



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104136456 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201380008469. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 02. 06

C07K 14/11 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/44 (2006. 01)

61/596, 014 2012. 02. 07 US

A61K 39/145 (2006. 01)

A61P 31/16 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/024957 2013. 02. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/119683 EN 2013. 08. 15

(71) 申请人 高等教育联邦系统 - 匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚

(72) 发明人 T·M·罗斯 D·M·卡特

C·J·科雷瓦

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 孙占华 张广育

权利要求书2页 说明书20页

序列表27页 附图4页

(54) 发明名称

以计算方式优化的 H3N2、H2N2 和 B 型流感病毒的广泛反应性抗原

(57) 摘要

本文描述了用于引起针对流感病毒分离株的广泛反应性免疫应答的优化的 H3N2、H2N2 和 B 型流感 HA 多肽的产生。基于 H3N2、H2N2 和 B 型流感分离株,通过一系列的 HA 蛋白比对和随后的共有序列产生,开发了优化的 HA 多肽。本文提供了优化的 H3N2、H2N2 和 B 型流感 HA 多肽以及包含所述 HA 多肽的组合物、融合蛋白和 VLP。本文还提供了编码所述 HA 多肽的密码子优化的核酸序列。本公开内容还提供了在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的方法。

1. 一种重组流感血凝素 (HA) 多肽, 包含:
 - (i) 与 SEQ ID NO:8 的 2-566 位残基至少 97.7% 相同的氨基酸序列;
 - (ii) 与 SEQ ID NO:1 的 2-562 位残基至少 99.6% 相同的氨基酸序列;
 - (iii) 与 SEQ ID NO:2 的 2-562 位残基至少 99.4% 相同的氨基酸序列;
 - (iv) 包含 SEQ ID NO:3 的 2-562 位残基的氨基酸序列;
 - (v) 与 SEQ ID NO:4 的 2-562 位残基至少 99.7% 相同的氨基酸序列;
 - (vi) 与 SEQ ID NO:5 的 2-584 位残基至少 99.6% 相同的氨基酸序列;
 - (vii) 与 SEQ ID NO:6 的 2-585 位残基至少 98.8% 相同的氨基酸序列;
 - (viii) 包含 SEQ ID NO:7 的 2-585 位残基的氨基酸序列;
 - (ix) 与 SEQ ID NO:9 的 2-566 位残基至少 98.4% 相同的氨基酸序列;
 - (x) 与 SEQ ID NO:10 的 2-566 位残基至少 97.8% 相同的氨基酸序列; 或
 - (xi) 与 SEQ ID NO:11 的 2-566 位残基至少 98.9% 相同的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 的流感 HA 多肽, 包含:
 - (i) 与 SEQ ID NO:8 至少 97.7% 相同的氨基酸序列;
 - (ii) 与 SEQ ID NO:1 至少 99.6% 相同的氨基酸序列;
 - (iii) 与 SEQ ID NO:2 至少 99.4% 相同的氨基酸序列;
 - (iv) SEQ ID NO:3 的氨基酸序列;
 - (v) 与 SEQ ID NO:4 至少 99.7% 相同的氨基酸序列;
 - (vi) 与 SEQ ID NO:5 至少 99.6% 相同的氨基酸序列;
 - (vii) 与 SEQ ID NO:6 至少 98.8% 相同的氨基酸序列;
 - (viii) SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;
 - (ix) 与 SEQ ID NO:9 至少 98.4% 相同的氨基酸序列;
 - (x) 与 SEQ ID NO:10 至少 97.8% 相同的氨基酸序列; 或
 - (xi) 与 SEQ ID NO:11 至少 98.9% 相同的氨基酸序列。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的流感 HA 多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列包含:
 - (i) 相对于 SEQ ID NO:8 不多于 10 个氨基酸置换;
 - (ii) 相对于 SEQ ID NO:1 不多于 2 个氨基酸置换;
 - (iii) 相对于 SEQ ID NO:2 不多于 3 个氨基酸置换;
 - (iv) 相对于 SEQ ID NO:4 不多于 1 个氨基酸置换;
 - (v) 相对于 SEQ ID NO:5 不多于 2 个氨基酸置换;
 - (vi) 相对于 SEQ ID NO:6 不多于 7 个氨基酸置换;
 - (vii) 相对于 SEQ ID NO:9 不多于 9 个氨基酸置换;
 - (viii) 相对于 SEQ ID NO:10 不多于 10 个氨基酸置换; 或
 - (ix) 相对于 SEQ ID NO:11 不多于 6 个氨基酸置换。
4. 权利要求 1 的流感 HA 多肽, 其包含 SEQ ID NO:8 的 2-566 位残基、SEQ ID NO:1 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:2 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:4 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:5 的 2-584 位残基、SEQ ID NO:6 的 2-585 位残基、SEQ ID NO:9 的 2-566 位残基、SEQ ID NO:10 的 2-566 位残基或 SEQ ID NO:11 的 2-566 位残基的氨基酸序列。
5. 权利要求 1 的流感 HA 多肽, 其由 SEQ ID NO:8 的 2-566 位残基、SEQ ID NO:1 的

2-562 位残基、SEQ ID NO:2 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:2 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:4 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:5 的 2-584 位残基、SEQ ID NO:6 的 2-585 位残基、SEQ ID NO:7 的 2-585 位残基、SEQ ID NO:9 的 2-566 位残基、SEQ ID NO:10 的 2-566 位残基或 SEQ ID NO:11 的 2-566 位残基的氨基酸序列组成。

6. 权利要求 2 的流感 HA 多肽,其包含 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

7. 权利要求 2 的流感 HA 多肽,其由 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列组成。

8. 编码权利要求 1-7 任一项的流感 HA 多肽的分离的核酸分子。

9. 权利要求 8 的分离的核酸分子,其中所述核酸分子被密码子优化以用于在哺乳动物细胞中表达。

10. 包含权利要求 8 或权利要求 9 的核酸分子的载体。

11. 权利要求 10 的载体,还包含可操作地连接至编码所述流感 HA 多肽的核酸序列的启动子。

12. 包含权利要求 10 或权利要求 11 的载体的分离的细胞。

13. 包含权利要求 1-7 任一项的流感 HA 多肽的流感病毒样颗粒 (VLP)。

14. 权利要求 13 的流感 VLP,还包含流感神经氨酸酶 (NA) 蛋白、流感基质 (M1) 蛋白或其两者。

15. 包含权利要求 1-7 任一项的流感 HA 多肽的流感 VLP,其通过在足以使所述 HA、M1 和 NA 蛋白表达的条件下,使用编码所述 HA 多肽的载体、编码流感 NA 蛋白的载体和编码流感 M1 蛋白的载体转染宿主细胞来产生。

16. 包含权利要求 1-7 任一项的流感 HA 多肽的融合蛋白。

17. 一种组合物,其包含权利要求 1-7 任一项的流感 HA 多肽、权利要求 13-15 任一项的 VLP 或权利要求 16 的融合蛋白,以及可药用载体。

18. 一种在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的方法,包括给予权利要求 1-7 任一项的流感 HA 多肽、权利要求 13-15 任一项的 VLP、权利要求 16 的融合蛋白或权利要求 17 的组合物。

19. 一种针对流感病毒免疫受试者的方法,包括给予所述受试者包含权利要求 13-15 任一项的 VLP 和可药用载体的组合物。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述组合物还包含佐剂。

21. 权利要求 19 或权利要求 20 的方法,其中所述组合物通过肌肉给予。

22. 权利要求 19-21 任一项的方法,其中所述组合物包含约 1- 约 25 μ g 的所述 VLP。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述组合物包含约 15 μ g 的所述 VLP。

以计算方式优化的 H3N2、H2N2 和 B 型流感病毒的广泛反应性抗原

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2012 年 2 月 7 日提交的美国临时申请 No. 61/596,014 的优先权,所述临时申请以引用的方式全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及可引起针对 H3N2、H2N2 或 B 型流感病毒的广泛反应性的免疫应答的优化的流感血凝素蛋白及其作为疫苗的用途。

背景技术

[0004] 流感病毒是正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) 家族的成员。有三个亚型的流感病毒,命名为 A 型流感、B 型流感和 C 型流感。所述流感病毒粒体含有分段的负义 (negative sense) RNA 基因组,所述基因组编码以下蛋白:血凝素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质 (M1)、质子离子通道蛋白 (M2)、核蛋白 (NP)、聚合酶碱性蛋白 1 (PB1)、聚合酶碱性蛋白 2 (PB2)、聚合酶酸性蛋白 (PA) 和非结构蛋白 2 (NS2)。HA、NA、M1 和 M2 为膜相关蛋白,而 NP、PB1、PB2、PA 和 NS2 为核衣壳相关蛋白。M1 蛋白是流感颗粒中最丰富的蛋白质。HA 和 NA 蛋白是包膜糖蛋白,负责病毒吸附和病毒颗粒侵入细胞,并且是用于病毒中和及保护性免疫的主要免疫显性表位的来源。HA 和 NA 蛋白都被认为是预防性流感疫苗的最重要组分。

[0005] 每年,季节性流感仅在美国就导致超过 300,000 例入院和 36,000 例死亡 (Simonsen et al., Lancet Infect Dis 7:658-66, 2007)。2009 年新型 H1N1 流感病毒的出现证明了新的流感大流行可如何快速地横扫全球。H3N2 流感毒株可感染鸟类和哺乳动物,并在季节性流感中 H3N2 流感正在变得越来越丰富。H2N2 是之前已经引起人类大流行的另一种流感亚型。H2N2 毒株引起了 1957 年的亚洲大流行。B 型流感病毒是另一种流感亚型,该病毒感染人类并代表季节性流感的一个重要病因,但是由于它的受限的宿主范围 (人和海豹),尚未得知其能够引起大流行。

[0006] 目前在美国有两种获得批准的流感疫苗方法——灭活的裂解疫苗和减毒活病毒疫苗。灭活疫苗可有效地诱导体液免疫应答,但通常只有弱的细胞免疫应答。活病毒疫苗不能给予免疫妥协的或怀孕的患者,因为这些患者具有增加的感染风险。因此,存在对广泛保护性的流感病毒疫苗的需求。

发明内容

[0007] 本文公开了用于引起针对流感病毒的广泛反应性免疫应答的以计算方式优化的 H2N2、H3N2 和 B 型流感 HA 多肽的产生。基于选择的 H2N2、H3N2 和 B 型流感病毒分离株,通过一系列的 HA 蛋白比对和随后的共有序列产生,开发了所述优化的 HA 多肽。

[0008] 本文提供了用于引起针对 H2N2、H3N2 和 B 型流感的广泛反应性免疫应答的具有优化的氨基酸序列的重组流感 HA 多肽。在一些实施方案中,所述 HA 多肽包含:与 SEQ ID

NO:1 至少 99.6%相同、与 SEQ ID NO:2 至少 99.4%相同、与 SEQ ID NO:4 至少 99.7%相同、与 SEQ ID NO:5 至少 99.6%相同、与 SEQ ID NO:6 至少 98.8%相同、与 SEQ ID NO:8 至少 99.7%相同、与 SEQ ID NO:9 至少 98.4%相同、与 SEQ ID NO:10 至少 97.8%相同或与 SEQ ID NO:11 至少 98.9%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述多肽的氨基酸序列包含:与 SEQ ID NO:1 相比不多于 2 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:2 相比不多于 3 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:4 相比不多于 1 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:5 相比不多于 2 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:6 相比不多于 7 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:8 相比不多于 10 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:9 相比不多于 9 个氨基酸置换;与 SEQ ID NO:10 相比不多于 10 个氨基酸置换;或与 SEQ ID NO:11 相比不多于 6 个氨基酸置换。在一些实施方案中,所述流感 HA 多肽没有 N-末端的甲硫氨酸残基。

[0009] 本公开内容还提供了编码所述重组 HA 多肽的分离的核酸分子和载体。还提供了包含所述载体的分离的细胞。

[0010] 还提供了包含本文公开的优化的 HA 多肽的流感病毒样颗粒 (VLP) 和融合蛋白。

[0011] 还提供了包括在可药用载体中的本文公开的优化的流感 HA 多肽、融合蛋白或 VLP 的组合物。本公开内容还提供了通过给予所公开的组合物、融合蛋白或 VLP 在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的方法。

[0012] 还提供了通过给予受试者包含含有优化的 HA 多肽的 VLP 的组合物而使所述受试者对流感病毒免疫的方法。

[0013] 根据以下参照附图进行的详细描述,本发明的上述和其他目的、特征和优点会变得更加清楚。

附图说明

[0014] 图 1 的示意图概述了根据实施例 1 所描述的方法 2 产生 H2N2 流感 COBRA HA 序列的方法。

[0015] 图 2 的示意图概述了根据实施例 1 所描述的方法 3 产生 H2N2 流感 COBRA HA 序列的方法。

[0016] 图 3 的示意图概述了根据实施例 2 所描述的方法 2 产生 B 型流感 COBRA HA 序列的方法。

[0017] 图 4 的示意图概述了根据实施例 2 所描述的方法 3 产生 B 型流感 COBRA HA 序列的方法。

[0018] 图 5 的示意图概述了根据实施例 3 所描述的方法 1 产生 H3N2 流感 COBRA HA 序列的方法。

[0019] 图 6 的示意图概述了根据实施例 3 所描述的方法 2 产生 H3N2 流感 COBRA HA 序列的方法。

[0020] 图 7 的示意图概述了根据实施例 3 所描述的方法 3 产生 H3N2 流感 COBRA HA 序列的方法。

[0021] 图 8 的示意图概述了根据实施例 3 所描述的方法 4 产生 H3N2 流感 COBRA HA 序列的方法。

[0022] 序列表

[0023] 列于所附序列列表中的核酸和氨基酸序列是使用在 37 C.F.R. 1.822 中定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母编码显示。只显示每条核酸序列的一条链,但是应理解任何提及所示链时均包括其互补链。所述序列列表以创建于 2013 年 1 月 30 日的 53.7 KB 的 ASCII 文本文件提交,以引用的方式纳入本文。在所附序列列表中:

[0024] SEQ ID NO:1-4 为 H2N2 流感 HA 的 COBRA 氨基酸序列。

[0025] SEQ ID NO:5-7 为 B 型流感 HA 的 COBRA 氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO:8-11 为 H3N2 流感 HA 的 COBRA 氨基酸序列。

具体实施方式

[0027] I. 缩写

[0028] COBRA :以计算方式优化的广泛反应性抗原

[0029] HA :血凝素

[0030] HAI :血凝抑制

[0031] HRP :辣根过氧化物酶

[0032] M1 :基质蛋白 1

[0033] NA :神经氨酸酶

[0034] PFU :空斑形成单位

[0035] VLP :病毒样颗粒

[0036] II. 术语和方法

[0037] 除非另有说明,技术术语以常规用法使用。分子生物学中的常用术语的定义可见于 Benjamin Lewin, genesV, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和 Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0038] 为了便于阅读本公开内容的各个实施方案,提供了以下对具体术语的解释:

[0039] 佐剂:非特异性增强对抗原的免疫应答的物质或载体。佐剂可包括其上吸附有抗原的矿物质(明矾、氢氧化铝或磷酸盐)悬液;或其中抗原溶液乳化在矿物油中的油包水乳剂(例如,弗氏不完全佐剂),有时包括灭活的分枝杆菌(mycobacteria)(弗氏完全佐剂)以进一步增强抗原性。免疫刺激寡核苷酸(例如包括 CpG 基序的那些)也可用作佐剂(例如,参见美国专利号 6,194,388;6,207,646;6,214,806;6,218,371;6,239,116;6,339,068;6,406,705;和 6,429,199)。佐剂还包括生物分子,例如共刺激分子。示例性生物佐剂包括 IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L 和 41 BBL。

[0040] 给药:如本文使用的,给予受试者组合物是指给予、施用所述组合物或使其与所述受试者接触。给药可通过许多途径中的任一种来完成,例如,局部、口服、皮下、肌肉、腹膜内、静脉内、鞘内和真皮内给药。

[0041] 抗体:由 B 淋巴细胞产生的具有特定氨基酸序列的免疫球蛋白分子。抗体在人或其他动物中由特定抗原(免疫原)诱发。抗体是通过以某些可证明的方式与抗原进行特异

性反应来表征,抗体和抗原各自以对方来定义。“引起抗体应答”是指抗原或其他分子诱导抗体产生的能力。

[0042] 抗原:可在动物中刺激抗体产生或 T 细胞应答的化合物、组合物或物质,包括注射或吸收到动物中的组合物。抗原与特定体液或细胞免疫的产物(包括由异源性免疫原诱导的那些)反应。在所公开的组合物和方法的一些实施方案中,所述抗原为流感 HA 蛋白。

[0043] 密码子优化的:“密码子优化的”核酸是指已经被改变使得密码子最适于在具体系统(例如具体物种或物种群)中表达的核酸序列。例如,核酸序列可被优化用于在哺乳动物细胞中表达。密码子优化不改变所编码的蛋白质的氨基酸序列。

[0044] 融合蛋白:通过表达从编码两种不同(异源)蛋白质的至少一部分的核酸序列改造的核酸序列而产生的蛋白质。为了产生融合蛋白,所述核酸序列必须在相同的读码框内并且不包含内部的终止密码子。例如,融合蛋白可包括融合至异源蛋白的流感 HA。

[0045] 血凝素(HA):流感病毒表面糖蛋白。HA 介导病毒颗粒结合到宿主细胞和随后的病毒进入所述宿主细胞。本领域已知并可公开获得许多流感 HA 蛋白的核苷酸和氨基酸序列,例如通过 NCBI 流感病毒资源数据库(Bao et al., J Virol 82:596-601, 2008)。HA(和 NA 一起)是两个主要的流感病毒抗原决定簇之一。

[0046] 免疫应答:免疫系统的细胞(例如 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞或多形核细胞)对刺激物(例如抗原或疫苗)的应答。免疫应答可包括参与宿主防卫反应的机体的任何细胞,包括例如,分泌干扰素或细胞因子的上皮细胞。免疫应答包括但不限于先天免疫应答或炎症。如本文所使用的,保护性免疫应答是指保护受试者免受感染(预防感染或预防与感染相关的疾病的发生)的免疫应答。测量免疫应答的方法在本领域中已知,包括例如测量淋巴细胞(例如 B 细胞或 T 细胞)的增殖和/或活性、细胞因子或趋化因子的分泌、炎症、抗体产生等等。

[0047] 免疫原:在合适的条件下能够刺激产生免疫应答(例如在动物中产生抗体或 T 细胞应答)的化合物、组合物或物质,包括注射或吸收到动物中的组合物。本文所使用的“免疫原性组合物”是包含免疫原(例如 HA 多肽)的组合物。

[0048] 免疫:使受试者受到保护免患传染性疾病,例如通过疫苗接种。

[0049] 流感病毒:属于正粘病毒科家族的分段的负链 RNA 病毒。有 A、B 和 C 三种类型的流感病毒。A 型流感病毒感染多种鸟和哺乳动物,包括人、马、海洋哺乳动物、猪、雪貂和鸡。在动物中,大多数 A 型流感病毒引起温和的呼吸道和肠道的局部感染。然而,高致病性 A 型流感毒株(例如 H5N1)引起家禽的全身感染,其中死亡率可达到 100%。2009 年, H1N1 流感是人流感的最常见病因。2009 年出现的起源于猪的 H1N1 的新毒株,并被世界卫生组织宣布为大范围流行的。该毒株被称为“猪流感”。H1N1 A 型流感病毒还是 1918 年的西班牙流感大流行、1976 年的迪克斯堡(Fort Dix)大爆发和 1977-1978 年的俄罗斯流感大流行的病因。H3N2、H2N2 和 B 型流感病毒也感染人并且是季节性流感的致病因子。

[0050] 分离的:“分离的”生物组分(例如核酸、蛋白质或病毒)已经基本上从其他生物组分(例如细胞碎片,或其他蛋白质或核酸)中分离或纯化。已经被“分离的”生物组分包括那些通过常规纯化方法纯化的组分。该术语还包括重组核酸、蛋白质或病毒(或 VLP),以及化学方法合成的核酸或肽。

[0051] 接头:在融合蛋白的两个多肽之间充当间隔物的一个或多个氨基酸。

[0052] 基质 (M1) 蛋白:存在于病毒包膜中的流感病毒结构蛋白。M1 被认为在装配和出芽中起作用。

[0053] 神经氨酸酶 (NA):一种流感病毒膜糖蛋白。NA 是通过在被感染细胞表面上的碳水化合物部分切割末端的唾液酸残基,参与破坏病毒 HA 的细胞受体。NA 还从病毒蛋白上切割唾液酸残基,防止病毒聚集。NA (和 HA 一起) 为两种主要的流感病毒抗原决定簇之一。

[0054] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列以有功能的关系放置时,所述第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则所述启动子可操作地连接于所述编码序列。可操作地连接的 DNA 序列通常是连续的,并且当需要连接两个蛋白编码区域时则位于相同的读码框中。

[0055] 优化的流感 HA 蛋白:如本文所使用的,“优化的流感 HA 蛋白”是指通过对 H2N2、H3N2 或 B 型流感病毒分离株进行序列比对而产生的 HA 蛋白共有序列(如下文实施例 1-3 所描述)。可通过密码子优化和 RNA 优化(例如以增加 RNA 稳定性)可将编码优化的 HA 蛋白的核苷酸序列进一步优化以用于在哺乳动物细胞中表达。本文公开(并且如本文 SEQ ID NO:1-11 所示)的优化的流感 HA 蛋白也称作“COBRA”(以计算方式优化的广泛反应性抗原)序列。设计优化的 HA 多肽以用于在受试者中引起广泛反应性免疫应答。在本公开内容的上下文中,“广泛反应性”意指所述蛋白序列在受试者中引起足以抑制、中和或预防众多流感病毒(例如特定亚型中的大多数或全部流感病毒)的感染的免疫应答。在一些实例中,所述优化的流感 HA 蛋白能够引起针对大多数或全部 H3N2 流感病毒分离株、大多数或全部 H2N2 流感病毒分离株、或者大多数或全部 B 型流感病毒分离株的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0056] 爆发:如本文所使用的,流感病毒“爆发”是指在给定年份中来自单个国家的病毒分离株的集合。

[0057] 可药用载体:可在本公开内容中使用的可药用载体(carrier 或 vehicle)是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第 15 版, (1975), 记载了适于一种或多种治疗组合物(例如一种或多种流感疫苗)以及其他的药剂的药物递送的组合物和制剂。

[0058] 通常,所述载体的性质会取决于采用的具体给药模式。例如,肠胃外制剂常常包含可注射流体作为载体,所述可注射流体包括可药用和生理上可接受的流体例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如,粉剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的无毒固体载体可包括,例如药品级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性的载体之外,待给予的药物组合物可含有少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和 pH 缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0059] 多肽:其中单体为通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当所述氨基酸为 α -氨基酸时,可使用 L-光学异构体或 D-光学异构体。本文所用的术语“多肽”或“蛋白质”意图包括任何氨基酸序列和包括修饰的序列例如糖蛋白。术语“多肽”特别意欲覆盖天然存在的蛋白质,以及重组或合成方法产生的那些。术语“残基”或“氨基酸残基”包括提及整合入蛋白质、多肽或肽中的氨基酸。

[0060] 保守性氨基酸置换是当进行氨基酸置换时对原始蛋白质的性质有最少干扰的那些置换,即,所述蛋白的结构,特别是功能是保守的,且没有被这些置换显著改变。保守性置

换的实例如下文所示。

[0061]

原始残基	保守性置换
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0062] 保守性置换通常保持了 (a) 在置换区域中多肽骨架的结构, 例如, 为片层或螺旋构象, (b) 在靶位点处分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链体积。

[0063] 通常预期在蛋白质性质上产生最大变化的置换会是不保守的, 例如发生如下改变 (a) 亲水残基例如丝氨酰基或苏氨酰基置换 (或置换为) 疏水残基例如亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基; (b) 半胱氨酸或脯氨酸置换 (或置换为) 任何其他残基; (c) 具有带正电荷的侧链的残基例如赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基置换 (或置换为) 带负电荷的残基例如谷氨酰基、天冬氨酰基; 或 (d) 具有庞大侧链的残基例如苯丙氨酸置换 (或置换为) 没有侧链的残基例如甘氨酸。

[0064] 预防、治疗或减轻疾病: “预防” 疾病是指抑制疾病的全面发生。“治疗” 是指当疾病已经开始发生后减轻疾病或病理病症的征象或症状的治疗干预。“减轻” 是指减少疾病征象或症状的数量或严重程度。

[0065] 启动子: 启动子是指指导核酸转录的核酸控制序列的阵列。启动子包括在转录起始位点附近的必需核酸序列。启动子还任选地包括远端增强子或抑制子元件。“组成型启动子” 是连续地有活性且不受外部信号或分子调节的启动子。相反, “诱导型启动子” 的活性受外部信号或分子 (例如转录因子) 调节。在本文的一些实施方案中, 所述启动子为 CMV 启动子。

[0066] 纯化的: 术语“纯化的” 不需要绝对的纯净; 而是意欲作为相对的概念。因此, 例如, 纯化的肽、蛋白质、病毒、VLP 或其他活性化合物是全部或部分从天然相关的蛋白质和其他污染物中分离的。在某些实施方案中, 术语“基本上纯化的” 是指已经从细胞、细胞培养基或其他粗制品中分离且经过分级分离以去除最初制品的各种组分 (例如蛋白质、细胞碎片和其他组分) 的肽、蛋白质、病毒、VLP 或其他活性化合物。

[0067] 重组体：重组体核酸、蛋白质、病毒或 VLP 是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个原本独立的序列片段而产生的序列。该人工组合常常是通过化学合成，或通过人工操纵分离的核酸片段（例如通过基因工程技术）完成。

[0068] 序列同一性：氨基酸或核酸序列之间的相似性被表示为所述序列之间的相似性，或者称作序列同一性。序列同一性常以同一性（或相似性或同源性）百分数来度量；所述百分数越高，两个序列越相似。当使用常规方法进行比对时，给定基因或蛋白质的同系物或变体具有相对高的序列同一性程度。

[0069] 比对用于比较的序列的方法在本领域中是熟知的。多种程序和比对算法记载于：Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981；Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970；Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444, 1988；Higgins 和 Sharp, Gene 73:237-244, 1988；Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989；Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881-10890, 1988 以及 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444, 1988。Altschul et al., Nature Genet. 6:119-129, 1994。

[0070] NCBI 基础局部比对搜索工具 (BLAST™) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) 可以从若干来源获得，包括美国国立生物技术信息中心 (NCBI, Bethesda, MD) 和互联网，用于与序列分析程序 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 联合使用。

[0071] 受试者：活的多细胞脊椎生物——包括人和非人哺乳动物（例如非人灵长类）的种类。

[0072] 治疗有效量：足以在用该试剂治疗的受试者中达到所需效果的那种试剂的量。例如，这可以是用于在受试者中引起免疫应答和 / 或用于预防由流感病毒引起的感染或疾病的流感病毒疫苗的量。理想地，在本公开内容的上下文中，流感疫苗的治疗有效量是足以在受试者中增加对流感病毒引起的感染的抵抗力、预防、减轻和 / 或治疗所述感染，而不会在所述受试者中产生明显的细胞毒性效应的量。用于在受试者中增加对感染的抵抗力、预防、减轻和 / 或治疗感染的流感疫苗的有效量会取决于，例如，被治疗的受试者、治疗组合物的给药方式及其他因素。

[0073] 转化的：转化的细胞是已经通过分子生物学技术将核酸分子导入其中的细胞。如本文所使用的，术语转化包括可将核酸分子导入这种细胞中的所有技术，包括用病毒载体转染、用质粒载体转化以及通过电穿孔、脂转染和基因枪加速导入裸露的 DNA。

[0074] 疫苗：能够刺激免疫应答的免疫原性材料制品，其被给予用于预防、减轻或治疗疾病，例如传染性疾病。所述免疫原性材料可包括，例如，弱化或灭活的微生物（例如弱化的病毒），或来自它们的抗原性蛋白质（包括 VLP）、肽或 DNA。疫苗可引起预防性的 (prophylactic 或 preventative) 和治疗性的应答。给药方法根据所述疫苗有所不同，但可包括接种、食入、吸入或其他给药形式。接种可通过许多途径（包括非肠胃外途径）中的任一种递送，例如静脉、皮下或肌内。疫苗可与佐剂一起给药以加强免疫应答。

[0075] 载体：载体是允许插入外源核酸而不会破坏所述载体在宿主细胞内的复制和 / 或整合的能力的核酸分子。载体可包含这样的核酸序列，即所述核酸序列使其能够在宿主细胞内复制，例如复制起点。插入型载体能够将自身插入宿主核酸中。载体还可包括一

种或多种选择性标记基因和其他遗传元件。表达载体是含有必需调控序列以允许转录和翻译插入的一个或多个基因的载体。在本公开内容的一些实施方案中,所述载体编码流感 HA、NA 或 M1 蛋白。在一些实施方案中,所述载体是 pTR600 表达载体(美国专利申请公开 No. 2002/0106798 ;Ross et al., Nat Immunol. 1(2):102-103, 2000 ;Green et al., Vaccine 20:242-248, 2001)。

[0076] 病毒样颗粒 (VLP): 由一个或多个病毒结构蛋白组成,但没有病毒基因组的病毒颗粒。由于 VLP 没有病毒基因组,他们是非传染性的。此外,VLP 经常可通过异源表达产生且可容易地被纯化。大多数 VLP 至少包括驱动颗粒从宿主细胞出芽和释放的病毒核心蛋白。这类核心蛋白的一个实例是流感 M1。在本文的一些实施方案中,流感 VLP 包含 HA、NA 和 / 或 M1 蛋白。流感 VLP 可通过使用编码 HA 和 NA 蛋白和任选的 M1 蛋白的质粒转染宿主细胞来产生。将所述转染的细胞孵育适当的一段时间以使得蛋白表达(例如约 72 小时)后,可从细胞培养物上清液中分离 VLP。实施例 5 提供了从细胞上清液中纯化流感 VLP 的示例性方案。在这个实施例中,通过低速离心(以去除细胞碎片)、真空过滤以及通过 20% 甘油的超速离心来分离 VLP。其他产生流感 VLP 的方法在本领域中已知(见,例如,美国专利申请公开号 2006/0263804 ;2008/0031895 ;2010/0166769 ;和 2010/0239610)。

[0077] 除非另有说明,本文所用的所有技术术语和科学术语的含义与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。除非上下文中另有明确说明,单数术语“一”、“一个”和“所述”包括复数指代对象。“包含 A 或 B”意指包括 A,或 B,或 A 和 B。还应该理解,对于核酸或多肽给出的全部碱基大小或氨基酸大小以及全部分子量或分子质量值是近似值,并且用于表述目的。虽然与本文描述的方法和材料相似或等价的方法和材料可以用于本公开内容的实施或测试,但适合的方法和材料在下文描述。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以引用的方式全文纳入本文。如果出现冲突,以本说明书(包括对术语的解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是示例性的,不意欲进行限制。

[0078] III. 若干实施方案概述

[0079] 本文公开了用于引起针对流感病毒的广泛反应性免疫应答的以计算方式优化的 H2N2、H3N2 和 B 型流感 HA 多肽的产生。基于所选择的 H2N2、H3N2 和 B 型流感病毒分离株,通过一系列的 HA 蛋白比对和随后的共有序列产生,开发了所述优化的 HA 多肽。用于产生优化的 HA 共有序列的方法记载于实施例 1-3 中并示出于图 1-7 中。10 种特定的 HA 多肽的氨基酸序列在本文中示出为 SEQ ID NO:1-11。

[0080] 本文提供了用于引起针对 H2N2、H3N2 或 B 型流感的广泛反应性免疫应答的具有优化的氨基酸序列的重组体流感 HA 多肽。在一些实施方案中,所述 HA 多肽包含:与 SEQ ID NO:1 的 2-562 位残基至少 99.6% 相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:2 的 2-562 位残基至少 99.4% 相同的氨基酸序列;包含 SEQ ID NO:3 的 2-562 位残基的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:4 的 2-562 位残基至少 99.7% 相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:5 的 2-584 位残基至少 99.6% 相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:6 的 2-585 位残基至少 98.8%、至少 99% 或至少 99.5% 相同的氨基酸序列;包含 SEQ ID NO:7 的 2-585 位残基的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:8 的 2-566 位残基至少 97.7%、至少 98%、至少 98.5%、至少 99% 或至少 99.5% 相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:9 的 2-566 位残基至少 98.4%、至少 99% 或至少 99.5% 相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:10 的 2-566 位残基至少 97.8%、至少 98%、至少 98.5%、至少

99%或至少 99.5%相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:11 的 2-566 位残基至少 98.9%、至少 99%或至少 99.5%相同的氨基酸序列。

[0081] 在具体的实例中,所述 HA 多肽的氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:2 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:3 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:4 的 2-562 位残基、SEQ ID NO:5 的 2-584 位残基、SEQ ID NO:6 的 2-585 位残基、SEQ ID NO:7 的 2-585 位残基、SEQ ID NO:8 的 2-566 位残基、SEQ ID NO:9 的 2-566 位残基、SEQ ID NO:10 的 2-566 位残基或 SEQ ID NO:11 的 2-566 位残基的氨基酸序列;或由这些组成。

[0082] 在一些实施方案中,所述流感 HA 多肽包含:与 SEQ ID NO:1 至少 99.6%相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:2 至少 99.4%相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:3 的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:4 至少 99.7%相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:5 至少 99.6%相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:6 至少 98.8%、至少 99%或至少 99.5%相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:8 至少 99.7%相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:9 至少 98.4%、至少 99%或至少 99.5%相同的氨基酸序列;与 SEQ ID NO:10 至少 97.8%、至少 98%、至少 98.5%、至少 99%或至少 99.5%相同的氨基酸序列;或与 SEQ ID NO:11 至少 98.9%、至少 99%或至少 99.5%相同的氨基酸序列。

[0083] 在一些实例中,所述 HA 多肽的氨基酸序列具有比以上所述的同一性百分数更高的同一性。在其他实例中,所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列,或由它们组成。

[0084] 在一些实施方案中,所述 HA 多肽包含:相对于 SEQ ID NO:1 不多于 2 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:2 不多于 3 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:4 不多于 1 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:5 不多于 2 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:6 不多于 7 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:8 不多于 10 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:9 不多于 9 个氨基酸置换;相对于 SEQ ID NO:10 不多于 10 个氨基酸置换;或相对于 SEQ ID NO:11 不多于 6 个氨基酸置换。在一些实例中,所述氨基酸置换为非保守性置换。在一些实例中,所述氨基酸置换为非保守性置换。在其他实例中,相对于所鉴定的序列的置换数量少于以上鉴定的置换数量。

[0085] 还提供了编码本文公开的重组体流感 HA 多肽的分离的核酸分子。在一些实施方案中,对所述核酸分子进行密码子优化以用于在哺乳动物细胞中表达。还任选地将所述核酸分子进一步优化以用于 RNA 稳定性。

[0086] 本公开内容还提供了包含编码重组体 HA 多肽的核酸分子的载体。所述载体可以是任何适用于表达所述 HA 多肽的载体,例如哺乳动物表达载体。在具体实例中,所述载体为 pTR600 表达载体(美国专利申请公开 No. 2002/0106798,以引用的方式纳入本文;Ross et al., Nat Immunol. 1(2):102-103, 2000;Green et al., Vaccine 20:242-248, 2001)。

[0087] 在一些实例中,所述载体包括可操作地连接至编码所述 HA 多肽的核酸序列的启动子。在具体实例中,所述启动子为 CMV 启动子。

[0088] 还提供了包含所公开的载体的分离的细胞。在某些情况下,所述细胞为任何适用于产生和表达 VLP 的细胞类型,例如哺乳动物细胞。

[0089] 还提供了包含本文公开的优化的 HA 多肽的流感 VLP。所述流感 VLP 还可包括形成

所述病毒颗粒所必需的任何其他流感蛋白。在一些实施方案中,所述流感 VLP 还包括流感神经氨酸酶 (NA) 蛋白、流感基质 (M1) 蛋白或其两者。

[0090] 还提供了包含本文公开的流感 HA 多肽的流感 VLP,所述流感 VLP 是通过在足以允许所述 HA、M1 和 NA 蛋白表达的条件下用编码所述 HA 多肽的载体、编码流感 NA 蛋白的载体和编码流感 M1 蛋白的载体转染宿主细胞而产生。

[0091] 本公开内容还提供了包含优化的流感 HA 多肽的融合蛋白。

[0092] 本文还提供了这样的组合物,即其包含本文公开的优化的流感 HA 蛋白、或包含所述优化的流感 HA 蛋白的融合蛋白或 VLP。在一些实施方案中,所述组合物还包含可药用载体和 / 或佐剂。例如,所述佐剂可为明矾、弗氏完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激性寡核苷酸 (例如 CpG 寡核苷酸)。

[0093] 还提供了一种通过给予如本文所公开的优化的流感 HA 蛋白、含有优化的流感 HA 的融合蛋白、含有优化的流感 HA 的 VLP、或其组合物,在受体中引起针对流感病毒的免疫应答的方法。在一些实施方案中,所述流感病毒为 H3N2、H2N2 或 B 型流感病毒。在一些实施方案中,可使用任何适合的给药途径 (例如,肌内、鼻内或口服) 给予所述 HA 蛋白、HA 融合蛋白或 VLP。在一些实施方案中,所述 HA 蛋白、融合蛋白或 VLP 作为还包含可药用载体和 / 或佐剂的组合物被给予。例如,所述佐剂可为明矾、弗氏完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激性寡核苷酸 (例如 CpG 寡核苷酸)。

[0094] 还提供了通过给予受试者含有本文公开的优化的流感 HA 蛋白的 VLP 或给予其组合物,而使所述受试者对流感病毒免疫的方法。在所述方法的一些实施方案中,所述组合物还包含可药用载体和 / 或佐剂。例如,所述佐剂可为明矾、弗氏完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激性寡核苷酸 (例如 CpG 寡核苷酸)。在一些实施方案中,所述 VLP (或其组合物) 通过肌内给予。

[0095] 在引起免疫应答或免疫受试者的方法的一些实施方案中,给予所述受试者约 1- 约 25 μ g 的含有优化的 HA 蛋白的 VLP。在具体实例中,给予所述受试者约 5- 约 20 μ g 的所述 VLP,或约 10- 约 15 μ g 的所述 VLP。在一个具体的非限制性的实例中,给予所述受试者约 15 μ g 的所述 VLP。然而,本领域技术人员能够确定待给予受试者的 VLP 的治疗有效量 (例如提供针对 H3N2、H2N2 或 B 型流感病毒感染的保护作用的量)。

[0096] IV. 流感

[0097] 流感病毒是属于正粘病毒科家族的分段的负链 RNA 病毒。有 A、B 和 C 三种类型的流感病毒。A 型流感病毒感染多种鸟类和哺乳动物,包括人、马、海洋哺乳动物、猪、雪貂和鸡。在动物中,大多数 A 型流感病毒引起温和的呼吸道和肠道的局部感染。然而,高致病性 A 型流感毒株 (例如 H5N1) 引起家禽的全身感染,其中死亡率可达到 100%。感染 A 型流感的动物常充当流感病毒的库 (reservoir),并且某些亚型已经被证明可跨越物种屏障而感染人。

[0098] 基于编码表面糖蛋白 (即血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA),其是病毒吸附和细胞释放所必需的) 的两个基因的抗原性区域中的等位基因变异,可将 A 型流感病毒分为多个亚型。目前,已知 A 型流感病毒的 16 个 HA 亚型 (H1-H16) 和 9 个 NA (N1-N9) 抗原性变体。以前,已知只有 3 个亚型在人中传播 (H1N1、H1N2 和 H3N2)。然而,近些年,如在 1997 年和 2003 年香港所记录的,已经报道 A 型禽流感的致病性 H5N1 亚型跨越物种屏障并感染人,导

致一些患者的死亡。

[0099] B 型流感病毒引起与 A 型流感病毒相同谱的疾病。然而, B 型流感病毒不会引起大流行, 可能是因为该病毒的有限的宿主范围(人和海豹)限制了通过重排而产生新毒株。B 型流感引起较高的发病率; 2008 年在美国, 所有实验室确认的流感病例中大约三分之一的是由流感 B 引起的。因此, 目前季节性三价流感疫苗含有 B 型流感组分。

[0100] 2009 年, H1N1 流感是人流感的最普遍病因。猪来源的 H1N1 的新毒株在 2009 年出现, 并被世界卫生组织宣布为大范围流行。该毒株称作“猪流感”。H1N1 A 型流感病毒也是 1918 年的西班牙流感大流行、1976 年的迪克斯堡爆发和 1977-1978 年的俄罗斯流感大流行的病因。

[0101] 所述流感病毒分段基因组含有 8 个负义 RNA (nsRNA) 基因片段 (PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA 和 NA), 所述 8 个负义 RNA 基因片段编码至少 10 个多肽, 包括 RNA 指导的 RNA 聚合酶蛋白 (PB2、PB1 和 PA)、核蛋白 (NP)、神经氨酸酶 (NA)、血凝素 (HA1 和 HA2 亚基)、基质蛋白 (M1 和 M2) 和非结构蛋白 (NS1 和 NS2) (Krug et al., In “The Influenza Viruses,” R. M. Krug, ed., Plenum Press, N. Y., 1989, pp. 89152)。

[0102] 流感病毒引起广泛传播的疾病的能力是由于其通过产生抗原改变而逃避免疫系统的能力, 该过程被认为发生在宿主同时感染动物流感病毒和人流感病毒时。在宿主中的突变和重排过程中, 所述病毒可将来源于另一病毒的 HA 和 / 或 NA 表面蛋白基因整合到其基因组中, 从而产生新的流感亚型并逃避免疫系统。

[0103] HA 是病毒表面糖蛋白, 一般包括约 560 个氨基酸并占总病毒蛋白的 25%。它负责在感染早期病毒颗粒吸附及侵入宿主细胞。病毒 HA0 前体切割为 HA1 和 HA2 亚片段是所述病毒感染细胞的必需步骤。因此, 需要切割以将宿主细胞内的新病毒颗粒转化成能够感染新细胞的病毒粒子。已知切割发生在完整的 HA0 膜蛋白从受感染细胞的内质网转运至质膜的过程中。在转运过程中, 血凝素经历一系列的共翻译和翻译后修饰, 包括前体 HA 被蛋白水解切割为氨基末端片段 HA1 和羧基末端 HA2。在原代组织培养物或已建立的细胞系中培养流感病毒株的主要困难之一, 源于需要在所述宿主细胞对流感血凝素内进行蛋白水解切割活化。

[0104] 虽然已知未切割的 HA 可介导病毒吸附于细胞表面上其含有神经氨酸的受体, 但其不能够进行感染周期的下一个步骤, 即融合。已经报道, 需要通过切割暴露 HA2 的疏水氨基末端, 以使其可被插入至靶细胞, 从而形成病毒和靶细胞膜之间的桥接。这个过程之后, 所述两种膜的融合以及病毒进入靶细胞中。

[0105] HA 的蛋白水解活化包括由胰蛋白酶样内切蛋白酶在精氨酸残基处进行切割, 所述胰蛋白酶样内切蛋白酶常为钙依赖的且具有中性 pH 最适条件的细胞内酶。由于所述活化的蛋白酶为细胞酶, 被感染细胞的类型决定 HA 是否被切割。哺乳动物流感病毒和非致病性禽流感病毒的 HA 仅在有限数量的细胞类型中对蛋白水解性切割敏感。另一方面, 在 H5 和 H7 亚型中的致病性禽病毒的 HA 被存在于很多不同宿主细胞中的蛋白酶切割。因此, 由于与病毒的致病性质相关的血凝素切割能力不同, 导致了宿主范围的不同。

[0106] 神经氨酸酶 (NA) 是流感病毒的第二膜糖蛋白。已经证明, 病毒 NA 的存在对于产生针对传染性病毒的多面性的保护性免疫应答是重要的。对于大多数 A 型流感病毒, NA 的长度为 413 个氨基酸, 且由具有 1413 个核苷酸的基因编码。在流感病毒中已经鉴定了 9 个

不同的 NA 亚型 (N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8 和 N9),所有这些 NA 亚型已经在野生鸟类中发现。NA 通过从受感染细胞表面的碳水化合物部分切割末端神经氨酸 (也称唾液酸) 残基,参与破坏病毒 HA 的细胞受体。NA 还从病毒蛋白上切割唾液酸残基,防止病毒的聚集。利用这种机制,假定 NA 通过如下方式促进病毒子代的释放:阻止新形成的病毒颗粒沿着细胞膜聚积,以及通过促进所述病毒通过存在于粘膜表面上的粘液的转运。NA 是发生抗原变异的重要抗原决定簇。

[0107] 除了所述表面蛋白 HA 和 NA 之外,流感病毒包括 6 种其他的内部基因,其产生 8 种不同蛋白质,包括聚合酶基因 PB1、PB2 和 PA,基质蛋白 M1 和 M2,核蛋白 (NP) 及非结构蛋白 NS1 和 NS2(Horimoto et al., Clin Microbiol Rev. 14(1):129-149, 2001)。

[0108] 为了组装成子代病毒颗粒,病毒 RNA 作为由三种流感病毒聚合酶蛋白、核蛋白 (NP) 和病毒 RNA 组成的核糖核蛋白 (RNP) 复合体,与流感病毒基质 1 (M1) 蛋白和核输出蛋白相结合,被从核中转运 (Marsh et al., J Virol, 82:2295-2304, 2008)。位于包膜内的 M1 蛋白被认为在装配和出芽方面发挥作用。有限数量的 M2 蛋白被整合入病毒粒子中 (Zebedee, J. Virol. 62:2762-2772, 1988)。它们形成具有 H⁺ 离子通道活性的四聚体,且当被核内体中的低 pH 激活时,它们将酸化病毒粒子的内部,促进其脱壳 (Pinto et al., Cell 69:517-528, 1992)。金刚烷胺是一种抗流感药,其通过干扰 M2 离子通道活性从而抑制病毒脱壳,来预防病毒感染。

[0109] NS1——一种非结构蛋白——具有多重功能,包括调控细胞 mRNA 的剪接和出核转运以及刺激翻译。NS1 的主要功能似乎是抵消宿主的干扰素活性,因为在干扰素无缺陷的细胞中,NS1 敲除的病毒虽然有活力,但其生长效率比亲本病毒低 (Garcia-Sastre, Virology 252:324-330, 1998)。

[0110] 已经在病毒颗粒中检测到 NS2(Richardson et al., Arch. Virol. 116:69-80, 1991; Yasuda et al., Virology 196:249-255, 1993)。估计病毒颗粒中的 NS2 蛋白的平均数量为 130-200 个分子。体外结合测定法证明在 M1 和 NS2 之间有直接的蛋白-蛋白接触。还已经通过在病毒感染的细胞的溶胞产物中的免疫沉淀检测到 NS2-M1 复合体。NS2 蛋白被认为通过与 M1 蛋白的相互作用,在 RNP 从核的输出中起作用 (Ward et al., Arch. Virol. 140:2067-2073, 1995)。

[0111] VI. 流感 VLP 及其给药

[0112] 本文提供了包含优化的 HA (例如具有如 SEQ ID NOs:1-11 中任一项所示的氨基酸序列的 HA) 的流感 VLP。所述流感 VLP 一般由 HA、NA 和 M1 蛋白组成。流感 VLP 的产生已经在本领域中描述,且在本领域普通技术人员的能力范围内。例如,可以通过使用编码所述 HA、NA 和 M1 蛋白的质粒转染宿主细胞来产生流感 VLP。将所述转染的细胞孵育适当的时间 (例如约 72 小时) 以使蛋白表达后,可从细胞培养物上清液中分离 VLP。下文的实施例 5 提供了从细胞上清液中纯化流感 VLP 的示例性方案。在该实施例中,通过低速离心 (以去除细胞碎片)、真空过滤和通过 20% 甘油的超速离心,来分离 VLP。

[0113] 本文公开的流感 VLP 可用作流感疫苗,以引起针对 H3N2 和 H2N2 流感病毒以及 B 型流感病毒的保护性免疫应答。

[0114] 可通过通常用于将重组病毒导入受试者中的任何途径,将流感 VLP 或其组合物给予受试者。给药方法包括,但不限于,真皮内、肌肉内、腹膜内、肠胃外、静脉内、皮下、阴道、直

肠、鼻内、吸入或口服。肠胃外给药（例如皮下、静脉内或肌内给药）一般通过注射完成。注射剂（injectable）可以以常规的形式制备，为液体溶液或悬液、适合用于注射前液体中的溶液或悬液的固体形式，或为乳剂形式。可由之前所描述的那些种类的无菌粉剂、粒剂和片剂来制备注射溶液和悬液。给药可以是全身的或局部的。

[0115] 以任何合适的方式（例如与可药用载体一起）给予流感 VLP 或其组合物。可药用载体部分地由被给予的具体组合物，以及用以给予所述组合物的具体方法来确定。因此，有多种本公开内容的药物组合物的合适制剂。

[0116] 用于肠胃外给药的制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬液和乳剂。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油（例如橄榄油）和可注射有机酯（例如油酸乙酯）。水性载体包括水、醇 / 水溶液、乳剂或悬液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外的载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏或不挥发性油。静脉内载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂（例如基于林格氏葡萄糖的那些）等。还可以存在防腐剂和和其他添加剂例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0117] 一些组合物可潜在地作为可药用的酸加成盐或碱加成盐被给予，所述酸加成盐是通过与无机酸例如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸，以及有机酸例如甲酸、乙酸、丙酸、羟乙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸和延胡索酸反应而形成，所述碱加成盐是通过与无机碱例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾，以及有机碱例如单烷基胺、二烷基胺、三烷基胺和芳香基胺及取代的乙醇胺反应来形成。

[0118] 可通过单剂量或多剂量来完成给药。在本公开内容的上下文中给予受试者的剂量应足以随着时间的推移在受试者中诱导有益的治疗反应，或足以抑制或预防 H2N2、H3N2 和 B 型流感病毒感染。所需剂量根据受试者的物种、年龄、重量和综合状况、所治疗的感染的严重性、所使用的具体组合物及其给药方式而在各个受试者之间不同。本领域普通技术人员仅使用常规实验即可确定适当的剂量。

[0119] 本文提供了包括治疗有效量的单独的或与可药用载体组合的流感 VLP 的药物组合物。可药用载体包括，但不限于，盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇，及其组合。所述载体和组合物可为无菌的，且所述制剂适合所述给药方式。所述组合物还可含有较少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。所述组合物可为液体溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂。所述组合物可与惯常的粘合剂和载体（例如甘油三酯）制成栓剂。口服制剂可包括标准载体例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。可使用任何常见的药物载体，例如无菌盐溶液或芝麻油。所述介质还可含有常规的药物辅助物质例如，用于调整渗透压力的可药用盐、缓冲液、防腐剂等。可与本文提供的组合物和方法共同使用的其他介质为生理盐水和芝麻油。

[0120] 本文描述的流感 VLP 可单独给予或与其他治疗剂组合给予以增强抗原性。例如，所述流感 VLP 可与佐剂（例如弗氏不完全佐剂或弗氏完全佐剂）一起给予。

[0121] 任选地，一种或多种细胞因子，例如 IL-2、IL-6、IL-12、RANTES、GM-CSF、TNF- α 或 IFN- γ ，一种或多种生长因子，例如 GM-CSF 或 G-CSF；一种或多种分子例如 OX-40L 或 41 BBL，或这些分子的组合，可用作生物佐剂（参见，例如，Salgaller et al., 1998, J. Surg. Oncol. 68(2):122-38; Lotze et al., 2000, Cancer J. Sci. Am. 6(Suppl 1):S61-6; Cao et al., 1998, Stem Cells 16(Suppl 1):251-60; Kuiper et al., 2000, Adv. Exp. Med.

Biol. 465:381-90)。可将这些分子全身性（或局部性）给予宿主。

[0122] 已知很多在体外和体内诱导细胞应答的方式。脂质已经被鉴定为能够协助引发针对多种抗原的体内 CTL 的试剂。例如，如美国专利 No. 5, 662, 907 所描述，棕榈酸残基可结合到赖氨酸残基的 α 和 ϵ 氨基上，然后连接（例如，通过一个或多个连接残基，例如甘氨酸、甘氨酸-甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸-丝氨酸等）到免疫原性肽上。然后可将所述脂质化的肽以微团形式直接注射、整合到脂质体或乳化于佐剂中。在另一实例中，大肠杆菌 (*E. coli*) 脂蛋白（例如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰基丝氨酰基-丝氨酸 (tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserine)，当其共价结合到适当的肽上时，可用于引发肿瘤特异性的 CTL（参见，Deres et al., Nature 342:561, 1989）。此外，因为中和抗体的诱导还可使用缀合至展示出适当表位的肽上的相同分子来引发，所以当认为需要时可以组合两种组合物，以引起体液和细胞介导的应答。

[0123] 虽然本文举例说明了给予含有 COBRA HA 蛋白的 VLP，但是本领域技术人员应理解，还可以给予所述流感 HA 蛋白本身（无病毒颗粒的情况下）或作为融合蛋白给予，以在受试者中引起免疫应答。在一些实施方案中，给予所述 HA 蛋白的片段，例如 HA1 或 HA2 亚片段。

[0124] 提供了以下实施例以举例说明某些具体特征和 / 或实施方案。这些实施例不应被解释为将本公开内容限制在所描述的具体特征或实施方案中。

[0125] 实施例

[0126] 实施例 1 :H2N2 流感的 COBRA 序列的产生

[0127] 该实例描述了用四种不同方法产生四个 H2N2 流感 HA COBRA 共有序列。

[0128] 为了根据方法 1 产生 H2N2 流感 HA COBRA 序列，使用分离自 1957-1968 年的 59 个 H2N2 毒株来产生 HA 共有序列。根据方法 1 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :1 示出：

[0129] MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITLERNVTVTTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELGD
CSIAGWLLGNPECDRLLRVPEWSYIMEKENPRDGLCPGFSFNDYEELKHLSSVKHFEKVKILPKDRWTQHTTTGGS
RACAVSGNPSFFRNMVWLTKKGSNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTIVSVSTSTLNKRS
TPEIATRPKVNGLGSRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLCNCETKCQTPLGAIN
TTLPFHNHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAAD
KESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSN
VKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLNREIKGVKLSSMGVYQILAIYA
TVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

[0130] 在方法 2 中，产生了两个层级的共有序列（参见图 1）。在第一层级中，使用 (1) 21 个 1957 年分离的毒株，(2) 12 个分离自 1958-1960 年的毒株，(3) 8 个分离自 1961-1964 年的毒株和 (4) 18 个分离自 1965-1968 年的毒株来产生 4 个单独的共有序列。在第二层级中，使用第一层级产生的 4 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 2 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :2 示出：

[0131] MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITLERNVTVTTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELGD
CSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRYSLCYPGFSFNDYEELKHLSSVKHFEKVKILPKDRWTQHTTTGGS
RACAVSGNPSFFRNMVWLTKKGSNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTIVSVSTSTLNKRS

TPDIATRPKVNLGSRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLGNCETKCQTPLGAIN
TTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAAD
KESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLEKRLNENLKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSN
VKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLRNEIKGVKLSSMGVYQILAIYA
TVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

[0132] 在方法 3 中,使用 98 个人和禽 H2N2 分离株产生了两个层级的共有序列(参见图 2)。在第一层级中,使用(1)21 个 1957 年分离的毒株,(2)12 个分离自 1958-1960 年的毒株,(3)8 个分离自 1961-1964 年的毒株,(4)18 个分离自 1965-1968 年的毒株,(5)1 个 2005 年分离的毒株和(6)38 个分离自 1961-2007 年的禽毒株来产生 6 个单独的共有序列。在第二层级中,使用第一层级产生的 6 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 3 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :3 示出:

[0133] MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITLERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELGD
CSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEELKHLSSVKHFEKVILPKDRWTQHTTTGGS
RACAVSGNPSFFRNMVWLTKKGSNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTYSVGTSTLNKRS
TPEIATRPKVNLGSRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTPLGAIN
TTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAAD
KESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSN
VKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLRNEIKGVKLSSMGVYQILAIYA
TVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

[0134] 在方法 4 中,使用 98 个分离自 1957-2007 年的人和禽 H2N2 毒株产生了单个共有序列。根据方法 4 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :4 示出:

[0135] MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDITLERNVTVTHAKDILEKTHNGKLCKLNGIPPLELGD
CSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRNGLCYPGSFNDYEELKHLSSVKHFEKVILPKDRWTQHTTTGGS
RACAVSGNPSFFRNMVWLTKKGSNYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDEAEQRTLYQNVGTYSVGTSTLNKRS
TPEIATRPKVNLGGRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETKCQTPLGAI
NTTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAA
DKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLERRLENLKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDS
NVKNLYDKVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKYEEESKLRNEIKGVKLSSMGVYQILAIY
ATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI

[0136] 实施例 2 :B 型流感 COBRA 序列的产生

[0137] 该实例描述了使用 3 种不同方法产生 3 个 B 型流感 HA COBRA 序列。

[0138] 为了根据方法 1 产生 B 型流感 HA COBRA 序列,使用 318 个分离自 1940-2011 年的 B 型流感毒株来产生 HA 共有序列。根据方法 1 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :5 示出:

[0139] MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTKTRGKLC
PNCLNCTDLVALGRPMCVGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVINA EKAP
GGPYRLGTSGSCPNTSRSGFFATMAWAVPRDNNTATNPLTVEVPYICTKGEDQITVWGFHSDNKTQMKNLGYDSN
PQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVWCASGRSKVIKGS
LPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWEG

MIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTIS
SQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDSL
NITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFIVYMSRDNVSCSICL

[0140] 在方法 2 中,使用 318 个 B 型流感分离株产生两个层级的共有序列(参见图 3)。在第一层级中,使用 (1)15 个分离自 1940-1986 年的毒株,(2)3 个 1987 年分离的毒株,(3)5 个分离自 1988-1989 年的毒株,(4)17 个分离自 1990-1992 年的毒株,(5)61 个分离自 1993-1998 年的毒株,(6)52 个分离自 1999-2000 年的毒株,(7)39 个分离自 2002-2003 年的毒株,(8)29 个分离自 2004-2005 年的毒株,(9)36 个分离自 2006-2007 年的毒株,和 (10)61 个分离自 2008-2011 年的毒株来产生 10 个单独的共有序列。在第二层级中,使用第一层级产生的 10 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 2 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :6 示出:

[0141] MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTKTRGKLC
PKCLNCTDLVALGRPKCMGTIPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTHNVINAEKAP
GGPYRIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMKKLYGDS
KPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTIVYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
GMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTIS
SSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDS
LNITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFIVYMSRDNVSCSICL

[0142] 在方法 3 中,使用 318 个 B 型流感分离株产生两个层级的共有序列(参见图 4)。在第一层级中,使用 (1)52 个分离自 1999-2001 年的毒株,(2)39 个分离自 2002-2003 年的毒株,(3)29 个分离自 2004-2005 年的毒株,(4)36 个分离自 2006-2007 年的毒株和 (5)61 个分离自 2008-2011 年的毒株来产生 5 个单独的共有序列。在第二层级中,使用第一层级产生的 5 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 3 产生的 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO :7 示出:

[0143] MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTKTRGKLC
PKCLNCTDLVALGRPKCTGNIPSAKVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAEKAP
GGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDS
KPQKFTSSANGVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
GMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTIS
SSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDS
LNITAASLNDDGLDNHTILLYYSTAASSLAVTLMIAIFVYVMSRDNVSCSICL

[0144] 实施例 3 :H3N2 流感 COBRA 序列的产生

[0145] 该实例描述了用四种不同的方法产生四个 H3N2 流感 HA COBRA 序列。

[0146] 为了根据方法 1 产生 H3N2 流感 HA COBRA 序列(十年共有序列(decade consensus sequence)),使用了 935 个 H3N2 分离株产生两个层级的共有序列(参见图 5)。在第一层级中,使用 (1)61 个分离自 1968-1979 年的毒株;(2)33 个分离自 1980-1990 年的毒株;(3)288 个分离自 1991-1999 年的毒株和 (4)553 个分离自 2000-2011 年的毒株来产生 4 个单独的

共有序列。在第二层级中,使用第一层级产生的 4 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 1 产生的 H3N2 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO:8 示出:

[0147] MKTIIALSILCLVFAQKLP GNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICD
SPHRILDGENCTLIDALLGDPHCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFINESFNWTGV
TQNGGSSACKRGSVNSFFSRLNWLTKLKYKYPALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPSTDQDQTSLYVQASGRVTVSTK
RSQQTVIPNIGSRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGTCNSECIT
PNGSIPNDKPFQNVNRTY GACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEG
TGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTI
DLTDSEMKNLF EKTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDW
ILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0148] 在方法 2 中(抗原时代(antigenic era)共有),使用 909 个 H3N2 分离株产生了两个层级的共有序列(参见图 6)。在第一层级中,使用(1)23 个分离自 1968-1972 年的毒株;(2)8 个分离自 1973-1974 年的毒株;(3)21 个分离自 1975-1980 年的毒株;(4)9 个分离自 1979-1981 年的毒株;(5)19 个分离自 1982-1985 年的毒株;(6)14 个分离自 1986-1988 年的毒株;(7)13 个分离自 1989-1992 年的毒株;(8)275 个分离自 1993-1998 年的毒株;(9)294 个分离自 1999-2003 年的毒株;(10)57 个 2004 年分离的毒株;(11)80 个分离自 2005-2006 年的毒株和(12)96 个分离自 2007-2008 年的毒株来产生 12 个单独的共有序列。在第二层级中,使用第一层级产生的 12 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 2 产生的 H3N2 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO:9 示出:

[0149] MKTIIALSILCLVFAQKLP GNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICD
SPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNKKWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFINESFNWTGV
TQNGGSYACKRGSVNSFFSRLNWLHKSESKYPALNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPSTDQEQTSLYVQASGRVTVSTK
RSQQTVIPNIGSRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRTGKSSIMRSDAPIGTCSSSECITP
NGSIPNDKPFQNVNKITY GACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGT
GQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTID
LTDSEMKNLF EKTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI
LWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0150] 在方法 3 中(1968-2011),使用 935 个 H3N2 分离株产生了两个层级的共有序列(参见图 7)。在第一层级中,使用(1)23 个分离自 1968-1972 年的毒株;(2)8 个分离自 1973-1974 年的毒株;(3)21 个分离自 1975-1978 年的毒株;(4)9 个分离自 1979-1981 年的毒株;(5)19 个分离自 1982-1985 年的毒株;(6)14 个分离自 1986-1988 年的毒株;(7)13 个分离自 1989-1992 年的毒株;(8)275 个分离自 1993-1998 年的毒株;(9)294 个分离自 1999-2003 年的毒株;(10)57 个 2004 年分离的毒株;(11)80 个分离自 2005-2006 年的毒株;(12)96 个分离自 2007-2008 年的毒株;和(13)26 个分离自 2009-2011 年的毒株来产生 13 个单独的共有序列。在第二层级中,使用第一层级产生的 13 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 3 产生的 H3N2 COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO:10 示出:

[0151] MKTIIALSILCLVFAQKLP GNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICD
SPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNKKWDLFVERSKAYSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFINESFNWTGV

TQNGGSYACKRGSNNSFFSRLNWLTKSESKYPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPSTDKEQTSLYVQASGRVTVSTK
RSQQTVIPNIGSRPWVRLSSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRTKGSSIMRSDAPIGTCNSECITP
NGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGT
GQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTID
LTDSEMKNLFKTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWI
LWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0152] 在方法 4 中 (1968–2004), 使用 733 个 H3N2 分离株产生了两个层级的共有序列 (参见图 8)。在第一层级中, 使用 (1) 23 个分离自 1968–1972 年的毒株; (2) 8 个分离自 1973–1974 年的毒株; (3) 21 个分离自 1975–1978 年的毒株; (4) 9 个分离自 1979–1981 年的毒株; (5) 19 个分离自 1982–1985 年的毒株; (6) 14 个分离自 1986–1988 年的毒株; (7) 13 个分离自 1989–1992 年的毒株; (8) 275 个分离自 1993–1998 年的毒株; (9) 294 个分离自 1999–2003 年的毒株; (10) 57 个 2004 年分离的毒株来产生 10 个单独的共有序列。在第二层级中, 使用第一层级产生的 10 个单独的共有序列产生最终的共有序列。根据方法 4 产生的 H3N2COBRA 序列如下所示并在本文中以 SEQ ID NO:11 示出:

[0153] MKTIIALSIFYCLVFAQKLPNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSSTGRICD
SPHRILDGKNCTLIDALLGDPHCDGFQNEKWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFINEGNWTGV
TQNGGSYACKRGSVNSFFSRLNWLHKSESKYPVLNVTMPNNDKFDKLYIWGVHHPSTDKE

[0154] QTSLYVQASGRVTVSTKRSQQTVIPNIGSRPWVRLSSRISYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFK
IRTKGSSIMRSDAPIGTCSEECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGIFGAI
AGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYV
EDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFKTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDV
YRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0155] 实施例 4: 密码子优化的 COBRA 基因序列

[0156] 本文公开的 COBRA 氨基酸序列被反向翻译, 并被优化以用于在哺乳动物细胞中表达, 包括密码子使用和 RNA 优化 (GeneArt;

[0157] Regensburg, Germany)。可将优化的核酸序列插入适当的表达载体, 例如 pTR600 表达载体中 (美国专利申请公开 No. 2002/0106798; Ross et al., Nat Immunol. 1(2): 102–103, 2000; Green et al., Vaccine 20:242–248, 2001)。编码所述密码子优化的 COBRA 基因序列的表达载体可用于, 例如, 产生含有所述 COBRA HA 的 VLP。

[0158] 实施例 5: 制备流感 VLP 并使用流感 VLP 进行免疫

[0159] 以下方法可用于产生和表征包含 COBRA HA 的流感 VLP。免疫小鼠、雪貂和猕猴的示例性方法也如下所述 (也参见, Giles and Ross, Vaccine 29(16):3043–3054, 2011)。

[0160] 疫苗制备

[0161] 使用表达 M1、NA 和优化的 HA 的质粒瞬时转染 293T 细胞, 在 37°C 下孵育 72 小时。所述编码 M1、NA 和 HA 的序列可被密码子优化以用于在哺乳动物细胞中表达。收集上清液, 通过低速离心及随后通过 0.22 μ m 无菌滤器进行真空过滤来去除细胞碎片。通过在 4°C 下超速离心 (100,000 $\times$ g 通过 20% 甘油, 重量/体积) 4 小时来纯化 VLP。然后将所得沉淀重悬于 pH 7.2 的 PBS 中, 并以单次使用的等分试样保存于 -80°C 直至使用。使用 Micro BCA™ 蛋白测定试剂盒 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 确定总蛋白浓度。

[0162] 剂量确定

[0163] 可通过蛋白质印迹和密度测定法 (densitometry assay) 来确定 HA 具体含量。以标准总蛋白量制备纯化的重组体 COBRA HA 和纯化的 VLP, 将其在 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳, 并转移至 PVDF 膜。将所述印迹用来源于流感感染的小鼠的小鼠多克隆抗血清探测, 使用缀合有辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊抗小鼠 IgG (Southern Biotech; Birmingham, AL, 美国) 检测 HA- 抗体复合体。用化学发光底物 (Pierce Biotechnology; Rockford IL, 美国) 检测 HRP, 曝光到 X- 光片 (ThermoFisher; Pittsburgh, PA, 美国)。用 ImageJ 软件 (NIH) 确定条带密度。重组体 HA 条带的密度用于计算标准曲线, 并且使用所述重组体 HA 的结果内插所述纯化 VLP 的密度。

[0164] 小鼠研究

[0165] BALB/c 小鼠 (小家鼠 (*Mus musculus*), 雌性, 6-8 周龄) 可购自 Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, 美国)。小鼠饲养在微隔离单元 (microisolator unit) 中, 自由取食食物和水, 并根据 USDA 的用于实验室动物的指导管理。在 0 周时, 基于密度测定法获得的 HA 含量, 通过肌肉注射, 用纯化的 COBRA HA VLP 的三个剂量 (1.5 μ g、0.3 μ g 或 0.06 μ g) 之一接种小鼠, 然后在第 3 周时用相同剂量加强。每个剂量的疫苗都用明矾佐剂 (Imject Alum, Pierce Biotechnology; Rockford, IL, 美国)、CpG 寡核苷酸或单独的载体配制。每次疫苗接种后的 14-21 天, 从麻醉的小鼠中经眶后丛收集血液, 并转移至微量离心管中。将管离心, 移出血清, 并将其冷冻于 $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。在第 5 周时, 使用代表性的重排病毒 (reassortant virus) 或 COBRA HA VLP 来确定每个疫苗组的血凝抑制 (HAI) 血清抗体滴度。

[0166] 末次接种后三周, 用 50 μ l 体积的致病性流感病毒 (例如致病性的 H2N2、H3N2 或 B 型流感病毒分离株) 对小鼠进行鼻内激发。感染后, 在感染后的 14 天内, 每天监测小鼠的体重减轻、疾病征象和死亡。接种后, 每天记录每组的个体体重、疾病评分 (Toapanta and Ross, Respiratory Research 10(1):112, 2009) 和死亡。

[0167] 雪貂研究

[0168] 艾鼬雪貂 (Fitch ferret, *Mustela putorius furo*, 雌性, 6-12 月龄), 未感染过流感且去臭腺 (de-scented), 可购自马歇尔农场 (Sayre, PA, 美国)。雪貂成对饲养于含有 Sani-chips Laboratory Animal Bedding (P. J. Murphy Forest Products, Montville, NJ, USA) 的不锈钢笼子 (Shor-line, Kansas City, KS, USA) 中。无限制地给雪貂提供 Teklad Global Ferret Diet (Harlan Teklad, Madison, WI, USA) 和淡水。用 pH7.2 的 PBS 稀释所述 COBRA HA VLP 至终浓度。在 0 周时, 基于通过密度测定法确定的 HA 含量, 通过以 0.25 ml 的体积, 用纯化的 COBRA HA VLP 的两个剂量 (15 μ g、3 μ g) 之一在四头肌处肌肉注射免疫雪貂, 然后在第 3 周时用相同剂量加强。疫苗在使用前在 -80°C 下保存, 用明矾佐剂 (Imject Alum; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 配制后立即使用。在接种方案期间每周监测动物的不利事件, 包括体重减轻、体温、活动减少、流涕、打喷嚏和腹泻。接种之前, 通过 HAI 测定确认动物对于传播的 A 型流感和 B 型流感病毒是血清反应阴性的。每次接种后 14-21 天, 从麻醉的雪貂中经前腔静脉收集血液, 并转移至微量离心管中。将管离心并移出血清, 将血清冷冻于 $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。第 5 周时, 使用有代表性的重排病毒或 COBRA HA VLP, 确定每个疫苗组的 HAI 血清抗体滴度。

[0169] 末次接种后三周,用 1ml 体积的致病性流感病毒(例如致病性的 H2N2、H3N2 或 B 型流感病毒分离株)对雪貂进行鼻内激发。感染后,在感染后的 14 天内,每天监测雪貂的体重减轻、疾病征象和死亡。接种后,每天记录每组的个体体重、患病评分和死亡。接种后的 7 天内,每天通过将 3 ml 的 PBS 滴入麻醉的雪貂的鼻孔内,来进行鼻洗涤。收集洗涤物并保存于 -80°C 直至使用。

[0170] 灵长类免疫接种

[0171] 短尾猕猴 (*Cynomolgus macaques*) (食蟹猴 (*Macaca fascicularis*), 雄性, 3-5 岁) 可购自 Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, 美国)。在 0 周时,基于密度测定法获得的 HA 含量,通过肌肉注射,用纯化的 COBRA HA VLP (15 μg) 接种猕猴,然后在第 3 周和第 6 周时用相同剂量加强。疫苗用明矾佐剂 (Imject Alum; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 配制后立即使用。每次接种后 21 天,从麻醉的猕猴经股静脉收集血液,并将血液转移至血清分离管中。使管中血液凝结,然后离心,移出血清并将血清冷冻在 $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下。在第 5 周时,使用有代表性的重排病毒或 COBRA HA VLP 确定每个疫苗组的终点 IgG 滴度和 HAI 血清抗体滴度。

[0172] 末次接种后三周,用 1ml 体积的致病性流感病毒(例如致病性的 H2N2、H3N2 或 B 型流感病毒分离株)通过鼻内、气管内和眼窝接种对猕猴进行激发。感染后,在感染后的 5 天内,每天监测猕猴的体重减轻、疾病征象和死亡。接种后,每天记录每组的个体体重、患病评分和死亡。

[0173] 鉴于所公开的发明的原理可应用于许多可能的实施方案,应认识到,所示出的实施方案只是本发明的优选实例,不应被认为是对本发明范围的限制。而是,本发明的范围是由以下的权利要求书限定。因此,申请人要求保护落入这些权利要求的范围和主旨的所有发明。

[0001]

序列表

<110> 高等教育联邦系统-匹兹堡大学
 T·M·罗斯
 D·M·卡特
 C·J·克里瓦尔

<120> 以计算方式优化的H3N2、H2N2和B型流感病毒的广泛反应性抗原

<130> 8123-88294-02

<150> US 61/596,014
 <151> 2012-02-07

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 562
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 1

Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp
 1 5 10 15

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

Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile Leu
 35 40 45

Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro
 50 55 60

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

Glu Cys Asp Arg Leu Leu Arg Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met Glu
 85 90 95

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

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu Lys
 115 120 125

Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly
 130 135 140

Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn

[0002]

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

[0003]

Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp
420 425 430

Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu
435 440 445

Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met
450 455 460

Gln Leu Arg Asp Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe
465 470 475 480

Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Asn Gly Thr
485 490 495

Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu
500 505 510

Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala
515 520 525

Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala
530 535 540

Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
545 550 555 560

Cys Ile

<210> 2
<211> 562
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 2

Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp
1 5 10 15

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

Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile Leu
35 40 45

Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro

[0004]

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

[0005]

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

[0006]

<210> 3
 <211> 562
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 3

Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp
 1 5 10 15

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

Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile Leu
 35 40 45

Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro
 50 55 60

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

Glu Cys Asp Arg Leu Leu Ser Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met Glu
 85 90 95

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

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu Lys
 115 120 125

Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly
 130 135 140

Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn
 145 150 155 160

Met Val Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Asn Tyr Pro Val Ala Lys Gly
 165 170 175

Ser Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Glu Gln Met Leu Ile Ile Trp Gly Val
 180 185 190

His His Pro Asn Asp Glu Thr Glu Gln Arg Thr Leu Tyr Gln Asn Val
 195 200 205

Gly Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Lys Arg Ser Thr
 210 215 220

[0007]

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

[0008]

Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Asn Gly Thr
485 490 495

Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu
500 505 510

Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala
515 520 525

Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala
530 535 540

Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
545 550 555 560

Cys Ile

<210> 4
<211> 562
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 4

Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp
1 5 10 15

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

Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile Leu
35 40 45

Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro
50 55 60

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

Glu Cys Asp Arg Leu Leu Ser Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met Glu
85 90 95

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

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu Lys
115 120 125

[0009]

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

[0010]

Phe Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn
385 390 395 400

Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Ser Asn Leu Glu Arg Arg
405 410 415

Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp
420 425 430

Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu
435 440 445

Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met
450 455 460

Gln Leu Arg Asp Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe
465 470 475 480

Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Asn Gly Thr
485 490 495

Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu
500 505 510

Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala
515 520 525

Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala
530 535 540

Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
545 550 555 560

Cys Ile

<210> 5
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽
<400> 5

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

Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys
20 25 30

[0011]

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

[0012]

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

[0013]

545	550	555	560
Val Thr Leu Met	Ile Ala Ile Phe Ile	Val Tyr Met Val Ser	Arg Asp
	565	570	575
Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu			
	580		
<210>	6		
<211>	585		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	6		
Met Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn Ala Asp			
1	5	10	15
Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys			
	20	25	30
Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu Thr			
	35	40	45
Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Lys Thr			
	50	55	60
Arg Gly Lys Leu Cys Pro Lys Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp Val			
65	70	75	80
Ala Leu Gly Arg Pro Lys Cys Met Gly Thr Ile Pro Ser Ala Lys Ala			
	85	90	95
Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro Ile			
	100	105	110
Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg Gly			
	115	120	125
Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr His Asn Val Ile Asn Ala Glu Lys			
	130	135	140
Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Ile Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro Asn			
145	150	155	160
Val Thr Asn Gly Asn Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val Pro			
	165	170	175

[0014]

Lys Asn Asp Asn Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val
 180 185 190

Pro Tyr Ile Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe
 195 200 205

His Ser Asp Asn Glu Thr Gln Met Lys Lys Leu Tyr Gly Asp Ser Lys
 210 215 220

Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val
 225 230 235 240

Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro
 245 250 255

Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Ser Gly Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu Pro Gln Lys Val
 275 280 285

Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu
 290 295 300

Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys
 305 310 315 320

Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys
 325 330 335

Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr
 340 345 350

Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile
 355 360 365

Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His
 370 375 380

Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400

Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser
 405 410 415

Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met
 420 425 430

Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp

[0015]

435	440	445
Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu 450	455	460
Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu 465	470	475 480
Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly 485	490	495
Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp 500	505	510
Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr 515	520	525
Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu 530	535	540
Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu 545	550	555 560
Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg 565	570	575
Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu 580	585	
<210> 7		
<211> 585		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 7		
Met Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn Ala Asp 1	5 10	15
Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys 20	25	30
Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu Thr 35	40	45
Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Lys Thr 50	55	60

[0016]

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

[0017]

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

[0018]

<210> 8
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 8

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
 20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
 35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
 50 55 60

Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln
 85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
 100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
 115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr
 130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Ser Ala Cys Lys Arg Gly Ser Val
 145 150 155 160

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

Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Lys Phe Asp Lys
 180 185 190

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp Gln Asp Gln Thr
 195 200 205

Ser Leu Tyr Val Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg

[0019]

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

[0020]

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 9
<211> 566
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 9

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Lys Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val

[0021]

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

[0022]

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
385 390 395 400

Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
450 455 460

Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 10
<211> 566
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 10

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly

[0023]

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

[0024]

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

[0025]

Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 11
<211> 566
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 11

Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Lys Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Glu Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Gly Phe Asn Trp Thr
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Tyr Ala Cys Lys Arg Gly Ser Val
145 150 155 160

Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Lys Ser Glu Ser Lys
165 170 175

Tyr Pro Val Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Lys Phe Asp Lys
180 185 190

[0026]

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

[0027]

Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asn	Lys	Leu	Phe
450						455					460				
Glu	Lys	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Glu	Asp	Met	Gly	Asn
465					470					475					480
Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Ala	Cys	Ile	Gly	Ser
				485					490						495
Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr	Arg	Asp	Glu	Ala	Leu
			500					505					510		
Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu	Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys
		515					520					525			
Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser	Cys	Phe	Leu	Leu	Cys
530						535					540				
Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys	Gln	Lys	Gly	Asn	Ile
545					550					555					560
Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile										
				565											

H2N2方法2（抗原时代）

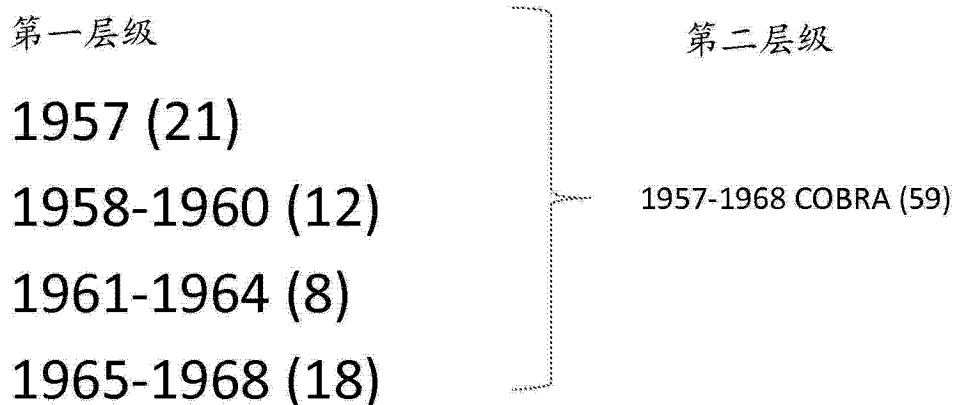


图 1

H2N2方法3（人/禽-1）

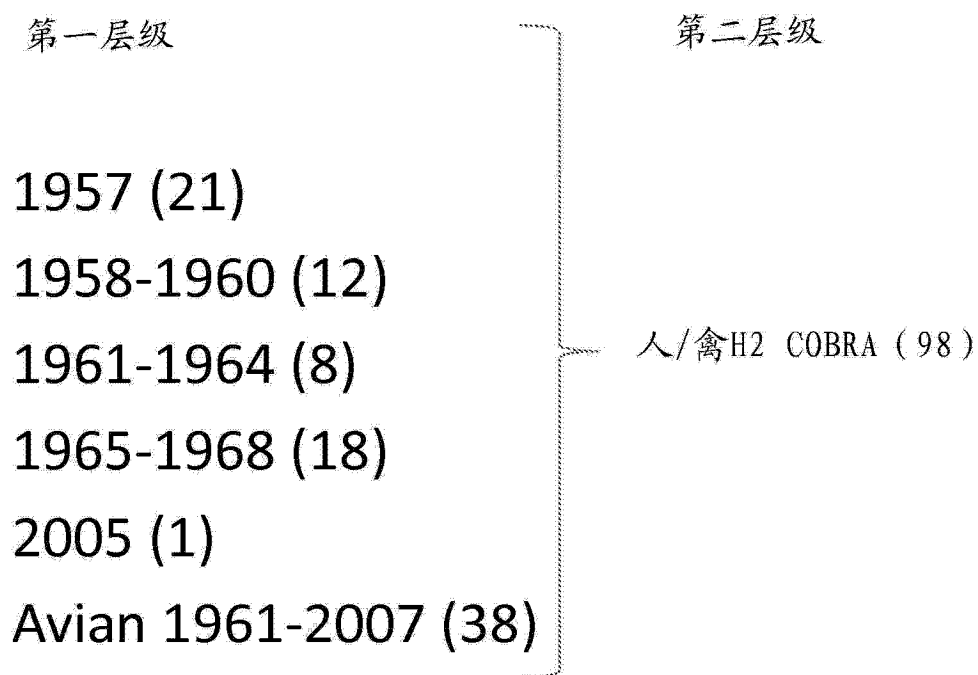


图 2

B型流感方法2（抗原时代）

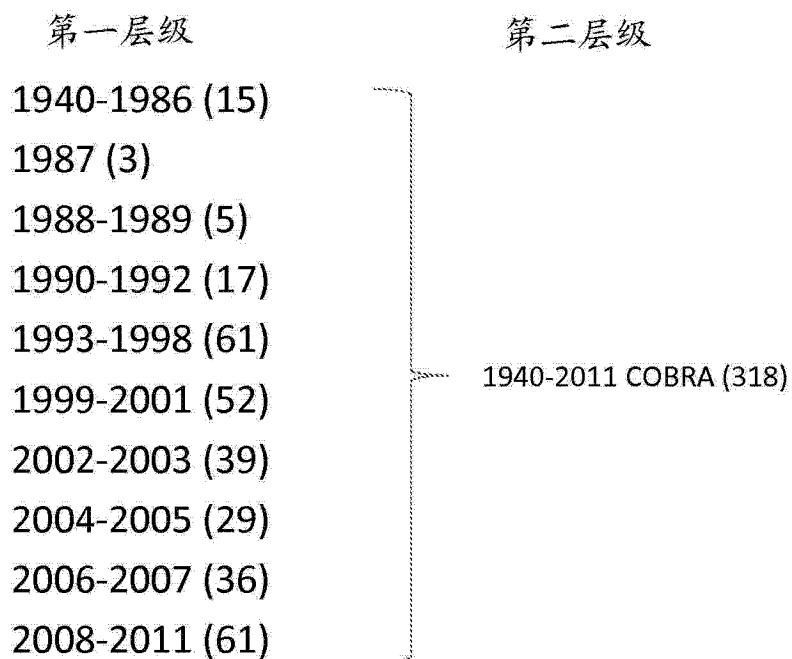


图 3

B型流感方法3（现代）

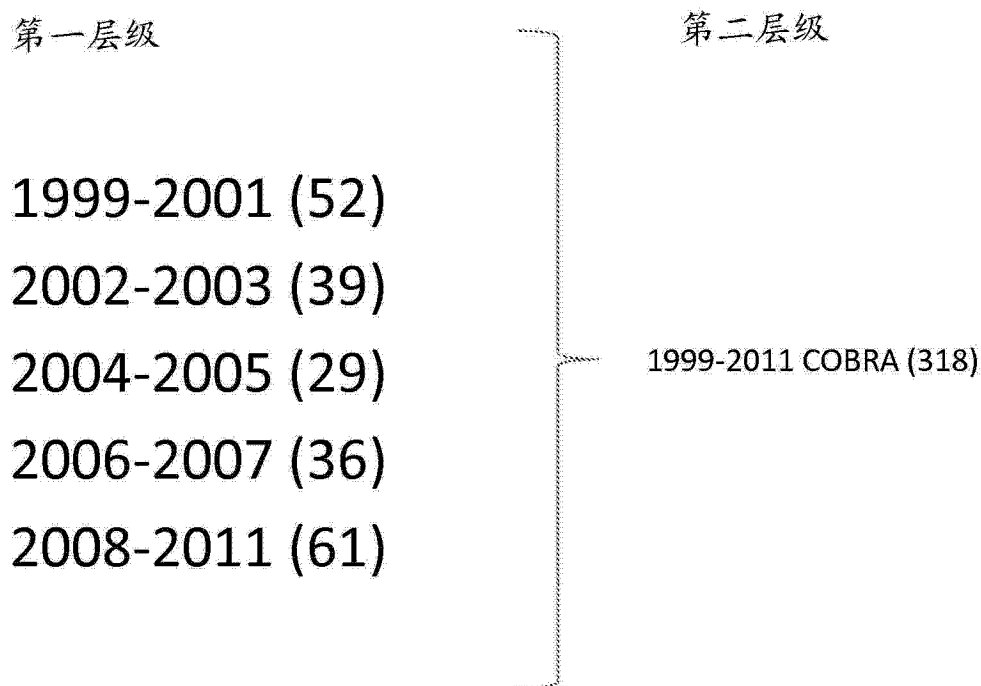


图 4

H3N2方法1（十年共有序列）

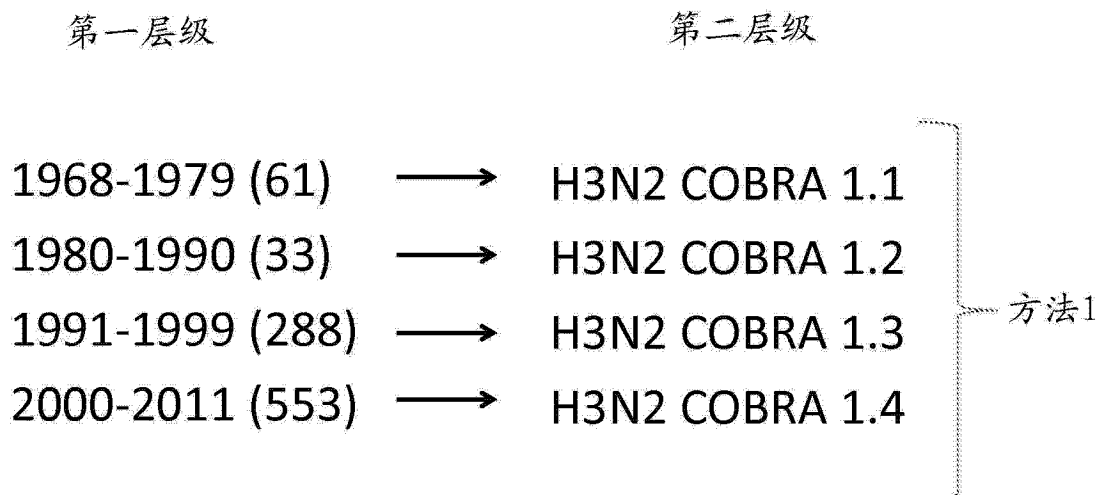


图 5

H3N2方法2（抗原时代）

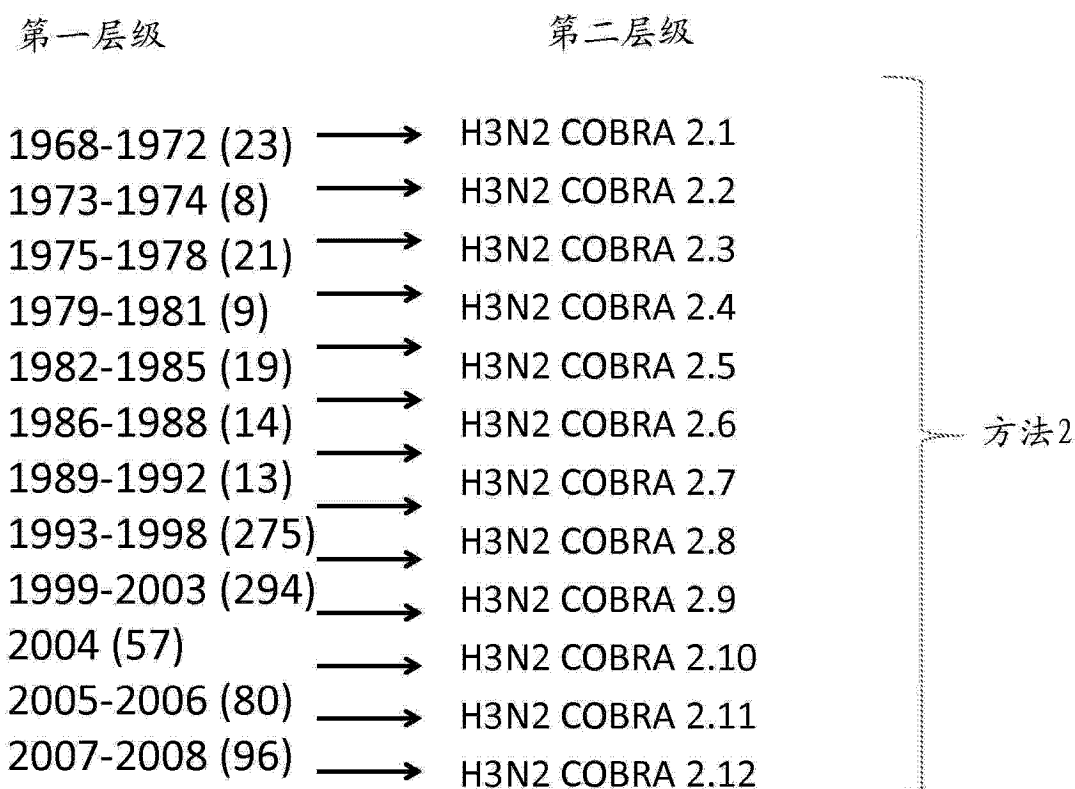


图 6

H3N2方法3 (1968-2011)

第一层级

第二层级

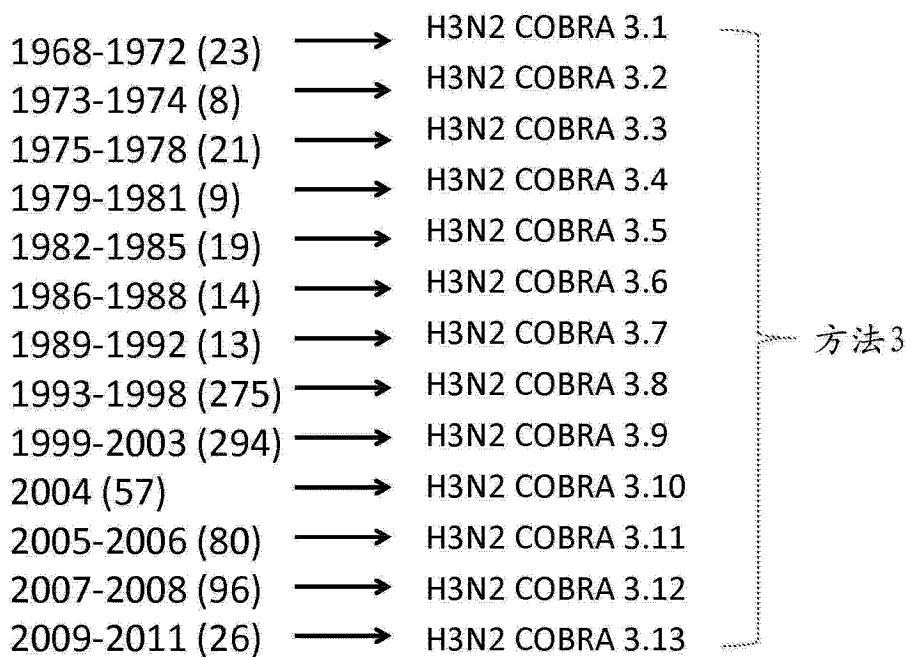


图 7

H3N2方法4 (1968-2004)

第一层级

第二层级

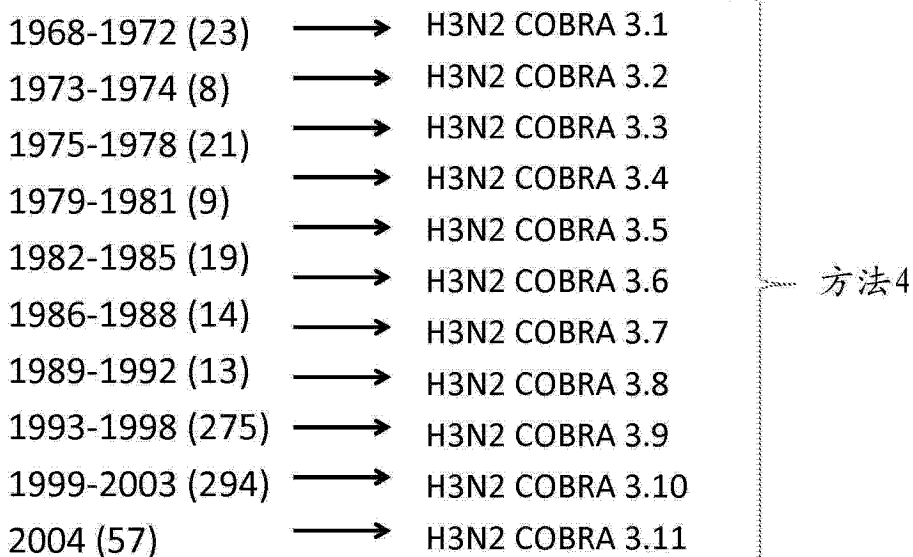


图 8