



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111132692 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201880054674.6

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

(22)申请日 2018.06.22

代理人 刘明海 周瑞

(30)优先权数据

62/524,440 2017.06.23 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/12(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.21

A61K 39/165(2006.01)

C07K 14/005(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/039079 2018.06.22

G12N 7/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/237313 EN 2018.12.27

(71)申请人 美国菌种保藏中心

地址 美国弗吉尼亚州

(72)发明人 维拉斯科·西米卡

权利要求书4页 说明书49页

序列表66页 附图16页

(54)发明名称

包含寨卡病毒抗原的病毒样颗粒

(57)摘要

本发明涉及含有并展示来自寨卡病毒(ZIKV)的表位和抗原的嵌合病毒样颗粒(VLP);并涉及用于产生和生产这种嵌合VLP以用于其应用的方法,应用包括但不限于疫苗、诊断、临床研究、测定法开发和抗体发现。

1. 一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:2-11中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

2. 根据权利要求1所述的肽,其包含与SEQ ID NO:2-11中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

3. 一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:22-33中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

4. 根据权利要求3所述的肽,其包含与SEQ ID NO:22-33中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

5. 一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:46-47中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

6. 根据权利要求5所述的肽,其包含与SEQ ID NO:46-47中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

7. 一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:50-51中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

8. 根据权利要求7所述的肽,其包含与SEQ ID NO:50-51中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

9. 一种嵌合肽,其包含与异源肽连接的权利要求1-8中任一项所述的肽,所述异源肽具有与土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg)具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述土拨鼠肝炎核心抗原蛋白包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由其组成,或包括SEQ ID NO:1的至少一个片段或由其组成。

10. 一种嵌合肽,其包含与异源肽连接的权利要求1-8中任一项所述的肽,所述异源肽具有与土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg)具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述土拨鼠肝炎核心抗原蛋白包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由其组成,其中将权利要求1-8中任一项所述的肽插入在SEQ ID NO:1的氨基酸77和82之间。

11. 根据权利要求9或10所述的嵌合肽,其还包含至少一个1-10个氨基酸的肽接头,所述肽接头连接与SEQ ID NO:2-11或22-33、46-47和50-51中的任何一个或多个具有至少80%同一性的序列和与WHcAg蛋白具有至少90%同一性的序列。

12. 根据权利要求9或10所述的嵌合肽,其包含与SEQ ID NO:12-21、34-45、48-49和52-53中的任意一个具有至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

13. 一种多核苷酸,其包含编码权利要求9-12中任一项所述的嵌合肽的核苷酸序列。

14. 根据权利要求13所述的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:65-74、87-98、101-102和105-106中的任意一个具有至少90%同一性或至少95%同一性的核苷酸序列。

15. 一种载体,其包含权利要求13或14所述的多核苷酸。

16. 一种表达载体,其包含权利要求13或14所述的多核苷酸,所述多核苷酸与表达控制序列可操作地连接。

17. 一种重组宿主细胞,其包含权利要求15所述的载体或权利要求16所述的表达载体。

18. 根据权利要求17所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞是:

(i) 选自由以下组成的组的真核细胞:哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞、两栖动物细胞和禽类细胞;或

(ii) 原核细胞。

19. 一种病毒样颗粒 (VLP), 其包含权利要求9-12中任一项所述的嵌合肽, 或基本上由其组成。

20. 一种制品, 其包含附着于固体支持物的、根据权利要求9-12中任一项所述的嵌合肽或根据权利要求19所述的VLP。

21. 根据权利要求20所述的制品, 其中所述固体支持物选自由以下组成的组: 微珠、测定板、测试条或过滤器。

22. 一种抗原性组合物, 其包含权利要求19所述的VLP, 其中所述VLP在药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中、以约0.1-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度存在于所述组合物中。

23. 一种抗原性组合物, 其包含药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中的、权利要求19所述的VLP。

24. 根据权利要求23所述的抗原性组合物, 其包含根据权利要求19的第一和第二VLP, 其中所述第一和第二VLP包含不同的序列, 所述不同的序列独立地选自与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51具有至少80%同一性的氨基酸序列。

25. 根据权利要求23所述的抗原性组合物, 其包含根据权利要求19的第一、第二和第三VLP, 其中所述第一、第二和第三VLP包含不同的序列, 所述不同的序列独立地选自与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51具有至少80%同一性的氨基酸序列。

26. 根据权利要求23所述的抗原性组合物, 其包含根据权利要求19的第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七VLP, 其中所述第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七VLP包含不同的序列, 所述不同的序列独立地选自与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51。

27. 一种组合物, 其包含药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中的、权利要求15或权利要求16所述的载体。

28. 根据权利要求27所述的组合物, 其中所述佐剂是聚合物颗粒、霍乱毒素或咪唑并喹啉。

29. 一种试剂盒, 其包含与选自酶底物、检测抗体和封闭缓冲液的至少一种试剂包装的、权利要求19所述的VLP或权利要求20或权利要求21所述的制品。

30. 一种疫苗, 其包含权利要求22-26或28中任一项所述的抗原性组合物和佐剂。

31. 一种抗原性组合物, 其包含药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中的、权利要求19所述的VLP, 其中所述组合物能够在哺乳动物受试者中产生免疫应答, 所述免疫应答包括抗体产生或保护性免疫应答。

32. 根据权利要求31所述的抗原性组合物, 其中由所述组合物产生的抗体应答相对于用寨卡病毒或寨卡病毒包膜蛋白获得的应答有提高。

33. 根据权利要求31或32所述的抗原性组合物, 其中抗体应答是中和性抗体应答或保护性抗体应答。

34. 一种在受试者中产生针对寨卡病毒的免疫应答的方法, 其包括向所述受试者施用有效量的权利要求22-26或31-33所述的抗原性组合物或权利要求30所述的疫苗, 从而在受试者中产生针对寨卡病毒的免疫应答。

35. 一种治疗有此需要的受试者中的寨卡病毒感染的方法, 其包括向所述受试者施用有效量的权利要求22-26或31-33所述的抗原性组合物, 从而治疗所述受试者中的寨卡病毒

感染。

36. 一种预防受试者中由寨卡病毒感染引起的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求30所述的疫苗,从而预防所述受试者中由寨卡病毒感染引起的疾病或病症。

37. 一种保护受试者免于产生一种或多种寨卡病毒感染症状的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求30所述的疫苗,从而保护所述受试者免于产生一种或多种寨卡病毒感染症状。

38. 一种使哺乳动物受试者针对寨卡病毒感染产生免疫的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求22-26或31-33所述的抗原性组合物或权利要求30所述的疫苗,从而使所述受试者针对寨卡病毒感染产生免疫。

39. 一种保护受试者免于寨卡病毒的性传播的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求22-26或31-33所述的抗原性组合物或权利要求30所述的疫苗,从而保护所述受试者免于寨卡病毒的性传播。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中施用是粘膜施用。

41. 根据权利要求30所述的方法,其中所述粘膜施用是鼻腔施用、阴道施用、直肠施用或口服施用。

42. 一种检测或测量生物样品中寨卡病毒抗体的方法,其包括:

a) 在适合于形成抗原-抗体复合物的条件下,使权利要求19所述的VLP与生物样品接触;和

b) 通过检测或测量在生物样品中的抗体和VLP之间形成的抗原-抗体复合物,来测量或检测寨卡病毒抗体。

43. 一种检测寨卡病毒感染的方法,其包括以下步骤:

a) 在适合于形成抗原-抗体复合物的条件下,使权利要求19所述的VLP与来自哺乳动物受试者的生物样品接触;和

b) 检测在VLP和生物样品中的抗体之间形成的抗原-抗体复合物,从而检测寨卡病毒感染。

44. 根据权利要求43所述的方法,其还包括检测生物样品中的寨卡病毒的步骤,其中寨卡病毒的存在表明当前寨卡病毒感染。

45. 一种筛选抗寨卡病毒抗体的方法,其包括:

a) 测量抗体或其片段与权利要求19所述的VLP的结合;和

b) 测量所述抗体或其片段与土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg) VLP的结合;和

c) 当所述抗体或其片段与VLP结合但不与WHcAg结合时,确定所述抗体或其片段是抗寨卡病毒抗体。

46. 根据权利要求42-45中任一项所述的方法,其中病毒样颗粒附着于固体支持物。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述固体支持物是微珠、测定板、测试条或过滤器。

48. 一种生产病毒样颗粒(VLP)的方法,其包括在一定条件下,将权利要求15所述的载体引入宿主细胞中,使所述细胞产生VLP。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述宿主细胞是:

(a) 选自由以下组成的组的真核细胞：哺乳动物细胞、真菌细胞、昆虫细胞、植物细胞、两栖动物细胞和禽类细胞；或

(ii) 原核细胞。

50. 根据权利要求49所述的方法，其中所述宿主细胞是酵母细胞。

51. 根据权利要求50所述的方法，其中所述酵母细胞是巴斯德毕赤酵母细胞。

52. 根据权利要求48-51中任一项所述的方法，其中通过转化、转染、转导或电穿孔将所述载体引入宿主细胞中。

53. 根据权利要求48-52中任一项所述的方法，其中在范围为25°C至37°C的温度下培养所述细胞。

54. 根据权利要求48-53中任一项所述的方法，其中从所述宿主细胞或所述宿主细胞的培养基中纯化所述VLP。

55. 根据权利要求54所述的方法，其中通过沉淀、超速离心、密度梯度超速离心、超滤、色谱法、切向流过滤 (TFF) 或其组合纯化所述VLP。

56. 通过权利要求48-55中任一项所述的方法产生的病毒样颗粒 (VLP)。

## 包含寨卡病毒抗原的病毒样颗粒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C. §119(e), 本申请要求2017年6月23日提交的美国临时专利申请号62/524,440的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 通过引用电子提交的材料并入

[0004] 作为本公开的单独部分,本申请包括计算机可读形式的序列列表,其通过引用整体并入本文,并标识如下:文件名:52049A\_Seqlisting.txt;大小:123,456字节,创建时间:2018年6月22日。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及用于检测寨卡病毒(Zika Virus) (ZIKV)的改良工具、ZIKV疫苗和ZIKV诊断。

### 背景技术

[0006] 寨卡病毒(ZIKV)是黄病毒属(Flavivirus)的一种虫媒病毒。ZIKV最初是从乌干达的寨卡森林中的受感染的哨兵猴中分离出来的(1947年),然后在蚊子中[1,2]分离,1954年在人类中分离[3]。直到2007年才爆发疫情,当时密克罗尼西亚联邦雅浦岛的一次ZIKV流行病表明该病毒具有导致严重疾病的倾向[4,5]。随后,ZIKV蔓延至法属波利尼西亚和太平洋岛屿(2013年-2014年),最近蔓延至美洲,在包括巴西、墨西哥和加勒比群岛在内的二十多个国家引起了大规模暴发(2015年至今)。有证据表明,ZIKV传播也可以通过性行为[6,7]、通过输血并可能通过胎盘感染胎儿[8]。

[0007] ZIKV是由分布广泛的埃及伊蚊(aedes aegypti)和白纹伊蚊(aedes albopictus)的蚊子传播的[4,5]。根据疾病控制中心(CDC)的数据,伊蚊属蚊子分布在具有亚热带或温带气候的美国许多地区。确实,ZIKV在美国和美国领土上引起了多次地方性感染,包括波多黎各、佛罗里达和德克萨斯州[9,10]。ZIKV可能会继续在全球传播,并引入欧洲和澳大利亚,并有可能在非洲和亚洲重现。在大多数(大约80%)接触该病毒的人中,ZIKV感染是无症状的。感染的症状与其他虫媒病毒疾病(例如登革热病毒(DENV)和基孔肯雅病毒(CHIKV))相似,包括发烧、斑丘疹、结膜炎和关节痛,搅乱了准确诊断。重要的是,ZIKV与自身免疫性疾病、格林-巴利综合症(GBS)和导致小头畸形的先天畸形密切相关[4,11]。

[0008] 迄今为止,尽管在这方面进行了大量的努力,但尚无获得许可的市售ZIKV预防或治疗方法。

### 发明内容

[0009] 本发明包括一种新型的ZIKV病毒样颗粒(VLP)以及用于制备和使用这种颗粒的材料和方法,包括作为疫苗、预防剂、治疗剂和诊断剂的制剂和用途。

[0010] 开发一种安全有效的疫苗来预防ZIKV感染是降低该疾病严重形式的发病率和传播优先考虑的目标。感染对孕妇具有影响,并且对可能被感染的男性的影响尚不明确,这也

突出表明了对疫苗的迫切需求。

[0011] 理想的疫苗候选物除了要具有高安全性之外,还应具有成本效益并且在经济上可行,易于大规模生产。活病毒疫苗和灭活病毒疫苗的制造成本很高,因为需要使用复杂生物生产系统(例如,哺乳动物细胞、卵)的高度严格的流程和遏制设施(BSL2或BSL3)。减毒疫苗的一个重要警告是安全性,特别是由于具有逆转的潜在可能,这可能会降低/消除减毒作用。在如ZIKV这样的病毒的情况下,尤其是如果需要施用给孕妇,这将是一个至关重要的问题。

[0012] 就灭活的全病毒疫苗而言,灭活方法通常会使得表位失效。表位稳定性对于产生完全中和性抗体或保护性抗体而言很重要。

[0013] 非中和性交叉反应性登革热病毒抗体会增强ZIKV感染这一问题尚未解决,在非中和性或部分中和性交叉反应性ZIKV抗体的情况下,可能会出现类似现象。由于ZIKV的各种毒株的流行,并且有关各种毒株之间有效交叉保护的信息尚未确定,因此使用ZIKV表面糖蛋白的高度保守区域设计的VLP策略(如本文所提供的)提供了显著的优势。这种方法将维持ZIKV表位结构,同时增加多个ZIKV毒株之间的交叉保护和具有成本效益的规模扩大的可能性。在过去的十年中,VLP生产、纯化和佐剂优化的进步使得产生数种针对病毒性疾病的得到许可的疫苗[12],例如人乳头瘤病毒(HPV)、乙型肝炎病毒(HBV)、戊型肝炎病毒(HEV)和流感。相较于亚单位蛋白,VLP能够更有效地刺激免疫系统,因为它们能够模拟靶标病毒体的天然形态,并且它们展示高浓度的重复的表位阵列。此外,由于缺乏复制性病毒遗传物质,VLP是安全的[12]。

[0014] 在一些方面,本文公开的VLP能够在不同ZIKV毒株之间交叉保护。与其他疫苗接种策略(例如减毒活疫苗)相比,本文所公开的VLP策略具有更高的安全性,特别是对于高危人群,例如免疫功能低下个体和孕妇。与纯化的蛋白质疫苗相比,本公开的VLP以更高的浓度、以有效表达表位的适当构象(折叠)并且以更高的稳定性表达免疫学实体。从产品开发的角度来看,本文公开的技术也将有助于通过用于大规模生产的明确的质量控制策略而促进规模扩大。

[0015] 因此,在一些方面,本发明包括适用于制备寨卡病毒疫苗或寨卡病毒抗体或适用于检测寨卡病毒抗体的分离的肽。例如,本发明包括一种分离的肽或蛋白质,其包含与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。还考虑了与参照序列具有更高的最小百分比同一性(包括85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%最小同一性)的肽的种类。在一些实施方案中,分离的肽或蛋白质包含与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51或其免疫原性片段中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些方面,本公开提供了一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:2-11中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些实施方案中,分离的肽包含与SEQ ID NO:2-11中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些方面,本公开提供了一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:22-33中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些实施方案中,分离的肽包含与SEQ ID NO:22-33中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些方面,本公开提供了一种分离的肽,

其包含与SEQ ID NO:46-47中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些实施方案中,分离的肽包含与SEQ ID NO:46-47中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些方面,提供了一种分离的肽,其包含与SEQ ID NO:50-51中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在一些实施方案中,分离的肽包含与SEQ ID NO:50-51中的任意一个或多个所示的序列具有100%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

[0016] 在相关方面,本发明包括一种嵌合肽,其包含如本文所述的衍生自寨卡病毒的肽(包括上一段的那些),所述肽与异源肽或蛋白质连接,所述异源肽或蛋白质具有与土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg)具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述土拨鼠肝炎核心抗原蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由其组成,或包含SEQ ID NO:1的至少一个片段或由其组成。在一些变体中,将嵌合肽的寨卡病毒衍生肽部分插入WHcAg衍生部分之内。如上一段所述,还考虑了更高的最小百分比同一性。在一些实施方案中,嵌合肽还包括至少一个1-10个氨基酸的肽接头,所述肽接头连接与SEQ ID NO:2-11或22-33或46-47或50-51中的任何一个或多个具有至少80%同一性的序列和与WHcAg蛋白具有至少90%同一性的序列。在一些实施方案中,嵌合肽包含与SEQ ID NO:12-21、34-45、48-49和52-53中的任意一个具有至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列,或由其组成。

[0017] 例如,本发明包括一种嵌合肽,其包含如本文所述的寨卡病毒衍生肽,所述寨卡病毒衍生肽与异源肽连接,所述异源肽具有与土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg)具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述土拨鼠肝炎核心抗原蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或由其组成,其中所述寨卡病毒衍生肽被插入在WHcAg衍生肽中的SEQ ID NO:1的氨基酸77和82之间的位置。

[0018] 在相关方面,本发明包括一种多核苷酸,其包含编码本文所述的任何多肽的核苷酸序列。例如,本发明包括一种多核苷酸,其包含编码本文所述的嵌合肽的核苷酸序列。考虑了这样的多核苷酸,其是DNA、RNA,且包括合成的核苷酸或修饰的核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包含与SEQ ID NO:65-74、87-98、101-102和105-106中的任意一个具有至少90%同一性或至少95%同一性的核苷酸序列。

[0019] 在一些方面,本发明还包括一种载体,其包含如本文公开的多核苷酸。在一些变体中,所述载体包括表达载体,所述表达载体包含与表达控制序列可操作地连接的本公开的多核苷酸。考虑了适合在所有宿主细胞种类中表达的载体,包括原核表达载体和真核表达载体。示例性的真核表达载体包括用于在哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、禽类细胞、两栖动物细胞和真菌细胞(包括酵母细胞)中表达的载体。

[0020] 在其他方面,本发明包括一种重组宿主细胞,其包含如本文公开的载体或表达载体。在一些实施方案中,宿主细胞是(a)选自由以下组成的组的真核细胞:哺乳动物细胞、真菌(例如酵母)细胞、昆虫细胞、植物细胞、两栖动物细胞和禽类细胞;或(b)原核细胞。

[0021] 本发明还包括一种组合物,其包含药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中的、如本文所述的载体。

[0022] 在一些方面,本发明包括一种病毒样颗粒(VLP),其包含本文所述的一种或多种嵌合肽或嵌合蛋白质,或基本上由其组成。在其他方面,本发明包括一种制品,其包括附着于固体支持物上的、如本文所述的嵌合肽或嵌合蛋白质或如本文所述的VLP。在一些实施方案

中,固体支持物是微珠、测定板、测试条或过滤器。在一些变体中,制品还包括附着于所述制品上的不同的肽,最好在空间上不同的位置,其可以用作本文所述测定法中的阳性或阴性对照。在其他变体中,将制品作为试剂盒的一部分与至少一种测定试剂(例如免疫测定试剂)一起包装。

[0023] 本发明还包括一种组合物,其包含本文所述的肽或蛋白质,或本文所述的嵌合肽或嵌合蛋白质,以及药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂、稳定剂、防腐剂或载体。在一些变体中,本公开提供了一种抗原性组合物,其包含如本文公开的VLP,其中所述VLP在药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中、以约0.1-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的核心抗原的浓度存在于组合物中。

[0024] 在另外的变体中,本发明包括一种抗原性组合物,其包含两种或更多种本文所述的不同的多肽、嵌合多肽或VLP。例如,本发明包括本文所述的第一和第二VLP,其中第一和第二VLP包含不同的序列,所述不同的序列独立地选自与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47和50-51具有至少80%同一性的氨基酸序列。对于这种性质的实施方案,诸如“第一”或“第二”之类的序数仅仅旨在将彼此区分开,而不意在暗示顺序。这样的组合物任选地还包括药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂、稳定剂、防腐剂或载体。

[0025] 在相关的实施方案中,本发明是包含如本文所述的第一、第二和第三VLP的抗原性组合物。例如,第一、第二和第三VLP包含不同的序列,所述不同的序列独立地选自与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47和50-51具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0026] 在另一个相关的实施方案中,本发明是包含如本文所述的第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七VLP的抗原性组合物。例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六和第七VLP包含不同的序列,所述不同的序列独立地选自SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47和50-51。

[0027] 本发明还包括一种试剂盒,其包含如本文所述的VLP,或包含如本文所述的制造品,所述VLP或所述制造品与至少一种可用于进行免疫测定的试剂包装在一起。示例性的合适试剂包括酶底物、检测抗体、阳性和阴性对照试剂、底物检测溶液以及洗涤、封闭和稀释缓冲液。在一些实施方案中,试剂盒包括用于执行方案和用于检测的特定装置。

[0028] 本发明还包括一种抗原性组合物,其包含在药学上可接受的载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂或佐剂中的、如本文所述的肽、嵌合肽或嵌合蛋白或VLP,其中所述组合物能够产生针对寨卡病毒的免疫应答。示例性的免疫应答包括哺乳动物受试者中的抗体产生或保护性免疫应答。理想地,相对于或相较于用活的寨卡病毒或寨卡病毒包膜(E)重组蛋白获得的免疫应答,由所述组合物产生的抗体应答提高。在一些变体中,抗体应答通过中和活性和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性作用(CDC)和/或T细胞应答(例如CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>)和/或其他保护性免疫机制针对寨卡病毒具有防御性和功能性。

[0029] 在另外的实施方案中,本发明包括一种疫苗,其包含如本文所述的肽、嵌合肽、嵌合蛋白质、VLP或抗原性组合物以及佐剂。在一些实施方案中,佐剂是聚合物颗粒、霍乱毒素或咪唑并喹啉。在其他实施方案中,佐剂制剂包括经典的基于铝的佐剂,和新型佐剂,例如脂质体(例如CAF01)、病原体识别受体的激动剂(例如免疫刺激复合物(ISCOM)、脂质A类似物(MPL、RC-529和GLA)、双链RNA类似物(例如Poly I:C和Poly ICLC)、胞苷一磷酸鸟苷寡聚脱氧核苷酸(cytidine monophosphate guanosine oligodeoxynucleotide)(例如CpG、CpG

ODN)、鞭毛蛋白、咪唑并喹啉(Imiquimod和Resiquimod)、聚合物颗粒(例如壳聚糖)、乳剂(例如基于角鲨烯油的乳剂)、细胞因子(例如白介素12)、细菌毒素(例如霍乱毒素(CT)或大肠杆菌肠毒素(LT))、Quil A和本领域已知的其他皂苷,以及植物多糖菊粉[12]。

[0030] 本发明还包括任何前述化合物、组合物、制品、装置和/或材料的制备方法和使用方法。此外,应当理解,本文中描述为方法的本发明的各方面可以可替代地描述为化合物、组合物、制品、装置和/或材料的“用途”。所有等同的“用途”也被认为是本发明的方面。

[0031] 在一些变体中,本发明包括一种在受试者中产生针对寨卡病毒的免疫应答的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的、如本文所述的抗原性组合物或疫苗,从而在受试者中产生(导致受试者的免疫系统产生)针对寨卡病毒的免疫应答。在相关的变体中,本公开提供了一种用于在受试者中产生针对寨卡病毒的免疫应答的抗原性组合物或疫苗,其特征在于,产生免疫应答包括向受试者施用有效量的、如本文所述的抗原性组合物或疫苗,从而在受试者中产生(导致受试者的免疫系统产生)针对寨卡病毒的免疫应答。

[0032] 在一些变体中,本发明包括一种治疗有此需要的受试者中的寨卡病毒感染的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的、本文所述的抗原性组合物,从而治疗所述受试者中的寨卡病毒感染。在相关的变体中,本公开提供了一种用于治疗有此需要的受试者的抗原性组合物,其特征在于,治疗包括向受试者施用有效量的、本文所述的抗原性组合物,从而治疗受试者的寨卡病毒感染。

[0033] 在另外的变体中,本发明包括一种预防受试者中由寨卡病毒感染引起的疾病或病症的方法,所述方法包括以有效预防受试者中由寨卡病毒感染引起的疾病或病症的量,向受试者施用有效量的、如本文所述的抗原性组合物或疫苗。在相关的变体中,本公开提供了一种用于预防受试者中由寨卡病毒感染引起的疾病或病症的抗原性组合物或疫苗,其特征在于,使用方法包括以有效预防受试者中由寨卡病毒感染引起的疾病或病症的量,向受试者施用有效量的、本文所述的抗原性组合物或疫苗。

[0034] 本发明还包括一种保护受试者免于产生一种或多种寨卡病毒感染症状的方法,所述方法包括以有效保护受试者免于产生一种或多种寨卡病毒感染症状的量,向受试者施用如本文所述的疫苗组合物。在相关变体中,该方法可有效降低寨卡病毒感染症状的数量、严重性或持续时间。在一些实施方案中,症状的降低被测量为受试者中病毒载量或病毒拷贝数的降低。在其他方面,本公开提供了一种用于保护受试者免于产生寨卡病毒感染症状的疫苗组合物,其特征在于,保护包括以有效保护受试者免于产生寨卡病毒感染症状的量,向受试者施用如本文所述的疫苗组合物。

[0035] 在另一个相关的实施方案中,本发明包括一种使哺乳动物受试者针对寨卡病毒感染产生免疫的方法,该方法包括向受试者施用有效量的、本文所述的抗原性组合物或本文所述的疫苗。在一些方面,本公开提供了一种本公开的抗原性组合物或疫苗,其用于使哺乳动物受试者针对寨卡病毒感染产生免疫,其特征在于,使产生免疫包括向受试者施用有效量的、本文所述的抗原性组合物或本文所述的疫苗。

[0036] 在一些方面,本公开提供了一种保护受试者免于寨卡病毒的性传播的方法,其包括向受试者施用有效量的、本公开的抗原性组合物或疫苗,从而保护受试者免于寨卡病毒的性传播。在一些方面,本公开提供了一种用于保护受试者免于寨卡病毒的性传播的抗原性组合物或疫苗,其特征在于,保护包括向受试者施用有效量的、本公开的抗原性组合物或

疫苗,从而保护受试者免于寨卡病毒的性传播。在一些实施方案中,施用是粘膜施用。在其他实施方案中,粘膜施用是鼻腔施用、阴道施用、直肠施用或口服施用。

[0037] 本文所述的材料和方法也可用于在感染和/或疫苗接种后定量或检测寨卡病毒免疫应答。例如,本发明包括一种检测或测量生物样品中的寨卡病毒抗体的方法,其包括:

[0038] a) 在适合于形成抗原-抗体复合物的条件下,使如本文所述的VLP与生物样品接触;和

[0039] b) 通过检测或测量在生物样品中的抗体和VLP之间形成的抗原-抗体复合物,来测量或检测寨卡病毒抗体。

[0040] 本发明还包括一种检测寨卡病毒感染的方法,其包括以下步骤:

[0041] a) 在适合于形成抗原-抗体复合物的条件下,使如本文所述的VLP与来自哺乳动物受试者的生物样品接触;和

[0042] b) 检测在VLP和生物样品中的抗体之间形成的抗原-抗体复合物,从而检测寨卡病毒感染。

[0043] 在某些变体中,前述方法还包括检测生物样品中的寨卡病毒的步骤,其中寨卡病毒的存在表明当前寨卡病毒感染。

[0044] 本发明还包括一种筛选抗体的方法,其包括以下步骤:

[0045] a) 测量抗体或其片段与如本文所述的VLP的结合;

[0046] b) 测量抗体或其片段与土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg)VLP或蛋白的结合;和

[0047] c) 当所述抗体或其片段与VLP结合但不与WHcAg结合时,确定所述抗体或其片段是抗寨卡病毒抗体。

[0048] 这样的方法特别可用于评估用本文所述的VLP免疫和/或寨卡病毒感染后产生的抗体。

[0049] 在任何前述方法中,一些变体涉及使用溶液或悬浮液中的VLP。在其他变体中,VLP附着于固体支持物,例如微珠、测定板、测试条或过滤器中的任何一种。

[0050] 本发明还包括制备本文所述的VLP的方法。例如,本发明包括一种产生VLP的方法,其包括在一定条件下,将权利要求6所述的载体引入宿主细胞中,使得所述细胞产生VLP。在一些变体中,宿主细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞、真菌或酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞、两栖动物细胞或禽类细胞。在其他变体中,所述细胞是原核细胞,例如细菌细胞。一种示例性的酵母宿主细胞是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞(例如,法夫驹形氏酵母 Kurtzman (*Komagataella phaffii* Kurtzman) (ATCC® 76273™)。在一些变体中,通过转化、转染、转导或电穿孔将载体引入宿主细胞中。在一些变体中,将细胞在连续搅拌和加氧条件下,在培养箱或发酵罐或振荡器中在范围为25°C至37°C的温度下培养。任选地,从宿主细胞或宿主细胞的培养基中纯化根据这种方法产生的VLP。VLP纯化的示例性合适程序包括沉淀、超速离心、密度梯度超速离心、超滤如切向流过滤(TFF)和其他方法、色谱法或其组合。

[0051] 本发明还包括通过任何前述方法生产的VLP。

[0052] 在整篇说明书中,提及“一个实施方案”或“一些实施方案”是指结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本公开的至少一个实施方案中。本文描述的特定特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合,并且所有这样的组合被认为是本发明的方面。

[0053] 除非另有说明,否则使用序数形容词“第一”、“第二”、“第三”等来描述一个共同的对象,仅表示在提及同类对象的不同实例,并不旨在暗示如此描述的对象必须在时间、空间、等级或任何其他方式上是给定的顺序。

[0054] 本文中的标题是为了读者的方便,而不是限制性的。根据具体实施方式和/或附图和/或权利要求,本发明的其他方面、实施实施方案和变体将是显而易见的。

[0055] 尽管申请人发明了本文所述的本发明的全部范围,但申请人无意要求保护他人的现有技术中描述的主题。因此,如果专利局或其他实体或个人提请申请人注意某项权利要求的范围内的法定现有技术,则申请人保留如下权利:根据适用专利法行使修改权以重新定义该权利要求的主题,以从该权利要求的范围中明确地排除这种法定现有技术或法定现有技术的明显变体。由这种修改的权利要求所限定的本发明的变体也旨在作为本发明的方面。

## 附图说明

[0056] 图1描述了如本文公开的用于表位递送的WHcAg VLP系统的元件。左图示出了WHcAg核心抗原肽和由这种肽组成的VLP。右图示出了本发明的嵌合肽和由这种肽组成的VLP。深黑色部分描述了所展示的ZIKV表位。

[0057] 图2描述了用于在酵母系统中表达WHcAg嵌合VLP的DNA构建体的实例。

[0058] 图3A和3B描述了使用包膜蛋白结构域III (EDIII) 开发WHcAg-ZIKV嵌合VLP所应用的结构疫苗学策略。在图3B中,包括了EDIII子结构域CD环(CD Loop),用于组成WHcAg-ZIKV嵌合VLP。

[0059] 图4示出了WHcAg-ZIKV嵌合体的生产、纯化和质量检测的流程图。

[0060] 图5示出了通过电子显微镜分析的WHcAg VLP。比例尺=50纳米(nm)。

[0061] 图6阐述了斑点印迹和蛋白质印迹分析,示出了WHcAg-ZIKV嵌合VLP的产生和抗原性。图6A展示了从毕赤酵母培养物中产生并纯化WHcAg,使用市售单克隆抗体HepBcAg检测WHcAg VLP。图6B和6C示出了WHcAg-ZIKV嵌合VLP的抗原性,使用了对ZIKV EDIII具有特异性的市售单克隆抗体如ZV-2和ZV-54。

[0062] 图7阐述了使用抗寨卡病毒抗体对小鼠血清进行的关于WHcAg-ZIKV嵌合VLP的抗原性的斑点印迹分析,prME VLP和ZIKV E重组蛋白用作该测定的阳性对照。

[0063] 图8阐述了用不同的WHcAg-ZIKV嵌合VLP免疫的小鼠血清的IgG滴度(A)、IgG1滴度(B)和IgG2a滴度(C)的ELISA分析。检测水平的极限是100(虚线)。

[0064] 图9阐述了用不同WHcAg-ZIKV嵌合VLP免疫的动物的血清库的斑点印迹分析,使用寨卡病毒(ZIKV)包膜(E)重组蛋白和登革热病毒2(DENV-2)E重组蛋白作为抗原(图9A)。使用市售的单克隆抗体(mAb)用于测定对照(图9B)。

[0065] 图10示出了免疫荧光显微镜实验,其显示:来自用WHcAg CD环VLP疫苗候选物免疫的小鼠的血清诱导产生了抗体,该抗体能够识别培养物中感染的Vero细胞中的寨卡病毒(左图);在该实验中,使用来自安慰剂对照的血清作为阴性对照(右图)。

[0066] 图11显示WHcAg CD环VLP疫苗候选物在小鼠模型中诱导了针对寨卡病毒的保护性抗体。图11A示出了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)测定:用WHcAg CD环VLP免疫的小鼠血清发挥了针对寨卡病毒的抗体的保护活性;包括了来自安慰剂对照WHcAg

CTRL免疫的动物的血清作为阴性对照,并使用来自用活寨卡病毒(#426)免疫的动物的血清作为附加对照。图11B阐述了补体依赖性细胞毒性作用(CDC)测定:相较于安慰剂对照(WHcAg CTRL)和用活寨卡病毒(#426)免疫的动物,WHcAg CD环VLP在用这种疫苗候选物免疫的小鼠中诱导了CDC活性。

[0067] 图12描述了本发明的示例性板、测试条和微珠。

[0068] 图13是本发明的测试条的示意图和使用侧流免疫测定(LFIA)系统、使用VLP中表达的病毒表位检测寨卡病毒感染的示意图(参见实施例5)。

[0069] 图14示出了WHcAg-ZIKV嵌合VLP侧流免疫测定应用(LFIA)。

[0070] 图15示出了用于测试WHcAg-ZIKV嵌合VLP疫苗候选物的功效、安全性和保护性的小鼠模型。

[0071] 图16示出了一种小鼠模型,其用于测试WHcAg-ZIKV嵌合VLP疫苗候选物对ZIKV子宫内传播的保护。

[0072] 图17示出了使用定量实时PCR(qRT-PCR)分析病毒注射后3天小鼠的血清病毒血症的实验结果。

### 具体实施方式

[0073] VLP的形态对于其强大的免疫刺激活性至关重要:i) VLP能够更有效地被抗原呈递细胞(APC)识别;ii) VLP从注射部位被运送至淋巴结;iii) VLP结构呈现了抗原的重复排列,其刺激B细胞进行体液免疫应答,并刺激T细胞进行细胞介导的免疫应答[13,14]。

[0074] 由于易于扩大规模(scalability),目前大多数FDA批准的基于VLP的疫苗都是在酵母中生产的。本发明的方面涉及一种基于ZIKV VLP(ZIK-VLP)的疫苗及其用途。在一些实施方案中,使用酵母表达系统生产VLP,应用结构疫苗学来优化VLP免疫原性:选择性地对抗原决定簇进行工程化改造,以实现高水平的免疫原性、ZIKV特异性和增强的毒株间保护[15,16]。

[0075] 本文使用的术语通常具有该领域的科学家赋予其的含义。以下定义将有助于理解本发明。

[0076] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即,具有与氢、羧基基团、氨基基团和R基团键合的 $\alpha$ -碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽主链,但是保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指这样的化合物,其结构与氨基酸的一般化学结构不同,但以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用。

[0077] “保守氨基酸取代”是指具有相似侧链的残基的互换。例如,具有脂族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂族羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:

缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0078] 术语“核酸”是指从5'至3'端阅读的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸碱基的单链或双链聚合物。

[0079] 术语“编码”是指编码一个或多个氨基酸的多核苷酸序列。该术语不需要起始或终止密码子。可以在由双链多核苷酸序列提供的六个不同阅读框中的任何一个中编码氨基酸序列。在一些变体中,编码序列还包括起始和/或终止密码子。

[0080] “载体”是指多核苷酸,其在不依赖宿主染色体的情况下,能够在宿主生物体中复制。载体的实例包括质粒。载体通常具有复制起点。载体可包括例如转录终止子和翻译终止子、转录起始序列和翻译起始序列以及可用于调控特定核酸的表达的启动子。

[0081] 当用来指例如细胞或核酸、蛋白质或载体时,术语“重组”表示该细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质,或通过改变天然核酸或蛋白质而被修饰,或者表示该细胞衍生自如此修饰的并且保留了这种修饰的细胞,例如子细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式内不存在的基因,或者表达否则会异常表达、低表达或根本不表达的天然基因。

[0082] 在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,术语“相同的”或百分比“同一性”是指两个或更多个相同的序列或子序列。“基本上相同的”是指,如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目测所测量的,当在比较窗口或指定区域内进行比较并比对以获得最大对应性时,两个或更多个核酸或多肽序列具有指定百分比(或指定最小百分比)的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域或整个序列(如果未指定)内具有(至少)60%同一性,任选地65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)。该定义也指受试序列的互补序列(complement)。任选地,在长度至少约50个核苷酸的区域内,或更优选地在长度为100至500或1000或更多个核苷酸或氨基酸的区域内存在同一性或基本同一性。

[0083] 蛋白质序列中的“非天然氨基酸”是指与天然存在的多肽比对时,具有最低最小总和概率的比对中出现在相应位置的氨基酸以外的任何氨基酸,其中比较窗口是所查询的单体结构域的长度,并且使用BLAST 2.0与Genbank的非冗余(non-redundant) (“nr”)数据库中的天然存在的序列进行比较。BLAST 2.0分别在现有技术中进行了描述[17]。可通过国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开获得进行BLAST分析的软件。

[0084] 如本文所用,术语“病毒样颗粒”和“VLP”是指与病毒相似的结构。本公开的VLP缺乏病毒基因组,因此是非感染性的。本公开的优选的VLP衍生自土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg),因此具有类似于WHcAg VLP的VLP结构或排列。病毒样颗粒在刺激免疫系统方面显示出更高的效率,因为它们与病毒体的形态相似,在有限的空间内展示表位的密集重复排列。此外,由于VLP缺乏复制性病毒遗传物质,使其无法引起病毒性疾病,因此是用于疫苗开发的非常安全的候选物。在过去的十年中,VLP生产、纯化和佐剂优化的进步已导致许可了几种基于VLP的疫苗,用于预防传染性疾病[12],例如人乳头瘤病毒(HPV)、乙型肝炎病毒(HBV)、戊型肝炎病毒(HEV)和流感。此外,针对流感、诺如病毒和基孔肯雅病毒(CHIK)的VLP疫苗目前正在进行多项临床试验(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0085] 术语“土拨鼠肝炎病毒(Woodchuck Hepatitis Virus)”在本文中与术语“土拨鼠嗜肝DNA病毒(Woodchuck Hepadnavirus)”互换使用,是指表达用作重组VLP平台的核心抗

原蛋白的病毒种类。

[0086] 术语“嵌合”是指多肽和/或肽序列的融合。关于土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)所使用的“嵌合”是指WHcAg与无关抗原(例如病毒肽及其变体)的融合蛋白。例如,在一些实施方案中,术语“嵌合肽”或“嵌合蛋白”是指包含WHcAg组分(全长或部分)和寨卡病毒肽或其片段的融合蛋白。如本文所述,一些融合采取插入的形式,其中将寨卡病毒序列插入在WHcAg序列内。

[0087] 关于核酸或多肽组分的术语“异源”表示该组分出现在自然界通常不存在的地方(例如,相对于相邻组分而言)和/或它源自不同的来源或物种。

[0088] 物质的“有效量”或“足够量”是产生有益结果或期望结果(包括临床结果)所必需的量,因此,“有效量”取决于其应用的语境。在施用抗原性组合物的情况下,有效量包括足以引发免疫应答的抗原(例如,包含本发明的嵌合肽的VLP)。有效量可以以一个或多个剂量施用。可以在实验或临床试验中,例如,通过将目标物质获得的结果与实验对照进行比较来证明功效。

[0089] 如本文所用,关于抗原性组合物的术语“剂量”是指在任何时间由受试者服用(施用或接受)的抗原性组合物的计量份(measured portion)。

[0090] 如本文所用,关于某一个值的术语“约”包括该值的90%至110%(例如,约200 $\mu$ g VLP是指180 $\mu$ g至220 $\mu$ g VLP)。

[0091] 如本文所用,术语“疫苗接种”是指将疫苗引入生物体中。

[0092] “受试者”是活的多细胞脊椎动物。在本公开的背景中,受试者可以是实验受试者,例如非人类哺乳动物(例如,小鼠、大鼠或非人类灵长类动物)。或者,受试者可以是人类受试者。

[0093] “抗原性组合物”是适于施用给人或动物受试者(例如在实验或临床环境中),能够引发例如针对病原体(例如寨卡病毒)的特异性免疫应答的物质组合物。这样,抗原性组合物包括一种或多种抗原(例如,肽抗原)或抗原表位。抗原性组合物还可以包括一种或多种能够引发或增强免疫应答的其他组分,例如赋形剂、载体和/或佐剂。在某些情况下,施用抗原性组合物以引发保护受试者免受由病原体诱导的症状或病况的影响的免疫应答。在某些情况下,通过在受试者暴露于病原体后抑制病原体(例如病毒)的复制,来预防(或减少或减轻)由病原体引起的症状或疾病。在本公开的背景中,术语抗原性组合物应被理解为包括旨在施用给受试者或受试者群体以引发针对病毒的保护性或姑息性免疫应答的组合物。

[0094] “佐剂”是指这样的物质,当添加到包括抗原的组合物中时,该物质非特异性地增强或加强暴露后的受体对抗原的免疫应答。常见的佐剂包括矿物质(明矾、氢氧化铝、磷酸铝)的悬浮液,抗原吸附在其上;乳剂(包括油包水和水包油(及其变体,包括双乳剂和可逆乳剂)、脂糖、脂多糖、免疫刺激性核酸(例如CpG寡核苷酸)、脂质体、模式识别受体(PRR)激动剂(例如NALP3、RIG-I样受体(RIG-1和MDA5)和Toll样受体激动剂(特别是TLR2、TLR3、TLR4、TLR7/8和TLR9激动剂)),以及这些组分的各种组合[12]。

[0095] “免疫应答”是免疫系统的细胞(例如B细胞、T细胞或单核细胞)对刺激物(例如病原体或抗原(例如,被配制为抗原性组合物或疫苗))的应答。免疫应答可以是B细胞应答,其导致产生特异性抗体,例如抗原特异性中和抗体。免疫应答也可以是T细胞应答,例如CD4<sup>+</sup>应答或CD8<sup>+</sup>应答。B细胞和T细胞应答是“细胞”免疫应答的方面。免疫应答也可以是由抗体

介导的“体液”免疫应答。在某些情况下,应答对特定抗原具有特异性(即“抗原特异性应答”)。如果抗原衍生自病原体,则抗原特异性应答是“病原体特异性应答”。“保护性免疫应答”是抑制病原体的有害功能或活性、降低由病原体引起的感染或减少由病原体引起的感染所导致的症状(包括死亡)的免疫应答。保护性免疫应答可以例如通过病毒测定和免疫测定来测量,使用来自受免疫的受试者的血清样品来测量血清抗体抑制病毒复制的能力,例如:噬斑减少中和测试(PRNT)、ELISA中和测定、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用测定(ADCC)、补体依赖性细胞毒性作用(CDC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。此外,可以通过使用流式细胞术(FACS)分析或ELISpot测定法测量免疫后的T细胞应答CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>,来测试疫苗功效。可以通过在动物模型中测量对体内病原体攻击的耐性,来测试保护性免疫应答。在人类中,可以在人群研究中证明保护性免疫应答,将接受治疗的受试者与未接受治疗的对照的感染、症状、发病率、死亡率等测量值进行比较。受试者暴露于免疫原性刺激物,例如病原体或抗原(例如,被配制为抗原性组合物或疫苗),会引发对该刺激物具有特异性的初次免疫应答,即,暴露会“引发”免疫应答。随后暴露(例如通过免疫)于该刺激物可增加或“加强”特异性免疫应答的强度(或持续时间,或两者)。因此,通过施用抗原性组合物来“加强”预先存在的免疫应答会增加抗原(或病原体)特异性应答的强度(例如,通过增加抗体滴度和/或亲和力,通过增加抗原特异性B或T细胞的频率,通过诱导成熟效应物功能,或其组合)。

[0096] 通过诸如以下的差异来测量“改善的”抗体应答:防止寨卡病毒复制和病毒血症;中和抗体滴度;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC);补体依赖性细胞毒性作用(CDC),抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP);刺激B细胞免疫记忆;激活免疫细胞,例如B细胞、T细胞和抗原呈递细胞(APC);防止疾病症状,例如发烧、疼痛、体重减轻;虚弱、斑丘疹、先天性寨卡病毒综合症(小头畸形)、格林-巴利综合症。在人群研究中测量这种差异,其中将接受治疗的受试者与未经治疗的对照受试者进行比较。

[0097] 当提及抗体或其片段与本文所公开的VLP、肽、嵌合蛋白或嵌合肽之间的相互作用时,短语“特异性地(或选择性地)结合”是指可以确定蛋白质的异质群(例如,细胞或组织裂解液)和其他生物制剂中存在多肽的结合反应。因此,在抗体结合测定中使用的标准条件下,指定的VLP、肽或嵌合肽与特定靶抗体或其片段的结合高于背景(例如,高于背景2X、5X、10X或更高),并且不与样品中的其他分子大量结合。本文特别感兴趣的是识别寨卡病毒但不识别登革热病毒或其他黄病毒的抗体。

[0098] 如本文所用,“表达载体”是一种DNA构建体,其包含与表达控制序列可操作地连接的结构基因,使得当将表达载体转化到合适的宿主细胞中时可以表达该结构基因。如果一个区域的生物活性会影响另一个区域,并且如果两个DNA序列之间的连接性质不会(1)导致引入移码突变,(2)干扰启动子区域序列指导所需序列转录的能力,或(3)干扰所需序列被启动子区域序列转录的能力,那么两个DNA序列被称为“可操作地连接”。因此,如果启动子能够实现所需DNA序列的转录,则可将该启动子区域与所需DNA序列可操作地连接。如本文所述,考虑了适合在所有宿主细胞种类中表达的载体,包括原核表达载体和真核表达载体。示例性的真核表达载体包括用于在哺乳动物细胞、禽类细胞、昆虫细胞、两栖动物细胞、植物细胞和真菌细胞(包括酵母细胞)中表达的载体。

[0099] 可以使用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学

的常规或已知技术来实施本发明的许多要素。由于这些技术是已知的和/或在文献(例如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版(Sambrook et al., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 编辑, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., 编辑, 1994); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (Freshney, 1987); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow et al., 1988); 和 Current Protocols in Immunology (Coligan et al., 编辑, 1991)) 中有充分的解释, 因此在本文中并不总是详细地描述这些技术。

[0100] 如本说明书和所附权利要求书中所使用的, 除非上下文另外明确指出, 否则单数形式的“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代。

[0101] 寨卡病毒

[0102] 寨卡病毒(ZIKV)是黄病毒科家族成员, 是一种单链正义RNA病毒, 具有大约10.7Kb的基因组, 编码一个多蛋白, 该多蛋白被病毒蛋白酶和宿主蛋白酶切割成三个结构蛋白(C、prM/M和E)和七个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5) [4, 在此通过引用整体并入]。ZIKV可溶性包膜(E)蛋白的整体结构类似于先前报道的黄病毒E蛋白结构, 并具有三个不同的结构域: 中央b桶(结构域I或结构域1)、细长手指状结构(结构域II或结构域2)以及C端免疫球蛋白样模块(结构域III或结构域3) [18])。

[0103] 嵌合肽构建体

[0104] 本发明的一些方面包括嵌合肽构建体或嵌合蛋白构建体, 其具有至少一个由啮齿动物嗜肝DNA病毒核心抗原组成或由其衍生的部分, 该部分与至少一个由寨卡病毒蛋白质抗原组成或由其衍生的部分连接。在一些实施方案中, 这些部分通过肽键连接以形成嵌合多肽, 如下文更详细地描述的。

[0105] A. 啮齿动物嗜肝DNA病毒核心抗原

[0106] 在一些方面, 嵌合构建体的嵌合嗜肝DNA病毒部分是从啮齿动物嗜肝DNA病毒核心抗原氨基酸序列工程改造的。例如, 有效去除天然核心抗原氨基酸序列中的一个或多个内源性B细胞表位。嗜肝DNA病毒核心抗原一般性地描述于美国专利申请公开号2016/0022801中, 其通过引用整体并入本文。

[0107] 适用于嵌合构建体的该组分/部分的示例性啮齿动物嗜肝DNA病毒核心抗原包括土拨鼠(WHcAg)、地松鼠(GScAg)、北极地松鼠(AGScAg)和人(HBcAg)嗜肝DNA病毒核心抗原。土拨鼠嗜肝DNA病毒核心抗原的示例性氨基酸序列在SEQ ID NO: 1中列出, 并且也可以以GenBank登录号NP\_671816获得。啮齿动物嗜肝DNA病毒核心抗原具有许多特性, 使其特别适合于制备本文所述的嵌合构建体。例如, 它们将自聚集/自组装成为多聚复合物或VLP。核心颗粒的基本亚单位是一种21kDa的蛋白质单体(在图1左上方中示意性描述), 其自发地组装成直径约34nm的240个亚单位颗粒结构(图1, 左下)。已经阐明了嗜肝DNA病毒核心颗粒的三级结构和四级结构[19, 其通过引用并入本文]。WHcAg上的免疫优势B细胞表位位于SEQ ID NO: 1的氨基酸76-82周围[20], 形成连接相邻 $\alpha$ -螺旋的环。该观察结果与以下发现一致: 在HBcAg的76-82环区域内插入的异源抗原比在N-末端或C-末端插入的抗原具有更高的抗原性和免疫原性, 重要的是, 比其天然蛋白背景中的抗原具有更高的免疫原性[20]。

[0108] 在一些实施方案中, 本发明的嵌合构建体由基于土拨鼠嗜肝DNA病毒核心抗原的嗜肝DNA病毒部分组成。例如, 当与SEQ ID NO: 1比对时, 所使用的部分具有与SEQ ID NO: 1

具有至少90% (例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的氨基酸序列。氨基酸变异(相对于野生型)可以是不破坏野生型蛋白质的自组装特性的任何变异。在一些变体中,与野生型相比,该变异不会增加蛋白质的抗原性。在一些变体中,改变的氨基酸是保守取代变体。序列变异也可以表示为野生型序列和本发明中使用的比对序列之间的有限数目(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的氨基酸序列差异。

[0109] 如下所述,嵌合构建体优选包括破坏和/或替换核心抗原序列的B细胞表位区域的寨卡病毒肽或多肽序列插入物。出于前面段落中的序列同一性分析的目的,忽略了B细胞表位和寨卡病毒插入物的变化。

[0110] B. 寨卡病毒衍生肽

[0111] 本发明的嵌合构建体中使用了与寨卡病毒氨基酸序列相同或衍生自寨卡病毒氨基酸序列的肽或蛋白质。选择寨卡病毒部分是因为其免疫原性特性。在优选的变体中,寨卡病毒部分包括或衍生自寨卡病毒包膜(E)、NS1、prM或C蛋白。在一些变体中,寨卡病毒部分包括或衍生自寨卡病毒E蛋白的结构域3。示例性的结构域3序列在SEQ ID NO:2中列出。考虑使用具有序列变异的肽,只要该肽仍包括充当表位的序列,所述表位将产生识别野生型寨卡病毒蛋白或野生型寨卡病毒的免疫应答。例如,所使用的肽或蛋白质包含与SEQ ID NO:2具有至少90% (例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的氨基酸序列。序列变异也可以表示为野生型序列和本发明中使用的比对序列之间的有限数目(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的氨基酸序列差异。在一些变体中,寨卡病毒部分包括NS1或衍生自NS1。示例性NS1序列在SEQ ID NO:22中列出。考虑使用具有序列变异的肽,只要该肽仍包括充当表位的序列,所述表位将产生识别野生型寨卡病毒NS1蛋白或野生型寨卡病毒的免疫应答。例如,所使用的肽包含与SEQ ID NO:22具有至少90% (例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的氨基酸序列。序列变异也可以表示为野生型序列和本发明中使用的比对序列之间的有限数目(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的氨基酸序列差异。在一些变体中,寨卡病毒部分包括prM/M蛋白或衍生自prM/M蛋白。示例性prM/M蛋白序列在SEQ ID NO:46中列出。考虑使用具有序列变异的肽,只要该肽仍包括充当表位的序列,所述表位将产生识别野生型寨卡病毒prM/M蛋白或野生型寨卡病毒的免疫应答。例如,所使用的肽包含与SEQ ID NO:46具有至少90% (例如,至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的氨基酸序列。序列变异也可以表示为野生型序列和本发明中使用的比对序列之间的有限数目(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的氨基酸序列差异。

[0112] 在一些实施方案中,衍生自寨卡病毒的肽是长度为4至200个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,肽的长度为5至150个氨基酸,或长度为5至100个氨基酸,或长度为5至55个氨基酸,优选为长度为10至50个氨基酸,优选长度为15至45个氨基酸,或优选长度为20至40个氨基酸。在一些实施方案中,肽的长度在下限为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸,并且独立选择的上限为200、195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25或20个氨基酸(条件是下限小于上限)的任意范围内。特别考虑从4到200个氨基酸的所有整数长度。

[0113] 在一些实施方案中,衍生自寨卡病毒的肽本身是融合蛋白,其包括两个、三个、四

个或五个不同寨卡病毒肽的片段。在各种实施方案中,该肽包含与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51中的任意一个或多个所示的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或由其组成。在其他实施方案中,该肽与SEQ ID NO:2-11、22-33、46-47或50-51中的任意一个或多个所示的序列100%相同。

[0114] 如下文更充分描述的,本文所用的核心抗原被修饰以包括一种或多种寨卡病毒表位。

[0115] C. 组合技术

[0116] 在一些实施方案中,将衍生自寨卡病毒的肽插入到衍生自嗜肝DNA病毒核心蛋白的肽(在图1右上方中示意性地描述)的一定位置,使得保留核心蛋白的自组装特性并以抗原性方式呈递衍生自寨卡病毒的肽或蛋白质(图1,右下)。

[0117] 以HBcAg或其他VLP技术(例如人乳头瘤病毒的L1蛋白和QB噬菌体)进行研究的几个小组选择将外源表位化学连接至VLP,而不是通过重组方法将表位插入颗粒中。这样的实施方案被认为是本发明的一方面。通过鉴定嵌合蛋白的合适插入位点(例如可以通过组合技术确定),已经绕开了用于连接异源抗原的化学偶联方法。(见[21])。使用此类技术确定了WHcAg C-末端的17个不同的插入位点和28个修饰,它们共同有助于嵌合颗粒的组装,以及许多其他改进的鉴定(参见,例如,美国专利号7,144,712、7,320,795和7,883,843,通过引用全部并入本文)。已经开发出了基于ELISA的筛选系统,该系统可以使用细菌粗裂解液来测量表达水平、VLP组装和插入物抗原性,避免了对表达和/或组装不好的VLP进行劳动密集型纯化步骤的需要。

[0118] WHcAg容许环区域内(位置76-82)以及环区域外的许多插入位点。在一些实施方案中,将肽或蛋白质直接插入或任选地与接头一起插入寨卡病毒肽的一端或两端。例如,SEQ ID NO:12-21、34-45、48-49和52-53中列出的嵌合肽或蛋白质包括源自WHcAg的部分(SEQ ID NO:12-21、34-45、48-49和52-53中的每一个中未带下划线的序列)以及衍生自寨卡病毒的肽部分(SEQ ID NO:12-21、34-45、48-49和52-53中带下划线的序列)。

[0119] 通过对包膜(E)蛋白进行结构分析获得SEQ ID NO:2-11(参见实施例和图3)。选择这些序列是因为它们对支架系统(即土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)蛋白)的适应性(表1)。具体地,SEQ ID NO:2-7是从包膜结构域3产生的,包膜结构域3具有对寨卡病毒非常特异的氨基酸序列。SEQ ID NO:8是从融合环结构域产生的,融合环结构域在黄病毒(例如,登革热病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒)之间具有非常相似的氨基酸序列。SEQ ID NO:9和10是从包膜结构域2产生的,包膜结构域2具有对寨卡病毒非常特异的氨基酸序列。最后,SEQ ID NO:11是从包膜结构域1产生的,包膜结构域1具有对寨卡病毒非常特异的氨基酸序列。

[0120] 表1

序列 ID 号	病毒样颗粒蛋白	氨基酸序列
1	土拨鼠肝炎核心抗原 (WHcAg)	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALY EEELTGREHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAMSSNI TSEQVRTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQH TVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRR GGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
序列 ID 号	ZIKV E 包膜抗原	氨基酸序列
2	包膜结构域 3 全长	HLKCRLKMDKLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHG TVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLIT ANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITH HWHRSBSTIGKAFEATVRGAKRMAV
[0121] 3	包膜结构域 3 G (EDIII) G 环截短型	AFTFTKIPAETLHGTVTVELQYAGTDGPCKVPAQMAV DMQTLTPVGRLLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDS YIVIG
4	包膜结构域 3, A-B 环	AFTFTKIPAETLHGTVTVELQYA
5	包膜结构域 3, Cx-CDDx 环 (CD 环)	PCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLITANPVIT
6	包膜结构域 3, Dx-E 环	RLITANPVITESTENSKMMLELDP
7	包膜结构域 3, F-G 环	GDSYIVIGVGEKKITHHWHR
8	包膜融合环	DRGWGNGCGLFGK
9	包膜结构域 2 (ED2) 序列 A-E	TTTVSNMAEVRSYCYEASISDMASDSRCPTQGEAYLD KQSDTQYVCKRTLVD <del>RGWGNGCGLFGK</del> GSLVTCAKF ACSKKMTGKSIQPENLEYR
10	包膜结构域 2 序列 B-D	EASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD RGWGNGCGLFGK <del>GSLVTCAKF</del> ACS
[0122] 11	包膜结构域 1 聚糖环	MTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMIVNDTGHETD ENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFS DLYYLTM

[0123] 表2描述了嵌合肽序列,其包括土拨鼠肝炎核心抗原 (WHcAg) 序列 (SEQ ID NO:1) 以及插入在SEQ ID NO:1的氨基酸77和82的区域中的SEQ ID NO:2-11中的每一个(双下划线)。粗体和斜体的氨基酸表示接头序列。

[0124] 表2

[0125]

SEQ ID NO	WHeAg (SEQ ID NO: 1) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV 包膜 (E) 抗原的嵌合肽的氨基酸序列
12	2	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGRE <u>HCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIGGGGTHLKCRLKMD</u> <u>KLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKV</u> <u>PAQMAVDMQTLTPVGRLLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSY</u> <u>IVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKRMAVGGGGTIIV</u> NHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPA PYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPR RRRSQSPSANC
13	3	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIAFTFTKIPAETLHG <u>TVTVELQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLITANPVITES</u> <u>TENSKMMLELDPPFGDSYIVIGTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFH</u> LSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIR RRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
14	4	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIAFTFTKIPAETLHG <u>TVTVELQYATIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQE</u> <u>FLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRPRR</u> RTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
15	5	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIPCKVPAQMAVDM <u>QTLTPVGRLLITANPVITTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTF</u> <u>GQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGA</u> RASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
16	6	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIRLITANPVITESTEN <u>SKMMLELDPTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQ</u> <u>EFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPR</u> RRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
17	7	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNIGDSYIVIGVGEKKI <u>THHWHTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFL</u> <u>VSGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRT</u> PSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

[0126]	18	8	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGT</b> DRGWGNGCG <u>LFGKGGTI</u> IVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLV SFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTP SPRRRSQSPRRRSQSPSANC
	19	9	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGT</b> TTVSNMAEVR <u>SYCYEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD</u> RG <u>WGNGCGLF</u> GKSLVTCAKFACSKKMTGKSIQPENLE <b>YRGG</b> TIIV NHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTP APYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRSQS PRRRRSQSPSANC
	20	10	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GG</b> EASISDMASDS <u>RCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD</u> RGWGNGCGLF <b>GK</b> SLV <u>TCAKFACSGGTIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQ EFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPR RRTSPRRRSQSPRRRSQSPSANC</u>
	21	11	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGR EHCSPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GG</b> MTGKSIQPENL <u>EYRIMLSVHGSQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEAT</u> <u>LGGFGLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMGG</u> TIIVNHVNDTWGLK RQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILST LPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRSQSPRRRSQSPSANC

[0127] 通过对NS1进行结构分析获得序列SEQ ID NO:22-33。选择这些序列是因为它们与支架系统(即土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)蛋白)的适应性(表3)。寨卡病毒NS1蛋白的结构信息可从已发表的科学文献[22]中获得。

[0128] 表3

SEQ ID NO	ZIKV NS1 抗原	氨基酸序列
22	NS1 β1-2	DVGCSDVDFSKKETRCGT
23	NS1β3-4	DRYKYHPDSPRRLLAAAVKQAWEDGICGISSVSR
24	NS1 α2-β5	MENIMWRSVEGELNAILEENGVQLTVVVGSV
25	NS1 β4-5-6	CGISSVSRMENIMWRSVEGELNAILEENGVQLTVVVG SVKNPMWRGPQRLPVPVNELPHGWKAWGKSYFVRA AKTNNSFVVDGDTLKEC
26	NS1 互相缠绕的环-β6	KNPMWRGPQRLPVPVNELPHGWKAWGKSYFVRAAK TNNSFVVDG
[0129]	NS1 β7-8-9	DTLKECPLKHRAWNSFLVEDHGFVHTSVWLKVRE DYSLE
28	NS1 β10-11-12-13	CDPAVIGTAVKKGKEAVHSDLGYWIESEKNDTWRLKRA HLIEMKTC
29	NS1 β12-13	GYWIESEKNDTWRLKRAHLI
30	NS1 Spaghetti 环-β14	RAHLIEMKTCEWPKSHTLWTDGIEESDLIIPKSLAGPLS HHNTREGYRTQMKGPWHSEELEIR
31	NS1 β14-15-16-17	LEIRFEECPGTKVHVEETCGTRGPSLRSTTASGRVIEE WCCRECTMPPLSFRAK
32	NS1 β15-16-17-18	CPGTKVHVEETCGTRGPSLRSTTASGRVIEEWCCRECT MPPLSFRAKDGC
[0130]	NS1 β14-15-16-17-18-19-C 末端	MKGPWHSEELEIRFEECPGTKVHVEETCGTRGPSLR TASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRAKDGCWYGMEIRP RKEPESNLVRSMTA

[0131] 表4描述了嵌合肽序列,其包括土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)序列(SEQ ID NO:1)以及插入在SEQ ID NO:1的氨基酸77和82的区域中的SEQ ID NO:22-33中的每一个(双下划线)。粗体和斜体的氨基酸表示接头序列。

[0132] 表4

SEQ ID NO	WHcAg (SEQ. ID NO: 1) 加 SEQ. ID NO:	含有 ZIKV NS1 抗原的嵌合蛋白的氨基酸序列
34	22	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> DVGCSDVDFSKKETR <u>CGTGGGGT</u> IIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSF GVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRR RSQSPRRRRSQSPSANC
35	23	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> DRYKYHPDSPRRLA <u>AAVKQAWEDGICGISSVSRGGGGT</u> IIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHL SCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGG ARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
36	24	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> MENIMWRSVEGEL <u>NAILEENGVQLTVVVGSVGGGGT</u> IIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLS CLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGA RASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
[0133] 37	25	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> CGISSVRMENIMW <u>RSVEGELNAILEENGVQLTVVVGSVKNPMWRGPQRLPVVNELPHG</u> <u>WKAWGKSYFVRAAKTNSFVVDGDTLKECGGGGT</u> IIVNHVNDTW GLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILS TLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
38	26	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> KNPMWRGPQRLPV PVNELPHGWKAWGKSYFVRAAKTNSFVVDG <u>GGGGT</u> IIVNHVNDT WGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPIL STLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
39	27	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> DTLKECPLKHLRAW <u>NSFLVEDHGFVFTSVWLKVREDYSLEGGGGT</u> IIVNHVNDTWGLK VRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPE HTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
40	28	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <u>GGGGT</u> CDPAVIGTAVKGKEA <u>VHSDLGYWIESEKNDTWRLKRAHLIEMKTCGGGGT</u> IIVNHVNDTW GLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILS TLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

[0134]	41	29	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> GYWIESEKNDTWR <u>LKRAHL<b>GGGGT</b></u> TIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQE FLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTP SPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC
	42	30	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> RAHLIEMKTCEWPK SHTLWTDGIEESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYRTQMKGPPWHSELEI <u>R<b>GGGGT</b></u> TIIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFG VWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRR SQSPRRRRSQSPSANC
	43	31	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> LEIRFEECPGTKVHV EETCGTRGPSLRSTTASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRAK <b>GGGGT</b> TIIVN HVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPP PNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQS PSANC
	44	32	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> CPGKTVHVEETCGT <u>RGPSLRSTTASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRAKDGC<b>GGGGT</b></u> TIIVNHV NDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPN APILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPS ANC
	45	33	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> MKGPPWHSELEIRF EECPGKTVHVEETCGTRGPSLRSTTASGRVIEEWCCRECTMPPLSFRA <u>KDGCWYGM<b>EIRPRKE</b>PESNLVRSMTA<b>GGGGT</b></u> TIIVNHVNDTWGLK VRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPE HTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSPSANC

[0135] 通过对prM/M蛋白进行结构分析获得SEQ ID NO:46-47。选择这些序列是因为它们与支架系统(即土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)蛋白)的适应性(表5)。寨卡病毒prM/M蛋白的结构信息可从文献[23]中获得。已对prM序列(序列ID NO:46)进行诱变,以防止弗林(furin)蛋白酶裂解(R89G/R90G/R92G/R93G见带下划线的氨基酸)。

[0136] 表5

SEQ ID NO	ZIKV prM/M 抗原	氨基酸序列
[0137] 46	prM 弗林缺陷型	AEVTRRGSAYMYLDRNDAGEAISFP TTLGMNKCYIQIMDLGH MCDATMSYEC PMLDEGV EPDDVDCWCNTTSTWVVYGTCHHK KGEAGGSGGAVTLPSHSTRKLQTRSQTWLESREYTKHLIRVEN WIFRNPGFALAAAAIAWLLGSSTSQKVYIYLV MILLIAPAYS
47	M 全长	AVTLPSHSTRKLQTRSQTWLESREYTKHLIRVENWIFRNPGFALA AAAAIAWLLGSSTSQKVYIYLV MILLIAPAYS

[0138] 表6描述了嵌合肽序列,其包括土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)序列(SEQ ID NO:1)以及插入在SEQ ID NO:1的氨基酸77和82的区域中的SEQ ID NO:46-47中的每一个(双下划线)。粗体和斜体的氨基酸表示接头序列。

[0139] 表6

SEQ ID NO	WHcAg (SEQ ID NO: 1) 加 SEQ. ID NO:	含有 ZIKV prM/M 抗原的嵌合蛋白的氨基酸序列
[0140] 48	46	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> AEVTRRGSAYMY LDRNDAGEAISFPPTTLGMNKC <i>YIQIMDLGHMCDATMSY</i> ECPMLDEG VEPDDVDCWCNTTSTWVVYGTCHHKKGEAGGSGGAVTLPSHSTRK LQTRSQTWLESREYTKHLIRVENWIFRNPGFALAAAAIAWLLGSSTS QKVIYLYVMILLIAPAYS <b>GGGGT</b> IIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCL TFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGAR ASRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSPSANC
49	47	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHC SPHHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> AVTLPSHSTRKLT RSQTWLESREYTKHLIRVENWIFRNPGFALAAAAIAWLLGSSTSQKVI YLYVMILLIAPAYS <b>GGGGT</b> IIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQ HTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSP RRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSPSANC

[0141] 通过对衣壳C蛋白进行结构分析获得序列SEQ ID NO:50-51。选择这些序列是因为它们与支架系统(即土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)蛋白)的适应性(表7)。寨卡病毒衣壳蛋白的结构信息可从文献[24]中获得。

[0142] 表7

SEQ ID NO	ZIKV C 衣壳抗原	氨基酸序列
[0143] 50	C 全长	MKNPKKKSGGFRIVNMLKRGVARVSPFGGLKRLPAGLLLGHGPI RMVLAILAFLRFTAIPKPSLGLINRWGVSVKKEAMETIKKFKKDL AAMLRIINARKEKKRR
51	C α2	GHGPIRMVLAILAFLRFTAIPKPSLG

[0144] 表8描述了嵌合肽序列,其包括土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)序列(SEQ ID NO:1)以及插入在SEQ ID NO:1的氨基酸77和82的区域中的SEQ ID NO:50-51中的每一个(双下划线)。粗体和斜体的氨基酸表示接头序列。

[0145] 表8

SEQ ID NO	WHcAg (SEQ ID NO: 1) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV C 抗原的嵌合蛋白的氨基酸序列
[0146]		
[0147] 52	50	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSP HHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> MKNPKKKSGGFRIVN LKRGVARVSPFGGLKRLPAGLLLGHGPIRMVLAILAFLRFTAIPKPSLGLI NRWGSVKKEAMETIKKFKKDLAAMLRIINARKEKKRR <b>GGGGT</b> IIVN HVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFLVSFGVWIRTPAPYRPP NAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSPS ANC
53	51	MDIDPYKEFGSSYQLLNFLPLDFFPDLNALVDTATALYEEELTGREHCSP HHTAIRQALVCWDELTKLIAWMSSNI <b>GGGGT</b> GHGPIRMVLAILAFLRFT AIKPSLG <b>GGGGT</b> IIVNHVNDTWGLKVRQSLWFHLSCLTFGQHTVQEFL VSFGVWIRTPAPYRPPNAPILSTLPEHTVIRRRGGARASRSPRRRTPSPR RRRSQSPRRRRSQRPRRRRSQSPSANC

[0148] 多核苷酸

[0149] 本发明包括编码本文所述的肽以及嵌合肽的多核苷酸。示例性序列在SEQ ID NO: 22-53(分别为表3-8)中列出。由于遗传密码的简并性,许多多核苷酸序列编码给定的氨基酸序列,并且全部被认为是本发明的一部分。在一些变体中,针对将用于表达的宿主生物的

类型对密码子选择进行优化。

[0150] 表9. 编码表1所示的ZIKV E抗原的肽和蛋白质序列的多核苷酸序列。

[0151]

Seq ID NO	病毒样颗粒蛋白	多核苷酸序列
54	土拨鼠肝炎核心抗原 (WHcAg)	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTCTCCACACC ACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCACT TCTGAACAAGTTAGAACTATCATCGTTAACACGTTAA CGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGT TCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTT AAGAATTCTTGGTTTCTTTCGGTGTGTTGGATCAGAACT CAGCTCCATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTCT ACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTG GTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCA TCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAA GAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
Seq ID NO	ZIKV E 包膜抗原	多核苷酸序列
55	包膜结构域 3 全长	CACTTGAAGTGTAGATTGAAGATGGACAAGTTGAGATT GAAGGGTGTTCCTTACTCTTTGTGTAAGTCTGCTTTCAC TTTCACTAAGATCCCAGCTGAAACTTTGCACGGTACTG TTACTGTTGAAGTTCAATACGCTGGTACTGACGGTCCAT GTAAGGTTCCAGCTCAAATGGCTGTTGACATGCAAACT TTGACTCCAGTTGGTAGATTGATCACTGCTAACCCAGTT ATCACTGAATCTACTGAAACTCTAAGATGATGTTGGA ATTGGACCCACCATTTCGGTGACTCTTACATCGTTATCGG TGTTGGTGAAAAGAAGATCACTCACCCTGGCACAGA TCTGGTTCTACTATCGGTAAGGCTTTCGAAGCTACTGTT AGAGGTGCTAAGAGAATGGCTGTT

Seq ID NO	病毒样颗粒蛋白	多核苷酸序列
54	土拨鼠肝炎核心抗原 (WHcAg)	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTCTCCACACC ACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCACT TCTGAACAAGTTAGAACTATCATCGTTAACACGTTAA CGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGT TCCACTTGTCTTGTGGTACTTTCGGTCAACACACTGTTT AAGAATTCCTGGTTTCTTTTCGGTGTGGATCAGAATC CAGCTCCATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTCT ACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTG GTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCA TCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAA GAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
Seq ID NO	ZIKV E 包膜抗原	多核苷酸序列
56	包膜结构域 3 (EDIII) G 环截短型	GCTTTCACCTTTCACTAAGATCCCAGCTGAAACTTTGCA CGGTACTGTTACTGTTGAATTGCAATACGCTGGTACTGA CGGTCCATGTAAGGTTCCAGCTCAAATGGCTGTTGACA TGCAAATCTTACTCCAGTTGGTAGATTGATCACTGCT AACCAGTTATCACTGAATCTACTGAAAACCTAAGAT GATGTTGGAATTGGACCCACCATTCCGGTACTCTTACAT CGTTATCGGT
57	包膜结构域 3, A-B 环	GCTTTCACCTTTCACTAAGATCCCAGCTGAAACTTTGCA CGGTACTGTTACTGTTGAATTGCAATACGCT
58	包膜结构域 3, CxCDDx 环 (CD 环)	CCATGTAAGGTTCCAGCTCAAATGGCTGTTGACATGCA AACTTTGACTCCAGTTGGTAGATTGATCACTGCTAACC CAGTTATCACT
59	包膜结构域 3, Dx-E 环	AGATTGATCACTGCTAACCAGTTATCACTGAATCTACT GAAAACCTAAGATGATGTTGGAATTGGACCCA
60	包膜结构域 3, F-G 环	GGTGACTCTTACATCGTTATCGGTGTTGGTAAAAGAA GATCACTCACCCTGGCACAGA
61	包膜融合环	GACAGAGGTTGGGGTAACGGTTGTGGTTTGTTCGGTAA G
62	包膜结构域 2 (ED2) 序列 A-E	ACTACTACTGTTTCTAACATGGCTGAAGTTAGATCTTAC TGTTACGAAGCTTCTATCTCTGACATGGCTTCTGACTCT AGATGTCCAACCTCAAGGTGAAGCTTACTTGGACAAGC AATCTGACACTCAATACGTTTGTAAAGAGAAGCTTTGGTT GACAGAGGTTGGGGTAACGGTTGTGGTTTGTTCGGTAA GGGTTCTTTGGTTACTTGTGCTAAGTTCGCTTGTCTAA GAAGATGACTGGTAAGTCTATCCAACCAGAAAACCTGG AATACAGA
63	包膜结构域 2 序列 B-D	GAAGCTTCTATCTCTGACATGGCTTCTGACTCTAGATGT CCAACCTCAAGGTGAAGCTTACTTGGACAAGCAATCTGA CACTCAATACGTTTGTAAAGAGAAGCTTTGGTTGACAGAG GTTGGGGTAACGGTTGTGGTTTGTTCGGTAAAGGTTCT TTGGTTACTTGTGCTAAGTTCGCTTGTCT
64	包膜结构域 1 聚糖环	ATGACTGGTAAGTCTATCCAACCAGAAAACCTTGGAAATA CAGAATCATGTTGTCTGTTACGGTCTCAACACTCTG GTATGATCGTTAACGACACTGGTCACGAAACTGACGAA AACAGAGCTAAGGTTGAAATCACTCCAACACTTCCAA GAGCTGAAGCTACTTTGGGTGGTTTCGGTTCTTTGGGT TTGGACTGTGAACCAAGAAGTGGTTTGGACTTCTCTGA CTTGACTACTTACTGACTATG

[0152]

[0153] 表10. 编码表2所示的具有ZIKV E抗原的WHcAg-ZIKV嵌合蛋白的多核苷酸序列。

[0154]

Seq ID NO	WHcAg 多核苷酸序列 (SEQ ID NO: 54) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV E 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
65	55	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACATCGGT GGTGGTGGTACTCACTTGAAGTGTAGATTGAAGATGGA CAAGTTGAGATTGAAGGGTGTCTTACTCTTTGTGTAC TGCTGCTTTCACCTTTCACCTAAGATCCCAGCTGAAACTTT GCACGGTACTGTTACTGTTGAAGTTCATACGCTGGTA CTGACGGTCCATGTAAGGTTCCAGCTCAAATGGCTGTT GACATGCAAACCTTGACTCCAGTTGGTAGATTGATCAC TGCTAACCCAGTTATCACTGAATCTACTGAAAACCTCTAA GATGATGTTGGAATTGGACCCACCATTCGGTGACTCTTA CATCGTTATCGGTGTTGGTGAAGAAGATCACTCACC ACTGGCACAGATCTGGTCTACTATCGGTAAGGCTTTTCG AAGCTACTGTTAGAGGTGCTAAGAGAATGGCTGTTGGT GGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCACGTTAACGACAC TTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTTCCTACT TGCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAA TTCTTGGTTTCTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCT CCATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTT GCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGTCT AGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCATCTCC AAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGA TCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT

Seq ID NO	WHcAg 多核苷酸序列 (SEQ ID NO: 54) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV E 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
66	56	ATGGACATCGACCCATAACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGCT TTCACTTTCACTAAGATCCCAGCTGAACTTTGCACGG TACTGTTACTGTTGAATTGCAATACGCTGGTACTGACGG TCCATGTAAGGTTCCAGCTCAAATGGCTGTTGACATGC AAACCTTGACTCCAGTTGGTAGATTGATCACTGCTAAC CCAGTTATCACTGAATCTACTGAAAACCTAAAGATGATG TTGGAATTGGACCCACCATTCCGGTACTCTTACATCGTT ATCCGGTACTATCATCGTTAACACGTTAACGACACTTGG GGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTCCACTTGTCT TGTTTGACTTTCCGGTCAACACACTGTTCAAGAATTCTT GGTTTCTTTCCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCCATA CAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAG AACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGCTAGAGC TTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCATCTCCAAGAA GAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGATCTCA ATCTCCATCTGCTAACTGT
67	57	ATGGACATCGACCCATAACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGCT TTCACTTTCACTAAGATCCCAGCTGAACTTTGCACGG TACTGTTACTGTTGAATTGCAATACGCTACTATCATCGTT AACACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGAC AATCTTTGTGGTCCACTTGTCTTGTGGTTCGGTTC AACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTCTTTCCGGTGT GGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCT CCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGA AGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAA GAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGATCTCAATCT CCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTG T
68	58	ATGGACATCGACCCATAACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCCCA TGTAAGGTTCCAGCTCAAATGGCTGTTGACATGCAAAAC TTTGACTCCAGTTGGTAGATTGATCACTGCTAACCCAGT TACTACTATCATCGTTAACACGTTAACGACACTTGG GGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTCCACTTGT CTGTTTGACTTTCCGGTCAACACACTGTTCAAGAATTC TTGGTTTCTTTCCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCCA TACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCC AGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGCTAGA GCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCATCTCCAAG AAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGATCT CAATCTCCATCTGCTAACTGT

[0155]

[0156]

Seq ID NO	WHcAg 多核苷酸序列 (SEQ ID NO: 54) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV E 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
69	59	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACAACACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACATCAGA TTGATCACTGCTAACCCAGTTATCACTGAATCTACTGAA AACTCTAAGATGATGTTGGAATTGGACCCAACATATCATC GTTAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAG ACAATCTTTGTGGTTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGG TCAACACACTGTTCAAGAATTCCTGGTTTCTTTCGGTGT TTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACG CTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCA GAAGAAGAGGTGGTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAG AAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAA TCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAA CTGT
70	60	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACAACACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACATCGGT GACTCTTACATCGTTATCGGTGTTGGTGAAAAGAAGAT CACTCACCACCTGGCACAGAAGTATCATCGTTAACACG TTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTG TGGTTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACT GTTCAAGAATTCCTGGTTTCTTTCGGTGTGTTGGATCAGA ACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTT GTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAG GTGGTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAAGT CCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAA GAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
71	61	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACAACACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACATCGGT GGTACTGACAGAGGTTGGGGTAAACGGTTGTGGTTTGT CGGTAAGGGTGGTACTATCATCGTTAACACGTTAACG AACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTTC CACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCA AGAATTCCTGGTTTCTTTCGGTGTGTTGGATCAGAAGTCC AGCTCCATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTA CTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGT GCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCCATC TCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGA AGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT

[0157]

Seq ID NO	WHcAg 多核苷酸序列 (SEQ ID NO: 54) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV E 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
72	62	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACATCGGT GGTACTACTACTGTTTCTAACATGGCTGAAGTTAGATCT TACTGTTACGAAGCTTCTATCTCTGACATGGCTTCTGAC TCTAGATGTCCAACCTCAAGGTGAAGCTTACTTGGACAA GCAATCTGACACTCAATACGTTTGTAAAGAGAACCTTGG TTGACAGAGGTTGGGGTAACGGTTGTGGTTTGTTCGGT AAGGGTTCCTTGGTTACTTGTGCTAAGTTCGCTTGTCT AAGAAGATGACTGGTAAGTCTATCCAACCAGAAAACCT GGAATACAGAGGTTGGTACTATCATCGTTAACCACGTTA ACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGG TTCCACTTGTCTTGTGGTTCGGTCAACACACTGTT CAAGAATTCCTGGTTTCTTTCGGTGTGGATCAGAACCT CCAGCTCCATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTGTC TACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTG GTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCA TCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAA GAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
73	63	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTCTCCACACC AACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACATCGGT GGTGAAGCTTCTATCTCTGACATGGCTTCTGACTCTAGA TGCCAACCTCAAGGTGAAGCTTACTTGGACAAGCAATC TGACACTCAATACGTTTGTAAAGAGAACCTTGGTTGACA GAGGTTGGGGTAACGGTTGTGGTTTGTTCGGTAAGGGT TCTTTGGTTACTTGTGCTAAGTTCGCTTGTCTGGTGGT ACTATCATCGTTAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGG AAGGTTAGACAATCTTGTGGTTCCACTTGTCTTGTGTTG ACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTTC TTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGAC CACCAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACAC ACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGCTAGAGCTTCTAG ATCTCCAAGAAGAAGAACTCCATCTCCAAGAAGAAGA AGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCC ATCTGCTAACTGT

[0158]

Seq ID NO	WHcAg 多核苷酸序列 (SEQ ID NO: 54) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV E 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
74	64	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTCTTCTTAC CAATTGTTGAACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGAC TTGAACGCTTTGGTTGACACTGCTACTGCTTTGTACGA AGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTCTCCACACC ACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAA TTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGCTTCTAACAATCGGT GGTATGACTGGTAAAGTCTATCCAACCAGAAAACCTTGG ATACAGAATCATGTTGTCTGTTACCGTTCTCAACACTC TGGTATGATCGTTAACGACACTGGTCACGAAACTGACG AAAACAGAGCTAAGGTTGAAATCACTCCAAACTCTCC AAGAGCTGAAGCTACTTTGGGTGGTTTCGGTTCTTTGG GTTTGGACTGTGAACCAAGAAGCTGGTTTGGACTTCTCT GACTTGTACTACTTACTATGGGTGGTACTATCATCGTT AACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGAC AATCTTTGTGGTTCCACTTGTCTTGTGGTTCGGTC AACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTTCTTTCGGTGT GGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAACCGCT CCAATCTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGA AGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAA GAAGAACTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCT CCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTG T

[0159] 表11. 编码表3所示的ZIKV NS1抗原的肽和蛋白质序列的多核苷酸序列。

[0160]

SEQ ID NO	ZIKV NS1 抗原	ZIKV NS1 抗原的多核苷酸序列
75	NS1 β1-2	GACGTTGGTTGTTCTGTTGACTTCTCTAAGAAGGAACTAGATGTG GTACT
76	NS1 β3-4	GACAGATACAAGTACCACCCAGACTCTCCAAGAAGATTGGCTGCTG CTGTTAAGCAAGCTTGGGAAGACGGTATCTGTGGTATCTCTCTGTT TCTAGA
77	NS1 α2-β5	ATGGAAAACATCATGTGGAGATCTGTTGAAGGTGAATTGAACGCTA TCTTGGAAAGAAAACGGTGTTCAATTGACTGTTGTTGTTGGTTCTGTT
78	NS1 β4-5-6	TGTGGTATCTTCTGTTTCTAGAATGGAAAACATCATGTGGAGATC TGTTGAAGGTGAATTGAACGCTATCTTGGAAAGAAAACGGTGTCAA TTGACTGTTGTTGTTGTTCTGTTAAGAACCAATGTGGAGAGGTC CACAAAGATTGCCAGTTCAGTTAACGAATTGCCACACGGTTGGAA GGCTTGGGGTAAAGTCTTACTTCGTTAGAGCTGCTAAGACTAACAA TCTTTCGTTGTTGACGGTGACACTTTGAAGGAATGTGTT
79	NS1 Inter. Loop-β6	AAGAACCAATGTGGAGAGGTCCACAAAGATTGCCAGTTCAGTTA ACGAATTGCCACACGGTTGGAAGGCTTGGGGTAAAGTCTTACTTCGT TAGAGCTGCTAAGACTAACAACCTTTTCGTTGTTGACGGT
80	NS1 β7-8-9	GACACTTGAAGGAATGTCCATTGAAGCACAGAGCTTGGAACTCTT TCTTGGTTGAAGACCACGGTTTCGGTGTTCCTCCACTTCTGTTTGG TTGAAGGTTAGAGAAGACTACTCTTTGGAA
81	NS1 β10-11-12-13	TGTGACCCAGCTGTTATCGGTACTGCTGTTAAGGGTAAGGAAGCTG TTCACTCTGACTTGGGTTACTGGATCGAATCTGAAAAGAACGACAC TTGGAGATTGAAGAGAGCTCACTTGATCGAAATGAAGACTTGT
82	NS1 β12-13	GGTACTGGATCGAATCTGAAAAGAACGACACTTGGAGATTGAAGA GAGCTCACTTGATC

SEQ ID NO	ZIKV NS1 抗原	ZIKV NS1 抗原的多核苷酸序列
83	NS1 Spaghetti 环-β14	AGAGCTCACTTGATCGAAATGAAGACTTGTGAATGGCCAAAAGTCTC ACACTTTGTGGACTGACGGTATCGAAGAATCTGACTTGATCATCCCA AAGTCTTTGGCTGGTCCATTGTCTCACCACAACACTAGAGAAGGTT ACAGAACTCAAATGAAGGGTCCATGGCACTCTGAAGAATTGAAAAT CAGA
84	NS1 β14-15-16-17	TTGAAAATCAGATTCGAAGAATGTCCAGGTAATAAGGTTACGTTG AAGAACTTGTGGTACTAGAGGTCCATCTTTGAGATCTACTACTGCT TCTGGTAGAGTTATCGAAGAATGGTGTGTAGAGAATGTACTATGCC ACCATGTCTTTCAGAGCTAAG
85	NS1 β15-16-17-18	TGTCCAGGTACTAAGGTTACGTTGAAGAACTTGTGGTACTAGAG GTCCATCTTTGAGATCTACTACTGCTTCTGGTAGAGTTATCGAAGAA TGGTGTGTAGAGAATGTACTATGCCACCATTGTCTTTCAGAGCTAA GGACGGTTGT
86	NS1 β14-15-16-17-18 -19-C-末端	ATGAAGGGTCCATGGCACTCTGAAGAATTGAAAATCAGATTCGAAG AATGTCCAGGTACTAAGGTTACGTTGAAGAACTTGTGGTACTAG AGGTCCATCTTTGAGATCTACTACTGCTTCTGGTAGAGTTATCGAAG AATGGTGTGTAGAGAATGTACTATGCCACCATTGTCTTTCAGAGCT AAGGACGGTGTGGTACGGTATGAAAATCAGACCAAGAAAGGAA CCAGAATCTAACTTGGTTAGATCTATGGTTACTGCT

[0161]

[0162] 表12. 编码表4所示的具有ZIKV NS1抗原的WHcAg-ZIKV嵌合蛋白的多核苷酸序列。

SEQ ID NO	WHcAg(SEQ ID NO: 54)加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV NS1 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
87	75	ATGGACATCGACCCATACAAAGGAATTCGGTCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACAACACTGTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT GACGTTGGTTGTTCTGTTGACTTCTCTAAGAAGGAAACTAGATGTGGT ACTGGTGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCACGTTAACGACACTTGG GGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTTCCACTTGCTTGTTGACTT TCGGTCAACACACTGTTCAAGAATTCTTGGTTTCTTTCGGTGTGGTGGAT CAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTCTAC TTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGGTGGTGGTGGT TAGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTC AATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT

[0163]

[0164]

SEQ ID NO	WHcAg(SEQ ID NO: 54)加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV NS1 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
88	76	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT GACAGATACAAGTACCACCCAGACTCTCCAAGAAGATTGGCTGCTGCT GTTAAGCAAGCTTGGGAAGACGGTATCTGTGGTATCTTCTGTTTCTA GAGGTGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACACGTTAACGACACTTGGG GTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTT CGGTCAACACACTGTTCAAGAATTCCTGGTTCTTTCGGTGTGGTGGATC AGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACT TTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTCT AGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCA ATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
89	77	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT ATGGAAAACATCATGTGGAGATCTGTTGAAGGTGAATTGAACGCTATC TTGGAAGAAAACGGTGTCAATTGACTGTTGTTGTTGGTCTGTTGGT GGTGGTGGTACTATCATCGTTAACACGTTAACGACACTTGGGGTTT AAGGTTAGACAATCTTTGTGGTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGT AACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTCTTTCGGTGTGGTGGATCAGAA CTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCC AGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TCCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTC CAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
90	78	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT TGTGGTATCTTCTGTTTCTAGAATGGAAAACATCATGTGGAGATCTG TTGAAGGTGAATTGAACGCTATCTTGAAGAAGAAGAGGTGGTGGTGGTGGT CTGTTGTTGTTGGTTCGTTAAGAACCAATGTGGAGAGGTCCACAAA GATTGCCAGTTCCAGTTAACGAATTGCCACACGGTTGGAAGGCTTGGG GTAAGTCTTACTTCGTTAGAGCTGCTAAGACTAACAACTCTTTCGTTGT TGACGGTGACACTTTGAAGGAATGTGGTGGTGGTGGTACTATCATCGT TAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTG GTTCCACTTGTCTTGTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATTC TTGGTTTCTTTCGGTGTGGTGGATCAGAAGTCCAGCTCCATACAGACCAC CAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACTGTTATCAGAA GAAGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCA ATCTCCATCTGCTAACTGT

[0165]

SEQ ID NO	WHcAg(SEQ ID NO: 54)加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV NS1 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
91	79	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTC TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT AAGAACCCAATGTGGAGAGGTCCACAAAGATTGCCAGTTCAGTTAA CGAATTGCCACACGGTTGGAAGGCTTGGGGTAAAGTCTTACTTCGTTAG AGCTGCTAAGACTAACAACTCTTTCGTTGTTGACGGTGGTGGTGGTGG TACTATCATCGTTAACACGTTAACGACACTTGGGGTTGAAGGTTAGA CAATCTTTGTGGTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTG TTCAAGAATTCCTGGTTTCTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCC ATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACAC TGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAG AAGAACTCCATCTCCAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAA GAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
92	80	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTC TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT GACTTTTGAAGGAATGTCCATTGAAGCACAGAGCTTGAAGTCTTTC TTGGTTGAAGACCACGGTTTCGGTGTTCCTCACACTTCTGTTTGGTTG AAGGTTAGAGAAGACTACTCTTTGGAAGGTGGTGGTGGTACTATCATC GTTAAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTG TGGTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAAT TCTTGGTTTCTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACC ACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAG AAGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCT CATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCT CAATCTCCATCTGCTAACTGT
93	81	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTC TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT TGTGACCCAGCTGTTATCGGTACTGCTGTTAAGGGTAAGGAAGCTGTT CACTCTGACTTGGGTTACTGGATCGAATCTGAAAAGAACGACACTTGG AGATTGAAGAGAGCTCACTTGTATCGAAATGAAGACTTGTGGTGGTGGT GGTACTATCATCGTTAACACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTA GACAATCTTTGTGGTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACAC TGTTCAAGAATTCCTGGTTTCTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCT CCATACAGACCACCAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACAC ACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGA AGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAG AAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT

[0166]

SEQ ID NO	WHcAg(SEQ ID NO: 54)加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV NS1 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
94	82	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT GGTTACTGGATCGAATCTGAAAAGAACGACACTTGGAGATTGAAGAG AGCTCACTTGATCGGTGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCACGTTAAC GACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTTCCACTTGTCT TGTTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTTCTTTTCG GTGTTTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCTCCAA TCTTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTG CTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAA GAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTA ACTGT
95	83	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT AGAGCTCACTTGATCGAAATGAAGACTTGTGAATGGCCAAAAGTCTCAC ACTTTGTGGACTGACGGTATCGAAGAATCTGACTTGATCATCCCAAAG TCTTTGGCTGGTCCATTGTCTCACCACAACACTAGAGAAGGTTACAGA ACTCAAATGAAGGGTCCATGGCACTCTGAAGAATTGGAAATCAGAGG TGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTT AAGGTTAGACAATCTTTGTGGTTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTC AACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTTCTTTCGGTGGTGGTGGTACTCAGAA CTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCTCCAAATCTTGTCTACTTTGGC AGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATC TCCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTC CAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
96	84	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT TTGGAATCAGATTCTGAAGAATGTCCAGGTACTAAGGTTACAGTTGAA GAAACTTGTGGTACTAGAGGTCCATCTTTGAGATCTACTACTGCTTCTG GTAGAGTTATCGAAGAATGGTGTGTAGAGAATGTACTATGCCACCATT GTCTTTCAGAGCTAAGGGTGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCACGTT AACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTTCCACTTG TCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTTCTT TCGGTGTTTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAACGCTC CAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTT GTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAA GAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTG CTAAGTGT

SEQ ID NO	WHcAg(SEQ ID NO: 54)加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV NS1 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
97	85	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT TGCCAGGTACTAAGGTTACGTTGAAGAACTTGTGGTACTAGAGGT CCATCTTTGAGATCTACTACTGCTTCTGGTAGAGTTATCGAAGAATGGT GTTGTAGAGAATGTACTATGCCACCATTGTCTTTCAGAGCTAAGGACG GTTGTGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCCAGTTAACGACACTTG GGTTTGAAGGTTAGACAATCTTTGTGGTCCACTTGTCTTGGTTGACT TTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATCTTGGTTTCTTTCGGTGGTTTGGGA TCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTCTA CTTGGCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGGTACTAGAGCTT CTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCT CAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
98	86	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT ATGAAGGTCCATGGCACTCTGAAGAATTGGAAATCAGATTCGAAGAA TGTCCAGGTACTAAGGTTACGTTGAAGAACTTGTGGTACTAGAGGT CCATCTTTGAGATCTACTACTGCTTCTGGTAGAGTTATCGAAGAATGGT GTTGTAGAGAATGTACTATGCCACCATTGTCTTTCAGAGCTAAGGACG GTTGTGGTACGGTATGGAATCAGACCAAGAAAGGAACCAGAATCTA ACTTGGTTAGATCTATGGTTACTGCTGGTGGTGGTACTATCATCGTT AACCCAGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACAATCTTGTGG TTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATCT TGGTTTCTTTCGGTGGTTTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCAC CAAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAA GAAGAGGTGGTGGTACTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAAGTCCA TCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCA ATCTCCATCTGCTAACTGT

[0167] 表13. 编码表5所示的ZIKV prM/M抗原的肽和蛋白质序列的多核苷酸序列。

SEQ ID NO	ZIKV prM/M 抗原	ZIKV prM/M 抗原的多核苷酸序列
99	prM 弗林缺陷型	GCTGAAGTTACTAGAAGAGGTTCTGCTTACTACATGTAAGTGGACAGA AACGACGCTGGTGAAGCTATCTTTTCCAACTACTTTGGGTATGAACA AGTGTACATCCAAATCATGGACTTGGGTACATGTGTGACGCTACTAT GTCTTACGAATGTCCAATGTTGGACGAAGGTGTTGAACGACGACGCT TGACTGTTGGTGTAACTACTTCTACTTGGGTTGTTACGGTACTTGT CACCACAAGAAGGGTGAAGCTGGTGGTCTGGTGGTGGTACTTTG CCATCTACTCTACTAGAAAGTTGCAAAGTACTAGATCTCAAAGTGGTTGG AATCTAGAGAATACACTAAGCACTTATCAGAGTTGAAAAGTGGATCT TCAGAAACCCAGGTTTCGCTTTGGCTGCTGCTGCTATCGCTTGGTTGTT GGTCTTCTACTTCTCAAAGGTTATCTACTTGGTTATGATCTTGTGTA TCGCTCCAGCTTACTCT
100	M 全长	GCTGTTACTTTGCCATCTCACTTACTACTAGAAAGTTGCAAAGTACTAGATCTC AACTTGGTTGGAATCTAGAGAATACTAAGCACTTATCAGAGTTG AAAAGTGGATCTTCAAGAAACCCAGGTTTCGCTTTGGCTGCTGCTGCTA TCGCTTGGTTGTTGGGTTCTTCTACTTCTCAAAGGTTATCTACTTGGTT ATGATCTTGTGATCGCTCCAGCTTACTCT

[0169] 表14. 编码表6所示的具有ZIKV prM/M抗原的WHcAg-ZIKV嵌合蛋白的多核苷酸序列。

SEQ ID NO	WHcAg(SEQ ID NO: 62)加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV prM/M 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
[0171] 101	99	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT GCTGAAGTTACTAGAAGAGGTTCTGCTTACTACATGACTTGGACAGA AACGACGCTGGTGAAGCTATCTCTTCCCAACTACTTTGGGTATGAAC AAGTGTACATCCAAATCATGGACTTGGGTCACATGTGTGACGCTACTA TGTCTTACGAATGTCCAATGTTGGACGAAGGTGTTGAACGACGACG TTGACTGTTGGTGTAACTACTACTTCTACTTGGGTTGTTACGGTACTTG TCACCACAAGAAGGGTGAAGCTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTGGTACTTT GCCATCTCACTTACTAGAAAAGTTGCAAACTAGATCTCAAACTTGGTT GGAATCTAGAGAATACTAAGCACTTGATCAGAGTTGAAAAGTGGAT CTTCAGAAACCCAGGTTTCGCTTTGGCTGCTGCTGCTATCGCTTGGTTG TTGGGTTCTTACTTCTCAAAAGGTTATCTACTTGGTTATGATCTGTT GATCGCTCCAGCTTACTCTGGTGGTGGTGGTACTATCATCGTTAACCAC GTTAACGACACTTGGGGTTGAAGGTTAGACAATCTTGTGGTTCCAC TTGCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAGAATCTTGGGTTT CTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAGACCACCAAAACG CTCCAATCTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATCAGAAGAAGAG GTGGTGCTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGAAGAAGAACTCCATCTCAA GAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAT CTGCTAACTGT
[0171] 102	100	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTCTTCTTACCAATTGTTGA ACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGACAC TGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACTGTTT TCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGGTGGGACGAATT GACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGTGGTACT GCTGTTACTTTGCCATCTCACTTACTAGAAAAGTTGCAAACTAGATCTC AACTTGGTTGGAATCTAGAGAATACTAAGCACTTGATCAGAGTTG AAAAGTGGATCTTCAGAAACCCAGGTTTCGCTTTGGCTGCTGCTGCTA TCGCTTGGTTGTTGGGTTCTTACTTCTCAAAAGGTTATCTACTTGGTT ATGATCTTGTGATCGCTCCAGCTTACTCTGGTGGTGGTGGTACTATCA TCGTTAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTGAAGGTTAGACAATCTT TGTGGTTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGTTCAAG AATCTTGGTTTCTTTCGGTGTGGATCAGAACTCCAGCTCCATACAG ACCACCAAACGCTCCAATCTGTCTACTTTGCCAGAACACACTGTTATC AGAAGAAGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAAGAAGAAGAT CTCAATCTCCATCTGCTAACTGT

[0172] 表15. 编码表7所示的ZIKV衣壳C抗原的肽和蛋白质序列的多核苷酸序列。

SEQ ID NO	ZIKV C 衣壳 抗原	ZIKV C 抗原的多核苷酸序列
[0173] 103	C 全长	ATGAAGAACCCAAAGAAGAAGTCTGGTGGTTTCAGAATCGTTAACA TGTTGAAGAGAGGTGTTGCTAGAGTTTCTCCATTCGGTGGTTGAAG AGATTGCCAGCTGGTTTGTGTTGGTTCACGGTCCAATCAGAATGGT TTTGGCTATCTTGGCTTCTTGGATTCCTGAGATTCATGCTATCAAGCCATCTTTG GGTTTGTATCAACAGATGGGGTTCTGTTGGTAAGAAGGAAGCTATGGA AACTATCAAGAAGTTCAAGAAGGACTTGGCTGCTATGTTGAGAATCA TCAACGCTAGAAAAGGAAAAGAAGAAGA
[0174] 104	C α2	GGTCACGGTCCAATCAGAATGGTTTGGCTATCTGGCTTCTTGAGA TTCCTGCTATCAAGCCATCTTTGGGT

[0175] 表16. 编码表8所示的具有ZIKV C抗原的WHcAg-ZIKV嵌合蛋白的多核苷酸序列。

SEQ ID NO	WHcAg (SEQ ID NO: 62) 加 SEQ ID NO:	含有 ZIKV C 抗原的嵌合蛋白的多核苷酸序列
[0176] 105	103	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCTTCTTACCAATTGTTG AACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGA CACTGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACT GTTCTCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGAC GAATTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGT GGTACTATGAAGAACCCAAAGAAGAAGTCTGGTGGTTTCAGAATCG TTAACATGTTGAAGAGAGGTGTTGCTAGAGTTTCTCCATTCGGTGGT TTGAAGAGATTGCCAGCTGGTTTGTGTTGGGTCACGGTCCAATCAG AATGGTTTTGGCTATCTGGCTTCTTGAGATTCACTGCTATCAAGCC ATCTTTGGGTTTGATCAACAGATGGGGTCTGTTGGTAAGAAGGAAG CTATGGAACTATCAAGAAGTTCAAGAAGGACTTGGCTGCTATGTTG AGAATCATCAACGCTAGAAAGGAAAAGAAGAGAAGAGGTGGTGGT GGTACTATCATCGTTAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGT TAGACAATCTTGTGGTTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACA CACTGTTCAAGAATCTTGGTTTCTTTCGGTGGTTGGATCAGAATCC AGCTCCATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTGCCAG AACACACTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCT CCAAGAAGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTC CAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT
106	104	ATGGACATCGACCCATACAAGGAATTCGGTTCTTCTTACCAATTGTTG AACTTCTTGCCATTGGACTTCTTCCCAGACTTGAACGCTTTGGTTGA CACTGCTACTGCTTTGTACGAAGAAGAATTGACTGGTAGAGAACACT GTTCTCCACACCACACTGCTATCAGACAAGCTTTGGTTTGTGGGAC GAATTGACTAAGTTGATCGCTTGGATGTCTTCTAACATCGGTGGTGGT GGTACTGGTCACGGTCCAATCAGAATGGTTTTGGCTATCTTGGCTTTC TTGAGATTCACTGCTATCAAGCCATCTTGGGTGGTGGTGGTACT ATCATCGTTAACCACGTTAACGACACTTGGGGTTTGAAGGTTAGACA ATCTTTGTGGTTCCACTTGTCTTGTGTTGACTTTCGGTCAACACACTGT TCAAGAATCTTGGTTTCTTTCGGTGGTTGGATCAGAATCCAGCTCC ATACAGACCACCAACGCTCCAATCTTGTCTACTTTCGCAGAACACA CTGTTATCAGAAGAAGAGGTGGTGTAGAGCTTCTAGATCTCCAAGA AGAAGAAGTCCATCTCCAAGAAGAAGAAGATCTCAATCTCCAAGAA GAAGAAGATCTCAATCTCCATCTGCTAACTGT

[0177] 制备预定序列的多核苷酸的方法是众所周知的。参见，例如，Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第二版, 1989) 和F. Eckstein (编辑) Oligonucleotides and Analogues, 第一版 (牛津大学出版社, 纽约, 1991)。固相合成方法对于聚核糖核苷酸和聚脱氧核糖核苷酸都是优选的 (合成DNA的众所周知的方法也可用于合成RNA)。聚核糖核苷酸也可以通过酶法制备。也可以将非天然存在的核酸碱基掺入多核苷酸中。参见，例如，美国专利号7,223,833 [25, 26]。

[0178] 载体

[0179] 在一些实施方案中，使用载体来表达本文所述的多核苷酸。表达载体通常包括针对用于蛋白质表达的宿主细胞类型而选择的表达控制序列。在一些实施方案中，表达载体是酵母表达载体。在本领域中已知多种表达载体，包括但不限于分别用于VLP的分泌生产或胞质生产的pD912或pD902 (ATUM (<https://www.atum.bio/>))。图2描述了示例性表达载体的组成和结构。

[0180] VLP生产/纯化

[0181] 存在许多用于蛋白质表达的合适的酵母菌株，包括但不限于法夫驹形氏酵母 Kurtzman (ATCC®76273™) 或巴斯德驹形氏酵母 (Komagataella pastoris) (ATCC®76274™)。使用计算机分析，我们设计了密码子优化的DNA构建体，该构建体表

达不同毒株之间保守的寨卡病毒抗原(图3A和3B)。根据ATUM(<https://www.atum.bio/>),并进一步优化,由重组构建体产生VLP,所述重组构建体使用来自毕赤酵母醇氧化酶1(AOX1)基因的启动子来驱动重组蛋白的生产。通过例如沉淀、超速离心、色谱法、切向流过滤(TFF)或超滤方法或这些方法的组合来纯化VLP(图4)[16]。使用生化测定和免疫测定(例如蛋白质印迹、斑点印迹、ELISA(图6和7)、凝胶电泳(SDS-PAGE或非变性琼脂糖凝胶,与考马斯亮蓝染色结合))和电子显微镜(图5)对VLP的纯度和抗原性进行定量[16]。

[0182] VLP的抗原性表征和免疫原性表征

[0183] A. 抗原性

[0184] 在免疫原性测试之前,对包括本文所述的嵌合肽的VLP进行了表达、颗粒组装和结合肽特异性抗体的能力方面的表征。根据本领域已知的方法[16],利用并设计了捕获酶联免疫吸附测定(ELISA)、斑点印迹或蛋白质印迹,以评估三种VLP特性(图6和7):1)通过使用对WHcAg具有特异性的抗体(例如,Santa Cruz Biotechnology,抗体Hep B cAg抗体(13A9):sc-23946),来评估WHcAg多肽的蛋白表达;2)使用对WHcAg上的构象表位具有特异性的抗体,来评估颗粒组装;和3)通过使用寨卡病毒肽反应性抗体(例如ATCC BEI资源NR-50414单克隆抗寨卡病毒包膜(E)蛋白,克隆ZV-2),来评估本公开的寨卡病毒肽的表位的展示。选择对所有三种特性均为阳性的构建体进行进一步纯化(例如,超速离心、超滤、色谱法)。简而言之,通过ELISA、斑点印迹和蛋白质印迹,测定表达、颗粒组装和抗体结合。使用SDS-PAGE和琼脂糖电泳以及电子显微镜(图5),来评估VLP的纯度和组装。根据文献[27],可以使用体外抗体依赖性增强测定来检测VLP的非交叉反应性。

[0185] B. 免疫原性

[0186] 在动物模型(例如免疫活性小鼠模型(例如BALB/c)或免疫缺陷小鼠模型(例如AG129和A129))中,评估了在不同佐剂配方中的基于VLP的疫苗的抗原性。根据文献[27,28],在寨卡病毒感染的小鼠模型中评估了针对VLP的免疫应答。除了抗插入物、抗肽-蛋白和抗WHcAg抗体终点滴度,还检测了抗体特异性、同种型分布、抗体持久性和抗体亲和力。根据文献[27],可以通过斑点印迹分析(图9)或体外抗体依赖性增强测定分析VLP免疫小鼠的血清样品,来测试VLP免疫刺激诱导非交叉反应抗体。通过本领域已知的ELISA和中和测定[16,28],将免疫血清与参照抗体的活性进行比较。在各种哺乳动物物种(例如,啮齿动物,例如大鼠和小鼠,非人类灵长类(NHP)和/或人类)中体内测试了免疫应答。

[0187] 组合物

[0188] 本发明包括组合物,所述组合物包括本文所述的嵌合肽或VLP或编码所述嵌合肽的多核苷酸。在一些实施方案中,所述组合物是抗原性组合物。在一些实施方案中,组合物还包括药学上可接受的载体。术语“载体”是指这样的媒介物(vehicle),VLP、载体、嵌合肽或编码嵌合肽的多核苷酸在该媒介物内被施用给哺乳动物受试者。术语载体涵盖稀释剂、赋形剂、佐剂及其组合。药学上可接受的载体在本领域中是众所周知的(参见,例如,Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences,1975年)。

[0189] 示例性的“稀释剂”包括无菌液体,例如无菌水、盐溶液和缓冲液(例如磷酸盐、tris、硼酸盐、琥珀酸盐或组氨酸)。示例性的“赋形剂”是可以增强疫苗稳定性的惰性物质,包括但不限于聚合物(例如聚乙二醇)、碳水化合物(例如,淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖或纤维素)和醇(例如,甘油、山梨糖醇或木糖醇)。

[0190] 佐剂根据其主要作用机理大致分为两类：使相关抗原靶向抗原呈递细胞 (APC) 的疫苗递送系统 (例如, 乳剂、微粒、免疫刺激复合物 (ISCOMS) 或脂质体); 以及直接激活固有免疫应答的免疫刺激佐剂 (例如, LPS、MPL或CpG)。可以将不同类型的佐剂组合以增强其免疫刺激活性 (例如AS04 (GSK) 由MPL与铝盐混合而成)。

#### [0191] A. 传统的分子佐剂

[0192] 尽管当使用本文公开的WHcAg递送系统时不需要佐剂, 但是本发明的一些实施方案采用了佐剂制剂。佐剂是一类免疫调节分子和组合物, 其能够通过以下方式增强疫苗的有效性和安全性: 1) 增强免疫原性并增加保护期限; 2) 扩大免疫应答的诱导; 3) 降低疫苗剂量和疫苗接种成本 (节省抗原); 4) 加速免疫应答; 5) 刺激更强的免疫记忆; 6) 提高在弱应答患者 (例如新生儿、老年人和免疫功能低下人群) 中的功效 [12]。另外, 一些佐剂制剂还可以提高基于VLP的疫苗的稳定性和在VLP递送中起重要作用。用于本公开的佐剂制剂包括经典的基于铝的佐剂, 和新型佐剂, 例如脂质体 (例如CAF01)、病原体识别受体的激动剂 (例如免疫刺激复合物 (ISCOM)、脂质A类似物 (MPL、RC-529和GLA)、双链RNA类似物 (例如Poly I:C和Poly ICLC)、胞苷一磷酸鸟苷寡聚脱氧核苷酸 (例如CpG、CpG ODN)、鞭毛蛋白、咪唑并喹啉 (Imiquimod和Resiquimod)、聚合物颗粒 (例如壳聚糖)、乳剂 (例如基于角鲨烯油的乳剂)、细胞因子 (例如白介素12)、细菌毒素 (例如霍乱毒素 (CT) 或大肠杆菌肠毒素 (LT))、Quil A和本领域已知的其他皂苷, 以及植物多糖菊粉 [12]。具体而言, 在盐水中的免疫会有效地引发针对疫苗制剂抗原的免疫应答。但是, 在非炎性剂 (例如IFA (矿物油)、Montanide ISA 720 (角鲨烯) 和磷酸铝 (AlPO<sub>4</sub>)) 或免疫调节剂或佐剂中的制剂可增强疫苗的免疫原性。另外, 不管使用何种佐剂 (如果使用的话), 施用WHcAg都会导致产生多种IgG同种型。与来自亚单位疫苗的重组蛋白相比, WHcAg VLP在特别恶劣的粘膜环境中显示出优异的稳定性。该特征对于开发用于粘膜施用 (如口服、鼻腔、直肠和阴道途径) 的疫苗是非常有利的。CpG基序的包含也可以增强初次应答。而且, 使用炎性佐剂例如Ribi制剂并不比使用非炎性佐剂更有益, 表明佐剂的益处是由于贮存效应 (depot effect) 引起的, 而不是由非特异性炎症引起。因此, 取决于应用和所需抗体量, 核心平台不与佐剂一起使用或者核心平台与非炎性佐剂一起使用。在本公开的一些实施方案中, 在鼠类研究中使用IFA, 而在人类研究中使用明矾或角鲨烯。当需要在盐水中以单剂量递送杂合WHcAg颗粒时, 使用分子佐剂。通过向靶标B细胞或其他APC提供共刺激, 许多分子佐剂可以用来缩小固有免疫和适应性免疫之间的差距。

#### [0193] B. 其他分子佐剂

[0194] 已经使用编码鼠类CD40L的基因 (655和470核酸形式两者) 成功地在WHcAg的C-末端表达了这些配体 (参见, 例如, WO 2005/011571)。此外, 与用WHcAg颗粒免疫小鼠相比, 用杂合WHcAg-CD40L颗粒免疫小鼠导致产生更高的抗核心抗体滴度。然而, 获得了低于期望的纯化颗粒产率。因此, 生产了含有不到100%CD40L融合的多肽的嵌合体颗粒以克服该问题。当插入C-末端时, 插入WHcAg内的其他分子佐剂, 包括C3d片段、BAFF和LAG-3, 具有被内化的趋势。因此, 使用分子佐剂的串联重复序列来抵抗内化。或者, 在WHcAg的所谓铰链区之内, 在核心颗粒的组装结构域和DNA/RNA结合区之间, 进行了各种突变, 以防止C-末端序列的内化。然而, 内化对于那些在APC/B细胞膜上起作用的分子佐剂 (例如CD40L、C3d、BAFF和LAG-3) 而言是一个问题。相反, 分子佐剂如CpG ODN的内化不是问题, 因为这些类型的佐剂在胞

质受体的水平上起作用。

[0195] 另一类分子佐剂或免疫增强剂是在杂合核心颗粒中包含可以被大部分CD4<sup>+</sup>T细胞(例如被大于50%,优选大于60%,更优选大于70%,最优选大于80%的CD4<sup>+</sup>T细胞)识别的CD4<sup>+</sup>T细胞表位,优选“通用”CD4<sup>+</sup>T细胞表位。在一个实施方案中,通用CD4<sup>+</sup>T细胞表位与多种人类MHC II类分子结合,并能够刺激T辅助细胞。在另一个实施方案中,通用CD4<sup>+</sup>T细胞表位优选衍生自人类经常通过自然感染或疫苗接种而暴露的抗原[29]。已经描述了许多这样的通用CD4<sup>+</sup>T细胞表位,包括但不限于:破伤风毒素(TT)残基632-651;TT残基950-969;TT残基947-967、TT残基830-843、TT残基1084-1099、TT残基1174-1189[30];白喉毒素(DT)残基271-290;DT残基321-340;DT残基331-350;DT残基411-430;DT残基351-370;DT残基431-450[31];恶性疟原虫环孢子(CSP)残基321-345和CSP残基378-395[32];乙型肝炎抗原(HBsAg)残基19-33[33];流感血凝素残基307-319;流感基质残基17-31[34];和麻疹病毒融合蛋白(MVF)残基288-302[35]。

[0196] 诱导免疫应答的方法

[0197] 本发明包括用于在有此需要的受试者中引发免疫应答的方法,其包括向受试者施用有效量的抗原性组合物,所述抗原性组合物包括本文所述的肽、蛋白质或VLP中的一种或多种。还提供了在有此需要的受试者中引发免疫应答的方法,其包括向受试者施用有效量的抗原性组合物,所述抗原性组合物包括编码本文所述的嵌合肽的多核苷酸,其中体内表达的所述嵌合多肽组装成杂合VLP。除非另有说明,否则抗原性组合物是免疫原性组合物。

[0198] 由本公开的方法引起的免疫应答通常包括抗体应答,优选中和性抗体应答,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC),抗体细胞介导的吞噬作用(ADCP),补体依赖性细胞毒性作用(CDC),和T细胞介导的应答,例如CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>。由本文公开的嵌合肽、蛋白质或VLP产生的免疫应答产生识别,优选减轻和/或中和寨卡病毒的免疫应答。在施用抗原性组合物(免疫或疫苗接种)后评估抗体应答的方法是本领域已知的和/或在本文描述的。在一些实施方案中,免疫应答包括T细胞介导的应答(例如,肽特异性应答,如增殖性应答或细胞因子应答)。在优选的实施方案中,免疫应答包括B细胞应答和T细胞应答两者。抗原性组合物可以以多种合适的方式施用,例如肌肉内注射、皮下注射、皮内施用和粘膜施用,例如口服或鼻内施用。其他施用方式包括但不限于鼻内施用、阴道内施用、直肠内施用和口服施用。本公开还考虑了被免疫的受试者中不同施用途径的组合,例如同时进行肌肉内施用和鼻内施用。

[0199] 抗原性组合物可用于治疗儿童和成人两者,包括孕妇。因此,受试者可以小于1岁、1-5岁、5-15岁、15-55岁或至少55岁。接受疫苗的优选受试者是老年人(例如,>55岁,>60岁,优选>65岁)和年轻人(例如,<6岁,1-5岁,优选小于1岁)。接受本公开的疫苗或组合物的其他受试者包括未受过感染的(**naïve**) (相对于先前受过感染的)受试者、当前感染的受试者或免疫受损的受试者。

[0200] 施用可以涉及单剂量或多剂量方案。可以在初次免疫方案和/或加强免疫方案中使用多剂量。在多剂量方案中,可以通过相同或不同途径给予各种剂量,例如,肠胃外初免和粘膜加强,或粘膜初免和肠胃外加强。多于一个剂量(通常是两个剂量)的施用在免疫学上未受过感染的受试者或低反应(hyporesponsive)人群的受试者(例如糖尿病患者,或患有慢性肾脏疾病的受试者(例如透析患者))中特别有用。多剂量通常将间隔至少1周(例如,

约2周、约3周、约4周、约6周、约8周、约10周、约12周或约16周)施用。优选地,多剂量间隔一、二、三、四或五个月施用。本公开的抗原性组合物可以与其他疫苗基本同时(例如,在同一次医疗咨询或就医期间)向患者施用。

[0201] 通常,每个剂量的抗原性组合物中蛋白质的量被选择为有效诱导受试者免疫应答,而不会在受试者中引起明显的不利副作用的量。优选地,所引发的免疫应答包括:中和抗体应答;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC);抗体细胞介导的吞噬作用(ADCP);补体依赖性细胞毒性作用(CDC);T细胞介导的应答,例如CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>,或保护性抗体应答。在这种情况下,保护性不一定要求完全保护受试者免受感染。当保护受试者免于产生与对应于异源抗原的病原体相关的疾病症状,特别是严重疾病的症状时,即实现了保护性应答。如上所述,由本文公开的嵌合肽或VLP产生的免疫应答产生识别,优选减轻和/或中和寨卡病毒的免疫应答。

[0202] 可以优化WHcAg-ZIKV嵌合体疫苗的施用和制剂以诱导粘膜免疫保护,以防止性传播。本发明涉及粘膜途径施用,例如鼻腔、阴道、直肠或口服。可以使用佐剂制剂来优化疫苗制剂,以刺激粘膜免疫应答例如IgA并诱导与粘膜相关的淋巴样组织(MALT)。考虑用于WHcAg-ZIKV嵌合体疫苗的、用于粘膜免疫的佐剂包括但不限于聚合物颗粒(例如,壳聚糖)、霍乱毒素(CT)和咪唑并喹啉(Imiquimod和Resiquimod)。

[0203] 可以将WHcAg-ZIKV嵌合体疫苗的制剂和施用设计成实现更广泛的免疫应答,以防止多种传播途径:蚊子传播、输血、母体传播、性传播、器官移植和其他可能的途径。

[0204] 抗原(例如,VLP)的量可以根据所使用的抗原性组合物而变化。通常,预期每个人类剂量将包括0.1-2000 $\mu$ g的蛋白质(例如,嵌合肽),例如约1 $\mu$ g至约2000 $\mu$ g,例如约1 $\mu$ g至约1500 $\mu$ g,或约1 $\mu$ g至约1000 $\mu$ g,或约1 $\mu$ g至约500 $\mu$ g,或约1 $\mu$ g至约100 $\mu$ g。在一些实施方案中,蛋白质的量在下限为0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240或250 $\mu$ g,并且独立选择的上限为2000、1950、1900、1850、1800、1750、1700、1650、1600、1550、1500、1450、1400、1350、1300or 1250、1200、1150、1100、1050、1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300或250 $\mu$ g(条件是下限小于上限)的任意范围内。通常,人类剂量为0.1ml至1ml,优选0.25ml至0.5ml的体积。抗原性组合物中使用的量是根据受试者群体来选择的。可以通过标准研究来确定特定组合物的最佳量,所述标准研究包括观察受试者中的抗体滴度和其他应答(例如,抗原诱导的细胞因子分泌)。初次接种疫苗后,受试者可在约4-12周内接受加强免疫。

[0205] 制品和试剂盒

[0206] 本发明还包括制品和试剂盒,其包括本文所述的肽、嵌合肽或嵌合蛋白质、融合蛋白或VLP(图12-14)。在一些实施方案中,试剂盒还包括固体支持物(例如,参见图12,固体支持物可以是板1、测试条3或微珠4)。在某些变体中,试剂盒或制品还包括捕获抗体5和/或检测抗体6。在一些实施方案中,试剂盒还包括用于测量肽特异性抗体的说明书。在一些实施方案中,抗体存在于用包括VLP的抗原性组合物免疫的受试者的血液样品的血清中。

[0207] 嵌合的WHcAg-ZIKV VLP被设计为用于捕获抗ZIKV,并且包括但不限于来自ZIKV病毒蛋白E、NS1、prM/M或C的特定且选定的氨基酸序列(参见表1、3、5和7)。将这样的重组氨基酸序列插入在WHcAg蛋白(GenBank登录号NP\_671816)的氨基酸77至82的区域中的两个氨基酸之间的位置。参见表2、4、6和8。

[0208] 如本文所用,术语“说明书”是指使用试剂盒中所包含的试剂来测量抗体滴度的操作指南或步骤。在一些实施方案中,说明书还包括美国食品和药物管理局(FDA)在标记体外诊断产品方面所要求的预期用途的说明。FDA将体外诊断产品归类为医疗设备,并要求它们通过510(k)程序被批准。根据510(k),一项申请中所要求的信息包括:1)体外诊断产品名称,包括设备的商标或专有名称、通用或惯用名称以及分类名称;2)产品的预期用途;3)提交510(k)提交物的所有者或运营商的机构注册号(如果适用);该体外诊断产品根据《FD&C法案》第513条被置于的类别(如果已知)、其适当的组,或者,如果所有者或运营商确定该设备未根据该条款进行分类,则声明该确定以及确定该体外诊断产品未被如此分类的依据;4)足以描述该体外诊断产品的建议标签、标记和广告,其预期用途,和使用说明,包括照片或工程图(如适用);5)一份声明,其指明该设备与美国商业发行中可比较类型的其他体外诊断产品相似和/或不同,并附有支持该声明的数据;6)实质等效性确定所依据的安全性和有效性数据的510(k)总结;或将在书面请求30天内向任何人提供支持实质等效性的FDA判决的510(k)安全性和有效性信息的声明;7)提交者(据其所知)认为在上市前通知中提交的所有数据和信息都是真实准确的并且没有遗漏任何重要事实的声明;和8)FDA进行实质等效性确定所必需的有所请求的体外诊断产品的任何其他信息。

[0209] 如本文所述,本发明还包括用于筛选抗寨卡病毒抗体的方法,其包括:a)测量抗体或其片段与如本文所述的VLP的结合;和b)测量抗体或其片段与缺少如本文所公开的肽的土拨鼠肝炎核心抗原蛋白(WHcAg)VLP的结合;和c)当抗体或其片段与嵌合VLP结合但不与缺少本发明的肽的WHcAg VLP结合时,确定该抗体或其片段对本发明的肽具有特异性或选择性。在一些实施方案中,将VLP附着于固体支持物上。在其他实施方案中,固体支持物是微珠、测定板、测试条或过滤器,如图12和13所示。用于(i)筛选抗寨卡病毒抗体;(ii)检测或测量生物样品中的抗寨卡病毒抗体;或(iii)检测寨卡病毒感染的方法都可以使用如图12、13和14所示的固体支持物进行。在各种实施方案中,抗原-抗体复合物的形成和检测可以通过如下方法进行:将如本文所述的VLP直接附着于固体支持物(例如,板1、测试条3或微珠4),然后使VLP 7与推定包含抗寨卡病毒抗体6的测试样品接触(参见图12)。或者,或另外地,可以通过如下方法将本公开的VLP间接地附着于固相支持物:首先将抗VLP抗体5附着于固相支持物,然后使VLP 7与抗VLP抗体接触以形成复合物(参见图12)。然后,施加假定包含抗寨卡病毒抗体6的测试样品,在抗VLP抗体、VLP和来自测试样品的对VLP具有亲和力的抗体之间形成“三明治”复合物。不管选择哪种方法,检测到来自测试样品的抗体与VLP的结合都表明样品中存在寨卡病毒抗体。

[0210] 使用夹心ELISA来检测患者的寨卡病毒抗体。人免疫球蛋白G(IgG)的夹心ELISA测试可用于检测循环的、持久的、中和性抗寨卡病毒抗体。免疫球蛋白M(IgM)夹心ELISA对于感染的早期发作(此时IgM应答达到峰值)非常有效。在病毒感染的情况下,使用ELISA形式,将微量滴定板的孔用山羊抗人IgG或IgM包被,然后与含有抗ZIKV抗体的受试者血清一起孵育。孵育后,将带有寨卡病毒肽序列的VLP加入孔中,洗去未结合的抗原,并添加辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗寨卡病毒单克隆抗体(使单克隆抗体显示)。加入底物溶液(如TMB或增强型化学发光(ECL)试剂)后,检测结合的缀合物。使用终止溶液终止TMB反应,并使用分光光度计读板器测量底物的水解程度。或者,可以在添加ECL底物后立即使用带有光度计检测器的读板器检测ECL信号。

[0211] 寨卡病毒的早期和准确诊断非常重要,尤其是在本领域。侧流免疫测定(LFIA)能够检测来自临床证实的患者以及健康对照受试者的血清中的抗寨卡病毒抗体。使用LFIA来检测抗寨卡病毒抗原的受试者血清抗体。使用胶体金颗粒标记的山羊抗人IgG/IgM(例如,1.0mg/L)作为检测试剂。通过抗WHcAg抗体将重组VLP蛋白(例如1.0mg/L)捕获在试纸条中或直接吸收到支持物上。分别将兔抗山羊IgG(1.0mg/L)固定在硝酸纤维素膜上的测试线和对照线中,作为捕获试剂(图13和14)。

[0212] 实施例

[0213] 如本文所述,本公开涉及嵌合VLP,其包含并展示来自ZIKV的表位和抗原。本公开还提供了用于创建和生产此类嵌合VLP的方法以用于其应用,包括但不限于疫苗、诊断、临床研究、测定法开发和抗体发现。重组嵌合WHcAg VLP充当来自E蛋白结构域III(E DIII)的高免疫原性且优化的氨基酸序列或来自ZIKV E蛋白的其他免疫原性序列的载体。另外,嵌合WHcAg VLP可以包括来自ZIKV病毒蛋白NS1、prM/M或C的特定且选定的氨基酸序列(参见表1、3、5和7)。将这样的重组氨基酸序列插入在WHcAg蛋白(GenBank登录号NP\_671816)的氨基酸77至82之间的位置。参见表2、4、6和8。

[0214] 本公开还提供了重组WHcAg嵌合VLP在酵母细胞系统:法夫驹形氏酵母Kurtzman(ATCC®76273™)中的优化生产和纯化。将WHcAg嵌合体构建体亚克隆到来自ATUM(以前为DNA2.0)(www.atum.bio)的pD912载体中,其中分泌 $\alpha$ 因子信号(SS\_Alphafactor)与WHcAg嵌合体序列的N末端相连(图2)。或者,将WHcAg嵌合构建体插入pD902载体中,其不具有分泌信号,用于胞质蛋白表达和积累。将载体线性化,并用于通过在酵母细胞中转化或电穿孔来创建高表达的酵母克隆。在半固体培养基(YPD琼脂)中,使用博来霉素(Zeocin)抗性标记选择酵母克隆。通过优化培养并使用甲醇补充来诱导WHcAg嵌合体蛋白表达。通过生化方法,例如沉淀、超速离心、超滤、色谱法、切向流过滤(TFF)或这些方法的组合,从酵母培养基中纯化分泌的VLP。通过细胞裂解方法(物理和化学方法),然后通过沉淀、超速离心、超滤、色谱法、切向流过滤(TFF)或这些方法的组合,纯化在酵母细胞溶质中表达和积累的(未分泌的)VLP。

[0215] Cimica等人[16]在TechnoVax有限公司(纽约州塔里敦)开发了一种针对呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus)(RSV)的VLP疫苗。以人偏肺病毒(human metapneumovirus)(hMPV)基质蛋白为结构颗粒支架,并以RSV融合糖蛋白(F)为主要免疫原,组装RSV样颗粒(RS-VLP)疫苗。应用结构疫苗学来提高和优化F蛋白的免疫原性;产生了多个F构建体并以抗原性不同的构象进行了测试。用以基于角鲨烯的乳剂作为佐剂的RS-VLP疫苗进行免疫在RSV疾病的小鼠模型中提供了全面保护,并且是安全的[16]。本公开利用了替代方法来创建和产生ZIK-VLP。可以由选定的克隆在大规模发酵巴斯德毕赤酵母培养物中产生VLP。使用最先进的方法进行VLP纯化,例如:沉淀、超速离心、切向流过滤(TFF)、超滤和色谱法。通过免疫测定和电子显微镜测定ZIK-VLP嵌合体的纯度和质量。

[0216] 实施例1

[0217] ZIKV VLP候选物的早期开发

[0218] ZIKV包膜(E)蛋白是疫苗开发的主要靶标,因为它展示的表位能够在宿主中诱导中和性和保护性抗体[36]。E蛋白构成黄病毒表面的大部分,并在病毒感染中起多种作用:宿主受体识别和结合、膜融合、从核内体区室释放病毒、病毒体组装和释出。ZIKV外壳是用

180个拷贝的E蛋白组装而成,并构成病毒体表面的大部分[23,37]。包括ZIKV在内的任何黄病毒的E蛋白均显示高度保守的结构,该结构分为三个结构域:结构域I(DI),其由中央 $\beta$ -桶状结构域组成;结构域II(DII),其对于二聚化和病毒体组装很重要;和结构域III(DIII),其以免疫球蛋白样节段为特征。值得注意的是,DII的远端部分包括一个融合环结构域,该融合环结构域在黄病毒之间具有很高的氨基酸序列同一性。

[0219] 有关包括ZIKV在内的黄病毒的多项研究表明,E蛋白DIII(EDIIII)是特异性中和性抗体的主要抗原靶标[38,39]。特别是,已显示在小鼠模型中,DIII内的结构域可以诱导高度中和性和保护性的抗体[38]。DII中的ZIKV融合环结构域可以诱导高度中和性抗体[18],该抗体能够与其他黄病毒交叉反应。然而,已经证明,交叉反应性抗体能够在有DENV感染史的患者中诱导ZIKV感染的抗体依赖性增强(ADE)[40]。融合环结构域与ZIKV感染的ADE效应有关[41]。由于这些原因,本公开描述了使用EDIIII选择的表位作为免疫原靶标的ZIK-VLP疫苗用于中和ZIKV的用途。

[0220] 利用结构疫苗学从ZIKV EDIII中选择特定的表位和抗原(图3和表5)。使用用于进行结构分析的NIH的Cn3D软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>)和用于分析黄病毒之间的酸序列保守性和特异性的CLC Sequence Viewer Qiagen(<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-sequence-viewer/>)鉴定了寨卡病毒包膜(E)蛋白的抗原序列。测序和结构数据获自美国国家医学图书馆国家健康研究所(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)。使用重组DNA技术,将这样的E DIII表位包括在土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)支架系统中,用于表位的递送(图3)。

[0221]

	所产生的构建体	已测试
1	WHcAg(免疫的空白对照(mock control))	是
2	WHcAg嵌合体E蛋白结构域III全长	是
3	WHcAg嵌合体E蛋白结构域III,A-B环	是
4	WHcAg嵌合体E蛋白结构域III,Cx-C-D-Dx环	是
5	WHcAg嵌合体E蛋白结构域III,Dx-E环	是
6	WHcAg嵌合体E蛋白结构域III,F-G环	是
7	E蛋白(免疫的阳性对照)	是

[0222] 表17. 用于生产ZIKV-VLP的DNA构建体

[0223] 这种系统已成功用于疫苗候选物:人类HBV表面蛋白(HBsAg)或HBV核心抗原蛋白(HBcAg)目前正在临床试验中用于流感病毒和疟疾寄生虫(恶性疟原虫)[42]。尽管HB-VLP系统是将抗原递送至APC和B细胞的非常有效的平台[43],但这种技术有两个局限性:i)由于所运载的抗原的空间位阻,HBV蛋白可能无法正确组装;ii)先前存在的针对HBV的免疫力可能会大大降低免疫效率。基于这些原因,我们将采用WHcAg支架系统[21],该系统已成功用于开发基于VLP的RSV疫苗[44]和疟疾寄生虫疫苗[45]。WHcAg具有充当所选表位/抗原肽(例如5-100个氨基酸)的载体的能力,以诱导非常特异性的抗体应答。应用结构疫苗学,我们设计了ZIKV DIII优化的抗原,其包括全长DIII结构域或选定的DIII结构域,所述选定的DIII结构域包括A-B环、C-D环、D-E环和F-G环(表1和2,图3)。使用重组表达技术,开发了在巴斯德毕赤酵母中表达ZIK-VLP的DNA构建体,并在用抗IFNAR1抗体治疗的A129、AG129和C57BL/6小鼠ZIKV感染模型中测试了潜在的疫苗候选物的功效和安全性。

[0224] 实施例2

[0225] 使用毕赤酵母表达系统生产ZIK-VLP

[0226] 用于蛋白质表达的合适的毕赤酵母酵母株可获自例如ATCC (例如,法夫驹形氏酵母Kurtzman ATCC 76274™或巴斯德驹形氏酵母ATCC® 76274™)。使用计算机分析,设计了表达在不同毒株之间保守的ZIKA EDIII抗原的密码子优化的DNA构建体(图2、3A和3B)。开发了使用来自毕赤酵母醇氧化酶1(AOX1)基因的启动子的构建体,以驱动重组蛋白的生产(ATUM.bio)。已经建立了通过超速离心和超滤方法纯化VLP的方法,以及用于VLP的定量、纯度和免疫原性的测定方法[16]。重要的是,使用电子显微镜分析评估了VLP的形态和纯度(图5)。使用蛋白质印迹法和斑点印迹法,使用针对EDIII结构域的不同市售单克隆抗体和所测试的市售单克隆抗体,例如ZV-2(ATCC BEI Resources NR-50414单克隆抗寨卡病毒包膜(E)蛋白)和ZV-54(Millipore Sigma MABF2046,抗寨卡病毒抗体),对VLP的抗原性进行了测试。(图6和7)

[0227] 实施例3

[0228] 免疫动物:小鼠研究

[0229] 在怀孕的雌性BALB/c小鼠和5周龄的雄性和雌性小鼠的背景下确定了安全性。在两种情况下(n=10只/浓度),均肌肉注射三种不同浓度(10µg、25µg和50µg)的WHcAg-ZIKV嵌合体VLP。作为阴性对照,注射PBS和不含寨卡病毒抗原的WHcAg VLP。为了在初免-加强免疫策略的背景下评估安全性,单独设置了一组动物(n=10只/浓度),在初次接种事件后3周,对其注射与初次接种相同浓度的VLP。每天对动物称重,并记录其形态特征和行为(饮食、饮水、活动能力、社交行为),与阴性对照组进行比较。对最终处死的动物进行尸检,以评估内部器官(包括脾脏和肝脏)水平的总毒性。取脾脏组织进行B细胞测定。在研究结束时评估这些动物的炎性负荷。最终放血后,获得血清并用于定量单独的初免和初免-加强免疫策略后循环中的炎性介质。使用Aushon Multiplex平台(Ciraplex,Aushon Biosystems)或Luminex系统来同时定量炎性介质的水平。此类测定法允许分析接种动物的血清和组织中的多种细胞因子和趋化因子。

[0230] 使用三种ZIKV感染致死模型进行了动物研究以表征WHcAg-ZIKV嵌合体VLP疫苗:i) A129小鼠模型[46];ii) AG129小鼠模型[47];和iii) 用抗IFNAR1抗体处理的C57BL/6免疫活性小鼠模型[27](图15)。根据Rossi等人在AG126小鼠模型中进行了攻击实验:3周龄小鼠最容易受到ZIKV感染,而5周龄小鼠表现出疾病迹象但已经康复[46]。5周龄小鼠在血清中持续维持可检测的病毒载量,可以与3周龄小鼠进行比较。典型的疫苗接种策略需要至少2-3周的持续时间才能使宿主产生免疫应答。对于三周龄小鼠,这需要在出生后立即进行疫苗接种。关于在新生动物中免疫系统的健全性,存在不确定性。为了解决这些问题,在本研究中,对5周龄的动物在出生后第1周进行初次免疫,在出生后第4周进行加强免疫,然后在第5周进行攻击。A129是一种免疫功能低下的动物模型,其可能无法重述(recapitulate)免疫应答。因此,在ZIKV攻击之前就包括了用抗IFNAR1抗体处理的免疫活性小鼠模型BALB/c。两种模型之间的比较与改善免疫策略有关,包括根据[27]的疫苗剂量和制剂。使用寨卡病毒FSS13025Cambodia毒株[46]、Puerto Rico毒株(PRVABC59)和其他可从ATCC BEI-Resources(www.beiresources.org)获得的毒株进行了攻击实验。已经开发了通过噬斑测定和定量逆转录酶聚合酶链反应(qRT-PCR)对该毒株进行定量的标准化测定。在疫苗接种

后,通过用具有 $1 \times 10^4$ 噬菌斑形成单位(PFU)的寨卡病毒株(例如PRVABC59)进行腹膜内攻击,对仅接受初免、初免-加强免疫接种(以无明显毒性结果的最大耐受浓度的VLP)的动物进行攻击。连续监测感染动物一周。假如没有保护或次优保护,动物将会表现出疾病症状。监测动物的疾病迹象,包括体重减轻、驼背姿势和皮毛褶皱,以及严重疾病的迹象,包括震颤、嗜睡和厌食。对接种疫苗的动物与未接种疫苗的对照的死亡率进行定量。在研究期结束时,将幸存者处死并收集样品用于后续研究。所有处死的动物均在最后放血并收集血清。对血清进行炎性介质的分析。此外,在所有实验组和对照组中对循环病毒载量(感染性病毒滴度和基因组拷贝数)进行定量。使用血清样品,通过噬斑减少中和测定法(PRNT测定法)测定中和性抗体滴度。将通过本领域中描述的方法[16,48]获得PRNT<sub>50</sub>和PRNT<sub>80</sub>滴度值。对所有动物进行尸检,并分离脾脏以进行B细胞活性研究(如下所述)。对包括肝脏在内的其他内部器官进行一般性总形态检查。由于黄病毒通常表现出对肝脏的趋向性,因此对肝脏+/-VLP中的病毒载量进行了定量。

[0231] 通过肌肉内注射,用安慰剂对照(不含寨卡病毒抗原的WHcAg CTRL VLP)和寨卡病毒疫苗候选物(WHcAg CD环VLP)对一组5只小鼠免疫两次(初免和加强免疫)。VLP剂量为10 $\mu$ g,用基于角鲨烯的水包油纳米乳剂AddaVax (InvivoGen)作为佐剂。初次免疫后14天进行加强免疫。根据文献方法[27],初次免疫28天后,使用抗IFNAR1抗体使动物适应寨卡病毒感染,见图16。在抗IFNAR1抗体处理后1天,通过腹膜内注射,使用10,000个噬斑形成单位(PFU)的寨卡病毒Puerto Rico毒株PRVABC59(ATCC,BEI Resources NR-50240)进行病毒感染。按照制造商的说明,用Bio-Rad CFX96 Touch™仪器和试剂盒Bio-Rad iTaq Universal SYBR Green试剂盒(货号172-5151),使用定量实时PCR(qRT-PCR),在病毒注射后3天,分析血清病毒血症。使用的寨卡病毒特异性PCR引物是根据Lanciotti,R.等人的方法[49]获得的:正向寡核苷酸5' CCGCTGCCCAACACAAG 3';和反向寡核苷酸5' CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT 3'。使用寨卡病毒(毒株PRVABC59)基因组RNA标准品(ATCC,BEI Resources NR-50244),通过标准曲线方法获得每微升( $\mu$ l)病毒拷贝数的定量。图17显示在接受寨卡病毒疫苗候选物(WHcAg CD环VLP)的小鼠中,ZIKV拷贝数减少。

[0232] 在怀孕的雌性BALB/c小鼠和5周龄的雄性和雌性小鼠的背景下确定了安全性。在两种情况下(n=10只/浓度),均肌肉注射三种不同浓度(10 $\mu$ g、25 $\mu$ g和50 $\mu$ g)的VLP。作为阴性对照,注射PBS和不含寨卡病毒抗原的WHcAg VLP。为了在初免-加强免疫策略的背景下评估安全性,单独设置了一组动物(n=10只/浓度),在初次接种事件后3周,对其注射与初次接种相同浓度的VLP。每天对动物称重,并记录其形态特征和行为(饮食、饮水、活动能力、社交行为),与阴性对照组进行比较。将最终处死的动物进一步尸检,以评估内部器官(包括脾脏和肝脏)水平的总毒性。取脾脏组织进行B细胞测定。在研究结束时评估这些动物的炎性负荷。最终放血后,获得血清并用于定量单独的初免和初免-加强免疫策略后循环中的炎性介质。使用Aushon Multiplex平台(Ciraplex,Aushon Biosystems)或Luminex系统来同时定量炎性介质的水平。此类测定法允许分析接种动物的血清和组织中的多种细胞因子和趋化因子。在鼠类模型中测试了寨卡病毒-VLP疫苗候选物针对胎儿传播的保护,评估了胎儿的生存能力、形态和病毒血症。采用了使用A129小鼠的经胎盘传播的成熟模型。在此模型中,在胚胎第6天(E6)感染母鼠会导致胎盘功能不足和胎儿死亡,而在中期E9感染母鼠则显示颅骨尺寸减小。重要的是,在两组中,在感染后5天,在E6时感染会导致100%的胎儿无法

存活,而在E9时感染会导致90%的胎儿存活(见图16)。

[0233] 根据文献[38],小鼠模型可用于鉴定抗寨卡病毒的特异性中和抗体。

[0234] 实施例4

[0235] 寨卡病毒抗体的交叉反应性和抗原依赖性增强试验

[0236] 在接种了ZIKV-VLP嵌合体小鼠中进行了用于测试抗原依赖性增强(ADE)的体外测定,以测试疫苗的特异性。按照本领域已知的方法,使用来自ATCC的U937(ATCC<sup>®</sup> CRL-1593.2<sup>™</sup>)和K562(ATCC<sup>®</sup> CCL-243<sup>™</sup>)淋巴细胞细胞系,在标准体外测定中测试了使用ZIKV-VLP嵌合体疫苗免疫的动物的血清。简而言之,对于每种1-4型血清型,将来自BALB/c小鼠的热灭活血清的系列稀释液与DENV毒株在37°C下孵育1小时。作为泛黄病毒抗体(pan-Flavivirus antibody)的ADE的阳性对照,还包括了克隆D1-4G2-4-15(ATCC BEI Resources, NR-50327)。用WHcAg VLP免疫的动物的血清将用作阴性对照。

[0237] 将细胞与血清-病毒混合物在37°C下、以感染复数(MOI)3孵育2小时,然后洗涤以去除游离的病毒颗粒。4天后(以允许进行病毒复制),用标准定量实时PCR(qRT-PCR)根据本领域的方法[27,50]测量培养上清液中的病毒滴度。

[0238] 实施例5

[0239] 寨卡病毒诊断

[0240] 抗体夹心ELISA。抗体夹心ELISA可能是用于检测抗原/抗体的免疫吸附测定法中最有用的方法,因为它的灵敏度比直接/间接ELISA的灵敏度高2至5倍,在直接/间接ELISA中,抗原直接与固相结合。将开发两组夹心ELISA,以:1)检测持久的中和的抗寨卡病毒抗体(IgG)的存在,以及2)能够早期检测临床样品中的抗寨卡病毒IgM。

[0241] 为了以夹心ELISA形式检测ZIKV抗原,将微量滴定板的孔用针对支架系统WHcAg的抗体包被,以捕获不同类型的WHcAg-ZIKV嵌合体VLP。将ELISA板与含有抗ZIKV抗体的受试者血清(人或小鼠)一起孵育。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的针对IgG或IgM的特异性二抗后,检测结合的缀合物。使用HRP底物(如TMB或ECL)和酶标仪,进行针对寨卡病毒抗原的抗体的检测。测试中包括阳性对照,阳性对照使用了针对寨卡病毒产生的抗体,而阴性对照包括:不含任何寨卡病毒抗原的WHcAg VLP或未针对寨卡病毒进行免疫的血清。人IgG的夹心ELISA测试可用于检测循环的持久的中和性抗寨卡病毒IgG。IgM夹心ELISA对于感染的早期发作(此时IgM应答达到峰值)将非常有效。

[0242] 使用侧流免疫测定(LFIA)系统进行快速诊断检测。寨卡病毒的早期和准确诊断非常重要,尤其是在本领域。将使用LFIA(图13)来检测来自临床证实的患者以及健康对照受试者的血清中的抗寨卡病毒抗体(图14)。开发了侧流免疫测定(LFIA)以检测针对寨卡病毒包膜和NS1抗原的受试者血清抗体。使用胶体金颗粒标记的山羊抗人IgG/IgM(1.0mg/L)作为检测试剂。分别将重组WHcAg-ZIKV嵌合体VLP蛋白(1.0mg/L)和兔抗山羊IgG(1.0mg/L)固定在硝酸纤维素膜上的测试线和对照线中,作为捕获试剂。或者,可以通过能够结合WHcAg支架蛋白的固定化抗体,将重组WHcAg-ZIKV嵌合体VLP捕获在支持物上。

[0243] 实施例6

[0244] 开发VLP制剂

[0245] 根据cGMP指南制备寨卡病毒VLP疫苗,并按照标准FDA指南进行配制。该疫苗不含外来因子和有毒化学物质。制剂将包括稀释剂、稳定剂、佐剂和防腐剂[12,51]。本文公开的

研究包括制剂优化,以提高疫苗效力和安全性。

[0246] 参考文献

[0247] [1]G.W.Dick,Zika virus.II.Pathogenicity and physical properties,Trans R Soc Trop Med Hyg 46(1952) 521-534.

[0248] [2]G.W.Dick,S.F.Kitchen,A.J.Haddow,Zika virus.I.Isolations and serological specificity,Trans R Soc Trop Med Hyg 46(1952) 509-520.

[0249] [3]F.N.Macnamara,Zika virus:a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria,Trans R Soc Trop Med Hyg 48(1954) 139-145.

[0250] [4]D.Musso,D.J.Gubler,Zika Virus,Clin Microbiol Rev 29(2016) 487-524.

[0251] [5]C.Chang,K.Ortiz,A.Ansari,M.E.Gershwin,The Zika outbreak of the 21st century,J Autoimmun 68(2016) 1-13.

[0252] [6]E.D'Ortenzio,S.Matheron,X.de Lamballerie,B.Hubert,G.Piorkowski,M.Maquart,D.Descamps,F.Damond,Y.Yazdanpanah,I.Leparc-Goffart,Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus,N Engl J Med(2016) .

[0253] [7]S.L.Hills,K.Russell,M.Hennessey,C.Williams,A.M.Oster,M.Fischer,P.Mead,Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission-Continental United States,2016,MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65(2016) 215-216.

[0254] [8]J.J.Adibi,E.T.Marques,Jr.,A.Cartus,R.H.Beigi,Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta,Lancet 387(2016) 1587-1590.

[0255] [9]A.Likos,I.Griffin,A.M.Bingham,D.Stanek,M.Fischer,S.White,J.Hamilton,L.Eisenstein,D.Atrubin,P.Mulay,B.Scott,P.Jenkins,D.Fernandez,E.Rico,L.Gillis,R.Jean,M.Cone,C.Blackmore,J.McAllister,C.Vasquez,L.Rivera,C.Philip,Local Mosquito-Borne Transmission of Zika Virus-Miami-Dade and Broward Counties,Florida,June-August 2016,MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65(2016) 1032-1038.

[0256] [10]L.Adams,M.Bello-Pagan,M.Lozier,K.R.Ryff,C.Espinet,J.Torres,J.Perez-Padilla,M.F.Febo,E.Dirlikov,A.Martinez,J.Munoz-Jordan,M.Garcia,M.O.Segarra,G.Malave,A.Rivera,C.Shapiro-Mendoza,A.Rosinger,M.J.Kuehnert,K.W.Chung,L.L.Pate,A.Harris,R.R.Hemme,A.Lenhart,G.Aquino,S.Zaki,J.S.Read,S.H.Waterman,L.I.Alvarado,F.Alvarado-Ramy,M.Valencia-Prado,D.Thomas,T.M.Sharp,B.Rivera-Garcia,Update:Ongoing Zika Virus Transmission-Puerto Rico, November 1,2015-July 7,2016,MMWR Morb Mortal Wkly Rep 65(2016) 774-779.

[0257] [11]S.A.Rasmussen,D.J.Jamieson,M.A.Honein,L.R.Petersen,Zika Virus and Birth Defects-Reviewing the Evidence for Causality,N Engl J Med(2016) .

[0258] [12]V.Cimica,J.M.Galarza,Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines,Clin Immunol 183(2017) 99-108.

[0259] [13]L.Zhao,A.Seth,N.Wibowo,C.X.Zhao,N.Mitter,C.Yu,A.P.Middelberg,

Nanoparticle vaccines, *Vaccine* 32 (2014) 327–337.

[0260] [14] F. Zabel, T. M. Kündig, M. F. Bachmann, Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated, *Current Opinion in Virology* 3 (2013) 357–362.

[0261] [15] P. R. Dormitzer, G. Grandi, R. Rappuoli, Structural vaccinology starts to deliver, *Nature Reviews. Microbiology* 10 (2012) 807–813.

[0262] [16] V. Cimica, H. Boigard, B. Bhatia, J. T. Fallon, A. Alimova, P. Gottlieb, J. M. Galarza, A Novel Respiratory Syncytial Virus-Like Particle (VLP) Vaccine Composed of the Postfusion and Prefusion Conformations of the F Glycoprotein, *Clinical and vaccine immunology: CVI* (2016).

[0263] [17] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* 215 (1990) 403–410.

[0264] [18] L. Dai, J. Song, X. Lu, Y. Q. Deng, A. M. Musyoki, H. Cheng, Y. Zhang, Y. Yuan, H. Song, J. Haywood, H. Xiao, J. Yan, Y. Shi, C. F. Qin, J. Qi, G. F. Gao, Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody, *Cell Host Microbe* (2016).

[0265] [19] J. F. Conway, N. Cheng, A. Zlotnick, P. T. Wingfield, S. J. Stahl, A. C. Steven, Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy, *Nature* 386 (1997) 91–94.

[0266] [20] F. Schodel, R. Wirtz, D. Peterson, J. Hughes, R. Warren, J. Sadoff, D. Milich, Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoite protein epitopes, *J Exp Med* 180 (1994) 1037–1046.

[0267] [21] J. N. Billaud, D. Peterson, M. Barr, A. Chen, M. Sallberg, F. Garduno, P. Goldstein, W. McDowell, J. Hughes, J. Jones, D. Milich, Combinatorial approach to hepadnavirus-like particle vaccine design, *J Virol* 79 (2005) 13656–13666.

[0268] [22] W. C. Brown, D. L. Akey, J. R. Konwerski, J. T. Tarrasch, G. Skiniotis, R. J. Kuhn, J. L. Smith, Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure, *Nat Struct Mol Biol* 23 (2016) 865–867.

[0269] [23] D. Sirohi, Z. Chen, L. Sun, T. Klose, T. C. Pierson, M. G. Rossmann, R. J. Kuhn, The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus, *Science* (2016).

[0270] [24] Z. Shang, H. Song, Y. Shi, J. Qi, G. F. Gao, Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus, *J Mol Biol* 430 (2018) 948–962.

[0271] [25] I. Zlatev, M. Manoharan, J. J. Vasseur, F. Morvan, Solid-phase chemical synthesis of 5'-triphosphate DNA, RNA, and chemically modified oligonucleotides, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem Chapter 1* (2012) Unit1 28.

[0272] [26] A. Shivalingam, T. Brown, Synthesis of chemically modified DNA, *Biochem Soc Trans* 44 (2016) 709–715.

[0273] [27] J. M. Richner, S. Himansu, K. A. Dowd, S. L. Butler, V. Salazar, J. M. Fox, J. G. Julander, W. W. Tang, S. Shresta, T. C. Pierson, G. Ciaramella, M. S. Diamond, Modified

mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection, *Cell* 169 (2017) 176.

[0274] [28] D. Betancourt, N. M. de Queiroz, T. Xia, J. Ahn, G. N. Barber, Cutting Edge: Innate Immune Augmenting Vesicular Stomatitis Virus Expressing Zika Virus Proteins Confers Protective Immunity, *J Immunol* 198 (2017) 3023–3028.

[0275] [29] F. Falugi, R. Petracca, M. Mariani, E. Luzzi, S. Mancianti, V. Carinci, M. L. Melli, O. Finco, A. Wack, A. Di Tommaso, M. T. De Magistris, P. Costantino, G. Del Giudice, S. Abrignani, R. Rappuoli, G. Grandi, Rationally designed strings of promiscuous CD4(+) T cell epitopes provide help to Haemophilus influenzae type b oligosaccharide: a model for new conjugate vaccines, *Eur J Immunol* 31 (2001) 3816–3824.

[0276] [30] S. Demotz, C. Barbey, G. Corradin, A. Amoroso, A. Lanzavecchia, The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residue 86, *Eur J Immunol* 23 (1993) 425–432.

[0277] [31] B. M. Diethelm-Okita, D. K. Okita, L. Banaszak, B. M. Conti-Fine, Universal epitopes for human CD4+ cells on tetanus and diphtheria toxins, *J Infect Dis* 181 (2000) 1001–1009.

[0278] [32] J. Hammer, P. Valsasnini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takacs, F. Sinigaglia, Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides, *Cell* 74 (1993) 197–203.

[0279] [33] J. L. Greenstein, V. C. Schad, W. H. Goodwin, A. B. Brauer, B. K. Bollinger, R. D. Chin, M. C. Kuo, A universal T cell epitope-containing peptide from hepatitis B surface antigen can enhance antibody specific for HIV gp120, *J Immunol* 148 (1992) 3970–3977.

[0280] [34] J. Alexander, M. F. del Guercio, A. Maewal, L. Qiao, J. Fikes, R. W. Chesnut, J. Paulson, D. R. Bundle, S. DeFrees, A. Sette, Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses, *J Immunol* 164 (2000) 1625–1633.

[0281] [35] N. K. Dakappagari, J. Pyles, R. Parihar, W. E. Carson, D. C. Young, P. T. Kaumaya, A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses, *J Immunol* 170 (2003) 4242–4253.

[0282] [36] T. C. Pierson, B. S. Graham, Zika Virus: Immunity and Vaccine Development, *Cell* (2016).

[0283] [37] V. A. Kostyuchenko, E. X. Lim, S. Zhang, G. Fibriansah, T. S. Ng, J. S. Ooi, J. Shi, S. M. Lok, Structure of the thermally stable Zika virus, *Nature* (2016).

[0284] [38] H. Zhao, E. Fernandez, K. A. Dowd, S. D. Speer, D. J. Platt, M. J. Gorman, J. Govero, C. A. Nelson, T. C. Pierson, M. S. Diamond, D. H. Fremont, Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection, *Cell* 166 (2016) 1016–1027.

[0285] [39] G. Fibriansah, S. M. Lok, The development of therapeutic antibodies

against dengue virus, *Antiviral Res* 128 (2016) 7–19.

[0286] [40] L. Priyamvada, K. M. Quicke, W. H. Hudson, N. Onlamoon, J. Sewatanon, S. Edupuganti, K. Pattanapanyasat, K. Chokeyhaibulkit, M. J. Mulligan, P. C. Wilson, R. Ahmed, M. S. Suthar, J. Wrammert, Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016).

[0287] [41] W. Dejnirattisai, P. Supasa, W. Wongwiwat, A. Rouvinski, G. Barba-Spaeth, T. Duangchinda, A. Sakuntabhai, V. M. Cao-Lormeau, P. Malasit, F. A. Rey, J. Mongkolsapaya, G. R. Screaton, Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus, *Nat Immunol* 17 (2016) 1102–1108.

[0288] [42] M. Tan, X. Jiang, Subviral particle as vaccine and vaccine platform, *Current Opinion in Virology* 6 (2014) 24–33.

[0289] [43] K. Roose, S. De Baets, B. Schepens, X. Saelens, Hepatitis B core-based virus-like particles to present heterologous epitopes, *Expert Rev Vaccines* 12 (2013) 183–198.

[0290] [44] J. H. Schickli, D. C. Whitacre, R. S. Tang, J. Kaur, H. Lawlor, C. J. Peters, J. E. Jones, D. L. Peterson, M. P. McCarthy, G. Van Nest, D. R. Milich, Palivizumab epitope-displaying virus-like particles protect rodents from RSV challenge, *J Clin Invest* 125 (2015) 1637–1647.

[0291] [45] D. C. Whitacre, B. O. Lee, D. R. Milich, Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms, *Expert Rev Vaccines* 8 (2009) 1565–1573.

[0292] [46] S. L. Rossi, R. B. Tesh, S. R. Azar, A. E. Muruato, K. A. Hanley, A. J. Auguste, R. M. Langsjoen, S. Paessler, N. Vasilakis, S. C. Weaver, Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus, *Am J Trop Med Hyg* 94 (2016) 1362–1369.

[0293] [47] M. T. Aliota, E. A. Caine, E. C. Walker, K. E. Larkin, E. Camacho, J. E. Osorio, Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice, *PLoS Negl Trop Dis* 10 (2016) e0004682.

[0294] [48] A. B. Kawiecki, R. C. Christofferson, Zika Virus-Induced Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype 2 Replication In Vitro, *J Infect Dis* 214 (2016) 1357–1360.

[0295] [49] R. S. Lanciotti, O. L. Kosoy, J. J. Laven, J. O. Velez, A. J. Lambert, A. J. Johnson, S. M. Stanfield, M. R. Duffy, Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007, *Emerg Infect Dis* 14 (2008) 1232–1239.

[0296] [50] H. Boigard, A. Alimova, G. R. Martin, A. Katz, P. Gottlieb, J. M. Galarza, Zika virus-like particle (VLP) based vaccine, *PLoS Negl Trop Dis* 11 (2017) e0005608.

[0297] [51] N. K. Jain, N. Sahni, O. S. Kumru, S. B. Joshi, D. B. Volkin, C. Russell Middaugh, Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-

like particle vaccines, *Adv Drug Deliv Rev* 93 (2015) 42–55.

## 序列表

<110> 美国菌种保藏中心(ATCC)

<120> 包含寨卡病毒抗原的病毒样颗粒

<130> 32262/52049A

<150> US 62/524,440

<151> 2017-06-23

<160> 106

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 188

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 土拨鼠肝炎核心抗原(WHcAg)

<400> 1

```

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1           5           10           15
Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
           20           25           30
Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
           35           40           45
Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
           50           55           60
Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln
65           70           75           80
Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
           85           90           95
Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln
           100          105          110
His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
           115          120          125
Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
           130          135          140
Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser
145          150          155          160

```

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro  
 165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 180 185

<210> 2

<211> 136

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3全长

<400> 2

His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala  
 20 25 30

Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr  
 35 40 45

Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr  
 50 55 60

Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu  
 65 70 75 80

Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly  
 85 90 95

Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His  
 100 105 110

Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val  
 115 120 125

Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Val  
 130 135

<210> 3

<211> 80

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3 G (EDIIII) G环截短型

<400> 3

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

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3, A-B环

<400> 4

Ala	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala	Glu	Thr	Leu	His	Gly	Thr	Val
1					5				10					15	
Thr	Val	Glu	Leu	Gln	Tyr	Ala									

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3, CXCDDX环

<400> 5

Pro	Cys	Lys	Val	Pro	Ala	Gln	Met	Ala	Val	Asp	Met	Gln	Thr	Leu	Thr
1				5						10				15	

Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr  
 20 25

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3, DX-E环

<400> 6

Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser  
 1 5 10 15

Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro  
 20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3, F-G环

<400> 7

Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His  
 1 5 10 15

His Trp His Arg  
 20

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜融合环

<400> 8

Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys

1                   5                   10

<210> 9

<211> 92

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域2 (ED2) 序列A-E

<400> 9

Thr Thr Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu

1                   5                   10                   15

Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly

20                   25                   30

Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg

35                   40                   45

Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys

50                   55                   60

Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Lys Lys Met Thr

65                   70                   75                   80

Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg

85                   90

<210> 10

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域2序列B-D

<400> 10

Glu Ala Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln

1                   5                   10                   15

Gly Glu Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys

20                   25                   30

Arg Thr Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly  
 35 40 45

Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser  
 50 55 60

<210> 11

<211> 82

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域1聚糖环

<400> 11

Met Thr Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met  
 1 5 10 15

Leu Ser Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Thr  
 20 25 30

Gly His Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Ile Thr Pro Asn  
 35 40 45

Ser Pro Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu  
 50 55 60

Asp Cys Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu  
 65 70 75 80

Thr Met

<210> 12

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 2

<400> 12

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly  
 85 90 95  
 Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro  
 100 105 110  
 Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly  
 115 120 125  
 Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln  
 130 135 140  
 Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His  
 180 185 190  
 His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr  
 195 200 205  
 Val Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Val Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile  
 210 215 220  
 Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu  
 245 250 255  
 Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg  
 260 265 270  
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile  
 275 280 285  
 Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr  
 290 295 300  
 Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 325

<210> 13

<211> 262  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 3  
 <400> 13  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
                   35                   40                   45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
                   50                   55                   60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Ala Phe Thr Phe  
 65                   70                   75                   80  
 Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Leu  
                   85                   90                   95  
 Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala  
                   100                   105                   110  
 Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn  
                   115                   120                   125  
 Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu  
                   130                   135                   140  
 Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Thr Ile Ile Val  
 145                   150                   155                   160  
 Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp  
                   165                   170                   175  
 Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe  
                   180                   185                   190  
 Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro  
                   195                   200                   205  
 Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg  
                   210                   215                   220  
 Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro  
 225                   230                   235                   240

Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln  
 245 250 255  
 Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 260  
 <210> 14  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 4  
 <400> 14  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Ala Phe Thr Phe  
 65 70 75 80  
 Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Leu  
 85 90 95  
 Gln Tyr Ala Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu  
 100 105 110  
 Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly  
 115 120 125  
 Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg  
 130 135 140  
 Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg  
 165 170 175  
 Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser  
 180 185 190  
 Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys

195	200	205
<210> 15		
<211> 211		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 5		
<400> 15		
Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu		
1                   5                   10                   15		
Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp		
20                   25                   30		
Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys		
35                   40                   45		
Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu		
50                   55                   60		
Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Pro Cys Lys Val		
65                   70                   75                   80		
Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg		
85                   90                   95		
Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Thr Ile Ile Val Asn His Val		
100                   105                   110		
Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu		
115                   120                   125		
Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser		
130                   135                   140		
Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala		
145                   150                   155                   160		
Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly		
165                   170                   175		
Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg		
180                   185                   190		
Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser		
195                   200                   205		
Ala Asn Cys		
210		



<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 7  
 <400> 17  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
                   35                   40                   45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
                   50                   55                   60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Asp Ser Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg  
                   100                   105                   110  
 Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr  
                   115                   120                   125  
 Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala  
                   130                   135                   140  
 Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His  
 145                   150                   155                   160  
 Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg  
                   165                   170                   175  
 Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg  
                   180                   185                   190  
 Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
                   195                   200  
 <210> 18  
 <211> 200  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 8

<400> 18

Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Leu
1				5					10					15	
Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Leu	Val	Asp
			20					25					30		
Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Glu	His	Cys
		35					40					45			
Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu	Val	Cys	Trp	Asp	Glu
		50				55					60				
Leu	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Trp	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Thr	Asp
65					70					75					80
Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Gly	Thr	Ile
				85					90						95
Ile	Val	Asn	His	Val	Asn	Asp	Thr	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gln	Ser
			100						105					110	
Leu	Trp	Phe	His	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Thr	Val	Gln
			115						120					125	
Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Ala	Pro	Tyr
			130			135							140		
Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val
145				150						155					160
Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Ala	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg
				165					170					175	
Thr	Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg
				180					185					190	
Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys								
		195				200									

<210> 19

<211> 278

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 9



&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 10

&lt;400&gt; 20

```

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1           5           10           15
Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
           20           25           30
Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
           35           40           45
Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
           50           55           60
Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Glu Ala
65           70           75           80
Ser Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu
           85           90           95
Ala Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr
           100          105          110
Leu Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly
           115          120          125
Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Gly Gly Thr Ile Ile
           130          135          140
Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu
145          150          155          160
Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu
           165          170          175
Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg
           180          185          190
Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile
           195          200          205
Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
           210          215          220
Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
225          230          235          240
Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys

```

245

<210> 21  
 <211> 268  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO: 11  
 <400> 21  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
                   20                   25                   30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
                   35                   40                   45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
                   50                   55                   60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Met Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Gly Lys Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met Leu Ser  
                   85                   90                   95  
 Val His Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Thr Gly His  
                   100                   105                   110  
 Glu Thr Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Ile Thr Pro Asn Ser Pro  
                   115                   120                   125  
 Arg Ala Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Asp Cys  
                   130                   135                   140  
 Glu Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu Thr Met  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys  
                   165                   170                   175  
 Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln  
                   180                   185                   190  
 His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
                   195                   200                   205  
 Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
                   210                   215                   220



<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1  $\alpha$ 2- $\beta$ 5

<400> 24

Met	Glu	Asn	Ile	Met	Trp	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile
1				5					10					15	
Leu	Glu	Glu	Asn	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Val	Val	Val	Gly	Ser	Val	
			20					25					30		

<210> 25

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1  $\beta$ 4-5-6

<400> 25

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

<210> 26

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1互相缠绕的环-β6

<400> 26

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

<210> 27

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1 β7-8-9

<400> 27

Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro Leu Lys His Arg Ala Trp Asn Ser Phe  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Val Glu Asp His Gly Phe Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp Leu  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Arg Glu Asp Tyr Ser Leu Glu  
           35                   40

<210> 28

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1 β10-11-12-13

<400> 28

Cys Asp Pro Ala Val Ile Gly Thr Ala Val Lys Gly Lys Glu Ala Val  
 1                   5                   10                   15  
 His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp Thr Trp  
                   20                   25                   30  
 Arg Leu Lys Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys

	35	40	45
<210>	29		
<211>	20		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<223>	NS1 $\beta$ 12-13		
<400>	29		
Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp Thr Trp Arg Leu Lys Arg			
1	5	10	15
Ala His Leu Ile			
	20		
<210>	30		
<211>	63		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<223>	NS1 Spaghetti环- $\beta$ 14		
<400>	30		
Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu Trp Pro Lys Ser His			
1	5	10	15
Thr Leu Trp Thr Asp Gly Ile Glu Glu Ser Asp Leu Ile Ile Pro Lys			
	20	25	30
Ser Leu Ala Gly Pro Leu Ser His His Asn Thr Arg Glu Gly Tyr Arg			
	35	40	45
Thr Gln Met Lys Gly Pro Trp His Ser Glu Glu Leu Glu Ile Arg			
	50	55	60
<210>	31		
<211>	54		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		



<400> 33

```

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

```

<210> 34

<211> 208

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:22

<400> 34

```

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

```

Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val  
 130 135 140  
 Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg  
 165 170 175  
 Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg  
 180 185 190  
 Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 195 200 205  
 <210> 35  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1) 加SEQ. ID NO:23  
 <400> 35  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Asp Arg Tyr Lys Tyr His Pro Asp Ser Pro Arg Arg Leu Ala Ala  
 85 90 95  
 Ala Val Lys Gln Ala Trp Glu Asp Gly Ile Cys Gly Ile Ser Ser Val  
 100 105 110  
 Ser Arg Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr  
 115 120 125  
 Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu  
 130 135 140  
 Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val

145                                    150                                    155                                    160  
 Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu  
     165                                    170                                    175  
 Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg  
     180                                    185                                    190  
 Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg  
     195                                    200                                    205  
 Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
     210                                    215                                    220  
 <210> 36  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:24  
 <400> 36  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1                                    5                                    10                                    15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
     20                                    25                                    30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
     35                                    40                                    45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
     50                                    55                                    60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65                                    70                                    75                                    80  
 Thr Met Glu Asn Ile Met Trp Arg Ser Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala  
     85                                    90                                    95  
 Ile Leu Glu Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val  
     100                                    105                                    110  
 Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly  
     115                                    120                                    125  
 Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe  
     130                                    135                                    140  
 Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile  
 145                                    150                                    155                                    160

Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr  
 165 170 175  
 Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser  
 180 185 190  
 Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln  
 195 200 205  
 Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 210 215 220  
 <210> 37  
 <211> 280  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:25  
 <400> 37  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Cys Gly Ile Ser Ser Val Ser Arg Met Glu Asn Ile Met Trp Arg  
 85 90 95  
 Ser Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala Ile Leu Glu Glu Asn Gly Val Gln  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn Pro Met Trp Arg Gly Pro  
 115 120 125  
 Gln Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu Pro His Gly Trp Lys Ala  
 130 135 140  
 Trp Gly Lys Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys Thr Asn Asn Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys Gly Gly Gly Gly Thr Ile

	165		170		175
Ile Val Asn His	Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser				
	180		185		190
Leu Trp Phe His	Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln				
	195		200		205
Glu Phe Leu Val	Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr				
	210		215		220
Arg Pro Pro Asn	Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val				
225	230		235		240
Ile Arg Arg Arg	Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg				
	245		250		255
Thr Pro Ser Pro	Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg				
	260		265		270
Ser Gln Ser Pro	Ser Ala Asn Cys				
	275		280		

<210> 38  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:26  
 <400> 38

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

Arg Ala Ala Lys Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val  
 130 135 140  
 Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His  
 145 150 155 160  
 Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro  
 165 170 175  
 Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu  
 180 185 190  
 His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro  
 195 200 205  
 Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg  
 210 215 220  
 Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 225 230 235  
 <210> 39  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:27  
 <400> 39  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro Leu Lys His Arg Ala Trp Asn Ser  
 85 90 95  
 Phe Leu Val Glu Asp His Gly Phe Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp

	100		105		110										
Leu	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile
	115		120		125										
Ile	Val	Asn	His	Val	Asn	Asp	Thr	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gln	Ser
	130		135		140										
Leu	Trp	Phe	His	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Thr	Val	Gln
145			150		155										160
Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Ala	Pro	Tyr
	165		170		175										
Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val
	180		185		190										
Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Ala	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg
	195		200		205										
Thr	Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg
	210		215		220										
Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys								
225			230												
<210>	40														
<211>	236														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成多肽														
<220>															
<221>	MISC_FEATURE														
<223>	WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:28														
<400>	40														
Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Leu
1			5						10				15		
Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Leu	Val	Asp
			20						25				30		
Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Glu	His	Cys
			35						40				45		
Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu	Val	Cys	Trp	Asp	Glu
			50						55				60		
Leu	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Trp	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly
65									70				75		80
Thr	Cys	Asp	Pro	Ala	Val	Ile	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Gly	Lys	Glu	Ala
			85						90						95

Val His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp Thr  
 100 105 110  
 Trp Arg Leu Lys Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys  
 130 135 140  
 Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln  
 145 150 155 160  
 His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
 165 170 175  
 Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
 180 185 190  
 Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser  
 195 200 205  
 Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro  
 210 215 220  
 Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 225 230 235  
 <210> 41  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:29  
 <400> 41  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp Thr Trp Arg Leu Lys

	85		90		95
Arg Ala His Leu Ile Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val					
	100		105		110
Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu					
	115		120		125
Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser					
	130		135		140
Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala					
145		150		155	160
Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly					
	165		170		175
Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg					
	180		185		190
Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser					
	195		200		205
Ala Asn Cys					
	210				
<210> 42					
<211> 254					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽					
<220>					
<221> MISC_FEATURE					
<223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:30					
<400> 42					
Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu					
1	5		10		15
Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp					
	20		25		30
Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys					
	35		40		45
Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu					
	50		55		60
Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly					
65		70		75	80
Thr Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu Trp Pro Lys Ser					
	85		90		95

His Thr Leu Trp Thr Asp Gly Ile Glu Glu Ser Asp Leu Ile Ile Pro  
 100 105 110  
 Lys Ser Leu Ala Gly Pro Leu Ser His His Asn Thr Arg Glu Gly Tyr  
 115 120 125  
 Arg Thr Gln Met Lys Gly Pro Trp His Ser Glu Glu Leu Glu Ile Arg  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe  
 165 170 175  
 Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile  
 180 185 190  
 Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr  
 195 200 205  
 Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser  
 210 215 220  
 Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 245 250

<210> 43

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1) 加SEQ. ID NO:31

<400> 43

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

65	70	75	80
Thr Leu Glu Ile Arg Phe Glu Glu Cys Pro Gly Thr Lys Val His Val			
	85	90	95
Glu Glu Thr Cys Gly Thr Arg Gly Pro Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala			
	100	105	110
Ser Gly Arg Val Ile Glu Glu Trp Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro			
	115	120	125
Pro Leu Ser Phe Arg Ala Lys Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn			
	130	135	140
His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe			
145	150	155	160
His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu			
	165	170	175
Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro			
	180	185	190
Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg			
	195	200	205
Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser			
	210	215	220
Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser			
225	230	235	240
Pro Ser Ala Asn Cys			
	245		

<210> 44

<211> 241

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:32

<400> 44

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

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Cys Pro Gly Thr Lys Val His Val Glu Glu Thr Cys Gly Thr Arg  
 85 90 95  
 Gly Pro Ser Leu Arg Ser Thr Thr Ala Ser Gly Arg Val Ile Glu Glu  
 100 105 110  
 Trp Cys Cys Arg Glu Cys Thr Met Pro Pro Leu Ser Phe Arg Ala Lys  
 115 120 125  
 Asp Gly Cys Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp  
 130 135 140  
 Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly  
 165 170 175  
 Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile  
 180 185 190  
 Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala  
 195 200 205  
 Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg  
 210 215 220  
 Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn  
 225 230 235 240

Cys

<210> 45

<211> 280

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ. ID NO: 1)加SEQ. ID NO:33

<400> 45

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30

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

<210> 46

<211> 168

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>



Glu Asn Trp Ile Phe Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ile Ala Trp Leu Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr Leu  
 50 55 60  
 Val Met Ile Leu Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser  
 65 70 75  
 <210> 48  
 <211> 359  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ. ID NO:46  
 <400> 48  
 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Glu Val Thr Arg Arg Gly Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Asp  
 85 90 95  
 Arg Asn Asp Ala Gly Glu Ala Ile Ser Phe Pro Thr Thr Leu Gly Met  
 100 105 110  
 Asn Lys Cys Tyr Ile Gln Ile Met Asp Leu Gly His Met Cys Asp Ala  
 115 120 125  
 Thr Met Ser Tyr Glu Cys Pro Met Leu Asp Glu Gly Val Glu Pro Asp  
 130 135 140  
 Asp Val Asp Cys Trp Cys Asn Thr Thr Ser Thr Trp Val Val Tyr Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Cys His His Lys Lys Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ala Val  
 165 170 175  
 Thr Leu Pro Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg Ser Gln Thr

	180		185		190										
Trp	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu	Tyr	Thr	Lys	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Asn
	195		200		205										
Trp	Ile	Phe	Arg	Asn	Pro	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala
	210		215		220										
Trp	Leu	Leu	Gly	Ser	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Val	Ile	Tyr	Leu	Val	Met
225			230		235		240								
Ile	Leu	Leu	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile
	245		250		255										
Val	Asn	His	Val	Asn	Asp	Thr	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gln	Ser	Leu
	260		265		270										
Trp	Phe	His	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Thr	Val	Gln	Glu
	275		280		285										
Phe	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Ala	Pro	Tyr	Arg
	290		295		300										
Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val	Ile
305			310		315		320								
Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Ala	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr
	325		330		335										
Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser
	340		345		350										
Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys									
	355														

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 266

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成多肽

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; WHcAg (SEQ ID NO: 1) 加SEQ. ID NO:47

&lt;400&gt; 49

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

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Gly Gly Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Val Thr Leu Pro Ser His Ser Thr Arg Lys Leu Gln Thr Arg  
 85 90 95  
 Ser Gln Thr Trp Leu Glu Ser Arg Glu Tyr Thr Lys His Leu Ile Arg  
 100 105 110  
 Val Glu Asn Trp Ile Phe Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 Ala Ile Ala Trp Leu Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Lys Val Ile Tyr  
 130 135 140  
 Leu Val Met Ile Leu Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Gly Gly Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg  
 165 170 175  
 Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr  
 180 185 190  
 Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala  
 195 200 205  
 Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His  
 210 215 220  
 Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser Pro Arg  
 225 230 235 240  
 Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg  
 245 250 255  
 Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys  
 260 265

<210> 50

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> C全长

<400> 50

Met Lys Asn Pro Lys Lys Lys Ser Gly Gly Phe Arg Ile Val Asn Met

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

<210> 51

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> C α2

<400> 51

Gly His Gly Pro Ile Arg Met Val Leu Ala Ile Leu Ala Phe Leu Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Phe Thr Ala Ile Lys Pro Ser Leu Gly  
                          20                    25

<210> 52

<211> 295

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 1) 加SEQ ID NO:50

<400> 52

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu  
 1                    5                    10                    15

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

<210> 53

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 1)加SEQ ID NO:51

<400> 53

Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Leu	1	5	10	15
Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Asp	Leu	Asn	Ala	Leu	Val	Asp	20	25	30	
Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Gly	Arg	Glu	His	Cys	35	40	45	
Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu	Val	Cys	Trp	Asp	Glu	50	55	60	
Leu	Thr	Lys	Leu	Ile	Ala	Trp	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	65	70	75	80
Thr	Gly	His	Gly	Pro	Ile	Arg	Met	Val	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Phe	Leu	85	90	95	
Arg	Phe	Thr	Ala	Ile	Lys	Pro	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ile	100	105	110	
Ile	Val	Asn	His	Val	Asn	Asp	Thr	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Gln	Ser	115	120	125	
Leu	Trp	Phe	His	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Thr	Val	Gln	130	135	140	
Glu	Phe	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Ala	Pro	Tyr	145	150	155	160
Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Val	165	170	175	
Ile	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly	Ala	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	180	185	190	
Thr	Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	195	200	205	
Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Asn	Cys	210	215										

<210> 54

<211> 564

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 土拨鼠肝炎核心抗原 (WHCAG)

<400> 54

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcac ttctgaacaa 240
gttagaacta tcatcgtaa ccacgttaac gacacttggg gtttgaaggt tagacaatct 300
ttgtggttcc acttgtcttg tttgacttcc ggtcaacaca ctgttcaaga attcttgggt 360
tctttcggtg tttggatcag aactccagct ccatacagac caccaaagc tccaatcttg 420
tctactttgc cagaacacac tgttatcaga agaagagtg gtgctagagc ttctagatct 480
ccaagaagaa gaactccatc tccaagaaga agaagatctc aatctccaag aagaagaaga 540
tctcaatctc catctgctaa ctgt 564
```

<210> 55

<211> 408

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域3全长

<400> 55

```
cacttgaagt gtagattgaa gatggacaag ttgagattga aggggtgttc ttactctttg 60
tgtactgctg ctttcacttt cactaagatc ccagctgaaa ctttgcacgg tactgttact 120
gttgaagttc aatacgtctg tactgacggc ccatgtaagg ttccagctca aatggctggt 180
gacatgcaaa ctttgactcc agttggtaga ttgateactg ctaaccaggt tatcactgaa 240
tctactgaaa actctaagat gatgttgtaa ttggaccac cattcgggtga ctcttacatc 300
gttatcggtg ttggtgaaaa gaagatcact caccactggc acagatctgg ttctactatc 360
ggtaaggctt tcgaagctac tgttagaggt gctaagagaa tggctggt 408
```

<210> 56

<211> 240

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜结构域3 (EDIIII) G环截短型  
 <400> 56  
 gctttcactt tcactaagat cccagctgaa actttgcacg gtactgttac tgttgaattg 60  
 caatacgctg gtactgacgg tccatgtaag gttccagctc aatggctgt tgacatgcaa 120  
 actttgactc cagttgtag attgatcact gtaaccag ttatcactga atctactgaa 180  
 aactctaaga tgatgttga attggacceca ccattcggtg actcttacat cgttatcggg 240  
 <210> 57  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜结构域3, A-B环  
 <400> 57  
 gctttcactt tcactaagat cccagctgaa actttgcacg gtactgttac tgttgaattg 60  
 caatacgct 69  
 <210> 58  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜结构域3, CXCDDX环  
 <400> 58  
 ccatgtaagg ttccagctca aatggctggt gacatgcaaa ctttgactcc agttggtaga 60  
 ttgatcactg ctaaccaggt tatcact 87  
 <210> 59  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜结构域3, DX-E环  
 <400> 59  
 agattgatca ctgctaaccc agttatcact gaatctactg aaaactctaa gatgatgttg 60  
 gaattggacc ca 72  
 <210> 60  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜结构域3, F-G环  
 <400> 60  
 ggtgactctt acatcgttat cgggtgttggg gaaaagaaga tcactcacca ctggcacaga 60  
 <210> 61  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜融合环  
 <400> 61  
 gacagaggtt ggggtaacgg ttgtggttg ttcggtaag 39  
 <210> 62  
 <211> 276  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 包膜结构域2 (ED2) 序列A-E  
 <400> 62  
 actactactg tttctaacat ggctgaagtt agatcttact gttacgaagc ttctatctct 60  
 gacatggctt ctgactctag atgtccaact caaggtgaag cttacttga caagcaatct 120

gacactcaat acgtttgtaa gagaactttg gttgacagag gttggggtaa cggttgtggt 180  
 ttgttcggta agggttcttt ggttacttgt gctaagttcg cttgttctaa gaagatgact 240  
 ggtaagtcta tccaaccaga aaacttggaa tacaga 276

<210> 63

<211> 183

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域2序列B-D

<400> 63

gaagcttcta tctctgacat ggcttctgac tctagatgtc caactcaagg tgaagcttac 60  
 ttggacaagc aatctgacac tcaatacgtt tgtaagagaa ctttggttga cagagtttg 120  
 ggtaacgggt gtggtttgtt cggtaagggt tctttggta cttgtgctaa gttcgcttgt 180  
 tct 183

<210> 64

<211> 246

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 包膜结构域1聚糖环

<400> 64

atgactggta agtctatcca accagaaaac ttggaataca gaatcatggt gtctgttcac 60  
 ggttctcaac actctggtat gatcgttaac gacactggtc acgaaactga cgaaaacaga 120  
 gctaaggttg aatcactcc aaactctcca agagctgaag ctactttggg tggtttcggt 180  
 tctttgggtt tggactgtga accaagaact ggtttggact tctctgactt gtactacttg 240  
 actatg 246

<210> 65

<211> 981

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:55

<400> 65

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgggtggtgt 240
actcacttga agttagatt gaagatggac aagttgagat tgaagggtgt ttcttactct 300
ttgtgtactg ctgctttcac tttcactaag atcccagctg aaactttgca cggtactgtt 360
actggtgaag ttcaatacgc tggactgac ggtccatgta aggttccagc tcaaatggct 420
gttgacatgc aaactttgac tccagttggg agattgatca ctgctaacc agttatcact 480
gaatctactg aaaactctaa gatgatgttg gaattggacc caccattcgg tgactcttac 540
atcggtatcg gtgttggtga aaagaagatc actcaccact ggcacagatc tggttctact 600
atcggtaagg ctttcgaagc tactgttaga ggtgctaaga gaatggctgt tgggtggtgt 660
ggactatca tcgttaacca cgtaacgac acttgggggt tgaaggtag acaatctttg 720
tggttccact tgtcttggtt gactttcggg caacacactg ttcaagaatt cttggtttct 780
ttcgggtgtt ggatcagaac tccagctcca tacagaccac caaacgctcc aatcttgtct 840
actttgccag aacacactgt tatcagaaga agaggtggtg ctagagcttc tagatctcca 900
agaagaagaa ctccatctcc aagaagaaga agatctcaat ctccaagaag aagaagatct 960
caatctccat ctgctaactg t 981
```

<210> 66

<211> 786

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:56

<400> 66

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgc tttcactttc 240
actaagatcc cagctgaaac tttgcacggg actgttactg ttgaattgca atacgctggt 300
actgacggtc catgtaaggt tccagctcaa atggctgttg acatgcaaac tttgactcca 360
gttggtagat tgatcactgc taaccagtt atcactgaat ctactgaaa ctctaagatg 420
atgttggaat tggaccacc attcggtgac tcttacatcg ttatcggtag tatcatcgtt 480
aaccacgtta acgacacttg gggtttgaag gttagacaat ctttgtggtt ccacttgtct 540
```

tgtttgactt tcggtaaca cactgttcaa gaattcttgg tttctttcgg tgtttgatc 600  
agaactccag ctccatacag accaccaaac gctccaatct tgtctacttt gccagaacac 660  
actgttatca gaagaagagg tgggtgctaga gcttctagat ctccaagaag aagaactcca 720  
tctccaagaa gaagaagatc tcaatctcca agaagaagaa gatctcaatc tccatctgct 780  
aactgt 786

<210> 67

<211> 615

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:57

<400> 67

atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgc tttcactttc 240  
actaagatcc cagctgaaac tttgcacggg actgttactg ttgaattgca atacgctact 300  
atcatcgtaa accacgtaa cgacacttgg ggtttgaagg ttagacaatc tttgtggttc 360  
cacttgtctt gtttgacttt cggtaaacac actgttcaag aattcttggg tttcttcggg 420  
gtttggatca gaactccagc tccatacaga ccaccaaac ctccaatctt gtctactttg 480  
ccagaacaca ctgttatcag aagaagaggg ggtgctagag cttctagatc tccaagaaga 540  
agaactccat ctccaagaag aagaagatct caatctcca gaagaagaag atctcaatct 600  
ccatctgcta actgt 615

<210> 68

<211> 633

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:58

<400> 68

atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180

tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatccc atgtaagggt 240  
 ccagctcaaa tggctgttga catgcaaact ttgactccag ttggttagatt gatcactgct 300  
 aaccagttta tcactactat catcgtaa acacgtaacg aacttgggg tttgaagggt 360  
 agacaatctt tgtggttcca cttgtcttgt ttgactttcg gtcaacacac tgttcaagaa 420  
 ttcttggttt ctttcggtgt ttggatcaga actccagctc catacagacc accaaacgct 480  
 ccaatcttgt ctactttgcc agaacacact gttatcagaa gaagaggtgg tgctagagct 540  
 tctagatctc caagaagaag aactccatct ccaagaagaa gaagatctca atctccaaga 600  
 agaagaagat ctcaatctcc atctgctaac tgt 633

<210> 69

<211> 618

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:59

<400> 69

atggacatcg accatacaa ggaattcggt tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcag attgatcact 240  
 gctaaccag ttatcactga atctactgaa aactetaaga tgatggtgga attggacca 300  
 actatcatcg ttaaccacgt taacgacact tggggtttga aggttagaca atctttgtgg 360  
 ttccacttgt cttgtttgac tttcgggtcaa cacactgttc aagaattctt ggtttctttc 420  
 ggtggttggga tcagaactcc agctccatac agaccaccaa acgctccaat cttgtctact 480  
 ttgccagaac aactgttat cagaagaaga ggtggtgcta gagcttctag atctccaaga 540  
 agaagaactc catctccaag aagaagaaga tctcaatctc caagaagaag aagatctcaa 600  
 tctccatctg ctaactgt 618

<210> 70

<211> 606

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:60

<400> 70

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggtt 180  
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgactcttac 240  
atcgttatcg gtgttggtga aaagaagatc actcaccact ggcacagaac tatcatcggtt 300  
aaccacgtta acgacacttg gggtttgaag gttagacaat ctttgtgggtt ccacttgtct 360  
tgtttgactt tccgtcaaca cactgttcaa gaattcttgg tttctttcgg tgtttgatc 420  
agaactccag ctccatacag accaccaaac gctccaatct tgtctacttt gccagaacac 480  
actgttatca gaagaagagg tgggtctaga gcttctagat ctccaagaag aagaactcca 540  
tctccaagaa gaagaagatc tcaatctcca agaagaagaa gatctcaatc tccatctgct 600  
aactgt 606

<210> 71

<211> 600

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:61

<400> 71

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggtt 180  
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtactgac 240  
agaggttggg gtaacggttg tggtttggtc ggtaagggtg gtactatcat cgtaaccac 300  
gttaacgaca cttgggggtt gaaggttaga caatctttgt ggttccactt gtcttgtttg 360  
actttcggtc aacacactgt tcaagaattc ttggtttctt tccgtgtttg gatcagaact 420  
ccagctccat acagaccacc aaacgctcca atcttgteta ctttgccaga acacactggt 480  
atcagaagaa gaggtggtgc tagagcttct agatctcca gaagaagaac tccatctcca 540  
agaagaagaa gatctcaatc tccaagaaga agaagatctc aatctccatc tgctaactgt 600

<210> 72

<211> 834

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:62

<400> 72

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgggtactact 240
actgttttcta acatggctga agttagatct tactgttacc aagcttctat ctctgacatg 300
gcttctgact ctagatgtcc aactcaagggt gaagcttact tggacaagca atctgacact 360
caatacgttt gtaagagaac tttggttgac agagggtggg gtaacggttg tggtttggtc 420
ggtaagggtt ctttggttac ttgtgctaag ttcgcttggt ctaagaagat gactggtaag 480
tctatccaac cagaaaaactt ggaatacaga ggtggtacta tcatcgtaa ccacgttaac 540
gacacttggg gtttgaaggt tagacaatct ttgtggttcc acttgtcttg tttgactttc 600
ggccaacaca ctgttcaaga attcttgggt tcttctcggg tttggatcag aactccagct 660
ccatacagac caccaaacgc tccaatcttg tctactttgc cagaacacac tgttatcaga 720
agaagaggtg gtgctagagc ttctagatct ccaagaagaa gaactccatc tccaagaaga 780
agaagatctc aatctccaag aagaagaaga tctcaatctc catctgctaa ctgt 834
```

<210> 73

<211> 741

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:63

<400> 73

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgggtgaagct 240
tctatctctg acatggcttc tgactctaga tgtccaactc aagggtgaagc ttacttggac 300
aagcaatctg aactcaata cgtttgtaag agaactttgg ttgacagagg ttggggtaac 360
ggttgtggtt tgttcggtaa gggttctttg gttacttgtg ctaagttcgc ttgttctggt 420
ggactatca tcgttaacca cgttaacgac acttgggggtt tgaaggtag acaatctttg 480
tggttccact tgtcttggtt gactttcggg caacacactg ttcaagaatt cttggtttct 540
ttcggtggtt ggatcagaac tccagctcca tacagaccac caaacgctcc aatcttctct 600
actttgccag aacacactgt tatcagaaga agagggtgtg ctagagcttc tagatctcca 660
agaagaagaa ctccatctcc aagaagaaga agatctcaat ctccaagaag aagaagatct 720
caatctccat ctgctaactg t 741
```

<210> 74  
 <211> 804  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg多核苷酸序列(SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO:64  
 <400> 74  
 atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagaact gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttggtt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggatgact 240  
 ggtaagtcta tccaaccaga aaacttgga tacagaatca tgttgtctgt tcacggttct 300  
 caacactctg gtatgatcgt taacgacact ggtcacgaaa ctgacgaaa cagagctaag 360  
 gttgaaatca ctccaaactc tccaagagct gaagctactt tgggtggttt cggttctttg 420  
 ggtttggact gtgaaccaag aactggtttg gacttctctg acttgacta cttgactatg 480  
 ggtgtacta tcatcgtaa ccacgtaac gacacttggg gtttgaaggt tagacaatct 540  
 ttgtggttcc acttgtcttg tttgactttc ggtcaacaca ctgttcaaga attcttggtt 600  
 tctttcggtg tttggatcag aactccagct ccatacagac caccaaagc tccaatcttg 660  
 tctactttgc cagaacacac tgttatcaga agaagagtg gtgctagagc ttctagatct 720  
 ccaagaagaa gaactccatc tccaagaaga agaagatctc aatctccaag aagaagaaga 780  
 tctcaatctc catctgctaa ctgt 804  
 <210> 75  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> NS1  $\beta$ 1-2  
 <400> 75  
 gacgttggtt gttctgttga cttctctaag aaggaaacta gatgtgttac t 51  
 <210> 76  
 <211> 99  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1  $\beta$ 3-4  
<400> 76  
gacagataca agtaccaccc agactctcca agaagattgg ctgctgctgt taagcaagct 60  
tgggaagacg gtatctgtgg tatctcttct gtttctaga 99  
<210> 77  
<211> 93  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1  $\alpha$ 2- $\beta$ 5  
<400> 77  
atggaaaaca tcatgtggag atctgttgaa ggtgaattga acgctatctt ggaagaaaac 60  
ggtgttcaat tgactgttgt tgttggttct gtt 93  
<210> 78  
<211> 270  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1  $\beta$ 4-5-6  
<400> 78  
tgtggtatct cttctgttct tagaatggaa aacatcatgt ggagatctgt tgaaggtgaa 60  
ttgaacgcta tcttgaaga aaacggtggt caattgactg ttgttggtgg ttctgttaag 120  
aacccaatgt ggagaggtcc acaaagattg ccagttccag ttaacgaatt gccacacggt 180  
tggaaggctt ggggtaagtc ttacttcggt agagctgcta agactaacia ctctttcgtt 240  
gttgacggtg acactttgaa ggaatgtggt 270  
<210> 79  
<211> 132  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1 互相缠绕的环-β6  
<400> 79  
aagaacccaa tgtggagagg tccacaaaga ttgccagttc cagttaacga attgccacac 60  
ggttggaagg cttggggtaa gtcttacttc gttagagctg ctaagactaa caactctttc 120  
gttgttgacg gt 132  
<210> 80  
<211> 123  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1 β7-8-9  
<400> 80  
gacactttga aggaatgtcc attgaagcac agagcttga actctttctt gtttgaagac 60  
cacggtttcg gtgttttcca cacttctggt tggttgaagg ttagagaaga ctactctttg 120  
gaa 123  
<210> 81  
<211> 135  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1 β10-11-12-13  
<400> 81  
tgtgaccag ctgttatcgg tactgctggt aagggttaagg aagctgttca ctctgacttg 60  
ggttactgga tcgaatctga aaagaacgac acttgagat tgaagagagc tcacttgatc 120  
gaaatgaaga cttgt 135  
<210> 82  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1  $\beta$ 12-13  
<400> 82  
ggttactgga tcgaatctga aaagaacgac acttggagat tgaagagagc tcacttgatc 60  
<210> 83  
<211> 189  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1 Spaghetti环- $\beta$ 14  
<400> 83  
agagctcact tgatcgaaat gaagacttgt gaatggccaa agtctcacac tttgtggact 60  
gacggtatcg aagaatctga ctgatcatc ccaaagtett tggctgtgcc attgtctcac 120  
cacaacacta gagaaggta cagaactcaa atgaagggtc catggcactc tgaagaattg 180  
gaaatcaga 189  
<210> 84  
<211> 162  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> NS1  $\beta$ 14-15-16-17  
<400> 84  
ttggaaatca gattcgaaga atgtccaggt actaaggttc acgttgaaga aacttgtggg 60  
actagaggtc catctttgag atctactact gcttctggta gagttatcga agaatgggtg 120  
tgtagagaat gtactatgcc accattgtet ttcagagcta ag 162  
<210> 85  
<211> 150  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1  $\beta$ 15-16-17-18

<400> 85

tgtccaggta ctaaggttca cgttgaagaa acttgtggta ctagagggtcc atctttgaga 60  
tctactactg cttctggtag agttatcgaa gaatggtgt gtagagaatg tactatgccca 120  
ccattgtctt tcagagctaa ggacggttgt 150

<210> 86

<211> 267

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> NS1  $\beta$ 14-15-16-17-18-19-C-末端

<400> 86

atgaagggtc catggcactc tgaagaattg gaaatcagat tcgaagaatg tccagggtact 60  
aaggttcacg ttgaagaaac ttgtggtact agagggtccat ctttgagatc tactactgct 120  
tctggtagag ttatcgaaga atggtgttgt agagaatgta ctatgccacc attgtctttc 180  
agagctaagg acggttgttg gtacggtatg gaaatcagac caagaaagga accagaatct 240  
aacttgggta gatctatggt tactgct 267

<210> 87

<211> 624

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 75

<400> 87

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgggtggtgt 240  
actgacgttg gttgttctgt tgacttctct aagaaggaaa ctagatgtgg tactggtggt 300  
ggtggtacta tcatcgtaa ccacgttaac gacacttggg gtttgaaggt tagacaatct 360

ttgtggttcc acttgtcttg tttgactttc ggtcaacaca ctggtcaaga attcttggtt 420  
 tctttcgggtg tttggatcag aactccagct ccatacagac caccaaacgc tccaatcttg 480  
 tctactttgc cagaacacac tgttatcaga agaagagtg gtgctagagc ttctagatct 540  
 ccaagaagaa gaactccatc tccaagaaga agaagatctc aatctccaag aagaagaaga 600  
 tctcaatctc catctgctaa ctgt 624

<210> 88

<211> 672

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 76

<400> 88

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttggtt 180  
 tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgggtggtgt 240  
 actgacagat acaagtacca cccagactct ccaagaagat tggctgctgc tgtaagcaa 300  
 gcttgggaag acggtatctg tggatctct tctgtttcta gaggtggtgg tggactatc 360  
 atcgtaacc acgtaacga cacttgggggt ttgaaggta gacaatcttt gtggttccac 420  
 ttgtcttggt tgactttcgg tcaacacact gttcaagaat tcttggtttc tttcgggtgt 480  
 tggatcagaa ctccagctcc atacagacca ccaaagctc caatcttgtc tactttgcca 540  
 gaacacactg ttatcagaag aagaggtggt gctagagctt ctagatctcc aagaagaaga 600  
 actccatctc caagaagaag aagatctcaa tctccaagaa gaagaagatc tcaatctcca 660  
 tctgctaact gt 672

<210> 89

<211> 666

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 77

<400> 89

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120

gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
 actatggaaa acatcatgtg gagatctggt gaaggtgaat tgaacgctat cttggaagaa 300  
 aacggtgttc aattgactgt tgttggtggt tctggtggtg gtggtggtac tatcatcggt 360  
 aaccacgtta acgacacttg gggtttgaag gttagacaat ctttgtggtt ccacttgtct 420  
 tgtttgactt tcggtcaaca cactgttcaa gaattcttgg tttctttcgg tgtttggatc 480  
 agaactccag ctccatacag accaccaaac gctccaatct tgtctacttt gccagaacac 540  
 actgttatca gaagaagagg tgggtctaga gcttctagat ctccaagaag aagaactcca 600  
 tctccaagaa gaagaagatc tcaatctcca agaagaagaa gatctcaatc tccatctgct 660  
 aactgt 666

<210> 90

<211> 840

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54) 加SEQ ID NO: 78

<400> 90

atggacatcg accatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
 acttgtggta tctcttctgt ttctagaatg gaaaacatca tgtggagatc tgttgaaggt 300  
 gaattgaacg ctatcttggg aaaaaacggt gttcaattga ctggttgtgt tggttctggt 360  
 aagaacccaa tgtggagagg tccacaaaga ttgccagttc cagttaacga attgccacac 420  
 ggttgggaagg cttggggtaa gtcttacttc gttagagctg ctaagactaa caactctttc 480  
 gttgttgacg gtgacacttt gaaggaatgt ggtggtggtg gtactatcat cgttaaccac 540  
 gttaacgaca cttgggggtt gaaggttaga caatctttgt ggttccactt gtcttgtttg 600  
 actttcggtc aacacactgt tcaagaatc ttggtttctt tcggtgtttg gatcagaact 660  
 ccagctccat acagaccacc aaacgctcca atcttgteta ctttgccaga acacactggt 720  
 atcagaagaa gaggtggtgc tagagcttct agatctccaa gaagaagaac tccatctcca 780  
 agaagaagaa gatctcaatc tccaagaaga agaagatctc aatctccatc tgctaactgt 840

<210> 91

<211> 705

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 79

<400> 91

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg ttttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240
actaagaacc caatgtggag aggtccacaa agattgccag ttccagttaa cgaattgccca 300
cacggttggg aggcttgggg taagtcttac ttcgtagag ctgctaagac taacaactct 360
ttcgttgttg acggtggtgg tggtggtact atcatcgta accacgttaa cgacacttgg 420
ggtttgaagg ttagacaatc tttgtggttc cacttgtctt gtttgacttt cggtcacac 480
actgttcaag aattcttggg ttctttcggg gtttgatca gaactccagc tccatacaga 540
ccaccaaacg ctccaatctt gtctactttg ccagaacaca ctgttatcag aagaagaggt 600
ggtgctagag cttctagatc tccaagaaga agaactccat ctccaagaag aagaagatct 660
caatctcaa gaagaagaag atctcaatct ccatctgcta actgt 705
```

<210> 92

<211> 696

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 80

<400> 92

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg ttttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240
actgacactt tgaaggaatg tccattgaag cacagagctt ggaactcttt cttggttgaa 300
gaccacggtt tcggtgtttt ccacacttct gtttggttga aggttagaga agactactct 360
ttggaaggtg gtggtggtac tatcatcggt aaccacgtta acgacacttg gggtttgaag 420
gtagacaat ctttgtggtt ccacttgtct tgtttgactt tcggtcaaca cactgttcaa 480
gaattcttgg tttctttcgg tgtttggatc agaactccag ctccatacag accaccaaac 540
gctccaatct tgtctacttt gccagaacac actgttatca gaagaagagg tggtgctaga 600
gcttctagat ctccaagaag aagaactcca tctccaagaa gaagaagatc tcaatctcca 660
agaagaagaa gatctcaatc tccatctgct aactgt 696
```

<210> 93

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 81

<400> 93

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagaactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttggtt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240
acttgtagacc cagctgttat cggtagctgct gtttaaggta aggaagctgt tcaactctgac 300
ttgggttact ggatcgaatc tgaaaagaac gacacttga gattgaagag agctcacttg 360
atcgaaatga agacttgtgg tggtggtggt actatcatcg ttaaccacgt taacgacact 420
tggggtttga aggttagaca atctttgtgg ttccacttgt cttgtttgac tttcgggtcaa 480
cacactgttc aagaattctt ggtttctttc ggtgtttgga tcagaactcc agctccatac 540
agaccaccaa acgctccaat cttgtctact ttgccagaac aactgttat cagaagaaga 600
ggtggtgcta gagcttctag atctccaaga agaagaactc catctccaag aagaagaaga 660
tctcaatctc caagaagaag aagatctcaa tctccatctg ctaactgt 708
```

<210> 94

<211> 633

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 82

<400> 94

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagaactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttggtt 180
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240
actggttact ggatcgaatc tgaaaagaac gacacttga gattgaagag agctcacttg 300
atcggtggtg gtggtactat catcgtaa cactgtaa acacttgggg tttgaaggtt 360
agacaatctt tgtggttcca cttgtcttgt ttgactttcg gtcaacacac tgttcaagaa 420
```

ttcttggttt ctttcggtgt ttggatcaga actccagctc catacagacc accaaacgct 480  
 ccaatcttgt ctactttgcc agaacacact gttatcagaa gaagaggtgg tgctagagct 540  
 tctagatctc caagaagaag aactccatct ccaagaagaa gaagatctca atctccaaga 600  
 agaagaagat ctcaatctcc atctgctaac tgt 633

<210> 95

<211> 762

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 83

<400> 95

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttggtt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
 actagagctc acttgatcga aatgaagact tgtgaatggc caaagtctca cactttgtgg 300  
 actgacggta tcgaagaatc tgacttgatc atcccaaagt ctttggctgg tccattgtct 360  
 caccacaaca ctagagaagg ttacagaact caaatgaagg gtccatggca ctctgaagaa 420  
 ttggaaatca gaggtgggtg tggactatc atcgtaacc acgtaacga cacttgggggt 480  
 ttgaaggtta gacaatcttt gtggttccac ttgtcttgggt tgactttcgg tcaacacact 540  
 gttcaagaat tcttggtttc tttcgggtgtt ttggatcagaa ctccagctcc atacagacca 600  
 ccaaacgctc caatcttgtc tactttgcca gaacacactg ttatcagaag aagaggtggt 660  
 gctagagctt ctagatctcc aagaagaaga actccatctc caagaagaag aagatctcaa 720  
 tctccaagaa gaagaagatc tcaatctcca tctgctaact gt 762

<210> 96

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 84

<400> 96

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120

gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
 actttggaaa tcagattcga agaattgtcca ggtactaagg ttcacgttga agaaacttgt 300  
 ggtactagag gtccatcttt gagatctact actgcttctg gtagagtatt cgaagaatgg 360  
 tgtttagtag aatgtactat gccaccattg tctttcagag ctaagggtgg tggtggtact 420  
 atcatcgtaa accacgttaa cgacacttgg gtttgaagg ttagacaatc tttgtggttc 480  
 cacttgtctt gtttgacttt cgttcaacac actgttcaag aattcttgggt ttctttcggt 540  
 gtttggatca gaactccagc tccatacaga ccaccaaacg ctccaatctt gtctactttg 600  
 ccagaacaca ctgttatcag aagaagaggt ggtgctagag cttctagatc tccaagaaga 660  
 agaactccat ctccaagaag aagaagatct caatctcaa gaagaagaag atctcaatct 720  
 ccatctgcta actgt 735

<210> 97

<211> 723

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54) 加SEQ ID NO: 85

<400> 97

atggacatcg accatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
 acttgtccag gtactaaggt tcacgttgaa gaaacttgtg gtactagagg tccatctttg 300  
 agatctacta ctgcttctgg tagagtatc gaagaatggt gttgtagaga atgtactatg 360  
 ccaccattgt ctttcagagc taaggacggt tgtggtggtg gtggtactat catcgtaac 420  
 cacgttaacg aacttgggg tttgaagggt agacaatctt tgtggttcca cttgtcttgt 480  
 ttgactttcg gtcaacacac tgttcaagaa ttcttggttt ctttcggtgt ttggatcaga 540  
 actccagctc catacagacc accaaacgct ccaatcttgt ctactttgcc agaacacact 600  
 gttatcagaa gaagaggtgg tgctagagct tctagatctc caagaagaag aactccatct 660  
 ccaagaagaa gaagatctca atctccaaga agaagaagat ctcaatctcc atctgctaac 720  
 tgt 723

<210> 98

<211> 840

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 54)加SEQ ID NO: 86

<400> 98

```
atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240
actatgaagg gtccatggca ctctgaagaa ttggaaatca gattcgaaga atgtccaggt 300
actaaggttc acgttgaaga aacttgtggg actagaggtc catctttgag atctactact 360
gcttctggta gagttatcga agaatgggtg tntagagaat gtactatgcc accattgtct 420
ttcagagcta aggacgggtg ttggtacggg atggaaatca gaccaagaaa ggaaccagaa 480
tctaacttgg ttagatctat ggttactgct ggtgggtggg gtactatcat cgtaaccac 540
gttaacgaca cttgggggtt gaaggttaga caatctttgt ggttccactt gtcttgtttg 600
actttcggtc aacacactgt tcaagaattc ttggtttctt tcggtgtttg gatcagaact 660
ccagctccat acagaccacc aaacgctcca atcttgtcta ctttgccaga acacactggt 720
atcagaagaa gaggtggtgc tagagcttct agatctcaa gaagaagaac tccatctcca 780
agaagaagaa gatctcaatc tccaagaaga agaagatctc aatctccatc tgctaactgt 840
```

<210> 99

<211> 504

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> prM弗林缺陷型

<400> 99

```
gctgaagtta ctagaagagg ttctgcttac tacatgtact tggacagaaa cgacgctggg 60
gaagctatct ctttcccaac tactttgggt atgaacaagt gttacatcca aatcatggac 120
ttgggtcaca tgtgtgacgc tactatgtct tacgaatgc caatgttggg cgaaggtggt 180
gaaccagacg acgttgactg ttggtgtaac actacttcta cttgggttgt ttacgggtact 240
tgtcaccaca agaagggtga agctgggtgg tctggtgggt ctgttacttt gccatctcac 300
tctactagaa agttgcaaac tagatctcaa acttgggttg aatctagaga atacactaag 360
cacttgatca gagttgaaaa ctggatcttc agaaaccag gtttcgcttt ggctgctgct 420
gctatcgctt ggttgttggg ttcttctact tctcaaaagg ttatctactt ggttatgatc 480
ttgttgatcg ctccagctta ctct 504
```

<210> 100

<211> 225  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> M全长  
 <400> 100  
 gctgttactt tgccatctca ctctactaga aagttgcaa ctagatctca aacttggttg 60  
 gaatctagag aatacactaa gcaacttgatc agagttgaaa actggatctt cagaaaccca 120  
 ggtttcgctt tggetgetgc tgetatcget tggttgttgg gttcttctac ttctcaaaag 180  
 gttatctact tggttatgat cttgttgatc gctccagctt actct 225  
 <210> 101  
 <211> 1077  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成多核苷酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> WHcAg (SEQ ID NO: 62)加SEQ ID NO:99  
 <400> 101  
 atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcget tggatgtctt ctaacatcgg tgggtggtgt 240  
 actgctgaag ttactagaag aggttctgct tactacatgt acttgacag aaacgacgct 300  
 ggtgaagcta tctctttccc aactactttg ggtatgaaca agtgttacat ccaaatcatg 360  
 gacttgggtc acatgtgtga cgctactatg tcttacgaat gtccaatggt ggacgaaggt 420  
 gttgaaccag acgacgttga ctgttgggtg aacactactt ctacttgggt tgtttacggt 480  
 acttgtcacc acaagaaggg tgaagctggg ggttctgggt gtgctgttac tttgcatct 540  
 cactctacta gaaagttgca aactagatct caaacttggg tggaatctag agaatacact 600  
 aagcacttga tcagagttga aaactggatc ttcagaaacc caggtttcgc tttggctgct 660  
 gctgctatcg cttggttggt gggttcttct acttctcaaa aggttatcta cttggttatg 720  
 atcttgttga tcgctccagc ttactctggg ggtgggtgta ctatcatcgt taaccacgtt 780  
 aacgacactt ggggtttgaa ggtagacaa tctttgtggg tccacttgtc ttgtttgact 840  
 ttcggtcaac aactgttca agaattcttg gtttcttctg gtgtttggat cagaactcca 900  
 gctccataca gaccacaaa cgctccaatc ttgtctactt tgccagaaca cactgttatc 960

agaagaagag gtggtagctag agcttctaga tctccaagaa gaagaactcc atctccaaga 1020  
agaagaagat ctcaatctcc aagaagaaga agatctcaat ctccatctgc taactgt 1077

<210> 102

<211> 798

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 62)加SEQ ID NO: 100

<400> 102

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggtt 180  
tggtgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
actgctgtta ctttgccatc tcaacttact agaaagttgc aaactagatc tcaaaacttg 300  
ttggaatcta gagaatacac taagcacttg atcagagttg aaaactggat cttcagaaac 360  
ccaggtttctg ctttggtctgc tgctgctatc gcttggttgt tgggttcttc tacttctcaa 420  
aaggttatct acttggttat gatcttggtg atcgtctcag cttactctgg tggtggtggt 480  
actatcatcg ttaaccacgt taacgacact tggggttga aggttagaca atctttgtgg 540  
ttccacttgt cttgtttgac tttcggtaaa cacactgttc aagaattctt ggtttctttc 600  
ggtgtttgga tcagaactcc agtccatac agaccacaa acgctccaat cttgtctact 660  
ttgccagaac aactgttat cagaagaaga ggtggtgcta gagcttctag atctccaaga 720  
agaagaactc catctccaag aagaagaaga tctcaatctc caagaagaag aagatctcaa 780  
tctccatctg ctaactgt 798

<210> 103

<211> 312

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> C全长

<400> 103

atgaagaacc caaagaagaa gtctggtggt ttcagaatcg ttaacatggt gaagagaggt 60  
gttgctagag tttctccatt cgggtggttg aagagattgc cagctggttt gttggtgggt 120  
cacggtccaa tcagaatggt tttggtctatc ttggtttct tgagattcac tgctatcaag 180

ccatcctttgg gtttgatcaa cagatgggggt tctgttggtga agaaggaagc tatggaaact 240  
 atcaagaagt tcaagaagga cttggctgct atgttgagaa tcatcaacgc tagaaaggaa 300  
 aagaagagaa ga 312

<210> 104

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> C α2

<400> 104

ggtcacggtc caatcagaat ggTTTTGGCT atcttggctt tcttgagatt cactgctatc 60  
 aagccatctt tgggt 75

<210> 105

<211> 885

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 62)加SEQ ID NO:103

<400> 105

atggacatcg acccatacaa ggaattcgggt tcttcttacc aattgttgaa cttcttgcca 60  
 ttggacttct tcccagactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
 gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
 tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tggtggtggt 240  
 actatgaaga acccaaagaa gaagtctgggt ggtttcagaa tcgttaacat gttgaagaga 300  
 ggtgttgcta gagtttctcc attcgggtgggt ttgaagagat tgccagctgg tttgttggtg 360  
 ggtcacggtc caatcagaat ggTTTTGGCT atcttggctt tcttgagatt cactgctatc 420  
 aagccatctt tgggtttgat caacagatgg ggttctggtg gtaagaagga agctatggaa 480  
 actatcaaga agttcaagaa ggacttggct gctatgttga gaatcatcaa cgctagaaag 540  
 gaaaagaaga gaagaggtgg tggtggtact atcatcgta accacgttaa cgacacttgg 600  
 ggtttgaagg ttagacaatc tttgtggttc cacttgtctt gtttgacttt cggtaaacac 660  
 actgttcaag aattcttgggt ttctttcgggt gtttgatca gaactccagc tccatacaga 720  
 ccaccaaagc ctccaatctt gtctactttg ccagaacaca ctgttatcag aagaagaggt 780  
 ggtgctagag cttctagatc tccaagaaga agaactccat ctccaagaag aagaagatct 840

caatctccaa gaagaagaag atctcaatct ccatctgcta actgt 885

<210> 106

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> WHcAg (SEQ ID NO: 62)加SEQ ID NO:104

<400> 106

atggacatcg acccatacaa ggaattcggg tcttcttacc aattggtgaa cttcttgcca 60  
ttggacttct tcccagaactt gaacgctttg gttgacactg ctactgcttt gtacgaagaa 120  
gaattgactg gtagagaaca ctgttctcca caccacactg ctatcagaca agctttgggt 180  
tgttgggacg aattgactaa gttgatcgct tggatgtctt ctaacatcgg tgggtggtgt 240  
actggtcacg gtccaatcag aatggttttg gctatcttgg ctttcttgag attcactgct 300  
atcaagccat ctttgggtgg tgggtggtgg actatcatcg ttaaccacgt taacgacact 360  
tggggtttga aggttagaca atctttgtgg ttccacttgt cttgtttgac tttcgggtcaa 420  
cacactgttc aagaattctt ggtttctttc ggtgtttgga tcagaactcc agctccatac 480  
agaccaccaa acgctccaat cttgtctact ttgccagaac aactgttat cagaagaaga 540  
ggtggtgcta gagcttctag atctccaaga agaagaactc catctccaag aagaagaaga 600  
tctcaatctc caagaagaag aagatctcaa tctccatctg ctaactgt 648

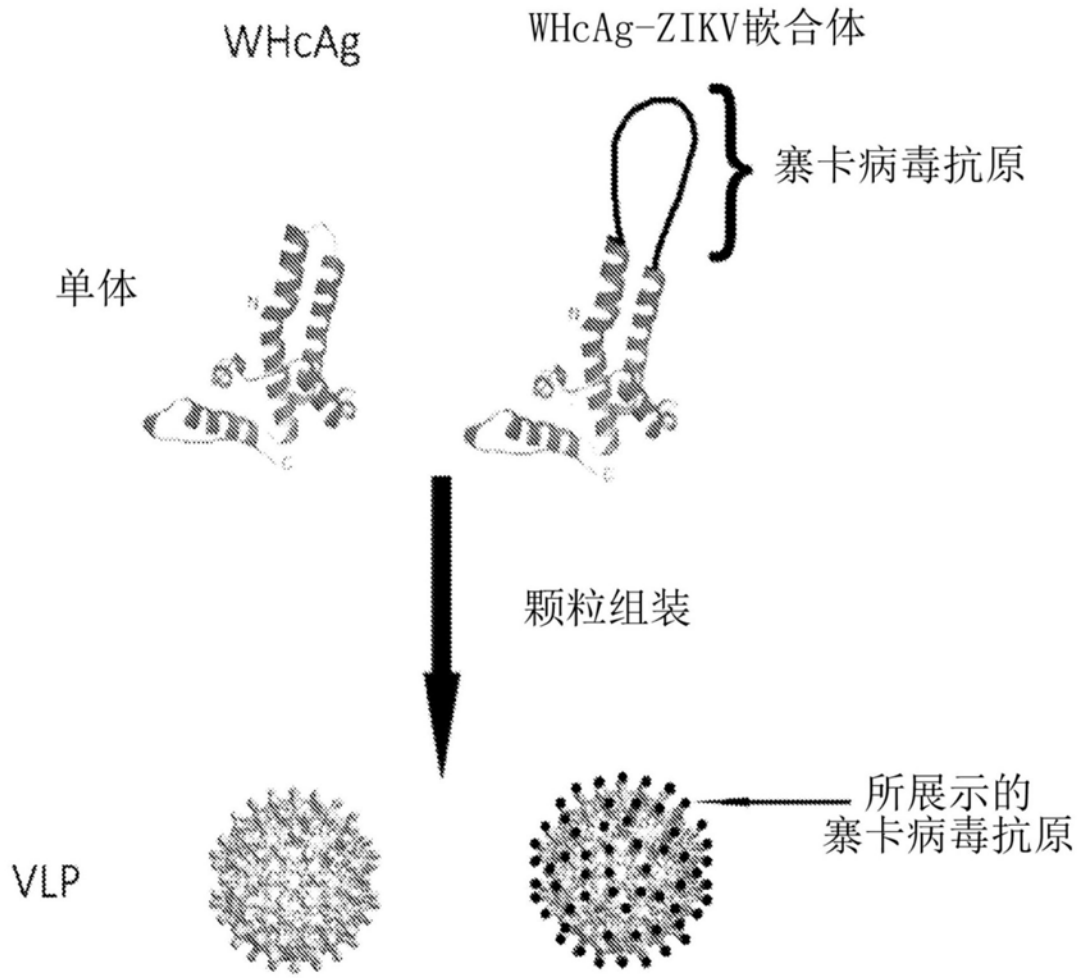


图1





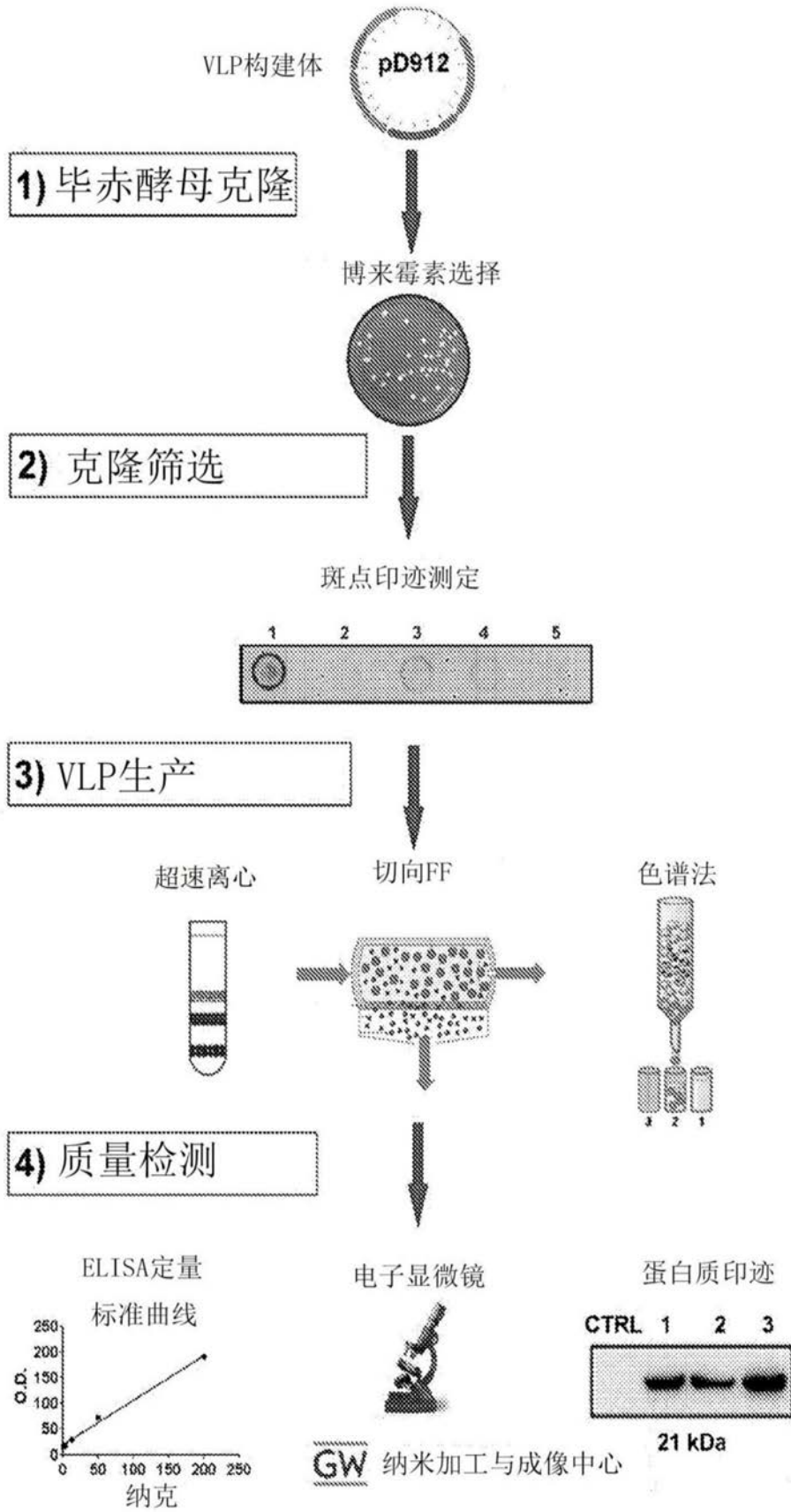


图4

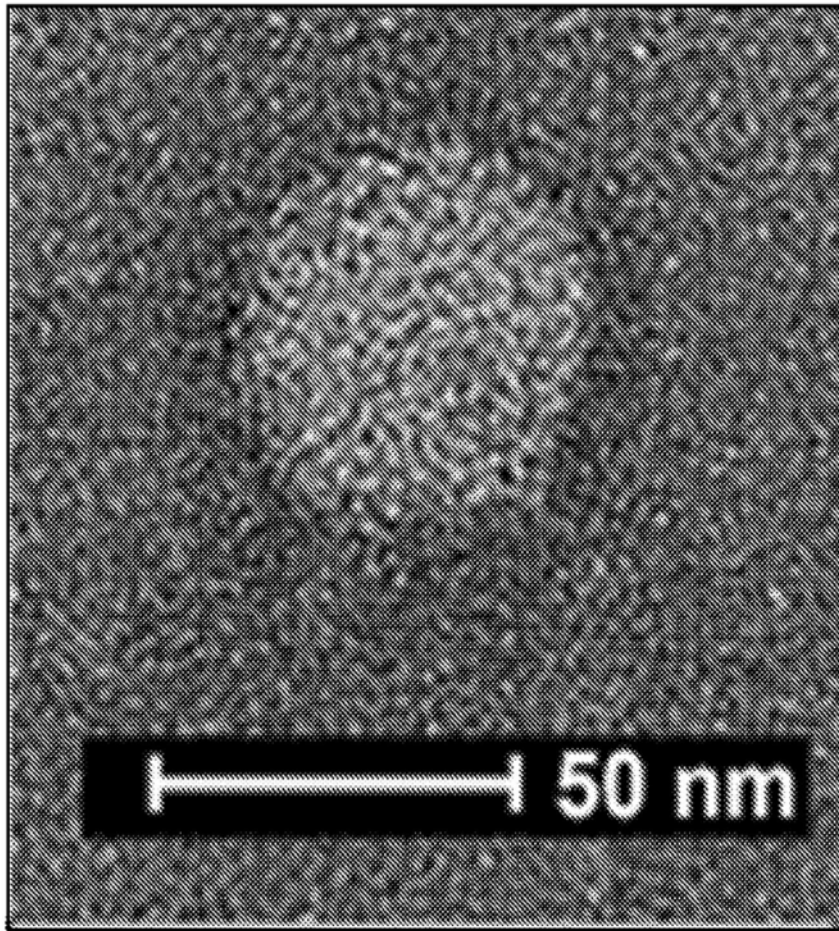


图5

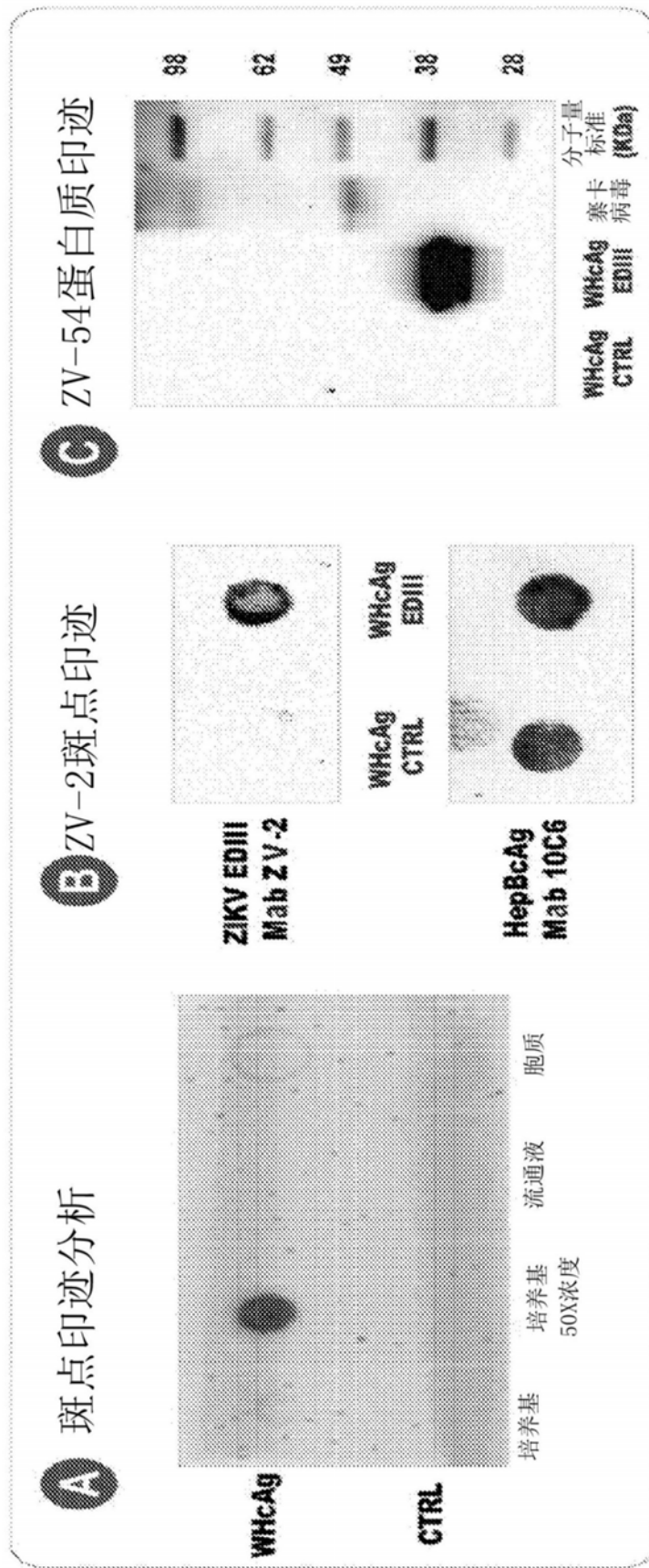


图6

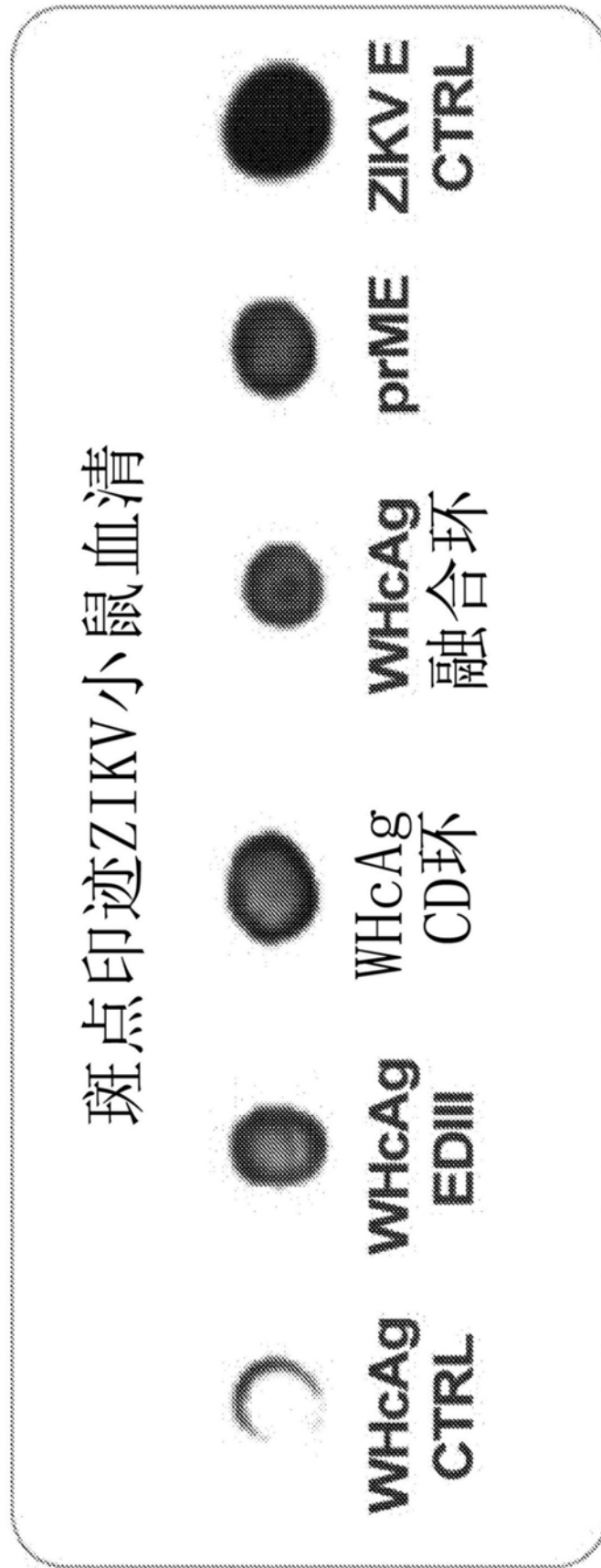


图7

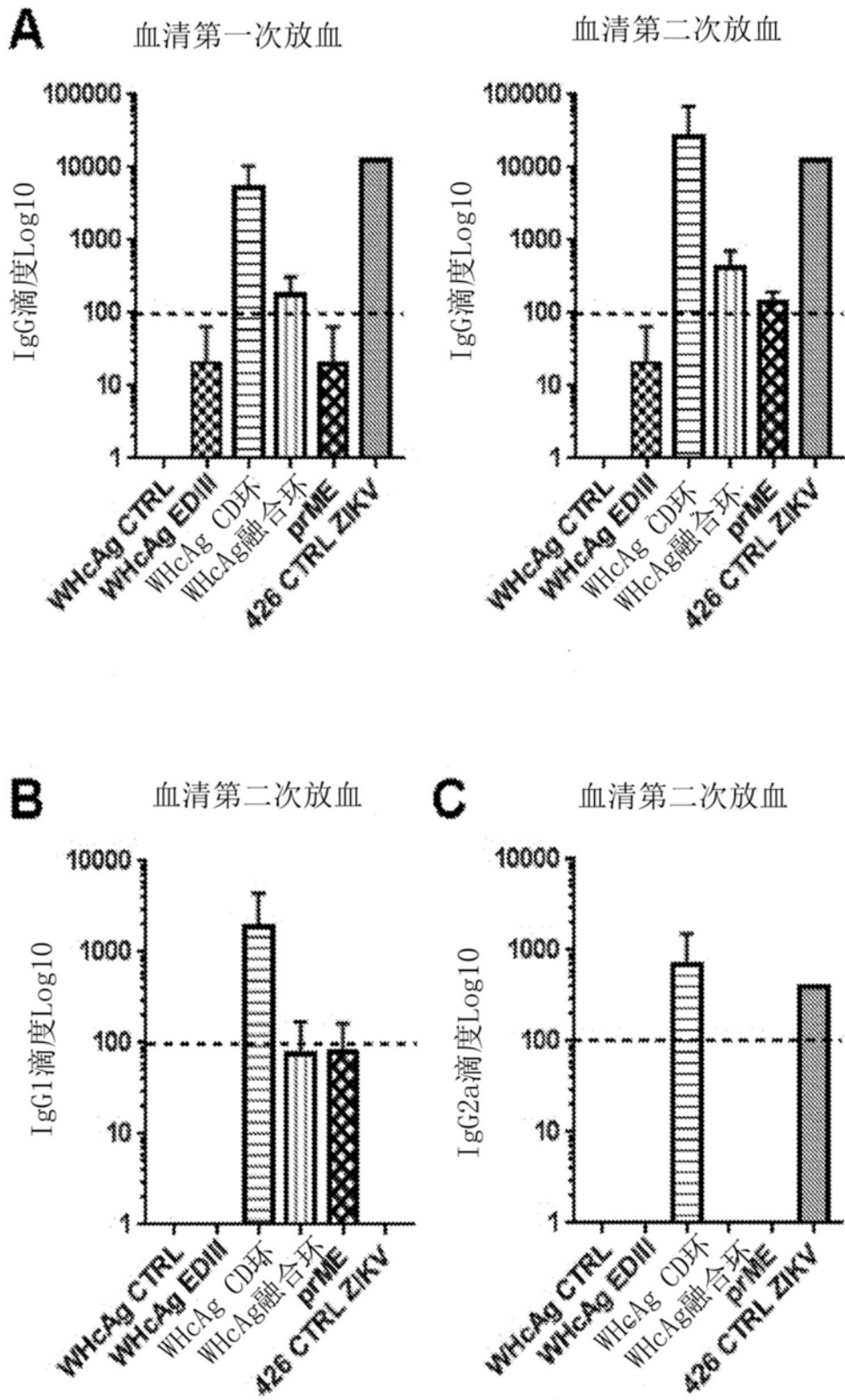


图8

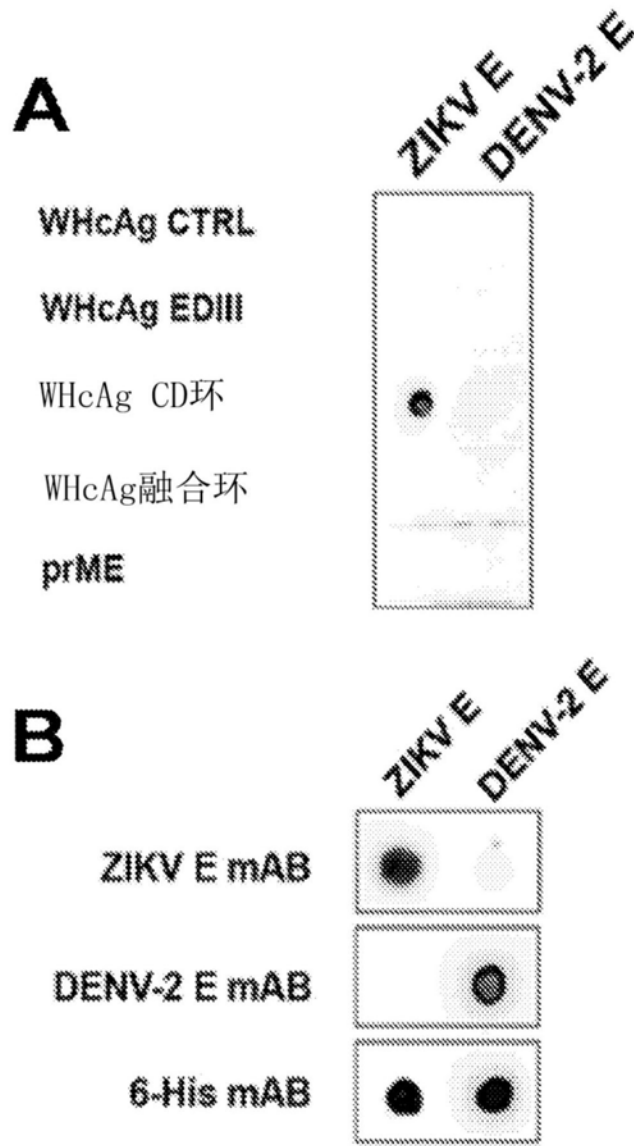
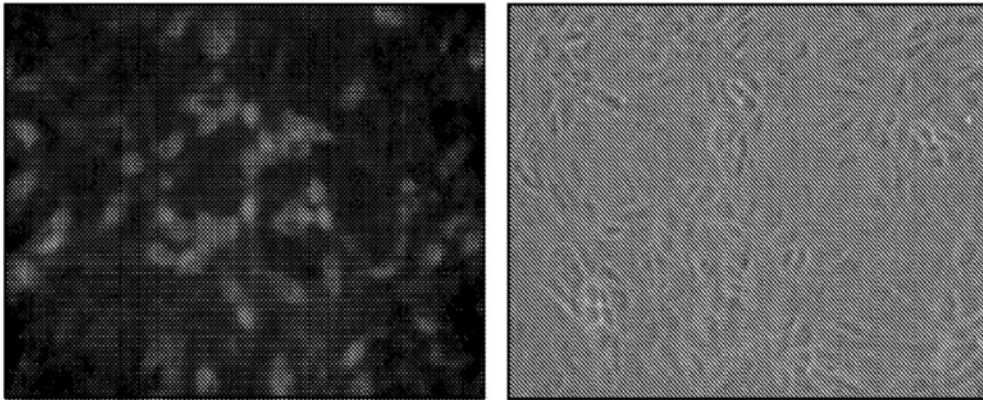


图9

血清WHcAg CD环

荧光

明场



血清WHcAg CTRL

荧光

明场

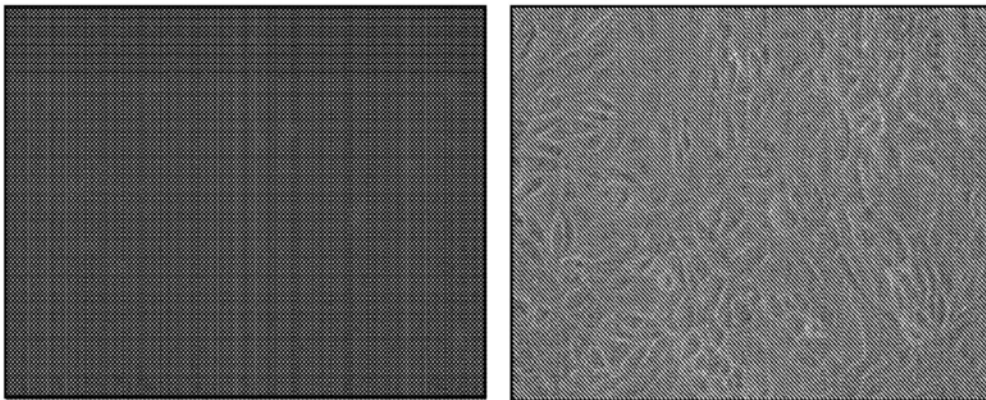


图10

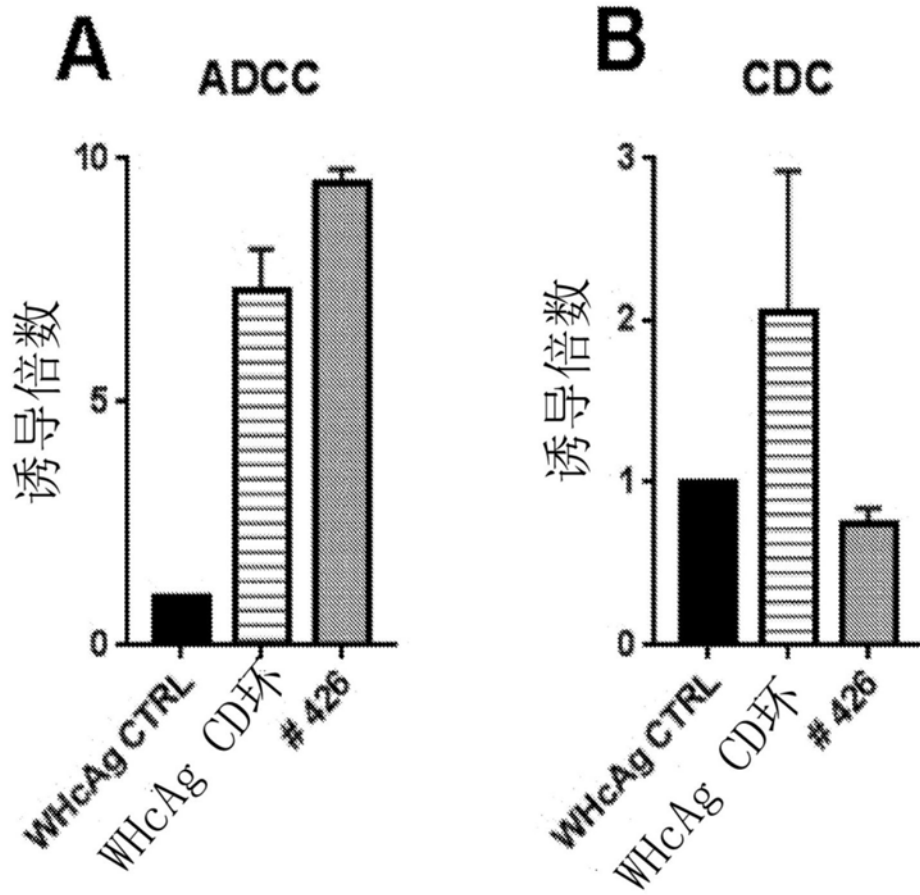


图11

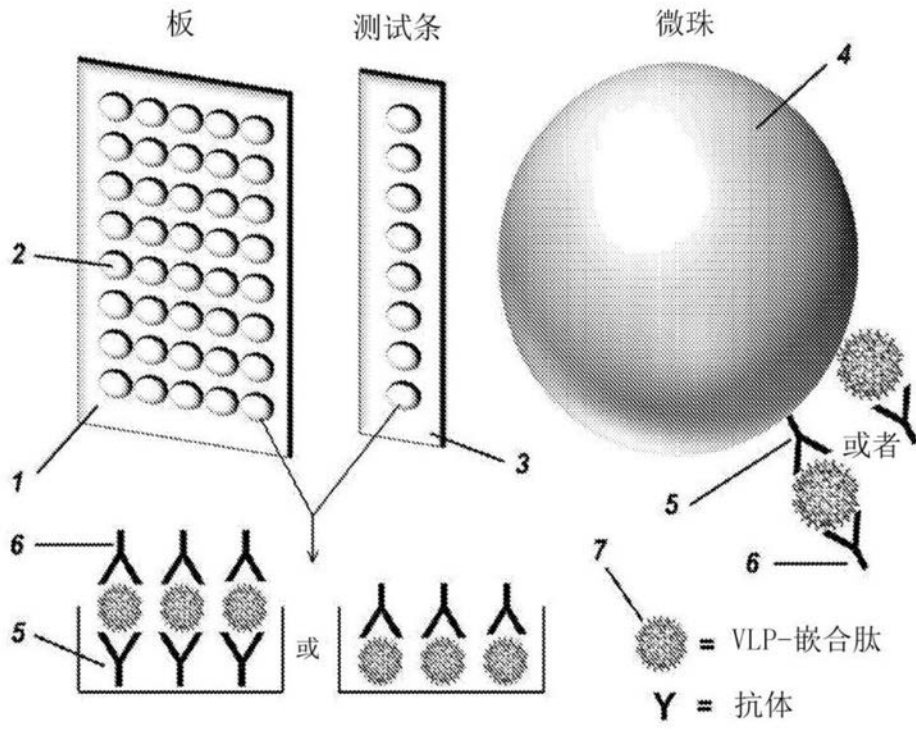


图12

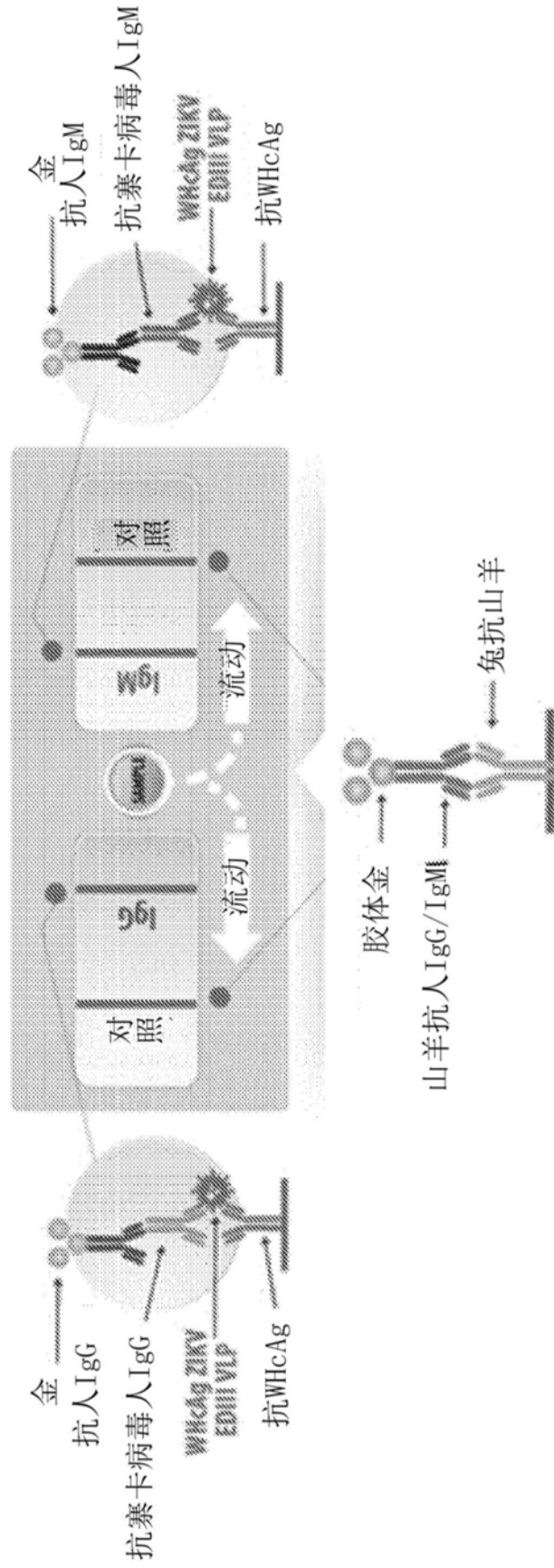


图13

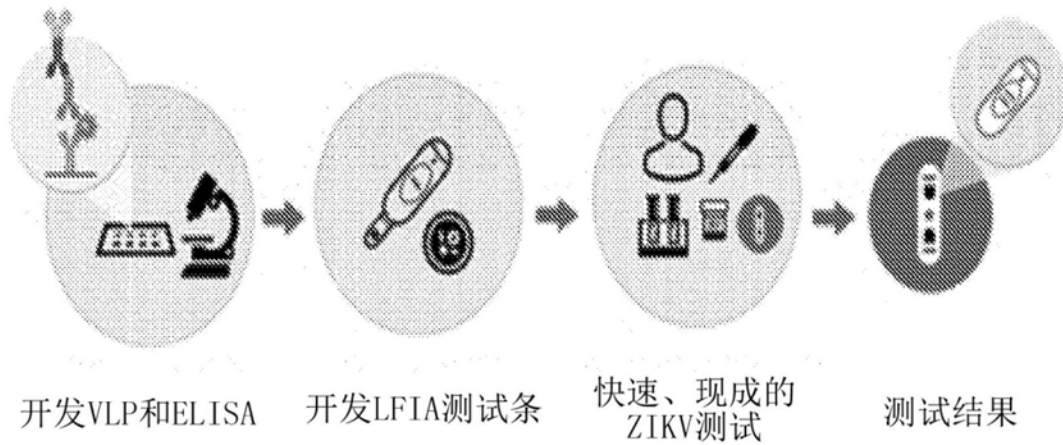


图14

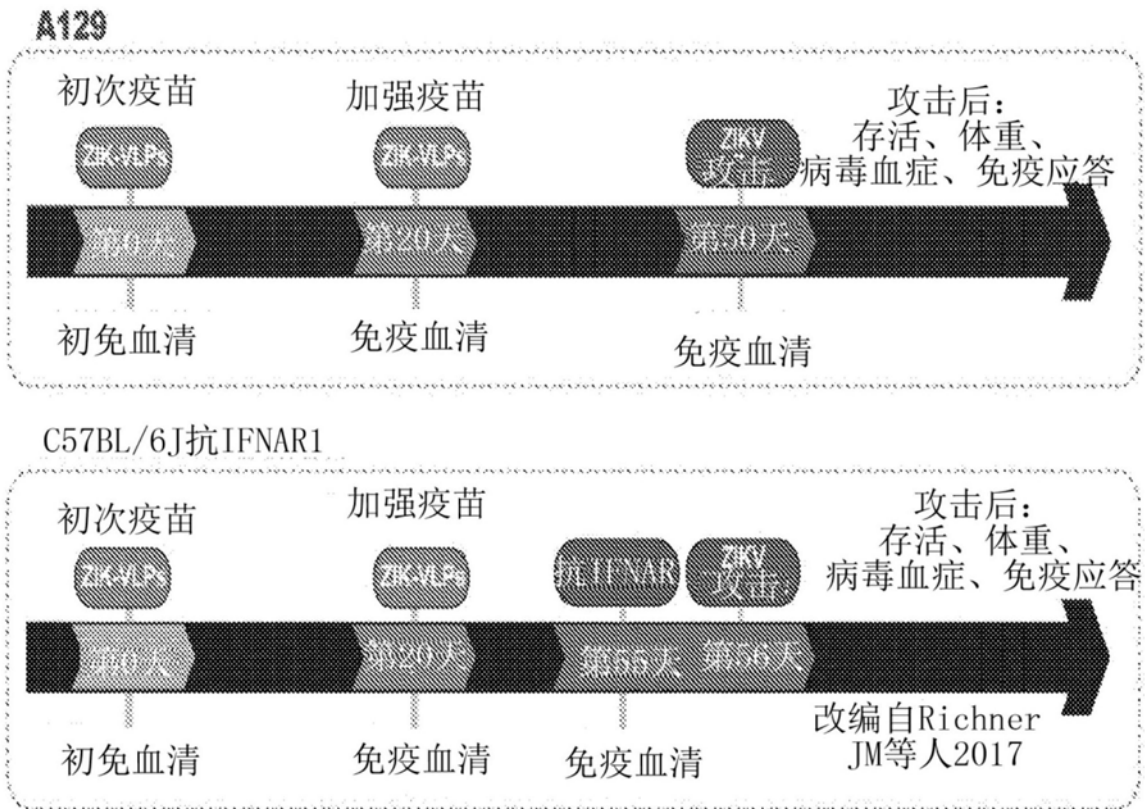


图15

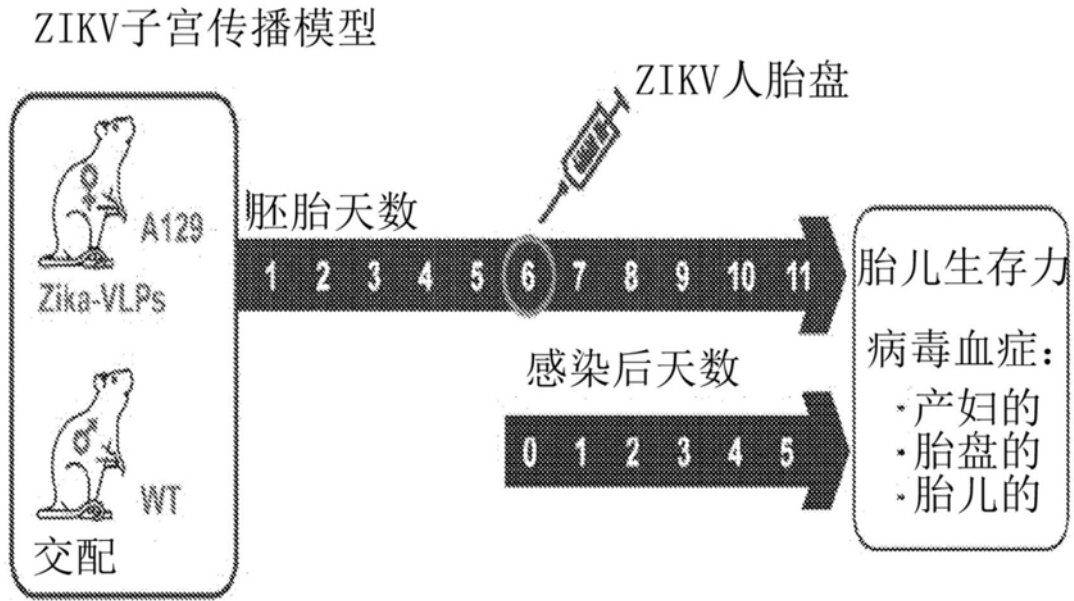


图16

血清病毒血症

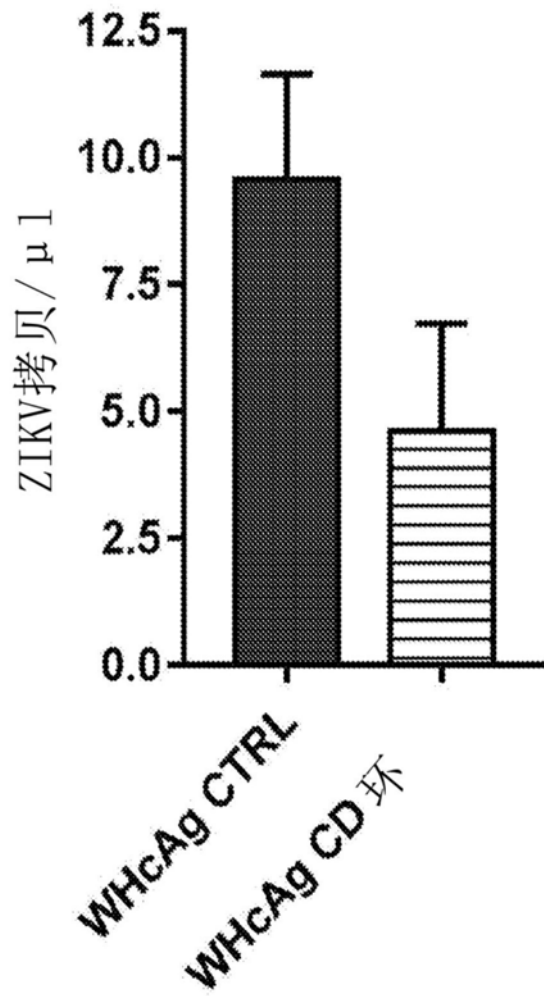


图17