

WO 2018/157455 A1

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明 (细则13之二. 4(d) (i) 和 48. 2(a) (viii))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5. 2(a))。

一种流感病毒株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒领域，具体涉及一种流感病毒株及其应用。

背景技术

[0002] 流感病毒 (influenza virus) 的基因组由 8 个单链 RNA 片断组成，编码 11 种蛋白，属于正粘病毒科流感病毒属。流感病毒分为 A、B、C 三型，A、B 两型为人群中流行的常见类型，并能引起世界性大流行，但 A 型流感病毒感染范围更广，危害更大。流感病毒的 8 个基因组片断按分子量由大到小顺序依次为 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因，这些基因片段编码的 11 种病毒蛋白中有 8 个是病毒结构蛋白 (HA、NA、NP、M1、M2、PB1、PB2 和 PA)；NS 基因编码的 NS1 和 NS2 为两个非结构蛋白；两种主要表面糖蛋白：血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 为流感病毒主要表面抗原。根据 HA 和 NA 的不同，A 型流感病毒又分为不同亚型，目前已鉴定出 9 种 NA 亚型和 16 种 HA 亚型。

[0003] 流感病毒能够引起严重的呼吸道疾病，传染性很强，容易诱发其他严重并发症。已发生多次世界性大流行，给人类生命健康带来了极大危害。由于病毒表面蛋白 HA 和 NA 易发生变异，能够产生抗原漂移 (antigenic drift) 和抗原转换 (antigenic shift) 两种突变形式，尤其近年来在世界及中国出现的 H1N1 和 H7N9 等流感病毒突变株的爆发和流行在全球一体化背景下给疾病的防控带来了更多困难，随着交流越来越频繁，病毒发生重组或重配的频率也随之增加，对于新型突变株的预测也会更加困难，不仅给各国、各地区造成巨大经济损失，给人们健康和生命安全带来了极大威胁，更是加大了对疾病的防控难度。

[0004] 接种疫苗是当前预防流感病毒大流行的最有效手段。现在广泛使用的流感疫苗设计主要针对病毒的 HA 和 NA 蛋白，以 HA 和 NA 作为靶抗原诱导机体产生免疫保护，目前已批准应用于人体的灭活病毒疫苗是由对人类危害较大的两种甲型流感病毒 (H1N1 和 H3N2) 和一种乙型流感病毒组成的三价灭活疫苗。虽然针对 HA 和 NA 设计的灭活全病毒疫苗安全性较高、抗原组分齐全、免疫原性强，能够抵抗同亚型流感病毒的攻击，提供良好的免疫保护。但当前疫苗在流感病毒流行和爆发期间的防治效果并不非常理想，一方面和病毒本身的特点具有重要的关系，同时疫苗设计方法、研发策略和保护效果等也有着直接的影响。首先流感病毒的 HA 和 NA 蛋白易发生抗原漂移或转变，新疫苗的生产要随着流行毒株的变异而及时更新，病毒疫苗株的选育费时费力，生产周期长、成本高，难以适应防控流感大流行的需要。其次灭活疫苗难以对病毒的感染产生完全充分的免疫保护，无法有效的刺激

细胞免疫反应，因此选择疫苗设计的合适靶抗原、加快候选疫苗株的高效筛选及充分提高疫苗的免疫保护效果是当前流感疫苗研究中非常关键和急需解决的问题。

[0005] 流感病毒疫苗靶抗原选择中，除了病毒表面 HA 和 NA 蛋白外，基质蛋白 M 也被众多学者广泛报道，M 蛋白由病毒 RNA 节段 7 编码，含 1027 个核苷酸，包括非糖基化结构蛋白 M1 和 M2。M1 和 M2 编码区部分重叠，但具有不同的开放读码框架，M1 蛋白由 252 个氨基酸编码，M2 蛋白编码区包括核苷酸 26~51 和 740~1007，编码 97 个氨基酸。M1 形成二聚体，结合病毒 RNA 和囊膜，在病毒核衣壳组装时发挥作用。M1 变异率低、具有型特异性，抗原的差异是病毒分型的依据之一。M2 蛋白是流感病毒膜蛋白之一，甲型流感病毒包膜上低密度表达，在感染细胞胞膜上分布广泛。M2 蛋白以同源四聚体形式存在内脂膜上，具有质子泵作用，通过控制质子通道活性调节病毒内的 pH 值，影响流感病毒的复制。由于 M2 蛋白是除 HA、NA 外的第三种跨膜蛋白，在人类 A 型流感病毒中高度保守。M2 蛋白作为具有交叉保护能力的“通用流感疫苗”（universal influenza vaccine）候选靶抗原，已成为目前流感病毒通用疫苗研究的热点。

[0006] 疫苗保护效果的提高上，减毒活疫苗（live attenuated influenza vaccine, LAIV）能够刺激体液免疫和细胞免疫，是目前流感疫苗研究的热点和开发的主要方向之一。流感病毒减毒活疫苗与灭活疫苗相比有较多优势。减毒活疫苗的免疫途径与病毒自然感染相似，呼吸道复制能够诱导有效的黏膜免疫应答，产生大量分泌型 IgA，诱导较强的细胞和体液免疫应答，有效控制病毒在呼吸道繁殖；可以通过滴鼻或喷鼻途径给药，非常方便，避免了注射途径带来的问题；经鼻免疫减毒疫苗所诱导细胞免疫及 sIgA 抗体对不同亚型流感病毒具有一定的交叉保护作用。

[0007] 减毒活疫苗传统的设计方法是在非生理条件下多次选择性突变的正向遗传学方法进行候选活疫苗筛选，仅能产生少量候选疫苗株。流感病毒冷适应减毒疫苗制备过程复杂耗时费力，技术要求高。当前利用反向遗传技术将 6 个来自冷适应病毒株的基因和 2 个来源于当年流行病毒株的 HA 和 NA 基因分别克隆到 8 个质粒中，共转染哺乳动物细胞，能够简化冷适应减毒活疫苗制备过程，加快疫苗开发。然而反向遗传技术仍不能进行减毒活疫苗候选株的大规模快速筛选，难以适应当前流感流行的防控需要。如果使用新的技术方法结合反向遗传操作加快并大规模进行候选疫苗株筛选，能够为当前流感病毒减毒活疫苗的设计提供新的研究方向，也能够为其他具有反向遗传操作平台的病毒的疫苗设计和开发提供参考。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于得到一种流感病毒株，并将其应用于疫苗的生产。

[0009] 本发明采用如下技术方案：

一种流感病毒株，其保藏号为 CGMCC No.13784。保藏日期为 2017 年 2 月 21 日。分类命名为 Influenza A virus (A/WSN/1933(H1N1))。

[0010] 其中，所述流感病毒株的 M 基因序列，如 SEQ ID No.1 所示。

[0011] 其中，所述流感病毒株在野生型流感病毒株的 M2 基因编码区的第 78nt 后面插入了 15nt 的序列，如 SEQ ID No.2 所示。

[0012] 上述流感病毒株在制备用于预防和/或治疗流感的药物中的应用。

[0013] 特别的，所述的药物选自流感弱毒活疫苗、流感灭活疫苗、流感多肽疫苗或流感基因工程疫苗。

[0014] 一种流感疫苗，所述的疫苗中含有上述流感病毒株。

[0015] 进一步的，所述疫苗为流感病毒弱毒活疫苗。

[0016] 一种用于制备抗体、杂交瘤细胞或抗血清的方法，根据上述的流感病毒株、所述病毒株的裂解成份、所述病毒株的基因工程蛋白或所述病毒株的多肽为免疫原进行制备。

[0017] 由上述制备方法得到的制备抗体、杂交瘤细胞或抗血清。

[0018] 上述流感病毒株在制备流感诊断制剂中的应用。

[0019] 进一步的，所述的诊断制剂包括抗原检测试剂盒、抗体检测试剂盒和核酸检测试剂盒。

[0020] 进一步的，所述的抗原检测试剂盒中的抗原选自上述流感病毒株、上述流感病毒株的裂解成份、上述流感病毒株的基因工程蛋白或上述流感病毒株的多肽；所述抗体检测试剂盒中的抗体选自所述流感病毒株、所述流感病毒株的裂解成份、所述流感病毒株的基因工程蛋白或流感病毒株的多肽制备的单抗或多抗。

[0021] 本发明的有益效果在于：所述流感病毒株安全稳定，能够给机体提供高效广谱的免疫保护。流感病毒株的进一步开发使用，不但能够克服传统流感灭活疫苗所面临的各种问题，而且其很多方面都优于目前市售的常规弱毒活疫苗。此外，流感病毒株的开发利用，也能为其他病毒弱毒活疫苗研制提供参考。

附图说明

[0022] 图 1 野生型 WSN 病毒和 W7-791 突变型病毒 M2 蛋白核酸和蛋白序列比较。

[0023] 图 1 中，(A) 核酸比较；(B) 蛋白质序列比较。

[0024] 图 2 在 M2 蛋白晶体结构上标记 W7-791 插入位置。

[0025] 图 3 病毒滴度测定。(用 0.25 MOI 的野生型 WSN 病毒和 W7-791 病毒感染 MDCK

细胞来检测不同时间点的病毒滴度)。

[0026] 图 4 W7-791 感染对 MDCK 细胞存活的影响。

[0027] 图 5 W7-791 病毒免疫效果评价。

[0028] 图 5 中, (A, C) 接种 10^6 、 10^7 或者 10^8 TCID₅₀ 的 W7-791 或野生型 WSN 病毒后小鼠体重检测; (B, D) 接种后第四和第六天病毒滴度测定; (E) W7-791、WSN 或 PBS 接种新生 BALB/c 小鼠后小鼠体重监测。

[0029] 图 6 W7-791 单次免疫能够激活对致死剂量流感病毒感染的保护。

[0030] 图 6 中, (A) 小鼠免疫和病毒感染流程示意图; (B-C) 每组 5 只小鼠滴鼻免疫 10^5 PFU 的 W7-791 或者同体积 PBS, 免疫一个月后接种 4 倍 MLD₅₀ 的 WSN 病毒, 在病毒感染后定时检测小鼠体重和存活状况; (D-E) 每组 5 只小鼠滴鼻免疫 10^5 PFU 的 W7-791 或者 PBS, 免疫一个月后接种 4 倍 MLD₅₀ 的 PR8 病毒, 病毒感染后定时检测小鼠体重和存活状况。*** 代表 P-值<0.001。

[0031] 图 7 W7-791 单次免疫能够激活针对致死剂量异型流感感染的强大交叉保护作用。

[0032] 图 7 中, (A-B) 6 只小鼠被滴鼻免疫了 10^6 pfu W7-791 或 PBS. 三个星期免疫以后, 小鼠被接种 2MLD₅₀ Cam/H5。在标明的时间点检测小鼠体重和存活情况。(C-D) 小鼠被滴鼻免疫 10^5 pfu W7-791 (n=9) 或 PBS (n=6) 免疫一个月以后, 小鼠被接种 2MLD₅₀ Vic/H3。在标明的时间点检测小鼠体重和存活情况。(E-F) 新生小鼠被 W7-791 免疫三周以后接种 WSN (10^5 or 10^6 TCID₅₀) 和 HK68/H3 (10^6 or 10^7 TCID₅₀), 观察小鼠体重变化。*** 代表 P-值<0.001。

[0033] 图 8 W7-791 能够更好的保护小鼠被异型 H3 病毒感染。

[0034] 图 8 中, C57BL/6 小鼠被免疫了 10^6 TCID₅₀ FluMist (2016 年) 或者 W7-791。一个月以后, 这些小鼠被感染 2MLD₅₀ HK68 H3N1。两图分别显示感染以后小鼠体重变化和存活情况。

[0035] 图 9 W7-791 能够激活体液和细胞介导的免疫应答。

[0036] 图 9 中, (A) 小鼠肺匀浆液中病毒滴度检测; (B) 免疫小鼠血清 HAI 活性检测; (C) 免疫小鼠血清抗流感病毒抗体检测; (D) 微量中和实验测定 W7-791 免疫小鼠血清中的中和抗体滴度; (E-F) 过继 W7-791 免疫小鼠的血清到未免疫小鼠体内, 24 小时后接种致死量的 WSN 和 HK68/H3 病毒, 观察并记录各时间点小鼠存活率; (G-H) 过继 W7-791 免疫小鼠的 T 细胞到未免疫小鼠体内, 24 小时后接种致死量的 WSN 和 HK68/H3 病毒, 观察并记录各时间点小鼠的存活率。

[0037] 图 10 单次 W7-791 免疫能够在雪貂体内激发活异型病毒保护作用。

[0038] 图 10 中, (A) 滴鼻接种 10^6 , 10^7 或 10^8 TCID₅₀ W7-791 或 PBS 后观察雪貂体温变化。(B) 雪貂感染 W7-791 或 10^6 TCID₅₀ WSN 后进行临床打分。(C) HAI 分析显示 W7-791 免疫过的雪貂提高了血清中抗 W7-791 抗体滴度。(D) HAI 分析显示感染 21 天以后, 血清中抗 H1HA 或者 H3HA 抗体升高.免疫或者没有免疫过的雪貂接种 10^6 TCID₅₀ WSN 或 HK68/H 后, 评价(E-F)病毒滴度和(G-H)临床打分。

具体实施方式

[0039] 为了更加清楚明了的叙述, 下文中, 本发明的流感病毒株采用 W7-791 指代。

[0040] 实施例 1 W7-791 的制备方法

Mu 噬菌体转座子介导 (transposon-mediated mutagenesis) 的随机插入高密度突变技术是一种能够在 DNA 中随机性插入一段 15bp (5' -NNNNNTGCGGCCGCA-3', N 代表靶序列 DNA 上 5 个重复碱基) 的短核苷酸序列, 从而产生高库容的基因插入突变体文库的方法。将其与病毒方向遗传学操作技术结合就能获得相应的病毒突变体文库, 再结合 PCR 扩增、毛细管电泳、荧光标记 DNA 测序技术和片段长度多态性分析 (AFLP) 等技术就能够准确鉴定突变数量和插入位点。这一技术已被广泛用于各种病毒基因组功能及病毒与宿主相互作用的研究。

[0041] 本发明以流感病毒 (A/WSN/1933(H1N1)) 基质蛋白 M 为靶基因通过 Mu 噬菌体转座子介导的随机插入技术建立了含 M 基因的高密度突变库 (突变效率大于 10^5), 并通过反向遗传操作技术获得了 M 基因高密度突变的流感病毒库。在此基础上综合应用体内筛选的方法和第二代测序技术从病毒突变体库中筛选到一株致弱性突变流感病毒株 W7-791。在对 W7-791 的致病力及免疫保护性进行全面检测和评价后, 发现 W7-791 是一株非常理想的流感病毒弱毒活疫苗毒株, 具有能够用于流感病毒防治的候选疫苗毒株。

[0042] 实施例 2 W7-791 的基本信息

W7-791 是通过结合新兴第二代高通量测序技术和疫苗体内筛选技术, 从病毒 M 基因被高频突变的流感病毒突变体库中筛选得到的流感弱毒活疫苗毒株。对病毒具体遗传物质 (病毒基因组 RNA) 的分析显示, W7-791 在其 M2 基因编码区的第 78nt (指病毒基因组对应的 cDNA) 后面插入了 GTCATTGCGGCCGCA 这一 15nt 的序列 (SEQ ID No.2)。对应到蛋白质水平, W7-791 病毒 M2 蛋白的第 26 个氨基酸的后面插入了 RHCGR1 的肽段。从 M2 蛋白的整体结构来看, 这段插入肽段是位于 M2 蛋白离子通道的胞浆段 (如图 1 和图 2 所示)。

[0043] 实施例 3 W7-791 在体外细胞培养中和小鼠体内的复制动力学

(1) W7-791 在细胞培养中的复制

当我们用野生型 WSN (WT-WSN) 和 W7-791 以 MOI 为 0.25 感染 MDCK 细胞, 然后在不同的时间点检测感染细胞上清中病毒的滴度, 结果显示, W7-791 的复制虽然要比 WT-WSN 要慢, 但其在 MDCK 细胞中也表现出良好的复制能力, 在复制的高峰点, W7-791 能够达到与 WT-WSN 基本一致的病毒滴度 (如图 3 所示)。

[0044] (2) W7-791 在小鼠体内的复制

W7-791 病毒虽然在感染小鼠后前六天能够在小鼠体内有效地复制, 在肺脏能够检测到较高滴度的病毒, 但是在感染后 6-8 天时则被机体清除, 此时几乎检测不到这些病毒的存在。但在整个感染过程中小鼠不会出现任何流感相关症状。

[0045] 实施例 4 W7-791 的安全性和遗传稳定性

良好的弱毒活疫苗需要具有绝对的安全性, 而且其表型和基因型需要能够在代际之间稳定遗传。所以, 我们对弱毒疫苗候选毒株 W7-791 进行了系统全面的安全性和遗传稳定性评价。

(1) W7-791 感染对细胞的毒性检测: 我们检测了 W7-791 感染 MDCK 细胞在不同时间点的细胞活力, 我们发现 W7-791 对细胞的毒性明显小于 WT-WSN 病毒 (图 4); (2) 弱毒疫苗遗传稳定性检测: 为了确保疫苗不会发生回复突变, 发生弱毒疫苗返祖的现象, 我们将 W7-791 病毒在 MDCK 细胞和小鼠体内进行了一系列的传代, 对从细胞或小鼠肺脏匀浆中获得病毒的基因序列特别是 M 基因的序列进行了测定, 我们发现 W7-791 病毒 M 基因的突变能够被稳定地遗传下去, 并不会发生插入突变的删除或回复突变的现象。而且随着传代次数的增多, W7-791 病毒的滴度也逐渐降低。这说明 W7-791 病毒所具有的突变和表型能够稳定的遗传下去。(3) 疫苗的安全性评估: 用不同滴度的 W7-791 病毒免疫 6-8 周龄小鼠, 甚至是当每只小鼠病毒接种量高达 10^7 TCID₅₀, 我们也没发现小鼠产生体重下降及流感症状。与相比, 10^3 TCID₅₀ 的野生型 WSN 病毒感染的小鼠则出现明显的流感症状并出现体重下降。W7-791 感染小鼠 6 天病毒载量要比野生型 WSN 病毒及 H3 亚型病毒感染小鼠肺内病毒滴度低 100 倍 (图 5A, B, C, D)。如果观察感染后 4 天小鼠的肺脏, 我们发现 PBS 组和 W7-791 感染小鼠的肺脏没有发生明显病变, 而野生型 WSN 病毒感染的小鼠则呈现严重的肺组织损伤。为了进一步确认 W7-791 的安全性, 我们给 15 日龄的新生 BALB/c 小鼠滴鼻接种不同量(10^6 , 10^7 or 10^8 TCID₅₀)的 W7-791 或 10^4 TCID₅₀ 的野生型 WSN 病毒, 小鼠体重和肺脏病变检测结果表明, W7-791 接种小鼠上未观察到像野生型 WSN 病毒感染小鼠那样的体重下降和肺部病变 (图 5E)。这些结果都表明, 我们筛选获得的流感病毒突变株 W7-791 是只能在体外和体内呈限制性复制, 对成年和新生小鼠都具有较高安全性的弱毒株。

[0046] 实施例 5 W7-791 的免疫保护能力**(1)** 一次免疫能够有效保护小鼠抵御致死剂量同亚型流感病毒的感染

用 W7-791 免疫小鼠，在免疫后一月，用 4 倍 MLD50 的亲本野生型 WSN 病毒或同亚型的 PR8 病毒对小鼠进行感染。我们发现未免疫组小鼠在实验过程中体重严重下降并死亡，而 W7-791 免疫小鼠一直保持了正常的体重，而且也未表现出任何流感症状（如图 6A-E）。这就说明一次免疫 W7-791 就能够有效保护小鼠抵抗致死剂量同亚型流感病毒的感染。

[0047] **(2)** 一次免疫能够为小鼠提供交叉保护抵御不同亚型流感病毒的感染

由于流感病毒可以分为不同的亚型，各亚型病毒之间缺乏交叉保护，传统的灭活疫苗需要根据不同时间段流行的不同亚型病毒进行不断的更新。所以我们进一步研究了 W7-791 能否为机体提供抗不同亚型流感病毒感染的交叉保护能力。为此，我们用先用 10^6 pfu 剂量的 W7-791 免疫 BALB/c 小鼠，在免疫后 3 周，用 2 MLD50 量的 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 A/Cambodia/P0322095/05(Cam/H5)对免疫组和对照组小鼠进行攻毒。结果显示，未免疫的小鼠表现出各种流感症状，体重严重下降并死亡；而免疫组小鼠未出现显著的体重下降，表现出对 Cam/H5 良好的抵御能力（图 7A, B）。另外，我们也检测了 W7-791 对一株不同遗传谱系流感病毒 A/Victoria/3/75 H3N2 (Vic/H3)的免疫保护作用，小鼠用 10^5 pfu 的 W7-791 免疫后 4 周用 2 MLD50 的 Vic/H3 进行感染。结果显示，W7-791 免疫小鼠在攻毒后 3-5 天的时间段内体重只下降了约 10%后逐渐恢复，而免疫对照组的小鼠都死亡（图 7C, D）。另外，我们也检测了 W7-791 能否为新生小鼠提供交叉保护，从而抵御致死剂量的亲本 WSN 病毒或其他不同亚型致死剂量流感病毒的感染。用 10^6 TCID50 的 W7-791 病毒免疫 15 日龄的 BALB/c 小鼠，然后用致死剂量的 WSN 病毒(10^5 or 10^6 TCID50/mice)或 A/Hong Kong/68 H3N1 (HK68/H3) (10^6 or 10^7 TCID50/mice)病毒对小鼠进行攻毒。与成年小鼠类似，所有被免疫的小鼠都得到了保护，并从体内清除了病毒（图 7E, F）。

[0048] 最后，我们比较了 W7-791 与商品化的在 2015-2016 期间推荐使用的流感病毒弱毒活疫苗 FluMist®的免疫效果。FluMist®是由四种流感弱毒株组成，包括两个 B 型流感病毒弱毒株、一个 H3N2(Switzerland/9715293/2013)和一个 H1N1 (California/7/2009 pandemic virus)弱毒株。用同样量的两种弱毒疫苗免疫小鼠并用同样量的 HK68/H3 病毒攻毒，结果显示，W7-791 的免疫保护效果要优于 FluMist®的免疫效果（图 8）。从上述研究可以看出，W7-791 的一次接种免疫，能够为机体提供非常有效的交叉免疫保护。

[0049] 实施例 6 W7-791 能够同时激发有效的体液免疫和细胞免疫应答

通过流感病毒血凝抑制实验或病毒中和实验可以测定免疫小鼠血清中流感特异性抗体或病毒

中和抗体。免疫小鼠抗体检测结果表明，W7-791 免疫的小鼠只产生了 WSN 病毒特异性的抗体，而没有针对 PR8 病毒、HK68(H3N1)、Wis(H3N2)病毒的抗体（如图 9A-C）。而将 W7-791 免疫小鼠的血清过继转移给未免疫小鼠，在用各种病毒对这些小鼠感染时，免疫小鼠血清除能提供部分针对 WSN 本身的保护了外，并不能保护其他病毒对小鼠的感染（图 9D-F）。这就说明体液免疫并不是 W7-791 病毒株所提供免疫力的唯一来源。

[0050] 将 W7-791 免疫小鼠的 T 淋巴细胞过继转移给未免疫小鼠，然后用不同的野生型流感病毒感染小鼠，观察所过继 T 淋巴细胞可能为小鼠所能提供的免疫力，从而确定 T 细胞免疫在疫苗保护中所发挥的作用。我们发现，当 W7-791 免疫小鼠的 T 细胞过继转移给未免疫小鼠后，能够使小鼠获得部分广谱的保护力，从而在一定程度上降低小鼠在受到各种流感病毒感染时的发病程度和疾病症状（图 9D-F）。由此说明 W7-791 能有效诱导机体产生保护性 T 细胞免疫应答，这也符合流感病毒弱毒活疫苗免疫的特点。

[0051] 实施例 7 W7-791 一次免疫能够有效保护雪貂免受不同流感病毒的感染

雪貂目前认为是更好的流感病毒感染模型。为了进一步研究和确认 W7-791 作为流感病毒弱毒活疫苗的有效性，我们测试了 W7-791 对雪貂的免疫保护作用。首先，为了评估 W7-791 对雪貂的感染和致病力，我们分别用 10^6 、 10^7 and 10^8 TCID₅₀ 的 W7-791 疫苗株病毒感染雪貂，然后观察病毒所引起的流感症状。我们发现， 10^8 TCID₅₀ 剂量的 W7-791 并未导致雪貂出现体温升高和其他流感症状，这就说明 W7-791 对于雪貂有着与小鼠相同的安全性（图 10A, B）。然后，我们检测了 W7-791 免疫雪貂体内的抗体水平，发现雪貂体内疫苗特异性抗体明显增加（图 10C），但是血凝抑制实验结果表明，这些抗体只能结合 WSN 的 HA，而不能结合 HK68/H3 或 H5N1 病毒的 HA（图 10D）。在雪貂用 W7-791 免疫后 4 周，我们分别用 10^6 TCID₅₀ 的 WSN、 10^6 TCID₅₀ 的 HK68/H3 病毒进行攻毒，结果显示，与未免疫动物相比，用 10^3 和 104.7 TCID₅₀ 的 W7-791 免疫的雪貂，攻毒后两天雪貂体内基本检测不到病毒（图 10E-F）。而且免疫雪貂在攻毒后所表现出的流感相关症状也明显较轻（图 10 G-H）。

[0052] 根据上述的实施例对本发明作了详细描述。需说明的是，以上的实施例仅为了举例说明发明而已。在不偏离本发明的精神和实质的前提下，本领域技术人员可以设计出本发明的多种替换方案和改进方案，其均应被理解为在本发明的保护范围之内。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/R0/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 1.01.00 MT/FOP 20140331/0.20.5.21
0-2	国际申请号	PCT/CN2017/080561
0-3	申请人或代理人的档案号	xsj201704141

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	第【0009】段
1-2	行号:	第2~3行
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
1-3-2	保藏单位地址	中国微生物菌种保藏委员会, 中国北京市2714信箱, 邮政编码:100080, Beijing (CN)。
1-3-3	保藏日期	2017年 2月 21日 (21.02.2017)
1-3-4	保藏号	CGMCC 13784
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	受权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	受权官员	

权 利 要 求 书

1. 一种流感病毒株，其特征在于，其保藏号为 CGMCC No.13784。
2. 根据权利要求 1 所述的一种流感病毒株，其特征在于，所述流感病毒株的 M 基因序列，如 SEQ ID No.1 所示。
3. 根据权利要求 1 所述的一种流感病毒株，其特征在于，所述流感病毒株在野生型流感病毒株的 M2 基因编码区的第 78nt 后面插入了 15nt 的序列，所述 15nt 的序列如 SEQ ID No.2 所示。
4. 如权利要求 1 所述的流感病毒株在制备用于预防和/或治疗流感的疫苗中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的疫苗选自流感弱毒活疫苗、流感灭活疫苗、流感多肽疫苗或流感基因工程疫苗。
6. 一种流感疫苗，其特征在于，所述的疫苗中含有如权利要求 1 所述的流感病毒株。
7. 根据权利要求 6 所述的一种流感疫苗，其特征在于，所述疫苗为流感病毒弱毒活疫苗。
8. 一种用于制备抗体、杂交瘤细胞或抗血清的方法，其特征在于，根据权利要求 1 所述的流感病毒株、所述病毒株的裂解成份、所述病毒株的基因工程蛋白或所述病毒株的多肽为免疫原进行制备。
9. 根据权利要求 8 所述的方法得到的制备抗体、杂交瘤细胞或抗血清。
10. 如权利要求 1 所述的流感病毒株在制备流感诊断制剂中的应用。

A

WT-M2	1	ATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGCCATCAGAAACGAATGGGGGTG	50
W7-791	1	ATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAACGCCATCAGAAACGAATGGGGGTG	50
WT-M2	51	CAGATGCAACGATTCAAGTGATCTC-----TCGTCATTG	85
W7-791	51	CAGATGCAACGATTCAAGTGATCTCgtcattgcggccgcaTCGTCATTG	100
WT-M2	86	CAGCAATATCATTGGAATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGT	135
W7-791	101	CAGCAATATCATTGGAATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGT	150
WT-M2	136	CTTTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCCCTAAATACGGTTTGAAAAGAGG	185
W7-791	151	CTTTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCCCTAAATACGGTTTGAAAAGAGG	200
WT-M2	186	GCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGG	235
W7-791	201	GCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGG	250
WT-M2	236	AACAGCAGAATGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTGTCAACATAGAG	285
W7-791	251	AACAGCAGAATGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTGTCAACATAGAG	300
WT-M2	286	CTGGAGT	292
W7-791	301	CTGGAGT	307

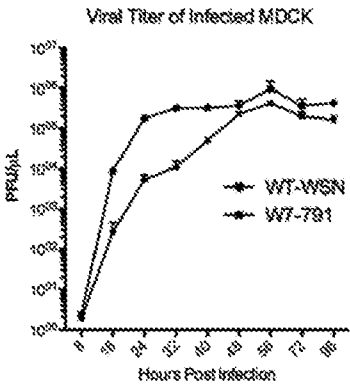
B

WT-M2	1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSDP-----LVIAANIIGILHLILWILDR	45
W7-791	1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSDPRHCGRIVIAANIIGILHLILWILDR	50
WT-M2	46	LFFKCIYRRLKYGLKRGPSLEGVPESMREEYRKEQQNAVDVDDGHFVNIE	95
W7-791	51	LFFKCIYRRLKYGLKRGPSLEGVPESMREEYRKEQQNAVDVDDGHFVNIE	100
WT-M2	96	LE	97
W7-791	101	LE	102

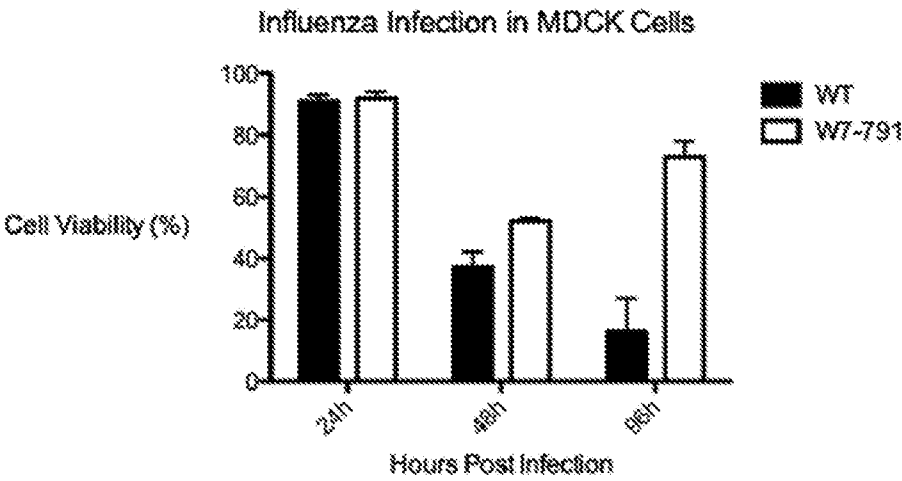
【图号】 图 1



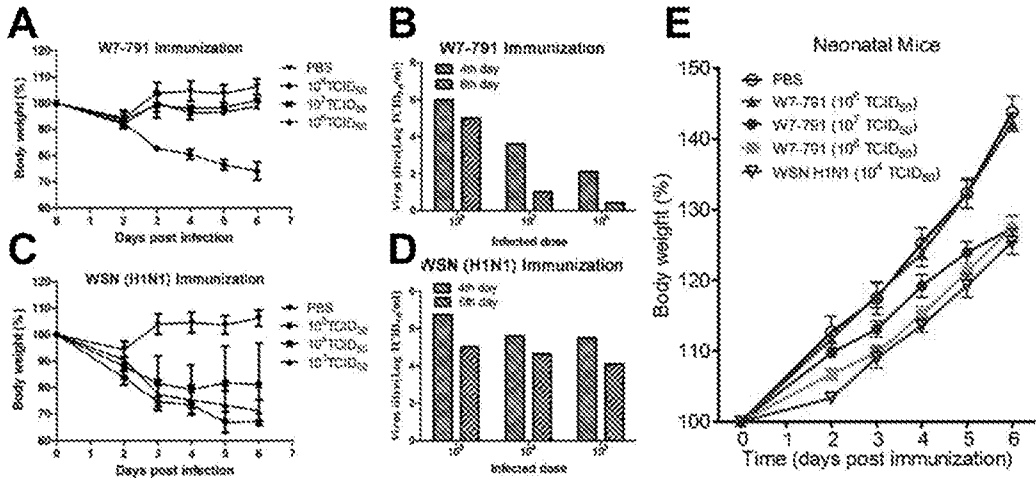
【图号】 图 2



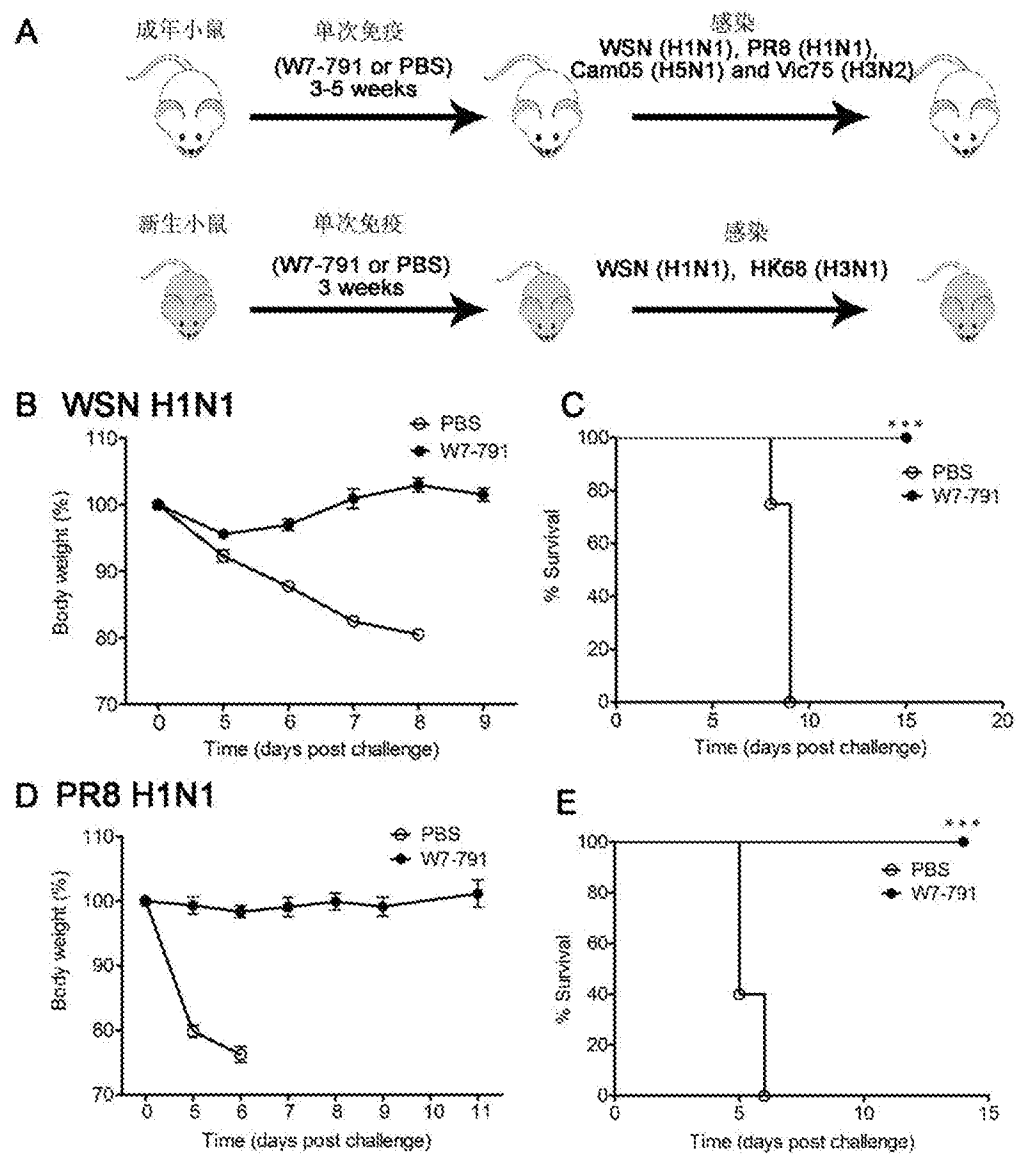
【图号】 图 3



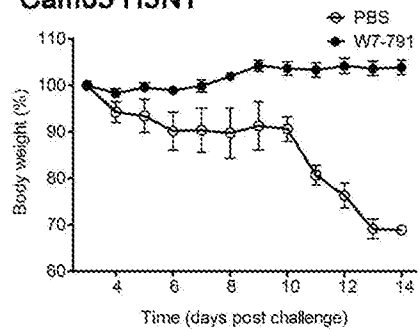
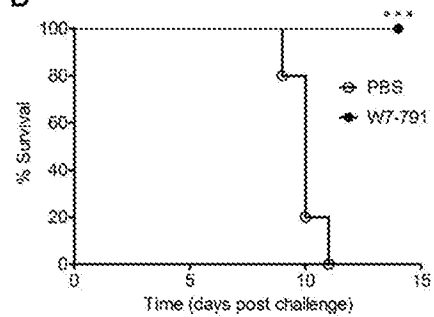
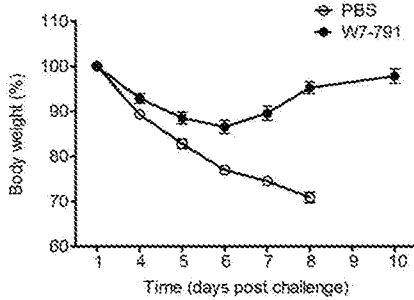
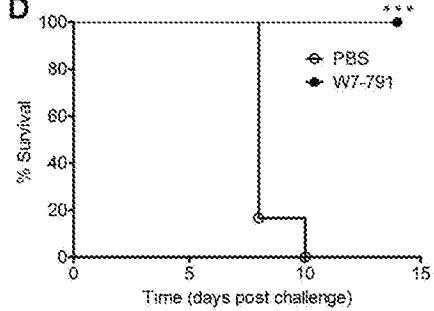
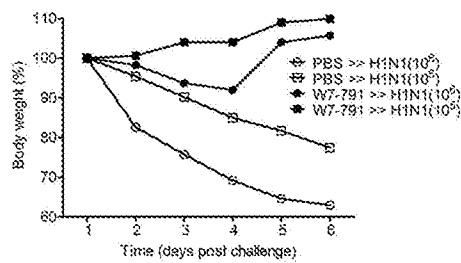
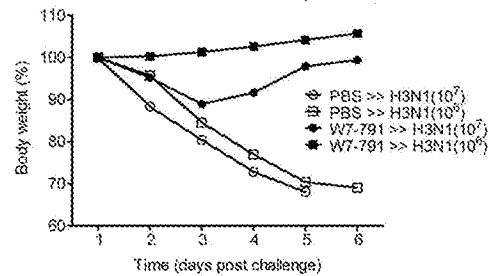
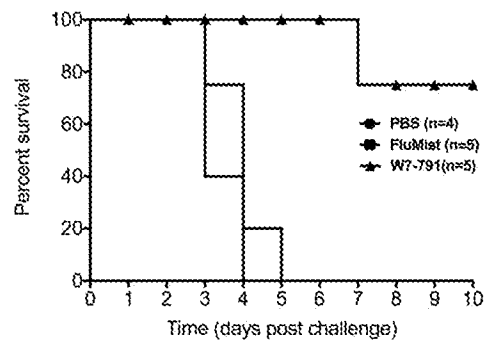
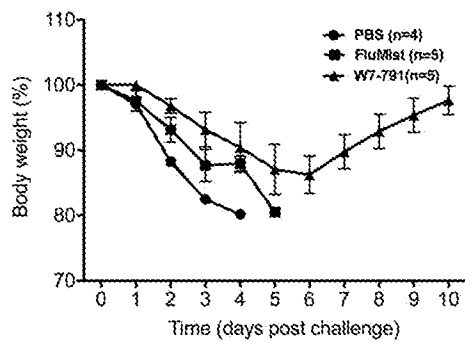
【图号】 图 4

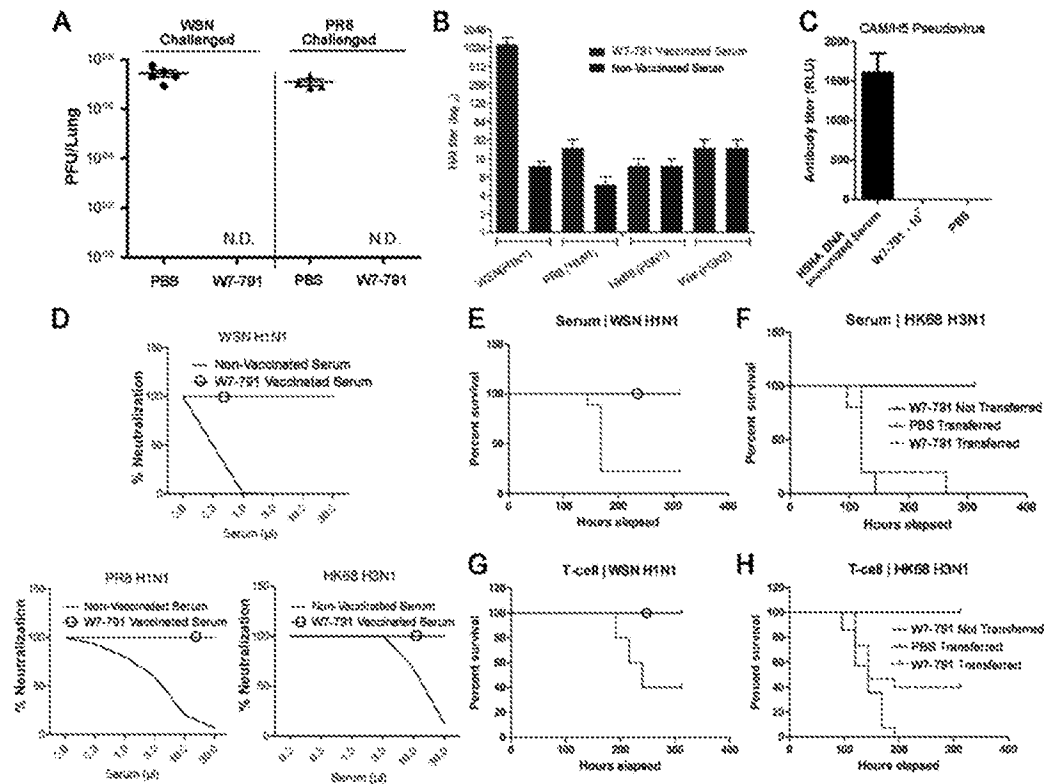


【图号】 图 5

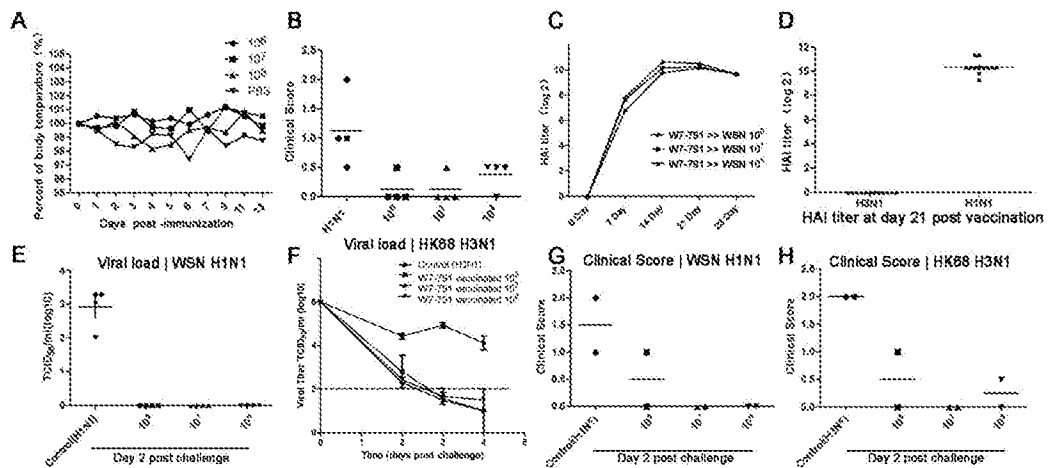


【图号】 图 6

A Cam05 H5N1**B****C Vic75 H3N2****D****E Neonatal Mice (H1N1)****F Neonatal Mice (H3N1)****【图号】 图 7****【图号】 图 8**



【图号】 图9



【图号】 图10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/080561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 7/01 (2006.01) i; C12N 15/33 (2006.01) i; A61K 39/145 (2006.01) i; A61P 31/16 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of science: H1N1, M2, 甲型, A 型, 流感病毒; GenBank+EMBL+DDBJ: Search for SEQ ID NOs: 1, 2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102612559 A (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE), 25 July 2012 (25.07.2012), see entire document	1-8, 10
A	CN 103781901 A (FLUGEN, INC.), 07 May 2014 (07.05.2014), see entire document	1-8, 10
A	FILETTE, M.D. et al., "Universal Influenza A Vaccine: Optimization of M2-based Constructs", Virology, 337(1), 03 May 2005 (03.05.2005), ISSN: 0042-6822, pages 149-161	1-8, 10
A	FRACE, A.M. et al., "Modified M2 Proteins Produce Heterotypic Immunity Against Influenza A Virus", Vaccine, 17(18), 04 May 1999 (04.05.1999), ISSN: 0264-410X, pages 2237-2244	1-8, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 23 November 2017	Date of mailing of the international search report 20 December 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Qiyang Telephone No. (86-10) 62088409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/080561

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WATANABE, T. et al., "Influenza A Virus with Defective M2 Ion Channel Activity as a Live Vaccine", Virology, 299(2), 01 August 2002 (01.08.2002), ISSN: 1743-422X, pages 266-270, see abstract, page 267, left-hand column, paragraph 3, and figure 1	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/080561

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102612559 A	25 July 2012	JP WO2011024748 A1	31 January 2013
		US 8883165 B2	11 November 2014
		EP 2471915 A1	04 July 2012
		EP 2471915 A4	01 May 2013
		WO 2011024748 A1	03 March 2011
		CN 102612559 B	10 June 2015
		US 2012244184 A1	27 September 2012
		JP 5730204 B2	03 June 2015
CN 103781901 A	07 May 2014	JP 2014526883 A	09 October 2014
		EP 2723855 A2	30 April 2014
		EP 2723855 A4	07 January 2015
		CN 106995802 A	01 August 2017
		US 2016228535 A1	11 August 2016
		US 2016228534 A1	11 August 2016
		AU 2012272837 A2	30 January 2014
		AU 2012272837 A1	16 January 2014
		WO 2012177924 A2	27 December 2012
		MX 346625 B	27 March 2017
		WO 2012177924 A3	06 September 2013
		MX 2014000254 A	14 October 2014
		US 2014127249 A1	08 May 2014
		NZ 620242 A	26 February 2016
		AU 2012272837 B2	02 November 2017
		US 9284533 B2	15 March 2016
		CA 2875484 A1	27 December 2012
		KR 20140037235 A	26 March 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/080561

A. 主题的分类 C12N 7/01(2006.01)i; C12N 15/33(2006.01)i; A61K 39/145(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N, A61K, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of science: H1N1, M2, 甲型, A型, 流感病毒; GenBank+EMBL+DDBJ:关于 SEQ ID NOs:1, 2的检索																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 102612559 A (一般财团法人化学及血清疗法研究所) 2012年 7月 25日 (2012 - 07 - 25) 参见全文</td> <td>1-8, 10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103781901 A (复尔健有限公司) 2014年 5月 7日 (2014 - 05 - 07) 参见全文</td> <td>1-8, 10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Marina De Filette等人. "Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs" VIROLOGY, 第337卷, 第1期, 2005年 5月 3日 (2005 - 05 - 03), ISSN: 0042-6822, 第149-161页</td> <td>1-8, 10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Frace, AM等人. "Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus" Vaccine, 第17卷, 第18期, 1999年 5月 4日 (1999 - 05 - 04), ISSN: 0264-410X, 第2237-2244页</td> <td>1-8, 10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 102612559 A (一般财团法人化学及血清疗法研究所) 2012年 7月 25日 (2012 - 07 - 25) 参见全文	1-8, 10	A	CN 103781901 A (复尔健有限公司) 2014年 5月 7日 (2014 - 05 - 07) 参见全文	1-8, 10	A	Marina De Filette等人. "Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs" VIROLOGY, 第337卷, 第1期, 2005年 5月 3日 (2005 - 05 - 03), ISSN: 0042-6822, 第149-161页	1-8, 10	A	Frace, AM等人. "Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus" Vaccine, 第17卷, 第18期, 1999年 5月 4日 (1999 - 05 - 04), ISSN: 0264-410X, 第2237-2244页	1-8, 10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 102612559 A (一般财团法人化学及血清疗法研究所) 2012年 7月 25日 (2012 - 07 - 25) 参见全文	1-8, 10															
A	CN 103781901 A (复尔健有限公司) 2014年 5月 7日 (2014 - 05 - 07) 参见全文	1-8, 10															
A	Marina De Filette等人. "Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs" VIROLOGY, 第337卷, 第1期, 2005年 5月 3日 (2005 - 05 - 03), ISSN: 0042-6822, 第149-161页	1-8, 10															
A	Frace, AM等人. "Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus" Vaccine, 第17卷, 第18期, 1999年 5月 4日 (1999 - 05 - 04), ISSN: 0264-410X, 第2237-2244页	1-8, 10															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2017年 11月 23日		国际检索报告邮寄日期 2017年 12月 20日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 王启扬 电话号码 (86-10)62088409															

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Tokiko Watanabe等. "Influenza A Virus with Defective M2 Ion Channel Activity as a Live Vaccine" Virology, 第299卷, 第2期, 2002年 8月 1日 (2002 - 08 - 01), ISSN: 1743-422X, 第266-270页, 参见摘要, 第267页左栏第三段和图1	9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/080561

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102612559	A	2012年 7月 25日	JP	WO2011024748	A1	2013年 1月 31日
				US	8883165	B2	2014年 11月 11日
				EP	2471915	A1	2012年 7月 4日
				EP	2471915	A4	2013年 5月 1日
				WO	2011024748	A1	2011年 3月 3日
				CN	102612559	B	2015年 6月 10日
				US	2012244184	A1	2012年 9月 27日
				JP	5730204	B2	2015年 6月 3日
CN	103781901	A	2014年 5月 7日	JP	2014526883	A	2014年 10月 9日
				EP	2723855	A2	2014年 4月 30日
				EP	2723855	A4	2015年 1月 7日
				CN	106995802	A	2017年 8月 1日
				US	2016228535	A1	2016年 8月 11日
				US	2016228534	A1	2016年 8月 11日
				AU	2012272837	A2	2014年 1月 30日
				AU	2012272837	A1	2014年 1月 16日
				WO	2012177924	A2	2012年 12月 27日
				MX	346625	B	2017年 3月 27日
				WO	2012177924	A3	2013年 9月 6日
				MX	2014000254	A	2014年 10月 14日
				US	2014127249	A1	2014年 5月 8日
				NZ	620242	A	2016年 2月 26日
				AU	2012272837	B2	2017年 11月 2日
				US	9284533	B2	2016年 3月 15日
				CA	2875484	A1	2012年 12月 27日
				KR	20140037235	A	2014年 3月 26日