

(21)申請案號：102144486

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 02 月 02 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/12 (2006.01)*
*C12N15/81 (2006.01)**C12N15/44 (2006.01)*

(30)優先權：2006/02/02 美國

60/765,025

(71)申請人：環球免疫公司 (美國) GLOBEIMMUNE, INC. (US)

美國

(72)發明人：杜克 理查 C DUKE, RICHARD C. (US)；法蘭族梭夫 艾力克斯 FRANZUSOFF, ALEX (US)；哈勒 奧瑞利亞 HALLER, AURELIA (US)；金 湯瑪士 H KING, THOMAS H. (US)；魯迎年 LU, YINGNIAN (CN)；哈德森 維多利亞 凱莉 HODSON, VICTORIA KELLEY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：74 項 圖式數：17 共 188 頁

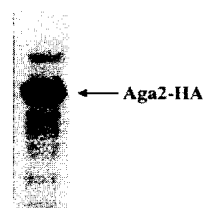
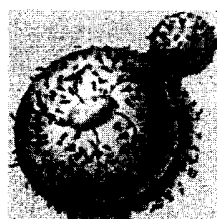
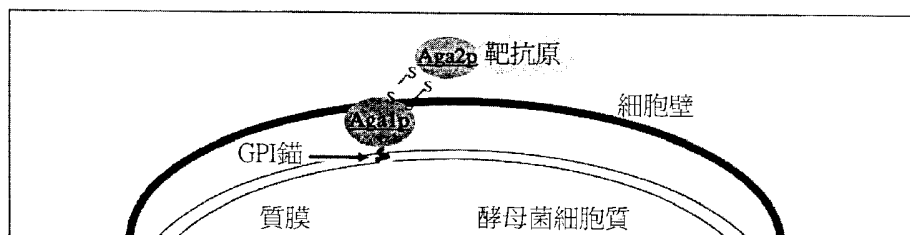
(54)名稱

用於誘發免疫反應之以酵母菌為基礎之疫苗

YEAST-BASED VACCINE FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE

(57)摘要

本文中所提供之本發明係關於經特製可獲得所要免疫反應的疫苗。本文中所提供之一些組合物適用於優先誘發體液免疫反應，而其他組合物適用於優先誘發細胞介導之反應。疫苗組合物之組合亦適用於誘發此兩種反應類型及/或適用於調節所誘發免疫反應之類型。本發明亦提供藉由投與本文中所揭示之組合物誘發個體之免疫反應的方法。該等免疫反應適用於保護個體免遭各種疾病、感染及不良病狀。



GI-8003 (原型)：表現於酵母菌中如Aga2-HA
融合蛋白的A/PR/8/34 H1-HA

圖10A

(21)申請案號：102144486

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 02 月 02 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/12 (2006.01)*
*C12N15/81 (2006.01)**C12N15/44 (2006.01)*

(30)優先權：2006/02/02 美國

60/765,025

(71)申請人：環球免疫公司 (美國) GLOBEIMMUNE, INC. (US)

美國

(72)發明人：杜克 理查 C DUKE, RICHARD C. (US)；法蘭族梭夫 艾力克斯 FRANZUSOFF, ALEX (US)；哈勒 奧瑞利亞 HALLER, AURELIA (US)；金 湯瑪士 H KING, THOMAS H. (US)；魯迎年 LU, YINGNIAN (CN)；哈德森 維多利亞 凱莉 HODSON, VICTORIA KELLEY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：74 項 圖式數：17 共 188 頁

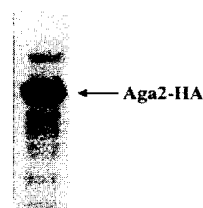
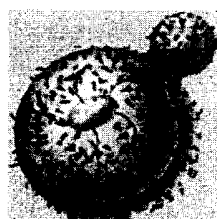
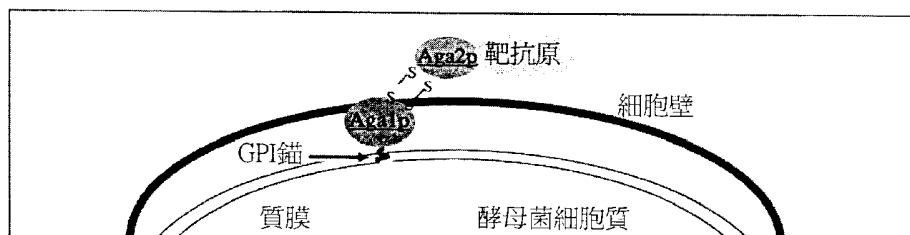
(54)名稱

用於誘發免疫反應之以酵母菌為基礎之疫苗

YEAST-BASED VACCINE FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE

(57)摘要

本文中所提供之本發明係關於經特製可獲得所要免疫反應的疫苗。本文中所提供之一些組合物適用於優先誘發體液免疫反應，而其他組合物適用於優先誘發細胞介導之反應。疫苗組合物之組合亦適用於誘發此兩種反應類型及/或適用於調節所誘發免疫反應之類型。本發明亦提供藉由投與本文中所揭示之組合物誘發個體之免疫反應的方法。該等免疫反應適用於保護個體免遭各種疾病、感染及不良病狀。



GI-8003 (原型)：表現於酵母菌中如Aga2-HA
融合蛋白的A/PR/8/34 H1-HA

圖10A

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於誘發免疫反應之以酵母菌為基礎之疫苗

YEAST-BASED VACCINE FOR INDUCING AN IMMUNE
RESPONSE

【技術領域】

本發明一般係關於可誘發包括細胞介導及/或體液免疫反應在內之各種類型之保護性及治療性免疫反應之基於酵母菌的疫苗。本文中揭示包括該等基於酵母菌之疫苗的組合物及使用該等疫苗之方法，包括與其他類型疫苗組合之該等疫苗的使用方法。亦揭示對動物接種疫苗以防止流感感染及治療或預防動物之流感感染的各種組合物及方法。

【先前技術】

疫苗為可由衛生保健行業用於預防及治療疾病之最節約成本的方法之一。然而，仍急需開發用於各種疾病之安全及有效疫苗及佐劑，該等疾病包括病原體感染所引發之或相關之彼等疾病、癌、遺傳缺陷及免疫系統之其他病症。關於疫苗之公開案，例如，Rabinovich 等人，Science 265, 1401-1404 (1994)，說明仍需要安全的及熱穩定的疫苗，其可經口投藥且需要僅幾次、較佳在生命初期投藥。可保護個體免患一種以上疾病的組合疫苗以及不需要佐劑且可誘發細胞介導免疫性、體液免疫性及黏膜免疫性的疫苗亦較佳。迄今，滿足該等所有標準的疫苗寥寥無幾(若有)。

死亡病原體或減毒病原體常用於習知疫苗，且尤其用於抗病毒感染之疫苗。舉例而言，目前在使用兩種類型之流感疫苗。更習知之

疫苗為滅活疫苗(含有死亡病毒)，其藉由注射、通常注射入胳膊而給藥。第二種疫苗，稱作經鼻噴霧流感疫苗(有時稱為活滅毒流感疫苗 LAIV)，於2003年獲得批准，且其含有可藉由經鼻噴霧器投藥的經滅毒(弱毒)之活病毒。如世界衛生組織(World Health Organization；WHO)所闡述，流感病毒類型A與B均為導致急性呼吸病之共同病因。儘管兩種病毒類型會造成相當大之致病率及死亡率之傳染病，但流感B感染常限於局部化發病，但流感A病毒為較大傳染病(包括世界範圍的廣泛傳染病)的主要病因。流感病毒為正黏(Orthomyxo)病毒家族之成員，且具有廣泛的宿主範圍，包括人、馬、犬、鳥及豬。其為編碼10種病毒蛋白之8個RNA片段中所產生的被膜反義RNA病毒。該病毒在受感染宿主細胞之核中複製。流感病毒對於年輕個體及年老個體或免疫力下降個體最為危險。該等病毒在雞蛋中可增殖至高效價，其充當形成用於製備流感疫苗之病毒的媒介物。

流感A病毒在其表面抗原方面經歷頻繁的變化，而B型流感病毒變化不甚頻繁。一病毒株感染後之免疫性未必能完全防禦以後的抗原變體。因此，每年必須設計新穎的抗流感疫苗，以對抗很可能引發下一個傳染病的傳播病毒株。因此，WHO每年搜集基於對傳播於人們當中之最流行流感病毒株之監測的資料且推薦流感疫苗組合物。當前，疫苗包括兩亞型之流感A病毒與一亞型之流感B病毒於疫苗中。疫苗通常可保護健康成年人中之約50%-80%防止臨床疾病。

可藉由重組DNA技術開發之次單位疫苗迄今為止令人失望，因為其僅呈現有限的免疫原性。一實例為最近對若干HIV(人類免疫缺乏性病毒)次單位疫苗的臨床測試已中止，原因不僅在於疫苗的功效有限，而且在有些狀況中，免疫個體當隨後暴露於HIV時展示疾病行進加速；參見，例如，Cohen, *Science* 264:1839 (1994)；及Cohen, *Science* 264:660 (1994)。次單位疫苗以及死亡病毒及重組活病毒疫苗

之一缺點在於，儘管其似乎可激發強烈的體液免疫反應，但其未能誘發保護性細胞介導免疫。1994年國際AIDS會議(1994 International AIDS Conference)的主要結論為，仍需要臨床疫苗中迄今為止所缺乏之細胞毒性T細胞介導反應以預防或減少HIV感染性。此外，迄今為止所測試之HIV疫苗未能在最初HIV感染發生之黏膜表面處誘發免疫性。

此外，獲准在美國使用的唯一佐劑為鋁鹽：氫氧化鋁與磷酸鋁，沒有一種能激發細胞介導免疫。此外，鋁鹽調配物無法冷凍或凍乾，且該等佐劑並非對所有抗原有效。

酵母菌細胞已用於生產次單位蛋白質疫苗，包括上述HIV疫苗試驗中所測試之彼等物中的一些。酵母菌亦可饋至動物、再進行免疫作用，用以設法以非特定方式(亦即，刺激噬菌作用以及補體及干擾素之產生)引發免疫反應。結果不明確，且該等方案未產生保護性細胞介導免疫性；參見，例如，Fattal-German等人，Dev. Biol. Stand. 77: 115-120(1992)及Bizzini等人，FEMS Microbiol. Immunol. 2:155-167 (1990)。

上述研究證明使用重組釀酒酵母菌(*S. cerevisiae*)作為疫苗及免疫治療載體的潛力。參見，例如，美國專利第5,830,463號及第7,083,787號，以及美國專利公開案第2004-0156858 A1號及第2006-0110755 A1號。該等基於酵母菌之免疫治療產品已證明可在各種動物種內誘發能夠活體內殺死表現各種病毒抗原及癌抗原的靶細胞的免疫反應，且可以抗原特異性、CD8⁺ CTL-介導方式達成此目的。亦參見Stubbs等人，Nat. Med. 7:625-629 (2001)及Lu等人，Cancer Research 64:5084-5088 (2004)。更具體而言，其他研究已證明，釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)被樹突狀細胞貪噬吞嚥且直接激活樹突狀細胞，接著以高效方式使酵母菌關聯之蛋白質呈遞至CD4⁺及CD8⁺ T

細胞。參見，例如，Stubbs等人，Nature Med. 5:625-629 (2001)及美國專利第7,083,787號。

除能夠與樹突狀細胞直接相互作用之外，酵母菌亦具有各種使其成為免疫治療之理想平臺的其他特徵。首先，可設計表現於單酵母菌株內的多重抗原(參見，例如，Pichuantes等人，"Expression of heterologous gene products in yeast." 於Protein Engineering-Principles and Practice中，第129-162頁，J. L. Cleland及C. S. Craik編，Wiley-Liss, NewYork (1996))。該等調配物與DNA疫苗共有多種優點，包括建構簡便及靶向多重抗原的能力。基於酵母菌之免疫治療調配物不同於DNA疫苗之處在於不需要大量的純化以移除潛在地毒性污染物。美國食品與藥物管理局(The U.S. Food and Drug Administration; FDA)稱酵母菌為GRAS(公認為安全的)。因而，對其他疫苗載體存在的毒性及安全擔憂不適合於基於酵母菌之傳遞媒介。

儘管目前皆在努力製備有效的疫苗，但仍需要有效激發各種免疫反應的疫苗組合物。對於流感疫苗，疾病在孩子、老年人及某些高風險群組之間的比率仍為顯著，且在發展中國家，疫苗接種可能為偶而發生的或不存在的。在工業化國家，生產問題、使用現行技術生產疫苗所需的高費用及長時間阻礙了充足流感疫苗的生產以供應接受者群體。此外，新病毒株之威脅及未來大傳染病之可能性提高了吾人對高效生產流感疫苗的興趣。因此，該項技術中需要經改良之疫苗，其可提供防止各種流感病毒株的持久及有效保護且可快速及安全地生產供人類及其他動物使用。然而，該等擔憂及需要並非只針對流感疫苗，而是擴展至其他類型之疫苗，包括靶向其他病毒及其他傳染物之疫苗。

實際上，很多病原體(包括細菌及寄生蟲)分階段感染個體，造成免疫系統在各階段需應付不同抗原亞群。此外，很多病原體演變出一

系列的策略，使病原體"躲避"或逃避免疫系統。最後，如同上述病毒，很多病原體使抗原演變且產生抗原變體，尤其表現或定位於其表面上的彼等抗原，且亦可同時被多種類或多病毒株之病原體感染，凡此種種皆使疫苗接種策略複雜化。舉例而言，導致瘧疾之寄生蟲(例如，惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)或間日瘧原蟲(*Plasmodium vivax*))感染最初係由於感染蚊子之叮咬而作為子孢子經由血流進入身體，但接著很快感染肝細胞，在肝細胞中子孢子經歷根本變化而變成裂殖子。裂殖子自肝細胞中釋放且快速感染紅血球，寄生蟲在紅血球中繁殖、分化且繼續感染其他細胞。因此，理想疫苗應能夠引導免疫系統識別及破壞所有階段之寄生蟲，無論在血液中、在肝中或在紅血球中。然而，大部分疫苗沒有能力預防或消除所有感染，而是集中於限制病原體引發疾病之能力或對個體為毒性之能力，但生命週期之其他階段及潛伏感染仍未解決。

因此，對於抗擊傳染性疾病或其他作用物所引起之疾病的傳染病，需要具有控制或影響所誘發之免疫反應類型的能力，諸如視所預防或治療之疾病或病狀及/或個體在給定時點對於特定抗原或病原體之免疫狀況而定，優先誘發細胞介導免疫反應(例如，產生細胞毒性T細胞(CTL))、優先誘發體液反應(例如，抗體反應)或誘發兩類型之免疫反應。此外，提供經幾次投藥可激發有效免疫反應且在暴露於低含量之抗原(節約劑量)下亦有效激發免疫反應的組合物為適用的。

【發明內容】

本文中所揭示之本發明提供滿足上述需要的組合物及方法。基於以酵母菌為基礎之疫苗之平臺技術的免疫治療產品(例如，疫苗)生產簡單，不藉由宿主免疫反應中和，可重複投藥以激發抗原特異性免疫反應，且不需要患者特定製造方法。

本發明之一實施例係關於疫苗。在一態樣中，該疫苗包括：(a)

包含至少一異源細胞內抗原之第一酵母菌煤劑；及(b)包含至少一異源細胞外抗原之第二酵母菌煤劑。在一態樣中，該疫苗包括：(a)包含至少一異源細胞內抗原與至少一異源細胞外抗原之第一酵母菌煤劑；及(b)包含至少一異源細胞內抗原或至少一異源細胞外抗原之第二酵母菌煤劑。在另一態樣中，該疫苗包括：(a)包含至少一異源細胞內抗原與至少一異源細胞外抗原之酵母菌煤劑；及(b)以非酵母菌為基礎之組合物，其包含至少一包含於(a)之酵母菌煤劑之抗原或來自相同病原體或疾病之抗原，其中該以非酵母菌為基礎之組合物係選自DNA疫苗、蛋白質次單位疫苗及死亡或失活病原體。

在本發明之以上實施例中，(a)之酵母菌煤劑可調配成藉由與(b)之以非酵母菌為基礎之組合物相同或不同的投藥途徑傳遞。在一態樣中，細胞內抗原為藉由病原體表現於內部的抗原。在一態樣中，細胞外抗原為同類型病原體當中在結構上保守的抗原。在一態樣中，細胞外抗原為表現於病原體表面上的抗原。在一態樣中，細胞外抗原為同類型病原體當中在結構上可變的抗原。在一態樣中，該抗原來自傳染性病原體。

本發明之另一實施例係關於含有至少一流感抗原的疫苗。在一態樣中，該疫苗包括(a)酵母菌煤劑；及(b)藉由酵母菌煤劑表現的流感病毒融合蛋白，該流感病毒融合蛋白包含選自：流感基質(M1)蛋白與流感離子通道蛋白(M2)之流感蛋白之至少一部分。在一態樣中，該疫苗包括(a)表現流感病毒融合蛋白的第一酵母菌煤劑，該流感病毒融合蛋白包含選自：流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白之流感蛋白之至少一部分；及(b)至少一表現流感病毒融合蛋白的其他酵母菌煤劑，該流感病毒融合蛋白包含選自：血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白之流感蛋白之至少一部分。在一態樣中，該疫苗包括(a)酵母菌煤劑；及(b)由該酵母菌煤劑表現

的流感病毒融合蛋白，該流感病毒融合蛋白包含：選自流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白之至少一第一流感蛋白之至少一部分；及選自血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白之至少一第二流感蛋白之至少一部分。在另一態樣中，該疫苗包括(a)酵母菌媒劑；及(b)由該酵母菌媒劑表現的第一流感病毒融合蛋白，該第一流感病毒融合蛋白包含選自流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白之至少一第一流感蛋白之至少一部分；及(c)由該酵母菌媒劑表現的第二流感病毒融合蛋白，該第二流感病毒融合蛋白包含選自血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白之至少一第一流感蛋白之至少一部分。在又一態樣中，該疫苗包括(a)酵母菌媒劑；及(b)選自流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白之至少一第一流感病毒蛋白之至少一部分；及(c)選自血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白之至少一第二流感蛋白之至少一部分。

在以上實施例中，在一態樣中，HA蛋白係選自：H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及H16。在一態樣中，HA蛋白係選自：H1、H2及H3。在一態樣中，HA蛋白為H5。在一態樣中，NA蛋白係選自：N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8及N9。在一態樣中，NA蛋白係選自：N1及N2。在一態樣中，M1蛋白相對於酵母菌媒劑為細胞內蛋白。在一態樣中，M2蛋白相對於酵母菌媒劑為細胞內、細胞外或兩者之蛋白。在一態樣中，M2蛋白為M2e。在一態樣中，NP蛋白相對於酵母菌媒劑為細胞內蛋白。在一態樣中，HA蛋白或NA蛋白相對於酵母菌媒劑為細胞外蛋白。在此態樣中，NA蛋白相對於酵母菌媒劑亦可為細胞內蛋白。

在以上實施例中，在一態樣中，流感病毒融合蛋白在其N-末端包含表示為SEQ ID NO:1(MADEAP)的胺基酸序列。在一態樣中，流

感病毒融合蛋白在其N-末端或C-末端包含Aga2蛋白或Cwp2蛋白之至少一部分以足以使融合蛋白靶向酵母菌媒劑之細胞壁。

本發明之另一實施例包括一種疫苗，該疫苗包括：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含M1抗原的流感病毒融合蛋白，該M1抗原藉由酵母菌媒劑重組表現為單細胞內融合蛋白，該融合蛋白由SEQ ID NO:4組成。

本發明之另一實施例包括一種疫苗，該疫苗包括：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含H1抗原的流感病毒融合蛋白，該H1抗原藉由酵母菌媒劑重組表現為單細胞內融合蛋白，該融合蛋白由選自SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:20之胺基酸序列組成。

本發明之又一實施例包括一種疫苗，該疫苗包括：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含H1抗原的流感病毒融合蛋白，該H1抗原藉由酵母菌媒劑重組表現為單細胞外融合蛋白，該融合蛋白由選自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:36之胺基酸序列組成。

本發明之另一實施例係關於一種疫苗，該疫苗包括：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含H5抗原的流感病毒融合蛋白，該H5抗原藉由酵母菌媒劑重組表現為單細胞外融合蛋白，該融合蛋白由選自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:24之胺基酸序列組成。

本發明之又一實施例係關於一種疫苗，該疫苗包含：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含M1抗原、N1抗原及四個M2e抗原、由酵母菌媒劑重組表現為單細胞內融合蛋白的流感病毒融合蛋白，該融合蛋白由SEQ ID NO:16組成。

本發明之另一實施例係關於一種疫苗，該疫苗包含：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含藉由酵母菌媒劑重組表現為單細胞內融合蛋白之N1抗原及兩個M2e抗原的流感病毒融合蛋白，該融合蛋白由SEQ ID NO:18組成。

本發明之另一實施例係關於一種疫苗，該疫苗包含：(a)酵母菌媒劑；及(b)包含藉由酵母菌媒劑重組表現為單細胞外融合蛋白之H3抗原及N2抗原的流感病毒融合蛋白。

在以上任一實施例中，在一態樣中，融合蛋白之表現係受誘導性啟動子之控制。在以上任一實施例之一態樣中，該啟動子係選自CUP1及TEF2。

在以上任一實施例之一態樣中，酵母菌媒劑係選自完整酵母菌、酵母菌原生質球狀體、酵母菌胞質體、酵母菌殘骸、酵母菌細胞壁製劑及亞細胞酵母菌膜萃取物或其溶離份。在以上任一實施例之一態樣中，用於製備酵母菌媒劑之酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體係經編碼融合蛋白之重組核酸分子轉型，以使得融合蛋白由酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體重組表現。在以上任一實施例之一態樣中，使用重組表現融合蛋白之酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體生產酵母菌媒劑，該酵母菌媒劑包含酵母菌胞質體、酵母菌殘骸、酵母菌細胞壁製劑或亞細胞酵母菌膜萃取物或其溶離份。在以上任一實施例之一態樣中，該酵母菌媒劑係來自非病原酵母菌。在以上任一實施例之一態樣中，酵母菌媒劑來自的酵母菌選自：酵母菌屬(*Saccharomyces*)、裂殖酵母菌屬(*Schizosaccharomyces*)、克魯弗氏酵母菌屬(*Kluveromyces*)、漢遜氏酵母菌屬(*Hansenula*)、念珠菌屬(*Candida*)及畢赤氏酵母菌屬(*Pichia*)。在以上任一實施例之一態樣中，酵母菌屬為釀酒酵母菌。

在以上任一實施例之一態樣中，該疫苗另外包含樹突狀細胞，其中已將酵母菌媒劑細胞內裝載入該樹突狀細胞。

在以上任一實施例之一態樣中，該疫苗另外包含至少一生物反應調節劑。

本發明之另一實施例係關於本文中所述之任一種疫苗在製備用

於誘發抗原特異性免疫反應之調配物中的用途。

本發明之又一實施例係關於本文中所述之任一種疫苗在製備用於保護動物防止流感感染之調配物中的用途。

本發明之另一實施例係關於本文中所述之任一種疫苗在製備用於誘發抗原特異性細胞介導免疫反應防禦流感抗原之調配物中的用途。

本發明之又一實施例係關於本文中所述之任一種疫苗在製備用於治療或預防疾病或病狀之調配物中的用途。

本發明之另一實施例係關於本文中所述之任一種疫苗在製備一種調配物中的用途，該調配物可使處於流感感染風險之個體群獲得免疫。

本發明之另一實施例係關於本文中所述之任一種疫苗在製備一種調配物中的用途，該調配物可治療感染流感之個體群。

本發明之另一實施例係關於本文中所述之任一種基於酵母菌之疫苗(包含酵母菌媒劑之疫苗)的生產方法，該方法包含在大於pH 5.5之pH值下、在疫苗中培養該酵母菌媒劑。

本發明之又一實施例係關於流感疫苗的生產方法，該方法包含將酵母菌媒劑以流感抗原融合蛋白轉染，其中該流感抗原融合蛋白包含選自以下流感病毒蛋白之至少一部分：流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)、流感病毒核鞘(NP)蛋白、血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白。在一態樣中，該方法包括在大於pH 5.5之pH值下培養該酵母菌媒劑。其他態樣包括：將流感病毒蛋白裝載入酵母菌媒劑，將流感病毒抗原與該酵母菌媒劑混合在一起，使流感病毒抗原實體上連接於酵母菌媒劑，調配該經轉型之酵母菌媒劑以便藉由注射投與個體，或調配該經轉型之酵母菌媒劑以便藉由鼻內投藥投與個體。

本發明之另一實施例係關於製備在個體內誘發細胞介導免疫反應、體液免疫反應或其組合之調配物的套組，該套組包含複數種酵母菌媒劑(其中每種酵母菌媒劑包含至少一細胞內異源抗原或至少一細胞外異源抗原)及使用酵母菌媒劑製備該調配物的說明書。在一態樣中，酵母菌媒劑重組表現抗原。在一態樣中，該套組亦包括至少一選自如下物的其他組合物：(a)酵母菌膜或細胞壁顆粒，其含有異源抗原或來自相同病原體或疾病之抗原中之至少一者；(b)混有異源抗原或來自相同病原體或疾病之抗原中之至少一者的酵母菌媒劑；(c)編碼該等抗原或來自相同病原體或疾病之抗原中之至少一者的DNA疫苗；(d)包含該等抗原或來自相同病原體或疾病之抗原中之至少一者的蛋白質次單位疫苗，或包含來自相同病原體或疾病之抗原的蛋白質次單位疫苗；及/或(e)包含異源抗原中之至少一者的死亡病原體或鈍化病原體。在一態樣中，細胞內抗原為藉由病原體表現於內部的抗原。在一態樣中，細胞外抗原為同類型病原體當中在結構上保守的抗原。在一態樣中，細胞外抗原為表現於病原體表面上的抗原。在一態樣中，細胞外抗原為同類型病原體當中在結構上可變的抗原。

【圖式簡單說明】

圖1為說明流感病毒及其若干成分的示意圖。更高度保守抗原中之一部分圈在圓內。

圖2為西方墨點法之數位影像，其展示流感基質蛋白1(M1，亦稱為MP或MP1)在酵母菌中之細胞內表現。

圖3A及3B展示CTL檢定之結果，其中以表現流感基質蛋白(M1)之酵母菌媒劑免疫接種小鼠可細胞內誘發殺死感染流感之靶細胞的M1-特異性(圖3A)與流感病毒特異性(圖3B)細胞毒性T細胞(CTL)。

圖4為來自感染有流感A/PR/8/34之P815細胞之溶解產物之西方墨點法之數位影像，說明P815細胞可以流感病毒感染且可在CTL檢定中

用作靶細胞。

圖5展示T淋巴細胞增殖檢定之結果，其中以表現流感基質蛋白(M1或MP)之酵母菌媒劑免疫接種小鼠可細胞內誘發M1-特異性T細胞反應。

圖6展示T淋巴細胞增殖檢定之結果，其中以表現流感基質蛋白(M1)之酵母菌媒劑免疫接種小鼠可細胞內誘發流感-特異性T細胞反應。

圖7為西方墨點法之數位化影像(頂端)及融合結構之示意圖(底部)，說明與Aga2融合之流感血球凝集素(HA)(Aga2-HA)在酵母菌中之細胞內表現。

圖8展示CTL檢定之結果，其中以表現與Aga2融合之流感血球凝集素(HA)(Aga2-HA)之酵母菌媒劑藉由兩種不同的投藥途徑免疫接種小鼠可細胞內誘發流感病毒特異性CTL反應。

圖9展示T淋巴細胞增殖檢定之結果，其中以表現與Aga2融合之流感血球凝集素(HA)(Aga2-HA)之酵母菌媒劑藉由兩種不同的投藥途徑免疫接種小鼠可細胞內誘發流感病毒特異性T淋巴細胞增殖反應。

圖10A描繪Tarmogen建構方案，該方案容許所研究之任何靶抗原表現於酵母菌媒劑之表面上(上圖)。下圖展示具體的Tarmogen，亦稱GI-8003，其為設計成作為Aga2-HA融合蛋白細胞外地表現(顯示於其表面上)流感A/PR/8/34 HA(H1)的酵母菌媒劑。所示西方墨點法之數位化影像指明Aga2-HA蛋白之表現。

圖10B描繪例示性結構，其中抗原經設計可表現於酵母菌表面上。該圖示意性說明如何使用各種酵母菌蛋白作為間隔臂的實例。

圖11描繪表現融合蛋白(在圖10B中稱為VK8)的Tarmogen(其經由細胞壁蛋白2(cwp2)表現酵母菌表面上的流感HA蛋白)，且展示與單獨酵母菌媒劑(GI-1001或YVEC)相比、由完整細胞之流式細胞分析所得

之酵母菌表面HA表現(Tarmogen亦稱為GI-8000-S)之直方圖。

圖12A-12G展示其中利用各種方法(以上所述及圖10B中所說明)使流感HA蛋白定位於表面上的直方圖。圖12A展示用於圖12B及12C之酵母菌對照(YEX)。圖12B-12C說明表現VK4之Tarmogen之表現(圖12B)及表現TK75-15之Tarmogen之表現(圖12C)。圖12D展示用於圖12E-12G之酵母菌對照(YEX)。圖12E及12F展示當酵母菌糖基化(圖12E)及脫糖基化(圖12F)時HA VK8藉由酵母菌之表現。圖12G展示HA表現於Lu002-表現原生質球狀體製劑之質膜上。

圖13A及13B為用於細胞外(圖13B)及細胞內(圖13A)流感血球凝集素(HA)之表現之結構的示意圖，該表現可與保守型流感抗原M1、NP及M2(圖13A)之細胞內表現組合。

圖14A及14B展示所用三種方案的T細胞引發(圖14B)及抗體產生量(圖14A)。方案A僅使用PBS(對照)。方案B在第0日及第28日使用PBS引發且在第56日使用可溶性卵清蛋白(ova)激發。方案C使用表現卵清蛋白(OVAX)之酵母菌媒劑引發且使用可溶性卵清蛋白激發。圖14B展示T細胞激活檢定之結果，該檢定使用各種量之可溶性卵清蛋白以便活體外重新激發獲自小鼠的T細胞，該等小鼠已藉由上述三種方案中每種方案賦予免疫性。

圖15展示實驗結果，其中測試GI-2010(表現HIV Gag蛋白之Tarmogen)引發抗體反應的能力(與以不編碼HIV-Gag蛋白(對照)或編碼HIV-Gag蛋白(病毒)之活痘苗病毒感染後所觀測之體液反應相比)。生理鹽水曲線及對照曲線在GI-2010及YVEC曲線之下(亦即，GI-2010及YVEC株疊加於生理鹽水曲線及對照曲線之上)。

圖16A及16B為展示需要將B細胞激活與輔助T細胞對來自所搜尋抗體反應相關之抗原之肽之反應所獲得之信號組合的示意圖(信號1展示於圖16A中且信號2展示於圖16B中)。

圖17為展示與Aga2融合之流感HA1域(Aga2-HA1)之細胞表面表現的數位化影像。

【實施方式】

本發明一般係關於有效誘發各種類型之免疫反應(包括細胞介導免疫反應、體液免疫反應及其組合)的組合物及方法。本發明適用於誘發防禦多種抗原(包括病原體)的保護性及/或治療性免疫反應，且該等反應可經最優化以優先誘發(或確保誘發)細胞介導免疫反應、體液免疫反應或細胞介導與體液免疫反應兩者。此外，本發明之疫苗及疫苗策略所誘發之免疫反應可經最優化以提供防禦經常性突變且/或同時以多種類或多病毒株感染個體之病原體、防禦於不同生命週期階段感染或存在於個體中之病原體及防禦藉由各種作用(包括感染靶細胞)逃避免疫系統之病原體的有效反應。本發明所誘發之免疫反應不僅在其中體液免疫反應可至少稍微有效限制病原體引發疾病之能力之情況中尤其有效，而且在其中免疫系統卻不能預防或偵測病原體之替代形式(突變體或生命週期形式)及/或宿主細胞被病原體感染或侵佔(接著可能逃避或誤導免疫反應)之情況中尤其有效。視對特定疾病或病狀最有利之免疫反應類型而定，且視患者在給定時點對給定抗原或病原體之免疫狀況而定，本發明之疫苗及疫苗策略所誘發之免疫反應亦可經最優化以保護或治療患有疾病或病狀之個體。最後，本發明之疫苗及疫苗策略經幾次投藥可激發有效的免疫反應，且在暴露於低含量之抗原(節約劑量)下亦可有效激發免疫反應。

本發明提供對各種適用於保護性或治療性免疫及/或疫苗接種目的之抗原誘發免疫反應的組合物與方法。在一態樣中，本發明提供可誘發體液免疫反應與細胞介導免疫反應的組合物，在其他態樣中，提供優先誘發或引發體液免疫反應的組合物及疫苗策略(包括引發靶向一或多種所研究之抗原之抗原特異抗體之產生)，或優先誘發或引發

細胞介導(細胞性)免疫反應(包括細胞毒性T細胞反應)的組合物及疫苗策略。優先誘發意謂免疫反應可推向或指向特定類型之免疫反應，主要係基於如何使用本發明之基於酵母菌之疫苗使抗原可被免疫系統利用。組合物及免疫策略可具體設計以提供如上所述之免疫反應之最優化。本發明亦提供可使用基於非酵母菌之疫苗(諸如DNA疫苗)增強或補充免疫原性或順利免疫的組合物及方法。

更具體而言，本發明係針對有關基於酵母菌之免疫治療產品(如美國專利第5,830,463號及第7,083,787號及美國專利公開案第2004-0156858 A1號及第2006-0110755 A1號中所述)之平臺技術之改良，且提供新穎的基於酵母菌之疫苗用於誘發防禦多種抗原(包括病原體)的保護性及/或治療性免疫反應。在一態樣中，本發明利用能夠選擇性設計基於酵母菌之疫苗組合物來細胞內、細胞外(亦即酵母菌表面表現)或兩種方式表現或定位抗原，及選擇不同抗原及抗原之組合用於細胞內及/或細胞外表現/定位，為操控經優先誘導防禦特定抗原之免疫反應類型以及操控免疫反應以最有效地賦予個體防禦特定抗原或抗原之免疫性及最有效地預防或治療與一種抗原或抗原關聯之疾病或病狀的能力。

舉例而言，在使用本文中所揭示之本發明之一實施例中，所揭示的組合物及方法可提供交叉保護性"通用"疫苗途徑以提供防禦一種抗原或抗原之持久免疫及尤其細胞介導免疫。本發明之此原理利用的事實為，對於病原體，例如某些抗原在病原體之不同病毒株或種類中高度保守。此外，免疫反應所靶向的某些細胞，例如腫瘤細胞，亦可共有特定的保守性抗原。該等抗原經常由病原體或細胞表現於內部(亦即，顯示於病原體或細胞表面上之抗原更可能容易改變或突變以逃避免疫偵測及清除，而對於所有病毒株、所有種類或所有細胞而言，病原體或細胞內部之抗原更可能保守)。該等保守性抗原(若由病

原體(諸如病毒)表現於內部，則其亦可泛稱為內部抗原)為交叉保護性的且能夠誘發防禦抗原(且從而防禦感染上病原體或被病原體侵佔之細胞)之有效細胞介導免疫反應(細胞性)的基於酵母菌之疫苗提供基礎。在此態樣中，保守性抗原或內部抗原通常由本發明之酵母菌媒劑在細胞內表現或提供。然而，該等類型抗原之表現不限於細胞內表現；保守性抗原或內部抗原亦可或另外由本發明之酵母菌媒劑在細胞外(酵母菌表面上)表現或提供，此情形如下所述。

藉由本發明之酵母菌媒劑進行細胞內表現或定位抗原(例如，藉由細胞內發生的表現，藉由細胞內裝載，或其他任何提供包含於酵母菌之細胞內環境內部之抗原的方法)一般適用於優先誘發防禦任何抗原之細胞介導免疫反應，或更具體而言，在易誘發細胞介導免疫反應之背景中提供抗原(儘管體液免疫反應亦可藉由此方法引發或誘導，尤其若天然存在形式之抗原存在或已存在於細胞外環境(亦即，藉由事先感染、疾病或免疫))。藉由酵母菌媒劑進行細胞內表現或提供抗原尤其適用於用抗原引發或起動疫苗接種，因為提供強烈的細胞介導免疫反應及較佳免疫記憶可增強細胞介導與體液免疫反應武器之能力以響應將來與抗原之遭遇(例如，經由激發免疫、感染或疾病)。細胞內表現或提供抗原適用於誘發防禦任何抗原(包括上述保守性抗原或內部抗原及下述可變抗原或外部抗原)的免疫反應。

在另一實施例中，提供經設計成誘導病毒株、種類或抗原變體特異性免疫反應的組合物及方法。舉例而言，此方法可賦予宿主防禦與病原體之特定突變體、病毒株、種類或生命週期階段或特定抗原變體關聯之更特異性抗原的免疫性，例如在習知死亡病毒疫苗(一般包括代表基於表面抗原之三個病毒群組之三種選定病毒株)中係如此。換而言之，本發明之此態樣利用的其他事實為很多病原體及細胞表現蛋白質(可變抗原)變化，尤其表現可用於形成基於酵母菌之疫苗之該

等病原體或細胞表面(表面抗原在本文中一般亦可稱為外部抗原)上的蛋白質變化，該基於酵母菌之疫苗可提供防禦抗原或病原體的完全直接免疫或甚至季節性免疫。在本發明之一態樣中，該等抗原通常由本發明之酵母菌媒劑在細胞外(表面上)表現。可變抗原或外部抗原之表現不限於細胞外表現或細胞外提供抗原於酵母菌媒劑上；該等抗原亦可或另外由本發明之酵母菌媒劑在細胞內表現或提供，如下文論述。

由本發明之酵母菌媒劑進行細胞外或表面表現或提供抗原(例如，藉由附著抗原至外表面或藉由自酵母菌中分泌抗原、導致抗原之表面表現或易位至酵母菌媒劑之外表面的表現)優先誘發防禦抗原之體液免疫反應，或更具體而言，與當抗原由酵母菌媒劑在細胞內表現時相比，增強體液免疫反應之誘發，儘管細胞介導免疫反應亦可藉由此方法引發或誘導。實際上，此疫苗之一優點在於，與上述的習知死亡病毒疫苗(例如，其主要誘發防禦病毒之中和抗體反應)相比，本發明之疫苗可誘發防禦該等表面抗原之細胞介導與體液免疫反應。由酵母菌媒劑進行細胞外表現或提供抗原適用於誘發防禦任何抗原(包括上述保守性抗原或內部抗原及可變抗原或外部抗原)的免疫反應。然而，細胞外表現或提供抗原於酵母菌媒劑上尤其適用於誘發防禦免疫系統預計在細胞外環境中所遭遇之抗原(諸如可溶性抗原、細胞表面表現抗原或病原體表面表現抗原)的免疫反應，因此需要開發防禦該等抗原的體液免疫反應。

在一態樣中，本發明亦將上述兩種疫苗方法(由酵母菌媒劑進行細胞內與細胞外表現或提供抗原)組合以提供有效誘發細胞介導免疫與體液免疫的高效新穎疫苗，該等新穎疫苗可經設計成提供防禦特定抗原變體或病原體種類、病毒株或突變體的交叉保護性免疫與更特異性免疫。舉例而言，關於病毒感染(諸如流感感染)，組合疫苗方法可以交叉保護"通用"方式連同病毒株特異抗原方法誘發防禦流感病毒感

染的有效免疫反應。該方法可誘發防禦流感病毒的細胞介導免疫反應與體液免疫反應，且在本發明之較佳實施例中，以交叉保護方式與病毒株特異方式達成此目的。

在本發明之該實施例中，該等疫苗可以很多方式中之任一種方式設計。舉例而言，在一態樣中，來自病原體之保守抗原(例如，病毒內部抗原)可由酵母菌媒劑在細胞內表現或提供，且來自病原體之可變抗原(例如，病毒表面抗原)可由酵母菌媒劑在細胞外表現或提供。使用該等酵母菌媒劑之免疫作用可誘發防禦病毒之細胞介導免疫反應與體液免疫反應，且以交叉保護方式與病毒株特異方式達成此目的。經含有該酵母菌媒劑之疫苗所免疫之個體具有防禦保守抗原的強細胞介導免疫性及防禦可變抗原的強體液免疫性，儘管兩類型之免疫反應係針對兩類型抗原引發。如何修改此第一實例以改良或修改防禦病毒之免疫反應對於熟習該項技術者顯而易見。舉例而言，保守性抗原與可變抗原可由酵母菌在細胞內表現或提供，且可變抗原可由酵母菌在細胞外表現或提供，以保證防禦兩類型抗原之良好的細胞介導免疫反應(其對於引發將來的細胞介導及體液免疫反應為重要的)且提供迅即防禦可變抗原之更有效的體液免疫性(例如，參見圖16及本文中之論述)。

在本文所述之組合實施例中，細胞外表現或提供抗原(於酵母菌媒劑表面上)的酵母菌媒劑可為與細胞內表現或提供抗原的酵母菌媒劑相同或不同的酵母菌媒劑。此外，細胞內抗原與/或細胞外抗原之不同組合可表現於不同的酵母菌媒劑上，且該等媒介物可分開或共同使用，此視所要之疫苗接種而定。一般而言，當抗原由兩種或兩種以上不同的酵母菌媒劑提供時(亦即，與在一種酵母菌媒劑中表現或提供所有抗原相反)，該等酵母菌媒劑可經組合(混合)以便作為單疫苗投藥(例如，單次注射或其他給藥類型)或可將不同的酵母菌媒劑依序

投藥。依序投藥可間隔以任何適當時期，包括小的時間增量(秒或分鐘)及較長的時間增量(日、週、月或甚至年)。本發明設想在該等實施例中可使用任何抗原組合(在一較佳實施例中其包括至少一細胞內抗原及至少一細胞外抗原)，且該等抗原可使用表現或提供該等抗原之酵母菌媒劑之任一組合(包括單酵母菌媒劑)提供。

因此上述疫苗方法可藉由基於酵母菌之不同疫苗之組合或依序投藥(例如，引發/激發策略)修改，其中提供抗原之不同組合(包括細胞外抗原與/或細胞內抗原之不同組合)，且在有些態樣中提供保守抗原與/或可變抗原之不同組合。此外，本文中所述之酵母菌媒劑可與其他類型之疫苗同時或依序組合(例如，在引發及激發方案中)，以進一步引導免疫反應及提供經增強之防感染及防疾病保護。在一實施例中，至少提供細胞介導免疫之本發明之基於酵母菌之疫苗，及在一態樣中提供細胞介導免疫與體液免疫之本發明之基於酵母菌之疫苗(諸如藉由細胞內與細胞外表現或提供抗原)，係用於引發防禦特定抗原、抗原組或病原體之免疫反應。接著藉由傳遞習知疫苗(諸如DNA疫苗、蛋白質次單位疫苗或死亡病原體或失活病原體)或藉由基於酵母菌之其他疫苗(包括膜或細胞壁顆粒疫苗)或酵母菌與習知抗原製劑之組合或甚至惟獨酵母菌(例如，在該等後兩者情況中，酵母菌主要用作佐劑)提供免疫激發。在該等"引發-激發"策略中，由於第一免疫作用(引發)之結果所誘發之強細胞介導反應改良隨後激發之功效，且在有些實施例中可實際上提供協同效應，尤其當激發疫苗為與引發疫苗不同類型之疫苗且/或與引發疫苗相比含有不同抗原時。

藉由使用本發明之基於酵母菌之疫苗及方法引發免疫反應，可產生細胞介導與體液免疫記憶(亦即，產生選擇性識別所研究之抗原的記憶B細胞及T細胞)。因此，在隨後暴露於抗原後(例如，經由疫苗接種激發、疾病或感染)，免疫系統更快速地且更有效地響應，且重

要地是，對於疫苗接種激發，可在基於非酵母菌之疫苗之激發劑中使用更低抗原劑量(參見，例如，實例2及圖14及圖16)。此外，酵母菌媒劑可與基於非酵母菌之疫苗協同作用，以使得免疫反應藉由組合方法(諸如將DNA疫苗與基於酵母菌之疫苗組合)最優化。因而，該等疫苗需要僅一次及/或以更低量投藥以實現功效。當基於非酵母菌之疫苗缺貨時或當抗擊威脅公眾健康之作用物時，需要該等劑量節約性質，因為尤其在大量免疫作用之環境中難以賦予個體一次以上之免疫性。

本發明之組合物及方法亦包括其中酵母菌媒劑不一定重組表現或另外提供所研究之抗原而是用作佐劑以增強單獨提供或在已攜帶足量抗原以在投與攜有非抗原之酵母菌媒劑之後誘發免疫反應的個體(諸如當時感染上病原體之個體、經歷細胞蛋白質突變或另外表現或攜帶免疫系統不容忍之抗原或可打破其容忍限度之抗原之個體)背景中提供之抗原之免疫反應的疫苗，例如任何習知疫苗，包括DNA疫苗、次單位蛋白質疫苗、死亡病原體或失活病原體、樹突狀細胞疫苗等。如以上所述，此方法可與表現或提供細胞內及/或細胞外異源抗原之酵母菌媒劑的預先免疫作用或隨後免疫作用組合。

實際上，在本發明之疫苗如何設計及使用中存在很大的靈活性。舉例而言，包含表現或與某些抗原(諸如保守抗原)複合(亦即，締合、混合、含有、提供)之酵母菌媒劑的"通用"疫苗，可定期投與個體，以在個體中產生交叉保護性免疫。接著此疫苗例如可一次性或定期與表現其他抗原(諸如可變抗原)或與其複合之其他酵母菌媒劑組合，以處理已知在個體群中傳播的特定病毒株。表現該等可變抗原或與其複合之酵母菌媒劑可輪換、交替或一年選擇一次或基於其他任何較佳選擇(例如，緊急情況或預期流行病或大流行病，或另外需要)以在給定時期期間或對特定地理區域靶向所關注之病原體及/或最流行

的病原體病毒株。本發明之其他實施例因本文中所提供之揭示內容而顯而易見。

如以上所述，操控抗原之表現類型或抗原與酵母菌媒劑之締合類型可獲得特定的免疫結果，其可如所需地利用來"定製"或"設計"針對群體、個體或特定疾病、病狀或病原性感染的疫苗。在由酵母菌媒劑在細胞外表現或提供抗原之狀況中，可誘發體液免疫與細胞介導免疫，儘管與由酵母菌在細胞內表現或提供抗原相比，此類型之表現或提供對誘發體液免疫尤其有效。此原因主要在於在該實施例中抗原直接暴露於B細胞，容許B細胞激活、增殖、成熟及抗體產生更有效地發生。

更具體而言，酵母菌表面上所表現或提供(或酵母菌所分泌)的抗原可由B細胞(B淋巴細胞)所表現之B細胞抗原受體(BCR)識別。在此表面抗原結合BCR後，接著B細胞使表現結合抗原之酵母菌媒劑內在化，且該等抗原經處理而以來自與主要組織相容性複合體(MHC)II類受體複合之抗原之肽形式返回至B細胞表面。該等MHC-肽複合物藉由"輔助" T細胞(例如CD4⁺ T細胞)結合，該等"輔助" T細胞具有特異性識別特定MHC-肽複合物的T細胞受體(TCR)。可識別由B細胞所呈遞之MHC-肽複合物的活化抗原特異性T細胞進而可以導致B細胞增殖及其後代分化及成熟為抗體分泌細胞之信號形式(例如，細胞激素)向該等B細胞提供"幫助"。輔助T細胞可藉由T細胞與正呈遞MHC-抗原複合物之該B細胞接觸以及藉由與其他抗原呈遞細胞(包括樹突狀細胞及巨噬細胞)所呈遞之MHC-肽複合物接觸來激活。此外，由於本發明之酵母菌媒劑被諸如樹突狀細胞之抗原呈遞細胞之MHC I類通道(除MHC II類通道外)貪婪吞噬且直接激活該通道，因此除CD4⁺細胞介導反應外，CD8⁺細胞介導免疫反應亦可藉由細胞外表現或提供抗原來誘發。以此方式，體液免疫反應與細胞介導免疫反應均可藉由酵母菌

在細胞外表現或提供抗原來誘發，且據信此類型表現比藉由細胞內表現或提供抗原對誘發體液免疫反應更有效。體液免疫反應可包括產生中和抗體，其適用於預防及治療傳染性疾病及其他不良病狀。

產生體液免疫反應之B細胞激活之態樣示意性展示於圖16A及16B中。參考圖16A，對於激活B細胞之信號1，該抗原可藉由基於非酵母菌之疫苗或可溶性蛋白質提供，或藉由表現、呈現或另外含有靶抗原於表面上的酵母菌提供。參考圖16B，細胞內處理藉由活化B細胞所容納之抗原係經由MHC 2類受體呈遞，抗原特異性輔助T細胞識別該抗原由且被其激活。活化抗原特異性T細胞所傳輸之信號及細胞激素使B細胞反應成熟且激發抗體產生。細胞內表現靶抗原之酵母菌對激活抗原特異性輔助T細胞及擴增抗原特異性輔助T細胞之數目極其有效，如上文及下文所述。當輔助T細胞激活及增殖在可溶性靶抗原之B細胞結合之前或與其伴隨發生時，可更有效地誘發抗體產生。

當抗原由酵母菌媒劑在細胞內表現或提供時，細胞介導免疫反應($CD4^+$ 與 $CD8^+$ T細胞反應)藉由抗原經由抗原呈遞細胞(諸如樹突狀細胞及巨噬細胞)之MHC I類限制通道與MHC II類限制通道呈遞來產生，如上文所述(參見，例如，美國專利第5,830,463號及7,083,787號，Stubbs等人，Nat. Med. 7:625-629 (2001)及Lu等人，Cancer Research 64:5084-5088 (2004))。此機制所激活之T細胞亦有助於例如藉由向經不同途徑遭遇靶抗原(諸如基於非酵母菌之疫苗)之B細胞提供信號或藉由(例如)自然暴露於病原體或疾病產生抗體。證明此概念的實驗結果展示於圖14及15中。

本發明之各種態樣可經由本文中所揭示之流感疫苗之具體實例更好理解，儘管本發明不限於該等疫苗。實際上，結合本文中所提供之資訊，熟習該項技術者利用對由本發明之酵母菌媒劑在細胞外及/或細胞內表現或提供抗原之操控、保守抗原及可變抗原(或內部抗原

和外部抗原)之表現或提供之操控及本文中所述引發及激發方法之操控，能夠易於將對於流感病毒所述之疫苗策略外推至其他病原體及免疫方案(其中靶抗原為細胞蛋白質)。

在一實施例中，本發明一般係關於用於對動物接種疫苗以防止流感病毒以及治療或預防動物之流感感染的新穎組合物及方法。本發明包括基於酵母菌之疫苗或基於酵母菌之疫苗之組合的用途，該疫苗包括至少一酵母菌媒劑及至少一經選擇可在動物中誘發防禦流感感染之免疫反應的流感抗原。在尤其較佳實施例中，本發明包括在基於酵母菌之疫苗中使用流感抗原之組合，其中抗原之組合提供防禦各種流感病毒株的交叉保護以及防禦特定病毒株的特定保護。藉由單獨或連同病毒株特異性抗原方法一起使用交叉保護性"通用"疫苗方法，本發明特別提供新穎的基於酵母菌之疫苗用於防止流感病毒感染。此方法可誘發防禦流感病毒的細胞介導免疫反應與體液免疫反應，較佳以交叉保護方式與病毒株特異方式達成此目的。

在該實施例之第一態樣中，本發明利用的事實為由流感病毒在內部表現的某些蛋白質在病毒株當中為高度保守的。該等抗原(本文中一般稱為內部病毒蛋白質)為交叉保護性的且能誘發防禦病毒蛋白質(及從而流感病毒感染之細胞)之有效細胞介導免疫反應的基於酵母菌之疫苗提供基礎。在該實施例之其他態樣中，本發明利用的事實為流感病毒株表現表面蛋白質(在本文中一般稱為外部病毒蛋白質)之變化，該等表面蛋白質可用於形成賦予宿主免疫性防禦更特異之病毒株的基於酵母菌之疫苗，如在通常包括代表三個基於表面抗原之病毒群組之三種選定病毒株的習知死亡病毒疫苗中一般。然而，與該等習知死亡病毒疫苗(其主要誘發防禦病毒之中和抗體反應)相比，本發明之疫苗可誘發防禦該等病毒表面抗原之細胞介導與體液免疫反應。此外，本發明在較佳態樣中將該等兩種疫苗組合以提供可誘發交叉保護

免疫與病毒株特異性免疫(包括細胞介導免疫與體液免疫)的新穎有效流感疫苗。

通用技術

除非另有說明，否則本發明之實施可利用熟習該項技術者熟知之分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學、核酸化學及免疫學之習知技術。該等技術詳細說明於諸如以下文獻中：*Methods of Enzymology*，第194卷，Guthrie等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *Biology and activities of yeasts*, Skinner等人編，Academic Press (1980); *Methods in yeast genetics : a laboratory course manual*, Rose等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); *The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Jones等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); *The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*, Broach等人編，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第二版 (Sambrook 等人，1989) 及 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第三版 (Sambrook 及 Russel, 2001)，(本文中簡稱為 "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel 等人編，1987，包括整個2001年的增刊); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等人編，1994); Harlow 及 Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow 及 Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (在本文中簡稱為 "Harlow 及 Lane")，Beaucage 等人編，*Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); Casarett and

Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, C. Klaassen編，第六版(2001)，及 *Vaccines*, S. Plotkin及W. Orenstein編，第三版(1999)。

一般定義

"體液免疫反應"一般係指抗體產生及伴隨抗體產生的所有過程，包括但不限於B淋巴細胞(B細胞)激活、親和力成熟、分化成漿細胞及記憶B細胞產生、生髮中心形成及同型轉變及T輔助細胞激活、信號傳導及細胞激素產生，以及抗體之效應功能，其包括中和、典型的補體激活及調理作用。

"細胞介導"免疫反應(其在本文中任何處可與術語"細胞"免疫反應互換使用)一般係指包括T淋巴細胞(包括細胞毒性T淋巴細胞(CTL))、樹突狀細胞、巨噬細胞及天然殺傷細胞之免疫細胞對抗原之反應，以及伴隨該等反應的所有過程，包括但不限於該等細胞之激活及增殖、CTL效應功能、影響涉及適應性免疫反應及先天性免疫反應之其他細胞之功能的細胞激素產生，以及記憶T細胞產生。

根據本發明，術語"細胞外"(如在本文中係用於相對於酵母菌媒劑在細胞外提供抗原)意謂可藉由多種方法中之任一種方法獲得的抗原發生於酵母菌媒劑之細胞外(表面上或外部)。舉例而言，若抗原由酵母菌媒劑(例如藉由重組產生)表現以使得抗原或其一部分呈現於(位於、含在、定位於)酵母菌媒劑之外表面(例如完整原樣酵母菌之細胞壁或酵母菌原生質球狀體、胞質體及殘骸之質膜)上，則抗原相對於酵母菌媒劑為細胞外的。抗原例如可表現於酵母菌之ER中且接著易位至酵母菌表面，儘管一般而言，相對於重組抗原產生，提及"表現"於酵母菌媒劑之表面上或在酵母菌媒劑之細胞外"表現"意欲涵蓋抗原產生之整個過程，自轉錄、經由轉譯、經由抗原之靶向及傳遞或易位至酵母菌媒劑中之最後目的地。術語"表現"一般亦可與術語"提供"互換使用且最一般可涵蓋在酵母菌媒劑之表面上提供抗原之任一方式

(亦即，涵蓋其他方法之結合)。舉例而言，若抗原諸如藉由共價鍵或非共價鍵附著於酵母菌之外表面(亦即，不一定由酵母菌重組表現)，則抗原相對於酵母菌媒劑亦為細胞外的。若抗原僅與酵母菌混合(混合物，經組合，組合物)，則抗原相對於酵母菌媒劑亦為細胞外的。若抗原係由酵母菌分泌，則抗原相對於酵母菌媒劑亦為細胞外的。

根據本發明，術語"細胞內"(如在本文中係用於相對於酵母菌媒劑在細胞內提供抗原)意謂可藉由多種方法獲得的抗原包含於酵母菌媒劑之細胞內環境內部。舉例而言，若抗原由酵母菌媒劑表現(例如藉由重組產生)且所產生之抗原中之至少一部分仍留在酵母菌內(亦即，未易位至或傳遞至酵母菌媒劑之表面或尚未傳遞至或易位至酵母菌媒劑之表面)，則抗原相對於酵母菌媒劑為細胞內的。酵母菌媒劑之細胞內環境可包括但不限於：細胞液、ER、內膜及尚未穿越至細胞表面的分泌小泡。若抗原(例如，藉由任何適當的輸送方法，包括電穿孔、粒子轟擊、微量注射、脂質轉染、吸附、感染及原生質體融合)載入酵母菌內，則抗原相對於酵母菌媒劑亦為細胞內的。

根據本發明，本文中所使用之術語"抗原"一般係指：蛋白質之任何部分(肽、部分蛋白質、全長蛋白質)，其中蛋白質為天然存在的或源於合成；細胞組合物(完整細胞、細胞溶解產物或分裂細胞)；有機體(完整有機體、溶解產物或分裂細胞)或碳水化合物(諸如表現於癌細胞上的彼等物)，或其他分子，或其一部分。抗原誘發防禦在該抗原所投與之個體之細胞及組織內部所遭遇之相同或類似抗原的抗原特異性免疫反應(例如體液及/或細胞介導免疫反應)。或者，抗原可充當耐受原。

當提及刺激免疫反應時，術語"抗原"可與術語"免疫原"互換使用。如本文中所使用之免疫原，描述了一種誘發體液及/或細胞介導免疫反應(亦即，為抗原性的)以使得免疫原(例如經由本發明之疫苗)

投與動物可引發防禦在動物組織內部所遭遇之相同或類似抗原的抗原特異性免疫反應的抗原。

"耐受原"係用於描述一種抗原，該抗原以使得對該抗原存在經減少或經改變之免疫反應且較佳為回應於接觸耐受原或表現或呈遞該等耐受原之細胞而實質上非響應性、無反應性、其他失活或缺失免疫系統細胞之形式、量或投藥途徑提供。

"疫苗接種抗原"不僅可為免疫原或耐受原，而且可為用於疫苗中的抗原，其中生物反應(誘發免疫反應，容忍限度)係針對疫苗接種抗原所誘發。

給定抗原之"免疫原結構域"可為含有至少一投與動物時充當免疫原之抗原決定基的抗原之任何部分、片段或抗原決定基(例如肽片段或次單位或抗體抗原決定基或其他構形抗原決定基)。舉例而言，單個蛋白質可含有多個不同的免疫原結構域。免疫原結構域在蛋白質內不一定為線性序列，諸如在體液免疫反應之狀況中。

抗原決定基在本文中定義為在足以誘發免疫反應之給定抗原內的單免疫原位點，或足以抑制、消除免疫反應或導致免疫反應失活之給定抗原內的單耐受原位點。熟習該項技術者應瞭解，T細胞抗原決定基在尺寸及組成上與B細胞抗原決定基不同，且經由I類MHC通道所呈遞的抗原決定基不同於經由II類MHC通道所呈遞的抗原決定基。抗原決定基可為線性序列或構形抗原決定基(保守結合區)。抗原可如單抗原決定基一般小，或更大，且可包括多個抗原決定基。因而，抗原尺寸可小至約5-12個胺基酸(例如肽)且可大至全長蛋白質，包括多聚體及融合蛋白質、嵌合蛋白質、完整細胞、完整微生物或其部分(例如完整細胞之溶解產物或微生物之萃取物)。此外，抗原可包括碳水化合物，其可載入酵母菌媒劑內或載入本發明之組合物內。應瞭解，在有些實施例中(亦即，當抗原由來自重組核酸分子之酵母菌媒

劑表現時)，該抗原為蛋白質、融合蛋白質、嵌合蛋白質或其片段，而非完整細胞或微生物。本文中所述之本發明之流感融合蛋白質較佳。

"疫苗接種"或"免疫作用"係指因單獨或連同佐劑投與抗原而誘發(誘導)防禦抗原或其免疫原部分或耐受原部分的免疫反應。疫苗接種較佳產生保護效應或治療效應，其中隨後暴露於抗原(或抗原之來源)可誘發防禦抗原(或來源)的免疫反應，其減緩或預防動物之疾病或病狀。疫苗接種之概念已熟知於該項技術中。藉由投與本發明之組合物(疫苗)所誘發的免疫反應可為與不投與該組合物相比在免疫反應之任何方面(例如，細胞介導反應、體液反應、細胞激素產生)的任何可偵測的變化。

Tarmogen(靶分子抗原)泛指細胞外(在其表面上)、細胞內(內部或胞內)或細胞外與細胞內表現一或多種異源抗原的酵母菌媒劑。Tarmogens一般已描述於該項技術中。參見，例如，美國專利第5,830,463號。

在本發明之一實施例中，本文中所述之任何胺基酸序列可結合至少1個及直至約20個其他異源胺基酸產生，其他異源胺基酸位於特定胺基酸序列之C-末端及/或N-末端每一者之側面。所得蛋白質或多肽可稱為"主要包含"特定胺基酸序列。如上所述，根據本發明，異源胺基酸為位於特定胺基酸序列側面、非天然存在(亦即，不存在於自然界、活體內)的胺基酸序列；或與特定胺基酸序列之功能無關的胺基酸序列；或並非由位於編碼特定胺基酸序列之天然存在核酸序列(當其存在於基因中時)側面之核苷酸所編碼的胺基酸序列(若使用標準密碼子選擇法轉譯給定胺基酸序列所來源之有機體之天然存在序列之該等核苷酸)。類似地，短語"主要包含"，當結合本文中所提及之核酸序列使用時，係指編碼特定胺基酸序列的核酸序列，該核酸序列的

側面為至少1個且至多多達約60個其他異源核苷酸，其他異源核苷酸位於編碼特定胺基酸序列之核酸序列的各5'及/或3'末端處。位於編碼特定胺基酸序列之核酸序列(當其存在於天然基因中)側面的異源核苷酸並非天然存在(亦即，不存在於自然界、活體內)，或不編碼給予蛋白質以任何其他功能或改變具有特定胺基酸序列之蛋白質之功能的蛋白質。

根據本發明，"異源胺基酸"為位於特定胺基酸序列側面、非天然存在(亦即，不存在於自然界、活體內)的胺基酸序列；或與特定胺基酸序列之功能無關的胺基酸序列；或並非由位於編碼特定胺基酸序列之天然存在核酸序列(當其存在於基因中時)側面之核苷酸所編碼的胺基酸序列(若使用標準密碼子選擇法轉譯給定胺基酸序列所來源之有機體之天然存在序列之該等核苷酸)。因此，至少兩個相對於流感抗原而言異源的胺基酸殘基為任何兩個位於流感抗原側面、非天然存在的胺基酸殘基。

根據本發明，短語"選擇性結合"係指抗體、本發明之抗原結合片段或結合夥伴優先結合特定蛋白質的能力。更具體而言，短語"選擇性結合"係指一蛋白質與其他蛋白質(例如，抗體、其片段或抗原之結合夥伴)之特異性結合，其中藉由任何標準檢定(例如免疫檢定)所量測的結合量在統計上顯著高於用於檢定之本底對照。舉例而言，當執行免疫檢定時，對照組通常包括僅含有抗體或抗原結合片段(亦即，缺少抗原)的反應孔/管，其中缺少抗原之抗體或其抗原結合片段的反應性之量(例如，非特異結合反應孔)視為本底。結合可使用該項技術中的各種標準方法(包括酶免疫測定(例如ELISA)、免疫印跡檢定等)量測。

"個體"為脊椎動物、較佳哺乳動物、更佳人類。哺乳動物包括但不限於農畜、運動動物、寵物、靈長類動物、小鼠及大鼠。術語"個

體"可與術語"動物"、"受檢者"或"患者"互換使用。

如本文中所使用，"選自由...組成之群"意謂所列項之群組中任一項或所列項之群組中多項之任一組合。因此，舉例而言，"選自由A、B及C組成之群之項"亦可表示為"選自A、B及/或C之項"。

本發明所提及之分離蛋白或多肽包括全長蛋白質、融合蛋白質或該等蛋白質之任何片段、結構域、構形抗原決定基或同源物。更具體而言，根據本發明，分離蛋白為已自其自然環境中移除(亦即，已經受人類操控)的蛋白質(包括多肽或肽)且可包括例如純化蛋白、部分純化蛋白、重組產生蛋白及合成產生蛋白。因而，"分離"不體現蛋白已經純化的程度。本發明之分離蛋白較佳經重組產生。根據本發明，術語"修飾"與"突變"可互換使用，尤其論及本文中所述之蛋白質或其部分之胺基酸序列(或核酸序列)之修飾/突變。

如本文中所使用，術語"同源物"係用於指藉由對天然存在蛋白質或肽稍作修飾而不同於天然存在蛋白質或肽(亦即，"原型"或"野生型"蛋白質)、但維持天然存在形式之鹼性蛋白及側鏈結構的蛋白質或肽。該等修改包括但不限於：一或幾個胺基酸側鏈之修改；一或幾個胺基酸之修改，包括缺失(例如蛋白質或肽之截短型)、插入及/或取代；一或幾個原子之立體化學修改；及/或若干衍生化作用，包括但不限於：甲基化、糖基化、磷酸化、乙醯化、肉豆蔻醯化、異戊烯化、棕櫚酸化、醯胺化及/或糖基磷脂醯肌醇之加成。同源物與天然存在蛋白質或肽相比具有經增強、減弱或大體上類似的性質。同源物可包括蛋白質之促效劑或蛋白質之拮抗劑。同源物可使用該項技術已知用於製備蛋白質之技術製備，該等技術包括但不限於：直接修飾經分離之天然存在蛋白質、直接合成蛋白質或使用例如典型的或重組DNA技術修飾編碼蛋白質之核酸序列以實現隨機突變或靶向突變。

給定蛋白質之同源物可包含或主要包含與參照蛋白之胺基酸序

列至少約45%一致或至少約50%一致或至少約55%一致或至少約60%一致或至少約65%一致或至少約70%一致或至少約75%一致或至少約80%一致或至少約85%一致或至少約90%一致或至少約95%一致或至少約96%一致或至少約97%一致或至少約98%一致或至少約99%一致(或以完整數增量介於45%與99%之間之任何百分比一致性)的胺基酸序列。在一實施例中，同源物包含或主要包含與參照蛋白之天然存在胺基酸序列一致性小於100%、一致性小於約99%、一致性小於約98%、一致性小於約97%、一致性小於約96%、一致性小於約95%等(增量為1%至一致性小於約70%)的胺基酸序列。

除非另作說明，否則如本文中所使用，提及百分比(%)一致性係指使用如下執行對同源性的評估：(1)具有標準內定參數的BLAST 2.0 Basic BLAST同源性搜尋(使用blastp搜尋胺基酸且使用blastn搜尋核酸)，其中預定過濾低複雜性區域的查詢序列(描述於Altschul, S.F., Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 中，其以引用方式全文併入本文中)；(2)BLAST 2比對(使用下述參數)；(3)及/或具有標準內定參數的PSI-BLAST(Position-Specific Iterated BLAST)。應瞭解，由於BLAST 2.0 Basic BLAST與BLAST 2之間標準參數的差異，因此使用BLAST 2程式可識別兩種具有顯著同源性的特定序列，而使用序列之一作為查詢序列、以BLAST 2.0 Basic BLAST執行搜尋未必能鑑定最高匹配的第二序列。此外，PSI-BLAST提供"外形"搜尋之自動、使用簡便型式，其為尋找序列同源物的靈敏方式。該程式首先執行空位BLAST資料庫搜尋。PSI-BLAST程式使用所返回之任何顯著比對之資訊建構特定位點記分矩陣，置換查詢序列用於下一輪資料庫搜尋。因此，應瞭解百分比一致性可使用該

等程式中之任一程式測定。

兩種特定的序列可使用BLAST 2序列彼此比對，如Tatusova及Madden, (1999), " Blast 2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences ", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250中所述，該文獻以引用方式全文併入本文中。使用BLAST 2.0演算法在兩個序列之間執行空位BLAST搜尋(BLAST 2.0)，以blastp或blastn執行BLAST 2序列比對，可在所得比對中導入空位(缺失及插入)。為使本文清楚起見，使用如下標準內定參數執行BLAST 2序列比對。

對於blastn，使用0 BLOSUM62矩陣：

匹配獎勵=1

不匹配處罰=-2

開放空位(5)及延伸空位(2)處罰

空位x衰減(50)預期(10)字尺寸(11)過濾(啓用)

對於blastp，使用0 BLOSUM62矩陣：

開放空位(11)及延伸空位(1)處罰

空位x衰減(50)預期(10)字尺寸(3)過濾(啓用)。

分離核酸分子為已自其自然環境中移除(亦即，已經受人類操控)的核酸分子，其自然環境為自然存在之核酸分子處於其中的基因組或染色體。因而，"分離"不一定地體現核酸分子已經純化的程度，但指明分子不包括自然存在之核酸分子處於其中的完整基因組或完整染色體。分離核酸分子可包括基因。包括基因之分離核酸分子並非包括該基因之染色體的片段，而是包括與該基因相關之編碼區及調控區、但無天然存在於相同染色體上之其他基因之染色體的片段。分離核酸分子亦可包括側面(亦即，在該序列之5'端及/或3'端)為實際上一般不位於特定核酸序列側面的其他核酸的特定核酸序列(亦即，異源序列)。分離核酸分子可包括DNA、RNA(例如，mRNA)，或DNA或RNA之衍

生物(例如，cDNA)。儘管短語"核酸分子"主要係指實體核酸分子且短語"核酸序列"主要係指核酸分子上之核苷酸之序列，但該兩個短語可互換使用，尤其對於能夠編碼蛋白質或蛋白質之結構域的核酸分子或核酸序列。

重組核酸分子為可包括與能夠有效調節核酸分子在待轉染之細胞中之表現之任何轉錄控制序列中之至少一序列操作性連接、編碼本文中所述之任一種或多種蛋白質之任何核酸序列中之至少一序列的分子。儘管短語"核酸分子"主要係指實體核酸分子且短語"核酸序列"主要係指核酸分子上之核苷酸之序列，但該兩個短語可互換使用，尤其對於能夠編碼蛋白質的核酸分子或核酸序列。此外，短語"重組分子"主要係指與轉錄控制序列操作性連接的核酸分子，但可與投與動物的短語"核酸分子"互換使用。

重組核酸分子包括重組載體，其為任一核酸序列、通常為異源序列，其可與編碼本發明之融合蛋白之分離核酸分子操作性連接，其能夠實現融合蛋白之重組產生且其能夠根據本發明將核酸分子傳遞入宿主細胞內。該載體可含有與待插入載體中之分離核酸分子相鄰近的非天然存在核酸序列。該載體可為RNA或DNA，原核的或真核的，而在本發明中為病毒或質體較佳。重組載體可用於選殖、定序及/或操控核酸分子，且可用於傳遞該等分子(例如，在DNA疫苗或基於病毒載體之疫苗中)。重組載體較佳用於表現核酸分子，且亦可稱為表現載體。重組載體較佳能夠表現於經轉染之宿主細胞中。

在本發明之重組分子中，核酸分子與含有調控序列(諸如轉錄控制序列、轉譯控制序列、複製起點及其他與宿主細胞相容且控制本發明之核酸分子之表現的調控序列)之表現載體操作性連接。詳言之，本發明之重組分子包括與一或多個表現控制序列操作性連接的核酸分子。短語"操作性連接"係指以使得核酸分子當轉染(亦即轉型、轉換

或轉染)入宿主細胞內時表現的方式使核酸分子與表現控制序列連接。

根據本發明，術語"轉染"係用於指可將外源核酸分子(亦即，重組核酸分子)插入細胞中的任何方法。術語"轉型"可與術語"轉染"互換使用(當該術語用於指將核酸分子導入微生物細胞(諸如海藻、細菌及酵母菌)內時)。在微生物系統中，術語"轉型"係用於描述因微生物獲得外源核酸的遺傳修改，基本上與術語"轉染"同義。因此，轉染技術包括但不限於：轉型、細胞之化學處理、粒子轟擊、電穿孔、微量注射、脂質轉染、吸附、感染及原生質體融合。

本發明之疫苗及組合物

本發明之實施例係關於一種組合物(疫苗)，該組合物可用於一種方法中以誘發對抗一種抗原或多種抗原之細胞介導及/或體液免疫反應，在一較佳實施例中保護動物防止疾病或病狀(包括病原體感染)或減輕至少一個因該疾病或病狀所引起的症狀。該等組合物一般包括：(a)酵母菌媒劑；及(b)由該酵母菌媒劑所表現、與該酵母菌媒劑締合或組合的異源抗原。其他組合物可包括一種酵母菌媒劑與一種以其他疫苗組合物之形式(諸如DNA疫苗、蛋白質次單位疫苗、或死亡或失活病原體)所提供之異源抗原組合。當酵母菌媒劑表現一或多種抗原時，抗原可以任何組合在細胞內、細胞外或兩種方式表現或提供。在某些實施例中，該等抗原作為融合蛋白提供，該融合蛋白係經設計以穩定異源蛋白質在酵母菌媒劑中之表現，防止所表現之異源蛋白質之後轉譯修飾，及/或在有些實施例中可使融合蛋白表現於(包括易位至)酵母菌媒劑之表面上(細胞外表現)。融合蛋白亦提供廣泛的細胞介導免疫反應及(在有些實施例中)體液免疫反應，較佳表現一種以上不同的抗原，及/或可與表現不同抗原之其他酵母菌媒劑組合。儘管如本文中所述可將一或多個該等融合蛋白載入酵母菌媒劑(例如，作為蛋

白質)或另外與酵母菌媒劑複合或混合以形成本發明之疫苗為本發明之一實施例，但該等融合蛋白最典型由酵母菌媒劑(例如，完整酵母菌或酵母菌原生質球狀體，其視需要可進一步處理為酵母菌胞質體、酵母菌殘骸或酵母菌膜或細胞壁萃取物或溶離份或其顆粒)表現為重組蛋白。

根據本發明，包括異源融合蛋白、由酵母菌表現的"異源"蛋白質意謂該蛋白質並非由酵母菌天然表現的蛋白質，儘管融合蛋白可包括酵母菌序列或由酵母菌天然表現的蛋白質或其部分(例如，本文所述之Aga蛋白)。舉例而言，流感血球凝集素蛋白與酵母菌Aga蛋白之融合蛋白被視為適用於本發明的異源蛋白質，因為該融合蛋白並非由酵母菌天然表現。

酵母菌媒劑

在本發明之任一組合物(例如疫苗)中，以下與酵母菌媒劑有關之態樣涵蓋於本發明。根據本發明，酵母菌媒劑為可用於結合本發明之疫苗或治療性組合物中之一或多種抗原的任一種酵母菌細胞(例如整個或完整細胞)或其衍生物(見下文)或為佐劑。因此酵母菌媒劑可包括但不限於：活的完整酵母菌微生物(亦即具有其所有成分(包括細胞壁)的酵母菌細胞)、死的完整酵母菌微生物，或其衍生物，包括：酵母菌原生質球狀體(亦即，缺乏細胞壁之酵母菌細胞)、酵母菌胞質體(亦即，缺乏細胞壁及核之酵母菌細胞)、酵母菌殘骸(亦即，缺乏細胞壁、核及細胞質的酵母菌細胞)、亞細胞酵母菌膜萃取物或其溶離份(亦稱為酵母菌膜顆粒且先前稱為亞細胞酵母菌顆粒)或酵母菌細胞壁製劑。

酵母菌原生質球狀體通常藉由酶促消化酵母菌細胞壁產生。該方法例如描述於Franzussoff等人，1991，Meth. Enzymol. 194, 662-674.，該文獻以引用方式全文併入本文中。

酵母菌胞質體通常藉由將酵母菌細胞去核而產生。該方法例如描述於Coon, 1978, Natl. Cancer Inst. Monogr. 48, 45-55, 該文獻以引用方式全文併入本文中。

酵母菌殘骸通常藉由將經滲透或經溶解之細胞再密封而產生，且可(但不一定)含有彼細胞之細胞器之至少一部分。該方法例如描述於Franzusoﬀ等人，1983, J. Biol. Chem. 258, 3608-3614及Bussey等人，1979, Biochim. Biophys. Acta 553, 185-196中，各文獻以引用方式全文併入本文中。

酵母菌膜顆粒(亞細胞酵母菌膜萃取物或其溶離份)係指缺乏自然核或細胞質的酵母菌膜。該顆粒可具有任何尺寸，包括的尺寸範圍為天然酵母菌膜至超音波處理或熟習該項技術者已知之其他膜分裂方法、繼之再密封所產生之微粒的尺寸。亞細胞酵母菌膜萃取物製備方法例如描述於Franzusoﬀ等人，1991, Meth. Enzymol. 194, 662-674中。亦可使用含有酵母菌膜部分之酵母菌膜顆粒之溶離份及(當抗原由酵母菌重組表現、再製備酵母菌膜顆粒時)所研究之抗原。抗原可承載於膜內部、膜表面或其組合(亦即，抗原可位於膜內部及外部且/或跨越酵母菌膜顆粒之膜)。在一實施例中，酵母菌膜顆粒為重組酵母菌膜顆粒，該重組酵母菌膜顆粒可為完整的、分裂的或分裂且再密封的酵母菌膜，該酵母菌膜在膜表面上包括至少一所要抗原或該抗原至少部分地嵌入膜內。

酵母菌細胞壁製劑之實例為在其表面上攜有抗原，或攜有至少部分地嵌入細胞壁內部之抗原以使得酵母菌細胞壁製劑當投與動物時激發所要(例如保護性)免疫反應防止傳染物的分離酵母菌細胞。

任何酵母菌株可用於製備本發明之酵母菌媒劑。酵母菌為單細胞微生物，其屬於子囊菌類(Ascomycetes)、擔子菌類(Basidiomycetes)及半知菌類(Fungi Imperfecti)三類中之其一。選擇用作免疫調節劑之

酵母菌類型的一主要考慮為酵母菌之病原性。在一實施例中，酵母菌為非病原病毒株，諸如釀酒酵母菌。選擇非病原酵母菌株可最小化對酵母菌媒劑所投與之個體的任何反效應。然而，若酵母菌之病原性可以熟習該項技術者已知之任何方式消除，則可使用病原性酵母菌(例如突變株)。儘管在過去使用病原性酵母菌株或其非病原突變體作為佐劑或作為生物反應調節劑，且根據本發明可使用，但較佳為非病原性酵母菌株。

酵母菌株之較佳屬包括酵母菌屬(*Saccharomyces*)、念珠菌屬(*Candida*)(其可為病原性的)、隱球酵母菌屬(*Cryptococcus*)、漢遜氏酵母菌屬(*Hansenula*)、克盧費氏酵母菌屬(*Kluyveromyces*)、畢赤氏酵母菌屬(*Pichia*)、紅酵母菌屬(*Rhodotorula*)、裂殖酵母菌屬(*Schizosaccharomyces*)及耶氏酵母菌屬(*Yarrowia*)，更佳為酵母菌屬、念珠菌屬、漢遜氏酵母菌屬、畢赤氏酵母菌屬及裂殖酵母菌屬，且尤其較佳為酵母菌屬。酵母菌株之較佳種包括釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、卡爾斯伯酵母菌(*Saccharomyces carlsbergensis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、乳酒假絲酵母菌(*Candida kefyr*)、熱帶假絲酵母菌(*Candida tropicalis*)、羅氏隱球酵母菌(*Cryptococcus laurentii*)、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、異常漢遜氏酵母菌(*Hansenula anomala*)、多形漢遜氏酵母菌(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克魯維酵母菌(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克魯維酵母菌(*Kluyveromyces lactis*)、馬克斯克魯維酵母菌乳酸變體(*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*)、巴斯德畢赤氏酵母菌(*Pichia pastoris*)、深紅酵母菌(*Rhodotorula rubra*)、粟酒裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)及解脂耶氏酵母菌(*Yarrowia lipolytica*)。應瞭解，該等很多種包括意欲包括於上述種內之各亞種、類型、亞型等。更佳酵母菌種包括釀酒酵母菌、白色念珠菌、多

形漢遜氏酵母菌、巴斯德畢赤氏酵母菌及粟酒裂殖酵母菌。釀酒酵母菌尤其較佳，因為其操控相對容易且對於用作食品添加劑"公認為安全的"或"GRAS"(GRAS，FDA於1997年4月17日所提出之Rule 62FR18938)。本發明之一實施例為能夠複製質體至尤其高之複製數的酵母菌株，諸如釀酒酵母菌株。釀酒酵母菌株為一種能支持表現載體的菌株，該等表現載體容許一或多個靶抗原及/或抗原融合蛋白以高量表現。此外，本發明中可使用任何突變酵母菌株，包括所表現之靶抗原之後轉譯修飾呈現減少的彼等物，諸如延續N-連接糖基化之酶中的突變。

在一實施例中，本發明之較佳酵母菌媒劑能夠與正傳遞酵母菌媒劑及抗原之細胞類型(諸如樹突狀細胞或巨噬細胞)融合，從而實現酵母菌媒劑(而在很多實施例中之抗原)高效傳遞至細胞類型。如本文中所使用，酵母菌媒劑與靶細胞類型之融合係指酵母菌細胞膜或其顆粒能夠與靶細胞類型(例如樹突狀細胞或巨噬細胞)之膜融合，從而形成合胞體。如本文中所使用，合胞體為藉由合併細胞所產生之原生質之多核團。很多病毒表面蛋白(包括諸如HIV、流感病毒、脊髓灰質炎病毒及腺病毒之免疫缺乏病毒之彼等物)及其他融合體(諸如涉及卵與精子之間融合的彼等物)已經證明能實現兩種膜之間(亦即，病毒與哺乳動物細胞膜之間或哺乳動物細胞膜之間)的融合。舉例而言，產生HIV gp120/gp41異源抗原於其表面上的酵母菌媒劑能夠與CD4+ T-淋巴細胞融合。然而，應瞭解靶向部分併入酵母菌媒劑內儘管在有些環境下是需要的，但並非必需的。在酵母菌媒劑於細胞外表現抗原之狀況中，此可為本發明之酵母菌媒劑的又一優點。以上已證明本發明之酵母菌媒劑易被樹突狀細胞(以及其他細胞，諸如巨噬細胞)接納。

酵母菌媒劑製備方法及表現酵母菌媒劑、組合或締合酵母菌媒劑與抗原的方法在下文描述。

抗原

欲用於本發明中之抗原包括任何希望據以誘發免疫反應的抗原。舉例而言，該等抗原可包括但不限於任何與病原體相關的抗原，包括病毒抗原、真菌抗原、細菌抗原、蠕蟲抗原、寄生蟲抗原、外寄生蟲抗原、原生蟲抗原或來自其他任何傳染物之抗原。抗原亦可包括任何與特定病原或病狀相關的抗原(無論來自病原性來源或細胞來源)，其包括但不限於癌抗原、自體免疫疾病相關之抗原(例如糖尿病抗原)、過敏症抗原(過敏原)、藏有一或多個突變胺基酸的哺乳動物細胞分子、一般由哺乳動物細胞生前或新生所表現的蛋白質、其表現由流行病媒介物(例如病毒)之插入所誘導的蛋白質、其表現由基因易位所誘導的蛋白質及其表現由調控序列之突變所誘導的蛋白質。該等抗原可為天然抗原或以某些方式(例如，序列修改或產生融合蛋白)所修飾之經遺傳設計的抗原。應瞭解，在有些實施例中(亦即，當抗原由來自重組核酸分子之酵母菌媒劑表現時)，該抗原可為蛋白質或其免疫原結構域之任何抗原決定基、融合蛋白或嵌合蛋白，而非完整細胞或微生物。

包括於本發明之組合物(疫苗)中的其他較佳抗原包括能夠抑制非所要之或有害之免疫反應(諸如因過敏原、自體免疫抗原、炎性媒介物、涉及GVHD之抗原、某些癌、膿毒性休克抗原及涉及移植排斥反應之抗原所引發的免疫反應)的抗原。該等化合物包括但不限於抗組織胺、環孢菌素、皮質類固醇、FK506、與涉及產生有害免疫反應之T細胞受體對應的肽、Fas配位體(亦即，結合細胞Fas受體之細胞外域或胞內域、從而誘導細胞凋亡的化合物)、以實現耐受作用或無反應性之方式存在的適當MHC複合物、T細胞受體以及自體免疫抗原，較佳與能夠增強或抑制細胞介導免疫及/或體液免疫之生物反應調節劑組合。

適用於本發明的腫瘤抗原(癌抗原)可包括諸如來自腫瘤細胞之蛋白質、糖蛋白或表面碳水化合物的腫瘤抗原、來自腫瘤抗原的抗原決定基、完整的腫瘤細胞、腫瘤細胞之混合物以及其部分(例如溶解產物)。

在一態樣中，抗原來自於病毒，其包括但不限於：腺病毒、砂粒病毒、崩芽病毒(bunyaviruses)、冠狀病毒、柯薩奇病毒(coxsackie viruses)、細胞巨化病毒、愛-巴病毒(Epstein-Barr viruses)、黃病毒、嗜肝DNA病毒、肝炎病毒、疱疹病毒、流感病毒、慢病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、黏病毒、致癌病毒、正黏病毒、乳頭狀瘤病毒、乳多泡病毒、副流感病毒、副黏病毒、細小病毒、細小核糖核酸病毒、痘病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞體病毒、呼腸孤病毒、棒狀病毒、風疹病毒、披衣病毒以及水痘病毒。其他病毒包括嗜T-淋巴細胞病毒，諸如嗜人T-淋巴細胞病毒(HTLV，諸如HTLV-I及HTLV-II)、牛白血病病毒(BLVS)以及貓白血病病毒(FLV)。慢病毒包括但不限於人類(HIV，包括HIV-1或HIV-2)、猴(SIV)、貓(FIV)及犬(CIV)免疫缺乏病毒。

在其他態樣中，該抗原係來自一種傳染物，該傳染物來自選自以下屬類之屬：麴黴屬(*Aspergillus*)、博德氏桿菌(*Bordatella*)、布魯格絲蟲屬(*Brugia*)、念珠菌屬(*Candida*)、衣原體屬(*Chlamydia*)、球蟲屬(*Coccidia*)、隱球菌屬(*Cryptococcus*)、心絲蟲屬(*Dirofilaria*)、埃希氏桿菌屬(*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌屬(*Francisella*)、淋球菌屬(*Gonococcus*)、組織胞漿菌屬(*Histoplasma*)、利什曼蟲屬(*Leishmania*)、分支桿菌屬(*Mycobacterium*)、支原體屬(*Mycoplasma*)、草履蟲屬(*Paramecium*)、百日咳屬(*Pertussis*)、瘧原蟲屬(*Plasmodium*)、肺炎球菌屬(*Pneumococcus*)、肺囊蟲屬(*Pneumocystis*)、立克次氏體屬(*Rickettsia*)、沙門氏菌(*Salmonella*)、

志賀菌屬 (*Shigella*)、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*)、鏈球菌屬 (*Streptococcus*)、弓形蟲屬 (*Toxoplasma*)、霍亂菌屬 (*Vibrio cholerae*)、耶爾森氏菌屬 (*Yersinia*)。在一態樣中，傳染物係選自惡性瘧原蟲 (*Plasmodium falciparum*)或間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*)。

在一態樣中，該抗原來自於一種細菌，該細菌來自選自以下菌科類之科：腸桿菌科 (*Enterobacteriaceae*)、細球菌科 (*Micrococcaceae*)、弧菌科 (*Vibrionaceae*)、巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*)、支原體科 (*Mycoplasmataceae*)及立克次氏體科 (*Rickettsiaceae*)。在一態樣中，該細菌屬於選自以下屬類之屬：假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)、博代桿菌屬 (*Bordetella*)、分支桿菌屬 (*Mycobacterium*)、弧菌屬 (*Vibrio*)、桿菌屬 (*Bacillus*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella*)、弗朗西斯氏菌屬 (*Francisella*)、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*)、鏈球菌屬 (*Streptococcus*)、埃希氏桿菌屬 (*Escherichia*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、巴斯德氏菌屬 (*Pasteurella*)及耶爾森氏菌屬 (*Yersinia*)。在一態樣中，該細菌來自選自以下菌種之種：綠膿假單胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鼻疽假單胞菌 (*Pseudomonas mallei*)、偽鼻疽假單胞菌 (*Pseudomonas pseudomallei*)、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*)、結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、麻風分枝桿菌 (*Mycobacterium leprae*)、土拉弗朗西絲氏菌 (*Francisella tularensis*)、霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*)、炭疽芽孢桿菌 (*Bacillus anthracis*)、沙門氏傷寒菌 (*Salmonella enteric*)、鼠疫耶爾森氏菌 (*Yersinia pestis*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)及支氣管敗血性博代桿菌 (*Bordetella bronchiseptica*)。

根據本發明，適用於該組合物或疫苗中的抗原可包括兩個或兩個以上來自相同抗原的免疫原結構域或抗原決定基、兩個或兩個以上來自相同細胞、組織或有機體的抗原、免疫原結構域或抗原決定基或兩個或兩個以上來自不同細胞、組織或有機體的抗原、免疫原結構域

或抗原決定基。

如上所述，用於本發明之疫苗及組合物中的融合蛋白包括至少一用於疫苗接種動物的流感抗原。該組合物或疫苗可按照需要包括一、兩、幾個、若干或複數個流感抗原，包括一或多個流感抗原之一或多個免疫原結構域。

當使用來自病原體(諸如流感病毒)之抗原時，則熟習該項技術者可藉由自對病原體之不同病毒株高度保守之病原體基因組之區域選擇抗原來使包含表現病原體抗原之酵母菌媒劑之疫苗的長期功效最大化。此外，例如藉由自可變之病原體之區域選擇抗原，諸如隨病毒株不同之抗原或在各季節或地理區域中可突變之抗原，可使疫苗處理特定傳染病的能力最大化。本發明之該態樣已於上文詳細論述。

在一態樣中，病原體為流感病毒。在此態樣中，保守抗原或內部表現抗原包括：基質蛋白(M1)、離子通道(M2)抗原、核鞘(NP)抗原、聚合酶PB1(PB1)抗原、聚合酶(PB2)抗原及聚合酶PA(PA)抗原。可變抗原或外部表現抗原包括血球凝集素(HA)抗原(任一種或多種亞型)及神經胺糖酸苷酶(NA)抗原(任一種或多種亞型)，以及M2之細胞外部分(稱M2e)。該等抗原可如上述選用於本發明之新穎的疫苗策略中。

在一態樣中，病原體為肝炎病毒，諸如肝炎病毒C(HCV)。在該態樣中，保守抗原或內部表現抗原包括HCV核心蛋白、HCV NS2、NS3、NS4、NS5。可變抗原或外部表現抗原包括HCV E1及E2(包膜蛋白)。該等抗原可如上述選用於本發明之新穎的疫苗策略中。

在一態樣中，病原體為肝炎病毒，諸如肝炎病毒B(HBV)。在該態樣中，保守抗原或內部表現抗原包括：核心抗原HbcAg及e抗原HbeAg。可變抗原或外部表現抗原包括HbsAg(42 nM病毒粒子及22 nM顆粒)。該等抗原可如上述選用於本發明之新穎的疫苗策略中。

在一態樣中，病原體為免疫缺乏病毒，諸如人類免疫缺乏性病毒(HIV)。在該態樣中，保守抗原或內部表現抗原包括：Vif、Vpr、Nef、p7、核鞘。可變抗原或外部表現抗原包括gp120及gp41。該等抗原可如上述選用於本發明之新穎的疫苗策略中。

在有些實施例中，抗原為融合蛋白。在本發明之一態樣中，融合蛋白可包括兩個或兩個以上抗原。在一態樣中，融合蛋白可包括一或多個抗原之兩個或兩個以上的免疫原結構域或兩個或兩個以上的抗原決定基(例如，流感M1序列及流感HA序列)。該疫苗可提供廣範圍患者中之抗原特異性免疫作用。舉例而言，適用於本發明中的多域融合蛋白可具有多個結構域，其中各結構域包含來自特定蛋白之肽，該肽包含至少4個位於兩側的胺基酸殘基且包括存在於蛋白質中的突變胺基酸，其中該突變係與特定疾病或病狀(例如，特定病毒株之流感感染)相關。

在一實施例中，用作本發明之基於酵母菌之疫苗之成分的融合蛋白係使用尤其適用於在酵母菌中表現異源抗原的結構產生。通常，所要抗原性蛋白或肽在其胺基末端與以下物融合：(a)穩定融合蛋白在酵母菌媒劑中之表現或防止所表現之融合蛋白之後轉譯修飾的特定合成肽(該等肽詳述於例如美國專利公開案第2004-0156858 A1(2004年8月12日公開)，該案以引用方式全文併入本文中)；(b)內源酵母菌蛋白之至少一部分，其中融合夥伴提供蛋白在酵母菌中之表現的顯著增強之穩定性及/或防止蛋白質藉由酵母菌細胞之後轉譯修飾(該等蛋白質亦詳述於例如美國專利公開案第2004-0156858 A1(同上)中)；及/或(c)使融合蛋白表現於酵母菌表面上之酵母菌蛋白之至少一部分(例如，本文中更詳細描述的Aga蛋白)。

又，融合肽或蛋白可提供經設計成由選擇劑(諸如抗體)識別的抗原決定基且似乎對防禦該結構中之疫苗接種抗原的免疫反應無不利影

響。該等劑適用於鑑別、選擇及純化適用於本發明的蛋白質。

此外，本發明包括與抗原編碼結構之C-末端融合、尤其用於選擇及鑑別蛋白質之肽的用途。該等肽包括但不限於任何合成肽或天然肽，諸如肽標記(例如6X His)或其他任何抗原決定基短標記。與本發明之抗原之C-末端連接的肽可結合或不結合添加上述N-末端肽使用。

適用於本發明之一融合結構為包括以下物之融合蛋白：(a)至少一抗原(包括全長抗原以及如本文中別處所述之各種融合蛋白及多抗原結構之免疫原結構域及抗原決定基)；及(b)合成肽。

在一實施例中，合成肽與流感抗原之N-末端連接，該肽包含至少兩個與流感抗原異源的胺基酸殘基，其中該肽穩定融合蛋白在酵母菌媒劑中之表現或防止所表現之融合蛋白之後轉譯修飾。合成肽與抗原之N-末端部分共同形成具有以下要求的融合蛋白：(1)在融合蛋白之位置1處的胺基酸殘基為甲硫胺酸(亦即，合成肽中的第一胺基酸為甲硫胺酸)；(2)在融合蛋白之位置2處的胺基酸殘基不為甘胺酸或脯胺酸(亦即，合成肽中的第二胺基酸不為甘胺酸或脯胺酸)；(3)在融合蛋白之位置2-6處的胺基酸殘基皆不為甲硫胺酸(亦即，若合成肽短於6個胺基酸，則無論合成肽之部分或蛋白質之部分，在位置2-6處的胺基酸不包括甲硫胺酸)；及(4)在融合蛋白之位置2-6處的胺基酸皆不為離胺酸或精胺酸(亦即，若合成肽短於5個胺基酸，則無論合成肽之部分或蛋白質之部分，在位置2-6處的胺基酸不包括離胺酸或精胺酸)。合成肽可短至兩個胺基酸，但更佳為至少2-6個胺基酸(包括3、4、5個胺基酸)，且可長於6個胺基酸，按完整數直至約200個胺基酸、300個胺基酸、400個胺基酸、500個胺基酸或500個胺基酸以上。

在一實施例中，融合蛋白包含胺基酸序列M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆，其中M為甲硫胺酸；其中X₂為除甘胺酸、脯胺酸、離胺酸或精胺酸之外的任何胺基酸；其中X₃為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸之外的任何胺

基酸；其中X₄為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸之外的任何胺基酸；其中X₅為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸之外的任何胺基酸；且其中X₆為除甲硫胺酸、離胺酸或精胺酸之外的任何胺基酸。在一實施例中，X₆殘基為脯胺酸。增強流感抗原在酵母菌細胞中之表現之穩定性且/或防止蛋白質在酵母菌中之後轉譯修飾的例示性合成序列包括序列M-A-D-E-A-P(SEQ ID NO:1)。MADEAP序列可隨流感抗原以及其他抗原使用。除表現產物之穩定性增強外，該融合夥伴似乎對防禦該結構中之疫苗接種抗原的免疫反應無不利影響。此外，合成融合肽可經設計以提供可由選擇劑(諸如抗體)識別的抗原決定基。

在本發明之其他實施例中，編碼用於本發明中之合成肽之轉譯起始位點的核酸根據Kozak轉譯序列規則為A-C-C-A-T-G-G，其中該序列中之ATG為最初轉譯起始位點且編碼M-A-D-E-A-P(SEQ ID NO:1)之甲硫胺酸。應瞭解，如本文中所述之本發明之各實施例亦可經組合。舉例而言，在本發明之一態樣中，當合成肽為MA-D-E-A-P(SEQ ID NO:1)時，編碼此肽之起始位點的核酸可為A-C-C-A-T-G-G。本發明之實施例之其他各種組合對於熟習該項技術者顯而易見。

在本發明之一態樣中，酵母菌媒劑經操控以使得抗原藉由所表現之抗原產物之傳遞或易位來部分地或完整地表現或提供於酵母菌媒劑之表面上(細胞外表現)。一完成本發明之此態樣的方法係使用間隔臂使一或多個抗原定位於酵母菌媒劑之表面上。一使用間隔臂的方式係形成所研究之抗原與使抗原靶向酵母菌細胞壁之蛋白質的融合蛋白。舉例而言，一種可使用的蛋白質為能使抗原靶向酵母菌細胞壁以使得抗原定位於酵母菌表面上的酵母菌蛋白(例如細胞壁蛋白2(cwp2)、Aga2、Pir4或Flo1蛋白)。除酵母菌蛋白外的其他蛋白質可用於間隔臂；然而，對於任何間隔臂蛋白，最需要具有針對靶抗原而非間隔臂蛋白的免疫原反應。因而，若間隔臂使用其他蛋白質，則所

用間隔臂蛋白不應對間隔臂蛋白自身產生該強免疫反應而使得針對靶抗原的免疫反應占下風。熟習該項技術者應致力於針對間隔臂蛋白的弱免疫反應(相對於針對靶抗原之免疫反應)。任何已知測定免疫反應大小的方法可使用(例如，抗體產生、溶解檢定等)且易為熟習該項技術者所知。

定位待暴露於酵母菌表面上之靶抗原的其他方法係使用信號序列(諸如糖基磷脂醯肌醇(GPI))使靶抗原錨至酵母菌細胞壁。或者，定位可藉由接合使所研究之抗原經由易位入內質網(ER)而靶向入分泌通道的信號序列，以使得抗原結合與細胞壁結合的蛋白質(例如cwp)來實現。

在一態樣中，間隔臂蛋白為酵母菌蛋白。該酵母菌蛋白可包含酵母菌蛋白之約兩個與約800個之間的胺基酸。在一實施例中，該酵母菌蛋白約為10至700個胺基酸。在其他實施例中，該酵母菌蛋白為約40至600個胺基酸。本發明之其他實施例包括的酵母菌蛋白為至少250個胺基酸、至少300個胺基酸、至少350個胺基酸、至少400個胺基酸、至少450個胺基酸、至少500個胺基酸、至少550個胺基酸、至少600個胺基酸或至少650個胺基酸。在一實施例中，該酵母菌蛋白的長度為至少450個胺基酸。

在其他實施例中，該酵母菌蛋白穩定融合蛋白在酵母菌媒劑中之表現，防止所表現之融合蛋白之後轉譯修飾，且/或使融合蛋白靶向酵母菌內之特定代謝區(例如，表現於酵母菌細胞表面上)。對於傳遞入酵母菌分泌通道，可使用的例示性酵母菌蛋白包括但不限於：Aga(包括但不限於Aga1及/或Aga2)；SUC2(酵母菌轉化酶)； α 因子信號前導序列；CPY；侷限且滯留於細胞壁中的Cwp2p；在子細胞形成之初始階段期間侷限於酵母菌細胞芽處的BUD基因；Flo1p；Pir2p；及Pir4p。

在本發明之其他態樣中，可使用其他序列使蛋白靶向、滯留及/或穩定於酵母菌媒劑之其他部分，例如在細胞液或線粒體中。以上任一實施例可使用之適當酵母菌蛋白的實例包括但不限於：SEC7；用於葡萄糖中之可抑制表現及胞內定位的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶PCK1、磷酸甘油酸激酶PGK及磷酸丙糖異構酶TPI基因產物；熱休克蛋白SSA1、SSA3、SSA4、SSC1，其表現係經誘導且其蛋白在細胞暴露於熱處理後更加熱穩定；用於引入線粒體內的線粒體蛋白CYC1；ACT1。

對於引發有效的體液免疫反應，靶抗原應部分地表現或提供於酵母菌表面上(或由酵母菌分泌)。如圖10A及圖10B、圖11及圖13B及實例所示，表現或提供抗原於酵母菌細胞表面上可存在多種變化。熟習該項技術者應瞭解酵母菌蛋白之其他組合可用於將一或多個所研究之抗原定位於表面上。

熟習該項技術者可以若干方式使抗原最優化表現或提供於酵母菌媒劑之表面上。一該方式係監視及/或控制抗原表面表現。一達成此目的的可能方法係最優化抗原之表現量以實施最大影響。對於有些抗原，抗原之過分表現對於酵母菌為毒性的，或對於個體之免疫細胞及免疫系統為毒性的。在其他狀況中，太少的表面表現則因缺乏與B細胞相互作用之抗原而會導致免疫系統之引發次最佳。熟習該項技術者可藉由使用熟知技術(諸如流式細胞術(例如FACS))且使表現量與細胞活力相關來監視抗原之表現。

最優化抗原表面表現或提供的其他方法係自細胞壁融合夥伴中謹慎選擇間隔臂。儘管可用作間隔臂之酵母菌蛋白之實例在下文給出且亦展示於圖10B中，但間隔臂之尺寸會影響結合於酵母菌表面上之抗原暴露程度。因此，視正使用之抗原而定，熟習該項技術者應選擇對酵母菌表面上之抗原達成適當間隔的間隔臂。在一實施例中，間隔

臂為至少450個胺基酸的酵母菌蛋白。

最優化抗原表面表現的其他考慮為抗原與間隔臂組合是否應作為單體(例如，如圖11中所示之HA-cwp2)或二聚物或三聚物(例如三聚HA-aga2p附加所分泌之可溶性HA)或甚至更多的共同連接單元表現。單體、二聚物、三聚物等之該使用可容許抗原之適當間隔或折疊，以使得抗原之有些部分(若非全部)以使其免疫原性更強之方式呈現於酵母菌媒劑表面上(若例如多聚形式採用誘發特定類抗體(例如中和抗體)所需的構形)。

熟習該項技術者可藉由在高於5.5之pH水準下(亦即中性pH)培育酵母菌細胞來使酵母菌媒劑(經及未經異源抗原之表現)在其表面上與在細胞液中的效能最優化。利用中性pH有助於最優化抗原利用度及表面呈現，容許酵母菌細胞壁處於更易順應之狀態且引發結合酵母菌之免疫細胞產生包括分泌有益細胞激素(例如INF- γ)之最優化免疫反應及最優化激活反應。

熟習該項技術者可用來最優化用於引發抗體反應之酵母菌媒劑的其他方法係控制酵母菌糖基化之量。酵母菌糖基化之量會影響表面上所表現之抗原的免疫原性及抗原性，因為糖部分傾向於體積龐大。因而，當實施本發明時，應考慮酵母菌表面上存在的糖部分及其對靶抗原周圍之三維空間的影響。可使用任一方法降低酵母菌糖基化的量。舉例而言，可使用經選擇而具有低糖基化的酵母菌突變株(例如mnn1、och1及mnn9突變體)或可藉由使靶抗原上之糖基化受體序列突變而清除。或者，可使用具有簡化糖基化型的酵母菌，例如畢赤氏酵母菌。糖基化對表面抗原之效應的實例提供於實例5中。

對於在酵母菌表面上提供抗原的其他考慮為如何使酵母菌失活以及其對如何以此影響表面上所表現之抗原之抗原性的潛在效應。酵母菌之熱失活為使酵母菌失活的標準方式，然而熱失活有可能改變靶

抗原之二級、三級或四級結構。若使用熱失活，則熟習該項技術者應藉由該項技術已知的標準方法注意監視靶抗原之結構變化。或者，可使用使酵母菌失活的其他方法，諸如化學方法、電方法、放射性方法或UV方法。參見，例如，標準酵母菌培養教科書(諸如Methods of Enzymology，第194卷，Cold Spring Harbor Publishing (1990))中所揭示的方法。所用任何最優化策略應考慮靶抗原之二級、三級或四級結構且保持該結構以便最優化其免疫原性。

與以上實施例類似且可包括以上實施例之侷限性(儘管此不需要)之本發明之融合蛋白結構的其他具體態樣包括包含與流感抗原之C-末端連接之肽的疫苗，該肽包含至少兩個與流感抗原異源的胺基酸殘基，其中該肽可穩定融合蛋白在酵母菌媒劑中之表現或防止所表現之融合蛋白的後轉譯修飾。在本發明之一例示性態樣中，該肽包含胺基酸序列E-D(Glu-Asp)。該序列作用為抵消疏水性。

在一實施例中，本發明之疫苗可包含與流感抗原之C-末端連接的肽，其中該肽容許藉由針對該肽之抗體識別融合蛋白。在一態樣中，該肽包含胺基酸序列G-G-G-H-H-H-H-H-H(HSEQ ID NO:2)。該實施例可單獨或與結合上述融合蛋白之其他態樣使用。

在一實施例中，用於本文中之融合蛋白的酵母菌蛋白/肽、間隔臂或合成肽包含用於鑑別及純化融合蛋白的抗體抗原決定基。選擇性結合內源性抗原的抗體已可獲得，或可容易生成。最後，若需要將蛋白質引導至特定的細胞位置(例如進入分泌通道、進入線粒體、進入核)，則該結構可對酵母菌蛋白使用內源信號以保證用於彼傳遞系統之細胞機制最優化。該等信號已於上文較詳細地描述。較佳地，選擇性結合融合夥伴的抗體係購得或製成。

本發明之酵母菌媒劑、Tarmogens及組合物(疫苗)之製備

根據本發明，術語"酵母菌媒劑-抗原複合物"或"酵母菌-抗原複合

物"一般係用於描述酵母菌媒劑與抗原之任何締合物。該締合包括酵母菌(重組酵母菌)表現抗原、抗原導入酵母菌、抗原實體附著至酵母菌以及酵母菌與抗原在一起混合於諸如緩衝劑或其他溶液或調配物中。該等類型之複合物在下文詳述。

在一實施例中，用於製備酵母菌媒劑的酵母菌細胞經編碼抗原之異源核酸分子轉染以使得抗原由酵母菌細胞表現。該酵母菌在本文中亦稱為重組酵母菌或重組酵母菌媒劑。接著可將酵母菌細胞作為完整細胞載入樹突狀細胞內，或可殺死酵母菌細胞，或可諸如藉由形成酵母菌原生質球狀體、胞質體、殘骸或亞細胞顆粒使其衍生化，繼之將衍生物載入樹突狀細胞內。酵母菌原生質球狀體亦可經重組核酸分子直接轉染(例如，由完整酵母菌製得原生質球狀體，且接著轉染)以製得表現抗原的重組原生質球狀體。

在一態樣中，用於製備酵母菌媒劑之酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體係經編碼抗原之重組核酸分子轉染，以使得抗原由酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體重組表現。在該態樣中，使用重組表現抗原的酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體製備酵母菌媒劑，該酵母菌媒劑包含酵母菌胞質體、酵母菌殘骸或酵母菌膜顆粒或酵母菌細胞壁顆粒或其溶離份。

一般而言，酵母菌媒劑及抗原可藉由本文中所述之任何技術締合。在一態樣中，酵母菌媒劑細胞內裝載有抗原。在另一態樣中，抗原以共價或非共價方式附著於酵母菌媒劑。在又一態樣中，酵母菌媒劑及抗原藉由混合締合。在另一態樣中，及在較佳實施例中，抗原由酵母菌媒劑或由酵母菌媒劑自其衍生之酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體重組表現。

藉由本發明之酵母菌媒劑所產生之抗原的較佳數目為藉由酵母菌媒劑所適當產生的任何抗原數目，且其範圍通常為至少1個至至少

約6或6個以上，更佳為約2個至約6個異源抗原。

抗原在本發明之酵母菌媒劑中的表現可使用熟習該項技術者已知的技術完成。簡而言之，編碼至少一個所要抗原之核酸分子係以核酸分子與轉錄控制序列操作性連接之方式插入表現載體中，以便當核酸分子轉入宿主酵母菌細胞內時能夠實現其組成性或調節性表現。編碼一或多個抗原的核酸分子可位於一或多個與一或多個表現控制序列操作性連接的表現載體上。尤其重要的表現控制序列為控制轉錄開始的彼等物，諸如啟動子及上游激活序列。本發明中可使用任何適當的酵母菌啟動子，且該等各種啟動子已為熟習該項技術者所知。表現於釀酒酵母菌中的較佳啟動子包括(但不限於)編碼以下酵母菌蛋白之基因的啟動子：乙醇脫氫酶I(ADH1)或II(ADH2)、CUP1、磷酸甘油酸激酶(PGK)、磷酸丙糖異構酶(TPI)、轉譯延伸因子EF-1 α (TEF2)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH；對磷酸丙糖脫氫酶而言亦稱為TDH3)、半乳糖激酶(GAL1)、半乳糖-1-磷酸尿苷轉移酶(GAL7)、UDP-半乳糖差向異構酶(GAL10)、細胞色素 c_1 (CYC1)、Sec7蛋白(SEC7)及酸性磷酸酶(PHO5)，更佳為雜合啟動子(諸如ADH2/GAPDH及CYC1/GAL10啟動子)，甚至更佳為ADH2/GAPDH啟動子(其當細胞中之葡萄糖濃度低時(例如約0.1至約0.2%)被誘導)以及CUP1啟動子及TEF2啟動子。同樣，很多上游激活序列(UAS)(亦稱為增強子)已獲知。表現於釀酒酵母菌中的較佳上游激活序列包括(但不限於)編碼以下蛋白質之基因的UAS：PCK1、TPI、TDH3、CYC1、ADH1、ADH2、SUC2、GAL1、GAL7及GAL10，以及其他藉由GAL4基因產物激活的UAS，尤其較佳為ADH2 UAS。由於ADH2 UAS係藉由ADR1基因產物激活，因此當異源基因與ADH2 UAS操作性連接時過度表現ADR1基因較佳。表現於釀酒酵母菌中的較佳轉錄終止序列包括 α -因子、GAPDH及CYC1基因之終止序列。

在嗜甲醇酵母菌中表現基因的較佳轉錄控制序列包括編碼醇氧化酶及甲酸脫氫酶之基因的轉錄控制區。

藉由酵母菌在細胞外表現抗原的最優化考慮及方法已在上文中詳述。

核酸分子轉染入本發明之酵母菌細胞可藉由將核酸分子投入細胞內之任何方法完成，該方法包括但不限於擴散、主動輸送、水浴超音波處理、電穿孔、微量注射、脂質轉染、吸附及原生質體融合。所轉染之核酸分子可使用熟習該項技術者已知之技術併入酵母菌染色體內或維持在染色體外載體上。攜有該等核酸分子的酵母菌媒劑實例詳細揭示於本文中。如上所述，酵母菌胞質體、酵母菌殘骸及酵母菌膜顆粒或細胞壁製劑亦可藉由以所要核酸分子轉染完整酵母菌微生物或酵母菌原生質球狀體、於其中產生抗原且接著使用熟習該項技術者已知之技術進一步操控微生物或原生質球狀體以產生含有所要抗原之胞質體、殘骸或亞細胞酵母菌膜萃取物或其溶離份來重組產生。

製備重組酵母菌媒劑及藉由酵母菌媒劑表現抗原的有效條件包括其中可培養酵母菌株的有效培養基。有效的培養基通常為包含可吸收性碳水化合物、氮及磷酸鹽來源以及適當鹽、礦物質、金屬及其他營養物(諸如維生素及生長因子)的水性培養基。培養基可包含複合營養物或可為定義的基本培養基。本發明之酵母菌株可培養於各種容器中，該等容器包括但不限於生物反應器、錐形瓶、試管、微量滴定盤及皮氏培養皿。培養係在適合酵母菌株的溫度、pH及氧含量下進行。該等培養條件已為一般熟習該項技術者所熟知(參見，例如，Guthrie等人(編)，1991, *Methods in Enzymology*，第194卷，Academic Press, San Diego)。

在本發明之有些態樣中，且尤其當需要抗原在其中需要誘導體液免疫反應之實施例中具有足夠的表面表現時，可將酵母菌在維持於

至少5.5之pH水準之培養基中培養，亦即不容許培養基之pH值降低至pH 5.5以下。在其他態樣中，酵母菌在維持於約5.5之pH水準下培養。在其他態樣中，酵母菌在維持於約5.6、5.7、5.8或5.9之pH水準下培養。在其他態樣中，酵母菌在維持於約6之pH水準下培養。在其他態樣中，酵母菌在維持於約6.5之pH水準下培養。在其他態樣中，酵母菌在維持於約6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0之pH水準下培養。在其他態樣中，酵母菌在維持於約7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0之pH水準下培養。pH水準對培養酵母菌至關重要。熟習該項技術者應瞭解培養過程不僅包括起用酵母菌培養而且亦包括維持培養。由於已知酵母菌培養隨著時間逝去會轉變為酸性(亦即，pH下降)，因此必須在培養過程期間注意監視pH水準。其中培養基之pH水準降至6以下之酵母菌細胞培養仍涵蓋於本發明之範疇內，條件是培養基之pH值可在培養過程期間之某些時點時達成至少5.5。因而，酵母菌在pH值至少5.5或高於5.5之培養基中培養時間愈長，則就獲得具有所要特徵之酵母菌而言，結果更好。

在培養酵母菌中使用中性pH值增進了若干生物效應，該等生物效應對使用酵母菌作為用於免疫調節之媒劑為所要的特性。在一態樣中，以中性pH培養酵母菌可讓酵母菌良好生長，不對細胞世代時間產生任何不利影響(例如減慢倍增時間)。酵母菌可持續生長至高密度而不失去其細胞壁順應性。在其他態樣中，使用中性pH可產生具有順應性細胞壁之酵母菌及/或在所有收穫密度對細胞壁消化酶(例如葡聚糖酶)敏感的酵母菌。該特性為需要的，因為具有撓性細胞壁之酵母菌可呈現獨特的免疫反應，諸如在容納酵母菌之細胞中促進細胞激素(例如，干擾素- γ (IFN- γ))之分泌。此外，藉由該等培養方法為位於細胞壁中之抗原提供更大的可及性。在其他態樣中，對某些抗原(諸如流感HA抗原)使用中性pH，容許藉由二硫蘇糖醇(DTT)處理來釋放

二硫化物結合的HA，而當HA表現酵母菌在更低pH值(例如pH 5)之培養基中培養時，此為不可行的。最後，在其他態樣中，產生Th1型細胞激素之細胞當使用中性pH值方法(例如，藉由噬菌作用或其他裝載)暴露於所培養之酵母菌時，表現產量增加之該Th1-型細胞激素，Th1-型細胞激素包括但不限於IFN- γ 、介白素-12(IL-12)及IL-2。

如本文中所使用，術語"中性pH"之一般用途係指pH值範圍介於約pH 5.5與約pH 8之間、較佳介於約pH 6與約8之間。熟習該項技術者應瞭解，當用pH計量測時，可存在較小波動(例如十分之一或百分之一)。因而，使用中性pH培養酵母菌細胞意謂酵母菌細胞在其培養中大部分時間係以中性pH培養。

在本發明之一實施例中，作為抗原重組表現於酵母菌媒劑中之替代方案，可使酵母菌媒劑在細胞內裝載有蛋白質或肽抗原或充當抗原的碳水化合物或其他分子。隨後，可將此刻於細胞內含有抗原的酵母菌媒劑投與患者或裝載入諸如樹突狀細胞之載劑(如下所述)。如本文中所使用，肽包含小於或等於約30-50個胺基酸的胺基酸序列，而蛋白質包含約30-50個以上胺基酸的胺基酸序列；蛋白質可為多聚物。適用作抗原的蛋白質或肽可小如T細胞抗原決定基(亦即，長度大於5個胺基酸)且可為大於包含多個抗原決定基、蛋白質片段、全長蛋白質、嵌合蛋白或融合蛋白之彼物的任何適當尺寸。肽及蛋白質可為天然或合成來源；該等修飾可包括但不限於糖基化、磷酸化、乙醯化、肉豆蔻醯化、異戊烯化、棕櫚醯化、醯胺化及/或添加甘油磷脂醯肌醇。肽及蛋白質可藉由熟習該項技術者已知之技術(諸如藉由擴散、主動輸送、脂質體融合、電穿孔、噬菌作用、冰凍-熔化循環及水浴超音波處理)直接插入本發明之酵母菌媒劑。可直接裝載有肽、蛋白質、碳水化合物或其他分子的酵母菌媒劑包括可在產生之後、但在載入樹突狀細胞之前裝載抗原的完整酵母菌以及原生質球狀體、殘

骸或胞質體。或者，可使完整酵母菌裝載抗原，且接著由此製備原生質球狀體、殘骸、胞質體或亞細胞顆粒。在該實施例中，酵母菌媒劑內可裝載至少1、2、3、4或任一完整數直至數百或數千個抗原的很多抗原，此諸如(例如)藉由裝載微生物之負載量、藉由哺乳動物腫瘤細胞或其部分之負載量所提供。

在本發明之其他實施例中，抗原實體上附著於酵母菌媒劑。抗原與酵母菌媒劑之實體附著可藉由該項技術中適當的任一方法完成，該方法包括共價及非共價締合方法，其包括但不限於諸如使用抗體或其他結合夥伴使抗原與酵母菌媒劑之外表面化學交聯或使抗原與酵母菌媒劑之外表面生物連接。化學交聯例如可藉由包括戊二醛鍵聯、光親和標記、碳化二醯亞胺處理、能連接二硫鍵之化學品之處理及該項技術中其他交聯化學標準之處理的方法獲得。或者，可使化學品接觸改變酵母菌膜之脂雙層之電荷或細胞壁之組成的酵母菌媒劑，以使得酵母菌外表面更可能與具有特定電荷特性之抗原融合或結合。諸如抗體、結合肽、可溶性受體及其他配位體之靶向劑亦可作為融合蛋白併入抗原，或另外與抗原締合以便使抗原結合酵母菌媒劑。

在又一實施例中，酵母菌媒劑與抗原藉由更被動之非特定或非共價鍵結機制彼此締合，諸如藉由將酵母菌媒劑與抗原在緩衝劑或其他適當的調配物中輕緩地混合在一起。在本發明之一實施例中，酵母菌媒劑與抗原皆於細胞內裝載入諸如樹突狀細胞或巨噬細胞之載劑以形成本發明之治療性組合物或疫苗。或者，可將本發明之抗原(亦即，本發明之流感融合蛋白)在缺少酵母菌媒劑的情況下裝載入樹突狀細胞內。其中可完成兩成分之裝載的各種形式於下文詳細論述。如本文中所使用，術語"裝載"及其派生詞係指將成分(例如，酵母菌媒劑及/或抗原)插入、導入或輸入細胞(例如樹突狀細胞)內。細胞內裝載成分係指將該成分插入或導入細胞之細胞內代謝區(例如，通過質

膜且至少載入細胞質、吞噬體、溶酶體或細胞之某些細胞內空間)。將成分載入細胞內可參考(例如藉由電穿孔)迫使該成分進入細胞內或使該成分處於其中該成分大體上可藉由某些過程(例如噬菌作用)進入細胞內的環境中(例如接觸或靠近細胞)的任何技術。裝載技術包括但不限於：擴散、主動輸送、脂質體融合、電穿孔、噬菌作用及水浴超音波處理。在一較佳實施例中，樹突狀細胞裝載酵母菌媒劑及/或抗原使用被動機制，該等被動機制包括藉由樹突狀細胞吞噬酵母菌媒劑及/或抗原。

在一實施例中，完整酵母菌(經或未經異源抗原之表現)可以產生酵母菌細胞壁製劑、酵母菌膜顆粒或酵母菌片段(亦即非完整)的方式碾碎或處理，且在有些實施例中，酵母菌片段可結合包括抗原(例如DNA疫苗、蛋白質次單位疫苗、死亡或失活病原體)之其他組合物提供或投藥以增強免疫反應。舉例而言，可使用酶促處理、化學處理或物理作用力(例如，機械剪切或超音波處理)將酵母菌碎裂為可用作佐劑的部分。

在本發明之一實施例中，組合物或疫苗亦可包括生物反應調節劑化合物，或能夠產生該等調節劑(亦即，藉由以編碼該等調節劑之核酸分子轉染酵母菌媒劑)，儘管該等調節劑不一定獲得本發明之強烈的免疫反應。舉例而言，酵母菌媒劑可經至少一抗原及至少一生物反應調節劑化合物轉染或裝載至少一抗原及至少一生物反應調節劑化合物，或可連同至少一生物反應調節劑投與本發明之疫苗或組合物。生物反應調節劑包括可調節免疫反應的化合物，其可稱為免疫調節化合物。某些生物反應調節劑可激發保護性免疫反應，而其他生物反應調節劑可抑制有害的免疫反應。某些生物反應調節劑優先增強細胞介導免疫反應，而其他生物反應調節劑優先增強體液免疫反應(亦即，可激發其中存在細胞介導免疫水準增加(與體液免疫水準相比)的免疫

反應，或反之亦然)。量測免疫反應之刺激或抑制以及區別細胞介導免疫反應與體液免疫反應的很多技術已為熟習該項技術者所知。

適當的生物反應調節劑包括細胞激素、激素、脂質衍生物、小分子藥物及其他生長調節劑，諸如但不限於介白素2(IL-2)、介白素4(IL-4)、介白素10(IL-10)、介白素12(IL-12)、干擾素 γ (IFN- γ)、胰島素樣生長因子I(IGF-I)、轉化生長因子 β (TGF- β)、甾類、前列腺素及白三烯。酵母菌媒劑能夠表現(亦即產生)及可能分泌IL-2、IL-12及/或IFN- γ 優先增強細胞介導免疫，而酵母菌媒劑能夠表現及可能分泌IL-4、IL-5及/或IL-10優先增強體液免疫。其他適當的生物反應調節劑包括但不限於：抗-CTLA-4抗體(例如，釋放無反應性T細胞)；T細胞共激活劑(例如，抗-CD137、抗-CD28、抗-CD40)；阿倫單抗(alemtuzumab)(例如CamPath®)、地尼白介素(denileukin diftitox)(例如ONTAK®)、抗-CD4、抗-CD25、抗-PD-1、抗-PD-L1、抗-PD-L2或阻遏FOXP3(例如，滅除CD4+/CD25+ T調控細胞活性/殺死該等細胞)的藥劑；Flt3配位體、咪喹莫特(imiquimod)(Aldara™)、GM-CSF、沙格司亭(sargramostim)(Leukine®)、Toll樣受體(TLR)-7促效劑或TLR-9促效劑(例如，增加樹突狀細胞、巨噬細胞及其他專門抗原呈遞細胞之數目或增強樹突狀細胞、巨噬細胞及其他專門抗原呈遞細胞之激活狀態的藥劑)。該等生物反應調節劑已熟知於該項技術中且可公開購得。

本發明之組合物及治療性疫苗可進一步包括適用於保護受檢者防止特定疾病或病狀(包括受病原體感染)的其他任何化合物，或可治療或改善該感染之任何症狀的任何化合物。

如本文中所使用，醫藥學上可接受之載劑係指適於傳遞本發明之酵母菌疫苗至適當之活體內或離體位點的任何物質或媒劑。該載劑可包括但不限於佐劑、賦形劑或其他任何類型的傳遞媒劑或載劑。

根據本發明，佐劑通常為一般增強動物對特定抗原之免疫反應

的物質。適當的佐劑包括但不限於弗洛因德氏佐劑 (Freund's adjuvant)；其他細菌細胞壁成分；基於鋁之鹽；基於鈣之鹽；二氧化矽；多核苷酸；類毒素；血清蛋白；病毒外被蛋白；源於其他細菌之製劑； γ 干擾素；嵌段共聚物佐劑，諸如 Hunter's Titermax 佐劑 (CytRx™, Inc. Norcross, GA)；Ribi 佐劑 (購自 Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)；及皂苷及其衍生物，諸如 Quil A (購自 Superfos Biosector A/S, Denmark)。本發明之酵母菌疫苗中未必需要佐劑，但不排除其使用。

載劑通常為增強治療性組合物在所治療之動物中之半衰期的化合物。適當的載劑包括但不限於聚合物控釋型調配物、生物可降解植入物、脂質體、油、酯及二醇。

本發明之組合物及疫苗亦可含有一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。如本文中所使用，醫藥學上可接受之賦形劑係指適於傳遞適用於本發明之方法中之組合物至適當之活體內或離體位點的任何物質。醫藥學上可接受之賦形劑較佳係在組合物到達體內之靶細胞、靶組織或靶點之後、以該組合物能夠在靶點處(注意靶點可為系統性的)誘發免疫反應的方式維持組合物(例如，酵母菌媒劑或包含酵母菌媒劑的樹突狀細胞)。本發明之適當賦形劑包括輸送、但不使疫苗特定靶向位點的賦形劑或配方(在本文中亦稱為非靶向載劑)。醫藥學上可接受之賦形劑之實例包括但不限於水、生理鹽水、磷酸鹽緩衝生理鹽水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、含血清溶液、Hank氏溶液、其他生理學上平衡水溶液、油、酯及二醇。水性載劑可含有例如接近接受者之生理條件所需的適當輔助物質(藉由增強化學穩定性及等張性)。輔助物質亦可包括防腐劑。可添加諸如海藻糖、甘胺酸、山梨糖醇、乳糖或麩胺酸單鈉(MSG)之穩定劑以針對各種條件(諸如溫度變化或凍乾製程)穩定疫苗調配物。組合物亦可包括諸如無菌之水或生理鹽水(較佳

經緩衝)的懸浮液。

酵母菌媒劑，包括直接投與患者或首先載入諸如樹突狀細胞之載劑中的製劑，可使用熟習該項技術者已知之很多技術調配入本發明之組合物中。舉例而言，酵母菌媒劑可藉由凍乾法乾燥，此為一較佳實施例。在隨抗原投藥或載入樹突狀細胞或其他類型之投藥之前，亦可使酵母菌媒劑與醫藥學上可接受之賦形劑混合。舉例而言，調配物可再懸浮或稀釋於適當的稀釋劑中，諸如無菌之水、生理鹽水、等張性緩衝生理鹽水(例如，經緩衝至生理學pH值的磷酸鹽)或其他適當的稀釋劑。凍乾(冰凍乾燥)為較佳選項。包含酵母菌媒劑之調配物亦可藉由將酵母菌填入團塊或錠劑內製備，諸如對用於烘焙或釀造操作之酵母菌可如此製備。

本發明之套組

本發明涵蓋包含單獨或與本文中所述之抗原及抗原製劑組合之本發明之任一種或多種疫苗及/或本發明之任一種或多種Tarmogens或酵母菌媒劑的套組。本發明之套組中包括用於任何類型之疫苗中且尤其用於本發明之基於酵母菌媒劑之疫苗或疫苗策略中之細胞內抗原與細胞外抗原之任何組合。舉例而言，本文中所述之任一種融合蛋白或如本文中所述提供細胞內及細胞外抗原的蛋白製劑可提供於該套組中。該等抗原可以任何形式提供，包括：(作為Tarmogen)藉由酵母菌媒劑表現或另外經酵母菌媒劑提供；作為蛋白製劑(包括融合蛋白製劑)或作為死亡病原體或失活病原體提供於DNA疫苗中。包括任何適當的抗原形式。亦包括多抗原或抗原製劑，其中各抗原藉由不同的酵母菌媒劑表現或另外提供於與不同酵母菌媒劑之(例如)複合物中。舉例而言，各種酵母菌媒劑可表現或另外提供來自特定病原體之不同抗原，以便可為投與個體或個體群選擇抗原之較佳組合(例如，保守的或內部的與/或可變的或外部的)及較佳疫苗策略(例如，經保守抗原或

內部抗原引發且經可變抗原或外部抗原激發)。在一態樣中，此套組另外可包括用於引發或激發疫苗策略、單獨或與包括於套組中之Tarmogen組合(如本文中所述，以在引發/激發策略及類似策略中同時或依序投藥)的抗原製劑。套組亦可包括如本文中所述、不表現或不提供抗原、用作佐劑的酵母菌媒劑。本發明之任何套組中可包括一組使用說明書。亦可包括用於酵母菌媒劑的培養試劑。酵母菌細胞可經冷凍以便起用培養或經預先培養以表現抗原，且接著冷凍以便作為套組之部分封裝，或凍乾提供。

本發明之方法

本發明之一實施例係關於誘發免疫反應(包括細胞介導免疫反應、體液免疫反應及其組合)的方法。本發明之其他實施例係關於保護動物防止病狀或疾病(包括受病原體感染(例如流感病毒感染)或由此所得之疾病)的方法(包括預防及/或治療性治療病狀或疾病)。該方法包括向具有或處於產生該疾病或病狀(包括病原體感染)之風險之動物投與如本文中所述之本發明之疫苗或組合物的步驟，以減緩或預防該疾病或病狀，包括預防感染或減緩至少一因動物中之感染所引起的症狀。本發明之方法至少在首次將包含抗原之疫苗投與個體後，在動物中優先誘發防禦至少一抗原的抗原特異性細胞介導免疫反應。對特定病原體或疾病定製免疫反應的詳細策略及該疫苗所投與之個體之免疫狀況已於上文描述且例證於本文中。熟習該項技術者能夠便利地使用如本文中所述之抗原之不同組合、抗原之表現或提供類型及疫苗組合物及疫苗方案以獲得所要的免疫反應。

在以上實施例中，該疫苗或組合物包括：(a)第一酵母菌媒劑；及(b)本文中所述之任一種或多種抗原(由酵母菌媒劑表現、輸送、分泌、與酵母菌媒劑複合、締合及/或混合)。該疫苗可包括表現、攜有、分泌如上所述之不同抗原或與其混合、締合或複合的其他酵母菌

媒劑。由本發明之酵母菌媒劑表現、輸送、分泌或與本發明之酵母菌媒劑混合、締合或複合之抗原的較佳組合，以及待組合或依序投藥之酵母菌媒劑的較佳組合已於上文詳細描述。

在一實施例中，該疫苗包括至少一由酵母菌在細胞內表現或提供的抗原。在一實施例中，該疫苗包括至少一由酵母菌在細胞內表現或提供的抗原及至少一由酵母菌在細胞外表現或提供的抗原。在該實施例之一態樣中，細胞內抗原與細胞外抗原為相同抗原，且在其他態樣中，其為不同抗原。在一實施例中，由酵母菌在細胞內表現或提供的抗原包括至少一為保守抗原之抗原或為由病原體在內部表現之抗原。在一實施例中，由酵母菌在細胞外表現或提供的抗原包括至少一為可變抗原之抗原或為由病原體在外部(表面上)表現之抗原。在其他實施例中，該等可變抗原或外部抗原亦由酵母菌在細胞內表現或提供。

在本發明之一實施例中，該疫苗包括至少一由酵母菌在細胞內表現或提供的抗原以及至少一由酵母菌在細胞外表現或提供的抗原，且該疫苗係用於引發防禦該(該等)抗原的免疫系統。引發意謂首次將該疫苗投與個體，以使得個體先前未使用該抗原或抗原組合免疫。因此，免疫系統經"引發"以更快速地且更有效地響應隨後與抗原之遭遇(例如，藉由激發疫苗或藉由與天然抗原遭遇，例如由於感染上病原體)。

在一實施例中，該疫苗包括至少一由酵母菌在細胞內表現或提供的抗原，或至少一由酵母菌在細胞外表現或提供的抗原，或由酵母菌在細胞內表現或提供之抗原與由酵母菌在細胞外表現或提供之抗原，且該疫苗係作為激發疫苗(亦即，經該抗原或該等抗原初次引發第一免疫接種之免疫作用之後)投藥。

在一實施例中，在抗原高度保守及不可能突變之狀況中，可能

需要表現單抗原。在其他實施例中，比藉由靶向單抗原所得範圍更廣之交叉保護反應需要表現或提供多抗原。該等交叉保護反應適用於產生通用疫苗，其如上所述可與抗體產生疫苗組合以提供廣泛圍之保護性免疫反應。由於保護機制與經抗體產生疫苗所誘發之機制不同，因此在劑量節約方案中可應用靶向通用抗原。

在其他實施例中，激發劑疫苗可為不同類型(例如基於非酵母菌之疫苗(例如蛋白質次單位、DNA、死亡/失活病原體)或為使用不同類型之酵母菌媒劑(諸如酵母菌膜或細胞壁顆粒或作為佐劑結合蛋白質、DNA或失活/死亡病原體疫苗使用的酵母菌)的基於酵母菌之疫苗。更具體而言，在本發明之一實施例中，如本文中所述之本發明之疫苗或組合物可以一種方案投藥，該方案包括投與一或多種其他疫苗或免疫治療組合物(包括任何習知的基於非酵母菌之疫苗或組合物)。舉例而言，該等其他疫苗或免疫治療組合物可包括其他任何含有抗原、編碼抗原或表現抗原的組合物，諸如DNA疫苗、死亡或失活病原體疫苗或蛋白質次單位疫苗(例如，經純化之抗原製劑)。本發明之基於酵母菌之疫苗較佳用於引發抗原特異性免疫反應，包括至少一強烈的細胞介導免疫反應及(在一實施例中)細胞介導免疫反應與體液免疫反應，且基於非酵母菌之疫苗或基於酵母菌之疫苗之替代形式較佳用於激發免疫反應(細胞介導免疫反應及/或體液免疫反應)。或者，可能存在當本發明之基於酵母菌之疫苗投藥時可激發個體對已預先於基於非酵母菌之疫苗中投藥之一或多種抗原的免疫反應的情況。

在一態樣中，不表現或另外含有或提供異源抗原的酵母菌可作為佐劑連同所研究之一或多種抗原使用。在一實施例中，不表現或另外含有或提供異源抗原的酵母菌與基於非酵母菌之疫苗(例如DNA疫苗)同時使用以增強DNA疫苗之免疫反應。在一替代例中，(在表面上或內部或兩者)表現或提供異源抗原的酵母菌連同其他類型疫苗使用

以增強免疫反應。在其他替代例中，不表現或另外含有或提供異源抗原的酵母菌單獨投與個體(亦即，不投與外源性抗原)。在本發明之該態樣中，該個體已攜有足量的抗原以在不攜有抗原之酵母菌媒劑投藥後誘發免疫反應，諸如當前感染上病原體的個體、細胞蛋白質中經歷突變的個體或另外表現或攜帶免疫系統不容忍或打破其容忍限度之抗原的個體。

酵母菌媒劑上之異源抗原不需要與用於基於非酵母菌之疫苗中的抗原一致，以便誘發保護性免疫反應。選擇抗原可使得兩種抗原共有序列相似性，具有共用的抗原決定基或可為靶病原體中不同的抗原。在一態樣中，選擇用於基於酵母菌之疫苗與基於非酵母菌之疫苗的抗原以誘發補充的或互補的免疫反應。此與其中酵母菌媒劑之異源抗原之免疫反應抵制基於非酵母菌之疫苗中之抗原之免疫反應的情形相比明顯較佳。

較佳地，本發明之治療性組合物或疫苗的使用方法誘發動物之免疫反應以使得動物經保護而防止該疾病或病狀(包括感染)或由該疾病或病狀(包括感染)所引起的症狀。如本文中所使用，短語"防止疾病"係指疾病之症狀減輕；疾病之發生率減少及/或疾病之嚴重程度下降。保護動物可指本發明之組合物當投與動物時能夠預防疾病發作及/或治療或減緩疾病症狀、病徵或病因。因而，保護動物防止疾病包括預防疾病發生(預防性治療或預防性疫苗)以及治療患有疾病或經歷疾病之最初症狀的動物(治療性治療或治療性疫苗)。詳言之，保護動物防止疾病係藉由誘發動物之免疫反應、藉由誘導有益的或保護性的免疫反應(在有些情況中另外可抑制(例如減少、抑制或阻遏)過度活化的或有害的免疫反應)完成。術語"疾病"係指與動物正常健康之任何偏離且包括當疾病症狀存在時的狀態，以及偏離(例如感染)發生、但症狀仍未顯現的病狀。

在一實施例中，本發明之任一種疫苗係投與已感染上病原體(諸如流感病毒)的個體或個體群。在其他實施例中，本發明之任一種疫苗係投與處於正感染該病原體之危險中的個體或個體群。該等個體可包括經鑑定為例如比正常個體群或總體個體群感染流感之危險更高的群體。該等個體亦可包括由於預期在該群體之地理位置中有病原體株(例如病毒株)而針對本發明之特定疫苗所選擇的群體。該等群體可以任何適當的參數定義。在其他實施例中，本發明之任一種疫苗可投與任一個體或投與任一個體群，無論其已知或預知感染狀態或對感染上特定病原體之易感性。

更具體而言，如本文中所述之疫苗，當藉由本發明之方法投與動物時，較佳產生以下結果，其包括：病原體感染減緩(例如感染之至少一症狀或臨床表現減輕)、感染消除或感染逐漸減輕至消除、預防感染及/或與其相關之症狀以及刺激防止感染之效應細胞免疫性以及體液免疫。此外，疫苗較佳引發免疫系統預防或減少病原體(包括病原體之所有生命週期形式、病毒株或突變體，無論其在循環過程中游離抑或處於個體之細胞或組織中)之所有感染。疫苗較佳亦產生防禦病原體的持久免疫性或至少一般性或交叉保護性免疫，以使得將來新病毒株或突變體之感染更易預防及/或消除。

本發明包括將本發明之組合物疫苗傳遞至動物。投藥方法可離體或活體內執行。離體投藥係指在患者外部執行部分調控步驟，諸如在使得酵母菌媒劑及抗原載入細胞之條件下將本發明之組合物投與自一患者中所移除之細胞(樹突狀細胞)群以及將細胞返投至該患者。本發明之治療性組合物可藉由任一種適當的投藥方式返投至患者或投與患者。

單獨或與本發明之載劑組合之疫苗或組合物的投藥通常為系統性的或經黏膜的。較佳投藥途徑對於熟習該項技術者顯而易見。較佳

投藥方法包括但不限於靜脈內投藥、腹膜內投藥、肌肉內投藥、節內投藥、冠脈內投藥、動脈內投藥(例如，投入頸動脈)、皮下投藥、經皮傳遞、氣管內投藥、皮下投藥、關節內投藥、心室內投藥、吸入投藥(例如氣霧劑)、顱內投藥、脊柱內投藥、眼內投藥、經耳投藥、鼻內投藥、經口投藥、經肺投藥、導管注入及直接注入組織。

尤其較佳的投藥途徑包括：靜脈內、腹膜內、皮下、真皮內、節內、肌肉內、經皮、吸入、鼻內、經口、眼內、關節內、顱內及脊柱內。非經腸傳遞可包括真皮內、肌肉內、腹膜內、胸膜內、肺內、靜脈內、皮下、心房導管及靜脈導管途徑。經耳傳遞可包括滴耳法，鼻內傳遞可包括滴鼻法或鼻內注射，且眼內傳遞可包括滴眼法。氣霧劑(吸入)傳遞亦可使用該項技術中之標準方法執行(參見，例如，Stribling等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992，其以引用方式全文併入本文中)。舉例而言，在一實施例中，本發明之組合物或疫苗可調配成適於使用適當吸入裝置或噴霧器噴霧傳遞的組合物。經口傳遞包括可通過口服用，且適用於產生黏膜免疫性的固體及液體且此歸因於包含酵母菌媒劑之組合物可易製備為例如錠劑或膠囊劑以及調配成飲食產品以便經口傳遞。

其他調節黏膜免疫性的投藥途徑尤其適用於治療病毒感染及其他病原體之感染。該等途徑包括支氣管、真皮內、肌肉內、鼻內、其他吸入途徑、直腸、皮下、局部、經皮、陰道及尿道途徑。

在上述任一方法之一實施例中，疫苗係投與呼吸道。在其他實施例中，疫苗藉由非經腸投藥途徑投藥。在又一實施例中，疫苗進一步包含樹突狀細胞或巨噬細胞，其中表現融合蛋白之酵母菌媒劑或媒劑(參考上述較佳組合)係離體傳遞至樹突狀細胞或巨噬細胞，且其中含有表現抗原之酵母菌媒劑的樹突狀細胞或巨噬細胞係投與動物。在該實施例之一態樣中，樹突狀細胞或酵母菌媒劑已另外裝載有自由抗

原。在一態樣中，基於酵母菌之疫苗投與個體內的位置與其他基於酵母菌之疫苗或基於非酵母菌之疫苗投與個體內的位置相同。在其他態樣中，基於酵母菌之疫苗投與個體內的位置與其他基於酵母菌之疫苗或基於非酵母菌之疫苗投與個體內的位置不同。在一態樣中，疫苗係作為治療性疫苗投藥。在其他態樣中，疫苗係作為預防性疫苗投藥。

根據本發明，有效的投藥方案(亦即，以有效方式投與疫苗或治療性組合物)包含在一患有疾病或病狀或處於感染疾病或病狀之危險中之動物中誘發免疫反應(較佳使得該動物得以保護而防止該疾病)的適當劑量參數及投藥方式。對於特定疾病的有效劑量參數可使用該項技術中的標準方法測定。該等方法包括例如測定生存率、副作用(亦即毒性)及疾病之進行或衰退。

根據本發明，適當的單次劑量大小為在適當期限內一或多次投藥時能夠誘發動物之抗原特異性免疫反應的劑量。劑量可視正治療之疾病或病狀而變。舉例而言，在一實施例中，本發明之酵母菌媒劑之單次劑量對於投與該組合物之有機體為每公斤該有機體體重約 1×10^5 至約 5×10^7 個酵母菌細胞當量。在一較佳實施例中，每劑量酵母菌細胞不需針對有機體體重作出調整。在該實施例中，本發明之酵母菌媒劑之單次劑量為每劑量約 1×10^4 至約 1×10^9 個酵母菌細胞。以單次劑量使用之酵母菌媒劑的量可介於約0.0001個酵母菌單位(YU)至約10,000 YU(1 YU= 10^7 個酵母菌)之間。在一實施例中，酵母菌媒劑使用量為約0.001 YU至約1000 YU。在其他實施例中，酵母菌媒劑使用量為約0.01 YU至約100 YU。在其他實施例中，酵母菌媒劑使用量為約0.1 YU至約10 YU。在一實施例中，本發明之酵母菌媒劑之單次劑量為每劑量(亦即，每個有機體)約0.1 YU(1×10^6 個細胞)至約100 YU(1×10^9 個細胞)(包括增量為 0.1×10^6 個細胞的任何中間劑量，亦即， 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 ...)。該劑量範圍可有效地用於任一大小之任一有機

體，包括小鼠、猴、人類等。

當疫苗藉由將酵母菌媒劑及抗原載入樹突狀細胞內投藥時，本發明之疫苗之較佳單次劑量為每次投藥每個個體約 0.5×10^6 至約 40×10^6 個樹突狀細胞。較佳地，單次劑量為每個個體約 1×10^6 至約 20×10^6 個樹突狀細胞，且更佳為每個個體約 1×10^6 至約 10×10^6 個樹突狀細胞。

治療性組合物之"激發劑"較佳在防禦抗原之免疫反應減弱時投藥，或在需要提供防禦一種特定抗原或多種抗原之免疫反應或誘導記憶反應時投藥。激發劑可在最初投藥之後約2週至若干年投藥。在一實施例中，投藥進程為在約1個月至約6個月之期限內，約1至約4次投與每公斤有機體體重約 1×10^5 至約 5×10^7 個酵母菌細胞當量之組合物。

在本發明之一實施例中，將包含一劑量之如上詳述之酵母菌媒劑或媒劑與一或多種抗原(而在一態樣中、較佳包含一劑量之單獨或與一或多種細胞外抗原組合之酵母菌媒劑或媒劑與一或多種細胞內抗原)的第一疫苗投與個體或個體群。在流感之狀況中，疫苗較佳包含至少一或多種內部流感抗原。此疫苗可在維持或誘發防禦抗原之細胞介導免疫及當抗原為細胞外時維持或誘發防禦抗原之體液免疫所需的任一適當期限內投與個體。在病原體(諸如流感)之狀況中，疫苗較佳至少維持或誘發防禦一或多種流感病毒株的細胞介導免疫。舉例而言，疫苗可連同激發劑投與，或每年一次或每年兩次、每若干年或另外如需要時投與。如上所述，本發明之該實施例可用作一般的交叉保護性疫苗，且可提供較習知疫苗更長久之防禦各種類型之病原體感染的免疫性。

在又一實施例中，將包含一劑量之酵母菌媒劑或媒劑與一或多種抗原(與上述第一疫苗中所包括者相同或不同的抗原)且較佳包含一劑量之單獨或連同一或多種細胞內抗原之酵母菌媒劑或媒劑及一或多種細胞外抗原的第二疫苗投與接受上述第一疫苗之同一個體或個體

群。該第二疫苗可連同第一疫苗(例如，作為包含不同酵母菌媒劑之組合的單疫苗)投與或與第一疫苗分開投與。在後者情況中，可將第二疫苗與第一疫苗連續、但同時投與(例如，其中投藥間隔期為數秒、數分鐘或數小時)，或以與第一疫苗之不同進程投與，以便操控藉由各種疫苗所誘發的免疫反應。舉例而言，如可行，則第一疫苗可一年一次或以更長增量時間投與，目標為誘發一般的交叉保護性細胞介導免疫反應及(若基於疫苗設計可適用)體液免疫反應。第二疫苗亦可一年一次或需要時(亦即，一次性、每年一次以上或按照相關的免疫接種策略)投與，以使群體適時免疫防禦彼時群體中最流行的病原體株，或如需要控制或預防因病原體感染之傳染病或大流行病。該適用於流感疫苗的策略在本文中得到特別詳細的描述，但本發明不限於流感疫苗。如上所述，本發明之疫苗策略可設計成提供交叉保護性與病原體株/突變體特異性免疫，包括細胞介導與體液免疫，據信其可提供比前述更靈活且更有效的防禦病原體之免疫作用。該策略例如易適用於細胞性抗原，諸如由腫瘤細胞表現的抗原。

在本發明之方法中，疫苗及治療性組合物可投與包括任何脊椎動物在內的動物(受檢者、個體、患者)，且尤其可投與脊椎動物綱、哺乳動物綱之任一成員，包括(不限於)靈長類動物、鼠類、牲畜及馴養寵物。牲畜包括待消費或生產適用產品的哺乳動物(例如，用於羊毛生產之羊)。可保護的較佳哺乳動物包括人類、狗、貓、小鼠、大鼠、山羊、綿羊、牛、馬及豬，尤其較佳為人類。

第一及第二醫療用途

本發明亦涵蓋表現或提供細胞外及/或細胞內抗原(Tarmogens)、細胞外與細胞內抗原之組合、融合蛋白之酵母菌媒劑、作為佐劑之酵母菌媒劑及/或本文中所述之抗原製劑及/或其任何組合中任一種用於製備一種調配物或藥物的用途，特別是用於治療或預防包括病原體感

染、癌、自體免疫疾病等的疾病或病狀。該等調配物或藥物可經調配用於任何投藥類型，包括投藥途徑之組合(例如鼻內及/或非經腸)。該等調配物或藥物可經製備用於本文中所述之任何類型的投藥方案。在一態樣中，該等調配物或藥物係用於誘發抗原特異性免疫反應(細胞介導及/或體液免疫反應)、用於保護動物防止流感感染、用於治療或預防疾病或病狀、用於使處於感染病原體(諸如流感病毒)危險之個體群免疫、用於治療感染病原體(諸如流感病毒)之個體群或用於保護動物防止病原體(包括流感病毒)感染。

流感組合物及疫苗

針對任一種抗原及上述之本發明之各種態樣將藉由詳細論述本發明對流感病毒應用之概念及實施例以及用於誘發對抗流感病毒之免疫反應之組合物及方法來說明及例證。本發明不限於流感病毒為抗原或抗原之來源。

本案發明人已開發出包含酵母菌媒劑及一或多種流感病毒融合蛋白的基於酵母菌之疫苗及其使用方法。該等表現一或多種流感抗原或另外與一或多種流感抗原複合的酵母菌媒劑可單獨或與一或多種其他表現一或多種其他流感病毒融合蛋白或另外與一或多種其他流感病毒融合蛋白複合的酵母菌媒劑組合使用，或該等酵母菌媒劑可與流感抗原之其他形式(包括任何基於非酵母菌之疫苗(例如，DNA疫苗、蛋白質次單位疫苗、或死亡或失活流感病毒))組合。

在一實施例中，該疫苗包括表現或提供一或多種選自基質蛋白(M1)、離子通道(M2)抗原、核鞘(NP)抗原、聚合酶PB1(PB1)抗原、聚合酶(PB2)抗原及聚合酶PA(PA)抗原中之內部流感抗原的酵母菌媒劑。在其他實施例中，該疫苗包括表現一或多種選自血球凝集素(HA)抗原(任一種或多種亞型)及神經胺糖酸苷酶(NA)抗原(任一種或多種亞型)中之外部流感抗原的酵母菌媒劑。內部抗原通常由酵母菌在細

胞內表現。外部流感抗原通常表現或提供於酵母菌表面上(細胞外抗原)，且亦可由酵母菌在細胞內表現或提供。在有些實施例中，較佳為抗原之兩類型提供(細胞內與細胞外)。在一尤其較佳實施例中，選擇可代表在給定時期內(例如，在一年中)、在動物種(例如人類)間傳播最顯著之病毒類型或病毒群的外部流感蛋白，或選擇可響應潛在、疑似或預期特定類型之流感(包括流感傳染病或大流行病)爆發的外部流感蛋白。

本發明之其他及尤其較佳實施例係關於利用外部流感抗原與內部流感抗原用途之組合的疫苗。在該實施例中，該疫苗包括表現或提供至少一種選自基質蛋白(M1)、離子通道(M2)抗原、核鞘(NP)抗原、聚合酶PB1(PB1)抗原、聚合酶(PB2)抗原及聚合酶PA(PA)抗原中之內部流感抗原的酵母菌媒劑。該等蛋白組合之用途亦涵蓋於本發明。內部流感抗原較佳由酵母菌在細胞內表現，儘管該抗原亦可在細胞外提供。該疫苗亦包括由酵母菌媒劑表現或提供至少一種選自血球凝集素(HA)抗原(任一種或多種亞型)及神經胺糖酸苷酶(NA)抗原(任一種或多種亞型)中之外部流感抗原。外部流感抗原表現或提供於酵母菌表面上(細胞外)，且亦可由酵母菌在細胞內表現或提供。在有些實施例中，表現或提供抗原兩型式對於外部流感抗原均為較佳。

來自各種病毒株之流感病毒之蛋白質的核酸及胺基酸序列係已知的。舉例而言，流感病毒株A/PR/8/34之H1N1的序列以NCBI資料庫入藏登記號第M38279號(核苷酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:29，其編碼SEQ ID NO:30)及第NC_002019號(核苷酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:31，其編碼SEQ ID NO:32)公佈。例如亦已知禽流感病毒株A/Vietnam/1203/04的序列。舉例而言，編碼A/Vietnam/1203/04之H5N1(例如，NCBI資料庫入藏登記號第AY818135號)的核苷酸在本文中表示為SEQ ID NO:33，其編碼SEQ ID NO:34。應瞭解，儘管本文

中所述特定序列來源於該等病毒株之已知或報導序列，但熟習該項技術者可易選擇不同病毒株或用於相同病毒株之報導序列且可以與對於所揭示之序列所述相同之方法將其用於本發明中。吾人可易使用各種序列軟體程式中之任一種程式比對序列，且鑑定其他病毒株或報導病毒序列中與本文中所述蛋白質之序列相應的序列。此外應注意，在各種病毒株或公用資料庫之序列報導當中，核苷酸及胺基酸序列可稍微不同。該等微小差異估計對根據本發明誘發免疫反應之能力無顯著影響。本發明不限於本文中所述之序列。在該實施例中，表現或提供外部流感抗原的酵母菌媒劑可為與表現或提供內部流感抗原之酵母菌媒劑相同或不同的酵母菌媒劑。此外，內部流感抗原與/或外部流感抗原之不同組合可表現或提供於不同的酵母菌媒劑上，且該等媒劑可分開或共同使用，此視所要之疫苗接種而定。一般而言，當流感抗原由兩種或兩種以上不同的酵母菌媒劑提供時(亦即，與在一種酵母菌媒劑中提供所有流感抗原相反)，該等酵母菌媒劑可經組合(混合)以便作為單疫苗投藥(例如，單次注射或其他給藥類型)或可將不同的酵母菌媒劑依序投藥。依序投藥可間隔以任何適當時期，包括小的時間增量(秒或分鐘)及較長的時間增量(日、週、月或甚至年)。本發明設想在該等實施例中可使用包括至少一內部流感蛋白及至少一外部流感蛋白在內之流感蛋白之任一組合，且該等流感蛋白可使用表現該等蛋白質或與該等蛋白質複合之酵母菌媒劑(包括單酵母菌媒劑)之任一組合來提供。

在如何設計及使用本發明之疫苗中存在很大的靈活性。舉例而言，包含提供內部流感抗原之酵母菌媒劑的"一般"疫苗可定期投與個體，以便在個體中產生細胞介導之交叉保護性免疫。接著例如可一次性或定期將此疫苗與提供外部流感抗原之其他酵母菌媒劑組合。提供外部流感抗原之酵母菌媒劑可輪換、交替或一年選擇一次或基於其他

任何較佳選擇(例如，緊急情況或預期流行病或大流行病，或另外需要)以在給定時期期間或對特定地理區域靶向所關注之病毒株及/或最流行的病毒株。本發明之其他實施例因本文中所提供之揭示內容而顯而易見。

在本發明之又一實施例中，表現或提供一或多種內部抗原(單獨或與一或多種外部抗原組合)的酵母菌媒劑可作為引發性疫苗投與，繼之投與其他基於酵母菌之疫苗之激發劑或其他內部及/或外部抗原製劑之激發劑，包括但不限於經部分純化或純化的流感蛋白製劑、表現流感蛋白之酵母菌媒劑的溶解產物、DNA流感疫苗、死亡(或失活)病毒或酵母菌媒劑(提供或不提供異源抗原)與基於非酵母菌之疫苗之組合。應注意，由於本發明之基於酵母菌之疫苗可極有效地誘發免疫反應，因此激發劑疫苗可能不需要，儘管其包括於本發明之一實施例中。

流感M1、M2及NP蛋白為由流感表現的內部蛋白，且在流感病毒株中呈現高度的序列保守性，使其成為免疫治療的優良靶。本發明之疫苗之投藥可增加流感特異性CD4⁺及CD8⁺ T細胞反應，且期望使病毒負荷減少，且最終增強病毒在感染流感之個體中之清除。當該疫苗以基於酵母菌之形式與外部流感抗原(例如，HA、M2e(M2蛋白之外部肽)及/或NA抗原)組合時，該疫苗可進一步增加流感特異性細胞介導免疫及體液免疫以提供包括交叉保護性疫苗接種方法(經由內部抗原)(具有潛在持久效應)以及病毒株特異方法(經由外部抗原)的疫苗接種平臺，其適合於處理目前疫苗需要。此外，本發明之疫苗非基於孵育的，使得使用疫苗的接受者範圍比習知流感疫苗更廣。與現時流感疫苗相比，該疫苗亦有望可更有效且更快速的生產。最後，如上所述，就能夠根據需要亦靶向病毒亞型的同時建立一般的免疫性而言，本發明所提供之疫苗設計上的靈活性係對習知流感疫苗的顯著改良。

本發明之一實施例係關於一種組合物(疫苗)，該組合物(疫苗)可用於保護動物防止流感感染或減緩至少一種由該流感感染引起之症狀的方法中。該疫苗包含：(a)酵母菌媒劑；及(b)由該酵母菌媒劑表現或提供的異源流感融合蛋白。如上所述，本發明包括可在本發明之疫苗中作為抗原使用的若干種不同的流感融合蛋白。該等融合蛋白可設計成穩定異源蛋白在酵母菌媒劑中之表現、防止所表現之異源蛋白的後轉譯修飾，且/或在有些實施例中可促使融合蛋白表現於酵母菌媒劑之表面上。融合蛋白亦提供廣泛的細胞介導免疫反應及(在有些實施例中)體液免疫反應，且較佳表現或提供一種以上不同的流感抗原，且/或可與表現或提供不同流感抗原之其他酵母菌媒劑組合。抗原之組合較佳包括至少一內部流感抗原與至少一外部流感抗原。儘管如本文中所述可將一或多個該等融合蛋白載入酵母菌媒劑(例如，蛋白質)或另外與酵母菌媒劑複合或混合以形成本發明之疫苗為本發明之一實施例，但該等融合蛋白最通常由酵母菌媒劑(例如，完整酵母菌或酵母菌原生質球狀體，其視需要可進一步處理為酵母菌胞質體、酵母菌殘骸或酵母菌膜萃取物或其溶離份)表現或提供為重組蛋白。

如上所述，用於本發明之疫苗及組合物中的融合蛋白包括至少一用於疫苗接種動物的流感抗原。該組合物或疫苗可按照需要包括一、兩、幾個、若干或複數個流感抗原，包括一或多個流感抗原之一或多個免疫原結構域。舉例而言，本文中所述之任一種融合蛋白可包括任一種或多種選自流感基質蛋白(M1)、流感離子通道蛋白(M2)或流感核鞘蛋白(NP)、聚合酶PB1(PB1)抗原、聚合酶(PB2)抗原及聚合酶PA(PA)抗原之內部流感蛋白與一或多種選自流感血球凝集素(HA)或流感神經胺糖酸苷酶(NA)之外部流感蛋白中的至少一部分。

根據本發明，短語"內部流感蛋白"係指由流感病毒(任何類型或病毒株)表現、全部或大部分包含於病毒核心中或基質蛋白膜中之病

毒顆粒內部的蛋白。在病毒類型及病毒株中，該等蛋白質通常為高度保守的，且可由病毒大量產生。如本文中所述之"外部流感蛋白"係指貫穿類脂膜且大部分表現於病毒顆粒表面上之流感病毒(任何類型或病毒株)所表現的蛋白質(例如，為病毒表面蛋白)。該等蛋白質可由抗體識別，且因此適用於誘發防禦病毒的體液免疫反應。應瞭解，流感離子通道蛋白(M2)當主要包含於流感病毒內部時具有表現於該流感病毒表面上的小細胞外結構域(在該項技術中已知為M2e)。因此，為本發明起見，M2蛋白儘管一般認為其是內部流感蛋白，但就其當由流感病毒表現或由在表面上表現或呈現至少細胞外結構域的細胞表現時能夠由抗體識別而言，亦可認為其是外部流感蛋白。

在本發明之一實施例中，該疫苗之流感抗原部分係作為包含兩種或兩種以上抗原之融合蛋白產生。在一態樣中，融合蛋白可包括一或多種抗原之兩種或兩種以上的免疫原結構域或兩種或兩種以上的抗原決定基(例如，流感M1序列與流感HA序列)。該疫苗可提供廣範圍患者中之抗原特異性免疫作用。舉例而言，適用於本發明中的多域融合蛋白可具有多種結構域，其中各結構域包含來自特定蛋白之肽，該肽包含至少4個位於兩側的胺基酸殘基且包括存在於蛋白質中的突變胺基酸，其中該突變係與特定疾病或病狀(例如，特定病毒株之流感感染)相關。

編碼來自各種流感類型、亞型及病毒株之流感基因及多蛋白的核酸序列及胺基酸序列於該項技術已知。因此，熟習該項技術者使用本文中所提供之指導及特定例示性流感抗原之參考能夠便利地產生及使用本發明之組合物及疫苗中之來自流感病毒株之各種基於流感之融合蛋白。

在本發明中，本發明者已發明出用於預防或抑制流感病毒感染之新穎的重組酵母菌免疫治療。酵母菌免疫治療之一係在誘導性啟動

子控制下表現作為融合蛋白的流感基質蛋白(M1)。使用抗組胺酸標記之抗體對酵母菌疫苗細胞溶解產物進行免疫印跡分析可展示重組酵母菌表現該蛋白質。在BALB/c小鼠中注射M1表現酵母菌疫苗可誘導有效的M1抗原特異性輔助T細胞及細胞毒性T細胞免疫反應，如淋巴細胞增殖及細胞毒性檢定中所展示。其他酵母菌免疫治療在細胞內表現血球凝集素抗原(HA)蛋白，且其他酵母菌免疫治療在細胞外提供血球凝集素抗原(HA)蛋白。有些免疫治療在組成性啟動子控制下提供抗原。本發明所涵蓋之其他酵母菌疫苗於下文詳述。

在本發明之一態樣中，流感抗原為內部流感蛋白、基質蛋白(M1)。在本發明之一態樣中，流感抗原主要包含流感M1蛋白之2至252個胺基酸。M1為在流感病毒中形成基質蛋白膜之約27 kD的流感蛋白(參見圖1)。M1為結構蛋白，且與病毒組裝及核糖核蛋白(RNP)核輸出至細胞質有關。M1在流感病毒中為高度保守蛋白，且為充裕的病毒蛋白，其包含全部病毒蛋白之約47%。任何M1蛋白或其部分，以及該等任一種M1蛋白之任何突變體或變體可設想用於本發明。

實例1描述使用基質蛋白(M1或MP)內部流感蛋白製備本發明之例示性疫苗或疫苗之成分(亦即，提及成分係就酵母菌媒劑可與表現不同蛋白質之其他酵母菌媒劑或經進一步轉型可表現如本文中所述之其他流感蛋白的其他酵母菌媒劑組合而言)。在該實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌W303α)可設計成在銅誘導性啟動子CUP1控制下表現源自A/PR/8/34流感病毒的流感M1融合蛋白。融合蛋白為具有胺基酸序列SEQ ID NO:4的單個多肽，其由表示為SEQ ID NO:3的核酸序列編碼。

在本發明之其他態樣中，流感抗原為外部流感蛋白、血球凝集素(HA)。在本發明之一態樣中，流感抗原主要包含流感HA蛋白之2至

530個胺基酸，其包括HA之N-末端ER靶信號序列，但不包括HA之36個C-末端殘基，從而除去其C-末端膜錨及細胞質尾。在其他態樣中，流感抗原主要包含流感HA蛋白之17至342個胺基酸，其不包括HA之16個胺基酸之N-末端ER靶信號序列，但不包括HA之包含C-末端膜錨及細胞質尾的36個C-末端殘基。HA為表現於流感病毒顆粒表面上的膜內在蛋白質(參見圖1)。血球凝集素促使宿主細胞經由糖基化受體蛋白之涎酸殘基結合在靶細胞表面上，以及在病毒藉由細胞內吞作用被容納之後，病毒膜與宿主膜在核內體中之隨後融合。HA含有至少四個主抗原性位點，而在該等四個區域之一內僅單胺基酸取代便可導致病毒能逃避免疫監督且每年在世界範圍散佈。人類感染中已發現三種不同的HA蛋白，稱為H1、H2及H3；在動物流感病毒中已發現其他13種，包括在禽流感病毒中發現的H5。任何HA蛋白或其部分，以及該等任一種HA蛋白之任何突變體或變體可設想用於本發明。在一實施例中，表現HA蛋白之本發明之酵母菌媒劑表現一種以上的HA蛋白(例如，H1、H2等)，或與表現不同HA蛋白之酵母菌媒劑組合(例如，表現H1之一媒劑與表現H2或其他HA蛋白之一媒劑)於疫苗中。

實例2描述使用血球凝集素(HA)外部流感蛋白製備本發明之其他例示性疫苗或疫苗之成分。在該實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌W303α)設計成在TEF2啟動子控制下表現融合蛋白。包含源自A/PR/8/34流感病毒之流感HA抗原(H1)的融合蛋白為包含胺基酸序列SEQ ID NO:6的單個多肽，其由在本文中SEQ ID NO:5表示的核酸序列編碼。

實例2亦描述使用其他血球凝集素(HA)外部流感蛋白(在該狀況中，為來自禽流感病毒株之H5 HA)製備本發明之其他例示性疫苗或疫苗之成分。在該實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌W303α)設計成表現融合蛋白。包含源自A/Vietnam/1203/04流感病毒之流感HA抗原

(H5)的融合蛋白為包含胺基酸序列SEQ ID NO:20的單個多肽，其由在本文中以SEQ ID NO:19表示的核酸序列編碼。

上述兩種融合蛋白可設計成由酵母菌在細胞內表現HA融合蛋白。簡而言之，該等融合蛋白含有Aga2與HA的N-末端信號序列。Aga2之信號序列靶向融合以便易位入ER內，但HA之信號序列係作為終止轉移子作用。因此，融合蛋白無法穿過分泌通道。其變成膜內在蛋白，其HA部分仍保留在質膜之胞內側上。

實例3描述使用血球凝集素(HA)外部流感蛋白製備本發明之又一例示性疫苗或疫苗之成分。在該實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌W303 α)設計成在TEF2啟動子控制下表現融合蛋白。此融合蛋白設計成提供由酵母菌在細胞外表現源自A/PR/8/34流感病毒之HA(H1)抗原(稱為HA1)之N-末端部分。此蛋白當表現於亦表現Aga1p之細胞中時可定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，但亦可包含於細胞內。融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:10，其由在本文中以SEQ ID NO:9表示的核酸序列編碼。

在本發明之其他態樣中，流感抗原為外部流感蛋白、神經胺糖酸苷酶(NA)，且在其他實施例中，考慮NA之免疫原部分。NA為表現於流感病毒顆粒表面上的膜內在蛋白質(參見圖1)。神經胺糖酸苷酶消化大部分細胞表面上具有的涎酸(神經胺酸)。由於涎酸為病毒受體之部分，因此當病毒結合細胞時，其會內在化(細胞內吞)。感染結束時，涎酸已由神經胺糖酸苷酶自受感染細胞表面移除，使得後代病毒粒子一旦離開細胞則更易擴散開。神經胺糖酸苷酶亦與穿透呼吸道中之黏液層有關。人類感染中已發現兩種不同的NA蛋白，稱為N1及N2；其他7種已發現於動物流感病毒中。任何NA蛋白或其部分，以及該等任一種NA蛋白之任何突變體或變體可設想用於本發明。在一較佳實施例中，表現NA蛋白之本發明之酵母菌媒劑表現一種以上的NA

蛋白(例如，N1、N2等)，或與表現不同NA蛋白之酵母菌媒劑組合(例如，表現NA之一媒劑與表現NA或其他NA蛋白之一媒劑)於疫苗中。

在本發明之又一態樣中，用於本發明之疫苗中的流感抗原為內部或外部流感蛋白、離子通道蛋白(M2)。在本發明之一態樣中，流感抗原主要包含流感M2蛋白之細胞外部分，亦已知為M2e。在一態樣中，M2e與NP流感蛋白之C-末端或其部分融合。此蛋白(M2e)可設計成細胞內(胞內)表現。在其他實施例中，M2e與細胞壁蛋白(例如Aga2)融合以便表現於酵母菌之細胞外表面上。M2為基質蛋白，且為跨越基質蛋白膜及脂雙層的膜內在蛋白質，且表現於病毒顆粒之表面上(參見圖1)。M2為病毒粒子在核內體中脫被期間容許質子進入病毒顆粒的離子通道，且其亦可調節高爾基體反面(trans-Golgi)網狀物在受病毒感染細胞中的pH值。M2為97個殘基與單跨膜(TM)結構域(其殘基包括通道之小孔區)的同型寡聚物。通道之生物學活性形式為同型四聚物。根據本發明，在外部表現於病毒上之M2蛋白之部分(亦即，亦已知為M2之細胞外結構域)在本文中可稱為M2e。M2e在A型流感病毒中已知為高度保守的。如上所述，在本發明之一實施例中，主要包含或僅僅包含M2e之M2蛋白之一部分係由酵母菌媒劑表現。在此實施例中，M2蛋白被視為外部流感蛋白。在其他實施例中，當表現M2蛋白之基質蛋白膜部分時，M2蛋白可視為內部流感蛋白。任何M2蛋白或其部分，以及該等任一種M2蛋白之任何突變體或變體，可設想用於本發明。

在本發明之其他態樣中，用於本發明之疫苗中的流感抗原為內部流感蛋白、核鞘蛋白(NP)(亦稱為核蛋白)。在本發明之一態樣中，流感抗原主要包含表現於酵母菌之細胞液中且為免疫原之流感NP蛋白之一部分。NP為定位於由基質蛋白膜所形成之殼體內的蛋白(參見圖1)。NP之主要功能係使病毒基因組殼體化以形成用於RNA轉錄、

複製及封裝的核糖核蛋白(RNP)，但NP亦可在整個病毒生命週期內執行其他必要功能。根據NP可將流感分類為A型、B型及C型，但NP甚至在各病毒類型之間且尤其在A型與B型之間仍高度保守。任何NP蛋白或其部分，以及該等任一種NP蛋白之任何突變體或變體，可設想用於本發明。在一較佳實施例中，表現NP蛋白之本發明之酵母菌媒劑表現一種以上的NP蛋白(例如，來自A型流感之NP及來自B型流感之NP)，或與表現不同NP蛋白之酵母菌媒劑組合(例如，表現來自A型流感之NP之一媒劑與表現來自B型流感之NP之一媒劑)於疫苗中。

實例4描述使用血球凝集素(HA)外部流感蛋白製備本發明之又一例示性疫苗或疫苗之成分。在此實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌)設計成在TEF2啟動子控制下表現融合蛋白。此融合蛋白設計成提供由酵母菌在細胞外表現之源自A/Vietnam/1203/04流感病毒株之HA(H5)抗原。此蛋白當表現於亦表現Aga1p之細胞中時可定位於酵母菌細胞之細胞壁外側。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:14，其由在本文中SEQ ID NO:13表示的核酸序列編碼。

實例5描述若干種已由本發明之酵母菌媒劑表現且說明用於表面表現之各種結構(包括酵母菌原生質球狀體)且另外說明糖基化對表面表現之作用、含有HA之融合蛋白的設計。

一種表示為TK75-15融合蛋白為在本文中指示為SEQ ID NO:36的融合蛋白，其由SEQ ID NO:35編碼，且說明HA序列位於Aga2序列之C-末端的融合蛋白結構。此蛋白當表現於亦表現Aga1p之酵母菌細胞中時(在此狀況中，由CUP1啟動子驅動)定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，以及細胞液中，如圖10B中所示(左上方)。

實例5亦描述圖10B(右上方)中示意性展示之融合蛋白(表示為VK4)，其設計成使用Aga2序列使流感HA蛋白(H1)定位於細胞壁(由TEF2啟動子驅動)。在此結構中，蛋白經建構成HA序列位於Aga2序

列之N-末端。此蛋白當表現於亦表現天然Aga1p(在此狀況中，為其天然啓動子)之Mat a酵母菌中時定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，且亦存在於細胞內。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:26，其由在本文中以SEQ ID NO:25表示的核酸序列編碼。

實例5亦描述與以上VK4類似的融合蛋白(表示為VK11)，除該融合蛋白設計成使用Aga2序列使流感H5 HA蛋白定位於細胞壁(由TEF2啓動子驅動)之外。在此結構中，該蛋白質亦建構成HA序列位於Aga2序列之N-末端。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:22，其由在本文中表示為SEQ ID NO:21的核酸序列編碼。

實例5亦描述圖10B(左下方)中示意性展示之融合蛋白(表示為VK8)，其設計成使用Cwp2序列使流感HA(H1)蛋白定位於細胞壁(由TEF2啓動子驅動)。在此結構中，該蛋白質亦建構成HA序列位於Cwp2序列之N-末端。此蛋白質可定位於酵母菌細胞之細胞壁外側且亦可存在於細胞內。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:28，其由在本文中以SEQ ID NO:27表示的核酸序列編碼。

實例5亦描述與以上VK8類似的融合蛋白(表示為VK12)，除該融合蛋白設計成使用Cwp2序列使流感H5 HA蛋白定位於細胞壁(由TEF2啓動子驅動)之外。在此結構中，該蛋白質亦經建構成HA序列位於Cwp2序列之N-末端。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:24，其由在本文中以SEQ ID NO:23表示的核酸序列編碼。

實例5亦描述圖10B中(右下方)示意性展示的融合蛋白(表示為Lu002)，其設計成具有內源 α -因子信號及前導序列以表現流感HA蛋白(由TEF2啓動子驅動)，該流感HA蛋白具有酵母菌原生質球狀體之質膜中之完整的跨膜結構域。此蛋白(α -因子信號及前導序列在Golgi中自該蛋白中自然分裂)定位於酵母菌原生質球狀體之質膜，且亦可存在於細胞內。使用內源 α -因子信號及前導序列將外源蛋白引入酵母

菌分泌通道先前已有描述(例如，參見美國專利第5,413,914號；或 Franzusoff等人，J. Biol. Chem. 270, 3154-3159 (1995))。

實例6描述使用若干種內部流感蛋白製備本發明之又一例示性 Tarmogen或Tarmogen之成分。在此實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌)設計成在TEF2啟動子控制下表現融合蛋白。此融合蛋白設計成提供由酵母菌在細胞內表現M1抗原及NP抗原(源自A/PR/8/34流感病毒)及M2e抗原(包括源自A/PR/8/34流感病毒株與A/Vietnam/1203/04流感病毒株之M2e抗原)。本發明之該基於酵母菌之疫苗適用於誘導防禦在所有流感病毒株中為保守之抗原的交叉保護性免疫。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:16，其由在本文中以SEQ ID NO:15表示之核酸序列編碼。

實例7描述使用若干種內部流感蛋白製備本發明之又一例示性 Tarmogen或Tarmogen之成分。在此實施例中，酵母菌(例如釀酒酵母菌)設計成在TEF2啟動子控制下表現融合蛋白。該融合蛋白設計成提供源自A/PR/8/34流感病毒之NP抗原及源自A/PR/8/34流感病毒之M2e抗原之細胞內表現。本發明之該基於酵母菌之疫苗適用於誘導防禦在所有流感病毒株中為保守之抗原的交叉保護性免疫。該融合蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:18，其由在本文中以SEQ ID NO:17表示的核酸序列編碼。

在本發明之一實施例中，任一種上述流感病毒抗原與至少一種其他流感病毒抗原一起表現於本發明之酵母菌媒劑中。較佳地，內部流感抗原(例如，M1、M2或NP)係與外部流感抗原(例如，HA、NA或M2e)一起表現。該等流感抗原可使用相同或不同的結構表現。外部流感抗原可由酵母菌在細胞外提供及/或在細胞內提供。待由酵母菌媒劑表現之抗原之較佳組合包括(但不限於)：M1與HA；M1與NA；M1、HA及NA；NP與HA；NP與NA；NP、HA及NA；M2與HA；M2

與NA；M2與M1；M2、HA及NA；及M1、M2及NA。在包括M2之該等任一組合中，M2可為可表現或提供於酵母菌中且為免疫原性之全長M2或M2e或M2之任一部分。類似地，其他蛋白質可以本文中所述之任何形式、部分或變體表現。在該等組合中，可表現或提供該等蛋白質之任一種或多種亞型，且尤其可表現或提供HA或NA之任一種或多種亞型。

在本發明之另一實施例中，上述任一種表現或提供一或多種流感抗原或該等抗原之組合的酵母菌媒劑可與表現或提供一或多種不同抗原或該等抗原之組合的酵母菌媒劑組合以形成酵母菌疫苗。或者，上述任一種表現或提供一或多種流感抗原的酵母菌媒劑可與表現一或多種不同抗原或該等抗原之組合的酵母菌媒劑依序投藥。較佳地，表現或提供一或多種內部流感抗原的酵母菌媒劑可與表現或提供一或多種外部流感抗原的酵母菌媒劑組合或依序投藥。酵母菌媒劑之較佳組合包括(但不限於)：與表現或提供HA、NA或其組合(包括該等抗原之一或多種亞型)之酵母菌媒劑共同或依序投藥之表現或提供M1的酵母菌媒劑；與表現或提供HA、NA或其組合(包括該等抗原之一或多種亞型)之酵母菌媒劑共同或依序投藥之表現或提供NP的酵母菌媒劑；以及與表現或提供HA、NA或其組合(包括該等抗原之一或多種亞型)之酵母菌媒劑共同或依序投藥之表現或提供M2的酵母菌媒劑。在另一實施例中，表現或提供M1、NP及/或M2中之任兩種或兩種以上的酵母菌媒劑可與表現或提供HA、NA或其組合(包括該等抗原之一或多種亞型)的酵母菌媒劑共同或依序投藥。

分離融合蛋白、核酸分子及細胞

本發明之另一實施例包括分離蛋白，其包括包含如本文中所述之流感抗原之任一種分離融合蛋白。本發明亦包括編碼該等任一種蛋白質之分離核酸分子、包含編碼該等蛋白質之核酸序列的重組核酸分

子以及含有該等核酸分子或重組核酸分子或經該等核酸分子或重組核酸分子轉染/轉型的細胞及載體，包括病毒載體。

本發明之較佳融合蛋白包括本文中所述之任一種融合蛋白。本發明所涵蓋之例示性融合蛋白包括包含或主要包含選自以下序列之胺基酸序列的彼等融合蛋白：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:36。由於各種流感蛋白序列已熟知於該項技術中，因此結合本文中所提供之指導，熟習該項技術者易瞭解其他融合蛋白序列。

本發明亦包括任何核酸分子，其包含或主要包含編碼本文中所述之任一種融合蛋白的核酸序列。

經本發明之重組核酸分子轉染的適當宿主細胞包括可轉染或轉型的任何細胞，包括任何動物、昆蟲、細菌、真菌(包括酵母菌)細胞。在一實施例中，宿主細胞為已經本發明之融合蛋白轉染且表現該蛋白的動物細胞。該細胞舉例說明於實例部分中，且例如適用於評定由本發明之疫苗或組合物誘導的抗原特異性T細胞反應。亦可對該等轉染細胞測試針對流感抗原的其他疫苗或組合物。

以下實驗結果為說明起見而提供且不意欲限制本發明之範圍。

實例

實例1

以下實例描述本發明之流感M1融合蛋白酵母菌疫苗GI-8001(在有些圖式中一般亦稱為GI-8000)之設計。

釀酒酵母菌設計成在銅誘導性啟動子CUP1控制下表現流感M1融合蛋白。融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分的單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID

NO:4)：1)防止蛋白酶體降解(SEQ ID NO:4之位置1至6)的序列MADEAP(SEQ ID NO:1)；2)M1蛋白之胺基酸2至252(SEQ ID NO:4之位置7至257)；3)經導入可使M1蛋白與組胺酸標記(SEQ ID NO:4之位置258至260)分開的三甘胺酸間隔基；及4)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:4之位置261至266)。編碼SEQ ID NO:2之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:1。在此例示性基於酵母菌之疫苗中，M1基因係藉由RT-PCR選殖於受流感A/PR/8/34/H1N1感染的培養細胞中，且所編碼之胺基酸序列與該病毒株/基因型之理論M1胺基酸序列完全匹配。

在ULDM培養基中對表現流感M1融合蛋白的酵母菌(釀酒酵母菌W303)進行培養及誘導。此培養基之pH值並非調節至如本文中所述之中性pH條件(亦即，使用正常的酵母菌培養條件)。在0.2 YU/ml下，以0.375 mM硫酸銅誘導流感M1融合蛋白之表現。在中指數階段收穫酵母菌且將其熱殺。M1融合蛋白之表現藉由西方墨點法分析來自銅誘導之熱滅活GI-8001酵母菌之溶解產物來證實(見圖2)。蛋白質偵測使用單株抗體特異性組胺酸標記。

以下為ULDM培養基之標準配方：

成分	g/L	20L	來源
不含硫酸銨及胺基酸之 YNB	1.7	34.0	Difco 233520
硫酸銨	5.0	100.0	EMD AX13853
OR			
不含胺基酸之 YNB	6.7	134.0	Difco
腺嘌呤	0.02	0.4	Sigma A9795
色胺酸	0.02	0.4	JTBaker 2092
組胺酸	0.02	0.4	JTBaker N327
一水合葡萄糖	25.0	500.0	EMD 1.08342.2500

給雌性BALB/c小鼠每週一次注射3劑單獨PBS或1 YU或10 YU之

表現M1之GI-8001基於酵母菌之疫苗(在圖3A及3B分別表示為"1YU M1"及"10YU M1")。小鼠接受最後劑量後16天死亡。活體外刺激檢定使用表現M1之酵母菌作為靶物(IVS-M1)或使用經減毒之流感病毒作為靶物(IVS-flu)來執行以評價CTL反應及淋巴細胞增殖，且收集上清液用於細胞激素分析。P815腫瘤細胞作為該等檢定中的靶細胞，係經流感M1融合蛋白轉染或經流感感染。CTL檢定之結果展示於圖3中。該等結果證明以GI-8001疫苗接種小鼠可誘導抗原特異性(M1及流感病毒)CTL反應。

圖4展示對來自感染上流感A/PR/8/34之P815細胞之溶解產物的西方墨點分析。在上清液中鑑定出HA，說明P815細胞可經流感病毒感染且可在本文中所述之檢定中用作靶細胞。

圖5及6展示淋巴細胞增殖檢定之結果。在圖5中，激發抗原為表現M1融合蛋白之酵母菌(MP酵母菌)的溶解產物。在圖6中，激發抗原為死亡流感(A/PR8)。該等結果證明GI-8001(GI-8000、M1-表現酵母菌)誘導酵母菌特異性增殖反應。

實例2

以下實例描述本發明之細胞內表現血球凝集素(HA)之兩種基於酵母菌之疫苗的設計，第一種使用H1 HA(在本文中別處亦稱為GI-8002或GI-8000-I)且第二種使用H5 HA(亦稱為GI-8102)。

用於細胞內表現之H1-HA

釀酒酵母菌設計成在轉錄延伸因子2啟動子TEF2(參見圖7下方)控制下表現HA(H1或HA1)融合蛋白。包含流感HA抗原之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分的單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:6)：1)全長釀酒酵母菌Aga2蛋白質序列(SEQ ID NO:6之位置1至87)，包括其天然18胺基酸ER-靶信號序列(SEQ ID NO:6之位置1至18)；2)流感HA蛋白之胺基酸

2至530(SEQ ID NO:6之位置88至616)，其包括HA之N-末端ER-靶信號序列(SEQ ID NO:6之位置88至105)，但不包括HA之36個C-末端殘基，從而除去其C-末端膜錨及細胞質尾；3)使HA蛋白本體與組胺酸標記(SEQ ID NO:6之位置617至619)分開的三甘胺酸間隔基；及4)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:6之位置620至625)。編碼SEQ ID NO:6之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:5。此融合蛋白及表現該蛋白之Tarmogen可稱作GI-8000 Aga2-HA或GI-8002。

在該例示性基於酵母菌之疫苗中，HA基因係選殖於受流感A/PR/8/34/H1N1感染的培養細胞中，且所編碼之胺基酸序列與該病毒株/基因型之理論HA胺基酸序列不完全匹配。實際序列與理論序列之比對展示於表1中(參見實例2)。

表1：來自A/PR/8/34/H1N1之理論HA蛋白(SEQ ID NO:7)與本文中所選殖之實際HA蛋白區域(不包含HA信號序列)(SEQ ID NO:8)之比對

理論 HA	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGW 60
實際 HA	DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGW 60 *****
理論 HA	LLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKE 120
實際 HA	LLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKE 120 *****
理論 HA	SSWPNNHTTKGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIH 180
實際 HA	SSWPNNH-TNGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIH 179 *****:*.*****
理論 HA	HPSNSKDQQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLKPGDTI 240
實際 HA	HPSNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLKPGDTI 239 *****:***.*****

將含有TEF2::Aga2-HA之酵母菌在UDM中培養至中指數階段。使用該培養基，無需將培養條件調節成中性pH值條件。將細胞洗滌且熱殺，且自該等細胞中萃取全部蛋白質。HA融合蛋白之表現藉由西

方墨點法分析來自表現該蛋白質之熱滅活酵母菌之溶解產物來證實(圖7)。西方墨點分析經his標記mAb(圖7右方)或HA特異性mAb(非圖示)所探測之全部蛋白質表明Aga2-HA蛋白在酵母菌中積聚至高含量。

以下為ULDM培養基之標準配方：

成分	g / L	20L	來源
不含硫酸銨及胺基酸之 YNB	1.7	34.0	Difco 233520
硫酸銨	5.0	100.0	EMD AX13853
OR			
不含胺基酸之 YNB	6.7	134.0	Difco
腺嘌呤	0.02	0.4	Sigma A9795
色胺酸	0.02	0.4	JTBaker 2092
組胺酸	0.02	0.4	JTBaker N327
白胺酸	0.03	0.6	JTBaker 2083
一水合葡萄糖	25.0	500.0	EMD 1.08342.2500

三週每週一次藉由皮下(100 μ l)或鼻內(50 μ L)投藥向BALB/c雌性小鼠(5-10週齡)投與PBS、0.5 YU GI-8000 Aga2-HA(GI-8002)或5 YU GI-8000 Aga2-HA(GI-8002)。小鼠在第三劑量後兩週死亡。收集血清用於分析且對脾細胞執行活體外刺激檢定以評價CTL反應(使用已經A/PR/8/34流感病毒隔夜感染的⁵¹Cr標記同源P815腫瘤細胞)及淋巴細胞增殖。對於增殖檢定，將脾細胞與GI-8000 Aga2-HA(GI-8002)或UV失活A/PR8流感病毒一起培養五天。亦收集血清用於抗體分析。

圖8展示CTL檢定之結果，且圖9展示淋巴細胞增殖檢定之結果。該等結果證明GI-8000 Aga2-HA可誘導流感病毒特異性CTL反應。藉由皮下途徑投藥總體上可誘導比鼻內投藥更強的CTL反應。然而，低劑量鼻內投藥可誘導高水準的CTL反應。增殖檢定證明兩種投藥途徑可誘導流感病毒特異性淋巴細胞增殖，儘管鼻內投藥途徑與皮下投藥

相比可產生更低水準的增殖反應。

亦對上述表現HA(作為細胞內抗原)的Tarmogen評價其作為佐劑誘導體液反應的能力。詳言之，在有或無佐劑(佐劑為該實例中所述之GI-8000-I Tarmogen)或Alum存在下，在第0日及第21日投與兩劑量之抗原(來自A/PR/8/34之HA)。第二劑量抗原之後對HA中和抗體效價量測3週。表2展示該實驗結果。該資料證明GI-8000-I具有充當用於B細胞反應之佐劑的優良能力。實際上，添加或不添加alum作為佐劑，其作用同樣優良或超過純化蛋白。因而，使用更低劑量之基於非酵母菌之疫苗可獲得產生抗體反應的相同功效(亦即，劑量節約)。

表 2：GI-8000 作為用於劑量節約之佐劑			
治療		HI 效價 (#動物響應)	HI 效價（幾何平均值）
佐劑	抗原(來自 A/PR/8/34 之 μg HA，i.a.)		
GI-8000-I	--	(0/5)	0
--	1 μg	16, 8, 8, 4, 0 (4/5)	8
Alum	1 μg	16, 4, 4, 0, 0 (3/5)	6.3
GI-8000-I	1 μg	32, 32, 32, 32, 16 (5/5)	27.9

亦對上述表現HA(作為細胞內抗原)的Tarmogen評價其引發防禦流感之免疫反應的能力。以失活A/PR/8/34之足夠病毒粒子進行引發以產生10 μg HA。使用5 YU之GI-8000-I。約1個月後給與激發。再過一個月後量測HI(HA中和抑制)效價。在量測HI效價的同時進行激發。5天後量測病毒效價。表3展示當使用GI-8000-I引發防禦流感時的結果。

表 3：引發防止流感之 GI-8000-I

引發	激發	HI 效價(各動物，激發後)	肺之病毒效價 (log ₁₀ pfu/公克肺)	平均病毒效價 log ₁₀ pfu/公克肺(+/- S.E.)
不	不	nd	7.14 7.41 7.18 7.06 7.32	7.22 (+/- 0.14)
失活 A/PR/8/34(SC)	低劑量活 A/PR/8/34-IN	64 16 16 0	0 0 0 5.09	1.27 (+/- 2.55)
GI-8000-I(HA)(4 劑量 SC)	低劑量活 A/PR/8/34-IN	256 64 32 32	0 0 0 0	0

使用此類型 Tarmogen，在受流感感染細胞中產生防禦多抗原之 T 細胞。誘發免疫反應防禦多抗原的益處在於其容許交叉保護性反應且容許 Tarmogen 表現之多抗原充當一般疫苗。與用於禽流感或季節性流感之習知疫苗相比，此類型疫苗藉由產生有效的免疫反應而可為劑量節約的(亦即，功效所需的劑量較低)。

用於細胞內表現之 H5 HA

釀酒酵母菌設計成在細胞內表現 HA(H5) 融合蛋白(在本文中亦稱為 GI8102)。包含流感 H5 抗原之融合蛋白為具有融合於 N-末端至 C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為 SEQ ID NO:20)：1) 全長釀酒酵母菌 Aga2 蛋白序列(SEQ ID NO:20 之位置 1 至 87)，包括其 18 種天然胺基酸 ER-靶信號序列(SEQ ID NO:20 之位置 1 至 18)；2) 相當於 H1 HA 之 1 至 16 個殘基的 N-末端 ER 靶信號序列(SEQ ID NO:20 之位置 88 至 105)；3) 禽流感病毒株 A/Vietnam/1203/2004 之 H5 HA(SEQ ID NO:20 之位置 106 至 620)；其不包括 36 個 HA 之 C-末端殘基，從而除去其 C-末端膜錨及細胞質尾；以

及4)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:20之位置621至626)。編碼SEQ ID NO:20之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:19。

實例3

以下實例描述本發明之酵母菌疫苗(其在本文中一般參考為GI-8000-S)之另一種HA融合蛋白(在本文中稱為HA1)之設計。

此融合蛋白設計成提供由酵母菌在細胞外表現以及細胞內表現HA融合蛋白。包含流感HA抗原(HA1)之N-末端部分的融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:10)：1)全長釀酒酵母菌Aga2蛋白序列(SEQ ID NO:10之位置1至89)，包括其18種天然胺基酸ER-靶信號序列(SEQ ID NO:10之位置1至18)；2)流感HA蛋白之胺基酸17至342(SEQ ID NO:10之位置90至415)，其不包括HA之第16胺基酸N-末端ER-靶信號序列且不包括包含C-末端膜錨及細胞質尾之HA之36個C-末端殘基；3)將HA1蛋白質本體與組胺酸標記分開的三甘胺酸間隔基(SEQ ID NO:10之位置416至418)；及4)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:10之位置419至424)。此蛋白當表現於亦表現Aga1p之細胞中時定位於酵母菌細胞之細胞壁外側(參見圖10A，圖10A示意性描繪使用此技術在細胞外表現)。該蛋白質亦可在細胞內表現。編碼SEQ ID NO:10之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:9。

在此例示性基於酵母菌之疫苗中，HA基因係選殖於流感A/PR/8/34/H1N1卵庫，且所編碼之胺基酸序列與該病毒株/基因型之理論HA胺基酸序列不完全匹配。實際序列與理論序列之比對展示於表4中。兩種序列之間存在10個不匹配的胺基酸。

表4：理論HA1區(SEQ ID NO:11)與本文中選殖之實際HA1序列(SEQ ID NO:12)之比對。


```

理論 HA      -----DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN 31
實際 HA1     SVTFVSNCGSHPTTSKGSPINTQYVFTSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTATHSVN 120
               *****.*****

理論 HA      LLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICY 91
實際 HA1     LLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICY 180
               *****

理論 HA      PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTTKGVTAACSHAGKSSFYRNLLWL 151
實際 HA1     PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHN-TNGVTAACSHAGKSSFYRNLLWL 239
               *****:*.*****

理論 HA      TEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKQDQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFT 211
實際 HA1     TEKEGSYPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFT 299
               *****:***.*****

理論 HA      PEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLKPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRGFGSGIITSNAS 271
實際 HA1     PEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLKPGDTIIFEANGNLIAPMSAFALSRGFGSGIITSNAS 359
               *****

理論 HA      MHECNTKCQTPLGAINSSLPFQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQSRGLFG 331
實際 HA1     MHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGERPKYVRS AKLRMTGLRNIPSIQSRG--- 416
               *****.*****

```

融合蛋白之表現係藉由西方墨點法分析銅誘導之熱滅活酵母菌之溶解產物來證實(參見圖17)。在正常(非中性pH)條件下、在UDM中經銅誘導(以誘導Aga1合成)之後，以50 mM DTT使組成性表現之Aga2-HA1脫離活細胞之細胞表面處之Aga1，且將DTT溶離液以糖苷酶PNGase F或ENDO-h處理1 h。藉由西方墨點法分析反應物之Aga-HA1含量(圖17)。觀測細胞內與細胞表面HA1表現。

實例4

以下實例描述本發明之另一種HA融合蛋白酵母菌疫苗之設計。

另一種酵母菌媒劑設計成表現來自禽流感病毒株A/Vietnam/1203/2004(H5-N1)、作為酵母菌細胞表面(細胞外)蛋白的血球凝集素(HA)蛋白(亦稱為TK88(Aga2-H5 HA))，其亦可定位於細胞內。再參考圖10A中之頂圖，例示用於表面表現之結構。包含流感

HA抗原(H5)之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:14)：1)全長釀酒酵母菌Aga2蛋白序列(SEQ ID NO:14之胺基酸1至87)，包括其天然第18胺基酸ER-靶信號序列；2)流感H5 HA蛋白之胺基酸2至530(SEQ ID NO:14之位置88至616)，其缺乏HA之N-末端ER-靶信號序列且亦不包括HA之36個C-末端殘基，從而除去其C-末端膜錨及細胞質尾；3)將HA蛋白質本體與組胺酸標記(SEQ ID NO:14之位置617至619)分開的三甘胺酸間隔基；以及4)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:14之位置620至625)。此蛋白質當表現於亦表現Aga1p之細胞中時定位於酵母菌細胞之細胞壁外側以及細胞液及ER。編碼SEQ ID NO:14之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:13。

此Tarmogen可使用本文所述之中性pH條件且在正常的酵母菌培養條件下表現。當使用中性pH條件表現時，融合蛋白係在細胞壁(表面)上偵測。由於pH值對細胞壁的作用及HA特異性抗體能夠偵測表面上所表現之蛋白質，因此中性pH條件增加蛋白質之表現之效率且改良存在於表面上之蛋白質之偵測能力。

實例5

以下實例描述其中抗原經設計成靶向酵母菌表面之其他建構(細胞外建構)的產生。

其他Tarmogen設計成表現作為酵母菌細胞表面(細胞外)蛋白之來自流感之血球凝集素(HA)蛋白。該蛋白質亦可表現於酵母菌細胞內。再參考圖10A中之頂圖，例示用於表面表現之結構。

圖10B示意性說明若干種用於抗原之表面表現的特定建構且展示如何使用各種酵母菌蛋白作為間隔臂。儘管該等建構可用於表現流感HA，但任何蛋白質可使用該等方法及建構來表現。

Aga2-HA H1融合蛋白(表面)

圖10B(左上方)中示意性展示之融合蛋白(表示為TK75-15)設計成使用Aga2序列表現細胞壁上之流感HA蛋白(由TEF2啟動子驅動)。在此建構中，該蛋白質建構成HA序列位於Aga2序列之C-末端。此蛋白質當表現於亦表現Aga1p之細胞中時(在此狀況中，由CUP1啟動子驅動)定位於酵母菌細胞之細胞壁外側以及細胞液，如圖10B(左上方)所示。包含流感HA抗原之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:36)：1)全長釀酒酵母菌Aga2蛋白序列(SEQ ID NO:36之胺基酸1至87)，包括其天然18胺基酸ER-靶信號序列(SEQ ID NO:36之位置1至18)；2)將Aga2與HA本體分開的間隔基(位置88及89)；3)缺乏信號序列(SEQ ID NO:36之位置90至600)且缺乏HA之36個C-末端殘基的流感HA蛋白，從而除去其C-末端膜錨及細胞質尾；4)將HA蛋白質本體與組胺酸標記(SEQ ID NO:36之位置601-603)分開的三甘胺酸間隔基；及5)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:36之位置604-609)。編碼SEQ ID NO:36之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:35。此融合蛋白及表現it之Tarmogen可稱75-15。

HA H1-Aga2融合蛋白(表面)

圖10B(右上方)中示意性展示之融合蛋白(表示為VK4)設計成使用Aga2序列表現細胞壁上之流感HA蛋白(由TEF2啟動子驅動)。在此建構中，該蛋白質建構成HA序列位於Aga2序列之N-末端。此蛋白質當表現於亦表現天然Aga1p(在此狀況中，為其天然啟動子)之酵母菌中時定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，且亦可存在於細胞內。包含流感HA抗原(H1)之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:26)：1)Aga2 ER靶信號序列(SEQ ID NO:26之胺基酸1至19)；2)缺乏信號序列及C-末端跨膜結構域(SEQ ID NO:26之位置20至533)之來

自 A/PR/8/34 之 H1 HA ; 3) 將 HA 蛋白質本體與組胺酸標記 (SEQ ID NO:26 之位置 534 至 535) 分開的間隔基 ; 4) 六聚組胺酸標記 (SEQ ID NO:26 之位置 536 至 541) ; 5) 腸激酶裂解位點 (SEQ ID NO:26 之位置 542 至 548) ; 6) 缺乏信號序列 (SEQ ID NO:26 之位置 549 至 614) 的 Aga2 。編碼 SEQ ID NO:26 之融合蛋白的核酸序列在本文中表現為 SEQ ID NO:25 。

HA H5-Aga2 融合蛋白(表面)

表示為 VK11 之融合蛋白(與上述 VK4 類似，除其包括來自禽流感 (A/Vietnam/1203/04) 之 H5 HA 蛋白之外)設計成使用 Aga2 序列表現細胞壁上之流感 HA H5 蛋白。在此建構中，該蛋白質建構成 HA 序列位於 Aga2 序列之 N-末端。此蛋白質當表現於酵母菌中時定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，且亦可存在於細胞內。包含流感 HA 抗原(H5)之融合蛋白為具有融合於 N-末端至 C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為 SEQ ID NO:22)：1)Aga2 ER 靶信號序列 (SEQ ID NO:22 之胺基酸 1 至 19)；2)缺乏信號序列及 C-末端跨膜結構域 (SEQ ID NO:22 之位置 20 至 536) 之來自 A/Vietnam/1203/04 之 H5 HA ; 3)六聚組胺酸標記 (SEQ ID NO:22 之位置 537 至 542)；4)腸激酶裂解位點 (SEQ ID NO:22 之位置 543 至 548)；5) 缺乏信號序列 (SEQ ID NO:22 之位置 549 至 616) 的 Aga2 。編碼 SEQ ID NO:22 之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為 SEQ ID NO:21 。

HA H1-Cwp2 融合蛋白(表面)

圖 10B(左下方)中示意性展示之融合蛋白(表示為 VK8)設計成使用 Cwp2 序列表現細胞壁上之流感 HA 蛋白(由 *TEF2* 啟動子驅動)。此蛋白質可定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，且亦可存在於細胞內。包含流感 HA 抗原(H1)之融合蛋白為具有融合於 N-末端至 C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為 SEQ

ID NO:28)：1)Suc2轉化酶信號序列(SEQ ID NO:28之胺基酸1至21)；2)缺乏信號序列及C-末端跨膜結構域(SEQ ID NO:28之位置22至535)之來自A/PR/8/34之H1 HA；3)將HA蛋白質本體與組胺酸標記(SEQ ID NO:28之位置536至537)分開的間隔基；4)六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:28之位置538至543)；5)腸激酶裂解位點(SEQ ID NO:28之位置544至549)；6)缺乏信號序列(SEQ ID NO:28之位置550至617)的Cwp2。編碼SEQ ID NO:28之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:27。

HA H5-Cwp2融合蛋白(表面)

表示為VK12融合蛋白(與上述VK8類似，除其包括來自禽流感(A/Vietnam/1203/04)之H5 HA蛋白之外)設計成使用Cwp2序列表現細胞壁上之流感HA H5蛋白。此蛋白質可定位於酵母菌細胞之細胞壁外側，且亦可存在於細胞內。包含流感HA抗原(H5)之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分之單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:24)：1)Suc2轉化酶信號序列(SEQ ID NO:24之胺基酸1至21)；2)缺乏信號序列及C-末端跨膜結構域(SEQ ID NO:24之位置22至536)之來自A/Vietnam/1203/04之H5 HA；3)將HA蛋白質本體與組胺酸標記(SEQ ID NO:24之位置537至538)分開的間隔基；4)六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:24之位置539至544)；5)腸激酶裂解位點(SEQ ID NO:24之位置545至550)；6)缺乏信號序列(SEQ ID NO:24之位置551至618)的Cwp2。編碼SEQ ID NO:24之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:23。

用於原生質球狀體表現之HA-融合蛋白(表面)

圖10B(右下方)中示意性展示之融合蛋白(表示為Lu002)設計成表現具有酵母菌原生質球狀體之質膜上完整之跨膜結構域的流感HA蛋白(由TEF2啟動子驅動)。此蛋白質可定位於酵母菌原生質球狀體之質

膜，且亦可存在於細胞內。

圖11描述表現融合蛋白(以上稱為VK8)之另一種Tarmogen，其經由細胞壁蛋白2(cwp2)表現酵母菌表面上之流感HA蛋白。右下角展示了流式細胞分析所得之酵母菌表面HA表現的直方圖。該等直方圖表明此特定的建構與單獨的酵母菌媒劑(GI-1001或YVEC)相比可很好的表現其細胞表面上之HA。

圖12A-12G展示其中已利用各種方法(以上所述及圖10B中所說明)表現酵母菌媒劑之表面上之流感HA蛋白的直方圖。該等實驗皆在正常的酵母菌培養條件下(亦即，不使用中性pH條件)執行。圖12A-12C說明使用Aga2間隔臂或連接子、表現如上所述以兩種不同方向所融合之VK4與TK75-15之Tarmogen之表現。圖12A展示對照(非轉型)酵母菌(YEX)之表現。圖12B展示VK4之表現，且圖12C展示TK75-15之表現。圖12D-12G展示用於HA之表面表現的其他可能構型。圖12D又為酵母菌對照物(YEX)。圖12E及12F展示使用Cwp2作為用於HA之表現之間隔臂、表現VK8的Tarmogen。該等圖式亦說明調節酵母菌之糖基化對表現該蛋白質的作用。表現脫糖基化VK8之Tarmogen(圖12F)與表現糖基化VK8之Tarmogen(圖12E)相比，可改良HA之表面表現。最後，圖12G展示HA藉由表現Lu002之Tarmogen之表現，該Tarmogen為表現質膜上之HA的原生質球狀體。

該等結果證明可使用各種建構成功表現本發明之酵母菌媒劑表面上(細胞外)的抗原。

實例6

以下實例描述本發明之另一種流感融合蛋白酵母菌疫苗之設計，其中流感蛋白之組合由酵母菌媒劑在細胞內表現。

Tarmogen設計成在TEF2啟動子控制下表現作為細胞內融合蛋白的基質蛋白(M1)核鞘蛋白(NP)及離子通道蛋白細胞外序列(M2e)(參見

圖13A，其中說明了此融合蛋白之表現以及同一質粒上之第二HA結構之表現)。M1及NP(N1)序列獲自A/PR/8/34流感病毒株。4xM2e表示獲自A/PR/8/34流感病毒株之M2e序列之兩種複本及獲自A/Viet Nam/1203/2004流感病毒株之M2e序列之兩種複本。包含M1-N1-4xM2e蛋白之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分之單一多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:16)：1)防止蛋白酶體降解(SEQ ID NO:16之位置1至6)之序列MADEAP(SEQ ID NO:1)；2)流感A/PR/8/34 M1蛋白(SEQ ID NO:16之位置7至260)；3)將M1蛋白與NP蛋白分開的間隔基(SEQ ID NO:16之位置261至262)；4)流感A/PR/8/34 NP蛋白(SEQ ID NO:16之位置263至760)；5)將NP蛋白與M2e蛋白分開的間隔基(SEQ ID NO:16之位置761至762)；6)獲自流感A/PR/8/34 M2蛋白(SEQ ID NO:16之位置763至787)之第一M2e(細胞外)蛋白；7)獲自流感A/Viet Nam/1203/2004 M2蛋白(SEQ ID NO:16之位置788至811)之第二M2e(細胞外)蛋白；8)將第二M2e蛋白與第三M2e蛋白分開的間隔基(SEQ ID NO:16之位置812至813)；9)獲自流感A/PR/8/34 M2蛋白(SEQ ID NO:16之位置814至838)的第三M2e(細胞外)蛋白；10)由獲自流感A/Viet Nam/1203/2004 M2蛋白(SEQ ID NO:16之位置839至862)之(細胞外)蛋白組成之第四M2e蛋白；及11)C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:16之位置864至869)。編碼SEQ ID NO:16之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:15。

參考圖13A及圖13B，展示了表現M1-NP-4xM2e融合蛋白(SEQ ID NO:16)之Tarmogen連同所關聯之額外結構之用途的示意圖。具體而言，由SEQ ID NO:16表示之融合蛋白亦可產生於亦含有在CUP1啟動子控制下編碼HA蛋白之第二結構的單質粒中。此質粒之表現可產生M1-NP-4xM2e融合蛋白及HA蛋白之細胞內表現。HA之表現亦可經由

使用第二獨立結構獲得。產生其他Tarmogen包括利用圖13B中所描繪之結構(相當於上述VK8結構)(此可使HA蛋白在細胞外(表面)表現)。此融合蛋白可單獨或與上述內部所表現之HA結構組合表現於具有上述M1-N1-4xM2e融合蛋白之相同的Tarmogen中。單獨或與內部所表現之HA組合之表現VK8(表面HA)融合蛋白的單獨Tarmogen亦可連同上述表現M1-N1-4xM2e融合蛋白之Tarmogen提供於疫苗中。提供用於細胞內表現及細胞外表現之單獨融合蛋白之一優點係可確保有充足的抗原可供B細胞反應與用於細胞介導免疫反應之抗原呈遞細胞(諸如樹突狀細胞)之攝取利用。

實例7

以下實例描述本發明之另一種流感融合蛋白酵母菌疫苗之設計，其中流感蛋白之組合由酵母菌媒劑在細胞內表現。

可產生表現NP-2xM2e融合蛋白之Tarmogen且可產生表現NP-4xM2e融合蛋白之Tarmogen。

NP-4xM2e融合蛋白以與實例6中所述且由SEQ ID NO:16表示之M1-N1-4xM2e融合蛋白相同之方法建構，除該結構之M1部分不包括在內之外。

在NP-2xM2e融合蛋白中，NP(N1)及M2e序列之2種複本皆獲自A/PR/8/34流感病毒株。包含N1-2xM2e蛋白之融合蛋白為具有融合於N-末端至C-末端框架中之以下序列成分的單個多肽(融合蛋白之胺基酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:18)：1)防止蛋白酶體降解(SEQ ID NO:18之位置1至6)的序列MADEAP(SEQ ID NO:1)；2)流感A/PR/8/34 NP蛋白(SEQ ID NO:18之位置7至503)；3)將NP蛋白與M2e蛋白分開的間隔基(SEQ ID NO:18之位置504至505)；4)獲自流感A/PR/8/34 M2蛋白(SEQ ID NO:18之位置506至530)的第一M2e(細胞外)蛋白；5)將第一M2e蛋白與第二M2e蛋白分開的間隔基(SEQ ID NO:18之位置531)；

6)獲自流感A/PR/8/34 M2蛋白(SEQ ID NO:18之位置532至555)的第二M2e(細胞外)蛋白；及7)其後緊隨C-末端六聚組胺酸標記(SEQ ID NO:18之位置556至564)的三甘胺酸間隔基。編碼SEQ ID NO:18之融合蛋白的核酸序列在本文中表示為SEQ ID NO:17。

該表現於酵母菌媒劑中以產生Tarmogen之融合蛋白可細胞內表現且可與其他結構之表現組合(例如，如以上實例6中所述之HA-表面或HA-內部表現策略)。

實例8

以下實例證明表現作為細胞外蛋白之流感HA之Tarmogen之免疫接種可引發體液免疫反應。

在該實例中，將單次劑量之GI-8000-S(其作為具有Cwp2之融合蛋白(參見圖10B，VK8))在酵母菌細胞表面上表現HA)皮下投與小鼠，或以低劑量之活流感病毒靜脈內感染小鼠。免疫接種後一週，量測HI效價。另一組小鼠接受5 YU之GI-8000-S。免疫接種後一週，量測HI效價。此研究之結果展示於表5中。該資料表明單次劑量之GI-8000-S疫苗能夠誘發HA中和抗體反應而無需添加可溶性純化蛋白或無需添加基於非酵母菌之疫苗。

表 5：GI-8000-S 誘發 HA 抗體	
免疫接種	每隻動物之 HI 效價 (#動物響應)
感染 w/低劑量活流感病毒(IN)	8, 8, 4, 0, 0 (3/5)
GI-8000-S(單次劑量，SC)	16, 8, 8, 0, 0 (3/5)

實例9

使用表現所研究之各種抗原的Tarmogen引發抗體產生。如下文論述，本文中所揭示之本發明提供誘導體液免疫反應(包括抗體反應)的方法。

曾對可產生作為酵母菌細胞內在膜蛋白之HIV-1 gp160外膜蛋白的GI-2001(HIVAX-1)作過研究(Franzusoff等人, J. Biol. Chem. 270, 3154-3159 (1995))。針對完整酵母菌或原生質球狀體之完整溶解產物, 對獲自己三週每週一次注射 2×10^7 (2 YU)之YVEC或HIVAX-1菌株(作為活的完整酵母菌細胞或作為原生質球狀體投藥)之小鼠之血清進行西方墨點分析。西方墨點法證明小鼠產生抗各種源自酵母菌蛋白的抗體且所得抗體類型視小鼠是否注射有完整酵母菌或原生質球狀體而定。獲自經HIVAX-1原生質球狀體而非完整HIVAX-1酵母菌或YVEC酵母菌或原生質球狀體免疫之小鼠的血清似乎含有gp160特異性的抗體。不受理論束縛, 此發現可能係由於gp160在HIVAX-1中作為膜內在蛋白質表現, 使得其不會暴露於完整酵母菌表面上之B細胞而暴露於原生質球狀體之外表面上。

與由HIVAX-1所得結果對比, 獲自接種疫苗OVAX(產生小雞卵清蛋白之Tarmogen)之小鼠的血清證明抗-OVA抗體之效價。該結果似乎由於小雞卵清蛋白主要分泌於OVAX酵母菌株之周質間隙中且某些可溶性蛋白質係經由完整酵母菌之細胞壁釋放。因而, 異源抗原定位於基於重組酵母菌之疫苗內部似乎決定是否產生抗體。

為進一步調查OVAX酵母菌誘導抗-OVA抗體的能力, 兩個月一月一次對BALB/c小鼠接種下表中所示之抗原。第二次疫苗接種後一個月, 給小鼠接種可溶性小雞卵清蛋白(不添加佐劑)。模仿疫苗接種PBS之小鼠在第56天經可溶性OVA單次激發之後不建立抗-OVA抗體反應。相比之下, 兩次接種 2×10^7 (2 YU)OVAX酵母菌接種之小鼠在經可溶性OVA(不添加佐劑)激發之後建立高效價的抗-OVA抗體反應。在經OVAX免疫、繼之再經可溶性OVA(基於非酵母菌之疫苗之實例)激發或者經OVAX與OVA-Alum共投藥、再經可溶性OVA激發之小鼠中(尤其在單劑量之OVAX外加OVA-Alum之後)觀測到高效價之抗-OVA抗

體，此研究證明了抗原節約效果。圖14A及14B亦說明相似實驗之結果。

表6：OVAX引發抗體反應

疫苗接種			血清抗-OVA 抗體量測			
第0日	第28日	第56日	第0日	第28日	第56日	第65日
PBS	PBS	可溶性 OVA	<1:50	1:50	<1:50	1:50
OVA-Alum	OVA-Alum	可溶性 OVA	<1:50	1:40000	1:93000	1:220000
OVAX	OVAX	可溶性 OVA	1:50	1:4600	1:11000	1:56000
OVAX + OVA-Al	OVAX + OVA-Al	可溶性 OVA	<1:50	1:86000	1:128000	1:274000

參照圖14A及14B，展示了所用三種方案之T細胞引發(圖14B)及抗體產生(圖14A)之結果。在圖14A中，方案A(對照)(其中僅投與PBS)展示當使用PBS激發時未偵測到卵清蛋白特異抗體效價。在方案B中，PBS在第0日及第28日投藥引發，且當第56日使用可溶性卵清蛋白(ova)激發時，直至第65日才偵測到卵清蛋白特異抗體效價。在方案C中，使用表現卵清蛋白(OVAX)之酵母菌媒劑引發，且當使用可溶性卵清蛋白激發時，觀測到高抗體效價之快速產生。圖14B展示使用各種量之可溶性卵清蛋白用於活體外再激發獲自藉由上述三種每一方案免疫之小鼠之T細胞之T細胞激活檢定的結果。方案C可有效誘導細胞介導免疫反應。

實例10

以下實例證明產生Gag之Tarmogen可引發抗原特異輔助性T細胞。

以下實例之目的係確定GI-2010(產生如胞漿蛋白之HIV-1 Gag蛋白的Tarmogen)引發用於產生抗體之抗原特異輔助性T細胞的能力。給各組5 BALB/c小鼠注射生理鹽水、2 YU YVEC或2 YU GI-2010(在第0、7及21日皮下注射)或注射 1×10^7 pfu MVA-對照物或 1×10^7 MVA-

UGD(編碼HIV-1 Gag之重組修飾牛痘疫苗Ankara病毒；在第0日及第21日腹膜內注射)。隨後在第28日給經生理鹽水或酵母菌免疫之小鼠注射5 μg 於生理鹽水(無佐劑)中之重組p24 Gag蛋白。藉由ELISA測定整個研究中所分離之小鼠血清樣本的抗-p24 Gag抗體效價。圖15中所示結果證明經GI-2010免疫的小鼠未產生可偵測的p24 Gag特異抗體，除非其經可溶性Gag蛋白激發。由於注射生理鹽水或YVEC之小鼠不產生抗體，因此該資料表明GI-2010引發所接種之小鼠中之輔助性T細胞以激發藉由可溶性Gag蛋白(無佐劑)所誘發之B細胞反應。

該實例證明Tarmogen可誘導用於抗體產生之輔助性T細胞且抗原定位於酵母菌內部對所產生之抗體之量起重要作用。舉例而言，研究表明表現作為酵母菌細胞表面蛋白之HBsAg的酵母菌可誘導抗-HBsAg抗體。參見，例如，M.P. Schreuder等人，Vaccine, 14 (5):383-8(1996)。

實例11

以下實例證明本發明之基於酵母菌之疫苗當與基於非酵母菌之抗原製劑混合時具有佐劑效果。

在此實驗中，使用GI-8002(產生如胞漿蛋白之A/PR/8/34 HA之Tarmogen)(參見實例2)。總之，使BALB/c小鼠(每組5隻)在第1日及第22日皮下單獨免疫接種5 YU(5×10^7)GI-8002酵母菌細胞、單獨免疫接種1 μg 或10 μg 之BPL-失活流感病毒(A/PR/8/34)，或免疫接種5 YU GI-8002外加指定量之BPL-失活流感病毒。第二劑量之後4週，收集血清，且執行HI檢定以測定中和抗體之存在。此實驗結果證明酵母菌當僅與BPL失活病毒混合以誘導中和抗體時可具有佐劑效果。

表7

治療		HI 效價	幾何平均 HI 效價 (倒數)	平均 HI 效價 (倒數)
佐劑	抗原			
5 YU GI-8002	無	<4, <4, <4, <4, <4	<4	<4
無	1 µg A/PR/8/34	8, 16, 4, <4, 8	8	9
5 YU GI-8002	1 µg A/PR/8/34	32, 32, 16, 32, 32	27.9	28.8
無	10 µg A/PR/8/34	8, 16, 16, 16, 8	12.1	12.8
5 YU GI-8002	10 µg A/PR/8/34	8, 128, 8, N.D., N.D.	20.2	48

* N.D.=由於睏後出血之技術問題，未測定

本文中所引用之全部專利、專利申請案及公開案之揭示內容以引用方式全文併入本文中以滿足各種目的。

參考文獻

1. Kiyosawa等人，**Hepatology** 12 (1990):671-675。
2. Tong等人，**NEJM** 332 (1995):1463-1466。
3. Yano等人，**Hepatology** 23 (1996):1334-1340。
4. Gordon等人，**Hepatology** 28 (1998) 2:562-567。
5. Di Bisceglie等人，**Hepatology** 14 (1991):969-974。
6. Koretz等人，**Ann Intern Med** 119 (1993):110-115。
7. Mattson等人，**Liver** 13 (1993):274-276。
8. Tremolada等人，**J Hepatol** 16 (1992):273-281。
9. Fattovich等人，**Gastroenterology** 112 (1997):463-472。
10. Serfaty等人，**Hepatology** 27 (1998):1435-1440。
11. Armstrong等人，**Hepatology** 31 (2000):777-82。
12. Shiratori等人，**Annals of Internal Medicine**, 142 (2005):105-114。
13. Yoshida 等人，IHIT Study Group (Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy). **Ann. Intern. Med** 131

(1999):174-81。

14. Okanoue等人，Viral hepatitis therapy study group. **J Hepatol** 30 (1999): 653-9。

15. Shoukry等人，**Annual Rev. Microbiol** 58 (2004): 391-424。

16. Stubbs等人，**Nat Med** 7 (2001):625-629。

17. Lu等人，**Cancer Research** 64 (2004):5084-5088。

18. Haller等人，Abstract, "A novel yeast-based immunotherapeutic product for chronic hepatitis C virus infection". **AASLD Meeting**, 2005年3月4至5日，Chicago, IL。

19. Mondelli等人，**Journal of Hepatology** 31 (1999):65-70。

20. Day等人，**Journal of Virology** (2002):12584-12595。

21. Lauer and Walker, **New England Journal of Medicine** 345 (2001) 1:41-52。

22. Grakoui等人，**Science Mag. Report** 342 (2003)。

23. Yewdell等人，**Adv. Immunol** 73 (1999):1-77。

24. Shoukry等人，**The Journal of Experimental Medicine** 197 (2003):1645-1655。

25. Matzinger, **Science** 296 (2002):301-305。

26. Faló等人，**Nat Med** 1 (1995):649-53。

27. Kikuchi等人，**Int. Immunopharmacol**, 2 (2002): 1503-1508。

28. Tada等人，**Microbio.l Immunol.** 46 (2002):503-512。

29. Pichuantes等人，"Expression of heterologous gene products in yeast. *In* Protein Engineering-Principles and Practice. J. L. Cleland and C. S. Craik, editors." **Wiley-Liss, New York** (1996):129-162。

30. Underhill, **Eur. J. Immunol.** 33 (2003):1767-1775。

31. Ozinsky等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 97 (2000):13766-

13771。

32. Akira等人，**Nat. Immunol.** 2 (2001):675-680。
33. Medzhitov等人，**Science** 296 (2002):298-300。
34. Gantner等人，**J. Exp. Med.** 197 (2003):1107-1117。
35. Huang等人，**Science.** 294 (2001):870-875。
36. Savolainen等人，**Allergy** 53 (1998):506-512。
37. Mari等人，**Clin. Exp.Allergy.** 33 (2003):1429-1438。
38. Kortekangas-Savolainen 等人，**Clin Exp Allergy** 24 (1994):836-842。
39. Belchi-Hernandez 等人，**Allergy Clin. Immunol.** 97 (1996):131-134。
40. Dentico等人，**Eur J Epidemiol.** 8 (1992):650-655。
41. Joossens等人，**Gastroenterology** 122 (2002):1242-7。
42. Sandborn等人，**Inflammatory Bowel Dis.** 7 (2001): 192-201。
43. Ponton等人，**Med. Mycology** 38 (2000):225-236。
44. Wheeler等人，**Proc Natl Acad Sci U S A.** 100 (2003): 2766-2770。
45. Haller等人，**Vaccine** 25 (2007): 1452-1463。

儘管本發明之各實施例已詳述，但熟習該項技術者顯然可對彼等實施例作出修改及調整。然而，應明確瞭解，該等修改及調整屬於本發明之範疇，如以下申請專利範圍中所述。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 美商環球免疫公司

<120> 用於誘發免疫反應之以酵母菌為基礎之疫苗

<130> 3923-18

<140> 096103976

<141> 2007-02-02

<150> 60/765,025

<151> 2006-02-02

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Pro
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 2

Gly Gly Gly His His His His His His
1 5

<210> 3

<211> 801

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 3

atggccgacg aggcaccaag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct ctctatcatc	60
ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt tgcagggaag	120
aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg cttaaagaaa gaccaatcct gtcacctctg	180
actaaggggg ttttaggatt tgtgttcacg ctacccgtgc ccagtgagcg aggactgcag	240
cgtagacgct ttgtccaaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa catggacaaa	300
gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc caaagaaatc	360
tcactcagtt atctctgttg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata caacaggatg	420
ggggctgtga ccaactgaag ggcatattgg ctggtatgtg caacctgtga acagattgct	480
gactcccagc atcgggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaaccact aatcagacat	540

gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat ggctggatcg 600
 agtgagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctaggcaaat ggtgcaagcg 660
 atgagaacca ttgggactca tcttagctcc agtgctggtc tgaaaaatga tcttcttgaa 720
 aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacgggtcaa ggggtggcggg 780
 catcaccatc accatcacta g 801

<210> 4
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 4

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val
 1 5 10 15

Leu Ser Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg
 20 25 30

Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met
 35 40 45

Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile
 50 55 60

Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn
 85 90 95

Asn Met Asp Lys Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile
 100 105 110

Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala
 115 120 125

Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr
 130 135 140

Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala
 145 150 155 160

Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro
 165 170 175

Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys
 180 185 190

Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met
 195 200 205

Glu Val Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile
 210 215 220

Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu
225 230 235 240

Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe
245 250 255

Lys Gly Gly Gly His His His His His His
260 265

<210> 5
<211> 1878
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 5
atgcagttac ttcgctgttt ttcaatat tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aatcccttca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctattttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct cacccttcaa caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtaag gcaaacctac tggctctgtt atgtgcactt 300
gcagctgcag atgcagacac aatatgtata ggctaccatg cgaacaattc aaccgacact 360
gttgacacag tactcgagaa gaatgtgaca gtgacacact ctgttaacct gctcgaagac 420
agccacaacg gaaaactatg tagattaaaa ggaatagccc cactacaatt ggggaaatgt 480
aacatgcgag gatggctctt gggaatcca gaatgcgacc cactgcttcc agtgagatca 540
tggctctaca ttgtagaaac accaaactct gagaatggaa tatgttatcc aggagatttc 600
atcgactatg aggagctgag ggagcaattg agctcagtgat catcattcga aagattcga 660
atatttccca aagaaagctc atggcccaac cacaacacaa acggagtaac ggcagcatgc 720
tcccatgagg ggaagagcag tttttacaga aatttgctat ggctgacgga gaaggagggc 780
tcatacccaa agctgaaaaa ttcttatgtg acaaaaaaag gaaagaagt cttgtactg 840
tggggtattc atcaccgctc taacagtaag gaacaacaga atctctatca gaatgaaat 900
gcttatgtct ctgtagtgc ttcaaattat aacaggagat ttaccccgga aatagcagaa 960
agacccaaag taagagatca agctgggagg atgaactatt actggacctt gctaaaaccc 1020
ggagacacaa taatatattga ggcaaatgga aatctaatac caccaatgta tgccttcgca 1080
ctgagtagag gctttgggtc cggcatcatc acctcaaag catcaatgca tgagtgtaac 1140
acgaagtgtc aaacacccct gggagctata aacagcagtc tcccttacca gaataacac 1200
ccagtcacaa taggagagcg cccaaaatac gtcaggagtg ccaaattgag gatggttaca 1260
ggactaagga acattccgct catcaatcc agaggcttat ttggagccat tgccgggttt 1320
attgaagggg gatggactgg aatgatagat ggatgggtat gttatcatca tcagaatgaa 1380
cagggatcag gctatgcagc ggatcaaaaa agcacacaaa atgccattaa cgggattaca 1440
aacaaggtga acactgttat cgagaaaatg aacattcaat tcacagctgt gggtaaagaa 1500
ttcaacaaat tagaaaaaag gatggaaaat ttaaataaaa aagttgatga tggatttctg 1560

gacatttgga catataatgc agaattgtta gtctactgg aaaatgaaag gactctggac 1620
 ttccatgact caaatatgaa gaatctgtat gagaaagtaa aaagccaatt aaagaataat 1680
 gccaaagaaa tcggaaatgg atgttttgag ttctaccaca agtgtgacaa tgaatgcatg 1740
 gaaagtgtaa gaaatgggac ttatgattat cccaaatatt cagaagagtc aaagtgaac 1800
 agggaaaagg tagatggagt gaaattggaa tcaatgggga tctatcaggg tggcgggcat 1860
 caccatcacc atcactag 1878

<210> 6
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成
 <400> 6

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
 1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
 20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn
 35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
 50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
 65 70 75 80

Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Thr Ser Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu
 85 90 95

Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr
 100 105 110

His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn
 115 120 125

Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly
 130 135 140

Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys
 145 150 155 160

Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu
 165 170 175

Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn
 180 185 190

Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu
 195 200 205

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

Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu
515 520 525

Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser
530 535 540

Asn Met Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn
545 550 555 560

Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp
565 570 575

Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys
580 585 590

Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys
595 600 605

Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln Gly Gly Gly His His His His His
610 615 620

His
625

<210> 7
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 7

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

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
20 25 30

Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala
35 40 45

Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
100 105 110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr
115 120 125

Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser Phe
130 135 140

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys
145 150 155 160

Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu
165 170 175

Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Asn Ile Tyr
180 185 190

Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg
195 200 205

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala
210 215 220

Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile
225 230 235 240

<210> 8
<211> 239
<212> PRT
<213> 流感A病毒

<400> 8

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

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
20 25 30

Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala
35 40 45

Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
100 105 110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr
115 120 125

Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser Ser Phe Tyr
130 135 140

Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys Leu
145 150 155 160

Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp
165 170 175

Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr Gln
180 185 190

Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg
195 200 205

Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly
210 215 220

Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile
225 230 235

<210> 9
<211> 750
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 9
atgcagttac ttgcgtgttt ttcaatatatt tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aatccctca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctattttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtgc acaatatgta taggctacca tgcgaacaat 300
tcaaccgaca ctgttgacac agtactcgag aagaatgtga cagtgcaca ctctgttaac 360
ctgctcgaag acagccacaa cggaaaacta ttagattaa aaggaatagc cccactacaa 420
ttggggaaat gtaacatgc cggatggctc ttggggaatc cagaatgcga cccactgctt 480
ccagtgagat catggtccta cattgtagaa acaccaaact ctgagaatgg aatatgttat 540
ccaggagatt tcatcgacta tgaggagctg agggagcaat tgagctcagt gtcattc 600
gaaagattcg aaatatttcc caaagaaagc tcatggccca accacaacac aaacggagta 660
acggcagcat gctcccatga ggggaaaagc agtttttaca gaaatttgct atggctgacg 720
gagaaggagg gctcataccc aaagctgaaa 750

<210> 10
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 10

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn

35					40					45					
Gly	Lys	Ala	Met	Gln	Gly	Val	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Val	Thr	Phe
50					55					60					
Val	Ser	Asn	Cys	Gly	Ser	His	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ser	Pro
65					70					75					80
Ile	Asn	Thr	Gln	Tyr	Val	Phe	Thr	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr
			85						90					95	
His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn
			100					105						110	
Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly
		115					120					125			
Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Lys	Cys
130					135					140					
Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Pro	Leu	Leu
145					150					155					160
Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn
			165						170					175	
Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Ile	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu
			180					185						190	
Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys
		195					200					205			
Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys
	210					215					220				
Ser	His	Glu	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr
225					230					235					240
Glu	Lys	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Ser	Tyr	Val	Asn	Lys
				245					250					255	
Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Asn
			260					265					270		
Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Leu	Tyr	Gln	Asn	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val	Ser
		275				280						285			
Val	Val	Thr	Ser	Asn	Tyr	Asn	Arg	Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Glu
		290				295					300				
Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Ala	Gly	Arg	Met	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr
305					310					315					320
Leu	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile	Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu
				325					330					335	

Ile Ala Pro Met Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly
340 345 350

Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln
355 360 365

Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His
370 375 380

Pro Val Thr Ile Gly Glu Arg Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu
385 390 395 400

Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly
405 410 415

Gly Gly His His His His His His
420

<210> 11
<211> 331
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 11

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

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu
20 25 30

Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala
35 40 45

Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu
100 105 110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr
115 120 125

Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser Phe
130 135 140

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys
145 150 155 160

Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu

165	170	175
Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Asp Gln Gln Asn Ile Tyr 180	185	190
Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg 195	200	205
Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala 210	215	220
Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile 225	230	235
Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala 245	250	255
Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met 260	265	270
His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser 275	280	285
Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro 290	295	300
Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn 305	310	315
Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly 325	330	

<210> 12
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 流感A病毒

<400> 12

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

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

<210> 13
 <211> 1836
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 13
 atgcagttac ttcgctgttt ttcaatat tctgtttatg cttcagtttt agcacaggaa 60
 ctgacaacta tatgcgagca aatccctca ccaactttag aatcgacgcc gtactctttg 120
 tcaacgacta ctattttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
 tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct cacccttcaa caactagcaa aggagccccc 240
 ataaacacac agtatgtttt tactagtatg cagatttgca ttggttacca tgcaacaac 300
 tcgacagagc aggttgacac aataatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgcccaagac 360
 atactggaaa agaaacacaa cggaagctc tgcgatctag atggagttaa gcctctaatt 420
 ttgagagatt gtacgtagc ttgatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc 480
 aatgtgccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc cagtcaatga cctctgttac 540
 ccaggggatt tcaatgacta tgaagaattg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt 600
 gagaaaattc agatcatccc caaaagtctt tgggccagtc atgaggcctc attaggggtg 660
 agctcagcat gtccatatca gggaaagtc tctttttca gaaatgtggt atggcttata 720
 aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aggagctaca ataataccaa ccaagaagat 780
 cttttgttac tgtgggggat tcaccatcct aatgatgcgg cagagcagac aaagctctat 840
 caaaacccaa ccacctatat ttccgttggg acatcaacac taaaccagag attggtacca 900
 agaatagcta ctatagccaa agtaaacggg caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca 960
 attttaagc caaatgatgc aatcaactc gagagtaatg gaaatttcac tgcctcagaa 1020
 tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcaacaatta tgaaaagtga actcgagtat 1080
 ggtaactgca acaccaagtg tcaactcca atggggcgga taaactctag catgccattc 1140
 cacaatatac accctctcac catgtgggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta 1200
 gtccttgcca ctgggctcag aaatagccct caaagagaga gaagaagaaa aaagagagga 1260
 tiatttggag ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaaatgt agatggttgg 1320
 tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact 1380
 caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcga tcattgacaa aatgaacact 1440
 cagtttgagg ccgttgaag ggaatttaac aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac 1500
 aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc tggacttata atgctgaact tctggttctc 1560
 atggaaaatg agagaactct agacttcat gactcaaatg tcaagaacct ttacgacaag 1620
 gtccgactac agcttaggga caatgcaaag gagctgggaa atggatgttt tgagttctac 1680
 cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt gtaagaaatg ggacttatga ttatccccag 1740
 tattcagaag aagcgagact aaaaagagag gaaataagtg gagtaaaatt ggaatcaata 1800
 ggaatttacc aacatcacca tcaccatcac tgatag 1836

<210> 14
 <211> 610
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 14

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

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

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

His His
610

<210> 15
<211> 2610
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 15
atggccgacg aggcaccaag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgtact ctctatcatt 60
ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt tgcagggaag 120
aacaccgacg ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct gtcacctctg 180
actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctccaccgtg ccagtggagcg aggactgcag 240
cgtagacgct ttgtccaaaa tgccttaaat gggaacgggg atccaaataa catggacaaa 300
gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc caaagaaatc 360
tcactcagtt attctgctgg tgcacttgcc agttgtatgg gcctcatata caacaggatg 420
ggggctgtga ccactgaagt ggcatattggc ctggtatgtg caacctgtga acagattgct 480
gactcccagc atcgggtctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact aatcagacat 540
gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat ggctggatcg 600
agttagcaag cagcagaggc catggagggt gctagtcagg ctagacaaat ggtgcaagcg 660
atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga tcttcttgaa 720
aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacgggttcaa ggggtggcggg 780
ctcgagatgg cgtcccaagg caccaaaggc tcttacgaac agatggagac tgatggagaa 840
cgccagaatg ccactgaaat cagagcatcc gtcggaaaaa tgattggtgg aattggacga 900
ttctacatcc aaatgtgcac cgaactcaaa ctccagtatt atgagggacg gttgatccaa 960
aacagcttaa caatagagag aatgggtgctc tctgcttttg acgaaaggag aaataaatac 1020
ctggaagaac atcccagtcg ggggaaagat cctaagaaaa ctggaggacc tatatacagg 1080
agagtaaacg gaaagtggat gagagaactc atcctttatg acaaagaaga aataaggcga 1140
atctggcgcc aagctaataa tggtagacat gcaacggctg gtcctgactc catgatgac 1200
tggcattcca atttgaatga tgcaacttat cagaggacaa gagctcttgt tcgcaccgga 1260
atggatccca ggatgtgctc tctgatgcaa ggttcaactc tccctaggag gtcctggagcc 1320
gcaggtgctg cagtcaaagg agttggaaca atggtgatgg aattggtcag gatgatcaaa 1380
cgtgggatca atgatcgga cttctggagg ggtgagaatg gacgaaaaac aagaattgct 1440
tatgaaagaa tgtgcaacat tctcaaaggg aaatttcaaa ctgctgcaca aaaagcaatg 1500
atggatcaag tgagagagag ccggaacca gggaatgctg agttcgaaga tctcactttt 1560
ctagcacggt ctgcactcat attgagaggg tcggttgctc acaagtcctg cctgcctgcc 1620
tgtgtgtatg gacctgccgt agccagtggg tacgactttg aaagagaggg atactctcta 1680
gtcggaatag accctttcag actgcttcaa aacagccaag tgtacagcct aatcagacca 1740
aatgagaatc cagcacacaa gagtcaactg gtgtggatgg catgccattc tgccgcattt 1800
gaagatctaa gagtattaag cttcatcaaa gggacgaagg tgctcccaag agggaagctt 1860

```

tccactagag gagttcaaat tgcttccaat gaaaatatgg agactatgga atcaagtaca 1920
cttgaactga gaagcaggta ctgggccata aggaccagaa gtggaggaaa caccaatcaa 1980
cagagggcat ctgcgggcca aatcagcata caacctacgt tctcagtaca gagaaatctc 2040
ccttttgaca gaacaaccgt tatggcagca ttcagtggga atacagaggg gagaacatct 2100
gacatgagga ccgaaatcat aaggatgatg gaaagtgcaa gaccagaaga tgtgtcttcc 2160
cagggcgggg gagtcttcga gctctcggac gaaaaggcag cgagcccgat cgtgccttcc 2220
tttgacatga gtaatgaagg atcttatttc ttcggagaca atgcagagga gtacgacaat 2280
actagtatga gcctcctgac agaagtagag actccgatcc gcaacgaatg gggctgtcgg 2340
tgcaacggat catcggaccc atcattattg acggaggctg aaacaccaac aaggaatgag 2400
tgggagtga gatgttctga cagcagtgat ccgcccggga tgagctcct gacagaagta 2460
gagactccga tccgcaacga atggggctgt cggtgcaacg gatcatcgga cccatcatta 2520
ttgacggagg tcgaacacc aacaaggaat gaatgggagt gcagatgttc tgacagcagt 2580
gatccgcac accatcacca tcactaatag 2610

```

<210> 16
 <211> 868
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 16

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val
1 5 10 15

Leu Ser Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg
20 25 30

Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met
35 40 45

Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile
50 55 60

Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln
65 70 75 80

Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn
85 90 95

Asn Met Asp Lys Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile
100 105 110

Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala
115 120 125

Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr
130 135 140

Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala

145	150	155	160
Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro	165	170	175
Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys	180	185	190
Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met	195	200	205
Glu Val Ala Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile	210	215	220
Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu	225	230	235
Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe	245	250	255
Lys Gly Gly Gly Leu Glu Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr	260	265	270
Glu Gln Met Glu Thr Asp Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg	275	280	285
Ala Ser Val Gly Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln	290	295	300
Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln	305	310	315
Asn Ser Leu Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg	325	330	335
Arg Asn Lys Tyr Leu Glu Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys	340	345	350
Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg	355	360	365
Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln	370	375	380
Ala Asn Asn Gly Asp Asp Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile	385	390	395
Trp His Ser Asn Leu Asn Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu	405	410	415
Val Arg Thr Gly Met Asp Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser	420	425	430
Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val	435	440	445

Gly Thr Met Val Met Glu Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn
 450 455 460
 Asp Arg Asn Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala
 465 470 475 480
 Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala
 485 490 495
 Gln Lys Ala Met Met Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn
 500 505 510
 Ala Glu Phe Glu Asp Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu
 515 520 525
 Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly
 530 535 540
 Pro Ala Val Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
 545 550 555 560
 Val Gly Ile Asp Pro Phe Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser
 565 570 575
 Leu Ile Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp
 580 585 590
 Met Ala Cys His Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe
 595 600 605
 Ile Lys Gly Thr Lys Val Leu Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly
 610 615 620
 Val Gln Ile Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr
 625 630 635 640
 Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly
 645 650 655
 Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro
 660 665 670
 Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Val Met
 675 680 685
 Ala Ala Phe Ser Gly Asn Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr
 690 695 700
 Glu Ile Ile Arg Met Met Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe
 705 710 715 720
 Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro
 725 730 735
 Ile Val Pro Ser Phe Asp Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly
 740 745 750

Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp Asn Thr Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu
755 760 765

Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser
770 775 780

Ser Asp Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu
785 790 795 800

Trp Glu Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro Pro Gly Met Ser Leu
805 810 815

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys
820 825 830

Asn Gly Ser Ser Asp Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr
835 840 845

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

His His His His
865

<210> 17
<211> 1706
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 17

```
atggccgacg aggcaccagc gtcccaaggc accaaacggc cttacgaaca gatggagact    60
gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc agagcatccg tcggaataat gattggtgga    120
attggacgat tctacatcca aatgtgcacc gaactcaaac tcagtatta tgaggacgg    180
ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga atggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga    240
aataaatacc tggaagaaca tcccagtgcg gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct    300
atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg agagaactca tcctttatga caaagaagaa    360
ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac    420
atgatgatct ggcatccaa ttigaatgat gcaacttacc agaggacaag agctcttgtt    480
cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct ctgatgaag gttcaactct cctaggagg    540
tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga gttggaacaa tggatgatga attggtcagg    600
atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca    660
agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa    720
aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc cggaaccagc ggaatgctga gttcgaagat    780
ctcacttttc tagcacggtc tgcactcata ttgagagggt cggttgctca caagtcctgc    840
ctgcctgcct gtgtgtatgg acctgccgta gccagtgggt acgactttga aagagaggga    900
tactctctag tcggaataga cccttcaga ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta    960
atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag agtcaactgg tgtggatggc atgccattct   1020
```

gccgcatttg aagatciaag agtattaagc ttcatcaaag ggacgaaggt gctccaaga 1080
 gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa 1140
 tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtagc tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac 1200
 accaatcaac agagggcatc tgcgggccaa atcagcatac aacctacgtt ctcagtacag 1260
 agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt atggcagcat tcagtgggaa tacagagggg 1320
 agaacatctg acatgaggac cgaaatcata aggatgatgg aaagtgaag accagaagat 1380
 gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc 1440
 gtgccttcct ttgacatgag taatgaagga tcttatttct tcggagacaa tgcagaggag 1500
 tacgacaata ctagtatgag cctcctgaca gaagtagaga ctccgatccg caacgaatgg 1560
 ggctgtcggg gcaacggatc atcggacccc gggatgagcc tcctgacaga agtagagact 1620
 ccgatccgca acgaatgggg ctgtcgggtc aacggatcat cggacgggtg cgggcatcac 1680
 catcaccatc actaataggc ggccgc 1706

<210> 18
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 18

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu
1 5 10 15

Gln Met Glu Thr Asp Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala
20 25 30

Ser Val Gly Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met
35 40 45

Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn
50 55 60

Ser Leu Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg
65 70 75 80

Asn Lys Tyr Leu Glu Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys
85 90 95

Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg Glu
100 105 110

Leu Ile Leu Tyr Asp Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala
115 120 125

Asn Asn Gly Asp Asp Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp
130 135 140

His Ser Asn Leu Asn Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val
145 150 155 160

Arg Thr Gly Met Asp Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr
 165 170 175
 Leu Pro Arg Arg Ser Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly
 180 185 190
 Thr Met Val Met Glu Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp
 195 200 205
 Arg Asn Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr
 210 215 220
 Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln
 225 230 235 240
 Lys Ala Met Met Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala
 245 250 255
 Glu Phe Glu Asp Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg
 260 265 270
 Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro
 275 280 285
 Ala Val Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val
 290 295 300
 Gly Ile Asp Pro Phe Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu
 305 310 315 320
 Ile Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met
 325 330 335
 Ala Cys His Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile
 340 345 350
 Lys Gly Thr Lys Val Leu Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val
 355 360 365
 Gln Ile Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu
 370 375 380
 Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn
 385 390 395 400
 Thr Asn Gln Gln Arg Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr
 405 410 415
 Phe Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Val Met Ala
 420 425 430
 Ala Phe Ser Gly Asn Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu
 435 440 445
 Ile Ile Arg Met Met Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln
 450 455 460

Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile
465 470 475 480

Val Pro Ser Phe Asp Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp
485 490 495

Asn Ala Glu Glu Tyr Asp Asn Thr Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu Val
500 505 510

Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser
515 520 525

Asp Pro Gly Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
530 535 540

Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Gly Gly Gly His His
545 550 555 560

His His His His

<210> 19
<211> 1884
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 19
atgcagttac ttcgctgttt ttcaatatatt tctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aatccccica ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctattttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtaag gcaaacctac tggctctgtt atgtgcactt 300
gcagctgcag atgcagatca gatttgcatt ggttaccatg caaacaactc gacagagcag 360
gttgacacaa taatggaaaa gaacgttact gttacacatg cccaagacat actggaaaag 420
aaacacaacg ggaagctctg cgatctagat ggagtgaagc ctctaatttt gagagattgt 480
agcgtagctg gatggctcct cggaaaccca atgtgtgacg aattcatcaa tgtgccggaa 540
tggctttaca tagtgagaa ggccaatcca gtcaatgacc tctgttacc agggttctc 600
aatgactatg aagaattgaa acacctattg agcagaataa accattttga gaaaattcag 660
atcatcccca aaagtctctg gtccagtcac gaggcctcat taggggtgag ctcagcatgt 720
ccatatcagg gaaagtcctc ctttttcaga aatgtggtat ggcttatcaa aaagaacagt 780
acatacccaa caataaagag gagctacaat aataccaacc aagaagatct tttgtactg 840
tgggggattc accatcctaa tgatgcggca gagcagacaa agctctatca aaaccaacc 900
acctatattt ccgttgggac atcaacacta aaccagagat tggtagcaag aatagctact 960
agatccaaag taaacgggca aagtgaagg atggagttct tctggacaat tttaaagcca 1020
aatgatgcaa tcaacttcga gagtaatgga aatttcattg ctccagaata tgcatacaaa 1080

attgtcaaga aaggggactc aacaattatg aaaagtgaac tcgagtatgg taactgcaac 1140
 accaagtgtc aaactccaat gggggcgata aactctagca tgccattcca caatatacac 1200
 cctctcacca ttggggaatg ccccaaatat gtgaaatcaa acagattagt ccttgcgact 1260
 gggctcagaa atagccctca aagagagaga agaagaaaaa agagaggatt atttgagct 1320
 atagcaggtt ttatagaggg aggatggcag ggaatgtag atggttgta tgggtaccac 1380
 catagcaatg agcaggggag tgggtacgct gcagacaaag aatccactca aaaggcaata 1440
 gatggagtca ccaataaggt caactcgatc attgacaaaa tgaacactca gttttagggc 1500
 gttggaaggg aatttaacaa cttagaaagg agaatagaga atttaacaa gaagatggaa 1560
 gacgggtttc tagatgtctg gacttataat gctgaacttc tggttctcat ggaaaatgag 1620
 agaactctag actttcatga ctcaaatgtc aagaaccttt acgacaaggt ccgactacag 1680
 cttagggaca atgcaaagga gctgggaaat ggaigtittg agttctacca caagtgtgac 1740
 aatgaatgca tggaaagtgt aagaaatggg acttatgatt atccccagta ttcagaagaa 1800
 gcgagactaa aaagagagga aataagtgga gtaaaattgg aatcaatagg aatttacaa 1860
 catcaccatc accatcactg atag 1884

<210> 20
 <211> 626
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 20

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
65 70 75 80

Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Thr Ser Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu
85 90 95

Leu Cys Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr
100 105 110

His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn
115 120 125

Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly
130 135 140

Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys
 145 150 155 160
 Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile
 165 170 175
 Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn
 180 185 190
 Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His
 195 200 205
 Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys
 210 215 220
 Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys
 225 230 235 240
 Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile
 245 250 255
 Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr
 260 265 270
 Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp
 275 280 285
 Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser
 290 295 300
 Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr
 305 310 315 320
 Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr
 325 330 335
 Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe
 340 345 350
 Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr
 355 360 365
 Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln
 370 375 380
 Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His
 385 390 395 400
 Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu
 405 410 415
 Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg
 420 425 430
 Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly
 435 440 445

Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu
450 455 460

Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile
465 470 475 480

Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr
485 490 495

Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile
500 505 510

Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr
515 520 525

Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp
530 535 540

Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln
545 550 555 560

Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr
565 570 575

His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr
580 585 590

Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile
595 600 605

Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln His His His His
610 615 620

His His
625

<210> 21
<211> 1851
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 21
atgcagttac ttcgctgttt ttcaatattt tctgttattg cttcagtttt agcacaggat 60
cagatttgca ttggttacca tgcaacaac tcgacagagc aggttgacac aataatggaa 120
aagaacgtta ctgttacaca tgcccaagac atactggaaa agaaacacaa cgggaagctc 180
tgcgatctag atggagttaa gcctctaatt ttgagagatt gtagcgtagc tggatggctc 240
ctcggaaacc caatgtgtga cgaattcatc aatgtgccgg aatggcttta catagtggag 300
aaggccaatc cagtcaatga cctctgttac ccaggggatt tcaatgacta tgaagaattg 360
aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt gagaaaattc agatcatccc caaaagttct 420
tggtccagtc atgaggcctc attaggggtg agctcagcat gtccatacca gggaaagtcc 480
tcctttttca gaaatgtggt atggcttatt aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag 540

```

aggagctaca ataataccaa ccaagaagat cttttggtac tgtgggggat tcaccatect 600
aatgatgcgg cagagcagac aaagctctat caaaacccaa ccacctatat ticcgttggg 660
acatcaacac taaaccagag attggtacca agaatagcta ctagatccaa agtaaacggg 720
caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca attttaaagc caaatgatgc aatcaacttc 780
gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac 840
tcaacaatta tgaaaagtga actcgagtat ggtaactgca acaccaagtg tcaaactcca 900
atgggggcga taaactctag catgccattc cacaatatac accctctcac cattggggaa 960
tgcccaaat atgtgaaatc aaacagatta gtccttgca ctgggctcag aaatagccct 1020
caaagagaga gaagaagaaa aaagagagga ttatttggag ctatagcagg ttttatagag 1080
ggaggatggc aggggaatggt agatggttgg tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg 1140
agtgggtacg ctgcgacaa agaatccact caaaaggcaa tagatggagt caccaataag 1200
gtcaactcga tcattgacaa aatgaacact cagtttgagg ccgttgaag ggaatttaac 1260
aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc 1320
tggaactata atgctgaact tctggttctc atggaaaatg agagaactct agactttcat 1380
gactcaaatg tcaagaacct ttacgacaag gtccgactac agcttaggga caatgcaaag 1440
gagctgggaa atggatgttt tgagttctac cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt 1500
gtaagaaatg ggacttatga ttatccccag tattcagaag aagcgagact aaaaagagag 1560
gaaataagtg gagtaaaatt ggaatcaata ggaatttacc aaactagtca ccaccaccac 1620
caccacgacg acgacgacga caaagaactg acaactatat gcgagcaaat cccctcacca 1680
actttagaat cgacgccgta ctctttgtca acgactacta ttttgccaa cggaagggca 1740
atgcaaggag tttttgaata ttacaaatca gtaacgtttg tcagtaattg cggttctcac 1800
ccctcaacaa ctagcaaagg cagcccccata aacacacagt atgttttttg a 1851

```

<210> 22
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 22

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Gln Asp Ile Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp
50 55 60

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

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

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

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

His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His
130 135 140

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

Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile
290 295 300

Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu
305 310 315 320

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu
325 330 335

Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe
340 345 350

Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp
355 360 365

Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala
370 375 380

Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys
385 390 395 400

Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly
405 410 415

Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys
420 425 430

Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
435 440 445

Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys
465 470 475 480

Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu
485 490 495

Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser
500 505 510

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

Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Thr Ser His His His His His His Asp Asp
530 535 540

Asp Asp Asp Lys Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro
545 550 555 560

Thr Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala
565 570 575

Asn Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr
580 585 590

Phe Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser
595 600 605

Pro Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe
610 615

<210> 23
<211> 1857
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 23
atgcttttgc aagcttttct ttctcttttg gctggttttg cagccaaaat atctgcatca 60
atggatcaga ttgcatctgg ttaccatgca aacaactcga cagagcaggt tgacacaata 120

atggaaaaga acgttactgt tacacatgcc caagacatac tggaaaagaa acacaacggg 180
 aagctctgcg atctagatgg agtgaagcct ctaattttga gagattgtag cgtagctgga 240
 tggctcctcg gaaacccaat gtgtgacgaa ttcataatg tgccggaatg gtcttacata 300
 gtggagaagg ccaatccagt caatgacctc tgttaccag gggatttcaa tgactatgaa 360
 gaattgaaac acctattgag cagaataaac cattttgaga aaattcagat catccccaaa 420
 agttcttggt ccagtcataa ggccctatta ggggtgagct cagcatgtcc ataccaggga 480
 aagtcctcct ttttcagaaa tgtggtatgg cttatcaaaa agaacagtac ataccaaca 540
 ataaagagga gctacaataa taccaaccaa gaagatcttt tggtagctgt ggggattcac 600
 catcctaattg atgcggcaga gcagacaaag ctctatcaaa acccaaccac ctatatttcc 660
 gttgggacat caacactaaa ccagagattg gtaccaagaa tagctactag atccaaagta 720
 aacgggcaaa gtggaaggat ggagttcttc tggacaattt taaagccaaa tgatgcaatc 780
 aacttcgaga gtaatggaaa ttctattgct ccagaatatg catacaaaat tgtcaagaaa 840
 ggggactcaa caattatgaa aagtgaactc gagtatggta actgcaacac caagtgtcaa 900
 actccaatgg gggcgataaa ctctagcatg ccattccaca atatacacc tctcaccatt 960
 ggggaatgcc ccaaatatgt gaaatcaaac agattagtcc ttgcgactgg gctcagaaat 1020
 agccctcaaa gagagagaag aagaaaaaag agaggattat ttggagctat agcagggttt 1080
 atagagggag gatggcaggg aatggtagat ggttggtagt ggtaccacca tagcaatgag 1140
 caggggagtg ggtacgtgc ggacaagaa tccactcaaa aggcaataga tggagtcacc 1200
 aataaggta actcgatcat tgacaaaatg aacactcagt ttgaggccgt tggaagggaa 1260
 ttaacaact tagaaaggag aatagagaat ttaaacaaga agatggaaga cgggtttcta 1320
 gatgtctgga cttataatgc tgaacttctg gtctcatgg aaaatgagag aactctagac 1380
 ttctatgact caaatgtcaa gaacctttac gacaagggtc gactacagct tagggacaat 1440
 gcaaaggagc tgggaaatgg atgttttgag ttctaccaca agtgtgacaa tgaatgcatg 1500
 gaaagigtaa gaaatgggac ttatgattat cccagttatt cagaagaagc gagactaaaa 1560
 agagagggaaa taagtggagt aaaattggaa tcaataggaa ttaccaaaac tagtcaccac 1620
 caccaccacc acgacgacga cgacgacaaa gccatttctc aaatcactga cgggtcaaatc 1680
 caagctacta ccaactgtac caccgaagct accaccactg ctgccccatc ttccaccgtt 1740
 gaaactgttt ctccatccag caccgaaact atctctcaac aaactgaaaa tgggtgtgct 1800
 aaggccgctg tcggtatggg tgccggtgct ctactgtctg ctgctatgtt gttataa 1857

<210> 24
 <211> 618
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 24

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser Met Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn
 20 25 30

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

325	330	335
Gly Leu Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly		
340	345	350
Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met		
355	360	365
Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly		
370	375	380
Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr		
385	390	400
Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala		
405	410	415
Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn		
420	425	430
Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu		
435	440	445
Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser		
450	455	460
Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn		
465	470	480
Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp		
485	490	495
Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln		
500	505	510
Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys		
515	520	525
Leu Glu Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Thr Ser His His His His His His		
530	535	540
Asp Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ser Gln Ile Thr Asp Gly Gln Ile		
545	550	555
Gln Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Glu Ala Thr Thr Thr Ala Ala Pro		
565	570	575
Ser Ser Thr Val Glu Thr Val Ser Pro Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser		
580	585	590
Gln Gln Thr Glu Asn Gly Ala Ala Lys Ala Ala Val Gly Met Gly Ala		
595	600	605
Gly Ala Leu Ala Ala Ala Ala Met Leu Leu		
610	615	

<210> 25
 <211> 1865
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 25
 ctgcaggcca ccatgcagtt acttcgctgt tttcaatat tttctgttat tgcttcagtt 60
 ttagcacagg acacaatatg tataggctac catgcgaaca attcaaccga cactgttgac 120
 acagtactcg agaagaatgt gacagtgaca cactctgtta acctgctcga agacagccac 180
 aacggaaaac tatgtagatt aaaaggaata gcccactac aattggggaa atgtaacatc 240
 gccggatggc tcttggggaa tccagaatgc gaccactgc ttccagttag atcatgggtc 300
 tacattgtag aaacacccaaa ctctgagaat ggaatatgtt atccaggaga tttcatcgac 360
 tatgaggagc tgaggagca attgagctca gtgtcatcat tcgaaagatt cgaaatattt 420
 cccaagaaa gctcatggcc caaccacaac acaaacggag taacggcagc atgtcccat 480
 gaggggaaaa gcagttttta cagaaatttg ctatggctga cggagaagga gggctcatac 540
 ccaaagctga aaaattctta tgtgaacaaa aaagggaag aagtccttgt actgtggggt 600
 attcatcacc cgtctaacag taaggacaa cagaatctct atcagaatga aaatgcttat 660
 gtctctgtag tgacttcaaa ttataacagg agatttacc cggaaatagc agaaagacce 720
 aaagtaagag atcaagctgg gaggatgaac tattactgga ccttgctaaa acccgagac 780
 acaataatat ttgaggcaaa tggaaatcta atagcaccaa tgtatgcttt cgactgagt 840
 agaggctttg ggtcggcat catcacctca aacgcatcaa tgcagtgtg taacacgaag 900
 tgtcaaacac ccctgggagc tataaacagc agtctccctt accagaatat acaccagtc 960
 acaataggag agcgcccaaa atacgtcagg agtgccaaat tgaggatggt tacaggacta 1020
 aggaacattc cgtccattca atccagaggt ctatttggag ccattgccg ttttattgaa 1080
 ggggatgga ctggaatgat agatggatgg tatggttata atcatcagaa tgaacaggga 1140
 tcaggctatg cagcgatca aaaaagcaca caaaatgcc ttaacgggat tacaacaag 1200
 gtgaacactg ttatcgagaa aatgaacatt caattcacag ctgtgggtaa agaattcaac 1260
 aaattagaaa aaaggatgga aaatttaaat aaaaaagtig atgatggatt tctggacatt 1320
 tggacatata atgcagaatt gttagtctta ctggaaaatg aaaggactct ggacttccat 1380
 gactcaaata tgaagaatct gtatgagaaa gtaaaaagcc aattaaagaa taatgccaaa 1440
 gaaatcgaa atggatgttt tgagttctac cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt 1500
 gtaagaaatg ggacttatga ttatccaaa tattcagaag agtcaaagt gaacaggga 1560
 aaggtagatg gagtgaatg ggaatcaatg gggatctatc aggttggcgg gactagtcac 1620
 caccaccacc accacgacga cgacgacgac aaagaactga caactatatg cgagcaaatc 1680
 ccctcaccaa ctttagaatg gacgccgtac tctttgtcaa cgactactat tttggccaac 1740
 gggaaggcaa tgcaaggagt ttttgaatat tacaatcag taacgtttgt cagtaattgc 1800
 ggttctcacc cctcaacaac tagcaaaggc agcccataa acacacagta tgtttaagcg 1860
 gccgc 1865

<210> 26

<211> 614
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 26

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser
 35 40 45

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

Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu
 65 70 75 80

Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser
 85 90 95

Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly
 100 105 110

Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser
 115 120 125

Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn
 130 135 140

His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser
 145 150 155 160

Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr
 165 170 175

Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu
 180 185 190

Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn
 195 200 205

Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr
 210 215 220

Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp
 225 230 235 240

Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp
 245 250 255

Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Met Tyr Ala
 260 265 270



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

565

570

575

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
580 585 590

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
595 600 605

Ile Asn Thr Gln Tyr Val
610

<210> 27
<211> 1862
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 27

```

atgcttttgc aagcttttct tttccttttg gctggttttg cagccaaaat atctgcatca    60
atggacacaa tatgtatagg ctacatgcg aacaattcaa cgcacactgt tgacacagta    120
ctcgagaaga atgtgacagt gacacactct gttaacctgc tcgaagacag ccacaacgga    180
aaactatgta gattaaaagg aatagcccca ctacaattgg ggaaatgtaa catcgccgga    240
tggtctcttg ggaatccaga atgcgaccca ctgcttcag tgagatcatg gtcctacatt    300
gtagaaacac caaactctga gaatggaata tgttatccag gagatttcat cgactatgag    360
gagctgaggg agcaattgag ctcaagtgtc tcattcgaaa gattcgaaat atttccaaa    420
gaaagctcat ggcccaacca caacacaaac ggagtaacgg cagcatgctc ccatgagggg    480
aaaagcagtt ttacagaaa ttgctatgg ctgacggaga aggagggtc atacccaaag    540
ctgaaaaaatt cttatgtgaa caaaaaagg aaagaagtcc ttgtactgtg gggtattcat    600
cacccgtcta acagtaagga acaacagaat ctctatcaga atgaaaatgc ttatgtctct    660
gtagtactt caaattataa caggagattt accccggaaa tagcagaaag acccaaagta    720
agagatcaag ctgggaggat gaactattac tggaccttgc taaaaccgg agacacaata    780
atatttgagg caaatggaaa tctaatagca ccaatgtaig ctttcgact gagtagaggc    840
tttgggtccg gcatcatcac ctcaaagca tcaatgcatg agtgaacac gaagtgtcaa    900
acacccttgg gagctataaa cagcagtctc cttaccaga atatacccc agtcacaata    960
ggagagcgcc caaaatacgt caggagtgcc aaattgagga tggttacagg actaaggaa    1020
attccgtcca ttcaatccag aggtctatgt ggagccattg ccggttttat tgaaggggga    1080
tggactggaa tgatagatgg atggtatggt tatcatcatc agaatgaaca gggatcaggc    1140
tatgcagcgg atcaaaaaag cacacaaaat gccattaacg ggattacaaa caaggtgaac    1200
actgttatcg agaaaatgaa cattcaattc acagctgttg gtaaagaatt caacaaatta    1260
gaaaaaagga tggaatttt aaataaaaaa gttgatgatg gatttctgga catttgaca    1320
tataatgcag aattgttagt tctactggaa aatgaaagga ctctggactt ccatgactca    1380
aataatgaaga atctgtatga gaaagtaaaa agccaattaa agaataatgc caaagaaatc    1440
ggaaatggat gttttgagtt ctaccacaag tgtgacaatg aatgcatgga aagtgtgaag    1500
aatgggactt atgattatcc caaatattca gaagagtcaa agttgaacag ggaaaaggta    1560

```

gatggagtga aattggaatc aatggggatc tatcaggggtg gcgggactag tcaccaccac 1620
 caccaccacg acgacgacga cgacaaagcc atttctcaaa tcactgacgg tcaaatccaa 1680
 gctactacca ctgctaccac cgaagctacc accactgctg ccccatcttc caccgttgaa 1740
 actgtttctc catccagcac cgaaactatc tctcaacaaa ctgaaaatgg tgctgctaag 1800
 gccgctgtcg gtatgggtgc cgggtgctcta gctgctgctg ctatgttggtt ataagcggcc 1860
 gc 1862

<210> 28
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 28

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser Met Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn
 20 25 30

Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr
 35 40 45

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

Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly
 65 70 75 80

Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser
 85 90 95

Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ile Cys Tyr
 100 105 110

Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser
 115 120 125

Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp
 130 135 140

Pro Asn His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly
 145 150 155 160

Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly
 165 170 175

Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu
 180 185 190

Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn Ser Lys Glu Gln
 195 200 205

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

Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met
515 520 525

Gly Ile Tyr Gln Gly Gly Gly Thr Ser His His His His His His Asp
530 535 540

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ile Ser Gln Ile Thr Asp Gly Gln Ile Gln
545 550 555 560

Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Glu Ala Thr Thr Thr Ala Ala Pro Ser
565 570 575

Ser Thr Val Glu Thr Val Ser Pro Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser Gln
580 585 590

Gln Thr Glu Asn Gly Ala Ala Lys Ala Ala Val Gly Met Gly Ala Gly
595 600 605

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Met Leu Leu
610 615

<210> 29
<211> 1565
<212> DNA
<213> 流感病毒

<400> 29
agcaaaagca gggtagataa tcactcactg agtgacatca aaatcatggc gtctcaaggc 60
accaaacgat cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc 120
agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcacc 180
gaactcaaac tcagtgattia tgagggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga 240
atggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc ttgaagaaca tcccagtgcg 300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg 360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat 420
ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcatccaa tttgaatgat 480
gcaacttata agaggacaag agctcttgtt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct 540
ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga 600
gttggaacaa tggatgatga attggtcaga atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac 660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt 720
ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc 780
cggaaccag ggaatgctga gtgcgaagat ctacttttc tagcacggtc tgcactcata 840
ttgagagggt cggttgctca caagtctgc ctgcctgcct gtgtgtatgg acctgccgta 900
gccagtgggt acgactttga aaggaggga tactctctag tcggaataga cctttcaga 960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag 1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgcatttg aagatctaag agtattaagc 1080
ttcatcaaag ggacgaaggt gctcccaaga gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt 1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtac 1200

```

tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agagggcac tgcgggccaa 1260
atcagcatac aacctacgtt ctcagtacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt 1320
atggcagcat tcagtgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaaatcata 1380
aggatgatgg aaagtgaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag 1440
ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttcct ttgacatgag taatgaagga 1500
tcctatttct tcggagacaa tgcagaggaa tacgataatt aaagaaaaat acccttgitt 1560
ctact 1565

```

<210> 30
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 30

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met
20 25 30

Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
35 40 45

Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu
50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
85 90 95

Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
100 105 110

Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp
115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
130 135 140

Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
180 185 190

Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Phe Glu Asp Leu
 245 250 255

Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Leu Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415

Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Val Met Ala Ala Phe Ser Gly Asn
 420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445

Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
 485 490 495

Asp Asn

<210> 31
 <211> 1565
 <212> DNA
 <213> 流感病毒

<400> 31

```

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

<210> 32
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<400> 32

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met
 20 25 30



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

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

Asp Asn

<210> 33
 <211> 1707
 <212> DNA
 <213> 流感病毒

<400> 33
 atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60
 attggttacc atgcaaaca ctcgacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120
 actgttacac atgccaaga catactggaa aagaaacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
 gatggagtga agcctctaata ttgagagat tgtagcgtag ctggatggct cctcgaaac 240
 ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat 300
 ccagtcaatg acctctgtta ccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta 360
 ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt 420
 catgaagcct cattaggggt gagctcagca tgtccatacc agggaaagtc ctcctttttc 480
 agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac 540
 aataatacca accaagaaga tcttttggtg ctgtggggga ttaccatcc taatgatgcg 600
 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata tttccgttgg gacatcaaca 660



```

ctaaaccaga gatttggtacc aagaatagct actagatcca aagtaaaccg gcaaagtgga 720
aggatggagt tcttctggac aattttaaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
atgaaaagtg aattggaata tggttaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatgggggcg 900
ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaaagagag 1020
agaagaagaa aaaagagagg attatttga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttgaa gggaatttaa caacttagaa 1260
aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tcctagatgt ctggacttat 1320
aatgctgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat 1380
gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaat 1500
ggaacgtatg actacccgca gtattcagaa gaagcgagac taaaagaga ggaaataagt 1560
ggagtaaaat tggaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg 1620
agttccctag cactggcaat catggtagct ggctctatcct tatggatgtg ctccaatgga 1680
tcgttacaat gcagaatttg catttaa 1707

```

<210> 34
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> 流感病毒
 <400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

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

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

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

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

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

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

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

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 35
<211> 1833
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成

<400> 35
atgcagttac ttgcgtgttt ttcaatat ttctgttattg cttcagtttt agcacaggaa 60
ctgacaacta tatgcgagca aatcccccca ccaacttttag aatcgacgcc gtactctttg 120
tcaacgacta ctattttggc caacgggaag gcaatgcaag gagtttttga atattacaaa 180
tcagtaacgt ttgtcagtaa ttgcggttct caccctcaa caactagcaa aggcagcccc 240
ataaacacac agtatgtttt tactagtac acaatatgta taggctacca tgcaacaat 300
tcaaccgaca ctgttgacac agtactcgag aagaatgtga cagtgcacac ctctgttaac 360
ctgctcgaag acagccacaa cggaaaacta thtagattaa aaggaatagc ccactacaa 420
ttggggaaat gtaacatcgc cggatggctc ttggggaatc cagaatgcga cccactgctt 480
ccagtgcgat catggtccta cattgtagaa acaccaaact ctgagaatgg aatatgttat 540
ccaggagatt tcacgacta tgaggagctg agggagcaat tgagctcagt gtcatttc 600
gaaagattcg aaatatttcc caaagaaagc tcatggccca accacaacac aaacggagta 660
acggcagcat gctcccatga ggggaaaagc agtttttaca gaaatttgct atggctgacg 720
gagaaggagg gtcataccc aaagctgaaa aattcttatg tgaacaaaaa agggaaagaa 780
gtccttgtac tgtggggtat tcatacccg tctaacagta aggaacaaca gaatctctat 840

```

cagaatgaaa atgcttatgt ctctgtagtg acctcaaatt ataacaggag atttaccgcc 900
gaaatagcag aaagacccaa agtaagagat caagctggga ggatgaacta ttactggacc 960
ttgctaaaac cggagagcac aataatattt gaggcaaatg gaaatctaag agcaccaatg 1020
tatgctttcg cactgagtag aggctttggg tccggcatca tcacctcaaa cgcatcaatg 1080
catgagtgtg acacgaagtg tcaaacaccc ctgggagcta taaacagcag tctcccttac 1140
cagaatatac acccagtcac aataggagag cgcccaaat acgtcaggag tgccaaattg 1200
aggatgggta caggactaag gaacattccg tccattcaat ccagaggtct atttgagacc 1260
attgccgggt ttattgaagg gggatggact ggaatgatag atggatggta tggttatcat 1320
catcagaatg aacagggatc aggctatgca gcggatcaaa aaagcacaca aaatgccatt 1380
aacgggatta caaacaaggt gaacactgtt atcgagaaaa tgaacattca attcacagct 1440
gtgggtaaag aattcaacaa attagaaaaa aggatggaaa atttaaataa aaaagttagt 1500
gatggatttc tggacatttg gacatataat gcagaattgt tagttctact ggaaaatgaa 1560
aggactctgg acttccatga ctcaaataat agaattctgt atgagaaagt aaaaagccaa 1620
ttaaagaata atgcaaaga aatcgaaat ggatgttttg agttctacca caagtgtgac 1680
aatgaatgca tggaaagtgt aagaaatggg acttatgatt atcccaaata ttcagaagag 1740
tcaaagtiga acagggaaaa gtagatgga gtgaaattgg aatcaatggg gatctatcag 1800
ggtagcgggc atcaccatca ccatcactag tga 1833

```

<210> 36
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成

<400> 36

Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr
20 25 30

Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe
50 55 60

Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro
65 70 75 80

Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe Thr Ser Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr
85 90 95

His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn
100 105 110

Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly
115 120 125

Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys
 130 135 140
 Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu
 145 150 155 160
 Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn
 165 170 175
 Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu
 180 185 190
 Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys
 195 200 205
 Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys
 210 215 220
 Ser His Glu Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys
 245 250 255
 Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Asn
 260 265 270
 Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser
 275 280 285
 Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu
 290 295 300
 Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu
 325 330 335
 Ile Ala Pro Met Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly
 340 345 350
 Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln
 355 360 365
 Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His
 370 375 380
 Pro Val Thr Ile Gly Glu Arg Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu
 385 390 395 400
 Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly
 405 410 415
 Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met

420 425 430

Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly
435 440 445

Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr
450 455 460

Asn Lys Val Asn Thr Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala
465 470 475 480

Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn
485 490 495

Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu
500 505 510

Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser
515 520 525

Asn Met Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn
530 535 540

Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp
545 550 555 560

Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys
565 570 575

Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys
580 585 590

Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln Gly Gly Gly His His His His His
595 600 605

His

發明摘要

※ 申請案號：102144486(由 96103976 分割)

※ 申請日：96.2.2

※IPC 分類：A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/44 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

【發明名稱】

用於誘發免疫反應之以酵母菌為基礎之疫苗

YEAST-BASED VACCINE FOR INDUCING AN IMMUNE
RESPONSE

【中文】

本文中所提供之本發明係關於經特製可獲得所要免疫反應的疫苗。本文中所提供之一些組合物適用於優先誘發體液免疫反應，而其他組合物適用於優先誘發細胞介導之反應。疫苗組合物之組合亦適用於誘發此兩種反應類型及/或適用於調節所誘發免疫反應之類型。本發明亦提供藉由投與本文中所揭示之組合物誘發個體之免疫反應的方法。該等免疫反應適用於保護個體免遭各種疾病、感染及不良病狀。

【英文】

The invention provided herein relates to vaccines that can be tailored to achieve a desired immune response. Some compositions provided herein are used for preferentially eliciting a humoral immune response while other compositions are useful for preferentially eliciting a cell-mediated response. Combinations of vaccine compositions are also useful for eliciting both types of responses and/or for modulating the type of immune response elicited. The invention also provides methods for eliciting an immune response in an individual by administering the compositions disclosed herein. These immune responses are useful for protecting an individual from various types of diseases, infections, and undesirable conditions.

申請專利範圍

1. 一種疫苗，其包含：
 - a)包含至少一種異源細胞內抗原的第一酵母菌媒劑；及
 - b)包含至少一種異源細胞外抗原的第二酵母菌媒劑。
2. 一種疫苗，其包含：
 - a)包含至少一種異源細胞內抗原及至少一種異源細胞外抗原的第一酵母菌媒劑；及
 - b)包含至少一種異源細胞內抗原或至少一種異源細胞外抗原的第二酵母菌媒劑。
3. 一種疫苗，其包含：
 - a)包含至少一種異源細胞內抗原及至少一種異源細胞外抗原的酵母菌媒劑；及
 - b)一種以非酵母菌為基礎之組合物，其包含至少一種(a)之酵母菌媒劑所包含之抗原或一種獲自相同病原體或疾病之抗原，其中該以非酵母菌為基礎之組合物係選自由DNA疫苗、蛋白質次單位疫苗及死亡或失活病原體組成之群。
4. 如請求項3之疫苗，其中(a)之酵母菌媒劑係調配成藉由與(b)之以非酵母菌為基礎之組合物不同的投藥途徑傳遞。
5. 如請求項1至3中任一項之疫苗，其中該細胞內抗原為由病原體於內部表現的抗原。
6. 如請求項1至3中任一項之疫苗，其中該細胞外抗原為同類型病原體中在結構上保守的抗原。
7. 如請求項1至3中任一項之疫苗，其中該細胞外抗原為表現於病原體表面的抗原。
8. 如請求項1至3中任一項之疫苗，其中該細胞外抗原為同類型病

原體中在結構上可變的抗原。

9. 如請求項1至3中任一項之疫苗，其中該抗原係來自一種傳染性病原體。
10. 一種疫苗，其包含：
 - a) 酵母菌媒劑；及
 - b) 由該酵母菌媒劑表現的流感病毒融合蛋白，該流感病毒融合蛋白包含選自由流感基質(M1)蛋白及流感離子通道蛋白(M2)組成之群之流感蛋白之至少一部分。
11. 一種疫苗，其包含：
 - a) 表現流感病毒融合蛋白之第一酵母菌媒劑，該流感病毒融合蛋白包含選自由流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白組成之群之流感蛋白之至少一部分；及
 - b) 至少一種表現流感病毒融合蛋白的其他酵母菌媒劑，該流感病毒融合蛋白包含選自由血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白組成之群之流感蛋白之至少一部分。
12. 一種疫苗，其包含：
 - a) 酵母菌媒劑；及
 - b) 由該酵母菌媒劑表現的流感病毒融合蛋白，該流感病毒融合蛋白包含：至少一種選自由流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白組成之群之第一流感蛋白之至少一部分；及至少一種選自由血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白組成之群之第二流感蛋白之至少一部分。
13. 一種疫苗，其包含：
 - a) 酵母菌媒劑；
 - b) 由該酵母菌媒劑表現的第一流感病毒融合蛋白，該第一流感病毒融合蛋白包含至少一種選自由流感基質(M1)蛋白、流感離

子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白組成之群之流感蛋白之至少一部分；及

c)由該酵母菌媒劑表現的第二流感病毒融合蛋白，該第二流感病毒融合蛋白包含至少一種選自由血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白組成之群之流感蛋白之至少一部分。

14. 一種疫苗，其包含：

a)酵母菌媒劑；及

b)至少一種選自由流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及核鞘(NP)蛋白組成之群之第一流感病毒蛋白之至少一部分；及

c)至少一種選自由血球凝集素(HA)蛋白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白組成之群之第二流感蛋白之至少一部分。

15. 如請求項10至14中任一項之疫苗，其中該HA蛋白係選自由H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及H16組成之群。

16. 如請求項10至14中任一項之疫苗，其中該HA蛋白係選自由H1、H2及H3組成之群。

17. 如請求項10至14中任一項之疫苗，其中該HA蛋白為H5。

18. 如請求項10至14中任一項之疫苗，其中該NA蛋白係選自由N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8及N9組成之群。

19. 如請求項10至14中任一項之疫苗，其中該NA蛋白係選自由N1及N2組成之群。

20. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該M1蛋白對於該酵母菌媒劑而言為細胞內的。

21. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該M2蛋白對於該酵母菌媒劑而言為細胞內的、細胞外的、或細胞內的與細胞外的。

22. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該M2蛋白為M2e。

23. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該NP蛋白對於該酵母菌媒劑而言為細胞內的。
24. 如請求項10至14中任一項之疫苗，其中該HA蛋白或該NA蛋白對於該酵母菌媒劑而言為細胞外的。
25. 如請求項24之疫苗，其中該HA蛋白或該NA蛋白對於該酵母菌媒劑而言亦為細胞內的。
26. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該流感病毒融合蛋白在其N-末端包含由SEQ ID NO:1(MADEAP)表示的胺基酸序列。
27. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該流感病毒融合蛋白在其N-末端或C-末端包含足以使該融合蛋白靶向該酵母菌媒劑之細胞壁之Aga2蛋白的至少一部分。
28. 如請求項9至14中任一項之疫苗，其中該流感病毒融合蛋白在其N-末端或C-末端包含足以使該融合蛋白靶向該酵母菌媒劑之細胞壁之Cwp2蛋白的至少一部分。
29. 一種疫苗，其包含：
 - a)酵母菌媒劑；及
 - b)流感病毒融合蛋白，其包含由該酵母菌媒劑表現為單一細胞內融合蛋白的M1抗原，該融合蛋白由SEQ ID NO:4組成。
30. 一種疫苗，其包含：
 - a)酵母菌媒劑；及
 - b)流感病毒融合蛋白，其包含由該酵母菌媒劑表現為單一細胞外融合蛋白的H1抗原，該融合蛋白係由選自SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:20組成之群的胺基酸序列組成。
31. 一種疫苗，其包含：
 - a)酵母菌媒劑；及
 - b)流感病毒融合蛋白，其包含由該酵母菌媒劑表現為單一細胞

外融合蛋白的H1抗原，該融合蛋白係由選自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28及SEQ ID NO:36組成之群的胺基酸序列組成。

32. 一種疫苗，其包含：

a)酵母菌媒劑；及

b)流感病毒融合蛋白，其包含由該酵母菌媒劑表現為單一細胞外融合蛋白的H5抗原，該融合蛋白係由選自SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:24組成之群的胺基酸序列組成。

33. 一種疫苗，其包含：

a)酵母菌媒劑；及

b)流感病毒融合蛋白，其包含M1抗原、N1抗原及四個M2e抗原，由該酵母菌媒劑表現為單一細胞內融合蛋白，該融合蛋白由SEQ ID NO:16組成。

34. 一種疫苗，其包含：

a)酵母菌媒劑；及

b)流感病毒融合蛋白，其包含N1抗原及兩個M2e抗原，由該酵母菌媒劑表現為單一細胞內融合蛋白，該融合蛋白由SEQ ID NO:18組成。

35. 一種疫苗，其包含：

a)酵母菌媒劑；及

b)流感病毒融合蛋白，其包含H3抗原及N2抗原，由該酵母菌媒劑表現為單一細胞外融合蛋白。

36. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中該融合蛋白之表現係在可誘導啟動子的控制下。

37. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中該啟動子係選自由*CUP1*及*TEF2*組成之群。

38. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中該酵母菌媒劑係選自由完整酵母菌、酵母菌原生質球狀體、酵母菌胞質體、酵母菌殘骸、酵母菌細胞壁製劑及亞細胞酵母菌膜萃取物或其部份組成之群。
39. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中用於製備該酵母菌媒劑之酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體係經一個編碼該融合蛋白之重組核酸分子轉型，以致該融合蛋白係由該酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體重組表現。
40. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中表現該融合蛋白之該酵母菌細胞或酵母菌原生質球狀體係用於產生一種包含酵母菌胞質體、酵母菌殘骸、酵母菌細胞壁製劑或亞細胞酵母菌膜萃取物或其部份的酵母菌媒劑。
41. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中該酵母菌媒劑係來自非病原性酵母菌。
42. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中該酵母菌媒劑係來自一種酵母菌選自由酵母菌屬(*Saccharomyces*)、裂殖酵母菌屬(*Schizosaccharomyces*)、克魯弗氏酵母菌屬(*Kluveromyces*)、漢遜氏酵母菌屬(*Hansenula*)、念珠菌屬(*Candida*)及畢赤氏酵母菌屬(*Pichia*)組成之群。
43. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中酵母菌屬為釀酒酵母菌(*S. cerevisiae*)。
44. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其中該疫苗進一步包含樹突狀細胞，其中該樹突狀細胞已在細胞內裝載有該酵母菌媒劑。
45. 如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗，其進一步包含至少一種生物反應修釋劑。

46. 一種如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗用於製備一種用於誘發抗原特異性免疫反應之調配物的用途。
47. 一種如請求項1-3、10-14或29-35中任一項之疫苗用於製備一種用於治療或預防疾病或病狀之調配物的用途。
48. 如請求項47之用途，其中該疾病或病狀為一種病原體感染。
49. 一種如請求項10-14或29-35中任一項之疫苗用於製備一種用於誘發對抗流感抗原之抗原特異性細胞介導免疫反應之調配物的用途。
50. 一種如請求項10-14或29-35中任一項之疫苗用於製備一種用於保護動物防止流感感染之調配物的用途。
51. 一種如請求項10-14或29-35中任一項之疫苗用於製備一種用於使處於感染流感危險之個體群免疫之調配物的用途。
52. 一種如請求項10-14或29-35中任一項之疫苗用於製備一種用於治療感染流感之個體群之調配物的用途。
53. 一種酵母菌媒劑、至少一種異源細胞內抗原及至少一種異源細胞外抗原用於製備一種用於誘發細胞介導免疫反應及體液免疫反應之調配物的用途。
54. 如請求項53之用途，其中該酵母菌媒劑經調配用於非經腸傳遞或鼻內傳遞。
55. 如請求項53之用途，其中該細胞內抗原為由病原體於內部表現的抗原。
56. 如請求項53之用途，其中該細胞外抗原為同類型病原體中在結構上保守的抗原。
57. 如請求項53之用途，其中該細胞外抗原為表現於病原體表面的抗原。
58. 如請求項53之用途，其中該細胞外抗原為同類型病原體中在結

構上可變的抗原。

59. 一種包含酵母菌媒劑之第一組合物與第二組合物組合用於製備一種用於誘發個體中細胞介導免疫反應及體液免疫反應之調配物的用途，該酵母菌媒劑包括至少一種異源細胞內抗原及至少一種異源細胞外抗原，該第二組合物包含：
 - a) 酵母菌媒劑，其包含用於該第一組合物中之異源抗原之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原，其中該抗原對於該酵母菌而言為細胞外的或為細胞內的與細胞外的；
 - b) 酵母菌膜或細胞壁顆粒，其含有用於該第一組合物中之異源抗原之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原；
 - c) 酵母菌媒劑，與用於該第一組合物中之異源抗原之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原混合；
 - d) DNA疫苗，其編碼該第一組合物中所用抗原之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原；
 - e) 蛋白質次單位疫苗，其包含用於該第一組合物中之該等抗原中之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原或獲自相同病原體或疾病之抗原；或
 - f) 死亡或失活病原體，其包含用於該第一組合物中之異源抗原之至少一者。
60. 一種製備如請求項1-3、10-14或32-38中任一項之酵母菌疫苗的方法，其包含在大於pH 5.5之pH值下培養包含該抗原之酵母菌媒劑。
61. 一種製備流感疫苗的方法，其包含以流感抗原融合蛋白轉染酵母菌媒劑，其中該流感抗原融合蛋白包含：選自由流感基質(M1)蛋白、流感離子通道蛋白(M2)及流感病毒核鞘(NP)蛋白組成之群之流感病毒蛋白之至少一部分；及選自由血球凝集素(HA)蛋

白及神經胺糖酸苷酶(NA)蛋白組成之群之流感蛋白之至少一部分。

62. 如請求項61之方法，包含在大於pH 5.5之pH值下培養該酵母菌媒劑。
63. 如請求項61之方法，其進一步包含使酵母菌媒劑裝載有流感病毒蛋白。
64. 如請求項61之方法，其進一步包含將流感病毒抗原與該酵母菌媒劑混合在一起。
65. 如請求項61之方法，其進一步包含流感病毒抗原以物理方式附著於酵母菌媒劑。
66. 如請求項61之方法，其進一步包含調配該經轉型之酵母菌媒劑以注射投與個體。
67. 如請求項61之方法，其進一步包含調配該經轉型之酵母菌媒劑以鼻內投藥投與個體。
68. 一種製備用於誘發個體中細胞介導免疫反應、體液免疫反應或其組合之調配物的套組，該套組包含：數種酵母菌媒劑，其中每一種酵母菌媒劑包含至少一種細胞內異源抗原或至少一種細胞外異源抗原；以及使用該等酵母菌媒劑製備該調配物的說明書。
69. 如請求項68之套組，其中該等酵母菌媒劑係重組表現該等抗原。
70. 如請求項68之套組，其進一步包含至少一種選自由以下各物組成之群的其他組合物：

a)酵母菌膜或細胞壁顆粒，其含有該等異源抗原之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原；

b)酵母菌媒劑，與該等異源抗原之至少一者或獲自相同病原體

或疾病之抗原混合；

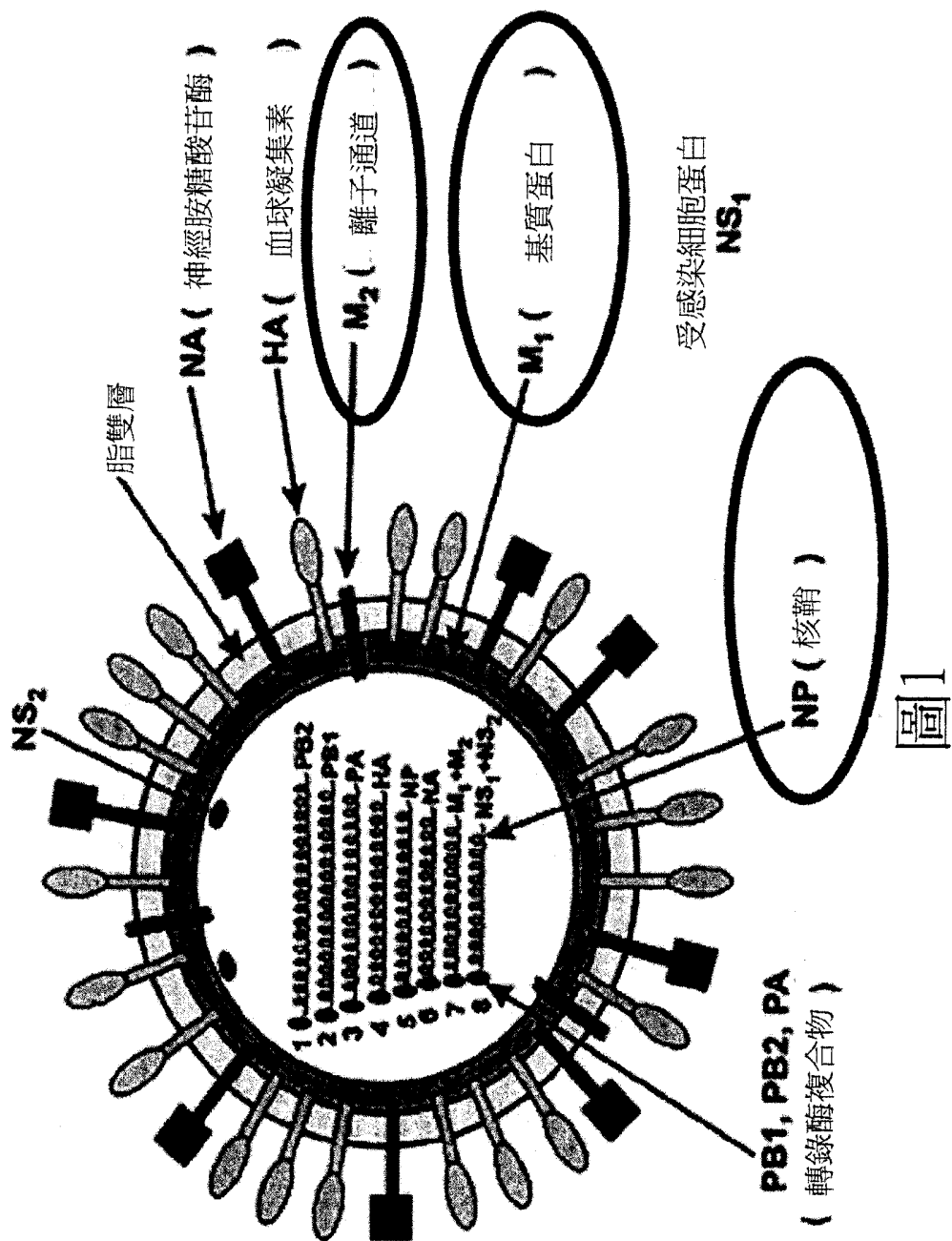
c)DNA疫苗，其編碼該等抗原之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原；

d)蛋白質次單位疫苗，其包含該等抗原中之至少一者或獲自相同病原體或疾病之抗原或獲自相同病原體或疾病之抗原；及

e)死亡或失活病原體，其包含該等異源抗原之至少一者。

71. 如請求項68之套組，其中該細胞內抗原為由病原體於內部表現的抗原。
72. 如請求項68之套組，其中該細胞外抗原為同類型病原體中在結構上保守的抗原。
73. 如請求項68之套組，其中該細胞外抗原為表現於病原體表面的抗原。
74. 如請求項68之套組，其中該細胞外抗原為同類型病原體中在結構上可變的抗原。

圖式



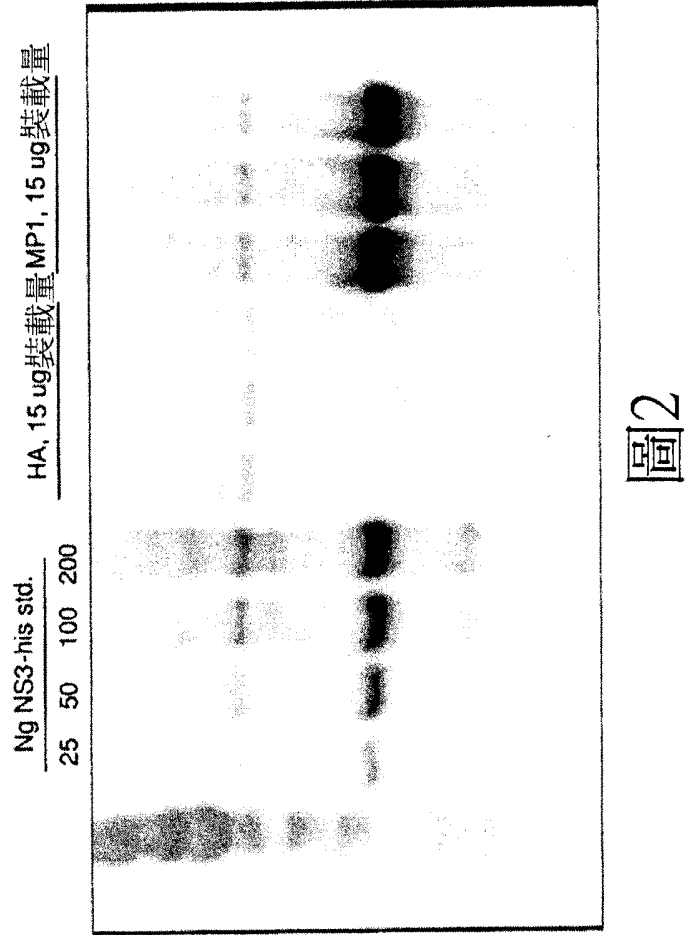


圖2

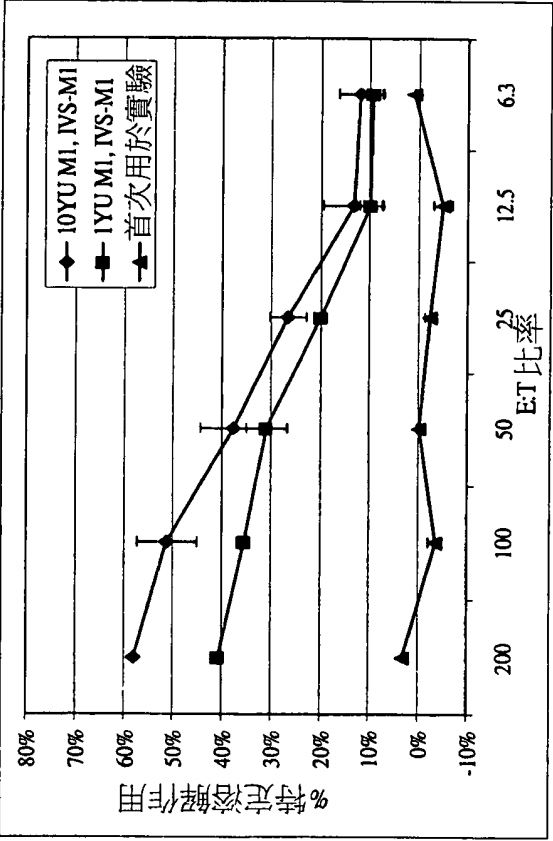


圖3A

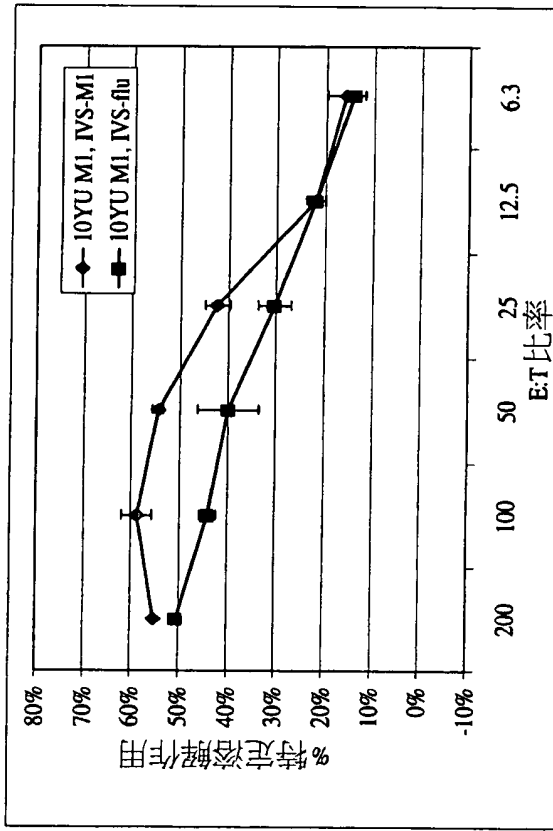


圖3B

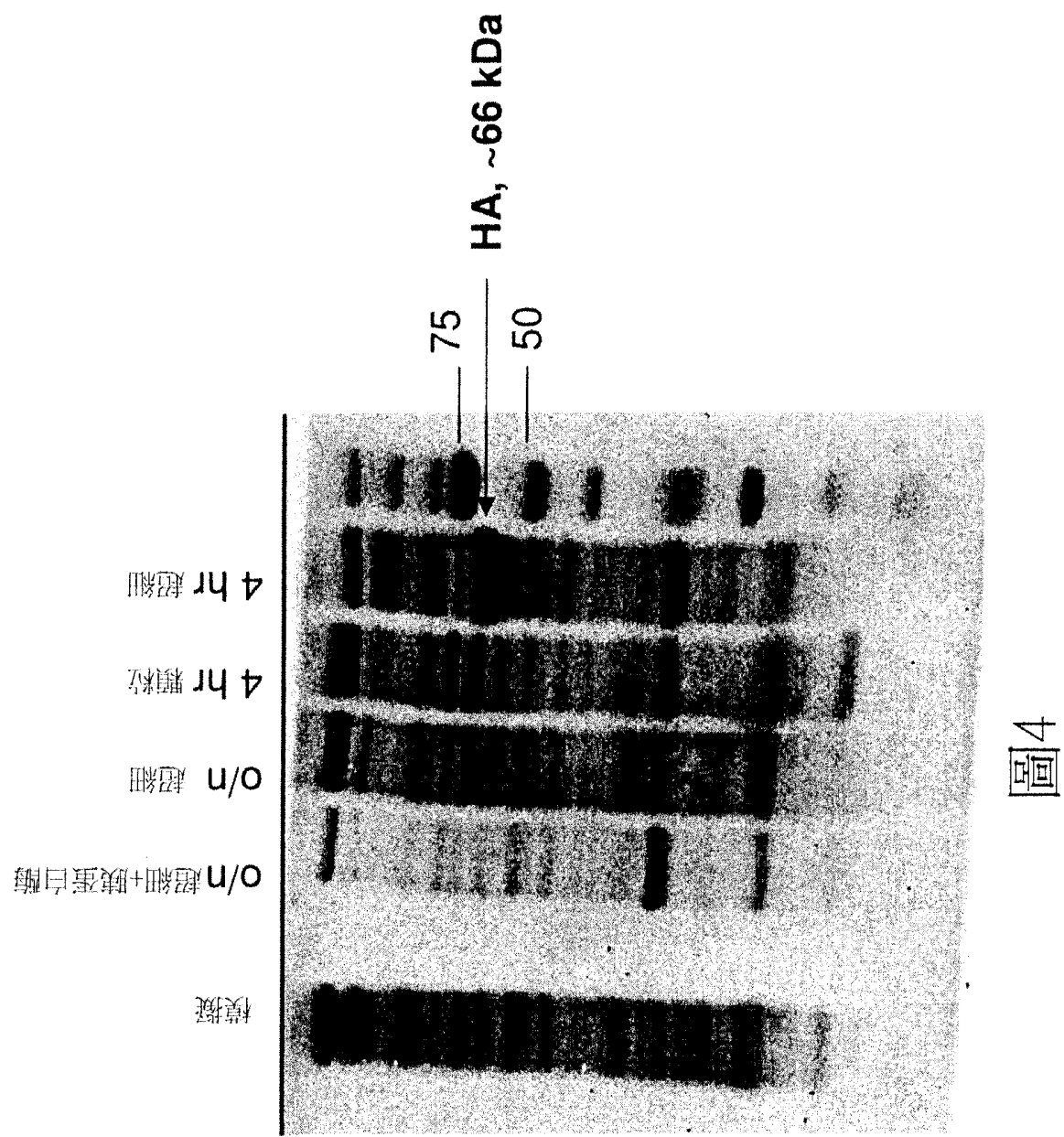
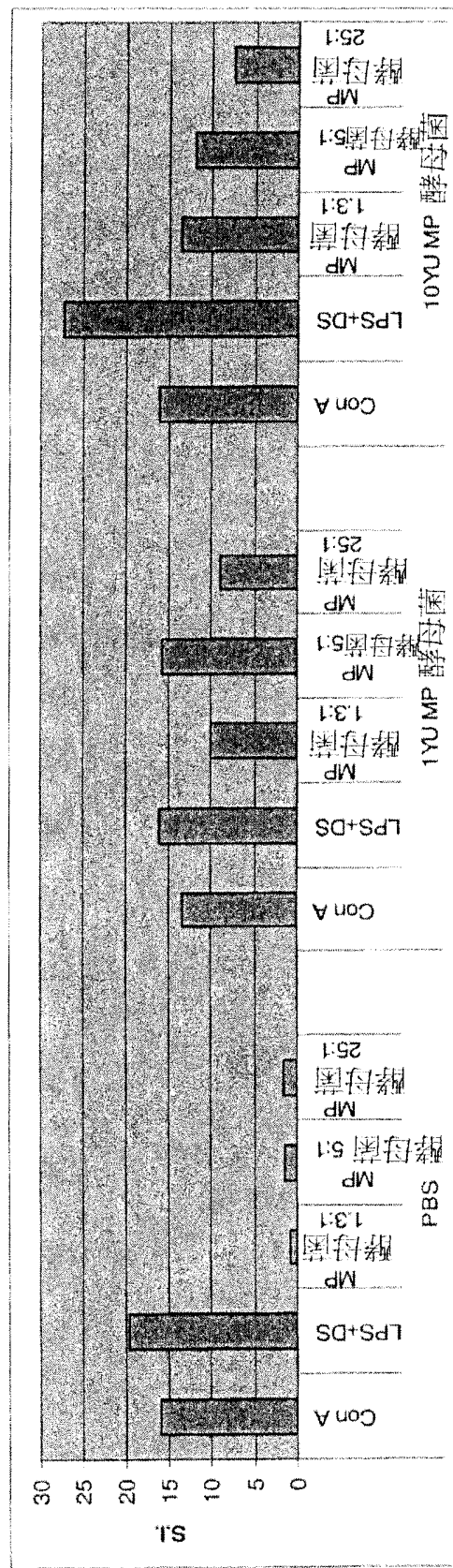
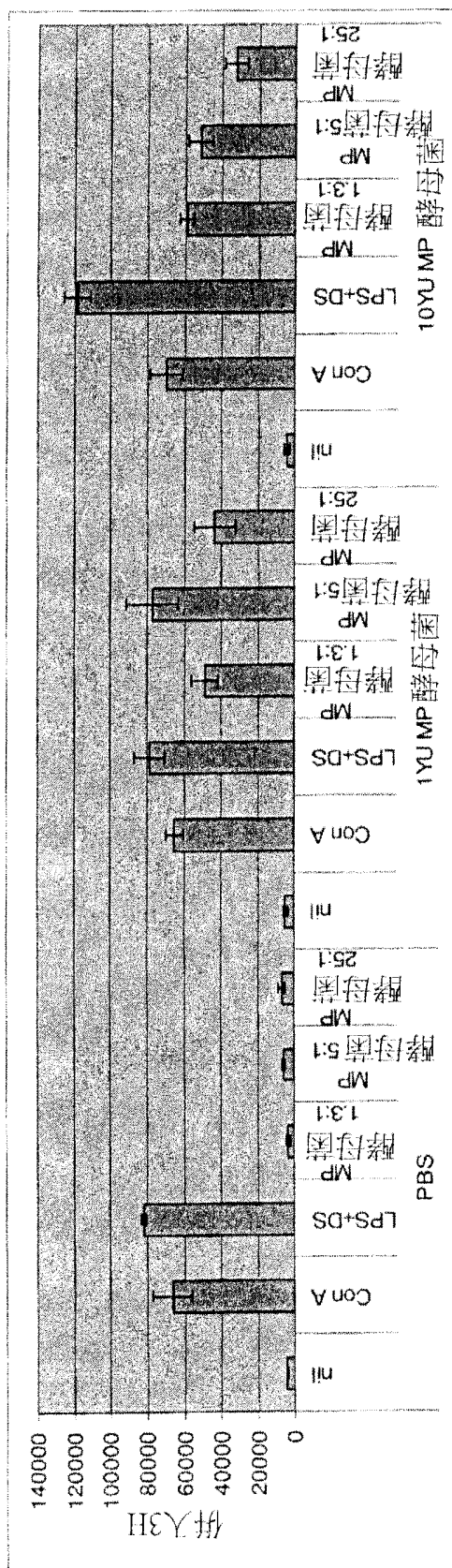
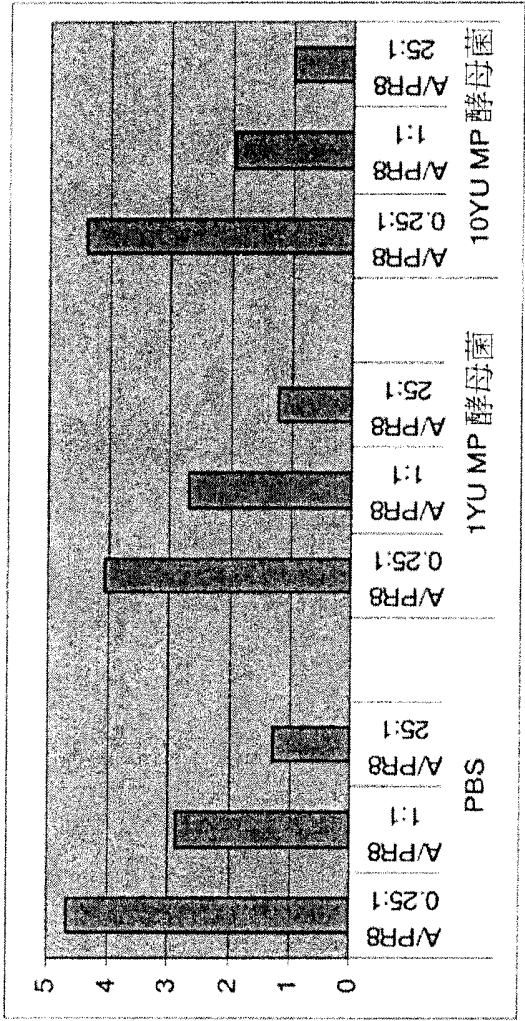


圖4

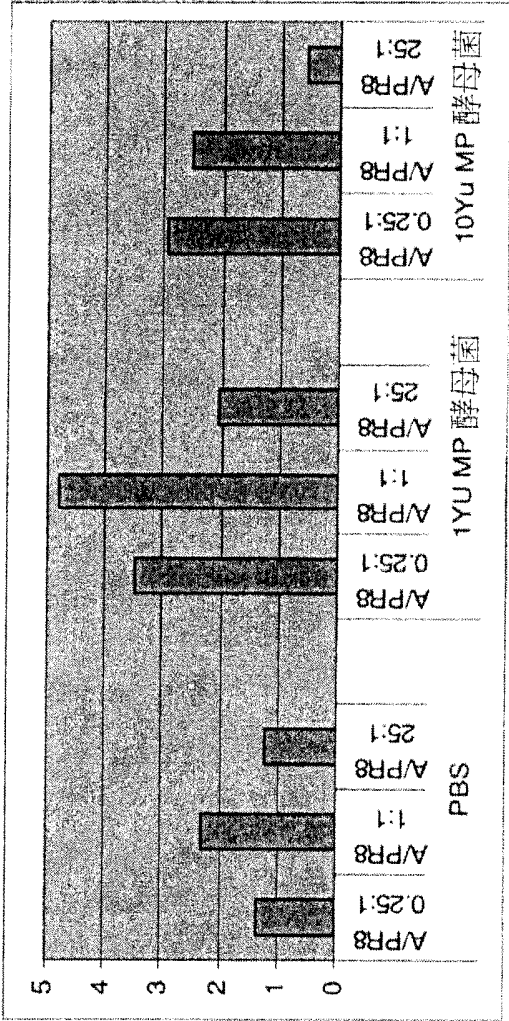


5



第3日

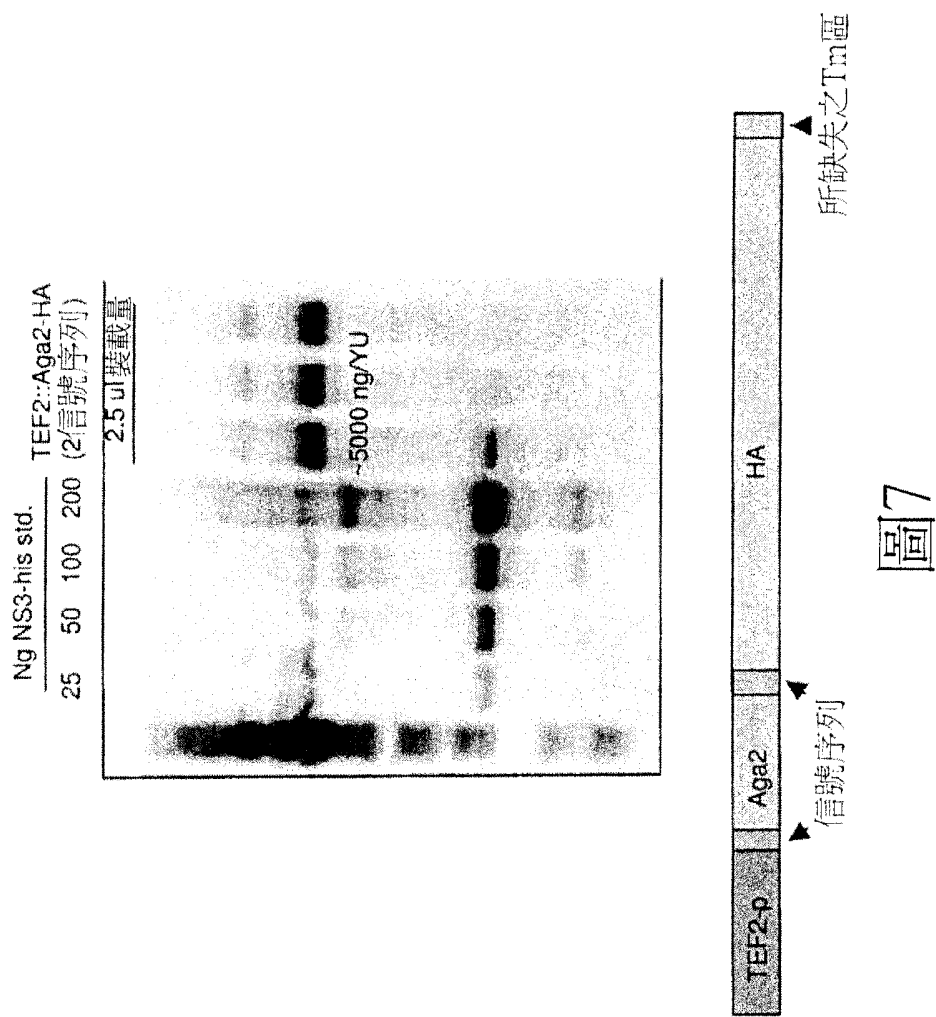
SI



第5日

SI

図6



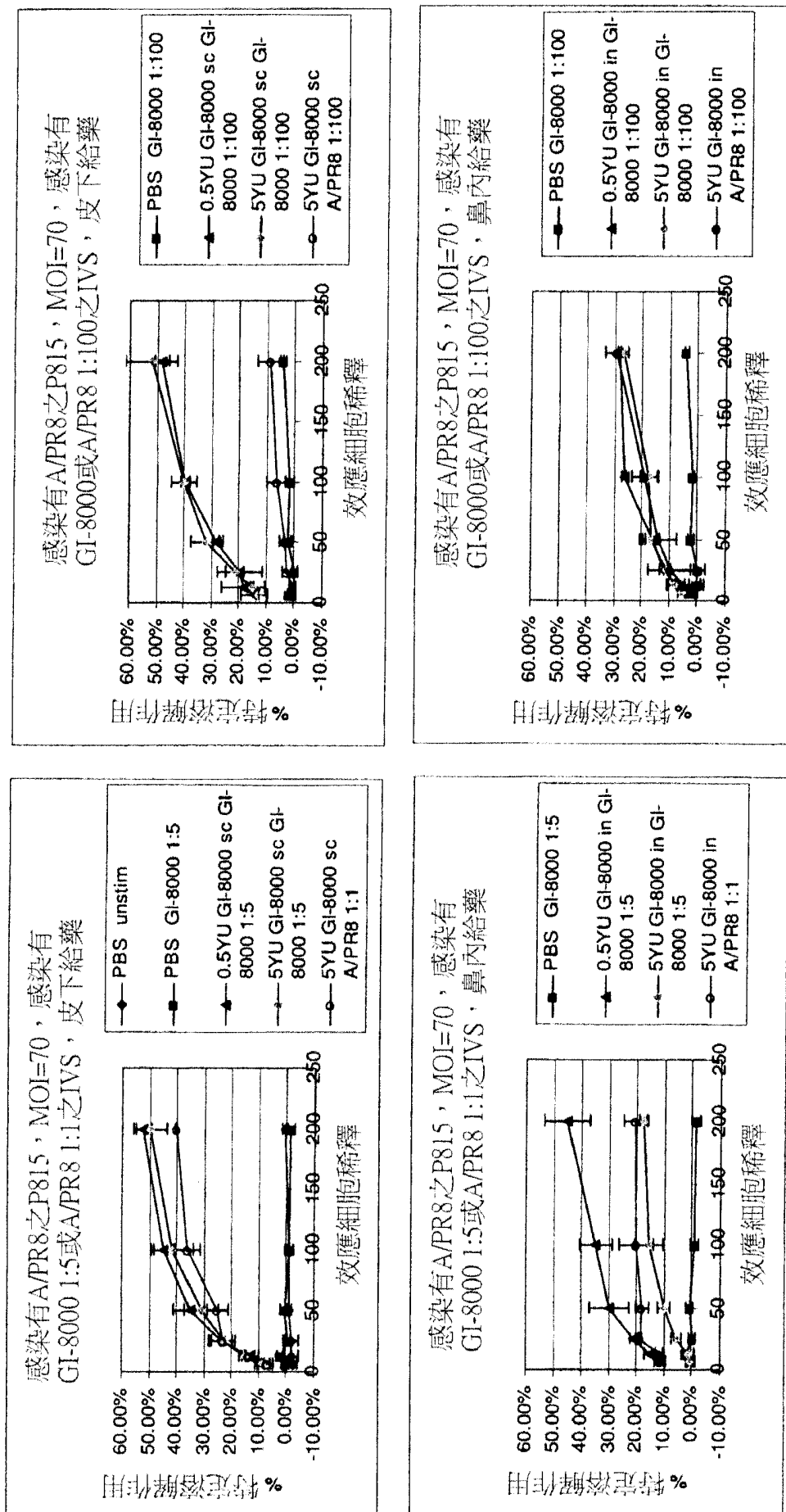


圖8

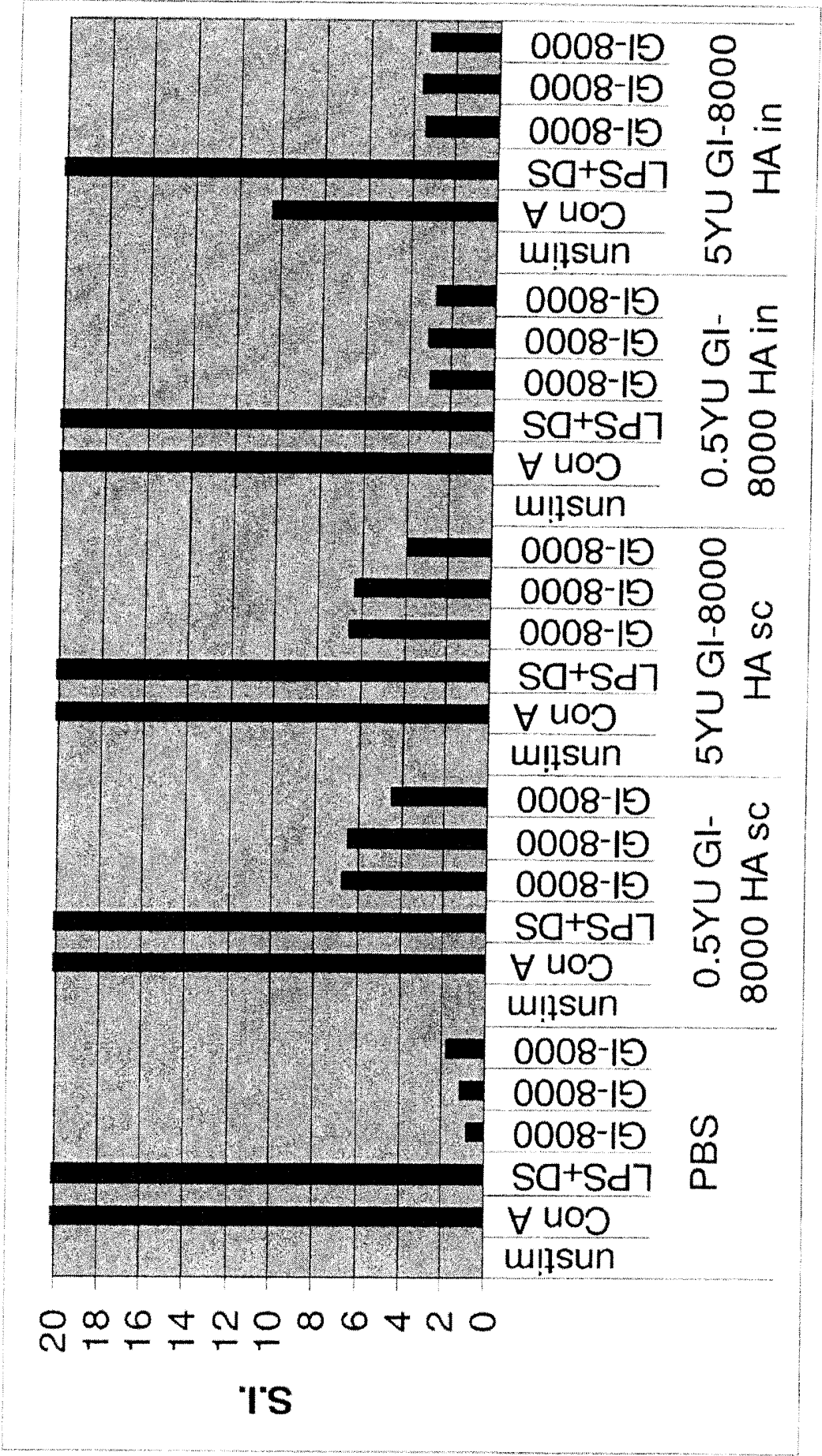
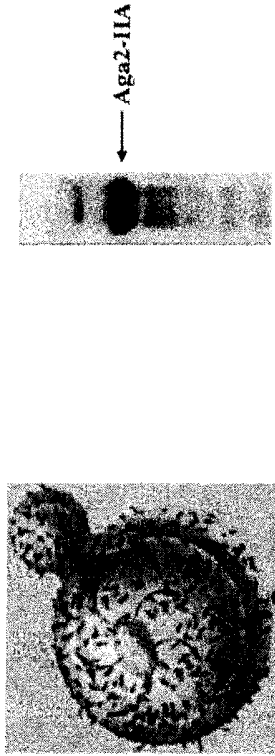
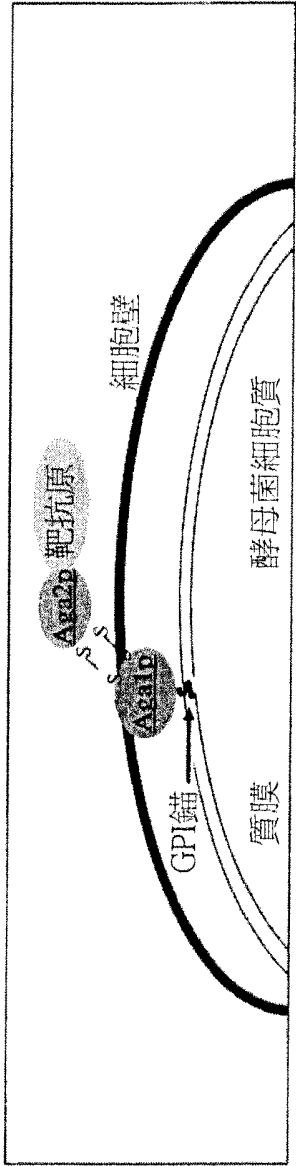


圖9



GI-8003 (原型)：表現於酵母菌中如Aga2-HA
融合蛋白的A/PR/8/34 H1-HA

圖10A

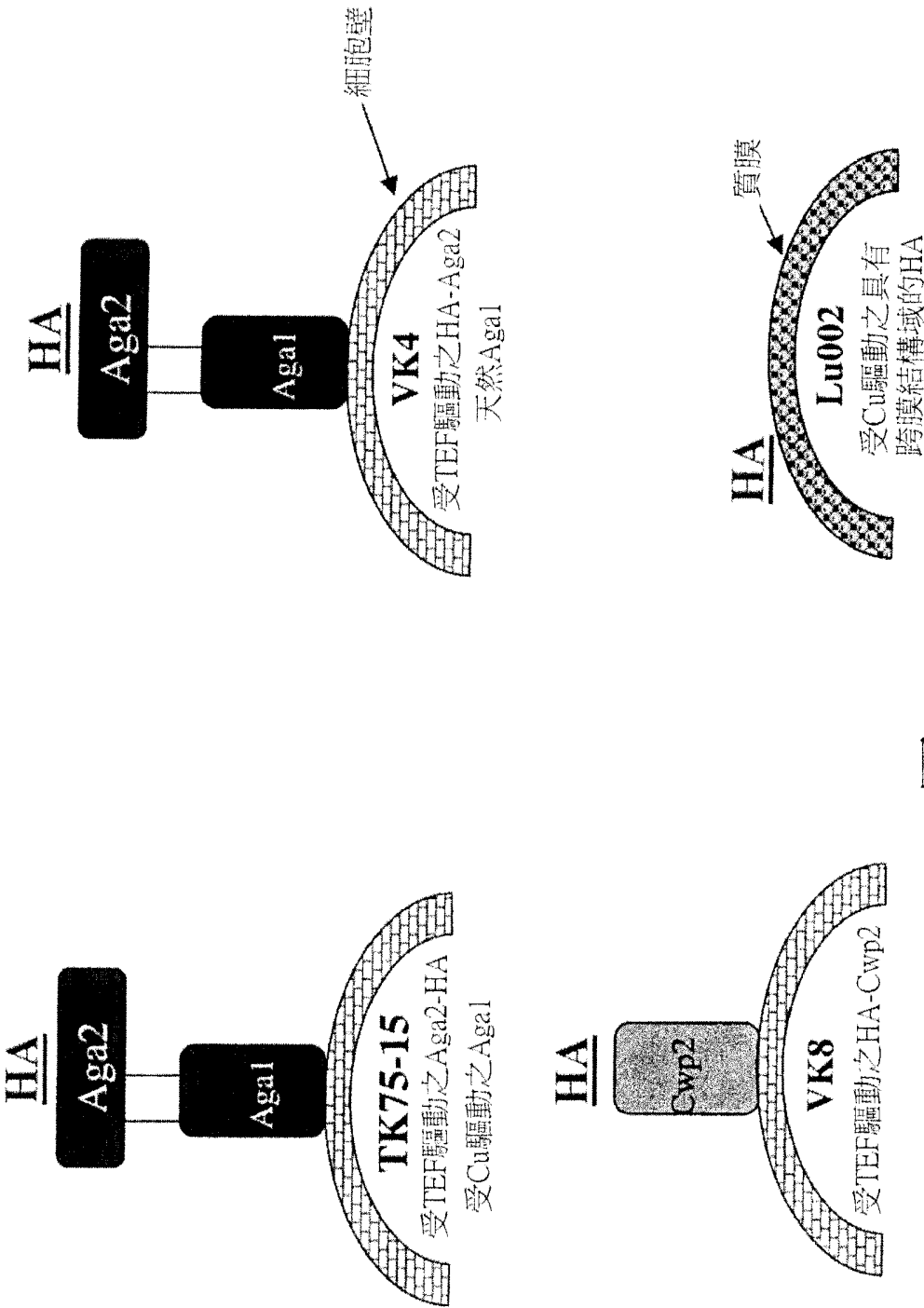
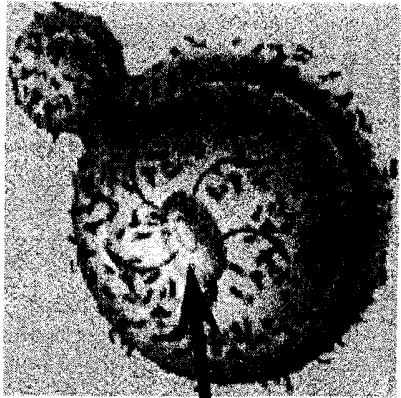
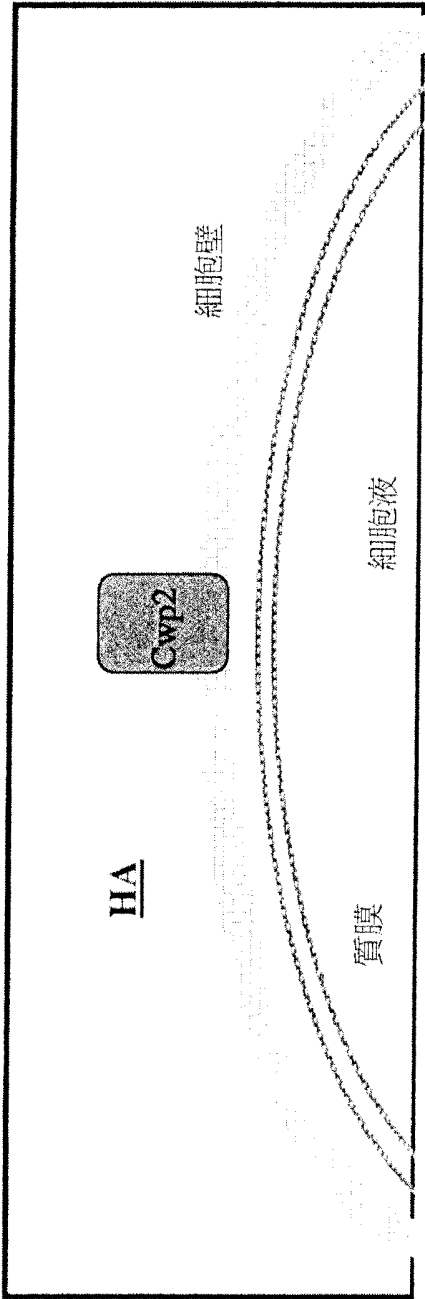


圖10B



HA Cwp2

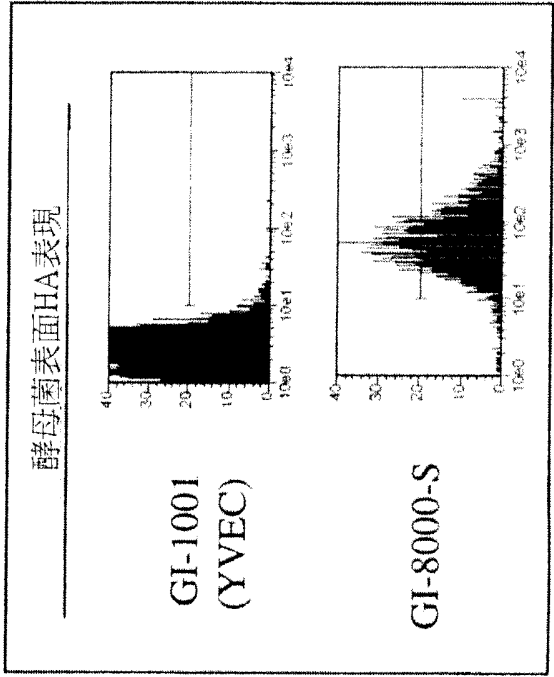
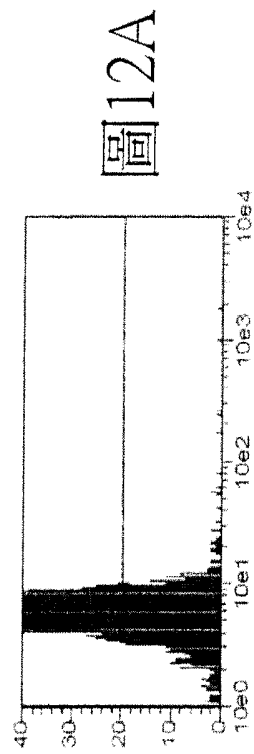


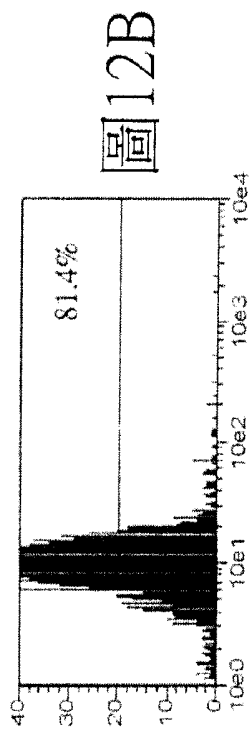
圖11

Aga2 + HA 融合途徑

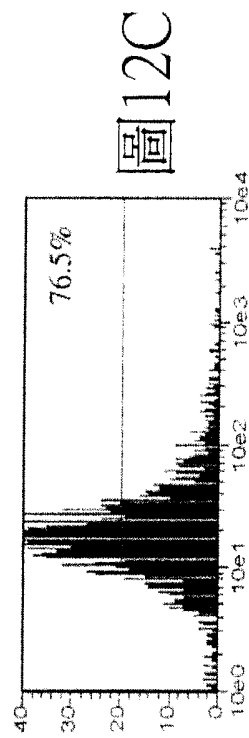
YEX



VK4
(HA-Aga2)



TK75-15
(Aga2-HA)



其他 HA 表現途徑

YEX

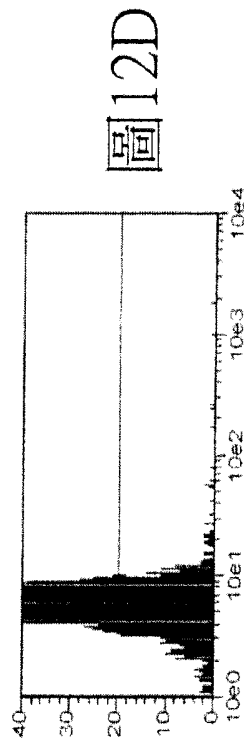


圖12D

VK8
(HA-Cwp2)

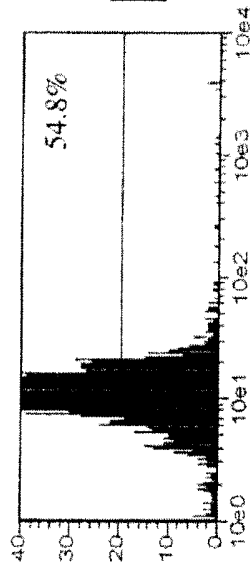


圖12E

VK8
(HA-Cwp2,
脫糖基化)

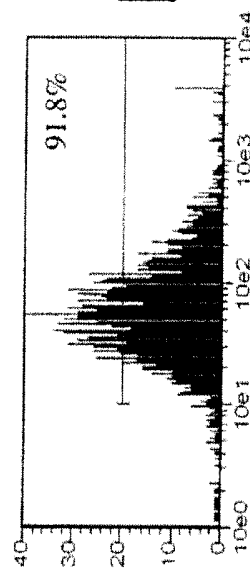


圖12F

原生質球狀態
(Lu002,
PM上之HA)

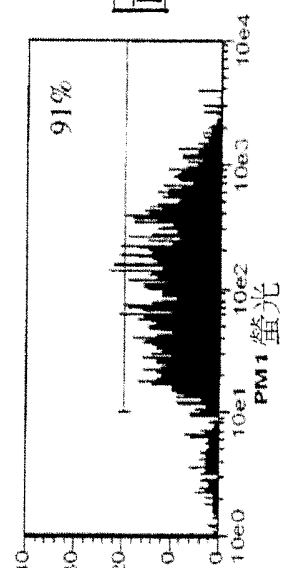
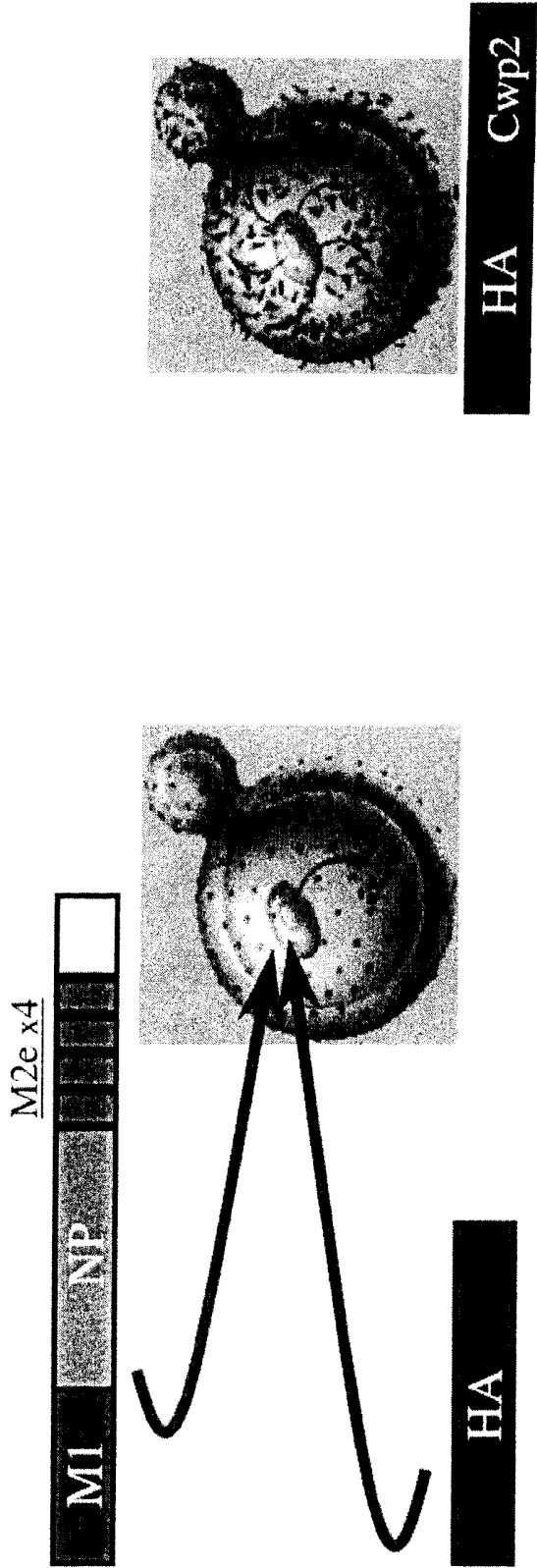
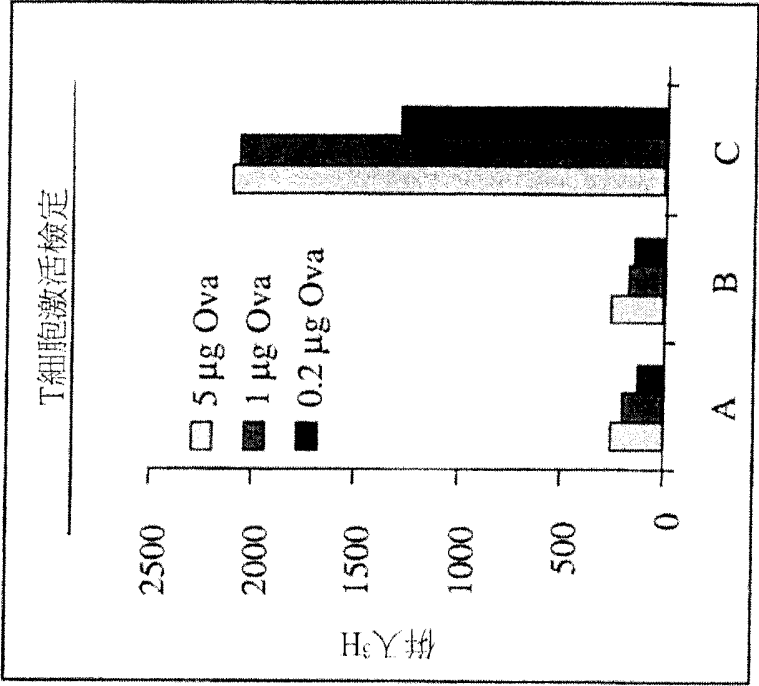
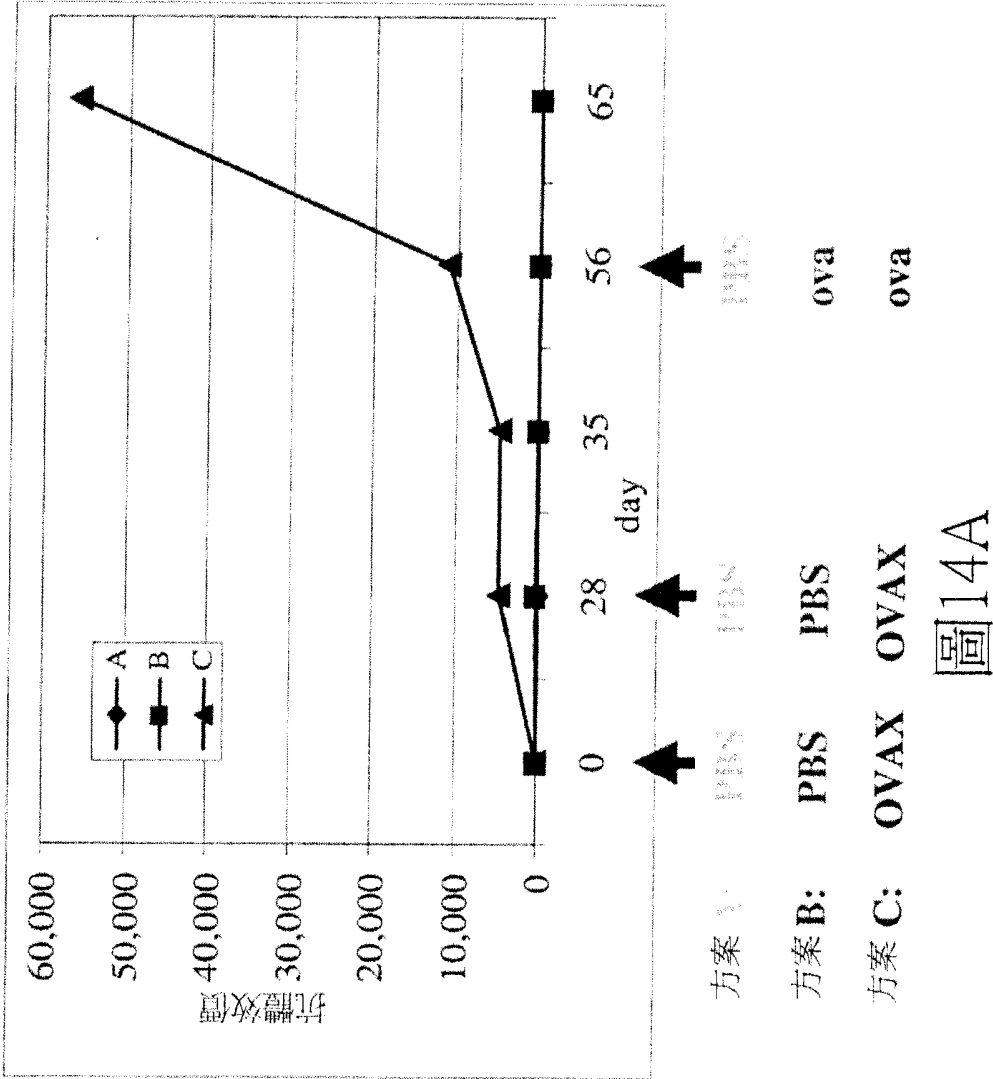


圖12G



GI-8000-S
圖13B

GI-8000-I
圖13A



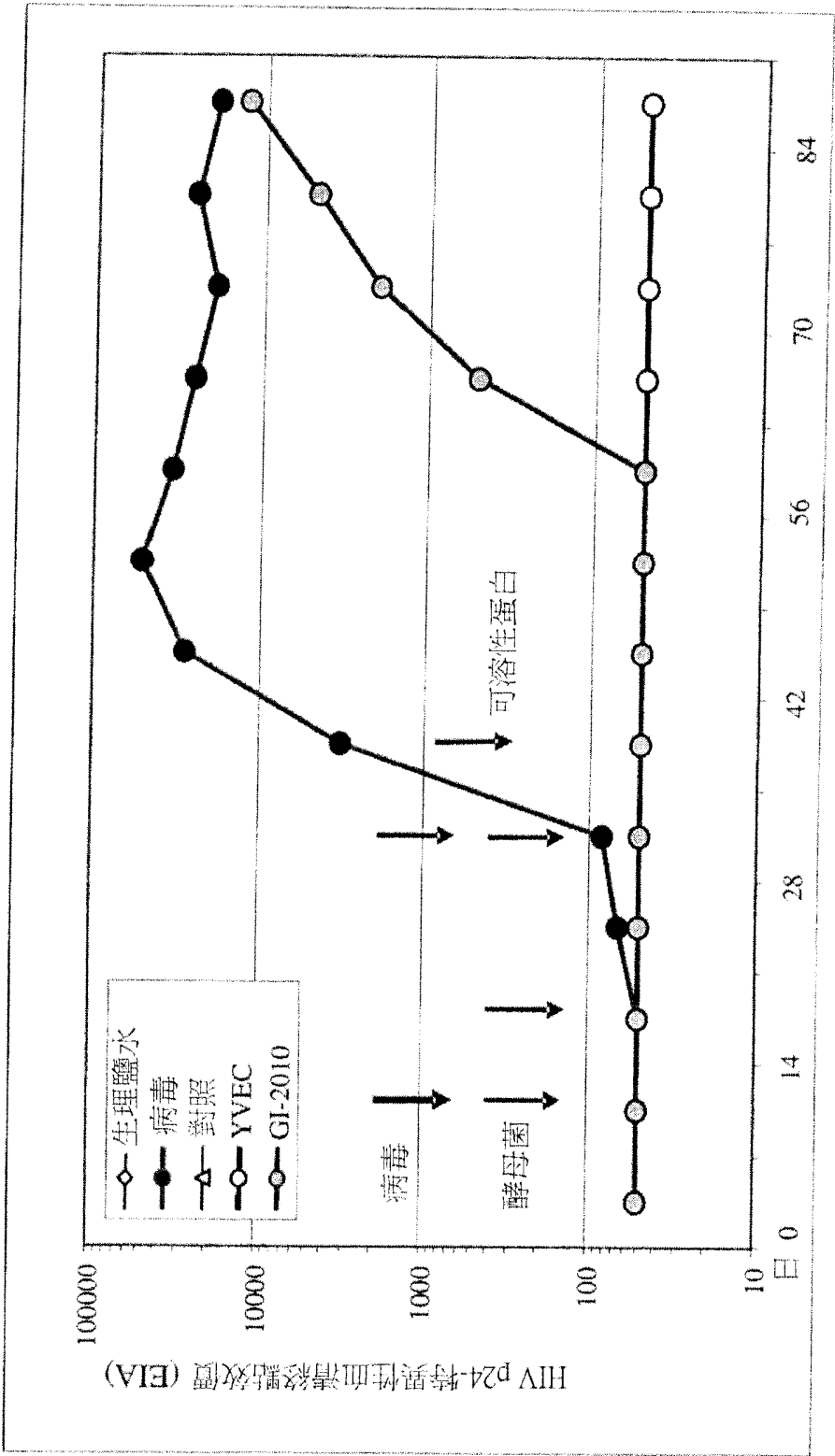
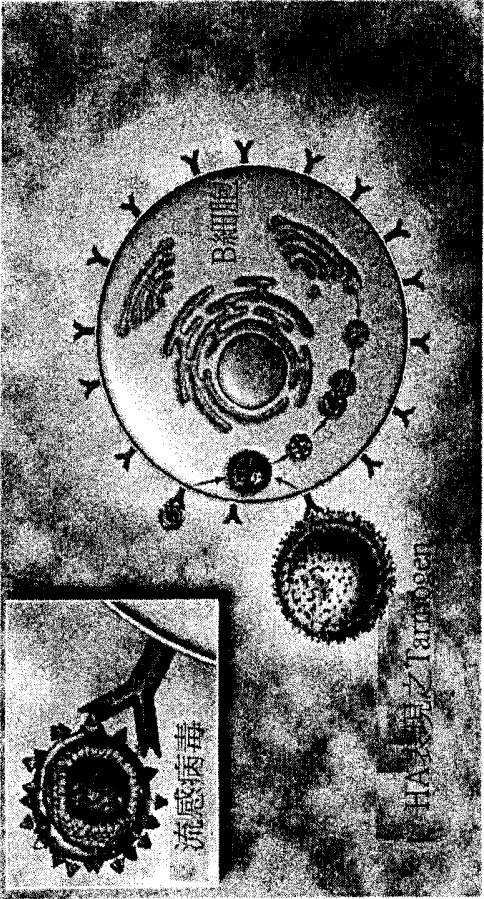
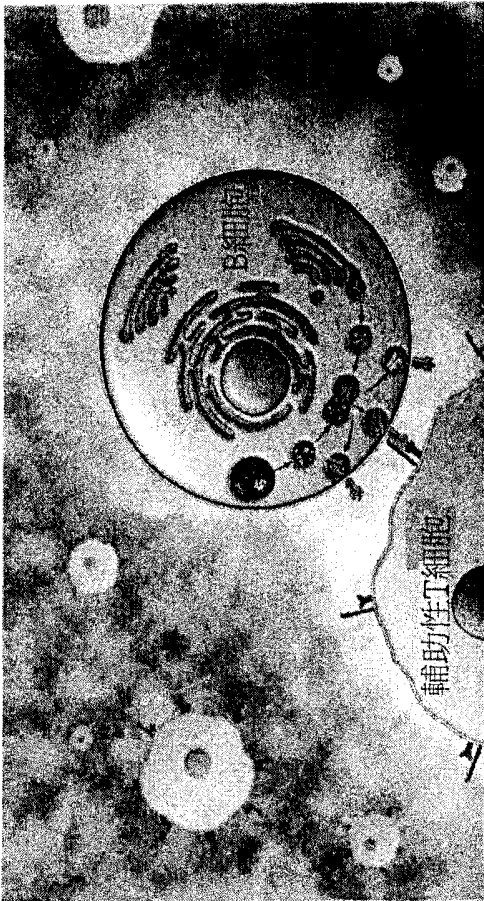


圖15



用於Ab產生之信號1

圖16A



用於Ab產生之信號2

圖16B

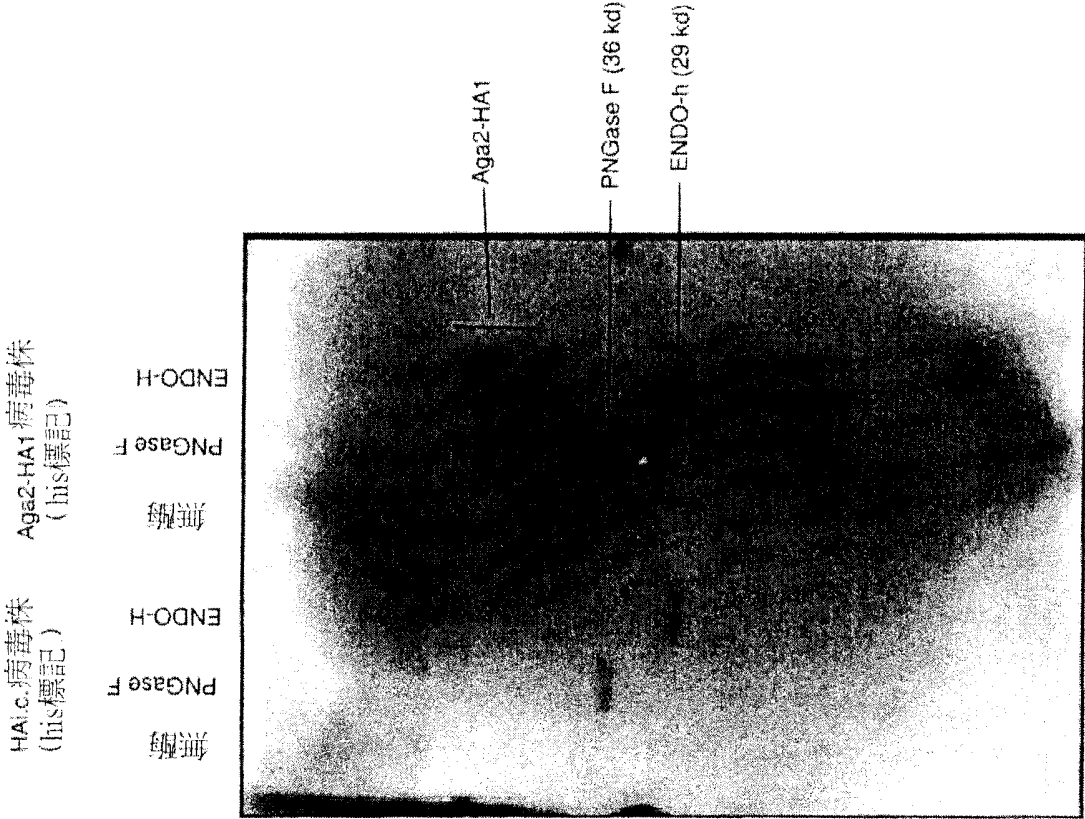


圖17

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 10(A) ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（ 無元件符號說明 ）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（ 無 ）