

Supplementary Materials

Multivalent administration of dengue E dimers on liposomes elicits type-specific neutralizing responses without immune interference

Thanh T. N. Phan¹, Devina J. Thiono^{2*}, Matthew G. Hvasta^{1*}, Ruby P. Shah²⁺, Gisselle Prida Ajo¹⁺, Weichiao Huang³, Jonathan Lovell³, Shaomin Tian², Aravinda M. de Silva², Brian Kuhlman^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Biophysics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

² Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

³ Department of Biomedical Engineering, University at Buffalo, Buffalo, New York, USA

Table of Contents

SFig 1. Sequences of DENV1-4 sE SC.

SFig 2. Coupling of sE to CPQ liposomes.

SFig 3. Binding ELISA of DENV2 and DENV3 CPQ-sE against a panel of type-specific and cross-reactive Abs.

SFig 4. Binding IgG titer against DENV1-4 as area under the curve (AUC).

SFig 5. Correlation between binding IgG and neut50 of mouse sera for CPQ-sE SC groups.

SFig 6. Confirmation of sE depletion by ELISA.

SFig 7. Binding titration of mouse mAb 4G2 against DENV1-4.

SFig 8-11. DENV1-4 binding titration and virus neutralization by mouse sera.

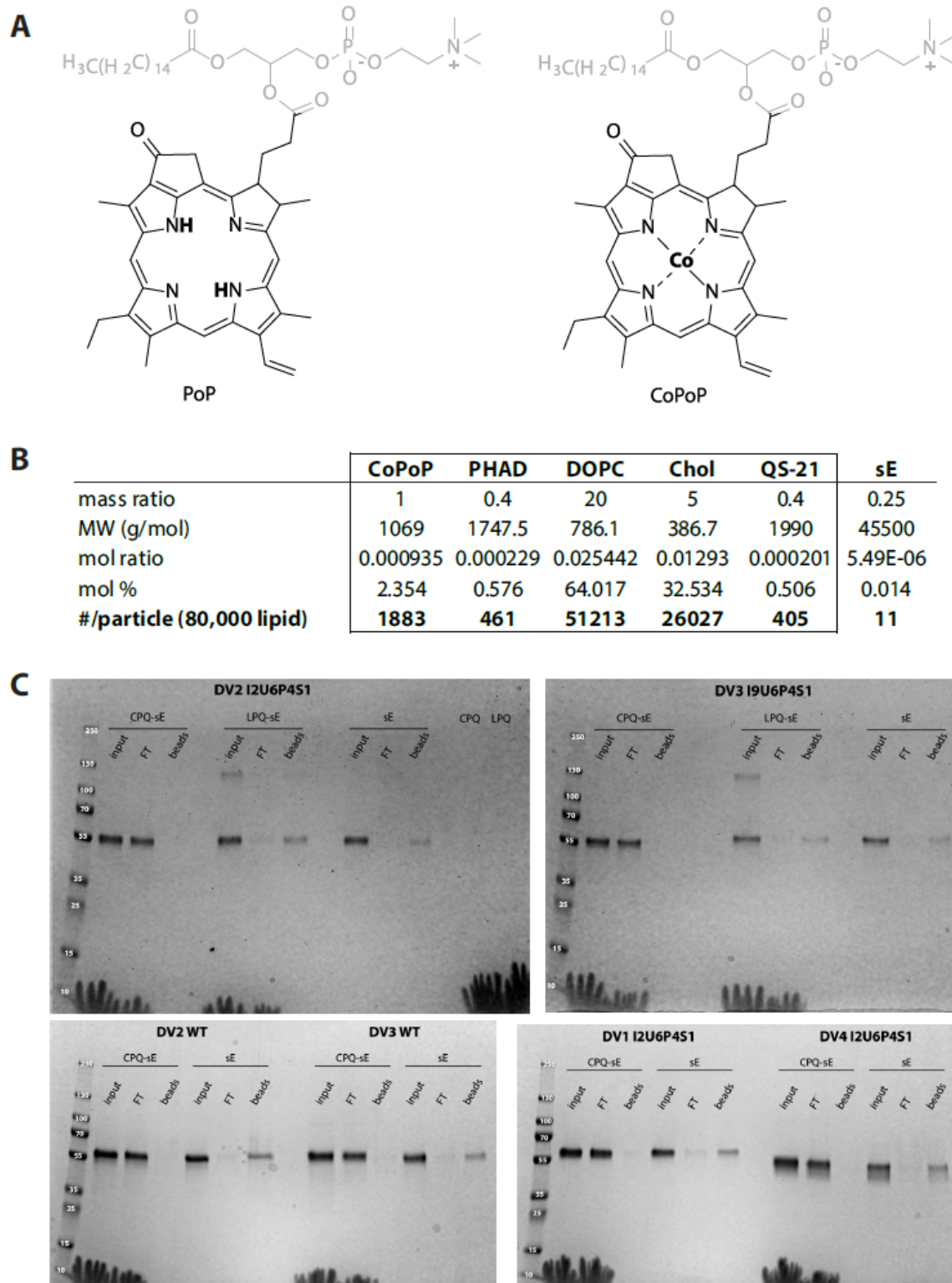
A

Serotype	Stabilizing combinations	Mutations
DENV1	I2-U6-P4-S1	A259W, T262R-F279W, A280P-S29K, T33V, A35M-K204R
DENV2	I2-U6-P4-S1	A259W, T262R-F279W, T280P-S29K, T33V, A35M-K204R
DENV3	I9-U6-P4-S1	L251R, Q254L, A257Y, T260L-F277W, A278P-G29K, T33V, A35M-K202R
DENV4	I2-U6-P4-S1	A259W, S262R-F279W, A280P-G29K, T33V, A35M-K204R

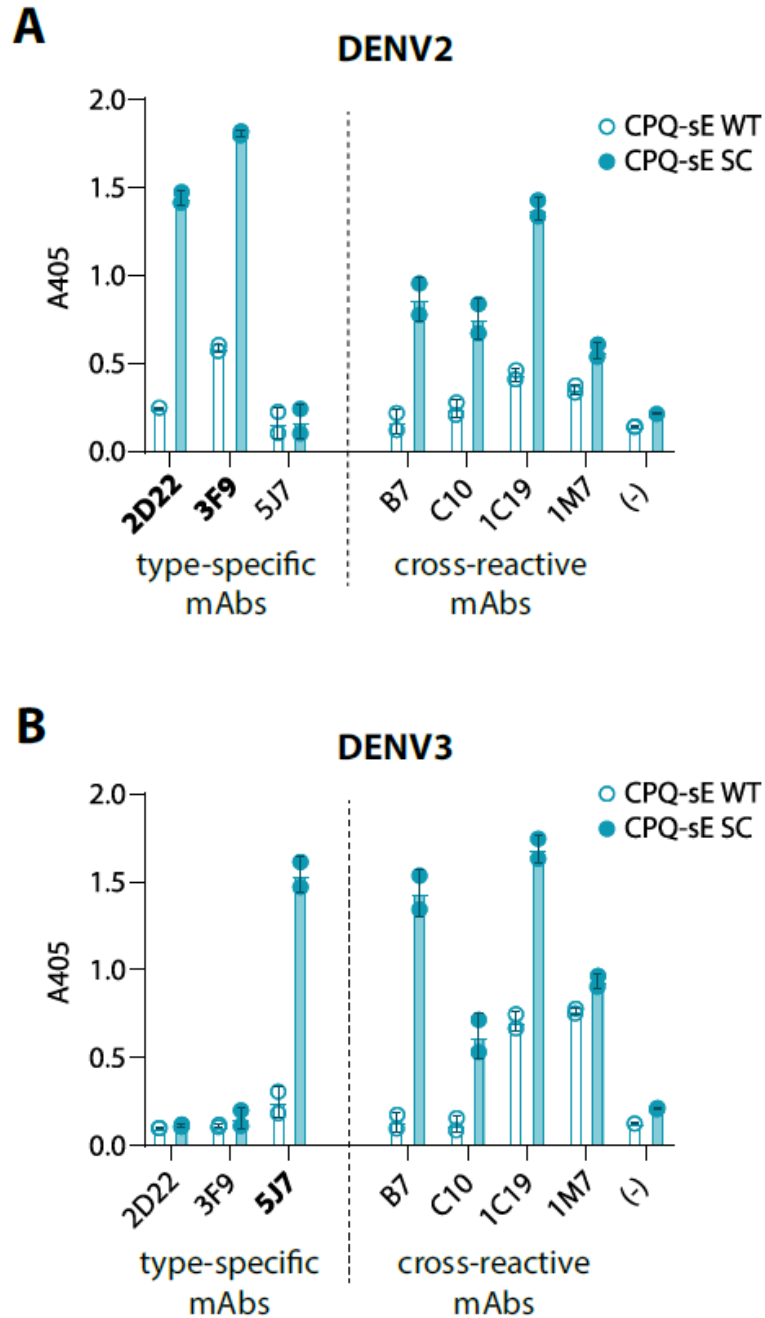
B

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

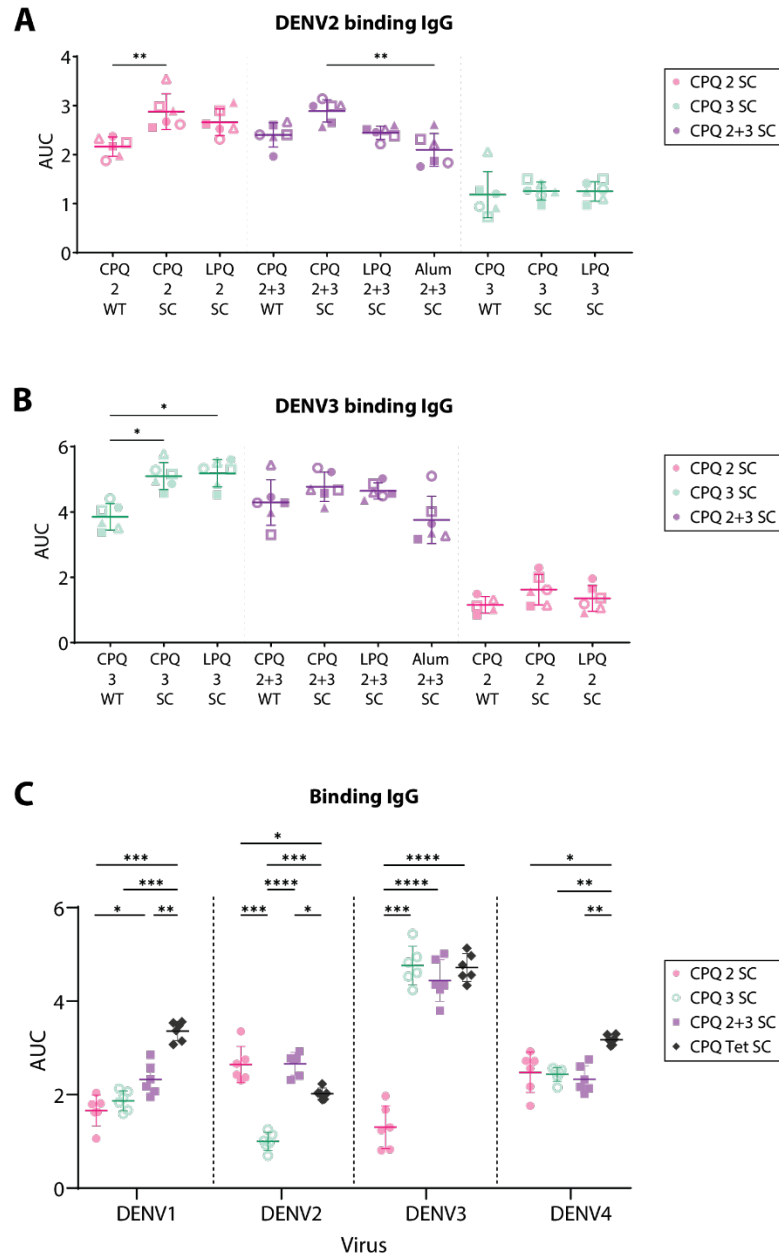
SFig 1. Sequences of DENV1-4 sE SC. (A) Mutations made in each serotype. (B) Sequence alignment of DENV1-4 sE SC. Amino acid sequences are from DENV1 WestPac 74, DENV2 16681, DENV3 CH53489 and DENV4 TVP-376. Stabilizing mutations are highlighted: PM4 in EDI (cyan), I2 and I9 at the central helix (orange), S1 (pink) and U6 (green) at EDI/II hinge.



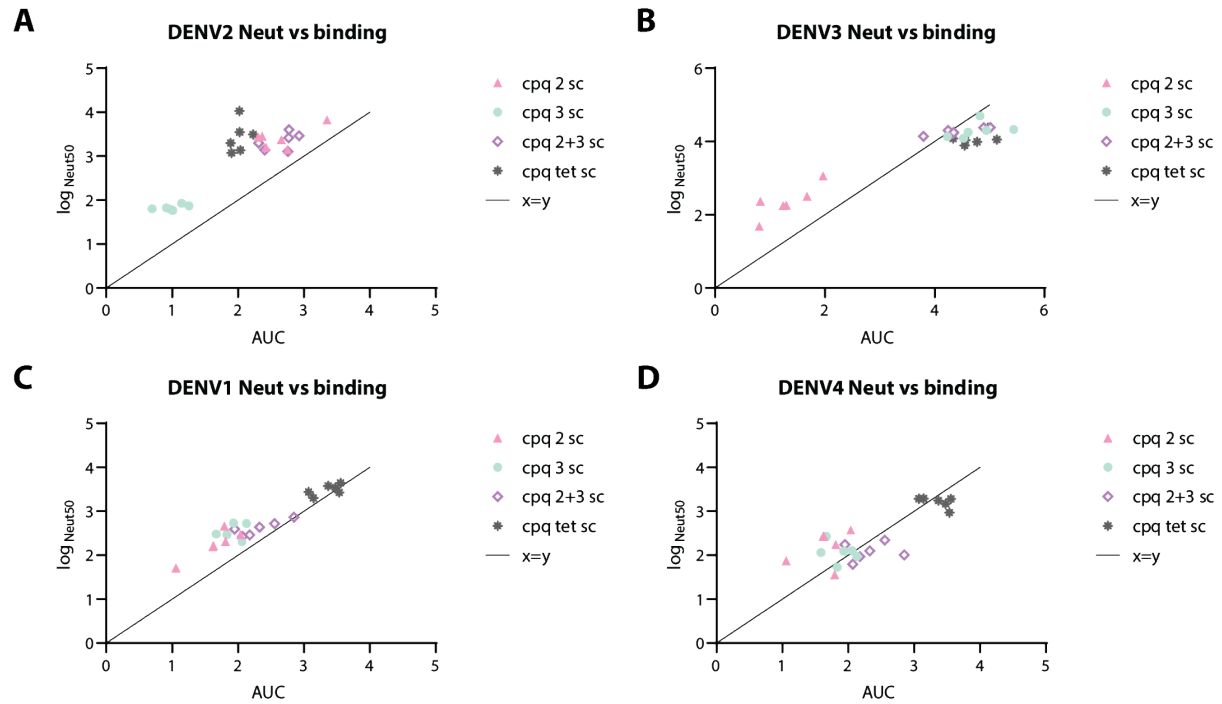
SFig 2. Coupling of sE to CPQ liposomes. (A) Chemical structure of PoP and CoPoP lipid moiety. (B) Stoichiometry calculation based on the coupling mass ratio. (C) SDS-PAGE analysis of unbound sE post conjugation to CPQ. ‘Beads’ refers to the fraction collected from Ni-beads. ‘FT’ fraction refers to the flow-through fraction after Ni incubation.



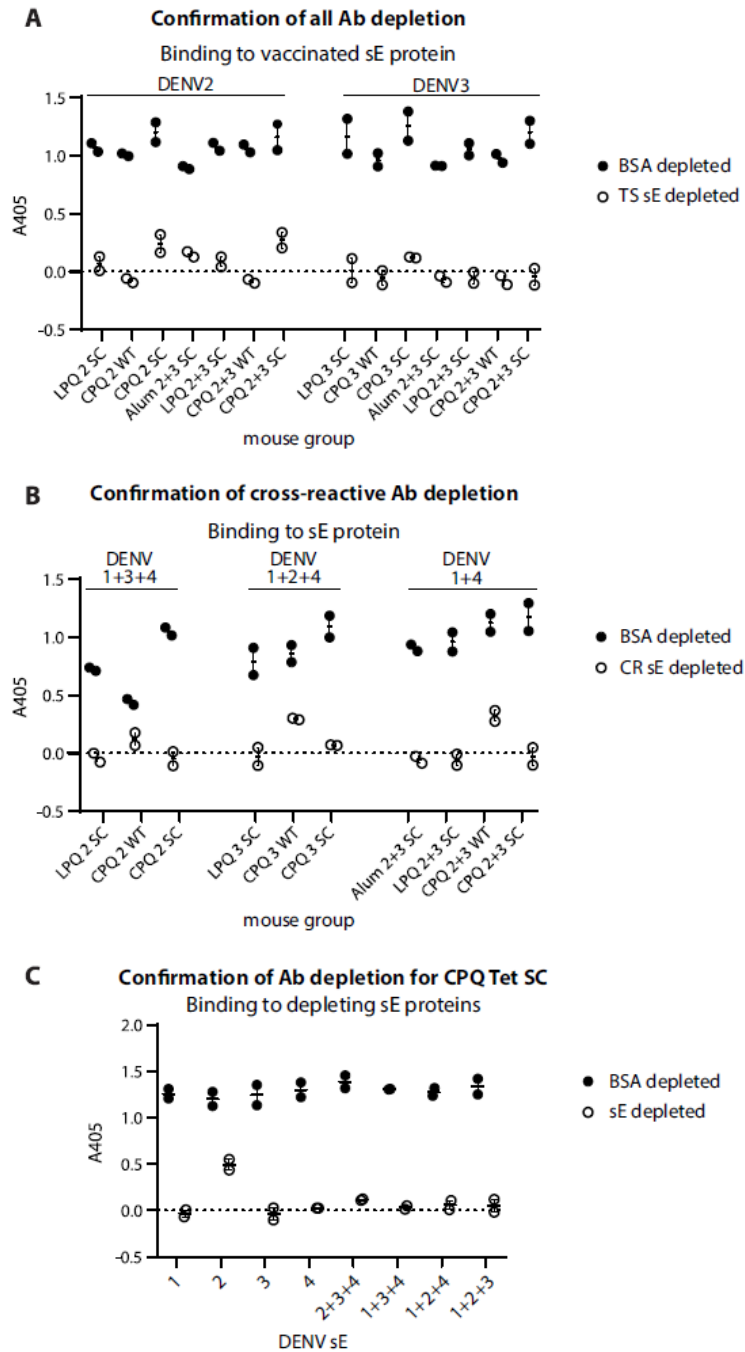
SFig 3. Binding ELISA of DENV2 and DENV3 CPQ-sE against a panel of type-specific and cross-reactive Abs. DENV2 (A) and DENV3 (B) CPQ-sE were captured by mouse mAb 4G2 and tested against human anti-E mAbs. Primary Abs were detected using AP-labelled anti-human IgG. (-) samples contained no primary Ab. Type-specific Abs for each serotype are bolded.



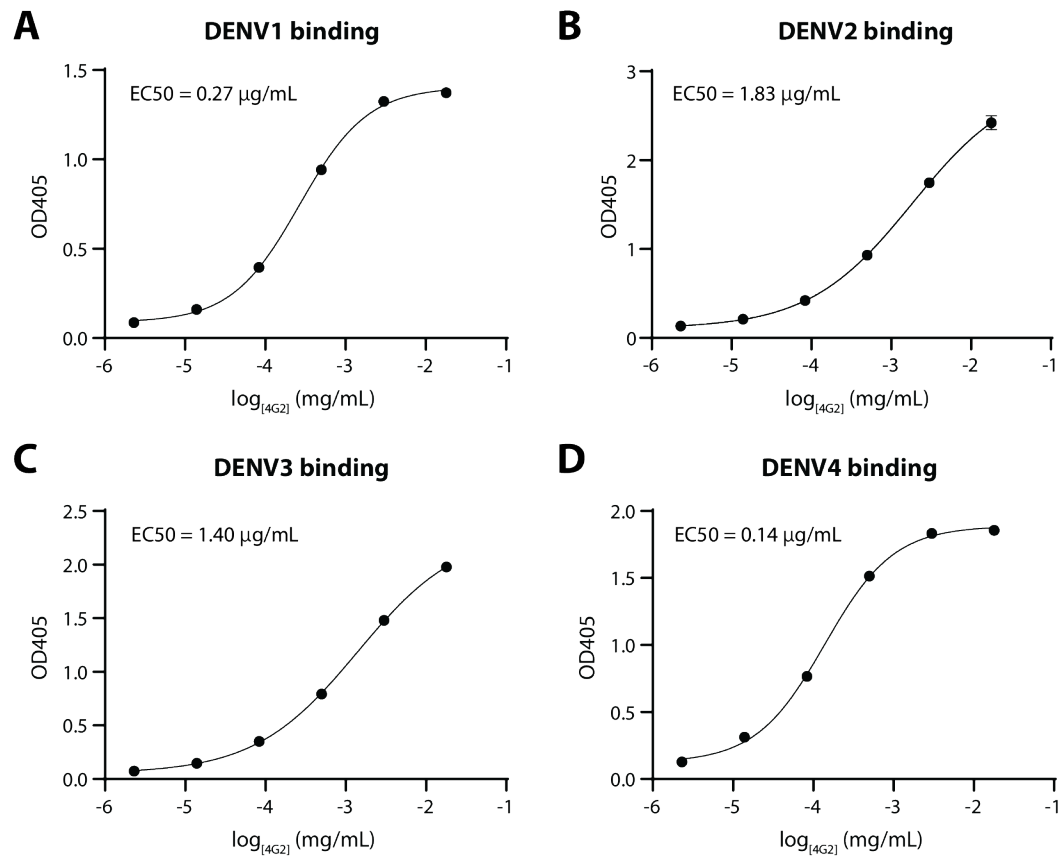
SFig 4. Binding IgG titer against DENV1-4 as area under the curve (AUC). (A) Binding IgG titer to mature DENV2, mean $\pm$ sd. Binding titer of DENV3-vaccinated groups was significantly lower than LPQ/CPQ 2 SC and bivalent groups with CPQ/LPQ (statistics not depicted on graph). (B) Binding IgG titer to mature DENV3, mean $\pm$ sd. Binding titer of DENV2-vaccinated groups was significantly lower than LPQ/CPQ 3 SC and bivalent groups containing sE SC (statistics not depicted on graph). (C) Binding IgG (placebo-subtracted) and neutralizing titer against mature DENVs across monovalent CPQ-sE groups, bivalent groups and tetravalent CPQ-sE SC. The horizontal dotted line represents the limit of detection of the neutralization assays. Statistical analysis by a one-way ANOVA followed by a Tukey's test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001).



SFig 5. Correlation between binding IgG and neut50 of mouse sera for CPQ-sE SC groups. Total IgG level represented as area under the curve (AUC) vs $\log_{\text{Neut50}}$ for DENV2 (A), DENV3 (B), DENV1 (C) and DENV4 (D) for mouse sera from monovalent (CPQ 2/3 SC), bivalent (CPQ 2+3 SC) and tetravalent (CPQ Tet SC) vaccinations. Neut50 is log-transformed to match the scale of AUC, which was calculated using log-transformed dilution factors.

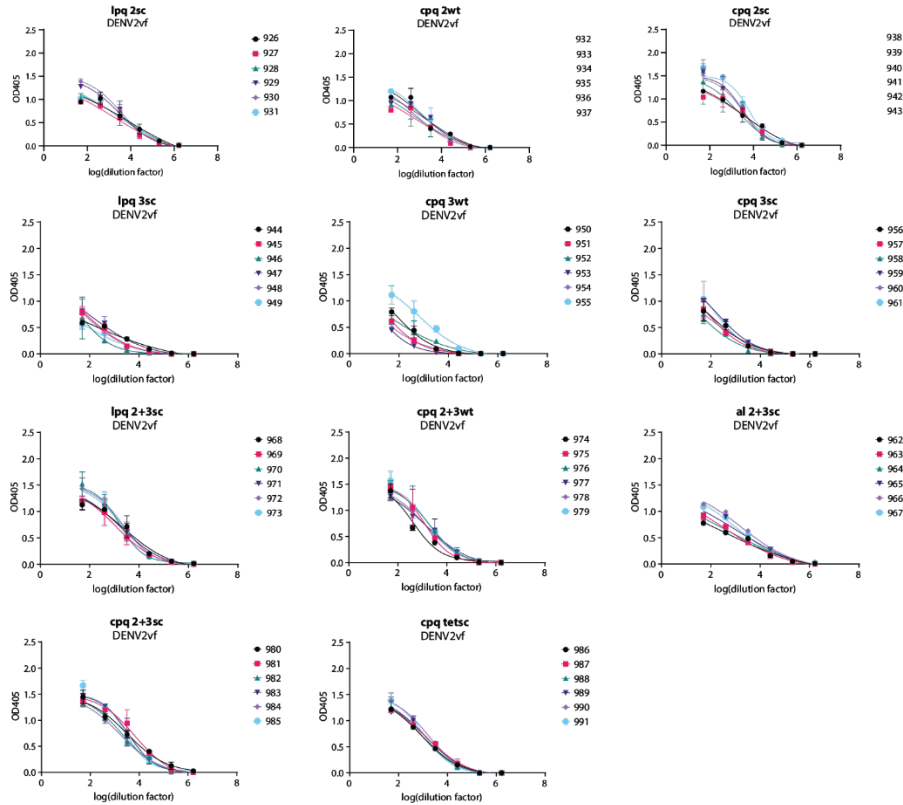


SFig 6. Confirmation of sE depletion by ELISA. Sera was pooled in each group for sE depletion and was incubated with sE-coupled or BSA-coupled beads to remove different Ab populations. Depletion was confirmed completed at 1:200 serum dilution by Ni ELISA to the matching depleting proteins for type-specific Ab depletion (A) and cross-reactive Ab depletion (B). (C) Type-specific and cross-reactive Ab depletion confirmation for CPQ Tet SC group. The dashed line represents no serum control

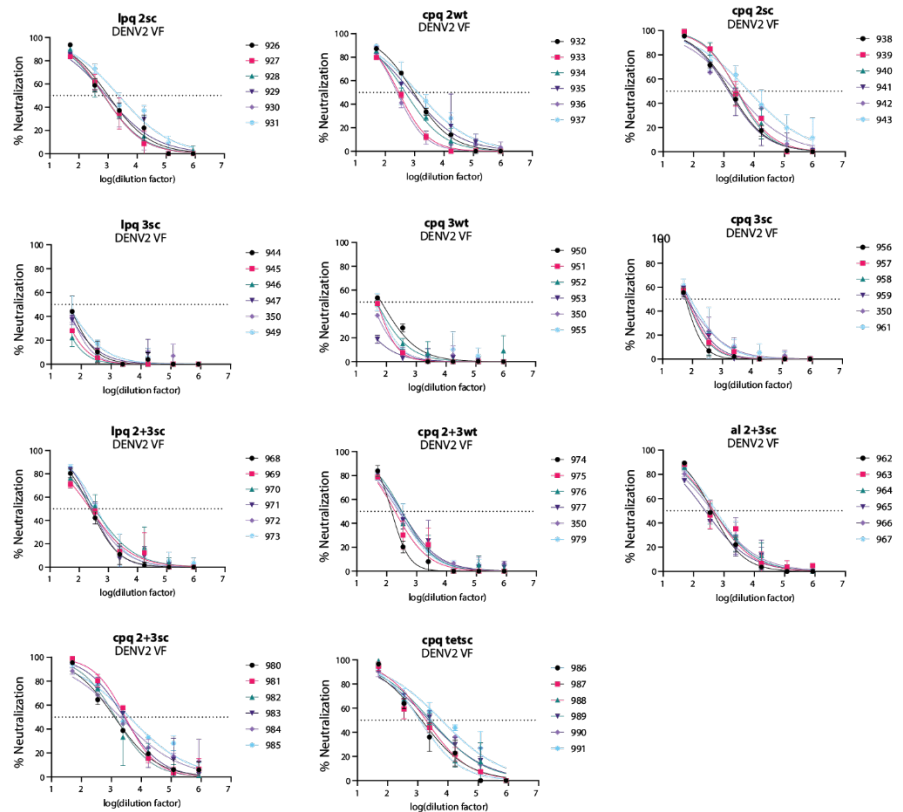


SFig 7. Binding titration of mouse mAb 4G2 against DENV1-4. Mouse mAb 4G2 was titrated against 1M7-captured viruses. The concentrations of viruses used are equivalent to those in serology experiments.

A

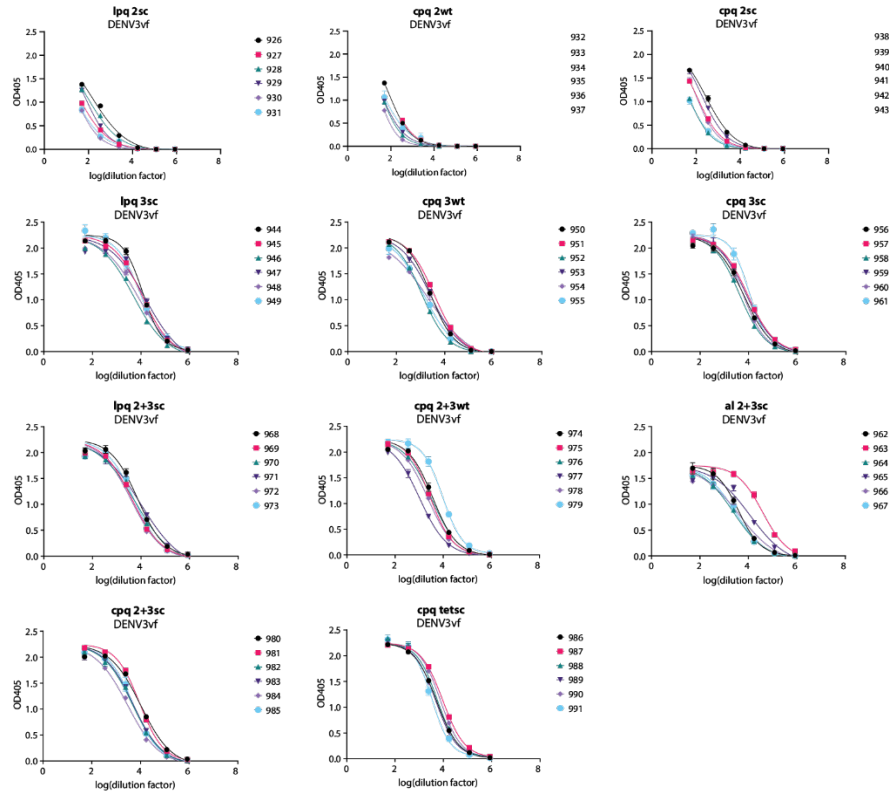


B

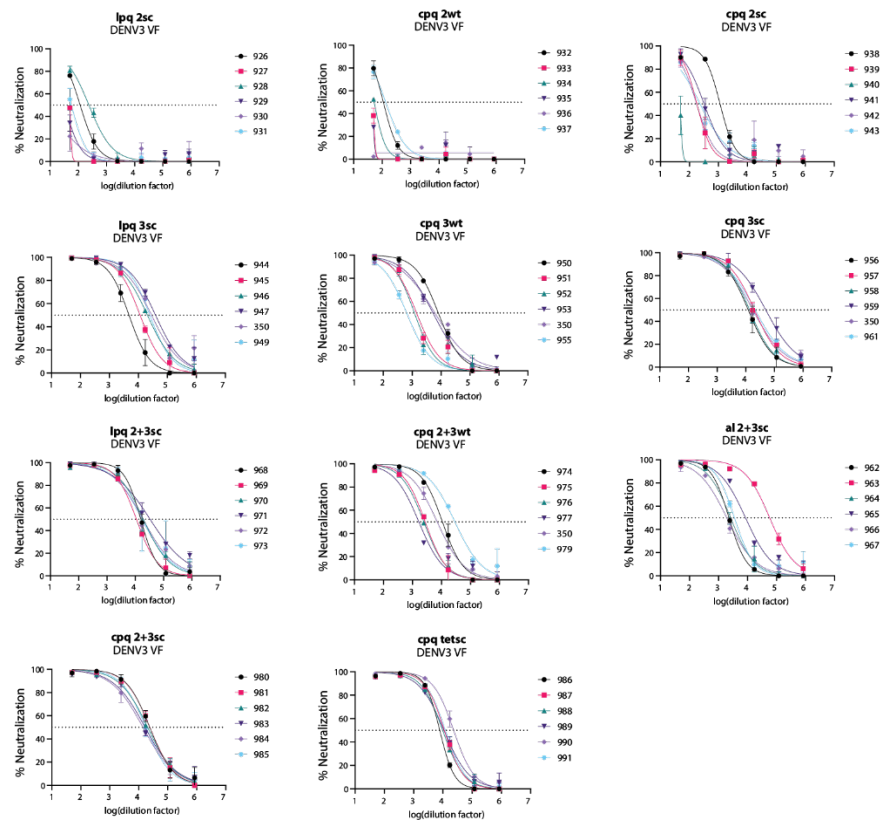


Sfig 8 DENV2 binding titrations (A) and virus neutralization (B) by mouse sera.

A

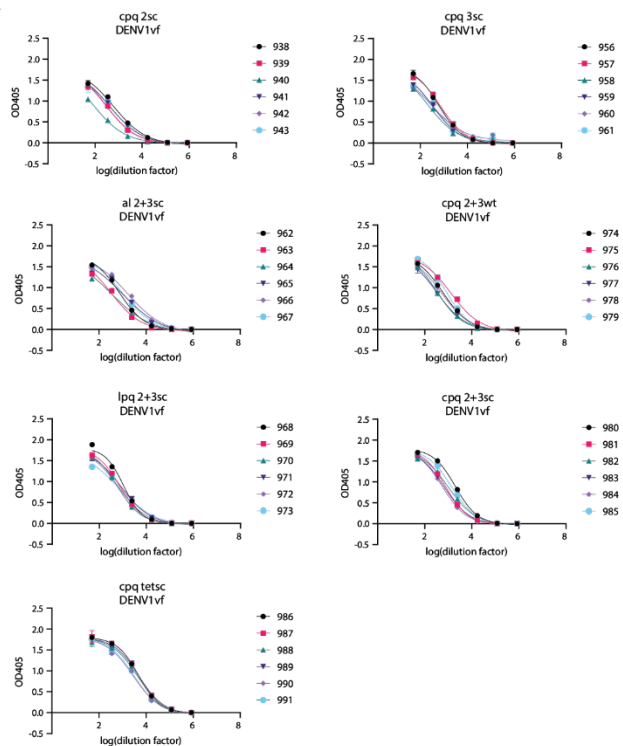


B

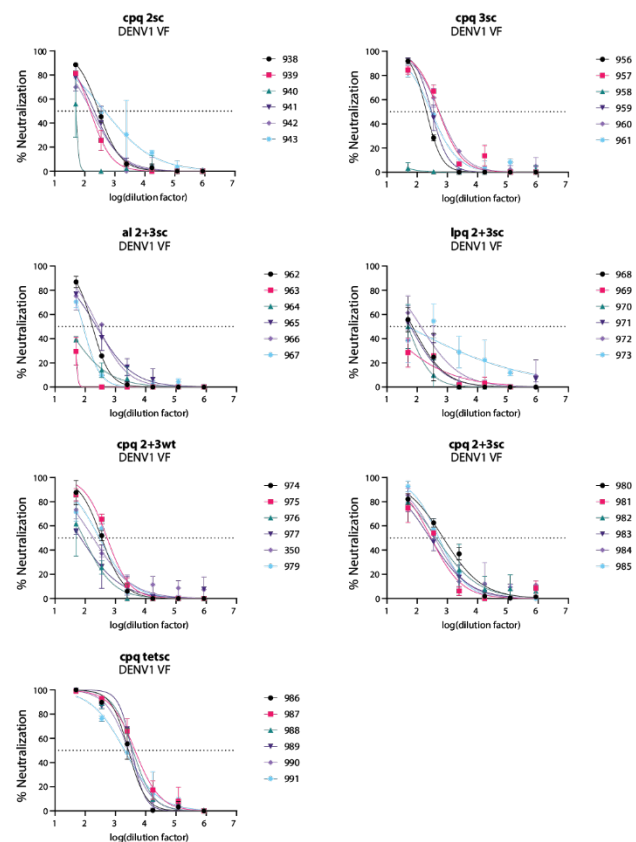


Sfig 9. DENV3 binding titrations (A) and virus neutralization (B) by mouse sera

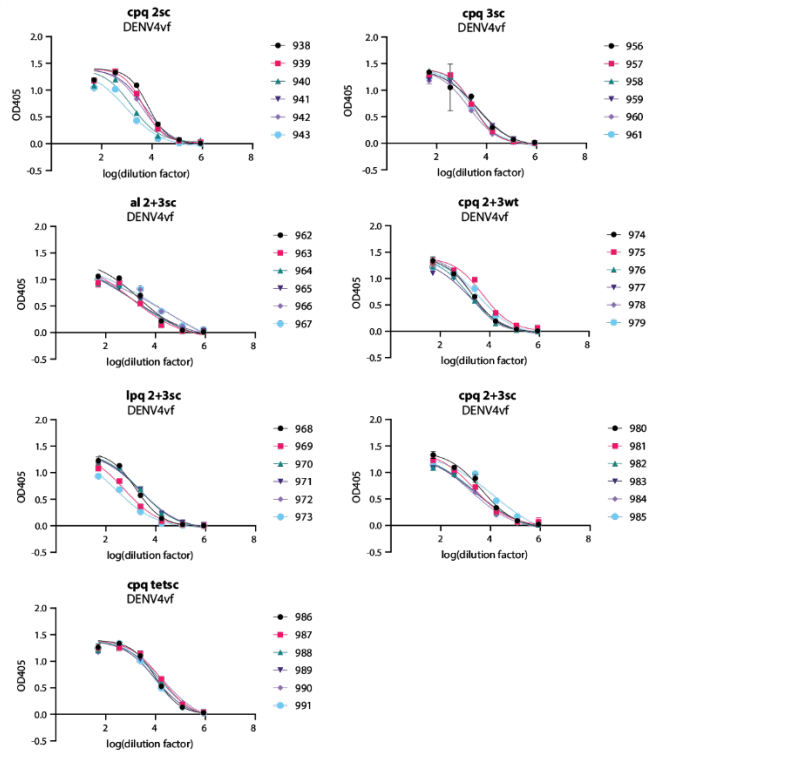
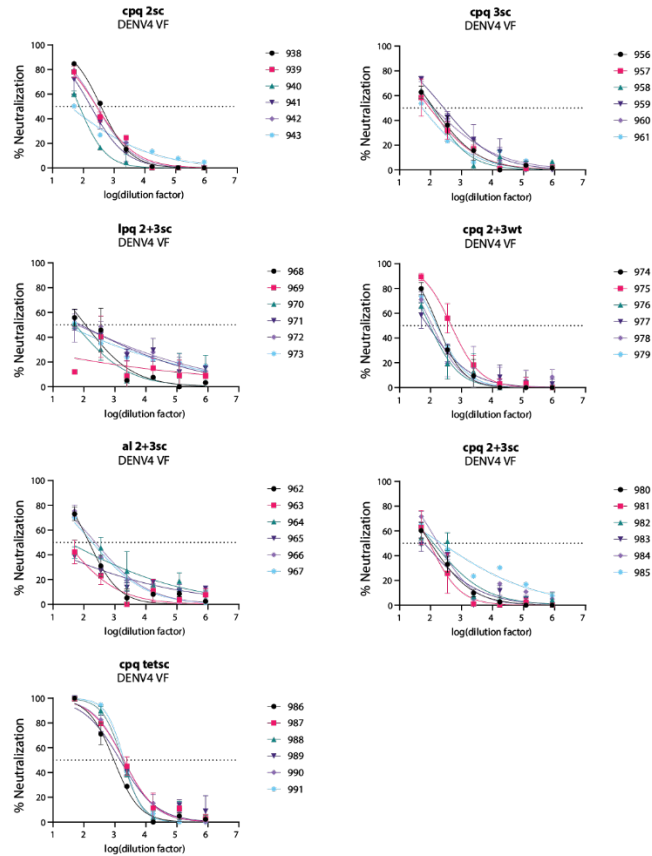
A



B



Sfig 10. DENV1 binding titrations (A) and virus neutralization (B) by mouse sera

A**B****SFig 11. DENV4 binding titration (A) and virus neutralization (B) by mouse sera.**