

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96140489

※ 申請日期： 96.10.26

※IPC 分類：C07K(4/11, 2006.01)

C12N(15/44, 2006.01)

A61K(39/145, 2006.01)

A61P(31/6, 2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新穎 H5 蛋白質、編碼彼等之核酸分子及載體及其醫藥用途

NOVEL H5 PROTEINS, NUCLEIC ACID MOLECULES AND
VECTORS ENCODING FOR THOSE, AND THEIR MEDICINAL USE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商百靈佳殷格翰家畜藥品公司

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

代表人：(中文/英文)

瑪拉 S 帕斯基

PERSKY, MARLA S.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國密蘇里州聖約瑟夫市北貝爾特高速公路2621號

2621 NORTH BELT HIGHWAY, ST. JOSEPH, MO 64506, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 艾瑞克 馬汀 瓦格恩
VAUGHN, ERIC MARTIN
2. 波里諾 卡勒斯 甘薩列-赫南德
GONZALEZ-HERNANDEZ, PAULINO CARLOS
3. 喬根 丹根
DAEMMGEN, JUERGEN

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 墨西哥 MEXICO
3. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年10月27日；60/863,142

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於新穎的血球凝集素H5蛋白、編碼彼等H5蛋白之核酸及載體，以及包含該等H5蛋白、編碼彼等H5蛋白之核酸或載體中之任一者的疫苗。此外，本發明亦係關於該等組合物中之任一者用於人類及動物之醫藥用途。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to novel hemagglutinin H5 proteins, nucleic acids and vectors encoding for those as well as vaccines comprising any of such H5 proteins, nucleic acids or vectors encoding for those H5 proteins. Moreover, the present invention also relates to the medicinal use of any of such compositions in humans and animals.

✓ 七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

● 八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於醫藥領域，較佳係關於傳染病領域。特定言之，本發明係關於流感蛋白；編碼彼等蛋白質之核酸分子及載體；及疫苗。更特定言之，本發明係關於該等蛋白質、核酸分子、載體或疫苗中之任一者用於治療及預防流感感染，進一步用於預防流感病毒之種內及種間傳染的用途。

【先前技術】

流感感染仍然為動物及人類之重要感染。流感係由經歷連續抗原性變異/修飾且佔據動物宿主的病毒引起。因此，未來可能發生新的流行病及廣泛性流行病，且難以實現該疾病之根除。流感病毒已熟知於此項技術且詳述於(例如)可供進一步參考之 *P. Palese, Nature Medicine* 第10卷，第12期，第S 82至S 86頁(2004年12月)中。簡而言之，流感A病毒之基因組係由八個單股區段組成，且病毒顆粒在其表面上具有兩種主要糖蛋白：血球凝集素(H)及神經胺糖酸苷酶(N)。在流感病毒之間因存在至少16種不同的血球凝集素(H1至H16)及9種不同的神經胺糖酸苷酶(N1至N9)亞型而存在大量的抗原性變異。

已證明H5N1型禽流感病毒之流感病毒可感染禽類、豬及人類。該等病毒亦可自禽類物種直接傳染給人類(*Claas* 等人，*Lancet* 1998, 351: 472; *Suarez* 等人，*J. Virol.* 1998, 72: 6678; *Subbarao* 等人，*Science* 1998, 279: 393;

Shortridge, Vaccine 1999, 17(增刊1): S26-S29)。已知人類臨床病例之死亡率接近約50%。

上一個世紀，豬一直為流感廣泛性流行病之重要媒介。豬、駱駝及海豹(以豬為較佳)可充當禽流感病毒之'混合室'且因此代表一種越過禽類(流感病毒之天然宿主)至哺乳動物之物種障礙之潛在風險因素。此通常發生為易感性動物(例如豬)為已確定哺乳動物(豬)流感病毒與禽流感病毒雙重感染。此雙重感染可形成可導致人類或豬廣泛性流行病的新重組病毒。然而，最近有跡象表明，當前禽類H5病毒株與哺乳動物流感病毒之重組不會形成強毒性重組體。另一方面，禽流感病毒可感染豬且藉由自發突變而變得順應於豬。一旦病毒在豬(或其他哺乳動物)群體內引起橫向感染，則將越過臨界障礙。

然而，東南亞豬大部分已經來源於鄰近家禽飼養業之禽(H5)流感病毒株感染。由於彼等感染迄今為止尚為亞臨床性，因此其僅可藉由實驗室方法診斷而由此常常被忽視。存在以下高風險：彼等受亞臨床性感染之豬為病毒順應於哺乳動物系統、在豬群體內傳播以及感染人類提供了機會。

當前流感疫苗包括次單位疫苗(*Babai*等人，*Vaccine 1999, 17(9-10):1223-1238*; *Crawford*等人，*Vaccine 1999, 17(18):2265-2274*; *Johansson*等人，*Vaccine 1999, 17(15-16):2073-2080*)、減毒疫苗(*Horimoto*等人，*Vaccine 2004, 22(17-18):2244-2247*)、DNA疫苗(*Watabe*等人，*Vaccine*

2001, 19(31):4434-4444)及滅活流感疫苗(Cao等人, *Vaccine* 1992, 10(4):238-242), 其中滅活流感疫苗以商業規模最廣泛使用(Lipatov等人, *J Virol* 2004, 78(17):8951-8959)。

次單位疫苗、重組性血球凝集素及神經胺糖酸苷酶(Babai等人, *Vaccine* 1999, 17(9-10):1223-1238; Crawford等人, *Vaccine* 1999, 17(18):2265-2274; Johansson等人, *Vaccine* 1999, 17(15-16):2073-2080)可為頗受關注的滅活疫苗替代物, 儘管目前尚未作為商用疫苗投入使用。該等疫苗之製備顯然比滅活疫苗安全。此外, 次單位疫苗並不對內部流感病毒蛋白產生抗體反應且從而使經接種之動物與已感染動物之間有區別。(Crawford等人, *Vaccine* 1999, 17(18):2265-2274)。

血球凝集素蛋白為流感病毒之受體結合及膜融合糖蛋白以及用於感染性中和抗體之標靶。H5N1之完整血球凝集素蛋白(HA)係由568個胺基酸組成, 分子量為56 kDa。HA分子係由HA1及HA2次單位組成, HA1次單位介導與細胞膜之初始接觸而HA2負責膜融合(Chizmadzhev, *Bioelectrochemistry* 2004, 63(1-2):129-136)。

桿狀病毒/昆蟲細胞系統已用於表現自禽流感亞型分離之血球凝集素基因(Babai等人, *Vaccine* 1999, 17(9-10):1223-1238; Crawford等人, *Vaccine* 1999, 17(18):2265-2274; Johansson等人, *Vaccine* 1999, 17(15-16):2073-2080); New等人, *BMC Microbiology* 2006,

6(16):doi:10.1186/1471-2180-6-16)。然而，彼等重組蛋白在某些情況下似乎不具有保護性，或者僅在最低程度上對某些物種具有較低有效性(Treanor等人，Vaccine 2001, 19: 1732-1737)。

因此，需要增強經改良之疫苗及新疫苗接種方法之可用性以提供控制流感感染的更佳方法及對疾病負荷產生正面影響。

【發明內容】

在本發明之實施例之前，應瞭解，如本文中及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式"一"及"該"包括複數提及物，除非上下文另有明確說明。因此，舉例而言，提及"一種製劑"包括複數種該等製劑；提及該"載劑"係指熟習此項技術者已知之一或多種載劑及其均等物，諸如此類。除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語具有的含義與普通熟習本發明所屬技術者通常所瞭解之含義相同。除非另外指明或熟習此項技術者另外得知，否則所有給定範圍及值可變化1至5%，因此術語"約"在本說明書中省去。儘管可在本發明之實施或測試中使用與本文中所述之彼等方法及物質相似或相當的任何方法及物質，但較佳之方法、裝置及物質現加以描述。為描述並揭示可配合本發明使用之如公開案中所報導之物質、賦形劑、載劑及方法之目的，本文中所提及之所有公開案以引用的方式併入本文中。不應認為本文中認可本發明無權優先於先前發明之此類揭示案。

藉由本說明及申請專利範圍中之特徵性實施例獲得上述技術問題之解決方法。

流感蛋白及編碼彼等蛋白質之核酸分子

本發明係關於流感病毒之H5蛋白，其中該H5蛋白具有胺基酸223N及修飾體328K+，其中H5蛋白之胺基酸位置編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)。較佳地，本發明之該H5蛋白及其他任何H5蛋白為經分離之H5蛋白。已驚人地發現，與在位置223及328/329上不具有相應胺基酸的H5蛋白相比，具有上述修飾體之H5蛋白具有更高的抗原性。

如本文中所使用之術語"血球凝集素5(H5)"或"禽流感病毒之H5"或"H5蛋白"意謂(但不限於)任何天然存在之H5蛋白及H5蛋白之任何經修飾形式(包括H5蛋白之任何缺失、取代及/或插入突變體)，其中彼等H5蛋白具有胺基酸223N及修飾體328K+。

如本文中所使用之H5蛋白之胺基酸位置之編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置。SEQ ID NO:1代表病毒株鴨/China/E319-2/03之血球凝集素之胺基序列(但缺少胺基末端信號肽)。換而言之，若提及位置223上之胺基酸(胺基酸223)，則意謂與SEQ ID NO:1中之胺基酸223對應的胺基酸殘基。然而，此並非意謂本發明之H5蛋白具有與SEQ ID NO:1一致的胺基酸序列。其僅意謂本發明之H5蛋白之對應胺基酸編碼所明確提及之胺基酸殘

基。在此情況下，胺基酸223為絲胺酸(S)。術語"223N"或"155N"分別例示性意謂，處於位置223及155(根據SEQ ID NO:1之胺基酸位置編號)上之胺基酸可編碼胺基酸天冬醯胺酸(N)。換而言之，若提及"具有胺基酸223N之H5蛋白"，則H5胺基酸分子通常在胺基酸位置223(根據SEQ ID NO:1之胺基酸位置編號)上編碼的胺基酸絲胺酸可經天冬醯胺酸(N)取代。術語"328K+"或"修飾體328K+"意謂，在H5蛋白之胺基酸位置328(根據SEQ ID NO:1之胺基酸位置編號)上插入第二離胺酸(K+)。在位置328及329上天然編碼離胺酸-離胺酸之胺基酸序列之情況下，未插入其他離胺酸(K)。然而，大多數已知H5序列在胺基酸位置328及329上編碼離胺酸-精胺酸。在該等任何情況下，術語328K+修飾體意謂，第二離胺酸(K)應插入位置328上之離胺酸與位置329上之精胺酸之間。於是經修飾之序列應讀成離胺酸-離胺酸-精胺酸(KKR)。

因此，本發明係關於H5蛋白及H5蛋白之任何經修飾形式(包括H5蛋白之任何缺失、取代及/或插入突變體)，其中彼等H5蛋白具有胺基酸223N及修飾體328K+，其中H5蛋白之胺基酸位置編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)。不言而喻，如本文中所提供之任一種H5蛋白具有抗原性，此意謂其在對流感病毒之標準血球凝集素抑制檢定中展示抗原特性。

根據另一實施例，本發明亦係關於H5蛋白之任何部分，

此部分意謂在標準血球凝集素抑制檢定中展示抗原特性，至少具有胺基酸223N及修飾體328K+的任何肽片段，其中H5蛋白之胺基酸位置之編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)。

若H5蛋白在標準血球凝集素抑制檢定(例如，如實例2中所述)中抑制血球凝集，則其展示抗原特性。H5蛋白之該抗原部分通常包含編碼如上所述之經修飾或未經修飾，在如實例2中所述之標準血球凝集素抑制檢定中展示抗原特性之H5蛋白的胺基酸序列中之200、180、160、150、140、130、120、110或最佳105個毗鄰胺基酸。標準血球凝集素抑制檢定例如亦描述於可供進一步參考之Stephenson等人，Virus Research，第103卷，第91-95頁(2004)中。然而，應瞭解，如實例2中所述之HI檢定為配合本文中所述之本發明之所有態樣的相關參考檢定：

簡而言之，進行HI檢定以偵測HA特異性抗體之存在。異源H5N2病毒(A/雞/Mexico/232/94)係以四個血球凝集單位[4 HA單位]之濃度用於HI檢定中。隨後在U形底微量滴定板中，將PBS中之連續兩倍血清稀釋液與等體積(25 μ L)(含有4 HA單位)之病毒混合，且在室溫(約25 $^{\circ}$ C)下培育30分鐘。將PBS中之濃度為0.5%之雞紅血球添加至含有血清-病毒之孔中且在室溫下培育40分鐘。以觀測到血球凝集抑制的最高血清稀釋度之倒數確定HI效價。

值得注意的是，*Haesebrouck*及*Pensaert*(1986)發現"針對

激發病毒之HI效價與防禦激發之保護之間可能存在關聯"。Haesebrouck及Pensaert(1986)亦測定，HI效價>40的豬"完全抵抗激發且在受激發下呼吸道中不發生病毒複製"。因此，在經疫苗接種之豬中形成>40之HI效價將與保護作用有關。(F. Haesebrouck及M.B. Pensaert, 1986)。預先用滅活流感H1N1疫苗免疫之肥育豬之氣管內激發的效應(Veterinary Microbiology, 11 (1986) 239-249)。須假設等值或至少差不多等值的H5 HI效價亦將對豬產生防禦禽流感病毒的完全免疫保護。較低效價至少引起經接種之動物之血清轉化且產生對彼等動物之部分免疫保護，此亦可大大降低廣泛性流行病之風險。

此外，本發明之H5蛋白之抗原部分包括(但不限於)H5蛋白之缺失突變體，其包含：

- i. 圍繞且包括胺基酸223N之胺基酸序列中之至少35、30、25、20、18、15、13、10、9或最佳8個毗鄰胺基酸；及
- ii. 圍繞且包括胺基酸修飾體328K+之胺基酸序列中之至少35、30、25、20、18、15、13、10、9或最佳8個毗鄰胺基酸；且
- iii. 其中H5蛋白之該抗原部分中之任一者可在如實例2中所述之標準血球凝集素抑制檢定中展示血球凝集素抑制。

較佳地，圍繞胺基酸223N及/或328K+之彼等胺基酸係由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:4編碼。

此外，本發明之較佳H5蛋白為：

- i. 上述具有胺基酸 223N 及修飾體 328K+ 的彼等 H5 蛋白中之任一者；
- ii. 上述具有胺基酸 94N/223N 及修飾體 328K+ 的彼等 H5 蛋白中之任一者；
- iii. 具有胺基酸 223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源 H5 蛋白，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或
- iv. 具有胺基酸 94N/223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源 H5 蛋白，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或
- v. 具有胺基酸 155N/223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源 H5 蛋白，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或
- vi. 具有胺基酸 120N/155N/223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源 H5 蛋白，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或
- vii. 具有修飾體 94N/223N 及修飾體 328K+ 的任何 H5 蛋白；或
- viii. 具有修飾體 94N/155N/223N 及修飾體 328K+ 的任何 H5 蛋白；或；
- ix. 具有修飾體 94N/120N/155N/223N 及修飾體 328K+ 的任何 H5 蛋白；或
- x. 具有修飾體 223N、修飾體 328K+ 及選自由以下各者組

成之群的以下胺基酸團中之一或多者的任何H5蛋白：

- a. aa 93-95: GNF
- b. aa 123-125: SDH
- c. aa 128-130: SSG
- d. aa 138-140: GSS
- e. aa 226-228: MDF
- f. aa 270-272: EVE
- g. aa 309-311: NKL；或

xi. 具有胺基酸223N及修飾體328K+及選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者的任何H5蛋白：

- a. aa 93-95: GNF
- b. aa 128-130: SSG
- c. aa 138-140: GSS；或

xii. 具有SEQ ID NO:4之胺基酸序列的任何H5蛋白。

此外，如本文中所提供之較佳H5蛋白包括以下文獻所述之H5蛋白：*Hoffmann*等人，*PNAS*，第106卷，第36期，第12915-12920頁(2005年9月6日)，其中彼等H5蛋白包括如上所述之修飾體中之一或多者，至少包括胺基酸223N及修飾體328K+，其中H5蛋白之胺基酸位置之編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)。該參考文獻之揭示內容將以引用方式全文併入本文中。

此外，如本文中所提供之較佳H5蛋白包括包含含有胺基

酸 223N 及修飾體 328K+ 之肽的 H5 蛋白，其中 H5 蛋白之胺基酸位置之編號係指如 SEQ ID NO:1 中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體 328K+ 意謂在 H5 蛋白之胺基酸位置 328 上插入第二離胺酸 (K+)，及：

- i. SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或
- ii. 具有與 i) 之多肽之至少 85% 序列同源性、更佳至少約 90% 序列同源性、甚至更佳至少約 95% 序列同源性、甚至更佳至少約 97% 序列同源性、甚至更佳至少約 98% 序列同源性且甚至更佳至少約 99% 序列同源性並在如上所述之標準血球凝集素抑制檢定中展示血球凝集素抑制的任何肽；或
- iii. i) 或 ii) 之多肽之任何抗原部分，其包含 i) 或 ii) 之肽中之任一者的至少 35、30、25、20、18、15、13、10、9 或最佳 8 個毗鄰胺基酸。
- iv. i)、ii) 或 iii) 之任何肽，其具有胺基酸 36T、36K、83A、83T、83D、86A、86V、120N、120S、155N、155S、156A、156T、189R、189K、212K、212R、212E、223N、223N 或 120N/155N。
- v. i)、ii)、iii) 或 iv) 之任何肽，其具有選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者：
 - a. aa 93-95: GNF
 - b. aa 123-125: SDH
 - c. aa 128-130: SSG

- d. aa 138-140: GSS
- e. aa 226-228: MDF
- f. aa 270-272: EVE
- g. aa 309-311: NKL ; 或

vi. i)、ii)、iii)或iv)之任何肽，其具有選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者：

- a. aa 93-95: GNF
- b. aa 128-130: SSG
- c. aa 138-140: GSS。

如本文中所使用之"序列同源性"係指測定兩個序列之相關性的方法。為測定序列同源性，將兩個或兩個以上的序列最佳對齊，且必要時引入空位(gap)。與序列一致性形成對比，在測定序列同源性時，保守性胺基酸取代視為匹配。換而言之，為獲得具有與參考序列之95%序列同源性的多肽或多核苷酸，參考序列中85%、較佳90%、甚至更佳95%之胺基酸殘基或核苷酸必須與其他胺基酸或核苷酸匹配或包含其他胺基酸或核苷酸之保守性取代，或者可將參考序列中全部胺基酸殘基或核苷酸(不包括保守性取代)之至多15%、較佳至多10%、甚至更佳至多5%量的胺基酸或核苷酸插入參考序列中。較佳地，同源序列包含至少一段50個核苷酸、甚至更佳100個核苷酸、甚至更佳250個核苷酸、甚至更佳500個核苷酸。此對齊後，逐位確定序列同源性，例如，若核苷酸或胺基酸殘基在特定位置處一致，則序列在彼位置上"同源"。接著將該等位置一致之總

數除以參考序列中核苷酸或胺基酸殘基之總數以得到序列同源性%。序列同源性可容易地藉由已知方法計算，該等方法包括(但不限於)以下文獻中所述之彼等方法：Computational Molecular Biology, Lesk, A. N.編，Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編，Academic Press, New York (1993)；Computer Analysis of Sequence Data，第I部分，Griffin, A.M.，及Griffin, H. G. 編，Humana Press, New Jersey (1994)；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987)；Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及 Devereux, J.編，M. Stockton Press, New York (1991)；及 Carillo, H.及Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)，該等文獻之教示內容以引用方式併入本文中。設計序列同源性之較佳測定方法以使所測試之序列之間達成最大匹配。序列同源性測定方法可編程為可公開獲得之測定指定序列之間的序列一致性的電腦程式。該等程式之實例包括(但不限於)GCG程式套件(Devereux, J.等人，Nucleic Acids Research, 12 (1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN及FASTA(Altschul, S. F.等人，J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990))。BLASTX程式可公開獲自NCBI及其他來源(BLAST Manual, Altschul, S.等人，NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F.等人，J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)，該等文獻之教示內容以引用方式併入

本文中)。該等程式利用預設空位權重使序列最佳對齊，以使指定序列與參考序列之間達成最高水準的序列同源性。

此外，較佳之H5蛋白包括包含如上所述之328K+修飾體及表1中所提供之胺基酸序列的H5蛋白或其任何免疫原部分：

表1：H5抗原

序列名稱	基本序列	胺基酸位置 [#]									
		36	83	86	120	155	156	189	212	223	263
223N/328K+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-
36T/223N/328K+	任何 HA H5	T	-	-	-	-	-	-	-	N	-
36K/223N/328k+	任何 HA H5	K	-	-	-	-	-	-	-	N	-
83A/223N/328k+	任何 HA H5	-	A	-	-	-	-	-	-	N	-
83T/223N/328k+	任何 HA H5	-	T	-	-	-	-	-	-	N	-
83D/223N/328k+	任何 HA H5	-	D	-	-	-	-	-	-	N	-
86A/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	A	-	-	-	-	-	N	-
86V/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	V	-	-	-	-	-	N	-
120N/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	N	-	-	-	-	N	-
120S/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	S	-	-	-	-	N	-
155N/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	N	-	-	-	N	-
155S/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	S	-	-	-	N	-
156A/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	A	-	-	N	-
156T/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	T	-	-	N	-
189R/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-
189K/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	K	-	N	-
212K/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	K	N	-
212R/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	R	N	-
212E/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	E	N	-
223N/263A/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	A
223N/263T/328k+	任何 HA H5	-	-	-	-	-	-	-	-	N	T
120N/155N/223N/328k+	任何 HA H5	-	-	-	N	N	-	-	-	N	-
A/鴨/China/E319-2/03/328k+	AAR99628	T	A	A	S	D	A	R	K	N	A
A/鴨/China/E319-2/03_223N/328k+	AAR99628	T	A	A	S	D	A	R	K	N	A
A/鴨/China/E319-2/03_120N/223N/328k+	AAR99628	T	A	A	N	D	A	R	K	N	A
A/鴨/China/E319-2/03_155N/223N/328k+	AAR99628	T	A	A	S	N	A	R	K	N	A
A/鴨/China/E319-2/03_120N/155N/223N/328k+	AAR99628	T	A	A	S	N	N	R	K	N	A
HA/HK/213/03/328k+	AY518362	T	A	A	N	N	A	R	K	N	A
HA/Vietnam/1203/04		K	T	V	S	S	T	K	R	N	T

HA/Vietnam/1203/04_223N/328k+		K	T	V	S	S	T	K	R	N	T
HA//Vietnam/3046/04_223N/328k+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/Vietnam/3062/04_223N/328k+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/雞/Vietnam/39/04_223N/328k+		T	A	V	S	S	T	K	R	N	T
HA/隼/HK-D0028/04_223N/328k+		T	A	A	S	S	A	K	E	N	A
HA/鴨/Singapore/3/97_223N/328k+		T	D	V	S	N	A	K	E	N	A
HA/HK/156/97/328k+		T	A	A	S	S	A	K	E	N	T

表1中所指定之胺基酸位置係指SEQ ID NO:1中所例示性指定之位置。換而言之，表1中之胺基酸223係指SEQ ID NO:1序列中之胺基酸223。

- 意謂此位置上之胺基酸與參考序列相比可變。

此外，本發明亦係關於至少具有胺基酸223N及修飾體328K+的H5蛋白，其中H5蛋白之胺基酸位置之編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)，且包含：

i. 具有以下NCBI寄存編號之序列的肽：AAT65209、CAJ32556、ABC47656、CAF21874、CAF21870、AAC58998、AAC58997、AAC58996、AAC58994、AAC58993、AAC58992、AAC58991、AAC58990、AAC58995、AAS45134、AAN17270、AAN17269、AAN17268、AAN17267、AAN17266、AAN17265、AAN17264、AAN17263、AAN17262、AAN17261、AAN17260、AAN17259、AAN17257、AAN17256、

AAN17255 、 AAN17254 、 AAA43083 、 AAA43082 、
AAB19079 、 BAE48696 、 BAE48693 、 BAE48696 、
BAE48695 、 BAE48694 、 BAE48692 、 BAE48691 、
BAE48690 、 BAE48689 、 BAE48688 、 BAE48687 、
BAE48686 、 BAE48685 、 BAE48684 、 BAE48683 、
AAC58999 、 ABC72082 、 AAV91149 、 AAP71993 、
AAP71992 、 AAP71991 、 AAP71990 、 AAP71989 、
AAP72011 、 AAP72010 、 AAP72009 、 AAP72008 、
AAP72007 、 AAP72006 、 AAP72005 、 AAP72004 、
AAP72003 、 AAP72002 、 AAP72001 、 AAP72000 、
AAP71999 、 AAP71998 、 AAP71997 、 AAP71996 、
AAP71995 、 AAP71994 、 AAF99718 、 ABF58847 、
AAG38534 、 AAC32102 、 AAC32099 、 AAL75847 、
AAC32101 、 AAC32098 、 AAC32088 、 AAC32078 、
AAR99628 、 AAC32100 、 AAM49555 、 AAL75843 、
AAL75839 、 AAD13573 、 AAD13568 、 AAF04720 、
AAF04719 、 AAC34263 、 AAR16155 、 AAD13574 、
AAD13570 、 AAD13575 、 AAD13572 、 AAD13569 、
AAD13567 、 AAD13566 、 AAK57506 、 AAG01225 、
AAG01215 、 AAG01205 、 AAG01195 或 ABD83813 ， 該
等序列可以上述方式修飾，此意謂彼等序列包括上述
不為野生型序列之部分的修飾體 223N 及 328K+ ； 或

- ii. 具有與 i) 之多肽之至少 85% 序列同源性、更佳至少約
90% 序列同源性、甚至更佳至少約 95% 序列同源性、

甚至更佳至少約97%序列同源性、甚至更佳至少約98%序列同源性且甚至更佳至少約99%序列同源性且在如上所述之標準血球凝集素抑制檢定中展示血球凝集素抑制的任何肽；

iii. i)或ii)之肽中之任一者，其具有胺基酸36T、36K、83A、83T、83D、86A、86V、120N、120S、155N、155S、156A、156T、189R、189K、212K、212R、212E、263A、263T或120N/155N；或

iv. i)、ii)或iii)之該等肽中之任一者，其具有選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者：

- a. aa 93-95: GNF
- b. aa 123-125: SDH
- c. aa 128-130: SSG
- d. aa 138-140: GSS
- e. aa 226-228: MDF
- f. aa 270-272: EVE
- g. aa 309-311: NKL；或

v. i)、ii)、iii)或iv)之任何肽，其具有選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者：

- a. aa 93-95: GNF
- b. aa 128-130: SSG
- c. aa 138-140: GSS。

根據另一實施例，本發明亦係關於編碼上述H5蛋白中之任一者的核酸分子。較佳地，彼等核酸分子為RNA、DNA

或複本(c)DNA分子。因此，本發明係關於核酸分子，較佳編碼H5蛋白及H5蛋白之任何修飾形式(包括H5蛋白之任何缺失、取代及/或插入突變體)的cDNA分子，其中彼等H5蛋白具有胺基酸223N及修飾體328K+，其中H5蛋白之胺基酸位置編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)。

根據另一實施例，本發明亦係關於核酸分子，較佳編碼H5蛋白之任何部分的cDNA分子，其意謂編碼在上述標準血球凝集素抑制檢定中展示抗原特性且至少具有胺基酸223N及修飾體328K+之任何肽片段的cDNA分子，其中H5蛋白之胺基酸位置之編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)。通常，編碼H5蛋白之抗原部分的該等核酸分子包含編碼上述經修飾或未經修飾且在如本文中所述之標準血球凝集素抑制檢定中展示抗原特性之H5蛋白的核苷酸序列中之600、540、480、450、420、390、360、330或最佳315個毗鄰核苷酸。

H5蛋白之抗原部分之其他實施例在上文中加以描述。建構任何該等核酸分子(較佳編碼上述H5蛋白之抗原部分的cDNA分子)已為熟習此項技術者所共知。此亦包括(但不限於)建構編碼上述H5蛋白之抗原部分(包括H5蛋白之缺失突變體)的核酸分子(較佳cDNA分子)，其包含：

i. 圍繞且包括編碼胺基酸223N之編碼序列的核苷酸序列

中之至少 105、90、75、60、48、45、39、30、27 或最佳 24 個毗鄰胺基核苷酸；及

ii. 圍繞且包括編碼修飾體 328K+ 之編碼序列的核苷酸序列中之至少 105、90、75、60、48、45、39、30、27 或最佳 24 個毗鄰胺基核苷酸；且

iii. 其中 H5 蛋白之該抗原部分中之任一者在如實例 2 中所述之標準血球凝集素抑制檢定中展示血球凝集素抑制。

較佳地，圍繞編碼胺基酸 223N 及 / 或 328K+ 之核苷酸的彼等核苷酸編碼 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4。

此外，本發明之編碼 H5 蛋白之較佳核酸分子為：

i. 上述編碼胺基酸 223N 及修飾體 328K+ 的彼等核酸分子中之任一者；

ii. 上述編碼胺基酸 94N/223N 及修飾體 328K+ 的彼等核酸分子中之任一者；

iii. 編碼胺基酸 223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源核酸分子，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或

iv. 編碼胺基酸 94N/223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源核酸分子，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或

v. 編碼胺基酸 155N/223N 及修飾體 328K+ 的任何禽源核酸分子，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或

- vi. 編碼具有胺基酸 120N/155N/223N 及修飾體 328K+ 之禽源 H5 蛋白的任何核酸分子，其中禽源意謂 H5 序列來源於最初自感染上 5 型禽流感病毒之禽類分離的病毒分離株；或
- vii. 編碼具有修飾體 94N/223N 及修飾體 328K+ 之 H5 蛋白的任何核酸分子；或
- viii. 編碼具有修飾體 94N/155N/223N 及修飾體 328K+ 之 H5 蛋白的任何核酸分子；或
- ix. 編碼具有修飾體 94N/120N/155N/223N 及修飾體 328K+ 之 H5 蛋白的任何核酸分子；或
- x. 編碼具有修飾體 223N、修飾體 328K+ 及選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者之 H5 蛋白的任何核酸分子：
- a. aa 93-95: GNF
 - b. aa 123-125: SDH
 - c. aa 128-130: SSG
 - d. aa 138-140: GSS
 - e. aa 226-228: MDF
 - f. aa 270-272: EVE
 - g. aa 309-311: NKL；或
- xi. 編碼具有胺基酸 223N、修飾體 328K+ 及選自由以下各者組成之群的以下胺基酸團中之一或多者之 H5 蛋白的任何核酸分子：
- a. aa 93-95: GNF

b. aa 128-130: SSG

c. aa 138-140: GSS ; 或

xii. 編碼具有 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列之 H5 蛋白的任何核酸分子。

此外，如本文中提供之較佳 H5 蛋白包括以下文獻所述之 H5 蛋白：*Hoffmann* 等人，*PNAS*，第 106 卷，第 36 期，第 12915-12920 頁 (2005 年 9 月 6 日)，其中彼等 H5 蛋白包括如上所述之修飾體中之一或多者，至少包括胺基酸 223N 及修飾體 328K+，其中 H5 蛋白之胺基酸位置之編號係指如 SEQ ID NO:1 中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體 328K+ 意謂在 H5 蛋白之胺基酸位置 328 上插入第二離胺酸 (K+)。此參考文獻之揭示內容將以引用方式全文併入本文中。因此，根據另一實施例，本發明亦係關於任何核酸分子，較佳編碼以下文獻所述之該等蛋白質中之任一者的 cDNA 分子：*Hoffmann* 等人，*PNAS*，第 106 卷，第 36 期，第 12915-12920 頁 (2005 年 9 月 6 日)，其中彼等 H5 蛋白包括上述修飾體中之一或多者，至少包括胺基酸 223N 及修飾體 328K+，其中 H5 蛋白之胺基酸位置之編號係指如 SEQ ID NO:1 中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體 328K+ 意謂在 H5 蛋白之胺基酸位置 328 上插入第二離胺酸 (K+)。

將上述任何修飾體引入核苷酸序列 (包括流感病毒之 H5 蛋白之編碼序列) 內的方法已熟知於此項技術。完整流感病毒之基因組序列可根據本發明加以修飾，例如根據可供進一步參考之 US 6,951,754 中所述之方法加以修飾。

此外，可利用此項技術技能範圍內之習知分子生物學、微生物學及重組DNA技術修飾編碼本文中所述之抗原的核酸序列。該等技術已詳釋於文獻中。參見例如 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第二版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*，第I及II卷 (D. N. Glover 編，1985)；*Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait 編，1984)；*Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames & S. J. Higgins 編 (1985)]；*Transcription And Translation* [B. D. Hames & S. J. Higgins 編 (1984)]；*Animal Cell Culture* [R. I. Freshney 編 (1986)]；*Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]；B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984)；F. M. Ausubel 等人 編，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. 1994)。

根據另一實施例，本發明亦係關於包含上述該等核酸分子中之任一者的載體。換而言之，本發明係關於包括上述任何該H5蛋白或其部分之編碼序列的載體。較佳地，該載體為使上述任何該H5蛋白或其部分得到表現的表現載體。本發明之載體為適於在活體外或活體內轉染或感染細菌、酵母或動物細胞的彼等載體。

載體及用於製備及/或使用表現載體(或重組體)的方法可依據或類似於以下文獻中所揭示之與DNA表現載體相關之方法：美國專利第4,603,112號、第4,769,330號、第

5,174,993 號、第 5,505,941 號、第 5,338,683 號、第 5,494,807 號、第 4,722,848 號、第 5,942,235 號、第 5,364,773 號、第 5,762,938 號、第 5,770,212 號、第 5,942,235 號、第 382,425 號；PCT 公開案 WO 94/16716、WO 96/39491、WO 95/30018；Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," PNAS USA 93: 11349-11353, 1996 年 10 月；Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, 1996 年 10 月；Smith 等人，美國專利第 4,745,051 號(重組性桿狀病毒)；Richardson, C.D.(編者)，Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols"(1995 Humana Press Inc.)；Smith 等人，"Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, 1983 年 12 月，第 3 卷，第 12 期，第 2156-2165 頁；Pennock 等人，"Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector," Molecular and Cellular Biology, 1984 年 3 月，第 4 卷，第 3 期，第 399-406 頁；EPA0 370 573；美國申請案第 920,197 號(1986 年 10 月 16 日申請)；EP 專利公開案第 265785 號；美國專利第 4,769,331 號(重組性疱疹病毒)；Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA

93:11307-11312, 1996年10月 ; Andreansky 等人 , "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, 1996年10月 ; Robertson 等人 , "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, 1996年10月 ; Frolov 等人 , "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, 1996年10月 ; Kitson 等人 , J. Virol. 65,3068-3075,1991 ; 美國專利第5,591,439號、第5,552,143號、WO 98/00166 ; 已受理之美國申請案第08/675,556號、第08/675,566號(兩者均於1996年7月3日申請)(重組性腺病毒) ; Grunhaus 等人 , 1992, "Adenovirus as cloning vectors," Seminars in Virology(第3卷) , 第237-52頁, 1993 ; Ballay 等人 , EMBO Journal , 第4卷 , 第3861-65頁 ; Graham, Tibtech 8,85-87, 1990年4月 ; Prevec 等人 , J. Gen Virol. 70,42434 ; PCT WO 91/11525 ; Felgner 等人 , (1994), J. Biol. Chem. 269,2550-2561, Science, 259: 1745-49,1993及 McClements 等人 , "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", PNAS USA 93: 11414-11420, 1996年10月 ; 及美國專利第5,591,639號、第5,589,466號及第5,580,859號 ; 以及 WO 90/11092 、 WO93/19183 、

WO94/21797、WO95/11307、WO95/20660；Tang 等人，Nature；及Furth等人，Analytical Biochemistry等。亦可參見 WO 98/33510；Ju 等人，Diabetologia, 41: 736-739,1998(豆狀病毒表現系統)；Sanford等人，美國專利第4,945,050號；Fischbach等人(Intracel)，WO 90/01543；Robinson等人，seminars in Immunology第9卷，第271-283頁(1997)(DNA載體系統)；Szoka等人，美國專利第號(將DNA插入活細胞內之方法)；McCormick等人，美國專利第5,677,178號(細胞病病毒之使用)；及美國專利第5,928,913號(用於基因傳遞之載體)以及本文中所引用之其他文件。

最好使用例如選自豬疱疹病毒(諸如Aujeszky氏疾病病毒)、豬腺病毒、痘病毒(尤其牛痘病毒、禽痘病毒、金絲雀痘病毒及豬痘病毒)之病毒載體以及DNA載體(DNA質體)來實施本發明。

本發明之H5蛋白之製備方法

根據另一態樣，本發明提供如下製備及/或回收高量重組性H5蛋白之方法：i)使培養物中之易感性細胞經含有H5 DNA編碼序列之重組性病毒載體感染，其中H5蛋白係由重組性病毒載體表現；及ii)爾後自細胞培養物中回收H5蛋白。H5蛋白之高量意謂(但不限於)以每毫升細胞培養物計約20 μg 以上、較佳約25 μg 以上、甚至更佳約30 μg 以上、甚至更佳約40 μg 以上、甚至更佳約50 μg 以上、甚至更佳約60 μg 以上、甚至更佳約80 μg 以上、甚至更佳約100 μg 以上、甚至更佳約150 μg 以上、最佳約190 μg 以上。

根據一較佳實施例，藉由收穫表現H5蛋白之全(亦即完整)SF+細胞來回收H5蛋白。

較佳細胞為彼等易受含有H5 DNA並表現H5蛋白的適當重組性病毒載體感染之細胞。較佳地，該等細胞為昆蟲細胞，且更佳地，其包括以商標SF+昆蟲細胞(Protein Sciences Corporation, Meriden, CT)出售的昆蟲細胞。較佳之細胞培養物具有約 0.3×10^6 - 2.0×10^6 個細胞/毫升之間，更佳約 0.35×10^6 - 1.9×10^6 個細胞/毫升、甚至更佳約 0.4×10^6 - 1.8×10^6 個細胞/毫升、甚至更佳約 0.45×10^6 - 1.7×10^6 個細胞/毫升且最佳約 0.5×10^6 - 1.5×10^6 個細胞/毫升的細胞數。

較佳病毒載體包括桿狀病毒，諸如BaculoGold(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)，尤其是在製備細胞為昆蟲細胞的情況下。儘管桿狀病毒表現系統為較佳的，但熟習此項技術者應瞭解，其他表現系統可用於本發明之目的，亦即用於使H5表現至細胞培養物之上清液中。該等其他表現系統可能需要使用信號序列以使H5表現至培養基中。

適當生長培養基亦可由熟習此項技術者確定，較佳生長培養基為無血清昆蟲細胞培養基，諸如Excell 420(JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS)及類似培養基。

當用於感染易感性細胞時，含有H5 DNA序列的重組性病毒載體具有較佳約0.03-1.5之間、更佳約0.05-1.3、甚至更佳約0.09-1.1且最佳約0.1-1.0之感染複數(MOI)。較佳地，上述MOI係關於1 mL之細胞培養流體。較佳地，本文

中所述方法包含：用含有H5 DNA且表現H5蛋白的重組性病毒載體感染 0.35×10^6 - 1.9×10^6 個細胞/毫升、甚至更佳約 0.4×10^6 - 1.8×10^6 個細胞/毫升、甚至更佳約 0.45×10^6 - 1.7×10^6 個細胞/毫升且最佳約 0.5×10^6 - 1.5×10^6 個細胞/毫升，該病毒載體具有約0.03-1.5之間、更佳約0.05-1.3、甚至更佳約0.09-1.1且最佳約0.1-1.0之MOI(感染複數)。

接著將受感染細胞培育至多十天、更佳約兩天至約十天、甚至更佳約四天至約九天且最佳約五天至約八天。較佳之培育條件包括介於約22-32°C之間、更佳約24-30°C、甚至更佳約25-29°C、甚至更佳約26-28°C且最佳約27°C之溫度。較佳地，接種之後觀測到SF+細胞之桿狀病毒誘導之特徵性變異。此觀測可包括監測感染後期間細胞密度趨向及存活力之降低。已發現，感染後3-5天觀測到峰值病毒效價，且細胞中之H5蛋白表現在第5天與第8天之間達到峰值，且/或在細胞存活力降至小於10%時。

因此，本發明之一態樣提供一種如下製備及/或回收重組性H5蛋白(較佳為上述量)的方法：i)使培養物中之大量易感性細胞(參見上文)經具有如上定義之MOI之重組性病毒載體感染；ii)由重組性病毒載體表現H5蛋白；及iii)爾後自感染後第5天與第8天之間獲得且/或細胞存活力降至小於10%之細胞中回收H5蛋白。較佳地，重組性病毒載體為含有H5 DNA編碼序列的重組性桿狀病毒且該等細胞為SF+細胞。此外，較佳定期檢查培養物受污染之宏觀及微觀跡象或感染後期間細胞形態之異常變化。任何呈現任何

污染的培養物應棄去。

為達成將用於免疫原性或免疫組合物(諸如疫苗)中之H5蛋白之回收，較佳包括滅活步驟以便將病毒載體滅活。

"免疫原性或免疫組合物"係指包含至少一種抗原的物質組合，該抗原可在宿主體內引發對受關注之組合物或疫苗之細胞性免疫反應及/或抗體介導之免疫反應的免疫反應。通常，"免疫反應"包括(但不限於)以下效應中之一或多者：特異性針對包含於受關注之組合物或疫苗中之抗原的抗體、B細胞、輔助性T細胞、抑制性T細胞及/或細胞毒性T細胞及/或 γ - δ T細胞之產生或活化。較佳地，宿主可呈現治療性或保護性免疫反應，以便增強對新感染之抵抗力及/或降低疾病之臨床嚴重程度。此保護作用表現為受感染宿主通常所呈現之症狀減少或消失、恢復時間加快及/或受感染宿主之病毒效價降低。

因此，本發明亦係關於一種如下製備及/或回收重組性H5蛋白(較佳為上述量)的方法：i)使培養物中之大量易感性細胞(參見上文)經具有如上定義之MOI之重組性病毒載體感染；ii)由重組性病毒載體表現H5蛋白；iii)將感染後第5天與第8天之間獲得且細胞存活力降至小於10%之細胞中所表現的H5回收；及iv)將重組性病毒載體滅活。

較佳地，此滅活係在即將進行過濾步驟之前進行或在過濾步驟剛結束之後進行，過濾步驟之後為較佳滅活時間。任何習知滅活方法可用於本發明之目的。因此，滅活可藉由化學及/或物理處理來進行。在較佳形式中，測定所收

穫流體之體積且使溫度介於約32-42°C之間、更佳介於約34-40°C之間且最佳介於約35-39°C之間。較佳滅活方法包括添加環化二元伸乙基亞胺(BEI)，此物質濃度較佳為約1 mM至約20 mM、較佳為約2 mM至約10 mM、甚至更佳為約2 mM至約8 mM、甚至更佳為約3 mM至約7 mM、最佳為約5 mM。舉例而言，滅活包括將較佳為約0.4 M之2-溴伸乙基胺氫溴化物溶液(其已在0.3 N NaOH中環化為0.2 M二元伸乙基亞胺BEI)添加至流體中以得到最終濃度約5 mM之BEI。較佳地，接著將流體連續攪拌72-96小時，且可將經滅活之收穫流體在-40°C或-40°C以下冷凍儲存或在約1-7°C之間儲存。滅活完成後，添加硫代硫酸鈉溶液(較佳為1.0 M)以中和任何殘餘BEI。較佳地，硫代硫酸鈉的添加量與滅活之前所添加之BEI的量相當。舉例而言，在添加BEI至最終濃度為5 mM之情況下，添加1.0 M硫代硫酸鈉溶液以得到最終最小濃度5 mM以中和任何殘餘BEI。

因此，本發明之另一態樣係關於一種如下製備重組性H5蛋白(較佳為上述量)的方法：i)使培養物中之大量易感性細胞(參見上文)經具有如上定義之MOI之重組性病毒載體感染；ii)由重組性病毒載體表現H5蛋白；iii)將感染後第5天與第8天之間獲得且細胞存活力降至小於10%之細胞中所表現之H5回收；及iv)將重組性病毒載體滅活。較佳地，重組性病毒載體為含有H5 DNA編碼序列的桿狀病毒且該等細胞為SF+細胞。較佳滅活步驟為上述彼等步驟。較佳地，滅活係在約35-39°C之間且在2 mM至8 mM BEI之

存在下、甚至更佳在約 5 mM BEI之存在下進行。

根據本發明之另一態樣，上述方法亦包括步驟iv)之後的中和步驟。此步驟v)包含添加中和溶液中之滅活劑的等量試劑。較佳地，若滅活劑為BEI，則較佳添加等量之硫代硫酸鈉。因此，根據另一態樣，當滅活劑為BEI時，步驟v)包含添加硫代硫酸鈉溶液直至最終濃度為約 1 mM至約 20 mM、較佳約 2 mM至約 10 mM、甚至更佳約 2 mM至約 8 mM、甚至更佳約 3 mM至約 7 mM、最佳約 5 mM。

在較佳形式中且尤其在以免疫原性組合物(諸如疫苗)使用重組性H5蛋白之形式中，將每一批所收穫之H5蛋白藉由於固著依賴性、桿狀病毒易感性昆蟲細胞(諸如Sf9細胞)中繼代來測試滅活。在此測試之一較佳形式中，將150 cm²之適當細胞培養物單層用1.0 mL經滅活之H5流體接種且在25-29°C下維持14天，至少繼代兩次。在維持期結束時，對細胞單層檢查H5桿狀病毒所特有之致細胞病變作用(CPE)。較佳地，亦使用陽性病毒對照。此等對照可由以下各物組成：一份經未滅活之參考H5桿狀病毒接種之Sf9細胞培養物及一瓶尚未接種之Sf9細胞。培育及繼代之後，經BEI處理之病毒流體中不存在受病毒感染之細胞說明滅活測試令人滿意。經參考病毒接種之對照細胞應呈現H5桿狀病毒所特有之CPE而未接種燒瓶應不呈現任何H5桿狀病毒CPE跡象。或者，在維持期結束時，可收集上清液樣本且將其接種於Sf9 96孔板上，該孔板已裝載Sf9細胞且接著在25-29°C下維持5-6天。接著將孔板固定且用結合

FITC之抗-H5抗體或針對桿狀病毒特異性蛋白(亦即gp64)的任何標記抗體染色。經BEI處理之病毒流體中不存在CPE、H5表現或桿狀病毒特異性蛋白(亦即gp64)之表現說明滅活測試令人滿意。經參考病毒接種之對照細胞應呈現CPE及IFA活性，而未接種燒瓶應不呈現任何H5桿狀病毒CPE跡象且不含IFA活性。

因此，本文中所述之另一態樣係關於用於測定表現H5蛋白之重組病毒載體之滅活有效性的滅活測試，其包含以下步驟：i)使含有重組性病毒載體之培養流體之至少一部分與較佳如上所述之滅活劑接觸；ii)添加較佳如上所述之中和劑以中和滅活劑；及iii)藉由如上所述之檢定測定殘餘感染性。

滅活之後，可以多種方式測定樣本中重組性H5蛋白之相對量。較佳量化方法包括SDS-PAGE密度測定法、ELISA及動物接種研究，其使已知疫苗量與臨床結果(血清學等)相關。當利用SDS-PAGE量化時，將含有未知量之重組性H5蛋白的樣本物質連同含有各種已知量之重組性H5蛋白的樣本一起在凝膠上展開。接著可基於已知樣本形成標準曲線，且可藉由與此標準曲線比較來測定未知樣本中重組性H5之量。由於ELISA通常公認為抗原量化之行業標準，因此較佳利用ELISA進行量化。

包含H5蛋白或編碼彼等蛋白質之核酸分子或載體的疫苗

根據另一態樣，本發明係關於通常包含以下物質的疫苗或醫藥組合物：

- i. 一或多種如本文中所述之H5蛋白；
- ii. 一或多種如本文中所述之編碼任何該等H5蛋白之核酸分子；及/或
- iii. 一或多種如本文中所述之載體，其包含如本文中所述之任何該等核酸分子且編碼如本文中所述之任何該等H5蛋白；及
- iv. 醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑。

如本文中所述之術語"醫藥組合物"、"醫藥/疫苗組合物"包括(但不限於)用於減少或預防感染之疫苗或用於治療及減輕感染之物質組合。

編碼流感血球凝集素之基於核酸之疫苗(較佳cDNA疫苗)的製備例如描述於以下參考文獻中：*Deck*等人，*Vaccine* 1997; 15(1):71-78；*Ulmer*等人，*Science* 1993; 259:1745-1749；*Ulmer*等人，*Vaccine* 1994;12(16):1541-1544。任何彼等方法可用於製備編碼如本文中所述之流感H5蛋白之基於核酸之疫苗，較佳cDNA疫苗。

此外，包含如本文中所述之H5蛋白或其部分的疫苗可藉由習知方法製備，例如藉由重組表現技術或藉由生物化學純化及分離技術製備。重組表現技術(包括在昆蟲細胞中表現)已熟知於此項技術且例如描述於以下參考文獻中：*Sambrook*等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第二版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.；*DNA Cloning: A Practical Approach*，第I及II卷(D. N. Glover編，1985)；

Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait 編, 1984) ; *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames & S. J. Higgins 編 (1985)] ; *Transcription And Translation* [B. D. Hames & S. J. Higgins 編 (1984)] ; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney 編 (1986)] ; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)] ; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984) ; F. M. Ausubel 等人 (編) , *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. 1994) 。習用之重組表現系統之其他實例為細菌表現系統, 諸如大腸桿菌 (*E. coli*) 或枯草芽孢桿菌 (*B. subtilis*) ; 基於酵母之表現系統, 諸如釀酒酵母 (*S. cerevisiae*) 或粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) ; 或哺乳動物細胞表現系統, 諸如基於BHK之表現系統、基於CHO之表現系統及/或基於NS0之表現系統。該等系統已熟知於此項技術且一般可(例如)經由Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, USA購得。其他表現策略例如描述於Lüschoff等人, *Vaccine* 第19期(2001), 第4249-4259頁或Veit等人, *PNAS* 第103卷(2006), 第8197-8202頁中。此外, 重組性腺相關病毒系統為習用系統且描述於例如可供進一步參考之US 5,436,146或WO200203872中。此外, 基於牛痘(痘)病毒之表現系統(例如, 如可供進一步參考之US 6,265,183中所述)亦為習用系統且適於製備如根據本發明使用之重組性抗原、抗原組合物。其他適當表現系統利用重組性popova病毒, 諸如SV40、禽痘病毒、假狂犬病毒

及逆轉錄病毒。

如本文中所述之相關醫藥/疫苗組合物亦可包含含有如本文中所述之H5蛋白的滅活病毒(包含如本文中所述之H5蛋白之活病毒的非病原形式)、病毒之製劑及/或片段，其中該製劑及/或片段包含如本文中所述之H5蛋白。

熟習該項技術者已知可連同抗原一起包含於該等組合物/疫苗中的其他組分(參見例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*. (1990), 第18版, Mack Publ., Easton)。熟習此項技術者可使用已知的生理學上可接受之無菌可注射溶液。可易於利用等張水溶液(諸如生理食鹽水)或相應血漿蛋白溶液來製備即用溶液。醫藥組合物/疫苗可以凍乾製劑或乾燥製劑(例如作為部分套組)提供，該等製劑可在臨用前、在無菌條件下用已知可注射溶液復水。

此外，本發明之醫藥/疫苗組合物可包括一或多種獸醫學上可接受之載劑。如本文中所使用，"獸醫學上可接受之載劑"包括(但不限於)任何及所有溶劑、分散介質、衣料、佐劑、穩定劑、稀釋劑、防腐劑、抗菌劑及抗真菌劑、等張劑、吸收延遲劑及類似載劑。

稀釋劑可包括水、生理食鹽水、右旋糖、乙醇、甘油及類似物。等張劑尤其可包括氯化鈉、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇及乳糖。穩定劑尤其包括白蛋白及乙二胺四乙酸之鹼金屬鹽。

如本文中所使用之防腐劑係指抗微生物活性劑，諸如慶大黴素(Gentamycin)、硫柳汞(Merthiolate)及類似物。特定

而言，製備多劑量組合物最佳添加防腐劑。彼等抗微生物活性劑係以一定濃度添加以有效防止受關注之組合物受任何微生物污染或抑制受關注之組合物內之任何微生物生長。

如本文中所使用之"佐劑"可包括氫氧化鋁及磷酸鋁、皂苷(例如 Quil A、QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA)、GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL))、油包水型乳液、水包油型乳液、水包油包水型乳液。

乳液尤其可基於輕質液狀石蠟油(歐洲藥典類型);類異戊二烯油,諸如角鯊烷或角鯊烯;烯烴(尤其異丁烯或癸烯)之寡聚反應所產生之油;含有直鏈烷基之酸或醇之酯,尤其植物油、油酸乙酯、丙二醇二-(辛酸酯/癸酸酯)、甘油基三-(辛酸酯/癸酸酯)或丙二醇二油酸酯;支鏈脂肪酸或醇之酯,尤其異硬脂酸酯。油可與乳化劑組合使用以形成乳液。乳化劑較佳為非離子型界面活性劑,尤其脫水山梨糖醇酯、二縮甘露糖醇酯(例如脫水甘露糖醇油酸酯)、乙二醇酯、聚甘油酯、丙二醇酯及油酸酯、異硬脂酸酯、蓖麻酸酯或羥基硬脂酸酯(其視情況經乙氧基化);及聚氧丙烯-聚氧乙烯共聚物嵌段,尤其Pluronic產品,尤其L121。參見Hunter等人,The Theory and Practical Application of Adjuvants (Stewart-Tull編, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, 第51-94頁(1995)及Todd等人, Vaccine 15:564-570 (1997)。適當水包油型乳液之實

例為基於 Emulsigen 之佐劑，諸如 EMULSIGEN[®]、EMULSIGEN-D[®]、EMULSIGEN-P[®]、EMULSIGEN-75[®] (MVP Laboratories, Inc. Omaha, NE, USA)。已驚人地發現，包含 H5 蛋白、較佳如本文中所述之重組性 H5 蛋白的醫藥/疫苗組合物有效地輔以水包油型乳液佐劑，較佳為該等基於 Emulsigen 之佐劑，更佳 EMULSIGEN[®] 及 EMULSIGEN-D[®]。

此外，可使用 M. Powell 及 M. Newman 所編之 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" 第 147 頁所述之 SPT 乳液及該書第 183 頁所述之乳液 MF59。

佐劑之另一實例為選自丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合物及順丁烯二酸酐與烯基衍生物之共聚物的化合物。有益的佐劑化合物為尤其與糖或多元醇之聚乙烷基醚交聯之丙烯酸或甲基丙烯酸之聚合物。該等化合物稱為卡波姆 (carbomer) (Pharmeuropa 第 8 卷，第 2 期，1996 年 6 月)。熟習此項技術者亦可參考美國專利第 2,909,462 號，其描述與具有至少 3 個羥基、較佳不超過 8 個羥基之多羥基化合物交聯的該等丙烯酸聚合物，至少三個羥基中之氫原子可置換為具有至少 2 個碳原子的不飽合脂族基。較佳基團為含有 2 至 4 個碳原子的彼等基團，例如乙烯基、烯丙基及其他烯系不飽合基團。不飽合基團本身可含有其他取代基，諸如甲基。在 Carbopol (BF Goodrich, Ohio, USA) 名下銷售的產品尤其適用。其與烯丙基蔗糖或烯丙基異戊四醇交聯。其中可提及 Carbopol 974P、934P 及 971P。最佳為使用 Carbopol

971P。在順丁烯二酸酐與烯基衍生物之共聚物中，共聚物EMA (Monsanto)為順丁烯二酸酐與乙烯之共聚物。該等聚合物溶解於水中可產生酸溶液，使該酸溶液中和，較佳中和至生理pH值，以便得到可免疫原性、免疫或疫苗組合物自身可併入的佐劑溶液。

其他適當佐劑尤其包括(但不限於)RIBI佐劑系統(Ribi Inc.)、嵌段共聚物(CytRx, Atlanta GA)、SAF-M (Chiron, Emeryville CA)、單磷醯脂A、阿夫立定(Avridine)脂質胺佐劑、獲自大腸桿菌之熱不穩定性腸毒素(重組體或其他形式)、霍亂毒素或胞壁醯二肽。

較佳地，佐劑以每劑量約100 μg 至約10 mg之量添加。甚至更佳地，佐劑以每劑量約100 μg 至約10 mg之量添加。甚至更佳地，佐劑以每劑量約500 μg 至約5 mg之量添加。甚至更佳地，佐劑以每劑量約750 μg 至約2.5 mg之量添加。最佳地，佐劑以每劑量約1 mg之量添加。

醫藥/疫苗組合物可進一步包括一或多種其他免疫調節劑，諸如介白素、干擾素或其他細胞因子。醫藥/疫苗組合物亦可包括慶大黴素及硫柳汞。儘管適用於本發明之上下文中之佐劑及添加劑之量及濃度可易於由熟習此項技術者確定，但本發明涵蓋1 ml劑量之疫苗組合物包含約50 μg 至約2000 μg 佐劑且較佳約250 μg 佐劑的組合物。在另一較佳實施例中，本發明涵蓋包含約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至約60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗生素且更佳小於約30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗生素的疫苗組合物。

因此，根據另一實施例，本發明亦係關於醫藥/疫苗組

合物，其包含：

- i. 治療有效量之如本文中所述之任一種流感病毒H5蛋白，其中該H5蛋白具有胺基酸223N及修飾體328K+，其中H5蛋白之胺基酸位置編號係指如SEQ ID NO:1中所例示性指定之胺基酸位置且其中修飾體328K+意謂在H5蛋白之胺基酸位置328上插入第二離胺酸(K+)；及
- ii. 如上所述之醫藥學上可接受之佐劑。

較佳地，佐劑係選自由以下各物組成之群：

- a) EMULSIGEN[®]：一種水包油型乳液(o/w)；
- b) EMULSIGEN-D[®]：一種具有溴化二甲基二-十八烷基銨(DDA)之水包油(o/w)乳液；
- c) Polygen：一種共聚物；
- d) EMULSIGEN-P[®]，一種具有專有免疫刺激劑的水包油型(o/w)乳液；
- e) Carbigen為一種交聯聚合物；
- f) EMULSIGEN-75[®]：一種包含具有交聯聚合物之水包油型(o/w)乳液的雙重佐劑；
- g) ISA 70為一種油包水型(w/o)乳液。

最佳地，該等佐劑為水包油型乳液，諸如選自由以下各物組成之群的基於emulsigen之佐劑：EMULSIGEN[®]、EMULSIGEN-D[®]、EMULSIGEN-P[®]、EMULSIGEN-75[®]、EMULSIGEN[®]及EMULSIGEN-P[®]。最佳EMULSIGEN[®]及EMULSIGEN-P[®]用於本發明之調配物中。

根據另一態樣，如本文中所提供之醫藥/疫苗組合物包

含一或多種抗原。較佳地，其他抗原為禽類或哺乳動物病原體之抗原。根據另一實施例，其他抗原為其他流感抗原，諸如流感病毒之血球凝集素H3、H7、H9或其他任何血球凝集素。該(等)其他抗原可以純化形式、作為抗原製劑之部分添加，以經滅殺微生物之形式或以經修飾之活微生物之形式添加。

如本文中所使用之術語"抗原"意謂(但不限於)肽、多肽、醣肽或多醣，其能夠與免疫系統之抗原識別分子(諸如免疫球蛋白(抗體)或T細胞抗原受體)特異性交互作用以便在該抗原所投與之宿主中引發、活化或刺激針對該抗原的免疫反應。術語"抗原"亦指核酸分子，較佳為DNA分子或RNA分子，其各自編碼且表現能夠與免疫系統之抗原識別分子(諸如免疫球蛋白(抗體)或T細胞抗原受體)特異性交互作用以便引發、活化或刺激針對由該核酸分子所編碼之抗原的免疫反應的肽、多肽或醣肽。用於製備根據本發明使用之醫藥組合物的抗原為微生物或該微生物之抗原部分及/或製劑。就此而言，如本文中所使用之術語"免疫"意謂(但不限於)免疫反應之任何引起或增強。術語"免疫反應"已於上文中加以描述。

流感疫苗之投藥策略已熟知於此項技術。本發明預期滅活病毒疫苗及減毒病毒疫苗之黏膜接種策略。儘管黏膜可由局部傳遞疫苗標靶導向，但多種策略皆已用於將免疫原性蛋白傳遞至黏膜。

在一特定實施例中，可將疫苗與霍亂毒素(諸如霍亂毒

素B或霍亂毒素A/B嵌合體)混合或作為結合型或嵌合型融合蛋白投藥 (*Hajishengallis*, *J Immunol.*, 154:4322-32, 1995 ; *Jobling* 及 *Holmes*, *Infect Immun.*, 60:4915-24, 1992)。基於使用霍亂毒素B次單位之黏膜疫苗已加以描述 (*Lebens*及*Holmgren*, *Dev Biol Stand* 82:215-27, 1994)。在另一實施例中，可製備與熱不穩定性腸毒素(LT)之混合物用於黏膜接種。

其他黏膜免疫策略包括將病毒囊封於微膠囊中 (US 5,075,109、US 5,820,883及US 5,853,763)及使用免疫增強性膜質載劑(WO 98/0558)。經口投藥之免疫原之免疫原性可藉由使用紅血球(rbc)或rbc殘骸(US 5,643,577)或藉由使用藍舌病抗原(US 5,690,938)而得以增強。

根據另一態樣，本發明係關於一種製備如上所述之醫藥/疫苗組合物的方法，較佳為一種製備包含如上所述之經桿狀病毒表現之重組性H5蛋白之疫苗的方法。通常，此方法包括以下步驟：i)將構築體轉染至病毒內，其中該構築體包含如本文中所述之重組性H5 cDNA；ii)用經轉染之病毒感染生長培養基中之細胞；iii)促使病毒表現如本文中所述之重組性H5蛋白；iv)自培養物回收經表現之H5蛋白；及v)藉由將經表現之H5蛋白與適當佐劑及/或其他醫藥學上可接受之載劑摻混而製備組合物。

較佳佐劑為上述彼等佐劑。因此，根據另一態樣，用於激發防禦流感感染之免疫反應之抗原組合物(諸如疫苗)的製備方法包含i)製備及回收H5蛋白，及ii)將此蛋白與適當

佐劑混合。

此外，本發明之疫苗組合物亦可包括稀釋劑、等張劑、穩定劑及/或防腐劑。稀釋劑可包括水、生理食鹽水、右旋糖、乙醇、甘油及類似物。等張劑尤其可包括無機鹽或有機鹽(例如氯化鈉)、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇及乳糖、糖類、海藻糖、甘露糖醇、蔗糖。穩定劑尤其包括白蛋白及乙二胺四乙酸之鹼金屬鹽。適當佐劑為上述彼等佐劑。

該等H5蛋白、核酸分子、載體及疫苗中之任一者之醫藥用途

如本文中所提供之H5蛋白、編碼任何該等H5蛋白之核酸分子、包含任何該等核酸分子(編碼如本文中所述之任何該等H5蛋白)的載體以及包含該H5蛋白、核酸分子或載體中之任一者的任何醫藥/疫苗組合物可用作藥物，較佳用於治療及預防由流感病毒、最佳由流感A病毒引起的感染。如本文中所提供之H5蛋白、編碼任何該等H5蛋白之核酸分子、包含任何該等核酸分子(編碼如本文中所述之任何該等H5蛋白)之載體以及包含如本文中所述之該H5蛋白、核酸分子或載體中之任一者之任何醫藥/疫苗組合物可用於人類之治療或預防且可用於獸醫藥物中。當用於獸醫藥物中時，較佳為治療禽類，較佳鳥、雞、鴨、火雞及類似動物；以及哺乳動物，較佳豬、牛、馬、海豹、駱駝、狗、貓、倉鼠、小鼠及類似動物。

因此，根據另一態樣，本發明係關於如本文中所提供之H5蛋白、編碼任何該等H5蛋白之核酸分子、包含任何該

等核酸分子(編碼如本文中所述之任何該等H5蛋白)之載體以及包含如本文中所述之該H5蛋白、核酸分子或載體中之任一者之任何醫藥/疫苗組合物的用途，其可用作藥物、較佳用作人類藥物及/或獸醫藥物。

此外，如本文中提供之H5蛋白、如本文中所述之編碼任何該等H5蛋白之核酸分子、包含任何該等核酸分子(編碼任何該H5蛋白)之載體可用於製備如本文中所述之醫藥組合物，以便預防或治療由流感病毒引起之感染。如上所述，彼等醫藥組合物/疫苗組合物可用於人類之治療及/或預防以及動物之治療及/或預防，該等動物諸如禽類，較佳鳥、雞、鴨、火雞及類似動物，以及哺乳動物，較佳豬、牛、馬、海豹、駱駝、狗、貓、倉鼠、小鼠及類似動物。

如本文中提供之H5蛋白、如本文中所述之編碼任何該等H5蛋白之核酸分子、包含任何該等核酸分子(編碼任何該等H5蛋白)之載體可用於製備如本文中所述之醫藥組合物，該醫藥組合物適於治療及預防較佳由禽、豬或人類流感病毒或其任何組合或混合之流感病毒感染。

根據另一態樣，本發明亦係關於一種治療或預防流感病毒感染之方法，其中該方法包含將治療有效量之如本文中所述之H5蛋白投與需要該治療之受檢者。此外，本發明亦係關於一種治療或預防流感病毒感染之方法，其中該方法包含將治療有效量的如本文中所述之編碼如本文中所述之任何H5蛋白的任何H5核酸分子或載體投與需要該治療之

受檢者。此外，本發明亦係關於一種治療或預防流感病毒感染之方法，其中該方法包含將治療有效量之包含如本文中所述之任何該H5蛋白、核酸分子或載體之疫苗投與需要該治療之受檢者。有需要之受檢者可為人類以及動物，較佳為禽類，甚至更佳為鳥、雞、鴨、火雞；或哺乳動物，較佳為豬、牛、馬、海豹、駱駝、狗、貓、倉鼠、小鼠及類似動物。

較佳地，當對雞進行接種時，可在1日齡時或1日齡之後（例如在10日齡時，或在1日齡至10日齡時，或在10日齡時或10日齡之後）使用如本文中所述之H5蛋白接種。

可藉由投與任何H5蛋白、編碼該任何H5蛋白之核酸分子或載體或如本文中所述之任何醫藥/疫苗組合物治療的流感感染較佳係由禽、豬或人類流感病毒或其任何組合或混合引起。

根據另一態樣，本發明係關於部分套組，其包含：i)如本文中所述之該H5蛋白、編碼任何該H5蛋白之核酸分子或載體或包含如本文中所述之該H5蛋白、核酸分子或載體中任一者之任何醫藥/疫苗組合物中的任一者；及ii)指示該H5蛋白、核酸分子、載體或疫苗於治療或預防由流感病毒引起之感染之使用的包裝插頁。當對雞進行接種時，可在1日齡時或1日齡之後使用如本文中所述之H5蛋白接種。

根據另一實施例，彼部分套組包含禽類或哺乳動物病原體之至少另一種抗原及指示彼另外抗原之醫藥、人類或獸醫學用途的資訊。

【實施方式】

實例

以下實例闡述本發明之較佳物質及程序。然而應瞭解，該等實例僅為說明而提供，且不應視為對本發明之整體範圍之限制。

實例 1

建構編碼及表現HA H5抗原的重組性桿狀病毒

如下生成含有H5 HA抗原的重組性桿狀病毒：化學合成H5 HA(SEQ ID NO:2)之編碼序列且將其次選殖入轉移載體pVL1392(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)內。藉由使用寡核苷酸引子及QuikChange®定點誘變套組(Stratagene, La Jolla, CA)生成H5 HA MutK+ (SEQ ID NO:4)且將其次選殖入轉移載體pVL1392(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)內。接著用DiamondBac®(Sigma)桿狀病毒DNA將含有編碼H5 HA抗原(SEQ ID NO:2)及H5 HA MutK+抗原(SEQ ID NO:4)之基因的pVL1392質體共轉染入Sf9昆蟲細胞(BD Biosciences Pharmingen)內以生成含有編碼SEQ ID NO:2之基因H5 HA及編碼SEQ ID NO:4之基因H5 HA mutK+的重組性桿狀病毒。將含有編碼H5 HA(SEQ ID NO:2)及H5 HA MutK+(SEQ ID NO:4)之基因的重組性桿狀病毒進行空斑純化，且將主種子病毒(Master Seed Virus; MSV)於SF+細胞株上繁殖，製成等分試樣且在-70°C下儲存。如由多株血清或單株抗體以間接螢光抗體檢定或西方墨點法所偵測，如上

所述經H5 HA桿狀病毒感染(以生成MSV或工作種子病毒(Working Seed Virus))之昆蟲細胞表現H5 HA抗原(SEQ ID NO:2)及H5 HA MutK+抗原(SEQ ID NO:4)。

用適量重組性桿狀病毒(分別為H5 HA及H5 HA MutK+)接種後，接著將含有SF+細胞(Protein Sciences, Inc., Meriden, CT)的旋轉瓶在 $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育7天且在彼期間以100 rpm攪拌。該等旋轉瓶使用通氣蓋以使空氣流動。收穫含有經桿狀病毒感染之SF+細胞的原全細胞培養物及各培養物之細胞培養上清液。

實例 2

製備包含HA H5抗原之醫藥組合物(疫苗)

收穫在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞H5 HA蛋白及H5 HA Mutk+蛋白。將桿狀病毒在5 mM環化二元伸乙基亞胺(BEI)(最終濃度)之存在下、在約 32°C 與 39°C 之間滅活72至96小時。滅活完成後，添加0.3 M硫代硫酸鈉溶液直至最終濃度為5 mM，以中和任何殘餘BEI。中和後，添加各種佐劑且生成以下疫苗/醫藥組合物。

疫苗

通用產物名稱	501
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞H5 HA蛋白
調配物	包含表現重組性H5 HA之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以Emulsigen佐劑。

通用產物名稱	502
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細

	胞 H5 HA 蛋白
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Emulsigen-D 佐劑。

通用產物名稱	503
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA 蛋白
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Polygen 佐劑。

通用產物名稱	504
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA 蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Emulsigen-P 佐劑。

通用產物名稱	505
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA 蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Carbigen 佐劑。

通用產物名稱	506
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA 蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Emulsigen-75 佐劑。

通用產物名稱	507
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA 蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 ISA 70 佐劑。

通用產物名稱	508
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA mutK+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Emulsigen 佐劑。

通用產物名稱	509
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA mutK+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Emulsigen-D 佐劑。

通用產物名稱	510
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA mutK+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Polygen 佐劑。

通用產物名稱	511
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA mutK+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗佐以 Emulsigen-P 佐劑。

通用產物名稱	512
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA mutK+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Carbigen 佐劑。

通用產物名稱	513
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA mutK+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 Emulsigen-75 佐劑。

通用產物名稱	514
抗原	在昆蟲細胞中由基於桿狀病毒之表現系統表現的原全細胞 H5 HA K+蛋白。
調配物	包含表現重組性 H5 HA 之培養昆蟲細胞及上清液的實驗性疫苗。疫苗輔以 ISA 70 佐劑。

實例 3

對豬進行接種以防禦禽流感

1. 引論

此研究之目的係測定含有重組性 H5 血球凝集素 (HA) 抗原之粗提取物之實驗性疫苗在豬體內誘導血球凝集抑制 (HI) 效價的能力。用 H5 HA 抗原評價各種佐劑。

此研究中評價含有來自習知 H5 HA 或 H5 HA MutK+ 之抗原的 HA H5 原型。習知 H5 HA 係源自 A/鴨/China/E319-2/03，而 H5 HA MutK+ 由習知 H5 HA 組成，其經工程化以在 S120N、D150N、S223N 及 328mutK+ 上含有三個特定胺基酸變異。其亦含有胺基酸 94N。H5 HA Mut K+ 中之特定胺基酸變異產生更接近類似於 A/HK/213/03 之 HA 的 H5 HA。目前認為 A/HK/213/03 之 H5 HA 之胺基酸組成有助於 H5 HA 之抗體識別。

2. 研究設計：

表 1：研究概述

組	豬數目	疫苗原型	第 0 日	第 21 日	第 35 日
1	5	501	放血及肌內 注射接種(頭 肱組)(藉由在 頸左側投藥 1 ml)	放血及肌內 注射接種 (頭肱組)(藉 由在頸右側 投藥 1 ml)	放血及終 止研究
2	5	502			
3	5	503			
4	5	504			
5	5	505			
6	5	506			
7	5	507			
8	5	508			
9	5	509			
10	5	510			
11	5	511			
12	5	512			
13	5	513			
14	5	514			
15	5	無	放血	放血	

研究開始時，仔豬為3週±5日齡。研究開始時，仔豬在臨床上為健康的。在研究第0日、第21日及第35日獲得血樣。

在研究第1日至第35日每日觀測全部研究動物之一般健康狀況。在每次接種後七天，每天查看注射部位且記錄可見反應。在研究日第35日動物研究期結束時，對全部動物施以無痛致死術。

3. 疫苗

將如實例2中所述之疫苗501至514用於豬接種研究。

4. 血球凝集素抑制檢定

在第0日及第21日用含有H5 HA之原型對豬進行接種。在第0日、第21日、第35日收集豬血清以便藉由血球凝集抑制(HI)檢定進行評價。進行HI檢定以偵測HA特異性抗體之存在。異源H5N2病毒(A/雞/Mexico/232/94)係以四個血球凝集單位[4 HA單位]之濃度用於HI檢定中。隨後在U形底微量滴定板中，將PBS中之連續兩倍血清稀釋液與等體積(25 μ L)(含有4 HA單位)之病毒混合，且在室溫(約25 $^{\circ}$ C)下培育30分鐘。將PBS中之濃度為0.5%之雞紅血球添加至含有血清-病毒之孔中且在室溫下培育40分鐘。以觀測到血球凝集抑制的最高血清稀釋度之倒數確定HI效價。

5. 結果

HI測試使用Mexican政府法定之H5N1抗原(A/雞/Mexico/232/94)[4 HA單位]，接種方案為第0日及第21日1 \times 1 mL。

		HI 效價		
		第 0 日	第 21 日	第 35 日
501	H5-Emulsigen	0	0	4
502	H5-Emulsigen-D	0	0	4
503	H5-Polygen	0	0	0
504	H5-Emulsigen-P	0	0	2
505	H5-Carbigen	0	0	4
506	H5-Emulsigen-75	0	0	16
507	H5 ISA 70	0	0	16
508	H5 K+-Emulsigen	0	0	128
509	H5 K+-Emulsigen-D	0	0	64
510	H5 K+-Polygen	0	0	16
511	H5 K+-Emulsigen-P	0	0	0
512	H5 K+-Carbigen	0	0	0
513	H5 K+-Emulsigen-75	0	0	16
514	H5 K+-ISA 70	0	4	32
對照	無	0	0	0

BIV H5(來源於流感 A 病毒(A/鴨/China/E319-2/03(H5N1))

BIV H5 K+(突變之 BIV H5，包括 S120N、D155N、S223N，且增添 328K+)

結果證明大部分疫苗組合物在接種豬中引發免疫反應。特定言之，大部分疫苗組合物引起血清轉化，其意謂大部分接種豬產生針對 HI 檢定中所使用之禽流感病毒的特異性抗體。總而言之，結果清楚且無疑地證明本發明創見極其奏效。藉由用禽流感病毒之相關抗原對豬進行接種可大大降低豬(第二物種之動物)經禽流感病毒(第一物種之病原體)廣泛流行性感染之風險。此已得到清楚證明。此外，依據此接種概念，禽流感病毒對哺乳動物(包括人類)之傳染性及順應性大大降低。豬為禽病原體(包括禽流感病毒)之最重要宿主之一。若病毒在豬體內之複製且因此禽流感對豬之順應性之風險大大降低且得以控制，則禽流感病毒

對人類之任何順應性之風險亦大大降低。在投與抗原產生較低HI效價(意謂效價低於30)之情況下，需要用抗原進一步加強以進一步改良HI效價且增強接種豬體內之免疫保護。因此，效價低並不意謂無法獲得保護，其僅教示似乎需要進一步加強以改良免疫反應。接種豬體內可量測到免疫反應證明作為本發明依據之本發明創見極其奏效。換而言之，本文所提供之實驗清楚且無疑地證明本發明之創見可奏效。

實例4

對鳥進行接種以防禦禽流感

1. 引論

此研究之目的係測定含有重組性H5mutk+血球凝集素(H5 HA mutk+)抗原之粗提取物之實驗性疫苗在雞體內誘導血球凝集抑制(HI)之能力。此外，習知重組性H5抗原(H5 HA)以及滅活疫苗Volvac® AI(Boehringer Ingelheim Vetmedica, Mexico)用於對照。此外，用H5 HA抗原評價多種佐劑。

2. 研究設計：

將SPF鳥(15-25隻)在1日齡或10日齡時，獨立地用0.5 ml不同實驗性疫苗在頸背部藉由皮下途徑接種；實驗期間將所有鳥供養於隔離器中。不限量提供饋食及水。用H5N2高病原性禽流感病毒株接種後第31日或第32日進行激發。

藉由在接種後第15日、第30日自鳥頸靜脈放血獲得血清樣本。為獲得抗體效價，在進行如實例3中所述之血球凝

集抑制(HI)測試之前，將所得血清在4°C下儲存。

3. 疫苗及激發病毒：

獨立評價四種不同調配物：

1. **習知油乳液H5HA Mut k+**：基於Boehringer Ingelheim Vetmedica程序將H5 HA mutk+抗原調配於油乳液(弗氏不完全佐劑(Freund incomplete adjuvant))中。
2. **Seppic H5HA Mut k+**：基於供應商建議，用非習知之佐劑 (ISA 206，W/O/W，獲自Seppic)調配H5 HA mutk+抗原。
3. **H5HA 習知油乳液**：基於Boehringer Ingelheim Vetmedica程序將H5 HA抗原調配於油乳液(弗氏不完全佐劑)中。
4. **Seppic H5HA**：基於供應商建議，用非習知之佐劑 (ISA 206，W/O/W，獲自Seppic)調配H5 HA抗原。

將禽流感Boehringer Ingelheim Vetmedica油乳液疫苗用作對照 Volvac® AI(Boehringer Ingelheim Vetmedica，Mexico)。

藉由鼻內途徑，每隻鳥用0.2 ml含有 $10^{6.7}$ CEID之H5N2激發病毒接種來於經接種及未經接種之雞體內進行激發。激發後，記錄病徵及死亡率。接種後第十日，根據動物實驗程序將所有存活雞施以無痛致死術。

4. 結果：

結果描述於下表中：

配方	1 日齡接種	
	接種後第 31 日激發	
	死亡數	死亡率%
Seppic H5HA Mut k+	8/25	32%
習知油乳液 H5HA Mut k+	0/24	0%
Seppic H5HA H5HA 習知油乳液	17/25	68%
	4/25	16%
Volvac AI KV		
陰性對照	10/10	100%

配方	10 日齡接種	
	接種後第 32 日激發	
	死亡數	死亡率%
Seppic H5HA Mut k+	0/20	0%
習知油乳液 H5HA Mut k+	0/20	0%
Seppic H5HA H5HA 習知油乳液	7/19	36.8%
	2/20	10%
Volvac AI KV	0/14	0%
陰性對照	14/14	100%

疫苗配方	1 日齡接種(0.5 ml)	
	接種後第 30 日 HI 效價 (MG Log2)	激發後保護%
Seppic H5HA Mut k+	0.56	68
習知油乳液 H5HA Mut k+	2.59	100
Seppic H5HA H5HA 習知油乳液	0.18	32
	0.7	84
Volvac AI KV	-----	-----
陰性對照	-----	-----

疫苗配方	10 日齡接種(0.5 ml)	
	接種後第 30 日 HI 效價 (MG Log2)	激發後保護%
Seppic H5HA Mut k+	2.5	100
習知油乳液 H5HA Mut k+	4.3	100
Seppic H5HA H5HA 習知油乳液	1.3	63.2
	1.6	100
Volvac AI KV	8.8	100
陰性對照	0	0

根據 OIE 標準將陽性血清效價以 $\log_2 4$ 考量。基於此標準，血清學結果為陰性，但與基線相比，觀測到某些陽性值。在 1 日齡或 10 日齡接種之鳥體內觀測到用油佐劑及 H5HA Mut k+ 抗原調配之疫苗具有最佳的血清學效價。經觀測，用 Seppic 及 H5HA 抗原調配之原型具有最低的血清學效價。在激發研究中觀測到，疫苗原型，尤其 H5HA

Mut k+抗原調配之習知油乳液疫苗，賦予保護作用。激發研究中觀測到Seppic H5HA具有最低的保護作用，死亡率為68%。相比之下，與在一日齡接種之鳥相比，在10日接種之鳥體內觀測到最高的血清學效價。

序列表

- <110> 美商百靈佳股格輸家畜藥品公司
 <120> 新穎 H5 蛋白質、編碼彼等之核酸分子及載體及其醫藥用途
 <130> Case 1-2150
 <140> 096140489
 <141> 2007-10-26
 <150> 60/863142
 <151> 2006-10-27
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> 禽流感病毒
 <400> 1

```

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1           5           10           15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
          20           25           30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
          35           40           45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50           55           60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65           70           75           80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
          85           90           95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
          100          105          110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
          115          120          125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe
          130          135          140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Ile
          145          150          155          160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
          165          170          175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
  
```


Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
500 505 510
Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
515 520 525
Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
530 535 540
Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
545 550

<210> 2
<211> 567
<212> PRT
<213> 禽流感病毒

<400> 2

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

		195					200					205				
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg	
	210					215					220					
Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	
225				230					235						240	
Arg	Met	Asp	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn	
			245						250					255		
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile	
			260					265					270			
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Tyr	Gly	
		275					280					285				
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	
	290					295					300					
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	
305				310						315					320	
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	
				325					330					335		
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	
			340					345					350			
Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	
		355					360					365				
Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	
	370					375					380					
Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Ile	
385					390					395					400	
Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	
				405					410					415		
Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Gly	
			420					425					430			
Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Glu	
		435					440					445				
Asn	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	
	450					455					460					
Asp	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Asn	
465					470					475				480		
Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu	Ser	
			485						490					495		
Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	
			500					505					510			

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
515 520 525

Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
530 535 540

Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
545 550 555 560

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 3

<211> 568

<212> PRT

<213> 禽流感病毒

<400> 3

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln

	195		200		205														
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg				
	210					215					220								
Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Asn	Gly				
225				230						235					240				
Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn				
				245					250					255					
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile				
			260					265					270						
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly				
		275					280					285							
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser				
	290					295					300								
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys				
305				310						315					320				
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser				
				325					330					335					
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile				
			340					345					350						
Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr				
		355					360					365							
Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys				
	370					375					380								
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser				
385				390						395					400				
Ile	Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe				
				405					410					415					
Asn	Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp				
		420						425					430						
Gly	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met				
		435					440					445							
Glu	Asn	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu				
	450					455					460								
Tyr	Asp	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly				
465					470				475						480				
Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu				
			485						490					495					
Ser	Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala				
			500					505					510						

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 4
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> 禽流感病毒

<400> 4

Met Glu Lys Thr Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln

		195					200					205					
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg		
	210					215					220						
Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Asn	Gly		
225				230					235						240		
Arg	Met	Asp	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn		
			245						250					255			
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile		
			260					265					270				
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Tyr	Gly		
		275					280					285					
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser		
	290					295					300						
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys		
305				310						315					320		
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Lys	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser		
				325					330					335			
Pro	Gln	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile		
			340					345					350				
Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr		
		355					360					365					
Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys		
	370					375					380						
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser		
385					390					395					400		
Ile	Ile	Asp	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe		
				405					410					415			
Asn	Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp		
			420					425					430				
Gly	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met		
		435					440					445					
Glu	Asn	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu		
	450					455					460						
Tyr	Asp	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly		
465					470					475					480		
Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu		
			485						490					495			
Ser	Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala		
			500					505					510				

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 5
<211> 263
<212> PRT
<213> 禽流感病毒

<400> 5

His Ala Asn Asn Trp Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn
1 5 10 15

Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly
20 25 30

Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys
35 40 45

Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile
50 55 60

Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn
65 70 75 80

Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His
85 90 95

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys
100 105 110

Asn Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys
115 120 125

Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile
130 135 140

Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr
145 150 155 160

Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp
165 170 175

Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser
180 185 190

Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr

Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr
 195 200 205

Arg Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr
 210 215 220

Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn
 225 230 235 240

Gly Gln Ser Gly Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn
 245 250 255

Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr
 260 265 270

Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu
 275 280 285

Val Glu
 290

十、申請專利範圍：

102年6月13日修正本

1. 一種流感病毒之血球凝集素H5蛋白，其包含 SEQ ID NO:1之胺基酸序列，其中SEQ ID NO:1之位置223上之絲胺酸經天冬醯胺酸取代，且胺基酸位置328上插入第二離胺酸。
2. 如請求項1之血球凝集素H5蛋白，其中該血球凝集素H5蛋白具有SEQ ID NO:4之序列。
3. 一種核酸分子，其中該核酸分子編碼如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白。
4. 一種疫苗，其包含：
 - a. 如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白或如請求項3之核酸分子；及
 - b. 醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑。
5. 如請求項4之疫苗，其中該疫苗包含作為額外抗原之流感病毒之血球凝集素蛋白H3、H7或H9。
6. 一種製備如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白的方法，其中該方法包含以下步驟：
 - a. 分離或擴增編碼該血球凝集素H5蛋白之核酸；
 - b. 將該編碼血球凝集素H5之核酸選殖於表現載體內；
 - c. 表現該血球凝集素H5蛋白。
7. 如請求項6之方法，其中該表現載體為重組性桿狀病毒。
8. 一種製備包含如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白之疫苗的方法，其中該方法包含以下步驟：

- a. 獲得如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白；
 - b. 將步驟a)之該血球凝集素H5蛋白與醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑混合。
9. 一種製備包含如請求項3之血球凝集素H5核酸之疫苗的方法，其中該方法包含以下步驟：
- a. 獲得如請求項3之血球凝集素H5核酸分子；
 - b. 將步驟a)之該血球凝集素H5核酸分子與醫藥學上可接受之載劑及/或賦形劑混合。
10. 一種如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白或如請求項3之核酸分子之用途，其係用於製備藥物。
11. 一種如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白或如請求項3之核酸分子之用途，其係用於製備供預防或治療由病毒性流感引起之感染之藥物。
12. 一種套組，其包含：
- a. 如請求項1或2之血球凝集素H5蛋白、如請求項3之核酸分子或如請求項4或5之疫苗；及
 - b. 一包裝紙頁，其指示a)之該血球凝集素H5蛋白、核酸分子或疫苗用於治療或預防由流感病毒引起之感染的使用。