



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101405026 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 22

(21) 申请号 200780009861. 4

(22) 申请日 2007. 02. 02

(30) 优先权数据

60/765, 025 2006. 02. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 09. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/061572 2007. 02. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/092792 EN 2007. 08. 16

(73) 专利权人 全球免疫股份有限公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 理查德·C·杜克

亚历克斯·弗兰祖索夫

奥里莉亚·哈勒 托马斯·H·金

鲁迎年 维多利亚·K·霍德森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 39/02(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20030129197 A1, 2003. 07. 10,

US 20030008000 A1, 2003. 01. 09,

US 20030202982 A1, 2003. 10. 30,

US 20040156858 A1, 2004. 08. 12,

审查员 张起

权利要求书2页 说明书57页

序列表53页 附图20页

(54) 发明名称

用于诱导免疫应答的基于酵母的疫苗

(57) 摘要

在此提供的发明涉及可适应于实现所期望的免疫应答的疫苗。在此提供的有些组合物用于优先引发体液免疫应答,而其它组合物可用于优先引发细胞介导的应答。疫苗组合物的组合还可用于引发这两种类型的应答和/或调控所引发免疫应答的类型。本发明还提供了通过施用在此公开的组合物在个体中引发免疫应答的方法。这些免疫应答可用于保护个体免于各种类型的疾病、感染、和不良状况。

1. 一种疫苗,其包含:
 - a) 酵母媒介;和
 - b) 选自由下列组成的组的流感病毒融合蛋白:
 - i) 包含 M1 抗原的融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由 SEQ ID NO:4 组成;
 - ii) 包含 H1 抗原的融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由 SEQ ID NO:6 组成;
 - iii) 包含 H1 抗原的融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞外融合蛋白,所述融合蛋白由选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:36 组成的组的氨基酸序列组成;和
 - v) 包含 M1 抗原、N1 抗原和 4 种 M2e 抗原的融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由 SEQ ID NO:16 组成。
2. 权利要求 1 的疫苗,其中所述融合蛋白的表达在可诱导型启动子的控制下。
3. 权利要求 1 的疫苗,其中所述融合蛋白的表达在选自 CUP1 和 TEF2 组成的组的启动子的控制下。
4. 权利要求 1 的疫苗,其中所述酵母媒介选自完整酵母、酵母原生质球、酵母胞质体、酵母空细胞、酵母细胞壁制备物、和亚细胞酵母膜提取物或其级分组成的组。
5. 权利要求 1 的疫苗,其中所述酵母媒介来自非病原性酵母。
6. 权利要求 1 的疫苗,其中所述酵母媒介来自选自糖酵母属、裂殖糖酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属、假丝酵母属和毕赤酵母属组成的组的酵母。
7. 权利要求 6 的疫苗,其中所述糖酵母是啤酒糖酵母。
8. 权利要求 1 的疫苗,其中所述疫苗进一步包含树突细胞,其中所述树突细胞已经胞内加载了所述酵母媒介。
9. 权利要求 1 的疫苗,其进一步包含至少一种生物应答调节剂。
10. 权利要求 1 的疫苗在制备用于引发抗原特异性免疫应答的配制剂中的用途。
11. 权利要求 1 的疫苗在制备用于引发针对流感病毒抗原的抗原特异性、细胞介导的免疫应答的配制剂中的用途。
12. 权利要求 1 的疫苗在制备用于保护动物免于流感病毒感染的配制剂中的用途。
13. 权利要求 1 的疫苗在制备用于对有受流感感染的风险的群体进行免疫的配制剂、或用于治疗受到流感感染的群体的配制剂中的用途。
14. 生产流感疫苗的方法,包含生产酵母媒介,所述酵母媒介表达选自 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:36 的融合蛋白。
15. 生产用于引发针对一种或多种抗原的细胞介导的免疫应答的组合物的方法,包含:
 - a) 用编码融合蛋白的异源核酸分子转染酵母细胞或酵母原生质球,其中所述融合蛋白选自 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28 和 SEQ ID NO:36;
 - b) 通过从酵母细胞制备酵母媒介,来制备该组合物。

16. 用于在个体中引发细胞介导的免疫应答的试剂盒,所述试剂盒包含多种酵母媒介及关于所述酵母媒介用于制备配制剂的使用说明书,其中每种酵母媒介表达选自 SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :28 和 SEQ ID NO :36 的融合蛋白。

17. 权利要求 16 的试剂盒,其进一步包含至少一种别的选自由下列组成的组的组合物:

- a) 酵母膜或细胞壁颗粒,其包含至少一种流感病毒抗原;
- b) 与至少一种流感病毒抗原混合的酵母媒介;
- c) DNA 疫苗,其编码至少一种流感病毒抗原;
- d) 蛋白质亚单位疫苗,其包含至少一种流感病毒抗原;和
- e) 杀死的或灭活的流感病毒。

用于诱导免疫应答的基于酵母的疫苗

发明领域

[0001] 本发明一般涉及可引发各种类型的保护性和治疗性免疫应答（包括细胞介导的和 / 或体液免疫应答）的基于酵母的疫苗。本文中公开了包含此类基于酵母的疫苗的组合物和使用此类疫苗的方法,包括与其它类型的疫苗联用。还公开了针对流感感染给动物接种疫苗和在动物中治疗或预防流感感染的多种组合物和方法。

[0002] 发明背景

[0003] 疫苗是疾病预防和治疗的卫生保健产业可用的最划算的措施之一。然而,仍然存在为多种疾病开发安全且有效的疫苗和佐剂的迫切需要,包括那些由致病体、癌症、遗传缺陷和其它免疫系统病症引起的或有关的。关于疫苗的出版物,例如 Rabinovich et al., Science265 :1401-1404(1994),谈到仍然需要可以口服施用、只需要施用少数几次、优选在生命早期施用的安全且热稳定的疫苗。还优选可以保护个体免于超过一种疾病的联合疫苗,以及不需要佐剂且可以引发细胞介导的、体液的和粘膜免疫的疫苗。迄今为止,就算有,也只有很少的疫苗达到了所有这些标准。

[0004] 杀死的或减毒的病原体频繁用于常规疫苗,特别是针对病毒感染的疫苗。例如,目前在使用两类流感疫苗。更常规的疫苗是灭活的疫苗（含有杀死的病毒）,通过注射给药,典型的注射入上臂。第二种疫苗,称为鼻腔喷雾流感疫苗（有时称作 LAIV,即活体减毒流感疫苗 (Live Attenuated Influenza Vaccine)),在 2003 年得到批准,含有减毒的（削弱的）活体病毒,通过鼻腔喷雾来施用。如世界卫生组织 (WHO) 所提出的,A 和 B 型流感病毒都是急性呼吸道疾病的常见原因。虽然这两类病毒都可能引起可观发病率和死亡率的流行病,但是 B 型流感感染常常限于局部爆发,而 A 型流感病毒是更大流行病（包括世界范围的流行病）的主要原因。流感病毒是正粘液病毒科的成员,具有较广的宿主范围,包括人、马、犬、鸟、和猪。它是有包膜的负义 RNA 病毒,产生 8 个 RNA 区段,编码 10 种病毒蛋白质。该病毒在受感染宿主细胞的核中复制。流感病毒对于年幼的和年老的、或免疫受损的个体是最危险的。该病毒可以在鸡卵中繁殖至高滴度,鸡卵充当生成病毒以生产流感疫苗的媒介。

[0005] A 型流感病毒在其表面抗原中发生频繁变化,而 B 型流感病毒变化较不频繁。感染一种病毒株后的免疫可能不能针对后续抗原性变体提供完全保护。因此,针对流感的新疫苗必须每年设计成匹配最有可能引起下次流行病的流通病毒株。因此,WHO 每年通过监督在群体中传播的最普遍流感病毒株来收集资料,并为流感疫苗组合物提出建议。当前,疫苗中包含 A 型流感病毒的两个亚型和 B 型流感病毒的一个亚型。疫苗通常针对临床疾病保护大约 50% -80% 的健康成人。

[0006] 亚单位疫苗（其开发因重组 DNA 技术而成为可能）,迄今为止是令人失望的,因为它们只展示出有限的免疫原性。一个例子是最近的数种 HIV（人免疫缺陷病毒）亚单位疫苗的临床测试已经停止了,不仅因为疫苗的功效有限,而且因为在有些案例中受免疫的个体在随后暴露于 HIV 时显示出疾病进展加速,参见例如 Cohen, Science264 :1839(1994) 和 Cohen, Science264 :660(1994)。亚单位疫苗,以及杀死的病毒和重组活体病毒疫苗的一个缺点在于尽管它们似乎刺激强体液免疫应答,但是它们未能引发保护性的、细胞介导的免

疫。1994 年国际 AIDS 大会的一项重要结论是仍然需要细胞毒性 T 细胞介导的应答来预防或降低 HIV 侵染性,这是迄今为止临床疫苗所缺乏的。另外,迄今为止测试的 HIV 疫苗未能在发生初始 HIV 感染的粘膜表面引发免疫力。

[0007] 此外,美国唯一批准使用的佐剂是铝盐,氢氧化铝和磷酸铝,二者都不刺激细胞介导的免疫力。另外,铝盐配制剂不可冷冻或冻干,而且此类佐剂并非对所有抗原都有效。

[0008] 酵母细胞已经用于生产亚单位蛋白质疫苗,包括那些在上述 HIV 疫苗试验中所测试的其中一些。酵母还已经在免疫前喂给动物,试图以非特异性方式引发免疫应答(即刺激吞噬作用以及生成补体和干扰素)。结果是不明确的,而且此类方案没有产生保护性的、细胞介导的免疫,参见例如 Fattal-German et al., *Dev. Biol. Stand.* 77:115-120 (1992) 和 Bizzini et al., *FEMS Microbiol. Immunol.* 2:155-167 (1990)。

[0009] 先前的研究显示了使用啤酒糖酵母作为疫苗和免疫疗法载体的潜力。参见例如美国专利号 5,830,463 和 7,083,787, 以及美国专利公开号 2004-0156858A1 和 2006-0110755A1。这些基于酵母的免疫治疗性产品已经在多种动物物种中显示出在体内引发能够杀死表达多种病毒和癌抗原的靶细胞的免疫应答,而且是抗原特异性的、CD8⁺CTL 介导的方式。还可参见 Stubbs et al., *Nat. Med.* 7:625-629 (2001) 和 Lu et al., *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004)。更具体的说,其它研究显示了啤酒糖酵母受到树突细胞的积极吞噬并直接活化树突细胞,然后树突细胞以高效方式将酵母相关蛋白质呈递给 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞。参见例如 Stubbs et al., *Nature Med.* 5:625-629 (2001) 和美国专利号 7,083,787。

[0010] 在能够与树突细胞直接相互作用之外,酵母还具有多种其它特征,使得它们成为免疫疗法的理想平台。首先,可以改造多种抗原以在单一酵母株中表达。参见例如 Pichuan et al., "Expression of heterologous gene products in yeast." 于 *Protein Engineering-Principles and Practice*, pp. 129-162, J. L. Cleland and C. S. Craik, eds., Wiley-Liss, New York (1996)。这些配制剂与 DNA 疫苗共享许多优点,包括易于构建和能够靶向多种抗原。与 DNA 疫苗不同,基于酵母的免疫治疗性配制剂不需要广泛的纯化来清除可能有毒的污染物。美国食品和药品管理局 (FDA) 将酵母认证为 GRAS (一般认为是安全的 (Generally Recognized as Safe))。因此,关于其它疫苗载体中存在的毒性和安全性的考虑不适用于基于酵母的投递媒介。

[0011] 尽管存在现有的试图生产有效疫苗的努力,仍然需要有效刺激多种免疫应答的疫苗组合物。对于流感疫苗,儿童、老年人和某些高风险人群中疾病的发病率仍然是较高的,而且在发展中国家,疫苗接种可能是零星的或不存在的。在工业化国家,为满足接种群体的有效流感疫苗的生产受制于生产问题,即使用当前技术生产疫苗所需要的成本高和时间长。另外,新病毒株的威胁和未来流行病的可能性使得更有效的且高效生产的流感疫苗受到关注。因此,本领域需要针对多种流感病毒株提供长效保护而且可以快速生产和安全用于人类和其它动物的改良疫苗。然而,这些考虑和需要不单涉及流感疫苗,而且扩展至其它类型的疫苗,包括针对其它病毒和其它传染物的疫苗。

[0012] 事实上,许多病原体,包括细菌和寄生虫,分阶段感染个体,在每个阶段给免疫系统呈现不同抗原子集。另外,许多病原体进化出了一系列策略,使得病原体“躲避”或以其它方式逃避免疫系统。最后,与上文所述病毒一样,许多病原体使抗原进化和突变,特别

是那些在其表面表达或定位的,而且还可能同时受到多种病原体物种或株的感染,它们都使疫苗接种策略变得复杂。举例而言,引起疟疾的寄生虫(例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)或间日疟原虫(*Plasmodium vivax*))的感染最初因为受感染蚊子的叮咬而作为孢子经由血流进入体内,但是然后迅速感染肝细胞,孢子在那里发生根本变化而成为裂殖子。裂殖子从肝细胞中释放出来并迅速感染红细胞,在那里寄生虫繁殖、分化和继续感染其它细胞。因而,理想的疫苗能够使免疫系统致敏(prime)以识别和破坏所有阶段的寄生虫,无论是在血液中、在肝中、或在红细胞中。然而,大多数疫苗不能预防或根除所有感染,而是集中在限制病原体引起疾病的能力或对个体有毒,而生命周期的其它阶段和静止感染(quiescent infection)仍然没有得到解决。

[0013] 因此,为了抗击由其它物质引起的传染病的流行,期望有能力控制或影响所引发的免疫应答的类型,诸如通过优先引发细胞介导的免疫应答(例如生成细胞毒性T细胞(CTL))、优先引发体液应答(例如抗体应答)、或引发这两种类型的免疫应答,这取决于所预防或治疗的疾病或疾患和/或个体在给定时间点对于特定抗原或病原体的免疫状态。另外,提供能以少数施用而刺激有效免疫应答,而且还在暴露于低水平抗原时(节省剂量的(dose-sparing))有效刺激免疫应答的组合物会是有用的。

[0014] 发明概述

[0015] 本文中所公开的发明提供了组合物和方法来解决上述需要。以基于酵母的疫苗平台技术为基础的免疫治疗性产品(例如疫苗)易于生产,不受宿主免疫应答的中和,可重复施用以加强抗原特异性免疫应答,而且不需要患者特异性的制作方法。

[0016] 本发明的一个实施方案涉及一种疫苗。一方面,所述疫苗包含:(a)第一酵母媒介,其包含至少一种异源胞内抗原;和(b)第二酵母媒介,其包含至少一种异源胞外抗原。一方面,所述疫苗包含:(a)第一酵母媒介,其包含至少一种异源胞内抗原和至少一种异源胞外抗原;和(b)第二酵母媒介,其包含至少一种异源胞内抗原或至少一种异源胞外抗原。另一方面,所述疫苗包含:(a)酵母媒介,其包含至少一种异源胞内抗原和至少一种异源胞外抗原;和(b)不基于酵母的组合物,其包含至少一种由(a)的所述酵母媒介包含的抗原或来自相同病原体或疾病的抗原,其中所述不基于酵母的组合物选自DNA疫苗、蛋白质亚单位疫苗、和杀死的或灭活的病原体。

[0017] 在本发明的上述实施方案中,(a)的所述酵母媒介可以配制成用于通过与(b)的所述不基于酵母的组合物相同或不同的施用路径来投递。一方面,所述胞内抗原是由病原体内在表达的抗原。一方面,所述胞外抗原是在相同类型(type)的病原体间结构保守的抗原。一方面,所述胞外抗原是在病原体表面上表达的抗原。一方面,所述胞外抗原是在相同类型(type)的病原体间有结构差异的抗原。一方面,所述抗原来自感染性病原体。

[0018] 本发明的另一个实施方案涉及一种疫苗,其包含至少一种流感抗原。一方面,所述疫苗包含:(a)酵母媒介;和(b)流感病毒融合蛋白,所述融合蛋白由所述酵母媒介表达或提供,所述流感病毒融合蛋白包含流感病毒蛋白的至少一部分,所述流感病毒蛋白选自流感基质蛋白(M1)和流感离子通道蛋白(M2)。一方面,所述疫苗包含:(a)第一酵母媒介,其表达流感病毒融合蛋白,所述流感病毒融合蛋白包含流感病毒蛋白的至少一部分,所述流感病毒蛋白选自流感基质蛋白(M1)、流感离子通道蛋白(M2)、和核壳体蛋白(NP);和(b)至少一种别的酵母媒介,其表达流感病毒融合蛋白,所述流感病毒融合蛋白包含流感病毒

蛋白的至少一部分,所述流感病毒蛋白选自血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶蛋白(HA)。一方面,所述疫苗包含:(a) 酵母媒介;和(b) 流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达或提供,所述流感病毒融合蛋白包含至少一种第一流感病毒蛋白的至少一部分、以及至少一种第二流感病毒蛋白的至少一部分,所述第一流感病毒蛋白选自流感基质蛋白(M1)、流感离子通道蛋白(M2)、和核壳体蛋白(NP),所述第二流感病毒蛋白选自血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶蛋白(HA)。另一方面,所述疫苗包含:(a) 酵母媒介;(b) 第一流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达或提供,所述第一流感病毒融合蛋白包含至少一种流感病毒蛋白的至少一部分,所述流感病毒蛋白选自流感基质蛋白(M1)、流感离子通道蛋白(M2)、和核壳体蛋白(NP);和(c) 第二流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达,所述第二流感病毒融合蛋白包含至少一种流感病毒蛋白的至少一部分,所述流感病毒蛋白选自血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶蛋白(HA)。又一方面,所述疫苗包含:(a) 酵母媒介;和(b) 至少一种第一流感病毒蛋白的至少一部分,所述第一流感病毒蛋白选自流感基质蛋白(M1)、流感离子通道蛋白(M2)、和核壳体蛋白(NP);和(c) 至少一种第二流感病毒蛋白的至少一部分,所述第二流感病毒蛋白选自血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶蛋白(HA)。

[0019] 在上述实施方案中,一方面,所述HA蛋白选自H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15和H16。一方面,所述HA蛋白选自H1、H2和H3。一方面,所述HA蛋白是H5。一方面,所述NA蛋白选自N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8和N9。一方面,所述NA蛋白选自N1和N2。一方面,所述M1蛋白对于所述酵母媒介是胞内的。一方面,所述M2蛋白对于所述酵母媒介是胞内的、胞外的、或二者。一方面,所述M2蛋白是M2e。一方面,所述NP蛋白对于所述酵母媒介是胞内的。一方面,所述HA蛋白或所述NA蛋白对于所述酵母媒介是胞外的。在这方面,所述NA蛋白对于所述酵母媒介也可以是胞内的。

[0020] 在上述实施方案中,一方面,所述流感病毒融合蛋白在其N端包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列(MADEAP)。一方面,所述流感病毒融合蛋白在其N端或C端包含Aga2蛋白或Cwp2蛋白的至少一部分,其足以使所述融合蛋白靶向所述酵母媒介的细胞壁。

[0021] 本发明的另一个实施方案包括一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含M1抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由SEQ ID NO:4组成。

[0022] 本发明的另一个实施方案包括一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含H1抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由选自SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成。

[0023] 本发明的又一个实施方案包括一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含H1抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞外融合蛋白,所述融合蛋白由选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成。

[0024] 本发明的另一个实施方案涉及一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含H5抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞外融合蛋白,所述融合蛋白由选自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成。

[0025] 本发明的又一个实施方案涉及一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含M1抗原、N1抗原和4种M2e抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由SEQ ID NO:16组成。

[0026] 本发明的另一个实施方案涉及一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含 N1 抗原和 2 种 M2e 抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞内融合蛋白,所述融合蛋白由 SEQ ID NO:18 组成。

[0027] 本发明的另一个实施方案涉及一种疫苗,其包含:(a) 酵母媒介;和(b) 包含 H3 抗原和 N2 抗原的流感病毒融合蛋白,其由所述酵母媒介表达为单一胞外融合蛋白。

[0028] 在任何上述实施方案中,一方面,所述融合蛋白的表达在可诱导型启动子的控制下。在任何上述实施方案的一个方面,所述启动子选自 CUP1 和 TEF2。

[0029] 在任何上述实施方案的一个方面,所述酵母媒介选自完整酵母、酵母原生质球、酵母胞质体 (cytoplast)、酵母空细胞 (ghost)、酵母细胞壁制备物、和亚细胞酵母膜提取物或其级分。在任何上述实施方案的一个方面,将用于制备所述酵母媒介的酵母细胞或酵母原生质球用编码所述融合蛋白的重组核酸分子转化,使得所述融合蛋白由所述酵母细胞或酵母原生质球表达。在任何上述实施方案的一个方面,将表达所述融合蛋白的所述酵母细胞或酵母原生质球用于生成酵母媒介,其包含酵母胞质体、酵母空细胞、酵母细胞壁制备物、或亚细胞酵母膜提取物或其级分。在任何上述实施方案的一个方面,所述酵母媒介来自非病原性酵母。在任何上述实施方案的一个方面,所述酵母媒介来自选自糖酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖糖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、克鲁维酵母属 (*Kluveromyces*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、假丝酵母属 (*Candida*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*) 的酵母。在任何上述实施方案的一个方面,所述糖酵母是啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*)。

[0030] 在任何上述实施方案的一个方面,所述疫苗进一步包含树突细胞,其中所述树突细胞已经胞内加载了所述酵母媒介。

[0031] 在任何上述实施方案的一个方面,所述疫苗进一步包含至少一种生物应答调节剂。

[0032] 本发明的另一个实施方案涉及任何本文所述疫苗在制备用于引发抗原特异性免疫应答的配制剂中的用途。

[0033] 本发明的又一个实施方案涉及任何本文所述疫苗在制备用于保护动物免于流感感染的配制剂中的用途。

[0034] 本发明的另一个实施方案涉及任何本文所述疫苗在制备用于引发针对流感抗原的抗原特异性、细胞介导的免疫应答的配制剂中的用途。

[0035] 本发明的又一个实施方案涉及任何本文所述疫苗在制备用于治疗或预防疾病或疾患的配制剂中的用途。

[0036] 本发明的另一个实施方案涉及任何本文所述疫苗在制备用于免疫有风险变成受到流感感染的群体的配制剂中的用途。

[0037] 本发明的另一个实施方案涉及任何本文所述疫苗在制备用于治疗受到流感感染的群体的配制剂中的用途。

[0038] 本发明的另一个实施方案涉及生产本文所述任何基于酵母的疫苗(包含酵母媒介的疫苗)的方法,包括在大于 5.5 的 pH 下培养所述疫苗中的所述酵母媒介。

[0039] 本发明的又一个实施方案涉及生产流感疫苗的方法,包括将酵母媒介用流感抗原融合蛋白转染,其中所述流感抗原融合蛋白包含流感病毒蛋白的至少一部分,所述流感病毒蛋白选自流感基质蛋白 (M1)、流感离子通道蛋白 (M2)、流感病毒核壳体蛋白 (NP)、血凝

素蛋白 (HA)、和神经氨酸酶蛋白 (HA)。一方面,所述方法包括在大于 pH5.5 的 pH 培养所述酵母媒介。其它方面包括给酵母媒介加载流感病毒蛋白,将流感表达抗原与所述酵母媒介混合在一起,将流感病毒抗原物理附着至酵母媒介,配制所述经转化酵母媒介以用于通过注射给个体施用,或配制所述经转化酵母媒介以用于通过鼻内施用给个体施用。

[0040] 本发明的另一个实施方案涉及保护动物免于流感感染的方法。所述方法包括给已经感染了流感或有风险感染流感的动物施用任何本文所述包含流感抗原的疫苗,其中给动物施用疫苗降低或预防所述动物中的流感感染或至少一种由流感感染所致的症状。

[0041] 本发明的又一个实施方案涉及引发针对流感抗原的抗原特异性免疫应答的方法,包含给动物施用任何本文所述包含流感抗原的疫苗。

[0042] 本发明的另一个实施方案涉及在已经感染流感的群体中引发针对流感抗原的抗原特异性免疫应答的方法,包含给群体施用任何本文所述包含流感抗原的疫苗。

[0043] 本发明的另一个实施方案涉及针对流感对有风险变成受到流感感染的群体进行免疫的方法,包含给群体施用任何本文所述包含流感抗原的疫苗。一方面,在用不同流感疫苗加强前施用疫苗以使免疫系统致敏。

[0044] 本发明的又一个实施方案涉及针对疾病或疾患免疫群体的方法,包括:(a) 给个体施用第一疫苗,其中所述疫苗包含酵母媒介,其包含至少一种异源胞内抗原,其中所述抗原与所述疾病或疾患有关;和(b) 在施用(a)至少2周后给所述个体施用第二疫苗,其中所述第二疫苗包含酵母媒介,其包含胞外异源抗原或胞外和胞内二者的抗原。一方面,所述第一疫苗中的所述酵母媒介还包含至少一种胞外抗原。在这方面,所述抗原可以是与所述胞内抗原相同或不同的抗原。

[0045] 本发明的另一个实施方案涉及针对疾病或疾患免疫个体的方法,包括:(a) 给个体施用第一疫苗,其中所述疫苗包含酵母媒介,其包含至少一种异源胞内抗原(胞内地)和至少一种异源胞外抗原,其中所述抗原与所述疾病或疾患有关;和(b) 与(a)的施用一起或之后给所述个体施用第二疫苗,其中所述第二疫苗选自:(i) 酵母媒介,其表达或提供至少一种步骤(a)中所使用的所述异源抗原或来自相同病原体或疾病的抗原,其中所述抗原对于所述酵母是胞外的、或胞内和胞外二者;(ii) 酵母膜或细胞壁颗粒,其包含至少一种步骤(a)中所使用的所述异源抗原或来自相同病原体或疾病的抗原;(iii) 酵母媒介,其与至少一种步骤(a)中所使用的所述异源抗原或来自相同病原体或疾病的抗原混合;(iv) DNA 疫苗,其编码至少一种步骤(a)中所使用的所述抗原或来自相同病原体或疾病的抗原;(v) 蛋白质亚单位疫苗,其包含至少一种步骤(a)中所使用的所述抗原或来自相同病原体或疾病的抗原;和(vi) 杀死的或灭活的病原体,其包含步骤(a)中所使用的至少一种所述异源抗原或来自相同病原体或疾病的抗原。一方面,所述胞内抗原是与所述胞外抗原相同的抗原。一方面,所述胞内抗原与所述胞外抗原不同。一方面,所述胞内抗原是由病原体内在表达的抗原。一方面,所述胞外抗原是在相同类型(type)的病原体间结构保守的抗原。一方面,所述胞外抗原是在病原体表面上表达的抗原。一方面,所述胞外抗原是在相同类型(type)的病原体间有结构差异的抗原。一方面,所述抗原来自感染性病原体。

[0046] 本发明的另一个实施方案涉及一种试剂盒,其用于制备在个体中引发细胞介导的免疫应答、体液免疫应答、或其组合的配制剂,所述试剂盒包含多种酵母媒介,其中每种所述酵母媒介包含至少一种胞内异源抗原或至少一种胞外异源抗原,及使用所述酵母媒介来

制备所述配制剂的说明书。一方面,所述酵母媒介表达所述抗原。一方面,所述试剂盒还包含至少一种别的组合物,其选自:(a) 酵母膜或细胞壁颗粒,其包含至少一种所述异源抗原或来自相同病原体或疾病的抗原;(b) 酵母媒介,其与至少一种所述异源抗原或来自相同病原体或疾病的抗原混合;(c) DNA 疫苗,其包含编码至少一种所述抗原或来自相同病原体或疾病的抗原;(d) 蛋白质亚单位疫苗,其包含至少一种所述抗原或来自相同病原体或疾病的抗原;和/或(e) 杀死的或灭活的病原体,其包含至少一种所述异源抗原。一方面,所述胞内抗原是由病原体内在表达的抗原。一方面,所述胞外抗原是在相同类型(type)的病原体间结构保守的抗原。一方面,所述胞外抗原是在病原体表面上表达的抗原。一方面,所述胞外抗原是在相同类型(type)的病原体间有结构差异的抗原。

[0047] 附图简述

[0048] 图 1 的示意图图解了流感病毒及其数种构件。圈示了一些更高度保守的抗原。

[0049] 图 2 是 Western 印迹的数字图像,显示了酵母中流感基质蛋白 1(M1,也称为 MP 或 MP1)的胞内表达。

[0050] 图 3A 和 3B 显示了 CTL 测定法的结果,其中将小鼠用胞内表达流感基质蛋白(M1)的酵母媒介免疫引发了 M1 特异性的(图 3A)和流感病毒特异性的(图 3B)细胞毒性 T 细胞(CTL)对感染了流感的靶细胞的杀伤。

[0051] 图 4 是来自感染了流感 A/PR/8/34 的 P815 细胞的溶胞物的 Western 印迹的数字图像,图解了可以将 P815 细胞用流感病毒感染并用作 CTL 测定法中的靶细胞。

[0052] 图 5 显示了 T 淋巴细胞增殖测定法的结果,其中将小鼠用胞内表达流感基质蛋白(M1 或 MP)的酵母媒介免疫,引发了 M1 特异性的 T 细胞应答。

[0053] 图 6 显示了 T 淋巴细胞增殖测定法的结果,其中将小鼠用胞内表达流感基质蛋白(M1)的酵母媒介免疫,引发了流感特异性的 T 细胞应答。

[0054] 图 7 是 Western 印迹的数字化图像(顶部)和融合构建物的示意图(底部),图解了流感血凝素(HA)融合至 Aga2 的构建物(Aga2-HA)在酵母中的胞内表达。

[0055] 图 8 显示了 CTL 测定法的结果,其中将小鼠通过两种不同施用路径用胞内表达流感血凝素(HA)融合至 Aga2 的构建物(Aga2-HA)的酵母媒介免疫,引发了流感病毒特异性 CTL 应答。

[0056] 图 9 显示了 T 淋巴细胞增殖测定法的结果,其中将小鼠通过两种不同施用路径用胞内表达流感血凝素(HA)融合至 Aga2 的构建物(Aga2-HA)的酵母媒介免疫,引发了流感病毒特异性 T 淋巴细胞增殖应答。

[0057] 图 10A 描绘了 Tarmogen 构建示意图,其容许任何感兴趣靶抗原在酵母媒介表面的表达和定位(上图)。下图显示了一种具体的 Tarmogen,也称为 GI-8003,即改造成以 Aga2-HA 融合蛋白形式胞外展示(在其表面上展示)流感 A/PR/8/34HA(H1)的酵母媒介。所示 Western 印迹的数字化图像表明了 Aga2-HA 蛋白的表达。

[0058] 图 10B 描绘了例示性的构建物,其中抗原已经改造成在酵母表面上展示。此图例示性的图解了各种酵母蛋白质如何可用作间隔臂。

[0059] 图 11 描绘了表达图 10B 中称作 VK8 的融合蛋白的 Tarmogen,其在酵母表面上经细胞壁蛋白 2(cwp2)表达流感 HA 蛋白,并显示了来自完整细胞的流式细胞术分析的酵母表面 HA(Tarmogen,也称为 GI-8000-S)表达的柱状图,与单独的酵母媒介(GI-1001 或 YVEC)进

行比较。

[0060] 图 12A-12G 显示了柱状图,其中利用各种方法(上文所述和图 10B 中所图示的)将流感 HA 蛋白定位在表面上。图 12A 显示了图 12B 和 12C 的酵母对照(YEX)。图 12B-12C 图示了表达 Tarmogen 的 VK4(图 12B)和 TK75-15(图 12C)的表达情况。图 12D 显示了图 12E-12G 的酵母对照(YEX)。图 12E 和 12F 显示了酵母的 HAVK8 表达,其中酵母是糖基化的(图 12E)和脱糖基化的(图 12F)。图 12G 显示了表达 Lu002 的原生质球制备物的质膜上的 HA 表达。

[0061] 图 13A 和 13B 是用于胞外(图 13B)和胞内(图 13A)表达流感血凝素(HA)的构建物的示意图,所述表达可以与保守流感抗原 M1、NP 和 M2 的胞内表达联合(图 13A)。

[0062] 图 14A 和 14B 显示了三种所用方案(图 14A)的 T 细胞致敏(图 14B)和抗体生成(图 14A)。方案 A 只使用 PBS(对照)。方案 B 在第 0 和 28 天使用 PBS 进行致敏,在第 56 天使用可溶性卵清蛋白(ova)进行加强。方案 C 使用表达卵清蛋白的酵母媒介进行致敏,使用可溶性卵清蛋白进行加强。图 14B 显示了 T 细胞活化测定法的结果,其中使用各种量的可溶性卵清蛋白对自通过上文所述三种方案之一免疫的小鼠收获的 T 细胞进行体外再刺激。

[0063] 图 15 显示了实验结果,其中对 GI-2010(一种表达 HIV Gag 蛋白的 Tarmogen)测试其致敏抗体应答的能力,与用不编码任何构建物(对照)或编码 HIV-Gag 蛋白(病毒)的活体痘苗病毒感染之后观察到的体液应答进行比较。盐水和对照曲线在 GI-2010 和 YVEC 线的下方(即 GI-2010 和 YVEC 线与盐水和对照线重叠)。

[0064] 图 16A 和 16B 的示意图显示了将 B 细胞活化与衍生自针对肽的辅助 T 细胞应答的信号联合起来的要求(所述肽衍生自抗体应答所寻求的抗原)(信号 1 显示于图 16A 而信号 2 显示于图 16B)。

[0065] 图 17 是 Western 印迹的数字化图像,显示了流感 HA1 结构域融合至 Aga2 的构建物(Aga2-HA1)的细胞表面表达。

[0066] 发明详述

[0067] 本发明一般涉及用于有效引发各种类型的免疫应答(包括细胞介导的免疫应答、体液免疫应答及其组合)的组合物和方法。本发明可用于引发针对极其多种抗原(包括病原体)的保护性和/或治疗性免疫应答,而且可以优化所述应答以优先引发细胞介导的免疫应答、体液免疫应答、或细胞介导的和体液免疫应答二者(或确保其引发)。另外,可以优化由本发明的疫苗和疫苗策略所引发的免疫应答以提供如下病原体的有效应答:频繁突变和/或多个物种/株同时感染个体的病原体,以生命周期不同阶段感染个体或存在于个体中的病原体,及通过各种作用(包括靶细胞的感染)规避免疫系统的病原体。本发明所引发的免疫应答在如下情况中特别有效,即体液免疫应答可能在限制病原体引起疾病的能力方面至少有些有效,但是免疫系统未能预防或检测出病原体的有差异的形式(突变体或生命周期各形式)和/或病原体对宿主细胞的感染或占领,其然后可以规避或误导免疫应答。还可以优化由本发明的疫苗和疫苗策略所引发的免疫应答以保护或治疗患有疾病或疾患的个体,这取决于对特定疾病或疾患将会最有益的免疫应答的类型和取决于患者在给定时间点对于给定抗原或病原体的免疫状态。最后,本发明的疫苗和疫苗策略可以通过少数几次施用而刺激有效的免疫应答。而且在暴露于低水平的抗原时(节省剂量的)有效刺激

免疫应答。

[0068] 本发明提供了用于引发针对多种抗原的免疫应答的组合物和方法二者,其可用于保护性或治疗性免疫和/或疫苗接种目的。一方面,本发明提供了可引发体液免疫应答和细胞介导的免疫应答二者的组合物,在别的方面,提供了用于优先引发或致敏体液免疫应答的组合物和疫苗策略,包括为针对一种或多种感兴趣抗原的抗原特异性抗体生成而致敏,或用于优先引发或致敏细胞介导的(细胞的)免疫应答,包括细胞毒性 T 细胞应答。“优先引发”意味着可以将免疫应答推向或导向特定类型的免疫应答,主要基于如何使用本发明基于酵母的疫苗使抗原为免疫系统可用。组合物和免疫策略特别设计成提供如上所述的免疫应答优化。本发明还提供了可以增强或补充不基于酵母的疫苗(诸如 DNA 疫苗)的免疫原性或成功免疫的组合物和方法。

[0069] 更具体的说,本发明致力于改进美国专利号 5,830,463 和 7,083,787 及美国专利公开号 2004-0156858A1 和 2006-0110755A1 中所记载的涉及基于酵母的免疫治疗性产品的平台技术,并提供了用于引发针对极其多种抗原(包括病原体)的保护性和/或治疗性免疫应答的新的基于酵母的疫苗。一方面,本发明利用了有关能力,选择性设计基于酵母的疫苗组合物以在胞内、在胞外(即酵母表面表达)或这两种方式表达或提供抗原及选择不同抗原和抗原组合进行胞内和/或胞外表达/定位,用以操纵针对规定抗原优先诱导的免疫应答类型,还用以操纵免疫应答的能力以针对一种或多种特定抗原最有效地免疫个体,及最有效的预防或治疗与所述一种或多种抗原有关的疾病或疾患。

[0070] 例如,在一个实施方案中,使用本文中所公开的发明,公开了提供交叉保护性、“通用”疫苗方法(其用以提供针对一种或多种抗原的长效免疫力,重要的是,细胞介导的免疫力)的组合物和方法。本发明的这个要素利用了如下事实,对于例如病原体,某些抗原在不同株或物种的病原体间是高度保守的。另外,作为免疫应答的靶的某些细胞(例如肿瘤细胞)还可能共享特定保守抗原。此类抗原由病原体或细胞频繁的内表达(即展示在病原体或细胞表面上的抗原更有可能是易于变化或突变以规避免疫检测和清除,而对病原体或细胞而言是内在的抗原更有可能是在各株、各物种、或各细胞间保守的)。此类保守抗原(若由病原体诸如病毒内在表达的,一般也可称为内部抗原)为基于酵母的疫苗提供了基础,所述基于酵母的疫苗是交叉保护性的且能够针对抗原(且如此针对受该病原体感染或占领的细胞)引发有效的细胞介导的(细胞的免疫应答)。在这方面,保守抗原或内部抗原通常由本发明的酵母媒介胞内表达或提供。然而,这些类型的抗原的表达不限于胞内表达;保守或内部抗原还可以、或可替换地由本发明的酵母媒介胞外(在酵母的表面上)表达或提供,如下文所讨论的。

[0071] 依照本发明的酵母媒介对抗原的胞内表达或定位(例如通过表达、通过胞内加载、或任何其它提供包含在酵母胞内环境内的抗原的方法)一般可用于优先引发针对任何抗原的细胞介导的免疫应答,或更具体的说,在细胞介导的免疫应答易于引发的环境中提供抗原,尽管体液免疫应答也会被这种方法所致敏或诱导,特别是在天然存在形式的抗原是或已经是胞外环境可得的情况中(即通过在先感染、疾病、或免疫)。由酵母媒介胞内表达或提供抗原特别可用于使用抗原的致敏或初始疫苗接种,因为提供强的细胞介导的免疫应答和优选的免疫学记忆会增强细胞介导的和体液的免疫应答分支二者对未来遭遇抗原(例如通过加强免疫、感染、或疾病)作出应答的能力。胞内表达或提供抗原可用于引发针

对任何抗原的免疫应答,包括上文所述保守或内部抗原及下文所述有差异的或外部抗原。

[0072] 在另一个实施方案中,提供了设计成诱导株、物种、或抗原变体特异性免疫应答的组合物和方法。例如,这种方法将宿主针对可能与病原体的特定突变体、株、物种或生命周期阶段有关的更特异性的抗原或特定抗原变体免疫,正如例如在常规的杀死的病毒疫苗中所做的那样;其通常包括三种选定的病毒株,以表面抗原为基础,代表三个病毒型。换言之,本发明的这方面进一步利用如下事实,即许多病原体 and 细胞表达蛋白质的变异形式(有差异的抗原),特别是在此类病原体或细胞的表面上(表面抗原在本文中一般也可称为外部抗原),其可用于创建基于酵母的疫苗,所述疫苗针对所述抗原或病原体提供非常有针对性的免疫,或甚至季节性免疫。在本发明的一个方面,此类抗原通常由本发明的酵母媒介在胞外(在表面上)表达。有差异的(variable)或外部抗原的表达不限于酵母媒介上的胞外抗原表达或提供;此类抗原也可以由本发明的酵母媒介在胞内表达或提供,如下文所讨论的。

[0073] 依照本发明的酵母媒介对抗原的胞外或表面表达或提供(例如通过导致抗原的表面表达或抗原易位至酵母媒介外表面的表达、通过将抗原附着至外表面、或通过由酵母分泌抗原)优先引发针对抗原的体液免疫应答,或更具体的说,与酵母媒介胞内表达抗原相比增强体液免疫应答的引发,尽管这种方法也会致敏或诱导细胞介导的免疫应答。事实上,此类疫苗的一个优点在于,与例如主要引发针对病毒的中和性抗体应答的上文所述常规的杀死的病毒疫苗相反,本发明的疫苗可引发针对这些表面抗原的细胞介导的和体液的免疫应答二者。酵母媒介对抗原的胞外表达或提供可用于引发针对任何抗原的免疫应答,包括上文所述保守或内部抗原和有差异的或外部抗原。然而,在酵母媒介上胞外表达或提供抗原特别可用于引发针对预计免疫系统会在胞外环境遭遇的抗原(诸如可溶性抗原、细胞表面表达的抗原、或病原体表面表达的抗原)的免疫应答,因为希望得到针对此类抗原的体液免疫应答。

[0074] 一方面,本发明还联合了上文所述这两种疫苗方法(由酵母媒介胞内和胞外表达或提供抗原)来提供有效引发细胞介导的和体液的免疫力二者的强有力的新疫苗,其可以设计成提供交叉保护性免疫力和针对特定抗原变体或病原体物种、株或突变体的更特异性的免疫力二者。例如,提到病毒感染诸如流感感染,联合疫苗方法与病毒株特异性抗原方法一起以交叉保护性的、“通用的”方式引发强有力的针对流感病毒感染的免疫应答。这种方法会引发针对流感病毒的细胞介导的和体液的免疫应答二者,而在本发明的一个优选实施方案中,以交叉保护性的和病毒株特异性的方式二者如此进行。

[0075] 在本发明的这个实施方案中,可以以多种方式来设计疫苗。例如,一方面,来自病原体的保守抗原(例如病毒内部抗原)可以由酵母媒介在胞内表达或提供,而来自病原体的有差异的抗原(例如病毒表面抗原)可以由酵母媒介在胞外表达或提供。使用此类酵母媒介的免疫会引发针对病毒的细胞介导的和体液的免疫应答二者,而且以交叉保护性的和病毒株特异性的方式二者进行。用包含此类酵母媒介的疫苗免疫的个体会具有强的针对一个或多个保守抗原的细胞介导的免疫力和强的针对有差异的抗原的体液免疫力,尽管这两种类型的免疫应答都会针对这两种类型的抗原致敏。如何修改这第一个例子以改进或更改针对病毒的免疫应答对于本领域技术人员是显而易见的。例如,保守抗原和有差异的抗原二者都可以由酵母在胞内表达或提供,而有差异的抗原可以由酵母在胞外表达或提供,以确保更好的针对这两种类型的抗原的细胞介导的免疫应答(这对于未来的细胞介导的和

体液的免疫应答的致敏是重要的),及提供更有效的直接针对有差异的抗原的体液免疫力(例如参见图 16 和本文中的讨论)。

[0076] 在本文所述联合实施方案中,在胞外(在酵母媒介表面上)表达或提供抗原的酵母媒介与在胞内表达或提供一个或多个抗原的酵母媒介可以是相同的或不同的酵母媒介。另外,可以在不同酵母媒介上表达胞内抗原和/或胞外抗原的不同组合,而且可以分开的或一起的使用媒介,这取决于所期望的疫苗接种。一般而言,在由两种或多种不同酵母媒介提供抗原时(即与在一种酵母媒介中表达或提供所有抗原不同),可以将酵母媒介联合(混合)以作为单一疫苗(例如单一注射或其它类型的剂量)来施用,或者可以序贯施用不同酵母媒介。序贯施用可以由合适的间隔时间分开,包括小段时间(秒或分)和大段时间(天、周、月、或甚至年)。本发明设想了在这些实施方案中,可以使用任何抗原组合,在一个优选的实施方案中,包括至少一种胞内抗原和至少一种胞外抗原,而且这些抗原可以使用表达或提供此类抗原的酵母媒介的任何组合(包括单一酵母媒介)来提供。

[0077] 上文所述疫苗方法可以相应的通过不同的基于酵母的疫苗的联合或序贯施用(例如致敏/加强策略)来进行更改,其中提供了不同抗原组合,包括胞外抗原和/或胞内抗原的不同组合,在有些方面是保守和/或有差异的抗原的不同组合。另外,本文所述酵母媒介可以与其它类型的疫苗联合,或是同时的或是序贯的(例如在致敏和加强方案中)以进一步指导免疫应答和提供增强的针对感染和疾病的保护。在一个实施方案中,使用本发明的基于酵母的疫苗来使针对特定抗原、抗原集、或病原体的免疫应答致敏,所述疫苗至少提供细胞介导的免疫力,一方面是提供细胞介导的和体液的免疫力二者,诸如通过在胞内和在胞外这两种方式表达或提供抗原。然后通过投递常规疫苗(诸如 DNA 疫苗、蛋白质亚单位疫苗、或杀死的或灭活的病原体)或另一种基于酵母的疫苗(包括膜或细胞壁颗粒疫苗)或酵母与常规抗原制备物的组合或甚至单独的酵母(例如在后两种情况中,酵母主要充当佐剂)来提供免疫加强。在这样的“致敏-加强”策略中,因第一免疫(致敏)而引发的强的细胞介导的应答提高了后续加强的功效,而且在有些实施方案中,可以事实上提供协同效应,特别是在加强疫苗是与致敏疫苗不同类型的疫苗和/或与致敏疫苗相比包含不同抗原时。

[0078] 通过使用本发明的基于酵母的疫苗和方法使免疫应答致敏,产生细胞介导的和体液的免疫学记忆二者(即生成选择性识别感兴趣抗原的记忆 B 细胞和 T 细胞)。结果,在后续暴露于抗原后,例如通过疫苗接种加强、疾病、或感染,免疫系统会更迅速的且更有效的产生应答,而且对于疫苗接种加强而言重要的是,在不基于酵母的疫苗的加强中可以使用更低的抗原剂量(参见例如实施例 2 和图 14-16),另外,酵母媒介可以与不基于酵母的疫苗协同作用,使得免疫应答通过联合方法得到优化,诸如通过联合 DNA 疫苗与基于酵母的疫苗。因此,疫苗可能只需要施用一次,和/或实现功效需要更低的量。在不基于酵母的疫苗供应短缺时或在抗击危及公共健康的物质时,需要这些节省剂量的品质,因为难以免疫个体超过一次,尤其在大量接种(massimmunization)的情况下。

[0079] 本发明的组合物和方法还包括如下疫苗,其中酵母媒介不是必需重组表达或以其它方式提供感兴趣抗原,而是作为佐剂用于增强针对分开提供的抗原(例如,作为任何常规疫苗,包括 DNA 疫苗、亚单位蛋白疫苗、杀死的或灭活的病原体、树突细胞疫苗等)的免疫应答,或在早就携带抗原且其量足以在施用非携带抗原的酵母媒介时引发免疫应答的个体

的环境中增强针对该抗原的免疫应答,诸如当前感染了病原体的个体、细胞蛋白质中发生了突变的个体、或以其它方式表达或携带免疫系统不耐受的抗原或其耐受可被打破的抗原的个体。这种方法可以与在先的或后续的使用如上所述表达或提供胞内和 / 或胞外异源抗原的酵母媒介的免疫相联合。

[0080] 事实上,如何设计和使用本发明的疫苗存在很大灵活性。例如,可以在周期性基础上给个体施用包含表达或复合(即结合、混合、包含、提供)有某些抗原(诸如保守抗原)的酵母媒介的“通用的”(universal)疫苗,用以在个体中形成交叉保护性免疫力。然后可以在例如一次性或周期性基础上将这种疫苗与表达或复合有其它抗原(诸如有差异的抗原)的别的酵母媒介联合,例如用以解决已知在群体中传播的特定病毒株。表达或复合有此类有差异的抗原的酵母媒介可以每年或在任何其它优选基础上(例如突发事件或预期流行或大流行、或根据其它需要)轮换、交替或选择,用以靶向感兴趣病原体 and / 或给定时段特定地区最流行的一个或多个病原体株。根据本文中所提供的公开内容,本发明的其它实施方案将是显而易见的。

[0081] 如上所述,用酵母媒介操纵抗原的表达或结合类型实现了特定的免疫学结果,这可以根据需要用于“剪裁”或“设计”疫苗,用于群体、个体、或特定疾病、疾患或致病性感染。在由酵母媒介胞外表达或提供抗原的情况中,体液的和细胞介导的免疫力二者都得到引发,尽管与由酵母胞内表达或提供抗原相比,这种类型的表达或提供对于引发体液免疫特别有效。这主要是因为这个实施方案中,抗原直接暴露于 B 细胞,容许 B 细胞活化、增殖、成熟和抗体生成更有效的发生。

[0082] 更具体的说,在酵母表面上表达或提供的(或由酵母分泌的)抗原可以受到由 B 细胞(B 淋巴细胞)表达的 B 细胞抗原受体(BCR)的识别。在此表面抗原结合至 BCR 后, B 细胞然后使所结合的抗原的酵母媒介内在化,抗原得到加工并以来自抗原的肽和主要组织相容性复合体(MHC) II 型受体的复合的形式返回至 B 细胞表面。这些 MHC-肽复合体受到“辅助”T 细胞(例如 CD4⁺T 细胞)的结合,该细胞具有特异性识别特定 MHC-肽复合体的 T 细胞受体(TCR)。识别 B 细胞所呈递的 MHC-肽复合体的活化的、抗原特异性的 T 细胞继而以信号(例如细胞因子)的形式给此类 B 细胞提供“辅助”,所述信号引起 B 细胞增殖及引起其后代分化和成熟成抗体分泌性细胞。通过使 T 细胞接触呈递 MHC-抗原复合体的 B 细胞,以及通过接触其它抗原呈递细胞(包括树突细胞和巨噬细胞)所呈递的 MHC-肽复合体,辅助 T 细胞可以得到活化。另外,因为本发明的酵母媒介(在 II 型 MHC 途径之外)受到抗原呈递细胞(诸如树突细胞)的 I 型 MHC 途径的积极吞噬并直接活化该途径,在 CD4⁺细胞介导的应答之外, CD8⁺细胞介导的免疫应答还可以通过胞外表达或提供抗原来引发。以这种方式,体液的和细胞介导的免疫应答二者都通过酵母对抗原的胞外表达或提供得到引发,而且认为这种类型的表达比抗原的胞内表达或提供更有效引发体液免疫应答。体液免疫应答可以包括生成中和性抗体,其可用于预防和治疗传染性疾病和其它不良疾患。

[0083] B 细胞活化导致体液免疫应答的方面图示于图 16A 和 16B。提到图 16A,关于 B 细胞活化的信号 1,可以由不基于酵母的疫苗或可溶性蛋白质或者由在表面上表达、展示或以其它方式包含靶抗原的酵母来提供抗原。提到图 16B,由活化的 B 细胞摄取的抗原的胞内加工经 II 型 MHC 受体呈递,其受到抗原特异性辅助 T 细胞的识别并活化该细胞。由活化的抗原特异性 T 细胞传导(transmit)的信号和细胞因子使 B 细胞应答成熟并加强抗体生成。胞

内表达靶抗原的酵母对于活化并扩增抗原特异性辅助 T 细胞是非常有效的,如先前所描述的和如下文所讨论的。在辅助 T 细胞活化和增殖早于或伴随 B 细胞结合可溶性靶抗原时,抗体生成得到更有效的引发。

[0084] 在抗原由酵母媒介胞内表达或提供时,细胞介导的免疫应答 ($CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞应答二者) 通过抗原的呈递而生成,所述抗原呈递经由抗原呈递细胞 (诸如树突细胞和巨噬细胞) 的 I 型 MHC 限制的和 II 型 MHC 限制的途径二者,如先前所述 (参见例如美国专利号 5,830,463 和 7,083,787 ;Stubbs et al., Nat. Med. 7 :625-629 (2001) 和 Lu et al., Cancer Research 64 :5084-5088 (2004))。通过这种机制活化的 T 细胞可能还通过不同方法 (诸如不基于酵母的疫苗或例如天然暴露于病原体或疾病) 给已经遭遇抗原的 B 细胞提供信号,而有助于抗体生成。证明这一概念的实验结果显示于图 14 和 15。

[0085] 通过本文中所公开的流感疫苗的具体实施例,本发明的各个方面将得到更好的理解,尽管本发明不限于这些疫苗。事实上,考虑到本文中所提供的信息,通过利用本文所述操纵依照本发明的酵母媒介对抗原的胞外和 / 或胞内表达或提供、操纵保守和有差异的抗原 (或内部和外部抗原) 的表达或提供、和操纵致敏和加强方法,本领域技术人员将轻易能够将流感病毒所描述的疫苗策略外推至其中靶抗原是细胞蛋白质的其它病原体和免疫方案。

[0086] 在一个实施方案中,本发明一般涉及新的组合物和方法,其用于针对流感病毒给动物疫苗接种及用于在动物中治疗或预防流感感染。本发明包括基于酵母的疫苗或基于酵母的疫苗的组合的用途,所述疫苗包含至少一种酵母媒介和至少一种流感抗原,选择该抗原是为了在动物中引发针对流感感染的免疫应答。在特别优选的实施方案中,本发明包括流感抗原组合在基于酵母的疫苗中的用途,其中所述抗原组合提供了针对多种流感病毒株的交叉保护,以及针对特定病毒株的特异性保护。本发明具体提供了新的基于酵母的疫苗,其单独使用交叉保护性的、“通用的”疫苗方法或与病毒株特异性抗原方法一起用于针对流感病毒感染的保护。这种方法会引发针对流感病毒的细胞介导的和体液的免疫应答二者,优选以交叉保护性的和病毒株特异性的方式二者如此进行。

[0087] 在这个实施方案的第一个方面,本发明利用了如下事实,即流感病毒内在表达的某些蛋白质在病毒株间是高度保守的。这些抗原 (在本文中一般称为内部病毒蛋白) 为基于酵母的疫苗提供了基础,所述疫苗是交叉保护性的且能够针对病毒蛋白 (及如此针对感染了流感病毒的细胞) 引发有效的细胞介导的免疫应答。在这个实施方案的另一个方面,本发明进一步利用了如下事实,即流感病毒株表达表面蛋白 (在本文中一般称为外部病毒蛋白) 的变异形式,其可用于创建基于酵母的疫苗,使宿主针对更特异性的病毒株免疫,正如在常规的杀死的病毒疫苗中所做的那样,其通常包括三种选定的病毒株,代表以表面抗原为基础的三个病毒型。然而,与主要引发针对病毒的中和性抗体应答的这些常规的杀死的病毒疫苗相反,本发明的疫苗可引发针对这些病毒表面抗原的细胞介导的和体液的免疫应答二者。此外,本发明在优选的方面联合这两种疫苗以提供强有力的新的流感疫苗,其引发交叉保护性的和病毒株特异性的免疫力二者,包括细胞介导的和体液的免疫力二者。

[0088] 通用技术

[0089] 除非另有说明,本发明的实施将采用分子生物学 (包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学、和免疫学的常规技术,它们是本领域技术人员所公知的。

此类技术在文献中有详细阐述,诸如 Methods of Enzymology, Vol. 194, Guthrie 等人编, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1990); Biology and activities of yeasts, Skinner 等人编, Academic Press(1980); Methods in yeast genetics: a laboratory course manual, Rose 等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1990); The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology, Pringle 等人编, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1997); The Yeast Saccharomyces: Gene Expression, Jones 等人编, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1993); The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, Broach 等人编, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1992); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Sambrook 等人 (1989) 和 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, Sambrook and Russel(2001) (在本文中共同称为“Sambrook”); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel 等人编, 1987, 包括到 2001 年的增刊; PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis 等人编 (1994); Harlow and Lane(1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York 和 Harlow and Lane(1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (在本文中共同称为“Harlow and Lane”); Beaucage 等人编, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, (2000); Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, C. Klaassen 编, 第 6 版 (2001); 及 Vaccines, S. Plotkin and W. Orenstein 编, 第 3 版 (1999)。

[0090] 通用定义

[0091] “体液免疫应答”一般指抗体生成和伴随抗体生成的所有过程,包括但不限于 B 淋巴细胞 (B 细胞) 活化、亲和成熟、分化成浆细胞和记忆 B 细胞生成,生发中心形成和同种型转换、和 T 辅助细胞活化、信号传导和细胞因子生成,以及抗体的效应或功能,包括中和、经典补体活化、和调理 (opsonization)。

[0092] “细胞介导的”免疫应答 (在本文中任何地方可以与术语“细胞的”免疫应答互换使用) 一般指免疫细胞包括 T 淋巴细胞 (包括细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL))、树突细胞、巨噬细胞、和天然杀伤细胞对抗原的应答及伴随此类应答的所有过程,包括但不限于这些细胞的活化和增殖、CTL 效应器功能、影响牵涉获得性免疫应答和先天性免疫应答的其它细胞的功能的细胞因子生成、和记忆 T 细胞生成。

[0093] 依照本发明,术语“胞外”在用于本文对于酵母媒介是胞外提供抗原 (或胞外抗原的提供) 时,意味着该抗原位于该酵母媒介的胞外 (在表面上或以外),这可以通过多种方法来实现。例如,若抗原由酵母媒介表达 (例如通过重组生成) 使得该抗原或其一部分展示 (定位、包含、位于) 在酵母媒介的外表面 (例如完整的、完全的酵母的细胞壁,或酵母原生质球、胞质体和空细胞的质膜) 上,则所述抗原对于所述酵母媒介是胞外的。例如,抗原可以在酵母的 ER 中表达,然后易位至酵母的表面,尽管一般而言对于重组抗原生成,提到在酵母媒介的表面上“表达”或对酵母媒介而言胞外“表达”意图涵盖抗原生成的整个过程,从抗原的转录、经翻译、经寻靶和投递或易位、至其在酵母媒介中的最终目的地。术语“表达”一般还可以与术语“提供”互换使用,而且可以最一般性的涵盖在酵母媒介的表面上提供抗原的任何方式 (即涵盖通过其它方式关联)。例如,若诸如通过共价或非共价连接 (即

不是必须由酵母重组表达), 抗原附着于酵母的外表面, 则所述抗原对于所述酵母媒介也是胞外的。若抗原只不过是含酵母的混合物中(混合物、联合、组合物), 则所述抗原对于所述酵母媒介也是胞外的。若抗原由酵母分泌, 则所述抗原对于所述酵母媒介也是胞外的。

[0094] 依照本发明, 术语“胞内”在用于本文对于酵母媒介是胞内提供抗原(或胞内抗原的提供)时, 意味着该抗原包含在酵母媒介的胞内环境内, 这可以通过多种方法来实现。例如, 若抗原由表达酵母媒介表达(例如通过重组生成)且至少一些生成的抗原保留在酵母内(即没有易位或投递至酵母媒介的表面, 或没有投递或易位至酵母媒介的表面), 则所述抗原对于所述酵母媒介胞内的。酵母媒介的胞内环境可以包括但不限于胞质溶胶、ER、内膜、和尚未横移至细胞表面的分泌小泡。若抗原加载入酵母(例如通过任何合适的传送方法, 包括电穿孔、颗粒轰击、显微注射、脂转染、吸附、感染和原生质体融合), 则所述抗原对于所述酵母媒介也是胞内的。

[0095] 依照本发明, 术语“抗原”在本文中的一般使用指: 蛋白质(肽、部分蛋白质、全长蛋白质)的任何部分, 其中所述蛋白质是天然存在的或合成衍生的; 细胞组合物(完整细胞、细胞溶解物或破碎的细胞); 有机体(完整有机体、溶解物或破碎的细胞); 或碳水化合物(诸如那些在癌细胞上表达的)、或其它分子、或其一部分。抗原引发针对在接受抗原施用的个体的细胞和组织内遭遇的相同或相似抗原的抗原特异性免疫应答(例如体液的和/或细胞介导的免疫应答)。或者, 抗原可以充当耐受原。

[0096] 在提到免疫应答的刺激时, 术语“抗原”可以与“免疫原”互换使用。免疫原, 在用于本文时, 描述引发体液的和/或细胞介导的免疫应答(即抗原性的), 使得免疫原对动物的施用(例如经由本发明的疫苗)引起针对在动物的组织内遭遇的相同或相似抗原的抗原特异性免疫应答的抗原。

[0097] “耐受原”用于描述以对抗原的免疫应答减轻或变化的施用形式、量、或路径提供的抗原, 优选免疫系统细胞在应答与耐受原或表达或呈递此类耐受原的细胞的接触时基本上非响应性的、无反应性(anergy)、其它灭活、或缺失。

[0098] “疫苗接种用抗原”可以是免疫原或耐受原, 但是是疫苗中所使用的抗原, 其中有待引发针对疫苗接种用抗原的生物应答(引发免疫应答、耐受)。

[0099] 给定抗原的“免疫原性结构域”可以是抗原中包含至少一种在施用于动物时充当免疫原的表位的任何部分、片段或表位(例如肽片段或亚单位或抗体表位或其它构象表位)。例如, 单一蛋白质可以包含多种不同免疫原性结构域。免疫原性结构域并不必然是蛋白质内的线性序列, 诸如在体液免疫应答的情况中。

[0100] 表位在本文中定义为给定抗原内足以引发免疫应答的单一免疫原性位点, 或给定抗原内足以遏制、删除或灭活免疫应答的单一耐受原性位点。本领域技术人员会认可, T 细胞表位在大小和组成上与 B 细胞表位不同, 而且经 I 型 MHC 途径呈递的表位与经 II 型 MHC 途径呈递的表位不同。表位可以是线性序列或构象表位(保守结合区)。抗原可以小至单一表位, 或较大, 而且可以包括多个表位。因此, 抗原的大小可以小至大约 5-12 个氨基酸(例如肽), 大至: 全长蛋白质, 包括多聚体和融合蛋白、嵌合蛋白、完整细胞、完整微生物、或其部分(例如完整细胞的溶解物或微生物的提取物)。另外, 抗原可以包括碳水化合物, 其可以加载入本发明的酵母媒介或组合物。应当领会, 在有些实施方案中(即在抗原由酵母媒介自重组核酸分子表达时), 抗原是蛋白质、融合蛋白、嵌合蛋白、或其片段, 而非完整细胞

或微生物。本发明的优选流感融合蛋白在本文中有描述。

[0101] “疫苗接种”或“免疫”指引发（诱发）针对抗原或其免疫原性或耐受原性部分的免疫应答，作为单独施用抗原或与佐剂一起施用抗原的结果。疫苗接种优选导致保护性或治疗性效应，其中对抗原（或抗原来源）的后续暴露引发针对该抗原（或来源）的免疫应答，在动物中减轻或预防疾病或疾患。疫苗接种的概念在本领域是众所周知的。通过施用本发明的组合物（疫苗）引发的免疫应答可以是与没有施用该组合物相比免疫应答任何方面（例如细胞介导的应答、体液应答、细胞因子生成）的任何可检测变化。

[0102] Tarmogen(targeted molecular antigen,“靶向分子抗原”)一般指在胞外（在其表面上）、在胞内（内部或胞质溶胶）、或胞外和胞内这两种方式表达一种或多种异源抗原的酵母媒介。Tarmogens 在本领域中已有描述。参见例如美国专利号 5,830,463。

[0103] 在本发明的一个实施方案中，本文所述任何氨基酸序列可以制备成在指定氨基酸序列的 C 端和 / 或 N 端侧翼各有至少一个、多至大约 20 个额外的异源氨基酸。所得蛋白质或多肽可以称为“基本上由指定氨基酸序列组成”。如上所述，依照本发明，异源氨基酸指如下一段氨基酸序列：在指定氨基酸序列侧翼没有天然找到的（即不是在体内天然找到的）氨基酸序列；或与指定氨基酸序列的功能无关的氨基酸序列；或不会由位于天然基因中所存在的编码指定氨基酸序列的天然存在核酸序列侧翼的核苷酸编码，若天然存在序列中的此类核苷酸使用衍生给定氨基酸序列的有机体的标准密码子用法进行翻译的话。类似的，短语“基本上由... 组成”在本文中提及核酸序列使用时指编码指定氨基酸序列的核酸序列的 5' 和 / 或 3' 末端侧翼可以各有至少一个、多至大约 60 个额外的异源核苷酸。异源核苷酸指在天然基因中所存在的编码指定氨基酸序列的核酸序列侧翼没有天然找到（即不是在体内天然找到）的核苷酸，或不编码如下蛋白质的核苷酸，所述蛋白质给予具有指定氨基酸序列的蛋白质任何别的功能、或改变具有指定氨基酸序列的蛋白质的功能。

[0104] 依照本发明，“异源氨基酸”指如下一段氨基酸序列：在指定氨基酸序列侧翼没有天然找到的（即不是在体内天然找到的）氨基酸序列；或与指定氨基酸序列的功能无关的氨基酸序列；或不会由位于基因中所存在的编码指定氨基酸序列的天然存在核酸序列侧翼的核苷酸编码的氨基酸序列，若天然存在序列中的此类核苷酸使用衍生给定氨基酸序列的有机体的标准密码子用法进行翻译的话。因此，对流感抗原而言异源的至少两个氨基酸残基指在流感抗原侧翼没有天然找到的任何两个氨基酸残基。

[0105] 依照本发明，与本发明的酵母媒介一起提及“异源”蛋白质或“异源”抗原，包括异源融合蛋白，意味着该蛋白质或抗原不是由该酵母天然表达的，尽管融合蛋白可以包括由酵母天然表达的酵母序列或蛋白质或其部分（例如本文所述 Aga 蛋白）。例如，为本发明目的，认为流感血凝素蛋白与酵母 Aga 蛋白的融合蛋白对于酵母媒介是异源蛋白，因为这样的融合蛋白不是由酵母天然表达的。

[0106] 依照本发明，短语“选择性结合”指本发明的抗体、抗原结合片段或结合配偶体优先结合指定蛋白质的能力。更具体的说，短语“选择性结合”指一种蛋白质与另一种蛋白质（例如针对抗原的抗体、其片段、或结合配偶体）的特异性结合，其中通过任何标准测定法（例如免疫测定法）测得的结合水平在统计学上显著高于该测定法的背景对照。例如，在实施免疫测定法时，对照通常包括只含有抗体或抗原结合片段（即没有抗原）的反应孔 / 管，其中抗体或其抗原结合片段在没有抗原时的反应性（例如对孔的非特异性结合）的量视为

背景。结合可以使用多种本领域标准方法来测量,包括酶免疫测定法(例如 ELISA)、免疫印迹测定法等。

[0107] “个体”指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于家畜、运动用动物、宠物、灵长类动物、小鼠和大鼠。术语“个体”可以与术语“动物”、“受试者”或“患者”互换使用。

[0108] 在本发明中提到分离的蛋白质或多肽包括全长蛋白质、融合蛋白、或此类蛋白质的任何片段、结构域、构象表位、或同源物。更具体的说,分离的蛋白质,依照本发明,指已经离开其天然环境(即已经进行过人为操作)的蛋白质(包括多肽或肽),可以包括例如纯化的蛋白质、部分纯化的蛋白质、重组生成的蛋白质、和合成生成的蛋白质。因此,“分离的”并不反映蛋白质已经纯化的程度。优选的是,本发明的分离的蛋白质是重组生产的。依照本发明,术语“修饰”或“突变”可以互换使用,特别是关于本文所述蛋白质或其部分的氨基酸序列(或核酸序列)的修饰/突变。

[0109] 在用于本文时,术语“同源物”用于指因对天然存在蛋白质或肽的微小修饰而与天然存在蛋白质或肽(即“原型”或“野生型”蛋白质)不同但保留天然存在形式的基本蛋白质和侧链结构的蛋白质或肽。此类变化包括但不限于:一个或一些氨基酸侧链的变化;一个或一些氨基酸的变化,包括删除(例如截短型式的蛋白质或肽)、插入和/或替代;一个或一些原子的立体化学变化;和/或微小衍生化,包括但不限于:甲基化、糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊二烯化(prenylation)、棕榈化(palmitation)、酰胺化和/或添加糖基磷脂酰肌醇。同源物可以具有与天然存在蛋白质或肽相比增强的、减弱的、或基本上相似的特性。同源物可以包括蛋白质的激动剂或蛋白质的拮抗剂。同源物可以使用本领域已知的蛋白质生产技术来生产,包括但不限于直接修饰分离的天然存在蛋白质、直接蛋白质合成、或修饰编码蛋白质的核酸序列(例如使用经典或重组 DNA 技术来实现随机或靶向诱变)。

[0110] 给定蛋白的同源物可以包含与参照蛋白质的氨基酸序列至少大约 45%、或至少大约 50%、或至少大约 55%、或至少大约 60%、或至少大约 65%、或至少大约 70%、或至少大约 75%、或至少大约 80%、或至少大约 85%、或至少大约 90%、或至少大约 95% 相同、或至少大约 95% 相同、或至少大约 96% 相同、或至少大约 97% 相同、或至少大约 98% 相同、或至少大约 99% 相同(或介于 45% 和 99% 之间的、整数增量的任何百分比同一性)的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成,或由所述氨基酸序列组成。在一个实施方案中,同源物包含与参照蛋白质的天然存在氨基酸序列少于 100% 相同、少于大约 99% 相同、少于大约 98% 相同、少于大约 97% 相同、少于大约 96% 相同、少于大约 95% 相同、诸如此类、增量为 1%、至少于大约 70% 相同的氨基酸序列,基本上由所述氨基酸序列组成,或由所述氨基酸序列组成。

[0111] 在用于本文时,除非另有说明,提到百分比(%) 同一性指使用如下方法进行的同源性评估:(1)BLAST2.0Basic BLAST 同源性搜索,使用 blastp 进行氨基酸搜索而使用 blastn 进行核酸搜索,其中使用标准缺省参数,其中以缺省方法(by default)对检索序列过滤低复杂性区域(见 Altschul, S. F., Madden, T. L., Sch        , A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) " Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. " Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402,完整收入本

文作为参考) ; (2) BLAST2 比对 (使用下文所述参数) ; (3) 和 / 或 PSI-BLAST (位置特异性的叠加 BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)), 其中使用标准缺省参数。注意到, 由于 BLAST2.0Basic BLAST 与 BLAST2 之间标准参数的一些差异, 在使用 BLAST2 程序时可能将两种特定序列认定为具有显著同源性, 而使用序列之一作为检索序列以 BLAST2.0Basic BLAST 进行的搜索可能没有在上等匹配中鉴定到第二序列。另外, PSI-BLAST 提供了自动化的、易于使用的“序型”(profile) 搜索型式, 这是一种寻找序列同源物的灵敏方法。该程序首先进行带缺口的 BLAST 数据库搜索。PSI-BLAST 程序利用来自任何返回的显著比对的信息来构建位置特异性得分矩阵, 它取代了检索序列用于下一轮数据库搜索。因此, 应当理解, 百分比同一性可以使用这些程序中的任一种来测定。

[0112] 两种特定序列可以使用 BLAST2 序列彼此比对, 见 Tatusova and Madden, (1999), " Blast2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotidesequences ", FEMS Microbiol Lett. 174 :247-250, 完整收入本文作为参考。BLAST2 序列比对以 blastp 或 blastn 进行, 使用 BLAST2.0 算法在两种序列之间进行带缺口的 BLAST 搜索 (BLAST2.0), 容许在所得比对中引入缺口 (删除和插入)。为了表述清楚, 使用标准缺省参数如下进行 BLAST2 序列比对。对于 blastn, 使用 0BLOSUM62 矩阵:

[0113] 匹配奖分 = 1

[0114] 错配罚分 = -2

[0115] 开放缺口 (5) 和延伸缺口 (2) 罚分

[0116] 缺口 x_ 落选 (dropoff) (50) 期望 (expect) (10) 词长 (11) 滤器 (开)

[0117] 对于 blastp, 使用 0BLOSUM62 矩阵:

[0118] 打开缺口 (11) 和延伸缺口 (1) 罚分

[0119] 缺口 x_ 落选 (dropoff) (50) 期望 (expect) (10) 词长 (3) 滤器 (开)

[0120] 分离的核酸分子指已经离开其天然环境的 (即已经进行人为操作的) 核酸分子, 其天然环境指在自然界中找到该核酸分子的基因组或染色体。因此, “分离的” 不必然反映该核酸分子已经纯化的程度, 但是指明该分子不包括在自然界中找到该核酸分子的整个基因组或整个染色体。分离的核酸分子可以包括基因。包括基因的分离的核酸分子不是包含所述基因的染色体片段, 而是包括与该基因有关的编码区和调控区, 但是没有在相同染色体上天然发现的别的基因。分离的核酸分子还可以包括侧翼 (即在序列的 5' 和 / 或 3' 末端) 有别的核酸的指定核酸序列, 所述别的核酸在自然界中通常不在所述指定核酸序列的侧翼 (即异源序列)。分离的核酸分子可以包括 DNA、RNA (例如 mRNA)、或 DNA 或 RNA 任一的衍生物 (例如 cDNA)。尽管短语“核酸分子” 主要指物理上的核酸分子, 而短语“核酸序列” 主要指核酸分子上的核苷酸序列, 但是这两个短语可以互换使用, 尤其对于能够编码蛋白质或蛋白质之结构域的核酸分子或核酸序列。

[0121] 重组的核酸分子指这样的分子, 它可以包括至少一种编码任何一种或多种本文所述蛋白质的核酸序列, 其可操作连接至至少一种能够有效调节核酸分子在待转染细胞中表达的任何转录控制序列。尽管短语“核酸分子” 主要指物理上的核酸分子, 而短语“核酸序列” 主要指核酸分子上的核苷酸序列, 但是这两个短语可以互换使用, 尤其对于能够编码蛋白质的核酸分子或核酸序列。另外, 短语“重组分子” 主要指可操作连接至转录控制序列的核酸分子, 但是可以与施用于动物的短语“核酸分子” 互换使用。

[0122] 重组核酸分子包括重组载体,其是任何核酸序列,通常是异源序列,其可操作连接至编码本发明融合蛋白的分离的核酸分子,其依照本发明能够使得融合蛋白的重组生产成为可能,且能够投递核酸分子入宿主细胞。这样的载体可包含这样的核酸序列,即在自然界中没有找到该核酸序列邻接待插入载体的分离的核酸分子。载体可以是 RNA 或 DNA,原核的或真核的,而且在本发明中优选的是,载体是病毒或质粒。重组载体可用于核酸分子的克隆、测序、和 / 或其它操作,而且可用于此类分子的投递(例如在 DNA 疫苗或基于病毒载体的疫苗中)。重组载体优选用于核酸分子的表达,而且还可称为表达载体。优选的重组载体能够在受到转染的宿主细胞中表达。

[0123] 在本发明的重组分子中,可以将核酸分子可操作连接至包含调控序列的表达载体,所述调控序列诸如转录控制序列、翻译控制序列、复制起点、和与宿主细胞相容的且控制本发明核酸分子表达的其它调控序列。具体而言,本发明的重组分子包括可操作连接至一种或多种表达控制序列的核酸分子。短语“可操作连接”指将核酸分子连接至表达控制序列,其连接方式使得该分子在转染(即转化、转导或转染)入宿主细胞后表达。

[0124] 依照本发明,术语“转染”用于指可以将外源核酸分子(即重组核酸分子)插入细胞的任何方法。在此类术语用于指将核酸分子导入微生物细胞诸如藻类、细菌和酵母时,术语“转化”可以与术语“转染”互换使用。在微生物系统中,术语“转化”用于描述由于微生物获得外源核酸而引起的遗传变化(inherited change),而且尤其与术语“转染”同义。因此,转染技术包括但不限于转化、细胞的化学处理、颗粒轰击、电穿孔、显微注射、脂转染、吸附、感染和原生质体融合。

[0125] 本发明的疫苗和组合物

[0126] 本发明的实施方案涉及可用于引发针对一种或多种抗原的细胞介导的和 / 或体液的免疫应答的方法的组合物(疫苗),和在一个优选的实施方案中,涉及保护动物免于疾病或疾患(包括病原体的感染)或减轻至少一种由疾病或疾患引起的症状。组合物一般包含:(a) 酵母媒介;和(b) 由酵母媒介表达的、与酵母媒介关联的、或与酵母媒介联合的异源抗原。其它组合物可以包含酵母媒介,其与以另一疫苗组合物(诸如 DNA 疫苗、蛋白质亚单位疫苗、或杀死的或灭活的病原体)的形式提供的异源抗原联合。若酵母媒介表达一种或多种抗原,抗原以任意组合在胞内、在胞外、或这两种方式表达或提供。在某些实施方案中,抗原以融合蛋白形式提供,其设计成稳定异源蛋白在酵母媒介中的表达、防止所表达异源蛋白质的翻译后修饰、和 / 或在一些实施方案中可以引起融合蛋白在酵母媒介的表面上表达(胞外表达)(包括易位至酵母媒介的表面)。融合蛋白还提供了宽的细胞介导的免疫应答和在有些实施方案中的体液免疫应答,而且优选表达超过一种不同抗原,和 / 或联合表达不同抗原的其它酵母媒介。这些融合蛋白最典型的是由酵母媒介(例如由完整酵母或酵母原生质球,其可以任选进一步加工成酵母胞质体、酵母空细胞、或酵母膜或细胞壁提取物或级分或其颗粒)表达成重组蛋白,但是可以将一种或多种此类融合蛋白加载入酵母媒介(例如作为蛋白质)或如本文所述以其它方式与酵母媒介复合或混合以形成本发明的疫苗也是本发明的一个实施方案。

[0127] 酵母媒介

[0128] 在本发明的任何组合物(例如疫苗)中,涉及酵母媒介的以下方面包括在本发明内。依照本发明,酵母媒介指可以与一种或多种抗原联合用于本发明的疫苗或治疗性组合

物、或作为佐剂的任何酵母细胞（例如完整细胞）或其衍生物（见下文）。酵母媒介因此可以包括但不限于活的完整酵母微生物（即具有其所有成分（包括细胞壁）的酵母细胞）、杀死的（死的）完整酵母微生物、或其衍生物，包括酵母原生质球（即缺乏细胞壁的酵母细胞）、酵母胞质体（即缺乏细胞壁和细胞核的酵母细胞）、酵母空细胞（即缺乏细胞壁、细胞核和细胞质的酵母细胞）、亚细胞酵母膜提取物或其级分（也称为酵母膜颗粒，先前称为亚细胞酵母颗粒）、或酵母细胞壁制备物。

[0129] 酵母原生质球通常通过酶促消化酵母细胞壁来生成。这样的方法加载于例如 Franzusoff et al., 1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674, 完整收入本文作为参考。

[0130] 酵母胞质体通常通过对酵母细胞去核来生成。这样的方法加载于例如 Coon, 1978, Natl. Cancer Inst. Monogr. 48, 45-55, 完整收入本文作为参考。

[0131] 酵母空细胞通常通过将经透化或溶解的细胞重新密封 (reseal) 来生成，可以而非必需包含该细胞的至少一些细胞器。这样的方法加载于例如 Franzusoff et al., 1983, J. Biol. Chem. 258, 3608-3614 和 Bussey et al., 1979, Biochim. Biophys. Acta 553, 185-196, 每一篇都完整收入本文作为参考。

[0132] 酵母膜颗粒（亚细胞酵母膜提取物或其级分）指缺乏天然细胞核或细胞质的酵母膜。该颗粒可以是任何大小的，包括范围从天然酵母膜大小至通过超声处理或本领域技术人员知道的其它膜破碎方法继以重新密封生成的微粒大小的大小。用于生成亚细胞酵母膜提取物的一种方法记载于例如 Franzusoff et al., 1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674。还可以使用包含酵母膜部分和（在制备酵母膜颗粒前由酵母重组表达抗原时）感兴趣抗原的酵母膜颗粒级分。抗原可以在膜内、在膜的表面上、或其组合方式（即抗原可以既有膜内的又有膜外的，和 / 或跨越酵母膜颗粒的膜）运载。在一个实施方案中，酵母膜颗粒是重组酵母膜颗粒，其可以是完整的、遭到破坏的、或遭到破坏并重新密封的酵母膜，其在膜的表面上包含至少一种期望抗原或所述抗原至少部分包埋在膜内。

[0133] 酵母细胞壁制备物的一个例子是在其表面上携带抗原或所述抗原至少部分包埋在细胞壁内的分离的酵母细胞壁，使得该酵母细胞壁制备物在施用于动物时刺激针对传染剂的所期望的（例如保护性）免疫应答。

[0134] 任何酵母菌株都可用于生成本发明的酵母媒介。酵母是属于三个纲之一的单细胞微生物：子囊菌纲 (Ascomycetes)、担子菌纲 (Basidiomycetes) 和不完全菌纲 (Fungi Imperfecti)。关于选择用作免疫调控剂的酵母类型的一项主要考虑是酵母的病原性。在一个实施方案中，酵母是非病原性菌株，诸如啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。非病原性酵母菌株选择成使对接受酵母媒介施用的个体的任何不利效应最小化。然而，如果酵母的病原性可以通过本领域技术人员知道的任何手段（例如突变株）来消除，那么可以使用病原性酵母。虽然病原性酵母菌株或其非病原性突变株过去已经用作佐剂或生物应答调节剂，而且可依照本发明使用，但是非病原性酵母菌株是优选的。

[0135] 优选的酵母菌株属包括糖酵母属 (*Saccharomyces*)、假丝酵母属 (*Candida*)（其可以是病原性的）、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、裂殖糖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、和亚罗酵母属 (*Yarrowia*)，其中糖酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、毕赤酵母属和裂殖糖酵母属是更加优选的，而且糖酵母属是特别优选的。优选的酵母

菌株种包括啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、卡尔斯伯糖酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、乳酒假丝酵母 (*Candida kefir*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、罗仑氏隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*)、新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)、乳克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、马克思克鲁维酵母乳变种 (*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、深红酵母 (*Rhodotorula rubra*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、和脂肪溶解亚罗酵母 (*Yarrowia lipolytica*)。应当领会,这些物种中的许多包括多种亚种、型、亚型等,它们意图包括在上述物种内。更优选的酵母种包括啤酒糖酵母、白色假丝酵母、多形汉逊酵母、巴斯德毕赤酵母和粟酒裂殖酵母。啤酒糖酵母是特别优选的,因为相对易于操作而且用作食品添加剂是“公认是安全的”(Generally Recognized As Safe 或 GRAS) (GRAS, 1997 年 4 月 17 日 FDA 建议的规则 62FR18938)。本发明的一个实施方案是能够复制质粒至特别高的拷贝数的酵母菌株,诸如啤酒糖酵母 *cir*^o 株。该啤酒糖酵母菌株是这样一种菌株,其能够支持容许一种或多种靶抗原和 / 或抗原融合蛋白以高水平表达的表达载体。另外,任何突变酵母株都可用于本发明,包括那些展现出所表达靶抗原的翻译后修饰降低,诸如延伸 N- 连接的糖基化的酶中有突变的。

[0136] 在一个实施方案中,本发明的一种优选酵母媒介能够与接受酵母媒介和抗原投递的细胞类型(诸如树突细胞或巨噬细胞)融合,由此实现特别有效的将酵母媒介和(在许多实施方案中的)一种或多种抗原投递至该细胞类型。在用于本文时,酵母媒介与靶细胞类型的融合指酵母细胞膜或其颗粒与靶细胞类型(例如树突细胞或巨噬细胞)的膜融合而导致合胞体形成的能力。在用于本文时,合胞体指通过细胞合并而生成的多核原生质块。许多病毒表面蛋白(包括免疫缺陷病毒诸如 HIV、流感病毒、脊髓灰质炎病毒和腺病毒的那些)和其它促融剂(fusogen)(诸如那些牵涉卵子与精子间融合的)已经显示出能够实现两种膜之间(即病毒与哺乳动物细胞膜之间或哺乳动物细胞膜之间)的融合。例如,在其表面上生成 HIV gp120/gp41 异源抗原的酵母媒介能够与 CD4+T 淋巴细胞融合。然而,应当注意,将寻靶模块掺入酵母媒介不是必需的,尽管这可能是有些情况中所期望的。在酵母媒介胞外表达抗原情况中,这可以是本发明酵母媒介的另一项优点。先前已经显示了本发明的酵母媒介易于由树突细胞(以及其它细胞,诸如巨噬细胞)摄取。

[0137] 生产酵母媒介和表达、联合或关联酵母媒介与抗原的方法在下文中有描述。

[0138] 抗原

[0139] 设想用于本发明的抗原包括希望针对它引发免疫应答的任何抗原。例如,抗原可以包括但不限于与病原体有关的任何抗原,包括病毒抗原、真菌抗原、细菌抗原、蠕虫抗原、寄生物抗原、外寄生物抗原、原生动物抗原、或来自任何其它传染剂的抗原。抗原还可以包括与特定疾病或疾患有关的任何抗原,无论是来自病原性来源或者是细胞来源,包括但不限于癌抗原、与自身免疫病有关的抗原(例如糖尿病抗原)、变态反应抗原(变应原)、携带一个或多个突变氨基酸的哺乳动物细胞分子、正常情况下由哺乳动物细胞在出生前或新生时表达的蛋白质、其表达由流行病学因子(例如病毒)的插入诱导的蛋白质、其表达由基因易位诱导的蛋白质、和其表达由调控序列的突变诱导的蛋白质。这些抗原可以是天然抗原

或已经以一些方式（例如序列变化或融合蛋白生成）修饰过的遗传工程抗原。应当领会，在有些实施方案中（即在抗原由酵母媒介自重核酸分子表达时），抗原可以是蛋白质或其免疫原性结构域的任何表位、融合蛋白、或嵌合蛋白质，而非整个细胞或微生物。

[0140] 本发明的组合物（疫苗）中包含的其它优选抗原包括能够遏制不良或有害免疫应答的抗原，诸如由例如变应原、自身免疫性抗原、炎性因子、牵涉 GVHD 的抗原、某些癌症、感染性休克抗原、和牵涉移植排斥的抗原引起的。此类化合物包括但不限于抗组胺剂、环孢菌素、皮质类固醇、FK506、对应于牵涉有害免疫应答生成的 T 细胞受体的肽、Fas 配体（即与细胞 Fas 受体的胞外或胞质结构域结合，由此诱导凋亡的化合物）、合适的 MHC 复合物（其以有效实现耐受或无反应性的方式呈递）、T 细胞受体、和自身免疫性抗原，优选联合能够增强或抑制细胞介导的和 / 或体液的免疫力的生物应答调节剂。

[0141] 可用于本发明的肿瘤抗原（癌抗原）可以包括肿瘤抗原，诸如来自肿瘤细胞的蛋白质、糖蛋白或表面碳水化合物，来自肿瘤抗原的表位，完整肿瘤细胞，肿瘤细胞混合物，及其部分（例如溶解物）。

[0142] 一方面，抗原来自病毒，包括但不限于腺病毒、沙粒病毒、布尼亚病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、巨细胞病毒、埃 - 巴二氏病毒（EB 病毒）、黄病毒、肝 DNA 病毒、肝炎病毒、疱疹病毒、流感病毒、慢病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、粘病毒、致癌病毒、正粘液病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒、副流感病毒、副粘液病毒、细小病毒、微小 RNA 病毒、痘病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、呼肠孤病毒、杆状病毒、风疹病毒、批膜病毒、和水痘病毒。其它病毒包括嗜 T 淋巴细胞病毒，诸如人嗜 T 淋巴细胞病毒（HTLV，诸如 HTLV-I 和 HTLV-II）、牛白血病病毒（BLVS）和猫白血病病毒（FLV）。慢病毒包括但不限于人的（HIV，包括 HIV-1 或 HIV-2）、猿的（SIV）、猫的（FIV）和犬的（CIV）免疫缺陷病毒。

[0143] 另一方面，抗原来自选自下组的属的传染剂：曲霉属（*Aspergillus*）、博德特氏菌属（*Bordetella*）、*Brugia*、假丝酵母属（*Candida*）、衣原体属（*Chlamydia*）、球虫属（*Coccidia*）、隐球酵母属（*Cryptococcus*）、恶丝虫属（*Dirofilaria*）、埃希氏菌属（*Escherichia*）、弗朗西丝氏菌属（*Francisella*）、淋菌属（*Gonococcus*）、组织胞浆菌属（*Histoplasma*）、利什曼虫属（*Leishmania*）、分支杆菌属（*Mycobacterium*）、支原体属（*Mycoplasma*）、草履虫属（*Paramecium*）、百日咳杆菌属（*Pertussis*）、疟原虫属（*Plasmodium*）、肺炎球菌属（*Pneumococcus*）、肺囊虫属（*Pneumocystis*）、立克次氏体属（*Rickettsia*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）、志贺氏菌属（*Shigella*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、链球菌属（*Streptococcus*）、弓形体属（*Toxoplasma*）、弧菌属（*Vibrio cholerae*）、和耶尔森氏菌属（*Yersinia*）。一方面，传染剂选自恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）或间日疟原虫（*Plasmodium vivax*）。

[0144] 一方面，抗原来自选自下组的科的细菌：肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）、微球菌科（*Micrococcaceae*）、弧菌科（*Vibrionaceae*）、巴斯德氏菌科（*Pasteurellaceae*）、支原体科（*Mycoplasmataceae*）、和立克次氏体科（*Rickettsiaceae*）。一方面，细菌是选自下组的属的：假单胞菌属（*Pseudomonas*）、博德特氏菌属（*Bordetella*）、分支杆菌属（*Mycobacterium*）、弧菌属（*Vibrio*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）、弗朗西丝氏菌属（*Francisella*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、链球菌属（*Streptococcus*）、埃希氏菌属（*Escherichia*）、肠球菌属（*Enterococcus*）、巴斯德氏菌

属 (*Pasteurella*)、和耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)。一方面,细菌是选自下组的种的:铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽假单胞菌 (*Pseudomonas mallei*)、假鼻疽假单胞菌 (*Pseudomonas pseudomallei*)、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*)、结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、麻风分支杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、肠沙门氏菌 (*Salmonella enteric*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、和支气管败血性博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*)。

[0145] 依照本发明,适用于本发明组合物或疫苗的抗原可以包含两种或多种来自相同抗原的免疫原性结构域或表位,两种或多种来自相同细胞、组织或生物体的抗原、免疫原性结构域、或表位,来自不同细胞、组织或生物体的不同抗原、免疫原性结构域、或表位。

[0146] 如上所述,用于本发明的疫苗和组合物的融合蛋白包含至少一种流感抗原,用于免疫接种动物。如果需要,组合物或疫苗可以包含一种、两种、一些、数种、或多种流感抗原,包括一种或多种流感抗原的一个或多个免疫原性结构域。

[0147] 若使用来自病原体诸如流感病毒的抗原,本领域技术人员可以通过在不同病原体株间从病原体基因组中高度保守的区域中选择抗原,使包含表达病原体抗原的酵母媒介的疫苗的长期功效最大化。另外,通过从病原体中有差异的区域中选择抗原,诸如各株间不同的或可能每个季节有突变的或在地理性区域中的抗原,例如,使疫苗解决特定流行病的能力最大化。本发明的这个方面已经在上文中有详细讨论。

[0148] 一方面,病原体是流感病毒。在这方面,保守的或内部表达的抗原包括:基质蛋白 (M1)、离子通道 (M2) 抗原、核壳体 (NP) 抗原、聚合酶 PB1 (PB1) 抗原、聚合酶 (PB2) 抗原、和聚合酶 PA (PA) 抗原。有差异的或外部表达的抗原包括血凝素 (HA) 抗原 (任何一种或多种亚型) 和神经氨酸酶 (NA) 抗原 (任何一种或多种亚型),以及 M2 的胞外部分,称作 M2e。这些抗原可以如上所述进行选择,用于依照本发明的新的疫苗策略。

[0149] 一方面,病原体是肝炎病毒,诸如丙肝病毒 (HCV)。在这方面,保守的或内部表达的抗原包括 HCV 核心蛋白质、HCV NS2、NS3、NS4、NS5。有差异的或外部表达的抗原包括 HCV E1 和 E2 (包膜蛋白质)。这些抗原可以如上所述进行选择,用于依照本发明的新的疫苗策略。

[0150] 一方面,病原体是肝炎病毒,诸如乙肝病毒 (HBV)。在这方面,保守的或内部表达的抗原包括核心抗原 HbcAg 和 e 抗原 HbeAg。有差异的或外部表达的抗原包括 HbsAg (42nM 病毒粒和 22nM 颗粒)。这些抗原可以如上所述进行选择,用于依照本发明的新的疫苗策略。

[0151] 一方面,病原体是免疫缺陷病毒,诸如人免疫缺陷病毒 (HIV)。在这方面,保守的或内部表达的抗原包括 Vif、Vpr、Nef、p7、核壳体。有差异的或外部表达的抗原包括 gp120 和 gp41。这些抗原可以如上所述进行选择,用于依照本发明的新的疫苗策略。

[0152] 在有些实施方案中,抗原是融合蛋白。在本发明的一个方面,融合蛋白可以包含两种或多种抗原。一方面,融合蛋白可以包含一种或多种抗原的两种或多种免疫原性结构域或两种或多种表位 (例如流感 M1 序列和流感 HA 序列)。这样的疫苗可以在较宽的宿主范围中提供抗原特异性免疫。例如,可用于本发明的多结构域融合蛋白可以具有多个结构域,其中每个结构域由来自特定蛋白质的肽组成,所述肽由至少 4 个氨基酸残基组成,其在蛋

白质中找到的突变氨基酸的任一侧翼并包含该突变氨基酸,其中所述突变与特定疾病或疾患(例如由特定株引起的流感感染)有关。

[0153] 在一个实施方案中,用作本发明基于酵母的疫苗的成分的融合蛋白使用对于在酵母中表达异源抗原特别有用的构建物来生产。典型的,期望的抗原性蛋白质或肽在其氨基末端融合至:(a) 特定合成肽,其稳定融合蛋白在酵母媒介中的表达或防止所表达融合蛋白的翻译后修饰(此类肽详细记载于例如美国专利公开号 2004-0156858A1,公开于 2004 年 8 月 12 日,完整收入本文作为参考);(b) 内源酵母蛋白质的至少一部分,其中任一融合配偶体提供蛋白质在酵母中的表达的显著增强的稳定性和/或防止酵母细胞对蛋白质的翻译后修饰(此类蛋白质还详细记载于例如美国专利公开号 2004-0156858A1,见上文);和/或(c) 引起融合蛋白在酵母表面上表达的酵母蛋白的至少一部分(例如 Aga 蛋白质,其在本文中有更详细的描述)。

[0154] 还有,融合肽或蛋白质可以提供这样的表位,其可以设计成受到选择剂诸如抗体的识别,且不表现出对针对构建物中疫苗接种用抗原的免疫应答有不利影响。此类药剂可用于在本发明中有用的蛋白质鉴定、选择、和纯化。

[0155] 另外,本发明包括融合至抗原编码构建物 C 端的肽的用途,特别是用于蛋白质的选择和鉴定。此类肽包括但不限于任何合成的或天然的肽,诸如肽标签(例如 6X His)或任何其它短表位标签。附着至依照本发明的抗原 C 端的肽可以在添加或没有添加上文所述 N-端肽的情况下使用。

[0156] 可用于本发明的一种融合构建物是包含以下各项的融合蛋白:(a) 至少一种抗原(包括全长抗原的免疫原性结构域和表位,以及各种融合蛋白和多抗原构建物,如本文中其它地方所述);和(b) 合成的肽。

[0157] 在一个实施方案中,将合成肽连接至流感抗原的 N 端,所述肽由至少 2 个对于流感抗原是异源的氨基酸残基组成,其中所述肽稳定融合蛋白在酵母媒介中的表达或防止所表达融合蛋白的翻译后修饰。合成肽和抗原的 N 端部分一起形成具有如下要求的融合蛋白:(1) 融合蛋白的第一位氨基酸残基是甲硫氨酸(即合成肽中的第一个氨基酸是甲硫氨酸);(2) 融合蛋白的第二位氨基酸残基不是甘氨酸或脯氨酸(即合成肽中的第二个氨基酸不是甘氨酸或脯氨酸);(3) 融合蛋白的第 2-6 位氨基酸残基无一为甲硫氨酸(即第 2-6 位氨基酸(无论是合成肽或蛋白质的一部分,如果合成肽短于 6 个氨基酸的话)不包括甲硫氨酸);和(4) 融合蛋白的第 2-6 位氨基酸无一为赖氨酸或精氨酸(即第 2-6 位氨基酸(无论是合成肽或蛋白质的一部分,如果合成肽短于 5 个氨基酸的话)不包括赖氨酸或精氨酸)。合成肽可以短至 2 个氨基酸,但是更优选至少 2-6 个氨基酸(包括 3 个、4 个、5 个氨基酸),而且可以长于 6 个氨基酸,为整数,多至大约 200 个氨基酸、300 个氨基酸、400 个氨基酸、500 个氨基酸、或更多。

[0158] 在一个实施方案中,融合蛋白包含氨基酸序列 M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆,其中 M 是甲硫氨酸;其中 X₂ 是任何氨基酸,除了甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸或精氨酸;其中 X₃ 是任何氨基酸,除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸;其中 X₄ 是任何氨基酸,除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸;其中 X₅ 是任何氨基酸,除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸;且其中 X₆ 是任何氨基酸,除了甲硫氨酸、赖氨酸或精氨酸。在一个实施方案中,X₆ 残基是脯氨酸。增强流感抗原在酵母细胞中表达的稳定性和/或防止蛋白质在酵母中的翻译后修饰的一种例示性合成序列包括序列

M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1)。在流感抗原以外,MADEAP 序列可以与其它抗原一起使用。在增强表达产物的稳定性以外,此融合配偶不表现出对针对构建物中疫苗接种用抗原的免疫应答有不利影响。另外,合成融合肽可以设计成提供这样的表位,其受到选择剂诸如抗体的识别。

[0159] 在本发明的另一个实施方案中,编码本发明中所使用的合成肽翻译起始位点的核酸是 A-C-C-A-T-G-G,,符合 Kozak 翻译序列法则,其中该序列中的 ATG 就是最初的翻译起始位点并编码 M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO:1) 的甲硫氨酸。应当理解,本文所述的本发明各个实施方案还可以联合起来。例如,在本发明的一个方面,若合成肽是 MA-D-E-A-P (SEQ ID NO:1),则编码该肽的起始位点的核酸可以是 A-C-C-A-T-G-G。本发明实施方案的各种其它组合对于本领域技术人员是显而易见的。

[0160] 在本发明的一个方面,对酵母媒介进行操作,使得抗原通过所表达抗原产物的投递或易位而部分的或完全的在酵母媒介表面上表达或提供(胞外表达)。用于实现本发明这个方面的一种方法是使用间隔臂将一种或多种抗原定位在酵母媒介的表面上。使用间隔臂的一种方式创建感兴趣抗原与将该感兴趣抗原靶向酵母细胞壁的蛋白质的融合蛋白。例如,可使用的一种蛋白质是使得抗原靶向酵母细胞壁,从而使得抗原定位在酵母表面上的酵母蛋白质(例如细胞壁蛋白质 2(cwp2)、Aga2、Pir4 或 Flo1 蛋白质)。可以使用酵母蛋白质以外的蛋白质作为间隔臂;然而,对于任何间隔臂蛋白质,最希望免疫原性应当针对靶抗原而非间隔臂蛋白质。因此,如果使用其它蛋白质作为间隔臂,那么所使用的间隔臂蛋白质不应生成这样大的针对间隔臂蛋白质自身的免疫应答,其使得针对靶抗原的免疫应答被淹没。本领域技术人员应当致力于相对于针对靶抗原的免疫应答为小的针对间隔臂蛋白质的免疫应答。可以使用测定免疫应答量级的任何已知方法(例如抗体生成、溶解测定法等),它们是本领域技术人员早就知道的。

[0161] 定位有待在酵母表面上暴露的靶抗原的另一种方法是利用信号序列诸如糖基磷脂酰肌醇(GPI)将靶物锚定至酵母细胞壁。或者,定位可以通过附加使感兴趣抗原经易位入内质网(ER)而靶向入分泌途径的信号序列,使得抗原与结合至细胞壁的蛋白质(例如 cwp)结合来实现。

[0162] 一方面,间隔臂蛋白质是酵母蛋白质。酵母蛋白质可以由介于大约 2 个和大约 800 个氨基酸之间的酵母蛋白质组成。在一个实施方案中,酵母蛋白质是大约 10-700 个氨基酸。在另一个实施方案中,酵母蛋白质是大约 40-600 个氨基酸。本发明的其它实施方案包括至少 250 个氨基酸、至少 300 个氨基酸、至少 350 个氨基酸、至少 400 个氨基酸、至少 450 个氨基酸、至少 500 个氨基酸、至少 550 个氨基酸、至少 600 个氨基酸、或至少 650 个氨基酸的酵母蛋白质。在一个实施方案中,酵母蛋白质的长度是至少 450 个氨基酸。

[0163] 在另一个实施方案中,酵母蛋白质稳定融合蛋白在酵母媒介中的表达,防止所表达融合蛋白的翻译后修饰,和/或将融合蛋白靶向酵母中的特定隔室(例如表达在酵母细胞表面上)。为了投递入酵母分泌途径,待使用的例示性酵母蛋白质包括但不限于:Aga(包括但不限于 Aga1 和/或 Aga2);SUC2(酵母转化酶); α 因子信号前导序列;CPY;Cwp2p,用于其在细胞壁中的定位和保持;BUD 基因,用于子细胞形成的初始阶段中在酵母细胞芽处的定位;Flo1p;Pir2p;和 Pir4p。

[0164] 在本发明的另一个方面,可以使用其它序列来进行蛋白质对酵母媒介其它部分的

靶向、保持、和 / 或稳定,例如在胞质溶胶或线粒体中。可用于任何上述实施方案的合适酵母蛋白质的例子包括但不限于 SEC7;磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 PCK1、磷酸甘油激酶 PGK 和磷酸丙糖异构酶 TPI 基因产物,因其在葡萄糖中的可抑制表达和胞质溶胶定位;热休克蛋白 SSA1、SSA3、SSA4、SSC1,其表达是诱导性的而且其蛋白质在细胞暴露于热处理时是更加热稳定的;线粒体蛋白质 CYC1,用于输入线粒体;ACT1。

[0165] 为了使有效体液免疫应答致敏,靶抗原应当在酵母表面上的一部分中表达或提供(或由酵母分泌)。如图 10A 和 10B、图 11、和图 13B 及实施例所示,关于在酵母细胞表面上提供或表达抗原,多种变化形式是可能的。本领域技术人员将领会,酵母蛋白质的其它组合也可用于将一种或多种感兴趣抗原定位在表面上。

[0166] 本领域技术人员可以以数种方式优化抗原在酵母媒介表面上的表达或提供。一种这样的方式是监测和 / 或控制抗原表面表达。实现这一目的的一种可能的方法是优化抗原的表达水平以获得最大影响。对于有些抗原,抗原的过分表达对于酵母或者对于个体的免疫细胞和免疫系统是有毒的。在其它情况中,由于缺乏抗原与 B 细胞的相互作用,过低的表面表达可致使免疫系统的致敏为亚最优的。本领域技术人员可以使用众所周知的技术来监测抗原表达,诸如流式细胞术(例如 FACS),并将表达水平与细胞存活力关联起来。

[0167] 优化抗原表面表达或提供的另一种方法是从细胞壁融合配偶中谨慎选择间隔臂。尽管可用作间隔臂的酵母蛋白质的例子在下文中给出而且还显示于图 10B,间隔臂的大小可影响抗原被多大程度的暴露以结合在酵母表面上。如此,取决于所使用的是什么抗原,本领域技术人员会选择能实现在酵母表面上适当间隔抗原的间隔臂。在一个实施方案中,间隔臂是至少 450 个氨基酸的酵母蛋白质。

[0168] 优化抗原表面表达的另一项考虑是抗原和间隔臂的组合是应当表达成单体(例如 HA-cwp2,如图 11 所示)还是二聚体或三聚体(例如三聚体 HA-aga2p 加可溶性分泌性 HA),甚至更多单元连接在一起。单体、二聚体、三聚体等的这种用途容许抗原的适当间隔或折叠,使得抗原的有些部分(如果不是全部的话)以使其更具免疫原性的方式展示在酵母媒介的表面上,如果例如多聚体形式采取引发特定类别的抗体例如中和性抗体所要求的构象的话。

[0169] 本领域技术人员可以通过在高于 5.5 的 pH 水平(即中性 pH)培养酵母细胞,来在酵母媒介表面上和在胞质溶胶二者中优化酵母媒介(有和无异源抗原表达)的性能。中性 pH 的使用有助于优化抗原可及性和表面呈递,容许酵母细胞壁处于更柔软的状态,和触发免疫细胞结合酵母以生成优化的免疫应答包括分泌有益细胞因子(例如 $\text{INF-}\gamma$)和优化的激活应答。

[0170] 本领域技术人员可用于优化酵母媒介以使抗体应答致敏的另一种方法是控制酵母糖基化的量。酵母糖基化的量可影响在表面上表达的抗原的免疫原性和抗原性,因为糖模块趋向于是大体积的。因此,在实施本发明时,应当考虑酵母表面上糖模块的存在及其对靶抗原周围三维空间的影响。可使用任何方法来降低酵母糖基化的量。例如,可以使用因具有低糖基化而选择的酵母突变株(例如 *mnn1*、*och1* 和 *mnn9* 突变体),或者可以通过突变靶抗原上的糖基化受体序列来消除。或者,可以使用具有简化糖基化样式的酵母,例如毕赤酵母属。表面抗原上糖基化的效应的一个例子提供于实施例 5。

[0171] 关于在酵母表面上提供抗原的另一项考虑是如何灭活酵母及其对这如何影响在

表面上表达的抗原的抗原性的潜在效应。酵母热灭活是灭活酵母的标准方式,然而,热灭活具有改变靶抗原二级、三级或四级结构的可能。如果采用热灭活,那么本领域技术人员应当通过本领域已知的标准方法小心监测靶抗原的结构变化。或者,可以采用灭活酵母的其它方法,诸如化学的、电学的、放射性的或UV方法。参见例如标准酵母培养教科书中披露的方法学,诸如Methods of Enzymology, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing(1990)。任何所用优化策略应当考虑靶抗原的二级、三级或四级结构及保持此类结构以优化其免疫原性。

[0172] 本发明的融合蛋白构建物与上述实施方案相似的且可包括上述实施方案之限制(尽管这不是必需的)的另一具体方面包括包含连接至流感抗原C端的肽的疫苗,所述肽由至少2个对于流感抗原是异源的氨基酸残基组成,其中所述肽稳定融合蛋白在酵母媒介中的表达或防止所表达融合蛋白的翻译后修饰。在本发明的一个例示性方面,所述肽包含氨基酸序列E-D(Glu-Asp)。这样的序列用于抵消疏水性。

[0173] 在一个实施方案中,本发明的疫苗可以包含连接至流感抗原C端的肽,其中所述肽容许针对该肽的抗体识别融合蛋白。一方面,所述肽包含氨基酸序列G-G-G-H-H-H-H-H(HSEQ ID NO:2)。此实施方案可以单独使用,或者联合上文所述融合蛋白的其它方面。

[0174] 在一个实施方案中,本文融合蛋白中所使用的酵母蛋白质/肽、间隔臂、或合成肽包含抗体表位以进行融合蛋白的鉴定和纯化。抗体可以是早就可得到的,选择结合内源抗原的,或可以轻易生成的。最后,如果希望将蛋白质引导至特定细胞定位(例如进入分泌途径、进入线粒体、进入细胞核),那么构建物可以使用酵母蛋白的内源信号,以确保细胞机制为该投递系统进行了优化。此类信号在上文中已有较为详细的描述。优选的是,可得到或生成选择结合融合配偶的抗体。

[0175] 本发明的酵母媒介、Tarmogen、和组合物(疫苗)的生产

[0176] 依照本发明,术语“酵母媒介-抗原复合物”或“酵母-抗原复合物”一般用于描述酵母媒介与抗原的任何联合体。此类联合体包括由酵母(重组酵母)进行的抗原的表达、将抗原导入酵母、抗原物理附着至酵母、及酵母与抗原混合在一起(诸如在缓冲液或其它溶液或配制剂中)。这些类型的复合物在下文中有详细描述。

[0177] 在一个实施方案中,将用于制备所述酵母媒介的酵母细胞用编码抗原的异源核酸分子转染,使得该酵母细胞表达该抗原。此类酵母在本文中也称为重组酵母或重组酵母媒介。然后将酵母细胞作为完整细胞加载入树突细胞,或者可以将酵母细胞杀死,或者可以将它衍生化,诸如通过形成酵母原生质球、胞质体、空细胞、或亚细胞颗粒,在任何这些之后将衍生物加载入树突细胞。还可以将酵母原生质球直接用重组核酸分子转染(例如从完整酵母生成原生质球,然后转染),用以生成表达抗原的重组原生质球。

[0178] 一方面,将用于制备所述酵母媒介的酵母细胞或酵母原生质球用编码抗原的重组核酸分子转染,使得该酵母细胞或酵母原生质球重组表达该抗原。在这方面,使用重组表达抗原的酵母细胞或酵母原生质球来生成一种酵母媒介,其包含酵母胞质体、酵母空细胞、或酵母膜颗粒或酵母细胞壁颗粒,或其级分。

[0179] 一般而言,酵母媒介和抗原可以通过本文所述任何技术来联合。一方面,给酵母媒介胞内加载抗原。另一方面,将抗原共价或非共价附着至酵母媒介。又一方面,酵母媒介和

抗原通过混合来联合。另一方面,和在优选的实施方案中,由酵母媒介或者由衍生该酵母媒介的酵母细胞或酵母原生质球重组表达抗原。

[0180] 由本发明的酵母媒介生成的抗原的优选数目是酵母媒介合理生成的抗原的任何数目,典型范围为至少一种至至少大约 6 种或更多,更优选大约 2 种至大约 6 种异源抗原。

[0181] 本发明酵母媒介中的抗原表达使用本领域技术人员知道的技术来实现。简言之,以这样一种方式将编码至少一种期望抗原的核酸分子插入表达载体,使得该核酸分子与转录控制序列可操作连接,从而在转化入宿主酵母细胞时能够实现核酸分子的组成性的或受调节的表达。编码一种或多种抗原的核酸分子可以在一种或多种表达载体上,可操作连接至一种或多种表达控制序列。特别重要的表达控制序列是那些控制转录起始的,诸如启动子和上游激活序列。任何合适的酵母启动子可用于本发明,而且多种此类启动子是本领域技术人员知道的。用于在啤酒糖酵母中表达的优选启动子包括但不限于编码如下酵母蛋白质的基因的启动子:醇脱氢酶 I (ADH1) 或 II (ADH2)、CUP1、磷酸甘油酸激酶 (PGK)、磷酸丙糖异构酶 (TPI)、翻译延长因子 EF-1 α (TEF2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH;也称为 TDH3,即磷酸丙糖脱氢酶)、半乳糖激酶 (GAL1)、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (GAL7)、UDP-半乳糖差向异构酶 (GAL10)、细胞色素 c_1 (CYC1)、Sec7 蛋白 (SEC7) 和酸性磷酸酶 (PHO5),更优选杂合启动子,诸如 ADH2/GAPDH 和 CYC1/GAL10 启动子,甚至更优选 ADH2/GAPDH 启动子(其在细胞中的葡萄糖浓度低时(例如大约 0.1%至大约 0.2%)被诱导)以及 CUP1 启动子和 TEF2 启动子。同样的,知道许多上游激活序列 (UAS),也称为增强子。用于在啤酒糖酵母中表达的优选上游激活序列包括但不限于编码如下蛋白质的基因的 UAS:PCK1、TPI、TDH3、CYC1、ADH1、ADH2、SUC2、GAL1、GAL7 和 GAL10,以及由 GAL4 基因产物激活的其它 UAS,特别优选 ADH2UAS。因为 ADH2UAS 受 ADR1 基因产物激活,所以优选在异源基因可操作连接至 ADH2UAS 时过表达 ADR1 基因。用于在啤酒糖酵母中表达的优选转录终止序列包括 α -因子、GAPDH、和 CYC1 基因的终止序列。

[0182] 用于在甲基营养酵母中表达基因的优选转录控制序列包括编码醇氧化酶和甲酸脱氢酶的基因的转录控制区。

[0183] 用于由酵母胞外表达抗原的优化考虑和方法在本文中先前有详细描述。

[0184] 将核酸分子转染入依照本发明的酵母细胞的转染可以通过将核酸分子施用入细胞的任何方法来实现,包括但不限于扩散、主动转运、超声浴、电穿孔、显微注射、脂转染、吸附、和原生质体融合。使用本领域技术人员知道的方法,可以将所转染的核酸分子整合入酵母染色体或保留在染色体外载体上。携带此类核酸分子的酵母载体的例子在本文中有详细描述。如上所述,酵母胞质体、酵母空细胞、和酵母膜颗粒或细胞壁制备物还可以如下重组生产,使用本领域技术人员知道的技术,将完整的酵母微生物或酵母原生质球用期望核酸分子转染,在其中生成抗原,然后进一步操作微生物或原生质球,以生成含有期望抗原的胞质体、空细胞或亚细胞酵母膜提取物或其级分。

[0185] 生产重组酵母媒介和酵母媒介表达抗原的有效条件包括能培养酵母菌株的有效培养基。有效培养基通常是含有可同化的碳水化合物源、氮源和磷酸盐源,以及适宜的盐、矿物质、金属和其它养分,诸如如维生素和生长因子的水性培养基。培养基可以包含复合营养素,或者可以是确定成分的极限培养基。本发明的酵母菌株可以在多种容器中培养,包括但不限于生物反应器、锥形烧瓶、试管、微量滴定皿、和皮氏培养皿。培养在适合酵母菌

株的温度、pH 和氧含量进行。此类培养条件在本领域普通技术人员的专业知识内（参见例如 Guthrie et al. (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego）。

[0186] 在本发明的有些方面，特别是在期望诱导体液免疫应答的实施方案中在期望具有充分的抗原表面表达或提供时，酵母在 pH 水平维持在至少 5.5 的培养基中培养，即培养液的 pH 不容许降至 pH5.5 以下。在其它方面，酵母在维持在大约 5.5 的 pH 水平培养。在其它方面，酵母在维持在大约 5.6、5.7、5.8 或 5.9 的 pH 水平培养。另一方面，酵母在维持在大约 6 的 pH 水平培养。另一方面，酵母在维持在大约 6.5 的 pH 水平培养。在其它方面，酵母在维持在大约 6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或 7.0 的 pH 水平培养。在其它方面，酵母在维持在大约 7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 或 8.0 的 pH 水平培养。pH 水平在酵母培养中是重要的。本领域技术人员将领会，培养过程不仅包括酵母培养的开始，还包括培养物的维持。因为已知酵母培养会随时间变酸（即降低 pH），所以在培养过程中必须小心监测 pH 水平。培养基的 pH 水平下降到 6 以下的酵母细胞培养仍然涵盖的本发明的范围内，只要培养基的 pH 在培养过程中的有些点上调至至少 5.5。因此，酵母在至少 pH5.5 或以上的培养基中培养时间越长，在获得具有期望特征的酵母方面的结果越好。

[0187] 中性 pH 在培养酵母中的应用促进了数项生物学效应，它们是使用酵母作为免疫调控媒介的期望特征。一方面，在中性 pH 中培养酵母容许酵母生长优良，对酵母生成时间没有任何不良效应（例如减缓倍增时间）。酵母可以继续生长至高密度，不丧失其细胞壁柔韧性。另一方面，中性 pH 的应用容许以所有收获密度产生具有柔韧细胞壁的酵母和 / 或对细胞壁消化酶（例如葡糖基酶）敏感的酵母。这种性状是想要的，因为具有柔韧细胞壁的酵母可展现独特的免疫应答，诸如通过在作为酵母的宿主的细胞中促进细胞因子（例如干扰素- γ (IFN- γ)) 的分泌。另外，这种培养方法提供了定位在细胞壁中的抗原的更大可及性。另一方面，对于有些抗原（诸如流感 HA 抗原）使用中性 pH 容许通过二硫苏糖醇 (DTT) 处理来释放二硫键键合的 HA，这在较低 pH（例如 pH5）的培养基中培养表达 HA 的酵母时是不可能的。最后，另一方面，生成 Th1 型细胞因子的细胞在暴露于（例如通过吞噬作用或其它加载）使用中性 pH 方法培养的酵母时表现出此类 Th1 型细胞因子（包括但不限于 IFN- γ 、白介素-12 (IL-12)、和 IL-2) 的生成增加。

[0188] 在用于本文时，术语“中性 pH”的一般使用指介于大约 pH5.5 和大约 pH8 之间的 pH 范围，优选介于大约 pH6 和大约 8 之间。本领域技术人员将领会，在使用 pH 计测量时会发生微小波动（例如十分之几或百分之几）。因此，中性 pH 对于培养酵母细胞的应用意味着在培养酵母细胞的大部分时间里在中性 pH 中培养它们。

[0189] 在本发明的一个实施方案中，作为在酵母媒介中重组表达抗原的替代，给酵母媒介内加载蛋白质或肽抗原，或者碳水化合物或其它充当抗原的分子。随后，现在胞内包含抗原的酵母媒介可以施用于患者或加载入载体诸如树突细胞（下文所述）。在用于本文时，肽包含少于或等于大约 30-50 个氨基酸的氨基酸序列，而蛋白质包含多于大约 30-50 个氨基酸的氨基酸序列；蛋白质可以是多聚体的。可用作抗原的蛋白质或肽可以小至 T 细胞表位（即长度大于 5 个氨基酸）和大于它、包含多个表位、蛋白片段、全长蛋白质、嵌合蛋白质或融合蛋白的任何合适大小。肽和蛋白质可以进行天然或合成衍生化；此类修饰包括但不限于糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊二烯化 (prenylation)、棕榈化

(palmitoylation)、酰胺化、和 / 或添加糖基磷脂酰肌醇。肽和蛋白质可以通过本领域技术人员知道的技术直接插入本发明的酵母媒介,诸如通过扩散、主动转运、脂质体融合、电穿孔、吞噬作用、冻融循环和超声浴。可以直接加载肽、蛋白质、碳水化合物、或其它分子的酵母媒介包括完整酵母,以及原生质球、空细胞或胞质体,它们可以在生成后但是在加载入树突细胞前加载抗原。或者,可以给完整酵母加载抗原,然后由其制备原生质球、空细胞、胞质体、或亚细胞颗粒。在此实施方案中可以将任何数目的抗原加载入酵母媒介,从至少 1、2、3、4 个 / 种或任何整数直至数百或数千抗原,诸如例如通过加载微生物、通过加载哺乳动物肿瘤细胞、或其部分会提供的。

[0190] 在本发明的另一个实施方案中,抗原物理附着至酵母媒介。抗原对酵母媒介的物理附着可以通过本领域的任何合适方法来实现,包括共价的和非共价的结合方法,包括但不限于化学交联抗原至酵母媒介的外表面或生物学连接抗原至酵母媒介的外表面,诸如通过使用抗体或其它结合配偶。化学交联可以通过例如以下方法来实现,包括戊二醛连接、光亲和标记、碳二亚胺处理、能够连接二硫键的化学药品的处理、和本领域的标准交联化学药品的处理。或者,可以使化学药品接触酵母媒介,改变酵母膜的脂双层或细胞壁的组成的电荷,使得酵母的外表面更有可能融合或结合具有特定电荷特征的抗原。靶向剂(诸如抗体、结合肽、可溶性受体和其它配体)也可掺入抗原作为融合蛋白或以其它方式与抗原联合用于将抗原结合至酵母媒介。

[0191] 在又一个实施方案中,酵母媒介和抗原通过更被动的、非特异性的或非共价的结合机制彼此联合,诸如通过在缓冲液或其它合适配制剂(例如混合物)中一起温和混合酵母媒介和抗原。

[0192] 在本发明的一个实施方案中,将酵母媒介和抗原二者都胞内加载入载体,诸如树突细胞或巨噬细胞,以形成本发明的治疗性组合物或疫苗。或者,本发明的抗原(即本发明的流感融合蛋白)可以在缺乏酵母媒介的情况中加载入树突细胞。

[0193] 可以实现这两种成分的加载的各种形式在下文中详细讨论。在用于本文时,术语“加载”及其派生词指一种成分(例如酵母媒介和 / 或抗原)插入、导入、或进入细胞(例如树突细胞)。胞内加载成分指一种成分插入或导入细胞胞内隔室(例如穿过质膜和至少进入胞质、吞噬体、溶酶体、或细胞的一些胞内空间)。加载一种成分入细胞指迫使该成分进入细胞(例如通过电穿孔)或将该成分置于该成分基本上很可能通过一些过程(例如吞噬作用)进入细胞的环境(例如接触或接近细胞)中的任何技术。加载技术包括但不限于:扩散、主动转运、脂质体融合、电穿孔、吞噬作用、和超声浴。在一个优选的实施方案中,使用给树突细胞加载酵母媒介和 / 或抗原的被动机制,此类被动机制包括树突细胞对酵母媒介和 / 或抗原的吞噬作用。

[0194] 在一个实施方案中,可以将完整酵母(有或无异源抗原的表达)磨碎或以一定方式加工以生成酵母细胞壁制备物、酵母膜颗粒或酵母片段(即不完整的),而在有些实施方案中,酵母片段可以与包括抗原(例如 DNA 疫苗、蛋白质亚单位疫苗、杀死的或灭活的病原体)的其它组合物一起提供或施用来增强。例如,酶学处理、化学处理或物理力(例如机械剪切或超声处理)可以用来将酵母破碎成多个用作佐剂的部分。

[0195] 在本发明的一个实施方案中,组合物或疫苗还可包括生物应答调节剂化合物,或生成此类调节剂的能力(即通过给酵母媒介转染编码此类调节剂的核酸分子),尽管此类

调节剂不是依照本发明实现强力免疫应答所必需的。例如,可以给酵母媒介转染或加载至少一种抗原和至少一种生物应答调节剂化合物,或者本发明的疫苗或组合物可以与至少一种生物应答调节剂联合施用。生物应答调节剂包括可调控免疫应答的化合物,它可以称作免疫调控化合物。某些生物应答调节剂可以刺激保护性免疫应答,而其它可以抑制有害免疫应答。某些生物应答调节剂优先增强细胞介导的免疫应答,而其它优先增强体液免疫应答(即可以刺激这样的免疫应答,其中细胞介导的水平与体液免疫相比升高,或反之亦然)。本领域技术人员知道许多技术来测量免疫应答的刺激或抑制,以及区别细胞介导的免疫应答与体液免疫应答。

[0196] 合适的生物应答调节剂包括细胞因子、激素、脂质衍生物、小分子药物和其它生长调控剂,诸如但不限于白介素 2(IL-2)、白介素 4(IL-4)、白介素 10(IL-10)、白介素 12(IL-12)、干扰素 γ (IFN- γ)、胰岛素样生长因子 I(IGF-I)、转化生长因子 β (TGF- β)、类固醇、前列腺素和白三烯。酵母媒介表达(即生成)和可能分泌 IL-2、IL-12 和 / 或 IFN- γ 的能力优先增强细胞介导的免疫,而酵母媒介表达和可能分泌 IL-4、IL-5 和 / 或 IL-10 的能力优先增强体液免疫。其它合适的生物应答调节剂包括但不限于:抗 CTLA-4 抗体(例如释放无变应性 T 细胞);T 细胞共刺激物(例如抗 CD137、抗 CD28、抗 CD40);alemtuzumab(例如 CamPath®)、denileukin diftitox(例如 ONTAK®)、抗 CD4、抗 CD25、抗 PD-1、抗 PD-L1、抗 PD-L2 或阻断 FOXP3 的药剂(例如为了消除活性 / 杀死 CD4+/CD25+T 调节细胞);Flt3 配体、咪喹莫特(imiquimod)(Aldara™)、GM-CSF、沙格司亭(sargramostim)(Leukine®)、Toll 样受体(TLR)-7 激动剂、或 TLR-9 激动剂(例如提高树突细胞、巨噬细胞和其它专门抗原呈递细胞的数目或活化状态的药剂)。此类生物应答调节剂在本领域是众所周知的且公众可获得的。

[0197] 本发明的组合物和治疗性疫苗可进一步包括可用于保护受试者免于特定疾病或疾患(包括病原体感染)的任何其它化合物,或治疗或改善此类感染的任何症状的任何化合物。

[0198] 在用于本文时,制药学可接受的载体指适于投递本发明的酵母疫苗至合适的体内或离体位点的任何物质或媒介。此类载体可以包括但不限于佐剂、赋形剂、或任何其它类型的投递媒介或载体。

[0199] 依照本发明,佐剂典型的是一般增强动物对特定抗原的免疫应答的物质。合适的佐剂包括但不限于弗氏佐剂;其它细菌细胞壁组分;基于铝的盐;基于钙的盐;硅土(silica);多核苷酸;类毒素;血清蛋白质;病毒外壳蛋白;其它细菌衍生的制备物; γ 干扰素;嵌段共聚物佐剂,诸如亨特(Hunter)氏 Titermax 佐剂(CytRx™, Inc. Norcross, GA);Ribi 佐剂(可从 Ribi ImmunoChemResearch, Inc., Hamilton, MT 获得);和皂苷及其衍生物,诸如 QuilA(可从 Superfos Biosector A/S, Denmark 获得)。佐剂不是本发明的酵母疫苗所必需的,但是不排除它们的应用。

[0200] 载体通常是延长治疗性组合物在接受治疗的动物中的半衰期的化合物。合适的载体包括但不限于多聚体可控释放配制剂、生物可降解埋植剂、脂质体、油、酯、和二醇。

[0201] 本发明的组合物和疫苗还可包含一种或多种制药学可接受的赋形剂。在用于本文时,制药学可接受的赋形剂指适于将可用于本发明方法的组合物投递至合适的体内或离体位点的任何物质。优选的制药学可接受赋形剂能够使组合物(例如酵母媒介或包含酵母媒介的树突细胞)维持这样一种形式,使得组合物到达靶细胞、组织、或体内位点时,该组合

物能够在靶位点引发免疫应答（注意，靶位点可以是全身性的）。本发明的合适的赋形剂包括能转运，但不是特异性地将疫苗靶向某位置（本文中也可称作非寻靶载体）的赋形剂或配制剂。制药学可接受的赋形剂的例子包括但不限于水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、含血清溶液、Hank 氏液、其它水性生理学平衡溶液、油、酯、和二醇。水性载体可包含通过例如提高化学稳定性和等渗性从而接近受者生理学疾患所需的合适的辅助物质。辅助物质还可以包括防腐剂。可以添加稳定剂，诸如海藻糖、甘氨酸、山梨醇、乳糖或谷氨酸单钠 (MSG)，以针对各种条件（诸如温度变化或冷冻干燥过程）稳定疫苗配制剂。组合物还可以包括悬浮用流体，诸如无菌水或盐水（优选有缓冲的）。

[0202] 可以使用本领域技术人员知道的许多技术将酵母媒介配制入本发明的组合物，包括直接施用于患者的制备物，或者首先加载入载体诸如树突细胞。例如，可以将酵母媒介直接冻干，这是一个优选的实施方案。在施用或加载入树突细胞或其它类型的抗原施用前，还可以将酵母媒介与制药学可接受的赋形剂混合，例如可以将配制剂在合适的稀释剂中重悬或稀释，诸如无菌水、等张缓冲盐水（例如缓冲至生理学 pH 的磷酸盐）、或其它合适的稀释剂。冻干（冷冻干燥）是一个有利的选项。包含酵母媒介的配制剂还可以如下制备，即在蛋糕或药片中包装酵母，诸如对烘烤或酿造操作中说使用酵母的所进行的那样。

[0203] 本发明的试剂盒

[0204] 本发明设想了试剂盒，其单独包含任何一种或多种本发明疫苗、和 / 或任何一种或多种 Tarmogens 或本发明的酵母媒介，或者联合本文所述抗原和抗原制备物。本发明的试剂盒中包括胞内和胞外抗原的任何组合，用于任何类型的疫苗，特别是在本发明的基于酵母媒介的疫苗或疫苗策略中。例如，可以在试剂盒中提供任何本文所述融合蛋白，或提供本文所述胞内和胞外抗原的蛋白质制备物。抗原可以以任何形式来提供，包括由酵母媒介表达或以其它方式提供（像 Tarmogen）、在 DNA 疫苗中、作为蛋白质制备物（包括融合蛋白制备物）、或作为杀死的或灭活的病原体。涵盖任何合适形式的抗原。还包括多抗原或抗原制备物，其中每种抗原由不同酵母媒介表达或以其它方式提供（例如与不同酵母媒介复合）。例如，每种酵母媒介可表达或以其它方式提供来自特定病原体的不同抗原，使得可以选择一种优选的抗原组合（例如保守或内部和 / 或有差异的或外部）和一种优选的疫苗策略（例如用保守或内部抗原致敏和用有差异的或外部抗原加强）来施用给个体或一群个体。一方面，这种试剂盒可以另外包括抗原制备物，用于致敏或加强疫苗策略，或是单独包括在试剂盒中或是联合 Tarmogen 包括在试剂盒中（在致敏 / 加强策略中同时或序贯施用，诸如此类，如本文所述）。试剂盒还可以包括不表达或提供抗原的酵母媒介，用作本文所述佐剂。本发明的任何试剂盒可以包括一套使用说明书。还可以包括酵母媒介的培养试剂。酵母细胞可以是冷冻的，用于起始培养，或者先培养以表达抗原，然后冷冻或包装，作为试剂盒的一部分，或者以冻干形式提供。

[0205] 本发明的方法

[0206] 本发明的一个实施方案涉及引发免疫应答的方法，包括细胞介导的免疫应答、体液免疫应答、和 / 或其组合。本发明的另一个实施方案涉及保护动物免于疾患或疾病的方法，（包括疾患或疾病的预防和 / 或治疗），包括病原体感染（例如流感病毒感染）或由其导致的疾病。所述方法包括如下步骤，即如本文所述对患有疾病或疾患（包括病原体感染）或有风险发生疾病或疾患（包括病原体感染）的动物施用本发明的疫苗或组合物，以减轻

或预防疾病或疾患,包括在动物中预防感染或减轻至少一种由感染导致的症状。本发明的方法在动物中优先引发针对至少一种抗原的抗原特异性细胞介导的免疫应答,至少在第一次给个体施用包含抗原的疫苗时。使免疫应答适应特定病原体或疾病的详细策略、和将要接受疫苗施用的个体的免疫状态在上文中已有描述且在本文中有例示。本领域技术人员将轻易的能够使用不同抗原组合、抗原表达或提供的类型、和疫苗组合物、及如本文所述的疫苗方案来实现期望的免疫应答。

[0207] 在上述实施方案中,疫苗或组合物包括:(a) 第一酵母媒介;和(b) 任何一种或多种本文所述抗原(由酵母媒介表达、被其携带、与其复合、关联、被其分泌、和/或与其混合)。疫苗可以如上所述包括别的酵母媒介,其表达、携带、分泌不同抗原或与不同抗原混合、关联或复合。待本发明的酵母媒介表达、携带、分泌、或与本发明的酵母媒介混合、关联、或复合的优选抗原组合,及待组合或序贯施用的优选酵母媒介组合在上文中有详细描述。

[0208] 在一个实施方案中,疫苗包括至少一种由酵母胞内表达或提供的抗原。在一个实施方案中,疫苗包括至少一种由酵母胞内表达或提供的抗原和至少一种由酵母胞外表达或提供的抗原。在这个实施方案的一个方面,胞内和胞外抗原是相同的抗原,在另一方面,它们是不同的抗原。在一个实施方案中,由酵母胞内表达或提供的抗原包括至少一种如下抗原,其是保守抗原或是由病原体内在表达的。在一个实施方案中,由酵母胞外表达或提供的抗原包括至少一种如下抗原,其是有差异的抗原或是由病原体外部表达的(在表面上)。在另一个实施方案中,此类有差异的或外部抗原也是由酵母胞内表达或提供的。

[0209] 在本发明的一个实施方案中,疫苗包括至少一种由酵母胞内表达或提供的抗原和至少一种由酵母胞外表达或提供的抗原,而且该疫苗用于使免疫系统针对抗原致敏。致敏意味着该疫苗是第一次施用给个体的疫苗,即该个体先前未用该用抗原或抗原组合免疫过。如此,免疫系统被“致敏”,对后续抗原遭遇(例如通过加强疫苗或通过遭遇天然抗原,例如因为感染病原体)的应答更迅速和有效。

[0210] 在一个实施方案中,疫苗包括至少一种由酵母胞内表达或提供的抗原或至少一种由酵母胞外表达或提供的抗原或二者即由酵母胞内表达或提供的抗原和由酵母胞外表达或提供的抗原,而且该疫苗作为加强疫苗来施用(即在第一次用一种或多种抗原免疫的初始致敏免疫后)。

[0211] 在一个实施方案中,在抗原是高度保守的和不太可能突变的情况中,可能希望表达单一抗原。在其它实施方案中,为了比靶向单一抗原能实现的更宽范围的交叉保护性应答,希望表达或提供多种抗原。此类交叉保护性应答对于生成通用疫苗是有用的,其可以联合生成抗体的疫苗,如上所述,以提供宽谱的保护性免疫应答。可以在节省剂量的方案中应用通用抗原的靶向,因为该保护机制不同于生成抗体的疫苗所引发的保护机制。

[0212] 在其它实施方案,加强疫苗属于不同的类型,例如不基于酵母的疫苗(例如蛋白质亚单位、DNA、杀死的/灭活的病原体)或基于酵母的疫苗,其使用不同类型的酵母媒介,诸如酵母膜或细胞壁颗粒或酵母,用作蛋白质、DNA 或灭活的/杀死的病原体疫苗的佐剂。更具体的说,在本发明的一个实施方案中,本文所述本发明的疫苗或组合物可以以如下方案施用,其包括施用一种或多种其它疫苗或免疫疗法组合物,包括任何常规的、不基于酵母的疫苗或组合物。例如,此类其它疫苗或免疫疗法组合物可以包括任何其它包含抗原的、编码抗原的、或表达抗原的组合物,诸如 DNA 疫苗、杀死的或灭活的病原体疫苗或蛋白质亚单

位疫苗（例如纯化的抗原制备物）。本发明的基于酵母的疫苗优选用于使抗原特异性免疫应答致敏，包括至少强烈的细胞介导的免疫应答，而在一个实施方案中，细胞介导的和体液的两种免疫应答，而不基于酵母的疫苗或其它形式的基于酵母的疫苗优选用于加强免疫应答（细胞介导的和 / 或体液的）。或者，可能有这样的情况，施用本发明的基于酵母的疫苗以加强个体对一种或多种已经在先前施用的不基于酵母的疫苗中施用的抗原的免疫应答。

[0213] 一方面，不表达或以其它方式包含或提供异源抗原的酵母可以联合一种或多种感兴趣抗原用作佐剂。在一个实施方案中，不表达或以其它方式包含或提供异源抗原的酵母与不基于酵母的疫苗（例如 DNA 疫苗）同时使用以增强 DNA 疫苗的免疫应答。在一个备选实施方案中，表达或提供异源抗原（或是在表面上或在内部或二者）的酵母联合其它类型的疫苗使用以增强免疫应答。在另一个备选实施方案中，不表达或以其它方式包含或提供异源抗原的酵母单独施用给个体（即不施用外源抗原）。在本发明的这个方面，个体早就携带足够数量的抗原以在施用非携带抗原的酵母媒介时引发免疫应答，诸如当前感染了病原体的个体、在细胞蛋白质中发生突变或以其它方式表达或携带免疫系统对其不耐受或针对它的耐受可被破坏的抗原的个体。

[0214] 酵母媒介上的异源抗原不必与不基于酵母的疫苗中用于引发保护性免疫应答的抗原相同。抗原的选择可以这样进行，使得两种抗原享有序列相似性，具有共享表位，或者可以是靶病原体中的不同抗原。一方面，为基于酵母的和基于酵母的疫苗选择抗原以引发补充性的或互补性的免疫应答。这在针对酵母媒介的异源抗原的免疫应答对于针对不基于酵母的疫苗中的抗原的免疫应答是拮抗性的情形中是显然优选的。

[0215] 使用本发明的治疗性组合物或疫苗的方法优选在动物中引发免疫应答，使得该动物受到保护免于疾病或疾患（包括感染），或者免于由疾病或疾患（包括感染）导致的症状。在用于本文时，短语“受到保护免于疾病”指减轻疾病的症状；减少疾病的发生；和 / 或减轻疾病的严重性。保护动物可以指本发明的组合物在施用给动物时预防疾病发生和 / 或治愈或减轻疾病症状、体征或病因的能力。因此，保护动物免于疾病既包括预防疾病发生（预防性处理或预防性疫苗）又包括治疗患有疾病或正在经历疾病初始症状的动物（治疗性处理或治疗性疫苗）。具体而言，保护动物免于疾病是如下实现的，即通过在动物中引发免疫应答，通过诱导有益的或保护性的免疫应答，其在有些情况中可以额外抑制（例如降低、抑制或阻断）过于活跃的或有害的免疫应答。术语“疾病”指相对于动物的正常健康状况的任何偏离，包括存在疾病症状时的状态，以及已经发生偏离（例如感染）但是症状尚未表现出来的状况。

[0216] 在一个实施方案中，将任何本发明疫苗施用给个体或一群个体，其已经感染了病原体，诸如流感病毒。在另一个实施方案中，将任何本发明疫苗施用给个体或一群个体，其有风险感染此类病原体。此类个体可以包括鉴定为比例如正常群体或整个群体有更高的流感感染风险的群体。此类个体还可以包括由于群体的地理位置的预期病原体株（例如病毒株）而为本发明的特定疫苗选择的群体。此类群体可以用任何合适参数来限定。在另一个实施方案中，将任何本发明疫苗施用给任何个体或任何群体，不管他们已知的或预测的感染状态或变成受特定病原体感染的易感性。

[0217] 更具体的说，本文所述疫苗，在通过本发明的方法施用给动物时，优选生成这样的结果，其可以包括减缓病原体感染（例如减轻感染的至少一种症状或临床表现），消除感染

或缩短消除感染所需时间,预防感染和 / 或其相关症状,及刺激针对感染的效应细胞免疫力,以及体液免疫力。另外,疫苗优选使免疫系统致敏,以预防或减轻所有病原体感染,包括病原体的所有生命周期形式、株、或突变体,无论是在循环中游离的或者是在个体的细胞或组织中。疫苗还优选赋予持久的针对病原体的免疫力,或至少通用的或交叉保护性的免疫力,使得未来的新株或突变体的感染更易于预防和 / 或消除。

[0218] 本发明包括将本发明的组合物或疫苗投递给动物。施用过程可以回体或体内进行。回体施用指部分操作步骤在患者体外进行,诸如在使得酵母媒介和抗原加载入细胞的条件下将本发明的组合物施用给从患者体内取出的一群细胞(树突细胞),并将这些细胞返回患者。本发明的治疗性组合物可以通过任何合适的施用模式返回患者或施用给患者。

[0219] 疫苗或组合物的施用,或是单独的或是联合依照本发明的载体,通常是系统性的(全身性的)或经粘膜的。优选的施用路径对于本领域技术人员是显而易见的。优选的施用方法包括但不限于静脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、结节内(intranodal)施用、冠状动脉内施用、动脉内施用(例如进入颈动脉)、皮下施用、经皮投递、气管内施用、皮下施用、关节内施用、心室内施用、吸入(例如气雾剂)、颅内、脊柱内、眼内、耳的、鼻内、口服、肺部施用、导管注入(impregnation of a catheter)、和直接注射入组织。

[0220] 特别优选的施用路径包括静脉内、腹膜内、皮下、皮内、结节内、肌肉内、经皮、吸入、鼻内、口服、眼内、关节内、颅内和脊柱内。胃肠外投递可以包括皮内、肌肉内、腹膜内、胸膜内、肺内、静脉内、皮下、心房导管和静脉导管(venal catheter)路径。耳的投递可以包括滴耳液,鼻内投递可以包括滴鼻液或鼻内注射,而眼内投递可以包括滴眼液。气溶胶(吸入)投递还可以使用本领域标准方法来进行(参见例如 Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA189:11277-11281, 1992, 完整收入本文作为参考)。例如,在一个实施方案中,本发明的组合物疫苗可以配制成适于使用合适的吸入装置或喷雾器喷雾投递的组合物。口服投递包括可以通过口摄取的固体和液体,而且可用于建立粘膜免疫,因为包含酵母媒介的组合物可以容易的制备成供口服投递,例如片剂或胶囊剂,以及配制成食品和饮料产品。

[0221] 调控粘膜免疫的其它施用路径在病毒感染和其它病原体感染的治疗中特别有用。此类路径包括支气管、皮内、肌肉内、鼻内、其它吸入、直肠、皮下、表面、经皮、阴道和尿道路径。

[0222] 在任何上文鉴定的方法的一个实施方案中,将疫苗施用至呼吸道。在另一个实施方案中,疫苗是通过肠胃外施用路径施用的。在又一个实施方案中,疫苗进一步包含树突细胞或巨噬细胞,其中将表达融合蛋白的一种或多种酵母媒介(指上文所述优选组合)离体投递至树突细胞或巨噬细胞,而且其中将包含表达抗原的酵母媒介的树突细胞或巨噬细胞施用给动物。在这个实施方案的一个方面,树突细胞或酵母媒介另外加载了游离抗原。一方面,将基于酵母的疫苗施用至个体中与另一种基于酵母的疫苗或不基于酵母的疫苗相同的位置。另一方面,将基于酵母的疫苗施用至个体中与另一种基于酵母的疫苗或不基于酵母的疫苗不同的位置。一方面,疫苗是作为治疗性疫苗施用的。另一方面,疫苗是作为预防性疫苗施用的。

[0223] 依照本发明,一个有效的施用方案(即以有效的方式施用疫苗或治疗性组合物)包含合适的剂量参数和施用模式,其导致在患有疾病或疾患或有风险发生疾病或疾患的动

物中引发免疫应答,优选使得动物得到保护免于疾病。关于特定疾病的有效剂量参数可以使用本领域标准方法来确定。此类方法包括例如测定疾病的存活率、副作用(即毒性)、和进展或消退。

[0224] 依照本发明,合适的单剂大小指在合适的一段时间里施用一次或多次后能够在动物中引发抗原特异性免疫应答的剂量。剂量可以随所治疗的疾病或疾患而有所变化。例如,在一个实施方案中,本发明的酵母媒介的单剂是大约 1×10^5 至大约 5×10^7 个酵母细胞等效物每千克接受组合物施用的生物体体重。在一个优选的实施方案中,每剂的酵母细胞不根据生物体的重量进行调节。在这个实施方案中,本发明的酵母媒介的单剂是大约 1×10^4 至大约 1×10^9 个酵母细胞每剂。单剂中所使用的酵母媒介的量可以介于大约 0.0001 个酵母单位(YU)至大约 10,000YU 之间(1 个 YU = 10^7 个酵母)。在一个实施方案中,所使用的酵母媒介的量是大约 0.001YU 至大约 1000YU。在其它实施方案中,所使用的酵母媒介的量是大约 0.01YU 至大约 100YU。在其它实施方案中,所使用的酵母媒介的量是大约 0.1YU 至大约 10YU。在一个实施方案中,本发明的酵母媒介的单剂是大约 0.1YU(1×10^6 个细胞)至大约 100YU(1×10^9 个细胞)每剂(即每个生物体),包括任何之间剂量,增量为 0.1×10^6 个细胞(即 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 ...)。这个剂量范围可以在任何大小的任何生物体中有效使用,包括小鼠、猴、人等。

[0225] 在通过将酵母媒介和抗原加载入树突细胞来施用疫苗时,本发明疫苗的优选单剂是大约 0.5×10^6 至大约 40×10^6 个树突细胞每个个体每次施用。优选的是,单剂是大约 1×10^6 至大约 20×10^6 个树突细胞每个个体,更优选大约 1×10^6 至大约 10×10^6 个树突细胞每个个体。

[0226] 优选在针对抗原的免疫应答已经减弱或者需要针对特定的一种或多种抗原提供免疫应答或诱导记忆应答时施用治疗性组合物的“加强”(剂/剂量)。加强(剂/剂量)可以在初始施用后大约 2 周至数年时施用。在一个实施方案中,施用方案是这样的,其中在大约 1 个月至大约 6 个月的一段时间里大约 1 次至大约 4 次施用大约 1×10^5 至大约 5×10^7 个酵母细胞等效物的组合物每千克生物体体重。

[0227] 在本发明的一个实施方案中,给个体或一群个体施用第一疫苗,其包含一剂上文详述的一种或多种酵母媒介和一种或多种抗原,而且一方面,优选包含一剂一种或多种酵母媒介和一种或多种胞内抗原,或是单独的或是联合一种或多种胞外抗原。在流感的情况中,疫苗优选包含至少一种或多种内部流感抗原。根据维持或引发针对抗原的、细胞介导的免疫的需要,这种疫苗可以以任何合适的周期基础施用给个体,并且在抗原是胞外抗原时,以维持或引发针对抗原的体液免疫的需要。在病原体的情况中,诸如流感,疫苗优选维持或引发针对一种或多种流感病毒株的、至少细胞介导的免疫。例如,疫苗可以与加强(剂/剂量)一起施用,或者在每年一次或一年两次、几年一次、或根据其它需要的基础上施用。如上所述,本发明的这个实施方案可用作通用的、交叉保护性的疫苗,而且可以提供比常规疫苗更持久的针对各种类型病原体感染的免疫。

[0228] 在另一个实施方案,给接受上文第一疫苗的同一个体或同一群个体施用第二疫苗,其包含一剂一种或多种酵母媒介和一种或多种抗原(与上文第一疫苗中所包括的相同或不同),优选包含一剂一种或多种酵母媒介和一种或多种胞外抗原,或是单独的或是联合一种或多种胞内抗原。这第二疫苗可以与第一疫苗一起施用(例如作为包含不同酵母媒介

的组合的单一疫苗),或是与第一疫苗分开施用。在后一种情况中,第二疫苗可以与第一疫苗序贯但同时施用(例如施用间隔数秒、数分、或数小时),或者以与第一疫苗不同的方案施用,以维持各种疫苗引发的免疫应答。例如,第一疫苗可以每年一次或以更长间隔施用,如果可能的话,目的是引发通用的、交叉保护性的细胞介导的免疫应答及(如果根据疫苗设计是适用的话)体液免疫应答。第二疫苗也可以每年一次或根据需要来施用(即以一次的基础、每年超过一次、或对于免疫接种策略来说恰当的)以适时针对当时群体中最流行的病原体株免疫群体,或者根据需要控制或预防病原体感染的流行或大流行。本文中特别详细的描述了这种策略应用于流感疫苗的情况,但是本发明不限于流感疫苗。如上所述,本发明的疫苗策略可以设计成提供交叉保护性的和病原体株/突变体特异性的免疫二者,包括细胞介导的和体液的免疫二者,认为这比先前所述的提供了更加灵活和有效的、针对病原体的免疫接种。例如,这种策略可以容易的适应细胞抗原,诸如由肿瘤细胞表达的抗原。

[0229] 在本发明的方法中,疫苗和治疗性组合物可以施用给动物(受试者、个体、患者),包括任何脊椎动物,特别是脊椎动物纲、哺乳类的任何成员,包括但不限于灵长类、啮齿类、家畜和宠物。家畜包括用于消费的或生产有用产物(例如用于羊毛生产的绵羊)的哺乳动物。优选的要保护的哺乳动物包括人、犬、猫、小鼠、大鼠、山羊、绵羊、牛、马和猪,人是特别优选的。

[0230] 第一和第二医学用途

[0231] 本发明还设想了本文所述任何表达或提供胞外和/或胞内抗原的酵母媒介(Tarmogens)、胞外和胞内抗原的组合、融合蛋白、作为佐剂的酵母媒介、和/或抗原制备物,和/或其任何组合用于制备用于任何用途,特别是用于治疗或预防疾病或疾患,包括病原体感染、癌症、自身免疫病等的配制剂或药物的用途。配制剂或药物可以配制成供任何类型的施用,包括施用路径的组合(例如鼻内和/或胃肠外)。配制剂或药物可以制备成供本文所述任何类型的施用方案。一方面,配制剂或药物用于引发抗原特异性免疫应答(细胞介导的和/或体液的)、用于针对流感感染保护动物、用于治疗或预防疾病或疾患、用于免疫有风险受到病原体(诸如流感病毒)感染的一群个体、用于治疗感染了病原体(诸如流感病毒)的一群个体、或用于针对病原体感染(包括流感病毒)保护动物。

[0232] 流感组合物和疫苗

[0233] 本发明针对任何抗原的和上文所述的各个方面将通过详细讨论本发明的理念和实施方案对流感病毒及用于引发针对流感病毒的免疫应答的组合物和方法的应用来说明和解释。本发明不限于流感病毒作为抗原或抗原来源。

[0234] 本发明人已经开发了基于酵母的疫苗及其使用方法,其包含酵母媒介和一种或多种流感病毒融合蛋白。表达或以其它方式复合有一种或多种流感抗原的此类酵母媒介可以单独使用或联合一种或多种表达或以其它方式复合有一种或多种别的流感病毒融合蛋白的别的酵母媒介,或者酵母媒介可以与其它形式的流感抗原联合,包括任何不基于酵母的疫苗(例如DNA疫苗、蛋白质亚单位疫苗、或杀死的或灭活的流感病毒)。

[0235] 在一个实施方案中,疫苗包括表达或提供选自基质蛋白(M1)、离子通道(M2)抗原、核壳体(NP)抗原、聚合酶PB1(PB1)抗原、聚合酶(PB2)抗原、和聚合酶PA(PA)抗原的一种或多种内部流感抗原的酵母媒介。在另一个实施方案中,疫苗包括表达选自血凝素(HA)抗原(任何一种或多种亚型)和神经氨酸酶(NA)抗原(任何一种或多种亚型)的一种或

多种外部流感抗原的酵母媒介。内部抗原通常由酵母在胞内表达。外部流感抗原通常在酵母的表面上表达或提供（胞外抗原），而且也可以由酵母在胞内表达或提供。在有些实施方案中，这两种类型的抗原提供（胞内和胞外）都是优选的。在一个特别优选的实施方案中，外部流感病毒蛋白选择成代表在给定时间段（例如一年）里在一个动物物种（例如人）中最突出流行的病毒型或群，或者选择成应答潜在的、怀疑的、或预期的特定类型流感爆发，包括流感流行或大流行。

[0236] 本发明的其它的和特别优选的实施方案涉及利用外部和内部两类流感抗原的联合使用的疫苗。在这个实施方案中，疫苗包括表达或提供选自基质蛋白（M1）、离子通道（M2）、核壳体（NP）抗原、聚合酶 PB1（PB1）抗原、聚合酶（PB2）抗原、和聚合酶 PA（PA）抗原的至少一种内部流感抗原的酵母媒介。这些蛋白质的联合使用也涵盖在本发明内。内部流感抗原优选由酵母在胞内表达，尽管该抗原也可以在胞外提供。疫苗还包括表达或提供选自血凝素（HA）抗原（任何一种或多种亚型）和神经氨酸酶（NA）抗原（任何一种或多种亚型）的至少一种外部流感抗原的酵母媒介。外部流感抗原在酵母的表面上（胞外）表达或提供，而且也可以由酵母在胞内表达或提供。在有些实施方案中，这两种类型的抗原表达或提供对外部流感抗原来说都是优选的。

[0237] 来自各种流感病毒株的蛋白质的核酸和氨基酸序列是已知的。例如，流感病毒株 A/PR/8/34 的 H1N1 的序列以 NCBI 数据库编号 M38279（本文中 SEQ ID NO:29 所示核苷酸序列，其编码 SEQ ID NO:30）和 NC_002019（本文中 SEQ ID NO:31 所示核苷酸序列，其编码 SEQ ID NO:32）公开。例如禽流感株 A/Vietnam/1203/04 的序列也是已知的。例如，编码来自 A/Vietnam/1203/04 的 H5N1 的核苷酸（例如 NCBI 数据库编号 AY818135）在本文中如 SEQ ID NO:33 所示，其编码 SEQ ID NO:34。应当理解，尽管本文所述特定序列衍生自这些株的已知的或已报道的序列，本领域技术人员可以容易的选择不同的株或同一株的不同已报道的序列，并且以与已公开序列相同的方式在本发明中使用。可以容易的使用多种序列软件程序比对序列并鉴定其它株或已报道的病毒序列中与本文所述蛋白质相应的序列。还应注意，核苷酸和氨基酸序列在各种株或公开数据库中的序列报告间可以有轻微差异。此类轻微差异预期不会显著影响引发依照本发明的免疫应答的能力。本发明不限于本文所述序列。在这个实施方案中，表达或提供外部流感抗原的酵母媒介与表达或提供内部流感抗原的酵母媒介可以是相同的或不同的酵母媒介。另外，可以在不同酵母媒介上表达或提供内部流感抗原和 / 或外部流感抗原的不同组合，而且各媒介可以分开使用或一起使用，取决于所期望的疫苗接种。一般而言，在通过两种或多种不同酵母媒介提供流感抗原时（即与在一种酵母媒介上提供所有流感抗原不同），酵母媒介可以联合（混合）以作为单一疫苗来施用（例如单次注射或其它剂量类型），或者可以序贯施用不同酵母媒介。序贯施用可以以任何合适时间段间隔，包括小段时间（数秒或数分）和大段时间（数天、数周、数月、或甚至数年）。在这些实施方案中，本发明设想了可以使用包括至少一种内部流感病毒蛋白和至少一种外部流感病毒蛋白的任何流感病毒蛋白组合，而且这些蛋白质可以使用表达或以其它方式复合有此类蛋白质的酵母媒介的任何组合（包括单一酵母媒介）来提供。

[0238] 在如何设计和使用本发明的疫苗方面有极大灵活性。例如，包含提供内部流感抗原的酵母媒介的“通用”疫苗可以以周期基础施用给个体，以在个体中形成细胞介导的交叉保护性免疫。然后可以以例如一次性的或周期性的基础组合这种疫苗与提供外部流感抗原

的别的酵母媒介。提供外部流感抗原的酵母媒介可以每年或以任何其它优选的基础（例如紧急情况或预期的流行或大流行、或根据其它需要）轮换、交替或选择以靶向感兴趣病毒株和 / 或在给定时间段里或对于特定地理区域最流行的病毒株。本发明的其它实施方案根据本文中所提供的公开内容将是显而易见的。

[0239] 在本发明的又一个实施方案中，表达或提供一种或多种内部抗原（单独的或联合一种或多种外部抗原）的酵母媒介可以作为致敏疫苗来施用，接着用别的基于酵母的疫苗加强或者用其它内部和 / 或外部抗原制备物加强，包括但不限于纯化的或部分纯化的流感病毒蛋白制备物、表达流感病毒蛋白的酵母媒介的溶解物、DNA 流感疫苗、杀死的（或灭活的）病毒、或酵母媒介（提供或不提供异源抗原）与不基于酵母的疫苗的组合。应当注意，因为本发明的基于酵母的疫苗在引发免疫应答方面极其有效，所以不太可能需要加强疫苗，但是它们包括在本发明的一个实施方案中。

[0240] 流感 M1、M2 和 NP 蛋白是由流感病毒表达的内部蛋白质，而且在各流感病毒株间展现出高度的序列保守性，使得它们成为免疫疗法的卓越靶物。施用本发明的疫苗提升流感特异性 CD4+ 和 CD8+T 细胞应答，而且预计导致病毒载荷降低，最终增强感染流感的个体中的病毒清除。在与基于酵母的形式的外部流感抗原（例如 HA、M2e（M2 蛋白的外部肽）和 / 或 NA 抗原）联合时，疫苗进一步提升流感特异性的、细胞介导的和体液的免疫，以提供疫苗接种平台，其包括具有潜在的持久效应的交叉保护性疫苗接种方法（经内部抗原），以及可进行适应以解决当前疫苗需求的株特异性方法（经外部抗原）。此外，本发明的疫苗不是基于鸡卵的，容许该疫苗在比常规流感疫苗更宽的受众范围中使用。还预计该疫苗的生产比当前流感疫苗更有效且快速。最后，如上所述，由本发明提供的疫苗设计中的灵活性，即在建立通用免疫力的同时还根据需要靶向病毒亚型方面，是超越常规流感疫苗的重大改进。

[0241] 本发明的一个实施方案涉及组合物（疫苗），其可用于保护动物免于流感感染或减轻至少一种由流感感染引起的症状的方法。疫苗包含：(a) 酵母媒介；和 (b) 由该酵母媒介表达或提供的异源流感融合蛋白。如上所述，本发明包括数种不同流感融合蛋白，用作本发明疫苗中的抗原。这些融合蛋白设计成稳定异源蛋白在酵母媒介中的表达、防止所表达异源蛋白质的翻译后修饰、和 / 或在有些实施方案中可以引起融合蛋白在酵母媒介的表面上表达。融合蛋白还提供宽的细胞介导的免疫应答，和在有些实施方案中的体液免疫应答，而且优选表达或提供超过一种不同流感抗原，和 / 或联合表达或提供不同流感抗原的其它酵母媒介。优选的是，抗原组合包括至少一种内部流感抗原和至少一种外部流感抗原。这些融合蛋白最典型的是作为重组蛋白由酵母媒介（例如由完整酵母或酵母原生质球，其可以任选进一步加工成酵母胞质体、酵母空细胞、或酵母膜提取物或其级分）表达或提供，尽管在本发明的一个实施方案中，可以将一种或多种此类融合蛋白加载入酵母媒介（例如作为蛋白质）或以其它方式与本文所述酵母媒介复合或混合以形成本发明的疫苗。

[0242] 如上所述，在本发明的疫苗和组合物中所使用的融合蛋白包括至少一种流感抗原，用于给动物接种疫苗。根据需要，组合物或疫苗可以包括一种、两种、一些、数种或众多流感抗原，包括一种或多种流感抗原的一种或多种免疫原性结构域。例如，本文所述任何融合蛋白可以包括选自下组的任何一种或多种内部流感病毒蛋白的至少一部分：流感基质蛋白（M1）、流感离子通道蛋白（M2）、或流感核壳体蛋白（NP）、聚合酶 PB1（PB1）抗原、聚合酶（PB2）抗原、和聚合酶 PA（PA）抗原，和 / 或选自下组一种或多种外部流感病毒蛋白的至少一

部分：流感血凝素 (HA) 或流感神经氨酸酶 (NA)。

[0243] 依照本发明，短语“内部流感病毒蛋白”指由流感病毒（任何型或株）表达的，整个或大部分包含在病毒颗粒内，在病毒核心或基质蛋白膜中的蛋白质。此类蛋白质通常在病毒各型和株间是高度保守的，而且可以由病毒大量生成。本文所述“外部流感病毒蛋白”指由流感病毒（任何型或株）表达的，延伸穿过脂膜且大部分在病毒颗粒的表面上表达的蛋白质（例如是病毒表面蛋白质）。此类蛋白质可以受到抗体的识别，因此可用于引发针对病毒的体液免疫应答。应当注意，流感离子通道蛋白 (M2) 尽管主要包含在流感病毒内，但是具有在流感病毒的表面上表达的小的胞外结构域（在本领域称为 M2e）。因此，为了本发明，M2 蛋白质尽管一般认为是内部流感病毒蛋白，就其在由在其上表达或展示至少胞外结构域的流感病毒或由细胞表达时能够受到抗体识别而言，也可以视为外部流感病毒蛋白。

[0244] 在本发明的一个实施方案中，疫苗的流感抗原部分是作为包含两种或多种抗原的融合蛋白生成的。一方面，融合蛋白可以包括一种或多种抗原（例如流感 M1 序列和流感 HA 序列）的两种或多种免疫原性结构域或两种或多种表位。此类疫苗可以在广泛的患者中提供抗原特异性免疫。例如，可用于本发明的多结构域融合蛋白可以具有多个结构域，其中每个结构域由来自特定蛋白质的肽组成，该肽由至少 4 个氨基酸残基组成，其在蛋白质中找到的突变氨基酸的任一侧翼并包含该突变氨基酸，其中所述突变与特定疾病或疾患（例如由特定株引起的流感感染）有关。

[0245] 来自多种流感型、亚型和株的流感基因和由其编码的多聚蛋白质的核酸和氨基酸序列是本领域已知的。因此，使用本文中提供的指导和参照特定例示性流感抗原，本领域技术人员将容易的能够自任何流感株生产多种基于流感的融合蛋白和在本发明的组合物和疫苗中使用多种基于流感的融合蛋白。

[0246] 在本发明中，本发明人生成了新的重组酵母免疫治疗剂，用于预防或抑制流感病毒感染。一种酵母免疫治疗剂在可诱导型启动子的控制下以融合蛋白形式表达流感基质蛋白 (M1)。使用针对组氨酸的抗体对酵母疫苗细胞溶解物进行的免疫印迹分析显示了重组酵母该蛋白质表达。将表达 M1 的酵母疫苗注射入 BALB/c 小鼠导致诱导有力的 M1 抗原特异性辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞免疫应答，如淋巴细胞增殖和细胞毒性测定法所示。另一种酵母免疫治疗剂在胞内表达血凝素抗原 (HA) 蛋白，而另一种酵母免疫治疗剂在胞外提供血凝素抗原 (HA) 蛋白。有些免疫治疗剂提供在组成性启动子控制下的抗原。本发明所涵盖的其它酵母疫苗在下文中有详细讨论。

[0247] 在本发明的一个方面，流感抗原是内部流感病毒蛋白，基质蛋白 (M1)。在本发明的一个方面，流感抗原基本上由流感 M1 蛋白的氨基酸 2 至 252 组成。M1 是大约 27kD 的流感病毒蛋白，在流感病毒中形成基质蛋白膜（见图 1）。M1 是结构蛋白，牵涉病毒组装和核蛋白 (RNP) 自核输出至胞质。M1 是在流感病毒间高度保守的蛋白质，而且是含量丰富的病毒蛋白质，占到病毒总蛋白质的大约 47%。设想了任何 M1 蛋白或其部分用于本发明，以及任何此类 M1 蛋白的任何突变体或变体。

[0248] 实施例 1 描述了基质蛋白 (M1 或 MP) 内部流感病毒蛋白用于生成本发明的例示性疫苗或疫苗成分（即，提到成分就是说该酵母媒介与表达不同蛋白质或进一步转化以表达别的本文所述流感病毒蛋白的其它酵母媒介组合）的用途。在这个实施方案中，将酵母（例如啤酒糖酵母 W303 α ）改造成在铜可诱导型启动子 CUP1 控制下表达衍生自 A/PR/8/34 流

感病毒的流感 M1 融合蛋白。融合蛋白是具有氨基酸序列 SEQ ID NO:4 的单一多肽,其由核酸序列 SEQ ID NO:3 编码。

[0249] 在本发明的另一个方面,流感抗原是外部流感病毒蛋白,血凝素(HA)。在本发明的一个方面,流感抗原基本上由流感 HA 蛋白的氨基酸 2 至 530 组成,其包括 HA 的 N 端 ER 靶向信号序列,但是排除 HA 的 36 个 C 端残基,如此消除其 C 端膜锚和胞质尾。另一方面,流感抗原基本上由流感 HA 蛋白的氨基酸 17 至 342 组成,其排除 HA 的 16 个氨基酸的 N 端 ER 靶向信号序列和 HA 的 36 个 C 端残基,后者包含其 C 端膜锚和胞质尾。HA 是在流感病毒颗粒的表面上表达的整合膜蛋白(见图 1)。血凝素负责经靶细胞表面上糖基化受体蛋白的唾液酸残基结合宿主细胞,以及随后在病毒被通过吞噬作用而摄取后在内体中融合病毒和宿主膜。HA 包含至少四个主要抗原性位点,而且这四个区之一内仅仅一个氨基酸替代就会导致病毒逃脱免疫监督和每年在全世界传播的能力。在人类感染中找到了三种独特 HA 蛋白,称为 H1、H2 和 H3;在动物流感病毒中找到了其它 13 种,包括在禽流感病毒中找到的 H5。任何 HA 蛋白或其部分设想用于本发明,以及任何此类 HA 蛋白的任何突变体或变体。在一个实施方案中,本发明的表达 HA 蛋白的酵母媒介表达超过一种 HA 蛋白(例如 H1、H2、等),或者在疫苗中联合表达不同 HA 蛋白的酵母媒介(例如一种媒介表达 H1,一种媒介表达 H2 或另一种 HA 蛋白)。

[0250] 实施例 2 描述了血凝素(HA)外部流感病毒蛋白用于生成本发明的另一种例示性疫苗或疫苗成分的用途。在这个实施方案中,将酵母(例如啤酒糖酵母 W303 α)改造成在 TEF2 启动子控制下表达融合蛋白。包含衍生自 A/PR/8/34 流感病毒的流感 HA 抗原(H1)的融合蛋白是包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6 的单一多肽,其由本文中 SEQ ID NO:5 所示核酸序列编码。

[0251] 实施例 2 还描述了另一种血凝素(HA)外部流感病毒蛋白(在此例子中是来自禽流感株的 H5HA)用于生成本发明的另一种例示性疫苗或疫苗成分的用途。在这个实施方案中,将酵母(例如啤酒糖酵母 W303 α)改造成表达融合蛋白。包含衍生自 A/Vietnam/1203/04 流感病毒的流感 HA 抗原(H5)的融合蛋白是包含氨基酸序列 SEQ ID NO:20 的单一多肽,其由本文中 SEQ ID NO:19 所示核酸序列编码。

[0252] 上述两种融合蛋白都设计成提供酵母对 HA 融合蛋白的胞内表达。简言之,这些融合蛋白包含 Aga2 和 HA 二者的 N 端信号序列。Aga2 的信号序列使融合物靶向进入 ER 的易位,但是 HA 的信号序列起停止转运的作用。为此,融合蛋白不进入分泌途径。它变成整合膜蛋白,其 HA 部分仍然在质膜的胞质侧上。

[0253] 实施例 3 描述了血凝素(HA)外部流感病毒蛋白用于生成本发明的又一种例示性疫苗或疫苗成分的用途。在这个实施方案中,将酵母(例如啤酒糖酵母 W303 α)改造成在 TEF2 启动子控制下表达融合蛋白。此融合蛋白设计成提供酵母对衍生自 A/PR/8/34 流感病毒的、称为 HA1 的 HA(H1)抗原 N 端部分的胞外表达。此蛋白质在还表达 Aga1p 的细胞中表达时定位至酵母细胞的细胞外壁,但是还包含在胞内。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10,其由本文中 SEQ ID NO:9 所示核酸序列编码。

[0254] 在本发明的另一个方面,流感抗原是外部流感病毒蛋白,神经氨酸酶(NA),而在另一个实施方案中,考虑了 NA 的免疫原性部分。NA 是在流感病毒颗粒的表面上表达的整合膜蛋白(见图 1)。神经氨酸酶消化唾液酸(神经氨酸),其在大多数细胞中在它们的表面

上。因为唾液酸是病毒受体的一部分,所以当病毒结合至细胞时,它被内部化(内吞)。在感染后期,唾液酸会被神经氨酸酶从受感染细胞表面消除掉,使得后代病毒粒一旦离开细胞时更易于扩散开。神经氨酸酶还牵涉穿透呼吸道粘液层。在人类感染中找到了两种独特的 NA 蛋白,称为 N1 和 N2;在动物流感病毒中找到了其它 7 种。任何 NA 蛋白或其部分设想用于本发明,以及任何此类 NA 蛋白的任何突变体或变体。在一个优选的实施方案,本发明的表达 NA 蛋白的酵母媒介表达超过一种 NA 蛋白(例如 N1、N2、等),或者在疫苗中联合表达不同 NA 蛋白的酵母媒介(例如一种媒介表达 NA,一种媒介表达 NA 或另一种 NA 蛋白)。

[0255] 在本发明的又一个方面,本发明疫苗中所使用的流感抗原是内部或外部流感病毒蛋白,离子通道蛋白(M2)。在本发明的一个方面,流感抗原基本上由流感 M2 蛋白的胞外部分(也称为 M2e)组成。一方面,M2e 融合至 NP 流感病毒蛋白或其部分的 C 端。此蛋白质(M2e)可以设计成胞内(胞质)表达。在另一个实施方案中,M2e 融合至细胞壁蛋白质(例如 Aga2)以在酵母的胞外表面上表达。M2 是基质蛋白质,而且是跨越基质蛋白膜和脂双层的整合膜蛋白,而且在病毒颗粒的表面上表达(见图 1)。M2 是离子通道,其在病毒粒在内体中解外壳时容许质子进入病毒颗粒,而且它还调控病毒感染细胞中 trans-Golgi 网络的 pH。M2 是 97 个残基的同型寡聚物,有单一跨膜(TM)结构域,其残基涵盖通道的孔区。通道的生物学活性形式是同型四聚体。依照本发明,M2 蛋白在病毒外部表达的部分(即也称为 M2 的胞外结构域)在本文中可称为 M2e。已知 M2e 在 A 型流感病毒中是高度保守的。如上所述,在本发明的一个实施方案中,由酵母媒介表达 M2 蛋白主要或唯一包含 M2e 的部分。在这个实施方案中,M2 蛋白视为外部流感病毒蛋白。在其它实施方案中,在表达 M2 蛋白的基质蛋白膜部分时,M2 蛋白可视为内部流感病毒蛋白。任何 M2 蛋白质或其部分设想用于本发明,以及任何此类 M2 蛋白的任何突变体或变体。

[0256] 在本发明的另一个方面,本发明疫苗中所使用的流感抗原是内部流感病毒蛋白,核壳体蛋白(NP),也称为核蛋白。在本发明的一个方面,流感抗原基本上由流感 NP 蛋白在酵母胞质溶胶中表达的且是免疫原性的部分组成。NP 是定位在由基质蛋白膜形成的壳内的蛋白质(见图 1)。NP 的主要功能是给病毒基因组包壳以形成核糖核蛋白(RNP),供 RNA 转录、复制和包装目的,但是 NP 还在这个病毒生命周期中执行其它关键功能。NP 负责流感分为 A、B 和 C 型的分类,但是甚至在各病毒型间也是高度保守的,特别是在 A 和 B 型间。任何 NP 蛋白或其部分设想用于本发明,以及任何此类 NP 蛋白的任何突变体或变体。在一个优选的实施方案中,本发明的表达 NP 蛋白的酵母媒介表达超过一种 NP 蛋白(例如来自 A 型流感的 NP 和来自 B 型流感的 NP),或者在疫苗中联合表达不同 NP 蛋白的酵母媒介(例如一种媒介表达来自 A 型流感的 NP,一种媒介表达来自 B 型流感的 NP)。

[0257] 实施例 4 描述了血凝素(HA)外部流感病毒蛋白用于生成发明的又一种例示性疫苗或疫苗成分的用途。在这个实施方案中,将酵母(例如啤酒糖酵母)改造成在 TEF2 启动子控制下表达融合蛋白。此融合蛋白设计成提供酵母对衍生自 A/Vietnam/1203/04 流感病毒株的 HA(H5)抗原的胞外表达。此蛋白质在还表达 Aga1p 的细胞中表达时定位至酵母细胞的细胞外壁。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:14,其由本文中 SEQ ID NO:13 所示核酸序列编码。

[0258] 实施例 5 描述了数种含 HA 融合蛋白的改造,其由本发明的酵母媒介表达,且例示了用于表面表达(包括在酵母原生质球上)的各种构建物,且进一步例示了糖基化对表面

表达的影响。

[0259] 一种称为 TK75-15 的融合蛋白是本文中 SEQ ID NO:36 所示融合蛋白,其由 SEQ ID NO:35 编码,且例示了 HA 序列位于 Aga2 序列 C 端的融合蛋白的构建。此蛋白质在还表达 Aga1p 的酵母细胞中表达时(在此情况下由 CUP1 启动子驱动)定位至酵母细胞的细胞外壁,以及胞质溶胶,如图 10B 所示(左上)。

[0260] 实施例 5 还描述了称为 VK4 的融合蛋白,示意图见图 10B(右上),其改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Aga2 序列将流感 HA 蛋白(H1)定位至细胞壁。在此构建物中,蛋白质构建成 HA 序列位于 Aga2 序列 N 端。此蛋白质在还表达天然 Aga1p 的 Mat α 酵母中表达时(在该例中是其天然启动子)定位至酵母细胞的细胞外壁,而且还存在于胞内。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:26,其由本文中 SEQ ID NO:25 所示核酸序列编码。

[0261] 实施例 5 还描述了称为 VK11 的融合蛋白,其与上文 VK4 类似,只是该融合蛋白改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Aga2 序列将流感 H5HA 蛋白定位至细胞壁。在此构建物中,蛋白质还构建成 HA 序列位于 Aga2 序列 N 端。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:22,其由本文中 SEQ ID NO:21 所示核酸序列编码。

[0262] 实施例 5 还描述了称为 VK8 的融合蛋白,示意图见图 10B(左下),其改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Cwp2 序列将流感 HA(H1)蛋白定位至细胞壁。在此构建物中,蛋白质还构建成 HA 序列位于 Cwp2 序列 N 端。此蛋白质定位至酵母细胞的细胞外壁,而且还存在于胞内。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28,其由本文中 SEQ ID NO:27 所示核酸序列编码。

[0263] 实施例 5 还描述了称为 VK12 的融合蛋白,其与上文 VK8 类似,只是该融合蛋白改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Cwp2 序列将流感 H5HA 蛋白定位至细胞壁。在此构建物中,蛋白质还构建成 HA 序列位于 Cwp2 序列 N 端。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24,其由本文中 SEQ ID NO:23 所示核酸序列编码。

[0264] 实施例 5 还描述了称为 Lu002 的融合蛋白,示意图见图 10B(右下),其改造成在 TEF2 启动子驱动下使用内源 α -因子信号和前导序列以在酵母原生质球的质膜上表达具有完整跨膜结构域的流感 HA 蛋白。此蛋白质的 α -因子信号和前导序列在高尔基体中被天然切除,蛋白质定位至酵母原生质球的质膜,而且还存在于胞内。内源 α -因子信号和前导序列引导外来蛋白质进入酵母分泌途径的应用先前已有记载(例如参见美国专利号 5,413,914 或 Franzusoff et al J.Biol.Chem. 270,3154-3159(1995))。

[0265] 实施例 6 描述了数种内部流感病毒蛋白用于生成本发明的又一种例示性 Tarmogen 或 Tarmogen 成分的用途。在这个实施方案中,将酵母(例如啤酒糖酵母)改造成在 TEF2 启动子控制下表达融合蛋白。此融合蛋白设计成提供酵母对衍生自 A/PR/8/34 流感病毒的 M1 抗原和 NP 抗原及 M2e 抗原(包括衍生自 A/PR/8/34 流感病毒株和 A/Vietnam/1203/04 流感病毒株的 M2e 抗原)的胞内表达。本发明的这种基于酵母的疫苗可用于诱导针对在各流感株间保守的抗原的交叉保护性免疫。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:16,其由本文中 SEQ ID NO:15 所示核酸序列编码。

[0266] 实施例 7 描述了数种内部流感病毒蛋白用于生成本发明的又一种例示性 Tarmogen 或 Tarmogen 成分的用途。在这个实施方案中,将酵母(例如啤酒糖酵母)改造成在 TEF2 启动子控制下表达融合蛋白。此融合蛋白设计成提供衍生自 A/PR/8/34 流感病毒

的 NP 抗原和衍生自 A/PR/8/34 流感病毒的 M2e 抗原的胞内表达。本发明的这种基于酵母的疫苗可用于诱导针对在各流感株间保守的抗原的交叉保护性免疫。融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18, 其由本文中 SEQ ID NO:17 所示核酸序列编码。

[0267] 在本发明的一个实施方案中, 任何上述流感病毒抗原在本发明的酵母媒介中与至少一种其它流感病毒抗原一起表达。优选的是, 这两种内部流感抗原 (例如 M1、M2 或 NP) 与外部流感抗原 (例如 HA、NA 或 M2e) 一起表达。流感抗原可以使用相同或不同的构建物来表达。外部流感抗原可以由酵母在胞外和 / 或胞内提供。将由酵母媒介表达的优选抗原组合包括但不限于: M1 和 HA; M1 和 NA; M1、HA 和 NA; NP 和 HA; NP 和 NA; NP、HA 和 NA; M2 和 HA; M2 和 NA; M2 和 M1; M2、HA 和 NA; 及 M1、M2 和 NA。在任何这些包括 M2 的组合中, M2 可以是全长 M2 或 M2e, 或者是可以在酵母中表达或提供且是免疫原性的 M2 任何部分。类似的, 其它蛋白质可以以本文所述任何形式、部分、或变体来表达。在这些组合中, 可以表达或提供蛋白质的任何一种或多种亚型, 特别是 HA 或 NA 的任何一种或多种亚型。

[0268] 在本发明的另一个实施方案中, 表达或提供一种或多种流感抗原或此类抗原组合的任何上述酵母媒介联合表达或提供一种或多种不同抗原或抗原组合的酵母媒介以形成酵母疫苗。或者, 表达或提供一种或多种流感抗原的任何上述酵母媒介可以与表达一种或多种不同抗原或抗原组合的酵母媒介序贯施用。优选的是, 表达或提供一种或多种内部流感抗原的酵母媒介与表达或提供一种或多种外部流感抗原的酵母媒介联合或序贯施用。优选的酵母媒介组合包括但不限于, 表达或提供 M1 的酵母媒介与表达或提供 HA、NA 或其组合 (包括这些抗原的一种或多种亚型) 的酵母媒介一起或序贯施用; 表达或提供 NP 的酵母媒介与表达或提供 HA、NA 或其组合 (包括这些抗原的一种或多种亚型) 的酵母媒介一起或序贯施用; 及表达或提供 M2 的酵母媒介与表达或提供 HA、NA 或其组合 (包括这些抗原的一种或多种亚型) 的酵母媒介一起或序贯施用。在另一个实施方案中, 表达或提供 M1、NP 和 / 或 M2 中任何两种或多种的酵母媒介可以与表达或提供 HA、NA 或其组合 (包括这些抗原的一种或多种亚型) 的酵母媒介一起或序贯施用。

[0269] 分离的融合蛋白、核酸分子和细胞

[0270] 本发明的另一个实施方案包括分离的蛋白质, 其包括任何包含本文所述流感抗原的分离的融合蛋白。本发明还包括分离的核酸分子, 其编码任何此类蛋白质; 重组核酸分子, 其包含编码此类蛋白质的核酸序列; 及细胞和载体, 包括病毒载体, 其包含或转染 / 转化有此类核酸分子或重组核酸分子。

[0271] 依照本发明的优选融合蛋白包括本文所述任何融合蛋白。本发明所涵盖的例示性融合蛋白包括那些包含选自 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ IDNO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28, 和 SEQ IDNO:36 的氨基酸序列的融合蛋白, 或所述融合蛋白基本上由上述氨基酸序列组成、或由上述氨基酸序列组成。根据本文中所提供的指导, 其它融合蛋白序列对于本领域技术人员将是显而易见的, 因为各种流感病毒蛋白序列是本领域众所周知的。

[0272] 本发明还包括包含编码任何本文所述融合蛋白的核酸序列、基本上由其组成、或由其组成的任何核酸分子。

[0273] 适于用依照本发明的重组核酸分子转染的宿主细胞包括任何可以转染或转化的细胞, 包括任何动物、昆虫、细菌、真菌 (包括酵母) 细胞。在一个实施方案中, 宿主细胞是

已经转染和表达本发明融合蛋白的动物细胞。此类细胞在实施例部分中有例示,而且可用于例如评估由本发明疫苗或组合物诱导的抗原特异性 T 细胞应答。针对流感抗原的其它疫苗或组合物还可以用此类转染细胞来测试。

[0274] 提供如下实验结果是为了例示而非意图限制本发明的范围。

[0275] 实施例

[0276] 实施例 1

[0277] 如下实施例描述了 GI-8001 (在一些图中一般还称为 GI-8000) 即本发明的流感 M1 融合蛋白酵母疫苗的改造。

[0278] 将啤酒糖酵母改造成在铜可诱导型启动子 CUP1 控制下表达流感 M1 融合蛋白。该融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起(融合蛋白的氨基酸序列如在本文中 SEQ ID NO:4 所示):1) 序列 MADEAP (SEQ ID NO:1),以赋予对蛋白酶体降解的抗性 (SEQ ID NO:4 第 1-6 位);2) M1 蛋白的氨基酸 2-252 (SEQ ID NO:4 第 7-257 位);3) 三甘氨酸间隔物,用于将 M1 蛋白与组氨酸标签隔开 (SEQ ID NO:4 第 258-260 位);和 4) C 端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:4 第 261-266 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:2 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:1 所示。在这种例示性的基于酵母的疫苗中, M1 基因通过 RT-PCR 克隆自感染了流感 A/PR/8/34/H1N1 的培养细胞,而且所编码的氨基酸序列与来自该株 / 基因型的理论 M1 氨基酸序列完全匹配。

[0279] 表达流感 M1 融合蛋白的酵母 (啤酒糖酵母 W303) 的培养和诱导在 ULDM 培养基中进行。如本文所述不将该培养基的 pH 调至中性 pH 条件 (即使用常规酵母培养条件)。用 0.375mM 硫酸铜以 0.2YU/ml 诱导流感 M1 融合蛋白的表达。在指数中期收获酵母并加热杀死。通过来自铜诱导的、热灭活的 GI-8001 酵母的溶解物的 Western 印迹分析证实 M1 融合蛋白的表达 (见图 2)。使用对组氨酸标签特异性的单克隆抗体来进行蛋白质检测。

[0280] ULDM 培养基的标准配方如下:

[0281]

成分	g/L	20L	来源
YNB, 不含硫酸铵和氨基酸	1.7	34.0	Difco233520
硫酸铵	5.0	100.0	EMD AX13853
或者			
YNB, 不含氨基酸	6.7	134.0	Difco
腺嘌呤	0.02	0.4	Sigma A9795
色氨酸	0.02	0.4	JTBaker2092
组氨酸	0.02	0.4	JTBaker N327
葡萄糖单水合物	25.0	500.0	EMD1.08342.2500

[0282] 给雌性 BALB/c 小鼠注射 3 剂每周一次的 PBS, 或者 1YU 或 10YU 的 GI-8001 即表达 M1 的基于酵母的疫苗 (在图 3A 和 3B 中分别以 “1YU M1” 和 “10YU M1” 表示)。将小鼠在接受最后一剂后 16 天处死。使用表达 M1 的酵母作为靶 (IVS-M1) 或使用减毒的流感病毒作为靶 (IVS-flu) 进行体外刺激测定法以评估 CTL 应答和淋巴细胞增殖,并收集上清液用于细胞因子分析。给 P815 肿瘤细胞转染流感 M1 融合蛋白或感染流感,作为这些测定法中的靶细胞。CTL 测定法的结果如图 3 所示。结果显示了给小鼠疫苗接种 GI-8001 疫苗诱导了抗原特异性 (M1 和流感病毒) 的 CTL 应答。

[0283] 图 4 显示了来自感染了流感 A/PR/8/34 的 P815 细胞的溶解物的 Western 印迹。在

上清液中鉴定出 HA,表明 P815 细胞可以感染流感病毒和用作本文所述测定法中的靶细胞。
[0284] 图 5 和 6 显示了淋巴细胞增殖测定法的结果。在图 5 中,刺激用抗原是表达 M1 融合蛋白的酵母(MP 酵母)的溶解物。在图 6 中,刺激用抗原是杀死的流感(A/PR8)。结果显示了 GI-8001(GI-8000,表达 M1 的酵母)诱导了酵母特异性增殖应答。

[0285] 实施例 2

[0286] 如下实施例描述了本发明的两种基于酵母的疫苗的改造,其在胞内表达血凝素(HA),第一种使用 H1HA(在本文中其它地方还称为 GI-8002 或 GI-8000-I),第二种使用 H5HA(也称为 GI-8102)。

[0287] 用于胞内表达的 H1-HA

[0288] 将啤酒糖酵母改造成在转录延伸因子 2 启动子 TEF2 控制下胞内表达 HA(H1 或 HA1)融合蛋白(见图 7,底图)。包含流感 HA 抗原的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起(融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:6 所示):1)全长啤酒糖酵母 Aga2 蛋白序列(SEQ ID NO:6 第 1-87 位),包括其天然 18 个氨基酸的 ER 靶向信号序列(SEQ ID NO:6 第 1-18 位);2)流感 HA 蛋白氨基酸第 2-530 位(SEQ ID NO:6 第 88-616 位),其包括 HA 的 N 端 ER 靶向信号序列(SEQ ID NO:6 第 88-105 位)但排除 HA 的 36 个 C 端残基,如此消除其 C 端膜锚和胞质尾;3)三甘氨酸间隔物,用于将 HA 蛋白主体与组氨酸标签隔开(SEQ ID NO:6 第 617-619 位);和 4)C 端六组氨酸标签(SEQ ID NO:6 第 620-625 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:6 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:5 所示。此融合蛋白和表达它的 Tarmogen 可称为 GI-8000Aga2-HA 或 GI-8002。

[0289] 在这种例示性的基于酵母的疫苗中,HA 基因克隆自感染了流感 A/PR/8/34/H1N1 的培养细胞,而且所编码的氨基酸序列与来自该株/基因型的理论 HA 氨基酸序列不完全匹配。实际序列与理论序列的比对见表 1(见实施例 2)。

[0290] 表 1:来自 A/PR/8/34/H1N1 的理论 HA 蛋白(SEQ ID NO:7)与本文中所克隆的实际 HA 蛋白区(排除 HA 信号序列)(SEQ ID NO:8)的比对。

[0291] 理论_HA DTICIGYHANNSTDITVDITVLEKNVTVTTHSVNLLSDSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGW 60

[0292] 实际_HA DTICIGYHANNSTDITVDITVLEKNVTVTTHSVNLLSDSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGW 60

[0293] *****

[0294] 理论_HA LLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKE 120

[0295] 实际_HA LLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKE 120

[0296] *****

[0297] 理论_HA SSWPNHNTTKGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLVLWGIH 180

[0298] 实际_HA SSWPNHN-TNGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLVLWGIH 179

[0299] *****;*:*****

[0300] 理论_HA HPSNSKDQQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTI 240

[0301] 实际_HA HPSNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTI 239

[0302] *****;***:*****

[0303] 将包含 TEF2::Aga2-HA 质粒的酵母在 UDM 中培养至指数中期。使用这种培养基的培养条件不调整为中性 pH 条件。将细胞清洗和加热杀死,并从细胞中提取总蛋白质。通

过来自热灭活的表达蛋白质的酵母的溶解物的 Western 印迹分析证实了 HA 融合蛋白的表达 (图 7)。用组氨酸标签单抗 (图 7, 右) 或 HA 特异性单抗 (未显示) 探查的总蛋白质的 Western 印迹指示 Aga2-HA 蛋白在酵母中积累至高水平。

[0304] UDM 培养基的标准配方如下:

[0305]

成分	g/L	20L	来源
YNB, 不含硫酸铵和氨基酸	1.7	34.0	Difco233520
硫酸铵	5.0	100.0	EMD AX13853
或者			
YNB, 不含氨基酸	6.7	134.0	Difco
腺嘌呤	0.02	0.4	Sigma A9795
色氨酸	0.02	0.4	JTBaker2092
组氨酸	0.02	0.4	JTBaker N327
亮氨酸	0.03	0.6	JTBaker2083
葡萄糖单水合物	25.0	500.0	EMD1.08342.2500

[0306] 给 5-10 周龄的 BALB/c 雌性小鼠施用 PBS、0.5YU GI-8000Aga2-HA (GI-8002) 或 5YU GI-8000Aga2-HA (GI-8002), 或是皮下 (100 μ l) 或是鼻内 (50 μ l) 施用, 每周一次, 持续三周。将小鼠在第三剂后两周处死。收集血清供分析, 并对脾细胞进行体外刺激测定法以评估 CTL 应答 (使用 ^{51}Cr 标记的、已经用 A/PR/8/34 流感病毒感染过夜的同基因 P815 肿瘤细胞) 和淋巴细胞增殖。为了增殖测定法, 将脾细胞与 GI-8000Aga2-HA (GI-8002) 或 UV 灭活的 A/PR8 流感病毒一起培养 5 天。也收集血清供抗体分析。

[0307] 图 8 显示了 CTL 测定法的结果, 而图 9 显示了淋巴细胞增殖测定法的结果。结果显示 GI-8000Aga2-HA 诱导了流感病毒特异性 CTL 应答。整体而言, 通过皮下路径的施用诱导比鼻内施用更强烈的 CTL 应答。然而, 低剂量的鼻内施用不诱导高水平的 CTL 应答。增殖测定法显示这两种施用路径都诱导了流感病毒特异性淋巴细胞增殖, 尽管鼻内施用路径产生比皮下路径低水平的增殖应答。

[0308] 还评估了如上所述表达 HA 作为胞内抗原的 Tarmogen 作为佐剂诱导体液应答的能力。具体而言, 在第 0 天和第 21 天给予两剂抗原 (来自 A/PR/8/34 的 HA), 有或无佐剂 (佐剂是本实施例中所描述的 GI-8000-I Tarmogen) 或明矾。第二剂抗原后 3 周测量 HA 中和性抗体滴度。表 2 显示了此实验的结果。数据显示 GI-8000-I 具有充当 B 细胞应答佐剂的卓越能力。事实上, 它与不添加或添加作为佐剂的明矾时的纯化蛋白一样有效或更加有效。因此, 可以使用更低剂量的不基于酵母的疫苗, 用来在产生抗体应答方面获得相同功效 (即节省剂量)。

[0309]

表2: GI-8000作为佐剂以节省剂量

处理		HI滴度 (有响应的动物数目)	HI滴度 (几何平均值)
佐剂	抗原 (μg 来自A/PR/8/34的HA i.a.)		
GI-8000-I	--	(0/5)	0
--	1 μg	16, 8, 8, 4, 0 (4/5)	8
明矾	1 μg	16, 4, 4, 0, 0 (3/5)	6.3
GI-8000-I	1 μg	32, 32, 32, 32, 16 (5/5)	27.9

[0310] 还评估了如上所述表达 HA 作为胞内抗原的 Tarmogen 针对流感使免疫应答致敏的能力。致敏是使用足以生成 10 μg HA 的灭活 A/PR/8/34 病毒粒进行的。使用 5YU GI-8000-I。大约 1 个月后给予加强。又一个月后测量 HI (HA 中和性抑制) 滴度。在测量 HI 滴度的同一时间进行攻击。5 天后测量病毒滴度。表 3 显示了使用 GI-8000-I 来针对流感致敏时的结果。

[0311]

表3: GI-8000-I针对流感的致敏保护

致敏	加强	HI滴度 (每只动物, 加强后)	肺部病毒滴度 ($\log_{10}$ pfu/g肺)	均值病毒滴度 $\log_{10}$ pfu/g肺 (+/- S.E.)
无	无	未检测	7.14 7.41 7.18	7.22 (+/- 0.14)

[0312]

			7.06 7.32	
灭活的 A/PR/8/34 (皮下)	低剂量活的 A/PR/8/34 - 鼻内	64 16 16 0	0 0 0 5.09	1.27 (+/- 2.55)
GI-8000-I (HA) (4剂皮下)	低剂量活的 A/PR/8/34 - 鼻内	256 64 32 32	0 0 0 0	0

[0313] 使用这种类型的 Tarmogen, 在感染了流感的细胞中产生了针对多种抗原的 T 细胞。引发针对多种抗原的免疫应答的好处在于它容许交叉保护性应答和容许表达多种抗原的 Tarmogens 起通用疫苗的作用。通过产生有效的免疫应答, 这种类型的疫苗与用于禽流感或季节性流感的常规疫苗相比可以节省剂量 (即需要较少的剂量来发挥功效)。

[0314] H5HA 用于胞内表达

[0315] 将啤酒糖酵母改造成胞内表达 HA (H5) 融合蛋白 (在本文中也称为 GI8102)。包含流感 H5 抗原的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽, 所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起 (融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:20 所示):
1) 全长啤酒糖酵母 Aga2 蛋白序列 (SEQ ID NO:20 第 1-87 位), 包括其天然 18 个氨基酸的 ER 靶向信号序列 (SEQ ID NO:20 第 1-18 位); 2) N 端 ER 靶向信号序列, 对应于 H1HA 的残基

1-16 (SEQ ID NO:20 第 88-105 位);3) 来自禽流感株 A/Vietnam/1203/2004 的 H5HA (SEQ ID NO:20 第 106-620 位),其排除 HA 的 36 个 C 端残基,如此消除其 C 端膜锚和胞质尾;和 4) C 端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:20 第 621-626 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:20 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:19 所示。

[0316] 实施例 3

[0317] 如下实施例描述了本发明的酵母疫苗中的另一种 HA 融合蛋白的改造,其在本文中称为 HA1 (在本文中一般可称为 GI-8000-S)。

[0318] 此融合蛋白设计成提供酵母对 HA 融合蛋白的胞外表达,以及胞内表达。包含流感 HA 抗原 N 端部分 (HA1) 的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起 (融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:10 所示):1) 全长啤酒糖酵母 Aga2 蛋白序列 (SEQ ID NO:10 第 1-89 位),包括其天然 18 个氨基酸的 ER 靶向信号序列 (SEQ ID NO:10 第 1-18 位);2) 流感 HA 蛋白的氨基酸 17-342 (SEQ ID NO:10 第 90-415 位),其排除 HA 的 16 个氨基酸的 N 端 ER 靶向信号序列和排除 HA 的 36 个 C 端残基,后者包含其 C 端膜锚和胞质尾;3) 三甘氨酸间隔物 (SEQ ID NO:10 第 416-418 位),用于将 HA1 蛋白主体与组氨酸标签隔开;和 4) C 端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:10 第 419-424 位)。此蛋白质在还表达 Aga1p 的细胞中表达时定位至酵母细胞的细胞外壁 (见图 10A,其是使用这种技术进行胞外表达的示意性描述)。该蛋白质还在胞内表达。编码融合蛋白 SEQ ID NO:10 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:9 所示。

[0319] 在这种例示性的基于酵母的疫苗中,HA 基因克隆自流感 A/PR/8/34/H1N1 鸡卵原种,而且所编码的氨基酸序列与来自该株/基因型的理论 HA 氨基酸序列不完全匹配。实际序列与理论序列的比对见表 4。这两种序列之间有 10 处氨基酸错配。

[0320] 表 4:理论 HA1 区 (SEQ ID NO:11) 与本文中所克隆的实际 HA1 序列 (SEQ ID NO:12) 的比对。

[0321]	理论_HA	-----DTICIGYHANNSTDITVDITVLEKNVTVTHSVN	31
[0322]	实际_HA1	SVTFVSNCGSHPTTSKGSPI NTQYVFTSDTICIGYHANNSTDITVDITVLEKNVTATHSVN	120
[0323]		*****.*****	
[0324]	理论_HA	LLED SHNGKLCRLKG IAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICY	91
[0325]	实际_HA1	LLED SHNGKLCRLKG IAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICY	180
[0326]		*****	
[0327]	理论_HA	PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWP NHNTTKGVTAACSHAGKSSFYRNLLWL	151
[0328]	实际_HA1	PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWP NHN-TNGVTAACSHAGKSSFYRNLLWL	239
[0329]		*****;*:*****	
[0330]	理论_HA	TEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSK DQQNIYQENAYVSVVTSN YNRRFT	211
[0331]	实际_HA1	TEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSN YNRRFT	299
[0332]		*****;***:*****	
[0333]	理论_HA	PEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTI IFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGI ITSNAS	271
[0334]	实际_HA1	PEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTI IFEANGNLIAPMSAFALSRGFGSGI ITSNAS	359
[0335]		*****	
[0336]	理论_HA	MHECNTKCQTPLGAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQSRGLFG	331

[0337] 实际_HA1 MHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGERPKYVRSACLRLMTGLRNIPS1QSRG—— 416

[0338] ***** ,*****.

[0339] 通过来自铜诱导的、热灭活的酵母的溶解物的 Western 印迹分析证实了融合蛋白的表达（见图 17）。在 UDM 中在常规（非中性 pH）条件下进行铜诱导以诱导 Aga1 合成后，用 50mM DTT 自活细胞的细胞表面上的 Aga1 释放组成性表达的 Aga2-HA1，并将 DTT 洗提液用糖苷酶 PNGase F 或 ENDO-h 处理 1 小时。通过 Western 印迹对反应物分析 Aga-HA1 含量（图 17）。胞内和细胞表面 HA1 表达二者都观察到了。

[0340] 实施例 4

[0341] 如下实施例描述了本发明的另一种 HA 融合蛋白酵母疫苗的改造。

[0342] 另一种酵母媒介改造成表达来自禽流感株 A/Vietnam/1203/2004 (H5-N1) 的血凝素蛋白 (HA) H5，作为酵母细胞表面（胞外）蛋白质，也称为 TK88 (Aga2-H5HA)，其还定位于胞内。再次见图 10A 的顶图，例示了用于表面表达的构建。包含流感 HA 抗原 (H5) 的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽，所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起（融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:14 所示）：1) 全长啤酒糖酵母 Aga2 蛋白序列 (SEQ ID NO:14 氨基酸 1-87)，包括其天然 18 个氨基酸的 ER 靶向信号序列；2) 流感 H5HA 蛋白的氨基酸 2-530 (SEQ ID NO:14 第 88-616 位)，其缺少 HA 的 N 端 ER 靶向信号序列，而且还排除 HA 的 36 个 C 端残基，如此消除其 C 端膜锚和胞质尾；3) 三甘氨酸间隔物，用于将 HA 蛋白主体与组氨酸标签隔开 (SEQ ID NO:14 第 617-619 位)；和 4) C 端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:14 第 620-625 位)。此蛋白质在还表达 Aga1P 的细胞中表达时定位至酵母细胞的细胞外壁，以及胞质溶胶和 ER。编码融合蛋白 SEQ ID NO:14 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:13 所示。

[0343] 此 Tarmogen 已经使用本文所述中性 pH 条件和在正常酵母培养条件下进行了表达。在使用中性 pH 条件表达时，在细胞壁（表面）上检测到融合蛋白。中性 pH 条件提高蛋白质表达效率，并因为 pH 对细胞壁的影响而改善检测蛋白质在表面上的存在情况的能力，和改善 HA 特异性抗体检测表面表达的蛋白质的能力。

[0344] 实施例 5

[0345] 如下实施例描述了别的构建物的生成，其中抗原已经改造成靶向酵母表面（胞外构建物）。

[0346] 别的 Tarmogens 已改造成表达来自流感的血凝素蛋白 (HA)，作为酵母细胞表面（胞外）蛋白质。该蛋白质还在酵母中胞内表达。再次见图 10A 的顶图，例示了用于表面表达的构建。

[0347] 图 10B 示意性的例示了数种用于表面表达抗原的特定构建物，并显示了各种酵母蛋白质如何可用作间隔臂。尽管这些构建物用于表达流感 HA，但是可以使用这些方法和构建物来表达任何蛋白质。

[0348] Aga2-HA H1 融合蛋白（表面）

[0349] 将图 10B（左上）示意性所示的、称为 TK75-15 的融合蛋白改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Aga2 序列在细胞壁上表达流感 HA 蛋白。在此构建物中，该蛋白质构建成 HA 序列位于 Aga2 序列 C 端。此蛋白质在还表达 Aga1 p 的细胞中表达时（在本案中由 CUP1 启动子驱动）定位至酵母细胞的细胞外壁，以及胞质溶胶，如图 10B（左上）所示。该包含流

感 HA 抗原的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起(融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:36 所示):1) 全长啤酒糖酵母 Aga2 蛋白序列(SEQ ID NO:36 第 1-87 位),包括其天然 18 个氨基酸的 ER 靶向信号序列(SEQ ID NO:36 第 1-18 位);2) 将 Aga2 与 HA 主体隔开的间隔物(第 88 和 89 位);3) 流感 HA 蛋白(SEQ ID NO:36 第 90-600 位),其缺少其信号序列和 36 个 C 端残基,如此消除其 C 端膜锚和胞质尾;4) 三甘氨酸间隔物,用于将 HA 蛋白主体与组氨酸标签隔开(SEQ ID NO:36 第 601-603 位);和 5) C 端六组氨酸标签(SEQ ID NO:36 第 604-609 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:36 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:35 所示。此融合蛋白和表达它的 Tarmogen 可称为 75-15。

[0350] HA H1-Aga2 融合蛋白(表面)

[0351] 将图 10B(右上)示意性所示的、称为 VK4 的融合蛋白改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Aga2 序列在细胞壁上表达流感 HA 蛋白。在此构建物中,该蛋白质构建成 HA 序列位于 Aga2 序列 N 端。此蛋白质在还表达天然 Aga1p 的酵母中表达时(在本案中是其天然启动子)定位至酵母细胞的细胞外壁,而且还存在于胞内。该包含流感 HA 抗原(H1)的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起(融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:26 所示):1) Aga2ER 靶向信号序列(SEQ ID NO:26 氨基酸 1-19);2) 来自 A/PR/8/34 的 H1HA,其缺少其信号序列和 C 端跨膜结构域(SEQ ID NO:26 第 20-533 位);3) 用于将 HA 蛋白主体与组氨酸标签隔开的间隔物(SEQ ID NO:26 第 534-535 位);4) 六组氨酸标签(SEQ ID NO:26 第 536-541 位);5) 肠激酶切割位点(SEQ ID NO:26 第 542-548 位);6) 缺少其信号序列的 Aga2(SEQ ID NO:26 第 549-614 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:26 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:25 所示。

[0352] HA H5-Aga2 融合蛋白(表面)

[0353] 将称为 VK11 的融合蛋白(与上文所述 VK4 类似,只是它包括来自禽流感(A/Vietnam/1203/04)的 H5HA 蛋白)改造成使用 Aga2 序列在细胞壁上表达流感 HA H5 蛋白。在此构建物中,该蛋白质构建成 HA 序列位于 Aga2 序列 N 端。此蛋白质在酵母中表达时定位至酵母细胞的细胞外壁,而且还存在于胞内。该包含流感 HA 抗原(H5)的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起(融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:22 所示):1) Aga2ER 靶向信号序列(SEQ ID NO:22 氨基酸 1-19);2) 来自 A/Vietnam/1203/04 的 H5HA,其缺少其信号序列和 C 端跨膜结构域(SEQ ID NO:22 第 20-536 位);3) 六组氨酸标签(SEQ ID NO:22 第 537-542 位);4) 肠激酶切割位点(SEQ ID NO:22 第 543-548 位);5) 缺少其信号序列的 Aga2(SEQ ID NO:22 第 549-616 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:22 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:21 所示。

[0354] HA H1-Cwp2 融合蛋白(表面)

[0355] 将图 10B(左下)示意性所示的、称为 VK8 的融合蛋白改造成在 TEF2 启动子驱动下使用 Cwp2 序列在细胞壁上表达流感 HA 蛋白。此蛋白质定位至酵母细胞的细胞外壁,而且还存在于胞内。该包含流感 HA 抗原(H1)的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起(融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:28 所示):1) Suc2 转化酶信号序列(SEQ ID NO:28 氨基酸 1-21);2) 来自 A/PR/8/34 的 H1HA,其缺少其信号序列和 C 端跨膜结构域(SEQ ID NO:28 第 22-535 位);3)

将 HA 蛋白主体与组氨酸标签隔开的间隔物 (SEQ ID NO:28 第 536-537 位);4) 六组氨酸标签 (SEQ ID NO:28 第 538-543 位);5) 肠激酶切割位点 (SEQ ID NO:28 第 544-549 位);6) 缺少其信号序列的 Cwp2 (SEQ ID NO:28 第 550-617 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:28 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:27 所示。

[0356] HA H5-Cwp2 融合蛋白 (表面)

[0357] 将称为 VK12 的融合蛋白 (与上文所述 VK8 类似,只是它包括来自禽流感 (A/Vietnam/1203/04) 的 H5HA 蛋白) 改造成使用 Cwp2 序列在细胞壁上表达流感 HA H5 蛋白。此蛋白质定位至酵母细胞的细胞外壁,而且还存在于胞内。该包含流感 HA 抗原 (H5) 的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽,所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起 (融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:24 所示):1) Suc2 转化酶信号序列 (SEQ ID NO:24 氨基酸 1-21);2) 来自 A/Vietnam/1203/04 的 H5HA,其缺少其信号序列和 C 端跨膜结构域 (SEQ ID NO:24 第 22-536 位);3) 用于将 HA 蛋白主体与组氨酸标签隔开的间隔物 (SEQ ID NO:24 第 537-538 位);4) 六组氨酸标签 (SEQ ID NO:24 第 539-544 位);5) 肠激酶切割位点 (SEQ ID NO:24 第 545-550 位);6) 缺少其信号序列的 Cwp2 (SEQ ID NO:24 第 551-618 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:24 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:23 所示。

[0358] HA-融合蛋白用于原生质球表达 (表面)

[0359] 将图 10B (右下) 示意性所示的、称为 Lu002 的融合蛋白改造成在 TEF2 启动子驱动下在酵母原生质球质膜上表达具有完整跨膜结构域的流感 HA 蛋白。此蛋白质定位至酵母原生质球质膜,而且还存在于胞内。

[0360] 图 11 描绘了另一种表达上文称为 VK8 的融合蛋白的 Tarmogen,其经细胞壁蛋白 2 (cwp2) 在酵母的表面上表达流感 HA 蛋白。来自流式细胞术分析的酵母表面 HA 表达的柱状图示于右下角。该柱状图指出与单独的酵母媒介 (GI-1001 或 YVEC) 相比,此特定构建物在其细胞表面上很好的表达 HA。

[0361] 图 12A-12G 显示了柱状图,其中各种方法 (上文所描述的和图 10B 所例示的) 已经用于在酵母媒介的表面上表达流感 HA 蛋白。这些实验都是在正常酵母培养条件下进行的 (即没有使用中性 pH 条件)。图 12A-12C 例示了表达 VK4 和 TK75-15 的 Tarmogens 的表达,其使用 Aga2 间隔臂或接头,如上所述以两种取向融合。图 12A 显示了对照 (未转化) 酵母 (YEX) 的表达。图 12B 显示了 VK4 的表达,而且图 12C 显示了 TK75-15 的表达。图 12D-12G 显示了用于 HA 表面表达的其它可能构造。图 12D 再次是酵母对照 (YEX)。图 12E 和 12F 显示了表达 VK8 的 Tarmogen,其使用 Cwp2 作为间隔臂来表达 HA。这些图还例示了调控酵母糖基化对蛋白质表达的影响。表达脱糖基化 VK8 的 Tarmogen (图 12F) 具有与表达糖基化 VK8 的 Tarmogen (图 12E) 相比改良的 HA 表面表达。最后,图 12G 显示了表达 Lu002 的 Tarmogen 对 HA 的表达,其是在质膜上表达 HA 的原生质球。

[0362] 这些结果证明了多种构建物可用于成功在本发明酵母媒介的表面上 (胞外) 表达抗原。

[0363] 实施例 6

[0364] 如下实施例描述了本发明的另一种流感融合蛋白酵母疫苗的改造,其中由酵母媒介在胞内表达流感病毒蛋白组合。

[0365] 将 Tarmogen 改造成在 TEF2 启动子控制下表达基质蛋白 (M1)、核壳体蛋白 (NP)

和离子通道蛋白胞外序列 (M2e) 作为胞内融合蛋白 (见图 13A, 其中此融合蛋白的表达与同一质粒上的第二个 HA 构建物的表达一起例示)。M1 和 NP (N1) 序列衍生自 A/PR/8/34 流感株。4xM2e 代表两个拷贝的来自 A/PR/8/34 流感株的 M2e 序列和两个拷贝的来自 A/VietNam/1203/2004 流感株的 M2e 序列。该包含 M1-N1-4xM2e 蛋白的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽, 所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起 (融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:16 所示): 1) 序列 MADEAP (SEQ ID NO:1), 以赋予对蛋白酶体降解的抗性 (SEQ ID NO:16 第 1-6 位); 2) 流感 A/PR/8/34M1 蛋白 (SEQ ID NO:16 第 7-260 位); 3) 用于将 M1 蛋白与 NP 蛋白隔开的间隔物 (SEQ ID NO:16 第 261-262 位); 4) 流感 A/PR/8/34NP 蛋白 (SEQ ID NO:16 第 263-760 位); 5) 用于将 NP 蛋白与 M2e 蛋白隔开的间隔物 (SEQ ID NO:16 第 761-762 位); 6) 来自流感 A/PR/8/34M2 蛋白的第一个 M2e (胞外) 蛋白 (SEQ ID NO:16 第 763-787 位); 7) 来自流感 A/VietNam/1203/2004M2 蛋白的第二个 M2e (胞外) 蛋白 (SEQ ID NO:16 第 788-811 位); 8) 用于将第二个 M2e 蛋白与第三个 M2e 蛋白隔开的间隔物 (SEQ ID NO:16 第 812-813 位); 9) 来自流感 A/PR/8/34M2 蛋白的第三个 M2e (胞外) 蛋白 (SEQ ID NO:16 第 814-838 位); 10) 由来自流感 A/VietNam/1203/2004M2 蛋白的 (胞外) 蛋白组成的第四个 M2e 蛋白 (SEQ ID NO:16 第 839-862 位); 和 11) C 端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:16 第 864-869 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:16 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:15 所示。

[0366] 见图 13A 和图 13B, 显示了使用联合别的构建物的表达 M1-NP-4xM2e 融合蛋白 (SEQ ID NO:16) 的 Tarmogen 的示意图。具体而言, SEQ ID NO:16 所示融合蛋白也在还包含在 CUP1 启动子控制下编码 HA 蛋白的第二个构建物的单一质粒中生成。此质粒的表达导致 M1-NP-4xM2e 融合蛋白和 HA 蛋白质的胞内表达。HA 的表达也可以经第二个独立构建物的使用来实现。待生成的别的 Tarmogen 包括使用图 13B 中所示构建物 (对应于上文所述 VK8 构建物), 其引起 HA 蛋白的胞外 (表面) 表达。此融合蛋白可以在与上文所述 M1-N1-4xM2e 融合蛋白相同的 Tarmogen 中表达, 或是单独的或是联合上文所述内部表达的 HA 构建物。还可以在疫苗中与上文所述表达 M1-N1-4xM2e 融合蛋白的 Tarmogen 一起提供分开的表达 VK8 (表面 HA) 融合蛋白的 Tarmogen, 或是单独的或是联合内部表达的 HA。为胞内和胞外表达分开提供融合蛋白的一项优点是确保有足够抗原可用于 B 细胞应答和被抗原呈递细胞诸如树突细胞摄取以引发细胞介导的免疫应答二者。

[0367] 实施例 7

[0368] 如下实施例描述了本发明的另一种流感融合蛋白酵母疫苗的改造, 其中由酵母媒介胞内表达流感病毒蛋白组合。

[0369] 已经生成了表达 NP-2xM2e 融合蛋白的 Tarmogen, 而且已经生成了表达 NP-4xM2e 融合蛋白的 Tarmogen。

[0370] NP-4xM2e 融合蛋白是以与实施例 6 中所述、SEQ ID NO:16 所示 M1-N1-4xM2e 融合蛋白相同的方式构建的, 只是不包括该构建物的 M1 部分。

[0371] 在 NP-2xM2e 融合蛋白中, NP (N1) 和 2 个拷贝的 M2e 序列都来自 A/PR/8/34 流感株。该包含 N1-2xM2e 蛋白的融合蛋白是具有如下序列元件的单一多肽, 所述序列元件从 N 端至 C 端以符合读码框的方式融合在一起 (融合蛋白的氨基酸序列如本文中 SEQ ID NO:18 所示): 1) 序列 MADEAP (SEQ ID NO:1), 以赋予对蛋白酶体降解的抗性 (SEQ ID NO:18 第 1-6

位);2) 流感 A/PR/8/34NP 蛋白 (SEQ ID NO:18 第 7-503 位);3) 用于将 NP 蛋白与 M2e 蛋白隔开的间隔物 (SEQ ID NO:18 第 504-505 位);4) 来自流感 A/PR/8/34M2 蛋白的第一个 M2e(胞外)蛋白 (SEQ ID NO:18 第 506-530 位);5) 用于将第一个 M2e 蛋白与第二个 M2e 蛋白隔开的间隔物 (SEQ ID NO:18 第 531 位);6) 来自流感 A/PR/8/34M2 蛋白的第二个 M2e(胞外)蛋白 (SEQ ID NO:18 第 532-555 位);和 7) 三甘氨酸间隔物,紧接着是 C 端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:18 第 556-564 位)。编码融合蛋白 SEQ ID NO:18 的核酸序列如本文中 SEQ ID NO:17 所示。

[0372] 此融合蛋白(其在酵母媒介中表达以生成 Tarmogen)在胞内表达,而且可以与其它构建物的表达(例如 HA- 表面或 HA- 内部表达策略,如上文实施例 6 所述)联合。

[0373] 实施例 8

[0374] 如下实施例证明了免疫接种表达流感 HA 作为胞外蛋白的 Tarmogen 使体液免疫应答致敏。

[0375] 在此实施例中,给小鼠皮下施用单剂 GI-8000-S,其在酵母细胞表面上表达 HA 作为与 Cwp2 的融合蛋白(见图 10B, VK8),或者给小鼠静脉内感染低剂量的活的流感病毒。免疫接种后 1 周,测量 HI 滴度。另一组小鼠接受 5YU 的 GI-8000-S。免疫接种后 1 周,测量 HI 滴度。此研究的结果示于表 5。数据显示了在不添加可溶性纯化的蛋白质或者不添加不基于酵母的疫苗的情况下,单剂 GI-8000-S 疫苗能够引发 HA 中和性抗体应答。

[0376]

表5: GI-8000-S引发HA抗体	
免疫接种	每只动物的HI滴度(有响应的动物数目)
用低剂量的活的流感病毒感染(鼻内)	8, 8, 4, 0, 0 (3/5)
GI-8000-S(单剂,皮下)	16, 8, 8, 0, 0 (3/5)

[0377] 实施例 9

[0378] 使用表达各种感兴趣抗原的 Tarmogen 来使抗体生成致敏。如下所述,本文中所公开的发明提供了诱导体液免疫应答的方法,其中包括抗体应答。

[0379] 一项研究用 GI-2001(HIVAX-1)进行,其生成 HIV-1gp160 包膜蛋白作为整合酵母细胞膜蛋白(Franzusoff et al J.Biol.Chem. 270,3154-3159(1995))。对来自小鼠的血清进行完整酵母或原生质球的全溶解物的 Western 印迹分析,所述小鼠注射 2×10^7 (2YU) YVEC 或 HIVAX-1 株,每周一次,持续三周,作为活的、完整酵母细胞或作为原生质球施用。Western 印迹显示了小鼠生成了针对多种酵母衍生蛋白质的抗体,而且所得抗体样式取决于小鼠是注射完整酵母还是原生质球。来自用 HIVAX-1 原生质球而非完整 HIVAX-1 酵母或 YVEC 酵母或原生质球免疫的小鼠的血清表现出包含对 gp160 特异性的抗体。不限于理论,此发现有可能是由于 gp160 在 HIVAX-1 中作为整合膜蛋白的表达使得它不会在完整酵母的表面上暴露于 B 细胞,而是在原生质球的外部表面上暴露。

[0380] 与使用 HIVAX-1 得到的结果相反,来自接种 OVAX(生成鸡卵清蛋白的 Tarmogen)的小鼠的血清展现出抗 OVA 抗体的滴度。此结果似乎是由于以下事实,即鸡卵清蛋白主要在 OVAX 酵母株的周质空间中分泌且有些可溶性蛋白自完整酵母穿过细胞壁释放。如此,异源抗原在重组的基于酵母的疫苗内的定位表现出决定是否生成抗体。

[0381] 为了进一步调查 OVAX 酵母诱导抗 OVA 抗体的能力,给 BALB/c 小鼠每月或每两个月一次接种下表所示抗原。第二次疫苗接种后一个月,给小鼠接种可溶性鸡卵清蛋白(不

添加佐剂)。模拟接种 PBS 的小鼠在第 56 天用可溶性 OVA 单次攻击后不发生抗 OVA 抗体应答。相反,两次接种 2×10^7 (2YU) OVAX 酵母的小鼠在用可溶性 OVA (不添加佐剂) 加强后发生高滴度的抗 OVA 抗体应答。此研究显示了用 Tarmogen 实现了抗原节省效应,即在如下小鼠中观察到高滴度的抗 OVA 抗体:在连续两次免疫接种 OVAX、然后用可溶性 OVA (不基于酵母的疫苗的例子) 加强的小鼠中,或者在共施用 OVAX 和 OVA-明矾、然后用可溶性 OVA 加强的小鼠中,尤其是在单剂 OVAX 加 OVA-明矾后。图 14A 和 14B 还例示了类似实验的结果。

[0382] 表 6 :OVAX 使抗体应答致敏

[0383]

疫苗接种			血清抗OVA抗体测量			
第0天	第28天	第56天	第0天	第28天	第56天	第65天
PBS	PBS	可溶性OVA	<1:50	1:50	<1:50	1:50
OVA-明矾	OVA-明矾	可溶性OVA	<1:50	1:40000	1:93000	1:220000
OVAX	OVAX	可溶性OVA	1:50	1:4600	1:11000	1:56000
OVAX + OVA-AI	OVAX + OVA-AI	可溶性OVA	<1:50	1:86000	1:128000	1:274000

[0384] 见图 14A 和 14B,显示了三个所用方案的 T 细胞致敏 (图 14B) 和抗体生成 (图 14A) 的结果。在图 14A 中,方案 A (对照),其中只施用 PBS,显示了在使用 PBS 加强后没有检测到卵清蛋白特异性抗体滴度。在方案 B 中,在第 0 和 28 天施用 PBS 以进行致敏,在第 56 天使用可溶性卵清蛋白蛋白 (ova) 进行加强,到第 65 天没有检测到卵清蛋白特异性抗体滴度。在方案 C 中,使用表达卵清蛋白 (OVAX) 的酵母媒介进行致敏,使用可溶性卵清蛋白进行加强,观察到快速的高抗体滴度生成。图 14B 显示了 T 细胞活化测定法的结果,其中使用各种量的可溶性卵清蛋白在体外再刺激自通过上文所述三种方案之一免疫接种的小鼠收获的 T 细胞。方案 C 在诱导细胞介导的免疫应答方面是有效的。

[0385] 实施例 10

[0386] 如下实施例证明了生成 Gag 的 Tarmogen 使抗原特异性辅助 T 细胞致敏。

[0387] 如下实施例的目的是确认 GI-2010 (生成 HIV-1Gag 蛋白作为胞质蛋白质的 Tarmogen) 使抗原特异性辅助 T 细胞致敏以生成抗体的能力。给各组 5 只 BALB/c 小鼠注射盐水、2YU 的 YVEC 或 2YU 的 GI-2010 (皮下,第 0、7 和 21 天) 或者 1×10^7 pfuMVA-对照或 1×10^7 MVA-UGD (编码 HIV-1Gag 的重组改良痘苗安卡拉 (Ankara) 病毒;腹膜内,第 0 和 21 天)。随后在第 28 天给免疫接种盐水或酵母的小鼠注射溶于盐水的 $5 \mu\text{g}$ 重组 p24Gag 蛋白 (不含佐剂)。通过 ELISA 对整个研究过程中分离的小鼠血清样品测定抗 p24Gag 抗体滴度。图 15 所示结果显示了免疫接种 GI-2010 的小鼠不生成可检测的 p24Gag 特异性抗体,除非它们用可溶性 Gag 蛋白进行了加强。由于注射盐水或 YVEC 的小鼠没有生成抗体,所以此数据指示 GI-2010 使接种疫苗的小鼠中的辅助 T 细胞致敏,以加强由可溶性 Gag 蛋白 (没有佐剂) 引发的 B 细胞应答。

[0388] 此实施例显示了 Tarmogen 可诱导辅助 T 细胞以生成抗体,而且抗原在酵母内的定位在所生成的抗体的量中发挥重要作用。例如,研究指示表达 HBsAg 作为酵母细胞表面蛋白的酵母诱导抗 HBsAg 抗体。参见例如 M. P. Schreuder et al., Vaccine, 14(5): 383-8 (1996)。

[0389] 实施例 11

[0390] 如下实施例证明了本发明的基于酵母的疫苗在与不基于酵母的抗原制备物混合

时具有佐剂效应。

[0391] 在此实验中,使用 GI-8002(生成 A/PR/8/34HA 作为胞质蛋白质的 Tarmogen)(见实施例 2)。简言之,在第 1 和 22 天给 BALB/c 小鼠(每组 5 只)皮下免疫单独的 5YU(5×10^7) GI-8002 酵母细胞、单独的 1ug 或 10ug BPL- 灭活的流感病毒(A/PR/8/34)、或 5YU GI-8002 加指定量的 BPL- 灭活的流感病毒。第二剂后 4 周收集血清,并进行 HI 测定法以确定中和性抗体的存在。此实验的结果显示了酵母在与 BPL- 灭活的病毒简单混合以诱导中和性抗体时具有佐剂效应。

[0392] 表 7

[0393]

处理		HI 滴度	HI 滴度(倒数) 几何平均值	HI 滴度(倒数) 平均值
佐剂	抗原			
5 YU GI-8002	无	<4, <4, <4, <4, <4	<4	<4
无	1ug A/PR/8/34	8, 16, 4, <4, 8	8	9
5 YU GI-8002	1ug A/PR/8/34	32, 32, 16, 32, 32	27.9	28.8

[0394]

无	10 ug A/PR/8/34	8, 16, 16, 16, 8	12.1	12.8
5 YU GI-8002	10 ug A/PR/8/34	8, 128, 8, N.D., N.D.	20.2	48

[0395] *N. D. = 因眶后出血的技术问题而未测定

[0396] 将本文中所引用的所有专利、专利申请、和出版物的公开内容完整收入本文作为参考以用于所有目的。

[0397] 参考文献

[0398] 1. Kiyosawa et al., Hepatology12(1990) :671-675.

[0399] 2. Tong et al., NEJM332(1995) :1463-1466.

[0400] 3. Yano et al., Hepatology23(1996) :1334-1340.

[0401] 4. Gordon et al., Hepatology28(1998) 2 :562-567.

[0402] 5. Di Bisceglie et al., Hepatology14(1991) :969-974.

[0403] 6. Koretz et al., Ann Intern Med119(1993) :110-115.

[0404] 7. Mattson et al., Liver13(1993) :274-276.

[0405] 8. Tremolada et al., J Hepatol16(1992) :273-281.

[0406] 9. Fattovich et al., Gastroenterology112(1997) :463-472.

[0407] 10. Serfaty et al., Hepatology27(1998) :1435-1440.

[0408] 11. Armstrong et al., Hepatology31(2000) :777-82.

[0409] 12. Shiratori et al., Annals of Internal Medicine, 142(2005) :105-114.

[0410] 13. Yoshida et al., IHIT Study Group (Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy). Ann. Intern. Med131(1999) :174-81.

[0411] 14. Okanoue et al., Viral hepatitis therapy study group. J Hepatol30(1999) :653-9.

[0412] 15. Shoukry et al., Annual Rev. Microbiol58(2004) :391-424.

- [0413] 16. Stubbs et al., Nat Med7(2001) :625-629.
- [0414] 17. Lu et al., Cancer Research64(2004) :5084-5088.
- [0415] 18. Haller et al., Abstract, "A novel yeast-based immunotherapeutic product for chronic hepatitis C virus infection" AASLD Meeting, March 4-5, 2005, Chicago, IL
- [0416] 19. Mondelli et al., Journal of Hepatology31(1999) :65-70.
- [0417] 20. Day et al., Journal of Virology(2002) :12584-12595.
- [0418] 21. Lauer and Walker, New England Journal of Medicine345(2001)1 :41-52.
- [0419] 22. Grakoui et al., Science Mag. Report342(2003).
- [0420] 23. Yewdell et al., Adv. Immunol73(1999) :1-77.
- [0421] 24. Shoukry et al., The Journal of Experimental Medicine197(2003) :1645-1655.
- [0422] 25. Matzinger, Science296(2002) :301-305.
- [0423] 26. Faló et al., Nat Med1(1995) :649-53.
- [0424] 27. Kikuchi et al., Int. Immunopharmacol, 2(2002) :1503-1508.
- [0425] 28. Tada et al., Microbio. l Immunol. 46(2002) :503-512.
- [0426] 29. Pichuantes et al., "Expression of heterologous gene products in yeast. In Protein Engineering-Principles and Practice. J.L. Cleland and C. S. Craik, editors. " Wiley-Liss, New York(1996) :129-162.
- [0427] 30. Underhill, Eur. J. Immunol. 33(2003) :1767-1775.
- [0428] 31. Ozinsky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(2000) :13766-13771.
- [0429] 32. Akira et al., Nat. Immunol. 2(2001) :675-680.
- [0430] 33. Medzhitov et al., Science296(2002) :298-300.
- [0431] 34. Gantner et al., J. Exp. Med. 197(2003) :1107-1117.
- [0432] 35. Huang et al., Science. 294(2001) :870-875.
- [0433] 36. Savolainen et al., Allergy53(1998) :506-512.
- [0434] 37. Mari et al., Clin. Exp. Allergy. 33(2003) :1429-1438.
- [0435] 38. Kortekangas-Savolainen et al., Clin Exp Allergy24(1994) :836-842.
- [0436] 39. Belchi-Hernandez et al., Allergy Clin. Immunol. 97(1996) :131-134.
- [0437] 40. Dentico et al., Eur J Epidemiol. 8(1992) :650-655.
- [0438] 41. Joossens et al., Gastroenterology122(2002) :1242-7.
- [0439] 42. Sandbom et al., Inflammatory Bowel Dis. 7(2001) :192-201.
- [0440] 43. Ponton et al., Med. Mycology38(2000) :225-236.
- [0441] 44. Wheeler et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2003) :2766-2770.
- [0442] 45. Haller et al., Vaccine25(2007) :1452-1463
- [0443] 美国临时申请流水号 60/765,025, 于 2006 年 2 月 2 日提交。
- [0444] 尽管已经详细描述了本发明的各种实施方案, 对这些实施方案的更改和改动对于本领域技术人员是显而易见的。然而, 应当清楚的了解, 此类更改和改动在本发明的范围之内, 正如所述权利要求中所列的。

序列表

<110> 全球免疫股份有限公司 (Globeimmune, Inc.)

<120> 用于诱导免疫应答的基于酵母的疫苗

<130> 3923-18-PCT

<150> 60/765, 025

<151> 2006-02-02

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Pro

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Gly Gly Gly His His His His His His

1

5

<210>3

<211>801

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>3

```
atggccgacg aggcaccaag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct ctctatcatc 60
ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt tgcagggaag 120
aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct gtcacctctg 180
actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagcg aggactgcag 240
cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa catggacaaa 300
gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc caaagaaatc 360
tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata caacaggatg 420
ggggctgtga ccactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga acagattgct 480
gactcccagc atcggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaaccact aatcagacat 540
gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat ggctggatcg 600
agttagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctaggcaaat ggtgcaagcg 660
atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga tcttcttgaa 720
aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa gggtaggcggg 780
catcacca tcaccatcacta g 801
```

<210>4

<211>266

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>4

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val

1

5

10

15

Leu Ser Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg		
20	25	30
Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met		
35	40	45
Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile		
50	55	60
Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln		
65	70	75
Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn		
85	90	95
Asn Met Asp Lys Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile		
100	105	110
Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala		
115	120	125
Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr		
130	135	140
Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala		
145	150	155
Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro		
165	170	175
Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys		
180	185	190
Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met		
195	200	205
Glu Val Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile		
210	215	220
Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu		
225	230	235
Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe		
245	250	255
Lys Gly Gly Gly His His His His His His		
260	265	

<210>5

<211>1878

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>5

```

atgcagttac ttcgctgttt ttcaatatTT tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aateccctca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctatTTttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctca caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtaag gcaaacctac tggtcctgtt atgtgcactt 300
gcagctgcag atgcagacac aatatgtata ggctaccatg cgaacaattc aaccgacact 360
gttgacacag tactcgagaa gaatgtgaca gtgacacact ctgttaacct gctcgaagac 420
agccacaacg gaaaactatg tagattaaaa ggaatagccc cactacaatt ggggaaatgt 480
aacatcgccg gatggctctt ggggaatcca gaatgcgacc cactgcttcc agtgagatca 540
tggtcctaca ttgtagaaac accaaactct gagaatggaa tatgttatcc aggagatttc 600
atcgactatg aggagctgag ggagcaattg agctcagtgt catcattcga aagattcgaa 660
atatTTtcca aagaaagctc atggcccaac cacaacacaa acggagtaac ggcagcatgc 720
tcccatgagg gaaaagcag tttttacaga aatttgctat ggctgacgga gaaggagggc 780
tcatacccaa agctgaaaaa ttcttatgtg aacaaaaaag ggaaagaagt ccttgactg 840
tggggtattc atcacccgtc taacagtaag gaacaacaga atctctatca gaatgaaaat 900
gcttatgtct ctgtagtgac ttcaaattat aacaggagat ttaccccgga aatagcagaa 960
agacccaaag taagagatca agctgggagg atgaactatt actggacctt gctaaaaccc 1020
ggagacacaa taatatttga ggcaaattga aatctaatag caccaatgta tgctttcgca 1080
ctgagtagag gctttgggtc cggcatcatc acctcaaacg catcaatgca tgagtgtaac 1140
acgaagtgtc aaacaccctt gggagctata aacagcagtc tcccttacca gaatatacac 1200
ccagtcacaa taggagagcg cccaaaatac gtcaggagtg ccaaattgag gatggttaca 1260
ggactaagga acattccgtc cattcaatcc agaggctctat ttggagccat tgccggTTTT 1320
attgaagggg gatggactgg aatgatagat ggatggtatg gttatcatca tcagaatgaa 1380
cagggatcag gctatgcagc ggatcaaaaa agcacacaaa atgccattaa cgggattaca 1440
aacaaggtga aactgtttat cgagaaaatg aacattcaat tcacagctgt gggtaaagaa 1500
ttcaacaaat tagaaaaaag gatggaaaat ttaaataaaa aagttgatga tggatttctg 1560
gacatttTga catataatgc agaattgtta gttctactgg aaaatgaaag gactctggac 1620
ttccatgact caaatatgaa gaatctgtat gagaaagtaa aaagccaatt aaagaataat 1680
gccaaagaaa tcggaaatgg atgttttgag ttctaccaca agtgtgacaa tgaatgcatg 1740
gaaagtgtaa gaaatgggac ttatgattat cccaaatatt cagaagagtc aaagttgaac 1800
agggaaaagg tagatggagt gaaattggaa tcaatgggga tctatcaggg tggcgggcat 1860
caccatcacc atcactag
1878

```

<210>6

<211>625

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>6

Met	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	Phe	Ser	Ile	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Ser	Val
1				5					10					15	
Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Thr	Thr	Ile	Cys	Glu	Gln	Ile	Pro	Ser	Pro	Thr
			20					25						30	
Leu	Glu	Ser	Thr	Pro	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Leu	Ala	Asn
		35					40					45			
Gly	Lys	Ala	Met	Gln	Gly	Val	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Val	Thr	Phe
	50					55					60				
Val	Ser	Asn	Cys	Gly	Ser	His	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ser	Pro
65				70					75					80	
Ile	Asn	Thr	Gln	Tyr	Val	Phe	Thr	Ser	Lys	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Leu
			85						90					95	
Leu	Cys	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr
		100						105						110	
His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn
		115						120						125	
Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly
	130						135					140			
Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Lys	Cys
145				150						155				160	
Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Pro	Leu	Leu
			165						170					175	
Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn
		180							185					190	
Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Ile	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu
		195					200						205		
Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys
	210						215						220		
Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys
225				230						235				240	
Ser	His	Glu	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr
			245						250					255	

Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys			
260	265	270	
Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn			
275	280	285	
Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser			
290	295	300	
Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu			
305	310	315	320
Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr			
325	330	335	
Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu			
340	345	350	
Ile Ala Pro Met Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly			
355	360	365	
Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln			
370	375	380	
Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His			
385	390	395	400
Pro Val Thr Ile Gly Glu Arg Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu			
405	410	415	
Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly			
420	425	430	
Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met			
435	440	445	
Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly			
450	455	460	
Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr			
465	470	475	480
Asn Lys Val Asn Thr Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala			
485	490	495	
Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn			
500	505	510	
Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu			
515	520	525	
Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser			
530	535	540	
Asn Met Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn			
545	550	555	560
Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp			

	565		570		575
Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys					
	580		585		590
Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys					
	595		600		605
Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln Gly Gly Gly His His His His His					
	610		615		620
His					
625					

<210>7

<211>240

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>7

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

145	150	155	160
Leu Lys Asn Ser Tyr Val	Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val	Leu Val Leu	
	165	170	175
Trp Gly Ile His His Pro	Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Asn Ile Tyr		
	180	185	190
Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val	Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg		
	195	200	205
Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala	Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala		
	210	215	220
Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp	Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile		
225	230	235	240
<210>8			
<211>239			
<212>PRT			
<213>A 型流感病毒			

<400>8

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

	165		170		175
Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr Gln					
	180		185		190
Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg					
	195		200		205
Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly					
	210		215		220
Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile					
225		230		235	

<210>9

<211>750

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>9

```

atgcagttac ttcgctgttt ttcaatatTT tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa      60
ctgacaacta tatgcgagca aatccccctca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg    120
tcaacgacta ctatttttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa    180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc    240
ataaacacac agtatgtttt tactagtgc acaatatgta taggctacca tgcgaacaat    300
tcaaccgaca ctgttgacac agtactcgag aagaatgtga cagtgcacaca ctctgttaac    360
ctgctcgaag acagccacaa cggaaaacta tgtagattaa aaggaatagc cccactacaa    420
ttggggaaat gtaacatcgc cggatggctc ttggggaatc cagaatgcga cccactgctt    480
ccagtga gat catggtccta cattgtagaa acaccaaaact ctgagaatgg aatatgttat    540
ccaggagatt tcatcgacta tgaggagctg agggagcaat tgagctcagt gtcatcattc    600
gaaagattcg aaatatTTcc caaagaaagc tcatggccca accacaacac aaacggagta    660
acggcagcat gctcccatga ggggaaaagc agtttttaca gaaatttgct atggctgacg    720
gagaaggagg gctcataccc aaagctgaaa                                750

```

<210>10

<211>424

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>10

Met	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	Phe	Ser	Ile	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Ser	Val
1				5					10					15	
Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Thr	Thr	Ile	Cys	Glu	Gln	Ile	Pro	Ser	Pro	Thr
			20					25					30		
Leu	Glu	Ser	Thr	Pro	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Leu	Ala	Asn
		35					40					45			
Gly	Lys	Ala	Met	Gln	Gly	Val	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Val	Thr	Phe
	50					55					60				
Val	Ser	Asn	Cys	Gly	Ser	His	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ser	Pro
65				70					75					80	
Ile	Asn	Thr	Gln	Tyr	Val	Phe	Thr	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr
			85						90				95		
His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn
		100						105				110			
Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly
	115						120					125			
Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Lys	Cys
	130					135					140				
Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Pro	Leu	Leu
145				150					155					160	
Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn
			165						170				175		
Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Ile	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu
		180					185					190			
Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys
	195						200					205			
Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys
	210					215				220					
Ser	His	Glu	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr
225				230					235					240	
Glu	Lys	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Ser	Tyr	Val	Asn	Lys
			245					250				255			
Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Asn
		260					265					270			

Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Leu	Tyr	Gln	Asn	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val	Ser
275				280				285							
Val	Val	Thr	Ser	Asn	Tyr	Asn	Arg	Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Glu
290				295				300							
Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Ala	Gly	Arg	Met	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr
305				310				315				320			
Leu	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile	Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu
				325				330				335			
Ile	Ala	Pro	Met	Tyr	Ala	Phe	Ala	Leu	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly
340				345				350							
Ile	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Ser	Met	His	Glu	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln
355				360				365							
Thr	Pro	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro	Tyr	Gln	Asn	Ile	His
370				375				380							
Pro	Val	Thr	Ile	Gly	Glu	Arg	Pro	Lys	Tyr	Val	Arg	Ser	Ala	Lys	Leu
385				390				395				400			
Arg	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly
				405				410				415			
Gly	Gly	His	His	His	His	His	His								
420															

<210>11

<211>331

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>11

Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val
1				5					10					15	
Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu
			20					25					30		
Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala
			35				40						45		
Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Lys	Cys	Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn
			50				55						60		

Pro	Glu	Cys	Asp	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val
65					70				75					80	
Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn	Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Ile
			85					90						95	
Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu
		100					105						110		
Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn	Thr
	115					120						125			
Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys	Ser	His	Ala	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe
	130					135					140				
Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Lys
145					150					155				160	
Leu	Lys	Asn	Ser	Tyr	Val	Asn	Lys	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu
		165						170					175		
Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Asn	Ser	Lys	Asp	Gln	Gln	Asn	Ile	Tyr
	180						185						190		
Gln	Asn	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val	Ser	Val	Val	Thr	Ser	Asn	Tyr	Asn	Arg
	195						200					205			
Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Ala
	210					215					220				
Gly	Arg	Met	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile
225					230					235				240	
Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe	Ala
		245						250					255		
Leu	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Ser	Met
	260						265						270		
His	Glu	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser
	275						280					285			
Ser	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Ile	His	Pro	Val	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro
	290					295					300				
Lys	Tyr	Val	Arg	Ser	Ala	Lys	Leu	Arg	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn
305					310					315				320	
Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly					
		325						330							

<210>12

<211>356

<212>PRT

<213>A 型流感病毒

<400>12

```

Ser Val Thr Phe Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser
1           5           10           15
Lys Gly Ser Pro Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Thr Ser Asp Thr Ile
          20           25           30
Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val
          35           40           45
Leu Glu Lys Asn Val Thr Ala Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp
          50           55           60
Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln
65           70           75           80
Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys
          85           90           95
Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro
          100          105          110
Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu
          115          120          125
Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu
          130          135          140
Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr Asn Gly Val
145          150          155          160
Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu
          165          170          175
Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser
          180          185          190
Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His
          195          200          205
His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr Gln Asn Glu Asn
          210          215          220
Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro
225          230          235          240
Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn
          245          250          255
Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala
          260          265          270
Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Met Ser Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly
          275          280          285
Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn

```

290	295	300	
Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr			
305	310	315	320
Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Arg Pro Lys Tyr Val Arg			
	325	330	335
Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile			
	340	345	350
Gln Ser Arg Gly			
355			

<210>13

<211>1836

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>13

```

atgcagttac ttcgctgttt ttcaatatTT tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aatccccTca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctattttTggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggtTct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtTat cagatttgca ttggttacca tgcaaacaac 300
tcgacagagc aggttgacac aataatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgccaagac 360
atactggaaa agaaacacaa cgggaagctc tgcgatctag atggagtTaa gcctctaatt 420
ttgagagatt gtagcgtagc tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc 480
aatgtgccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc cagtcaatga cctctgttac 540
ccaggggatt tcaatgacta tgaagaattg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt 600
gagaaaaattc agatcatccc caaaagtTct tggTccagtc atgaggcctc attaggggtg 660
agctcagcat gtccatatca gggaaagtcc tcctttttca gaaatgtggT atggcttate 720
aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aggagctaca ataataccaa ccaagaagat 780
cttttggTac tgtgggggat tcaccatcct aatgatgcgg cagagcagac aaagctctat 840
caaaacccaa ccacctatat ttccgttggg acatcaacac taaaccagag attggtacca 900
agaatagcta ctagatccaa agtaaacggg caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca 960
attttaaage caaatgatgc aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa 1020
tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcaacaatta tgaaaagtga actcgagtat 1080
ggtaactgca acaccaagtg tcaaactcca atgggggcga taaactctag catgccattc 1140

```

cacaatat ac cctctcac cattggggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta 1200
 gtccttgca ctgggctcag aaatagccct caaagagaga gaagaagaaa aaagagagga 1260
 ttatttggag ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaatggt agatggttgg 1320
 tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact 1380
 caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcga tcattgacaa aatgaacact 1440
 cagtttgagg ccgttggag ggaatttaac aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac 1500
 aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc tggacttata atgctgaact tctggttctc 1560
 atggaaaatg agagaactct agactttcat gactcaaatg tcaagaacct ttacgacaag 1620
 gtccgactac agcttaggga caatgcaaag gagctgggaa atggatgttt tgagttctac 1680
 cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt gtaagaaatg ggacttatga ttatccccag 1740
 tattcagaag aagcgagact aaaaagagag gaaataagtg gagtaaaatt ggaatcaata 1800
 ggaatttacc aacatcacca tcaccatcac tgatag 1836

<210>14

<211>610

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>14

Met	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	Phe	Ser	Ile	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Ser	Val
1				5					10					15	
Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Thr	Thr	Ile	Cys	Glu	Gln	Ile	Pro	Ser	Pro	Thr
				20				25						30	
Leu	Glu	Ser	Thr	Pro	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Leu	Ala	Asn
				35				40						45	
Gly	Lys	Ala	Met	Gln	Gly	Val	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Val	Thr	Phe
				50				55						60	
Val	Ser	Asn	Cys	Gly	Ser	His	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ser	Pro
65				70				75						80	
Ile	Asn	Thr	Gln	Tyr	Val	Phe	Thr	Ser	Asp	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr
				85				90						95	
His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Gln	Val	Asp	Thr	Ile	Met	Glu	Lys	Asn
				100				105						110	
Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Glu	Lys	Lys	His	Asn	Gly
				115				120						125	

Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys		
130	135	140
Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile		
145	150	155
Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn		
165	170	175
Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His		
180	185	190
Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys		
195	200	205
Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys		
210	215	220
Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile		
225	230	235
Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr		
245	250	255
Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp		
260	265	270
Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser		
275	280	285
Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr		
290	295	300
Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr		
305	310	315
Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe		
325	330	335
Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr		
340	345	350
Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln		
355	360	365
Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His		
370	375	380
Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu		
385	390	395
Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg		
405	410	415
Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly		
420	425	430
Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu		

435	440	445
Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile		
450	455	460
Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr		
465	470	475
Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile		480
485	490	495
Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr		
500	505	510
Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp		
515	520	525
Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln		
530	535	540
Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr		
545	550	555
His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr		
565	570	575
Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile		
580	585	590
Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln His His His His		
595	600	605
His His		
610		

<210>15

<211>2610

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>15

```

atggccgacg aggcaccaag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact ctctatcatc   60
ccgtcaggcc cctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt tgcagggaag   120
aacaccgate ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct gtcacctctg   180
actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctcaccgtgc ccagtgagec aggactgcag   240
cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa catggacaaa   300

```

gcagttaaac	tgtataggaa	gctcaagagg	gagataacat	tccatggggc	caaagaaatc	360
tcactcagtt	attctgctgg	tgcacttgcc	agttgtatgg	gcctcatata	caacaggatg	420
ggggctgtga	ccactgaagt	ggcatttggc	ctggatatgtg	caacctgtga	acagattgct	480
gactcccage	atcggtctca	taggcaaattg	gtgacaacaa	ccaatccact	aatcagacat	540
gagaacagaa	tggtttttagc	cagcactaca	gctaaggcta	tggagcaaatt	ggctggatcg	600
agttagcaag	cagcagaggc	catggagggtt	gctagtcagg	ctagacaaat	ggtgcaagcg	660
atgagaacca	ttgggactca	tcttagctcc	agtgtctggc	tgaaaaatga	tcttcttgaa	720
aatttgcagg	cctatcagaa	acgaatgggg	gtgcagatgc	aacgggtcaa	gggtggcggg	780
ctcgagatgg	cgtcccaagg	caccaaacgg	tcttacgaac	agatggagac	tgatggagaa	840
cgccagaatg	ccactgaaat	cagagcatcc	gtcggaaaaa	tgattgggtg	aattggacga	900
ttctacatcc	aaatgtgcac	cgaactcaaa	ctcagtgatt	atgagggacg	gttgatccaa	960
aacagcttaa	caatagagag	aatggtgctc	tctgcttttg	acgaaaggag	aaataaatac	1020
ctggaagaac	atcccagtg	ggggaaagat	cctaagaaaa	ctggaggacc	tatatacagg	1080
agagtaaacg	gaaagtggat	gagagaactc	atcctttatg	acaaagaaga	aataaggcga	1140
atctggcgcc	aagctaataa	tggtgacgat	gcaacggctg	gtctgactca	catgatgatc	1200
tggcattcca	atttgaatga	tgcaacttat	cagaggacaa	gagctcttgt	tcgcaccgga	1260
atggatccca	ggatgtgctc	tctgatgcaa	ggttcaactc	tccctaggag	gtctggagcc	1320
gcaggtgctg	cagtcaaagg	agttggaaca	atggtgatgg	aattggtcag	gatgatcaaa	1380
cgtgggatca	atgateggaa	cttctggagg	ggtgagaatg	gacgaaaaac	aagaattgct	1440
tatgaaagaa	tgtgcaacat	tctcaaaggg	aaatttcaaa	ctgctgcaca	aaaagcaatg	1500
atggatcaag	tgagagagag	ccggaaccca	gggaatgctg	agttcgaaga	tctcactttt	1560
ctagcacggt	ctgcactcat	attgagaggg	tgggttgctc	acaagtcttg	cctgcctgcc	1620
tgtgtgtatg	gacctgccgt	agccagtggg	tacgactttg	aaagagaggg	atactctcta	1680
gtcggaatag	accctttcag	actgcttcaa	aacagccaag	tgtacagcct	aatcagacca	1740
aatgagaatc	cagcacacaa	gagtcaactg	gtgtggatgg	catgccattc	tgccgcattt	1800
gaagatctaa	gagtattaag	cttcatcaaa	gggacgaagg	tgctcccaag	agggaagctt	1860
tccactagag	gagttcaaatt	tgcttccaat	gaaaatatgg	agactatgga	atcaagtaca	1920
cttgaactga	gaagcaggta	ctggggcata	aggaccagaa	gtggaggaaa	caccaatcaa	1980
cagagggcat	ctgcgggcca	aatcagcata	caacctacgt	tctcagtaca	gagaaatctc	2040
ccttttgaca	gaacaaccgt	tatggcagca	ttcagtggga	atacagaggg	gagaacatct	2100
gacatgagga	ccgaaatcat	aaggatgatg	gaaagtgcaa	gaccagaaga	tgtgtctttc	2160
caggggcggg	gagtcttcga	gctctcggac	gaaaaggcag	cgagcccgat	cgtgccttcc	2220
tttgacatga	gtaatgaagg	atcttatttc	ttcggagaca	atgcagagga	gtacgacaat	2280
actagtatga	gcctcctgac	agaagtagag	actccgatcc	gcaacgaatg	gggtgtcgg	2340
tgcaacggat	catcggaccc	atcattattg	acggaggctg	aaacaccaac	aaggaatgag	2400
tgggagtgca	gatgttctga	cagcagtgat	ccgcccggga	tgagcctcct	gacagaagta	2460
gagactccga	tccgcaacga	atggggctgt	cgggtgcaacg	gatcatcgga	cccatcatta	2520
ttgacggagg	tcgaaacacc	aacaaggaat	gaatgggagt	gcagatgttc	tgacagcagt	2580
gatecgcate	accatcacca	tcactaatag				2610

<210>16

<211>868

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>16

```

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val
1           5           10           15
Leu Ser Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg
           20           25           30
Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met
           35           40           45
Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile
           50           55           60
Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln
65           70           75           80
Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn
           85           90           95
Asn Met Asp Lys Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile
           100          105          110
Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala
           115          120          125
Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr
           130          135          140
Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala
145          150          155          160
Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro
           165          170          175
Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys
           180          185          190
Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met
           195          200          205
Glu Val Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile
           210          215          220

```

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu			
225	230	235	240
Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe			
245	250	255	
Lys Gly Gly Gly Leu Glu Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr			
260	265	270	
Glu Gln Met Glu Thr Asp Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg			
275	280	285	
Ala Ser Val Gly Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln			
290	295	300	
Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln			
305	310	315	320
Asn Ser Leu Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg			
325	330	335	
Arg Asn Lys Tyr Leu Glu Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys			
340	345	350	
Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg			
355	360	365	
Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln			
370	375	380	
Ala Asn Asn Gly Asp Asp Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile			
385	390	395	400
Trp His Ser Asn Leu Asn Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu			
405	410	415	
Val Arg Thr Gly Met Asp Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser			
420	425	430	
Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val			
435	440	445	
Gly Thr Met Val Met Glu Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn			
450	455	460	
Asp Arg Asn Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala			
465	470	475	480
Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala			
485	490	495	
Gln Lys Ala Met Met Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn			
500	505	510	
Ala Glu Phe Glu Asp Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu			
515	520	525	
Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly			

530	535	540
Pro Ala Val Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu		
545	550	555
Val Gly Ile Asp Pro Phe Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser		560
565	570	575
Leu Ile Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp		
580	585	590
Met Ala Cys His Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe		
595	600	605
Ile Lys Gly Thr Lys Val Leu Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly		
610	615	620
Val Gln Ile Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr		
625	630	635
Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly		640
645	650	655
Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro		
660	665	670
Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Val Met		
675	680	685
Ala Ala Phe Ser Gly Asn Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr		
690	695	700
Glu Ile Ile Arg Met Met Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe		
705	710	715
Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro		720
725	730	735
Ile Val Pro Ser Phe Asp Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly		
740	745	750
Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp Asn Thr Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu		
755	760	765
Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser		
770	775	780
Ser Asp Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu		
785	790	795
Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro Pro Gly Met Ser Leu		800
805	810	815
Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys		
820	825	830
Asn Gly Ser Ser Asp Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr		
835	840	845

Arg Asn Glu Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro His His
 850 855 860
 His His His His
 865

<210>17

<211>1706

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>17

```

atggccgacg aggcaccagc gtcccaaggc accaaacggt cttacgaaca gatggagact 60
gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga 120
attggacgat tctacatcca aatgtgcacc gaactcaaac tcagtgatta tgagggacgg 180
ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga atggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga 240
aataaatacc tggaagaaca tcccagtgcg gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct 300
atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg agagaactca tcctttatga caaagaagaa 360
ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac 420
atgatgatct ggcatccaa tttgaatgat gcaacttata agaggacaag agctcttggt 480
cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg 540
tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga gttggaacaa tggatgatgga attggtcagg 600
atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca 660
agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa 720
aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc cggaaccag ggaatgctga gttcgaagat 780
ctcacttttc tagcacggtc tgcactcata ttgagagggt cggttgctca caagtcctgc 840
ctgcctgcct gtgtgtatgg acctgccgta gccagtgggt acgactttga aagagaggga 900
tactctctag tcggaataga ccttttcaga ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta 960
atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag agtcaactgg tgtggatggc atgccattct 1020
gccgcatttg aagatctaag agtattaagc ttcatcaaag ggacgaaggt gctcccaaga 1080
gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa 1140
tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtac tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac 1200
accaatcaac agagggcatc tgcgggcca atcagcatac aacctacgtt ctcagtacag 1260
agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt atggcagcat tcagtgggaa tacagagggg 1320
agaacatctg acatgaggac cgaaatcata aggatgatgg aaagtgaag accagaagat 1380
gtgtcttttc aggggcgggg agtcttcgag ctctcgagc aaaaggcagc gagcccgatc 1440

```

```

gtgccttcct ttgacatgag taatgaagga tcttatttct tcggagacaa tgcagaggag 1500
tacgacaata ctagtatgag cctcctgaca gaagtagaga ctccgatccg caacgaatgg 1560
ggctgtcggt gcaacggatc atcggacccc gggatgagcc tcctgacaga agtagagact 1620
ccgatccgca acgaatgggg ctgtcggtgc aacggatcat cggacggtgg cgggcatcac 1680
catcaccate actaatagge ggccgc 1706

```

<210>18

<211>564

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>18

```

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

```

180	185	190
Thr Met Val Met Glu Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp		
195	200	205
Arg Asn Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr		
210	215	220
Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln		
225	230	235
Lys Ala Met Met Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala		
245	250	255
Glu Phe Glu Asp Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg		
260	265	270
Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro		
275	280	285
Ala Val Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val		
290	295	300
Gly Ile Asp Pro Phe Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu		
305	310	315
Ile Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met		
325	330	335
Ala Cys His Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile		
340	345	350
Lys Gly Thr Lys Val Leu Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val		
355	360	365
Gln Ile Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu		
370	375	380
Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn		
385	390	395
Thr Asn Gln Gln Arg Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr		
405	410	415
Phe Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Val Met Ala		
420	425	430
Ala Phe Ser Gly Asn Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu		
435	440	445
Ile Ile Arg Met Met Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln		
450	455	460
Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile		
465	470	475
Val Pro Ser Phe Asp Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp		
485	490	495

Asn Ala Glu Glu Tyr Asp Asn Thr Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu Val
500 505 510
Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser
515 520 525
Asp Pro Gly Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
530 535 540
Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Gly Gly Gly His His
545 550 555 560
His His His His

<210>19

<211>1884

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>19

```

atgcagttac ttcgctgttt ttcaatatTT tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aatccccTca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctatTTttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtaag gcaaacctac tggtcctgtt atgtgcactt 300
gcagctgcag atgcagatca gatttgcatt ggttaccatg caaacaactc gacagagcag 360
gttgacacaa taatggaaaa gaacgttact gttacacatg cccaagacat actggaaaag 420
aaacacaacg ggaagctctg cgatctagat ggagtgaagc ctctaatttt gagagattgt 480
agcgtagctg gatggctcct cggaaaccca atgtgtgacg aattcatcaa tgtgccggaa 540
tggtcttaca tagtggagaa ggccaatcca gtcaatgacc tctgttaccc aggggatttc 600
aatgactatg aagaattgaa acacctattg agcagaataa accattttga gaaaattcag 660
atcateccca aaagttcttg gtccagtcac gaggcctcat taggggtgag ctcagcatgt 720
ccatatcagg gaaagtcctc ctttttcaga aatgtggtat ggcttatcaa aaagaacagt 780
acatacccaa caataaagag gagctacaat aataccaacc aagaagatct tttggtactg 840
tggggggattc accatcctaa tgatgcggca gagcagacaa agctctatca aaacccaacc 900
acctatattt ccgttgggac atcaacacta aaccagagat tggtagcaag aatagctact 960
agatccaaag taaacgggca aagtggaagg atggagtTct tctggacaat tttaaagcca 1020
aatgatgcaa tcaacttcga gagtaatgga aatttcattg ctccagaata tgcatacaaa 1080
attgtcaaga aaggggactc aacaattatg aaaagtgaac tcgagtatgg taactgcaac 1140

```

```

accaagtgtc aaactccaat gggggcgata aactctagca tgccattcca caatatacac 1200
cctctcacca ttggggaatg ccccaaatat gtgaaatcaa acagattagt ccttgcgact 1260
gggctcagaa atagccctca aagagagaga agaagaaaaa agagaggatt atttggagct 1320
atagcaggtt ttatagaggg aggatggcag ggaatggtag atggttggta tgggtaccac 1380
catagcaatg agcaggggag tgggtacgct gcagacaaag aatccactca aaaggcaata 1440
gatggagtca ccaataaggt caactcgatc attgacaaaa tgaacactca gtttgaggcc 1500
gttgaaggg aatttaacaa cttagaaagg agaatagaga atttaacaa gaagatggaa 1560
gacgggttct tagatgtctg gacttataat gctgaacttc tggttctcat ggaaaatgag 1620
agaactctag actttcatga ctcaaagtgc aagaaccttt acgacaaggt ccgactacag 1680
cttagggaca atgcaaagga gctgggaaat ggatgttttg agttctacca caagtgtgac 1740
aatgaatgca tggaaagtgt aagaaatggg acttatgatt atccccagta ttcagaagaa 1800
gcgagactaa aaagagagga aataagtgga gtaaaattgg aatcaatagg aatttaccaa 1860
catcaccatc accatcactg atag 1884

```

<210>20

<211>626

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>20

```

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1           5           10           15
Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
20           25           30
Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn
35           40           45
Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
50           55           60
Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
65           70           75           80
Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Thr Ser Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu
85           90           95
Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr
100          105          110
His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn

```

115	120	125
Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly		
130	135	140
Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys		
145	150	155
Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile		
165	170	175
Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn		
180	185	190
Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His		
195	200	205
Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys		
210	215	220
Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys		
225	230	235
Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile		
245	250	255
Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr		
260	265	270
Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp		
275	280	285
Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser		
290	295	300
Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr		
305	310	315
Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr		
325	330	335
Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe		
340	345	350
Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr		
355	360	365
Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln		
370	375	380
Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His		
385	390	395
Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu		
405	410	415
Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg		
420	425	430

Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly
 435 440 445
 Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu
 450 455 460
 Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile
 465 470 475 480
 Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr
 485 490 495
 Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile
 500 505 510
 Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr
 515 520 525
 Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp
 530 535 540
 Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln
 545 550 555 560
 Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr
 565 570 575
 His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr
 580 585 590
 Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile
 595 600 605
 Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln His His His His
 610 615 620
 His His
 625

<210>21

<211>1851

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>21

atgcagttac ttcgctgttt ttcaatat tctgttattg cttcagtttt agcacaggat 60
 cagatttgca ttggttacca tgcaaacaac tcgacagagc aggttgacac aataatggaa 120

```

aagaacgtta ctgttacaca tgcecaagac atactggaaa agaaacacaa cgggaagctc 180
tgcatctag atggagtga gctctaat ttgagagatt gtagcgtagc tggatggctc 240
ctcgaaacc caatgtgtga cgaattcatt aatgtgccgg aatggtctta catagtggag 300
aaggccaatc cagtcaatga cctctgttac ccaggggatt tcaatgacta tgaagaattg 360
aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt gagaaaattc agatcatccc caaaagttct 420
tggtccagtc atgaggcctc attaggggtg agctcagcat gtccatatca gggaaagtcc 480
tcctttttca gaaatgtggt atggcttatt aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag 540
aggagctaca ataataccaa ccaagaagat ctttttggtac tgtgggggat tcaccatcct 600
aatgatgcgg cagagcagac aaagctctat caaaacccaa ccacctatat ttccgttggg 660
acatcaacac taaaccagag attggtacca agaatagcta ctagatccaa agtaaaggg 720
caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca attttaaagc caaatgatgc aatcaacttc 780
gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac 840
tcaacaatta tgaaaagtga actcgagtat ggtaactgca acaccaagtg tcaaaactca 900
atgggggcga taaactctag catgccattc cacaatatac accctctcac cattggggaa 960
tgccccaaat atgtgaaatc aaacagatta gtccttgcca ctgggctcag aaatagccct 1020
caaagagaga gaagaagaaa aaagagagga ttatttggtac ctatagcagg ttttatagag 1080
ggaggatggc agggaaatggt agatggttgg tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg 1140
agtgggtacg ctgcggacaa agaattccact caaaaggcaa tagatggagt caccaataag 1200
gtcaactcga tcattgacaa aatgaacact cagtttgagg ccgttgggaag ggaatttaac 1260
aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc 1320
tggaacttata atgctgaact tctggttctc atggaaaatg agagaactct agactttcat 1380
gactcaaatg tcaagaacct ttacgacaag gtccgactac agcttaggga caatgcaaag 1440
gagctgggaa atggatgttt tgagttctac cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt 1500
gtaagaaatg ggacttatga ttatccccag tattcagaag aagcgagact aaaaagagag 1560
gaaataagtg gagtaaaatt ggaatcaata ggaatttacc aaactagtca ccaccaccac 1620
caccacgacg acgacgacga caaagaactg acaactatat gcgagcaaat cccctcacca 1680
actttagaat cgacgccgta ctctttgtca acgactacta ttttggccaa cgggaaggca 1740
atgcaaggag tttttgaata ttacaaatca gtaacgtttg tcagtaattg cggttctcac 1800
ccctcaacaa ctagcaaagg cagecccata aacacacagt atgttttttg a 1851

```

<210>22

<211>616

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>22

Met	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	Phe	Ser	Ile	Phe	Ser	Val	Ile	Ala	Ser	Val
1				5					10					15	
Leu	Ala	Gln	Asp	Gln	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr
			20					25					30		
Glu	Gln	Val	Asp	Thr	Ile	Met	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala
		35					40					45			
Gln	Asp	Ile	Leu	Glu	Lys	Lys	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Leu	Asp
	50					55					60				
Gly	Val	Lys	Pro	Leu	Ile	Leu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Leu
65					70				75					80	
Leu	Gly	Asn	Pro	Met	Cys	Asp	Glu	Phe	Ile	Asn	Val	Pro	Glu	Trp	Ser
				85				90					95		
Tyr	Ile	Val	Glu	Lys	Ala	Asn	Pro	Val	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly
		100						105				110			
Asp	Phe	Asn	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Asn
	115						120					125			
His	Phe	Glu	Lys	Ile	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Ser	His
	130					135						140			
Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Gln	Gly	Lys	Ser
145					150				155					160	
Ser	Phe	Phe	Arg	Asn	Val	Val	Trp	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr
			165					170					175		
Pro	Thr	Ile	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu
		180						185				190			
Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys
	195						200					205			
Leu	Tyr	Gln	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu
	210					215					220				
Asn	Gln	Arg	Leu	Val	Pro	Arg	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly
225				230				235						240	
Gln	Ser	Gly	Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp
			245					250					255		
Ala	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala
		260					265					270			
Tyr	Lys	Ile	Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu
		275					280					285			
Glu	Tyr	Gly	Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile
	290					295					300				

Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu			
305	310	315	320
Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu			
	325	330	335
Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe			
	340	345	350
Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp			
	355	360	365
Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala			
	370	375	380
Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys			
385	390	395	400
Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly			
	405	410	415
Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys			
	420	425	430
Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu			
	435	440	445
Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val			
	450	455	460
Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys			
465	470	475	480
Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu			
	485	490	495
Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser			
	500	505	510
Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu			
	515	520	525
Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Thr Ser His His His His His His Asp Asp			
	530	535	540
Asp Asp Asp Lys Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro			
545	550	555	560
Thr Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala			
	565	570	575
Asn Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr			
	580	585	590
Phe Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser			
	595	600	605
Pro Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe			

610

615

<210>23

<211>1857

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>23

```

atgcttttgc aagcttttct tttccttttg gctggttttg cagccaaaat atctgcatca 60
atggatcaga ttgcatcagg ttaccatgca aacaactcga cagagcaggt tgacacaata 120
atggaaaaga acgttactgt tacacatgcc caagacatac tggaaaagaa acacaacggg 180
aagctctgcg atctagatgg agtgaagcct ctaattttga gagattgtag cgtagctgga 240
tggtcctcgc gaaacccaat gtgtgacgaa ttcatcaatg tgccggaatg gtcttacata 300
gtggagaagg ccaatccagt caatgacctc tgttaccagc gggatttcaa tgactatgaa 360
gaattgaaac acctattgag cagaataaac cattttgaga aaattcagat catcccaaaa 420
agttcttggc ccagtcataa ggccctatta ggggtgagct cagcatgtcc atatcaggga 480
aagtcctcct ttttcagaaa tgtgggatgg cttatcaaaa agaacagtac ataccaca 540
ataaagagga gctacaataa taccaacca gaagatcttt tggtagcttg ggggattcac 600
catcctaata atgcggcaga gcagacaaag ctctatcaaa acccaaccac ctatatttcc 660
gttgggacat caacactaaa ccagagattg gtaccaagaa tagctactag atccaaagta 720
aacgggcaaa gtggaaggat ggagttcttc tggacaattt taaagccaaa tgatgcaatc 780
aacttcgaga gtaattgaaa ttcatattgt ccagaatatg catacaaaaat tgtcaagaaa 840
ggggactcaa caattatgaa aagtgaactc gagtatggta actgcaacac caagtgtcaa 900
actccaatgg gggcgataaa ctctagcatg ccattccaca atatacacc tctcaccatt 960
ggggaatgcc ccaaatatgt gaaatcaaac agattagtcc ttgcgactgg gtcagaaaat 1020
agccctcaaa gagagagaag aagaaaaaag agaggattat ttggagctat agcaggtttt 1080
atagagggag gatggcaggg aatggtagat ggttggtagt ggtaccacca tagcaatgag 1140
caggggagtg ggtacgctgc ggacaaagaa tccactcaaa aggcaataga tggagtcacc 1200
aataagggtc actcgatcat tgacaaaatg aacactcagt ttgaggccgt tggaagggaa 1260
tttaacaact tagaaaggag aatagagaat ttaaacaaga agatggaaga cgggtttcta 1320
gatgtctgga cttataatgc tgaacttctg gtctctatgg aaaatgagag aactctagac 1380
tttcatgact caaatgtcaa gaacctttac gacaaggctc gactacagct tagggacaat 1440
gcaaaggagc tgggaaatgg atgttttgag ttctaccaca agtgtgacaa tgaatgcatg 1500
gaaagtgtaa gaaatgggac ttatgattat cccagctatt cagaagaagc gagactaaaa 1560
agagaggaaa taagtggagt aaaattggaa tcaataggaa tttaccaaac tagtcaccac 1620

```

```

caccaccacc acgacgacga cgacgacaaa gccatttctc aaatcactga cgggtcaaac 1680
caagctacta ccactgctac caccgaagct accaccactg ctgccccatc ttccaccgtt 1740
gaaactgttt ctccatccag caccgaaact atctctcaac aaactgaaaa tgggtgctgct 1800
aaggccgctg tcggtatggg tgccgggtgct ctagctgctg ctgctatgtt gttataa 1857

```

<210>24

<211>618

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>24

```

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

```

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

500	505	510
Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys		
515	520	525
Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Thr Ser His His His His His His		
530	535	540
Asp Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ser Gln Ile Thr Asp Gly Gln Ile		
545	550	555
Gln Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Glu Ala Thr Thr Thr Ala Ala Pro		
565	570	575
Ser Ser Thr Val Glu Thr Val Ser Pro Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser		
580	585	590
Gln Gln Thr Glu Asn Gly Ala Ala Lys Ala Ala Val Gly Met Gly Ala		
595	600	605
Gly Ala Leu Ala Ala Ala Ala Met Leu Leu		
610	615	

<210>25

<211>1865

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>25

ctgcaggcca ccatgcagtt acttcgctgt ttttcaatat tttctgttat tgcttcagtt	60
ttagcacagg acacaatatg tataggctac catgcgaaca attcaaccga cactgttgac	120
acagtactcg agaagaatgt gacagtgaca cactctgtta acctgctcga agacagccac	180
aacggaaaac tatgtagatt aaaaggaata gcccactac aattggggaa atgtaacatc	240
gccgatggc tcttggggaa tccagaatgc gaccactgc ttccagtga atcatggtcc	300
tacattgtag aaacacaaa ctctgagaat ggaatatgtt atccaggaga tttcatcgac	360
tatgaggagc tgaggagca attgagctca gtgtcatcat tcgaaagatt cgaaatattt	420
cccaaagaaa gctcatggcc caaccacaac acaaacggag taacggcagc atgtcccat	480
gaggggaaaa gcagttttta cagaaatttg ctatggctga cggagaagga gggtcatac	540
ccaaagctga aaaattctta tgtgaacaaa aaagggaaag aagtccttgt actgtggggt	600
attcatcacc cgtctaacag taaggaacaa cagaatctct atcagaatga aaatgcttat	660
gtctctgtag tgacttcaaa ttataacagg agatttaccc cggaatagc agaaagaccc	720
aaagtaagag atcaagctgg gaggatgaac tattactgga ccttgctaaa acccgagac	780

```

acaataatat ttgaggcaaa tggaaatcta atagcaccaa tgtatgcttt cgcactgagt      840
agaggctttg ggtccggcat catcacctca aacgcatcaa tgcattgagt taacacgaag      900
tgtcaaacac ccctgggagc tataaacagc agtctccctt accagaatat acaccagtc      960
acaataggag agcgcccaaa atacgtcagg agtgccaaat tgaggatggg tacaggacta     1020
aggaacattc cgtccattca atccagaggt ctatttggag ccattgccgg ttttattgaa     1080
gggggatgga ctggaatgat agatggatgg tatggttata atcatcagaa tgaacaggga     1140
tcaggctatg cagcgatca aaaaagcaca caaatgcc aataacgggat tacaacaag      1200
gtgaacactg ttatcgagaa aatgaacatt caattcacag ctgtgggttaa agaattcaac      1260
aaattagaaa aaaggatgga aaatttaaat aaaaaagttg atgatggatt tctggacatt      1320
tgacatata atgcagaatt gttagttcta ctggaaaatg aaaggactct ggacttccat      1380
gactcaaata tgaagaatct gtatgagaaa gtaaaaagcc aattaaagaa taatgccaaa     1440
gaaatcgaa atggatgttt tgagttctac cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt      1500
gtaagaaatg ggacttatga ttatcccaaa tattcagaag agtcaaagtt gaacaggga      1560
aaggtagatg gagtgaaatt ggaatcaatg gggatctatc aggggtggcgg gactagtcac      1620
caccaccacc accacgacga cgacgacgac aaagaactga caactatatg cgagcaaata      1680
ccctcaccaa ctttagaatc gacgccgtac tctttgtcaa cgactactat tttggccaac      1740
gggaaggcaa tgcaaggagt ttttgaatat tacaatcag taacgtttgt cagtaattgc      1800
ggttctcacc cctcaacaac tagcaaaggc agccccataa acacacagta tgtttaagcg      1860
gccgc                                             1865

```

<210>26

<211>614

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>26

```

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1           5           10           15
Leu Ala Gln Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr
          20           25           30
Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser
          35           40           45
Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys
          50           55           60
Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu

```

65	70	75	80
Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser			
	85	90	95
Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly			
	100	105	110
Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser			
	115	120	125
Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn			
	130	135	140
His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser			
145	150	155	160
Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr			
	165	170	175
Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu			
	180	185	190
Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn			
	195	200	205
Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr			
	210	215	220
Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp			
225	230	235	240
Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp			
	245	250	255
Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Met Tyr Ala			
	260	265	270
Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala			
	275	280	285
Ser Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile			
	290	295	300
Asn Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu			
305	310	315	320
Arg Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu			
	325	330	335
Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala			
	340	345	350
Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly			
	355	360	365
Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys			
	370	375	380

Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Thr Val			
385	390	395	400
Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn			
	405	410	415
Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly			
	420	425	430
Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu			
	435	440	445
Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Met Lys Asn Leu Tyr			
	450	455	460
Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile 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 Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys			
	500	505	510
Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Ile			
	515	520	525
Tyr Gln Gly Gly Gly Thr Ser His His His His His His Asp Asp Asp			
	530	535	540
Asp Asp Lys Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr			
545	550	555	560
Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn			
	565	570	575
Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe			
	580	585	590
Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro			
	595	600	605
Ile Asn Thr Gln Tyr Val			
610			

<210>27

<211>1862

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>27

```

atgcttttgc aagcttttct tttctttttg gctggttttg cagccaaaat atctgcatca    60
atggacacaa tatgtatagg ctaccatgcg aacaattcaa ccgacactgt tgacacagta    120
ctcgagaaga atgtgacagt gacacactct gttaacctgc tcgaagacag ccacaacgga    180
aaactatgta gattaaaagg aatagcccca ctacaattgg ggaaatgtaa catcgccgga    240
tggctcttgg ggaatccaga atgcgaccca ctgcttccag tgagatcatg gtcctacatt    300
gtagaaacac caaactctga gaatggaata tgttatccag gagatttcat cgactatgag    360
gagctgaggg agcaattgag ctcagtgtca tcattcgaaa gattcgaaat atttcccaaa    420
gaaagctcat ggcccaacca caacacaaac ggagtaacgg cagcatgctc ccatgagggg    480
aaaagcagtt ttacagaaa ttgctatgg ctgacggaga aggagggctc atacccaaag    540
ctgaaaaatt cttatgtgaa caaaaaaggg aaagaagtcc ttgtactgtg gggatttcat    600
cacccgtcta acagtaagga acaacagaat ctctatcaga atgaaaatgc ttatgtctct    660
gtagtgactt caaattataa caggagattt accccgaaa tagcagaaag acccaaagta    720
agagatcaag ctgggaggat gaactattac tggaccttgc taaaaccgag agacacaata    780
atatttgagg caaatggaaa tctaatagca ccaatgtatg ctttcgcact gagtagaggc    840
tttgggtccg gcatcatcac ctcaaacgca tcaatgcatg agtgtaacac gaagtgtcaa    900
acacccttgg gagctataaa cagcagtcct ccttaccaga atatacaccc agtcacaata    960
ggagagcgcc caaaatacgt caggagtgcc aaattgagga tggttacagg actaaggaac   1020
attccgtcca ttcaatccag aggtctattt ggagccattg ccggttttat tgaaggggga   1080
tggactggaa tgatagatgg atggtatggt tatcatcatc agaatgaaca gggatcaggc   1140
tatgcagcgg atcaaaaaag cacacaaaat gccattaacg ggattacaaa caaggtgaac   1200
actgttatcg agaaaatgaa cattcaattc acagctgtgg gtaaagaatt caacaaatta   1260
gaaaaaagga tggaaaatth aaataaaaaa gttgatgatg gatttctgga catttgga   1320
tataatgcag aattgttagt tctactggaa aatgaaagga ctctggactt ccatgactca   1380
aatatgaaga atctgtatga gaaagtaaaa agccaattaa agaataatgc caaagaaatc   1440
ggaaatggat gttttgagtt ctaccacaag tgtgacaatg aatgcatgga aagtgtgaaga   1500
aatgggactt atgattatcc caaatattca gaagagtcaa agttgaacag ggaaaaggta   1560
gatggagtga aattggaatc aatggggatc tatcagggtg gcgggactag tcaccaccac   1620
caccaccacg acgacgacga cgacaaagcc atttctcaaa tcaactgacg tcaaatccaa   1680
gctactacca ctgctaccac cgaagctacc accactgctg ccccatcttc caccgttgaa   1740
actgtttctc catccagcac cgaaactatc tctcaacaaa ctgaaaatgg tgctgctaag   1800
gccgctgtcg gtatgggtgc cggtgctcta gctgctgctg ctatgttggt ataagcggcc   1860
gc                                                                    1862

```

<210>28

<211>617

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>28

```

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
1           5           10           15
Ile Ser Ala Ser Met Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn
20           25           30
Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr
35           40           45
His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg
50           55           60
Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly
65           70           75           80
Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser
85           90           95
Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr
100          105          110
Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser
115          120          125
Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp
130          135          140
Pro Asn His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly
145          150          155          160
Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly
165          170          175
Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu
180          185          190
Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln
195          200          205
Gln Asn Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser
210          215          220
Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val
225          230          235          240
Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro
245          250          255
Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Met

```

260	265	270
Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser		
275	280	285
Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly		
290	295	300
Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile		
305	310	315
Gly Glu Arg Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr		
325	330	335
Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala		
340	345	350
Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp		
355	360	365
Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp		
370	375	380
Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn		
385	390	395
Thr Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu		
405	410	415
Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp		
420	425	430
Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu		
435	440	445
Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Met Lys Asn		
450	455	460
Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile		
465	470	475
Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met		
485	490	495
Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu		
500	505	510
Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met		
515	520	525
Gly Ile Tyr Gln Gly Gly Gly Thr Ser His His His His His His Asp		
530	535	540
Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ser Gln Ile Thr Asp Gly Gln Ile Gln		
545	550	555
Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Glu Ala Thr Thr Thr Ala Ala Pro Ser		
565	570	575

Ser Thr Val Glu Thr Val Ser Pro Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser Gln	
580	585 590
Gln Thr Glu Asn Gly Ala Ala Lys Ala Ala Val Gly Met Gly Ala Gly	
595	600 605
Ala Leu Ala Ala Ala Ala Met Leu Leu	
610	615

<210>29

<211>1565

<212>DNA

<213> 流感病毒

<400>29

```

agcaaaagca gggtagataa tcactcactg agtgacatca aaatcatggc gtctcaaggc      60
accaaacgat cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc      120
agagcatccg tcggaaaaat gattgggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcacc      180
gaactcaaac tcagtgatta tgagggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga      240
atgggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc ttgaagaaca tcccagtgcg      300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg      360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat      420
ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcattccaa tttgaatgat      480
gcaacttate agaggacaag agctcttggt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct      540
ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga      600
gttgaacaa tggtgatgga attggtcaga atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac      660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt      720
ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc      780
cggaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctcacttttc tagcacggtc tgcactcata      840
ttgagagggt cggttgctca caagtcctgc ctgcctgcct gtgtgtatgg acctgccgta      900
gccagtgggt acgactttga aagggaggga tactctctag tcggaataga ccctttcaga      960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag     1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgcatttg aagatctaag agtattaagc     1080
ttcatcaaag ggacgaaggt gctcccaaga gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt     1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtac     1200
tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agagggcac tgcgggccaa     1260
atcagcatac aacctacgtt ctcagtacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt     1320
atggcagcat tcagtgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaaatcata     1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag     1440
ctctcgacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttcct ttgacatgag taatgaagga     1500

```

tcttatttct tcggagacaa tgcagaggaa tacgataatt aaagaaaaat acccttgttt 1560
ctact 1565

<210>30

<211>498

<212>PRT

<213> 流感病毒

<400>30

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1 5 10 15
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met
20 25 30
Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
35 40 45
Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu
50 55 60
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
65 70 75 80
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
85 90 95
Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
100 105 110
Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp
115 120 125
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
130 135 140
Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
145 150 155 160
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
165 170 175
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
180 185 190
Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
195 200 205
Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
210 215 220
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp

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

Asp Asn

<210>31

<211>1565

<212>DNA

<213> 流感病毒

<400>31

```

agcaaaagca gggtagataa tcactcactg agtgacatca aaatcatggc gtcccaaggc 60
accaaacggt cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc 120
agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcaca 180
gaacttaaac tcagtgatta tgagggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga 240
atggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc tggaagaaca tcccagtgcg 300
gggaaggatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagaa gagtaaacgg aaagtggatg 360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat 420
ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcattccaa tttgaatgat 480
gcaacttata agaggacaag ggctcttggt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct 540
ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga 600
gttgaacaa tggatgatga attggtcagg atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac 660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt 720
ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc 780
cgggaccag ggaatgctga gttcgaagat ctcacttttc tagcacggtc tgcactcata 840
ttgagagggt cggttgctca caagtcctgc ctgcctgcct gtgtgtatgg acctgccgta 900
gccagtgggt acgactttga aagagaggga tactctctag tcggaataga ccctttcaga 960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag 1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgcatttg aagatctaag agtattgagc 1080
ttcatcaaag ggacgaaggt ggtcccaaga gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt 1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtag 1200
tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agagggcata tcggggcca 1260
atcagcatac aacctacgtt ctacgtacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt 1320
atggcagcat tcactgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaaatcata 1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag 1440
ctctcgacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttcct ttgacatgag taatgaagga 1500
tcttatttct tcggagacaa tgcagaggag tacgacaatt aaagaaaaat acccttgttt 1560
ctact 1565

```

<210>32

<211>498

<212>PRT

<213> 流感病毒

<400>32

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp

1

5

10

15

Gly	Glu	Arg	Gln	Asn	Ala	Thr	Glu	Ile	Arg	Ala	Ser	Val	Gly	Lys	Met
20				25				30							
Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Arg	Phe	Tyr	Ile	Gln	Met	Cys	Thr	Glu	Leu	Lys
35				40				45							
Leu	Ser	Asp	Tyr	Glu	Gly	Arg	Leu	Ile	Gln	Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Glu
50				55				60							
Arg	Met	Val	Leu	Ser	Ala	Phe	Asp	Glu	Arg	Arg	Asn	Lys	Tyr	Leu	Glu
65				70				75				80			
Glu	His	Pro	Ser	Ala	Gly	Lys	Asp	Pro	Lys	Lys	Thr	Gly	Gly	Pro	Ile
85				90				95							
Tyr	Arg	Arg	Val	Asn	Gly	Lys	Trp	Met	Arg	Glu	Leu	Ile	Leu	Tyr	Asp
100				105				110							
Lys	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Ile	Trp	Arg	Gln	Ala	Asn	Asn	Gly	Asp	Asp
115				120				125							
Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Thr	His	Met	Met	Ile	Trp	His	Ser	Asn	Leu	Asn
130				135				140							
Asp	Ala	Thr	Tyr	Gln	Arg	Thr	Arg	Ala	Leu	Val	Arg	Thr	Gly	Met	Asp
145				150				155				160			
Pro	Arg	Met	Cys	Ser	Leu	Met	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Arg	Arg	Ser
165				170				175							
Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Lys	Gly	Val	Gly	Thr	Met	Val	Met	Glu
180				185				190							
Leu	Val	Arg	Met	Ile	Lys	Arg	Gly	Ile	Asn	Asp	Arg	Asn	Phe	Trp	Arg
195				200				205							
Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Lys	Thr	Arg	Ile	Ala	Tyr	Glu	Arg	Met	Cys	Asn
210				215				220							
Ile	Leu	Lys	Gly	Lys	Phe	Gln	Thr	Ala	Ala	Gln	Lys	Ala	Met	Met	Asp
225				230				235				240			
Gln	Val	Arg	Glu	Ser	Arg	Asp	Pro	Gly	Asn	Ala	Glu	Phe	Glu	Asp	Leu
245				250				255							
Thr	Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Leu	Arg	Gly	Ser	Val	Ala	His
260				265				270							
Lys	Ser	Cys	Leu	Pro	Ala	Cys	Val	Tyr	Gly	Pro	Ala	Val	Ala	Ser	Gly
275				280				285							
Tyr	Asp	Phe	Glu	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Val	Gly	Ile	Asp	Pro	Phe
290				295				300							
Arg	Leu	Leu	Gln	Asn	Ser	Gln	Val	Tyr	Ser	Leu	Ile	Arg	Pro	Asn	Glu
305				310				315				320			
Asn	Pro	Ala	His	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Trp	Met	Ala	Cys	His	Ser	Ala

	325	330	335
Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val			
	340	345	350
Val Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn			
	355	360	365
Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg			
	370	375	380
Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg			
385	390	395	400
Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg			
	405	410	415
Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Val Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn			
	420	425	430
Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met			
	435	440	445
Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe			
	450	455	460
Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp			
465	470	475	480
Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr			
	485	490	495
Asp Asn			

<210>33

<211>1707

<212>DNA

<213> 流感病毒

<400>33

```

atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc      60
attggttacc atgcaaacaa ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacggt      120
actgttacac atgccaaga cactactggaa aagaacaca acgggaagct ctgcgatcta      180
gatggagtga agcctctaatt tttagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcggaaac      240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat      300
ccagtcaatg acctctgtta ccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta      360
ttgagcagaa taaaccatit tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt      420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctcctttttc      480
agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac      540

```

```

aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga ttcaccatcc taatgatgcg      600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata ttcccggttg gacatcaaca      660
ctaaaccaga gattgggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaacgg gcaaagtgga      720
aggatggagt tcttctggac aatttttaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat      780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt      840
atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg      900
ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa     960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag    1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg    1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac    1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg    1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa caacttagaa    1260
aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat    1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat    1380
gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaaa ggagctgggt    1440
aacggttggt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaat    1500
ggaacgtatg actaccgca gtattcagaa gaagcgagac taaaaagaga ggaaataagt    1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg    1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatgga    1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa                                     1707

```

<210>34

<211>568

<212>PRT

<213> 流感病毒

<400>34

```

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 Lys 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	Val	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	Ser	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	Ser	Thr	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	Lys	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	Arg	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	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	Thr	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
Ile 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>35

<211>1833

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>35

atgcagttac ttcgctgttt ttcaatatTT tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa	60
ctgacaacta tatgcgagca aatccccTca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg	120
tcaacgacta ctattttTggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa	180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc	240
ataaacacac agtatgtttt tacttagtgac acaatatgta taggctacca tgcaacaat	300
tcaaccgaca ctgttgacac agtactcgag aagaatgtga cagtgacaca ctctgttaac	360

```

ctgctcgaag acagccacaa cggaaaacta tgtagattaa aaggaatagc cccactacaa 420
ttggggaaat gtaacatcgc cggatggctc ttgggggaatc cagaatgcga cccactgctt 480
ccagtgagat catggctcta cattgtagaa acaccaaact ctgagaatgg aatatgttat 540
ccaggagatt tcategacta tgaggagctg agggagcaat tgagctcagt gtcatcattc 600
gaaagattcg aaatatttcc caaagaaagc tcatggccca accacaacac aaacggagta 660
acggcagcat gctcccatga ggggaaaagc agtttttaca gaaatttgct atggctgacg 720
gagaaggagg gctcataccc aaagctgaaa aattcttatg tgaacaaaaa agggaaagaa 780
gtccttgtac tgtggggtat tcatcaccgc tctaacagta aggaacaaca gaatctctat 840
cagaatgaaa atgcttatgt ctctgtagtg acttcaaatt ataacaggag atttaccctg 900
gaaatagcag aaagacccaa agtaagagat caagctggga ggatgaacta ttactggacc 960
ttgctaaaac ccggagacac aataatatat gaggcaaatg gaaatctaata agcaccaatg 1020
tatgctttcg cactgagtag aggccttggg tccggcatca tcacctcaaa cgcacatg 1080
catgagtgtg acacgaagtg tcaaacaccc ctgggagcta taaacagcag tctcccttac 1140
cagaatatac acccagtcac aataggagag cgcccaaaat acgtcaggag tgccaaattg 1200
aggatggtta caggactaag gaacattccg tccattcaat ccagaggtct atttggagcc 1260
attgccggtt ttattgaagg gggatggact ggaatgatag atggatggta tggttatcat 1320
catcagaatg aacagggatc aggctatgca gcggatcaaa aaagcacaca aaatgccatt 1380
aacgggatta caaacaaggt gaacactggt atcgagaaaa tgaacattca attcacagct 1440
gtgggtaaag aattcaacaa attagaaaaa aggatggaaa atttaaataa aaaagttgat 1500
gatggatttc tggacatttg gacatataat gcagaattgt tagttctact ggaaaatgaa 1560
aggactctgg acttccatga ctcaaatatg aagaatctgt atgagaaagt aaaaagccaa 1620
ttaaagaata atgcaaaga aatcggaat ggatgttttg agttctacca caagtgtgac 1680
aatgaatgca tggaaagtgt aagaaatggg acttatgatt atcccaaata ttcagaagag 1740
tcaaagttga acagggaaaa ggtagatgga gtgaaattgg aatcaatggg gatctatcag 1800
ggtggcgggc atcaccatca ccatcactag tga 1833

```

<210>36

<211>609

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的

<400>36

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val

1

5

10

15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr

20	25	30
Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser	Leu Ser Thr Thr Thr Ile	Leu Ala Asn
35	40	45
Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe	Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe	
50	55	60
Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro	Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro	
65	70	75
Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Thr	Ser Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr	
85	90	95
His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr	Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn	
100	105	110
Val Thr Val Thr His Ser Val Asn	Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly	
115	120	125
Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile	Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys	
130	135	140
Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly	Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu	
145	150	155
Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile	Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn	
165	170	175
Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe	Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu	
180	185	190
Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe	Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys	
195	200	205
Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn	Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys	
210	215	220
Ser His Glu Gly Lys Ser Ser Phe	Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr	
225	230	235
Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys	Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys	
245	250	255
Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu	Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn	
260	265	270
Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr	Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser	
275	280	285
Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg	Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu	
290	295	300
Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala	Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr	
305	310	315
Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile	Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu	
325	330	335

Ile Ala Pro Met Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly		
340	345	350
Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln		
355	360	365
Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His		
370	375	380
Pro Val Thr Ile Gly Glu Arg Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu		
385	390	395
Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly		
405	410	415
Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met		
420	425	430
Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly		
435	440	445
Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr		
450	455	460
Asn Lys Val Asn Thr Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala		
465	470	475
Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn		
485	490	495
Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu		
500	505	510
Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser		
515	520	525
Asn Met Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn		
530	535	540
Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp		
545	550	555
Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys		
565	570	575
Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys		
580	585	590
Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln Gly Gly Gly His His His His His		
595	600	605
His		

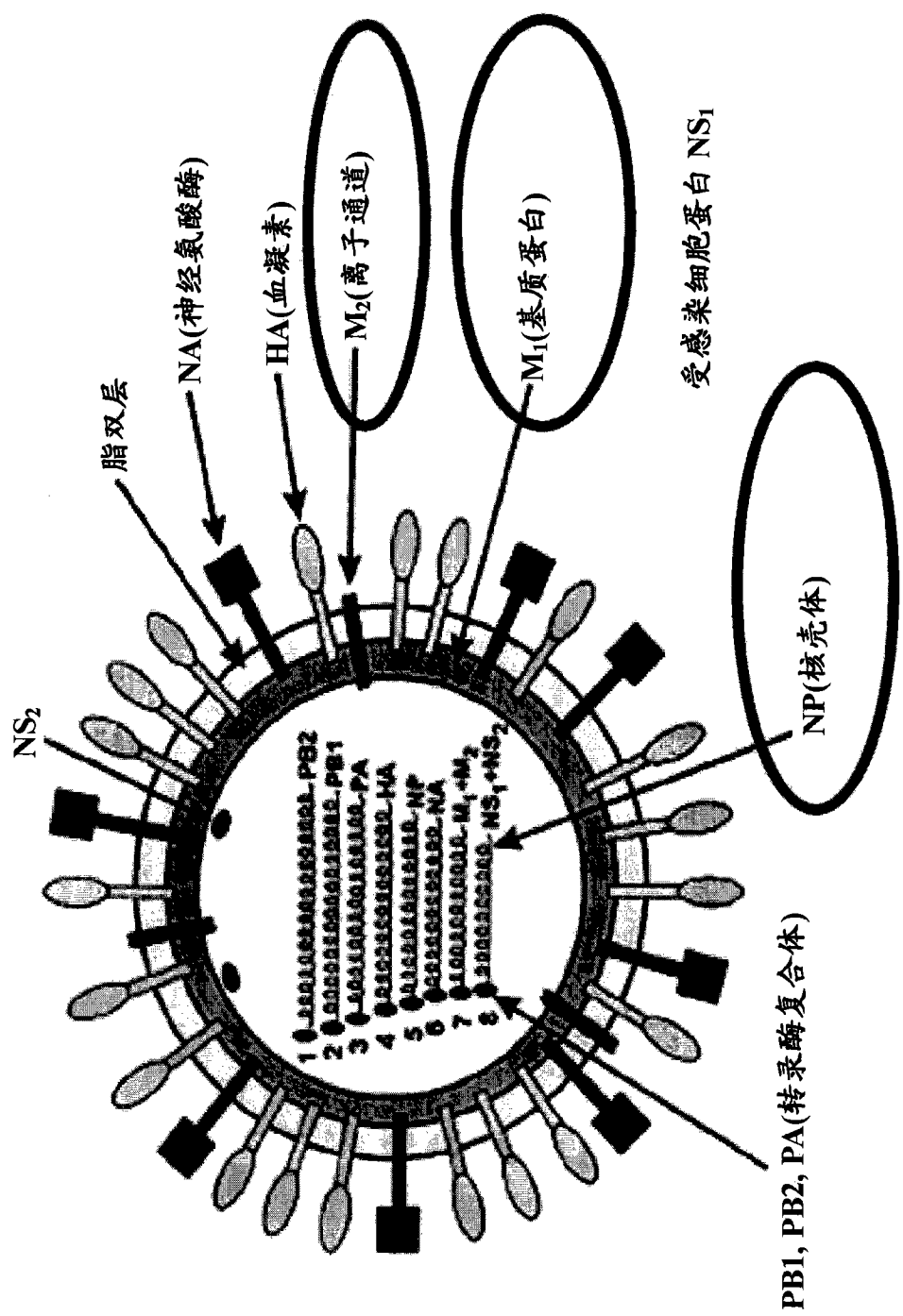


图 1

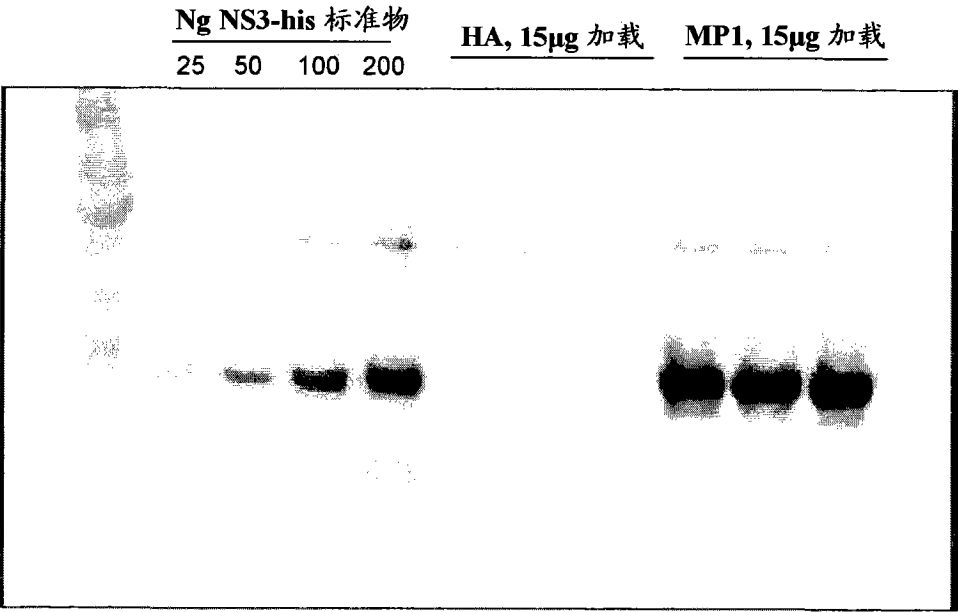


图 2

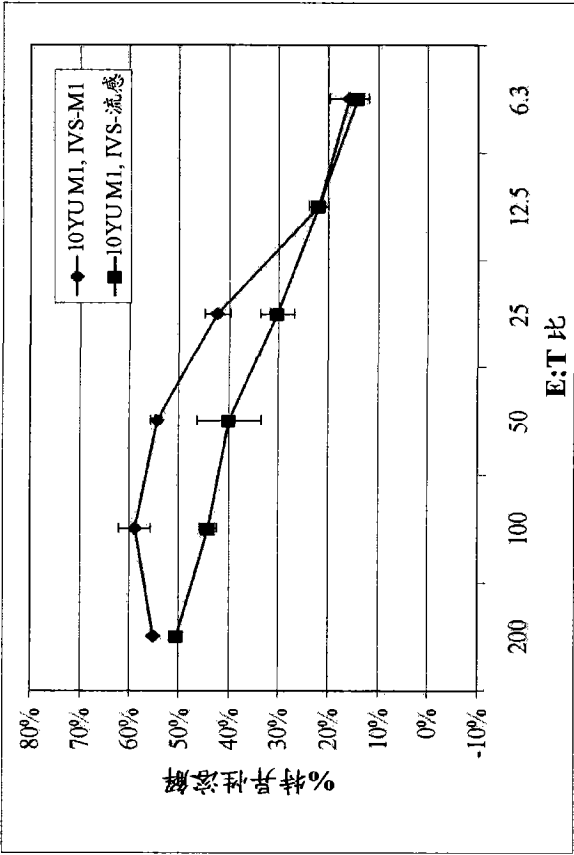


图 3B

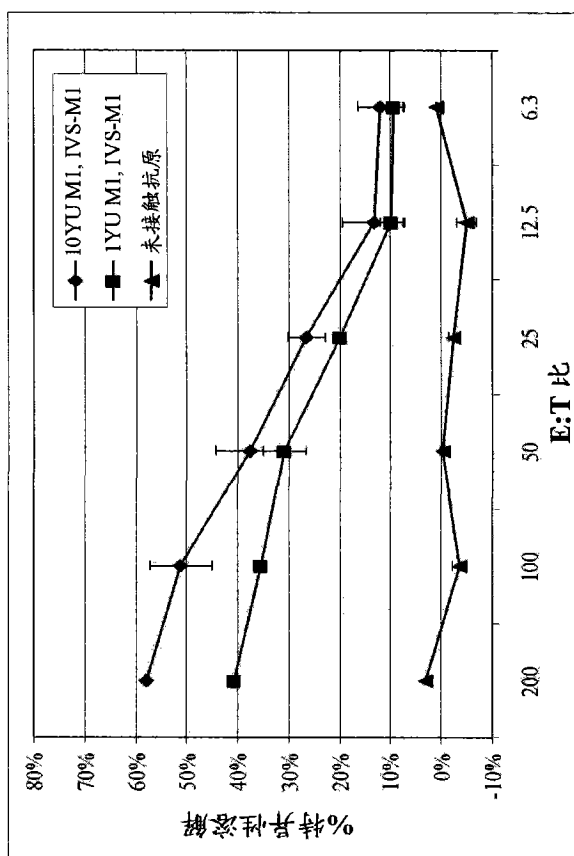


图 3A

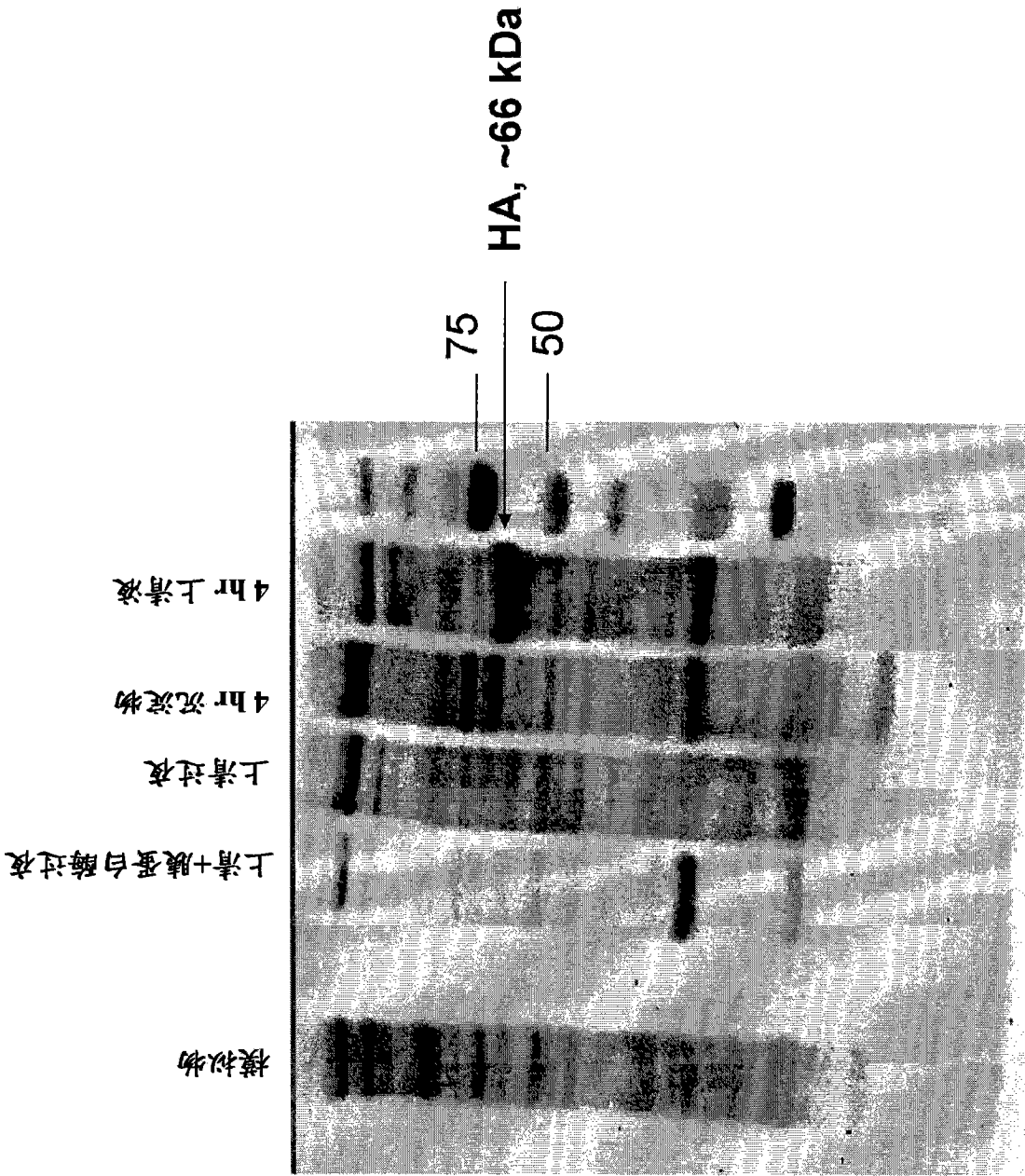


图 4

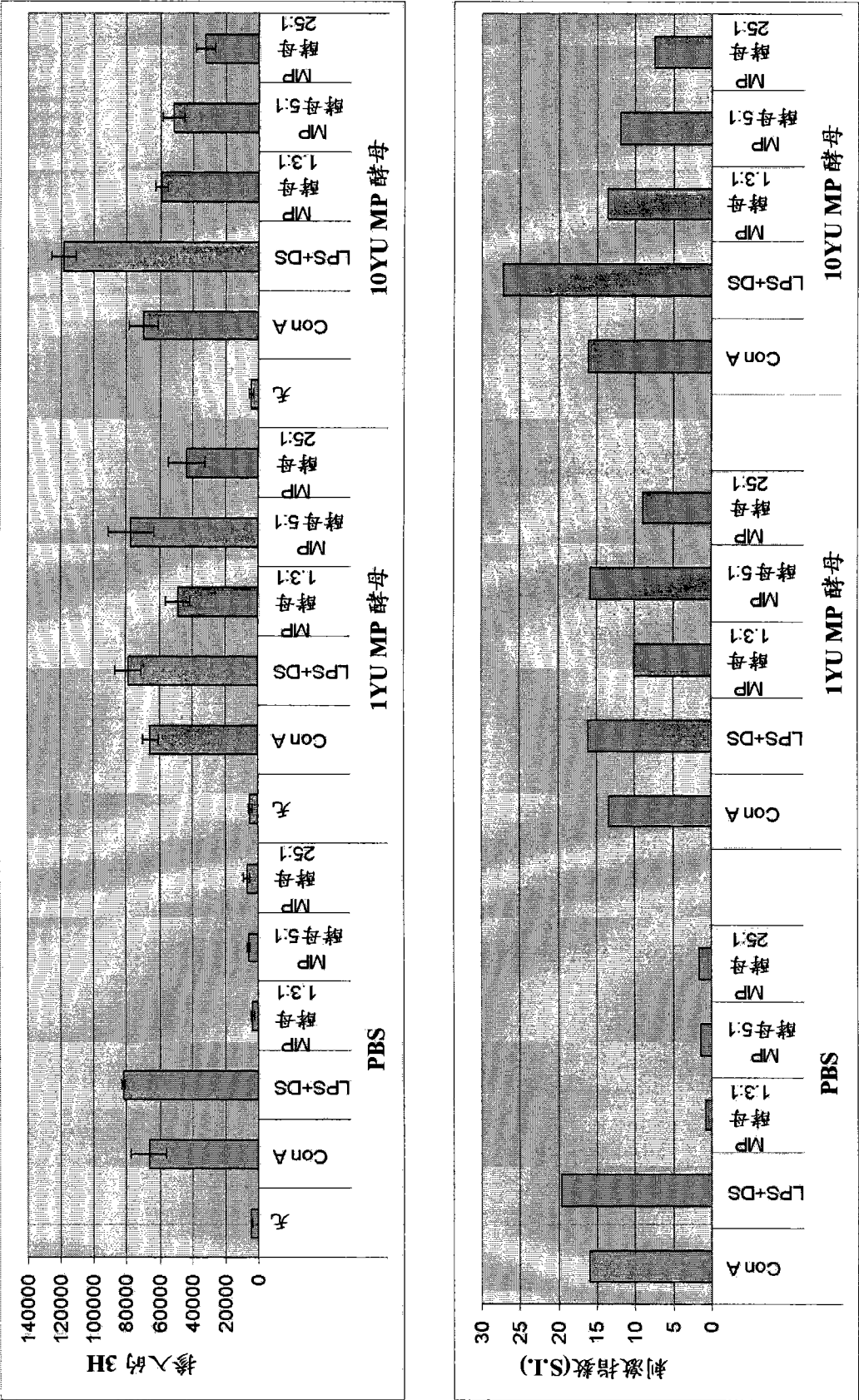


图 5

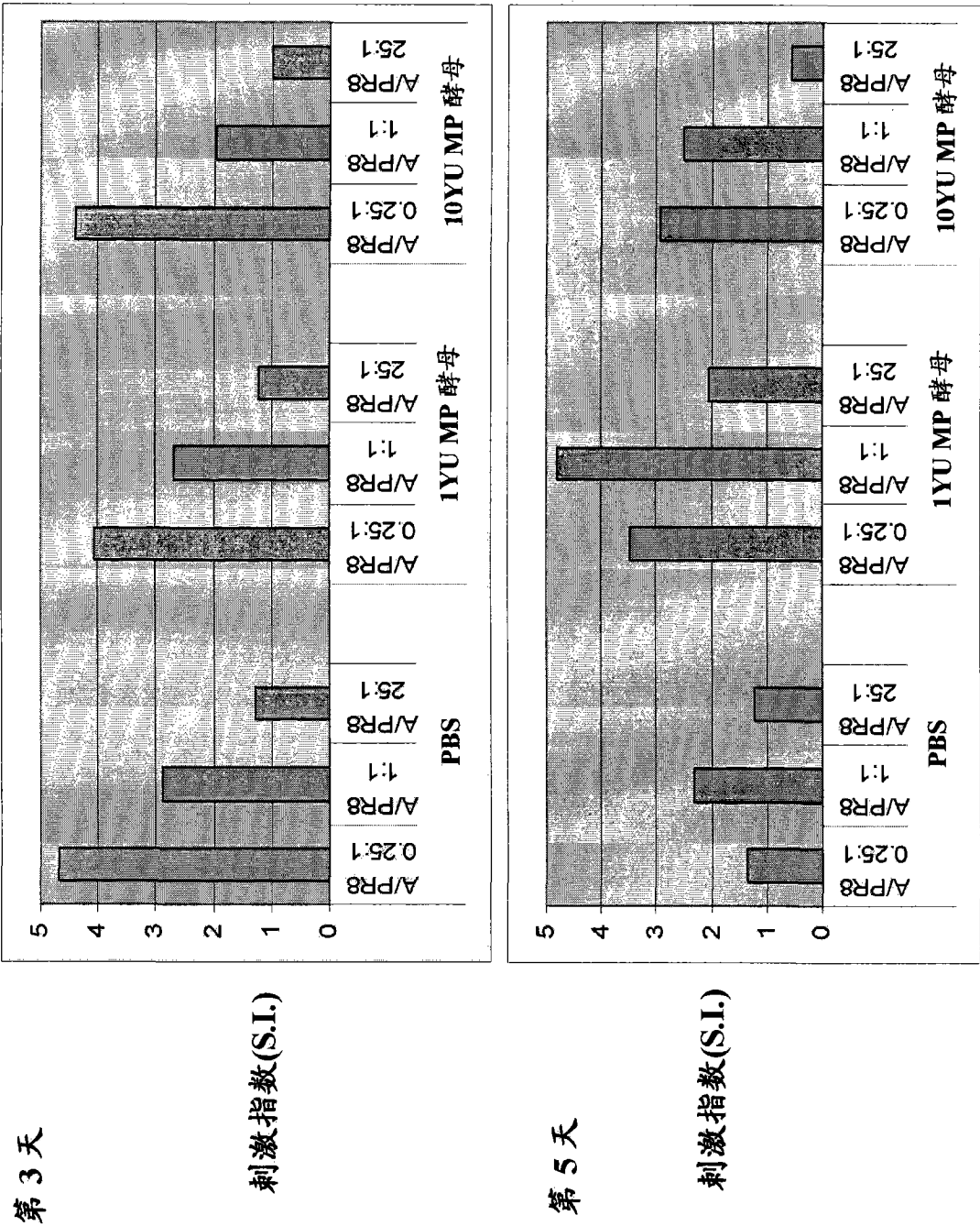


图6

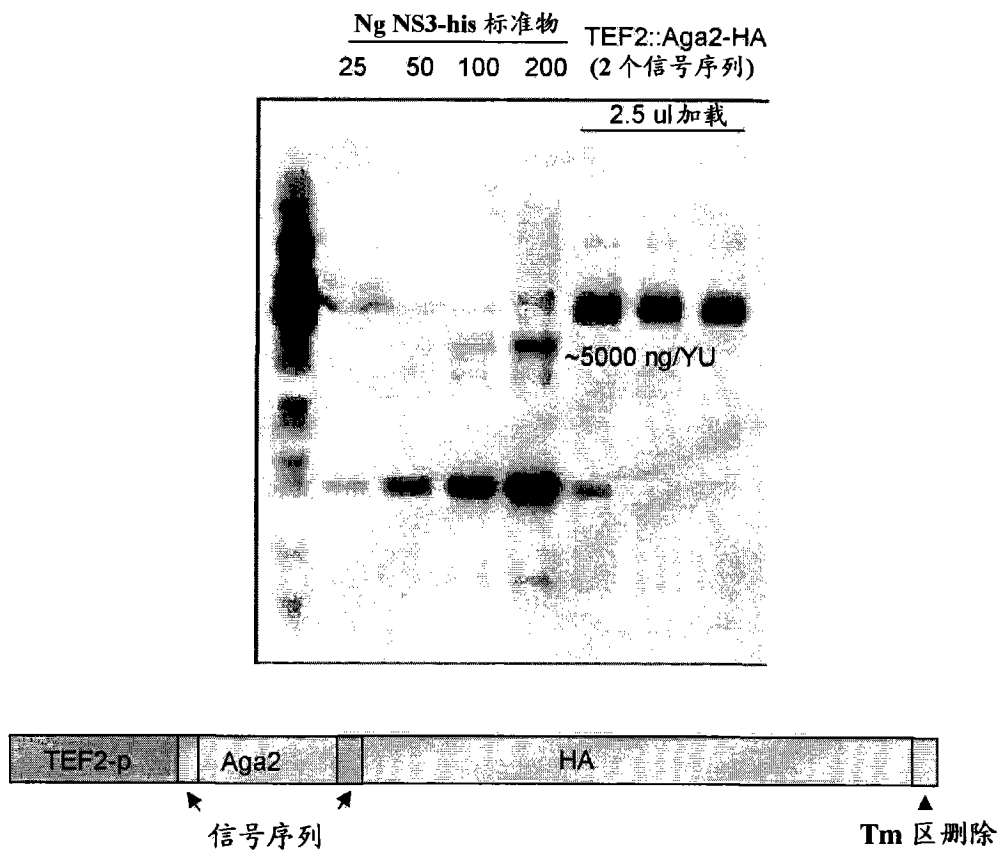


图 7

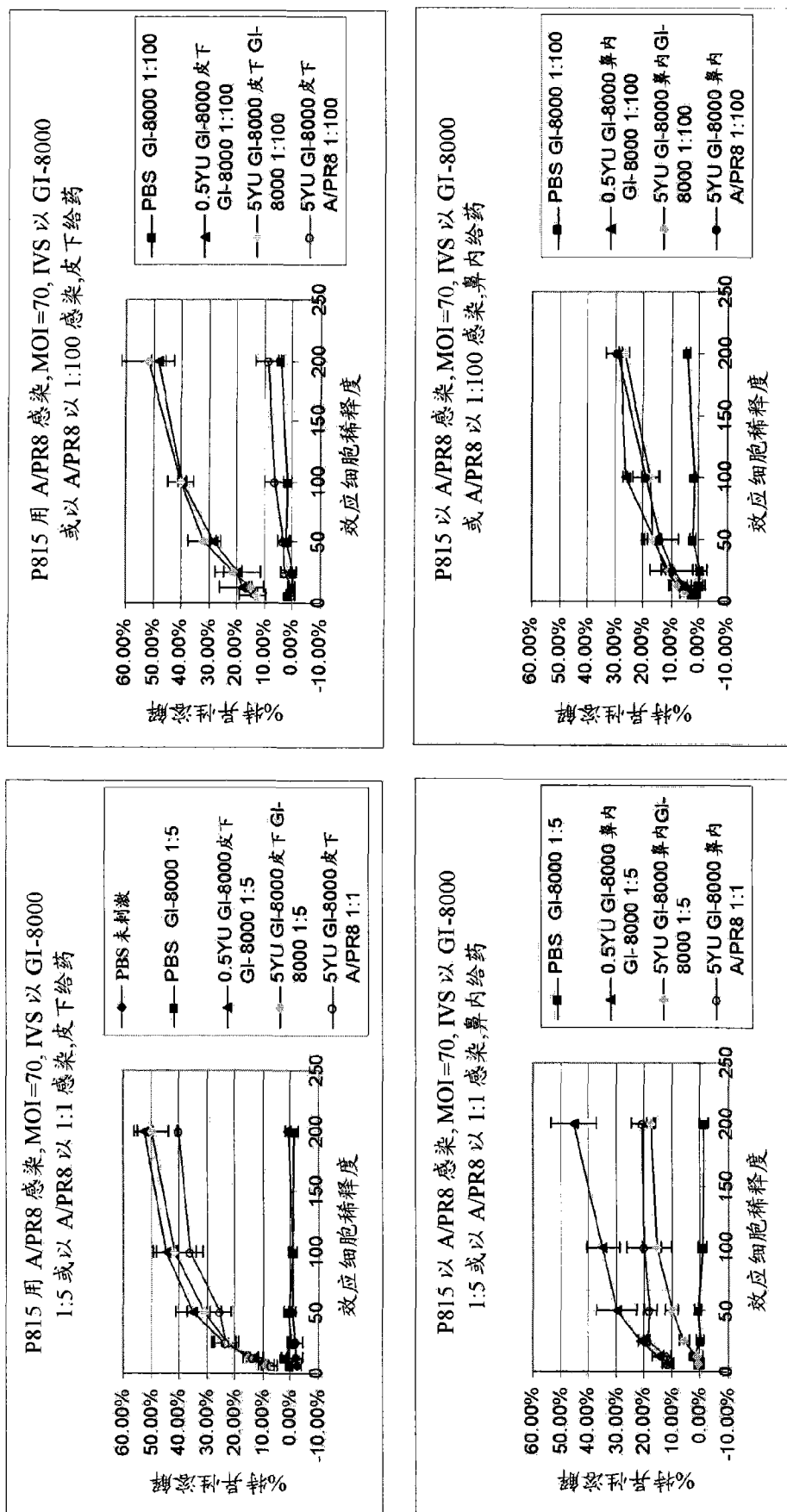


图 8

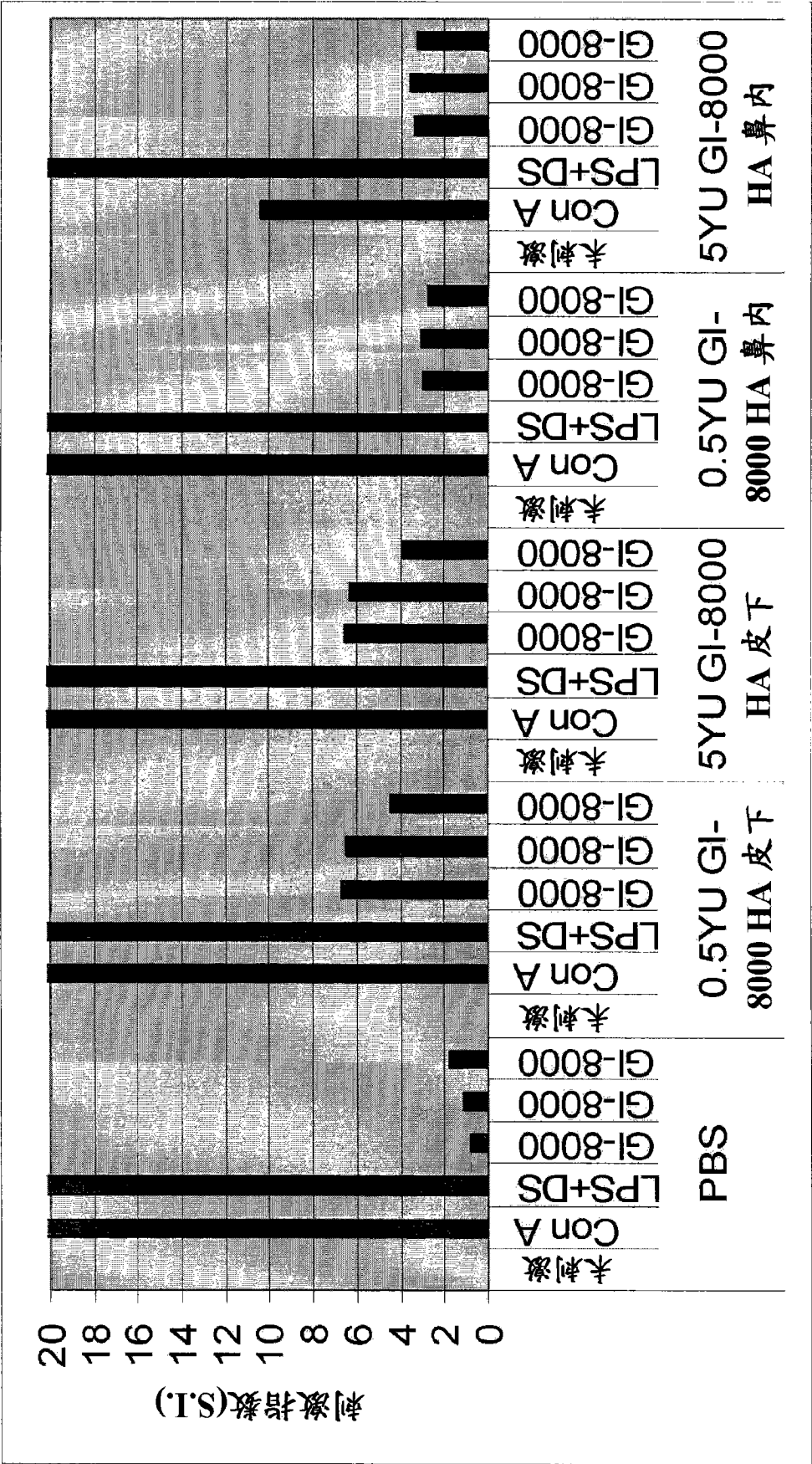
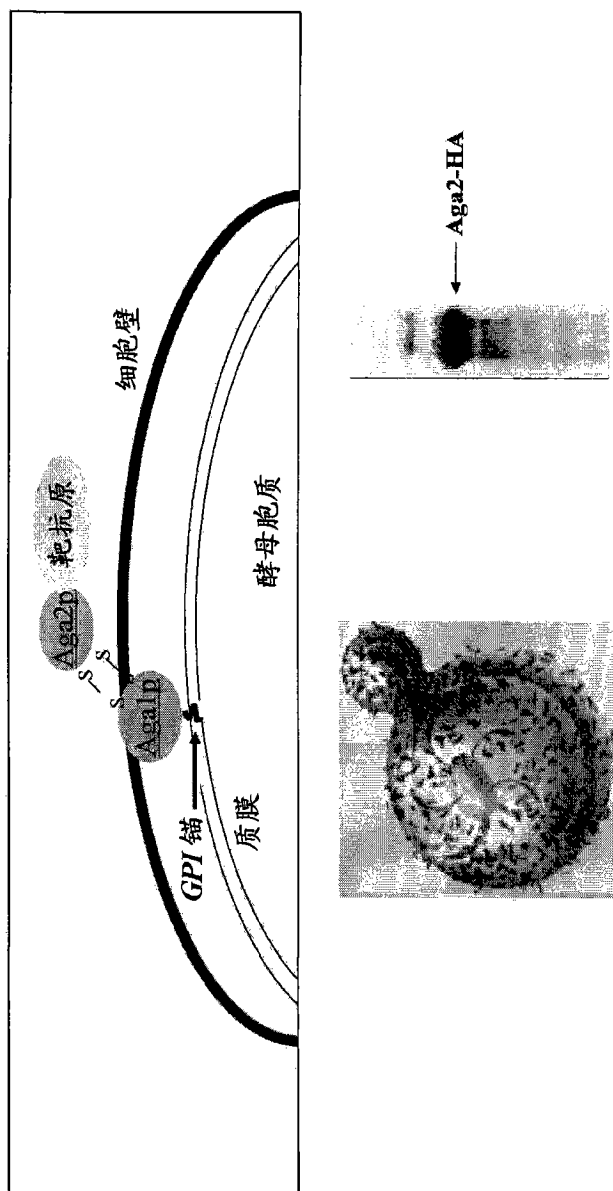


图 9



GI-8003(原型):A/PR/8/34 H1-HA 在酵母中以
Aga2-HA 融合蛋白形式表达

图 10A

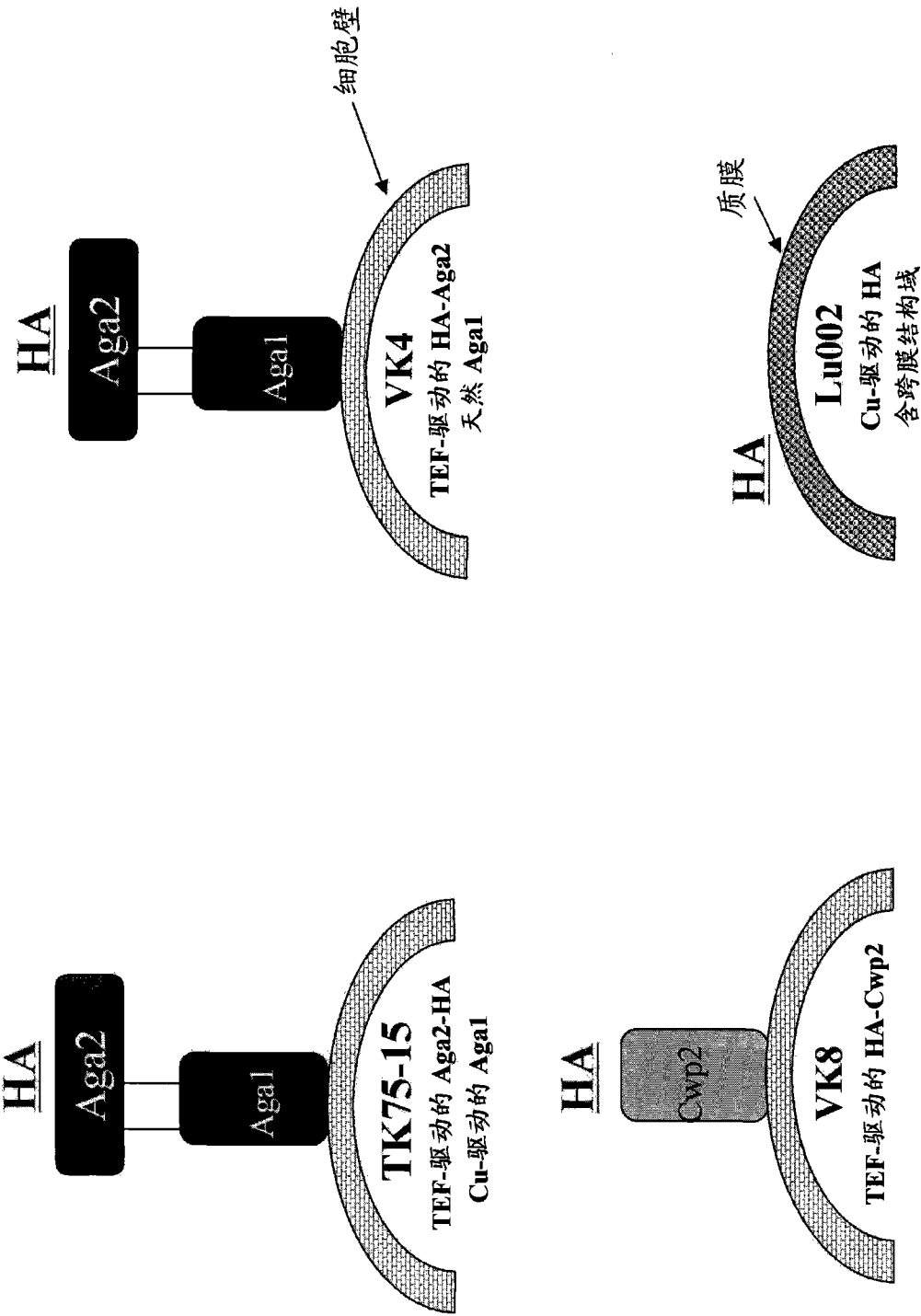


图 10B

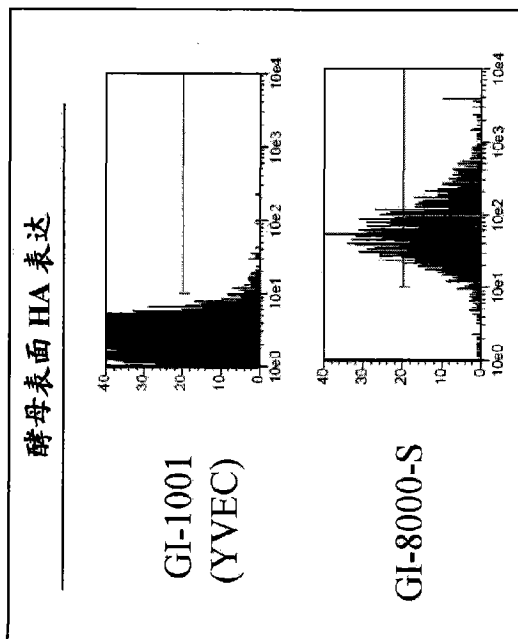
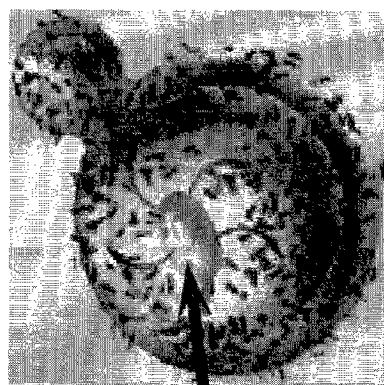
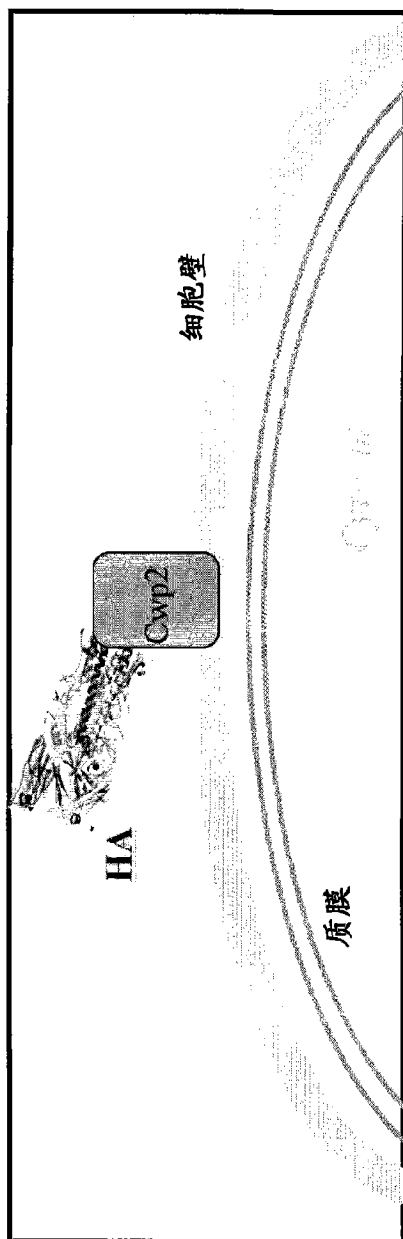


图 11

Aga2+HA 融合方法

YEX

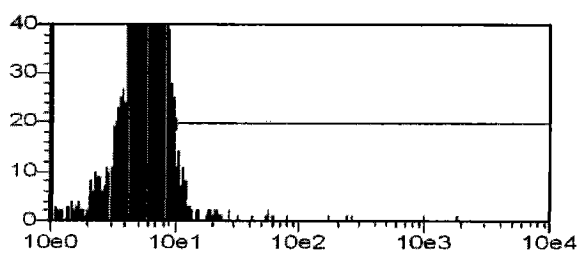


图 12A

VK4
(HA-Aga2)

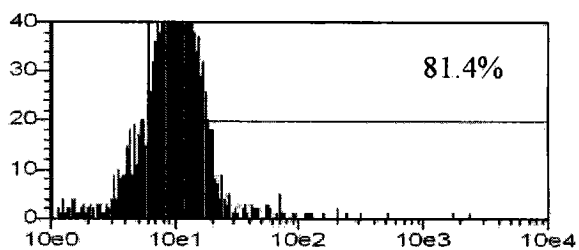


图 12B

TK75-15
(Aga2-HA)

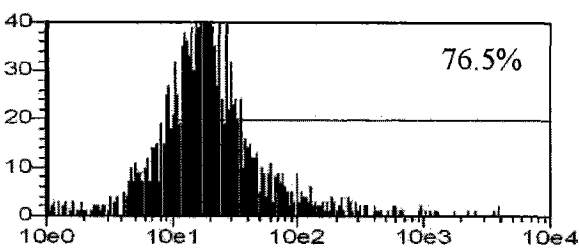


图 12C

其它 HA 表达方法

YEX

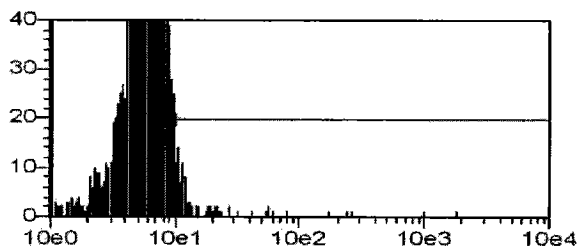


图 12D

VK8
(HA-Cwp2)

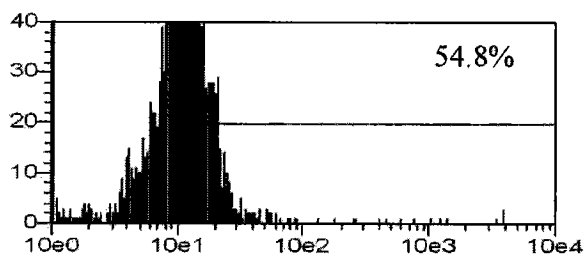


图 12E

VK8
(HA-Cwp2,
脱糖基化的)

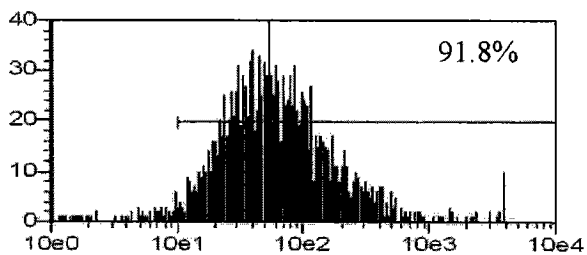


图 12F

原生质球
(Lu002,
HA 在 PM 上)

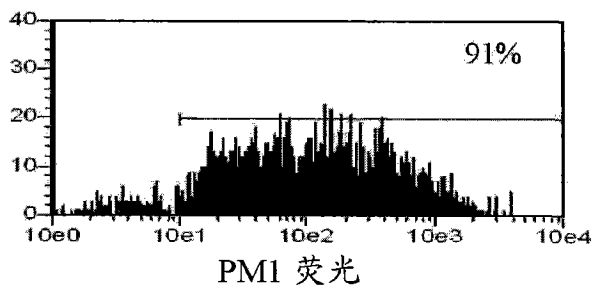


图 12G



HA Cwp2

GI-8000-S

图 13B

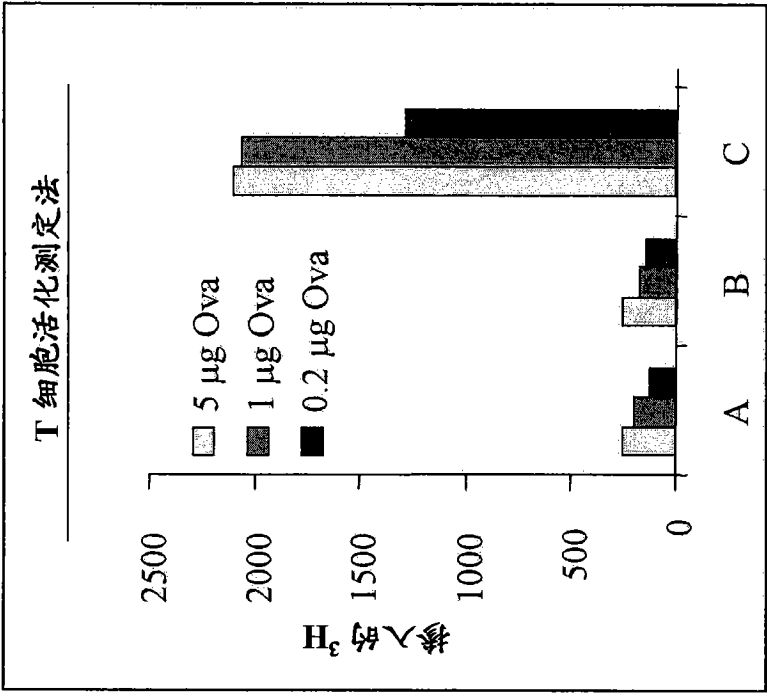


图 14B

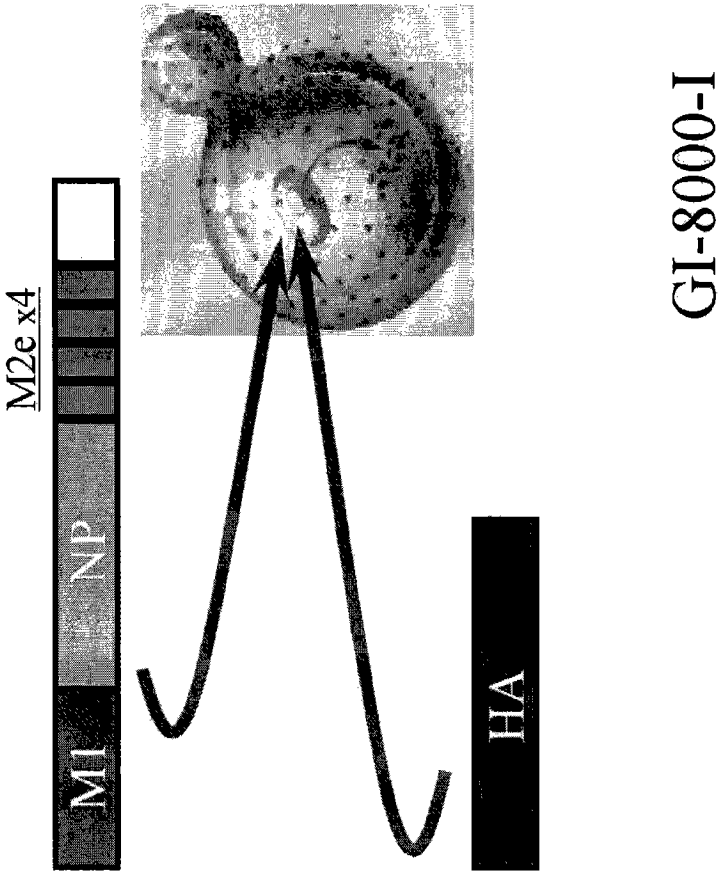


图 13A

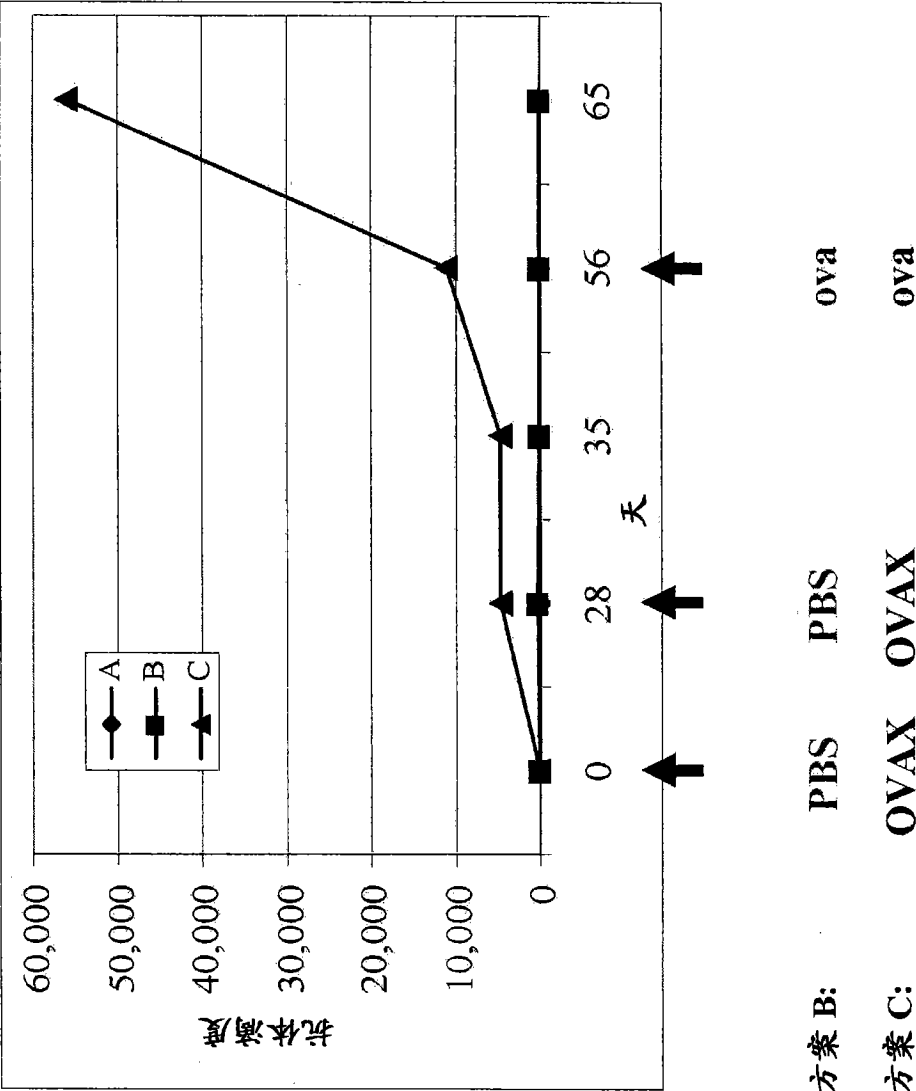


图 14A

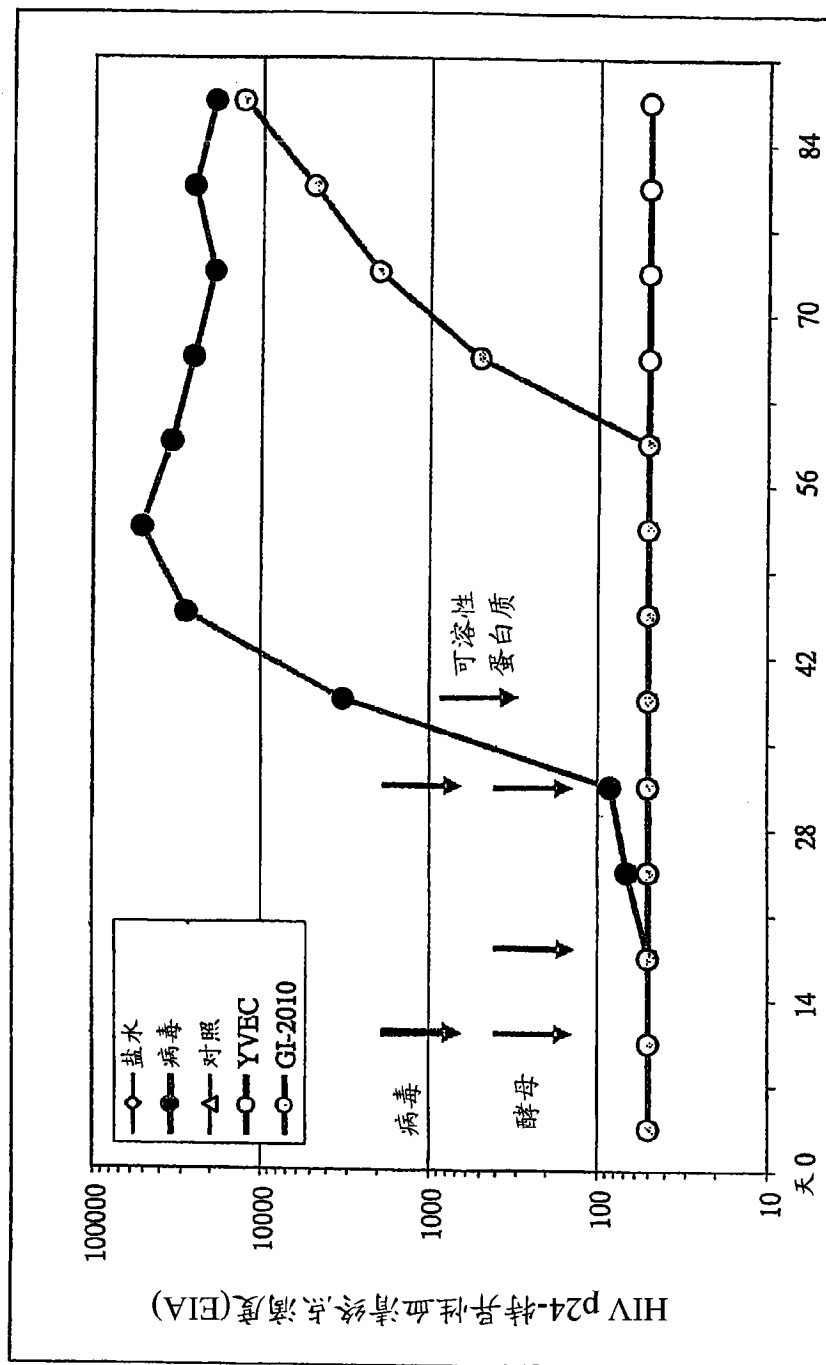
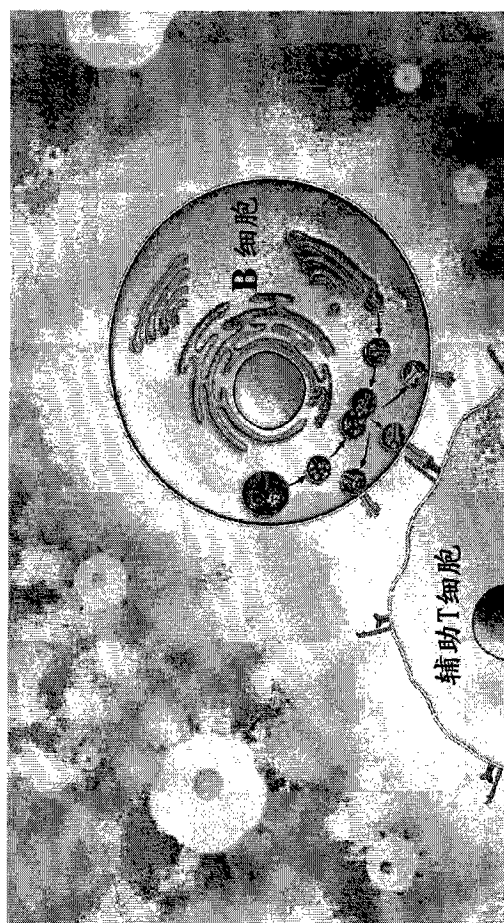
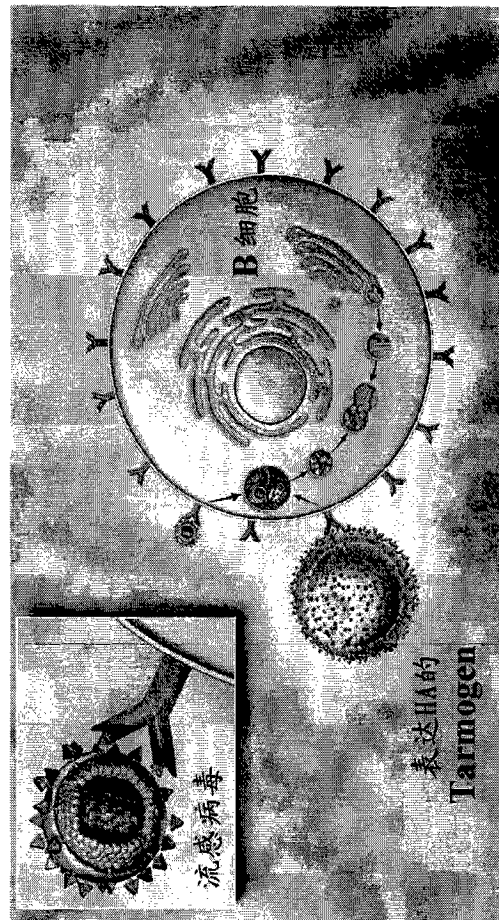


图 15



Ab 生成的信号 2

图 16B



Ab 生成的信号 1

图 16A

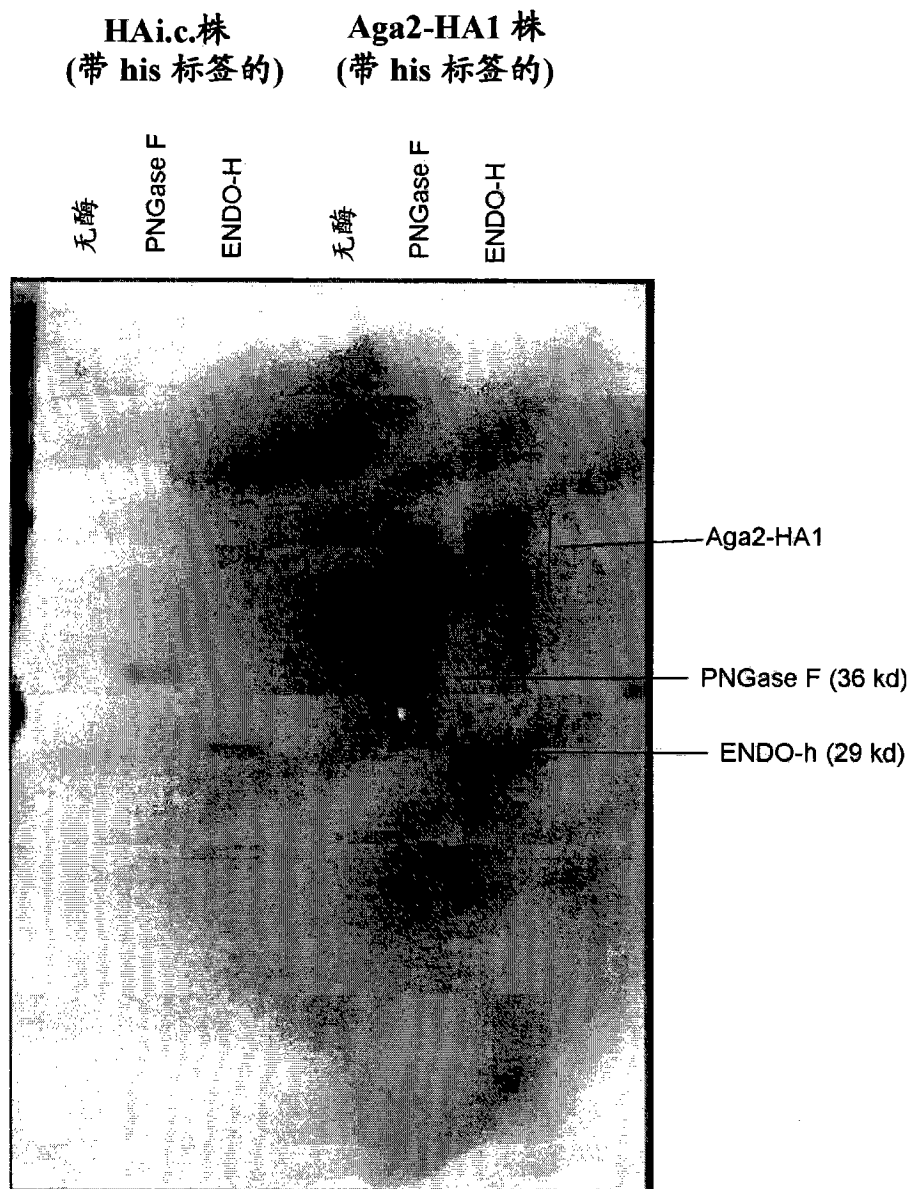


图 17