



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107083391 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201611044710.X

A61P 31/14(2006.01)

(22)申请日 2009.04.06

(30)优先权数据

61/042,661 2008.04.04 US

(62)分案原申请数据

200980112893.6 2009.04.06

(71)申请人 宾夕法尼亚大学托管会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 D·B·韦纳 K·穆图玛尼

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司  
31100

代理人 陶家蓉

(51)Int.Cl.

C12N 15/40(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书20页

序列表24页 附图7页

(54)发明名称

屈曲病毒蛋白共有序列、编码该屈曲病毒蛋白共有序列的核酸分子和组合物及其使用方法

(57)摘要

公开了CHIKV E1共有蛋白、CHIKV E2共有蛋白、CHIKV衣壳共有蛋白或它们的片段和同源物，以及编码所述CHIKV E1共有蛋白、CHIKV E2共有蛋白、CHIKV衣壳共有蛋白或它们的片段和同源物的核酸分子。还公开了包括CHIKV E1共有蛋白、CHIKV E2共有蛋白、CHIKV E3共有蛋白或它们的片段和同源物的CHIKV Env共有蛋白以及编码所述CHIKV Env共有蛋白的核酸分子。公开了包含CHIKV共有蛋白的组合物和重组疫苗以及它们的使用方法。

1. 一种核酸分子,其编码一种或多种屈曲病毒的蛋白,所述核酸分子包含SEQ ID NO: 15。
2. 一种包含根据权利要求1所述的核酸分子的组合物。
3. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述核酸分子是SEQ ID NO:13。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的核酸分子或组合物,其中所述核酸分子是质粒。
5. 一种可注射药物组合物,其包括权利要求1-3任一项所述的核酸分子或组合物。
6. 根据权利要求1-5任一项所述的核酸分子或组合物的用途,其特征在于,用于制备诱发个体中对CHIKV免疫应答的药物。
7. 根据权利要求1-5任一项所述的核酸分子或组合物的用途,其中所述药物使用电穿孔施用。
8. 一种重组疫苗,其包含权利要求1-3任一项所述的核酸分子或组合物。
9. 根据权利要求8所述的重组疫苗,其中所述重组疫苗是重组牛痘疫苗。
10. 根据权利要求8所述的重组疫苗的用途,其特征在于,用于制备诱发个体中对CHIKV免疫应答的药物。

## 屈曲病毒蛋白共有序列、编码该屈曲病毒蛋白共有序列的核酸分子和组合物及其使用方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于个体预防性地和/或治疗性地免疫屈曲病毒的疫苗和方法。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求美国临时申请第61/042,661号的优先权,该美国临时申请以引用的方式并入本文。

[0004] 免疫疗法指调节人体免疫应答以达到理想的治疗效果。免疫治疗剂指当施用于个体时调节个体免疫系统的那些组合物,所述调节足以最终减轻与不期望的免疫应答相关的症状或足以最终通过增加期望的免疫应答而缓解症状。在一些情况下,免疫疗法是接种方案的一部分,其中给个体施用疫苗使个体暴露于免疫原(在此类情况下个体对该免疫原产生免疫应答),免疫治疗剂增加免疫应答和/或选择性增强预期治疗或预防特定病症、感染或疾病的免疫应答的一部分(例如细胞免疫部分或体液免疫部分)。

[0005] 可通过递送调节人体免疫应答而诱发改进的免疫应答的制剂来完善疫苗方案。在一些接种方案中,其中给个体施用疫苗使个体暴露于免疫原(个体对该免疫原产生免疫应答),提供增加免疫应答和/或选择性增强预期治疗或预防特定病症、感染或疾病的免疫应答的一部分(例如细胞免疫部分或体液免疫部分)的制剂。

[0006] 疫苗可用于使个体免疫靶抗原,所述靶抗原例如变应原、病原体抗原或与人类疾病有关的细胞相关的抗原。与人类疾病有关的细胞相关的抗原包括癌症相关肿瘤抗原和与自身免疫疾病有关的细胞相关的抗原。

[0007] 在设计此类疫苗时,已发现在受接种个体的细胞中产生靶抗原的疫苗有效诱发免疫系统的细胞免疫部分。特别地,减毒活疫苗、利用无毒载体的重组疫苗以及DNA疫苗各自使得在受接种个体的细胞中产生抗原,从而形成免疫系统细胞免疫部分的诱发。另一方面,尽管死疫苗或灭活疫苗以及仅包含蛋白的亚单位疫苗确实诱发有效的体液应答,但它们不诱发良好的细胞免疫应答。

[0008] 细胞免疫应答通常是对病原体感染提供保护和对治疗病原体感染、癌症或自身免疫疾病提供有效免疫介导疗法所必要的。因此,通常优选的是在受接种个体的细胞中产生靶抗原的疫苗,例如减毒活疫苗、利用无毒载体的重组疫苗和DNA疫苗。

[0009] 屈曲病毒(CHIKV)是一种热带非洲和亚洲本土的 $\alpha$ 病毒,该病毒在那里通过感染的蚊子(通常是伊蚊属[1])叮咬而传播至人类。屈曲热是由CHIKV引起的疾病,在1952-1953期间首次在东非以流行病形式被发现[2]。CHIKV对人类的感染可以引起以发热、头痛、皮疹、不适、恶心、呕吐、肌痛、严重关节痛和偶发神经系统表现(例如急性四肢无力)为表征的综合征。它还伴有致命的出血性病征。其他症状包括肌肉疼痛和眼窝后疼痛。屈曲疾病很少致命,但是伴有显著的发病率。屈曲病具有大约1-2周的潜伏期。认为词语“屈曲”源于当地方言对受伴随该疾病的严重关节疼痛折磨的患者扭曲姿势的描述[1-3]。

[0010] 因为屈曲具有可产生突然令人衰弱的疾病的流行潜能,因此对发展中国家来说屈曲是潜在的威胁,并且基于其持续蔓延以及由于在新兴的流行区冲突地带的士兵部署而造

成的相当多的军事威胁, 屈曲对发达国家也是潜在的威胁。CHIKV感染对经济有显著影响, 因为该感染的症状使雇员无能力工作, 导致流行病区停工, 影响当地商业。这种经济影响对数周或数月不能工作的个体家庭成员是最大的。由于使人衰弱的感染后遗症, 特定抗病毒治疗方法的缺乏和预防该疾病的任何目前可用疫苗的缺乏是管理或控制新CHIKV爆发的主要障碍。

[0011] CHIKV通过感染的蚊子叮咬而传播。蚊子在吸食CHIKV感染个体时被感染。猴子和可能的其他野生动物也可能被感染, 但是它们作为CHIKV储库的作用还没有文献记载。感染的蚊子则可以在它们叮咬时将病毒传播给其他人。埃及伊蚊(黄热蚊)在家用容器中繁殖并且在白天侵犯性地叮咬人类, 是人类CHIKV的主要载体。白纹伊蚊(亚洲虎蚊)也可以在亚洲人类传播中起作用, 在非洲已经发现各种林居蚊类被病毒感染[11-17]。因为CHIK热流行病通过人类-蚊子-人类传播来维持, 流行病周期类似于登革热和城市黄热病的流行病周期。最近已经报道了印度洋和印度的几个岛屿的CHIK热的大规模爆发。

[0012] 自2004年末以来, 屈曲病毒在世界各地(主要在印度洋岛屿)以大规模爆发形式再现。在2006年初, 在冬季较低传播期之后并随着南半球夏季的到来, 留尼旺岛遭受了爆炸性的爆发。报道估计266,000居民(共有770,000人口)感染CHIKV, 并且248份死亡证明书将CHIKV作为可能的死亡病因[10, 12]。文献记载了孕妇宫内感染和垂直传播的证据[12, 13, 17]。序列分析揭示了地理上集群的病毒谱系的存在。基于部分E1序列的种系发育分析揭示了三个不同的CHIKV种群的存在: 一个是西非分离株, 另一个包括亚洲分离株, 以及一个再分为东非、中非和南非分离株[15, 17]。

[0013] 2006年, 在从已知发病区返回欧洲、加拿大、加勒比(马丁尼克岛)和南美(法属圭亚那)的旅行者中也已经报道了CHIK热病例[5-9]。2005-2006期间, 在疾病控制中心(美国)从CHIK热流行病或地方病的已知区域到达美国的旅行者中根据血清学和病毒学诊断出了12例CHIK热[10]的病例。

[0014] 这些感染已经引起公共健康危机并引起了全世界研究者的关注。重要的是, 大部分屈曲病毒感染在数周或数月内完全消退。然而, 已经有文献记载了CHIKV诱发的持续数年的关节痛病例, 并进而发展成为慢性关节问题。感染在较长时间之后消退的事实证明, 免疫系统最终可以集合起来控制该感染。而且, 这种清理表型证明在T细胞应答清理中的作用。早期研究屈曲疫苗, 诸如福尔马林灭活疫苗、吐温醚灭活病毒疫苗和减毒活疫苗的尝试取得了一定成功, 然而, 这些尝试由于各种原因而没有继续下去[3]。而且, 据报道所有这些疫苗仅产生血清学应答, 而没有诱发有用的细胞免疫。

[0015] 最近在印度洋和留尼旺岛的流行病频发表明一种新的载体可能携带病毒, 因为在那里没有发现埃及伊蚊。事实上, 相关的亚洲虎蚊(白纹伊蚊)可能是罪魁祸首, 已经在世界卫生界引起对CHIK病毒大范围流行可能的担忧。

[0016] 因此, 应该采取步骤来研究控制CHIKV的方法。不幸的是, 目前没有针对屈曲病毒的特定的治疗方法, 目前也没有可用的疫苗。最近的研究表明, 被膜E1-A226V突变直接导致白纹伊蚊CHIKV感染性显著增加, 并且进一步证实单个氨基酸取代可以影响载体特异性。该发现提供了该突变病毒如何在缺乏典型昆虫载体的区域引起流行病的合理解释[18]。还没有研究出针对屈曲热的特定疫苗或特定抗病毒治疗方法。减毒活疫苗试验曾在2000年进行, 但是该项目的资金来源被中断, 并且目前没有可用的疫苗。但是, 有文献详细记载了与

该先前疫苗相关的几个不良事件,因此,必须开发新的疫苗策略[3,5]。

[0017] 2005-2007 屈曲热爆发的巨大规模凸显出对安全有效的CHIKV疫苗的需求[6]。人们仍然需要可防止个体受CHIKV感染的疫苗。人们仍然需要有效治疗患有CHIKV感染的个体的治疗方法。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明涉及一种包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E1的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0020] 本发明涉及一种包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E2的共有序列或其免疫原性片段。

[0021] 本发明涉及一种包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白衣壳的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0022] 本发明涉及一种包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码嵌合基因,所述嵌合基因包含CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3的共有序列或它们的同源序列或它们的免疫原性共有片段或它们的免疫原性共有片段的同源序列,这些序列编码诱发对CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3各自的免疫应答的免疫原性氨基酸序列。

[0023] 本发明涉及包含分离的核酸分子的可注射药物组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E1的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0024] 本发明涉及包含分离的核酸分子的可注射药物组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E2的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0025] 本发明涉及包含分离的核酸分子的可注射药物组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白衣壳的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0026] 本发明涉及包含分离的核酸分子的可注射药物组合物,所述分离的核酸分子编码嵌合基因,所述嵌合基因包含CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3的共有序列或它们的同源序列或它们的免疫原性共有片段或它们的免疫原性共有片段的同源序列,这些序列编码诱发对CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3各自的免疫应答的免疫原性氨基酸序列。

[0027] 本发明还涉及诱发个体中对CHIKV免疫应答的方法,该方法包括为所述个体施用包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E1的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0028] 本发明还涉及诱发个体中对CHIKV免疫应答的方法,其包括为所述个体施用包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E2的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0029] 本发明还涉及诱发个体中对CHIKV免疫应答的方法,其包括为所述个体施用包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白衣壳的共有序列或其免疫原性共有片段。

[0030] 本发明还涉及诱发个体中对CHIKV免疫应答的方法,其包括为所述个体施用包含分离的核酸分子的组合物,所述分离的核酸分子编码CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3的共有序列或它们的同源序列或它们的免疫原性共有片段或它们的免疫原性共有片段的同源序列,这些序列编码诱发对CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3各自的免疫

应答的免疫原性氨基酸序列。

[0031] 本发明还涉及重组疫苗,所述重组疫苗包含编码CHIKV蛋白衣壳、CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2的共有序列或它们的免疫原性共有片段的核苷酸序列,或者编码CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3的共有序列或它们的同源序列或它们的免疫原性共有片段或它们的免疫原性共有片段的同源序列的分离的核酸分子,所述序列编码诱发对CHIKV蛋白E1、CHIKV蛋白E2和CHIKV蛋白E3各自的免疫应答的免疫原性氨基酸序列,并且本发明还涉及诱发个体中对CHIKV的免疫应答的方法,该方法包括向个体施用所述重组疫苗。

[0032] 附图简述

[0033] 图1:(A)将IgE-前导CHIKV融合基因克隆到pVax1载体中的策略示意图。(B)琼脂糖凝胶照片,显示用Kpn1和Not1双酶切反应所标示的CHIKV质粒(被膜E1、E2和衣壳)的线性特异性条带(泳道4),所述双酶切反应分别产生1403bp、1355bp和869bp的大小。

[0034] 图2:CHIKV构建体的表征。(A)显示合成构建体的S<sup>35</sup>标记的体外转译。抗原CHIKV-E1、CHIKV-E2和CHIKV-衣壳被转译并分别使用特异性E1、E2和衣壳抗体免疫沉淀并经12% SDS凝胶电泳,然后进行放射显影分析。抗原电泳在其预测的分子量下进行,证实了表达。(B)BHK-21细胞中CHIKV-E1和CHIKV-衣壳构建体的蛋白质印迹分析(Western blot analysis)。转染后两天,制备转染细胞溶胞产物并且在小鼠中培养的多克隆CHIKV-E1抗血清进行的免疫印迹显示52kDa E1蛋白和36kDa衣壳蛋白的表达。

[0035] 图3:抗体ELISA。(A)、(B)和(C)C57BL/6小鼠如所示用25μg pVax1载体或CHIKV质粒免疫两次,每次间隔2周,1周后处死。收集血清并对CHIKV-E1、CHIKV-E2或CHIKV-衣壳的总IgG制备量进行分析。血清在用2μg/ml各CHIKV肽涂布的96孔板上在37°C下培养1h,并使用抗小鼠IgG-HRP检测抗体。值代表两个复孔的平均值(±S.D.)。

[0036] 图4:通过酶联免疫斑点法(ELISpot)测量的干扰素-γ对被膜E1的应答。C57BL/6小鼠用25μg pVax1载体或pCHIKV-E1免疫两次,每次间隔2周,1周后处死。(A)收获脾细胞并在R10(阴性对照)或10μg/ml四个肽库之一存在下培养过夜,所述肽库由跨E1蛋白长度的9个氨基酸重叠的15肽构成。对CHIKV-E1的应答显示为堆叠组平均应答。(B)收获脾细胞并在R10(阴性对照)或10μg/ml十八个肽库之一存在下培养过夜,所述肽库由跨基质E1蛋白长度的9个氨基酸重叠的15肽构成。斑点形成单位(SFU)通过自动化ELISpot读取分析仪定量,将原始值标准化为SFU/百万脾细胞。值代表三个复孔的平均值。

[0037] 图5:通过酶联免疫斑点法(ELISpot)测量的干扰素-γ对CHIKV被膜E2的应答。C57BL/6小鼠用25μg pVax1载体或pCHIKV-E2免疫两次,每次间隔2周,1周后处死。(A)收获脾细胞并在R10(阴性对照)或10μg/ml四个肽库之一存在下培养过夜,所述肽库由跨E2蛋白长度的9个氨基酸重叠的15肽构成。对CHIKV-E2的应答显示为堆叠组平均应答。(B)收获脾细胞并在R10(阴性对照)或10μg/ml十八个肽库之一存在下培养过夜,所述肽库由跨基质E2蛋白长度的9个氨基酸重叠的15肽构成。斑点形成单位(SFU)通过自动化ELISpot读取分析仪定量,将原始值标准化为SFU/百万脾细胞。值代表三个复孔的平均值。

[0038] 图6:通过酶联免疫斑点法(ELISpot)测量的干扰素-γ对CHIKV-衣壳的应答。C57BL/6小鼠用25μg pVax1载体或pCHIKV-衣壳免疫两次,每次间隔2周,1周后处死。(A)收获脾细胞并在R10(阴性对照)或10μg/ml四个肽库之一存在下培养过夜,所述肽库由跨衣壳蛋白长度的9个氨基酸重叠的15肽构成。对CHIKV-衣壳的应答显示为堆叠组平均应答。(B)

收获脾细胞并在R10 (阴性对照) 或10 $\mu$ g/ml十八个肽库之一存在下培养过夜,所述肽库由跨基质衣壳蛋白长度的9个氨基酸重叠的15肽构成。斑点形成单位 (SFU) 通过自动化ELISpot读取分析仪定量,将原始值标准化为SFU/百万脾细胞。值代表三个复孔的平均值。

[0039] 图7是显示患者和健康个体(首次实验的)血清的屈曲病毒的中和抗体滴度的图,所述滴度使用实施例2所述分析方法测量。

[0040] 优选的具体实施方案

[0041] 如本文所使用,“免疫原性共有片段”意指CHIKV共有蛋白的片段,该CHIKV共有蛋白的片段包括足以对两种或多种CHIKV菌株提供交叉防护的共有序列,所述交叉防护在使用相应的天然序列时没有出现。片段长度一般是10个或更多个氨基酸。一些优选的CHIKV E1长度是至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100、至少105、至少110、至少115、至少120、至少125、至少130、至少135、至少140、至少145、至少150、至少155、至少160、至少165、至少170、至少175、至少180、至少185、至少190、至少195、至少200、至少205、至少210、至少215、至少220、至少225、至少230、至少235、至少240、至少245、至少250、至少255、至少260、至少265、至少270、至少275、至少280、至少285、至少290、至少295、至少300、至少305、至少310、至少315、至少320、至少325、至少330、至少335、至少340、至少345、至少350、至少355、至少360、至少365、至少370、至少375、至少380、至少385、至少390、至少395、至少400、至少405、至少410、至少415、至少420、至少425或至少430。一些优选的CHIKV E1长度是15或更小、20或更小、25或更小、30或更小、35或更小、40或更小、45或更小、50或更小、55或更小、60或更小、65或更小、70或更小、75或更小、80或更小、85或更小、90或更小、95或更小、100或更小、105或更小、110或更小、115或更小、120或更小、125或更小、130或更小、135或更小、140或更小、145或更小、150或更小、155或更小、160或更小、165或更小、170或更小、175或更小、180或更小、185或更小、190或更小、195或更小、200或更小、205或更小、210或更小、215或更小、220或更小、225或更小、230或更小、235或更小、240或更小、245或更小、250或更小、255或更小、260或更小、265或更小、270或更小、275或更小、280或更小、285或更小、290或更小、295或更小、300或更小、305或更小、310或更小、315或更小、320或更小、325或更小、330或更小、335或更小、340或更小、345或更小、350或更小、355或更小、360或更小、365或更小、370或更小、375或更小、380或更小、385或更小、390或更小、395或更小、400或更小、415或更小、420或更小、425或更小、430或更小、或者435或更小。一些优选的CHIKV E2长度是至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100、至少105、至少110、至少115、至少120、至少125、至少130、至少135、至少140、至少145、至少150、至少155、至少160、至少165、至少170、至少175、至少180、至少185、至少190、至少195、至少200、至少205、至少210、至少215、至少220、至少225、至少230、至少235、至少240、至少245、至少250、至少255、至少260、至少265、至少270、至少275、至少280、至少285、至少290、至少295、至少300、至少305、至少310、至少315、至少320、至少325、至少330、至少335、至少340、至少345、至少350、至少355、至少360、至少365、至少370、至少375、至少380、至少385、至少390、至少395、至少400、至少405、至少410、至少415或至少420。一些优选的CHIKV E2长度是15或更小、20或更小、25或更小、30或更小、35或更小、40或更小、45或更小、50或更小、55或

更小、60或更小、65或更小、70或更小、75或更小、80或更小、85或更小、90或更小、95或更小、100或更小、105或更小、110或更小、115或更小、120或更小、125或更小、130或更小、135或更小、140或更小、145或更小、150或更小、155或更小、160或更小、165或更小、170或更小、175或更小、180或更小、185或更小、190或更小、195或更小、200或更小、205或更小、210或更小、215或更小、220或更小、225或更小、230或更小、235或更小、240或更小、245或更小、250或更小、255或更小、260或更小、265或更小、270或更小、275或更小、280或更小、285或更小、290或更小、295或更小、300或更小、305或更小、310或更小、315或更小、320或更小、325或更小、330或更小、335或更小、340或更小、345或更小、350或更小、355或更小、360或更小、365或更小、370或更小、375或更小、380或更小、385或更小、390或更小、395或更小、400或更小、415或更小、422或更小。一些优选的CHIKV衣壳长度是至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100、至少105、至少110、至少115、至少120、至少125、至少130、至少135、至少140、至少145、至少150、至少155、至少160、至少165、至少170、至少175、至少180、至少185、至少190、至少195、至少200、至少205、至少210、至少215、至少220、至少225、至少230、至少235、至少240、至少245、至少250或至少255。一些优选的CHIKV衣壳长度是15或更小、20或更小、25或更小、30或更小、35或更小、40或更小、45或更小、50或更小、55或更小、60或更小、65或更小、70或更小、75或更小、80或更小、85或更小、90或更小、95或更小、100或更小、105或更小、110或更小、115或更小、120或更小、125或更小、130或更小、135或更小、140或更小、145或更小、150或更小、155或更小、160或更小、165或更小、170或更小、175或更小、180或更小、185或更小、190或更小、195或更小、200或更小、205或更小、210或更小、215或更小、220或更小、225或更小、230或更小、235或更小、240或更小、245或更小、250或更小、255或更小、或者260或更小。如本段所使用,对优选片段大小的提及旨在指至少和小于之间范围的所有排列组合,例如范围可以是以“至少”大小所列的任何数值到以“小于t”大小所列的任何数值,以提供一系列大小,例如20-400、20-30、40-100,等等。

[0042] 本文使用的术语“基因构建体”指包含编码靶蛋白或免疫调节蛋白的核苷酸序列的DNA或RNA分子。编码序列包括可操作连接于调控元件的起始信号和终止信号,所述调控元件包括能够指导被施用核酸分子的个体细胞中表达的启动子和多聚腺苷酸化信号。

[0043] 本文使用的术语“可表达形式”指含有可操作连接于编码靶蛋白或免疫调节蛋白的编码序列的必要调控元件的基因构建体,使得当存在于个体细胞中时,所述编码序列被表达。

[0044] 本文使用的短语“严格杂交条件”或“严格条件”指核酸分子与另一核酸分子杂交但不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的,并且在不同环境下有所不同。较长序列在较高温度下特异性杂交。一般而言,严格条件被选择为在确定的离子强度和pH下比特定序列的热力学熔点( $T_m$ )低约5°C。 $T_m$ 是平衡时与靶序列互补的探针的50%与靶序列杂交的温度(在确定的离子强度、pH和核酸浓度下)。由于靶序列一般是过量存在的,所以在 $T_m$ 下,平衡时探针的50%被占据。通常,严格条件是下述条件:即,其中在pH 7.0至8.3下,盐浓度小于约1.0M钠离子、通常约0.01至1.0M钠离子(或其他盐),并且温度对于短的探针、引物或寡核苷酸(例如10至50个核苷酸)而言是至少约30°C且对于较长探针、引物或寡核苷酸而言是至少约60°C。严格条件还可以通过添加去稳定剂(例如甲酰胺)来实现。

[0045] 本文使用的“同源”指两个核酸序列之间或两个氨基酸序列之间的序列同源性。足够同源以使得免疫原性功能的两个核酸序列或两个氨基酸序列是“同源的”。核苷酸和氨基酸的序列同源性可以使用FASTA、BLAST和空位BLAST (Altschul等, *Nuc. Acids Res.*, 1997, 25, 3389, 该文献的全文以引用的方式并入本文) 和PAUP\*4.0b10软件 (D.L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts) 来确定。“相似百分比”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与系统进化树中所有序列进行对比计算。简而言之, 代表基本局部比对检索工具 (Basic Local Alignment Search Tool) 的BLAST算法适合确定序列相似性 (Altschul等, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410, 该文献的全文以引用的方式并入本文)。进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得。该算法包括首先通过确定查询序列中的长度W的短字来确定高得分序列对 (HSP), 该查询序列与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足某一正值阈值分数T。T被称为相邻字分数阈值 (Altschul等, 同上)。这些初始相邻字的匹配用作启动寻找含有它们的HSP的检索的种子。字匹配沿每个序列两个方向延伸至尽可能使累积比对分数可以增加。下述情况下每个方向的字匹配延伸停止: 1) 累积比对分数从其最大实现值减少数量X; 2) 由于一个或多个负得分残基比对的累积, 累积分数到达零或以下; 或3) 到达任一序列的末端。Blast算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。Blast程序使用下述作为默认值: 字长 (W) 为11, BLOSUM62得分矩阵 (参见Henikoff等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 10915-10919, 该文献的全文以引用的方式并入本文) 比对 (B) 为50, 期望值 (E) 为10, M=5, N=4, 和双链对比。BLAST算法 (Karlin等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 5873-5787, 该文献的全文以引用的方式并入本文) 和空位BLAST进行两个序列之间相似性的统计分析。BLAST算法提供的相似性的一个量度是最小总和概率 (P (N)), 其指示两个核苷酸序列之间偶然发生匹配的概率。例如, 如果测试核酸与其他核酸对比中的最小总和概率小于约1、优选小于约0.1、更优选小于约0.01且最优选小于约0.001, 则认为核酸与另一核酸相似。

[0046] 在一些实施方案中, 提供了可以用于免疫个体的CHIKV的DNA疫苗。该疫苗包括体内体液免疫性和细胞免疫性两者。

[0047] 根据一些实施方案, 为了开发有能力诱发对屈曲病毒 (CHIKV) 的交叉反应性免疫应答的免疫原, 我们设计了针对CHIKV病毒被膜E1、E2和核心蛋白衣壳的共有构建体。对于这些构建体, 从1952年至2006年分离的导致人类感染和死亡的屈曲病毒中选择21个序列。所选择的每个基因的DNA序列来自S27菌株 (首次分离株) 和各个国家的菌株 (包括留尼旺岛爆发分离株), 以避免抽样偏差。对DNA序列进行比对, 为合成序列选择各个位置最常见的核苷酸。推导的氨基酸序列用于指导引入比对空位, 以便它们被引入到保持阅读框的密码子之间。共有序列产生之后, IgE前导序列被加至N末端以增强表达和分泌, 构建体通过密码子优化并用更强序列 (GCCGCCACC) (图1A) 替换现有Kozak序列来优化。为了分析, 将多聚组氨酸标签加至E1和衣壳的C末端以证实表达。然后在根据之前对于分析、表达和免疫原性研究 [21] 所述的细菌和纯化环境下制备这些构建体。图1B示出了编码被膜E1、E2和衣壳DNA的构建体的琼脂糖凝胶电泳。

[0048] 根据另一实施方案, 我们设计了针对CHIKV病毒被膜E1、E2和E3各自的嵌合共有构建体。对于这些构建体, 制备E1、E2和E3各自的共有序列, 并将各共有序列彼此连接, 优选使

用编码蛋白酶切割位点的序列。此外,将IgE前导序列加至N末端以增强表达和分泌。

[0049] 在优选实施方案中,构建体包括与IgE前导序列连接的CHIKV编码序列。然而,在一些实施方案中,CHIKV编码序列不与IgE前导序列连接,但是可任选地连接不同的前导序列。

[0050] SEQ ID NO:1指编码与IgE前导序列连接的CHIKV-E1共有蛋白的核苷酸序列。

[0051] SEQ ID NO:2指编码与IgE前导序列连接的CHIKV-E2共有蛋白的核苷酸序列。

[0052] SEQ ID NO:3指编码与IgE前导序列连接的CHIKV-衣壳共有蛋白的核苷酸序列。

[0053] SEQ ID NO:4指对应于SEQ ID NO:1的编码CHIKV-E1共有蛋白但是没有IgE前导序列的编码序列的核苷酸序列。

[0054] SEQ ID NO:5指对应于SEQ ID NO:2的编码CHIKV-E2共有蛋白但是没有IgE前导序列的编码序列的核苷酸序列。

[0055] SEQ ID NO:6指对应于SEQ ID NO:13的编码CHIKV-衣壳共有蛋白但是没有IgE前导序列的编码序列的核苷酸序列。

[0056] SEQ ID NO:7指SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列,是带有IgE前导序列的CHIKV-E1共有蛋白。

[0057] SEQ ID NO:8指SEQ ID NO:2编码的氨基酸序列,是带有IgE前导序列的CHIKV-E2共有蛋白。

[0058] SEQ ID NO:9指SEQ ID NO:3编码的氨基酸序列,是带有IgE前导序列的CHIKV-衣壳共有蛋白。

[0059] SEQ ID NO:10指SEQ ID NO:4编码的氨基酸序列,是没有IgE前导序列的CHIKV-E1共有蛋白。

[0060] SEQ ID NO:11指SEQ ID NO:5编码的氨基酸序列,是没有IgE前导序列的CHIKV-E2共有蛋白。

[0061] SEQ ID NO:12指SEQ ID NO:6编码的氨基酸序列,是没有IgE前导序列的CHIKV-衣壳共有蛋白。

[0062] SEQ ID NO:13指编码共有Env的核苷酸序列,所述共有Env是Kozak序列-IgE前导序列-CHIKV-E3编码序列-切割位点-CHIKV-E2编码序列-切割位点-CHIKV-E1编码序列-终止信号-终止信号。

[0063] SEQ ID NO:14指SEQ ID NO:13编码的氨基酸序列,是共有Env蛋白序列,即IgE前导序列-CHIKV-E3-切割位点-CHIKV-E2-切割位点-CHIKV-E1编码序列。

[0064] SEQ ID NO:15指对应于SEQ ID NO:13的编码共有Env但是没有IgE前导序列的核苷酸序列,即CHIKV-E3编码序列-切割位点-CHIKV-E2编码序列-切割位点-CHIKV-E1编码序列-终止信号-终止信号。

[0065] SEQ ID NO:16指SEQ ID NO:15编码的氨基酸序列,是没有IgE前导序列的共有Env蛋白序列,即CHIKV-E3-切割位点-CHIKV-E2-切割位点-CHIKV-E1编码序列。

[0066] SEQ ID NO:17指IgE前导序列的氨基酸序列。

[0067] GCCGCCACC指优选的Kozak序列。

[0068] 当编码共有蛋白的核酸分子被个体细胞摄取时,编码共有蛋白的核苷酸序列在细胞中表达,由此将蛋白递送给个体。本发明的多个方面提供了递送质粒上共有蛋白编码序列或者作为重组疫苗的一部分和作为减毒疫苗的一部分的共有蛋白编码序列的方法。

[0069] 根据本发明一些方面,提供了针对病原体或异常的疾病相关细胞而预防性和/或治疗性免疫个体的组合物和方法。疫苗可以是任何类型的疫苗,例如减毒活疫苗、重组疫苗或核酸疫苗或DNA疫苗。

[0070] 在一些实施方案中,疫苗包含一种、两种或所有三种共有蛋白。在一些实施方案中,疫苗包含同一核酸分子上两种共有蛋白的编码序列。在一些实施方案中,疫苗包含两种不同核酸分子上两种共有蛋白的编码序列。在一些实施方案中,疫苗包含同一核酸分子上三种共有蛋白的编码序列。在一些实施方案中,疫苗包含三种共有蛋白的编码序列,其中两种共有蛋白的编码序列在同一核酸分子上而第三种共有蛋白的编码序列在第二种核酸分子上。例如,一种核酸分子包含E1和E2的编码序列并且包含衣壳的编码序列;或者一种核酸分子包含E1和衣壳的编码序列并且包含E2的编码序列,或者一种核酸分子包含E2和衣壳的编码序列并且包含E1的编码序列。在一些实施方案中,疫苗包含三种共有蛋白的编码序列,其中有三种不同的核酸分子,并且每种核酸分子包含不同的编码序列。

[0071] 在一些实施方案中,包括IgE前导序列的共有E1的编码序列是SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,无IgE前导序列的共有E1的编码序列是SEQ ID NO:4。在一些实施方案中,含有IgE前导序列的共有E1蛋白是SEQ ID NO:7或其片段。在一些实施方案中,共有E1蛋白是SEQ ID NO:10或其片段。在一些实施方案中,含有IgE前导序列的共有E1蛋白80%、90%、95%、98%或99%同源于SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,无IgE前导序列的共有E1蛋白80%、90%、95%、98%或99%同源于SEQ ID NO:10。在一些实施方案中,包括IgE前导序列的共有E2的编码序列是SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,无IgE前导序列的共有E2的编码序列是SEQ ID NO:5。在一些实施方案中,含有IgE前导序列的共有E2蛋白是SEQ ID NO:8或其片段。在一些实施方案中,共有E2蛋白是SEQ ID NO:11或其片段。在一些实施方案中,含有IgE前导序列的共有E2蛋白80%、90%、95%、98%或99%同源于SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,无IgE前导序列的共有E1蛋白80%、90%、95%、98%或99%同源于SEQ ID NO:11。在一些实施方案中,包括IgE前导序列的共有衣壳的编码序列是SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,无IgE前导序列的共有E1的编码序列是SEQ ID NO:6。在一些实施方案中,含有IgE前导序列的共有E1蛋白是SEQ ID NO:9或其片段。在一些实施方案中,共有E1蛋白是SEQ ID NO:12或其片段。在一些实施方案中,含有IgE前导序列的共有E1蛋白80%、90%、95%、98%或99%同源于SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,无IgE前导序列的共有E1蛋白80%、90%、95%、98%或99%同源于SEQ ID NO:12。

[0072] 多种基因可以在单一核酸分子上或在多种核酸分子上。例如,一种核酸分子包含E1和E2的编码序列并且包含衣壳的编码序列;或者一种核酸分子包含E1和衣壳的编码序列并且包含E2的编码序列,或者一种核酸分子包含E2和衣壳的编码序列并且包含E1的编码序列。在一些实施方案中,疫苗包含三种共有蛋白的编码序列,其中存在三种不同的核酸分子并且每种核酸分子包含不同的编码序列。疫苗可以包含E1、E2和衣壳的两种或多种共有序列的组合。

[0073] 在一些实施方案中,疫苗包含共有CHIKV Env,共有CHIKV Env包含连接在一起作为单一嵌合基因的E1、E2和E3。在一些实施方案中,个体共有序列通过编码蛋白酶切割位点的序列彼此连接。在一些实施方案中,嵌合基因包含E1、E2和E3各自的片段,使得嵌合基因在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含SEQ

ID NO:13或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少85%同源于SEQ ID NO:13的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少90%同源于SEQ ID NO:13的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少95%同源于SEQ ID NO:13的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少98%同源于SEQ ID NO:13的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少99%同源于SEQ ID NO:13的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含SEQ ID NO:15或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少85%同源于SEQ ID NO:15的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少90%同源于SEQ ID NO:15的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少95%同源于SEQ ID NO:15的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少98%同源于SEQ ID NO:15的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,嵌合基因包含至少99%同源于SEQ ID NO:15的核酸序列或其片段,该片段包含的序列足以使蛋白在个体中的表达形成对E1、E2和E3各自的免疫应答。

[0074] 在一些实施方案中,疫苗包含共有CHIKV Env,其编码连接在一起的E1、E2和E3的共有氨基酸序列。在一些实施方案中,个体共有序列通过编码蛋白酶切割位点的序列彼此连接。在一些实施方案中,嵌合基因编码E1、E2和E3各自的片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,共有蛋白CHIKV Env包含SEQ ID NO:14或其片段,该片段包含足够序列,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少85%同源于SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少90%同源于SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少95%同源于SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少98%同源于SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少99%同源于SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少85%同源于SEQ ID NO:16的氨基酸序列或其片段,其中由

此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少90%同源于SEQ ID NO:16的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少95%同源于SEQ ID NO:16的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少98%同源于SEQ ID NO:16的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发对E1、E2和E3各自的免疫应答。在一些实施方案中,CHIKV Env共有蛋白包含至少99%同源于SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其片段,其中由此编码的氨基酸序列具有免疫原性并且诱发针对E1、E2和E3各自的免疫应答。

[0075] 核酸分子可以使用几种已知技术中的任何一种来递送,所述已知技术包括DNA注射(还称为DNA接种)、重组载体(例如重组腺病毒、重组腺病毒相关病毒和重组牛痘病毒)。

[0076] DNA疫苗描述于美国专利号5,593,972,5,739,118,5,817,637,5,830,876,5,962,428,5,981,505,5,580,859,5,703,055,5,676,594和其中引用的优先申请,这些文献均以引用的方式并入本文。除了那些申请中描述的递送方案以外,递送DNA的可选方法还描述于美国专利号4,945,050和5,036,006,这两个文献均以引用的方式并入本文。

[0077] 施用途径包括但不限于肌内、鼻内、腹膜内、皮内、皮下、静脉内、动脉内、眼内和口服以及局部、经皮、通过吸入或栓剂或至粘膜组织(例如通过灌洗至阴道、直肠、尿道、口腔和舌下组织)。优选的施用途径包括至粘膜组织、肌内、腹膜内、皮内和皮下注射。基因构建体可以通过包括但不限于下述的工具施用:传统注射器、无针头注射装置或“微弹轰击基因枪”。

[0078] 另一施用途径涉及使用电穿孔来递送基因构建体,描述于美国专利号5,273,525,5,439,440,5,702,359,5,810,762,5,993,434,6,014,584,6,055,453,6,068,650,6,110,161,6,120,493,6,135,990,6,181,964,6,216,034,6,233,482,6,241,701,6,347,247,6,418,341,6,451,002,6,516,223,6,567,694,6,569,149,6,610,044,6,654,636,6,678,556,6,697,669,6,763,264,6,778,853,6,865,416,6,939,862和6,958,060,这些文献据此以引用的方式并入。

[0079] 优选用于促进DNA疫苗递送的电穿孔装置和电穿孔方法的实例包括描述于下述文献中的那些:Draghia-Akli等的美国专利号7,245,963,Smith等提交的美国专利公布2005/0052630,这两个文献的内容全文据此以引用的方式并入。还优选的是在2007年10月17日提交的共同待审和共同拥有的美国专利申请序号11/874072中提供的促进DNA疫苗递送的电穿孔装置和电穿孔方法,该美国专利申请根据35USC 119(e)要求2006年10月17日提交的美国临时申请序号60/852,149和2007年10月10日提交的美国临时申请序号60/978,982的权益,所有申请的全文据此以引用的方式并入。

[0080] 下面是使用电穿孔技术的实施方案的一个实例,并且在上述专利参考文献中更详细地讨论:电穿孔装置可被配置为向所需的哺乳动物组织递送能量脉冲,该能量脉冲产生类似于使用者预设电流输入的恒定电流。电穿孔装置包括电穿孔组件和电极部件或手柄部件。电穿孔组件可包括并入电穿孔装置的各种元件的一种或多种,包括:控制器、电流波形发生器、阻抗测试仪、波形记录仪、输入元件、状态报告元件、通讯端口、记忆组件、电源和电源开关。电穿孔组件能够作为电穿孔装置的一个元件起作用,其他元件是与所述电穿孔

组件联通的分开元件(或组件)。在一些实施方案中,电穿孔组件能够起到电穿孔装置中不止一个元件的作用,其还可以与电穿孔装置中与所述电穿孔组件分开的其他元件联通。使用电穿孔技术递送疫苗不受作为一个机电装置或机械装置的部分而存在的电穿孔装置的元件所限制,因为所述元件能够起到一个装置或起到与分开元件彼此联通的作用。电穿孔组件能够递送在所需组织中产生恒定电流的能量脉冲,并且包括反馈机制。电极部件包括具有空间排列的多个电极的电极阵列,其中电极部件接收来自电穿孔组件的能量脉冲并通过电极将其递送至所需的组织。多个电极的至少一个在能量脉冲递送中是中性的并且测量所需组织中的阻抗并且将阻抗联通至电穿孔组件。反馈机制可以接收测量的阻抗并且可以调节电穿孔组件递送的能量脉冲以保持恒定电流。

[0081] 在一些实施方案中,多个电极可以以分散模式递送能量脉冲。在一些实施方案中,多个电极可以通过以编程顺序控制电极来以分散模式递送能量脉冲,所述编程顺序由使用者输入至电穿孔组件。在一些实施方案中,编程顺序包括顺序递送的多个脉冲,其中所述多个脉冲的每一个脉冲由至少两个活性电极(带有一个测量阻抗的中性电极)递送,并且其中所述多个脉冲的下一个脉冲由至少两个活性电极(带有一个测量阻抗的中性电极)的一个递送。

[0082] 在一些实施方案中,反馈机制通过硬件或软件进行。优选地,反馈机制通过模拟闭环电路进行。优选地,该反馈每隔 $50\mu\text{s}$ 、 $20\mu\text{s}$ 、 $10\mu\text{s}$ 或 $1\mu\text{s}$ 发生,但是优选为实时反馈或即时反馈(即,通过采用现有技术测定响应时间确定为基本上是即时的)。在一些实施方案中,中性电极测量所需组织中的阻抗并将阻抗联通至反馈机制,并且反馈机制响应阻抗并调节能量脉冲以保持恒定电流为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递送过程中连续并即时保持恒定电流。

[0083] 当被细胞摄取时,基因构建体可以作为功能性染色体外分子保持存在于细胞中。DNA可以以质粒形式被引入细胞,DNA在细胞中短暂存在。可选地,RNA可以被施用至细胞。还考虑提供作为线性微型染色体的基因构建体,包括着丝粒、端粒和复制起点。基因构建体可以构成被施用于受试者的减毒活微生物或重组微生物载体中遗传物质的部分。基因构建体可以是重组病毒疫苗的基因组的部分,其中遗传物质保持在染色体外。基因构建体包括核酸分子基因表达所必要的调控元件。所述元件包括:启动子、起始密码子、终止密码子和多聚腺苷酸化信号。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所需要的。必要的是,这些元件与编码所需蛋白的序列可操作连接,并且所述调控元件在它们被施用的个体中是可操作的。

[0084] 一般认为起始密码子和终止密码子是编码所需蛋白的核苷酸序列的部分。然而,必要的是,这些元件在基因构建体被施用的个体中是功能性的。起始密码子和终止密码子必须与编码序列在框内。

[0085] 所使用的启动子和多聚腺苷酸化信号必须在个体细胞内是功能性的。

[0086] 可用于实施本发明、特别是产生人类基因疫苗的启动子的实例包括但不限于来自猿猴病毒40(SV40)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人类免疫缺陷病毒(MV)(例如BIV长末端重复序列(LTR)启动子)、莫洛尼病毒、ALV(禽白血病病毒)、巨细胞病毒(CMV)(例如CMV立即早期启动子)、EB病毒(EBV)、劳氏肉瘤病毒(RSV)的启动子以及来自人类基因的启动子,所述人类基因例如人类肌动蛋白、人类肌球蛋白、人类血红素、人类肌肉肌酸和人类金

属硫蛋白。

[0087] 可用于实施本发明、特别是产生人类基因疫苗的多聚腺苷酸化信号的实例包括但不限于SV40多聚腺苷酸化信号、小牛生长激素多聚腺苷酸化(bgh-PolyA)信号和LTR多聚腺苷酸化信号。特别地,使用在pCEP4质粒(Invitrogen, San Diego Calif.)中称为SV40多聚腺苷酸化信号的SV40多聚腺苷酸化信号。

[0088] 除了DNA表达所需的调控元件,DNA分子中还可以包括其他元件。此类其他元件包括增强子。增强子可以选自下述组,包括但不限于: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(例如来自CMV、RSV和EBV的那些)。

[0089] 基因构建体可以具有哺乳动物复制起点以在染色体外保持构建体并在细胞内产生多个构建体拷贝。来自Invitrogen(San Diego, Calif.)的质粒pVAX1、pCEP4和pREP4含有EB病毒复制起点和核抗原EBNA-1编码区,其产生高拷贝的无整合游离型复制。

[0090] 在有关免疫应用的一些优选实施方案中,递送的核酸分子包括编码共有蛋白的核苷酸序列并且另外包括进一步增强对此类靶蛋白的免疫应答的蛋白基因。此类基因的实例是编码其他细胞因子和淋巴因子的那些基因,所述细胞因子和淋巴因子例如 $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素、血小板衍生生长因子(PDGF)、TNF、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、IL-28,其包括信号序列缺失并任选包括来自IgE信号肽的IL-15。

[0091] 用于本方法的组合物可以进一步包含一种或多种下述蛋白和/或编码此类蛋白的核酸分子,如在对应于美国公开号20030176378的美国序号10/139,423(该文献以引用的方式并入本文)中提出的:主要组织相容性复合物抗原,包括主要组织相容性复合物I类抗原或主要组织相容性复合物II类抗原;死亡结构域受体,包括但不限于Apo-1、Fas、TNFR-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2和DR6;死亡信号,即,与死亡结构域受体相互作用的蛋白,包括但不限于FADD、FAP-1、TRADD、RIP、FLICE和RAIDD;或包括结合死亡结构域受体并引发细胞凋亡的配体的死亡信号,包括但不限于FAS-L和TNF;和与死亡结构域受体相互作用的介体,包括但不限于FADD、MORT1和MyD88;毒素,包括杀伤细胞的蛋白,包括但不限于昆虫毒液和蛇毒液、细菌外毒素(例如假单胞杆菌外毒素)、双链核糖体失活蛋白(例如蓖麻毒素),包括单链毒素和白树毒素。

[0092] 本方法中使用的组合物可以进一步包含一种或多种下述蛋白和/或编码此类蛋白的核酸分子,如在对应于美国公开号20070041941的美国序号10/560,650(该文献以引用的方式并入本文)中提出的:IL-15,包括包含与IL-15蛋白序列连接的非IL-15信号肽的融合蛋白,例如包含与IL-15蛋白序列连接的IgE信号肽的融合蛋白,CD40L,TRAIL;RAILrecDRC5,TRAIL-R2,TRAIL-R3,TRAIL-R4,RANK,RANK LIGAND,Ox40,Ox40LIGAND,NKG2D,F461811或MICA,MICB,NKG2A,NKG2B,NKG2C,NKG2E,NKG2F,CD30,CD153(CD30L)、Fos、c-jun、Sp-1、Ap1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I $\kappa$ B、NIK、SAP K、SAP1、JNK2、JNK1B2、JNK1B1、JNK2B2、JNK2B1、JNK1A2、JNK2A1、JNK3A1、JNK3A2、NF- $\kappa$ -B2、p49剪接形式、NF- $\kappa$ -B2、p100剪接形式、NF- $\kappa$ -B2、p105剪接形式、NF- $\kappa$ -B 50K链前体、NF $\kappa$ B p50、人IL-1 $\alpha$ 、人IL-2、人IL-4、鼠IL-4、人IL-5、人IL-10、人IL-15、人IL-18、人TNF- $\alpha$ 、人TNF- $\beta$ 、人白介素12、MadCAM-1、NGF IL-7、VEGF、TNF-R、Fas、CD40L、IL-4、CSF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、LFA-3、ICAM-3、ICAM-2、ICAM-1、PECAM、P150.95、Mac-1、LFA-1、CD34、RANTES、IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、E-选择

子、CD2、MCP-1、L-选择子、P-选择子、FLT、Apo-1、Fas、TNFR-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4 (TRAIL)、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、ICE、VLA-1和CD86 (B7.2)。

[0093] 用于本方法的组合物可以进一步包含一种或多种下述蛋白和/或编码此类蛋白的核酸分子,如在对应于美国公开号20070104686的美国序号10/560,653(该文献以引用的方式并入本文)中提出的:Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、Ikb、失活NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素应答基因、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1和TAP2。

[0094] 如果为任何原因而希望消除接收基因构建体的细胞,可以添加用作细胞破坏的靶的其他元件。基因构建体中可以包括可表达形式的疱疹病毒胸苷激酶(tk)基因。药物更昔洛韦(gancyclovir)可以施用至个体,并且该药物会引起形成tk的任何细胞的选择性杀伤,从而提供选择性破坏具有基因构建体的细胞的方式。

[0095] 为了最大化蛋白制备,可以选择非常适合在被施用构建体的细胞中基因表达的调控序列。而且,可以选择在细胞中最有效转录的密码子。本领域普通技术人员可以制备在细胞中有功能性的DNA构建体。

[0096] 在一些实施方案中,可以提供基因构建体以产生与IgE信号肽连接的本文所述的免疫调节蛋白的编码序列。

[0097] 本发明的一个方法包括肌内、鼻内、腹膜内、皮下、皮内或局部或通过灌洗至粘膜组织而施用核酸分子的步骤,所述灌洗至粘膜组织选自自由吸入、阴道、直肠、尿道、口腔和舌下组成的组。

[0098] 在一些实施方案中,联合多核苷酸功能增强剂或基因疫苗促进剂的施用将核酸分子递送至细胞。多核苷酸功能增强剂描述于美国专利号5,593,972和5,962,428,这两个文献均以引用的方式并入本文。基因疫苗促进剂描述于美国专利号5,739,118,该文献以引用的方式并入本文。联合核酸分子施用的助剂可以作为与核酸分子的混合物施用或者在核酸分子施用的同时、之前或之后分开施用。此外,可以作为转染剂和/或复制剂和/或炎性剂的其他制剂和可以与多核苷酸功能增强剂共同施用的其他制剂包括生长因子、细胞因子和淋巴因子,例如 $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素、GM-CSF、血小板衍生生长因子(PDGF)、TNF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12和IL-15以及成纤维细胞生长因子、表面活性剂(例如免疫刺激复合物(ISCOMS))、LPS类似物(包括单磷脂酰脂A(WL))、胞壁酰肽、醌类似物和诸如角鲨烯的小囊泡,透明质酸也可以联合基因构建体施用来使用。在一些实施方案中,免疫调节蛋白可以用作多聚核苷酸功能增强剂。在一些实施方案中,核酸分子与(丙交酯-乙交酯)共聚物(PLG)联合提供以增强递送/摄取。

[0099] 根据本发明的药物组合物包含约1纳克至约2000微克DNA。在一些优选实施方案中,根据本发明的药物组合物包含约5纳克至约1000微克DNA。在一些优选实施方案中,所述药物组合物含有约10纳克至约800微克DNA。在一些优选实施方案中,所述药物组合物含有约0.1至约500微克DNA。在一些优选实施方案中,所述药物组合物含有约1至约350微克DNA。在一些优选实施方案中,所述药物组合物含有约25至约250微克DNA。在一些优选实施方案中,所述药物组合物含有约100至约200微克DNA。

[0100] 根据本发明的药物组合物根据要使用的施用方式来配制。在药物组合物是可注射药物组合物的情况下,它们是无菌、无热原和无微粒的。优选使用等渗制剂。一般而言,等渗性添加剂可以包括氯化钠、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇和乳糖。在一些情况下,诸如磷酸盐缓冲盐水之类的等渗溶液是优选的。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。

[0101] 根据本发明一些实施方案,提供了诱发对屈曲病毒的免疫应答的方法。疫苗可以是减毒活疫苗、重组疫苗或核酸或DNA疫苗。

[0102] 核酸分子可以提供为质粒DNA、重组载体的核酸分子或者减毒疫苗中提供的遗传物质的部分。可选地,在一些实施方案中,共有蛋白可以作为附随编码它们的核酸分子或者取代编码它们的核酸分子的蛋白而被递送。

[0103] 基因构建体可以包含编码可操作地连接至基因表达所需的调控元件的靶蛋白或免疫调节蛋白的核苷酸序列。根据本发明,提供了基因构建体的组合,包括包含编码靶蛋白的核苷酸序列的可表达形式的一个构建体和包含编码免疫调节蛋白的核苷酸序列的可表达形式的一个构建体。将包含基因构建体组合的DNA或RNA分子递送入活细胞,导致DNA或RNA的表达以及靶蛋白和一种或多种免疫调节蛋白的产生。形成增强的对靶蛋白的免疫应答。

[0104] 除了使用免疫调节蛋白编码序列的可表达形式来改进基因疫苗以外,本发明还涉及改进的减毒活疫苗和使用重组载体递送编码抗原的外源基因的改进的疫苗。减毒活疫苗和使用重组载体递送外来抗原的疫苗描述于美国专利号:4,722,848;5,017,487;5,077,044;5,110,587;5,112,749;5,174,993;5,223,424;5,225,336;5,240,703;5,242,829;5,294,441;5,294,548;5,310,668;5,387,744;5,389,368;5,424,065;5,451,499;5,453,364;5,462,734;5,470,734;和5,482,713,这些文献均以引用的方式并入本文。提供了包含编码共有蛋白或其免疫原性共有片段的核苷酸序列的基因构建体,其中所述核苷酸序列可操作地连接至可在疫苗中起作用以实现表达的调控序列。将基因构建体掺入减毒活疫苗和重组疫苗中以产生根据本发明的改进的疫苗。

[0105] 本发明提供了免疫个体的改进的方法,该方法包括将基因构建体作为疫苗组合物的部分递送至个体细胞的步骤,所述疫苗组合物包括DNA疫苗、减毒活疫苗和重组疫苗。所述基因构建体包含编码共有蛋白或其免疫原性共有片段的核苷酸序列,所述核苷酸序列可操作地连接至可在疫苗中起作用以实现表达的调控序列。所述疫苗形成对不同菌株的交叉防护。

## 实施例

[0106] 实施例1

[0107] 这里,我们提供了采用DNA疫苗策略进行CHIKV疫苗设计的基于共有序列的新方法的数据。基于带有几种改性的CHIKV衣壳和被膜特异性共有序列设计了疫苗盒。衣壳、被膜E1和E1的表达使用T7-偶联转录/转译和免疫印迹分析来评估。使用自适应恒定电流电穿孔技术通过肌肉注射编码CHIK-衣壳、E1和E1的质粒来免疫C57BL/6小鼠。细胞免疫应答的分析(包括表位作图)表明,这些构建体的电穿孔诱发了强力且广泛的细胞免疫性。此外,抗体ELISA表明,这些合成免疫原能够诱发可识别天然抗原的高滴度抗体。综合起来,这些数据

支持在潜在疫苗混合物中使用CHIKV共有抗原的进一步研究。

[0108] 该研究中,我们设计了基于带有几种改性的衣壳(Cap)和被膜(E1)和被膜(E2)特异性共有序列和取代的免疫球蛋白E前导序列的疫苗盒,所述改性包括密码子优化、RNA优化、添加Kozak序列。疫苗盒被引入DNA疫苗载体pVax1的特定位置。使用特异限制性酶切并使用T7启动子的引物测序来检查疫苗构建体的插入物。基于体外表达以及使用体内蛋白质印迹分析,最终的构建体被高效表达。这证实了病毒构建体被正确表达并处理以用于进一步的免疫原性研究。

[0109] 最近,使用EP递送DNA疫苗引起广泛关注。在小动物模型和非人灵长类动物中IM免疫+EP的最近研究一致性地报道了细胞应答、特别是抗体应答的增加[20-22]。

[0110] 材料和方法

[0111] 细胞和动物:

[0112] 在补充有10%胎牛血清的DMEM培养基中培养并保持从ATCC获得的BHK-21细胞系。哺乳动物质粒表达载体pVax1购自Invitrogen((Carlsbad,CA)。3-4周龄雌性C57BL/6小鼠(Jackson laboratories,Indianapolis,IN)用于这些实验并分成三个实验组(n4)。所有动物根据美国国立卫生研究院(Bethesda,MD,USA)和宾夕法尼亚大学(Philadelphia,PA,USA)机构动物管理与使用委员会(IACUC)的指导原则圈养于控温的光循环设施内。

[0113] CHIKV DNA构建体和合成:

[0114] 通过合成引物的合成,随后使用从所有CHIKV病毒的NCBI数据库搜集的共有菌株预测序列进行DNA-PCR扩增,来设计CHIKV核心和被膜基因。共有序列被优化以用于表达,其包括密码子和RNA优化(GeneArt,Regensburg,Germany),然后插入pVax1表达载体(Invitrogen)。

[0115] 体外和体内表达:

[0116] 利用pVax1骨架中T7启动子和含有S35-甲硫氨酸CHIKV基因的基于T7的偶联转录/转译系统(Promega,Madison,WI)证实构建体表达。合成的蛋白使用抗E1抗体、抗E2抗体或抗衣壳抗体进行免疫沉淀。免疫沉淀蛋白在12%NuPage SDS-PAGE凝胶(Invitrogen,CA)上电泳并随后固定并干燥。进行自显影以检测掺入的S35标记的基因产物。在体内表达中,BHK-21细胞( $1 \times 10^6$ )使用Fugene转染方法(Roche,NJ)用CHIKV构建体转染。转染后72小时,蛋白(50 $\mu$ g)在SDS-PAGE(12%)上分级分离并转移至PVDF膜(Bio-Rad,Hercules,CA)。使用在小鼠中培养的特异性抗血清进行免疫印迹分析,并使用ECL检测系统(Amersham Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ)用辣根过氧化物酶耦联的山羊抗小鼠IgG使表达的蛋白显现[19]。

[0117] 免疫和电穿孔

[0118] 使用标准方案用质粒DNA初次免疫动物[20]。四只小鼠的组用pCHIKV基因(25 $\mu$ g)免疫两次,2-3次,间隔2周,在最后一次免疫后1周处死。所有免疫通过体内电穿孔(EP)(VGX Pharmaceuticals Inc,Blue Bell,PA)以100 $\mu$ l的总体积递送至四头肌。动物在最后一次免疫后7天被处死,之后收集血清和脾用于免疫学分析。分别在第二次免疫和第三次免疫之后1周获得对照小鼠和免疫小鼠的血液。在所有实验中使用方波脉冲,并使用在我们实验室设计和测试的恒定电流EKD递送[20-22]。小鼠实验中使用三电极阵列(3-EA)。3-EA由三个26规实心不锈钢电极组成,形成等腰三角形,两个长边长0.5mm,短边长0.3mm,用不导电塑料

固定在一起。小鼠实验的具体EP条件是使用恒定电流0.1安培,三脉冲,52毫秒/脉冲,脉冲间隔4秒。质粒注射和EP之间的延迟时间为约20秒。质粒施用/EP的事件顺序如下:将一次性电极组件放入手柄容器,按压手柄上的启动按钮并输入动物实验组号,使用胰岛素注射器注射50 $\mu$ l DNA构建体(共25 $\mu$ g DNA)质粒,立即将针头放入注射位点周围区域,按压手柄上的启动按钮,4秒钟倒计时后,脉冲被递送。电穿孔5秒钟后,将阵列轻轻从肌肉移开。所有电极在所有处理过程中完全插入肌肉[21,22]。所有DNA使用无内毒素的Qiagen柱制备。所有动物在宾夕法尼亚大学圈养于控温的光循环设施内,它们的管理依据美国国立卫生研究院和宾夕法尼亚大学的指导原则。

#### [0119] 细胞应答:ELISPOT分析

[0120] ELISPOT分析如先前所述进行[23]。简而言之,ELISpot 96孔板(微孔)用抗小鼠IFN- $\gamma$ 捕获抗体涂布并在4 $^{\circ}$ C下培养24h(R&D Systems)。第二天,将板洗涤并用1%BSA封闭2h。将来自免疫小鼠的20万脾细胞添加至每个孔,并在37 $^{\circ}$ C下5%CO<sub>2</sub>中于存在RPMI 1640(阴性对照)、Con A(阳性对照)或特定肽抗原(10 $\mu$ g/ml;Invitrogen)的情况下中刺激过夜。肽库由11个氨基酸重叠的15肽组成。刺激24h后,细胞经洗涤后在4 $^{\circ}$ C下与生物素化抗小鼠IFN- $\gamma$ 抗体(R&D Systems)一起培养24h。洗涤板,并将链霉亲和素-碱性磷酸酶(R&D Systems)加入每个孔并在室温下培养2h。洗涤板,向每个孔加入5-溴-4-氯-3'-吡啶基磷酸对甲苯胺盐和氯化四唑氮蓝(色原体显色剂;R&D Systems)。然后将板用蒸馏水冲洗并在室温下干燥。通过自动化ELISPOT读取仪(CTL Limited)计数斑点[21-23]。

#### [0121] 体液免疫应答:抗体ELISA

[0122] 确定每个CHIKV DNA构建体在每个DNA首次注射后的抗体水平和对接种的体液免疫应答。简而言之,96孔高结合聚苯乙烯板(Corning, NY)板用在PBS中稀释的合成特定肽(2 $\mu$ g/ml)在4 $^{\circ}$ C下涂布过夜。第二天,板用PBST(PBS, 0.05%吐温20)洗涤,用PBST中3%BSA封闭1h,并在37 $^{\circ}$ C下与来自免疫小鼠和首次实验小鼠的血清的1:100稀释液一起培养1h。结合的IgG使用1:5,000稀释的山羊抗小鼠IgG-HRP(Research Diagnostics, NJ)检测。结合的酶通过添加色原体基底溶液TMB(R&D Systems)来检测,并在Biotek EL312e Bio-Kinetics读取仪上在450nm读数。所有血清样品均以一式两份测试[22]。

#### [0123] 结果

#### [0124] 共有构建体表达:

[0125] 三种CHIKV共有构建体的表达使用多种技术来验证。为了显现体外产生的蛋白质,进行S<sup>35</sup>标记的体外T7偶联转录和转译分析。使用组氨酸标签抗体免疫沉淀转译产物并进行凝胶分析。SDS-PAGE和放射显影分析显示,每种构建体(被膜E1、E2和衣壳)电泳在其理论预测的分子量(图2A)下进行。我们接着试图检验这些构建体在哺乳动物细胞中的体内表达。转染入BHK-21细胞后,在3天后提取蛋白质并使用特异性多克隆抗体通过蛋白质印迹分析来检测表达(图2B)。用特异性抗体进行免疫印迹时,在被膜E1构建体转染的细胞中观察到52kDa蛋白,在衣壳构建体转染的细胞中观察到36kDa蛋白。

#### [0126] 体液免疫原性

[0127] 我们假设,我们的共有免疫原防卫致命性CHIK病毒的强度取决于免疫系统的细胞免疫部分。而且,交叉反应性但非中和性抗体可以提供某种程度的对疾病严重度的防护。为了确定我们的构建体是否诱发抗体应答,我们对CHIK免疫的小鼠血清进行了抗体ELISA以

确定DNA免疫后获得的血清的抗体滴度,通过ELISA测试抗体应答。用被膜E1免疫的小鼠血清中抗E1特异性IgG抗体显著高于用载体对照免疫的小鼠血清(图3A)。类似地,分别用被膜E2和衣壳构建体免疫的小鼠血清中抗E2特异性IgG抗体和衣壳特异性IgG抗体显著高于用载体对照免疫的小鼠血清(图3B&C)。这些结果进一步支持:质粒递送的可选方式、特别是电穿孔增加了响应DNA疫苗免疫原的抗体产生。

#### [0128] 细胞免疫原性

[0129] E1、E2和衣壳构建体诱发CD8+CTL应答的能力通过IFN- $\gamma$  ELISpot分析确定。共有被膜构建体E1、E2和衣壳疫苗能够在三次免疫之后在C57BL/6小鼠中诱发强的IFN- $\gamma$  应答(图4A、5A和6A)。对于被膜E1诱发的细胞免疫应答的分子表征,针对跨整个被膜E1的肽文库进行ELISpot分析。使用了跨E1蛋白残基1-435的74种15肽(它们之间有9个氨基酸重叠)和跨E2蛋白1-423的肽。被膜诱发了E1蛋白中的优势表位HSMTNAVTI (SEQ ID NO:18) (图4B)和E2蛋白中的IILYYYELY (SEQ ID NO:19) (图5B)。类似地,对于衣壳蛋白,对跨整个衣壳蛋白的肽文库进行ELISpot分析。使用了跨衣壳蛋白残基1-261的45种15肽,它们之间有9个氨基酸重叠。构建体衣壳诱发了优势表位ACLVGDKVM (SEQ ID NO:20) (图5B)。有趣的是,构建体CHIKV-E1诱发的优势表位带有226A-V突变,表明所述构建体还可以有效地诱发对新出现的突变病毒的免疫应答。该发现可以表明,免疫应答能够在细胞选择过程中推动病毒进化。

#### [0130] 讨论

[0131] C57BL/6小鼠中诱发的免疫应答评估显示,构建体具有高度免疫原性并且就IFN- $\gamma$  应答和增殖而言引发了T细胞免疫应答。本研究的ELISpot数据表明,IFN- $\gamma$  应答强度就获得的斑点数量而言是基础广泛的。尽管已知其他相关 $\alpha$ 病毒中的被膜蛋白和衣壳具有免疫原性,但是有关屈曲被膜和衣壳蛋白的免疫原性知之甚少。来自被膜E1和衣壳不同区域的基质肽库引发脾细胞的IFN- $\gamma$  产生,分别确定了在E1和衣壳蛋白中的T细胞优势表位HSMTNAVTI和ACLVGDKVM。发现接种小鼠的总IgG水平与未接种对照的总IgG水平相比有所增加,表明强体液免疫应答的诱发。除了这些疫苗加强对多种屈曲病毒攻击的防护能力外,进一步分析所诱发的抗体应答类型的后续研究目前正在进行中。

[0132] 该研究表明,这些构建体可以作为疫苗候选物进一步研究。然而,由于该研究局限于证明疫苗构建体在小鼠中肌内注射接着电穿孔之后的高效表达和免疫原性,因此所述疫苗构建体在包括非人灵长类动物模型在内的更多模型中的免疫原性详细评估是重要的。描述的合成盒构建体似乎是进一步考察屈曲病毒免疫生物学的方便工具。

#### [0133] 实施例2

[0134] 设计了测量中和性抗体滴度的分析,其提供了对临床人类CHIKV感染可行的快速诊断并应用于易感的脊椎动物宿主的临床前血清监视。

[0135] CHIKV通过RT-PCR识别。使用QIAamp病毒RNA迷你试剂盒从患者血清提取RNA。使用Quiagen一步式RT-PCR试剂盒进行一步式RT-PCR测试。在编码病毒被膜蛋白E2的基因中,扩增产物为305bp。当观察细胞时,CHIKV形成泡沫细胞病变效应(CPE),其中在感染后(pi) 24-48小时后看到细胞圆化(rounding)。

[0136] 微量中和分析设计如下。中和试验是基于抗原与抗体反应。观察到患者血清中抑制已知病毒滴度对CHIKV病毒的同源抗体的存在。对血清进行连续稀释(通常例如1:10至1:640)并在足以使血清中抗体抑制病毒的条件和时间量下与已知滴度的CHIKV一起培养。培

养后,如果病毒还未被血清中的抗体中和,在会导致细胞感染病毒的情况下向受纳细胞添加混合物。将抑制病毒繁殖的血清最高稀释度记录为抗体滴度。CPE (细胞病变效应) 可以用作细胞中病毒繁殖的量度。

[0137] 使用患者样品进行CHIKV中和测试。图7是显示预免疫和DNA免疫小鼠血清的中和抗体滴度的图。小鼠用编码E1、E2、衣壳、E1+E2或载体pVax的构建体免疫。血清被连续稀释(1:10至1:640)并在37℃下与CHIKV (100TC<sub>10</sub>50) 一起培养90分钟。培养后,将混合物添加至96孔平底板中的Vero细胞 (15,000细胞/孔) 并在5%CO<sub>2</sub>气氛中37℃下培养5天。将没有观察到CPE (细胞病变效应) 的最高滴度记录为中和抗体滴度。参考文献

[0138] 下述参考文献以引用的方式并入本文。

[0139] 1. Strauss, J.H. 和 Strauss, E.G. (1994)。甲病毒:基因表达、复制和进化,微生物学评论,58,491-562。

[0140] 2. Robinson, M.C. (1955)。英属坦噶尼喀南部省1952至1953年的病毒性疾病流行。I. 临床特征。皇家热带医学与卫生学会会报,49,28-32。

[0141] 3. Powers, A.M. 和 Logue, C.H. (2007)。屈曲病毒的变化型式:动物间传播的虫媒病毒的再现。普通病毒学杂志,第88卷,第9部分,第2363-2377页。

[0142] 4. Porterfield, J.H. (1980)。披膜病毒的抗原特征和分类,选自Schlesinger R编写的:披膜病毒。纽约:Academic Press。第13-46页。

[0143] 5. Weaver, S.C. 和 Barrett D.T. (2004)。虫媒病毒病的传输周期、宿主范围、进化和出现,自然评论:微生物学,2,第789-801页。

[0144] 6. Chevillon C, Briant L, Renaud F, Devaux C. (2008)。屈曲的威胁:生态学和进化学透视。微生物学趋向,16 (2) 80-88。

[0145] 7. Lahariya, C. 和 Pradhan S.K. (2006)。关于32年后屈曲病毒在印度次大陆出现的评论,媒介源性疾病杂志,43,第151-160页。

[0146] 8. Vanlandingham DL, Hong C, Klingler K, Tsetsarkin K, McElroy KL, Powers AM, Lehane MJ, Higgs S (2005)。“从冈比亚按蚊和埃及伊蚊中的阿尼昂尼昂病毒和屈曲病毒分离株的不同传染性”。美国热带医学与卫生学杂志,72 (5) :616-21。

[0147] 9. Yergolkar, P.N. 等, (2006)。由非洲基因型引起的屈曲爆发,印度,新发传染病,12;1580-1583。

[0148] 10. Warner, E., Garcia-Diaz, J., Balsamo, G., Shranatan, S., Bergmann, A., Blauwet, L., Sohail, M., Baddour, L., Reed, C. 及其他作者 (2006)。在国际旅行者中诊断到的屈曲热-美国,2005-2006。MMWR发病率及死亡率每周报告,55,1040-1042。

[0149] 11. Turell, M.J., Beaman, J.R. 和 Tammariello, R.F. (1992)。埃及伊蚊和白纹伊蚊 (双翅目蚊科) 的所选株对屈曲病毒的易感性。医学昆虫学杂志,29,49-53。

[0150] 12. Reiter, P., Fontenille, D. 和 Paupy, C. (2006)。作为屈曲病毒传染载体的白纹伊蚊:又一个新出现的问题?柳叶刀传染病学,6,463-464。

[0151] 13. Johnston RE, Peters CJ (1996) 主要与发热和多发性关节炎相关的甲病毒。选自Fields BN, Knipe DM, Howley PM编写的:费氏病毒学。费城:Lippincott-Raven Publishers。第843-898页。

[0152] 14. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. (2003)。氯奎对病

毒感染的效果:用旧药治现在的病?柳叶刀传染病学,3(11):722-7。

[0153] 15.Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGeer CE, Higgs S. (2007)。屈曲病毒的单次突变影响载体特异性和流行潜能。公共科学图书馆:病原体,7;3(12):e201。

[0154] 16.Grivard P, Le Roux K, Laurent P, Fianu A, Perrau J, Gigan J, Hoarau G, Grondin N, Staikowsky F, Favier F, Michault A. (2007)。屈曲病毒感染的分子学和血清学诊断。生物病理学(巴黎),55(10):490-4。

[0155] 17.Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux AB (1999)。对来自法属波利尼西亚塔希提岛和摩莱阿岛的埃及伊蚊集群的登革热2型病毒的口腔易感性的不同。美国热带医学与卫生学杂志,60:292-299。

[0156] 18.Marie Vazeille等(2007)。留尼旺岛(印度洋)爆发中获得的1两份屈曲分离株表现出在白纹伊蚊中不同的感染型态。公共科学图书馆—综合,11:1-9。

[0157] 19.Muthumani, K., A. Y. Choo, W. X. Zong, M. Madesh, D. S. Hwang, A. Premkumar, K. P. Thieu, J. Emmanuel, S. Kumar, C. B. Thompson 和 D. B. Weiner. 2006. HIV-1Vpr和糖皮质激素受体的复合体是一种获得性相互作用,其阻止PARP-1的核定位。自然—细胞生物学,8:170-179。

[0158] 20.Khan AS, Smith LC, Abruzzese RV, Cummings KK, Pope MA, Brown PA, Draghia-Akli R. (2003)。在猪中进行肌肉递送质粒的电穿孔参数最优化。DNA细胞生物学,(12):807-1。

[0159] 21.Lauren LA, Hirao LA, Wu L, Khan AS, Satishchandran A, Draghia-Akli R, Weiner DB (2008)。通过电穿孔的皮内/皮下免疫改善了在猪和恒河猴中的质粒疫苗递送和效力。疫苗,17;26(3):440-8。

[0160] 22.Laddy DJ, Yan J, Corbitt N, Kobasa D, Kobinger GP, Weiner DB (2007)。用于禽流感的基于一致性的新型DNA疫苗的致免疫性。疫苗,25(16):2984-9。

[0161] 23.Boyer JD, Robinson TM, Kutzler MA, Vansant G, Hokey DA, Kumar S, Parkinson R, Wu L, Sidhu MK, Pavlakis GN, Felber BK, Brown C, Silvera P, Lewis MG, Monforte J, Waldmann TA, Eldridge J, Weiner DB (2007)。使用SHIV抗原和IL-15质粒进行共免疫之后,保护猕猴属不受猿猴/人类免疫缺陷病毒(SHIV) 89.6P的影响。美国国家科学院院刊,20:104(47):18648-53。

[0162] 24.Feng GH, Liu N, Zhou Y, Zhai YZ, Li XM, Dou XG (2007)。为源自日本脑炎病毒的北京-1株进行E蛋白编码的DNA疫苗导致的免疫分析,国际病毒学,50(2):93-8。

## 序列表

<110> D·B·韦纳(WEINER , DAVID B.)

K·穆图玛尼(MUTHUMANI, KARUPPIAH)

<120> 屈曲病毒蛋白共有序列、编码该屈曲病毒蛋白共有序列的核酸分子和组合物及其使用方法

<130> 130694.06302

<150> US 61/042661

<151> 2008-04-04

<160> 18

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1374

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV E1共有序列

<400> 1

```

atggactgga cctggatcct gtttctggtc gctgctgcca cccgggtgca cagctacgag 60
cacgtgaccg tgatcccaaa caccgtgggc gtgccctaca agaccctggt gaacaggccc 120
ggctacagcc ccatggtgct ggaaatggaa ctgctgtccg tgaccctgga acccaccctg 180
agcctggact acatcacctg cgagtacaag acagtgatcc ccagccceta cgtgaagtgc 240
tgcggcaccg ccgagtgcaa ggacaagaac ctgcccgaact acagctgcaa ggtgttcacc 300
ggcgtgtacc cttcatgtg gggcggagcc tactgettct gcgacgccga gaacaccag 360
ctgtccgagg cccacgtgga gaagagcgag agctgcaaga ccgagttcgc cagcgcctac 420
cgggcccaca cagccagcgc cagcgcgaag ctgcgggtgc tgtaccaggg caacaacatc 480
accgtgaccg cctacgcca cggcgaccac gccgtgacag tgaaggacgc caagttcatc 540
gtgggcccga tgagcagcgc ctggacccc ttcgacaaca agatcgtggt gtacaagggc 600
gacgtgtaca acatggacta ccccccttc ggagccggca gaccggcca gttcggcgac 660
atccagagcc ggacccccga gagcaaggac gtgtacgcca ataccagct ggtgctgcag 720
agaccgccc tgggcaccgt gcacgtgect tacagccagg ccccagcgg cttcaagtac 780
tggctgaaa agaggggccc cagcctgcag cacaccgcc ccttcggctg ccagatcgcc 840
accaacccc tgcgggccgt gaattgtgcc gtgggcaaca tgcccacag catcgacatc 900
cccaggccc ccttcaccag ggtggtggac gccccagcc tgaccgacat gagctgcgag 960
gtgcccgcct gcacccacag cagcgaette ggcgcgctgg ccatcatcaa gtacgccgcc 1020
agcaagaaa gcaagtgcgc cgtgcacagc atgaccaatg ccgtgacat ccgggaggcc 1080
gagatcgagg tggagggcaa cagccagctg cagatcagct tcagaccgc cctggccagc 1140
gccgagttcc ggggtgcaggt ctgcagcacc caggtgcaact gtcccgccga gtgtcacc 1200
ccaaggacc acatcgtgaa ctaccccgcc agccacacca ccctgggcgt gcaggacatc 1260

```

agcgccaccg ccatgagctg ggtgcagaag atcacaggcg gcgtcggcct ggtggtggcc 1320  
 gtggccgccc tgatcctgat cgtggtgctg tgcgtgagct tcagccggca ctga 1374  
 <210> 2  
 <211> 1326  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CHIKV E2共有序列  
 <400> 2  
 atggactgga cctggatect gttcctggtc getgetgcca caagagtgca cagcagcacc 60  
 aaggacaact tcaacgtgta caaggccacc cggeectacc tggeccactg ccccgattgc 120  
 ggcgagggcc acagctgcca cagccccgtg gcctggaac ggatccggaa cgaggccacc 180  
 gacggcacc tgaagatcca ggtgtccctg cagatcgcca tcaagaccga cgacagccac 240  
 gactggacca agctgcggta catggacaac cacatgcccg ccgacgccga gagagccggc 300  
 ctgttcgtcc ggaccagcgc ccctgcacc ataccggca ccatgggcca ctteatcctg 360  
 gcccggtgcc ccaagggcga gacactgacc gtgggettea ccgacagccg gaagatcagc 420  
 cactcctgca cccaccctt ccaccacgac cccccgtga tcggccggga gaagttccac 480  
 agcaggcccc agcacggcaa agagctgccc tgcagcacct acgtgcagag caccgccgcc 540  
 acaaccgagg aaatcgaggt gcacatgccc cccgataccc ccgaccggac cctgatgagc 600  
 cagcagagcg gcaacgtgaa gatcaccgtg aacggccaga ccgtgcggta caagtgaac 660  
 tgcggcggca gcaacgaggg cctgaccacc accgacaagg tgatcaaaa ctgcaaggtg 720  
 gaccagtgcc acgccgccgt gaccaaccac aagaagtggc agtacaacag ccccctgggtg 780  
 ccccggaatg ccgagctggg cgaccggaag ggcaagatcc acatcccctt ccccctggcc 840  
 aacgtgacct gccgggtgcc caaggcccgg aaccccaccg tgacctacgg caagaaccag 900  
 gtgatcatgc tgctgtacc cgaccacccc accctgctgt cctaccggaa catgggcgag 960  
 gaaccaact accaagagga gtgggtcatg cacaagaaag aagtgtgtct gaccgtcccc 1020  
 accgagggcc tggaagtgac ctggggcaac aacgagccct acaagtactg gccccagctg 1080  
 tccaccaacg gcaccgccc cggccacccc cagcagatca tctgtacta ctacgagctg 1140  
 taccctacca tgaccgtggt ggtggtgtcc gtggccacct ttatcctgct gtccatggtc 1200  
 ggcatggccg ctggcatgtg catgtgcgcc aggaggeget gtateacccc ctacgagctg 1260  
 acacctggcg ccaccgtgcc ctttctgctg tcctgatct getgatccg gaccgccaag 1320  
 gcctga 1326  
 <210> 3  
 <211> 840  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CHIKV衣壳共有序列  
 <400> 3

atggactgga cctggatcct gttcctggtg gccgctgcca cccgggtgca cagcatggaa 60  
 ttcatcccca cccagacctt ctacaaccgg cgctaccage ccagacctg gacccccagg 120  
 cccaccatcc aggtgatccg gcccaggccc agaccccaga ggcaggccgg gcagctggca 180  
 cagctgatca gcgccgtgaa caagctgacc atgagagccg tgccccagca gaagcccagg 240  
 cggaaccgga agaacaagaa gcagaagcag aaacagcagg cccccagaa caacaccaac 300  
 cagaagaagc agcccccaa gaagaagcct gcccagaaga agaagaaacc cggcaggcgg 360  
 gagcggatgt gcatgaagat cgagaacgac tgcatcttcg aggtgaagca cgagggcaag 420  
 gtgaccggct acgcctgcct ggtcggcgac aaagtgatga agcccccca cgtgaagggc 480  
 accatcgaca acgccgacct ggccaagctg gccttcaagc ggagcagcaa gtacgacctg 540  
 gaatgcgccc agatccccgt gcatatgaag agcgacgcca gcaagttcac ccacgagaag 600  
 cccgagggct actacaactg gcaccacgga gccgtgcagt acagcggcgg caggttcacc 660  
 atccccacag gcgccgaaa gcccgcgac agcggcaggc ccatcttcga caacaagggc 720  
 cgggtggtgg ccatcgtgct gggcggagcc aacgaggggc ccaggaccgc cctgagcgtg 780  
 gtgacctgga acaaggacat cgtgaccaag atcacccccg agggcgccga agagtgtgta 840

<210> 4

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV E1共有序列

<400> 4

tacgagcacg tgaccgtgat cccaacacc gtgggcgtgc cctacaagac cctggtgaac 60  
 aggccccgct acagccccat ggtgctggaa atggaactgc tgtccgtgac cctggaacce 120  
 accctgagcc tggactacat cacctgcgag tacaagacag tgatccccag cccctacgtg 180  
 aagtgctgcg gcaccgccga gtgcaaggac aagaacctgc ccgactacag ctgcaagggt 240  
 ttcaccggcg tgtaccctt catgtggggc ggagcctact gcttctgca cgcggagaac 300  
 acccagctgt ccgaggccca cgtggagaag agcgagagct gcaagaccga gttcgccagc 360  
 gcctaccggg cccacacagc cagcgccagc gccaaactgc ggggtgctgta ccagggcaac 420  
 aacatcaccg tgaccgccta cgccaacggc gaccacgccg tgacagtga gacgccaag 480  
 ttcatcgtgg gccccatgag cagcgctgg accccttcg acaacaagat cgtggtgtac 540  
 aagggcgacg tgtacaacat ggactacccc ccttcggag ccggcagacc cggccagttc 600  
 ggcgacatcc agagccggac ccccagagc aaggacgtgt acgccaatac ccagctggtg 660  
 ctgcagagac ccgccgtggg caccgtgcac gtgccttaca gccaggcccc cagcggcttc 720  
 aagtactggc taaaagagag gggcgccagc ctgcagcaca ccgccccctt cggctgccag 780  
 atcgccacca accccgtgcg ggccgtgaat tgtgccgtgg gcaacatgcc catcagcacc 840  
 gacatccccg aggccgcctt caccagggtg gtggacgccc ccagcctgac cgacatgagc 900  
 tgcgagggtc ccgcctgcac ccacagcagc gacttcggcg gcgtggccat catcaagtac 960  
 gccgccagca agaaaggcaa gtgcgccgtg cacagcatga ccaatgccgt gaccatccgg 1020  
 gaggccgaga tcgagggtga gggcaacagc cagctgcaga tcagcttcag caccgcctg 1080

gccagcgccg agttccgggt gcaggtctgc agcaccagg tgcactgtgc cgccgagtgt 1140  
 cccccccca aggaccacat cgtgaactac cccgccagcc acaccaccct gggcgtgcag 1200  
 gacatcagcg ccaccgcat gagctgggtg cagaagatca caggcggcgt cggcctgggtg 1260  
 gtggccgtgg ccgccctgat cctgatcgtg gtgctgtgcg tgagcttcag ccggcactga 1320

<210> 5

<211> 1273

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV E2共有序列

<400> 5

cagcaccaag gacaacttca acgtgtacaa ggccaccgg cctacctgg cccactgccc 60  
 cgattgcggc gagggccaca getgccacag ccccgtagcc ctggaacgga tccggaacga 120  
 ggccaccgac ggcaccctga agatccaggt gtccctgcag atcggcatca agaccgacga 180  
 cagccacgac tggaccaage tgcggtacat ggacaaccac atgcccgcg acgccgagag 240  
 agccggcctg ttcgtccgga ccagcgcgcc ctgcaccatc accggcaca tgggccactt 300  
 catcctggcc cggtgcccca agggcgagac actgaccgtg ggcttcaccg acagccggaa 360  
 gatcagccac tctgcacc acccettcca ccacgacccc cccgtgatcg gccgggagaa 420  
 gttccacagc agggcccagc acggcaaaga gtgcccctgc agcacctacg tgcagagcac 480  
 cgccgccaca accgaggaaa tcgaggtgca catgcccc gataccccc accggaccct 540  
 gatgagccag cagagcggca acgtgaagat caccgtgaac ggccagaccg tgcggtacaa 600  
 gtgcaactgc ggccggcagca acgagggcct gaccaccacc gacaaggtga tcaacaactg 660  
 caaggtggac cagtgccacg ccgccgtgac caaccacaag aagtggcagt acaacagccc 720  
 cctggtgccc cggaatgccg agctgggcca ccggaagggc aagatccaca tccccttccc 780  
 cctggccaac gtgacctgcc gggtgcccaa ggcccggaac cccaccgtga cctacggcaa 840  
 gaaccaggtg atcatgctgc tgtaccccga ccaccacc ctgctgtcct accggaacat 900  
 gggcgaggaa cccaactacc aagaggagtg ggatcatgac aagaaagaag tggctgtgac 960  
 cgtccccacc gaggccctgg aagtgacctg gggcaacaac gagccctaca agtactggcc 1020  
 ccagctgtcc accaacggca ccgcccagg ccaccacc gagatcatcc tgtactacta 1080  
 cgagctgtac cctaccatga ccgtggtggt ggtgtccgtg gccaccttta tctgctgtc 1140  
 catggtcggc atggccgctg gcatgtgcat gtgcgccagg aggcgctgta tcaccacct 1200  
 cgagctgaca cctggcgcca ccgtgccctt tctgctgtcc ctgatctgct gcatecggac 1260  
 cgccaaggcc tga 1273

<210> 6

<211> 786

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV capsid共有序列

&lt;400&gt; 6

atggaattca tccccacca gaccttctac aaccggeget accagcccag accctggacc 60  
cccaggccca ccatccaggt gatccggccc aggcccagac cccagaggca ggccgggcag 120  
ctggcacagc tgatcagcgc cgtgaacaag ctgacatga gagccgtgcc ccagcagaag 180  
cccaggcgga accggaagaa caagaagcag aagcagaaac agcaggcccc ccagaacaac 240  
accaaccaga agaagcagcc cccaagaag aagcctgccc agaagaagaa gaaacccggc 300  
aggcggggagc ggatgtgcat gaagatcgag aacgactgca tcttcgaggt gaagcacgag 360  
ggcaaggtga cgggctacgc ctgcctggtc ggcgacaaag tgatgaagcc cgcccacgtg 420  
aagggcacca tcgacaacgc cgacctggcc aagctggcct tcaagcggag cagcaagtac 480  
gacctggaat gcgcccagat cccctgacac atgaagagcg acgccagcaa gttcaccac 540  
gagaagcccc agggctacta caactggcac cacggagccg tgcagtacag cggcggcagg 600  
ttcaccatcc ccacaggegc cggaaagccc ggcgacagcg gcaggcccat cttegacaac 660  
aagggccggg tgggtggccat cgtgetgggc ggagccaac agggcgcccag gaccgcccctg 720  
agcgtggtga cctggaacaa ggacatcgtg accaagatca cccccgaggg cgccgaagag 780  
tggtga 786

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 457

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CHIKV E1共有序列

&lt;400&gt; 7

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

130	135	140
Ala Ser Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile		
145	150	155
Thr Val Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp		
	165	170
Ala Lys Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp		
	180	185
Asn Lys Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro		
	195	200
Pro Phe Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg		
210	215	220
Thr Pro Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln		
225	230	235
Arg Pro Ala Val Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser		
	245	250
Gly Phe Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr		
	260	265
Ala Pro Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn		
	275	280
Cys Ala Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala		
290	295	300
Phe Thr Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu		
305	310	315
Val Pro Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile		
	325	330
Lys Tyr Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr		
	340	345
Asn Ala Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser		
	355	360
Gln Leu Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg		
370	375	380
Val Gln Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro		
385	390	395
Pro Lys Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly		
	405	410
Val Gln Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr		
	420	425
Gly Gly Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val		
	435	440
		445

Val Leu Cys Val Ser Phe Ser Arg His  
 450 455  
 <210> 8  
 <211> 441  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CHIKV E2共有序列  
 <400> 8  
 Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val  
 1 5 10 15  
 His Ser Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser  
 35 40 45  
 Pro Val Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu  
 50 55 60  
 Lys Ile Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His  
 65 70 75 80  
 Asp Trp Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala  
 85 90 95  
 Glu Arg Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr  
 115 120 125  
 Leu Thr Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr  
 130 135 140  
 His Pro Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His  
 145 150 155 160  
 Ser Arg Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln  
 165 170 175  
 Ser Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp  
 180 185 190  
 Thr Pro Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile  
 195 200 205  
 Thr Val Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser  
 210 215 220  
 Asn Glu Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val  
 225 230 235 240

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

<210> 9

<211> 279

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV衣壳共有序列

<400> 9

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

Arg Pro Arg Pro Gln Arg Gln Ala Gly Gln Leu Ala Gln Leu Ile Ser  
 50 55 60  
 Ala Val Asn Lys Leu Thr Met Arg Ala Val Pro Gln Gln Lys Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Arg Lys Asn Lys Lys Gln Lys Gln Lys Gln Ala Pro Gln  
 85 90 95  
 Asn Asn Thr Asn Gln Lys Lys Gln Pro Pro Lys Lys Lys Pro Ala Gln  
 100 105 110  
 Lys Lys Lys Lys Pro Gly Arg Arg Glu Arg Met Cys Met Lys Ile Glu  
 115 120 125  
 Asn Asp Cys Ile Phe Glu Val Lys His Glu Gly Lys Val Thr Gly Tyr  
 130 135 140  
 Ala Cys Leu Val Gly Asp Lys Val Met Lys Pro Ala His Val Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Ile Asp Asn Ala Asp Leu Ala Lys Leu Ala Phe Lys Arg Ser Ser  
 165 170 175  
 Lys Tyr Asp Leu Glu Cys Ala Gln Ile Pro Val His Met Lys Ser Asp  
 180 185 190  
 Ala Ser Lys Phe Thr His Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Trp His  
 195 200 205  
 His Gly Ala Val Gln Tyr Ser Gly Gly Arg Phe Thr Ile Pro Thr Gly  
 210 215 220  
 Ala Gly Lys Pro Gly Asp Ser Gly Arg Pro Ile Phe Asp Asn Lys Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Val Val Ala Ile Val Leu Gly Gly Ala Asn Glu Gly Ala Arg Thr  
 245 250 255  
 Ala Leu Ser Val Val Thr Trp Asn Lys Asp Ile Val Thr Lys Ile Thr  
 260 265 270  
 Pro Glu Gly Ala Glu Glu Trp  
 275  
 <210> 10  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CHIKV E1共有序列  
 <400> 10  
 Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys  
 1 5 10 15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu  
 20 25 30  
 Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr  
 35 40 45  
 Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly  
 50 55 60  
 Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val  
 65 70 75 80  
 Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu  
 100 105 110  
 Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser  
 115 120 125  
 Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val  
 130 135 140  
 Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys  
 165 170 175  
 Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe  
 180 185 190  
 Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro  
 195 200 205  
 Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro  
 210 215 220  
 Ala Val Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe  
 225 230 235 240  
 Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro  
 245 250 255  
 Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala  
 260 265 270  
 Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr  
 275 280 285  
 Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro  
 290 295 300  
 Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala

	325		330		335
Val Thr Ile Arg	Glu Ala Glu Ile	Glu Val Glu Gly	Asn Ser Gln Leu		
	340		345		350
Gln Ile Ser Phe	Ser Thr Ala Leu	Ala Ser Ala Glu	Phe Arg Val Gln		
	355		360		365
Val Cys Ser Thr	Gln Val His Cys	Ala Ala Glu Cys	His Pro Pro Lys		
	370		375		380
Asp His Ile Val	Asn Tyr Pro Ala	Ser His Thr Thr	Leu Gly Val Gln		
385		390		395	400
Asp Ile Ser Ala	Thr Ala Met Ser	Trp Val Gln Lys	Ile Thr Gly Gly		
	405		410		415
Val Gly Leu Val	Val Ala Val Ala	Ala Leu Ile Leu	Ile Val Val Leu		
	420		425		430
Cys Val Ser Phe	Ser Arg His				
	435				
<210>	11				
<211>	423				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	CHIKV E2共有序列				
<400>	11				
Ser Thr Lys Asp	Asn Phe Asn Val	Tyr Lys Ala Thr	Arg Pro Tyr Leu		
1	5	10	15		
Ala His Cys Pro	Asp Cys Gly Glu	Gly His Ser Cys	His Ser Pro Val		
	20	25	30		
Ala Leu Glu Arg	Ile Arg Asn Glu	Ala Thr Asp Gly	Thr Leu Lys Ile		
	35	40	45		
Gln Val Ser Leu	Gln Ile Gly Ile	Lys Thr Asp Asp	Ser His Asp Trp		
	50	55	60		
Thr Lys Leu Arg	Tyr Met Asp Asn	His Met Pro Ala	Asp Ala Glu Arg		
65	70	75	80		
Ala Gly Leu Phe	Val Arg Thr Ser	Ala Pro Cys Thr	Ile Thr Gly Thr		
	85	90	95		
Met Gly His Phe	Ile Leu Ala Arg	Cys Pro Lys Gly	Glu Thr Leu Thr		
	100	105	110		
Val Gly Phe Thr	Asp Ser Arg Lys	Ile Ser His Ser	Cys Thr His Pro		
	115	120	125		
Phe His His Asp	Pro Pro Val Ile	Gly Arg Glu Lys	Phe His Ser Arg		

130	135	140
Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr		
145	150	155
Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro		
	165	170
Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val		
	180	185
Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu		
	195	200
Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln		
	210	220
Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro		
225	230	235
Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His		
	245	250
Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg		
	260	265
Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr		
	275	280
Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro		
	290	295
Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr		
305	310	315
Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr		
	325	330
Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro		
	340	345
His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val		
	355	360
Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met		
	370	375
Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr		
385	390	395
Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys		
	405	410
Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala		
	420	

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 261

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CHIKV衣壳共有序列  
 <400> 12  
 Met Glu Phe Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Asn Arg Arg Tyr Gln Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Pro Trp Thr Pro Arg Pro Thr Ile Gln Val Ile Arg Pro Arg Pro  
                   20                   25                   30  
 Arg Pro Gln Arg Gln Ala Gly Gln Leu Ala Gln Leu Ile Ser Ala Val  
                   35                   40                   45  
 Asn Lys Leu Thr Met Arg Ala Val Pro Gln Gln Lys Pro Arg Arg Asn  
                   50                   55                   60  
 Arg Lys Asn Lys Lys Gln Lys Gln Lys Gln Gln Ala Pro Gln Asn Asn  
 65                   70                   75                   80  
 Thr Asn Gln Lys Lys Gln Pro Pro Lys Lys Lys Pro Ala Gln Lys Lys  
                   85                   90                   95  
 Lys Lys Pro Gly Arg Arg Glu Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn Asp  
                   100                   105                   110  
 Cys Ile Phe Glu Val Lys His Glu Gly Lys Val Thr Gly Tyr Ala Cys  
                   115                   120                   125  
 Leu Val Gly Asp Lys Val Met Lys Pro Ala His Val Lys Gly Thr Ile  
                   130                   135                   140  
 Asp Asn Ala Asp Leu Ala Lys Leu Ala Phe Lys Arg Ser Ser Lys Tyr  
 145                   150                   155                   160  
 Asp Leu Glu Cys Ala Gln Ile Pro Val His Met Lys Ser Asp Ala Ser  
                   165                   170                   175  
 Lys Phe Thr His Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Trp His His Gly  
                   180                   185                   190  
 Ala Val Gln Tyr Ser Gly Gly Arg Phe Thr Ile Pro Thr Gly Ala Gly  
                   195                   200                   205  
 Lys Pro Gly Asp Ser Gly Arg Pro Ile Phe Asp Asn Lys Gly Arg Val  
                   210                   215                   220  
 Val Ala Ile Val Leu Gly Gly Ala Asn Glu Gly Ala Arg Thr Ala Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Ser Val Val Thr Trp Asn Lys Asp Ile Val Thr Lys Ile Thr Pro Glu  
                   245                   250                   255  
 Gly Ala Glu Glu Trp  
                   260

<210> 13

<211> 3008

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV Env共有序列

<400> 13

```

atggactgga cctggatcct gttcctggtg getgetgcca cccgcgtgca cagcagcctg 60
gccatccccg tgatgtgctt gctggccaac accaccttc cttgcagcca gccccctgc 120
acccccctgct gctacgagaa agagccccgag gaaacctgc ggatgctgga agataacgtg 180
atgaggccccg gctactacca getgetccag gccagcctga cctgetcccc ccaccggcag 240
cggcggcgcg ggcgcaaacg ccgetctgcc accatggact ggacctggat cctgttctct 300
gtcgtgctg ccacaagagt gcacagcagc accaaggaca acttcaactg gtacaaggcc 360
acccggccct acctggcca ctgccccgat tgcggcgagg gccacagctg ccacagcccc 420
gtggccctgg aacggatccg gaacgaggcc accgacggca cctgaagat ccaggtgtcc 480
ctgcagatcg gcatcaagac cgacgacagc cacgactgga ccaagctgcg gtacatggac 540
aaccacatgc ccgccgacgc cgagagagcc ggctgttctg tccggaccag cgccccctgc 600
accatcaccg gcacatggg ccacttcac ctggccccgt gcccccaagg cgagacactg 660
accgtgggct tcaccgacag ccggaagatc agccactcct gcaccaccc ctccaccac 720
gacccccccg tgatcggccg ggagaagttc cacagcaggc cccagcacgg caaagagctg 780
ccctgcagca cctactgca gagcaccgcc gccacaaccg aggaaatcga ggtgcacatg 840
ccccccgata cccccgaccg gaccctgatg agccagcaga gcggcaactg gaagatcacc 900
gtgaacggcc agaccgtgcg gtacaagtgc aactgcggcg gcagcaacga gggcctgacc 960
accaccgaca aggtgatcaa caactgcaag gtggaccagt gccacgccgc cgtgaccaac 1020
cacaagaagt ggcagtacaa cagccccctg gtgccccgga atgccgagct gggcgaccgg 1080
aagggcaaga tccacatccc ctccccctg gccaacgtga cctgccgggt gcccaggcc 1140
cggaacccca ccgtgaccta cggcaagaac caggtgatca tgctgctgta ccccgaccac 1200
cccaccctgc tgcctaccg gaacatgggc gaggaacca actaccaaga ggagtgggtc 1260
atgcacaaga aagaagtggg gctgaccgtc cccaccgagg gcctggaagt gacctggggc 1320
aacaacgagc cttacaagta ctggccccag ctgtccacca acggcaccgc ccacggccac 1380
ccccacgaga tcatectgta ctactacgag ctgtacccta ccatgaccgt ggtggtggtg 1440
tccgtggcca ctttatect getgtccatg gtcggcatgg ccgctggcat gtgcatgtgc 1500
gccaggaggc getgtatcac cccctacgag ctgacacctg gcgccaccgt gccctttctg 1560
ctgtccctga tetgetgcat ccggaccgcc aagccccgcg ggcgcaaacg ccgctctgcc 1620
accatggact ggacctggat cctgtttctg gtcgetgetg ccaccgggt gcacagctac 1680
gagcacgtga ccgtgatecc caacaccgtg ggcgtgcect acaagacct ggtgaacagg 1740
cccggctaca gccccatggg getggaaatg gaactgetgt ccgtgacct ggaaccacc 1800
ctgagcctgg actacatcac ctgcgagtac aagacagtga tccccagccc ctacgtgaag 1860
tgctgcggca ccgccgagtg caaggacaag aacctgcccc actacagctg caaggtgttc 1920

```

accggcgtgt accccttcat gtggggcgga gcctactget tetgcgacgc cgagaacacc 1980  
 cagctgtccg agggccacgt ggagaagagc gagagctgca agaccgagtt cgccagcgcc 2040  
 taccgggccc acacagccag cgccagcgcc aagctgcggg tgctgtacca gggcaacaac 2100  
 atcaccgtga ccgcctacgc caacggcgac cacgccgtga cagtgaagga cgccaagttc 2160  
 atcgtgggcc ccatgagcag cgcctggacc cccttcgaca acaagatcgt ggtgtacaag 2220  
 ggcgacgtgt acaacatgga ctaccccc ttcggagccg gcagaccgg ccagttcggc 2280  
 gacatccaga gccggacccc cgagagcaag gacgtgtacg ccaataccca gctggtgctg 2340  
 cagagaccgg ccgtgggcac cgtgcacgtg cttacagcc aggccccag cggcttcaag 2400  
 tactggctga aagagagggg cgccagcctg cagcacaccg ccccttcgg ctgccagatc 2460  
 gccaccaacc ccgtgcgggc cgtgaattgt gccgtgggca acatgcccac cagcatcgac 2520  
 atccccgagg ccgccttcac cagggtggtg gacgceccca gctgaccga catgagctgc 2580  
 gaggtgcccg cctgcaccca cagcagcgac ttcggcgggc tgccatcat caagtacgcc 2640  
 gccagcaaga aaggcaagtg cgccgtgcac agcatgacca atgccgtgac catccgggag 2700  
 gccgagatcg aggtggaggg caacagccag ctgcagatca gcttcagcac cgccctggcc 2760  
 agcggcgagt tccgggtgca ggtctgcagc acccaggtgc actgtgcccg cgagtgtcac 2820  
 ccccccaagg accacatcgt gaactacccc gccagccaca ccacctggg cgtgcaggac 2880  
 atcagcgcca ccgcatgag ctgggtgcag aagatcacag gcggcgtcgg cctggtggtg 2940  
 gccgtggccg ccctgatcct gatcgtggtg ctgtgcgtga gcttcagccg gactgatga 3000  
 gcggccgc 3008

<210> 14

<211> 998

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV Env共有序列

<400> 14

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

100	105	110
Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu Ala His Cys		
115	120	125
Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val Ala Leu Glu		
130	135	140
Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile Gln Val Ser		
145	150	155
Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp Thr Lys Leu		
165	170	175
Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg Ala Gly Leu		
180	185	190
Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr Met Gly His		
195	200	205
Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr Val Gly Phe		
210	215	220
Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro Phe His His		
225	230	235
Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg Pro Gln His		
245	250	255
Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala Thr		
260	265	270
Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro Asp Arg Thr		
275	280	285
Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val Asn Gly Gln		
290	295	300
Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu Gly Leu Thr		
305	310	315
Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln Cys His Ala		
325	330	335
Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro Leu Val Pro		
340	345	350
Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His Ile Pro Phe		
355	360	365
Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg Asn Pro Thr		
370	375	380
Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr Pro Asp His		
385	390	395
Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro Asn Tyr Gln		
405	410	415

Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr Val Pro Thr  
 420 425 430  
 Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr Lys Tyr Trp  
 435 440 445  
 Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro His Glu Ile  
 450 455 460  
 Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val Val Val Val  
 465 470 475 480  
 Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met Ala Ala Gly  
 485 490 495  
 Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr Glu Leu Thr  
 500 505 510  
 Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys Cys Ile Arg  
 515 520 525  
 Thr Ala Lys Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Ala Thr Met Asp Trp  
 530 535 540  
 Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Tyr  
 545 550 555 560  
 Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr  
 565 570 575  
 Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu  
 580 585 590  
 Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys  
 595 600 605  
 Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr  
 610 615 620  
 Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe  
 625 630 635 640  
 Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp  
 645 650 655  
 Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser  
 660 665 670  
 Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala  
 675 680 685  
 Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr  
 690 695 700  
 Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe  
 705 710 715 720  
 Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile

	725		730		735
Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly					
	740		745		750
Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu					
	755		760		765
Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala					
	770		775		780
Val Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys					
785		790		795	800
Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe					
	805		810		815
Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val					
	820		825		830
Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg					
	835		840		845
Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro Ala					
	850		855		860
Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr Ala					
865		870		875	880
Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala Val					
	885		890		895
Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu Gln					
	900		905		910
Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln Val					
	915		920		925
Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys Asp					
	930		935		940
His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp					
945		950		955	960
Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly Val					
	965		970		975
Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu Cys					
	980		985		990
Val Ser Phe Ser Arg His					
	995				

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 2954

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CHIKV Env共有序列

&lt;400&gt; 15

```

agcctggcca tccccgtgat gtgcctgctg gccaacacca ccttccttg cagccagccc 60
ccctgcaccc cctgctgcta cgagaaagag cccgaggaaa ccctgcggat gctggaagat 120
aacgtgatga ggcccggcta ctaccagctg ctccaggcca gcctgacctg ctccccccac 180
cggcagcggc ggcgcgggcg caaacgccgc tctgccacca tggactggac ctggatcctg 240
ttcctggctg ctgctgccac aagagtgcac agcagacca aggacaactt caacgtgtac 300
aagcccaccc ggccctacct ggcccactgc cccgattgcg gcgaggcca cagctgccac 360
agccccgtgg ccctggaacg gatccggaac gaggccaccg acggcaccct gaagatccag 420
gtgtccctgc agatcggcat caagaccgac gacagccacg actggacca gctgcggtac 480
atggacaacc acatgcccgc cgacgccgag agagccggcc tgttcgtccg gaccagcgc 540
ccctgcacca tcaccggcac catgggccac ttatecttg cccggtgcc caagggcgag 600
aactgaccg tgggttcac cgacagccgg aagatcagcc actcctgcac ccacccttc 660
caccacgacc cccccgtgat cggccgggag aagtccaca gcaggccca gcacggcaa 720
gagctgccct gcagcaccta cgtgcagagc accgcccca caaccgagga aatcgaggtg 780
cacatgcccc ccgatacccc cgaccggacc ctgatgagcc agcagagcgg caacgtgaag 840
atcacctga acggccagac cgtgcggtac aagtgcaact gcggcggcag caacgagggc 900
ctgaccacca ccgacaaggt gatcaacaac tgcaaggtgg accagtcca cgcgccctg 960
accaaccaca agaagtggca gtacaacagc ccctggtgc cccggaatgc cgagctgggc 1020
gaccggaagg gcaagatcca catcccttc ccctggcca acgtgacctg ccgggtgcc 1080
aaggcccgga accccaccgt gacctacggc aagaaccagg tgateatgct gctgtacccc 1140
gaccaccca ccctgctgtc ctaccggaac atgggcgagg aaccaacta ccaagaggag 1200
tgggtcatgc acaagaaaga agtgggtgct accgtccca ccgaggcct ggaagtgacc 1260
tggggcaaca acgagcccta caagtactgg cccagctgt ccaccaacgg caccgcccac 1320
ggccaccccc acgagatcat cctgtactac tacgagctgt accctacat gaccgtggtg 1380
gtggtgtccg tggccacctt tatcctgctg tcatggtcg gcatggccgc tggcatgtgc 1440
atgtgcgcca ggaggcgtg tatcaccctc tacgagctga cacctggcgc caccgtgccc 1500
tttctgctgt ccctgatctg ctgcatccgg accgccaagg cccgcgggcg caaacgccgc 1560
tctgccacca tggactggac ctggatcctg tttctggtg ctgctgccac ccgggtgcac 1620
agctacgagc acgtgaccgt gatecccaac accgtgggcg tgcctaca gaccctggtg 1680
aacaggcccc gctacagccc catggtgctg gaaatggaac tgctgtccgt gaccctggaa 1740
cccaccctga gcctggacta catcactgc gagtacaaga cagtgatecc cageccctac 1800
gtgaagtgtc gcggcaccgc cgagtgaag gacaagaacc tgcccacta cagctgcaag 1860
gtgttcaccg gcgtgtaccc ctcatgtgg ggcggagcct actgcttctg cgacgccgag 1920
aacaccagc tgtccgagge ccacgtggag aagagcgaga gctgcaagac cgagttegcc 1980
agcgcctacc gggcccacac agccagcgc agcgcgaagc tgcgggtgct gtaccagggc 2040
aacaacatca ccgtgaccgc ctacgccaac ggcgaccag ccgtgacagt gaaggacgcc 2100
aagtcatcg tgggcccac gagcagcgc tggacccct tcgacaaca gatcgtggtg 2160

```

tacaagggcg acgtgtacaa catggactac cccccctteg gagccgagcag acccggccag 2220  
 ttcggcgaca tccagagccg gacccccgag agcaaggacg tgtacgcaa taccagctg 2280  
 gtgctgcaga gaccgcccgt gggcacctg cacgtgcett acagccaggc cccagcggc 2340  
 ttcaagtact ggctgaaaga gaggggcgcc agcctgcagc acaccgcccc cttcggtgc 2400  
 cagatcgcca ccaaccccgt gcgggcccgt aattgtgccg tgggcaacat gcccatcagc 2460  
 atcgacatcc ccgaggccgc cttcaccagg gtggtggacg cccccagcct gaccgacatg 2520  
 agctgcgagg tgcccgcctg caccacagc agcgacttcg gcggcgtggc catcatcaag 2580  
 tacgccgcca gcaagaaaagg caagtgcgcc gtgcacagca tgaccaatgc cgtgaccatc 2640  
 cgggaggccg agatcgaggt ggagggcaac agccagctgc agatcagctt cagcaccgcc 2700  
 ctggccagcg ccgagttccg ggtgcaggtc tgcagaccc aggtgactg tgccgccgag 2760  
 tgtcaccccc ccaaggacca catcgtgaac taccgccca gccacaccac cctgggctg 2820  
 caggacatca gcgccaccgc catgagctgg gtgcagaaga tcacaggcgg cgtcggcctg 2880  
 gtggtggccg tgcccgcct gatcctgate gtggtgctgt gcgtgagctt cagccggcac 2940  
 tgatgagcgg ccgc 2954

<210> 16

<211> 980

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CHIKV Env共有序列

<400> 16

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

Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp Thr Lys Leu Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg Ala Gly Leu Phe Val  
 165 170 175  
 Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr Met Gly His Phe Ile  
 180 185 190  
 Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr Val Gly Phe Thr Asp  
 195 200 205  
 Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro Phe His His Asp Pro  
 210 215 220  
 Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg Pro Gln His Gly Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala Thr Thr Glu  
 245 250 255  
 Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro Asp Arg Thr Leu Met  
 260 265 270  
 Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val Asn Gly Gln Thr Val  
 275 280 285  
 Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu Gly Leu Thr Thr Thr  
 290 295 300  
 Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln Cys His Ala Ala Val  
 305 310 315 320  
 Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro Leu Val Pro Arg Asn  
 325 330 335  
 Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His Ile Pro Phe Pro Leu  
 340 345 350  
 Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg Asn Pro Thr Val Thr  
 355 360 365  
 Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr Pro Asp His Pro Thr  
 370 375 380  
 Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro Asn Tyr Gln Glu Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr Val Pro Thr Glu Gly  
 405 410 415  
 Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr Lys Tyr Trp Pro Gln  
 420 425 430  
 Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro His Glu Ile Ile Leu  
 435 440 445  
 Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val Val Val Val Ser Val

450	455	460
Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met Ala Ala Gly Met Cys		
465	470	475
Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr Glu Leu Thr Pro Gly		
	485	490
Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys Cys Ile Arg Thr Ala		
	500	505
Lys Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Ala Thr Met Asp Trp Thr Trp		
	515	520
Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Tyr Glu His		
	530	535
Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr Leu Val		
545	550	555
Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu Leu Ser		
	565	570
Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Glu Tyr		
	580	585
Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr Ala Glu		
	595	600
Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe Thr Gly		
	610	615
Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Ala Glu		
625	630	635
Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Lys		
	645	650
Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala Ser Ala		
	660	665
Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr Ala Tyr		
	675	680
Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe Ile Val		
	690	695
Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile Val Val		
705	710	715
Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly Ala Gly		
	725	730
Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu Ser Lys		
	740	745
Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala Val Gly		
	755	760
		765

Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys Tyr Trp  
 770 775 780  
 Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe Gly Cys  
 785 790 795 800  
 Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val Gly Asn  
 805 810 815  
 Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg Val Val  
 820 825 830  
 Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro Ala Cys Thr  
 835 840 845  
 His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr Ala Ala Ser  
 850 855 860  
 Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala Val Thr Ile  
 865 870 875 880  
 Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu Gln Ile Ser  
 885 890 895  
 Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln Val Cys Ser  
 900 905 910  
 Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys Asp His Ile  
 915 920 925  
 Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp Ile Ser  
 930 935 940  
 Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly Val Gly Leu  
 945 950 955 960  
 Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu Cys Val Ser  
 965 970 975

Phe Ser Arg His  
 980

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val  
 1 5 10 15

His Ser

<210> 18

<211> 9

<212> PRT



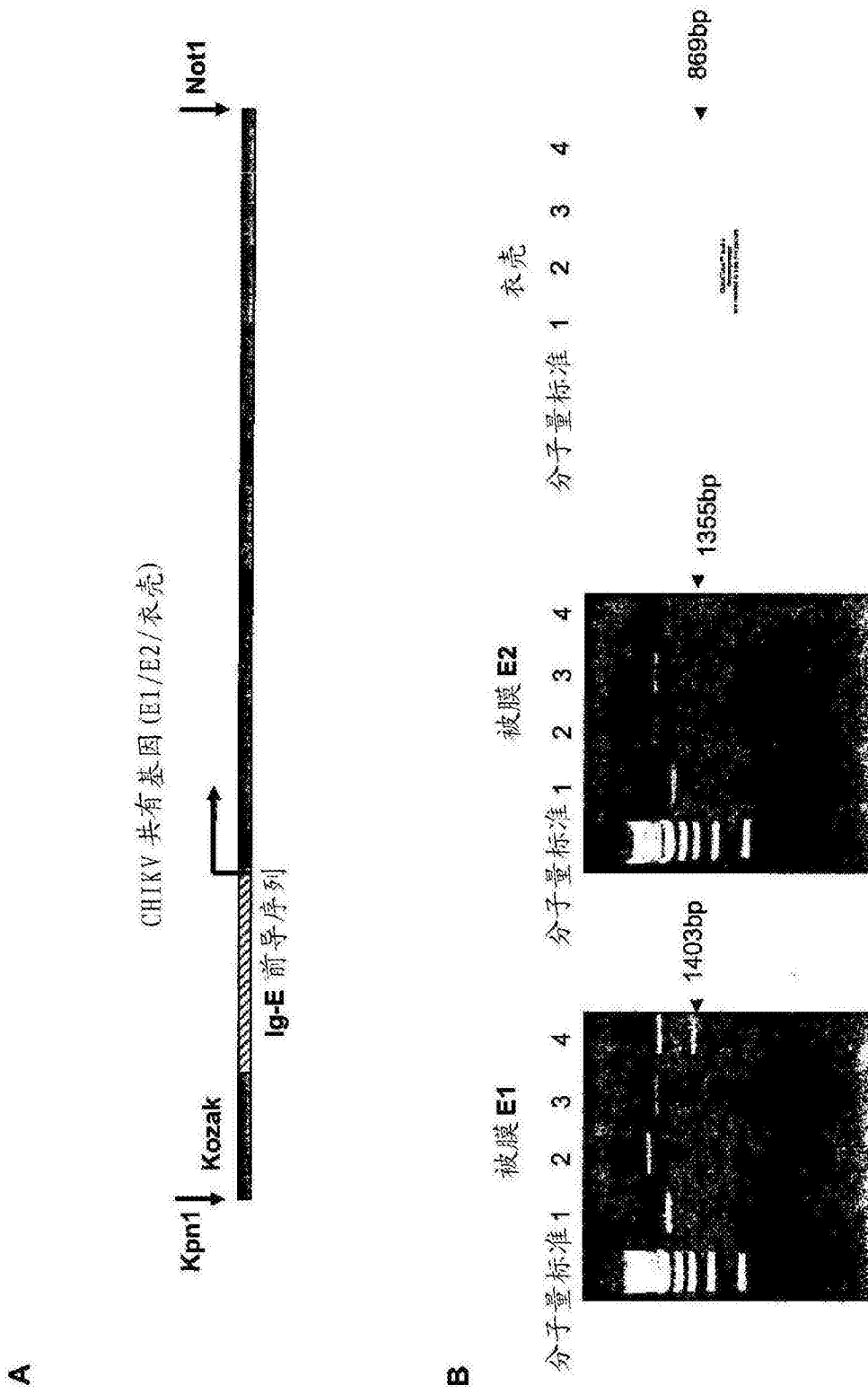


图1

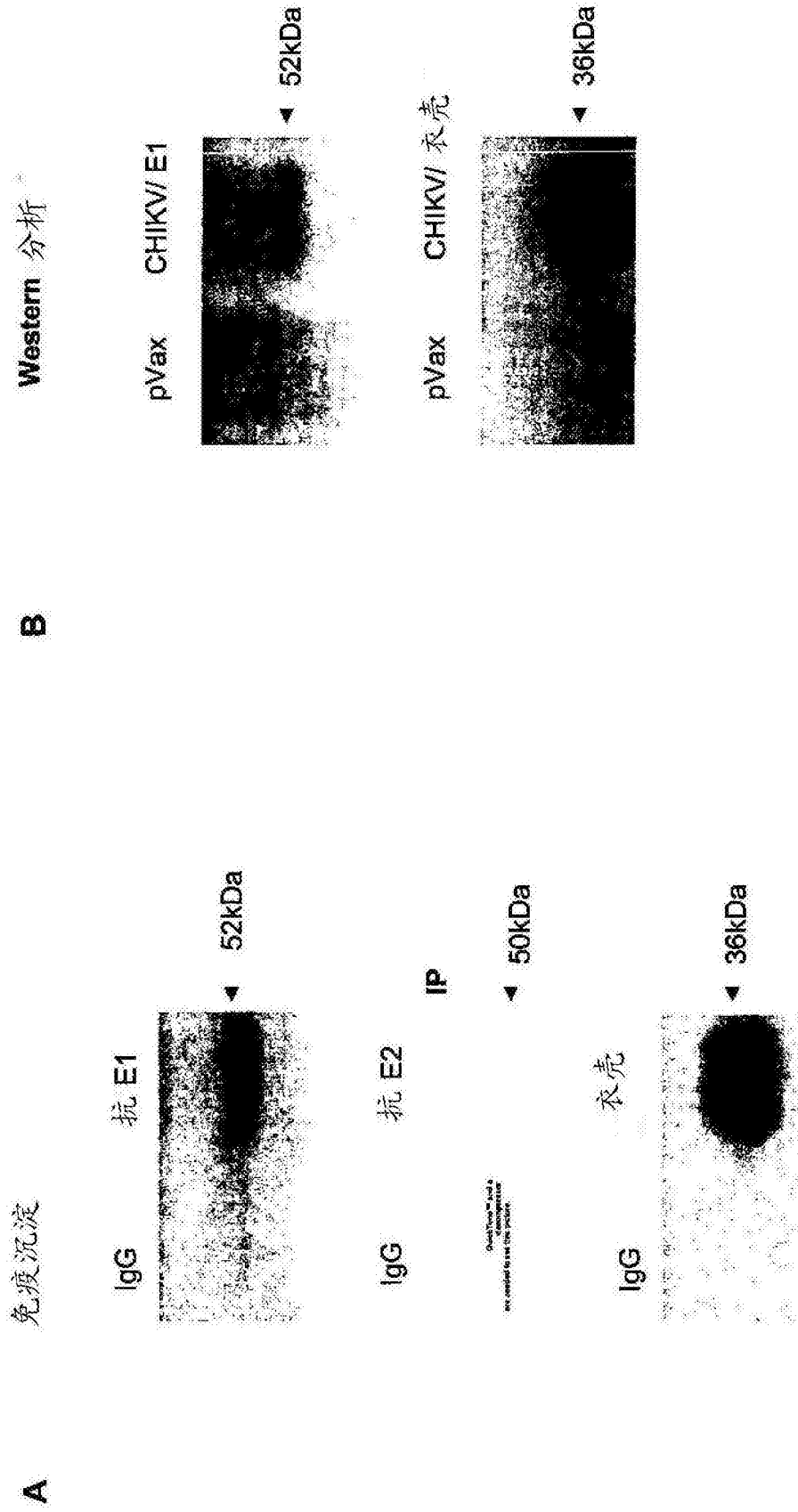


图2

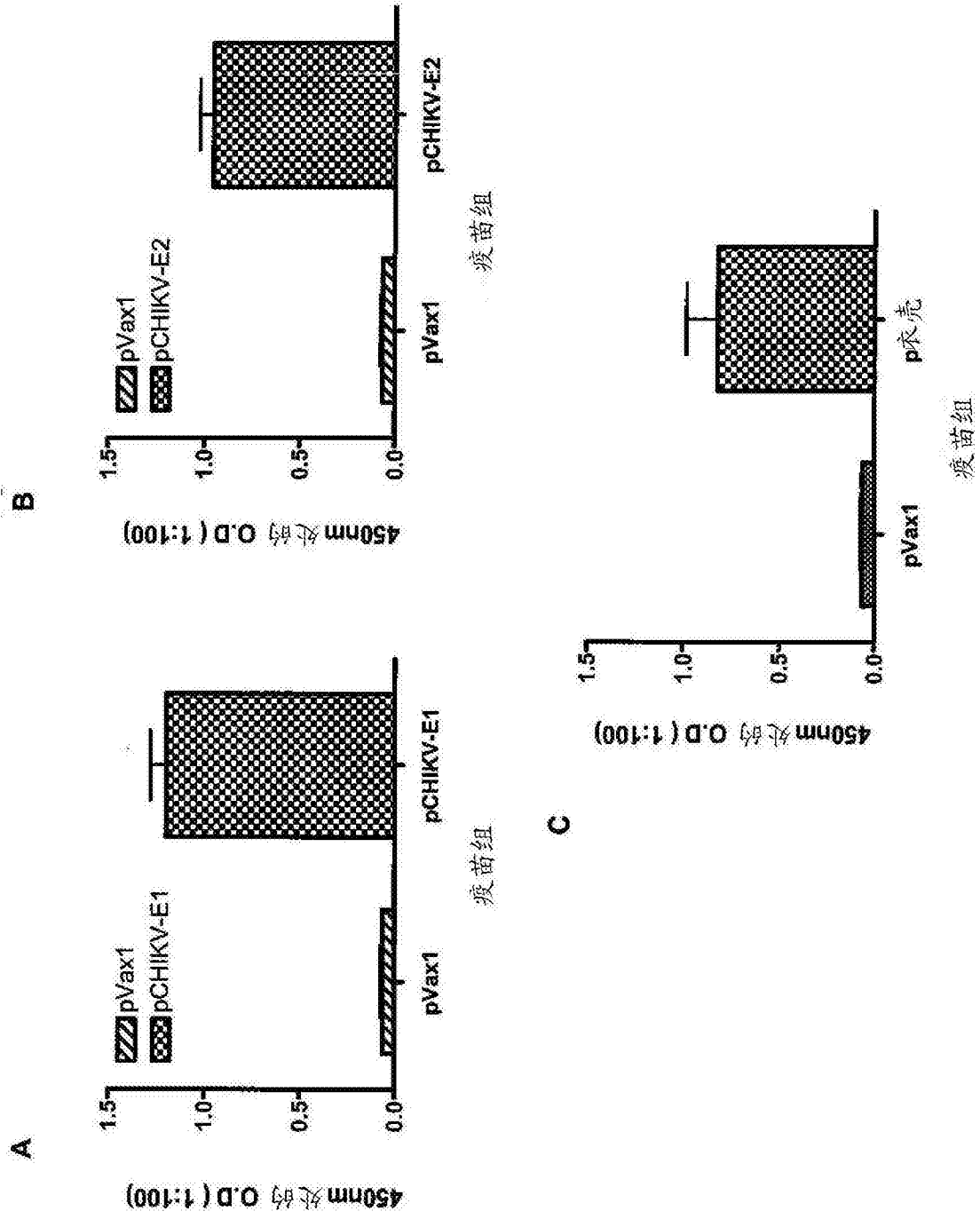


图3

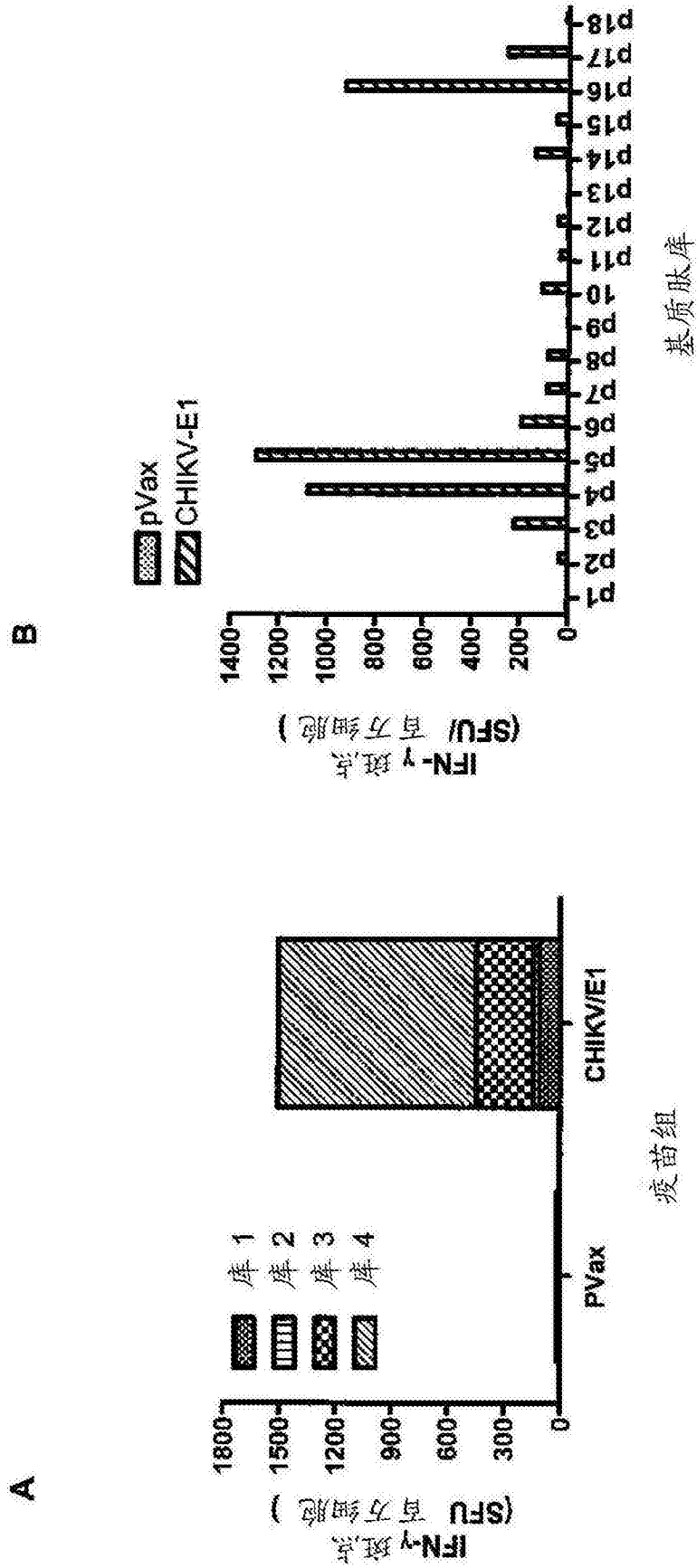


图4

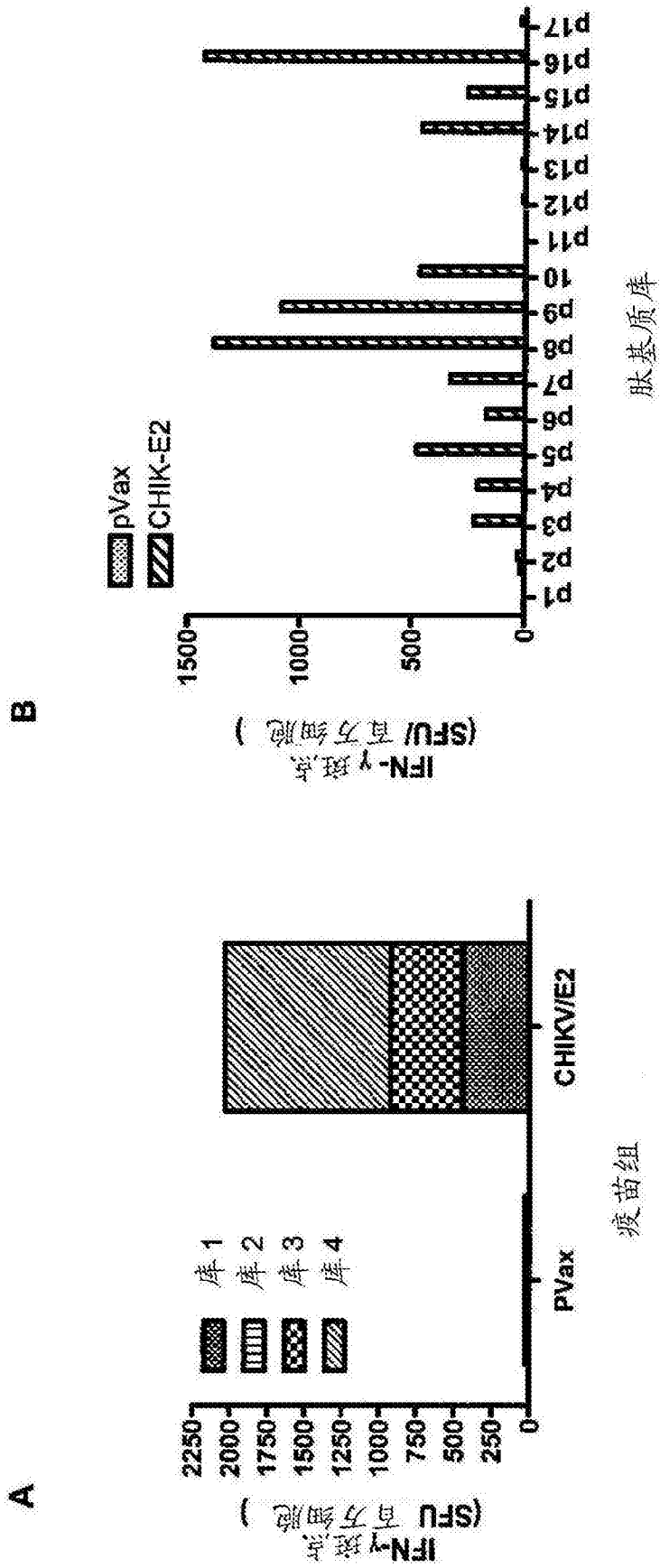


图5

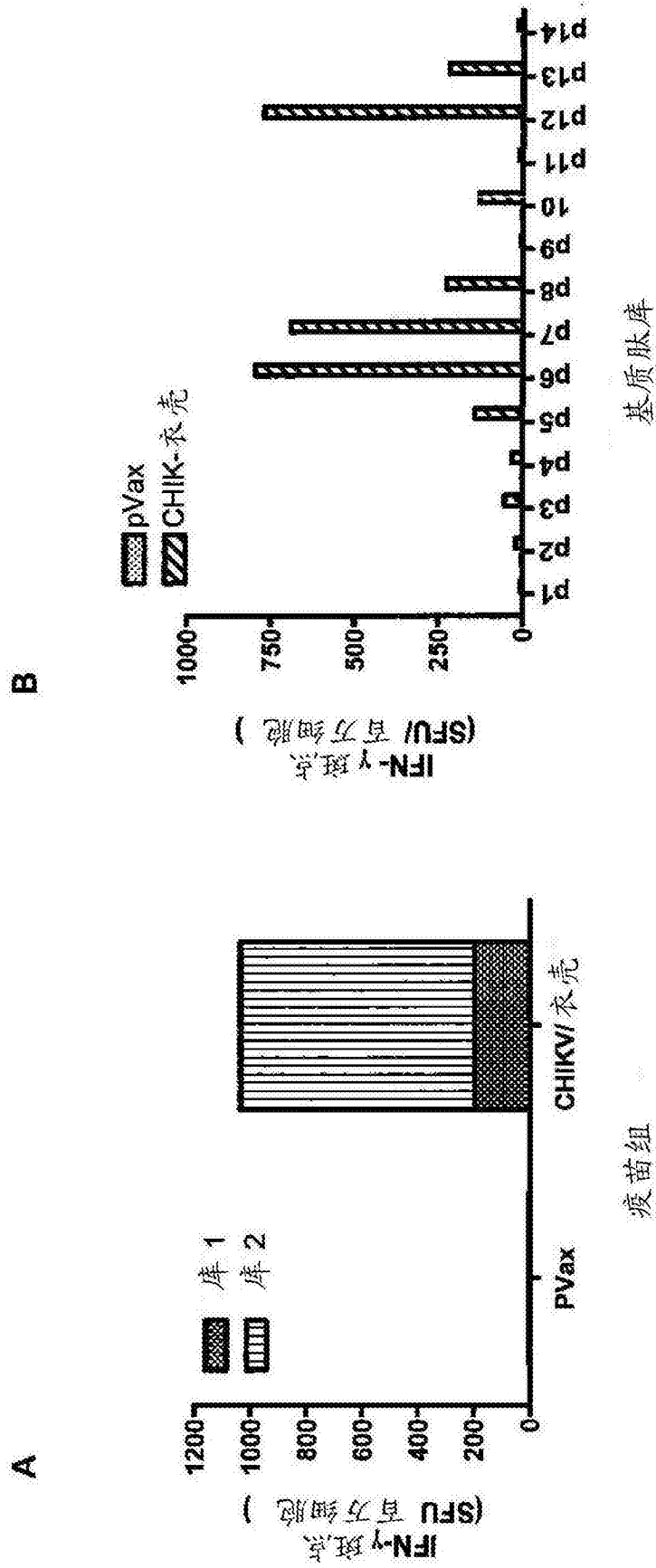


图9

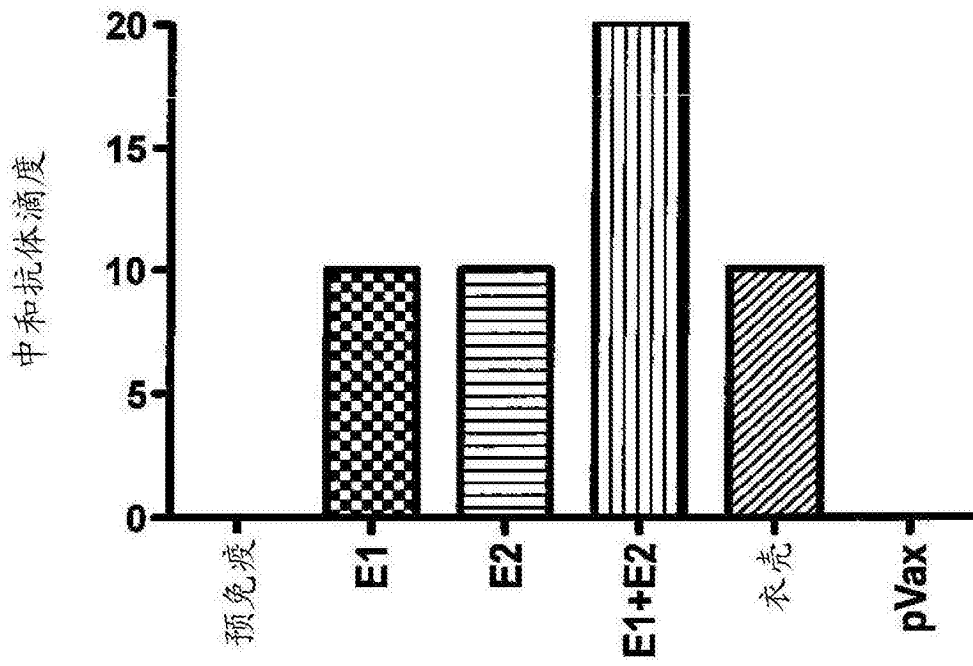


图7