



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111491663 B

(45) 授权公告日 2024.08.20

(21) 申请号 201880081694.2

(22) 申请日 2018.12.17

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111491663 A

(43) 申请公布日 2020.08.04

(30) 优先权数据

62/607,101 2017.12.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/085198 2018.12.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/121513 EN 2019.06.27

(73) 专利权人 英特维特国际股份有限公司

地址 荷兰博克斯梅尔

(72) 发明人 M·A·莫勒 P·基蒂坤

S·帕塔姆莱迪 E·斯特雷特

R·P·A·M·西格斯 B·纳贾拉

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理人 陈文平 刘盈盈

(54) 发明名称

猪甲型流感病毒疫苗

(57) 摘要

本发明提供了编码一种或多种甲型流感病毒神经氨酸酶(NA)抗原的载体和/或核酸构建体。本发明还提供了包含这样的载体和/或核酸构建体的针对甲型流感病毒的疫苗。本发明进一步提供了单独或与其他保护剂组合制备和使用所述疫苗的方法。

(51) Int.CI.

A61K 39/193 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2009104226 A1, 2009.04.23

Matthew J Sylte等.Influenza

neuramidase as a vaccine antigen.《Curr  
Top Microbiol Immunol》.2009, 第333卷第227  
页摘要.

Maryna C. Eichelberger等.Influenza  
Neuramidase as a Vaccine Antigen.  
《Current Topics in Microbiology and  
Immunology》.2014, 第Influenza Pathogenesis  
and Control-Volume II章, 第19页第3段.

审查员 陈皓

权利要求书2页 说明书37页

序列表43页 附图10页

1. 一种免疫原性组合物,其包含各自分别编码一种或多种神经氨酸酶(NA)或其抗原性片段的两种或更多种RNA复制子颗粒(RP);

其中第一 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码第一NA或其抗原性片段和第二 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码第二NA或其抗原性片段;或

其中 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码两种或多种NA或其抗原性片段;

条件是所述免疫原性组合物既不包含猪甲型流感病毒(IAV-S)血凝素(HA)或其抗原性片段,也不包含编码所述IAV-S血凝素(HA)或其抗原性片段的核苷酸序列;和其中所述第一NA和所述第二NA包含具有98%或更低同一性的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述第一NA来源于来自第一系统发生簇的IAV-S和所述第二NA来源于来自第二系统发生簇的IAV-S,其中所述第一系统发生簇和所述第二系统发生簇是不同的;和其中所述第一系统发生簇和所述第二系统发生簇分别选自下述:N1-经典簇、N1-大流行簇、N2-1998簇、和N2-2002簇。

3. 根据权利要求2所述的免疫原性组合物,其中所述第一系统发生簇选自下述:所述N1-经典簇和所述N1-大流行簇,和其中所述第二系统发生簇选自下述:所述N2-1998簇和所述N2-2002簇。

4. 根据权利要求3所述的免疫原性组合物,其中所述第一系统发生簇是所述N1-经典簇和所述第二系统发生簇是所述N2-2002簇。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的免疫原性组合物,其还包含编码第三NA或其抗原性片段的第三 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒;其中所述第三NA来源于来自第三系统发生簇的IAV-S;和其中所述第三系统发生簇与所述第一系统发生簇和所述第二系统发生簇是不同的。

6. 根据权利要求5所述的免疫原性组合物,其还包含编码第四NA或其抗原性片段的第四 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒;其中所述第四NA来源于来自第四系统发生簇的IAV-S;和其中所述第四系统发生簇与所述第一系统发生簇、所述第二系统发生簇、和所述第三系统发生簇是不同的。

7. 根据权利要求6所述的免疫原性组合物,其中所述第一系统发生簇是N1-经典簇,所述第二系统发生簇是N2-2002簇,所述第三系统发生簇是N1-大流行簇,和所述第四系统发生簇是N2-1998簇。

8. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码两种或更多种NA或其抗原性片段;和

其中所述第一NA来源于来自第一谱系的IAV-S和所述第二NA来源于来自第二谱系的IAV-S,其中所述第一谱系和所述第二谱系是不同的;和其中所述第一谱系和所述第二谱系分别选自下述:N1-大流行(EU)谱系、N1-欧亚禽类谱系、N2-根特/1984谱系、N2-意大利/4675/2003谱系、N2-苏格兰/1994(分支1)谱系、和N2-苏格兰/1994(分支2)谱系。

9. 根据权利要求8所述的免疫原性组合物,其中所述第一谱系选自下述:N1-大流行(EU)谱系和N1-欧亚禽类谱系;和其中所述第二谱系选自下述:N2-根特/1984谱系、N2-意大利/4675/2003谱系、N2-苏格兰/1994(分支1)谱系、和N2-苏格兰/1994(分支2)谱系。

10. 根据权利要求2所述的免疫原性组合物,其中所述 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码两种或更多种NA或其抗原性片段;和

其中所述第一系统发生簇是N1-经典簇和所述第二系统发生簇是N1-大流行簇。

11. 根据权利要求10所述的免疫原性组合物,其还包含编码第三NA或其抗原性片段和第四NA或其抗原性片段的第二 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒;其中所述第三NA来源于来自N2-1998簇的IAV-S和所述第四NA来源于来自N2-2002簇的IAV-S。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的免疫原性组合物,其中每种 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)  $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。

13. 一种有助于预防由流感病毒引起的疾病的疫苗,其包含权利要求1-12中任一项所述的免疫原性组合物,和药学上可接受的载体;条件是所述疫苗既不包含IAV-S血凝素(HA)或其抗原性片段,也不包含编码IAV-S血凝素(HA)或其抗原性片段的核苷酸序列。

14. 根据权利要求13所述的疫苗组合物,其包含选自下述的佐剂:可生物降解的油、具有2.5-50% (v/v) 矿物油的水包油乳剂、和可生物降解的油与具有2.5-50% (v/v) 矿物油的水包油乳剂的混合物。

15. 根据权利要求14所述的疫苗组合物,其中所述可生物降解的油是d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯和所述矿物油是液体石蜡。

16. 免疫有效量的权利要求13至15中任一项所述的疫苗在制备针对猪甲型流感病毒免疫猪的药物中的用途。

17. 权利要求1-12中任一项所述的免疫原性组合物,其用于疫苗以有助于在猪中预防由猪甲型流感病毒引起的疾病。

## 猪甲型流感病毒疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119 (c) 要求2017年12月18日提交的美国临时申请序列号62/607,101的优先权。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及编码一种或多种甲型流感病毒神经氨酸酶(NA)抗原的载体和/或核酸构建体。本发明还涉及包含这些载体和/或核酸构建体的针对甲型流感病毒的疫苗。本发明还涉及单独或与其他保护剂组合制备和使用所述疫苗的方法。

### 背景技术

[0004] 甲型流感病毒 (IAV) 给全世界的人类和动物健康带来了沉重负担。IAV是正粘病毒 (Orthomyxoviridae) 科成员, 基于其病毒表面糖蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 将其分为不同亚型。IAV感染家禽、猪、马、猫、犬、海洋哺乳动物 (例如, 鲸)、蝙蝠和人类。野生水禽和岸禽 (鸭、鹅、天鹅和海鸥) 是天然储库, 其可以被16种不同HA和9种不同NA亚型感染 [Webster等, *Microbiol Rev* 56:152-179 (1992)]。最近, 在蝙蝠中鉴定出两种新亚型 H17N10和H18N11[Tong等, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 109 (11) :4269-4274 (2012) 和Mehle, *Viruses* 6 (9) :3438-3449 (2014) ]。病毒的种间传播最常见于野生和家养水禽之间以及猪与人之间[Nelson和Vincent, 23 (3) *Trends in Microbiol.* 142-153 (2015) ]。感染IAV的哺乳动物显示出急性呼吸道疾病, 导致气溶胶病毒传播。在水禽和家禽中, 病毒可以在呼吸道和肠道中复制, 并通过粪-口途径传播。

[0005] 一种此类IAV猪甲型流感病毒 (IAV-S) 是家猪的严重呼吸道病原体, 已证明其在经济上是昂贵的, 特别是对全世界畜牧业而言 [Holtkamp等, *The American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting* (2007) ]。此外, 猪源性流感病毒向人类的传播已有充分记录, 并构成了重大公共卫生威胁, 因此, 其提供了更大诱因来控制猪群中的甲型流感病毒[Krueger和Gray, *Curr Top Microbiol Immunol* 370:201-225 (2013) ]。

[0006] 针对这一问题, 很多养猪户现在使用可商购的疫苗为猪接种IAV-S疫苗。然而, 使用常规疫苗控制IAV-S很困难, 因为很多不同IAV-S毒株在田野共同流行并且不断进化[Gao等, *J Gen Virol* 98 (8) :2001-2010 (2017) ]。IAV-S的多样性和易变性是由病毒的遗传结构引起的。与其他甲型流感病毒一样, IAV-S具有在8个RNA区段上编码的基因和引入频繁突变的基因组复制机制。这些遗传特征使IAV-S能够快速适应, 包括避免存在因暴露于此前的毒株而诱发的中和抗体。因此, 尽管包含多达5个不同IAV-S毒株, 但已证实在美国市场上可以买到的灭活病毒IAV-S疫苗是不足的, 因为由于持续的抗原漂移导致产生了新出现的毒株。

[0007] 甲型流感病毒的分类从HA和NA的亚型开始, 其是病毒表面上的两种主要糖蛋白。HA蛋白介导病毒与宿主细胞的附着和融合。与HA结合的抗体可阻断: 病毒附着、病毒复制并减少或甚至预防疾病。神经氨酸酶是一种在流感病毒复制周期的最后阶段起作用的酶, 其通过从宿主细胞中裂解新形成的病毒颗粒, 从而使新的子代病毒传播并感染其他细胞。与

NA结合的抗体限制其酶活性,从而可以降低某些动物模型中病毒的传播水平和疾病的严重程度。

[0008] 尽管人甲型流感病毒通常在给定的流感季节在全球范围内传播1或2个优势株,但更多IAV-S毒株同时共同传播,而这些毒株在地理区域之间也有所不同。IAV-S毒株具有抗原可变性,但主要包含HA的H1或H3亚型,和NA的N1或N2亚型。在IAV-S的每个HA和NA亚型中,都存在进一步的系统发生多样性。在美国猪群中,有四个主要的H1系统发生簇(phylogenetic cluster) ( $\gamma$ 、 $\delta_1$ 、 $\delta_2$ 、大流行)、两个主要的H3簇(簇IV和人样)、两个主要的N1簇(经典、大流行)和两个主要的N2簇(N2-1998和N2-2002)。[参见,Anderson等,Influenza and other Respiratory Viruses 7(Suppl.4);42-51(2013);和Anderson等,mSphere 1(6)e00275-16:1-14(2016)]。在欧洲,有三个主要H1谱系(欧亚禽类样H1、苏格兰/410440/1994-样H1和大流行2009样H1)、一个主要H3谱系(根特/1/1984-样H3)、两个主要N1谱系(欧亚禽类样N1、大流行2009样N1)、两个主要N2谱系(根特/1/1984-样N2、苏格兰/410440/1994-样N2)和两个次要N2谱系(意大利/4675/2003样N2、人季节样N2)[Watson等,J.Virol.,89:9920-9931(2015);doi:10.1128/JVI.00840-15]。

[0009] 多年来,已在疫苗中使用多种基于载体的策略,以努力针对某些病原体产生保护作用。一种这样的载体策略包括使用 $\alpha$ 病毒衍生的复制子RNA颗粒(RP)[Vander Veen等,Anim Health Res Rev.13(1):1-9.(2012)doi:10.1017/S1466252312000011;Kamrud等,J Gen Virol.,91(Pt 7):1723-1727(2010)],其是由几种不同 $\alpha$ 病毒开发而成,包括委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)[Pushko等,Virology 239:389-401(1997)]、辛德毕斯(SIN)[Bredenbeek等,Journal of Virology 67:6439-6446(1993)]和塞姆利基森林病毒(SFV)[Liljestrom和Garoff,Biotechnology (NY) 9:1356-1361(1991)]。RP疫苗可将繁殖缺陷的 $\alpha$ 病毒RNA复制子递送到宿主细胞中,并在体内表达一种或多种所需的抗原转基因[Pushko等,Virology 239(2):389-401(1997)]。当与一些传统疫苗制剂比较时,RP具有有吸引力的安全性和功效性质[Vander Veen等,Anim Health Res Rev.13(1):1-9.(2012)]。已将RP平台用于编码致病性抗原,并且其是几种USDA许可的猪和家禽疫苗的基础。

[0010] 如上所述,可用于家猪的市销IAV-S疫苗通常无法保护畜群,因为这些抗原与田野传播的所有现代毒株均不匹配[Lee等,Can J Vet Res 71(3):207-12(2007);Vincent等,Vaccine 28(15):2782-2787(2010)]。灭活病毒抗原的常规平台受到监管和生产因素的限制,这些因素限制了针对不断发展的病毒抗原漂移而快速更新疫苗株的响应能力。对于常规灭活病毒IAV-S疫苗,病毒株的选择基于HA抗原性质。免疫应答的血清学评价类似地集中在测量针对HA的抗体。对HA抗原的相同强调也适用于市售的针对人类以及其他流感易感动物物种(例如,禽类、马、犬)的已上市灭活流感病毒疫苗。诱导HA抑制(HI)抗体效价的IAV-S疫苗可保护猪免受抗原相似毒株的实验性感染[Kyriakis等,Vet Microbiol 144(1-2):67-74(2010)]。然而,HA基因相对迅速的遗传漂移使得出现了新毒株,其不受由疫苗诱导的HA抗体的功能性抑制。

[0011] 临床研究表明,NA特异性抗体效价与人类流感疾病发病率降低之间具有统计学上显著的相关性[Memoli等,MBio 7(2):e00417-16.(2016);Monto等,J Infect Dis 212(8):1191-1199(2015);Murphy等,N Engl J Med 286(25):1329-32(1972)]。在近交系小鼠中进行的各种研究表明,NA特异性免疫可以防止攻击感染[Brett和Johansson,Virology 339

(2) :273-80 (2005); Johansson 和 Kilbourne, Proc Natl Acad Sci USA 91 (6) :2358-2361 (1994); Kilbourne 等, J Infect Dis 189 (3) :459-461 (2004)。Hessel 等 [PLoS One 5 (8), e12217 (2010)] 发现, 包含编码IAV-S NA 的重组痘病毒载体的疫苗能够部分诱导小鼠免受病毒攻击, 但痘病毒载体NA的功效不及编码相应HA基因的等效疫苗。然而, 重要的是, 不能将利用小鼠的流感能动物模型作为疫苗功效的可靠预测指标, 因为与猪、禽类和人不同, 小鼠不是甲型流感病毒的天然宿主 [Bodewes 等, Expert Rev Vaccines 9 (1) :59-72 (2010); Tripp 和 Tompkins, Curr Top Microbiol Immunol 333:397-412 (2009); Vander Veen 等, Vaccine 30 (11) :1944-1950 (2012)]。事实上, 必须首先使病毒株适应在小鼠中生长, 因为该物种对甲型流感病毒感染天然不敏感。相应地, 发病机制和疾病由体重减轻和死亡率表示, 这与天然宿主的感染参数不同。

[0012] 在鸡(流感病毒的天然宿主物种)中使用利用病毒载体的NA疫苗抵抗攻击感染进行了类似研究。鸡的NA免疫力仅能部分保护其免受感染, 并且其显著不及由等效载体HA疫苗诱导的免疫力稳健 [Nayak 等, J Virol 84 (5) :2408-2420 (2010); Pavlova 等, Vaccine 27 (5) :773-785 (2009); Sylte 等, Vaccine 25 (19) :3763-72 (2007)]。在另一种自然易感的流感病毒宿主雪貂中报告了类似结果, 向雪貂接种可溶性重组NA和/或HA蛋白, 随后进行病毒攻击 [Bosch 等, J Virol 84 (19) :10366-103674 (2010)]。这些数据在一起表明, NA免疫力只能对更关键的HA免疫力起补充和/或互补作用。的确, 似乎在没有血凝素抗原的情况下, 神经氨酸酶甲型流感病毒疫苗的效力不足以保护免于甲型流感病毒感染或保护免于甲型流感病毒引起的疾病。

[0013] 一项公开发表的研究检测了减毒伪狂犬病毒 (PrV) 载体NA疫苗在猪中对病毒攻击感染的影响 [Klingbeil 等, Virus Res 199:20-30 (2015)]。值得注意的是, PrV-NA与PrV-HA的结合并未提供对由PrV-HA本身诱导的保护作用的显著改善。研究数据确实表明, PrV-NA疫苗, 无论是单独施用还是与PrV-HA疫苗共同施用, 均可诱导针对NA蛋白的血清抗体。然而, 尽管产生了抗体, 但接种NA的猪只表现出非常轻微的病毒复制程度降低 (仅在一个取样日有统计学意义: 感染后4天)。如所预期的那样, 仅用PrV-HA载体接种的猪可诱导HI抗体应答, 但这些应答与病毒脱落更显著的减少相关 (从感染后2-6天就开始具有统计学意义)。实际上, 到目前为止, 确实没有已发表的研究表明, 在不存在相应血凝素抗原的情况下, 包含和/或编码甲型流感病毒神经氨酸酶抗原的IAV-S疫苗可以充分保护猪免受IAV-S感染。

[0014] 不应将本文引用的任何参考文献解释为承认该参考文献可作为本申请的“现有技术”。

## 发明内容

[0015] 因此, 本发明提供了编码一种或多种甲型流感病毒神经氨酸酶 (NA) 抗原的载体和/或核酸构建体。可以将这些载体和/或核酸构建体用于包含这些载体的免疫原性组合物中。本发明的免疫原性组合物可以用于疫苗中, 所述疫苗有助于保护接种的受试者 (例如, 人、伴侣动物或家畜) 免于遭受甲型流感病毒感染, 例如有助于预防甲型流感病毒感染。在特定实施方式中, 本发明的免疫原性组合物和疫苗包含一种或多种NA, 所述NA来源于甲型流感病毒, 其既不包含流感病毒血凝素 (HA) 或其抗原性片段, 也不包含编码甲型流感病毒 HA 或其抗原性片段的核苷酸序列。

[0016] 在某些实施方式中,提供了编码一种或多种人甲型流感病毒NA抗原的载体和/或核酸构建体。在其他实施方式中,载体和/或核酸构建体编码一种或多种犬流感病毒NA抗原。在另外其他实施方式中,载体和/或核酸构建体编码一种或多种马流感病毒NA抗原。在又一些其他实施方式中,载体和/或核酸构建体编码一种或多种禽类流感病毒NA抗原。在另外其他实施方式中,载体和/或核酸构建体编码一种或多种牛流感病毒NA抗原。在具体实施方式中,载体和/或核酸构建体编码两种至四种流感病毒NA抗原。

[0017] 在具体实施方式中,载体是 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,其编码来源于甲型流感病毒的一种或多种抗原。在特定实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种甲型流感病毒NA。在相关实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种甲型流感病毒NA的一个或多个抗原性片段。本发明还包括其他载体和/或核酸构建体,其编码来源于猪甲型流感病毒(IAV-S)的一种或多种抗原。在特定实施方式中,载体和/或核酸构建体还可以编码一种或多种IAV-S神经氨酸酶抗原(NA)。在相关实施方式中,载体和/或核酸构建体可以编码一种或多种NA的一个或多个IAV-S抗原性片段。

[0018] 在本发明的一个重要方面中,提供了载体和/或核酸构建体,其编码一种或多种猪甲型流感病毒(IAV-S)神经氨酸酶(NA)抗原。此类载体和/或核酸构建体可以用于包含这些载体的免疫原性组合物中。本发明的免疫原性组合物可以用于疫苗中,所述疫苗有助于保护接种的猪受试者(例如,母猪和/或仔猪)免于遭受IAV-S感染,例如有助于预防猪流感病毒感染。在特定实施方式中,免疫原性组合物和疫苗包含一种或多种NA,所述NA来源于本发明的IAV-S,其既不包含IAV-S HA或其抗原性片段,也不包含编码IAV-S HA或其抗原性片段的核苷酸序列。本发明还提供了用于激发针对IAV-S和其他疾病(例如,其他猪感染性疾病)的保护性免疫的组合疫苗。还提供了制备和使用本发明的免疫原性组合物和疫苗的方法。

[0019] 在更具体的实施方式中,载体是 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,其编码来源于IAV-S的一种或多种抗原。在特定实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种IAV-S NA。在相关实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种IAV-S NA的一个或多个抗原性片段。在特定实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种NA,所述NA来源于本发明的IAV-S,其既不包含IAV-S HA或其抗原性片段,也不包含编码IAV-S HA或其抗原性片段的核苷酸序列。

[0020] 在某些实施方式中,IAV-S NA来源于N1-经典系统发生簇。在其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA的抗原性片段。在另外其他实施方式中,IAV-S NA来源于N2-1998系统发生簇。在又一些其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-1998系统发生簇的NA的抗原性片段。在另外其他实施方式中,IAV-S NA来源于N1-大流行系统发生簇。在又一些其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-大流行系统发生簇的NA的抗原性片段。在另外其他实施方式中,IAV-S NA来源于N2-2002系统发生簇。在又一些其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-2002系统发生簇的NA的抗原性片段。

[0021] 在一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自N1-大流行(EU)谱系的NA(或其抗原性片段)。在一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自N1-欧亚禽类谱系的NA(或其抗原性片段)。

[0022] 在一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自

N2-根特/1984谱系的NA(或其抗原性片段)。在另一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自N2-意大利/2003谱系的NA(或其抗原性片段)。在又一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自N2-苏格兰/1994谱系的NA(或其抗原性片段)。在这种类型的某些实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自N2-苏格兰/1994谱系(分支1)的NA(或其抗原性片段)。在这种类型的其他实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自N2-苏格兰/1994谱系(分支2)的NA(或其抗原性片段)。在这种类型另外的其他实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自A/猪/意大利/4675/2003样N2的NA(或其抗原性片段)。在这种类型另外的其他实施方式中,IAV-S NA来源于-和/或 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来自人季节样N2的NA(或其抗原性片段)。

[0023] 在特定实施方式中,来源于N1-经典系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有95%同一性、97%同一性、98%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码。在其他实施方式中,来源于N1-大流行系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有95%同一性、97%同一性、98%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列编码。在又一些其他实施方式中,来源于N2-1998系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有92%同一性、94%同一性、97%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列编码。在又一些其他实施方式中,来源于N2-2002系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有92%同一性、94%同一性、97%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列编码。

[0024] 在特定实施方式中,来源于N1-大流行(EU)谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:12所示的核苷酸序列编码。在这种类型的相关实施方式中,NA由SEQ ID NO:23所示的核苷酸序列编码。在其他实施方式中,来源于N1-欧亚禽类谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有85%同一性、90%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:13所示的核苷酸序列编码。在又一些其他实施方式中,来源于N2-根特/1984谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:15所示的核苷酸序列编码。在这种类型的相关实施方式中,NA由SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列编码。在又一些其他实施方式中,来源于N2-意大利/2003谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列

具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列编码。在这种类型的相关实施方式中,NA由SEQ ID NO:25所示的核苷酸序列编码。在其他实施方式中,来源于N2-苏格兰/1994(分支1)谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列编码。在这种类型的相关实施方式中,NA由SEQ ID NO:26所示的核苷酸序列编码。在又一些其他实施方式中,来源于N2-苏格兰/1994(分支2)谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。在这种类型甚至更具体的实施方式中,NA由SEQ ID NO:21所示的核苷酸序列编码。在这种类型的相关实施方式中,NA由SEQ ID NO:27所示的核苷酸序列编码。

[0025] 在另外更特定的实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是委内瑞拉马脑炎(VEE) $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。在另外更具体的实施方式中,VEE $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是TC-83VEE $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。在其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是辛德毕斯(SIN) $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。在另外其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是塞姆利基森林病毒(SFV) $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。在一个替代实施方式中,裸DNA载体包含核酸构建体,其编码来源于猪病原体的一种或多种抗原。在这种类型的特定实施方式中,裸DNA载体包含核酸构建体,其编码来源于IAV-S的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,裸RNA载体包含核酸构建体,其编码来源于猪病原体的一种或多种抗原。在这种类型的特定实施方式中,裸RNA载体包含核酸构建体,其编码来源于IAV-S的NA或其抗原性片段。

[0026] 本发明提供了 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,其编码两种或更多种IAV-S抗原或其抗原性片段。在特定实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种NA,所述NA来源于本发明的IAV-S,其既不包含IAV-S HA或其抗原性片段,也不包含编码IAV-S HA或其抗原性片段的核苷酸序列。

[0027] 在具体实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码两种至四种或更多种来源于IAV-S的NA抗原或其抗原性片段。在相关实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码两种至四种或更多种来源于不同IAV-S系统发生簇的NA抗原或其抗原性片段。在某些实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段。在其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段。

[0028] 在某些实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-大流行(EU)谱系的NA或其抗原性片段和来源于N1-欧亚禽类谱系的NA或其抗原性片段。在其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-根特/1984谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-意大利/2003谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-根特/1984谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支1)谱系的NA或其抗

原性片段。在另外其他实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-根特/1984谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支2)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-意大利/2003谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支1)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-意大利/2003谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支2)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,来源于欧洲N1谱系之一的NA或其抗原性片段与来源于欧洲N2谱系之一的NA或其抗原性片段一起在α病毒RNA复制子颗粒中编码。类似地,本发明包括编码三种、四种或更多种NA的α病毒RNA复制子颗粒,每种NA来源于不同欧洲谱系。此外,本发明包括编码两种、三种、四种或更多种NA的α病毒RNA复制子颗粒,每种NA来源于不同欧洲谱系和/或系统发生簇。

[0029] 因此,本发明还提供了α病毒RNA复制子颗粒,其编码三种或四种IAV-S抗原或其抗原性片段。在具体实施方式中,免疫原性组合物包含α病毒RNA复制子颗粒,其编码三种或四种来源于IAV-S的NA抗原或其抗原性片段。在相关实施方式中,免疫原性组合物包含α病毒RNA复制子颗粒,其编码三种或四种来源于不同IAV-S系统发生簇的NA抗原或其抗原性片段。在某些实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段、来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段。在其他实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段、来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段。在其他实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段、来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段。在其他实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段、来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段。

[0030] 在具体实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码四种或更多种IAV-S NA抗原或其抗原性片段。在更具体的实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码四种或更多种来源于不同IAV-S系统发生簇的NA抗原或其抗原性片段。在甚至更具体的实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段、来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段、来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段。

[0031] 在如上所述的类似实施方式中,α病毒RNA复制子颗粒编码三种、四种或更多种IAV-S NA抗原或其抗原性片段,其来源于IAV-S N1-大流行(EU)谱系、N1-欧亚禽类谱系、NA谱系、N2-根特/1984谱系、N2-意大利/2003谱系、N2-苏格兰/1994(分支1)谱系和/或N2-苏格兰/1994(分支2)谱系。

[0032] 如上所述,本发明的所有α病毒RNA复制子颗粒可以是免疫原性组合物和/或疫苗的组分。因此,本发明的免疫原性组合物和/或疫苗可以包含一种或多种本发明的α病毒RNA复制子颗粒。在某些实施方式中,免疫原性组合物和/或疫苗仅包含一组相同的α病毒RNA复制子颗粒,其可以编码一种或多种来源于一种或多种系统发生簇和/或一种或多种谱系的NA,如上文所详述的。

[0033] 在这种类型一个更具体的实施方式中,免疫原性组合物和/或疫苗包含RNA复制子

颗粒,其编码来源于N1-系统发生簇的NA(或其抗原性片段)和来源于N2-系统发生簇的NA(或其抗原性片段)两者。特别地,免疫原性组合物和/或疫苗包含RNA复制子,其中第一NA是属于选自N1-经典和N1-大流行系统发生簇的N1-系统发生簇和第二NA是属于选自N2-1998和N2-2002系统发生簇的N2-系统发生簇。

[0034] 在这种类型更特定的实施方式中,免疫原性组合物和/或疫苗包含RNA复制子,其中第一NA是属于选自N1-大流行(EU)和N1-欧亚禽类谱系的N1-谱系和第二NA是属于选自N2-根特/1984、N2-意大利/2003、N2-苏格兰1994(分支1)谱系和N2-苏格兰1994(分支2)谱系的N2-系统发生谱系。

[0035] 本发明还提供了免疫原性组合物和/或疫苗,其包含两组或更多组此类 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。在这种类型的特定实施方式中,一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种来源于一个系统发生簇和/或谱系的NA,而另一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种来源于另一个系统发生簇和/或谱系的NA。

[0036] 在这种类型的具体实施方式中,第一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种来源于N1-系统发生簇和/或谱系的NA抗原或其抗原性片段,和第二组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种来源于N2-系统发生簇和/或谱系的NA抗原或其抗原性片段。特别地,在第一组中,NA抗原(或其片段)是属于选自N1-经典和N1-大流行系统发生簇的N1-系统发生簇,在第二组中,NA抗原(或其抗原性片段)是属于选自N2-1998和N2-2002系统发生簇的N2-系统发生簇。

[0037] 在类似、平行的实施方式中,在第一组中,NA抗原(或其片段)是属于选自N1-大流行(EU)和N1-欧亚禽类谱系的N1-系统发生谱系,在第二组中,NA抗原(或其抗原性片段)是属于选自N2-根特/1984、N2-意大利/2003、N2-苏格兰1994(分支1)谱系和N2-苏格兰1994(分支2)谱系的N2-谱系。

[0038] 在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物和/或疫苗包含编码第一抗原的一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,编码第二抗原的另一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒和编码第三抗原的第三组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。更具体地,在免疫原性组合物和/或疫苗中,抗原是选自下组的系统发生簇的NA抗原:N1-经典、N1-大流行、N2-1998和N2-2002系统发生簇,或者其是选自下组的谱系的NA抗原:N1-大流行(EU)、N1-欧亚禽类、N2-根特/1984、N2-意大利/2003、N2-苏格兰1994(分支1)谱系和N2-苏格兰1994(分支2)谱系。

[0039] 在这种类型的特定实施方式中,第一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1经典系统发生簇的NA或其抗原性片段;第二组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段;和第三组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段。

[0040] 在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物和/或疫苗包含编码第一抗原的一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,编码第二抗原的另一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,编码第三抗原的第三组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒和编码第四抗原的第四组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。

[0041] 更具体地,在免疫原性组合物和/或疫苗中,抗原是选自下组的系统发生簇的NA抗原:N1-经典系统发生簇、N1-大流行系统发生簇、N2-1998系统发生簇和N2-2002系统发生簇,或者其是选自下组的谱系的NA抗原:N1-大流行(EU)谱系、N1-欧亚禽类谱系、N2-根特/1984谱系、N2-意大利/2003谱系、N2-苏格兰1994(分支1)谱系和N2-苏格兰1994(分支2)谱

系。

[0042] 在这种类型的特定实施方式中,第一组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段;第二组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段;第三组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段;和第四组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段。

[0043] 因此,在本发明的一个方面中,免疫原性组合物/疫苗包含多组(例如,2-10组) $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。在这种类型的特定实施方式中,一组或多组包含 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,其编码一种或多种来源于一个或多个系统发生簇(或其抗原性片段)或谱系(或其抗原性片段)的IAV-S NA。在这种类型的具体实施方式中,免疫原性组合物包含一组或多组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,其编码一种或多种来源于一个或多个系统发生簇(或其抗原性片段)或谱系(或其抗原性片段)的IAV-S NA,联合一组或多组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,其编码一种或多种非-IAV-S抗原或其抗原性片段。在甚至更具体的实施方式中,一组或多组 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码一种或多种来源于一个或多个系统发生簇(或其抗原性片段)或谱系(或其抗原性片段)的IAV-S NA和编码一种或多种非-IAV-S抗原或其抗原性片段。在这种类型的具体实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段和/或来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段,以及一种至三种非-IAV-S抗原或其抗原性片段。

[0044] 在特定实施方式中,非-IAV-S抗原来源于猪繁殖与呼吸综合征病毒(PPRS)。在其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于猪圆环病毒(PCV)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于可传播的胃肠炎病毒(TGE)。在又一些其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于猪伪狂犬病毒(PPRV)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于猪细小病毒(PPV)。在又一些其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于猪轮状病毒(PRV)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于猪流行性腹泻病毒(PED)。在又一些其他实施方式中,一种或多种非-IAV-S抗原来源于多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)的一个或多个血清型。在另外其他实施方式中,一种或多种非-IAV-S抗原来源于沙门氏菌属种(*Salmonella* ssp)的一个或多个血清型。在又一些其他实施方式中,一种或多种非-IAV-S抗原来源于大肠杆菌的一个或多个血清型。在另外其他实施方式中,一种或多种非-IAV-S抗原来源于副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)的一个或多个血清型。在又一些其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于胞内劳森菌(*Lawsonia intracellularis*)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于支原体属种(*Mycoplasma* ssp)(例如,猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*))。在又一些其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于丹毒菌属种(*Erysipelatospirillum* ssp)。在又一些其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于弯曲杆菌属种(*Campylobacter* ssp)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。在又一些其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)。在另外其他实施方式中,非-IAV-S抗原来源于艰难梭菌(*Clostridium difficile*)。

[0045] 在更特定的实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是委内瑞拉马脑炎(VEE) $\alpha$ 病毒RNA

复制子颗粒。在另外更具体的实施方式中,VEE $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是TC-83 VEE $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒。

[0046] 本发明还提供了联合免疫原性组合物和/或疫苗(多价疫苗),其包含编码一种或多种来源于IAV-S的NA或其抗原性片段的 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,如上所述,以及还包含一种或多种经修饰的活/减毒或灭活猪病原体。在特定实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活PRRS病毒。在其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活PCV。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活TGE。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活PPRV。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活PPV。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活PRV。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活PED。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活多杀性巴氏杆菌的血清型。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活沙门氏菌属种的血清型。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活大肠杆菌的血清型。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活副猪嗜血杆菌。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活胞内劳森菌。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活支原体属种(例如,猪肺炎支原体)。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活支气管败血波氏杆菌。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活丹毒菌属种。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活弯曲杆菌属种。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活胸膜肺炎放线杆菌。在另外其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活产气荚膜梭菌。在又一些其他实施方式中,免疫原性组合物还包含一种或多种经修饰的活/减毒和/或灭活艰难梭菌。

[0047] 在特定实施方式中,本发明的核酸构建体编码一种或多种来源于IAV-S系统发生簇的NA或其抗原性片段。因此,尽管下面具体示例了 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,但是应当理解的是,本发明还包括其他载体和/或核酸构建体。

[0048] 因此,在某些实施方式中,核酸构建体编码来源于N1-经典系统发生簇的IAV-S NA。在其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N1-经典系统发生簇的NA的抗原性片段。在另外其他实施方式中,IAV-S NA来源于N2-1998系统发生簇。在又一些其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N2-1998系统发生簇的NA的抗原性片段。在另外其他实施方式中,IAV-S NA来源于N1-大流行系统发生簇。在又一些其他实施方式中, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒编码来源于N1-大流行系统发生簇的NA的抗原性片段。在另外其他实施方式中,IAV-S NA来源于N2-2002系统发生簇。在又一些其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-2002系统发生簇的NA的抗原性片段。

[0049] 在一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于来自N1-大流行(EU)谱系的NA。在一个类

似实施方式中,IAV-S NA来源于来自N1-欧亚禽类谱系的NA。在一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于来自N2-根特/1984谱系的NA。在另一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于N2-意大利/2003谱系。在又一个类似实施方式中,IAV-S NA来源于N2-苏格兰/1994谱系。在这种类型的某些实施方式中,IAV-S NA来源于N2-苏格兰/1994谱系(分支1)。在这种类型的其他实施方式中,IAV-S NA来源于N2-苏格兰/1994谱系(分支2)。

[0050] 在特定实施方式中,来源于N1-经典系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有95%同一性、97%同一性、98%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。在其他实施方式中,来源于N1-大流行系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有95%同一性、97%同一性、98%同一性或更高同一性的氨基酸序列。这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在又一些其他实施方式中,来源于N2-1998系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有92%同一性、94%同一性、97%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在又一些其他实施方式中,来源于N2-2002系统发生簇的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列具有92%同一性、94%同一性、97%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0051] 在特定实施方式中,来源于N1-大流行(EU)谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在其他实施方式中,来源于N1-欧亚禽类谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有85%同一性、90%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。在又一些其他实施方式中,来源于N2-根特/1984谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。在又一些其他实施方式中,来源于N2-意大利/2003谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。在其他实施方式中,来源于N2-苏格兰/1994(分支1)谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在又一些其他实施方式中,来源于N2-苏格兰/1994(分支2)谱系的IAV-S NA包含与SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列具有90%同一性、92%同一性、95%同一性或更高同一性的氨基酸序列。在这种类型更具体的实施方式中,NA包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列。

[0052] 本发明提供了核酸构建体,其编码两种或更多种IAV-S抗原或其抗原性片段。在具体实施方式中,核酸构建体编码两种至四种或更多种来源于IAV-S的NA抗原或其抗原性片段。在相关实施方式中,核酸构建体编码两种至四种或更多种来源于不同IAV-S系统发生簇的NA抗原或其抗原性片段。在某些实施方式中,核酸构建体编码来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段。在甚至更具体的

实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-2002系统发生簇的NA或其抗原性片段,来源于N2-1998系统发生簇的NA或其抗原性片段,来源于N1-大流行系统发生簇的NA或其抗原性片段和来源于N1-经典系统发生簇的NA或其抗原性片段。

[0053] 在某些实施方式中,核酸构建体编码来源于N1-大流行(EU)谱系的NA或其抗原性片段和来源于N1-欧亚禽类谱系的NA或其抗原性片段。在其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-根特/1984谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-意大利/2003谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-根特/1984谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支1)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-根特/1984谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支2)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-意大利/2003谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支1)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,核酸构建体编码来源于N2-意大利/2003谱系的NA或其抗原性片段和来源于N2-苏格兰/1994(分支2)谱系的NA或其抗原性片段。在另外其他实施方式中,来源于欧洲N1谱系之一的NA或其抗原性片段与来源于欧洲N2谱系之一的NA或其抗原性片段一起在同一核酸构建体中编码。类似地,本发明包括编码三种、四种或更多种NA的核酸构建体,每种NA来源于不同欧洲谱系。此外,本发明包括编码两种、三种、四种或更多种NA的核酸构建体,每种NA来源于不同欧洲谱系和/或系统发生簇。

[0054] 因此,本发明还包括本发明的所有 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,包含本发明的核酸构建体的裸DNA载体,包含本发明的核酸构建体的裸RNA载体,包含合成信使RNA和RNA复制子的本发明的核酸构建体,以及所有免疫原性组合物和/或疫苗,其包含本发明的核酸构建体(例如,合成信使RNA、RNA复制子)、 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒、裸RNA载体和/或裸DNA载体。

[0055] 本发明还包含疫苗(多价疫苗),其包含本发明的免疫原性组合物。在特定实施方式中,疫苗是无佐剂疫苗。在其他实施方式中,疫苗包含佐剂。在特定实施方式中,佐剂是可生物降解的油。在这种类型的具体实施方式中,可生物降解的油是d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯(维生素E乙酸酯)。在其他实施方式中,佐剂包含具有2.5%-50%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在具体实施方式中,佐剂包含具有2.5%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在相关实施方式中,佐剂包含具有5%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在其他实施方式中,佐剂包含具有12.5%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在另外其他实施方式中,佐剂包含具有25%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在又一些其他实施方式中,佐剂包含具有50%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在更具体的实施方式中,佐剂包含可降解的油与矿物油佐剂的混合物。具体实施方式中,可降解的油是d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯和矿物油是液体石蜡。在更具体的实施方式中,可降解的油是d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯和矿物油是轻质液体石蜡。

[0056] 在某些实施方式中,疫苗有助于预防IAV-S引起的疾病。在相关实施方式中,当使用疫苗免疫猪时,在猪受试者中诱导抗体。在某些实施方式中,猪受试者是母猪。在相关实施方式中,疫苗向接种母猪的后代提供保护性母源抗体。在其他实施方式中,猪受试者是仔猪。在这种类型的特定实施方式中,向最小3日龄的仔猪施用疫苗。在具体实施方式中,作为加强疫苗施用疫苗。在某些实施方式中,作为单剂疫苗施用疫苗。在这种类型的具体实施方式中,作为加强疫苗施用疫苗。在又一些其他实施方式中,作为多剂疫苗施用疫苗。在这种类型的具体实施方式中,作为两剂疫苗施用疫苗。

[0057] 本发明还提供了针对猪病原体免疫猪(例如,母猪或仔猪)的方法,其包括向猪施用免疫有效量的本发明的疫苗或多价疫苗。在特定实施方式中,通过肌内注射施用疫苗。在替代实施方式中,通过皮下注射施用疫苗。在其他实施方式中,通过静脉内注射施用疫苗。在另外其他实施方式中,通过皮内注射施用疫苗。在又一些其他实施方式中,通过口服施用施用疫苗。在另外其他实施方式中,通过鼻内施用施用疫苗。

[0058] 因此,本发明的疫苗和多价疫苗可以作为初免疫苗和/或加强疫苗施用。在具体实施方式中,本发明的疫苗是作为一次注射疫苗(一个剂量)施用的,不需要后续施用。在某些实施方式中,在施用初免疫苗和加强疫苗两者的情况下,可以以相同途径施用初免疫苗和加强疫苗。这种类型的某些实施方式中,初免疫苗和加强疫苗均通过皮内注射施用。在这种类型的其他实施方式中,初免疫苗和加强疫苗均通过肌内注射施用。在替代实施方式中,在施用初免疫苗和加强疫苗两者的情况下,初免疫苗的施用可以通过一种途径进行和加强疫苗可以通过另一种途径施用。在这种类型的某些实施方式中,初免疫苗可以通过皮内注射施用和加强疫苗可以口服施用。在这种类型的相关实施方式种,初免疫苗可以通过肌内注射施用和加强疫苗可以口服施用。在这种类型的其他实施方式中,初免疫苗可以通过肌内注射施用和加强疫苗可以通过皮内注射施用。在这种类型另外的其他实施方式中,初免疫苗可以通过皮内注射施用和加强疫苗可以通过肌内注射施用。

[0059] 本发明还提供了针对IAV-S免疫猪(例如,母猪或仔猪)的方法,其包括向猪施用免疫有效量的上文所述的本发明疫苗。在特定实施方式中,疫苗可以包含约 $1 \times 10^4$ 至约 $1 \times 10^{10}$ 个RP或更多RP,例如。在更特定的实施方式中,疫苗可以包含约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^9$ 个RP。在甚至更特定的实施方式中,疫苗可以包含约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^8$ 个RP。

[0060] 在特定实施方式中,本发明的疫苗以0.05mL至3mL剂量施用。在更特定的实施方式中,所施用的剂量是0.1mL至2mL。在另外更特定的实施方式中,所施用的剂量是0.2mL至1.5mL。在甚至更特定的实施方式中,所施用的剂量是0.3mL至1.0mL。在另外更特定的实施方式中,所施用的剂量是0.4mL至0.8mL。

[0061] 通过参考下述附图和具体实施方式,将更好地理解本发明的这些和其他方面。

## 附图说明

[0062] 图1A-1D显示了对下文实施例1中描述的疫苗组合物的所有四个NA毒株具有特异性的血清神经氨酸酶抑制(NI)抗体应答。在第一次接种前(3周龄)、第二次接种前(6周龄)和攻击前(9周龄)收集血清样品。

[0063] 图2A和2B描述了施用下文实施例1中描述的疫苗组合物,以及使用(A)H1-γ-N1-经典或(B)H1-δ1-N2-2002A病毒攻击感染后的猪肺病变评分。

[0064] 图3A和3B描述了施用下文实施例1中描述的疫苗组合物,以及使用(A)H1-γ-N1-经典或(B)H1-δ1-N2-2002A病毒攻击感染后的猪鼻拭子样品中的病毒滴度。

[0065] 图4A和4B描述了施用下文实施例1中描述的疫苗组合物,以及使用(A)H1-γ-N1-经典或(B)H1-δ1-N2-2002A病毒攻击感染后的猪支气管肺泡灌洗液标本中的病毒滴度。

[0066] 图5描述了对实施例2中描述的疫苗组合物的N1-经典毒株具有特异性的血清神经氨酸酶抑制(NI)抗体应答。在第一次接种前(3周龄)、第二次接种前(7周龄)和攻击前(10周龄)收集血清样品。

[0067] 图6显示了施用实施例2中描述的疫苗组合物,以及使用H1-γ-N1-经典病毒攻击感染后的猪肺病变评分。

[0068] 图7描述了感染H1N2病毒后5天时的宏观肺病变百分比。

[0069] 图8描述了使用H1N2病毒感染后的鼻脱落情况。

[0070] 图9显示了接种后针对N2<sub>2002</sub>疫苗分级的神经氨酸酶抑制(NI)效价。注:DPV=接种后天数

## 具体实施方式

[0071] 本发明提供了包含免疫有效量的一种或多种α病毒RNA复制子颗粒的疫苗和免疫原性组合物,所述α病毒RNA复制子颗粒编码来自一个或多个甲型流感病毒血清型的一种或多种神经氨酸酶(NA)。在本发明的一个方面中,疫苗和免疫原性组合物既不包含血凝素(HA)或其抗原性片段,也不包含编码HA或其抗原性片段的核苷酸序列。基于多种NA且不含HA的甲型流感病毒疫苗的一个优势是,与HA相比,NA受到抗原漂移的影响较小,这使相应的疫苗能够包含来自较少流感分离株的抗原。这样既节省了生产成本,又延长了更新特定流感疫苗所需的时间。此外,因为当前市售的甲型流感病毒疫苗基于灭活的流感病毒,在动物受试者中产生的HA抗体效价比NA抗体高得多,所以针对基于NA的疫苗应显著减少母源抗体对动物受试者后代免疫的负面作用。

[0072] 在本发明的一个重要方面中,提供了疫苗和免疫原性组合物,其包含免疫有效量的一种或多种α病毒RNA复制子颗粒,所述α病毒RNA复制子颗粒编码来自一个或多个猪甲型流感病毒(IAV-S)系统发生簇和/或谱系的一种或多种神经氨酸酶(NA)。在本发明的一个方面中,疫苗和免疫原性组合物既不包含IAV-S血凝素(HA)或其抗原性片段,也不包含编码IAV-S HA或其抗原性片段的核苷酸序列。

[0073] 如上所述,基于多种NA和不含HA的IAV-S能够使相应的疫苗包含来自更少IAV-S分离株的抗原。这节省了生产成本,以及延长了更新给定IAV-S疫苗所需的时间。此外,因为当前市售的IAV-S疫苗基于灭活的流感病毒,在动物受试者中产生的HA抗体效价比NA抗体高得多,所以针对基于神经氨酸酶的疫苗应显著减少母源抗体对仔猪免疫的负面作用。

[0074] 为了更充分地理解本发明,提供了以下定义。

[0075] 为了便于描述所使用的单数形式的术语并非旨在是限制性的。因此,例如,提及组合物包含“一种多肽”时包括提及一种或多种此类多肽。另外,除非另有说明,提及“α病毒RNA复制子颗粒”包括提及多种此类α病毒RNA复制子颗粒。

[0076] 如在本文中所使用的,术语“大约(approximately)”与“约(about)”可以互换使用,表示在所示值百分之五十以内的值,即每毫升含有“约” $1 \times 10^8$ 个α病毒RNA复制子颗粒的组合物含有每毫升 $5 \times 10^7$ 至 $1.5 \times 10^8$ 个α病毒RNA复制子颗粒。

[0077] 如在本文中所使用的,除非另有明示,术语“猪(pig)”或“猪(swine)”或“猪(porcine)”可以互换使用,并且包括所有驯化的猪种。

[0078] 如在本文中所使用的,“系统发生簇”是一组流感病毒神经氨酸酶,它们已在植根于相似(同源)祖先的系统发生树或进化树中分组在一起(在同一分支上)(参见,实施例5)。对于在美国发现的IAV-S神经氨酸酶(NA),有两个主要的N1系统发生簇N1-经典和N1-大流行,以及两个主要的N2系统发生簇N2-1998和N2-2002。N1经典系统发生簇包含与H1N1经典

猪流感病毒的NA组合在一起的NA。N1大流行系统发生簇包含与来自H1N1大流行流感病毒的NA组合在一起的NA。N2-1998系统发生簇包含与人H3N2流感病毒的NA(其在1998年跳入猪中)组合在一起的NA,而N2-2002系统发生簇包含与人H3N2流感病毒的NA(其在2002年跳入猪中)组合在一起的NA。[参见,Anderson等,Influenza and other Respiratory Viruses 7(Suppl.4):42-51(2013)]。实施例5提供了用于进行系统发生簇确定的方法学。对于N1-经典、N1-大流行、N2-1998、N2-2002的美国IAV-S NA系统发生簇,对应的代表性神经氨酸酶分别具有下述氨基酸序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8。

[0079] 如在本文中所使用的,“谱系”是一组流感病毒神经氨酸酶,它们已在植根于相似(同源)祖先的进化树中分组在一起(在同一分支上)(参见,下文实施例6)。已对欧洲神经氨酸酶进行了这些分组,其类似于美国的系统发生簇,但不是相同的。如下文实施例6中所描述的,可以使用易于获得的软件(即,MEGA X)获得谱系的确定结果。对于N1-大流行(EU)、N1-欧亚禽类、N2-根特/1984、N2-意大利/4675/2003、N2-苏格兰/1994分支1或N2-苏格兰/1994分支2的EU IAV-S NA谱系,对应的代表性神经氨酸酶分别具有下述氨基酸序列SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20和22。

[0080] 如在本文中所使用的,术语“复制子”指缺少一个或多个元件(例如,结构蛋白的编码序列)的经修饰的RNA病毒基因组,如果这些元件存在,其将能够使亲本病毒在细胞培养物或动物宿主中成功繁殖。在适宜细胞环境中,复制子将自身扩增并可以产生一种或多种亚基因组RNA种类(species)。

[0081] 如在本文中所使用的,术语“ $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒”(简称为“RP”)是一种包装在病毒结构蛋白(例如,衣壳和糖蛋白)中的 $\alpha$ 病毒衍生的复制子,所述病毒结构蛋白也来源于 $\alpha$ 病毒,例如如在Pushko等[Virology 239(2):389-401(1997)]中所描述的。RP无法在细胞培养物或动物宿主中繁殖(无辅助质粒或类似组分的情况下),因为复制子不编码 $\alpha$ 病毒结构组分(例如,衣壳和病毒糖蛋白)。

[0082] 术语“非-IAV-S”用于修饰术语如病原体和/或抗原(或免疫原),以表示分别的病原体和/或抗原(或免疫原)既不是IAV-S病原体,也不是IAV-S病原体(或免疫原),并且非-IAV-S蛋白抗原(或免疫原)不来源于IAV-S。

[0083] 针对给定蛋白抗原和天然编码其的病原体或该病原体的毒株,术语“来源于(originate from; originates from; originating from)”、可以互换使用,如在本文中所使用的,表示由该病原体或该病原体的毒株编码的给定蛋白抗原的未经修饰和/或截短的氨基酸序列。针对来源于病原体的蛋白抗原的本发明核酸构建体中的编码序列可能已经过遗传操纵,以导致相对于其所来源的病原体或病原体株(包括天然减毒株)中蛋白抗原的相应编码序列,所表达的蛋白抗原具有氨基酸序列修饰和/或截短。

[0084] 如在本文中所使用的,术语“保护”、或“提供对……的保护”、或“激发对……的保护性免疫”、和“有助于保护”不需要对感染的任何迹象提供全面的保护。例如,“有助于保护”可以指保护作用是足够的,使得在受到攻击后,至少可以减轻潜在感染的症状,和/或减轻和/或消除引起症状的一种或多种潜在细胞、生理或生化原因或机制。应当理解的是,如在本文中所使用的,“减轻”指相对于感染的状态,包括感染的分子状态,而不仅仅是感染的生理状态。

[0085] 如在本文中所使用的,“疫苗”是适于向动物应用的组合物,例如猪(在某些实施方

式中,包括人,而在其他实施方式中,特异性不是用于人的),所述组合物包含通常与药学上可接受的载体(如含有水的液体)组合的一种或多种抗原,在向动物施用后能够诱导足够强的免疫应答,使其至少能够帮助保护动物免受野生型微生物感染引起的疾病的侵害,即强度足以帮助预防疾病和/或预防、改善或治愈疾病。

[0086] 如在本文中所使用的,多价疫苗是包含两种或多种不同抗原的疫苗。在这种类型的一个特定实施方式中,多价疫苗针对两种或多种不同病原体刺激受体的免疫系统。

[0087] 术语“佐剂”和“免疫刺激剂”在本文中可以互换使用,并将其定义为引起免疫系统刺激的一种或多种物质。在这一背景下,将佐剂用于增强对一种或多种疫苗抗原/分离物的免疫应答。因此,“佐剂”是非特异性增加对特定抗原的免疫应答,从而减少任何给定疫苗中必需的抗原量和/或为了产生对感兴趣抗原的充分免疫应答所必需的注射频率的药剂。在这一背景下,将佐剂用于增强对一种或多种疫苗抗原/分离物的免疫应答。

[0088] 如在本文中所使用的,“无佐剂疫苗”是不含佐剂的疫苗或多价疫苗。

[0089] 如在本文中所使用的,术语“药学上可接受的”作为形容词用于表示所修饰的名词是适用于药品的。例如,当将其用于描述药物疫苗中的赋形剂时,其表征了该赋形剂是与组合物中的其他成分具有相容性,并且对目标受体动物(例如,猪)无不利的有害作用。

[0090] “胃肠外施用”包括皮下注射、粘膜下注射、静脉内注射、肌内注射、皮内注射和输注。

[0091] 如在本文中所使用的,针对特定蛋白(例如,蛋白抗原)的术语“抗原性片段”指该蛋白具有抗原性的片段,即能够与免疫系统的抗原识别分子(如免疫球蛋白(抗体)或T细胞抗原受体)发生特异性的相互作用。例如,IAV-S神经氨酸酶(NA)的抗原性片段是具有抗原性的NA蛋白的片段。优选地,本发明的抗原性片段对抗体和/或T细胞受体识别具有免疫优势。在特定实施方式中,针对给定蛋白抗原的抗原性片段是保留全长蛋白抗原性的至少25%的该蛋白的片段。在优选的实施方式中,抗原性片段保留了全长蛋白抗原性的至少50%。在更优选的实施方式中,抗原性片段保留了全长蛋白抗原性的至少75%。抗原性片段可以小至20个氨基酸,或者在另一个极端,其是全长蛋白中仅缺失一个氨基酸的大片段。在特定实施方式中,抗原性片段包含25至150个氨基酸残基。在其他实施方式中,抗原性片段包含50至250个氨基酸残基。

[0092] 如在本文中所使用的,当两条序列的氨基酸残基相同时,一条氨基酸序列与另一条氨基酸序列是100%“相同的”或具有100%“同一性”。因此,当两条氨基酸序列50%的氨基酸残基相同时,一条氨基酸序列与另一条氨基酸序列是50%“相同的”。序列比较是在给定蛋白(例如,所比较的蛋白或多肽的一部分)包含的氨基酸残基的连续嵌段上进行的。在一个特定的实施方式中,考虑了可能改变两条氨基酸序列之间对应性的选定的缺失或插入。

[0093] 如在本文中所使用的,可以使用C, MacVector (MacVector, Inc. Cary, NC 27519)、Vector NTI (Informax, Inc. MD)、Oxford Molecular Group PLC (1996) 和Clustal W算法,利用默认比对参数和针对同一性的默认参数确定核苷酸和氨基酸序列的同一性百分比。还可以使用相同或相似的默认参数,将这些可购买获得的程序用于确定序列相似性。或者,可以使用默认过滤条件下的高级Blast检索,例如使用默认参数的GCG (Genetics Computer Group, GCG软件包程序手册,第7版,Madison, Wisconsin) 累积程序。

[0094] 如在本文中所使用的,术语“灭活的”微生物可以与“杀死的”微生物互换使用。出于本发明的目的,“灭活的”微生物是能够在动物中激发免疫应答,但不能感染动物的生物体。可以采用选自下述的药剂将本发明的抗原(例如,灭活的猪肺炎支原体)灭活:二乙烯亚胺、福尔马林、 $\beta$ -丙内酯、硫柳汞或加热。在一个特定的实施方式中,使用二乙烯亚胺将灭活的猪肺炎支原体与本发明RP的组合灭活。

[0095] 本发明还提供了针对多种猪病原体的疫苗。例如,可以将用于猪疫苗的蛋白抗原或其抗原性片段的编码序列,或此类蛋白抗原编码序列的组合加入到 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒(RP)中和/或在与编码疫苗中来源于IAV-S的NA的RP相同的RP中组合。可以作为一种或多种蛋白抗原或其抗原性片段来源的病原体的实例包括猪繁殖与呼吸综合征病毒(PPRS)、猪圆环病毒(PCV)、可传播的胃肠炎病毒(TGE)、猪伪狂犬病病毒(PPRV)、猪细小病毒(PPV)、猪轮状病毒(PRV)、猪流行性腹泻病毒(PED)、多杀性巴氏杆菌的多个血清型、沙门氏菌属种、大肠杆菌,例如(血清型K99、K88、987P或F41)、副猪嗜血杆菌、胞内劳森氏菌、支原体属种(例如,猪肺炎支原体)、支气管败血波氏杆菌、丹毒菌属种、弯曲杆菌属种、胸膜肺炎放线杆菌、产气荚膜梭菌和艰难梭菌。

[0096] 此外,本发明提供了包含本发明的一种或多种RP与编码一种或多种这些猪抗原的一种或多种其他载体(例如,编码来自猪圆环病毒-2(PCV-2)和/或猪圆环病毒-3(PCV-3)的ORF-2蛋白的杆状病毒载体)和/或来源于一种或多种这些猪病原体的灭活类毒素组合的疫苗。此外,此类疫苗可以包括编码本发明疫苗中来源于IAV-S的NA的任何 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,以及一种或多种杀死和/或修饰的(减毒的)活猪病毒分离株和/或猪细菌。所有此类多价疫苗均包括在本发明中。

[0097] 因此,可以将编码来源于IAV-S的一种或多种NA的一种或多种 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒(RP)与编码下述的一种或多种其他载体一起添加:一种或多种猪抗原和/或一种或多种杀死和/或经修饰(减毒)的活病毒分离株,如一种或多种杀死或修饰的活IAS-V毒株、一种或多种杀死和/或修饰的活PPRS病毒、一种或多种杀死和/或修饰的活PCV、一种或多种杀死和/或修饰的活TGE、一种或多种杀死和/或修饰的活PPRV、一种或多种杀死和/或修饰的活PPV、一种或多种杀死和/或修饰的活PRV和一种或多种杀死和/或修饰的活PED。此外,可以将编码来源于IAV-S的一种或多种NA的一种或多种 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒(RP)与编码一种或多种猪抗原的一种或多种其他载体一起添加和/或与也能够感染猪的一种或多种杀死和/或修饰(减毒)的活细菌一起添加,包括一种或多种杀死和/或修饰的活多杀性巴氏杆菌(多个血清型的一个或多个)、沙门氏菌属种、大肠杆菌(多个血清型的一个或多个)、副猪嗜血杆菌、胞内劳森氏菌、支原体属种(例如,猪肺炎支原体)、支气管败血波氏杆菌、丹毒菌属种、弯曲杆菌属种、胸膜肺炎放线杆菌、产气荚膜梭菌和艰难梭菌。

[0098] 可以将本发明的 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒冻干,并用无菌水稀释剂重新水化。另一方面,当将 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒单独储存,但意欲在施用前与其他疫苗组分混合时,可以将 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒储存在那些组分的稳定溶液(例如,高蔗糖溶液)中。

[0099] 在一个方面中,本发明的疫苗可以包含佐剂。在某些实施方式中,佐剂是可生物降解的油。在特定制剂中,可生物降解的油是d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯(维生素E乙酸酯)。在其他制剂中,佐剂包含含2.5%至50%(v/v)矿物油的水包油乳剂。在更特定的制剂中,佐剂包含水包油乳剂,其含有5%至25%矿物油。在相关制剂中,佐剂是两种组分的混合物。第一组分由

平均尺寸(以体积计)约1μm的矿物油滴组成,使用聚山梨醇酯80(聚氧乙烯(20)山梨糖醇单油酸酯)水溶液对其进行稳定。第一组分可以包含25重量%矿物油和1重量%聚山梨醇酯80,余量为水。第二组分可以由大约平均尺寸(以体积计)约400nm的可生物降解的d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯液滴组成,也使用聚山梨醇酯80对其进行稳定。特定制剂包含15重量%d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯和6重量%聚山梨醇酯80,余量为水。在特定实施方式中,佐剂是X-SOLVE<sup>TM</sup>(其是两个组分佐剂的组合:基于d1- $\alpha$ -生育酚乙酸酯的DILUVAC FORTE<sup>TM</sup>和基于轻质液体石蜡的MICROSOL<sup>TM</sup>,[参见例如,US 8,597,662])。在相关制剂中,佐剂含有亚微米尺寸的油滴和可生物降解的油滴,其中可生物降解油滴的平均尺寸不同于矿物油滴的平均尺寸[参见例如,US 9,084,768]。

[0100] 本发明的疫苗可以通过任何标准途径容易地施用,包括静脉内、肌内、皮下、口服、鼻内、皮内和/或腹腔内接种。本领域技术人员将意识到,疫苗组合物优选地针对每种类型的受体动物和施用途径适当地配制。

[0101] 因此,本发明还提供了针对IAV-S和/或其他猪病原体免疫猪的方法。一种这样的方法包括向猪注射免疫学有效量的本发明的疫苗,以使得猪产生适当的IAV-S抗体。

[0102] 还应理解的是,本发明不限于本文公开的特定构造、工艺步骤和材料,因为此类构造、工艺步骤和材料可以有所变化。还应理解的是,本文所采用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而并非旨在限制本发明,因为本发明的范围将仅由所附权利要求及其等同方案限制。

[0103] 序列表<sup>1</sup>

[0104]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>描述</u>               | <u>类型</u> |
|-------------------|-------------------------|-----------|
| 1                 | N1-经典(密码子优化)            | 核酸        |
| 2                 | N1-经典                   | 氨基酸       |
| 3                 | N1-大流行(密码子优化)           | 核酸        |
| 4                 | N1-大流行                  | 氨基酸       |
| 5                 | N2-1998(密码子优化)          | 核酸        |
| 6                 | N2-1998                 | 氨基酸       |
| 7                 | N2-2002(密码子优化)          | 核酸        |
| 8                 | N2-2002                 | 氨基酸       |
| 9                 | ggcgccgcacc             | 核酸        |
| 10                | ttaattaa                | 核酸        |
| 11                | N1-大流行(EU)              | 核酸        |
| 12                | N1-大流行(EU)              | 氨基酸       |
| 13                | N1-欧亚禽类                 | 核酸        |
| 14                | N1-欧亚禽类                 | 氨基酸       |
| 15                | N2-根特/1984              | 核酸        |
| 16                | N2-根特/1984              | 氨基酸       |
| 17                | N2-意大利/4675/2003        | 核酸        |
| 18                | N2-意大利/4675/2003        | 氨基酸       |
| 19                | N2-苏格兰/1994(分支1)        | 核酸        |
| 20                | N2-苏格兰/1994(分支1)        | 氨基酸       |
| 21                | N2-苏格兰/1994(分支2)        | 核酸        |
| 22                | N2-苏格兰/1994(分支2)        | 氨基酸       |
| 23                | N1-大流行(EU)(密码子优化)       | 核酸        |
| 24                | N2-根特/1984(密码子优化)       | 核酸        |
| 25                | N2-意大利/4675/2003(密码子优化) | 核酸        |
| 26                | N2-苏格兰/1994(分支1)(密码子优化) | 核酸        |
| 27                | N2-苏格兰/1994(分支2)(密码子优化) | 核酸        |

[0105] <sup>1</sup>核苷酸序列仅作为DNA序列提供,但应当理解的是,当序列包含在RNA构建体中时,应使用相应的RNA序列(用尿嘧啶“u”代替胸腺嘧啶“t”)。

[0106] 序列

[0107] N1-经典(SEQ ID NO:1)

[0108] atgaatactaatcaaaggatcattaccatggacagtctgcatgattgtcggtatcatctctttt  
gcttcagattggaaacattgtctacttgaggattgcattcaattcagacggatggagaatcacactgagatg  
tgcaatcaaagtgtcattacttatgtcaataaacacttgggtgaaccggacttatgtgaacattagcaatataaga  
ttgcaactattcaagatgtgacttagtatcatttggccggaaattctagtcttgcccgggtcagggtggctgt  
ctacagcaaagacaatagcattaggattggatcaaaagggacatttcgtcattagagagccttcatctcatgc  
tcacaattggagtgccggaccttctgacccaagggcattgctgaatgacaaacattcaatggtaccgtca  
aggacaggagtccatatagaaccctgtatgagctgccctatcggtgaggcccctcgccatacaactcacggttcga  
atctgtcgcatggtcagcatctgctgtcatgtatggatggatggcttacaatcggtcagtggaccggataat  
ggtgcgtcgacttggaaatacaacggatcattacagatacaatcttgaggacaagattcttagaa  
ctcaagaatcagagtgtgtatgaacggatcatgtttacagtcttgacagatggcccaagcaatggacaagc  
ctcttacaaaatcttaaggtggaaaagggaaagattatcaagtcgattgagctggatcccccaattaccactat

gaagaatgcttttatccagatactggcaaagtcatgtgtctgccggacaattggcacgcctaaaccggc  
catgggtgtcggtcaatcagaatcttactatcaaattggatacattgtctggagtcattggatataccctag  
atccaatgtatggaaaggcaattgtggccggcattttcaatggagcaatggagtgaaaggttctcatatcg  
tatggaaatgggtgtggattggtcggaccaagtcaatcaactctcggtcggtttgagatgattggatccga  
atggatggactgagacagattcatcattctcgatgaagcaggacattatcgcttaatgattggatggactc  
gggatctttgtccaacatccggagctactggatgaattgcattaggcattttctgggtgaaattgatcaga  
ggcaacccaaggaaagcactatctggctagcggtccagcatctcattctgtggcgtcaattcgaaaccgctt  
cctgggtttggccagacggagctgatctgccattcaccattgacaag

[0109] N1-经典 (SEQ ID NO:2)

[0110] MNTNQRIITIGTVCIVGIISLLQIGNIVSLWISHSIQTGWENHTEMCNQSVITYVNNTWVNRTYVNI  
SNIKIATIQDVTSIILAGNSSLCPVSGAWYSKDNSIRIGSKGDIFVIREPFISCSQLECRTFFLTQGALLNDKHSN  
GTVKDRSPYRTLMSCPIGEAPSPYNRFESVAWSASACHDGMGWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGLITDTIKSWRNKI  
LRTQESECVCMNGSCFTVLTDGPSNGQASYKIFKVEKGKIIKSIELDAPNYHYEECSCYPDGTKVMCVRDNWHASN  
RPWVFSFNQNLDYQIGYICSGVFGDNPRSNDKGKNCGPVLSNGANGVKGFSYRYGNGVWIGRTKSINSRSGFEMIWDP  
NGWTETDSSFSMKQDIIALNDWSGYSGSFVQHPELTGMNCIRPCFWVELRGQPKESTIWASGSSISFCGVNSETAS  
WSWPDGADLPFTIDK

[0111] N1-大流行 (SEQ ID NO:3)

[0112] atgaatcctaaccaaaagatcattaccattgggtcggtctgtatgacaattggaaatggctaacctgat  
ccttcaattggaaacattatctcaatctgggtcagccactcaattcaaattggaaatcaatcgcatcggatggaaaca  
tgcaaccaaggcgtcattacttacgaaaacaacacttgggtgaaaccagacactcgatcggatggctat  
tcgctgctggacagtccgtgggtccgtgaaactggcggcaactcctctgcctgtgagcggatggctat  
ctactccaaagacaactcagtcagaatcggtccaaggggatgtgtttgtcataaggaaaccattcatctcatgc  
tctcccattgaatgcagaacccattttactcaaggggccattgctaaatgacaacattccaaacggaaaccatta  
aagacaggagccatatcgaccctgatgagctgcctatcggtgaagtccctcgccatacaactcaagattga  
gtcagtcgttggtcagcatccgcttgcattgtcatgatggcatcaattggctaccattggaaatttgcggccagacagt  
ggggcagtggctgtgtaagtacaatggcattataacagacactatacgatcgatggggacaacatattgagaa  
ctcaagagtctgaatgtcatgtgtaatggttctgcttaccatcatgaccatggaccatccgatggacaggc  
ctcctacaagatcttcagaatcgaaaaggaaagatcgtaaatcagtcgaaatgaatgcccctaactaccactat  
gaggaatgctcgttattcgtattccgaaatcacgtcgatggggataactggcatggctccaaatcgcc  
cgatgggtgtttcaaccagaatctggaaatcatcgatcgatccgatattgcgtccgggtgtcgagacaatccgc  
ccctaaatgataagacaggctcgatggccactcgatcgtctacggagccaaacggagtcaaggatttcattcaaa  
tacggcaatggagtgtggataggagaactaagagcatttcaagaaaaggatggatgtttcgagatgattggatccg  
atggatggactggactgacaacaagttctcaatcaagcaagacatcgatggaaatcagcgatcgatggatata  
cggtccttgcagcaccggactgaccggctggatgtttagacccattgcgttgcggatccatcaga  
ggcgaccggactggacttagcggagcagcatccctttgtggatgtgaactcgacactgtgg  
gttggatggccagacggatggatgtgccttaccattgacaag

[0113] N1-大流行 (SEQ\_ID\_N0:4)

[0114] MNPQNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIIVVSHSIQIGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNI  
SNTNFAAGQSUVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSKDNDNSVRIGSKGDVFVIREPFI  
SCPLECRTFFLTQGALLNDKHSN

GTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHGINWLTIGISGPDSGAVAVLKNGIITDTIKSWRNNI  
 LRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKKGIVKSVEMNAPNYHYEECSCYPDSSEITCVCRDNWHGSN  
 RPWVFSFNQNLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRKGFEMIWDP  
 NGWTGTDNKFSIKQDIVGISEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWELIRGRPEENTIWTSGSSISFCGVNSDTVG  
 WSWPDGAELPFTIDK

[0115] N2-1998A (SEQ ID NO:5)

[0116] atgaatccaaaccaaagataatcacaattggctctgttctcaactattgccacaatgtgcctcct  
 tatgcaaaattgccatcctgattactaatgtcacattgcactccaatcagtacgaatgcaactacccccaacaac  
 caagtgatactgtgtgaaccaactatcatcaaaagaacattactgagattgttatctggcaacaccaccatag  
 agaaggaaatctgccccaaagctggcagaatacagaaactggcgaagccgaatgtaaaattacagggtttgcacc  
 ttttccaaggacaattcgattaggcttcgtggcgacattggtaacgagagaaccttatgtgtcatgc  
 gatcctgataagtgttaccagttgcccttgacaaggaacaacgctaacaacagacattcaaacgacaccgtgc  
 atgataggacccttatcgaaccctattgatgaatgagttggattccattccatttgggaccaaacaagtgt  
 catcgcatggccagctcatcctgcccattacaatggacgccttgcatagtattggatcatggccaaagaatcctcaggaccc  
 aggagtggaaatgcgtgtcatcaatggaaacttgtaccgtggcatgactgatgggtccgctcaggatagctga  
 cactaaaatcctgttcatgaagagggaaaatcgtgcacattagcccactgctgggtccgctcagcacgtggag  
 gagtgctcctgctatccccatacccgatggatcatgttagagacaactggaaaggctccaacagacactg  
 tcgtggatattaatgtgaaggattatgcattgtgtcctctacgtgtgcctcgactggggagacacccca  
 aaaagacgacagatccagctccagcaattgtctgaatcctaacaacgagaaagggagcatggagtgaaaggctgg  
 gccttgcattgtatggaaatgacgtgtggatggggaggacaatcaacgagacattacgctcaggatgaaacccctca  
 aagtattgttgcattgttgcattgtcatgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgt  
 gtgcggattttctgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgt  
 ggaaggaaacaggaaactgcagtgtggatggacgtcaaattccattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgt  
 gaaccggctcatggcctgatggggcgacatcaatctcatgcctgt

[0117] N2-1998A (SEQ ID NO:6)

[0118] MNPNQKIIITIGSVSLTIATMCLLQIAILITNVTLHSNQYECNYPPNNQVILCEPTIIRNITEIVYLA  
 NTTIEKEICPKLAEYRNWSKPQCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPDKCYQFALGQGTTLNRRHSN  
 DTVHDRTPYRTLLMNELGIPFHGKQVCIAWSSSCHDGRAWLHVCITGHDDNNATASIYNGRLVDSIGWSKRIL  
 RTQESECVCINGTCTVVMTDGSASGIADTKILFIEEGKIVHISPLLGSAQHVEECSCYPYRGVRCICRDNWKGSR  
 PVVDINVKDYSIVSSYVCSGLVGDTPRKDDRSSSNCLNPNEKGEHGVKGWFDDGNDVWMGRTINETLRSGYETF  
 KVIEGWSKPNSQLQINRQVIVERDDRSGYSGIFSVEGKSCINRCFYVELIRGRKQETAWWTSNSIVVFCGTSGTYG  
 TGSWPDGADINLMPV

[0119] N2-2002A (SEQ ID NO:7)

[0120] atgaatccaaatcaaagatcattactattggatcagtctcaactcatcattgccacaatttggatt  
 tatgcaaaattgcaatccttgcactactgtcacattgcattcaaggcatgactacaactccccccaacaac  
 caagctactctgtgtgaaccaacaatcattgaacggaaaacaactgaaattgttatcttactaacaccaccattg  
 agaaaagaagtctgccccaaacttgcagagtaccggactggtaaaggctcaatgttaacattactggattgcacc  
 atttcgaaagacaatttgcattgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgttgcattgt

gatcctgacaagtgttaccaattgccctggacagggtaactctaacaacggacattgaatacacagtcc  
 atgataggacccgtatcgacccttcatgaatgagcttggtcccttcattttcatcttggaaaccagaactgtg  
 catggcttggctagctcatcttgcacatggaaagcatggctgatgtgtactggaaatgataacaat  
 gctactgcttagctcatctacaatggtaggctgtggattctattgggtcggtcgaaaaacattctccgaccc  
 aagagtcaaatgcgtctgttatcaatggaaacatgtactgtcgcatgactgatggatccctgtagtggaaaagcaga  
 taccaaaatcttgcgtcgaagagggaaagatcgccatcatcagcactctgtggatctgcacagcacgtcgag  
 gaatgctcctgttattcctaggtttccggagtcgggtgtctgccggacaactggaaaggatctaatagaccca  
 tcgtcgacatcaatgtcaagaattacagcattgtcttcgtatgtctgcagtggacttgtcggtgataactccag  
 agagagcgactcagtctcctcatcttattgcttgatccgaacaatgagaagggtgatggatgaaagggtgg  
 gccttgcgtatggtaatgacgtgtggatggaaagaacaatcaacgagactttgcgttgatgaaaccc  
 aagtcaattgaaggctggccacagctaactccaagtcaacagacaatagaactgtgattgtcgaaaaaggagacag  
 gtcaaggatattctggatatttcctcagtcgagggaaagaactgcatcaataggtgcttatgtggagttgattaga  
 ggacggaaagaggagacaagactctggtgaccagtaactcaattgtcggtttgtggcacctcaggacttatg  
 gtactggcttggccggatggctgacatcaatctcatgccaatt

[0121] N2-2002A (SEQ ID NO:8)

[0122] MNPNQKIIITIGSVSLIATICFLMQIAILVTTVTLHFKQHDYNNSPPNNQATLCEPTIIERKTTEIVYLT  
 NTTIEKEVCPLAHEYRNWSKPQCNITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPDKCYQFALGQGTTLNNGHSN  
 NTVHDRTPYRTLLMNELGVFHLGTRQVCMAWSSSCHDGKAWLHVCVTGNDNNATASFIYNGRLVDSIGWSKNIL  
 RTQESECVICINGTCTVVMTDGSASGKADTKILFVEEGKIVHISTLLGSAQHVEECSCYPRFPGVRCVRDNWKGSNR  
 PIVDINVKNYSIVSSYVCSGLVGDTRESDSVSSYCLDPNEKGHGKVKGWFDDGNDVWMGRTINETRLGYETF  
 KVIEGWSTANSKSQTNRQVIVEKGDRSGYSGIFSVEGKNCINRCFYVELIRGRKEETKWWTSNSIVVFCGTSGTYG  
 TGSWPDGADINLMPI

[0123] N1-大流行EU (SEQ ID NO:11)

[0124] atgaatccaaacaaaagataataaccatgggtcggtctgtatgacaattggaaatggtaacttaat  
 attacaaaattggaaacataatctcaatatggattagccactcaattcaacttggaaatcaaagtcaattggaaaca  
 tgcaatcaaagcgtcattacttatgaaaacaacacttggtaatcagacatgttaacatcagcaacaccaact  
 ttgctgtggacagtcgtgggttcgcgaattagcggcaattccctctgcctgttagggatggctat  
 atacagtaaaagacaacactgttaagaatcggtcaagggggatgtgttgcataaggaaaccattcatatcatgc  
 tcccccttagaatgcagaaccctttcttgcactcaagggcctgtctaaatgacaacattcaatggaaaccatta  
 aagataggagccatatcgaaaccctgtgagctgtcattggtaagttccctccatataactcaagatttg  
 gtccgtcgctggcgtcagcaagtgttgcacatggcatcaattggtaacaatcggaatttctggccagacagt  
 gggcagtggctgtttaagtacaatggcataataacagacactatcaagagttggaaaaacaatattgagaa  
 cacaagagtctgaatgtcatgttaatggttttaccataatgaccatggacaggatgtgatggacaggc  
 ctcatacaagatctcagaatagaaaaggaaagatagtcaaatcagtcgaaatgaaatgcccctaatttactat  
 gaggaatgctctgttattcctgattctgatgttgcacatgtgtgcaggataactggcatggctgaatcgac  
 cgtgggtgtttcaaccagaatctggaaatcatggataggatacatatgcgtggatttcgagacaatccacg  
 ccctaatgataagacaggcagttgtggccgtatcgtaatggagcaatggagtaaaaggatttcattcaaa  
 tatggcaatgggtttggataggagaactaaagcatttagtcaagaaaagggtttgagatgattggatccaa  
 atggatggactggacagacaaaaacttctcaataaagcaagatcataggaataatgagtggcaggatacag

cggagtttgcacatccagaactaacaggctgaattgtataagacccgttgcattgggtgaactaatcaga  
ggcgacccaaagagaacacaatctggactagcgggagcagcatatccttgcattgaaacagtacactgtgg  
gttgcattggccagacggctgtagttgccattaccattgacaagtaa

[0125] N1-大流行EU(SEQ ID NO:12)

[0126] MNPNQKIIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQSQIETCNQSVITYENNTWVNQTYVNI  
SNTNFAAGQSVVSAGLAGNSLCPVSGWAIYSKDNSVRIGSKGDVFIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLNDKHSN  
GТИKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTIGISGPDSGAVALKYNGIITDTIKSWKNNI  
LRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGQASYKIFRIEKKGIVKSVEVNAPNYHYEECSCYPDSSEITCVRDNWHGSN  
RPWVSNQNLEYQIGYICSGIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNVWIGRTKSISSRKGFEMIWDP  
NGWTGTDKNFSIKQDIIGINEWSGYSGSFVQHPELTGLNCIRPCFWELIRGRPENTIWTSGSSISFCGVNSDTV  
WSWPDGAEELPFTIDK

[0127] N1-欧亚禽类(SEQ ID NO:13)

[0128] atgaacccaaatcagaagataatacattttcaatctgtatgacaatggaaattgttagcttat  
attacaaattggaaacataatcaatatggatttagccattcaatttgcataatggaaacccaaaccagaccgaccat  
gcaatcaaagcgttattttacaaaacaacacatggtaaatcaacgtatgttaacatcagcaacaataattt  
tgttgttgcacagacagtggttcaatgaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
tacagtaaagataacagtgttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
cccatttgcacatgttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
agacagaagcccatttgcaccccttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
tcagttgcacatgttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
gagcagttgcacatgttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
acaagaatcttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
tcatacaagatcttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
aggaatgttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
atgggtgttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
cctaattttgcacatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
acggcaatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
cgatggactggaaacagacaataatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
ggatggatggaaatttcggcagttctctgcctgttagtgatggatggctata  
gagacccaaagagaacacaatctggactagcggaaagcagcatatccttgcattgaaatgtgacactgtgggt  
tggcttggccagacggctgtagttgccattaccattgacaagtaa

[0129] N1-欧亚禽类(SEQ ID NO:14)

[0130] MNPNQKIIIISSICMTNGIASLILQIGNIISIWISHSIQIENPNQTEPCNQSVIYENNTWVNQTYVNI  
SNNNFVVEQTVVSMKLAGSSSLCPVSGWAIYSKDNSVRIGSKGDVFIREPFISCSHLERCFRTFFLTQGALLNDKHSN  
GTVKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSKFESVAWSASACHDGTSWLTIGISGPDSGAVALKYNDIITDTIKSWKNNI  
LRTQESECACLNNGSCFTVMTDGPSNGQASYKIFKIEKGKVKSVELNAPNYHYEECSCYPDSGEICVCRDNWHGSN  
RPWVSNQNLEYQIGYICSGVLGDNPRPNDRTGSCGPVSSHGANGVKGFSFKYGNVWIGRTKSTIRSGFEMIWDP  
NGWTGTDNNFSVKQDIVGITNWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWELIRGRPENTIWTSGSSISFCGVNSDTV  
WSWPDGAEELPFTIDK

[0131] N2-根特/1984 (SEQ ID NO:15)

[0133] N2-根特/1984 (SEQ ID NO:16)

[0134] MNPNQKIIITIGSVSLTITMCLFLQIAILVTTITLHFKQYECDSPANNQVIPCEPIIEKNITKIVYL  
NTTIEKEVCPKLGEYRNWSKPQCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGAIWVTREPYVSCDPNKCYQFALGQGTTLDNRHSN  
DTIHDRTPFRTLLMSELGVFPFLGTRQVCIAWSSSSCHDGKAWLHVCVTGHDKNATASFIFYDGKLVDSSWSKNIL  
RTQESECVCIDGICTVVMTDGSASGKADTKILFIEKGKIIHISPLLGSAQHVEECSCYPRYPDVRCICRDNWKGNSR  
PIVDIRMKNYSIGSSYMCGLVGDTPRNNDGSSNSNCRNPNNERGNHGVKGWAFDDGNDTWMGRTISKDSRLGYETF  
KVVGGWSQPNSKSQINRQVIVDSDNRSGYSGIFSVEGKDCINRCFYVELIRGRRQETRVWWTSNSIVVFCGTSGTYG  
SGSWPDGANINFMPV

[0135] N2-意大利/4675/2003(SEQ ID NO:17) atgaattcaaataaaaagataataacaattggctc  
tggttctcaactattgccacactatgccttatgcaaattgctatcatggtaactactgtacatttcatttc  
aaggcgttatgaatacacaactccccccgaacaaccaagaatgttgtgaaccaacgataattgaaagaaaacataa  
cagagacagtgtacatgaccaacaccaccatagtgaaagaaatatgcacccaaacttagcggaaatacagaaaattggc  
aaaacgcatacgccaaattacaggattgcacccatttcaaaggacaactcaattcggcttccgctggcggac  
atctgggtgacaagagaaccttatgtgtcatgcgatcctaacaagtgttatcaatttgcacccctggcagggaaacaa  
cgtaaacaacaggcattcaaatgacacagtacatgatagaaccccttaccgaacctgttcatgtaaattgg  
tggttccatttcatttaggaaccaagcagggttgcatacgctggccagttcaagggtcatgtatggaaaagcatgg  
ttgcatacggtgtactggcatgtaaaaatgcactgcgcatttacaacgagagacttgttagatagta  
ttgggtcatggcataagaaaatcctcagaacccaggagtcggatgcgttgcataatggacttgtacagtgg  
gatgacagatggagtgcttcaggttagactaaaatactattcatttgaggagggaaaatcgatgttt

agccaaactgacaggaagtgcgtcagcatgttagaggagtgcctttatccccgttatccctgtcagatgttttgcagagataattggaaaggctcaataggcccattgttagatataaatgtaaaggatcatgcattgttccagtttgtgtctcaggacttgtcgagacacacccagaaaaaacgacagcttagcagtagtaactgcctgaatcctaacaatgaagaaggggtcatgggtgaaaggctggctttgcattgtatgaaaatgacttgtggatggaaacgatcagcggaaagtacgattaggttatgaaacctcaaggcattgaaggctggtccaaggcctaattccaaattgcagataataggcaagtaatagttgacaaagataatagatccggttattctggattttctgttggaaagtaaaagttgcatacaatcggtgtttatgtggagttgataagaggaaggaaacaggaaatgaagtggtggacactcaaacagcatgttgcatttatgttgcacctcaggtacatgttggaaacaggctcatggcctgtatgggcagacatcaatctcatgtttatgttgcataat

[0136] N2-意大利/4675/2003(SEQ ID NO:18)

[0137] MNSNQKIIITIGSVSLTIATLCLLMQIAIMVTTVFHFQYEYNNSPPNNQVMLCEPTIIERNITETVYMT  
NTTIVKEICPKLAEYRNWSKPQCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPNKCYQFALGQGTTLNRRHSN  
DTVHDRTPYRTLLMNELGVPFHLGTKQVCIAWSSSCHDGKAWLHVCVTGHDENATASFIYNERLVDSIGSWSKKIL  
RTQESECVCINGTCTVVMTDGSASGRADTKILFIEEGKIVHVSQLTGSAQHVEECSCYPRYPGVRCVCRDNWKGSNR  
PIVDINVKDHSIVSSYVCSGLVGDTPRKNDSSSNCLNPNEEGGHGVKGWAFDDENDLWMGRTISEKLRLGYETF  
KVIEGWSKPNSQLQINRQIVDKDNRSGYSGIFSVESKSCINRCFYVELIRGRKQENEVWWTNSIVVFCGTSGTYG  
TGSWPDGADINLMP1

[0138] N2-苏格兰/1994(分支1) (SEQ ID NO:19)

[0139] atgaatccaaatcagaagataataacaattggctctgttctcgtcattgcaacattatgcttctt  
aatgcagatggccatcctaataactactgtaaaattacattcaaacaatatgagtgcggctccctgcaacaac  
caagtaataacatgtgagccaaacagtaatagaaaggAACACAGAGATAGTGTACTTAACACACCACCATAG  
agaaagaaacatgccacaaaacagtggaatacaggaattggtaaaggcctcaatgcaaaataacaggcttgacc  
ttttccaaggacaattcaattcgacttctgctggggacatatggtgacgaggAACCTTACGTGTCATGC  
gagcctggcaaatttttatcagttgcactcggcaagggaccacactagacaataaacattcaaacgcataatac  
atgacagaaccccattcgaactctattgatgaatgaattgggtgtccatttcatttagggacaagacaagtgt  
tattgcatggtccagctcaagtttatgatggaaagcatgggtgcattgttatcactggacatgataaaaaat  
gcaactgccagttcatttacatggtagacttgttagatagcattggatggctataaaataacttagaaaccc  
aggaatcagaatgcgttgcattcaatgggtctgtacagttagactgtatggaaagtgcttcggagagctga  
tactaaaatactattcattgaagaaggAAAATTGTTCAATTAGCCCATTAGCGGGAGTGCACAGCATGTGGAG  
gagtgcctgttatccccgatatcctggcgtaagggtatctgcagagacaactggaaaggcttaacagacccg  
ttgtggatataatataagaagattatagcattgattccagttatgtgtttcagggttggcgacacacccag  
aatcaatgacggatcccgatgtactgcccgtatccaaattgcagataataggcaagtaatagtgtatgcaacaatag  
gtcaggttattctgggtttccgttgcaggcaaaagctgcattcaatagatgttttacgtggagttgataaga  
ggaaaggcgtcagaagcgcgagttgcggacctcaaacagtttgcatttgcaggcacccatgt  
gaacaggctcatggccctgtatggagcagacatcaacccatgccttatata

[0140] N2-苏格兰/1994(分支1) (SEQ ID NO:20)

[9141] MNPNQKLIITIGSVSLVIATLCEIMOMAIIITTVKHLHEKOYECGEPANNQVITCEPTVIERNTTELVYT

NTTIEKETCHKTVEYRNWSKPQCKITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCEPGKCYQFALGQGTTLDNKHSN  
 DTIHDRTPYRTLLMNELGVFHLGTRQVCIAWSSSCYDGKAWLHVCITGHDKNATASFIYDGRLVDSIGWSKNIL  
 RTQESECVICINGVCTVMTDGSASGRADTKILFIEEGKIVHISPLAGSAQHVEECSCYPYRGVRCICRDNWKGSR  
 PVVDINIEDYSIDSSYVCSGLVGDTPRINDSSSYCRDPNNEKGHNHGKVKGWFDDGNDVWMGRTINEDSRSGYETF  
 KVIGGWSTPNSKLQINRQVIVDSNNRSGYSGVFSVEGKSCINRCFYVELIRGRRSEARWWTSNSIVVFCGTSGTYG  
 TGSWPDGADINLMPI

[0142] N2-苏格兰/1994(分支2) (SEQ ID NO:21)

[0143] atgaatccaaaccagaaaataataacgatcggttctgtctcattgcaacaatgtgcgg  
 catgcaagttgccattctggtaactactgtaacattgcattcaggcagtgcgaatgcaactccctccgcaaccaac  
 caaataatgccatgtaaaccaacaaaaaatagagagaaacataactgaaatttgtacttaaccaataccaccataa  
 aaacagaggtatgccccaaacttagtggaaatacagggattgggaaaaccacaatgtagaatcacagggttgcacc  
 ttttccaaggacaattcgattcggttctgcccgggtggccattggtaacgagagaaccatatgtatcatgc  
 gatcttagcaagtgttaccagttgcgtcgacagggactacactagacaacagacattcaaatgacacaatac  
 atgatagaactcattatcgaccattgtatgaatgaattgggtttccatttcatttaggaaccaggcaagtgt  
 tatacgcttggccatgtcaagttgtcacgtggaaaagcatggctgcatgttgactggatgataaaaaat  
 gctactgcttagcctcatttatgacggaaggctgtggacagcatcggttcatggccaaaacatcctccgaccc  
 aggaatcggaatgtgttgcataatggacttgcacagtggtaatgactgatggagtgcttcaggaaaagctga  
 taccagaatactatttattgaagaaggaaagattattcacatttagtccattgacaggaagtgcacagcatgt  
 gagttttttatcctcgatacccggttaagatgttttagagacaactggaaggcttaacagaccc  
 tcgtggatataatgtaaaagattataaaactccatgttatgctcaggcttggatgaaactttca  
 aacaaacgatagatctgcaatagcaactgccaatccataacaaccagagggaaatcatggagtgaaggctgg  
 gccttgcgtggaaatgacatgatggatggaaagaaccatcagcaatgattcacgttttaggttatgaaactttca  
 aagttattttctggcgtttctgttgaaggcaaaagctgcatcaataggtgctttatgttagactaataaga  
 ggaaggagacaggaagctagagtatggacttcgaacagtatttttttttttttttttttttttttttttttt  
 gttcaggctcatggcctgatgggctgacatcaatcttatgcctatataa

[0144] N2-苏格兰/1994(分支2) (SEQ ID NO:22)

[0145] MNPNQKIITIGSVSLIATMCFMQVAILVTTVTLHFRQCECNSSATNQIMPCPPTKIERNITEIVYLT  
 NTTIKTEVCPKLVKYRDWAKPQCRTGFAPFSKDNSIRLSAGGAIWVTREPYVSCDLSKCYQFALGQGTTLDNRHSN  
 DTIHDRTPYRTLLMNELGVFHLGTRQVCIAWSSSCYDGKAWLHVCVTGYDKNATASLIYDGRLVDSIGWSQNIL  
 RTQESECVICINGTCTVMTDGSASGKADTRILFIEEGKIIHISPLTGSAQHVEECSCYPYRGVRCICRDNWKGSR  
 PVVDINVKDYKINSSYVCSGLVGDTPRNDRSSNSNCNPNNQRGNHGKVKGWFDDGNDIWMGRTISNDRLGYETF  
 KVIGGWSPNPKVQTNRQVIVDSDNRSGYSGVFSVEGKSCINRCFYVELIRGRRQEARWWTSNSIVVFCGTSGTYG  
 SGSPDGADINLMPI

[0146] 下列实施例用于提供对本发明的进一步理解,但绝不意味着以任何方式限制本发明的有效范围。

[0147] 实施例

[0148] 实施例1

[0149] 包含四个个体NA-RP构建体的无佐剂多价NA-RP疫苗在断奶仔猪中的功效

[0150] 简介

[0151] 已将RNA病毒用作引入疫苗抗原的载体-载体,其已被基因工程化至它们的基因组。然而,迄今为止,其用途主要限于将病毒抗原整合入RNA病毒,然后将病毒引入受体宿主。结果是诱导针对整合入的病毒抗原的保护性抗体。已将 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒用于编码病原性抗原。已经从几种不同 $\alpha$ 病毒开发成这样的 $\alpha$ 病毒复制子平台,包括委内瑞拉马脑炎病毒(VEE) [Pushko等,Virology 239:389-401 (1997)]、辛德毕斯(SIN) [Bredenbeek等,Journal of Virology 67:6439-6446 (1993),其全部内容通过引用并入本文]和塞姆利基森林病毒(SFV) [Liljestrom和Garoff,Biotechnology (NY) 9:1356-1361 (1991),其全部内容通过引用并入本文]。此外, $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒是几种USDA许可的猪和禽类疫苗的基础。这些包括:猪流行性腹泻疫苗, RNA颗粒(产品代码19U5.P1)、猪流感疫苗, RNA(产品代码19A5.D0)、禽流感疫苗, RNA(产品代码19O5.D0)和处方产品, RNA颗粒(产品代码9PP0.00)。

[0152] 进行了一项研究,以确定两个剂量水平的四联无佐剂NA-RP疫苗的功效和免疫原性。该无佐剂疫苗包含四个RP构建体,每个构建体分别编码一个单独、不同的当代U.S.IAV-S分离株的NA蛋白。这些NA基因一起代表了美国猪群体中主要的两个N1系统发生簇和两个N2簇。向疫苗组分和攻击毒株血清反应均呈阴性的断奶仔猪两次肌内(IM)接种(每剂1mL)无佐剂疫苗。然后,检测四联NA-RP疫苗针对异源N1(H1N1病毒)和N2(H1N2病毒)攻击感染的功效。

[0153] 材料和方法

[0154] NA-RP抗原的构建:

[0155] 根据此前的描述[参见US 9,441,247B2;其内容通过引用并入本文]构建设计用于表达神经氨酸酶(NA)基因的VEE复制子载体,具有下述修饰。使用限制性内切酶AscI和PacI消化来源于TC-83的复制子载体“pVEK”[在U.S.9,441,247B2中公开和描述]。使用限制性内切酶AscI和PacI同样地消化DNA质粒,所述DNA质粒含有具有5'侧翼序列(5'-GGCGCGCCGCACC-3') [SEQ ID NO:9]和3'侧翼序列(5'-TTAATTAA-3') [SEQ ID NO:10]的N1或N2基因的密码子优化的开放阅读框序列(表1)。然后,将合成的基因表达盒连接至经消化的pVEK载体,并将所得到的克隆重新命名为“pVHV-N1-大流行”、“pVHV-N1-经典”、“pVHV-N2-2002”和“pVHV-N2-1998”。选择“pVHV”载体命名法指来源于pVEK的复制子载体,其含有在pVEK的多个克隆位点中通过AscI和PacI位点克隆的转基因表达盒。

[0156] 根据此前描述的方法[U.S.9,441,247B2和U.S.8,460,913B2;其内容通过引用并入本文]制备TC-83RNA复制子颗粒。简言之,在使用MegaScript T7 RNA聚合酶和帽类似物(Promega, Madison, WI)进行体外转录之前,用NotI限制性内切酶将pVHV复制子载体DNA和辅助DNA质粒线性化。重要的是,如此前所述[Kamrud等,J Gen Virol.91 (Pt 7):1723-1727 (2010)],在制备中使用的辅助RNA缺乏VEE亚基因组启动子序列。将复制子和辅助组分的纯化RNA合并并与Vero细胞悬液混合,在4mm比色杯中电穿孔,然后再将其放入OptiPro SFM细胞培养基(Thermo Fisher, Waltham, MA)中。孵育过夜后,纯化 $\alpha$ 病毒RNA复制子颗粒,使用含5%蔗糖(w/v)和1%猪血清的磷酸盐缓冲液配制,通过0.22微米膜滤器,并分装成小份保存。在感染的Vero细胞单层上使用免疫荧光测定法确定功能性RP的滴度。根据由包装的复制子编码的基因鉴定RP的批次。

[0157] 表1

[0158] 在NA-RP构建体中编码的N1和N2基因

| NA 系统发生簇 | 基因供体毒株  | GenBank 登录号                             |
|----------|---------|---|
| [0159]   | N1-经典   | A/猪/爱荷华/A01410307/2014 (H1N1) KJ605083  |
|          | N1-大流行  | A/猪/明尼苏达/A01483170/2014 (H1N1) KP036969 |
|          | N2-1998 | A/猪/密歇根/A02077465/2015 (H1N2) KR982634  |
|          | N2-2002 | A/猪/伊利诺伊/A01475495/2014 (H1N2) KJ941362 |

[0160] 病毒:攻击病毒是从USDA国家兽医服务实验室获得的。

[0161] • A/猪/伊利诺伊/A01554351/2015 (H1N1) 具有H1- $\gamma$ 簇的HA基因和N1-经典簇的NA基因。

[0162] • A/猪/爱荷华/A02076654/2015 (H1N2) 具有H1- $\delta 1$ 簇的HA基因和N2-2002A簇的NA基因。

[0163] 在MDCK细胞培养物中繁殖病毒。感染汇合细胞约48小时,直至在超过70%的细胞单层中出现明显的细胞病变作用为止。收获时,从容器中除去上清液,并且在-60°C或更低温度下保存病毒之前通过离心澄清。

[0164] 动物:根据血清学筛查从高健康猪群中选择断奶仔猪以确认不存在针对疫苗和攻击毒株的HI或NI抗体。这些动物是雄性和雌性混合的,并且在第一次接种时约3周龄。

[0165] 接种和攻击:下表2中概述了治疗组。以两个剂量水平配制四联NA-RP疫苗: $10^6$ 个拷贝每种RP/剂(低剂量)和 $10^7$ 个拷贝每种RP/剂(高剂量),根据基于免疫荧光的滴度测定对功能性RP进行定量。在由1%猪血清和5%蔗糖组成的稳定剂中配制NA-RP抗原。安慰剂疫苗由不含抗原的相同稳定剂组成。在3周龄和7周龄时,以1mL剂量向猪IM施用无佐剂疫苗。在接种后,通过IFA检测对剩余疫苗物质反滴定确定剂量水平。在第一次接种当天,第二次接种当天和攻击感染当天收集血清样品。

[0166] 表2

[0167] 治疗组

| 组别     | 猪的数量 | 疫苗        | 每剂的拷贝数<br>(1 mL) | 攻击毒株 |
|--------|------|-----------|------------------|------|
| [0168] | 1    | 高剂量 NA-RP | $10^7$           | H1N1 |
|        | 2    | 低剂量 NA-RP | $10^6$           |      |
|        | 3    | 安慰剂       | -                |      |
|        | 4    | 高剂量 NA-RP | $10^7$           | H1N2 |
|        | 5    | 低剂量 NA-RP | $10^6$           |      |
|        | 6    | 安慰剂       | -                |      |

[0169] 在第二次免疫后3周时,向猪施用攻击感染。将攻击物质H1N1(H1- $\gamma$ -N1-经典)和H1N2(H1- $\delta 1$ b-N2-2002A)病毒配制为目标剂量 $10^{6.5}$ TCID50/猪(体积为6mL)。通过气管内途径施用攻击物质。通过对剩余攻击物质反滴定确认攻击病毒剂量。在攻击后-1、1、3和5天对所有猪取鼻拭子样品。

[0170] 在攻击后(DPC)5天进行尸检。在有执照兽医的监督下,在5DPC以过量的巴比妥酸盐将猪安乐死。收集并观察肺,以记录受宏观病变影响的每个肺叶的表面积,从而得出全面的肺病变评分百分比。从所有猪中收集支气管肺泡灌洗液和鼻拭子样品以测量病毒滴度。收集肺切片用于微观病变的分析。

[0171] 免疫应答分析:通过HI和NI检测确定在猪血清样品中的IAV-S特异性抗体。将血清在56°C下热灭活30-60分钟。对于HI,还用受体破坏酶和/或高岭土处理血清,并使用火鸡红细胞吸收,以除去非特异性凝集素。根据此前的描述[Kitikoon等,Methods Mol Biol 1161:295-301(2014)],使用火鸡红细胞,进行HI检测。使用经过微小改进的此前描述的方法[Sandbulte和Eichelberger,Methods Mol Biol 1161:337-45(2014)]进行NI检测。简而言之,将血清的2倍系列稀释液与表达的蛋白抗原在胎球蛋白包被的96孔板上等体积混合,并在37°C下孵育过夜。在室温下添加花生凝集素辣根过氧化物酶缀合物(PNA-HRP)2小时以结合剥离唾液酸的胎球蛋白分子。通过TMB显色底物获得信号,并在650nm处读取结果。从所有孔扣除不含NA抗原的阴性对照的平均光密度(OD)。然后将测试样品的OD值在0-100%范围内标准化,其中将阳性对照孔(含有NA抗原,但无血清)的平均OD定义为100%。将NI抗体效价定义为抑制≥50%的神经氨酸酶活性的样品的最高稀释度。

[0172] 肺部病理学检查:在肺前叶和后叶的网格图上记录了在所有肺叶外部观察到的肉眼可见病变(界限清楚的紫色至李子色实变(consolidation))。根据受病变影响的网格的数量计算每头猪的综合评分(肺部病变百分比)。

[0173] 病毒脱落:使用感染培养基[Dulbeco最低限度基本培养基(DMEM),补充了0.3%牛血清白蛋白,组分V;2mM L-谷氨酰胺;25μg/mL庆大霉素;2μg/mL胰酶IX]将鼻拭子样品和BAL液进行10倍系列稀释,并将100μL每种稀释液加入96孔板中的汇合MDCK细胞中(四复孔)。将板在37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育,并在72小时后通过对每孔的上清液进行血凝素检测观察是否存在感染性病毒。通过Spearman-Kärber法计算IAV-S滴度,并以Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL表示。

#### [0174] 结果

[0175] 接种多价NA-RP的猪的免疫应答,见图1A-1D。

[0176] • 高剂量和低剂量疫苗(分别为,10<sup>7</sup>和10<sup>6</sup>个RP拷贝/剂)四联NA-RP疫苗诱导针对所有四个NA组分的功能性NI抗体效价。

[0177] • 由高剂量疫苗诱导的NI效价要高约1-2倍稀释。

[0178] • 安慰剂疫苗组中的猪仍保持血清阴性。

[0179] 四联NA-RP疫苗针对攻击感染的功效:

[0180] 肺病变:见图2A-2B。

[0181] • 在安慰剂对照猪的肺部H1N1攻击感染引起超过13%的病变。高剂量和低剂量免疫的两个治疗组在H1N1攻击后5天的肺病变评分均显著低于未经免疫的安慰剂组( $p < 0.05$ )。无论疫苗剂量如何,对肺病变的保护作用都是稳健的。

[0182] • 在安慰剂对照猪的肺部H1N2攻击感染仅引起3.2%的病变。两个治疗组在H1N2攻击后5天的肺部病变评分均低于未经免疫的安慰剂组,平均肺部病变评分分别低于1.1%和1.2%,但接种疫苗的组与安慰剂组之间的差异无统计学意义。

[0183] 鼻脱落:见图3A-3B。

[0184] 对于所有三个治疗组,H1N1攻击病毒脱落均在3DPC时最大。

[0185] • 在5DPC时,高剂量和低剂量四联RP治疗组与安慰剂对照相比病毒滴度均显著降低( $p<0.05$ )。

[0186] • H1N2攻击病毒的鼻脱落更加延迟,安慰剂组的平均滴度直至5DPC时才超过测定的检测下限。在5DPC时,两个剂量水平的接种组的H1N2病毒滴度均显著降低( $p<0.05$ )。

[0187] 在肺中的病毒:见图4A-4B。

[0188] • 安慰剂接种组5DPC时收集的支气管肺泡灌洗液(BALF)中H1N1的病毒滴度比接种四联(4联)NA-RP的两个组的任何一个均高2个对数,后者未检测到阳性滴度。这代表了两个接种组的统计学显著差异( $p<0.05$ )。

[0189] • 两个接种组与安慰接种组之间,H1N2攻击组的病毒滴度均显示出2-3个对数的降低,且具有统计学意义( $p<0.05$ )。

[0190] 总结

[0191] H1N1感染是更加稳健的攻击模型,其具有较高肺病变评分以及鼻和肺病毒滴度。对于肺病变严重程度、鼻脱落和BALF病毒滴度而言,四联NA-RP接种组显示出对H1N1病毒具有统计学显著意义的保护作用。出现的血清NI效价较弱(<80)的低剂量四联NA-RP疫苗组的个体动物也受到了保护。H1N2攻击感染是稳健性较差的模型,因为安慰剂组中的肺部病变较少。然而,即使在该组中,对于鼻脱落和肺中的病毒滴度,接种组也产生了显著的保护作用。无佐剂的多价NA-RP制剂具有免疫原性,并显示出对抗原性相似攻击NA毒株的功效。

[0192] 实施例2

[0193] 在第一次接种时具有N1抗体的断奶仔猪中,佐剂四联NA-RP疫苗对H1N1感染的功效

[0194] 进行了一项研究,以确定四联佐剂NA-RP疫苗的功效和免疫原性。佐剂疫苗包含四种RP构建体,每个构建体分别编码一种单独、不同的当代U.S.IAV-S分离株的NA基因。这些NA基因一起代表了两个N1系统发生簇(N1-经典和N1-大流行)和两个N2簇(N2-1998和N2-2002)。向第一次接种时针对N1-经典抗原血清反应阳性的断奶仔猪两次肌内(IM)接种(每剂1mL)佐剂疫苗。检测佐剂四联NA-RP疫苗针对异源N1(H1N1病毒)攻击感染的功效。

[0195] 材料和方法

[0196] NA-RP抗原的构建:如实施例1中所述制备含有表达神经氨酸酶(NA)基因的α病毒复制子RNA的复制缺陷型RNA颗粒(RP)。

[0197] 表3

[0198] 在NA-RP构建体中编码的N1和N2基因

|        | NA 系统发生簇 | 基因供体毒株                         | GenBank 登录号 |
|--------|----------|--------------------------------|-------------|
| [0199] | N1-经典    | A/猪/爱荷华/A01410307/2014 (H1N1)  | KJ605083    |
|        | N1-大流行   | A/猪/明尼苏达/A01483170/2014 (H1N1) | KP036969    |
|        | N2-1998  | A/猪/密歇根/A02077465/2015 (H1N2)  | KR982634    |
|        | N2-2002  | A/猪/伊利诺伊/A01475495/2014 (H1N2) | KJ941362    |

[0200] 病毒:攻击病毒是从USDA国家兽医服务实验室获得的。A/猪/伊利诺伊/A01554351/2015(H1N1)具有H1-γ簇的HA基因和N1-经典簇的NA基因。在MDCK细胞培养物中繁殖病毒。感染汇合细胞约48小时,直至在超过70%的细胞单层中出现明显的细胞病变作

用为止。收获时,从容器中除去上清液,并且在-0°C或更低温度下保存病毒之前通过离心澄清。

[0201] 动物:根据血清学筛查从高健康猪群中选择断奶猪仔以确认不存在针对疫苗和攻击毒株的HI或NI抗体。这些动物是雄性和雌性混合的,并且在第一次接种时约3周龄。

[0202] 接种和攻击:表4中概述了治疗组。以 $10^6$ 个拷贝每种RP/剂配制4联NA-RP疫苗,根据基于免疫荧光的滴度测定对功能性RP进行定量。在由1%猪血清和5%蔗糖组成的稳定剂中配制NA-RP抗原。安慰剂疫苗由不含抗原的相同稳定剂组成。在3周龄和7周龄时,将疫苗与XSolve佐剂混合(1:1v/v,1mL剂量),然后立即通过IM途径向猪施用。在接种后,通过IFA检测对剩余疫苗物质反滴定(back-titrated)确定剂量水平。在第一次接种当天,第二次接种当天和攻击感染当天收集血清样品。

[0203] 在第一次接种前1天对所有猪称重,向在N1-经典抗体阳性组的猪皮下注射2mL/kg剂量的N1-经典超免疫血清(对N1-经典抗原的NI效价为1:2560)。

[0204] 表4

[0205] 治疗组

[0206] (n=每组10只猪)

| 组别     | N1-经典抗体状态 | 疫苗<br>(含有 XSolve®50) | 每剂的拷贝数 (1 mL) | 攻击毒株 |
|--------|-----------|----------------------|---------------|------|
| [0207] | 1         | 阳性                   | $10^6$        | H1N1 |
|        | 2         | 阴性                   | $10^6$        |      |
|        | 3         | 阳性                   | -             |      |
|        | 4         | 阴性                   | -             |      |

[0208] 在第二次免疫后3周时,向猪施用攻击感染。将攻击物质H1N1(H1-γ-N1-经典)配制为目标剂量 $10^{6.5}$ TCID50/猪(体积为6mL)。通过气管内途径施用攻击物质。通过对剩余攻击物质反滴定确认攻击病毒剂量。在攻击后-1、1、3和5天对所有猪取鼻拭子样品。

[0209] 在攻击后5天进行尸检。在有执照兽医的监督下,在5DPC时以过量的巴比妥酸盐将猪安乐死。收集并观察肺,以记录受宏观病变影响的每个肺叶的表面积,从而得出全面的肺病变评分百分比。从所有猪中收集支气管肺泡灌洗液和鼻拭子样品以测量病毒滴度。收集肺切片用于微观病变的分析。

[0210] 免疫应答分析:通过NI检测确定在猪血清样品中的IAV-S特异性抗体。将血清在56°C下热灭活30-60分钟。使用经过微小改进的此前所述的方法[Sandbulte和Eichelberger, Methods Mol Biol 1161:337-45(2014)]进行NI检测。简而言之,将血清的2倍系列稀释液与表达的蛋白抗原在胎球蛋白包被的96孔板上等体积混合,并在37°C下孵育过夜。在室温下添加花生凝集素辣根过氧化物酶缀合物(PNA-HRP)2小时以结合剥离唾液酸的胎球蛋白分子。通过TMB显色底物获得信号,并在650nm处读取结果。从所有孔扣除不含NA抗原的阴性对照的平均光密度(OD)。然后将测试样品的OD值在0-100%范围内标准化,其中将阳性对照孔(含有NA抗原,但无血清)的平均OD定义为100%。将NI抗体效价定义为抑制≥50%的神经氨酸酶活性的样品的最高稀释度。

[0211] 肺部病理学检查:在肺前叶和后叶的网格图上记录了在所有肺叶外部观察到的肉

眼可见病变(界限清楚的紫色至李子色实变)。根据受病变影响的网格的数量计算每头猪的综合评分(肺部病变百分比)。

[0212] 病毒脱落:使用感染培养基[Dulbecco最低限度基本培养基(DMEM),补充了0.3%牛血清白蛋白,组分V;2mM L-谷氨酰胺;25 $\mu$ g/mL庆大霉素;2 $\mu$ g/mL胰酶IX]将鼻拭子样品和BAL液进行10倍系列稀释,并将100 $\mu$ L每种稀释液加入96孔板中的汇合MDCK细胞中(四复孔)。将板在37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育,并在72小时后通过对每孔的上清液进行血凝素检测观察是否存在感染性病毒。通过Spearman-Kärber法计算IAV-S滴度,并以Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL表示。

[0213] 结果

[0214] 接种多价NA-RP的猪的免疫应答(参见,图5)

[0215] • 在接受其第一次接种前一天被动转移了N1-经典超免疫血清的猪在接种时N1-经典抗体的效价为40-80。

[0216] • 与其第一次接种时针对NI-经典抗体阳性的猪相比,针对N1-经典抗体阴性的猪在使用含有Xsolve 50的四联NA-RP疫苗两次接种后诱导出约高3倍的NI效价。

[0217] • 在N1-经典阴性/安慰剂接种组中,猪的NI效价仍保持血清阴性。

[0218] 四联NA-RP疫苗对攻击感染肺病变的功效(参见,图6)

[0219] • 当接种在第一次接种时无N1-经典抗体的猪时,四联NA-RP接种在减轻肺病变方面非常有效。与两个安慰剂接种组相比,肺病变百分比显著更低。

[0220] • 与两个安慰剂接种组相比,在存在N1-经典NI效价的情况下接种的猪也具有显著减轻的肺病变。

[0221] 总结

[0222] 与安慰剂接种组相比,对于肺病变严重程度而言,在N1-经典血清阳性和血清阴性的猪中接种四联佐剂NA-RP均显示出对H1N1病毒具有统计学显著性的保护作用。当在存在被动转移的N1-经典抗体的条件下接种猪时,N1-经典效价水平降低,但仍呈阳性。此外,令人吃惊的是,当在N1-经典血清阴性的猪中接种时,与Xsolve佐剂一起使用的四联NA-RP疫苗对N1-经典抗原具有非常高的免疫原性。

[0223] 实施例3

[0224] 具有双NA基因RP构建体的四联神经氨酸酶(NA)疫苗制剂的疫苗功效评价

[0225] 在这项研究中的疫苗由两种RNA颗粒构建体组成,每种构建体编码来自美国当代IAV-S分离株的两个NA基因。一种构建体具有两个N1系统发生簇(N1-经典和N1-大流行)和另一种构建体具有两个N2簇(N2-1998和N2-2002)。不使用佐剂,将疫苗配制成不同剂量。研究目的是在疫苗组分血清阴性的断奶仔猪中确定以不同剂量配制的四联NA-RP疫苗对H1N2(N2-2002)病毒感染的功效和免疫原性。

[0226] 材料和方法

[0227] 双基因(DG)NA-RP抗原的构建和疫苗制剂

[0228] 每种构建体均由 $\alpha$ 病毒非结构蛋白开放阅读框、后接一个NA糖蛋白基因序列的亚基因组启动子、间隙序列、后接第二NA糖蛋白基因的第二亚基因组启动子序列和最后是 $\alpha$ 病毒非翻译区组成。整合入单一RP构建体中的NA DG来自美国目前流行的猪流感病毒(SIV)分离株,并用于合成质粒载体pVHV中的NA基因(见表5)。质粒载体pVHV是委内瑞拉马脑炎病毒

(TC-83) 无毒人疫苗株的衍生物。针对序列组成对完成的复制子颗粒进行验证并在体外转录成RNA。将每种NA复制子RNA与编码VEE衣壳辅助蛋白和糖蛋白序列的辅助RNA一起电穿孔进入Vero细胞中,从而将NA复制子RNA包装到RP中。将多价免疫荧光测定法用于定量功能性N1和N2特异性RP并测定疫苗剂量。连续稀释待测物质,加入48孔板中的Vero细胞单层中,并在37°C下孵育18-24hr。固定细胞,并使用一抗N1或N2抗体,随后使用FITC偶联的二抗染色。对单个抗原阳性细胞计数,并以RP/mL为单位计算滴度。

[0229] 表5

[0230] 在NA-RP构建体中编码的N1和N2基因

| 构建体      | 病毒供体和基因位置  | NA 系统发生簇<br>(GENBANK 登录号) 和基因位<br>置            |
|----------|--|--|
|          |  |  |
| N1-DG-RP | 5': A/猪/MN/A01483170/2014 (H1N1)<br>3': A/猪/IA/A01410307/2014 (H1N1) | 5'-N1 大流行 (KP036969) -N1 经<br>典 (KJ605083) -3' |
| N2-DG-RP | 5': A/猪/MI/A02077465/2015 (H1N2)<br>3': A/猪/IL/A01475495/2014 (H1N2) | 5'-N21998 (KR982634) -N22002<br>(KJ941362) -3' |

[0232] 在由谷氨酸一钠、蔗糖、PVP、硫酸钠和HEPES组成的稳定剂中配制四个不同剂量水平的疫苗(参见,表6)。安慰剂疫苗由不含任何RP构建体的磷酸盐缓冲液(PBS)组成。

[0233] 表6

[0234] 疫苗剂量

| 疫苗   | 每 mL 的 RP 拷贝数       |                     |                     |
|------|---------------------|---------------------|---------------------|
|      | N1-DG-RP            | N2-DG-RP            | 总计                  |
| 疫苗 1 | 5.0x10 <sup>6</sup> | 2.5x10 <sup>7</sup> | 3.0x10 <sup>7</sup> |
| 疫苗 2 | 5.6x10 <sup>5</sup> | 2.8x10 <sup>6</sup> | 3.3x10 <sup>6</sup> |
| 疫苗 3 | 2.2x10 <sup>5</sup> | 1.1x10 <sup>6</sup> | 1.3x10 <sup>6</sup> |
| 疫苗 4 | 5.6x10 <sup>4</sup> | 2.8x10 <sup>5</sup> | 3.3x10 <sup>5</sup> |

[0236] 病毒

[0237] 攻击病毒A/猪/IL/A01475495/2014 (H1N2) 是从USDA国家兽医服务实验室获得的。H1N2分离株具有H1-δ1簇的HA基因和N2-2002簇的NA基因。在MDCK细胞培养物中繁殖病毒。感染汇合细胞约48小时,直至在超过70%的细胞单层中出现明显的细胞病变作用为止。收获时,从容器中除去上清液,并且在-60°C或更低温度下保存病毒之前通过离心澄清。

[0238] 动物

[0239] 根据血清学筛查从高健康猪群中选择断奶猪仔以确认不存在针对疫苗和攻击毒株的神经氨酸酶抑制(NI)抗体。这些动物是雄性和雌性混合的,并且在第一次接种时约3周龄。

[0240] 接种、攻击和样品收集;肺部病理学检查;病毒脱落和神经氨酸酶抑制(NI)检测

[0241] 如上文所述。

[0242] 结果

[0243] 四联NA-DG-RP疫苗针对攻击感染的功效

[0244] 宏观肺病变如图7中所示。在安慰剂对照猪的肺中,H1N2攻击感染导致平均16.7%的病变。与剂量水平无关,接种的猪具有平均3.3%或更少的肺病变,并且显著低于安慰剂组( $p<0.0001$ )。

[0245] 鼻脱落(参见,图8)

[0246] 在攻击前的时间点,所有猪的病毒脱落均为阴性。在1DPC时,接种的猪均无脱落病毒,而在安慰剂组中有1头猪脱落 $102.5\text{TCID50}/\text{mL}$ 病毒。在3DPC时,与接种安慰剂的猪相比,接种配制成前两个最高剂量的猪(疫苗1和2)鼻腔中的病毒显著减少。在5DPC时,与安慰剂组相比,仅接种最高疫苗剂量(疫苗1)的猪的病毒脱落显著减少。

[0247] 针对接种的免疫应答

[0248] 神经氨酸酶抑制(NI)效价如图9中所示。在所有接种的猪中,以不同剂量水平配制的疫苗均诱导血清转化(N2-2002效价>40),并且最高效价在第二次接种后14天时。在14DPV2和-1DPC时检测到的接种组之间的平均效价没有显著差异。然而,似乎检测到的NI效价水平与疫苗剂量有关(剂量越高,NI效价越高)。在所有样品收集时间点,安慰剂组的猪都保持血清阴性。

[0249] 总结

[0250] H1N2感染诱导较高的肺病变评分,并伴有较多鼻脱落。无论所检测的疫苗剂量水平如何,对于肺病变而言,保护作用是稳健的(最低N2-DG-RP剂量为 $2.5 \times 10^5 \text{ RP/mL}$ )。N2-DG-RP构建体至少需要 $2.5 \times 10^7 \text{ RP/mL}$ 水平,以显著减少攻击后前5天的脱落。在第二次接种后2周,所有猪均具有阳性N22002效价。在接受较高疫苗剂量的猪中观察到,检测到的抗体水平似乎随着疫苗剂量的增加而趋向于升高。

[0251] 实施例4

[0252] 具有单一基因RP构建体的2联神经氨酸酶(NA)疫苗制剂的疫苗功效评价

[0253] 进行了一项研究,以确定五种不同二价佐剂NA-RP疫苗的功效和免疫原性,每种疫苗分别编码单独、不同的当代EU IAV-S分离株的NA基因。这些NA基因在一起代表两个NA系统发生谱系和三个N2谱系(参见,下表7)。在5周龄和8周龄,通过两次肌内(IM)接种,向猪施用佐剂疫苗(每剂1mL; $5 \times 10^6$ 个RP/剂)。如下表8所示,单独检测五种佐剂NA-RP疫苗针对其相应攻击感染的功效。

[0254] 材料和方法

[0255] NA-RP抗原的构建:

[0256] 如实施例1中所述制备含有表达神经氨酸酶(NA)基因的α病毒复制子RNA的复制缺陷型RNA颗粒(RP)。

[0257] 血清反应实验:

[0258] 下表8中概述了治疗组。使用佐剂(XSolve50),在1mL体积中,以 $5 \times 10^6$ 个RP/剂的剂量水平配制NA-RP疫苗。在5周龄和8周龄,以1-mL剂量向猪IM施用疫苗。在最后一次接种后2周时收集血清样品,以定量测定针对各自谱系和同源NA蛋白的异源流感病毒株的NI抗体效价。

[0259] 接种和攻击:

[0260] 每组9只猪在5周龄和8周龄时分别通过肌内途径免疫两次,使用编码来自两个不同谱系的NA抗原的RP疫苗以及X-Solve50佐剂。安慰剂组由7只猪组成,每只均接种编码无关抗原的RP以及X-solve50。第二次接种后两周,从所有猪中采集血样,以定量测定针对属于各自谱系的异源流感病毒株的神经氨酸酶抑制(NI)抗体效价,平均NI效价如表中所示。采集血样后,用针对疫苗组分之一的谱系匹配的异源甲型流感病毒株对猪进行攻击。在攻

击后3天处死猪,每只猪收集6个肺样品(每个肺叶一个),并使用合并的肺匀浆测定病毒载量。值为病毒滴度的几何平均值( $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/mL)。使用Mann-Whitney U检验对数据进行分析。\*与各自未接种组相比,值具有显著差异( $P<0.05$ )。

[0261] 表7

[0262] 在欧洲NA-RP构建体中编码的N1和N2基因

| NA 谱系                      | 基因供体毒株                       | GenBank 登录号 <sup>1</sup> |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 2009 大流行样 N1               | A/猪/意大利/179057/2015 (H1N1)   | KU323247.1<br>ALX30323   |
| 欧亚禽类样 N1                   | A/猪/意大利/28762-3/2013 (H1N1)  | KR700532.1<br>AKJ81669   |
| 根特/1/1984 样 N2             | A/猪/意大利/248147-8/2015 (H3N2) | KU323318.1<br>ALX30429   |
| 意大利/4675/2003 样 N2         | A/猪/意大利/129452/2015 (H1N2)   | KU323215.1<br>ALX30277   |
| 苏格兰/410440/1994 样 N2(分支 1) | A/猪/英格兰/61470/2013 (H1N2)    | KR700793.1<br>AKJ82042   |
| 苏格兰/410440/1994 样 N2(分支 2) | A/猪/意大利/246087/2014 (H1N2)   | KU322976.1<br>ALX29925   |

<sup>1</sup> 核苷酸和氨基酸序列。

[0264] 表8

[0265] 治疗组和接种攻击结果

| 治疗组 | 疫苗组分                            | 攻击毒株               | 针对毒株匹配疫苗组分的 NI 效价 |      | 病毒载量              |
|-----|---------------------------------|--------------------|-------------------|------|-------------------|
|     |                                 |                    | 第一次               | 第二次  |                   |
| 1a  | Pdm N1 & 欧亚禽类 N1                | 大流行样 H1N1          | 512               | 128  | $2.01 \pm 0.90^*$ |
|     | 安慰剂                             |                    | 16                | 16   | $3.64 \pm 0.66$   |
| 2a  | Pdm N1 & 欧亚禽类 N1                | 欧亚禽类 H1N1          | 256               | 32   | $1.98 \pm 0.86^*$ |
|     | 安慰剂                             |                    | 16                | 8    | $3.23 \pm 0.53$   |
| 3a  | 根特 1984 N2 & Scot1994 N2(分支 2)  | 根特 1984 样 H3N2     | 1024              | 256  | $1.63 \pm 0.44^*$ |
|     | 安慰剂                             |                    | 8                 | 32   | $3.33 \pm 0.62$   |
| 4a  | 意大利 4675 N2 & Scot1994 N2(分支 1) | 意大利 4675 N2 样 H1N2 | 2048              | 1024 | $1.50 \pm 0.00^*$ |
|     | 安慰剂                             |                    | 4                 | 32   | $3.14 \pm 0.62$   |
| 5a  | 意大利 4675 N2 & Scot1994 N2(分支 1) | Scot1994 N2 样 H1N2 | 1024              | 1024 | $1.50 \pm 0.00^*$ |
|     | 安慰剂                             |                    | 4                 | 64   | $4.17 \pm 0.62$   |

[0267] 结果

[0268] 本实验的结果如表8中所示。所有五种NA-RP疫苗均在猪中诱导了针对各自谱系和同源NA蛋白的异源流感病毒株的功能性NI抗体效价。

[0269] 收集每只猪的肺样品,并使用合并的肺匀浆测定病毒载量。提供的值是病毒滴度的几何平均值( $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/mL)。从表8中可以明显看出,接种猪的值与其各自未接种组相

比具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) , 表明在使用异源病毒株感染后在病毒载量方面NA-RP疫苗是成功的。

[0270] 实施例5

[0271] 美国系统发生簇的确定

[0272] 美国神经氨酸酶(NA)簇的定义

[0273] 美国N1簇:

[0274] (1) 在N1簇中的氨基酸同一性

[0275] a.N1<sub>大流行</sub>或N1-大流行是~97%-100% (平均多样性%为3.12%)

[0276] b.N1<sub>经典</sub>或N1-经典是~95%-100% (平均多样性%为4.91%)

[0277] (2) N1簇之间的氨基酸同一性是~82% (平均多样性%为18.26%)

[0278] 美国N2簇:

[0279] (1) 在N2簇中的氨基酸同一性

[0280] a.N2<sub>1998</sub>或N2-1998是~94%-100% (平均多样性%为5.94%)

[0281] b.N2<sub>2002</sub>或N2-2002是~94%-100% (平均多样性%为6.37%)

[0282] (2) N2簇之间的氨基酸同一性是~88% (平均多样性%为11.84%)

[0283] 方法:

[0284] 从流感研究数据库下载从2000年至今收录的来自H1N1和H3N1病毒的US N1 (共计约1,550条序列) 和来自H1N2和H3N2病毒的US N2 (共计约2,700条序列) 的全长非冗余氨基酸序列。使用MEGA7.0.7版分析了US N1和N2数据的簇内和簇间氨基酸同一性百分比 [参见, Kumar等, Bioinformatics 28:2685-2686 (2012)]。使用MAFFT 7.294b版 [Katoh等, Nucleic Acids Res. 30:3059-3066 (2002); Katoh等, Molecular Biology and Evolution 30:772-780 (2013)] 对两条序列进行比对, 并在FastTree 2.1.8版中生成两个独立的N1和N2最大似然性系统发生树 [Price等, PLoS ONE, 5 (3) 2010:e9490]。基于N1和N2的系统发生, 将N1和N2序列分配至四个此前描述的NA抗原谱系 (N1<sub>经典</sub>、N1<sub>大流行</sub>、N2<sub>1998</sub>和N2<sub>2002</sub>) 之一 [参见, Nelson等, J Virol. 86 (16):8872-8878 (2012); Anderson等, Influenza Other Respir Viruses Suppl 4:42-51 (2013)]。标记特定的簇, 并使用MEGA命令行 (默认设置) 进一步计算多样性指标, 并且针对簇内和簇间多样性使用  $\gamma$  分布速率变化 ( $\alpha$ 为0.5) 且部分缺失设置为95%计算p距离。

[0285] 实施例6

[0286] 欧洲谱系的确定

[0287] 对EU-NA部分的简介:

[0288] 与北美类似, 欧洲猪群中的猪之间同时传播了三个亚型的甲型流感病毒H1N1、H3N2和H1N2。然而, 在每个亚型中, HA和NA基因谱系差异很大 [参见, Kuntz-Simon和Madec Zoonoses Public Health., 56 (6-7):310-325 (2009)]。如Watson等, [J. Virol., 89:9920-9931 (2015); doi:10.1128/JVI.00840-15] 等所述, 欧洲猪流感分离株的NA基因属于四个主要谱系和两个次要谱系。主要谱系包括:

[0289] 1.A(H1N1) 大流行2009样N1,

[0290] 2.欧亚禽类-样N1,

[0291] 3.A/猪/根特/1/1984-样N2(根特/84), 和

- [0292] 4.A/猪/苏格兰/410440/1994-样N2(Scot/94)。
- [0293] 与其他欧洲主要谱系不同,苏格兰/94谱系的NA区段包括在欧洲猪群中传播的四大主要病毒分支。次要欧洲流感NA谱系包括:
- [0294] 1.A/猪/意大利/4675/2003样N2,和
- [0295] 2.人季节样N2。
- [0296] 对用于分析EU NA-N1和N2基因区段的方法的描述:
- [0297] 从NCBI流感病毒资源中检索了2005至2018年之间收录的欧洲猪分离株全长NA基因的氨基酸序列[参见,Watson等,J.Virol.,89:9920-9931(2015);doi:10.1128/JVI.00840-15的参考文献32]。使用Muscle(密码子)比对仪,利用MEGA X中提供的默认设置对N1和N2序列进行比对[Kumar等,Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549(2018)]。通过使用基于Whelan和Goldman模型的最大似然性法推断进化史[Molecular Biology and Evolution 18:691-699(2001)]。使用250次重复的Bootstrap法进行系统发生测试。将离散的 $\gamma$ 分布用于模拟位点之间的进化速率差异[5个类别(+G,参数=0.7258)]。速率变化模型允许一些位点在进化上是不变的{[+I],38.08%的位点}。分析涉及244条氨基酸序列。剔除了位点覆盖率低于95%的所有位置。也就是说,在任何位置均允许少于5%的比对空位、缺失数据和模糊的碱基。在最终的数据集中共计有469个位置。在MEGA X中进行进化分析[Kumar等,Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549(2018)]。将N1分离株指定为欧亚禽类-N1样或大流行2009-N1样谱系和N2分离株指定为苏格兰/410440/1994-N2样谱系(例如,分支1或分支2)、根特/1/1984-N2样谱系、意大利/4675/2003-N2样谱系或人季节样N2谱系,如此前所述[Watson等,J.Virol.,89:9920-9931(2015)]。使用MEGA X计算谱系内和谱系之间的遗传同一性。随后,从上述每个谱系中选择一个代表性毒株作为疫苗的候选对象。
- [0298] 针对各个谱系和/或分支具有所得到的变异性范围的目标序列如下所示:
- [0299] • 具有10%变异性的A/猪/意大利/179057/2015(H1N1)序列
- [0300] • 具有15%变异性的A/猪/意大利/28762-3/2013(H1N1)序列
- [0301] • 具有10%变异性的A/猪/意大利/248147-8/2015(H3N2)序列
- [0302] • 具有10%变异性的A/猪/意大利/129452/2015(H1N2)序列
- [0303] • 具有10%变异性的A/猪/英格兰/61470/2013(H1N2)序列
- [0304] • 具有10%变异性的A/猪/意大利/246087/2014(H1N2)序列。
- [0305] 本发明不限于本文所述具体实施方式的范围。实际上,除了本文描述的那些以外,根据前面的描述,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。此类修改均旨在落入所附权利要求的范围内。
- [0306] 还应理解的是,针对核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值均为近似值,并提供用于描述。

## 序列表

<110> Intervet, Inc.  
 Intervet International, BV  
 Mogler, Mark A.  
 Kitikoon, Pravina  
 Puttamreddy, Supraja  
 Strait, Erin  
 Segers, Ruud A.M.  
 Nagaraj, Basav

<120> 猪甲型流感病毒疫苗

<130> 24554W0

<150> US 62/607,101

<151> 2017-12-18

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

[0001]

<210> 1  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的猪流感病毒序列

<400> 1

|   |    |
|---|----|
| atgaatacta atcaaaggat cattaccatt gggacagtct gcatgattgt cggtatcatc | 60 |
|---|----|

|   |     |
|---|-----|
| tctctttgc ttcagattgg aaacattgtc tcacttgga ttagccattc aattcagacc | 120 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| ggatgggaga atcacactga gatgtgcaat caaagtgtca ttacttatgt caataaacact | 180 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| tgggtgaacc ggacttatgt gaacatttagc aatatcaaga ttgcaactat tcaagatgt | 240 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| actagtatca ttttggccgg aaattcttagt ct当地tggcgg tgtcagggtg ggctgtctac | 300 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| agcaaagaca atagcattag gattggatca aaagggaca tttcgcat tagagagcct | 360 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| ttcatctcat gctcacaatt ggagtgccgg accttcttc tgacccaagg ggcattgctg | 420 |
|--|-----|

|  |      |
|--|------|
| aatgacaaac attcaaattgg taccgtcaag gacaggagtc cttatagaac cctgtatgac | 480  |
| tgccttatcg gtgaggcccc ttgcgcatac aactcacggt tcgaatctgt cgcatggta   | 540  |
| gcacatgtctt gtcgtatgg aatggatgg cttaaatcg ggatcagtgg accggataat    | 600  |
| ggtgctgtcg cagtcttcaa atacaacgga atcattacag atacaatcaa atctggagg   | 660  |
| aacaagattc tttagaactca agaatcagag tgtgtctgt tgaacggatc atgtttaca   | 720  |
| gtcttgacag atggcccaag caatggacaa gcctcttaca aaatcttaa ggtggaaaaa   | 780  |
| ggaaagatta tcaagtgcgt tgagctggat gcccccaatt accactatga agaatgctct  | 840  |
| tgttatccag atactggcaa agtcatgtgt gtctgccgg acaattggca cgcctcaaac   | 900  |
| cggccatggg tgtcggtcaa tcagaatctt gactatcaa ttggatacat ttgctctgga   | 960  |
| gtctttggtg ataaccctag atccaatgtat gggaaaggca attgtggccc ggtccttct  | 1020 |
| aatggagcaa atggagtgaa aggttctca tatcggtatg gaaatggtgt gtggattgg    | 1080 |
| [0002]   |      |
| cggaccaagt caatcaactc tcggcggtt tttgagatga tttggatcc gaatggatgg    | 1140 |
| actgagacag attcatcatt ctgcgtatgg caggacatta tcgctctaa tgattggct    | 1200 |
| ggatactcg gatctttgt ccaacatccg gagcttactg gtatgaattt cattaggcct    | 1260 |
| tgtttctggg tggaatttgc cagagggcaa cccaaaggaaa gcactatctg ggctagcggt | 1320 |
| tccagcatct cattctgtgg cgtcaattcg gaaaccgctt cctggcttg gccagacgga   | 1380 |
| gctgatctgc cattcaccat tgacaag                                      | 1407 |
| <210> 2  |      |
| <211> 469  |      |
| <212> PRT  |      |
| <213> 猪流感病毒  |      |
| <400> 2  |      |

Met Asn Thr Asn Gln Arg Ile Ile Thr Ile Gly Thr Val Cys Met Ile  
 1 5 10 15

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Val Gly Ile Ile Ser Leu Leu Leu Gln Ile Gly Asn Ile Val Ser Leu               |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Trp Glu Asn His Thr Glu Met               |     |     |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Val Asn Asn Thr Trp Val Asn Arg               |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Ile Lys Ile Ala Thr Ile Gln Asp Val               |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Thr Ser Ile Ile Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly               |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Trp Ala Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly               |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
| Asp Ile Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser Gln Leu Glu               |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| <b>[0003]</b> Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser               |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Cys Pro Ile Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser               |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Met Gly Trp Leu Thr               |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr               |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Lys Ile Leu               |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Met Asn Gly Ser Cys Phe Thr               |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Val Leu Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe               |     |     |     |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
|   | 245 | 250 | 255 |
| Lys Val Glu Lys Gly Lys Ile Ile Lys Ser Ile Glu Leu Asp Ala Pro |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Thr Gly Lys Val |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| Met Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Ala Ser Asn Arg Pro Trp Val |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
| Ser Phe Asn Gln Asn Leu Asp Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Ser Asn Asp Gly Lys Gly Asn Cys Gly |     |     |     |
| 325   | 330 | 335 |     |
| Pro Val Leu Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Arg |     |     |     |
| 340   | 345 | 350 |     |
| Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Asn Ser Arg |     |     |     |
| [0004] 355  | 360 | 365 |     |
| Ser Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp |     |     |     |
| 370   | 375 | 380 |     |
| Ser Ser Phe Ser Met Lys Gln Asp Ile Ile Ala Leu Asn Asp Trp Ser |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Met Asn |     |     |     |
| 405   | 410 | 415 |     |
| Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Gln Pro Lys |     |     |     |
| 420   | 425 | 430 |     |
| Glu Ser Thr Ile Trp Ala Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val |     |     |     |
| 435   | 440 | 445 |     |
| Asn Ser Glu Thr Ala Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Leu Pro |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |
| Phe Thr Ile Asp Lys   |     |     |     |
| 465   |     |     |     |

|        |   |      |
|--------|---|------|
| <210>  | 3   |      |
| <211>  | 1407  |      |
| <212>  | DNA   |      |
| <213>  | 人工序列  |      |
| <220>  |   |      |
| <223>  | 密码子优化的猪流感病毒序列   |      |
| <400>  | 3   |      |
|        | atgaatccta accaaaagat cattaccatt gttcggct gtatgacaat tgaaatggct     | 60   |
|        | aacctgatecc ttcaaattgg aaacattatac tcaatctggg tcagccactc aattcaaatt | 120  |
|        | gaaatcaat cgcatgattga aacatgcaac caaagcgtca ttacttacga aaacaacact   | 180  |
|        | tgggtgaacc agacctaagt gaacatcagc aacaccaact tcgctgctgg acagtcgtg    | 240  |
|        | gttccgtga aactggcgaa caactccctt ctctgccctg tgagcggatg ggctatctac    | 300  |
|        | tccaaagaca actcagtcag aatcggttcc aagggggatg tgggtcat aaggaaacca     | 360  |
| [0005] | ttcatctcat gctctccct tgaatgcaga accttcttct tgactcaagg ggccttgcta    | 420  |
|        | aatgacaaac attccaacgg aaccattaaa gacaggagcc catatcgac cctgatgagc    | 480  |
|        | tgcctatcg gtgaagtccc ctgcctatac aactcaagat ttgagtcagt cgcttggta     | 540  |
|        | gcatccgctt gtcgtatgg catcaattgg ctcaccattg gaatttctgg cccagacagt    | 600  |
|        | ggggcagtgg ctgtgctgaa gtacaatggc attataacag acactatcaa gtcgtggagg   | 660  |
|        | aacaacatat tgagaactca agagtcgaa tgtgcatttg tgaatggttc ttgcattacc    | 720  |
|        | atcatgaccg atggaccatc cgatggacag gcctctaca agatcttcag aatcgaaaag    | 780  |
|        | ggaaagatcg tcaaattcagt cgaaatgaat gcccttaact accactatga ggaatgtcc   | 840  |
|        | tgttatcccg attccctccga aatcacgtgc gtgtgcaggataactggca tggctccat     | 900  |
|        | cggccgtggg tgtcttcaa ccagaatctg gaatatcaga tcggatacat ttgctccggg    | 960  |
|        | gtgttcggag acaatcccgcc ccctaattgt aagacaggct cgtgtggtcc agtctcgct   | 1020 |
|        | aacggagcca acggagtcaa aggatttca ttcaaatacg gcaatggagt gtggataggg    | 1080 |

|   |      |
|---|------|
| agaactaaga gcatttcctc aagaaaagg ttcgagatga tttggatcc gaatggatgg   | 1140 |
| actggactg acaacaagtt ctcaatcaag caagacatcg tggaaatcg cgagtggta    | 1200 |
| ggatatagcg ggtccttgt gcagcacccc gaactgaccg ggctggattt tattagacct  | 1260 |
| tgcttctggg tcgaactcat cagagggcga cccgaagaga acacaatctg gactageggg | 1320 |
| agcagcatct cctttgtgg tgtgaactcg gacactgtgg gttggtctt gccagacggt   | 1380 |
| gctgagttgc cttttaccat tgacaag                                     | 1407 |
| <210> 4   |      |
| <211> 469   |      |
| <212> PRT   |      |
| <213> 猪流感病毒   |      |
| <400> 4   |      |
| Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Cys Met Thr   |      |
| 1 5 10 15   |      |
| [0006]  |      |
| Ile Gly Met Ala Asn Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile   |      |
| 20 25 30  |      |
| Trp Val Ser His Ser Ile Gln Ile Gly Asn Gln Ser Gln Ile Glu Thr   |      |
| 35 40 45  |      |
| Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln   |      |
| 50 55 60  |      |
| Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val   |      |
| 65 70 75 80   |      |
| Val Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly   |      |
| 85 90 95  |      |
| Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly   |      |
| 100 105 110   |      |
| Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser Pro Leu Glu   |      |
| 115 120 125   |      |

Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His  
 130 135 140

Ser Asn Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser  
 145 150 155 160

Cys Pro Ile Gly Glu Val Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser  
 165 170 175

Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Asn Trp Leu Thr  
 180 185 190

Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Ser Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr  
 195 200 205

Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu  
 210 215 220

Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr  
 225 230 235 240

Ile Met Thr Asp Gly Pro Ser Asp Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe  
 [0007] 245 250 255

Arg Ile Glu Lys Gly Lys Ile Val Lys Ser Val Glu Met Asn Ala Pro  
 260 265 270

Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ser Ser Glu Ile  
 275 280 285

Thr Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val  
 290 295 300

Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly  
 305 310 315 320

Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Lys Thr Gly Ser Cys Gly  
 325 330 335

Pro Val Ser Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys  
 340 345 350

Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Ser Ser Arg  
 355 360 365

Lys Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp  
 370 375 380

Asn Lys Phe Ser Ile Lys Gln Asp Ile Val Gly Ile Ser Glu Trp Ser  
 385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp  
 405 410 415

Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Glu  
 420 425 430

Glu Asn Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val  
 435 440 445

Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro  
 450 455 460

Phe Thr Ile Asp Lys  
 465

[0008] <210> 5  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 密码子优化的猪流感病毒序列

<400> 5  
 atgaatccaa accaaaagat aatcacaatt ggctctgttt ctctcaactat tgccacaatg 60  
 tgccctccta tgcaaattgc catcctgatt actaatgtca cattgcactc caatcagtac 120  
 gaatgcaact accccccaaa caaccaagtg atactgtgtg aaccaactat catcaaaaga 180  
 aacattactg agattgtgta tctggccaac accaccatag agaaggaaat ctgccccaaag 240  
 ctggcagaat acagaaaactg gtcgaagccg caatgtaaaa ttacagggtt tgcaccttt 300  
 tc当地aggaca attcgattag gcttctgctg ggtggcgaca tttggtaac gagagaacct 360  
 tatgtgtcat gcgatcctga taagtgttac cagttgccccc ttggacaagg aacaacgctc 420

|   |      |
|---|------|
| aacaacagac attcaaacga caccgtgcat gataggaccc cttatcgaa cctattgatg    | 480  |
| aatgagttgg gtattccatt ccatttgggg accaaacaag tgtgcacgc atggccagc     | 540  |
| tcatcctgcc atgatggacg ggcttggctt catgtctgtat ttactggca tgacaacaat   | 600  |
| gcaactgcca gcatcattta caatggacgc ctgtcgata gtattggttc atggccaaa     | 660  |
| agaatcctca ggacccagga gtcggaatgc gtgtgcata atggaacttg taccgtggc     | 720  |
| atgactgatg ggtccgccttc aggaatagct gacactaaaa tcctgttcat tgaagagggg  | 780  |
| aaaatcgtgc acatttagccc actgtctgggg tccgctcagc acgtggagga gtgctcctgc | 840  |
| tatccccat acccagggtt cagatgcata ttagagaca actggaaagg ctccaacaga     | 900  |
| cctgtcgtgg atattaatgt gaaggattat agcattgtgt cctcctacgt gtgctccgga   | 960  |
| ctgggtggag acaccccccag aaaagacgac agatccagct ccagcaattt tctgaatcct  | 1020 |
| aacaacgaga aaggggagca tggagtgaaa ggctggcct ttgatgatgg aaatgacgtg    | 1080 |
| [0009]  |      |
| tggatgggaa ggacaatcaa cgagacatta cgctcaggat atgaaacctt caaagtcatt   | 1140 |
| gaaggctggt ccaaacctaa ttccaaattt cagataatc gccaagtcata tggtaaaaga   | 1200 |
| gatgataggt ccggtttattt tggaaattttc tctgtcgaag gaaagagctg tatcaatcgg | 1260 |
| tgttttacg tggagctgat cagaggaagg aaacagggaaa ctgcagtgat gtggacgtca   | 1320 |
| aattccattt tgggtttttt tggcacctca ggtacctatg gaaccggctc atggcctgat   | 1380 |
| ggggcggaca tcaatctcat gcctgtg                                       | 1407 |
| <210> 6   |      |
| <211> 469   |      |
| <212> PRT   |      |
| <213> 猪流感病毒   |      |
| <400> 6   |      |

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr  
 1 5 10 15

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Ile Ala Thr Met Cys Leu Leu Met Gln Ile Ala Ile Leu Ile Thr Asn               |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Val Thr Leu His Ser Asn Gln Tyr Glu Cys Asn Tyr Pro Pro Asn Asn               |     |     |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Gln Val Ile Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Lys Arg Asn Ile Thr Glu               |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Ile Val Tyr Leu Ala Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys               |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly               |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly               |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
| Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys               |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| <b>[0010]</b> Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Arg His |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Ser Asn Asp Thr Val His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met               |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Asn Glu Leu Gly Ile Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile               |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Arg Ala Trp Leu His Val                   |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| Cys Ile Thr Gly His Asp Asn Asn Ala Thr Ala Ser Ile Ile Tyr Asn               |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Arg Ile Leu Arg               |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val               |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Ile Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe               |     |     |     |

|  |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|
|  | 245 | 250 | 255 |
| Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Ile Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ala        |     |     |     |
| 260  | 265 | 270 |     |
| Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg        |     |     |     |
| 275  | 280 | 285 |     |
| Cys Ile Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Val Asp        |     |     |     |
| 290  | 295 | 300 |     |
| Ile Asn Val Lys Asp Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly        |     |     |     |
| 305  | 310 | 315 | 320 |
| Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asp Asp Arg Ser Ser Ser Asn            |     |     |     |
| 325  | 330 | 335 |     |
| Cys Leu Asn Pro Asn Asn Glu Lys Gly Glu His Gly Val Lys Gly Trp        |     |     |     |
| 340  | 345 | 350 |     |
| [0011] Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Asn Glu |     |     |     |
| 355  | 360 | 365 |     |
| Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser        |     |     |     |
| 370  | 375 | 380 |     |
| Lys Pro Asn Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Glu Arg        |     |     |     |
| 385  | 390 | 395 | 400 |
| Asp Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser        |     |     |     |
| 405  | 410 | 415 |     |
| Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Gln        |     |     |     |
| 420  | 425 | 430 |     |
| Glu Thr Ala Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly        |     |     |     |
| 435  | 440 | 445 |     |
| Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile        |     |     |     |
| 450  | 455 | 460 |     |
| Asn Leu Met Pro Val  |     |     |     |
| 465  |     |     |     |

<210> 7  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 密码子优化的猪流感病毒序列

|   |      |
|---|------|
| <400> 7   |      |
| atgaatccaa atcaaaagat cattactatt ggatcagtct cactcatcat tgccacaatt             | 60   |
| <br>tgttcctta tgcaaattgc aatccttgc actactgtca cattgcattt caaggcagcat          | 120  |
| <br>gactacaact cccccccaaa caaccaagct actctgtgtg aaccaacaat cattgaacgg         | 180  |
| <br>aaaacaactg aaattgtgta tcttactaac accaccattt agaaagaagt ctgccccaaa         | 240  |
| <br>cttgtaggtt accggaactg gtcaaaggct caatgttaaca ttactggatt tgccaccattt       | 300  |
| <br>tcgaaagaca attctattcg gttgtctgct ggtggggaca tctgggtgac tagggAACCT         | 360  |
| <br>[0012] tatgtgtcat gcgatcctga caagtgttac caatttgcctt ttggacaggg tacaactctt | 420  |
| <br>aacaacggac attcgaataa cacagtccat gataggaccc cgtatcgac ccttcttatg          | 480  |
| <br>aatgagcttg gtgtcccttt tcatcttggaa accagacaag tgtgcattgc ttggcttagc        | 540  |
| <br>tcatcttggc acgatggaa agcatggctg catgtctgtg tcactggaaa tgataacaat          | 600  |
| <br>gctactgcta gcttcattcta caatggtagg cttgtggatt ctattggttc gtggcgaaa         | 660  |
| <br>aacattctcc ggacccaaga gtcagaatgc gtctgttatca atggaacatg tactgtcg          | 720  |
| <br>atgactgatg gatccgctag tggaaaagca gataccaaaa tcttggatgt cgaagaggg          | 780  |
| <br>aagatcgccc atatcagcac tctgttggaa tctgcacagc acgtcgagga atgctcctgt         | 840  |
| <br>tatcctaggt ttccggaggt ccgggtgttc tgccgggaca actggaaagg atctaata           | 900  |
| <br>cccatcgatcg acatcaatgt caagaattac agcattgtct cttcgatgt ctgcagtg           | 960  |
| <br>cttgcgggtg atactcccg agagagcgac tcagtctcct catcttattt cttggatccg          | 1020 |

|   |   |            |            |             |            |      |
|---|---|------------|------------|-------------|------------|------|
| aacaatgaga  | agggtggtca  | tgggtgaaa  | gggtggcct  | ttgatgatgg  | taatgacgtg | 1080 |
| tggatggaa   | gaacaatcaa  | cgagacttg  | cgcttggat  | atgaaacctt  | caaagtcatt | 1140 |
| gaaggctggt  | ccacagctaa  | ctccaagtca | cagacaaata | gacaagtgtat | tgtcgaaaaa | 1200 |
| ggagacaggt  | caggatattc  | tgggatttc  | tcagtcgagg | gaaagaactg  | catcaatagg | 1260 |
| tgcttctatg  | tggagttgat  | tagaggacgg | aaagaggaga | caaaagtctg  | gtggaccagt | 1320 |
| aactcaattg  | tcgtgtttg   | tggcacctca | gggacttatg | gtactggctc  | ttggccggat | 1380 |
| ggtgctgaca  | tcaatctcat  | gc当地       |            |             |            | 1407 |
| <210>   | 8   |            |            |             |            |      |
| <211>   | 469   |            |            |             |            |      |
| <212>   | PRT   |            |            |             |            |      |
| <213>   | 猪流感病毒   |            |            |             |            |      |
| <400>   | 8   |            |            |             |            |      |
| [0013]  | Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Ile |            |            |             |            |      |
|   | 1   | 5          | 10         |             | 15         |      |
| Ile Ala Thr Ile Cys Phe Leu Met Gln Ile Ala Ile Leu Val Thr Thr |   |            |            |             |            |      |
|   | 20  |            | 25         |             | 30         |      |
| Val Thr Leu His Phe Lys Gln His Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Asn Asn |   |            |            |             |            |      |
|   | 35  |            | 40         |             | 45         |      |
| Gln Ala Thr Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Lys Thr Thr Glu |   |            |            |             |            |      |
|   | 50  |            | 55         |             | 60         |      |
| Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Val Cys Pro Lys |   |            |            |             |            |      |
|   | 65  |            | 70         |             | 75         |      |
| Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Asn Ile Thr Gly |   |            |            |             |            |      |
|   | 85  |            | 90         |             | 95         |      |
| Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly     |   |            |            |             |            |      |
|   | 100   |            | 105        |             | 110        |      |
| Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Lys |   |            |            |             |            |      |
|   | 115   |            | 120        |             | 125        |      |

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Gly His  
 130 135 140

Ser Asn Asn Thr Val His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met  
 145 150 155 160

Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Arg Gln Val Cys Met  
 165 170 175

Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val  
 180 185 190

Cys Val Thr Gly Asn Asp Asn Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn  
 195 200 205

Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Asn Ile Leu Arg  
 210 215 220

Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val  
 225 230 235 240

[0014] Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe  
 245 250 255

Val Glu Glu Gly Lys Ile Val His Ile Ser Thr Leu Leu Gly Ser Ala  
 260 265 270

Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Phe Pro Gly Val Arg  
 275 280 285

Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp  
 290 295 300

Ile Asn Val Lys Asn Tyr Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly  
 305 310 315 320

Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Glu Ser Asp Ser Val Ser Ser Tyr  
 325 330 335

Cys Leu Asp Pro Asn Asn Glu Lys Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp  
 340 345 350

Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Asn Glu

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
|   | 355 | 360 | 365 |
| Thr Leu Arg Leu Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser |     |     |     |
| 370   | 375 | 380 |     |
| Thr Ala Asn Ser Lys Ser Gln Thr Asn Arg Gln Val Ile Val Glu Lys |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Asn |     |     |     |
| 405   | 410 | 415 |     |
| Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Glu |     |     |     |
| 420   | 425 | 430 |     |
| Glu Thr Lys Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly |     |     |     |
| 435   | 440 | 445 |     |
| Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |
| Asn Leu Met Pro Ile   |     |     |     |
| 465   |     |     |     |
| <210> 9   |     |     |     |
| <211> 13  |     |     |     |
| <212> DNA   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 5' 侧翼序列   |     |     |     |
| <400> 9   |     |     |     |
| ggcgccgc acc  |     |     | 13  |
| <210> 10  |     |     |     |
| <211> 8   |     |     |     |
| <212> DNA   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 3' 侧翼序列   |     |     |     |
| <400> 10  |     |     |     |
| ttaattaa  |     |     | 8   |

|  |       |  |
|--|-------|--|
| <210>  | 11    |  |
| <211>  | 1410  |  |
| <212>  | DNA   |  |
| <213>  | 猪流感病毒 |  |
| <400>  | 11    |  |
| atgaatccaa accaaaagat aataaccatt gttcggtct gtatgacaat tggaatggct   | 60    |  |
| aacttaatat tacaaatttg aacataatc tcaatatgga tttagccactc aattcaactt  | 120   |  |
| ggaatcaaa gtcagattga aacatgcaat caaagcgtca ttacttatga aaacaacact   | 180   |  |
| tggtaaatc agacatatgt taacatcage aacaccaact ttgctgctgg acagtcagt    | 240   |  |
| gttccgcga aattagcggg caattcctcc ctctgccctg ttagtggatg ggctatatac   | 300   |  |
| agtaaagaca acagtgttaag aatcggttcc aaggggatg tggttgtcat aagggAACCA  | 360   |  |
| ttcatatcat gctccccctt agaatgcaga accttcttct tgactcaagg ggccttgcta  | 420   |  |
| aatgacaaac attccaatgg aaccattaaa gataggagcc catatgaac cctgtatgagc  | 480   |  |
| [0016]   |       |  |
| tgcctattt gtgaagttcc ctctccatac aactcaagat ttgagtcggt cgcttggta    | 540   |  |
| gcaagtgcgtt gtcacgatgg catcaattgg ctaacaatcg gaatttctgg cccagacagt | 600   |  |
| ggggcagtgg ctgtattaaa gtacaatggc ataataacag acactatcaa gagttggaaa  | 660   |  |
| aacaatataat tgagaacaca agagtctgaa tgtgcattgt taaatggttc ttgcattacc | 720   |  |
| ataatgaccg atggaccaag tggacacag gcctcataca agatcttcg aatagaaaag    | 780   |  |
| gaaagatag tcaaattcgt cggaaatgaat gccctaatt atcactatga ggaatgctcc   | 840   |  |
| tgttatcctg attcttagtga aatcacatgt gtgtcaggg ataactggca tggctcgaat  | 900   |  |
| cgaccgtggg tgtcttcaa ccagaatctg gaatatcaga taggatacat atgcagtggg   | 960   |  |
| atttcggag acaatccacg ccctaattgt aagacaggca gttgtggcc agtacgtct     | 1020  |  |
| aatggagcaa atggagtaaa aggatttca ttcaaatatg gcaatgggtt ttggataggg   | 1080  |  |
| agaactaaaa gcatttagttc aagaaaaggt tttgagatga ttggatgcc aaatggatgg  | 1140  |  |

|   |      |
|---|------|
| actggacag acaaaaacctt ctcaataaag caagatatac taggataaa tgagtggta   | 1200 |
| ggatacagcg ggagtttgt tcagcatcca gaactaacag ggctgaattt tataagacct  | 1260 |
| tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga cccaaagaga acacaatctg gactagcggg | 1320 |
| agcagcatat cctttgtgg tgtaaacagt gacactgtgg gttggcttg gccagacgg    | 1380 |
| gctgagttgc catttaccat tgacaagtaa                                  | 1410 |
| <210> 12  |      |
| <211> 469   |      |
| <212> PRT   |      |
| <213> 猪流感病毒   |      |
| <400> 12  |      |
| Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Cys Met Thr   |      |
| 1   | 5    |
| Ile Gly Met Ala Asn Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile   |      |
| [0017] 20   | 25   |
| Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Leu Gly Asn Gln Ser Gln Ile Glu Thr   |      |
| 35  | 40   |
| Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln   |      |
| 50  | 55   |
| Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val   |      |
| 65  | 70   |
| 75  | 80   |
| Val Ser Ala Lys Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly   |      |
| 85  | 90   |
| 95  |      |
| Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly   |      |
| 100   | 105  |
| 110   |      |
| Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser Pro Leu Glu   |      |
| 115   | 120  |
| 125   |      |
| Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His   |      |
| 130   | 135  |
| 140   |      |

Ser Asn Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser  
 145 150 155 160  
  
 Cys Pro Ile Gly Glu Val Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser  
 165 170 175  
  
 Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Asn Trp Leu Thr  
 180 185 190  
  
 Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Ser Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr  
 195 200 205  
  
 Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Lys Asn Asn Ile Leu  
 210 215 220  
  
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr  
 225 230 235 240  
  
 Ile Met Thr Asp Gly Pro Ser Asp Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe  
 245 250 255  
  
**[0018]** Arg Ile Glu Lys Gly Lys Ile Val Lys Ser Val Glu Met Asn Ala Pro  
 260 265 270  
  
 Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ser Ser Glu Ile  
 275 280 285  
  
 Thr Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val  
 290 295 300  
  
 Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly  
 305 310 315 320  
  
 Ile Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Lys Thr Gly Ser Cys Gly  
 325 330 335  
  
 Pro Val Ser Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys  
 340 345 350  
  
 Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Ser Ser Arg  
 355 360 365  
  
 Lys Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 370   | 375 | 380 |
| Lys Asn Phe Ser Ile Lys Gln Asp Ile Ile Gly Ile Asn Glu Trp Ser     |     |     |
| 385   | 390 | 395 |
| Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asn     |     |     |
| 405   | 410 | 415 |
| Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys     |     |     |
| 420   | 425 | 430 |
| Glu Asn Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val     |     |     |
| 435   | 440 | 445 |
| Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |
| Phe Thr Ile Asp Lys   |     |     |
| 465   |     |     |
| <210> 13  |     |     |
| [0019] <211> 1408   |     |     |
| <212> DNA   |     |     |
| <213> 猪流感病毒   |     |     |
| <400> 13  |     |     |
| atgaacccaa atcagaagat aataatcatt agttcaatct gtatgacaaa tggaattgct   | 60  |     |
| agcttgatat tacaaattgg gaacataata tcaatatgga ttagccattc aattcaaatt   | 120 |     |
| gagaacccaa accagaccga ccatgcaatc aaagcgttat tatcacgaa aacaacacat    | 180 |     |
| gggttaaatca aacgttatgtt aacatcagca acaataattt tgttgttcaa cagacagtgg | 240 |     |
| tttcaatgaa attagcgggc agttttctc tctgccctgt tagtggatgg gctatataca    | 300 |     |
| gtaaagataa cagtgttcaa atcggttcca aaggggatgt gtttgtcata agagagccat   | 360 |     |
| tcatctcatg ctcccatttgaatgttagaa cttttttttt aactcaaggg gccctactga    | 420 |     |
| atgataaaaca ttctaatgga accgttaag acagaagccc ctatcgaacc ctgtatgagct  | 480 |     |
| gtcctattgg tgaagtcccc tctccataaca actcaaaatt tgagtcagtt gcttggtcag  | 540 |     |

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | caagtgcgg ccatgatggc accagtttgt tgacaattgg gatttcttgt ccagacaatg     | 600  |
|        | gagcagtggc tgtgttggaa tacaatgaca taataacaga cactatcaag agttggaaaa    | 660  |
|        | acaacatatt gagaacacaa gaatctgaat gtgcattttt gaatggttct tgctttactg    | 720  |
|        | taatgaccga tggaccaagt aatggcagg cctcatacaa gatcttcaaa atagaaaagg     | 780  |
|        | ggaaagtagt caaatcagtc gagttgaatg ctcctaatta tcactatgag gaatgttcct    | 840  |
|        | gttatcctga ttctggtaaa atcatatgtg tatgcaggga caattggcat ggctcgaatc    | 900  |
|        | gaccatgggt gtcttcaat cagaatctgg agtacatcgat aggatacata tgcagtgggg    | 960  |
|        | ttctcgaga caatccgcgc cctaattgata gaacaggcag ttgtggcca gtatcatctc     | 1020 |
|        | atggagcaaa tgggttaaaa gggtttcgt ttaaatacgg caatggatt tggataggga      | 1080 |
|        | gaactaaaag cactattaca aggagtgggt ttgagatgat ttgggaccca aacggatgg     | 1140 |
|        | ctggaacaga caataatttc tcagtgaagc aagatatcgta aggaataact aactggcag    | 1200 |
| [0020] | gatacgcggg agtttggtcc aacatccaga attaaccggta ttggattgttta tagaccttgc | 1260 |
|        | cttctgggtt gaactaatca gagggagacc caaagagaac acaatctggta ctgcggaaag   | 1320 |
|        | cagcatatcc ttttgtgggt taaatagtga cactgtgggt tggcttggc cagacgggtgc    | 1380 |
|        | ttagttgcca tttaccatttgc acaagtaa                                     | 1408 |

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 猪流感病毒

&lt;400&gt; 14

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asn | Pro | Asn | Gln | Lys | Ile | Ile | Ile | Ser | Ser | Ile | Cys | Met | Thr |
| 1   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Gly | Ile | Ala | Ser | Leu | Ile | Leu | Gln | Ile | Gly | Asn | Ile | Ile | Ser | Ile |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Ile | Ser | His | Ser | Ile | Gln | Ile | Glu | Asn | Pro | Asn | Gln | Thr | Glu | Pro |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 35  | 40  | 45  |
| Cys Asn Gln Ser Val Ile Ile Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln |     |     |
| 50  | 55  | 60  |
| Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Asn Phe Val Val Glu Gln Thr Val     |     |     |
| 65  | 70  | 75  |
| Val Ser Met Lys Leu Ala Gly Ser Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly |     |     |
| 85  | 90  | 95  |
| Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly |     |     |
| 100   | 105 | 110 |
| Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu |     |     |
| 115   | 120 | 125 |
| Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His |     |     |
| 130   | 135 | 140 |
| Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser |     |     |
| [0021] 145  | 150 | 155 |
| 160   |     |     |
| Cys Pro Ile Gly Glu Val Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Lys Phe Glu Ser |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Asn Asp Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Lys Asn Asn Ile Leu |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Leu Asn Gly Ser Cys Phe Thr |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| 240   |     |     |
| Val Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Lys Ile Glu Lys Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asn Ala Pro |     |     |
| 260   | 265 | 270 |

|  |     |     |
|--|-----|-----|
| Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ser Gly Glu Ile        |     |     |
| 275  | 280 | 285 |
| Ile Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val        |     |     |
| 290  | 295 | 300 |
| Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly        |     |     |
| 305  | 310 | 315 |
| Val Leu Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Arg Thr Gly Ser Cys Gly        |     |     |
| 325  | 330 | 335 |
| Pro Val Ser Ser His Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys        |     |     |
| 340  | 345 | 350 |
| Tyr Gly Asn Gly Ile Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Ile Thr Arg        |     |     |
| 355  | 360 | 365 |
| Ser Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp        |     |     |
| 370  | 375 | 380 |
| [0022] Asn Asn Phe Ser Val Lys Gln Asp Ile Val Gly Ile Thr Asn Trp Ser |     |     |
| 385  | 390 | 395 |
| Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp        |     |     |
| 405  | 410 | 415 |
| Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys        |     |     |
| 420  | 425 | 430 |
| Glu Asn Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val        |     |     |
| 435  | 440 | 445 |
| Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro        |     |     |
| 450  | 455 | 460 |
| Phe Thr Ile Asp Lys  |     |     |
| 465  |     |     |
| <210> 15   |     |     |
| <211> 1410   |     |     |
| <212> DNA  |     |     |
| <213> 猪流感病毒  |     |     |

|  |      |  |
|--|------|--|
| <400>  | 15   |  |
| atgaatccaa atcaaaaagat aataacaatt ggttctgttt ctctcaactat tacaacaatg      | 60   |  |
| tgcctttct tgcagattgc catccttagta actactataa cattgcattt caagcaatat        | 120  |  |
| aatgcgatt cccctgcaaa caaccaagta ataccgtgtg aaccaataat aatagaaaaa         | 180  |  |
| aacataacaa aaatagtgtt tttgaccaat accaccatag agaaagaggat atgcccacaa       | 240  |  |
| ttagggaat acaggaattt gtcaaaacca caatgcaaga tcacaggatt tgccacccat         | 300  |  |
| tctaaggaca attcaattcg gctctcg ggtggggcca tttgggtcac gagagaacct           | 360  |  |
| tatgtgtcat gcgaccctaa caagtgttat caatttgcatt taggacagg aaccacatta        | 420  |  |
| gataaacagac attcaaatga cacaatacat gatagaaccc cttagaaac cctgttgatg        | 480  |  |
| agtgaatttgcgttccatt tcatttggga accagacaag tatgcatacg atggtccagt          | 540  |  |
| tcaagttgtc acgatggaa agcttgggtt catgtttgtg tcactggca tgataaaaaat         | 600  |  |
| [0023] gcaactgcta gtttcattta tgacggaaag cttagacata gcatcagttc atggtccaaa | 660  |  |
| aacataactcc ggactcagga atcagaatgt gttgtatcg atggaatctg tacagtgg          | 720  |  |
| atgactgatg gaagtgcctc agggaaagct gatactaaga tactatttat tgaaaaagg         | 780  |  |
| aagatcatttcc atatttagtcc attgttggga agtgcgtcagc atgtagaaga atgttcctgt    | 840  |  |
| tacccttagat accctgatgt cagggttatt tgccaggata actggaaagg ttcaaataagg      | 900  |  |
| cccatcgtag acataagaat gaaaaattt agcattggtt ccagttatgt gtgcgtcagga        | 960  |  |
| cttgtggcg acacacccag gaacaatgtt gggcttagta atagcaatttgc tcggaaatccc      | 1020 |  |
| aataatgaaa gagaaatca tggagtgaaa ggttggccct ttgtatgtgg aaatgacaca         | 1080 |  |
| tggatggaa gaactatcag caaggactca cgcttaggtt acgaaacctt caaagtgtt          | 1140 |  |
| ggtgttgggt cccaaacccaa ttccaaatcc cagataaata gacaagttat tggtgacagc       | 1200 |  |
| gataatagat caggtaactc tggatatttc tctgttgagg ggaaagatttgc cattaatagg      | 1260 |  |
| tgtttttatg tggaaactaat aagaggaagg agacaggaaa ctagagtgtg gtggacttcg       | 1320 |  |

|  |      |
|--|------|
| aacagtattg ttgtttctg tggcacttct ggcacctatg ggtcaggctc atggcccgat | 1380 |
| ggagcaaaca tcaatttcat gcctgtataa                                 | 1410 |
| <210> 16   |      |
| <211> 469  |      |
| <212> PRT  |      |
| <213> 猪流感病毒  |      |
| <400> 16   |      |
| Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr  |      |
| 1 5 10 15  |      |
| Ile Thr Thr Met Cys Leu Phe Leu Gln Ile Ala Ile Leu Val Thr Thr  |      |
| 20 25 30   |      |
| Ile Thr Leu His Phe Lys Gln Tyr Glu Cys Asp Ser Pro Ala Asn Asn  |      |
| 35 40 45   |      |
| Gln Val Ile Pro Cys Glu Pro Ile Ile Glu Lys Asn Ile Thr Lys      |      |
| [0024] 50 55 60  |      |
| Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Val Cys Pro Lys  |      |
| 65 70 75 80  |      |
| Leu Gly Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly  |      |
| 85 90 95   |      |
| Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly  |      |
| 100 105 110  |      |
| Ala Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asn Lys  |      |
| 115 120 125  |      |
| Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asp Asn Arg His  |      |
| 130 135 140  |      |
| Ser Asn Asp Thr Ile His Asp Arg Thr Pro Phe Arg Thr Leu Leu Met  |      |
| 145 150 155 160  |      |
| Ser Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Arg Gln Val Cys Ile  |      |
| 165 170 175  |      |

|  |     |     |
|--|-----|-----|
| Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val            |     |     |
| 180  | 185 | 190 |
| Cys Val Thr Gly His Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asp        |     |     |
| 195  | 200 | 205 |
| Gly Lys Leu Val Asp Ser Ile Ser Ser Trp Ser Lys Asn Ile Leu Arg        |     |     |
| 210  | 215 | 220 |
| Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Thr Val Val        |     |     |
| 225  | 230 | 235 |
| Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe        |     |     |
| 245  | 250 | 255 |
| Ile Glu Lys Gly Lys Ile Ile His Ile Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ala        |     |     |
| 260  | 265 | 270 |
| Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Asp Val Arg        |     |     |
| 275  | 280 | 285 |
| [0025] Cys Ile Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp |     |     |
| 290  | 295 | 300 |
| Ile Arg Met Lys Asn Tyr Ser Ile Gly Ser Ser Tyr Met Cys Ser Gly        |     |     |
| 305  | 310 | 315 |
| Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Asn Asn Asp Gly Ser Ser Asn Ser Asn        |     |     |
| 325  | 330 | 335 |
| Cys Arg Asn Pro Asn Asn Glu Arg Gly Asn His Gly Val Lys Gly Trp        |     |     |
| 340  | 345 | 350 |
| Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Thr Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Lys        |     |     |
| 355  | 360 | 365 |
| Asp Ser Arg Leu Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Val Gly Gly Trp Ser        |     |     |
| 370  | 375 | 380 |
| Gln Pro Asn Ser Lys Ser Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser        |     |     |
| 385  | 390 | 395 |
| Asp Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Asp        |     |     |

405

410

415

Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Arg Gln  
 420 425 430

Glu Thr Arg Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly  
 435 440 445

Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile  
 450 455 460

Asn Phe Met Pro Val  
 465

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1410

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 猪流感病毒

&lt;400&gt; 17

atgaattcaa atcaaaaagat aataacaatt ggctctgttt ctctcaactat tgccacacta 60

[0026]

tgccctccta tgcaaattgc tatcatggta actactgtaa catttcattt caaggcgttat 120

gaataacaact cccccccgaa caaccaagta atgttgtgtg aaccaacgat aattgaaaga 180

aacataacag agacagtgtt catgaccaac accaccatag taaaaaaaat atgccccaaa 240

ctagcggaat acagaaaattt gtcaaaaaccg caatgcaaaa ttacaggatt tgcaccttt 300

tcaaaggaca actcaattcg gcttccgct ggtggggaca tctgggtgac aagagaacct 360

tatgtgtcat gcgatcctaa caagtgttat caatttgcctt ttggcaggaa aacaacgtta 420

aacaacaggc attcaaatttga cacagtacat gatagaaccc cttaccgaac cctgttgatg 480

aatgaattgg gtgttccatt tcatttagga accaaggcagg tttgcatacg ttggccagt 540

tcaagttgtc atgatggaaa agcatggttt catgtttgtg taactggcata tgatgaaaat 600

gcaactgccat gtttcatttcaacgagaga cttgttagata gtattgggtt atggccaag 660

aaaatcctca gaacccagga gtcggatgc gttgcataa atgggacttg tacagtgggt 720

|        |  |      |
|--------|--|------|
|        | atgacagatg ggagtgcctc aggttagagct gatactaaaa tactattcat tgaggagggg | 780  |
|        | aaaatcggtc atgttagcca actgacagga agtgctcagc atgttagagga gtgctcctgt | 840  |
|        | tatccccgtt atccctgggt cagatgtgtt tgcagagata attggaaagg ctccaatagg  | 900  |
|        | cccattgttag atataaatgt aaaggatcat agcattgtt ccagttatgt gtgctcagga  | 960  |
|        | cttgtcggag acacacccag aaaaaacgac agctctagca gtagtaactg cctgaatcct  | 1020 |
|        | aacaatgaag aagggggtca tgggtgaaa ggctgggcct ttgatgatga aatgacttg    | 1080 |
|        | tggatggaa gaacgatcag cgaaaagtta cgattaggtt atgaaacctt caaggtcatt   | 1140 |
|        | gaaggctggt ccaagcctaa ttccaaattt cagataaata ggcaagtaat agttgacaaa  | 1200 |
|        | gataatagat ccgttatttc tggatatttc tctgttggaaa gtaaaagttt catcaatcgg | 1260 |
|        | tgttttatg tggagtttcat aagaggaagg aaacaggaaa atgaagtatg gtggacactca | 1320 |
|        | aacagcattt ttgttattt tggcacctca ggtacatatg gaacaggctc atggcctgat   | 1380 |
| [0027] | ggggcagaca tcaatctcat gcctatatga                                   | 1410 |

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 猪流感病毒

&lt;400&gt; 18

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| Met Asn Ser Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr |   |    |    |
| 1   | 5 | 10 | 15 |

|   |    |    |  |
|---|----|----|--|
| Ile Ala Thr Leu Cys Leu Leu Met Gln Ile Ala Ile Met Val Thr Thr |    |    |  |
| 20  | 25 | 30 |  |

|   |    |    |  |
|---|----|----|--|
| Val Thr Phe His Phe Lys Gln Tyr Glu Tyr Asn Ser Pro Pro Asn Asn |    |    |  |
| 35  | 40 | 45 |  |

|   |    |    |  |
|---|----|----|--|
| Gln Val Met Leu Cys Glu Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu |    |    |  |
| 50  | 55 | 60 |  |

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| Thr Val Tyr Met Thr Asn Thr Ile Val Lys Glu Ile Cys Pro Lys |  |  |  |
|---|--|--|--|

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu Ala Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly |     |     |     |
| 85  |     | 90  | 95  |
| Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly |     |     |     |
| 100   |     | 105 | 110 |
| Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asn Lys |     |     |     |
| 115   |     | 120 | 125 |
| Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asn Asn Arg His |     |     |     |
| 130   |     | 135 | 140 |
| Ser Asn Asp Thr Val His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Lys Gln Val Cys Ile |     |     |     |
| 165   |     | 170 | 175 |
| Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val     |     |     |     |
| [0028]  | 180 | 185 | 190 |
| Cys Val Thr Gly His Asp Glu Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asn |     |     |     |
| 195   |     | 200 | 205 |
| Glu Arg Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Lys Ile Leu Arg |     |     |     |
| 210   |     | 215 | 220 |
| Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val |     |     |     |
| 225   |     | 230 | 235 |
| Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Arg Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe |     |     |     |
| 245   |     | 250 | 255 |
| Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Val Ser Gln Leu Thr Gly Ser Ala |     |     |     |
| 260   |     | 265 | 270 |
| Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg |     |     |     |
| 275   |     | 280 | 285 |
| Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Ile Val Asp |     |     |     |
| 290   |     | 295 | 300 |

|  |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|
| Ile Asn Val Lys Asp His Ser Ile Val Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly        |     |     |     |
| 305  | 310 | 315 | 320 |
| Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn            |     |     |     |
| 325  | 330 | 335 |     |
| Cys Leu Asn Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp        |     |     |     |
| 340  | 345 | 350 |     |
| Ala Phe Asp Asp Glu Asn Asp Leu Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Glu        |     |     |     |
| 355  | 360 | 365 |     |
| Lys Leu Arg Leu Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser        |     |     |     |
| 370  | 375 | 380 |     |
| Lys Pro Asn Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Lys        |     |     |     |
| 385  | 390 | 395 | 400 |
| Asp Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Ser Lys Ser        |     |     |     |
| 405  | 410 | 415 |     |
| [0029] Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Lys Gln |     |     |     |
| 420  | 425 | 430 |     |
| Glu Asn Glu Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly        |     |     |     |
| 435  | 440 | 445 |     |
| Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile        |     |     |     |
| 450  | 455 | 460 |     |
| Asn Leu Met Pro Ile  |     |     |     |
| 465  |     |     |     |
| <210> 19   |     |     |     |
| <211> 1410   |     |     |     |
| <212> DNA  |     |     |     |
| <213> 猪流感病毒  |     |     |     |
| <400> 19   |     |     |     |
| atgaatccaa atcagaagat aataacaatt ggctctgttt ctctcgcat tgcaacatta       |     | 60  |     |
| tgcttcttaa tgcagatggc catcctaata actactgtaa aattacattt caaacaatat      |     | 120 |     |

gagtgcggct tccctgcgaa caaccaagta ataacatgtg agccaacagt aatagaagg 180  
aacacaacag agatagtgtt cttactaac accaccatag agaaagaaac atgccacaaa 240  
acagtggaaat acaggaattt gtcaaagcct caatgaaaa taacaggctt tgcaccttt 300  
tccaaggaca attcaattcg actttctgct ggtgggaca tatgggtgac gagggAACCT 360  
tacgtgtcat gcgagcctgg caaatgttat cagttgcac tcggcaagg gaccacacta 420  
gacaataaac attcaaacga tacaatacat gacagaACCC cctatcgaac tctattgtat 480  
aatgaattgg gtgtcccatt tcatttaggg acaagacaag tgtgtattgc atggtccagc 540  
tcaagttgtt atgatggaa agcatggtg catgtctgtt tcactggaca tgataaaaaat 600  
gcaactgccca gttcattta cgatggtaga cttgtagata gcattggttc atggtctaaa 660  
aatataactta gaacccagga atcagaatgc gtttgcattca atggggcttg tacagttaga 720  
atgactgatg gaagtgcTTT ggaaagagct gataactaaaa tactattcat tgaagaagg 780  
[0030] aaaattgttc atattagccc attagcgggg agtgcacagc atgtggagga gtgtcctgt 840  
tatccccgat atcctggcgt aaggtgtatc tgcagagaca actggaaagg ctctaacaga 900  
cccgttgtgg atataaatat agaagattat agcattgatt ccagttatgt gtgttcaggg 960  
cttggggcg acacacccag aatcaatgac ggatccagta gtagctactg ccgtgatcct 1020  
aacaacgaaa aaggaaatca cggagtgaag ggctggcTTT ttgacgatgg aaatgatgtg 1080  
tggatggaa gaacgatcaa cgaagattca cgctcaggTTT atgaaacatt caaagtctt 1140  
ggtggttggt ccactcctaa ttccaaatgt cagataaataa ggcaagtaat agttgatagc 1200  
aacaataggt caggttattc tgggttttc tccgttgaag gcaaaagctg catcaataga 1260  
tggatggaa gaacgatcaa cgaagattca cgctcaggTTT atgaaacatt caaagtctt 1320  
aacagtttttgg tggcacttca ggtacctatg gaacaggctc atggcctgtat 1380  
ggagcagaca tcaacctcat gcctatatga 1410

<210> 20  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> 猪流感病毒

<400> 20

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Val  
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Leu Cys Phe Leu Met Gln Met Ala Ile Leu Ile Thr Thr  
 20 25 30

Val Lys Leu His Phe Lys Gln Tyr Glu Cys Gly Phe Pro Ala Asn Asn  
 35 40 45

Gln Val Ile Thr Cys Glu Pro Thr Val Ile Glu Arg Asn Thr Thr Glu  
 50 55 60

Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Thr Cys His Lys  
 65 70 75 80

[0031] Thr Val Glu Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro Gln Cys Lys Ile Thr Gly  
 85 90 95

Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly  
 100 105 110

Asp Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Glu Pro Gly Lys  
 115 120 125

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asp Asn Lys His  
 130 135 140

Ser Asn Asp Thr Ile His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met  
 145 150 155 160

Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Arg Gln Val Cys Ile  
 165 170 175

Ala Trp Ser Ser Ser Cys Tyr Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val  
 180 185 190

Cys Ile Thr Gly His Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Phe Ile Tyr Asp

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 195   | 200 | 205 |
| Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Lys Asn Ile Leu Arg |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Val Cys Thr Val Val |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Arg Ala Asp Thr Lys Ile Leu Phe |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Ile Glu Glu Gly Lys Ile Val His Ile Ser Pro Leu Ala Gly Ser Ala |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Cys Ile Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Val Asp |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Ile Asn Ile Glu Asp Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly |     |     |
| [0032] 305  | 310 | 315 |
| Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Ile Asn Asp Gly Ser Ser Ser Tyr     |     |     |
| 325   | 330 | 335 |
| Cys Arg Asp Pro Asn Asn Glu Lys Gly Asn His Gly Val Lys Gly Trp |     |     |
| 340   | 345 | 350 |
| Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Asn Glu |     |     |
| 355   | 360 | 365 |
| Asp Ser Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Gly Gly Trp Ser |     |     |
| 370   | 375 | 380 |
| Thr Pro Asn Ser Lys Leu Gln Ile Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser |     |     |
| 385   | 390 | 395 |
| Asn Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Val Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser |     |     |
| 405   | 410 | 415 |
| Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Arg Ser |     |     |
| 420   | 425 | 430 |

Glu Ala Arg Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly  
435 440 445

Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile  
450 455 460

Asn Leu Met Pro Ile  
465

<210> 21  
<211> 1410  
<212> DNA  
<213> 猪流感病毒

<400> 21

atgaatccaa accagaaaat aataacgatc gttctgtct cttgtatcat tgcaacaatg 60  
  
tgcttttca tgcaagttgc cattctggta actactgtaa cattgcattt caggcagtgc 120  
  
gaatgcaact cctccgcaac caaccaaata atgccatgt aaccaacaaa aatagagaga 180  
  
aacataactg aaatttgtgt aaccaccaat accaccataa aaacagaggt atgccccaaa 240  
  
ctagtgaat acagggattt ggcaaaacca caatgttaga tcacagggtt tgcaccttt 300  
  
tccaaggaca attcgattcg gcttcgtcc ggtggggcca ttgggttaac gagagaaccc 360  
  
tatgtatcat gcgatcttag caagtgttac cagttgcgc tcggacaggg gactacacta 420  
  
gacaacagac attcaaatac cacaatacat gatagaactc cttatcgac cttttttttt 480  
  
aatgaattgg gtgttccatt tcatttaga accaggcaag tgtgtatgc ttggtccagt 540  
  
tcaagttgtc acgatggaaa agcatggctg catgtttgtc tcactggta tgataaaaaat 600  
  
gctactgcta gcctcattt tgacggaagg cttgtggaca gcatcggttc atggcccaa 660  
  
aacatcctcc ggaccaggaa atcggatgt gttgtataa atggtaatgg cacagtggta 720  
  
atgactgtatgg ggagtgcgtt aggaaaagct gataccagaa tactattttt tgaagaagg 780  
  
aagattattt acatttagtcc attgacaggaa agtgcacagc atgttgaaga gtgttctgt 840  
  
tatccctcgat acccccgtgt aagatgtgtt ttttagagaca actggaaaggcc ctctaacaga 900

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | cccgctgtgg atataaatgt aaaagattat aaaattaact ccagttatgt atgctcaggc | 960  |
|        | cttgttgcgc atacaccagg aaacaacgt agatcttagca atagcaactg ccaaaatcct | 1020 |
|        | aacaaccaga gagggaatca tggagtgaag ggctgggcct ttgacgatgg aatgacata  | 1080 |
|        | tggatggaa gaaccatcg caatgattca cgtttaggtt atgaaactt caaagttt      | 1140 |
|        | ggtggttggc ccaaacccaa ctccaaagtt cagacaaata ggcaagtcat agttgacagc | 1200 |
|        | gataatagat caggttattc tggcgtttc tctgttgaag gcaaaagctg catcaatagg  | 1260 |
|        | tgcgttatg tagagcta aagaggaagg agacaggaag ctagagtatg gtggacttcg    | 1320 |
|        | aacagtattg ttgtgtttg tggtaacttcg ggtacatatg gttcaggctc atggectgat | 1380 |
|        | gggctgaca tcaatcttgcctatataa                                      | 1410 |
|        | <210> 22  |      |
|        | <211> 469   |      |
| [0034] | <212> PRT   |      |
|        | <213> 猪流感病毒   |      |
|        | <400> 22  |      |
|        | Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Ile   |      |
| 1      | 5   | 10   |
|        | Ile Ala Thr Met Cys Phe Phe Met Gln Val Ala Ile Leu Val Thr Thr   |      |
| 20     | 25  | 30   |
|        | Val Thr Leu His Phe Arg Gln Cys Glu Cys Asn Ser Ser Ala Thr Asn   |      |
| 35     | 40  | 45   |
|        | Gln Ile Met Pro Cys Lys Pro Thr Lys Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu   |      |
| 50     | 55  | 60   |
|        | Ile Val Tyr Leu Thr Asn Thr Thr Ile Lys Thr Glu Val Cys Pro Lys   |      |
| 65     | 70  | 75   |
|        | Leu Val Lys Tyr Arg Asp Trp Ala Lys Pro Gln Cys Arg Ile Thr Gly   |      |
| 85     | 90  | 95   |

Phe Ala Pro Phe Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Leu Ser Ala Gly Gly  
 100 105 110

Ala Ile Trp Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Leu Ser Lys  
 115 120 125

Cys Tyr Gln Phe Ala Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Asp Asn Arg His  
 130 135 140

Ser Asn Asp Thr Ile His Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Thr Leu Leu Met  
 145 150 155 160

Asn Glu Leu Gly Val Pro Phe His Leu Gly Thr Arg Gln Val Cys Ile  
 165 170 175

Ala Trp Ser Ser Ser Cys His Asp Gly Lys Ala Trp Leu His Val  
 180 185 190

Cys Val Thr Gly Tyr Asp Lys Asn Ala Thr Ala Ser Leu Ile Tyr Asp  
 195 200 205

**[0035]** Gly Arg Leu Val Asp Ser Ile Gly Ser Trp Ser Gln Asn Ile Leu Arg  
 210 215 220

Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Ile Asn Gly Thr Cys Thr Val Val  
 225 230 235 240

Met Thr Asp Gly Ser Ala Ser Gly Lys Ala Asp Thr Arg Ile Leu Phe  
 245 250 255

Ile Glu Glu Gly Lys Ile Ile His Ile Ser Pro Leu Thr Gly Ser Ala  
 260 265 270

Gln His Val Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Arg Tyr Pro Gly Val Arg  
 275 280 285

Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Val Val Asp  
 290 295 300

Ile Asn Val Lys Asp Tyr Lys Ile Asn Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly  
 305 310 315 320

Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Asn Asn Asp Arg Ser Ser Asn Ser Asn

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
|   | 325 | 330 | 335 |
| Cys Gln Asn Pro Asn Asn Gln Arg Gly Asn His Gly Val Lys Gly Trp     |     |     |     |
| 340   | 345 | 350 |     |
| Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Ile Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Asn     |     |     |     |
| 355   | 360 | 365 |     |
| Asp Ser Arg Leu Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Gly Gly Trp Ser     |     |     |     |
| 370   | 375 | 380 |     |
| Lys Pro Asn Ser Lys Val Gln Thr Asn Arg Gln Val Ile Val Asp Ser     |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Asp Asn Arg Ser Gly Tyr Ser Gly Val Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser     |     |     |     |
| 405   | 410 | 415 |     |
| Cys Ile Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Arg Gln     |     |     |     |
| 420   | 425 | 430 |     |
| Glu Ala Arg Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly     |     |     |     |
| [0036] 435  | 440 | 445 |     |
| Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Ile     |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |
| Asn Leu Met Pro Ile   |     |     |     |
| 465   |     |     |     |
| <210> 23  |     |     |     |
| <211> 1410  |     |     |     |
| <212> DNA   |     |     |     |
| <213> 人工序列  |     |     |     |
| <220>   |     |     |     |
| <223> 密码子优化的猪流感病毒序列   |     |     |     |
| <400> 23  |     |     |     |
| atgaacccta accagaagat tattaccatc ggatccgtgt gcatgaccat cggaatggcc   |     | 60  |     |
| aacctgatcc tgcaaatcgaa aacatcatc tccatctggat ttagccatag cattcagctt  |     | 120 |     |
| ggaaaccaga gccagatcgaa gacttgtaac cagtccgtga tcacctacgaa gaacaacacc |     | 180 |     |

|             |            |            |             |            |             |             |     |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-----|
| tgggtcaacc  | agacttacgt | aatatcagc  | aacaccaact  | tcgctgcggg | gcagtccgtg  | 240         |     |
| gtgtcccaa   | agctggccgg | caacagctcc | ctgtccccg   | tgtccggatg | ggcgatctac  | 300         |     |
| tccaaggata  | acagcgtcg  | catcgggtcc | aaaggggacg  | tgttcgtcat | ccgcgaacca  | 360         |     |
| ttcatttctt  | gctccccctt | ggaatgtcgg | actttcttcc  | tgacccaagg | ggcgttgctc  | 420         |     |
| aacgacaaggc | acagcaacgg | aaccatcaaa | gatcggtcgc  | cctaccgcac | tctgatgtcg  | 480         |     |
| tgccctatcg  | gcgaagtgcc | atccccctac | aactcacgct  | tcgagtcggt | ggcctgggtcc | 540         |     |
| gcttccgcct  | gccacgatgg | aatcaactgg | ctcacaatcg  | gcatctccgg | ccggactcgc  | 600         |     |
| ggagccgtgg  | ccgtgctgaa | gtacaatgg  | attattactg  | acactatcaa | gtcgtggaag  | 660         |     |
| aacaatattc  | tccggactca | agaatctgaa | tgcgcctcgc  | tgaacggttc | ctgcttcact  | 720         |     |
| atcatgaccg  | acggcccttc | cgatggacag | gcctcataca  | agatcttccg | gatcgagaag  | 780         |     |
| ggaaagatcg  | tgaagtccgt | cgagatgaac | gcaccgaact  | accattatga | ggaatgctcg  | 840         |     |
| [0037]      | tgctaccgg  | actcctcgga | aattacttgc  | gtgtccgcg  | acaattggca  | cgggtccaaac | 900 |
| aggcccctggg | tgtccttcaa | ccaaaacctg | gagtaccaga  | tcggttacat | ctgctccggg  | 960         |     |
| atttttggag  | acaaccctag | acctaacgac | aagaccggct  | catgcggacc | tgtgtctcc   | 1020        |     |
| aacggagcca  | acggcgtgaa | gggattctcg | ttcaaatatg  | ggaacggcgt | ctggataggt  | 1080        |     |
| cggaccaagt  | ccatctcgtc | acggaaggc  | tttggaaatga | tttgggaccc | gaacggttgg  | 1140        |     |
| accggaaccg  | acaagaactt | cagcatcaag | caggacatta  | tcggcattaa | cgagtggagc  | 1200        |     |
| ggatactcg   | gcagcttcgt | ccagcacccg | gaacttacgg  | gcctcaattg | tattaggccc  | 1260        |     |
| tgttttggg   | tcgagctgat | tagagggcgc | cccaaggaaa  | acaccatctg | gaccagcggc  | 1320        |     |
| tccagcatct  | cattctgcgg | agtgaactcc | gacaccgtgg  | gctggtcgtg | gccccgacgg  | 1380        |     |
| gccgagactgc | cgttcaccat | cgataaatga |             |            |             | 1410        |     |

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 密码子优化的猪流感病毒序列

&lt;400&gt; 24

atgaatccta accaaaagat catcaccate ggctccgtca gcctcactat taccaccatg 60

tgccctgttcc ttcaaattgc ctcctcgta accacgtca ccctgcactt caaggactac 120

gagtgcgact ccccgccaa caaccaggc atcccggtg aaccgattat cattgagaag 180

aacatcacaa agattgtgtc cctgactaac accaccatcg agaaggaagt ctgccccaaa 240

ttgggagagt accggaactg gtccaaagcct caatgcaaaa tcactggatt tgctccgttc 300

agcaaggata actcaatcag actgagcgcg ggtggcgcca tctgggtcac cagggAACCT 360

tatgtgtcgt gcgtcccaa caagtgtac cagttgcgc tggccaggg caccaccctc 420

gacaaccgcc actccaacga caccatccat gatgcaccc cttccgaac cctgctgatg 480

agcgagcttgcgtgccctt ccacctcgga acgcgcggaa tctgtattgc ctggagctcg 540

tcctcctgcc acgatggaaa ggcctggctg catgtctgtg tgactggta cgacaagaac 600

gccaccgcta gttcatcta tgacggaaaa ttgggtggatt ccatctcctc ctggcttaag 660

aacattctgc ggacccagga atccaatgc gtgtcatcg atggcatctg cactgtggc 720

atgactgacg gatccgcaag cggaaaggcg gacactaaga tcctgtttat cgaaaaggga 780

aagatcatc atatctcgcc gtcgtgggg tcccccagc acgtggaaaga gtgcagctgt 840

taccccccgtt accccgacgt gcgggtgcatt tgcggaca actggaaagg tagcaacagg 900

cccatcgtgg acattcgcat gaagaattac tcaatcgat cctctacat gtgctcagg 960

ctcgtggag acaccccccag gaacaacgac gttcctcaa actccaactg tcggaaaccg 1020

aacaatgagc gcggaaatca cggagtgaag ggatggcat tcgacgacgg aaacgacacc 1080

tggatgggtc ggactatcag caaggactcc cgccctgggtt acgaaacttt caaggctgt 1140

|   |      |
|---|------|
| gggggctggt cgcaagccaaa ctcgaagtgc cagattaaca gacaggcatc cgtggactcc        | 1200 |
| gacaataggt ccggctactc cggaatcttc tcggtcgagg ggaaggattg cattaaccgg         | 1260 |
| tgcttctacg tggagctgat cagaggcaga cgccagggaaa cccgcgtgtg gtggacctcc        | 1320 |
| aactcaatcg tggtgttctg cggaacatcc ggcacttacg gcagcggatc ctggcctgat         | 1380 |
| ggcgccaaca taaacttcat gcccggtgtga   | 1410 |
| <210> 25  |      |
| <211> 1410  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> 人工序列  |      |
| <220>   |      |
| <223> 密码子优化的猪流感病毒序列   |      |
| <400> 25  |      |
| atgaacccca accaaaagat cattacaatc ggatcagtgt cacttgtat cgccaccttg          | 60   |
| [0039] tgtttcctca tgcaaattggc cattctgatc accactgtga agctgcactt caaacagtat | 120  |
| gagtgcggat tcccggcga caatcaggta atcacctgtg aacacctaccgt gatcgagcgg        | 180  |
| aacaccaccg agatagtgta cctgaccaat acgactatcg aaaaggaaac ttgccataag         | 240  |
| accgtcgagt accgaaactg gtcgaagccg cagtgcaga tcactgggtt cgcaccgttc          | 300  |
| agcaaggata acagcatccg gctgtccgcc gggggagaca tttgggtcac ccgcgaaccg         | 360  |
| tacgtgtcgta gcgagcccg aaagtgcata cagttcgccc tggccagggtt taccaccctg        | 420  |
| gataacaagc acagcaacga taccatccac gataggaccc cctaccggac tctgctgtat         | 480  |
| aacgaactgg gcgtgccttt tcacctcgcc acgagacaag tctgcattgc ctggcctca          | 540  |
| tcgtcctgct acgacggaaa ggcctggctg cacgtctgca tcaccggcca tgacaaaaac         | 600  |
| gccaccgcgt cttcatcta cgacggtcgc ctgggtggact ccattggatc ctggagcaag         | 660  |
| aacattctgc ggacccagga atcggaatgc gtgtgttatca acggagtgtg caccgtcgta        | 720  |

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | atgactgatg gctctgcttc cggccgggcc gacaccaaga tcttggttat cgaagaaggg       | 780  |
|        | aagattgtcc acatttcccc gcttgcgttgc acgtgaaaga gtgcagctgt                 | 840  |
|        | taccccccgtt accctggcggt gcgggtgcatt tgcgggaca actgaaaggg atccaatagg     | 900  |
|        | cccggtgggg acatcaacat cgaagattac tcgattgact ccagctacgt gtgctccggc       | 960  |
|        | ctcgctgggg acactccccg catcaacgac gggtcgagct cctcctattt ccgggatcca       | 1020 |
|        | aacaacgaga aggggaacca cggcgtgaag ggctggcatt tcgacgacgg aaacgacgtc       | 1080 |
|        | tggatggta gaactatcaa cgaggattcc cggagcggat acgagacttt caaggtcattc       | 1140 |
|        | ggtgttgggt caaccctaa tagcaaactc cagattaaca gacaggtcat cgtggactcg        | 1200 |
|        | aacaatcgga gcggctactc cggagtgttc tccgtggaaag gaaagtcgtg catcaaccgg      | 1260 |
|        | tgcttctacg tggagctgtat taggggtcgc cgcagcgaag cccgcgtgtg gtggacttcc      | 1320 |
|        | aactcaatcg tgggtttctg cggcacctcc gggacttacg gaaccggatc ctggccggat       | 1380 |
| [0040] | ggcgccgaca ttaacctgtat gccaaatttga                                      | 1410 |
|        | <210> 26  |      |
|        | <211> 1410  |      |
|        | <212> DNA   |      |
|        | <213> 人工序列  |      |
|        | <220>   |      |
|        | <223> 密码子优化的猪流感病毒序列   |      |
|        | <400> 26  |      |
|        | atgaacccca accaaaagat cattacaatc ggatcgtgt cacttgtat cgccacccgt         | 60   |
|        | tgtttccctca tgcaaattggc cattctgtatcc accactgtatc agctgcactt caaacatgtat | 120  |
|        | gagtgcggat tcccgccgaa caatcaggatc atcacctgtatc aacctaccgt gatcgagcgg    | 180  |
|        | aacaccacccg agatagtgtatc cctgaccaat acgactatcg aaaaggaaac ttgccataatcg  | 240  |
|        | accgtcgagt accgaaactg gtcgaagccg cagtgcataa tcactgggtt cgcaccgttc       | 300  |
|        | agcaaggata acagcatccg gctgtccggcc gggggagaca tttgggtcac ccgcgaaccg      | 360  |

|                     |      |
|---------------------|------|
| tacgtgtcgt          | 420  |
| gataacaaggc         | 480  |
| aacgaactgg          | 540  |
| tcgtcctgct          | 600  |
| gccaccgcgt          | 660  |
| aacattctgc          | 720  |
| atgactgatg          | 780  |
| aagattgtcc          | 840  |
| tacccccgct          | 900  |
| cccggtgg            | 960  |
| ctcgccgggg          | 1020 |
| [0041]              |      |
| aacaacgaga          | 1080 |
| tggatggta           | 1140 |
| ggtggttgg           | 1200 |
| aacaatcgga          | 1260 |
| tgcttctacg          | 1320 |
| aactcaatcg          | 1380 |
| ggcgccgaca          | 1410 |
| <210> 27            |      |
| <211> 1410          |      |
| <212> DNA           |      |
| <213> 人工序列          |      |
| <220>               |      |
| <223> 密码子优化的猪流感病毒序列 |      |

|   |      |  |
|---|------|--|
| <400>   | 27   |  |
| atgaacccca accagaagat tatcaccatc ggatccgtgt ctctcatcat cggcaccatg       | 60   |  |
| tgttttta tgcaagtggc catttcgtc accactgtga ccctgcactt tcggcagtgc          | 120  |  |
| aatgcaact cctccgtac taaccaaatt atgccgtca agcctactaa gatgaacgg           | 180  |  |
| aacatcaccg agatcgtgta cttgacgaac accaccatca agaccgaagt ctgcccgaag       | 240  |  |
| cttgtgaaat atcgggactg ggcgaagcca caatgtcgca tcaccggttt cgccccgttc       | 300  |  |
| agcaaagata acagcattcg gctgtccgcc gggggcgcga tctgggtcac caggagccg        | 360  |  |
| tacgtgtcgt gtgatctgtc caagtgtac caattcgac tggacaggg taccaccctc          | 420  |  |
| gacaaccgcc actccaacga taccatacat gaccggaccc cttaccgcac tctttgatg        | 480  |  |
| aacgagctgg gagtgcctt ccacctgggt accagacaag tctgcattgc ctggcctca         | 540  |  |
| tcctcctgcc atgacggaa ggcctggctg catgtctgctg tgactggcta cgataagaac       | 600  |  |
| [0042] gcgacggcct ccctgatcta cgacggtcgc ctggggact ccattgggtc gtggagccag | 660  |  |
| aatatcctgc ggactcagga gtcagaatgc gtgtgcatca acggacttg caccgtggc         | 720  |  |
| atgactgacg gatccgcctc gggaaaggcc gacaccagga tcctgttcat tgaggaggga       | 780  |  |
| aagattatcc acatctgcc tctgactgga tccgcccagc acgtggaaga gtgtcctgc         | 840  |  |
| taccctcgat accccggcgt ggcgtgtgt tgtcggata actggaaggg aagcaaccgg         | 900  |  |
| cccggtggg acattaacgt gaaggactac aagattaact catcatacgt gtgtccggaa        | 960  |  |
| ctcggtggcgt atacaccaag aaacaacgac cgcagcagca acagcaattt tcagaacccc      | 1020 |  |
| aacaaccagc gggcaacca cggcgtgaag ggctggcat tcgacgacgg aaatgacatc         | 1080 |  |
| tggatggga ggactatctc caacgattca cgcctggct acgaaacctt caaggtcatc         | 1140 |  |
| ggcggctggt caaaaaccgaa ctccaagggtc cagaccaaca gacaggtcat cgtggattcg     | 1200 |  |
| gacaatagaa gggatacag cggagtgttc agcgtggagg gaaagtgcgtg catcaaccgc       | 1260 |  |

|        |   |      |
|--------|---|------|
|        | tgcttctacg tggaactgat caggggtcgg agacaggaag cgcgctgtg gtggacttcg  | 1320 |
| [0043] | aactcgattg tggtgttctg cggtacctcc ggaacctatg ggagcggatc ctggccggac | 1380 |
|        | ggcgctgaca ttaacccttat gccgatctga                                 | 1410 |

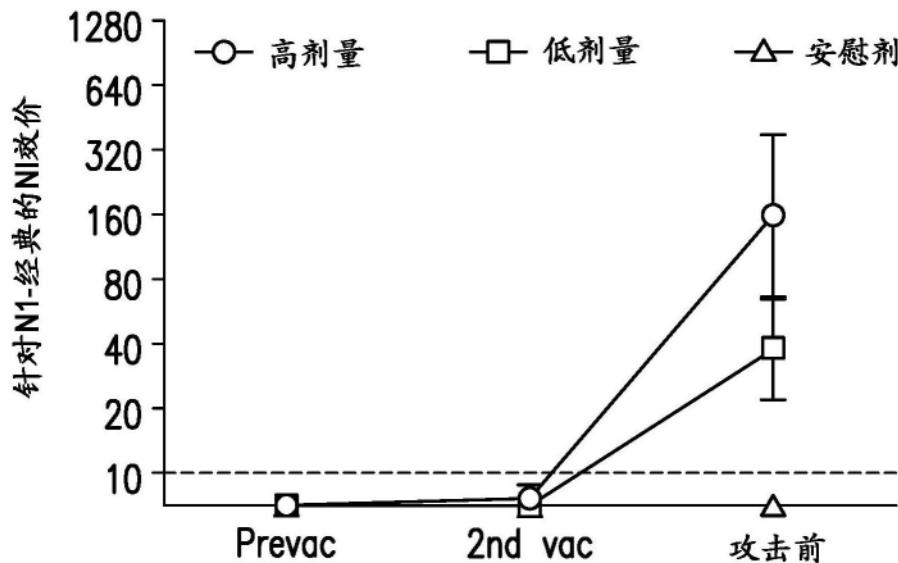


图1A

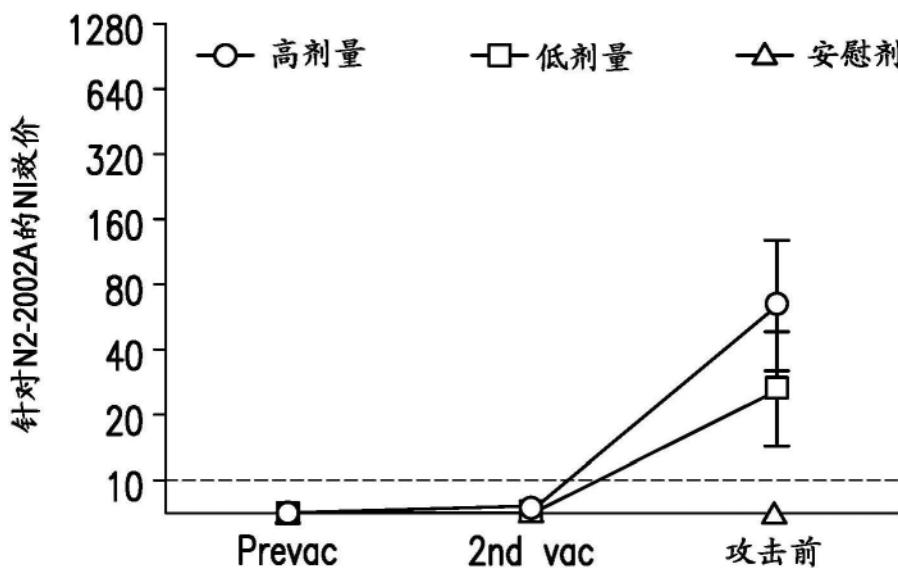


图1B

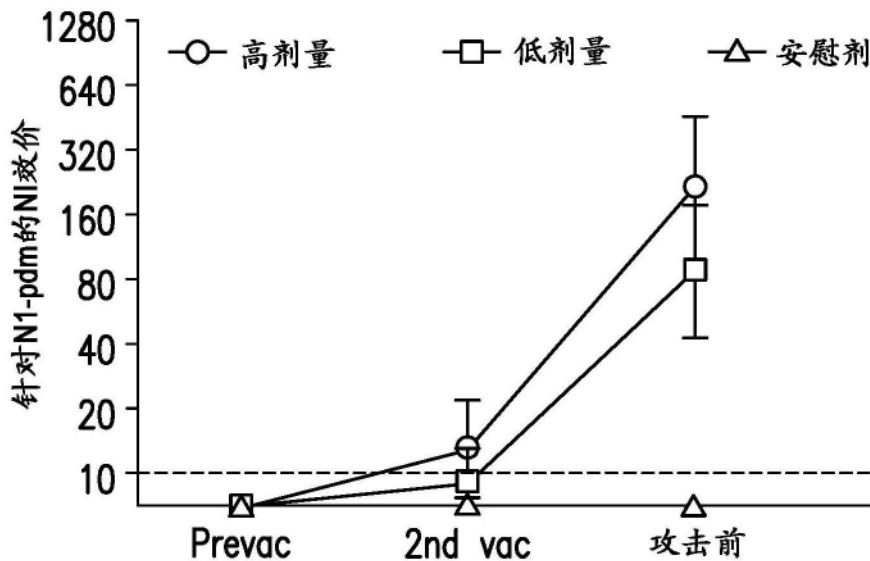


图1C

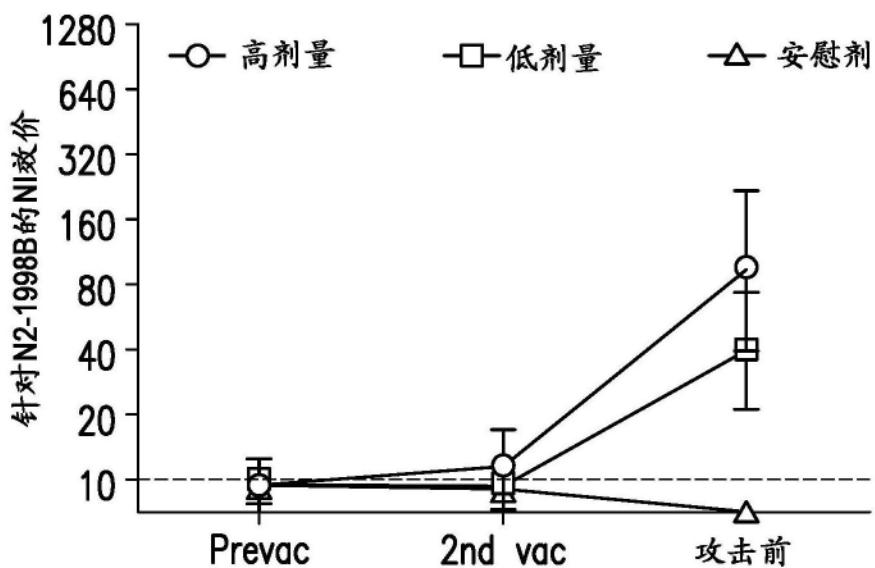


图1D

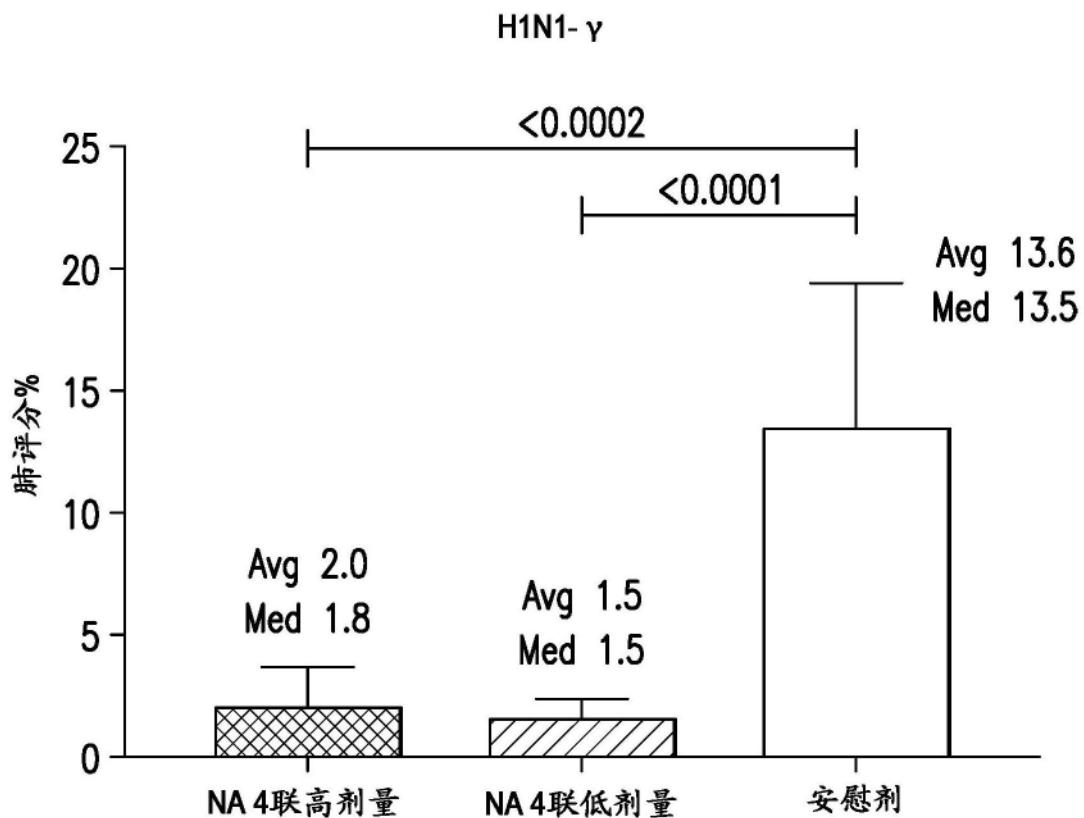


图2A

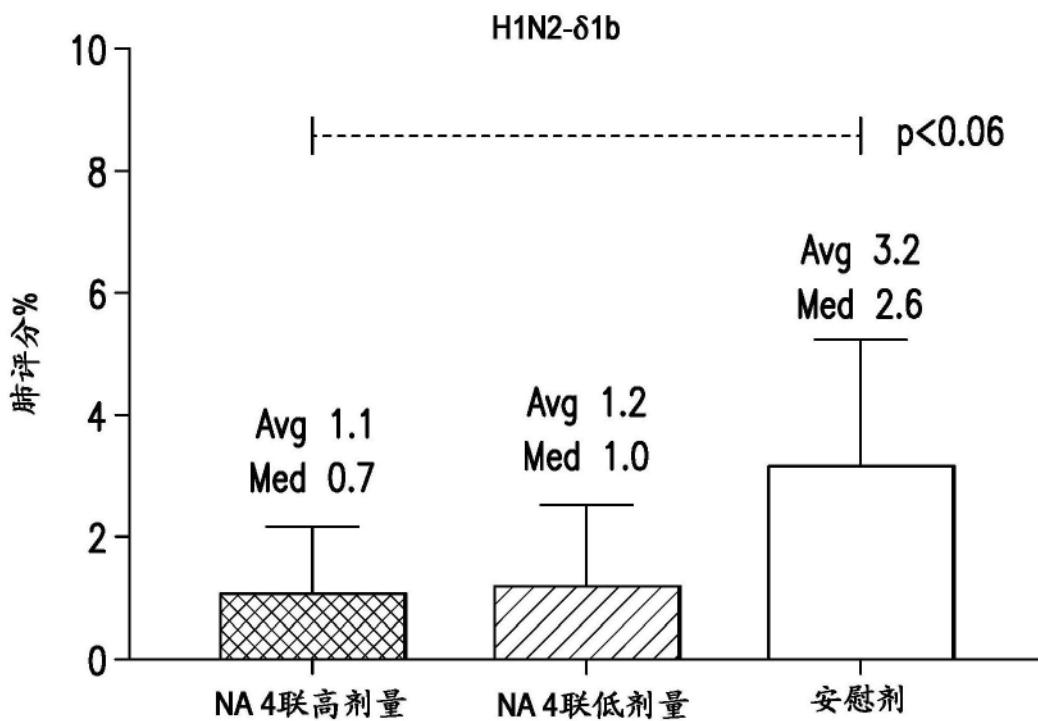


图2B

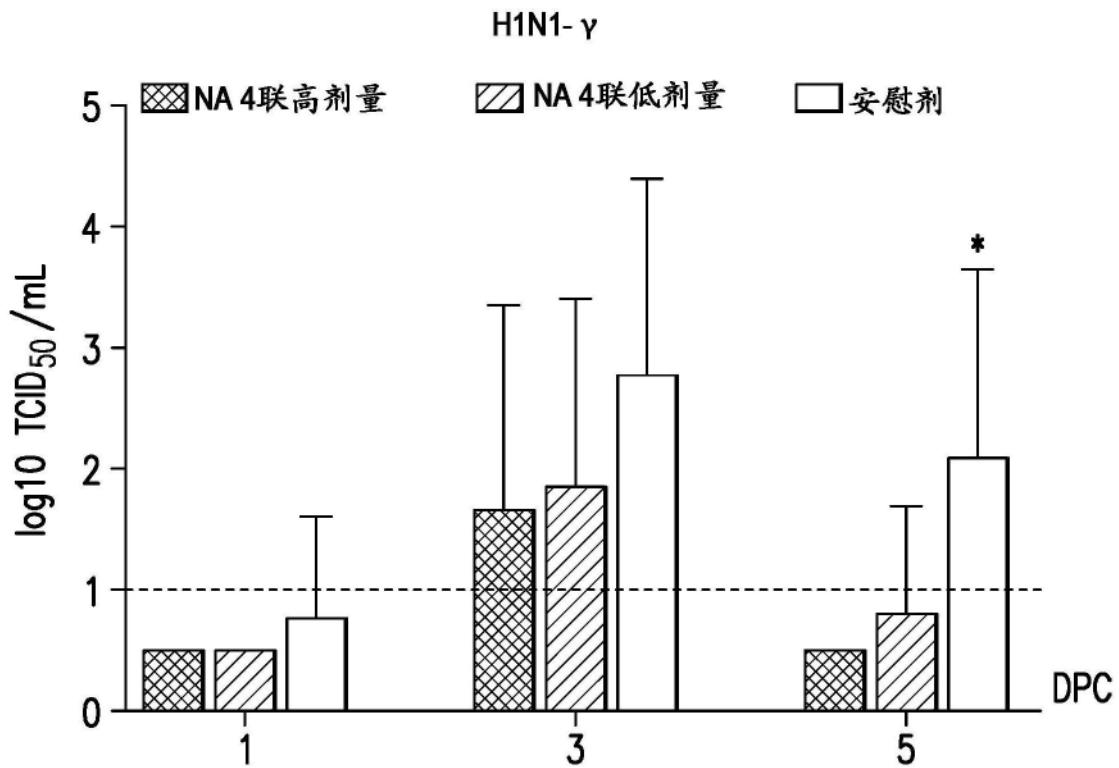


图3A

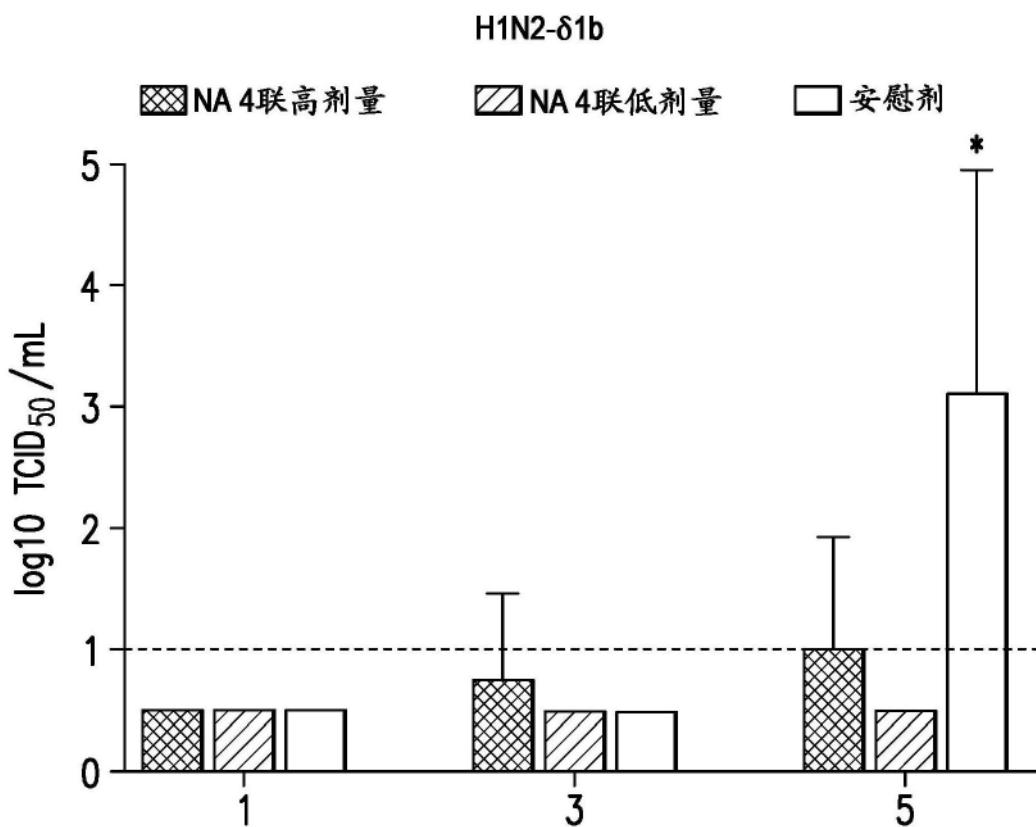


图3B

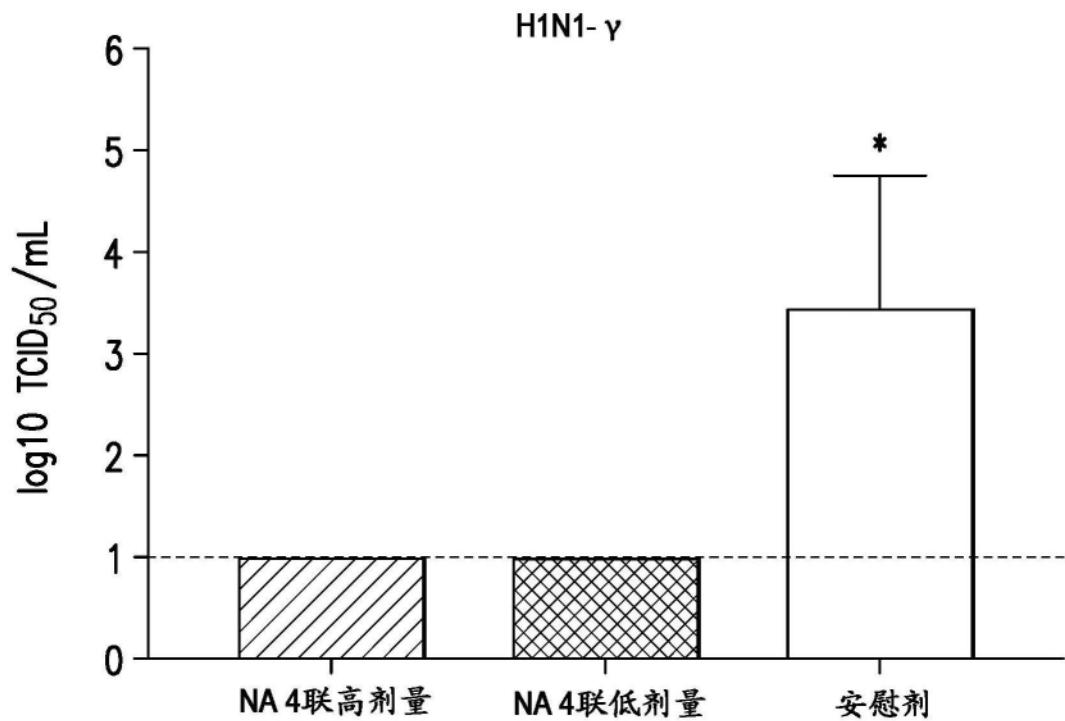


图4A

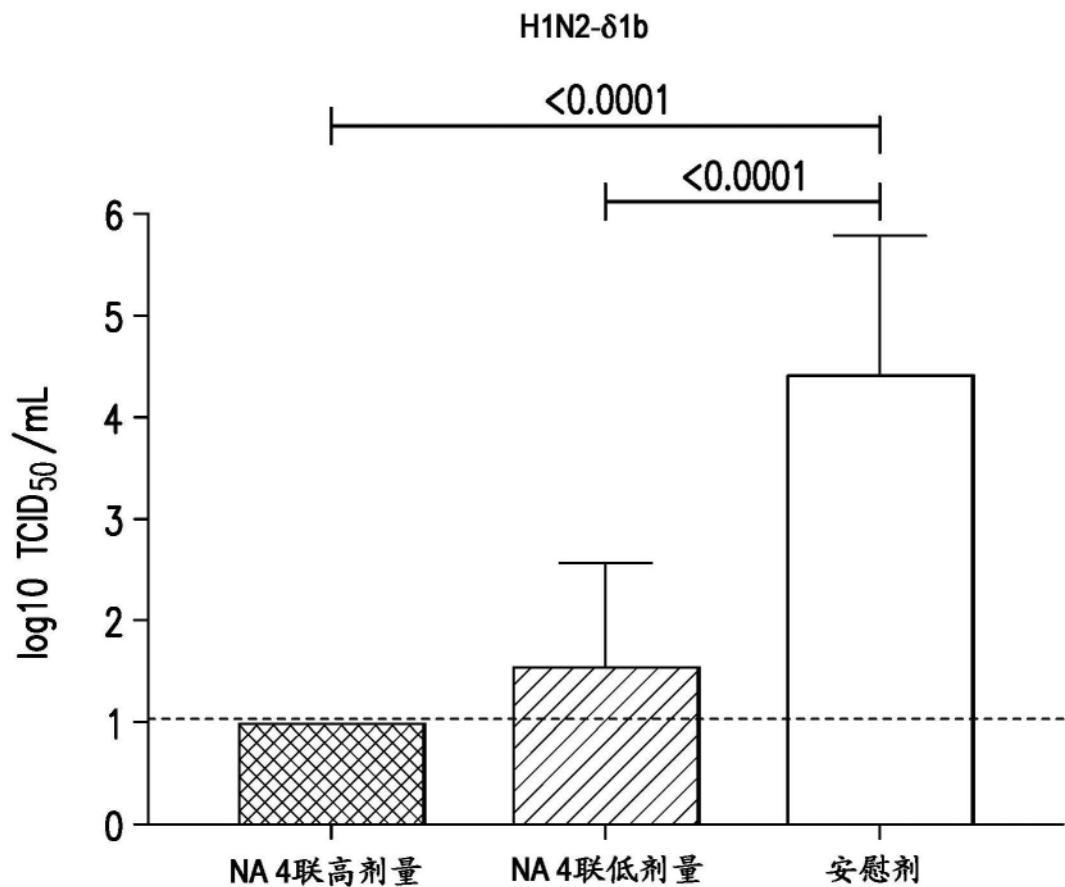


图4B

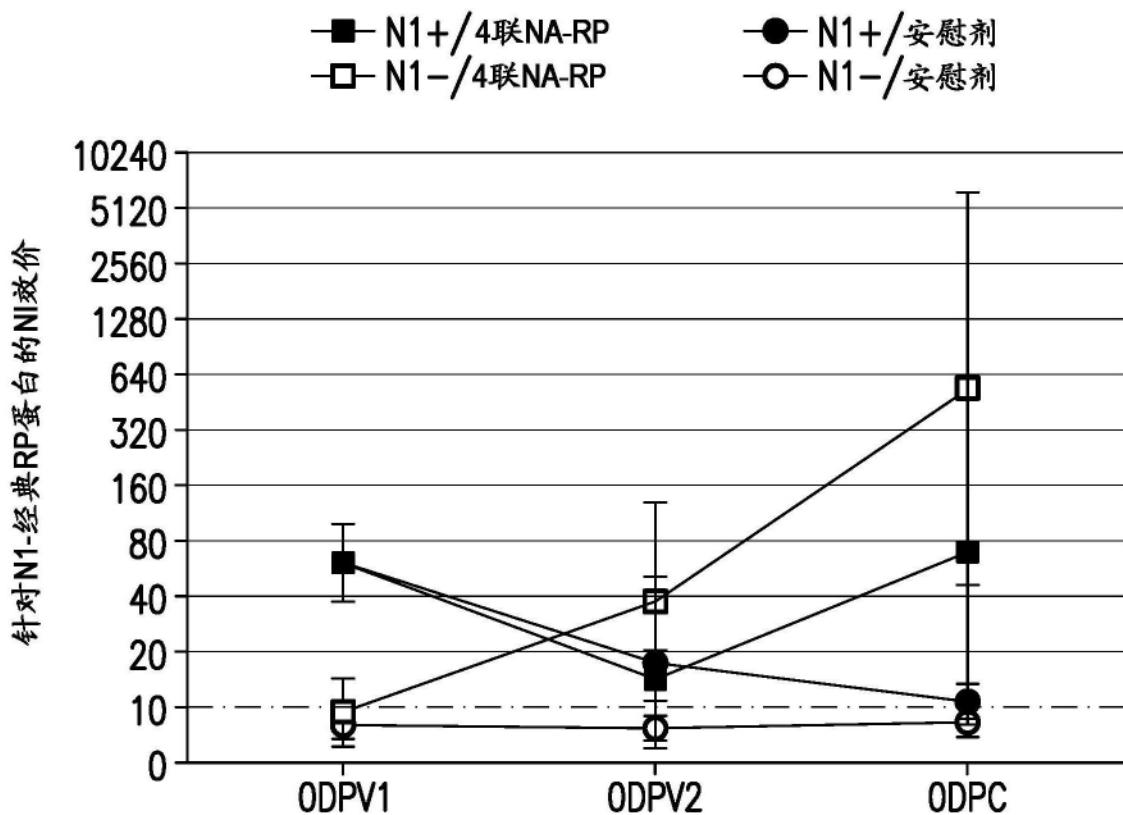


图5

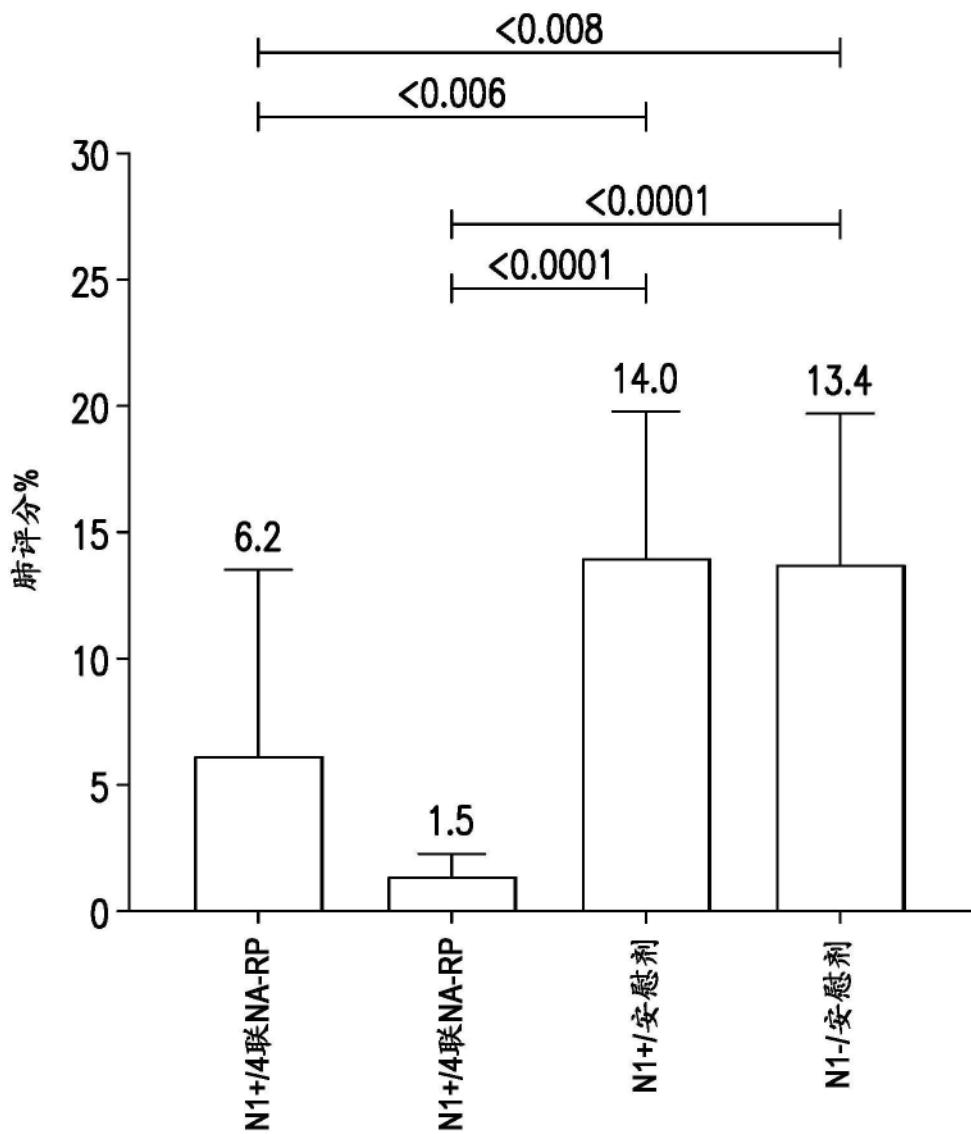


图6

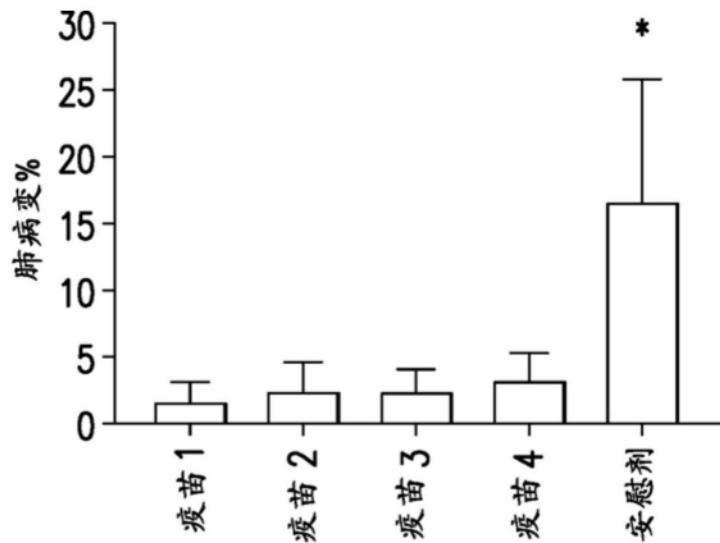


图7

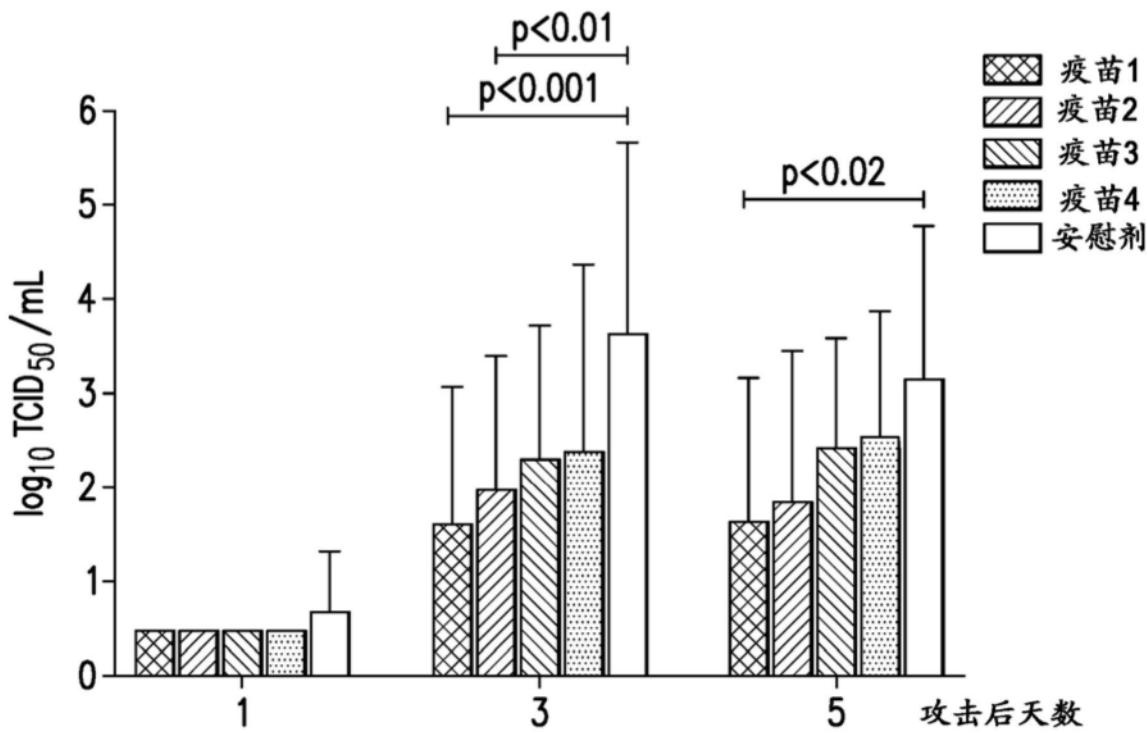


图8

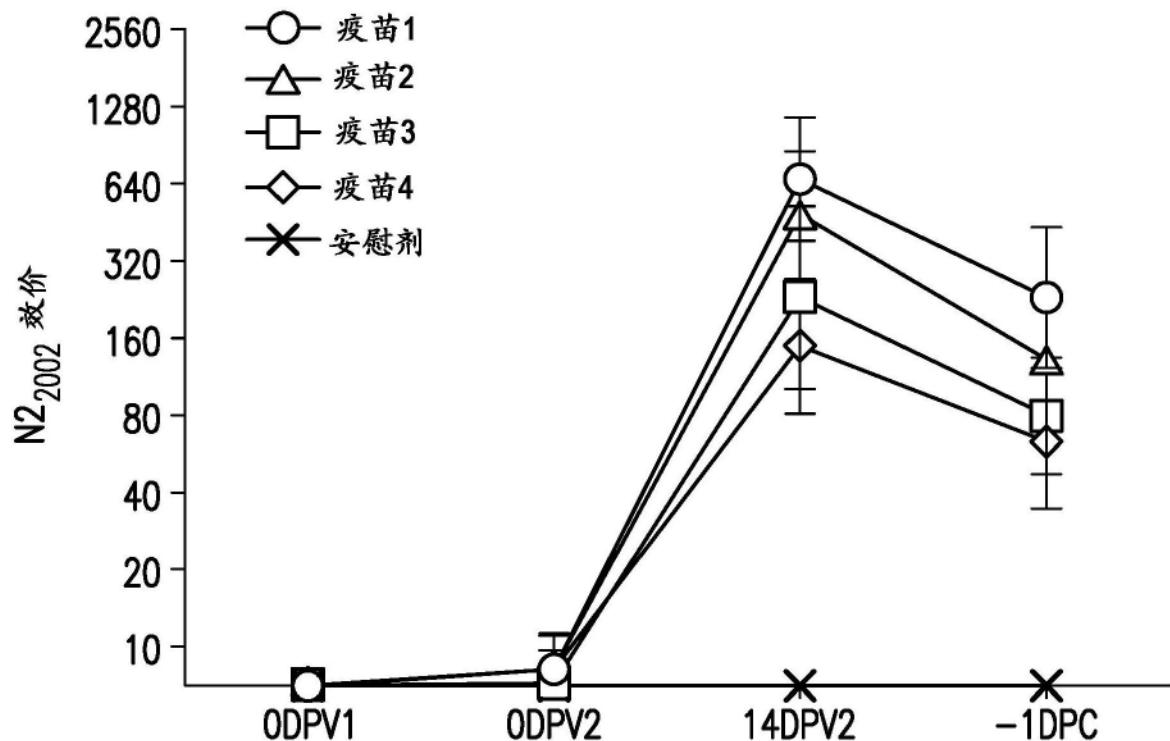


图9