

## 针对寨卡/登革病毒的重组抗原、其疫苗组合物及其应用

### 交叉引用

本申请要求于 2024 年 1 月 5 日提交的、申请号为 202410024322.3、发明名称为“针对寨卡/登革病毒的重组抗原、其疫苗组合物及其应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

### 技术领域

本申请涉及生物技术领域，具体涉及针对寨卡/登革病毒的重组抗原、其疫苗组合物及其应用。

### 背景技术

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是一种蚊媒病毒，属于黄病毒科黄病毒属，最早在非洲乌干达丛林中被发现。在 2007 年，寨卡病毒只是在非洲和亚洲热带地区散在流行，直到 2013 年在法国波利尼西亚群岛暴发，随后在 2015-2016 年美洲爆发的ZIKV疫情蔓延至全球的 84 个国家，其中也包括中国。但是到目前为止尚没有疫苗和药物可供使用。尽管现在全球的ZIKV感染发生率已经减弱，但是ZIKV仍对生活在流行区的人们构成威胁，因此对于ZIKV的疫苗研发刻不容缓。

登革病毒(Dengue virus, DV)是登革热(Dengue fever, DF) 的致病原，主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊等媒介昆虫传播，在热带和亚热带地区广泛分布，在有些国家DV感染甚至成为儿童住院和死亡的主要原因。据世界卫生组织( WHO) 统计显示，登革热目前已经在 100 多个国家和地区流行，全球有 25 -30 亿人生活在登革热流行区域，每年约有 3.9 亿人感染，1 亿人出现临床症状，超过 200 万人发展为重症DF，超过 2 万人死亡。ZIKV和DV病毒的结构较为相似，均呈球形，有囊膜，囊膜表面含有囊膜(Envelope, E)蛋白，内部的病毒基因组是单股正链RNA，长度约 11kb，仅含有一个开放阅读框，经过翻译出的多聚蛋白可被切割成3个结构蛋白(C、prM、E)和7个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)。其中，C蛋白构成核衣壳；PrM蛋白在病毒成熟时，经酶裂解形成膜蛋白M后，固定于病毒包膜内层，是病毒诱发保护性免疫的重要协同成分，此外还有助于E蛋白的正确折叠及其结构的稳定；E蛋白是病毒包膜的主要糖蛋白，与病毒的细胞嗜性、红细胞凝集以及诱导红细胞凝集抑制抗体和中和抗体的产生等有关，是寨卡或登革病毒的主要保护性抗原。

E蛋白以二聚体形式存在，每个单体有三个结构域，分别是DI、DII和DIII，其中，DII头部(98-109 位氨基酸)包含一个高度保守的融合环区(fusion loop, FL)，其中，ZIKV和DV病毒的FL区域序列完全一致，均为D98-R99-G100-W101-G102-N103-G104-C105-G106-L107-F108-G109；FL区在病毒入侵的膜融合过程中起关键作用，在病毒感染过程中，免疫细胞会产生大量的针对FL的抗体。

DV属于黄病毒科黄病毒属，依抗原性不同分为 1、2、3、4 四个血清型。DV感染具有典型的抗体依赖的感染增强现象（antibody-dependent infection enhancement, ADE），当一种血清型病毒如DV-1 感染时，机体免疫细胞会产生对应的抗DV-1 抗体，然而，若再次感染另一种类的登革病毒如DV-2，之前产生的抗DV-1 抗体不仅不能中和DV-2 病毒，还会加重感染。

目前，登革疫苗有赛诺菲巴斯德公司的Dengvaxia和今年刚获批的日本武田制药公司的DVax，两者开发思路相似，均为减毒活疫苗，区别在于Dengvaxia使用黄热病毒减毒株 17D作为疫苗病毒骨架，DVax使用DV-2 减毒株PDK-53 作为疫苗病毒骨架，DVax可增强对DV-2 的免疫应答和保护，但对DV-3 和 4 保护较弱。疫苗Dengvaxia在无登革热感染人群中已展现出显著的ADE安全性问题，菲律宾发生了十几例儿童在接种Dengvaxia疫苗后出现重症登革热甚至死亡的案例，故该疫苗被严格限制在有登革热感染史的人群使用。在今年新公布的疫苗接种后 5 年的追踪数据中，DVax疫苗也在在无登革热感染人群中出现了潜在的ADE安全风险。

大量研究表明，E蛋白的疏水融合环（Fusion loop, FL）是诱导ADE效应的主要表位，也是E蛋白上一个主要的显性表位，从登革感染者筛选到的抗体中，41%抗体(46/112)都靶向FL（Dejnirattisai W. et al. Nature Immunology, (2016)）。为彻底消除疫苗的ADE效应，通常的思路是将FL表位突变，使其不能诱导FL抗体，同时，突变不能破坏E蛋白的其余表位或引起蛋白表达量的显著下降以确保疫苗能够诱导足够的中和抗体并产生免疫保护。然而，FL表位在黄病毒入侵宿主细胞时发挥诱导病毒囊膜与宿主细胞膜融合的重要功能，其氨基酸序列D98-R99-G100-W101-G102-N103-G104-C105-G106-L107-F108-G109 在整个黄病毒属都具有极高度保守性，在发明人的前期研究中，当将W101 突变为任一其余 25 种氨基酸时，E蛋白几乎不表达；在整个黄病毒属仅在与登革/寨卡病毒亲缘关系很远的昆虫特异性黄病毒FL中存在极少数的变异序列，然而这些变异序列应用于登革疫苗时，突变导致了E蛋白表达的大幅下降，疫苗无法提供有效的免疫保护。

鉴于现有技术中存在的上述问题，目前急需开发一种能够避免ADE效应的产生、同时具有较高免疫原性的寨卡/登革疫苗。

## **发明内容**

### 发明目的

针对现有技术中存在的问题或需求，本申请的目的在于提供一种能够避免ADE效应、同时也能高效表达并具有较高免疫原性的寨卡/登革病毒重组抗原、基于该重组抗原的疫苗组合物及其应用。

### 解决方案

为了实现上述目的，本申请通过在寨卡病毒培养过程中，加入FL表位抗体，定向诱导病毒FL区域的突变；由于寨卡病毒FL表位的氨基酸序列与登革病毒FL表位的氨基酸序列完全一致，发明人随后将上述在寨卡病毒FL表位和其余位置出现的点突变引入到登革疫苗中，获得了针对寨卡病毒/登革病毒的重组E蛋白抗原。所获得的针对寨卡病毒/登革病毒的重组E蛋白抗原可高效表达，具有针对寨卡病毒/登革病毒的较高的免疫原性，且能够避免诱导FL表位抗体的产生，从而实现降低或者消除ADE效应的效果。

具体地，本申请提供了如下技术方案：

第一方面，本申请提供了一种重组抗原，所述重组抗原具有寨卡病毒或登革病毒的E蛋白全长序列，其中所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

FL融合环区G106 位点突变；

FL融合环区W101 和G106 双位点突变；

FL融合环区W101、G106 双位点突变以及非FL融合环区第 125 位氨基酸的突变；

FL融合环区G102 和G106 双位点突变；

FL融合环区N103 和G106 双位点突变；

FL融合环区W101、N103 和 G106 三位点突变。

在优选的实施方案中，所述FL融合环区G106 位点突变为：G106V突变；

在优选的实施方案中，所述FL融合环区W101 和G106 双位点突变选自：（1）W101R和G106V，（2）W101G和G106V，和（3）W101L和G106V；

在优选的实施方案中，所述FL融合环区W101、G106 双位点突变以及非FL融合环区第 125 位氨基酸的突变为：FL融合环区W101R、G106V双位点突变和非融合环区第 125 位氨基酸向缬氨酸的突变；

在优选的实施方案中，所述FL融合环区G102 和G106 双位点突变为：G102R和G106V双位点突变；

在优选的实施方案中，所述FL融合环区N103 和G106 双位点突变选自：（1）N103T和G106V，（2）N103H和G106V，（3）N103K和G106V，（4）N103P和G106V，和（5）N103Y和G106V；

在优选的实施方案中，所述FL融合环区W101、N103 和 G106 三位点突变选自：（1）W101G、N103T和 G106V，和（2）W101G、N103K和G106V。

在一些优选的具体实施方案中，所述重组抗原具有 1 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；

W101R和G106V双位点突变；

W101G和G106V双位点突变；

W101L和G106V双位点突变；  
W101R、G106V和L125V三位点突变；  
G102R和G106V双位点突变；  
N103T和G106V双位点突变；  
N103H和G106V双位点突变；  
N103K和G106V双位点突变；  
N103P和G106V双位点突变；  
N103Y和G106V双位点突变；  
W101G、N103T和G106V三位点突变；  
W101G、N103K和G106V三位点突变。

在另一些优选的具体实施方案中，所述重组抗原具有 2 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；  
W101R和G106V双位点突变；  
W101G和G106V双位点突变；  
W101L和G106V双位点突变；  
W101R、G106V和M125V三位点突变；  
G102R和G106V双位点突变；  
N103T和G106V双位点突变；  
N103H和G106V双位点突变；  
N103K和G106V双位点突变；  
N103P和G106V双位点突变；  
N103Y和G106V双位点突变；  
W101G、N103T和G106V三位点突变；  
W101G、N103K和G106V三位点突变。

在另一些优选的具体实施方案中，所述重组抗原具有 3 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；  
W101R和G106V双位点突变；  
W101G和G106V双位点突变；  
W101L和G106V双位点突变；  
W101R、G106V和I125V三位点突变；  
G102R和G106V双位点突变；

N103T和G106V双位点突变；

N103H和G106V双位点突变；

N103K和G106V双位点突变；

N103P和G106V双位点突变；

N103Y和G106V双位点突变；

W101G、N103T和 G106V三位点突变；

W101G、N103K和G106V三位点突变。

在另一些优选的具体实施方案中，所述重组抗原具有 4 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；

W101R和G106V双位点突变；

W101G和G106V双位点突变；

W101L和G106V双位点突变；

W101R、G106V和I125V三位点突变；

G102R和G106V双位点突变；

N103T和G106V双位点突变；

N103H和G106V双位点突变；

N103K和G106V双位点突变；

N103P和G106V双位点突变；

N103Y和G106V双位点突变；

W101G、N103T和 G106V三位点突变；

W101G、N103K和G106V三位点突变。

进一步优选地，当所述重组抗原具有寨卡病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原还包括寨卡病毒的全长或部分prM蛋白序列或M蛋白序列。

进一步优选地，当所述重组抗原具有登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原还包括相应血清型的登革病毒的全长或部分prM蛋白序列或M蛋白序列；

在进一步优选的具体实施方案中，当所述重组抗原具有 1 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:2-14 所示所示的氨基酸序列；

在进一步优选的具体实施方案中，当所述重组抗原具有 2 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:16-28 所示的氨基酸序列；

在进一步优选的具体实施方案中，当所述重组抗原具有 3 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:30-42 所示的氨基酸序列；

在进一步优选的具体实施方案中，当所述重组抗原具有 4 型登革病毒的E蛋白全长

序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:44-56 所示的氨基酸序列。

第二方面，本申请提供了如上述第一方面所述的重组抗原的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：

在编码如权利要求 1-8 任一项所述重组抗原的核苷酸序列的 5'端加上Kozak序列以及信号肽的编码序列，3'端加上组氨酸标签的编码序列和终止密码子，进行克隆表达，筛选正确的重组子，然后将其转染表达系统细胞进行表达，收集细胞培养上清，从中分离获得所述重组抗原。

作为优选，所述表达系统细胞为哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞；

可选地，所述哺乳动物细胞为HEK293T细胞、293F系列细胞或CHO细胞；进一步可选地，所述 293F系列细胞为HEK293F细胞、Freestyle293F细胞或Expi293F细胞；

可选地，所述昆虫细胞为sf9 细胞、Hi5 细胞、sf21 细胞或S2 细胞；

可选地，所述酵母细胞为毕赤酵母细胞或者由其改造的酵母细胞；

可选地，所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。

在可行的实施方案中，所述信号肽可以为本领域中常用的任何信号肽；例如，所述信号肽可以为氨基酸序列如SEQ ID NO:57-61 之一所示的信号肽。

第三方面，本申请提供了编码如上述第一方面所述的重组抗原的多核苷酸。所述多核苷酸不受限于产生其的方法，例如，可以利用基因工程重组技术或化学合成方法获得。

所述多核苷酸可以为DNA或mRNA，优选为mRNA。

在优选的具体实施方案中，所述多核苷酸为具有如SEQ ID NO:62-113 之一所示序列的DNA，或与所述DNA相应的mRNA。

具体地，当所述重组抗原具有如SEQ ID NO:2-14 所示的氨基酸序列时，编码所述重组抗原的多核苷酸为具有如SEQ ID NO:62-74 所示序列的DNA，或与所述DNA相应的mRNA；当所述重组抗原具有如SEQ ID NO:16-28 所示的氨基酸序列时，编码所述重组抗原的多核苷酸为具有如SEQ ID NO:75-87 所示序列的DNA，或与所述DNA相应的mRNA；和/或，当所述重组抗原具有如SEQ ID NO:30-42 所示的氨基酸序列时，编码所述重组抗原的多核苷酸为具有如SEQ ID NO:88-100 所示序列的DNA，或与所述DNA相应的mRNA；和/或，当所述重组抗原具有如SEQ ID NO:44-56 所示的氨基酸序列时，编码所述重组抗原的多核苷酸为具有如SEQ ID NO:101-113 所示序列的DNA，或与所述DNA相应的mRNA。

上文所述“与所述DNA相应的mRNA”是指具有这样的序列的mRNA，即，将所指定DNA序列中的所有“T”替换为“U”所形成的RNA序列。

第四方面，本申请提供了包含如上述第三方面所述的多核苷酸的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒。

第五方面，本申请提供了一种疫苗或免疫原性组合物，其包括如上述第一方面所述的重组抗原，或如上述第三方面所述的多核苷酸，或如上述第四方面所述的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒作为活性成分。

在具体实施方案中，除了所述活性成分外，所述疫苗或免疫原性组合物还包含生理学可接受的媒介物、佐剂、赋形剂、载体和/或稀释剂。

在一些可行的实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为重组蛋白疫苗，其包括如上述第一方面所述的重组抗原和佐剂；

优选地，所述佐剂为选自以下佐剂中的一种或多种：铝佐剂、MF59 佐剂和、类MF59 佐剂、CpG佐剂、含QS-21 佐剂、AS系列佐剂（例如AS01 系列佐剂）和纳米颗粒佐剂。

在另一些可行的实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为DNA疫苗，所述DNA疫苗包括：

(i)真核表达载体；和

(ii)构建入所述真核表达载体中的、编码如上述第一方面所述重组抗原的DNA序列；

优选地，所述编码如上述第一方面所述重组抗原的DNA序列为如SEQ ID NO:62-113 之一所示的DNA序列；

优选地，所述真核表达载体选自pGX0001、pVAX1、pCAGGS和pcDNA系列载体。

在另一些可行的实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为mRNA疫苗，所述mRNA疫苗包括：

(I)编码如上述第一方面所述重组抗原的mRNA序列；和

(II)脂质纳米颗粒；

优选地，所述编码如上述第一方面所述重组抗原的mRNA序列为与如SEQ ID NO: 62-113 之一所示的DNA序列相应的mRNA序列。

在另一些可行的实施方案中，所述疫苗或免疫原性组合物为病毒载体疫苗，其包括：

(1) 病毒骨架载体；和

(2)构建入所述病毒骨架载体中的、编码如上述第一方面所述重组抗原的DNA序列；

优选地，所述编码如上述第一方面所述重组抗原的DNA序列为如SEQ ID NO:62-113 之一所示的DNA序列；

优选地，所述病毒骨架载体选自以下病毒载体中的一种或几种：腺病毒载体、慢病毒载体、痘病毒载体、流感病毒载体、腺相关病毒载体。

在可行的实现方式中，所述疫苗或免疫原性组合物为鼻喷剂、口服制剂、栓剂或胃肠外制剂的形式；

优选地，所述鼻喷剂选自气雾剂、喷雾剂和粉雾剂；

优选地，所述口服制剂选自片剂、粉末剂、丸剂、颗粒剂、软/硬胶囊剂、薄膜包衣

剂和膏剂；

进一步优选地，所述片剂为舌下片；

进一步优选地，所述颗粒剂为细粒剂；

进一步优选地，所述粉末剂为散剂；

进一步优选地，所述丸剂为小丸剂；

优选地，所述胃肠外制剂为经皮剂、软膏剂、硬膏剂、外用液剂、可注射制剂；进一步优选地，所述可注射制剂为可推注射剂。

第六方面，本申请提供了如上述第一方面所述的重组抗原，或如上述第三方面所述的多核苷酸，或如上述第四方面所述的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒在制备用于检测、预防和/或治疗寨卡病毒或登革病毒感染的药物中的用途。

优选地，所述药物为疫苗。

第七方面，本申请提供了一种预防和/或治疗寨卡病毒或登革病毒感染的方法，所述方法包括：向有需要的受试者施用预防和/或治疗有效量的以下物质：如上述第一方面所述的重组抗原、如上述第三方面所述的多核苷酸、如上述第四方面所述的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒和/或如上述第五方面所述的疫苗或免疫原性组合物。

所述“预防和/或治疗有效量”可根据给药对象、对象脏器、症状、给药方法等不同而存在差异，可以考虑剂型的种类、给药方法、患者的年龄和体重、患者的症状等，根据医生的判断来确定。

#### 有益效果

本申请的针对寨卡/登革病毒的重组抗原有效消除了E蛋白中的FL表位，避免了导致ADE的FL表位抗体的产生，从而可显著降低或消除ADE效应；同时，所述重组抗原能够维持E蛋白的正确构象，并具有与野生型相似或更高的蛋白表达量，经动物免疫实验证实，基于该重组抗原的寨卡/登革疫苗可在动物体内诱导较高的特异性抗体滴度和中和抗体滴度，从而能够提供有效的免疫保护，并且其所诱导的针对其他血清型E蛋白的交叉抗体滴度明显降低，因此疫苗的ADE风险也大幅降低。

此外，本申请提供的基于所述重组抗原获得的疫苗可以包括各种形式，如重组蛋白疫苗、核酸疫苗（如mRNA疫苗）、病毒载体疫苗（如腺病毒载体疫苗）、基于所述抗原序列的病毒减毒或灭活疫苗、其他骨架的嵌合疫苗等，可用于制备消除ADE效应的寨卡和/或登革疫苗，具有较好的临床应用价值和产业化前景。

#### **附图说明**

一个或多个实施例通过与之对应的附图中的图片进行示例性说明，这些示例性说明并不构成对实施例的限定。在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。

这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

图 1 显示实施例 1 所制备的DV1 mRNA疫苗的抗原表位检测结果，如实施例 4 所检测的。

图 2 显示实施例 1 所制备的DV2 mRNA疫苗的抗原表位检测结果，如实施例 4 所检测的。

图 3 显示实施例 1 所制备的DV3 mRNA疫苗的抗原表位检测结果，如实施例 4 所检测的。

图 4 显示实施例 1 所制备的DV4 mRNA疫苗的抗原表位检测结果，如实施例 4 所检测的。

图 5 显示通过酶联免疫吸附实验所检测的、各DV mRNA疫苗所诱导的针对病毒E蛋白的特异性抗体滴度，如实施例 6 所检测的。

图 6 显示通过病毒微量中和实验所检测的、各DV mRNA疫苗所诱导的针对相应血清型DV病毒的中和抗体滴度，如实施例 7 所检测的。

图 7 显示实施例 1 所制备的DV1 mRNA疫苗所诱导的针对DV2/3/4 和寨卡病毒E蛋白的交叉抗体滴度，如实施例 8 所检测的。

图 8 显示实施例 1 所制备的DV2 mRNA疫苗所诱导的针对DV1/3/4 和寨卡病毒E蛋白的交叉抗体滴度，如实施例 8 所检测的。

图 9 显示实施例 1 所制备的DV3 mRNA疫苗所诱导的针对DV1/2/4 和寨卡病毒E蛋白的交叉抗体滴度，如实施例 8 所检测的。

图 10 显示实施例 1 所制备的DV4 mRNA疫苗所诱导的针对DV1/2/3 和寨卡病毒E蛋白的交叉抗体滴度，如实施例 8 所检测的。

图 11 显示通过病毒微量中和实验所检测的、DV1-EM3-1 和DV2-EM3 mRNA疫苗所诱导的针对相应血清型DV病毒的中和抗体滴度，如实施例 9 所检测的。

图 12 显示实施例 1 所制备的DV1-EM3-1 mRNA疫苗所诱导的针对DV2/3/4 和寨卡病毒E蛋白的交叉抗体滴度，如实施例 9 所检测的。

图 13 显示实施例 1 所制备的DV2-EM3 mRNA疫苗所诱导的针对DV1/3/4 和寨卡病毒E蛋白的交叉抗体滴度，如实施例 9 所检测的。

图 14 显示实施例 1 所制备的DV1 mRNA疫苗免疫血清所诱导的针对DV2/3/4 病毒的在细胞水平的ADE效应，如实施例 10 所检测的。

图 15 显示实施例 1 所制备的DV2 mRNA疫苗免疫血清所诱导的针对DV1/3/4 病毒的在细胞水平的ADE效应，如实施例 10 所检测的。

图 16 显示实施例 1 所制备的DV3 mRNA疫苗免疫血清所诱导的针对DV1/2/4 病毒的在细胞水平的ADE效应，如实施例 10 所检测的。

图 17 显示实施例 1 所制备的DV4 mRNA疫苗免疫血清所诱导的针对DV1/2/3 病毒的在细胞水平的ADE效应，如实施例 10 所检测的。

图 18 显示实施例 1 所制备的DV4 mRNA疫苗免疫血清所诱导的针对DV2 病毒体内ADE效应，如实施例 11 所检测的。

图 19 显示采用实施例 12 所获得的四价登革mRNA疫苗小鼠血清，检测四价登革mRNA疫苗所诱导的针对FL表位的抗体水平，如实施例 14 所检测的。

图 20 显示采用实施例 12 所获得的四价登革mRNA疫苗小鼠血清，检测四价登革mRNA疫苗所诱导的针对四种血清型DV病毒的中和抗体滴度，如实施例 15 所检测的。

图 21 显示实施例 12 中记载的四价登革mRNA疫苗所诱导的针对DV1 和DV2 病毒的攻毒保护效果，如实施例 16 所检测的。

图 22 显示实施例 17 所制备的DV1 mRNA疫苗的抗原表位和抗原表达检测结果，如实施例 18 所检测的。

图 23 显示实施例 17 所制备的DV2 mRNA疫苗的抗原表位和抗原表达检测结果，如实施例 18 所检测的。

图 24 显示实施例 17 所制备的DV3 mRNA疫苗的抗原表位和抗原表达检测结果，如实施例 18 所检测的。

图 25 显示实施例 17 所制备的DV4 mRNA疫苗的抗原表位和抗原表达检测结果，如实施例 18 所检测的。

图 26 显示实施例 17 所制备的DV2 mRNA疫苗所诱导的针对DV2 病毒的攻毒保护效果，如实施例 19 所检测的。

图 27 显示实施例 20 所制备的登革病毒样颗粒的SDS-PAGE结果，如实施例 20 所检测的。

图 28 显示实施例 20 所制备的DV1-EM3-1 病毒样颗粒电镜负染结果，如实施例 21 所检测的。

图 29 显示实施例 20 所制备的DV2-EM3-1 病毒样颗粒电镜负染结果，如实施例 21 所检测的。

图 30 显示实施例 20 所制备的DV3-EM3 病毒样颗粒电镜负染结果，如实施例 21 所检测的。

图 31 显示实施例 20 所制备的DV4-EM3 病毒样颗粒电镜负染结果，如实施例 21 所检测的。

图 32 显示通过病毒微量中和实验所检测的、各DV重组蛋白疫苗所诱导的针对相应血清型DV病毒的中和抗体滴度，如实施例 22 所检测的。

图 33 显示通过病毒微量中和实验所检测的、四价DV重组蛋白疫苗所诱导的针对四

种血清型DV病毒的中和抗体滴度，如实施例 23 所检测的。

### 具体实施方式

为使本申请的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。

另外，为了更好的说明本申请，在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解，没有某些具体细节，本申请同样可以实施。在一些实施例中，对于本领域技术人员熟知的原料、元件、方法、手段等未作详细描述，以便于凸显本申请的主旨。

除非另有说明，本申请的实施将采用分子生物学(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技术，这些都在本领域的技术范围内。

此外，除非本文其它部分另有明确定义，否则本文所用的科技术语都具有本申请所属领域普通技术人员通常理解的含义。为了可以更容易地理解本申请，某些科技术语具体定义如下。

术语“包括”或其变换如“包含”或“包括有”等等将被理解为包括所陈述的元件或组成部分，而并未排除其它元件或其它组成部分。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值，包括但不限于 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$ ，因为这些变化适于进行所公开的方法。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或更多项的组合。

如本文所用，术语“或”应被理解为与如上定义的“和/或”具有相同的含义。例如，当分离列表中的项目时，“或”或“和/或”应被解释为包容性的，即，包括数量或元素列表中的至少一个，但也包括多于一个，以及任选地，额外的未列出的项目。

### 实施例 1：登革病毒mRNA疫苗的制备

本实施例中，设计了一系列编码登革病毒prME全长蛋白(即，包括prM蛋白+E蛋白)的mRNA构建体，包括：

DV1-WT (即，DV1 野生型)，编码如SEQ ID NO:1 所示的prME抗原蛋白；

DV1-EM3，编码如SEQ ID NO: 3 所示的prME抗原蛋白；

DV1-EM3-1，编码如SEQ ID NO: 4 所示的prME抗原蛋白；

DV2-WT (即，DV2 野生型)，编码如SEQ ID NO:15 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM3，编码如SEQ ID NO: 17 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM3-1, 编码如SEQ ID NO: 18 所示的prME抗原蛋白;

DV3-WT (即, DV3 野生型), 编码如SEQ ID NO:29 所示的prME抗原蛋白;

DV3-EM3, 编码如SEQ ID NO: 31 所示的prME抗原蛋白;

DV3-EM3-1, 编码如SEQ ID NO:32 所示的prME抗原蛋白;

DV4-WT (即, DV4 野生型), 编码如SEQ ID NO:43 所示的prME抗原蛋白;

DV4-EM3, 编码如SEQ ID NO: 45 所示的prME抗原蛋白;

DV4-EM3-1, 编码如SEQ ID NO: 46 所示的prME抗原蛋白。

接下来, 根据哺乳动物细胞密码子的偏爱性, 优化编码上述重组登革病毒prME抗原蛋白的核酸序列, 得到优化的核酸编码序列, 其中, DV1-WT、DV2-WT、DV3-WT、DV4-WT的优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:114-117 所示, DV1-EM3、DV1-EM3-1、DV2-EM3、DV2-EM3-1、DV3-EM3、DV3-EM3-1、DV4-EM3、DV4-EM3-1 的优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:63、64、76、77、89、90、102、103 所示; 然后, 在各核酸编码序列的 5'端添加Kozak序列和信号肽的核酸编码序列 (如SEQ ID NO:118, 其编码氨基酸序列如SEQ ID NO:58 所示的信号肽), 在其 3'端添加终止密码子后, 委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因合成, 再将所合成基因片段重组至实验室保存的pHRNT载体 (发明专利ZL202110224383.0) 上, 获得制备mRNA疫苗的模板质粒。

mRNA疫苗具体制备流程参照发明专利ZL202110224383.0 中公布的方法。简单讲, 将上述模板质粒通过酶切进行线性化, 然后使用T7 转录酶进行mRNA体外转录, 在转录过程中, 通过使用假尿苷或N1-甲基假尿苷等替换尿嘧啶, 获得修饰mRNA, 以提高mRNA在体内的蛋白表达量; 随后, 通过微流控技术对mRNA进行纳米颗粒包装; 包装时, 水相为mRNA溶液 (50 mM醋酸钠缓冲溶液, pH 4.0), 乙醇相为脂质混合液 (由可质子化的磷脂、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG修饰磷脂按摩尔比 50:10:38.5:1.5 比例配制), 水相和乙醇相的总流速为 12 ml/min, 水相和乙醇相体积比为 3: 1; 最后, 将包装完成的mRNA疫苗使用透析袋将缓冲液置换成PBS, 使用Thermo Fisher公司的Quan-iT RiboGreen RNA测定试剂盒测定包封的和游离的mRNA浓度, 并计算mRNA包装效率, 结果显示: 包装效率符合mRNA疫苗的标准; 之后, 将包封的mRNA置于 4°C保存待用。

## 实施例 2: 检测抗体的表达和分离纯化

本实施例中, 按照文献中公开的抗体重链、轻链序列及其表达质粒的构建方法, 分别构建了登革病毒 prME 蛋白不同表位的检测抗体 Z5 (Wang, Q. H. et al. Sci Transl Med 8, (2016))、Z6 (Dai, L. et al. Nat Immunol 22, 958-968, (2021))、4G2 (Dai, L. P. et al. Nat Immunol 22, 958-968, (2021))、MZ24 (Dussupt, V. et al. Nat Med 26, 228-35, (2020))、Ab513 (Robinson, L. N. et al. Cell 162, 493-504, (2015))、1F4 (Fibriansah, G. et al. Embo Mol Med

6, 358-371, (2014))、3H5 (Renner, M. et al. Nature Immunology 19, 1248-56, (2018))、MZ-1 (Dussupt, V. et al. Nat Med 26, 228-35, (2020))、MZ-4 (Dussupt, V. et al. Nat Med 26, 228-35, (2020))、5J7 (Fibriansah, G. et al. Embo Journal 31, 767-779, (2012)) 和 5H2 (Cockburn, J. J. B. et al. Embo Journal 31, 767-779, (2012)) 的重链、轻链表达质粒。

其中, Z5、Z6 和 4G2 抗体识别寨卡和登革病毒的 FL 表位, 其余抗体 (MZ-1, MZ-4, MZ24, Ab513, 1F4, 3H5, 5J7, 和 5H2) 均为可识别非 FL 表位的高中和活性抗体。

#### 抗体表达

在转染前的 14-16 h, 将 293T 细胞密度较大的细胞分盘 (如, 一盘 100% 铺满 293T 细胞的 10 cm 培养皿以 1: 3 进行传代), 14-16 h 后, 细胞密度达到 70% 以上即可进行转染。转染时, 将按上述构建的抗体的重链、轻链表达质粒以 2: 3 的比例共转染 293T 细胞, 转染 4-6 小时后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 换成无血清 DMEM 培养基继续培养; 分别于转染后第 3 天和 7 天收取细胞上清, 离心去除细胞碎片, 将两次获得的抗体上清混合, 用于后续的抗体蛋白纯化。

#### 抗体纯化

将 Protein A (5 ml) HP 亲和柱 (购自 GE 公司) 连接于 AKTA Purifier/Explorer/FPLC/START (GE 公司) 上, 在仪器上的操作过程如下: 先用水将柱中的 20% 乙醇冲出, 再用 20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 的缓冲液平衡柱子, 待仪器上电导平稳后, 将上述抗体上清通过 10 ml loop 环上样的方式注入以与 Protein A 结合, 流速 2 ml/min, 待 UV 平稳后, 在随后的收集管中加入 1M Tris pH9.0 缓冲液约 0.8 ml (收集体积约 3.2 ml), 然后在程序上改为 100% 的 0.1 M Gly pH3.0 洗脱结合在柱子上的抗体, 收集洗脱液, 然后采用浓缩换液的方法, 将抗体缓冲液置换成 PBS, 所得抗体溶液可直接使用或分装保存于 -80°C 冰箱以备后用。

#### **实施例 3: 登革和寨卡病毒 E 蛋白的表达纯化**

本实施例中, 按照文献 (Kudlacek, S. T. et al. Sci Adv 7, (2021)) 中公开的登革和寨卡病毒 E 蛋白二聚体可溶性表达的方法构建登革和寨卡病毒的 E 蛋白表达质粒。

具体地, 分别将 DV1 (THSTI-TRC-DV1-08 株, GenBank: OP310803.1)、DV2 (New Guinea C 株, GenBank: KM204118.1)、DV3 (YN02 株, GenBank: KF824903)、DV4 (中国广州 B5 株, GenBank: AF289029) E 蛋白 1-395 位氨基酸编码基因, ZIKV-SMGC-1 (GenBank: KX266255) E 蛋白 1-404 位氨基酸编码基因 (其中为使 E 蛋白形成稳定的二聚体, DV1、DV2 和 DV4 E 蛋白含有 A259C 突变, DV3 E 蛋白含有 A257C 突变, ZIKV E 蛋白含有 A264C 突变) 按照哺乳细胞密码子偏好性进行优化, 得到上述各病毒 E 蛋白片段的优化的核酸编码序列, 分别如 SEQ ID NO:120-124 所示; 然后在上述核酸编码序列的 5' 端加入 Kozak 序列和信号肽的编码序列 (如 SEQ ID NO:119 所示,

其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示的信号肽), 在 3'端加入 His 标签用于蛋白的分离纯化, 委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因合成, 再将所合成基因片段通过 5'EcoRI 和 3'XhoI 双酶切克隆至 pCAGGS 载体, 构建 E 蛋白表达质粒 pCAGGS-DV1-sE, pCAGGS-DV2-sE, pCAGGS-DV3-sE, pCAGGS-DV4-sE, pCAGGS-ZV-sE。使用 HEK293F 细胞进行蛋白表达, 使用 HisTrap™Mexcel 亲和层析柱和 Superdex200 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱进行蛋白的纯化。

挑选生长状态良好的 HEK293F 细胞, 转染前一天以  $1-1.5 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度接种至新 SMM293-TII 培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 150rpm 恒温摇床培养。转染当天调整细胞密度至  $2.5 \times 10^6$  cell/ml。配制转染试剂(以 10ml 细胞为例), 用 150 mM 的 NaCl 稀释 10 ug 质粒至总体积为 250 ul, 温和混匀; 用 150 mM 的 NaCl 稀释 Sinofection 转染试剂至总体积 250ul, 温和混匀; 将稀释好的质粒和转染试剂同时单独静置约 5min 后温和混匀, 总体积 500ul, 再室温静置 10 min。将转染液逐滴加入到细胞培养液中, 滴加的同时轻轻摇动培养瓶, 摇匀后放回摇床继续培养。在转染后第 24h 加入 350ul SMS-293-SUPI 加料液, 此后每隔 48h 添加一次加料液(350ul)。转染 5 天后, 收集上清进行蛋白纯化。

将转染 5 天后的细胞上清液收集, 8000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 1h 之后, 将上清液用 0.22 um 滤膜抽滤。His 亲和层析纯化: 先用经 0.22um 滤膜抽滤过的水冲洗 HisTrap™ excel 亲和层析柱, 冲洗约 3-5 个柱体积。之后, 再用 HisTrap 亲和层析平衡液冲洗层析柱, 至 UV 及电导两个检测线平稳, 认为层析柱已被平衡完成。然后, 将细胞上清液以 1-2 mL/min 流速流经层析柱, 使蛋白结合于层析柱。待所有上清都流经层析柱后, 用 5-10 个柱体积的亲和层析平衡液冲洗层析柱, 直至 UV 检测线平稳。最后, 依次用含有 50mM、300mM、1 M 咪唑的洗脱液冲洗层析柱, 将收集到的蛋白制样后用 SDS-PAGE 鉴定。进一步用 Superdex 200 Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析纯化, 将亲和层析获得的样品, 使用 10kDa 超滤浓缩管浓缩至 800ul 以下后, 转移至 1.5 mL 离心管中。12000 g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 20 min 后, 在确保没有吸到沉淀的情况下, 将样品换至新的 1.5 mL 离心管中。12000 g,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 20 min 去除样品中的气泡, 准备上样。将 Superdex 200 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱用凝胶过滤层析平衡液以最大 0.5mL/min 流速平衡至 UV 检测线平稳, 使用 1 mL loop 环上样。上样后, 用 20/50 平衡液(20mM Tris, 50mM NaCl) 以 0.5 mL/min 流速冲洗层析柱, 设置峰收集, 收集出峰处的样品。将收集的样品制样后用 SDS-PAGE 鉴定。将经鉴定表达正确的样品用 10kDa 超滤浓缩管浓缩并分装保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱以备后用。

#### 实施例 4: 登革病毒 mRNA 疫苗的抗原表达检测

在本实施例中, 我们将实施例 1 中制备的一系列登革病毒 prME mRNA 疫苗转染

293T 细胞,之后使用实施例 2 中所制备的 FL 表位抗体和其它中和表位抗体检测各 prME 中各表位情况以及蛋白表达量。

具体地,以含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养 HEK293T 细胞,转染前,使细胞密度达到 70%以上,用实施例 1 构建的 mRNA 疫苗转染 HEK293T。转染 12 小时后,弃掉细胞培养上清,用胰蛋白酶消化并收集细胞,使用 PBS 清洗细胞后,加入细胞固定通透液(BD 公司 Cytofix/Cytoperm™Fixation/Permeabilization Kit),冰上孵育 20 分钟,使用 1×洗涤液(BD 公司 Cytofix/Cytoperm™Fixation/Permeabilization Kit)洗涤细胞两次后,加入实施例 2 中的可识别登革 prME 蛋白不同表位的抗体 Z5、Z6,冰上避光孵育 30 分钟,用 1×洗涤液洗涤细胞两次后,加入 FITC 标记的羊抗人二抗(美国 Abcam),冰上避光孵育 30 分钟,1×洗涤液洗涤细胞两次后,用 PBS 重选细胞,在 BD FACSAria III 流式细胞仪上检测细胞荧光,数据使用 FlowJo 7.6.1 进行分析。

结果如图 1-4 所示,图 1-4 结果显示:

对于 DV1 mRNA 疫苗,FL 表位抗体(Z5 和 Z6)可与 DV1-WT 结合但不与两个突变体(DV1-EM3 和 DV1-EM3-1)结合,表明在两个突变体中,FL 表位已经被破坏;其它中和表位抗体(MZ24、Ab513 和 1F4)则既可以与 DV1-WT 结合也可以与两个突变体结合,表明在两个突变体中其它中和表位没有发生改变,并且两个突变体的蛋白表达量与野生型相似;

对于 DV2 mRNA 疫苗,FL 表位抗体(Z5、Z6 和 4G2)与 DV2-WT 结合但不与两个突变体 DV2-EM3 和 DV2-EM3-1,表明在两个突变体中,FL 表位已经被破坏;其它中和表位抗体(3H5、MZ-1 和 MZ-4)则既可以与 DV2-WT 结合也可以与两个突变体结合,表明在两个突变体中其它中和表位没有发生改变,并且两个突变体的蛋白表达量与野生型相似;

对于 DV3 mRNA 疫苗,FL 表位抗体(Z5 和 Z6)与 DV3-WT 结合但不与两个突变体 DV3-EM3 和 DV3-EM3-1 结合,表明在两个突变体中,FL 表位已经被破坏;其它中和表位抗体(MZ24、Ab513 和 5J7)则既可以与 DV3-WT 结合也可以与两个突变体结合,表明在两个突变体中其它中和表位没有发生改变,并且两个突变体的蛋白表达量与野生型相似;

对于 DV4 mRNA 疫苗,FL 表位抗体(Z5 和 Z6)与 DV4-WT 结合但不与两个突变体 DV4-EM3 和 DV4-EM3-1 结合,表明在两个突变体中,FL 表位已经被破坏;其它中和表位抗体(MZ24、Ab513 和 5H2)则既可以与 DV4-WT 结合也可以与两个突变体结合,表明在两个突变体中其它中和表位没有发生改变,并且两个突变体的蛋白表达量与野生型相似。

上述结果表明,在上述所有突变体中,FL表位均被破坏,而其它中和抗体表位维持

不变，并且突变体的蛋白表达量与野生型相当或更高。即，本申请的重组抗原中的FL表位被破坏，这避免了导致ADE的FL表位抗体的产生，从而可显著降低或消除ADE效应；同时，所述重组抗原能够与其它中和表位抗体正常结合，表明其具有E蛋白的正确构象；并且，所述重组抗原具有与野生型相似或更高的蛋白表达量。

#### **实施例 5：登革病毒 mRNA 疫苗小鼠免疫实验**

本实施例中，使用雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）进行疫苗免疫实验；实验分为 mRNA 疫苗免疫组和阴性对照组（即，Sham 组），每组 6 只；对于各免疫组，分别在第 0 天和第 14 天肌肉注射安慰剂（生理盐水，作为 Sham 组）或实施例 1 制备的登革 mRNA 疫苗，每次注射剂量为 12  $\mu$ g/只，并在免疫后第 4 周取血，4 $^{\circ}$ C 分离血清并 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 分钟后保存于 -80 $^{\circ}$ C 待用。

#### **实施例 6：酶联免疫吸附实验（ELISA）检测免疫小鼠血清中的特异性抗体滴度**

本实施例中，通过 ELISA 实验，检测实施例 5 获得的免疫小鼠血清中针对抗原 E 蛋白的特异性抗体滴度。

具体地，采用以下程序：

（1）分别将实施例 3 制备的登革病毒或寨卡病毒 E 蛋白用 ELISA 包被液（索莱宝，C1050）稀释至 2  $\mu$ g/ml，96 孔 ELISA 板（Coring，3590）每孔加入 100 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 放置 12 小时；

（2）倒掉包被液，加入 PBS，洗一遍；将 PBS 配制的 5% 脱脂牛奶作为封闭液加入 96 孔板中，每孔 100  $\mu$ l，室温放置 1 小时，进行封闭；封闭完成后，用 PBS 溶液洗一遍；

（3）在步骤（2）封闭期间，用封闭液稀释小鼠血清样品，血清样品从 10 倍起始，以 2 倍梯度进行稀释；之后，在 ELISA 板中每孔加入 100  $\mu$ l 免疫血清稀释液，阴性对照为加入封闭液，37 度孵育 2 小时，之后使用 PBST 洗 4 遍；

（4）加入使用封闭液 1：2000 稀释的偶联 HRP 的羊抗鼠二抗（Abcam，ab6789），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，之后 PBST 洗 5-6 遍；加入 TMB 显色液显色，反应适当时间后，加入 2 M 盐酸终止反应，在酶标仪上检测 OD450 读值。

抗体滴度值被定义为反应值大于 2.1 倍阴性对照值的血清最高稀释倍数。当最低稀释倍数（检测限）的反应值仍小于 2.1 倍背景值时，该样品的滴度定义为最低稀释倍数的一半，即 1：5。

ELISA 实验结果如图 5 所示，图 5 显示：DV1-EM3 可诱导与 DV1-WT 相似的 DV1 病毒 E 蛋白特异性抗体滴度；DV2-EM3-1、DV4-EM3 和 DV4-EM3-1 疫苗也诱导了与对应的野生型疫苗相似的抗体滴度；与 DV3-WT 相比，DV3-EM3 和 DV3-EM3-1 诱导的 DV3 病毒 E 蛋白特异性抗体滴度虽然降低但其抗体滴度值依然较高（>10,000）。

上述结果表明,本申请的重组抗原可在小鼠体内诱导高水平的特异性结合抗体,提示其具有较高的免疫原性,可诱导高水平的免疫保护效应。

#### **实施例 7: 登革病毒微量中和实验检测免疫小鼠血清中的中和抗体滴度**

本实施例中,通过登革病毒微量中和实验,定量测定实施例 5 中的各 mRNA 疫苗免疫小鼠血清中对相应血清型登革病毒的中和抗体滴度,其具体操作步骤如下:

提前一天将 Vero 细胞接种于 24 孔细胞培养皿中,待第二天细胞生长至汇合度大于 70%时用于中和试验;用含 1% FBS (Gibco, 10270-106)的 DMEM 培养基 (Invitrogen, C11995500BT)梯度稀释血清,病毒也用含 1%FBS 的 DMEM 培养基稀释,把血清和病毒液各 200ul 等体积混合,同时,稀释后的病毒与等体积的空白培养基混合,作为阳性对照,置于 37°C 孵育 30 min;孵育完成后将 VERO 细胞板中的上清培养基移除,将上述混合液加入细胞中,350  $\mu$ l/孔,在 37°C 培养箱中孵育 1 小时后每孔补加含 1% FBS 的 DMEM 培养基 150ul,置于 37°C 培养箱中继续培养 3 天;3 天后取出细胞培养板,弃去全部上清并用 PBS 洗细胞一遍;然后每孔加入 150 $\mu$ L 胰蛋白酶消化细胞,37°C 恒温培养箱静置 5 分钟,再向孔内加入 150 $\mu$ L 含有 10%FBS 的 PBS 终止胰酶消化;将消化后的细胞吹散混匀,将 24 孔板中的细胞全部转移至 96 孔尖底板离心收集细胞后再用 PBS 清洗一遍细胞;然后向 96 孔圆底板中每孔加入 100 $\mu$ L Fixation and Permeabilization solution(BD, 554722)1, 4°C 避光固定 30 分钟后,800g 离心 5 分钟收集细胞并用 1 $\times$ Perm/Wash buffer(BD, 554723)洗两遍;加入 AF-488 标记的 Z6 抗体(Z6- AF488),100 $\mu$ l 每孔,4°C 避光染色 30 分钟。染色结束后,离心收集细胞,并用 1 $\times$ Perm/Wash buffer 洗两遍;最后用 200 $\mu$ L PBS 重悬细胞,转移至流式管中,用 FACS Canto II 检测细胞的 FITC 荧光阳性率。使用 GraphPad Prism 软件对数据进行非线性拟合计算中和 50%的细胞感染时相应的血清稀释倍数,即为中和滴度值(IC50)。当最低稀释倍数的血清仍无法中和 50%的细胞感染时,定义该样品的 IC50 为最低稀释倍数的一半。

结果如图 6 所示,图 6 显示:与相应的 WT 疫苗相比, DV1-EM3、DV2-EM3-1、DV3-EM3 和 DV4-EM3 疫苗均诱导了相当的病毒中和抗体滴度, DV3-EM3-1 和 DV4-EM3-1 诱导的病毒中和抗体滴度略低。特别是,与 DV3-WT 相比, DV3-EM3 疫苗诱导了较少的结合抗体(图 5),但疫苗血清中和活性并未下降(图 6),表明: DV3-EM3 疫苗诱导了更高比例的高中和活性抗体。

上述结果表明,本申请的重组抗原可在小鼠体内诱导高水平的中和抗体滴度,提示其具有较高的免疫原性,从而可诱导高水平的免疫保护效应。

#### **实施例 8: 交叉抗体滴度测定**

由于 FL 表位在登革病毒和寨卡病毒高度保守, FL 表位抗体具有广谱性,即此类抗体可交叉结合所有血清型登革病毒和寨卡病毒的 E 蛋白,但此类抗体一般对病毒中和活

性差,容易诱导 ADE 效应。任一血清型登革病毒疫苗所诱导的 FL 表位抗体可交叉结合其余三种血清型登革病毒和寨卡病毒 E 蛋白,故评估疫苗的交叉抗体滴度可反映疫苗所诱导的 FL 表位抗体量以及疫苗的 ADE 风险。交叉抗体滴度通过 ELISA 方法测定,具体方法参照实施例 6。

实施例 5 中各 mRNA 疫苗免疫所诱导的交叉抗体滴度测定结果如图 7-10 所示,图 7-10 显示:

对于 DV1 疫苗, DV1-WT 诱导的大量抗体可交叉结合 DV2/3/4 和 ZIKV 病毒 E 蛋白,而 DV1-EM3 的交叉抗体滴度则显著降低,在个别小鼠中甚至检测不到交叉结合抗体,可推测 DV1-EM3 疫苗针对 DV2/3/4 和 ZIKV 病毒的 ADE 风险显著降低;

DV2/3/4 疫苗也具有相似的结果,即,与相应的 WT 疫苗相比,各突变体疫苗所诱导的交叉抗体滴度大幅显著下降,其 ADE 风险也大幅显著降低。

上述结果表明,本申请的重组抗原诱导的针对其他血清型 DV 或 ZIKV 病毒 E 蛋白的交叉抗体显著降低,从而大幅降低了疫苗诱导 ADE 效应的风险,具有较高的安全性。

#### **实施例 9: DV1-EM3-1 和 DV2-EM3 疫苗血清中和抗体滴度和交叉抗体滴度测定**

本实施例对实施例 5 获得的 DV1-EM3-1 和 DV2-EM3 疫苗免疫小鼠血清进行中和抗体滴度和交叉抗体滴度测定,其中中和抗体滴度测定方法参照实施例 7,交叉抗体滴度测定方法参照实施例 8。

血清中和抗体滴度测定结果如图 11 所示,图 11 显示:与相应的 WT 疫苗相比, DV1-EM3-1、诱导了相当的病毒中和抗体滴度, DV2-EM3 诱导的中和抗体滴度虽有下降但仍然在 1,000 以上,均展现出良好的免疫原性。

交叉抗体滴度测定结果如图 12-13 所示,图 12-13 显示:与 WT 疫苗相比, DV1-EM3-1 与 DV2-EM3 疫苗所诱导的针对异血清型登革病毒和寨卡病毒的交叉抗体滴度显著大幅降低,由此推测,其针对异血清型登革病毒和寨卡病毒的 ADE 风险也大幅降低。

#### **实施例 10: 疫苗诱导的体外 ADE 效应评价**

本实施例中,使用雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)进行疫苗免疫实验;实验分为 mRNA 疫苗免疫组和阴性对照组(即, Sham 组),每组 8 只;对于各免疫组,分别在第 0 天和第 21 天肌肉注射安慰剂(生理盐水,作为 Sham 组)或实施例 1 制备的 DV1-WT、DV2-WT、DV3-WT、DV4-WT、DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3、DV4-EM3 单价登革 mRNA 疫苗,每次注射剂量为 1  $\mu$ g/只,并在加强免疫后第 2 周取血,4 $^{\circ}$ C 分离血清并 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 分钟后保存于-80 $^{\circ}$ C 待用。

使用高表达 Fc $\gamma$ RIIA 受体的 K562 细胞模型(ATCC, 货号 CCL-243),测定上述单价 mRNA 疫苗免疫的 BALB/c 小鼠血清对其余三种血清型病毒的 ADE 效应,如

DV1-WT、DV1-EM3 和 DV1-EM3-1 免疫血清对 DENV2、3、4 病毒的 ADE 效应。具体操作步骤如下：

将疫苗免疫血清取出放在 4℃融化，轻弹混匀，离心机瞬时离心。在超净工作台内将用含 1%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基（Invitrogen, C11875500BT）按 4 倍比在 96 孔 U 型板（Corning 3799）中依次梯度稀释小鼠血清。用含 1%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释 DENV 病毒至  $2 \times 10^6$  FFU/mL，将血清稀释液与 3 种 DENV 病毒分别等体积混合后在室温孵育 20 分钟。将培养的 K562 细胞 800g 离心 5 分钟，用含 1% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬后对细胞计数，再将细胞密度调整到  $4 \times 10^6$ /mL，随后按照 10  $\mu$ L 每孔加入到病毒与血清的混合物中，置于 37℃细胞培养箱中孵育 1 小时。补加含 1% FBS 的 RPMI1640 培养基，100 $\mu$ L 每孔，置于 37℃细胞培养箱中继续培养 12-14 小时。

12 小时后，将细胞转移至 96 孔板，800 g 离心 5 分钟，去除上清，然后用 PBS 洗一遍并离心收集细胞。向 96 孔 U 型板中加入 Fixation and Permeabilization solution(BD 554722)细胞固定液 100 $\mu$ L 每孔，置于 4℃冰箱孵育 30min。800 g 离心 5 分钟，收集细胞并用 1 $\times$ Perm/Wash buffer(BD 554723)洗两遍。加入 AF488 标记的 Z6 抗体(Z6-AF488)，100  $\mu$ L 每孔，置于 4℃冰箱孵育 30 分钟；800 g 离心 3 分钟，收集细胞，并用 1 $\times$ Perm/Wash buffer 洗两遍。用每孔 100  $\mu$ L PBS 对细胞进行重悬，使用流式细胞仪检测病毒感染的阳性细胞比例。

结果如图 14-17 所示，其显示：DENV 病毒与 Sham 免疫血清混合后不感染 K562 细胞；四种野生型疫苗(DV1-WT、DV2-WT、DV3-WT 和 DV4-WT)的免疫血清在不同稀释度下都可检测到较强的体外 ADE 效应，即 WT 疫苗血清可增强登革病毒对 K562 细胞的侵染，细胞感染率提升；与上述野生型疫苗相比，突变体疫苗（DV1-EM3、DV2-EM3、DV3-EM3、DV4-EM3、DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3-1 和 DV4-EM3-1）小鼠血清诱导的体外 ADE 效应显著大幅降低，这表明，突变体抗原诱导 ADE 效应的风险显著大幅降低。

#### **实施例 11：疫苗诱导的体内 ADE 效应评价**

本实施例中，通过将由实施例 10 获得的经疫苗 DV4-WT、DV4-EM3 和 DV4-EM3-1 免疫的 BALB/c 小鼠血清与 DENV2 病毒混合后皮下注射到 AG129 小鼠体内，检测 DENV4 疫苗的免疫血清在 AG129 小鼠模型所诱导的对 DENV2 病毒体内 ADE 效应。

以 AG129 小鼠为感染模型，BALB/c 小鼠用不同疫苗或 PBS 免疫。加强免疫后 4 周，取血后分离血清，热灭活，将每种疫苗组不同小鼠血清混合在一起，分装并储存在 -80℃直至使用。在过继转移至 AG129 小鼠前，首先用 PBS 将血清稀释 1000 倍至 50  $\mu$ L，然后与等体积的 DENV2 病毒（6000 FFU）混合，将病毒血清混合物通过皮下注射到

AG129 小鼠体内。每天监测小鼠的存活率和体重减轻情况，初始体重减轻了 25% 的小鼠实施安乐死。

结果如图 18 所示，其显示：与过继 PBS 免疫血清相比，野生型疫苗 DV4-WT 免疫血清诱导了 AG129 小鼠死亡时间提前，显示了显著的 ADE 效应；而突变体疫苗 DV4-EM3 和 DV4-EM3-1 免疫血清没有导致 AG129 小鼠更快的死亡，无 ADE 效应。

#### 实施例 12：四价登革病毒 mRNA 疫苗免疫小鼠

本实施例中，使用雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）进行四价登革病毒疫苗免疫实验；实验分为阴性对照组（Sham 组）、四价野生型疫苗组（tWT 组）、四价突变体疫苗组（tMut 组），每组 8 只；其中，阴性对照组免疫生理盐水，tWT 疫苗是由实施例 1 制备的 DV1-WT、DV2-WT、DV3-WT、DV4-WT 四种疫苗混合而成，每种疫苗 3  $\mu\text{g}$ /剂，即共 12  $\mu\text{g}$ /剂，tMut 疫苗是由实施例 1 制备的 DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3、DV4-EM3 四种疫苗混合而成，每种疫苗 3  $\mu\text{g}$ /剂，即共 12  $\mu\text{g}$ /剂，对于各免疫组，分别在第 0 天和第 21 天肌肉注射，并在初次免疫后第 6 周取血，4°C 分离血清并 56°C 灭活 30 分钟后保存于 -80°C 待用。

#### 实施例 13：FL 抗体 scfv 的表达纯化

在本实施例，按照文献中公开的抗体重链、轻链序列，分别构建了登革病毒 FL 抗体 Z5-scfv (Wang, Q. H. et al. Sci Transl Med 8, (2016))、Z6-scfv (Dai, L. et al. Nat Immunol 22, 958-968, (2021))。在 scfv 抗体氨基酸序列 5' 和 3' 端分别添加信号肽和 His 标签后，按照哺乳细胞密码子偏好性进行优化，得到 Z5-scfv 和 Z6-scfv 抗体核酸编码序列，分别如 SEQ ID NO:125 和 SEQ ID NO:126 所示，然后在上述核酸编码序列的 5' 端和 3' 端分别加入 Kozak 序列和终止密码子后委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因合成，再将所合成基因片段通过 5'EcoRI 和 3'XhoI 双酶切克隆至 pCAGGS 载体，构建 E 蛋白表达质粒 pCAGGS-Z5-scfv，pCAGGS-Z6-scfv。使用 HEK293F 细胞进行蛋白表达，使用 HisTrapTMexcel 亲和层析柱和 Superdex200 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱进行蛋白的纯化。

挑选生长状态良好的 HEK293F 细胞，转染前一天以  $1-1.5 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度接种至新 SMM293-TII 培养基中，37°C、5% CO<sub>2</sub>、150rpm 恒温摇床培养。转染当天，调整细胞密度至  $2.5 \times 10^6$  个细胞/ml。配制转染试剂（以 10 ml 细胞为例），用 150 mM 的 NaCl 稀释 10  $\mu\text{g}$  质粒至总体积为 250  $\mu\text{l}$ ，温和混匀；用 150 mM 的 NaCl 稀释 Sinofection 转染试剂至总体积 250  $\mu\text{l}$ ，温和混匀；将稀释好的质粒和转染试剂同时单独静置约 5 min 后温和混匀，总体积 500  $\mu\text{l}$ ，再室温静置 10 min。将转染液逐滴加入到细胞培养液中，滴加的同时轻轻摇动培养瓶，摇匀后放回摇床继续培养。在转染后第 24h 加入 350  $\mu\text{l}$  SMS-293-SUPI 加料液，此后每隔 48h 添加一次加料液（350  $\mu\text{l}$ ）。转染 5 天后，

收集上清进行蛋白纯化。

将转染 5 天后的细胞上清液收集，8000rpm、4℃ 离心 1h 之后，将上清液用 0.22 μm 滤膜抽滤。His 亲和层析纯化：先用经 0.22 μm 滤膜抽滤过的水冲洗 HisTrap™ excel 亲和层析柱，冲洗约 3-5 个柱体积。之后，再用 HisTrap 亲和层析平衡液冲洗层析柱，至 UV 及电导两个检测线平稳，认为层析柱已被平衡完成。然后，将细胞上清液以 1-2 mL/min 流速流经层析柱，使蛋白结合于层析柱。待所有上清都流经层析柱后，用 5-10 个柱体积的亲和层析平衡液冲洗层析柱，直至 UV 检测线平稳。最后，依次用含有 50 mM、300 mM、1 M 咪唑的洗脱液冲洗层析柱，将收集到的蛋白制样后用 SDS-PAGE 鉴定。进一步用 Superdex 200 Increase 10/300 GL 凝胶过滤层析纯化，将亲和层析获得的样品，使用 10 kDa 超滤浓缩管浓缩至 800 μl 以下后，转移至 1.5 mL 离心管中。12000 g，4℃ 离心 20 min 后，在确保没有吸到沉淀的情况下，将样品换至新的 1.5 mL 离心管中。12000 g，4℃ 离心 20 min 去除样品中的气泡，准备上样。将 Superdex 200 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱用凝胶过滤层析平衡液以最大 0.5 mL/min 流速平衡至 UV 检测线平稳，使用 1 mL loop 环上样。上样后，用 20/50 平衡液（20mM Tris,50mM NaCl）以 0.5 mL/min 流速冲洗层析柱，设置峰收集，收集出峰处的样品。将收集的样品制样后用 SDS-PAGE 鉴定。将经鉴定表达正确的样品用 10kDa 超滤浓缩管浓缩并分装保存于-80℃冰箱以备后用。

#### **实施例 14：竞争酶联免疫吸附实验（ELISA）检测四价登革 mRNA 疫苗所诱导的 FL 表位抗体**

本实施例中，通过竞争 ELISA 实验，采用实施例 12 获得的四价登革 mRNA 疫苗免疫小鼠血清，检测四价登革疫苗所诱导的针对抗原 E 蛋白 FL 表位的抗体水平。

具体地，采用以下程序：

（1）分别将实施例 3 制备的登革病毒 E 蛋白用 ELISA 包被液（索莱宝，C1050）稀释至 2 μg/mL，96 孔 ELISA 板（Coring，3590）每孔加入 100 μL，4℃放置 12 小时；

（2）倒掉包被液，加入 PBS，洗一遍；将 PBS 配制的 5%脱脂牛奶作为封闭液加入 96 孔板中，每孔 100 μL，室温放置 1 小时，进行封闭；封闭完成后，用 PBS 溶液洗一遍；

（3）在步骤（2）封闭期间，用封闭液将 scFv 竞争抗体混合物（Z5-scFv 和 Z6-scFv 按照浓度比 1:1 混合）稀释至 20 μg/ml 浓度，在非竞争性 ELISA 测定中，加入 50 μL 空白封闭液，在竞争性 ELISA 测定中，其加 50 μL scFv 竞争抗体，阴性对照为加入空白封闭液，37 度孵育 1 小时；

（4）在步骤（3）封闭期间，用封闭液稀释小鼠免疫血清样品，血清样品从 10000 倍起始，以 2 倍梯度进行稀释；之后，在 ELISA 板中每孔加入稀释后的 50 μL 免疫血清，

阴性对照为加入封闭液，37 度孵育 2 小时，之后使用 PBST 洗 4 遍；

(5) 加入使用封闭液 1:2000 稀释的偶联 HRP 的羊抗鼠二抗 (Abcam, ab6789)，37°C 孵育 1 小时，之后 PBST 洗 5-6 遍；加入 TMB 显色液显色，反应适当时间后，加入 2 M 盐酸终止反应，在酶标仪上检测 OD450 读值。

抗体滴度值被定义为反应值大于 2.1 倍阴性对照值的血清最高稀释倍数。当最低稀释倍数 (检测限) 的反应值仍小于 2.1 倍背景值时，该样品的滴度定义为最低稀释倍数的一半，即 1:5。

竞争 ELISA 实验结果如图 19 所示，图 19 显示：在不加入 FL 表位 scfv 竞争性抗体时 (tWT 和 tMut)，小鼠血清中所有 E 蛋白特异性抗体均可与包被的 E 蛋白结合，在加入 FL 表位 scfv 竞争性抗体时 (tWT-C 和 tMut-C)，小鼠血清中 FL 表位抗体无法结合包被的 E 蛋白，其余表位的抗体可正常结合包被的 E 蛋白，因此两者差值可代表小鼠血清中 FL 表位抗体的数量；加入 FL 表位 scfv 竞争性抗体后，tWT 疫苗血清抗体滴度显著大幅降低，表明 tWT 疫苗诱导产生了大量 FL 表位抗体，相比较，tMut 疫苗血清在是否加入 FL 表位 scfv 竞争性抗体时所测的抗体滴度不变，表明 tMut 疫苗没有诱导 FL 表位抗体。上述结果表明，本申请的突变体抗原在小鼠体内不诱导具有高 ADE 活性的 FL 抗体，提示其具有较低的 ADE 风险。

#### 实施例 15：登革四价疫苗所诱导的中和抗体检测

通过登革病毒微量中和实验，定量测定实施例 12 获得的四价登革 mRNA 疫苗免疫小鼠血清中针对四种血清型登革病毒的中和抗体滴度，具体操作步骤如下：

提前一天将 Vero 细胞接种于 24 孔细胞培养皿中，待第二天细胞生长至汇合度大于 70% 时用于中和试验；用含 1% FBS (Gibco, 10270-106) 的 DMEM 培养基 (Invitrogen, C11995500BT) 梯度稀释血清，病毒也用含 1% FBS 的 DMEM 培养基稀释，把血清和病毒液各 50  $\mu$ L 等体积混合，同时，稀释后的病毒与等体积的空白培养基混合，作为阳性对照，置于 37°C 孵育 30 min；孵育完成后将 VERO 细胞板中的上清培养基移除，将上述混合液加入细胞中，100  $\mu$ L/孔，置于 37°C 培养箱中继续培养 3 天；3 天后取出细胞培养板，弃去全部上清并用 PBS 洗细胞一遍；除去培养基，PBS 洗一遍，每孔加 50  $\mu$ L 固定通透液 (BD Cytofix/Cytoperm Soln Kit 554714) 在 4°C 固定 30 min；用 PBST 洗两遍，每孔加 50  $\mu$ L MZ24-HRP 稀释液 (浓度 2  $\mu$ g/ml)，4°C 孵育 1h；PBST 洗三遍，每孔加 50  $\mu$ L TMB 显色液，8min 后用 2M 硫酸终止，并使用酶标仪 (PerkinElmer) 在 450 nm 处测量吸光度。使用 GraphPad Prism 软件对数据进行非线性拟合计算中和 50% 的细胞感染时相应的血清稀释倍数，即为中和滴度值 (NT<sub>50</sub>)。当最低稀释倍数的血清仍无法中和 50% 的细胞感染时，定义该样品的 NT<sub>50</sub> 为最低稀释倍数的一半。

结果如图 20 所示，其显示：与阴性对照组相比，tWT 与 tMut 疫苗均诱导了针对四种血清型病毒的高滴度的中和抗体免疫应答，特别是，tMut 疫苗还诱导了均衡的针对四种血清型病毒的中和抗体反应。

**实施例 16：登革四价疫苗攻毒保护评价**

本实施例中，采用 AG129 小鼠致死模型，检测四价登革 mRNA 疫苗的攻毒保护效果。

具体地，使用 6-8 周龄 AG129 小鼠（购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司）进行四价登革病毒疫苗免疫和攻毒实验，实验分为阴性对照组（Sham 组）和四价突变体疫苗组（tMut 组），每组 12 只；其中，阴性对照组免疫生理盐水，tMut 疫苗是由实施例 1 制备的 DV1-EM3-1、DV2- EM3-1、DV3- EM3、DV4- EM3 四种疫苗混合而成，每种疫苗 3 μg/剂，即共 12 μg/剂，对于各免疫组，分别在第 0 天和第 21 天肌肉注射，并在初次免疫后第 49 天将每组小鼠随机平均分配，一半经皮下注射感染 1×10<sup>6</sup> FFU DENV1 病毒，另一半皮下注射感染 1×10<sup>6</sup> FFU DENV2 病毒。DENV 病毒攻击后，每天称重并监测动物的疾病临床体征，初始体重减轻 25% 的小鼠因动物福利被安乐死，最后统计死亡率。

结果如图 21 所示，其显示：DENV1 和 DENV2 病毒攻毒后，Sham 组小鼠全部死亡，而 tMut 疫苗组小鼠全部存活，表明，tMut 疫苗可为 AG129 小鼠提供优良的免疫保护。

**实施例 17：登革病毒mRNA疫苗的制备**

本实施例中，设计了一系列编码登革病毒prME全长蛋白（即，包括prM蛋白+E蛋白）的mRNA构建体，包括：

- DV1-WT （即，DV1 野生型），编码如SEQ ID NO:1 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM1，编码如SEQ ID NO:2 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM2，编码如SEQ ID NO: 5 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM4，编码如SEQ ID NO: 6 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM5，编码如SEQ ID NO:7 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM6，编码如SEQ ID NO: 8 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM7，编码如SEQ ID NO: 9 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM8，编码如SEQ ID NO:10 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM9，编码如SEQ ID NO: 11 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM10，编码如SEQ ID NO: 12 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM11，编码如SEQ ID NO:13 所示的prME抗原蛋白；
- DV1-EM12，编码如SEQ ID NO: 14 所示的prME抗原蛋白；

DV2-WT（即，DV2 野生型），编码如SEQ ID NO:15 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM1，编码如SEQ ID NO:16 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM2，编码如SEQ ID NO: 19 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM4，编码如SEQ ID NO: 20 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM5，编码如SEQ ID NO:21 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM6，编码如SEQ ID NO: 22 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM7，编码如SEQ ID NO: 23 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM8，编码如SEQ ID NO:24 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM9，编码如SEQ ID NO: 25 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM10，编码如SEQ ID NO:26 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM11，编码如SEQ ID NO:27 所示的prME抗原蛋白；

DV2-EM12，编码如SEQ ID NO: 28 所示的prME抗原蛋白；

DV3-WT（即，DV3 野生型），编码如SEQ ID NO:29 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM1，编码如SEQ ID NO:30 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM2，编码如SEQ ID NO: 33 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM4，编码如SEQ ID NO: 34 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM5，编码如SEQ ID NO:35 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM6，编码如SEQ ID NO: 36 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM7，编码如SEQ ID NO: 37 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM8，编码如SEQ ID NO:38 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM9，编码如SEQ ID NO: 39 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM10，编码如SEQ ID NO: 40 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM11，编码如SEQ ID NO:41 所示的prME抗原蛋白；

DV3-EM12，编码如SEQ ID NO: 42 所示的prME抗原蛋白；

DV4-WT（即，DV4 野生型），编码如SEQ ID NO:43 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM1，编码如SEQ ID NO:44 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM2，编码如SEQ ID NO: 47 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM4，编码如SEQ ID NO: 48 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM5，编码如SEQ ID NO:49 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM6，编码如SEQ ID NO: 50 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM7，编码如SEQ ID NO: 51 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM8，编码如SEQ ID NO:52 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM9，编码如SEQ ID NO: 53 所示的prME抗原蛋白；

DV4-EM10, 编码如SEQ ID NO: 54 所示的prME抗原蛋白;

DV4-EM11, 编码如SEQ ID NO:55 所示的prME抗原蛋白;

DV4-EM12, 编码如SEQ ID NO: 56 所示的prME抗原蛋白。

接下来, 根据哺乳动物细胞密码子的偏爱性, 优化编码上述重组登革病毒prME抗原蛋白的核酸序列, 得到优化的核酸编码序列, 其中, DV1-WT、DV2-WT、DV3-WT、DV4-WT优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:114-117 所示, DV1-EM1、DV1-EM2、DV1-EM4、DV1-EM5、DV1-EM6、DV1-EM7、DV1-EM8、DV1-EM9、DV1-EM10、DV1-EM11、DV1-EM12 优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:62、65-74 所示, DV2-EM1、DV2-EM2、DV2-EM4、DV2-EM5、DV2-EM6、DV2-EM7、DV2-EM8、DV2-EM9、DV2-EM10、DV2-EM11、DV2-EM12 优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO: 75、78-87 所示, DV3-EM1、DV3-EM2、DV3-EM4、DV3-EM5、DV3-EM6、DV3-EM7、DV3-EM8、DV3-EM9、DV3-EM10、DV3-EM11、DV3-EM12 优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO: 88、91-100 所示, DV4-EM1、DV4-EM2、DV4-EM4、DV4-EM5、DV4-EM6、DV4-EM7、DV4-EM8、DV4-EM9、DV4-EM10、DV4-EM11、DV4-EM12 优化的核酸编码序列分别如SEQ ID NO:101、104-113 所示,; 然后, 在各核酸编码序列的 5'端添加Kozak序列和信号肽的核酸编码序列(如SEQ ID NO:118, 其编码氨基酸序列如SEQ ID NO:58 所示的信号肽), 在其 3'端添加终止密码子后, 委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因合成, 再将所合成基因片段重组至实验室保存的pHRNT载体(发明专利ZL202110224383.0)上, 获得制备mRNA疫苗的模板质粒。mRNA疫苗制备方法参照实施例 1。

#### **实施例 18: 登革病毒mRNA疫苗的抗原表达检测**

在本实施例中, 我们将实施例 17 中制备的一系列登革病毒prME mRNA疫苗转染293T细胞, 之后使用实施例 2 中所制备的FL表位抗体和其它中和表位抗体检测各prME中各表位情况以及蛋白表达量。详细实验步骤参照实施例 4, 在BD FACSAria III 流式细胞仪上检测细胞荧光, 以WT疫苗的阳性细胞率为 100%, 计算各突变体疫苗的相对阳性率。

结果如图 22-25 所示, 其显示:

对于DV1 mRNA疫苗, FL表位抗体(Z5 和Z6)可与DV1-WT结合, 但与所有DV1突变体结合下降或不结合, 表明在所有DV1突变体中, FL表位已经被部分或完全破坏; 中和表位抗体Ab513 则既可以与DV1-WT结合也可以与所有DV1突变体结合, 表明在所有DV1突变体中该中和表位仍然存在, 并且所有DV1突变体均具有较高的蛋白表达量。

对于DV2 mRNA疫苗、DV3 mRNA疫苗和DV4 mRNA疫苗均具有类似的结果。

#### **实施例 19: DV2 突变体 mRNA 疫苗攻毒保护评价**

本实施例中,采用 AG129 小鼠致死模型,检测实施例 17 中制备的不同突变体的 DV2 mRNA 疫苗(DV2-EM1、DV2-EM2、DV2-EM4、DV2-EM5、DV2-EM6、DV2-EM7、DV2-EM8、DV2-EM9、DV2-EM10、DV2-EM11、DV2-EM12)的攻毒保护效果。

具体地,使用 6-8 周龄 AG129 小鼠(购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司)进行疫苗免疫和攻毒实验,实验分为阴性对照组(Sham 组)和各突变体疫苗组(DV2-EM1、DV2-EM2、DV2-EM4、DV2-EM5、DV2-EM6、DV2-EM7、DV2-EM8、DV2-EM9、DV2-EM10、DV2-EM11、DV2-EM12 组),每组 5 只,其中,阴性对照组免疫生理盐水,突变体疫苗每剂 15  $\mu$ g/只,对于各免疫组,分别在第 0 天和第 21 天肌肉注射,并在初次免疫后第 49 天对小鼠经皮下注射感染  $1 \times 10^6$  FFU DENV2 病毒。DENV 病毒攻击后,每天称重并监测动物的疾病临床体征,初始体重减轻 25% 的小鼠因动物福利被安乐死,最后统计死亡率。

结果如图 26 所示,其显示:DENV2 病毒攻毒后,Sham 组小鼠全部死亡,而 DV2-EM1、DV2-EM2、DV2-EM4、DV2-EM5、DV2-EM6、DV2-EM7、DV2-EM8、DV2-EM9、DV2-EM10、DV2-EM11、DV2-EM12 疫苗组小鼠全部存活;这些结果表明,各突变体疫苗可为 AG129 小鼠提供优良的免疫保护。

#### **实施例 20: 登革病毒样颗粒疫苗的制备**

对于黄病毒属病毒而言,重组表达 prME 全长蛋白可形成病毒样颗粒。本实施例中,设计了一系列编码登革病毒 prME 全长蛋白的哺乳动物细胞表达质粒,包括:

DV1-EM3-1, 编码如 SEQ ID NO: 4 所示的 prME 抗原蛋白;

DV2-EM3-1, 编码如 SEQ ID NO: 18 所示的 prME 抗原蛋白;

DV3-EM3, 编码如 SEQ ID NO: 31 所示的 prME 抗原蛋白;

DV4-EM3, 编码如 SEQ ID NO: 45 所示的 prME 抗原蛋白;

接下来,根据哺乳动物细胞密码子的偏爱性,优化编码上述重组登革病毒 prME 抗原蛋白的核酸序列,得到优化的核酸编码序列, DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3、DV4-EM3 的优化的核酸编码序列分别如 SEQ ID NO: 64、77、89、102 所示;然后,在各核酸编码序列的 5'端添加 Kozak 序列和信号肽的核酸编码序列(如 SEQ ID NO:118,其编码氨基酸序列如 SEQ ID NO:58 所示的信号肽),在其 3'端添加终止密码子后,委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因合成,再将所合成基因片段重组至实验室保存的 pCAGGS 载体上,获得制备 mRNA 疫苗的模板质粒。使用 HEK293T 细胞表达病毒样颗粒。使用 HiTrap Capto Q ImpRes 阴离子交换层析柱和 SuperoseTM6 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱进行病毒样颗粒纯化。在转染前一天,将长满 15cm 培养皿的 293T 细胞以 1:3 进行传代,14-16 h 后,细胞密度达到 70%以上即可进行转染;转染前,将细胞培养液换为新鲜的无抗性 DMEM 培养基。配制转染体系:每一个 15 cm 培养皿

转染质粒 30  $\mu\text{g}$ , 加入到 500  $\mu\text{l}$  opti-MEM 中, 轻轻混匀静置 5 min; 将 150  $\mu\text{l}$  Sinofection® Transfection Reagent 转染试剂加入到 350  $\mu\text{l}$  opti-MEM 中, 轻轻混匀静置 5 min; 然后将二者混匀室温孵育 15 min; 4) 将转染体系混匀, 缓慢滴加到 15 cm 培养皿无抗性细胞培养上清中, 轻轻混匀, 置于 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养; 5) 4-6h 后弃去含有转染试剂的细胞培养上清, 更换为无抗生素无血清的 DMEM 培养基, 继续培养 48h, 收获细胞及表达上清。

准备浓缩杯, 根据 VLP 大小选择截留分子量为 100 kDa 的滤膜。将转染 2 天后的细胞上清液收集, 3500rpm、4°C 离心 15min 之后, 将上清倒入浓缩杯, 缓慢打开液氮阀门, 将上清浓缩至 5~10 ml。换液为 20mM Tris/150mM NaCl, 其中含有 0.1mM EDTA, pH8.0。

HiTrap Capto Q ImpRes 阴离子交换层析柱纯化: 先用经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜抽滤过的水冲洗 HiTrap Capto Q ImpRes 阴离子交换层析柱, 冲洗约 3-5 个柱体积。之后, 再用 20 mM Tris/150mM NaCl 平衡液冲洗层析柱, 至 UV 及电导两个检测线平稳, 认为层析柱已被平衡完成。然后, 将浓缩换液后的细胞上清液以 1 mL/min 流速流经层析柱, 使杂蛋白结合于层析柱, 收集流穿下液。待所有上清都流经层析柱后, 用 5-10 个柱体积的亲和层析平衡液冲洗层析柱, 直至 UV 检测线平稳。最后, 依次用含有 300 mM、500 mM、1 M NaCl 的洗脱液冲洗层析柱, 将流穿中收集到的样品制样后用 SDS-PAGE 鉴定。进一步用 SuperoseTM6 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱纯化, 将阴离子交换层析获得的样品, 使用 100kDa 超滤浓缩管浓缩至 1000  $\mu\text{l}$  以下后, 转移至 1.5 mL 离心管中。12000 rpm、4°C 离心 20 min 后, 在确保没有吸到沉淀的情况下, 将样品换至新的 1.5 mL 离心管中。12000 rpm、4°C 离心 20 min 去除样品中的气泡, 准备上样。将 SuperoseTM6 Increase 10/300GL 凝胶过滤层析柱用 20 mM Tris/150 mM NaCl 以最大 0.5 mL/min 流速平衡至 UV 检测线平稳, 使用 1 mL loop 环上样。上样后, 用 20 mM Tris/150 mM NaCl 平衡液以 0.5 mL/min 流速冲洗层析柱, 设置峰收集, 收集出峰处的样品。将收集的样品制样后经 SDS-PAGE 初步鉴定:

- 1) 取上述纯化后样品 20  $\mu\text{l}$ , 加入 5  $\mu\text{l}$  5 $\times$  protein loading buffer, 100°C 加热 3 min;
- 2) 取 10  $\mu\text{l}$  上清进行 SDS-PAGE 电泳;
- 3) 考马斯亮蓝染色;
- 4) 脱色液脱色观察。

鉴定结果如图 27 所示, 图 27 显示: DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3 和 DV4-EM3 四种病毒样颗粒疫苗在 SDS-PAGE 凝胶电泳中显示仅在 70 与 55kDa 之间存在单一条带, 与预期一致, 表明样品纯度较高。

#### 实施例 21: 使用投射电镜对登革病毒样颗粒疫苗的特征

本实施例中,通过透射电镜观察、检测实施例 20 所制备的登革病毒样颗粒的形态,具体操作步骤如下:

准备铜载网, 磷钨酸染液, 滤纸, 样品盒

1) 负染样品制备, 首先进行铜网辉光, 辉光放电仪通常被用来对喷碳铜网进行亲水化处理。

2) 铜网辉光后, 用尖镊夹起, 镊子用长尾夹固定。

3) 滴加 6.5  $\mu$ l 样品于铜网上, 静置一分钟用滤纸吸去。

4) 滴加 6.5  $\mu$ l 磷钨酸于铜网上, 立刻用滤纸吸去。

5) 滴加 6.5  $\mu$ l 磷钨酸于铜网上, 静置一分钟, 用打湿的滤纸吸去多余染液;

6) 干燥后进行电镜观察。

对经层析柱纯化后的样品进行磷钨酸负染色后, 通过 100 kV 电镜进行样品观察分析, 电镜结果如图 28-31 所示, 其显示: DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3、DV4-EM3 病毒样颗粒负染结果表明, 在视野中可以观察到大量的、均一的、直径约为 30nm 左右的病毒样颗粒。

#### **实施例 22: 单价登革病毒重组蛋白疫苗免疫原性检测**

使用雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司) 进行疫苗免疫实验; 实验分为单价登革病毒重组蛋白疫苗免疫组和阴性对照组 (生理盐水, 作为 Sham 组), 每组 5 只; 对于各免疫组, 分别在第 0 天和第 21 天肌肉注射安慰剂 (或实施例 20 制备的登革病毒样颗粒蛋白分别搭配由  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Invivogen, vac-alu-250) 和 CpG 1826 (Invivogen, vac-1826-1) 组成的复合佐剂混合制成, 注射剂量为 12  $\mu$ g/剂, 并在加强免疫后第 2 周取血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 分离血清并 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 分钟后保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 待用。血清中和抗体滴度检测方法参照实施例 7。

中和抗体滴度检测结果如图 32 所示, 其显示: Sham 组血清中检测不到中和抗体, 所有突变体的登革病毒重组蛋白疫苗均可以检测到针对自身病毒的较高的中和抗体滴度, 中和抗体滴度在 4,000-20,000, 说明上述登革病毒重组蛋白疫苗具有良好的免疫原性。

#### **实施例 23: 四价登革病毒重组蛋白疫苗免疫原性检测**

使用雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司) 进行疫苗免疫实验; 实验分为四价登革病毒重组蛋白疫苗组 (tVLP) 和阴性对照组 (即, Sham 组), 每组 5 只。tVLP 疫苗制备方法如下: 将实施例 20 制备的 DV1-EM3-1、DV2-EM3-1、DV3-EM3、DV4-EM3 四种病毒样颗粒按照质量比 1:1:1:1 等比例混合, 每种 2.5 $\mu$ g/剂, 共 10 $\mu$ g/剂, 搭配由  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Invivogen, vac-alu-250) 和 CpG 1826 (Invivogen, vac-1826-1) 组成的复合佐剂混合制成。分别在第 0 天和第 21 天肌肉注射安慰剂或疫苗, 加强免疫 2

周后取血，离心分离血清，将血清 56 °C 加热 30 分钟灭活后，保存于 -80°C 待用。血清中和抗体检测方法参照实施例。

中和实验结果如图 33 所示，其显示：Sham 组血清中检测不到针对四种血清型登革病毒的中和抗体，tVLP 疫苗可诱导针对四种血清型登革病毒均衡的、较强的中和抗体免疫应答，中和抗体滴度 1,100-4,000，说明由突变体病毒样颗粒组成的四价登革病毒重组蛋白疫苗具有良好的免疫原性。

最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本申请的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述实施例对本申请进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本申请各实施例技术方案的精神和范围。

### 工业实用性

本申请提供的针对寨卡/登革病毒的重组抗原能够避免诱导 FL 表位抗体的产生，从而实现降低或者消除 ADE 效应的目的；并且，所述重组抗原具有正确的 E 蛋白构象，具有与野生型相似或更高的蛋白表达量，可在动物体内诱导较高的特异性结合抗体滴度和中和抗体滴度，从而能够提供有效的免疫保护，具有较好的临床应用价值和产业化前景。

## 权利要求书

1、一种重组抗原，所述重组抗原具有寨卡病毒或登革病毒的E蛋白全长序列，其中所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

FL融合环区G106 位点突变；

FL融合环区W101 和G106 双位点突变；

FL融合环区W101、 G106 双位点突变以及非FL融合环区第 125 位氨基酸的突变；

FL融合环区G102 和G106 双位点突变；

FL融合环区N103 和G106 双位点突变；

FL融合环区W101、 N103 和 G106 三位点突变。

2、根据权利要求 1 所述的重组抗原，其特征在于，所述FL融合环区G106 位点突变为：G106V突变；

和/或，所述FL融合环区W101 和G106 双位点突变选自：（1）W101R和G106V，（2）W101G和G106V，和（3）W101L和G106V；

和/或，所述FL融合环区W101、 G106 双位点突变以及非FL融合环区第 125 位氨基酸的突变为：FL融合环区W101R、 G106V双位点突变和非融合环区第 125 位氨基酸向缬氨酸的突变；

和/或，所述FL融合环区G102 和G106 双位点突变为：G102R和G106V双位点突变；

和/或，所述FL融合环区N103 和G106 双位点突变选自：（1）N103T和G106V，（2）N103H和G106V，（3）N103K和G106V，（4）N103P和G106V，和（5）N103Y和G106V；

和/或，所述FL融合环区W101、N103 和 G106 三位点突变选自：（1）W101G、N103T 和 G106V，和（2）W101G、N103K和G106V。

3、根据权利要求 2 所述的重组抗原，其特征在于，所述重组抗原具有 1 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；

W101R和G106V双位点突变；

W101G和G106V双位点突变；

W101L和G106V双位点突变；

W101R、 G106V和L125V三位点突变；

G102R和G106V双位点突变；

N103T和G106V双位点突变；

N103H和G106V双位点突变；

N103K和G106V双位点突变；

N103P和G106V双位点突变；

N103Y和G106V双位点突变；

W101G、N103T和 G106V三位点突变；

W101G、N103K和G106V三位点突变。

4、根据权利要求 2 所述的重组抗原，其特征在于，所述重组抗原具有 2 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；

W101R和G106V双位点突变；

W101G和G106V双位点突变；

W101L和G106V双位点突变；

W101R、G106V和M125V三位点突变；

G102R和G106V双位点突变；

N103T和G106V双位点突变；

N103H和G106V双位点突变；

N103K和G106V双位点突变；

N103P和G106V双位点突变；

N103Y和G106V双位点突变；

W101G、N103T和 G106V三位点突变；

W101G、N103K和G106V三位点突变。

5、根据权利要求 2 所述的重组抗原，其特征在于，所述重组抗原具有 3 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；

W101R和G106V双位点突变；

W101G和G106V双位点突变；

W101L和G106V双位点突变；

W101R、G106V和I125V三位点突变；

G102R和G106V双位点突变；

N103T和G106V双位点突变；

N103H和G106V双位点突变；

N103K和G106V双位点突变；

N103P和G106V双位点突变；

N103Y和G106V双位点突变；

W101G、N103T和 G106V三位点突变；

W101G、N103K和G106V三位点突变。

6、根据权利要求 2 所述的重组抗原，其特征在于，所述重组抗原具有 4 型登革病毒的E蛋白全长序列，并且所述E蛋白具有选自以下的位点突变：

G106V突变；

W101R和G106V双位点突变；

W101G和G106V双位点突变；

W101L和G106V双位点突变；

W101R、G106V和I125V三位点突变；

G102R和G106V双位点突变；

N103T和G106V双位点突变；

N103H和G106V双位点突变；

N103K和G106V双位点突变；

N103P和G106V双位点突变；

N103Y和G106V双位点突变；

W101G、N103T和 G106V三位点突变；

W101G、N103K和G106V三位点突变。

7、根据权利要求 1-6 任一项所述的重组抗原，其特征在于，当所述重组抗原具有寨卡病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原还包括寨卡病毒的全长或部分prM蛋白序列或M蛋白序列。

8、根据权利要求 1-6 任一项所述的重组抗原，其特征在于，当所述重组抗原具有登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原还包括相应血清型的登革病毒的全长或部分prM蛋白序列或M蛋白序列；

优选地，当所述重组抗原具有 1 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:2-14 所示的氨基酸序列；和/或，当所述重组抗原具有 2 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:16-28 所示的氨基酸序列；和/或，当所述重组抗原具有 3 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:30-42 所示的氨基酸序列；和/或，当所述重组抗原具有 4 型登革病毒的E蛋白全长序列时，所述重组抗原具有如SEQ ID NO:44-56 所示的氨基酸序列。

9、如权利要求 1-8 任一项所述重组抗原的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

在编码如权利要求 1-8 任一项所述重组抗原的核苷酸序列的 5'端加上Kozak序列以及信号肽的编码序列，3'端加上组氨酸标签的编码序列和终止密码子，进行克隆表达，筛选正确的重组子，然后将其转染表达系统细胞进行表达，收集细胞培养上清，从中分离获得所述重组抗原。

10、根据权利要求9所述的制备方法，其特征在于，所述表达系统细胞为哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细菌细胞；

可选地，所述哺乳动物细胞为HEK293T细胞、293F系列细胞或CHO细胞；进一步可选地，所述293F系列细胞为HEK293F细胞、Freestyle293F细胞或Expi293F细胞；

可选地，所述昆虫细胞为sf9细胞、Hi5细胞、sf21细胞或S2细胞；

可选地，所述酵母细胞为毕赤酵母细胞或者由其改造的酵母细胞；

可选地，所述细菌细胞为大肠杆菌细胞。

11、编码如权利要求1-8任一项所述重组抗原的多核苷酸。

12、根据权利要求11所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸为DNA或mRNA，优选为mRNA；

优选地，所述多核苷酸为具有如SEQ ID NO:62-113之一所示序列的DNA，或与所述DNA相应的mRNA。

13、包含如权利要求11或12所述的多核苷酸的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒。

14、一种疫苗组合物，其包括如权利要求1-8任一项所述的重组抗原，或如权利要求11或12所述的多核苷酸，或如权利要求13所述的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒作为活性成分。

15、根据权利要求14所述的疫苗组合物，其特征在于，其为重组蛋白疫苗，其包括如权利要求1-8任一项所述的重组抗原和佐剂；

优选地，所述佐剂为选自以下佐剂中的一种或多种：铝佐剂、MF59佐剂、类MF59佐剂、CpG佐剂、含QS-21佐剂、AS系列佐剂和纳米颗粒佐剂。

16、根据权利要求15所述的疫苗组合物，其特征在于，其为DNA疫苗，所述DNA疫苗包括：

(i)真核表达载体；和

(ii)构建入所述真核表达载体中的、编码如权利要求1-8任一项所述重组抗原的DNA序列；

优选地，所述编码如权利要求1-8任一项所述重组抗原的DNA序列为如SEQ ID NO:62-113之一所示的DNA序列；

和/或，所述真核表达载体选自pGX0001、pVAX1、pCAGGS和pcDNA系列载体。

17、根据权利要求14所述的疫苗组合物，其特征在于，其为mRNA疫苗，所述mRNA疫苗包括：

(I)编码如权利要求1-8任一项所述重组抗原的mRNA序列；和

(II)脂质纳米颗粒；

优选地，所述编码如权利要求 1-8 任一项所述重组抗原的 mRNA 序列为与如 SEQ ID NO: 62-113 之一所示的 DNA 序列相应的 mRNA 序列。

18、根据权利要求 14 所述的疫苗组合物，其特征在于，其为病毒载体疫苗，其包括：

(1) 病毒骨架载体；和

(2) 构建入所述病毒骨架载体中的、编码如权利要求 1-8 任一项所述重组抗原的 DNA 序列；

优选地，所述编码如权利要求 1-8 任一项所述重组抗原的 DNA 序列为如 SEQ ID NO: 62-113 之一所示的 DNA 序列；

和/或，所述病毒骨架载体选自以下病毒载体中的一种或几种：腺病毒载体、慢病毒载体、痘病毒载体、流感病毒载体、腺相关病毒载体。

19、根据权利要求 14-18 任一项所述的疫苗组合物，其特征在于，所述疫苗组合物为鼻喷剂、口服制剂、栓剂或胃肠外制剂的形式；

优选地，所述鼻喷剂选自气雾剂、喷雾剂和粉雾剂；

优选地，所述口服制剂选自片剂、粉末剂、丸剂、颗粒剂、软/硬胶囊剂、薄膜包衣剂和膏剂；

进一步优选地，所述片剂为舌下片；

进一步优选地，所述颗粒剂为细粒剂；

进一步优选地，所述粉末剂为散剂；

进一步优选地，所述丸剂为小丸剂；

优选地，所述胃肠外制剂为经皮剂、软膏剂、硬膏剂、外用液剂、可注射制剂；进一步优选地，所述可注射制剂为可推注制剂。

20、如权利要求 1-8 任一项所述的重组抗原、如权利要求 11 或 12 所述的多核苷酸，或如权利要求 13 所述的表达盒、重组载体、转基因细胞系、重组菌或重组病毒在制备用于检测、预防和/或治疗寨卡病毒或登革病毒感染的药物中的用途；

优选地，所述药物为疫苗。