(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111511395 B
(45)授权公告日 2024.10.15

(21)申请号 201880070383.6
(22)申请日 2018.11.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111511395 A
(43)申请公布日 2020.08.07
(30)优先权数据
62/581,500 2017.11.03 US
62/592,995 2017.11.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/059227 2018.11.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/090233 EN 2019.05.09
(73)专利权人 武田疫苗股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 J.A.利文古德 H.吉布勒 H.迪安 T.佐藤 R.拉奥 J.马克斯 M.里昂 A.新谷 J.吉福德
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 刘国军 邹宗亮
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017009873 A1,2017.01.19
WO 2017109225 A1,2017.06.29
Yun,S.-I等.Zika virus strain PRVABC-59, complete genome.GenBank.2016,第1-4页.
Mugdha Tiwari等.Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus.Vaccine.2009,第27卷第2517页左栏第2段.
审查员 董旭婷

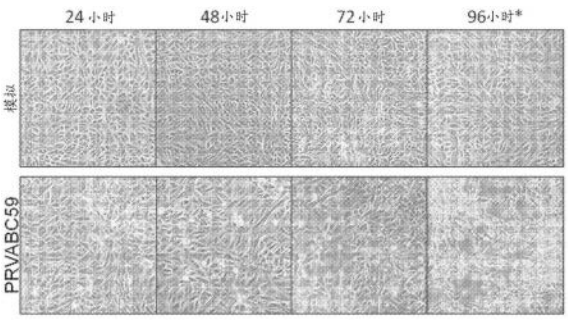
权利要求书2页 说明书55页
序列表12页 附图29页

(54)发明名称

用于将寨卡病毒灭活和用于确定灭活完全性的方法

(57)摘要

本公开涉及用于将寨卡病毒灭活的方法,所述寨卡病毒可用于疫苗和免疫原性组合物中。本公开还涉及一种用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法。



CN 111511395 B

1.一种用于将寨卡病毒制剂灭活的方法,所述方法包括:

(a) 从一个或多个体外培养的细胞分离所述寨卡病毒制剂,其中所述细胞用于产生所述寨卡病毒制剂;

(b) 在18°C至25°C的温度下将所述寨卡病毒制剂用0.008%至0.015% w/v的甲醛处理九至十一天;

(c) 确定灭活的完全性,其中步骤(c)包括:

(i) 将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的寨卡病毒制剂接种并将所述昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生昆虫细胞上清液;

(ii) 将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的所述昆虫细胞上清液接种并将所述哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

(iii) 确定所述寨卡病毒制剂是否含有对所述哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述体外培养的细胞为非人细胞。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中将所述寨卡病毒制剂用0.01% w/v的甲醛处理。

4.如权利要求1或2所述的方法,其中将所述寨卡病毒制剂处理十天。

5.如权利要求1或2所述的方法,其中在20℃至25℃的温度下处理所述寨卡病毒制剂。

6.如权利要求5所述的方法,其中在22℃的温度下处理所述寨卡病毒制剂。

7.如权利要求1或2所述的方法,其中所述昆虫细胞选自CCL-125细胞、Aag-2细胞、RML-12细胞、C6/36细胞、C7-10细胞、AP-61细胞、A.t. GRIP-1细胞、A.t. GRIP-2细胞、A.t. GRIP-3细胞、UM-AVE1细胞、Mos.55细胞、Sua1B细胞、4a-3B细胞、Mos.42细胞、MSQ43细胞、LSB-AA695BB细胞、NIID-CTR细胞和TRA-171细胞。

8.如权利要求1或2所述的方法,其中所述第一段时间为3至7天。

9.如权利要求1或2所述的方法,其中所述哺乳动物细胞选自VERO细胞、LLC-MK2细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。

10.如权利要求1或2所述的方法,其中所述哺乳动物细胞选自ATCC CCL34 MDCK(NBL2)细胞和MDCK 33016细胞。

11.如权利要求1或2所述的方法,其中所述第二段时间为3至14天。

12.如权利要求1或2所述的方法,所述方法还包括步骤(d)将经过甲醛处理的寨卡病毒制剂用焦亚硫酸钠中和。

13.如权利要求12所述的方法,所述方法还包括步骤(e)制备包含灭活寨卡病毒制剂的药物组合物。

14.如权利要求13所述的方法,其中将所述寨卡病毒制剂与佐剂混合。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述佐剂选自由以下组成的组:toll样受体(TLR)激动剂、乳液和微粒。

16.如权利要求14所述的方法,其中所述佐剂选自由以下组成的组:铝盐、单磷脂酰脂质A (MLA)、合成脂质A、脂质A模拟物或类似物、MLA衍生物、细胞因子、皂角苷、胞壁酰二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)、聚磷腈、病毒颗粒、脂质卷、聚(丙交酯-共-乙交酯) (PLG)微粒、泊洛沙姆颗粒、脂质体、完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。

17.如权利要求14所述的方法,其中所述佐剂为铝盐。

18.如权利要求17所述的方法,其中所述铝盐为磷酸铝、氢氧化铝、硫酸铝钾或Alhydrogel 85。

19.如权利要求14-18中任一项所述的方法,其中所述寨卡病毒制剂中的一种或多种抗原的至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%吸附至所述佐剂。

用于将寨卡病毒灭活和用于确定灭活完全性的方法

[0001] 关于联邦政府发起的研究的声明

[0002] 本发明是在政府支持下根据与美国卫生与人类服务部(the Department of Health and Human Services)、备灾及应变助理秘书长办公室(Office of the Assistant Secretary for Preparedness and Response)、美国生物医学高级研究与开发局(Biomedical Advanced Research and Development Authority)的合同号HHSO100201600015C作出的。本发明是在与美国疾病控制与预防中心(the Centers for Disease Control and Prevention,美国卫生与人类服务部的一个机构)的合作研究和开发协议的执行中建立的。美国政府在本发明中具有一定的权利。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于将可用于疫苗和免疫原性组合物中的寨卡病毒(Zika virus)灭活的方法。本公开还涉及一种用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法。

背景技术

[0004] 寨卡病毒係黄病毒科(Flaviviridae)内与其它蚊媒病毒(例如黄热病病毒、登革热病毒(dengue)、西尼罗河病毒(West Nile)和日本脑炎病毒)一起分类的黄病毒(flavivirus),自从这种病毒在2013年被引入巴西以来,它迅速传播,成为一种半球流行病。这种病毒已经到达了中美洲和北美洲,包括美国领土,因此现在正威胁着美国大陆。实际上,从来自一个曾在2015年到过波多黎各(Puerto Rico)旅行的人的血清中分离出寨卡病毒株PRVABC59。已经对这种病毒株的基因组测序至少三次(参见Lanciotti等人Emerg.Infect.Dis.2016年5月;22(5):933-5和GenBank登录号KU501215.1;GenBank登录号KX087101.3;以及Yun等人Genome Announc.2016年8月18日;4(4)和GenBank登录号ANK57897.1)。

[0005] 这种病毒最初是在1947年在乌干达(Uganda)分离,1952年首次与人类疾病相关联,并且在非洲和东南亚已经零星地被公认为是轻度自限性发热性疾病的病因(Weaver等人(2016)Antiviral Res.130:69-80;Faria等人(2016)Science.352(6283):345-349)。然而,2007年,在北太平洋雅浦岛(the North Pacific island of Yap)出现一次爆发,然后跨越太平洋在岛屿之间传播,引起了2013-2014年法属玻利尼西亚(French Polynesia)的大范围爆发,然后传播至新喀里多尼亚(New Caledonia)、库克群岛(Cook Islands),最终传播至复活节岛(Easter Island)。随后亚洲谱系病毒通过尚不确定的途径转移至西半球(Faria等人(2016)Science.352(6283):345-349)。病毒在动物学上可通过埃及伊蚊(Aedes aegypti)、白纹伊蚊(A.albopictus)以及可能通过赫斯里伊蚊(A.hensilli)和波利尼西亚伊蚊(A.polynieseinsis)传播(Weaver等人(2016)Antiviral Res.130:69-80)。另外,认为可能存在其它的病毒传播载体,并且病毒可通过输血、经胎盘和/或通过性传播来传播。

[0006] 2015年底,在广泛的寨卡病毒感染区域,胎儿异常(例如小头畸形)和吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome,GBS)显著增加,警示寨卡病毒可能比最初想得更加致命,

这促使世界卫生组织(the World Health Organization,WHO)宣布其为国际关注的突发公共卫生事件(Public Health Emergency of International Concern,PHEIC)(Heymann等人(2016)Lancet 387(10020):719-21)。虽然寨卡病毒对公共卫生造成相当大的威胁,但是当前没有获得FDA批准的疫苗或治疗,并且用于控制寨卡病毒的唯一预防措施涉及对蚊子群体进行管理。

[0007] 近来为了努力表征重组寨卡病毒以研发出潜在疫苗,鉴定出一种非人细胞适应的寨卡病毒,它在病毒包膜蛋白中位置330处具有突变(Weger-Lucarelli等人2017.Journal of Virology)。该研究的作者发现寨卡病毒株PRVABC59的全长感染性cDNA克隆当在克隆期间扩增时在遗传上不稳定,并且选择使病毒基因组分裂以阐明所观察到的不稳定性,研发并应用双质粒系统。然而,用于研发寨卡疫苗的双质粒系统不太合乎需要。

发明内容

[0008] 因此,需要研发出利用遗传稳定的寨卡病毒治疗和/或预防寨卡病毒感染的疫苗和免疫原性组合物。疫苗研发的一个选择是将全病毒灭活并使用该灭活的全病毒对受试者接种疫苗。然而,在研发灭活病毒疫苗的过程中,关键的安全保证是确信药品或原料药中没有感染性病毒。研发出一种有效的灭活工艺和灵敏的分析法来测量和确定感染性病毒体是否仍然存在对于研发来源于任何野生型病毒但无疑具有可能引起胎儿异常的致病性/脑炎病毒的纯化的灭活病毒来说是一个关键的安全方面。

[0009] 本公开至少部分地基于以下令人以外的发现:在室温下将低浓度甲醛相对短暂地施加于病毒,可有效地将寨卡病毒灭活。另外,研发出一种测定法,所述测定法允许高灵敏度地确定感染性病毒体在灭活后是否仍然存在。

[0010] 因此,本公开的某些方面涉及一种用于将寨卡病毒制剂灭活的方法,所述方法包括:

[0011] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离所述寨卡病毒制剂,其中所述细胞用于产生所述寨卡病毒制剂;以及

[0012] (b)将所述寨卡病毒制剂用0.005%至0.02%w/v的甲醛处理。

[0013] 在一些实施方案中,细胞为非人细胞。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用0.01%的甲醛处理。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂处理八至十二天,例如十天。在一些实施方案中,在15℃至30℃的温度下,例如在22℃的温度下处理寨卡病毒制剂。

[0014] 所述方法还可包括步骤(c)确定灭活完全性。在一些实施方案中,步骤(c)包括:

[0015] (i)将培养的昆虫细胞用经过0.005%至0.02%w/v的甲醛处理的寨卡病毒制剂接种并将所述昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生昆虫细胞上清液;

[0016] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的昆虫细胞上清液接种并将所述哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0017] (iii)确定所述寨卡病毒制剂是否含有对所述哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0018] 在一些实施方案中,昆虫细胞选自CCL-125细胞、Aag-2细胞、RML-12细胞、C6/36细胞、C7-10细胞、AP-61细胞、A.t.GRIP-1细胞、A.t.GRIP-2细胞、A.t.GRIP-3细胞、UM-AVE1细胞、Mos.55细胞、Sua1B细胞、4a-3B细胞、Mos.42细胞、MSQ43细胞、LSB-AA695BB细胞、NIID-

CTR细胞和TRA-171细胞,例如C6/36细胞。

[0019] 在一些实施方案中,第一段时间为3至7天。

[0020] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞选自VERO细胞、LLC-MK2细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)细胞、MDCK 33016(如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞),例如VERO细胞。

[0021] 在一些实施方案中,第二段时间为3至14天。

[0022] 所述方法还可包括步骤(d)将经过甲醛处理的寨卡病毒制剂用焦亚硫酸钠中和,例如在甲醛处理后至少五天、至少七天、至少九天、至少11天或至少14天时将经过甲醛处理的寨卡病毒制剂中和。

[0023] 所述方法还可包括步骤(e)制备包含灭活寨卡病毒的药物组合物。

[0024] 在一些实施方案中,将经过处理的寨卡病毒制剂与佐剂混合。佐剂可选自由以下组成的组:铝盐、toll样受体(TLR)激动剂、单磷脂酰脂质A(MLA)、合成脂质A、脂质A模拟物或类似物、MLA衍生物、细胞因子、皂角苷、胞壁酰二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)、聚磷腈、乳液、病毒颗粒、脂质卷、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆颗粒(poloxamer particle)、微粒、脂质体、完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant,CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。

[0025] 在一些实施方案中,佐剂为铝盐,例如磷酸铝、氢氧化铝、硫酸铝钾和Alhydrogel 85。

[0026] 在一些实施方案中,经过处理的病毒制剂中的一种或多种抗原的至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%吸附至佐剂。

[0027] 在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含突变,例如SEQ ID NO:1中的Trp98Gly突变。

[0028] 在一些实施方案中,寨卡病毒在包膜蛋白(E)中不包含突变。在一些实施方案中,编码包膜蛋白的序列与SEQ ID NO:2中的对应序列相同。

[0029] 本公开的一些方面涉及一种药物组合物,所述药物组合物包含能通过任一种本文公开的方法获得的灭活寨卡病毒。

[0030] 本公开的一些方面涉及一种药物组合物,所述药物组合物包含灭活寨卡病毒并且具有小于0.5μg/ml的残余福尔马林(formalin)含量。在一些实施方案中,药物组合物能通过任一种本文公开的方法获得。

[0031] 本公开的一些方面涉及一种用于确定包含灭活病毒的药物组合物中的残余福尔马林含量的方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] (a)提供包含已经用甲醛处理过的病毒的药物组合物;

[0033] (b)将(a)的药物组合物与磷酸和2,4-二硝基苯肼(DNPH)混合,由此提供混合物;

[0034] (c)将(b)的混合物在适合条件下孵育;以及

[0035] (d)分析混合物中残余福尔马林的存在。

[0036] 在一些实施方案中,药物组合物含有佐剂。在一些实施方案中,药物组合物含有氢氧化铝作为佐剂。在一些实施方案中,药物组合物含有0.1mg/ml至1.0mg/ml氢氧化铝作为佐剂。在一些实施方案中,药物组合物含有0.4mg/ml氢氧化铝作为佐剂。

[0037] 在一些实施方案中,将1ml体积的(a)的药物组合物与20μl 15至25%(v/v)磷酸和

50μl 0.9至1.1mg/ml DNPH混合。在一些实施方案中,将1ml体积的(a)的药物组合物与20μl 20％(v/v)磷酸和50μl1.0mg/ml DNPH混合。

[0038] 在一些实施方案中,将(a)的药物组合物与磷酸和2,4-二硝基苯肼(DNPH)的混合物在室温下孵育。在一些实施方案中,将(a)的药物组合物与磷酸和2,4-二硝基苯肼(DNPH)的混合物孵育10至30分钟。在一些实施方案中,将(a)的药物组合物与磷酸和2,4-二硝基苯肼(DNPH)的混合物在室温下孵育20分钟。

[0039] 在一些实施方案中,通过HPLC分析(a)的药物组合物与磷酸和2,4-二硝基苯肼(DNPH)的混合物。在一些实施方案中,HPLC为反相HPLC。在一些实施方案中,水与乙腈(1:1,v/v)的混合物用作HPLC中的流动相。在一些实施方案中,检测波长为360nm。

[0040] 在一些实施方案中,病毒为灭活寨卡病毒。在一些实施方案中,已经将灭活寨卡病毒在22℃下用0.01％(w/v)甲醛处理10天。在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含突变,例如SEQ ID NO:1中的Trp98Gly突变。

[0041] 本公开的一些方面涉及一种用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0042] (i)将培养的昆虫细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生昆虫细胞上清液;

[0043] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的昆虫细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0044] (iii)确定所述虫媒病毒制剂是否含有对所述哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0045] 在一些实施方案中,虫媒病毒为黄病毒或甲病毒。在一些实施方案中,虫媒病毒为寨卡病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、日本脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒、登革热病毒(dengue virus)、圣路易斯脑炎病毒(St.Louis Encephalitis virus)、基孔肯雅病毒(Chikungunya virus)、阿尼昂尼昂病毒(O'nyong'nyong virus)或马雅鲁病毒(Mayarovirus)。

[0046] 在一些实施方案中,所述虫媒病毒制剂经历了用洗涤剂、福尔马林、过氧化氢、β-丙内酯(BPL)、二乙胺(BEI)、乙酰基亚乙基亚胺、亚甲基蓝或补骨脂素灭活的步骤。

[0047] 在一些实施方案中,昆虫细胞选自CCL-125细胞、Aag-2细胞、RML-12细胞、C6/36细胞、C7-10细胞、AP-61细胞、A.t.GRIP-1细胞、A.t.GRIP-2细胞、A.t.GRIP-3细胞、UM-AVE1细胞、Mos.55细胞、Sua1B细胞、4a-3B细胞、Mos.42细胞、MSQ43细胞、LSB-AA695BB细胞、NIID-CTR细胞和TRA-171细胞,例如C6/36细胞。

[0048] 在一些实施方案中,第一段时间为3至7天。

[0049] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞选自VERO细胞、LLC-MK2细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)细胞、MDCK 33016(如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞),例如VERO细胞。

[0050] 在一些实施方案中,第二段时间为3至14天。

[0051] 在一些实施方案中,所述方法能够检测小于1.0TCID50的虫媒病毒。

附图说明

[0052] 图1展示了模拟感染(顶部)或感染ZIKAV病毒株PRVABC59(底部)的Vero细胞单层的明视场显微图像。

[0053] 图2展示了如通过$TCID_{50}$所确定的ZIKAV PRVABC59 P1在Vero细胞单层上的生长动力学。

[0054] 图3展示了寨卡病毒PRVABC59 P5克隆a-f的效力测定测试($TCID_{50}$)。

[0055] 图4展示了描绘寨卡病毒PRVABC59 P6克隆a-f在Vero细胞单层上的生长的致细胞病变作用(CPE)的明视场显微图像。

[0056] 图5展示了寨卡病毒PRVABC59 P6克隆a-f的效力测定测试($TCID_{50}$)。

[0057] 图6展示了一种氨基酸序列比对,其比较来自寨卡病毒株PRVABC59 P6e(SEQ ID NO:8)和PRVABC59(SEQ ID NO:9)的靠近残基330的寨卡病毒包膜糖蛋白序列与若干其它黄病毒(WNV(SEQ ID NO:10);JEV(SEQ ID NO:11);SLEV(SEQ ID NO:12);YFV(SEQ ID NO:13);DENV 1 16007(SEQ ID NO:14);DENV 2 16681(SEQ ID NO:15);DENV 3 16562(SEQ IDNO:16);以及DENV 4 1036(SEQ ID NO:17))。

[0058] 图7展示了一种氨基酸序列比对,其比较来自寨卡病毒株PRVABC59 P6e(SEQ ID NO:18)和PRVABC59(SEQ ID NO:19)的靠近残基98的寨卡病毒NS1蛋白序列与若干其它黄病毒(WNV(SEQ ID NO:20);JEV(SEQ ID NO:21);SLEV(SEQ ID NO:22);YFV(SEQ ID NO:23);DENV 1 16007(SEQ ID NO:24);DENV 2 16681(SEQ ID NO:25);DENV 3 16562(SEQ IDNO:26);以及DENV 4 1036(SEQ ID NO:27))。

[0059] 图8展示了与ZIKAV PRVABC59 P1病毒相比ZIKAV PRVABC59 P6病毒克隆a-f的蚀斑表型。

[0060] 图9展示了与ZIKAV PRVABC59 P1病毒相比ZIKAV PRVABC59 P6病毒克隆的平均斑点尺寸。

[0061] 图10展示了在无血清生长条件下ZIKAV PRVABC59 P6克隆a-f在Vero细胞中的生长动力学。

[0062] 图11展示了制备用于免疫接种实验的PRVABC59 P6b和P6e配制药品所采取的步骤的示意图。

[0063] 图12A展示了向CD-1小鼠给予来源于ZIKAV PRVABC59 P6b和P6e克隆的疫苗制剂的时间表。PBS用作安慰剂。

[0064] 图12B展示了如图12A中所述使用来源于ZIKAV PRVABC59P6b和P6e克隆的疫苗制剂进行免疫接种的CD-1小鼠的血清ZIKAV中和抗体效价。ZIKAV中和抗体效价通过报告病毒颗粒(RVP)中和测定来测定ZIKAV中和抗体效价。实线表示一组的几何平均值。检测限($1.93\log_{10}$)由虚线表示。

[0065] 图13A展示了向AG129小鼠给予来源于ZIKAV PRVABC59 P6b和P6e克隆的疫苗制剂的时间表。PBS用作安慰剂。

[0066] 图13B展示了如图13A中所述使用来源于ZIKAV PRVABC59P6b和P6e克隆的疫苗制剂进行免疫接种的AG129小鼠的血清ZIKAV中和抗体效价。实线表示一组的几何平均值。检测限($1.30\log_{10}$)由虚线表示。分配没有可检测效价(<1.30)的动物0.5的效价。

[0067] 图14展示了攻击后AG129测试组的平均重量,其表示为起始重量的百分比。误差线

表示标准偏差。

[0068] 图15展示了在攻击后的两天个别AG129小鼠的血清病毒血症,以PFU/mL报告。实线表示一组的平均值。检测限($2.0\log_{10}$)由虚线表示。

[0069] 图16展示了攻击后AG129测试组的存活率分析。

[0070] 图17展示了在来自接种疫苗的和受到攻击的AG129小鼠的汇集血清被动转移后的攻击前血清循环ZIKAV中和抗体(Nab)效价。

[0071] 图18展示了经过寨卡病毒攻击的被动转移小鼠和对照小鼠的平均体重。

[0072] 图19展示了在攻击后的三天个别AG129小鼠的血清病毒血症,以PFU/mL报告。

[0073] 图20展示了经过寨卡病毒攻击的被动转移小鼠和对照小鼠的存活率分析。

[0074] 图21展示了ZIKAV中和抗体效价与在被动转移小鼠中观察到的病毒血症之间的相关性。

[0075] 图22展示了在感染P6a和P6e寨卡病毒前MVS原液后使用卡普兰梅耶存活曲线(Kaplan Meier survival curve)对AG129小鼠的存活率分析。

[0076] 图23展示了在发明时在感染P6a和P6e寨卡病毒前MVS原液后的平均体重,以起始重量的百分比表示。虚线表示供参考的起始重量的100%。

[0077] 图24展示了在感染P6a和P6e寨卡病毒前MVS原液后的三天个别AG129小鼠的血清病毒血症,以PFU/mL报告。虚线表示测定的检测限。

[0078] 图25展示了编辑的灭活动力学数据。数据比较感染效力(TCID50)与RNA拷贝,以及四个毒物学批次样品的灭活完全性(COI)。这些数据表明COI测定的灵敏度超过TCID50。

[0079] 图26展示了如0.31TCID50的输入病毒效价所证明的测定中C6/36和Vero灵敏度的比较。

[0080] 图27展示了使用C6/36细胞的CPE对比log TCID50的对数回归分析,位点包括在0.01TCID50/孔(-2log TCID50/孔)的目标值周围的99%置信区间;模型预测0.85%的孔将为阳性。

[0081] 图28展示了PBS(a)和含有0.049μg/mL(b)、0.098μg/mL(c)、0.196μg/mL(d)、0.491μg/mL(e)、0.982μg/mL(f)和1.964μg/mL(g)甲醛的PBS溶液的色谱图。

具体实施方式

[0082] 通用技术

[0083] 使用常规的方法,例如以下中描述的广泛利用的方法,本领域的技术人员一般更好地理解本文中描述或提及的技术和程序并且常采用所述技术和程序:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑,(2003));Methods in Enzymology系列(Academic Press公司):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑(1995)),Harlow和Lane编辑(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,and Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编辑,

1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean,编辑,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);以及The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,编辑,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0084] 寨卡病毒

[0085] 本公开的某些方面涉及一种可用于疫苗和/或免疫原性组合物中的纯化的灭活全寨卡病毒。

[0086] 寨卡病毒(ZIKV)是一种蚊媒黄病毒,在1947年,首次从乌干达寨卡森林(Zika Forest)的哨兵恒河猴分离出其。从那是起,已经在非洲和亚洲从人中分离出该病毒,近年来在美洲分离出。发现ZIKV有两个(可能三个)谱系:非洲谱系(可能独立的东非和西非谱系)和亚洲谱系。因此,本公开的合适寨卡病毒的实例包括不限于来自非洲和/或亚洲谱系的病毒。在一些实施方案中,寨卡病毒为非洲谱系病毒。在一些实施方案中,寨卡病毒为亚洲谱系病毒。另外,先前已经鉴定出寨卡病毒的非洲和亚洲谱系内的多个病毒株。本领域中已知的寨卡病毒的任一种或多种合适病毒株都可用于本公开中,包括例如病毒株Mr 766、ArD 41519、IbH 30656、P6-740、EC Yap、FSS13025、ArD 7117、ArD 9957、ArD 30101、ArD 30156、ArD 30332、HD 78788、ArD 127707、ArD 127710、ArD 127984、ArD 127988、ArD 127994、ArD 128000、ArD 132912、132915、ArD 141170、ArD 142623、ArD 149917、ArD 149810、ArD 149938、ArD 157995、ArD 158084、ArD 165522、ArD 165531、ArA 1465、ArA 27101、ArA 27290、ArA 27106、ArA 27096、ArA 27407、ArA 27433、ArA 506/96、ArA 975-99、Ara 982-99、ArA 986-99、ArA 2718、ArB 1362、尼日利亚(Nigeria)68、马来西亚(Malaysia)66、凯杜古(Kedougou)84、苏里南(Suriname)、MR1429、PRVABC59、ECMN2007、DakAr41524、H/PF/2013、R103451、103344、8375、JMB-185、ZIKV/H、智人/巴西(Brazil)/纳塔耳(Natal)/2015、SPH2015、ZIKV/Hu/千叶(Chiba)/S36/2016和/或古巴(Cuba)2017。在一些实施方案中,病毒株PRVABC59用于本公开中。

[0087] 在一些实施方案中,寨卡病毒基因组序列的一实例以SEQ ID NO:2示于下文中:

[0088]

1 gttgttgatc tgtgtgaatc agactgcgac agttcgagtt tgaagcgaaa gctagcaaca

61 gtatcaacag gttttatttt ggatttggaa acgagagttt ctggtcatga aaaacccaaa

121 aaagaaatcc ggaggattcc ggattgtcaa tatgctaaaa cgcggagtag cccgtgtgag

181 ccccttttggg ggcttgaaga ggctgccagc cggacttctg ctgggtcatg ggcccatcag

241 gatggtcttg gcgattctag ccttttttgag attcacggca atcaagccat cactgggtct

301 catcaataga tggggttcag tggggaaaaa agaggctatg gaaacaataa agaagttcaa

361 gaaagatctg gctgccatgc tgagaataat caatgctagg aaggagaaga agagacgagg

421 cgcagatact agtgtcggaa ttgttggcct cctgctgacc acagctatgg cagcggaggt

481 cactagacgt gggagtgcat actatatgta cttggacaga aacgatgctg gggaggccat

541 atcttttcca accacattgg ggatgaataa gtgttatata cagatcatgg atcttggaca

601 catgtgtgat gccaccatga gctatgaatg ccctatgctg gatgaggggg tggaaccaga

661 tgacgtcgat tgttggtgca acacgacgtc aacttgggtt gtgtacggaa cctgccatca

721 caaaaaaggt gaagcacgga gatctagaag agctgtgacg ctccccctccc attccaccag

781 gaagctgcaa acgcggtcgc aaacctggtt ggaatcaaga gaatacacaa agcacttgat

841 tagagtcgaa aattggatat tcaggaaccc tggcttcgcg ttagcagcag ctgccatcgc

901 ttggcttttg ggaagctcaa cgagccaaaa agtcatatac ttggtcatga tactgctgat

961 tgccccggca tacagcatca ggtgcatagg agtcagcaat agggactttg tggaaggtat

1021 gtcaggtggg acttgggttg atgttgtctt ggaacatgga ggttgtgtca ccgtaatggc

1081 acaggacaaa ccgactgtcg acatagagct ggttacaaca acagtcagca acatggcgga

1141 ggtaagatcc tactgctatg aggcatcaat atcagacatg gcttctgaca gccgctgccc

1201 aacacaaggt gaagcctacc ttgacaagca atcagacact caatatgtct gcaaaagaac

1261 gttagtggac agaggctggg gaaatggatg tggacttttt ggcaaaggga gcctggtgac

1321 atgcgctaag tttgcatgct ccaagaaaat gaccgggaag agcatccagc cagagaatct

1381 ggagtaccgg ataatgctgt cagttcatgg ctcccagcac agtgggatga tcgttaatga

1441 cacaggacat gaaactgatg agaatagagc gaaagttgag ataacgccca attcaccgag

1501 agccgaagcc accctggggg gttttggaag cctaggactt gattgtgaac cgaggacagg

1561 ccttgacttt tcagatttgt attacttgac tatgaataac aagcactggt tggttcacaa

1621 ggagtggttc cacgacattc cattaccttg gcacgctggg gcagacaccg gaactccaca

1681 ctggaacaac aaagaagcac tggtagagtt caaggacgca catgccaaaa ggcaaactgt

1741 cgtggttcta gggagtcaag aaggagcagt tcacacggcc cttgctggag ctctggaggc

1801 tgagatggat ggtgcaaagg gaaggctgtc ctctggccac ttgaaatgtc gcctgaaaat

1861 ggataaactt agattgaagg gcgtgtcata ctccttgtgt actgcagcgt tcacattcac

1921 caagatcccg gctgaaacac tgcacgggac agtcacagtg gaggtacagt acgcagggac

1981 agatggacct tgcaaggttc cagctcagat ggcggtggac atgcaaactc tgaccccagt

2041 tgggaggttg ataaccgcta accccgtaat cactgaaagc actgagaact ctaagatgat

2101 gctggaactt gatccaccat ttggggactc ttacattgtc ataggagtcg gggagaagaa

2161 gatcacccac cactggcaca ggagtggcag caccattgga aaagcatttg aagccactgt

2221 gagaggtgcc aagagaatgg cagtcttggg agacacagcc tgggactttg gatcagttgg

2281 aggcgctctc aactcattgg gcaagggcat ccatcaaatt tttggagcag ctttcaaatc

2341 attgtttgga ggaatgtcct ggttctcaca aattctcatt ggaacgttgc tgatgtggtt

[0089] 2401 gggtctgaac acaaagaatg gatctatttc ccttatgtgc ttggccttag ggggagtgtt

2461 gatcttctta tccacagccg tctctgctga tgtggggtgc tcggtggact tctcaaagaa

2521 ggagacgaga tgcggtacag gggtgttcgt ctataacgac gttgaagcct ggagggacag

2581 gtacaagtac catcctgact ccccccgtag attggcagca gcagtcaagc aagcctggga

2641 agatggtatc tgcgggatct cctctgtttc aagaatggaa aacatcatgt ggagatcagt

2701 agaaggggag ctcaacgcaa tcctggaaga gaatggagtt caactgacgg tcgttgtggg

2761 atctgtaaaa aaccccatgt ggagaggtcc acagagattg cccgtgcctg tgaacgagct

2821 gccccacggc tggaaggctt gggggaaatc gtatttcgtc agagcagcaa agacaaataa

2881 cagctttgtc gtggatggtg acacactgaa ggaatgccca ctcaaacata gagcatggaa

2941 cagctttctt gtggaggatc atgggttcgg ggtatttcac actagtgtct ggctcaaggt

3001 tagagaagat tattcattag agtgtgatcc agccgttatt ggaacagctg ttaagggaaa

3061 ggaggctgta cacagtgatc taggctactg gattgagagt gagaagaatg acacatggag

3121 gctgaagagg gcccatctga tcgagatgaa aacatgtgaa tggccaaagt cccacacatt

3181 gtggacagat ggaatagaag agagtgatct gatcataccc aagtctttag ctgggccact

3241 cagccatcac aataccagag agggctacag gacccaaatg aaagggccat ggcacagtga

3301 agagcttgaa attcggtttg aggaatgccc aggcactaag gtccacgtgg aggaaacatg

3361 tggaacaaga ggaccatctc tgagatcaac cactgcaagc ggaagggtga tcgaggaatg

3421 gtgctgcagg gagtgcacaa tgcccccact gtcgttccgg gctaaagatg gctgttggta

3481 tggaatggag ataaggccca ggaaagaacc agaaagcaac ttagtaaggt caatggtgac

3541 tgcaggatca actgatcaca tggaccactt ctcccttgga gtgcttgtga tcctgctcat

3601 ggtgcaggaa gggctgaaga agagaatgac cacaaagatc atcataagca catcaatggc

3661 agtgctggta gctatgatcc tgggaggatt ttcaatgagt gacctggcta agcttgcaat

3721 tttgatgggt gccaccttcg cggaaatgaa cactggagga gatgtagctc atctggcgct

3781 gatagcggca ttcaaagtca gaccagcgtt gctggtatct ttcatcttca gagctaattg

3841 gacacccccgt gaaagcatgc tgctggcctt ggcctcgtgt cttttgcaaa ctgcgatctc

3901 cgccttggaa ggcgacctga tggttctcat caatggtttt gctttggcct ggttggcaat

3961 acgagcgatg gttgttccac gcactgataa catcaccttg gcaatcctgg ctgctctgac

4021 accactggcc cggggcacac tgcttgtggc gtggagagca ggccttgcta cttgcggggg

4081 gtttatgctc ctctctctga agggaaaagg cagtgtgaag aagaacttac catttgtcat

4141 ggccctggga ctaaccgctg tgaggctggt cgaccccatc aacgtggtgg gactgctgtt

4201 gctcacaagg agtgggaagc ggagctggcc ccctagcgaa gtactcacag ctgttggcct

4261 gatatgcgca ttggctggag ggttcgccaa ggcagatata gagatggctg ggcccatggc

4321 cgcggtcggt ctgctaattg tcagttacgt ggtctcagga aagagtgtgg acatgtacat

4381 tgaaagagca ggtgacatca catgggaaaa agatgcggaa gtcactggaa acagtccccg

4441 gctcgatgtg gcgctagatg agagtggtga tttctccctg gtggaggatg acggtccccc

4501 catgagagag atcatactca aggtggtcct gatgaccatc tgtggcatga accaatagc

4561 catacccttt gcagctggag cgtggtacgt atacgtgaag actggaaaaa ggagtggtgc

[0090] 4621 tctatgggat gtgcctgctc ccaaggaagt aaaaaagggg gagaccacag atggagtgta

4681 cagagtaatg actcgtagac tgctaggttc aacacaagtt ggagtgggag ttatgcaaga

4741 gggggtcttt cacactatgt ggcacgtcac aaaaggatcc gcgctgagaa gcggtgaagg

4801 gagacttgat ccatactggg gagatgtcaa gcaggatctg gtgtcatact gtggtccatg

4861 gaagctagat gccgcctggg atgggcacag cgaggtgcag ctcttggccg tgccccccgg

4921 agagagagcg aggaacatcc agactctgcc cggaatattt aagacaaagg atggggacat

4981 tggagcggtt gcgctggatt acccagcagg aacttcagga tctccaatcc tagacaagtg

5041 tgggagagtg ataggacttt atggcaatgg ggtcgtgatc aaaaacggga gttatgttag

5101 tgccatcacc caagggagga gggaggaaga gactcctgtt gagtgcttcg agccctcgat

5161 gctgaagaag aagcagctaa ctgtcttaga cttgcatcct ggagctggga aaaccaggag

5221 agttcttcct gaaatagtcc gtgaagccat aaaaacaaga ctccgtactg tgatcttagc

5281 tccaaccagg gttgtcgctg ctgaaatgga ggaggccctt agagggcttc cagtgcgtta

5341 tatgacaaca gcagtcaatg tcacccactc tggaacagaa atcgtcgact taatgtgcca

5401 tgccaccttc acttcacgtc tactacagcc aatcagagtc cccaactata atctgtatat

5461 tatggatgag gcccacttca cagatccctc aagtatagca gcaagaggat acatttcaac

5521 aagggttgag atgggcgagg cggctgccat cttcatgacc gccacgccac caggaacccg

5581 tgacgcattt ccggactcca actcaccaat tatggacacc gaagtggaag tcccagagag

5641 agcctggagc tcaggctttg attgggtgac ggatcattct ggaaaaacag tttggtttgt

5701 tccaagcgtg aggaacggca atgagatcgc agcttgtctg acaaaggctg gaaaacgggt

5761 catacagctc agcagaaaga cttttgagac agagttccag aaaacaaaac atcaagagtg

5821 ggactttgtc gtgacaactg acatttcaga gatgggcgcc aactttaaag ctgaccgtgt

5881 catagattcc aggagatgcc taaagccggt catacttgat ggcgagagag tcattctggc

5941 tggacccatg cctgtcacac atgccagcgc tgcccagagg agggggcgca taggcaggaa

6001 tcccaacaaa cctggagatg agtatctgta tggaggtggg tgcgcagaga ctgacgaaga

6061 ccatgcacac tggcttgaag caagaatgct ccttgacaat atttacctcc aagatggcct

6121 catagcctcg ctctatcgac ctgaggccga caaagtagca gccattgagg gagagttcaa

6181 gcttaggacg gagcaaagga agacctttgt ggaactcatg aaaagaggag atcttcctgt

6241 ttggctggcc tatcaggttg catctgccgg aataacctac acagatagaa gatggtgctt

6301 tgatggcacg accaacaaca ccataatgga agacagtgtg ccggcagagg tgtggaccag

6361 acacggagag aaaagagtgc tcaaaccgag gtggatggac gccagagttt gttcagatca

6421 tgcggccctg aagtcattca aggagtttgc cgctgggaaa agaggagcgg cttttggagt

6481 gatggaagcc ctgggaacac tgccaggaca catgacagag agattccagg aagccattga

6541 caacctcgct gtgctcatgc gggcagagac tggaagcagg ccttacaaag ccgcggcggc

6601 ccaattgccg gagaccctag agaccataat gcttttgggg ttgctgggaa cagtctcgct

6661 gggaatcttc ttcgtcttga tgaggaacaa gggcataggg aagatgggct ttggaatggt

6721 gactcttggg gccagcgcat ggctcatgtg gctctcggaa attgagccag ccagaattgc

6781 atgtgtcctc attgttgtgt tcctattgct ggtggtgctc atacctgagc cagaaaagca

[0091] 6841 aagatctccc caggacaacc aaatggcaat catcatcatg gtagcagtag gtcttctggg

6901 cttgattacc gccaatgaac tcggatggtt ggagagaaca aagagtgacc taagccatct

6961 aatgggaagg agagaggagg gggcaaccat aggattctca atggacattg acctgcggcc

7021 agcctcagct tgggccatct atgctgcctt gacaactttc attaccccag ccgtccaaca

7081 tgcagtgacc acctcataca acaactactc cttaatggcg atggccacgc aagctggagt

7141 gttgtttggc atgggcaaag ggatgccatt ctacgcatgg gactttggag tcccgctgct

7201 aatgataggt tgctactcac aattaacacc cctgacccta atagtggcca tcattttgct

7261 cgtggcgcac tacatgtact tgatcccagg gctgcaggca gcagctgcgc gtgctgccca

7321 gaagagaacg gcagctggca tcatgaagaa ccctgttgtg gatggaatag tggtgactga

7381 cattgacaca atgacaattg acccccaagt ggagaaaaag atgggacagg tgctactcat

7441 agcagtagcc gtctccagcg ccatactgtc gcggaccgcc tgggggtggg gggaggctgg

7501 ggctctgatc acagccgcaa cttccacttt gtgggaaggc tctccgaaca agtactggaa

7561 ctcctctaca gccacttcac tgtgtaacat ttttagggga agttacttgg ctggagcttc

7621 tctaatctac acagtaacaa gaaacgctgg cttggtcaag agacgtgggg gtggaacagg

7681 agagaccctg ggagagaaat ggaaggcccg cttgaaccag atgtcggccc tggagttcta

7741 ctcctacaaa aagtcaggca tcaccgaggt gtgcagagaa gaggcccgcc gcgccctcaa

7801 ggacggtgtg gcaacgggag gccatgctgt gtcccgagga agtgcaaagc tgagatggtt

7861 ggtggagcgg ggatacctgc agccctatgg aaaggtcatt gatcttggat gtggcagagg

7921 gggctggagt tactacgtcg ccaccatccg caaagttcaa gaagtgaaag gatacacaaa

7981 aggaggccct ggtcatgaag aacccgtgtt ggtgcaaagc tatgggtgga acatagtccg

8041 tcttaagagt ggggtggacg tctttcatat ggcggctgag ccgtgtgaca cgttgctgtg

8101 tgacataggt gagtcatcat ctagtcctga agtggaagaa gcacggacgc tcagagtcct

8161 ctccatggtg ggggattggc ttgaaaaaag accaggagcc ttttgtataa aagtgttgtg

8221 cccatacacc agcactatga tggaaaccct ggagcgactg cagcgtaggt atgggggagg

8281 actggtcaga gtgccactct cccgcaactc tacacatgag atgtactggg tctctggagc

8341 gaaaagcaac accataaaaa gtgtgtccac cacgagccag ctcctcttgg ggcgcatgga

8401 cgggcctagg aggccagtga aatatgagga ggatgtgaat ctcggctctg gcacgcgggc

8461 tgtggtaagc tgcgctgaag ctcccaacat gaagatcatt ggtaaccgca ttgaaaggat

8521 ccgcagtgag cacgcggaaa cgtggttctt tgacgagaac cacccatata ggacatgggc

8581 ttaccatgga agctatgagg ccccccacaca agggtcagcg tcctctctaa taaacggggt

8641 tgtcaggctc ctgtcaaaac cctgggatgt ggtgactgga gtcacaggaa tagccatgac

8701 cgacaccaca ccgtatggtc agcaaagagt tttcaaggaa aaagtggaca ctagggtgcc

8761 agacccccaa gaaggcactc gtcaggttat gagcatggtc tcttcctggt tgtggaaaga

8821 gctaggcaaa cacaaacggc cacgagtctg caccaaagaa gagttcatca acaaggttcg

8881 tagcaatgca gcattagggg caatatttga agaggaaaaa gagtggaaga ctgcagtgga

8941 agctgtgaac gatccaaggt tctgggctct agtggacaag gaaagagagc accacctgag

9001 aggagagtgc cagagctgtg tgtacaacat gatgggaaaa agagaaaaga aacaagggga

[0092] 9061 atttggaaag gccaagggca gccgcgccat ctggtatatg tggctagggg ctagatttct

9121 agagttcgaa gcccttggat tcttgaacga ggatcactgg atggggagag agaactcagg

9181 aggtggtgtt gaagggctgg gattacaaag actcggatat gtcctagaag agatgagtcg

9241 tataccagga ggaaggatgt atgcagatga cactgctggc tgggacaccc gcattagcag

9301 gtttgatctg gagaatgaag ctctaatcac caaccaaatg gagaaagggc acagggcctt

9361 ggcattggcc ataatcaagt acacatacca aaacaaagtg gtaaaggtcc ttagaccagc

9421 tgaaaaaggg aaaacagtta tggacattat ttcgagacaa gaccaaaggg ggagcggaca

9481 agttgtcact tacgctctta acacatttac caacctagtg gtgcaactca ttcggaatat

9541 ggaggctgag gaagttctag agatgcaaga cttgtggctg ctgcggaggt cagagaaagt

9601 gaccaactgg ttgcagagca acggatggga taggctcaaa cgaatggcag tcagtggaga

9661 tgattgcgtt gtgaagccaa ttgatgatag gtttgcacat gccctcaggt tcttgaatga

9721 tatgggaaaa gttaggaagg acacacaaga gtggaaaccc tcaactggat gggacaactg

9781 ggaagaagtt ccgttttgct cccaccactt caacaagctc catctcaagg acgggaggtc

9841 cattgtggtt ccctgccgcc accaagatga actgattggc cgggcccgcg tctctccagg

9901 ggcgggatgg agcatccggg agactgcttg cctagcaaaa tcatatgcgc aaatgtggca

9961 gctcctttat ttccacagaa gggacctccg actgatggcc aatgccattt gttcatctgt

10021 gccagttgac tgggttccaa ctgggagaac tacctggtca atccatggaa agggagaatg

10081 gatgaccact gaagacatgc ttgtggtgtg gaacagagtg tggattgagg agaacgacca

10141 catggaagac aagacccccag ttacgaaatg gacagacatt ccctatttgg gaaaaaggga

[0093]

10201 agacttgtgg tgtggatctc tcatagggca cagaccgcgc accacctggg ctgagaacat

10261 taaaaacaca gtcaacatgg tgcgcaggat cataggtgat gaagaaaagt acatggacta

10321 cctatccacc caagttcgct acttgggtga agaagggtct acacctggag tgctgtaagc

10381 accaatctta atgttgtcag gcctgctagt cagccacagc ttggggaaag ctgtgcagcc

10441 tgtgaccccc ccaggagaag ctgggaaacc aagcctatag tcaggccgag aacgccatgg

10501 cacggaagaa gccatgctgc ctgtgagccc ctcagaggac actgagtcaa aaaaccccac

10561 gcgcttggag gcgcaggatg ggaaaagaag gtggcgacct tccccaccct tcaatctggg

10621 gcctgaactg gagatcagct gtggatctcc agaagaggga ctagtggtta gagga

[0094] 在一些实施方案中,寨卡病毒可包含GenBank登录号KU501215.1的基因组序列。在一些实施方案中,寨卡病毒来自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,GenBank登录号KU501215.1的基因组序列包含SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,寨卡病毒可包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的基因组序列。

[0095] 在一些实施方案中,寨卡病毒可包含至少一种由SEQ ID NO:2的序列编码的多肽。在一些实施方案中,寨卡病毒可包含至少一种具有与由SEQ ID NO:2的序列编码的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0096] 因此,在一些实施方案中,本公开的灭活寨卡病毒可用于本文公开的疫苗和/或免疫原性组合物中的任一种中。举例来说,本公开的灭活寨卡病毒可用于提供一种或多种可用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染和/或诱发有需要的受试者中针对寨卡病毒的免疫应答,例如保护性免疫应答的抗原。

[0097] 用于本公开中的寨卡病毒可从细胞培养的一个或多个细胞获得(例如经由蚀斑纯化)。可使用本领域中已知的用于产生寨卡病毒的任何合适细胞,例如昆虫细胞(例如蚊子细胞,例如CCL-125细胞、Aag-2细胞、RML-12细胞、C6/36细胞、C7-10细胞、AP-61细胞、A.t.GRIP-1细胞、A.t.GRIP-2细胞、A.t.GRIP-3细胞、UM-AVE1细胞、Mos.55细胞、Sua1B细胞、4a-3B细胞、Mos.42细胞、MSQ43细胞、LSB-AA695BB细胞、NIID-CTR细胞、TRA-171细胞和来自例如埃及伊蚊(Aedes aegypti)、白纹伊蚊(Aedes albopictus)、假鳞斑伊蚊(Aedes pseudoscutellaris)、三列伊蚊(Aedes triseriatus)、刺扰伊蚊(Aedes vexans)、冈比亚按蚊(Anopheles gambiae)、斯氏按蚊(Anopheles stephensi)、艾氏按蚊(Anopheles albimus)、致倦库蚊(Culex quinquefasciatus)、希氏库蚊(Culex theileri)、三带喙库蚊(Culex tritaeniorhynchus)、二带喙库蚊(Culex bitaeniorhynchus)和/或安汶巨蚊(Toxorhynchites amboinensis))的蚊子物种的另外的细胞或细胞系,以及哺乳动物细胞(例如VERO细胞(来自猴肾)、LLC-MK2细胞(来自猴肾)、MDBK细胞、MDCK细胞、ATCC CCL34

MDCK(NBL2)细胞、MDCK 33016(如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞或中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。在一些实施方案中,寨卡病毒(例如寨卡病毒克隆分离株)由非人细胞产生。在一些实施方案中,寨卡病毒(例如寨卡病毒克隆分离株)由昆虫细胞产生。在一些实施方案中,寨卡病毒(例如寨卡病毒克隆分离株)由蚊子细胞产生。在一些实施方案中,寨卡病毒(例如寨卡病毒克隆分离株)由哺乳动物细胞产生。在一些实施方案中,寨卡病毒(例如寨卡病毒克隆分离株)由VERO细胞产生。

[0098] 寨卡病毒具有编码结构与非结构多肽的正义单链RNA基因组。基因组在5'端和3'端区域还含有在病毒复制中起作用的非编码序列。由这些病毒编码的结构多肽包括不限于衣壳(C)、前体膜(prM)和包膜(E)。由这些病毒编码的非结构(NS)多肽包括不限于NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5。

[0099] 在某些实施方案中,寨卡病毒包括寨卡病毒非结构蛋白1(NS1)的突变。在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有Trp98Gly突变。

[0100] 在一些实施方案中,突变在NS1多肽内。来自例示性寨卡病毒株的野生型NS1多肽的氨基酸序列示为以下:

[0101] DVGCSVDFSKKETRCGTGVFVYNDVEAWRDRYKYHPDSPRRLAAAVKQAWEDGICGISS VSRMENIMWRSVEGELNAILEENGVQLTVVVGSVKNPMWRGPQRLPVPVNELPHGWKA WGKSYFVRAAKTNNSFVVDGDTLKECPLKHRAWNSFLVEDHGFGVFHTSVWLKVREDYS LECDPAVIGTAVKGKEAVHSDLGYWIESEKNDTWRLKRAHLIEMKTCEWPKSHTLWTDGI EESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYRTQMKGPWHSEELEIRFEECPGTKVHVEETCGTRGPSL RSTTASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRAKDGCWYGMEIRPRKEPESNLVRSMVT (SEQ ID NO: 1)。

[0102] 在一些实施方案中,NS1多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,NS1多肽的氨基酸序列可来自由GenBank登录号KU501215.1的序列(SEQ ID NO:2)编码的氨基酸序列。在一些实施方案中,NS1多肽的氨基酸序列可为由GenBank登录号KU501215.1的序列编码的氨基酸序列的氨基酸位置795至1145。在一些实施方案中,NS1多肽的氨基酸序列可来自寨卡病毒株PRVABC59。

[0103] "序列同一性"、"序列同一性%"、"同一性%"、"同一%"或"序列比对"意指第一氨基酸序列与第二氨基酸序列的比较,或第一核酸序列与第二核酸序列的比较,并且计算为基于所述比较的百分比。此计算的结果可被称作"同一百分比"或"ID百分比"。

[0104] 一般地,序列比对可用于通过两种不同方法中的一种计算序列同一性。在第一种方法中,在最后的序列同一性计算中单个位置处的错配和单个位置处的空位均被算作是非相同位置。在第二方法中,在最后的序列同一性计算中单个位置处的错配被算作是非相同位置;然而在最后的序列同一性计算中单个位置处的空位不算作是非相同位置(忽略)。换句话说,在第二方法中,在最后的序列同一性计算中空位忽略。这两种之间的差异,即单个位置处的空位算作是非相同位置对比忽略空位,可能引起两种序列之间的序列同一性值的

变化性。

[0105] 在一些实施方案中,通过如下程序,确定序列同一性,所述程序产生比对并通过在最后的序列同一性计算中将单个位置处的错配和单个位置处的空位算作是非相同位置来计算同一性。例如程序Needle(EMBOS),其执行Needleman和Wunsch(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)的算法,并通过首先在第一序列与第二序列之间产生比对,然后计数比对长度上相同位置的数目,然后将相同残基的数目除以比对长度,然后将此数乘以100,产生序列同一性%来计算每个默认设置下的序列同一性[序列同一性%=(相同残基数/比对长度)×100)]。

[0106] 序列同一性可由在全长上展示两个序列,因此展示第一序列和第二序列的全长的成对比对计算(“整体序列同一性”)。举例来说,程序Needle(EMBOSS)产生这类比对;序列同一性%=(相同残基数目/比对长度)×100)]。

[0107] 序列同一性可由仅仅展示第一序列或第二序列的局部区域的成对比对计算(“局部同一性”)。举例来说,程序Blast(NCBI)产生这类比对;序列同一性%=(相同残基数目/比对长度)×100)]。

[0108] 序列比对优选通过使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(1979)48,第443-453页)的算法产生。优选地,程序“NEEDLE”(欧洲分子生物学开放软件套件(The European Molecular Biology Open Software Suite,EMBOSS))和程序默认参数(空位开放=10.0,空位延长=0.5并且蛋白质的矩阵=EBLOSUM62,以及核苷酸的矩阵=EDNAFULL)一起使用。然后,序列同一性可由在全长上展示两个序列,因此展示第一序列和第二序列的全长的比对计算(“整体序列同一性”)。举例来说:序列同一性%=(相同残基数目/比对长度)×100)]。

[0109] 在一些实施方案中,突变在NS1多肽内的一个或多个氨基酸位置处发生。在一些实施方案中,突变在SEQ ID NO:1的位置98处或当使用成对比对算法与SEQ ID NO:1比对时在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处发生。在一些实施方案中,在位置98处的突变为色氨酸至甘氨酸取代。

[0110] 在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含突变。与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置可通过使用成对比对算法对NS-1蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1进行比对来确定。除寨卡病毒以外的病毒中与SEQ ID NO:1的位置98处的色氨酸残基对应的氨基酸残基展示于本申请的图7中,其中将这些残基加框。在一些实施方案中,在位置98处的突变为色氨酸至甘氨酸取代。在一些实施方案中,在位置98处的突变为SEQ ID NO:1的位置98处的色氨酸至甘氨酸取代。

[0111] 在一些实施方案中,寨卡病毒含有NS1蛋白内的突变,以及C、prM、E、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5病毒蛋白中的一种或多种蛋白内的至少一种突变。在一些实施方案中,寨卡病毒含有NS1蛋白内的突变,并且不含C、prM、E、NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5病毒蛋白中的一种或多种蛋白内的至少一种突变。在一些实施方案中,寨卡病毒含有NS1蛋白内的突变并且不含包膜蛋白E内的至少一种突变。在一些实施方案中,全灭活病毒含有寨卡病毒非结构蛋白1(NS1)中的至少一种突变,并且不包括寨卡病毒包膜蛋白E(Env)中的突变。在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有突变,并且不含包膜蛋白E内的任何突变。在一些实施方

案中,全灭活寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有突变,并且不包括寨卡病毒包膜蛋白E(Env)中的突变。在一些实施方案中,全灭活病毒含有寨卡病毒非结构蛋白1(NS1)中的至少一种突变,并且编码包膜蛋白的序列与SEQ ID No.2中的对应序列相同。在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有突变,并且编码包膜蛋白的序列与SEQ ID NO.2中的对应序列相同。在一些实施方案中,全灭活寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有突变,并且编码包膜蛋白的序列与SEQ ID NO:2中的对应序列相同。

[0112] 在一些实施方案中,寨卡病毒含有至少一种突变,与缺乏所述至少一种突变的寨卡病毒相比所述突变使遗传稳定性增强。在一些实施方案中,寨卡病毒含有至少一种突变,与缺乏所述至少一种突变的寨卡病毒相比所述突变使病毒复制增强。在一些实施方案中,寨卡病毒含有至少一种突变,所述突变减少或以其它方式抑制例如寨卡病毒的包膜蛋白E(Env)内发生不合需要的突变。

[0113] 在本公开的以上实施方案中,一种例示性成对比对算法为Needleman-Wunsch整体比对算法,所述算法使用默认参数(例如空位开放罚分=10.0,空位延长罚分=0.5,使用EBLOSUM62评分矩阵)。所述算法宜在EMBOSS程序包中的needle工具中执行。

[0114] 在一些实施方案中,灭活寨卡病毒可用于疫苗和免疫原性组合物中。举例来说,灭活寨卡病毒可用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染和/或诱发有需要的受试者中针对寨卡病毒的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0115] 疫苗和免疫原性组合物的产生

[0116] 本公开的其它方面涉及寨卡病毒疫苗和免疫原性组合物,所述寨卡病毒疫苗和免疫原性组合物含有纯化的灭活全病毒,例如如本文所述的在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的寨卡病毒。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。在一个实施方案中,疫苗和免疫原性组合物含有经过蚀斑纯化的克隆寨卡病毒分离株。这类疫苗和免疫原性组合物可用于例如治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染和/或诱发有需要的受试者中针对寨卡病毒的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0117] 本公开的疫苗和/或免疫原性组合物的产生包括寨卡病毒的生长。在细胞培养物中生长是一种用于制备本公开的疫苗和/或免疫原性组合物的方法。用于病毒生长的细胞可悬浮培养或在附着条件下培养。

[0118] 适合于至少一种本公开的病毒生长的细胞系优选为哺乳动物来源,并且包括(但不限于):昆虫细胞(例如如本文所述的蚊子细胞、VERO细胞(来自猴肾)、马、奶牛(例如MDBK细胞)、绵羊、犬(例如来自犬肾的MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)或MDCK33016,如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)、猫和啮齿动物(例如仓鼠细胞,例如BHK21-F、HKCC细

胞或中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)),并且可从包括例如成年、新生、胎儿和胚胎在内的多个发育阶段获得。在某些实施方案中,细胞进行永生化(例如PERC.6细胞,如WO 01/38362和WO 02/40665中所述,以及如ECACC保藏号96022940下所保藏)。在优选实施方案中,利用哺乳动物细胞,并且可选自和/或源自于以下非限制性细胞类型中的一或多种:成纤维细胞(例如皮肤、肺)、内皮细胞(例如主动脉、冠状动脉、肺、血管、皮肤微血管、脐)、肝细胞、角化细胞、免疫细胞(例如T细胞、B细胞、巨噬细胞、NK、树突状)、乳腺细胞(例如上皮)、平滑肌细胞(例如血管、主动脉、冠状动脉、动脉、子宫、支气管、子宫颈、视网膜周细胞)、黑色素细胞、神经细胞(例如星形细胞)、前列腺细胞(例如上皮、平滑肌)、肾细胞(例如上皮、系膜、近端小管)、骨骼细胞(例如软骨细胞、破骨细胞、成骨细胞)、肌细胞(例如成肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、支气管)、肝细胞、成视网膜细胞和基质细胞。WO 97/37000和WO 97/37001描述了能够悬浮生长和在无血清培养基中生长并可用于产生和复制病毒的动物细胞和细胞系的产生。

[0119] 已知以上细胞类型的培养条件并且在多个公布中描述。可替代地,培养基、补充物及条件可购得,例如在Cambrex Bioproducts(East Rutherford,N.J.)的目录和另外的文献中描述。

[0120] 在某些实施方案中,本文所述的方法中使用的细胞在无血清和/或无蛋白的培养基中培养。如果培养基不含有来自人类或动物来源的血清的任何添加剂,那么在本公开的上下文中它被称为无血清培养基。应了解无蛋白意指在除去蛋白质、生长因子、其它蛋白质添加剂和非血清蛋白下发生细胞增殖的培养物,但可任选地包括例如胰蛋白酶或可能为病毒生长所需的其它蛋白酶的蛋白质。在此类培养物中生长的细胞本身天然地含有蛋白质。

[0121] 已知的无血清培养基包括伊斯科夫培养基培养基(Iscove's medium)、Ultra-CHO培养基(BioWhittaker)或EX-CELL(JRH Bioscience)。常用的含血清培养基包括伊格尔基础培养基(Eagle's Basal Medium,BME)或最低必需培养基(MEM)(Eagle,Science,130,432(1959))或达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM或EDM),所述培养基通常与至多10%胎牛血清或类似的添加剂一起使用。任选地,最低必需培养基(MEM)(Eagle,Science,130,432(1959))或达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM或EDM)可在无任何含血清的补充物下使用。现有技术中同样足够了解如PF-CHO(JHR Bioscience)的无蛋白培养基、如ProCHO 4CDM(BioWhittaker)或SMIF 7(Gibco/BRL Life Technologies)的化学上确定成分培养基以及如Primactone、Pepticase或HyPep.TM.(均来自Quest International)或乳白蛋白水解物(Gibco和其它制造商)的促有丝分裂肽。基于植物水解物的培养基添加剂具有可排除被病毒、支原体或未知感染物污染的特别益处。

[0122] 细胞培养条件(温度、细胞密度、pH值等)由于根据本公开采用的细胞系的适合性而在广泛的范围内变化,并且可适应具体病毒株的要求。

[0123] 繁殖培养细胞中的病毒的方法一般包括以下步骤:用有待培养的病毒株接种培养细胞;将受感染细胞培养达病毒繁殖所需的时间段,例如如通过病毒效价或抗原表达所确定(例如介于接种后24小时与168小时之间);以及收集繁殖的病毒。在一些实施方案中,病毒经由蚀斑纯化收集。用病毒(通过PFU或TCID50测量)接种培养细胞至1:500至1:1、优选1:100至1:5的细胞比率。将病毒加入细胞悬浮液中或施加至细胞单层上,并且在25℃至40℃、优选28℃至38℃下病毒吸在细胞上至少10分钟、至少20分钟、至少30分钟、至少40分钟、至

少50分钟、至少60分钟,但通常小于300分钟。受感染细胞培养物(例如单层)可以通过收获上清液(不含细胞)、冻融或者通过酶促作用来去除,以增加收获的培养物上清液的病毒含量。然后将收获的流体灭活或者冷冻存储。培养细胞可在约0.0001至10、优选0.002至5、更优选0.001至2的感染复数("MOI")下感染。更优选地,细胞在约0.01的MOI下感染。在感染期间,培养基与细胞培养容器面积的比率可以低于细胞培养期间。保持此比率低可使病毒最大可能地感染细胞。受感染细胞的上清液可以在感染后30至60小时或感染后3至10天收获。在某些优选实施方案中,受感染细胞的上清液在感染后3至7天收获。更优选地,受感染细胞的上清液在感染后3至5天收获。在一些实施方案中,可在细胞培养期间加入蛋白酶(例如胰蛋白酶)以允许病毒释放,并且蛋白酶可在培养期间的任何合适阶段加入。可替代地,在某些实施方案中,可收获受感染细胞培养物的上清液并且可分离或以其它方式从上清液纯化病毒。

[0124] 病毒接种物和病毒培养物优选不含(即经过测试并得出被以下病毒污染的否定结果)单纯疱疹病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒3、SARS冠状病毒、腺病毒、鼻病毒、呼肠孤病毒、多瘤病毒、双RNA病毒、圆环病毒和/或细小病毒(WO 2006/027698)。

[0125] 在病毒已经在细胞系上生长的情况下,标准的做法是将最终疫苗中的残余细胞系DNA的量减至最少,以使宿主细胞DNA的任何致癌活性降至最低。在疫苗制备期间可使用例如色谱法等标准的纯化程序去除污染DNA。残余宿主细胞DNA的去除可通过核酸酶处理,例如通过使用脱氧核糖核酸酶来加强。参考文献中公开的一种用于减少宿主细胞DNA污染的便利方法(Lundblad(2001)Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197,Guidance for Industry:Bioanalytical Method Validation.U.S.Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research(CDER)Center for Veterinary Medicine(CVM).2001年5月)涉及两步处理,首先使用脱氧核糖核酸酶(例如全能核酸酶),此酶可在病毒生长期间使用,然后使用阳离子洗涤剂(例如CTAB),此阳离子洗涤剂可在病毒体破环期间使用。还可以通过β-丙内酯处理来去除。在一个实施方案中,通过培养物上清液的全能核酸酶(benzonase)处理去除污染DNA。

[0126] 抗原的产生

[0127] 寨卡病毒可通过本领域中已知的任何合适方法产生和/或纯化或以其它方式分离。在一个实施方案中,本公开的抗原为纯化的灭活全寨卡病毒。

[0128] 在一些实施方案中,灭活病毒可如以上标题为"疫苗和免疫原性组合物的产生"的部分中所述产生。

[0129] 在某些实施方案中,本公开的寨卡病毒可通过培养非人细胞来产生。适合于产生本公开的寨卡病毒的细胞系可包括昆虫细胞(例如本文所述的蚊子细胞中的任一种)。适合于产生本公开的寨卡病毒的细胞系也可为哺乳动物来源的细胞,并且包括(但不限于):VERO细胞(来自猴肾)、马、奶牛(例如MDBK细胞)、绵羊、犬(例如来自犬肾的MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)或MDCK 33016,如WO 97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)、猫和啮齿动物(例如仓鼠细胞,例如BHK21-F、HKCC细胞或中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)),并且可从包括例如成年、新生、胎儿和胚胎在内的多个发育阶段获得。在某些实施方案中,细胞进行永生化(例如PERC.6细胞,如WO 01/38362和WO 02/40665中所述,以及如ECACC保藏号

96022940下所保藏)。在优选实施方案中,利用哺乳动物细胞,并且可选自和/或源自于以下非限制性细胞类型中的一或多种:成纤维细胞(例如皮肤、肺)、内皮细胞(例如主动脉、冠状动脉、肺、血管、皮肤微血管、脐)、肝细胞、角化细胞、免疫细胞(例如T细胞、B细胞、巨噬细胞、NK、树突状)、乳腺细胞(例如上皮)、平滑肌细胞(例如血管、主动脉、冠状动脉、动脉、子宫、支气管、子宫颈、视网膜周细胞)、黑色素细胞、神经细胞(例如星形细胞)、前列腺细胞(例如上皮、平滑肌)、肾细胞(例如上皮、系膜、近端小管)、骨骼细胞(例如软骨细胞、破骨细胞、成骨细胞)、肌细胞(例如成肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、支气管)、肝细胞、成视网膜细胞和基质细胞。WO 97/37000和WO 97/37001描述了能够悬浮生长和在无血清培养基中生长并可用于产生病毒抗原的动物细胞和细胞系的产生。在某些实施方案中,在无血清培养基中培养非人细胞。

[0130] 病毒灭活

[0131] 本公开的某些实施方案涉及含有纯化的灭活寨卡病毒的寨卡病毒疫苗和/或免疫原性组合物。如本文所用的术语“灭活寨卡病毒”意图包含已经用例如用有效量的福尔马林处理的灭活方法处理的寨卡病毒。具体地说,能从如下方法获得/从如下方法获得灭活寨卡病毒,其中在20℃至24℃的温度下将寨卡病毒用约0.01%w/v的量的甲醛处理10天。灭活寨卡病毒不再能够感染可能被尚未灭活的寨卡病毒感染的宿主细胞。在一个实施方案中,灭活寨卡病毒不再能够感染VERO细胞并对VERO细胞发挥致细胞病变作用。

[0132] 术语“纯化的寨卡病毒”意指寨卡病毒已经经受如下所述的纯化法。与未纯化的寨卡病毒相比,纯化的寨卡病毒具有较低含量的如Vero细胞蛋白质的宿主细胞蛋白质和如Vero细胞DNA的宿主细胞DNA。纯化的寨卡病毒的纯度可通过尺寸排阻色谱法测定。在尺寸排阻色谱法中纯化的寨卡病毒的主峰可超过尺寸排阻色谱法中曲线下总面积的85%,或超过尺寸排阻色谱法中曲线下总面积的90%,或超过尺寸排阻色谱法中曲线下总面积的95%。这类结果被认为是“纯化”的寨卡病毒。

[0133] 因此术语“纯化的灭活全寨卡病毒”是指能从如下方法获得/从如下方法获得的寨卡病毒,其中在20℃至24℃的温度下将纯化的寨卡病毒用约0.01%w/v的量的甲醛处理10天,并且提供占尺寸排阻色谱法中曲线下总面积的至少85%的主峰。在某些实施方案中,纯化的灭活全寨卡病毒是通过蚀斑纯化获得/能通过蚀斑纯化获得的克隆分离株。

[0134] 本领域中已知将病毒灭活或杀死以破坏其感染哺乳动物细胞的能力但不破坏病毒的二级、三级或四级结构和免疫原性表位的方法。这类方法包括化学方式与物理方式两种。适用于将病毒灭活的方式包括不限于用有效量的选自以下中的一种或多种剂处理:洗涤剂、福尔马林(本文中又称为“甲醛”)、过氧化氢、β-丙内酯(BPL)、二乙胺(BEI)、乙酰基亚乙基亚胺、热、电磁辐射、x射线辐射、γ辐射、紫外线(紫外辐射)、UV-A辐射、UV-B辐射、UV-C辐射、亚甲基蓝、补骨脂素、羧基富勒烯(C60)、过氧化氢和它们任一种剂的任何组合。如以上所提及,出于本申请的目的,术语“福尔马林”与“甲醛”可互换使用。

[0135] 在本公开的某些实施方案中,至少一种病毒化学灭活。用于化学灭活的剂和化学灭活的方法是本领域中众所周知的,并且描述于本文中。在一些实施方案中,至少一种病毒用BPL、过氧化氢、福尔马林或BEI中的一种或多种化学灭活。在至少一种病毒用BPL化学灭活的某些实施方案中,病毒可含有一个或多个修饰。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰可包括修饰核酸。在一些实施方案中,修饰核酸为烷基化核酸。在其它实施方案中,所述

一个或多个修饰可包括修饰多肽。在一些实施方案中,修饰多肽含有修饰氨基酸残基,包括修饰半胱氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏胺酸中的一种或多种。

[0136] 在至少一种病毒用福尔马林化学灭活的某些实施方案中,灭活病毒可含有一个或多个修饰。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰可包括修饰多肽。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰可包括交联多肽。在至少一种病毒用福尔马林化学灭活的某些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物还包括福尔马林。在至少一种病毒用BEI化学灭活的某些实施方案中,病毒可含有一个或多个修饰。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰可包括修饰核酸。在一些实施方案中,修饰核酸为烷基化核酸。

[0137] 在至少一种病毒用福尔马林化学灭活的某些实施方案中,任何残余的未反应福尔马林可用焦亚硫酸钠中和,可渗析出,和/或可进行缓冲液更换,以去除残余的未反应福尔马林。在一些实施方案中,焦亚硫酸钠过量加入。在一些实施方案中,溶液可使用例如串联静态混合器的混合器混合,随后过滤或进一步纯化(例如使用交叉流过滤系统)。

[0138] 本公开的某些实施方案涉及一种用于将寨卡病毒制剂灭活的方法。在一些实施方案中,所述方法包括(a)从一个或多个体外培养的细胞分离寨卡病毒制剂,所述细胞用于产生寨卡病毒制剂;以及(b)将所述寨卡病毒制剂用约0.005%至约0.02%v/v甲醛处理。

[0139] 在一些实施方案中,细胞为非人细胞。合适的非人哺乳动物细胞包括(但不限于)VERO细胞、LLC-MK2细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)细胞、MDCK 33016(如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。在一些实施方案中,哺乳动物细胞为Vero细胞。

[0140] 在所述方法的某些实施方案中,在约2℃至约42℃范围内的温度下将寨卡病毒制剂用福尔马林处理。举例来说,可在约2℃至约42℃、约2℃至约8℃、约15℃至约37℃、约17℃至约27℃、约20℃至约25℃范围内的温度下或在约2℃、约4℃、约8℃、约10℃、约15℃、约17℃、约18℃、约19℃、约20℃、约21℃、约22℃、约23℃、约24℃、约25℃、约26℃、约27℃、约28℃、约29℃、约30℃、约37℃或约42℃的温度下将寨卡病毒制剂用福尔马林处理。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂在15℃至30℃的温度下用福尔马林处理。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂在18℃至25℃的温度下用福尔马林处理。在一些实施方案中,在室温下将寨卡病毒制剂用福尔马林处理。在一些实施方案中,在22℃的温度下将寨卡病毒制剂用福尔马林处理。

[0141] 在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约1天。举例来说,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约26天、至少约27天、至少约28天、至少约29天、至少约30天或更多天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约9天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约11天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约14天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约20天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理至少约30天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理八至十二天。在

一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理九至十一天。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用福尔马林处理十天。

[0142] 在灭活处理期的中期,可将病毒制剂与福尔马林的混合物过滤以去除聚集体。在过滤后,将病毒制剂与福尔马林的混合物转移至新的容器并进一步用福尔马林处理,直到灭活处理期结束。在一些实施方案中,如果整个福尔马林处理期为八至十二天,那么在福尔马林处理四至六天后,将病毒制剂与福尔马林的混合物过滤。在一些实施方案中,如果整个福尔马林处理期为九至十一天,那么在福尔马林处理五至六天后,将病毒制剂与福尔马林的混合物过滤。在一些实施方案中,如果整个福尔马林处理期为十天,那么在福尔马林处理五天后,将病毒制剂与福尔马林的混合物过滤。此步骤的一种合适过滤器为0.2μm过滤器。

[0143] 在一些实施方案中,在15℃至30℃的温度下将寨卡病毒制剂用0.005至0.02%(w/v)福尔马林处理八至十二天。在一些实施方案中,在18℃至25℃的温度下将寨卡病毒制剂用0.008至0.015%(w/v)福尔马林处理九至十一天。在一些实施方案中,在22℃的温度下将寨卡病毒制剂用0.01%(w/v)福尔马林处理十天。

[0144] 认为灭活全寨卡病毒制剂能从如下方法获得/从如下方法获得,其中在22℃的温度下将寨卡病毒用在约0.02%w/v范围内的量的甲醛处理14天。在一些实施方案中,认为灭活全寨卡病毒制剂能从如下方法获得/从如下方法获得,其中在22℃的温度下将寨卡病毒用约0.01%w/v的量的甲醛处理10天。

[0145] 在一些实施方案中,所述方法还包括用有效量的焦亚硫酸钠中和未反应的福尔马林。在一些实施方案中,焦亚硫酸钠的有效量在约0.01mM至约100mM范围内。举例来说,焦亚硫酸钠可在约0.01mM至约100mM、约0.1mM至约50mM、约0.5mM至约20mM或约1mM至约10mM的有效浓度下或在约0.01mM、约0.05mM、约0.1mM、约0.25mM、约0.5mM、约0.75mM、约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM或约100mM的浓度下加入。在一些实施方案中,将福尔马林用约2mM焦亚硫酸钠中和。

[0146] 在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用过氧化氢处理。在一些实施方案中,在20℃至30℃的任何温度下将寨卡病毒制剂用在0.1至3%或0.1至1%范围内的浓度下的过氧化氢处理5至120分钟。在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂用在0.01%的最终浓度下的过氧化氢处理60分钟或更短时间。

[0147] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)从一个或多个体外培养的用于产生病毒制剂的细胞分离寨卡病毒制剂;(b)通过一个或多个纯化步骤纯化病毒制剂;(c)用有效量的福尔马林处理病毒制剂;(d)用有效量的焦亚硫酸钠中和病毒制剂;以及(e)制备包含灭活寨卡病毒的药物组合物。本领域中已知的纯化病毒制剂的任何方法可用以分离寨卡病毒,所述方法包括不限于使用交叉流过滤(CFF)、多模色谱法、尺寸排阻色谱法、阳离子交换色谱法和/或阴离子交换色谱法。在一些实施方案中,病毒制剂通过交叉流过滤(CFF)分离。在一些实施方案中,病毒制剂高度纯化至约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的量。

[0148] 在一些实施方案中,寨卡病毒可选自由以下病毒株组成的病毒株的组:Mr 766、ArD 41519、IbH 30656、P6-740、EC Yap、FSS13025、ArD 7117、ArD 9957、ArD 30101、ArD 30156、ArD 30332、HD 78788、ArD 127707、ArD 127710、ArD 127984、ArD 127988、ArD

127994、ArD 128000、ArD 132912、132915、ArD 141170、ArD 142623、ArD 149917、ArD 149810、ArD 149938、ArD 157995、ArD 158084、ArD 165522、ArD 165531、ArA 1465、ArA 27101、ArA 27290、ArA 27106、ArA 27096、ArA 27407、ArA 27433、ArA 506/96、ArA 975-99、Ara982-99、ArA 986-99、ArA 2718、ArB 1362、尼日利亚68、马来西亚66、凯杜古84、苏里南、MR1429、PRVABC59、ECMN2007、DakAr41524、H/PF/2013、R103451、103344、8375、JMB-185、ZIKV/H、智人/巴西/纳塔耳/2015、SPH2015、ZIKV/Hu/千叶/S36/2016、泰国(Thailand)SV0127/14、菲律宾(Philippine)COC C0740、巴西福塔莱萨(Brazil Fortaleza)2015和古巴2017。

[0149] 在某些实施方案中,寨卡病毒包括寨卡病毒非结构蛋白1(NS1)中的突变。在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有Trp98Gly突变。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含与病毒株PRVABC59的不同之处在于SEQ ID NO:1的位置98处具有Trp98Gly突变的纯化的灭活全寨卡病毒。

[0150] 含有来自至少一种灭活寨卡病毒的一种或多种抗原的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物可用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染和/或诱发有需要的受试者中针对寨卡病毒的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0151] 确定灭活完全性

[0152] 本公开的其它方面涉及用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法,所述方法通过使用两种不同细胞类型的相继感染。与仅仅使用一种细胞类型的测定相比以及与例如TCID50方法的其它方法相比,所述方法具有意外低的检测限(LOD)。此外,所述方法避免使用动物来确定灭活病毒的感染性。

[0153] 用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0154] (i)将培养的昆虫细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生昆虫细胞上清液;

[0155] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的昆虫细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0156] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0157] 虫媒病毒是由节肢动物传播到人的病毒。其包括来自黄病毒、披膜病毒(togavirus)和布尼亚病毒(bunyavirus)属。由本文公开的方法检查的虫媒病毒制剂含有能够感染哺乳动物细胞、特别是Vero细胞并对这些细胞引起致细胞病变作用的虫媒病毒。在一些实施方案中,虫媒病毒选自寨卡病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、日本脑炎病毒、登革热病毒、圣路易斯脑炎病毒、蜱传脑炎病毒、基孔肯雅病毒、阿尼昂尼昂病毒或马雅鲁病毒。在一些实施方案中,虫媒病毒为寨卡病毒。

[0158] 在一些实施方案中,寨卡病毒可选自由以下病毒株组成的病毒株的组:Mr 766、ArD 41519、IbH 30656、P6-740、EC Yap、FSS13025、ArD 7117、ArD 9957、ArD 30101、ArD 30156、ArD 30332、HD 78788、ArD 127707、ArD 127710、ArD 127984、ArD 127988、ArD 127994、ArD 128000、ArD 132912、132915、ArD 141170、ArD 142623、ArD 149917、ArD 149810、ArD 149938、ArD 157995、ArD 158084、ArD 165522、ArD 165531、ArA 1465、ArA 27101、ArA 27290、ArA 27106、ArA 27096、ArA 27407、ArA 27433、ArA 506/96、ArA 975-99、Ara 982-99、ArA 986-99、ArA 2718、ArB 1362、尼日利亚68、马来西亚66、凯杜古84、苏里南、MR1429、PRVABC59、ECMN2007、DakAr41524、H/PF/2013、R103451、103344、8375、JMB-185、ZIKV/H、智人/巴西/纳塔耳/2015、SPH2015、ZIKV/Hu/千叶/S36/2016、泰国SV0127/14、菲律宾COC C0740、巴西福塔莱萨2015和古巴2017。

[0159] 在某些实施方案中,寨卡病毒包括寨卡病毒非结构蛋白1(NS1)中的突变。在一些实施方案中,寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处含有Trp98Gly突变。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含与病毒株PRVABC59的不同之处在于SEQ ID NO:1的位置98处具有Trp98Gly突变的纯化的灭活全寨卡。

[0160] 通过将虫媒病毒制剂加入含有昆虫细胞和生长培养基的昆虫细胞培养物中,将培养的昆虫细胞用虫媒病毒制剂接种。然后将接种的昆虫细胞与虫媒病毒制剂一起在适合条件下孵育第一段时间。在一些实施方案中,第一段时间为三至七天。在一些实施方案中,第一段时间为五至七天。在一些实施方案中,第一段时间为六天。因此,在一些实施方案中,将接种的昆虫细胞与虫媒病毒制剂一起孵育三至七天。在一些实施方案中,将接种的昆虫细胞与虫媒病毒制剂一起孵育五至七天。在一些实施方案中,将接种的昆虫细胞与虫媒病毒制剂一起孵育六天。在培育期间,任何活病毒将分泌至昆虫细胞上清液中。

[0161] 所用的昆虫细胞可为能够被所研究的虫媒病毒感染并且病毒感染不改变活力的任何昆虫细胞。选择昆虫细胞,使得病毒对细胞没有致细胞病变作用。合适的昆虫细胞包括(但不限于)CCL-125细胞、Aag-2细胞、RML-12细胞、C6/36细胞、C7-10细胞、AP-61细胞、A.t.GRIP-1细胞、A.t.GRIP-2细胞、A.t.GRIP-3细胞、UM-AVE1细胞、Mos.55细胞、Sua1B细胞、4a-3B细胞、Mos.42细胞、MSQ43细胞、LSB-AA695BB细胞、NIID-CTR细胞和TRA-171细胞。在一些实施方案中,昆虫细胞为C6/36细胞。

[0162] 然后,通过昆虫细胞与虫媒病毒制剂一起孵育而产生的昆虫细胞上清液用于接种培养的哺乳动物细胞。为了接种,将昆虫细胞上清液转移至哺乳动物细胞并与哺乳动物细胞一起孵育60至120分钟或80至100分钟或90分钟。在接种后,加入细胞培养基并将哺乳动物细胞与昆虫细胞上清液一起在适合条件下孵育第二段时间。在一些实施方案中,第二段时间为3至14天。在一些实施方案中,第二段时间为五至十二天。在一些实施方案中,第二段时间为六至十天。在一些实施方案中,第二段时间为七至九天。在一些实施方案中,第二段

时间为八天。因此,在一些实施方案中,将接种的哺乳动物细胞与昆虫细胞上清液一起孵育3至14天。在一些实施方案中,将接种的哺乳动物细胞与昆虫细胞上清液一起孵育五至十二天。在一些实施方案中,将接种的哺乳动物细胞与昆虫细胞上清液一起孵育七至九天。在一些实施方案中,将接种的哺乳动物细胞与昆虫细胞上清液一起孵育八天。在培育期间,任何活病毒将对哺乳动物细胞发挥致细胞病变作用。在培育期间,任何残余复制病毒将对例如Vero细胞的哺乳动物细胞发挥致细胞病变作用。

[0163] 所用的哺乳动物细胞可为能够被所研究的虫媒病毒感染并且病毒发挥致细胞病变作用的任何哺乳动物细胞。合适的哺乳动物细胞包括(但不限于)VERO细胞、LLC-MK2细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)细胞、MDCK 33016(如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。在一些实施方案中,哺乳动物细胞为Vero细胞。

[0164] 在一些实施方案中,用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0165] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生C6/36细胞上清液;

[0166] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0167] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0168] 在一些实施方案中,用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0169] (i)将培养的昆虫细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生昆虫细胞上清液;

[0170] (ii)将培养的Vero细胞用(i)中产生的昆虫细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0171] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0172] 在一些实施方案中,用于确定虫媒病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0173] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一种时间段,由此产生C6/36细胞上清液;

[0174] (ii)将Vero细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0175] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0176] 在一些实施方案中,用于确定寨卡病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0177] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一种时间段,由此产生C6/36细胞上清液;

[0178] (ii)将Vero细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0179] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0180] 在一些实施方案中,用于确定寨卡病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0181] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育三至七天,由此产生C6/36细胞上清液;

[0182] (ii)将Vero细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0183] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0184] 在一些实施方案中,用于确定寨卡病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0185] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一种时间段,由此产生C6/36细胞上清液;

[0186] (ii)将Vero细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育3至14天;以及

[0187] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0188] 在一些实施方案中,用于确定寨卡病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0189] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育三至七天,由此产生C6/36细胞上清液;

[0190] (ii)将Vero细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育3至14天;以及

[0191] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0192] 在一些实施方案中,用于确定寨卡病毒制剂的灭活完全性的方法包括以下步骤:

[0193] (i)将C6/36细胞用经历了灭活步骤的虫媒病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育六天,由此产生C6/36细胞上清液;

[0194] (ii)将Vero细胞用(i)中产生的C6/36细胞上清液接种并将哺乳动物细胞孵育八天;以及

[0195] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0196] 在第二段时间结束时,确定病毒制剂是否对哺乳动物细胞具有致细胞病变作用。致细胞病变作用是在病毒复制期间由病毒侵袭、感染和从细胞萌发所引起的细胞结构的任何变化。在本公开的方法中,如果细胞在含有酚红的培养基中培养,那么致细胞病变作用通过培养基颜色从粉红色变成橙色或黄色来确定,或通过哺乳动物细胞的显微镜检查来确定。如果哺乳动物细胞的显微镜检查显示细胞成圆形,开始从组织培养容器(平板、孔或烧瓶)离开或从组织培养板/烧瓶清除,那么认为存在致细胞病变作用。致细胞病变作用的其它标志包括相邻细胞融合形成合胞体和出现核内包涵体或细胞质包涵体。

[0197] 如上所论述,本文公开的方法具有极低的检测限。利用这种方法,能够检测小于1.0$TCID_{50}$的病毒含量。在一些实施方案中,能够检测小于0.8$TCID_{50}$的病毒含量。在一些实施方案中,能够检测小于0.5$TCID_{50}$的病毒含量。在一些实施方案中,能够检测小于0.2$TCID_{50}$的病毒含量。在一些实施方案中,能够检测小于0.1$TCID_{50}$的病毒含量。

[0198] 以上用于确定灭活完全性的方法可用于任何将虫媒病毒灭活的方法。在一个实施方案中,用于将虫媒病毒制剂灭活的方法包括:

[0199] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离虫媒病毒制剂,其中所述细胞用于产生虫媒病毒制剂;

[0200] (b)将虫媒病毒制剂用0.005%至0.02%w/v的甲醛处理;

[0201] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0202] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0203] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0204] (iii)确定虫媒病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0205] 在一些实施方案中,用于将虫媒病毒制剂灭活的方法包括:

[0206] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离虫媒病毒制剂,其中所述细胞用于产生虫媒病毒制剂;

[0207] (b)在20℃至30℃的温度下将虫媒病毒制剂用0.1%至3%过氧化氢处理5至120分钟;

[0208] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0209] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0210] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0211] (iii)确定虫媒病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0212] 在一些实施方案中,用于将虫媒病毒制剂灭活的方法包括:

[0213] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离虫媒病毒制剂,其中所述细胞用于产生虫媒病毒制剂;

[0214] (b)在20℃至30℃的温度下将虫媒病毒制剂用0.01%过氧化氢处理60分钟;

[0215] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0216] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0217] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0218] (iii)确定虫媒病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0219] 以上用于确定灭活完全性的方法可用于任何将寨卡病毒灭活的方法。在一个实施方案中,用于将寨卡病毒制剂灭活的方法包括:

[0220] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离所述寨卡病毒制剂,其中所述细胞用于产生所述寨卡病毒制剂;

[0221] (b)将所述寨卡病毒制剂用0.005％至0.02％w/v的甲醛处理;

[0222] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0223] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的寨卡病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0224] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0225] (iii)确定寨卡病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0226] 在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂灭活的方法包括:

[0227] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离所述寨卡病毒制剂,其中所述细胞用于产生所述寨卡病毒制剂;

[0228] (b)在20℃至30℃的温度下将寨卡病毒制剂用0.1％至3％过氧化氢处理5至120分钟;

[0229] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0230] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的寨卡病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0231] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0232] (iii)确定寨卡病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0233] 在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂灭活的方法包括:

[0234] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离所述寨卡病毒制剂,其中所述细胞用于产生所述寨卡病毒制剂;

[0235] (b)在20℃至30℃的温度下将寨卡病毒制剂用0.01％过氧化氢处理60分钟;

[0236] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0237] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的寨卡病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0238] (ii)将哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0239] (iii)确定寨卡病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0240] 在一些实施方案中,将寨卡病毒制剂灭活的方法包括:

[0241] (a)从一个或多个体外培养的细胞分离所述寨卡病毒制剂,其中所述细胞用于产生所述寨卡病毒制剂;

[0242] (b)在20℃至30℃、例如22℃的温度下将寨卡病毒制剂用0.05％福尔马林处理七天;

[0243] (c)通过以下来确定灭活完全性:

[0244] (i)将培养的昆虫细胞用根据步骤(b)处理的寨卡病毒制剂接种并将昆虫细胞孵育第一段时间,由此产生上清液;

[0245] (ii)将培养的哺乳动物细胞用(i)中产生的上清液接种并将哺乳动物细胞孵育第二段时间;以及

[0246] (iii)确定病毒制剂是否含有对哺乳动物细胞产生致细胞病变作用的残余复制病毒。

[0247] 在一些实施方案中,细胞为非人细胞。合适的非人哺乳动物细胞包括(但不限于)VERO细胞、LLC-MK2细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、ATCC CCL34 MDCK(NBL2)细胞、MDCK 33016(如WO97/37001中所述的保藏号DSM ACC 2219)细胞、BHK21-F细胞、HKCC细胞和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。在一些实施方案中,哺乳动物细胞为Vero细胞。

[0248] 佐剂

[0249] 本公开的其它方面涉及寨卡病毒疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有一种或多种来自本文所述的至少一种寨卡病毒的抗原以及一种或多种佐剂。在一些实施方案中,疫苗和/或免疫原性组合物含有纯化的灭活全病毒,例如如本文所述的在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的寨卡病毒,以及一种或多种佐剂。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒以及一种或多种佐剂,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,疫苗或免疫原性组合物包含纯化的灭活全寨卡病毒以及一种或多种佐剂,所述灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。在一个实施方案中,疫苗和免疫原性组合物含有蚀斑纯化的克隆寨卡病毒分离株以及一种或多种佐剂。本公开的这类具有佐剂的疫苗和/或免疫原性组合物可用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染和/或诱发有需要的受试者中针对寨卡病毒的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0250] 已知实现疫苗的佐剂作用的各种方法,并且可联合本文公开的寨卡病毒疫苗和/或免疫原性组合物使用。一般原理和方法详述于“The Theory and Practical Application of Adjuvants”,1995,Duncan E.S.Stewart-Tull(编辑),John Wiley&Sons Ltd,ISBN 0-471-95170-6以及“Vaccines:New Generation Immunological Adjuvants”,1995,Gregoriadis G等人(编辑),Plenum Press,New York,ISBN 0-306-45283-9。

[0251] 例示性佐剂可包括(但不限于)铝盐、磷酸钙、toll样受体(TLR)激动剂、单磷脂酰脂质A(MLA)、MLA衍生物、合成脂质A、脂质A模拟物或类似物、细胞因子、皂角苷、胞壁酰二肽(MDP)衍生物、CpG寡核苷酸、革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)、聚磷腈、乳液(油乳液)、壳聚糖、维生素D、硬脂酰或十八烷基酪氨酸、病毒颗粒、脂质卷、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、泊洛沙姆颗粒、微粒、脂质体、完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。在一些实施方案中,佐剂为铝盐。

[0252] 在一些实施方案中,佐剂包括明矾、磷酸铝、氢氧化铝、硫酸铝钾和Alhydrogel 85中的至少一种。在一些实施方案中,已经发现本公开的铝盐佐剂增加本公开的寨卡病毒疫苗和/或免疫原性组合物的抗原吸附。因此,在一些实施方案中,抗原中的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%吸附至铝盐佐剂。

[0253] 本公开的某些实施方案包括一种用于制备具有佐剂的寨卡病毒疫苗或免疫原性组合物的方法,所述方法包括(a)将疫苗或免疫原性组合物与铝盐佐剂混合,其中所述疫苗或免疫原性组合物包括一种或多种来自本文所述的至少一种寨卡病毒的抗原;以及(b)将混合物在适合条件下孵育在约1小时至约24小时(例如约16小时至约24小时)范围内的一段时间,其中抗原中的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%吸附至铝盐佐剂。在所述方法的某些实施方案中,至少一种寨卡病毒为包含非人细胞适应突变(例如蛋白质NS1中的非人细胞适应突变,例如Trp98Gly突变)的寨卡病毒。在一些实施方案中,至少一种寨卡病毒为纯化的灭活全寨卡病毒,所述纯化的灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,寨卡病毒为纯化的灭活全寨卡病毒,所述纯化的灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。

[0254] 病毒纯化

[0255] 本公开的其它方面涉及纯化寨卡病毒的方法。在一些实施方案中,所述方法包括用含有寨卡病毒群体的接种物接种多个细胞,并且通过蚀斑纯化从接种的细胞中的一个或多个获得寨卡病毒克隆分离株。在一些实施方案中,细胞为非人细胞(例如昆虫细胞、哺乳动物细胞等)。在一些实施方案中,细胞为昆虫细胞(例如本文所述的蚊子细胞/细胞系中的任一种)。在一些实施方案中,细胞为哺乳动物细胞(例如本文所述的哺乳动物细胞/细胞系中的任一种)。在一些实施方案中,哺乳动物细胞为猴细胞。

[0256] 在一些实施方案中,寨卡病毒群体为非均质的(例如包含两种或更多种基因型)。在一些实施方案中,寨卡病毒群体包含寨卡病毒临床分离株(例如来自病毒株PRVABC59)和/或先前已经在细胞培养物中传代的一种或多种寨卡病毒。在一些实施方案中,蚀斑纯化(例如如本文所述)允许从非均质病毒群体基本上和/或完全分离(遗传上均质)克隆分离株。在一些实施方案中,猴细胞来自于VERO细胞系(例如VERO 10-87细胞)。在一些实施方案中,接种物包含人血清。在一些实施方案中,接种物包含一种或多种外来因子(adventitious agent)(例如一种或多种污染病毒)。在一些实施方案中,蚀斑纯化(例如如本文所述)允许基本上和/或完全纯化(遗传上均质)克隆纯化株,使其不含一种或多种外来因子。

[0257] 在一些实施方案中,描述用于分离和/或纯化寨卡病毒克隆的方法包括寨卡病毒克隆分离株的另外蚀斑纯化中的一种或多种(例如一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种等)。在一些实施方案中,描述用于分离和/或纯化寨卡病毒克隆分离株的方法包括在细胞培养物中(例如在例如蚊子细胞系的昆虫细胞中和/或在例如VERO细胞系的哺乳动物细胞中)使寨卡病毒克隆分离株传代一次或多次(例如一次或多次、两次或多次、三次或多次、四次或多次、五次或多次等)。

[0258] 本公开的其它方面涉及纯化寨卡病毒供制备疫苗或免疫原性组合物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括以下中的一个或多个(例如一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、或六个或更多个)(以任何次序,包括以下次序):

对含有寨卡病毒的样品或制剂进行深度过滤;对含有寨卡病毒的样品进行缓冲液更换和/或稀释(例如通过交叉流过滤(CFF))以产生保留物;使包含寨卡病毒的样品结合于离子交换膜(例如阴离子交换膜、阳离子交换膜)以产生结合部分,其中所述结合部分包含寨卡病毒,并且从离子交换膜洗脱结合部分;用有效量的本文所述的任何化学灭活剂处理含有寨卡病毒的样品;用焦亚硫酸钠中和含有化学灭活寨卡病毒的样品;和/或纯化包含化学灭活寨卡病毒的中和样品(例如通过交叉流过滤(CFF))。在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)使含有寨卡病毒的样品通过第一深度过滤器以产生第一洗脱物,其中第一洗脱物含有寨卡病毒;(b)通过交叉流过滤(CFF)对第一洗脱物进行缓冲液更换和/或稀释以产生第一保留物,其中第一保留物含有寨卡病毒;(c)使第一保留物结合于离子交换膜以产生第一结合部分,其中所述第一结合部分含有寨卡病毒,并且从离子交换膜洗脱第一结合部分以产生第二洗脱物,其中第二洗脱物含有寨卡病毒;(d)使第二洗脱物通过第二深度过滤器以产生第二保留物,其中第二保留物含有寨卡病毒;(e)用有效量的化学灭活剂处理第二保留物;(f)将经过处理的第二保留物用焦亚硫酸钠中和;以及(g)通过交叉流过滤(CFF)纯化中和的第二保留物。

[0259] 疫苗和/或免疫原性组合物的制剂

[0260] 本公开的其它方面涉及本公开的疫苗和/或免疫原性组合物的制剂,所述制剂含有一种或多种来自本文所述的寨卡病毒的抗原。在一些实施方案中,寨卡病毒为纯化的灭活全寨卡病毒。在一些实施方案中,纯化的灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含突变。在一些实施方案中,纯化的灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变。在一些实施方案中,纯化的灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,纯化的灭活全寨卡病毒在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处包含Trp98Gly突变,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。

[0261] 含有一种或多种来自本文所述的寨卡病毒的抗原的本公开的这类疫苗和/或免疫原性组合物可用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染和/或诱发有需要的受试者中针对寨卡病毒的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0262] 典型地,本公开的疫苗和/或免疫原性组合物被制成液体溶液或悬浮液形式的可注射液;还可制备适合在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式。这类制剂还可乳化或呈干粉形式产生。活性免疫原性成分常常与药学上可接受并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂为例如水、盐水、右旋糖、蔗糖、丙三醇、乙醇等等以及它们的组合。此外,必要时,疫苗或免疫原性组合物可含有辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂或增强疫苗或免疫原性组合物的效力的佐剂。

[0263] 疫苗或免疫原性组合物可照惯例在肠胃外,通过注射,例如皮下、经皮、皮内、皮下或肌肉内施用。适合于其它施用模式的另外的制剂包括栓剂以及在一些情况下口服、经口、鼻内、经颊、舌下、腹膜内、阴道内、肛门和颅内制剂。对于栓剂来说,传统的粘合剂和载体可包括例如聚烷二醇或甘油三酸酯;这类栓剂可由含有在0.5%至10%或甚至1-2%范围内的活性成分的混合物形成。在某些实施方案中,首先使低熔点蜡,例如脂肪酸甘油酯或可可脂

的混合物熔融,并且例如通过搅拌将本文所述的寨卡病毒疫苗和/或免疫原性组合物均匀分散。然后将熔融的均匀混合物倒入适宜尺寸的模具,并使其冷却和固化。

[0264] 本公开的疫苗和/或免疫原性组合物可用与给予制剂相容的方式并以将治疗有效和免疫原性的量施用。将施用的量取决于有待治疗的受试者,包括例如个体的免疫系统启动免疫应答的能力和所需保护程度。合适的剂量范围可包括例如约0.1μg至约100μg纯化的灭活全寨卡病毒。纯化的灭活寨卡病毒的量能够通过布拉德福德测定(Bradford assay)(Bradford等人(1976)Anal.Biochem.72:248-254)使用确定量的重组寨卡包膜蛋白建立标准曲线来确定。

[0265] 初始施用和加强注射的合适方案也是可变的,但典型的是先初始施用,随后接种或其它施用。

[0266] 施加方式可广泛地变化。用于施用疫苗或免疫原性组合物的任何常规方法都是适用的。这些包括在固体的生理学上可接受的基质上或在生理学上可接受的分散液中口服、肠胃外、通过注射等等。疫苗或免疫原性组合物的剂量将取决于施用途径并且可根据有待接种疫苗的人的年龄和抗原的配制变化。疫苗或免疫原性组合物可具有超过0.5mL、0.5mL或小于0.5mL的单位剂量体积,如本文所述。举例来说,其施用体积可为0.25mL。

[0267] 为控制张性,优选包括生理盐,例如钠盐。氯化钠(NaCl)为优选的,其含量可介于1与20mg/ml之间。可存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸二钠脱水物、氯化镁、氯化钙等等。

[0268] 本公开的疫苗和/或免疫原性组合物可包括一种或多种缓冲剂。典型的缓冲剂包括:磷酸盐缓冲液;Tris缓冲液;硼酸盐缓冲液;琥珀酸盐缓冲液;组氨酸缓冲液(尤其具有氢氧化铝佐剂);或柠檬酸盐缓冲液。缓冲液的含量典型地在5-20mM范围内。

[0269] 疫苗或免疫原性组合物的pH值一般介于5.0与8.5之间或5.0与8.1之间,并且更典型地,介于6.0与8.5之间,例如介于6.0与8.0之间、6.5与8.0之间、6.5与7.5之间、7.0与8.5之间、7.0与8.0之间或7.0与7.8之间。因此,本公开的制造方法可包括在包装前调整散装疫苗的pH值的步骤。

[0270] 疫苗或免疫原性组合物优选无菌。其优选无热原,例如每剂含有<1EU(内毒素单位,标准量度),并且优选每剂<0.1EU。其优选不含麸质。

[0271] 在某些实施方案中,本公开的疫苗和/或免疫原性组合物可包括有效浓度的洗涤剂。在一些实施方案中,洗涤剂的有效量可包括不限于约0.00005%v/v至约5%v/v或约0.0001%v/v至约1%v/v。在某些实施方案中,洗涤剂的有效量为约0.001%v/v、约0.002%v/v、约0.003%v/v、约0.004%v/v、约0.005%v/v、约0.006%v/v、约0.007%v/v、约0.008%v/v、约0.009%v/v或约0.01%v/v。不希望受理论束缚,洗涤剂帮助维持本公开的疫苗和/或免疫原性组合物处于溶解状态,并且有助于防止疫苗和/或免疫原性组合物聚集。

[0272] 合适的洗涤剂包括例如聚氧化乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(称为'Tweens')、辛苯聚醇(例如辛苯聚醇-9(Triton X 100)或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)、十六浣基三甲基溴化铵('CTAB')和脱氧胆酸钠。洗涤剂可仅仅痕量存在。痕量的其它剩余组分可为抗生素(例如新霉素(neomycin)、卡那霉素(kanamycin)、多粘菌素B(polymyxin B))。在一些实施方案中,洗涤剂含有聚山梨酸酯。在一些实施方案中,洗涤剂的有效浓度包括约

0.00005％v/v至约5％v/v的范围。

[0273] 疫苗和/或免疫原性组合物优选存储在2℃与8℃之间。理想地其避免直射光。抗原和乳液典型地混合,不过其最初可呈单独组分的试剂盒形式呈现,在临用时才混合。在施用于受试者时疫苗和/或免疫原性组合物一般将呈水性形式。

[0274] 本公开的方法

[0275] 本公开的其它方面涉及使用本文所述的疫苗和/或免疫原性组合物治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒和/或诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有纯化的灭活全寨卡病毒,例如如本文所述的在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的寨卡病毒)。本公开的其它方面涉及使用本文所述的疫苗和/或免疫原性组合物治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒和/或诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒。本公开的其它方面涉及使用本文所述的疫苗和/或免疫原性组合物治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒和/或诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。本公开的其它方面涉及使用本文所述的疫苗和/或免疫原性组合物治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒和/或诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。

[0276] 在一些实施方案中,本公开涉及用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染的方法,所述方法通过向所述受试者施用纯化的灭活全寨卡病毒,例如如本文所述的在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的寨卡病毒。

[0277] 在一些实施方案中,本公开涉及用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染的方法,所述方法通过向所述受试者施用治疗有效量的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒。在一些实施方案中,本公开涉及用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染的方法,所述方法通过向所述受试者施用治疗有效量的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,本公开涉及用于治疗或预防有需要的受试者的寨卡病毒感染的方法,所述方法通过向所述受试者施用治疗有效量的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株

PRVABC59。

[0278] 在一些实施方案中,本公开涉及用于诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述方法通过向所述受试者施用治疗有效量的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有纯化的灭活全寨卡病毒,例如如本文所述的在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的寨卡病毒)。在一些实施方案中,本公开涉及用于诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述方法通过向所述受试者施用治疗有效量的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒,其中所述寨卡病毒源自于病毒株PRVABC59。在一些实施方案中,本公开涉及用于诱发有需要的受试者中对寨卡病毒的免疫应答的方法,所述方法通过向所述受试者施用治疗有效量的本公开的疫苗和/或免疫原性组合物,所述疫苗和/或免疫原性组合物含有在SEQ ID NO:1的位置98处或在与SEQ ID NO:1的位置98相对应的位置处具有为色氨酸至甘氨酸取代的突变的纯化的灭活全寨卡病毒,其中所述寨卡病毒源自于包含根据SEQ ID NO:2的基因组序列的病毒株PRVABC59。

[0279] 在一些实施方案中,施用步骤诱发受试者中针对寨卡病毒的保护性免疫应答。在一些实施方案中,受试者为人。在一些实施方案中,受试者怀孕或打算受孕。

[0280] 在一些实施方案中,施用步骤包括一次或多次施用。施用可通过单剂时间表或多剂(初免-加强)时间表。在多剂时间表中,各种剂量可通过相同或不同的途径,例如肠胃外初免和粘膜加强、粘膜初免和肠胃外加强等来给予。典型地,其通过相同途径给予。多个剂量典型地将相隔至少1周(例如约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周、约16周等)施用。假设两个剂量相隔25-30天(例如28天)尤其有用。

[0281] 本公开的方法包括施用治疗有效量或免疫原性量的本公开的寨卡病毒疫苗和/或免疫原性组合物。治疗有效量或免疫原性量可为本公开的疫苗和/或免疫原性组合物将在施用其的未感染、感染或未暴露的受试者中诱发保护性免疫应答的量。这类应答一般将引起受试者中显现对疫苗的分泌、细胞和/或抗体介导的免疫应答。通常,这类应答包括(但不限于)以下作用中的一种或多种;产生来自例如免疫球蛋白A、D、E、G或M的免疫学类别中的任一种;B和T淋巴细胞增殖;为免疫细胞提供活化、生长和分化信号;辅助T细胞、抑制T细胞和/或细胞毒性T细胞扩张。

[0282] 优选地,治疗有效量或免疫原性量足够治疗或预防疾病症状。所需的确切量将尤其取决于以下而变化:治疗的受试者;有待治疗的受试者的年龄和整体状况;受试者的免疫系统合成抗体的能力;所需保护程度;治疗的疾患的严重度;选择的具体寨卡病毒抗原和其施用模式。本领域普通技术人员容易确定适当的治疗有效量或免疫原性量。治疗有效量或免疫原性量将在可通过常规试验确定的相对广泛的范围内。

[0283] 通过参考以下实施例,将更充分地理解本公开。然而,不应将所述实施例视为以任何方式限制本公开的任何方面或范围。

[0284] 实施例

[0285] 实施例1:克隆寨卡病毒株的产生

[0286] 本实施例描述了具有已知研究史的寨卡病毒(ZIKAV)病毒株的产生。

[0287] 材料与方法

[0288] Vero细胞的维持

[0289] 使一小瓶WHO Vero 10-87细胞在水浴中迅速地解冻,并直接接种至36℃+/2℃、5％CO_2下T-75cm^2烧瓶中19mL预温热的含有青霉素-链霉素、L-谷氨酰胺40mM和10％FBS的DMEM(达尔伯克改良最低必需培养基)中。使细胞生长至汇合并使用TryplE继代培养。此烧瓶扩张成两个T-185cm^2烧瓶,生长至汇合并继代培养至31×T-185cm^2烧瓶,并生长直到细胞达到100％汇合。通过胰酶消化来收获细胞,以800×g离心10分钟,并再悬浮于含有10％FBS和10％DMSO的DMEM中,浓度为1.9×10^7个细胞/毫升。使一小瓶Vero细胞迅速地解冻并如上所述复苏至T-75cm^2烧瓶中。将这些细胞继代培养两次以在13×T-185cm^2烧瓶中产生细胞库。在胰酶消化后,将细胞以800×g离心,并再悬浮于冷冻介质(含有10％FBS和10％DMSO的DMEM)中,浓度为4.68×10^5个细胞/毫升。将所述细胞库等分至冷冻小瓶。

[0290] 使Vero细胞在含有青霉素-链霉素、L-谷氨酰胺和10％FBS(cDMEM-10％-FBS)的DMEM中生长和维持。TryplExpress用于维持细胞和进行胰酶消化。在病毒吸附前的两天,将6孔板用3mL cDMEM-10％-FBS中$4-5\times10^5$个细胞/孔或T-25cm^2烧瓶中5mL cDMEM-10％-FBS中7×10^5个细胞或96孔板中0.1mL cDMEM-10％-FBS中1×10^4个细胞/孔接种。每天监测孵育箱以维持所指示的温度。将Vero细胞系存储在液氮中。

[0291] 蚀斑测定

[0292] 通过在生长在6孔板中的Vero细胞新鲜汇合单层中进行蚀斑滴定来测定病毒效价。使冷冻的等分试样解冻并在96孔板中cDMEM-0％-FBS中对等分试样进行一系列十倍稀释。在接种Vero细胞单层前将稀释的病毒维持在冰上。在测定时,从6孔板吸出生长培养基,并将100μL的每种病毒稀释液加入孔中。在36℃±2℃、5％CO_2下病毒吸附60分钟,其中频繁地(每10分钟)晃动板以防细胞片干燥。在病毒吸附后,将维持在40-41℃下的4mL第一琼脂糖覆盖层(1X cDMEM-2％-FBS+0.8％琼脂糖)加入每个孔中。使琼脂糖在室温下固化30分钟,然后将板在36℃+/2℃、5％CO_2下倒转孵育4-6天。在第4天,加入2mL的含有160μg/mL中性红活性染料的第二琼脂糖覆盖层。在第5天和第6天目测蚀斑。

[0293] 通过TCID50测定定量病毒

[0294] 还通过在生长在96孔板中的Vero细胞新鲜汇合单层中进行滴定来确定病毒效价。使冷冻的等分试样解冻并在96孔板中cDMEM-2％-FBS稀释剂中对等分试样进行一系列十倍稀释。在接种Vero细胞单层前将稀释的病毒维持在冰上。在测定时,从96孔板吸出生长培养基,并将100μL的每种病毒稀释液加入孔中。将平板在36℃+/2℃、5％CO_2下孵育5天。使用Reed/Muench计算法计算50％组织培养感染剂量(TCID50)效价。

[0295] 测试物品

[0296] 寨卡病毒株PRVABC59(干冰上的一个0.5mL小瓶)收自美国疾病控制与预防中心(CDC)。通过RT-PCR证实了寨卡病毒的鉴定。通过PCR,测出病毒株对甲病毒和支原体污染呈阴性。表1中概述了这个信息。

[0297] 表1:PRVABC59病毒株信息

[0298]

病毒株	分离信息	患者信息	制剂信息	分析	PFU
PRVABC59 (亚洲)	人血清; 2015年到过波多黎各旅行	未提供	传代: Vero(2)C6/36(1) 制剂: 2016年1月29日 宿主: C6/36	■ 通过离子激流测序: 基因登录号 KU501215 ■ 通过蚀斑测定获得 PFU ■ 通过 RT-PCR 得到同一性 ■ 通过 PCR 对甲病毒呈(-) ■ 通过 ATCC 和 ABM PCR 对支原体呈(-)	6.7 log pfu/mL

[0299] 测序

[0300] 使用QIAampViral RNA Mini Spin试剂盒,根据制造商方案,从每个分离株的稳定病毒收获物提取RNA。从每个分离株提取的RNA用于建立和扩增涵盖整个寨卡病毒基因组的6个cDNA片段。在1％琼脂糖/TBE凝胶上分析扩增的cDNA片段的尺寸和纯度,随后使用Qiagen快速凝胶提取试剂盒进行凝胶纯化。使用ABI 3130XL基因分析测序仪进行自动测序反应。使用Lasergene SeqMan软件分析测序数据。

[0301] 结果

[0302] 寻找一种与美洲当前的寨卡爆发有关的具有已知研究史的ZIKAV病毒株。为此,选择ZIKAV病毒株PRVABC59。为了产生适合于在Vero细胞中生长的充分表征的病毒,首先使ZIKAV PRVABC59在Vero细胞中扩增(P1)。

[0303] 将具有100％汇合的Vero细胞(T-175cm^2)的烧瓶在4mL cDMEM-0％-FBS中以MOI 0.01感染。在36℃±2℃、5％CO_2下使病毒吸附至单层,历时60分钟,然后在36℃±2℃、5％CO_2下施加20mL cDMEM-0％-FBS进行病毒扩增。在接种后每天监测细胞层的致细胞病变作用(CPE)(图1)。在96小时后,通过收集培养基并通过离心(600×g,4℃,10分钟)净化来收获上清液。通过加入海藻糖至18％w/v的最终浓度,使收获物稳定。将散装物等分至0.5mL冷冻小瓶中并存储在-80℃下。

[0304] 通过TCID50测定分析Vero细胞单层上稳定化的P1收获物中感染性病毒的存在。通过在0小时开始,每天取等分试样,监测生长动力学。至72小时,到达峰值效价(图2)。

[0305] 通过在Vero细胞的6孔单层上滴定来自第3天的收获物对P1材料进行蚀斑纯化。第6天目测蚀斑,并通过在塑料板的底部上在不同并且单独的蚀斑周围画个圆来鉴定有待分离的10个蚀斑。通过使用无菌的大口径移液管提取琼脂糖塞同时敲碎孔的底部并用cDMEM-10％-FBS清洗来挑选蚀斑。将琼脂糖塞加入0.5mL cDMEM-10％-FBS中,旋转,标记为PRVABC59 P2a-j并放入孵育箱中36℃±2℃、5％CO_2下过夜。

[0306] 三个蚀斑(PRVABC59 P2a-c)继续用于另外的纯化。每个分离株一式两份地在无溶剂下涂铺至Vero细胞的新鲜6孔单层上。将所述P2/P3转换进行蚀斑纯化,并标记为PRVABC59 P3a-j。

[0307] 六个蚀斑(PRVABC59 P3a-f)继续用于最后一轮纯化。每个分离株一式两份地在无

溶剂下涂铺至Vero细胞的新鲜6孔单层上。将所述P3/P4转换进行蚀斑纯化,并标记为PRVABC59 P4a-j。

[0308] 将来自P4蚀斑纯化的六个蚀斑(PRVABC59 P4a-f)在T-25cm^{2}烧瓶中Vero细胞单层上盲目传代。将每个挑选的蚀斑在2mL cDMEM-0%-FBS中稀释-在36℃±2℃、5%CO_2下使1mL吸附1小时;另1mL用海藻糖(18%v/v最终)稳定并存储在<-60℃下。在病毒吸附后,将cDMEM-0%-FBS加入每个烧瓶中并在36℃±2℃、5%CO_2下生长4天。收获病毒上清液,通过离心(600×g,4℃,10分钟)净化,在18%海藻糖中稳定,并且等分并存储在<-60℃下。通过TCID50测试所述P5种子的寨卡病毒效力(图3)。

[0309] 将T-175cm^{2}烧瓶的Vero细胞汇合单层于4mL cDMEM-0%-FBS中以MOI 0.01感染六个PRVABC59克隆(P5a-f)中的每一种。在36℃+/2℃、5%CO_2下使病毒吸附60分钟,然后将20mL cDMEM-0%-FBS加入每个烧瓶并使之在36℃+/2℃、5%CO_2下生长。每天监测Vero细胞单层的健康状况和CPE。如所指示(图4),在第3天和第5天收获病毒。将来自第3天和第5天的P6病毒株收获物汇集,用18%海藻糖稳定,等分并存储于<-60℃下。

[0310] 测试PRVABC59(P6a-f)的六个克隆中的每一个的寨卡病毒体外效力(图5)。通过两种不同的方法TCID50和蚀斑滴定来测定效力。通过目测检查CPE(显微镜)和通过测量与红色(无CPE)相比显示CPE(黄色)的孔的吸光度差异(A_{560}-A_{420})来计算TCID50。在读板器上读取平板,并施加至与用显微镜读取的平板相同的计算法(吸光度)。两种评分技术之间的TCID50值相当类似,而通过蚀斑滴定获得的值较低。

[0311] 以下表2中展示了P6病毒产生和表征的概述。

[0312] 表2:用于产生克隆ZIKAV病毒株的病毒传代和表征的概述

[0313]

传代	种子产生/纯化	表征
P1	Vero 中的病毒扩增	TCID50 效价
P2	通过蚀斑滴定扩增 P1; P1 的蚀斑纯化	蚀斑纯化
P3	从 P2 蚀斑测定挑选蚀斑和传代; P2 的蚀斑纯化	蚀斑纯化
P4	从 P3 蚀斑测定挑选蚀斑和传代; P3 的蚀斑纯化	蚀斑纯化
P5	Vero 细胞中扩增 P4 蚀斑(a-f)	TCID50 效价
P6	Vero 细胞中扩增 P5(a-f)病毒	TCID50 效价、蚀斑表型、基因型、完整基因组测序、生长动力学

[0314] 寻找一种密切类似原始分离株的包膜糖蛋白序列的分离的寨卡病毒克隆,因为黄病毒的包膜蛋白是所述病毒的显性免疫原性部分。PRVABC59克隆P6a、P6c、P6d和P6f在包膜区中的核苷酸990处含有G→T突变(G990T),引起包膜残基330处Val→Leu的氨基酸突变,而PRVABC59克隆P6b和P6e的包膜基因相对于参考病毒株(GenBank参考KU501215.1)是同一的(表3和图6)。

[0315] 表3:PRVABC59 P6克隆的测序

[0316]

包膜测序(来自 PRVABC59 的参考基因；登录号 KU501215)				
病毒株	**核苷酸**	**氨基酸**	**突变**	**注释**
PRVABC59 P6a	Env-990: G→T	Env-330: Val330→Leu	**Val/Leu**	4个读段中的3个突变
PRVABC59 P6b	Env-1404: T→G 沉默	野生型	野生型	野生型相对于参考
PRVABC59 P6c	Env-990: G→T	Env-330: Val330→Leu	**Val/Leu**	4个读段中的3个突变
PRVABC59 P6d	Env-990: G→T	Env-330: Val330→Leu	**Val/Leu**	2个读段中的2个突变
PRVABC59 P6e	野生型	野生型	野生型	野生型相对于参考
PRVABC59 P6f	Env-990: G→T	Env-330: Val330→Leu	**Val/Leu**	2个读段中的2个突变。190 bp 未测序(aa 421-484)。
完整基因组测序(来自 PRVABC59 的参考基因；登录号 KU501215)				
病毒株	**核苷酸**	**氨基酸**	**突变**	**注释**
PRVABC59 P6b	Env-1404 T→G	野生型	沉默	2个读段中的2个突变
	NS1-292 T→G	NS1-98 Trp98→Gly	**Trp/Gly**	2个读段中的2个突变
PRVABC59 P6e	NS1-292 T→G	NS1-98 Trp98→Gly	**Trp/Gly**	2个读段中的2个突变

[0317] 然后,两个在塞卡包膜序列中缺乏突变的克隆经受完整基因组测序。测序结果概述于以上表3中。序列分析揭露了两个克隆的NS1区域中的核苷酸292处具有T→G取代,引起NS1残基98处的Trp→Gly突变。NS1 W98G突变位于ZIKAV NS1的翼结构域的缠绕环中,所述缠绕环与膜缔合、与包膜蛋白的相互作用以及可能六聚NS1的形成相关联。虽然其它的色氨酸残基(W115、W118)在黄病毒中高度保守,但W98不是(图7)。然而,有趣地,在11种不同的ZIKAV病毒株中观察到W98残基100％保守,包括来自非洲和亚洲谱系的那些病毒株。表4中概述了在每种病毒株中鉴定出的突变。

[0318] 表4:在PRVABC59 P6克隆中鉴定出的突变的概述

[0319]

在包膜中鉴定出的突变		
克隆	核苷酸	氨基酸
P6a	G990T	V330L
P6b	T1404G	(沉默)
P6c	G990T	V330L
P6d	G990T	V330L
P6e	无	无
P6f	G990T	V330L
在基因组中鉴定出的另外的突变		
克隆	核苷酸	氨基酸
P6b	NS1-T292G	NS1-W98G
P6e	NS1-T292G	NS1-W98G
参考序列：KU501215.1 (PRVABC59)		

[0320] 对ZIKAV PRVABC59 P6原液进行表型分析,以表征ZIKAV克隆。如图8中所示出和图9中所定量,与具有大小蚀斑的混合群体的P1病毒相比,每个克隆分离株由大尺寸蚀斑的相对均质群体组成。这些数据表明成功分离单个ZIKAV克隆。

[0321] 然后,分析ZIKAV PRVABC59 P6克隆在Vero细胞中的生长动力学分析。在无血清生长培养基中用0.01$TCID_{50}$/细胞的每个ZIKAV P6克隆感染Vero细胞。每天取病毒上清液样品,并且同时通过$TCID_{50}$测定来测定感染效价。所有P6克隆的峰值效价都出现在第3天与第4天之间(约9.0log_{10} $TCID_{50}$/mL)。各种P6克隆的生长动力学无显著差异(图10)。

[0322] 综上所述,结果表明成功产生寨卡病毒种子。所述种子选择需要了解病毒的生长史、动力学、产率、基因型和表型。重要的是,寨卡病毒株的克隆分离允许成功纯化病毒,使其不含污染因子(例如在亲本人分离株中可能存在的外来因子)。有趣地,三次依序蚀斑纯化成功地快速选择适应Vero细胞的病毒(病毒株P6a-f),这些病毒株能够在无血清的Vero细胞培养物中很好地复制,其中病毒株P6a、c、d和f在病毒包膜蛋白中具有突变,而病毒株p6b和p6e在病毒NS1蛋白中获得突变(病毒包膜没有修饰)。另外,适应Vero的病毒株能够使由这些病毒株繁殖的随后病毒传代高效并且可复现地生长和制造。不希望受理论束缚,在病毒株P6a、c、d和f中观察到的Env-V330L突变可能是体外适应的结果,因为在Vero细胞中传代时也观察到Env330处的突变(Weger-Lucarelli等人2017.Journal of Virology)。因为包膜蛋白是寨卡病毒的显性免疫原性表位,所以在Env中含有Vero适应性突变的病毒株可能负面影响疫苗免疫原性。不希望受理论束缚,蛋白质NS1中的适应突变不仅看似增强病毒复制,而且还减少或以其它方式抑制例如寨卡病毒的包膜蛋白E(Env)中不合需要的突变发生。此外,可知在病毒生命周期期间NS1结合于包膜蛋白。此突变(NS1W98G)可能与NS1在下游加工期间与病毒缔合并且可能共同纯化的能力相关联。还已知NS1是免疫原性的,并且可能与对疫苗的免疫应答相关联。

[0323] 实施例2:源自于P6b和P6e病毒株的纯化的灭活寨卡病毒疫苗(PIZV)的临床前免

疫原性和功效

[0324] 以下实施例描述了源自于P6b和P6e病毒株的灭活寨卡病毒疫苗(PIZV)在CD1和AG129小鼠中的临床前免疫原性和功效。如实施例1中所述,从流行病相关的PRVABC59病毒株产生六个克隆,并且挑选两个(P6b和P6e)用于进一步的临床前免疫原性和功效研究。

[0325] 材料与方法

[0326] 寨卡病毒疫苗的纯化、灭活和配制

[0327] 产生大量的适用于临床前免疫原性和功效研究的灭活ZIKAV疫苗并表征。通过以MOI 0.01感染汇合Vero细胞的烧瓶,从P6b和P6e病毒株扩增病毒。使病毒在36℃±2℃/5%CO_2下吸附1小时。在吸附后,将20mL cDMEM-0%-FBS加入每个烧瓶中并在36℃±2℃/5%CO_2下生长五天。在感染后第3天和第5天收获细胞上清液,并通过离心来净化细胞碎片。

[0328] 对于每种分离株,将净化过的上清液汇集,在含有18%海藻糖的DMEM中稳定并存储在<-60℃下。使汇集的净化过的病毒上清液在37℃水浴中解冻并且在4℃下用全能核酸酶处理过夜。在全能核酸酶处理后,将每个样品施加于Sartorius PP3深度过滤器。在深度过滤后,将每个样品施加于Centricon Plus-70切向流过滤(tangential flow filtration,TFF)装置。将保留物进行缓冲液更换,稀释并施加于Sartorius SartobindQ IEXNano。将每个样品施加于第二Sartorius SartobindQ IEXNano并使用3步洗脱法利用250mM、500mM和750mM NaCl洗脱。在MonoQ色谱法和稀释后,将每种250mM洗脱物施加于Centricon Plus-70交叉流过滤(CFF)装置进行缓冲液更换,用PBS稀释至35mL并存储在2-8℃下。

[0329] 对于福尔马林灭活,在缓缓旋动下将新鲜制备的1%甲醛逐滴加入每个纯化的样品中,获得0.02%的最终甲醛浓度。在每天倒转下,将样品在室温(约22℃)下孵育14天。在室温下将甲醛用焦亚硫酸钠中和15',然后施加于Centricon Plus-70切向流过滤(TFF)装置。通过加入50mL原料药缓冲液(10mM NaH2PO4、50mM NaCl、6%蔗糖,pH 7.4),将缓冲液更换四次。然后将每个样品用原料药缓冲液稀释至15mL,使用0.2m注射器式过滤器杀菌,等分至无菌的加塞玻璃小管(每小瓶0.5mL)并冷冻在<-60℃下。

[0330] 通过TCID50测定和双感染性测定来证实病毒灭活。简单地说,将原料药样品施加于C6/36细胞并扩增6天。将来自C6/36细胞的上清液施加于Vero细胞并监测CPE 8天。为配制药品,使PIZV原料药的小瓶解冻,根据样品类型汇集,并在有或者没有Alhydrogel(Brenntag;0.5mg/mL最终,每剂0.050mg)的PBS中稀释至1μg/mL或10μg/mL并在缓缓搅动下在2-8℃下孵育过夜。然后将所得药品批次等分至无菌的加塞玻璃小管并存储在2-8℃下,直到使用。图11提供了用于制备药品的步骤的概述。

[0331] 小鼠免疫接种和攻击

[0332] 对于免疫原性研究,将六周龄的雄性和雌性Swiss-ICR(CD-1)小鼠分成6组(n=10只/组)。在第0天,通过肌肉内(i.m.)途径(2×0.05mL注射液)将第1-5组中的小鼠用0.1mL疫苗接种。第6组中的小鼠用作为安慰剂对照物的PBS接种。在第28天和第56天,使用与第0天相同的剂量和疫苗类型对小鼠进行加强。在第-1天(免疫前)、第27天(初免)、第42天(加强1)和第70天(加强2)收集血液样品。

[0333] 对于免疫原性和功效研究,将四周龄的雄性和雌性AG129小鼠分成7组(n=5只/组)。在第0天,通过肌肉内(i.m.)途径(2×0.05mL注射液)将第1-6组中的小鼠用0.1mL疫苗

接种。第7组中的小鼠用作为安慰剂对照物的PBS接种。在第28天,使用与第0天相同的剂量和疫苗类型对小鼠进行加强。在第-1天(免疫前)、第27天(初免)和第55天(加强)从尾静脉收集血液样品。在施以安乐死时,在用异氟烷深度麻醉(终末)下经由心脏穿刺对小鼠放血。在第56天,在腹膜内用10^4蚀斑形成单位(PFU)的ZIKAV PRVABC59攻击小鼠。

[0334] 血清转移

[0335] 从PIZV接种的和攻击的AG129小鼠收集血清并在汇集后冷冻(表6的第1组、第2组、第4组和第5组)。使血清池解冻,并通过在PBS中三倍稀释血清池来产生测试物品。使用AG129正常小鼠血清在PBS中的3倍稀释产生安慰剂。

[0336] 测试物品呈0.1mL腹膜内注射液施用至AG129小鼠(向对照小鼠施用同等体积的安慰剂物品)。然后在腹膜内,用100μL的10^4蚀斑形成单位的寨卡病毒株PRVABC59攻击动物。

[0337] 在第-11天(免疫接种前),通过尾部放血从十只小鼠呈全血收集按重量计的容许的血容量。在第1天(最初循环Nab)和第4天(病毒血症),通过尾部放血从每只小鼠收集全血。在深度麻醉下通过心脏穿刺来进行在致命攻击后的终末放血,获得更大容量,然后通过颈椎脱臼法施以安乐死。血液样品被收集在microtainer SST血清分离凝胶管中并且凝固至少30分钟,然后通过离心(10,000×g,2分钟)分离血清并冷冻在-80℃下。

[0338] 蚀斑减少中和测试

[0339] 通过如先前所述(参见例如Osorio等人Lancet Infect Dis.2014年9月;14(9):830-8)的蚀斑减少中和测试(plaque reduction neutralization test,PRNT)测定中和抗体效价。

[0340] 报告病毒颗粒(RVP)中和测定

[0341] 通过在96孔板中生长的Vero细胞中用恒定量的寨卡RVP滴定血清样品来分析中和抗体效价。RVP含有寨卡(病毒株SPH2012)的prME蛋白和基于登革热的海肾荧光素酶报告体。简单地说,将血清在56℃下热灭活30分钟,稀释,然后在37℃下与RVP一起孵育。然后将血清/RVP混合物与Vero细胞混合并在37℃±2℃/5%CO_2下孵育72小时,然后用荧光素酶底物检测。使用JMP11非线性4参数分析来分析数据,相对于阳性追踪对照物归一化,并报告有效剂量50%(EC_{50})。

[0342] 除非相反地指示,否则所有另外的实验方法均如以上实施例1中所述进行。

[0343] 结果

[0344] 为了评定6周龄的雄性和雌性CD-1小鼠中候选PIZV的免疫原性,通过肌肉内途径,用0.1μg(+明矾)、1.0μg(+明矾)剂量的源自于ZIKAV PRVABC69 P6b或P6e病毒株的疫苗对成组的CD-1小鼠(N=10只/组)进行免疫接种。为了评定对佐剂的需要,用0.1μg源自于P6e并缺乏明矾佐剂的疫苗对一组动物接种疫苗。在第0天、第28天和第56天接种疫苗,其中接受PBS的第6组作为安慰剂对照物(图12A和表5)。

[0345] 表5:CD-1小鼠中的PIZV制剂和攻击

[0346]

组	病毒株	剂量(μg)	明矾(μg)	N
1	P6b	0.1	0.50	10
2	P6b	1.0	0.50	10
3	P6e	0.1	0.50	10
4	P6e	1.0	0.50	10
5	P6e	0.1	-	10
6	安慰剂(PBS)	-	-	10

[0347] 在接种疫苗后,通过RVP中和测定,针对ZIKAV特异性中和抗体来测试初次(第27天)、第二次(第40天)和第三次(第70天)免疫接种后收集的血清样品(图12B)。在接受第一剂后的二十七天,与PBS安慰剂对照组相比,在接种源自于含有明矾的任一克隆的PIZV的小鼠中观察到轻微的中和抗体应答。重要的是,在第二次免疫接种(第40天)后这种应答显著增加,但在免疫接种第三剂(第70天)后不再增强。在接种无佐剂的疫苗的小鼠中未观察到中和抗体应答(图12B)。

[0348] 为了评定候选PIZV的免疫原性和保护功效,在第1天和第28天通过肌肉内途径,用0.1μg剂量(+明矾)、1.0μg剂量(+明矾)或0.1μg剂量(-明矾)的源自于ZIKAV PRVABC59 P6b或P6e原液的疫苗对成组的4周龄AG129小鼠(n=5只/组)进行免疫接种(图13A和图6)。

[0349] 表6:AG129小鼠中的PIZV制剂和攻击

[0350]

组	性别	病毒株	剂量(μg)	明矾(μg)	N

[0351]

1	F	P6b	0.1	0.50	5
2	F	P6b	1.0	0.50	5
3	F	P6b	0.1	-	5
4	M	P6e	0.1	0.50	5
5	M	P6e	1.0	0.50	5
6	M	P6e	0.1	-	5
7	M	安慰剂(PBS)	-	-	5

[0352] 在接种疫苗后,在第56天,用10^4PFU ZIKAV PRVABC59(低传代)腹膜内攻击接种疫苗的小鼠和对照小鼠。针对ZIKAV特异性中和抗体应答,测试在初次(D27)和二次(D55)免疫接种后收集的血清样品(图13B和表7)。只有接受高剂量的具有明矾佐剂的疫苗的组(第2组和第5组)在单次免疫接种后引起中和抗体应答,应答在加强后显著增加。相比之下,接受低剂量或高剂量的具有明矾佐剂的疫苗的组在第二剂后产生高的中和抗体应答。在接受两剂疫苗后,不管剂量或来自P6克隆的来源如何,接受具有明矾佐剂的疫苗的小鼠组之间均不存在统计学差异。

[0353] 表7:ZIKAV特异性中和抗体应答

[0354]

		血清中和抗体效价			
		D27 (初免)		D55 (加强)	
组	制剂	GMT	% sc	GMT	% sc
1	P6b 0.1 μg + 明矾	<20	40	1280	100
2	P6b 1.0 μg + 明矾	135	80	2229	100
3	P6b 0.1 μg - 明矾	<20	0	<20	0
4	P6e 0.1 μg + 明矾	<20	20	640	100
5	P6e 1.0 μg + 明矾	30	100	905	100
6	P6e 0.1 μg - 明矾	<20	0	<20	20
7	PBS	<20	0	<20	0

[0355] 还监测所有组在攻击后21天内的死亡率、发病率和重量减轻。在攻击后检测到病毒血症并通过蚀斑滴定定量。如通过蚀斑减少中和测试(PRNT)测定以及类似的二次中和测定所评定,接种低剂量或高剂量的用明矾配制的候选PIZV的小鼠(第1组、第2组、第4组和第5组)完全避开致命的ZIKAV攻击(表8)。在接种疫苗的小鼠中未观察到重量减轻或疾病的临床征象,在攻击后的三天没有可检测的感染性病毒血症,并且所有接种低剂量或高剂量抗原+明矾佐剂的小鼠都存活至攻击后21天(图14-16)。相比之下,所有未处理小鼠的攻击均引起攻击后第2天的高病毒血症以及攻击后第10天与第18天之间的发病/死亡(中位存活期=D13)。另外,接种低剂量的无明矾佐剂的源自于病毒株P6b的疫苗的小鼠的攻击引起攻击后第2天的高病毒血症和类似于安慰剂对照组的中位存活期天数,而接种低剂量的无明矾佐剂的源自于克隆e的疫苗的小鼠仍然得到部分保护,其中中位存活期为19天。这些结果表明在明矾下免疫接种更有效,可能需要二次免疫接种,并且低剂量与高剂量同等有效。

[0356] 表8:血清中和抗体效价

[0357]

池	血清中和抗体效价	
	终末(攻击后)	
	$PRNT_{50}$	二次测定
明矾(1、2、4、5)	10240	20480
没有明矾(3、6)	2560	2560
PBS (7)	1280	1280

[0358] 另外,测试由全灭活P7b和P7e病毒(分别来自P6b和P6e病毒株的另一传代)产生的疫苗原料药(DS)中NS1的存在。使用用对寨卡病毒NS1的亚洲和非洲谱系均具有反应性但与登革热NS1无法交叉反应的单克隆抗体预包被的平板进行夹心ELISA。制备DS的重复2倍、4倍、8倍、16倍和32倍稀释液,并与在0-8ng/mL的浓度下一式两份地与使用重组纯化NS1的标准曲线相比。制备单独DS缓冲液的一式两份的稀释液作为阴性对照物。用抗NS1 HRP-缀合物检测到结合NS1,并且将具有单独DS缓冲液的孔的吸光度(A_{450}-A_{630})减去在含有匹配DS样品的孔中测量的吸光度。夹心ELISA的结果展示于以下表9中。有趣地,观察到NS1与疫苗原

料药制剂一同纯化,这表明病毒NS1可为全灭活病毒疫苗的免疫原性组分。

[0359] 表9:NS1 ELISA

[0360]

疫苗制剂中的病毒株	样品OD	预测 log ng/mL	标准误差	下限95%	上限95%	稀释因子	预测浓度(ng/mL)
P7b	3.61	0.951	0.018	0.915	0.986	32	约 285
P7e	3.79	0.980	0.023	0.935	1.024	32	约 306

[0361] 接着测试在抗体被动转移后免遭野生型寨卡病毒攻击所需要的中和抗体(Nab)的阈值。(表10A和B)。

[0362] 表10A:AG129小鼠中被动转移研究的设计

[0363]

组	测试物品	血清稀释	IP前预测Nab效价
1	100μL	1/3	6827/3.83
2	100μL	1/9	2276/3.36
3	100μL	1/27	759/2.88
4	100μL	1/81	253/2.40
5	100μL	1/243	84/1.93
6	100μL	1/729	28/1.45
7	100μL	1/2187	9/0.97
8	100μL	PBS	-

[0364] 表10B:AG129小鼠中被动转移研究的时机

[0365]

描述	研究天数
被动转移	第0天
初始放血(AM)	第1天
攻击(PM)	第1天
病毒血症放血	第4天
终末放血	对于存活小鼠来说,第29日

[0366] 将来自接种疫苗和攻击的AG129小鼠的汇集血清在PBS中连续稀释3倍,并经腹膜内注射至7组(N=5只/组)5-6周龄的AG129小鼠中。预免疫AG129小鼠血清用作安慰剂对照物(第8组)。在被动转移后(约16-19小时后),从每只小鼠收集全血并通过离心分离血清,然后进行病毒攻击,以测定循环中和抗体效价(图17)。在即将病毒攻击时,小鼠组(称为第1组、第2组、第3组、第4组、第5组、第6组、第7组、第8组)分别具有2.69、2.26、1.72、1.30、<1.30、<1.30、<1.30、<1.30的平均log10中和抗体效价。

[0367] 在ZIKV nAb被动转移后的二十四小时,经腹膜内将小鼠用10^4pfu ZIKV PRVABC59攻击。在攻击后,每天称重动物,并且一天监测疾病征象1-3次,历时28天。基于症状,给予每只动物临床分数(表11)。对濒死的和/或显示明显神经病学征象(临床分数≥2)的动物施以人性化的安乐死并算作是未存活动物。

[0368] 表11:所给予的临床分数的描述,同时监测发病和死亡

[0369]

分数	描述
0	正常外观和行为
1	毛皮稍微起皱和/或整体上体况变坏
2	以上行为/外观增加、呼吸改变、抽搐、反社会行为
3	神经病第一征象-严重弓背姿势、部分瘫痪(不动、步态不稳、后肢无力、严重抽搐)或完全瘫痪
4	发现死亡，未先显示分数2或3的征象

[0370] 疾病征象是在对照组(第8组)和第5-7组中攻击后的九天开始出现,具有相对应的重量减轻(图18)。在攻击后的三天,从每只动物收集全血并通过离心分离血清。使用蚀斑滴定测定来分析血清样品中感染性ZIKV的存在(图19)。在第1-8组中小鼠的平均感染效价(log_{10}pfu/mL)分别为1.66、2.74、4.70、4.92、7.24、7.54、7.54和7.46。重要的是,与对照小鼠相比,第1-4组中具有可检测水平的ZIKV中和抗体(≥1.30log_{10})的小鼠具有统计上显著较低水平(低102.5至106.0倍的效价)的病毒血症(p=0.0001、0.0003、0.0007和0.0374)。这些结果表明可检测水平的ZIKV中和抗体(≥1.30log10)以剂量依赖性方式减少病毒血症。

[0371] 第1-8组中的小鼠的中位存活期天数分别为:不确定、第17天、第17天、第13天、第11天、第11天、第11天和第10天(图20)。重要的是,具有可检测的ZIKV中和抗体效价的小鼠组(第1-4组)的存活曲线在统计学上不同于对照组(第8组)(分别p=0.0019、0.0019、0.0019、0.0153)。这些结果表明可检测水平的ZIKV中和抗体(≥1.30log_{10})以剂量依赖性方式延迟发病。

[0372] 最终,将每只动物的ZIKV中和抗体效价相对于其对应的病毒血症效价作图并进行线性回归分析。观察到ZIKV中和抗体效价与攻击后第3天的病毒血症水平之间的高度负相关关系(图21)。以下表12中展示了被动转移研究结果的概述。

[0373] 表12:被动转移结果的概述

[0374]

组	血清稀释	循环 ZIKV nAb GMT	病毒血症(第3天) log10 pfu/mL	存活%(第28天)	中位存活期天数
1	1/3	2.69 ± 0.17	1.66 ± 0.62	20	24
2	1/9	2.26 ± 0.13	2.73 ± 0.68	0	17
3	127	1.72 ± 0.16	4.69 ± 0.77	0	17
4	1/81	1.30 ± 0.16	4.94 ± 1.29	0	13
5	1/243	<1.30	7.25 ± 0.10	0	11
6	1/729	<1.30	7.54 ± 0.31	0	11
7	1/2187	<1.30	7.52 ± 0.39	0	11
8	PBS	<1.30	7.47 ± 0.37	0	10

[0375] 虽然在这个实验中接受ZIKAV中和抗体的小鼠组没有完全避开致命的ZIKAV攻击,

但证明了在具有可检测水平的循环ZIKAV中和抗体效价的小鼠组中以剂量依赖性方式降低病毒血症水平和延迟发病。

[0376] 综上所述,来自CD-1和AG129小鼠两个研究的临床前数据表明,源自于单独的和充分表征的病毒克隆的PIZV是免疫原性的,并且能够预防野生型ZIKAV的攻击。重要的是,低疫苗剂量和高疫苗剂量在两剂量后引起类似的中和抗体应答,且对致命的ZIKAV攻击提供类似水平的预防。有趣地,接种没有佐剂的候选PIZV的小鼠还显示部分避开ZIKAV攻击。疫苗抗血清显著减少被动免疫的AG129小鼠中的病毒血症,并且针对致命的ZIKAV攻击,延长存活期。这些结果还证明了在高度ZIKAV易感的AG129小鼠模型中充分表征的候选PIZV对ZIKAV感染高度有效。

[0377] 另外,发现第7代的PRVABC59(来自PRVABC59 P6e)的序列与第6代在遗传上同一。这是令人意外的,因为一般认为黄病毒在遗传上不稳定。选择PRVABC59 P6e作为前主要病毒种子,这部分是因为其在7个传代中遗传稳定。不希望受理论束缚,相信这种增强的遗传稳定性可能是因为NS1的翼结构域中单个氨基酸取代(W98G),因为这是在适应Vero细胞的PRVABC59 P6基因组中观察到的唯一突变。另外,遗传稳定性和均一性是有利的,因为其减少随后的可用于疫苗配制的病毒株的变化性并增加这些病毒株的可重复生产。

[0378] 实施例3:P6a和P6e病毒株的表型的临床前评定

[0379] 材料与方法

[0380] AG129小鼠(缺乏干扰素α/β和γ受体)易感染ZIKV和包括脑部重度病变的疾病。14周龄的AG129小鼠经腹膜内感染10^4和10^3pfu ZIKV第6代克隆a和e。

[0381] 每天(直至28天)称重小鼠并监测疾病的临床征象(重量减轻、毛皮起皱、弓背姿势、昏睡、四肢无力、部分/完全瘫痪)。另外,通过如实施例1中所述对在攻击后的三天收集的血清样品进行蚀斑滴定来分析病毒血症。

[0382] 结果

[0383] 感染前MVS P6e引起100%死亡(中位存活时间=12.5天),而感染前MVS P6a仅仅引起33%死亡(中位存活时间=未确定)(图22)。与此一致,前MVS P6e感染的小鼠显示与PRVABC59 P6a感染的小鼠(3)相比更大的重量减轻。在感染PRVABC59 P6a或P6e的小鼠组之间未发现平均组病毒血症水平的统计学差异(图24)。这些数据表明单单生长动力学可能不是关键的决定因素(因为两种病毒株均产生类似的病毒血症,和类似的体外峰值效价)并且包膜蛋白的特征可能对于毒力(野生型病毒株)和免疫原性(灭活候选病毒)来说是重要的。

[0384] 实施例4:确定灭活效力的灭活完全性测定

[0385] 研发出一种双感染性测定,又称灭活完全性(COI)测定,它确定福尔马林灭活(0.01%甲醛)的效力和纯化的灭活寨卡病毒(PIZV)散装原料药(BDS)的潜在残余感染病毒活性。

[0386] 样品制备:通过在Vero细胞中生长,制造如上所述的克隆e的四个纯化的灭活寨卡疫苗(PIZV)批次(Tox批次1-4)。通过色谱法来纯化来自4个每天收获物的上清液(总计约4000mL),接着加入甲醛至0.01%.w/v的最终浓度,在22℃下灭活10天。在灭活期间每天从散装原料药(BDS)去除过程控制(IPC)样品用于表征和分析学。将每天IPC样品用焦亚硫酸钠中和并渗析至DMEM(病毒生长培养基)中。样品含有纯化的灭活寨卡病毒。在灭活最后一天,不中和剩余体积的BDS样品,而是用TFF加工以去除甲醛并且缓冲液更换成PBS。

[0387] 灭活完全性测定(COI):COI测定用于分析每天IPC样品中的灭活效力,以了解灭活动力学和最终BDS。为求最高灵敏度,最初在这个测定中利用两个细胞系Vero和C6/36,以检测IPC和DS样品中潜在的活病毒。当在含有酚红的生长培养基存在下寨卡病毒感染Vero细胞时,细胞死亡的副产物引起pH值下降。因此,培养基颜色从红色/粉红色变成黄色,这表明培养基的pH值发生了此酸性变化。这个现象是由细胞凋亡和致细胞病变作用(CPE)引起,是指所观察到的在病毒复制期间由病毒侵袭、感染和从细胞萌发引起的宿主细胞的细胞结构的变化。最终,虽然C6/36蚊子和Vero细胞都是用于感染的容许细胞系,但寨卡病毒感染仅仅在体外杀死Vero细胞。因此,Vero细胞用作测定的指示细胞系。相比之下,源自于寨卡病毒的天然宿主载体的C6/36细胞在寨卡感染后未展现CPE并且不溶解。培养基不变色并且C6/36细胞的活力未改变。

[0388] 因此测定分为两个部分:测定的第一部分允许在两个易感细胞系的96孔板上平行扩增可能活的病毒颗粒六天。测定的第二步涉及将96孔板的上清液(包括可能扩增的颗粒)转移至含有单层Vero细胞的6孔板上,并再孵育8天以允许病毒感染以及致细胞病变作用显现在Vero细胞上。使用光学显微镜证实观察到的任何CPE。

[0389] 虽然详细描述了在测定的第一部分中使用96孔板,即在C6/36细胞中培养,以及在测定的第二部分中使用六孔板,即培养Vero细胞来观察致细胞病变作用,但所述测定容易根据下表按比例扩大:

[0390]

			测定部分 1: 施加 BDS (必须在推荐体积范围内)					测定部分 2: 转移至 Vero (必须容纳用于转移的汇集体积)	
平板或烧瓶	表面积 (cm^2)	建议体积范围(生长)	mL 样品 /cm2	每孔(或每烧瓶)接种体积	扩大 15 倍所需的容器数目; 2 倍稀释	扩大 15 倍所需的容器数目; 5 倍稀释	用于转移的汇集体积 (mL)	mL 样品 /cm2	每孔(或烧瓶)转移的接种物体积
96 孔格式	0.32	100-200 uL	0.3125	0.1					
12 孔格式	3.8	0.076-1.14 ml	0.3125	1.188	6.48	16.21	11.88		
6 孔格式	9.5	1.9-2.9mL	0.3125	2.969	4.32	10.81	17.81	0.0526	0.1
T25 烧瓶格式	25	5-7.5 mL	0.3125	7.813	9.86	24.64	7.813	0.0526	1.32
T75 烧瓶格式	75	15-22.5 mL	0.3125	23.438	3.29	8.21	23.438	0.0526	3.95
T150 烧瓶格式	150	30-45 mL	0.3125	46.875	1.64	4.11	46.88	0.0526	7.89
T175 烧瓶格式	175	35-52.5	0.3125	54.688	1.41	3.52	54.69	0.0526	9.21
T235 烧瓶格式	235	47-70.5	0.3125	73.438	1.05	2.62	73.44	0.0526	12.36
T300 烧瓶格式	300	30-40 mL?	0.3125	93.750	0.82	2.05	93.75	0.0526	15.78
CF1	6/36	150-200	0.3125	198.750	0.39			0.0526	33.45
CF2	1272	300-400	0.3125	397.500	0.19			0.0526	66.91
CF10	63360	1500-2000	0.3125	19800.000	0.00			0.0526	3332.74

[0391] 很明显,在扩大期间,对于部分1,每平方厘米容器的样品体积保持恒定,并且在部分2中保持相同的病毒感染条件。

[0392] COI分析对照:这个测定的效价和回滴定对照物使用Vero指示细胞进行,并在$TCID_{50}$ 96孔格式中评分,其中基于作为细胞死亡或CPE存在的替代物,培养基颜色从粉红色变成黄色,将孔评分为阳性。

[0393] 病毒效价对照测试:已知效价的对照病毒(PRVABC59)的两个独立复制品在含有2%FBS的培养基中进行一系列10倍稀释,并将100μL每种稀释液加入含有Vero细胞的96孔

板的四个孔中。将平板孵育5天,然后记录含有CPE的孔,并使用Reed-Meunch计算法计算病毒效价。

[0394] 病毒回滴定对照测试:将已知效价的对照病毒连续稀释至200TCID50。200TCID50对照病毒的两个独立复制品在含有2%FBS的培养基中进行一系列2倍稀释,并将100μL每种稀释液加入含有Vero细胞的96孔板的四个孔中。将细胞孵育5天,然后记录含有CPE的孔,并使用Reed-Meunch计算法计算病毒效价。

[0395] 详细COI方案:

[0396] 1.测定的第一部分:在样品加入前的两天,将Vero(1.4E^{+05}个细胞/毫升)和埃及伊蚊C6/36(4E^{+05}个细胞/毫升)细胞接种于96孔板中。将Vero细胞在DMEM+10%最终FBS+2%L-谷氨酰胺+1%青霉素/链霉素中于37℃下培养。将C6/36细胞在DMEM+10%FBS+2%L-谷氨酰胺+1%青霉素/链霉素+1%非必需氨基酸中于28℃下培养。

[0397] 2.将200TCID50对照病毒(在病毒回滴定对照测试中制备)或DS样品的三个独立复制品在含有2%FBS的培养基中稀释(5倍和10倍稀释)。

[0398] 3.将96孔板中的细胞用样品接种。在96孔板中的细胞单层感染前,将样品旋转以破坏任何可能的聚集。将100μL每种稀释液施加于分别含有Vero和C6/36细胞的两个单独96孔板中的5个孔中的每一个。

[0399] 4.对于每种细胞类型,在另一孔中包括单独培养基,作为阴性CPE对照物。

[0400] 5.将平板在适于细胞系的温度下孵育6天。

[0401] 6.测定的第二部分:为在容许细胞系上使活病毒进一步扩增并通过CPE目测,将来自Vero和C6/36细胞的每种96孔上清液的整个体积转移至Vero细胞的6孔板的个别孔中。在以15分钟时间间隔进行晃动下,接种进行90分钟。

[0402] 7.将含有2%FBS的培养基加入孔中并将平板再孵育8天,用于随后检测扩增样品与CPE的函数关系。如果有DS的任何复制品在第8天结束时显示CPE,那么认为灭活是不完全的。

[0403] 7.通过在转移至6孔板并孵育8天以允许病毒复制后在易感细胞单层上形成蚀斑或CPE来目测活/复制病毒体的存在。在测定结束时6孔板中的%CPE评分如下计算:

[0404] -通过目测比色变化来检查Vero细胞的每个6孔板的CPE,接着通过在倒置光学显微镜下检查来确认CPE。

[0405] -每个6孔板代表了在上述5倍和10倍稀释液中制备的DS稀释液的一个复制品(5个孔加含有单独培养基的一个孔)。

[0406] 因此,每个复制品的%CPE反映了每个样品总共5个孔中具有CPE的孔的数目(每次测定使用总共120个孔)。基于每个稀释液的三个复制品计算平均%CPE和标准偏差。

[0407] 结果:在如以下表中所示的Tox批次编号1-4中的每一个中分析每天样品。

[0408] 表A:灭活动力学,Tox批次编号1

[0409]

样品	转移	平均%CPE	STDV
1:10 第-1 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 2 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 3 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	Vero 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第-1 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	C6/36 至 Vero	6.7	12
1:10 第 2 天	C6/36 至 Vero	13.3	12
1:10 第 3 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	C6/36 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	C6/36 至 Vero	100	0

[0410]

[0411] 表B:灭活动力学,Tox批次编号2

[0412]

样品	转移	平均%CPE	STDV
1:10 第-1 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 2 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 3 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	Vero 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第-1 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	C6/36 至 Vero	100	12
1:10 第 2 天	C6/36 至 Vero	13.3	12
1:10 第 3 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	C6/36 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	C6/36 至 Vero	100	0

[0413] 表C:灭活动力学,Tox批次编号3

[0414]

样品	转移	平	STDV

[0415]

		均%CPE	
1:10 第-1 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	Vero 至 Vero	27	12
1:10 第 2 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 3 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	Vero 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第-1 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	C6/36 至 Vero	87	12
1:10 第 2 天	C6/36 至 Vero	27	12
1:10 第 3 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	C6/36 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	C6/36 至 Vero	100	0

[0416] 表D:灭活动力学,Tox批次编号4

[0417]

样品	转移	平均%CPE	STDV
1:10 第-1 天	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	Vero 至 Vero	93	12
1:10 第 1 天	Vero 至 Vero		0
1:10 第 2 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 3 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	Vero 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	Vero 至 Vero	0	0

[0418]

100TCID50/mL	Vero 至 Vero	100	0
1:10 第-1 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 0 天	C6/36 至 Vero	100	0
1:10 第 1 天	C6/36 至 Vero	33	23
1:10 第 2 天	C6/36 至 Vero	7	12
1:10 第 3 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 4 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 7 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 8 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 9 天	C6/36 至 Vero	0	0
1:10 第 10 天	C6/36 至 Vero	0	0
100TCID50/mL	C6/36 至 Vero	100	0

[0419] 编辑的灭活动力学数据:将来自四个毒物学批次的样品的COI数据与如上所述确定的感染效力(TCID50)和RNA拷贝相比。通过纯化来自样品的核酸并使用RT-PCR试剂盒用血清型特异性引物扩增寨卡RNA来测定RNA拷贝。图25中所示的结果显示COI测定的灵敏度显著超过TCID50。

[0420] COI测定的性能特征-准确度:目标稀释液(TCID50/孔)和其相应的CPE比例用于确定相对准确度。对于Vero细胞,在观察和预期的阳性CPE比例之间存在统计上显著的线性关系。将观察的与预期的结果相关的线的斜率为0.92,95%置信区间(CI)为0.83至1.01,与1重叠,这表明100%准确度。对于C6/36细胞,在观察的和预期的阳性CPE之间存在统计上显著的线性关系。将观察的与预期的结果相关的线的斜率为0.88,95%置信区间(CI)为0.80至0.95,这表明在此细胞系下有轻微偏倚(5-20%)。两个细胞系均显示令人满意的准确度(相对)。

[0421] COI测定的性能特征-检测限(LoD):评定C6/36至Vero和Vero至Vero平板的测定灵敏度。如上所述,对每一用效价稀释液涂铺的所有孔所观察到的阳性CPE的比例使用最小二乘回归来拟合数据,涂铺以10.00TCID50/孔开始下至0.08TCID50的较低效价。此外,针对平板内的每个稀释液,包括阴性对照(0.00TCID50/孔)。在C6/36至Vero和Vero至Vero平板上针对每个稀释液进行CPE评分。看到CPE与对数输入病毒效价之间清楚的关系。这显示了CPE阳性孔的比例相对于TCID50/孔的log10浓度之间的对数(S形)关系,以及99%置信下限和99%置信上限。在-2log10浓度(=0.01TCID50/孔)下,基于并且说明鉴定数据中的所有固定和随机源变化的模型预测0.85%,或当在0.01TCID50/孔下四舍五入时为0.01,其中99%置信下限为0.42%。因为99%置信下限不包括零,所以0.85%CPE孔可能由0TCID50/孔产生(即由于噪音)的概率几乎不计量(<1%)。这为测定建立了至少0.01TCID50/孔的测定检测限(即样品中可检测到的活寨卡颗粒的最低量)。也就是说,当四舍五入时,60个孔中的1个将为CPE阳性,或假定这些参数,在60个孔中可检测到的CPE阳性的最低理论比例将为1.67%或0.0167。

[0422] 比较细胞类型(C363和Vero)的相对灵敏度,其中C6/36证明与Vero细胞相比可检测到病毒效价的较低稀释,如图26所示;在相同病毒输入水平(0.31TCID50)下,相对于Vero

细胞,C6/36的CPE阳性孔的比例更高。

[0423] 在这个测定鉴定期间使用的最低病毒输入值为0.02TCID50(-1.61log TCID50)。使用C6/36细胞的拟合曲线,这产生评分为CPE阳性的孔的0.035或3.5%(28个孔中的1个)。如果针对0.167或1.6%的最低操作水平推断曲线,那么这等于0.015TCID50(-1.82log TCID50)的输入水平。然而,当确定可检测到的如阳性CPE结果所反映的感染病毒的最低水平时需要考虑传输的测定方差的影响。此噪音是由输入病毒的工作原液产生。目标TCID50的比较和回滴定计算显示当目标是200的储备TCID50/mL浓度时工作原液病毒的TCID50展现85TCID50/mL的标准偏差(SD),源自于213的平均值。算得%CV为约40%,偏离约+7%。此噪音可作为对数回归模型的因子,以产生病毒稀释液的目标值周围的置信区间。在0.01TCID50/孔的目标值下,基于并且说明两个位点上鉴定数据中的所有固定和随机源的模型预测0.86%的孔将为CPE阳性(60个孔中的1)。因为99%置信下限不包括零,所以0.85%CPE阳性孔可能由于噪音而由0TCID50/孔产生的概率几乎不可计量(<1%)(图27)。这为测定建立了如下测定检测限:0.01TCID50/孔是样品中可检测到的活寨卡颗粒的最低量。

[0424] COI测定的性能特征-范围:测定的范围是0.01TCID50/孔至4.5TCID50/孔并且被定义为引起超过0%但小于100%的CPE阳性比例评分的输入病毒的范围。

[0425] 结论:四个Tox的分析揭露了在室温下在0.01%甲醛中孵育10天后灭活完全。在所产生的所有批次中,如通过COI测定所测量,至第3-4天实现灭活。COI测定比TCID50效力或RNA测量更灵敏;通过LoD还观察到灵敏度增加。

[0426] 实施例5:确定药物组合物中的残余福尔马林含量

[0427] 1.材料与方法

[0428] 1.1材料

[0429] 甲醛标准溶液(甲醇中)(982μg/mL)、DNPH、HPLC级乙腈和磷酸是从Wako Pure Chemicals公司(Tokyo,Japan)购买。从Otsuka Pharmaceutical(Tokushima,Japan)获得用于稀释磷酸的蒸馏水。从Brenntag(Frederikssund,Denmark)获得用作氢氧化铝凝胶的Alhydrogel® 2%(对应于10mg/mL铝)。PBS是内部制备的,并且如下所述制造含有氢氧化铝凝胶的寨卡疫苗药品。在收获后用各种技术纯化寨卡病毒。在用甲醛灭活后,浓缩病毒并通过过滤将缓冲液更换为PBS。将散装原料药用PBS稀释并用氢氧化铝凝胶(0.4mg/mL铝)配制,形成最终药品。

[0430] 1.2HPLC条件

[0431] 使用装备了UV检测器(Milford,USA)和反相柱(YMC-Pack ODS-A,4.6mm×250mm,5μm(Kyoto,Japan))的Waters HPLC联合系统。水与乙腈的混合物(1:1,v/v)用作流动相,检测波长设定在360nm,并且流速为1.0mL/min。柱温和注射体积分别为25℃和50μL。

[0432] 1.3样品制备

[0433] 将疫苗药品(1.2mL)在15000rpm下离心10分钟,并将上清液(1mL)转移至从Waters(Milford,USA)购买的2mL HPLC玻璃小管中。然后,加入20μL 20%(v/v)磷酸和50μL 1.0mg/mL DNPH于乙腈中的溶液,并将混合物搅拌并在室温下静置20分钟,然后注射。

[0434] 1.4方法验证

[0435] 根据ICH Q2准则,根据样品的特异性、线性度、准确度、可重复性、中间精密度、稳

固性和稳定性来验证所述方法。在准确度研究中,寨卡疫苗药品和氢氧化铝凝胶溶液外加特定量的甲醛,并通过旋转将样品充分混合,然后根据部分2.3中所述的程序。

[0436] 2.结果和论述

[0437] 2.1线性度和特异性

[0438] 通过用PBS稀释来制备甲醛的六个标准溶液(0.049、0.098、0.196、0.491、0.982和1.964μg/mL)。然后,将20%(v/v)磷酸和1mg/mL DNPH于乙腈中的溶液加入每个溶液中,并在图28中展示对应色谱图。明显地,10.4分钟峰面积显示线性度,具有如下回归方程:y=1075730x+11731(其中y为10.4分钟峰面积并且x为甲醛浓度,以μg/mL为单位)(相关系数:0.9998),这表明其归于HCHO-DNPH(即用DNPH衍生化的甲醛)。此外,5.8分钟处的峰归于DNPH,因为在加有DNPH的所有样品中都检测到此峰。因此,在减去PBS中的背景峰面积后HCHO-DNPH峰面积用于评估线性度和准确度。

[0439] 2.2准确度和精确度(可重复性)

[0440] 通过回收研究评估氢氧化铝佐剂的作用,这些研究通过在缺少疫苗原料药下将氢氧化铝于PBS中的三种样品(0.1、0.4和1.0mg/mL铝)外加0.05μg/mL甲醛来进行。平均回收率分别为102%(n=3),100%(n=3)以及100%(n=3),具有低的相对标准偏差(RSD)值(表13)。计算准确度数据的RSD以评估可重复性,并且发现其为1.0%,这表明高达1.0mg/mL的铝量不干扰甲醛的回收。

[0441] 表13使用外加有0.05μg/mL甲醛的氢氧化铝样品评估的准确度和可重复性

[0442]

氢氧化铝浓度 [mg/mL 铝]	平均值(n=3) [%] (RSD [%])
0.1	102 (0.2)
0.4	100 (0.8)
1.0	100 (0.3)
可重复性[%] (n=9)	1.0

[0443] 通过回收研究评估方法的准确度,这些研究通过将含有氢氧化铝佐剂的寨卡疫苗药品外加三种浓度的甲醛(0.05、0.10和1.00μg/mL)来进行并且平均回收率结果展示于表14中。计算准确度数据的RSD以评估可重复性,并且发现其为3.7%,这表明用氢氧化铝配制的寨卡疫苗药品不干扰介于0.05与1.00μg/mL之间的甲醛的回收。

[0444] 表14使用外加甲醛的含有氢氧化铝的寨卡疫苗药品评估的准确度和可重复性

[0445]

外加甲醛浓度 [μg/mL]	平均值(n=3) [%] (RSD [%])
0.05	102 (5.6)
0.10	97 (0.3)
1.00	98

[0446]

	(0.7)
可重复性[%] (n = 9)	3.7

[0447] 2.4稳固性

[0448] 评估方法的稳固性以确定在样品制备期间样品中的甲醛浓度如何受到实验参数的变化影响。考虑到对衍生化功效的影响,选择DNPH和磷酸的浓度作为本研究中的监测参数。通过分别改变DNPH和磷酸的浓度±0.1mg/mL和±5%来检查所述作用。在两种研发药品批次中在每种条件下测定甲醛,并且表15中所示的结果表明DNPH和磷酸浓度的变化对甲醛的测定没有显著的影响。

[0449] 表15方法的稳固性

[0450]

条件	DNPH 浓度 [mg/mL]	磷酸浓度[%]	甲醛浓度[μg/mL]	
			批次 B	批次 C
1*	1.0	20	0.51	0.45
2	1.1	20	0.53	0.48
3	0.9	20	0.49	0.47
4	1.0	15	0.52	0.49
5	1.0	25	0.52	0.48

[0451] (*)方法的规定条件

[0001] 序列表

[0002] <110> 武田疫苗股份有限公司

[0003] 美利坚合众国，由健康及人类服务 部部长代表

[0004] <120> 用于将寨卡病毒灭活和用于确定灭活完全性的方法

[0005] <130> T08289WO2

[0006] <150> US 62/581500

[0007] <151> 2017-11-03

[0008] <150> US 62/592995

[0009] <151> 2017-11-30

[0010] <160> 27

[0011] <170> PatentIn version 3.5

[0012] <210> 1

[0013] <211> 351

[0014] <212> PRT

[0015] <213> 寨卡病毒(Zika virus)

[0016] <400> 1

[0017] Asp Val Gly Cys Ser Val Asp Phe Ser Lys Lys Glu Thr Arg Cys Gly

[0018] 1 5 10 15

[0019] Thr Gly Val Phe Val Tyr Asn Asp Val Glu Ala Trp Arg Asp Arg Tyr

[0020] 20 25 30

[0021] Lys Tyr His Pro Asp Ser Pro Arg Arg Leu Ala Ala Ala Val Lys Gln

[0022] 35 40 45

[0023] Ala Trp Glu Asp Gly Ile Cys Gly Ile Ser Ser Val Ser Arg Met Glu

[0024] 50 55 60

[0025] Asn Ile Met Trp Arg Ser Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala Ile Leu Glu

[0026] 65 70 75 80

[0027] Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn Pro

[0028] 85 90 95

[0029] Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu Pro

[0030] 100 105 110

[0031] His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys

[0032] 115 120 125

[0033] Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro

[0034] 130 135 140

[0035] Leu Lys His Arg Ala Trp Asn Ser Phe Leu Val Glu Asp His Gly Phe

[0036] 145 150 155 160

[0037] Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp Leu Lys Val Arg Glu Asp Tyr Ser

[0038] 165 170 175

[0039] Leu Glu Cys Asp Pro Ala Val Ile Gly Thr Ala Val Lys Gly Lys Glu

[0040] 180 185 190

[0041] Ala Val His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp

[0042] 195 200 205

[0043] Thr Trp Arg Leu Lys Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu

[0044] 210 215 220

[0045] Trp Pro Lys Ser His Thr Leu Trp Thr Asp Gly Ile Glu Glu Ser Asp

[0046] 225 230 235 240

[0047] Leu Ile Ile Pro Lys Ser Leu Ala Gly Pro Leu Ser His His Asn Thr

[0048] 245 250 255

[0049] Arg Glu Gly Tyr Arg Thr Gln Met Lys Gly Pro Trp His Ser Glu Glu

[0050] 260 265 270

[0051] Leu Glu Ile Arg Phe Glu Glu Cys Pro Gly Thr Lys Val His Val Glu

[0052] 275 280 285

[0053] Glu Thr Cys Gly Thr Arg Gly Pro Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala Ser

[0054] 290 295 300

[0055] Gly Arg Val Ile Glu Glu Trp Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro Pro

[0056] 305 310 315 320

[0057] Leu Ser Phe Arg Ala Lys Asp Gly Cys Trp Tyr Gly Met Glu Ile Arg

[0058] 325 330 335

[0059] Pro Arg Lys Glu Pro Glu Ser Asn Leu Val Arg Ser Met Val Thr

[0060] 340 345 350

[0061] <210> 2

[0062] <211> 10675

[0063] <212> DNA

[0064] <213> 寨卡病毒(Zika virus)

[0065] <400> 2

[0066] gttgttgatc tgtgtgaatc agactgcgac agttcgagtt tgaagcgaaa gctagcaaca 60

[0067] gtatcaacag gttttatttt ggatttggaa acgagagttt ctggtcatga aaaacccaaa 120

[0068] aaagaaatcc ggaggattcc ggattgtcaa tatgctaaaa cgcggagtag cccgtgtgag 180

[0069] ccccttttggg ggcttgaaga ggctgccagc cggacttctg ctgggtcatg ggcccatcag 240

[0070] gatggtcttg gcgattctag ccttttttgag attcacggca atcaagccat cactgggtct 300

[0071] catcaataga tggggttcag tggggaaaaa agaggctatg gaaacaataa agaagttcaa 360

[0072] gaaagatctg gctgccatgc tgagaataat caatgctagg aaggagaaga agagacgagg 420

[0073] cgcagatact agtgtcggaa ttgttggcct cctgctgacc acagctatgg cagcggaggt 480

[0074] cactagacgt gggagtgcat actatatgta cttggacaga aacgatgctg gggaggccat 540

[0075] atcttttcca accacattgg ggatgaataa gtgttatata cagatcatgg atcttggaca 600

[0076] catgtgtgat gccaccatga gctatgaatg ccctatgctg gatgaggggg tggaaccaga 660

[0077] tgacgtcgat tgttggtgca acacgacgtc aacttgggtt gtgtacggaa cctgccatca 720

[0078] caaaaaaggt gaagcacgga gatctagaag agctgtgacg ctccccctccc attccaccag 780

[0079] gaagctgcaa acgcggtcgc aaacctggtt ggaatcaaga gaatacacaa agcacttgat 840

[0080] tagagtcgaa aattggatat tcaggaaccc tggcttcgcg ttagcagcag ctgccatcgc 900

[0081] ttggcttttg ggaagctcaa cgagccaaaa agtcatatac ttggtcatga tactgctgat 960

[0082] tgccccggca tacagcatca ggtgcatagg agtcagcaat agggactttg tggaaggtat 1020

[0083] gtcaggtggg acttgggttg atgttgtctt ggaacatgga ggttgtgtca ccgtaatggc 1080

[0084] acaggacaaa ccgactgtcg acatagagct ggttacaaca acagtcagca acatggcgga 1140

[0085] ggtaagatcc tactgctatg aggcatcaat atcagacatg gcttctgaca gccgctgccc 1200

[0086] aacacaaggt gaagcctacc ttgacaagca atcagacact caatatgtct gcaaaagaac 1260

[0087] gttagtggac agaggctggg gaaatggatg tggacttttt ggcaaaggga gcctggtgac 1320

[0088] atgcgctaag tttgcatgct ccaagaaaat gaccgggaag agcatccagc cagagaatct 1380

[0089] ggagtaccgg ataatgctgt cagttcatgg ctcccagcac agtgggatga tcgttaatga 1440

[0090] cacaggacat gaaactgatg agaatagagc gaaagttgag ataacgccca attcaccgag 1500

[0091] agccgaagcc accctggggg gttttggaag cctaggactt gattgtgaac cgaggacagg 1560

[0092] ccttgacttt tcagatttgt attacttgac tatgaataac aagcactggt tggttcacaa 1620

[0093] ggagtggttc cacgacattc cattaccttg gcacgctggg gcagacaccg gaactccaca 1680

[0094] ctggaacaac aaagaagcac tggtagagtt caaggacgca catgccaaaa ggcaaactgt 1740

[0095] cgtggttcta gggagtcaag aaggagcagt tcacacggcc cttgctggag ctctggaggc 1800

[0096] tgagatggat ggtgcaaagg gaaggctgtc ctctggccac ttgaaatgtc gcctgaaaat 1860

[0097] ggataaactt agattgaagg gcgtgtcata ctccttgtgt actgcagcgt tcacattcac 1920

[0098] caagatcccg gctgaaacac tgcacgggac agtcacagtg gaggtacagt acgcagggac 1980

[0099] agatggacct tgcaaggttc cagctcagat ggcggtggac atgcaaactc tgaccccagt 2040

[0100] tgggaggttg ataaccgcta accccgtaat cactgaaagc actgagaact ctaagatgat 2100

[0101] gctggaactt gatccaccat ttggggactc ttacattgtc ataggagtcg gggagaagaa 2160

[0102] gatcacccac cactggcaca ggagtggcag caccattgga aaagcatttg aagccactgt 2220

[0103] gagaggtgcc aagagaatgg cagtcttggg agacacagcc tgggactttg gatcagttgg 2280

[0104] aggcgctctc aactcattgg gcaagggcat ccatcaaatt tttggagcag ctttcaaatc 2340

[0105] attgtttgga ggaatgtcct ggttctcaca aattctcatt ggaacgttgc tgatgtggtt 2400

[0106] gggtctgaac acaaagaatg gatctatttc ccttatgtgc ttggccttag ggggagtgtt 2460

[0107] gatcttctta tccacagccg tctctgctga tgtggggtgc tcggtggact tctcaaagaa 2520

[0108] ggagacgaga tgcggtacag gggtgttcgt ctataacgac gttgaagcct ggagggacag 2580

[0109] gtacaagtac catcctgact ccccccgtag attggcagca gcagtcaagc aagcctggga 2640

[0110] agatggtatc tgcgggatct cctctgtttc aagaatggaa aacatcatgt ggagatcagt 2700

[0111] agaaggggag ctcaacgcaa tcctggaaga gaatggagtt caactgacgg tcgttgtggg 2760

[0112] atctgtaaaa aaccccatgt ggagaggtcc acagagattg cccgtgcctg tgaacgagct 2820

[0113] gccccacggc tggaaggctt gggggaaatc gtatttcgtc agagcagcaa agacaaataa 2880

[0114] cagctttgtc gtggatggtg acacactgaa ggaatgccca ctcaaacata gagcatggaa 2940

[0115] cagctttctt gtggaggatc atgggttcgg ggtatttcac actagtgtct ggctcaaggt 3000

[0116] tagagaagat tattcattag agtgtgatcc agccgttatt ggaacagctg ttaagggaaa 3060

[0117] ggaggctgta cacagtgatc taggctactg gattgagagt gagaagaatg acacatggag 3120

[0118] gctgaagagg gcccatctga tcgagatgaa aacatgtgaa tggccaaagt cccacacatt 3180

[0119] gtggacagat ggaatagaag agagtgatct gatcataccc aagtctttag ctgggccact 3240

[0120] cagccatcac aataccagag agggctacag gacccaaatg aaagggccat ggcacagtga 3300

[0121] agagcttgaa attcggtttg aggaatgccc aggcactaag gtccacgtgg aggaaacatg 3360

[0122] tggaacaaga ggaccatctc tgagatcaac cactgcaagc ggaagggtga tcgaggaatg 3420

[0123] gtgctgcagg gagtgcacaa tgccccccact gtcgttccgg gctaaagatg gctgttggta 3480

[0124] tggaatggag ataaggccca ggaaagaacc agaaagcaac ttagtaaggt caatggtgac 3540

[0125] tgcaggatca actgatcaca tggaccactt ctcccttgga gtgcttgtga tcctgctcat 3600

[0126] ggtgcaggaa gggctgaaga agagaatgac cacaaagatc atcataagca catcaatggc 3660
[0127] agtgctggta gctatgatcc tgggaggatt ttcaatgagt gacctggcta agcttgcaat 3720
[0128] tttgatgggt gccaccttcg cggaaatgaa cactggagga gatgtagctc atctggcgct 3780
[0129] gatagcggca ttcaaagtca gaccagcgtt gctggtatct ttcatcttca gagctaattg 3840
[0130] gacaccccgt gaaagcatgc tgctggcctt ggcctcgtgt cttttgcaaa ctgcgatctc 3900
[0131] cgccttggaa ggcgacctga tggttctcat caatggtttt gctttggcct ggttggcaat 3960
[0132] acgagcgatg gttgttccac gcactgataa catcaccttg gcaatcctgg ctgctctgac 4020
[0133] accactggcc cggggcacac tgcttgtggc gtggagagca ggccttgcta cttgcggggg 4080
[0134] gtttatgctc ctctctctga agggaaaagg cagtgtgaag aagaacttac catttgtcat 4140
[0135] ggccctggga ctaaccgctg tgaggctggt cgaccccatc aacgtggtgg gactgctgtt 4200
[0136] gctcacaagg agtgggaagc ggagctggcc ccctagcgaa gtactcacag ctgttggcct 4260
[0137] gatatgcgca ttggctggag ggttcgccaa ggcagatata gagatggctg ggcccatggc 4320
[0138] cgcggtcggt ctgctaattg tcagttacgt ggtctcagga aagagtgtgg acatgtacat 4380
[0139] tgaaagagca ggtgacatca catgggaaaa agatgcggaa gtcactggaa acagtccccg 4440
[0140] gctcgatgtg gcgctagatg agagtggtga tttctccctg gtggaggatg acggtccccc 4500
[0141] catgagagag atcatactca aggtggtcct gatgaccatc tgtggcatga acccaatagc 4560
[0142] catacccttt gcagctggag cgtggtacgt atacgtgaag actggaaaaa ggagtggtgc 4620
[0143] tctatgggat gtgcctgctc ccaaggaagt aaaaaagggg gagaccacag atggagtgta 4680
[0144] cagagtaatg actcgtagac tgctaggttc aacacaagtt ggagtgggag ttatgcaaga 4740
[0145] gggggtcttt cacactatgt ggcacgtcac aaaaggatcc gcgctgagaa gcggtgaagg 4800
[0146] gagacttgat ccatactggg gagatgtcaa gcaggatctg gtgtcatact gtggtccatg 4860
[0147] gaagctagat gccgcctggg atgggcacag cgaggtgcag ctcttggccg tgccccccgg 4920
[0148] agagagagcg aggaacatcc agactctgcc cggaatattt aagacaaagg atggggacat 4980
[0149] tggagcggtt gcgctggatt acccagcagg aacttcagga tctccaatcc tagacaagtg 5040
[0150] tgggagagtg ataggacttt atggcaatgg ggtcgtgatc aaaaacggga gttatgttag 5100
[0151] tgccatcacc caagggagga gggaggaaga gactcctgtt gagtgcttcg agccctcgat 5160
[0152] gctgaagaag aagcagctaa ctgtcttaga cttgcatcct ggagctggga aaaccaggag 5220
[0153] agttcttcct gaaatagtcc gtgaagccat aaaaacaaga ctccgtactg tgatcttagc 5280
[0154] tccaaccagg gttgtcgctg ctgaaatgga ggaggcccct agagggcttc cagtgcgtta 5340
[0155] tatgacaaca gcagtcaatg tcacccactc tggaacagaa atcgtcgact taatgtgcca 5400
[0156] tgccaccttc acttcacgtc tactacagcc aatcagagtc cccaactata atctgtatat 5460
[0157] tatggatgag gcccacttca cagatccctc aagtatagca gcaagaggat acatttcaac 5520
[0158] aagggttgag atgggcgagg cggctgccat cttcatgacc gccacgccac caggaacccg 5580
[0159] tgacgcattt ccggactcca actcaccaat tatggacacc gaagtggaag tcccagagag 5640
[0160] agcctggagc tcaggctttg attgggtgac ggatcattct ggaaaaacag tttggtttgt 5700
[0161] tccaagcgtg aggaacggca atgagatcgc agcttgtctg acaaaggctg gaaaacgggt 5760
[0162] catacagctc agcagaaaga cttttgagac agagttccag aaaacaaaac atcaagagtg 5820
[0163] ggactttgtc gtgacaactg acatttcaga gatgggcgcc aactttaaag ctgaccgtgt 5880
[0164] catagattcc aggagatgcc taaagccggt catacttgat ggcgagagag tcattctggc 5940
[0165] tggacccatg cctgtcacac atgccagcgc tgcccagagg agggggcgca taggcaggaa 6000
[0166] tcccaacaaa cctggagatg agtatctgta tggaggtggg tgcgcagaga ctgacgaaga 6060
[0167] ccatgcacac tggcttgaag caagaatgct ccttgacaat atttacctcc aagatggcct 6120

[0168] catagcctcg ctctatcgac ctgaggccga caaagtagca gccattgagg gagagttcaa 6180
[0169] gcttaggacg gagcaaagga agacctttgt ggaactcatg aaaagaggag atcttcctgt 6240
[0170] ttggctggcc tatcaggttg catctgccgg aataacctac acagatagaa gatggtgctt 6300
[0171] tgatggcacg accaacaaca ccataatgga agacagtgtg ccggcagagg tgtggaccag 6360
[0172] acacggagag aaaagagtgc tcaaaccgag gtggatggac gccagagttt gttcagatca 6420
[0173] tgcggccctg aagtcattca aggagtttgc cgctgggaaa agaggagcgg cttttggagt 6480
[0174] gatggaagcc ctgggaacac tgccaggaca catgacagag agattccagg aagccattga 6540
[0175] caacctcgct gtgctcatgc gggcagagac tggaagcagg ccttacaaag ccgcggcggc 6600
[0176] ccaattgccg gagaccctag agaccataat gcttttgggg ttgctgggaa cagtctcgct 6660
[0177] gggaatcttc ttcgtcttga tgaggaacaa gggcataggg aagatgggct ttggaatggt 6720
[0178] gactcttggg gccagcgcat ggctcatgtg gctctcggaa attgagccag ccagaattgc 6780
[0179] atgtgtcctc attgttgtgt tcctattgct ggtggtgctc atacctgagc cagaaaagca 6840
[0180] aagatctccc caggacaacc aaatggcaat catcatcatg gtagcagtag gtcttctggg 6900
[0181] cttgattacc gccaatgaac tcggatggtt ggagagaaca aagagtgacc taagccatct 6960
[0182] aatgggaagg agagaggagg gggcaaccat aggattctca atggacattg acctgcggcc 7020
[0183] agcctcagct tgggccatct atgctgcctt gacaactttc attaccccag ccgtccaaca 7080
[0184] tgcagtgacc acctcataca acaactactc cttaatggcg atggccacgc aagctggagt 7140
[0185] gttgtttggc atgggcaaag ggatgccatt ctacgcatgg gactttggag tcccgctgct 7200
[0186] aatgataggt tgctactcac aattaacacc cctgacccta atagtggcca tcattttgct 7260
[0187] cgtggcgcac tacatgtact tgatcccagg gctgcaggca gcagctgcgc gtgctgccca 7320
[0188] gaagagaacg gcagctggca tcatgaagaa ccctgttgtg gatggaatag tggtgactga 7380
[0189] cattgacaca atgacaattg acccccaagt ggagaaaaag atgggacagg tgctactcat 7440
[0190] agcagtagcc gtctccagcg ccatactgtc gcggaccgcc tgggggtggg gggaggctgg 7500
[0191] ggctctgatc acagccgcaa cttccacttt gtgggaaggc tctccgaaca agtactggaa 7560
[0192] ctcctctaca gccacttcac tgtgtaacat ttttagggga agttacttgg ctggagcttc 7620
[0193] tctaatctac acagtaacaa gaaacgctgg cttggtcaag agacgtgggg gtggaacagg 7680
[0194] agagaccctg ggagagaaat ggaaggcccg cttgaaccag atgtcggccc tggagttcta 7740
[0195] ctcctacaaa aagtcaggca tcaccgaggt gtgcagagaa gaggcccgcc gcgccctcaa 7800
[0196] ggacggtgtg gcaacgggag gccatgctgt gtcccgagga agtgcaaagc tgagatggtt 7860
[0197] ggtggagcgg ggatacctgc agccctatgg aaaggtcatt gatcttggat gtggcagagg 7920
[0198] gggctggagt tactacgtcg ccaccatccg caaagttcaa gaagtgaaag gatacacaaa 7980
[0199] aggaggccct ggtcatgaag aacccgtgtt ggtgcaaagc tatgggtgga acatagtccg 8040
[0200] tcttaagagt ggggtggacg tctttcatat ggcggctgag ccgtgtgaca cgttgctgtg 8100
[0201] tgacataggt gagtcatcat ctagtcctga agtggaagaa gcacggacgc tcagagtcct 8160
[0202] ctccatggtg ggggattggc ttgaaaaaag accaggagcc ttttgtataa aagtgttgtg 8220
[0203] cccatacacc agcactatga tggaaaccct ggagcgactg cagcgtaggt atgggggagg 8280
[0204] actggtcaga gtgccactct cccgcaactc tacacatgag atgtactggg tctctggagc 8340
[0205] gaaaagcaac accataaaaa gtgtgtccac cacgagccag ctcctcttgg ggcgcatgga 8400
[0206] cgggcctagg aggccagtga aatatgagga ggatgtgaat ctcggctctg gcacgcgggc 8460
[0207] tgtggtaagc tgcgctgaag ctcccaacat gaagatcatt ggtaaccgca ttgaaaggat 8520
[0208] ccgcagtgag cacgcggaaa cgtggttctt tgacgagaac cacccatata ggacatgggc 8580
[0209] ttaccatgga agctatgagg cccccacaca agggtcagcg tcctctctaa taaacggggt 8640

[0210] tgtcaggctc ctgtcaaaac cctgggatgt ggtgactgga gtcacaggaa tagccatgac 8700

[0211] cgacaccaca ccgtatggtc agcaaagagt tttcaaggaa aaagtggaca ctagggtgcc 8760

[0212] agacccccaa gaaggcactc gtcaggttat gagcatggtc tcttcctggt tgtggaaaga 8820

[0213] gctaggcaaa cacaaacggc cacgagtctg caccaaagaa gagttcatca acaaggttcg 8880

[0214] tagcaatgca gcattagggg caatatttga agaggaaaaa gagtggaaga ctgcagtgga 8940

[0215] agctgtgaac gatccaaggt tctgggctct agtggacaag gaaagagagc accacctgag 9000

[0216] aggagagtgc cagagctgtg tgtacaacat gatgggaaaa agagaaaaga aacaagggga 9060

[0217] atttggaaag gccaagggca gccgcgccat ctggtatatg tggctagggg ctagatttct 9120

[0218] agagttcgaa gcccttggat tcttgaacga ggatcactgg atggggagag agaactcagg 9180

[0219] aggtggtgtt gaagggctgg gattacaaag actcggatat gtcctagaag agatgagtcg 9240

[0220] tataccagga ggaaggatgt atgcagatga cactgctggc tgggacaccc gcattagcag 9300

[0221] gtttgatctg gagaatgaag ctctaatcac caaccaaatg gagaaagggc acagggcctt 9360

[0222] ggcattggcc ataatcaagt acacatacca aaacaaagtg gtaaaggtcc ttagaccagc 9420

[0223] tgaaaaaggg aaaacagtta tggacattat ttcgagacaa gaccaaaggg ggagcggaca 9480

[0224] agttgtcact tacgctctta acacatttac caacctagtg gtgcaactca ttcggaatat 9540

[0225] ggaggctgag gaagttctag agatgcaaga cttgtggctg ctgcggaggt cagagaaagt 9600

[0226] gaccaactgg ttgcagagca acggatggga taggctcaaa cgaatggcag tcagtggaga 9660

[0227] tgattgcgtt gtgaagccaa ttgatgatag gtttgcacat gccctcaggt tcttgaatga 9720

[0228] tatgggaaaa gttaggaagg acacacaaga gtggaaaccc tcaactggat gggacaactg 9780

[0229] ggaagaagtt ccgttttgct cccaccactt caacaagctc catctcaagg acgggaggtc 9840

[0230] cattgtggtt ccctgccgcc accaagatga actgattggc cgggcccgcg tctctccagg 9900

[0231] ggcgggatgg agcatccggg agactgcttg cctagcaaaa tcatatgcgc aaatgtggca 9960

[0232] gctcctttat ttccacagaa gggacctccg actgatggcc aatgccattt gttcatctgt 10020

[0233] gccagttgac tgggttccaa ctgggagaac tacctggtca atccatggaa agggagaatg 10080

[0234] gatgaccact gaagacatgc ttgtggtgtg gaacagagtg tggattgagg agaacgacca 10140

[0235] catggaagac aagaccccag ttacgaaatg gacagacatt ccctatttgg gaaaaaggga 10200

[0236] agacttgtgg tgtggatctc tcatagggca cagaccgcgc accacctggg ctgagaacat 10260

[0237] taaaaacaca gtcaacatgg tgcgcaggat cataggtgat gaagaaaagt acatggacta 10320

[0238] cctatccacc caagttcgct acttgggtga agaagggtct acacctggag tgctgtaagc 10380

[0239] accaatctta atgttgtcag gcctgctagt cagccacagc ttggggaaag ctgtgcagcc 10440

[0240] tgtgaccccc ccaggagaag ctgggaaacc aagcctatag tcaggccgag aacgccatgg 10500

[0241] cacggaagaa gccatgctgc ctgtgagccc ctcagaggac actgagtcaa aaaaccccac 10560

[0242] gcgcttggag gcgcaggatg ggaaaagaag gtggcgacct tccccaccct tcaatctggg 10620

[0243] gcctgaactg gagatcagct gtggatctcc agaagaggga ctagtggtta gagga 10675

[0244] <210> 3

[0245] <211> 20

[0246] <212> DNA

[0247] <213> 人工(artificial)

[0248] <220>

[0249] <223> 寡核苷酸1 (CpG 1826)

[0250] <400> 3

[0251] tccatgacgt tcctgacgtt 20

[0252] <210> 4

[0253] <211> 18

[0254] <212> DNA

[0255] <213> 人工(artificial)

[0256] <220>

[0257] <223> 寡核苷酸2 (CpG 1758)

[0258] <400> 4

[0259] tctcccagcg tgcgccat 18

[0260] <210> 5

[0261] <211> 30

[0262] <212> DNA

[0263] <213> 人工(artificial)

[0264] <220>

[0265] <223> 寡核苷酸3

[0266] <400> 5

[0267] accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

[0268] <210> 6

[0269] <211> 24

[0270] <212> DNA

[0271] <213> 人工(artificial)

[0272] <220>

[0273] <223> 寡核苷酸4 (CpG 2006)

[0274] <400> 6

[0275] tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

[0276] <210> 7

[0277] <211> 20

[0278] <212> DNA

[0279] <213> 人工(artificial)

[0280] <220>

[0281] <223> 寡核苷酸5 (CpG 1668)

[0282] <400> 7

[0283] tccatgacgt tcctgatgct 20

[0284] <210> 8

[0285] <211> 31

[0286] <212> PRT

[0287] <213> 寨卡病毒(Zika virus)

[0288] <400> 8

[0289] Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu

[0290] 1 5 10 15

[0291] Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln

[0292] 20 25 30

[0293] <210> 9

[0294] <211> 31

[0295] <212> PRT

[0296] <213> 寨卡病毒(Zika virus)

[0297] <400> 9

[0298] Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu

[0299] 1 5 10 15

[0300] Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln

[0301] 20 25 30

[0302] <210> 10

[0303] <211> 31

[0304] <212> PRT

[0305] <213> 西尼罗河病毒(West Nile Virus)

[0306] <400> 10

[0307] Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu

[0308] 1 5 10 15

[0309] Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser

[0310] 20 25 30

[0311] <210> 11

[0312] <211> 31

[0313] <212> PRT

[0314] <213> 日本脑炎病毒(Japanese Encephalitis Virus)

[0315] <400> 11

[0316] Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu

[0317] 1 5 10 15

[0318] Leu Thr Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Val

[0319] 20 25 30

[0320] <210> 12

[0321] <211> 31

[0322] <212> PRT

[0323] <213> 圣路易斯脑炎病毒(Saint Louis Encephalitis Virus)

[0324] <400> 12

[0325] Phe Ser Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Ile Val Glu

[0326] 1 5 10 15

[0327] Leu Gln Tyr Thr Gly Ser Asn Gly Pro Cys Arg Val Pro Ile Ser

[0328] 20 25 30

[0329] <210> 13

[0330] <211> 30

[0331] <212> PRT

[0332] <213> 黄热病病毒(Yellow Fever Virus)

[0333] <400> 13

[0334] Phe Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln

[0335] 1 5 10 15

[0336] Val Lys Val Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile
[0337] 20 25 30
[0338] <210> 14
[0339] <211> 31
[0340] <212> PRT
[0341] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0342] <400> 14
[0343] Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln
[0344] 1 5 10 15
[0345] Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser
[0346] 20 25 30
[0347] <210> 15
[0348] <211> 31
[0349] <212> PRT
[0350] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0351] <400> 15
[0352] Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg
[0353] 1 5 10 15
[0354] Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
[0355] 20 25 30
[0356] <210> 16
[0357] <211> 31
[0358] <212> PRT
[0359] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0360] <400> 16
[0361] Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile Lys
[0362] 1 5 10 15
[0363] Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser
[0364] 20 25 30
[0365] <210> 17
[0366] <211> 31
[0367] <212> PRT
[0368] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0369] <400> 17
[0370] Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys
[0371] 1 5 10 15
[0372] Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu
[0373] 20 25 30
[0374] <210> 18
[0375] <211> 29
[0376] <212> PRT
[0377] <213> 寨卡病毒(Zika virus)

[0378] <400> 18

[0379] Ser Val Lys Asn Pro Met Gly Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro

[0380] 1 5 10 15

[0381] Val Asn Glu Leu Pro His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys

[0382] 20 25

[0383] <210> 19

[0384] <211> 29

[0385] <212> PRT

[0386] <213> 寨卡病毒(Zika virus)

[0387] <400> 19

[0388] Ser Val Lys Asn Pro Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro

[0389] 1 5 10 15

[0390] Val Asn Glu Leu Pro His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys

[0391] 20 25

[0392] <210> 20

[0393] <211> 29

[0394] <212> PRT

[0395] <213> 西尼罗河病毒(West Nile Virus)

[0396] <400> 20

[0397] Lys Gln Glu Gly Met Tyr Lys Ser Ala Pro Lys Arg Leu Thr Ala Thr

[0398] 1 5 10 15

[0399] Thr Glu Lys Leu Glu Ile Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys

[0400] 20 25

[0401] <210> 21

[0402] <211> 29

[0403] <212> PRT

[0404] <213> 日本脑炎病毒(Japanese Encephalitis Virus)

[0405] <400> 21

[0406] Lys Pro Val Gly Arg Tyr Arg Ser Ala Pro Lys Arg Leu Ser Met Thr

[0407] 1 5 10 15

[0408] Gln Glu Lys Phe Glu Met Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys

[0409] 20 25

[0410] <210> 22

[0411] <211> 29

[0412] <212> PRT

[0413] <213> 圣路易斯脑炎病毒(Saint Louis Encephalitis Virus)

[0414] <400> 22

[0415] Glu Asp Pro Lys Tyr Tyr Lys Arg Ala Pro Arg Arg Leu Lys Lys Leu

[0416] 1 5 10 15

[0417] Glu Asp Glu Leu Asn Tyr Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys

[0418] 20 25

[0419] <210> 23

[0420] <211> 29
[0421] <212> PRT
[0422] <213> 黄热病病毒(Yellow Fever Virus)
[0423] <400> 23
[0424] Asp Pro Lys Asn Val Tyr Gln Arg Gly Thr His Pro Phe Ser Arg Ile
[0425] 1 5 10 15
[0426] Arg Asp Gly Leu Gln Tyr Gly Trp Lys Thr Trp Gly Lys
[0427] 20 25
[0428] <210> 24
[0429] <211> 29
[0430] <212> PRT
[0431] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0432] <400> 24
[0433] Asp Val Ser Gly Ile Leu Ala Gln Gly Lys Lys Met Ile Arg Pro Gln
[0434] 1 5 10 15
[0435] Pro Met Glu His Lys Tyr Ser Trp Lys Ser Trp Gly Lys
[0436] 20 25
[0437] <210> 25
[0438] <211> 29
[0439] <212> PRT
[0440] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0441] <400> 25
[0442] Asp Ile Lys Gly Ile Met Gln Ala Gly Lys Arg Ser Leu Arg Pro Gln
[0443] 1 5 10 15
[0444] Pro Thr Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys Thr Trp Gly Lys
[0445] 20 25
[0446] <210> 26
[0447] <211> 29
[0448] <212> PRT
[0449] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0450] <400> 26
[0451] Asp Ile Thr Gly Val Leu Glu Gln Gly Lys Arg Thr Leu Thr Pro Gln
[0452] 1 5 10 15
[0453] Pro Met Glu Leu Lys Tyr Ser Trp Lys Thr Trp Gly Lys
[0454] 20 25
[0455] <210> 27
[0456] <211> 29
[0457] <212> PRT
[0458] <213> 登革热病毒(Dengue virus)
[0459] <400> 27
[0460] Asp Val Lys Gly Val Leu Thr Lys Gly Lys Arg Ala Leu Thr Pro Pro
[0461] 1 5 10 15

[0462] Val Asn Asp Leu Lys Tyr Ser Trp Lys Thr Trp Gly Lys

[0463] 20 25

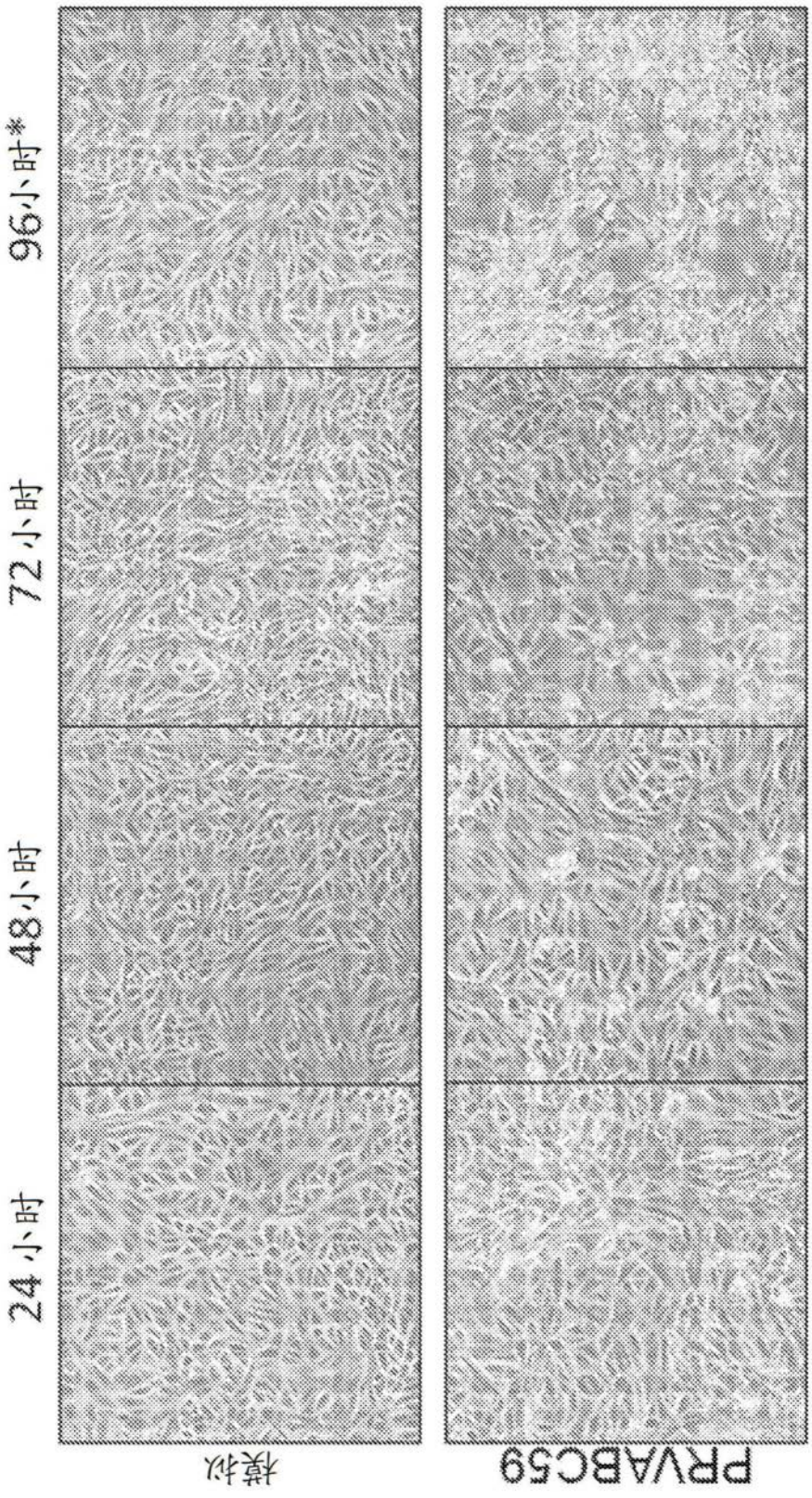


图1

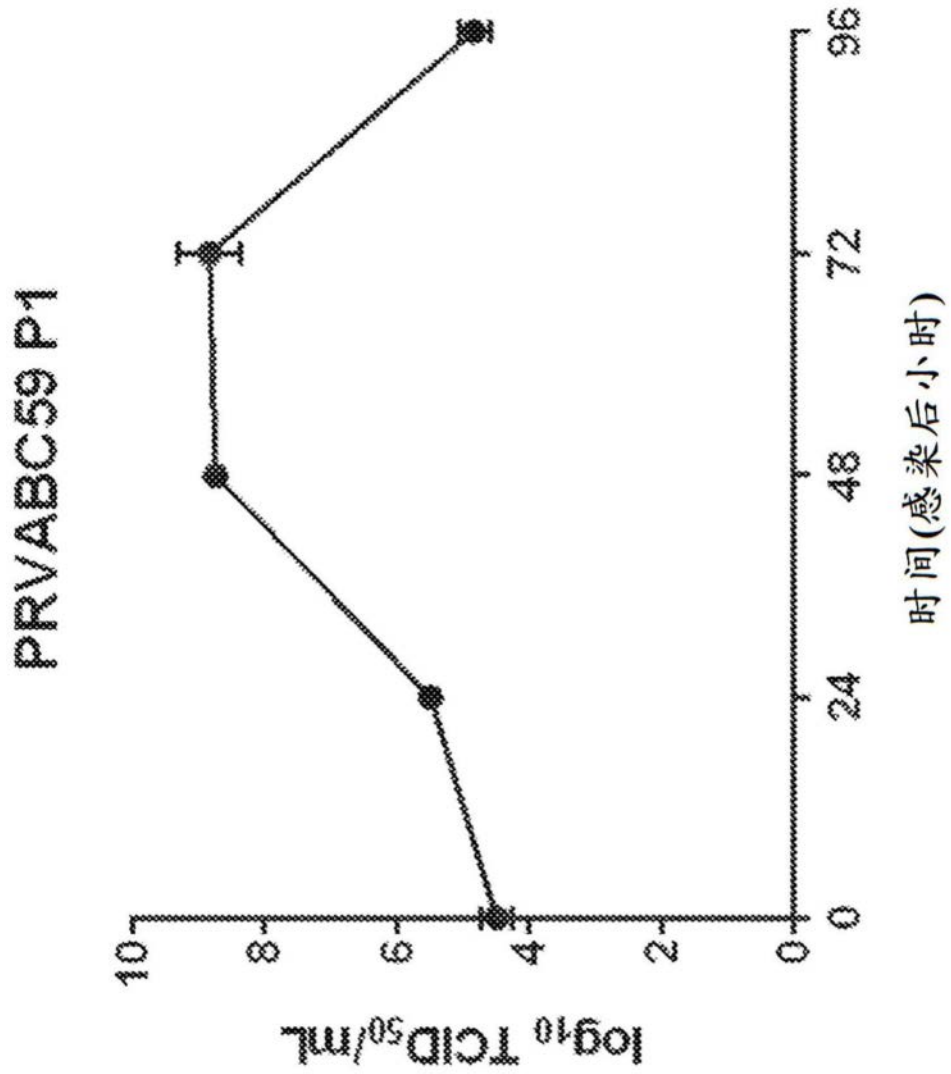


图2

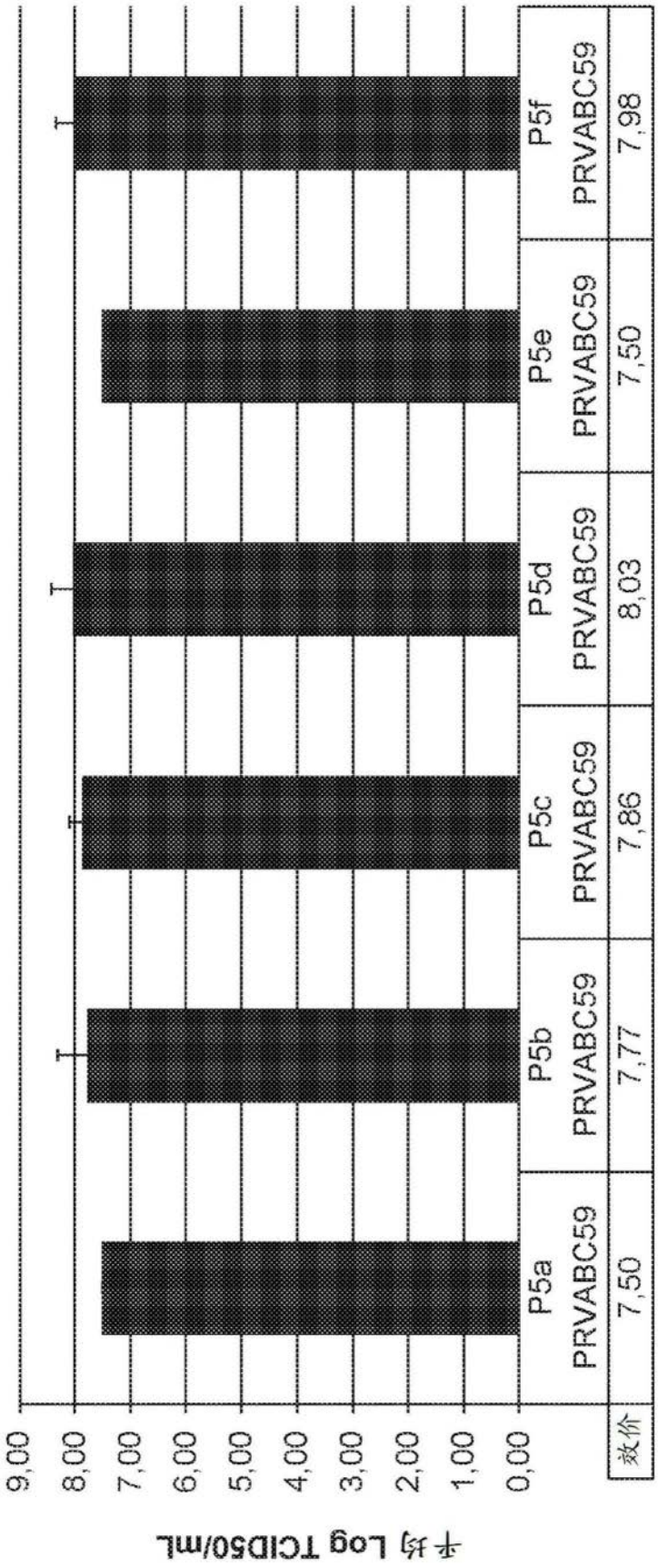

平均 Log TCID50/mL
9,00
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
效价
P5a PRVABC59
7,50
P5b PRVABC59
7,77
P5c PRVABC59
7,86
P5d PRVABC59
8,03
P5e PRVABC59
7,50
P5f PRVABC59
7,98

图3

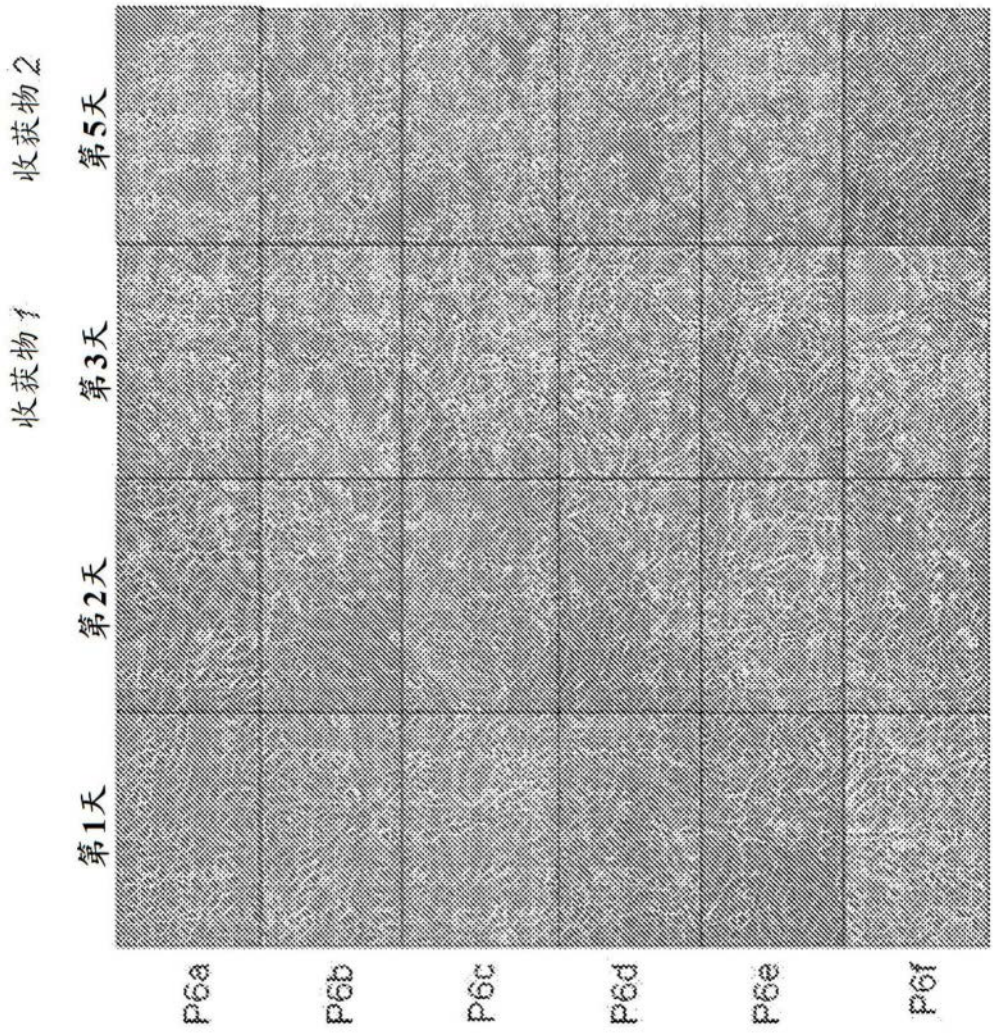


图4

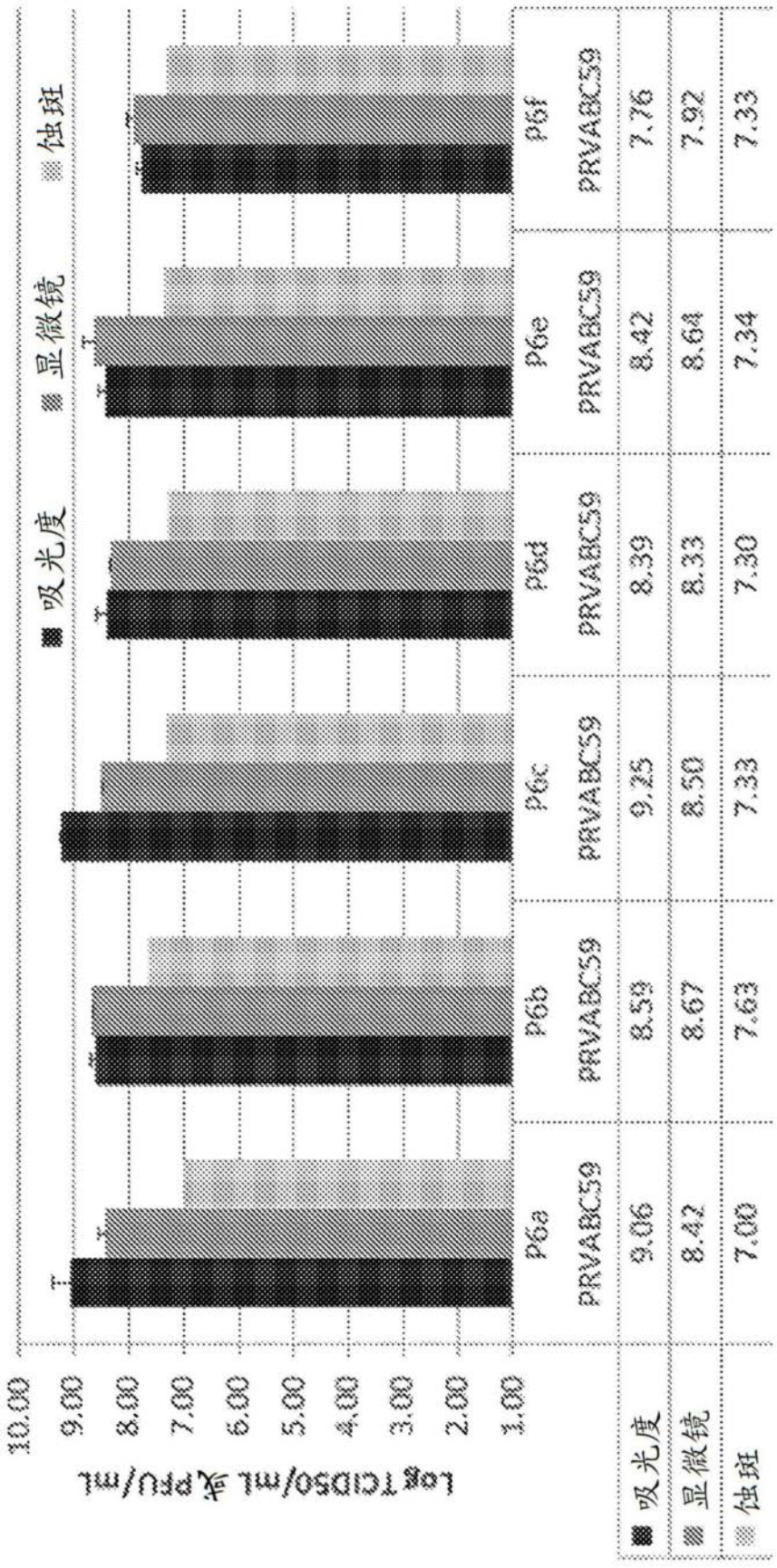

吸光度
显微镜
蚀斑
log TCID50/mL 或 PFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
P6a PRVABC59
P6b PRVABC59
P6c PRVABC59
P6d PRVABC59
P6e PRVABC59
P6f PRVABC59
吸光度 9.06 8.39 9.25 8.39 8.42 7.76
显微镜 8.42 8.67 8.50 8.33 8.64 7.92
蚀斑 7.00 7.63 7.33 7.30 7.34 7.33

图5

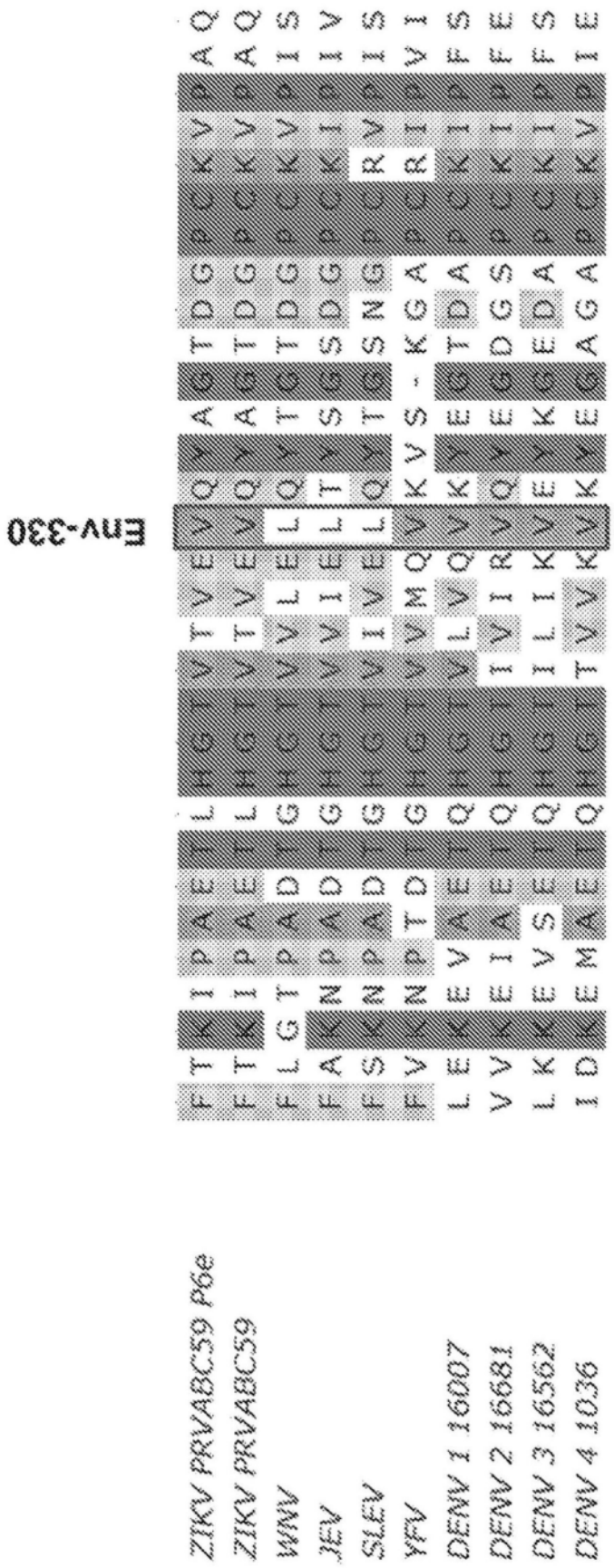

Env-330
ZIKV PRVABC59 P6e
ZIKV PRVABC59
WNV
JEV
SLEV
YFV
DENV 1 16007
DENV 2 16681
DENV 3 16562
DENV 4 1036

图6

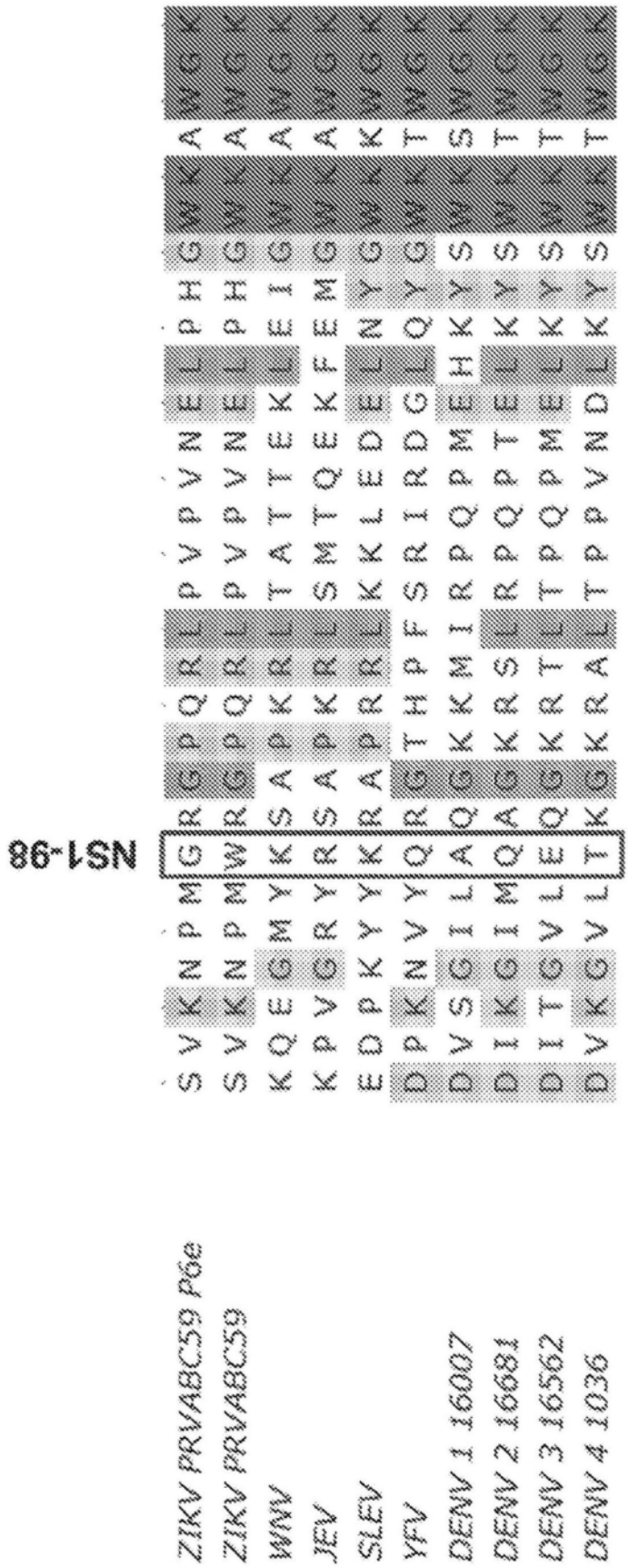

NS1-98
ZIKV PRVABC59 P6e
ZIKV PRVABC59
WNV
JEV
SLEV
YFV
DENV 1 16007
DENV 2 16681
DENV 3 16562
DENV 4 1036

图7

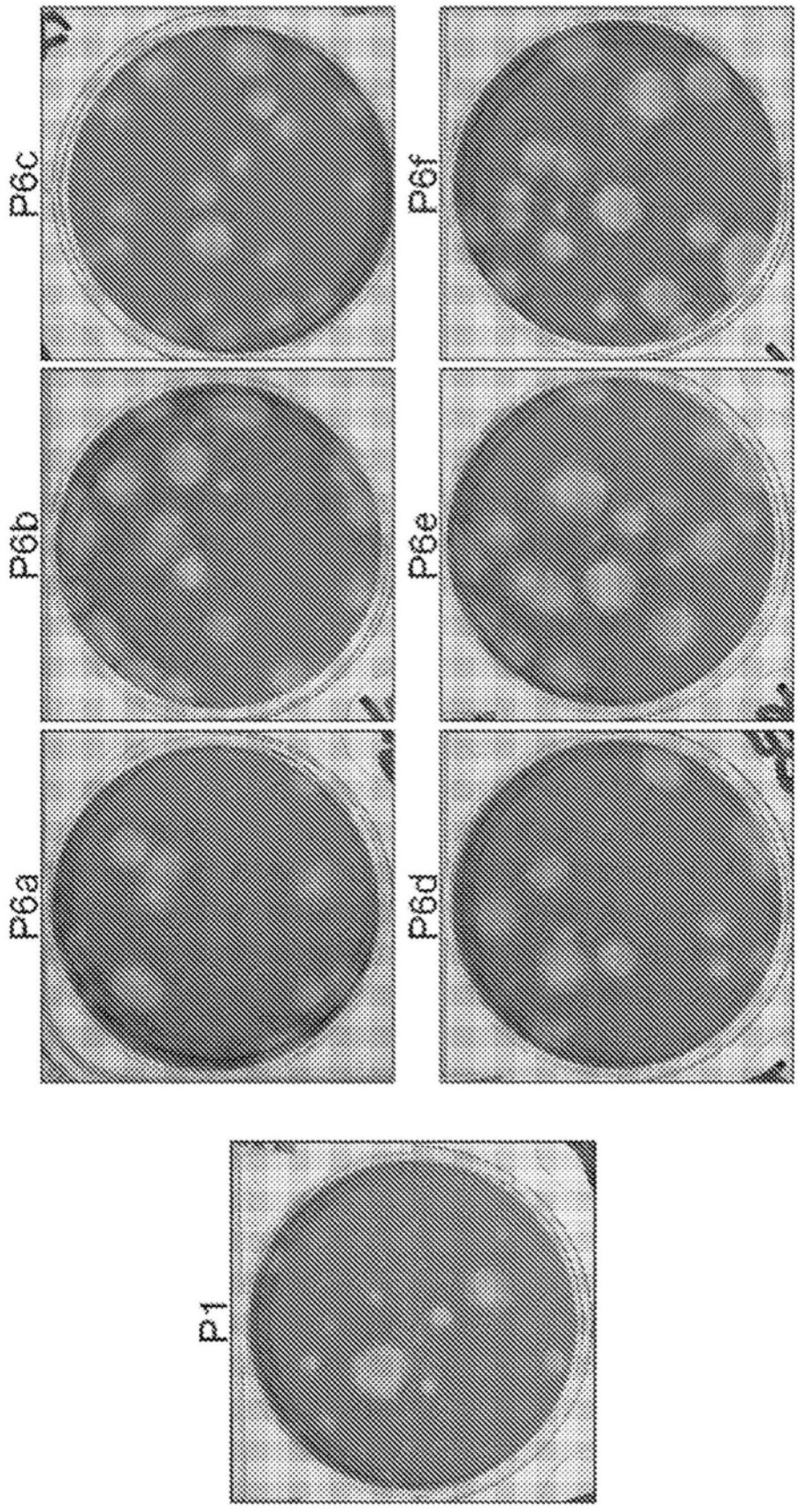


图8

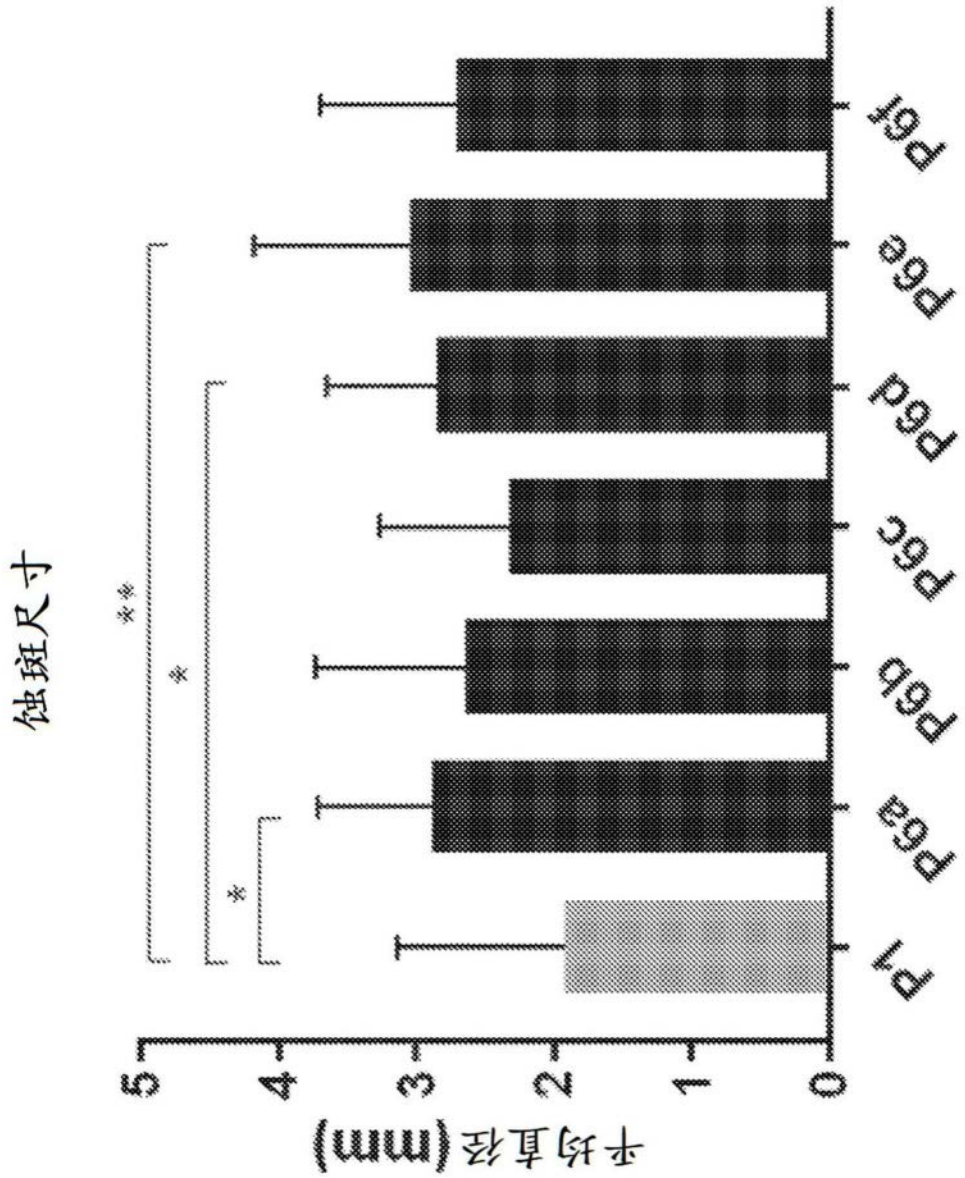


图9

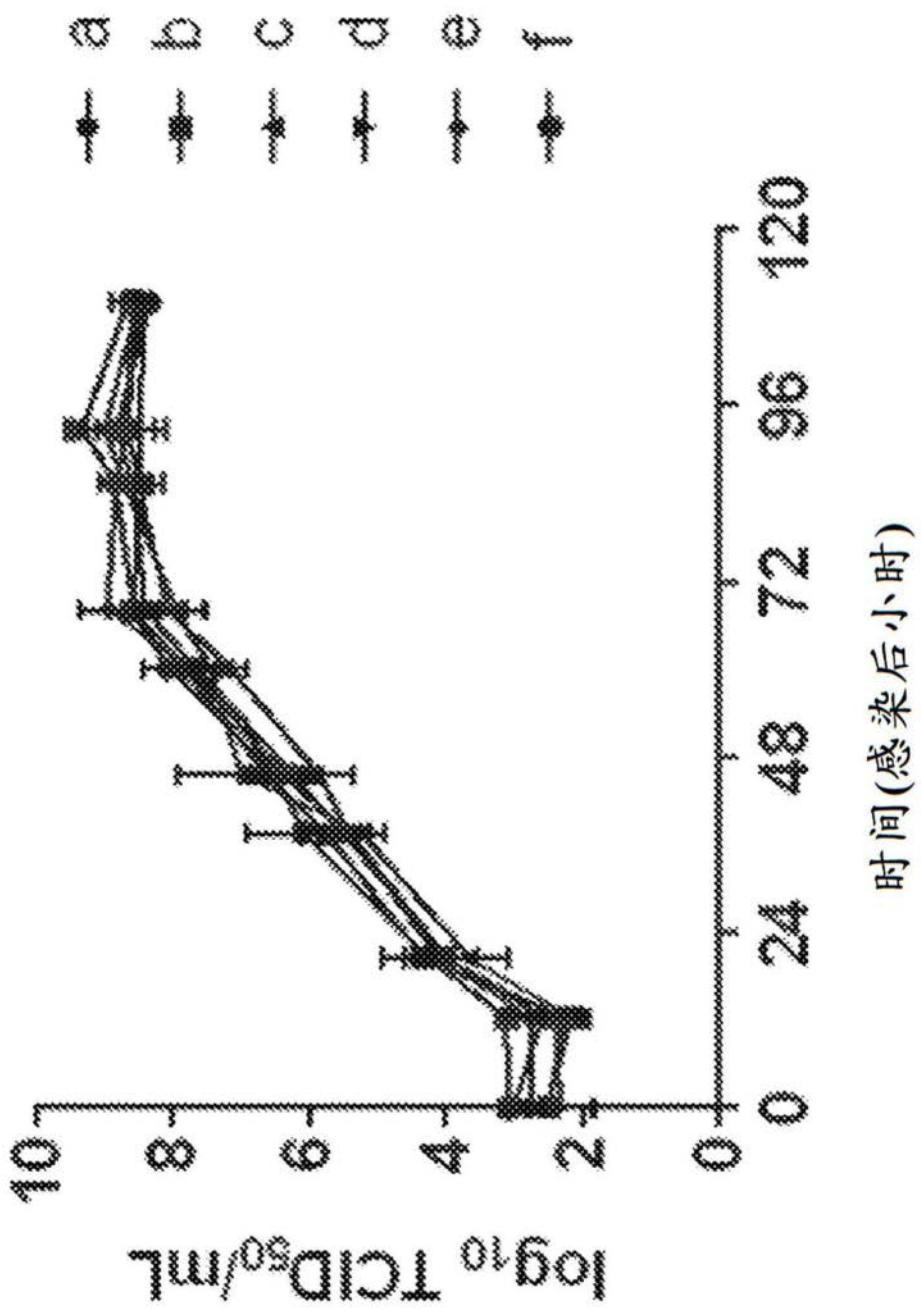


图10

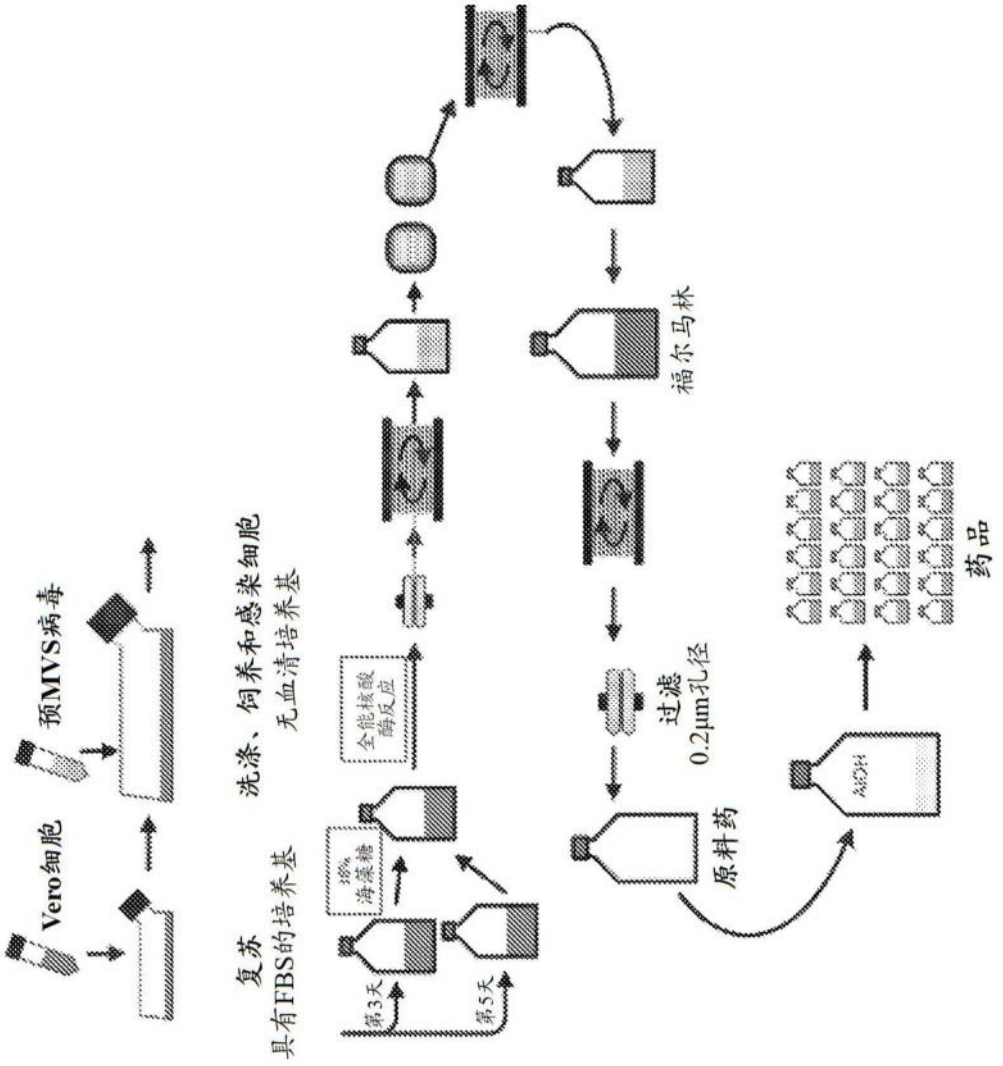

Vero细胞
预MVS病毒
复苏
具有FBS的培养基
洗涤、饲养和感染细胞
无血清培养基
第3天
第5天
海藻糖
全能核酸酶反应
过滤
0.2μm孔径
福尔马林
原料药
药品

图11



图12A

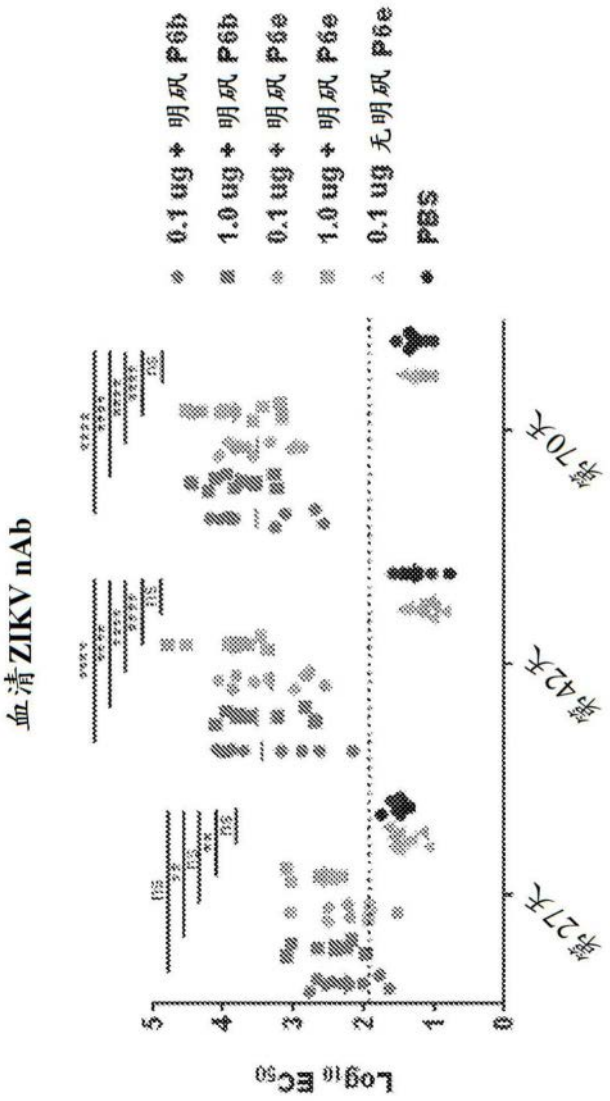

血清ZIKV nAb
Log10 EC50
5
4
3
2
1
0
第27天
第42天
第70天
0.1 ug + 明矾 P6b
1.0 ug + 明矾 P6b
0.1 ug + 明矾 P6e
1.0 ug + 明矾 P6e
0.1 ug 无明矾 P6e
PBS

图12B

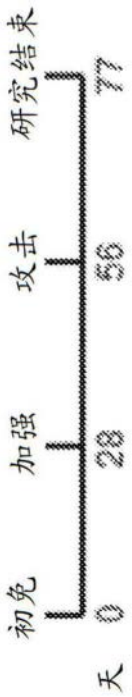


图13A

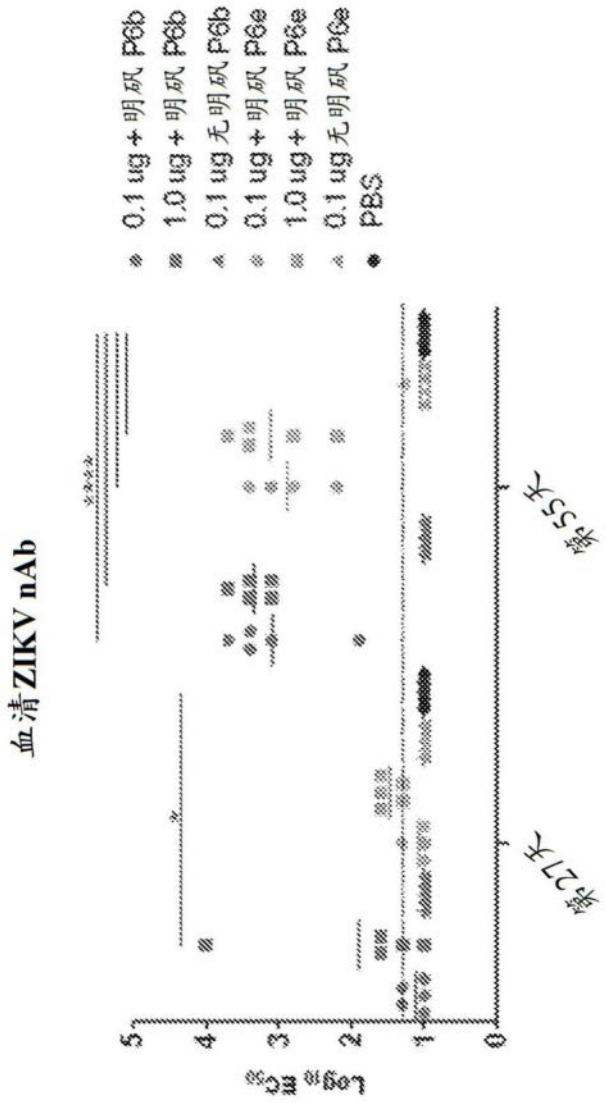

血清ZIKV nAb
log10 EC50
0.1 ug + 明矾 P6b
1.0 ug + 明矾 P6b
0.1 ug 无明矾 P6b
0.1 ug + 明矾 P6e
1.0 ug + 明矾 P6e
0.1 ug 无明矾 P6e
PBS
第21天
第55天

图13B

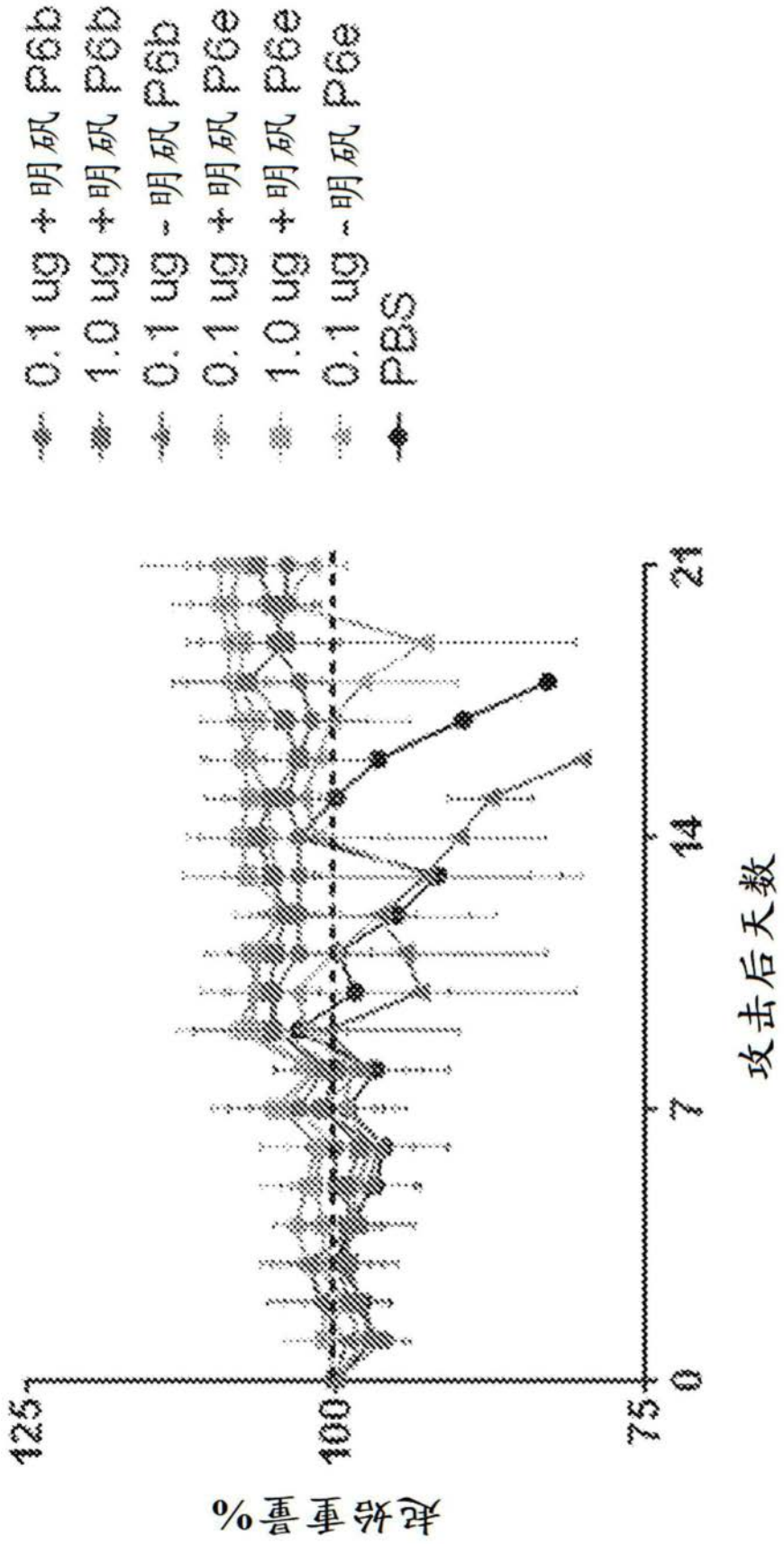

0.1 ug + 明矾 p6b
1.0 ug + 明矾 p6b
0.1 ug - 明矾 p6b
0.1 ug + 明矾 p6e
1.0 ug + 明矾 p6e
0.1 ug - 明矾 p6e
PBS
125
100
75
0
7
14
21
攻击后天数
起始重量%

图14

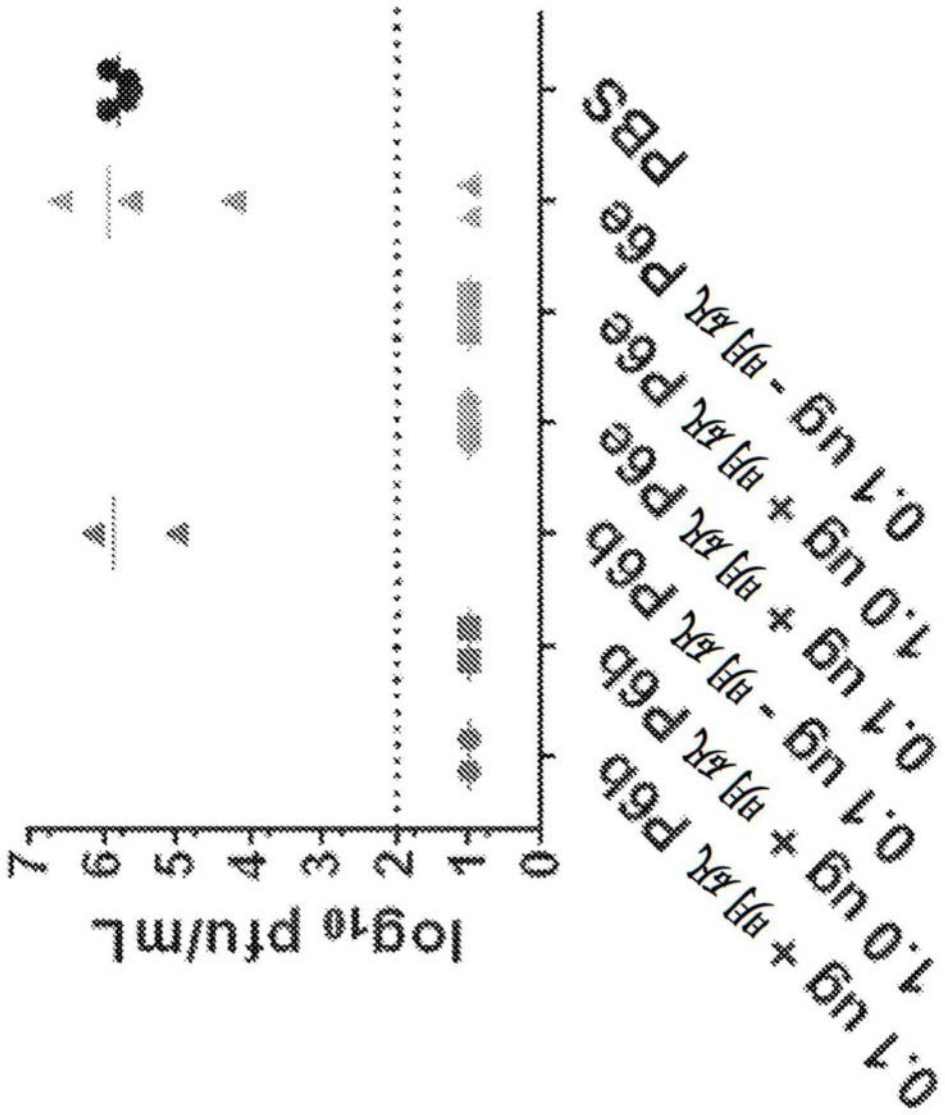

log10 pfu/mL
0
1
2
3
4
5
6
7
PBS
0.1 ug + 明矾 P6e
1.0 ug + 明矾 P6e
0.1 ug - 明矾 P6e
1.0 ug + 明矾 P6b
0.1 ug + 明矾 P6b

图15

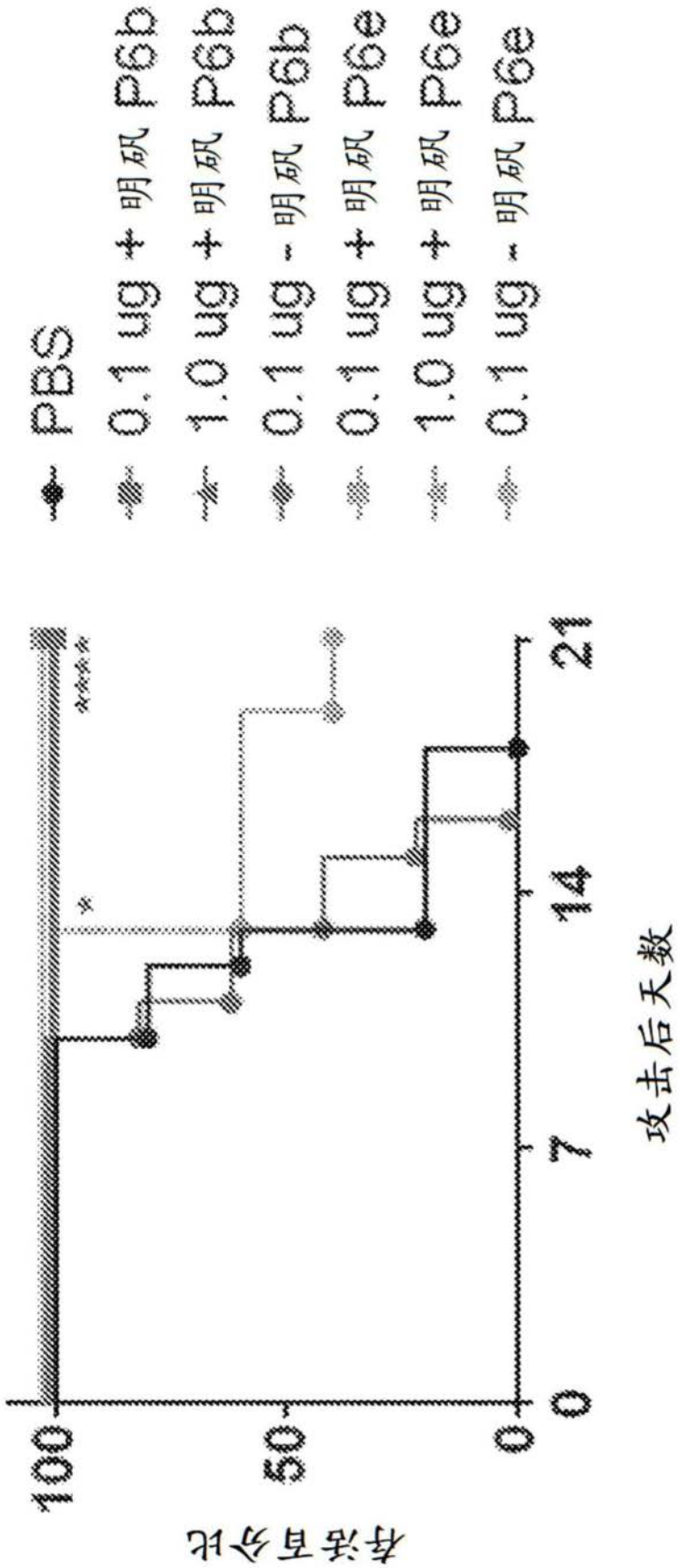

PBS
0.1 ug + 明矾 P6b
1.0 ug + 明矾 P6b
0.1 ug - 明矾 P6b
0.1 ug + 明矾 P6e
1.0 ug + 明矾 P6e
0.1 ug - 明矾 P6e
存活百分比
100
50
0
0
7
14
21
攻击后天数

图16

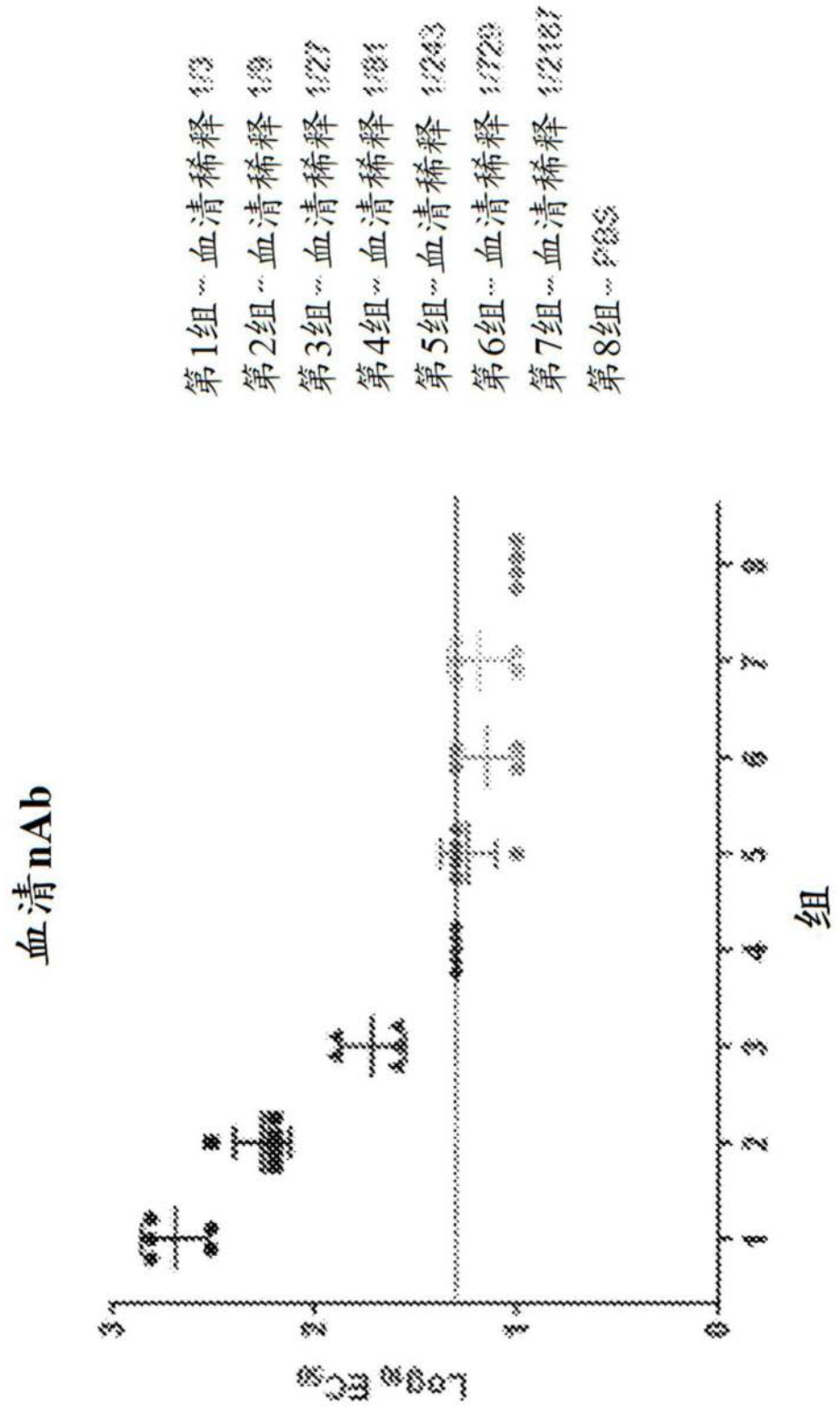


图17

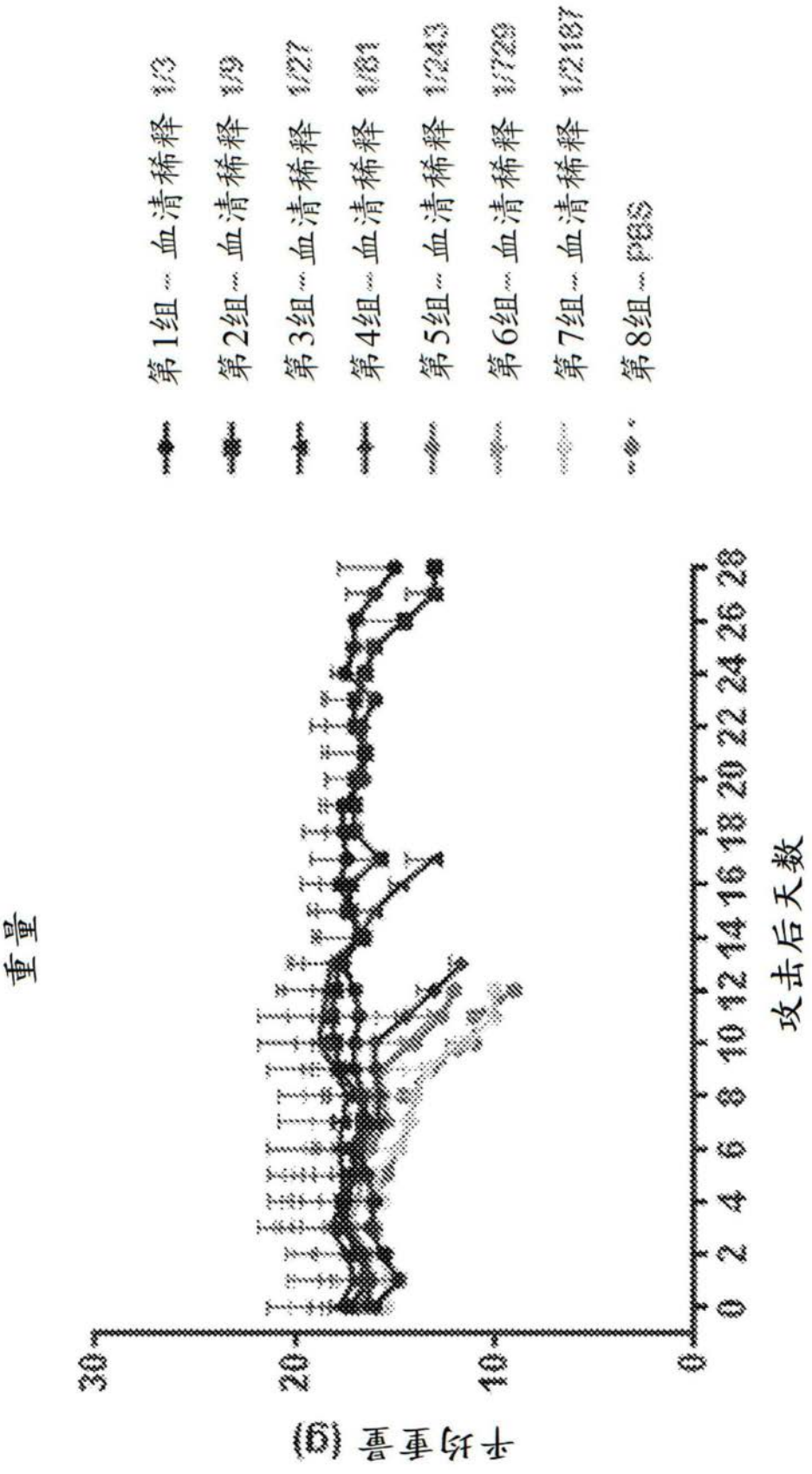

第1组 血清稀释 1/3
第2组 血清稀释 1/9
第3组 血清稀释 1/27
第4组 血清稀释 1/81
第5组 血清稀释 1/243
第6组 血清稀释 1/729
第7组 血清稀释 1/2187
第8组 PBS
平均重量 (g)
30
20
10
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
攻击后天数
重量

图18

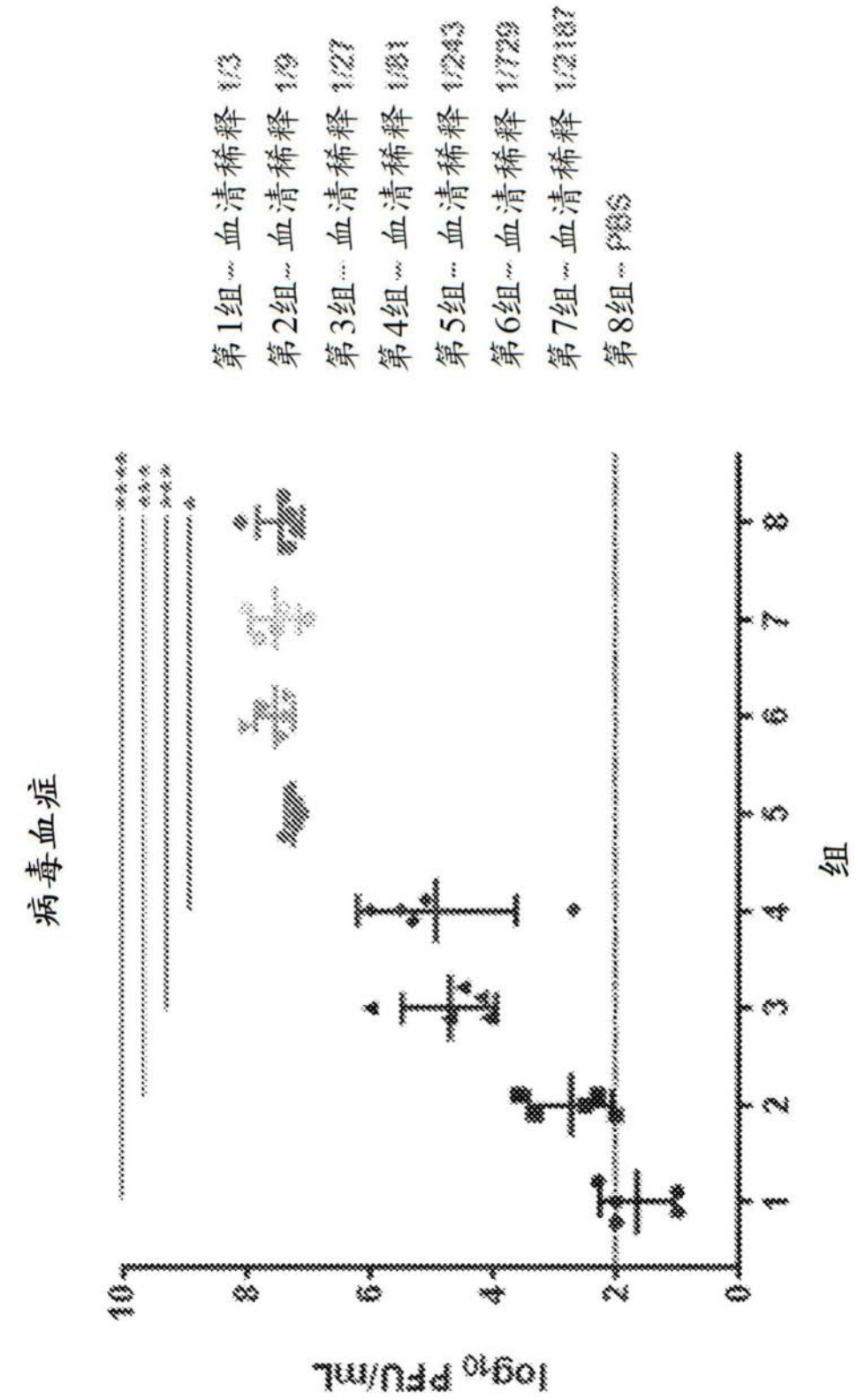

第1组…血清稀释 1/3
第2组…血清稀释 1/9
第3组…血清稀释 1/27
第4组…血清稀释 1/81
第5组…血清稀释 1/243
第6组…血清稀释 1/729
第7组…血清稀释 1/2187
第8组…空白
病毒血症
log10 PFU/mL
组
0
2
4
6
8
10
1
2
3
4
5
6
7
8

图19

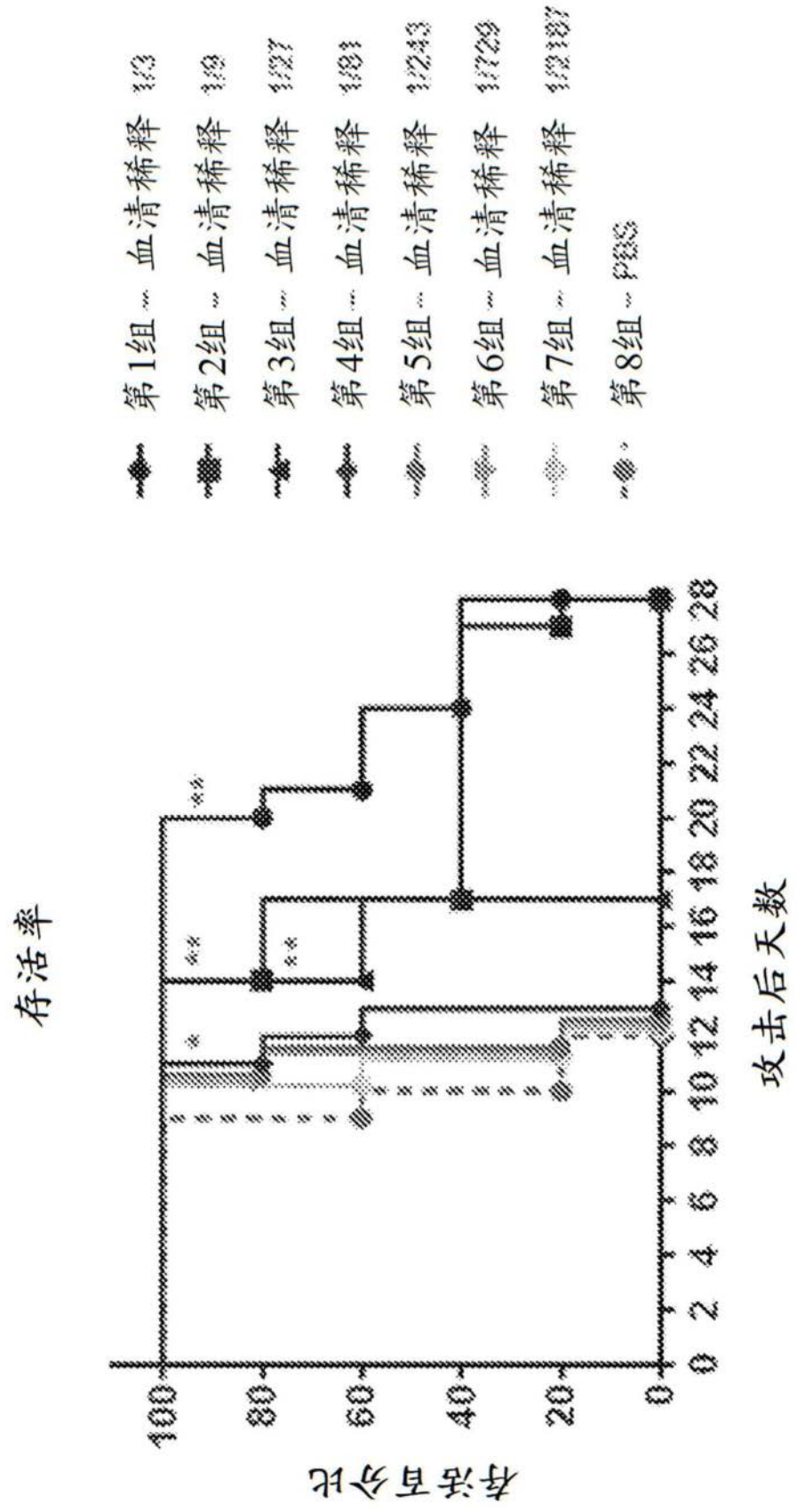

第1组 血清稀释
第2组 血清稀释
第3组 血清稀释
第4组 血清稀释
第5组 血清稀释
第6组 血清稀释
第7组 血清稀释
第8组
存活率
存活百分比
攻击后天数
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
0 20 40 60 80 100

图20

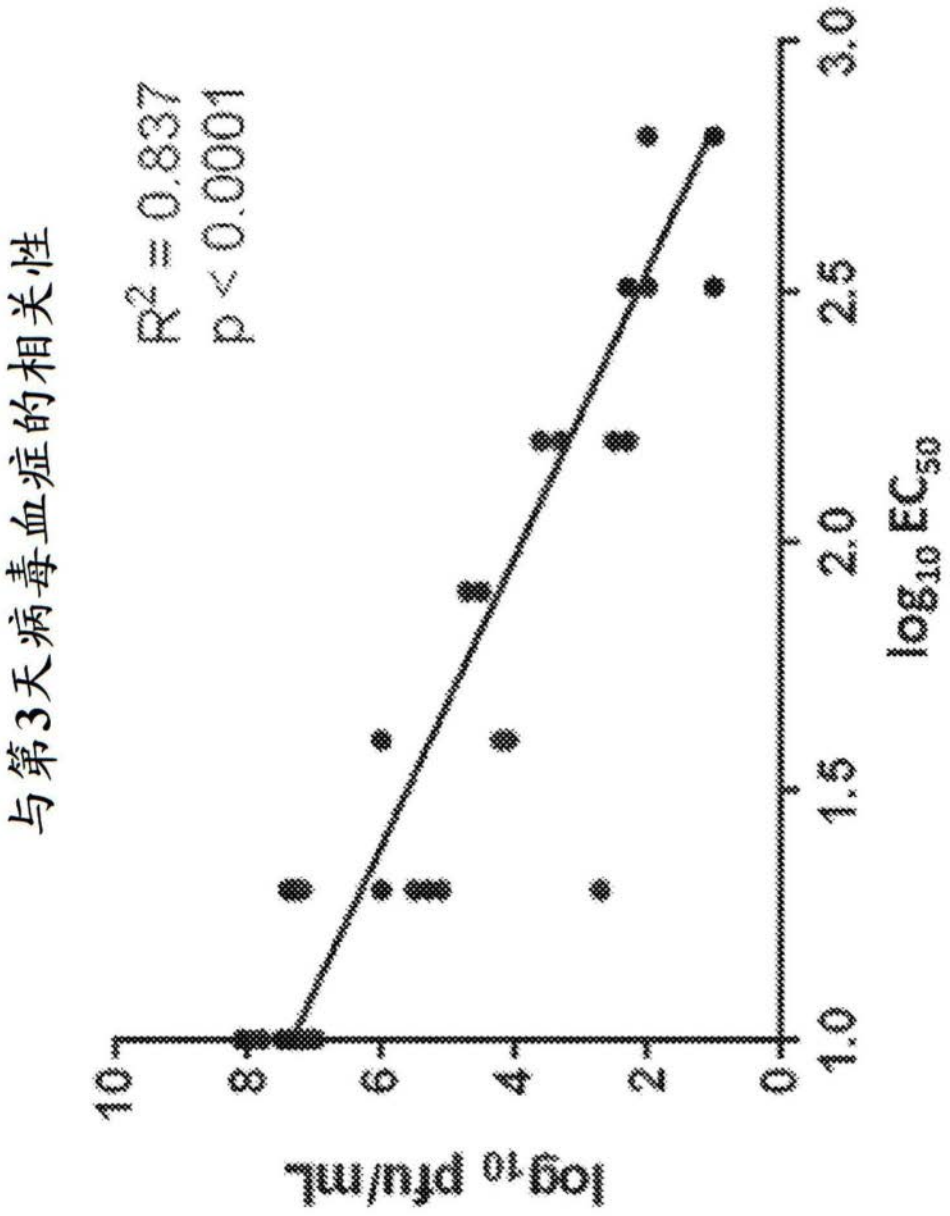

与第3天病毒血症的相关性
$R^2 = 0.837$
$p < 0.0001$
$\log_{10}$ pfu/mL
10
8
6
4
2
0
$\log_{10} EC_{50}$
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

图21

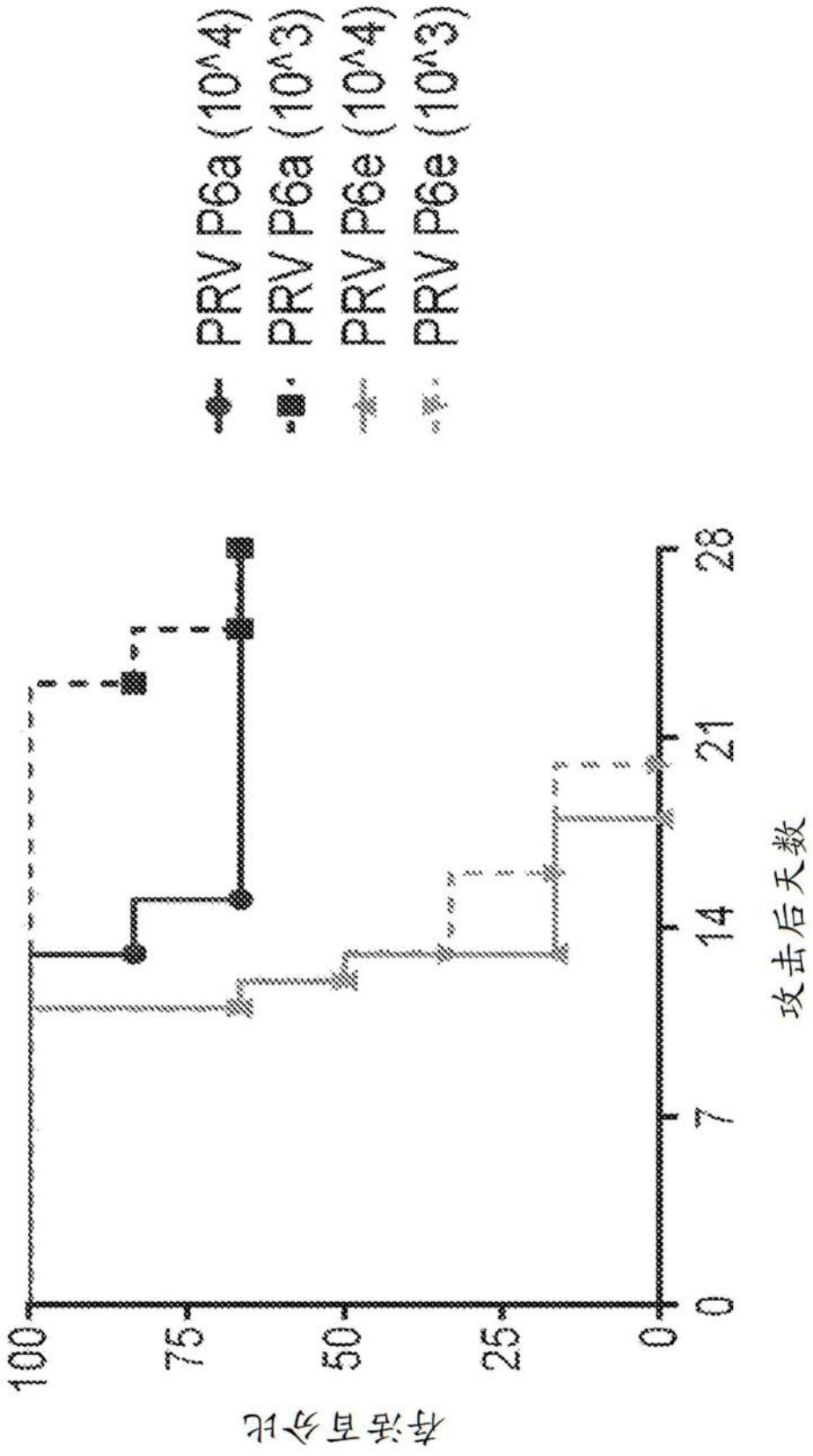

PRV P6a (10^4)
PRV P6a (10^3)
PRV P6e (10^4)
PRV P6e (10^3)
存活百分比
100
75
50
25
0
0
7
14
21
28
攻击后天数

图22

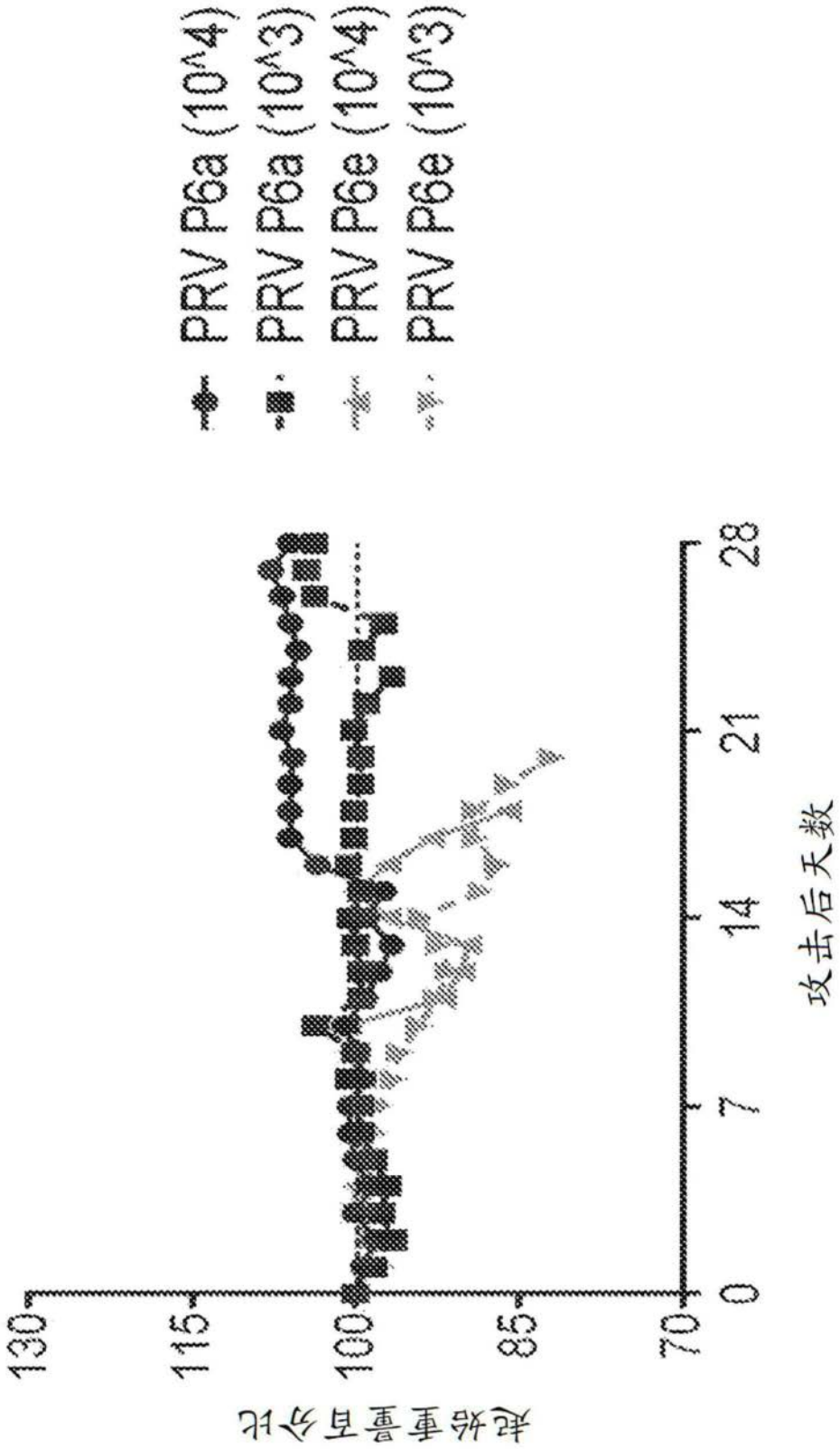

PRV P6a (10^4)
PRV P6a (10^3)
PRV P6e (10^4)
PRV P6e (10^3)
130
115
100
85
70
0
7
14
21
28
攻击后天数
起始重量百分比

图23

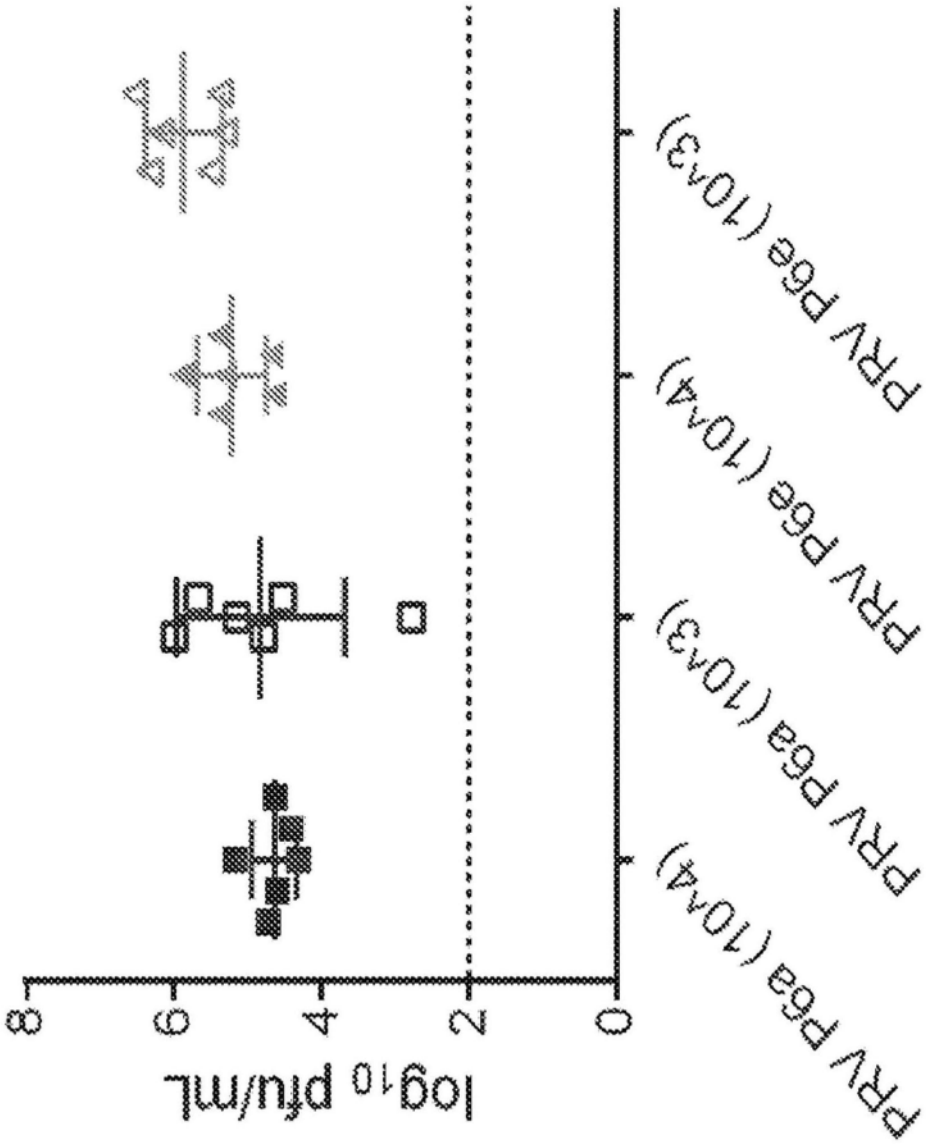

PRV P6a (10^4)
PRV P6a (10^3)
PRV P6e (10^4)
PRV P6e (10^3)
0
2
4
6
8
log10 pfu/mL

图24

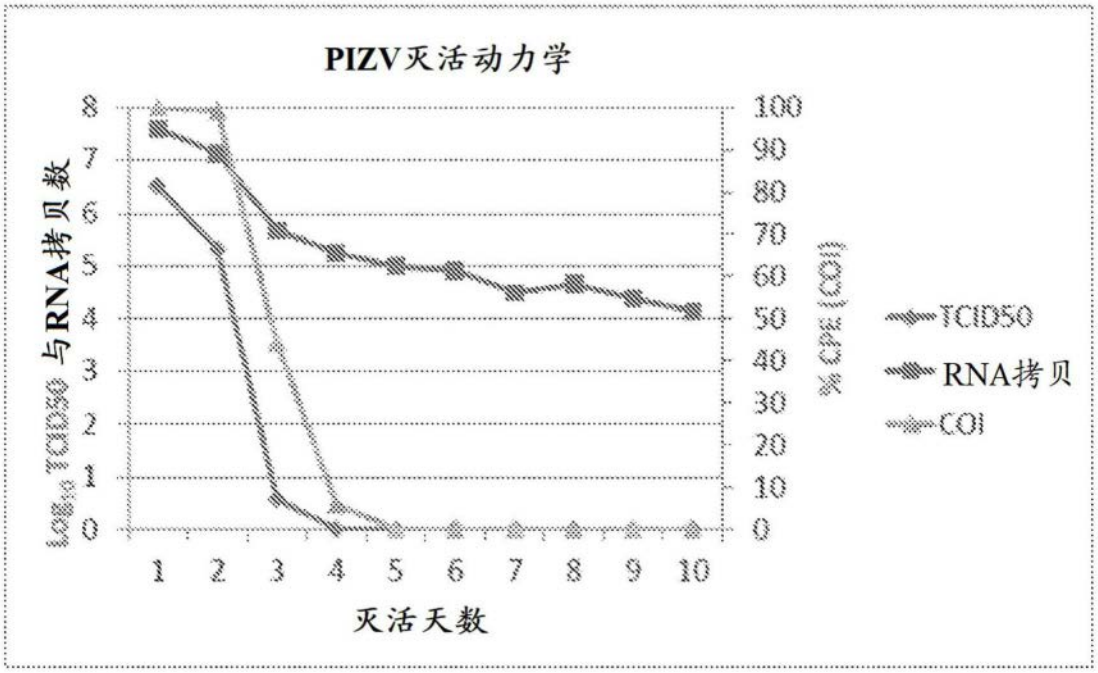


图25

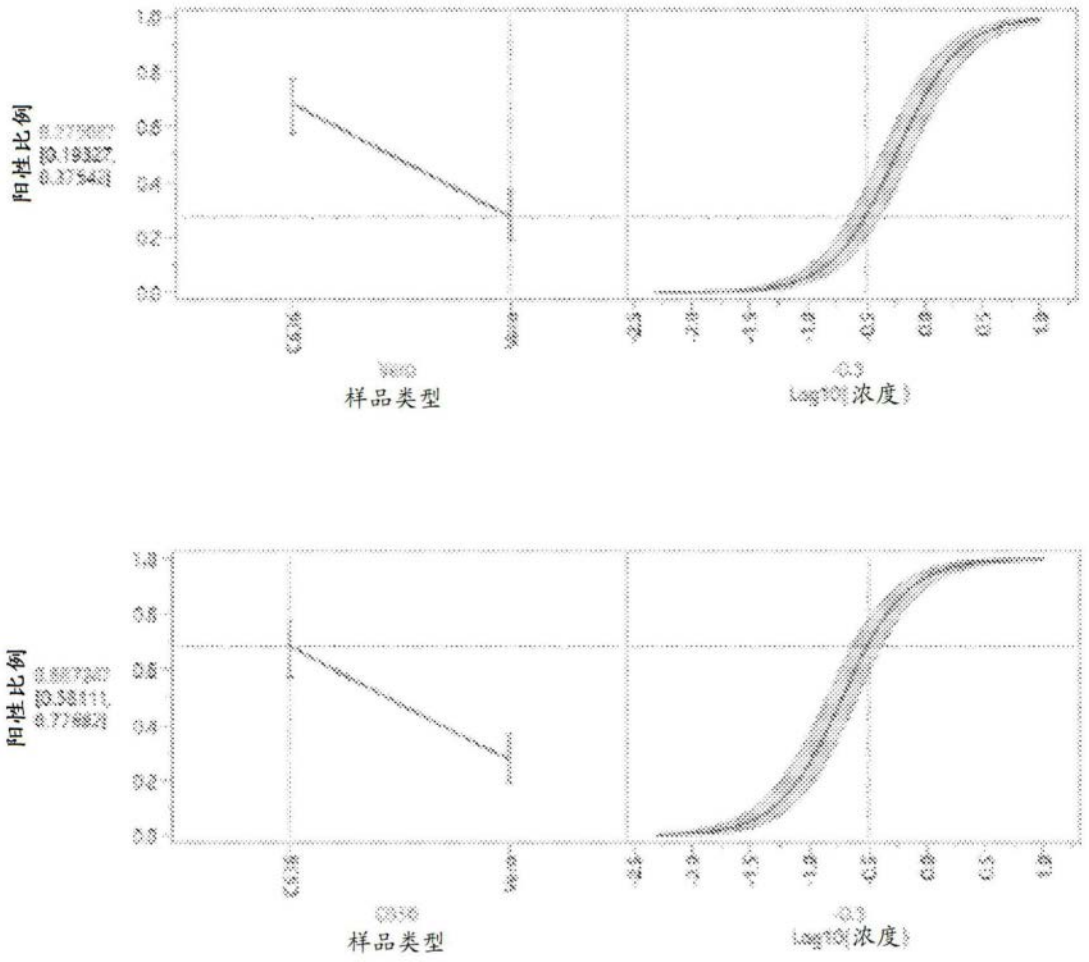


图26

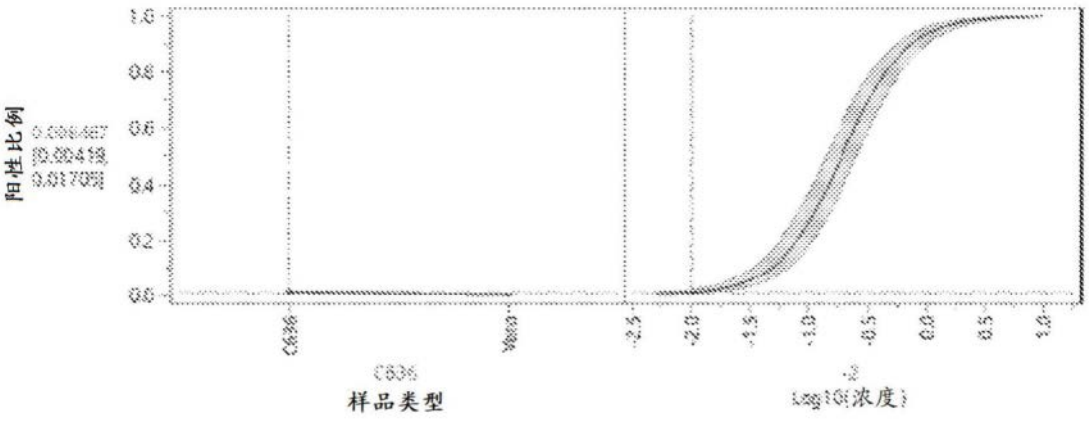


图27

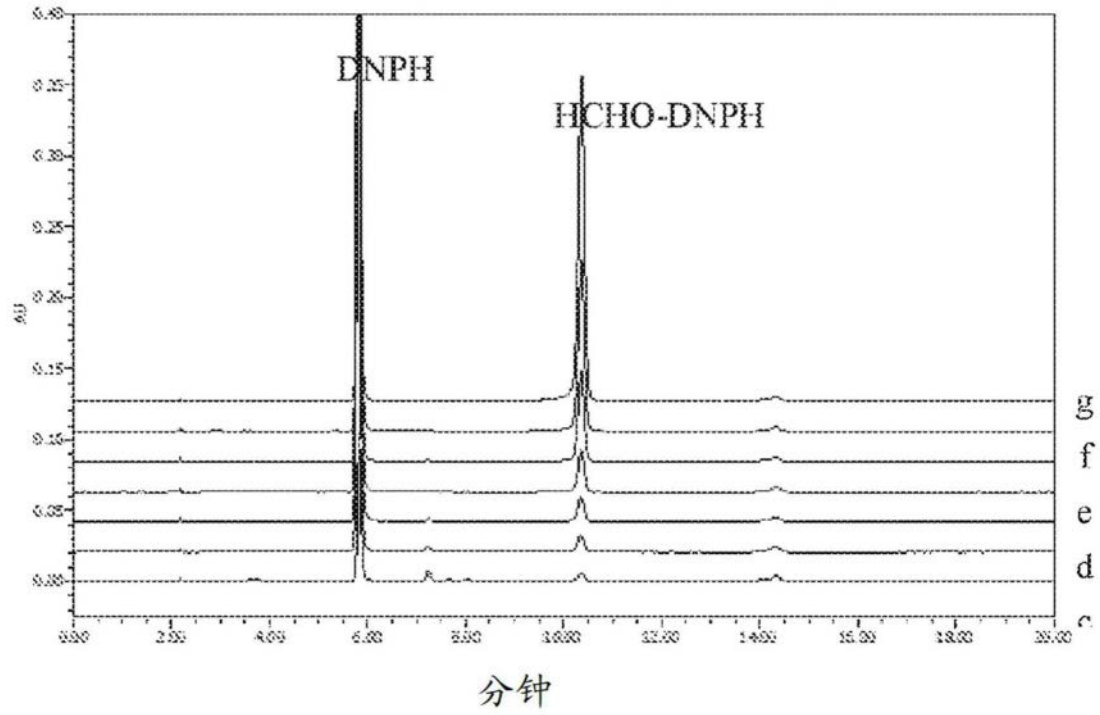


图28