TaqMan快速病毒1步主混合物 (Applied Biosystems) 逆转录和扩增RNA。平行生成每个板的标准曲线, 并用于定量病毒基因组拷贝数。如上所述, 使用StepOnePlus实时PCR系统 (ABI) 软件第2.3版计算循环阈值 (Ct), 并且至少一个重复实验的Ct值 ≤ 38被视为阳性 (Lanciotti等人, 2008, Emerg Infect Dis 14:1232-9)。在该测定中采血前为阴性。

[0247] 统计学分析

[0248] 使用Mann-Whitney分析比较抗体滴度倍数增加的差异。使用Graphpad, Prism 4 (Graphpad软件, Inc. San Diego, CA, USA) 进行统计学分析。对于所有分析, P < 0.05被视为具有显著性。将Log₁₀转换应用于终点结合ELISA滴度和全病毒PRNT₅₀滴度。

[0249] 现在描述这些实验的结果。

[0250] ZIKV-prME共有DNA疫苗的构建

[0251] 使用在1952年和2015年之间分离的多种ZIKV(它们引起人类中的感染)的prM和Env序列产生ZIKV prM(前体膜)和Env(包膜)基因(ZIKV-prME)的共有序列。在进行另外的修饰和优化以改善其体内表达(包括添加高效免疫球蛋白E(IgE)前导肽序列)后,将ZIKV-prME共有序列克隆至pVax1载体(图24的小图a)。使用Discovery Studio 4.5上的同源模型和可视化进行ZIKV-包膜序列的最佳比对。参考模型包括PDB 5JHM和PDB 5IZ7。在模型中标记与prME抗原上的特定区域对应的对齐残基,以用于可视化目的(图24的小图b)。优化的共有疫苗选择相对于本研究中分析的多个ZIKV株通常是保守的或半保守的。EDE特异性中和抗体的结构研究揭示,这些识别决定子可见于包膜-二聚体界面处的血清型不变位点,这些识别决定子包括融合环的暴露主链和两个保守聚糖链(N67-和N153-连接聚糖)(Rouvinski等人,2015,Nature 520:109-13)。这两个糖基化位点在其他黄病毒中不是高度保守的。此外,ZIKV不具有N67-连接糖基化位点,并且N154-连接糖基化位点(相当于登革热中的N153-连接糖基化位点)不存在于一些分离ZIKV株中。因此,作为共有区设计的一部分,构建体的设计忽略该糖基化位点。该位点糖基化的缺乏将EDE1型广泛中和抗体(bnAb)与ZIKV-包膜蛋白的改善结合相关联(Rouvinski等人,2015,Nature 520:109-13)。

[0252] 在构建后,来自质粒的ZIKV-prME蛋白的表达通过蛋白质印迹分析和间接免疫荧光测定来确认。使用泛黄病毒抗体(图24的小图c)和血清(图24的小图d)(从ZIKV-prME免疫小鼠收集的)通过蛋白质印迹分析从ZIKV-prME瞬时转染的细胞制备的蛋白质提取物的表达。在抗ZIKV-prME特异性抗体转染后48h,通过ZIKV-prME质粒转染的293T细胞的染色通过IFA进一步检测ZIKV-prME表达(图24的小图e)。

[0253] ZIKV-prMEnv DNA疫苗在C57BL/6小鼠中诱导抗原特异性T细胞

[0254] 评价ZIKV-prMEnv质粒疫苗诱导细胞免疫应答的能力。用对照质粒骨架(pVax1)或ZIKV-prME质粒疫苗以2周间隔通过肌肉内(i.m.)注射免疫四只雌性C57BL/6小鼠组三次,然后在递送位点进行电穿孔(图25的小图a)。在第三次注射后1周杀死动物,并在包括离体暴露至涵盖ZIKV-prME的肽库之后,在ELISpot分析中评价从每只动物收集的大量脾细胞分泌干扰素- γ (IFN- γ)的能力。测定结果显示,在用多个ZIKV-E肽库刺激后,来自ZIKV-prME免疫小鼠的脾细胞产生细胞免疫应答(图25的小图b)。使用22个肽库通过ELISpot测定以矩阵形式评价引发一种或多种最强细胞应答的ZIKVEnv的一个或多个区域,所述肽库由跨越整个ZIKV-prME蛋白的15-聚体(其中11个氨基酸重叠)组成。几个库表现出升高的T细胞应答,其中肽库15表现出最高数量的斑点形成单位(SFU)(图25的小图c)。该矩阵作图分析揭示了显性prME表位‘IRCIGVSNRDFVEGM(SEQ ID NO:17)’(aa167-181)。通过使用免疫表位数据库分析资源工具的分析确认该肽含有H2-Db限制性表位,该工具支持在该单倍型中抗原被有效地加工。

[0255] ZIKV-prMEnv疫苗的细胞免疫原性的进一步评价需要确定最后免疫后1周收集的CD8⁺T细胞的多功能特性。结果显示,ZIKV-prMEnv疫苗接种提高了表达TNF- α (肿瘤坏死因子- α)和IFN- γ 的双功能疫苗特异性T细胞的比例。重要的是,ZIKV-prMEnv疫苗接种表现出强大的扩大T细胞功能的能力(图25的小图d)。

[0256] 此外,使用编码最近鉴定的巴西ZIKV株或原始MR766 ZIKV株的prMEnv序列的优化质粒进行比较免疫研究。在第三次疫苗接种后1周,在用ZIKV-prMEnv肽库刺激脾细胞后通过IFN- γ ELISpot分析测量任一质粒免疫的小鼠中的细胞免疫应答的诱导。结果显示,共有

ZIKVprME DNA疫苗构建体诱导的T细胞应答始终高于这两种非共有质粒疫苗中的一种产生的那些应答(图31A和图31B)。巴西或MR766 prME疫苗诱导的细胞应答的详细作图分析揭示,两种疫苗诱导对显性Env特异性CTL表位(如在图25的小图b和图25的小图c中针对共有ZIKV-prMEnv质粒鉴定)的显著细胞应答(数据未示出)。共有免疫原在这些T细胞测定中始终以相同的剂量诱导更稳健的应答,并且以另外的测定进一步评价。

[0257] ZIKV重组包膜蛋白的产生

[0258] 在这些研究开始时,没有可用的评价特异性抗ZIKV免疫应答的商业化试剂。所以,必要时,产生重组ZIKV-包膜蛋白(rZIKV-E)以支持在该研究中进行的测定。为了产生该试剂,基于ZIKV-prME疫苗共有抗原,将共有ZIKV-包膜序列克隆至pET30a大肠杆菌表达载体(图32A)。rZIKV-E抗原在大肠杆菌培养物中产生,使用镍柱层析纯化并使用SDS-PAGE分析,所述SDS-PAGE分析显示,rZIKV-E转染的细菌裂解物中预测大小的过表达蛋白质可通过蛋白质分析使用抗His标签抗体检测(图32B)。将来自小鼠的血清用结合至rZIKV-Env的ZIKV-prME疫苗免疫,所述rZIKV-Env用作ELISA(酶联免疫吸附测定;图32C)中的捕获抗原。与多种黄病毒的包膜蛋白反应的商业化抗体(称为泛黄病毒)也结合至rZIKV-E。蛋白质分析证实,ZIKV-prMEnv免疫小鼠的免疫血清特异性识别rZIKV-E(图32D)。这些数据表明,所产生的rZIKV-E与来自ZIKV-prMEnv疫苗接种小鼠的免疫血清特异性反应,因此该重组蛋白质被用于进一步免疫原性研究。

[0259] 通过ZIKV-prME DNA疫苗诱导C57BL/6小鼠中的功能性体液应答

[0260] 评价共有ZIKV-prMEnv疫苗诱导小鼠中的体液免疫应答的能力。通过电穿孔介导的递送,使用25 μ g空对照pVax1或共有ZIKV-prMEnv疫苗质粒,以2周间隔肌肉内(i.m.)免疫四只C57BL/6小鼠组三次。从每只免疫小鼠获得血清,并使用固定化rZIKV-E作为捕获抗原通过ELISA测试ZIKV特异性IgG应答。在第21天观察到抗ZIKV特异性IgG显著增加,并观察到第35天记录血清IgG水平进一步加强(图26A)。第60天来自疫苗接种动物的血清显示,在最终加强后长期维持升高的ZIKV特异性抗体应答。最重要的是,如终点滴度所示,疫苗接种小鼠的血清含有非常高水平的rZIKV-E特异性抗体(图26B)。通过筛选ZIKVprMEnv质粒接种小鼠的合并血清来进行疫苗诱导的抗体的特异性的另外评估,以评估其通过蛋白质分析检测rZIKV-E(包膜)(图26C)以及通过免疫荧光测定法对ZIKV株(MR766株)-感染的细胞染色(图26D)的能力。这两项分析的结果确认了疫苗诱导的体液应答的特异性。

[0261] 此外,还评估编码上述巴西株和MR766株的prMEnv序列的质粒免疫的小鼠中的ZIKV特异性结合抗体应答。通过ELISA分析pVax1和两种非共有疫苗免疫小鼠的第35天(第三次免疫后1周)血清与rZIKV-E的结合。此分析表明,MR766和Brazil疫苗质粒诱导显著的抗体结合,并且共有ZIKV-prME DNA疫苗的免疫产生有效的针对rZIKV-E的体液应答(图31C和图31D)。

[0262] 针对对照pVax1质粒、共有ZIKV-prMEnv质粒疫苗或共有ZIKV-C(衣壳)质粒疫苗免疫(3 \times)的小鼠的合并第35天血清进行噬菌斑减少中和试验(PRNT)测定。所用的PRNT测定是改编自前述分析登革热病毒、西尼罗河病毒和其他黄病毒的技术的方法(Davis等人,2001,J Virol 75:4040-7)。如图26E所示,ZIKV-prME疫苗接种产生显著的中和应答,其中抗ZIKV倒数PRNT₅₀稀释滴度(50%的对照ZIKV感染受到抑制的血清稀释度的倒数)为456 \pm 5,而ZIKV-Cap DNA疫苗接种的小鼠展示出的滴度(33 \pm 6)仅略高于pVax1对照质粒疫苗接

种动物(滴度=15±2)。

[0263] 在用ZIKV-prME DNA疫苗免疫后,缺乏I型干扰素受体(IFNAR^{-/-})的小鼠中的免疫应答和针对ZIKV的保护

[0264] ZIKV诱导的疾病和免疫的机制不明确,并且对ZIKV感染的免疫应答的保护性相对于假设致病性质仍不清楚(Rossi等人,2016,J Rop Med Hyg 94:1362-9)。大多数小鼠品系对ZIKV感染具有抗性,然而,据发现缺乏IFN-α/β受体(IFNAR^{-/-})的小鼠对感染和疾病易感,大多数在激发后的6-7天内死亡(Lazear等人,2016,Cell Host Microbe 19:720-30)。研究共有ZIKV-prME质粒疫苗诱导该小鼠品系中的细胞和体液免疫应答的能力。使用对照pVax1质粒或ZIKV prME疫苗质粒疫苗,通过电穿孔介导的递送以2周间隔肌肉内免疫五至六周龄雌性IFNAR^{-/-}小鼠(n=4)三次。在第0天、第14天、第21天和第35天从免疫小鼠收集血清,并在最后免疫后1周从小鼠收集脾细胞(第35天)。来自疫苗免疫的小鼠的脾细胞产生显著的细胞免疫应答,如ELISpot测定中每10⁶个细胞的SFU水平所示(图33A)。使用rZIKV-E作为捕获抗原的ELISA分析的结果示出了到第14天的可检测抗ZIKV血清IgG(滴度为~1:1,000),并且这些水平通过结合抗体滴度达到至少1:100,000的后续疫苗接种得到加强(图33B和图33C)。作为比较,免疫后第35天样品的PRNT₅₀滴度为1:60。结果表明,共有ZIKV-prMEnv疫苗免疫的IFNAR^{-/-}小鼠能够产生抗ZIKV细胞和体液免疫应答,这支持了该推断疫苗模型在致病性激发中的作用的进一步研究。

[0265] 在非人灵长类动物中ZIKV-prMEnv DNA疫苗引发的ZIKV特异性功能性细胞和体液应答

[0266] 基于最近的研究(示出低电压皮内形式的强效免疫应答),使用皮内电穿孔通过皮内免疫来免疫NHP(Hutnick等人,2012,Hum gene Ther 23:943-50;Broderick等人,Mol Ther Nucleic Acids 1:e11)。通过电穿孔将2.0mg疫苗质粒皮内施用于恒河猴(RM;n=5只/组),每只动物相隔4周进行疫苗接种两次。在第0天(免疫前)和第6周(第二次免疫后2周)收集血清和外周血单核细胞(PBMC)。用ZIKV-prMEnv肽库离体刺激免疫前和第6周PBMC的ELISpot分析显示出,ZIKV-prMEnv免疫诱导RM中的稳健抗ZIKV T细胞应答(图27A)。

[0267] 通过ELISA评估来自疫苗接种RM的血清中的特异性抗ZIKV抗体应答。在第6周,rZIKV-Env特异性结合抗体可在ZIKV-prMEnv疫苗接种的动物中检测到(图27B)。测定第2周(第1次免疫后)和第6周(第2次免疫后;图27C)每只动物的终点滴度。通过蛋白质印迹分析使用来自单只疫苗接种动物的RM血清确认ELISA结果(图27D)。通过PRNT₅₀测定评价第6周RM中产生的抗体的中和活性。所有疫苗接种猴具有显著的中和活性,其抗ZIKV倒数PRNT₅₀稀释滴度在161至1380的范围内(平均值501±平均值标准误差224;图27E)。PRNT滴度不与ELISA滴度直接相关联(数据未示出)。

[0268] 通过IFA检查NHP疫苗免疫血清体外阻断Vero细胞、成神经细胞瘤(SK-N-SH)或神经祖细胞(U-87MG)的ZIKV感染的能力。在血清或NHP免疫血清稀释液中预温育ZIKV Q2株(MR766或PR209),并加入每种细胞类型的单层中。感染后四天,使用泛黄病毒抗体通过IFA鉴定ZIKV阳性细胞(图34A-图34C)并定量ZIKV阳性细胞(图34B-图34D)。来自ZIKV-prME疫苗接种的RM的血清抑制每种细胞类型中的ZIKV感染。

[0269] 在ZIKV-prME免疫后在IFNAR^{-/-}小鼠中保护免受ZIKV感染和疾病

[0270] 在探索性研究中,使用1×10⁶个噬菌斑形成单位(PFU)的ZIKV-PR209分离株,通过

皮下 (s.c.) ; 腹膜内 (i.p.) ; 颅内 ; 或静脉内 (i.v.) 途径施用来激发5-6周龄IFNAR^{-/-}小鼠 (n=10)。在激发后, 监测所有动物的临床感染体征, 这包括常规体重测定以及检查濒死疾患的其他体征, 诸如后肢无力和麻痹。在接种后前4天内观察到小鼠的总体外观变化。然而, 在第四天后, 每组中的小鼠展示出总体活性减少、行动减少和驼背姿势, 通常伴随有后肢无力、水摄入减少和明显的体重下降。动物在第6天和第8天之间死于感染, 而与病毒激发途径无关 (图35A-35E)。根据这些数据, 在该模型中评价ZIKV-prME介导的保护的后续研究使用皮下途径进行激发。

[0271] 接着评价该IFNAR^{-/-}小鼠模型中的ZIKV-prMEnv疫苗的保护功效。通过肌肉内途径, 通过电穿孔介导的ZIKV-prME疫苗递送来免疫 (25 μ g疫苗) 两组小鼠 (n=10)。另外, 通过肌肉内途径, 通过电穿孔介导的对照pVax1载体递送来免疫两组10只小鼠。相隔两周进行免疫两次, 并在第21天 (第二次免疫后1周) 激发所有动物。通过皮下途径使一个集合的对照和疫苗接种小鼠接收 1×10^6 PFU ZIKV-PR209, 并且通过皮下途径用总共 2×10^6 PFU ZIKV-PR209激发每组的另一个集合。在激发后3周, 100%的所有ZIKV-prME疫苗接种动物存活, 而仅30%的单剂量或10%的双剂量激发的对照存活 (图28A和图28B)。在所有激发中, 疫苗接种动物无疾病体征, 包括无体重下降的证据 (图28C和图28D)。用ZIKV-PR209病毒感染对照小鼠引起体重显著下降, 以及行动减少、驼背姿势、后肢指节行走和/或一条或两条后肢麻痹 (图28E和图28F)。

[0272] 评价ZIKVprME DNA疫苗的单次免疫保护IFNAR^{-/-}小鼠免受ZIKV激发的潜在能力。使用对照质粒或ZIKV-prME疫苗通过电穿孔肌肉内免疫10只小鼠组一次, 并且2周后使用双倍总剂量 2×10^6 PFU ZIKV-PR209施用进行激发。在激发后三周, 100%的ZIKV-prME疫苗接种动物存活, 而仅10%的对照动物存活 (图29A)。为了确定总体组织病理学变化, 将大脑组织切成5 μ m厚矢状切片, 对核结构染色, 并使用伊红对细胞质结构进行复染 (图29B)。在激发后第7天或第8天杀死小鼠, 用于分析组织学和病毒载量。ZIKV感染导致小鼠中严重的大脑病理学变化。未接受疫苗接种的对照 (pVax1) 小鼠大脑切片显示出中性粒细胞内的核片段 (图29B); 大脑皮层的皮层内血管的管周成套、淋巴细胞浸润和退变细胞 (图29B) 以及海马体内的退变神经元 (图29B)。然而, 相比之下, ZIKV prME疫苗接种的动物大脑组织的呈现正常组织病理学 (图29B), 这支持合成ZIKV-prME疫苗免疫诱导的保护性抗体可限制大脑中病毒诱导的疾病。此观察结果证实了该模型中疫苗接种保护大脑的潜力。与ZIKV激发后疫苗接种小鼠中的体重下降和行动性损伤的改善一致, 与高 (2×10^6 PFU) 剂量激发组中病毒激发的pVax1疫苗接种动物相比, 记录到ZIKV-prME疫苗接种动物的血液 (图29C) 和脑 (图29D) 的病毒载量显著更低。总之, 这些数据展示了, ZIKV-prME DNA疫苗介导的免疫应答可保护小鼠免受ZIKV激发。

[0273] 抗ZIKV免疫血清保护小鼠免受ZIKV感染的被动转移

[0274] 然后, 测试免疫血清从ZIKV-prMEnv疫苗接种的RM转移是否可预防IFNAR^{-/-}小鼠中的ZIKV介导的发病。为此, 在ZIKV病毒激发后1天, 将第6周RM的150 μ g当量IgG (PRNT₅₀ \approx 1/160) 过继性转移到IFNAR^{-/-}小鼠。包括两组对照小鼠, 一组接收来自RM的免疫前血清, 并且另一组接收磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。接收PBS或对照血清的小鼠在感染的过程期间丧失15%至25%的原始体重, 并且在感染后6-8天均死亡。当来自RM的疫苗免疫血清转移到易于感染的小鼠时, 动物在第3天和第4天体重下降, 但随后从第5天开始体重重新增加, 并且80%最

终在感染性激发中存活(图30A),这证实了NHP血清转移在病毒激发后赋予针对ZIKV感染的临床表现的保护的的能力(图30B)。在进行以评价免疫血清转移在针对ZIKV激发的保护中的功效的重复实验中,ZIKV-prME免疫血清接受者之间的存活率在80%至100%的范围内。这些研究显示,在不存在获得性过继性抗ZIKV免疫应答的情况下,抗ZIKV疫苗免疫血清具有赋予针对ZIKV感染的显著保护的能力。

[0275] 使用ZIKV-prME共有构建体进行疫苗接种

[0276] 最近ZIKV的传播及其在人类中的相关发病机理引起了人们的严重关注。目前,对于这种新出现的感染因子没有许可的疫苗或治疗剂。最近,一组实验性ZIKV疫苗显示出在非致病性动物感染模型中降低了激发后病毒载量(Larocca等人,2016,Nature 536:474-8; Abbink等人,2016,Science 353:1192-32)。这些数据是令人鼓舞的。在这点上,在另外的模型中检查靶向寨卡的另外的新型疫苗方法是重要的。此处在小鼠和非人灵长类动物中进行电穿孔增强的免疫之后,评价合成DNA疫苗(设计为表达新型共有ZIKV-prM和E抗原)的免疫原性。据观察,ZIKV-prME DNA疫苗接种具有免疫原性,并在小鼠和NHP中产生抗原特异性T细胞以及结合和中和抗体。独特地,如最近的研究所述,通过皮内途径通过电穿孔用ZIKV-prME免疫NHP,所述皮内途径使用的电压低于肌肉内电穿孔,并且转染区域小于肌肉内电穿孔(Trimble等人,2016,Lancet 386:2078-88)。此类方法的进一步研究可以在临床环境中提供优点。

[0277] ZIKV-prME共有构建体包括潜在NXS/T基序的设计变化,该变化移除了推断糖基化位点。该位点糖基化的缺失与针对ZIKV-E蛋白的EDE1型bnAbs(广泛中和抗体)的改善结合相关联(Muthumani等人,2016,Sci Transl Med 7:301ra132)。共有ZIKV-prME诱导的抗体应答的稳健程度似乎与类似开发的ZIKV-prME-MR766和ZIKV-prME-Brazil疫苗引发的那些应答一样,或者在一些情况下量级高于那些应答。这些构建体分别与原始ZIKV-MR766分离株或最近来自巴西的循环ZIKV株序列匹配。虽然是支持性的,但进一步研究将提供这种结合的设计变化对诱导的免疫应答的作用的更多理解。

[0278] 由于ZIKV的致病性激发模型很少,比较C57BL/6和IFNAR^{-/-}小鼠中ZIKV-prME疫苗的免疫应答的推断保护性质。当用ZIKV-prME免疫时,两种小鼠品系产生稳健的体液免疫应答。还诱导了T细胞应答,但似乎与在IFNAR^{-/-}动物中诱导的那些应答相比,在野生型C57BL/6中诱导的更稳健,这支持如预期归因于小鼠敲除表型的过继性免疫转换先天的部分缺陷。然而,基于抗原特异性免疫的诱导,该模型可用于评价疫苗对感染和发病机理的影响。在该模型中,IFNAR^{-/-}小鼠中ZIKV-prME的单个疫苗接种能够保护免受疾病和死亡的伤害,包括保护神经发病机理。针对Env抗原的黄病毒中和抗体被认为对疾病保护具有关键作用,此想法由动物模型中的被动抗体转移实验直接支持,并且由易于通过蚊子传播的病毒感染的地理区域中的前瞻性研究的流行病学数据间接支持(Weaver等人,2016,Antiviral Res 130:69-80;Roa等人,2016,Lancet 387:843;Samarasekera等人,2016,Lancet 387:521-4)。虽然ZIKV-prME DNA疫苗以及从免疫NHP的血清转移的IFNAR^{-/-}小鼠的免疫在该鼠模型中是保护性的,但是与血清转移的小鼠相比,IFNAR^{-/-}疫苗接种的小鼠表现出改善的体重下降控制,这是发病机理控制的指示。虽然需要另外的研究,但此结果潜在暗示了T细胞应答在该模型中的这一保护方面的作用。此外,据通过PCR观察,从激发恢复的对照IFNAR^{-/-}小鼠保持病毒阳性至少几周,表明了疫苗接种的另外益处。本研究支持疫苗接种并且在这种情况下,

这种合成DNA疫苗接种影响易感宿主中疾病的预防的潜力。

[0279] 实施例4:DNA疫苗抗寨卡病毒prME诱导非人灵长类动物中的保护性免疫

[0280] 在第0周和第4周给恒河猴皮内 (i.d.) 免疫2mg ZIKV-prME质粒,两个部位各施用1mg,免疫之后立即进行皮内电穿孔 (EP)。在免疫前和第6周分离PBMC,并用于ELISPOT测定,以检测响应于ZIKV-prME肽刺激的IFN-g分泌细胞 (图36A)。接收一次免疫的NHP和接收两次免疫的NHP示出了针对六个肽库获得的每百万个PBMC的产生IFN-g的细胞增加,这些肽库涵盖整个prME蛋白 (图36B和图36C),表明在ZIKV-prME疫苗接种后诱导ZIKV特异性细胞免疫应答。如图37所示,抗ZIKV抗体应答由NHP的ZIKV-prME疫苗接种诱导。

[0281] 在第0周和第4周使用EP经由ID途径用pZV-prME DNA给恒河猴进行疫苗接种两次。在第8周,用寨卡-PR209病毒株皮下激发动物。作为对照,用ZV-PR209病毒感染5只未暴露的动物 (图38A)。ZV-PR209感染的未暴露的NHP各自表现出显著的病毒载量 (图38B)。用pZV-prME DNA免疫一次或两次的NHP不具有可检测的病毒载量 (图37C和图38D)。这些研究证实,寨卡-prME免疫赋予针对寨卡激发的保护。

[0282] 实施例5:1期寨卡DNA疫苗研究ID-EP期中分析

[0283] 寨卡-001临床方案

[0284] 第一次I期研究是开放标签、剂量范围研究以评价GLS-5700的安全性、耐受性和免疫原性,在未暴露于登革热病毒的成人中进行ID施用然后是EP,并且在美国和加拿大的3个地点进行。

[0285] 该研究的主要目的是,评价当通过ID注射然后是EP来施用,直到最终疫苗施用后14天,健康的未暴露于登革热病毒的成人受试者中的GLS-5700的安全性和耐受性。

[0286] 本研究的主要安全性终点包括:(1)根据系统器官类别(SOC)分类的不良事件的发生、首选术语(PT)严重性以及研究治疗和时间表(至疫苗接种后14天)的关系;(2)施用(注射)部位反应(由频率和严重性等级描述)和施用部位疼痛(直到最终疫苗接种后14天);以及(3)由频率和严重性等级描述的安全性实验室参数的变化(例如,肝功能测试、生命体征)。

[0287] 次要目的包括:(1)评价未暴露于登革热病毒的成人中GLS-5700疫苗接种后1年的安全性;以及(2)评价ID递送然后是EP时,未暴露于登革热病毒的成人中的GLS-5700的细胞和体液应答。

[0288] 次要免疫终点包括:(1)如通过ELISA测量的寨卡包膜(E)蛋白的结合抗体滴度;(2)如病毒中和测定法所测量的针对寨卡病毒的中和抗体滴度;以及(3)如通过干扰素- γ (IFN- γ) ELISpot和/或细胞内染色(ICS)测定法所测定的对寨卡病毒的抗原特异性细胞免疫应答。

[0289] 此I期临床试验评价通过皮内注射然后是电穿孔(EP)施用的GLS-5700是否为安全的、具有耐受性的并且能够在未暴露于登革热病毒的参与者中产生针对寨卡病毒的免疫应答,以及免疫反应性是否为剂量依赖性的。注射将在三角肌中给予,然后立即使用CELLECTRA[®]-3P装置进行EP。

[0290] GLS-5700含有编码寨卡病毒的前体膜(prM)和包膜(E)蛋白的共有序列的质粒pGX7201。

[0291] 目前尚无获批的寨卡病毒的治疗或预防性疫苗。也没有任何进入人体试验的寨卡

病毒的疫苗候选物。

[0292] GLS-5700的ID施用评价：

[0293] 寨卡-001有两组(表1)。以两个剂量水平中的一个将GLS-5700施用于参与者(n=20名/组)：1mg或2mg DNA/剂。疫苗将以0.1ml ID注射施用，然后使用CELLECTRA®-3P装置进行EP。参与者将在第0周、第4周和第12周疫苗接种(3次疫苗接种系列)时接收一次或两次注射到三角肌区。

[0294] 表1. 给药组和方案

组	疫苗	时间表	n	途径	每剂量注射#	剂量(mg)
[0295] 1	GLS-5700	0-4-12周	20	ID	1	1
2	GLS-5700	0-4-12周	20	ID	2	2
	总计		40			

[0296] 为了评估安全性，利用“参与预防性疫苗临床试验的健康成人和青少年志愿者的毒性分级量表(附录B) (Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials (Appendix B))”监测参与者的不良事件，并且实验室根据地点正常值评估。在EP后立即和EP后30分钟评估疼痛。实验室安全性评估将在筛选时、第1次疫苗接种后1周和第2次和第3次疫苗接种后2周进行。在最终疫苗接种后12个月监测不良事件(包括注射部位反应的评估)。

[0297] 纳入研究群体的标准为：

[0298] a. 年龄18-65岁；

[0299] b. 能够同意参与并签署知情同意书(ICF)；

[0300] c. 能够并愿意遵守所有研究程序；

[0301] d. 可能怀孕的女性同意使用医学上有效的避孕措施(口服避孕药、屏障方法、杀精剂等)或具有从参与至最后一次注射后3个月不育的伴侣，或在医学上不能诱导怀孕的伴侣。

[0302] e. 被视为性可育的性活跃男性必须同意在研究期间使用屏障避孕方法，并同意在最后一次注射后继续使用至少3个月，或伴侣永久不育或在医学上不能怀孕；

[0303] f. 正常筛选ECG或筛选ECG无临床上显著的发现；

[0304] g. 筛选实验室必须在正常限内或仅有0-1级发现；

[0305] h. 无临床上显著的免疫抑制性疾病史或自身免疫性疾病史。

[0306] i. 无登革热病毒疫苗接种史或疾病史；无黄热病疫苗接种史。

[0307] j. 通过筛选实验室评价为基线时登革热血清反应阴性

[0308] k. 目前或在前4周内未服用免疫抑制剂(不包括吸入、局部皮肤和/或眼滴剂，含有皮质类固醇、低剂量氨甲蝶呤或泼尼松(剂量低于10mg/天或类固醇剂量当量))。

[0309] 排除在研究群体外的标准为：

[0310] a. 目前或在第一剂量30天内施用研究化合物；

[0311] b. 此前接收用于治疗或预防寨卡病毒的研究产品，排除参与者被证实已接收安慰剂的情况；

- [0312] c.在第一剂量4周内施用任何疫苗；
- [0313] d.在第一剂量4周内施用任何单克隆或多克隆抗体产品
- [0314] e.在第一剂量3个月内施用任何血液产品；
- [0315] f.在研究过程中怀孕或哺乳或计划怀孕；
- [0316] g.登革热病毒(任何血清型)血清学结果为阳性或在过去任何时间有接收登革热病毒或黄热病病毒疫苗接种史；
- [0317] h.HIV、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的血清学测试阳性；或由首席研究员或医学监测员确定的任何潜在传染性传染病；
- [0318] i.丙型肝炎的血清学测试阳性(排除：成功治疗并由持续病毒学应答确认)；
- [0319] j.如通过肌酐酞大于1.5(CKD II期或更大)测量的肾脏疾病的基线证据；
- [0320] k.基线筛查实验室,异常为2级或更高,但2级肌酐酞除外；
- [0321] l.慢性肝病或肝硬化；
- [0322] m.免疫抑制性疾病,包括血液恶性肿瘤,实体器官或骨髓移植史；
- [0323] n.目前或预期伴随性免疫抑制性治疗(不包括吸入、局部皮肤和/或眼滴剂,含有皮质类固醇、低剂量氨甲蝶呤或泼尼松(剂量大于10mg/天或类固醇剂量当量))；
- [0324] o.目前或预期用TNF- α 抑制剂(诸如英夫利昔单抗、阿达木单抗、依那西普)治疗；
- [0325] p.此前在分组4周内进行大型手术或任何放射治疗；
- [0326] q.任何预激综合征,例如沃夫-巴金森-怀特(Wolff-Parkinson-White)综合征；
- [0327] r.存在心脏起搏器或自动植入式心律转复除颤器(AICD)
- [0328] s.在一个或多个计划注射部位20cm内有金属植入物；
- [0329] t.在一个或多个计划注射部位存在作为临床上显著的医学疾患的瘢痕疙瘩形成或肥厚性瘢痕。
- [0330] u.被强制拘留(非自愿监禁)以治疗身体疾病或精神疾病的囚犯或参与者；
- [0331] v.根据研究员的观点可干扰对研究要求的依从性或免疫终点评估的活性药物或酒精的使用或依赖性；或者
- [0332] w.不愿意允许储存和将来使用样品进行寨卡病毒相关研究
- [0333] x.根据研究员的观点可能影响参与者的安全性或任何研究终点评价的任何疾病或疾患。

[0334] 寨卡-002临床方案

[0335] 第二次I期研究是安慰剂对照、双盲研究以评价GLS-5700的安全性、耐受性和免疫原性,GLS-5700在登革热血清阳性成人中施用然后是电穿孔,在波多黎各进行。该研究的主要目的是,评价当通过ID注射然后是EP来施用,直到最终疫苗施用后12周,登革热血清阳性健康成人受试者的GLS-5700的安全性和耐受性。

[0336] 本研究的主要安全性终点包括：(1)根据系统器官类别(SOC)分类的不良事件的发生、首选术语(PT)严重性以及研究治疗和时间表(至最终疫苗接种后12周)关系的；(2)施用(注射)部位反应(由频率和严重性等级描述)和施用部位疼痛(至最终疫苗接种后12周)；以及(3)由频率和严重性等级描述的安全性实验室参数的变化(例如,肝功能测试、生命体征)。本研究的次要安全性终点包括：(1)评价登革热病毒血清阳性成人中GLS-5700最终疫苗接种后1年的安全性；以及(2)评价登革热病毒血清阳性成人中,ID递送然后是EP的GLS-

5700的细胞和体液应答。

[0337] 次要免疫终点包括：(1) 通过ELISA测量的寨卡包膜 (E) 的结合抗体滴度；(2) 如中和测定法所测定的针对寨卡病毒的中和抗体；以及(3) 如通过干扰素- γ (IFN- γ) ELISpot和/或细胞内染色 (ICS) 测定法所测定的对寨卡病毒的抗原特异性细胞免疫应答。

[0338] 此I期临床试验评价通过ID注射然后是电穿孔 (EP) 施用的GLS-5700在登革热血清阳性成人中是否为安全的、具有耐受性的并且能够产生针对寨卡病毒的免疫应答。注射在三角肌区中皮内给予，然后立即使用**CELLECTRA[®]-3P**装置进行EP。

[0339] GLS-5700含有编码寨卡病毒的前体膜 (prM) 和包膜 (E) 蛋白的共有序列的质粒 pGX7201。

[0340] 目前尚无获批的寨卡病毒的治疗或预防性疫苗。也没有进入人体试验的寨卡病毒的疫苗候选物。

[0341] GLS-5700的ID施用评价：

[0342] 受试者 (n=80名/组) 将被随机施用2mg DNA/剂的GLS-5700 (GLS-5700在SSC中配制) 或安慰剂 (SSC, GLS-5700的组成缓冲液)。疫苗或安慰剂将以两个0.1mL ID注射施用，然后使用**CELLECTRA[®]-3P**装置进行EP。受试者将在第0周、第4周和第12周接收疫苗接种到三角肌区 (3次疫苗接种系列；表2)。

[0343] 表2. 给药组和方案

组	疫苗	时间表	n	途径	剂量 (mg)
1	安慰剂	0-4-12周	80	ID	0
2	GLS-5700	0-4-12周	80	ID	2
	总计		160		

[0345] 为了评估安全性，利用“参与预防性疫苗临床试验的健康成人和青少年志愿者的毒性分级量表 (附录B)”监测受试者的不良事件，并且实验室根据地点正常值评估。在EP后30分钟评估疼痛。如适用，实验室安全性评估将在筛选时、第1次疫苗接种后1周和第2次和第3次疫苗接种后2周进行。在最终疫苗接种后12个月将监测不良事件 (包括注射部位反应的评估)。

[0346] 纳入研究群体的标准为：

[0347] a. 年龄18-65岁；

[0348] b. 能够同意参与并签署知情同意书 (ICF)；

[0349] c. 能够并愿意遵守所有研究程序；

[0350] d. 可能怀孕的女性同意使用医学上有效的避孕措施 (口服避孕药、屏障方法、杀精剂等) 或或具有从参与至最后一次注射后3个月不育的伴侣，或在医学上不能诱导怀孕的伴侣。

[0351] e. 被视为性可育的性活跃男性必须同意在研究期间使用屏障避孕方法，并同意在最后一次注射后继续使用至少3个月，或伴侣永久不育或在医学上不能怀孕；

[0352] f. 筛选时登革热病毒血清阳性；

[0353] g. 正常筛选ECG或筛选ECG无临床上显著的发现；

[0354] h. 筛选实验室必须在正常限内或仅有0-1级发现；

- [0355] i. 无临床上显著的免疫抑制或自身免疫疾病史。
- [0356] j. 无登革热病毒疫苗接种史；无黄热病疫苗接种史。
- [0357] k. 目前或在前4周内未服用免疫抑制剂(不包括吸入、局部皮肤和/或眼滴剂,含有皮质类固醇、低剂量氨甲蝶呤或泼尼松(剂量低于10mg/天或类固醇当量))
- [0358] 排除在研究群体外的标准为:
- [0359] a. 目前或在第一剂量30天内施用研究化合物;
- [0360] b. 此前接收用于治疗或预防寨卡病毒的研究产品,排除受试者被证实已接收安慰剂的情况;
- [0361] c. 在第一剂量4周内施用任何疫苗;
- [0362] d. 在第一剂量4周内施用任何单克隆或多克隆抗体产品
- [0363] e. 在第一剂量3个月内施用任何血液产品;
- [0364] f. 在研究过程中怀孕或哺乳或计划怀孕;
- [0365] g. 登革热病毒的血清学结果阴性
- [0366] h. 在过去任何时间有接收登革热病毒或黄热病病毒疫苗接种史;
- [0367] i. HIV、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的血清学测试阳性史;或如由首席研究员或医学监测员测量的任何潜在传染性传染病;
- [0368] j. 丙型肝炎的血清学测试阳性(排除:成功治疗并由持续病毒学应答确认);
- [0369] k. 如通过肌酐酞大于1.5(CKD II期或更大)测量的肾脏疾病的基线证据;
- [0370] l. 一个或多个基线筛查实验室,异常为2级或更高,但2级肌酐酞除外;
- [0371] m. 慢性肝病或肝硬化;
- [0372] n. 免疫抑制性疾病,包括血液恶性肿瘤,实体器官或骨髓移植史;
- [0373] o. 目前或预期伴随性免疫抑制性治疗(不包括吸入、局部皮肤和/或眼滴剂,含有皮质类固醇、低剂量氨甲蝶呤或泼尼松(剂量大于10mg/天或类固醇当量));
- [0374] p. 目前或预期用TNF- α 抑制剂(诸如英夫利昔单抗、阿达木单抗、依那西普)治疗;
- [0375] q. 此前在分组4周内进行大型手术或任何放射治疗;
- [0376] r. 任何预激综合征,例如沃夫-巴金森-怀特(Wolff-Parkinson-White)综合征;
- [0377] s. 存在心脏起搏器或自动植入式心律转复除颤器(AICD)
- [0378] t. 在一个或多个计划注射部位20cm内有金属植入物;
- [0379] u. 在一个或多个计划注射部位存在作为临床上显著的医学疾患的瘢痕疙瘩形成或肥厚性瘢痕。
- [0380] v. 被强制拘留(非自愿监禁)以治疗身体疾病或精神疾病的囚犯或受试者;
- [0381] w. 根据研究员的观点可干扰对研究要求的依从性或免疫终点评估的活性药物或酒精的使用或依赖性;或者
- [0382] x. 不愿意允许储存和将来使用样品进行寨卡病毒相关研究
- [0383] y. 根据研究员的观点可能影响受试者的安全性或任何研究终点评价的任何疾病或疾患。
- [0384] 临床结果
- [0385] 在第0天和第4周用pZV-prME DNA免疫患者(图39-图42)。为了确定结合响应者的百分比,在涂布有寨卡包膜蛋白和检测总IgG应答的二抗的平板中以指定的稀释度温育血

清。

[0386] 用寨卡病毒感染Vero细胞,3天后固定细胞,然后与1:100稀释的第0天和第6周血清一起温育。

[0387] 通过测定患者血清的 IC_{50} (中和Vero细胞的ZIKV PR209感染50%的血清稀释度)来进行中和研究。

[0388] 图39A提供了结合ELISA测定的结果。图39B提供了展示被动转移和保护实验结果。

[0389] 图40提供了示例性免疫荧光数据,其示出了剂量2后抗人IgG-AF488染色增加。

[0390] 图41提供了展示结合响应者的鉴定的数据。

[0391] 图42提供了展示剂量2后中和增加的数据。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 宾夕法尼亚大学理事会(The Trustees Of The University Of Pennsylvania)
- [0003] 卡卢皮亚.穆苏马尼(Muthumani, Karuppiah)
- [0004] 大卫.韦纳(Weiner, David)
- [0005] <120> 新抗寨卡病毒疫苗
- [0006] <130> 206108-0069-00-WO.605918
- [0007] <150> 62/300,030
- [0008] <151> 2016-02-25
- [0009] <150> 62/305,183
- [0010] <151> 2016-03-08
- [0011] <150> 62/396,742
- [0012] <151> 2016-09-19
- [0013] <150> 62/417,100
- [0014] <151> 2016-11-03
- [0015] <150> 62/462,249
- [0016] <151> 2017-02-22
- [0017] <160> 19
- [0018] <170> PatentIn 3.5版
- [0019] <210> 1
- [0020] <211> 702
- [0021] <212> PRT
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <220>
- [0024] <223> LS+前体+膜+包膜(DIII域;跨膜I&II)
- [0025] <400> 1
- [0026] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
- [0027] 1 5 10 15
- [0028] His Ser Gly Ile Ile Gly Leu Leu Leu Thr Thr Ala Met Ala Ala Glu
- [0029] 20 25 30
- [0030] Ile Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Asp Arg Asn Asp
- [0031] 35 40 45
- [0032] Ala Gly Glu Ala Ile Ser Phe Pro Thr Thr Leu Gly Met Asn Lys Cys
- [0033] 50 55 60
- [0034] Tyr Ile Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys Asp Ala Thr Met Ser
- [0035] 65 70 75 80
- [0036] Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val Glu Pro Asp Asp Val Asp
- [0037] 85 90 95
- [0038] Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val Val Tyr Gly Thr Cys His
- [0039] 100 105 110
- [0040] His Lys Lys Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg Arg Ala Val Thr Leu Pro
- [0041] 115 120 125

[0042]	Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg Ser Gln Thr Trp Leu Glu
[0043]	130 135 140
[0044]	Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Arg Val Glu Asn Trp Ile Phe
[0045]	145 150 155 160
[0046]	Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ala Ile Ala Trp Leu Leu
[0047]	165 170 175
[0048]	Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr Leu Val Met Ile Leu Leu
[0049]	180 185 190
[0050]	Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp
[0051]	195 200 205
[0052]	Phe Val Glu Gly Met Ser Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu
[0053]	210 215 220
[0054]	His Gly Gly Cys Val Thr Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr Val Asp
[0055]	225 230 235 240
[0056]	Ile Glu Leu Val Thr Thr Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val Arg Ser
[0057]	245 250 255
[0058]	Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys
[0059]	260 265 270
[0060]	Pro Thr Gln Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr
[0061]	275 280 285
[0062]	Val Cys Lys Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
[0063]	290 295 300
[0064]	Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Ser
[0065]	305 310 315 320
[0066]	Lys Lys Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg
[0067]	325 330 335
[0068]	Ile Met Leu Ser Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile Val Asn
[0069]	340 345 350
[0070]	Asp Ile Gly His Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Val Thr
[0071]	355 360 365
[0072]	Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu
[0073]	370 375 380
[0074]	Gly Leu Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr
[0075]	385 390 395 400
[0076]	Tyr Leu Thr Met Asn Asn Lys His Trp Leu Val His Lys Glu Trp Phe
[0077]	405 410 415
[0078]	His Asp Ile Pro Leu Pro Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly Thr Pro
[0079]	420 425 430
[0080]	His Trp Asn Asn Lys Glu Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala His Ala
[0081]	435 440 445
[0082]	Lys Arg Gln Thr Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Val His
[0083]	450 455 460

[0126]	accacatcta catgggtggt gtatggcacc tgtcaccaca agaagggaga ggcacggcgc	360
[0127]	agcaggagag cagtgcact gccctctcac agcaccagga agctgcagac aagaagccag	420
[0128]	acctggctgg agtcccggga gtatacaaag cacctgatca aggtggagaa ctggatcttt	480
[0129]	cgcaatccag gattgcact ggtggcagtg gcaatcgcac ggctgctggg cagctccacc	540
[0130]	tcccagaaag tgatctacct ggtcatgatc ctgctgatcg cccctgccta ttccatcagg	600
[0131]	tgcatcggcg tgtctaatag agacttcgtg gagggcatgt ctggcggcac ctgggtggat	660
[0132]	gtggtgctgg agcacggcg atgcgtgaca gtgatggccc aggacaagcc aaccgtggat	720
[0133]	atcgagctgg tgaccacaac cgtgagcaac atggccgagg tgaggtccta ctgctatgag	780
[0134]	gcctccatct ctgacatggc cagcgattcc agatgtcca cccagggcga ggcctacctg	840
[0135]	gacaagcagt ccgatacaca gtacgtgtgc aagcggacc tggtggacag gggatgggga	900
[0136]	aatggatgtg gcctgtttgg caagggtct ctggtgacat gcgccaagt cacctgttct	960
[0137]	aagaagatga ccggcaagag catccagccc gagaacctgg agtacaggat catgctgagc	1020
[0138]	gtgcacggca gccagcactc cggcatgaca gtgaacgaca tcggctatga gaccgatgag	1080
[0139]	aatagggcca aggtggaggt gacacctaac agcccaagag ccgaggccac cctgggcggc	1140
[0140]	tttgctccc tgggactgga ctgcgacct agaacaggcc tggacttctc cgatctgtac	1200
[0141]	tatctgacca tgaacaataa gcaactgctg gtgcacaagg agtggtttca cgacatccca	1260
[0142]	ctgccatggc acgcaggagc agatacagga accccacact ggaacaataa ggaggccctg	1320
[0143]	gtggagtcca aggatgcca cgccaagcgc cagacagtgg tggtgctggg cagccaggag	1380
[0144]	ggagcagtgc acaccgcct ggcaggcgc ctggaggccg agatggacgg cgccaagggc	1440
[0145]	aagctgtttt ccggccacct gaagtccgg ctgaagatgg ataagctgag cctgaagggc	1500
[0146]	gtgtcttaca gcctgtgcac agccgcctc accttaccac aggtgcctgc cgagaccctg	1560
[0147]	cacggcacag tgaccgtgga ggtgcagtat gccggcacag acggcccctg taagatccct	1620
[0148]	gtgcagatgg ccgtggatat gcagacactg acccctgtgg gccggctgat caccgcaaat	1680
[0149]	ccagtatca cagagtccac cgagaactct aagatgatgc tggagctgga ccctccctc	1740
[0150]	ggcgacagct acatcgtgat cggcgtgggc gacaagaaga tcacacacca ctggcaccgc	1800
[0151]	tccgctcta caatcgcaa ggccttcgag gcaaccgtgc ggggcgcaa gaggatggcc	1860
[0152]	gtgctggcg acaccgcatg ggattttggc tccgtggcg gcgtgttcaa ctctctgggc	1920
[0153]	aaggcatcc accagatctt cggcgcgcc tttaagtctc tgttcggcg aatgtcttgg	1980
[0154]	ttcagccaga tctgatcgg cactctctg gtgtggtgg gcctgaacac caagaatggc	2040
[0155]	agcatctctc tgactgtct ggcctggga ggcgtgatga ttttctgtc cactgccgtg	2100
[0156]	tctgcctgat aa	2112
[0157]	<210>	3
[0158]	<211>	702
[0159]	<212>	PRT
[0160]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0161]	<220>	
[0162]	<223>	寨卡prM-Env共有蛋白
[0163]	<400>	3
[0164]	Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val	
[0165]	1 5 10 15	
[0166]	His Ser Gly Ile Ile Gly Leu Leu Leu Thr Thr Ala Met Ala Ala Glu	
[0167]	20 25 30	

[0168]	Ile Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Asp Arg Ser Asp
[0169]	35 40 45
[0170]	Ala Gly Lys Ala Ile Ser Phe Ala Thr Thr Leu Gly Val Asn Lys Cys
[0171]	50 55 60
[0172]	His Val Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys Asp Ala Thr Met Ser
[0173]	65 70 75 80
[0174]	Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val Glu Pro Asp Asp Val Asp
[0175]	85 90 95
[0176]	Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val Val Tyr Gly Thr Cys His
[0177]	100 105 110
[0178]	His Lys Lys Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg Arg Ala Val Thr Leu Pro
[0179]	115 120 125
[0180]	Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg Ser Gln Thr Trp Leu Glu
[0181]	130 135 140
[0182]	Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Lys Val Glu Asn Trp Ile Phe
[0183]	145 150 155 160
[0184]	Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Val Ala Val Ala Ile Ala Trp Leu Leu
[0185]	165 170 175
[0186]	Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr Leu Val Met Ile Leu Leu
[0187]	180 185 190
[0188]	Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp
[0189]	195 200 205
[0190]	Phe Val Glu Gly Met Ser Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu
[0191]	210 215 220
[0192]	His Gly Gly Cys Val Thr Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr Val Asp
[0193]	225 230 235 240
[0194]	Ile Glu Leu Val Thr Thr Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val Arg Ser
[0195]	245 250 255
[0196]	Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys
[0197]	260 265 270
[0198]	Pro Thr Gln Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr
[0199]	275 280 285
[0200]	Val Cys Lys Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
[0201]	290 295 300
[0202]	Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Ser
[0203]	305 310 315 320
[0204]	Lys Lys Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg
[0205]	325 330 335
[0206]	Ile Met Leu Ser Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Thr Val Asn
[0207]	340 345 350
[0208]	Asp Ile Gly Tyr Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Val Thr
[0209]	355 360 365

[0210]	Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu
[0211]	370 375 380
[0212]	Gly Leu Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr
[0213]	385 390 395 400
[0214]	Tyr Leu Thr Met Asn Asn Lys His Trp Leu Val His Lys Glu Trp Phe
[0215]	405 410 415
[0216]	His Asp Ile Pro Leu Pro Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly Thr Pro
[0217]	420 425 430
[0218]	His Trp Asn Asn Lys Glu Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala His Ala
[0219]	435 440 445
[0220]	Lys Arg Gln Thr Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Val His
[0221]	450 455 460
[0222]	Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ala Glu Met Asp Gly Ala Lys Gly
[0223]	465 470 475 480
[0224]	Lys Leu Phe Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu
[0225]	485 490 495
[0226]	Arg Leu Lys Gly Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe
[0227]	500 505 510
[0228]	Thr Lys Val Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val
[0229]	515 520 525
[0230]	Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Val Gln Met Ala
[0231]	530 535 540
[0232]	Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn
[0233]	545 550 555 560
[0234]	Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu
[0235]	565 570 575
[0236]	Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Lys
[0237]	580 585 590
[0238]	Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala
[0239]	595 600 605
[0240]	Phe Glu Ala Thr Val Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Val Leu Gly Asp
[0241]	610 615 620
[0242]	Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Asn Ser Leu Gly
[0243]	625 630 635 640
[0244]	Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala Phe Lys Ser Leu Phe Gly
[0245]	645 650 655
[0246]	Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile Gly Thr Leu Leu Val Trp
[0247]	660 665 670
[0248]	Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile Ser Leu Thr Cys Leu Ala
[0249]	675 680 685
[0250]	Leu Gly Gly Val Met Ile Phe Leu Ser Thr Ala Val Ser Ala
[0251]	690 695 700

[0252] <210> 4
 [0253] <211> 1119
 [0254] <212> DNA
 [0255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0256] <220>
 [0257] <223> 寨卡NS1 DNA
 [0258] <400> 4
 [0259] atggactgga cttggattct gttcctggg gctgccgcta caagagtgca tagcgtggga 60
 [0260] tgcagcgtgg acttcagcaa gaaggagacc cgctgcgga caggcgtgtt cgtgtacaac 120
 [0261] gacgtggagg cttggagaga ccggtacaag taccaccccg atagccctag aagactggcc 180
 [0262] gcagccgtga aacagccttg ggaagagga atttgcggca tcagcagcgt gtcccggatg 240
 [0263] gagaacatca tgtggaagag cgtggagggc gagctgaacg ctatcctgga ggagaacggc 300
 [0264] gtgcagctga cagtggctgt gggatcagtg aagaaccca tgtggagagg ccctcagagg 360
 [0265] ctgccagtgc cagtgaacga actgcctcac ggttggagg cttggggcaa gagctacttc 420
 [0266] gtgaggcccg ccaagaccaa caacagcttc gtggtggacg gcgataacct caaggagtgt 480
 [0267] cctctgaagc accgggcttg gaacagcttc ctggtggaag accacggctt tggcgtgttc 540
 [0268] cacacaagcg tctggctgaa ggtccgcgaa gactacagcc tggagtgcga tccagcagtg 600
 [0269] atcggcacag ccgtgaaggg aaaagaggcc gctcacagcg acctgggcta ttggatcgag 660
 [0270] agcgagaaga acgacacttg gagcctgaag cgggccacc tgatcgagat gaagacttgc 720
 [0271] gaggggccca agagccacac tctgtggaca gacggcgtgg aagagagcga cctgatcadc 780
 [0272] cctaagagcc tggccggacc tctgtctcat cacaacacca gggagggcta cagaaccag 840
 [0273] gtgaaggac cttggcacag cgaagagctg gagatccgct tcgaggagtg tccaggaacc 900
 [0274] aagtgacacg tggaggagac ttgcggaacc agaggccta gcctgagaag cacaacagcc 960
 [0275] agcggacgcg tgatcgagga gtggtgttgt agggagtgca ccatgcctcc tctgagcttc 1020
 [0276] agggccaagg acggttgttg gtacggcatg gagatcagc ccagaaagga gccagagagc 1080
 [0277] aacctgtgc ggtctatggt gacagccgga agctgataa 1119
 [0278] <210> 5
 [0279] <211> 371
 [0280] <212> PRT
 [0281] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0282] <220>
 [0283] <223> 寨卡NS1蛋白
 [0284] <400> 5
 [0285] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 [0286] 1 5 10 15
 [0287] His Ser Val Gly Cys Ser Val Asp Phe Ser Lys Lys Glu Thr Arg Cys
 [0288] 20 25 30
 [0289] Gly Thr Gly Val Phe Val Tyr Asn Asp Val Glu Ala Trp Arg Asp Arg
 [0290] 35 40 45
 [0291] Tyr Lys Tyr His Pro Asp Ser Pro Arg Arg Leu Ala Ala Ala Val Lys
 [0292] 50 55 60
 [0293] Gln Ala Trp Glu Glu Gly Ile Cys Gly Ile Ser Ser Val Ser Arg Met

[0294]	65	70	75	80
[0295]	Glu Asn Ile Met Trp Lys Ser Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala Ile Leu			
[0296]		85	90	95
[0297]	Glu Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn			
[0298]		100	105	110
[0299]	Pro Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu			
[0300]		115	120	125
[0301]	Pro His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala			
[0302]		130	135	140
[0303]	Lys Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys			
[0304]		145	150	155
[0305]	Pro Leu Lys His Arg Ala Trp Asn Ser Phe Leu Val Glu Asp His Gly			
[0306]		165	170	175
[0307]	Phe Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp Leu Lys Val Arg Glu Asp Tyr			
[0308]		180	185	190
[0309]	Ser Leu Glu Cys Asp Pro Ala Val Ile Gly Thr Ala Val Lys Gly Lys			
[0310]		195	200	205
[0311]	Glu Ala Ala His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn			
[0312]		210	215	220
[0313]	Asp Thr Trp Arg Leu Lys Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys			
[0314]		225	230	235
[0315]	Glu Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Thr Asp Gly Val Glu Glu Ser			
[0316]		245	250	255
[0317]	Asp Leu Ile Ile Pro Lys Ser Leu Ala Gly Pro Leu Ser His His Asn			
[0318]		260	265	270
[0319]	Thr Arg Glu Gly Tyr Arg Thr Gln Val Lys Gly Pro Trp His Ser Glu			
[0320]		275	280	285
[0321]	Glu Leu Glu Ile Arg Phe Glu Glu Cys Pro Gly Thr Lys Val His Val			
[0322]		290	295	300
[0323]	Glu Glu Thr Cys Gly Thr Arg Gly Pro Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala			
[0324]		305	310	315
[0325]	Ser Gly Arg Val Ile Glu Glu Trp Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro			
[0326]		325	330	335
[0327]	Pro Leu Ser Phe Arg Ala Lys Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile			
[0328]		340	345	350
[0329]	Arg Pro Arg Lys Glu Pro Glu Ser Asn Leu Val Arg Ser Met Val Thr			
[0330]		355	360	365
[0331]	Ala Gly Ser			
[0332]		370		
[0333]	<210> 6			
[0334]	<211> 438			
[0335]	<212> DNA			

- [0336] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0337] <220>
- [0338] <223> 寨卡衣壳DNA
- [0339] <400> 6
- [0340] atggactgga cttggatcct gtttctggtg gccgccgcca caagagtgca tagcaagaac 60
- [0341] cccaagaaga agagcggcgg cttcaggatc gtgaacatgc tgaagcgggg cgtggctaga 120
- [0342] gtgaaccctc tgggagcgg actgaagaga ctgccagcag gactgctcct gggacacgga 180
- [0343] cctattcgca tgggtgctggc catcctggct ttctgaggt tcaccgccat caagcccagc 240
- [0344] ctgggactga tcaaccgctg gggttcagtc ggcaagaagg aggccatgga gatcatcaag 300
- [0345] aagttaaga aggacctggc cgccatgctg aggatcatca acgcccggaa ggagcggaag 360
- [0346] agaagaggag ccgacaccag catcggcatc atcgactgc tgctgacaac cgccatggct 420
- [0347] gccgagatct gatgatga 438
- [0348] <210> 7
- [0349] <211> 143
- [0350] <212> PRT
- [0351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0352] <220>
- [0353] <223> 寨卡衣壳蛋白
- [0354] <400> 7
- [0355] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
- [0356] 1 5 10 15
- [0357] His Ser Lys Asn Pro Lys Lys Lys Ser Gly Gly Phe Arg Ile Val Asn
- [0358] 20 25 30
- [0359] Met Leu Lys Arg Gly Val Ala Arg Val Asn Pro Leu Gly Gly Gly Leu
- [0360] 35 40 45
- [0361] Lys Arg Leu Pro Ala Gly Leu Leu Leu Gly His Gly Pro Ile Arg Met
- [0362] 50 55 60
- [0363] Val Leu Ala Ile Leu Ala Phe Leu Arg Phe Thr Ala Ile Lys Pro Ser
- [0364] 65 70 75 80
- [0365] Leu Gly Leu Ile Asn Arg Trp Gly Ser Val Gly Lys Lys Glu Ala Met
- [0366] 85 90 95
- [0367] Glu Ile Ile Lys Lys Phe Lys Lys Asp Leu Ala Ala Met Leu Arg Ile
- [0368] 100 105 110
- [0369] Ile Asn Ala Arg Lys Glu Arg Lys Arg Arg Gly Ala Asp Thr Ser Ile
- [0370] 115 120 125
- [0371] Gly Ile Ile Gly Leu Leu Leu Thr Thr Ala Met Ala Ala Glu Ile
- [0372] 130 135 140
- [0373] <210> 8
- [0374] <211> 2130
- [0375] <212> DNA
- [0376] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0377] <220>

[0378] <223> 寨卡prM-Env MR766 DNA
[0379] <400> 8
[0380] atggactgga cttggattct gttcctggtg gctgccgcta caagagtgca ttcaggagcc 60
[0381] gacacctcta tcggcatcgt gggactgctg ctgaccacag ccatggccgc cgaaattacc 120
[0382] aggaggggca ggcctacta catgtacctg gacagaagcg acgccgaaa agccatcagc 180
[0383] ttcgccacaa ccctgggcgt caacaagtgc cacgtgcaga tcatggacct gggccacatg 240
[0384] tgcgacgcca caatgagcta cgagtgcct atgctggacg agggagtgga accagacgac 300
[0385] gtcgactgtt ggtgcaacac cacctccact tgggtcgtgt acggcacttg ccaccacaag 360
[0386] aaggcgagg ccagaagaag cagaagagcc gtgaccctgc ctagccacag caccagaaag 420
[0387] ctgcagacca ggagccagac ttggctgtaa agccgcgagt acaccaagca cctgatcaag 480
[0388] gtggagaatt ggatcttccg gaacccggc ttcacactgg tggcctggc aatcgcttgg 540
[0389] ctgctgggat ctgaccag ccagaaagt atctacctg tcatgatcct gctgatgcc 600
[0390] ccagctaca gcatccgtg tatcggagt agcaaccgg acttcgtgga gggaatgagc 660
[0391] ggaggaactt ggttgacgt ggtgctgtaa cacggaggt gcgtgacagt gatggctcag 720
[0392] gacaagcca ccgtggatat cgagctgtg accaccaccg tgtccaacat ggccgaagt 780
[0393] cgcagctact gctacgagc cagtatctc gacatggcca gcgatagcc ctgtcctaca 840
[0394] caggagagg cctatctgga caagcagagc gacaccagc acgtctgcaa gaggaccctc 900
[0395] gtggatagag gctgggaaa cggttcgga ctgttcgaa agggcagcct cgtgacttgc 960
[0396] gccaagtcca cttgcagca gaagatgacc ggcaagtcta tccagcccga gaacctggag 1020
[0397] taccgatca tgctgagcgt gcacggaagc cagcacagc gcgatgcgt gaacgacgag 1080
[0398] ggatacgaga ccgacgaga caggccaag gtggaagtga cccctaacag ccctagagcc 1140
[0399] gaagccacac tgggaggatt tggcagcct ggactggatt gcgagcctag aacaggcctg 1200
[0400] gacttcagc acctgtacta cctgaccatg aacaacaagc attggctggt gcacaaggag 1260
[0401] tggttccacg acatccctct gccttggcag gcaggagccg atacaggcac acctcattgg 1320
[0402] aacaacaagg aggcctggt ggagttcaag gacgctcag ccaagagaca gacagtggtg 1380
[0403] gtgctgggaa gccaggaagg agcagtgcac acagccctgg caggagctct ggaagcagaa 1440
[0404] atggacggcg ctaaggcag actgttcagc ggacacctca agtgccggct gaagatggac 1500
[0405] aagctcggc tgaaggcgt gtcttacagc ctctgcaccg cagccttac cttaccaag 1560
[0406] gtgccagcag agacactgca cggaacagt accgtggaag tgcagtacgc cggaacagac 1620
[0407] ggacctgca aagtccagc ccagatggca gtggacatgc agacactgac ccagtgagg 1680
[0408] aggctgatca ccgtaacc cgctatcacc gagagaccg agaacagca gatgatgctg 1740
[0409] gagctggacc ccccttcg cgatagctac atcgtgatcg gcgtggcgca caagaagatc 1800
[0410] accaccatt ggcacagaag cggcagcaca atcggcaagg ctttcgaggc caccgtgaga 1860
[0411] ggagctaaga gaatggcgt gctgggagac accgcttggg attttggcag cgtgggagga 1920
[0412] gtgttcaaca gcctgggcaa gggcatccac cagatcttc gagccgctt caagagcctg 1980
[0413] ttcggcgca tgtcttgggt cagccagatc ctgatcgaa cactcctcgt ctggctggga 2040
[0414] ctgaacacca agaacggcag catcagcctg acttgtctgg ccctgggagg cgtgatgatc 2100
[0415] ttctgagca ccgccgtgc cgcttgataa 2130
[0416] <210> 9
[0417] <211> 708
[0418] <212> PRT
[0419] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0420] <220>
 [0421] <223> 寨卡prM-Env MR766蛋白
 [0422] <400> 9
 [0423] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 [0424] 1 5 10 15
 [0425] His Ser Gly Ala Asp Thr Ser Ile Gly Ile Val Gly Leu Leu Leu Thr
 [0426] 20 25 30
 [0427] Thr Ala Met Ala Ala Glu Ile Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met
 [0428] 35 40 45
 [0429] Tyr Leu Asp Arg Ser Asp Ala Gly Lys Ala Ile Ser Phe Ala Thr Thr
 [0430] 50 55 60
 [0431] Leu Gly Val Asn Lys Cys His Val Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met
 [0432] 65 70 75 80
 [0433] Cys Asp Ala Thr Met Ser Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val
 [0434] 85 90 95
 [0435] Glu Pro Asp Asp Val Asp Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val
 [0436] 100 105 110
 [0437] Val Tyr Gly Thr Cys His His Lys Lys Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg
 [0438] 115 120 125
 [0439] Arg Ala Val Thr Leu Pro Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg
 [0440] 130 135 140
 [0441] Ser Gln Thr Trp Leu Glu Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Lys
 [0442] 145 150 155 160
 [0443] Val Glu Asn Trp Ile Phe Arg Asn Pro Gly Phe Thr Leu Val Ala Val
 [0444] 165 170 175
 [0445] Ala Ile Ala Trp Leu Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr
 [0446] 180 185 190
 [0447] Leu Val Met Ile Leu Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Ile
 [0448] 195 200 205
 [0449] Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser Gly Gly Thr Trp
 [0450] 210 215 220
 [0451] Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr Val Met Ala Gln
 [0452] 225 230 235 240
 [0453] Asp Lys Pro Thr Val Asp Ile Glu Leu Val Thr Thr Thr Val Ser Asn
 [0454] 245 250 255
 [0455] Met Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met
 [0456] 260 265 270
 [0457] Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys
 [0458] 275 280 285
 [0459] Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly
 [0460] 290 295 300
 [0461] Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys

[0462]	305	310	315	320
[0463]	Ala Lys Phe Thr Cys Ser Lys Lys Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro			
[0464]		325	330	335
[0465]	Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met Leu Ser Val His Gly Ser Gln His			
[0466]		340	345	350
[0467]	Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Glu Gly Tyr Glu Thr Asp Glu Asn Arg			
[0468]		355	360	365
[0469]	Ala Lys Val Glu Val Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu			
[0470]		370	375	380
[0471]	Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu			
[0472]		385	390	395
[0473]	Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu Thr Met Asn Asn Lys His Trp Leu			
[0474]		405	410	415
[0475]	Val His Lys Glu Trp Phe His Asp Ile Pro Leu Pro Trp His Ala Gly			
[0476]		420	425	430
[0477]	Ala Asp Thr Gly Thr Pro His Trp Asn Asn Lys Glu Ala Leu Val Glu			
[0478]		435	440	445
[0479]	Phe Lys Asp Ala His Ala Lys Arg Gln Thr Val Val Val Leu Gly Ser			
[0480]		450	455	460
[0481]	Gln Glu Gly Ala Val His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ala Glu			
[0482]		465	470	475
[0483]	Met Asp Gly Ala Lys Gly Arg Leu Phe Ser Gly His Leu Lys Cys Arg			
[0484]		485	490	495
[0485]	Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser Tyr Ser Leu Cys			
[0486]		500	505	510
[0487]	Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Val Pro Ala Glu Thr Leu His Gly			
[0488]		515	520	525
[0489]	Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys			
[0490]		530	535	540
[0491]	Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly			
[0492]		545	550	555
[0493]	Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser			
[0494]		565	570	575
[0495]	Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val			
[0496]		580	585	590
[0497]	Ile Gly Val Gly Asp Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly			
[0498]		595	600	605
[0499]	Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val Arg Gly Ala Lys Arg			
[0500]		610	615	620
[0501]	Met Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly			
[0502]		625	630	635
[0503]	Val Phe Asn Ser Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala			

[0504]	645	650	655
[0505]	Phe Lys Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile		
[0506]	660	665	670
[0507]	Gly Thr Leu Leu Val Trp Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile		
[0508]	675	680	685
[0509]	Ser Leu Thr Cys Leu Ala Leu Gly Gly Val Met Ile Phe Leu Ser Thr		
[0510]	690	695	700
[0511]	Ala Val Ser Ala		
[0512]	705		
[0513]	<210> 10		
[0514]	<211> 2130		
[0515]	<212> DNA		
[0516]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0517]	<220>		
[0518]	<223> 寨卡prM-包膜Brazil构建体DNA		
[0519]	<400> 10		
[0520]	atggactgga cttggattct gttcctgggtg gctgccgcta caagagtgca ttcaggagcc	60	
[0521]	gacacatcag tgggcatcgt gggactgctg ctgacaacag ctatggccgc cgaagtgacc	120	
[0522]	agaagaggca gcgcctacta catgtacctg gaccggaacg acgccggaga ggccattagc	180	
[0523]	tttctacca ccttgggcat gaacaagtgc tacatccaga tcatggacct gggccacatg	240	
[0524]	tgcgacgcta caatgagcta cgagtgcccc atgctggacg aaggagtgga gccagacgac	300	
[0525]	gtggattggt ggtgcaacac cacctccact tgggtcgtgt acggcacctg tcaccacaaa	360	
[0526]	aagggcgaag ccaggagaag cagaagagcc gtgaccctgc ctagccactc taccaggaag	420	
[0527]	ctgacagcca ggagccagac ttggctggag agcagggagt acaccaagca cctgatccgc	480	
[0528]	gtggagaatt ggatcttcag aaacccggc ttcgccctgg cagccgcagc aattgcttgg	540	
[0529]	ctgctgggat ctagcaccag ccagaagtc atctacctgg tcatgatcct gctgatgcc	600	
[0530]	cccgttaca gcatccgctg tatcggcgtg tccaacaggg acttcgtgga gggcatgagc	660	
[0531]	ggaggaactt ggggtggacgt ggtgctggaa cacggaggtt gtgtgaccgt gatggctcag	720	
[0532]	gacaagccta ccgtggacat cgagctgggtg accacaaccg tgtccaacat ggccgaggtc	780	
[0533]	cgagctatt gctacgagc cagcatcagc gatatggcca gcgatagcag gtgtcccacc	840	
[0534]	cagggtgaag cttacctgga caagcagac gacaccagc acgtgtgcaa gcggacactg	900	
[0535]	gtggatagag gctggggaaa cggttgcggc ctgtttggca agggaagcct ggtgacctgc	960	
[0536]	gccaagtctg catgcagcaa gaagatgacc ggcaagagca tccagcccga gaacctggag	1020	
[0537]	taccggatca tgctgagcgt gcacggatct cagcatagcg gaatgatcgt gaacgacacc	1080	
[0538]	ggccacgaga ccgacgaaaa caggccaag gtggaaatca ccccaactc tcctagagcc	1140	
[0539]	gaggccacac tgggaggttt tggaagcctg ggcctggatt gcgagcctag aacaggcctg	1200	
[0540]	gacttcagcg acctgtacta cctgacctg aacaacaagc attggctggt gcacaaggag	1260	
[0541]	tggttccacg acatccctct gccttggcac gcaggagcag atacaggaac cccccattgg	1320	
[0542]	aacaacaagg aggccctggt ggagttcaag gacgctcac ccaagagaca gacagtgggtg	1380	
[0543]	gtgctgggaa gccaggaagg agcagtgcac acagctctgg caggagctct ggaagccgaa	1440	
[0544]	atggacggag ccaaggcag actgtcctcc ggacacctca agtgccggct gaagatggac	1500	
[0545]	aagctgcggc tgaaggcgt gtcttatagc ctctgcacag ccgctttcac cttaccaag	1560	

[0546] atccccgcag agaccctgca cggaacagtg accgtggaag tgcagtacgc cggaacagac 1620
 [0547] ggaccttgca aggtgccagc tcagatggca gtggacatgc agaccctgac cccagtggga 1680
 [0548] agactgatca ccgctaacc cgtcatcacc gagagaccg agaacagcaa gatgatgctg 1740
 [0549] gagctggacc cccccctgg cgatagctac atcgtgatcg gcgtgggcga gaaaaagatc 1800
 [0550] acccaccatt ggcacaggag cggcagcaca atcggcaagg cctttgaggc caccgtgaga 1860
 [0551] ggagccaaga gaatggccgt gctgggagat accgcttggg atttcggcag cgtgggaggc 1920
 [0552] gccctgaaca gcctgggcaa gggcattcac cagatcttcg gagccgctt caagagcctg 1980
 [0553] ttcgcgga tgtcttggtt cagccagatc ctgatcgga cactgctcat gtggctgggc 2040
 [0554] ctgaacacca agaacggcag catcagcctg atgtgtctgg ctctgggagg cgtgctgatc 2100
 [0555] ttctgagca ccgctgtgtc cgcttgataa 2130
 [0556] <210> 11
 [0557] <211> 708
 [0558] <212> PRT
 [0559] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0560] <220>
 [0561] <223> 寨卡prM-包膜Brazil构建体蛋白
 [0562] <400> 11
 [0563] Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 [0564] 1 5 10 15
 [0565] His Ser Gly Ala Asp Thr Ser Val Gly Ile Val Gly Leu Leu Leu Thr
 [0566] 20 25 30
 [0567] Thr Ala Met Ala Ala Glu Val Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met
 [0568] 35 40 45
 [0569] Tyr Leu Asp Arg Asn Asp Ala Gly Glu Ala Ile Ser Phe Pro Thr Thr
 [0570] 50 55 60
 [0571] Leu Gly Met Asn Lys Cys Tyr Ile Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met
 [0572] 65 70 75 80
 [0573] Cys Asp Ala Thr Met Ser Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val
 [0574] 85 90 95
 [0575] Glu Pro Asp Asp Val Asp Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val
 [0576] 100 105 110
 [0577] Val Tyr Gly Thr Cys His His Lys Lys Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg
 [0578] 115 120 125
 [0579] Arg Ala Val Thr Leu Pro Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg
 [0580] 130 135 140
 [0581] Ser Gln Thr Trp Leu Glu Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Arg
 [0582] 145 150 155 160
 [0583] Val Glu Asn Trp Ile Phe Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ala
 [0584] 165 170 175
 [0585] Ala Ile Ala Trp Leu Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr
 [0586] 180 185 190
 [0587] Leu Val Met Ile Leu Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Ile

[0588]	195	200	205
[0589]	Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser Gly Gly Thr Trp		
[0590]	210	215	220
[0591]	Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr Val Met Ala Gln		
[0592]	225	230	235
[0593]	Asp Lys Pro Thr Val Asp Ile Glu Leu Val Thr Thr Thr Val Ser Asn		
[0594]		245	250
[0595]	Met Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met		255
[0596]		260	265
[0597]	Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys		270
[0598]		275	280
[0599]	Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly		
[0600]		290	295
[0601]	Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys		300
[0602]		305	310
[0603]	Ala Lys Phe Ala Cys Ser Lys Lys Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro		315
[0604]		325	330
[0605]	Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met Leu Ser Val His Gly Ser Gln His		335
[0606]		340	345
[0607]	Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Thr Gly His Glu Thr Asp Glu Asn Arg		
[0608]		355	360
[0609]	Ala Lys Val Glu Ile Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu		
[0610]		370	375
[0611]	Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu		
[0612]		385	390
[0613]	Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu Thr Met Asn Asn Lys His Trp Leu		395
[0614]		405	410
[0615]	Val His Lys Glu Trp Phe His Asp Ile Pro Leu Pro Trp His Ala Gly		
[0616]		420	425
[0617]	Ala Asp Thr Gly Thr Pro His Trp Asn Asn Lys Glu Ala Leu Val Glu		
[0618]		435	440
[0619]	Phe Lys Asp Ala His Ala Lys Arg Gln Thr Val Val Val Leu Gly Ser		
[0620]		450	455
[0621]	Gln Glu Gly Ala Val His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ala Glu		
[0622]		465	470
[0623]	Met Asp Gly Ala Lys Gly Arg Leu Ser Ser Gly His Leu Lys Cys Arg		475
[0624]		485	490
[0625]	Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser Tyr Ser Leu Cys		
[0626]		500	505
[0627]	Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly		510
[0628]		515	520
[0629]	Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys		525

[0630]	530	535	540
[0631]	Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly		
[0632]	545	550	555 560
[0633]	Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser		
[0634]		565	570 575
[0635]	Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val		
[0636]		580	585 590
[0637]	Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly		
[0638]		595	600 605
[0639]	Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val Arg Gly Ala Lys Arg		
[0640]	610	615	620
[0641]	Met Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly		
[0642]	625	630	635 640
[0643]	Ala Leu Asn Ser Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala		
[0644]		645	650 655
[0645]	Phe Lys Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile		
[0646]		660	665 670
[0647]	Gly Thr Leu Leu Met Trp Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile		
[0648]		675	680 685
[0649]	Ser Leu Met Cys Leu Ala Leu Gly Gly Val Leu Ile Phe Leu Ser Thr		
[0650]	690	695	700
[0651]	Ala Val Ser Ala		
[0652]	705		
[0653]	<210> 12		
[0654]	<211> 18		
[0655]	<212> PRT		
[0656]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0657]	<220>		
[0658]	<223> IgE前导序列		
[0659]	<400> 12		
[0660]	Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val		
[0661]	1	5	10 15
[0662]	His Ser		
[0663]	<210> 13		
[0664]	<211> 1119		
[0665]	<212> DNA		
[0666]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0667]	<220>		
[0668]	<223> 寨卡NS1 DNA (pGX7211)		
[0669]	<400> 13		
[0670]	atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa cacgggtgca ctccgtgggc 60		
[0671]	tgctctgtgg atttcagcaa gaaggagaca agatgtggca caggcgtgtt cgtgtacaac 120		

[0672]	gacgtggagg cctggagggg tgcctacaag tatcacccctg actctccacg gagactggca	180
[0673]	gcagcagtga agcaggcatg ggaggagggc atctgcggca tcagctccgt gtcccggatg	240
[0674]	gagaatatca tgtggaagtc tgtggagggc gagctgaacg ccatcctgga ggagaatgga	300
[0675]	gtgcagctga ccgtggtggt gggcagcgtg aagaaccaa tgtggagggg accacagaga	360
[0676]	ctgccagtgc cagtgaatga gctgccacac ggatggaagg catggggcaa gtcttatttc	420
[0677]	gtgaggcccg ccaagaccaa caatagcttt gtggtggacg gcgatacact gaaggagtgc	480
[0678]	ccccgaagc accgcgctg gaactccttt ctggtggagg atcacggctt cggcgtgttt	540
[0679]	cacaccagcg tgtggctgaa ggtgaggag gactactccc tggagtgtga tctgcccgtg	600
[0680]	atcggaacag cagtgaagg caaggaggca gcacactctg acctgggcta ttggatcgag	660
[0681]	agcgagaaga acgatacctg gaggctgaag cgcgccacc tgatcgagat gaagacctgt	720
[0682]	gagtgccaa agtcccacac cctgtggaca gacggcgtg aggagtctga tctgatcatc	780
[0683]	cctaagagcc tggccggccc actgtcccac cacaatacca gggagggcta ccgcacacag	840
[0684]	gtgaaggcc cctggcactc cgaggagctg gagatccgct tcgaggagt ccttggcacc	900
[0685]	aaggtgcacg tggaggagac atgtggcaca cggggcccct ctctgagaag caccacagcc	960
[0686]	agcggcagag tgatcgagga gtggtgctgt cgcgagtca caatgcccc tctgtccttt	1020
[0687]	cggccaagg acggtgttg gtatggcatg gagatccggc ccagaaagga gcctgagtc	1080
[0688]	aatctggtga gatctatggt gaccgccgc agctgataa	1119
[0689]	<210>	14
[0690]	<211>	435
[0691]	<212>	DNA
[0692]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0693]	<220>	
[0694]	<223>	寨卡衣壳DNA (pGX7212)
[0695]	<400>	14
[0696]	atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa cacgggtgca cagcaagaac	60
[0697]	cccaagaaga agagcggcgg cttccggatc gtgaacatgc tgaagcggg cgtggccaga	120
[0698]	gtgaatccac tggcggcgg cctgaagcgg ctgcctgcag gcctgctgct gggccacggc	180
[0699]	ccaatcagga tgggtctggc catcctggcc ttctgcgct ttaccgcat caagccctct	240
[0700]	ctgggcctga tcaacagatg gggcagcgtg ggcaagaagg aggccatgga gatcatcaag	300
[0701]	aagtcaaga aggacctggc cgccatgctg cgcacatca atgcaaggaa ggagaggaag	360
[0702]	aggagaggcg ccgatacaag catcggcatc atcggcctgc tgctgaccac agcaatggca	420
[0703]	gccgagatct gataa	435
[0704]	<210>	15
[0705]	<211>	2130
[0706]	<212>	DNA
[0707]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0708]	<220>	
[0709]	<223>	寨卡Pre+Env (Brazil) (pGX7213)
[0710]	<400>	15
[0711]	atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa cacgggtgca cagcggagca	60
[0712]	gatacctccg tgggaatcgt gggcctgctg ctgaccacag caatggcagc agaggtgacc	120
[0713]	aggagaggct ctgcctacta tatgtacctg gacagaaatg atgccggcga ggccatcagc	180

[0714]	ttccccacca cactgggcat gaacaagtgc tacatccaga tcatggacct gggccacatg	240
[0715]	tgcgatgcca ccatgagcta tgagtgtcca atgctggacg agggcgtgga gcccgacgat	300
[0716]	gtggattgct ggtgtaatac cacatccaca tgggtggtgt acggcacctg tcaccacaag	360
[0717]	aaggagagg caaggcgtc tcggagagca gtgacactgc cttcccactc taccggaag	420
[0718]	ctgcagacaa gatctcagac ctggctggag agccgggagt atacaaagca cctgatccgg	480
[0719]	gtggagaact ggatctttag aaatccagga ttgcactgg cagcagcagc aatgcctgg	540
[0720]	ctgctgggca gctccacctc tcagaaagt atctacctgg tcatgatcct gctgatgcc	600
[0721]	cctgcctatt ccatcagtg catcgcgctg tctaactcgc actttgtgga gggaatgtcc	660
[0722]	ggcggcacct gggatgatgt ggtgctggag cacggcggat gcgtgacagt gatggcccag	720
[0723]	gacaagccaa ccgtggatat cgagctggtg accacaaccg tgagcaacat ggccgaggtg	780
[0724]	cggtcctact gctatgagc cagcatctcc gacatggcct ctgatagcag atgtcccacc	840
[0725]	cagggcgagg cctacctgga caagcagagc gatacacagt acgtgtgcaa gaggaccctg	900
[0726]	gtggacaggg gatgggaaa tggatgtgc ctgtttggca agggctcct ggtgacatgc	960
[0727]	gccaaagtgc cctgttctaa gaagatgacc ggcaagagca tccagccaga gaacctggag	1020
[0728]	taccgatca tgctgagcgt gcacggctcc cagcactctg gcatgatcgt gaacgacaca	1080
[0729]	ggccacgaga cagatgagaa tagggccaag gtggagatca cacctaacag cccacgcgc	1140
[0730]	gaggccacc tggcggtt tggctcctg ggcctggact gcgagcctag aacaggcctg	1200
[0731]	gacttctccg atctgtacta tctgacctg aacaataagc actggctggt gcacaaggag	1260
[0732]	tggtttcacg acatcccact gccatggcac gcaggagcag atacaggaac cccacactgg	1320
[0733]	aacaataagg aggcctggt ggagttcaag gatgccacg ccaagaggca gacagtggtg	1380
[0734]	gtgctgggca gccaggagg agcagtgcac accgcctgg cagggcctt ggaggccgag	1440
[0735]	atggacggag caaaggccg cctgtctagc ggccacctga agtgccggt gaagatggat	1500
[0736]	aagctgagac tgaaggcgt gtctactct ctgtgcacag ccgccttcac cttaccaag	1560
[0737]	atcctgccg agacactgca cggcacagt accgtggagg tgcagtatgc cggcacagac	1620
[0738]	ggcccctgta aggtgcctgc ccagatggc gtggatatgc agacactgac cctgtgggc	1680
[0739]	aggctgatca ccgccaatc agtgatcaca gagtctacc agaacagca gatgatgctg	1740
[0740]	gagctggacc ctccctcgg cgacagctat atcgtgatc gcgtgggcga gaagaagatc	1800
[0741]	acacaccact ggcaccgag cggctccaca atcggcaagg ctttgaggc caccgtgagg	1860
[0742]	ggcgccaaga ggatggcctg gctgggcgac accgatggg atttcgctc cgtgggcggc	1920
[0743]	gcctgaact ctctgggcaa gggcatccac cagatcttc gcgccctt taagtccctg	1980
[0744]	ttcggcgaa tgagctggt ttcccagatc ctgatcgca cactgctgat gtggctgggc	2040
[0745]	ctgaacacca agaatgctc tatcagcctg atgtgcctgg ccctggcgcg cgtgctgatc	2100
[0746]	ttctgtcca ccgctgtc tgctgataa	2130
[0747]	<210>	16
[0748]	<211>	2130
[0749]	<212>	DNA
[0750]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0751]	<220>	
[0752]	<223>	寨卡PreEnv (MR766) (pGX7214)
[0753]	<400>	16
[0754]	atggactgga cctggattct gttcctggtg gcagcagcaa cacgggtgca ctccggagcc	60
[0755]	gatacctcta tcggcatcgt gggcctgctg ctgaccacag caatggcagc agagatcacc	120

[0756]	aggagaggca ggcctacta tatgtacctg gacagatctg atgccggcaa ggccatcagc	180
[0757]	ttgccacca cactgggctg gaataagtgc cacgtgcaga tcatggacct gggccacatg	240
[0758]	tgcatgccca ccatgtccta cgagtgtcca atgctggacg agggcgtgga gcccagacat	300
[0759]	gtggattgct ggtgtaacac cacatctaca tgggtggtgt atggcacctg tcaccacaag	360
[0760]	aaggagagg caaggcagc cggagagca gtgacctgc cctctcacag caccgggaag	420
[0761]	ctgcagacaa gaagccagac ctggctggag tccagggagt ataccaagca cctgatcaag	480
[0762]	gtggagaact ggatctttcg caatcccggc ttcacctgg tggcagtggc aatcgcatgg	540
[0763]	ctgctgggca gctccacctc tcagaaagtg atctacctgg tcatgatcct gctgatgcc	600
[0764]	cctgcctatt ccatccggtg catcggcgtg tctaataagag actttgtgga gggaatgtcc	660
[0765]	ggcggcacct ggggtgatgt ggtgctggag cacggcggat gcgtgacagt gatggcccag	720
[0766]	gacaagccaa ccgtggatat cgagctggtg accacaaccg tgagcaacat ggccgaggtg	780
[0767]	cggtcctact gctatgagc ctccatctct gacatggcca gcgattccag atgtcccacc	840
[0768]	cagggcgagg cctacctgga caagcagtc gatacacagt acgtgtgcaa gaggaccctg	900
[0769]	gtggacaggg gatgggaaa tggatgtggc ctgtttggca agggctctct ggtgacatgc	960
[0770]	gccaaagtca cctgttctaa gaagatgaca ggcaagagca tccagcccga gaacctggag	1020
[0771]	taccgatca tgctgagcgt gcacggtct cagcacagcg gcatgatcgt gaacgacgag	1080
[0772]	ggctatgaga cagatgagaa tcgggccaag gtggaggtga cacctaacag cccaagagcc	1140
[0773]	gaggccacc tgggcgctt tggctccctg ggcctggact gcgagcctag gacaggcctg	1200
[0774]	gacttctccg atctgtacta tctgacctg aacaataagc actggctggt gcacaaggag	1260
[0775]	tggtttcacg acatcccact gccatggcac gcaggagcag atacaggaac cccacctgg	1320
[0776]	aacaataagg aggcctggt ggagttcaag gatgccacg ccaagaggca gacagtgggtg	1380
[0777]	gtgctgggca gccaggagg agcagtgac accgcctgg caggcgcct ggaggccgag	1440
[0778]	atggacggag caaaggccg cctgttctcc ggccacctga agtgcaggct gaagatggat	1500
[0779]	aagctgcgcc tgaaggcgt gtcttacagc ctgtgcacag ccgccttcc cttaccaag	1560
[0780]	gtgctgccc agacctgca cggcacagt accgtggagg tgcagtatgc cggcacagac	1620
[0781]	ggcccctgta aggtgctgc ccagatggc gtggatatgc agacctgac ccctgtgggc	1680
[0782]	aggctgatca ccgccaatcc agtgatcaca gagagcaccg agaactcaa gatgatgctg	1740
[0783]	gagctggacc ctccctcgg cgacagctac atcgtgatcg gcgtggcgca caagaagatc	1800
[0784]	acacaccact ggcaccgctc cggctctaca atcggcaagg ccttcgagc caccgtgagg	1860
[0785]	ggcccaaga ggatggcctg gctggcgac accgcatggg attttgctc cgtggcggc	1920
[0786]	gtgttcaatt ctctgggcaa gggcatccac cagatcttcg gcgccctt taagagcctg	1980
[0787]	ttcggcgaa tgcctggtt ttctcagatc ctgatcggca cactgctggt gtggctgggc	2040
[0788]	ctgaacacaa agaatggcag catctcctg acctgctgg ccctggcgcg cgtgatgatc	2100
[0789]	ttctgtcta ccgctgag cgctgataa	2130
[0790]	<210>	17
[0791]	<211>	2070
[0792]	<212>	DNA
[0793]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0794]	<220>	
[0795]	<223>	无衣壳的寨卡PreEnv (MR766)
[0796]	<400>	17
[0797]	atggactgga cttggattct gttctggtg gctgccgcta caagagtgca ttcaattacc	60

[0798]	aggaggggca ggcctacta catgtacctg gacagaagcg acgccgaaa agccatcagc	120
[0799]	ttgccacaa ccctgggct caacaagtgc cacgtgcaga tcatggacct gggccacatg	180
[0800]	tgcgaccca caatgagcta cgagtgcct atgctggacg agggagtgga accagacgac	240
[0801]	gtcactgtt ggtgcaacac cacctccact tgggtcgtgt acggcacttg ccaccacaag	300
[0802]	aagggcgagg ccagaagaag cagaagagcc gtgacctgc ctagccacag caccagaaag	360
[0803]	ctgcagacca ggagccagac ttggctgaa agccgcgagt acaccaagca cctgatcaag	420
[0804]	gtggagaatt ggatcttccg gaacccggc ttcacactgg tggcctggc aatcgcttgg	480
[0805]	ctgctgggat ctagcaccag ccagaaagt atctacctg tcatgatcct gctgatgcc	540
[0806]	ccagcctaca gcatccgtg tctcggagt agcaaccgg acttcgtgga gggaatgagc	600
[0807]	ggaggaactt ggtgagcgt ggtgctgaa cacggaggt gcgtgacagt gatggctcag	660
[0808]	gacaagccca ccgtggatat cgagctggt accaccacc tgtccaacat ggccgaagtg	720
[0809]	cgcagctact gctacgagc cagtatctc gacatggcca gcgatagcc ctgtcctaca	780
[0810]	cagggagagg cctatctgga caagcagac gacaccagt acgtctgca gaggaccctc	840
[0811]	gtggatagag gctgggaaa cggttcgga ctgttcgaa agggcagcct cgtgacttgc	900
[0812]	gccaaagtca cttgcagca gaagatgacc ggcaagtcta tccagcccga gaacctggag	960
[0813]	taccgatca tgctgagcgt gcacggaag cagcacagc gcatgatcgt gaacgacgag	1020
[0814]	ggatacgaga ccgacgaga caggccaag gtggaagtga cccctaacag ccctagagcc	1080
[0815]	gaagccacac tgggaggatt tggcagcct ggactggatt gcgagcctag aacaggcctg	1140
[0816]	gacttcagc acctgtacta cctgacctg aacaacaagc attggctggt gcacaaggag	1200
[0817]	tggtccacg acatccctc gccttggcag gcaggaccg atacaggcac acctcattgg	1260
[0818]	aacaacaagg aggccctggt ggagttcaag gacgctcac ccaagagaca gacagtgggt	1320
[0819]	gtgctggaa gccaggaag agcagtcat acagccctg caggagctct ggaagcagaa	1380
[0820]	atggacggcg ctaaggcag actgttcagc ggacacctca agtgccggct gaagatggac	1440
[0821]	aagctcggc tgaaggcgt gtcttacag ctctgcacc cagccttac cttaccaag	1500
[0822]	gtgccagcag agacactgca cggaacagt accgtggaag tgcagtacgc cggaacagac	1560
[0823]	ggaccttga aagtccagc ccagatggca gtggacatgc agacactgac ccagtgga	1620
[0824]	aggctgatca ccgtaacc cgtcatcacc gagagaccg agaacagca gatgatgctg	1680
[0825]	gagctggacc ccccttcg cgatagctac atcgtgatc gcgtgggca caagaagatc	1740
[0826]	accaccatt ggcacagaag cggcagcaca atcggcaag ctttcgagc caccgtgaga	1800
[0827]	ggagctaaga gaatggcgt gctgggagc accgcttgg attttggcag cgtgggagga	1860
[0828]	gtgtcaaca gcctggcaa gggcatccac cagatcttc gagccgctt caagagcctg	1920
[0829]	ttcggcgca tgtcttggt cagccagatc ctgatcggaa cactcctcgt ctggctggga	1980
[0830]	ctgaacacca agaaccgag catcagcctg acttgtctg ccctgggagg cgtgatgatc	2040
[0831]	ttctgagca ccgccgtgc cgcttgataa	2070
[0832]	<210>	18
[0833]	<211>	688
[0834]	<212>	PRT
[0835]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0836]	<220>	
[0837]	<223>	无衣壳的寨卡PreEnv (MR766)
[0838]	<400>	18
[0839]	Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val	

[0840]	1	5	10	15
[0841]	His Ser Ile Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Asp Arg			
[0842]		20	25	30
[0843]	Ser Asp Ala Gly Lys Ala Ile Ser Phe Ala Thr Thr Leu Gly Val Asn			
[0844]		35	40	45
[0845]	Lys Cys His Val Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys Asp Ala Thr			
[0846]		50	55	60
[0847]	Met Ser Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val Glu Pro Asp Asp			
[0848]		65	70	75
[0849]	Val Asp Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val Val Tyr Gly Thr			
[0850]		85	90	95
[0851]	Cys His His Lys Lys Gly Glu Ala Arg Arg Ser Arg Arg Ala Val Thr			
[0852]		100	105	110
[0853]	Leu Pro Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg Ser Gln Thr Trp			
[0854]		115	120	125
[0855]	Leu Glu Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Lys Val Glu Asn Trp			
[0856]		130	135	140
[0857]	Ile Phe Arg Asn Pro Gly Phe Thr Leu Val Ala Val Ala Ile Ala Trp			
[0858]		145	150	155
[0859]	Leu Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr Leu Val Met Ile			
[0860]		165	170	175
[0861]	Leu Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn			
[0862]		180	185	190
[0863]	Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val			
[0864]		195	200	205
[0865]	Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr			
[0866]		210	215	220
[0867]	Val Asp Ile Glu Leu Val Thr Thr Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val			
[0868]		225	230	235
[0869]	Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser			
[0870]		245	250	255
[0871]	Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr			
[0872]		260	265	270
[0873]	Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly			
[0874]		275	280	285
[0875]	Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Thr			
[0876]		290	295	300
[0877]	Cys Ser Lys Lys Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu			
[0878]		305	310	315
[0879]	Tyr Arg Ile Met Leu Ser Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile			
[0880]		325	330	335
[0881]	Val Asn Asp Glu Gly Tyr Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu			

[0882]		340		345		350
[0883]	Val Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly					
[0884]		355		360		365
[0885]	Ser Leu Gly Leu Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp					
[0886]		370		375		380
[0887]	Leu Tyr Tyr Leu Thr Met Asn Asn Lys His Trp Leu Val His Lys Glu					
[0888]		385		390		395
[0889]	Trp Phe His Asp Ile Pro Leu Pro Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly					
[0890]		405		410		415
[0891]	Thr Pro His Trp Asn Asn Lys Glu Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala					
[0892]		420		425		430
[0893]	His Ala Lys Arg Gln Thr Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala					
[0894]		435		440		445
[0895]	Val His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu Glu Ala Glu Met Asp Gly Ala					
[0896]		450		455		460
[0897]	Lys Gly Arg Leu Phe Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp					
[0898]		465		470		475
[0899]	Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe					
[0900]		485		490		495
[0901]	Thr Phe Thr Lys Val Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val					
[0902]		500		505		510
[0903]	Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln					
[0904]		515		520		525
[0905]	Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr					
[0906]		530		535		540
[0907]	Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu					
[0908]		545		550		555
[0909]	Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly					
[0910]		565		570		575
[0911]	Asp Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly					
[0912]		580		585		590
[0913]	Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Val Leu					
[0914]		595		600		605
[0915]	Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Phe Asn Ser					
[0916]		610		615		620
[0917]	Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile Phe Gly Ala Ala Phe Lys Ser Leu					
[0918]		625		630		635
[0919]	Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser Gln Ile Leu Ile Gly Thr Leu Leu					
[0920]		645		650		655
[0921]	Val Trp Leu Gly Leu Asn Thr Lys Asn Gly Ser Ile Ser Leu Thr Cys					
[0922]		660		665		670
[0923]	Leu Ala Leu Gly Gly Val Met Ile Phe Leu Ser Thr Ala Val Ser Ala					

[0924]	675	680	685
[0925]	<210> 19		
[0926]	<211> 15		
[0927]	<212> PRT		
[0928]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0929]	<220>		
[0930]	<223> prME表位		
[0931]	<400> 19		
[0932]	Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Met		
[0933]	1	5	10 15

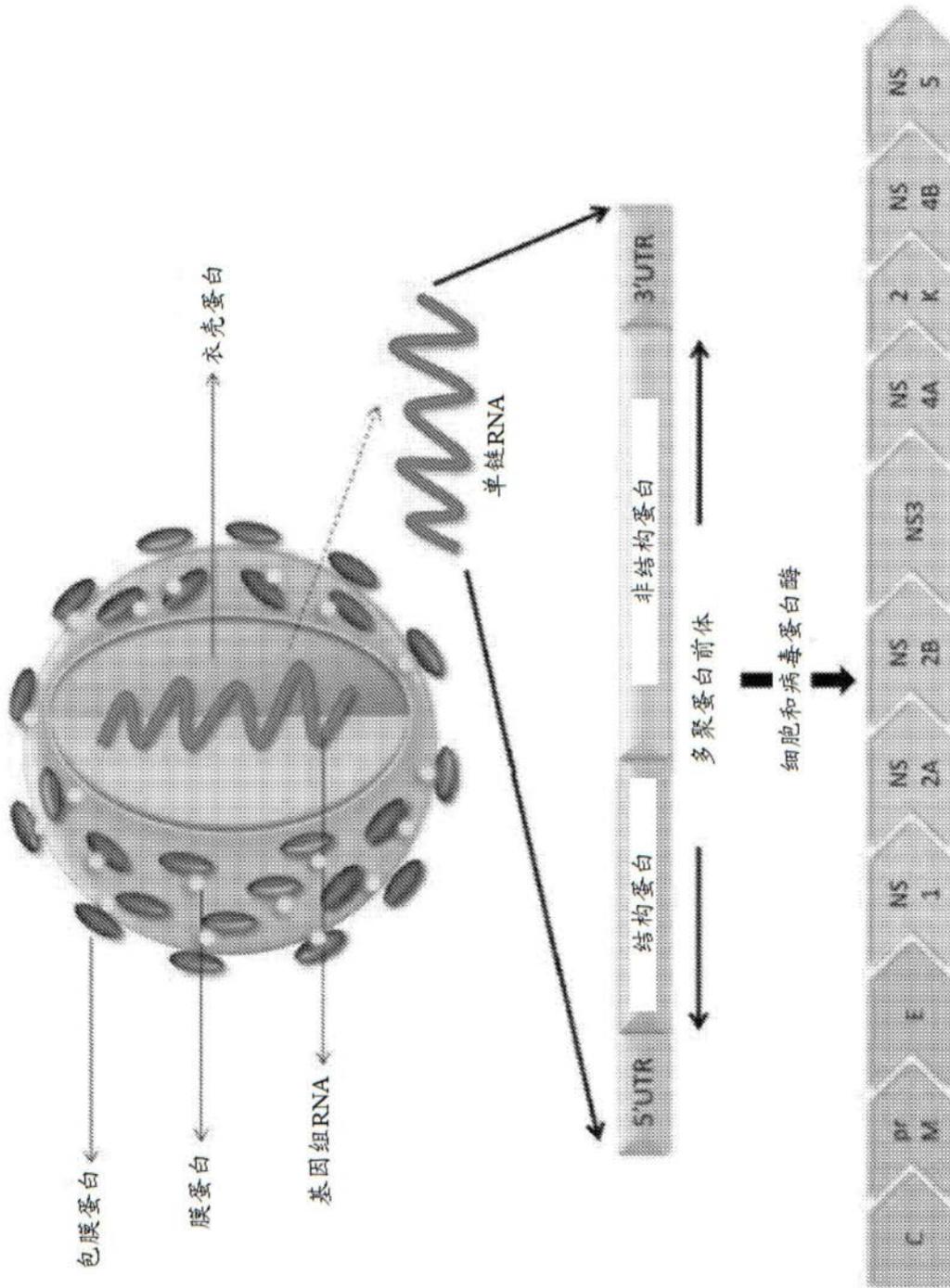


图1

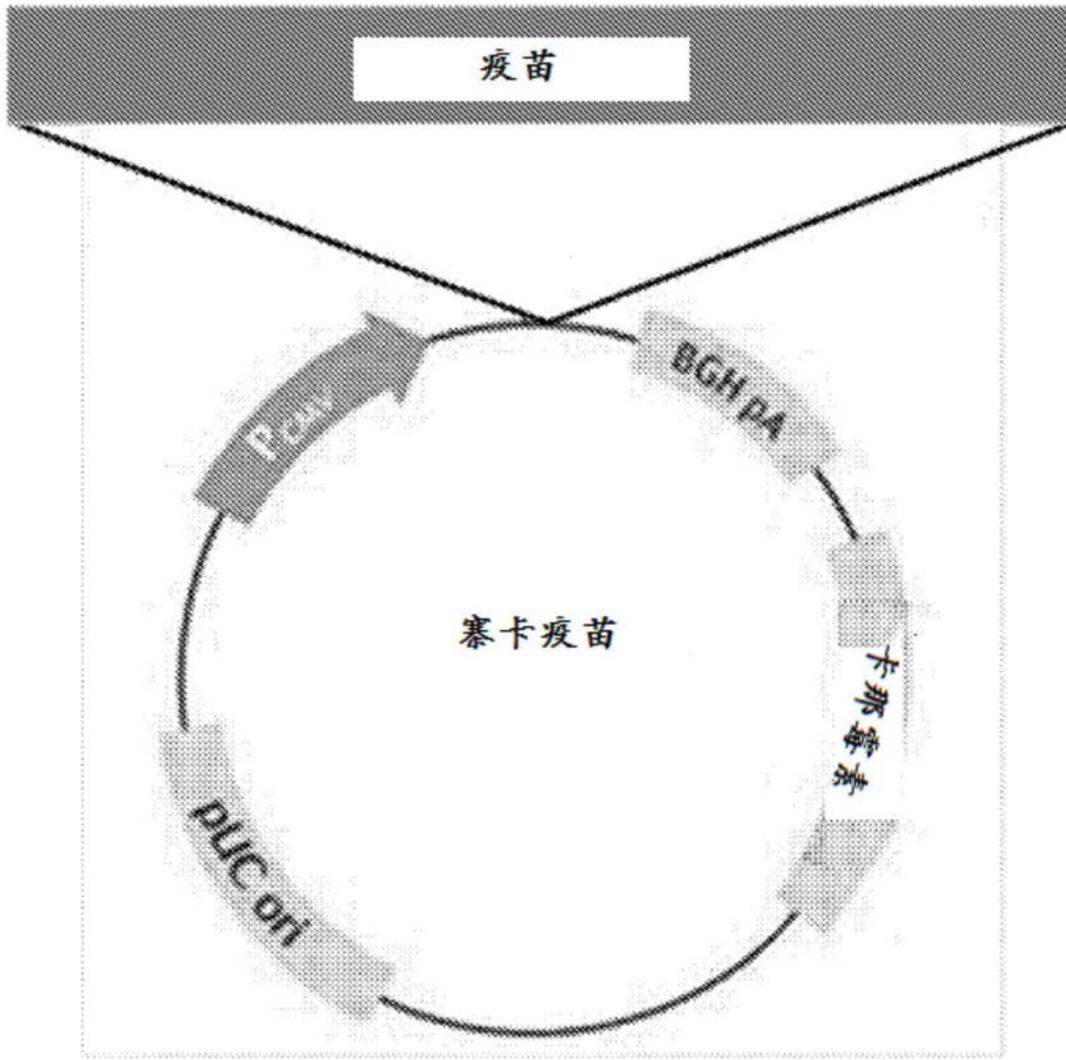


图2

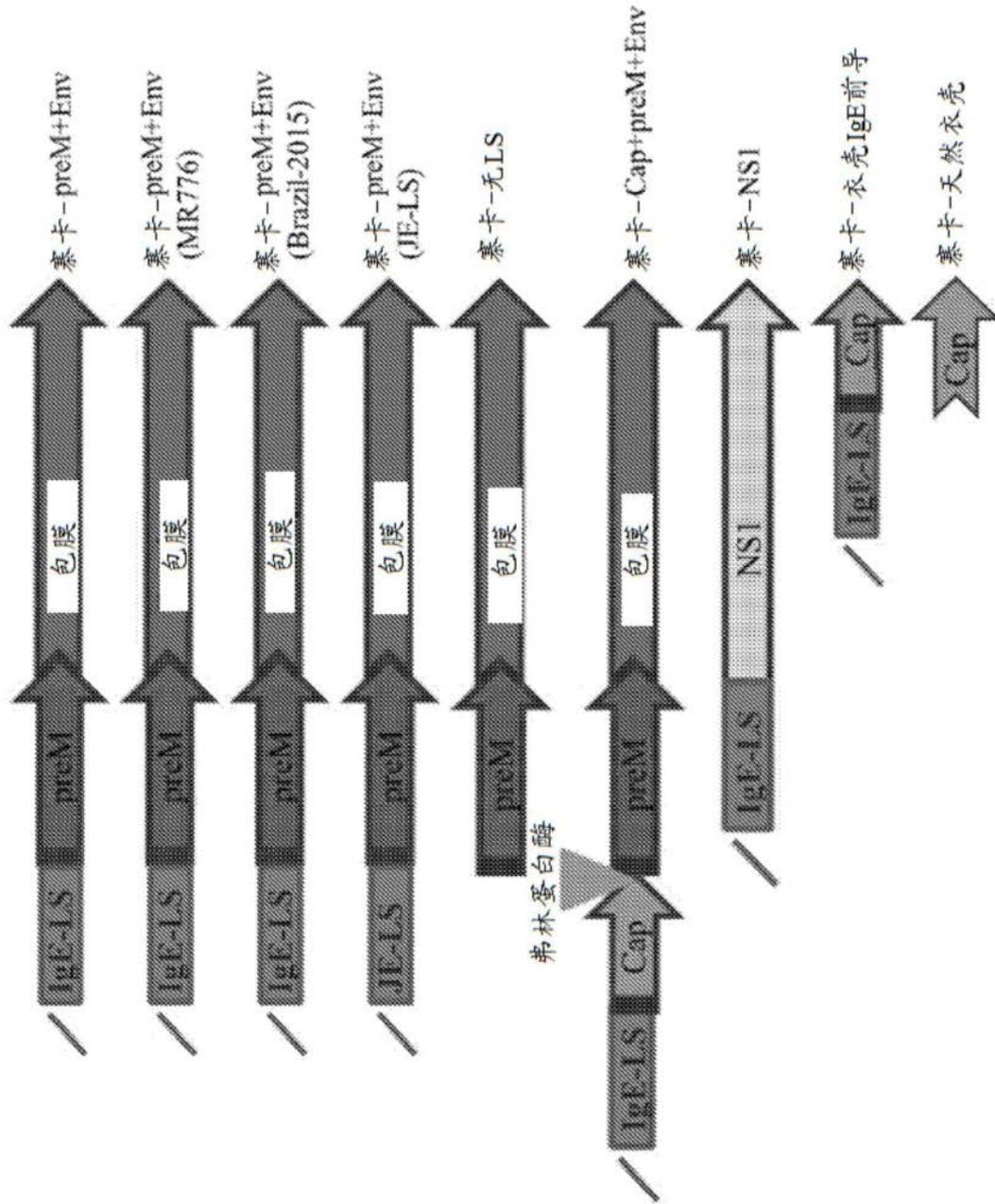


图3

MDWTWILFLVAAATRVHSGI IGLLLTTAMAAEITRRGSAYY
MYLDRNDAGEAISFPPTLGMNKC YIQIMDLGHMCDATMSYE
CPMLDEGV EPDDVDCWCNTTSTWVVYGTCHHKKGEARRSRR
AVTLPSHSTRKLQTRSQTWLESREYTKHLIRVENWIFRNPG
FALAAAAIAWLLGSSTSQKVIYLV MILLIAPAYSIRCIGVS
NRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTT
TVSNMAEVRSYCYEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQ
YVCKRTLVDGRWGNGCGLFGKGS LVTCAKFTCSKKMTGKSI
QOPENLEYRIMLSVHGSQHSGMI VNDIGHETDENRAKVEVTP
NSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLTMNNKHWL
VHKEWFHDIPLPWHAGADTGT PHWNNKEALVEFKDAHAKRQ
TVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLFSGHLKCRLK
MDKLRLKGVSYSLCTAAFTFTKVP AETLHGTVTVVEVQYAGT
DGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGR LITANPVITESTENSKMML
ELDPPFGDSYIVIGVGDKKITHHWHRSGSTIGKA FEATVRG
AKRMAVLGDTAWDFGSVGGVFNSL GKGIHQIFGAAFKSLFG
GMSWFSQILIGTLLVWLGLNTKNGS ISLTCLALGGVMIFLS
TAVSA

SEQ ID No. 1

LS+pre+膜+包膜(DIII域; 跨膜I和II)

图4

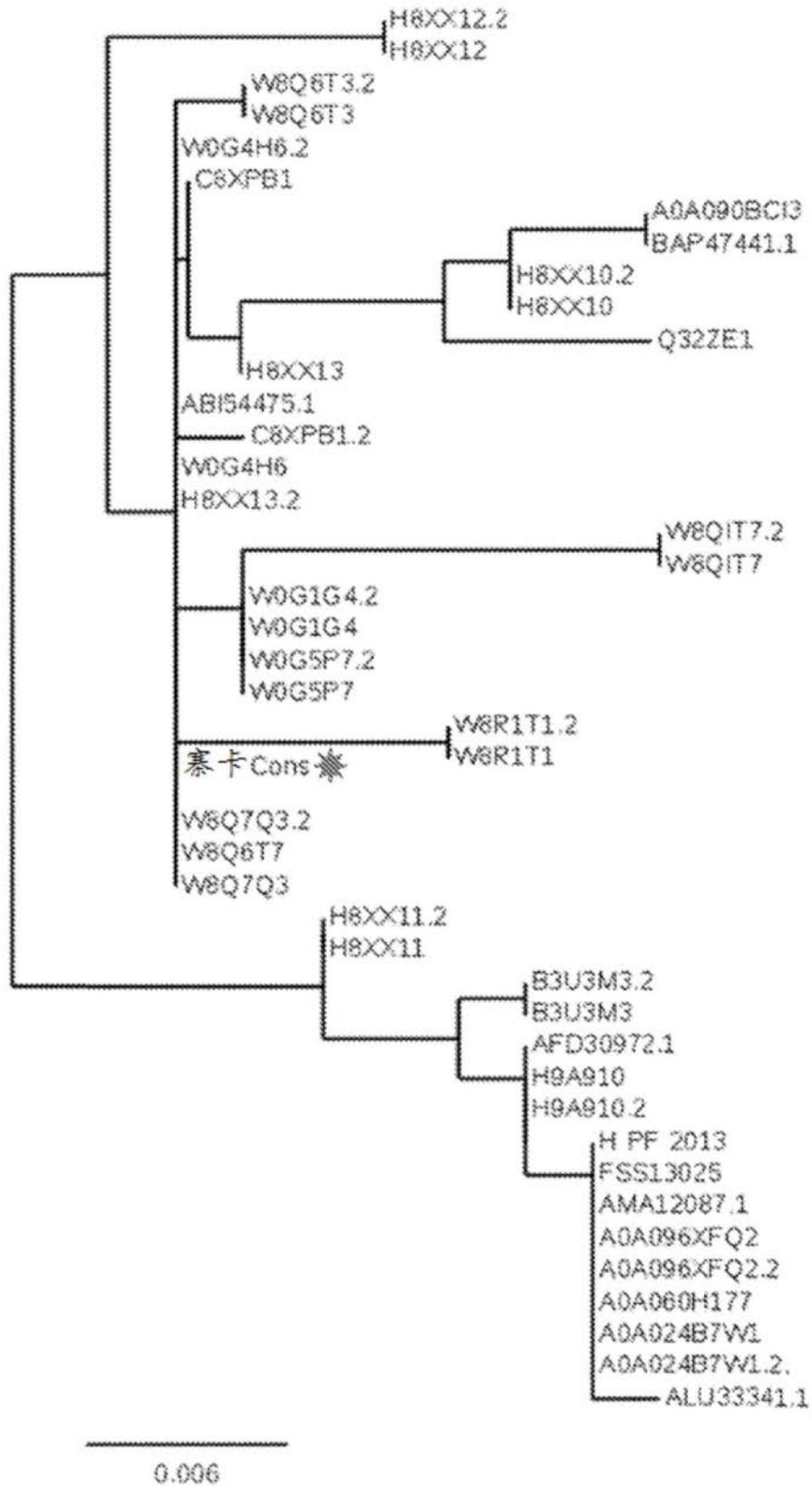


图5

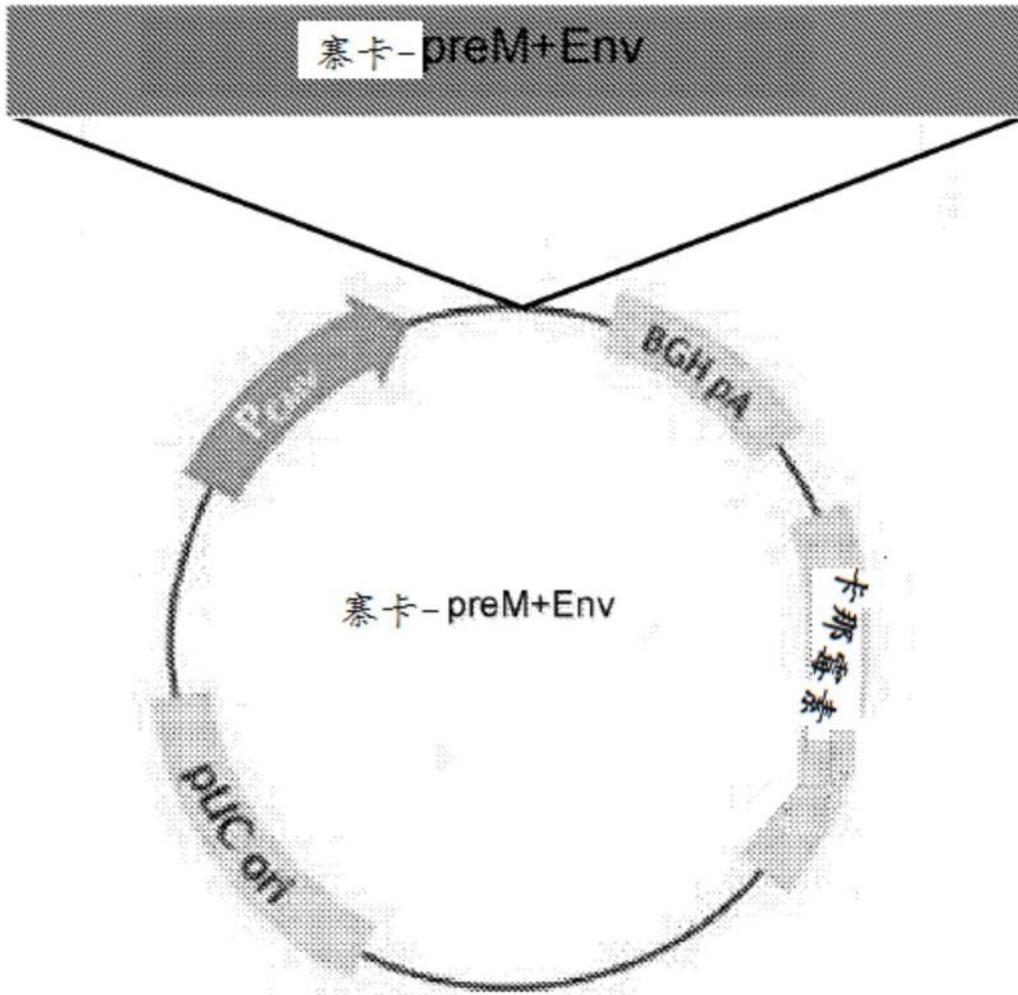


图7

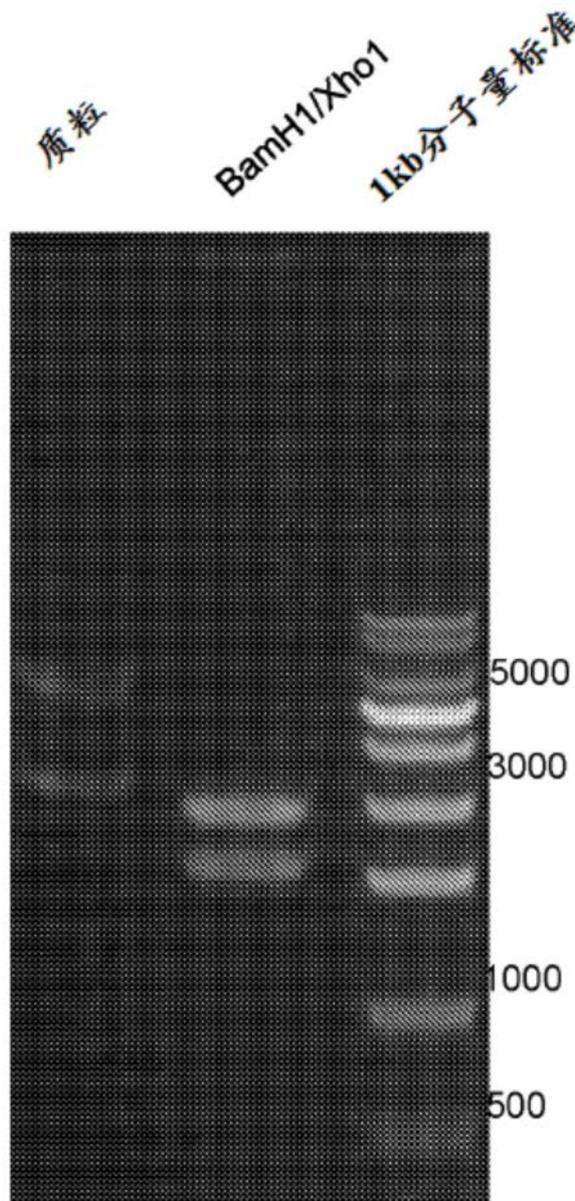


图8

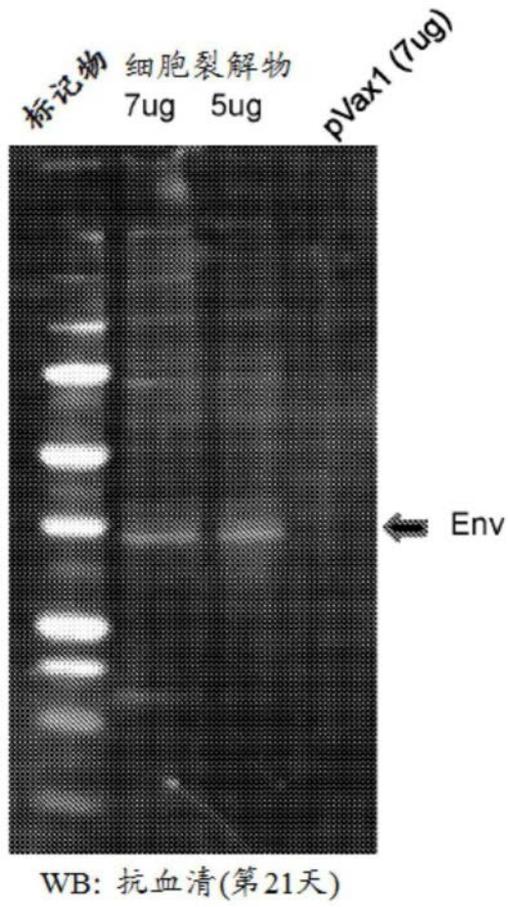


图9A

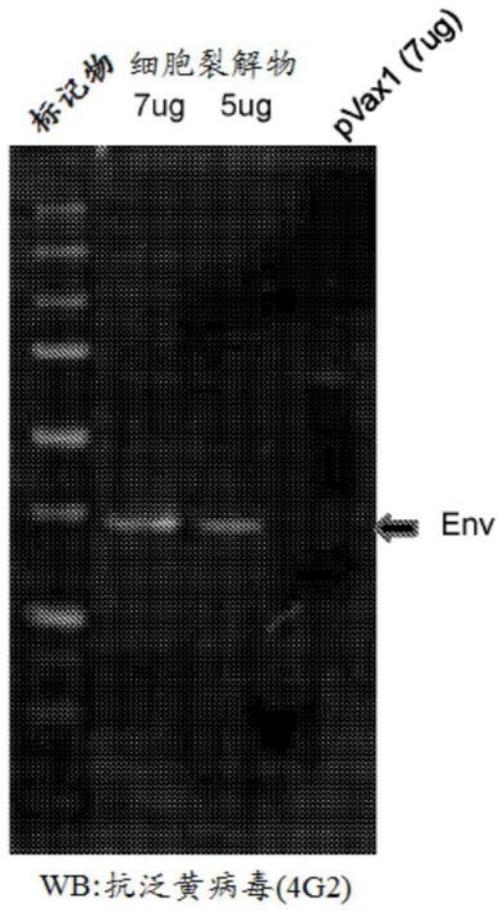
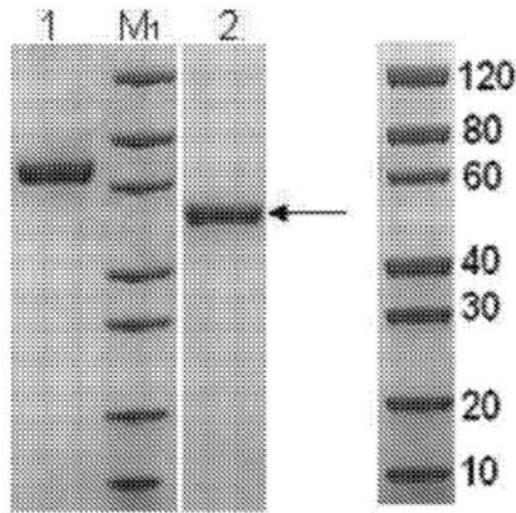


图9B

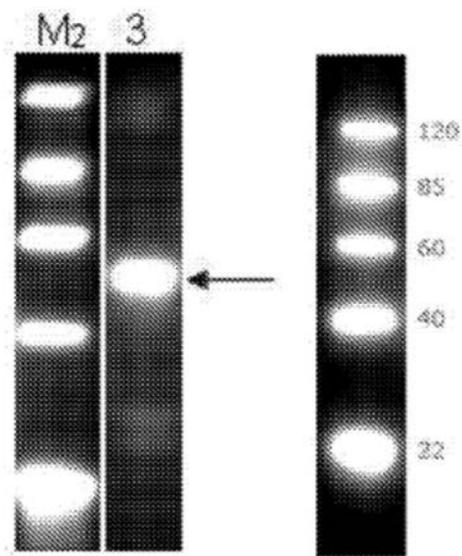
SDS-PAGE分析



道: BSA (2ug)
第2道: 寨卡-Env (2ug)

图10A

蛋白质印迹分析抗His标记



第3道: 蛋白质印迹-抗His标记

图10B

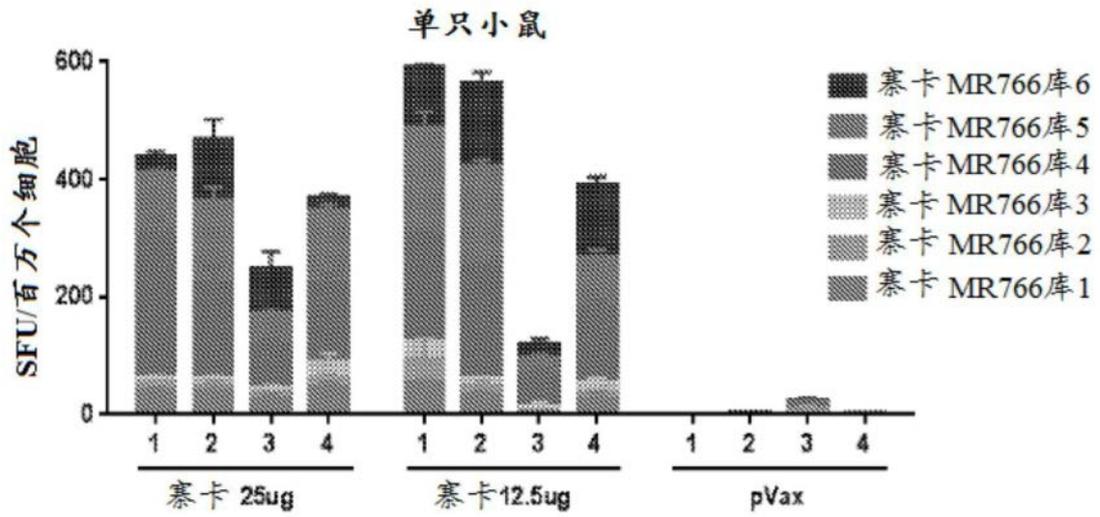


图11

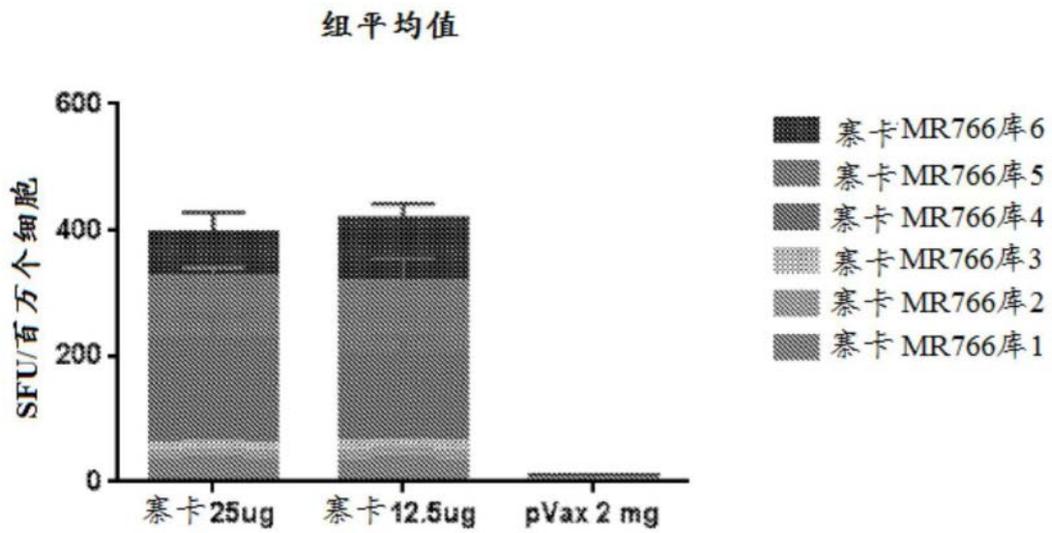


图12

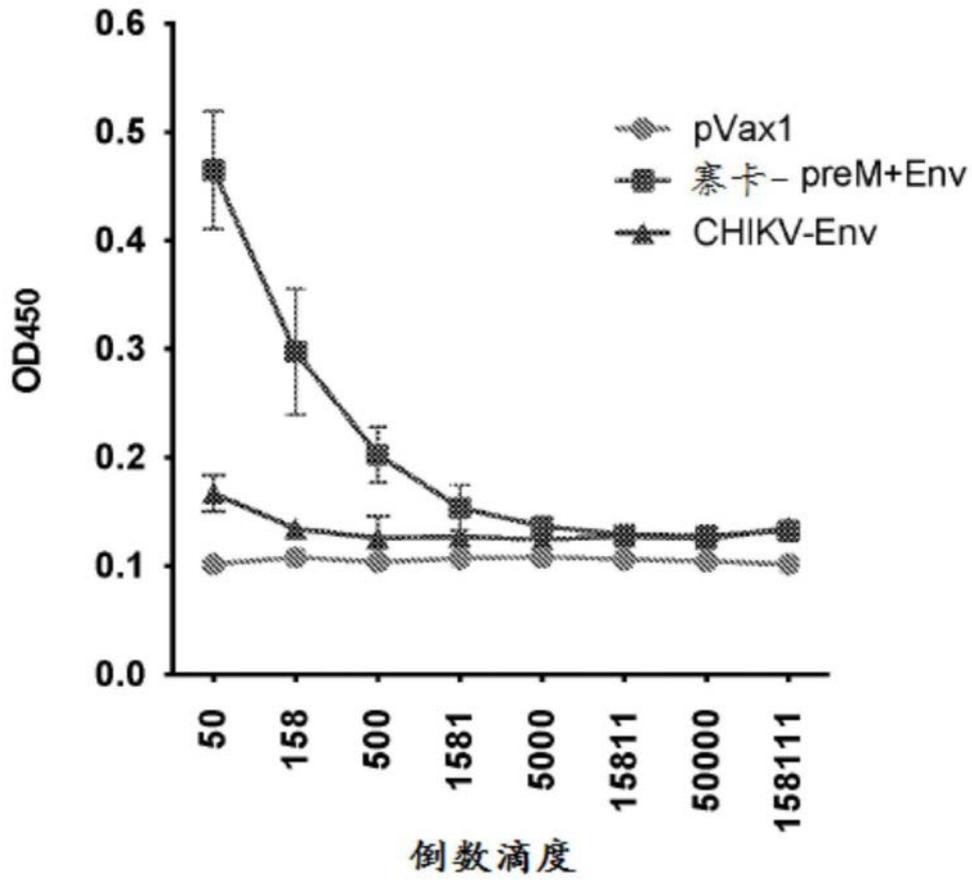


图13A

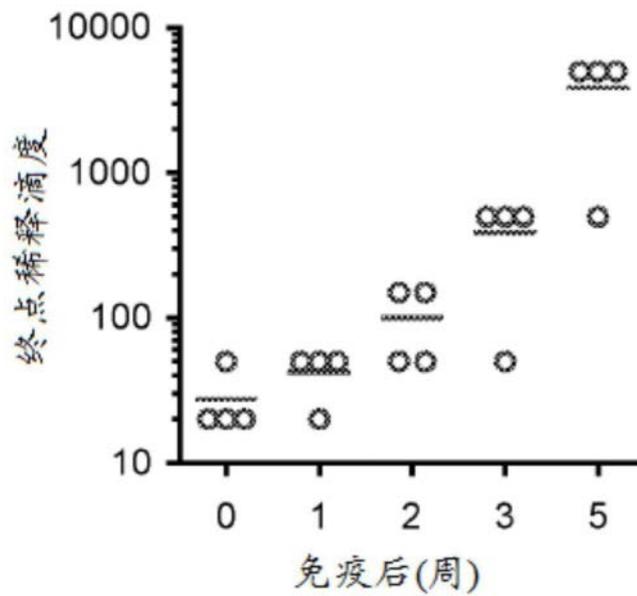


图13B

随时间的终点滴度

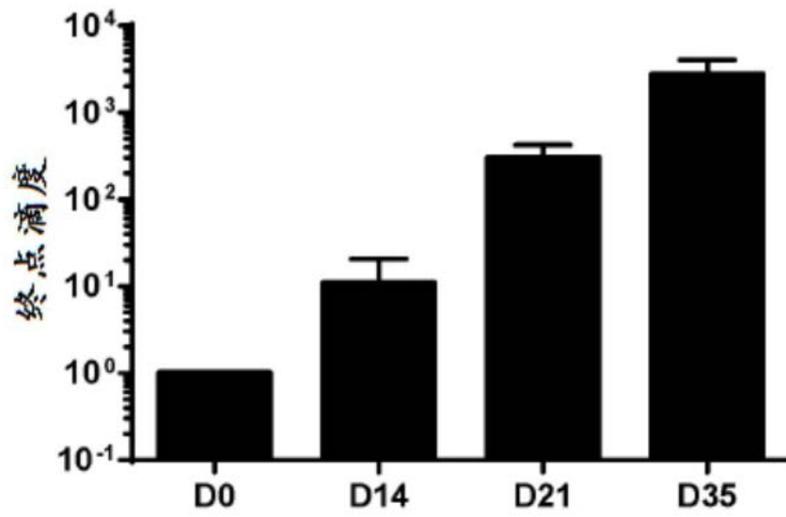


图14A

D35终点滴度

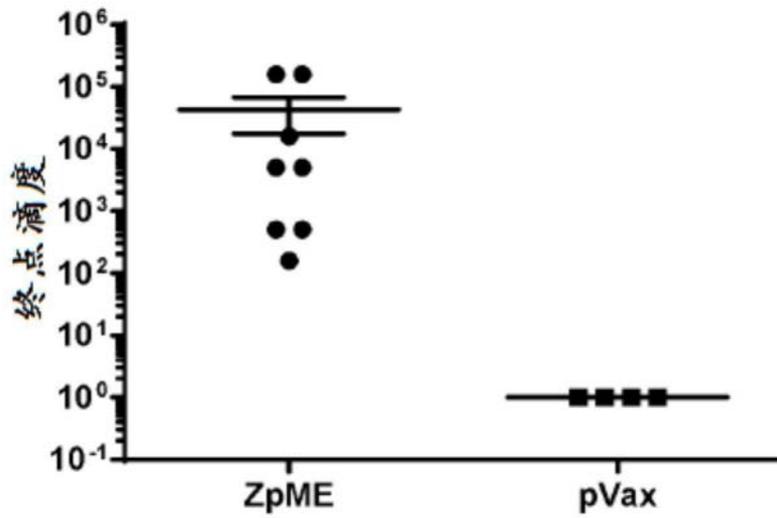


图14B

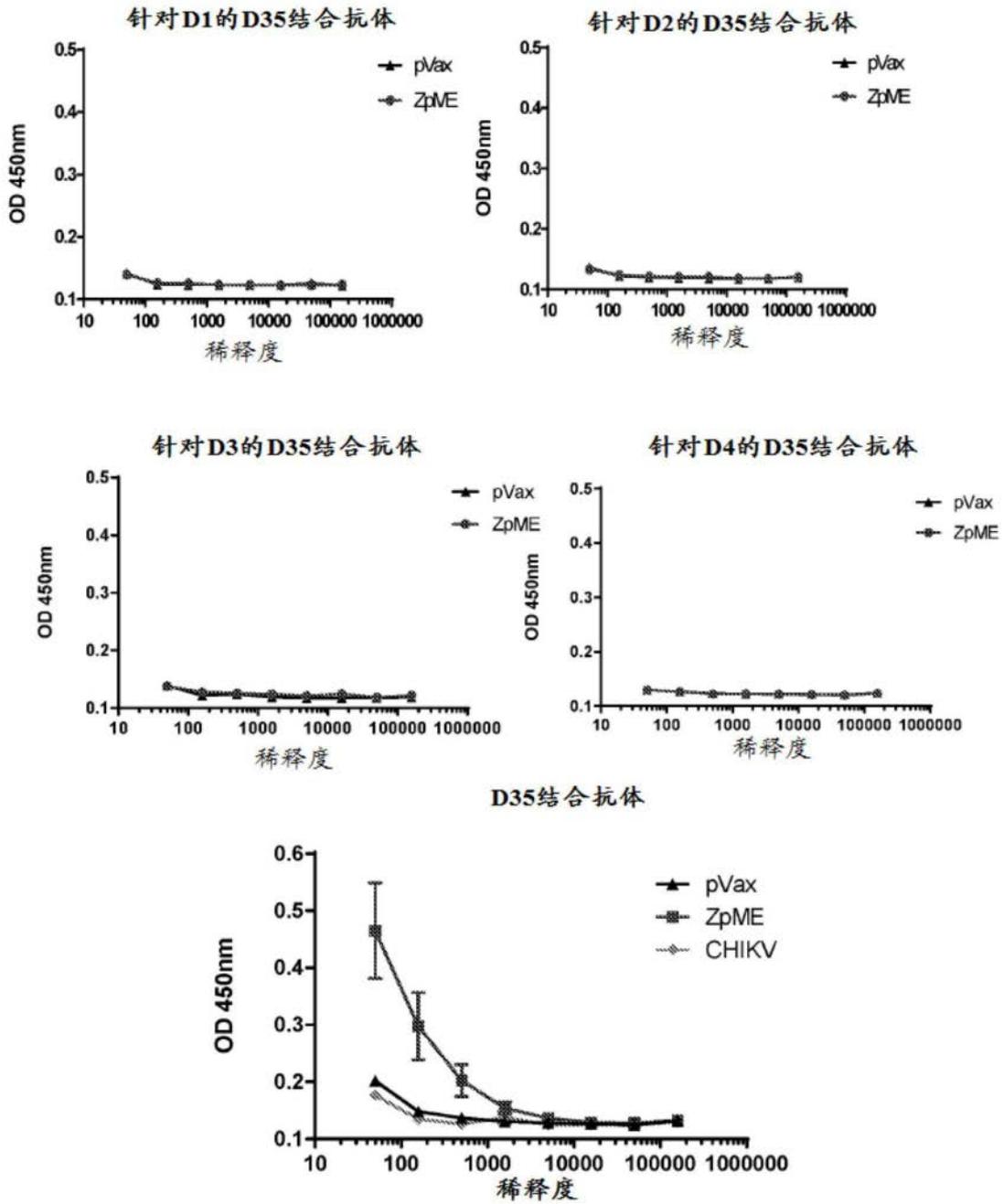


图15A-E

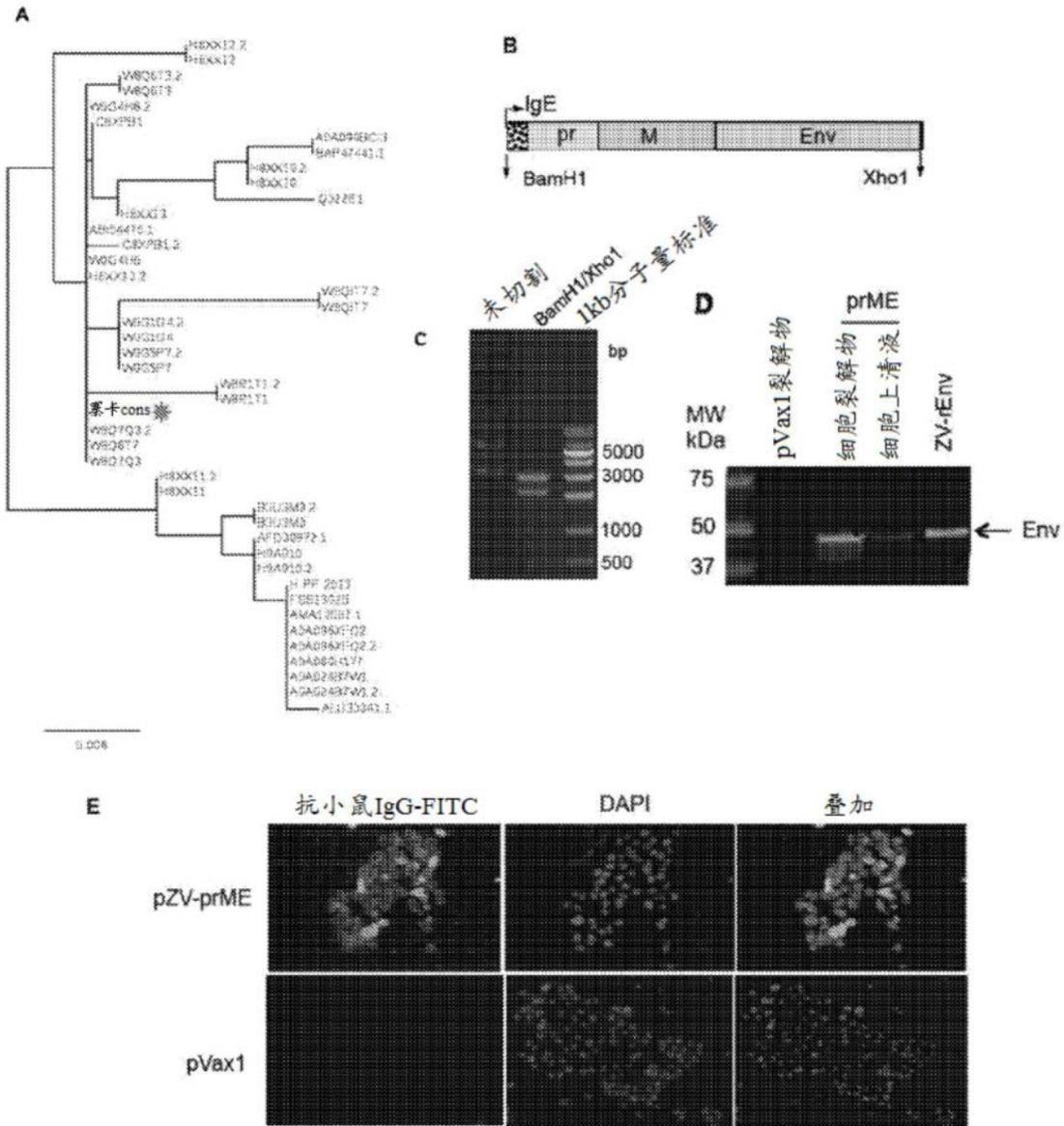


图16A-E

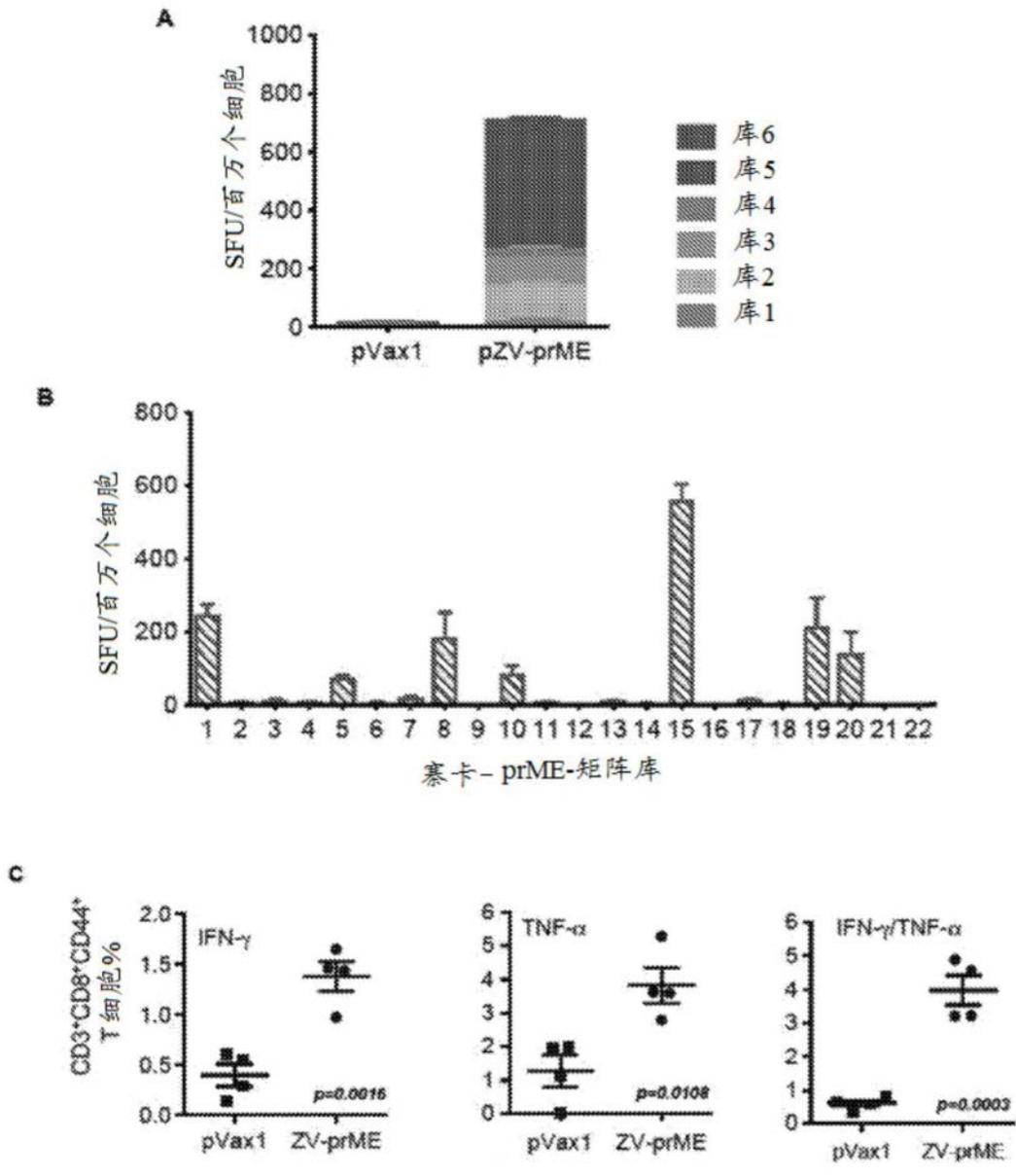


图17A-C

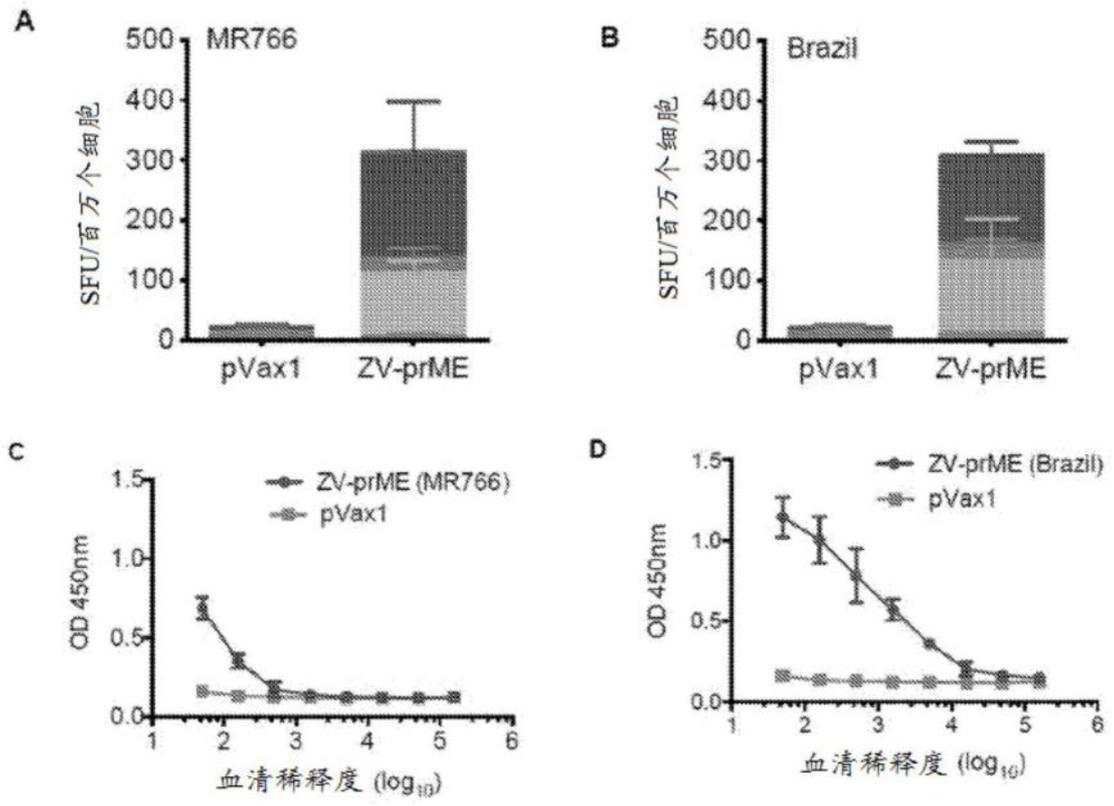


图18A-D

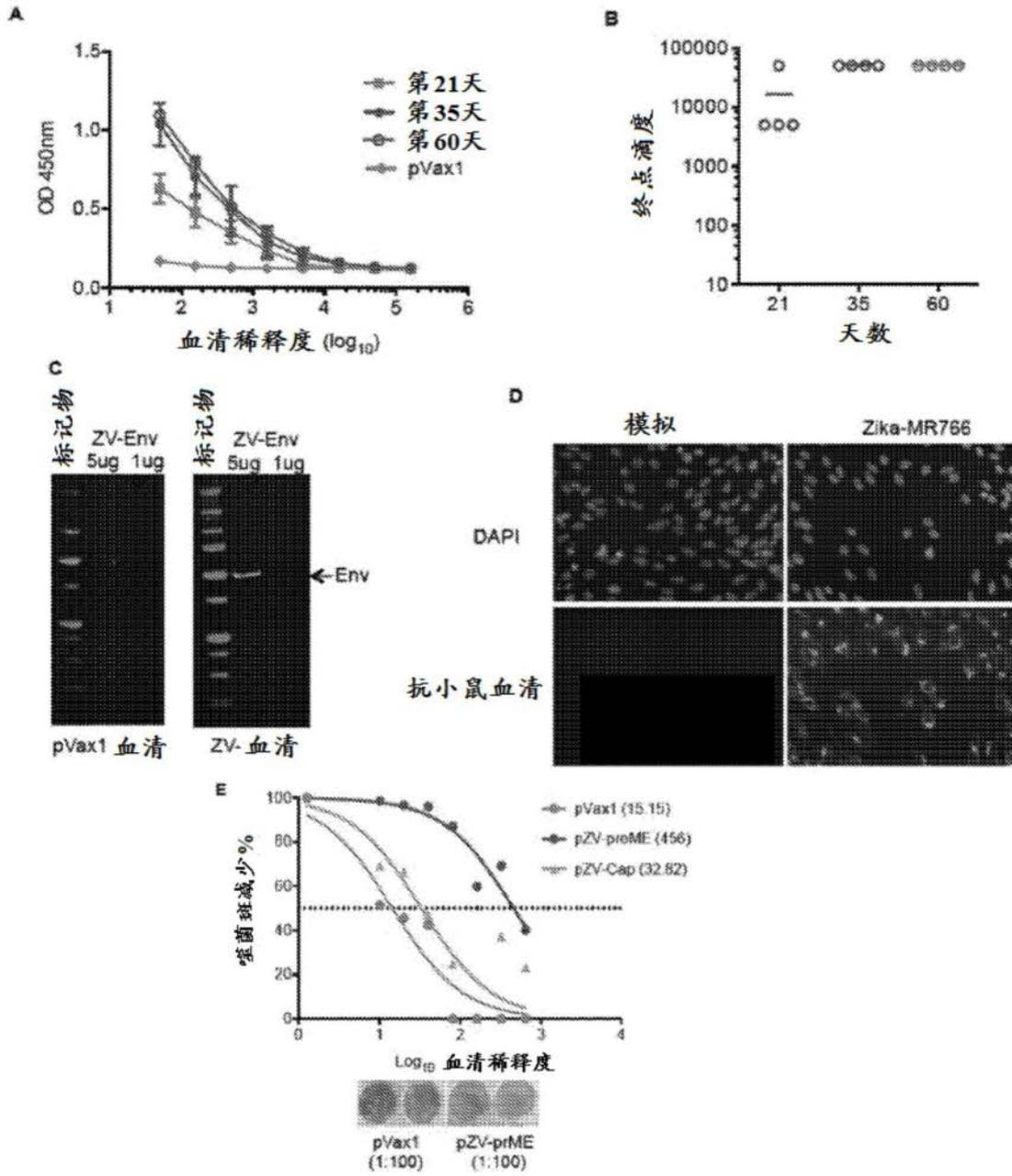


图19A-E

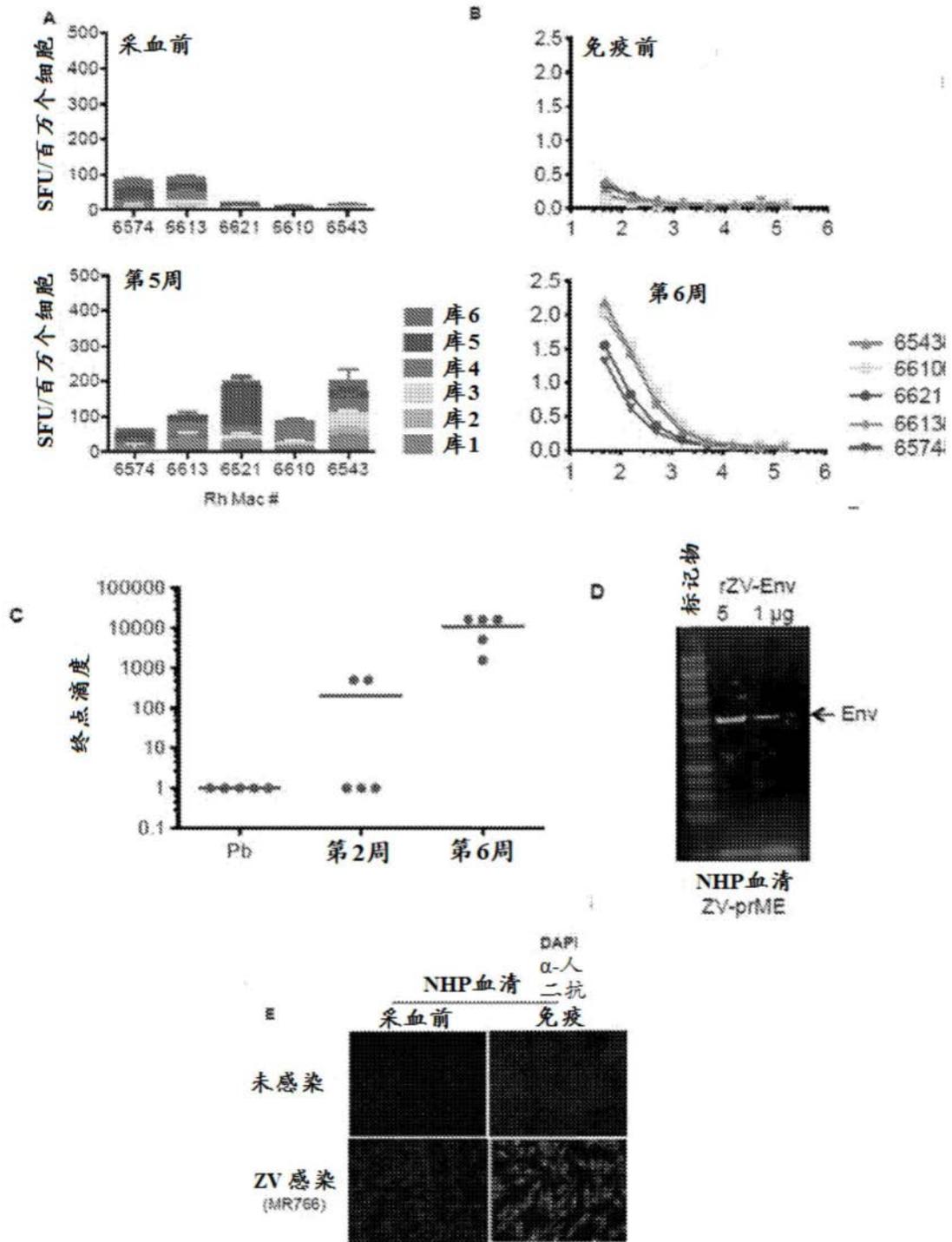


图20A-E

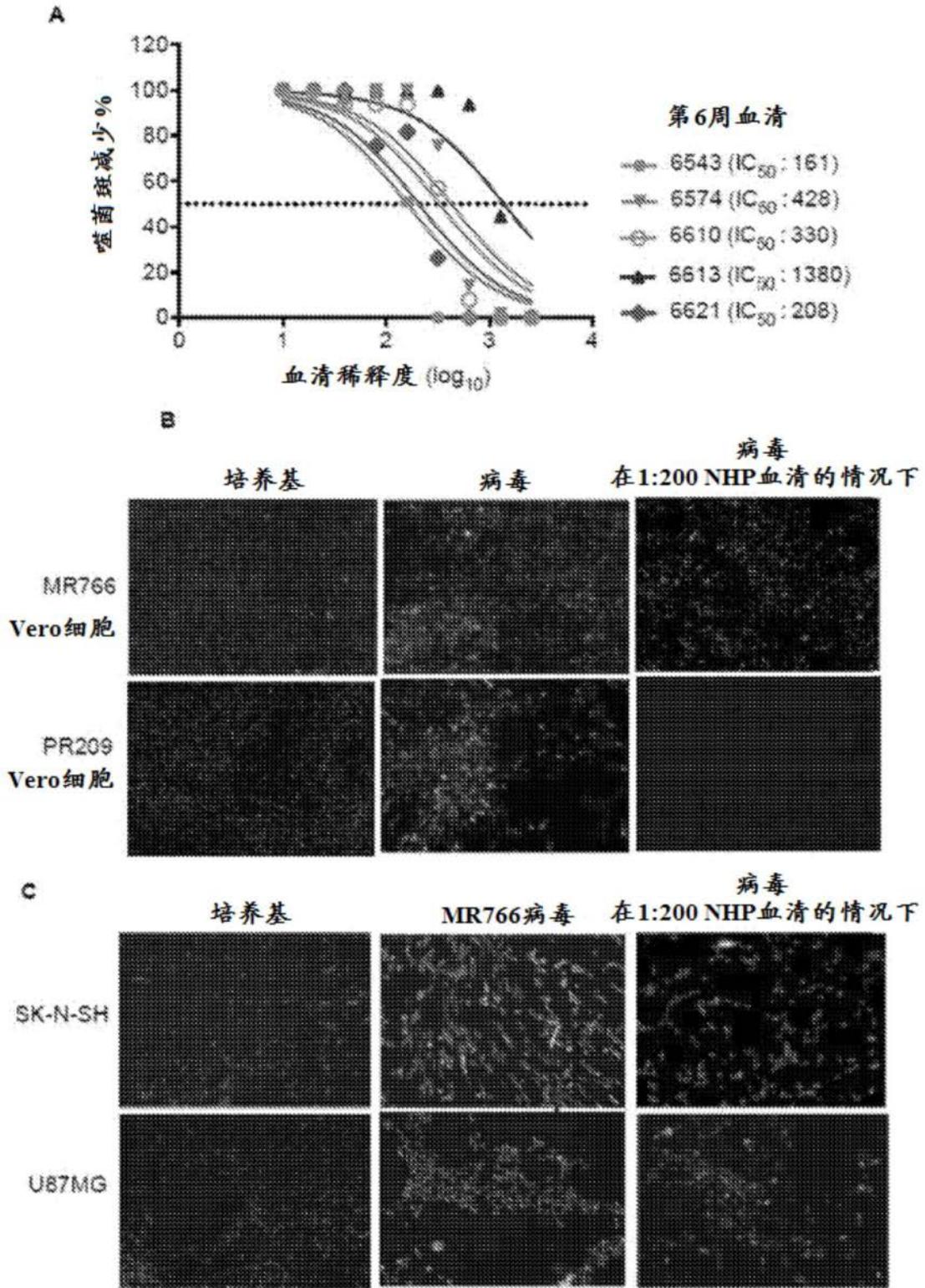


图21A-C

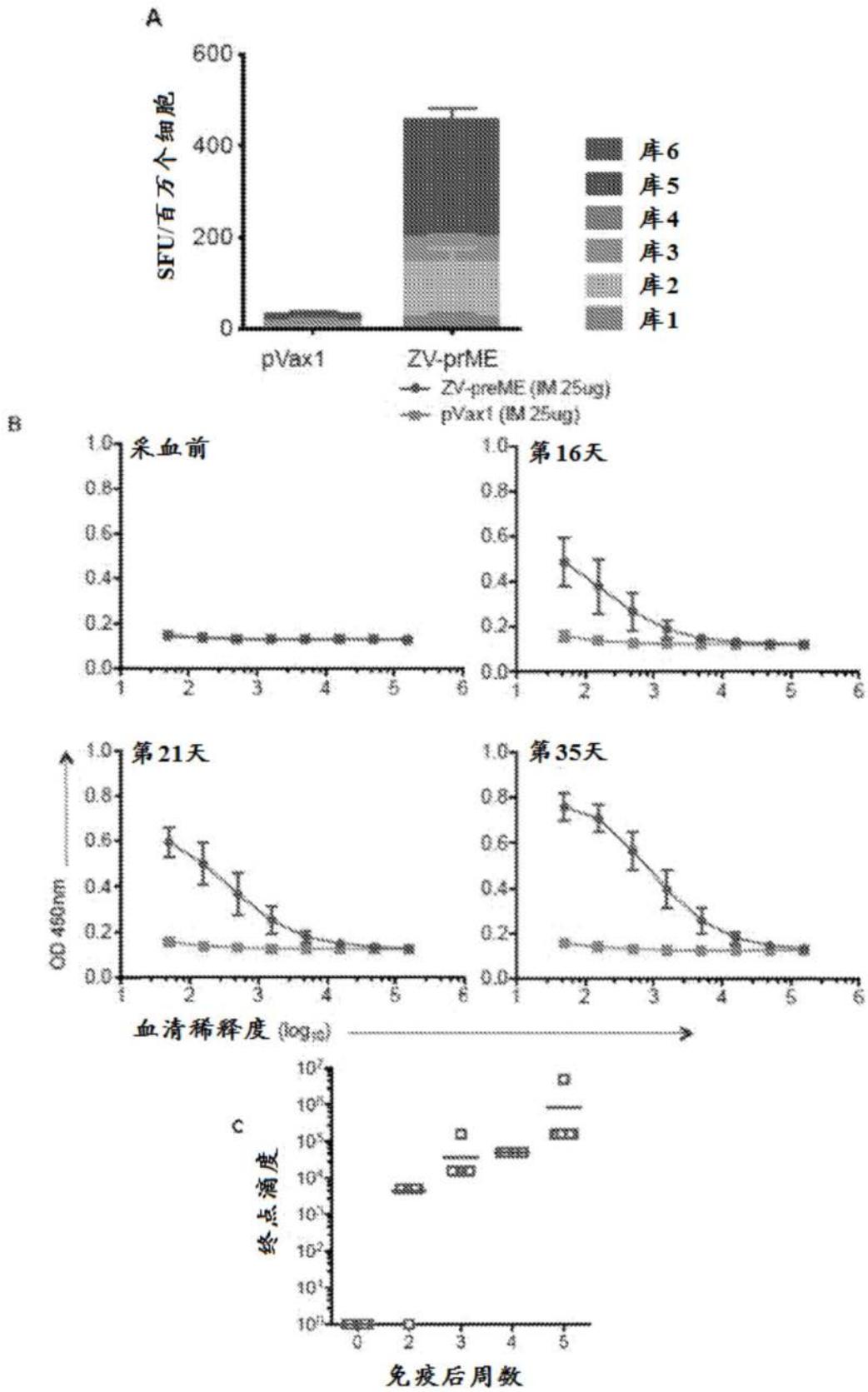


图22A-C

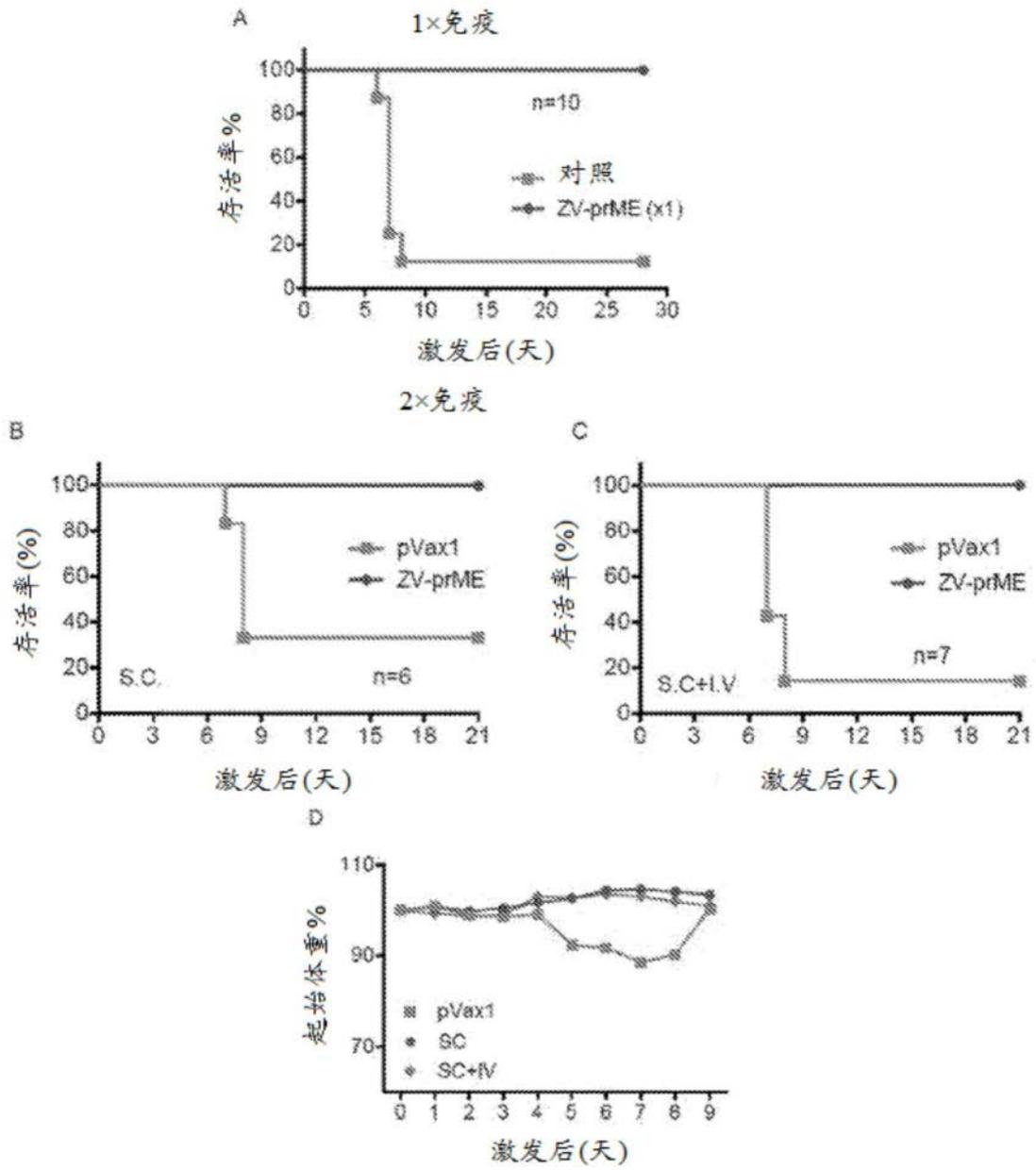


图23A-D

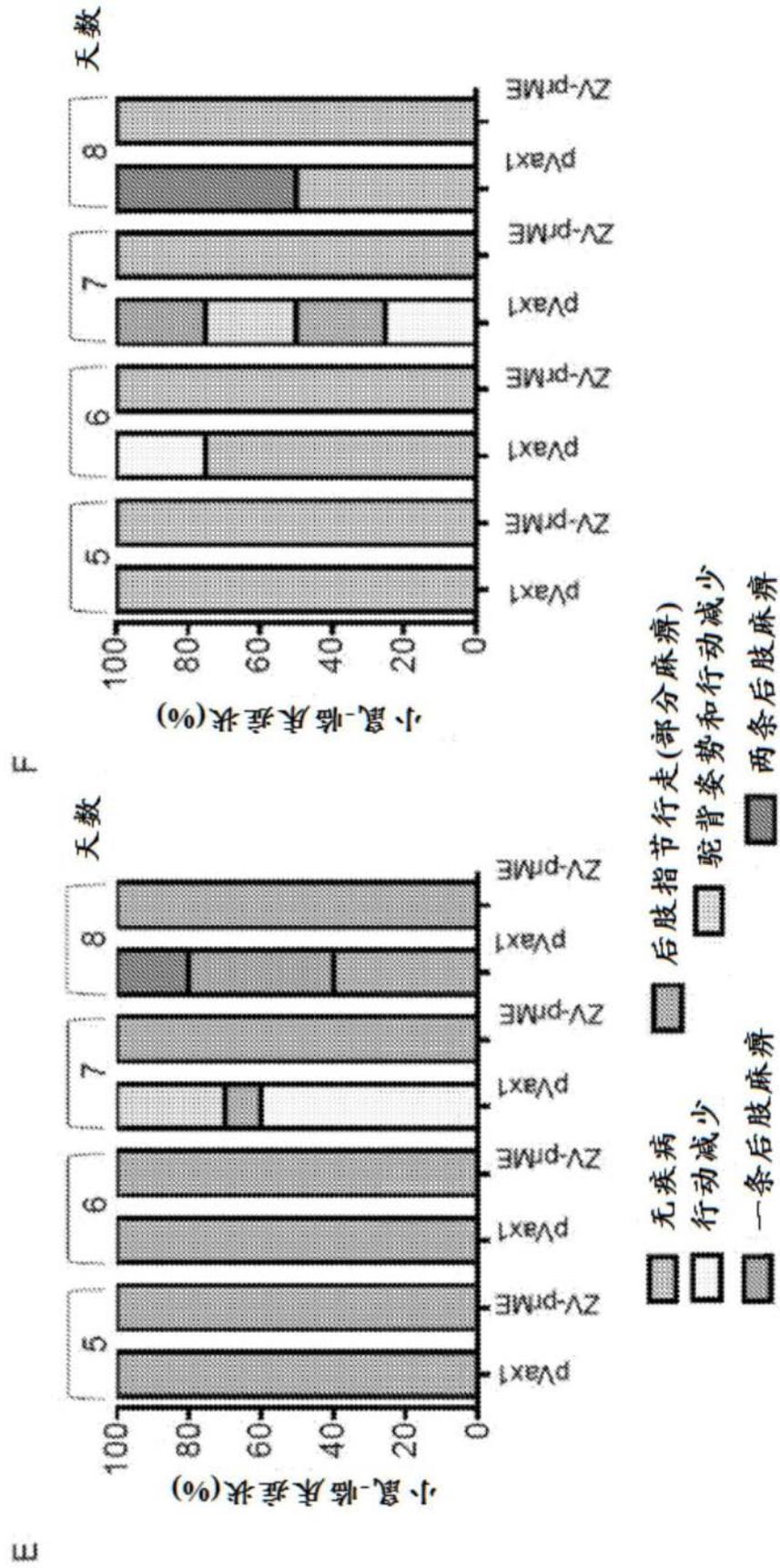


图23E-F

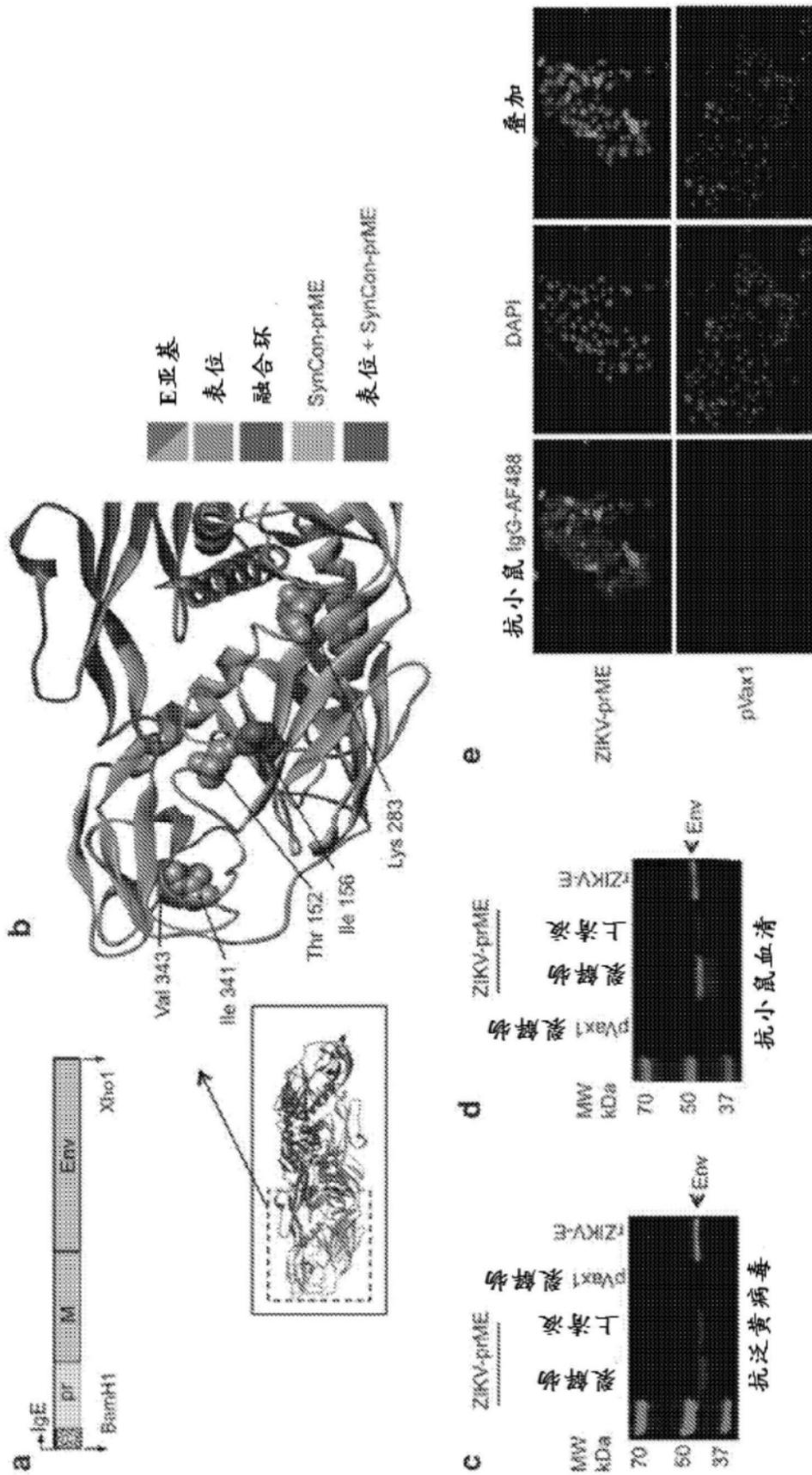


图24a-e

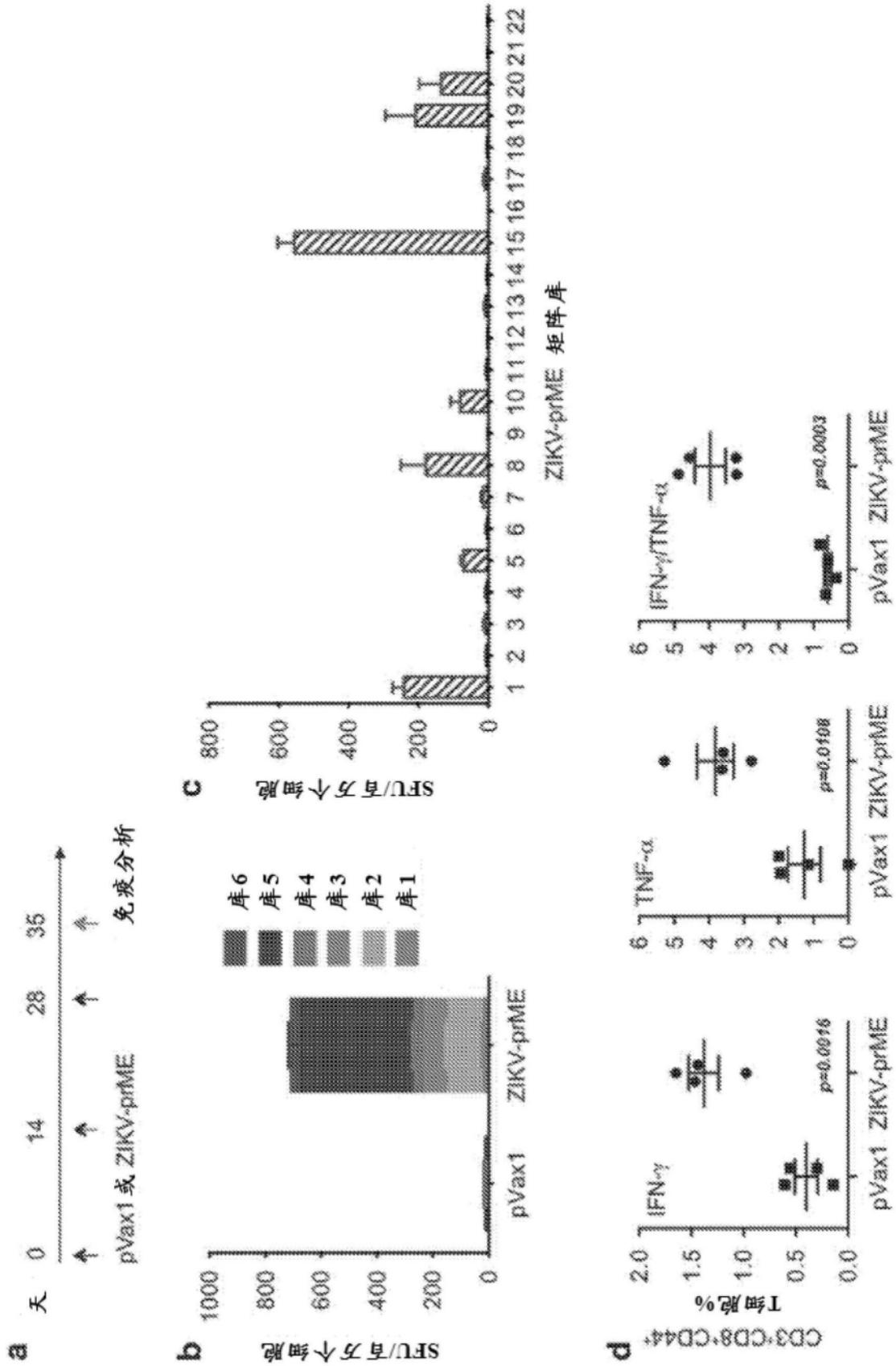


图25a-d

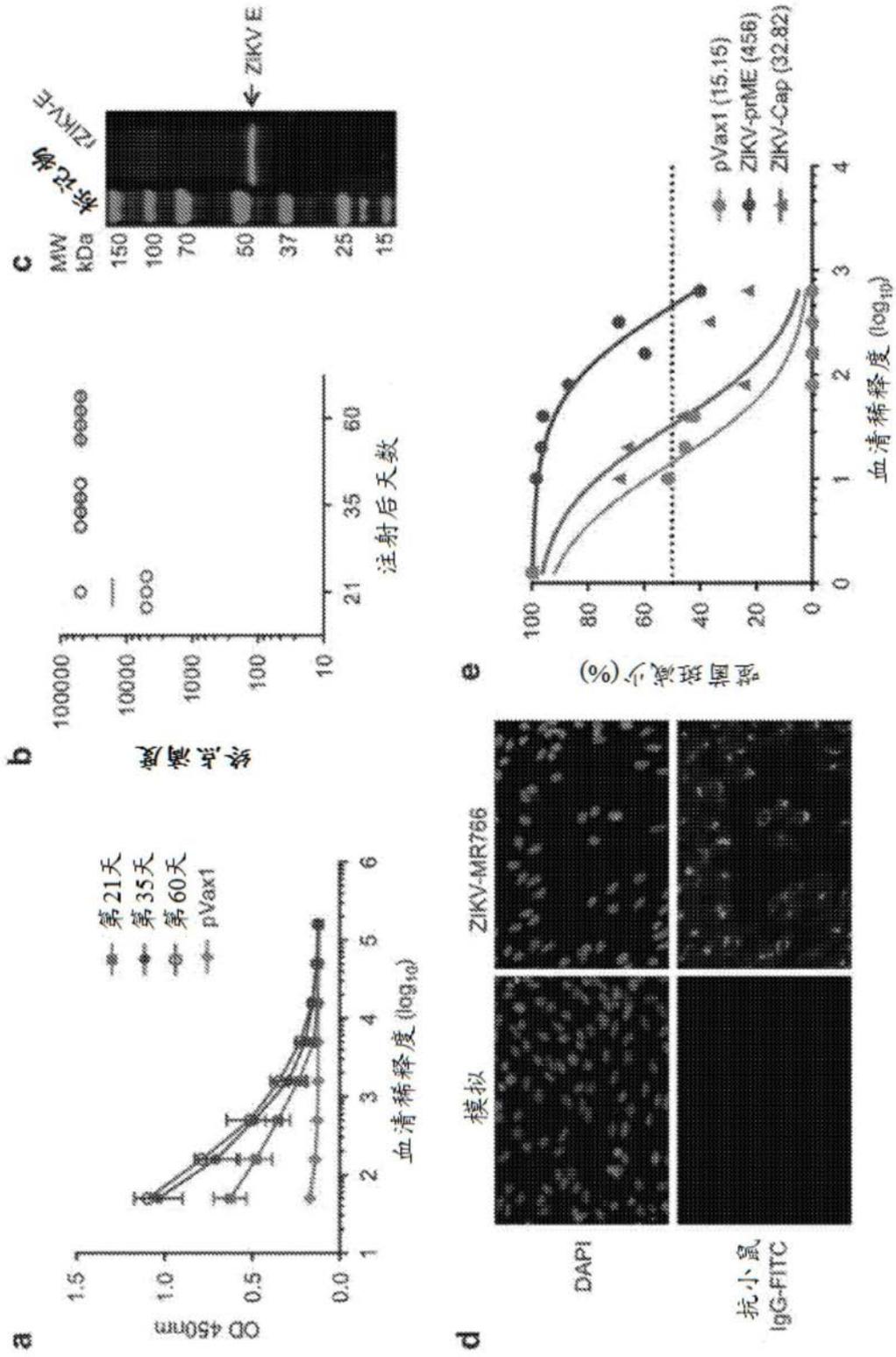


图26A-E

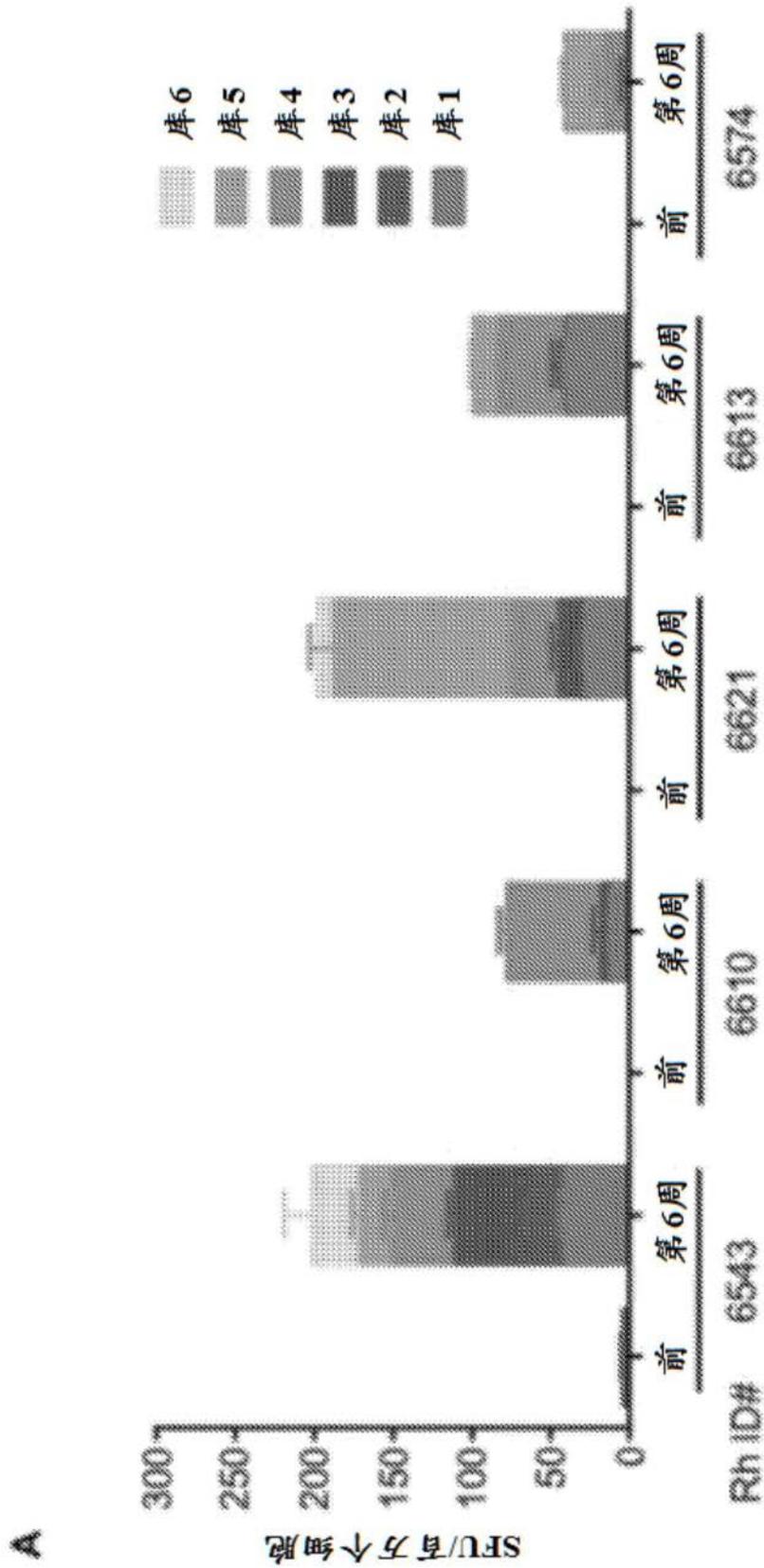


图27A

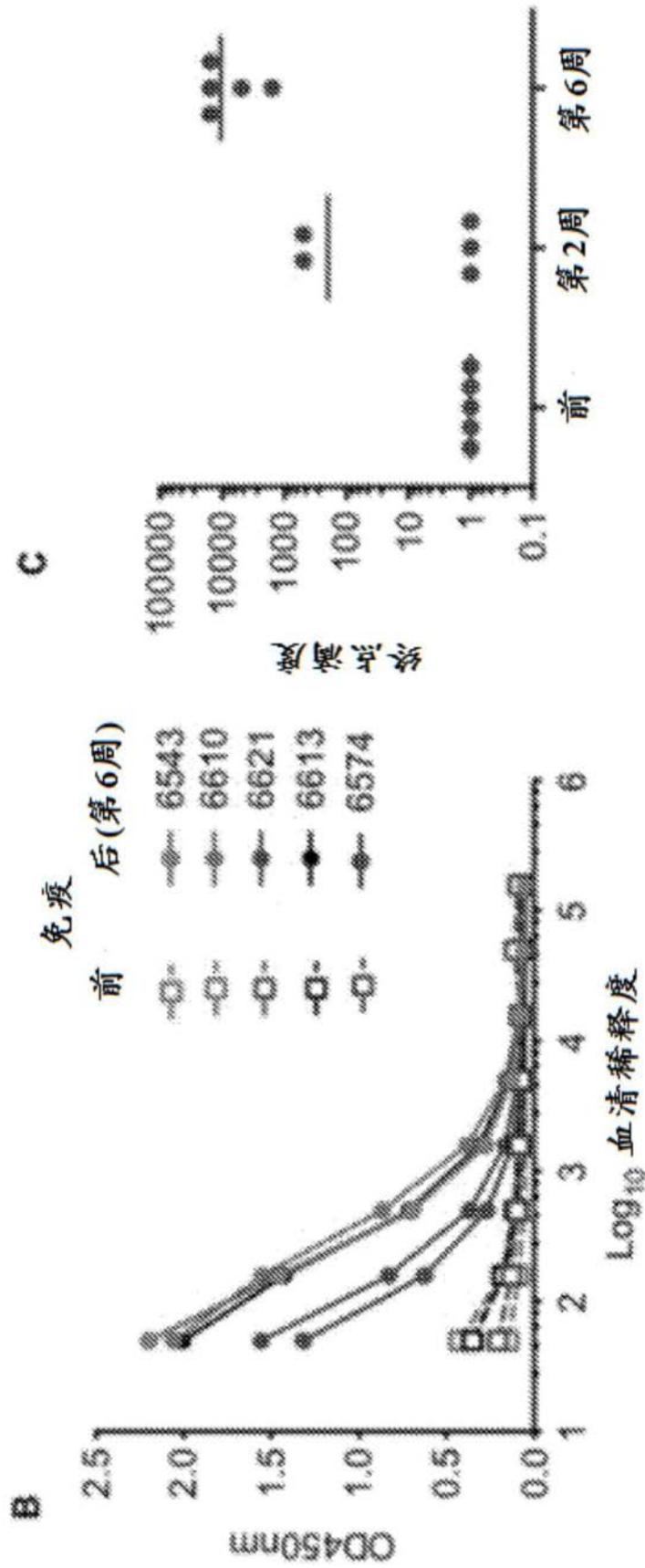


图27B-C

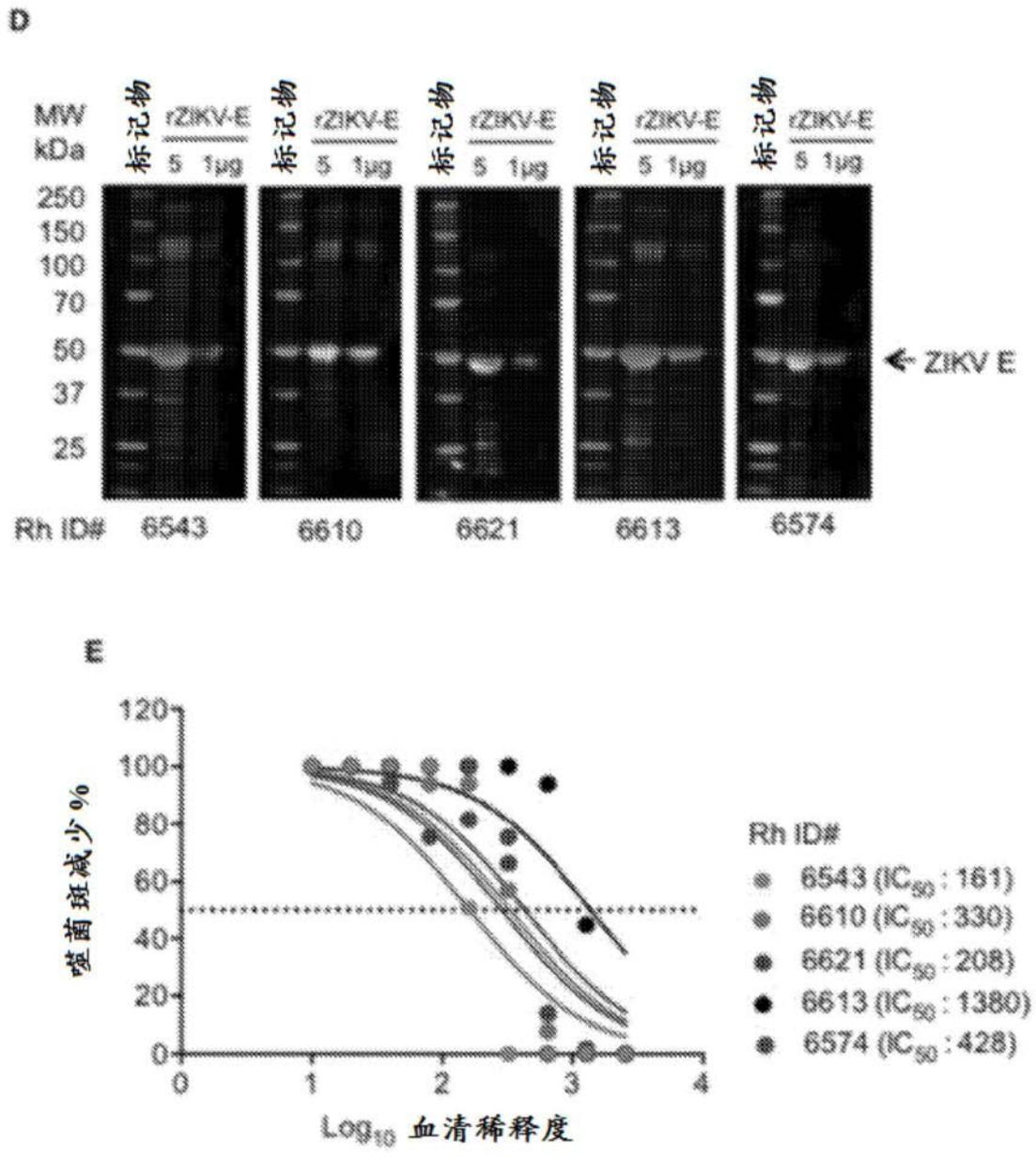


图27D-E

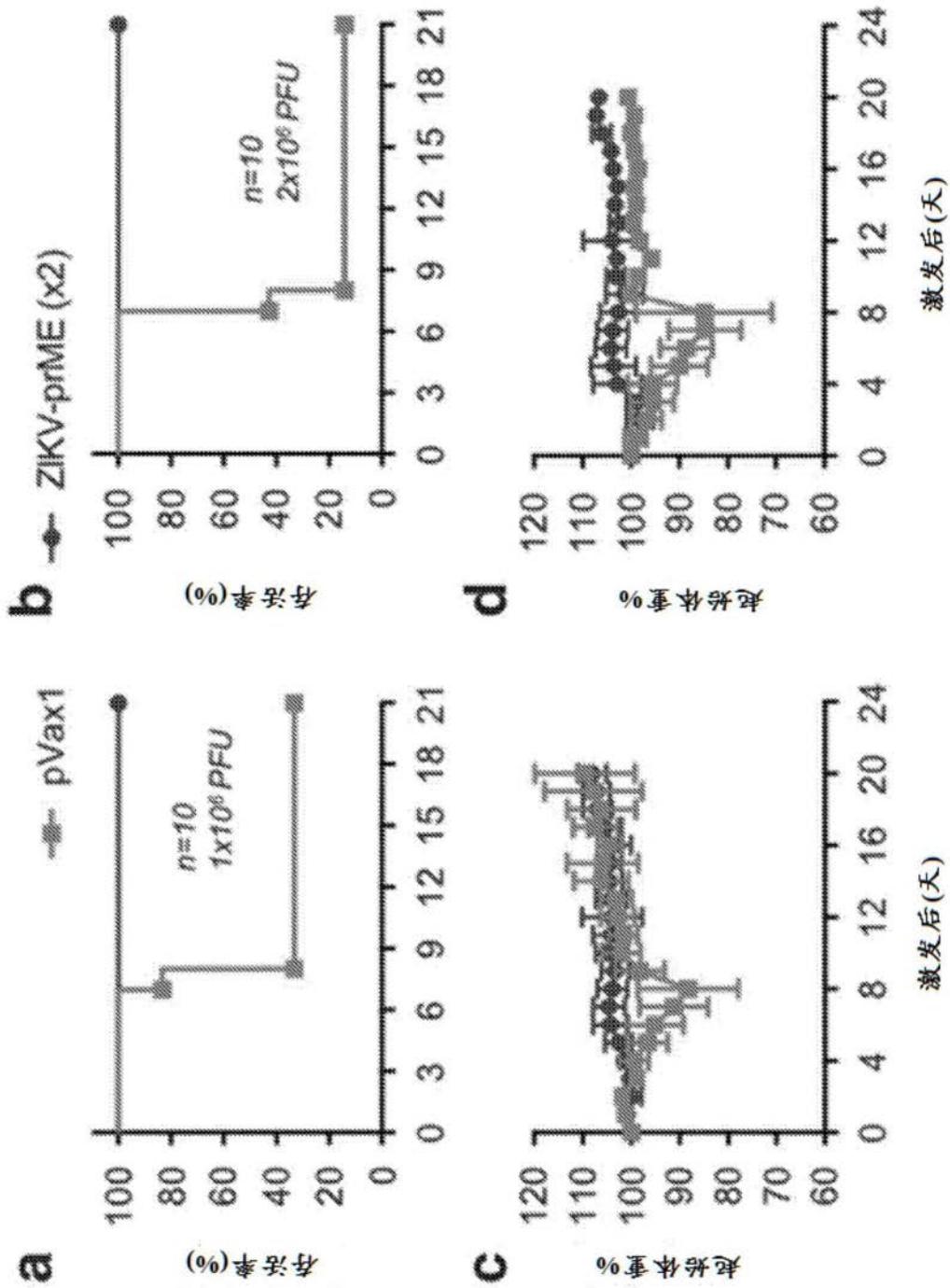


图28A-D

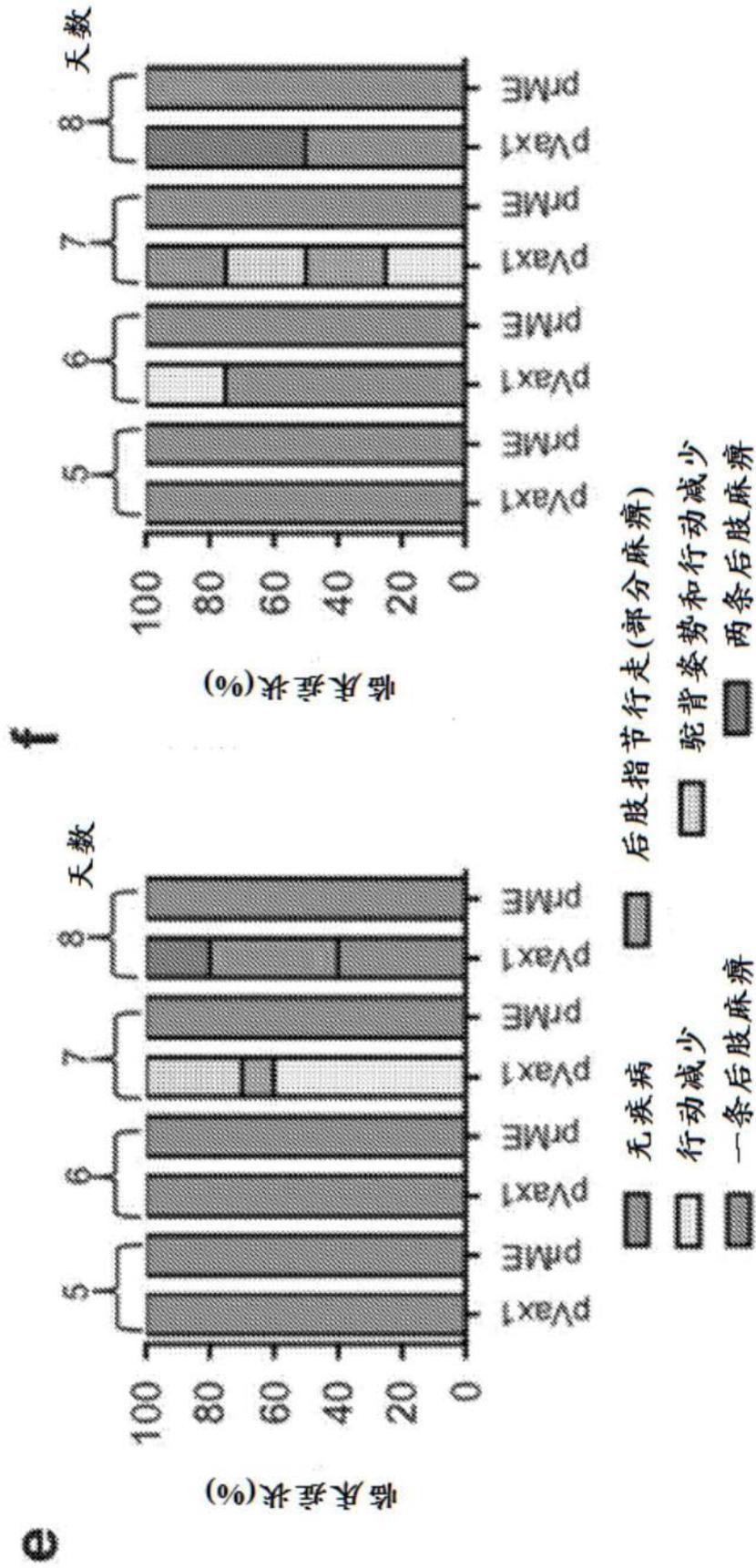


图28E-F

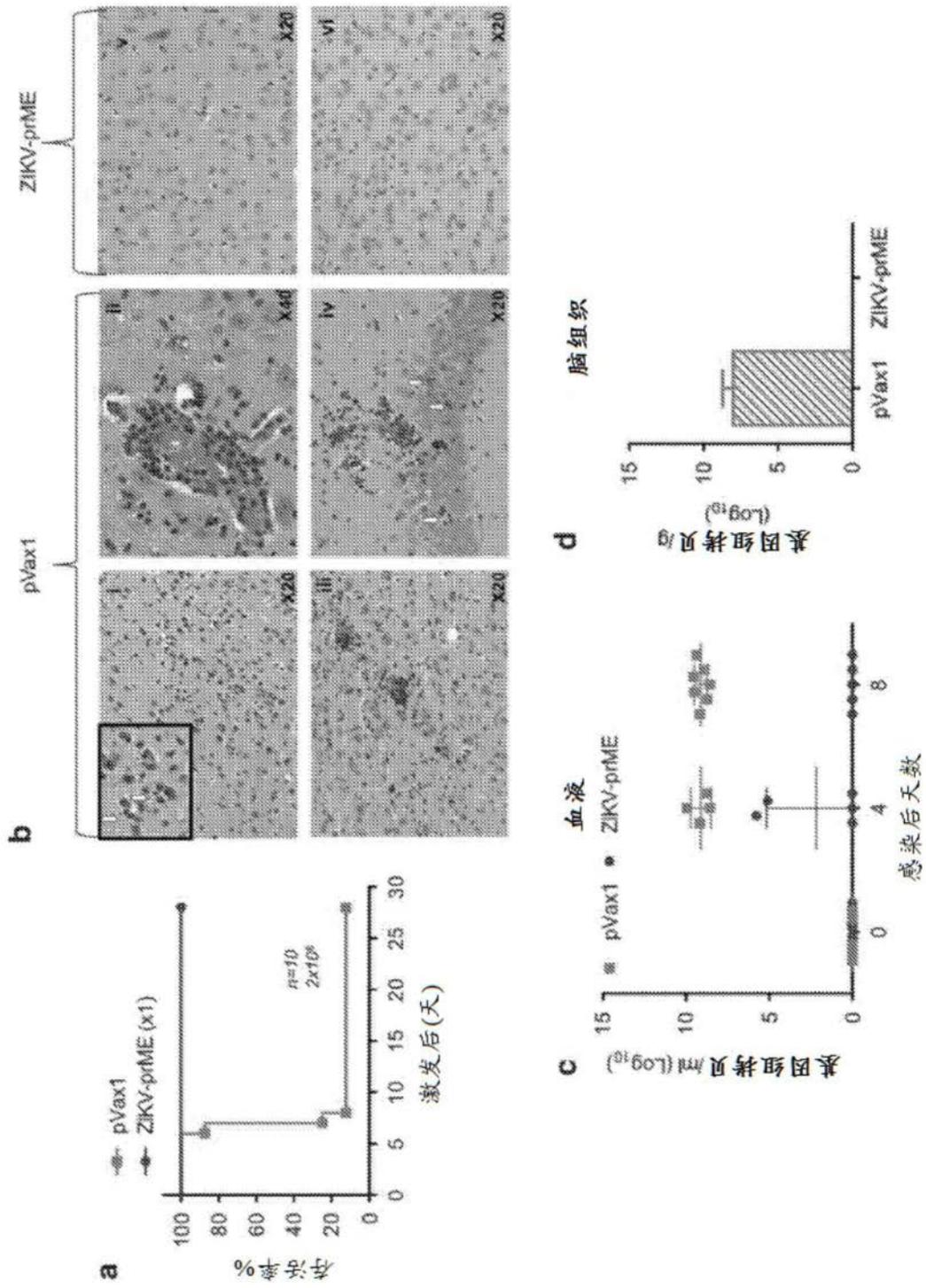


图29A-D

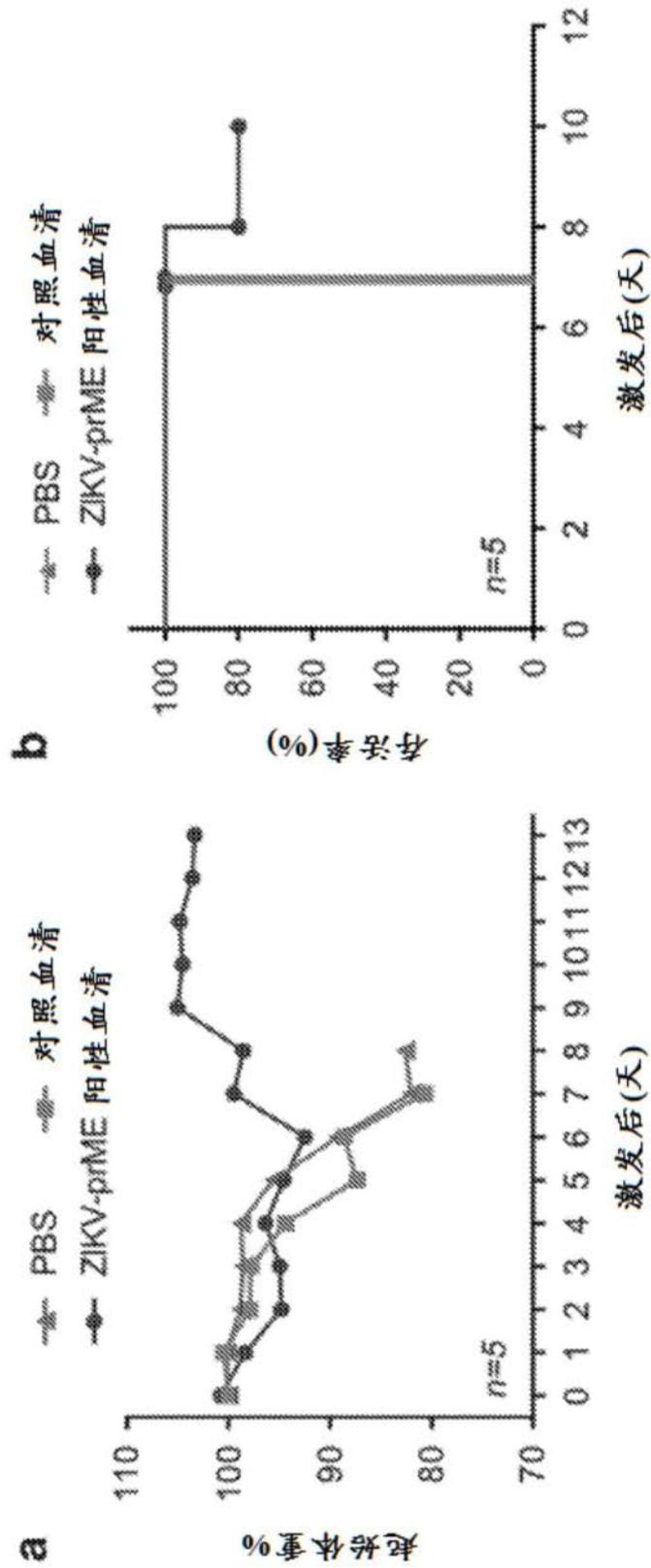


图30A-B

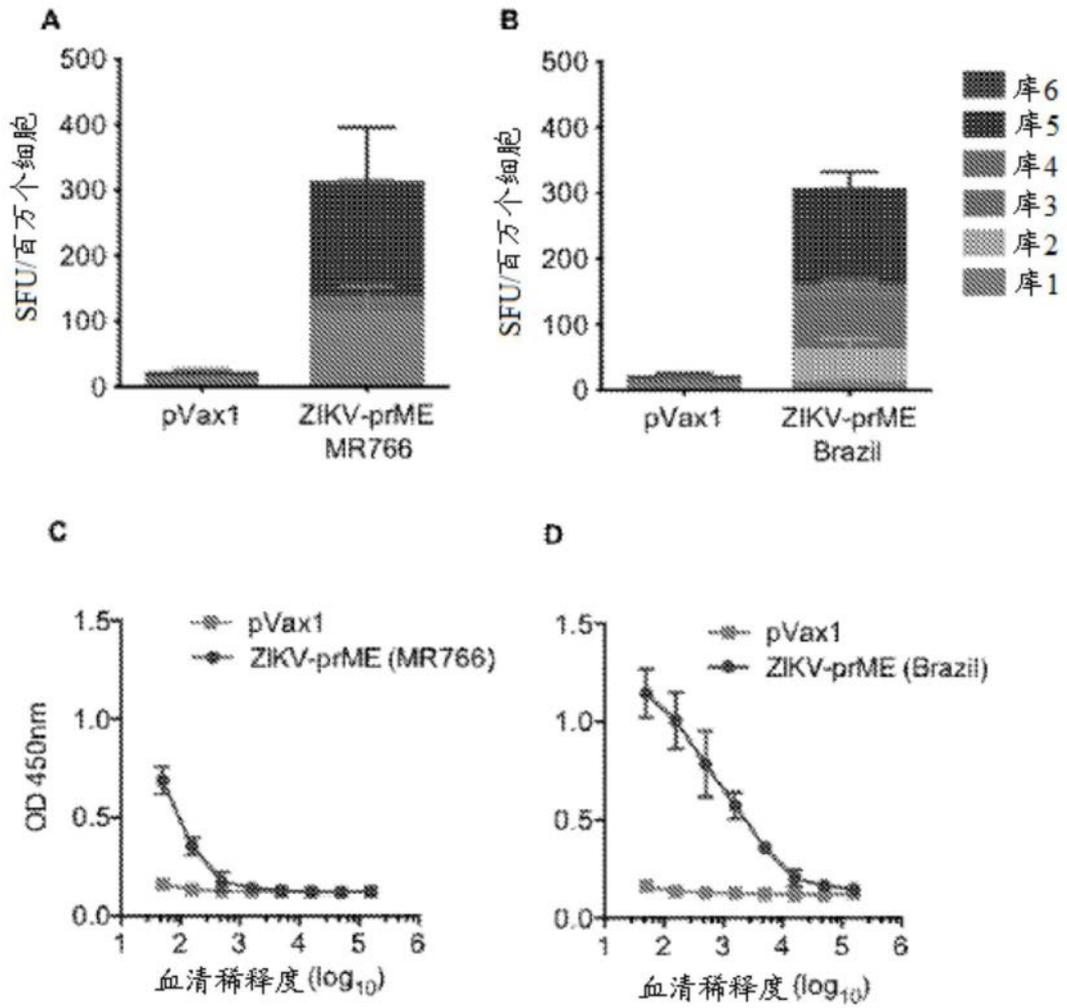


图31A-D

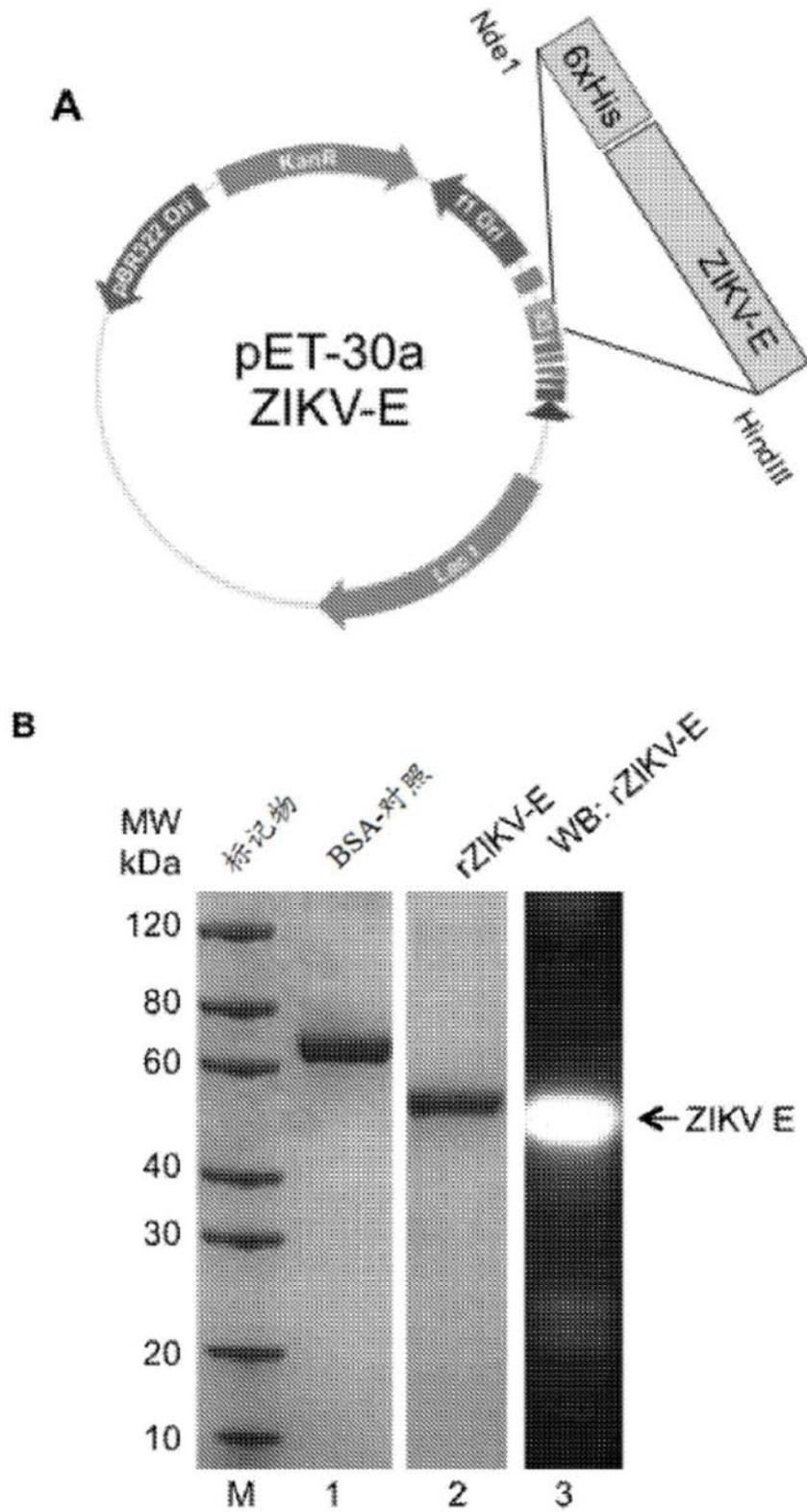


图32A-B

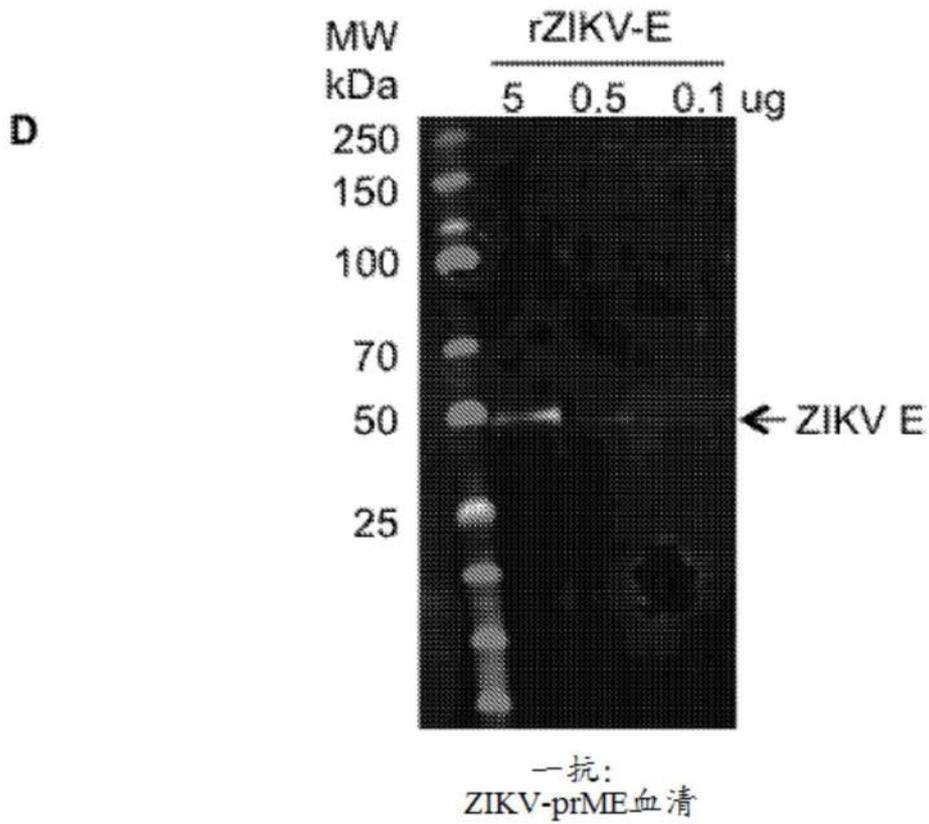
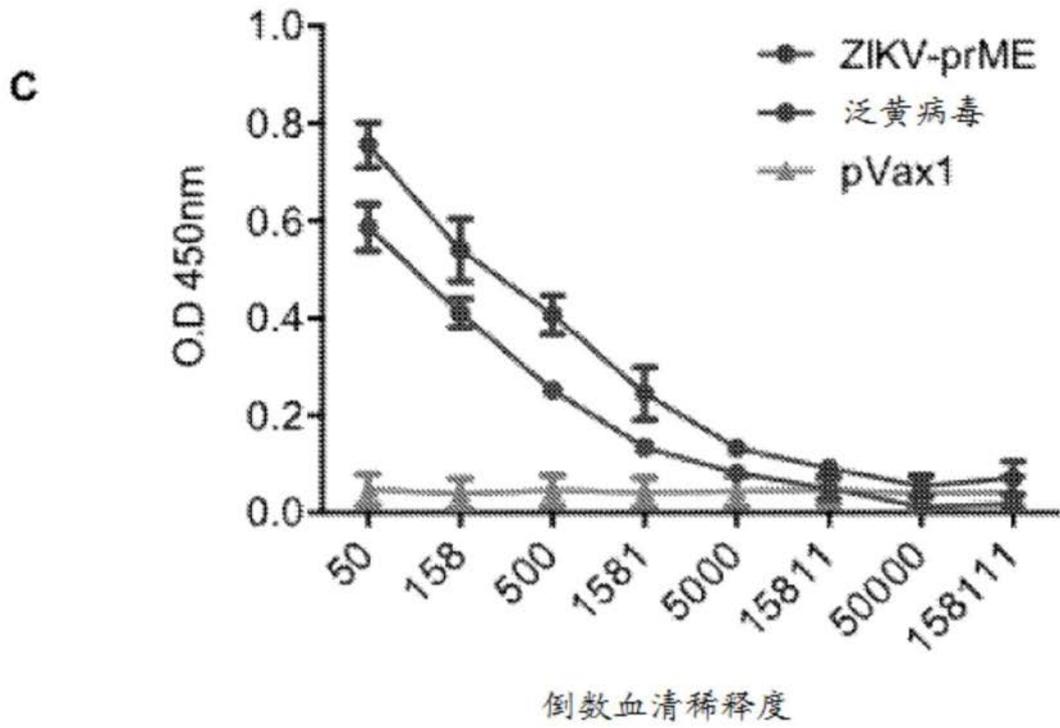


图32C-D

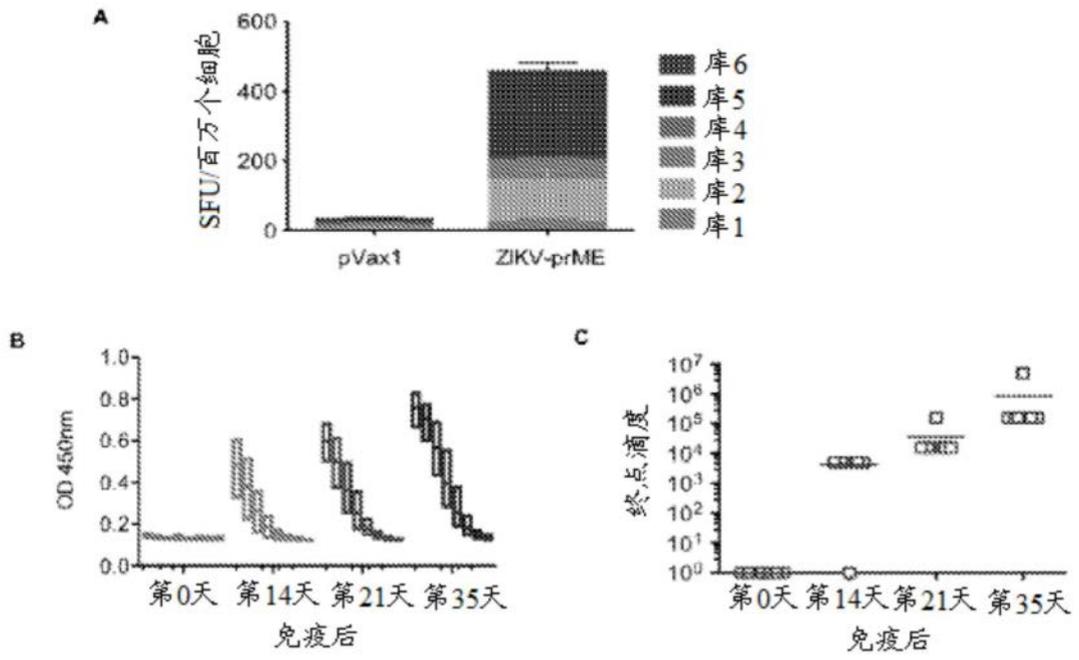


图33A-C

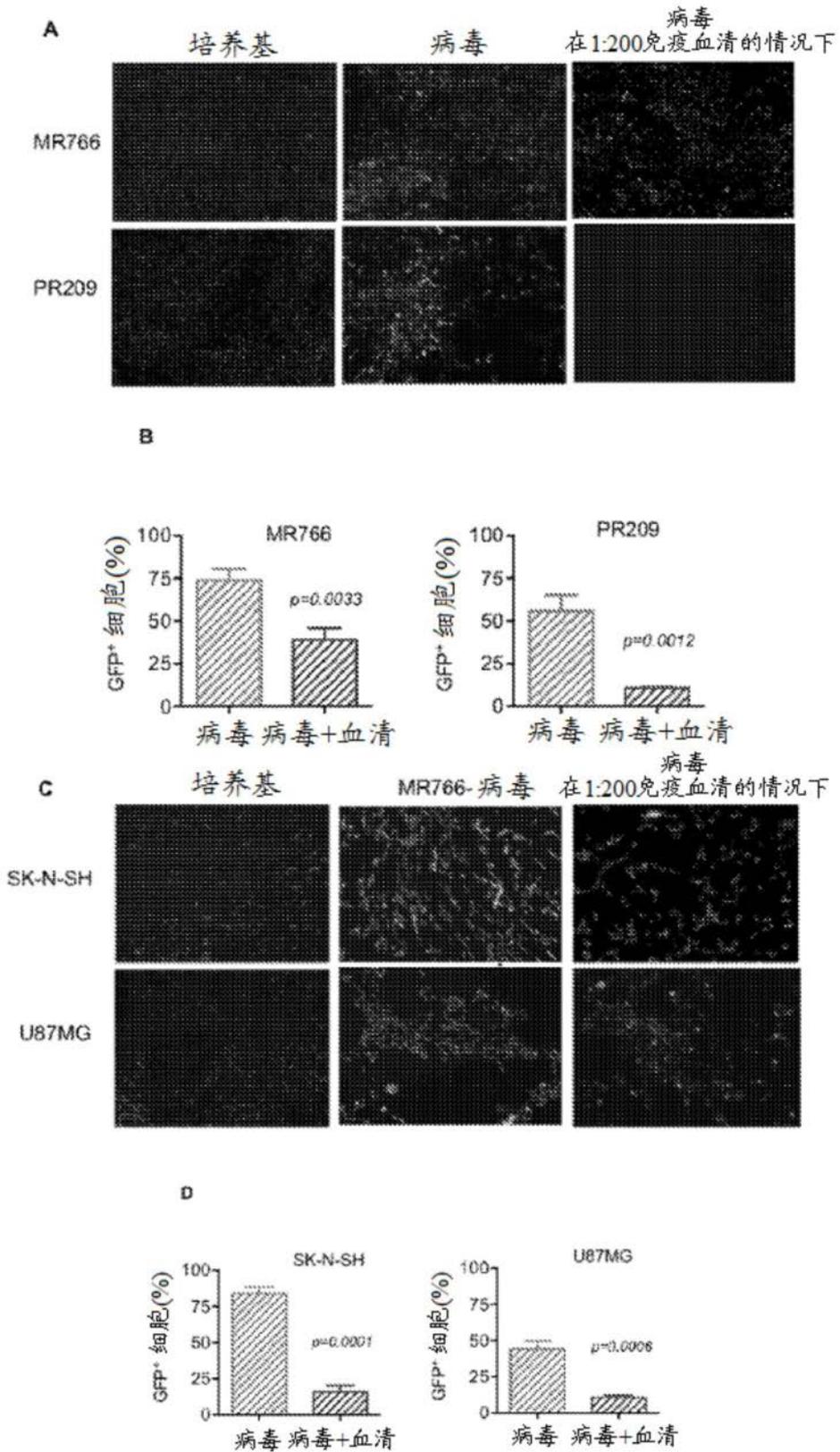


图34A-D

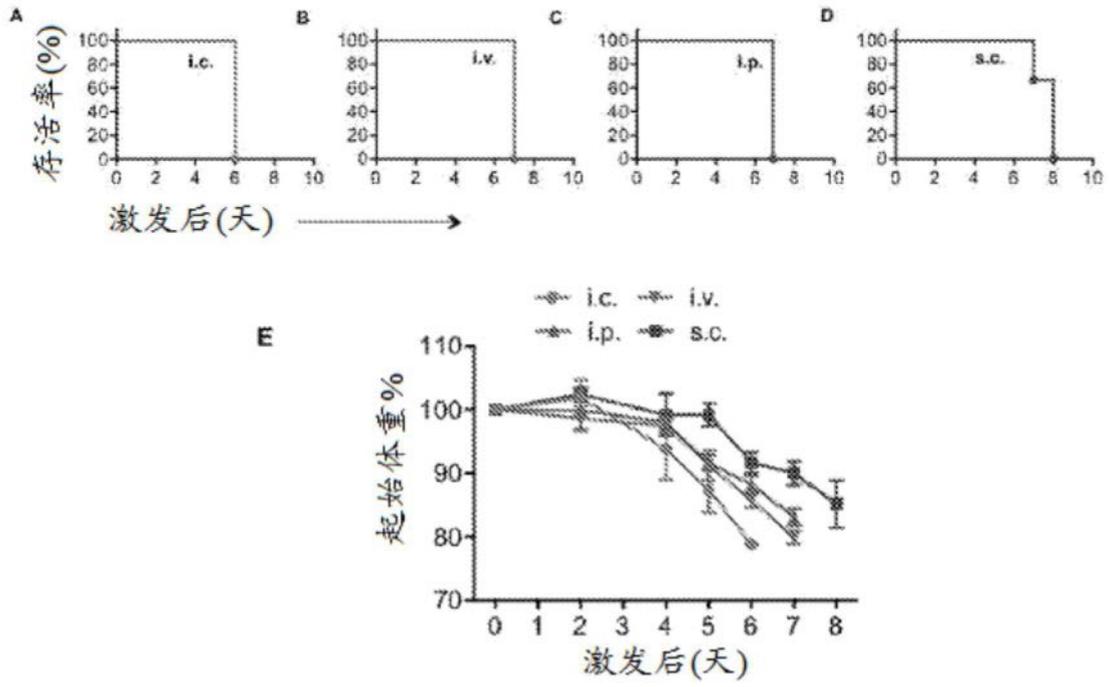


图35A-E

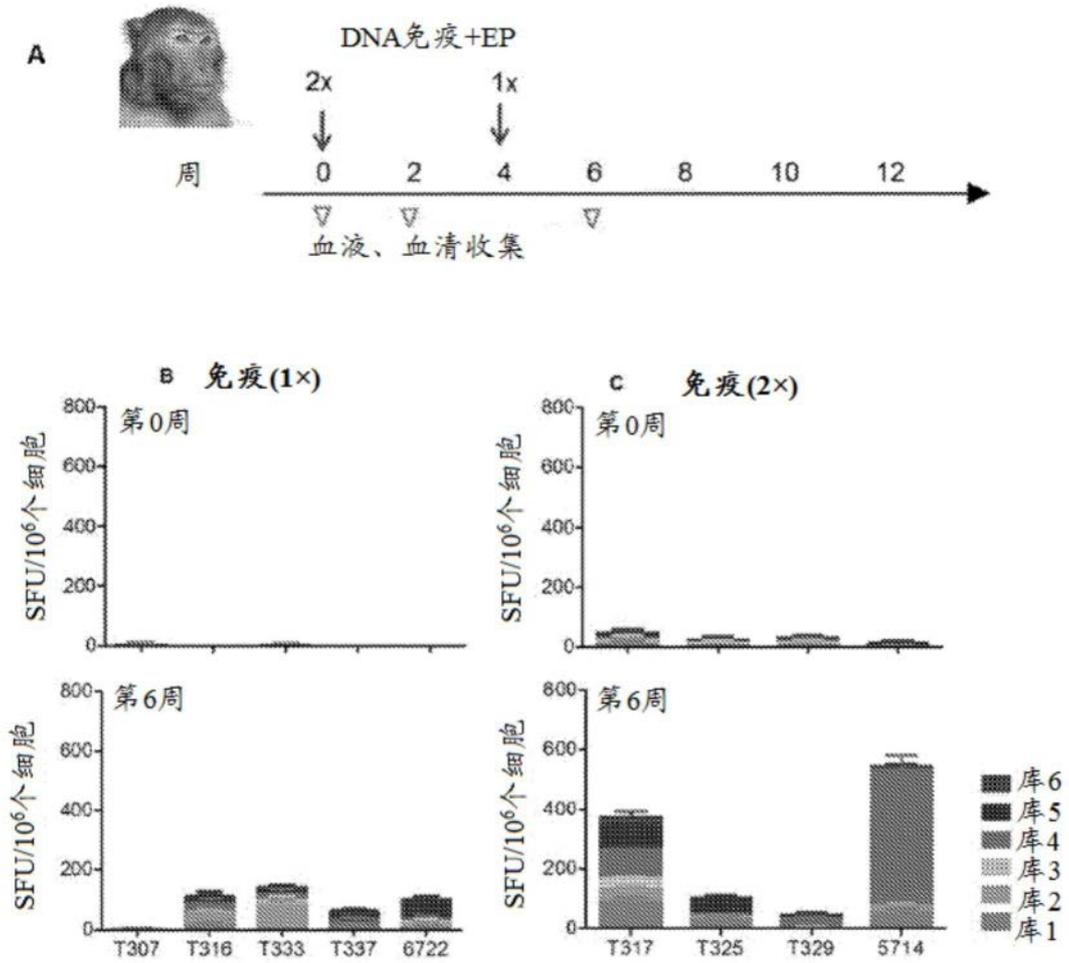


图36A-C

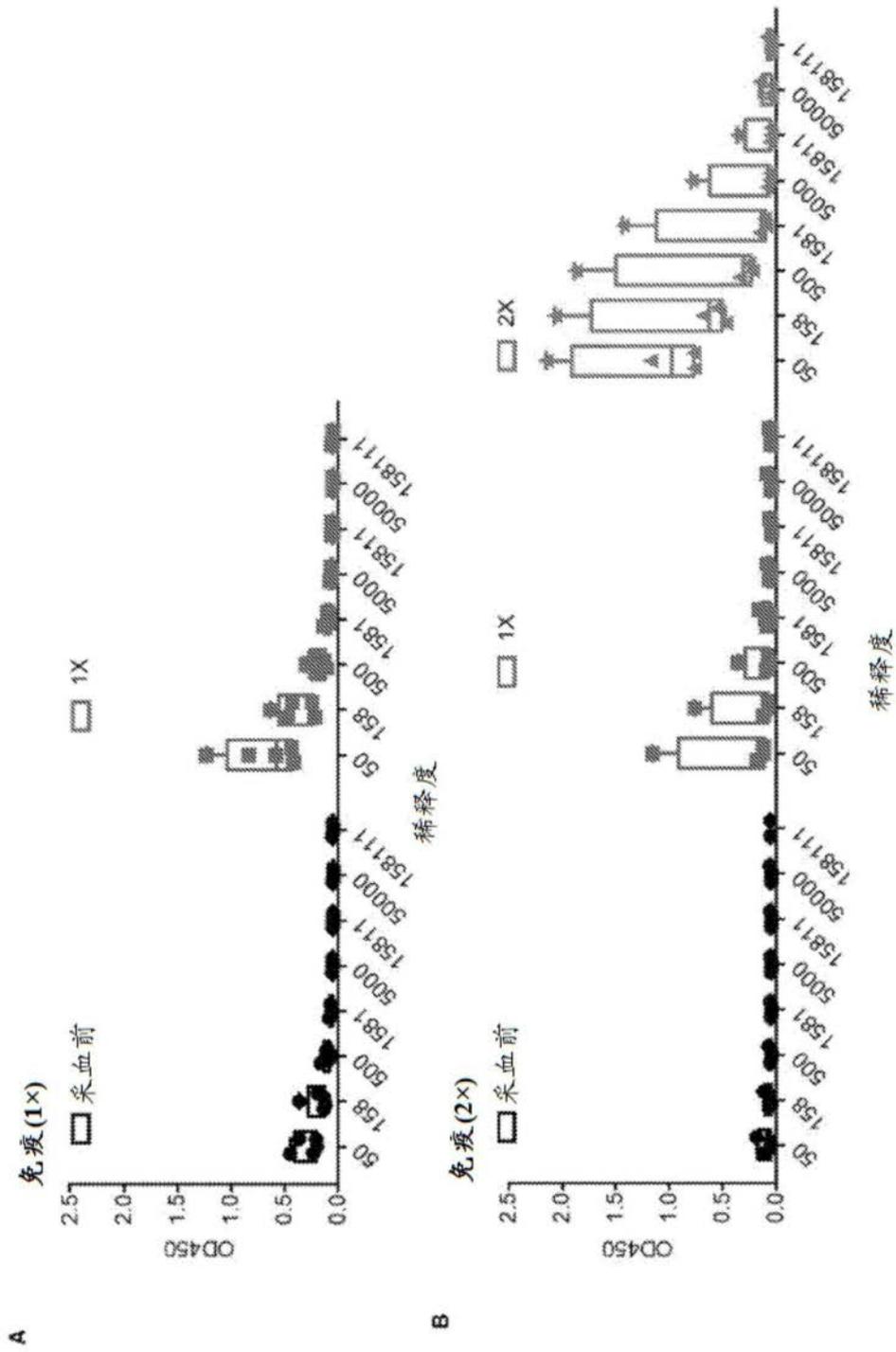


图37A-B

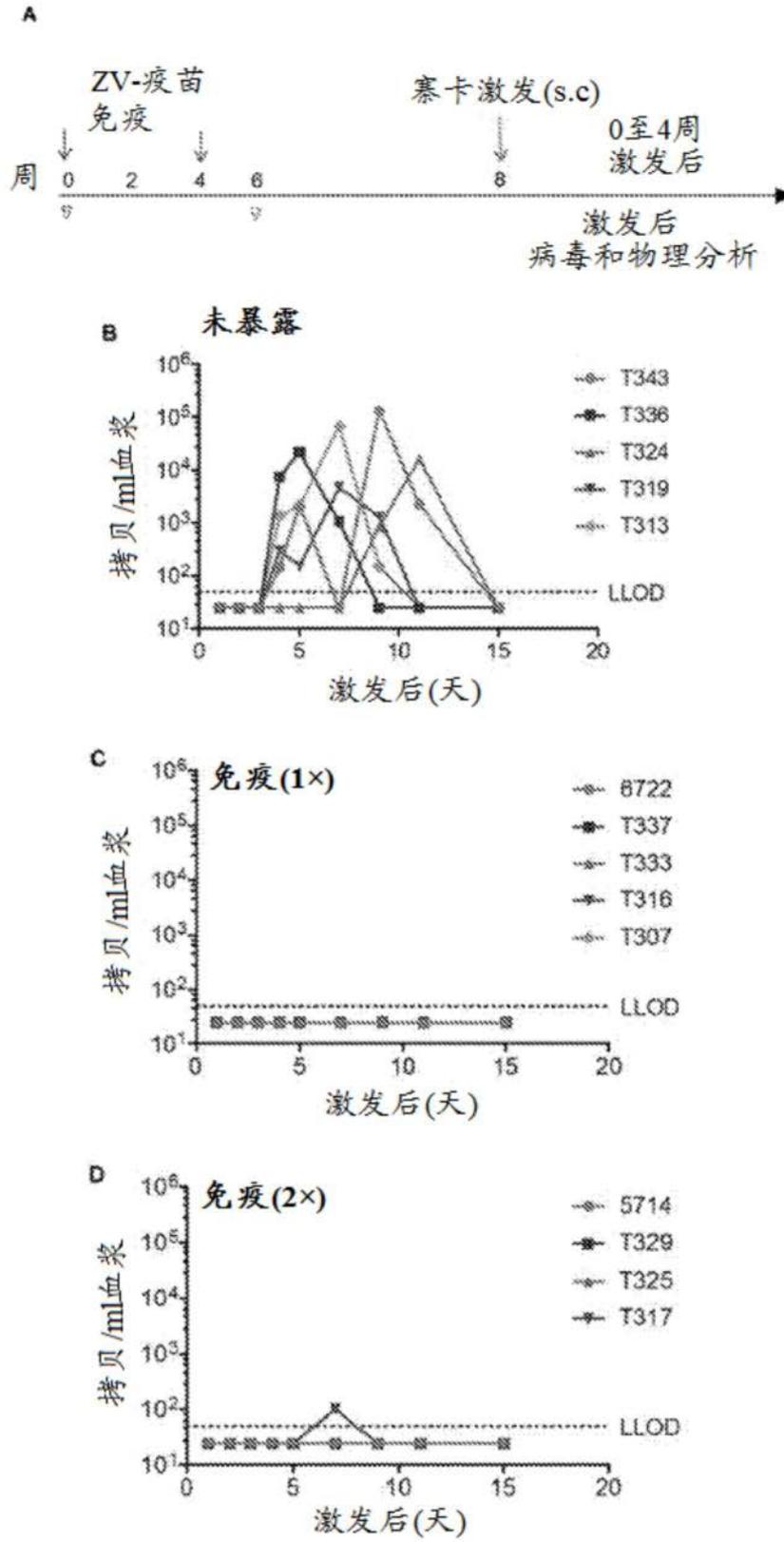


图38A-D

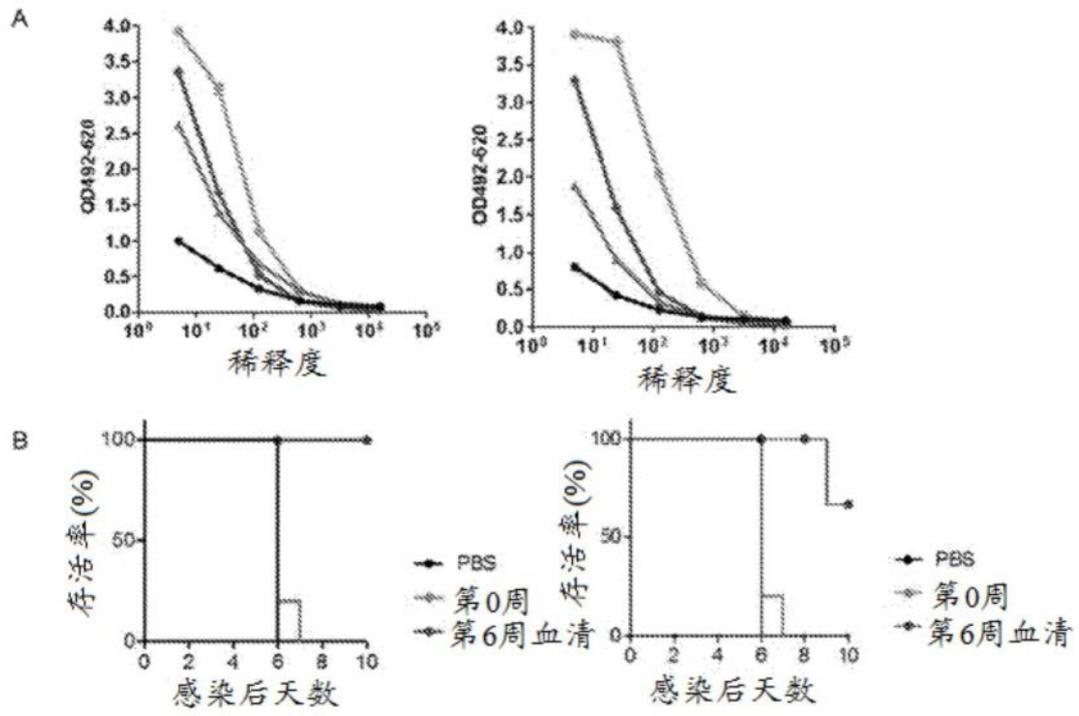


图39A-B

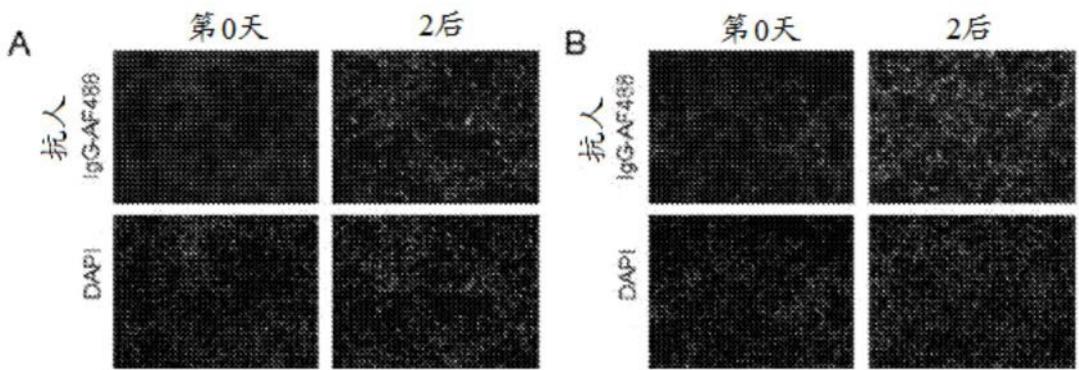


图40A-B

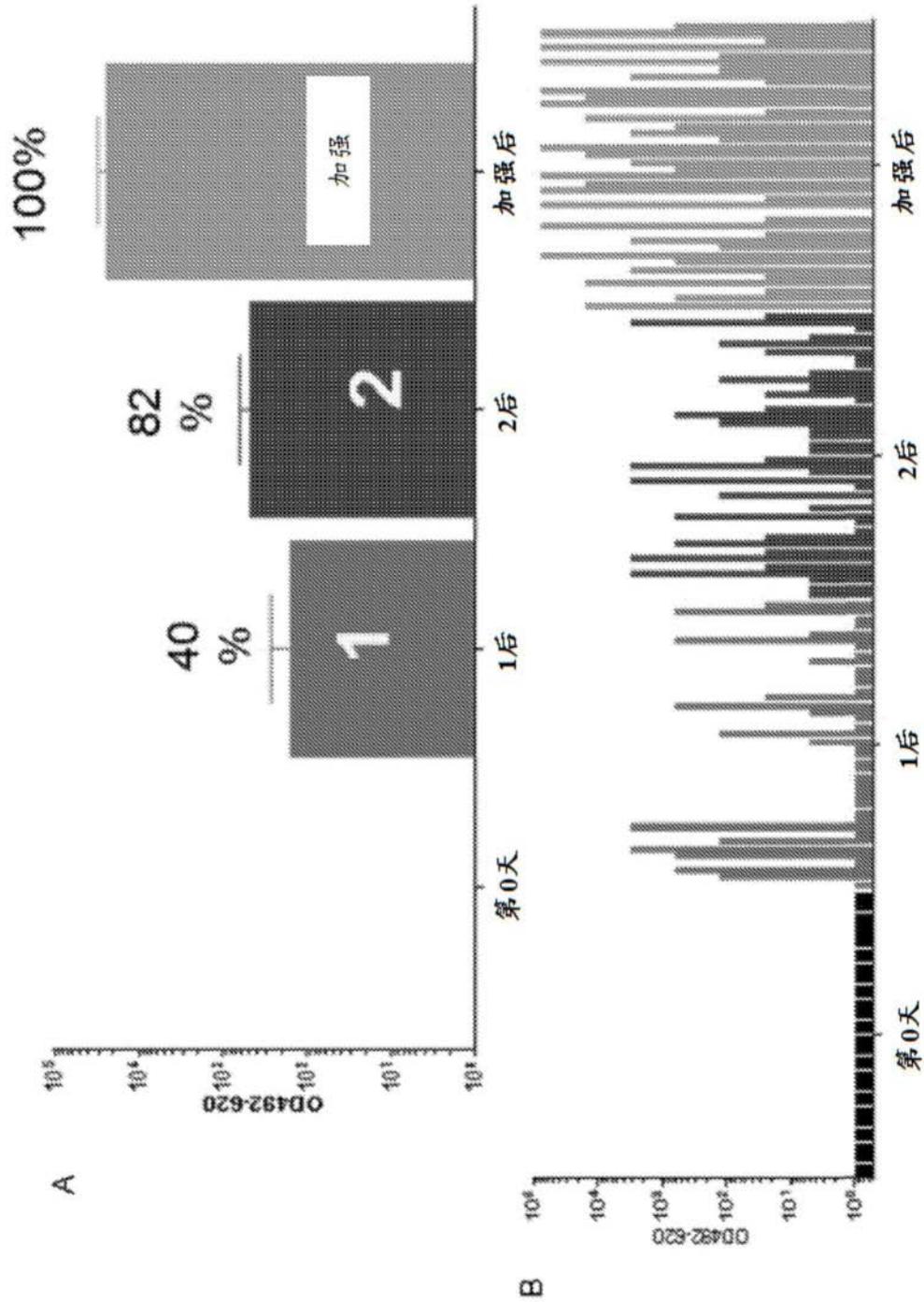


图41A-B

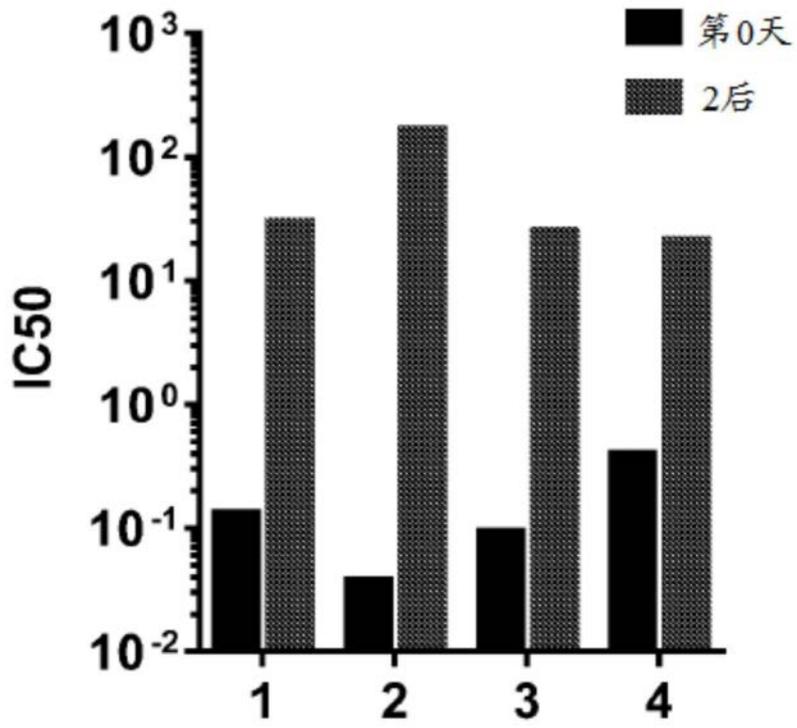


图42