(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102481355 A
(43)申请公布日 2012.05.30

(21)申请号 201080023950.6
(22)申请日 2010.06.01
(30)优先权数据
61/182754 2009.05.31 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.11.30
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/001608 2010.06.01
(87)PCT申请的公布数据
WO2010/141084 EN 2010.12.09
(71)申请人 默沙东公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 B. 科勒 V. 佩
C. L. 维克斯-莱维 S. A. 奥加塔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李波 刘健
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)

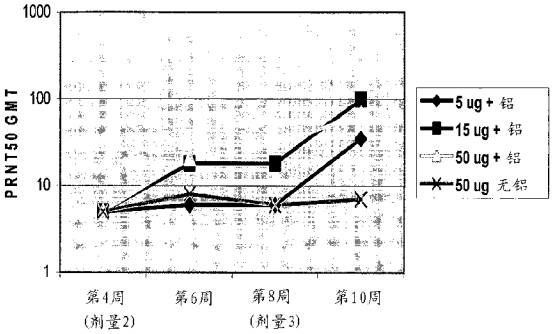
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 5 页

(54)发明名称

用于保护人受试者的重组亚单位西尼罗病毒疫苗

(57)摘要

描述了用于人用的西尼罗病毒疫苗，其优选地包含截短的西尼罗病毒囊膜糖蛋白的重组产生形式和铝佐剂。所述疫苗可用于一般群体，包括免疫抑制、免疫受损和免疫衰老个体。所述疫苗可安全和有效地用于所有健康和高危群体。在所述疫苗中也可包含药学上可接受的载体。



CN 102481355 A

1. 一种疫苗，其包含：

有效量的纯化的重组西尼罗病毒囊膜（“E”）蛋白，其中所述 E 蛋白构成野生型 E 的从其 N- 端第一位氨基酸残基开始约 80% 的长度（WN-80E），使得当在宿主细胞中重组表达时，所述 E 蛋白可被分泌至生长培养基；和

有效量的基于铝的佐剂，其中所述疫苗在人受试者中诱发中和抗体的产生。

2. 权利要求 1 的疫苗，其中所述 E 蛋白在昆虫宿主细胞中重组产生和表达。

3. 权利要求 1 的疫苗，其中所述 E 蛋白在黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）Schneider 2 (S2) 宿主细胞中重组产生和表达。

4. 权利要求 1、2 或 3 的疫苗，其还包含药学上可接受的赋形剂。

5. 权利要求 1、2 或 3 的疫苗，其用于免疫缺陷群体。

6. 一种在人中引起保护性免疫应答的方法，其包括以治疗可接受的方式施用治疗有效量的权利要求 1、2 或 3 的疫苗。

7. 一种在人中提供针对西尼罗病毒诱发的疾病的免疫保护的方法，其包括施用有效量的权利要求 1、2 或 3 的疫苗，由此提供免患西尼罗疾病的保护。

8. 权利要求 4 的疫苗，其用于免疫缺陷群体。

9. 一种在人中引起保护性免疫应答的方法，其包括以治疗可接受的方式施用治疗有效量的权利要求 4 的疫苗。

10. 一种在人中提供针对西尼罗病毒引起的疾病的免疫保护的方法，其包括施用有效量的权利要求 4 的疫苗，由此提供免患西尼罗疾病的保护。

用于保护人受试者的重组亚单位西尼罗病毒疫苗

[0001] 相关申请

此申请要求保护 2009 年 5 月 31 日提交的美国临时专利申请号 61/182,754 的利益，所述在前申请的公开内容和附图在此以其整体引入作为参考。

[0002] 序列表

在此申请中没有要求保护序列表。

[0003] 有关联邦政府资助的研究的声明

此发明分别在由 NIH 和 DoD 授予的 NS052139-04 和 W81XWH-06-2-0035 的政府支持下进行。政府在本发明中享有一定的权利。

发明领域

[0004] 本发明大体上涉及疫苗领域。本发明涉及被设计用于保护人免患由西尼罗病毒引起的疾病的疫苗。具体地，所述疫苗包含在昆虫细胞生产系统中生产的西尼罗病毒的重组囊膜（envelope，E）糖蛋白的截短形式（version）和基于铝的佐剂。

背景技术

[0005] 黄病毒科包括原型黄热病病毒（YFV），登革热病毒的 4 种血清型（DENV-1，DENV-2，DENV-3 和 DENV-4），日本脑炎病毒（JEV），蜱传脑炎病毒（TBEV），西尼罗病毒（WNV），圣路易斯脑炎病毒（SLEV）和约 70 种其他引起疾病的病毒。黄病毒是包含单条正链 RNA 基因组的小的、有囊膜的病毒。10 种基因产物由单个开放阅读框编码并翻译为以如下顺序组织的多聚蛋白：衣壳（C），“膜前体”（preMembrane，prM，其在病毒粒子从细胞释放前才被加工成“膜”（M）），“囊膜”（E），接着是非结构（NS）蛋白 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5（在 Chambers，T. J. 等人，*Annual Rev Microbiol* (1990) 44:649-688；Henchal，E. A. 和 Putnak，J. R.，*Clin Microbiol Rev.* (1990) 3:376-396 中综述）。然后通过由宿主以及病毒编码的蛋白酶介导的精确的加工事件产生各个黄病毒蛋白。

[0006] 黄病毒的囊膜来源于宿主细胞膜并包含病毒编码的膜锚定的膜（M）和囊膜（E）糖蛋白。E 糖蛋白是最大的病毒结构蛋白并包含负责细胞表面附着和内体内融合（intra-endosomal fusion）活性的功能结构域。其也是宿主免疫系统的主要靶，诱发病毒中和抗体的产生，这与保护性免疫相关。

[0007] 西尼罗病毒已成为在美国新出现的传染病。此病毒感染鸟，鸟充当病毒的天然储存库，此外还感染人和马，人和马是偶见宿主（incidental host）。其是虫媒传播病毒，由包括库蚊属（*Culex*）的多种属的超过 42 种蚊子传播。首个文件记录的 WNV 病例在 1937 年乌干达的西尼罗河区域发现（Smithburn 等人，*Am J Trop Med Hyg* (1940) 20:471-492）。从那以后其传播至中东、大洋洲、欧洲和亚洲的部分，并且最近在美洲出现。自 1999 年在纽约市记录到首个在美国的人感染的病例之后，病毒迅速传播，遍及美国东海岸并已穿过大陆向西传播。现在已经在所有 48 个大陆州的鸟群体中发现此病毒。WN 疾病的人病例已在 50 个州的 47 个中有文件记录，仅在阿拉斯加、夏威夷和缅因州未报导有人病例（*MMWR*，

2008, 57(26):720-23)。

[0008] 大部分感染 WNV 的个体经历类似流感的症状。然而，大量感染个体会出现严重的疾病，其具有 3-15% 的病死率并在老年人中病死率最高。另外，其在高百分比的非致死病例中导致永久性的神经障碍。在 2003 年，在 9,862 位有症状的感染个体中，2,866 位 (29%) 具有神经侵入性疾病(被定义为西尼罗脑膜炎、脑炎和脊髓炎)且 264 位死于此疾病。在 2004 年，神经侵入性并发症升高至 36%(*MMWR*, vol. 53 Nov. 19, 2004)。最近的研究显示，从病毒感染中恢复需要比原先想象的显著更多的时间。一项研究已推断出中值恢复时间为 60 天 (Comment, *Ann Inter. Med.* (2004), 141:153)，而另一项研究记录了仅 37% 的患者在 1 年后完全恢复 (Klee 等人, *Emerg. Inf. Dis.* (2004) 10:1405-1411)。病毒导致的神经损伤治愈较慢，且有时损伤是永久的。近年来，一些个体已遭受类似脊髓灰质炎的急性弛缓性麻痹症状。在老年患者中临床表现显著更差。在最近以色列爆发的 WNV 感染的研究中，在 233 位住院患者的研究组中，总体的病死率为 14%。然而，在 70 岁或更老的患者中，病死率为 29%(Chowers 等人, *Emerg. Inf. Dis.* (2001) 7:675-78)。在最近罗马尼亚 (Tsai 等人, *Lancet* (1998) 352:767-771) 和俄罗斯 (Platonov 等人, *Emerg. Inf. Dis.* (2001) 7:128-32) 的流行中也报导了类似的发现。因此，特别在老年 / 免疫衰老、免疫受损和免疫抑制的群体中，具有显著的与 WN 疾病相关的发病率和死亡率。

[0009] WNV 囊膜蛋白与其他黄病毒特别是日本脑炎 (JE) 血清复合型 (serocomplex)：JEV、圣路易斯脑炎 (SLEV) 和墨莱溪谷脑炎 (MVEV) 病毒的囊膜蛋白共有显著的同源性。针对包含在囊膜蛋白中的特定表位的抗体能够中和病毒，即抑制病毒在体外感染易感细胞。已将中和抗体表位定位至黄病毒 (包括 WNV) 的 E 糖蛋白的所有 3 个结构域 (Diamond 等人, *Immunol. Rev.* (2008) 225:212-25)。通常公认高滴度的病毒中和抗体是体内保护免于黄病毒感染和其导致的疾病的最佳体外相关指标 (correlate)(Markoff *Vaccine* (2000) 18:26-32; Ben-Nathan 等人, *J. Inf. Diseases* (2003) 188:5-12; Kreil 等人, *J. Virol.* (1998) 72:3076-3081; Beasley 等人, *Vaccine* (2004) 22:3722-26)。因此，诱发高滴度 WNV 中和抗体应答的疫苗将类似地保护疫苗接种者免于由 WNV 引起的疾病。

[0010] 迄今为止，黄病毒疫苗的开发已取得了多个成功 (mixed success)。为了产生保护免于由黄病毒引起的疾病的候选疫苗，已实施了 4 种基本方法。这 4 种方法是活减毒病毒、失活的全病毒、重组亚单位蛋白质和 DNA。为 YFV 开发的活减毒病毒疫苗已存在了数十年，并证明了此方法的有效性。失活的全病毒疫苗的应用已被证明用于 TBEV 和 JEV，具有基于此方法的用于这 2 种疾病靶标的注册产品。

[0011] 如上所述，开发用于 YFV、JEV 和 TBEV 的疫苗已经取得成功。然而，使用活减毒病毒和失活病毒法开发其他黄病毒的疫苗遇到了很大的挑战。例如，已在开发候选的活减毒登革热疫苗株中花费了大量精力；然而，许多检测的疫苗株已证实不令人满意的 (见， 例如， Eckels, K. H. 等人, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1984) 33:684-689; Bancroft, W.H. 等人, *Vaccine* (1984) 149:1005-1010; McKee, K. T., 等人, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1987) 36:435-442)。尽管这些最初不令人满意的结果，仍在继续努力开发和检测登革热活减毒候选疫苗株 (在 *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2003) 69:1-60 中综述)。在使用传统活减毒法开发 WNV 疫苗中没有投入太多精力。

[0012] 为了开发黄病毒疫苗，作为传统活减毒法的可选方案，已经使用了重组嵌合法。

此方法使用已知的活减毒黄病毒株作为基础并用来自相关目的病毒的合适基因(对于黄病毒为 prM 和 E)取代基础病毒的等同基因。已用于 WNV 和 DENV 疫苗开发的一种方法是使用基于减毒的 DENV-4 株的 intertypic 嵌合体 (Bray, M. *等人*, *J. Virol.* (1996) 70:4162-4166; Chen, W., *等人*, *J. Virol.* (1995) 69:5186-5190; Bray, M. 和 Lai, C.-J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:10342-10346; Lai, C. J. *等人*, *Clin. Diagn. Virol.* (1998) 10:173-179)。另一种方法是使用 YFV 17D 减毒株作为基础来开发 JEV、DENV 和 WNV 的重组嵌合疫苗 (Lai, C.J. 和 Monath T.P. *Adv Virus Res* (2003) 61:469-509; Monath 等人 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103:6694)。尽管使用活减毒嵌合法相比传统活减毒法有优势,但是嵌合法仍受到开发合适的减毒株所面临的困难的困扰,以及在 DENV 疫苗的情况下,获得针对 4 种登革热病毒的平衡的四价应答所面临的困难的困扰。此外,活减毒法可能不适用于靶向脑炎疾病的疫苗(由于提高的风险因素)或具有受损的免疫系统的目的群体。这两种因素都适用于 WNV 疫苗开发。

[0013] 目前存在使用全失活病毒法生产的用于 JE 和 TBE 的可商业获得的疫苗。如同活减毒病毒法,失活病毒法在某些黄病毒中的应用不能保证在其他黄病毒中成功。例如,开发失活的 DENV 或 WNV 疫苗的努力遇到了一定困难(limited success)。此方法受限于从细胞培养系统中得到足够的病毒产量的能力。从昆虫细胞例如 C6/36 细胞中得到的病毒产量一般在 10^4 至 10^5 pfu/ml 的范围,远低于产生低成本的失活病毒疫苗所需的水平。从哺乳动物细胞(包括 LLC-MK2 和 Vero 细胞)中得到的产量较高,但从单一的 Vero 细胞系得到的约 10^6 pfu/ml 的最高产量仍低于获得低成本疫苗产品所需的水平。

[0014] 为了开发用于 DENV、JEV、TBEV 和 WNV 的非复制型黄病毒疫苗,还已评估了裸 DNA 法的应用 (在 Putnak,R. 等人 (2003) *Adv. Virus Res.* 61:445-68 中综述)。DNA 法提供易于生产、使用确定的序列、由于体内病毒抗原的表达引发体液和细胞免疫二者的潜力的优点。尽管具有这些优点,在人中诱发持续和强烈的免疫应答,特别是抗体应答的能力始终是此方法的主要障碍。另外,DNA 疫苗面临额外的法规审查,因为担忧质粒序列整合进宿主基因组和产生针对双链 DNA 的自身抗体的潜能。迄今为止没有批准任何人用 DNA 疫苗,且不清楚此方法何时可被认为适用于预防性的人疫苗。

[0015] 用于黄病毒疫苗开发的重组亚单位蛋白质的使用是非复制型病毒方法的另一个实例。此方法提供产生非常确定的产品和引发特异性免疫应答的潜能的优点。尽管存在产生有关的和强烈的免疫应答的潜能,也存在与使用重组亚单位蛋白质疫苗相关的挑战。这是因为在引发期望的免疫应答中蛋白质的质量(类似天然的结构)和对佐剂的需要二者。重组亚单位蛋白质疫苗具有历史悠久的安全性和保护效力,最有效的证据是重组亚单位乙肝疫苗(例如 Engerix B® 和 Recombivax HB®),和最近的人乳头瘤病毒疫苗(例如 Gardasil® 和 Cervarix®)。在生产中的任意时间不存在复制性病毒的事实有助于保证在预防背景下对健康或免疫受损个体施用亚单位疫苗相关的极其有限的风险。此外,已显示乙肝和人乳头瘤病毒疫苗是高度免疫原性和有效的。

[0016] 重组黄病毒蛋白质的表达已集中在结构蛋白 C、prM 和 E 以及非结构蛋白 NS1 上。E 蛋白是大多数研究的对象,因为此蛋白质暴露在病毒的表面,涉及病毒生命周期的重要生物学方面(例如结合受体和介导融合),并且在受感染的宿主中是中和抗体的靶 (Chambers, *如上*; Mason, P. W., *J. Gen Virol* (1989) 70:2037-2048)。此外,针对纯化的黄病毒

E 蛋白的单克隆抗体在体外是中和性的并且已显示有些在体内赋予被动保护 (Henchal, E.A. 等人，*Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1985) 34:162-169; Heinz, F. X. 等人，*Virology* (1983) 130:485-501; Kimura-Kiroda, J. 和 Yasui, K.，*J. Immunol.* (1988) 141:3606-3610; Trirawatanapong, T. 等人，*Gene* (1992) 116:139-150; Morrey, J.D. 等人，*J. Inf. Dis* (2006) 194:1300-8)。

[0017] 已利用了多种表达系统例如大肠杆菌 (*E. coli*)、酵母和杆状病毒产生重组黄病毒蛋白质用于疫苗使用。这些尝试受到低产量、黄病毒蛋白质的不正确加工和中等至较差的免疫原性的困扰 (Eckels, KH 和 Putnak, R, *Adv. Virus Res.* (2003) 61:395-418)。在 Hawaii Biotech, Inc. (HBI) 进行的表达重组 E 亚单位蛋白的工作已确定需要维持 E 蛋白的类似天然结构以使重组蛋白作为有效的免疫原。产生具有天然类似结构的重组 E 蛋白的能力高度依赖于使用的表达系统。美国专利 6,165,477 公开了在酵母细胞中表达 DENV E 蛋白质亚单位的方法。在酵母细胞中表达的 E 亚单位证明了相比细菌系统的改进的结构，但仍然面临有关过度糖基化、产量和产物一致性的问题。

[0018] 在最近的研究中，已经确定使用稳定转化的昆虫细胞表达 E 蛋白的截短形式得到维持类似天然结构的一致产物，如通过 X 光结晶学所测定的 (Modis, Y. 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003) 100:6986-91; Modis, Y. 等人，*Nature* (2004) 427:313-19; 和 Zhang, Y. 等人，*Structure* (2004) 12 :1607-18)。使用稳定转化的昆虫细胞系统已得到来自 DENV-1、-2、-3、-4、JEV、TBEV 和 WNV 的截短的重组 E 亚单位蛋白的成功表达。美国专利 6,136,561 公开了在稳定转化的昆虫细胞中表达 DENV、JEV、TBEV 和 YFV 的重组 E 亚单位蛋白的方法。美国专利 6,432,411 公开了当与包含皂素的类似 ISCOM 结构组合时，在稳定转化的昆虫细胞中表达的黄病毒 E 重组亚单位蛋白作为候选疫苗的效用。最近报导了由稳定转化的昆虫细胞系产生的截短的重组 WNV 囊膜亚单位蛋白 (WN-80E) 和非结构蛋白 1 (WN-NS1) 的临床前评估 (Lieberman 等人，*Vaccine* (2008) 25:414-423; Watts 等人，*Vaccine* (2007) 25:2913-2918; Siirin 等人，*Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2008) 79:955-962)。在这些报导中，在小鼠和仓鼠模型中评估了用包含皂素的佐剂配制的 E 和 NS1 组合，以评估保护效力。这些专利和出版物证明，当与包含皂素的佐剂组合时，由稳定转化的昆虫细胞表达的黄病毒重组亚单位蛋白在动物模型中产生适当的抗体应答的效用。美国专利 6,432,411 以及 Lieberman 等人 2007 (见上) 和 Watts 等人 2007 (见上) 也证明了在疫苗制剂中包含重组 NS1 在动物模型中的益处。然而，这些专利和出版物没有提出或预测仅基于 E 的已证明适于人用的疫苗制剂。

[0019] 大体上，使用非复制型病毒疫苗法例如失活病毒、重组亚单位蛋白和 DNA 相比活减毒病毒疫苗法具有若干优点。这些优点基本上涉及安全性，因为没有对受试者递送活病毒，并且优点涉及通过调整剂量调节和平衡免疫应答的能力。

[0020] 在开发用于人的黄病毒疫苗中，基于在动物模型中的临床前数据难以预测候选疫苗在人受试者中的安全性和免疫原性。已证明许多已进入人临床试验的活减毒病毒候选疫苗面临挑战。最令人瞩目的完全失败的实例是克隆的登革热病毒 3 型分离株展示的安全特性，其在非人灵长类中展示了非常吸引人的安全特性，但其在香港的疫苗接受者中引发登革热 (Sanchez 等人，*FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (2006) 24:4914-26)。通过使用非复制型病毒疫苗可减少此挑战，其不需要与复制型病毒疫苗相同水平的病毒 / 宿主相互

作用以获得疫苗效力。然而，存在大量在临床前模型中显示了良好的安全性和保护效力，而在人中不能作为安全和有效的疫苗起作用的非复制型病毒候选疫苗的实例(例如，灭活的RSV疫苗；Murphy等人，*J. Clin. Microbiol.* (1986) 24: 197-202)。因此，可能存在与开发用于黄病毒的安全和有效的疫苗相关的多重挑战且开发经常需要数年的试验和错误。此外，基于动物模型的临床前研究可能不能预测疫苗在人受试者中的表现；和因此，人数据对证明候选疫苗的效用是关键的。

[0021] 尽管在临床前研究和开发中的多个阶段中有若干研究中的WNV疫苗，但据以前的报导仅有3种候选疫苗进入人临床试验。已在临床研究中检测的3种疫苗是：(1)活的、减毒的登革热血清型4-西尼罗嵌合体(Pletnev 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99:3036-41)；(2)活的、减毒的黄热-西尼罗嵌合体(Chimerivax; Monath 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103:6694)；和(3)编码prM和E基因的“裸”DNA疫苗(Martin 等人，*J. Infect. Dis.* (2007) 196:1732-40)。3种候选疫苗中的每一种都具有相关的内在困难和潜在的缺点。

[0022] 临床检测的前两种疫苗都是活减毒疫苗。对所有提供给健康受试者的活病毒疫苗来说最重要的就是安全性方面的担忧。病毒减毒不足可导致病毒相关的副作用，而减毒过度可削弱疫苗的效力。此外，可能发生回复为野生型或突变为提高的毒性(或降低的效力)。此外，即使适当地减毒，活病毒疫苗对特定患者群体，例如免疫缺陷或免疫抑制患者，以及正常群体的特定部分，例如怀孕妇女或老年个体是禁忌的。Chimerivax技术特别令人担忧的是YF 17D疫苗(其充当嵌合体的骨架)在老年和免疫受损个体中的安全特征。自20世纪90年代末以来，已记录了大量致命的、传播的、亲内脏的和亲神经的疫苗病毒感染的病例，特别是在老年和免疫受损个体中。这已导致反对在这些群体中使用YF 17D疫苗的建议，除非YF病毒感染风险非常高之外(Barrett, ADT和Teuwen, DE (2009) *Curr. Opin. Immunol.* 21:308-13)。根据WNV感染在老年受试者中的发病率和死亡率之间的重要联系，从安全性观点来看对此目的疾病应用活减毒疫苗法是非常有问题的，因此前两种候选疫苗没有为西尼罗疫苗的需求提供安全的解决方案。

[0023] 在临床试验中已检测的第三种西尼罗疫苗是DNA疫苗。目前裸DNA疫苗未证实用于任何感染性疾病，且由于诱发针对DNA的自身免疫应答而引起的潜在免疫病理学问题长期未得到解决。最近报导了WNV DNA疫苗临床试验的结果(Martin 等人，*J Infect Dis* (2007) 196:1732)。引发了低水平的中和抗体；然而，显然已放弃了此DNA疫苗的临床开发，可能与安全性挑战有联系。因此，DNA疫苗没有为开发人用的WNV疫苗提供安全和有效的解决方案。

[0024] 如上所述，已进行了努力以产生既安全又具有充分免疫原性的保护人免患由WNV感染引起的疾病的疫苗。尽管进行了这些努力，仍未研制出完全满足这些条件的人用WNV疫苗。因此，本发明待解决的技术问题是发现满足2种主要条件的WNV疫苗；(1)在接种的个体(人受试者)中诱发相关保护性免疫应答，和(2)根据包括老年和免疫受损个体的主要高危群体，在人受试者中维持优越的安全特性的能力。这代表了在WNV疫苗开发中的重大挑战，且迄今为止没有一种疫苗方法已显示了充分解决此技术问题的所有方面。随着西尼罗病毒感染传播的流行，对解决方案存在尚未满足且日益增长的需求。

[0025] 发明概述

本发明提供了唯一的人疫苗用于保护免患与 WNV 感染有关的疾病。所述疫苗通过组合 WNV 囊膜蛋白衍生的重组亚单位蛋白和氢氧化铝佐剂形成。所述疫苗能够诱发相关保护性免疫应答，并在接种的人志愿者中已证明可接受的安全特性。这种唯一的疫苗制剂依赖于新的、适当折叠的重组囊膜亚单位蛋白（“西尼罗 80E”或“WN-80E”）和基于铝的佐剂的组合，以产生疫苗制剂 HBV-002。这种疫苗（1）在健康的人志愿者中诱发了相关的保护性免疫应答，例如病毒中和抗体，和（2）维持对健康和免疫受损个体施用的可接受的安全特性。

[0026] 本发明的其他方面包括在可接受的载体中使用治疗有效量的疫苗用作针对由 WNV 感染引起的疾病的免疫预防药，和在可接受的载体中使用治疗有效量的疫苗作为药物组合物。

附图说明

[0027] 图 1. WN-80E 重组亚单位蛋白的氨基酸序列。氨基酸编号从蛋白质的氨基端开始指示。

[0028] 图 2. 纯化的西尼罗 80E 的考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶（A）和蛋白质印迹（B）。所有样品在 10% 的凝胶上在非还原条件下电泳。使用针对西尼罗病毒产生的兔多克隆抗血清显色蛋白质印迹。在凝胶和印迹的左侧指示分子量标记的大小（以 kD 为单位）。在每个泳道顶端指示样品上样量（以 μg 为单位）。

[0029] 图 3. 在用西尼罗 HBV-002 疫苗制剂接种的人志愿者中诱发的病毒中和抗体应答。

[0030] 发明详述

本文描述的发明提供了用于人的保护免于由西尼罗病毒感染导致的疾病的疫苗。所述疫苗包含 WNV 重组亚单位囊膜糖蛋白（WN-80E）和铝佐剂。将所述人用疫苗制剂称为 HBV-002。HBV-002 在人志愿者中有效诱发强烈的病毒中和抗体应答。此外，HBV-002 具有对于健康和高危（at-risk）人受试者的可接受的安全特性。

[0031] 西尼罗病毒囊膜蛋白亚单位（WN-80E）

本发明的 WNV 疫苗使用 WN-80E 重组亚单位蛋白，所述蛋白通过基于果蝇 Schneider 2 (S2) 细胞的细胞培养表达系统产生。使用此系统得到维持类似天然结构的重组囊膜亚单位蛋白。WNV 重组囊膜蛋白在 C 末端截短，剩下 80% 的天然囊膜蛋白（“80E”）。因此 WN-80E 被定义为从首个 N- 端氨基酸开始 E 的约前 80% 的连续氨基酸。C- 端截短被设计为缺失 WN E 蛋白的膜锚定部分（约 50 个氨基酸或 10% 的全长 E 蛋白的羧基端末端），换句话说，从其 N- 端的第一位氨基酸开始的 WN E 蛋白的最多前 90% 的连续氨基酸，因此允许其被分泌至细胞外培养基且便于回收。可克隆和分泌超过 90%，但少于 100% 的 E 蛋白，即蛋白质可为 90%+ 的长度，羧基端截短的，并可包括部分跨膜结构域，只要截短的 E 蛋白可分泌。“可分泌”指能够被分泌，和通常从表达系统的转化细胞中被分泌。80E 截短蛋白进一步缺失了连接 E 的胞外结构域和膜锚定部分的 WN E 蛋白的“茎”部分。茎部分不包含重要的抗原表位和因此未被包含。

[0032] 包含在 WNV 疫苗中的优选抗原是 WN-80E。在果蝇 S2 表达系统中表达的 WN-80E 重组亚单位蛋白被分泌至培养基中，被适当地糖基化，并维持类似天然的构象（通过与构象敏感的单克隆抗体 4G2 的反应性测定）。如在本发明中证明的，人用重组 WN-80E 亚单位蛋白

的合适制剂导致在人受试者中诱发有效的病毒中和抗体的能力。因此，本发明的 WNV 疫苗制剂为关键的技术问题——产生证明在人受试者中具有高水平的安全性和免疫原性的西尼罗疫苗——提供了新的解决方案。

[0033] 本发明的优选疫苗制剂包含适于人用的佐剂。优选的佐剂是基于铝的佐剂(例如，Alhydrogel™)。具有铝的制剂包含掺合剂，由此允许 WN-80E 抗原结合 Alhydrogel，从而使 ≥ 75% 的抗原结合氢氧化铝。

[0034] 在优选的实施方案中，WN-80E 包含 WNV，NY99 株的第 1-401 位氨基酸。图 1 提供了 WN-80E 的氨基酸序列。从包含编码 WNV prM 蛋白和 80E 蛋白的合适的 DNA 片段的载体中优选地产生 WN-80E 蛋白。编码的 prM 段在宿主细胞中被细胞酶加工从而以类似在天然 WNV 成熟过程中发生的方式释放成熟的 WN-80E 蛋白(图 1)。图 2 中显示了由 S2 细胞表达的纯化的 WN-80E 产物。

[0035] 在本发明的另一个实施方案中，WN-80E 被更广泛地定义为在 Cys1-Cys2、Cys3-Cys8、Cys4-Cys6、Cys5-Cys7、Cys9-Cys10 和 Cys11-Cys12 处包含 6 个二硫键的西尼罗病毒囊膜蛋白亚单位；其中所述多肽作为重组蛋白从果蝇细胞中分泌；且其中所述多肽当施用于人受试者时引起针对西尼罗病毒的中和抗体应答。

[0036] 在更优选的实施方案中，重组 WNV 囊膜蛋白亚单位还包含所述二硫键模式和亲水性特征，其特征在于从天然 WNV 囊膜蛋白的 N 端的首个氨基酸开始与囊膜蛋白的 80% 同源的部分(80E)。换句话说，在包含 WN-80E 的序列中的氨基酸可被取代，只要维持二硫键和亲水性特征以确保重组亚单位蛋白保留类似天然的结构和合适的免疫原性(引发病毒中和抗体的能力)。

[0037] 优选地，使用主细胞库(Master Cell Bank)在无血清培养基中表达 WN-80E 重组亚单位蛋白并使用以前描述的单克隆抗体(例如，4G2)(Ivy 等人，美国专利号 6,432,411)，通过免疫亲和层析(IAC)纯化。这样得到可在适于人用的疫苗制剂中使用的 WN-80E 产物。

[0038] 令人惊讶地，且与在其他黄病毒制剂中包含非结构蛋白例如非结构蛋白 1 (NS1) 的描述的额外益处形成对比 (McDonell 等人，US 6,416,763)，本发明的仅包含 WN-80E 蛋白的疫苗制剂在非人灵长类 (Lieberman 等人，*Clin. Vaccine Immunol.* (2009) 16:1332-37) 和人受试者中可作为有效的免疫原性疫苗，甚至在不包含 NS1 的情况下。图 3 中显示了在用包含 WN-80E 蛋白和基于铝的佐剂的 HBV-002 疫苗制剂接种的人志愿者中诱发的病毒中和抗体应答。

[0039] 铝

在优选的实施方案中，本发明的 WNV 疫苗包含与基于铝的佐剂(统称“铝”或“基于铝的佐剂”)例如氢氧化铝、磷酸铝或其混合物一起配制的 WN-80E 重组亚单位蛋白。氢氧化铝(可以“Alhydrogel™”商业地获得)用于制备临床材料并因此是优选的铝形式。基于铝的佐剂是在美国和全世界首个注册的人用佐剂，且其有效性是被广泛公认的。认为基于铝的佐剂至少部分通过储存机制起作用，且具有类似天然结构的重组 WN-80E 抗原和铝的佐剂作用的组合足以在接种的个体(包括免疫缺陷群体成员)中诱发有效的免疫应答。具有铝的制剂包含掺合剂，由此允许 WN 80E 抗原结合 Alhydrogel™，从而使≥ 75% 的抗原结合氢氧化铝。

[0040] 优选地，在动态药品生产管理规范(cGMP)下实施 WN-80E+Alhydrogel 的 WNV 疫苗

制剂和用优选的疫苗制剂(HBV-002)填充小瓶的生产。这样得到适于人用的包含 WN-80E 和铝的 WNV 疫苗制剂。

[0041] 施用和用途

本发明提供了预防或减弱由 WNV 感染引起的疾病的手段。如本文中使用的,如果对个体施用疫苗导致个体对疾病的完全或部分免疫性,或与疾病相关的症状或病症的完全或部分减弱(即,抑制),则称疫苗预防或减弱疾病。

[0042] 如果接受的患者可耐受组合物的施用,则称组合物为“药理学可接受的”。如果施用的量是生理学显著的,则称以“治疗有效量”施用这样的药剂。如果药剂的存在导致接受的患者的生理学中可检测的变化,则其是生理学显著的。在本发明中在接受的患者中可检测的变化是诱发针对 WNV 的中和抗体。

[0043] 本发明的活性疫苗可单独使用,或与其他活性疫苗(例如包含使其有效量的其他活性亚单位的疫苗)组合使用。在特定制剂中可包含一种或几种病毒或血清型的对应的或不同的亚单位。本发明的活性疫苗可还包含药学上可接受的赋形剂。

[0044] 所述发明的治疗组合物可通过皮下、肌肉内或皮内注射非肠道地施用;然而,也可应用其他全身性施用模式。用于本发明的优选施用方法是肌肉内途径。

[0045] 当使用多次施用方案时,存在许多不同的技术用于免疫的时间选择。优选地使用本发明的组合物多于 1 次以提高被免疫的受试者表达的免疫球蛋白库的表达水平和多样性。通常,如果给予多次免疫,将间隔 1 至 2 个月给予免疫。本发明的优选免疫时间表是在 0、1 和 2 个月时免疫受试者。也可使用其他免疫时间表。例如,可使用例如 0、1 和 3 个月,或 0、1 和 6 个月,或 0、1、12 个月的可选的免疫时间表。可在规定的时间间隔例如每 5 至 10 年施用额外的加强免疫。

[0046] 为了免疫受试者以抵抗例如 WNV 引起的疾病,使用通常包括多次施用疫苗的常规的免疫方案对受试者施用包含重组亚单位蛋白和佐剂的疫苗制剂。施用通常通过注射,通常为肌肉内或皮下注射进行;然而,也可应用其他全身性施用模式。

[0047] 根据所述发明,治疗组合物的“有效量”是足以获得预期的生物学效果的量。大体上,提供组合物有效量所需的剂量将取决于下述因素而变化,例如受试者的年龄、病症、性别和疾病程度(如果有的话),以及本领域普通技术人员可调整的其他变量。本发明的抗原性制备物可以有效量的单个或多个剂量施用。本发明的组合物的有效量可在 0.01-100 μg/剂量,更优选从 5-50 μg/ 剂量,和最优选 15-50 μg/ 剂量中变化。本发明的组合物可还包含药学上可接受的赋形剂。

实施例

[0048] 以下给出的实施例提供了本发明的基础。实施例证明了能够大规模地且在 cGMP 下制备重组 WN-80E 蛋白和 HBV-002 疫苗制剂,以支持对人受试者施用(实施例 1-3)。实施例还证明了疫苗在健康的成年志愿者中的安全性和免疫原性(效力)(实施例 4)。HBI WNV 疫苗的安全性和效力取决于 2 个不同方面的新型组合。一方面,重组亚单位蛋白与基于铝的佐剂的组合的内在安全性为最严重的疾病提供了预防靶向老年和免疫受损个体——特别虚弱的高危群体的疾病的最佳方法。第二方面,在 cGMP 下,以足够实际应用的量生产构象相关(类似天然结构)的重组 WN-80E 抗原得到在人受试者中诱发病毒中和抗体的疫苗,提

供了保护免于疾病的机制。这两方面的独特组合导致在人受试者中安全和有效的 WNV 疫苗的新发明。这些疫苗制剂的进一步特征在于以下意料之外的发现，即对于有效的免疫原性和保护不需要包含非结构蛋白 NS1。此外，公开的西尼罗疫苗独特地处于这样的位置，即解决了在接种的个体中诱发相关保护性免疫应答同时维持可接受的安全特性的技术问题，特别是针对那些处于患严重疾病的极高风险下的受试者，老年和免疫受损个体。

[0049] 以下实施例旨在说明而非限制本发明。

[0050] 实施例 1

在果蝇 S2 系统中表达和纯化西尼罗 80E 蛋白

表达质粒 pMttbns（来源于 pMttPA）包含以下元件：黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）金属硫蛋白启动子，人组织纤溶酶原激活物分泌前导序列（tPAL）和 SV40 早期多聚腺苷酸化信号。在 Hawaii Biotech，从 pMttbns 载体上切除 14 个碱基对的 *Bam*HI 片段以得到包含唯一的 *Xho*I 位点以及现有的唯一的 *Bgl*II 位点的 pMtt Δ Xho。此表达载体促进表达的蛋白质分泌至培养基。使用这些唯一的 *Bgl*II 和 *Xho*I 位点将西尼罗序列引入 pMtt Δ Xho 载体。为表达羧基端截短的西尼罗囊膜蛋白，合成了编码西尼罗病毒的整个 prM 蛋白和 E 蛋白的第 1-401 位氨基酸的合成基因 (Midland Certified Reagent Co., Midland, TX)。合成基因的核苷酸序列符合 1999 年在纽约市分离的西尼罗病毒的已公布的序列。在 E 蛋白第 401 位氨基酸的 E 蛋白 C- 端截短去除了跨膜结构域，并因此可分泌至培养基。将最终的 prM80E 质粒构建体称为 pMttWNprM80E。在 S2 细胞中表达后，prM 序列由宿主细胞蛋白酶从 80E 序列上切除。401 个氨基酸的 WN-80E 重组亚单位蛋白被分泌至培养基。图 1 中提供了 WN-80E 蛋白的氨基酸序列。

[0051] 使用（i）磷酸钙共沉淀法或（ii）Cellfectin (Invitrogen Kits, Carlsbad, CA)，根据制造商的建议，用 pMttWNprM80E 表达质粒和编码潮霉素抗性的 pCoHygro 选择质粒共转化 S2 细胞。用 20 :1 的表达质粒与选择质粒的比例，用 20 μg 总 DNA 共转化细胞。用 300 μg/ml 的潮霉素 B(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 选择转化体。在选择后，使细胞适应在无血清培养基 Excel 420 (JRH, Lenexa, KS) 中生长。为了研究表达，在 Excel 420、300 μg/ml 潮霉素中培养细胞，并用 200 μM $CuSO_4$ 诱导。以 2 X 10^6 个细胞 /ml 的密度接种细胞并允许生长 6-7 天。在最佳条件下，在 6-7 天的生长后得到大于 2 X 10^7 个细胞 /ml 的细胞密度。通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹检查培养物上清中的表达蛋白。

[0052] 为了在蛋白质印迹上检测 WN-80E，使用兔多克隆抗西尼罗病毒抗体 (BioReliance Corp., Rockville, MD) 或与西尼罗病毒 E 蛋白交叉反应的兔多克隆抗 -DEN 纯化失活病毒，接着使用抗 - 兔 IgG- 碱性磷酸酶缀合的第二抗体。使用 NBT/BCIP (Sigma Chem. Co.) 固相碱性磷酸酶底物显色印迹。

[0053] 使用单克隆抗体（MAb）4G2，通过免疫亲和层析（IAC）实现 WN-80E 蛋白的纯化。简单地说，程序涉及表达后的培养基的澄清。然后将原材料上样至 IAC 柱，其包含通过 N- 羟基琥珀酰亚胺化学法共价连接的固定化的 MAb。在样品上样后，用包含 0.05% (v/v) 吐温 -20 的 10 mM 磷酸缓冲液（PBS），pH7.2(PBST, 140 mM NaCl) 清洗基质。用 20 mM 甘氨酸缓冲液，pH 2.5 从 IAC 柱上洗脱结合的蛋白质。中和洗脱液然后将缓冲液替换为 PBS。通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）使用考马斯或银染、蛋白质印迹、紫

外光吸收和夹心 ELISA 常规地分析纯化产物，以分别测定纯度、身份（identity）、量和生物活性。另外，通过 N- 端氨基酸测序和氨基酸分析来分析样品。这些分析提供了纯化产物的身份和量的验证。

[0054] 图 2 中显示了纯化的 WN-80E 蛋白的代表性 SDS-PAGE 和蛋白质印迹谱。为了分析，在非还原条件下电泳样品。WN-80E 分子以单个条带迁移并具有与从氨基酸组成测定的一致的相对分子量（即 43kD）。

[0055] 实施例 2

在 cGMP 下生产 WN-80E 以支持临床测试

在 cGMP 条件下从用 pMttprMWN80E 质粒转化的 S2 细胞中制备主细胞库（MCB）。cGMP 制造方法包括将 S2 MCB 细胞系扩增至搅拌槽生物反应器和然后收获包含分泌的蛋白质的培养基。使用深层滤器通过过滤将细胞从培养基中分离。然后通过使用 4G2 单克隆抗体的免疫亲和层析从得到的澄清上清中纯化 WN 80E。免疫亲和纯化产物然后经历低 pH 病毒失活步骤和病毒过滤步骤，使用具有能够去除 20nm 颗粒的孔径的 PVDF 膜来进行。WN-80E 蛋白的最终处理包括缓冲液替换和通过超滤浓缩，然后是最终的通过 0.2 μm 滤器的过滤。

[0056] 如下所述实现在 cGMP 下制备 WN-80E 的代表性批次。解冻 MCB 小瓶并在 10 mL 体积的 EX-CELL 培养基中于 26℃下培养 5 天。将每份培养物扩增至一次性摇瓶。使培养物培养至得到 1.5 X 10^7/mL 的细胞密度。合并培养瓶并用于在一次性摇瓶中接种更多的培养物，然后将其培养至得到 2 X 10^7 个细胞 /mL 的密度。然后在一次性摇瓶中将培养物扩增为多份培养物。将这些培养物培养至得到 1.6 X 10^7 个细胞 /mL 的平均细胞密度。合并培养瓶中的细胞并用于接种 20L 的不锈钢生物反应器。将培养物培养至得到 1.2 X 10^7 个细胞 /mL 的细胞密度。将合适量的细胞从 20L 生物反应器转移至 100L 不锈钢生物反应器以得到 2 X 10^6 个细胞 /mL 的初始细胞密度。将培养物培养至得到 >4.0 X 10^6 个细胞 /mL 的细胞密度。然后通过加入硫酸铜至培养物以得到 0.2 mM 的终浓度，诱导培养物。然后将培养物培养 5 天。使用 0.45 μm 滤芯（filter cartridge），接着使用 0.2 μm 滤芯，通过深层过滤收获 100L 的培养物。在单个使用袋中以 10 L 体积收集滤过液并贮存于 -20℃。

[0057] 解冻 WN-80E 整批收获物（bulk harvest）并通过使材料通过 5 μm 孔径的滤器去除颗粒。将滤过的整批收获物直接上样至 4G2- 琼脂糖凝胶柱。上样后，用包含 0.05% 吐温 -20 的 11 mM PBS, pH 7.1(PBST) 洗涤柱，然后通过用甘氨酸缓冲液降低 pH 洗脱保留的 WN-80E。合并亚批次，然后通过降低 pH 至 3.8 的终 pH 并在室温 (15-25℃) 孵育材料 16-24 小时进行病毒失活，然后将 pH 调节至 7.0 ± 0.5。使材料通过 0.2 μm 的预滤器以去除小颗粒，然后使用 20 nm 孔径的膜过滤。然后通过超滤浓缩材料和替换缓冲液，并通过 0.2 μm 滤器直接滤入无菌袋完成最终的无菌过滤。在释放用于配置成 HBV-002 疫苗前，对纯化的 WN-80E 生物物质进行大量的安全性、身份、强度和纯度的评估。

[0058] 实施例 3

配制 HBV-002 疫苗用于临床研究

解冻在实施例 2 中描述的纯化的 WN-80E 生物物质并转移至 Class 100 层流流动区。将 WN-80E 加入无菌容器并加入无菌 Dulbecco's 磷酸缓冲液（DPBS）以得到 0.20 mg/mL 的最终蛋白质目的浓度。无菌过滤稀释的 WN-80E。加入一定体积的 Alhydrogel '85 至含有 DPBS 的无菌容器至 14.0 mg/mL 的最终 Alhydrogel 浓度。然后将 WN-80E 蛋白溶液定量转

移至 Alhydrogel 悬浮液并在 2-8℃下过夜温和混合。

[0059] 在过夜吸收以后，测定未被吸收的 WN-80E 蛋白的量。最低 75% 的吸收是前进至 HBV-002 疫苗的填充所必需的。在准备好的无菌小瓶中分装 HBV-002 疫苗。用塞子塞住填充的小瓶，封口并压褶。将填充的 HBV-002 疫苗小瓶贮存于 2-8℃。在临床研究中使用 HBV-002 疫苗之前，进行了大量的安全性、强度、身份、效力和纯度的检测。

[0060] 实施例 4

HBV-002 西尼罗重组亚单位疫苗的临床检测

在临床试验中检测了如实施例 3 中所述的在 cGMP 下制造的 HBV-002 疫苗。在健康成年志愿者中的 HBV-002 生物产品的 1 期、标签开放式、临床研究评估了具有相同量 Alhydrogel '85' 佐剂的疫苗活性成分（WN-80E）的 3 种不同剂量水平或不含 Alhydrogel '85' 的 WN-80E 的最高剂量水平。受试者在第 0、4 和 8 周接受研究疫苗的单次 IM 注射。在下表 1 中总结了研究设计。

[0061] 表 1. 临床研究 HBV-002-C-101 的设计

处理	同期组群
低剂量 WN-80E (5 μg) + Alhydrogel (3.5 mg)	同期组群 A (N = 6)
中剂量 WN-80E (15 μg) + Alhydrogel (3.5 mg)	同期组群 B (N = 6)
高剂量 WN-80E (50 μg) + Alhydrogel (3.5 mg)	同期组群 C (N = 6)
高剂量 WN-80E (50 μg), 无佐剂	同期组群 D (N = 6)

。

[0062] 通过在研究志愿者中的定向的身体检查、常规实验室检测（血液学、临床化学和尿分析）和生命体征和不良事件的记录在研究全程中评估安全性和耐受性。另外，受试者在每次接种后使用 14 +/-2 天的日志卡以记录反应原性和耐受数据以及特定不良事件。在该研究中的效力评估包括测定病毒中和抗体滴度（即免疫原性）的比例和程度，如通过≥ 1:10 的 $PRNT_{50}$（蚀斑减少中和试验）试验测定。

[0063] 临床安全性评估显示，在给药期间全程中疫苗被良好耐受，没有严重的不良事件。记录的主要副作用是一般持续时间较短（1-3 天）的轻微的注射位点反应（例如痛、肿胀）。基本上没有与疫苗相关的全身性不良事件，且与疫苗相关的少数事件（例如头痛）实际上较轻且持续时间很短（几小时）。这证明 HBV-002 疫苗具有完全可接受的安全特性且适用于虚弱和高危群体，例如老年和免疫受损个体。

[0064] 效力评估（病毒中和抗体的测量）证明，当在第 3 次剂量后 2 周检测时，所有接受包含 Alhydrogel '85 的 HBV-002 疫苗制剂的受试者（100%）不管剂量多少都产生了≥ 10 的病毒中和抗体滴度。许多接受 15 或 50 μg 剂量的疫苗的受试者在第 2 次剂量后就产生了病毒中和抗体滴度。图 3 中说明了 HBV-002 疫苗诱发的病毒中和抗体应答。

[0065] 这证明这种特别安全的疫苗也特别有效，且克服了在接种的个体中诱发相关保护性免疫应答同时维持可接受的安全特性的技术问题，特别是针对那些处于患严重疾病的极高风险下的受试者，老年和免疫受损个体。此外，尽管预期需要 NS1 用于有效的保护 (McDonell 等人， US 6,416,763)，在制剂中不含 NS1 的接种个体中诱发了这种相关保护

性免疫应答。

[0066] 参考资料

Bancroft, W.H. 等人，(1984) *Vaccine* 149:1005-10

Barrett, ADT 和 Teuwen, DE, (2009) *Curr. Opin. Immunol.* 21:308-313

Beasley, D. 等人，(2004) *Vaccine* 22:3722-26

Ben-Nathan 等人，(2003) *J. Inf. Dis.* 188:5-12

Bray, M. 等人，(1996) *J. Virol.* 70:4162-66

Bray, M. 和 Lai, C.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10342-46

Chambers, T.J. 等人，(1990) *Annual Rev. Microbiol.* 44:649-88

Chen, W. 等人，(1995) *J. Virol.* 69:5186-90

Chowers 等人，(2001) *Emerg. Inf. Dis.* 7:675-78

Comment (2004) *Ann. Inter. Med.* 141:153

Culp, J.S. 等人，(1991) *Biotechnology* 9 :173-7

Cuzzubbo 等人，(2001) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:1150-55

Diamond, M.S. 等人，(2008) *Immunol.Rev.* 225 :212-225

Eckels, K.H.，和 Putnak, R. (2003) *Adv. Virus Res.* 61:395-418

Heinz, F.X. 等人，(1983) *Virology* 130:485-501

Henchal, E.A. 等人，(1985) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34 :162-69

Henchal, E.A. 和 Putnak J.R. (1990) *Clin. Microbiol Rev.* 3:376-96

Ivey-Hoyle, M. (1991) *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:704-7

Ivy, J. 等人， 美国专利 6,432,411

Johansen, H. 等人，(1989) *Genes Dev.* 3:882-89

Kimura-Kiroda, J. 和 K. Yasui (1988) *J. Immunol.* 141:3606-10

Klee 等人，(2004) *Emerg. Inf. Dis.* 10:1405-11

Kreil 等人，(1998) *J. Virol.* 72:3076-3081

Lai, C.J. 等人，(1998) *Clin. Diagn. Virol.* 10:173-79

Lai, C.J. 和 Monath, T.P. (2003) *Adv. Virus Res.* 61 :469-509

Lieberman, M. 等人 (2008) *Vaccine* 25 :414-23

Lieberman, M. 等人 (2009) *Clin. Vaccine Immunol.* 16 :1332-37

Markoff, L. (2000) *Vaccine* 18:26-32

Martin, J.E. 等人，(2007) *J. Infect. Dis.* 196 :1732-40

Mason, P.W. (1989) *J. Gen. Virol.* 70:2037-48

McDonell 等人，美国专利 6,416,763

McKee, K.T. 等人，(1987) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36:435-42

Modis, Y. 等人，(2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6986-91

Modis, Y. 等人，(2004) *Nature* 427:313-9

Monath, T.P.，等人，(2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6694

Morbidity 和 Mortality Weekly Report (MMWR) (2004) vol. 53, Nov 19, 2004

Morbidity 和 Mortality Weekly Report (MMWR) (2008) vol. 57:720-23

Morrey, J.D. 等人，*J. Inf. Dis.* 194 :1300-8

Murphy 等人，(1986) *J. Clin. Microbiol.* 24:197-202

Platonov 等人，(2001) *Emerg. Inf. Dis.* 7:128-32

Pletnev 等人，(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3036-41

Putnak, R.，等人，(2003) *Adv. Virus Res.* 61:445-68

Review (2003) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69 Supplement:1-60

Sanchez 等人，(2006) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24 :4914-26

Siirin, M.T. 等人，(2008) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79 :955-62

WN-80E重组亚单位蛋白的氨基酸序列

Phe	Asn	Cys	Leu	Gly	Met	Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Leu	Glu	Gly	Val
1				5					10					15
Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	Val	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys
				20					25					30
Val	Thr	Ile	Met	Ser	Lys	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Asp	Val	Lys	Met
				35					40					45
Met	Asn	Met	Glu	Ala	Ala	Asn	Leu	Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Tyr	Cys
				50					50					60
Tyr	Leu	Ala	Thr	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Lys	Ala	Ala	Cys	Pro
				65					70					75
Thr	Met	Gly	Glu	Ala	His	Asn	Asp	Lys	Arg	Ala	Asp	Pro	Ala	Phe
				80					85					90
Val	Cys	Arg	Gln	Gly	Val	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys
				95					100					105
Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Ala
				110					115					120
Cys	Ser	Thr	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Glu	Asn	Ile
				125					130					135
Lys	Tyr	Glu	Val	Ala	Ile	Phe	Val	His	Gly	Pro	Thr	Thr	Val	Glu
				140					145					150

图 1

```
Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly
                155                 160                 165

Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr Leu Lys Leu
                170                 175                 180

Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly
                185                 190                 195

Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys Thr
                200                 205                 210

Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp
                215                 220                 225

Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met
                230                 235                 240

Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu
                245                 250                 255

Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile
                260                 265                 270

Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His
                275                 280                 285

Leu Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr
                290                 295                 300

Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro
```

图 1

```
                305                 310                 315

Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr
                320                 325                 330

Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser
                335                 340                 345

Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro
                350                 355                 360

Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu
                365                 370                 375

Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu
                380                 385                 390

Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly
                395                 400
```

图 1

纯化的西尼罗80E的考马斯染色的SDS-PAGE
凝胶(A)和蛋白质印迹(B)

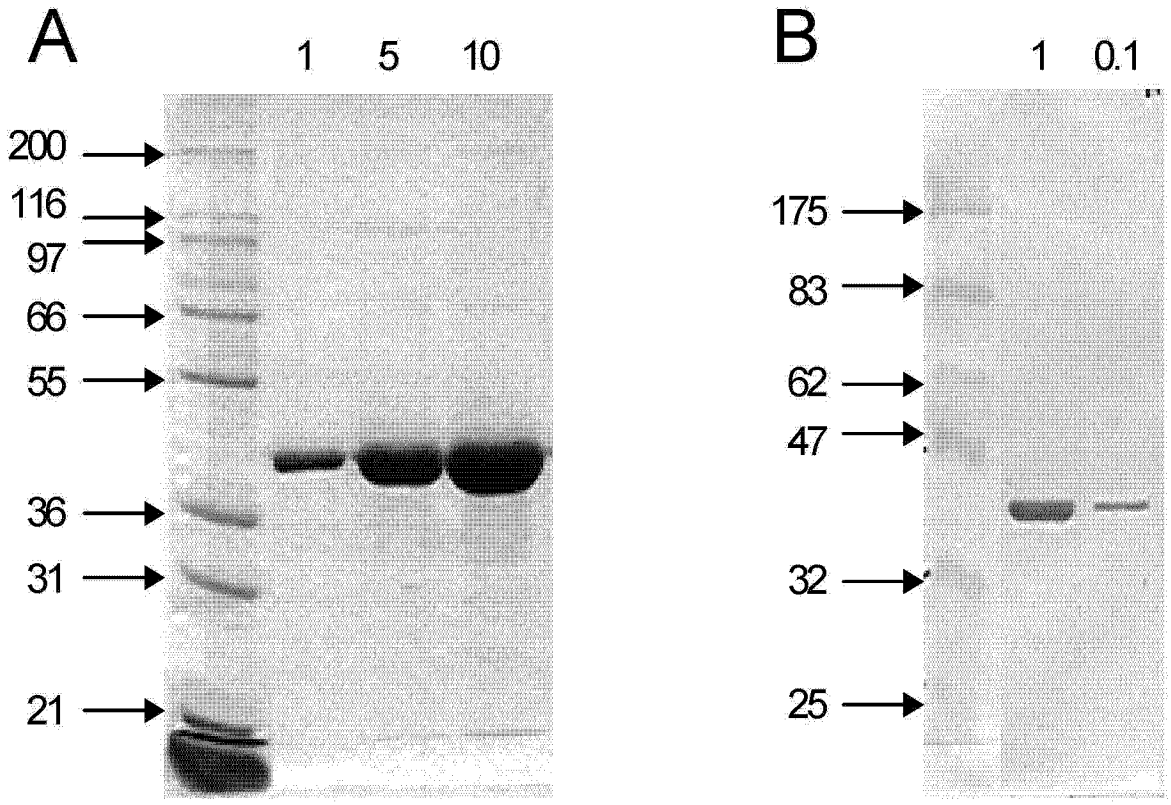


图 2

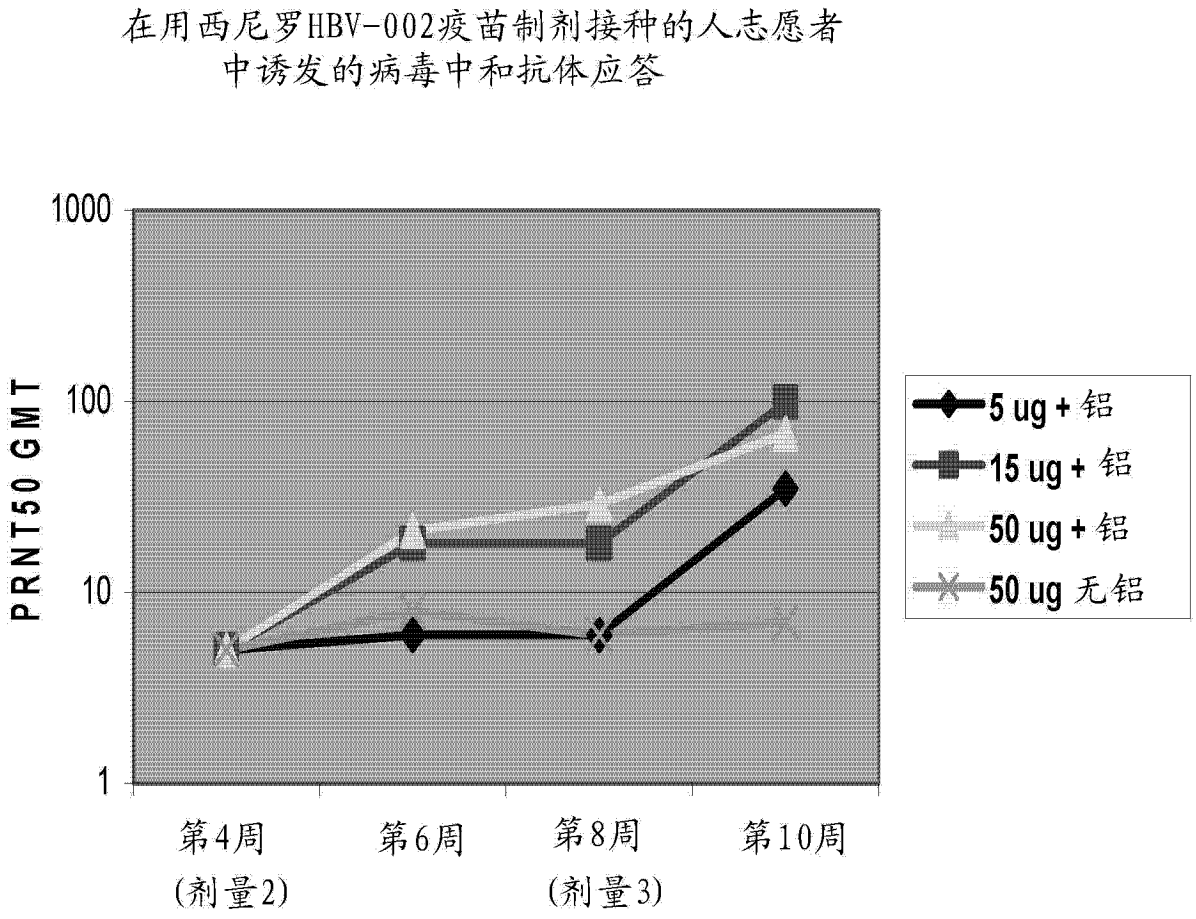

在用西尼罗HBV-002疫苗制剂接种的人志愿者
中诱发的病毒中和抗体应答
PRNT50 GMT
1000
100
10
1
第4周
(剂量2)
第6周
第8周
(剂量3)
第10周
5 ug + 铝
15 ug + 铝
50 ug + 铝
50 ug 无铝

图 3