



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1809633 B

(45) 授权公告日 2011. 01. 19

(21) 申请号 200480017037. X

A61K 39/145(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 04. 20

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/464, 776 2003. 04. 23 US

60/465, 328 2003. 04. 24 US

WO 01/79273 , 2001. 10. 25, 全文 .

CN 1338307 A, 2002. 03. 06, 全文 .

刘红旗

刘秀梵

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005. 12. 19

张如宽 . A型流感病毒蛋白研究进展 . 动物医学进展 23 2. 2002, 23(2), 6-9.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/012050 2004. 04. 20

审查员 李振鹏

(87) PCT申请的公布数据

W02004/094466 EN 2004. 11. 04

(73) 专利权人 威斯康星旧生研究基金会

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 河冈义裕

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 王景朝

(51) Int. Cl.

C12N 7/04(2006. 01)

C07K 14/11(2006. 01)

C12N 15/44(2006. 01)

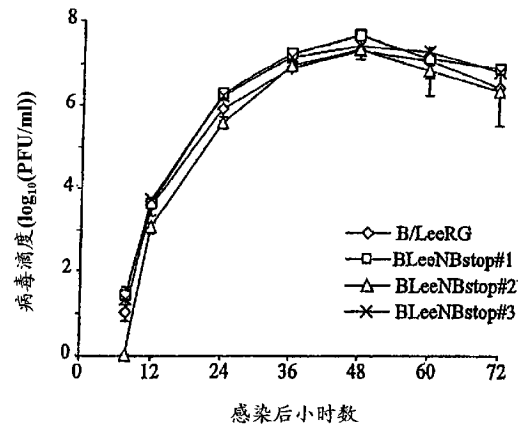
权利要求书 3 页 说明书 25 页 序列表 15 页
附图 26 页

(54) 发明名称

跨膜蛋白基因中含有突变的重组流感病毒

(57) 摘要

提供了带有突变膜蛋白基因的病毒的制备方法, 以及用该方法所获得的病毒。



1. 一种分离的重组乙型流感病毒,所述病毒包含不编码功能性 NB 蛋白或其功能性部分的突变 NB 蛋白基因,其中相对于编码功能性膜蛋白的相应 NB 蛋白基因来说,所述突变 NB 蛋白基因包含至少两个突变,其中突变 NB 膜蛋白基因的一个突变位于 NB 膜蛋白的起始甲硫氨酸,或位于 NB 膜蛋白的起始甲硫氨酸和 NA 的起始甲硫氨酸之间,以及其中所述至少两个突变不改变 NA 的编码区。

2. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 蛋白基因编码至少一个氨基酸取代。

3. 权利要求 2 的分离的重组病毒,其中至少一个突变编码位于起始甲硫氨酸密码子的取代。

4. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 基因中的一个突变是起始甲硫氨酸密码子变为终止密码子。

5. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 蛋白基因中的一个突变是所述 NB 蛋白编码区内的终止密码子。

6. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的缺失。

7. 权利要求 6 的分离的重组病毒,其中所述缺失改变了所述 NB 蛋白的读框。

8. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的插入。

9. 权利要求 8 的分离的重组病毒,其中所述插入改变了所述 NB 蛋白的读框。

10. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的缺失并且编码氨基酸取代。

11. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的插入并且编码氨基酸取代。

12. 权利要求 1 的分离的重组病毒,所述病毒还包含病原体的异源免疫原性蛋白或治疗性蛋白。

13. 权利要求 1 的分离的重组病毒,所述病毒还包含病原体的异源免疫原性蛋白基因或治疗性蛋白基因。

14. 权利要求 1 的分离的重组病毒,其中至少一个突变不改变所述病毒的体外复制,但与所述病毒的体内减毒有关。

15. 一种疫苗,所述疫苗包含权利要求 1 的分离的重组病毒。

16. 一种制备包含突变 NB 蛋白基因的重组乙型流感病毒的方法,所述突变 NB 蛋白基因不编码功能性 NB 蛋白或其功能性部分,所述方法包括:

(i) 使宿主细胞与多种流感载体接触,以便产生重组流感病毒,其中所述多种载体包括包含与流感病毒 PA cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 PB1cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 PB2cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 HA cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 NP cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 M cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病

毒 NS cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 NB 和 NA 的 DNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,其中相对于编码功能性 NB 蛋白的相应 NB 基因来说,所述 NB 和 NA 的 cDNA 序列包括至少两个在 NB 序列中的突变,其中突变 NB 膜蛋白基因的一个突变位于 NB 膜蛋白的起始甲硫氨酸,或位于 NB 膜蛋白的起始甲硫氨酸和 NA 的起始甲硫氨酸之间,以及其中所述至少两个突变不改变 NA 的编码区;包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 NA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 M 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,以及包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体;和

(ii) 分离所述病毒。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因编码至少一个氨基酸取代。

18. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因中的一个突变是起始甲硫氨酸密码子变为终止密码子。

19. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因中的一个突变是所述膜蛋白编码区内的终止密码子。

20. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的缺失。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述缺失改变了所述 NB 蛋白的读框。

22. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的插入。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述插入改变了所述 NB 蛋白的读框。

24. 权利要求 16 的方法,其中至少一个突变编码位于起始密码子甲硫氨酸的取代。

25. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的缺失并且编码至少一个氨基酸取代。

26. 权利要求 16 的方法,其中所述突变 NB 蛋白基因包含一个或多个核苷酸的插入并且编码氨基酸取代。

27. 权利要求 1-14 中任一项的重组病毒在制备用于免疫脊椎动物的药物中的用途。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述脊椎动物是鸟类。

29. 权利要求 27 的用途,其中所述脊椎动物是哺乳动物。

30. 一种包含多种流感载体的组合物,所述组合物包含:

包含与流感病毒 PA cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 PB1cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 PB2cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 HA cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 NP cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 NB 和 NA 的 cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,包含与流感病毒 M cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的

载体,以及包含与流感病毒 NS cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的用于生产 vRNA 的载体,其中相对于编码功能性膜蛋白的相应 NB 基因来说,所述 NB 和 NA 的 cDNA 序列包括至少两个在 NB 序列中的突变,其中突变 NB 膜蛋白基因的一个突变位于 NB 膜蛋白的起始甲硫氨酸,或位于 NB 膜蛋白的起始甲硫氨酸和 NA 的起始甲硫氨酸之间,以及其中所述至少两个突变不改变 NA 的编码区 ;和

包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 NA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒 M 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,包含与编码流感病毒突变 NB 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体,以及包含与编码流感病毒 NS2 的 DNA 区段操作性连接的启动子的用于生产 mRNA 的载体。

31. 权利要求 30 的组合物,所述组合物还包括含以反义方向与目标 DNA 片段操作性连接的启动子的载体。

32. 权利要求 31 的组合物,其中所述载体包含编码病原体免疫原性多肽或肽或者治疗性蛋白的 DNA 片段。

33. 通过权利要求 16 的方法制备的分离的病毒。

34. 一种与权利要求 1 或 33 的病毒接触过的宿主细胞。

跨膜蛋白基因中含有突变的重组流感病毒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2003 年 4 月 23 日申请的美国申请顺序号 60/464, 776 和 2003 年 4 月 24 日申请的美国申请顺序号 60/465, 328 的权益, 所述申请记载的内容通过引用结合到本文中。

[0003] 政府权利声明

[0004] 本发明是在美国政府资助下完成的 (美国国立卫生研究院 (the National Institutes of Health) 的资助号为 AI-47446)。美国政府在本发明中可以享有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 细胞膜由双层脂质分子组成, 其中镶嵌着各种蛋白。因其疏水的内部, 细胞膜的脂双层对大多数极性分子的通过起到屏障作用, 因而对细胞活力至关重要。为了促进水溶性小分子进出细胞或胞内区室的转运, 细胞膜具有载体蛋白和通道蛋白。对于包括肌细胞电兴奋性和神经系统电信号传导在内的许多细胞功能来说, 离子通道是必不可少的 (有关综述参见 Alberts 等, 1994)。它们不仅存在于所有动植物细胞和微生物细胞中, 而且在病毒中也已鉴定出它们的存在 (Ewart 等, 1996; Piller 等, 1996; Pinto 等, 1992; Schubert 等, 1996; Sugrue 等, 1990; Sunstrom 等, 1996), 据此认为它们在病毒生命周期中起到重要作用。

[0007] 甲型流感病毒是有包膜的负链病毒, 并且具有 8 个 RNA 区段, 其上包裹着核蛋白 (NP) (有关综述参见 Lamb 和 Krug, 1996)。有 3 种蛋白跨越病毒膜: 血凝素 (HA)、神经氨酸酶 (NA) 和 M2。HA 和 NA 的胞外结构域 (胞外域) 极易变异, 而 M2 的胞外域在甲型流感病毒中基本上不变异。病毒的生命周期通常包括与细胞表面受体的结合, 进入细胞和病毒核酸脱壳, 随后病毒基因在细胞内复制。当合成病毒蛋白和基因新拷贝后, 这些组分装配成子代病毒颗粒, 随后从细胞中释放 (有关综述参见 Roizman 和 Palese, 1996)。不同的病毒蛋白在这些步骤的各步起作用。在甲型流感病毒中, 认为具有离子通道活性的 M2 蛋白 (Pinto 等, 1992) 在病毒生命周期的早期即穿入宿主细胞和病毒 RNA 脱壳之间起作用 (Martin 和 Helenius, 1991; 有关综述参见 Helenius, 1992; Sugrue 等, 1990)。据信, 一旦病毒体经过胞吞作用, 病毒体相关 M2 离子通道 (一种同型四聚体螺旋束) 就允许质子从胞内体流到病毒体内部, 以破坏酸不稳定 M1 蛋白-核糖核蛋白复合物 (RNP) 的相互作用, 从而促进 RNP 释放到细胞质中 (有关综述参见 Helenius, 1992)。另外, 在 HA 在细胞内被切割的某些流感病毒株 (例如 A/fowl plagues/Rostock/34) 中, 其 M2 离子通道被认为会升高跨高尔基体网络的 pH, 从而避免了在此区室由于低 pH 条件引起的 HA 构象变化 (Hay 等, 1985; Ohuchi 等, 1994; Takeuchi 和 Lamb, 1994)。

[0008] 通过有爪蟾 (Xenopus laevis) 卵母细胞表达 M2 蛋白并测量膜电流, 证实了该蛋白具有离子通道活性 (Pinto 等, 1992; Wang 等, 1993; Holsinger 等, 1994)。M2 蛋白跨膜 (TM) 结构域的特定变化改变了通道的动力学特性和离子选择性, 为 M2TM 结构域构成离子通道孔提供了强有力的证据 (Holsinger 等, 1994)。事实上, M2TM 结构域自身就可以起到

离子通道的作用 (Duff 和 Ashley, 1992)。人们认为, M2 蛋白离子通道活性在流感病毒生命周期中是必不可少的, 因为阻断 M2 离子通道活性的盐酸金刚烷胺 (Hay 等, 1993), 能抑制病毒复制 (Kato 和 Eggers, 1969 ; Skehel 等, 1978)。

[0009] 乙型流感病毒是正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) 的成员, 其基因组由 8 个负链 RNA 区段组成, 并且编码 11 种蛋白。在甲型流感病毒中也发现了其中的 9 种 : 3 种 RNA 依赖性 RNA 聚合酶亚基 (PB1、PB2 和 PA)、血凝素 (HA)、核蛋白 (NP)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M1) 和 2 种非结构蛋白 (NS1 和 NS2)。NB 和 BM2 两种蛋白是乙型流感病毒所特有的。RNA 区段 6 编码 NB, 也编码 NA, 而区段 7 编码 BM2。

[0010] 乙型流感病毒 NB 蛋白是 III 型膜内在蛋白, 其在病毒感染的细胞表面上大量表达 (Betakova 等, 1996 ; Shaw 等, 1983 ; Shaw 等, 1984), 并且掺入到病毒体中 (Betakova 等, 1996 ; Brassard 等, 1996)。这种小蛋白 (100 个氨基酸) 具有 18 个残基的 N- 端胞外域, 22 个残基的跨膜结构域和 60 个残基的胞质尾 (Betakova 等, 1996 ; Williams 等, 1986)。根据以前测量膜电流的研究并根据甲型流感病毒 M2 蛋白进行类推 (Fisher 等, 2000 ; Fisher 等, 2001 ; Sunstrom 等, 1996), 认为 NB 的功能是作为离子通道蛋白。然而, 基于脂双层系统的 NB 蛋白电生理学测定是难以中断的。换句话说, 含有疏水结构域的蛋白和肽 (据信在细胞中缺乏离子通道活性) 在脂双层中能产生通道记录 (Lear 等, 1988 ; Tosteson 等, 1988 ; Tosteson 等, 1989)。此外, 在 Fischer 等 (2001) 和 Sunstrom 等 (1996) 的研究中, 金刚烷胺被用来证明 NB 蛋白通道活性的缺乏, 尽管该药物并不能抑制乙型流感病毒复制。因此, 现有的证据挑战了 NB 蛋白具有离子通道活性的说法。

[0011] 针对病毒感染的免疫力取决于响应感染细胞表面或病毒体上存在的抗原的免疫应答的产生。如果知道了这些表面病毒抗原, 就可以成功地生产出疫苗。尽管在表面有多种抗原, 但其中只有某些抗原才产生中和免疫性。生产疫苗的方法之一是使病毒“减毒”。通常的做法是将感染性病毒传代到外源宿主并鉴定超强毒株。通常, 这些在外源宿主中的超强毒株在原始宿主细胞中毒性要弱些, 因而是良好的候选疫苗, 因为它们产生以体液 IgG 和局部 IgA 形式的良好免疫应答。

[0012] 通常从培养至高滴度的活病毒、减毒病毒或灭活病毒来制备流感疫苗。活病毒疫苗能激活免疫系统的所有时相并刺激针对每种保护性抗原的免疫应答, 这避免了制备灭活疫苗时要选择性地破坏保护性抗原的困难。另外, 由活病毒疫苗产生的免疫性通常比灭活疫苗更持久、更有效、更具有交叉反应性。此外, 活病毒疫苗的生产成本比灭活病毒疫苗更低廉。然而, 减毒病毒中的突变通常并不清楚, 并且这些突变看来是在病毒抗原基因中。

[0013] 因此, 所需要的是制备供疫苗用的重组减毒流感病毒的方法, 所述病毒例如是具有确定突变的减毒病毒。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供一种分离和 / 或纯化的重组流感病毒, 所述病毒包含突变膜蛋白基因, 例如突变膜内在蛋白基因, 例如突变 III 型膜内在蛋白基因, 所述基因不编码功能性膜蛋白或其功能性部分。本发明也提供一种分离和 / 或纯化的重组流感病毒, 所述病毒缺乏膜蛋白基因。重组流感病毒中缺乏功能性膜蛋白 (例如膜内在蛋白), 提供了在体外能复制但在体内被减毒的重组流感病毒。在一个实施方案中, 所述重组病毒包含突变膜蛋白基因, 所述基因包含一个或多个突变, 当所述基因在细胞中转录和 / 或翻译时, 不能产生功能

性膜蛋白或其功能性部分。在另一个实施方案中,相对于编码功能性膜蛋白的相应膜蛋白基因来说,所述突变膜蛋白基因包含至少两个突变,其中至少一个突变不在对应于所述蛋白跨膜结构域的区域。例如,所述突变膜蛋白基因,当在细胞中转录和 / 或翻译时,不产生功能性基因产物,而产生水平降低(例如小于约 50%、10%、1%或无法检测)的野生型膜蛋白,和 / 或产生这样的突变膜蛋白:其活性小于约 50%、优选小于约 10%、更优选小于约 1%的相应野生型(功能性)膜蛋白的活性,例如是由于其 C-端缺乏野生型序列,即为截短的膜蛋白。在本发明的一个实施方案中,相对于相应野生型膜蛋白来说,所述突变膜蛋白基因编码至少一个氨基酸取代。在一个实施方案中,所述取代在起始甲硫氨酸的约 1-50 个残基上或内部,或者其间的任意整数,例如在 1-20 个残基上或内部,或者在 1-3 个残基上或内部。在一个优选的实施方案中,至少一个取代就位于起始甲硫氨酸。在另一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因具有一个或多个终止密码子,所述终止密码子在起始密码子的约 1-50 个密码子上或内部,或者其间的任意整数,例如在 1-20 个密码子上或内部。在又一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因包含一个或多个核苷酸的一个或多个缺失。在一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因包含一个或多个核苷酸的一个或多个缺失,所述缺失在所述基因编码区第一个密码子的约 150 个核苷酸上或内部,例如在 1、2、3、..... 150 个核苷酸上或内部,或者其间的任意整数。在一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因包含一个或多个核苷酸的一个或多个插入。在一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因包含一个或多个核苷酸的一个或多个插入,所述插入在所述基因编码区第一个密码子的约 150 个核苷酸上或内部,例如在 1、2、3、..... 150 个核苷酸上或内部,或者其间的任意整数。所述插入和 / 或缺失优选改变膜蛋白基因的读框。在又一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因包含 2 个或更多个突变,例如包括以下突变在内的 2 个或更多个突变:在起始密码子中产生不是甲硫氨酸的氨基酸密码子的核苷酸取代,导致起始密码子变为终止密码子的核苷酸取代,导致在编码序列中产生终止密码子的核苷酸取代,编码序列中的一个或多个核苷酸缺失,编码序列中的一个或多个核苷酸插入,或它们的任何组合。在一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因在载体上并且操作性连接包括但不限于以下的启动子:RNA 聚合酶 I 启动子(例如人 RNA 聚合酶 I 启动子)、RNA 聚合酶 II 启动子、RNA 聚合酶 III 启动子、T7 启动子和 T3 启动子。在另一个实施方案中,所述突变膜蛋白基因在载体上并且操作性连接包括但不限于以下的转录终止序列:RNA 聚合酶 I 转录终止序列、RNA 聚合酶 II 转录终止序列或 RNA 聚合酶 III 转录终止序列或核酶。

[0016] 如本文所述,已通过反求遗传学产生乙型流感敲除病毒,对其生长特征和其它特性都做了体外试验和体内试验。在细胞培养物中,不表达 NB 的突变体与野生型病毒的复制一样有效,而在小鼠中它们与野生型病毒相比显示出受限制的生长。因此,NB 蛋白对于细胞培养的乙型流感病毒来说并非必不可少,但是在小鼠中能促进有效生长。假定 NB 敲除病毒在体内、而不是在体外减慢生长,那么这些突变病毒就可用于流感活疫苗的开发。

[0017] 因比,本发明还提供包含本发明重组病毒的疫苗或免疫原性组合物,以及使用所述疫苗或免疫原性组合物来免疫脊椎动物或者诱导脊椎动物的免疫应答的方法。在一个实施方案中,本发明的重组病毒包含来自甲型流感病毒的基因。在另一个实施方案中,本发明的重组病毒包含来自乙型流感病毒的基因。在又一个实施方案中,本发明的重组病毒包含来自丙型流感病毒的基因。在再一个实施方案中,本发明的重组病毒包含一

个或多个来自甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒或其任何组合的基因。例如，所述重组病毒可包含来自以下的 NB 基因的突变 NB 基因：B/Lee/40、B/Shiga/T30/98、B/Mie/1/93、B/Chiba/447/98、B/Victoria/2/87、B/Yamanashi/166/98、B/Nagoya/20/99、B/Kouchi/193/99、B/Saga/S172/99、B/Kanagawa、B/Lusaka/432/99、B/Lusaka/270/99、B/Quebec/74204/99、B/Quebec/453/98、B/Quebec/51/98、B/Quebec/465/98 和 B/Quebec/511/98（检索号 AB036873、AB03672、AB036871、AB036870、AB036869、AB036868、AB036867、AB036866、D14855、D14543、D14542、AB059251、AB059243、NC002209、AJ419127、AJ419126、AJ419125、AJ419124 和 AJ419123，其公开内容都通过引用结合到本文中。在一个实施方案中，NB 基因中的突变不会改变 NA 基因的序列。在另一个实施方案中，NB 基因中的突变也会改变 NA 基因的序列，但产生的 NA 具有与相应非突变型 NA 基因所编码的 NA 基本相同的活性。本文所用的“基本相同的活性”包括约为相应的全长多肽活性的 0.1%、1%、10%、30%、50%、例如直到 100% 或更高的活性。

[0018] 也提供了制备包含突变膜蛋白基因的重组流感病毒的方法，相对于相应野生型膜蛋白来说，所述膜蛋白基因不编码功能性膜蛋白或其功能性部分。该方法包括使宿主细胞与包含多种流感载体的组合物接触，所述载体包括含有突变膜蛋白基因的载体，所以产生重组病毒。例如，对于乙型流感来说，所述组合物包含：a) 至少两种选自以下的载体：包含与流感病毒 PA cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，包含与流感病毒 PB1 cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，包含与流感病毒 PB2 cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，包含与流感病毒 HA cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，包含与流感病毒 NP cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，包含与流感病毒 NA 和 NB 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，包含与流感病毒 M cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，以及包含与流感病毒 NS cDNA 操作性连接的启动子及转录终止序列的载体，其中相对于编码功能性 NB 膜蛋白的相应 NB 基因来说，NB 的 cDNA 序列包括至少两个突变，其中的一个突变不在跨膜结构域内，而存在于所述突变基因中，当突变基因在宿主细胞中转录和翻译时，不能产生功能性膜蛋白或其功能性部分，而任选产生功能性 NA 蛋白；和 b) 至少两种选自以下的载体：包含与编码流感病毒 PA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 PB1 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 PB2 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 NP 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 HA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 NA 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 M1 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，包含与编码流感病毒 BM2 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体，以及包含与编码流感病毒 NS 的 DNA 区段操作性连接的启动子的载体。

[0019] 本发明还提供包含多种载体（例如上述载体）的组合物和与所述组合物或本发明分离的重组病毒接触的宿主细胞，例如以便得到感染性病毒。或者，可以使所述宿主细胞与每种载体或者与载体亚群序贯接触。

[0020] 还提供分离和 / 或纯化的核酸分子（多核苷酸）或核酸分子的互补序列，所述核酸分子编码至少一种流感病毒 B/Lee/40 蛋白或其部分。在一个实施方案中，所述分离和 / 或纯化的核酸分子编码 HA、NA、PB1、PB2、PA、NP、M 或 NS，或其部分，它们具有与 SEQ ID NO：

1-8 之一的相应多肽基本相同的活性。本文所用的“基本相同的活性”包括为相应的全长多肽活性的约 0.1%、1%、10%、30%、50%、例如直到 100% 或更高的活性。在一个实施方案中,所述分离和 / 或纯化的核酸分子编码的多肽与 SEQ ID NO :1-8 之一有至少 80%、例如 90%、92%、95%、97% 或 99% 的毗连氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,所述分离和 / 或纯化的核酸分子包括与 SEQ ID NO :1-8 之一有至少 50%、例如 60%、70%、80% 或 90% 或更高的毗连核酸序列同源性的核苷酸序列或其互补序列,并且如果与 SEQ ID NO :1-8 之一的编码序列同源的话,那么编码与 SEQ ID NO :1-8 之一有至少 80%、例如 90%、92%、95%、97% 或 99% 的毗连氨基酸序列同一性的多肽。在另一个实施方案中,在低严格性、中等严格性和严格性条件下,使编码至少一种流感病毒 B/Lee/40 蛋白或其部分的分离和 / 或纯化的核酸分子或所述核酸分子的互补序列,与 SEQ ID NO :1-8 之一或其互补序列杂交。例如,可以采用以下条件:在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中,于 50°C 杂交,用 2X SSC、0.1% SDS 于 50°C 洗涤;更好是在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中,于 50°C 杂交,用 1X SSC、0.1% SDS 于 50°C 洗涤;还更好是在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中,于 50°C 杂交,用 0.5X SSC、0.1% SDS 于 50°C 洗涤;优选在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中,于 50°C 杂交,用 0.1X SSC、0.1% SDS 于 50°C 洗涤;更优选在 7% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、0.5M NaPO₄、1mM EDTA 中,于 50°C 杂交,用 0.1X SSC、0.1% SDS 于 65°C 洗涤。

[0021] 本发明的核酸分子可用于表达流感蛋白,以制备嵌合基因(例如含有其它病毒基因,包括其它流感病毒基因)和 / 或制备重组病毒。因此,本发明也提供分离的多肽、重组病毒和与包含流感病毒 B/Lee/40 序列的核酸分子或重组病毒接触的宿主细胞。所述多肽、重组病毒和宿主细胞可用于药物治疗(例如诱导保护性免疫应答)或用于基因治疗。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1. 已建立的反求遗传学系统的示意图。在 RNP 转染方法 (A) 中,纯化的 NP 和聚合酶蛋白与体外合成的 vRNA 一起装配成 RNP。细胞用 RNP 转染,随后通过辅助病毒感染。在 RNA 聚合酶 I 方法 (B) 中,使含有 RNA 聚合酶 I 启动子、有待拯救的编码 vRNA 的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子的质粒转染细胞。通过 RNA 聚合酶 I 进行胞内转录,得到合成的 vRNA,其在辅助病毒感染后包装到子代病毒颗粒中。采用这两种方法,转染病毒(即含有来自克隆 cDNA 的 RNA 的病毒)选自辅助病毒群体。

[0024] 图 2. 产生 RNA 聚合酶 I 构建体的示意图。通过 PCR 扩增来自流感病毒的 cDNA,用 BsmBI 消化,克隆到 pHH21 载体的 BsmBI 位点上(E. Hoffmann, 博士论文, Justus, Liebig-University, Giessen, 德国),该载体含有人 RNA 聚合酶 I 启动子 (P) 和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子 (T)。终止序列上游的胸腺嘧啶核苷酸 (*T) 代表流感病毒 RNA 的 3' 端。甲型流感病毒序列用粗体字母表示。(SEQ ID NO :10-19 和 28-29)。

[0025] 图 3. 产生分节段负义 RNA 病毒的反求遗传学方法。将含有 RNA 聚合酶 I 启动子、8 种病毒 RNA 区段的 cDNA 和 RNA 聚合酶 I 终止子的质粒与蛋白表达质粒一起转染到细胞中。尽管可以用表达 PA、PB1、PB2 和 NP 的质粒产生感染性病毒,但是所有其余的结构蛋白(用圆框表示)的表达提高了病毒产生的效率,这取决于所产生的病毒。

[0026] 图 4. 将突变导入 NA 区段的示意图。突变以黑体表示(-, 缺失;*, 插入)。数字表示核苷酸位置。(SEQ ID NO :20-27)。

[0027] 图 5. NB 蛋白表达的分析。(A) 通过免疫荧光测定,检测感染 MDCK 细胞中的 NB 蛋白。分别为 B/LeeRG, B/LeeRG⁻ 感染的细胞 ;WSN, A/WSN/33⁻ 感染的细胞 ;对照,未感染细胞 ;#1, #2 和 #3, BLeeNBstop#1, BLeeNBstop#2 和 BLeeNBstop#3⁻ 感染的细胞。(B) 通过免疫沉淀测定,检测病毒感染的 MDCK 细胞中的 NB 蛋白。放射性标记的 NB 蛋白用兔抗 NB 肽血清进行免疫沉淀,然后在 4-20% 的梯度聚丙烯酰胺凝胶上进行分析。#1, BLeeNBstop#1⁻ 感染的细胞裂解物 ;#2, BLeeNBstop#2⁻ 感染的细胞裂解物 ;#3, BLeeNBstop#3⁻ 感染的细胞裂解物 ;C, 未感染细胞裂解物。标明了分子量标记 (kDa)。

[0028] 图 6. B/LeeRG 和突变病毒的生长曲线。MDCK 细胞用病毒 (0.001PFU) 感染,于 37°C 孵育。感染后在指定时间里,测定上清液中的病毒滴度。数值是 3 次测定的平均值 (±SD)。

[0029] 图 7. 流感病毒 B/Lee/40 序列 (SEQ ID NO :1-8)。

[0030] 发明详述

[0031] 定义

[0032] 本文所用的术语“分离和 / 或纯化”是指本发明的载体、质粒或病毒的体外制备、分离和 / 或纯化,使得不再结合体内物质,或者说基本上从体外物质中纯化出来。本发明的分离的病毒制备物通常是通过体外培养和扩增而得到的,并且基本上不含其它感染因子。本文所用的“基本上不含”是指对特定感染因子来说,低于用标准检测方法对其进行检测的检出水平。“重组”病毒是已经经过体外操作 (例如使用重组 DNA 技术) 而改变其病毒基因组的病毒。

[0033] 本文所用的术语“重组核酸”或“重组 DNA 序列或区段”是指这样的核酸例如 DNA : 其衍生或分离自同一来源,随后可在体外因化学修饰而改变,致使其序列不是天然存在的,或者对应于天然存在的序列但其定位与在天然基因组中的定位不同。

[0034] “衍生”自同一来源的 DNA 的一个实例可以是已鉴定为有用片段并随后以基本纯的形式化学合成的 DNA 序列。“分离”自同一来源的 DNA 的一个实例可以用化学方法 (例如用限制性内切核酸酶) 从其来源切下或取出的有用的 DNA 序列,致使其可通过基因工程方法进行进一步操作如扩增,供本发明使用。

[0035] “低”严格性条件包括在 30-35% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS (十二烷基硫酸钠) 的缓冲液中于 37°C 杂交,然后在 1X-2X SSC (20X SSC = 3.0M NaCl/0.3M 柠檬酸三钠) 中于 50-55°C 洗涤。

[0036] “中等”严格性条件包括在 40-45% 甲酰胺、1.0M NaCl、1% SDS 中于 37°C 杂交,然后在 0.5X-1X SSC 中于 55-60°C 洗涤。

[0037] 对于 DNA 印迹或 RNA 印迹的滤膜上有超过 100 个互补残基的互补核酸杂交,“严格性”条件为 :在 50% 甲酰胺,例如 50% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS 中于 37°C 杂交,然后在 0.1X SSC 中于 60-65°C 洗涤。

[0038] 用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。因此,可以运用数学算法求出任何两个序列间的同一性百分率。这些数学算法的优选非限制性实例是 Myers 和 Miller (1988) 的算法、Smith 等 (1981) 的局部同源性算法、Needleman 和 Wunsch (1970) 的同源性比对算法、Pearson 和 Lipman (1988) 的相似性搜索方法、Karlin 和 Altschul (1990) 的算法,后来 Karlin 和 Altschul (1993) 又作了修改。

[0039] 可以在计算机上实施这些数学算法以进行序列比较,求出序列同一性。这些实

施包括但不限于:PC/Gene 程序中的 CLUSTAL(可得自 Intelligenetics, Mountain View, California);ALIGN 程序(第 2.0 版)和 Wisconsin Genetics 软件包(第 8 版)(可得自 Genetics ComputerGroup(GCG),575Science Drive, Madison, Wisconsin, USA) 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA。可以用缺省参数运行这些程序,进行比对。Higgins 等,1988;Higgins 等,1989;Corpet 等,1988;Huang 等,1992;和 Pearson 等,1994 已经详细介绍了 CLUSTAL 程序。ALIGN 程序是根据 Myers 和 Miller(出处同上)的算法。Altschul 等(1990)的 BLAST 程序是根据 Karlin 和 Altschul(出处同上)的算法。

[0040] 公众可通过国立生物工程信息中心(National Center forBiotechnology Information,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),获取进行 BLAST 分析的软件。该算法包括首先通过鉴定在查询序列中与数据库序列中相同长度的字串比对时或者匹配或者满足某些正数值最低分值 T 的长度 W 的短字串,来鉴定高分序列配对(HSP)。T 被称为邻近字串最低分值(Altschul 等,1990)。这些原始邻近字串命中作为起始搜索以发现含有它们的更长 HSP 的种子。只要累积序列比对分值可以增加,字串命中则以两个方向沿每个序列延伸。对于核苷酸序列,使用参数 M(一对匹配残基的奖分(reward score);总是 > 0)和 N(错配残基的罚分(penalty score);总是 < 0),计算累积分值。对于氨基酸序列,使用打分矩阵来计算累积分值。字串命中在每个方向的延伸当遇到下述情况之一时终止:累积序列比对分值比其获得的最大值低数量 X;累积分值为零或零以下,这是由于一个或多个负打分残基比对的累积所致;或者到达任一序列的末端。

[0041] 除了计算序列同一性百分率外,BLAST 算法也可进行两个序列间相似性的统计学分析(参见例如 Karlin&Altschul(1993))。BLAST 算法提供的一种相似性测定是最小和概率(P(N)),它提供两个核苷酸序列或两个氨基酸序列可能偶然发生匹配的概率的指标。例如,如果待测核酸与参比核酸比较中的最小和概率低于大约 0.1,更优选低于大约 0.01,最优选低于大约 0.001,则认为待测核酸与参比序列相似。

[0042] 为了得到空位比对供比较用,可以使用 Altschul 等(1997)介绍的 Gapped BLAST(在 BLAST 2.0 中)。或者,可以使用 PSI-BLAST(在 BLAST 2.0 中)来进行反复搜索,以检查分子间距离关系。参见 Altschul 等(出处同上)。当使用 BLAST、Gapped BLAST、PSI-BLAST 时,可以使用各自程序(例如用于核苷酸序列的 BLASTN,用于蛋白的 BLASTX)的缺省参数。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)中使用的缺省字长(W)为 11,期望值(E)为 10,阈值为 100,M = 5,N = -4,进行两条链之间的比较。对于氨基酸序列,BLASTP 程序中使用的缺省字长(W)为 3,期望值(E)为 10,BLOSUM62 打分矩阵(参见 Henikoff&Henikoff,1989)。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。也可通过人工序列比对和目测检查。

[0043] 关于序列比较,通常将一个序列作为参比序列,将待测序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将待测序列和参比序列输入计算机,必要时指定亚序列坐标,并且指定序列算法程序参数。根据所指定的程序参数,序列比较算法则计算出待测序列相对于参比序列的序列同一性百分比。

[0044] 正粘病毒

[0045] 流感病毒

[0046] 甲型流感病毒具有 8 条单链负义病毒 RNA(vRNA)的基因组,总共编码 10 种蛋白。流感病毒生命周期起始于 HA 与宿主细胞表面含唾液酸受体的结合,其后是受体介导的胞

吞作用。后期胞内体的低 pH 触发 HA 变构,因而暴露出 HA2 亚基的 N 端(所谓融合肽)。融合肽促使病毒和胞内体膜融合,然后基质蛋白(M1)和 RNP 复合体释放到细胞质内。RNP 由核蛋白(NP)组成,其中包裹着 vRNA 和病毒聚合酶复合体,该聚合酶复合体是由 PA、PB1 和 PB2 蛋白所形成的。RNP 转运到细胞核中,在此进行翻译和复制。RNA 聚合酶复合体催化 3 个不同的反应:以 cDNA 为模板合成具有 5' 帽子和 3' 多聚腺苷酸结构的 mRNA,用该 mRNA 为模板合成全长互补 RNA(cRNA),最后合成基因组 vRNA。随后,新合成的 vRNA、NP 和聚合酶蛋白装配成 RNP,从核中输出,转运到质膜,在此进行子代病毒颗粒的出芽。通过除去唾液酸寡糖中的唾液酸,从细胞表面释放出新装配的病毒体,阻止病毒颗粒的自我聚集,神经氨酸酶(NA)蛋白在感染后期起到至关重要的作用。尽管病毒装配包括蛋白-蛋白相互作用和蛋白-vRNA 相互作用,但是这些相互作用的性质基本上尚未知晓。

[0047] 尽管乙型和丙型流感病毒在结构和功能上均类似于甲型流感病毒,但是还是有一些差异。例如,乙型流感病毒没有具离子通道活性的 M2 蛋白。同样,丙型流感病毒也没有具离子通道活性的 M2 蛋白。然而,CM1 蛋白可能具有这一活性。可通过本领域众所周知的方法,参见例如 Holsinger 等(1994)和 W001/79273,测定离子通道蛋白的活性。

[0048] 本发明可以使用的细胞系和流感病毒

[0049] 根据本发明,任何支持流感病毒有效复制的细胞都可用于本发明,所述细胞包括表达减少或降低水平的一个或多个唾液酸(流感病毒受体)的突变细胞。由该方法得到的病毒可以制成重配(reassortant)病毒。

[0050] 优选所述细胞是经 WHO 检验或确认的连续细胞系。证明这些细胞系的要求包括对至少一个谱系、生长特征、免疫学标记、病毒易感性、致癌性和储藏条件进行表征,以及通过在动物、鸡胚和细胞培养在做实验进行表征。所述表征用于证实所述细胞没有可检测的外来因子(adventitious agents)。在一些国家,还需要做细胞核学实验。另外,致癌性优选在与用于疫苗生产的细胞具有相同传代水平的细胞中进行试验。在进行疫苗生产的灭活或减毒之前,病毒优选通过已显示能得到稳定结果的方法进行纯化(参见例如世界卫生组织(World Health Organization),1982)。

[0051] 优选建立待用细胞系的完整表征,使其包括用于终产物纯度的合适试验。可用于表征本发明所用细胞的数据包括:(a)有关其来源、衍生过程和传代史的信息;(b)有关其生长和形态学特征的信息;(c)外来因子的试验结果;(d)区别特征,例如将这些细胞与其它细胞系清楚地区分开来的生物化学、免疫学和细胞遗传学模式;和(e)致癌性试验结果。优选所用宿主细胞的传代水平或群体倍增尽可能低。

[0052] 优选所述细胞中生产的病毒在配制疫苗或基因治疗制剂之前已经高度纯化。一般而言,纯化过程使得细胞 DNA、其它细胞组分和外来因子完全除去。也可使用完全降解或变性 DNA 的方法。参见例如 Mizrahi,1990。

[0053] 疫苗

[0054] 本发明的疫苗可包括免疫原性蛋白,所述蛋白包括任何病原体的糖蛋白,例如来自一种或多种细菌、病毒、酵母或真菌的免疫原性蛋白。因此,在一个实施方案中,本发明的流感病毒可以是流感病毒的疫苗载体或包括但不限于以下的其它病毒病原体的疫苗载体:慢病毒,例如 HIV、乙肝病毒、丙肝病毒,疱疹病毒例如 CMV 或 HSV 或口蹄疫病毒。

[0055] 通过超滤,浓缩完整病毒体的疫苗,然后通过区带离心或层析进行纯化。可以在纯

化前后使用福尔马林或 β -丙内酯等来灭活。

[0056] 亚单位疫苗包括纯化的糖蛋白。所述疫苗可按以下方法制备：使用经去垢剂处理而破坏的病毒悬液，通过例如超速离心纯化表面抗原。因此，亚单位疫苗主要含有 HA 蛋白，但也含有 NA。所用的去垢剂可以是阳离子去垢剂例如十六烷基三甲基溴化铵 (Bachmeyer, 1975)，阴离子去垢剂例如脱氧胆酸铵 (Laver&Webster, 1976) ; Webster 等, 1977) ; 或非离子去垢剂例如商品名为 TRITON X100 的去垢剂。也可以在蛋白酶例如菠萝蛋白酶处理病毒体后，分离血凝素，然后通过例如 Grand 和 Skehel (1972) 所介绍的方法进行纯化。

[0057] 片段疫苗 (split vaccine) 包括经过溶解脂质的试剂处理的病毒体。片段疫苗可以如下制备：在搅拌下，用脂质溶剂例如乙醚或氯仿以及去垢剂，处理如上获得的纯化病毒的含水悬液（灭活或未灭活）。病毒包膜脂质的分解产生病毒颗粒片段。回收水相，其中含有片段疫苗，其主要由血凝素和神经氨酸酶（其原有的脂质环境被去除）以及核心或其降解产物组成。然后，将残留的感染性颗粒灭活，如果之前尚未灭活的话。

[0058] 灭活疫苗。可以用已知方法灭活本发明的复制型病毒，提供本发明的灭活流感病毒疫苗，所述方法例如但不限于福尔马林或 β -丙内酯处理。用于本发明的灭活疫苗类型可包括全病毒 (WV) 疫苗或亚病毒颗粒 (SV) (片段) 疫苗。WV 疫苗含有完整的灭活病毒，而 SV 疫苗含有用去垢剂破坏而溶解含脂质病毒包膜、接着通过化学方法灭活残余病毒的纯化病毒。

[0059] 另外，可以使用的疫苗还包括含有分离的 HA 和 NA 表面蛋白的疫苗，所述疫苗称为表面抗原或亚单位疫苗。一般而言，针对 SV 和表面抗原（即纯化的 HA 或 NA）疫苗的应答都是类似的。一种含有与流行病毒免疫相关的 NA 抗原和无关 HA 的实验灭活 WV 疫苗看来有效性要比常规疫苗差些 (Ogra 等, 1977)。优选含有这两种相关表面抗原的灭活疫苗。

[0060] 减毒活病毒疫苗。根据已知的方法步骤，减毒活流感病毒疫苗也可用于预防或治疗流感病毒感染。优选按照已知方法（参见例如 Murphy, 1993），通过将来自减毒供体病毒的减毒基因转移到分离的或重配的 (reassorted) 复制型病毒中，用一步法完成减毒过程。因为抗甲型流感病毒的抗性是由产生抗 HA 和 NA 糖蛋白的免疫应答介导的，所以编码这些表面抗原的基因必须来自重配病毒或高度生长的临床分离株。减毒基因来自减毒亲本。在这一方法中，赋予减毒作用的基因优选不编码 HA 和 NA 糖蛋白。另外，这些基因不能转移给带有临床病毒分离株表面抗原的重配子。

[0061] 已经对许多供体病毒再现减毒流感病毒的能力进行了评价。作为非限制性实例，A/Ann Arbor (AA) /6/60 (H2N2) 冷适应 (ca) 供体病毒可以用于减毒疫苗生产（参见例如 Edwards, 1994 ; Murphy, 1993）。另外，可以通过将 ca 供体病毒与本发明的强毒复制型病毒交配，产生减毒活重配病毒疫苗。然后在 H2N2 抗血清的存在下，在 25°C 选择重配子代（限制强毒病毒的复制），所述抗血清抑制带有减毒 A/AA/6/60 (H2N2) ca 供体病毒表面抗原的病毒的复制。

[0062] 已经对在人类中的一系列 H1N1 和 H3N2 重配病毒进行了评价，并且发现是令人满意的：(a) 感染性，(b) 对血清反应阴性儿童和初次免疫的成人来说是弱毒的，(c) 免疫原性，(d) 遗传稳定性。ca 重配子的免疫原性平行于其复制水平。因此，由新野生型病毒获得 ca 供体病毒的 6 个可转移基因，可以重复地减毒这些病毒，用于接种易感性成人和儿童。

[0063] 其它减毒突变可以经定点诱变引入流感病毒基因，以拯救带有这些突变基因的感

染性病毒。减毒突变可以引入基因组非编码区以及编码区。这些减毒突变也可以引入 HA 或 NA 以外的基因,例如 PB2 聚合酶基因 (Subbarao 等,1993)。因此,也可以产生带有经定点诱变引入的减毒突变的新的供体病毒,而所述新的供体病毒可用于减少活的减毒重配 H1N1 和 H3N2 候选疫苗,其方式类似于上述 A/AA/6/60ca 供体病毒。同样,其它已知的合适减毒供体株可以与本发明的流感病毒重配,以得到适于哺乳动物免疫接种的减毒疫苗 (Ewami 等,1990 ;Muster 等,1991 ;Subbarao 等,1993)。

[0064] 优选所述减毒病毒保留来自编码与原始临床分离株的抗原决定簇基本类似的病毒的基因。这是因为减毒疫苗的目的是为了提供与原始临床分离病毒株基本相同的抗原性,而同时缺乏感染性,以至于疫苗在接种的哺乳动物中最小可能地引起严重致病性。

[0065] 因此,可以按照常规方法,将所述病毒减毒或灭活,配制并作为疫苗给药,以在动物例如哺乳动物体内诱导免疫应答。下述方法在本领域中是众所周知的:确定这些减毒或灭活疫苗是否保留与临床分离株或其衍生的高生长株相似的抗原性。所述已知方法包括利用抗血清或抗体消除表达供体病毒抗原决定簇的病毒;化学选择(例如金刚烷胺或金刚乙胺);HA 和 NA 活化和抑制;DNA 筛选法(例如探针杂交或 PCR),以证实减毒病毒中不存在编码抗原决定簇的供体基因(例如 HA 或 NA 基因)。参见例如 Robertson 等,1988 ;Kilbourne,1969 ;Aymard-Henry 等,1985 ;Robertson 等,1992。

[0066] 药物组合物

[0067] 适于接种或胃肠外或口服给药的本发明药物组合物包含减毒流感病毒或灭活流感病毒,任选还包含无菌的水性或非水性溶液剂、混悬剂和乳剂。所述组合物还可包含本领域已知的助剂或赋形剂。参见例如 Berkow 等,1987 ;Goodman 等,1990 ;Avery's Drug Treatment,1987 ;Osol,1980 ;Katzung,1992。本发明的组合物通常为单剂量(单位剂量)形式。

[0068] 常规疫苗通常含有约 0.1-200 μ g、优选 10-15 μ g 血凝素,这来自加入其组合物的各毒株。构成本发明疫苗组合物主要成分的疫苗可包括甲型、乙型、丙型病毒或其任何组合,例如,这三种型别中的至少两种,不同亚型的至少两种,同型中的至少两种,相同亚型的至少两种或不同的分离株或重配株。人甲型流感病毒包括 H1N1、H2N2 和 H3N2 亚型。

[0069] 供胃肠外给药用制剂包括无菌水性或非水性溶液剂、混悬剂和/或乳剂,其可含有本领域已知的助剂或赋形剂。非水溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)以及注射用有机酯类,例如油酸乙酯。载体或闭合敷料(occlusive dressings)可用于增加皮肤渗透性并增加抗原吸收。供口服给药用液体剂型通常可包括含有所述液体剂型的脂质体溶液剂。用于悬浮脂质体的合适的形式包括乳剂、混悬剂、溶液剂、糖浆剂和酞剂,其含有本领域通常使用的惰性稀释剂,例如纯净水。除了惰性稀释剂外,所述组合物也可包括佐剂、润湿剂、乳化剂和悬浮剂,或者甜味剂、矫味剂或芳香剂。参见例如 Berkow 等,1992 ;Goodman 等,1990 ;Avery's,1987 ;Osol,1980 ;Katzung,1992。

[0070] 当本发明的组合物用于给予个体时,它还可包含可提高所述组合物功效的盐类、缓冲剂、佐剂或其它物质。对于疫苗来说,可以使用能增强特异性免疫应答的佐剂。通常,佐剂和组合物可以混合在一起,然后给予免疫系统,或者可以单独给予,但是给予免疫生物体的同一部位。Osol(1980)提供了适用于疫苗组合物的材料的实例。

[0071] 通过将至少 2 株流感病毒株、例如 2-50 株或其中任意范围或数值的复制型流感病

毒进行混合,提供疫苗的异质性。优选具有现代抗原组合的甲型或乙型流感病毒株。按照本发明,可以使用本领域已知技术,在单株流感病毒中提供用于变异的疫苗。

[0072] 本发明的药物组合物还可包含或者另外包含至少一种化疗化合物,例如用于基因治疗和疫苗的化合物,用于基因治疗的化合物例如免疫抑制剂、抗炎药或免疫增强剂,用于疫苗的化合物包括但不限于 γ -球蛋白、金刚烷胺、胍、羟基苯并咪唑、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 、缩氨基硫脲类、美替沙脞、利福平、利巴韦林、嘧啶类似物、嘌呤类似物、膦甲酸、膦乙酸、阿昔洛韦、二脱氧核苷、蛋白酶抑制剂或更昔洛韦。参见例如 Katzung(1992) 及其中引用的参考文献,第 798-800 页和第 680-681 页。

[0073] 所述组合物也可含有可变的、但是少量的无内毒素甲醛和防腐剂,其已发现是安全的并且在接受所述组合物的生物体内不会产生不想要的效果。

[0074] 药用目的

[0075] 给予所述组合物(或其诱导的抗血清)可以是为了“预防”或者“治疗”目的。当用于预防目的时,在出现病原体感染的任何症状之前,给予作为疫苗的本发明组合物。预防性给予所述组合物的作用是预防或缓解任何其后的感染。当用于预防目的时,在出现任何疾病症状之前,给予本发明的基因治疗组合物。预防性给予所述组合物的作用是预防或缓解一种或多种与所述疾病有关的症状。

[0076] 当用于治疗目的时,在检测到有实际感染症状时,给予减毒或灭活病毒疫苗。治疗性给予所述化合物的作用是缓解任何实际感染。参见例如 Berkow 等,1992 ;Goodman 等,1990 ;Avery,1987 ;Katzung,1992。当用于治疗时,当检测到疾病症状或指征时,给予基因治疗组合物。治疗性给予所述化合物的作用是缓解所述疾病症状或指征。

[0077] 因此,本发明减毒或灭活疫苗组合物可以在感染发作之前(以预防或缓解预期的感染)或实际感染开始之后给予。同样,对于基因治疗,所述组合物也可以在出现障碍或疾病的任何症状之前或者在检测到一种或多种症状之后给予。

[0078] 所述组合物是“药理学上可接受的”,是指受体患者可以耐受给予所述组合物。所述药物是以“治疗有效量”给予,是指所给予的用量在生理上是有意义的。本发明的组合物在生理上是有意义的,是指其存在产生在受体患者生理学上可检测的变化,例如增强至少一个针对感染性流感病毒至少一个毒株的初次或继发的体液或细胞免疫应答。

[0079] 所提供的“保护性”并不是绝对的,即流感感染并不总是可以预防或根除的,虽然与对照群体或一组患者相比,有统计学显著性改善。保护性可仅限于减轻流感病毒感染症状发作的严重程度或减慢其速度。

[0080] 给药

[0081] 本发明的组合物可通过或者被动免疫或者主动免疫而赋予抗一种或多种病原体例如一种或多种流感病毒株的抗性。在主动免疫中,预防性给予宿主(例如哺乳动物)灭活或减毒活疫苗组合物,给药宿主的免疫应答可避免感染和/或疾病。对于被动免疫,可以回收诱导的抗血清,然后给予怀疑受到至少一种流感病毒株感染的接受者。本发明的基因治疗组合物可通过主动免疫而产生预防或治疗水平的所需基因产物。

[0082] 在一个实施方案中,将所述疫苗在足以产生免疫应答的时间和用量的条件下给予雌性哺乳动物(在受孕或分娩时或之前),所述免疫应答起到同时保护母体和胎儿或新生儿的作用(通过被动给予穿过胎盘的抗体或母乳中的抗体)。

[0083] 因此,本发明包括预防或缓解障碍或疾病(例如由至少一株病原体引起的感染)的方法。本文所说的疫苗预防或缓解疾病,是指如果其给药则会引起症状或病症全部或部分缓解(即抑制),或者引起个体对所述疾病的全部或部分免疫力。本文所说的基因治疗组合物预防或缓解疾病,是指如果其给药则会引起症状或病症全部或部分缓解(即抑制),或者引起个体对所述疾病的全部或部分免疫力。

[0084] 可以通过达到预期目的的任何方式,使用上述药物组合物,给予本发明的至少一种灭活或减毒流感病毒或其组合物。

[0085] 例如,可以通过各种胃肠外途径,例如皮下、静脉内、皮内、肌内、腹膜内、鼻内、口服或经皮途径,给予所述组合物。胃肠外给药可以通过快速浓注或者通过长时间逐渐输注的方式进行。使用本发明药物组合物的优选方式是通过肌内或皮下给药。参见例如 Berkow 等,1992 ;Goodman 等,1990 ;Avery,1987 ;Katzung,1992。

[0086] 对于预防、抑制或治疗流感病毒相关病理,通常的方案包括给予有效量的上述疫苗组合物,可以作为单次给药,或者在 1 周和约 24 个月之间的周期内或者其间的任何范围内,作为加强或增强剂量重复给药。

[0087] 按照本发明,组合物的“有效量”是指足以达到所需生物学效果的用量。人们知道,有效量将取决于接受者的年龄、性别、健康状况和体重,同时治疗的种类(如果有的话)、治疗频率和所需效果的特点。下面提供的有效剂量的范围并不是对本发明的限制,而是代表优选的剂量范围。然而,最优选剂量将因各受试者而异,这是本领域技术人员可理解和可确定的。参见例如 Berkow 等,1992 ;Goodman 等,1990 ;Avery's,1987 ;Ebadi,1985 ;Katsung,1992。

[0088] 对于哺乳动物(例如人)或鸟类成年生物体,减毒病毒疫苗的剂量可为约 10^3 - 10^7 噬斑形成单位(PFU)/kg,或其中任意范围或数值。灭活疫苗剂量范围可为约 0.1-200 μ g,例如 50 μ g 血凝素蛋白。然而,通过常规方法检定、使用现有疫苗作为出发点,所述剂量应当是安全有效的。

[0089] 可以将每剂复制型病毒疫苗中免疫反应性 HA 的剂量标准化,使其含有合适的量,例如 1-50 μ g 或其中任意范围或数值,或者为美国公共卫生服务部(U.S. Public Health Service, PHS)推荐量,通常是对于 3 岁以上儿童每份 15 μ g,对于 3 岁以下儿童每份 7.5 μ g。NA 的用量也可以标准化,然而,该糖蛋白在加工、纯化和储藏中可能不太稳定(Kendal 等,1980 ;Kerr 等,1975)。每剂 0.5ml 的疫苗优选含有约 10-500 亿个病毒颗粒,优选 100 亿个病毒颗粒。

[0090] 下面通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0091] 实施例 1

[0092] 材料与amp;方法

[0093] 细胞与病毒. 将 293T 人胚肾细胞和 Madin-Darby 狗肾(MDCK)细胞分别在补充 10%胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)和含有 5%新生小牛血清的改良 Eagle 培养基(MEM)中进行培养。所有细胞都维持在 37°C /5% CO₂。流感病毒 A/WSN/33(H1N1)和 A/PR/8/34(H1N1)在 10 日龄鸡胚中繁殖。

[0094] 质粒的构建. 为了产生 RNA 聚合酶 I 构建体,将衍生自 A/WSN/33 或 A/PR/8/34 病毒 RNA 的克隆 cDNA 引入到 RNA 聚合酶 I 启动子和终止序列之间。简而言之,使用含有

BsmBI 位点的引物,通过 PCR 扩增该克隆 cDNA,用 BsmBI 消化,克隆到 pHH21 载体的 BsmBI 位点,所述载体含有人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子,其间被 BsmBI 位点间隔开(图 2)。分别通过使用以下质粒:pSCWPB2、pGW-PB1、pSCWPA(都得自 Debi Nayak 博士,University of California Los Angeles)和 pWH17、pWNP152、pT3WNA15(Castrucci 等,1992)、pGT3WM、pWNS1,将 A/WSN/33 株的 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因进行 PCR 扩增。流感 A/PR/8/34 病毒的 PB1 基因通过使用 pcDNA774(PB1)(Perez 等,1998)作为模板进行扩增。为了确保这些基因不含不需要的突变,用自动测序仪(Applied Biosystem Inc., CA, USA),按照生产商推荐的方案,对来自 PCR 的片段进行测序。按照 Huddleston 等(1982)介绍的方法,对编码 A/WSN/33 病毒 HA、NP、NA 和 M1 基因的 cDNA 进行克隆并亚克隆到真核表达载体 pCAGGS/MCS(处于鸡 β -肌动蛋白启动子的控制下)中(Niwa 等,1991),分别得到 pEWSN-HA、pCAGGS-WSN-NP0-14、pCAGGS-WNA15 和 pCAGGS-WSN-M1-2/1。来自 A/PR/8/34 病毒的 M2 和 NS2 基因通过 PCR 扩增并克隆到 pCAGGS/MCS 中,得到 pEP24c 和 pCA-NS2。最后,用 pcDNA774(PB1)、pcDNA762(PB2)和 pcDNA787(PA),在巨细胞病毒启动子的控制下表达 PB2、PB1 和 PA 蛋白(Perez 等,1998)。

[0095] 感染性流感病毒颗粒的产生。使用 Trans IT LT-1(Panavera, Madison, Wisconsin),按照生产商的说明书,用最多达 17 种质粒以不同数量转染 293T 细胞(1×10^6)。简而言之,将 DNA 和转染试剂混合在一起(每 μg DNA $2 \mu\text{l}$ Trans IT LT-1),在室温下孵育 45 分钟,然后加入到细胞中。6 小时后,用含有 0.3% 牛血清白蛋白和 0.01% 胎牛血清的 Opti-MEM(Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) 更换 DNA-转染试剂混合物。转染后,在不同时间收获上清液中的病毒,在 MDCK 细胞上测定其滴度。因为该方法不需要辅助病毒,所以回收的转染病毒无需噬斑纯化就可直接进行分析。

[0096] 质粒转染细胞产生的病毒百分率测定。转染后 24 小时,293T 细胞用 0.02% EDTA 分散成单细胞。然后将细胞悬液进行 10 倍稀释,转移到长满单层 MDCK 细胞的 24 孔板中。通过血细胞凝集试验来检测病毒。

[0097] 免疫染色测定。用流感病毒感染后 9 小时,细胞用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次,用 3.7% 低聚甲醛(溶于 PBS)在室温下固定 20 分钟。然后,按照 Neumann 等(1997)介绍的方法,用 0.1% Triton X-100 处理和加工。

[0098] 结果

[0099] 通过质粒驱动病毒 RNA 区段、3 种聚合酶亚基和 NP 蛋白的表达,产生感染性病毒。尽管用纯化病毒体提取的 RNP 混合物转染细胞,产生感染性流感病毒颗粒,但是当用 8 种不同的体外产生的 RNP 时,该策略不一定有效。为了完全从 cDNA 产生感染性流感病毒,体内产生 8 种病毒 RNP。因此,制备含有 A/WSN/33 病毒全长病毒 RNA 的 cDNA 的质粒,所述 cDNA 邻接人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子。原则上来说,这 8 种质粒转染到真核细胞,将导致所有 8 种流感病毒 vRNAD 的合成。然后,通过蛋白表达质粒共转染所产生的 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白将与 vRNA 一起装配成可复制和转录的功能性 vRNP,最终形成感染性流感病毒(图 3)。用蛋白表达质粒($1 \mu\text{g}$ pcDNA762(PB2)、 $1 \mu\text{g}$ pcDNA774(PB1)、 $0.1 \mu\text{g}$ pcDNA787(PA)和 $1 \mu\text{g}$ pCAGGS-WSN-NP0/14)和各 $1 \mu\text{g}$ 以下 RNA 聚合酶 I 质粒(pPolII-WSN-PB2、pPolII-WSN-PB1、pPolII-WSN-PA、pPolII-WSN-HA、pPolII-WSN-NP、pPolII-WSN-NA、pPolII-WSN-M 和 pPolII-WSN-NS),转染 1×10^6 293T 细胞。使

用减少量的 pcDNA787 (PA) 的做法是根据以前的观察结果 (Mena 等, 1996), 并根据用于产生病毒样颗粒 (VLP) 的最佳条件的数据 (数据未显示)。293T 细胞转染后 24 小时, 在上清液中发现 7×10^3 pfu 病毒 /ml (实验 1, 表 1), 首次证明采用反求遗传学完全能够从质粒产生甲型流感病毒。

[0100] 表 1. 用于从克隆 cDNA 产生流感病毒的质粒系列 *

RNA 聚合酶 I 质粒 ⁺ :		实验							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	PB1	+	+	-	-	-	-	-	-
	PR8-PB1	-	-	+	+	+	+	+	+
	PB2	+	+	+	+	+	+	+	+
	PA	+	+	+	+	+	+	+	+
	HA	+	+	+	+	+	+	+	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	+
	NA	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	+	+	+	+	+	+	+	+
	NS	+	+	+	+	+	+	+	+
蛋白表达质粒:									
	PB1	+	+	+	+	-	+	+	+
	PB2	+	+	+	+	+	-	+	+
	PA	+	+	+	+	+	+	-	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	-
	HA	-	+	-	+	+	+	+	+
	NA	-	+	-	+	+	+	+	+
	M1	-	+	-	+	+	+	+	+
	M2	-	+	-	+	+	+	+	+
	NS2	-	+	-	+	+	+	+	+
病毒滴度(pfu/ml)		7×10^3	7×10^3	1×10^3	3×10^4	0	0	0	0

[0102] *293T 细胞用指定质粒转染。24 小时 (实验 1 和 2) 或 48 小时 (实验 3-8) 后, 测定 MDCK 细胞上清液中的病毒滴度。

[0103] ⁺ 除非另有说明, 否则质粒用代表 A/WSN/33 病毒 RNA 的 cDNA 来构建。

[0104] 用所有病毒结构蛋白共表达, 产生流感病毒的效率。尽管病毒 NP 和聚合酶蛋白的表达对质粒驱动流感病毒的产生是足够的, 但是其效率还可以提高。在先前的研究中, 所有流感病毒结构蛋白 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2 和 NS2) 的表达, 产生 VLP, 所得 VLP 含有编码氯霉素 - 乙酰转移酶报道基因的人工 vRNA (Mena 等, 1996)。因此, 结构蛋白完整组分的利用度、而不仅是病毒 RNA 复制和转录所需要的那几种, 可以提高病毒生产效率。为此, 用以下最佳数量的病毒蛋白表达质粒 (根据 VLP 产生而判断; 未发表的数据) 转染

293T 细胞: $1 \mu\text{g}$ pcDNA762 (PB2) 和 pcDNA774 (PB1); $0.1 \mu\text{g}$ pcDNA787 (PA); $1 \mu\text{g}$ pEWSN-HA、pCAGGS-WSN-NP0/14 和 pCAGGS-WNA15; $2 \mu\text{g}$ pCAGGS-WSN-M1-2/1; $0.3 \mu\text{g}$ pCA-NS2; 和 $0.03 \mu\text{g}$ pEP24c (对于 M2), 以及各 $1 \mu\text{g}$ RNA 聚合酶 I 质粒 (实验 2, 表 1)。用相同系列的 RNA 聚合酶 I 质粒 (除了 PB1 基因之外, 因为 pPo1I-PR/8/34-PB1 被取代, 以便产生重配病毒) 以及仅表达 PA、PB1、PB2 和 NP 的质粒 (实验 3, 表 1) 或表达所有流感结构蛋白的质粒 (实验 4, 表 1), 转染第二系列细胞。得到的 WSN 病毒在转染后 24 小时 (实验 1 和 2, 表 1) 或 36 小时并无很大差异 (数据未显示)。然而, 当提供所有流感病毒结构蛋白时, 发现带有 PR/8/34-PB1 的病毒产量增加 10 倍以上 (实验 3 和 4, 表 1)。缺乏一个表达 PA、PB1、PB2、NP 蛋白的质粒的阴性对照不能得到任何病毒 (实验 5-8, 表 1)。因此, 根据所产生的病毒, 所有甲型流感病毒结构蛋白的表达极大提高了反求遗传学方法的效率。

[0105] 随后, 使用用于产生带有 A/PR/8/34-PB1 基因的病毒的质粒系列, 来测量细胞转染后病毒产生的动力学。在 3 次实验有 2 次, 在感染后 24 小时首次检出病毒。当时测定的滴度 $> 10^3$ pfu/ml, 在转染后 48 小时增加到 $> 10^6$ pfu/ml (表 2)。为了估计质粒转染细胞产生病毒的百分率, 将 293T 细胞在转染后 24 小时用 EDTA (0.02%) 处理以分散细胞, 然后进行有限稀释研究。在该实验中, 在该时间点在上清液中没有发现游离病毒。该结果表明, 每 10^{33} 个细胞中有 1 个细胞会产生感染性病毒颗粒。

[0106] 表 2. 质粒转染到 293T 细胞后病毒产生的动力学 *

[0107]

质粒转染后的小时数	培养上清液中的病毒滴度 (pfu/ml)		
	实 验		
	1	2	2
6	0	ND	ND
12	0	ND	0
18	0	ND	0
24	0	2×10^3	6×10^3
30	ND	5×10^4	9×10^4
36	6×10^2	$>1 \times 10^5$	7×10^5
42	ND	$>1 \times 10^6$	5×10^6
48	8×10^4	$>1 \times 10^6$	1×10^7

[0108] * 用编码除 PB1 基因外的 A/WSN/33 病毒基因的 8 种 RNA 聚合酶 I 质粒, 以及如上所述 9 种蛋白表达质粒, 来转染 293T 细胞, 该 A/WSN/33 来自 A/PR/8/34 病毒。在不同时间点, 我们测定了 MDCK 细胞培养上清液中的病毒滴度。ND = 未做。

[0109] 在 NA 蛋白中含有 FLAG 表位的流感病毒的回收. 为了证实新反求遗传学系统允许将突变引入到甲型流感病毒基因组中, 产生在 NA 蛋白中含有 FLAG 表位的病毒 (Castrucci 等, 1992)。用 RNA 聚合酶 I 质粒 (pPo1I-WSN-NA/FL79) 以及所需的 RNA 聚合酶 I 和蛋白表达质粒来转染 293T 细胞, 所述 RNA 聚合酶 I 质粒含有同时编码 NA 蛋白以及在所述蛋白头部下面的 FLAG 表位的 cDNA。为了证实回收病毒 (PR8-WSN-FL79) 确实能表达 NA-FLAG 蛋白,

对感染 PR8-WSN-FL79 或 A/WSN/33 野生型病毒的细胞进行免疫染色测定。抗 FLAG 表位的单克隆抗体检出感染 PR8-WSN-FL79 的细胞,而不是感染野生型病毒的细胞。PR8-WSN-FL79 病毒的回收率与未标记的野生型病毒相同(数据未显示)。这些结果表明,新反求遗传学系统允许将突变引入到甲型流感病毒基因组中。

[0110] 在 PA 基因中含有突变的感染性流感病毒的产生。为了产生在 PA 基因中具有突变的病毒,引入 2 个沉默突变,产生限制性内切核酸酶的新识别序列(Bsp120I,在 mRNA 的 846 位,以及 PvuII,在 mRNA 的 1284 位)。先前,不能通过反求遗传学修饰该基因,因为缺乏可靠的选择系统。回收了转染病毒 PA-T846C 和 PA-A1284。通过 2 次连续有限稀释,将回收的转染病毒进行生物学无性繁殖。为了证实回收的病毒确实是在 PA 基因中带有突变的转染子,通过逆转录酶-PCR 得到 PA 基因的 cDNA。PA-T846C 和 PA-A1284C 病毒在 PA 基因中具有预期突变,新引入限制位点的存在证明了这一点。没有逆转录步骤的相同病毒样品和引物通过 PCR 扩增没有产生任何产物(数据未显示),表明 PA cDNA 确实来源于 vRNA,而不是用于产生病毒的质粒。这些结果说明,不用辅助病毒时,怎样产生和回收带有突变基因的病毒。

[0111] 讨论

[0112] 本文所述的反求遗传学系统允许完全从克隆 cDNA 有效产生甲型流感病毒。Bridgen 和 Elliott(1996) 也使用反求遗传学产生了布尼奥罗病毒(Bunyamwera virus)(布尼亚病毒科(Bunyaviridae)),但是它仅含有 3 个负义 RNA 区段,并且其产生的效率低,仅为 10^2 pfu/ 10^7 细胞。尽管病毒在实验中产量不同,对于含有 4 个区段的流感病毒来说,始终观察到 $> 10^3$ pfu/ 10^6 细胞。对于上述反求遗传学系统的高效率来说,有几种解释。与体外产生 RNP 不同(Luytjes 等,1989),RNP 在体内是通过使用 RNA 聚合酶 I 进行 vRNA 的胞内合成并且通过质粒驱动病毒聚合酶蛋白和 NP 的表达而产生。另外,使用容易用质粒转染的 293T 细胞(Goto 等,1997),确保大量细胞得到所有病毒产生所需质粒。另外,RNA 聚合酶 I(这在生长细胞中是最丰富表达的酶)产生大量转录,可能有助于系统的总效率。这些特点导致相当丰富的 vRNA 转录物和足够量的病毒蛋白,用于包裹 vRNA,在核中形成 RNP,并将这些复合体输出到细胞膜,在此新病毒进行装配,然后释放。

[0113] 以前建立的反求遗传学系统(Enami 等,1990;Neumann 等,1994;Luytjes 等,1989;Pleschka 等,1996)需要辅助病毒感染,并因此需要选择方法,以允许从极大量的辅助病毒中回收少量的转染子。已经采用所述策略产生带有一个以下来自 cDNA 基因的流感病毒:PB2(Subbarao 等,1993)、HA(Enami 等,1991;Horimoto 等,1994)、NP(Li 等,1995)、NA(Enami 等,1990)、M(Castrucci 等,1995;Yasuda 等,1994)和 NS(Enami 等,1991)。大多数选择方法除了适用于 HA 和 NA 基因之外,依赖于生长温度、宿主范围限制或药物敏感性,因此限制了反求遗传学在基因产物功能性分析中的应用。甚至是在可以使用具有 HA 和 NA 基因用于可靠的抗体驱动的选择系统时,仍然难以产生具有显著生长缺陷的病毒。相比之下,本文描述的反求遗传学系统不需要辅助病毒,并允许产生在任何基因区段中都带有突变的转染子或者带有严重生长缺陷的转染子。在图 5 中已证明了这一优点,其中回收到带有突变型 PA 基因的转染病毒。有了该项技术,就可将任何可行的突变引入甲型流感病毒基因组中,将使研究人员致力于许多长期课题的研究,例如病毒基因组非翻译区中的调节序列的性质、病毒蛋白结构与功能的关系和宿主范围限制和病毒致病性的分子基础。

[0114] 尽管灭活流感疫苗是可用的,但是其功效还不是最佳的,这部分是因为其诱导局部 IgA 和细胞毒性 T 细胞应答的有限能力。目前正在进行的冷适应活流感疫苗的临床试验表明,所述疫苗是最佳减毒的,所以它们不会引起流感症状,但是仍会诱导保护性免疫力(有关综述参见 Keitel&Piedra,1998)。然而,初步结果表明,这些活病毒疫苗的效果将不会比最好的灭活疫苗更显著(有关综述参见 Keitel. &Piedra,1998),这尚需要作进一步改进。一个可能的做法是用上述反求遗传学系统来修饰冷适应疫苗。或者,可以通过从使用反求遗传学开始,产生一种编码内部蛋白的基因中带有多种减毒突变的“母种”甲型流感株。上述反求遗传学系统最令人着迷的用途可能是,如果发生怀疑包括流感病毒新 HA 或 NA 亚型在内的大流行,能快速生产出减毒活病毒疫苗。

[0115] 这一新反求遗传学系统可能会加强流感病毒作为疫苗载体的应用。病毒可以经工程改造,使其除表达流感病毒蛋白之外,还表达外源蛋白或免疫原性表位。人们可以例如产生具有外源蛋白作为第 9 区段的病毒(Enami 等,1991)并将其用作活疫苗。流感病毒不仅刺激强烈的细胞介导的免疫应答和体液免疫应答,而且还提供各种各样的病毒体表面 HA 和 NA 蛋白(例如 15 种 HA 和 9 种 NA 亚型及其流行变异株),允许对同一目标群体进行重复免疫。

[0116] 已经通过使用痘苗 -T7 聚合酶系统来表达病毒结构蛋白和 vRNA,产生了具有编码报道基因的人工 vRNA 的流感 VLP(Mena 等,1996)。使用反求遗传学,人们现在可以产生含有 vRNA 的 VLP,所述 vRNA 编码 vRNA 转录和复制所需的蛋白(即 PA、PB1、PB2 和 NP),以及编码目标蛋白。所述 VLP 可以是有用的基因传递载体。重要的是,它们缺乏编码病毒结构蛋白的基因,这将确保 VLP- 基因治疗后将不会产生感染性病毒。因为流感病毒基因组不整合到宿主染色体中,所以 VLP 系统将适用于仅需要短期转导细胞的基因治疗(例如用于癌症治疗)。与腺病毒载体(Kovesdi 等,1997)不同,流感 VLP 可同时含有 HA 和 NA 变异体,允许对目标群体进行重复治疗。

[0117] 正粘病毒科(Orthomyxoviridae)包括甲、乙、丙型流感病毒,以及最近分类的 Thogotovirus。完全从本文描述的克隆 cDNA 产生感染性甲型流感病毒的策略将适用于任何正粘病毒,并且也可能适用于其它分节段负义 RNA 病毒(例如布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、沙粒病毒科(Arenaviridae))。不受技术限制地操纵病毒基因组的能力,对病毒生命周期及其调控、病毒蛋白的功能和病毒致病性的分子机制的研究来说,具有深远意义。

[0118] 实施例 2

[0119] 材料与amp;方法

[0120] 细胞、病毒与抗体. 将 293T 人胚肾细胞和 Madin-Darby 狗肾(MDCK)细胞分别维持在补充 10%胎牛血清的 DMEM 和含有 5%新生小牛血清的 MEM 中。293T 细胞系来源于 293 细胞系,其中插入了猿猴病毒 40T 抗原基因(DuBridge 等,1987)。所有细胞都维持在 37°C /5% CO₂。B/Lee/40 及其突变病毒在 10 日龄鸡胚中繁殖。通过 10-50%蔗糖梯度的差速离心和沉淀,从尿囊液中纯化病毒。针对与匙孔 蛾血蓝蛋白偶联的合成肽 NKRDDISTPRAGVD(SEQ ID NO :9 ;NB 蛋白氨基酸残基 70-83),产生抗 NB 兔血清。

[0121] 质粒的构建. 通过病毒 RNA 的逆转录,用与病毒 RNA 保守 3' 端互补的寡核苷酸,合成 B/Lee/40 病毒的 cDNA。使用含有 BsmBI 位点的基因特异性寡核苷酸引物,通过 PCR 扩

增 cDNA,然后将 PCR 产物克隆到 pT7Blueblunt 载体 (Novagen, Madison, WI) 中。用 BsmBI 消化后,将所得片段克隆到质粒载体的 BsmBI 位点,该质粒载体含有人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子,其间被 BsmBI 位点间隔开。这些用于表达 vRNA 的质粒称为“PoII”构建体。将编码 B/Lee/40 病毒 PB2、PB1、PA 和 NP 基因的 cDNA 克隆到真核表达载体 pCAGGS/MCS(处于鸡 β -肌动蛋白启动子的控制下)中 (Kobasa 等,1997;Niwa 等,1991),得到 pCABLeePB2、pCABLeePB1、pCABLeePA 和 pCABLeeNP,它们分别表达 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白。

[0122] 按照以下方法构建 NB 敲除突变体。从含有 B/Lee/40NA 基因的 PoII 构建体,通过 PCR 扩增突变型 NA 基因 (参见图 4),然后用 BsmBI 消化。将 BsmBI 消化的片段克隆到 PoII 质粒的 BsmBI 位点。所得构建体命名为 pPoIBLeeNBstop#1、pPoIBLeeNBstop#2 和 pPoIBLeeNBstop#3。所有构建体都进行测序以确保没有不想要的突变。

[0123] 基于质粒的反求遗传学。按照较早报道的方法 (实施例 1),产生转染病毒。简而言之,将 12 种质粒 (8 种 PoII 构建体,用于 8 个 RNA 区段;4 种蛋白表达构建体,用于聚合酶蛋白和 NP) 与转染试剂 (TransIT LT-1 [Panvera, Madison, WI]) 一起混合,在室温下孵育 10 分钟,然后加入到在含有 0.3% BSA 的 Opti-MEM (Invitrogen) 中培养的 1×10^6 293T 细胞中。48 小时后,收集上清液中的病毒并在 MDCK 细胞中扩增以产生病毒母种。

[0124] 间接免疫荧光测定。用病毒以 1 至约 2 噬斑形成单位 (PFU)/细胞的感染复数 (MOI) 感染 MDCK 细胞。感染 8 小时后,细胞用 3% 甲醛溶液固定并用 0.1% TritonX-100 透化。用兔抗 NB 肽兔血清作为第一抗体和 FITC-缀合的抗兔 IgG 作为第二抗体,检测抗原。

[0125] 免疫沉淀。感染后 7 小时,用 $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ 和 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ (各 $50 \mu\text{Ci/ml}$) ($\text{Tran}^{35}\text{S-label}$; ICN Biochemicals) 的混合物,标记乙型流感病毒感染的 MDCK 细胞 (MOI 为 5PFU/细胞) 达 2 小时。放射性标记的细胞在含有 10mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaCl、1mM EDTA 和 0.5% Triton X-100 的 RIPA 缓冲液中裂解,然后进行离心。向上清液中加入抗 NB 兔血清,于 4°C 孵育过夜。然后加入 A 蛋白-琼脂糖珠,在室温下孵育 1 小时。洗涤免疫复合物,在 4-20% 梯度聚丙烯酰胺凝胶 (ISC BioExpress, Kaysville, UT) 上进行分离。干燥所得凝胶,用放射自显影进行检查。

[0126] 转染病毒的复制特性。MDCK 细胞用病毒以 0.001PFU/细胞的 MOI 感染,涂布含有 $0.5 \mu\text{g}$ 胰蛋白酶/ml 的 MEM 培养基,在 37°C 孵育。在不同时间用 MDCK 细胞上的噬斑来测定上清液中的感染性病毒。

[0127] 实验性感染。5 周龄雌性 BALB/c 小鼠,用甲氧氟烷麻醉,然后经鼻内给予 $50 \mu\text{l}$ 病毒。按照 Gao 等 (1999) 介绍的方法,测定小鼠 50% 致死剂量 (MLD_{50})。通过鼻内感染小鼠 (1.0×10^4 PFU) 测定病毒的复制能力,并按照 Bilse1 等 (1993) 介绍的方法,测定感染后 3 天器官中的病毒滴度。

[0128] 结果

[0129] 通过反求遗传学产生 B/Lee/40 病毒。确定 NB 蛋白在病毒复制中的作用的的第一步,是使用基于质粒的反求遗传学,完全从克隆 cDNA 产生 B/Lee/40 (B/Lee) 病毒 (Neumann 等,1999)。质粒含有编码 B/Lee 病毒所有 8 个区段的 cDNA,其邻接人 RNA 聚合酶 I 启动子和小鼠 RNA 聚合酶 I 终止子。然后,用 4 种表达 B/Lee 病毒 PA、PB1、PB2 和 NP 蛋白的质粒以及 8 种指导 B/Lee 病毒的 8 个病毒 RNA 区段产生的质粒转染 293T 细胞。转染后 48 小时,

从 293T 细胞上清液中回收病毒（称为 B/LeeRG）($10^{3.5}$ 50%组织培养感染量, TCID₅₀)。

[0130] NB 蛋白敲除病毒是活的。使用该反求遗传学系统, 产生不表达 NB 蛋白的突变病毒。制备 3 种突变型 PolI 构建体, 命名为 pPolBLeeNBstop#1、pPolBLeeNBstop#2 和 pPolBLeeNBstop#3(图 4)。在所有突变构建体中, NB 蛋白起始密码子从 ATG 变为 GCG(Met → Ala), 而 NB 蛋白的 41 位氨基酸密码子从 AAA 变为 TAA(终止密码子)。pPolBLeeNBstop#2 在突变的起始密码子下游有一个核苷酸缺失, 这预期会改变 NB 蛋白的读框。pPolBLeeNBstop#3 在突变的起始密码子下游有一个核苷酸插入, 这预期也会改变 NB 蛋白的读框。293T 细胞用每种突变型 NA PolI 质粒以及 7 种其它 PolI 质粒和 4 种蛋白表达质粒转染后 48 小时, 从上清液中回收 BLeeNBstop#1、BLeeNBstop#2 和 BLeeNBstop#3($10^{3.5}$ TCID₅₀), 表明产生了所有缺乏 NB 蛋白的病毒, 其效率等同于野生型 B/Lee 病毒。让上清液中存在的转染病毒在 MDCK 细胞中生长, 用作病毒母种。对每个病毒母种的 NA 基因测序证实了所需突变的稳定性并排除了其它突变的引入。

[0131] 为了证实这 3 种突变病毒正如所预期的一样不表达 NB 蛋白, 用病毒感染的 MDCK 细胞进行间接免疫荧光测定和免疫沉淀测定(图 5)。这些突变体都不是阳性, 相比之下, B/LeeRG 病毒表达 NB。在免疫沉淀研究中, NB 蛋白鉴定为 1.8kDa 蛋白(高甘露糖形式)和约 30-50kDa 蛋白(不均一形式), 与先前所报道的结果一致(Williams 等, 1986; Williams 等, 1988)。几个感染了 BLeeNBstop#1 病毒的细胞在免疫荧光测定中显示出模糊弥散性胞质染色, 可表明产生了由替代起始序列一直读到引入的终止密码子所产生的短 NB 肽。因此, 所有 3 个突变病毒都是活的, 并且不表达全长 NB 蛋白。

[0132] NB 敲除病毒在细胞培养中的生长特性。用 B/LeeRG、BLeeNBstop#1、BLeeNBstop#2 或 BLeeNBstop#3 病毒以 0.001PFU/细胞的 MOI 感染 MDCK 细胞, 于 37℃ 孵育。感染后, 在不同时间收集上清液, 通过噬斑测定, 检测 MDCK 细胞中的病毒滴度。BLeeNBstop#1、BLeeNBstop#2 和 BLeeNBstop#3 病毒显示出与 B/LeeRG 类似的生长动力学, 在感染后 36 小时, 病毒滴度达到 10^7 PFU/ml(图 6)。这些结果表明, 在细胞培养中, 乙型流感病毒可以在没有 NB 蛋白的情况下进行多轮复制并生长良好。

[0133] NB 敲除病毒在小鼠中的复制。为了确定 NB 在乙型流感病毒体内复制中的作用, 比较了野生型和突变型病毒的 MLD₅₀(表 5)。NB 敲除病毒的 MLD₅₀ 值比 B/LeeRG 的 MLD₅₀ 值至少高一个 log。在用 10^4 PFU 病毒感染的小鼠肺部和鼻管(NT)的病毒复制试验(表 3)中, B/LeeRG 在这两处均生长良好, 而突变病毒生长受到限制, 比起突变病毒来说, 其病毒滴度通常要低不止一个 log。因此, 尽管在细胞培养中生长是不需要的, 但是 NB 蛋白看来对小鼠体内有效的乙型流感病毒复制来说是重要的。

[0134] 表 3. NB 在小鼠病毒复制中的作用^a

[0135]

病毒	病毒滴度(平均 log PFU \pm SD/g):		MLD ₅₀ (PFU)
	肺	鼻管	
B/LeeRG	7.9 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	2.1 \times 10 ³
BLeNBstop#1	5.2 \pm 0.6	4.9 \pm 0.3	4.3 \times 10 ⁴
BLeNBstop#2	5.7 \pm 0.1	3.9 \pm 0.2	>1.5 \times 10 ⁵
BLeNBstop#3	6.6 \pm 0.04	3.4 \pm 0.4	1.5 \times 10 ⁴

[0136] ^a用甲氧氟烷麻醉的 BALB/c 小鼠经鼻内给予 50 μ l 病毒 (1×10^4 PFU) 感染。在感染后 3 天,处死病毒感染的每组 3 只小鼠,进行病毒滴度定量测定。按照 Gao 等 (1999) 介绍的方法,测定 MLD₅₀。

[0137] 讨论

[0138] 如上所述, NB 蛋白在细胞培养物中并非乙型流感病毒复制所必要的,但是能促进体内有效复制。基于此点, NB 类似于 A/WSN/33 流感病毒 M2 蛋白,尽管体内复制对 NB 的需要看来并没有对 M2 蛋白的需要更迫切。缺乏 M2 跨膜结构域和胞质结构域的 A/WSN/33 突变体在小鼠中是明显减毒的 (Watanabe 等, 2001), 而缺乏编码 M2 蛋白氨基酸残基 29-31 的核苷酸的 A/Udorn/72 (H3N2) 突变体甚至在细胞培养物中也是减毒的 (Takeda 等, 2001)。尽管在实验中已经完全清楚 M2 离子通道活性 (Duff 等, 1992; Holsinger 等, 1994; Pinto 等, 1992; Sugrue 等, 1990; Sugrue 等, 1991), 但是 NB 蛋白的所述活性仍然没有完全明确。因此, 乙型流感病毒对 NB 功能的有限依赖性可能显示, 或者所述病毒并不象甲型流感病毒那样更多依赖于离子通道活性, 或者 NB 具有除离子通道活性以外的功能。因为 NB 在乙型流感株中是高度保守的, 所述功能对于天然背景下的病毒复制来说可能是重要的。

[0139] 目前的人用疫苗是灭活疫苗, 该疫苗降低了病毒感染的严重程度, 但是也限制了其预防病毒感染的能力。冷适应减毒活疫苗的临床试验在功效和安全性方面已经获得了有希望的结果 (Abbasi 等, 1995; Alexandrova 等, 1986; Anderson 等, 1992; Belshe 等, 1998; Cha 等, 2000; Hrabar 等, 1977; Obrosova-Serova 等, 1990; Steinhoff 等, 1990; Tomoda 等, 1995; Wright 等, 1982)。然而, 乙型流感病毒疫苗株母种减毒的分子机制仍未了解。因此, 产生具有已知减毒突变的乙型流感病毒是重要的。产生这样的疫苗株母种是理想的: 其中仅在并非 HA 和 NA 的基因中含有减毒突变, 因而仅后者基因需要用野生株替换供疫苗生产用。然而, 有了反求遗传学的发明, 修饰 HA 和 NA 基因用于疫苗生产, 不再是困难的了。因此, 疫苗株中除了包括其它减毒突变外, 还可以包括敲除 NB 表达的突变, 因为在细胞培养中用 NB 敲除病毒没有检出生长缺陷。

[0140] 尽管 NB 敲除病毒的复制能力在 MDCK 细胞中彼此类似, 但是它们在小鼠中是不同的。在小鼠中突变体间复制能力的这一差异可能源于不同水平的 NA 表达。为了敲除 NB 表达, 对 NA 蛋白的上游序列进行了修饰。这可能会改变 NA 蛋白表达水平, 导致在体内不同程度的减毒。

[0141] 迄今为止, 已经报道了 5 种病毒蛋白的作用是作为离子通道: 甲型流感病毒 M2 蛋白、乙型流感病毒 NB 蛋白、人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) Vpu 和 Vpr 及小球藻病毒 Kcv (Ewart

等,1996 ;Piller 等,1996 ;Plugge 等,2000 ;Schubert 等,1996 ;Sugrue 等,1990 ;Sugrue 等,1991 ;Sunstrom 等,1996)。已经证明 Vpr 和 Kcv 蛋白在病毒生命周期中起到重要作用。HIV-1 的 Vpu 基因可以缺失,而不会完全消除 HIV-1 体外复制。在目前的研究中,已经表明 NB 蛋白在细胞培养中对病毒生长来说并非是必要的,但是对在小鼠中有效的乙型流感病毒复制来说是需要的。因此,可以将 NB 突变,任选和其它减毒突变一起,引入到疫苗株中。

[0142] 参考文献

[0143] Abbasi 等, Virus. Res., 39 :377(1995).

[0144] Alberts 等(主编), Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York, NY. (1994).

[0145] Albo 等, J. Virol., 70 :9013(1996).

[0146] Alexandrova 等, Vaccine, 4 :114(1986).

[0147] Altschul 等, J. Mol. Biol. 215 :403(1990).

[0148] Altschul 等, Nucleic Acids Res., 25 :3389(1997).

[0149] Anderson 等, J. Clin. Microbiol., 30 :2230(1992).

[0150] Appleyard, J. Gen. Virol., 36 :249(1977).

[0151] Avery ' s Drug Treatment :Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 第 3 版, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD(1987).

[0152] Aymard-Henry 等, Virology :A Practical Approach, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150(1985).

[0153] Bachmeyer, Intervirology, 5, 260-272(1975).

[0154] Belshe 等, N. Engl. J. Med., 338 :1405(1998).

[0155] Berkow 等(主编), The Merck Manual, 第 16 版, Merck&Co., Rahway, NJ(1992).

[0156] Betakova 等, J. Gen. Virol., 77 :2689(1996).

[0157] Bilsel 等, J. Virol., 67 :6762(1993).

[0158] Brassard 等, Virology, 220 :350(1996).

[0159] Bridgen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93 :15400(1996).

[0160] Castrucci 等, J. Virol., 66 :4647(1992).

[0161] Castrucci 等, J. Virol., 69 :2725(1995).

[0162] Cha 等, J. Clin. Microbiol., 38 :839(2000).

[0163] Corpet 等, Nucleic Acids Res., 16 :10881(1988).

[0164] Cox 等, Virology, 167 :554(1988).

[0165] Daniels 等, Cell, 40 :431(1985).

[0166] Dederá 等, J. Virol., 63 :3205(1989).

[0167] DuBridge 等, Mol. Cell Biol., 7 :379(1987).

[0168] Duff 等, FEBS Lett., 311 :256(1992).

[0169] Duff 等, Virology, 190 :485(1992).

[0170] Dunn 等, Virology, 211 :133(1995).

[0171] Edwards, J. Infect. Dis., 169, 68-76(1994).

- [0172] Enami 等, J. Virol., 65 :2711 (1991).
- [0173] Enami 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87 :3802 (1990).
- [0174] Enami 等, Virology, 185 :291 (1991).
- [0175] Ewald 等, J. Virol., 70 :7108 (1996).
- [0176] Ewart 等, J. Virol., 70 :7108 (1996).
- [0177] Fischer 等, Biochemistry, 39 :12708 (2000).
- [0178] Fischer 等, Eur. Biophys. J., 30 :416 (2001).
- [0179] Fodor 等, J. Virol., 73 :9679 (1999).
- [0180] Gao 等, J. Virol., 73 :3184 (1999).
- [0181] Goodman 等 (主编), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 8 版, Pergamon Press, Inc., Elmsford, NY (1990).
- [0182] Goto 等, Virology, 238 :265 (1997).
- [0183] Grambas 等, Virology, 190 :541 (1992).
- [0184] Grand 和 Skehel, Nature, New Biology, 238, 145-147 (1972).
- [0185] Hagen 等, J. Virol., 68 :1509 (1994).
- [0186] Hay 等, EMBO J., 4 :3021 (1985).
- [0187] Hay 等, 载于 Hannoun, C., Kendal, A. P., Klenk, H. D. 和 Ruben, F. L. (主编) Options for the control of influenza II. Excerpta Medica, Amsterdam, 第 281-288 页 (1993).
- [0188] Helenius, Cell, 69 :577 (1992).
- [0189] Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :10915 (1989).
- [0190] Higgins 等, Genes, 73 :237 (1988).
- [0191] Higgins 等, CABIOS 5 :151 (1989).
- [0192] Huang 等, CABIOS 8 :155 (1992).
- [0193] Herlocher 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6032 (1993).
- [0194] Hoffmann 等, J. Gen. Virol., 81 :2843 (2000).
- [0195] Hoffmann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 :11411 (2002).
- [0196] Holsinger 等, J. Virol., 68 :1551 (1994).
- [0197] Horimoto 等, J. Virol., 68 :3120 (1994).
- [0198] Horimoto 等, Virology, 206 :755 (1995).
- [0199] Horimoto 等, Virology, 213 :223 (1995).
- [0200] Hrabar 等, Dev. Biol. Stand., 39 :53 (1977).
- [0201] Jackson 等, J. Virol., 76 :11744 (2002).
- [0202] Kato 等, Virology, 37 :632 (1969).
- [0203] Katz 等, J. Virol., 64 :1808 (1990).
- [0204] Katzung (主编), Basic and Clinical Pharmacology, 第 5 版, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).
- [0205] Kawaoka 等, Virology, 139 :303 (1984).
- [0206] Keitel 等, 载于 Textbook of Influenza, Nickolson, K. G., Webster, R. G. 和 Hay,

- A. (主编) (Blackwell, Oxford), 第 373-390 页 (1998).
- [0207] Kilbourne, Bull. M2 World Health Org., 41, 653-645 (1969).
- [0208] Klimkait 等, J. Virol., 64 :621 (1990).
- [0209] Kobasa 等, J. Virol., 71 :6706 (1997).
- [0210] Lamb 等, 载于 Fields, B. N., Knipe, D. M. 和 Howley, P. M. (主编) Fields Virology, 第 3 版. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa, 第 1353-1395 页 (1996).
- [0211] Laver & Webster, Virology, 69, 511-522 (1976).
- [0212] Leahy 等, J. Virol., 71 :8347 (1997).
- [0213] Leahy 等, J. Virol., 71 :8352 (1997).
- [0214] Leahy 等, J. Virol., 72 :2305 (1998).
- [0215] Lear 等, Science, 240 :1177 (1988).
- [0216] Li 等, Virus Res., 37 :153 (1995).
- [0217] Luytjes 等, Cell, 59 :1107 (1989).
- [0218] Maassab 等, Rev. Med. Virol., 9 :237 (1991).
- [0219] Martin 等, Cell, 67 :117 (1991).
- [0220] Mena 等, J. Virol., 70 :5016 (1996).
- [0221] Mizrahi (主编), Viral Vaccines, Wiley-Liss, New York, 39-67 (1990).
- [0222] Murphy, Infect. Dis. Clin. Pract., 2, 174-181 (1993).
- [0223] Muster 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5177-5181 (1991).
- [0224] Myers 和 Miller, CABIOS 4 :11 (1988).
- [0225] Needleman 和 Wunsch, J. Mol. Biol., 48 :443 (1970).
- [0226] Neiryneck 等, Nat. Med., 5 :1157 (1999).
- [0227] Neumann 等, J. Virology., 71 :9690 (1997).
- [0228] Neumann 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 :9345 (1999).
- [0229] Neumann 等, Virol, 202 :477 (1994).
- [0230] Niwa 等, Gene, 108 :193 (1991).
- [0231] Obrosova-Serova 等, Vaccine, 8 :57 (1990).
- [0232] Ochman 等, Genetics, 120 :621 (1988).
- [0233] Ogra 等, J. Infect. Dis., 134, 499-506 (1977).
- [0234] Ohuchi 等, J. Virol., 68 :920 (1994).
- [0235] Osol (主编), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).
- [0236] Pearson 等, Meth. Mol. Biol., 24 :307 (1994).
- [0237] Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., 85 :2444 (1988).
- [0238] Perez 等, Virology, 249 :52 (1998).
- [0239] Piller 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 :111 (1996).
- [0240] Pinto 等, Cell, 69 :517 (1992).
- [0241] Pleschka 等, J. Virol., 70 :4188 (1996).
- [0242] Plugge 等, Science, 287 :1641 (2000).

- [0243] Robertson 等, Biologicals, 20, 213-220 (1992).
- [0244] Robertson 等, Giornale di Igiene e Medicina Preventiva, 29, 4-58 (1988).
- [0245] Roizman 等, 载于 Fields, B. N., Knipe, D. M. 和 Howley, P. M. (主编) Fields Virology, 第 3 版. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa, 第 101-111 页 (1996).
- [0246] Sansom 等, Protein Eng., 6:65 (1993).
- [0247] Schnell 等, EMBO J., 13:4195 (1994).
- [0248] Schubert 等, FEBS Lett., 398:12 (1996).
- [0249] Schubert 等, J. Virol., 69:7699 (1995).
- [0250] Sears 等, J. Infect. Dis., 158:1209 (1988).
- [0251] Shaw 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4879 (1983).
- [0252] Shaw 等, Virology, 139:178 (1984).
- [0253] Smith 等, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981).
- [0254] Skehel 等, J. Gen. Virol., 38:97 (1978).
- [0255] Steinhoff 等, J. Infect. Dis., 162:394 (1990).
- [0256] Steinhoff 等, J. Infect. Dis., 163:1023 (1991).
- [0257] Strebel 等, J. Virol., 63:3784 (1989).
- [0258] Strebel 等, Science 241:1221 (1988).
- [0259] Subbarao 等, J. Virol., 67, 7223-7228 (1993).
- [0260] Subbarao 等, J. Virol., 67:7223-7228 (1993).
- [0261] Sugrue 等, EMBO J., 9:3469 (1990).
- [0262] Sugrue 等, Virology, 180:617 (1991).
- [0263] Sunstrom 等, J. Membr. Biol., 150:127 (1996).
- [0264] Takeda 等, J. Virol., 76:1391 (2002).
- [0265] Takeuchi 等, J. Virol., 68:911 (1994).
- [0266] Terwilliger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5163 (1989).
- [0267] Tomoda 等, Vaccine, 13:185 (1995).
- [0268] Tosteson 等, Biosci. Rep., 8:173 (1988).
- [0269] Tosteson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:707 (1989).
- [0270] Wang 等, J. Virol., 67:5585 (1993).
- [0271] Watanabe 等, J. Virol., 75:5656 (2001).
- [0272] Weber 等, Arch. Virol, 142:1029 (1997).
- [0273] Weber 等, J. Virol., 70:8361 (1996).
- [0274] Wharton 等, EMBO J., 14:240 (1995).
- [0275] Williams 等, Mol. Cell. Biol., 6:4317 (1986).
- [0276] Williams 等, Mol. Cell. Biol., 8:1186 (1988).
- [0277] World Health Organization TSR No. 673 (1982).
- [0278] Wright 等, J. Infect. Dis., 146:71 (1982).
- [0279] Yasuda 等, J. Virol., 68:8141 (1994).

[0280] Zebedee 等, J. Viro., 62 :2762 (1988).

[0281] Zhirnov 等, J. Gen. Viro., 65 :1127 (1984).

[0282] Zhirnov, Virology, 176 :274 (1990).

[0283] 所有出版物、专利和专利申请都通过引用结合到本文中。尽管在上述说明书中已经用某些优选实施方案描述了本发明,而且为了说明目的,给出了大量细节,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不偏离本发明基本原则的情况下,本发明允许其它的实施方案并且可以对某些本文描述的细节进行各种修改。

序列表

<110>Kawaoka, Yoshihiro

WARF-Wisconsin Alumni Research Foundation

<120> 编码突变膜蛋白的病毒

<130>800. 036US1

<150>US 60/464, 776

<151>2003-04-23

<150>US 60/465, 328

<151>2003-04-24

<160>29

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>2396

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>1

```

agcagaagcg gagcgttttc aagatgacgt tggctaaaat tgaactacta aagcagctgt      60
taagggacaa tgaagccaaa acgggtgttga gacagacaac ggtagaccaa tacaacataa     120
taagaaaatt caatacatca agaattgaaa agaacccttc attaagaatg aagtgggcca     180
tgtgtttccaa tttttccctta gctctgacca agggtgatat ggcaaatcga atcccccttg     240
aatacaaggg aatacaactt aaaacaaatg ctgaagacat aggaactaaa ggacaaatgt     300
gttcaatagc agcagttacc tgggtggaata catatgggcc cataggggat actgaagggt     360
ttgaaaaggt ctacgaaagc ttttttctca gaaagatgag acttgacaat gccacttggg     420
gccgaatgac ctttggccct gttgagagag taagaaaaag agtactacta aacccegetca     480
ccaaggaaat gccccagat gaagcgagca atgtaataat ggaaatatta ttccctaaag     540
aagcaggaat accaagagaa tctacttggga tacatagaga actgataaaa gaaaaaagag     600
aaaaattgaa gggaacgatg ataactccca ttgtactggc atacatgctt gagagagaac     660
tagttgcccc aagaaggttc ctgccagtag caggagcaac atcagcagag ttcatagaaa     720
tgctacattg cttacaaggt gaaaattgga gacaaatata tcatccagga gggaataaac     780
taactgaatc tagatctcaa tcaatgattg tagcttgcag gaagataatc agaagatcaa     840

```

tagttgcatc	aaaccacta	gagctagctg	tagagattgc	aaataagact	gtgatagaca	900
ctgaaccttt	aaagtcatgt	ctggcagccc	tagatggagg	tgatgtagcc	tgtgacataa	960
taagagctgc	attaggatta	aaaattagac	aaagacaaag	atttgggaga	cttgaactaa	1020
agagaatatc	agggagagga	ttcaaaaatg	atgaagagat	attaatcggg	aacggaacaa	1080
tacaaaagat	tggaatatgg	gacggagaag	aggaattcca	tgtaagatgt	ggtgaatgca	1140
gggggatatt	gaaaaaaagc	aaaatgagaa	tggaaaaact	actgataaat	tcagccaaaa	1200
aggaggacat	gaaagattta	ataatcttat	gcatggtatt	ttctcaagac	accaggatgt	1260
tccaaggagt	gagaggagag	ataaattttc	ttaatcgagc	aggccaactt	ttatccccc	1320
tgtaccaact	ccaacgatac	tttttgaata	ggagcaatga	cctttttgat	caatggggat	1380
atgaggaatc	acctaaagca	agtgagctac	atgggataaa	tgaattaatg	aatgcatctg	1440
actatacatt	gaaaggggtt	gtagtaacaa	aaaatgtgat	tgatgatttt	agttctactg	1500
aaacagaaaa	agtatctata	acaaaaaatc	ttagtttaat	aaaaaggact	ggggaagtta	1560
taatgggagc	caatgacgta	agtgaattag	aatcacaagc	acagctaata	ataacgtatg	1620
atacacccaa	gatgtgggaa	atgggaacaa	ccaaagaact	ggtacaaaac	acttaccat	1680
gggtgcttaa	aaatttagta	acattgaagg	ctcagtttct	tttgggaaaa	gaagacatgt	1740
tccaatggga	tgcatttgaa	gcatttgaaa	gcataatccc	tcagaagatg	gctggtcagt	1800
acagtggatt	tgcaagagca	gtgctcaaac	aaatgagaga	ccaagagggt	atgaaaactg	1860
accaattcat	aaaattgttg	cctttctgtt	tttcgccacc	aaaattaagg	agcaatggag	1920
agccttatca	atTTTTgagg	cttatgctga	aaggaggagg	ggaaaatttc	atcgaagtaa	1980
ggaaagggtc	ccccttgttc	tcctacaatc	cacaaacgga	aatcctaact	atatgcggca	2040
gaatgatgtc	attaaaagga	aaaattgagg	atgaagaaag	aaatagatca	atggggaatg	2100
cagtactggc	aggctttctt	gtagtgga	aatatgaccc	agatcttgga	gatttcaaaa	2160
ccattgagga	acttgaaaga	ctaaaaccgg	gagaaaaagc	caacatctta	ctttaccaag	2220
gaaagccgt	taaagtagtt	aaaaggaaaa	gatatagtgc	tttatccaat	gatatttcac	2280
aagggattaa	gagacaaaga	atgacagttg	agtccatggg	gtgggccttg	agctaataata	2340
aatttatcca	tcaattcaat	aaatacaatt	gagtgaaaaa	tgctcgtggt	tctact	2396

<210>2

<211>2368

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>2

agcagaagcg	gagctttaag	atgaatataa	atccatattt	tcttttcata	gatgtaccta	60
tacaggcagc	aatttcaaca	acattcccat	acaccggtgt	tcccccttat	tctcatggaa	120
cggaacagg	ctacacaata	gacaccgtga	ttagaacaca	cgagtactca	aacaagggaa	180
aacaatacat	ttctgatggt	acaggatgtg	taatggtaga	tccaacaaat	gggccattac	240
ccgaagacaa	tgaaccgagt	gcctatgcac	aattggattg	tgttctggag	gctttggata	300
gaatggatga	agaacatcca	ggtctgtttc	aagcagcctc	acagaatgcc	atggaggcac	360

taatggtcac aacagtggac aaattgactc aggggagaca gacctttgat tggacggtgt	420
gtagaaacca acctgctgca acggcactga acacaacaat aacctctttt aggttgaatg	480
atlttaaatgg agccgacaag ggtggattag tgcctttttg ccaagatatac attgattcat	540
tagacaaacc tgaaatgatt ttcttctcag taaagaatat aaagaaaaaa ttgcctgcta	600
aaaacagaaa gggtttccctt ataaaaagaa tacctatgaa ggtaaaagac agaataacaa	660
gagtgggaata catcaaaaga gcattatcat taaacacaat gactaaagat gctgaaagag	720
gcaaaactaaa aagaagagca attgccaccg ctgggataca aatcagagga tttgtattag	780
tagttgaaaa cttggctaaa aatatctgtg aaaatctaga gcaaagtggg ttacccttag	840
gtgggaacga aaagaaggcc aaactatcaa atgcagtggc taaaatgctc agtaattgtc	900
caccaggagg gatcagtatg actgtgacag gagacaatac taaatggaat gaatgcttaa	960
atccaagaat ctttttggct atgactgaaa gaataaccag agacagccca atttggttcc	1020
gggatttttg tagtatagca ccggtcttgt tctccaataa aatagctaga ttgggaaaag	1080
ggttcatgat aacaagtaaa acaaaaagac taaaagctca aataccttgt cccgatctgt	1140
ttaatatacc attagaaaga tataatgaag aaacaagggc aaaactgaaa aagctaaaac	1200
ctttcttcaa tgaagaagga acggcatctc tttcgccagg aatgatgatg ggaatgttta	1260
atatgctatac tacagtatta ggagtagccg cactagggat aaaaaacatt ggaacaaag	1320
aatacttatg ggatggactg cagtcttccg atgattttgc tctgtttgtt aatgcaaaag	1380
atgaagagac atgtatggaa ggaataaacg atttttaccg aacatgtaag ctattgggaa	1440
taaacatgag caaaaagaaa agttactgta atgaaactgg gatgtttgaa tttaccagca	1500
tgttttacag agatggattt gtatctaatt ttgcaatgga actcccttca tttggagtgc	1560
ctggagtgaa tgaatcagca gacatggcaa taggaatgac aataataaag aacaatatga	1620
tcaacaatgg gatgggcca gcaacggcac aaacagccat acaattattc atagctgatt	1680
atagatacac ctacaaatgc cacaggggag attccaaagt ggaagggaag agaataaaaa	1740
ttataaagga gctatgggaa aacactaaag gaagagatgg tctattagta gcagatggtg	1800
ggcctaattct ttacaatttg agaaacctgc atattccaga aatagtatta aaatacaaca	1860
taatggacce tgagtacaaa ggacggttac tgcatacctca aaatcccttt gtaggacatt	1920
tgtctattga gggatcaaaa gaagcagata taacacctgc acatggccca ataaagaaaa	1980
tggactacga tgcggtatct ggaactcata gttggagaac caaaaggaac agatctatac	2040
taaactactga tcagaggaac atgattcttg aggaacaatg ctacgctaag tgttgcaacc	2100
tttttgagge ttgctttaac agtgcgctcat acaggaaacc agtaggccag cacagcatgc	2160
ttgaagctat ggcccacaga ttaagaatgg atgcacgact ggactatgag tcaggaagga	2220
tgtcaaaaaga ggatttcgaa aaagcaatgg ctacaccttg tgagattggg tacatgtaag	2280
ctccggaat gtctatgggg ttatttggtca tegtgaata catgctggtgc acaaatgatt	2340
aaaatgaaaa aaggctcgtg tttctact	2368

<210>3

<211>2307

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>3

agcagaagcg	gtgcgtttga	tttgccacaa	tggatacttt	tattacaaag	aatttccaga	60
ctacaataat	acaaaaggcc	aaaaacacaa	tggcagaatt	tagtgaagat	cctgaattac	120
agccagcagt	actattcaac	atctgcgtcc	atctggaggt	ctgctatgta	ataagtgata	180
tgaactttct	tgatgaggaa	ggaaagacat	atacagcatt	agaaggacaa	ggaaaagagc	240
aaaatltgag	accacagtat	gaagtgattg	agggaatgcc	aagaaacata	gcatggatgg	300
ttcaaagatc	cttagcccaa	gagcatggaa	tagagactcc	aaggtatctg	gctgatttat	360
ttgattataa	aaccaagagg	tttatcgaag	tccgagtaac	aaagggattg	gctgatgatt	420
acttttggaa	aaagaaagaa	aagttgggga	atagcatgga	actgatgata	ttcagctata	480
atcaagacta	ctcgttaagt	gatgaatctt	cattggatga	ggaaggaaaa	gggagagtgc	540
taagcagact	cacagaactt	caggctgagt	taagttttaa	aaacctatgg	caagttctaa	600
taggggaaga	agaaattgaa	aaaggaattg	acttcaaact	tggacaaaca	atatctaaac	660
tgagggatat	atctgttcca	gctggtttct	ccaatlttga	agggatgaga	agttacatag	720
acaacataga	ccctaaagga	gcaatagaga	gaaatctagc	aaggatgtct	cccttagtat	780
cagttacacc	caaaaagttg	aaatgggagg	acctgagacc	catagggcct	cacatttaca	840
accatgagct	accagaagtt	ccatataatg	cctttctcct	catgtctgat	gagttggggc	900
tggccaatat	gactgaagga	aagtccaaga	aaccgaagac	cttagctaag	gaatgtctag	960
aaaggtatc	aacactacgt	gatcaaactg	acccaatatt	gataatgaaa	agcgaaaaag	1020
ctaacgaaaa	cttcttatgg	aggttatgga	gggactgtgt	aaatacaata	agcaatgagg	1080
aaacaggcaa	cgaattacag	aaaaccaatt	atgccaagtg	ggccacagga	gatggactaa	1140
catacaaaaa	aataatgaaa	gaagtagcaa	tagatgacga	aacgatgtac	caagaagaac	1200
ccaaaatacc	caataaatgt	agagtggctg	cttgggttca	ggcagagatg	aatctactga	1260
gtactctgac	aagtaaaagg	gccctggatc	tgccagaaat	agggccagat	gtagcacccg	1320
tggagcatgt	agggagtgaa	agaaggaaat	actttgttaa	tgaaatcaac	tactgtaaag	1380
cctctacagt	tatgatgaag	tatgtacttt	ttcacacttc	attattaaat	gaaagcaatg	1440
ctagtatggg	aaaatataaa	gtaataccaa	tcaccaacag	agtggtaaat	ggaaaagggg	1500
aaagctttga	catgctttat	ggtctggcgg	ttaaggggca	atctcatttg	cggggggaca	1560
cggatgttgt	aacagttgtg	actttcgagt	ttagtagtac	agatcctaga	gtggactcag	1620
gaaagtggcc	aaaatatact	gtctttaaaa	tggctccct	atltgtgagt	ggaagagaaa	1680
aacctgtgta	cctatattgc	cgagtgaatg	gtacaaacaa	aatccaaatg	aaatggggaa	1740
tggaagctag	aagatgtctg	cttcaatcaa	tgcaacaaat	ggaggcaatt	gttgatcaag	1800
aatcatcgat	acaagggtat	gatatgacca	aagcttgttt	caaggagac	agagtgaata	1860
atcccaaaac	tttcagtatt	gggactcagg	aaggcaaaact	agtaaaaagg	tcctttggga	1920
aagcactaag	agtaatatc	accaaatggt	tgatgcatta	tgtatlttga	aatgctcaat	1980
tggaggggtt	tagtgccgaa	tctaggagac	ttctactgtt	aattcaggca	ttaaaagaca	2040
ggaagggcc	ttgggtatlt	gacttagagg	gaatgtactc	tggagtagag	gaatgtatta	2100
gtaacaatcc	ttgggtaata	cagagtgcatt	actgglttaa	tgaatggltg	ggcattgaaa	2160
aagaaggaag	taaagtgtta	gaatcaatag	atgaaataat	ggatgaatga	acgaagggca	2220

tagcgctcaa tttagtacta ttttgttcat tatgtattta aacatccaat aaaagaattg	2280
agaattaaata atgcacgtgt ttctact	2307

<210>4

<211>1882

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>4

agcagaagcg ttgcattttc taatatccac aaaatgaagg caataattgt actactcatg	60
gtagtaacat ccaatgcaga tcgaatctgc actgggataa catcgtcaaa ctcacctcat	120
gtggttaaaa ctgccactca aggggaagtc aatgtgactg gtgtgatacc actaacaaca	180
acacctacta gatctcattt tgcaaatctc aaaggaacac agaccagagg aaaactatgc	240
ccaaactggt ttaactgcac agatctggac gtggccttgg gcagacccaaa atgcatgggg	300
aacatacctt ccgcaaaagt ctcaatactc catgaagtca aacctgttac atctggatgc	360
tttctataa tgcacgacag aacaaaaate agacaactac ctaatcttct cagaggatat	420
gaaaacatca ggttatcaac cagtaatggt atcaatacag agacggcacc aggaggaccc	480
tacaaggtgg ggacctcagg atcttgcctt aacgttacta atgggaacgg cttcttcaac	540
acaatggctt gggttatccc aaaagacaac aacaagatag caataaatcc agtaacagta	600
gaagtaccat acatttgttc agaaggggaa gaccaaaata ctgtttgggg gtccactct	660
gatgacaaaa cccaaatgga aagactctat ggagactcaa atcctcaaaa gttcacctca	720
tctgccaatg gagtaaccac acattatggt tctcagattg gtggcttccc aatcaaaaca	780
gaagacgaag ggctaaaaca aagcggcaga attgttgttg attacatggt acaaaaacct	840
ggaaaaacag gaacaattgt ttatcaaaga ggcattttat tgcctcaaaa agtgtggtgc	900
gcaagtggca ggagcaaggt aataaaaggg tccttgcctt taattggtga agcagattgc	960
ctccacgaaa agtacgggtg attaaataaa agcaagcctt actacacagg agagcatgca	1020
aaggccatag gaaattgccc aatatgggtg aaaacaccct tgaagctggc caatggaacc	1080
aaatatagac cgcctgcaaa actattaaag gaaagagggt tcttcggagc tattgctggt	1140
ttcttgggaag gaggatggga aggaatgatt gcaggttggc acggatacac atctcatgga	1200
gcacatggag tggcagtggc agcagacctt aagagtacac aagaagctat aaacaagata	1260
acaaaaaate tcaactcttt aagtgagcta gaagtaaaaa accttcaaag actaagcgga	1320
gcaatgaatg agcttcacga cgaaatactc gagctagacg aaaaagtgga tgatctaaga	1380
gctgatacaa taagcccaca aatagagctt gcagtcttgc tttccaacga agggataata	1440
aacagtgaag atgagcatct tttggcactt gaaagaaaaac tgaagaaaat gctgggcccc	1500
tctgctgtag aatatgggaa tgggtgcttt gaaaccaaac acaaatgcaa ccagacttgc	1560
ctagacagga tagctgctgg cacctttaat gcaggagatt tttctcttcc cacttttgat	1620
tcattaaaca ttactgctgc atctttaaata gatgatggct tggataatca tactatactg	1680
ctctactact caactgctgc ttctagcttg gctgtaacat tgatgatage tatcttcatt	1740
gtctacatgg tctccagaga caatgtttct tgttccatct gtctgtgagg gagattaage	1800

cctgtgtttt cctttactgt agtgetcatt tgcttgtcac cattacaaag aaacgttatt 1860
gaaaaatgct cttgttacta ct 1882

<210>5

<211>1557

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>5

agcagaagca gagcatatc ttagaactga agtgaacagg ccaaaaatga acaatgctac 60
cttcaactgt acaaacatta accctattac tcacatcagg gggagtatta ttatcactat 120
atgtgtcagc ctcatgtca tacttattgt attcggatgt attgctaaaa ttttcatcaa 180
caaaaacaac tgcaccaaca atgtcattag agtgcacaaa cgcatcaaat gccagactg 240
tgaaccattc tgcaacaaaa gagatgacat ttccaccccc agagccggag tggacatacc 300
ctcgtttatc ttgccagggc tcaaccttcc agaaggcact cctaattagc cctcataggt 360
tcggagagat caaaggaaac tcagctccct tgataataag agaacctttt gttgcttgtg 420
gaccaaaga atgcagacac tttgctctga cccattatgc agctcagccg gggggatact 480
acaatggaac aagaaaggac agaaacaagc tgaggcatct agtatcagtc aaattgggaa 540
aaatcccaac tgtggaaaac tccattttcc acatggcagc ttggagcgga tccgcatgcc 600
atgatggtag agaatggaca tatatcggag ttgatggctc tgacaatgat gcattgggtca 660
aaataaaata tggagaagca tatactgaca catatcattc ctatgcacac aacatcctaa 720
gaacacaaga aagtgcctgc aattgcatcg ggggagattg ttatcttatg ataacagacg 780
gctcagcttc aggaattagt aaatgcagat ttcttaaaat tagagagggt cgaataataa 840
aagaaatact tccaacagga agagtggagc aactgaaga gtgcacatgc gggttcgcca 900
gcaataaaac catagaatgt gcctgtagag acaacagtta cacagcaaaa agacccttg 960
tcaaattaaa tgtggaaact gatacagctg aaataagatt gatgtgcaca aagacttacc 1020
tggacactcc cagaccgat gatggaagca tagcagggcc ttgcgaatct aatggagaca 1080
agtggtcttg aggcacaaa ggaggatttg tccatcaaag aatggaatct aagattggaa 1140
gatggtactc ccgaacgatg tctaaaacta acagaatggg gatggaactg tatgtaaagt 1200
atgatggtga cccatggact gacagtgatg ctcttactct tagtggagta atggtttcca 1260
tagaagaacc tggttggtat tcttttggtc tcgaaataaa ggacaagaaa tgtgatgtcc 1320
cttgtattgg gatagagatg gtacacgatg gtggaaaaga tacttggcat tcagctgcaa 1380
cagccattta ctggttgatg ggctcaggac aattgctatg ggacactgtc acagcgcttg 1440
atatggcttt ataataagagg aatggttgga tctgttctaa accctttggt cctattttat 1500
ttgaacagtt gttcttacta gatttaattg tttctgaaaa atgctcttgt tactact 1557

<210>6

<211>1841

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>6

agcagaagca cagcattttc ttgtgagctt cgagcactaa taaaactgaa aatcaaaaatg	60
tccaacatgg atattgacag tataaatacc ggaacaatcg ataaaacacc agaagaactg	120
actcccggaa ccagtggggc aaccagacca atcatcaagc cagcaaccct tgctccgcca	180
agcaacaaac gaacccgaaa tccatcccca gaaaggacaa ccacaagcag tgaaccaat	240
atcgggaagga aatccaaaa gaaacaaacc ccaacagaga taaagaagag cgtctacaac	300
atggtggtaa aactgggtga attctacaac cagatgatgg tcaaagctgg acttaatgat	360
gacatggaaa ggaatctaata ccaaaatgca caagctgtgg agagaatcct attggctgca	420
actgatgaca agaaaactga ataccaaaag aaaaggaatg ccagagatgt caaagaaggg	480
aaagaagaaa tagaccacag caagacagga ggcacctttt ataagatggg aagagatgat	540
aaaaccatct acttcagccc tataaaaatt acctttttta aagaagaggg gaaaacaatg	600
tataagacca ccatggggag tgatggtttc agtggactaa atcacattat gattggacat	660
tcacagatga acgatgtctg tttccaaaga tcaaaggcac tgaaaagggt tggacttgac	720
ccttcattaa tcagtacttt tgccggaagc aactaccca gaagatcagg tacaactggg	780
gttgcaatca aaggaggtgg aacttttagtg gcagaagcca tccgatttat aggaagagca	840
atggcagaca gagggctact gagagacatc aaggccaaga cggcctatga aaagattcct	900
ctgaatctga aaaacaagtg ctctgcgctt caacaaaagg ctctagtga tcaagtgatc	960
ggaagtagga acccagggat tgcagacata gaagacctaa ctctgcttgc cagaagcatg	1020
gtagttgtca gaccctctgt agcgagcaaa gtggtgcttc ccataagcat ttatgctaaa	1080
atacctcaac taggattcaa tategaagaa tactctatgg ttgggtatga agccatggct	1140
ctttataata tggcaacacc tgtttccata ttaagaatgg gagatgacgc aaaagataaa	1200
tctcaactat tcttcatgtc gtgcttcgga gctgcctatg aagatctaag agtgttatct	1260
gcactaacgg gcaccgaatt taagcctaga tcagcactaa aatgcaaggg tttccatgct	1320
ccggctaagg agcaagtaga aggaatgggg gcagctctga tgtccatcaa gcttcagttc	1380
tgggccccaa tgaccagatc tggagggaaat gaagtaagtg gagaaggagg gtctgggtcaa	1440
ataagttgca gccctgtggt tgcagtagaa agacctattg ctctaagcaa gcaagctgta	1500
agaagaatgc tgtcaatgaa cgttgaagga cgtgatgcag atgtcaaagg aaatctactc	1560
aaaatgatga atgattcaat ggcaaaagaaa accagtggaa atgctttcat tgggaagaaa	1620
atgtttcaaa tatcagacaa aaacaaagtc aatcccattg agattccaat taagcagacc	1680
atcccgaatt tcttctttgg gagggacaca gcagaggatt atgatgacct cgattattaa	1740
agcaataaaa tagacactat ggctgtgact gtttcagtac gtttgggatg tgggtgttta	1800
ctcttattga aataaatgta aaaaatgctg ttgtttctac t	1841

<210>7

<211>1191

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>7

agcagaagca cgcactttct taaaatgtcg ctgtttggag acacaattgc ctacctgctt	60
tcactaatag aagatggaga aggcaaagca gaactagctg aaaaattaca ctgttggttc	120
ggtgggaaag aatttgacct agattctgct ttggaatgga taaaaaaca aaggtgccta	180
actgatatac aaaaagcact aattgggtgcc tctatatgct ttttaaaacc caaagaccaa	240
gaaagaaaaa ggagattcat cacagagccc ctgtcaggaa tgggaacaac agcaacaaag	300
aagaaaggcc taattctagc tgagagaaaa atgagaagat gtgtaagctt tcatgaagca	360
tttgaaatag cagaaggcca cgaaagctca gcattactat attgtcttat ggtcatgtac	420
ctaaaccctg aaaactatc aatgcaagta aaactaggaa cgctctgtgc tttatgagag	480
aaacaagcat cgcactcgca tagagcccat agcagagcag caaggtcttc ggtacctgga	540
gtaagacgag aatgcagat ggtttcagct atgaacacag caaagacaat gaatggaatg	600
ggaaaggag aagacgtcca aaaactagca gaagagctgc aaaacaacat tggagtgttg	660
agatctctag gagcaagtca aaagaatgga gaaggaattg ccaaagatgt aatggaagtg	720
ctaaaacaga gctctatggg aaattcagct cttgtgagga aatacttata atgctcgaac	780
cacttcagat tctttcaatt tgtttttca ttttatcagc tctccatttc atggcttggg	840
caatagggca tttgaaatcaa ataagaagag gggtaaacct gaaaatacaa ataaggaatc	900
caaataagga ggcaataaac agagaggtgt caattctgag acacaattac caaaaggaaa	960
tccaagccaa agaaacaatg aagaaaatac tctctgacaa catggaagta ttgggtgacc	1020
acatagtagt tgaagggtct tcaactgatg agataataaa aatgggtgaa acagttttgg	1080
aggtggaaga attgcaatga gcccaatctt cactgtatctt cttactatgc atttaagcaa	1140
attgtaatca atgtcagtgata ataaaactgg aaaaagtgcg ttgtttctac t	1191

<210>8

<211>1096

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>8

agcagaagca gaggatttat ttagtcactg gcaaacggaa agatggcgga caacatgacc	60
acaacacaaa ttgaggtggg tccgggagca accaatgcca ctataaactt tgaagcagga	120
attctggagt gctatgaaag gttttcatgg caaagagccc ttgactatcc tggcaagac	180
cgcctacaca gactaaaacg aaaattagaa tcaagaataa agactcaca caagagtgag	240
cctgagaata aaaggatgtc tcttgaagag agaaaagcaa ttggggtaaa aatgatgaaa	300
gtgcttctgt ttatggatcc ctctgctgga attgaagggt ttgagccata ctgtgtgaaa	360
aatccctcaa ctagcaaatg tccaaattac gattggaccg attaccctcc aaccccagga	420
aagtaccttg atgacataga agaagagccg gaaaatgtcg atcacccaat tgaggtagta	480
ttaagggaca tgaacaataa agatgcacga caaaagataa aggatgaagt aaacactcag	540
aaagagggga aattccattt gacaataaaa agggatatac gtaatgtgtt gtccttgaga	600

gtgttggtga acggaacctt cctcaagcac cetaatggag acaagtcctt atcaactctt	660
catagattga atgcatatga ccagaatgga gggcttggtg ctaaacttgt tgctactgat	720
gatcttacag tggaggatga aaaagatggc catcggatcc tcaactcact cttcgagcgt	780
tttgatgaag gacattcaaa gccaattega gcagctgaaa ctgcggtggg agtcttatcc	840
caatttggtc aagagcaccg attatcacca gaagagggag acaattagac tggccacgga	900
agaactttat ctcttgagta aaagaattga tgatagtata ttgttccaca aaacagtaat	960
agctaacagc tccataatag ctgacatgat tgtatcatta tcattactgg aaacattgta	1020
tgaaatgaag gatgtggttg aagtgtacag caggcagtgc ttatgaatgt aaaataaaaa	1080
tcctcttggt actact	1096

<210>9

<211>14

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400>9

Asn Lys Arg Asp Asp Ile Ser Thr Pro Arg Ala Gly Val Asp

1 5 10

<210>10

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>10

gggttattgg agacgtacc gtctctctccc ccc 33

<210>11

<211>33

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>11
ggggggagga gacggtaccg tctccaataa ccc 33

<210>12
<211>17
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>
<221> 其他特征
<222>11
<223>N = A、T、G 或 C

<400>12
ttttgctccc ngagacg 17

<210>13
<211>17
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>
<221> 其他特征
<222>7
<223>n = A、T、G 或 C

<400>13
cgtctcnggg agcaaaa 17

<210>14
<211>11
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>14

tattagtaga a 11

<210>15

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>15

gggagcaaaa 10

<210>16

<211>15

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>16

gggttattag tagaa 15

<210>17

<211>15

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>17

ttctactaat aacce 15

<210>18

<211>13

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>18

ttttgctccc ccc 13

<210>19

<211>13

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>19

ggggggagca aaa 13

<210>20

<211>22

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>20

gccaaaaatg aacaatgcta cc 22

<210>21

<211>11

<212>DNA

<213> 流感病毒 B/Lee/40

<400>21

ctaaaatttt a 11

<210>22

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>22

gccaaaagcg aacaatgcta cc 22

<210>23

<211>11

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>23

cttaaatttt a 11

<210>24

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>24

gccaaaagcg acaatgctac c 21

<210>25

<211>11

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>25

cttaaatttt a 11

<210>26

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>26

gccaaaagcg aaacaatgct acc 23

<210>27

<211>11

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400>27

cttaaatttt a 11

<210>28

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 其他特征

<222>7

<223>N = A、T、G 或 C

<400>28

cgtctentat tagtagaa 18

<210>29

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 其他特征

<222>12

<223>N = A、T、G 或 C

<400>29

ttctactaat angagacg 18

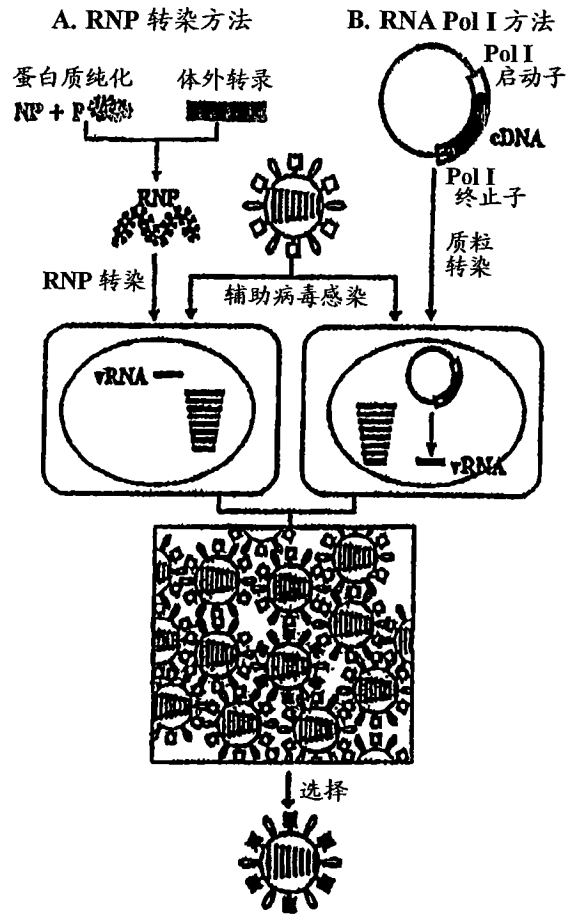


图 1

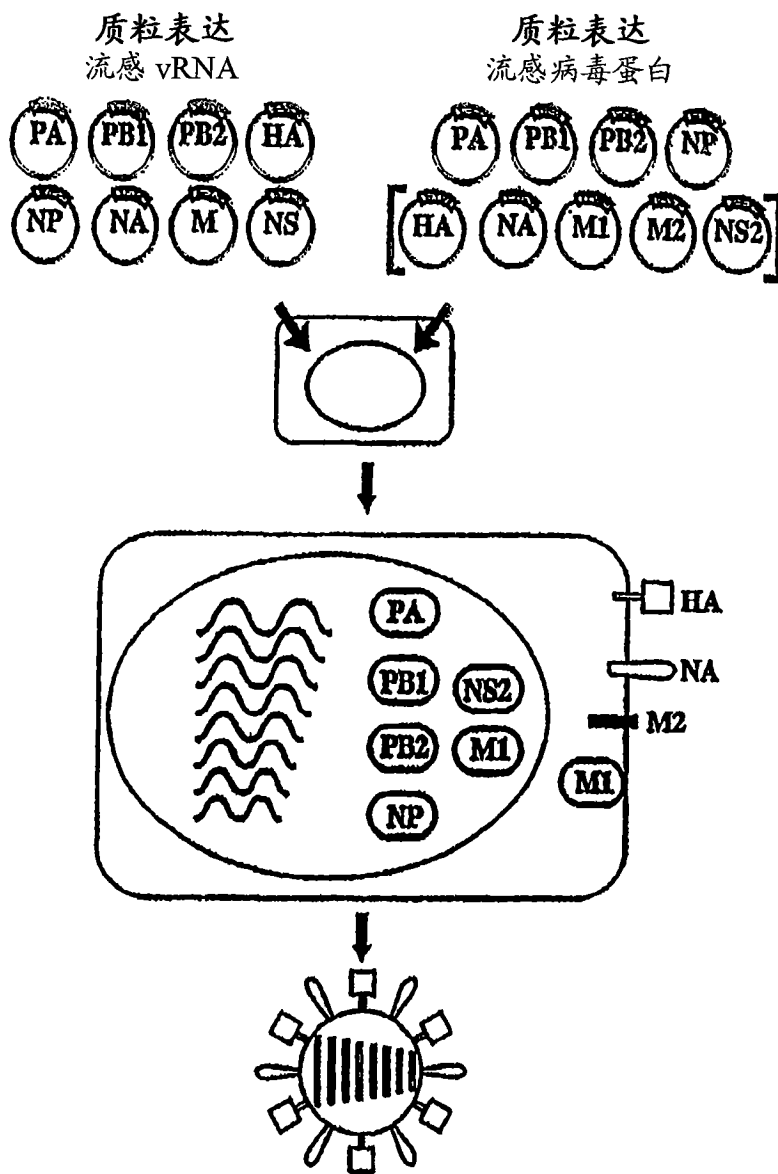


图 3

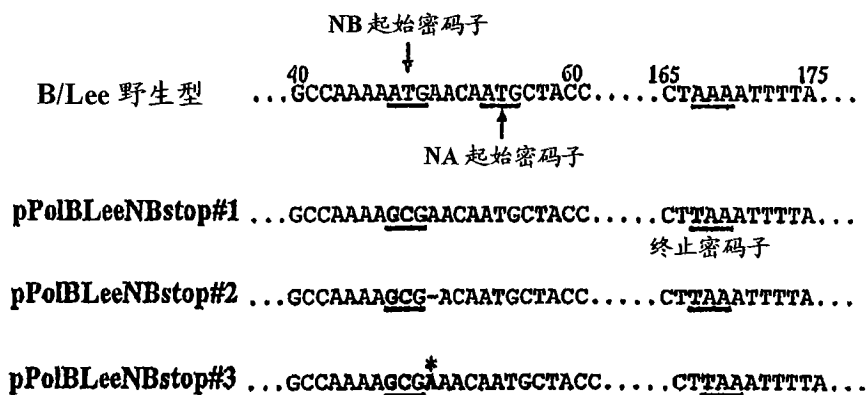


图 4

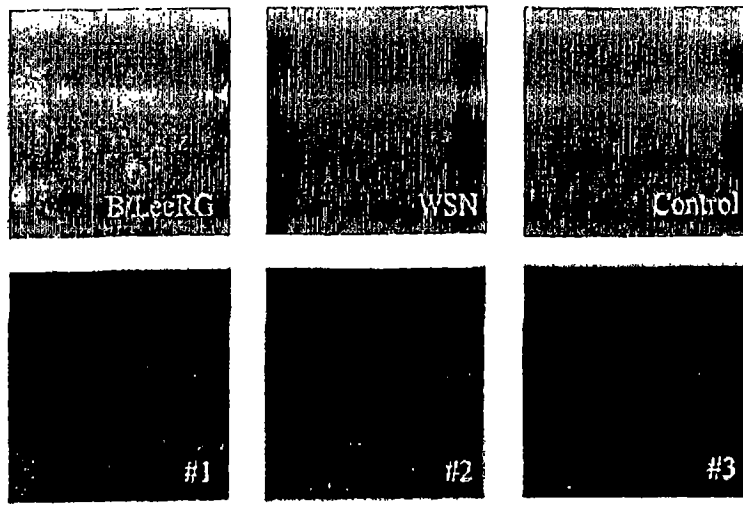


图 5A

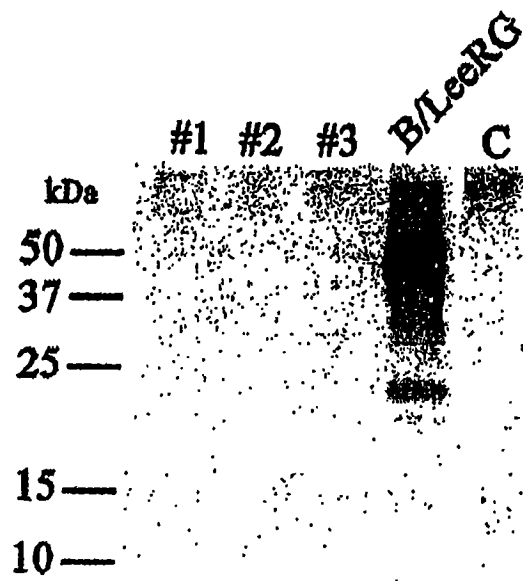


图 5B

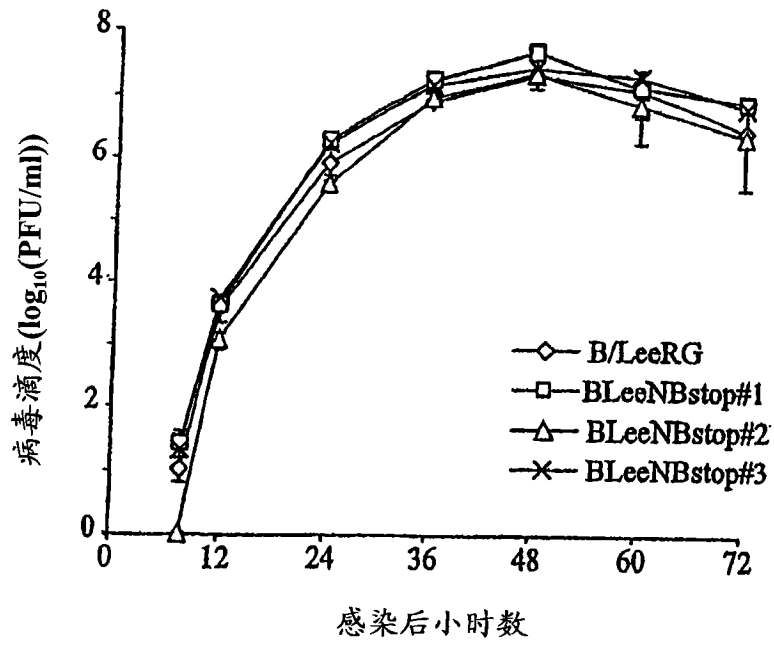


图 6

B/Lee
 >PB2
 AGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAGATGACGTTGGCTAAAATTGAACTACTAAAGCAGCTGTTA
 AGGGACAA
 TGAAGC
 CAAA
 ACGGTGTTGAGACAGACAACGGTAGACCAATACAACATAATAAGAAAATTCAATACATCAAG
 AATTGAAA
 AGAACC
 CTTC
 ATTAAGAATGAAGTGGGCCATGTGTTCCAATTTCCCTTAGCTCTGACCAAGGGTGATATGG
 CAAATCGA
 ATCCCC
 TTGG
 AATACAAGGGAATACAACCTAAAACAAATGCTGAAGACATAGGAACTAAAGGACAAATGTGTT
 CAATAGC
 AGCAGT
 TACC
 TGGTGAATACATATGGGCCCATAGGGGATACTGAAGGGTTTGAAAAGGTCTACGAAAGCTT
 TTTTCTCA
 GAAAGA
 TGAG
 ACTTGACAATGCCACTTGGGGCCGAATGACCTTTGGCCCTGTTGAGAGAGTAAGAAAAAGA
 GTACTACTA
 AACCCG
 CTCA
 CCAAGGAAATGCCCCAGATGAAGCGAGCAATGTAATAATGGAAATATTATCCCTAAAGAA
 GCAGGAAT
 ACCAAG
 AGAA
 TCTACTTGGATACATAGAGAACTGATAAAAGAAAAAGAGAAAAATTGAAGGGAACGATGATA
 ACTCCCA
 TTGTAC
 TGGC

图 7

ATACATGCTTGAGAGAGAACTAGTTGCCCGAAGAAGGTTCCCTGCCAGTAGCAGGAGCAACA
 TCAGCAGAG
 TTCATA
 GAAA

TGCTACATTGCTTACAAGGTGAAAAATTGGAGACAAATATATCATCCAGGAGGGAATAAACTAA
CTGAATC
TAGATC
TCAA
TCAATGATTGTAGCTTGCAGGAAGATAATCAGAAGATCAATAGTTGCATCAAACCCACTAGA
GCTAGCTG
TAGAGA
TTGC
AAATAAGACTGTGATAGACACTGAACCTTTAAAGTCATGTCTGGCAGCCCTAGATGGAGGTG
ATGTAGCC
TGTGAC
ATAA
TAAGAGCTGCATTAGGATTAATAATTAGACAAAGACAAAGATTTGGGAGACTTGAACATAAAGA
GAATATC
AGGGAG
AGGA
TTCAAAAATGATGAAGAGATATTAATCGGAAACGGAACAATACAAAAGATTGGAATATGGGAC
GGAGAAG
AGGAAT
TCCA
TGTAAGATGTGGTGAATGCAGGGGGATATTGAAAAAAGCAAAATGAGAATGGAAAACTAC
TGATAAAT
TCAGCC
AAAA
AGGAGGACATGAAAGATTTAATAATCTTATGCATGGTATTTTCTCAAGACACCAGGATGTTCC
AAGGAGT
GAGAGG
AGAG
ATAAATTTTCTTAATCGAGCAGGCCAACTTTTATCCCCATGTACCAACTCCAACGATACTTTT
TGAATA
GGAGCA
ATGA
CCTTTTTGATCAATGGGGATATGAGGAATCACCTAAAGCAAGTGAGCTACATGGGATAAATG
AATTAATG
AATGCA
TCTG

ACTATACATTGAAAGGGGTTGTAGTAACAAAAAATGTGATTGATGATTTTAGTTCTACTGAAA
CAGAAAA
AGTATC
TATA
ACAAAAAATCTTAGTTTAATAAAAAAGGACTGGGGAAGTTATAATGGGAGCCAATGACGTAAGT
GAATTAG
AATCAC
AAGC
ACAGCTAATGATAACGTATGATACACCCAAGATGTGGGAAATGGGAACAACCAAAGAACTGG
TACAAAAC
ACTTAC
CAAT
GGGTGCTTAAAAATTTAGTAACATTGAAGGCTCAGTTTCTTTTGGGAAAAGAAGACATGTTCC
AATGGGA
TGCATT
TGAA
GCATTTGAAAGCATAATCCCTCAGAAGATGGCTGGTCAGTACAGTGGATTTGCAAGAGCAGT
GCTCAAAC
AAATGA
GAGA
CCAAGAGGTTATGAAAACGACCAATTCATAAAAATTGTTGCCTTTCTGTTTTTCGCCACCAAA
ATTAAGG
AGCAAT
GGAG
AGCCTTATCAATTTTTGAGGCTTATGCTGAAAGGAGGAGGGGAAAAATTCATCGAAGTAAGG
AAAGGGTC
CCCCTT
GTTC
TCCTACAATCCACAAACGGAAATCCTAACTATATGCGGCAGAATGATGTCATTAAGGAAAA
ATTGAGG
ATGAAG
AAAG
AAATAGATCAATGGGGAATGCAGTACTGGCAGGCTTTCTTGTTAGTGGCAAATATGACCCAG
ATCTTGGA
GATTTT
AAAA

CCATTGAGGAACTTGAAAGACTAAAAACGGGAGAAAAAGCCAACATCTTACTTTACCAAGGA
AAGCCCGT
TAAAGT
AGTT
AAAAGGAAAAGATATAGTGCTTTATCCAATGATATTTCAACAAGGGATTAAGAGACAAAAGAATG
ACAGTTG
AGTCCA
TGGG
GTGGGCCTTGAGCTAATATAAATTTATCCATCAATTCAATAAATACAATTGAGTGAAAAATGCT
CGTGTT
TCTACT (SEQ ID NO :1)
> PB1
AGCAGAAGCGGAGCTTTAAGATGAATATAAATCCATATTTTCTTTTCATAGATGTACCTATACA
GGCAGC
AATTTTC
AACA
ACATTCCCATACACCGGTGTTCCCCCTTATTCTCATGGAACGGGAACAGGCTACACAATAGA
CACCGTGA
TTAGAA
CACA
CGAGTACTCAAACAAGGGAAAACAATACATTTCTGATGTTACAGGATGTGTAATGGTAGATC
CAACAAAT
GGGCCA
TTAC
CCGAAGACAATGAACCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGTGTTCTGGAGGCTTTGGATAGA
ATGGATGA
AGAACA
TCCA
GGTCTGTTTCAAGCAGCCTCACAGAATGCCATGGAGGCACTAATGGTCACAACAGTGGACA
AATTGACTC
AGGGGA
GACA
GACCTTTGATTGGACGGTGTGTAGAAACCAACCTGCTGCAACGGCACTGAACACAACAATAA
CCTCTTTT
AGGTTG
AATG

ATTTAAATGGAGCCGACAAGGGTGGATTAGTGCCCTTTTGCCAAGATATCATTGATTCATTAG
ACAAACC
TGAAAT
GATT
TTCTTCTCAGTAAAGAATATAAAGAAAAAATTGCCTGCTAAAAACAGAAAGGGTTTCCTTATAA
AAAGAA
TACCTA
TGAA
GGTAAAAGACAGAATAACAAGAGTGAATACATCAAAAAGAGCATTATCATTAAACACAATGAC
TAAAGAT
GCTGAA
AGAG
GCAAACATAAAAAGAAGAGCAATTGCCACCGCTGGGATACAAAATCAGAGGATTTGTATTAGTA
GTTGAAAA
CTTGGC
TAAA
AATATCTGTGAAAATCTAGAGCAAAGTGGTTTACCCGTAGGTGGGAACGAAAAGAAGGCCAA
ACTATCAA
ATGCAG
TGGC
TAAAATGCTCAGTAATTGTCCACCAGGAGGGATCAGTATGACTGTGACAGGAGACAATACTA
AATGGAAT
GAATGC
TTAA
ATCCAAGAATCTTTTTGGCTATGACTGAAAGAATAACCAGAGACAGCCCAATTTGGTTCCGG
GATTTTTG
TAGTAT
AGCA
CCGGTCTTGTCTCCAATAAAAATAGCTAGATTGGGAAAAAGGGTTCATGATAACAAGTAAAAACA
AAAAGAC
TAAAAG
CTCA
AATACCTTGTCCCGATCTGTTTAATATAACCATTAGAAAAGATATAATGAAGAAAACAAGGGCAAA
ACTGAAA
AAGCTA
AAAC

CTTTCTTCAATGAAGAAGGAACGGCATCTCTTTCGCCAGGAATGATGATGGGAATGTTTAATA
TGCTATC
TACAGT
ATTA
GGAGTAGCCGCACTAGGGATAAAAAACATTGGAAACAAAGAATACTTATGGGATGGACTGCA
GTCTTCCG
ATGATT
TTGC
TCTGTTTGTTAATGCAAAAGATGAAGAGACATGTATGGAAGGAATAAACGATTTTTACCGAAC
ATGTAAG
CTATTG
GGAA
TAAACATGAGCAAAAAGAAAAGTTACTGTAATGAAACTGGGATGTTTGAATTTACCAGCATGT
TTTACAG
AGATGG
ATTT
GTATCTAATTTTGCAATGGAACCTCCCTTCATTTGGAGTCGCTGGAGTGAATGAATCAGCAGA
CATGGCAA
TAGGAA
TGAC
AATAATAAAGAACAATATGATCAACAATGGGATGGGCCAGCAACGGCACAAACAGCCATAC
AATTATTC
ATAGCT
GATT
ATAGATACACCTACAAATGCCACAGGGGAGATTCCAAAGTGAAGGGAAGAGAATGAAAAAT
ATAAAGGA
GCTATG
GGAA
AACACTAAAGGAAGAGATGGTCTATTAGTAGCAGATGGTGGGCCTAATCTTTACAATTTGAG
AAACCTGC
ATATTC
CAGA
AATAGTATTAATAACAACATAATGGACCCTGAGTACAAAGGACGGTTACTGCATCCTCAAAA
TCCCTTT
GTAGGA
CATT

TGTCTATTGAGGGTATCAAAGAAGCAGATATAACACCTGCACATGGCCCAATAAAGAAAATG
GACTACGA
TGCGGT
ATCT
GGAACTCATAGTTGGAGAACCAAAAAGGAACAGATCTATACTAAACACTGATCAGAGGAACAT
GATTCTTG
AGGAAC
AATG
CTACGCTAAGTGTTGCAACCTTTTTGAGGCTTGCTTTAACAGTGCGTCATACAGGAAACCAG
TAGGCCAG
CACAGC
ATGC
TTGAAGCTATGGCCACAGATTAAGAATGGATGCACGACTGGACTATGAGTCAGGAAGGAT
GTCAAAGA
GGATTT
CGAA
AAAGCAATGGCTCACCTTGGTGAGATTGGGTACATGTAAGCTCCGAAAATGTCTATGGGGTT
ATTGGTCA
TCGTTG
AATA
CATGCGGTGCACAAATGATTA AAAATGAAAAAAGGCTCGTGTTTCTACT (SEQ ID NO :2)
> PA
AGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTTGCCACAATGGATACTTTTATTACAAAAGAATTTCCAGACTA
CAATAAT
ACAAAA
GGCC
AAAAACACAATGGCAGAATTTAGTGAAGATCCTGAATTACAGCCAGCAGTACTATTCAACATC
TGCGTCC
ATCTGG
AGGT
CTGCTATGTAATAAGTGATATGAACTTTCTTGATGAGGAAGGAAAGACATATACAGCATTAGA
AGGACAA
GGAAAA
GAGC
AAAATTTGAGACCACAGTATGAAGTGATTGAGGGAATGCCAAGAAACATAGCATGGATGGTT
CAAAGATC

CTTAGC
CCAA
GAGCATGGAATAGAGACTCCAAGGTATCTGGCTGATTTATTTGATTATAAAAACCAAGAGGTTT
ATCGAAG
TCGGAG
TAAC
AAAGGGATTGGCTGATGATTACTTTTGGAAAAAGAAAAGTTGGGGAAATAGCATGGAAC
TGATGATA
TTCAGC
TATA
ATCAAGACTACTCGTTAAGTGATGAATCTTCATTGGATGAGGAAGGAAAAGGGAGAGTGCTA
AGCAGACT
CACAGA
ACTT
CAGGCTGAGTTAAGTTTGA AAAACCTATGGCAAGTTCTAATAGGGGAAGAAGAAATTGAAAA
AGGAATTG
ACTTCA
AACT
TGGACAAACAATATCTAAACTGAGGGATATATCTGTTCCAGCTGGTTTCTCCAATTTTGAAGG
GATGAGA
AGTTAC
ATAG
ACAACATAGACCCTAAAGGAGCAATAGAGAGAAATCTAGCAAGGATGTCTCCCTTAGTATCA
GTTACACC
CAAAAA
GTTG
AAATGGGAGGACCTGAGACCCATAGGGCCTCACATTTACAACCATGAGCTACCAGAAGTTC
CATATAATG
CCTTTC
TCCT
CATGTCTGATGAGTTGGGGCTGGCCAATATGACTGAAGGAAAGTCCAAGAAAACCGAAGACC
TTAGCTAAG
GAATGT
CTAG
AAAGGTATTCAACACTACGTGATCAAACTGACCCAATATTGATAATGAAAAAGCGAAAAAGCTA
ACGAAAA

CTTCTT
ATGG
AGGTTATGGAGGGACTGTGTAAATACAATAAGCAATGAGGAAACAGGCAACGAATTACAGAA
AACCAATT
ATGCCA
AGTG
GGCCACAGGAGATGGACTAACATACCAAAAAATAATGAAAGAAGTAGCAATAGATGACGAAA
CGATGTAC
CAAGAA
GAAC
CCAAAATACCCAATAAATGTAGAGTGGCTGCTTGGGTTTCAGGCAGAGATGAATCTACTGAGT
ACTCTGAC
AAGTAA
AAGG
GCCCTGGATCTGCCAGAAATAGGGCCAGATGTAGCACCCGTGGAGCATGTAGGGAGTGAAA
GAAGGAAAT
ACTTTG
TTAA
TGAAATCAACTACTGTAAAGCCTCTACAGTTATGATGAAGTATGTACTTTTTTCACACTTCATTA
TTAAAT
GAAAGC
AATG
CTAGTATGGGAAAAATATAAAGTAATACCAATCACCAACAGAGTGGTAAATGGAAAAGGGGAA
AGCTTTGA
CATGCT
TTAT
GGTCTGGCGGTTAAGGGGCAATCTCATTGCGGGGGACACGGATGTTGTAACAGTTGTGA
CTTTCGAGT
TTAGTA
GTAC
AGATCCTAGAGTGGACTCAGGAAAGTGGCCAAAATATACTGTCTTTAAAAATTGGCTCCCTATT
TGTGAGT
GGAAGA
GAAA
AACCTGTGTACCTATATTGCCGAGTGAATGGTACAAAACAAAATCCAAATGAAATGGGGAATG
GAAGCTAG

AAGATG
TCTG
CTTCAATCAATGCAACAAATGGAGGCAATTGTTGATCAAGAATCATCGATACAAGGGTATGAT
ATGACCA
AAGCTT
GTTT
CAAGGGAGACAGAGTGAATAATCCCAAACTTTTCAGTATTGGGACTCAGGAAGGCAAAGTAG
TAAAAGGG
TCCTTT
GGGA
AAGCACTAAGAGTAATATTCACCAAATGTTTGTATGCATTATGTATTTGGAAATGCTCAATTGG
AGGGGT
TAGTGC
CGAA
TCTAGGAGACTTCTACTGTTAATTCAGGCATTAAGACAGGAAGGGCCCTTGGGTATTTGA
CTTAGAGG
GAATGT
ACTC
TGGAGTAGAGGAATGTATTAGTTAACAATCCTTGGGTAATACAGAGTGCATACTGGTTTAATGA
ATGGTTG
GGCATT
GAAA
AAGAAGGAAGTAAAGTGTTAGAATCAATAGATGAAATAATGGATGAATGAACGAAGGGCATA
GCGCTCAA
TTTAGT
ACTA
TTTTGTTTATTATGTATTTAAACATCCAATAAAAAGAAATTGAGAATTAATAATGACACGTGTTTCT
ACT (SEQ ID NO :3)
> HA
AGCAGAAGCGTTGCATTTTCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTA
GTAACAT
CCAATG
CAGA
TCGAATCTGCACTGGGATAACATCGTCAAACCTCACCTCATGTGGTTAAAACTGCCACTCAAG
GGGAAGTC
AATGTG

ACTG
GTGTGATAACCACTAACAAACAACACCTACTAGATCTCATTTTGCAAATCTCAAAGGAACACAGA
CCAGAGG
AAAAC
ATGC
CCAAACTGTTTTAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAATGCATGGGGA
ACATACCTT
CCGCAA
AAGT
CTCAATACTCCATGAAGTCAAACCTGTTACATCTGGATGCTTTCCTATAATGCACGACAGAAC
AAAAATC
AGACAA
CTAC
CTAATCTTCTCAGAGGATATGAAAACATCAGGTTATCAACCAGTAATGTTATCAATACAGAGA
CGGCACC
AGGAGG
ACCC
TACAAGGTGGGGACCTCAGGATCTTGCCCTAACGTTACTAATGGGAACGGCTTCTTCAACAC
AATGGCTT
GGGTTA
TCCC
AAAAGACAACAACAAGATAGCAATAAATCCAGTAACAGTAGAAGTACCATACATTTGTTTCAGA
AGGGGAA
GACCAA
ATTA
CTGTTTGGGGTTCCACTCTGATGACAAAACCCAAATGGAAAGACTCTATGGAGACTCAAAT
CCTCAAAA
GTTTAC
CTCA
TCTGCCAATGGAGTAACCACACATATGTTTCTCAGATTGGTGGCTTCCCAAATCAAACAGAA
GACGAAG
GGCTAA
AACA
AAGCGGCAGAATTGTTGTTGATTACATGGTACAAAAACCTGGAAAAACAGGAACAATTGTTTA
TCAAAGA
GGCATT

TTAT
TGCCTCAAAAAGTGTGGTGGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGGTAATAAAAAGGGTCCTTGCCTTT
AATTGGTGA
AGCAGA
TTGC
CTCCACGAAAAGTACGGTGGATTAATAAAAAGCAAGCCTTACTACACAGGAGAGCATGCAAA
GGCCATAG
GAAATT
GCCC
AATATGGGTGAAAACACCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAAATATAGACCGCCTGCAAAAC
TATTAAG
GAAAGA
GGTT
TCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTTCTTGAAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCA
CGGATACAC
ATCTCA
TGGA
GCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCAGACCTTAAGAGTACACAAGAAGCTATAAAACAAGATAA
CAAAAATC
TCAACT
CTTT
AAGTGAGCTAGAAGTAAAAACCTTCAAAGACTAAGCGGAGCAATGAATGAGCTTCACGACG
AAATACTC
GAGCTA
GACG
AAAAAGTGGATGATCTAAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTT
CCAACGA
AGGGAT
AATA
AACAGTGAAGATGAGCATCTTTTGGCACTTGAAAGAAAACCTGAAGAAAATGCTGGGCCCTC
TGCTGTAG
AAATAG
GGAA
TGGGTGCTTTGAAACCAAAACACAAATGCAACCAGACTTGCCTAGACAGGATAGCTGCTGGCA
CCTTTAAT
GCAGGA

GATT
TTTCTCTTCCCCTTTTGATTCATTA AACATTACTGCTGCATCTTTAAATGATGATGGCTTGA
TAATCA
TACTAT
ACTG
CTCTACTACTCAACTGCTGCTTCTAGCTTGGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTCATTGTC
TACATGG
TCTCCA
GAGA
CAATGTTTCTTGTTCCATCTGTCTGTGAGGGAGATTAAGCCCTGTGTTTTCCCTTACTGTAGT
GCTCATT
TGCTTG
TCAC
CATTACAAAGAAACGTTATTGAAAAATGCTCTTGTTACTACT (SEQ ID NO :4)
> NA
AGCAGAAGCAGAGCATATTCTTAGAACTGAAGTGAACAGGCCAAAAATGAACAATGCTACCT
TCAACTGT
ACAAAC
ATTA
ACCCTATTACTCACATCAGGGGGAGTATTATTATCACTATATGTGTCAGCCTCATTGTCATAC
TTATTGT
ATTCGG
ATGT
ATTGCTAAAATTTTCATCAACAAAAACA ACTGCACCAACAATGTCATTAGAGTGCACAAACGC
ATCAAAT
GCCCAG
ACTG
TGAACCATTCTGCAACAAAAGAGATGACATTTCCACCCCCAGAGCCGGAGTGGACATACCCT
CGTTTATC
TTGCCA
GGGC
TCAACCTTTCAGAAGGCACTCCTAATTAGCCCTCATAGGTTCCGGAGAGATCAAAGGAAACTC
AGCTCCCT
TGATAA
TAAG
AGAACCTTTTGTGCTTGTGGACCAAAAAGAATGCAGACACTTTGCTCTGACCCATTATGCAG

CTCAGCCG
GGGGGA
TACT
ACAATGGAACAAGAAAGGACAGAAACAAGCTGAGGCATCTAGATCAGTCAAATTGGGAAAA
ATCCCAAC
TGTGGA
AAAC
TCCATTTTCCACATGGCAGCTTGGAGCGGATCCGCATGCCATGATGGTAGAGAATGGACATA
TATCGGAG
TTGATG
GTCC
TGACAATGATGCATTGGTCAAAAATAAAATATGGAGAAGCATATACTGACACATATCATTCCCTA
TGCACAC
AACATC
CTAA
GAACACAAGAAAGTGCCTGCAATTGCATCGGGGGAGATTGTTATCTTATGATAACAGACGGC
TCAGCTTC
AGGAAT
TAGT
AAATGCAGATTTCTTAAAATTAGAGAGGGTCGAATAATAAAAGAAATACTTCCAACAGGAAGA
GTGGAGC
ACACTG
AAGA
GTGCACATGCGGGTTCGCCAGCAATAAAACCATAGAATGTGCCTGTAGAGACAACAGTTACA
CAGCAAAA
AGACCC
TTTG
TCAAATTAATGTGGAACTGATACAGCTGAAATAAGATTGATGTGCACAAAAGACTTATCTGG
ACACTCC
CAGACC
GGAT
GATGGAAGCATAGCAGGGCCTTGC GAATCTAATGGAGACAAGTGGCTTGGAGGCATCAAAG
GAGGATTTG
TCCATC
AAAG
AATGGAATCTAAGATTGGAAGATGGTACTCCCGAACGATGTCTAAAACTAACAGAATGGGGGA

TGGA ACTG
TATTGTA
AAGT
ATGATGGTGACCCATGGACTGACAGTGATGCTCTTACTCTTAGTGGAGTAATGGTTTCCATA
GAAGAACC
TGGTTG
GTAT
TCTTTTGGCTTCGAAATAAAGGACAAGAAATGTGATGTCCCTTGTATTGGGATAGAGATGGTA
CACGATG
GTGGAA
AAGA
TACTTGGCATTTCAGCTGCAACAGCCATTTACTGTTTGATGGGCTCAGGACAATTGCTATGGG
ACACTGTC
ACAGGC
GTTG
ATATGGCTTTATAATAGAGGAATGGTTGGATCTGTTCTAAACCCCTTGTTCCTATTTTATTGA
ACAGTT
GTTCTT
ACTA
GATTTAATTGTTTCTGAAAAATGCTCTTGTTACTACT (SEQ ID NO :5)
> NP
AGCAGAAGCACAGCATTTTCTTGTGAGCTTCGAGCACTAATAAAACTGAAAAATCAAAATGTCC
AACATGG
ATATTG
ACAG
TATAAATACCGGAACAATCGATAAAACACCAGAAGAACTGACTCCCGGAACCAGTGGGGCAA
CCAGACCA
ATCATC
AAGC
CAGCAACCCTTGCTCCGCCAAGCAACAAACGAACCCGAAATCCATCCCCAGAAAGGACAAC
CACAAGCAG
TGAAAC
CAAT
ATCGGAAGGAAAAATCCAAAAGAAACAAACCCCAACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAACAT
GGTGGTAA
AACTGG

GTGA
ATTCTACAACCAGATGATGGTCAAAGCTGGACTTAATGATGACATGGAAAGGAATCTAAATCC
AAAATGCA
CAAGCT
GTGG
AGAGAATCCTATTGGCTGCAACTGATGACAAGAAAACTGAATACCAAAAAGAAAAGGAATGCC
AGAGATGT
CAAAGA
AGGG
AAAGAAGAAATAGACCACAGCAAGACAGGAGGCACCTTTTATAAGATGGTAAGAGATGATAA
AACCATCT
ACTTCA
GCCC
TATAAAAATTACCTTTTTAAAAGAAGAGGTGAAAAAATGTATAAGACCACCATGGGGAGTGA
TGGTTTC
AGTGGA
CTAA
ATCACATTATGATTGGACATTCACAGATGAACGATGTCTGTTTCCAAAGATCAAAGGCACTGA
AAAGGGT
TGGACT
TGAC
CCTTCATTAATCAGTACTTTTGCCGGAAGCACACTACCCAGAAGATCAGGTACAACCTGGTGT
TGCAATCA
AAGGAG
GTGG
AACTTTAGTGGCAGAAGCCATCCGATTTATAGGAAGAGCAATGGCAGACAGAGGGCTACTG
AGAGACATC
AAGGCC
AAGA
CGGCCTATGAAAAGATTCTTCTGAATCTGAAAAACAAGTGCTCTGCGCCTCAACAAAAGGCT
CTAGTTGA
TCAAGT
GATC
GGAAGTAGGAACCCAGGGATTGCAGACATAGAAGACCTAACTCTGCTTGCCAGAAGCATGG
TAGTTGTCA
GACCCT

CTGT
AGCGAGCAAAGTGGTGCTTCCCATAAAGCATTTATGCTAAAAATACCTCAACTAGGATTCAATAT
CGAAGAA
TACTCT
ATGG
TTGGGTATGAAGCCATGGCTCTTTATAATATGGCAACACCTGTTTCCATATTAAGAATGGGAG
ATGACGC
AAAAGA
TAAA
TCTCAACTATTCTTCATGTCGTGCTTCGGAGCTGCCTATGAAGATCTAAGAGTGTATCTGCA
CTAACGG
GCACCG
AATT
TAAGCCTAGATCAGCACTAAAATGCAAGGGTTTCCATGTCCCGGCTAAGGAGCAAGTAGAAG
GAATGGGG
GCAGCT
CTGA
TGTCCATCAAGCTTCAGTTCTGGGCCCAATGACCAGATCTGGAGGGAATGAAGTAAGTGG
AGAAGGAGG
GTCTGG
TCAA
ATAAGTTGCAGCCCTGTGTTTGCAGTAGAAAGACCTATTGCTCTAAGCAAGCAAGCTGTAAG
AAGAATGC
TGTCAA
TGAA
CGTTGAAGGACGTGATGCAGATGTCAAAGGAAATCTACTCAAAATGATGAATGATTCAATGG
CAAAGAAA
ACCAAGT
GGAA
ATGCTTTTCATTGGGAAGAAAATGTTTCAAATATCAGACAAAAACAAAGTCAATCCCATTGAGA
TTCCAAT
TAAGCA
GACC
ATCCCCAATTTCTTCTTTGGGAGGGACACAGCAGAGGATTATGATGACCTCGATTATTAAG
CAATAAAA
TAGACA

CTAT
GGCTGTGACTGTTTCAGTACGTTTGGGATGTGGGTGTTTACTCTTATTGAAATAAATGTAAAA
AATGCTG
TTGTTT
CTAC
T (SEQ ID NO :6)
> M
AGCAGAAGCACGCACTTTCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTACCTGCTTTC
ACTAATAG
AAGATG
GAGA
AGGCAAAGCAGAAGTAGCTGAAAAATTACACTGTTGGTTCGGTGGGAAAGAATTTGACCTAG
ATTCTGCT
TTGGAA
TGGA
TAAAAACAAAAGGTGCCTAACTGATATACAAAAAGCACTAATTGGTGCCTCTATATGCTTTT
TAAAACC
CAAAGA
CCAA
GAAAGAAAAGGAGATTCATCACAGAGCCCCTGTCAGGAATGGGAACAACAGCAACAAAAGA
AGAAAGGCC
TAATTC
TAGC
TGAGAGAAAAATGAGAAGATGTGTAAGCTTTCATGAAGCATTGAAATAGCAGAAGGCCACG
AAAGCTCA
GCATTA
CTAT
ATTGTCTTATGGTCATGTACCTAAACCCTGAAAACTATTCAATGCAAGTAAAACTAGGAACGC
TCTGTGC
TTTATG
CGAG
AAACAAGCATCGCACTCGCATAGAGCCCATAGCAGAGCAGCAAGGTCTTCGGTACCTGGAG
TAAGACGAG
AAATGC
AGAT
GGTTTCAGCTATGAACACAGCAAAGACAATGAATGGAATGGGAAAGGGAGAAGACGTCCAA

AAACTAGCA
GAAGAG
CTGC
AAAACAACATTGGAGTGTTGAGATCTCTAGGAGCAAGTCAAAAAGAATGGAGAAGGAATTGCC
AAAGATGT
AATGGA
AGTG
CTAAAACAGAGCTCTATGGGAAATTCAGCTCTTGTGAGGAAATACTTATAATGCTCGAACCAC
TTCAGAT
TCTTTC
AATT
TGTTCTTTCATTTTATCAGCTCTCCATTTTCATGGCTTGGACAATAGGGCATTGGAATCAAATAA
GAAGAG
GGGTAA
ACCT
GAAAATACAAATAAGGAATCCAAATAAGGAGGCAATAAACAGAGAGGTGTCAATTCTGAGAC
ACAATTAC
CAAAAG
GAAA
TCCAAGCCAAAGAAACAATGAAGAAAATACTCTCTGACAACATGGAAGTATTGGGTGACCAC
ATAGTAGT
TGAAGG
GCTT
TCAACTGATGAGATAATAAAAAATGGGTGAAACAGTTTTGGAGGTGGAAGAAATTGCAATGAGC
CCAATTTT
CACTGT
ATTT
CTTACTATGCATTTAAGCAAATTGTAATCAATGTCAGTGAATAAAACTGGAAAAAGTGC GTT
TTTCTAC
T (SEQ ID NO :7)
> NS
AGCAGAAGCAGAGGATTTATTTAGTCACTGGCAAACGGAAAGATGGCGGACAACATGACCA
CAACACAAA
TTGAGG
TGGG
TCCGGGAGCAACCAATGCCACTATAAACTTTGAAGCAGGAATTCTGGAGTGCTATGAAAGGT

TTTCATGG
CAAAGA
GCCC
TTGACTATCCTGGTCAAGACCGCCTACACAGACTAAAAACGAAAATTAGAATCAAGAATAAAGA
CTCACAA
CAAGAG
TGAG
CCTGAGAATAAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAAGCAATTGGGGTAAAAATGATGAAAGT
GCTTCTGT
TTATGG
ATCC
CTCTGCTGGAATTGAAGGGTTTGAGCCATACTGTGTGAAAAATCCCTCAACTAGCAAATGTC
CAAATTAC
GATTGG
ACCG
ATTACCCTCCAACCCAGGAAAGTACCTTGATGACATAGAAGAAGAGCCGGAAAAATGTCGAT
CACCCAAT
TGAGGT
AGTA
TTAAGGGACATGAACAATAAAGATGCACGACAAAAGATAAAAGGATGAAGTAAACACTCAGAA
AGAGGGGA
AATTCC
ATTT
GACAATAAAAAGGGATATACGTAATGTGTTGTCCCTTGAGAGTGTTGGTGAACGGAACCTTCC
TCAAGCAC
CCTAAT
GGAG
ACAAGTCCTTATCAACTCTTCATAGATTGAATGCATATGACCAGAATGGAGGGCTTGTTGCTA
AACTTGT
TGCTAC
TGAT
GATCTTACAGTGGAGGATGAAAAAGATGGCCATCGGATCCTCAACTCACTCTTCGAGCGTTT
TGATGAAG
GACATT
CAAA
GCCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTGGGAGTCTTATCCCAATTTGGTCAAGAGCACCGA

TTATCACCA

GAAGAG

GGAG

ACAATTAGACTGGCCACGGAAGAAGCTTTATCTCTTGAGTAAAAGAATTGATGATAGTATATTG

TTCCACA

AAACAG

TAAT

AGCTAACAGCTCCATAATAGCTGACATGATTGTATCATTATCATTACTGGAAACATTGTATGA

AATGAAG

GATGTG

GTTG

AAGTGACAGCAGGCAGTGCTTATGAATGTAAAATAAAAAATCCTCTTGTTACTACT

(SEQ ID NO :8)