



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102361649 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 22

(21) 申请号 201080013880. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 02. 03

A61K 39/145 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/152, 094 2009. 02. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/022970 2010. 02. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02010/093537 EN 2010. 08. 19

(71) 申请人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

申请人 美国政府健康及人类服务部

(72) 发明人 H·金 X·程 K·苏巴拉奥

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 杨帆

权利要求书 4 页 说明书 41 页 附图 4 页

(54) 发明名称

流感血凝素和神经氨酸酶变体

(57) 摘要

本发明提供包含流感血凝素和神经氨酸酶变体的多肽、多核苷酸、重配病毒、免疫原性组合物和疫苗,以及它们的使用方法。

1. 一种分离多肽,其中所述多肽选自:
  - i) SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1的残基 89-1063、SEQ ID NO:1的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5的残基 1063-1728 中任一项所示多核苷酸序列编码的多肽;
  - ii) 包含 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2的残基 16-340、SEQ ID NO:2的残基 341-562、SEQ ID NO:6的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6的残基 341-562 中任一项所示氨基酸序列的多肽;
  - iii) 包含 SEQ ID NO:2、4、6 和 8 中任一项所示氨基酸序列的多肽的成熟形式;
  - iv) 包含选自 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2的残基 16-340、SEQ ID NO:2的残基 341-562、SEQ ID NO:6的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6的残基 341-562 的氨基酸序列,其中取代、插入或缺失一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个或十五个氨基酸残基的多肽。
2. 一种免疫原性组合物,其包含免疫学有效量的至少一种权利要求 1 所述的多肽。
3. 一种分离抗体,其特异性与权利要求 1 所述的多肽结合。
4. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:
  - i) 通过生理上可接受的运载体将免疫学有效量的权利要求 1 所述多肽给予该个体。
5. 一种重配流感病毒,其包含权利要求 1 所述的多肽。
6. 一种免疫原性组合物,其包含免疫学有效量的权利要求 5 所述的重配流感病毒。
7. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:
  - i) 通过生理上可接受的运载体将免疫学有效量的权利要求 5 所述重配流感病毒给予该个体。
8. 一种分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸选自:
  - i) 包含 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1的残基 89-1063、SEQ ID NO:1的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5的残基 1063-1728 中任一项所示核苷酸序列或其互补序列的多核苷酸;
  - ii) 与多核苷酸序列 (a) 的序列相同性为至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的多核苷酸序列;
  - iii) 多核苷酸 (a),其中取代、插入或缺失了少于 1 个、少于 2 个、少于 3 个、少于 4 个、少于 5 个、少于 6 个、少于 7 个、少于 8 个、少于 9 个、少于 10 个、少于 11 个、少于 12 个、少于 13 个、少于 14 个、少于 15 个、少于 20 个、少于 25 个、少于 30 个、少于 40 个或少于 50 个核苷酸残基;和
  - iv) 包含编码权利要求 1 所述多肽的核苷酸序列的多核苷酸。
9. 一种免疫原性组合物,其包含权利要求 8 所述的多核苷酸。
10. 一种重配流感病毒,其包含权利要求 8 所述的多核苷酸。
11. 一种免疫原性组合物,其包含免疫学有效量的权利要求 10 所述的重配流感病毒。
12. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:
  - i) 通过生理上可接受的运载体将免疫学有效量的权利要求 10 所述重配流感病毒给予该个体。
13. 一种细胞,其包含权利要求 8 所述的多核苷酸。

14. 一种载体,其包含权利要求 8 所述的多核苷酸。
15. 如权利要求 14 所述的载体,其特征在于,所述载体是质粒、粘粒、噬菌体、病毒或病毒片段。
16. 如权利要求 14 所述的载体,其特征在于,所述载体是表达载体。
17. 一种包含权利要求 14-16 中任一项所述载体的细胞。
18. 一种阐述分离或重组多肽的方法,所述方法包括:
  - i) 在允许表达所述核酸的条件下,在合适培养基中培养权利要求 13 或 17 所述的细胞;和
  - ii) 从所述细胞或所述培养基中分离所述多肽。
19. 一种 6:2 重配流感病毒,其中所述病毒包含 6 个来自一种或多种供体病毒的内部基因组区段,并至少包含编码第一免疫原性流感表面抗原的第一基因组区段,其中所述第一流感表面抗原包含权利要求 1 所述的多肽。
20. 如权利要求 19 所述的重配病毒,其特征在于,还包含编码第二免疫原性流感表面抗原的第二基因组区段,其中所述第二流感表面抗原包含权利要求 1 所述的多肽。
21. 一种 6:2 重配流感病毒,其中所述病毒包含 6 个来自一种或多种供体病毒的内部基因组区段,并至少包含编码第一免疫原性流感表面抗原的第一基因组区段,其中所述第一流感表面抗原的编码基因组区段包含权利要求 8 所述的多核苷酸。
22. 如权利要求 19 所述的重配病毒,其特征在于,还包含编码第二免疫原性流感表面抗原的第二基因组区段,其中所述第二流感表面抗原的编码基因组区段包含权利要求 8 所述的多核苷酸。
23. 如权利要求 19-22 中任一项所述的重配病毒,其特征在于,所述一种或多种供体病毒是 A/Ann Arbor/6/60。
24. 如权利要求 19-22 中任一项所述的重配病毒,其特征在于,所述一种或多种供体病毒不是 A/Ann Arbor/6/60。
25. 如权利要求 24 所述的重配病毒,其特征在于,所述一种或多种供体病毒是 PR8。
26. 如权利要求 24 所述的重配病毒,其特征在于,所述一种或多种供体病毒是 A/Leningrad/17。
27. 如权利要求 19-26 中任一项所述的重配病毒,其特征在于,所述病毒包含具有修饰的多碱性切割位点的血凝素。
28. 如权利要求 19-27 中任一项所述的重配病毒,其特征在于,所述一种或多种供体病毒的内部基因组区段产生一种或多种下述特性:温度敏感性、冷适应性或减毒。
29. 一种免疫原性组合物,其包含免疫学有效量的权利要求 19-28 中任一项所述的重配流感病毒。
30. 一种减毒的活流感疫苗,其包含权利要求 19-28 中任一项所述的重配流感病毒。
31. 一种裂化病毒或杀死的病毒疫苗,其包含权利要求 19-28 中任一项所述的重配流感病毒。
32. 一种减毒的活流感疫苗,其包含权利要求 29 所述的组合物。
33. 一种裂化病毒或杀死的病毒疫苗,其包含权利要求 29 所述的组合物。
34. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:

i) 通过生理上有有效的运载体将免疫学有效量的权利要求 19-28 中任一项所述重配流感病毒给予该个体。

35. 一种在对象中预防性或治疗性治疗病毒感染的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 19-28 中任一项所述重配流感病毒给予该对象,其用量能有效产生对抗该病毒感染的免疫原性反应。

36. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:

i) 将免疫学有效量的权利要求 29 所述的免疫原性组合物给予该个体。

37. 一种在对象中预防性或治疗性治疗病毒感染的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 29 所述免疫原性组合物给予该对象,其用量能有效产生对抗该病毒感染的免疫原性反应。

38. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:

i) 将免疫学有效量的权利要求 30-33 中任一项所述的疫苗给予该个体。

39. 一种在对象中预防性或治疗性治疗病毒感染的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 30-33 中任一项所述的疫苗给予该对象,其用量能有效产生对抗该病毒感染的免疫原性反应。

40. 如权利要求 34-39 中任一项所述的方法,其特征在于,所述对象是人。

41. 一种分离抗体,其特异性结合权利要求 19-28 中任一项所述的重配流感病毒。

42. 一种在细胞培养物中产生流感病毒的方法,所述方法包括:

i) 将多种载体引入宿主细胞群中,所述载体包含对应于至少 6 个来自一种或多种供体病毒的内部基因组区段的核苷酸序列,还至少包含编码第一免疫原性流感表面抗原的第一基因组区段,其中所述第一表面抗原包含权利要求 1 所述的多肽;

ii) 培养所述宿主细胞群;和

iii) 回收多种流感病毒。

43. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,所述多种载体还包含对应于编码第二免疫原性流感表面抗原的第二基因组区段的核苷酸序列,其中所述第二流感表面抗原包含权利要求 1 所述的多肽。

44. 一种在细胞培养物中产生流感病毒的方法,所述方法包括:

i) 将多种载体引入宿主细胞群中,所述载体包含对应于至少 6 个来自一种或多种供体病毒的内部基因组区段的核苷酸序列,还至少包含编码第一免疫原性流感表面抗原的第一基因组区段,其中所述第一基因组区段包含权利要求 8 所述的多核苷酸;

ii) 培养所述宿主细胞群;和

iii) 回收多种流感病毒。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其特征在于,所述多种载体还包含对应于编码第二免疫原性流感表面抗原的第二基因组区段的核苷酸序列,其中所述第二流感表面抗原的编码基因组区段包含权利要求 8 所述的多核苷酸。

46. 如权利要求 42-45 中任一项所述的方法,其特征在于,所述一种或多种供体病毒是 A/Ann Arbor/6/60。

47. 如权利要求 42-45 中任一项所述的方法,其特征在于,所述一种或多种供体病毒不是 A/Ann Arbor/6/60。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其特征在于,所述一种或多种供体病毒是 PR8。

49. 如权利要求 47 所述的方法,其特征在于,所述一种或多种供体病毒是 A/Leningrad/17。

50. 如权利要求 42-49 中任一项所述的方法,其特征在于,所述病毒包含具有修饰的多碱性切割位点的血凝素。

51. 如权利要求 42-50 中任一项所述的方法,其特征在于,所述一种或多种供体病毒具有以下一种或多种特性:温度敏感性、冷适应性或减毒。

52. 一种免疫原性组合物,其包含免疫学有效量的权利要求 42-51 中任一项所述方法产生的流感病毒。

53. 一种减毒的活流感疫苗,其包含权利要求 52 所述的免疫原性组合物。

54. 一种裂化病毒或杀死的病毒疫苗,其包含权利要求 52 所述的免疫原性组合物。

55. 一种减毒的活流感疫苗,其包含权利要求 42-51 中任一项所述方法产生的病毒。

56. 一种裂化病毒或杀死的病毒疫苗,其包含权利要求 42-51 中任一项所述方法产生的病毒。

57. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:

i) 通过生理上有效的运载体将免疫学有效量的权利要求 42-51 中任一项所述方法产生的流感病毒给予该个体。

58. 一种在对象中预防性或治疗性治疗病毒感染的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 42-51 中任一项所述方法产生的流感病毒给予该对象,其用量能有效产生对抗该病毒感染的免疫原性反应。

59. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 52 所述的免疫原性组合物给予该个体。

60. 一种在对象中预防性或治疗性治疗病毒感染的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 52 所述的免疫原性组合物给予该对象,其用量能有效产生对抗该病毒感染的免疫原性反应。

61. 一种刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 53-56 中任一项所述的疫苗给予该个体。

62. 一种在对象中预防性或治疗性治疗病毒感染的方法,所述方法包括:

i) 将权利要求 53-56 中任一项所述的疫苗给予该对象,其用量能有效产生对抗该病毒感染的免疫原性反应。

63. 一种分离抗体,其特异性结合权利要求 42-51 中任一项所述方法产生的流感病毒。

## 流感血凝素和神经氨酸酶变体

### [0001] 发明背景

[0002] 每年众多个体感染不同品系和类型的流感病毒,因此对抗多种并且不断演化的流感病毒株的疫苗不仅对于公共卫生很重要,同时具有商业价值。对婴儿、老年人、缺乏医疗条件的人群以及免疫低下的人群而言,此类感染的致死风险很高。此类流感感染的复杂性在于新的流感病毒株容易演化并在不同物种间传播,因此需要不断生产新的疫苗。

[0003] 近 50 年生产了数种能够对此类不同流感病毒 / 病毒株产生特异性保护性免疫应答的疫苗,包括完全病毒疫苗、裂化病毒疫苗、表面抗原疫苗和减毒病毒疫苗。然而,尽管任一这些疫苗类型的合适剂型都可产生系统的免疫应答,但减毒病毒疫苗的优势在于还可在呼吸道内刺激局部黏膜免疫。本发明人和同事为生产疫苗在产生流感病毒及其片段方面进行了大量工作;参见例如,2002 年 10 月 23 日提交的美国申请号 60/420,708;2004 年 5 月 24 日提交的 60/574,117;2003 年 4 月 25 日提交的 10/423,828;2004 年 6 月 12 日提交的 60/578,962;以及 2004 年 6 月 16 日提交的 10/870,690,其公开内容纳入文本作参考。

[0004] 因为不同流感病毒株的持续出现(或再现),因此不断地需要新的流感疫苗。通常利用新出现病毒株的抗原部分创造此类疫苗,因此,急需新的、新出现的或新重现的病毒株的多肽和多核苷酸(尤其是抗原性基因序列)。

[0005] 本发明提供可用于数种类型疫苗的生产及研究、诊断等的新的和 / 或新分离的流感血凝素和神经氨酸酶变体。浏览下述内容后还可明了其它多种益处。

### [0006] 发明概述

[0007] 在本发明的一些方面,本发明包括分离或重组多肽,其选自:包含 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 中任一项编码的氨基酸序列的多肽;包含 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 中任一项的氨基酸序列的多肽;包含 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 中任一项的开放阅读框编码的氨基酸序列的多肽;包含 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 中任一项的氨基酸序列的任何另选多肽形式(如不含信号肽的成熟形式或病毒(如流感病毒)表面上出现的多肽);在高度严谨条件下,与由选自 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 的核苷酸序列组成的多核苷酸基本上全长杂交的多核苷酸编码的任何多肽;在高度严谨条件下,与由选自 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 的核苷酸序列组成的多核苷酸杂交的多核苷酸编码的任何多肽;以及上述多肽的片段,其中所述序列包含血凝素或神经氨酸酶多肽、或血凝素或神经氨酸酶多肽的片段。在一个实施方式中,这类多肽片段产生能特异性结合本发明全长多肽的抗体。在各种实施方式中,本发明

分离或重组多肽与任何上述多肽的约 300 个毗连氨基酸残基基本相同。在另一个实施方式中,本发明所包括的分离或重组多肽中包含与任何上述多肽中相互毗连的至少约 350 个氨基酸;至少约 400 个氨基酸;至少约 450 个氨基酸;至少约 500 个氨基酸;至少约 520 个氨基酸;至少约 550 个氨基酸;至少约 559 个氨基酸;至少约 565 个氨基酸;或至少约 566 个氨基酸基本相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,多肽序列(如本文“序列”所列举的)包含少于 565、559 等等个氨基酸。在此类实施方式中,较短的列举多肽任选含有少于 565、559 等等个氨基酸。在另一实施方式中,本发明多肽(如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562)任选包括融合蛋白、有前导序列的蛋白、前体多肽、有分泌信号或定位信号的蛋白、或有表位标签如 E- 标签或 His 表位标签的蛋白。在其它实施方式中,本发明包括的多肽含有与包含选自 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 的氨基酸序列的多肽具有至少 85%、至少 90%、至少 93%、至少 95%、至少 98%、至少 98.5%、至少 99%、至少 99.2%、至少 99.4%、至少 99.6%、至少 99.8%、或至少 99.9% 序列相同性的氨基酸序列。在另一实施方式中,本发明多肽包含在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 个氨基酸残基上与 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 或 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 中任一项不同的氨基酸序列。本发明血凝素序列能同时含有具有未修饰或修饰的多碱性切割位点(从而使病毒在鸡蛋中生长)的序列。SEQ ID NO:2 和 6 的血凝素多肽序列包含内源性氨基末端信号肽序列,然而,本发明血凝素多肽序列还包含血凝素多肽的成熟形式(切掉氨基末端的信号肽)。可利用本领域数种方法常规测定或预测任何流感病毒株的任何血凝素多肽序列的切割位点。

[0008] 在其它方面,本发明包括含有一种或多种上述多肽或其片段的组合物。本发明也包括与多克隆抗血清特异性结合的多肽,所述多克隆抗血清是用含有至少一种上文所述氨基酸序列或其片段的至少一种抗原产生的。此类对上述多肽具有特异性的抗体也是本发明的特征。在一个实施方式中,本发明的多肽具有免疫原性。

[0009] 本发明也包括包含免疫有效量的一种或多种上述多肽(如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562)的免疫原性组合物,以及通过生理上可接受的运载体将免疫有效量的任何上述多肽给予个体,刺激该个体的免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法。

[0010] 此外,本发明包括包含一种或多种上述多肽或多核苷酸的重配流感病毒,以及包含免疫有效量的这类重配流感病毒的免疫原性组合物。通过生理上可接受的运载体给予免疫有效量的这类重配流感病毒以刺激个体免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法也是本发明的一部分。

[0011] 在其它方面,本发明包括分离或重组多核苷酸,其选自:包含 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 的核苷酸序列或其互补序列中任一项的多核苷酸、包含选自 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ

ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 的氨基酸序列的多肽的编码多核苷酸或其互补核苷酸序列、在高度严谨条件下与任何上述多核苷酸基本上全长杂交的多核苷酸,包含任何这类核苷酸序列的全长或片段的多核苷酸,其中所述序列编码血凝素或神经氨酸酶多肽或者血凝素或神经氨酸酶多肽的片段。本发明也包括分离或重组核酸,所述分离或重组核酸编码的氨基酸序列与上述多核苷酸编码的任何多肽至少约 300 个氨基酸基本相同,或与上述核酸编码的多肽至少约 350 个氨基酸;至少约 400 个氨基酸;至少约 450 个氨基酸;至少约 500 个氨基酸;至少约 502 个氨基酸;至少约 550 个氨基酸;至少约 559 个氨基酸;至少约 565 个氨基酸;至少约 566 个氨基酸基本相同。此外,在氨基酸长度少于如 566、565、559 等的情况下(参见例如,“序列”),应理解的是长度任选小于 566、565、559 等。本发明也包括上述任何多核苷酸,其包含编码血凝素或神经氨酸酶多肽、或一种或多种血凝素或神经氨酸酶多肽的一个或多个片段的核苷酸序列。本发明的其它方面包括编码多肽(例如血凝素或神经氨酸酶多肽)的分离或重组多核苷酸,该多肽的序列与上述至少一种多肽具有至少 98% 相同性,至少 98.5% 相同性,至少 99% 相同性,至少 99.2% 相同性,至少 99.4% 相同性,至少 99.6% 相同性,至少 99.8% 相同性,或至少 99.9% 相同性。本发明还包括通过突变或重组一种或多种上述多核苷酸而产生的编码血凝素或神经氨酸酶多肽的分离或重组多核苷酸。在一个实施方式中,本发明多核苷酸可包含编码(例如)前导序列、前体序列、表位标签序列等中一种或多种的核苷酸序列,任选编码融合蛋白。

[0012] 在其它实施方式中,本发明包括含有两种或多种上述多核苷酸的组合物(例如,包含至少约 2、5、10、50 或更多种多核苷酸的文库)。任选地,可通过切割一种或多种上述多核苷酸(例如,机械切割、化学切割、用限制性核酸内切酶/RNA 酶/DNA 酶进行酶促切割等)产生这类组合物。本发明的其它组合物包括例如,在三磷酸脱氧核糖核苷酸和热稳定性多核苷酸聚合酶的存在下培育一种或多种上述多核苷酸产生的组合物。

[0013] 本发明还包括含有至少一种上述多核苷酸或其切割或扩增片段或其产物的细胞。此类细胞可任选表达所述多核苷酸编码的多肽。本发明的其它实施方式包括含有任何上述多核苷酸的载体(如质粒、粘粒、噬菌体、病毒、病毒片段等)。此类载体任选包括表达载体。本发明优选的表达载体包括但不限于:含有 pol I 启动子和终止子序列的载体或使用 pol I 和 pol II 启动子“polI/polII 启动子系统”的载体(如 Zobel 等, Nucl. Acids Res. 1993, 21:3607; US20020164770; Neumann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9345; Fodor 等, J. Virol. 1999, 73:9679; 和 US20030035814)。被此类载体转化的细胞也在当前发明的范围内。

[0014] 在一些实施方式中,本发明包括含有一种或多种上述多核苷酸(如编码血凝素和/或神经氨酸酶)或其一种或多种片段的病毒(如流感病毒)。包含此类病毒的免疫原性组合物也是本发明的一部分。此类病毒能包含重配病毒,如 6:2 重配病毒(如,含有来自一种或多种供体病毒的 6 个内部基因组区段和包含一种或多种上述多核苷酸(或其一种或多种片段)的 2 个基因组区段(如 HA 或 NA 基因组区段))。在一个实施方式中,所述基因组区段可编码本发明的血凝素和/或神经氨酸酶多肽。在一个实施方式中,本发明重配病毒是活病毒。在另一实施方式中,本发明重配病毒是温度敏感型(ts)、冷适应性(ca)或减毒(att)病毒。在一个实施方式中,本发明重配病毒包括至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或 6 个供体病毒(如 A/Ann Arbor/6/60、PR8 等)的内部基因组区段。在另



一实施方式中,本发明重配病毒包括至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或 6 个除 A/Ann Arbor/6/60 以外的供体病毒的内部基因组区段。本发明的一个优选实施方式是重配流感病毒,其中病毒是 6:2 重配流感病毒并包含 6 个来自 A/Ann Arbor/6/60 的内部基因组区段和 2 个编码选自下组的多肽的基因组区段:SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 的多肽。在另一实施方式中,本发明重配流感病毒包括 6:2 重配流感病毒,其中所述病毒包含 6 个来自除 A/Ann Arbor/6/60 以外的一种或多种供体病毒的内部基因组区段和 2 个编码选自下组的多肽的基因组区段:SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 的多肽。在另一实施方式中,本发明重配流感病毒包括 6:2 重配流感病毒,其中所述病毒包含 6 个来自除 A/Ann Arbor/6/60 以外的一种或多种供体病毒的内部基因组区段和 2 个基因组区段,其中所述 2 个基因组区段编码来自大流行流感病毒株的 HA 和 / 或 NA 多肽。在允许重配流感病毒复制的条件下在合适培养基中培养携带流感病毒的宿主细胞以织造重配流感病毒,并从一种或多种宿主细胞或培养基中分离所述重配流感病毒的方法也是本发明的一部分。

[0015] 在本文所述的其它实施方式中,本发明包括含有免疫有效量的任何上述重配流感病毒的免疫原性组合物。其它实施方式包括通过给予个体免疫有效量的任何上述重配流感病毒(任选在生理上有效的运载体中),刺激该个体的免疫系统对流感病毒产生保护性免疫应答的方法。

[0016] 本发明的其它方面包括在允许表达所述多肽的条件下在合适培养基中培养任何上述宿主细胞,并且从一个或多个宿主细胞或培养细胞的培养基中分离所述多肽,从而产生分离或重组多肽的方法。

[0017] 免疫原性组合物也是本发明的特征。例如,包含一种或多种任何上述多肽和 / 或多核苷酸和任选的赋形剂,如药学上可接受的赋形剂或一种或多种药学上可接受的给药组分的免疫原性组合物。本发明免疫原性组合物也可包含任何一种或多种上述病毒(如,与一种或多种药学上可接受的给药组分一起)。

[0018] 通过将有效量的任何上述病毒(或免疫原性组合物)给予对象在对象中产生免疫原性反应的方法也在本发明范围内。此外,通过给予一定量的任何一种或多种上述病毒(或免疫原性组合物)以有效产生对抗病毒感染的免疫原性反应,从而在对象中预防或治疗病毒感染(如病毒性流感)的方法也是本发明的一部分。此类治疗的对象包括但不限于:鸟类(如家禽)和哺乳动物(如人)。此类方法也可包括对对象体内给药以及对对象的一种或多种细胞体外或离体给药。此外,此类方法还包括给予病毒和药学上可接受的赋形剂的组合物,以一定量给予对象从而有效预防或治疗病毒感染。

[0019] 在其它方面,本发明包括含有编码一种或多种大流行流感病毒株血凝素和 / 或神经氨酸酶多肽的核苷酸序列以及编码 A/Ann Arbor/6/60 的一种或多种多肽的核苷酸序列的组合物。此外,本发明包括含有编码一种或多种大流行流感病毒株血凝素和 / 或神经氨酸酶多肽的核苷酸序列以及编码 PR8/A/Leningrad/17 或 A/Ann Arbor/6/60 的一种或多种多肽的核苷酸序列的组合物。此类序列能包括本文“序列”部分所列举的那些。此外,本发明的优选实施方式包括含有编码一种或多种大流行流感病毒株血凝素和 / 或神经氨酸酶

多肽的核酸序列以及在 6:2 重配株中编码所选主体 (backbone) 病毒株的核苷酸序列的组合物。此类组合物优选包括选自本文“序列”部分中编码血凝素和神经氨酸酶的序列以及主体病毒株,其中主体病毒株为 PR8、A/LENINGRAD/17 或 A/Ann Arbor/6/60。本发明也包括如上所述的此类组合物,其中血凝素包含修饰的多碱性切割位点。本发明也包括含有上述组合物的减毒的活流感疫苗。

[0020] 参照附图和附录阅读以下详述后,将完全明白本发明的这些和其它目的和特征。

[0021] 附图简要说明

[0022] 图 1 :H2 野生型刺激病毒在用所示各种 H2 疫苗病毒进行免疫的雪貂肺中的复制。效价代表右肺和左肺的平均值。

[0023] 图 2 :H2 野生型刺激病毒在用所示各种 H2 疫苗病毒进行免疫的雪貂 NT 中的复制。

[0024] 图 3 :H2 野生型刺激病毒在用所示各种 H2 疫苗病毒进行免疫的小鼠肺中的复制。

[0025] 图 4 :H2 野生型刺激病毒在用所示各种 H2 疫苗病毒进行免疫的小鼠 NT 中的复制。

[0026] 发明详述

[0027] 本发明包括流感血凝素和神经氨酸酶多肽和多核苷酸,以及包含此类多肽和多核苷酸的载体、组合物、重配流感病毒等和其使用方法。本发明的其它特点在此详述。

[0028] 定义

[0029] 除非另有限定,在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域技术人员的通常理解一致。以下的定义为本领域的内涵提供补充,用于本申请,但不一定用于任何相关或不相关的情况,例如任何共同拥有的专利或申请。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明,但下面描述了优选的方法和材料。因此,本文所用的术语仅仅用来描述具体的实施方式,而不是用于限制。

[0030] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”,“一种”和“该”包括多个指示物,除非上下文中有明显的表示。因此,例如,提及“一个病毒”包括多数病毒;提及“一种宿主细胞”包括宿主细胞的混合物。

[0031] 在提到病毒时,术语“重配”表示所述病毒包括来自多于一种亲本病毒株或来源的遗传和/或多肽组分。例如,7:1 重配株包括 7 个来自第一病毒的病毒基因组区段(或基因区段)和 1 个(例如)编码本发明血凝素或神经氨酸酶的补充病毒基因组区段。6:2 重配株包含来自第一病毒的 6 个基因组区段,如 6 个内部基因组区段,以及来自第二病毒或第二和第三病毒的两个补充基因组区段,即编码血凝素和神经氨酸酶的基因组区段。

[0032] 术语“宿主细胞”指含有异源多核苷酸如载体,并支持该多核苷酸的复制和/或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌(E. coli),或真核细胞如酵母、昆虫、两栖类、鸟类或哺乳动物细胞,包括人细胞。在一个实施方式中,宿主细胞可以是但不限于:Vero(非洲绿猴肾)细胞、BHK(幼仓鼠肾)细胞、原代鸡肾(PCK)细胞、Madin-Darby 狗肾(MDCK)细胞、Madin-Darby 牛肾(MDBK)细胞、293 细胞(如 293T 细胞)和 COS 细胞(如 COS1、COS7 细胞)等。

[0033] 流感病毒的“免疫有效量”是足以提高个体(如人)自身对随后接触流感病毒产生免疫应答的用量。可检测诱导免疫水平,如通过检测中和分泌和/或血清抗体的量,如通过空斑中和、补体固定、酶联免疫吸附或微中和实验来检测。

[0034] 对抗病毒的“保护性免疫应答”指经过疾病防护的个体后续暴露于和/或被此类

流感病毒感染时,个体(如人)展示的免疫应答。在一些例子中,流感病毒(如天然循环)仍能引起感染,但不能引起严重感染。通常,保护性免疫应答使得宿主产生血清和分泌抗体水平可检测到,所述宿主产生血清和分泌抗体能体外和体内中和同一病毒株和/或亚组的病毒(也可能为不同的、非疫苗株和/或亚组)。

[0035] 本文所用“抗体”为包含一个或多个完全或部分由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的多肽的蛋白。公认的免疫球蛋白基因包括  $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\mu$  恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为  $\kappa$  或  $\lambda$ 。重链归类为  $\gamma$ 、 $\nu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$ ,它们分别依次定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。一种典型的免疫球蛋白(抗体)的结构单位包含四聚体。各四聚体由两个相同的多肽链对组成,各对有一条“轻链”(约 25kD)和一条“重链”(约 50-70kD)。各链的 N 末端确定约 100-110 或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)分别指这些轻链和重链。抗体以完整的免疫球蛋白形式或用不同肽酶消化产生许多良好表征的片段形式存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区二硫连接以下消化抗体产生  $F(ab')_2$ ,  $F(ab')_2$  是 Fab 二聚体,其本身是通过二硫键与  $V_H-C_H1$  连接的轻链。可在温和条件下还原  $F(ab')_2$  以打断铰链区中的二硫连接,从而将  $F(ab')_2$  二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体实质上是具有部分铰链区的 Fab(对其它抗体片段的更详细描述参见,《基础免疫学》(Fundamental Immunology),W. E. Paul 编, Raven Press, N. Y. (1999))。虽然根据完整抗体的消化定义了不同抗体片段,但是本领域技术人员将理解,也可用化学方法或通过重组 DNA 的方法从头合成所述 Fab' 片段。因此,本文所用术语“抗体”包含抗体或通过完整抗体修饰的或使用重组 DNA 方法全新合成的片段。抗体包括,例如,多克隆抗体、单克隆抗体、多链或单链抗体,单链抗体包括其中可变的重链和可变的轻链连接在一起(直接或通过肽接头)形成连续多肽的单链 Fv(sFv 或 scFv) 抗体,以及人源化或嵌合抗体。

#### [0036] 流感病毒

[0037] 本发明的多肽和多核苷酸,如 SEQ ID NO:1-8,为流感 HA 和 NA 序列的变体。通常,流感病毒由含区段化单链 RNA 基因组的内部核蛋白核心以及由基质蛋白排列成的外部脂蛋白包膜组成。流感病毒基因组由 8 个线性(-)链核糖核酸(RNA)的基因组区段和 6 个内部核心多肽组成,所述基因组区段编码免疫原性血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)蛋白,所述内部核心多肽是:核衣壳核蛋白(NP);基质蛋白(M);非结构蛋白(NS);和 3 个 RNA 聚合酶(PA、PB1、PB2)蛋白。复制过程中,基因组 RNA 在宿主细胞核中转录成为(+)链信使 RNA 和(-)链基因组 cRNA。8 个基因组区段中的每一个都包装成为核糖核蛋白复合物,其中除了 RNA 外还含有 NP 和聚合酶复合物(PB1、PB2 和 PA)。

[0038] 流感通常分为甲型流感和乙型流感。每一甲型流感和乙型流感病毒均含有 8 段具负极性的单链 RNA。甲型流感基因组编码 11 个多肽。区段 1-3 编码 3 个多肽,组成 RNA- 依赖性 RNA 聚合酶。区段 1 编码聚合酶复合物蛋白 PB2。剩下的聚合酶蛋白 PB1 和 PA 分别由区段 2 和区段 3 编码。此外,某些流感株的区段 1 编码小蛋白 PB1-F2,由 PB1 编码区内的另一阅读框产生。区段 4 编码在感染过程中参与细胞粘附和进入的血凝素(HA)表面糖蛋白。区段 5 编码与病毒 RNA 关联的主要结构组分,核衣壳核蛋白(NP)多肽。区段 6 编码神经氨酸酶(NA)包膜糖蛋白。区段 7 编码两个基质蛋白 M1 和 M2,它们由差异剪接的 mRNA 翻译。区段 8 编码两个非结构蛋白 NS1 和 NS2,它们由另路剪接的 mRNA 变体翻译。乙型流感的

个基因组区段编码 11 个蛋白。三个最大的基因编码 RNA 聚合酶的组分 PB1、PB2 和 PA。区段 4 编码 HA 蛋白。区段 5 编码 NP。区段 6 编码 NA 蛋白和 NB 蛋白。蛋白质 NB 和 NA 均由顺反子 mRNA 的交叠阅读框翻译而来。乙型流感的区段 7 也编码两个蛋白：M1 和 M2。最小区段编码两个产物：NS1 翻译自全长 RNA，而 NS2 翻译自剪接 mRNA 变体。

#### [0039] 流感病毒疫苗

[0040] 本文的序列、组合物和方法主要但非只关于产生流感病毒疫苗。历史上，首先使用选择或基于经验预测的相关株的病毒株在含胚鸡蛋中产生流感病毒疫苗。最近，在一种批准的减毒温度敏感型主株中合并所选血凝素和 / 或神经氨酸酶抗原产生重配病毒。在鸡蛋中将病毒培养物传代数次后，回收病毒并任选灭活病毒，如使用甲醛和 / 或  $\beta$ -丙内酯灭活（或用于减毒的活疫苗）。因此，应理解，HA 和 NA 序列（如 SEQ ID NO：2、4、6、8、SEQ ID NO：2 的残基 16-340、SEQ ID NO：2 的残基 341-562、SEQ ID NO：6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO：6 的残基 341-562）在流感疫苗的构建中相当有用。本发明包括含有 A/Japan/57 和 A/swine/MO/2006HA 和 / 或 NA 的多肽和多核苷酸的病毒 / 疫苗（包括其中 HA 多肽和多核苷酸包含修饰的多碱性切割位点，例如本文所述修饰）；并包括其中病毒 / 疫苗包含主体（即 6 个内部基因组区段），如 ca A/AA/6/60、A/Leningrad/17 或 PR8 的主体。

[0041] 在细胞培养物中生产重组和重配疫苗的尝试受阻的原因是一些批准用于疫苗生产的病毒株无法在标准细胞培养条件下有效生长。然而，发明人和同事先前的工作提供了一种在培养物中产生重组和重配病毒的载体系统及方法，因此，使快速生产对应一种或多种所选抗原性病毒株的疫苗成为可能，如，A 或 B 株，不同亚型或亚株等，如，含有本文 HA 和 / 或 NA 序列。参见，用于生产流感病毒的多质粒系统 (Multi-Plasmid System for the production of Influenza virus)，2002 年 10 月 23 日提交的美国申请号 60/420,708，2003 年 4 月 25 日提交的美国申请号 10/423,828，以及 2004 年 5 月 24 日提交的美国申请号 60/574,117。通常，将培养物维持于恒温器控制的恒温（使温度不超过 35℃）、湿度和 CO<sub>2</sub> 控制系统中，如细胞培养箱。通过将对应主流感病毒的基因组区段的载体子集与源于感兴趣病毒株的补充区段（如，本文 HA 和 / 或 NA 抗原性变体）联合引入，易于获得重配流感病毒。通常，基于需给药疫苗相关所需特性选择主病毒株。例如，用于疫苗生产，如，用于减毒的活疫苗生产，主供体病毒株可选自减毒表型、冷适应和 / 或温度敏感型。在一个实施方式中，主供体病毒包含产生一种或多种以下特性的 6 个内部基因组区段（即主体）：温度敏感性、冷适应性或减毒。如本文其它部分及美国专利申请号 10/423,828 等所释，本发明的不同实施方式使用 A/Ann Arbor(AA)/6/60 流感株作为“主体”，在其基础之上加上 HA 和 / 或 NA 基因（如本文所列的那些序列等）来创造所需重配病毒。因此，例如，在 6:2 重配株中，2 个基因（即 NA 和 HA）来自于期望对之产生免疫原性反应的流感株，而其它 6 个基因来自于 Ann Arbor 株，或其它主体病毒株，等。Ann Arbor 病毒的冷适应性、减毒和温度敏感属性很有用。当然，应当被意识到的是本文中的 HA 和 NA 序列能够与数种其它病毒基因或病毒类型发生重配（如数种不同“主体”，如 PR8 等，其包含出现于重配株的其它流感基因，即非 HA 和非 NA 基因）。

[0042] 本文中的不同实施方式可包含用于 A/Japan/57 或 A/swine/MO/2006 的具有本文 HA 和 / 或 NA 序列的减毒活疫苗。这类疫苗通常包含，例如，SEQ ID NO：2、4、6、8、SEQ ID NO：2 的残基 16-340、SEQ ID NO：2 的残基 341-562、SEQ ID NO：6 的残基 16-340 和 SEQ ID

NO:6 的残基 341-562 的 HA 和 / 或 NA 多肽,或者与它们对应的编码核苷酸,即 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728。疫苗病毒株(如重配株)在鸡蛋中生长造成的一个问题是一些病毒株(可能涉及大流行)能杀死生产疫苗的鸡蛋,因此通过使用传统(非质粒拯救)重配株生产难以操作、制造等。因为此类病毒株能引起人类流感及可能大流行因此对其很感兴趣。因此,急需使用质粒拯救系统及各种病毒株(如本文 HA 和 NA 序列)产生 / 操作流感重配株,这也是本发明的特征。然而,应当意识到的是当前序列也可能用于非质粒或传统的系统。

[0043] 在本文的不同实施方式中,抗原性序列(如 HA 和 / 或 NA 多肽)以及病毒和来自此类病毒的疫苗含有修饰的多碱性切割位点。一些高致病性流感病毒株在血凝素序列内包含多个碱性氨基酸切割位点。参见例如, Li 等, *J. of Infectious Diseases*, 179:1132-8, 1999。在本发明的典型实施方式中,与产生目前序列的野生型序列相比,此类切割位点的序列经过修饰或更改(如,使其不能切割或减少了切割等)。因为野生型序列切割位点的不同序列,在不同病毒株中此类修饰 / 更改是不同的。例如,通常,本文序列中移除(与 wt 相比)成熟 H5 的位置 326-329 上的 4 个多碱性残基(精氨酸-精氨酸-赖氨酸-赖氨酸)。在各种实施方式中,可通过多种方式修饰多碱性切割位点(这些均包含于本发明范围内)。例如,一次可移除多碱性切割位点的一个氨基酸(如,移除一个精氨酸,移除两个精氨酸,移除两个精氨酸和一个赖氨酸,或移除两个精氨酸和两个赖氨酸)。此外,切割位点直接上游的氨基酸残基也可被移除或更改(如, R 变为 T 等);切割位点直接下游的氨基酸编码核苷酸也同样可被修饰。此外,流感病毒血凝素多肽序列含有氨末端信号肽序列,因此,本发明的血凝素多肽序列包含血凝素多肽的成熟(氨基末端信号肽切割)形式以及血凝素的预切割形式。利用本领域任何数种方法可常规检测任何流感株的任何血凝素多肽序列的切割位点。

[0044] 应用于任选包含当前序列的病毒(通常用于疫苗或疫苗生产)的术语“温度敏感型”、“冷适应性”和“减毒的”为本领域所熟知。例如,对甲型流感株而言,术语“温度敏感型”(ts)表明与 33℃相比病毒在 39℃时表现出 100 倍甚至更多的减弱,或者对乙型流感株而言,与 33℃相比,在 37℃时表现出 100 倍甚至更多的减弱。术语“冷适应性”(ca)表明病毒在 25℃时生长为在 33℃的 100 倍之内,而术语“减毒”(att)表明病毒在雪貂的上呼吸道内复制但未在其肺组织中检测到,并且不在动物中引起流感样疾病。应理解,病毒具有中间表型,即病毒在 39℃(对 A 株病毒)或 37℃(对 B 株病毒)展现的减弱小于 100 倍,或在 25℃时生长为 33℃生长的 100 倍以上(如 200 倍内、500 倍内、1000 倍、少于 10,000 倍),和 / 或与上气道相比,在雪貂肺中生长减弱(即部分减毒)和 / 或在动物中减弱的流感样疾病,也是有用的病毒并可与本文的 HA 和 NA 序列联用。

[0045] 再次,任选将本发明的 HA 和 NA 序列用于生产重配病毒或用于重配病毒(和 / 或在其它 ts、cs、ca 和 / 或 att 病毒和疫苗)。然而,应该注意到本发明的 HA 和 NA 序列等不仅限于特定的疫苗组合物或生产方法,因此也可应用于利用菌株特异性 HA 和 NA 抗原的基本上任何疫苗类型或疫苗生产方法(例如, SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562,或者编码特定 HA 和 NA 抗原的相应核苷酸,如 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1

的残基 89-1063、SEQ ID NO :1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO :5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO :5 的残基 1063-1728)。

[0046] FluMist™

[0047] 如前文所提到的,存在数种流感疫苗类型的例子。流感疫苗的一个例子是 FluMist™,它是保护儿童和成人免受流感疾病侵袭的活减毒疫苗 (Belshe 等 (1998) 减毒、冷适应性、三价、鼻内流感病毒活疫苗在儿童中的功效 (The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children) N Engl J Med 338:1405-12; Nichol 等 (1999) 减毒、鼻内流感病毒活疫苗在健康的有工作成年人中的有效性:随机对照试验 (Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial) JAMA 282:137-44)。本发明的方法和组合物可以适应于 / 应用于 FluMist™ 疫苗生产。然而,应当被本领域熟练技术人员了解的是本文的序列、方法、组合物等也可用于生产相似或者甚至不同的病毒疫苗。

[0048] FluMist™ 疫苗病毒株包含起源于病毒株 (如野生型病毒株) 的 HA 和 NA 基因区段,疫苗还包含六个来自共有主供体病毒 (MDV) 的基因区段,即 PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS。因此本文的 HA 序列可以是不同的 FluMist™ 制剂的一部分。FluMist™ 的甲型流感病毒株的 MDV (MDV-A) 是在持续低温下在原代鸡肾组织培养物中连续传代野生型 A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) 病毒株所得 (Maassab (1967) 流感病毒在 25 摄氏度下的适应和生长特性 (Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C) Nature 213:612-4)。MDV-A 在 25°C 下有效复制 (ca, 冷适应性),但在 38°C 和 39°C 下生长受限 (ts, 温度敏感)。此外,该病毒在感染雪貂的肺部不复制 (att, 减毒)。ts 表型被认为通过限制除呼吸道最冷区域外病毒的复制使疫苗具有减毒性。该性质的稳定性已在动物模型及临床试验中展现。与化学诱变产生的流感株 ts 表型相反,MDV-A 的 ts 特性不随在感染仓鼠中传代而回复也不在儿童的流出分离物中回复 (近期的一篇综述,参见 Murphy 和 Coelingh (2002) 开发和使用减毒的冷适应性甲型流感和乙型流感病毒活疫苗的原理 (Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccine) Virus Immunol 15:295-323)。

[0049] 在超过 20,000 个成人和儿童中进行关于 12 种分离 6:2 重配株的临床研究表明这些疫苗是减毒、安全有效的 (Belshe 等 (1998) 减毒、冷适应性、三价、鼻内流感病毒活疫苗在儿童中的功效 (The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza vaccine in children) N Engl J Med 338:1405-12; Boyce 等 (2000) 通过鼻内途径给予健康成年人的含佐剂和不含佐剂的亚基流感疫苗的安全性和免疫原性 (Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccine administered intranasally to healthy adults) Vaccine 19: 217-26; Edwards 等 (1994) 用于预防甲型流感的冷适应性和灭活疫苗的随机对照试验 (A randomized controlled trial of cold-adapted and inactivated vaccine for the prevention of influenza A disease) J Infect Dis 169:68-76; Nichol 等 (1999) 减毒、鼻内流感病毒活疫苗在健康的有工作成年人中的有效性:随机对照试验 (Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza vaccine in healthy, working adults:

a randomized controlled trial) JAMA 282:137-44)。携带 MDV-A 六个内部基因和野生型病毒两个 HA 和 NA 基因区段的重配病毒（即，6:2 重配株）一向保持 ca、ts 和 att 表型（Maassab 等（1982）在雪貂中评价冷适应性流感疫苗（Evaluation of a cold-recombinant influenza vaccine in ferrets）J. Infect. Dis. 146:780-900）。

[0050] 使用乙型流感病毒株生产此类重配病毒要困难一些，然而，近期工作（参见例如，生产流感病毒的多质粒系统，2002 年 10 月 23 日提交的美国申请号 60/420,708，2003 年 4 月 25 日提交的美国申请号 10/423,828 以及 2004 年 5 月 24 日提交的美国申请号 60/574,117）展示了一个完全来自克隆 cDNA 的用于产生乙型流感病毒的八质粒系统。用于产生减毒甲型和乙型流感活病毒的方法适用于疫苗制剂，如为人熟知的用于鼻内给药的活病毒疫苗制剂。

[0051] 前述系统和方法可用于在细胞培养物中快速生产重组和重配的甲型和乙型流感病毒，包括适合用作疫苗的病毒，包括减毒的活疫苗，如合适鼻内给药的疫苗。本发明的序列（例如，核苷酸序列 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 或 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728、以及所述核苷酸序列编码的相应氨基酸序列 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 或 SEQ ID NO:6 的残基 341-562）、方法等可任选与先前工作涉及的，例如用于疫苗生产的重配流感病毒一起或联合使用，以生产疫苗用病毒。

[0052] 用于预防性疫苗给药的方法和组合物

[0053] 如上所述或除了用于生产 FluMist™ 疫苗外，本发明还可用于其它疫苗制剂。通常，本发明的重组和重配病毒（例如，包含 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 或 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 的多核苷酸，或者 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 或 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 的多肽，或其片段的病毒）可以免疫有效量并在合适运载体或赋形剂中预防性给药以刺激对于一种或多种流感病毒株的特异性免疫应答，这些流感病毒株由 HA 和 / 或 NA 序列决定。通常，运载体或赋形剂为药学上可接受的运载体或赋形剂，如灭菌水、盐水溶液、缓冲盐水溶液、右旋糖水溶液、甘油水溶液、乙醇或其组合。根据本领域确定的实验方法能够有效制备此类溶液并确保无菌、pH、等渗和稳定性。通常，选择运载体或赋形剂以尽量减少过敏和其它不需要的反应，并适合于特定的给药途径，如皮下、肌肉内、鼻内等。

[0054] 本发明的一个相关方面提供了刺激个体免疫系统产生对抗流感病毒的保护性免疫应答的方法。在方法中，用在生理上可接受运载体中的重组流感病毒（如，含有本发明 HA 和 / 或 NA 分子）的免疫有效量、本发明多肽的免疫有效量和 / 或本发明核酸的免疫有效量进行给药。

[0055] 通常，以足以刺激对一种或多种流感病毒株（即，本发明的 HA 和 / 或 NA 病毒株）应答的量给予本发明的流感病毒。优选给予流感病毒引起对此类病毒株的保护性免疫应答。本领域熟练技术人员了解引起对于一种或多种流感病毒株的保护性免疫应答的剂量和方法。参见例如，USPN 5,922,326；Wright 等，Infect. Immun. 37:397-400（1982）；Kim 等，Pediatrics 52:56-63（1973）；和 Wright 等，J. Pediatr. 88:931-936（1976）。例如，每剂量

提供约 1-1000  $\text{HID}_{50}$  (人有效剂量), 即约  $10^5$ - $10^8$  pfu (空斑形成单位) 流感病毒进行给药。通常, 根据如年龄、身体条件、体重、性别、饮食、给药时间和其它临床因素在范围内调整剂量。全身给予预防性疫苗制剂, 如利用针和注射器或无针装置进行皮下或肌肉内注射。或者鼻内给予疫苗制剂, 通过滴剂、大颗粒气溶胶 (大于约 10 微米), 或喷入上呼吸道。尽管上述任何途径均引起保护性系统免疫应答, 但鼻内给药的另一益处是引起流感病毒进入位置的黏膜免疫。对于鼻内给药, 经常优选减毒活病毒疫苗, 如, 减毒、冷适应性和 / 或温度敏感型重组或重配流感病毒。参见上文。尽管优选单次给药刺激保护性免疫应答, 但也可通过相同或不同途径给予额外剂量, 以达到所需预防效果。

[0056] 通常, 在疫苗中的本发明减毒重组流感 (病毒) 充分减毒, 因此感染症状, 至少严重感染症状不会在大多数减毒流感病毒免疫的 (或由于另外因素感染的) 个体中发生。在一些例子中, 减毒流感病毒仍能够产生轻度疾病症状 (如轻度上呼吸疾病) 和 / 或传染未接种疫苗的个体。然而, 其毒性充分消减, 因此并不会在接种或随机宿主体内发生严重的下呼吸道感染。

[0057] 或者, 利用含有本文序列的流感病毒离体或体内靶向树突细胞刺激免疫应答。例如, 使树突细胞暴露于足够量的病毒足够长的时间以使树突细胞捕获流感抗原。然后利用标准静脉内移植方法将该细胞转移到要接种的个体中。

[0058] 尽管可通过单次给药引发保护性免疫应答, 但也可通过相同或不同途径给予额外剂量, 以达到所需预防效果。例如在婴幼儿中, 也许需要多次给药引发足够水平的免疫。为了维持足够水平对抗野生型流感感染的防护, 可在整个儿童期持续间隔给药。同样, 对重复或严重流感感染尤其易感的成人, 例如, 健康工作者、护工、幼年儿童的家庭成员、老年人以及心肺功能受损的个体也许需要多次免疫以建立和 / 或维持保护性免疫应答。可监测诱导免疫的水平, 如通过测定分泌和血清抗体的量, 并且根据需要调整剂量和重复接种以引发并维持所需水平的保护。

[0059] 任选地, 预防性给予流感病毒的制剂也含有一种或多种佐剂, 以提高对流感抗原的免疫应答。合适的佐剂包括: 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、皂苷、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阴离子、肽、油或烃乳剂、卡介苗 (BCG), 短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*) 和合成佐剂 QS-21。

[0060] 根据需要, 流感病毒的预防性疫苗给药可与一种或多种免疫刺激分子联合进行。

[0061] 免疫刺激分子包括具有免疫刺激、免疫增效和预刺激活性的各种细胞因子、淋巴因子和趋化因子, 如白介素 (如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13); 生长因子 (如粒细胞-巨噬细胞 (GM)-集落刺激因子 (CSF)); 和其它免疫刺激分子, 如巨噬细胞炎症因子、Flt3 配体、B7.1、B7.2 等。

[0062] 免疫刺激分子可在与流感病毒同样的制剂中给药, 或者独立给药。可通过给予蛋白质 (如本发明的 HA 和 / 或 NA 多肽, 例如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 或 SEQ ID NO:6 的残基 341-562) 或者含有编码蛋白质的多核苷酸的表达载体 (例如, SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 或 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728) 产生免疫刺激效应。

[0063] 上述方法可用于通过体外、离体或体内将含有编码治疗或预防有效的 HA 和 / 或 NA



多肽（或肽）或 HA 和 / 或 NA RNA（如反义 RNA 或核酶）的异源多核苷酸的本发明载体引入靶细胞群，以便治疗性和 / 或预防性治疗疾病或失调，通常是流感。通常，编码感兴趣多肽（或肽）或 RNA 的多核苷酸可操作性地连接于合适的调节序列，如上文名为“表达载体”和“附加表达原件”部分所述。任选地，可将一种以上异源编码序列插入单一载体或病毒。例如，除了编码治疗或预防有效的活性 HA 和 / 或 NA 多肽或 HA 和 / 或 RNA 的多核苷酸外，该载体还可包含其它治疗性或预防性多肽，如抗原、共刺激分子、细胞因子、抗体等和 / 或标记物等。

[0064] 尽管利用特定亚组的特定病毒株的减毒流感病毒接种个体能诱导对于不同病毒株和 / 或亚组的交叉防护，如果需要可利用来自至少两个病毒株的减毒流感病毒（如各自代表不同的亚组）接种个体。此外，疫苗组合可任选包括大流行疫苗（如对抗大流行株如各种禽类病毒株（参见例如，本文序列）或其它大流行病毒株的疫苗）和非大流行病毒株的混合物。疫苗混合物（多重疫苗）能包含来自人病毒株和 / 或非人（如禽类和人类等）流感株的组分。同样，本发明的减毒流感病毒疫苗能任选与诱导对抗其它感染剂的保护性免疫应答的疫苗组合。

[0065] 本发明的多核苷酸

[0066] 本领域众所周知流感病毒 HA 和 NA 多核苷酸区段包含编码区（编码 ORF）和非编码区（NCR），以及 HA 和 NA 编码序列的 5' 和 3'。同样知道的是可制造这些 NCR 的引物以利于扩增流感病毒整个 HA 和 NA 区段。（参见例如，Hoffmann 等，Arch Virol. 2001 年 12 月；146(12)：2275-89）。此外，还知道流感的 HA 和 NA 的 NCR 可增加所得重配株的效率。因此，这些 NCR 的核苷酸序列（包括片段及其变体（如至少约 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%、或至少约 91% 或至少约 92%、或至少约 93%、或至少约 94%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 98.5%、或至少约 98.7%、或至少约 99%、或至少约 99.1%、或至少约 99.2%、或至少约 99.3%、或至少约 99.4%、或至少约 99.5%、或至少约 99.6% 或至少约 99.7%、或至少约 99.8%、或至少约 99.9% 相同））在本发明的范围之内。当扩增任何大流行病毒株 HA 和 NA 区段时，可制造并使用多核苷酸引物与 HA 和 NA NCR 的保守区（在相关病毒株中保守）结合，以便扩增（如通过 RT-PCR）。在一个实施方式中，本发明的 HA 和 NA 多核苷酸包含大流行病毒株 HA 和 NA 序列的 NCR 和 ORF（包括片段及其变体（如至少约 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%、或至少约 91% 或至少约 92%、或至少约 93%、或至少约 94%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 98.5%、或至少约 98.7%、或至少约 99%、或至少约 99.1%、或至少约 99.2%、或至少约 99.3%、或至少约 99.4%、或至少约 99.5%、或至少约 99.6% 或至少约 99.7%、或至少约 99.8%、或至少约 99.9% 相同））。在另一个实施方式中，本发明的 HA 和 NA 多核苷酸不包含 NCR，但包含大流行病毒株 HA 和 NA 序列（如 SEQ ID NO：1、3、5、7、SEQ ID NO：1 的残基 89-1063、SEQ ID NO：1 残基 1064-1729、SEQ ID NO：5 残基 88-1062 和 SEQ ID NO：5 的残基 1063-1728）的 ORF（包括片段及其变体（如至少约 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90%、或至少约 91% 或至少约 92%、或至少约 93%、或至少约 94%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 98.5%、或至少约 98.7%、或至少约 99%、或至少约 99.1%、或至少约 99.2%、或至少约 99.3%、或至少约 99.4%、或至少约 99.5%、或至少约 99.6% 或至少约 99.7%、或至少约 99.8%、或至

少约 99.9% 相同))。

[0067] 本发明的 HA 和 NA 多核苷酸,例如 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 及其片段,可任选用于产生数种不同能力(capacity),作为用于上述疫苗的备选或补充。本文所述其它示范性用途仅出于说明目的而非为了限制实际使用范围。本文也描述构建、纯化和鉴定核苷酸序列的不同方法。在一些实施方式中,含有本发明一种或多种核苷酸序列的多核苷酸易于用作监测不同环境中对应或相关多核苷酸的探针,这些环境包括例如,核酸杂交实验,如为了寻找和/或鉴定感染其它种属或在不同流感爆发中(等)的同源流感变体(如,与本文序列同源等)。探针可为 DNA 或 RNA 分子,如基因组的限制性片段或克隆 DNA、cDNA、PCR 扩增产物、转录子和寡核苷酸,并且长度可从短至约 10 个核苷酸的寡核苷酸到长至超过 1kb 甚至更长的全长序列或 cDNA。例如,在一些实施方式中,本发明探针包括选自下组的核苷酸序列或其子序列:例如,SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728,或其互补序列。或者,使用上述指定序列之一变体的核苷酸序列作为探针。最通常的,此类变体包含一个或数个保守核苷酸变化。例如,选择数对(或数套)寡核苷酸,其中两个(或更多)核苷酸序列彼此保守性变异,其中一个核苷酸序列完全对应第一个变体或,且其它核苷酸序列完全对应剩余变体。此类寡核苷酸探针对尤其有用,如,用于特异性杂交实验以探测多态性核苷酸或探测同源性流感 HA 和 NA 变体,如与当前 HA 和 NA 序列同源的变体,感染其它种属或在不同流感爆发(时间和/或地理上不同)中出现的变体。在其它应用中,选择更离散的探针即选择至少约 91%(或约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 98.5%、约 98.7%、约 99%、约 99.1%、约 99.2%、约 99.3%、约 99.4%、约 99.5%或约 99.6%或多于约 99.7%、约 99.8%、约 99.9%或更多)相同的探针。

[0068] 本发明的探针,例如衍生自本文序列的序列,根据本领域常规步骤也可用于识别其它有用的多核苷酸序列。在一套实施方式中,如上所述,用一个或多个探针筛选产物表达文库或染色体区段文库(如表达文库或基因组文库)以鉴别包含与本文序列的一个或多个探针序列相同或序列显著相似的克隆,即变体、同源物等。应被理解的是除了如文库筛选的物理方法外,计算机辅助的生物信息学手段,如 BLAST 和其它序列同源性搜索算法等,也能用于鉴定相关多核苷酸序列。以此方式鉴定的多核苷酸序列也是本发明特征。

[0069] 任选通过本领域熟练技术人员熟知的数种方法生产寡核苷酸探针。最典型的是,利用熟知的合成方法,如 Beaucage 和 Caruthers(1981)Tetrahedron Letts 22(20):1859-1862 所述固相亚磷酰胺三酯方法,如使用自动合成仪或如 Needham-Van Devanter 等(1984)Nucl Acids Res,12:6159-6168 所述制造。也可定制寡核苷酸或从本领域技术人员熟知的商品来源订购。当需要纯化寡核苷酸时,一般进行非变性(nature)聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换 HPLC,如 Pearson 和 Regnier(1983)J Chrom 255:137-149 所述。可根据 Maxam 和 Gilbert(1980)在 Grossman 和 Moldave(编)纽约科学出版社,《酶学方法》(Methods in Enzymology)65:499-560 所述化学降解方法来验证合成寡核苷酸的序列。也可方便从多个熟练技术人员所知的商业来源订购定制的寡核苷酸。

[0070] 在其它情况下,如关于表达本发明多核苷酸和多肽的细胞或生物体(如,带有包

含本发明序列病毒的那些),方便使用多肽、肽或抗体探针。例如,源于本发明任何氨基酸序列(如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 或 SEQ ID NO:6 的残基 341-562)和/或本发明多核苷酸序列,例如 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 或 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 编码的任何氨基酸序列的分离或重组多肽、多肽片段和肽宜用于鉴定和分离噬菌体展示文库、组合文库、多克隆血清等中的抗体。本发明的多肽片段包含肽或多肽,其氨基酸序列包含本发明 HA 或 NA 多肽的氨基酸序列(如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562)的至少 5 个毗连氨基酸残基,或至少 10 个毗连氨基酸残基,或至少 15 个毗连氨基酸残基,或至少 20 个毗连氨基酸残基,或至少 25 个毗连氨基酸残基,或至少 40 个毗连氨基酸残基,或至少 50 个毗连氨基酸残基,或至少 60 个毗连氨基酸残基,或至少 70 个毗连氨基酸残基,或至少 80 个毗连氨基酸残基,或至少 90 个毗连氨基酸残基,或至少 100 个毗连氨基酸残基,或至少 125 个毗连氨基酸残基,或至少 150 个毗连氨基酸残基,或至少 175 个毗连氨基酸残基,或至少 200 个毗连氨基酸残基,或至少 250 个毗连氨基酸残基,或至少 350 个,或至少 400 个,或至少 450 个或至少 500 个,或至少 550 个毗连氨基酸残基。本发明的实施方式中优选编码特异性与所述多肽结合的所述多肽片段和抗体的多核苷酸。

[0071] 例如,SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 或 SEQ ID NO:6 的残基 341-562 的任何多肽序列或子序列,和/或本发明多核苷酸序列,如 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 或 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 编码的序列的特异性抗体同样可用作评价表达产物,例如来自细胞或组织的表达产物的探针。此外,抗体尤其适用于在组织阵列,细胞、组织或生物体中,如被未知流感病毒或类似感染的生物体中,原位评价含有氨基酸子序列的蛋白质(如本文给出的那些)或由本发明多核苷酸序列(如选自本文所示的那些)编码的蛋白质的表达。可用检测试剂直接标记抗体,或用特定抗体的重链恒定区(即同种型)特异性第二抗体进行标记以便间接检测。下文提供了关于产生特异性抗体的另外的细节。

#### [0072] 诊断实验

[0073] 可在诊断实验中使用本发明的多核苷酸序列检测样品中的流感病毒(和/或血凝素和/或神经氨酸酶)、检测血凝素样和/或神经氨酸酶样序列、利用如选自本文序列的化学合成或重组的多核苷酸片段检测流感临床分离物中病毒株差异。例如,可将含有至少 10-20 个核苷酸的血凝素和/或神经氨酸酶序列片段用作引物以使用本领域熟知聚合酶链反应(PCR)(如逆转录 PCR)方法扩增多核苷酸,或者用作多核苷酸杂交实验中的探针以检测临床标本中的靶遗传物质,如流感 RNA。

[0074] 本发明的探针,如本文给定的那些独特子序列,根据本领域常规步骤也能用于鉴定其它有用的多核苷酸序列(如鉴定其它流感株)。在一套优选实施方式中,使用如上所述的一个或多个探针筛选表达产物文库和克隆病毒多核苷酸文库(即,表达文库或基因组文库)以鉴定包含与本文序列相同或具有显著相同性的序列的克隆。然后这些鉴定的序列各自可用于制造探针,包括如上所述的成对或成套的变体探针。应被理解的是除了如文库筛

选的物理方法外,计算机辅助的生物信息学手段,如 BLAST 和其它序列同源性搜索算法等,也能用于鉴定相关多核苷酸序列。

[0075] 本发明的探针在用于检测细胞、组织或其它生物样品(如鼻腔洗液或支气管灌洗液)中流感病毒多核苷酸的存在或测定其种类时尤其有用。例如,本发明的探针有助于测定生物样品,如个体(如人个体)或模型系统(如培养细胞样品)是否暴露于或已经被流感或特定流感株感染。检测所选探针与源于(或分离自)生物样品或模型系统的多核苷酸的杂交情况可指示是否暴露于或受到探针多核苷酸选自的病毒(或相关病毒)的感染。

[0076] 应当被理解的是探针设计受到目的应用的影响。例如,在单一实验,如单一 DNA 芯片中,检测数个等位基因特异性探针靶点相互作用时,需要所有的探针具有相近的解链温度。因此,调整探针的长度使阵列上所有探针的解链温度接近相同(应当被理解的是当不同探针的 GC 含量不同时,需要使不同探针长度不同以达到特定的  $T_m$ )。尽管解链温度是探针设计中首先考虑的因素,但可任选使用其它因素进一步调整探针构建,如选择抗引物自身互补等。

[0077] 载体,启动子和表达系统

[0078] 本发明包括整合本文一个或多个多核苷酸序列的重组构建物。此类构建物任选包括载体,例如质粒、粘粒、噬菌体、病毒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)等,其中正向或反向插入本发明一个或多个多核苷酸序列,如包含 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 中任何一个或其子序列等的多核苷酸序列。例如,插入的多核苷酸能包含含有至少一个本发明多核苷酸序列的全部或一部分的病毒染色体序列或 cDNA。在一个实施方式中,构建物还包括与序列操作性连接的调节序列,包括例如启动子。本领域技术人员知道大量合适的载体和启动子,并可商业购得。

[0079] 本发明的多核苷酸可包含于数种适合产生正义或反义 RNA,以及任选地产生多肽(或肽)表达产物(如,本发明血凝素和/或神经氨酸酶分子或其片段)的载体中。此类载体包括染色体、非染色体和合成 DNA 序列,如 SV40 衍生物;细菌质粒;噬菌体 DNA;杆状病毒;酵母质粒;衍生自质粒和噬菌体 DNA 的组合,病毒 DNA 如牛痘、腺病毒、禽痘病毒、狂犬病毒、腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒等(如 pCDL)。可使用任何能够将遗传物质引入细胞并且能够在相关宿主中复制(如果需要的话)的载体。

[0080] 在表达载体中,感兴趣的 HA 和/或 NA 多核苷酸序列物理排布接近并朝向合适的转录控制序列(如启动子,任选地,一个或多个增强子)以指导 mRNA 合成。也就是说,感兴趣的多核苷酸序列可操作性连接于合适的转录控制序列。此类启动子的例子包括:LTR 或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac 或 trp 启动子、噬菌体  $\lambda$  P<sub>L</sub> 启动子及其它知道可控制原核或真核细胞或其它病毒中基因表达的启动子。

[0081] 数种启动子可用于表达载体中,以调节流感病毒基因组区段转录。在某些实施方式中,使用巨细胞病毒(CMV)DNA 依赖性 RNA 聚合酶 II(Pol II)启动子。如果需要如条件控制表达,可替换使用其它可在特定条件下、或特定组织和细胞中,诱导 DNA 转录的启动子。可用数种病毒和哺乳动物,如人的启动子,或者根据预期特定应用分离。例如,获自动物和人病毒基因组的候选启动子包括此类启动子,如腺病毒(如腺病毒 2)、乳头瘤病毒、乙肝病毒、多瘤病毒以及猿病毒 40(SV40)和不同逆转录病毒的启动子。哺乳动物启动子包括肌动

蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子等。

[0082] 任选地,可通过包含增强子序列增强转录。增强子通常较短,如,10-500bp,它是与启动子配合作用以增加转录的顺式作用 DNA 原件。从哺乳动物基因(血红蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)和真核细胞病毒中分离了许多增强子序列。可将增强子序列剪接到载体中异源编码序列的 5' 或 3' 位置,但通常插入启动子的 5' 位点。通常,选择启动子和其它转录增强序列(若需要)以优化异源 DNA 在引入宿主细胞中的表达(Scharf 等(1994) 热应力启动子和转录因子 (Heat stress promoter and transcription factors) Results Probl Cell Differ 20:125-62;Kriegler 等(1990) 组装增强子、启动子和剪接信号以控制转移基因的表达 (Assembly of enhancers, promoter, and splice signals to control expression of transferred gene) Methods in Enzymol 185:512-27)。任选地,为了启动转录,扩增子也可包含核糖体结合位点或内部核糖体进入位点(IRES)。

[0083] 本发明的载体也包含终止转录和稳定 mRNA 所需的序列,如聚腺苷酸化位点或终止序列。此类序列一般位于真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5' 末端,偶尔位于 3' 末端。在一个实施方式中,SV40 聚腺苷酸化信号序列能提供双向聚腺苷酸化位点,它从启动(-)链病毒基因组复制的 PolII 启动子隔离了(+)链 mRNA 分子的转录。

[0084] 此外,如上所述,表达载体任选包含一个或多个选择性标记物基因以提供用于筛选转化宿主细胞的表型特征,除了以前列出的基因,诸如二氢叶酸还原酶或新霉素抗性标记物可用于真核细胞培养物的选择。

[0085] 含有如上所述的合适多核苷酸序列以及合适的启动子或控制序列的载体,可用于转化允许蛋白表达的宿主细胞。虽然本发明的载体可在细菌细胞中复制,但最经常需要将其引入哺乳动物细胞,如 Vero 细胞、BHK 细胞、MDCK 细胞、293 细胞、COS 细胞等用于表达。

[0086] 如其它地方所述,在各种实施方式中,本文 HA 和 NA 序列可包含于参与质粒拯救重配株的质粒之中。参见例如,2002 年 10 月 23 日提交的美国申请号 60/420,708;2004 年 5 月 24 日提交的 60/574,117;2003 年 4 月 25 日提交的 10/423,828;2004 年 6 月 12 日提交的 60/578,962;和 2004 年 6 月 24 日提交的 10/870,690 以及 US20020164770,纳入本文作为参考。例如,本发明优选的表达载体包括但不限于:含有 pol I 启动子和终止子序列的载体或使用 pol I 和 pol II 启动子“polI/polII 启动子系统”的载体(如,Zobel 等, Nucl. Acids Res. 1993,21:3607;US20020164770;Neumann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999,96:9345;Fodor 等, J. Virol. 1999,73:9679;和 US20030035814)。产生的重配株可包含 HA 和 NA 基因与排列在一起的来自 A/Ann Arbor/6/60 供体病毒株(和/或其衍生物及修饰形式)、PR8 供体病毒株主体、A/Leningrad/17 供体病毒株主体的 6 个其它流感基因。其它主体病毒株在如 20040137013 和 20030147916 中有描述,纳入本文作为参考。

[0087] 其它表达元件

[0088] 最常见的,编码流感病毒 HA 和/或 NA 蛋白的基因组区段包含其表达、包括翻译为功能性病毒蛋白质所必需的任何其它序列。在其它情况下,可使用编码病毒蛋白如 HA 和/或 NA 蛋白的小基因或其它人工构建物。再次,在此类情况下,常常需要包括有助于异源编码序列有效翻译的特定起始信号。这些信号能包括如,ATG 起始密码子和相邻序列。为了保证整个插入子的翻译,将起始密码子插入到病毒蛋白正确的阅读框中。外源性转录原件

和起始密码子的来源可以不同,天然和合成均可。在所用细胞系统中包含合适的增强子可增强表达效率。

[0089] 如果需要,可将编码其它表达原件如信号序列、分泌或定位序列等的多核苷酸序列掺入载体中,通常与感兴趣的多核苷酸序列在同一阅读框内,以便(例如)使多肽靶向表达于所需细胞隔室、膜或细胞器中,或指导多肽分泌至周质空间或细胞培养基中。本领域技术人员了解此类序列,包括分泌前导肽、细胞器靶向序列(如核定位序列、ER 驻留信号、线粒体转运序列序列),膜定位/锚定序列(如终止转运序列、GPI 锚定序列)等。

[0090] 当需要翻译本发明多核苷酸序列编码多肽时,其它翻译特异性起始信号可提高翻译效率。这些信号能包括,如,ATG 起始密码子和相邻序列、IRES 区等。在一些情况下,例如,含有掺入本发明多核苷酸序列(如在本文序列中)、翻译起始密码子和相关序列元件的编码序列的全长 cDNA 分子或染色体区段与感兴趣多核苷酸序列同时插入合适的表达载体。在这些情况下,通常无需其它翻译控制信号。然而,当仅插入多肽编码序列或其部分的情况下,常常提供外源性翻译控制信号,包括如 ATG 起始密码子用于相关序列的表达。将起始密码子置于合适的阅读框中以保证感兴趣多核苷酸序列的转录。外源性转录原件和起始密码子的来源可以不同,天然和合成均可。通过包含对所用细胞体系合适的增强子可增强表达效率(参见例如, Scharf D. 等 (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; Bittner 等 (1987) Methods in Enzymol 153:516-544)。

[0091] 生产重组病毒

[0092] 利用重组反向遗传学手段可遗传工程改造并回收负链 RNA 病毒(参见例如, Palese 等的 USPN 5,166,057)。起初此类方法用于工程改造病毒基因组(Luytjes 等 (1989) Cell 59:1107-1113; Enami 等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567)并被成功应用于各种区段化和非区段化负链 RNA 病毒,如狂犬病病毒(Schnell 等 (1994) EMBO J. 13:4195-4203); VSV(Lawson 等 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4477-4481); 麻疹病毒(Radecke 等 (1995) EMBO J. 14:5773-5784); 牛瘟病毒(Baron 和 Barrett (1997) J. Virol. 71:1265-1271); 人副流感病毒(Hoffman 和 Banerjee (1997) J. Virol. 71:3272-3277; Dubin 等 (1997) Virology 235:323-332); SV5(He 等 (1997) Virology 237:249-260); 犬瘟病毒(Gassen 等 (2000) J. Virol. 74:10737-44); 和仙台(Sendai)病毒(Park 等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5537-5541; Kato 等 (1996) Genes to Cells 1:569-579)。本领域技术人员将熟悉这些制造含本发明 HA 和 NA 序列流感病毒的方法及类似方法。根据此类方法制造的重配流感病毒就像含有本发明的一种或多种多核苷酸和/或多肽的重配流感病毒一样,也是本发明的特征。

[0093] 细胞培养和表达宿主

[0094] 本发明也涉及引入(转导、转化和转染)本发明载体的宿主细胞,和利用重组技术产生本发明的多肽。利用本发明载体,如表达载体遗传学工程改造宿主细胞(即转导、转化或转染)。如上所述,载体可为质粒、病毒颗粒、噬菌体等的形式。合适的表达宿主的例子包括:细菌细胞,如大肠杆菌(*E. coli*)、链霉菌(*Streptomyces*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*);真菌细胞,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);或昆虫细胞如果蝇(*Drosophila*)和草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)。

[0095] 最常见的,使用哺乳动物细胞培养本发明的 HA 和 NA 分子。流感病毒复制的合适宿主细胞包括,如 Vero 细胞、BHK 细胞、MDCK 细胞、293 细胞和 COS 细胞,包括 293T 细胞、COS7 细胞或类似细胞。通常,使用一定比例如 1 : 1 的两种上述细胞系的共培养物,如 MDCK 细胞和 293T 或 COS 细胞,以提高复制效率。通常,在标准商品化培养基中培养细胞,如在添加血清(如 10%胎牛血清)的杜氏改良的易购氏培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium),或在无血清培养基中,在保持中性缓冲 pH(如 pH 在 7.0-7.2)的受控湿度和 CO<sub>2</sub> 浓度下培养。任选地,培养基包含阻止细菌生长的抗生素,如青霉素、链霉素等,和 / 或补充营养物,如 L- 谷胺酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸等,以及利于促进生长特性的其它补充剂,如胰蛋白酶、β- 巯基乙醇等。

[0096] 工程改造的宿主细胞可在根据激活启动子、选择转化子或扩增插入多核苷酸序列的需要改良的营养培养基中培养。如温度、pH 等培养条件通常为所选用于表达的特定宿主细胞先前培养所使用的条件,并为本领域熟练技术人员所熟悉并在本文引用的参考文献中,包括如, Freshney (1994) 《动物细胞培养,基本技术手册》(Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique), 第 3 版, 纽约韦利 - 李斯出版社 (Wiley-Liss) 及其引用文献。其它有用的参考文献包括,如, Paul (1975) 《细胞和组织培养》(Cell and Tissue Culture), 第 5 版, 爱丁堡利文斯顿出版社; Adams (1980) 《生物化学与分子生物学实验室技术 - 生物化学家细胞培养》(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists), Work 和 Burdon 编, 阿姆斯特丹埃斯威尔出版社。关于体外产生流感病毒感兴趣的组织培养步骤的其它细节包括,如 Merten 等 (1996) 在细胞培养物中生产流感病毒用于疫苗制备 (Production of Influenza virus in cell cultures for vaccine preparation) Cohen 和 Shafferman 编《设计和生产疫苗的新策略》(Novel Strategies in Design and Production of Vaccine), 出于所有目的将其整体纳入本文。此外,易于通过常规实验确定并且本领域技术人员熟知此类步骤适合本发明的改变。

[0097] 用于生产流感病毒(如具有本发明 HA 和 / 或 NA 序列)的细胞能在含血清或无血清培养基中培养。在一些情况下,如用于制备纯化病毒时,尤其需要细胞在无血清条件下生长。可小规模培养细胞,如,少于 25ml 培养基,培养管或瓶中或在大瓶中震荡培养,在滚瓶中培养,或在培养瓶、瓶或反应器培养物中的微载体珠上(如, DEAE- 右旋糖苷微载体珠, 如灰鹤和朗更公司的多玛萨尔 (Dormacell, Pfeifer and Langen); 弗洛实验室公司的超级珠 (Superbead, Flow Laboratories); 苯乙烯共聚三甲胺珠, 如希尔莱克斯、所略希尔、安阿伯 (Hillex, SoloHill, Ann Arbor)) 上培养。微载体珠是为每体积贴壁细胞培养物提供更大表面积的小球(直径范围为 100-200 微米)。例如一升培养基能包含 2 千万个微载体珠,这些珠提供了超过 8000 平方厘米的生长表面。商业病毒生产,如为了生产疫苗,经常需要在生物反应器或发酵罐里培养细胞。生物反应器容积从 1 升至超过 100 升,如, Cyto3 生物反应器(奥斯莫里卡公司, 明尼苏达州明内通卡市 (Osmonics, Minnetonka, MN)); NBS 生物反应器(新不伦瑞克科学公司, 新泽西州埃迪逊市 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ)); 来自布朗生物技术国际公司(布朗生物技术公司, 德国迈尔苏金 (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany)) 的实验室和商业规模的生物反应器。

[0098] 不考虑培养体积,在本发明的许多所需方面,重要的是保持培养物合适温度以保

证利用温度依赖的多质粒系统（参见例如，用于生产流感病毒的多质粒系统，2002 年 10 月 23 日提交的美国申请号 60/420,708, 2003 年 4 月 25 日提交的美国申请号 10/423,828 以及 2004 年 5 月 24 日提交的美国申请号 60/574,117）有效回收重组和 / 或重配流感病毒并加热病毒溶液进行过滤等。通常使用调节器，如自动调温装置或其它感受并维持细胞培养体系和 / 或其它溶液温度的设备以确保合适时期（如病毒复制等）温度处于正确水平。

[0099] 在本文的一些实施方式中（如其中从载体区段制造重配病毒），根据本领域熟知的将异源多核苷酸引入细胞的方法将含有流感基因组区段的载体引入（如转染）宿主细胞，这些包括例如，磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂转染和使用聚胺转染试剂的转染。例如，可将载体，如质粒转染入宿主细胞，如 COS 细胞、293T 细胞或 COS 或 293T 细胞和 MDCK 细胞的混合物，根据制造商指导手册利用聚胺转染试剂 TransIT-LT1（密如斯公司（Mirus））生产重配病毒等。因此，在一个实施例中，用 160  $\mu$ l 培养基（优选无血清培养基）稀释的约 2  $\mu$ l TransIT-LT1 将每一载体各约 1  $\mu$ g 引入一群宿主细胞中，总体积是 200  $\mu$ l。在室温下将 DNA:转染试剂混合物孵育 45 分钟然后加入 800  $\mu$ l 培养液。将转染混合物加入宿主细胞，通过本领域熟练技术人员所熟知的其它方法培养细胞。因此，为了在细胞培养物中生产重组或重配病毒，将各自掺入 8 个基因组区段（如本发明 PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA 和 NA）的载体与约 20  $\mu$ l TransIT-LT1 混合并转染进入宿主细胞。任选地，在转染前用无血清培养基如 Opti-MEM I 替换含血清的培养基，并孵育 4-6 小时。

[0100] 或者，可使用电穿孔将此类掺入流感基因组区段的载体引入宿主细胞。例如，根据下述步骤利用电穿孔将掺入甲型流感或乙型流感病毒的质粒载体引入 Vero 细胞。简要说，如生长于含 10% 胎牛血清（FBS）的改良易购氏培养基（Modified Eagle's Medium (MEM)）的约  $5 \times 10^6$  Vero 细胞重悬于 0.4ml OptiMEM 中并置于电穿孔杯中。将体积多至 25  $\mu$ l 的 20 微克 DNA 加入杯中的细胞，轻拍以温和混匀。根据厂商指导手册进行电穿孔（如，连接电容延长器（Capacitance Extender Plus）的伯乐基因脉冲仪 II），300 伏，950 微法拉，恒定时间 28-33 毫秒。轻拍细胞混匀并在电穿孔后约 1-2 分钟直接在杯中加入含 10% FBS 的 0.7ml MEM。将细胞转移至标准 6 孔组织培养板的两个含 2ml MEM，10% FBS 的孔中。洗涤电击杯回收任何剩余细胞并将洗涤悬液在两孔间平分。终体积约为 3.5mL。然后在允许病毒生长的条件下，如对于冷适应性病毒株在 33°C，孵育细胞。

[0101] 在哺乳动物宿主细胞中，可使用数种表达系统，如基于病毒的系统。当使用腺病毒作为表达载体时，任意将编码序列连接到含晚期启动子和三重前导序列的腺病毒转录 / 翻译复合物中。插入病毒基因组非必需 E1 和 E3 区将得到在感染宿主细胞中能表达感兴趣多肽的活病毒（Logan 和 Shenk (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81:3655-3659）。此外，可使用转录增强子，如劳氏肉瘤病毒（RSV）增强子增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0102] 可任选能调节插入序列的表达或以所需方式加工表达蛋白的宿主细胞株。此类蛋白修饰包括但不限于：乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰基化。将前体形式切割为成熟形式的蛋白翻译后加工对于正确的插入、折叠和 / 或功能有时重要。此外，在宿主细胞中的位置（如在细胞表面）也很重要。不同的宿主细胞，如 COS、CHO、BHK、MDCK、293、293T、COS7 等，对于此类转录后活动具有特定的细胞机器和特有机理，可对细胞进行选择以保证当前引入外来蛋白的正确修饰和加工。

[0103] 对于本发明多核苷酸或其子序列编码的重组蛋白的长期高产率生产而言，任选使



用稳定表达系统。例如,利用含病毒来源的复制或内源性表达原件和选择性标记物基因的表达式转化稳定表达本发明多肽的细胞系。例如,在引入载体之后,在富集培养基中培养细胞 1-2 天后转移至选择性培养基中。选择性标记物的目的是产生选择抗性,它的存在允许成功表达引入序列的细胞生长和恢复。因此,如源于单一细胞类型的稳定转化抗性细胞团可利用适合细胞类型的合适组织培养技术扩增。

[0104] 可在适合表达和从细胞培养物中回收编码蛋白的条件下任意培养被编码本发明多肽的核苷酸序列转化的宿主细胞。对表达所述蛋白的细胞进行分选、分离和/或纯化。根据序列(如取决于编码膜滞留信号或其它的融合蛋白)和/或使用的载体,重组细胞产生的蛋白或其片段可为分泌的、膜结合的或胞内滞留的。

[0105] 本发明多核苷酸对应的表达产物也能在非动物细胞,如植物、酵母、真菌、细菌等中产生。除了 Sambrook, Berger 和 Ausubel(参见下文)以外,关于细胞培养的细节可参见 Payne 等(1992)《在液体系统中的植物细胞和组织培养》(Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems) 约翰韦利森出版公司(John Wiley & Sons, Inc.), 纽约; Gamborg 和 Phillips 编(1995)《植物细胞、组织和器官培养;施普林格实验室基本方法手册》(Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Srringer Lab Manual), 施普林格弗莱格公司(Springer-Verlag)(纽约柏林海德尔堡)和 Atlas 和 Parks 编《微生物培养基手册》(The Handbook of Microbiological Media)(1993) CRC 出版社, 佛罗里达州伯克莱屯(Boca Raton, FL)。

[0106] 在细菌系统中,根据表达产物的用途目的可选择数种表达载体。例如,当生产抗体需要大量多肽或其片段时,优先使用指导易于大量表达纯化蛋白的载体。此类载体包括但不限于:多功能大肠杆菌克隆和表达载体,如 BLUESCRIPT(司查塔基公司(Stratagene)), 其中感兴趣的编码序列,如含有本文那些序列等的编码序列,可连接入载体并与  $\beta$  半乳糖苷酶的氨基端翻译起始甲硫氨酸和后续 7 个残基的序列在同一读框内,产生有催化活性的钟半乳糖苷酶融合蛋白;同样,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,可使用数种含有组成型或诱导型启动子如釀因子、醇氧化酶和参见 Ausubel, 同上,和 Grant 等,(1987);《酶学方法》(Methods in Enzymology)153:516-544 的综述。

[0107] 核酸杂交

[0108] 可采用比较杂交鉴定本发明核酸(如 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728),包括本发明核酸的保守性变异。比较性杂交法是区别本发明核酸的优选方法。此外,在高、超高和超超高严谨性条件下与如本文所示代表的核酸杂交的靶核酸是本发明的特征。此类核酸的例子包括与给定核酸序列相比包含一个或数个沉默或保守性核酸取代的核酸。

[0109] 当测试靶核酸与探针杂交程度至少相当于完全配合互补靶点的一半时,称此测试靶核酸与探针核酸特异性杂交,即,靶点与探针杂交的信噪比至少为与完全配合互补序列的一半,后者的信噪比至少为观察到任何不配合靶核酸的杂交信噪比的约 5 倍-10 倍。

[0110] 通常在溶液中,当核酸结合时发生“杂交”。数种已知明了的物理化学力,如氢键、溶剂斥力、碱基堆积等引起核酸杂交。核酸杂交的数种实验方案为本领域所熟知。核酸杂交的详尽指南参见 Tijssen(1993)《生物化学和分子生物学实验室技术-核酸探针杂交》

(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes) 第一部分第二章,“杂交原则概述与核酸探针实验策略”(“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”),埃斯威尔出版社,纽约),以及下述 Ausubel, Sambrook 和 Berger 和 Kimmel. Hames 和 Higgins(1995)《基因探针 1》(Gene Probes 1) 牛津大学出版社 IRL 出版社,牛津,英格兰 (Hames 和 Higgins 1) 以及 Hames 和 Higgins(1995)《基因探针 2》(Gene Probes 2) 牛津大学出版社 IRL 出版社,牛津,英格兰 (Hames 和 Higgins 2) 提供了合成、标记、检测和定量测定 DNA 和 RNA 包括寡核苷酸的详细内容。

[0111] 在 Southern 或 Northern 印迹中滤纸上有多于 100 个互补残基的互补核酸杂交的严谨性杂交条件的一个例子是 42°C, 含 1mg 肝素的 50% 福尔马林杂交过夜。严谨性洗涤条件的例子包含 0.2x SSC 在 65°C 洗涤 15 分钟 (参见 Sambrook 下文中 SSC 缓冲液和其它核酸杂交参数的描述)。通常在高严谨性洗涤之前进行低严谨性洗涤以去除探针信号背景。低严谨性洗涤的例子是 2x SSC 在 40°C 洗涤 15 分钟。通常,在特定杂交实验中观察到信噪比比无关探针信噪比高 5 倍 (甚至更高) 表明检测到了特异性杂交。

[0112] 杂交以后,通过一系列的洗涤去除未杂交核酸,其严谨性根据需要结果可进行调整。低严谨性条件 (如使用高盐和低温) 增加灵敏度,但会造成非特异性杂交信号和高背景信号。高严谨性条件 (如使用低盐和接近  $T_m$  的高温) 降低背景信号,通常主要是留下特异性信号。参见 Rapley, R. 和 Walker, J. M. 编,《分子生物学方法手册》(Molecular Biomethods Handbook) (Humana 出版公司,1998)。

[0113] 核酸杂交实验如 Southern 和 northern 杂交上下文中的“严谨杂交洗涤条件”取决于序列,并在不同的环境参数下“严谨杂交洗涤条件”也不同。核酸杂交的详尽指南参见 Tijssen(1993),同上以及 Hames 和 Higgins,1 和 2。对于任何测试核酸的严谨杂交和洗涤条件可凭经验测定。例如,在确定高严谨杂交和洗涤条件时,逐渐增加杂交和洗涤条件 (如通过增加杂交或洗涤中的温度、降低盐浓度、增加去污剂浓度和 / 或增加有机溶剂,如福尔马林的浓度) 直至满足选择的一套标准。例如,逐渐增加杂交和洗涤的条件直至探针与互补靶点完美配合,其信噪比是观察到的探针与不配合靶点杂交信噪比的 5 倍。

[0114] 通常,在特定杂交实验中,信噪比是观察到无关探针的至少 2 倍 (或更高,如,至少 5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍或更高) 表明检测到特异性杂交。本发明的上下文中检测到两个序列至少发生严谨杂交表明与本文序列表提供了本发明的核酸具有相对强的结构相似性。

[0115] 所选择的“非常严谨”条件等于特定探针的热解链点 ( $T_m$ )。  $T_m$  是 50% 测试序列与完美配合探针杂交时的温度 (在确定离子强度和 pH 的条件下)。出于本发明的目的,在确定离子强度和 pH 的条件下,通常选择低于特定序列  $T_m$  5°C 的“高度严谨的”杂交和洗涤条件 (如下文注明,高严谨度条件也是相等同的术语)。可在严谨或高度严谨条件下鉴别与感兴趣核苷酸序列相接近或相同的靶序列 (如“探针”)。低严谨性条件适合互补性较差的序列。

[0116] “超高严谨性”杂交和洗涤条件是提高杂交和洗涤条件的严谨性直至探针与互补靶点完美配合,其信噪比是观察到的探针与不配合靶点杂交信噪比的至少 10 倍。在此条件下与探针杂交的信噪比相当于完美配合互补靶核酸一半的靶核酸被称作在超高严谨条件

下与探针结合。

[0117] 在测定严谨或高度严谨的杂交（或甚至更严谨的杂交）和洗涤条件时，逐渐增加杂交和洗涤条件（如，通过增加杂交或洗涤中的温度、降低盐浓度、增加去污剂浓度和 / 或增加有机溶剂如甲酰胺的浓度），直至满足所选一套标准。例如，逐渐增加杂交和洗涤条件，直至含有本发明一个或多个多核苷酸序列，如选自本文给定的序列或独特子序列（如 SEQ ID NO :1、3、5、7、SEQ ID NO :1 的残基 89-1063、SEQ ID NO :1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO :5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO :5 的残基 1063-1728）的探针和 / 或互补多核苷酸序列，与完美配合互补靶点（再次，含有本发明一个或多个选自本文给定的序列或子序列和 / 或其互补多核苷酸序列的核酸）结合，根据需要，信噪比至少为观察到的非配合靶点（如含有一个或多个选自提交时公共数据库（如 Genbank）中的已知流感序列的序列或子序列的多核苷酸序列，和 / 或其互补多核苷酸序列）杂交的 2 倍（任选 5 倍、10 倍或 100 倍或更多倍）。

[0118] 利用本发明的多核苷酸或其子序列，可获取新颖靶核酸；此类靶核酸也是本发明的特点。例如，此类靶核酸包含在严谨条件下与对应本发明多核苷酸，如 SEQ ID NO :1、3、5、7、SEQ ID NO :1 的残基 89-1063、SEQ ID NO :1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO :5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO :5 的残基 1063-1728 的独特寡核苷酸探针杂交的序列。

[0119] 同样，通过逐渐增加相关杂交实验的杂交和 / 或洗涤条件可确定甚至更高水平的严谨性。例如，增加杂交和洗涤的严谨性直至与探针与完美配合互补靶核酸结合的信噪比至少为任何非配合靶核酸杂交的 10 倍、20 倍、50 倍、100 倍或 500 倍甚至更高。特定信号取决于相关实验中使用的标记，如荧光标记、比色标记、放射性标记等。在此条件下与探针杂交的信噪比相当于完美配合互补靶核酸一半的靶核酸被称作在超超高严谨条件下与探针结合，并且也是本发明的特点。

[0120] 如果核酸编码的多肽基本相同，那么在严谨条件下彼此不杂交的核酸仍有可能基本相同。例如当使用遗传密码允许的最大密码子简并性创建核酸拷贝时。

[0121] 感兴趣生物分子的克隆、诱变和表达

[0122] 描述应用于本发明的分子生物学方法技术如克隆、突变、细胞培养等的文本包括 Berger 和 Kimmel,《分子克隆技术指南,酶学方法》(Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology) 第 152 卷科学出版社公司,加州圣地亚哥 (Berger) ; Sambrook 等,《分子克隆 - 实验室手册》(Molecular Cloning-A Laboratory Manual) (第三版),第 1-3 卷,冷泉港实验室,冷泉港,纽约 2000 (“Sambrook”) 和《新编分子生物学实验方案》(Current Protocols in Molecular Biology), F.M.Ausubel 等编,格林出版联合公司 (Greene Publishing Associates, Inc) 和约翰韦利森出版公司 (John Wiley & Sons, Inc.) 合资的最新实验方案公司 (从 2002 年补充) (“Ausubel”)。这些文本描述了诱变、使用载体、启动子和其它关于如 HA 和 / 或 NA 分子等产生的相关话题。

[0123] 本发明任选使用不同类型的诱变,如生产和 / 或分离本发明新颖的或新分离的 HA 和 / 或 NA 分子和 / 或进一步修饰 / 诱变多肽 (例如,HA 和 NA 分子,如 SEQ ID NO :2、4、6、8、SEQ ID NO :2 的残基 16-340、SEQ ID NO :2 的残基 341-562、SEQ ID NO :6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO :6 的残基 341-562)。它们包括但不限于定点诱变、随机点突变、同源重组 (DNA 重排)、利用含尿嘧啶的模板进行诱变、寡核苷酸定向诱变、硫代磷酸酯修饰的 DNA 诱变、利用缺口双链体 DNA 诱变等。其它合适的方法包括点错配修复、利用修复缺陷宿主株进行诱

变、限制性选择和限制性纯化、缺失诱变、全基因合成诱变、双链打断修复等。本发明也包括诱变,如涉及嵌合构建物的诱变。在一个实施方式中,可由天然产生分子或改变或诱变的天然产生分子的信息,如序列、序列对比、物理性质、晶体结构等指导诱变。

[0124] 上述文本和例子以及下列公开物(及其引用文献)都描述了这些步骤:Sieber, 等, Nature Biotechnology, 19:456-460(2001);Ling 等, DNA 诱变方法:概览 (Approaches to DNA Mutagenesis:an overview), Anal Biochem 254(2):157-178(1997);Dale 等, 利用硫代磷酸酯方法进行寡核苷酸定向随机诱变 (Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method), Methods Mol Biol 57:369-374(1996);I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res 23,3067-8(1995);W. P. C. Stemmer, Nature 370,389-91(1994);Arnold, 非常态环境下的蛋白质工程 (Protein engineering for unusual environments), Current Opinion in Biotechnology 4:450-455(1993);Bass 等, 具有新 DNA 结合特异性的突变 Trp 阻抑物 (Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities), Science 242:240-245(1988);Fritz 等, 突变的寡核苷酸定向构建:不进行体外酶反应的缺口双链体 DNA 方法 (Oligonucleotide-directed construction of mutation:a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro), Nucl Acids Res 16:6987-6999(1988);Kramer 等, 在缺口双链体 DNA 方法中用于寡核苷酸定向构建突变的改良的酶促体外反应 (Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutation), Nucl Acids Res 16:7207(1988);Sakamar 和 Khorana, 牛杆体外节鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(转导蛋白)的  $\alpha$  亚基的基因的总合成和表达 (Total synthesis and expression of a gene for the  $\alpha$ -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein(transducin)), Nucl Acids Res 14:6361-6372(1988);Sayers 等, 基于硫代磷酸酯的寡核苷酸定向诱变中的 Y-T 核酸外切酶 (Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis), Nucl Acids Res 16:791-802(1988);Sayers 等, 溴乙锭存在下通过限制性核酸外切酶的反应对含硫代磷酸酯的 DNA 进行链特异性切割 (Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide), (1988)Nucl Acids Res 16:803-814;Carter, 改进的利用 M13 载体的寡核苷酸定向诱变 (Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vector), Methods in Enzymol 154:382-403(1987);Kramer 和 Fritz 通过缺口双链体 DNA 进行突变的寡核苷酸定向构建 (Oligonucleotide-directed construction of mutation via gapped duplex DNA), Methods in Enzymol 154:350-367(1987);Kunkel,《核酸和分子生物学》(Nucleic Acids and Molecular Biology) 中的《寡核苷酸定向诱变的效率》(The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis) (Eckstein, F. 和 Lilley, D. M. J. 编, 施普林格弗莱格公司, 柏林) (1987);Kunkel 等, 不进行表型选择的快速有效的定点诱变 (Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection), Methods in Enzymol 154,367-382(1987);Zoller 和 Smith, 寡核苷酸定向诱变:利用两种寡核苷酸引物和一种

单链 DNA 模板的简单方法 (Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template), Methods in Enzymol 154:329-350(1987); Carter, 定点诱变 (Site-directed mutagenesis), Biochem J 237:1-7(1986); Eghtedarzadeh 和 Henikoff, 使用寡核苷酸产生大缺失 (Use of oligonucleotides to generate large deletions), Nucl Acids Res 14:5115(1986); Mandecki, 大肠杆菌质粒中寡核苷酸定向的双链断裂修复: 定点诱变方法 (oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis), Proc Natl Acad Sci USA, 83:7177-7181(1986); Nakamaye 和 Eckstein, 通过硫代磷酸酯基团抑制核酸内切酶 NciI 切割和它在寡核苷酸定向诱变中的应用 (Inhibition of endonuclease NciI cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis), Nucl Acids Res 14:9679-9698(1986); Wells 等, 氢键形成在稳定枯草杆菌蛋白酶的过渡态中的重要性 (Importance of Hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin), Phil Trans R Soc Lond A 317:415-423(1986); Botstein 和 Shortle, 体外诱变的方案和应用 (Strategies and applications of in vitro mutagenesis), Science 229:1193-1201(1985); Carter 等, 改进的利用 M13 载体的寡核苷酸定向诱变 (Improved oligonucleotide site-specific mutagenesis using M13 Vector), Nucl Acids Res 13:4431-4443(1985); Grundström 等, 通过小规模 '鸟枪' 基因合成进行寡核苷酸定向诱变 (oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis), Nucl Acids Res 13:3305-3316(1985); Kunkel, 不进行表型选择的快速有效的定点诱变 (Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection), Proc Natl Acad Sci USA 82:488-492(1985); Smith, 体外诱变 (In vitro mutagenesis), Ann Rev Genet 19:423-462(1985); Taylor 等, 在限制性酶反应中使用硫代磷酸酯修饰的 DNA 制备带切口的 DNA (The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA), Nucl Acids Res 13:8749-8764(1985); Taylor 等, 利用硫代磷酸酯修饰的 DNA 高频快速产生寡核苷酸定向突变 (The rapid generation of oligonucleotide-directed mutaiton at high freauency using phosphorothioate-modified DNA), Nucl Acids Res 13:8765-8787(1985); Wells 等, 盒诱变: 在确定位点产生多个突变的有效方法 (Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutation at defined sites), Gene 34:315-323(1985); Kramer 等, 进行寡核苷酸定向突变构建的缺口双链体 DNA 方法 (The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction), Nucl Acids Res 12:9441-9456(1984); Kramer 等, 点错配修复 (Point Mismatch Repair), Cell 38:879-887(1984); Nambiar 等, 核糖核酸酶 S 蛋白编码基因的总合成和克隆 (Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease Sprotein), Science 223:1299-1301(1984); Zoller 和 Smith, 考虑到 M13 载体中的 DNA 片段的寡核苷酸定向诱变 (oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragment cloned into M13 vector), Methods in Enzymol 100:468-500(1983); 以及 Zoller 和 Smith, 利用 M13 衍生载体进行寡核苷酸定向诱变: 在任何 DNA 片段中产生点突变的有效

的普通方法 (oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vector: an efficient and general procedure for the production of point mutation in any DNA fragment), Nucl Acids Res 10:6487-6500 (1982)。上述方法的其它细节可在《酶学方法》(Methods in Enzymol) 第 154 卷中找到, 其中也描述了有关不同诱变、基因分离、表达和其它方法的有用问题解决控制方法。

[0125] 用于如本发明诱变如将本发明 HA 和 / 或 NA 分子文库进行突变或更改的寡核苷酸通常根据 Beaucage 和 Caruthers, Tetrahedron Letts 22(20):1859-1862, (1981) 所述固相亚磷酸胺三酯方法化学合成, 如利用自动合成仪, 如 Needham-VanDevanter 等, Nucleic Acids Res, 12:6159-6168 (1984) 所述。

[0126] 此外, 基本上任何多核苷酸均可通过数种商业来源定制或标准订购, 如中部认证试剂公司 (The Midland Certified Reagent Company) (mcrc@oligos.com)、大美国基因公司 (The Great American Gene Company) (www.genco.com)、快速基因公司 (ExpressGen Inc.) (www.expressgen.com)、欧普龙技术公司 (Operon Technologies Inc.) (加州阿拉米达 (Alameda, CA)) 及其它来源。同样, 也可从任何数种资源定制肽和抗体, 如 (派普肽金尼克公司) (PeptidoGenic) (pkim@ccnet.com)、HTI 生物产品公司 (HTI Bio-products, Inc.) (www.htibio.com)、BMA 生物医学有限公司 (BMA Biomedicals Ltd.) (英国)、生物合成公司 (Bio. Synthesis, Inc.) 等等。

[0127] 本发明也涉及含有本发明 HA 和 / 或 NA 分子或其它多肽和 / 或核酸, 如 SEQ ID NO:1、3、5、7、SEQ ID NO:1 的残基 89-1063、SEQ ID NO:1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO:5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO:5 的残基 1063-1728 的宿主细胞和生物体。利用本发明载体遗传工程改造宿主细胞 (如转化、转导或转染), 本发明载体可以是 (例如) 克隆载体或表达载体。载体可为, 例如, 质粒、细菌、病毒、裸露多核苷酸或偶联多核苷酸的形式。通过以下标准方法将载体引入细胞或微生物: 电穿孔 (参见, From 等, Proc Natl Acad Sci USA 82, 5824 (1985)、病毒载体感染、小珠或颗粒基质内部或表面具有核酸的颗粒高速弹道穿透 (Klein 等, Nature 327, 70-73 (1987))。Berger, Sambrook 和 Ausubel 提供了数种合适的转化方法。参见上文。

[0128] 本发明可利用数种已知在细菌细胞中引入靶核酸的方法, 它们均可用于本发明。这些方法包括: 将受体细胞和含 DNA 的细菌原生质体融合、电穿孔、微粒轰击、用病毒载体感染等。可使用细菌细胞扩增含本发明 DNA 构建物质粒的数目。细菌生长至对数期, 可利用本领域已知数种方法分离细菌中的质粒 (参见例如 Sambrook)。此外, 用市售的各种试剂盒纯化细菌质粒 (参见例如, 来自法玛西亚生物技术公司的 EasyPrep™, FlexiPrep™; 来自司查塔基公司的 StrataClean™; 以及凯杰公司的 QIAprep™)。进一步操作分离并纯化的质粒产生其它质粒, 用于转染细胞或掺入相关载体以感染生物体。典型的载体包含转录、翻译终止子和转录、翻译起始序列, 以及用于调节特定靶核酸表达的启动子。载体任选包含普通表达盒, 表达盒含有至少一个独立终止序列, 允许表达盒在真核、原核或两者中 (如穿梭载体) 复制的序列以及原核和真核系统的选择性标记。载体可在原核、真核或任选两者中复制和整合。参见, Gilman 和 Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, 等, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B. 等, Protein Expr Purif 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (所有同上)。用于克隆的细菌和噬菌体目录由 ATCC 提供, 如, 《ATCC 细菌和噬菌体

目录》(The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage)(1992)Ghera 等(编)ATCC 发行。其它测序、克隆及分子生物学其它方面基础步骤以及其理论探讨可参见 Watson 等(1992) 重组 DNA(Recombinant DNA) 第二版(科学美国人图书公司)(Scientific American Books), 纽约。参见上文。在上文有关流感病毒疫苗生产的章节及其引用文献中阐述了用于本文序列的其它载体。

#### [0129] 多肽生产和回收

[0130] 在转导合适的宿主细胞系或细胞株并使其生长至合适细胞密度后,利用合适方法诱导所选启动子(如,改变温度或化学诱导),将细胞再培养一段时间。在一些实施方式中,可从培养基中回收分泌的多肽产物,如分泌融合蛋白形式中的 HA 和 / 或 NA 多肽。在其它实施方式中,细胞产生含本发明 HA 和 / 或 NA 多肽的病毒颗粒。或者,可离心收集细胞,通过物理或化学方法破碎细胞并保留所得粗提物进一步纯化。可使用任何方便方法破碎表达蛋白所使用的真核或微生物细胞,包括反复冻融、超声、机械破碎或使用细胞裂解试剂或其它方法,本领域熟练技术人员熟知这些方法。此外,可使用表达本发明 HA 和 / 或 NA 多肽产物的细胞而不将多肽从细胞中分离。在此种情况下,本发明多肽可任选表达于细胞表面并因此可用细胞表面结合抗体等检测(如通过具有 HA 和 / 或 NA 分子或其片段的融合蛋白等形式)。此类细胞也是本发明的特点。

[0131] 可通过本领域熟知的任何方法从重组细胞培养物中回收并纯化表达的多肽,包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱(如使用本领域熟练技术人员指导的任何标签系统)、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。根据需要可在完成成熟蛋白构型的过程中使用蛋白质重折叠步骤。也可以在最终纯化步骤中使用高效液相色谱(HPLC)。除了本文注明的参考文献外,本领域熟知数种纯化方法,包括如下文献列出的那些:Sandana(1997)《蛋白的生物分离》(Bioseparation of proteins),科学出版公司(Academic Press, Inc.)和 Bollag 等(1996)《蛋白方法(第二版)》(Protein Methods, 2<sup>nd</sup> Edition)韦利李斯公司,纽约(Wiley-Liss, NY); Walker(1996)《蛋白实验手册》(The Protein Protocols Handbook)Humana 出版公司,纽约, Harris 和 Angal(1990)《蛋白纯化应用:方法实践》(Protein purification application: A practical approach)牛津 IRL 出版公司,牛津,英格兰(Press at Oxford, Oxford, England); Harris 和 Angal《蛋白纯化方法:方法实践》(Protein Purification Methods: A Practical Approach)牛津 IRL 出版公司,牛津,英格兰(Press at Oxford, Oxford, England); Scopes(1993)《蛋白纯化:原理和实践(第三版)》(Protein Purification: Principles and Practice 3<sup>rd</sup> Edition)施普林格佛莱格公司,纽约(Springer Verlag, NY); Janson 和 Ryden(1998)《蛋白纯化:原理、高分辨率方法及其应用(第二版)》(Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, 韦利-VCH 公司,纽约(Wiley-VCH, NY); 和 Walker(1998)CD-ROM 上的蛋白实验方法(Protein Protocols on CD-ROM)休曼出版公司(Humana Press),新泽西州。

[0132] 在病毒中生产本发明表达多肽时,病毒通常从感染(转染)细胞生长的培养基中回收。通常,在浓缩流感病毒前澄清粗培养基。一般的方法包括超滤、硫酸钡吸附和洗脱以及离心。例如,来自感染培养物的粗培养基首先离心澄清,如 1000-2000x g 离心足够长的时间以去除细胞碎片和其它大颗粒物质,如离心 10-30 分钟。任选的,离心澄清培养基

上清使流感病毒成团,如 15,000x g 离心约 3-5 小时。接下来将病毒团块重悬于合适的缓冲液,如 STE(0.01M Tris-HCl ;0.15M NaCl ;0.0001M EDTA) 或磷酸缓冲盐水 (PBS)pH 7.4 中,在蔗糖 (60% -12%) 或酒石酸钾 (50% -10%) 中密度梯度离心病毒。连续梯度或步进梯度均可,如 12% -60% 的 4 个 12% 步长的蔗糖梯度。以一定速度和时间进行梯度离心,所用时间足以使病毒浓缩于可见条带中用于回收。或者,对于多数大规模商用,用分带离心转头以连续模式从密度梯度中淘选病毒。其它在组织培养物中制备流感病毒的足以指导技术人员的细节参见 Nicholson 等 (编)《流感教科书》(Textbook of Influenza) 第 324-332 页的 Furminger.《疫苗生产》(Vaccine Production);Cohen 和 Shafferman (编)《设计和生产疫苗的新策略》(Novel Strategies in Design and Production of Vaccine) 第 141-151 页 Merten 等 (1996)《从细胞培养物中制生产用于制备疫苗的流感病毒》(Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation),以及美国专利号 5,690,937。需要的话可将回收病毒在作为稳定剂的蔗糖磷酸谷氨酸 (SPG) 存在下存储于 -80℃。

[0133] 或者,可使用无细胞转录 / 翻译系统产生包含本文给定序列如 SEQ ID NO :2、4、6、8、SEQ ID NO :2 的残基 16-340、SEQ ID NO :2 的残基 341-562、SEQ ID NO :6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO :6 的残基 341-562 的氨基酸序列或子序列、或由本发明多核苷酸序列如 SEQ ID NO :1、3、5、7、SEQ ID NO :1 的残基 89-1063、SEQ ID NO :1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO :5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO :5 的残基 1063-1728 编码的氨基酸序列或子序列的多肽。可购得数种合适的体外转录和翻译系统。体外转录和翻译实验方案的通用指南参见 Tymms (1995)《体外转录和翻译实验方案:分子生物学方法》(In vitro Transcription and Translation Protocols ;Methods in Molecular Biology 第 37 卷,加兰出版公司,纽约 (Garland Publishing, NY))。

[0134] 此外,多肽或其子序列,如含抗原性肽的子序列,可通过手工或自动化系统合成,如利用固相技术直接进行肽合成 (参见,Stewart 等 (1969)《固相肽合成》(Solide-Phase Peptide Synthesis),WH 佛理芒公司,旧金山 (WH Freeman Co, San Francisco); Merrifield J (1963) J Am Chem Soc 85 :2149-2154)。示例性的自动化系统包括应用生物系统 (Applied Biosystems) 431A 肽合成仪 (珀金埃尔默公司,加州福斯特城 (Perkin Elmer, Foster City, CA))。根据需要可以分别合成子序列,并用化学方法组合提供全长多肽。

[0135] 修饰的氨基酸

[0136] 本发明表达多肽能含一个或多个修饰氨基酸。修饰氨基酸存在的优势在于,例如,(a) 增加多肽血清半衰期,(b) 降低 / 增加多肽抗原性,(c) 增加多肽存储稳定性等。例如,在重组生产的翻译时或翻译后 (如,在哺乳动物细胞表达时 N-X-S/T 基序的 N 连接糖基化) 或通过合成手段 (如,通过 PEG 化) 进行氨基酸修饰。

[0137] 修饰的氨基酸的非限制性例子包括糖基化的氨基酸、硫酸化氨基酸、异戊烯基化 (如法尼基化、牻牛儿基牻牛儿基化) 氨基酸、乙酰化氨基酸、酰基化氨基酸、PEG 化氨基酸、生物素化氨基酸、羧化氨基酸、磷酸化氨基酸等,以及与脂部分或其它有机衍生物偶联的修饰氨基酸。文献中遍布足以指导技术人员进行氨基酸修饰的参考内容。示例性的实验方案参见 Walker (1998)《CD-ROM 上的蛋白实验方案》(Protein Protocols on CD-ROM) 休曼出版社 (Human Press),新泽西州托瓦它 (Towata, NJ)。



**[0138] 融合蛋白**

**[0139]** 本发明也提供融合蛋白,该融合蛋白含有本发明序列(如SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2的残基16-340、SEQ ID NO:2的残基341-562、SEQ ID NO:6的残基16-340和SEQ ID NO:6的残基341-562示例的HA和/或NA多肽的序列)或具有如免疫球蛋白(或其部分)、GFP(绿色荧光蛋白)编码序列或其它类似标记物的它们的片段。编码此类融合蛋白的核苷酸序列是本发明另一方面。本发明的融合蛋白任选用于,如,与本发明非融合蛋白类似的应用(包括,如,治疗、预防、诊断、实验等本文所述的应用)。除了与免疫球蛋白序列和标记序列融合,本发明蛋白也可任选与用于分选融合蛋白和/或使融合蛋白靶向特定细胞类型、区域等的序列融合。

**[0140] 抗体**

**[0141]** 本发明的多肽能用于生产本文给定多肽和/或本发明多核苷酸(如本文所示的那些及其保守性变体)编码多肽的特异性抗体。上述提及多肽的特异性抗体可用于如诊断和治疗目的,如关于靶多肽的活性、分布和表达。

**[0142]** 可通过本领域熟知方法产生本发明多肽的特异性抗体。此类抗体能包括但不限于:多克隆、单克隆、嵌合、人源化、单链、Fab片段和Fab表达文库产生的片段。

**[0143]** 抗体生产所用多肽无需生物学活性(如,无需全长功能性血凝素或神经氨酸酶)。然而,多肽或寡肽必须具有抗原性。用于诱导特异性抗体的肽通常具有至少4个氨基酸的序列,常常至少5个或10个氨基酸。多肽的短臂可与另一蛋白,如钥孔血蓝素及抗嵌合分子的抗体融合。

**[0144]** 本领域技术人员了解数种制造多克隆和单克隆抗体的方法,这些方法适合生产本发明多肽和/或本发明多核苷酸序列编码多肽的特异性抗体。参见例如,Coligan(1991)《新编免疫学实验方案》(Current Protocols in Immunology)纽约韦利/格林公司(Wiley/Greene, NY);Paul(编)(1998)《基础免疫学第四版》(Fundamental Immunology, Fourth Edition), Lippincott-Raven, Lippincott Williams 和 Wilkins;Harlow 和 Lane(1989)《抗体:实验室手册》(Antibody: A Laboratory Manual),纽约冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press, NY);Stites等(编)《基础和临床免疫学(第四版)》(Basic and Clinical Immunology(4th ed.)),兰格医学出版公司,加州洛斯阿尔托斯(Lange Medical Publications, Los Altos, CA)及其引用文献;Goding(1986)《单克隆抗体:原理和实践(第二版)》(Monoclonal antibody: Principles and Practice(2d ed.))科学出版社,纽约(Academic Press, New York, NY);Kohler和Milstein(1975)*Nature* 256:495-497。其它合适的抗体制备技术包括在噬菌体或类似载体中选择重组抗体文库。参见, Huse等(1989)*Science* 246:1275-1281;和Ward等(1989)*Nature* 341:544-546。特异性单克隆和多克隆抗体和抗血清结合的 $K_D$ ,如至少约0.1  $\mu M$ ,至少约0.01  $\mu M$ 或更好,并且,通常至少约0.001  $\mu M$ 或更好。

**[0145]** 对于某种治疗性应用,需要人源化抗体。制备嵌合(人源化)抗体的方法参见美国专利5,482,856。人源化和其它抗体生产和工程改造技术的其它细节参见Borrebaeck(编)(1995)《抗体工程第二版》(Antibody Engineering, 2<sup>nd</sup> Edition)佛理茫和公司,纽约(Borrebaeck)(Freeman and Company, NY(Borrebaeck));McCafferty等(1996)《抗体工程,实践方法》(Engineering, A Practical Approach), IRL 牛津出版社,牛津,英格兰

(McCafferty) (IRL at Oxford Press, Oxford, England (McCafferty)) 以及和 Paul (1995) 《抗体工程手册》(Engineering Protocols) 休曼出版社, 新泽西州 (Paul) (Humana Press, Towata, NJ (Paul))。其它特定步骤的细节可参见 Ostberg 等 (1983), Hybridoma 2: 361-367, Ostberg, 美国专利号 4, 634, 664, 和 Engelman 等, 美国专利号 4, 634, 666。

[0146] 由免疫反应性定义多肽

[0147] 由于本发明多肽提供了多种新的多肽序列 (如含有 HA 和 NA 分子的多肽序列), 因此多肽也提供了可在如免疫学实验中被识别的新结构特点。因此生产能特异性结合本发明多肽的抗血清以及此类抗血清结合的多肽也是本发明的特点。

[0148] 例如, 本发明包括能够与抗体或抗血清特异性结合或者对抗体或抗血清具有特异免疫反应性的多肽 (如, HA 和 NA 分子), 其中抗体或抗血清所抗免疫原包含选自一个或多个本文给定序列 (如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562) 等的氨基酸序列。为了减少与其它同源物的交叉反应, 用提交时公共数据库中的 HA 和 / 或 NA 分子如“对照”多肽对抗体或抗血清进行消减。当其它对照序列对应核酸时, 产生由核酸编码的多肽并用于抗体 / 抗血清消减目的。

[0149] 在一个典型形式中, 免疫实验使用的多克隆抗血清是用包含一个或多个对应本文序列 (如 SEQ ID NO:2、4、6、8、SEQ ID NO:2 的残基 16-340、SEQ ID NO:2 的残基 341-562、SEQ ID NO:6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO:6 的残基 341-562) 等或其基本序列 (即占所提供全长序列的至少约 30%) 的序列的一种或多种多肽产生的。起源于当前序列的一套潜在多肽免疫原下文统称为“免疫原性多肽”。任意选择所得抗血清使其对对照血凝素和 / 或神经氨酸酶同系物具有低交叉反应性, 并且在免疫实验使用多克隆抗血清之前通过免疫吸附消除与一种或多种对照血凝素和神经氨酸酶同系物的交叉反应性。

[0150] 为了生产免疫实验中所用抗血清, 按照本文所述生产一种或多种免疫原性多肽并纯化。例如, 能在重组细胞中产生重组蛋白质。按照标准小鼠免疫实验方案 (参见例如, Harlow 和 Lane (1988) 《抗体: 实验室手册》(Antibody, A Laboratory Manual), 冷泉港出版公司 (Cold Spring Harbor Publications), 纽约), 用免疫原性蛋白和标准佐剂如弗氏佐剂免疫纯系小鼠 (用于本实验的原因是由于该小鼠遗传背景基本相同导致结果更具重现性), 上述文献中包含关于可用于测定特异性免疫反应性的抗体产生、免疫实验形式及条件的标准描述。其它抗体参考资料和讨论可在本文中找到, 并可用于利用免疫反应性定义多肽。或者, 将源于本文公开序列的一种或多种合成或重组的多肽与运载体蛋白偶联, 并用作免疫原。

[0151] 收集多克隆血清, 并在免疫实验中测定抗免疫原性多肽的滴度, 例如, 使用在固体支持物上固定一种或多种免疫原性蛋白的固相免疫实验。选择滴度为  $10^6$  或更高的多克隆抗血清, 汇集并用对照血凝素和 / 或神经氨酸酶多肽消减以产生消减、汇集的已知滴度的多克隆抗血清。

[0152] 在比较性免疫实验中检测消减、汇集的已知滴度多克隆抗血清抗对照同系物的交叉反应性。在此比较性实验中, 使用差异性结合条件检测消减的已知滴度多克隆抗血清, 已知滴度抗血清与免疫原性多肽结合的信噪比至少比结合对照同系物信噪比高 5-10 倍。即, 通过加入非特异性竞争物如清蛋白或脱脂奶粉和 / 或调整盐条件、温度和或其它来调整结

合反应的严谨性。在接下来的实验中使用这些结合条件,以测定测试多肽(与免疫原性多肽和/或对照多肽对比的多肽)是否特异性与汇集的消减多克隆抗血清结合。具体说,在差异性结合条件下,测试多肽比对照受试同源物信噪比高至少 2-5 倍,且信噪比是免疫原性多肽的至少约 1/2,与已知受体相比与免疫原性多肽具有显著结构相似性等,因此是本发明的多肽。

[0153] 在另一个实施例中,用竞争结合形式的免疫实验检测受试多肽。例如,利用对照多肽免疫吸附将交叉反应抗体从汇集抗血清混合物中去除。然后将免疫原性多肽固定于固体支持物上,随后接触消减、汇集的抗血清。将受试蛋白加入实验,以竞争结合汇集、消减的抗血清。与固定蛋白相比,受试蛋白竞争结合汇集、消减的抗血清的能力与加入实验的免疫原性多肽竞争结合的能力(免疫原性多肽与固定的免疫原性多肽有效竞争结合汇集的抗血清)作比较。使用标准计算方法计算受试蛋白的交叉反应百分数。

[0154] 在平行实验中,任选测定对照蛋白竞争结合汇集、消减的抗血清的能力,与免疫原性多肽竞争结合抗血清的能力作比较。再次使用标准计算方法计算受试蛋白的交叉反应百分数。当受试蛋白交叉反应百分数是对照多肽的至少 5-10 倍或受试多肽的结合大约在免疫原性多肽结合范围内,则称受试多肽特异性结合汇集、消减的抗血清。

[0155] 通常,可在如本文所述比较任何多肽与免疫原性和/或对照多肽的竞争结合免疫实验中使用免疫吸附并汇集的抗血清。为了进行比较,免疫原性、受试和对照多肽分别进行宽浓度范围实验,并用标准技术测定每一多肽抑制 50% 消减抗血清结合固定对照、受试或免疫原性多肽的多肽量。如果竞争实验中结合所需受试多肽的量小于所需免疫原性多肽量的两倍,则称受试多肽特异性结合免疫原性蛋白的抗体,只要该量至少是比对照多肽的约 5-10 倍。

[0156] 作为特异性的另一测定,任选用免疫原性多肽(而非对照多肽)完全免疫吸附汇集抗血清,直至检测到所得免疫原性多肽消减、汇集的抗血清很少或没有结合于免疫吸附中使用的免疫原性多肽。然后测试该完全免疫吸附抗血清与受试多肽的反应性。若观察到很少或没有反应(即,不超过完全免疫吸附抗血清结合免疫原性多肽信噪比的 2 倍),则受试多肽特异性结合于免疫原性蛋白产生的抗血清。

[0157] 核酸和多肽序列变体

[0158] 如本文所述,本发明提供核酸多核苷酸序列和多肽氨基酸序列,如血凝素和神经氨酸酶序列,以及包含所述序列的组合物和方法。本文公开所述序列的例子(如 SEQ ID NO: 1-8)。然而,本领域技术人员将意识到本发明提供的这些序列并不限制本发明,并且本发明也提供许多具有本文所述功能的相关和非相关的序列,如编码 HA 和/或 NA 分子的序列。

[0159] 技术人员也将意识到本发明包括许多所公开序列的变体。例如,本发明包括所公开序列通过保守性变异产生的功能相同的序列。如果核酸多核苷酸序列的变体能与至少一条公开序列杂交,那么该变体也应该包括在本发明中。本发明也包括通过如标准序列比对技术确定的本文公开序列的独特子序列。

[0160] 沉默变异

[0161] 由于遗传密码的简并性,可任选产生任何编码本发明多肽和/或病毒的多种核酸序列,其中一些与本文 HA 和 NA 核酸和多肽序列具有较低水平的序列相同性。下文提供了详细遗传密码的密码子表,可在许多生物学和生化教科书中找到。

[0162] 表 1

[0163] 密码子表

[0164]

| 氨基酸  |     |   | 密码子 |     |     |     |     |     |
|------|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 丙氨酸  | Ala | A | GCA | GCC | GCG | GCU |     |     |
| 半胱氨酸 | Cys | C | UGC | UGU |     |     |     |     |
| 天冬氨酸 | Asp | D | GAC | GAU |     |     |     |     |
| 谷氨酸  | Glu | E | GAA | GAG |     |     |     |     |
| 苯丙氨酸 | Phe | F | UUC | UUU |     |     |     |     |
| 甘氨酸  | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU |     |     |
| 组氨酸  | His | H | CAC | CAU |     |     |     |     |
| 异亮氨酸 | Ile | I | AUA | AUC | AUU |     |     |     |
| 赖氨酸  | Lys | K | AAA | AAG |     |     |     |     |
| 亮氨酸  | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| 甲硫氨酸 | Met | M | AUG |     |     |     |     |     |
| 天冬酰胺 | Asn | N | AAC | AAU |     |     |     |     |
| 脯氨酸  | Pro | P | CCA | CCC | CCG | CCU |     |     |
| 谷氨酰胺 | Gln | Q | CAA | CAG |     |     |     |     |
| 精氨酸  | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| 丝氨酸  | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| 苏氨酸  | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU |     |     |
| 缬氨酸  | Val | V | GUA | GUC | GUG | GUU |     |     |
| 色氨酸  | Trp | W | UGG |     |     |     |     |     |
| 酪氨酸  | Tyr | Y | UAC | UAU |     |     |     |     |

[0165] 密码子表显示许多氨基酸可由一种以上密码子编码。例如,密码子 AGA、AGG、CGA、

CGC、CGG 和 CGU 均编码精氨酸。因此,在本发明核酸的每个编码精氨酸的密码子位置,可用上述任何对应密码子改换密码子而并不改变编码的多肽。应当理解的是 RNA 序列中的 U 对应 DNA 序列中的 T。

[0166] 此类“沉默变异”是下文讨论的“保守修饰变化”的一种。技术人员认识到核酸中的每一密码子(除了 ATG,通常是甲硫氨酸的唯一密码子,以及 TTG,通常是色氨酸的唯一密码子)均能通过标准技术修饰以编码功能相同的多肽。因此,多肽编码核酸的每一沉默变异均隐含于任何所述序列中。因此本发明隐含的提供了编码本发明多肽的每一和每个可能的变化,可通过选择基于可能密码子选择的组合产生。根据标准的三联体遗传密码产生这些应用于编码本发明血凝素或神经氨酸酶多肽的核酸序列的组合(如,表 1 所列,或本领域常用的)。考虑在序列以及遗传密码的基础上提供并描述了本文每个核酸的所有此类变化。技术人员完全能够利用本文方法进行这些沉默取代。

[0167] 保守性变异

[0168] 由于遗传密码的简并性,“沉默取代”(即不引起所编码多肽改变的核酸序列中的取代)是本发明的每个编码氨基酸序列的核酸序列的暗含特点。同样,在氨基酸序列中的一个或一些氨基酸中的“保守性氨基酸取代”则是利用具有高度相似性的不同氨基酸进行的取代,也被鉴定为与如本文公开的构建物具有高度相似性。每一公开序列的此类保守性变异是本发明的特点。

[0169] 特定核酸序列的“保守性变异”指那些编码相同或基本相同的氨基酸序列的核酸,或不编码氨基酸序列但序列基本相同的核酸,参见下文表 2。技术人员将认识到改变、加入或删除编码序列中单一氨基酸或小部分氨基酸(通常小于 5%、更通常少于 4%、3%、2%或 1%)的个别的取代、删除或增加为“保守性修饰的变异”,其中改变导致氨基酸的删除、增加或化学相似性氨基酸的取代。因此,本发明所列举的多肽序列的“保守性变异”包括多肽序列中小百分数的氨基酸被具有相同保守取代基的保守性选择氨基酸所取代,所述小百分数通常小于 5%,更通常小于 4%、3%、2%或 1%。最后,加入不改变核酸分子编码活性的序列,如加入非功能性序列,也是基本核酸的保守性变异。

[0170] 表 2-- 保守取代基团

[0171]

|   |          |          |          |         |
|---|----------|----------|----------|---------|
| 1 | 丙氨酸 (A)  | 丝氨酸 (S)  | 苏氨酸 (T)  |         |
| 2 | 天冬氨酸 (D) | 谷氨酸 (E)  |          |         |
| 3 | 天冬酰胺 (N) | 谷氨酰胺 (Q) |          |         |
| 4 | 精氨酸 (R)  | 赖氨酸 (K)  |          |         |
| 5 | 异亮氨酸 (I) | 亮氨酸 (L)  | 甲硫氨酸 (M) | 缬氨酸 (V) |
| 6 | 苯丙氨酸 (F) | 酪氨酸 (Y)  | 色氨酸 (W)  |         |

[0172] 独特的多肽和多核苷酸子序列

[0173] 在一个方面,本发明提供包含独特子序列的核酸,所述独特子序列是选自本文公

开的 HA 和 NA 分子序列,如 SEQ ID NO :1、3、5、7、SEQ ID NO :1 的残基 89-1063、SEQ ID NO :1 的残基 1064-1729、SEQ ID NO :5 的残基 88-1062 和 SEQ ID NO :5 的残基 1063-1728 的核酸中的独特子序列。与对应提交时如 GenBank 或其它类似公共数据库的对应核酸相比,这些独特子序列是独特的。可利用如默认参数的 BLAST 进行比对。任何独特子序列均可用作识别本发明核酸的探针。参见上文。

[0174] 同样,本发明包括包含独特子序列的多肽,所述独特子序列是选自本文公开 HA 和 NA 分子序列,如 SEQ ID NO :2、4、6、8、SEQ ID NO :2 的残基 16-340、SEQ ID NO :2 的残基 341-562、SEQ ID NO :6 的残基 16-340 和 SEQ ID NO :6 的残基 341-562 的多肽中的独特子序列。这里,与对应提交时如 GenBank 或其它类似公共数据库的多核苷酸序列对应的氨基酸序列相比,这些独特子序列是独特的。

[0175] 本发明也提供了在严谨条件下与独特编码寡核苷酸杂交的靶核酸,其中独特编码寡核苷酸编码选自本发明 HA 和 NA 分子序列的多肽中的独特子序列,其中与任何对照多肽对应的多肽(如,提交时与 GenBank 或其它类似公共数据库中核酸对应的多肽序列)相比,独特子序列是独特的。如上文所述测定独特序列。

[0176] 序列比较、相同性和同源性

[0177] 涉及两个或多个核酸或多肽序列的术语“相同”或“相同性”百分数指当利用下述序列对比算法之一(或技术人员所用其它算法)或视觉检视比较并比对最大对应量时,两个或多个序列或子序列是相同的,或者具有特定百分数的氨基酸残基或核苷酸是相同的。

[0178] 涉及两个或多个核酸或多肽(如,编码 HA 或 NA 分子的 DNA,或 HA 或 NA 分子的氨基酸序列)的短语“基本相同”指当利用序列比较算法或视觉检视比较并比对最大对应量时,两个或多个序列或子序列具有至少约 90%、优选 91%、最优选 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9% 或更高的核苷酸或氨基酸残基相同性。此类“基本相同的”序列通常被认为是“同源的”,无论其实际来源是什么。优选地,在长度至少约 200 残基、至少约 250 个残基、至少约 300 个残基、350 个残基、400 个残基、425 个残基、450 个残基、475 个残基、480 个残基、490 个残基、495 个残基、499 个残基、500 个残基、502 个残基、559 个残基、565 个残基、或 566 个残基的氨基酸序列区域,或两个比较序列的全长上存在“基本相同”。

[0179] 在序列比较和同源性测定中,一般将一个序列用作参比序列,将测试序列与其作比较。使用序列比较算法时,将测试序列和参比序列输入计算机,如果必要则指定子序列坐标,并指定序列比对程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列与参比序列的序列相同性百分数。

[0180] 可通过,例如 Smith 和 Waterman, Adv Appl Math 2:482(1981) 的局部同源性算法,Needleman 和 Wunsch, J Mol Biol 48:443(1970) 的同源性比对算法, Pearson 和 Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85:2444(1988) 的相似性搜索法,算法的计算机执行如威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA(遗传学计算组(Genetics Computer Group),575 Science Dr.,威斯康星州麦迪逊)或目测方法(概述参见 Ausubel 等,同上)对序列进行最优比对,以便比较。

[0181] 适合测定序列相同性和序列相似性百分数的算法的例子是 BLAST 算法,参见 Altschul 等, J Mol Biol 215:403-410(1990)。进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物

技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) 从公共渠道获得。此种算法包括:首先通过鉴定查询序列中长度为 W 的短字来鉴定高分序列对 (HSP),与数据库序列中长度相同的字比对时它们能匹配或满足一些具有积极价值的阈值评分 T。T 被称为相邻字评分阈值 (参见 Altschul 等,同上)。这些初始相邻字命中用作启动搜索的种子,以便找到含有它们的较长 HSP。然后,沿各个序列在两个方向上延伸该字命中,直到提高累积的比对评分。就核苷酸序列而言,采用参数 M(一对匹配残基的奖励评分;总是  $> 0$ ) 和 N(错配残基的罚分;总是  $< 0$ ) 计算累积评分。就氨基酸序列而言,用评分矩阵计算累积评分。在以下情况出现时中止字命中在各个方向上的延伸:累积比对评分比最大获得值降低 X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积评分变为零或零以下;或者达到各序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (用于核苷酸序列) 使用默认参数,字长 (W) 为 11、期望值 (E) 为 10、截止值为 100、 $M = 5$ 、 $N = -4$  且比较两条链。就氨基酸序列而言,BLASTP 程序使用默认参数,字长 (W) 为 3、期望值 (E) 10、使用 BLOSUM62 评分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff (1989) Proc Natl Acad Sci USA 89:10915)。

[0182] 除计算序列相同性百分数外,BLAST 算法也进行两个序列之间相似性的统计学分析 (参见例如,Karlin 和 Altschul, Proc Natl Acad Sci USA 90:5873-5787 (1993))。BLAST 算法提供了一种相似性衡量是最小概率和 ( $P(N)$ ),它说明两个核苷酸或氨基酸序列之间偶尔发生匹配的概率。例如,如果测试核酸与参比核酸比较时的最小概率和小于约 0.1,更优选小于约 0.01,最优选小于约 0.001,那么认为该核酸与参比序列相似。

[0183] 另一种有用的序列比对算法的例子是 PILEUP。PILEUP 能用累进逐对比对由一组相关序列产生多个序列比对。它也可绘制树形图,显示用于产生该比对的聚类关系。PILEUP 使用 Feng 和 Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-360 的累进比对方法的简化形式。所用方法与 Higgins 和 Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 所述方法相似。该程序可比对,例如,多达 300 个最大长度为 5,000 字的序列。多重比对方法从两个最相似序列的逐对比对开始,产生两个比对序列的组 (cluster)。然后,可将此组与下一个最相关序列或比对序列的组作比对。可通过简单延伸两个单独序列的逐对比对来比对两个序列组。通过一系列累进逐对比对实现最终比对。也可利用该程序绘制代表聚类关系的树形图。通过指定特定序列和序列比较区域的氨基酸或核苷酸坐标 (coordinate) 运行该程序。

[0184] 适用于 DNA 或氨基酸多重序列比对的算法的其它例子是 CLUSTALW 程序 (Thompson, J. D. 等 (1994) Nucl. Acids. Res. 22:4673-4680)。CLUSTALW 在序列组之间进行多重逐对比较,并根据同源性将它们组装成多个比对。缺口开放和缺口延伸罚分分别可以是,例如,10 和 0.05。在氨基酸比对中,可将 BLOSUM 算法用作蛋白质权矩阵。参见例如, Henikoff 和 Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919。

[0185] 试剂盒和试剂

[0186] 任选将本发明以试剂盒的形式提供给用户。例如,本发明的试剂盒包含一种或多种核酸、多肽、抗体或本文所述细胞系 (如,包含或具有本发明 HA 和 / 或 NA 分子)。该试剂盒可包含诊断性核酸或多肽,如抗体、探针组,如包装在合适容器中的 cDNA 微阵列,或其它核酸如一种或多种表达载体。该试剂盒还可装有一种或多种其它试剂,如底物、标记物、引物,用于标记表达产物、试管和 / 或其它配件、用于收集样品的试剂、缓冲液、杂交室、盖片

等。该试剂盒还可任选装有仪器套件或详述使用试剂盒组件用于诊断套件的发现或应用的使用说明书等。

[0187] 当根据说明书使用时,可将试剂盒用于如评测疾病的状态或状况、评测细胞或生物体中药学试剂或其它治疗干预对疾病状态或状况的进展的效果,或用作疫苗等。

[0188] 在另一方面,本发明提供了使用本发明方法、组合物、系统和设备的系统试剂盒。本发明的系统试剂盒任选装有一种或多种下列内容:(1) 设备、系统、系统组件或设备组件;(2) 本文所述实施方法和/或操作本文设备或设备组件和/或使用本文组合物的说明书。在另一方面,本发明提供了本文任何设备、设备组件或组合物或试剂盒,用以实施本文任何方法或实验,和/或使用任何设备或试剂盒实施本文任何实验和方法的应用。

[0189] 此外,该试剂盒能装有前述一种或多种翻译系统(如细胞),以及用于容纳试剂盒组分的合适的包装材料、容器,实施本文方法的说明书和/或类似材料。同样,可以试剂盒的形式提供翻译系统的产品(例如蛋白,如 HA 和/或 NA 分子),所述试剂盒中还装有试剂盒组分的容器、实施本文方法的说明书和/或其它材料。

[0190] 为了利于本发明方法和组合物的使用,可以试剂盒形式容纳任何疫苗组分和/或组合物,如尿囊液中的重配病毒等,以及其它用于实验或治疗性疫苗目的的流感病毒包装和感染组分,如缓冲液、细胞、培养基。通常,除了上述组分试剂盒还包含其它材料,如进行本发明方法的说明书、包装材料和容器。

## 实施例

[0191] 1957 年, H2N2 流感病毒在人群中流行和流转,直到 1968 年它们被 H3N2 流感病毒代替。鉴于已证明能引起疾病, H2 病毒可能在 1968 年之后出生的人群中具有大流行潜能。在雪貂上评估十四种地理上和时间上不同的 H2 禽类和人类流感病毒复制和引发广泛交叉反应性抗体应答的能力。在血凝抑制和中和实验中,接种甲型流感 A/Japan/57 (H2N2)、A/mallard/NY/78 (H2N2) 和 A/swine/MO/2006 (H2N3) 病毒的雪貂的血清能对异源 H2 病毒引发广泛的交叉反应性抗体应答。

[0192] 采用 A/Ann Arbor/6/60 (AA) 冷适应性 (ca) (H2N2) 主体,产生三种 ca 病毒:ca A/Japan/57、ca A/mallard/NY/78 和 ca A/swine/MO/2006。A/Japan/57 和 A/swine/MO/2006 的 HA 和 NA 序列如表 3 所示。在雪貂中评估各 ca 疫苗病毒对同源和异源野生型 (wt) H2 病毒刺激产生保护的能力。在上呼吸道中,保护功效可变。ca AA 和 ca A/Japan/57 疫苗对同源刺激提供完全保护,而 ca A/mallard/NY/78 和 ca A/swine/MO/2006 疫苗对同源刺激提供部分保护,与模拟免疫的动物相比其病毒效价显著降低。ca 疫苗病毒对上呼吸道中的异源刺激均不能产生完全保护。在下呼吸道中,各 ca 疫苗对同源野生型病毒的刺激产生完全保护。ca AA 和 ca A/swine/MO/2006 疫苗对下呼吸道的所有异源野生型病毒刺激都能提供完全保护。

[0193] 表 3. 重配疫苗病毒株的 HA/NA 序列。



[0194]

| SEQ ID NO    | HA 或 NA | 病毒株名称              | 氨基酸或核苷酸 |
|--------------|---------|--------------------|---------|
| SEQ ID NO: 1 | HA (H3) | ca A/Japan/57      | 核苷酸     |
| SEQ ID NO: 2 | HA (H3) | ca A/Japan/57      | 氨基酸     |
| SEQ ID NO: 3 | NA (N2) | ca A/Japan/57      | 核苷酸     |
| SEQ ID NO: 4 | NA (N2) | ca A/Japan/57      | 氨基酸     |
| SEQ ID NO: 5 | HA (H3) | ca A/swine/MO/2006 | 核苷酸     |
| SEQ ID NO: 6 | HA (H3) | ca A/swine/MO/2006 | 氨基酸     |
| SEQ ID NO: 7 | NA (N3) | ca A/swine/MO/2006 | 核苷酸     |
| SEQ ID NO: 8 | NA (N3) | ca A/swine/MO/2006 | 氨基酸     |

[0195] 图1和2显示ca AA、ca A/Japan/57、ca A/mallard/NY/78和ca A/swine/MO/2006疫苗在雪貂中产生的保护功效。用单一剂量的ca重配病毒疫苗对雪貂进行免疫接种。然后,用野生型AA、野生型A/Japan/57、野生型A/mallard/NY/78和野生型A/swine/MO/2006流感病毒刺激雪貂。刺激三天后,收集雪貂的肺和鼻甲,测定组织中的病毒效价。图1和2分别显示在雪貂的肺和鼻甲中,重组H2疫苗对同源和异源野生型H2病毒产生的保护功效。

[0196] 图3和4显示ca AA、ca A/Japan/57、ca A/mallard/NY/78和ca A/swine/MO/2006疫苗在小鼠中产生的保护功效。用单一剂量的ca重配病毒疫苗对小鼠进行免疫接种。然后,用野生型AA、野生型A/Japan/57、野生型A/mallard/NY/78和野生型A/swine/MO/2006流感病毒刺激小鼠。刺激三天后,收集小鼠的肺和鼻甲,测定组织中的病毒效价。图3和4分别显示在小鼠的肺和鼻甲中,重组H2疫苗对同源和异源野生型H2病毒产生的保护功效。

[0197] 尽管已经出于阐述和理解的目的在某种程度上详细地描述了本发明,但是本领域技术人员通过阅读本说明书可清楚地了解,可在不背离本发明真实范围的情况下进行各种形式和细节的变化。例如,上述所有的技术和设备都可以各种组合联用。本申请中提到的所有公开出版物、专利、专利申请或其它文献均通过引用全文纳入本文中用于所有目的,就好像所述公开出版物、专利、专利申请或其它文献单独指明通过引用纳入本文用于所有目的的那样。

[0198] 序列

[0199] ca A/Japan/57

[0200] SEQ ID NO:1 ca A/Japan/57 H2 的核苷酸序列

[0201] 分子全长:1773nt

[0202] 1 agcaaaagca ggggttatac catagacaac caaaagcaaa acaatggcca

[0203] 51 tcatttatct cattctcctg ttcacagcag tgagagggga ccagatatgc

[0204] 101 attggatacc atgccaataa ttccacagag aaggtcgaca caattctaga

[0205] 151 gcggaacgtc actgtgactc atgccaagga cattcttgag aagaccata

[0206] 201 acggaaagtt atgcaaacta aacggaatcc ctccacttga actaggggac

[0207] 251 tgtagcattg ccgatggct ccttggaat ccagaatgtg ataggttct

[0208] 301 aagtgtgcca gaatggctct atataatgga gaaagaaac ccgagagacg

[0209] 351 gtttgtgtta tccaggcagc ttcaatgatt atgaagaatt gaaacatctc

[0210] 401 ctcagcagcg tgaacattt cgagaaagta aagattctgc ccaaagatag

[0211] 451 atggacacag catacaacaa ctggaggttc acgggcctgc gcggtgtctg  
[0212] 501 gtaatccatc attcttcagg aacatggtct ggctgacaaa gaaaggatca  
[0213] 551 gattatccgg ttgccaaagg atcgtacaac aatacaagcg gagaacaaat  
[0214] 601 gctaataatt tggggggtgc accatcccaa tgatgagaca gaacaaagaa  
[0215] 651 cattgtacca gaatgtggga acctatgttt ccgtaggcac atcaacattg  
[0216] 701 aacaaaaggt caaccccaga aatagcaaca aggcctaaag tgaatggaca  
[0217] 751 aggaggtaga atggaattct cttggaccct cttggatatg tgggacacca  
[0218] 801 taaattttga gagtactggt aatctaattg caccagagta tggattcaaa  
[0219] 851 atatcgaaaa gaggtagttc agggatcatg aaaacagaag gaacacttga  
[0220] 901 gaactgtgag accaaatgcc aaactccttt gggagcaata aatacaacat  
[0221] 951 tgccttttca caatgtccac ccactgacaa taggtgagtg ccccaaatat  
[0222] 1001 gtaaaatcgg agaagttggt cttagcaaca ggactaagga atgttcccca  
[0223] 1051 gattgaatca agaggattgt ttggggcaat agctgggttt atagaaggag  
[0224] 1101 gatggcaagg aatggttgat ggttggtatg gataccatca cagcaatgac  
[0225] 1151 cagggatcag ggtatgcagc agacaaagaa tccactcaaa aggcatttga  
[0226] 1201 tggaatcacc aacaaggtaa attctgtgat tgaaaagatg aacacccaat  
[0227] 1251 ttgaagctgt tgggaaagaa ttcagtaact tagagagaag actgggagaac  
[0228] 1301 ttgaacaaaa agatggaaga cgggtttcta gatgtgtgga catacaatgc  
[0229] 1351 tgagcttcta gttctgatgg aaaatgagag gacacttgac tttcatgatt  
[0230] 1401 ctaatgtcaa gaatctgtat gataaagtca gaatgcagct gagagacaac  
[0231] 1451 gtcaaagaac taggaaatgg atgttttgaa ttttatcaca aatgtgatga  
[0232] 1501 tgaatgcatg aatagtgtga aaaacgggac gtatgattat cccaagtatg  
[0233] 1551 aagaagagtc taaactaaat agaaatgaaa tcaaaggggt aaaattgagc  
[0234] 1601 agcatggggg tttatcaaat ccttgccatt tatgctacag tagcaggttc  
[0235] 1651 tctgtcactg gcaatcatga tggtgggat ctctttctgg atgtgtcca  
[0236] 1701 acgggtctct gcagtgcagg atctgcatat gattataagt cattttataa  
[0237] 1751 ttaaaaacac cttgtttct act  
[0238] SEQ ID NO :2 ca A/Japan/57 H2 的氨基酸序列  
[0239] 分子全长 :562aa  
[0240] 1 maiiylillf tavrgdqici gyhannstek vtilernvt vthakdilek  
[0241] 51 thngklckln gipplelgdc siagwllgnp ecdrlsvpe wsyimekenp  
[0242] 101 rdglcypgsf ndyeelkhll ssvkhfekvk ilpkdrwtqh tttggsraca  
[0243] 151 vsgnpsffrn mvwltkkgsd ypvakgsynn tsgeqmliiw gvhhpnmete  
[0244] 201 qrtlyqnvgt yvsvgtstln krstpeiater pkvngqggrm efswtlldmw  
[0245] 251 dtinfestgn liapeygfki skrgssgimk tegtlencet kcqtplgain  
[0246] 301 ttlpfhnvhp ltigecpkv kseklvlatg lrnvpqiesr glfgaiagfi  
[0247] 351 eggwqgmvdg wygyhnsndq gsgyaadkes tqkafdgitn kvnsviekmn  
[0248] 401 tqfeavgkef snlerrlenl nkkmedgfld vwtynaellv lmenertldf  
[0249] 451 hdsnvknlyd kvrmqlrdnv kelngcfef yhkcddecn svkngtydyp

- [0250] 501 kyeesklnr neikgvklss mgvyqilaiy atvagslsia immagisfwm
- [0251] 551 csngslqcri ci
- [0252] SEQ ID NO :3 ca A/Japan/57 N2 的核苷酸序列
- [0253] 分子全长 :1466nt
- [0254] 1 agcaaaagca ggagtgaaaa tgaatccaaa tcaaaagata ataacaattg
- [0255] 51 gctctgtctc tctcaccatt gaaacagtat gcttcctcat gcagattgcc
- [0256] 101 atcctggcaa ctactgtgac attgcatttt aagcaacatg agtgcgactc
- [0257] 151 ccccgcgagc aaccaagtaa tgccatgtga accaataata atagaaagga
- [0258] 201 acataacaga gatagtgtat ttgaataaca ccaccataga gaaagagatt
- [0259] 251 tgccccgaag tagtggaata cagaaattgg tcaaagccgc aatgtcaa
- [0260] 301 tacaggattt gcaccttttt ctaaggacaa ttcaatccgg ctttctgctg
- [0261] 351 gtggggacat ttgggtgacg agagaacctt atgtgtcatg cgatcctggc
- [0262] 401 aagtgttate aatttgcact cgggcagggg accacactag acaacaaca
- [0263] 451 ttcaaatggc acaatacatg atagaatccc tcatcgaacc ctattaatga
- [0264] 501 atgagttggg tgttccattt catttaggaa ccaaacaagt gtgtgtagca
- [0265] 551 tgggtccagct caagttgtca cgatggaaaa gcatggttgc atgtttgtgt
- [0266] 601 cactggggat gatagaaatg caactgctag cttcatttat gacgggaggc
- [0267] 651 ttgtggacag tatttggttca tgggtctcaa atatcctcag gaccaggag
- [0268] 701 tcggaatgcg tttgtatcaa tgggacttgc acagtagtaa tgactgatgg
- [0269] 751 aagtgcata ggaagagccg atactagaat actattcatt aaagagggga
- [0270] 801 aaattgtcca tattagccca ttgtcaggaa gtgctcagca tatagaggag
- [0271] 851 tgttctgtt accctcgata tcttgacgtc agatgtatct gcagagacaa
- [0272] 901 ctggaaaggc tctaataaggc ccgttataga cataaatatg gaagattata
- [0273] 951 gcattgattc cagttatgtg tgctcagggc ttgttggcga cacaccagg
- [0274] 1001 aacgacgaca gctctagcaa tagcaattgc agggatccta acaatgagag
- [0275] 1051 agggaaatcca ggagtgaag gctgggcctt tgacaatgga gatgatgtat
- [0276] 1101 ggatgggaag aacaatcagc aaagattcac gctcaggtta tgaaacttgc
- [0277] 1151 aaagtcattg gtggttggtc cacacctaata tccaaatcgc aggtcaatag
- [0278] 1201 acaggtcata gttgacaaca ataattggtc tggttactct ggtattttct
- [0279] 1251 ctgttgaggg caaaagctgc atcaataggt gcttttatgt ggagttgata
- [0280] 1301 aggggaaggc cacaggagac tagagtatgg tggacctcaa acagtattgt
- [0281] 1351 tgtgttttgt ggcacttcag gtacttatgg aacaggctca tggcctgatg
- [0282] 1401 gggcgaacat caatttcatt cctatataag ctttcgcaat tttagaaaaa
- [0283] 1451 actccttggt tctact
- [0284] SEQ ID NO :4 ca A/Japan/57 N2 的氨基酸序列
- [0285] 分子全长 :471aa
- [0286] 1 mnpnqiiti gsvsltiety cflmqiaila ttvtlhfkh ecdspasnqv
- [0287] 51 mpcepiier niteivlynn ttiekeicpe vveyrnwskp qcqitgfapf
- [0288] 101 skdnsirlsa ggdiwvtrp yvscdpkcy qfalgggttl dnkhsngtih

[0289] 151 driphrtllm nelgvpfhlg tkqvcvawss sschdgkawl hvcvtgddrn  
[0290] 201 atasfiydgr lvdsigswsq nilrtqesec vcingtctvv mtdgsasgra  
[0291] 251 dtrilfikey kivhisplsg saqhieecsc ypripdvrci crdnwksnr  
[0292] 301 pvidinmedy sidssyvcsq lvgdtpnrdd sssnsncrdp nnergnpvgk  
[0293] 351 gwafdngddv wmgrtiskds rsgyefkvi ggwstpnsks qvnrqvivdn  
[0294] 401 nnwsgysgif svegkscinr cfyvelirgr pgetrvwwts nsivvfcgts  
[0295] 451 gtygtgswpd ganinfmpi  
[0296] ca A/swine/M0/2006  
[0297] SEQ ID NO :5 ca A/swine/M0/2006 H2 的核苷酸序列  
[0298] 分子全长 :1772nt  
[0299] 1 agcaaaagca ggggttatac catagacaac cgaacaaaga caatgaccat  
[0300] 51 cacttttctc atcctcctgt tcacagtagt gaaaggggac caaatatgca  
[0301] 101 tcggatacca tgccaacaat tccacagaaa aagttgacac aatcttggaa  
[0302] 151 cgaaacgtca ccgtgactca tgccaagaac attcttgaaa agacgcataa  
[0303] 201 tggaaagttg tgcagattga gtggaatccc tccattggaa ctgggggatt  
[0304] 251 gcagcattgc aggttggctc cttggaaatc cggaatgtga cgggctctta  
[0305] 301 agtgtacctg aatggctcta tatagtggaa aaggaaaacc cggatgaatgg  
[0306] 351 tctgtgctat ccaggcagtt tcaatgatta tgaggaattg aaacatcttc  
[0307] 401 tcaccagtgt gacacacttt gagaaagtta agattctgcc cagagatcaa  
[0308] 451 tggaccacgc acacaacaac tgggtggttct cgggcctgtg cagtatctgg  
[0309] 501 aaaccctgca ttcttttagga acatggtttg gcttacaag aaagggtaaa  
[0310] 551 actactcaat tgctaaaagg tcatacaaca acacaagtgg ggagcaaatg  
[0311] 601 ctggtaatat gggggataca tcacccaat gacgatgcgg aacagaggac  
[0312] 651 actgtaccag aatgtgggaa catatgtttc cgttggaaaca tcaacactaa  
[0313] 701 ataagaggtc aatccctgaa atagcaacaa ggcccaaagt caatggacag  
[0314] 751 ggaggaagaa tggaattctc ttggactcta ttggagacat gggatgtcat  
[0315] 801 aaattttgag agcactggta atttaattgc accagaatac ggattcaaaa  
[0316] 851 tatcaaagag aggaagctca ggaattatga agacagagaa aatacttgaa  
[0317] 901 aattgtgaaa ccaaatgtca gaccccttg ggggcaataa atacaacatt  
[0318] 951 gccctttcac aacattcacc cattgacaat aggtgagtgc cccaagtatg  
[0319] 1001 taaagtcaga tagactgatt ttggcgacag gagtaagaaa tgtccccag  
[0320] 1051 attgaatcaa ggggattgtt tggagcaata gctgggttta tagaaggcgg  
[0321] 1101 atggcaaggg atggttgatg gctggtatgg gtaccatcac agcaatgatc  
[0322] 1151 aaggatcagg atatgcagca gacaaagaat ccaactcaaaa ggcaattgat  
[0323] 1201 gggataacta acaagtaaa ttctgtgatt gaaaagatga aactcagtt  
[0324] 1251 tgaggctgtt gggaaagagt tcaacaacct agagagaagg ctggaaaact  
[0325] 1301 taaataaaaa gatggaagat ggatttattg atgtatggac atataatgcc  
[0326] 1351 gaactcctag ttctaattga aatgagagg acatttgatt tccatgatc  
[0327] 1401 taatgtgaag aatctgtacg ataaggtcag aatgcaattg agagacaatg

- [0328] 1451 ctaaggaaat agggaacgga tgctttgagt tttatcataa atgtgatgat  
[0329] 1501 gaatgcatga atagtgtcag gaatgggaca tatgattatc ccaaatatga  
[0330] 1551 ggaagagtcc aagctgaaca ggaacgaaat caaaggagtg aaattgagca  
[0331] 1601 atatgggggt ttatcaaata cttgctatat acgctacagt tgcaggctct  
[0332] 1651 ttgtcactgg caatcatgat agctgggatt tctttctgga tgtgttctaa  
[0333] 1701 tgggtctctg caatgcagaa tttgcatatg actgtaagtc aatttgtaat  
[0334] 1751 taaaaacacc cttgtttcta ct  
[0335] SEQ ID NO :6 ca A/swine/M0/2006 H2 的氨基酸序列  
[0336] 分子全长 :562aa  
[0337] 1 mtitflillf tvvkgdqici gyhannstek vtilernvt vthaknilek  
[0338] 51 thngklcrls gipplelgdc siagwllgnp ecdrlsvpe wsyivekenp  
[0339] 101 vnglcypgsf ndyeelkhll tsvthfekvk ilprdqwtqh tttggsraca  
[0340] 151 vsgnpsffrn mvwltkkgsn ysiakrsynn tsgeqmlviw gihhpnddae  
[0341] 201 qrtlyqnvgt yvsvgtstln krsipeiatr pkvngqggrm efswtlletw  
[0342] 251 dvinfestgn liapeygfki skrgssgimk tekilencet kcqtplgain  
[0343] 301 ttlpfhnihp ltigecpkv ksdrlilatg vrnpqiesr glfgaiagfi  
[0344] 351 eggwqgmvdg wygyhhsndq gsgyaadkes tqkaidgitn kvnsviekmn  
[0345] 401 tqfeavgkef nnlerrlenl nkkmedgfid vwtynaellv lmenertldf  
[0346] 451 hdsnvknlyd kvrmqlrdna keingncfef yhkcddecn svrngtydyp  
[0347] 501 kyeesklr neikgvklm mgvyqilaiy atvagsls la imiagisfwm  
[0348] 551 csngslqcri ci  
[0349] SEQ ID NO :7 ca A/swine/M0/2006 N3 的核苷酸序列  
[0350] 分子全长 :1453nt  
[0351] 1 agcaaaagca ggtgcgagat gaatccgaat cagaagataa taacaatcgg  
[0352] 51 ggtagtgaat accactctgt caacaatagc ccttctcatt ggagtgggaa  
[0353] 101 acttaatttt caacacagtc atacatgaga aaataggaga ccatcaaata  
[0354] 151 gtgacctatc caacaataac gaccctgca gtaccgaact gcagtgcacac  
[0355] 201 tataataaca tacaataaca ctgtgataaa caacataaca acaacaataa  
[0356] 251 taactgaaga agaaaggcct ttcaagtctc cactaccgct gtgccccctc  
[0357] 301 agaggattct tcccttttca caaggacaat gcaatacgac tgggtgaaaa  
[0358] 351 caaagacgtc atagtcacaa gagagcctta tgtagctgc gataatgaca  
[0359] 401 actgctggtc ctttgctctc acacaaggag cattgctagg gaccaaacat  
[0360] 451 agcaatggga ccattaaaga caggacacca tataggtctc taattcggtt  
[0361] 501 cccaatagga acagctccag tactaggaaa ttataaagag atatgcattg  
[0362] 551 cttggctgag cagcagttgc ttgacggga aagagtggat gcatgtgtgc  
[0363] 601 atgacaggga acgataatga tgcaagtgcc cagataatat atggaggagg  
[0364] 651 aatgacagac tccattaaat catggagaaa ggacatacta agaactcagg  
[0365] 701 agtctgaatg ccaatgcatt gacgggactt gtgttggtgc tgcacagat  
[0366] 751 ggccctgctg ctaatagtgc agattacagg gtttactgga tacgggaggg

[0367] 801 aaaaataata aagtatgaaa atgttcccaa aacaaagata caacacttag  
[0368] 851 aagaatgttc ctgctatgtg gacattgatg tttactgtat atgtagggac  
[0369] 901 aattggaagg gctctaacag accttgatg agaatcaaca acgagactat  
[0370] 951 actggaaaca gggatatgtat gtagtaaatt ccactcagac acccccaggc  
[0371] 1001 ccgctgaccc ttcaacaatg tcatgtgact cccaagcaa tgtcaatgga  
[0372] 1051 ggacccggag tgaaggggtt tggtttcaaa gctggcgatg atgtatgggt  
[0373] 1101 aggtagaaca gtgtcgacta gtggtagatc gggctttgaa attatcaaag  
[0374] 1151 ttacagaagg gtggatcaac tctcctaacc atgtcaaate aattacacaa  
[0375] 1201 acactagtgc caaacaatga ctggtcaggc tattccggta gcttcattgt  
[0376] 1251 caaagccaag gactgttttc agccctgttt ttatgttgag cttatacgag  
[0377] 1301 ggaggcccaa caagaatgat gacgtctctt ggacaagtaa tagtatagtt  
[0378] 1351 actttctgtg gactagacaa tgaacctgga tcgggaaatt ggccagatgg  
[0379] 1401 ttctaacatt gggtttatgc ccaagtaata gaaaaaagca ccttgtttct  
[0380] 1451 act  
[0381] SEQ ID NO :8 ca A/swine/M0/2006 N2 的氨基酸序列  
[0382] 分子全长 :469aa  
[0383] 1 mnpnqiiti gvnnttlsti alligvgnli fntvihekig dhqivtypti  
[0384] 51 ttpavpnscsd tiitynntvi nittttiite eerpfksplp lcpfrgffpf  
[0385] 101 hkdnairlge nkdvivtrep yvscdndncw sfaltqgall gtkhsngtik  
[0386] 151 drtpyrslir fpigtapvlg nykeiciaws ssscfdgkew mhvcmtgndn  
[0387] 201 dasagiiygg rmtsikswr kdilrtqese cqcidgtcvv avtdgpaans  
[0388] 251 adyrvywire gkiikyenvp ktkiqhleec scyvdivdyc icrdnwkgsn  
[0389] 301 rpwmrinnet iletgyvesk fhsdtpypad pstmscdsps nvnggpgvkg  
[0390] 351 fgfkagddvw lgrtvstsgs sgfeikvte gwinspnvhk sitqtlvpnn  
[0391] 401 dwsgysgsfi vkakdcfqc fyvelirgrp nknddvswts nsivtfcgld  
[0392] 451 nepgsgnwpd gsnigfmpk

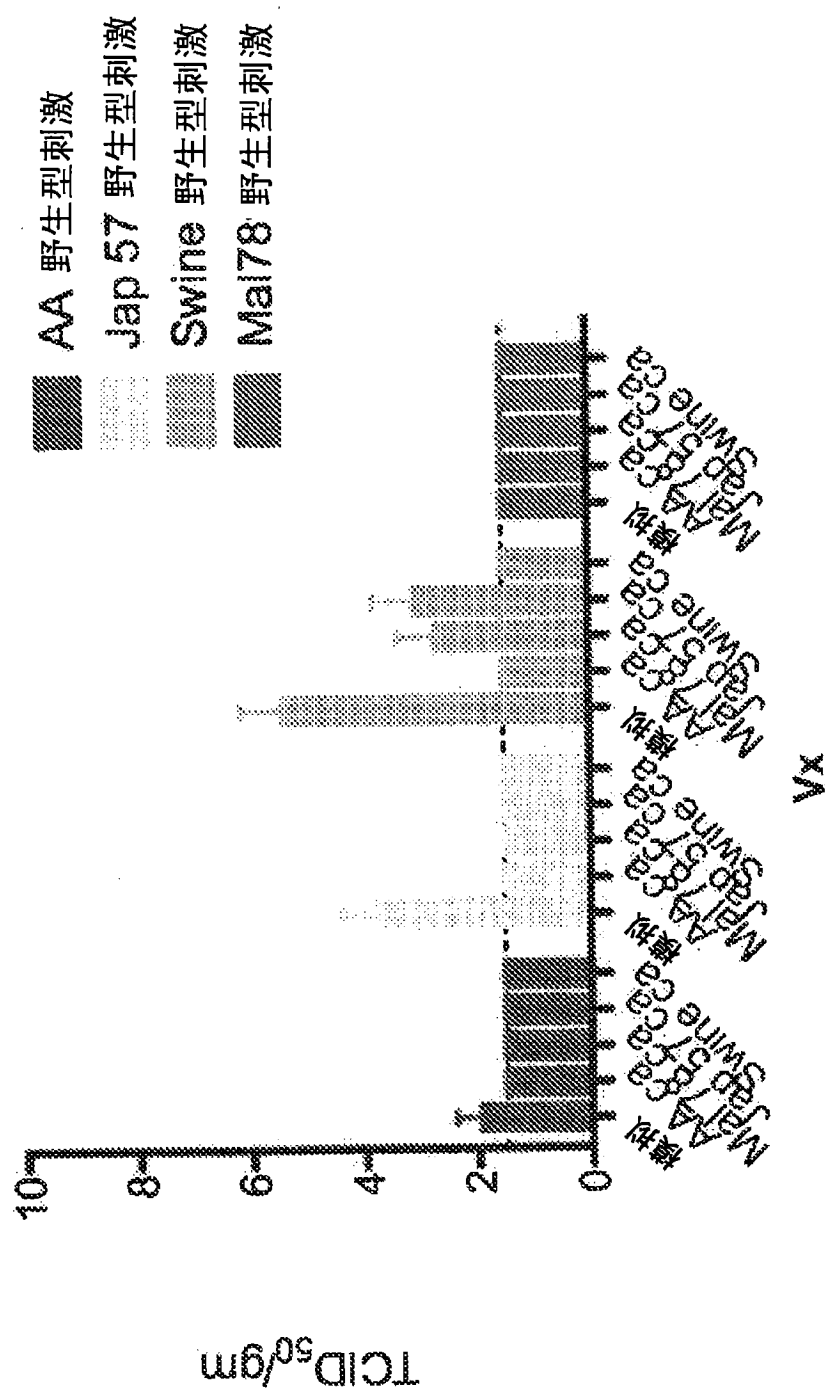


图 1

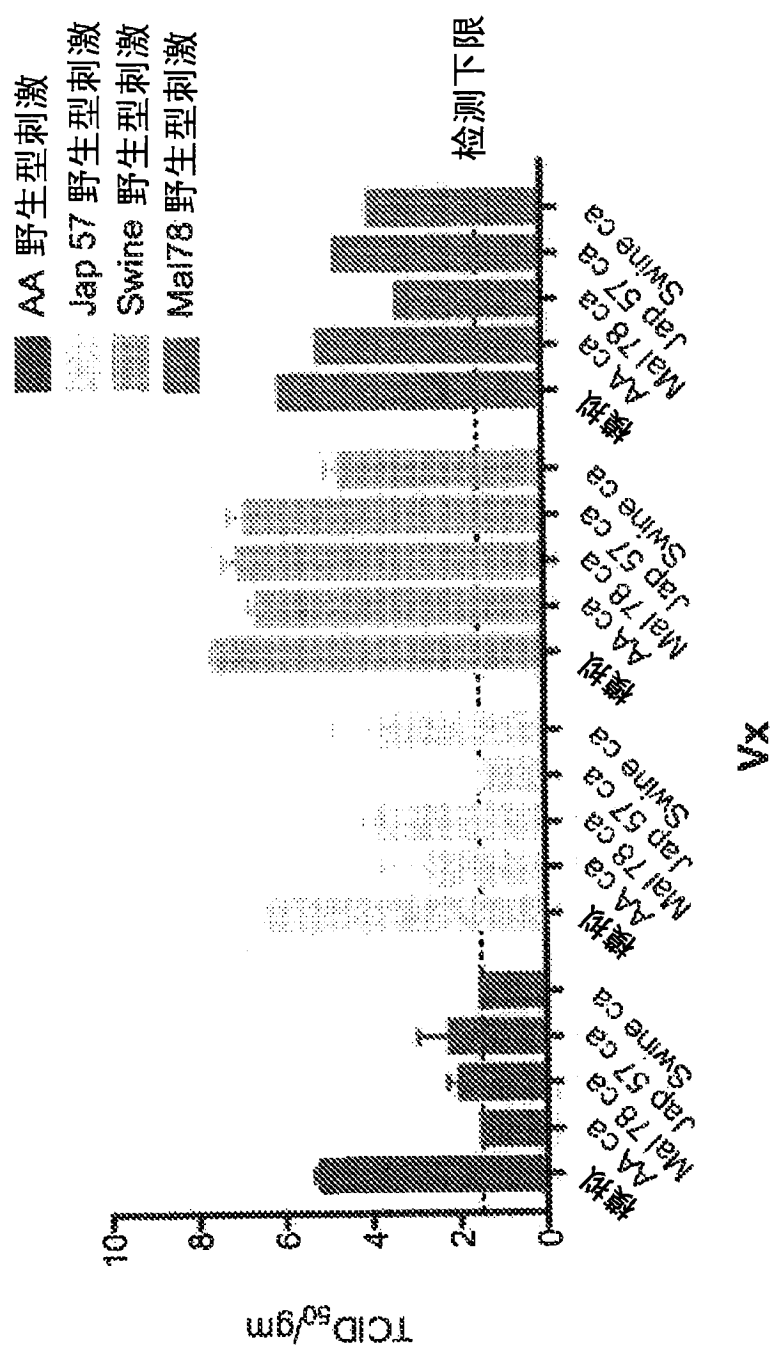


图 2



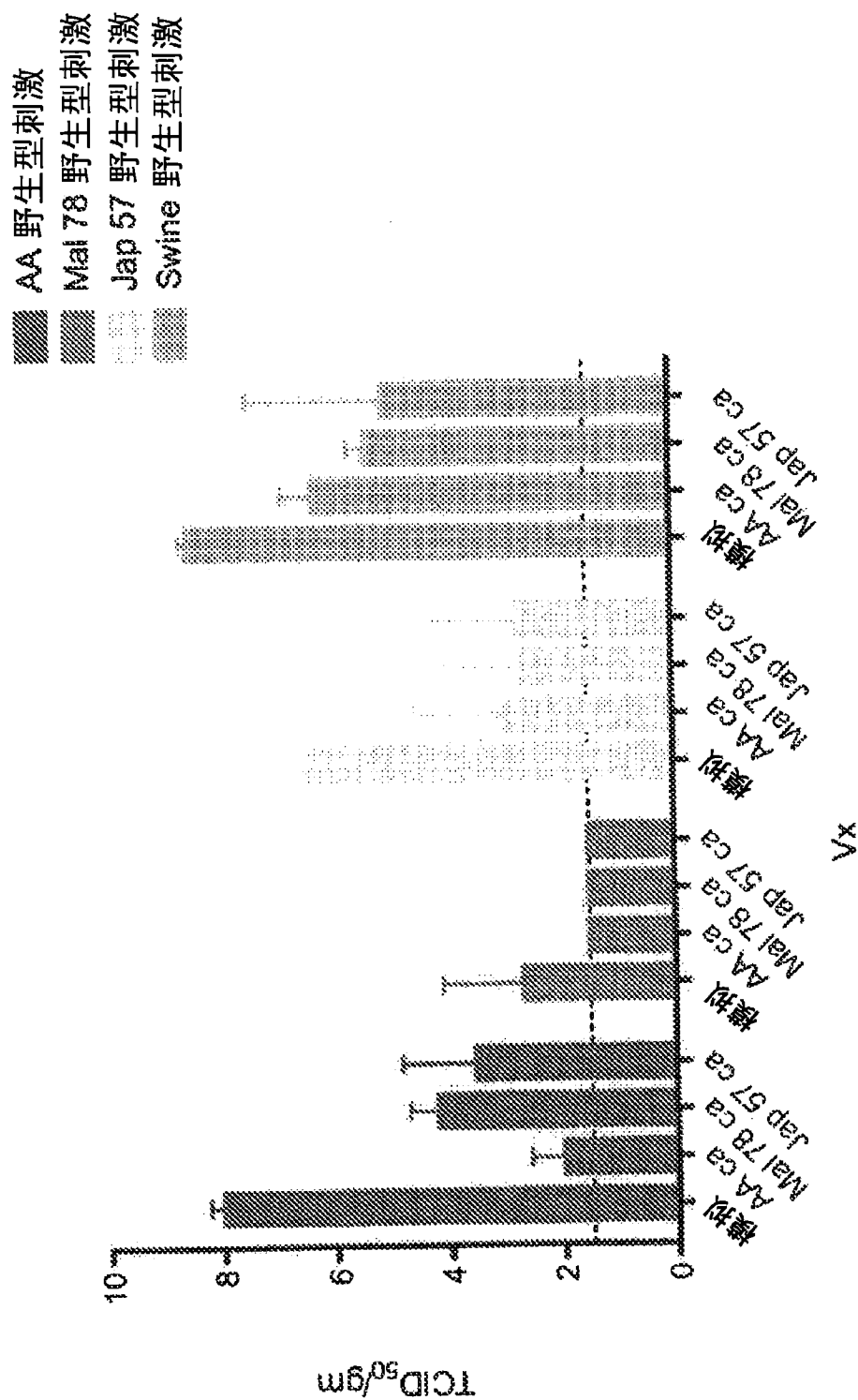


图 3

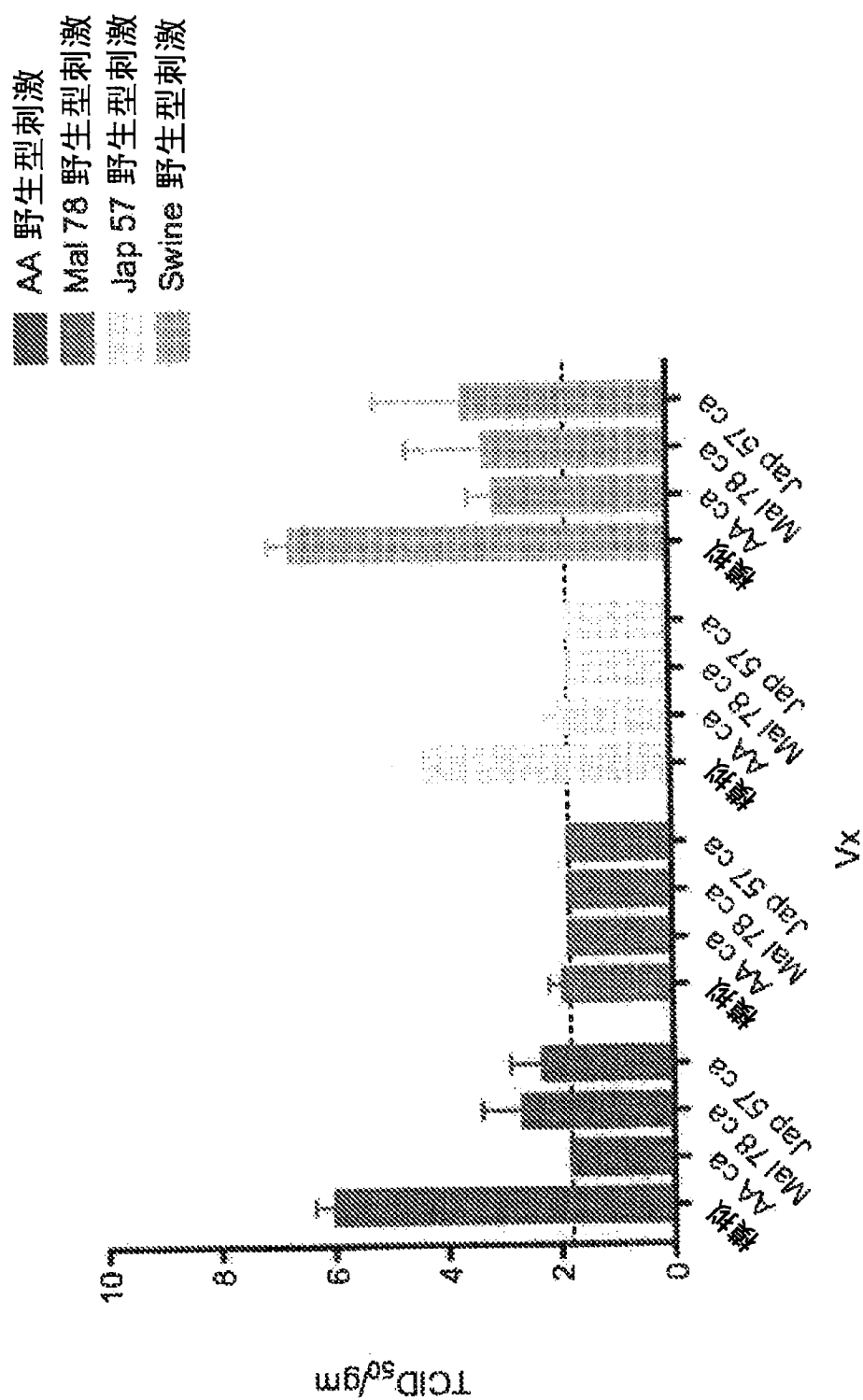


图 4