(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117693359 A
(43)申请公布日 2024.03.12

(21)申请号 202280044271.X

(22)申请日 2022.06.09

(30)优先权数据
63/209,209 2021.06.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/032799 2022.06.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/261297 EN 2022.12.15

(71)申请人 乔治亚大学研究基金会股份有限公司
地址 美国乔治亚州

(72)发明人 T·M·罗斯 J·D·艾伦

(74)专利代理机构 广州川墨知识产权代理事务所(普通合伙) 44485
专利代理师 王丙强 温建洲

(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)
C07K 14/005(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)

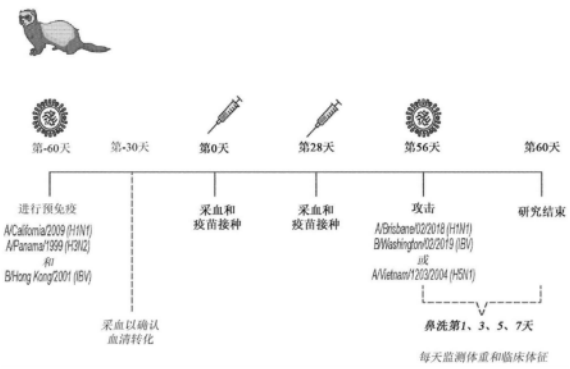
权利要求书4页 说明书53页 附图36页

(54)发明名称

作为免疫原的广泛反应性病毒抗原、其组合物和使用方法

(57)摘要

本文提供了源自流感病毒的非天然存在的、广泛反应性的抗原,其具有免疫原性并且能够在引入受试者后引发针对流感病毒抗原的广泛反应性免疫应答,例如,广泛反应性中和抗体应答。还提供了非天然的、广泛反应性的免疫原、疫苗、病毒颗粒、病毒样颗粒(VLP)以及包含所述免疫原和疫苗的组合物。提供了通过施用所述免疫原、疫苗、VLP或其组合物在人类或非人类受试者中生成免疫应答的方法。特别地,所述免疫原包含流感病毒毒株诸如H1或H3的广泛反应性血凝素(HA)蛋白抗原或可溶性HA蛋白抗原。



CN 117693359 A

1.一种非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原,包含与SEQ ID NO:1-17中任一个的血凝素(HA)蛋白抗原的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或其免疫原性部分。

2.根据权利要求1所述的流感病毒抗原,其包含与SEQ ID NO:1-17中列出的HA蛋白抗原的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的流感病毒抗原,其包含SEQ ID NO:1-17中列出的HA蛋白抗原的氨基酸序列。

4.根据权利要求1或权利要求2所述的流感病毒抗原,其由SEQ ID NO:1-17中列出的HA蛋白抗原的氨基酸序列组成。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的流感病毒抗原,其包含SEQ ID NO:1-8中列出的全长HA蛋白抗原的氨基酸序列。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的流感病毒抗原,其包含SEQ ID NO:9-17中列出的可溶性HA(sHA)蛋白抗原的氨基酸序列。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的流感病毒抗原,其中所述流感病毒是H1或H3流感病毒。

8.一种病毒样颗粒(VLP),其包含根据权利要求1至7中任一项所述的流感病毒抗原。

9.根据权利要求8所述的VLP,其包含编码流感病毒HA抗原的多核苷酸。

10.一种非天然存在的免疫原,其能够生成针对当前和未来流感病毒毒株的免疫应答;其中所述免疫原包含与SEQ ID NO:1-17中列出的血凝素(HA)抗原的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

11.根据权利要求10所述的免疫原,其中所述免疫原包含与SEQ ID NO:1-17中列出的血凝素(HA)抗原的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原,其生成包括中和抗体的产生的免疫应答。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原,其生成包括具有血凝素抑制活性的抗体的产生的免疫应答。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原,其生成包括T淋巴细胞的产生的免疫应答。

15.一种免疫原性组合物或疫苗,其包含根据权利要求1至14中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原。

16.根据权利要求15所述的免疫原性组合物或疫苗,其包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

17.根据权利要求15或16所述的免疫原性组合物或疫苗,其进一步包含佐剂。

18.一种药学上可接受的组合物,其包含根据权利要求1至14中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

19.根据权利要求18所述的药学上可接受的组合物,其进一步包含佐剂。

20.一种在受试者中生成免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至14中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原。

21.一种在受试者中生成免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求15至17中任一项所述的免疫原性组合物或疫苗。

22.一种在受试者中生成免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求18或19所述的药学上可接受的组合物。

23.一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受所述疾病和/或其症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至14中任一项所述的病毒抗原、VLP或免疫原。

24.一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受所述疾病和/或其症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求15至17中任一项所述的免疫原性组合物或疫苗。

25.一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受所述疾病和/或其症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求18或19所述的药学上可接受的组合物。

26.根据权利要求20至25中任一项所述的方法,其中所述受试者被流感病毒感染,或者处于被流感病毒感染的风险中或易受流感病毒感染。

27.根据权利要求20至26中任一项所述的方法,其中向所述受试者伴随施用佐剂。

28.根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述受试者生成包括中和抗体的产生的免疫应答。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述免疫应答进一步包括细胞免疫应答。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述细胞免疫应答包括T淋巴细胞的产生。

31.根据权利要求20至30中任一项所述的方法,其中生成预防性或治疗性免疫应答。

32.根据权利要求20至31中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用一种或多种抗病毒剂。

33.根据权利要求20至32中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物受试者。

34.根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类受试者。

35.根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述受试者是非人类受试者或兽医受试者。

36.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1至14中任一项所述的病毒抗原。

37.根据权利要求36所述的多核苷酸,其编码流感病毒抗原,所述流感病毒抗原包含SEQ ID NO:1-8中列出的全长HA蛋白抗原的氨基酸序列。

38.根据权利要求36所述的多核苷酸,其编码流感病毒抗原,所述流感病毒抗原包含SEQ ID NO:9-17中列出的可溶性HA(sHA)蛋白抗原的氨基酸序列。

39.根据权利要求36至38中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸是RNA或DNA。

40.根据权利要求39所述的多核苷酸,其中所述RNA是mRNA。

41.一种组合物,其包含根据权利要求36至40中任一项所述的多核苷酸以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

42.一种病毒样颗粒(VLP),其包含根据权利要求36至40中任一项所述的多核苷酸。

43.一种单价免疫原,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原。

44.根据权利要求43所述的单价免疫原,其中所述免疫原性流感病毒抗原包含以下物质:包含SEQ ID NO:15中列出的序列的Y2抗原;包含SEQ ID NO:3、7或9中列出的序列的J1

抗原;包含SEQ ID NO:4中列出的序列的J2抗原;包含SEQ ID NO:5中列出的序列的J3抗原;包含SEQ ID NO:6或8中列出的序列的J4抗原;包含SEQ ID NO:11中列出的序列的NG1抗原;包含SEQ ID NO:2或12中列出的序列的NG2抗原;或包含SEQ ID NO:13中列出的序列的NG3抗原。

45.一种多价免疫原,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原中的至少两种。

46.根据权利要求45所述的多价免疫原,其中所述免疫原包含所述非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原中的两种。

47.根据权利要求45或46所述的多价免疫原,其中所述免疫原是二价的并且包含以下项:包含SEQ ID NO:15中列出的序列的Y2抗原和包含SEQ ID NO:6或8中列出的序列的J4抗原的组合,或者包含SEQ ID NO:15中列出的序列的Y2抗原和包含SEQ ID NO:2或12中列出的序列的NG2抗原的组合。

48.根据权利要求43所述的多价免疫原,其中所述免疫原包含所述非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原中的八种。

49.根据权利要求45至48中任一项所述的多价免疫原,其中所述免疫原包含重组流感血凝素(rHA)多肽。

50.一种病毒颗粒或病毒样颗粒(VLP),其包含编码根据权利要求45至49中任一项所述的免疫原性流感病毒抗原的一个或多个多核苷酸。

51.一种组合物,其包含根据权利要求43或44所述的单价免疫原。

52.一种组合物,其包含根据权利要求45至49中任一项所述的多价免疫原。

53.一种组合物,其包含根据权利要求50所述的病毒颗粒或VLP。

54.根据权利要求51所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

55.根据权利要求52所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

56.根据权利要求53所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

57.一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受所述疾病和/或其症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求54所述的药学上可接受的组合物。

58.一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受所述疾病和/或其症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求55所述的药学上可接受的组合物。

59.一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受所述疾病和/或其症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求56所述的药学上可接受的组合物。

60.一种在受试者中生成免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求54所述的药学上可接受的组合物。

61.一种在受试者中生成免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的

根据权利要求55所述的药学上可接受的组合物。

62.一种在受试者中生成免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求56所述的药学上可接受的组合物。

作为免疫原的广泛反应性病毒抗原、其组合物和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年6月10日提交的美国临时申请号63/209,209的优先权和权益，该临时申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 流感病毒感染是每年急性呼吸道疾病的重要就医原因，并且在美国和全世界均造成巨大的发病、死亡和经济负担。2009年流感大流行前不久，与流感相关的死亡每年造成超过611,000的生命损失，估计每年给社会造成870亿美元的损失。美国疾病控制与预防中心2017年估计，季节性流行性感冒疫苗的有效性仅为42％。这种有限的有效性是由于甲型流感H3N2疫苗毒株发生突变，从而导致感染个体的流行性感冒。此外，在2017年至2018年的时间段，乙型流感病毒引起的流行性感冒病例有所增加。由于严重的流行性感冒季节仅在美国就会导致约50,000人死亡，因此迫切需要新的和改进的提供针对病毒(特别是当前和未来流行的流感病毒毒株)的广泛保护的免疫原和疫苗。

[0004] 其他病毒类型(诸如冠状病毒)的感染也会在人类和其他物种(例如，禽类物种，诸如家禽)中引起严重的疾病和病状。此类感染和疾病对产肉和产蛋禽类动物(例如，鸡)的健康和性能产生不利影响，从而导致行业的重大经济损失。因此，还需要新的和改进的提供针对当前和未来流行的其他病毒毒株(例如，禽病毒及其毒株)的广泛保护的免疫原和疫苗。

发明内容

[0005] 如本文所述，提供了非天然存在的、广泛反应性的抗原和抗原序列，其源自流感病毒，诸如流感H1或H3病毒(也称为“H1或H3流感”、“H1或H3流感病毒”，或在本文简称为“H1或H3”)。在实施例中，非天然存在的广泛反应性抗原和抗原序列包含源自H1和H3流感病毒的HA的氨基酸序列，如本文SEQ ID NO:1-17中所提供的。在一个实施例中，HA抗原包含全长HA多肽。在一个实施例中，HA抗原包含可溶性HA(sHA)，其缺少HA多肽的跨膜结构域和尾部结构域。

[0006] 本文所述的流感病毒抗原可以是结构蛋白(多肽)或肽并且包括例如血凝素(HA)蛋白和/或包含HA蛋白的HA1(头部)或HA2(尾部或茎部)部分(结构域)，并且是有效的免疫原，其在受试者中引发针对HA蛋白并最终针对受试者中当前和未来病毒毒株的广泛反应性免疫应答。在一个实施例中，HA抗原构成全长HA蛋白，或缺少HA蛋白的跨膜(TM)和尾部结构域的可溶性HA(sHA)。如本文所提及的，在受试者中引发免疫应答的病毒抗原或抗原序列(例如，流感病毒抗原)是免疫原性抗原(即，免疫原)。这些流感病毒免疫原被称为广泛反应性的，因为它们可以引发针对流感病毒的不同亚型或毒株的广泛反应性抗体的产生，这些亚型或毒株在它们的蛋白质抗原及其序列(特别是流感病毒的HA抗原)中具有序列相似性和变异性以及表位(抗原决定簇)多样性。

[0007] 存在四种不同类型的流感病毒，其中三种(甲型、乙型和丙型流感)感染人类。在这三种传染性病毒中，甲型和乙型流感子集是最常见的类型，并且这些子集中的每一种都发

展出不同的毒株或亚型。甲型和乙型流感病毒通常在人类中传播并引起季节性流行性感冒流行。作为非限制性示例,H1N1、H2N2、H3N2和H5N1毒株是甲型流感的亚型,其通常引起严重的流行性感冒疾病并且通过不断改变其表面蛋白(诸如血凝素(HA)蛋白)来调整以适合逃避被根除。流感病毒毒株的治疗尤其困难,因为其突变率异常高,并且无法生成有效对抗HA表面蛋白发生的相对快速变化的疫苗。

[0008] 在一个实施例中,具有免疫原性的抗原(抗原序列)源自甲型流感病毒。在某些实施例中,免疫原源自H1或H3流感病毒毒株或类型。在一个实施例中,免疫原源自乙型流感病毒。在一个实施例中,抗原是病毒的结构蛋白。在一个特定实施例中,流感抗原是血凝素(HA)。在一个实施例中,HA抗原是全长HA。在一个实施例中,HA抗原是可溶性HA (sHA)。在其他实施例中,流感抗原是神经氨酸酶(NA)。

[0009] 在一个方面,非天然存在的流感病毒氨基酸序列和包含本文所述序列的抗原(例如,结构抗原)含有反映过去、当前和未来流感病毒抗原的序列相似性和变异性的广泛反应性表位。因此,此类抗原序列和包含该序列的抗原是"非天然存在的、广泛反应性的"抗原。抗原具有免疫原性,并且当引入或施用于受试者时,在受试者中引发针对流感病毒(特别是H1或H3流感病毒蛋白抗原,诸如HA)或其抗体结合部分的广泛反应性抗体(诸如中和抗体)。在一个实施例中,引发的抗体还针对相关但不相同的H1或H3流感病毒类型具有反应性。在一个实施例中,此类流感病毒序列是氨基酸序列。在一个实施例中,流感病毒序列是多核苷酸序列,例如编码本文所述抗原的氨基酸序列的多核苷酸序列。为了便于参考,本文所述的流感病毒的"非天然存在的、广泛反应性的"抗原被称为"广泛反应性抗原"。

[0010] 因此,本文所述的广泛反应性流感病毒抗原是免疫原,因为它们在受试者中引发广泛反应性免疫应答。免疫应答特别呈中和抗体应答的形式,例如,特异性针对流感病毒的HA抗原并中和HA蛋白的活性的中和抗体。因此,还提供了含有本文所述的广泛反应性流感病毒抗原的免疫原和免疫原性组合物,包括在受试者中诱导针对流感病毒、诸如针对流感病毒的HA蛋白的免疫应答的免疫原性组合物,诸如疫苗(例如,多肽或多核苷酸产物)。为了便于参考,本文所述的"非天然存在的、广泛反应性的流感病毒免疫原"将被称为"广泛反应性免疫原"。

[0011] 还提供了使用本文所述的免疫原在受试者中诱导针对流感感染、疾病和/或其症状的免疫应答的方法。在一个特定实施例中,流感病毒抗原是流感病毒类型或亚型(诸如H1或H3流感病毒类型)或与其相关的病毒类型的HA、HA1或HA2蛋白,或其抗体结合部分。在其他实施例中,HA蛋白是全长或可溶性HA (sHA)。还提供了使用免疫原在受试者中诱导免疫应答的方法。

[0012] 在一个方面,HA免疫原性抗原与下文实例1中列出的SEQ ID NO:1-17的HA蛋白中的一种或多种的HA氨基酸序列至少或等于85%、至少或等于90%、至少或等于91%、至少或等于92%、至少或等于93%、至少或等于94%、至少或等于95%、至少或等于96%、至少或等于97%、至少或等于98%、或至少或等于99%相同。

[0013] 在一个方面,提供了一种非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原,其包含与实例1中列出的SEQ ID NO:1-17中任一个的血凝素(HA)抗原的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,或其免疫原性部分。在一个实施例中,流感病毒抗原包含与SEQ ID NO:1-17中任一个中列出的HA抗原的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。在一个实施例中,流感病

毒抗原包含SEQ ID NO:1-17中任一个中列出的HA抗原的氨基酸序列。在一个实施例中,流感病毒抗原由SEQ ID NO:1-17中任一个中列出的HA抗原的氨基酸序列组成。在一个实施例中,HA抗原是全长HA蛋白。在一个实施例中,HA抗原是可溶性HA蛋白,其例如缺少HA蛋白的TM和尾部部分。在一个实施例中,流感病毒抗原包含SEQ ID NO:1-8中列出的全长HA (sHA)蛋白抗原的氨基酸序列。在一个实施例中,流感病毒抗原包含SEQ ID NO:9-17中列出的可溶性HA(sHA)蛋白抗原的氨基酸序列。在一个实施例中,流感病毒是H1或H3流感病毒。

[0014] 另一方面提供了一种病毒样颗粒(VLP),其包含根据前述方面中任一个的流感病毒免疫原性抗原。在一个实施例中,VLP包含编码流感病毒抗原的多核苷酸。在一个实施例中,VLP包含编码流感病毒HA或sHA抗原的多核苷酸。在一个实施例中,VLP包含编码多肽的多核苷酸,该多肽包含下文实例1中提供的SEQ ID NO:1-17中任一个的氨基酸序列。在一个实施例中,流感病毒是H1或H3流感病毒。在一个实施例中,多核苷酸是RNA或DNA。在一个实施例中,RNA是mRNA。

[0015] 另一方面,提供了一种非天然存在的免疫原,其能够生成针对当前和未来流感病毒毒株的免疫应答;其中该免疫原包含与实例1中提供的SEQ ID NO:1-17中列出的血凝素(HA)抗原或sHA抗原的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一个实施例中,免疫原包含与实例1中提供的SEQ ID NO:1-17中列出的血凝素(HA)抗原或sHA抗原的氨基酸序列至少98%相同的氨基酸序列。

[0016] 在本文上述方面中任一个的实施例中,病毒抗原、VLP或免疫原引发免疫应答,其包括中和抗体的产生。在一个实施例中,免疫应答包括具有血凝素抑制活性和/或神经氨酸酶抑制活性的抗体的产生。在一个实施例中,免疫应答进一步包括细胞免疫应答,例如抗原应答性T淋巴细胞的产生。

[0017] 另一方面提供了一种免疫原性组合物或疫苗,其包含前述方面和/或实施例中任一个的流感病毒免疫原或VLP。在一个实施例中,免疫原性组合物或疫苗包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施例中,免疫原性组合物或疫苗进一步包含佐剂。

[0018] 另一方面提供了一种药学上可接受的组合物,其包含前述方面和/或实施例中任一个的流感病毒抗原、免疫原或VLP,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施例中,组合物进一步包含佐剂。在一个实施例中,病毒或病毒抗原源自H1或H3流感病毒。在一个实施例中,HA抗原或免疫原是全长HA或可溶性流感HA抗原或免疫原。在实施例中,全长HA或可溶性HA流感抗原或免疫原包含实例1中提供的SEQ ID NO:1-17中列出的氨基酸序列。

[0019] 另一方面提供了一种药学上可接受的组合物,其包含上述方面的免疫原性组合物或疫苗以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0020] 另一方面提供了一种在受试者中生成免疫应答的方法,其中该方法包括向有此需要的受试者施用有效量的前述方面和/或实施例中任一个的病毒抗原、VLP、免疫原、免疫原性组合物、疫苗或药物组合物。

[0021] 另一方面提供了一种治疗由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状或保护受试者免受该疾病和/或其症状的方法,该方法包括向受试者施用有效量的前述方面和/或实施例中任一个的病毒抗原、VLP、免疫原、免疫原性组合物、疫苗或药物组合物。在该方法的一个实施例中,受试者被流感病毒感染,或者处于被流感病毒感染的风险中或易被流感病毒感

染。在该方法的一个实施例中,引发的免疫应答包括中和抗体的产生和/或细胞免疫应答,例如T淋巴细胞的产生。在该方法的一个实施例中,向受试者伴随施用佐剂。在该方法的一个实施例中,免疫应答是预防性的或治疗性的。在该方法的一个实施例中,向受试者施用佐剂或一种或多种抗病毒剂。在该方法的一个实施例中,受试者是人类受试者。在该方法的一个实施例中,受试者是非人类受试者或兽医受试者。

[0022] 另一方面提供了一种多核苷酸,其编码前述方面和所述实施例中任一个的病毒抗原、特别是流感HA抗原(全长或可溶性HA)。在一个实施例中,多核苷酸是DNA或RNA。在一个实施例中,多核苷酸是mRNA。在一个实施例中,病毒抗原是HA蛋白抗原。在一个特别的实施例中,HA蛋白抗原包含实例1中提供的SEQ ID NO:1-17中任一个的氨基酸序列。在实施例中,HA蛋白抗原是全长HA或可溶性HA。在一个实施例中,多核苷酸编码流感病毒抗原,其包含SEQ ID NO:1-8中列出的全长HA(sHA)蛋白抗原的氨基酸序列。在一个实施例中,多核苷酸编码流感病毒抗原,其包含SEQ ID NO:9-17中列出的可溶性HA (sHA)蛋白抗原的氨基酸序列。在一个实施例中,病毒是流感病毒。在一个实施例中,流感病毒是H1或H3流感病毒。在一个实施例中,上述多核苷酸含在组合物中,该组合物包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施例中,上述多核苷酸含在病毒样颗粒(VLP)中。

[0023] 另一方面,提供了一种单价免疫原,其包含上述方面和/或其实施例的非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原。在一个实施例中,免疫原性流感病毒抗原包含本文所述的以下非天然存在的、广泛反应性的流感多肽免疫原:包含SEQ ID NO:15中列出的序列的Y2;包含SEQ ID NO:3、7或9中列出的序列的J1;包含SEQ ID NO:4中列出的序列的J2;包含SEQ ID NO:5中列出的序列的J3;包含SEQ ID NO:6或8中列出的序列的J4;包含SEQ ID NO:11中列出的序列的NG1;包含SEQ ID NO:2或12中列出的序列的NG2;或包含SEQ ID NO:13中列出的序列的NG3。

[0024] 另一方面,提供了一种多价免疫原,其包含上述方面和/或其实施例的非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原中的至少两种。在一个实施例中,免疫原包含非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原中的两种。在实施例中,免疫原是二价的并且包含:包含SEQ ID NO:15中列出的序列的Y2和包含SEQ ID NO:6或8中列出的序列的J4的组合,或者包含SEQ ID NO:15中列出的序列的Y2和包含SEQ ID NO:2或12中列出的序列的NG2的组合。在一个实施例中,多价免疫原包含本文所述的非天然存在的且免疫原性的流感病毒抗原中的八种。在前述单价或多价免疫原的实施例中,免疫原包含重组流感血凝素(rHA)多肽。在前述单价或多价免疫原的实施例中,免疫原包含重组流感神经氨酸酶(rNA)多肽。

[0025] 另一方面,提供了一种病毒颗粒或病毒样颗粒(VLP),其包含编码上述方面和/或其实施例中的任一个的免疫原性流感病毒抗原的一个或多个多核苷酸。

[0026] 另一方面,提供了一种组合物,其包含上述方面和/或其实施例中任一个的单价或多价免疫原。在一个实施例中,组合物进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物,即药物组合物。

[0027] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含上述方面和/或其实施例的病毒颗粒或VLP。在一个实施例中,组合物进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物,即药物组合物。

[0028] 在一个方面,提供了一种治疗或保护受试者免受由流感病毒感染引起的疾病和/

或其症状的方法,其中该方法包括向受试者施用有效量的上述药学上可接受的组合物,该药学上可接受的组合物包含上述方面和/或其实施例中任一个的单价或多价免疫原。

[0029] 在一个方面,提供了一种治疗或保护受试者免受由流感病毒感染引起的疾病和/或其症状的方法,其中该方法包括向受试者施用有效量的上述药学上可接受的组合物,该药学上可接受的组合物包含上述方面和/或其实施例的病毒颗粒或病毒样颗粒(VLP)。

[0030] 在一个方面,提供了一种在受试者中生成免疫应答的方法,其中该方法包括向受试者施用有效量的药学上可接受的组合物,该药学上可接受的组合物包含上述方面和/或其实施例中任一个的单价、多价免疫原、或者病毒颗粒或病毒样颗粒。

[0031] 定义

[0032] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语具有与本文所述方面和实施例所属或所涉及领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。以下参考文献为本领域技术人员提供了本文所述方面和实施例中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第2版1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等人(编),Springer Verlag(1991);Benjamin Lewin,Genes V,由Oxford University Press出版,1994(ISBN 0-19-854287-9);Kendrew等人(编);The Encyclopedia of Molecular Biology,由Blackwell Science Ltd.出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,Robert A.Meyers(编),由VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);以及Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。除非另有说明,否则如本文所用的以下术语具有以下赋予它们的含义。

[0033] “佐剂”是指非特异性增强针对抗原的免疫应答的物质或媒介物。佐剂可以包括其上吸附有抗原的矿物质悬浮液(例如,明矾、氢氧化铝或磷酸盐);或油包水乳液,其中抗原溶液乳化在矿物油(例如,弗氏不完全佐剂)中,有时包含灭活的分枝杆菌(弗氏完全佐剂)以进一步增强抗原性。免疫刺激性寡核苷酸(诸如包含CpG基序的那些)也可用作佐剂(参见例如,美国专利号6,194,388;6,207,646;6,214,806;6,218,371;6,239,116;6,339,068;6,406,705;和6,429,199)。佐剂还包括生物分子,诸如共刺激分子。示例性生物佐剂包括但不限于白细胞介素-1(IL-2)、蛋白质记忆T细胞引诱剂“调节激活正常T细胞表达和分泌因子”(RANTES)、粒细胞-巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、干扰素-γ(IFN-γ)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、淋巴细胞功能相关抗原3(LFA-3,也称为CD58)、簇分化抗原72(CD72)(B细胞响应性的负调节因子)、外周膜蛋白B7-1(B7-1,也称为CD80)、外周膜蛋白B7-2(B7-2,也称为CD86)、TNF配体超家族成员4配体(OX40L)或属于TNF超家族的2型跨膜糖蛋白受体(4-1BBL)。

[0034] “施用”意指向受试者给予、供应、分配、递送或施加组合物、药剂、治疗剂等,或者将或使组合物等与受试者接触。施用(administering/administration)可以通过多种途径中的任一种来完成,诸如但不限于局部、口服、皮下、肌内、腹膜内、静脉内(IV)、(注射)、鞘内、肌内、皮肤、皮内、颅内、吸入、直肠、阴道内或眼内。

[0035] “试剂”意指任何小分子、小分子化合物、抗体、核酸分子、肽、多肽或其片段。

[0036] “改变”意指基因或多肽的表达水平或活性的变化(增加或减少),如通过标准领域

已知的方法(诸如本文所述的那些方法)所检测的。如本文所用,改变包括表达水平的5%的变化、表达水平的10%的变化,优选25%的变化,更优选40%的变化,并且最优选表达水平的50%或更大的变化。

[0037] “改善”意指降低、减少、减小、抑制、减弱、阻止或稳定疾病或病理状况的发展或进展。

[0038] “类似物”意指不相同但具有类似功能或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留相应天然存在的多肽的生物活性,同时具有相对于天然存在的多肽增强类似物功能的某些生化修饰。此类生化修饰可以增加类似物的蛋白酶抗性、膜通透性或半衰期,而不改变例如配体结合。类似物可以包括非天然氨基酸。

[0039] “抗体”意指由B淋巴细胞产生并具有特定氨基酸序列的免疫球蛋白(Ig)分子。暴露于特定抗原(免疫原)后,在受试者(人或其他动物或哺乳动物)中诱发或引发抗体。能够生成针对特定抗原/免疫原的抗体/免疫球蛋白(即免疫应答)的受试者被认为具有免疫能力。抗体的特征在于以某种可证明的方式与抗原或免疫原特异性反应(例如,结合),抗体和抗原/免疫原各自就彼此而言定义。

[0040] “引发抗体应答”是指抗原、免疫原或其他分子诱导抗体产生的能力。抗体具有不同类别(例如,IgM、IgG、IgA、IgE、IgD)和亚型或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4)。在受试者中引发的抗体/免疫球蛋白应答可以通过与病原体(例如,传染性或致病性)上的表位(抗原决定簇)结合并阻断或抑制该病原体的活性,和/或通过与从受试者的系统(或身体)中清除(例如,经由肝脏)的该病原体形成结合复合物来中和该病原体。

[0041] 如本文所用,“广泛反应性”意指在受试者中引发针对病原体衍生的抗原蛋白(例如,病毒蛋白序列,诸如HA或NA)的免疫应答,该免疫应答足以阻断、抑制、阻碍、中和或预防广泛范围的相关病原体(诸如特定亚型内的大多数或所有流感病毒)的感染。在一个实施例中,受试者是哺乳动物受试者。在一个实施例中,受试者是禽类受试者。

[0042] “抗原”意指可以在动物中刺激产生抗体或T细胞应答的化合物、组合物或物质,包括注射或吸收到动物中的组合物。抗原与特定体液或细胞免疫的产物(包括由异源免疫原诱导的那些)发生反应。在所公开的组合物和方法的一些实施例中,抗原是流感血凝素(HA)蛋白。在一个实施例中,HA蛋白是全长HA。在一个实施例中,HA蛋白是sHA,其被截短并且不包括跨膜结构域和尾部结构域。在许多情况下,在受试者中引发或刺激免疫应答的抗原被称为“免疫原”。在具体实施例中,HA蛋白包含SEQ ID NO:1-17(实例1)中提供的氨基酸序列。

[0043] 术语“抗原漂移”是指生物体或微生物(诸如病毒)变异的机制,其涉及编码抗体结合位点(也称为抗原决定簇或表位)的基因内突变的积累。这个过程产生了新的病毒/病毒颗粒毒毒株,其不会被最初针对突变前病毒毒株抗原生成的抗体有效地抑制或阻断,从而使病毒更容易在整个部分免疫群体中传播。作为示例,抗原漂移发生在甲型流感病毒和乙型流感病毒二者中。

[0044] 在活病毒的情况下,术语“减毒”反映了减毒病毒,条件是与野生型病毒在受试者中产生疾病的能力相比,该病毒感染细胞或受试者的能力和/或该病毒产生疾病的能力降低(例如,减小、消除或排除)。通常,减毒病毒在施用于具有免疫能力受试者后至少保留一些引发免疫应答的能力。在某些情况下,减毒病毒可以引发保护性免疫应答,而不会引起任

何感染体征或症状。在一些实施例中,相对于野生型病毒在受试者中引起疾病或病状的能力,减毒病毒在受试者中引起疾病或病状的能力降低至少约或等于5%、或至少约或等于10%、或至少约或等于25%、至少约或等于50%、至少约或等于75%、或至少约或等于80%、或至少约或等于85%、或至少约或等于90%、或至少约或等于95%或更高。

[0045] 术语“进化枝”是指已知流感病毒的不同分类(通常称为亚型),诸如例如甲型流感H3N2病毒。作为示例,H3N2进化枝中的病毒在遗传上相关,但不共享确切的病毒基因组。如技术人员所理解的,存在本领域指定的H3N2病毒亚型的许多进化枝和亚进化枝。作为示例,一个进化枝是3C.2a;该进化枝的亚进化枝包括3C.2a.1、3C.2a.2、3C.2a.3和3C.2a.4。另外,存在本领域指定的H5N1病毒亚型的至少十个不同的进化枝:进化枝0、进化枝1、进化枝2、进化枝3、进化枝4、进化枝5、进化枝6、进化枝7、进化枝8和进化枝9(Abdel-Ghafar等人,N Engl J Med 358:261-273,2008)。进化枝2进一步分为亚进化枝(包括进化枝2.1、进化枝2.2、进化枝2.3、进化枝2.4和进化枝2.5)。

[0046] “密码子优化的”核酸是指已经改变的核酸序列,使得密码子对于在特定系统(诸如特定物种或物种组)中的表达而言是最佳的。例如,可以优化核酸序列以用于在哺乳动物细胞中表达。密码子优化不会改变所编码蛋白质的氨基酸序列。

[0047] 在本公开中,“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“含有(containing)”和“具有(having)”等可以具有美国专利法中赋予它们的含义,并且可以意指“包括(includes)”、“包括(including)”等;“基本上由……组成(consisting essentially of)”或“基本上由……组成(consists essentially)”同样具有美国专利法中规定的含义并且该术语是开放式的,允许存在多于所列举的那些,只要所列举的那些的基本或新颖特征不因存在多于所列举的那些而改变,但是排除现有技术实施例。

[0048] “检测”是指识别待检测的分析物、化合物、试剂或物质的存在、不存在或量。“可检测标记”是指当与目的分子连接时使后者可例如经由光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的组合物。有用的可检测标记的非限制性示例包括放射性同位素、磁珠、金属珠、胶体颗粒、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,如ELISA中常用的)、生物素、地高辛或半抗原。

[0049] “疾病”意指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何病症、疾患或病状。疾病的示例包括由流感病毒感染引起的那些以及由身体感染H1或H3流感病毒引起的症状和副作用。流感病毒在感染个体中引起流行性感冒及其症状。

[0050] “有效量”意指相对于未经治疗的患者改善、降低、改进、消除、减小或排除疾病、病症或病状的症状和/或作用所需的活性治疗剂、组合物、化合物、生物制品(例如,疫苗或治疗性肽、多肽或多核苷酸)的量。在一个实施例中,有效量是引发免疫应答所需的抗原的量。当用于实施疾病、病症或病状的治疗性治疗方法时,免疫原或包含免疫原的组合物的有效量根据施用方式、受试者的年龄、体重和一般健康状况而变化。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和剂量方案。此类量被称为“有效”量。

[0051] “治疗有效量”是指足以在用特定试剂治疗的受试者中实现期望效果的该试剂的量。例如,这可以是可用于在受试者中引发免疫应答和/或用于预防流感病毒感染的流感病毒免疫原或疫苗的量。理想地,在本公开的上下文中,流感疫苗或免疫原性组合物的治疗有效量是足以在受试者中增加对流感病毒引起的感染的抗性、预防、改善、降低和/或治疗由

流感病毒引起的感染而不引起对受试者的实质细胞毒性作用的量。可用于在受试者中增加对感染的抗性、预防、改善、降低和/或治疗感染的免疫原性组合物(或疫苗)的有效量取决于例如所治疗的受试者、治疗组合物的施用方式以及其他因素,如上文所述。

[0052] “片段”意指多肽或核酸分子的一部分。该部分优选含有参考核酸分子或多肽全长的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。片段可以含有10、20、30、40、50、60、70、80、90、或100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个核苷酸或氨基酸。多肽的部分或片段可以是肽。在抗体或免疫球蛋白片段的情况下,片段通常与靶抗原结合。

[0053] “融合蛋白”意指通过表达由编码两种不同(异源)蛋白质或肽的至少一部分的核酸序列工程化的核酸(多核苷酸)序列而生成的蛋白质。为了创建融合蛋白,核酸序列必须位于相同的阅读框中并且不含内部终止密码子。例如,融合蛋白包括与异源蛋白融合的流感HA蛋白或NA蛋白。

[0054] “基因疫苗”意指包含编码抗原的多核苷酸的免疫原性组合物。

[0055] “病毒多肽”,诸如H1或H3流感病毒,意指与抗原的氨基酸序列至少85%相同、或至少95%或更高相同的氨基酸序列,该抗原例如下文SEQ ID NO:1-17中列出的HA蛋白或其能够在免疫受试者中诱导针对病毒、病毒感染和/或其症状的免疫应答的片段。在实施例中,流感病毒多肽包含本文所述和下文SEQ ID NO:1-17中提供的氨基酸序列或其片段或由该氨基酸序列或其片段组成。

[0056] “病毒多核苷酸”意指编码流感病毒多肽(诸如H1或H3流感病毒(抗原或抗原蛋白))的核酸分子,如本文所述。在一个实施例中,多核苷酸是DNA或RNA多核苷酸。在一个实施例中,多核苷酸是mRNA。

[0057] 术语“血凝素(HA)”是指流感病毒表达的表面糖蛋白。HA介导病毒颗粒与宿主细胞的结合以及随后病毒进入宿主细胞。许多流感HA蛋白的核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的并且是公众可获得的,诸如保存在公众可访问的GenBank(NCBI)和UniProtKB数据库中的那些。作为非限制性示例,H5N1 HA序列的GenBank登录号列表可以在美国专利申请公开US2015/0030628中找到。甲型流感病毒(毒株A/Puerto Rico/8/1934H1N1)的HA蛋白的氨基酸序列的非限制性示例在UniProtKB登录号P03452(HEMA_134A1)下提供。甲型流感H3N2病毒(A/Hong Kong/1-4/1968(H3N2))的HA蛋白的氨基酸序列的非限制性示例在登录号CY033017下提供。HA(与神经氨酸酶(NA)一起)是两种主要流感病毒抗原蛋白中的一种,其具有被抗体/免疫球蛋白识别和结合的抗原决定簇(表位)。在实施例中,HA是HA1(H1)或HA2(H2)。

[0058] 在实施例中,HA蛋白或其片段可以与代表性甲型流感病毒HA蛋白或其片段的氨基酸序列具有至少约或等于85%,或者至少约或等于90%、95%、98%、99%或更大的氨基酸序列同一性。

[0059] 在一个实施例中,HA免疫原性抗原是H1或H3 HA蛋白,其可以是全长或其可溶形式,包含下文实例1中列出的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

[0060] “杂交”意指互补核碱基之间的氢键键合,该氢键键合可以是沃森-克里克、霍氏或反向霍氏氢键键合。例如,在DNA中,腺嘌呤和胸腺嘧啶以及胞嘧啶和鸟嘌呤分别是通过氢键的形成进行配对的互补核碱基。

[0061] 术语“免疫应答”意指由免疫应答性细胞介导的任何应答。在免疫应答的一个示例

中,响应于暴露于抗原(例如,外来实体),白细胞被募集以实施多种不同的特定功能。免疫应答是多因素过程,根据所涉及的细胞类型而有所不同。免疫应答包括细胞介导的应答(例如,T细胞应答)、体液应答(B细胞/抗体应答)、先天应答及其组合。

[0062] “免疫原”意指在适当的条件下可以在动物中引发或刺激免疫应答(诸如产生抗体和/或T细胞应答)的化合物、组合物或物质,包括注射或以其他方式递送至动物的组合物。如本文所用,“免疫原性组合物”是包含免疫原(诸如HA多肽或肽(例如,HA多肽的全长或可溶形式)或编码此类免疫原的多核苷酸)或者包含HA多肽或肽(例如,HA多肽的全长或可溶形式)或编码此类免疫原的多核苷酸)的疫苗的组合物。如本领域技术人员将理解的,如果在受试者感染疾病或经历全面疾病之前向有需要的受试者施用,则免疫原性组合物可以是预防性的并引起受试者引发免疫应答,例如,中和抗体和/或细胞免疫应答,以防范疾病,或预防更严重的疾病或病症和/或其症状。如果在受试者感染疾病之后向有需要的受试者施用,则免疫原性组合物可以是治疗性的并引起受试者引发免疫应答,例如,中和抗体和/或细胞免疫应答,以例如通过降低、减小、消除、改善、缓和、缓解或根除疾病和/或其症状来治疗疾病。在一个实施例中,免疫应答是B细胞应答,其引起产生针对包含抗原或抗原序列的免疫原或免疫原性组合物的抗体,例如中和抗体。以与前述类似的方式,在一些实施例中,免疫原、免疫原性组合物或疫苗可以是预防性的。在一些实施例中,免疫原、免疫原性组合物或疫苗可以是治疗性的。在一个实施例中,疾病是流感(流行性感冒)。在一个实施例中,疾病是传染性支气管炎。在本文的一些情况下,术语免疫原和疫苗可互换使用。

[0063] “免疫原性组合物”意指包含抗原、抗原序列或免疫原的组合物,其中该组合物在免疫受试者中引发免疫应答。

[0064] 术语“免疫(immunize/immunization)”是指诸如通过疫苗接种使受试者免受或在免疫学上响应由病原体引起的疾病或病状,例如由病毒(例如,流感病毒H1或H3)引起的传染病。在本文的一些情况下,术语“免疫”和“疫苗接种”可以互换使用(例如,免疫/疫苗接种)。

[0065] 术语“流感病毒”是指属于病毒的正粘病毒(Orthomyxoviridae)科的分节段的负链RNA病毒。存在三种类型的流感病毒:甲型、乙型和丙型。甲型流感病毒感染多种鸟类和哺乳动物,包括人、马、海洋哺乳动物、猪、雪貂和鸡。在动物中,大多数甲型流感病毒会引起呼吸道和肠道的轻度局部感染。然而,高致病性甲型流感毒株,诸如但不限于H5N1、H5N2、H5N6、H5N8、H7N9、H9N2、H1N1、H1N2、H2N1、H2N2、H2N3、H7N3、H7N7、H3N2、H3N1和相关病毒,引起家禽的全身性流感,其中死亡率可能达到100%。H5N1也称为“禽流感”。

[0066] “抑制性核酸”意指双链RNA、siRNA、shRNA或反义RNA、或其部分、或其模拟物,当施用于哺乳动物细胞时该抑制性核酸会导致靶基因表达减少(例如,5%、10%、25%、50%、75%或甚至90-100%)。通常,核酸抑制剂包含靶核酸分子或其直系同源物的至少一部分,或包含靶核酸分子的互补链的至少一部分。例如,抑制性核酸分子包含本文描述的核酸中的任一种或全部的至少一部分。

[0067] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯的”是指不同程度地不含在其天然状态中发现的正常伴随的组分的材料。“分离”表示与原始来源或周围环境的分离程度。“纯化”表示比分离更高的分离程度。“纯化的”或“生物纯的”蛋白质充分不含其它材料,使得任何杂质不会实质上影响蛋白质的生物学特性或引起其他不良后果。也就是说,如果核酸、蛋白质或肽

在通过重组DNA技术产生时实质上不含细胞材料、碎片、不相关病毒材料或培养基,或化学合成时实质上不含化学前体或其它化学品,则该核酸、蛋白质或肽是纯化的。纯度和均一性通常使用标准纯化方法和分析化学技术,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法确定。术语"纯化的"可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一条条带。对于可以进行修饰(例如磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,可以单独纯化该蛋白质。术语"分离的"还包括重组核酸、蛋白质或病毒,以及化学合成的核酸或肽。

[0068] "分离的多核苷酸"意指不含基因的核酸(例如,DNA分子),该基因在衍生所述方面和实施例的核酸分子的生物的天然存在的基因组中的基因的侧翼。因此,该术语包括例如掺入载体中;掺入自主复制的质粒或病毒中;或掺入原核生物或真核生物的基因组DNA中的重组DNA;或者作为独立于其他序列的单独分子(例如,通过PCR或限制性内切酶消化产生的cDNA或基因组或cDNA片段)存在的重组DNA。此外,该术语包括从DNA分子(例如,mRNA)转录的RNA分子,以及作为编码额外多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0069] "分离的多肽"意指已与其天然伴随的组分分离的多肽,诸如本文所述的多肽。通常,当多肽按重量计至少30%、按重量计至少40%、按重量计至少50%、按重量计至少60%不含与该多肽天然相关的蛋白质和天然存在的有机分子时,该多肽是分离的。优选地,分离的多肽制剂按重量计至少75%、至少90%或至少99%不含与其天然相关的蛋白质和天然存在的有机分子。分离的多肽可以例如通过从天然来源提取;通过表达编码此类多肽的重组核酸;或通过化学合成蛋白质来获得。纯度可以通过任何标准的适当方法(例如,柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过HPLC分析)来测量。分离的多肽可以指通过本文所述的方法生成的广泛活性的病毒免疫原多肽。

[0070] "接头"意指充当融合蛋白的两个多肽或肽之间的间隔物的一个或多个氨基酸。

[0071] "标记物"意指在与疾病、病症、病状或疾患相关的表达水平或活性上具有改变(例如,增加或减少)的任何蛋白质或多核苷酸。

[0072] "基质(M1)蛋白"是指在病毒包膜内发现的流感病毒结构蛋白。M1被认为在细胞感染后在病毒的组装和出芽中发挥作用。

[0073] 如本文所用,"获得试剂"中的"获得"包括合成、分离、纯化、购买或以其他方式获取试剂。

[0074] 术语"可操作地连接"是指本文所用的核酸序列。作为示例,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响(允许)编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列可操作地连接。一般来说,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区时位于相同的阅读框中。

[0075] 编码具有广泛反应性的HA蛋白(使得针对该HA蛋白以及其他可能抗原漂移但相关的病毒生成免疫应答(例如,抗体应答))的核苷酸序列可以使用本领域实践的程序和技术经由密码子优化和RNA优化(诸如以增加RNA稳定性)来优化以在哺乳动物细胞中表达。

[0076] 用于在受试者中引发免疫应答的(非天然存在的)广泛反应性免疫原性抗原(诸如流感(例如,H1或H3流感病毒)血凝素(HA)蛋白)具有共同的强免疫原性表位(也称为抗原决定簇)集。本文所述的流感病毒HA蛋白适合用作引发免疫应答的免疫原或疫苗,其在引入宿主受试者(特别是感染流感H1或H3病毒的人类受试者)时引发针对在病毒表面上表达HA蛋

白的其他相关但不相同的病毒类型的广泛反应性免疫应答,例如,中和抗体应答。免疫原性抗原(或疫苗)有利于提供抗病毒免疫原(或疫苗),其引发针对具有抗原变异性和相似性的其他流感病毒HA抗原(诸如H1或H3)的广泛活性免疫应答,并治疗或防范由超过一种的H1或H3流感病毒亚型引起的感染和疾病。

[0077] “开放阅读框(ORF)”意指编码氨基酸而没有任何终止密码子的一系列核苷酸三联体(密码子)。这些序列通常可翻译成肽或多肽。

[0078] 术语“药学上可接受的媒介物”是指用于特别在哺乳动物(例如,人类)受试者中以及其他动物或禽类受试者中使用的生理上和药学上可接受的常规载体(媒介物)和赋形剂。此类药学上可接受的媒介物是相关领域技术人员已知的并且可以容易地在Remington's Pharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,第15版(1975)及其更新版本中找到,该参考文献描述了适合于药物递送一种或多种治疗组合物(诸如一种或多种流感HA免疫原(疫苗))和另外的药剂的组合物和制剂。通常,药学上可接受的载体的性质取决于所采用的特定施用模式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射流体/液体,其包括作为媒介物或稀释剂的药学和生理学可接受的流体,诸如水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如,粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可以包括例如通常稳定和/或增加组合物或药物的半衰期的药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性载体之外,要施用的药物组合物可以含有少量无毒的辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如,乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0079] “质粒”(或“载体”)意指能够在宿主细胞中自主复制的环状核酸分子。

[0080] “多肽”(或蛋白质)意指其中单体包含通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当氨基酸是α-氨基酸时,可以使用L-光学异构体或D-光学异构体。如本文所用,术语“多肽”或“蛋白质”旨在涵盖任何氨基酸序列并且包括修饰的序列诸如糖蛋白。术语“多肽”具体旨在涵盖天然存在的蛋白质以及重组或合成产生的蛋白质。术语“残基”或“氨基酸残基”还指掺入蛋白质、多肽或肽中的氨基酸。

[0081] 保守氨基酸取代是在进行时对原始蛋白质性质的干扰最小的那些取代,即,蛋白质的结构并且尤其是功能是保守的并且不会因此类取代而显著改变。保守氨基酸取代的示例是本领域已知的,例如,如美国公开号2015/0030628中列出的。保守取代通常维持(a)该取代区域中的多肽骨架的结构,例如作为片状或螺旋构象;(b)分子在靶位点的电荷或疏水性,和/或(c)侧链的主体。

[0082] 通常预期会产生蛋白质性质最大变化的取代是非保守的,例如以下改变,其中(a)亲水性残基(例如,丝氨酰基或苏氨酰基)用(或被)疏水性残基(例如,亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基)取代;(b)半胱氨酸或脯氨酸用(或被)任何其他残基取代;(c)具有正电性侧链的残基(例如,赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基)用(或被)负电性残基(例如,谷氨酰基或天冬氨酰基)取代;或(d)具有大侧链的残基(例如,苯丙氨酸)用(或被)不具有侧链的残基(例如,甘氨酸)取代。

[0083] “引物集”是指可以用于例如PCR的寡核苷酸集。引物集将由至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、80、100、200、250、300、400、500、600或更多个引物组成。

[0084] “启动子”意指引导核酸转录的核酸控制序列的阵列。启动子包括转录起始位点附

近必需的核酸序列。启动子还任选地包括远端增强子或阻抑序列元件。“组成型启动子”是持续活性且不受外部信号或分子调节的启动子。相反,“诱导型启动子”的活性受到外部信号或分子(例如,转录因子)的调节。作为示例,启动子可以是CMV启动子。

[0085] 如本领域技术人员所理解的,术语“纯化的”不需要绝对纯度;相反,它旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的肽、蛋白质、病毒、多核苷酸或其他活性化合物是完全或部分与天然相关蛋白质和其他污染物分离的。在某些实施例中,术语“实质上纯化的”是指已从细胞、细胞培养基或其他粗制剂中分离并经受常规方法(诸如但不限于,分级、色谱法或电泳)以除去初始制剂的各种组分(诸如蛋白质、细胞碎片和其他组分)的肽、蛋白质、病毒、多核苷酸或其他活性化合物。

[0086] “重组”核酸、蛋白质或病毒是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个以其他方式分离的序列区段而产生的序列的核酸、蛋白质或病毒。此类人工组合通常通过化学合成来实现,或者通过对分离的核酸区段进行人工操纵,例如通过基因工程技术来实现。“非天然存在的”核酸、蛋白质或病毒是可以经由重组技术、人工操纵、遗传或分子生物工程化或者分子合成程序和技术(诸如本领域通常实践的那些)来制备的核酸、蛋白质或病毒。

[0087] “降低”意指至少5%、10%、25%、30%、40%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或100%的负面改变(例如,减少或降低)。

[0088] “参考”意指标准或对照条件,例如,野生型或未突变的蛋白质或多核苷酸。在一些情况下,参考可以是健康的、未感染的受试者或细胞,例如,未感染流感病毒的受试者或细胞。

[0089] “参考序列”是用作序列比较的基础的定义序列。参考序列可以是特定序列的子集或全部;例如,全长cDNA或基因序列的区段,或完整的cDNA或基因序列。对于多肽,参考多肽序列的长度通常为至少约16个氨基酸,优选至少约20个氨基酸,更优选至少约25个氨基酸,并且甚至更优选约35个氨基酸,约50个氨基酸,或约100个氨基酸。对于核酸,参考核酸序列的长度通常为至少约50个核苷酸,优选至少约60个核苷酸,更优选至少约75个核苷酸,并且甚至更优选约100个核苷酸或约300个核苷酸或其附近或其间的任何整数。

[0090] “特异性结合”的化合物或抗体是指识别并结合多肽,诸如病毒多肽、肽或疫苗产物,但实质上不识别和结合天然地包含多肽(诸如病毒多肽或肽)的样品(例如,生物样品)中的其他分子。

[0091] 可用于本文所述的方法的核酸分子包括编码所述多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但通常将表现出实质同一性。与内源性序列具有“实质同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意指在各种严格条件下在互补多核苷酸序列(例如,基因)或其部分之间形成双链分子。(参见例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger,(1987),Methods Enzymol.,152:399;Kimmel,A.R.,(1987),Methods Enzymol.152:507)。

[0092] 作为示例,严格盐浓度通常小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,并且更优选小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格杂交可以在不存在有机溶剂例如甲酰胺的情况下获得,而高严格杂交可以在存在至少约35%甲酰胺并且更优选至少约50%甲酰胺的情况下获得。严格的温度条件通常包括至少约30℃、更优选至少约37℃、并且最优选至少约42℃的温度。改变另外的参数(诸如杂交时间、

去污剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度以及载体DNA的包含或排除)是本领域技术人员众所周知的。通过根据需要组合这些不同的条件来实现不同级别的严格度。在一个优选的实施例中,杂交将在30℃下在750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1％ SDS中进行。在一个更优选的实施例中,杂交将在37℃下在500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1％ SDS、35％甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精DNA(ssDNA)中进行。在一个最优选的实施例中,杂交将在42℃下在250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1％ SDS、50％甲酰胺和200μg/ml ssDNA中进行。这些条件的可用修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0093] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤的严格度也会有所不同。洗涤严格度条件可以通过盐浓度和温度来定义。如上所述,可以通过降低盐浓度或提高温度来提高洗涤严格度。例如,洗涤步骤的严格盐浓度优选小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,并且最优选小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。洗涤步骤的严格温度条件通常包括至少约25℃、更优选至少约42℃并且甚至更优选至少约68℃的温度。在一个优选的实施例中,洗涤步骤将在25℃下在30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1％ SDS中进行。在一个更优选的实施例中,洗涤步骤将在42℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1％ SDS中进行。在一个更优选的实施例中,洗涤步骤将在68℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1％ SDS中进行。这些条件的其他修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。杂交技术是本领域技术人员众所周知的并且描述于例如Benton和Davis(Science 196:180,1977);Grunstein和Hogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubel等人(Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York,2001);Berger和Kimmel(Guide to Molecular Cloning Techniques,1987,Academic Press,New York);以及Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York中。

[0094] “实质上相同”意指表现出与参考氨基酸序列(例如,本文描述的氨基酸序列中的任一种)或核酸序列(例如,本文描述的核酸序列中的任一种)至少50％同一性的多肽或核酸分子。优选地,此类序列在氨基酸水平或核酸上与用于比较的序列至少60％、或者至少80％或85％、或者至少或等于90％、93％、95％或甚至99％相同。

[0095] “序列同一性”是指氨基酸或核酸序列之间的相似性,其根据序列之间的相似性来表达。序列同一性经常根据同一性(或类似性或同源性)百分比来测量;百分比越高,序列越相似。当使用标准方法比对时,给定基因或蛋白质的同源物或变体将具有相对高程度的序列同一性。序列同一性通常使用序列分析软件(例如,Genetics Computer Group的序列分析软件包,University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue,Madison,Wis.53705,BLAST,BESTFIT,GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)来测量。此类软件通过分配各种取代、缺失和/或其他修饰的同源性程度来匹配相同或相似的序列。保守取代通常包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可使用BLAST程序,其概率得分在e^{-3}和e^{-100}之间,指示紧密相关的序列。另外,其他程序和比对算法描述于例如Smith和Waterman,1981,Adv.Appl.Math.2:482;Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443;Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444;Higgins和Sharp,1988,Gene 73:237-244;Higgins

和Sharp,1989,CABIOS 5:151-153;Corpet等人,1988,Nucleic Acids Research16:10881-10890;Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444;以及Altschul等人,1994,Nature Genet.6:119-129。NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST™)(Altschul等人1990,J.Mol.Biol.215:403-410)可以从多个来源容易获得(包括国家生物技术信息中心(NCBI,Bethesda,Md.)和互联网)以与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx关联使用。

[0096] “受试者”意指脊椎动物,例如,哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类动物或者非人动物或哺乳动物,诸如牛、马、犬、羊或猫科哺乳动物,或者绵羊、山羊、美洲驼、骆驼、雪貂或啮齿动物(大鼠、小鼠)、沙鼠或仓鼠。“受试者”还可以指非人类动物或禽类脊椎动物。非人类受试者或非人类动物受试者也可称为“兽医受试者”。在非限制性示例中,受试者被病原体(诸如流感病毒,例如H1或H3病毒)感染,或处于被此类病毒感染的风险中,或易受此类感染。在本文所述的一些方面,受试者是人类受试者,诸如患者。在本文所述的一些方面,受试者是非人类受试者,诸如非人类动物受试者或兽医受试者。

[0097] 本文提供的范围应理解为该范围内的所有值的速记。例如,1至50的范围应理解为包括来自由以下项组成的组的任何数字、数字的组合或子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更大,连续地诸如到100或更大,包括第一个和最后一个值以及其间的值。

[0098] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”等是指降低、减小、减少、减轻、消除、缓解、改善或根除疾病、病症、疾患或病状和/或与之相关的症状。虽然不旨在限制,但“治疗”通常涉及在疾病、病症、疾患或病状和/或与之相关的症状已经开始发展之后发生以降低疾病等的严重程度以及相关的体征和症状的治疗干预。应当理解,尽管不排除,治疗疾患或病症并不需要完全根除疾病、病症、疾患、病状或与之相关的症状。

[0099] 如本文所用,术语“防止(prevent/preventing/prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等是抑制或阻断受试者的疾病状态或者疾病的完全或全面发展,或者降低未患有疾病、疾患或病症但处于发展疾病、疾患或病症的风险中或者易于发展疾病、疾患或病症的受试者发展疾病、疾患或病症的可能性。

[0100] 如本文所提及的,“转化的”细胞是已通过分子生物学技术将核酸分子或多核苷酸序列引入其中的细胞。如本文所用,术语“转化”涵盖可以将核酸分子或多核苷酸引入此类细胞中的所有技术,包括用病毒载体转染,用质粒载体转化以及通过电穿孔、脂转染、粒子枪加速或本领域已知和实践的其他方法引入裸核酸(DNA或RNA,例如,mRNA)。

[0101] “疫苗”意指能够刺激(引发)免疫应答的免疫原性材料(例如,蛋白质或核酸)的制剂,诸如蛋白质或肽抗原,其施用于受试者以治疗疾病、病症或病状,或者预防或防范疾病、病症或病状,诸如传染病,例如,病毒感染。免疫原性材料可以包括例如减毒或灭活的微生物(例如,减毒病毒),或源自此类微生物的抗原蛋白、肽、DNA或RNA。疫苗可能会在受试者中引发预防性(防止性)免疫应答;它们还可以在受试者中引发治疗应答免疫应答。如上所述,疫苗施用方法根据疫苗而变化,并且可以包括途径或手段,诸如接种(静脉内或皮下注射)、食入、吸入或医学领域已知和实践的其他施用形式。可以通过多种途径中的任一种来递送接种,包括肠胃外,诸如静脉内、皮下或肌内。疫苗也可以与佐剂一起施用以增强免疫应答。

疫苗可以施用于人类受试者、非人类受试者或兽医受试者。术语疫苗和免疫原在本文中可互换使用。在一个实施例中,单价免疫原/疫苗含有一种本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感HA或NA免疫原性多肽抗原,或者某些类型或亚型中的一种HA或NA流感病毒抗原。在一个实施例中,二价免疫原/疫苗含有两种相同或不同的本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感HA或NA免疫原性多肽抗原,和/或某些类型或亚型中的两种相同或不同的HA或NA流感病毒抗原。在一个实施例中,多价免疫原/疫苗含有至少两种(或多于两种)本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感HA或NA免疫原性多肽抗原,和/或某些类型或亚型中的至少两种HA或NA流感病毒抗原。在一个实施例中,多价免疫原/疫苗含有2、3、4、5、6、7、8、9或10种本文所述和举例说明的流感多肽抗原,包括不同的本文所述和举例说明的流感免疫原性多肽抗原的混合物和/或某些类型或亚型中的HA或NA流感病毒抗原。在一个实施例中,流感免疫原/疫苗制剂是二价的。在一个实施例中,流感免疫原疫苗制剂是多价的,例如八价的。

[0102] 如本文所用,“载体”是指可以将外源核酸插入其中而不破坏载体在宿主细胞中复制和/或整合到宿主细胞中的能力的核酸(多核苷酸)分子。载体可以包括允许其在宿主细胞诸如复制起点中进行复制的核酸序列。插入载体可以将其自身插入宿主核酸中。载体还可以包括一种或多种可选择标记物基因和其他遗传元件。表达载体是含必要的调控序列以允许插入的一个或多个基因在宿主细胞中转录和翻译的载体。在本公开的一些实施例中,载体编码流感HA、NA或M1蛋白。在一些实施例中,载体是pTR600表达载体(美国专利申请公开号2002/0106798;Ross等人,2000,Nat Immunol.1(2):102-103;和Green等人,2001,Vaccine 20:242-248)。

[0103] “病毒样颗粒(VLP)”意指由多种病毒结构蛋白中的一种组成但缺少病毒基因组的病毒颗粒。由于VLP缺少病毒基因组,因此它们不具有传染性,并且产生更安全且可能更经济的疫苗和疫苗产物。此外,VLP通常可以通过异源表达产生,并且可能容易纯化。大多数VLP至少包含病毒核心蛋白,该蛋白驱动颗粒从宿主细胞出芽和释放。此类核心蛋白的一个示例是流感M1。在本文的一些实施例中,流感VLP包含HA、NA和M1蛋白。在某些情况下,流感VLP可以通过用编码HA、NA和M1蛋白的质粒转染宿主细胞来产生。将转染的细胞孵育适当的时间以允许蛋白质表达(诸如持续约72小时)后,可以从细胞培养物上清液中分离VLP。作为示例,从细胞上清液中纯化或分离流感VLP的方案涉及VLP的低速离心(以去除细胞碎片)、VLP的真空过滤和通过20%甘油对VLP进行超速离心。病毒样颗粒还可以包括亚病毒颗粒(SVP),其尺寸通常比病毒小并且构成没有病毒衣壳或基因组的颗粒。

[0104] 如本文所用,术语“或”应理解为包含性的,除非特别说明或从上下文显而易见。如本文所用,术语“一”、“一个”和“该”应理解为单数或复数,除非特别说明或从上下文显而易见。同样,除非上下文另有明确指示,否则词语“或”旨在包括“和”。因此,“包含A或B”意指包括A、或B、或A和B。还应当理解,对于核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值是近似的,并提供用于描述。

[0105] 除非具体说明或从上下文显而易见,否则如本文所用,术语“约”被理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。约可以理解为在规定值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%内开始。除非上下文另有说明,否则本文提供的所有数值都用术语约修饰。

[0106] 在本文变量的任何定义中化学基团列表的记载包括将该变量定义为任何单个基团或所列基团的组合。本文针对变量或方面的实施例的记载包括作为任何单个实施例或与任何其他实施例或其部分的组合的该实施例。

[0107] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或多种组合。

附图说明

[0108] 图1呈现了使用用本文所述的广泛反应性流感HA多肽免疫原的组合免疫(疫苗接种)的预免疫和未经处理雪貂进行的研究(实例2)的时间线的说明,该研究评估多肽作为免疫原(例如,疫苗)的功效,从而防范和/或减少免疫后病毒攻击和严重疾病的影响。如时间线所示,在用广泛反应性流感HA多肽免疫原对动物进行免疫/疫苗接种前60天(第-60天),通过用流感病毒毒株A/California/2009(H1N1)、A/Panama/1999(H3N2)和B/Hong Kong/2001(IBV,乙型流感病毒)感染一组动物使该组动物成为预免疫的。这些毒株历史上在正常人群中发现,并且在动物中模拟在在用本文所述的广泛反应性HA多肽免疫原对动物进行免疫/疫苗接种之前在正常、预免疫人群中发现的典型病毒载量或病毒组分。在第-30天,对动物抽血以确认血清转化。在研究的第0天和第28天,对雪貂进行抽血并用广泛反应性的HA多肽免疫原和c-di-AMP佐剂(每种抗原15μg+50μg c-di-AMP)进行免疫/疫苗接种,如本文(实例2)所述。第二次疫苗接种后四周,用流感病毒A/Brisbane/02/2018(H1N1)、B/Washington/02/2019(IBV)或A/Vietnam/1203/2004(H5N1)攻击动物(研究的第56天)。在感染后第1、3、5和7天,即攻击时间(第56天)和研究结束(第60天)之间进行鼻腔清洗。在此时段期间,每天监测动物的临床体征和体重。

[0109] 图2A-图2D呈现了示出在实例2中描述的和在图1中示出的研究的第56天使用从免疫雪貂获得血液后获得的血清进行的ELISA分析的结果的图。第二次疫苗接种后,测试雪貂血清中是否存在总IgG抗体应答。评估与包被在微量滴定板上的不同免疫原性HA多肽抗原结合的抗体的量。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。代表性免疫/疫苗接种的动物组是:施用八价Cobra疫苗的预免疫雪貂(图2A);施用模拟疫苗的预免疫雪貂(图2B);施用八价Cobra疫苗的未经处理雪貂(图2C),施用模拟疫苗的未经处理雪貂(图2D)。如x轴上所示,针对8种HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)中的每一种确定总IgG抗体滴度。y轴指示OD 414nm值。每个点表示单独的雪貂。对于每个独立实验,血清一式两份进行测定。结果证明,用本文所述的八价HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)进行免疫引发了免疫应答并产生了与HA免疫原性多肽/疫苗的所有组分结合的抗体(图2A和图2C)。来自预免疫模拟动物的抗体与H1、N1和N2 HA抗原结合(图2B)。来自未经处理模拟动物的抗体未显示与HA抗原的结合(图2D)。由于与多肽上存在的组氨酸标签的非特异性结合,选择OD值1作为最小值。

[0110] 图3A和图3B呈现了ELISA分析结果的图,使用从用HA免疫原性多肽抗原免疫的预免疫雪貂或从预免疫、模拟免疫的雪貂获得的血清进行该ELISA分析以比较在图1中描述的研究的第0天和第56天在雪貂的预免疫组中进行疫苗接种之前和之后的总IgG抗体应答。在免疫/疫苗接种之前(第0天(d0))和最终免疫/疫苗接种之后(第56天(d56))收集用HA多肽免疫原(Cobra)免疫的单独预免疫雪貂的血清(图3A)以及给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂

的血清(图3B)。结果证明,用本文所述的HA免疫原性多肽抗原免疫的预免疫雪貂具有增加的针对免疫原性多肽抗原/疫苗的所有HA组分的抗体,其中针对Z1、NG3、IAN8、Q6和BC2免疫原生成的抗体有统计学上显著的增加。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)使用单因素ANOVA来分析每组的d0和d56 ELISA结果(图2A-图2D)之间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。

[0111] 图4A和图4B呈现了示出在疫苗接种之前和之后针对流感H1N1病毒的雪貂血清HAI抗体滴度的结果的图。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。在疫苗接种前(图4A)和第二次疫苗接种后4周(图4B)收集血清以用于针对6种H1N1流感病毒的组进行HAI测定。x轴上列出的病毒为:A/Solomon Islands/03/2006(SI/06)A/Brisbane/59/2007(Bris/07)、A/California/07/2009(CA/09)、A/Michigan/45/2015(Mich/15)、A/Brisbane/02/2018(Bris/18)和A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019(GD/19)。y轴指示每个疫苗接种组的$\log_2$ HAI滴度,并将其表示为绝对平均值±SEM。虚线指示HAI滴度范围为1:40(下线)和1:80(上线)。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)使用非参数单因素ANOVA来分析每个疫苗组第0天和第56天HAI滴度之间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。结果显示,预免疫模拟动物组针对Mich/15和Bris/18的HAI滴度统计上显著降低。对于除Guangdong/19之外的大流行样病毒毒株,用HA免疫原性多肽(COBRA抗原)免疫的预免疫动物保持高HAI滴度,并且用HA免疫原性多肽(COBRA抗原)免疫的未经处理动物组达到1:40的HAI滴度。

[0112] 图5A和图5B呈现了示出在疫苗接种之前和之后针对流感H3N2病毒的雪貂血清HAI抗体滴度的结果的图。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为:给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的预免疫雪貂(黑色条);给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的未经处理雪貂(白色条);或给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂(灰色条)。在疫苗接种前(图5A)和第二次疫苗接种后4周(图5B)收集血清以用于针对6种H3N2流感病毒的组的HAI测定。x轴上列出的病毒为:A/Switzerland/9715293/2013(Switz/13)、A/Hong Kong/4801/2014(HK/14)、A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(Sing/16)、A/Kansas/14/2017(KS/17)、A/South Australia/34/2019(SA/19)和A/Hong Kong/2671/2019(HK/19)。y轴指示每个疫苗接种组的$\log_2$ HAI滴度,并将其表示为绝对平均值±SEM。虚线指示HAI滴度范围为1:40(下线)和1:80(上线)。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)使用非参数单因素ANOVA来分析每个疫苗动物组第0天和第56天HAI滴度之间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。

[0113] 图6A和图6B呈现了示出在疫苗接种之前和之后针对乙型流感病毒(IBV)的雪貂血清HAI抗体滴度的结果的图。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为:给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的预免疫雪貂(黑色条),给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的未经处理雪貂(白色条),或给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂(灰色条)。在疫苗接种前(图6A)和第二次疫苗接种后4周(图6B)收集血清以用于针对6种IBV流感病毒的组的HAI测定。x轴上列出的病毒为:Yamagata样谱系的病毒:B/

Florida/04/2006(B/FL/06)、B/Massachusetts/02/2012(B/Mass/12)、B/Phuket/3073/2013(B/Phuk/13);Victoria样谱系的病毒:B/Brisbane/60/2008(B/Bris/08)、B/Colordado/06/2017(B/CO/17)和B/Washington/02/2019(B/WA/19)。y轴指示每个疫苗接种组的$\log_2$ HAI滴度,并将其表示为绝对平均值±SEM。虚线指示HAI滴度范围为1:40(下线)和1:80(上线)。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)使用非参数单因素ANOVA来分析每个疫苗组第0天和第56天HAI滴度之间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。

[0114] 图7A和图7B展示了研究雪貂在疫苗接种之前和之后针对流感H5病毒的血清HAI抗体滴度。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为:给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的预免疫雪貂(黑色条);给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的未经处理雪貂(白色条);或给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂(灰色条)。在疫苗接种前(图7A)和第二次疫苗接种后4周(图7B)收集血清以用于针对6种H5流感病毒的组的HAI测定:A/Vietnam/1203/2004(H5N1,Vn/04)、A/whooper swan/Mongolia/244/2005(H5N1,ws/Mo/05)A/Egypt/321/2007(H5N1,Eg/07)、A/Hubei/01/2010(H5N1,Hu/10)、A/Guizhou/01/2013(H5N1,Gu/13)。A/Sichuan/26221/2014(H5N6,Si/14)。y轴指示每个疫苗接种组的$\log_2$HAI滴度,并将其表示为绝对平均值±SEM。虚线指示HAI滴度范围为1:40(下线)和1:80(上线)。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)使用非参数单因素ANOVA来分析每个疫苗组第0天和第56天HAI滴度之间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。

[0115] 图8A和图8B示出了雪貂在用流感H5N1病毒攻击后的体重和存活曲线。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂(黑色线);用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的未经处理雪貂(带圆圈的黑色线);或预免疫的模拟免疫的雪貂(灰色线)。最后一次免疫/疫苗接种后四周,使雪貂鼻内感染1mL体积的致死剂量的病毒A/Vietnam/1203/2004(10^5PFU)。观察动物的临床体征并在感染后每天记录它们的体重(图8A)。感染后的存活曲线数据表明所有动物都在致命病毒攻击中存活下来(图8B)。

[0116] 图9A和图9B示出了雪貂在用流感病毒攻击后的体重曲线。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为:用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂(黑色线);用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的未经处理雪貂(带圆圈的黑色线);给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂(灰色线);或给予模拟疫苗接种的未经处理雪貂(黑色虚线)。最后一次疫苗接种后四周,使雪貂鼻内感染1mL体积的流感病毒A/Brisbane/02/2018(10^8PFU)(图9A)或流感病毒(b)B/Washington/02/2019(10^7PFU)(图9B)。观察动物的临床体征并在感染后每天记录它们的体重。体重减轻的统计差异显示在图10A和图10B的表中。

[0117] 图10A和图10B呈现了示出用不同病毒毒株(H1N1与IBV)攻击的免疫雪貂组之间体重减轻的统计差异的表。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)经由双因素ANOVA以及多重比较分析图9A和图9B中描述的用H1N1A/Brisbane/02/2018(图10A)或IBV B/Washington/02/2019(图10B)攻击的雪貂的体重损失值的每天感染的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001;

n.s.,不显著)。

[0118] 图11A-图11C示出了感染流感病毒A/Brisbane/02/2018(H1N1)后雪貂上呼吸道中的病毒滴度的图。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组显示在x轴上。第二次疫苗接种后四周,用H1N1 A/Brisbane/02/2018病毒攻击动物组。在感染后第1天(图11A)、第3天(图11B)和第5天(图11C)从动物采集鼻洗液并确定病毒滴度。鼻洗液中的病毒滴度以PFU/mL表示,显示在y轴上。每个点表示单独的雪貂。

[0119] 图12A-图12C示出了感染流感病毒B/Washington/02/2019(IBV)后雪貂的鼻洗液滴度图。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组显示在x轴上。第二次疫苗接种后四周,用IBV B/Washington/02/2019病毒攻击动物组。在感染后第1天(图12A)、第3天(图12B)和第5天(图12C)采集鼻洗液并确定病毒滴度。鼻洗液中的病毒滴度以PFU/mL表示,显示在y轴上。每个点表示单独的雪貂。

[0120] 图13A-图13N示出了在初次疫苗接种后第70天对来自75只未经流感处理的BALB/c小鼠(n=5/组)的血清进行的血凝抑制(HAI)测定的结果的图。针对2012年至2019年期间分离的历史H3N2疫苗毒株的组(x轴),评估初次疫苗接种后第70天从75只未经流感处理的BALB/c小鼠(n=5/组)收集的血清的HAI活性。Log_2 HAI滴度报告为绝对平均值6平均值标准误差(SEM)(y轴)。下面的虚线代表1:40的HAI滴度,并且上面的虚线代表1:80的HAI滴度。用3mg如下重组流感血凝素(rHA)免疫原性多肽抗原对小鼠进行疫苗接种:模拟(图13A)、J1(图13B)、J2(图13C)、J3(图13D)、J4(图13E)、NG1(图13F)、NG2(图13G)、NG3(图13H)、Switz/13(图13I)、HK/14(图13J)、Sing/16(图13K)、Kan/17(图13L)、Switz/17(图13M)和SA/19(图13N),通过Prism 9软件(GraphPad Software,Inc.,San Diego,CA)使用非参数单因素方差分析(ANOVA)对HAI滴度进行统计分析。P值小于0.05被定义为统计上显著的(*,P,0.05;**,P,0.01;***,P,0.001;****,P,0.0001)。H3N2病毒属于以下进化枝:Tx/12(3c2)、Switz/13(3c3.a)、HK/14(3c.2a)、Sing/16(3c2.a1)、Kan/17(3c3.a)、Tx17(3c3.a)、Switz/17(3c3.a2)、SA/19(3c2.ab/131K)和HK/19(3c2.a1b/137F)。

[0121] 图14呈现了示出第89天肺病毒滴度的图。在第89天(A/Kansas/14/2017攻击后3天)从每组n=3只小鼠收集肺,以评估肺组织中存在的病毒载量。疫苗组列在x轴上,并且肺组织的PFU/g值报告在y轴上。使用Prism 9软件(GraphPad Software,Inc.,San Diego,CA)使用非参数单因素ANOVA来分析组之间的统计差异。P值小于0.05被定义为统计上显著的(*,P,0.05;**,P,0.01;***,P,0.001;****,P,0.0001)。

[0122] 图15A-图15F呈现了示出在第72天针对H3N2流感病毒组使用来自预免疫小鼠的血清实施的空斑减少测定(FRA)的结果的图,该测定评估了针对H3N2病毒组的抗体的存在。在初次感染后第72天,针对每组合并从136只H1+H3预免疫DBA/2J小鼠(n=8/组)收集的血清,这些小鼠用H1+H3重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)或WT rHA的单价和二价制剂进行疫苗接种,并且针对2016年至2019年历史H3N2疫苗毒株的组评估血清的FRA中和。针对以下H1N1病毒测试来自用单价抗原进行疫苗接种的小鼠的血清:A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(图15A)、A/Kansas/14/2017(图15B)和A/Hong Kong/2671/2019(图15C)。针对以下H1N1病毒测试来自用二价H1+H3抗原混合物进行疫苗接种的小鼠的血清:A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(图15D)、A/Kansas/14/2017(图15E)和A/Hong Kong/2671/2019(图15F)。下面的虚线代表80%中和(Neut80);中间的虚线代表50%中和(Neut50;并且上面的

虚线代表没有中和病毒感染。

[0123] 图16A-图16F呈现了示出在第72天使用来自预免疫小鼠的血清实施的针对H1N1流感病毒组的空斑减少测定(FRA)的结果的图。在初次感染后第72天,针对每组合并从136只H1+H3预免疫DBA/2J小鼠(n=8/组)收集的血清,这些小鼠用H1+H3重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)或WT rHA的单价和二价制剂进行疫苗接种,并且针对2009年至2019年历史H1N1疫苗毒株的组评估血清的FRA中和。针对以下H1N1病毒测试来自用单价抗原进行疫苗接种的小鼠的血清:A/California/07/2009(图16A)、A/Brisbane/2/2018(图16B)和A/Guangdong Maonan/SWL1536/2019(图16C)。针对以下H1N1病毒测试来自用二价H1+H3抗原混合物进行疫苗接种的小鼠的血清:A/California/07/2009(图16D)、A/Brisbane/2/2018(图16E)和A/Guangdong Maonan/SWL1536/2019(图16F)。下面的虚线代表80%中和(Neut80);中间的虚线代表50%中和(Neut50);并且上面的虚线代表没有中和病毒感染。

[0124] 图17呈现了使用用本文所述的广泛反应性流感HA多肽免疫原的免疫(疫苗接种)的小鼠进行的研究(实例2)的时间线的说明,该研究评估多肽作为免疫原(例如,疫苗)的功效,从而防范和/或减少免疫后病毒攻击和严重疾病的影响。在动物研究中,在第0、4和8周用利用ADDAVAX™佐剂配制的病毒样颗粒(VLP)免疫原/疫苗中的广泛反应性流感HA免疫原或野生型HA对88只BALB/c小鼠(n=11)进行肌内免疫/疫苗接种。在疫苗接种后第6周和第10周,从动物中收集血液,并分离血清用于分析。在第12周,所有小鼠鼻内接种5x 10^4PFU的A/California/07/2009H1N1病毒攻击。感染后第3天和第6天(3dpi和6dpi)收获肺组织(n=3/组),并进行组织病理学和病毒滴定评估。

[0125] 图18A-图18D呈现了展示按照图17所示的方案用本文所述的广泛反应性重组流感HA免疫原或用野生型rHA蛋白与PBS对照免疫/疫苗接种的小鼠在流感病毒感染后的体重和存活曲线的图。图18A示出了感染后小鼠原始体重减轻的百分比。观察小鼠的临床体征14天,并在感染后每天记录其体重。虚线指示感染后第0天体重的80%。图18B示出了感染A/California/07/2009病毒后的存活曲线。使用上述免疫/疫苗接种方案,利用用ADDAVAX™佐剂配制的广泛反应性重组流感HA免疫原或野生型rHA免疫原/疫苗对另一组六十四(64)只DBA/2J小鼠进行肌内免疫/疫苗接种。在第12周,所有小鼠均鼻内感染8.75x 10^6PFU的A/Brisbane/02/2018H1N1病毒作为病毒攻击。图18C示出了用A/Brisbane/02/2018H1N1病毒感染(攻击)后DBA/2J小鼠的体重减轻曲线。图18D示出了用A/Brisbane/02/2018病毒感染(攻击)后的存活曲线。

[0126] 图19A-图19E呈现了示出针对H1N1病毒组的免疫/疫苗接种后小鼠中的血清HAI抗体滴度的图。用含有编码广泛反应性重组流感H1N1 HA免疫原Y2(例如,SEQ ID NO:15)的多核苷酸的VLP免疫原/疫苗或用H1N1野生型Bris/07、CA/09或Bris/18VLP免疫原/疫苗以4周的间隔对免疫学上未经处理的BALB/c小鼠进行免疫/疫苗接种三次。在第一次免疫/疫苗接种后第10周从动物收集血清,并针对7种H1N1流感病毒的组使用该血清进行HAI测定:广泛反应性、重组流感H1 HA免疫原(图19A);Bris/18(图19B);CA/09(图19C);Bris/07(图19D);PBS(图19E)。y轴指示每个免疫/疫苗接种组的动物的$\log_2$ HAI滴度,并将其表示为绝对平均值±SEM。虚线指示HAI滴度范围为1:40(下线)和1:80(上线)。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)使用非参数单因素ANOVA对HAI滴度进行统计分析。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,$p<0.05$;**,$p<0.01$;***,$p<0.001$;****,$p<0.0001$)。

[0127] 图20A和图20B呈现了示出疫苗接种后小鼠血清中的中和抗体滴度的图。使用广泛反应性HA免疫原性多肽(Y2 COBRA H1N1)VLP疫苗或使用H1N1野生型Bris/07、CA/09或Bris/18VLP疫苗以4周的间隔对免疫学上未经处理的BALB/c小鼠(n=11/组)进行免疫三次。在疫苗接种后第10周,收集血清并用于实施针对A/California/07/2009(图20A)和A/Brisbane/02/2018(图20B)病毒的FRA测定。对于每种病毒,将病毒浓度标准化为1.2x 10^4FFU/mL,并将单独感染良好的病毒标准化为100%感染。x轴指示log2血清稀释度,并且y轴表示与仅病毒感染的对照孔相比受感染细胞的百分比。虚线代表抗血清中存在的抗体的50%抑制(上线)和80%抑制(下线)活性。

[0128] 图21A-图21C呈现了示出小鼠中总IgG抗体应答的图。在使用利用ADDAVAX™佐剂配制的广泛反应性的HA免疫原性多肽疫苗(H1 Cobra HA)、野生型HA VLP疫苗(例如,Bris/18HA、CA/09HA、Bris/07HA)或PBS(x轴)进行疫苗接种后第10周评估BALB/c小鼠的疫苗应答。确定针对A/California/07/2009HA蛋白(图21A)、A/Brisbane/02/2018HA蛋白(图21B)或cH6/1HA蛋白(具有来自A/California/07/2009HA的具有球状头部和来自亚型H6流感病毒HA的茎部的嵌合rHA)(图21C)的IgG抗体滴度。数据表示为来自3倍系列稀释血清的获得的OD141值加SEM的曲线下面积(AUC)。对于每个独立实验,小鼠血清一式两份进行测定。通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)采用单因素ANOVA来分析组间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。

[0129] 图22A和图22B呈现了示出BALB/c和DBA/2J小鼠的肺组织中的病毒滴度的图。用广泛反应性HA免疫原性多肽(H1 Cobra HA)或野生型HA VLP疫苗(例如,Bris/18HA、CA/09HA、Bris/07HA)(x轴)对BALB/c小鼠进行肌内疫苗接种,并且然后在疫苗接种后第12周用H1N1 A/California/07/2009病毒攻击(图22A)。感染后第3天收集肺样品(n=3/组),并确定肺病毒滴度。已用如上所述的相同疫苗免疫/疫苗接种并以rHA形式递送的另一组DBA/2J小鼠在疫苗接种后第12周用A/Brisbane/02/2018攻击(图22B)。感染后第3天收获肺样品(n=3),并确定肺病毒滴度。肺组织中的病毒滴度以PFU/mL表示,显示在y轴上。x轴指示研究中使用的不同疫苗。使用GraphPad Prism 9软件,采用非参数单因素ANOVA来分析组间的统计差异。p值小于0.05被定义为统计上显著的(*,p<0.05;**,p<0.01;***,p<0.001;****,p<0.0001)。

具体实施方式

[0130] 本文的特征是在受试者中引发有效的广泛反应性且持久的免疫应答的源自流感病毒毒株例如H1或H3的流感(“流行性感冒”)血凝素(HA)蛋白的合成的(非天然存在的)免疫原性抗原,例如,蛋白质(多肽)和糖蛋白抗原。在一个实施例中,受试者是哺乳动物受试者。在一个实施例中,受试者是人类受试者。在一个实施例中,受试者是禽类受试者。在一个实施例中,HA蛋白是全长HA多肽或可溶性HA (sHA)多肽。在一个实施例中,sHA多肽不包括跨膜(TM)或尾部结构域。此类免疫原性抗原在本文中也称为免疫原、免疫原性多肽、蛋白质或肽或疫苗。

[0131] 提供了防范流感毒毒株(诸如H1或H3,例如,H1N1或H3N2)引起的疾病的广泛反应性免疫原。在一个实施例中,特征是完全合成的蛋白质抗原,诸如流感病毒HA蛋白抗原。此

类HA抗原是自然界中未发现的合成蛋白,但它们保留了天然流感病毒HA蛋白的所有功能并且具有免疫原性,即,它们在施用或递送或引入受试者后,可以引发免疫应答,特别是呈中和抗体和/或反应性T淋巴细胞形式的广泛活性的免疫应答,尤其是流感病毒抗原免疫原。在实施例中,HA蛋白抗原是全长HA多肽或可溶性HA (sHA)多肽。还提供了包含合成病毒蛋白抗原或编码抗原的核酸(例如,DNA或RNA)的免疫原性组合物,例如疫苗。

[0132] HA氨基酸序列和具有此类序列的蛋白质抗原特别用作免疫原或用于免疫原性组合物(例如,疫苗),该免疫原或免疫原性组合物在施用组合物或疫苗的受试者、特别是人类受试者中引发广泛反应性的免疫应答。合成抗原被设计为在受试者中生成广泛活性的免疫应答(特别呈中和抗体的形式)以及在某些情况下的细胞免疫应答。在一个实施例中,受试者是哺乳动物受试者,特别是人类受试者。此类抗原作为免疫原是有益的,其引发针对病毒的免疫应答(例如,产生中和抗体和/或细胞免疫应答),特别是在给定的时间下在多于一种病毒毒株共同传播的情况下。作为示例,广泛反应性流感免疫原性抗原可以源自流感病毒,该流感病毒频繁地突变其基因组的若干部分以逃避免疫压力,并因此逃避感染后免疫系统未启动或未被刺激生成针对病毒抗原上的抗原表位(决定簇)的抗体的受试者的免疫监视。因此,合成流感病毒抗原(例如H1或H3 HA抗原)包含氨基酸(或多核苷酸)序列,该序列将引发针对表现出抗原漂移的潜在流感病毒变体的与野生型抗原序列相比更多数量的中和抗体(和/或改善的细胞免疫应答)。

[0133] 本文所述的H1或H3流感病毒的HA免疫原性蛋白或免疫原可以用于可以随时间提供针对多种病毒毒株的保护的免疫原性组合物中或作为可以随时间提供针对多种病毒毒株的保护的疫苗。在实施例中,H1或H3流感病毒的HA免疫原性蛋白或免疫原包含本文SEQ ID NO:1-17中列出的序列。本文所述的广泛反应性病毒抗原免疫原和疫苗的优点在于,它们被设计为提供针对几种不同病毒(例如,流感病毒)毒株(或进化枝)(诸如在不同地区产生的那些)的更广泛和更持久的保护。

[0134] 本文所述的免疫原性流感病毒HA抗原(包括全长和可溶形式的HA)可以用于免疫原性组合物(例如,疫苗),该免疫原性组合物可以在受试者中提供针对流感病毒感染和疾病的保护性免疫。通过引发广泛反应性抗HA特异性抗体或细胞免疫应答在受试者中提供保护性免疫,该抗体或细胞免疫应答保护受试者免受可能已突变或经历抗原漂移的病毒毒株的侵害。

[0135] 流感病毒

[0136] 流感病毒是属于正粘病毒科的分节段的负链RNA病毒。存在三种类型的流感病毒:甲型、乙型和丙型。甲型流感病毒感染多种鸟类和哺乳动物,包括人、马、海洋哺乳动物、猪、雪貂和鸡。在动物中,大多数甲型流感病毒会引起呼吸道和肠道的轻度局部感染。然而,高致病性甲型流感毒株,诸如作为非限制性实例,H1N1(“H1”)、H3N2(“H3”)、或H5N1(“H5’”)、或H7、或H9毒株,引起家禽的全身性流感,其中死亡率可能达到100%。感染甲型流感的动物通常充当流感病毒的储库,并且某些亚型已显示跨越物种屏障到人类,在人类中可以引起严重的疾病和毁灭性的流行性感冒爆发,这可以导致受感染的人类受试者死亡。

[0137] 甲型流感病毒可以根据编码表面糖蛋白(即分别是病毒粘附和细胞释放所需的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA))的两种基因的抗原区域的等位基因变异分类为若干亚型。目前,已知甲型流感病毒的十六种亚型HA(H1-H16)和九种NA(N1-N9)抗原变体。此前,已知只

有三种亚型在人类中传播(H1N1或H1N2)。然而,近年来,例如,已报道1997年和2003年香港记录的致病性甲型禽流感H5N1亚型跨越物种屏障并感染人类,导致数名患者死亡。

[0138] 在人类中,禽流感病毒感染呼吸道细胞以及肠道、肝脏、脾脏、肾脏和其他器官。禽流感感染的症状包括发烧、呼吸困难(包括呼吸短促和咳嗽)、淋巴细胞减少、腹泻和血糖水平调节困难。与季节性流感相比,最危险的群体是占人口大部分的健康成年人。由于某些甲型禽流感亚型的高致病性及其已证明的交叉感染人类的能力,所以存在与这些病毒毒株相关的重大经济和公共卫生风险,包括真正的流行和大流行威胁。

[0139] 甲型流感病毒基因组编码九种结构蛋白和一种具有调节功能的非结构(NS1)蛋白。流感病毒分段基因组含有八个负义RNA(nsRNA)基因区段(PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA和NA),该区段编码至少十种多肽,包括RNA指导的RNA聚合酶蛋白(PB2、PB 1和PA)、核蛋白(NP)、神经氨酸酶(NA)、血凝素(例如亚基HA1,通常称为"头部"亚基;和HA2,通常称为"尾部"或"茎部"亚基);基质蛋白(M1和M2);以及非结构蛋白(NS1和NS2)(参见例如,Krug等人,1989,The Influenza Viruses,R.M.Krug,编,Plenum Press,N.Y.,第89 152页)。

[0140] 流感病毒能够引起广泛疾病是因为它能够通过经历抗原改变来逃避免疫系统,这种改变被认为是在宿主同时感染动物流感病毒和人类流感病毒二者时发生的。在宿主中突变和重配期间,病毒可能会将另一种病毒的HA和/或NA表面蛋白基因掺入其基因组中,从而产生新的流感亚型并逃避免疫系统。

[0141] 由于感冒病毒传播毒株中的抗原变异(漂移),特别是病毒的HA和NA蛋白中的抗原变异(漂移),免疫原性组合物(例如,疫苗)针对流感病毒的功效经常不够理想且低于平均水平。本文所述的免疫原、组合物和方法提供了生成广泛反应性免疫应答(特别呈与病毒抗原结合并中和病毒活性(例如,其感染细胞的能力)的中和抗体的形式)的广泛反应性HA抗原以更有效地治疗流感及其症状。

[0142] 流感病毒血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)蛋白

[0143] HA是病毒表面糖蛋白,通常包含约560个氨基酸(例如,566个氨基酸)并且占总病毒蛋白的25%。如本文所述,HA是作为免疫原非常有用的蛋白质抗原,因为它含有多种表位库,在于感染期间遇到流感病毒的HA抗原的受试者或宿主中生成针对这些表位的抗体。

[0144] HA负责在感染早期阶段将病毒颗粒粘附并渗透到宿主细胞中,特别是在呼吸道上皮细胞中的宿主细胞中。将病毒HA0前体裂解为HA1和HA2亚片段是病毒感染细胞的必要步骤。因此,需要裂解将宿主细胞中的新病毒颗粒转化为能够感染新细胞的病毒粒子。已知裂解发生在完整的HA0膜蛋白从受感染细胞的内质网转运到质膜的过程中。在运输期间,HA经历一系列共翻译和翻译后修饰,包括前体HA蛋白水解为氨基末端片段HA1("头部")和羧基末端HA2("尾部"或"茎部")。在原代组织培养物或已建立的细胞系中生长流感毒株的主要困难之一源于宿主细胞中流感血凝素的蛋白水解激活的需要。

[0145] 尽管已知未裂解的HA可以介导病毒与其细胞表面上的含神经氨酸受体的粘附,但它不能进行感染周期的下一步,即融合。据报道,需要通过裂解将HA2的疏水性氨基末端暴露出来使其能够插入靶细胞,从而在病毒和靶细胞膜之间形成桥梁。此过程之后是两个膜的融合以及病毒进入靶细胞。

[0146] HA的蛋白水解激活涉及胰蛋白酶样内切蛋白酶在精氨酸残基处裂解,该内切蛋白酶通常是钙依赖性细胞内酶并且最适pH为中性。由于激活蛋白酶是细胞酶,所以受感染的

细胞类型决定了HA是否被裂解。哺乳动物流感病毒和非致病性禽流感病毒的HA仅在有限数量的细胞类型中对蛋白水解敏感。另一方面,作为示例,H5和H7亚型中的致病性禽病毒的HA被存在于多种不同宿主细胞中的蛋白酶裂解。因此,存在由于血凝素裂解性的差异而导致的宿主范围的差异,该差异与病毒的致病特性相关。

[0147] 神经氨酸酶(NA)是流感病毒的第二膜糖蛋白。病毒NA的存在已显示对于生成针对感染病毒的多方面保护性免疫应答是重要的。对于大多数甲型流感病毒,NA长度为413个氨基酸,并且由1413个核苷酸的基因编码。已鉴定出流感病毒的九种不同的NA亚型(N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8和N9),所有这些亚型均在野生鸟类中发现。NA通过从受感染细胞表面的碳水化合物部分裂解末端神经氨酸(也称为唾液酸)残基来参与病毒HA细胞受体的破坏。NA还裂解来自病毒蛋白的唾液酸残基,防止病毒聚集。利用这种机制,假设NA通过防止新形成的病毒颗粒沿着细胞膜聚集,以及通过促进病毒通过粘膜表面上存在的粘液运输来帮助病毒后代的释放。NA是重要的倾向抗原变异的抗原决定簇。

[0148] 除了表面蛋白HA和NA之外,流感病毒还包含六种额外的内部基因,这些基因产生八种不同的蛋白质,包括聚合酶基因PB1、PB2和PA、基质蛋白M1和M2、核蛋白(NP)和非结构蛋白NS1和NS2蛋白(参见例如,Horimoto等人,2001,Clin Microbiol Rev.14(1):129-149)。

[0149] 为了包装成子代病毒粒子,病毒RNA以与流感病毒基质1(M1)蛋白和核输出蛋白缔合的核糖核蛋白(RNP)复合物形式从细胞核运输,该复合物由三种流感病毒聚合酶蛋白、核蛋白(NP)和病毒RNA构成(Marsh等人,2008,J Virol,82:2295-2304)。位于包膜内的M1蛋白被认为在组装和出芽中发挥作用。有限数量的M2蛋白整合到病毒粒子中(Zebedee,1988,J.Virol.62:2762-2772)。这些M2蛋白形成具有H+离子通道活性的四聚体,并且当被内涵体中的低pH激活时,酸化病毒粒子的内部,从而帮助其脱壳(Pinto等人,1992,Cell 69:517-528)。金刚烷胺是抗流感药物,其通过干扰M2离子通道活性从而抑制病毒脱壳来防止病毒感染。

[0150] 非结构蛋白NS1具有多种功能,包括调节细胞mRNA的剪接和核输出以及刺激翻译。NS1的主要功能似乎是抵消宿主的干扰素活性,因为NS1敲除病毒是能存活的,尽管它在干扰素无缺陷细胞中的生长效率低于亲代病毒(Garcia-Sastre,1998,Virology 252:324-330)。

[0151] NS2非结构蛋白已在病毒颗粒中检测到(Richardson等人,1991,Arch.Virol.116:69-80;Yasuda等人,1993,Virology 196:249-255)。病毒颗粒中NS2蛋白的平均数量估计为130-200个分子。体外结合测定已证明M1与NS2之间的直接蛋白质-蛋白质接触。NS2-M1复合物也已通过免疫沉淀法在病毒感染的细胞裂解物中检测到。NS2蛋白被认为通过与M1蛋白相互作用在RNP从细胞核输出中发挥作用(Ward等人,1995,Arch.Virol.140:2067-2073)。

[0152] 病毒蛋白和病毒样颗粒(VLP)

[0153] 提供了非天然存在的、广泛反应性的流感(例如,H1或H3)HA免疫原性多肽(免疫原)和病毒样颗粒(VLP),其包含流感病毒HA免疫原,该免疫原含有赋予HA抗原在施用和递送至易感受试者后生成针对流感及其症状的广泛活性免疫应答的能力(预防性的或治疗性的)的多种表位(抗原决定簇)。作为示例,代表性流感病毒HA免疫原性抗原序列呈现于本文的SEQ ID NO:1-17(实例1)中。在特定实施例中,广泛反应性HA多肽作为VLP的一部分施用。

在实施例中,VLP含有编码一种或多种本文所述的广泛反应性流感HA免疫原性抗原的一种或多种多核苷酸。

[0154] 应当理解,本文描述和提供的流感病毒免疫原和序列是非天然存在的并且是广泛反应性的,无论这些特点和特征是否明确说明。还应当理解,本文描述的并用作免疫原的抗原蛋白是在受试者中引发免疫应答(例如,中和抗体和/或细胞免疫应答)的非天然存在的或合成的抗原。

[0155] 流感VLP包括病毒HA、NA和M1蛋白。流感VLP的产生已在本领域中描述并且在本领域普通技术人员的技能和专业知识之内。简而言之并且如所描述的,流感VLP可以通过用一种或多种含有编码HA、NA和M1蛋白的多核苷酸序列的质粒转染宿主细胞来产生。将转染的细胞孵育适当的时间以允许蛋白质表达(诸如持续约72小时)后,可以从细胞培养物上清液中分离VLP。可以使用本领域实践的程序从细胞上清液中纯化流感VLP,例如,可以通过低速离心(以除去细胞碎片)、真空过滤和通过20%甘油进行超速离心来分离VLP。在一个实施例中,还可以生产、分离含有源自其他病原体的广泛反应性抗原的VLP,并将该VLP用作免疫原或用于免疫原性组合物中。

[0156] 流感VLP可以用作流感疫苗以引发针对H1或H3流感病毒的免疫应答。特别地,疫苗(或VLP)的组分、即广泛反应性流感HA多肽含有广泛反应性的并用于在受试者中引发免疫应答(例如,产生中和抗体和/或激活的T细胞)的抗原决定簇,该免疫应答可以治疗病毒感染的受试者(例如,中和感染病毒)和/或保护受试者免受全面病毒感染或其体征和症状。

[0157] 在一个实施例中,本文所述的广泛反应性的且免疫原性的流感抗原(诸如,H1或H3 HA抗原)的抗原序列含有可以反映病毒抗原蛋白中的抗原漂移和序列变异性的多种表位决定簇库。特别地,本文所述的流感病毒HA抗原可以包含含有源自序列不同的流感病毒毒株(包括漂移变体)的抗原决定簇(表位)的氨基酸序列,针对该抗原决定簇可以产生广泛反应性的中和抗体,尤其是当抗原用作引入受试者的免疫原性产物(免疫原)(例如,抗病毒疫苗)时。在一个实施例中,H1或H3免疫原性抗原序列在SEQ ID NO:1-17中列出。在一个实施例中,HA免疫原性抗原是全长HA多肽。在一个实施例中,HA免疫原性抗原是可溶性HA多肽(sHA),其缺少跨膜结构域和尾部结构域。

[0158] 因为本文所述并用作免疫原或免疫原性组合物(诸如疫苗)的广泛反应性流感HA抗原及其序列在具有免疫能力的受试者中引发广泛反应性免疫应答,所以它们提供了优异的免疫原性产物(例如,疫苗),其捕获不同流感分离毒株(亚型或毒株)的抗原决定簇,针对该抗原决定簇生成广泛活性的免疫应答(例如,广泛活性的中和抗体和/或细胞免疫反应)。注意,术语"广泛活性"和"广泛反应性"在本文中同义使用。

[0159] 在一个实施例中,本文所述的流感病毒抗原是当前引起疾病或感染及其症状(诸如流感、流行性感冒或传染性支气管炎)的病毒的多肽或肽抗原。在另一个实施例中,流感病毒抗原是可能引起未来疾病和感染的多肽或肽抗原。在一个实施例中,流感病毒抗原是多核苷酸序列。在一个实施例中,流感病毒抗原是编码本文所述的多肽或肽抗原的多核苷酸序列。作为示例,代表性的广泛反应性流感病毒HA免疫原性序列提供于下文实例1中的SEQ ID NO:1-17中。

[0160] 在另一个实施例中,本文所述的流感免疫原序列在细胞中表达为多肽、蛋白质或肽。在一个实施例中,流感免疫原是分离的和/或纯化的。在一个实施例中,免疫原被配制成

用于施用于有需要的受试者。在一个实施例中,将有效量的免疫原施用于有此需要的受试者以在受试者中引发免疫应答。在一个实施例中,免疫应答引发中和抗体。在一个实施例中,引发细胞免疫应答。在一个实施例中,免疫应答是预防性的或治疗性的。

[0161] 在一个实施例中,提供了非天然存在的流感病毒免疫原(免疫原序列),例如,疫苗,在将该免疫原引入、施用或递送至受试者后在受试者中引发广泛反应性的免疫应答。引入、施用或递送的途径不受限制并且可以包括例如静脉内、皮下、肌内、口服等途径。疫苗可以是治疗性的(例如,在由流感病毒引起的疾病(流行性感冒或支气管炎)症状之后施用于受试者),或者它可以是预防性的(保护性的)(例如,在受试者患有或表达由病毒引起的疾病(流行性感冒或支气管炎)症状或全面疾病之前施用于受试者)。

[0162] 在一个实施例中,病毒抗原例如HA的最终氨基酸序列被逆翻译并优化以在哺乳动物细胞中表达。如本领域技术人员将理解的,核酸序列的优化包括用于在哺乳动物细胞中表达序列的密码子的优化和RNA优化(诸如RNA稳定性)。

[0163] 在一个实施例中,提供了包含编码多肽或肽抗原(诸如流感病毒HA多肽)的核苷酸序列的分离的核酸分子(多核苷酸)。在某些实施例中,编码HA多肽的核苷酸序列与编码本文的SEQ ID NO:1-17的HA多肽序列的多核苷酸至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。

[0164] 在其他实施例中,与编码本文SEQ ID NO:1-17的流感病毒HA多肽序列的多核苷酸至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的编码流感病毒HA多肽的核苷酸序列缺少编码N末端甲硫氨酸的起始密码子。在一些实施例中,核苷酸序列编码起始密码子,该起始密码子编码N末端甲硫氨酸。

[0165] 提供了含有编码非天然存在的、广泛反应性多肽或肽抗原(诸如流感HA多肽)的核苷酸序列的载体。在一些实施例中,载体包含编码多肽或肽抗原(诸如流感H1或H3 HA多肽抗原)的核苷酸序列,其与编码本文SEQ ID NO:1-17的HA多肽序列的多核苷酸至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在一些实施例中,载体进一步包括与编码HA多肽的核苷酸序列可操作地连接的启动子。在一个特定实施例中,启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。在一些实施例中,载体的核苷酸序列与编码本文SEQ ID NO:1-17的HA多肽序列的多核苷酸至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。在一个特定实施例中,载体的核苷酸序列包含编码本文SEQ ID NO:1-17的HA多肽序列的多核苷酸。在实施例中,载体是原核或真核载体。在一个实施例中,载体是表达载体,诸如真核(例如,哺乳动物)表达载体。在另一个实施例中,载体是质粒(原核或细菌)载体。在另一个实施例中,载体是病毒载体。

[0166] 用于表达流感病毒抗原(例如,H1或H3病毒蛋白,诸如本文所述的HA蛋白)的载体可以是本领域已知和使用的任何合适的表达载体。载体可以是例如哺乳动物表达载体或病毒载体。在一些实施例中,载体是pTR600表达载体(美国专利申请公开号2002/0106798,通过引用并入本文;Ross等人,2000,Nat Immunol.1(2):102-103;和Green等人,2001,Vaccine 20:242-248)。

[0167] 提供了在细胞中的源自流感病毒的非天然存在的多肽免疫原,例如H1或H3流感HA多肽抗原,该多肽免疫原通过用本领域已知和使用的表达载体在足以允许HA多肽表达的条件下转染宿主细胞来产生。还提供了含有载体的分离细胞。

[0168] 还提供了本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感病毒抗原多肽,诸如广泛反应性H1或H3流感HA多肽。在某些实施例中,多肽的氨基酸序列与本文SEQ ID NO:1-17(实例1)中显示的HA多肽的氨基酸序列至少95%至99%(包括端值)相同。在特定实施例中,与SEQ ID NO:1-17的HA多肽的氨基酸序列至少95%至99%(包括端值)相同的流感HA多肽的氨基酸序列缺少N末端甲硫氨酸残基。在一个特定实施例中,流感HA多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-17的HA多肽的氨基酸序列至少95%至99%(包括端值)相同。

[0169] 在一些实施例中,还提供了包含本文所述的广泛反应性流感病毒抗原多肽(例如但不限于本文公开的HA多肽)的融合蛋白。在一些实施例中,流感HA多肽可以与任何异源氨基酸序列融合以形成融合蛋白。作为示例,HA1和HA2多肽可以独立生成,并且然后融合在一起以产生流感HA多肽抗原。

[0170] 还提供了病毒样颗粒(VLP),特别是含有广泛反应性蛋白抗原(例如,HA蛋白)的H1或H3流感VLP,如本文所述。在某些实施例中,VLP的HA蛋白与本文SEQ ID NO:1-17中列出的流感病毒HA蛋白至少或等于94%、至少或等于95%、至少或等于96%、至少或等于97%、至少或等于98%、至少或等于99%或100%相同。病毒或流感VLP可以进一步包括形成病毒颗粒所必需的任何额外的病毒或流感蛋白。在某些实施例中,病毒或流感VLP进一步包括流感神经氨酸酶(NA)蛋白、流感基质(M1)蛋白或两者。

[0171] 还提供了含有本文所述的H1或H3流感病毒HA多肽的流感VLP,其通过用含编码HA多肽的多核苷酸的载体转染宿主细胞产生。在实施例中,多核苷酸是DNA或RNA,例如mRNA。在某个实施例中还提供了含有本文所述的流感HA多肽的流感VLP,其通过在足以允许流感病毒HA、NA和M1蛋白表达的条件下用编码流感病毒HA多肽的载体、编码流感NA蛋白的载体和编码流感M1蛋白的载体转染宿主细胞产生。此类VLP包含SEQ ID NO:1-17中列出的序列并用作免疫原,生成针对本文所述的流感病毒类型的不同毒株具有高血凝素抑制(HAI)滴度的抗体。

[0172] 还考虑了质粒(载体)的集合。在某些实施例中,质粒集合包括编码流感病毒NA的质粒、编码流感MA的质粒和编码本文所述的广泛反应性流感病毒HA蛋白的质粒。在一些实施例中,HA编码质粒的编码流感HA蛋白的核苷酸序列与编码SEQ ID NO:1-17中显示的HA氨基酸序列的多核苷酸至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在一些实施例中,HA编码质粒的编码密码子优化的流感HA蛋白的核苷酸序列与编码SEQ ID NO:1-17中显示的流感HA氨基酸序列的多核苷酸至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在另一个实施例中,质粒集合含有编码本文所述的广泛反应性HA蛋白的质粒,其包含编码SEQ ID NO:1-17中显示的HA氨基酸序列的多核苷酸。

[0173] 在本公开的上下文中,“广泛反应性”或“广泛活性”是指流感病毒蛋白(例如,H1或H3 HA蛋白序列),其是免疫原性的并且含有在受试者中引发足以治疗由特定亚型内的大多数或全部流感病毒或相关病毒毒株引起的疾病或感染和/或抑制、中和或预防该感染的免疫应答(例如,针对广泛反应性蛋白免疫原中含有的表位的中和抗体,通常伴随T细胞应答)的多种表位(抗原决定簇)。在实施例中,广泛反应性的H1或H3流感病毒衍生的HA抗原蛋白可以引发针对大多数或所有已知的H1或H3流感病毒分离株(诸如约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约96%-99%的已知H1或H3流感病毒分离株)的保护性免疫应答。在特定的实施例中,广泛反应性的H1或H3流感病毒衍生的抗原蛋白(例如,HA蛋白)可以引

发针对大多数或所有已知的H1或H3流感病毒分离株的保护性免疫应答,诸如约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％或约96％-99％的已知H1或H3流感病毒分离株。用于施用的组合物和药物组合物

[0174] 提供了包含广泛反应性流感HA蛋白的组合物,或者包含本文所述的此类广泛反应性流感或HA蛋白的融合蛋白或VLP的组合物。在一些实施例中,组合物进一步包含药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。在一些实施例中,还采用佐剂(改变或增强免疫应答例如以产生更多更持久的抗体的药理学或免疫学试剂)。作为示例而非限制,佐剂可以是无机化合物,诸如明矾、氢氧化铝或磷酸铝;矿物油或石蜡油;角鲨烯;清洁剂,诸如Quil A;植物皂甙;弗氏完全佐剂或不完全佐剂、生物佐剂(例如,细胞因子,诸如IL-1、IL-2或IL-12);细菌产物,诸如灭活的百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)或类毒素;或免疫刺激寡核苷酸(诸如CpG寡核苷酸)。

[0175] 用于肠胃外施用的含有非天然存在的、广泛反应性的流感病毒HA多肽和流感病毒样颗粒(VLP)的组合物和制剂(例如,生理学或药学上可接受的组合物)包括但不限于无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的非显著性示例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(诸如橄榄油和菜籽油)以及可注射有机酯(诸如油酸乙酯)。水性载剂包含水、醇性/水溶液、乳液或悬浮液,包含盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包含例如氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏或固定油。静脉内媒介物包括例如液体和营养补充剂、电解质补充剂诸如那些基于林格氏右旋糖的电解质补充剂等。在此类组合物和制剂中还可以存在防腐剂和其他添加剂,诸如例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、着色剂、稳定剂、惰性气体等。

[0176] 一些组合物可能呈药学上可接受的酸加成盐或碱加成盐形式施用,该酸加成盐或碱加成盐是通过与以下各酸反应形成:无机酸,如盐酸、氢溴酸、过氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸;和有机酸,如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、顺丁烯二酸和反丁烯二酸;或通过与以下各碱反应形成:无机碱,如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾;和有机碱,如单烷基胺、二烷基胺、三烷基胺和芳基胺以及被取代的乙醇胺。

[0177] 本文提供了药物组合物,其包含治疗有效量的单独的或与药学上可接受的载体组合的非天然存在的、广泛反应性的流感病毒蛋白HA抗原或流感VLP。在实施例中,流感病毒HA抗原包括具有例如本文SEQ ID NO:1-17中显示的序列的H1或H3流感病毒的那些抗原。药学上可接受的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。载体和组合物可以是无菌的,并且制剂适合施用模式。组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。该组合物可以是液体或水溶液、悬浮液、乳液、分散体、片剂、丸剂、胶囊、粉末或缓释制剂。液体或水性组合物可以在使用前冻干并用溶液或缓冲液重构。组合物可与常规粘合剂和载体诸如甘油三酯一起配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体,诸如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。可以使用公知的药物载体中的任一种,诸如无菌盐水溶液或芝麻油。介质还可以含有常规的药物辅助材料,诸如例如调节渗透压的药学上可接受的盐、缓冲液、防腐剂等。可以用于所描述的组合物和施用方法中的其他介质是生理盐水和芝麻油。

[0178] 治疗、施用和递送方法

[0179] 提供了治疗由流感病毒(例如,H1或H3流感病毒)引起的疾病或感染或其症状的方

法。该方法包括向受试者(例如,哺乳动物,特别是人类受试者、非人类动物或兽医受试者或者禽类受试者)施用治疗有效量的本文所述的广泛反应性免疫原或包含该免疫原的药物组合物或本文所述的疫苗(例如,VLP疫苗)。应当理解,术语施用涵盖受试者的接种、免疫或疫苗接种。术语免疫和疫苗接种("免疫/疫苗接种")在本文中可以互换使用。

[0180] 一个实施例涉及治疗患有由流感病毒引起的疾病或感染或其症状或处于患有该疾病或感染或其症状的风险中或易患该疾病或感染或其症状的受试者的方法。该方法包括向受试者(例如,哺乳动物受试者)施用足以在治疗由流感病毒引起的疾病、感染或其症状的条件下治疗该疾病、感染和/或其症状的一定量或治疗量的免疫原性组合物或疫苗,其包含非天然存在的、广泛反应性的流感病毒抗原多肽,诸如HA多肽或VLP。

[0181] 在一个实施例中,本文的方法包括向受试者(包括被鉴定为需要此类治疗的人类受试者或非人类受试者)施用有效量的非天然存在的、广泛反应性的流感病毒抗原多肽(诸如本文所述的H1或H3流感病毒HA多肽)或本文所述的疫苗或组合物以产生免疫应答。该治疗方法适合施用于患有、具有、易感疾病、病症、感染或其症状(例如,流行性感冒或流感或者传染性支气管炎)或者处于发展该疾病、病症、感染或其症状的风险中的受试者,特别是人。在实施例中,该治疗方法还适合施用于非人类受试者,诸如非人类动物受试者、兽医受试者或禽类受试者。鉴定需要此类治疗的受试者可以依据受试者或者医疗或兽医保健专业人员的判断,并且可以为主观的(例如,意见)或客观的(例如,可通过测试或诊断方法测量)。简而言之,可以通过诊断测试(例如,基因测试、酶或蛋白质标记物测定)、标记物分析、家族史等(包括受试者或医疗保健提供者的意见)经由任何客观或主观确定来确定需要治疗或"处于危险中"或"易患"的那些受试者。本文所述的非天然存在的、广泛反应性的病毒免疫原,诸如H1或H3流感病毒HA多肽、免疫原和疫苗,也可以用于治疗涉及由H1或H3流感病毒引起的感染或疾病的任何其他病症。接受治疗的受试者可以是非人类哺乳动物,诸如兽医受试者、禽类受试者或人类受试者(也称为"患者")。

[0182] 另外,提供了防止或防范由流感病毒例如H1或H3流感病毒引起的疾病或感染或其症状的预防方法。此类方法包括向有需要的受试者(例如,哺乳动物,诸如人)施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物包含本文所述的H1或H3流感病毒HA多肽免疫原性组合物或疫苗(例如,H1或H3流感病毒VLP疫苗),特别是在感染受试者之前或疾病(诸如H1或H3病毒相关疾病)发作之前施用。

[0183] 在另一个实施例中,提供了监测由例如H1或H3流感病毒引起的流感病毒感染或疾病的进展的方法,或者监测流感病毒感染或疾病的治疗的方法。该方法包括确定患有或易患与流感病毒相关的感染、疾病或其症状的受试者中的诊断标记物或生物标记物(例如,流感病毒蛋白,诸如H1或H3 HA)的水平,或诊断测量(例如,筛选测定或检测测定),其中已向受试者施用足以治疗感染、疾病或其症状的一定量(例如,治疗量)的本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感病毒HA蛋白免疫原,或本文所述的疫苗。在该方法中确定的标记物或生物标记物(例如,病毒蛋白)的水平或量可以与来自健康(未感染)的正常对照的样品中;在受试者的感染前或疾病前样品中;或在受影响/感染/患病患者中的标记物或生物标记物的已知水平进行比较以确定经治疗的受试者的疾病状态。为了监测,在从受试者获得的样品中的标记物或生物标记物的第二水平或量在晚于确定第一水平或量的时间点确定,并且可以比较两种标记物或生物标记物水平或量以监测疾病或感染的进程,或疗法/治疗

的功效。在某些实施例中,在所述的开始治疗之前确定受试者中(例如,从受试者获得的样品中)标记物或生物标记物的治疗前水平;然后可以将标记物或生物标记物的这种治疗前水平与治疗开始后和/或治疗进程期间受试者中标记物或生物标记物的水平进行比较以确定疾病治疗的功效(监测功效)。在所述方法中,受试者可以是人类受试者或患者,或者非人类动物或兽医受试者。

[0184] 非天然存在的、广泛反应性的流感病毒多肽(诸如所述的H1或H3流感病毒HA多肽)以及包含此类HA多肽的VLP或其组合物可以通过通常用于将重组蛋白、含有重组蛋白的组合物或重组病毒引入受试者的途径中的任一种施用于受试者。施用途径和方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、鞘内、肠胃外(诸如静脉内(IV)或皮下(SC))、阴道、直肠、鼻内、吸入、眼内、颅内或口服。肠胃外施用(诸如皮下、静脉内或肌内施用)通常通过注射(免疫)来实现。可以以常规形式和制剂(作为液体溶液或悬浮液,适合于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式(例如,冻干形式)或作为乳液)制备注射剂。可以由无菌粉末、微粒和片剂制备注射溶液和悬浮液。施用可以是全身性的或局部的。

[0185] 非天然存在的广泛反应性的流感病毒多肽(诸如所述H1或H3流感病毒HA多肽)以及包含此类HA多肽的VLP或其组合物可以以任何合适的方式施用,诸如与上文所述的药学上可接受的载体一起施用。药学上可接受的载体部分地由所施用的特定免疫原或组合物以及通过用于施用组合物的特定方法来测定。因此,包含免疫原性非天然存在的流感病毒抗原多肽(诸如所述H1或H3流感病毒HA多肽)和包含此类HA多肽的VLP或其组合物的药物组合物可以使用多种合适的且生理学和药学上可接受的制剂制备。

[0186] 广泛反应性的免疫原性病毒抗原多肽(诸如所述H1或H3流感病毒HA多肽)和包含此类HA多肽的VLP或其组合物的施用可以通过单剂量或多剂量来完成。向受试者施用的剂量应足以随着时间的推移在受试者中诱导有益的治疗应答,诸如以抑制、阻断、减少、改善、防范或预防流感病毒(例如,H1或H3流感病毒)引起的疾病或感染。所需剂量因受试者而异,取决于受试者的物种、年龄、体重和一般状况,所治疗的感染的严重程度,所使用的特定组合物和施用模式。合适的剂量可以由本领域技术人员(诸如临床医生或执业医师)仅使用常规实验来确定。

[0187] 进一步提供了通过向受试者施用所述的非天然存在的、广泛反应性的H1或H3流感病毒HA多肽,或包含此类HA多肽的VLP、其组合物,或含有本文所述的H1或H3流感病毒HA多肽的融合蛋白,在受试者中引发针对流感病毒的免疫应答的方法。在一些实施例中,流感病毒HA蛋白、融合蛋白或VLP可以使用任何合适的施用途径施用,诸如例如通过肌内注射施用。在一些实施例中,流感病毒HA蛋白、融合蛋白或VLP作为包含药学上可接受的载体的组合物施用。在一些实施例中,组合物包含选自例如明矾、弗氏完全或不完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激寡核苷酸(诸如CpG寡核苷酸)的佐剂。在其他实施例中,组合物可以与本领域技术人员使用的另一种治疗剂或分子(例如抗病毒剂或其组合)组合施用。

[0188] 还提供了针对由H1或H3流感病毒引起的感染或疾病或其症状对受试者进行免疫的方法,其中该方法包括向受试者施用含有本文所述的非天然存在的、广泛反应性的H1或H3流感HA蛋白的VLP或者施用其免疫原性组合物。在该方法的一些实施例中,该组合物进一步包含药学上可接受的载体和/或佐剂。例如,佐剂可以是明矾、弗氏完全或不完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激寡核苷酸(诸如CpG寡核苷酸)。在一个实施例中,VLP(或其组合物)肌内

施用。

[0189] 在针对由流感病毒(例如,H1或H3流感)引起或与该流感病毒相关的病毒感染或疾病引发免疫应答或使受试者免疫的方法的一些实施例中,向受试者施用至少1μg含有非天然存在的、广泛反应性的流感病毒(例如,H1或H3流感)HA蛋白的VLP,诸如至少5μg、至少10μg、至少15μg、至少20μg、至少25μg、至少30μg、至少40μg或至少50μg的含有非天然存在的、广泛反应性的流感病毒HA蛋白的VLP,例如,约1至约50μg或约1至约25μg的含有流感病毒HA蛋白的VLP。在特定示例中,向受试者施用约5至约20μg的VLP,或约10至约15μg的VLP。在一个具体但非限制性的示例中,向受试者施用约15μg的VLP。然而,本领域技术人员能够确定适合于向需要治疗或保护免受病毒感染的受试者施用的VLP的治疗有效量(例如,提供针对流感病毒(例如,H1或H3流感)感染的治疗效果或保护的量)。

[0190] 预期施用包含本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感病毒HA蛋白的VLP将引发针对HA蛋白免疫原上的多种表位决定簇库的高滴度中和抗体,以及针对多种代表性流感分离株的治疗或保护水平的HA抑制(HAI)抗体,并且将提供针对流感病毒(例如,H1或H3流感)和/或相关流感病毒类型的致命攻击的全面保护。含有本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感HA蛋白(例如,H1或H3流感HA蛋白)的VLP引发更广泛的免疫应答(例如,与由例如多价流感病毒(例如,多价H1或H3流感病毒)疫苗引发的免疫应答相比,引发针对更广泛的流感病毒分离株的中和抗体)。

[0191] 佐剂和组合疗法

[0192] 本文所述的含有流感蛋白抗原(例如,H1或H3流感HA抗原)或含有流感病毒(例如,H1或H3流感病毒)VLP的流感病毒免疫原或免疫原性组合物可以单独施用或与用于增强抗原性或免疫原性(即,增强受试者中的免疫应答,诸如特异性抗体的引发)的其他治疗剂组合施用。作为示例,H1或H3流感病毒VLP可以与佐剂一起施用,诸如明矾、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、ADDAVAX™佐剂、生物佐剂或免疫刺激寡核苷酸(诸如CpG寡核苷酸)。ADDAVAX™佐剂(InvivoGen,San Diego,CA;ThermoFisher)是基于角鲨烯的水包油纳米乳液,其配方与MF59®相似。此类角鲨烯水包油乳液佐剂引发细胞(Th1)和体液(Th2)免疫应答,并被认为通过募集和激活抗原呈递细胞(APC)以及刺激巨噬细胞和粒细胞产生细胞因子和趋化因子来发挥作用。

[0193] 如需要或有必要,一种或多种细胞因子,诸如白细胞介素-1(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-12(IL-12)、蛋白质记忆T细胞引诱剂“调节激活正常T细胞表达和分泌因子”(RANTES)、粒细胞-巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)或干扰素-γ(IFN-γ);一种或多种生长因子,诸如GM-CSF或粒细胞集落刺激因子(G-CSF);一种或多种分子,诸如TNF配体超家族成员4配体(OX40L)或属于TNF超家族的2型跨膜糖蛋白受体(4-1BBL),或这些分子的组合可以用作生物佐剂(参见例如,Salgaller等人,1998,J.Surg.Oncol.68(2):122-38;Lotze等人,2000,Cancer J.Sci.Am.6(增刊1):S61-6;Cao等人,1998,Stem Cells 16(增刊1):251-60;Kuiper等人,2000,Adv.Exp.Med.Biol.465:381-90)。这些分子可以全身(或局部)施用于受试者。在另一个实施例中,本领域技术人员使用的一种或多种抗病毒剂(例如但不限于流感药物Rapivab(帕拉米韦)、瑞乐砂(Relenza)(扎那米韦)、达菲(Tamiflu)(磷酸奥司他韦)或Xofluza(巴洛昔韦马鲍醇))可以向受试者共同施用。

[0194] 体外和体内诱导细胞应答的几种方法是本领域已知的并已实践的。脂质已被鉴定为能够帮助体内启动细胞毒性淋巴细胞(CTL)对抗各种抗原的试剂。例如,棕榈酸残基可以与赖氨酸残基的α和ε氨基基团连接,并且然后(例如,经由一个或多个连接残基,诸如甘氨酸、甘氨酸-甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸-丝氨酸等)与免疫原性肽连接(美国专利号5,662,907)。然后,脂化肽可以以胶束形式直接注射、掺入脂质体中或乳化在佐剂中。作为另一个示例,当与适当的肽共价连接时,大肠杆菌(E.coli)脂蛋白,诸如三棕榈酰-S-甘油酰半胱氨酰丝氨酰-丝氨酸,可以用于初免肿瘤特异性CTL(参见例如,Deres等人,1989,Nature 342:561)。此外,中和抗体的诱导也可以用与展示适当表位的肽缀合的相同分子来启动,并且可以组合两种组合物以引发体液和细胞介导的应答,其中此类组合被认为是期望的。

[0195] 虽然治疗方法可能涉及施用含有本文所述的非天然存在的、广泛反应性的HA免疫原性蛋白的VLP,但本领域技术人员将理解,非天然存在的、广泛反应性的HA蛋白本身(不存在病毒颗粒)可以以药学上可接受的组合物的组分的形式或以融合蛋白的形式施用于有此需要的受试者以在受试者中引发免疫应答。

[0196] 试剂盒

[0197] 还提供了例如用于向有需要的受试者施用的含有所述非天然存在的、广泛反应性的流感病毒免疫原,或疫苗,或含有该免疫原和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药学上可接受的组合物的试剂盒。免疫原可以呈流感病毒(例如,H1或H3流感病毒)蛋白(多肽)或多核苷酸(编码流感病毒蛋白的多核苷酸)(例如,本文所述的H1或H3流感病毒HA)的形式。还提供了含有本文所述的一种或多种质粒或质粒集合的试剂盒。如本领域技术人员将理解的,此类试剂盒可以含有一个或多个容纳免疫原、疫苗或组合物、必要时的稀释剂或赋形剂以及使用说明的容器。

[0198] 除非另有指示,否则本文所述的方面和实施例的实践采用分子生物学(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,这些技术完全属于技术人员的职权范围。此类技术在文献中得到了充分的解释,诸如“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook,1989);“Oligonucleotide Synthesis”(Gait,1984);“Animal Cell Culture”(Freshney,1987);“Methods in Enzymology”;“Handbook of Experimental Immunology”(Weir,1996);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”(Miller和Calos,1987);“Current Protocols in Molecular Biology”(Ausubel,1987);“PCR:The Polymerase Chain Reaction”(Mullis,1994);“Current Protocols in Immunology”(Coligan,1991)。这些技术适用于本文描述和/或举例说明的方面和实施例的多核苷酸和多肽的产生,并且因此可以在制备和实践此类方面和实施例时考虑。用于特定实施例的有用技术将在以下部分中讨论。

[0199] 实例

[0200] 提供以下实例来说明某些特定特征和/或实施例。该实例不应被解释为将本公开限制于所述的特定特征或实施例。

[0201] 实例1:流感病毒血凝素(HA)序列

[0202] 本实例呈现了源自流感H1和H3类型(诸如H1N1和H3N2)的全长、非天然存在的、广泛反应性的流感病毒血凝素(HA)免疫原性多肽抗原和可溶性流感病毒HA(sHA)抗原氨基酸序列的氨基酸序列。在一个实施例中,HA抗原提供源自流感H1或H3的HA抗原在某个时间范

围(例如,给定的年份跨度或流行性感冒季节)的表位,当HA抗原作为免疫原施用于受试者或宿主时,该表位提供针对当前和未来的H1或H3 HA抗原(例如,未来流行性感冒季节中传播的流感病毒的H1或H3抗原)的广泛反应性免疫应答。作为免疫原,非天然存在的HA免疫原性多肽抗原在受体受试者或宿主中生成针对流感病毒(例如,病毒抗原)的广泛反应性免疫应答(抗体和/或细胞免疫应答)。在一个实施例中,用作免疫原的HA抗原在受试者中针对可能在不同(例如,随后或未来)流行性感冒季节中产生的流感病毒毒株或类型生成治疗性和/或保护性免疫应答(例如,抗体应答和/或细胞免疫应答)。作为示例,用作免疫原的非天然存在的、广泛反应性的流感病毒血凝素(HA)或神经氨酸酶(NA)多肽抗原序列可以通过诸如例如在公开的PCT申请号WO 2020/014673或WO 2020/014675中描述的方法生成,其内容通过引用整体并入本文。在本文的一些情况下,生成广泛反应性流感HA或NA免疫原性多肽(或肽)的方法被称为'计算优化广泛反应性抗原'(Cobra)方法,并且非天然存在的、广泛反应性的流感病毒HA或NA免疫原性多肽(或肽)(包括其可溶形式)被称为"Cobra"抗原或免疫原。本文提供的H1或H3病毒HA多肽的氨基酸序列如下:

[0203] Y2-H1N1 HA:

[0204] MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLH
LGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD
SNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFVGT
SRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPEGAINTSLPFQNVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQN
EQGSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLEN
ERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVGTGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGS**(SEQ ID NO:1)

[0205] NG2-H3N2 HA:

[0206] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFKNESFNWT
GVTQNGTSSACIRGSSSSFFSRLNWLTHLNYTYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVEGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGS**(SEQ ID NO:2)

[0207] J1(2013S-2015S)1-566AA:

[0208] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRNIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELK

SGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI(SEQ ID NO:3)

[0209] J2(2014-15N至2015-16N)1-566AA:

[0210] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSSSSFFSRLNWLTHLNYKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELK
SGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI(SEQ ID NO:4)

[0211] J3(2014S-2016S)(S1)1-566AA:

[0212] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSSSSFFSRLNWLTHLNYTYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELK
SGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI(SEQ ID NO:5)

[0213] J4 1-566 AA(2013S至2015-16N)(S2):

[0214] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNYKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELK
SGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI(SEQ ID NO:6)

[0215] J1 HA:

[0216] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRNIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELK
SGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI(SEQ ID NO:7)

[0217] J4 HA:

[0218] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC

DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNYKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVELK
SGYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI(SEQ ID NO:8)

[0219] 可溶性HA序列

[0220] J1 H3N2 sHA:

[0221] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRNIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVEGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH**(SEQ ID NO:9)

[0222] J4 sHA:

[0223] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRRSNSSFFSRLNWLTHLNYKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVEGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH**(SEQ ID NO:10)

[0224] NG1 sHA:

[0225] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWT
GVTQNGTSSACIRGSSSSFFSRLNWLTHLNYTYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVEGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH**(SEQ ID NO:11)

[0226] NG2 sHA:

[0227] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFKNESFNWT
GVTQNGTSSACIRGSSSSFFSRLNWLTHLNYTYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV

STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVEGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH**(SEQ ID NO:12)

[0228] NG3 sHA:

[0229] MKTIIALSYILCLVFAQKIPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDRIEVTNATELVQNSSIGEIC
DSPHQILDGGNCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVERSRAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFKNESFNWT
GVTQNGTSSACIRGSSSSFFSRLNWLTHLNYTYPALNVTMPNKEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQSSGRITV
STKRSQQAVIPNIGSRPRIRDIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGKCKSE
CITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQSTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQ
NSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALE
NQHTIDLTDSEMNKLFEKTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHNVYRDEALNNRFQIKGVEGY
IPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH**(SEQ ID NO:13)

[0230] H1N1可溶性HA序列

[0231] Y1 H1N1 sHA:

[0232] MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLH
LGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD
SNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFVGT
SRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPEGAINTSLPFQNVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQN
EQGSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLEN
ERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLES
TRIYGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH(SEQ ID NO:14)

[0233] Y2 H1N1 sHA:

[0234] MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLH
LGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD
SNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFVGT
SRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPEGAINTSLPFQNVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQN
EQGSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLEN
ERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLES
TRIYGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH(SEQ ID NO:15)

[0235] Y3 H1N1 sHA:

[0236] MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLH
LGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD
SNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFVGT
SRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPEGAINTSLPFQNVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQN

EQGSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLEN
ERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLES
TRIYGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH(SEQ ID NO:16)

[0237] Y4 H1N1 sHA:

[0238] MKAILVVLLYTFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLH
LGKCNIAGWILGNPECESLSTARSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD
SNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLNQTYINDKGKEVLVLWGIHHPSTTADQQSLYQNADAYVFVGT
SRYSKKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC
QTPEGAINTSLPFQNVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQN
EQGSGYAADLKSTQNAIDKITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLEN
ERTLDYHDSNVKNLYEKVRNQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREKIDGVKLES
TRIYGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGLNDIFEAQKIEWHEGHHHHHH(SEQ ID NO:17)

[0239] 实例2:使用重组流感病毒HA免疫原性肽(甲型流感(H3))作为免疫原(疫苗)的雪貂和小鼠动物研究

[0240] 使用重组流感病毒HA免疫原性肽(诸如甲型流感(H3N2))作为免疫原(疫苗)在预免疫和未经处理小鼠以及预免疫和未经处理雪貂中进行体内研究,以使用体内动物模型确定重组流感HA免疫原在引发针对季节性和大流行性流感病毒的广泛保护性免疫应答中的免疫原性和功效。预免疫的小鼠和雪貂动物提供了相关的动物模型,在该模型中评估本文所述的流感HA免疫原作为预防和/或治疗疾病的治疗剂的功效,因为动物通常不表现出针对季节性流感病毒抗原(例如,HA)的预先存在的抗体。相比之下,大多数人类受试者具有预先存在的针对季节性流感病毒抗原的抗体。如实例1中所述,HA多肽免疫原(和重组HA多肽免疫原)构成源自流感H1和H3类型(诸如H1N1和H3N2)的流感病毒血凝素(HA)抗原氨基酸序列,例如,含有代表季节性或大流行性流感病毒的那些的HA序列。在以下实例中,术语免疫和疫苗接种可互换使用。

[0241] 雪貂研究

[0242] 使用广泛反应性的重组HA多肽免疫原对雪貂进行病毒感染和免疫(疫苗接种)

[0243] 将对针对传播的甲型流感(H1N1、H3N2)和乙型流感病毒的抗体呈阴性的Fitch雪貂(蒙眼貂(Mustela putorius furo),雌性,6至12个月龄)脱臭并从Triple F农场(Sayre,PA)购买。将雪貂配对饲养在不锈钢笼(Shor-line,Kansas City,KS)中,其中装有Sani-Chips实验动物垫料(P.J.Murphy Forest Products,Montville,NJ)。为雪貂提供Teklad全球雪貂饮食(Harlan Teklad,Madison,WI)和随意的淡水。对于预免疫疫苗组,雪貂在疫苗接种前60天感染CA/09、Pan/99和B/HK/01病毒毒株(各10^6PFU)。(图1)用重组流感血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)免疫原性多肽抗原(Y4、Z1、NG3、IAN8、Q6、BC2、N1I(也称为NA-A)和N2A)的八价制剂对雪貂进行鼻内免疫接种(第0和28天),例如本文所述的非天然存在的、广泛反应性的流感免疫原性多肽(例如,Y4(SEQ ID NO:17);NG3(SEQ ID NO:13),以及WO 2020/014673 A1(例如,Z1;IAN8);WO 2021/142256 A2(例如,Q6(H7 HA)和神经氨酸酶抗原诸如N1、N2、N1I(NA-A和NA-D));WO 2020/014656 A1,Y.Huang等人,2021,Vaccines,9:793.doi.org/10.3390/vaccines9070793,或J.D.Allen和T.M.Ross,2022,J.Virology,第96卷,第7期:doi.org/10.1128/jvi.01652-21中的免疫原性多肽,所有参考文献的内容均

通过引用整体并入本文)。疫苗免疫原含有15μg每种抗原,用50μg环-di-AMP作为佐剂(InvivoGen,San Diego,CA)配制该抗原。在初次疫苗接种后28天对雪貂进行加强免疫。在疫苗接种前以及初次疫苗接种后第28天和56天经由前腔静脉从所有麻醉的雪貂中收获血液。将从动物收集的血清转移至离心管中并以2500rpm离心。取出澄清血清并冷冻于-20±5℃。对照(模拟)雪貂用安慰剂进行免疫,安慰剂包括用50μgc-di-AMP配制的磷酸盐缓冲盐水(PBS),pH 7.4。所有疫苗免疫原和安慰剂均保存在温度在2℃与8℃之间的冰箱中直至使用。

[0244] 在疫苗接种后第56天,用1ml体积中的10^8PFU的Bris/18(H1N1)、10^7PFU的B/WA/19(IBV)或10^5PFU的Vn/04(H5N1)病毒鼻内攻击雪貂(每次攻击每个疫苗组n=5)。感染后14天,每天监测雪貂的体重减轻、疾病体征和死亡。病毒攻击后每天记录每组的个体体重和死亡。实验终点定义为体重减轻>20%。在感染后第1、3、5和7天,通过将3ml PBS滴注入麻醉雪貂的鼻孔来进行鼻洗。(图1)。收集洗液并储存在-80℃直至使用。佐治亚大学机构动物护理和使用委员会批准了动物使用协议(编号A2020 11-016)下的所有实验,这些实验是按照国家研究委员会实验动物护理和使用指南、动物福利法以及CDC/NIH的微生物和生物医学实验室生物安全指南进行的。图2A-图2D呈现了示出在研究的第56天对从雪貂获得的血清进行的ELISA分析的结果的图。结果证明,用本文所述的八价HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)进行免疫引发了免疫应答并产生了与HA免疫原性多肽/疫苗的所有组分结合的抗体(图2A和图2C)。来自预免疫模拟动物的抗体与H1、N1和N2 HA抗原结合(图2B)。来自未经处理模拟动物的抗体未显示与HA抗原的结合(图2D)。图3A和图3B呈现了ELISA分析结果的图,使用从用HA免疫原性多肽抗原免疫的预免疫雪貂或从预免疫、模拟免疫的雪貂获得的血清进行该ELISA分析以比较研究的第0天和第56天在雪貂的预免疫组中进行疫苗接种之前和之后的总IgG抗体应答。在免疫/疫苗接种之前(d0)和最终免疫/疫苗接种之后(d56)收集用HA多肽免疫原(Cobra)免疫的单独预免疫雪貂的血清(图3A)以及给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂的血清(图3B)。结果证明,用本文所述的HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂具有增加的针对免疫原性多肽抗原/疫苗的所有HA组分的抗体,其中针对Z1、NG3、IAN8、Q6和BC2免疫原生成的抗体有统计学上显著的增加。

[0245] 图4A和图4B示出了疫苗接种之前和之后从用HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂、用HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)免疫的未经处理雪貂和从预免疫的模拟免疫雪貂获得的血清中针对H1N1病毒的血清HAI抗体滴度。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。在疫苗接种前(H1NI,第0天;图4A)和第二次疫苗接种后4周(H1N1,第56天;图4B)收集血清以用于针对6种H1N1流感病毒的组进行HAI测定。结果显示,预免疫模拟组的Mich/15和Bris/18病毒毒株具有在统计上显著降低的HAI滴度;用HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)免疫的预免疫组保持高HAI滴度;并且具有HA免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)的未经处理组针对大流行样毒株的HAI滴度达到1:40,Guangdong/19除外。

[0246] 图5A和图5B示出了在疫苗接种之前和之后从研究雪貂获得的血清中针对H3N2病毒的血清HAI抗体滴度。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组包括给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的预免疫雪貂(黑色条);给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的未经处理雪貂(白色条);或给予模拟疫苗接种的预

免疫雪貂(灰色条)。在疫苗接种前(图5A)和第二次疫苗接种后4周(图5B)收集血清以用于针对6种H3N2流感病毒的组的HAI测定。结果显示,接受八价重组流感免疫原性多肽作为免疫原的预免疫雪貂具有统计学上显著增加的HAI滴度,KS/17和HK/19除外,并且接受八价重组流感免疫原性多肽作为免疫原的未经处理雪貂具有增加但统计学上不显著的滴度。

[0247] 图6A和图6B展示了研究雪貂在疫苗接种之前和之后针对乙型流感(IBV)病毒的血清HAI抗体滴度。疫苗组为:给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的预免疫雪貂;给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的未经处理雪貂;或给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂。在疫苗接种前和第二次疫苗接种后4周收集血清以用于针对6种IBV流感病毒的组的HAI测定。结果显示,给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的预免疫组中的雪貂具有增加的HAI滴度,针对B/Bris/08和B/CO/17的HAI滴度增加是统计学上显著的,并且给予八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)的未经处理雪貂和预免疫模拟免疫的雪貂没有统计学上显著的变化。

[0248] 图7A和图7B展示了研究雪貂在免疫/疫苗接种之前和之后针对H5病毒的血清HAI抗体滴度。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为:用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂;用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的未经处理雪貂;或给予模拟疫苗接种的预免疫雪貂。在免疫/疫苗接种前和第二次免疫/疫苗接种后4周收集血清以用于针对6种H5流感病毒的组的HAI测定。A/Vietnam/1203/2004(H5N1,Vn/04)、A/whooper swan/Mongolia/244/2005(H5N1,ws/Mo/05)A/Egypt/321/2007(H5N1,Eg/07)、A/Hubei/01/2010(H5N1,Hu/10)、A/Guizhou/01/2013(H5N1,Gu/13)。A/Sichuan/26221/2014(H5N6,Si/14)。结果显示,没有一个组具有针对H5N1病毒的HAI滴度。

[0249] 图8A和图8B呈现了研究中雪貂在用流感H5N1病毒攻击后的体重和存活曲线。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂(黑色线);用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的未经处理雪貂(带圆圈的黑色线);或给予模拟免疫/疫苗接种的预免疫雪貂(灰色线)。最后一次免疫/疫苗接种后四周,使雪貂鼻内感染1mL体积的致死剂量的A/Vietnam/1203/2004(10^5PFU)。观察动物的临床体征并在感染后每天记录它们的体重(图8A)。感染后的存活曲线数据表明所有动物都在致命病毒攻击中存活下来(图8B)。结果显示,雪貂的免疫/疫苗接种保护动物免受致命的H5N1病毒攻击(10^5PFU)。H1预免疫还赋予针对H5N1的保护。

[0250] 图9A和图9B示出了雪貂在用流感病毒攻击后的体重曲线。以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。疫苗组为:用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫雪貂;用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的未经处理雪貂;给予模拟免疫/疫苗接种的预免疫雪貂;或给予模拟免疫/疫苗接种的未经处理雪貂。最后一次疫苗接种后四周,使雪貂鼻内感染1mL体积的流感病毒A/Brisbane/02/2018(10^8PFU)(图9A)或流感病毒(b)B/Washington/02/2019(10^7PFU)(图9B)。观察动物的临床体征并在感染后每天记录它们的体重。体重减轻的统计差异显示在图10A和图10B的表中。

[0251] 图11A-图11C示出了感染流感病毒A/Brisbane/02/2018(H1N1)后雪貂上呼吸道中的病毒滴度的图,并且图12A-图12C示出了感染流感病毒B/Washington/02/2019(IBV)后雪

貂的鼻洗液滴度图。在进行这些分析之前,以c-di-AMP作为佐剂,以四周为间隔对雪貂进行鼻内免疫两次。免疫动物组包括用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫和未经处理雪貂以及模拟免疫的预免疫和未经处理雪貂。第二次疫苗接种后四周,用H1N1 A/Brisbane/02/2018病毒(图11A-图11C)或用IBV B/Washington/02/2019病毒(图12A-图12C)攻击动物组。在感染后第1天、第3天和第5天从动物采集鼻洗液并确定病毒滴度。结果证明,到感染后第5天,在从已用八价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的预免疫动物和未经处理动物以及已模拟免疫的预免疫动物获得的鼻液中未检测到病毒。

[0252] 总之,雪貂研究的结果证明本文所述的多价重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)引发针对多种流感病毒亚型的广泛保护性免疫应答。此外,观察到预免疫改善了动物对病毒攻击的免疫应答,改善了用重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)免疫的动物的免疫应答,并且改善了由多种亚型病毒引起的疾病。

[0253] 小鼠研究

[0254] 使用广泛反应性的重组HA多肽免疫原对小鼠进行病毒感染和免疫(疫苗接种)

[0255] BALB/c和DBA/2J小鼠(雌性,6-8周龄)购自The Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME,USA)。将小鼠饲养在微型隔离装置中,并被允许自由获取食物和水。所有动物均根据USDA实验动物指南进行护理,并且所有程序均经佐治亚大学机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准(编号A2018 06-018-Y3-A16)。

[0256] 将七十五(75)只未经流感处理的BALB/c小鼠随机分为15组(5只动物/组),并用3μg本文所述的广泛反应性重组HA(rHA)免疫原性多肽(Cobra抗原)(J1、J2、J3、J4、NG1、NG2或NG3 rHA)(例如,J1:SEQ ID NO:3、7、9);J2:SEQ ID NO:4);J3(SEQ ID NO:5);J4(SEQ ID NO:6、8);NG1(SEQ ID NO:11);NG2(SEQ IDNO:2、12);NG3(SEQ ID NO:13)),以及3μg来自以下历史H3N2疫苗毒株的WT rHA(野生型重组HA抗原)进行肌内疫苗接种:A/Switzerland/9715293/2013(Switz/13)(EPI_ISL_162149,MDCK-SP2)、A/Hong Kong/4801/2014(HK/14)(EPI_ISL_259080,MDCK-SP3)、A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(Sing/16)(EPI_ISL_285898,MDCK-SP3)、A/Kansas/14/2017(Kan/17)(EPI_ISL_403059,MDCK-SP2)、A/Switzerland/8020/2017(Switz/2017)(EPI_ISL_303951,MDCK-SP1)、A/South Australia/34/2019(SA/19)(EPI_ISL_395032,MDCK-SP2);或施用单独的25μL磷酸盐缓冲盐水(PBS,Corning,Tewksbury,MA,USA)作为模拟疫苗接种对照。

[0257] 所有免疫原/疫苗(广泛反应性流感免疫原性多肽抗原(Cobra抗原)、野生型(WT)rHA抗原和模拟)均采用基于乳化角鲨烯的水包油乳液佐剂ADDAVAX™(InvivoGen,San Diego,CA,USA)配制,并且与rHA 1:1混合后的终浓度为2.5%角鲨烯。在第0、28和56天以同源初免-加强-加强方案将免疫原/疫苗施用到动物的后腿中。每次疫苗接种后14天,即第14天、第42天和第70天,从面部静脉收集血液。通过以2,500rpm离心10分钟从动物血液中分离血清。取出澄清血清并冷冻于-20±5℃。

[0258] 图13A-图13N示出了在用重组流感血凝素(rHA)免疫原性多肽抗原初次疫苗接种后第70天对来自75只未经流感处理的BALB/c小鼠的血清进行的血凝抑制(HAI)测定的结果的图。结果证明,模拟疫苗接种的小鼠没有针对组中H3N2病毒中的任一种的任何可检测滴度(图13A)。用广泛反应性重组流感免疫原性多肽抗原(Cobra抗原(rHA))J1(例如,SEQ ID NO:3、7)进行疫苗接种的小鼠具有针对2012年至2016年分离的H3N2流感病毒和Switz/17和

SA/19毒株的具有HAI活性的抗体,但这些抗体未能识别Kan/17、Tx/17和HK/19病毒(图13B)。J2疫苗接种的小鼠具有针对Tx/12、HK/14、Sing/16和Switz/17的具有HAI活性的抗体(图13C)。用J3 rHA进行疫苗接种的小鼠具有针对2012年至2016年分离的所有H3N2流感病毒毒株以及Switz/17和SA/19的具有HAI活性的抗体,其最高抗体滴度针对Tx/12分离株(图13D)。J4 rHA在疫苗接种的小鼠中诱导针对Tx/12、HK/14、Sing/16、Switz/17和SA/19的具有HAI活性的抗体,其最高抗体滴度是针对HK/14和Sing/16毒株检测到的(图13E)。用NG1 rHA疫苗接种的小鼠血清转化为2012年至2019年分离的所有H3N2毒株,Kan/17和HK/19除外(图13F)。用NG2 rHA进行疫苗接种的小鼠具有针对组中所有H3N2毒株的血清保护性抗体滴度,其最高抗体滴度针对SA/19病毒(图13G)。NG3 rHA疫苗诱导血清转化为Tx/12、Switz/13、Switz/17和SA/19(图13H)。用Switz/13进行疫苗接种的动物仅血清转化为同源匹配的病毒Switz/13,并且不转化为H3N2组中的任何其他病毒(图13I)。HK/14rHA疫苗诱导针对2012年至2016年所有病毒的具有HAI活性的抗体,其最大幅度抗体滴度针对同源匹配的HK/14病毒。HK/14rHA疫苗没有诱导针对2017年至2019年期间分离的毒株中的任一种的具有HAI活性的抗体(图13J)。用Sing/16rHA进行疫苗接种的小鼠具有针对2012年至2019年分离的所有毒株(Kan/17和HK/19病毒除外)的具有HAI活性的抗体。这些小鼠的最大幅度的抗体应答针对同源匹配的Sing/16病毒(图13K)。Kan/17rHA疫苗诱导针对2012年至2017年所有H3N2分离株(Sing/16病毒除外)的具有HAI活性的抗体。这些小鼠也没有血清转化为2019分离株SA/19或HK/19中的任一种,并且来自该组的最大幅度的抗体应答针对同源匹配的Kan/17病毒(图13L)。用Switz/17rHA进行疫苗接种的小鼠具有针Tx/12、Tx/17、Switz/17和SA/19的具有HAI活性的抗体;其中最大幅度的抗体应答针对同源匹配的Switz/17病毒(图13M)。SA/19rHA疫苗诱导针对Tx/12、HK/14、Tx/17、Switz/17和SA/19病毒的具有HAI活性的抗体。该组的最高滴度的HAI抗体针对同源匹配的SA/19病毒(图13N)。

[0259] 图14示出了在第89天(A/Kansas/14/2017攻击后3天)从小鼠(n=3/组)收集的小鼠肺的病毒滴度,以评估肺组织中存在的病毒载量。未经流感处理的模拟疫苗接种的动物肺中存在最多的病毒。这显著高于用本文所述的单价J4 HA免疫原性多肽抗原或NG2 rHA以及Y2+J4或Y2+NG2 rHA的二价制剂进行疫苗接种的预免疫动物,其中在感染后第3天在肺组织中不存在可检测到的超出检测限(约1x 10^2PFU/g肺组织)的病毒。相比之下,用单价H1 rHA、Y2、Bris/07或Cal/09进行疫苗接种的小鼠的肺滴度与接受模拟疫苗接种(约1x 10^5PFU/g肺组织)的预免疫动物的那些相似。

[0260] 将一百三十八(138)只未经流感处理的DBA/2J小鼠随机分为17组(8只动物/组)以用于预免疫小鼠实验。在第0天,通过施用含有等浓度的H1N1病毒(A/Singapore/6/1986(Sing/86))和H3N2病毒(A/Panama/2007/1999(Pan/99))的混合物,PBS中的终浓度为5x10^5 PFU/50μL,通过向每只小鼠鼻内施用50μL,使16个小鼠组针对H1N1和H3N2流感病毒均为预免疫的。向模拟预免疫动物鼻内接种50μLPBS。预免疫感染后,每天早晚两次监测动物体重减轻和临床体征(呼吸困难、嗜睡、驼背、皮毛皱起、对刺激无反应和严重呼吸窘迫),持续感染后14天。在此期间,没有一只小鼠减轻超过其原始体重的5%,并且没有表现出临床体征。然后允许动物休息30天,此时用总共3μg的以下广泛反应性重组HA免疫原(Cobra)的任一单价制剂:Y2(H1)(例如,SEQ ID NO:15);J4(H3)(例如,SEQ ID NO:6、8)或NG2(H3)(例如,SEQ ID NO:2、12);以下WT rHA的单价制剂:A/Brisbane/59/2007(Bris/07)(H1)、A/

California/07/2009(Cal/09)(H1)、A/Switzerland/9715293/2013(Switz/13)(H3)、A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(Sing/16)(H3);或总共3μg(1.5μg H1+1.5μg H3)的以下Cobra rHA多肽免疫原混合物:Y2、Y2+J4(H1+H3)或Y2+NG2(H1+H3);或总共3μg(1.5μg H1+1.5μg H3)的以下WT rHA混合物:Bris/07+Switz/13(H1+H3)、Bris/07+Sing/16(H1+H3)、Cal/09+Switz/13(H1+H3)、Cal/09+Sing/16(H1+H3);或单独的含有25μL磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Corning,Tewksbury,MA,USA)的模拟疫苗对它们进行疫苗接种。所有疫苗(广泛反应性、重组、多肽免疫原(Cobra抗原)、WT和模拟)均采用ADDAVAX™佐剂配制,并且与rHA 1:1混合后的终浓度为2.5%角鲨烯。在第30天和第58天,以同源初免-加强方案将疫苗肌内施用到动物的后腿中。预免疫感染以及每次疫苗接种后14天,即第14天、第44天和第72天,从面部静脉收集血液。通过以2,500rpm离心10分钟从动物血液中分离血清。取出澄清血清并冷冻于-20±5℃。然后在第86天,用50μL浓度为$6.7x10^6$ PFU/50μL的活H3N2流感病毒A/Kansas/14/2107(EP4)鼻内攻击所有DBA/2J小鼠。感染后,每天早晚两次监测动物体重减轻和临床体征(呼吸困难、嗜睡、驼背、皮毛皱起、对刺激无反应和严重呼吸窘迫),持续感染后14天。在第89天,每组处死3只动物,并收集肺以评估病毒载量。将肺冷冻在干冰上,并储存在-80±5℃下,直到进行病毒斑点测定。

[0261] 图15A-图15F示出了第72天来自预免疫小鼠的血清的空斑减少测定(FRA)滴度,以评估针对H3N2病毒组的抗体的存在。在初次感染后第72天,针对每组合并从136只H1+H3预免疫DBA/2J小鼠(n=8/组)收集的血清,这些小鼠用H1+H3重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)或WT rHA的单价和二价制剂进行疫苗接种,并且如下所述针对2016年至2019年历史H3N2疫苗毒株的组评估血清的FRA中和。针对以下H1N1病毒测试来自用单价抗原进行疫苗接种的小鼠的血清:A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(图15A)、A/Kansas/14/2017(图15B)和A/Hong Kong/2671/2019(图15C)。针对以下H1N1病毒测试来自用二价H1+H3抗原混合物进行疫苗接种的小鼠的血清:A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(图15D)、A/Kansas/14/2017(图15E)和A/Hong Kong/2671/2019(图15F)。结果显示,施用于预免疫动物的广泛反应性流感免疫原性多肽增强了针对最近传播的H3N2病毒(例如,Sing/16病毒)的中和抗体应答。

[0262] 用广泛反应性重组HA(rHA)免疫原性多肽J4或NG2的单价制剂进行免疫接种的预免疫小鼠拥有的抗体具有针对Sing/16病毒的高(80%)斑点减少/中和滴度($PRNT_{80}$滴度),其范围在10.92和11.76之间(图5A)。这些滴度与单价Sing/16rHA疫苗接种组生成的滴度相似,该组针对同源匹配的Sing/16病毒具有12.46的平均$PRNT_{80}$滴度(图15A)。用Switz/13rHA进行疫苗接种的小鼠的中和滴度比其他H3 rHA疫苗抗原的中和滴度低约6倍,但仍产生针对Sing/16病毒的7.47的平均$PRNT_{80}$滴度。接受单价H1 rHA疫苗Y2、Bris/07或Cal/09的小鼠具有中和约10%的Sing/16病毒感染的抗体,类似于接受模拟疫苗接种的预免疫小鼠的那些(图15A)。未经流感处理的模拟疫苗接种的小鼠不具有可以中和Sing/16的抗体。(参见例如,J.D.Allen等人,2022,J.Virology,第96卷,第7期:doi.org/10.1128/jvi.01652-21)。

[0263] 用单价J4或NG2 H3 rHA进行疫苗接种的小鼠生成针对Kan/17病毒的$PRNT_{50}$滴度范围在7.56与7.82之间的抗体(图15B)。用Switz/13rHA进行疫苗接种的小鼠具有最高水平的针对Kan/17的中和抗体,$PRNT_{50}$滴度为8.71(图15B)。Sing/16rHA疫苗接种的小鼠的平均$PRNT_{50}$滴度为6.34,比用H3 rHA免疫原性多肽抗原疫苗接种的小鼠的这种滴度低约2倍,并

且比Switz/13rHA疫苗接种的动物的这种滴度低约4倍(图15B)。接受H1 rHA或模拟疫苗的动物具有中和约10％的Kan/17感染的抗体,并且模拟疫苗接种的未经流感处理的动物不能中和Kan/17病毒(图15B)。用J4或NG2 rHA进行疫苗接种的预免疫小鼠针对HK/19病毒的$PRNT_{50}$滴度范围在9.64与9.89之间,这是针对这种H3N2毒株的最高中和抗体应答(图15C)。用Sing/16进行疫苗接种的小鼠针对HK/19病毒具有相似的范围在7.55与7.8之间的$PRNT_{50}$滴度,但它们的滴度比J4和NG2生成的中和抗体滴度低约4倍(图15C)。用Switz/13rHA进行疫苗接种的小鼠具有稍低的7.12的平均$PRNT_{50}$滴度,低于H3 rHA疫苗接种动物的任何其他组的这种滴度(图15C)。接受H1 rHA或模拟免疫原/疫苗的组生成中和约15％的HK/19感染的抗体(图15C)。模拟疫苗接种的未经流感处理的动物在任何血清稀释度下均不能中和HK/19病毒(图15C)。

[0264] 用含有H3免疫原性多肽抗原中的任一种的二价H1+H3,rHA制剂(Y2+J4和Y2+NG2)进行疫苗接种的预免疫小鼠具有针对Sing/16病毒具有类似中和能力的抗体,平均$PRNT_{50}$滴度范围在12.34和12.48之间(图15D)。这些中和抗体滴度与同源匹配的rHA免疫原/疫苗Sing/16所引发的滴度相似,但略低,其中两种二价制剂Bris/07+Sing/16和Cal/09+Sing16分别产生12.75和12.99的$PRNT_{50}$滴度(图15D)。这与用含有Switz/13rHA、Bris/07+Switz/13和Cal/09+Switz/13的二价组合进行疫苗接种的小鼠相对,针对Sing/16病毒的$PRNT_{50}$滴度低约10倍,分别为7.49和7.74(图15D)。然而,用含有Switz/13rHA、Bris/07+Switz/13和Cal/09+Switz/13的二价疫苗进行疫苗接种的小鼠生成针对Kan/17病毒的最高中和抗体滴度,平均$PRNT_{50}$滴度范围在7.93与8.0之间(图15E)。用含有Sing/16H3 rHA、Bris/07+Sing/16和Cal/09+Sing16的二价蛋白制剂进行疫苗接种的小鼠具有针对Kan/17病毒的任何二价疫苗接种的最低平均中和抗体滴度,$PRNT_{50}$滴度范围在5.21与5.45之间(图15E)。用含有H3免疫原性多肽抗原(Y2+J4和Y2+NG2)的rHA制剂进行疫苗接种的动物具有针对Kan/17病毒的平均$PRNT_{50}$滴度在6.92与7.51之间的抗体(图15E)。用Y2+J4或Y2+NG2进行疫苗接种的小鼠生成针对HK/19病毒的最高中和抗体应答,$PRNT_{50}$滴度分别为8.41和8.52(图15F)。用含有Sing/16rHA、Bris/07 1Sing/16和Cal/09+Sing16的免疫原/疫苗进行疫苗接种的预免疫动物产生针对HK/19病毒的类似中和抗体应答,但这些滴度比由Y2+J4或Y2+NG2生成的滴度低约4倍(图15F)。用Switz/13rHA(Bris/07+Switz/13和Cal/09+Switz/13)进行疫苗接种的小鼠具有针对HK/19病毒的最低中和抗体滴度,相同的$PRNT_{50}$滴度为5.64(图15F)。

[0265] 图16A-图16F示出了在第72天使用来自预免疫DBA/2J小鼠的血清实施的针对H1N1流感病毒组的空斑减少测定(FRA)的结果。小鼠(n＝8/组)已用H1+H3重组流感免疫原性多肽(Cobra抗原)或WT rHA的单价和二价制剂进行免疫接种。如下所述,针对2009年至2019年历史H1N1疫苗毒株的组,评估每组的合并血清的FRA中和。针对以下H1N1病毒测试来自用单价抗原进行疫苗接种的小鼠的血清:A/California/07/2009(图16A)、A/Brisbane/2/2018(图16B)和A/Guangdong Maonan/SWL1536/2019(图16C)。针对以下H1N1病毒测试来自用二价H1+H3抗原混合物进行疫苗接种的小鼠的血清:A/California/07/2009(图16D)、A/Brisbane/2/2018(图16E)和A/Guangdong Maonan/SWL1536/2019(图16F)。

[0266] 对于图16A-图16F中显示的研究结果,流感病毒空斑减少测定(FRA)用于确定广泛反应性的免疫原性多肽免疫原引发的抗体中和针对2009年至2019年的3种历史甲型流感(H1N1)疫苗毒株分离株的组的活病毒感染的能力。该测定中使用的血清是在预免疫后72天

从136只小鼠(n＝8/组)中收集的,并针对每组进行合并。用广泛反应性的免疫原性多肽免疫原Y2 rHA(例如,SEQ ID NO:15)的单价制剂进行疫苗接种的预免疫小鼠拥有中和Cal/09病毒感染的抗体,其中在每个稀释度下的平均滴度大于log_2 80％中和(80％斑点减少/中和滴度[$PRNT_{80}$])标记(图16A)。类似地,用Cal/09rHA抗原进行疫苗接种的小鼠在测试的每个稀释度下也生成大于$PRNT_{80}$的滴度的能够中和Cal/09病毒感染的抗体((图16A)。所有其他单价rHA疫苗接种的小鼠都不生成针对Cal/09病毒抗原的中和抗体,其滴度与模拟疫苗接种的预免疫动物相似((图16A)。从接受模拟免疫/疫苗接种的未经流感处理的小鼠收集的血清在任何稀释度下都不含有能够中和Cal/09病毒抗原的抗体(图16A)。用Y2 rHA进行疫苗接种的预免疫小鼠在每个稀释度下也生成.$PRNT_{80}$滴度的中和Bris/18病毒感染的血清抗体(图16B)。从用Cal/09rHA抗原进行疫苗接种的小鼠收集的血清在每个稀释度下还含有.$PRNT_{80}$滴度的中和Bris/18病毒感染的抗体(图16B)。所有其他单价rHA免疫原/疫苗组生成的抗体在最低血清稀释度下防止少于约20％的细胞被Bris/18感染,类似于模拟疫苗接种的预免疫动物((图16B)。从接受模拟免疫/疫苗接种的未经流感处理的小鼠收集的血清在任何血清稀释度下都不含有能够中和Bris/18病毒的抗体((图16B)。用Y2 rHA抗原进行疫苗接种的预免疫小鼠具有针对Guang/19病毒的单价组中的任一个的最高中和滴度,平均log_2 50％斑点减少/中和滴度($PRNT_{50}$)滴度为10.14(图16C)。用Cal/09rHA进行疫苗接种的小鼠的血清抗体中和Guang/19,平均$PRNT_{50}$滴度为7.75;该滴度比Y2 rHA抗原疫苗接种的动物中引发的滴度低约6倍(图16C)。用单价rHA抗原疫苗进行疫苗接种的所有其他组的小鼠生成的血清抗体防止约10％的细胞被Guang/19病毒感染,类似于模拟疫苗接种的预免疫动物(图16C)。来自接受模拟免疫/疫苗接种的未经流感处理的小鼠的血清不能中和Guang/19病毒(图16C)。

[0267] 用含有Y2 HA免疫原性多肽的二价rHA制剂(即Y2+J4和Y2+NG2)进行疫苗接种的小鼠均具有针对Cal/09病毒具有相似中和能力的血清抗体,平均$PRNT_{80}$滴度分别为11.08、11.35和11.61(图16D)。类似地,用含有Cal/09rHA的混合物(Cal/091Switz/13和Cal/091Sing/16)进行疫苗接种的预免疫小鼠针对同源匹配的Cal/09病毒具有在11.96与12.32之间的高$PRNT_{80}$滴度(图16D)。用含有Bris/07H1 rHA的混合物(Bris/07 1Switz/13和Bris/071Sing/16)进行疫苗接种的小鼠在最低血清稀释度下防止约25％的细胞被Cal/09病毒感染,类似于模拟疫苗接种的预免疫动物(图16D)。用含有Cal/09rHA的混合物(Cal/091Switz/13和Cal/09 1Sing/16)进行疫苗接种的小鼠也产生了针对Bris/18病毒的高$PRNT_{80}$血清滴度,范围在11.35与11.73之间,该值略低于针对Cal/09病毒生成的值(图16E)。用含有Y2 rHA抗原的混合物(诸如Y2+J4和Y2+NG2)进行疫苗接种的小鼠均生成针对Bris/18病毒具有相似中和能力的抗体,其$PRNT_{80}$滴度范围在11.75与12.13之间,略高于由Cal/09疫苗混合物产生的滴度(图16E)。用含有Bris/07rHA的混合物进行疫苗接种的动物在最低血清稀释度下防止约20％的细胞被Birs/18病毒感染,类似于模拟疫苗接种的预免疫动物(图16E)。用含有Cal/09rHA抗原的二价制剂(Cal/09 1Switz/13和Cal/091Sing/16)进行疫苗接种的小鼠针对Guang/19病毒分别产生6.59至6.78的$PRNT_{50}$滴度(图16F)。相比之下,用含有COBRA Y2 H1 rHA抗原的混合物(诸如Y2+J4和Y2+NG2)进行疫苗接种的预免疫动物都生成了针对Guang/19病毒具有相似中和能力的抗体,$PRNT_{50}$滴度比在Cal/09rHA疫苗接种的动物中引发的滴度高约4倍,log_2 PRNT50滴度分别在8.34与8.44之间(图16F)。用含有Bris/

07rHA的混合物进行疫苗接种的小鼠在最低血清稀释度下防止约10％的细胞被Guang/19病毒感染,类似于模拟疫苗接种的预免疫动物(图16E)。还比较了每组的平均HAI和$PRNT_{50}$滴度。一般来说,HAI log_2几何平均滴度(GMT)为约5.5或更高,与log_2 $PRNT_{50}$滴度为约8.34或更高相关,表明与人类50％保护相关的HAI滴度(5.32)可以作为在FRA中观察到针对甲型流感(H1N1)病毒的中和作用的预测量度。结果证明,COBRA疫苗增强了针对现代大流行样H1N1病毒的中和抗体应答。

[0268] 实例2中使用的材料、试剂和方法

[0269] 病毒和HA抗原

[0270] 甲型流感(H3N2)病毒通过流感试剂资源(IRR)、BEI资源、疾病控制中心(CDC)提供或由Virapur(San Diego,CA,USA)提供。病毒在与收到它们时相同的生长条件下传代一次,即按照WHO提供的说明,在含胚鸡蛋或半汇合的Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞培养物中传代。H3N2病毒批次在20nM奥司他韦存在下用0.75％豚鼠红细胞进行滴定,并制成等分试样以供一次性应用。H1N1病毒批次用0.8％火鸡红细胞进行滴定,并制成等分试样以供一次性应用。

[0271] 用于HAI分析的A(H3N2)2012-2019历史流感疫苗毒株病毒组包括以下八(8)种病毒毒株:A/Texas/50/2012(Tx/12)卵第4代(EP4)(进化枝3c2)、A/Switzerland/9715293/2013(Switz/13)EP4(进化枝3c3.a)、A/Hong Kong/4801/2014(HK/14)EP11(进化枝3c2.a)和A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016(Sing/16)EP3(进化枝3c2.a1)、A/Kansas/14/2017(Kan/17)EP1(进化枝3c3.a)、A/Texas/71/2017(Tx/17)MDCK-siat细胞第1代(MDCK-SP1)(进化枝3c3.a)、A/Switzerland/8060/2017(Switz/17)EP1(进化枝3c3.a2)、A/South Australia/34/2019(SA/19)EP1(进化枝3c2.a1b/131K)、A/Hong Kong/2671/2019(HK/19)EP1(进化枝3c2.a1b/137F)。

[0272] 用于HAI分析的A(H1N1)2007-2019历史流感疫苗毒株组包括以下五(5)种甲型流感病毒(IAV)毒株:A/Brisbane/59/2007(Bris/07)EP1、A/California/07/2009(Cal/09)EP4、A/Michigan/45/2015(Mich/15)EP1、A/Brisbane/02/2018(Bris/18)EP1和A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019(Guang/19)EP1。对于雪貂中的H1N1 HAI分析,还使用了A/Solomon Islands/03/2006(Genbank登录号EU100724)。

[0273] 用于HAI分析的IBV 2006-2019组包括以下六(6)种病毒毒株:Yamagata样谱系的B/Florida/04/2006(Genbank登录号KF009552)、B/Massachusetts/02/2012(Genbank登录号C892118)、B/Phuket/3073/2013(NCBI登录号EPI1799823);Victoria样谱系的B/Brisbane/60/2008(Genbank登录号FJ766840)、B/Colordado/06/2017(Genbank登录号CY232066)和B/Washington/02/2019(Genbank登录号MK676295)。

[0274] 用于HAI分析的H5 2004-2014组包括以下六(6)种病毒毒株:A/Vietnam/1203/2004(H5N1,Genbank登录号AAW80717.1)、A/whooper swan/Mongolia/244/2005(H5N1,Genbank登录号ACD68156.1)、A/Egypt/321/2007(H5N1,Genbank登录号AEL31632.1)、A/Hubei/01/2010(H5N1,Genbank登录号AEO89181.1)、A/Guizhou/01/2013(H5N1,Genbank登录号EPI420386)。A/Sichuan/26221/2014(H5N6,Genbank登录号EPI533583)。

[0275] 使用一种历史H1N1疫苗毒株病毒A/Singapore/6/1986(Sing/86)EP1和一种历史H3N2疫苗毒株病毒A/Panama/2007/1999(Pan/99)EP4使小鼠对H1N1和H3N2病毒预免疫。在

预免疫研究的第86天,还用H3N2流感病毒A/Kansas/14/2017(Kan/17)EP1攻击预免疫小鼠。

[0276] 对于雪貂,使用CA/09、Pan/99和B/Hong Kong/330/2001病毒毒株(Genbank登录号AF532549)建立针对所有3种季节性病毒亚型的预免疫。用Bris/18(H1N1)、B/WA/19(IBV)或A/Vietnam/1203/2004(Vn/04)攻击雪貂。

[0277] 血凝抑制(HAI)测定

[0278] 血凝抑制(HAI)测定用于评估功能性抗血凝素(HA)抗体(例如,在从采血动物获得的血清中)的存在,这些抗体能够抑制豚鼠红细胞针对H3N2病毒的凝集,以及火鸡红细胞针对H1N1病毒的凝集。该方案改编自WHO实验室流感监测手册。(参见,J.D.Allen等人,2022,J.Virology,第96卷,第7期:doi.org/10.1128/jvi.01652-21)。豚鼠红细胞经常用于表征当代A(H3N2)流感毒株,这些毒株已发展为优先结合α(2,6)连接的唾液酸受体。为了灭活非特异性抑制剂,在测试前用受体破坏酶(RDE)(Denka Seiken,Co.,Japan)处理血清样品。简而言之,将三份RDE添加到一份血清中,并将样品在37℃下孵育过夜。RDE通过在56℃下孵育30分钟来灭活。

[0279] 在V形底微量滴定板中以一系列两倍系列稀释来稀释RDE处理的血清。将等体积的每种A(H3N2)病毒在20nM奥司他韦羧酸盐存在下调整至约8个血凝单位(HAU)/50μl,添加到每个孔中。将板覆盖并在室温下孵育30分钟,并且然后添加PBS中的0.75%豚鼠红细胞(Lampire Biologicals,Pipersville,PA,USA)。使用前,用PBS将红细胞(RBC)洗涤两次,保存在4℃下,并在制备的24小时(h)内使用。将板通过轻轻搅拌混合,覆盖,并使红细胞在室温下静置1小时。HAI滴度由含有非凝集RBC的最后一个孔的稀释度的倒数确定。每个板均包括阳性和阴性血清对照。

[0280] 在单独的测定中,在V形底微量滴定板中以一系列两倍系列稀释来稀释RDE处理的血清。将等体积的每种A(H1N1)病毒调整至约8个血凝单位(HAU)/50μl,添加到每个孔中。将板覆盖并在室温下孵育20分钟,并且然后添加PBS中的0.8%火鸡红细胞(Lampire Biologicals,Pipersville,PA,USA)。使用前,将RBC用PBS洗涤两次,保存在4℃下,并在制备的24小时内使用。将板通过轻轻搅拌混合,覆盖,并使红细胞在室温下静置30分钟。HAI滴度由含有非凝集RBC的最后一个孔的稀释度的倒数确定。每个板均包括阳性和阴性血清对照。

[0281] 所有小鼠在感染或疫苗接种之前对针对人类流感病毒的预先存在的抗体均呈阴性(HAI≤1:10),并且对于上文描述的动物研究,阳性HAI反应(HAI+)或“血清保护”定义为HAI滴度为≥1:40,而根据WHO和欧洲医药产品委员会的流感疫苗评估,“血清转化”是指滴度与基线相比增加4倍。

[0282] 空斑减少测定(FRA)

[0283] 动物研究中使用的空斑减少测定(FRA)最初由英国伦敦的WHO合作中心开发,并且然后由美国疾病控制和预防中心(CDC)修改。MDCK-SIAT1细胞(Sigma,St.Louis,MO,USA)在用于测定前一天以2.5-3x 10^5个细胞/ml(96孔板中100μL/孔)铺板。将细胞在96孔平底板中的含有5%热灭活胎牛血清和抗生素的杜氏改良伊戈尔培养基(DMEM)中培养过夜,以形成95-100%汇合的单层。第二天,用pH 7.2的0.01M磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Gibco,Waltham,MA,USA)冲洗细胞单层,然后添加在含有TPCK处理的胰蛋白酶(1μg/ml)(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)、VGM-T(即含有0.1%BSA、1%青霉素/链霉素(100U/mL青霉素、100μg/mL

链霉素溶液)和1μg/ml TPCK处理的胰蛋白酶的DMEM)(Sigma,St.Louis,MO,USA)的病毒生长培养基中以1:20稀释度开始的2倍系列稀释的RDE处理血清(每孔50μL)。将VGM-T中的50μLA(H3N2)流感病毒(1.2x 10^4空斑形成单位(FFU)/mL,相当于600FFU/50μl)添加到每个板的孔中。仅将VGM-T添加到含有对照孔的孔中。病毒储液通过之前在FRA中的滴定进行标准化。测定使用的A(H3N2)病毒是历史上WHO选定的疫苗毒株A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016EP3、A/Kansas/14/2017EP1和A/Hong Kong/2671/2019EP1。测定中使用的A(H1N1)病毒是历史上WHO选定的疫苗毒株A/California/07/2009EP4、A/Brisbane/2/2018EP1和A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019EP1。

[0284] 在37℃下在5% CO_2中的2小时孵育期后,然后用100μL等体积的在含有1μg/ml TPCK处理的胰蛋白酶、0.1% BSA和抗生素的2X改良伊戈尔培养基中的1.2% Avicel RC/CL(型号:RC581 NF;FMC Health and Nutrition,Philadelphia,PA,USA)覆盖每个孔中的细胞。将板在37℃、5% CO_2下孵育18-22小时。然后从每个孔中除去覆盖物,并用PBS洗涤单层一次以除去任何残留的Avicel。然后将板用在PBS中的冰冷的4%福尔马林在4℃下固定30分钟,然后进行PBS洗涤并使用PBS/甘氨酸中的0.5%Triton-X-100在室温(RT)下透化20分钟。用洗涤缓冲液(PBS、0.1% TWEEN-20;PBST)将板洗涤三次,并且然后与从流感试剂资源(IRR)(Manassas,VA,USA)获得的针对甲型流感核蛋白的单克隆抗体(FR-1217)(1mg/mL)一起孵育1小时,在ELISA缓冲液(PBS、10%马血清、0.1% TWEEN-80)中以1:2000稀释。洗涤(3X PBST)后,将细胞与山羊抗小鼠过氧化物酶标记的IgG(Sera Care,Inc.,Milford,MA,USA)(KPL 474-1802)(1mg/mL)一起孵育,在ELISA缓冲液中在RT下以1:2000稀释1小时。然后再次洗涤板(3X PBST),并使用含有0.03% H_2O_2的TrueBlue底物(Sera Care,Inc.,Milford,MA USA)在RT下孵育10分钟来可视化感染性病毒空斑。通过用dH_2O洗涤五次来终止反应。将板风干,并使用带有ImmunoCapture 6.4.87软件的CTL BioSpot分析仪(CTL,Shaker Heights,OH,USA)对空斑进行计数。FRA滴度报告为血清最高稀释度的倒数,对应于与病毒对照减去细胞对照相比的50%空斑减少。

[0285] 为了使板通过质量控制(QC),八联病毒对照孔(VC)的平均值以及八联细胞对照孔(CC)的平均值也都必须通过QC。病毒对照必须落入200和1600个空斑之间,并且细胞对照必须没有空斑。此外,在每个单独的测定中,阳性对照、A(H1N1)和A(H3N2)历史流感疫苗毒株病毒在一式三份的板中运行,并且至少三分之二的板必须通过VC和CC标准。先前通过感染同源匹配的A(H1N1)和A(H3N2)流感病毒(1x10^6FFU/mL)生成并在感染后14天收集的同源小鼠抗血清在板上必须具有相同的滴度。每个测定板(每个板一种病毒)含有小鼠参考抗血清组,以及人类流感疫苗血清对照,以评估整体测定一致性。测定中报告的受感染细胞的百分比通过对阳性对照(仅病毒和细胞)孔中的空斑计数进行平均,并将每个实验孔中的空斑数量除以阳性对照的平均值来计算。

[0286] 流感病毒斑点测定

[0287] 在进行斑点测定前一天,将MDCK细胞(Sigma,St.Louis,MO,USA)以1×10^6个细胞/孔的浓度接种到六孔板的每个孔中。测定当天,将冷冻肺组织在冰上解冻,并且称重并在1ml DMEM(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)中均质化。将匀浆以2,000rpm离心5分钟以除去组织碎片。收集上清液并在补充有1%青霉素-链霉素的DMEM(DMEM+P/S)(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)中进行系列10倍稀释。当每孔中的MDCK细胞达到90%汇合度时,

用DMEM+P/S洗涤板2次,并用100μL匀浆上清液的每种稀释液进行感染。然后每15分钟振荡板,持续1小时。孵育1小时后,除去上清液并用新鲜的DMEM+P/S洗涤细胞两次。第二次洗涤后,将50:50v/v混合的并补充有1μg/mL TPCK胰蛋白酶(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)的2xMEM和1.6%琼脂糖(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)的溶液添加到每个孔中。然后将板在37℃+5%CO_2下孵育72小时。72小时后,从每个孔中除去凝胶覆盖物,并将细胞用10%缓冲福尔马林固定10分钟,并用1%结晶紫(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)在RT下染色10分钟。然后用淡水彻底冲洗板5次以除去过量的结晶紫。使板风干24小时,并将病毒斑点计数为每个稀释度的倒数。计算肺病毒滴度并表示为斑点形成单位(PFU)/g肺组织。

[0288] 类似地,对于雪貂鼻洗斑点测定,将鼻洗液样品在测定当天解冻并在DMEM+P/S中系列稀释10倍。将100μL每种稀释液置于已用DMEM+P/S洗涤2次的90%汇合的MDCK细胞上。如上所述,每15分钟振荡板,持续1小时。将板洗涤并在37℃+5%CO_2下在琼脂糖覆盖物中孵育72小时。然后,除去覆盖物,并如上所述对细胞进行固定、染色和计数。计算病毒滴度并表示为PFU/mL鼻洗液样品。

[0289] 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0290] 使用ELISA来评估针对不同H1N1 HA毒株的抗体反应性,并如前所述进行。简而言之,在加湿室中在4℃下用含有1μg/mL不同rHA (A/California/07/2009,A/Brisbane/02/2018)或cH6/1纯化的rHA和5μg/ml牛血清白蛋白(BSA)的碳酸盐缓冲液(pH 9.4)溶液包被Immulon 4HBX板(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)过夜,每孔50μl。单独包被5μg/ml BSA(每孔50μl)作为阴性对照。将板用ELISA封闭缓冲液以200μl/孔的体积在37℃下封闭1小时。将血清样品从1:100稀释度开始在封闭缓冲液中系列稀释3倍,并且然后添加到HA蛋白包被的板中。在4℃下孵育过夜后,向每孔中添加100μl体积的1:2000稀释的羊抗小鼠IgG(Southern Biotech,Birmingham,AL,USA)二抗,并在37℃下孵育1小时。最后,向每孔中添加50μl ABTS底物(VWR Corporation),并将板进一步在37℃下孵育15-20分钟。通过向每孔中添加50μl 1% SDS终止比色转换。通过分光光度计(PowerWave XS,BioTek)在414nm处测量O.D.值(OD 414)。

[0291] 同样,使用ELISA来评估雪貂血清中针对流感HA或NA多肽抗原(Cobra抗原)的抗体反应性。将板在加湿室中于4℃下在含有1μg/mL不同的rHA和rNA的碳酸盐缓冲液中包被过夜,每孔50μl。将板用ELISA封闭缓冲液以200μl/孔的体积在37℃下封闭1小时。将血清样品从1:100稀释度开始在封闭缓冲液中系列稀释3倍,并且然后添加到蛋白包被板中。在4℃下孵育过夜后,将板在洗涤缓冲液(0.05%TWEEN-20,于PBS中)中洗涤5次。添加100μl在封闭缓冲液中以1:4000稀释的山羊抗雪貂IgG H&L HRP(Abcam,Boston,MA),并将板在37℃下孵育1小时。将板在洗涤缓冲液中洗涤5次。将50μl ABTS底物(VWR,Radnor,PA)添加到每个孔中,并将板在37℃下进一步孵育15-20分钟。通过向每个孔中添加50μl 1% SDS来终止比色转换。通过分光光度计(PowerWave XS,BioTek)在414nm处测量O.D.值(OD 414)。

[0292] 统计分析

[0293] 数据表示为绝对平均值±平均值的标准误差(SEM)。使用GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)采用单因素ANOVA和双因素ANOVA以及多重比较来分析组间的统计差异。“p”值小于0.05被定义为统计上显著的(*,P<0.05;**,P<0.01;***,P<0.001;****,P<0.0001)。

[0294] 实例3:使用重组流感病毒HA免疫原性肽(流感H1N1病毒)作为免疫原(疫苗)的小鼠研究

[0295] 使用重组流感病毒HA免疫原性多肽(流感H1N1病毒)作为免疫原(疫苗)在预免疫小鼠和未经处理小鼠体内进行类似于实例2中所述的那些的研究,以使用体内小鼠模型确定重组流感HA免疫原性多肽在引发针对季节性和大流行性流感病毒的广泛保护性免疫应答中的免疫原性和功效。如实例1和2中所述,广泛反应性、非天然存在的HA多肽免疫原(和重组HA多肽免疫原)构成源自流感H1类型(诸如H1N1)的流感病毒血凝素(HA)抗原氨基酸序列,例如含有代表季节性或大流行性流感病毒的那些的HA序列。

[0296] 本研究中使用的H1N1流感病毒包括:A/Chile/1/1983(GenBank登录号CY121261.1)、A/Singapore/6/1986(GenBank登录号CY020477.1)、A/Beijing/262/1995(GenBank登录号CY033614.1)、A/New Caledonia/20/1999(GenBank登录号EF566076.1)、A/California/07/2009(GISAID登录号EPI516535)、A/Brisbane/02/2018(GISAID登录号EPI1799929)和A/Guangdong-Maonan/SWL 1536/2019(GISAID登录号EPI1921671)。所有病毒均从Virapur(NY)或BEI资源获得。每种病毒都在含胚鸡蛋中扩增。

[0297] 动物免疫/疫苗接种和感染

[0298] BALB/c和DBA/2J小鼠(雌性,6至8周龄)购自Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME,USA),饲养在微型隔离装置中,并允许自由获取食物和水。动物按照USDA实验动物指南进行照顾。所有程序均经过佐治亚大学机构动物护理和使用委员会(IACUC)的审查和批准(编号A2018 06-018-Y3-A16)。八十八(88)只BALB/c小鼠随机分为8组,每组11只小鼠。给小鼠肌内疫苗接种1μg重组产生的、非天然存在的、广泛反应性的H1 HA多肽免疫原(Cobra);Brisbane/59/2007、California/07/2009、Brisbane/02/2018病毒样颗粒(VLP);或用ADDAVAX™(水包油乳液)(InvovoGen,San Diego,CA,USA)以1:1比例配制的PBS,最终体积为50μL。第一次疫苗接种后第4周和第8周,用等量的VLP或PBS对小鼠进行肌内加强。(Y.Huang等人,2021,Vaccines,9(7):793,其内容通过引用并入本文)。

[0299] 另一组40只DBA/2J小鼠分为5组(n=8/组),并使用相同的疫苗接种方案用1μg上述相应的可溶性重组HA蛋白进行疫苗接种。在第一次疫苗接种后第6周和第10周收集血液,并且分离血清并储存在-20℃下以供将来使用。在第12周,所有小鼠均鼻内感染50μL体积的5×10^4PFU的野生型H1N1 A/California/07/2009(CA/09)或8.75×10^6PFU的H1N1 A/Brisbane/02/2018(Bris/18)。每天监测动物并记录它们的体重,持续感染后14天。在感染后第3天和第6天,每组处死三只小鼠并收集肺。左肺用10%中性福尔马林充气以用于组织病理学,并且右肺叶在干冰上速冻,并且然后储存在-80℃下以用于评估病毒滴度。一旦小鼠达到人道终点(即其初始体重减轻20%或累积临床疾病评分为3),就将小鼠人道安乐死。所有程序均按照实验动物护理和使用指南、动物福利法以及微生物和生物医学实验室生物安全进行。

[0300] 使用ELISA来评估针对不同H1N1 HA毒株的抗体反应性,并按照G.A.中所述进行。Kirchenbaum G.A.等人(2017,J.Immunol.;199:3798-3807)。简而言之,在加湿室中在4℃下用含有1μg/mL不同rHA (A/California/07/2009,A/Brisbane/02/2018)和5μg/mL牛血清白蛋白(BSA)的碳酸盐缓冲液(pH 9.4)溶液包被Immulon 4HBX板(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)过夜,每孔50μL。单独包被5μg/mL量的BSA(每孔50μL)作为阴

性对照。将板用ELISA封闭缓冲液以200μL/孔的体积在37℃下封闭1小时。将血清样品从1:100稀释度开始在封闭缓冲液中系列稀释3倍,并且然后添加到HA蛋白包被的板中。在4℃下孵育过夜后,向每孔中添加100μL体积的山羊抗小鼠IgG(Southern Biotech,Birmingham,AL,USA)二抗(以1:2000稀释),并在37℃下孵育板1小时。最后,向每孔中添加50μL ABTS底物(VWR Corporation),并将板进一步在37℃下孵育15-20分钟。通过向每个孔中添加50μL 1％SDS来终止比色转换。使用分光光度计(PowerWave XS,BioTek)在414nm处测量O.D.值(OD 414)。

[0301] 进行斑点测定来分析样品。对于斑点测定,在进行斑点测定前一天,将20代以内的MDCK细胞以1×10^6个细胞/孔的浓度接种到六孔板的每个孔中。将冷冻肺组织在冰上解冻并在1mL DMEM中均质化。将匀浆以2000rpm离心5分钟以去除组织碎片,并且将上清液收集并在补充有1％青霉素-链霉素的DMEM中进行系列10倍稀释。用100μL匀浆上清液的每种稀释液感染每孔中具有90％汇合度的MDCK细胞。然后每15分钟振荡板1小时。孵育1小时后,除去上清液,并用新鲜DMEM洗涤细胞两次。最后,向每孔中添加2mL的2×MEM和0.8％琼脂糖覆盖物(Cambrex,East Rutherford,NJ,USA),并将板在37℃和5％ CO_2下孵育另外72小时。此后,从每个孔中除去覆盖物,并将细胞用10％缓冲福尔马林固定20分钟,并用1％结晶紫(Fisher Science Education,Waltham,MA,USA)在室温(RT)下染色15分钟。然后使用自来水彻底冲洗板以除去过量的结晶紫。计数斑点,并计算肺病毒滴度并表示为PFU/mL。

[0302] 使用血凝抑制(HAI)测定来评估与HA蛋白结合并能够抑制红细胞凝集的功能性抗体的存在。该方案改编自WHO实验室流感监测手册(WHO Global Influenza Surveillance Network.Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza.World Health Organization;Geneva,Switzerland:2011)。在本研究中,针对包括以下项的7种H1N1流感病毒的组进行HAI测定:A/Chile/1/1983、A/Singapore/6/1986、A/Beijing/262/1995、A/New Caledonia/20/1999、A/California/07/2009、A/Brisbane/02/2018和A/Guangdong-Maonan/SWL 1536/2019。HAI测定按照D.M.Carter等人(2016,J.Virol.2016;90:4720-4734)的描述进行。简而言之,用受体破坏酶(RDE)(Denka Seiken,Co.,Tokyo,Japan)处理血清,然后进行测试以通过在37℃下孵育过夜去除非特异性抑制剂。然后将RDE在56C下进一步灭活45分钟。将25μL量的PBS添加到96孔V形底板的第2-12行中;向第1行中添加50μLRDE处理血清;并且然后在整个板上进行2倍系列稀释。将等体积的H1N1病毒(大约8个血凝单位(HAU)/50μL)添加到每个孔中。将板在RT下孵育30分钟,并且然后向每孔中添加50μL体积的0.8％火鸡红细胞的PBS溶液。通过搅拌混合板并在RT下孵育另外30分钟。HAI滴度确定为含有非凝集RBC的最后一个孔的稀释度的倒数。每个板均包括阳性和阴性血清对照。HAI滴度大于1:40被定义为血清保护性的,并且根据WHO和欧洲医药产品委员会评估流感疫苗的指南(European Medicines Agency,2014,Guideline on Influenza Vaccines:Non-Clinical and Clinical Module(草案)European Medicines Agency;London,UK),HAI滴度与基线相比增加4倍被定义为血清转化性的。

[0303] 本研究使用了由英国伦敦的世界卫生组织合作中心最初开发并经美国疾病控制和预防中心(CDC)修改的空斑减少测定(FRA)。简而言之,如上所述用RDE处理血清样品。最初,将100μL MDCK细胞以3×10^5个细胞/mL的浓度接种到96孔平底板的每个孔中。24小时后,使细胞达到95％至100％汇合,并且然后用PBS洗涤。接下来,将50μL在补充有1μg/mL甲

苯磺酰基苯丙氨酰氯甲基酮(TPCK)处理的胰蛋白酶(VGM-T)(Sigma,St.Louis,MO,USA)的病毒生长培养基(VGM)中以1:20稀释度开始的2倍系列稀释的血清样品添加到每个孔中。随后在VGM-T中稀释流感病毒,并且向每孔中添加50μL浓度为1.2×10^4FFU/mL的病毒溶液;还将单独的VGM-T添加到细胞对照孔中。将板在37℃下孵育2小时,并且然后向每孔中添加100μL的覆盖物。覆盖物含有等体积的1.2% Avicel RC/CL(FMC Health and Nutrition,Philadelphia,PA,USA)和补充有1μg/mL TPCK处理的胰蛋白酶、0.1% BSA和1%青霉素-链霉素的2×MEM。在37℃下孵育18-22小时后,除去覆盖物,并使用PBS洗涤细胞两次。此后,将细胞用冰冷的4%福尔马林在4℃下固定30分钟,然后用PBS洗涤一次,并在RT下用0.5% Triton X-100透化20分钟。单层用含有0.1% Tween 20(洗涤缓冲液)的PBS洗涤三次,并与小鼠抗IAV核蛋白单克隆抗体一起在37℃下孵育1小时((Y.Huang等人,2021,Vaccines,9(7):793)。用洗涤缓冲液洗涤三次后,将细胞与二抗、即山羊抗小鼠过氧化物酶标记的IgG(SeraCare,Inc.,Milford,MA,USA)一起在RT下孵育1小时。然后用洗涤缓冲液洗涤细胞三次,并添加含有0.03% H_2O_2的TrueBlue底物(SeraCare,Inc.,Milford,MA,USA)并在RT下孵育10至15分钟。通过用蒸馏水洗涤板五次来终止反应。将板风干,并使用带有ImmunoCapture 6.4.87软件的CTL BioSpot分析仪(CTL,Cleveland,OH,USA)对空斑进行计数。FRA滴度表示为血清最高稀释度的倒数,对应于与病毒对照孔减去细胞对照孔相比的50%空斑减少。

[0304] 所有数据均表示为绝对平均值±平均值的标准误差(SEM)。使用GraphPad Prism 9软件(GraphPad,San Diego,CA,USA)采用单因素ANOVA来分析组间的统计差异。“p”值小于0.05被定义为统计上显著的(*,$p<0.05$;**,$p<0.01$;***,$p<0.001$;****,$p<0.0001$)。

[0305] 图17描绘了实例3中所述研究的时间线。图18A-图18D呈现了展示根据实例3以及图17中所示的时间线和方案中描述的研究用广泛反应性重组流感HA免疫原进行疫苗接种的小鼠在流感病毒感染后的体重和存活曲线的图。提供于图18A-图18D中的体重和存活结果示出已经用本文所述的广泛反应性重组流感HA免疫原进行疫苗接种的动物没有显著的体重减轻,并且示出在病毒攻击后的100%存活。图19A-图19E示出了针对H1N1病毒组的疫苗接种后小鼠中的血清HAI抗体滴度。来自用编码广泛反应性重组流感H1N1 HA免疫原Y2(例如,SEQ ID NO:15)的VLP或用H1N1野生型CA/09或Bris/18进行疫苗接种的动物的血清具有感染后针对CA/09、Bris/18和Guangdong/19病毒抗原的高HAI滴度。图20A和图20B示出了用本文所述的广泛反应性HA免疫原性多肽抗原(例如,Y2(SEQ ID NO:15)或Y4(SEQ ID NO:17)、(“H1 COBRA HA”),或用野生型Bris/07、CA/09或Bris/18VLP免疫原/疫苗进行免疫/疫苗接种后在免疫上未经处理的Balb/c小鼠血清中引发的抗体的血清中和抗体滴度和中和活性。用PBS和野生型Bris/07VLP免疫原进行疫苗接种的小鼠不具有可检测的针对CA/09病毒(图20A)或Bris/18病毒(图20B)的中和抗体滴度。用H1COBRA HA VLP免疫原进行免疫/疫苗接种的小鼠具有针对CA/09和Bris/18病毒二者的高中和抗体滴度。来自COBRA HA VLP疫苗接种的小鼠的抗血清针对CA/09病毒的log2滴度为11.32(50%抑制),并且针对Bris/18病毒的log2滴度为9.32(50%抑制)。图21A-图21C示出了已用广泛反应性重组流感HA VLP免疫原(H1 Cobra HA,例如,Y2或Y4 rHA VLP免疫原)、野生型流感rHA VLP免疫原或用ADDAVAX™佐剂配制的PBS进行免疫/疫苗接种的小鼠中的总IgG抗体应答。确定针对以下项的IgG抗体滴度:(图21A):A/California/07/2009rHA蛋白、(图21B):A/Brisbane/02/

2018rHA蛋白免疫原或(图21C):cH6/1HA蛋白免疫原:具有来自A/California/07/2009HA的球状头部和来自亚型H6流感病毒rHA蛋白免疫原的茎部的嵌合rHA。与接受PBS的对照小鼠相比,用不同VLP进行疫苗接种的小鼠针对CA/09HA的IgG抗体滴度显著更高。(图21A)。来自CA/09-rHA疫苗接种小鼠的抗血清针对同源匹配的CA/09HA蛋白具有最高总IgG滴度,而来自用H1 Cobra HA蛋白免疫原(例如,Y2或Y4免疫原)进行疫苗接种的小鼠的抗血清具有与CA/09疫苗接种小鼠相比统计上相似的IgG抗体滴度。(图21A)。与用CA/09rHA免疫原进行疫苗接种的小鼠和用H1 Cobra HA蛋白免疫原进行疫苗接种的小鼠相比,Bris/18rHA疫苗接种的小鼠具有较低的IgG抗体滴度(图21A),表明VLP上的H1 Cobra HA蛋白抗原有效引发与由同源匹配的CA/09HA抗原生成的滴度相似的IgG滴度。与Bris/18和CA/09疫苗接种小鼠相比,来自用H1 Cobra HA蛋白免疫原VLP(Y2或Y4)进行疫苗接种的小鼠的抗血清具有针对Bris/18rHA的统计上相似的总IgG滴度(图21B)。图22A和图22B示出了感染H1N1 A/California/07/2009病毒或A/Brisbane/02/2018病毒后三天BALB/c和DBA/2J小鼠的肺组织中的病毒滴度。用广泛反应性HA免疫原性多肽疫苗(H1 Cobra HA VLP疫苗)(例如,Y2或Y4免疫原)或用野生型HA VLP疫苗(例如,Bris/18HA、CA/09HA、Bris/07HA)(x轴)对BALB/c小鼠进行肌内疫苗接种,并且然后在疫苗接种后第12周用H1N1 A/California/07/2009病毒攻击(图22A)。在感染后第3天收集肺样品(n=3/组)并确定肺病毒滴度。已用如上所述的相同疫苗免疫/疫苗接种并以rHA形式递送的另一组DBA/2J小鼠在疫苗接种后第12周施用A/Brisbane/02/2018病毒攻击(图22B)。在感染后第3天收获肺样品(n=3),并确定肺病毒滴度(图22B)。这项研究确定,对于A/California/07/2009(“CA/09”)病毒攻击,PBS疫苗接种的小鼠在感染后第3天具有最高的肺病毒滴度,并且用Bris/07HA VLP进行疫苗接种的小鼠具有与PBS疫苗接种的动物相比统计上相似的肺病毒滴度。用广泛反应性HA免疫原性多肽VLP疫苗(例如,Y2)进行疫苗接种的小鼠具有最低的肺病毒滴度,与CA/09疫苗接种的小鼠的肺病毒滴度在统计上相似(图22A)。对于A/Brisbane/02/2018(“Bris/18”)病毒攻击,PBS疫苗接种的小鼠在感染后第3天具有最高的肺病毒滴度,并且用广泛反应性HA免疫原性多肽VLP疫苗(例如,Y2)或用Bris/18进行疫苗接种的小鼠的肺基本上没有病毒滴度,而用CA/09进行疫苗接种的小鼠的肺病毒滴度显著低于PBS疫苗接种的小鼠的肺病毒滴度。用Bris/07进行疫苗接种的小鼠具有与PBS疫苗接种的小鼠的病毒滴度相似的病毒滴度(图22B)。这些结果证明,用广泛反应性的HA H1N1免疫原性多肽疫苗进行免疫/疫苗接种的动物在受到流感病毒攻击和感染后降低了肺病毒载量。

[0306] 如上文实例中所述,在先前已暴露于甲型流感(H1N1)和甲型流感(H3N2)病毒的小鼠(即预免疫动物)中评估用作本文所述疫苗的非天然存在的、广泛反应性的H1和H3免疫原性多肽疫苗(例如,Y2、J4和NG2)。虽然预免疫对流感疫苗接种的影响尚未得到充分研究,但此类评估是至关重要的,因为大多数人在五岁之前就感染了流感病毒。因此,大多数目标疫苗群体在疫苗接种之前就已经拥有对这些病毒亚型中的一种或两种的免疫史。与未经流感处理的模型中的其他候选疫苗相比,在预免疫模型中,J4免疫原改善了HAI反应性抗体宽度。用J4免疫原进行疫苗接种的预免疫小鼠也生成了针对Switz/13、Kan/17、Tx/17和HK/19病毒类型的具有HAI活性的血清抗体,在未经流感处理的J4 HA疫苗接种小鼠中不存在这种抗体。用Sing/16进行疫苗接种的预免疫小鼠出现了类似的宽度扩展,即在预免疫模型中生成了在未经流感处理的小鼠中不存在的针对HK/19的具有HAI活性的血清抗体。

[0307] 不希望受理论束缚,预免疫背景下的季节性流感疫苗接种受到免疫记忆区室的贡献的强烈偏向,并且主要刺激记忆B细胞,从而导致分泌抗体的浆母细胞数量短暂激增。因此,观察到的反应性抗体(抗体宽度)的扩展可能是由于识别rHA疫苗抗原和H3N2引发毒株的HA蛋白之间的共享表位的记忆B细胞应答,因为当淋巴细胞靶向保守的HA表位时,会出现广泛的HA组水平的免疫记忆。此外,预免疫印记诱导对不同流感病毒抗原上的保守位点和可变位点二者的免疫记忆。因此,疫苗抗原和引发毒株之间共有的HA表位也可能存在于历史HAI组中的H3N2病毒上。在疫苗诱导的免疫唤醒后,预免疫动物中的特定记忆B细胞会受到刺激以产生HAI反应性抗体,在没有流感预免疫的情况下,疫苗不会引发这种抗体。

[0308] 其他实施例

[0309] 从前面的描述中,显而易见的是,可以对本文描述的各种方面和实施例进行变化和修改以使其适用于各种用途和条件。此类实施例也在以下权利要求的范围内。

[0310] 在本文变量的任何定义中记载的元素列表包括将该变量定义为任何单个元素或所列元素的组合(或子组合)。本文实施例的记载包括该实施例作为任何单个实施例或与任何其他实施例或其部分的组合。

[0311] 本说明书中提到的所有专利和公开都以引用方式并入本文,所达到的程度如同每个单独的专利和公开都被具体地和单独地指出以引用方式并入。

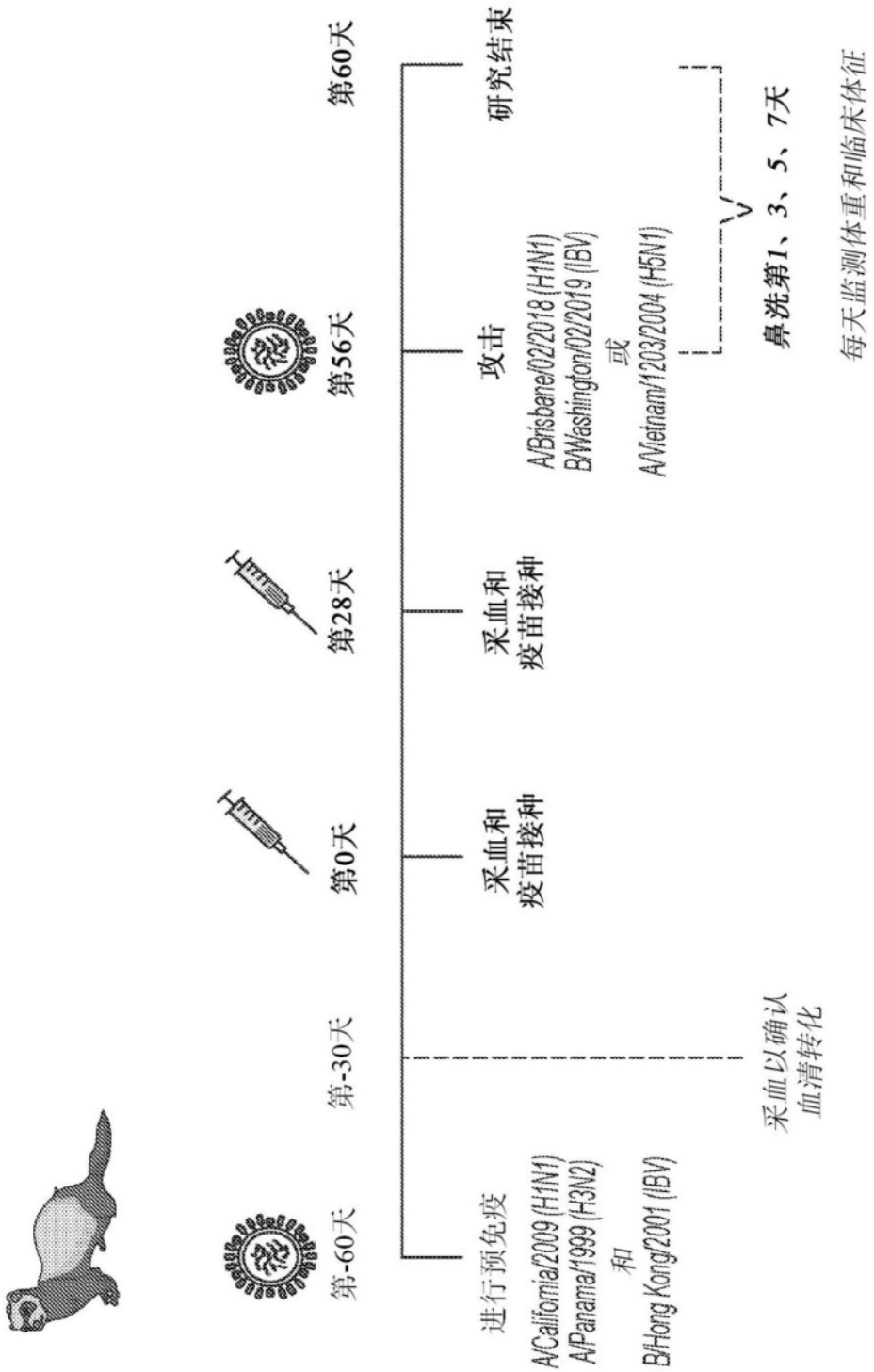

第-60天
第-30天
第0天
第28天
第56天
第60天
进行预免疫
A/California/2009 (H1N1)
A/Panama/1999 (H3N2)
和
B/Hong Kong/2001 (IBV)
采血以确认
血清转化
采血和
疫苗接种
采血和
疫苗接种
攻击
A/Brisbane/02/2018 (H1N1)
B/Washington/02/2019 (IBV)
或
A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)
研究结束
鼻洗第1、3、5、7天
每天监测体重和临床体征

图1

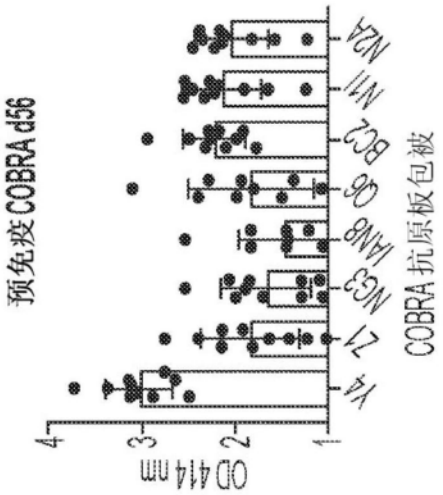

预免疫COBRA d56
OD 414 nm
1
2
3
4
V4
27
NC3
IAN8
Q6
BC2
N11
N24
COBRA抗原板包被

图2A

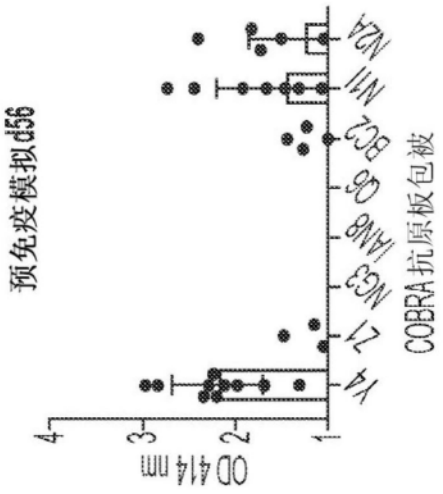

预免疫模拟d56
OD 414 nm
1
2
3
4
V4
27
NC3
IAN8
Q6
BC2
N11
N24
COBRA抗原板包被

图2B

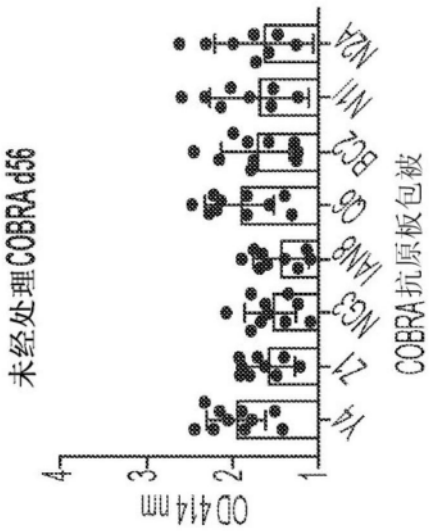

未经处理COBRA d56
OD 414 nm
1
2
3
4
Y4
Z1
N53
IAN8
Q6
BC2
N11
N24
COBRA抗原板包被

图2C

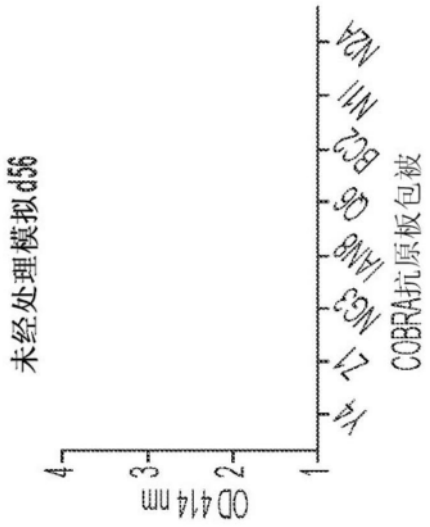

未经处理模拟d56
OD 414 nm
1
2
3
4
Y4
Z1
N53
IAN8
Q6
BC2
N11
N24
COBRA抗原板包被

图2D

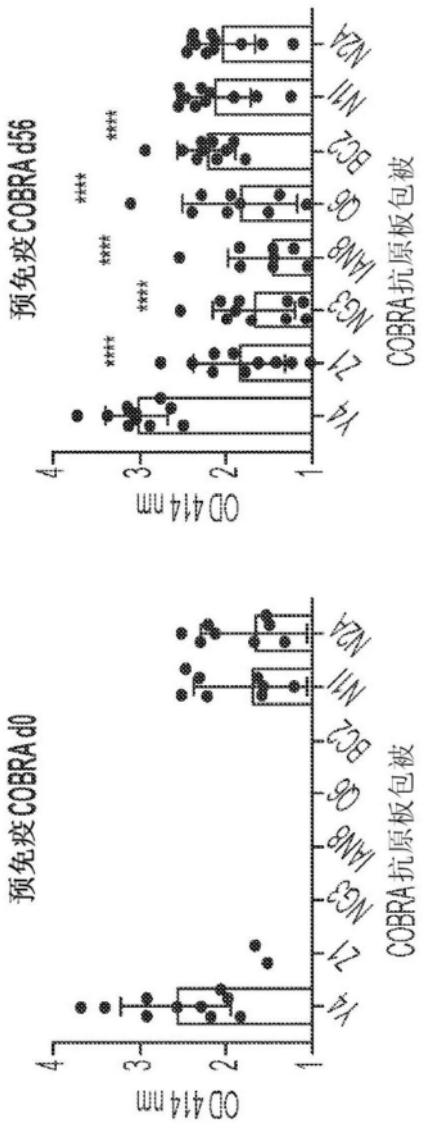

预免疫COBRA d56
OD414nm
COBRA抗原板包被
预免疫COBRA d0
OD414nm
COBRA抗原板包被

图3A

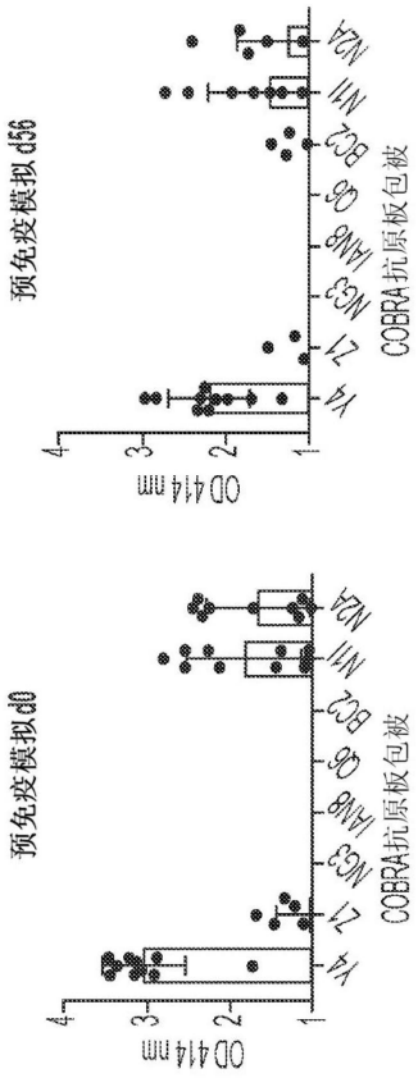

预免疫模拟 d56
OD 414 nm
1
2
3
4
V4
Z1
NC3
IAN8
Q6
BC2
N11
N24
COBRA抗原板包被
预免疫模拟 d0
OD 414 nm
1
2
3
4
V4
Z1
NC3
IAN8
Q6
BC2
N11
N24
COBRA抗原板包被

图3B

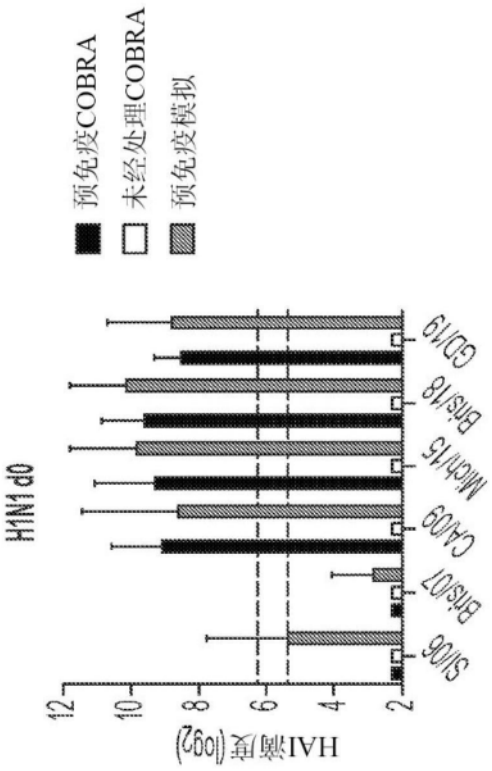

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
H1N1 d0
HAI滴度(log2)
12
10
8
6
4
2
SI/06
BI/S07
CA/09
MI/Ch/15
BI/S/18
GD/19

图4A

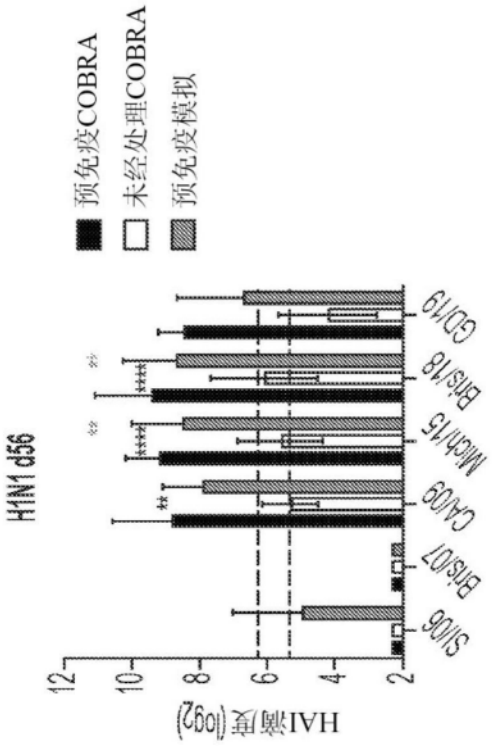

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
H1N1 d56
HAI滴度(log2)
12
10
8
6
4
2
SI/06
BI/S07
CA/09
MI/Ch/15
BI/S/18
GD/19

图4B

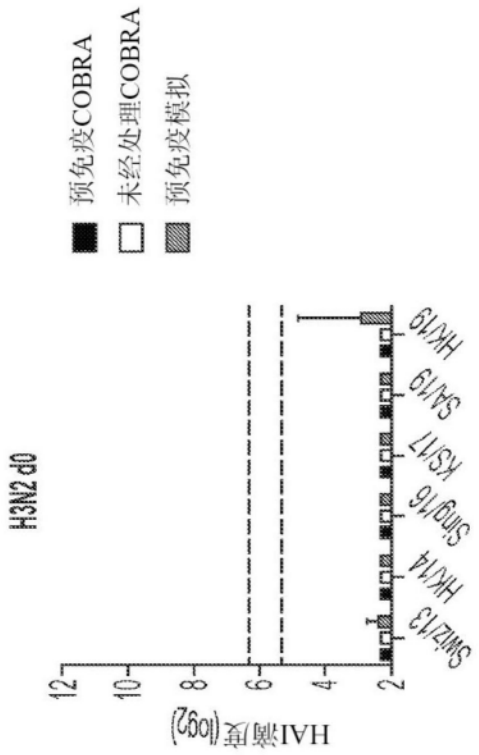

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
H3N2 d0
HAI滴度(log2)
12
10
8
6
4
2
SWIZ/13
HK/14
Sin9/16
KS/17
SA/19
HK/19

图5A

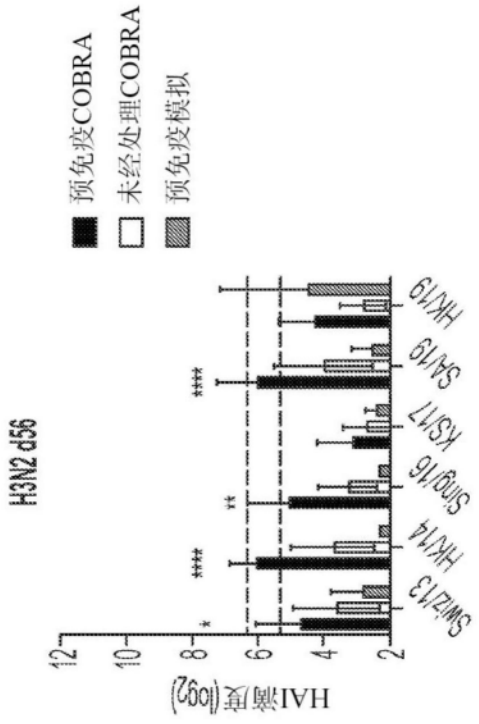

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
H3N2 d56
HAI滴度(log2)
12
10
8
6
4
2
*
****
**
****
SWIZ/13
HK/14
Sin9/16
KS/17
SA/19
HK/19

图5B

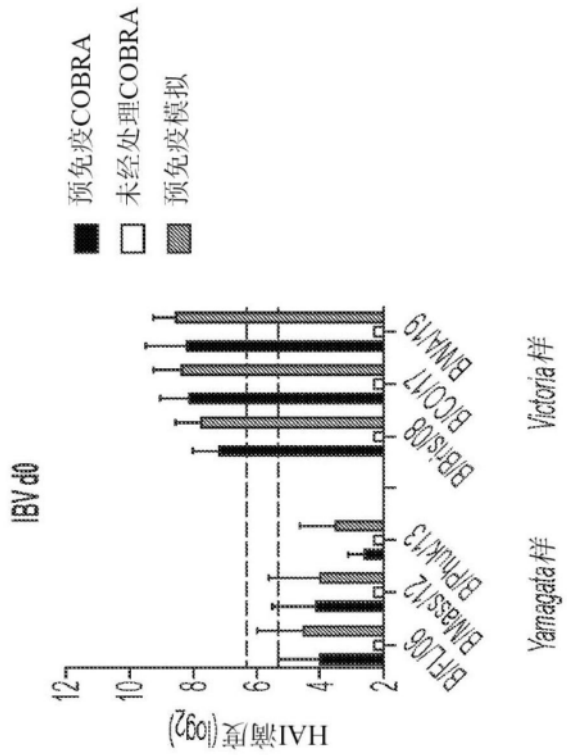

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
IBV d0
HAI滴度 (log2)
12
10
8
6
4
2
BFL06
BMass/12
BPhuk/13
BRis08
BCO/17
BMA/19
Yamagata株
Victoria株

图6A

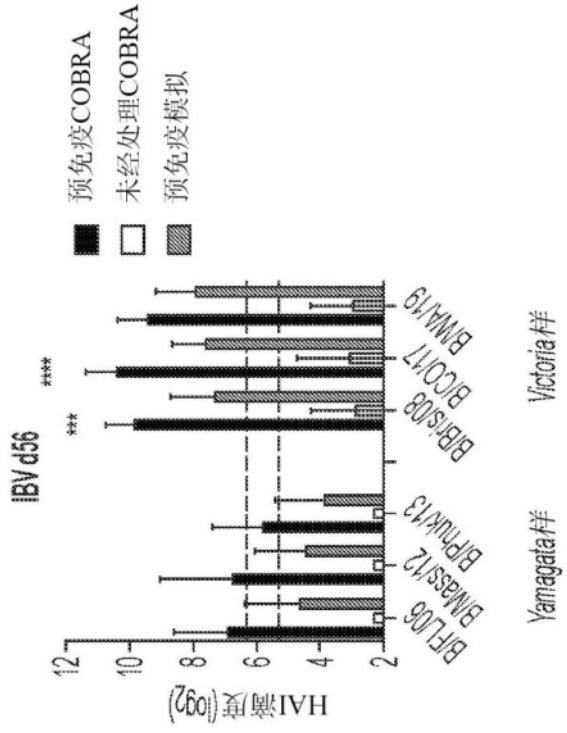

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
IBV d56
***
****
HAI滴度 (log2)
12
10
8
6
4
2
BFL06
BMass/12
BPhuk/13
BRis08
BCO/17
BMA/19
Yamagata株
Victoria株

图6B

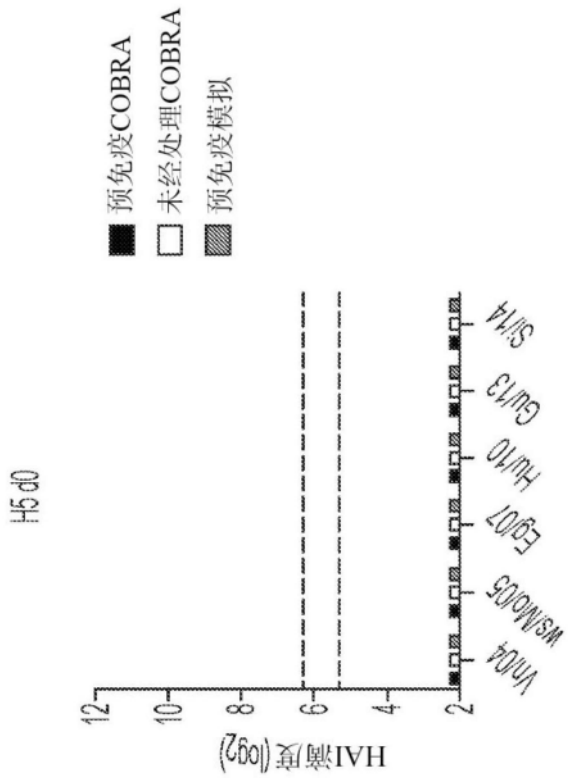

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
H5 d0
HAI滴度(log2)
12
10
8
6
4
2
Vn04
WSN/05
Eg/07
Hu/10
Gu/13
Si/14

图7A

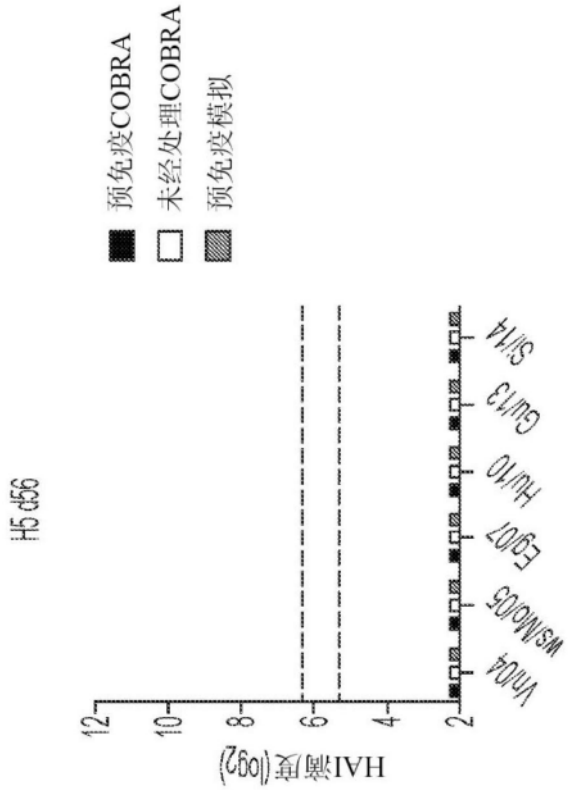

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
H5 d56
HAI滴度(log2)
12
10
8
6
4
2
Vn04
WSN/05
Eg/07
Hu/10
Gu/13
Si/14

图7B

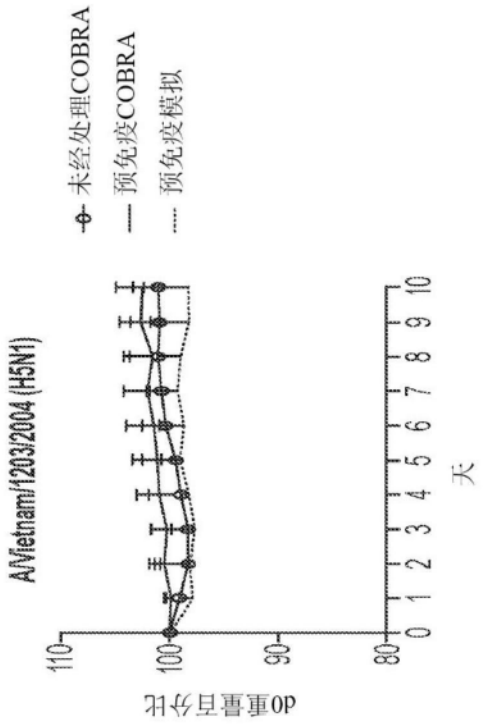

未经处理COBRA
预免疫COBRA
预免疫模拟
A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)
d0重量百分比
110
100
90
80
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
天

图8A

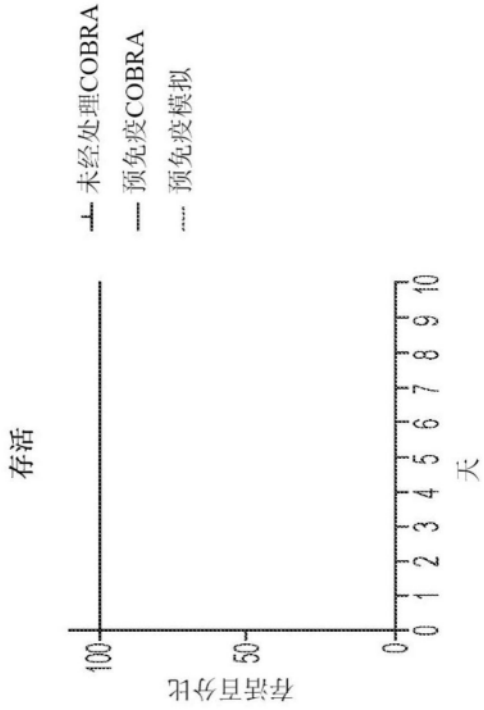

未经处理COBRA
预免疫COBRA
预免疫模拟
存活
存活百分比
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
天

图8B

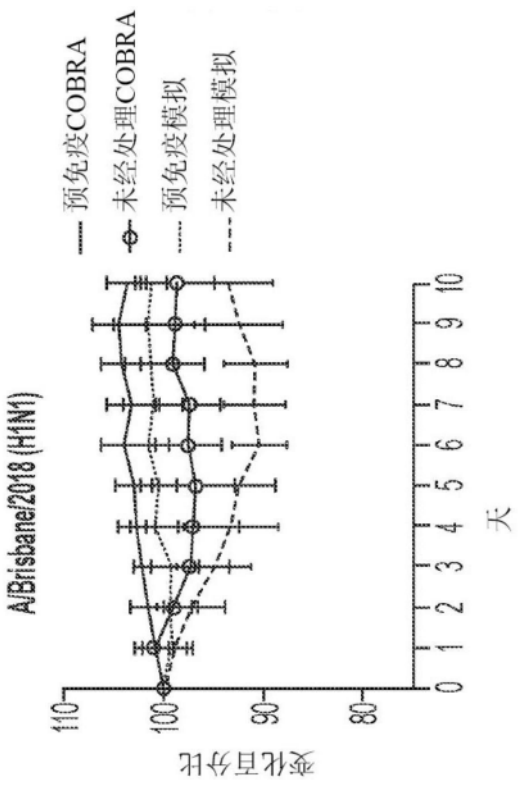

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
未经处理模拟
A/Brisbane/2018 (H1N1)
变化百分比
110
100
90
80
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
天

图9A

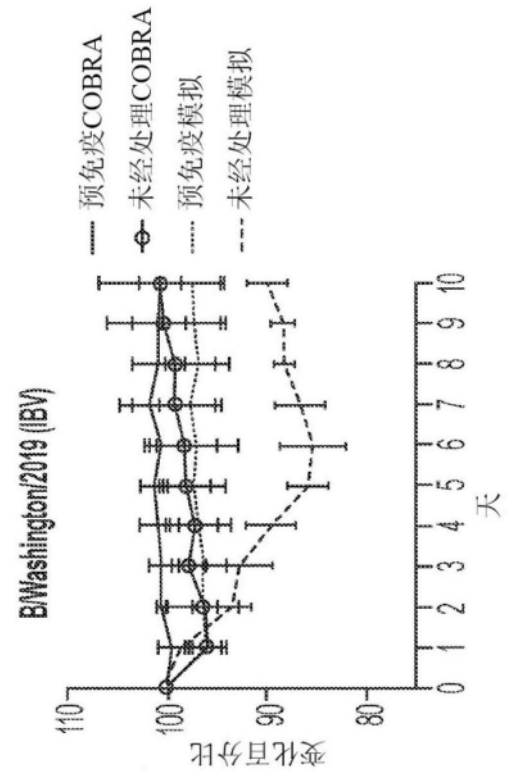

预免疫COBRA
未经处理COBRA
预免疫模拟
未经处理模拟
B/Washington/2019 (IBV)
变化百分比
110
100
90
80
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
天

图9B

A/Brisbane/02/2018 (H1N1)攻击	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天	第10天
预免疫COBRA与未经处理COBRA	n.s.	n.s.	*	**	**	***	**	**	**	*
预免疫COBRA与预免疫模拟	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
预免疫COBRA与未经处理模拟	n.s.	n.s.	**	****	****	****	****	****	****	****
未经处理COBRA与预免疫模拟	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
未经处理COBRA与未经处理模拟	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	****	**	*
预免疫模拟与未经处理模拟	n.s.	n.s.	n.s.	***	****	****	****	****	****	***

图10A

BWashington/02/2019 (IBV)攻击	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天	第10天
预免疫COBRA与未经处理COBRA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
预免疫COBRA与预免疫模拟	n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
预免疫COBRA与未经处理模拟	n.s.	***	****	****	****	****	****	****	****	****
未经处理COBRA与预免疫模拟	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
未经处理COBRA与未经处理模拟	n.s.	n.s.	*	***	****	****	****	****	****	****
预免疫模拟与未经处理模拟	n.s.	n.s.	n.s.	***	****	****	****	****	****	***

图10B

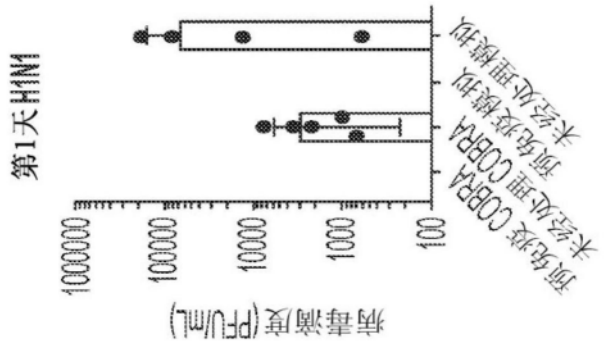


图11A

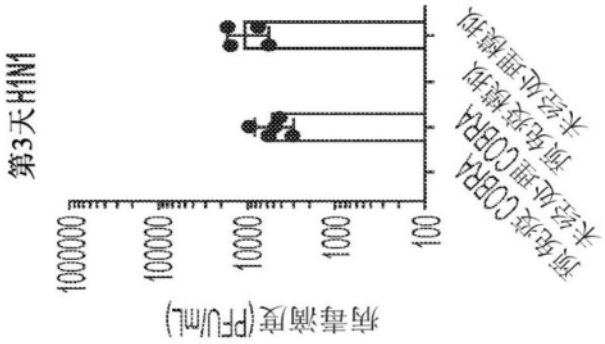


图11B

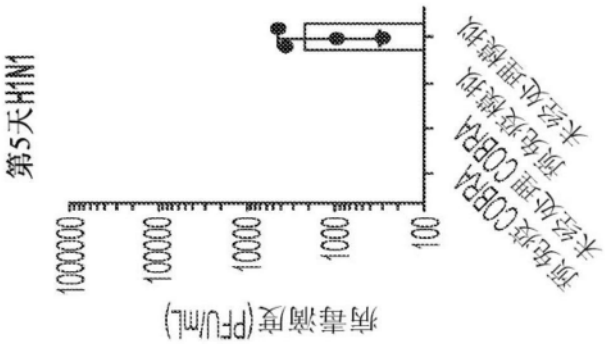


图11C

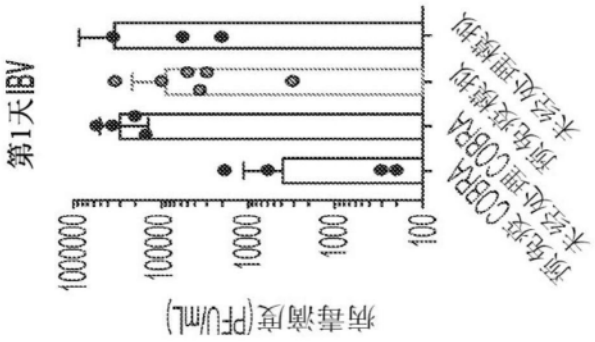


图12A

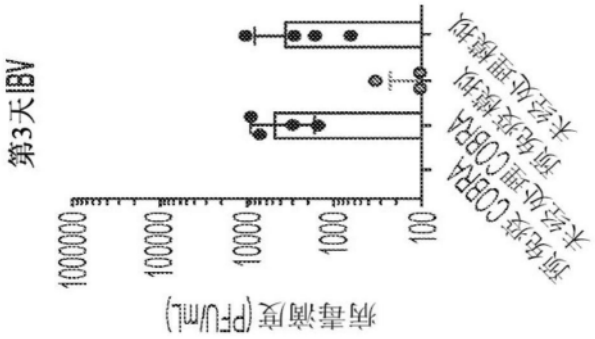


图12B

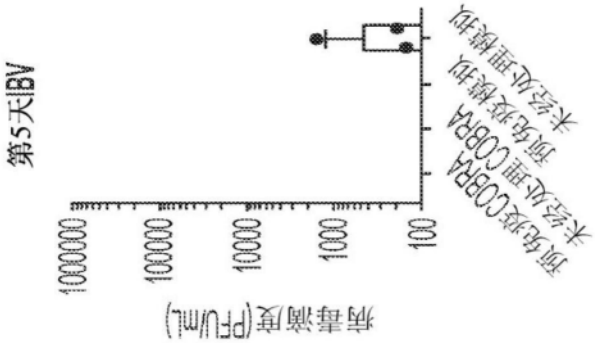


图12C

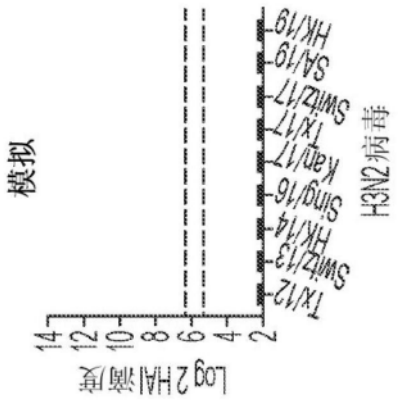


图13A

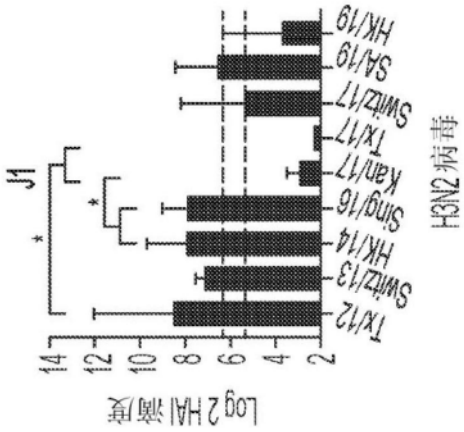


图13B

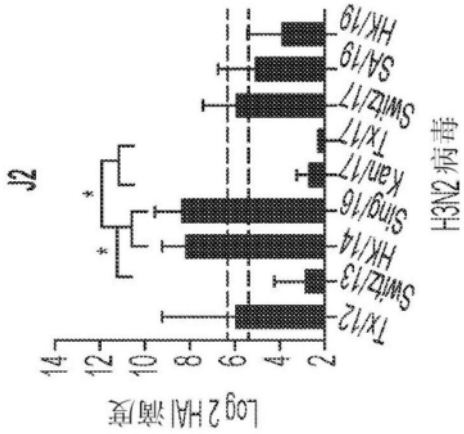


图13C

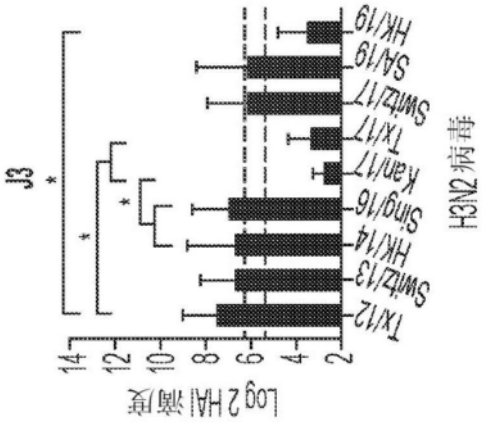


图13D

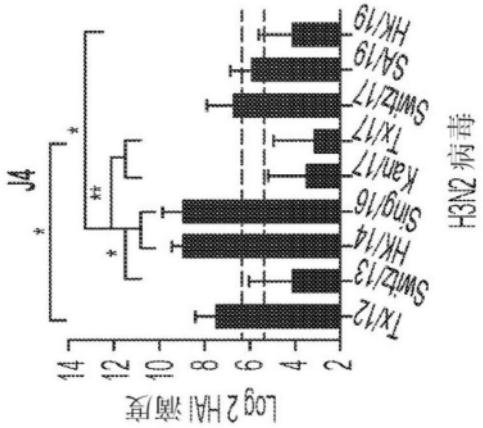


图13E

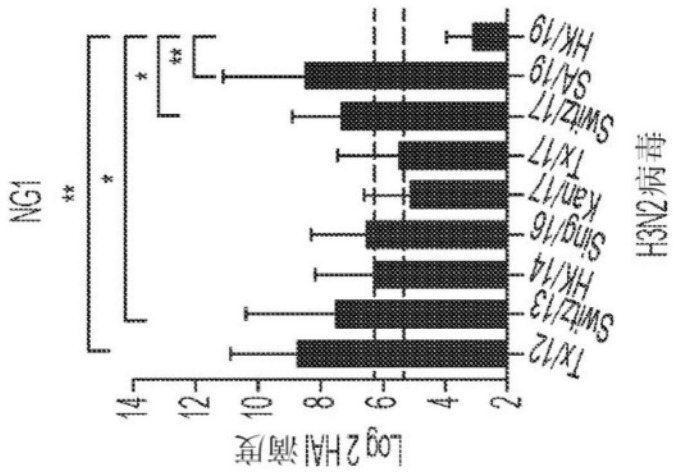


图13F

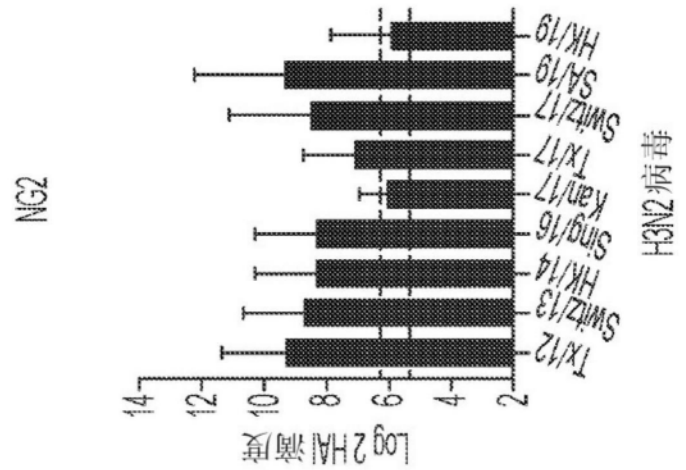


图13G

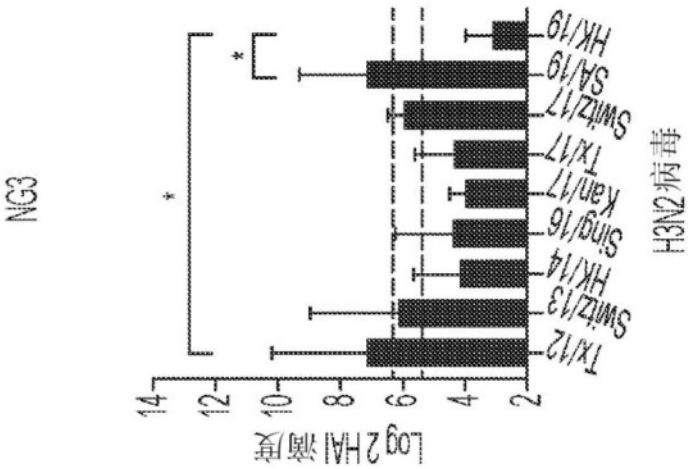


图13H

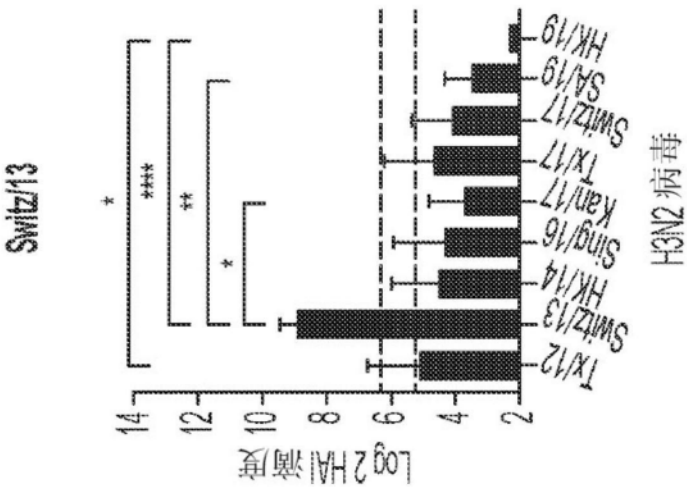


图13I

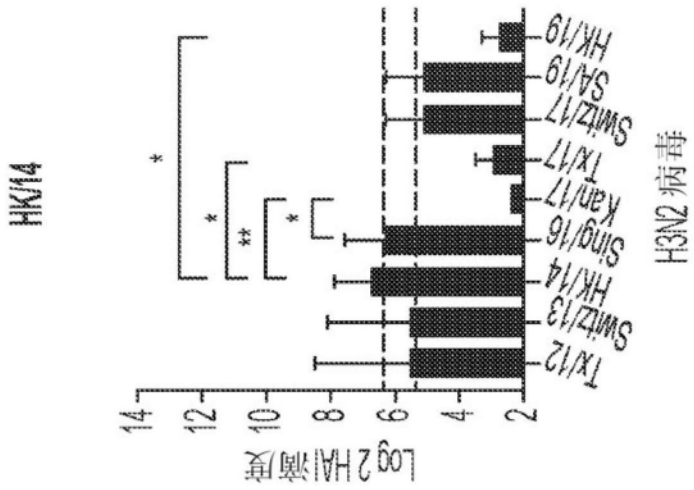

HK/14
Log 2 HAI 滴度
14
12
10
8
6
4
2
Tx/12
Swiz/13
HK/14
Sing/16
Kan/17
Tx/17
Swiz/17
SA/19
HK/19
H3N2 病毒
*
*
**
*

图13J

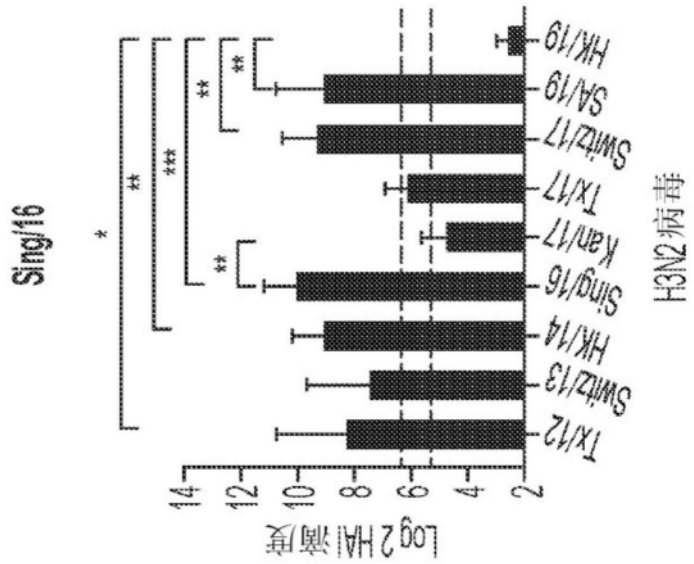

Sing/16
Log 2 HAI 滴度
14
12
10
8
6
4
2
Tx/12
Swiz/13
HK/14
Sing/16
Kan/17
Tx/17
Swiz/17
SA/19
HK/19
H3N2 病毒
*
**
***
**
**

图13K

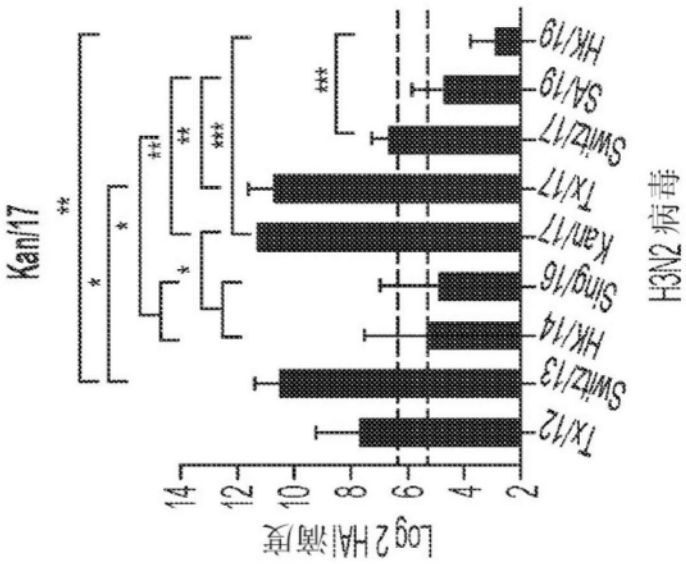

Kan/17
Log 2 HAI滴度
H3N2病毒
Tx/12
Switz/13
HK/14
Sing/16
Kan/17
Tx/17
Switz/17
SA/19
HK/19

图13L

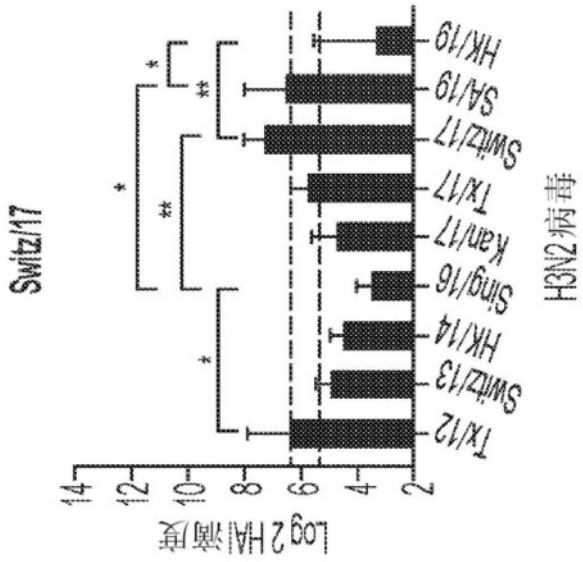

Switz/17
Log 2 HAI滴度
H3N2病毒
Tx/12
Switz/13
HK/14
Sing/16
Kan/17
Tx/17
Switz/17
SA/19
HK/19

图13M

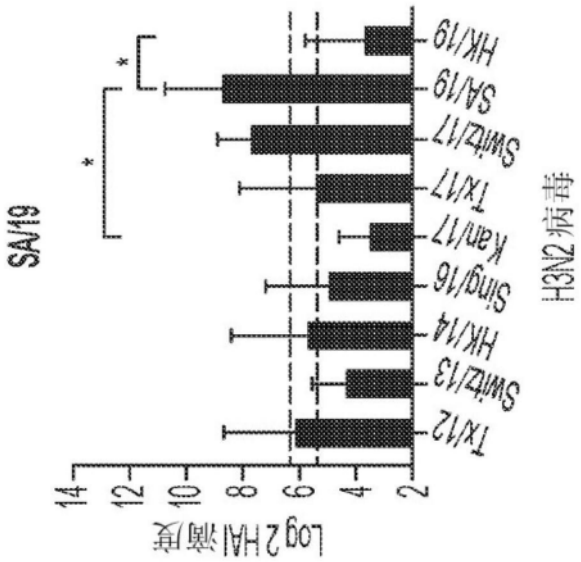

SA/19
*
*
HK/19
SA/19
Switz/17
Tx/17
Kan/17
Sing/16
HK/14
Switz/13
Tx/12
H3N2病毒
14
12
10
8
6
4
2
Log 2 HAI滴度

图13N

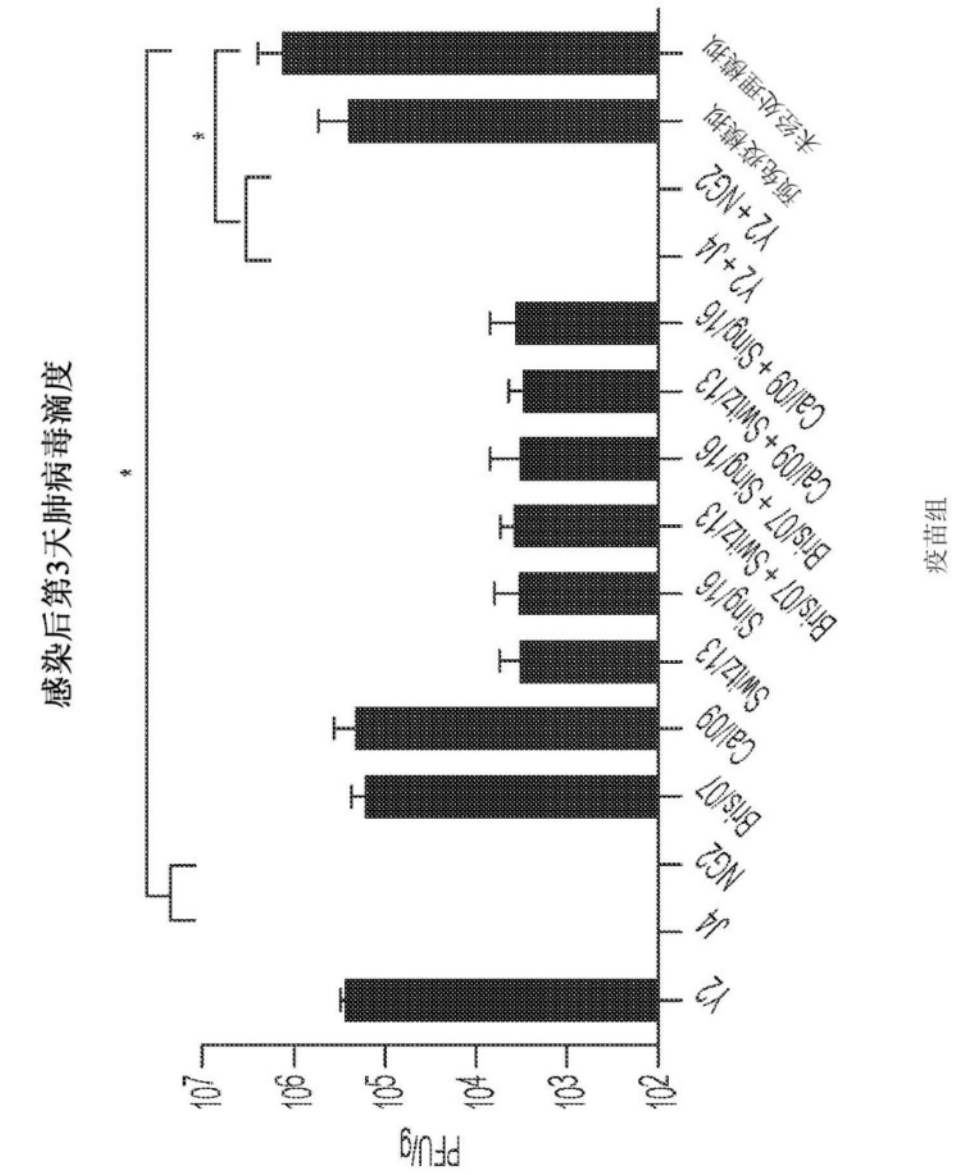

感染后第3天肺病毒滴度
PFU/g
107
106
105
104
103
102
Y2
J4
NG2
Bris07
Ca/09
SWiZ/13
Sh9/16
Bris07 + SWiZ/13
Bris07 + Sh9/16
Ca/09 + SWiZ/13
Ca/09 + Sh9/16
Y2 + J4
Y2 + NG2
预免疫-攻毒
未经免疫攻毒
疫苗组
*
*
*

图14

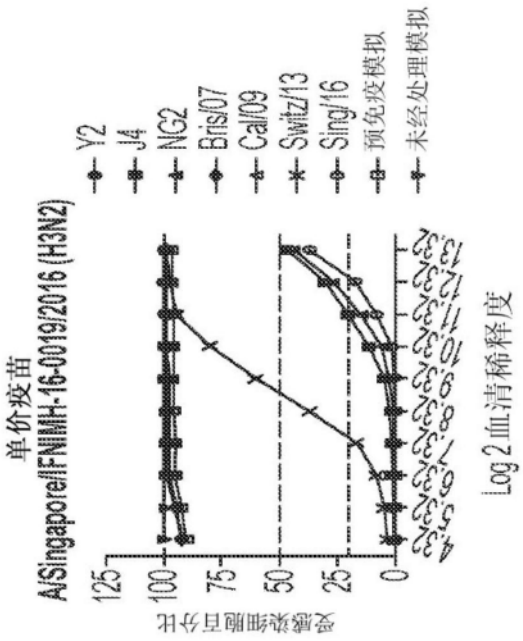

单价疫苗
A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016 (H3N2)
Y2
J4
NG2
Bris/07
Cal/09
Switz/13
Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度

图15A

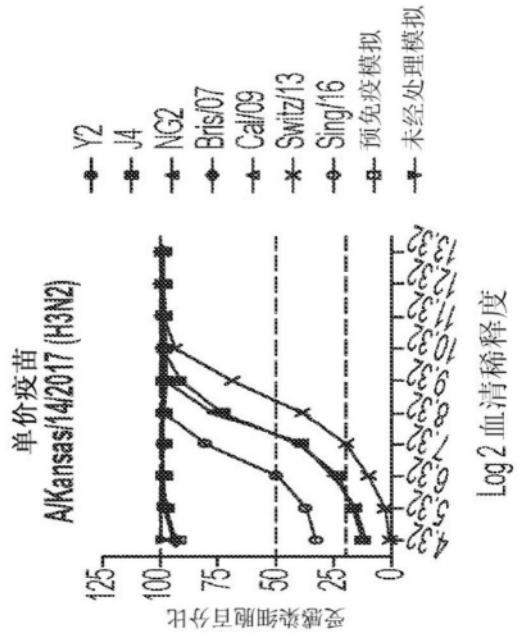

单价疫苗
A/Kansas/14/2017 (H3N2)
Y2
J4
NG2
Bris/07
Cal/09
Switz/13
Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度

图15B

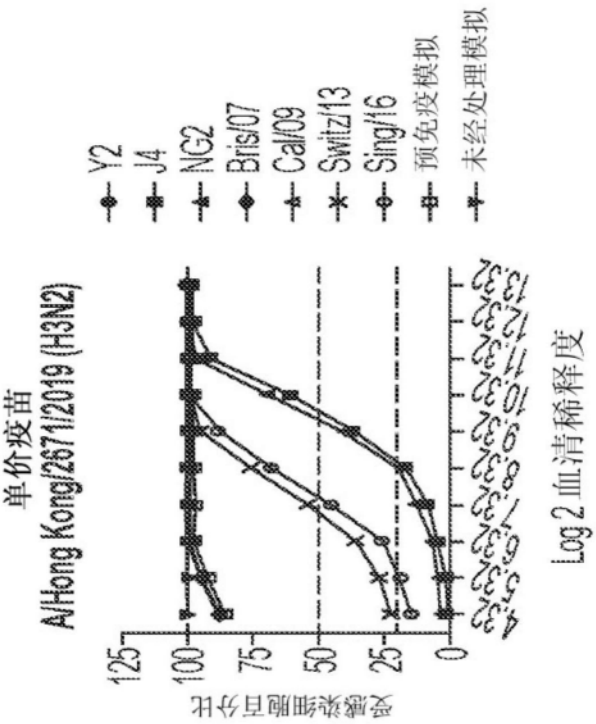

单价疫苗
A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)
Y2
J4
NG2
Brisb/07
Cal/09
Switz/13
Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4 32
5 32
6 32
7 32
8 32
9 32
10 32
11 32
12 32
13 32
Log 2 血清稀释度

图15C

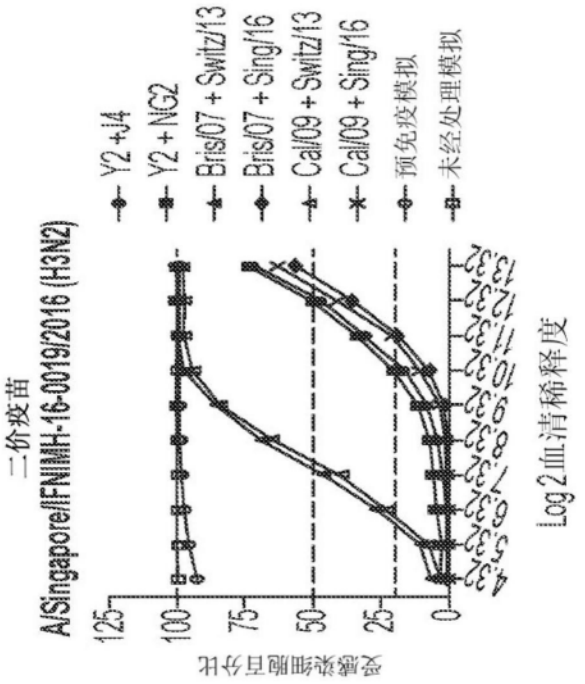

二价疫苗
A/Singapore/IFNIMH-16-0019/2016 (H3N2)
Y2 +J4
Y2 + NG2
Brisb/07 + Switz/13
Brisb/07 + Sing/16
Cal/09 + Switz/13
Cal/09 + Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4 32
5 32
6 32
7 32
8 32
9 32
10 32
11 32
12 32
13 32
Log 2 血清稀释度

图15D

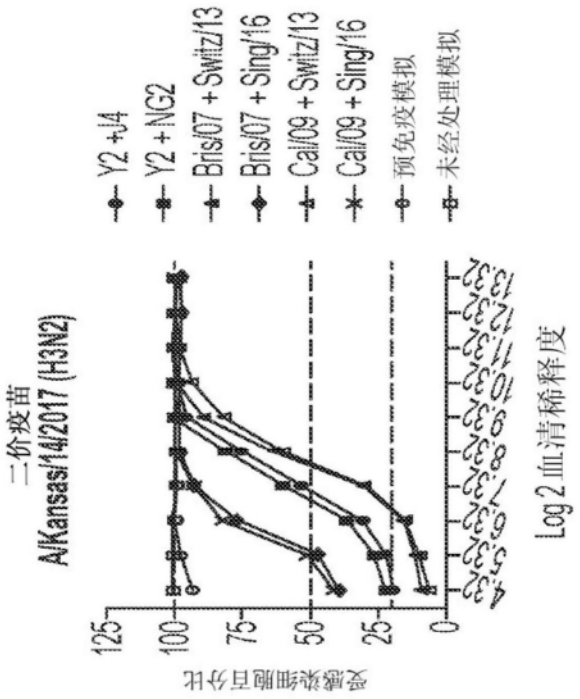

二价疫苗
A/Kansas/14/2017 (H3N2)
Y2 +J4
Y2 +NG2
Bris/07 + Switz/13
Bris/07 + Sing/16
Cal/09 + Switz/13
Cal/09 + Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
Log 2 血清稀释度

图15E

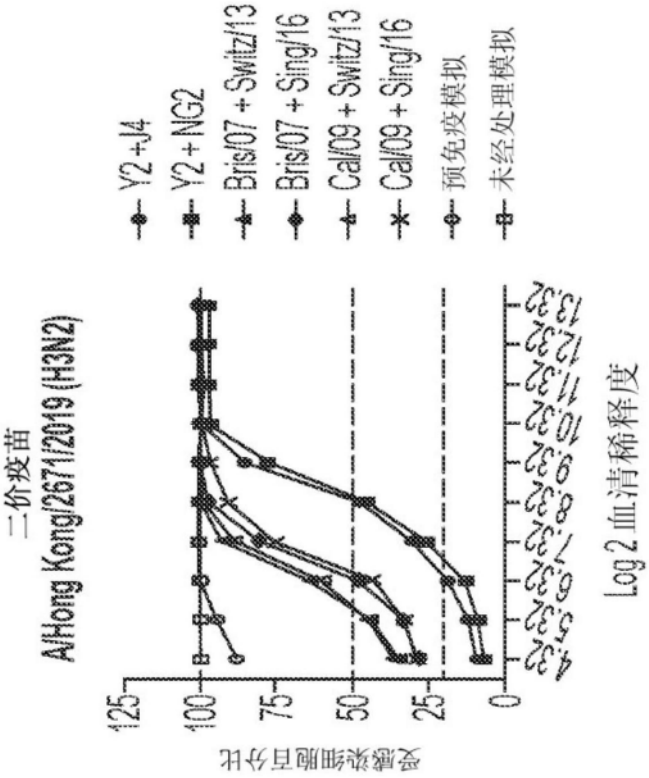

二价疫苗
A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)
Y2 +J4
Y2 +NG2
Bris/07 + Switz/13
Bris/07 + Sing/16
Cal/09 + Switz/13
Cal/09 + Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
Log 2 血清稀释度

图15F

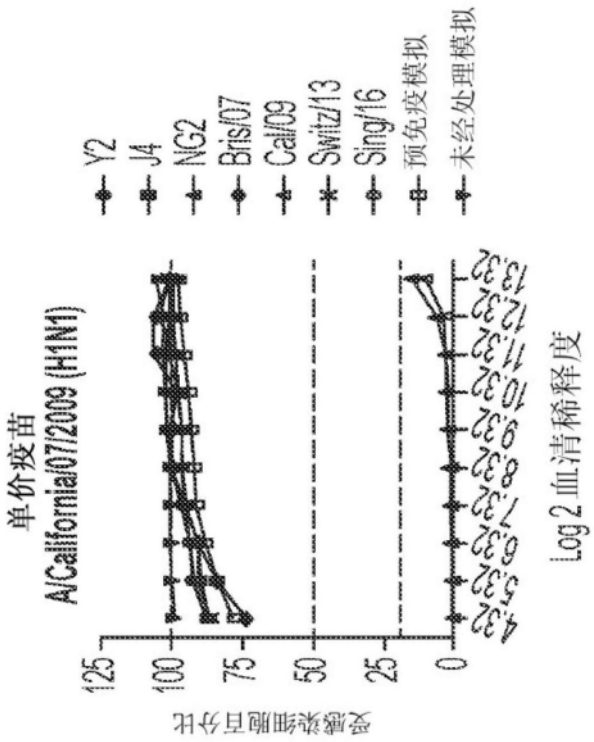

单价疫苗
A/California/07/2009 (H1N1)
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度
Y2
J4
NG2
Bris/07
Cal/09
Switz/13
Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟

图16A

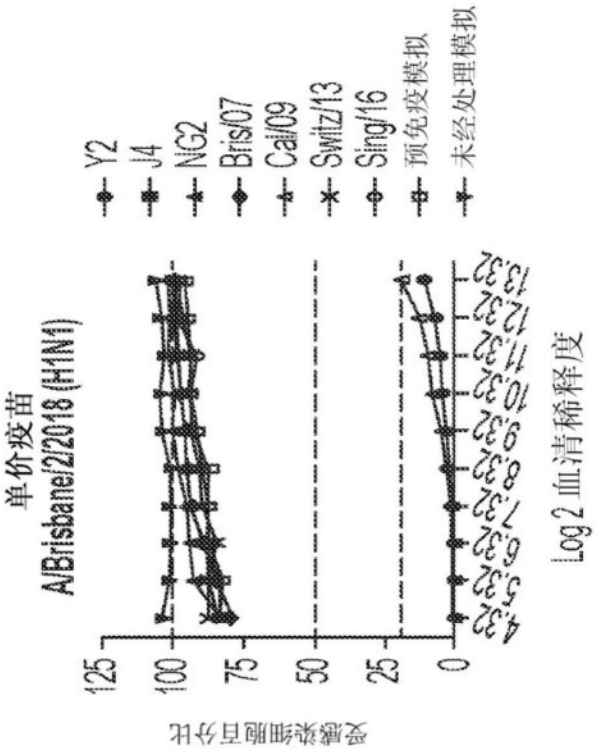

单价疫苗
A/Brisbane/2/2018 (H1N1)
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度
Y2
J4
NG2
Bris/07
Cal/09
Switz/13
Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟

图16B

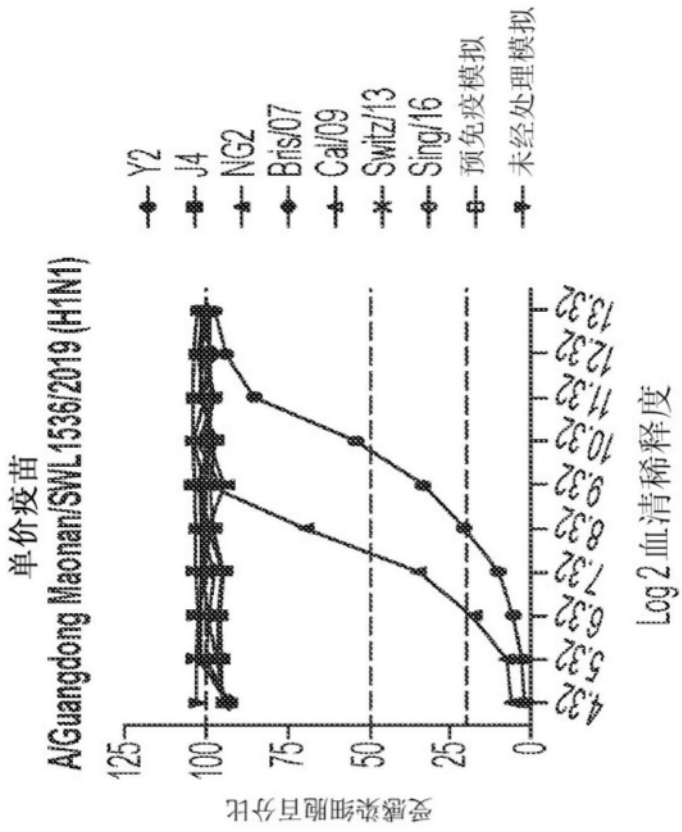

单价疫苗
A/Guangdong Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)
Y2
J4
NG2
Bris/07
Cal/09
Switz/13
Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度

图16C

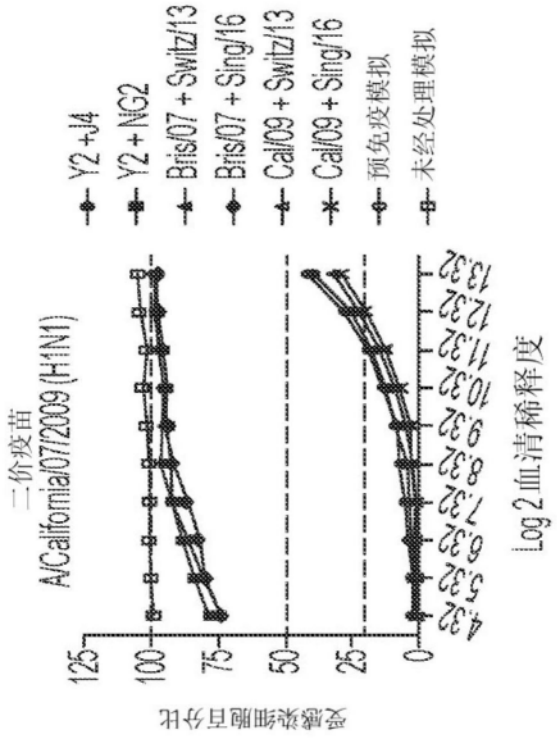

二价疫苗
A/California/07/2009 (H1N1)
Y2 +J4
Y2 + NG2
Bris/07 + Switz/13
Bris/07 + Sing/16
Cal/09 + Switz/13
Cal/09 + Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度

图16D

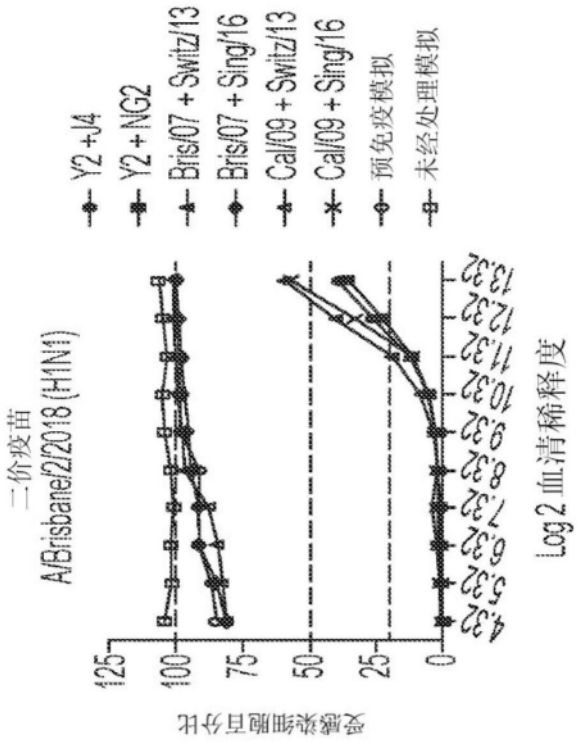

二价疫苗
A/Brisbane/2/2018 (H1N1)
Y2 +J4
Y2 + NG2
Bris/07 + Switz/13
Bris/07 + Sing/16
Cal/09 + Switz/13
Cal/09 + Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度

图16E

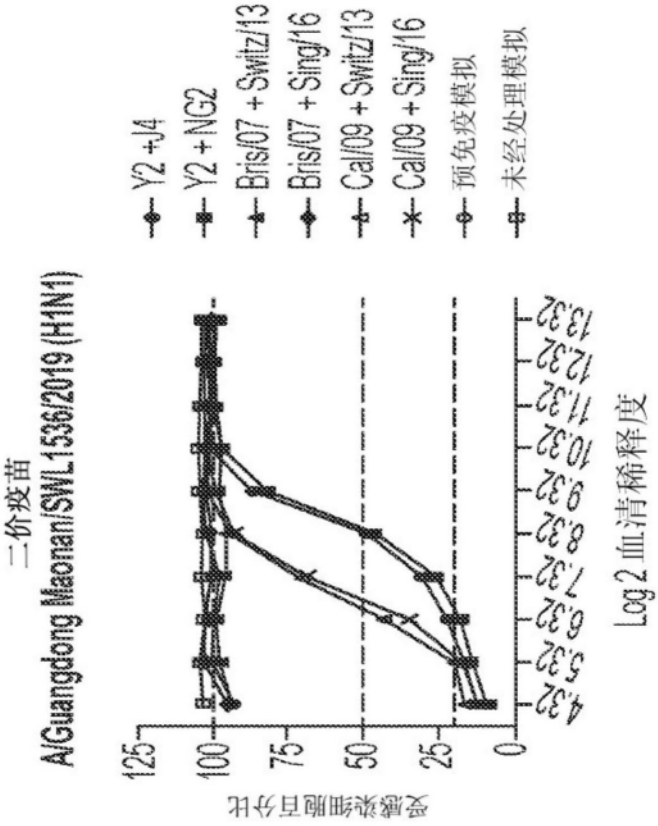

二价疫苗
A/Guangdong Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)
Y2 +J4
Y2 + NG2
Bris/07 + Switz/13
Bris/07 + Sing/16
Cal/09 + Switz/13
Cal/09 + Sing/16
预免疫模拟
未经处理模拟
受感染细胞百分比
125
100
75
50
25
0
4.32
5.32
6.32
7.32
8.32
9.32
10.32
11.32
12.32
13.32
Log 2 血清稀释度

图16F

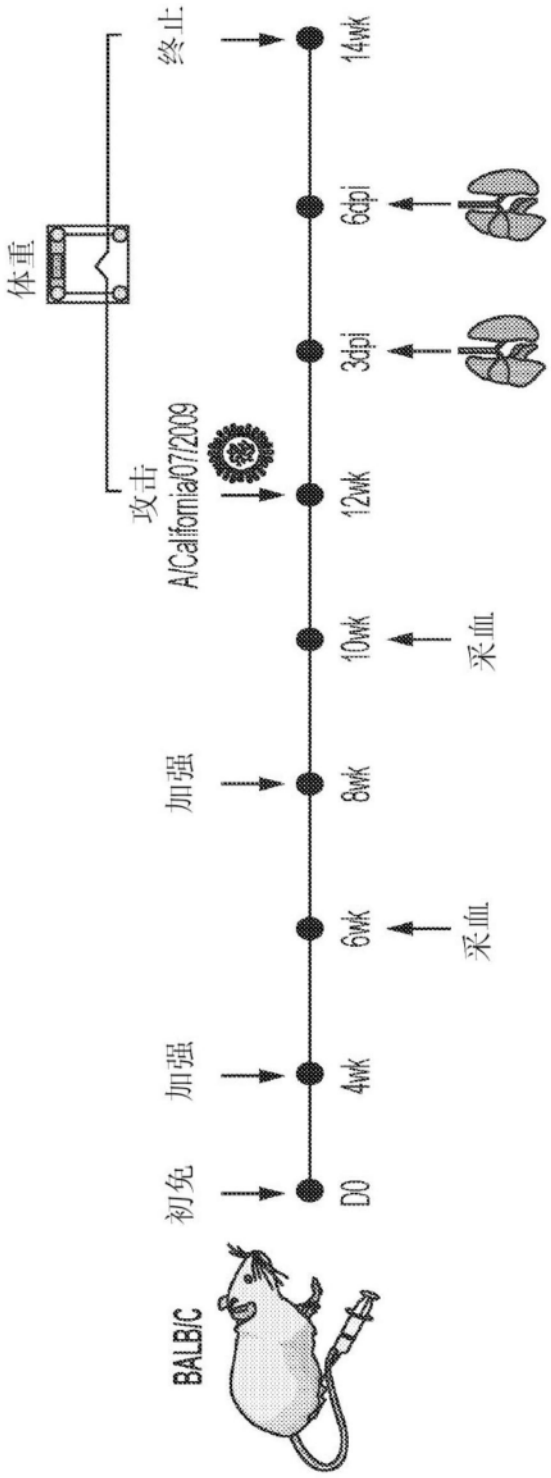

BALB/C
初免
加强
加强
采血
采血
加强
攻击
A/California/07/2009
体重
终止
D0
4wk
6wk
8wk
10wk
12wk
3dpi
6dpi
14wk

图17

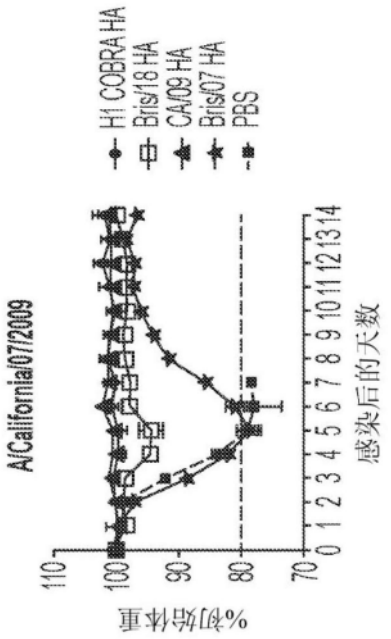

H1 COBRA HA
Brisi/18 HA
CA/09 HA
Brisi/07 HA
PBS
A/California/07/2009
%初始体重
感染后的天数

图18A

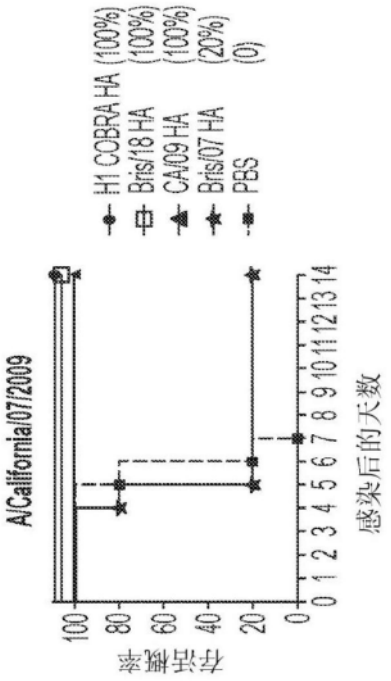

H1 COBRA HA (100%)
Brisi/18 HA (100%)
CA/09 HA (100%)
Brisi/07 HA (20%)
PBS (0)
A/California/07/2009
存活概率
感染后的天数

图18B

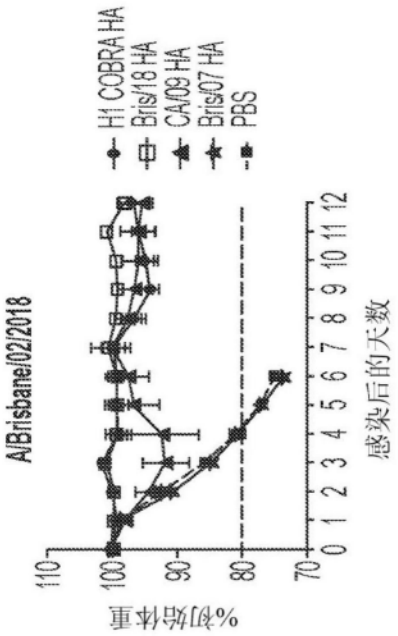

H1 COBRA HA
Bris/18 HA
CA/09 HA
Bris/07 HA
PBS
A/Brisbane/02/2018
%初始体重
感染后的天数

图18C

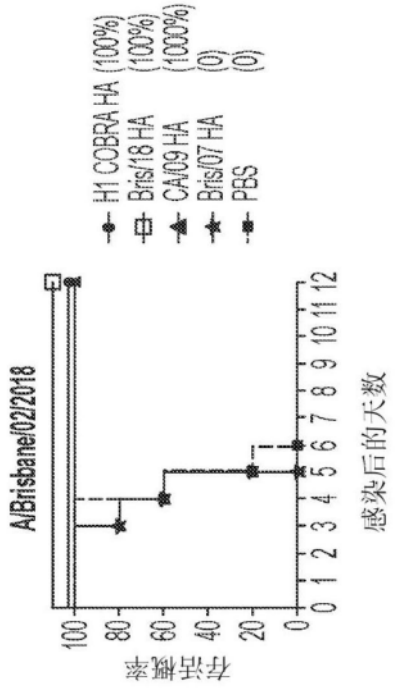

H1 COBRA HA (100%)
Bris/18 HA (100%)
CA/09 HA (100%)
Bris/07 HA (0)
PBS (0)
A/Brisbane/02/2018
存活概率
感染后的天数

图18D

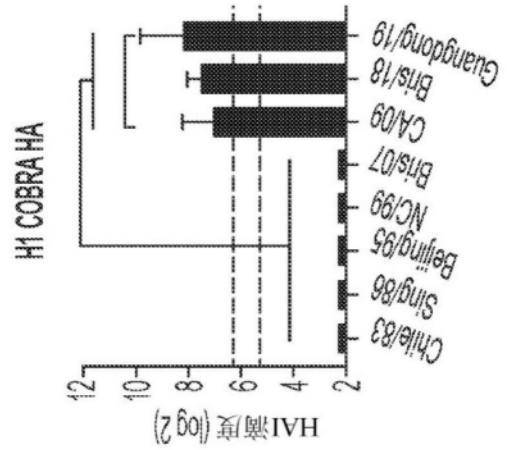


图19A

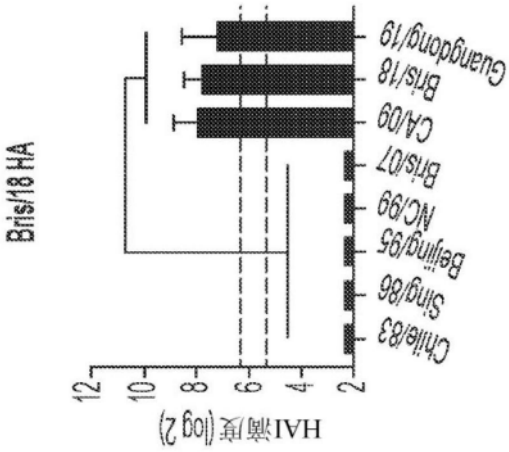


图19B

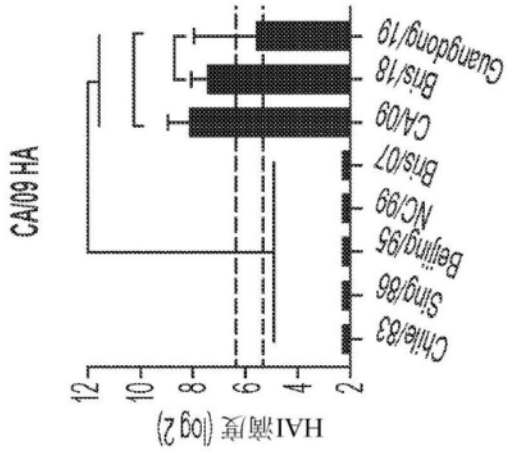


图19C

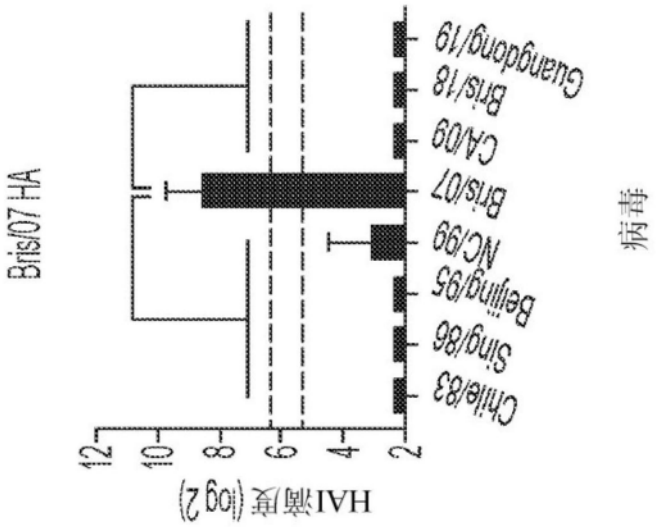

Bris/07 HA
HAI滴度 (log 2)
12
10
8
6
4
2
Chile/83
Sing/86
Beijing/95
NC/99
Bris/07
CA/09
Bris/18
Guangdong/19
病毒

图19D

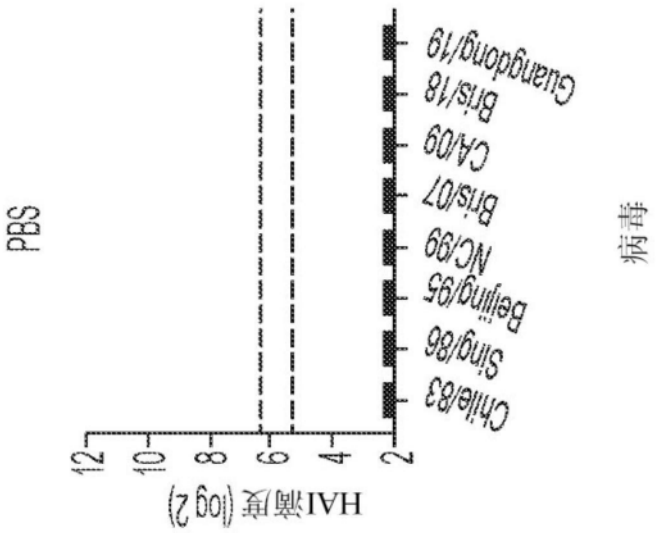

PBS
HAI滴度 (log 2)
12
10
8
6
4
2
Chile/83
Sing/86
Beijing/95
NC/99
Bris/07
CA/09
Bris/18
Guangdong/19
病毒

图19E

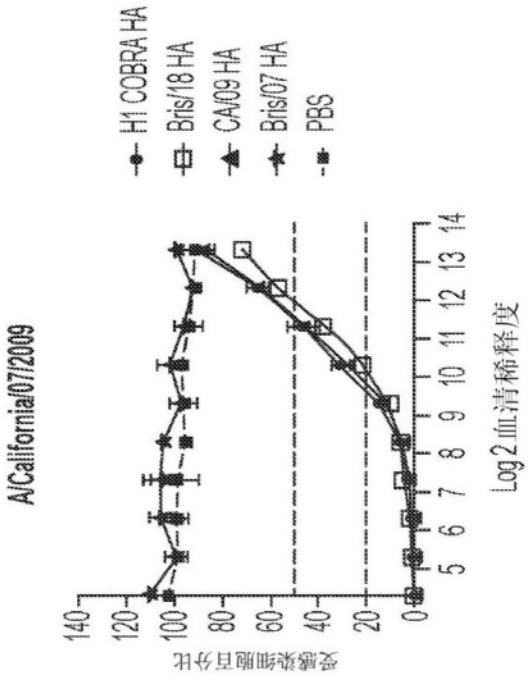

A/California/07/2009
H1 COBRA HA
Bris/18 HA
CA/09 HA
Bris/07 HA
PBS
受感染细胞百分比
Log 2 血清稀释度

图20A

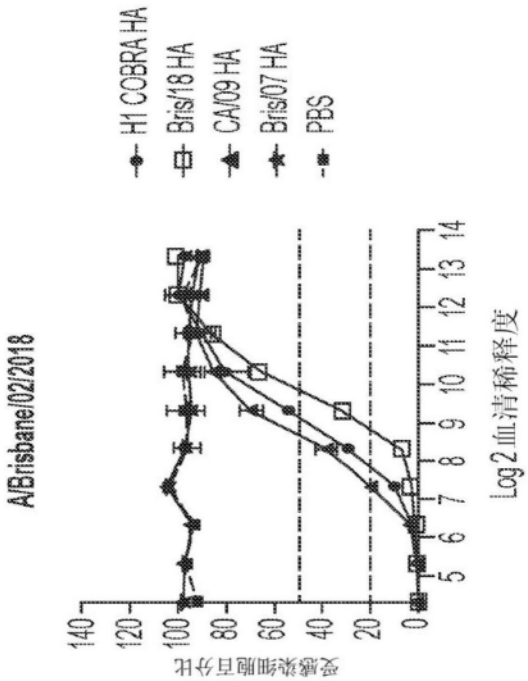

A/Brisbane/02/2018
H1 COBRA HA
Bris/18 HA
CA/09 HA
Bris/07 HA
PBS
受感染细胞百分比
Log 2 血清稀释度

图20B

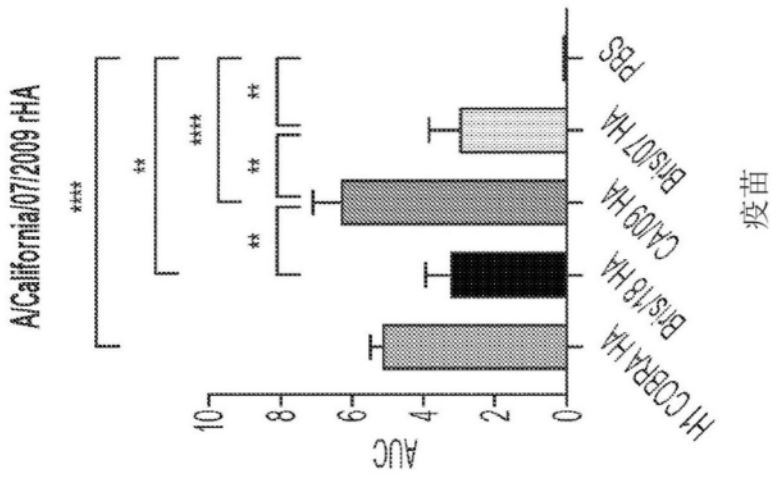


图21A

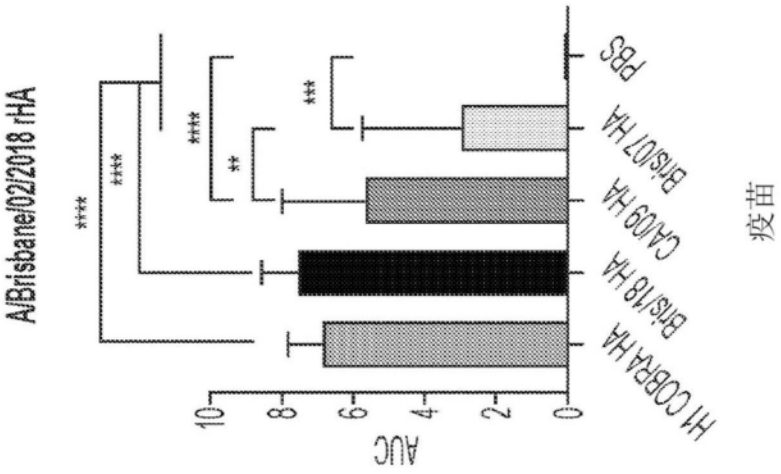


图21B

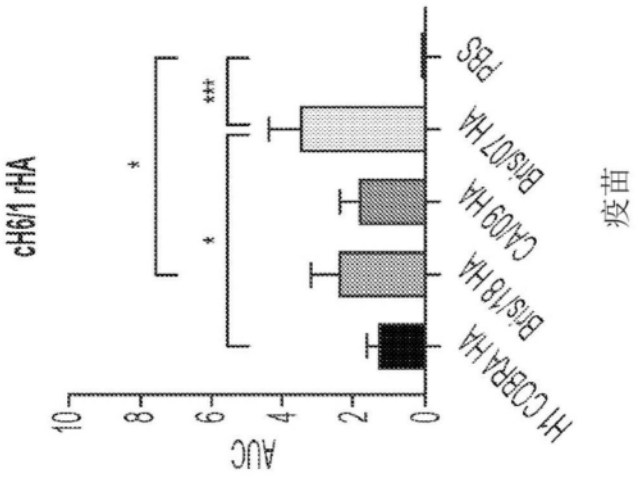


图21C

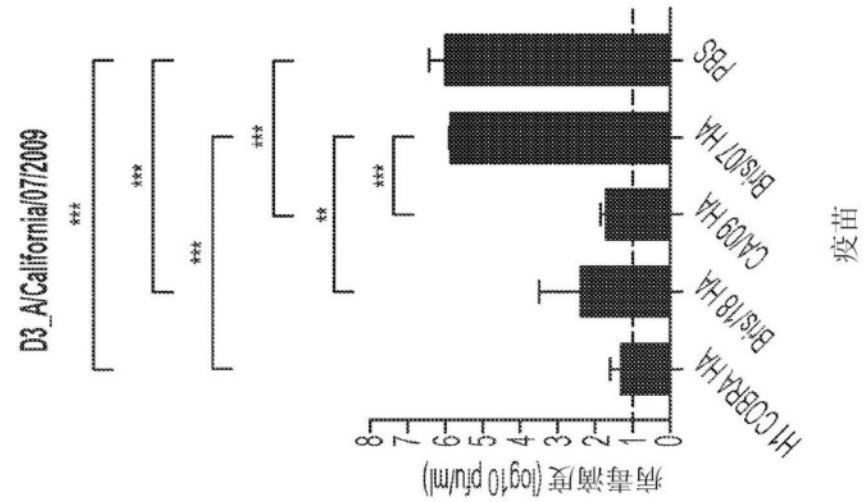

D3_A/California/07/2009
病毒滴度 (log10 pfu/ml)
疫苗
H1 COBRA HA
Bris/18 HA
CA/09 HA
Bris/07 HA
PBS

图22A

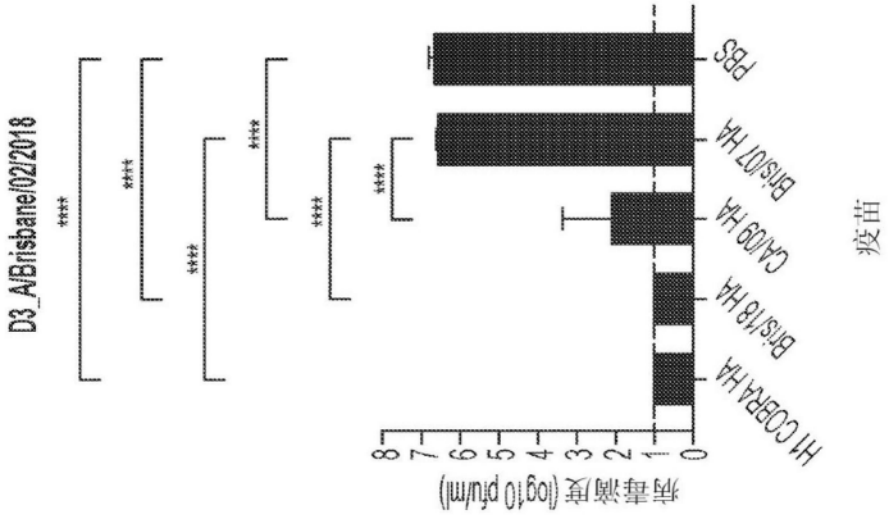

D3_A/Brisbane/02/2018
病毒滴度 (log10 pfu/ml)
疫苗
H1 COBRA HA
Bris/18 HA
CA/09 HA
Bris/07 HA
PBS

图22B