



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110051835 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910150339.2

(22)申请日 2013.04.12

(30)优先权数据

61/623,428 2012.04.12 US

(62)分案原申请数据

201380030601.0 2013.04.12

(71)申请人 宾夕法尼亚大学理事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 大卫·B·韦纳 德文·谢德洛克

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 张晓影

(51)Int.Cl.

A61K 39/12(2006.01)

权利要求书4页 说明书43页

A61P 31/14(2006.01)

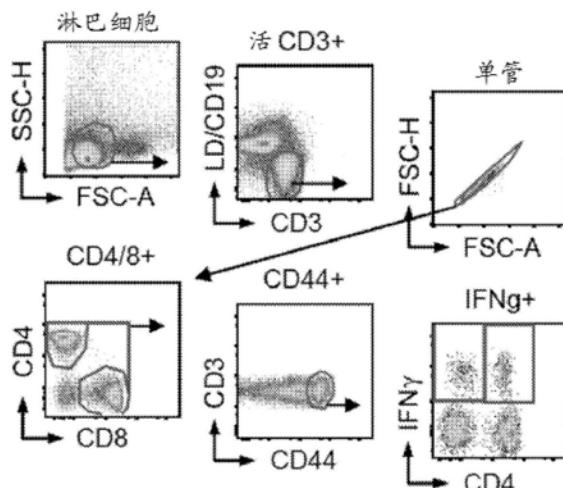
序列表30页 附图23页

(54)发明名称

丝状病毒共有抗原、由其制备的核酸构建体和疫苗以及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了丝状病毒共有抗原、由其制备的核酸构建体和疫苗以及其使用方法,具体地公开了包含一个或多个编码共有丝状病毒免疫原的核酸序列的核酸分子和组合物,共有丝状病毒免疫原包括共有马尔堡病毒丝状病毒糖蛋白MARV GP免疫原、共有苏丹埃博拉病毒丝状病毒糖蛋白SEBOV GP免疫原和共有扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白ZEOBV GP免疫原。这些编码序列任选地包括了编码信号肽的可操作地连接的编码序列。



1.一种组合物,包含:

a) 编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

b) 编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;及

c) 编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:3 (MARV)、SEQ ID NO:3的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:3 (MARV)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:3的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段。

2.一种组合物,包含:

i) 编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

ii) 编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段；

iii) 编码第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:4 (MARV CON1)、SEQ ID NO:4的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:4 (MARV CON1)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:4的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段；

iv) 编码第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:5 (MARV CON2)、SEQ ID NO:5的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:5 (MARV CON2)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:5的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段；及

v) 编码第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6 (MARV CON3)、SEQ ID NO:6的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:6 (MARV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:6的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段。

### 3. 一种组合物,包含:

编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段；及

编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,所述共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片

段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段。

4. 一种诱导针对丝状病毒的免疫应答的方法,包括向个体施用有效诱导所述个体中的免疫应答的量的如权利要求1到3中任一权利要求所述的组合物。

5. 一种诱导针对丝状病毒的免疫应答的方法,所述丝状病毒选自由以下组成的组:马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒,所述方法包括向个体施用有效诱导所述个体中的免疫应答的量的如权利要求1到3中任一权利要求所述的组合物。

6. 一种治疗被诊断带有丝状病毒的个体的方法,包括向个体施用治疗有效量的如权利要求1到3中任一权利要求所述的组合物。

7. 一种治疗被诊断带有丝状病毒的个体的方法,所述丝状病毒选自由以下组成的组:马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒,所述方法包括向个体施用治疗有效量的如权利要求1到3中任一权利要求所述的组合物。

8. 一种防止个体感染丝状病毒的方法,包括向个体施用预防有效量的如权利要求1到3中任一权利要求所述的组合物。

9. 一种防止个体感染丝状病毒的方法,其中所述丝状病毒选自由以下组成的组:马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒,所述方法包括向个体施用预防有效量的如权利要求1到3中任一权利要求所述的组合物。

10. 一种组合物,包含两种或更多种选自由以下组成的组的蛋白质:

共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原,所述共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:1的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:1具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原,所述共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:2的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:2具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原,所述马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:3 (MARV)、SEQ ID NO:3的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:3 (MARV)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:3的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:3具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原,所述第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:4 (MARV CON1)、SEQ ID NO:4的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:4 (MARV CON1)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:4的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:4具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;

第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原,所述第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:5 (MARV CON2)、SEQ ID NO:5的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:5 (MARV CON2)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:5的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:5具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段;及

第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原,所述第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6 (MARV CON3)、SEQ ID NO:6的包含600个或更多氨基酸的片段、与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列、与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:6 (MARV CON)、连接到IgE信号肽的SEQ ID NO:6的包含600个或更多氨基酸的片段、连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列,及连接到IgE信号肽的与SEQ ID NO:6具有95%同源性的氨基酸序列的包含600个或更多氨基酸的片段。

## 丝状病毒共有抗原、由其制备的核酸构建体和疫苗以及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2013年4月12日、发明名称为“丝状病毒共有抗原、由其制备的核酸构建体和疫苗以及其使用方法”的中国专利申请号201380030601.0的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于诱导免疫应答并且防止丝状病毒感染和/或治疗感染丝状病毒，特别是感染马尔堡病毒 (Marburgvirus)、苏丹埃博拉病毒 (Ebolavirus Suda) 和扎伊尔埃博拉病毒 (Ebolavirus Zaire) 的个体的疫苗。本发明涉及共有丝状病毒蛋白，特别是马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒丝状病毒蛋白，及编码这些蛋白质的核酸分子。

### 背景技术

[0003] 丝状病毒科 (Filoviridae) 是非节段性单链RNA病毒，这些病毒含有两个相异的属：马尔堡病毒属 (Marburgvirus; MARV) 和埃博拉病毒属 (Ebolavirus, EBOV)。其各自的成员可以引起严重并且高死亡率的出血热疾病，尚无针对这种疾病的治疗或许可的疫苗 (Bradfute S.B. 等人, (2011) *Filovirus vaccines*. *Hum Vaccin* 7:701-711; Falzarano D. 等人, (2011) *Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use*. *Expert Rev Vaccines* 10:63-77; Fields B.N. 等人, (2007) *Fields' virology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. 2v. (xix, 第3091、I-3086页)； Richardson J.S. 等人, (2009) *Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine*. *PLoS One* 4:e5308; 及 Towner J.S. 等人, (2006) *Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola*. *J Virol* 80:6497-6516)。

[0004] 由于致死率高达90%，这些病毒已经被世界卫生组织 (World Health Organization) 描述为“人类已知的最致命的病毒性疾病之一”。部分由于这些病毒在武器化时会对国家安全造成的潜在威胁，美国疾病控制与预防中心 (US Centers for Disease Control and Prevention) 已经将其归类为‘A级生物恐怖试剂’ (Burki T.K. (2011) USA focuses on Ebola vaccine but research gaps remain. *Lancet* 378:389)。这些‘高优先权’ 试剂在理论上可以为易于传播的，造成高死亡率，引起严重的公共健康影响和恐慌，并且需要针对公共卫生准备采取特殊措施 (CDC (2011) *Bioterrorism Agents/Diseases*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention)。

[0005] 出血热疾病是在无载体状态下发生的急性感染，不过这些疾病易于通过与受污染体液、血液和组织的直接接触而在人类和非人类灵长类动物间传播 (Feldmann H. 等人 (2003) *Ebola virus: from discovery to vaccine*. *Nat Rev Immunol* 3:677-685)。在疾病爆发期间，医疗设备的重复使用、健康护理机构的资源有限以及预防措施的不合时宜地应用使疾病的传播飞快增加，从而导致在医疗环境中感染的扩大。

[0006] 由于这些人畜共通病原体的自然宿主可能是非洲蝙蝠和猪 (Kobinger G.P. 等人 (2011) *Replication, pathogenicity, shedding, and transmission of Zaire ebolavirus in pigs*. *J Infect Dis* 204:200–208), 其中后者作为扩散宿主的可能性更大, 使得病毒在疾病爆发开始时首次出现的方式被认为是通过人与受感染动物接触而发生。这种疾病在菲律宾, 潜在地在欧洲以及主要在非洲的不可预测的地方性表面加工进一步构成了一个严重的公共卫生问题 (Outbreak news. (2009) *Ebola Reston in pigs and humans, Philippines*. *Wkly Epidemiol Rec* 84:49–50)。

[0007] 已经进行了多次实验来确定疫苗在诱导保护功效和广泛CTL方面的能力, 包括在啮齿动物临床前研究中进行的实验。(Fenimore PW等人 (2012) *Designing and testing broadly-protective filoviral vaccines optimized for cytotoxic T-lymphocyte epitope coverage*. *PLoS ONE* 7:e44769; Hensley LE等人 (2010) *Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species*. *PLoS Pathog* 6:e1000904; Zahn R等人 (2012) *Ad35 and ad26 vaccine vectors induce potent and cross-reactive antibody and T-cell responses to multiple filovirus species*. *PLoS ONE* 7:e44115; Geisbert TW, Feldmann H (2011) *Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections*. *J Infect Dis* 204增刊3:S1075–1081; 及 Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS (2012) *A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge*. *Hum Vaccin Immunother* 8; Grant-Klein RJ, Altamura LA, Schmaljohn CS (2011) *Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses*. *Virus Res* 162:148–161)。

[0008] 已经在众多临床前动物模型中描述疫苗诱导的适应性免疫应答 (Blaney JE等人 (2011) *Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses*. *J Virol* 85:10605–10616; Dowling W 等人 (2007) *Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines*. *J Virol* 81:1821–1837; Jones SM 等人 (2005) *Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses*. *Nat Med* 11:786–790; Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009) *Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model*. *J Virol* 83:132; Kobinger GP 等人 (2006) *Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus*. *Virology* 346:394–401; Olinger GG 等人 (2005) *Protective cytotoxic T-cell responses induced by Venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins*. *J Virol* 79:14189–14196; Rao M, Bray M, Alving CR, Jahrling P, Matyas GR (2002) *Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells*. *J Virol* 76:9176–9185; Rao M, Matyas GR, Grieder F, Anderson K, Jahrling PB, Alving CR (1999) *Cytotoxic T lymphocytes*

to Ebola Zaire virus are induced in mice by immunization with liposomes containing lipid A. Vaccine 17:2991–2998; Richardson JS等人(2009). Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. PLoS One 4:e5308; Vanderzanden L等人(1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. Virology 246:134–144; Warfield KL等人(2005). Induction of humoral and CD8+T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. J Immunol 175:1184–1191; Jones SM等人(2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. J Infect Dis 196增刊2:S404–412; Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS(2012). A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. Hum Vaccin Immunother 8.; Geisbert TW等人(2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. J Virol 84:10386–10394。经显示,病毒疫苗是颇具前景的并且主要包括重组腺病毒和水疱性口炎病毒。非感染性策略,如重组DNA和Ag偶合的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)疫苗,已经展现出一定水平的临床前功效并且一般被认为比基于病毒的平台更安全。当在感染之前或感染之后立即施加病毒特异性Ab时,这些Ab在被动施加的情况下可以具有保护作用(Gupta M, Mahanty S, Bray M, Ahmed R, Rollin PE(2001). Passive transfer of antibodies protects immunocompetent and immunodeficient mice against lethal Ebola virus infection without complete inhibition of viral replication. J Virol 75:4649–4654; Marzi A等人(2012). Protective efficacy of neutralizing monoclonal antibodies in a nonhuman primate model of Ebola hemorrhagic fever. PLoS ONE 7:e36192; Parren PW, Geisbert TW, Maruyama T, Jahrling PB, Burton DR(2002). Pre-and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody. J Virol 76: 6408–6412; Qiu X等人(2012). Ebola GP-Specific Monoclonal Antibodies Protect Mice and Guinea Pigs from Lethal Ebola Virus Infection. PLoSNegl Trop Dis 6: e1575; Wilson JA等人(2000). Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. Science 287:1664–1666; Sullivan NJ等人(2011). CD8(+) cellular immunity mediates rAd5vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. Nat Med 17:1128–1131; Bradfute SB, Warfield KL, Bavari S (2008). Functional CD8+ T cell responses in lethal Ebola virus infection. J Immunol 180:4058–4066; Warfield KL, Olinger GG(2011). Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. J Biomed Biotechnol 2011:984241)。基于在基因敲除小鼠中进行的研究、在NHP中进行的耗尽研究及鼠类过继转移研究,还显示出T细胞可提供保护作用,其中功效主要与过继转移的CD8+T细胞的溶解功能相关。然而,有关由保护性疫苗所驱动的这一应答的详细分析报导甚少。

[0009] 发展对策最终将需要改善对保护性免疫相关性和其在感染期间如何进行调节的了解。这在死于丝状病毒疾病的受感染个体无法产生早期免疫应答时被证实是很难的。如由病毒特异性Ab反应的缺乏和总T细胞数量大幅减少所证实,这些迅速传播的出血热疾病引起免疫失调,导致不受控制的病毒复制以及多器官感染和衰竭。相反,埃博拉病毒(EBOV)疾病的幸存者展现早期并且短暂的IgM反应,这之后迅速发生病毒特异性IgG和CTL水平的增加。这些观察结果表明,体液和细胞介导的免疫应答在赋予针对疾病的防护方面起到作用。这些数据还得到了众多临床前功效研究的支持,这些研究证实疫苗诱导的适应性免疫促成了针对致死性攻击的防护作用。然而,越来越多的证据已证实T细胞在提供防护作用方面的关键作用,其中功效主要与CD8+T细胞的功能表型相关。尽管这些近期的研究突出了T细胞在提供防护作用方面的重要性,但其确切的贡献仍未得到表征并且仍存在争议。此外,有关由保护性疫苗所驱动的这一应答的详细分析报导甚少。

## 发明内容

[0010] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒(Zaire ebolavirus)包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码共有苏丹埃博拉病毒(Sudan ebolavirus)包膜糖蛋白免疫原的核酸序列及编码马尔堡马尔堡病毒(Marburg marburgvirus)安哥拉(Angola)2005包膜糖蛋白免疫原的核酸序列。该共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的片段、与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:1具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:1的片段或与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,630个或更多,或者660个或更多氨基酸。该共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的片段、与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:2具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:2的片段或与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,630个或更多,或者660个或更多氨基酸。该马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:3 (MARV ANG)、SEQ ID NO:3的片段、与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:3具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:3的片段或与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,637个或更多,或者670个或更多氨基酸。该氨基酸序列可以任选地包含前导序列,如IgE前导序列。

[0011] 还提供了一种组合物,该组合物包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码马尔堡马尔堡病毒第一共有包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码马尔堡马尔堡病毒第二共有包膜糖蛋白免疫原的核酸序列及编码马尔堡马尔堡病毒第三共有包膜糖蛋白免疫原的核酸序列。该共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的片段、与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1同源的氨基

酸序列的片段。与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:1具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:1的片段或与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,630个或更多,或者660个或更多氨基酸。该共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的片段、与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:2具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高同源性。SEQ ID NO:2的片段或与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,630个或更多,或者660个或更多氨基酸。该马尔堡马尔堡病毒第一共有包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:4 (MARV RAV)、SEQ ID NO:4的片段、与SEQ ID NO:4同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:4同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:4具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高同源性。SEQ ID NO:4的片段或与SEQ ID NO:4同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,637个或更多,或者670个或更多氨基酸。该马尔堡马尔堡病毒第二共有包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:5 (MARV OZO)、SEQ ID NO:5的片段、与SEQ ID NO:5同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:5同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:4具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:5的片段或与SEQ ID NO:5同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,637个或更多,或者670个或更多氨基酸。该马尔堡马尔堡病毒第三共有包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:6 (MARV MUS)、SEQ ID NO:6的片段、与SEQ ID NO:6同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:6同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:6具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:6的片段或与SEQ ID NO:6同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,637个或更多,或者670个或更多氨基酸。该氨基酸序列可以任选地包含前导序列,如IgE前导序列。在一些实施方案中,该组合物另外包含一种编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的核酸序列。该马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:3 (MARV ANG)、SEQ ID NO:3的片段、与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:3具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:3的片段或与SEQ ID NO:3同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,637个或更多,或者670个或更多氨基酸。该氨基酸序列可以任选地包含前导序列,如IgE前导序列。

[0012] 还提供了一种组合物,该组合物包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列及编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列。该共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:1 (ZEBOV CON)、SEQ ID NO:1的片段、与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:1具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:1的片段或与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,630个或更多,或者660个或更多氨基酸。该共有苏

丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列可以为SEQ ID NO:2 (SUDV CON)、SEQ ID NO:2的片段、与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列的片段。与SEQ ID NO:1同源的氨基酸序列典型地与SEQ ID NO:2具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:2的片段或与SEQ ID NO:2同源的氨基酸序列的片段典型地为600个或更多,630个或更多,或者660个或更多氨基酸。该氨基酸序列可以任选地包含前导序列,如IgE前导序列。

[0013] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列及编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的核酸序列。该编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列可以为SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:64的片段、与SEQ ID NO:64同源的核酸序列或与SEQ ID NO:64同源的核苷酸序列的片段。与SEQ ID NO:64同源的核酸序列典型地与SEQ ID NO:64具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:64的片段或与SEQ ID NO:64同源的氨基酸序列的片段典型地编码600个或更多,630个或更多,或者660个或更多的由SEQ ID NO:64编码的共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸。该编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列可以为SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:65的片段、与SEQ ID NO:65同源的核酸序列或与SEQ ID NO:65同源的核苷酸序列的片段。与SEQ ID NO:65同源的核酸序列典型地与SEQ ID NO:65具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:65的片段或与SEQ ID NO:65同源的氨基酸序列的片段典型地编码600个或更多,630个或更多,或者660个或更多的由SEQ ID NO:65编码的共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的氨基酸。该编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的核酸序列可以为SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:66的片段、与SEQ ID NO:66同源的核酸序列或与SEQ ID NO:66同源的核苷酸序列的片段。与SEQ ID NO:66同源的核酸序列典型地与SEQ ID NO:66具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,99%或更高,或99%或更高同源性。SEQ ID NO:66的片段或与SEQ ID NO:66同源的氨基酸序列的片段典型地编码600个或更多,630个或更多,或者670个或更多的由SEQ ID NO:66编码的马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的氨基酸。这些核酸序列可以任选地包括连接到编码这些免疫原的序列的编码前导序列(如IgE前导序列)的序列。

[0014] 这些不同的核酸序列各自可以在单一核酸分子上,可以各自在单独的核酸分子上或呈各种排列。核酸分子可以是质粒。

[0015] 该组合物可以被配制成使用电穿孔法传递给个体。

[0016] 该组合物可以另外包含编码一种或多种选自由IL-12、IL-15和IL-28组成的组的蛋白质的核酸序列。

[0017] 该组合物可以用于诱导针对丝状病毒的免疫应答的方法中。该丝状病毒可以选自由以下组成的组马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒。

[0018] 本发明提供了治疗被诊断带有丝状病毒的个体的方法,该方法包括向个体施用治疗有效量的组合物。该丝状病毒可以选自由以下组成的组:马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒。

[0019] 还提供了防止个体感染丝状病毒的方法。这些方法包括向个体施用预防有效量的

组合物。该丝状病毒可以选自由以下组成的组：马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒。

[0020] 还提供了包含两种或更多种蛋白质的组合物，这些蛋白质选自由以下组成的组：共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。

## 附图说明

[0021] 图1A-图1C是指实施例1中的多价疫苗构建策略和表达实验。图1A示出了MGP (顶图)、SGP (右下图) 和ZGP (左下图) 的系统发生树。如通过自引分析 (bootstrap) 验证，显著支持值是以 (\*) 指示。针对ZGP和SGP免疫原采用了共有策略 (CON VACCINE)。刻度条表示每个位点的氨基酸距离并且使用了第5版MEGA软件进行分析。在工业上合成GP转基因，对其进行遗传优化并且亚克隆到经过修饰的pVAX1哺乳动物表达载体中。在转染HEK 293T细胞之后，通过蛋白质免疫印迹和FACS来对抗原表达进行分析。蛋白质免疫印迹的结果示于图1B中并且FACS的结果示于图1C中。对于比较性对照物，与每个GP样品同时执行表达MGP、SGP或ZGP的rVSV，并且使用物种特异性抗GP1mAb进行检测。大小以 (kDa) 指示。对于FACS，用小鼠源性GP特异性血清试剂对转染的细胞进行间接染色，随后充分洗涤并且用山羊抗小鼠 IgG 和 I 类 MHC 进行染色。将蛋白质免疫印迹和FACS实验重复至少三次，得到类似结果。通过最大似然估计法确定无根系统发生树的重要性并且通过自引分析加以验证，并通过第5版MEGA软件测定显著支持值 ( $\geq 80\%$  ; 1,000次自引复制)。

[0022] 图2A-图2H示出了由实施例1中的实验得到的结果，其中观察到针对MARV和ZEOV攻击的完全防护作用。动物存活率数据示于图2A和图2E中。图2A显示，三价疫苗接种的动物在MARV攻击后存活，而对照动物在第10天时全部死亡。图2E显示，三价疫苗接种的动物在ZEOV攻击后存活，而对照动物在第7天时全部死亡。对于用MARV攻击的接种疫苗的动物，接种疫苗的动物和对照动物的体重变化%数据展示于图2B中。如图2F中所示，y轴指示体重变化。浅色实线是关于三价疫苗接种的动物。浅色虚线是关于TriAVE，即三价疫苗接种的动物的平均结果。深色实线是关于对照动物。深色虚线是关于对照AVE，即对照动物的平均结果。浅色实线和浅色虚线在攻击后数天中在曲线上保持稳定，显示了在接种疫苗的动物中无显著体重减轻。深色实线和深色虚线在攻击后从第0天到第9天曲线下降，以剑形 (dagger) 结束，表示动物在第10天时死于疾病。对于用ZEOV攻击的接种疫苗的动物，接种疫苗的动物和对照动物的体重变化%数据展示于图2F中。y轴指示体重变化 (以百分比显示)。浅色实线是关于三价疫苗接种的动物。浅色虚线是关于TriAVE，即三价疫苗接种的动物的平均结果。深色实线是关于对照动物。深色虚线是关于对照AVE，即对照动物的平均结果。浅色实线和浅色虚线在攻击后数天中在曲线上保持稳定，显示了在接种疫苗的动物中无显著体重减轻。深色实线和深色虚线在攻击后从第0天到第6天曲线下降，以剑形结束，表示动物在第8天时死于疾病。(对于gpMARV, n=3, 并且对于gpZEOV, n=6)。在免疫前 (Pre) 和第一次免疫 (1X) 和第二次免疫 (2X) 免疫之后，对接种疫苗的动物的血清中的结合Ab (图2C和图2G) 和NAb (图2D和图2H) 进行测量。针对汇集的血清进行分析 (图2H)。 $*p < 0.1$ ;  $***p < 0.001$ ;  $****p <$

0.0001。

[0023] 图3A-图3C示出了由实施例1得到的结果,展现了中和Ab的诱导作用。分别在用40 $\mu$ g的E-DNA疫苗接种进行的两次疫苗接种之后20天,评估小鼠(每组n=5只)中的B细胞反应,每次注射之间间隔三周。图3A示出了通过ELISA测量的接种疫苗(实线)的小鼠或预先抽血(虚线)的小鼠中的血清GP特异性IgG反应。数据概述于图3B中。由于SGP不可用于本研究中,故针对蔗糖纯化的ZGP测量pEB0S免疫的动物和pEB0Z免疫的动物中的所有反应。针对MARV-Ozolin GP或在阴性对照蔗糖纯化的尼帕病毒G蛋白(Nipah G protein)存在下测量pMARV免疫的小鼠中的IgG反应,在BSL-4实验室中针对ZEBOV-EGFP、SUDV-Boniface和MARV-Angola测量血清样品的中和活性,并且NAb滴度示于图3C中。基于在CV-1细胞上的细胞病理效应(cytopathic effect, CPE)检验针对SUDV-Boniface的NAb,并且使用免疫荧光检验来检验针对MARV-Angola的那些NAb。平均值示于图3B和图3C中,并且误差条表示SEM。组分析是通过配对的双尾未成对t测试完成的。重复实验至少两次,得到类似结果,并且\*p<0.1; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001。

[0024] 图4A-图4D是指由接种疫苗产生的广泛T细胞反应。在图4A中,用pMARV、pEB0S或pEB0Z DNA对H-2<sup>b</sup>(浅色条形)和H-2<sup>d</sup>(深色条形)小鼠(每组n=5只)免疫两次,并且通过IFN $\gamma$  ELISPOT检验来测量IFN $\gamma$ 反应。在个别GP肽(有9个氨基酸重叠的15聚体)存在下孵育在第二次免疫之后8天采集的脾细胞,并且结果以堆积条形图显示。鉴别出含表位的肽( $\geq$ 10AVE斑点和 $\geq$ 80%反应率),通过流式细胞术确定并且在总体活化的IFN $\gamma$ +并且CD44+CD4+和/或CD8+T细胞群中表征(表1-6),并且阳性诱导剂的肽编号在条形上方指示。对仅含CD4+表位、仅含CD8+表位(\*)以及含有CD4+和CD8+双表位(\*\*)的肽编号。针对连续阳性肽反应研究推定的共有表位和/或部分表位(表1-6)。图4B示出了比较来自图1A中所展示的MARV、SUDV和ZEBOV病毒的GP序列的氨基酸相似性图。图4C是示出了在ZEBOV GP(GenBank#VGP\_EB0ZM)内的推定的结构域的图表。SP,信号肽;RB,受体结合;MUC,粘蛋白样区;FC,弗林蛋白酶裂解位点;TM,跨膜区。在图4D中,展示了总次优势(较深的阴影)和免疫优势(较浅的阴影)T细胞表位反应占由每种疫苗产生的总IFN $\gamma$ 反应的百分比。重复实验至少两次,得到类似结果。

[0025] 图5A-图5D示出了由评估保护性‘单剂量’疫苗接种诱导的中和Ab和CTL的实验得到的数据。用pEB0Z E-DNA对H-2<sup>k</sup>小鼠(每组n=10只)肌肉内接种疫苗一次,然后在28天后,在BSL-4实验室中用1,000LD<sub>50</sub>的mZEBOV攻击。每天对小鼠称重并且监测疾病进展。动物存活率数据示于图5A中。接种疫苗的动物在攻击后存活,而对照动物在第7天时死亡。图5B示出了受攻击动物的体重变化%数据。由免疫动物得到的数据以浅色实线示出;有关免疫动物的平均数据以浅色虚线示出。由对照动物得到的数据以深色实线示出;有关对照动物的平均数据以深色虚线示出。浅色实线和浅色虚线在攻击后数天中在曲线上稳定保持在约85%-120%范围内,显示了在接种疫苗的动物中无显著体重减轻。深色实线和深色虚线在攻击后从第0天到第6天曲线下降,以剑形结束,表示动物在第7天时死于疾病。在攻击之前测量NAb;数据示于图5C中。如通过FACS所测量,在单次pEB0Z免疫之后,T细胞反应以占总CD44+/IFN $\gamma$ +CD4+细胞(深色)或CD8+细胞(浅色)的AVE%概述于图5D中。评估T<sub>h</sub>1-型效应子标记物(TNF和T-bet)并且将有关CD44+/IFN $\gamma$ +CD4+T细胞和CD8+T细胞的数据与总T细胞数据比较如下:对于总细胞:TNF 2.9 $\pm$ 0.8, Tbet13.0 $\pm$ 1.1。对于CD4+/CD44+/IFN $\gamma$ +细胞:

TNF  $61.4 \pm 3.1$ , Tbet  $72.6 \pm 2.0$ 。对于CD8+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞: TNF  $33.0 \pm 3.3$ , Tbet  $992.1 \pm 1.4$  ( $*p < 0.1$ ;  $***p < 0.001$ ;  $****p < 0.0001$ )。组分析是通过配对的双尾未成对t测试完成,并且存活率曲线是通过对数秩 (Mantel-Cox) 测试进行分析。实验进行两次,得到类似结果,并且误差条表示SEM。

[0026] 图6示出了实施例1中所公开的GP特异性T细胞门控。

[0027] 图7A和图7B显示,在实施例1中的疫苗接种实验产生稳健的T细胞。

[0028] 图8A和图8B示出了由实施例1中所公开的‘单剂量’疫苗接种引起的T细胞诱导作用。

## 具体实施方式

[0029] 在本发明的一个方面,希望的是,共有抗原提供改善的转录和翻译,包括具有以下一种或多种特性:用以增加转录的低GC含量的前导序列;mRNA稳定性和密码子优化;在一定程度上消除可能的顺式作用序列基元(即,内部TATA盒)。

[0030] 在本发明的一些方面,希望产生一种共有抗原,该抗原在多种品系中产生广泛免疫应答,包括具有以下一种或多种特性:并入所有可用的全长序列;计算机产生在每个位置处利用最常见氨基酸的序列;及增加各品系之间的交叉反应性。

[0031] 丝状病毒科间的多样性相当高。已进行诸多尝试,旨在开发一种通用并且具有广泛反应性的丝状病毒疫苗,该疫苗将理想地针对引起最高人类疾病死亡率的多种物种提供防护作用。然而,由于丝状病毒科间的多样性水平相对较高,故这被证实是很难的。EBOV当前被分成五个不同的种类:扎伊尔埃博拉病毒 (ZEBOV)、苏丹埃博拉病毒 (SUDV)、雷斯顿埃博拉病毒 (Reston ebolavirus; RESTV)、本迪布焦埃博拉病毒 (Bundibugyo ebolavirus; BDBV) 及塔伊森林埃博拉病毒 (*Tai* Forest ebolavirus; TAFV; 以前称为科特迪瓦埃博拉病毒 (Cote d' Ivoire ebolavirus)),前两种引起最高致死率并且是武器化的最可能的候选物。马尔堡病毒 (MARV) 间的多样性较低,但其仍可以具有高达90%的致死率。目前,只存在一个分类的种类,即,马尔堡马尔堡病毒 (以前称为维多利亚湖马尔堡病毒 (Lake Victoria marburgvirus)),不过近期的修正案提出,它含有两种病毒,包括拉文病毒 (Ravn virus; RAVV) 在内。MARV和EBOV的明显差异(其中在核苷酸水平上存在约67%的差异)增加了多价疫苗开发的复杂性。此外,丝状病毒GP间的系统发生多样性也极高(总计82%)。如最近在2007年出现的BDBV所证实,这些涉及到了丝状病毒进化的可能。因此,由于丝状病毒科间的差异相对较大,故假定有效多价丝状病毒疫苗的开发将可能需要免疫原性组分的混合物。

[0032] 开发出一种针对马尔堡马尔堡病毒 (MARV)、扎伊尔埃博拉病毒 (ZEBOV) 和苏丹埃博拉病毒 (SUDV) 的合成多价丝状病毒DNA疫苗。这种新颖的多价丝状病毒疫苗由编码马尔堡马尔堡病毒 (MARV)、苏丹埃博拉病毒 (SUDV) 和扎伊尔埃博拉病毒 (ZEBOV) 的包膜糖蛋白 (envelope glycoprotein, GP) 基因的三个DNA质粒构成,采用了多试剂方法。鉴于近期在遗传优化和传递技术方面的发展,作为一种丝状病毒疫苗候选物,基于增强的DNA (DNA) 的平台展现了许多益处 (Bagarazzi ML等人 (2012). Immunotherapy Against HPV16/18 Generates Potent TH1 and Cytotoxic Cellular Immune Responses. Sci Transl Med 4: 155ra138; Kee ST, Gehl J, W. LE (2011). Clinical Aspects of Electroporation, Springer, New York, NY.; Hirao LA等人 (2011). Multivalent smallpox DNA vaccine

delivered by intradermal electroporation drives protective immunity in nonhuman primates against lethal monkeypox challenge. J Infect Dis 203:95-102)。因此,对每种GP进行遗传优化,将其亚克隆到经过修饰的哺乳动物表达载体中,然后使用体内电穿孔法(electroporation,EP)进行传递。

[0033] 使用啮齿动物适应性病毒在豚鼠和小鼠中进行临床前功效研究,同时使用本文所描述的经过修改的新颖检验来深入分析鼠类T细胞反应。T细胞反应的深入分析包括了使用本文所描述的一种新颖的表位鉴别和表征方法。这一模型为研究能用于现有平台的保护性免疫相关性提供了一个重要的临床前工具。

[0034] 在临床前啮齿动物研究中进行的疫苗接种是特别有效的,产生了稳健的中和抗体(neutralizing antibody, NAb)和表达T<sub>h</sub>1型标记物的CTL,并且针对MARV和ZEBOV攻击具有完全的防护作用。如使用本文所描述的经过修改的新颖检验进行深入分析,全面T细胞分析(Shedlock DJ等人(2012) .Vaccination with synthetic constructs expressing cytomegalovirus immunogens is highly T cell immunogenic in mice. Hum Vaccin Immunother 8:1668-1681) 揭露了具有较大量、表位宽度(epitopic breadth)和T<sub>h</sub>1型标记物表达的细胞毒性T淋巴细胞。总体来说,从两种不同的小鼠遗传背景鉴别出了52个新颖的T细胞表位(20个MARV表位中的19个、16个SUDV表位中的15个,及22个ZEBOV表位中的18个),并且这些表位主要出现在其对应糖蛋白(GP)的高度保守区域。这些数据代表了截至目前有关临床前糖蛋白表位的最全面报导。

[0035] 针对引起最高人类疾病死亡率的多种物种的防护作用的策略的开发集中在了MARV、SUDV和ZEBOV。由于其存在相对较大的差异,故假定多价丝状病毒疫苗的开发将需要可以响应未来爆发品系和/或物种而快速并且容易地适应的组分的混合物。尽管EBOV间的总体多样性为约33%,但当对SUDV和ZEBOV进行单独分析时,氨基酸同一性基本上增加(在每一物种内同一性为约94%)。因此,如图1A中所示,设计出一种覆盖了最致命的EBOV的两组分策略,一个质粒GP疫苗针对SUDV并且另一个针对ZEBOV。由于每个物种间的GP多样性相对较低(对于SUDV为5.6%并且对于ZEBOV为7.1%),故开发出增加种间覆盖的共有免疫原,先前已显示,这种策略可增强在相异的流感和HIV病毒株间的防护作用。如使用Vector NTI软件(Invitrogen, CA, USA)进行比对所测定,这些GP序列对于所有报导的爆发序列(GenBank)来说是共有的。分别针对古卢(Gulu)和姆博莫(Mbomo)/姆班扎(Mbanza)对非共有残基进行加权,SUDV(95、203、261和472)及ZEBOV(314、377、430和440)各4个氨基酸。选择古卢是因为它引起任何丝状病毒科爆发的最高人类疾病死亡率(n=425),而选择姆博莫/姆班扎是因为它们是具有公开的序列数据的最近并且死亡率最高的爆发。SUDV(SUDV CON VACCINE)和ZEBOV(ZEBOV CON VACCINE)的共有GP是系统发生中间的其亲本比对的品系。

[0036] 图1A中蛋白质的鉴别如下:MARV Durba (05DRC99) '99:ABE27085;Uganda (01Uga07) '07:ACT79229;Durba (07DRC99) '99:ABE27078;Ozolin'75:VGP\_MABVO;Musoke'80:VGP\_MABVM;Popp'67:VGP\_MABVP;Leiden'08:AEW11937;Angola'05:VGP\_MABVA;Ravn'87:VGP\_MABVR;Durba (09DRC99) '99:ABE27092;Uganda (02Uga07) '07:ACT79201.SUDV:Boniface'76:VGP\_EBOSB;Maleo'79:VGP\_EBOSM;Yambio'04:ABY75325;Gulu'00:VGP\_EBOSU.ZEBOV:Booue'96:AAL25818;Mayibout'96:AEK25495;Mekouka'94:AAC57989,VGP\_EBOG4;Kikwit'95:VGP\_EBOZ5;Yambuku (Ekron) '76:VGP\_EBOEC;Yambuku (Mayinga) '76:

VGP\_EBOZM; Kasai '08: AER59712; Kassai '07: AER59718; Etoumbi '05: ABW34742; Mbomo/ Mbandza '03: ABW34743。

[0037] 与其一起提供的序列表含有一个具有66个序列的清单,这些序列包括以下序列:

[0038] SEQ ID NO:1是ZEBOV CON的氨基酸序列,该氨基酸序列是共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原。

[0039] SEQ ID NO:2是SUDV CON的氨基酸序列,该氨基酸序列是共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原。

[0040] SEQ ID NO:3是MARV或MARV ANG的氨基酸序列,该氨基酸序列是马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白和马尔堡马尔堡安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的氨基酸序列。

[0041] SEQ ID NO:4是MARV CON1的氨基酸序列,该氨基酸序列是第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。

[0042] SEQ ID NO:5是MARV CON2的氨基酸序列,该氨基酸序列是第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。

[0043] SEQ ID NO:6是MARV CON3的氨基酸序列,该氨基酸序列是第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。

[0044] SEQ ID NO:7-25是衍生自MARV ANG的肽。

[0045] SEQ ID NO:26-41是衍生自SUDV CON的肽。

[0046] SEQ ID NO:42-62是衍生自ZEBOV CON的肽。

[0047] SEQ ID NO:63是IgE信号肽序列:MDWTWILFLVAAATRVHS。

[0048] SEQ ID NO:64是编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的质粒pEBOZ中的核苷酸序列插入序列。

[0049] SEQ ID NO:65是编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的质粒pEB0S中的核苷酸序列插入序列。

[0050] SEQ ID NO:66是编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白的质粒pMARZ ANG中的核苷酸插入序列。

[0051] 在一些实施方案中,该策略采用了以下三种丝状病毒免疫原的编码序列:MARV、SUDV和ZEBOV。MARV免疫原是安哥拉2005分离株的糖蛋白。对于SUDV和ZEBOV,设计出共有糖蛋白序列。

[0052] 在一些实施方案中,该策略采用了五种丝状病毒免疫原的编码序列。提供了三种MARV免疫原。设计出衍生自三个丛集的共有糖蛋白Ozolin、Musoke或Ravn。这三种MARV免疫原连同所设计的SUDV和ZEBOV共有糖蛋白序列一起为免疫应答的靶。

[0053] 在一些实施方案中,该策略采用了六种丝状病毒免疫原的编码序列。提供了四种MARV免疫原:设计出衍生自三个丛集的三种共有糖蛋白。这三种MARV免疫原连同所设计的SUDV和ZEBOV共有糖蛋白序列一起为免疫应答的靶并且MARV免疫原是安哥拉2005分离株的糖蛋白。

[0054] 作为丝状病毒疫苗的候选物,DNA疫苗展现出诸多益处,包括快速并且低廉的大规模生产、在室温下的稳定性及易于运输,从经济学和地理学观点看,所有这些都进一步增强了这一平台。由于质粒的合成性质,Ag序列可以响应于新出现的物种而迅速并且容易地进行修饰,和/或扩展到包括在爆发环境期间进行快速响应的另外的疫苗组分和/或方案。举

例来说,本文中的MARV策略可以通过共同施用编码其它系统发生从集的共有MARV GP (MGP) 免疫原的另外的质粒而容易地扩展到更大覆盖率。

[0055] 尽管‘第一代’DNA疫苗具有较弱免疫原性,但近期的技术发展已在临床试验中大幅改良其免疫原性。质粒DNA载体和其编码的Ag基因的优化已引起体内免疫原性的增加。当利用体内电穿孔法(在疫苗接种部位内使用短暂方波电脉冲驱使质粒进入暂时可渗透的细胞中的一种技术)施用高度浓缩的质粒疫苗制剂时,细胞摄入和随后的Ag表达基本上扩大。理论上,DNA质粒的混合物可以组装起来用于引导针对多种可变的Ag的高度专化的免疫应答。通过与编码物种特异性细胞因子基因的质粒分子佐剂的共同传递以及Ag氨基酸序列的‘共有工程改造’来帮助偏离针对特定品系的疫苗诱导的免疫性,可以进一步引导免疫性。经显示,这一策略可增强不同的流感病毒和HIV病毒株间的防护作用。部分由于这些技术的发展,包括这些DNA疫苗在内的免疫方案变为高度通用的并且特别是可定制的。

[0056] 1. 定义.

[0057] 本文所使用的术语只是用于描述特定实施方案的目的,并且不打算作为限制。除非上下文另外清楚地规定,否则如本说明书和所附权利要求中所使用,单数形式“一个(种)”(a/an)和“该”包括复数个参照物。

[0058] 对于本文所陈述的数字范围,明确地涵盖其间具有相同精确度的每个中间数字。举例来说,对于范围6-9,除6和9外,还涵盖数字7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确地涵盖数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及7.0。

[0059] a. 佐剂

[0060] 如本文所使用,“佐剂”可以指添加到本文所描述的DNA质粒疫苗中以增强由这些DNA质粒所编码的一个或多个共有丝状病毒免疫原的抗原性以及编码下文所描述的核酸序列的任何分子。

[0061] b. 抗体

[0062] “抗体”可以指属于类别IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的抗体,或片段、片段或其衍生物,包括Fab、F(ab')2、Fd及单链抗体、微型双功能抗体、双特异性抗体、双功能抗体及其衍生物。抗体可以是从哺乳动物的血清样品分离的抗体、多克隆抗体、亲和纯化的抗体,或其混合物,其对所希望的表位或衍生自其的序列展现出足够的结合特异性。

[0063] c. 编码序列

[0064] 如本文所使用,“编码序列”或“编码核酸”可以指包含了编码蛋白质的核苷酸序列的核酸(RNA或DNA分子)。编码序列可以另外包括可操作地连接到调控元件的起始和终止信号,包括启动子和聚腺苷酸化信号,它能够引导施用该核酸的个体或哺乳动物的细胞中的表达。在一些实施方案中,编码序列可以任选地另外包含一个编码N末端甲硫氨酸的起始密码子或一个信号肽,如IgE或IgG信号肽。

[0065] d. 补体

[0066] 如本文所使用,“补体”或“互补”可以指核苷酸或核酸分子的核苷酸类似物之间的Watson-Crick(例如A-T/U和C-G)或Hoogsteen碱基配对。

[0067] e. 共有或共有序列

[0068] 如本文所使用,“共有”或“共有序列”可以指基于特定丝状病毒抗原的多种亚型的比对分析构建的合成核酸序列,或相应的多肽序列,其可以被用于诱导针对特定丝状病毒

抗原的多种亚型或血清型的广泛免疫性。

[0069] 共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原是指SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:1的片段、SEQ ID NO:1的变体及SEQ ID NO:1的变体的片段。(ZEBOV或ZEBOV CON或ZEBOV CON VACCINE)。包含编码序列SEQ ID NO:1的质粒可以称为pZEBOV或pEBOZ。共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的编码序列包括SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:64的片段、SEQ ID NO:64的变体及SEQ ID NO:64的变体的片段。质粒pEBOZ包含SEQ ID NO:64。

[0070] 共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原是指SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:2的片段、SEQ ID NO:2的变体及SEQ ID NO:2的变体的片段。(SUDV或SUDV CON或SUDV CON VACCINE)包含编码序列SEQ ID NO:2的质粒可以称为pSUDV或pEBOS。共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的编码序列包括SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:65的片段、SEQ ID NO:65的变体及SEQ ID NO:65的变体的片段。质粒pEBOS包含SEQ ID NO:65。

[0071] 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白不是共有序列,而是衍生自一个分离株的蛋白质序列。其具有序列SEQ ID NO:3。马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原是指SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:3的片段、SEQ ID NO:3的变体及SEQ ID NO:3的变体的片段。(MARV或MARV ANG或MARV ANG或MARV ANG VACCINE)包含编码序列SEQ ID NO:3的质粒可以称为pMARV或pMARV-ANG。马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的编码序列包括SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:66的片段、SEQ ID NO:66的变体及SEQ ID NO:66的变体的片段。质粒pMARV ANG包含SEQ ID NO:66。

[0072] 第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原是指SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:4的片段、SEQ ID NO:4的变体及SEQ ID NO:4的变体的片段。SEQ ID NO:4是来自Ravn从集共有序列(Ravn, Durba (09DRC99) 和Uganda (02Uga07Y) 的马尔堡马尔堡共有序列。(MARV CON1或MARV-RAV CON或MARV-RAV CON VACCINE)包含编码序列SEQ ID NO:4的质粒可以称为pMARV-RAV。

[0073] 第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原是指SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:5的片段、SEQ ID NO:5的变体及SEQ ID NO:5的变体的片段。SEQ ID NO:5是来自Ozolin从集共有序列(Ozolin, Uganda (01Uga07) 和Durba (05和07DRC99) 的马尔堡马尔堡共有序列。(MARV CON2或MARV-OZO CON或MARV-OZO CON VACCINE)包含编码序列SEQ ID NO:5的质粒可以称为pMARV-OZO。

[0074] 第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原是指SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:6的片段、SEQ ID NO:6的变体及SEQ ID NO:6的变体的片段。SEQ ID NO:6是来自Musoke从集共有序列(Musoke、Popp和Leiden)的马尔堡马尔堡共有序列。(MARV CON1或MARV-MUS CON或MARV-MUS CON VACCINE)包含编码序列SEQ ID NO:6的质粒可以称为pMARV-MUS。

[0075] f. 恒定电流

[0076] 如本文所使用,“恒定电流”定义为由组织或界定所述组织的细胞在向该组织传递电脉冲期间所接收或经历的电流。该电脉冲是由本文所描述的电穿孔装置传递。这一电流在电脉冲施加期间于所述组织中保持在恒定电流强度,因为本文提供的电穿孔装置具有一个反馈元件,优选地具有即时反馈。该反馈元件可以测量在整个脉冲持续期间的组织(或细胞)的电阻,并且引起该电脉冲装置改变其电能输出(例如,增加电压),因此在该组织中的电流在整个电脉冲(约数微妙)中并且随脉冲变化而保持恒定。在一些实施方案中,该反馈

元件包含控制器。

[0077] g. 电流反馈或反馈

[0078] 如本文所使用,“电流反馈”或“反馈”可以互换使用,并且可以指所提供的电穿孔装置的主动响应,其包括测量组织中各电极之间的电流,及相应地改变EP装置所传递的能量输出,以便将电流维持在恒定水平。这一恒定水平是由用户在起始脉冲序列或电处理之前预先设定的。该反馈可以通过电穿孔装置的电穿孔组件(例如控制器)实现,因为其中的电路能够持续地监测组织中各电极之间的电流并且将该电流监测值(或组织内的电流)与预先设定的电流相比较,并且不断地作出能量输出调整以将所监测的电流维持在预先设定的水平。反馈循环可以是即时的,因为它是一个模拟闭环反馈。

[0079] h. 分散电流

[0080] 如本文所使用,“分散电流”可以指由本文所描述的电穿孔装置的各种针式电极阵列所传递的电流模式,其中这些模式使得在进行电穿孔的组织的任何区域上出现的电穿孔相关热应力减到最小或优选地消除。

[0081] i. 电穿孔

[0082] “电穿孔”、“电渗透”或“电动力学强化”(“EP”)在本文中可互换使用,可以指使用跨膜电场脉冲在生物膜中诱导微观路径(孔);其存在允许如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子和水等生物分子从细胞膜的一侧到达另一侧。

[0083] j. 反馈机制

[0084] 如本文所使用,“反馈机制”可以指由软件或硬件(或固件)执行的一种工艺,该工艺接收所希望的组织的阻抗(在传递能量脉冲之前、期间和/或之后)并将其与预先设定的值(优选为电流)相比较,并且调整所传递的能量脉冲以达到预先设定的值。反馈机制可以由模拟闭环电路执行。

[0085] k. 片段

[0086] “片段”可以指能够在哺乳动物中通过识别特定丝状病毒抗原而引起针对丝状病毒的免疫应答的丝状病毒免疫原的多肽片段。丝状病毒包膜糖蛋白免疫原可以任选地包括信号肽和/或在1位的甲硫氨酸、与本文所陈述的共有序列具有98%或更高同源的蛋白质、与本文所陈述的共有序列具有99%或更高同源性的蛋白质及与本文所陈述的共有序列100%同一的蛋白质,在每一情形中,都含有或不含有信号肽和/或在1位的甲硫氨酸。片段可以包含或可以不包含例如连接到信号肽(如免疫球蛋白信号肽,例如IgE信号肽或IgG信号肽)的丝状病毒免疫原的片段。

[0087] ZEBOV CON、SUDV CON、MARV ANG、MARV-RAV CON、MARV-OZO CON或MARV-MUS CON中任一种或其变体的片段(在每一情形中,含有或不含有信号肽和/或在1位的甲硫氨酸)可以占特定全长ZEBOV CON、SUDV CON、MARV ANG、MARV-RAV CON、MARV-OZO CON或MARV-MUS CON或其变体的长度的20%或更高,25%或更高,30%或更高,35%或更高,40%或更高,45%或更高,50%或更高,55%或更高,60%或更高,65%或更高,70%或更高,75%或更高,80%或更高,85%或更高,90%或更高,91%或更高,92%或更高,93%或更高,94%或更高,95%或更高,96%或更高,97%或更高,98%或更高,99%或更高百分比。片段是指与序列ZEBOV CON、SUDV CON、MARV ANG、MARV-RAV CON、MARV-OZO CON或MARV-MUS CON具有100%同一性的多肽片段,在每一情形中含有或不含有信号肽和/或在1位的甲硫氨酸。片段也是指变体

的片段,即,与序列ZEBOV CON、SUDV CON、MARV ANG、MARV-RAV CON、MARV-OZO CON或MARV-MUS CON具有95%或更高,98%或更高,或99%或更高同源性的多肽,在每一情形中含有或不含有信号肽和/或在1位的甲硫氨酸。片段可以包含与SEQ ID NO:1-6中陈述的丝状病毒免疫原具有98%或更高同源性,99%或更高同源性,或具有100%同一性的多肽片段,并且另外包含当计算同源性百分比时未包括在内的信号肽,如免疫球蛋白信号肽。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-6的片段连接到信号肽,如免疫球蛋白信号肽,例如IgE信号肽或IgG信号肽。该片段可以包括含N末端甲硫氨酸的SEQ ID NO:1-6的片段。片段还指与SEQ ID NO:1-6中所公开的序列具有95%或更高,98%或更高,或99%或更高同源性的多肽的片段。如果存在信号肽,那么当计算同源性百分比时,它不包括在内。

[0088] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-6或其变体的片段可以包含SEQ ID NO:1-6中任一个或其变体的10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670个或更多连续氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-6或其变体的片段可以包含SEQ ID NO:1-6中任一个或其变体的15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670、675个或更少连续氨基酸。

[0089] “片段”还可以指编码丝状病毒免疫原的核酸序列的片段,该核酸序列片段编码丝状病毒免疫原中能够在哺乳动物中通过识别特定丝状病毒抗原而引起针对丝状病毒的免疫应答的片段。编码丝状病毒免疫原的核酸片段或其变体的片段(在每一情形中,含有或不含信号肽和/或在1位的甲硫氨酸)可以占编码丝状病毒免疫原的特定全长核酸序列或其变体的长度的20%或更高,25%或更高,30%或更高,35%或更高,40%或更高,45%或更高,50%或更高,55%或更高,60%或更高,65%或更高,70%或更高,75%或更高,80%或更高,85%或更高,90%或更高,91%或更高,92%或更高,93%或更高,94%或更高,95%或更高,96%或更高,97%或更高,98%或更高,99%或更高百分比。片段可以包含编码与SEQ ID NO:1-6中陈述的丝状病毒免疫原具有98%或更高同源性,99%或更高同源性,或具有100%同一性的多肽的核苷酸序列的片段,并且另外包含当计算同源性百分比时未包括在内的信号肽,如免疫球蛋白信号肽。在一些实施方案中,编码SEQ ID NO:1-6的片段的核苷酸序列的片段连接到信号肽,如免疫球蛋白信号肽,例如IgE信号肽或IgG信号肽。存在信号肽的编码序列,那么当计算同源性百分比时,它不包括在内。在一些实施方案中,编码SEQ ID NO:1-6或其变体的片段的核苷酸序列的片段可以包含编码SEQ ID NO:1-6中任一个或其变体的10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670个或更多连续氨基酸的序列。在一些实施方案中,编码SEQ ID NO:1-6或其变体的片段的核苷酸序列的片段可以包含编码SEQ ID NO:1-6中任一个或其变体的15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670、675个或更少连续氨基酸的序列。

[0090] 在一些实施方案中,片段是SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的片段。SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的片段(在每一情形中,含有或不含信号肽和/或在1位的甲硫氨酸)可以占编码丝状病毒免疫原的特定全长核酸序列或其变体的长度的20%或更高,25%或更高,30%或更高,35%或更高,40%或更高,45%或更高,50%或更高,55%或更高,60%或更高,65%或更高,70%或更高,75%或更高,80%或更高,85%或更

高,90%或更高,91%或更高,92%或更高,93%或更高,94%或更高,95%或更高,96%或更高,97%或更高,98%或更高,99%或更高百分比。SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:66的片段可以包含编码与由SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66编码的丝状病毒免疫原具有98%或更高同源性,99%或更高同源性,或具有100%同一性的多肽的核苷酸序列的片段,并且另外包含当计算同源性百分比时未包括在内的信号肽,如免疫球蛋白信号肽。SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的片段可以包含编码SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66或其变体的10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670个或更多连续氨基酸的序列。SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的片段可以包含编码SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66或其变体的670、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、675个或更少连续氨基酸的序列。

[0091] 1. 同一

[0092] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下,如本文所使用,“同一”或“同一性”可以指这些序列在指定区域内具有指定百分比的残基相同。该百分比可以通过以下方式计算:最佳地对准两个序列,在指定区域内比较两个序列,测定在两个序列中出现相同残基的位置的数量以得到匹配位置的数量,用匹配位置的数量除以指定区域中的总位置数并且将结果乘以100,得到序列同一性百分比。在两个序列具有不同长度或该对准产生一个或多个交错的末端并且比较的指定区域仅包括单一序列的情况下,在计算的分母而非分子中包括单一序列的残基。当比较DNA和RNA时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可以视为相同的。同一性可以手动地得到或通过使用如BLAST或BLAST 2.0等计算机序列算法得到。

[0093] m. 阻抗

[0094] 如本文所使用,“阻抗”可以在论述反馈机制时使用,并且可以根据欧姆定律 ( $0hm's$  law) 换算成电流值,由此能够与预先设定的电流相比较。

[0095] n. 免疫应答

[0096] 如本文所使用,“免疫应答”可以指宿主免疫系统(例如哺乳动物免疫系统)经由所提供的DNA质粒疫苗而响应一种一种或多种丝状病毒共有抗原的诱导作用发生活化。免疫应答可以是细胞应答或体液应答,或两者的形式。

[0097] o. 核酸

[0098] 如本文所使用,“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”可以指共价连接在一起的至少两个核苷酸。单链的描绘也定义互补链的序列。因此,核酸还涵盖所描绘的单链的互补链。许多核酸变体可以被用于与指定核酸相同的目的。因此,核酸还涵盖基本上同一的核酸和其互补。单链提供了可以在严格杂交条件下与靶序列杂交的探针。因此,核酸还涵盖在严格杂交条件下杂交的探针。

[0099] 核酸可以是单链或双链的,或可以含有双链和单链序列的部分。核酸可以是DNA(基因组DNA和cDNA)、RNA或杂交体,其中核酸可以含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的组合,以及包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、次黄嘌呤、次黄嘌呤和次黄嘌呤在内的碱基的组合。核酸可以通过化学合成法或通过重组方法获得。

[0100] p. 可操作地连接

[0101] 如本文所使用,“可操作地连接”可以指基因的表达处于在空间上与其连接的启动

子的控制下。启动子可以定位于在其控制下的基因的5' (上游) 或3' (下游)。启动子与基因之间的距离可以同该启动子与衍生得到该启动子的基因中其所控制的基因之间的距离大致相同。如本领域中所知,在不损失启动子功能的情况下,可以实现这一距离的变化。

[0102] q. 启动子

[0103] 如本文所使用,“启动子”可以指能够赋予、活化或增进细胞中核酸的表达的合成或天然来源的分子。启动子可以包含一个或多个特定转录调控序列,用以进一步增进表达和/或改变其空间表达和/或时间表达。启动子还可以包含远端增强子或阻遏子元件,这些元件可以位于距转录起始位点数千碱基对处。启动子可以来源于包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物在内的来源。启动子可以组成性地,或相对于发生表达的细胞、组织或器官,或相对于发生表达的发育阶段,或响应于如生理应激、病原体、金属离子或诱导剂等外部刺激物而有差别地调控基因组分的表达。启动子的代表性实例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、lac操作子-启动子、tac启动子、SV40晚期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV40晚期启动子及CMV IE启动子。

[0104] r. 严格杂交条件

[0105] 如本文所使用,“严格杂交条件”可以指第一核酸序列(例如探针)将与第二核酸序列(例如靶),如以复杂核酸混合物形式杂交的条件。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下将不同。所选严格杂交条件可以比在指定离子强度和pH下特定序列的热熔融温度( $T_m$ )低约5°C-10°C。 $T_m$ 可以是在平衡时,与靶互补的探针中有50%与靶序列杂交(当靶序列过量存在时,在 $T_m$ 下,在平衡时50%的探针被占据)的温度(在指定离子强度、pH和核酸浓度下)。严格条件可以是在pH7.0到8.3下盐浓度低于约1.0M钠离子,如为约0.01-1.0M钠离子浓度(或其它盐)并且温度对于短探针(例如约10-50个核苷酸)为至少约30°C并且对于长探针(例如超过约50个核苷酸)为至少约60°C的那些条件。严格条件也可以通过添加去稳定剂(如甲酰胺)实现。对于选择性或特异性杂交,阳性信号可以为背景杂交的至少2到10倍。示范性严格杂交条件包括以下条件:50%甲酰胺、5x SSC及1% SDS,在42°C下孵育;或5x SSC、1% SDS,在65°C下孵育,并且在65°C下在0.2x SSC和0.1% SDS中洗涤。

[0106] s. 基本上互补

[0107] 如本文所使用,“基本上互补”可以指第一序列与第二序列的互补在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多核苷酸或氨基酸的区域内至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一,或这两个序列在严格杂交条件下杂交。

[0108] t. 基本上同一

[0109] 如本文所使用,“基本上同一”可以指第一序列与第二序列在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多核苷酸或氨基酸的区域内至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一,或就核酸来说,第一序列与第二序列的互补基本上互补。

[0110] u. 变体

[0111] 本文关于核酸所使用的“变体”可以指(i)所提到的核苷酸序列的一部分或片段;(ii)所提到的核苷酸序列的补体或其一部分;(iii)与所提到的核酸或其补体基本上同一的核酸;或(iv)在严格条件下于所提到的核酸、其补体或与其基本上同一的序列杂交的核

酸。

[0112] 关于肽或多肽的“变体”因氨基酸的插入、缺失或保守取代而在氨基酸序列中存在差异,但保留了至少一种生物活性。变体还可以指氨基酸序列与具有保留了至少一种生物活性的氨基酸序列的参照蛋白质基本上同一的蛋白质。氨基酸的保守取代,即,一个氨基酸被具有类似特性(例如,亲水性,以及带电区域的程度和分布)的不同氨基酸置换,在本领域中被公认为典型地涉及极小变化。如本领域中所了解,这些极小变化可以部分通过考虑氨基酸的亲水指数来鉴别。Kyte等人,J.Mol.Biol.157:105-132(1982)。氨基酸的亲水指数是基于考虑其疏水性和电荷。本领域中已知,具有类似亲水指数的氨基酸可以被取代并且仍保持蛋白质功能。在一个方面,亲水指数为±2的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性也可以用于揭露将产生保留生物功能的蛋白质的取代。在肽的情形下,考虑氨基酸的亲水性容许计算出该肽的最大局部平均亲水性,这是已报导的与抗原性和免疫原性充分相关的一种有用措施。美国专利号4,554,101,通过引用完全并入本文中。如本领域中所了解,具有类似亲水性值的氨基酸的取代可以产生保留生物活性(例如免疫原性)的肽。取代可以用亲水性值彼此差异在±2范围内的氨基酸进行。氨基酸的疏水指数和亲水性值都受该氨基酸的特定侧链的影响。与该观察结果一致,如通过疏水性、亲水性、电荷、大小和其它特性所揭露,与生物功能相容的氨基酸取代应当理解为取决于氨基酸的相对相似性及这些氨基酸的特定侧链。变体优选与SEQ ID NO:1-6具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,98%或更高,或99%或更高的同源性。

[0113] 关于编码相同特定氨基酸序列的核酸序列来说,“变体”因使用不同密码子而在核苷酸序列中存在差异。编码的氨基酸序列与由SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66所编码的那些相同的SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的变体可以具有任何同源性程度,优选为80%或更高,85%或更高,90%或更高,95%或更高,96%或更高,97%或更高,98%或更高,或99%或更高。变体还可以是编码的蛋白质为SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66所编码的蛋白质的变体的SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的变体,其氨基酸序列与具有了保留至少一种生物活性的氨基酸序列的参照蛋白质基本上同一,典型地,这些氨基酸序列具有95%或更高,96%或更高,97%或更高,98%或更高,或99%或更高同源性。

[0114] v. 载体

[0115] 本文所使用的“载体”可以指含有复制起点的核酸序列。载体可以是质粒、噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。载体可以是DNA或RNA载体。载体可以为自我复制的染色体外载体或整合到宿主基因组中的载体。

[0116] 2. 蛋白质

[0117] 本文提供了可以用于诱导针对特定丝状病毒抗原的多种亚型或血清型的广泛免疫性的丝状病毒免疫原。共有丝状病毒抗原可以分别包括马尔堡病毒丝状病毒糖蛋白MARV RAV免疫原的共有氨基酸序列、马尔堡病毒丝状病毒糖蛋白MARV OZO免疫原的共有氨基酸序列、马尔堡病毒丝状病毒糖蛋白MARV MUS免疫原的共有氨基酸序列、马尔堡病毒丝状病毒糖蛋白MARV ANG免疫原的分离氨基酸序列、扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白ZEBOV免疫原的共有氨基酸序列及苏丹埃博拉病毒糖蛋白SUDV免疫原的共有氨基酸序列。在一些实施方案中,这些免疫原可以包含来自不同蛋白质的信号肽,如免疫球蛋白信号肽,例如IgE信号肽

或IgG信号肽。

[0118] 免疫原的氨基酸序列包括SEQ ID NO:1-6、其变体和SEQ ID NO:1-6的片段及其变体,任选地包括信号肽,如例如IgE信号肽或IgG信号肽。

[0119] 3.编码蛋白质的编码序列

[0120] 编码本文所陈述的蛋白质的编码序列可以使用常规方法产生。提供了一种组合物,该组合物包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的核酸序列,并且可以基于所公开的氨基酸序列产生编码第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列、编码第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列及编码第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列。

[0121] 核酸序列可以编码全长共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、全长共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、全长马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原、全长第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、全长第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原或全长第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。核酸序列可以包含一个编码SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的序列。核酸序列可以包含SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66。核酸序列可以任选地包含编码信号肽(如例如IgE信号肽或IgG信号肽)的编码序列。

[0122] 核酸序列可以编码全长共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的片段、全长共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的片段、全长马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的片段、全长第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的片段、全长第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的片段或全长第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的片段。核酸序列可以包含一个编码SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的片段的序列。核酸序列可以包含SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66的片段。片段的大小已于本文中公开,如标题为“片段”一节中所陈述。核酸序列可以任选地包含编码信号肽(如例如IgE信号肽或IgG信号肽)的编码序列。

[0123] 核酸序列可以编码与全长共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原同源的蛋白质、与全长共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原同源的蛋白质、与全长马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原同源的蛋白质、与全长第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原同源的蛋白质、与全长第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原同源的蛋白质或与全长第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原同源的蛋白质。核酸序列可以包含一个编码与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6同源的蛋白质的序列。核酸序列可以与SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66同源。同源性程度已于本文中论述,如参看变体一节。核酸序列可以任选地包含编码信号肽(如例如IgE信号肽或IgG信号肽)的编码序列。

[0124] 核酸序列可以编码与全长共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的片段同源的蛋白质、与全长共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的片段同源的蛋白质、与全长马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原的片段同源的蛋白质、与全长第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的片段同源的蛋白质、与全长第二共有马尔堡马尔堡病毒

包膜糖蛋白免疫原的片段同源的蛋白质或与全长第三共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的片段同源的蛋白质。核酸序列可以包含一个编码与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的片段同源的蛋白质的序列。核酸序列可以包含与SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:66同源的片段。同源性程度已于本文中论述,如参看变体一节。核酸序列可以任选地包含编码信号肽(如例如IgE信号肽或IgG信号肽)的编码序列。

[0125] SEQ ID NO:64是编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的质粒pEBOZ中的核苷酸序列插入序列。

[0126] SEQ ID NO:65是编码共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的质粒pEBOS中的核苷酸序列插入序列。

[0127] SEQ ID NO:66是编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白的质粒pMARZ ANG中的核苷酸插入序列。

[0128] 4. 质粒

[0129] 质粒可以包含一种核酸序列,该核酸序列编码以上所公开的各种免疫原中的一种或多种,包括了编码能够引起针对丝状病毒蛋白(filoprotein)的免疫应答的合成共有抗原的编码序列。

[0130] 单一质粒可以含有单一丝状病毒蛋白免疫原的编码序列、两种丝状病毒蛋白免疫原的编码序列、三种丝状病毒蛋白免疫原的编码序列、四种丝状病毒蛋白免疫原的编码序列、五种丝状病毒蛋白免疫原的编码序列或六种丝状病毒蛋白免疫原的编码序列。单一质粒可以含有能够一起配制的单一丝状病毒蛋白免疫原的编码序列。在一些实施方案中,质粒可以包含编码IL-12、IL-15和/或IL-28的编码序列。

[0131] 质粒可以另外包含起始密码子,该起始密码子可以在编码序列的上游;及终止密码子,该终止密码子可以在编码序列的下游。起始和终止密码子可以与编码序列同框。

[0132] 质粒还可以包含一个可操作地连接到编码序列的启动子。可操作地连接到编码序列的启动子可以是来自猿猴病毒40(simian virus 40,SV40)的启动子、小鼠乳房肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus,MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)启动子(如牛免疫缺陷病毒(bovine immunodeficiency virus,BIV)长末端重复序列(long terminal repeat,LTR)启动子)、莫罗尼氏病毒(Moloney virus)启动子、禽白血病病毒(avian leukosis virus,ALV)启动子、巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)启动子(如CMV立即早期启动子)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein Barr virus,EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)启动子。启动子还可以是来自人类基因(如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白)的启动子。启动子还可以是天然或合成的组织特异性启动子,如肌肉或皮肤特异性启动子。这些启动子的实例描述于美国专利申请公布号US20040175727中,其内容通过引用整体并入本文中。

[0133] 质粒也可以包含聚腺苷酸化信号,该信号可以在编码序列的下游。聚腺苷酸化信号可以为SV40聚腺苷酸化信号、LTR聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bovine growth hormone,bGH)聚腺苷酸化信号、人生长激素(human growth hormone,hGH)聚腺苷酸化信号或人β-球蛋白聚腺苷酸化信号。SV40聚腺苷酸化信号可以是来自pCEP4质粒(Invitrogen, San Diego, CA)的聚腺苷酸化信号。

[0134] 质粒还可以在编码序列上游包含增强子。增强子可以为人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸，或病毒增强子，如来自CMV、FMDV、RSV或EBV的增强子。多核苷酸功能增强描述于美国专利号5,593,972、5,962,428;以及W094/016737中，其各自的内容通过引用完整地并入本文中。

[0135] 质粒还可以包含哺乳动物复制起点，以便在染色体外维持质粒并且在细胞中产生多个质粒拷贝。质粒可以为来自Invitrogen公司(San Diego, CA)的pVAX1、pCEP4或pREP4，这些质粒可以包含爱泼斯坦-巴尔病毒复制起点和核抗原EBNA-1编码区，该编码区可以在不进行整合情况下产生高拷贝游离型复制。质粒的主链可以为pAV0242。质粒可以是复制缺陷性腺病毒型5(Ad5)质粒。

[0136] 质粒还可以包含调控序列，该调控序列可以特别适合于在施用该质粒的细胞中进行基因表达。编码序列可以包含一个能够允许编码序列在宿主细胞中更高效的转录的密码子。

[0137] 编码序列还可以包含Ig前导序列。前导序列可以在编码序列的5'端。由这一序列编码的共有抗原可以依序包含N末端Ig前导序列和共有抗原蛋白。N末端Ig前导序列可以为IgE或IgG。

[0138] 质粒可以为pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可以用于在大肠杆菌(Escherichia coli, E. coli)中产生蛋白质。质粒还可以为pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可以用于在酵母的酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株中产生蛋白质。质粒还可以属于MAXBAC<sup>TM</sup>完全杆状病毒表达系统(Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可以用于在昆虫细胞中产生蛋白质。质粒还可以为pcDNA1或pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可以用于在如中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞等哺乳动物细胞中产生蛋白质。

#### [0139] 5. 组合物

[0140] 提供了包含核酸分子的组合物。这些组合物可以包含单一核酸分子(如单一质粒)的多个拷贝、两个或更多个不同核酸分子(如两个或更多个不同质粒)的多个拷贝。举例来说，组合物可以包含许多两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多不同核酸分子。这些组合物可以包含许多两个、三个、四个、五个、六个或更多个不同质粒。

[0141] 组合物可以包含共同地含有单一丝状病毒蛋白免疫原的编码序列的核酸分子，如质粒，该免疫原选自由以下组成的组一种或多种共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白免疫原、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。

[0142] 组合物包含了编码以下各物的组合的核酸序列：共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原；或共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白；或共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原；或共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原；或共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免

疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原。每种丝状病毒蛋白免疫原各自的编码序列优选被包括在单独的质粒上。因此，包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列的组合物可以在单一质粒上，但优选在两个单独质粒上。包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白的核酸序列的组合物可以在单一质粒上或在呈任何排列的两个质粒上，但优选在三个单独质粒上。包含了编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列的组合物可以在单一质粒上，或在呈任何排列的两个质粒上，或在呈任何排列的三个质粒上，或在呈任何排列的四个质粒上，但优选在五个单独质粒上。同样，包含了共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸序列的组合物可以在单一质粒上，或在呈任何排列的两个质粒上，或在呈任何排列的三个质粒上，或在呈任何排列的四个质粒上，或在呈任何排列的五个质粒上，但优选在六个单独质粒上。

[0143] 6. 疫苗

[0144] 本文提供了一种能够在哺乳动物中产生针对丝状病毒，特别是马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和/或扎伊尔埃博拉病毒的免疫应答的疫苗。该疫苗可以包含如以上所论述的每种质粒。该疫苗可以包含多个质粒，或其组合。提供的疫苗可以诱导治疗性或预防性免疫应答。

[0145] 疫苗可以被用于传递编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸分子。疫苗可以被用于传递编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原和马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白的核酸分子。疫苗可以被用于传递编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸分子。疫苗可以被用于传递编码共有扎伊尔埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、共有苏丹埃博拉病毒包膜糖蛋白免疫原、马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005包膜糖蛋白、第一共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原、第二共有马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原及第三马尔堡马尔堡病毒包膜糖蛋白免疫原的核酸分子。疫苗优选为包含质粒的组合物。

[0146] 疫苗可以另外包含药学上可接受的赋形剂。该药学上可接受的赋形剂可以是如媒介剂、佐剂、载剂或稀释剂等功能分子。该药学上可接受的赋形剂可以是转染促进剂，其可以包括表面活性剂，如免疫刺激复合物 (immune-stimulating complex, ISCOMS)、弗氏不完全佐剂 (Freunds incomplete adjuvant)、包括单磷酰基脂质A的LPS类似物、胞壁酰肽、醣类似物、囊泡 (如角鲨烯和角鲨烯)、透明质酸、脂质、脂质体、钙离子、病毒蛋白、聚阴离子或纳

米粒子,或其它已知的转染促进剂。

[0147] 转染促进剂为聚阴离子、聚阳离子(包括聚L-谷氨酸(L-glutamate,LGS))或脂质。转染促进剂为聚L-谷氨酸,并且更优选该聚L-谷氨酸是以低于6mg/ml的浓度存在于疫苗中。转染促进剂还可以包括表面活性剂,如免疫刺激复合物(ISCMS)、弗氏不完全佐剂、包括单磷酰基脂质A的LPS类似物、胞壁酰肽、醣类似物以及囊泡(如角鲨烯和角鲨烯),并且还可以将透明质酸结合遗传构建体一起施用。在一些实施方案中,DNA质粒疫苗还可以包括一种转染促进剂,如脂质、脂质体(包括卵磷脂脂质体或本领域中已知的其它脂质体,如DNA-脂质体混合物(参看例如W09324640))、钙离子、病毒蛋白、聚阴离子、聚阳离子或纳米粒子,或其它已知的转染促进剂。优选地,转染促进剂为聚阴离子、聚阳离子(包括聚L-谷氨酸(LGS))或脂质。疫苗中转染剂的浓度低于4mg/ml,低于2mg/ml,低于1mg/ml,低于0.750mg/ml,低于0.500mg/ml,低于0.250mg/ml,低于0.100mg/ml,低于0.050mg/ml,或低于0.010mg/ml。

[0148] 药学上可接受的赋形剂可以为一种或多种佐剂。佐剂可以是由相同质粒或由替代性质粒表达,或以蛋白质形式与以上质粒组合于疫苗中进行传递的其它基因。该一种或多种佐剂可以是选自由以下组成的组的蛋白质和/或编码这些蛋白质的核酸分子:CCL20、 $\alpha$ -干扰素(IFN- $\alpha$ )、 $\beta$ -干扰素(IFN- $\beta$ )、 $\gamma$ -干扰素、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、皮肤T细胞吸引趋化因子(cutaneous T cell-attracting chemokine,CTACK)、上皮胸腺表达趋化因子(epithelial thymus-expressed chemokine,TECK)、粘膜相关上皮趋化因子(mucosae-associated epithelial chemokine,MEC)、IL-12、IL-15(包括缺失信号序列或编码信号序列的编码序列并且任选包括如来自IgE的信号肽等不同信号肽或编码如来自IgE的信号肽等不同信号肽的编码序列的IL-15)、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、IL-8、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、Caspase ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I $\kappa$ B、无活性NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素反应基因、NF $\kappa$ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及其功能片段,或其组合。在一些实施方案中,佐剂可以是一种或多种选自由以下组成的组的蛋白质和/或编码这些蛋白质的核酸分子:CCL-20、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、MEC或RANTES。IL-12构建体和序列的实例公开于PCT申请号PCT/US1997/019502和相应美国申请序列号08/956,865,以及2011年12月12日申请的美国临时申请序列号61/569600中,其各自通过引用并入本文中。IL-15构建体和序列的实例公开于PCT申请号PCT/US04/18962和相应美国申请序列号10/560,650,以及PCT申请号PCT/US07/00886和相应美国申请序列号12/160,766,及PCT申请号PCT/US10/048827中,其各自通过引用并入本文中。IL-28构建体和序列的实例公开于PCT申请号PCT/US09/039648和相应美国申请序列号12/936,192中,其各自通过引用并入本文中。RANTES以及其它构建体和序列的实例公开于PCT申请号PCT/US1999/

004332和相应美国申请序列号09/622452中,其各自通过引用并入本文中。RANTES构建体和序列的其它实例公开于PCT申请号PCT/US11/024098中,该案通过引用并入本文中。RANTES以及其它构建体和序列的实例公开于PCT申请号PCT/US1999/004332和相应美国申请序列号09/622452中,其各自通过引用并入本文中。RANTES构建体和序列的其它实例公开于PCT申请号PCT/US11/024098中,该案通过引用并入本文中。趋化因子CTACK、TECK和MEC构建体和序列的实例公开于PCT申请号PCT/US2005/042231和相应美国申请序列号11/719,646中,其各自通过引用并入本文中。OX40和其它免疫调节剂的实例公开于美国申请序列号10/560,653中,该案通过引用并入本文中。DR5和其它免疫调节剂的实例公开于美国申请序列号09/622452中,该案通过引用并入本文中。

[0149] 疫苗可以另外包含如1994年4月1日申请的美国序列号021,579(该案通过引用完整地并入本文中)中所描述的基因疫苗促进剂。

[0150] 疫苗包含的共有抗原和质粒的量可以为约1纳克到100毫克;约1微克到约10毫克;或优选约0.1微克到约10毫克;或更优选约1毫克到约2毫克。在一些优选的实施方案中,根据本发明的药物组合物包含约5纳克到约1000毫克的DNA。在一些优选的实施方案中,这些药物组合物含有约10纳克到约800毫克的DNA。在一些优选的实施方案中,这些药物组合物含有约0.1到约500微克的DNA。在一些优选的实施方案中,这些药物组合物含有约25到约250微克,约100到约200微克,约1纳克到100毫克;约1微克到约10毫克;约0.1微克到约10毫克;约1毫克到约2毫克;约5纳克到约1000微克、约10纳克到约800微克、约0.1到约500微克、约1到约350微克、约25到约250微克、约100到约200微克的共有抗原或其质粒。

[0151] 疫苗可以根据打算使用的施药模式进行配制。可注射疫苗药物组合物可以是无菌、无热原质并且无颗粒状物的。可以使用等渗制剂或溶液。用于等渗性的添加剂可以包括氯化钠、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇及乳糖。疫苗可以包含血管收缩剂。等渗溶液可以包括磷酸盐缓冲的生理盐水。疫苗可以另外包含稳定剂,包括明胶和白蛋白。稳定剂可以使该制剂在室温或环境温度下稳定保持较长时间段,如添加到疫苗制剂中的LGS或聚阴离子或聚阳离子。

## [0152] 7. 疫苗传递方法

[0153] 本文提供了一种用于传递疫苗的方法,该疫苗将提供共有抗原的遗传构建体和蛋白质,其包含使其特别有效地针对丝状病毒,特别是马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和/或扎伊尔埃博拉病毒的免疫原的表位,针对这些免疫原可以诱导免疫应答。提供的传递疫苗或疫苗接种的方法可以诱导治疗性和预防性免疫应答。该疫苗接种方法可以在哺乳动物中产生针对丝状病毒,特别是马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和/或扎伊尔埃博拉病毒的免疫应答。该疫苗可以被传递给个体以调节哺乳动物免疫系统的活性并且增强免疫应答。疫苗的传递可以是呈核酸分子形式的共有抗原的转染,该核酸分子在细胞中表达并且被传递到细胞表面,在细胞表面上被免疫系统识别,并且诱导细胞、体液或细胞和体液反应。疫苗的传递可以用于在哺乳动物中诱导或引起针对丝状病毒,特别是马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和/或扎伊尔埃博拉病毒的免疫应答,这是通过向哺乳动物施用如以上所论述的疫苗实现的。

[0154] 在将疫苗和质粒传递到哺乳动物细胞中之后,受转染的细胞将表达并分泌由该疫

苗所注射的每个质粒的共有抗原。这些蛋白质将被免疫系统识别为外来物，并且将产生针对其的抗体。这些抗体将被免疫系统维持并且允许对随后由丝状病毒，特别是马尔堡病毒、苏丹埃博拉病毒和/或扎伊尔埃博拉病毒引起的感染产生有效反应。

[0155] 该疫苗可以被施用给哺乳动物以在哺乳动物中引起免疫应答。该哺乳动物可以为人类、灵长类动物、非人类灵长类动物、母牛、牛、绵羊、山羊、羚羊、野牛、水牛、野牛、牛科动物、鹿、刺猬、大象、骆驼、羊驼、小鼠、大鼠和鸡。

[0156] a. 组合治疗

[0157] 该疫苗可以与其它蛋白质和/或编码以下各物的基因组合施用：CCL20、 $\alpha$ -干扰素 (IFN- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素、血小板源性生长因子 (PDGF)、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 、GM-CSF、表皮生长因子 (EGF)、皮肤T细胞吸引趋化因子 (CTACK)、上皮胸腺表达趋化因子 (TECK)、粘膜相关上皮趋化因子 (MEC)、IL-12、IL-15 (包括缺失信号序列并且任选包括如IgE信号肽等不同信号肽的 IL-15)、MHC、CD80、CD86、IL-28、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、Caspase ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、无活性NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素反应基因、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及其功能片段，或其组合。在一些实施方案中，疫苗是与以下一种或多种核酸分子和/或蛋白质组合施用：选自由以下组成的组的核酸分子：包含了编码CCL20、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、MEC及RANTES中的一种或多种的编码序列或其功能片段的核酸分子；及选自由以下组成的组的蛋白质：CCL02、IL-12蛋白、IL-15蛋白、IL-28蛋白、CTACK蛋白、TECK蛋白、MEC蛋白或RANTES蛋白，或其功能片段。

[0158] 疫苗可以通过不同途径施用，这些途径包括口服、肠胃外、舌下、透皮、直肠、透粘膜、局部、经由吸入、经由口腔施用、经胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、鼻内、鞘内及关节内，或其组合。对于兽医应用，该组合物可以根据标准兽医实践以适合地可接受的制剂施用。兽医可以容易地确定最适合特定动物施用的剂量方案和途径。疫苗可以通过传统注射器、无针注射装置、“微粒轰击基因枪 (microprojectile bombardment gun)”，或如电穿孔法 (“EP”)、“流体动力学方法”或超声波法等其它物理方法施用。

[0159] 疫苗的质粒可以通过若干众所周知的技术传递给哺乳动物，包括DNA注射 (又称为DNA疫苗接种)，并且利用和不利用了体内电穿孔法、脂质体介导、纳米粒子促进的重组载体，如重组腺病毒、重组腺病毒相关病毒及重组牛痘。该共有抗原可以经由DNA注射以及体内电穿孔法传递。

[0160] b. 电穿孔

[0161] 经由疫苗质粒的电穿孔来施用疫苗可以使用电穿孔装置实现，这些电穿孔装置可以被配置成向所希望的哺乳动物组织传递有效引起细胞膜中可逆孔形成的能量脉冲，并且优选该能量脉冲是类似于用户输入的预先设定的电流的恒定电流。电穿孔装置可以包含一个电穿孔组件和一个电极组合件或处理组合件。电穿孔组件可以包括并且并入电穿孔装置

的各种元件中的一个或多个,包括:控制器、电流波形发生器、阻抗测试仪、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端口、记忆组件、电源和电源开关。电穿孔可以使用体内电穿孔装置,例如CELLLECTRA EP系统(VGX Pharmaceuticals,Blue Bell,PA)或Elgen电穿孔仪(Genetronics, San Diego, CA)实现,以促进质粒对细胞的转染。

[0162] 电穿孔组件可以起到电穿孔装置的一个元件的作用,并且其它元件是与电穿孔组件通信的单独元件(或组件)。电穿孔组件可以起到电穿孔装置的超过一个元件的作用,其可以同与电穿孔装置中与电穿孔组件分开的其它元件通信。作为一种电机械或机械装置的一部分存在的电穿孔装置的元件不受限制,因为这些元件可以起到一个装置或彼此通信的单独元件的作用。电穿孔组件能够传递能量脉冲以在所希望的组织中产生恒定电流,并且包括反馈机制。电极组合件可以包括一个电极阵列,该电极阵列具有呈空间布置的多个电极,其中该电极组合件从电穿孔组件接收能量脉冲并且通过电极将其传递给所希望的组织。这多个电极中的至少一个在能量脉冲的传递期间是呈中性的,并且测量所希望的组织中的阻抗,并将该阻抗传达给电穿孔组件。该反馈机制可以接收所测量的阻抗并且可以调整由电穿孔组件所传递的能量脉冲以维持恒定电流。

[0163] 多个电极可以按一种分散模式传递能量脉冲。该多个电极可以通过电极的控制以一种程序化的次序传递能量脉冲,并且该程序化的次序是由用户输入到电穿孔组件中。该程序化的次序可以包含依序传递的多个脉冲,其中该多个脉冲中的每个脉冲是通过至少两个有效电极和一个测量阻抗的中性电极传递,并且其中该多个脉冲中的随后脉冲是通过与至少两个有效电极不同的一个电极和一个测量阻抗的中性电极传递。

[0164] 该反馈机制可以由硬件或软件执行。反馈机制可以由模拟闭环电路执行。反馈每50μs、20μs、10μs或1μs发生,但优选实时反馈或即时反馈(即,如由可用于测定反应时间的技术确定为基本上即时的)。该中性电极可以测量所希望的组织中的阻抗并且将该阻抗传达给反馈机制,并且该反馈机制对该阻抗作出响应并调整能量脉冲以将恒定电流维持在类似于预先设定的电流的值。反馈机制可以在能量脉冲传递期间持续地并且即时地维持恒定电流。

[0165] 可以有助于本发明的DNA疫苗的传递的电穿孔装置和电穿孔方法的实例包括Draghia-Akli等人的美国专利号7,245,963、Smith等人提交的美国专利公布2005/0052630中所描述的那些,这些专利的内容都通过引用整体并入本文中。可以用于促进DNA疫苗的传递的其它电穿孔装置和电穿孔方法包括2007年10月17日提交的同在申请并且共同拥有的美国专利申请序列号11/874072中所提供的那些,该案依据35USC 119 (e)要求2006年10月17日提交的美国临时申请序列号60/852,149和2007年10月10日提交的美国临时申请序列号60/978,982的权益,所有这些申请都整体并入本文中。

[0166] Draghia-Akli等人的美国专利号7,245,963描述了模块式电极系统及其用于促进将生物分子引入身体或植物中的所选组织的细胞中的用途。这些模块式电极系统可以包含多个针状电极;皮下注射针;提供从可程序化的恒定电流脉冲控制器到多个针状电极的导电链路的电连接器;及电源。操作人员可以抓住被安装在一个支撑结构上的多个针状电极,并且平稳地将其插入身体或植物中的所选组织中。然后,经由皮下注射针将生物分子传递到所选组织中。将可程序化的恒定电流脉冲控制器激活,并且将恒定电流电脉冲施加到该多个针状电极。所施加的恒定电流电脉冲促进将生物分子引入在多个电极之间的细胞中。

美国专利号7,245,963的完整内容通过引用并入本文中。

[0167] 由Smith等人提交的美国专利公布2005/0052630描述了一种电穿孔装置,该装置可以用于有效地促进将生物分子引入身体或植物中的所选组织的细胞中。该电穿孔装置包含一个电动力学装置(“EKD装置”),其操作是由软件或固件指定的。EKD装置基于用户控制和脉冲参数的输入在呈阵列形式的电极之间产生一系列可程序化的恒定电流脉冲模式,并且允许储存和获取电流波形数据。电穿孔装置还包含一个可更换的电极盘,该电极盘具有一个由针状电极形成的阵列;一个用于注射针的中央注射通道;及一个可拆卸的导向盘。美国专利公布2005/0052630的完整内容通过引用并入本文中。

[0168] 美国专利号7,245,963和美国专利公布2005/0052630中所描述的电极阵列和方法都可以用于深穿透到不仅如肌肉等组织中,而且还深穿透到其它组织或器官中。归因于电极阵列的配置,注射针(用以传递所选生物分子)还能完全地插入靶器官中,并且垂直于靶组织,在由电极预先划定的区域中施用注射液。美国专利号7,245,963和美国专利公布2005/005263中所描述的电极优选为20mm长度并且为21号。

[0169] 另外地,涵盖了并入电穿孔装置和其用途的一些实施方案,电穿孔装置是以下专利中所描述的那些:1993年12月28日颁布的美国专利5,273,525、2000年8月29日颁布的美国专利6,110,161、2001年7月17日颁布的6,261,281和2005年10月25日颁布的6,958,060,以及2005年9月6日颁布的美国专利6,939,862。此外,涵盖2004年2月24日颁布的美国专利6,697,669(涉及使用多种装置中的任一种传递DNA)和2008年2月5日颁布的美国专利7,328,064(涉及注射DNA的方法)中所提供的主题内容的专利也涵盖在本文中。以上专利都通过引用整体并入本文中。

[0170] c. 制备DNA质粒的方法

[0171] 本文提供了用于制备DNA质粒的方法,这些DNA质粒包含本文所论述的DNA疫苗。DNA质粒在最后一个步骤亚克隆到哺乳动物表达质粒中之后,可以用于在大规模发酵罐中,使用本领域中已知的方法接种细胞培养基。

[0172] 用于本发明的EP装置的DNA质粒可以使用已知装置和技术的组合进行配制或制造,但优选使用优化的质粒制造技术进行制造,该技术描述于2007年5月23日提交的得到许可的同在申请的美国临时申请美国序列号60/939,792中。在一些实施例中,用于这些研究中的DNA质粒可以被配制成浓度大于或等于10mg/mL。除美国序列号60/939792中所描述的那些,包括得到许可的专利美国专利号7,238,522(2007年7月3日颁布)中所描述的那些外,这些制造技术还包括或并入了本领域普通技术人员通常已知的各种装置和方案。以上参考的申请和专利(分别为美国序列号60/939,792和美国专利号7,238,522)都整体并入本文中。

[0173] 实施例

[0174] 以下实施例将进一步说明本发明。应了解,这些实施例尽管指示了本发明的优选实施方案,但仅出于说明的目的提供。从以上论述和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的基本特征,并且在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种改变和修改以使其适于各种用法和条件。因此,本领域技术人员从前述说明将对除本文所显示并描述的那些外的本发明的各种修改显而易见。这些修改也打算在所附权利要求书的范围内。

[0175] 实施例1

[0176] 方法

[0177] 质粒疫苗的构建

[0178] pMARV、pEBOS和pEB0Z质粒DNA构建体编码全长GP蛋白。对于pEBOS和pEB0Z, 使用了氨基酸共有策略, 而对于pMARV, 使用了来自2005年安哥拉疾病爆发病毒株 (GenBank#VGP\_MABVR) 的类型相配的序列 (Towner JS等人 (2006) . Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol* 80: 6497-6516)。通过比对占优势的ZEBOV和SUDV GP氨基酸序列并产生各自的共有序列来确定共有序列。针对在人类中表达对每个疫苗GP基因进行遗传优化(包括用于增强蛋白质表达的密码子优化和RNA优化 (GenScript, Piscataway, NJ) ), 在工业上进行合成, 然后将其亚克隆 (GenScript, Piscataway, NJ) 到经过修饰的pVAX1哺乳动物表达载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 使其处于巨细胞病毒立即早期 (CMV) 启动子控制下; 修饰包括2A>C、3C>T、4T>G、241C>G、1,942C>T、2,876A>-、3,277C>T及3,753G>C。通过用ClustalW, 使用第5版MEGA软件进行多重比对来执行系统发生分析。作为替代方案, 在比较时, MARV间的GP多样性高得多(约70%同一性), 因此不采用共有策略。对于MARV的覆盖率, 选择了利用来自2005年安哥拉疾病爆发的MGP序列 (GenBank#VGP\_MABVR) , 因为截至目前, 它独立引起了最大规模并且死亡率最高的MARV爆发。这一序列与其最密切的相关病毒株丛集中任一种具有超过10%的差异, 包括Musoke、Popp和Leiden (10.6%差异) , 或Uganda (01Uga07) 、Durba (05DRC99和07DRC99) 以及Ozolin (10.3%差异) 。总的来说, 三质粒策略形成了本发明新颖三价多价丝状病毒疫苗策略的基础。

[0179] 转染和免疫印迹

[0180] 对人胚肾 (Human Embryonic Kidney, HEK) 293T细胞进行培养, 转染和收集。简单地说, 使细胞在含10%FBS、1%青霉素-链霉素、丙酮酸钠及L-谷氨酰胺的DMEM中生长。在150mm的Corning培养皿中培养细胞并且使其在含5%CO<sub>2</sub>的37℃恒温箱中过夜生长到70%汇合。遵照制造商的方案, 使用Calphos<sup>TM</sup>哺乳动物转染试剂盒方案 (Clonetech) 或Lipofectamine<sup>TM</sup>2000试剂 (Invitrogen) , 用10-25μg的丝状病毒科pDNA转染培养皿, 然后孵育24-48小时。用冰冷的PBS收集细胞, 离心并洗涤, 然后使其聚结成团用于蛋白质免疫印迹或FACS分析。使用标准蛋白质印迹并且产生GP特异性MAb用于GP1检测。图1B中示出了由蛋白质免疫印迹实验得到的数据。图1C中示出了由FACS分析得到的数据。

[0181] 动物、疫苗接种和攻击

[0182] 成年雌性C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) 小鼠、BALB/cJ (H-2<sup>d</sup>) 小鼠及B10.Br (H-2<sup>k</sup>) 小鼠是购自Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) , 而Hartley豚鼠是来自Charles River (Wilmington, MA)。所有动物实验都是遵循UPenn IACUC医学动物实验学院, 或PHAC的NML实验动物护理委员会及加拿大动物管理协会有关实验动物圈养和护理的指南进行, 并且在得到以上提到的委员会的相关评审和批准之后根据NIH实验动物护理和使用指导中的推荐执行。UPenn和NML遵守NIH有关动物福利的政策、动物权益法案 (Animal Welfare Act) , 以及所有其它适用的联邦、州和地方法律。

[0183] 通过用针向小鼠肌肉内注射40μg再悬浮于水中的质粒来进行免疫, 而豚鼠是用200μg各质粒经皮内免疫, 分别注射到三个分开的疫苗接种部位。在疫苗接种之后, 立即在

同一部位注射EP。简单地说,将三个尖端分叉的CELLECTRA®适应性恒定电流微创装置(Minimally Invasive Device)经皮内插入约2mm (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA)。通过由26号固体不锈钢电极组成的三角形3电极阵列来传递方波脉冲,并且传递0.1Amps的两个恒定电流脉冲,每次脉冲持续52毫秒,其间有1秒延迟。

[0184] 对于致死攻击研究,攻击局限于啮齿动物适应性ZEBOV和MARV。在最后一次疫苗接种之后28天,通过腹膜内注射1,000LD<sub>50</sub>的豚鼠适应性ZEBOV(每只动物21.3FFU) (Richardson JS, Abou MC, Tran KN, Kumar A, Sahai BM, Kobinger GP (2011). Impact of systemic or mucosal immunity to adenovirus on ad-based Ebola virus vaccine efficacy in guinea pigs. *J Infect Dis* 204增刊3:S1032-1042)或1,000LD<sub>50</sub>的MARV-Angola(每只动物681TCID50)对豚鼠进行攻击。简单地说,通过在远系繁殖的成年雌性Hartley豚鼠中对野生型MARV-Angola进行连续传代,来制备豚鼠适应性MARV。在接种之后七天,对动物实施安乐死并且收集肝,并将其均质化。然后,将这一匀浆腹膜内注射到原生成年豚鼠中,并且重复该过程,直到动物体重减轻,毛发丧失光泽,并死于与在豚鼠中进行EBOV适应类似的感染。对于小鼠致死攻击研究(Kobinger GP等人(2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology* 346:394-401),对小鼠腹膜内注射200μl 1,000LD<sub>50</sub>(每只动物10FFU)的小鼠适应性ZEBOV。每天对所有动物称重,并使用批准的量表监测疾病发展,对于小鼠持续至少18天,并且对于豚鼠持续22天。所有感染性工作都是在位于PHAC的NML的‘生物安全4级’(Biosafety Level 4, BSL4)实验室中进行。

[0185] ELISA和中和检验

[0186] 使用以1:2,000浓度涂有蔗糖纯化的MARV Ozolin GP或ZGP,或涂有阴性对照蔗糖纯化的尼帕病毒G蛋白的96孔ELISA板中测定抗体(Ab)滴度。简单地说,然后在4°C下将这些板孵育18小时,用PBS加0.1%Tween-20洗涤,并且一式三份测试100μl血清样品(在含5%脱脂乳和0.5%Tween-20的PBS中以1:100、1:400、1:1,600及1:6,400稀释)。在潮湿容器中于37°C下孵育1小时之后,洗涤这些板,然后添加100μl的山羊抗小鼠IgG偶联的HRP抗体(Cedarlane)(1:2,000稀释),并在潮湿容器中于37°C下再孵育1小时。洗涤之后,添加100μl的ABST(2,2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)和过氧化物酶底物(Cedarlane)以观测Ab结合。再在潮湿容器中,将该板在37°C下孵育30分钟,然后在405nm下读取。阳性结合结果是以当从阴性对照血清中减去阳性对照值时>3SD为特征。

[0187] 进行ZEBOV中和检验。简单地说,使从免疫的小鼠和豚鼠收集的血清在56°C下失活45分钟,并且将每份样品的连续稀释液(在50μl的DMEM中,对于小鼠,1:20、1:40稀释等;对于豚鼠,1:50稀释)与表达EGFP报告基因的等体积ZEBOV(ZEBOV-EGFP)(根据EGFP的表达,100个转导单元/孔)混合,并在37°C下孵育90分钟。然后将混合物转移到96孔平底板中的近汇合VeroE6细胞中,并且在室温下孵育5-10分钟。用等量的ZEBOV-EGFP病毒,在不添加血清或在存在非免疫血清的情况下感染对照孔。然后向每个孔中添加100μl补充有20%FBS的DMEM,并且将板在37°C下于5%CO<sub>2</sub>中孵育48小时。

[0188] 作为替代方案,使用免疫荧光检验来评估MARV-Angola 368的中和情况。使用了一次兔抗MARV Ab和二次山羊抗兔IgG FITC偶联的Ab进行检测。基于在CV-1细胞上的细胞病理效应(CPE),检验针对SUDV Boniface的中和Ab(NAb)。将细胞与等份数的经免疫血清和

SUDV Boniface一起孵育10天,之后用10%缓冲福尔马林固定24小时并在光学显微镜下检查。对每个孔中的EGFP和FITC阳性细胞进行计数并且将显示绿色细胞数量相较于对照组减少>50%的样品稀释液评为对NAb呈阳性。作为替代方案,基于在CV-1细胞上的细胞病理效应(CPE),检验针对SUDV Boniface的NAb。所有感染工作都是在PHAC的NML的BSL4实验室中进行。

[0189] 脾细胞分离

[0190] 在最后一次免疫之后8-11天,处死小鼠并收集脾。简单地说,将脾放入补充有10% FBS、1X Anti-anti (Invitrogen) 及1Xβ-ME (Invitrogen) 的RPMI 1640培养基 (Mediatech Inc., Manassas, VA) 中。通过使用Stomacher机器 (Seward Laboratory Systems Inc., Bohemia, NY) 机械破坏脾来分离脾细胞,并使用40μm的细胞过滤网 (BD Falcon) 过滤所得产物。然后用ACK溶解缓冲液 (Lonza, Switzerland) 处理细胞5分钟以溶解RBC,在PBS洗涤,然后将其再悬浮于RPMI培养基中以用于ELISPOT或FACS检验。

[0191] ELISPOT检验

[0192] 进行标准IFN γ ELISPOT检验。简单地说,用抗小鼠IFN- γ 捕捉抗体涂覆96孔板 (Millipore, Billerica, MA),并且在4℃下孵育24小时 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。次日,用PBS洗涤板,然后用阻断缓冲液 (含1% BSA和5% 蔗糖的PBS) 阻断2小时。一式三份接种脾细胞 ( $1-2 \times 10^5$ 个细胞/孔) 并且在37℃下于5% CO<sub>2</sub>中并在RPMI 1640 (阴性对照物)、Con A (阳性对照物),或者个别GP肽 (有9个氨基酸重叠并且跨越其对应GP的长度的15聚体) 或整体汇集的GP肽 (最终2.5μg/ml) 存在下刺激过夜。在刺激18到24小时之后,在PBS中洗涤板,然后在4℃下与生物素化的抗小鼠IFN- γ mAb (R&D Systems, Minneapolis, MN) 一起孵育24小时。接下来,再在PBS中洗涤板,并且向每个孔中添加抗生蛋白链菌素-碱性磷酸酶 (MabTech, Sweden),并在室温下孵育2小时。最后,再在PBS中洗涤板,然后向每个孔中添加BCIP/NBT Plus底物 (MabTech),保持5-30分钟以供斑点显影。一旦目测检查到显影过程完成,就用蒸馏水漂洗板,然后在室温下干燥过夜。使用自动ELISPOT读取器 (Cellular Technology Ltd., Shaker Heights, OH) 列举斑点。

[0193] 对于T细胞宽度的全面分析,如先前Shedlock DJ等人 (2012) 同上文中所描述,在本文中对标准IFN γ ELISPOT进行修改。如与整体或基质肽库相对,通过用个别肽刺激脾细胞来评估次优势和免疫优势T细胞表位的鉴别和测量;为了保存样品而汇集肽的传统实践 (如使用基质阵列库) 引起检验敏感性的降低,因为在含有多个表位展示肽的库中的总功能反应将有效降低检验分辨率,即‘淹没 (drown-out)’具有较低量值的那些肽。因此,用跨每个GP免疫原的个别肽 (有9个氨基酸重叠的15聚体;最终2.5μg/ml) 进行修改过的ELISPOT。鉴别出含有T细胞表位的肽 ( $\geq 10\text{AVE IFN } \gamma + \text{斑点加} \geq 80\%$  的动物反应率;概述于表1-6中),然后通过FACS在功能上和表型上进行确定。未鉴别出共有表位或部分表位,并且FACS数据或基于网络的表位预测软件也未表明在连续肽内保存的CD4+或CD8+T细胞表位的存在。此处,如通过修改过的ELISPOT检验所鉴别,对于邻接肽反应的所有情形,确定可能的共有/部分T细胞表位的地址。用邻接肽中的每一肽独立地刺激细胞,并且用呈配对组合形式的肽刺激细胞以进行直接比较,并且如果组合的反应未超过两种个别反应中的任一种,那么将其定义为‘共有/部分的’。又,必须注意的是,本文呈现的表位反应可能并不是完全详尽的,因为用于产生肽的‘有9个氨基酸重叠的15聚体’ 算法相对于CD8T细胞表位的完全覆

盖存在偏差,这可能由于II类限制性表位长于15个氨基酸的性质而低估CD4T细胞反应。最后,使用Vector NTI软件生成氨基酸相似性曲线并且结果示于图4B中。

#### [0194] 流式细胞术

[0195] 将脾细胞添加到96孔板中( $1 \times 10^6$ 个细胞/孔)并且用个别肽或‘最小肽库’刺激5-6小时(最终 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ )。个别肽刺激被用于由修改过的ELISPOT所鉴别的所有肽的功能确定(表1-6)以及表型表征。首先用LIVE/DEAD®可固定紫色死细胞染色试剂盒(Fixable Violet Dead Cell Stain Kit; Invitrogen)对脾细胞和经过转染的293T进行预染色。对于脾细胞,针对CD19(V450;克隆1D3)、CD4(PE-Cy7;克隆RM4-5)、CD8α(APC-Cy7;克隆53-6.7)及CD44(PE-Cy5;克隆IM7)(BD Biosciences, San Jose, CA)对细胞进行表面染色,在PBS+1%FBS中洗涤三次,用BD Cytofix/Cytoperm™试剂盒使其透化,然后用IFN γ(APC;克隆XMG1.2)、TNF(FITC;克隆MP6-XT22)、CD3(PE-cy5.5;克隆145-2C11)及T-bet(PE;克隆4B10)(eBioscience, San Diego, CA)进行细胞内染色。转染之后24小时,对经过转染的293T细胞中的GP表达进行评估。在4°C下,在含有指定小鼠源性GP特异性多克隆血清试剂(1:200稀释)的PBS+1%FBS中孵育30分钟之后,进行间接染色,该血清试剂分别通过汇集来自用其对应DNA疫苗或pVAX1空载体对照物免疫三次的H-2<sup>b</sup>小鼠的血清制造。然后,用FITC偶联的山羊抗小鼠IgG(BioLegend, San Diego, CA)对细胞进行染色,彻底洗涤,然后针对I类MHC(HLA-ABC;PE-Cy7;克隆G46-2.6;BD)进行染色。所有细胞都固定于1%三聚甲醛中。使用LSRII流式细胞仪(BD)收集所有数据,并且使用FlowJo软件(Tree Star, Ashland, OR)进行分析。关于呈CD3+CD44+、CD4+或CD8+并且对B细胞标记物CD19和活力染色呈阴性的活化的产IFN γ的T细胞对脾细胞进行门控。

[0196] 图6示出了GP特异性T细胞门控。通过总淋巴细胞、对CD 19和LIVE-DEAD(倾倒通道(dump channel))呈阴性的活(LD)CD3+细胞、单管(排除细胞二联管)、CD4+并且CD8+细胞、活化的细胞(CD44+)及肽特异性产IFN γ的T细胞的FACS门控来进行如由ELISPOT所鉴别的含有T细胞表位的肽的功能和表型分析。

#### [0197] 统计学分析

[0198] 通过最大似然估计法确定无根系统发生树的重要性并且通过自引分析加以验证,并通过第5版MEGA软件测定显著支持值( $\geq 80\%$ ;1,000次自引复制)。组分析是通过配对的双尾未成对t测试完成,并且存活率曲线是通过对数秩测试进行分析。所有值都是平均值±SEM并且统计学分析是由GraphPad Prism(La Jolla, CA)进行。

#### [0199] 结果

#### [0200] 疫苗构建和表达

[0201] 系统发生分析揭露了EBOV GP间的相对保守性(对于SUDV为94.4%并且对于ZEBOV为92.9%),而MARV GP(MGP)差别很大(约70%保守)。因此,对于EBOV GP采用了如由占优势的ZEBOV和SUDV GP氨基酸序列的比对所确定的共有策略,而对于采用2005年安哥拉疾病爆发序列(其独立引起了最大规模并且死亡率最高的MARV爆发)的MARV使用了类型匹配策略。对每个GP转基因进行遗传优化,在工业上合成,然后将其亚克隆到经过修饰的pVAX1哺乳动物表达载体中。总的来说,三质粒策略形成了本发明新颖多价丝状病毒疫苗策略的基础。

[0202] 用每个质粒独立地转染HEK 293T细胞,并且通过蛋白质免疫印迹法和FACS评估GP表达。在转染后48小时收集的每份细胞溶解产物中观察到约130kDa的蛋白质,使用物种特

异性抗GP1mAb进行检测。结果示于图1B中。对于比较性对照物,将表达对应的GP的重组水疱性口炎病毒(rVSV)装载到并存的泳道中。接下来,在转染后24小时,通过用GP特异性或对照多克隆血清间接染色,借助于FACS来分析细胞表面上的GP表达。结果示于图1C中。针对所有疫苗质粒检测细胞表面表达,同时观察到极少的非特异性结合;对照血清不与GP转染的细胞反应,阳性血清也不与pVAX1转染的细胞反应(有关pEB0Z的数据如图示)。如关于EBOV GP所预期的,细胞表面表达在空间上阻碍了表面I类MHC以及 $\beta$ 1-整合素的识别(Francica JR, Varela-Rohena A, Medvec A, Plesa G, Riley JL, Bates P (2010). Steric shielding of surface epitopes and impaired immune recognition induced by the ebola virus glycoprotein. PLoS Pathog 6:e1001098)。

[0203] 针对MARV和ZEBOV攻击的完全防护

[0204] 为了测定防护功效,采用了豚鼠临床前攻击模型。临床前免疫原性和功效研究在本文中是使用豚鼠和小鼠模型进行的。豚鼠临床前模型已经被广泛用作丝状病毒疫苗开发的筛选和‘概念验证’工具。尽管MARV和EBOV的原代分离株在豚鼠中引起非致命性疾病,但在这一宿主中的少量子代导致选出能够引起致命性疾病并且具有类似于在感染丝状病毒的灵长类动物中所见的病理特征的变体。类似地,小鼠也被广泛用于丝状病毒疫苗的开发,不过,与豚鼠模型不同,用于评估免疫性和T细胞反应的免疫检测试剂是广泛可用的。用鼠类适应性ZEBOV(mZEBOV)进行感染引起了以靶器官中的高病毒水平以及肝和脾中类似于在感染EBOV的灵长类动物中所见的病理变化为特征的疾病。

[0205] 通过经皮内将200 $\mu$ g的每个质粒(pEB0Z、pEB0S和pMARV)注射到三个分开的疫苗接种部位或用pVAX1空载体对照( $n=9$ )来对豚鼠( $n=24$ )进行免疫,然后在一个月后,用相同疫苗进行加强免疫。在第二次免疫之后28天,在BSL-4实验室中,用1,000LD<sub>50</sub>的豚鼠适应性MARV-Angola(gpMARV)( $n=9$ )或ZEBOV(gpZEBOV)( $n=15$ )攻击动物,然后进行观察并每天称重。结果示于图2A-图2H中。接种疫苗的动物完全得到保护,而对照疫苗接种的动物在攻击后10天死于gpMARV( $n=3$ ;  $P=0.0052$ ),或在攻击后7天死于gpZEBOV( $n=6$ ;  $P=0.0008$ )(图2A和图2E)。另外,接种疫苗的动物免于经历体重减轻(图2B和图2F;  $P<0.0001$ )。可能的情形是,疫苗诱导的Ab可能有助于进行保护,因为在汇集的血清中的GP特异性Ab展现出结合(图2C和图2G)和中和(图2D和图2H)滴度的显著增加。实验是在BSL-4实验室中进行并且重复两次,得到类似的结果,并且图2A-图2H中的误差条表示SEM。组分析是通过配对的双尾未成对t测试完成,并且存活率曲线是通过对数秩测试进行分析。

[0206] 质粒疫苗具有高免疫原性

[0207] 为了更好的表征如由保护性DNA疫苗(质粒pEB0Z、pEB0S及pMARV,又称为三价DNA疫苗)驱动的免疫相关性,接下来采用小鼠模型,该模型已经被广泛用作丝状病毒疫苗开发的筛选和‘概念验证’工具,并且其中众多的免疫检测试剂都可用。首先,在用40 $\mu$ g对应的单价DNA疫苗进行的两次疫苗接种中每一次之后20天,评估H-2<sup>d</sup>小鼠(每组 $n=5$ 只)中的B细胞反应,每次注射之间间隔三周。由这些实验得到的数据示于图3A-图3C中。尽管在预先抽血的对照样品中观察到极少GP特异性IgG,但如图3A和图3B中所示,疫苗接种之后,在所有动物中检测到显著增加。由于纯化的SGP是无法得到的,故使用纯化的ZGP作为代用品。SUDV疫苗接种的小鼠中IgG结合ZGP,展现了疫苗诱导产生Ab的能力以及其交叉物种识别能力。另外,在仅一次免疫之后,100%的接种疫苗的动物中发生血清转换,此后反应因同质免疫加

强而显著增加；AVE终点稀释液滴度倒数在pMARV免疫的小鼠中加强22.1倍，并且在pEBOS疫苗接种和pEB0Z疫苗接种的动物中分别加强3.4倍和8.6倍。接下来，在BSL-4实验室中针对ZEBOV、SUDV-Boniface及MARV-Angola的中和来检验样品。中和检验的结果示于图3C中。在疫苗接种之后，在所有动物中检测到NAb滴度的显著增加。

[0208] 用40 $\mu$ g对应的质粒pEB0Z、pEBOS及pMARV对来自两种不同遗传背景(H-2<sup>d</sup>和H-2<sup>b</sup>；每组n=5只)的小鼠进行免疫，两周后进行同质免疫加强，然后在8天后处死小鼠用于T细胞分析。由新颖的修改过的ELISPOT检验评估全面疫苗诱导的T细胞反应所得到的结果示于图4A中，其中如与基质库相对，使用了个别肽来刺激脾细胞。DNA疫苗接种诱导了稳健的IFN  $\gamma$  +反应，其识别各种各样的T细胞表位(表1-6)。随后，针对所有包含阳性表位的肽进行门控(参看图6)，确定并通过FACS进一步表征。这一修改过的ELISPOT方法证明了极大的敏感性，因为来自对照孔的背景反应较少(在H-2<sup>b</sup>小鼠中7.2±0.2的产IFN  $\gamma$  的SFC/10<sup>6</sup>个脾细胞并且在H-2<sup>d</sup>小鼠中为9.2±0.5)。如图4A中所示的结果揭露，用pMARV进行疫苗接种在H-2<sup>b</sup>小鼠中诱导出9个可测量的表位并且在H-2<sup>d</sup>小鼠中诱导出11个可测量的表位，在这些对应的品系中，pEBOS诱导9个和8个可测量的表位，并且pEB0Z产生10个和12个可测量的表位。当来自pMARV免疫的H-2<sup>b</sup>小鼠的九个表位中有五个(55.6%)呈CD8+时，如通过ELISPOT和FACS确定及表型分析所测量，它们占总MGP特异性IFN  $\gamma$  +反应的约57.3%。类似地，在pEBOS免疫的H-2<sup>b</sup>小鼠和H-2<sup>d</sup>小鼠中，分别仅33%和38%的确定的表位为CD8-限制性的。然而，这些表位大致占总反应的50%-90%；据估计，在两种小鼠品系中CD8+T细胞反应为约56%，而在H-2<sup>b</sup>小鼠和H-2<sup>d</sup>小鼠中，FACS估计值分别为51%和90%。总CD8+反应在pEB0Z疫苗接种的动物中较低，并且测量值在33%与57%之间(通过ELISPOT所测量，对于两种品系为33%；并且通过FACS所测量，对于H-2<sup>b</sup>小鼠和H-2<sup>d</sup>小鼠分别为6%和57%)。

[0209] 在接受pEBOS的两个小鼠品系中检测到单一免疫优势表位，其中免疫优势表位被宽松地定义为产生的IFN  $\gamma$  反应是最高次优势表位的至少两倍；pMARV在肽MGP<sub>25-39</sub>(#5)、MGP<sub>67-81</sub>(#12)、MGP<sub>181-195</sub>(#31)及MGP<sub>385-399</sub>(#65)内诱导出四个H-2<sup>b</sup>限制性免疫优势CD8+表位，并且在MGP<sub>151-171</sub>(#27)中诱导出一个H-2<sup>d</sup>限制性CD4+表位。如图4B和图4C中所示，这些表位中的四个出现在MARV GP1的高度保守区域，包括其中位于推定的受体结合结构域内的三个，而仅一个出现在可变粘蛋白样区域(MGP<sub>385-399</sub>(#65))内。pEBOS在H-2<sup>b</sup>小鼠和H-2<sup>d</sup>小鼠中刺激分别出现在SUDV GP(SGP)<sub>19-33</sub>(#4)和SGP<sub>241-255</sub>(#41)中的CD8+表位，这两种GP都在GP1的高度保守区域中。然而，pEB0Z免疫揭露了在H-2<sup>d</sup>小鼠中的三个免疫优势表位(一个位于ZEBOV GP受体结合结构域(GP)<sub>139-153</sub>(#24)中的CD8-限制性表位，及两个CD4-限制性表位ZGP<sub>175-189</sub>(#30)和ZGP<sub>391-405</sub>(#66))，分别出现在受体结合结构域和粘蛋白样区域中。在H-2<sup>b</sup>小鼠中仅界定一个免疫优势表位，它含有CD4+和CD8+表位(#89)并且出现在GP2的高度保守区域中。总体而言，多样的表位分级结构在每个疫苗组中是一致的并且是可再现的。此外，如图4D中所示，次优势反应占总反应相当大的比例；如通过修改过的ELISPOT检验所测量的总AVE次优势反应在pMARV、pEBOS和pEB0Z免疫的H-2<sup>b</sup>小鼠中分别为约12%、62%和74%，而在H-2<sup>d</sup>小鼠中的反应分别为47%、50%和34%。

[0210] 最后，通过FACS，使用仅含有所鉴别的确定的含表位肽的最小肽库进行刺激来测量总GP特异性T细胞反应。在每只接种疫苗的动物中都检测到稳健的反应，并且在大多数情况下，包含由活化的CD4+和CD8+T细胞引起的反应。反应是GP特异性的，因为用对照肽(h-

Clip) 观察到极少的IFN  $\gamma$  产生, 并且与ELISPOT数据充分相关。免疫不诱导明显CTL(如通过FACS所测量) 的唯一情形出现在pMARV疫苗接种的H-2<sup>d</sup>小鼠中, 其中ELISPOT未鉴别到的表位被确定为CD8-限制性的。总的说来, 这些数据显示, 每个疫苗质粒在小鼠中都具有高免疫原性, 并且产生稳健的GP特异性T细胞反应, 从而识别出各种各样的T细胞表位阵列, 包括在GP的高度保守区域内的免疫优势表位。此外, 使用传统的用于表位鉴别的基质阵列肽库可能忽略本文所表征的高度多样性的次优势T细胞反应。

[0211] 通过针对最小肽库的反应性来测量T细胞反应, 包含以FACS针对每个对应GP所鉴别的所有阳性肽引起的反应。图7A示出了DNA疫苗诱导的T细胞反应, 这些反应是由代表性动物显示并且针对产IFN  $\gamma$  的CD4+细胞(右图)和CD8+细胞(左图)进行门控。示出了FACS曲线。与h-CLIP肽一起孵育用作阴性对照(对照物)。图7B示出了在图7A中门控的细胞的结果, 以总CD44+/IFN  $\gamma$  +CD4+细胞或CD8+细胞的平均%进行概述并且误差条表示SEM。重复实验至少两次, 得到类似结果。

[0212] 在小鼠中的‘单剂量’防护作用

[0213] 接下来, 在临床前鼠类模型中评估针对ZEBOV攻击的疫苗功效。由于强烈的NAb诱导作用, 故仅对小鼠进行一次疫苗接种, 并且观察防护作用数据。用40 $\mu$ g的pEBOZ DNA对小鼠(H-2<sup>k</sup>; 每组n=10只)进行免疫, 并且在28天后, 在BSL4实验室中通过用1,000LD<sub>50</sub>的小鼠适应性ZEBOV(mZEBOV)攻击来评价防护作用。所有对照动物在攻击后第7天死于感染, 而图5A显示, DNA疫苗接种的小鼠得到完全保护( $P=0.0002$ )。此外, 如图5B中所示, 对照小鼠展现出体重的进行性减轻, 直到死亡( $P<0.0001$ )。

[0214] 为了更好地了解在‘单剂量’模型中DNA诱导的防护作用的机制, 接下来评估NAb和T细胞产生。在疫苗接种后25天, 即在攻击前3天, 评估NAb, 并且如图5C中所示, 在所有接种疫苗的动物(每组n=10只)中检测到显著( $P<0.0001$ )增加; 终点稀释液滴度倒数在19到42范围内( $27.3 \pm 2.5$ )。

[0215] 接下来评价ZGP特异性T细胞的产生并将分析的范围增加到对仅用pEBOZ或以三价制剂免疫的小鼠中的反应进行比较。11天后, 通过FACS, 使用全ZGP肽库评估IFN- $\gamma$ 的产生(n=5); 数据示于图5D中。在所有动物中检测产IFN  $\gamma$  的T细胞, 并且这些细胞对ZGP肽具有特异性, 因为用对照肽刺激不诱导细胞因子产生。用单价或三价制剂进行免疫诱导出稳健的IFN  $\gamma$  T反应, 当比较时, 这些反应没有显著不同( $P=0.0920$ )。

[0216] 由于CTL对于消除感染病毒的细胞很重要(Warfield KL等人(2005). Induction of humoral and CD8+T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. J Immunol 175:1184-1191; Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S(2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. Virol J 6:132; Olinger GG等人(2005). Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. J Virol 79: 14189-14196; Sullivan NJ等人(2011). CD8(+) cellular immunity mediates rAd5vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. Nat Med 17:1128-1131; 及Geisbert TW等人(2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus

in nonhuman primates. *J Virol* 84:10386–10394), 故对于已知与Th1-型CTL免疫性和细胞毒性相关的另一效应细胞因子TNF, 以及发育限制性因子T盒转录因子TBX21 (T-bet) 的产生进行测量并且结果如下。对于总细胞: TNF  $2.9 \pm 0.8$ , Tbet  $13.0 \pm 1.1$ 。对于CD4+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞: TNF  $61.4 \pm 3.1$ , Tbet  $72.6 \pm 2.0$ 。对于CD8+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞: TNF  $33.0 \pm 3.3$ , Tbet  $992.1 \pm 1.4$  ( $*p < 0.1$ ;  $***p < 0.001$ ;  $****p < 0.0001$ )。发现活化的CD4+T细胞和CD8+T细胞中分别有约61%和约33%除产生IFN  $\gamma$  外, 还产生TNF。此外, 大多数产IFN  $\gamma$  的T细胞高水平表达T-bet; CD8+T细胞和CD4+T细胞中分别有约73%和92%为CD44+, 并且在ZGP肽刺激之后, 产生IFN  $\gamma$ 。

[0217] 图8A和图8B示出了由‘单剂量’疫苗接种引起的T细胞诱导作用。显示了如通过FACS所测量的在单次pEB0Z免疫或单次三价疫苗接种之后H-2<sup>k</sup>小鼠中的反应(包含在独立部位由三个疫苗质粒引起的反应) (a), 并且以总CD44+/IFN  $\gamma$  +CD4+细胞(紫色)或CD8+细胞(橙色)的AVE%概述(b)。伪彩色FACS曲线是由代表性动物得到并且针对产IFN  $\gamma$  的CD4+细胞(右图)和CD8+细胞(左图)进行门控。与h-CLIP肽一起孵育用作阴性对照(对照物)。实验进行两次, 得到类似结果, 并且误差条表示SEM; ns, 无显著性。

#### [0218] 讨论

[0219] 我们报导了在临床前啮齿动物免疫原性和功效研究中进行的多价丝状病毒疫苗的开发和评价。在豚鼠中使用两剂DNA疫苗之后观察到针对gpMARV和gpZEBOV攻击的完全防护作用, 并且在小鼠中使用‘单剂量’DNA疫苗之后观察到针对mZEBOV攻击的完全防护作用。截至目前, 豚鼠的基因疫苗接种包括了注射裸DNA (Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ (2000) .Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408:605–609) 或通过基因枪传递的DNA (Dowling W等人 (2006) .The influences of glycosylation on the antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Ebola virus GP DNA vaccines. *J Virol* 81:1821–1837; Vanderzanden L等人 (1998) .DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* 246:134–144; 及 Riemenschneider J等人 (2003) .Comparison of individual and combination DNA vaccines for *B. anthracis*, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* 21:4071–4080), 不过, 任一种方法都需要至少三次疫苗接种来实现完全的防护作用。本文中的改善的防护作用可能归因于稳健Ab的诱导, 因为单次DNA疫苗接种产生的GP特异性IgG结合剂滴度在量值上与在基因枪施药之后受保护动物中的滴度相当; DNA疫苗接种在单次施药之后分别诱导3.85和2.18log<sub>10</sub>ZGP和MGP特异性Ab滴度, 与在三次基因枪疫苗接种之后分别为2.7和3.01log<sub>10</sub>的ZGP和MGP特异性Ab滴度形成对比。对于与在豚鼠中进行的替代性‘单剂量’保护策略相比较, Ag偶合的病毒样粒子(virus-like particle, VLP)平台产生的Ab滴度仅略高于在DNA疫苗接种之后观察到的滴度 (Swenson DL, Warfield KL, Negley DL, Schmaljohn A, Aman MJ, Bavari S (2005) .Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* 23:3033–3042)。此外, 重组腺病毒(recombinant adenovirus, rAd)方法诱导的ZGP特异性NAb滴度低于由单次DNA疫苗接种所得到的滴度(终点稀释液滴度倒数为53对比本文中的88) (Kobinger GP等人 (2006)

.Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus.Virology 346:394-401)。用rVSV进行疫苗接种(Jones SM等人(2007) .Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever.J Infect Dis 196增刊2:S404-412)产生的ZGP特异性Ab滴度类似于当前的平台。总体而言,这些数据证实,DNA疫苗接种能够诱导结合和中和Ab,其与非复制性病毒平台相当并且这些数据可能部分有助于解释本文中的较高豚鼠存活率数据。

[0220] 通过保护性DNA疫苗接种产生NAb可能因转基因表达的成熟GP结构而获益。体外转染研究确定,疫苗编码的GP得到高度表达,翻译后裂解(图1B),转运到细胞表面上,并且在空间上阻碍了细胞表面分子的免疫检测(图1C)。因此,本文中形成的疫苗免疫原很有可能成熟成为异三聚体棘突(spike),其在感染期间病毒体组装之后将另外起到功能作用。这对于病毒学相关性中和决定肽的产生和展示极为重要,而这随后将决定构象依赖性Nab的诱导(Dowling W等人(2007) .Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines.J Virol 81:1821-1837;Shedlock DJ,Bailey MA,Popernack PM,Cunningham JM,Burton DR,Sullivan NJ(2010) .Antibody-mediated neutralization of Ebola virus can occur by two distinct mechanisms.Virology 401:228-235)。因此,就这一点来说,天然锚定结构的表达在产生NAb的能力方面可能优于可溶性衍生物(Sullivan NJ等人(2006) .Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs.PLoS Med 3:e177;Xu L等人(1998) .Immunization for Ebola virus infection.Nat Med 4:37-42)。

[0221] 为了更好地表征如由保护性疫苗所驱动的T细胞反应,在小鼠中进行了免疫原性和功效研究,并且测定了‘单剂量’DNA疫苗接种针对mZEBOV的防护作用(图5A-图5D)。截至目前,在这一模型中赋予完全的防护作用的最有效平台是VLP,其中利用了(Warfield KL等人(2005) .Induction of humoral and CD8+T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection.J Immunol 175:1184-1191; Warfield KL,Swenson DL,Olinger GG,Kalina WV,Aman MJ,Bavari S(2007) .Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge.J Infect Dis 196增刊2:S430-437)或未利用(Sun Y等人(2009) .Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells.Virology 383:12-21)佐剂、rAd疫苗接种(Kobinger GP等人(2006)同上文;Choi JH等人(2012) .A single sublingual dose of an adenovirus-based vaccine protects against lethal Ebola challenge in mice and guinea pigs.Mol Pharm 9: 156-167;Richardson JS等人(2009) .Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine.PLoS One 4:e5308)或rRABV疫苗接种(Blaney JE等人(2011) .Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses.J Virol 85:10605-10616)。然而,T细胞反应的表征在这些研究中受到严重限制并且局限于用两剂(Warfield KL,(2007),同上文)或一剂(Warfield KL等人(2005),同上文)先前描述的含有ZGP T细胞表位的肽进行的脾细胞刺激(Warfield KL的人(2005),同上文;Olinger GG等人(2005),同

上文;Kobinger GP等人(2006),同上文;Sun Y等人(2009).Choi, JH等人(2012)。在本文中,报导了由保护性疫苗接种引起的稳健并且广泛的CTL诱导,如通过修改过的新颖T细胞检验深入分析的(图4A和表1-6)。总体而言,鉴别出52个新颖的T细胞表位,包括主要出现在GP的高度保守区域中的众多免疫优势表位。在所鉴别的总计22个ZGP表位中,先前仅报导了4个。此外,先前描述了20个MGP表位中的仅一个(Kalina WV, Warfield KL, Olinger GG, Bavari S (2009). Discovery of common marburgvirus protective epitopes in a BALB/c mouse model. Virology 6:132)及16个SGP表位中的一个。因此,这是截至目前有关临床前GP表位的最全面的报导,描述了在两种不同小鼠遗传背景中来自多种丝状病毒的GP表位。

[0222] 由这些分析得到的另一个新颖发现是疫苗诱导的次优势T细胞反应的评估,经显示,这些反应占总T细胞反应相当大的百分比,在12%-74%之间的较宽范围内(图4D)。这是特别重要的,因为次优势反应将明显有助于防护作用。由此可以为未来确定次优势和免疫优势表位T细胞反应对防护作用的特定贡献提供证据。值得注意的是,使用传统的用于表位鉴别的基质阵列肽库可能忽略这些反应。因此,先前的研究中有限的表位检测可能与疫苗诱导的免疫性水平较低、使用不太敏感的标准检验和/或使用有利于检测免疫优势CD8+表位的肽布置和/或算法直接相关。

[0223] 尽管针对丝状病毒的防护作用的免疫相关性仍存在争议,但由这一高免疫原性方法产生的数据提供了一个利用该方法研究如由保护性疫苗所驱动的T细胞免疫性的独特机遇。在本文中,DNA疫苗接种强烈诱导ZGP特异性T细胞,其中大部分是以高水平表达T-bet的Th1型多功能CTL为特征,经显示,其也与人体中T细胞的细胞毒性相关。很明显,能够主要产生体液免疫应答及倾向于CD4+T细胞的细胞免疫性的先前的独立DNA疫苗平台可能从体内EP传递获益,目前已证实,该体内EP传递可在NHP和诊所中诱导有效CD8+T细胞。因此,本文中的数据与这种在NHP免疫原性和功效研究中作为独立或预致敏-免疫加强模式的方法一致。该方法提供了一种引人注目的疫苗接种策略,该策略可以快速并且廉价地修改和/或产生以用于在丝状病毒科生物威胁状况和爆发期间快速响应。此外,这一模型方法提供了一个研究针对丝状病毒疾病的保护性免疫相关性的重要工具,并且可以用于现有的平台以指导未来的策略。

#### [0224] 实施例2

[0225] 提供一种包含三个质粒的三价疫苗。第一个质粒包含了编码扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,其是基于ZEBOV CON, SEQ ID NO:1,经修饰成在扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第二个质粒包含了编码苏丹埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,其是基于SUDV CON, SEQ ID NO:2,经修饰成在苏丹埃博拉病毒共有免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第三个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉(MARV)免疫原的核酸序列,其是基于MARV ANG, SEQ ID NO:3,经修饰成在马尔堡马尔堡病毒安哥拉免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。

#### [0226] 实施例3

[0227] 提供了五个质粒的疫苗。第一个质粒包含了编码扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,该免疫原为ZEBOV CON, SEQ ID NO:1。第二个质粒包含了编码苏丹埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,该免疫原为SUDV CON, SEQ ID NO:2。第三个质粒包含了编码SEQ ID NO:4的核酸序列,即马尔堡马尔堡病毒Ravn株从集共有序列(MARV-RAV CON),其使用了

马尔堡马尔堡病毒Ravn株、Durba株(09DRC99)及Uganda株(02Uga07Y)。第四个质粒包含了编码SEQ IDNO:5的核酸序列,即马尔堡马尔堡病毒Ozolin株丛集共有序列(MARV-OZO CON),其使用了Ozolin株、Uganda株(01Uga07)和Durba株(05和07DRC99)。第五个质粒包含了编码SEQ IDNO:6的核酸序列,即马尔堡马尔堡病毒Musoke株丛集共有序列(MARV-MUS CON),其使用了(Musoke株、Popp株和Leiden株)。

[0228] 实施例4

[0229] 提供了五个质粒的疫苗。第一个质粒包含了编码扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,其是基于ZEBOV CON,SEQ ID NO:1,经修饰成在扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第二个质粒包含了编码苏丹埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,其是基于SUDV CON,SEQ ID NO:2,经修饰成在苏丹埃博拉病毒共有免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第三个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒Rav共有序列的核酸序列,其是基于SEQ IDNO:4,即马尔堡马尔堡病毒Ravn株丛集共有序列(MARV-RAV CON),使用了马尔堡马尔堡病毒Ravn株、Durba株(09DRC99)和Uganda株(02Uga07Y),并且经修饰成在该共有马尔堡马尔堡病毒Rav株免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第四个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒Ozo共有序列的核酸序列,该序列是基于SEQ IDNO:5,即马尔堡马尔堡病毒Ozolin株丛集共有序列(MARV-OZO CON),使用了Ozolin株、Uganda株(01Uga07)和Durba株(05和07DRC99),并且经修饰成在该共有马尔堡马尔堡病毒Ozo株免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第五个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒Mus共有序列的核酸序列,其是基于SEQ IDNO:6,即马尔堡马尔堡病毒Musoke株丛集共有序列(MARV-MUS CON),使用了(Musoke株、Popp株和Leiden株),并且经修饰成在该共有马尔堡马尔堡病毒Mus株免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。

[0230] 实施例5

[0231] 提供了六个质粒的疫苗。第一个质粒包含了编码扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,该免疫原为ZEBOV CON,SEQ ID NO:1。第二个质粒包含了编码苏丹埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,该免疫原为SUDV CON,SEQ ID NO:2。第三个质粒包含了编码SEQ IDNO:4的核酸序列,即马尔堡马尔堡病毒Ravn株丛集共有序列(MARV-RAV CON),其使用了马尔堡马尔堡病毒Ravn株、Durba株(09DRC99)及Uganda株(02Uga07Y)。第四个质粒包含了编码SEQ IDNO:5的核酸序列,即马尔堡马尔堡病毒-Ozolin株丛集共有序列(MARV-OZO CON),其使用了Ozolin株、Uganda株(01Uga07)和Durba株(05和07DRC99)。第五个质粒包含了编码SEQ IDNO:6的核酸序列,即马尔堡马尔堡病毒Musoke株丛集共有序列(MARV-MUS CON),其使用了(Musoke株、Popp株和Leiden株)。第六个质粒包含了编码SEQ IDNO:3,即马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白免疫原的核酸序列。

[0232] 实施例6

[0233] 提供了五个质粒的疫苗。第一个质粒包含了编码扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,该序列是基于ZEBOV CON,SEQ ID NO:1,经修饰成在扎伊尔埃博拉病毒共有免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第二个质粒包含了编码苏丹埃博拉病毒共有免疫原的核酸序列,该序列是基于SUDV CON,SEQ ID NO:2,经修饰成在苏丹埃博拉病毒共有免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第三个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒Rav共有序列的核酸序列,其是基于SEQ IDNO:4,即马尔堡马尔堡病毒Ravn丛集共有序列(MARV-RAV CON),使用

了马尔堡马尔堡病毒Ravn株、Durba株(09DRC99)和Uganda株(02Uga07Y),并且经修饰成在该共有马尔堡马尔堡病毒Rav株免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第四个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒Ozo共有序列的核酸序列,其是基于SEQ IDNO:5,即马尔堡马尔堡病毒-Ozolin从集共有序列(MARV-OZO CON),使用了Ozolin株、Uganda株(01Uga07)和Durba株(05和07DRC99),并且经修饰成在该共有马尔堡马尔堡病毒Ozo株免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第五个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒Mus共有序列的核酸序列,其是基于SEQ IDNO:6,即马尔堡马尔堡病毒Musoke从集共有序列(MARV-MUS CON),使用了(Musoke株、Popp株和Leiden株),并且经修饰成在该共有马尔堡马尔堡病毒-Mus株免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。第六个质粒包含了编码马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白免疫原的核酸序列,其是基于MARV ANG,SEQ ID NO:3,经修饰成在马尔堡马尔堡病毒安哥拉免疫原的N末端处包括一个IgE信号肽。

[0234] 表1

[0235] 质粒疫苗pMARV

[0236] GP序列MARV ANG

肽编号	序列	SEQ ID NO:	位置	ELISPOT			FACS T细胞限制性
				H-2	AVE	±SEM	
[0237]	IQGVKTLPILEIASN	7	13-27	d	62	34	4+
	ASNIQPQNVDSVCSG	8	25-39	b	743	186	8+
	SKRWAFRAGVPPKNV	9	67-81	b	694	204	4+
	GKVFTEGNIAAMIVN	10	157-171	d	602	75	4+
	GNIAAMIVNKTVHKM	11	163-177	b/d	126	28	8+
	GNIAAMIVNKTVHKM	12		d	30	10	4+
	IVNKTVHKMIFSRQG	13	169-183	d	92	17	4+
	HKMIFSRQQGQYRHM	14	175-189	d	31	10	4+
	RQQGQYRHMNLSTTN	15	181-195	b	674	112	8+
	RHMNLSTTNKYWTSS	16	187-201	b	44	16	8+
	LPTENPTTAKSTNST	17	385-399	b/d	398/16	107/2	4+
	PNSTAQHLVYFRRKKR	18	421-435	d	29	6	4+
	HLVYFRRKRNLWRE	19	427-441	d	145	18	4+
	GLSWIPFFGPGIEGL	20	529-543	b	26	8	4+
	GLIKNQNNLVCRLRR	21	547-561	d	29	10	4+
	NNLVCRLRRRLANQTA	22	553-567	d	34	13	4+
	TTEERTFSLINRHAI	23	577-591	b	46	18	8+
	HAIDFLLARWGGTCK	24	589-603	d	63	12	4+
	TCKVLGPDCIGIED	25	601-615	b	97	37	4+

[0238] “含表位肽是通过IFN  $\gamma$  ELISPOT鉴别( $\geq 10SFC/10^6$ 个脾细胞及 $\geq 80\%$ 的反应率),然后通过FACS确定(获取 $\geq 3-5 \times 10^4$ 个CD3+细胞)。各自的反应通过FACS进一步表征(CD3+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞对CD4和/或CD8的表达)。预测的CD8+表位加下划线(由IEDB得到最佳一致性%秩)并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*)展示。

[0239] 表2

[0240] 质粒疫苗pEBOS

[0241] GP序列SUDV CON

肽编号	序列	SEQ ID NO:	位置	ELISPOT			FACS T细胞限制性
				H-2	AVE	±SEM	
[0242]	4 FFVWVIIILFQKAFSM	26	19-33	b	310	139	8+
	15 RWGFRSGVPPKVVSY	27	85-99	b	108	59	4+
	19 YNLEIKKPDGSECLP	28	109-123	b	55	25	4+
	24 HKAQGTGPGCAGDFAF	29	139-153	d	13	3	8+
	27 GAFFLYDRLASTVIY	30	157-171	d	29	9	8+
	30 NFAEGVIAFLILAKP	31	175-189	d	31	6	4+
	36 SYYATSYLEYEIENF	32	211-225	b	60	16	4+
	41 FVLLDRPHTPQFLFQ	33	241-255	d	338	55	8+
	78 NITTAVKTVLPQEST	34	463-477	b/d	28/105	12/18	4+
	82 TGILGSLGLRKRSRR	35	487-501	d	82	14	4+
	83 LGLRKRSRRQVNTRA	36	493-507	d	69	12	4+
	89 IA WIPYFGPGAEIY	37	529-543	b	123	40	8+/4+
	97 TELRTYTIILNRKAI	38	577-591	d	12	5	4+
	101 CRILGPDCIEPHDW	39	601-615	b	80	41	4+
	105 QIIHDFIDNPLPNQD	40	625-639	b	28	23	4+
	110 GIGITGIIIAIIALL	41	655-669	b	27	19	8+

[0243] “含表位肽是通过IFN  $\gamma$  ELISPOT鉴别( $\geq 10SFC/10^6$ 个脾细胞及 $\geq 80\%$ 的反应率)，然后通过FACS确定(获取 $\geq 3-5 \times 10^4$ 个CD3+细胞)。各自的反应通过FACS进一步表征(CD3+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞对CD4和/或CD8的表达)。预测的CD8+表位加下划线(由IEDB得到最佳一致性%秩)并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*)展示。

[0244] 表3

[0245] 质粒疫苗pEBOZ

[0246] GP序列ZEBOV CON

肽编号	序列	SEQ ID NO:	位置	ELISPOT			FACS T细胞限制性
				H-2	AVE	±SEM	
[0247]	6 FSJPLGVIIHNSTLQV	42	31-45	d	78	31	8+
	15 RWGFRSGVPPKVVNY	43	85-99	b	44	12	4+
	19 YNLEIKKPDGSECLP	44	109-123	b	29	12	4+
	24 HKVSGTGPCAGDFAF	45	139-153	d	484	85	8+
	27 GAFFLYDRLASTVIY	46	157-171	d	72	18	8+
	30 TFAEGVVAFLILPQA	47	175-189	d	581	85	4+
	32 PQAKKDFSSHPLRE	48	187-201	b	18	6	4+
	33 FFSSHPLREPVNATE	49	193-207	b	21	8	4+
	40 EVDNLTYYQLESRFT	50	235-249	d	32	17	4+
	41 YVQLESRFTPQFLLQ	51	241-255	d	97	23	4+
	48 TTIGEWAFWETKKNL	52	283-297	d	219	70	4+
	49 AFWETKKNLTRKIRS	53	289-303	d	32	15	4+
	50 KNLTRKIRSEELSFT	54	295-309	d	105	37	4+
	60 SQGREA AVSHLTTLA	55	355-369	b	16	7	4+
	65 DNSTHNTPVYKLDIS	56	385-399	d	29	18	4+
	66 TPVYKLDISEATQVE	57	391-405	d	371	118	4+
	71 PPATTAAGPPKAENT	58	421-435	b	21	8	4+
	84 TRREAI VNAQPKCNP	59	499-513	b	12	5	8+
	89 IA WIPYFGPGAEIY	60	529-543	b	93	8	8+/4+
	97 TELRTFSILNRKAI	61	577-591	b/d	14/82	4/42	8+
	101 CHILGPDCIEPHDW	62	601-615	b	96	62	4+

[0248] “含表位肽是通过IFN  $\gamma$  ELISPOT鉴别( $\geq 10SFC/10^6$ 个脾细胞及 $\geq 80\%$ 的反应率)，然后通过FACS确定(获取 $\geq 3-5 \times 10^4$ 个CD3+细胞)。各自的反应通过FACS进一步表征(CD3+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞对CD4和/或CD8的表达)。预测的CD8+表位加下划线(由IEDB得到最佳一致性%秩)并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*)展示。

致性%秩) 并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*) 展示。

[0249] 表4

[0250] 质粒疫苗pMARV

[0251] GP序列MARV ANG

[0252] 最佳一致性%秩UEDB)

肽编号	序列	SEQ ID NO:	CD8+ (<0.5)				CD4+ (<25)			先前定义 (80% Blast; Allele
			D <sup>b</sup>	K <sup>b</sup>	D <sup>d</sup>	K <sup>d</sup>	L <sup>d</sup>	I-A <sup>b</sup>	I-A <sup>d</sup>	
[0253]	3 IQGVKTLPILEIASN	7							12.1	
	5 ASNIQPQNVDSCSG	8	0.4							
	12 SKRWAFRAGVPPKNV	9						0.8		
	27 GKVFTEGNIAAMIVN	10						12.9		
	28 GNIAAMIVNKTVHKM	11	0.2						3.9	
	GNIAAMIVNKTVHKM	12	0.2						3.9	
	29 IVNKTVHKMIFSRQG	13							17.2	
	30 HKMIFSRQGQGYRH	14								
	31 RQGQGYRHMMNLST	15		0.1					23.9	
	N									
	32 RHMMNLSTNKYWTSS	16								
	65 LPTEENPTTAKSTNST	17						24.0		
	71 PNSTAQHLVYFRRKR	18								7.5
	72 HLVYFRRKRNILWRE	19			0.3					8.3
	89 GLSWIPFFGPGIEGL	20						7.0		
	92 GLIKNQNNLVCRLLR	21								
	93 NNLVCRLLRLANQTA	22							13.3	
	97 TTEERTFSLINRHAI	23	0.1		0.4					
	99 HAIDFLLARWGGTCK	24								21.8
	101 TCKVLGPDCIGIED	25		0.4						

[0254] “含表位肽是通过IFN  $\gamma$  ELISPOT鉴别( $\geq 10\text{SFC}/10^6$ 个脾细胞及 $\geq 80\%$ 的反应率)，然后通过FACS确定(获取 $\geq 3-5 \times 10^4$ 个CD3+细胞)。各自的反应通过FACS进一步表征(CD3+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞对CD4和/或CD8的表达)。预测的CD8+表位加下划线(由IEDB得到最佳一致性%秩) 并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*) 展示。

[0255] 表5

[0256] 质粒疫苗pEBOS

[0257] GP序列SUDV CON

[0258] 最佳一致性%秩 (IEDB)

肽编号	序列	SEQ ID NO:	CD8+ (<0.5)				CD4+ (<25)			先前定义 (80% Blast; Allele
			D <sup>b</sup>	K <sup>b</sup>	D <sup>d</sup>	K <sup>d</sup>	L <sup>d</sup>	I-A <sup>b</sup>	I-A <sup>d</sup>	
[0259]	4 FFVWVIIILFQKAFSM	26		0.4						
	15 RWGFRSGVPPKVVSY	27						1.2		
	19 YNLEIKKPDGSECLP	28								
	24 HKAQGTGPCPGDYAF	29					0.3			
	27 GAFFLYDRLASTVIY	30		0.3				21.1		23.4
	30 NFAEGVIAFLILAKP	31			0.1					
	36 SYYATSYLEYEIENF	32	0.4		0.3	0.1				
	41 FVLLDRPHTPQFLFQ	33					0.1			
	78 NITTAVKTVLPQEST	34							7.2	
	82 TGILGSLGLRKRKSRR	35								17.2
	83 LGLRKRSRRQVNTRA	36								
	89 IA WIPYFGPGAEQIY	37			0.1			3.0		
	97 TELRTYTILNRKAID	38	0.1						18.5	21.2
	101 CRILGPDC CIEPHDW	39								
	105 QIIHDFIDNPLPNQD	40	0.3							
	110 GIGITGIII AII ALL	41								

[0260] “含表位肽是通过IFN  $\gamma$  ELISPOT鉴别( $\geq 10SFC/10^6$ 个脾细胞及 $\geq 80\%$ 的反应率)，然后通过FACS确定(获取 $\geq 3-5 \times 10^4$ 个CD3+细胞)。各自的反应通过FACS进一步表征(CD3+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞对CD4和/或CD8的表达)。预测的CD8+表位加下划线(由IEDB得到最佳一致性%秩)并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*)展示。

[0261] 表6

[0262] 质粒疫苗pEB02

[0263] GP序列ZEBOV CON

[0264]

最佳一致性%秩 (IEDB)

肽编号	序列	SEQ ID NO:	CD8+ (<0.5)				CD4+ (<25)			先前定义 (80% Blast; Allele
			D <sup>b</sup>	K <sup>b</sup>	D <sup>d</sup>	K <sup>d</sup>	L <sup>d</sup>	I-A <sup>b</sup>	I-A <sup>d</sup>	
[0265]	6 FSIPLGVIHNSTLQV	42					0.2			
	15 RWGFRSGVPPKVVNY	43						1.2		
	19 YNLEIKKPDGSECLP	44								
	24 HKVSGTGPCAGDFAF	45					0.1	14.9		
	27 GAFFLYDRLASTVIY	46		0.3				21.1		23.4
	30 TFAEGVVAFLILPQA	47			0.2				21.6	
	32 PQAKKDFSSHPLRE	48	0.1	0.4				16.4		
	33 FFSSHPLREPVNATE	49						14.7		
	40 EVNDLTYVQLESRFT	50				0.4			19.6	
	41 YVQLESRFTPQFLLQ	51								
	48 TTIGEWAFWETKKNL	52								12.9
	49 AFWETKKNLTRKIRS	53								22.9
	50 KNLTRKIRSEELSFT	54								22.7
	60 SQGREAAVSHLTTLA	55	0.3					23.1	3.9	
	65 DNSTHNTPVYKLDIS	56								
	66 TPVYKLDISEATQVE	57						22.6	5.5	
	71 PPATTAAGPPKAENT	58						2.1		
	84 TRREAIVNAQPKCNP	59	0.3					14.6	7.9	
	89 LA WIPYFGPGAEQIY	60			0.1			0.8		
	97 TELRTFSILNRKAID	61	0.1							22.2
	101 CHILGPDC CIEPHDW	62								

[0266] “含表位肽是通过IFN  $\gamma$  ELISPOT鉴别( $\geq 10SFC/10^6$ 脾细胞及 $\geq 80\%$ 的反应率)，然

后通过FACS确定(获取 $\geq 3-5 \times 10^4$ 个CD3+细胞)。各自的反应通过FACS进一步表征(CD3+/CD44+/IFN  $\gamma$  +细胞对CD4和/或CD8的表达)。预测的CD8+表位加下划线(由IEDB得到最佳一致性%秩)并且参考先前描述的表位。免疫优势表位以(\*)展示。

## 序列表

<110> 宾夕法尼亚大学理事会

大卫 B 韦纳

德文 谢德洛克

<120> 丝状病毒共有抗原、由其制备的核酸构建体和疫苗及其使用方法

<130> 133172.04202

<150> 61/623428

<151> 2012-04-12

<160> 66

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 676

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白的合成共有序列

<400> 1

Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg

1 5 10 15

Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser

20 25 30

Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val

35 40 45

Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg

50 55 60

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro

65 70 75 80

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val

85 90 95

Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu

100 105 110

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly

115 120 125

Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr

130 135 140

Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe

145 150 155 160

Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe

165	170	175
Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp		
180	185	190
Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp		
195	200	205
Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly		
210	215	220
Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr		
225	230	235
Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu		
245	250	255
Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys		
260	265	270
Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp		
275	280	285
Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu		
290	295	300
Glu Leu Ser Phe Thr Ala Val Ser Asn Arg Ala Lys Asn Ile Ser Gly		
305	310	315
Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser Asp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Thr		
325	330	335
Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln		
340	345	350
Val His Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu		
355	360	365
Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln Ser Pro Thr Thr Lys Pro Gly Pro		
370	375	380
Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu		
385	390	395
Ala Thr Gln Val Glu Gln His His Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr		
405	410	415
Ala Ser Asp Thr Pro Pro Ala Thr Thr Ala Ala Gly Pro Pro Lys Ala		
420	425	430
Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Ser Thr Asp Leu Leu Asp Pro Ala Thr		
435	440	445
Thr Thr Ser Pro Gln Asn His Ser Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr		
450	455	460
His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly		
465	470	475
		480

Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly  
 485 490 495  
 Arg Arg Thr Arg Arg Glu Ala Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn  
 500 505 510  
 Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly  
 515 520 525  
 Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Thr  
 530 535 540  
 Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln  
 545 550 555 560  
 Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr  
 565 570 575  
 Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe  
 580 585 590  
 Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys  
 595 600 605  
 Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp  
 610 615 620  
 Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp  
 625 630 635 640  
 Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile  
 645 650 655  
 Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys  
 660 665 670  
 Lys Phe Val Phe  
 675  
 <210> 2  
 <211> 676  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白的合成共有序列  
 <400> 2  
 Met Glu Gly Leu Ser Leu Leu Gln Leu Pro Arg Asp Lys Phe Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Phe Phe Val Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Lys Ala Phe Ser  
 20 25 30  
 Met Pro Leu Gly Val Val Thr Asn Ser Thr Leu Glu Val Thr Glu Ile  
 35 40 45

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

355	360	365													
Glu	Gly	Arg	Arg	Val	Asp	Val	Asn	Thr	Gln	Glu	Thr	Ile	Thr	Glu	Thr
370						375						380			
Thr	Ala	Thr	Ile	Ile	Gly	Thr	Asn	Gly	Asn	Asn	Met	Gln	Ile	Ser	Thr
385						390					395				400
Ile	Gly	Thr	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Leu	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr
						405					410				415
Met	Ala	Pro	Ser	Pro	Glu	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Pro	Lys
						420			425			430			
Leu	Pro	Val	Met	Thr	Thr	Glu	Glu	Pro	Thr	Thr	Pro	Pro	Arg	Asn	Ser
						435			440			445			
Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Glu	Ala	Pro	Thr	Leu	Thr	Thr	Pro	Glu	Asn	Ile
						450			455			460			
Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Glu	Ser	Thr	Ser	Asn	Gly
						465			470			475			480
Leu	Ile	Thr	Ser	Thr	Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg
						485			490			495			
Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Gln	Val	Asn	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Lys	Cys	Asn
						500			505			510			
Pro	Asn	Leu	His	Tyr	Trp	Thr	Ala	Gln	Glu	Gln	His	Asn	Ala	Ala	Gly
						515			520			525			
Ile	Ala	Trp	Ile	Pro	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Ile	Tyr	Thr
						530			535			540			
Glu	Gly	Leu	Met	His	Asn	Gln	Asn	Ala	Leu	Val	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln
						545			550			555			560
Leu	Ala	Asn	Glu	Thr	Thr	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Leu	Arg	Ala	Thr
						565			570			575			
Thr	Glu	Leu	Arg	Thr	Tyr	Thr	Ile	Leu	Asn	Arg	Lys	Ala	Ile	Asp	Phe
						580			585			590			
Leu	Leu	Arg	Arg	Trp	Gly	Gly	Thr	Cys	Arg	Ile	Leu	Gly	Pro	Asp	Cys
						595			600			605			
Cys	Ile	Glu	Pro	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Asn	Ile	Thr	Asp	Lys	Ile	Asn
						610			615			620			
Gln	Ile	Ile	His	Asp	Phe	Ile	Asp	Asn	Pro	Leu	Pro	Asn	Gln	Asp	Asn
						625			630			635			640
Asp	Asp	Asn	Trp	Trp	Thr	Gly	Trp	Arg	Gln	Trp	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile
						645			650			655			
Gly	Ile	Thr	Gly	Ile	Ile	Ala	Ile	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Val	Cys	
						660			665			670			

Lys Leu Leu Cys  
 675  
 <210> 3  
 <211> 681  
 <212> PRT  
 <213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白  
 <400> 3  
 Met Lys Thr Thr Cys Leu Leu Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Gly Val  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Leu Pro Ile Leu Glu Ile Ala Ser Asn Ile Gln Pro Gln Asn  
 20 25 30  
 Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His  
 35 40 45  
 Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu  
 50 55 60  
 Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Ala Gly Val Pro Pro Lys Asn  
 65 70 75 80  
 Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser  
 85 90 95  
 Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Thr Asn  
 100 105 110  
 Ile Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Ile His His Ile Gln Gly Gln  
 115 120 125  
 Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe  
 130 135 140  
 Leu Tyr Asp Arg Ile Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Lys Val Phe  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys  
 165 170 175  
 Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr  
 180 185 190  
 Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser Asn Gly Thr Gln Thr Asn Asp  
 195 200 205  
 Thr Gly Cys Phe Gly Thr Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Lys Asn Gln  
 210 215 220  
 Thr Cys Ala Pro Ser Lys Lys Pro Leu Pro Leu Pro Thr Ala His Pro  
 225 230 235 240  
 Glu Val Lys Leu Thr Ser Thr Ser Thr Asp Ala Thr Lys Leu Asn Thr  
 245 250 255

Thr Asp Pro Asn Ser Asp Asp Glu Asp Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gly  
 260 265 270  
 Ser Gly Glu Gln Glu Pro Tyr Thr Thr Ser Asp Ala Ala Thr Lys Gln  
 275 280 285  
 Gly Leu Ser Ser Thr Met Pro Pro Thr Pro Ser Pro Gln Pro Ser Thr  
 290 295 300  
 Pro Gln Gln Gly Gly Asn Asn Thr Asn His Ser Gln Gly Val Val Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Pro Gly Lys Thr Asn Thr Ala Gln Pro Ser Met Pro Pro His  
 325 330 335  
 Asn Thr Thr Thr Ile Ser Thr Asn Asn Thr Ser Lys His Asn Leu Ser  
 340 345 350  
 Thr Pro Ser Val Pro Ile Gln Asn Ala Thr Asn Tyr Asn Thr Gln Ser  
 355 360 365  
 Thr Ala Pro Glu Asn Glu Gln Thr Ser Ala Pro Ser Lys Thr Thr Leu  
 370 375 380  
 Leu Pro Thr Glu Asn Pro Thr Thr Ala Lys Ser Thr Asn Ser Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Ser Pro Thr Thr Val Pro Asn Thr Thr Asn Lys Tyr Ser Thr Ser  
 405 410 415  
 Pro Ser Pro Thr Pro Asn Ser Thr Ala Gln His Leu Val Tyr Phe Arg  
 420 425 430  
 Arg Lys Arg Asn Ile Leu Trp Arg Glu Gly Asp Met Phe Pro Phe Leu  
 435 440 445  
 Asp Gly Leu Ile Asn Ala Pro Ile Asp Phe Asp Pro Val Pro Asn Thr  
 450 455 460  
 Lys Thr Ile Phe Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ala Ser Ala Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Asp Gln His Ala Ser Pro Asn Ile Ser Leu Thr Leu Ser Tyr Phe Pro  
 485 490 495  
 Lys Val Asn Glu Asn Thr Ala His Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys  
 500 505 510  
 Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala  
 515 520 525  
 Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr  
 530 535 540  
 Thr Ala Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg  
 545 550 555 560  
 Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val

565	570	575	
Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp			
580	585	590	
Phe Leu Leu Ala Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp			
595	600	605	
Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Arg Asn Ile Ser Glu Gln Ile			
610	615	620	
Asp Gln Ile Lys Lys Asp Glu Gln Lys Glu Gly Thr Gly Trp Gly Leu			
625	630	635	640
Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly			
645	650	655	
Ile Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile			
660	665	670	
Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly			
675	680		
<210> 4			
<211> 681			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 马尔堡马尔堡病毒糖蛋白的合成共有序列			
<400> 4			
Met Lys Thr Ile Tyr Phe Leu Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Ser Ile			
1	5	10	15
Lys Thr Leu Pro Val Leu Glu Ile Ala Ser Asn Ser Gln Pro Gln Asp			
20	25	30	
Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His			
35	40	45	
Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu			
50	55	60	
Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Thr Gly Val Pro Pro Lys Asn			
65	70	75	80
Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser			
85	90	95	
Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Ser Asn			
100	105	110	
Ile Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Val His His Ile Gln Gly Gln			
115	120	125	
Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe			

130	135	140
Leu Tyr Asp Arg Val Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Lys Val Phe		
145	150	155
Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Arg		
165	170	175
Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr		
180	185	190
Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser Asn Glu Thr Arg Arg Asn Asp		
195	200	205
Thr Gly Cys Phe Gly Ile Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Asn Asn Gln		
210	215	220
Thr Cys Ser Pro Ser Leu Lys Pro Pro Ser Leu Pro Thr Val Thr Pro		
225	230	235
Ser Ile His Ser Thr Asn Thr Gln Ile Asn Thr Ala Lys Ser Gly Thr		
245	250	255
Met Asn Pro Ser Ser Asp Asp Glu Asp Leu Met Ile Ser Gly Ser Gly		
260	265	270
Ser Gly Glu Gln Gly Pro His Thr Thr Leu Asn Val Val Thr Glu Gln		
275	280	285
Lys Gln Ser Ser Thr Ile Leu Ser Thr Pro Ser Leu His Pro Ser Thr		
290	295	300
Ser Gln His Glu Gln Asn Ser Thr Asn Pro Ser Arg His Ala Val Thr		
305	310	315
Glu His Asn Gly Thr Asp Pro Thr Thr Gln Pro Ala Thr Leu Leu Asn		
325	330	335
Asn Thr Asn Thr Pro Thr Tyr Asn Thr Leu Lys Tyr Asn Leu Ser		
340	345	350
Thr Pro Ser Pro Pro Thr Arg Asn Ile Thr Asn Asn Asp Thr Gln Arg		
355	360	365
Glu Leu Ala Glu Ser Glu Gln Thr Asn Ala Gln Leu Asn Thr Thr Leu		
370	375	380
Asp Pro Thr Glu Asn Pro Thr Thr Ala Gln Asp Thr Asn Ser Thr Thr		
385	390	395
Asn Ile Ile Met Thr Thr Ser Asp Ile Thr Ser Lys His Pro Thr Asn		
405	410	415
Ser Ser Pro Asp Ser Ser Pro Thr Thr Arg Pro Pro Ile Tyr Phe Arg		
420	425	430
Lys Lys Arg Ser Ile Phe Trp Lys Glu Gly Asp Ile Phe Pro Phe Leu		
435	440	445

Asp Gly Leu Ile Asn Thr Glu Ile Asp Phe Asp Pro Ile Pro Asn Thr  
 450 455 460  
 Glu Thr Ile Phe Asp Glu Ser Pro Ser Phe Asn Thr Ser Thr Asn Glu  
 465 470 475 480  
 Glu Gln His Thr Pro Pro Asn Ile Ser Leu Thr Phe Ser Tyr Phe Pro  
 485 490 495  
 Asp Lys Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys  
 500 505 510  
 Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala  
 515 520 525  
 Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr  
 530 535 540  
 Thr Ala Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg  
 545 550 555 560  
 Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val  
 565 570 575  
 Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp  
 580 585 590  
 Phe Leu Leu Thr Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp  
 595 600 605  
 Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Lys Asn Ile Ser Glu Gln Ile  
 610 615 620  
 Asp Lys Ile Arg Lys Asp Glu Gln Lys Glu Glu Thr Gly Trp Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly  
 645 650 655  
 Ile Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile  
 660 665 670  
 Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly  
 675 680  
 <210> 5  
 <211> 681  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 马尔堡马尔堡病毒糖蛋白的合成共有序列  
 <400> 5  
 Met Arg Thr Thr Cys Phe Phe Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Gly Ile  
 1 5 10 15

Lys Thr Leu Pro Ile Leu Glu Ile Ala Ser Asn Asp Gln Pro Gln Asn  
 20 25 30

Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His  
 35 40 45

Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu  
 50 55 60

Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Thr Gly Val Pro Pro Lys Asn  
 65 70 75 80

Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser  
 85 90 95

Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Thr Asn  
 100 105 110

Val Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Ile His His Ile Gln Gly Gln  
 115 120 125

Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe  
 130 135 140

Leu Tyr Asp Arg Ile Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Lys Val Phe  
 145 150 155 160

Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys  
 165 170 175

Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr  
 180 185 190

Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser Asn Gly Thr Gln Thr Asn Asp  
 195 200 205

Thr Gly Cys Phe Gly Thr Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Lys Asn Gln  
 210 215 220

Thr Cys Ala Pro Ser Lys Thr Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ala Arg Pro  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Pro Thr Ser Thr Pro Thr Asp Ala Thr Arg Leu Asn Thr  
 245 250 255

Thr Asn Pro Asn Ser Asp Asp Glu Asp Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gly  
 260 265 270

Ser Gly Glu Gln Glu Pro Tyr Thr Thr Ser Asp Ala Val Thr Lys Gln  
 275 280 285

Gly Leu Ser Ser Thr Met Pro Pro Thr Pro Ser Pro Gln Pro Gly Thr  
 290 295 300

Pro Gln Gln Gly Gly Asn Asn Thr Asn His Ser Gln Asp Ala Ala Thr  
 305 310 315 320

Glu Leu Asp Asn Thr Asn Thr Thr Ala Gln Pro Pro Thr Pro Ser His

325	330	335
Asn Thr Thr Thr Ile Ser Thr Asn Asn Thr Ser Lys His Asn Leu Ser		
340	345	350
Thr Leu Ser Glu Pro Pro Gln Asn Thr Thr Asn Pro Asn Thr Gln Ser		
355	360	365
Met Ala Thr Glu Asn Glu Lys Thr Ser Ala Pro Pro Lys Thr Thr Leu		
370	375	380
Pro Pro Thr Glu Ser Pro Thr Thr Glu Lys Ser Thr Asn Asn Thr Lys		
385	390	395
Ser Pro Thr Thr Met Glu Pro Asn Thr Thr Asn Gly His Phe Thr Ser		
405	410	415
Pro Ser Ser Thr Pro Asn Ser Thr Thr Gln His Leu Ile Tyr Phe Arg		
420	425	430
Arg Lys Arg Ser Ile Leu Trp Arg Glu Gly Asp Met Phe Pro Phe Leu		
435	440	445
Asp Gly Leu Ile Asn Ala Pro Ile Asp Phe Asp Pro Val Pro Asn Thr		
450	455	460
Lys Thr Ile Phe Asp Glu Ser Ser Ser Gly Ala Ser Ala Glu Glu		
465	470	475
Asp Gln His Ala Ser Ser Asn Ile Ser Leu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro		
485	490	495
His Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys		
500	505	510
Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala		
515	520	525
Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr		
530	535	540
Thr Ala Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg		
545	550	555
Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val		
565	570	575
Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp		
580	585	590
Phe Leu Leu Thr Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp		
595	600	605
Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Arg Asn Ile Ser Glu Gln Ile		
610	615	620
Asp Gln Ile Lys Lys Asp Glu Gln Lys Glu Gly Thr Gly Trp Gly Leu		
625	630	635
		640

Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly  
645 650 655  
Ile Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile  
660 665 670  
Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly  
675 680  
<210> 6  
<211> 681  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 马尔堡马尔堡病毒糖蛋白的合成共有序列  
<400> 6  
Met Lys Thr Thr Cys Leu Phe Ile Ser Leu Ile Leu Ile Gln Gly Ile  
1 5 10 15  
Lys Thr Leu Pro Ile Leu Glu Ile Ala Ser Asn Asn Gln Pro Gln Asn  
20 25 30  
Val Asp Ser Val Cys Ser Gly Thr Leu Gln Lys Thr Glu Asp Val His  
35 40 45  
Leu Met Gly Phe Thr Leu Ser Gly Gln Lys Val Ala Asp Ser Pro Leu  
50 55 60  
Glu Ala Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Thr Gly Val Pro Pro Lys Asn  
65 70 75 80  
Val Glu Tyr Thr Glu Gly Glu Ala Lys Thr Cys Tyr Asn Ile Ser  
85 90 95  
Val Thr Asp Pro Ser Gly Lys Ser Leu Leu Leu Asp Pro Pro Thr Asn  
100 105 110  
Ile Arg Asp Tyr Pro Lys Cys Lys Thr Ile His His Ile Gln Gly Gln  
115 120 125  
Asn Pro His Ala Gln Gly Ile Ala Leu His Leu Trp Gly Ala Phe Phe  
130 135 140  
Leu Tyr Asp Arg Ile Ala Ser Thr Thr Met Tyr Arg Gly Arg Val Phe  
145 150 155 160  
Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys  
165 170 175  
Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr  
180 185 190  
Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Asn Asn Gly Thr Gln Thr Asn Asp  
195 200 205

Thr Gly Cys Phe Gly Ala Leu Gln Glu Tyr Asn Ser Thr Lys Asn Gln  
 210 215 220  
 Thr Cys Ala Pro Ser Lys Ile Pro Ser Pro Leu Pro Thr Ala Arg Pro  
 225 230 235 240  
 Glu Ile Lys Pro Thr Ser Thr Pro Thr Asp Ala Thr Lys Leu Asn Thr  
 245 250 255  
 Thr Asp Pro Asn Ser Asp Asp Glu Asp Leu Ala Thr Ser Gly Ser Gly  
 260 265 270  
 Ser Gly Glu Gln Glu Pro His Thr Thr Ser Asp Ala Val Thr Lys Gln  
 275 280 285  
 Gly Leu Ser Ser Thr Met Pro Pro Thr Pro Ser Pro Gln Pro Ser Thr  
 290 295 300  
 Pro Gln Gln Glu Gly Asn Asn Thr Asp His Ser Gln Asp Ala Val Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Pro Asn Lys Thr Asn Thr Thr Ala Gln Pro Ser Met Pro Pro His  
 325 330 335  
 Asn Thr Thr Ala Ile Ser Thr Asn Asn Thr Ser Lys His Asn Phe Ser  
 340 345 350  
 Thr Leu Ser Ala Pro Leu Gln Asn Thr Thr Asn Tyr Asp Thr Gln Ser  
 355 360 365  
 Thr Ala Thr Glu Asn Glu Gln Thr Ser Ala Pro Ser Lys Thr Thr Leu  
 370 375 380  
 Pro Pro Thr Gly Asn Leu Thr Thr Ala Lys Ser Thr Asn Asn Thr Lys  
 385 390 395 400  
 Gly Pro Thr Thr Ala Pro Asn Met Thr Asn Gly His Leu Thr Ser  
 405 410 415  
 Pro Ser Pro Thr Pro Asn Pro Thr Thr Gln His Leu Val Tyr Phe Arg  
 420 425 430  
 Lys Lys Arg Ser Ile Leu Trp Arg Glu Gly Asp Met Phe Pro Phe Leu  
 435 440 445  
 Asp Gly Leu Ile Asn Ala Pro Ile Asp Phe Asp Pro Val Pro Asn Thr  
 450 455 460  
 Lys Thr Ile Phe Asp Glu Ser Ser Ser Ser Gly Ala Ser Ala Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Asp Gln His Ala Ser Pro Asn Ile Ser Leu Thr Leu Ser Tyr Phe Pro  
 485 490 495  
 Asn Ile Asn Glu Asn Thr Ala Tyr Ser Gly Glu Asn Glu Asn Asp Cys  
 500 505 510  
 Asp Ala Glu Leu Arg Ile Trp Ser Val Gln Glu Asp Asp Leu Ala Ala

515	520	525
Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu Tyr		
530	535	540
Thr Ala Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg		
545	550	555
Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala Lys Ser Leu Glu Leu Leu Leu Arg Val		
565	570	575
Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile Asp		
580	585	590
Phe Leu Leu Thr Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp		
595	600	605
Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp Leu Ser Arg Asn Ile Ser Glu Gln Ile		
610	615	620
Asp Gln Ile Lys Lys Asp Glu Gln Lys Glu Gly Thr Gly Trp Gly Leu		
625	630	635
Gly Gly Lys Trp Trp Thr Ser Asp Trp Gly Val Leu Thr Asn Leu Gly		
645	650	655
Ile Leu Leu Leu Leu Ser Ile Ala Val Leu Ile Ala Leu Ser Cys Ile		
660	665	670
Cys Arg Ile Phe Thr Lys Tyr Ile Gly		
675	680	
<210> 7		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白 peptides		
<400> 7		
Ile Gln Gly Val Lys Thr Leu Pro Ile Leu Glu Ile Ala Ser Asn		
1	5	10
15		
<210> 8		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽		
<400> 8		
Ala Ser Asn Ile Gln Pro Gln Asn Val Asp Ser Val Cys Ser Gly		
1	5	10
15		
<210> 9		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽		

&lt;400&gt; 9

Ser Lys Arg Trp Ala Phe Arg Ala Gly Val Pro Pro Lys Asn Val  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

&lt;400&gt; 10

Gly Lys Val Phe Thr Glu Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

&lt;400&gt; 11

Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys Met  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

&lt;400&gt; 12

Gly Asn Ile Ala Ala Met Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys Met  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

&lt;400&gt; 13

Ile Val Asn Lys Thr Val His Lys Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

&lt;400&gt; 14

His Lys Met Ile Phe Ser Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

<400> 15

Arg Gln Gly Gln Gly Tyr Arg His Met Asn Leu Thr Ser Thr Asn  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

<400> 16

Arg His Met Asn Leu Thr Ser Thr Asn Lys Tyr Trp Thr Ser Ser  
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

<400> 17

Leu Pro Thr Glu Asn Pro Thr Thr Ala Lys Ser Thr Asn Ser Thr  
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

<400> 18

Pro Asn Ser Thr Ala Gln His Leu Val Tyr Phe Arg Arg Lys Arg  
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

<400> 19

His Leu Val Tyr Phe Arg Arg Lys Arg Asn Ile Leu Trp Arg Glu  
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽

<400> 20

Gly Leu Ser Trp Ile Pro Phe Phe Gly Pro Gly Ile Glu Gly Leu  
 1 5 10 15  
 <210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽  
 <400> 21

Gly Leu Ile Lys Asn Gln Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg Arg  
 1 5 10 15  
 <210> 22  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽  
 <400> 22

Asn Asn Leu Val Cys Arg Leu Arg Arg Leu Ala Asn Gln Thr Ala  
 1 5 10 15  
 <210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽  
 <400> 23

Thr Thr Glu Glu Arg Thr Phe Ser Leu Ile Asn Arg His Ala Ile  
 1 5 10 15  
 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽  
 <400> 24

His Ala Ile Asp Phe Leu Leu Ala Arg Trp Gly Gly Thr Cys Lys  
 1 5 10 15  
 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 马尔堡马尔堡病毒安哥拉2005分离株糖蛋白肽  
 <400> 25

Thr Cys Lys Val Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile Gly Ile Glu Asp  
 1 5 10 15  
 <210> 26  
 <211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 26

Phe Phe Val Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Lys Ala Phe Ser Met

1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 27

Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val Val Ser Tyr

1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 28

Tyr Asn Leu Glu Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro

1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 29

His Lys Ala Gln Gly Thr Gly Pro Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Phe

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 30

Gly Ala Phe Phe Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 31

Asn Phe Ala Glu Gly Val Ile Ala Phe Leu Ile Leu Ala Lys Pro  
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 32

Ser Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Asn Phe  
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 33

Phe Val Leu Leu Asp Arg Pro His Thr Pro Gln Phe Leu Phe Gln  
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 34

Asn Ile Thr Thr Ala Val Lys Thr Val Leu Pro Gln Glu Ser Thr

1	5	10	15
<210> 35			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列			
<400> 35			
Thr Gly Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Arg Lys Arg Ser Arg Arg			
1	5	10	15
<210> 36			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列			
<400> 36			
Leu Gly Leu Arg Lys Arg Ser Arg Arg Gln Val Asn Thr Arg Ala			
1	5	10	15
<210> 37			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列			
<400> 37			
Ile Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Gly Ala Glu Gly Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 38			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列			
<400> 38			
Thr Glu Leu Arg Thr Tyr Thr Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp			
1	5	10	15
<210> 39			
<211> 15			

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 39

Cys Arg Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile Glu Pro His Asp Trp  
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 40

Gln Ile Ile His Asp Phe Ile Asp Asn Pro Leu Pro Asn Gln Asp  
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 41

Gly Ile Gly Ile Thr Gly Ile Ile Ile Ala Ile Ile Ala Leu Leu  
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 42

Phe Ser Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val  
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 43

Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val Val Asn Tyr  
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 44

Tyr Asn Leu Glu Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro  
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 45

Gly Ala Phe Phe Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 46

Gly Ala Phe Phe Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 47

Thr Phe Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala

1	5	10	15											
<210>	48													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列													
<400>	48													
Pro	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Phe	Phe	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Arg	Glu
1		5						10					15	
<210>	49													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人工序列													
<220>														
<223>	扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列													
<400>	49													
Phe	Phe	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Arg	Glu	Pro	Val	Asn	Ala	Thr	Glu
1		5						10					15	
<210>	50													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人工序列													
<220>														
<223>	扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列													
<400>	50													
Glu	Val	Asp	Asn	Leu	Thr	Tyr	Val	Gln	Leu	Glu	Ser	Arg	Phe	Thr
1		5						10					15	
<210>	51													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人工序列													
<220>														
<223>	扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列													
<400>	51													
Tyr	Val	Gln	Leu	Glu	Ser	Arg	Phe	Thr	Pro	Gln	Phe	Leu	Leu	Gln
1		5						10					15	
<210>	52													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人工序列													

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

&lt;400&gt; 52

Thr Thr Ile Gly Glu Trp Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

&lt;400&gt; 53

Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

&lt;400&gt; 54

Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu Glu Leu Ser Phe Thr  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

&lt;400&gt; 55

Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu Ala  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

&lt;400&gt; 56

Asp	Asn	Ser	Thr	His	Asn	Thr	Pro	Val	Tyr	Lys	Leu	Asp	Ile	Ser
1														15

<210> 57  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列  
 <400> 57

Thr	Pro	Val	Tyr	Lys	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ala	Thr	Gln	Val	Glu
1														15

<210> 58  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列  
 <400> 58

Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Pro	Pro	Lys	Ala	Glu	Asn	Thr
1														15

<210> 59  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列  
 <400> 59

Thr	Arg	Arg	Glu	Ala	Ile	Val	Asn	Ala	Gln	Pro	Lys	Cys	Asn	Pro
1														15

<210> 60  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列  
 <400> 60

Leu	Ala	Trp	Ile	Pro	Tyr	Phe	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Gly	Ile	Tyr
1														15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 61

Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp

1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白肽的合成共有序列

<400> 62

Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile Glu Pro His Asp Trp

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人类

<400> 63

Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile Glu Pro His Asp Trp

1 5 10 15

<210> 64

<211> 2034

<212> DNA

<213> 扎伊尔埃博拉病毒糖蛋白的合成共有序列的编码序列

<400> 64

atgggggtca ctgggattct gcagctgcct agagatcgct tcaagcgaac ctctttcttt 60

ctgtgggtca tcattctgtt ccagaggact ttttagtatcc ctctggcgt cattcacaat 120

tctaccctgc aggtgagtga cgtcgataag ctggtgtgtc gggacaaact gagctccacc 180

aaccagctga gatctgtcgg cctgaatctg gaggggaacg gagtggtcac cgatgtccca 240

agtgcaacaa agagatgggg gtttcgctca ggagtgcctt ctaaagtggc caattacgag 300

gccgggaaat gggctgagaa ttgctataac ctggaaatca agaaacccga cggatcagag 360

tgtctgccag ccgctcccgta tgggattcgc ggattcccta gatgcagata cgtgcacaag 420

gtcagcggca cccggccatg tgcaggagac ttgcctttc ataaagaagg cgccttcttt 480

ctgtacgata gactggcttc caccgtgatc tataggggaa ccacattcgc cgagggagtg 540

gtcgcttttc tgattctgcc tcaggccaag aaagacttct tttctagtca tcctctgcgg 600

gaaccagtga acgctaccga ggaccccagc agcggctact attccactac catcagatac 660  
 caggccacag gattcggcac caatgagaca gaataacctgt ttgaagtggca caacctgaca 720  
 tatgtccagc tggagtctag gttcactccc cagttctgc tgcaagctaa tgaaactatac 780  
 tataccagtg gcaagcgctc aaatacacaact gggaaagctga tttggaaagt gaaccctgag 840  
 atcgatacca caattggcga atggccttt tggagacca agaaaaaacct gacacggaag 900  
 atcagaagcg aggaactgtc ctccaccgca gtgagtaata gggccaaaaa catttcaggc 960  
 cagagccag cacgaacttc ctctgacccc gggaccaata ctaccacaga agatcacaag 1020  
 atcatggcca gcgagaacag ttcaagctatg gtgcagggtcc actcccagg aaggaggca 1080  
 gccgtgtctc atctgactac cctggccaca atctctacta gtccccagag ccccaacaact 1140  
 aagcccgggc ctgacaatag caccataac acacctgtgt acaaactgga tatctccgaa 1200  
 gccaccagg tcgagcagca ccatcgaga acagacaatg attccactgc atctgacacc 1260  
 cctccagcaa ccacagctgc aggacccccc aaggctgaga atactaacac cagcaaaagc 1320  
 accgacactgc tggaccccg aactaccaca tcaccacaga accacagcga gacagccgg 1380  
 aacaataaca ctcaccatca ggacaccgga gaggaatccg ccagctccgg caagctggg 1440  
 ctgatcacaa atactattgc tggagtggca ggactgatca caggcggag gcaactcga 1500  
 cgagaagcta ttgtgaacgc acagccaaa tgcaatcta acctgcacta ttggactacc 1560  
 caggacgagg gagcagctat cggactggca tggattccat acttggggcc cgcagccgaa 1620  
 ggaatctata ccgagggcct gatgcataat caggatggac tggatctgtgg cctgcggcag 1680  
 ctggctaactg aaacaactca ggcactgcag ctgttctgc gagctaccac agagctgcgg 1740  
 accttagca tcctgaatcg caaggcaatt gacttcctgc tgcagcgatg gggaggcaca 1800  
 tgccacatcc tgggaccaga ctgctgtatt gagcctcatg attggacaaa gaacatcact 1860  
 gacaaaattg atcagatcat tcacgacttc gtggataaaa cactgccaga tcagggggac 1920  
 aatgataact ggtggactgg atggagacag tggattcccg ccggcattgg cgtcaccggc 1980  
 gtcattattg ccgtcattgc tctgttctgt attttaagt tcgtgttctg ataa 2034  
 <210> 65  
 <211> 2034  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 苏丹埃博拉病毒糖蛋白合成共有序列的编码序列  
 <400> 65

atggagggac tgcactgct gcagctgcct agagataagt tcaggaaaag ctccttcttt 60  
 gtgtgggtca tcattctgtt ccagaaggcc ttttcaatgc ccctggcgt ggtcaactat 120  
 agcacccctgg aagtgcacaga gatcgatcag ctggctgtta aggaccacct ggcttcaact 180  
 gatcagctga aaagcgtgg gctgaacctg gagggatcag ggcgtcagcac tgatattcct 240  
 tctgcaacca agagatgggg atttcgcagc ggagtgcggcc ctaaaatgggt ctcctacgaa 300  
 gcaggggagt gggccgaaaaa ttgctataac ctggagatca agaaaccaga tggcagcga 360  
 tgtctgccac cccctccaga cgggggtgcgc ggattccca gatgcagata cgtccacaag 420  
 gcccagggga ccggacatttgc tccaggagac tatgccttc ataaagatgg cgctttcttt 480

ctgtacgacc gcctggctag tacagtgatc tatcgaggcg tcaatttcgc cgagggcgtg 540  
 atcgctttc tgattctggc aaagccaaaa gaaaccttcc tgcagagccc tcccattagg 600  
 gaggccgtga actacacaga aaacacttct agttactacg ctacatccta cctggagtt 660  
 gaaatcgaga actttggcgc tcagcactct accacactgt tcaagattaa caataacacc 720  
 tttgtgctgc tggatcgccc tcatacacca cagttcctgt ttcagctgaa cgacactatc 780  
 cacctgcatac agcagctgag caatactacc ggaaaactga tttggacact ggacgctaat 840  
 atcaacgcag atattggcga gtgggccttc tggaaaata agaaaaacct gtccgagcag 900  
 ctgcggggag aggaactgag ctttggaaaca ctgtccctga atgaaactga ggacgatgac 960  
 gccaccta a gccgaacaac taagggccgg atctctgatc gggctaccag aaagtacagt 1020  
 gatctggtgc caaaagactc tcccgcatg gtgagtctgc acgtccctga aggggagacc 1080  
 acactgccc cccagaactc tactgagggc cgagagtg acgtcaatac ccaggagact 1140  
 atcaccgaaa ctaccgcaac aatcattggc actaacgggataaacatgca gatcagcacc 1200  
 attggcacag ggctgtcctc tagtcagatt ctgtcaagct cccctaccat ggccccctcc 1260  
 cctgagacac agacttctac aacttataca cccaagctgc ctgtgatgac cacagaggaa 1320  
 cccactaccc cacccagaaa cagtcctggg tcaacaactg aggacccac cctgaccaca 1380  
 cctgaaaata tcactaccgc cgtaaaaaca gtcctgcctc aggagtctac tagtaacgga 1440  
 ctgatcacca gcacagtgac tggattctg ggcagtctgg ggctgcgcaa gcgtcaagg 1500  
 cgccaagtga atactcgggc taccggaaa tgcaatccaa acctgcacta ctggaccgca 1560  
 caggagcagc ataacgcgc tggtatcgct tggattcctt acttcggacc aggccgag 1620  
 gggatctata ccgaaggact gatgcataat cagaacgccc tgggtgtgg cctgagacag 1680  
 ctggcaaattg agacaactca ggccctgcag ctgtccctga gagcaaccac agaactgagg 1740  
 acctatacaa tcctgaaccg gaaggccatt gatttctgc tgcacgatg gggcgggacc 1800  
 tgcagaatcc tgggaccaga ctgctgtatt gagccccacg attggaccaa gaacatcaca 1860  
 gacaagatca accagatcat tcatgatttc atcgacaacc cactgccc tcaaggacaac 1920  
 gatgacaatt ggtggaccgg atggcgacag tggattcccg caggaattgg aatcaccgga 1980  
 attattatttgc ccattattgc tctgctgtgt gtctgttaagc tgctgtgtt ataa 2034  
 <210> 66  
 <211> 2049  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 马尔堡马尔堡病毒糖蛋白的编码序列

<400> 66

atgaaaaacca ttgtctgct gatctcaactg attctgattc agggcgtcaa aacactgccc 60  
 attctggaaa ttgcctctaa catccagcca cagaacgtgg actccgtctg ttctgggacc 120  
 ctgcagaaga cagaggatgt gcacccatg ggcttcaccc tgagcggca gaaggtcgca 180  
 gactcaccac tggaaagccag caaacatgg gcatttcggg ccggagtgcc ccctaagaac 240  
 gtcgagtaca ccgaaggcga ggaagccaaa acatgctata atatctccgt gactgatcct 300  
 agtggcaagt cactgctgct ggacccaccc accaacatgg gggattaccc taagtgtaaa 360

acaatccacc atattcaggg ccagaatcca cacgctcagg gatatgcact gcatctgtgg 420  
 ggagccttct ttctgtacga caggattgct agcaccacaa tgtatgcgg gaaagtgttc 480  
 accgagggaa acatgcgcg tatgattgtg aataagacag tccacaaaat gatctttct 540  
 cgccagggcc aggggtaccg acatatgaac ctgaccagta caaataagta ttggaccagc 600  
 tccaacggca ctcagaccaa tgacactggg tgcttcggaa ccctgcagga gtacaacagt 660  
 actaaaaatc agacctgtgc tccatcaaag aaaccactgc cactgcctac cgacacacca 720  
 gaggtgaagc tgacaagtac ttcaaccgac gccacaaaaac tgaacactac cgaccccaat 780  
 agtgacgatg aagatctgac aactagcgg tccggctctg gggagcagga accttataacc 840  
 acatccgatg cagccaccaa gcagggcctg tctagtacaa tgcctccaaac tccatctccc 900  
 cagcctagta ctccccagca gggcgggaac aataccaacc attcccaggg cgtggtcaca 960  
 gagccaggga agactaacac taccggccag ccctctatgc cccctcaca tacaactacc 1020  
 atctccacca acaatacatc taaacataac ctgagcacac cttccgtgcc aatccagaac 1080  
 gctactaact acaacactca gtctaccgca cccgagaatg aacagacttc tgcccctagt 1140  
 aagacaactc tgctgcccac cgagaaccct accacagcca agtcaacaaa tagcactaaa 1200  
 tcccctacta ccacagtgcc aaacactacc aataagtaca gtacctcacc aagccccacc 1260  
 cctaactcca cagcacagca cctggtctat ttccggagaa aaagaaatat cctgtggagg 1320  
 gagggcgaca tgccccctt tctggatggg ctgatcaacg ctccaattga cttcgatcca 1380  
 gtgcccaata caaagactat cttgacgaa tcaagctcct ctggcgccctc tgctgaggaa 1440  
 gatcagcacg ctcacccaa cattagcctg acactgtcct acttcctaa agtgaacgag 1500  
 aatactgccc atagcgggaa gaacgaaaat gactgcgatg ctgagctgctg gatctggagc 1560  
 gtccaggaag acgatctggc tgcaggactg tcctggatcc cattcttgg acccggcatt 1620  
 gagggactgt ataccggccg cctgattaag aaccagaaca acctgggtgtg cagactgagg 1680  
 cgcctggcca atcagaccgc taaatcactg gaactgctgc tgccggtcac aactgaggaa 1740  
 agaacattca gcctgatcaa ccgacatgct attgacttgc tgctggcact ctggggaggc 1800  
 acctgcaagg tgctggacc agactgctgt atcggcattg aggatctgctc tcgcaatatac 1860  
 agtgaacaga tcgaccagat taagaaagat gagcagaagg aaggaaccgg atggggactg 1920  
 ggcggcaagt ggtggaccag cgattggggc gtgctgacaa acctggaaat cctgctgctg 1980  
 ctgtccatcg ccgtcctgat tgctctgtcc tgtatttgc ggattttcac taagtatatt 2040  
 gggtgataa 2049

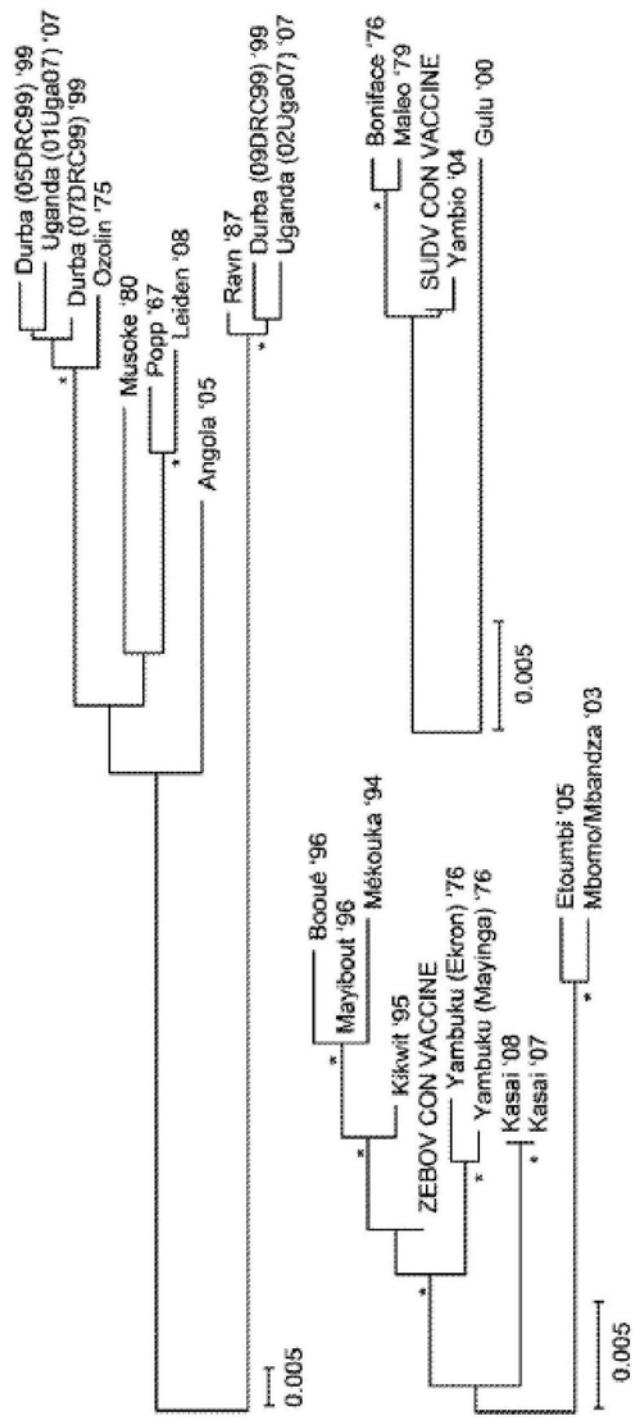


图1A

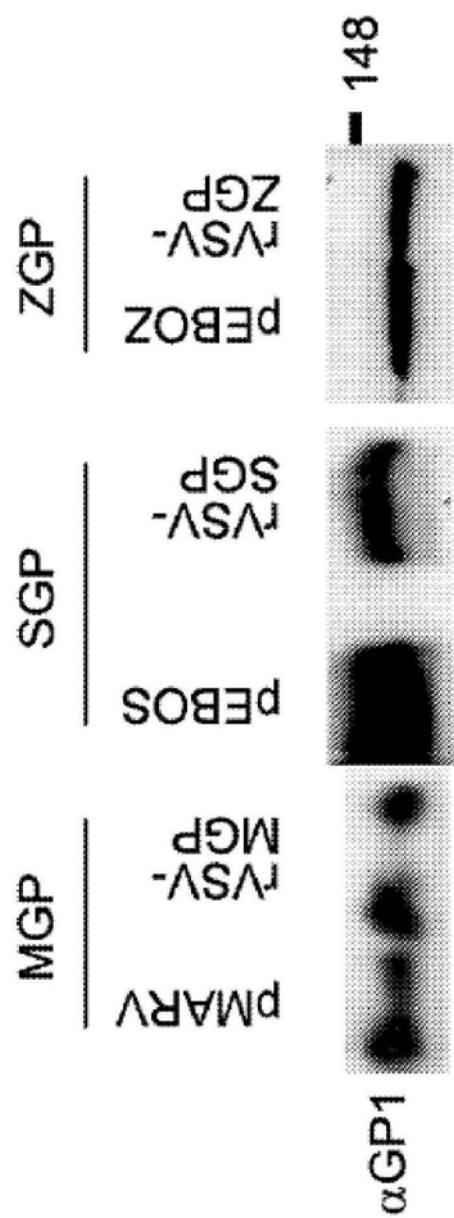


图1B

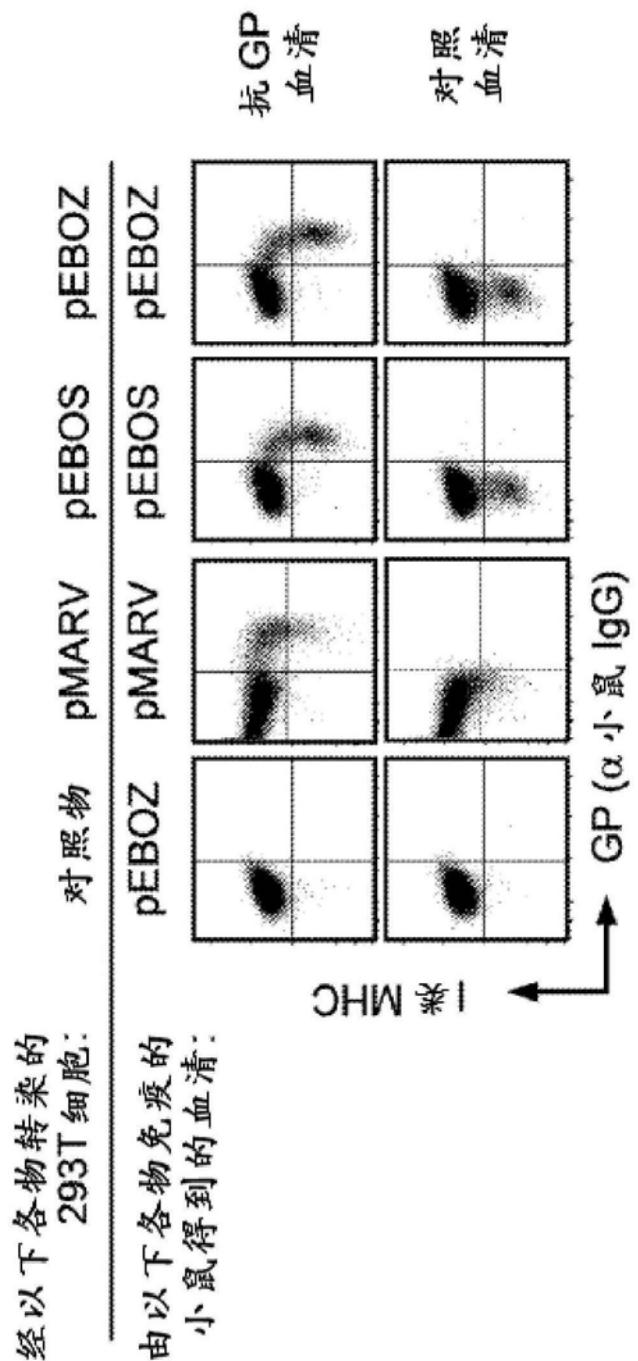


图1C

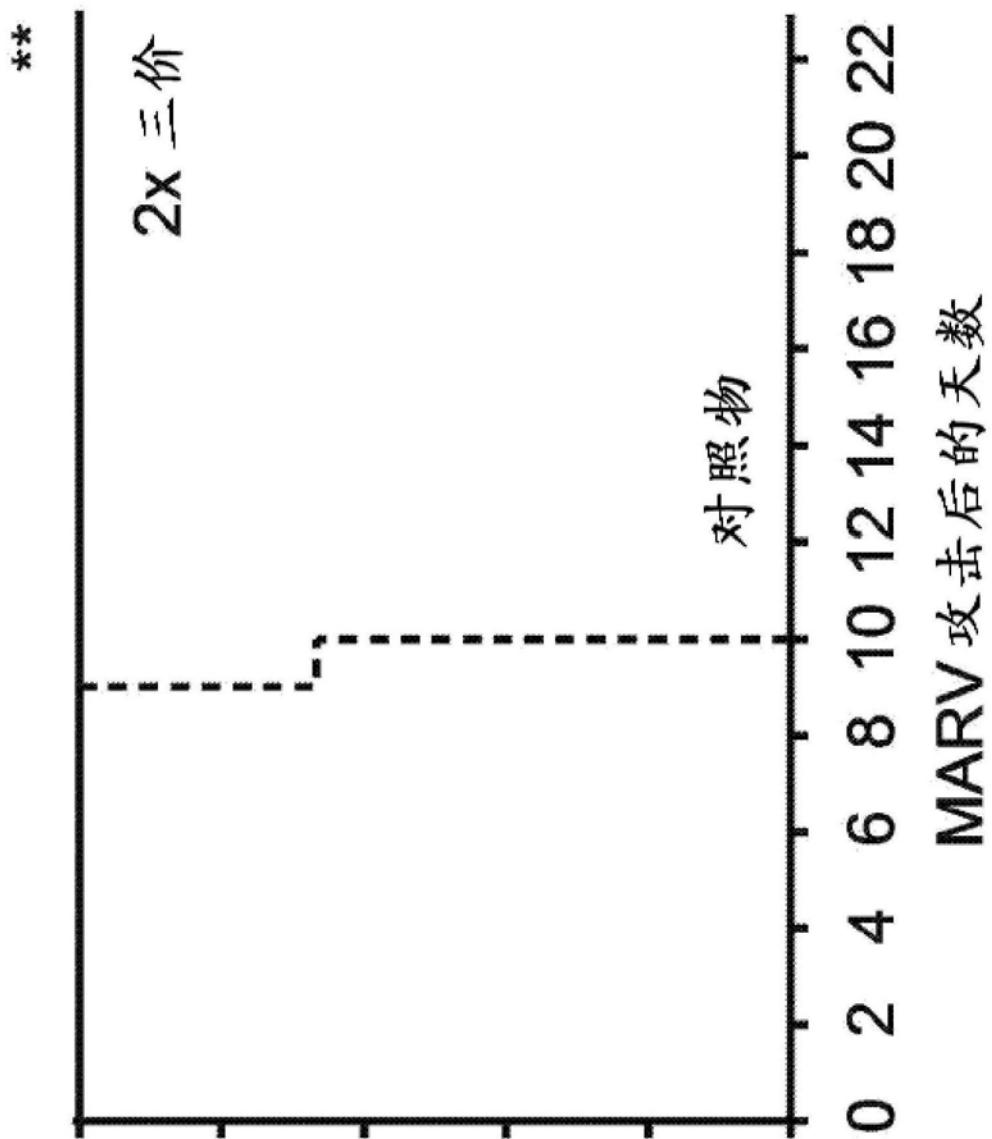


图2A

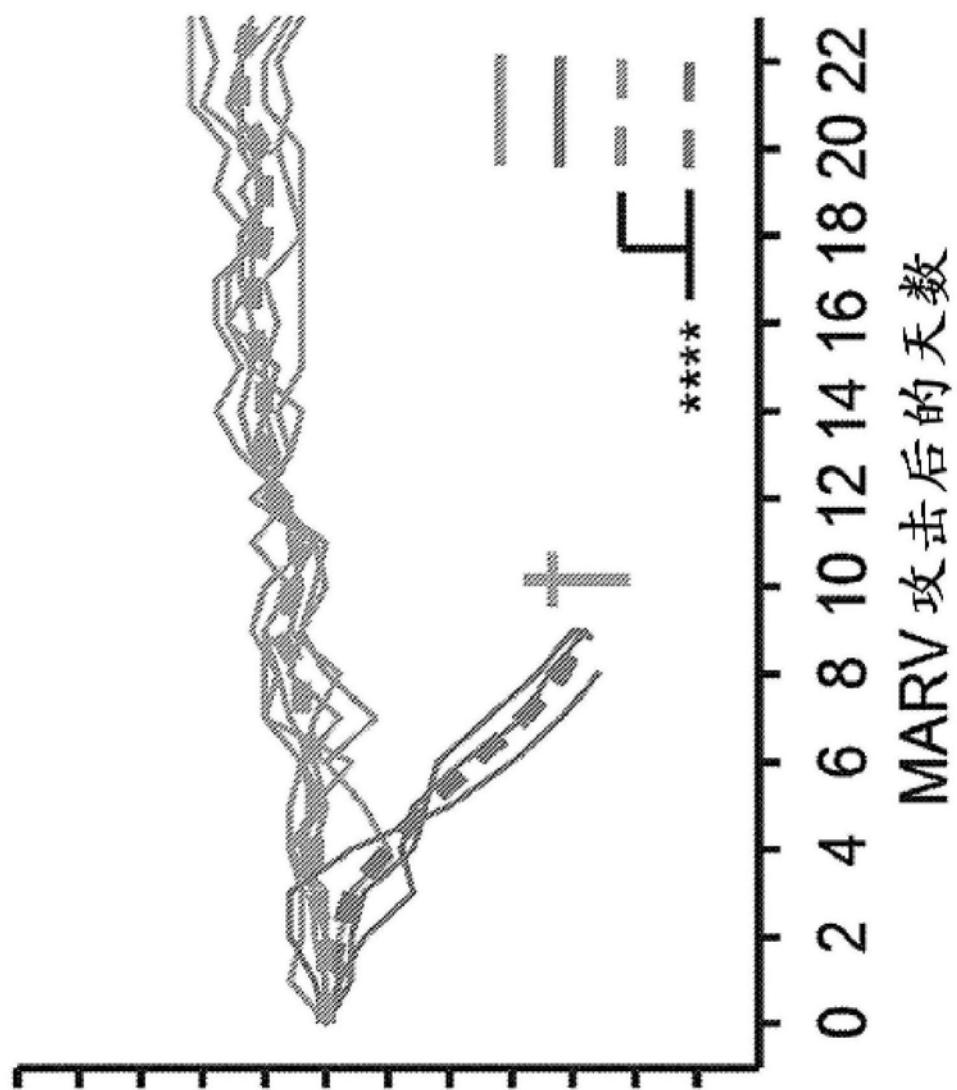
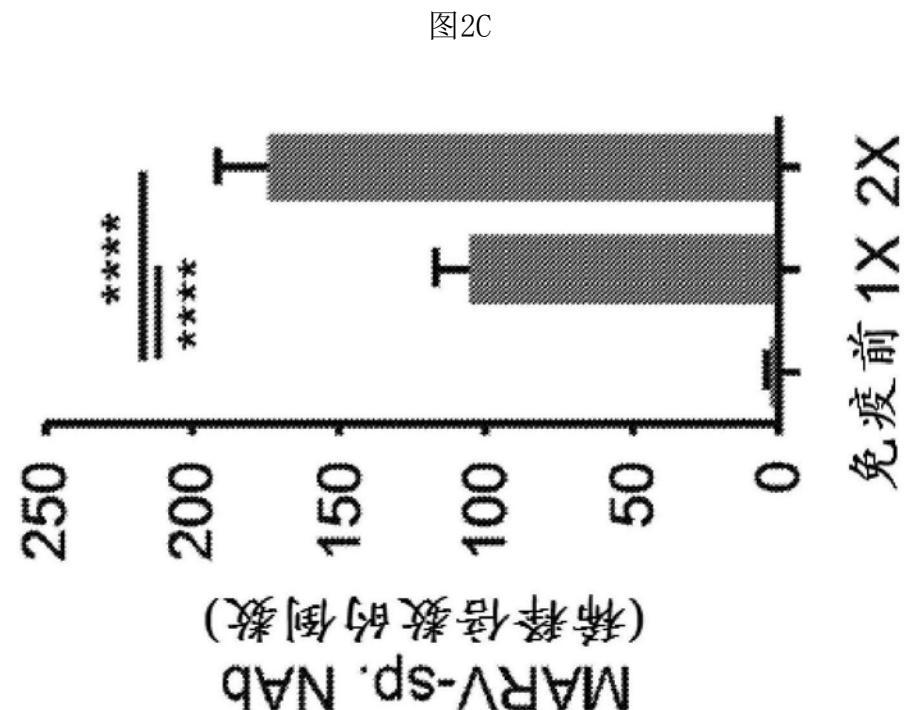
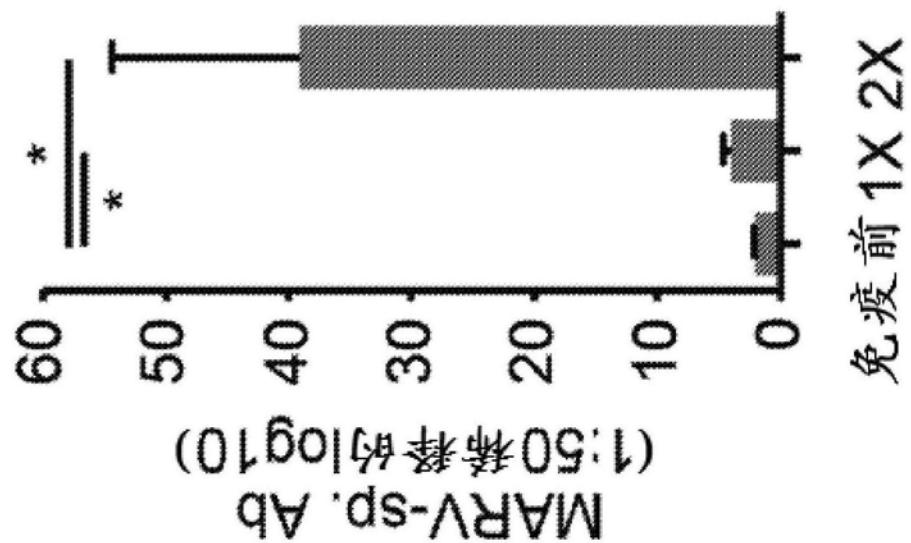


图2B



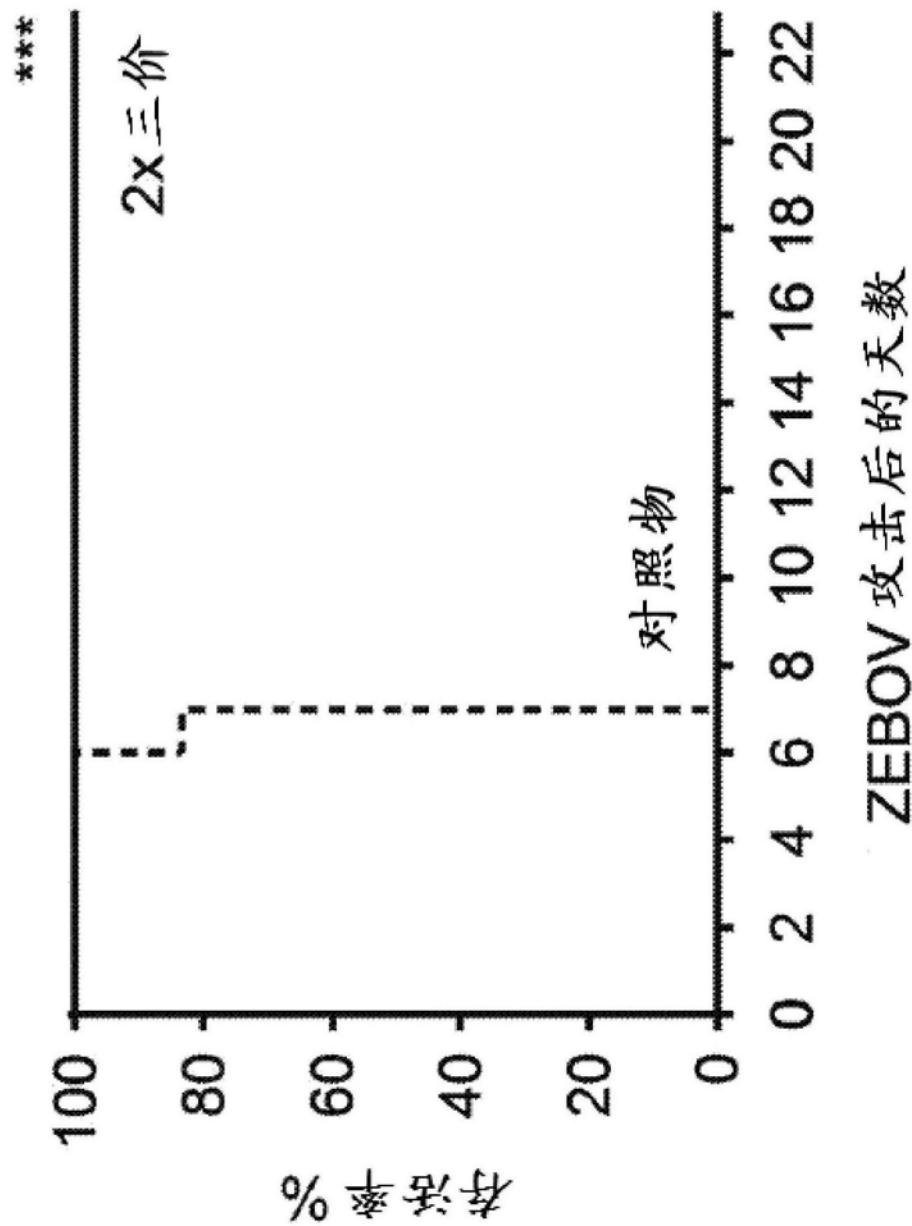


图2E

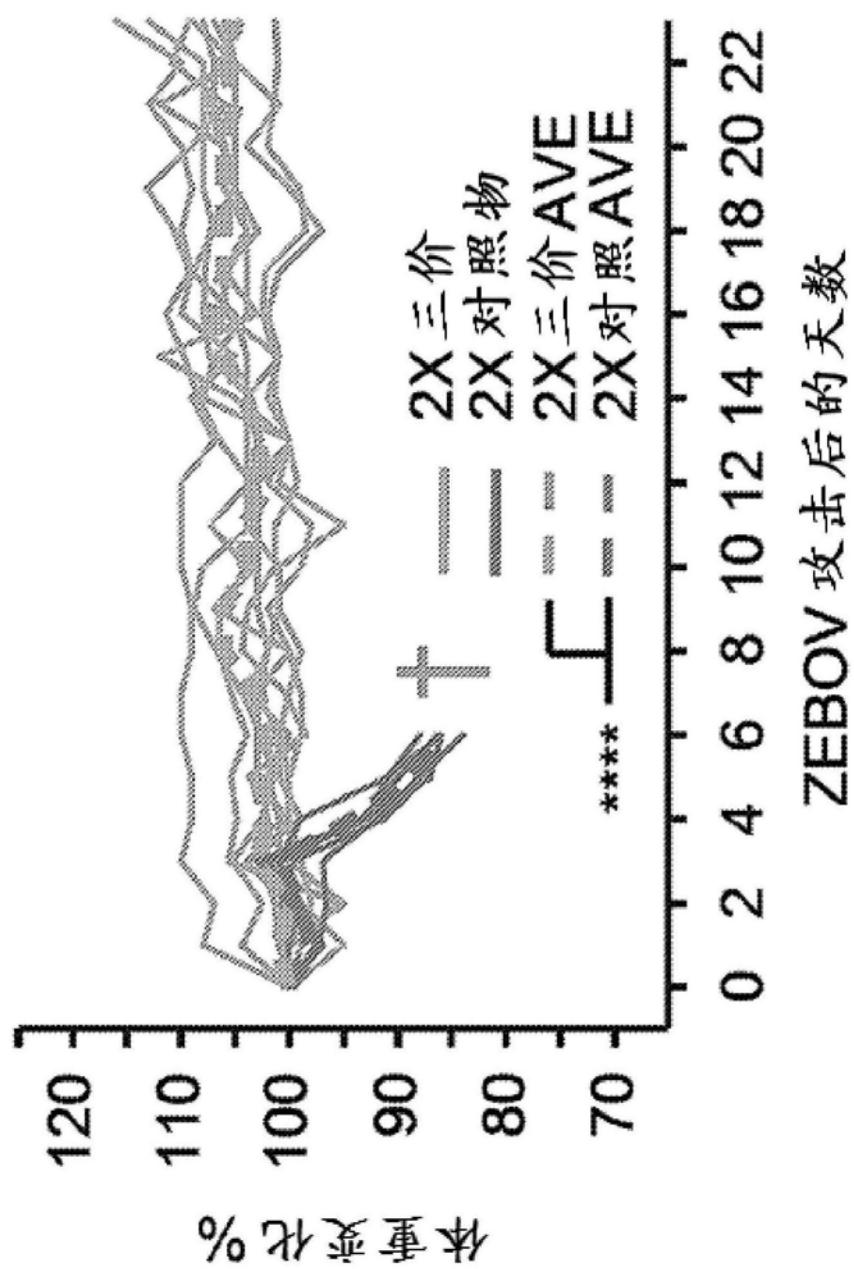


图2F

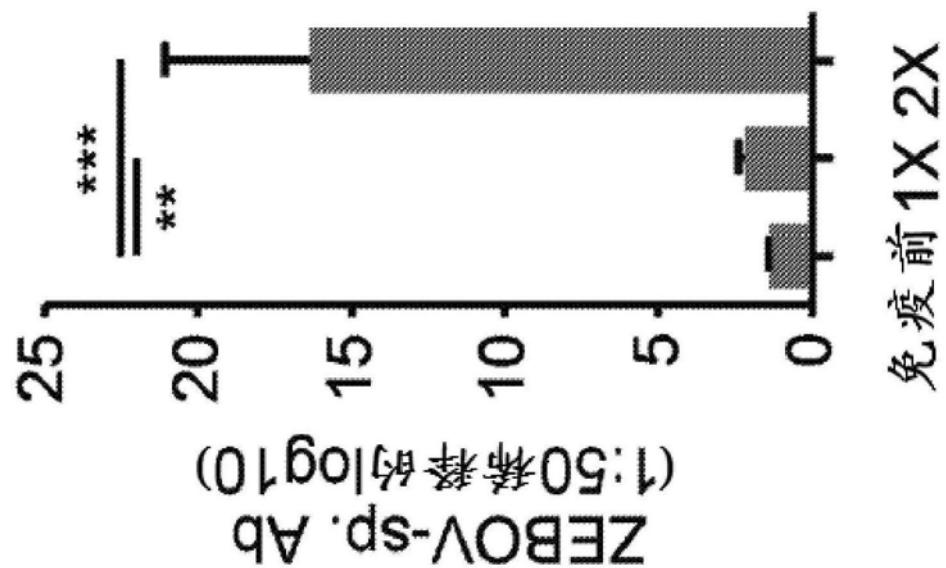


图2G

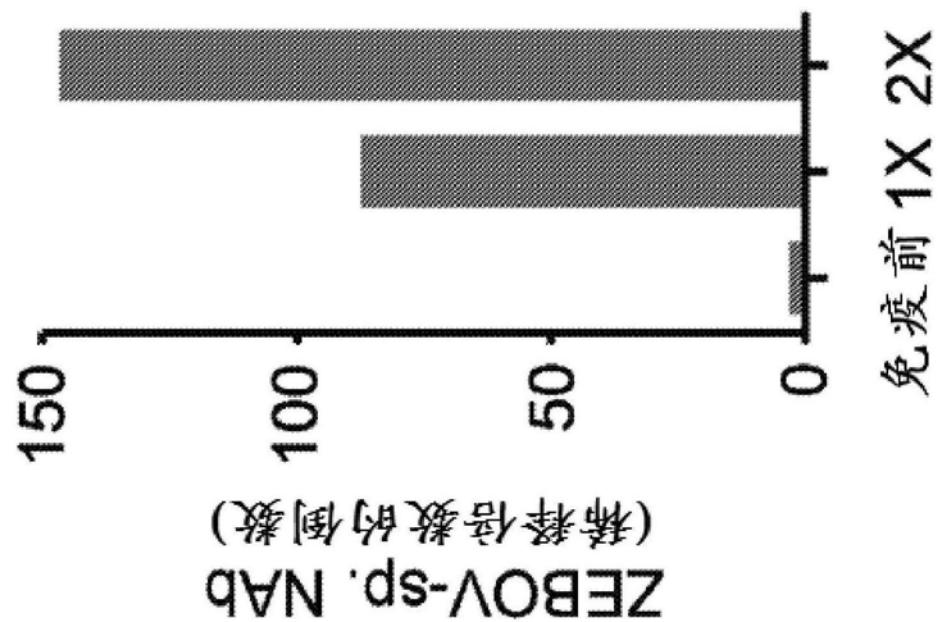


图2H

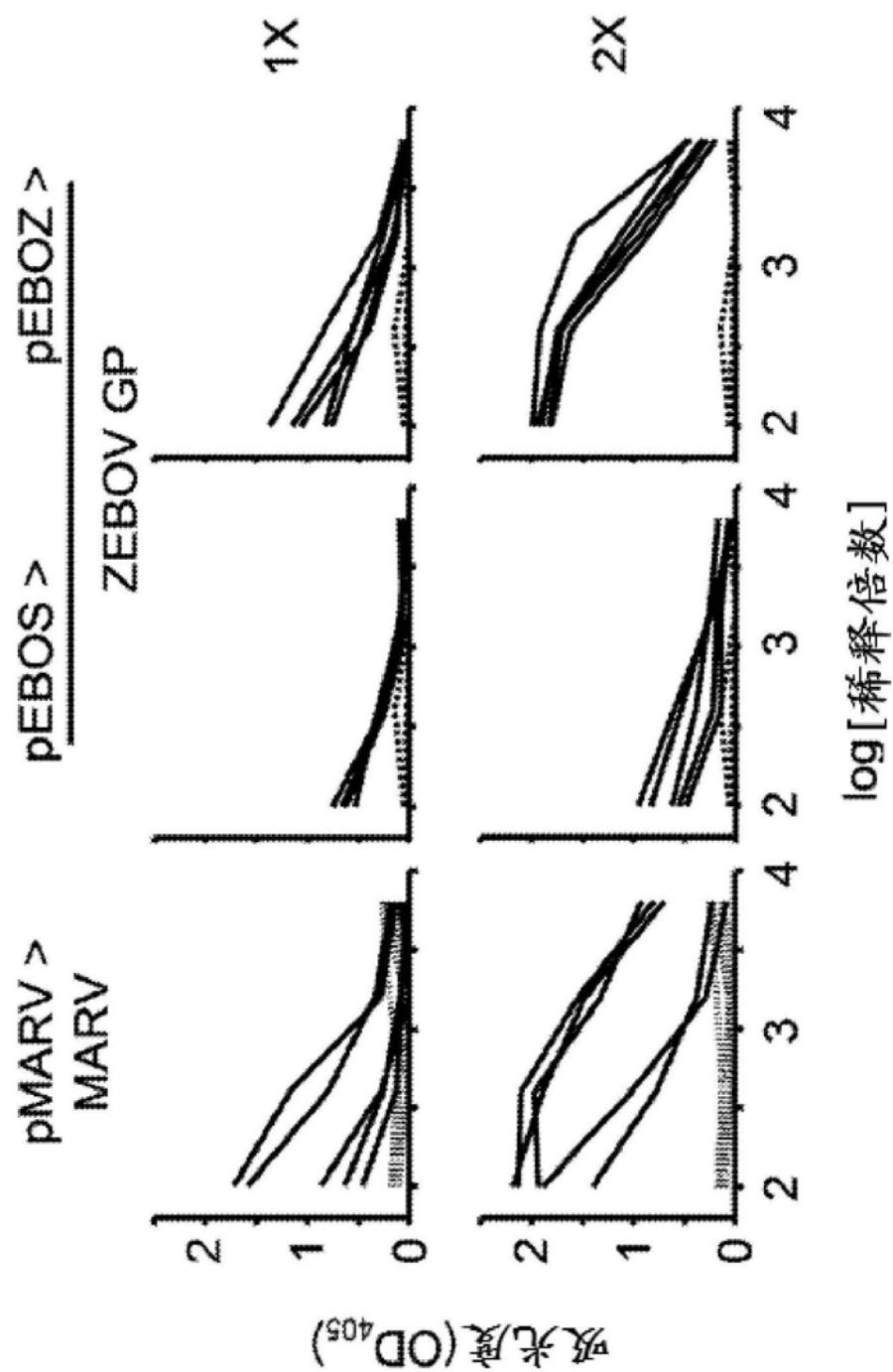


图3A

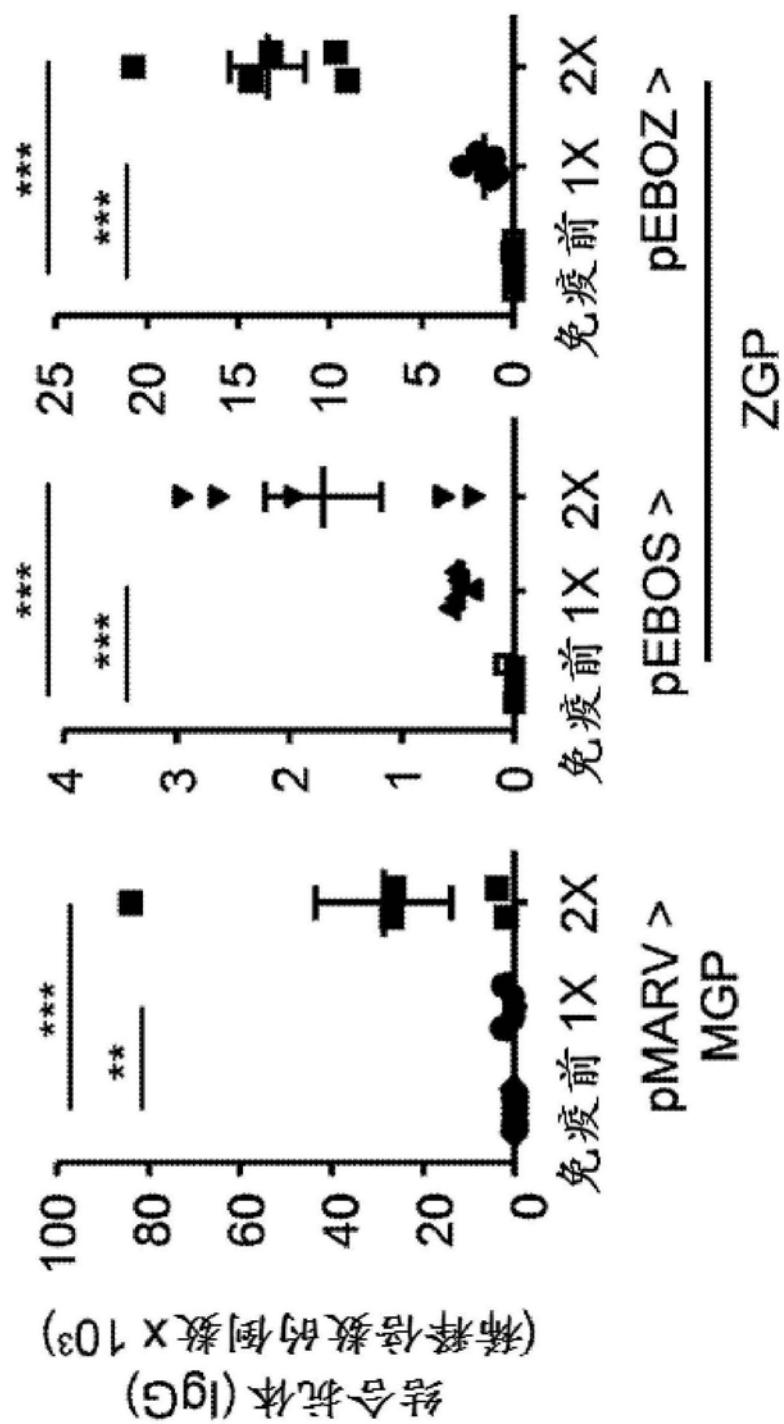


图3B

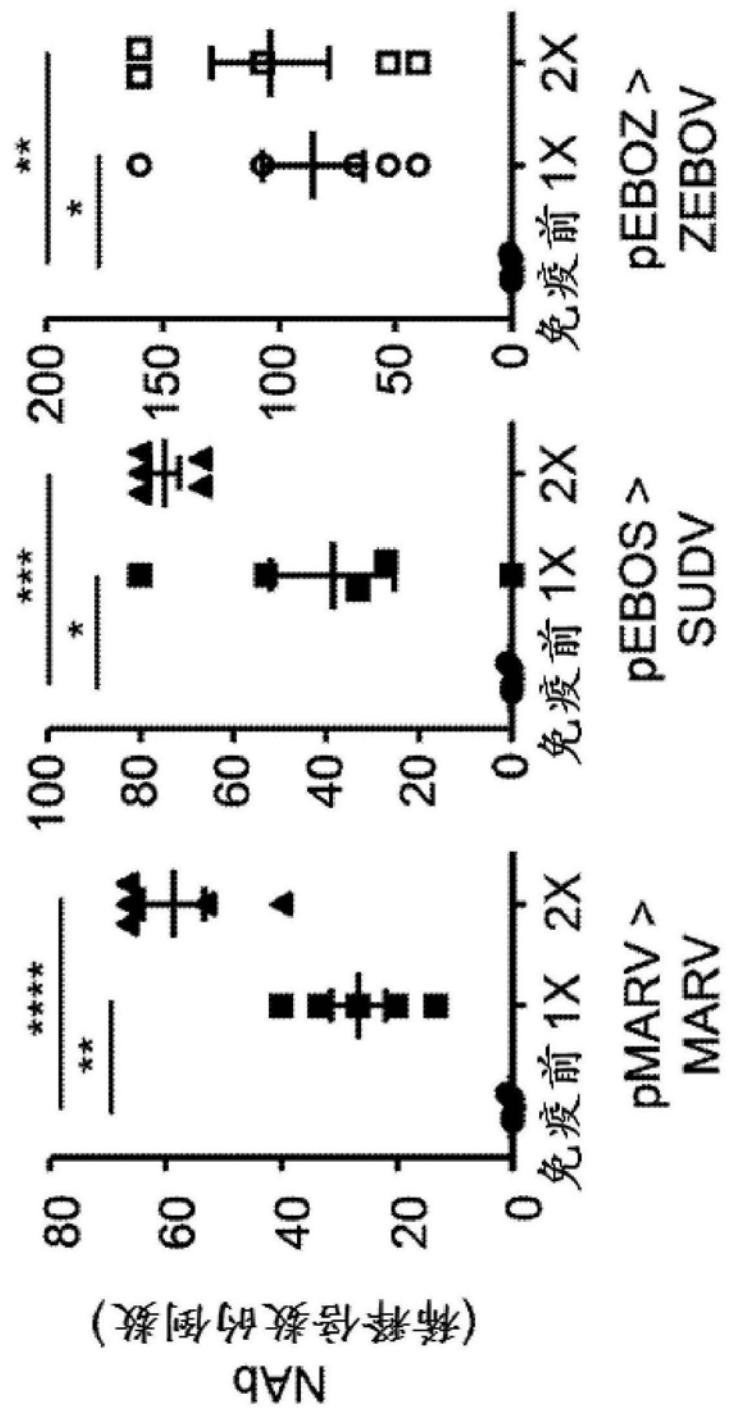


图3C

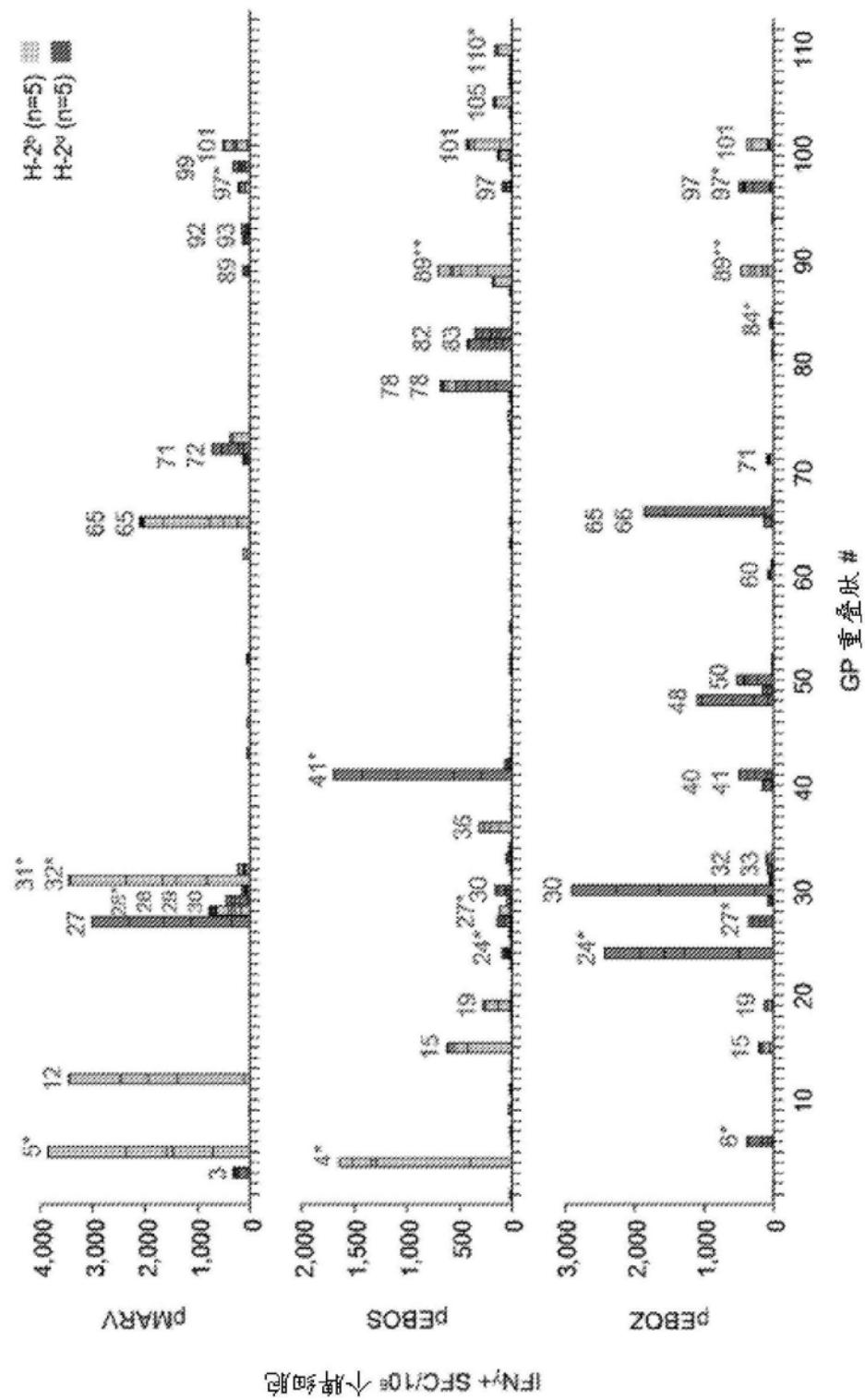


图4A

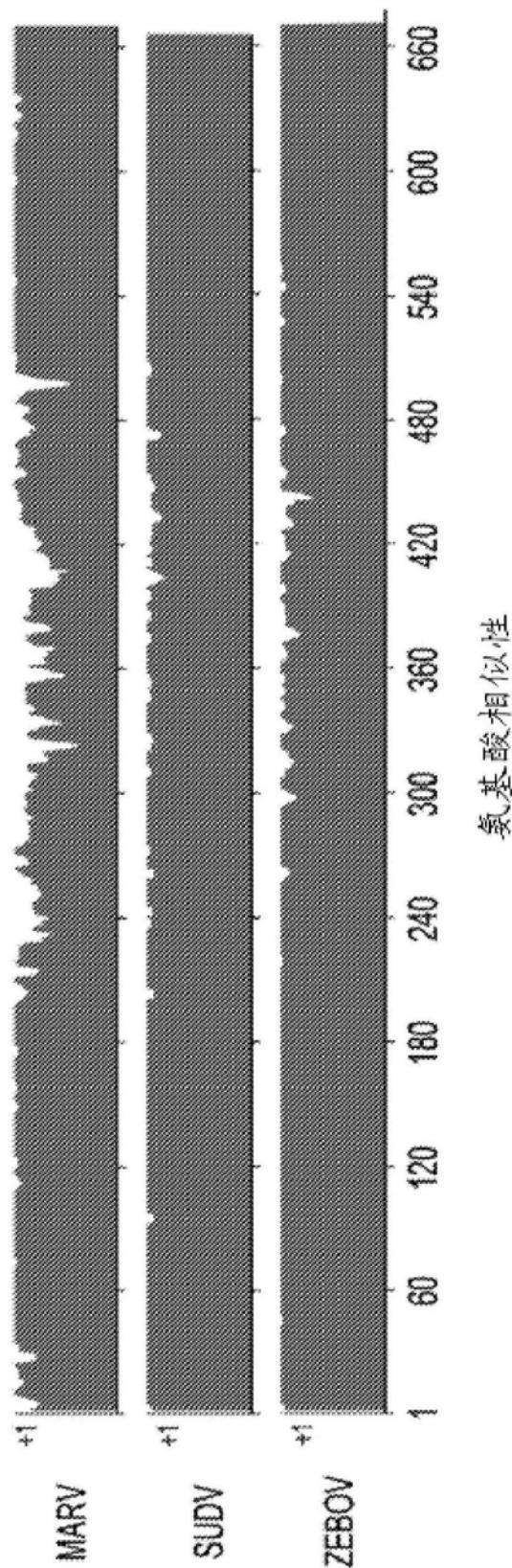


图4B

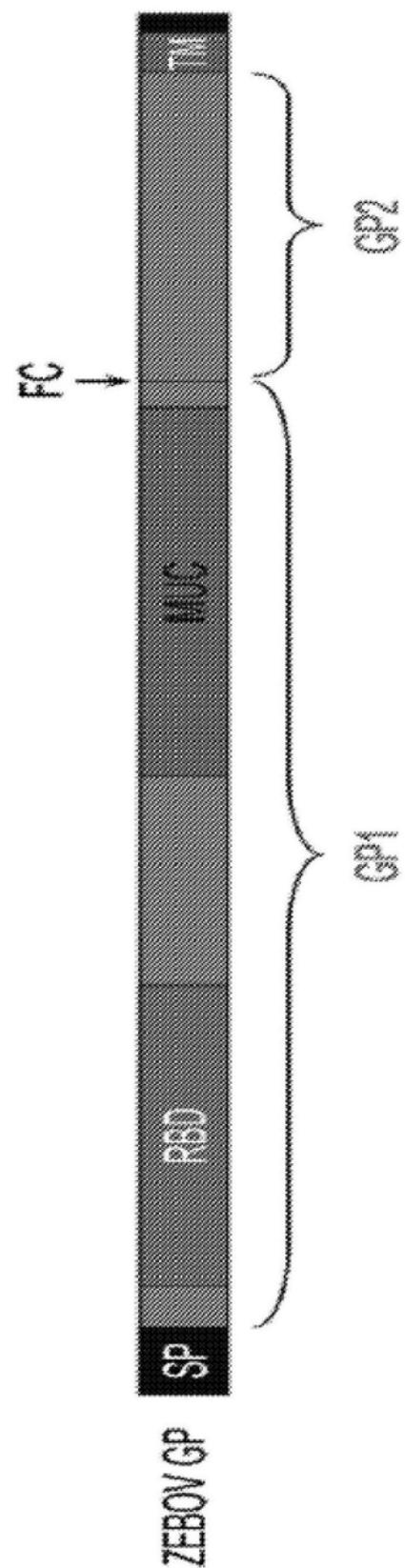


图4C

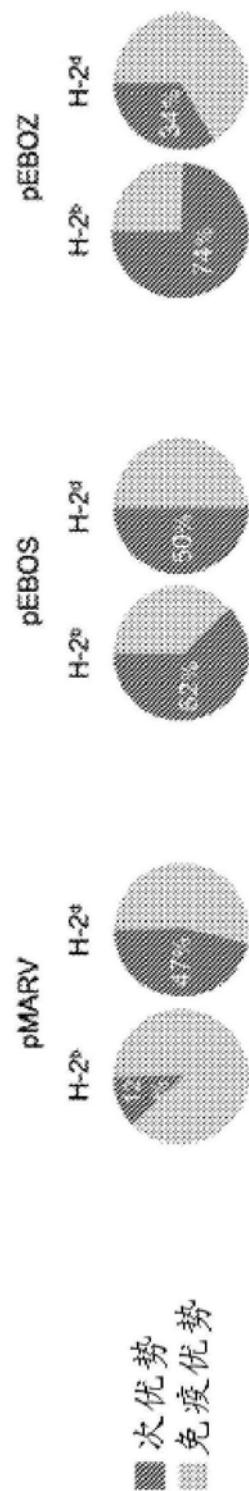


图4D

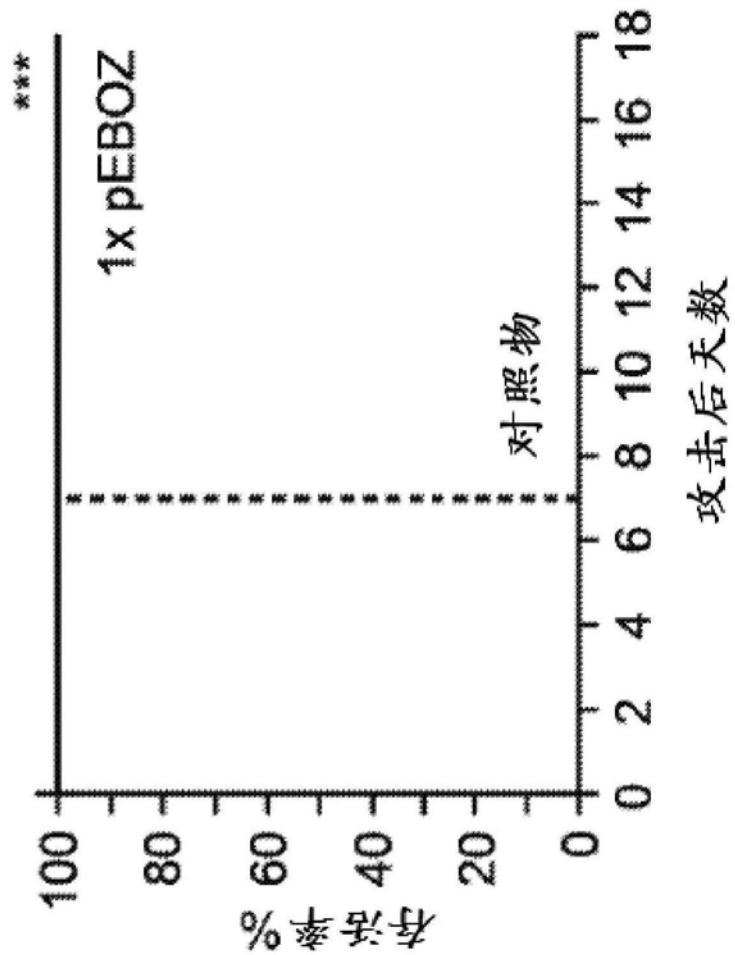


图5A

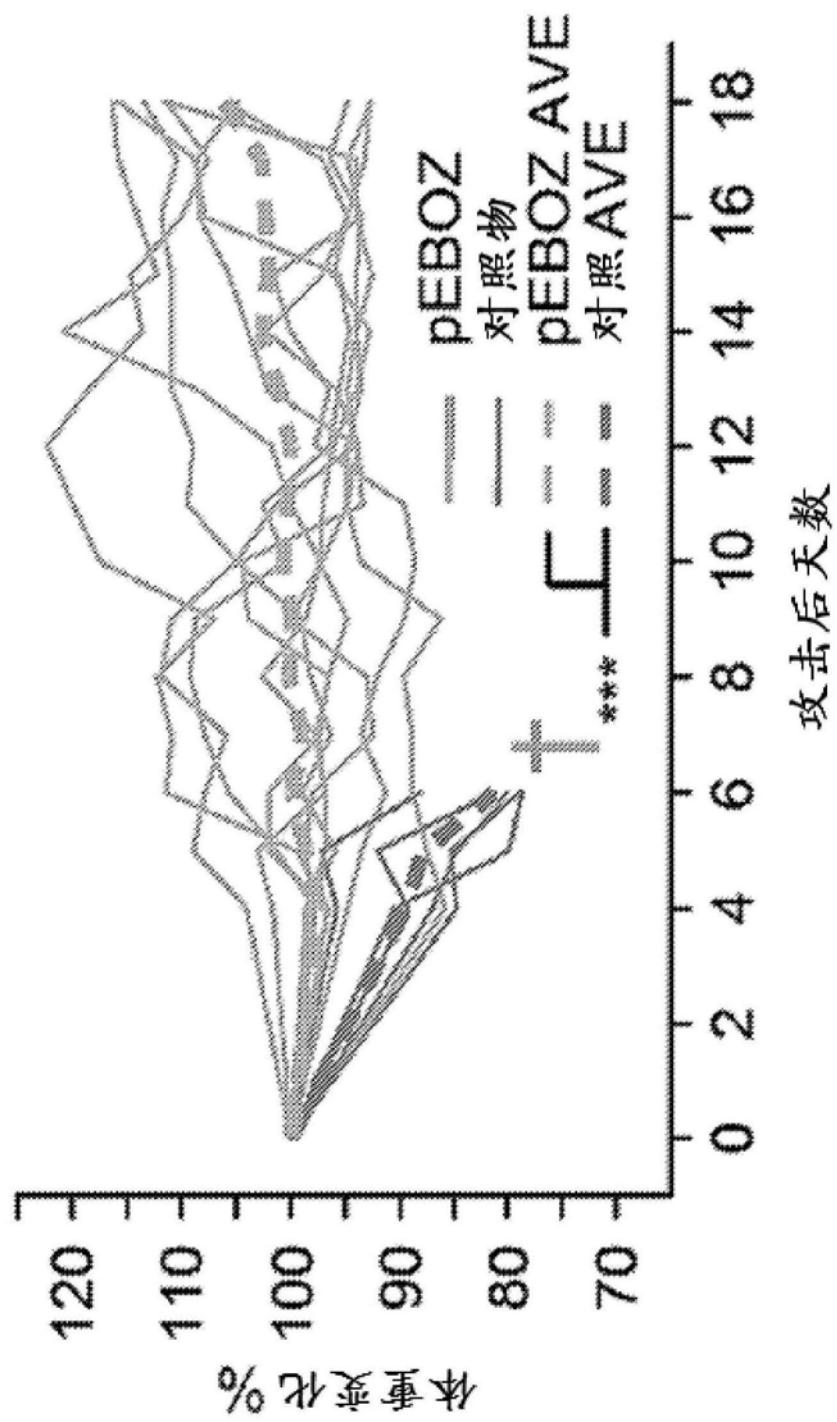


图5B

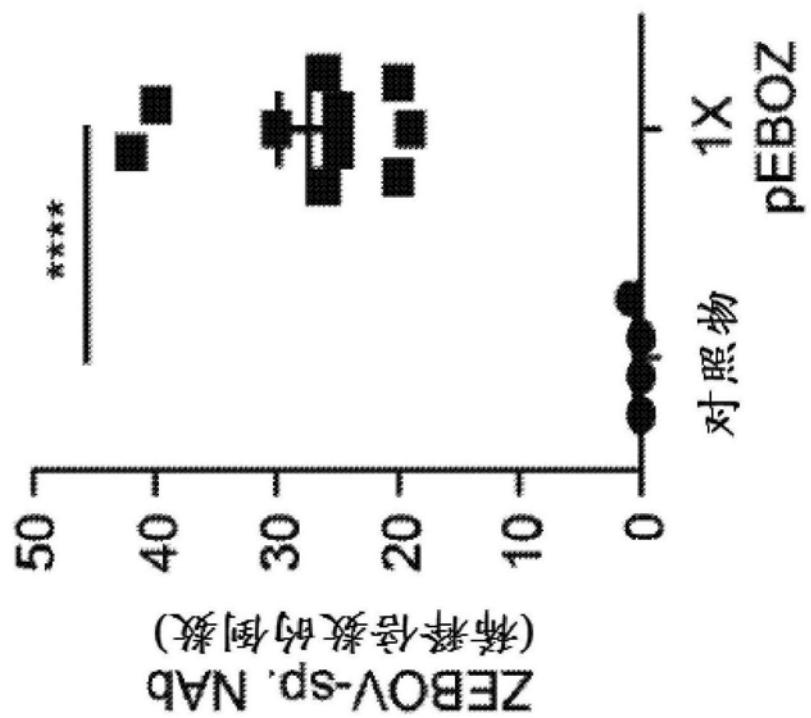


图5C

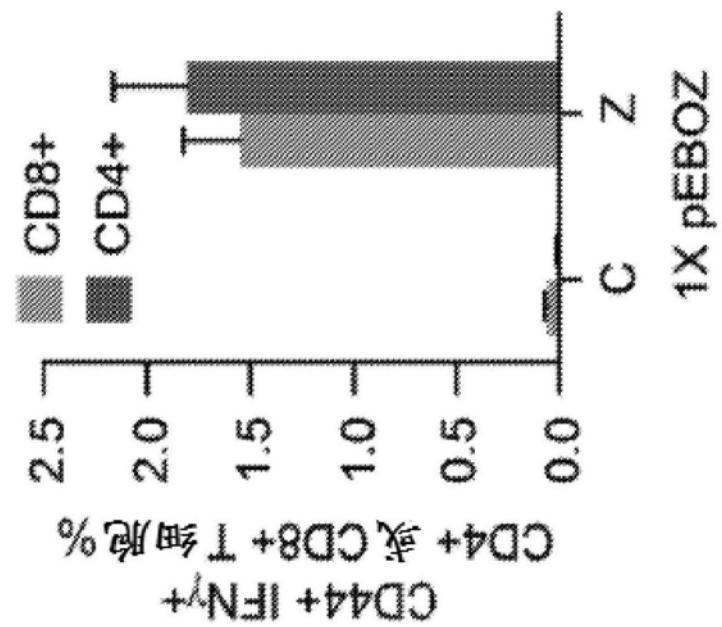


图5D

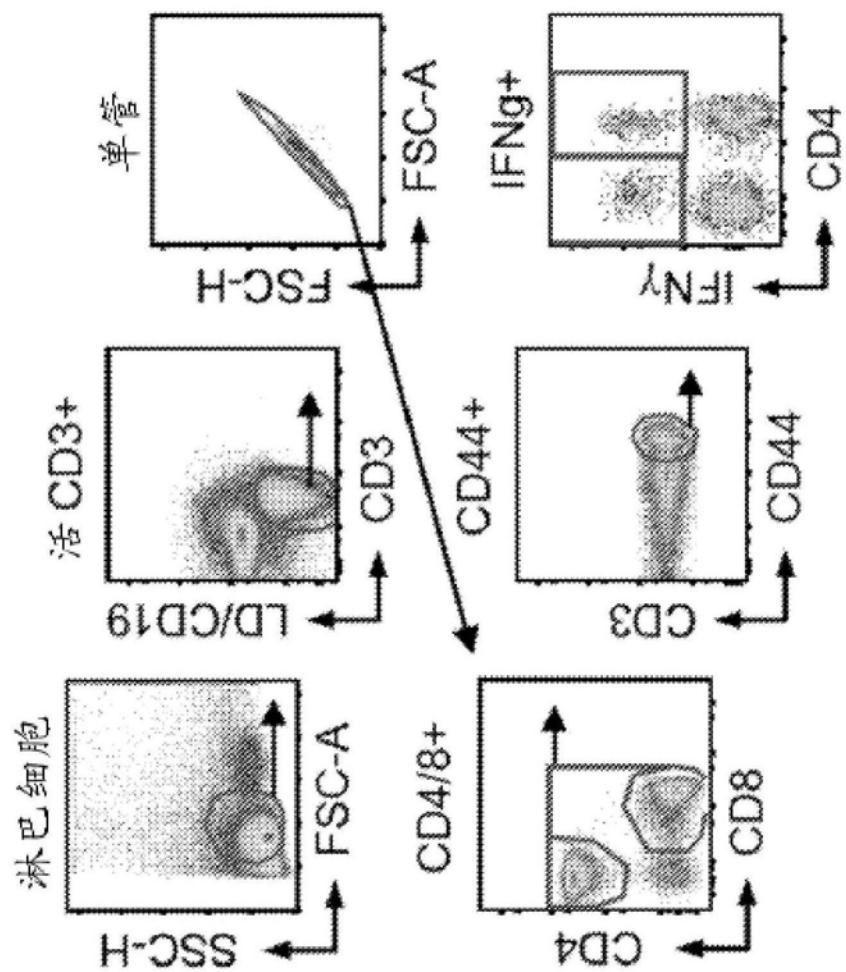


图6

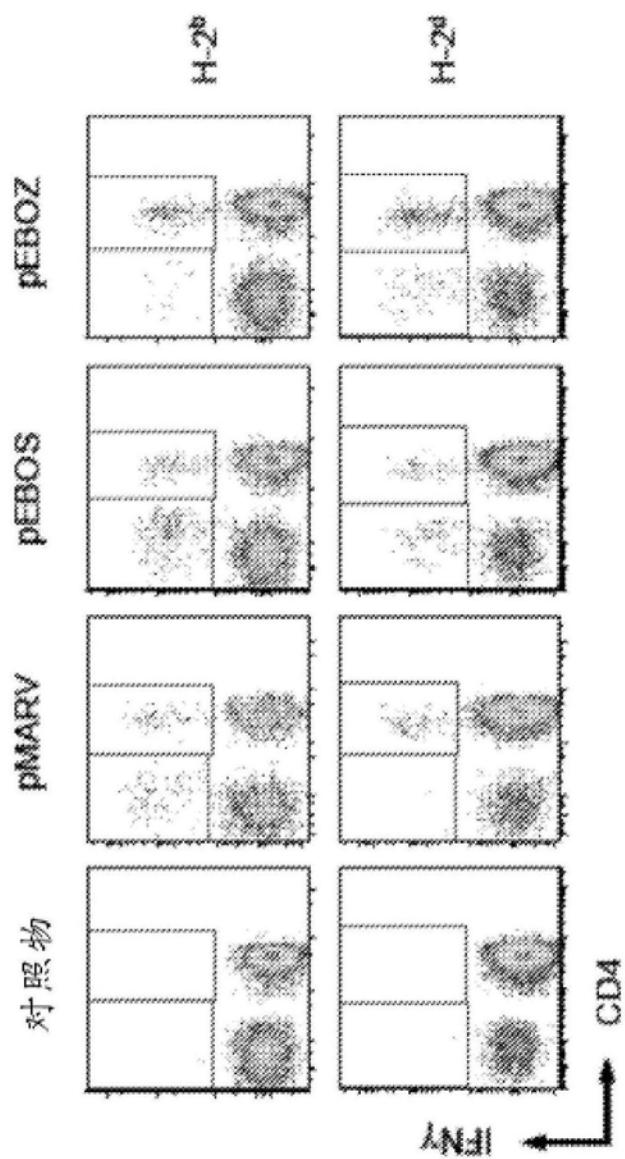


图7A

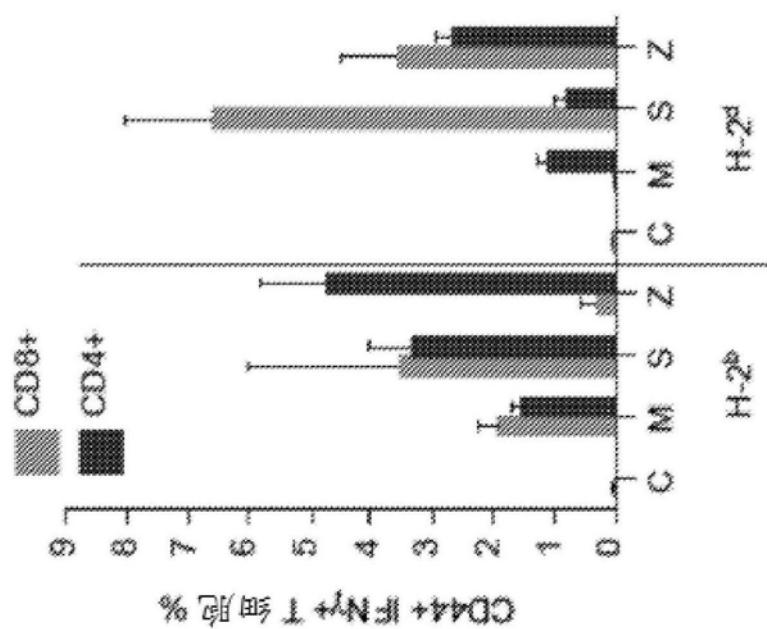


图7B

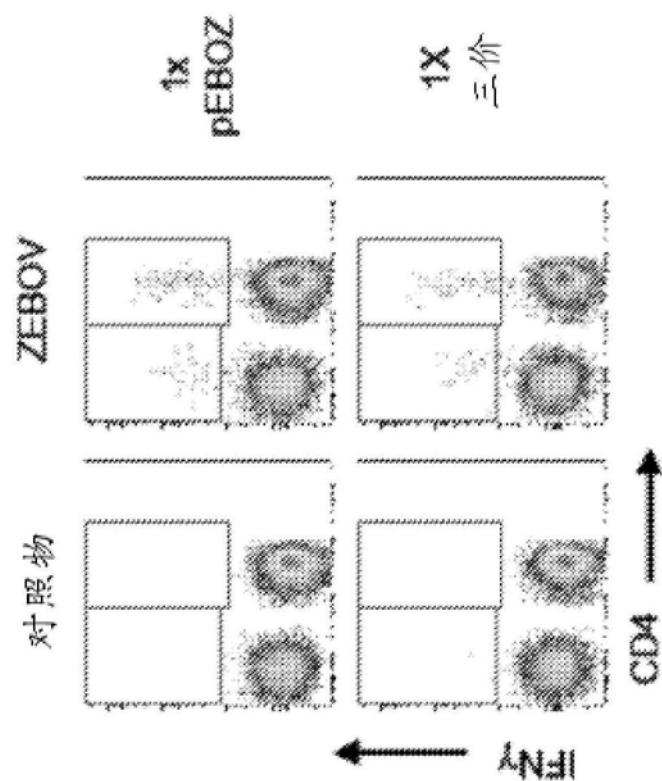


图8A

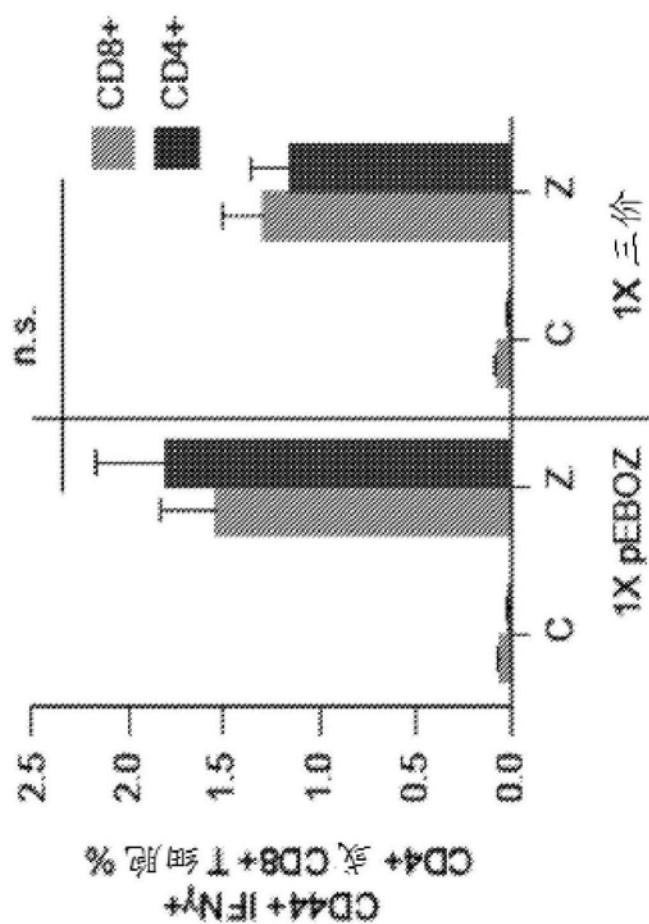


图8B