(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115427430 A
(43)申请公布日 2022.12.02

(21)申请号 202180028559.3

(22)申请日 2021.03.09

(30)优先权数据
20169787.7 2020.04.16 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/055928 2021.03.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/209199 EN 2021.10.21

(71)申请人 奥地利卫生与食品安全机构公司
地址 奥地利维也纳

(72)发明人 B·哈特曼

(74)专利代理机构 北京市正见永申律师事务所 11497
专利代理师 黄小临 闵丹

(51)Int.Cl.
C07K 14/005(2006.01)

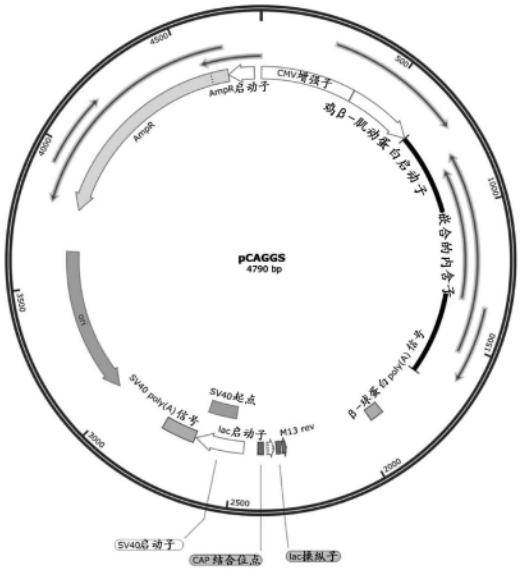
权利要求书2页 说明书24页
序列表11页 附图13页

(54)发明名称

流感病毒样颗粒(VLP)

(57)摘要

公开了流感病毒样颗粒(VLP),其中VLP包括:-VLP表面的血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白,-核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物,其中VLP不含PB1、PB2和NS中至少一种的核糖核蛋白复合物。



CN 115427430 A

1.疫苗,包含流感病毒样颗粒(VLP)和药学上可接受的赋形剂,其中所述VLP包含:

-位于VLP表面的血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白,

-核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物,

其中VLP不含PB1、PB2和NS2中至少一种的核糖核蛋白复合物。

2.权利要求1所述的疫苗,其中所述VLP进一步包含基质蛋白(M)核糖核蛋白复合物。

3.权利要求1或2所述的疫苗,其中所述HA蛋白选自季节性、非大流行的HA蛋白。

4.权利要求1至3中任一项所述的疫苗,其中所述NA蛋白选自季节性、非大流行的NA蛋白。

5.权利要求1至4中任一项所述的疫苗,其中所述VLP进一步包含经遗传修饰的M核糖核蛋白复合物,优选其中所述M核糖核蛋白复合物包含编码非流感病毒的病原体的抗原、癌基因或恶性组织蛋白的病毒RNA,特别是其中M核糖核蛋白复合物含有编码融合蛋白的病毒RNA,所述融合蛋白是含有M蛋白和非流感病毒的病原体的蛋白或抗原性蛋白片段的融合蛋白。

6.权利要求5所述的疫苗,其中所述非流感病毒的病原体选自非流感的病毒、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、或朊病毒,优选非流感的RNA病毒、DNA病毒、或逆转录病毒,尤其所述病毒是SARS-COV-1、SARS-COV-2、或登革热病毒。

7.权利要求1至6中任一项所述的疫苗,其中所述VLP包含:

-位于VLP表面的HA蛋白和NA蛋白,

-NP核糖核蛋白复合物,以及,优选地M核糖核蛋白复合物,

其中所述VLP不含PB1、PB2、NS1和NS2中至少两者的核糖核蛋白复合物;优选地,其中所述VLP不含PB1、PB2、NS1和NS2中至少三者的核糖核蛋白复合物;甚至更优选其中所述VLP不含NS1的核糖核蛋白复合物;特别是其中所述VLP不包含PB1、PB2、NS1和NS2的核糖核蛋白复合物。

8.权利要求1至7中任一项所述的疫苗,一旦所述VLP进入细胞则触发炎性细胞死亡(坏死性凋亡)。

9.权利要求1至8中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗是鼻内疫苗,优选气雾剂或鼻喷雾剂。

10.流感病毒样颗粒(VLP),其中所述VLP包括:

-位于VLP表面的血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白,

-核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物,

-基质蛋白(M)核糖核蛋白复合物,

其中所述VLP不含至少PB1、PB2和NS的核糖核蛋白复合物。

11.权利要求10所述的VLP,还包含遗传修饰的M核糖核蛋白复合物,优选其中M核糖核蛋白复合物含有编码非流感病毒的病原体的抗原、癌基因或恶性组织蛋白的病毒RNA,尤其是其中M核糖核蛋白复合物含有编码融合蛋白的病毒RNA,该融合蛋白含有M蛋白和非流感病毒的病原体的蛋白或抗原性蛋白片段。

12.权利要求11的VLP,其中所述非流感病毒的病原体选自非流感的病毒、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、或朊病毒,优选非流感的RNA病毒、DNA病毒、或逆转录病毒,尤其所述病毒是SARS-COV-1、SARS-COV-2、或登革热病毒。

13.药物组合物,包含权利要求1至9中任一项所述的疫苗或权利要求10至12中任一项所述的VLP。

14.产生权利要求1至9中任一项所述的疫苗或权利要求10至12中任一项所述的VLP的方法,包括以下步骤:

-提供HA、NA、PA、PB1和PB2的单向载体;

-提供NP的双向载体,

-提供M的单向或双向载体,

-在重组细胞系统中表达这些载体以获得权利要求10至12中任一项的VLP和/或权利要求1至9中任一项的VLP。

15.权利要求14所述的方法,进一步包括将所述VLP填充到最终容器中、并将所述VLP最终制成准备用于对人类个体给药的药物组合物的步骤。

16.权利要求14或15的方法,其中所述载体表达在Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞、非洲绿猴肾(Vero)细胞、293细胞、293T细胞、猪肾(PK)细胞、枭猴肾(OMK)细胞、Madin-Darby牛肾(MDBK)细胞、鸡胚肾(CEK)细胞、鸡胚成纤维细胞、原代鸡肾细胞、或从有胚鸡卵的绒毛尿囊膜分离的细胞中,优选表达在MDCK细胞或Vero细胞中,尤其是表达在MDCK细胞中。

17.权利要求1-10任一项所述的VLP,用于医学用途,优选用于预防病原体引起的疾病,尤其是用于预防流感。

流感病毒样颗粒(VLP)

[0001] 本发明公开了流感病毒样颗粒(VLP)和包含这种VLP的疫苗。

[0002] 病毒感染或疫苗接种首先被宿主的先天免疫系统识别。先天免疫细胞将病毒或疫苗识别为外来物,对其进行加工以将其呈递给适应性免疫系统,从而激活它。根据疫苗的性质,适应性免疫系统启动的保护更多地基于抗体(体液免疫应答)或基于快速有效地杀死新感染细胞的细胞、使病毒无法传播(细胞免疫应答)。

[0003] 当前针对甲型流感病毒(IAV)的疫苗接种策略基于3至4种灭活IAV毒株或减毒活病毒(LAIV)的组合给药。灭活IAV毒株的疫苗接种主要激发体液免疫应答,这种应答仅提供约6个月的保护。此外,这种疫苗接种仅对用于制造疫苗的那些毒株有效。而且,对减毒疫苗还有关于生物安全性的担忧。

[0004] 与仅接种疫苗的患者相比,在IAV感染中幸存的患者对新的IAV感染具有更广泛和更持续的保护。这种保护是由细胞免疫应答提供的,这种应答不是由灭活毒株接种引起的。

[0005] 哈特曼等(Nat.Commun.8(2017),1916-1918)发现人类树突细胞(DC)中的甲型流感病毒(IAV)感染会引起炎症细胞死亡。宿主传感器蛋白ZBP1/DAI在病毒RNA进入细胞时识别它并触发危险信号在微环境中的释放。这种由病毒RNA诱导的应答导致局部炎症和更有效、更持久的免疫应答。这提示细胞免疫应答因侦测到宿主细胞中新表达的病毒RNA而被活化。这反过来意味着用新表达的病毒RNA进行疫苗接种对于长期和更广泛的保护是必要的(图1)。

[0006] 因基于减毒病毒的疫苗具有表达在体温条件下无效的聚合酶的病毒RNA,宿主中的疫苗接种不表达必须的触发细胞免疫所需微炎症的新病毒RNA。由于这些原因,目前的疫苗策略对IAV没有持久的免疫保护。

[0007] 流感病毒每年导致全球250,000-500,000例死亡;一场全球大流行可能杀死数百万人。疫苗接种是预防流感病毒感染引起的疾病和死亡的最具成本效益的公共卫生措施。

[0008] 流感病毒体是一种包膜病毒,其脂质双层来自宿主细胞的胞质膜。外壳中嵌入了两种不同类型的糖蛋白刺突。这些刺突中大约80%是血凝素(HA),这是一种三聚体蛋白、在病毒附着到宿主细胞时起作用。剩余约20%的糖蛋白刺突由神经氨酸酶(NA)组成,据信它主要促进新生成的病毒颗粒从宿主细胞中释放。包膜内侧有一层基质蛋白,包围着流感病毒颗粒。包膜内是流感基因组,分为八个单链RNA节段。RNA与核蛋白(NP)一起包装,形成螺旋状核糖核蛋白复合物,每个RNA节段包含三个聚合酶肽。大多数节段编码单独一种蛋白,但有些节段编码数种,例如M节段编码基质蛋白M1和离子通道蛋白M2(图2)。

[0009] 流感VLP是潜在的包含到免疫原性组合物中的候选者。VLP与成熟病毒体非常相似,但它们不含病毒基因组物质(参见例如最近的:WO 2020/00101 A1([0017],[00254]);WO 2020/014656 A1(p.23))。事实上,根据现有技术的定义,VLP是空的病毒包膜。因此,VLP本质上是不可复制的,这使得它们作为疫苗给药时是安全的。此外,VLP可以经过工程改造而在VLP表面表达病毒糖蛋白,这是它们最天然的生理构型。而且,因VLP类似于完整无损的病毒颗粒、并且是多价颗粒结构,VLP在诱导针对糖蛋白的中和抗体方面可能比可溶性包膜蛋白抗原更有效。

[0010] US 2017/058265 A1公开了通过使用带有病毒节段的分离的宿主细胞的组从病毒样颗粒产生流感病毒。Watanabe等(J.Virol.76(2002):767-773)报告了复制无能的流感VLP的免疫原性和保护功效。US 9,150,620 B2描述了一种针对禽流感病毒多个型别、带有特异性突变的流感HA蛋白的疫苗。刘及其他人(Antivi-ral.Res.133(2016):110-118)报告了掺有鞭毛蛋白和GM-CSF的多亚型流感VLP用于疫苗设计。在US2015/0273048A1中,一种通用流感疫苗是基于异源多重基质蛋白2胞外域(M2e)蛋白。

[0011] 本发明的一个目的是提供有效且更安全的疫苗接种,尤其是针对流感病毒的疫苗接种。

[0012] 本发明的该目的通过根据本发明的表达RNA的VLP(RNA-VLP)来解决。

[0013] 因此,本发明提供流感病毒样颗粒(VLP),其中所述VLP包括:

[0014] -位于所述VLP表面的血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白,

[0015] -核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物,

[0016] 其中所述VLP不包含PB1、PB2、NS1和NS2中至少一种的核糖核蛋白复合物。

[0017] 本发明还提供了一种疫苗,其包含流感病毒样颗粒(VLP)和药学上可接受的赋形剂,其中所述VLP包括:

[0018] -位于VLP表面的血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白,

[0019] -核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物,

[0020] 其中所述VLP不含PB1、PB2和NS2中至少一种的核糖核蛋白复合物。

[0021] 本发明提供了在疫苗中使用的RNA-VLP,该疫苗看起来像对免疫系统的真正的病毒感染但不能繁殖。为此目的,使用了与功能性病毒体的外部相同的病毒样颗粒(VLP)。在VLP内部插入至少一个(即NP)、优选两个(即NP和M)功能性IAV-核糖核蛋白复合物(RNP),它们在宿主细胞中触发炎性细胞死亡,就像真正的病毒在宿主细胞中因病毒RNA表达而引起的炎性细胞死亡一样。简言之:在患者接种疫苗后,由于它们的相似性,这些RNA-VLP以与功能性IAV病毒体相同的途径进入细胞,将它们的两种RNP释放到细胞核中。进入后,作为RNP一部分的病毒聚合酶开始复制病毒RNA,然后触发上述炎性细胞死亡(坏死性凋亡)。坏死性凋亡导致宿主细胞破裂,这对免疫系统有数个好处:内部成分如核DNA和蛋白是一种危险信号,可以吸引和活化先天免疫系统中未参与的细胞;病毒蛋白和RNA因受感染细胞的细胞死亡而失去功能;这些无功能的病毒部分现在充当病原体相关分子模式(PAMP),它们被先天免疫系统的现已活化的细胞摄入,加工后被呈递给适应性免疫系统的细胞。因受感染的细胞被RNA-VLP诱导坏死性凋亡而导致的先天免疫系统的活化与感染真正危险的IAV病毒时的免疫应答相似,并负责细胞介导的免疫应答的活化。由于缺乏RNA表达,传统疫苗接种不会活化坏死性凋亡,因此主要诱导体液免疫应答。此外,RNA-VLP在生物学上比假型疫苗更安全,假型疫苗是具有非功能性NA蛋白的IAV病毒的简称(Powell等,J.Virol.86(2012),13397-13406),因为它们不复制表达病毒RNA聚合酶的节段。

[0022] 因此,本发明的VLP在进入细胞时触发炎性细胞死亡(坏死性凋亡)、但不触发细胞凋亡。

[0023] 程序性细胞死亡在流感病毒经由Caspase依赖性细胞凋亡而传播中的作用已得到最广泛的研究(参见例如Harold等,J.Leukoc.Biol.92(2012),75-82的综述)。另一方面,程序性坏死(或坏死性凋亡)是一种更具致免疫性的宿主细胞死亡机制(参见例如Sridharan

等,Trends Microbiol.22(2014),199-207的综述)。与细胞凋亡不同,坏死性凋亡导致危险相关分子模式(DAMP)的释放,并因此与炎症和免疫细胞活化有关。坏死性凋亡是受体-相互作用蛋白激酶(RIPK)-依赖性和混合谱系激酶域-样假激酶(MLKL)-依赖性的。根据宿主/病原体的情况,坏死性凋亡既可以参与宿主对感染的应答,也可以被病原体利用以进一步传播。

[0024] 根据本发明的RNA-VLP是对现有VLP技术(例如公开于Kang等,PloS one14(2019),e0216871;10.1371/journal.pone.0216871;Haynes,Exp.Rev.Vacc.8(2009),435-445;Schotsaert等,Sci.Rep.6(2016),24402;10.1038/srep24402;Mohan,T.等,Sci.Rep.7(2017),40226;10.1038/srep40226)的改进,因为用于免疫系统的RNA-VLP通过RNA表达模拟了活病毒感染。

[0025] 根据本发明的RNA-VLP可以使用“反向遗传学”技术(Perez等,Meth.Mol.Biol.1602(2017),251-273;10.1007/978-1-4939-6964-7_16)来生成。为此目的,单个的流感节段从野生型病毒中分离,被从RNA转录成DNA并被克隆到DNA质粒中。然后将含有每个IAV节段DNA的质粒转染到细胞系中。在转染的细胞中,质粒产生病毒拷贝RNA和/或病毒信使RNA以产生病毒蛋白。启动子在质粒上的位置决定了在将质粒转染到细胞培养物中以后是否表达病毒RNA、病毒蛋白或两者。该技术长期以来一直用于生产嵌合病毒。

[0026] 一般而言,VLP在当前技术领域中被称为由一种或多种病毒结构蛋白组成、但缺乏病毒基因组(即编码VLP的这些病毒结构蛋白)的颗粒。由于VLP缺乏病毒基因组,它们无法在细胞中繁殖以产生感染性颗粒并产生更安全且可能更经济的疫苗和疫苗产品。此外,VLP通常可以通过异源表达产生,并可易于纯化。现有技术中公开的大多数VLP包含至少一种病毒核心蛋白,其驱动颗粒从宿主细胞出芽和释放。流感VLP可以通过用编码HA、NA和M蛋白的质粒转染宿主细胞来产生。在将转染的细胞温育适当时间以允许蛋白表达(例如大约72小时)后,VLP可以从细胞培养上清液中分离。例如,用于从细胞上清液中纯化或分离流感病毒VLP的方案涉及低速离心(以去除细胞碎片)、真空过滤和通过20%甘油对VLP进行超速离心。病毒样颗粒还可以包括亚病毒颗粒(SVP),其大小通常小于病毒、并且构成不含病毒衣壳或基因组的颗粒。

[0027] 本发明的VLP—尽管含有某些病毒核酸—明显不同于本领域已知的拯救病毒(例如Fodor等,J.Virol.73(1999),9679-9682;Hoffman等,Arch.Virol.146(2001),2275-2289;WO 01/04333A1;WO 2007/016598 A2),因为缺乏在细胞中复制以获得感染性病毒颗粒的能力。US 2017/058265 A1使用各种VLP构建体和细胞,但没有建议将它们用于疫苗;此文件旨在具有复制能力的完全传染性病毒以用于列出的各种疫苗技术中(但未提及在疫苗接种环境中使用这些VLP)。值得注意的是,包含NS1可以使此类构建体变得免疫拮抗;这就是为什么优选本发明的VLP不包含NS1的核糖核蛋白复合物的原因。Watanabe等,2002年,描述了delta NS1重组流感病毒(不是VLP),它可以在IFN缺陷细胞(内在免疫应答减弱的细胞)中繁殖。引人注目的是,本发明的VLP—与所有这些构建体形成鲜明对照—不能在任何细胞系中繁殖,因为(对于病毒复制绝对必要的)RNA依赖性RNA聚合酶的遗传信息是缺失的。

[0028] 优选地,对本发明疫苗中VLP的最低要求是:内部只有一或两种RNP;在任何情况下,PA、PB1、PB2或NS1都不能用作RNP中RNA的模板;这确保该VLP无法复制(PA、PB1、PB2)或

发挥任何免疫拮抗功能。本发明的VLP不含能够在宿主细胞中产生感染性颗粒的核酸体系。这就是为什么—根据定义—本发明的VLP缺少至少一种对病毒复制而言必不可少的核糖核蛋白复合物，即PB1、PB2和NS2(NS1已被证明对于在缺乏IFN途径中底物时的病毒复制而言是可有可无的(Garcia-Sastre等，Virol.252(1998)，324-330)；重组流感delNS1病毒的生物学和分子特性的表征提示，NS1是病毒编码的针对干扰素介导的抗病毒应答的抑制剂)。优选地，本发明的VLP缺乏PB1、PB2和NS2中甚至不止一种的核糖核蛋白复合物，例如，缺乏两种或全部三种；还优选本发明的VLP缺乏NS1核糖核蛋白复合物。根据本发明的最优选实施方案，本发明的VLP仅包含NP核糖核蛋白复合物，优选具有M核糖核蛋白复合物，作为唯一的核糖核蛋白复合物。

[0029] 事实上，本发明的VLP—由于强制缺乏在宿主细胞内复制必不可少的遗传物质(即PB1、PB2和/或NS2)—是非传染性的，因为它们只能结合并进入细胞，但不能被任何宿主细胞繁殖以产生能进入其他细胞的感染性颗粒。

[0030] 与现有技术的VLP形成鲜明对照，本发明的VLP含有病毒遗传物质(NP核糖核蛋白复合物；优选还有M核糖核蛋白复合物)，并因此也可称为“RNA-VLP”，但却是—像现有技术的VLP—流感的非复制、非感染性病毒衣壳结构。因此，本发明的VLP能够进入细胞，但不会发生病毒/VLP在细胞中的繁殖。相应地，很明显本文中例如术语“核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物”是指编码NP的核糖核蛋白复合物(RNP)(即具有编码NP的病毒RNA(vRNA)的RNP；也参见例如图11)。因此，本发明疫苗中使用的VLP是在其表面表达HA和NA、并将RNP与编码NP的vRNA整合、但不具有编码PB1、PB2和NS2中至少一种的RNP(并且优选也不具有编码NS1的RNP)、特别是不具有编码PB1、PB2、NS1和NS2全部的RNP的VLP。

[0031] 作为最低要求，IAV表面蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)是构建VLP包膜所必须的。添加M蛋白以获得更大稳定性，也使VLP外在与真正的病毒相同。NP节段的RNP将作为病毒RNA的来源。NP的优点是感染后早期表达量相对较高，并且没有已知的免疫拮抗功能。添加M节段作为RNP使得RNA-VLP可以用作疫苗接种流感以外病原体的载体，因为外来的其他病原体的序列也可以添加到M节段中而不会严重限制其功能(图3)。

[0032] 因此，本发明的VLP优选表现出血凝素活性和/或神经氨酸酶活性。如本文所用，术语“血凝素活性”是指含HA的VLP或其部分结合和凝集血红细胞(红细胞)的能力。如本文所用，术语“神经氨酸酶活性”是指含有NA的VLP或其部分从包括蛋白例如胎球蛋白在内的底物切出唾液酸残基的酶活性。

[0033] 流感病毒血凝素HA是一种病毒表面糖蛋白，通常包含大约560个氨基酸(例如，566个氨基酸)，占病毒总蛋白的25％。HA是一种蛋白抗原，作为免疫原非常有用，负责病毒颗粒在感染早期(或进入细胞时(对于本发明的VLP而言))附着至并穿透进宿主细胞，特别是呼吸道表皮的宿主细胞。已在流感病毒中鉴定出18种不同的HA亚型(H1-H18)。流感病毒神经氨酸酶(NA)是流感病毒的第二种膜糖蛋白。病毒NA的存在已显示对于产生针对感染病毒的多方面保护性免疫应答很重要。对于大多数甲型流感病毒而言，NA长度为413个氨基酸，由一个具有1413个核苷酸的基因编码。已在流感病毒中鉴定出九种不同的NA亚型(N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8和N9)，所有这些亚型均在野生鸟类中发现。NA通过从受感染细胞表面的碳水化合物部分切出末端神经氨酸(也称唾液酸)残基，而参与破坏病毒HA的细胞受体。NA还从病毒蛋白切出唾液酸残基，阻止病毒聚集。利用这种机制，有人假设，NA通过阻止新形成

的病毒颗粒沿细胞膜积聚，以及通过促进该病毒穿过位于粘膜表面的粘液而转运，来促进病毒后代的释放。NA是发生抗原变异的重要抗原决定簇。

[0034] 本发明使用的HA和NA蛋白的序列例如可从Influenza Research Database(IRD)获得。IRD包含禽类和非人类哺乳动物流感监测数据、与病毒提取物相关的人类临床数据、从提取物中分离的病毒的表征以及流感病毒公共储库中可找到的所有基因组和蛋白质组数据。IRD将宿主监测和临床数据与所有明确表征的流感病毒株的序列和表型数据以及从公共数据源获得的良好表征的病毒株的数据联系起来，并将用IRD生成的数据进行补充。截至2020年3月28日，IRD包含95,032个HA蛋白词条和82,794个NA蛋白词条。

[0035] 根据一优选实施方案，本发明VLP中的HA蛋白选自IRD中公开的HA蛋白组，优选季节性、非大流行性HA。在IRD中，这可以通过例如在搜索HA蛋白时，从“进化枝分类”中排除2009pH1N1序列来选择。

[0036] 优选地，本发明VLP中的NA蛋白选自IRD中公开的NA蛋白组，优选季节性的、非大流行的NA。

[0037] 当然，还有HA和NA蛋白的修饰/重组版本，例如WO 2020/000101 A1)中所公开的。

[0038] 甲型流感病毒RNA节段5编码NP(一种长度为498个氨基酸的多肽)，其富含精氨酸、甘氨酸和丝氨酸残基，在中性pH值下具有净正电荷。此多肽的大部分以碱性氨基酸占优势，总体预测的pi为9.3，但NP的C端30个残基具有3.7的pi，明显偏酸性。在乙型和丙型流感病毒中，同源NP多肽的长度分别为560和565个残基。三种流感病毒型别的NP基因的预测氨基酸序列的比对揭示了这三种蛋白之间的显著相似性，其中A型和B型NP显示出最高程度的保守性。从不同宿主分离的病毒株的系统发育分析表明，NP基因相对地非常保守。

[0039] 流感病毒的第七个RNA节段(M基因)编码M1和M2蛋白。M1是一种基质蛋白，以二聚体形式位于病毒包膜下方，并与病毒核糖核蛋白(vRNP)复合物相互作用，在内核成分和膜蛋白之间形成一座桥梁。vRNP携带宿主范围的决定簇。M1与病毒RNA和NP接触，促进RNP复合物的形成并导致RNP与核基质解离。M1通过将病毒成分募集到组装部位而在组装中起着至关重要的作用，并在病毒颗粒出芽过程(包括形成)中发挥必不可少的作用。M1蛋白在宿主细胞膜的一些区块下形成一层富含病毒血凝素、神经氨酸酶和M2跨膜蛋白的层，有利于成熟病毒的出芽。M1由两个通过接头序列连接的结构域组成。N端结构域具有多螺旋结构，可分为两个子结构域。C-端结构域还包含α-螺旋结构。M2是插入病毒包膜中、并以四聚体的形式从病毒表面突出的一种膜蛋白。M2的胞外域被宿主的免疫系统识别。M2的跨膜域具有离子通道活性，参与病毒在细胞内的脱衣壳过程。M2蛋白是一种质子选择性病毒孔蛋白，整合在甲型流感病毒的病毒包膜中。通道本身是同型四聚体(由四个相同的M2单元组成)，这些单元都是由两个二硫键稳定的螺旋，在低pH条件下被活化。甲型流感中M2蛋白的质子传导对病毒复制必不可少。因此，M基因既编码基质蛋白又编码膜蛋白，并具有多种功能(参见例如Furuse等，Virol.J.6(2009)，67；doi:10.1186/1743-422X-6-67)。

[0040] 本发明VLP的优选实施方案还包含基质蛋白(M)核糖核蛋白复合物。

[0041] 根据一个优选实施方案，本发明的VLP包括：

[0042] -位于VLP表面的HA蛋白和NA蛋白，

[0043] -NP核糖核蛋白复合物，以及，优选地M核糖核蛋白复合物，

[0044] 其中这些VLP不含PB1、PB2、NS1和NS2中至少两者的核糖核蛋白复合物；优选其中

这些VLP不含PB1、PB2、NS1和NS2中至少三者的核糖核蛋白复合物;甚至更优选其中这些VLP不含NS1的核糖核蛋白复合物;特别是其中这些VLP不包含PB1、PB2、NS1和NS2的核糖核蛋白复合物。

[0045] 优选地,本发明VLP中的M核糖核蛋白复合物包含选自IRD中公开的M基因的核酸。此外,编码本发明VLP中M蛋白的核酸序列可以是编码一种修饰蛋白,例如包含(一种)流感病毒的(一或多种)M蛋白和一种非流感病毒的病原体的抗原或由这两者组成的融合蛋白。根据该优选实施方案,本发明的VLP进一步包含遗传修饰的M核糖核蛋白复合物,优选其中M核糖核蛋白复合物含有编码非流感病毒的病原体的抗原的病毒RNA,尤其是其中M核糖核蛋白复合物含有编码融合蛋白的病毒RNA,该融合蛋白含有M蛋白和非流感病毒的病原体的蛋白或抗原性蛋白片段。因此,如本文所用,术语"M蛋白"或"M核糖核蛋白复合物"在这方面包括本发明的两个实施方案,(野生型,天然,流感)M蛋白或(野生型,天然,流感)M核糖核蛋白复合物("流感M实施方案")及其遗传工程改造的形式,例如(一种)流感病毒的(一或多种)M蛋白和来自非流感病毒的病原体的抗原的融合蛋白、以及带有编码该融合蛋白的vRNA的相应核糖核蛋白复合物(流感/非流感融合实施方案")。

[0046] 例如,非流感病毒的病原体可以是非流感的病毒、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、或朊病毒,优选非流感的RNA病毒、DNA病毒、或逆转录病毒,尤其所述病毒是SARS-COV-1、SARS-COV-2或登革热病毒。

[0047] 优选地,M核糖核蛋白复合物包含编码融合蛋白的RNA,该融合蛋白包含(流感)M蛋白和病原体抗原或其免疫原性部分。优选地,病原体是病毒、细菌、真菌或原生动物病原体。在这种情况下,特别优选的是来自以下病原体的抗原:鲍曼不动杆菌(Acinetobacter baumannii)、无形体(Anaplasma)属、嗜吞噬细胞无形体(Anaplasmaphagocytophilum)、巴西钩虫(Ancylostomabraziliense)、十二指肠钩口线虫(Ancylostoma duodenale)、溶血隐秘杆菌(Arcanobacteriumhaemolyticum)、似蚓蛔线虫(Ascaris lumbricoides)、曲霉(Aspergillus)属、星状病毒科(Astroviridae)、巴贝虫(Babesia)属、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)、蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)、汉赛巴通体(Bartonella henselae)、BK病毒、人芽囊原虫(Blastocystis hominis)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、百日咳杆菌(Bordetella pertussis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、疏螺旋体(Borrelia)属、疏螺旋体属未知种(Borrelia spp)、布氏杆菌(Brucella)属、马来布鲁线虫(Brugiamalayi)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、洋葱伯克霍尔德菌(Burkholderiacepacia)和其他伯克霍尔德菌属物种、鼻疽伯克霍尔德菌(Burkholderia mallei)、假鼻疽伯克霍尔德菌(Burkholderiapseudomallei)、杯状病毒科(Caliciviridae),弯曲杆菌(Campylobacter)属,白色念珠菌(Candida albicans),念珠菌属未知种(Candida spp),沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis),肺炎衣原体(Chlamydophila pneumoniae),鹦鹉热衣原体(Chlamydophila psittaci),CJD朊病毒(prion),中华肝吸虫(Clonorchis sinensis),肉毒梭菌(Clostridium botulinum),艰难梭菌(Clostridium difficile),产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens),产气荚膜梭菌,梭菌属未知种(Clostridium spp),破伤风梭菌(Clostridium tetani),球孢子菌属未知种(Coccidioides spp)、冠状病毒(coronaviruses),白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、贝氏考克斯菌(Coxiella burnetii)、克里米亚-刚果出血热病毒、新型隐球

菌(Cryptococcus neoformans)、隐孢子虫(Cryptosporidium)属、巨细胞病毒、登革热病毒(DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4)、脆弱双核阿米巴(Dientamoeba fragilis)、埃博拉病毒(EBOV),棘球绦虫(Echinococcus)属,查菲埃立克体(Ehrlichiachaffeensis),尤因埃立克体(Ehrlichiaewingii),埃立克体(Ehrlichia)属,溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica),肠球菌(Enterococcus)属,肠病毒(Enterovirus)属,肠病毒(Enteroviruses),主要是柯萨奇(Coxsackie)A病毒和肠病毒(Enterovirus)71型(EV71),表皮癣菌属未知种(Epidermophyton spp),EB病毒(Epstein-Barr Virus,EBV),大肠杆菌(Escherichia)O157:H7、O111和O104:H4、肝片形吸虫(Fasciola hepatica)和巨大片形吸虫(Fasciola gigantica)、FFI朊病毒、丝状总科(Filarioidea)超家族、黄病毒(Flaviviruses)、土拉弗朗西斯菌(Francisellatularensis)、梭杆菌(Fusobacterium)属、白地霉(Geotrichumcandidum)、肠贾第鞭毛虫(Giardia intestinalis)、颚口线虫属未知种(Gnathostomaspp)、GSS朊病毒、瓜纳利托(Guanarito)病毒、杜克雷嗜血杆菌(Haemophilus ducreyi),流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae),幽门螺杆菌(Helicobacter pylori),亨尼帕病毒(Henipavirus)(亨德拉病毒(Hendra virus)尼帕病毒(Nipah virus)),甲型肝炎病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,丁型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,单纯疱疹病毒1型和2型(HSV-1和HSV-2),荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、HIV(人类免疫缺陷病毒)、威尼克何德霉(Hortaeawerneckii)、人类博卡病毒(HBoV)、人类疱疹病毒6型(HHV-6)和人类疱疹病毒7型(HHV-7)、人类间质肺病毒(hMPV)、人类乳头瘤病毒(HPV)、人类副流感病毒(HPIV)、日本脑炎病毒、JC病毒、胡宁(Junin)病毒、金氏金氏菌(Kingellakingae)、肉芽肿克雷伯菌(Klebsiella granulomatis)、库鲁(Kuru)朊病毒、拉沙(Lassa)病毒、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、利什曼原虫(Leishmania)属、钩端螺旋体(Leptospira)属、单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)、淋巴细胞性脉络膜炎病毒(LCMV),马丘波(Machupo)病毒,马拉色菌属未知种(Malasseziaspp),马尔堡(Marburg)病毒,麻疹(Measles)病毒,横川后殖吸蟲(Metagonimusyokagawai),微孢子虫门(Microsporidia phylum),传染性软疣病毒(Molluscum contagiosum virus,MCV),腮腺炎病毒(Mumps virus),麻风分枝杆菌(Mycobacterium leprae)和弥漫型麻风分枝杆菌(Mycobacterium lepromatosis),结核分枝杆菌(ycobacterium tuberculosis),溃疡分枝杆菌(Mycobacterium ulcerans),肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae),福氏内格里虫(Naegleria fowleri),美洲板口线虫(Necator americanus),淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae),脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis),星形诺卡菌(Nocardia asteroides),诺卡菌属未知种(Nocardia spp),蟠尾丝虫(Onchocerca volvulus),恙虫东方体(Orientia tsutsugamushi),正粘病毒科(Orthomyxoviridae),巴西副球孢子菌(Paracoccidioides brasiliensis)、肺吸虫属未知种(Paragonimusspp)、卫氏肺吸虫(Paragonimuswestermani)、细小病毒(Parvovirus)B19、巴氏杆菌(Pasteurella)属、疟原虫(Plasmodium)属、耶氏肺孢子菌(Pneumocystis jirovecii)、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、鼻病毒(Rhinovirus,rhinoviruses)、小蛛立克次体(Rickettsia akari)、立克次体(Rickettsia)属、普氏立克次体(Rickettsia prowazekii)、立氏立克次体(Rickettsia ricketts),伤寒立克次体(Rickettsia typhi),裂谷热(Rift Valley fever)病毒,轮状病毒(Rotavirus),风疹病毒

(Rubella virus),萨比亚(Sabia)病毒,沙门氏菌(Salmonella)属,疥螨(Sarcoptesscabiei),SARS-COV-1,SARS-COV-2,裂体吸虫(Schistosoma)属,志贺氏菌(Shigella)属,辛诺柏(Sin Nombre)病毒,汉坦病毒(Hantavirus),申克孢子丝菌(Sporothrixschenckii),葡萄球菌(Staphylococcus)属,葡萄球菌属,无乳链球菌(Streptococcus agalactiae),肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae),化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes),粪类圆线虫(Strongyloidesstercoralis),带绦虫(Taenia)属,猪带绦虫(Taenia solium),蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus,TBEV),犬弓蛔虫(Toxocaracanis)或猫弓蛔虫(Toxocaracati),刚地弓形虫(Toxoplasma gondii),梅毒螺旋体(Treponema pallidum),猪旋毛虫(Trichinella spiralis),阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis),毛癣菌属未知种(Trichophyton spp),毛首鞭形线虫(Trichuris trichiura),布氏锥虫(Trypanosoma brucei),克氏锥虫(Trypanosoma cruzi),解脲脲原体(Ureaplasmaurealyticum),水痘带状疱疹病毒(VZV)、大天花(Variola major)或小天花(Variola minor)、vCJD朊病毒、委内瑞拉马脑炎(Venezuelan equine encephalitis)病毒、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)、西尼罗(West Nile)病毒、西方马脑炎病毒、班氏丝虫(Wuchereriabancrofti)、黄热病病毒、小肠结肠炎耶尔森氏菌(Yersinia enterocolitica)、鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis)和假结核耶尔森氏菌(Yersinia pseudotuberculosis)。

[0048] 此类抗原的合适例子公开在例如WO 2015/149944 A2中。

[0049] 由于本发明的VLP触发的微炎症也适用于克服肿瘤的免疫减弱环境,本发明的VLP技术也可以用于触发针对癌基因或恶性组织蛋白(例如,位于肿瘤细胞表面且特异于肿瘤细胞(即不存在于良性细胞上)的肿瘤抗原)的免疫应答。

[0050] 根据另一方面,本发明还涉及包含本发明VLP和药学上可接受的赋形剂的疫苗。

[0051] 优选地,本发明的VLP作为适用于人类个体的药物制剂形式提供。因此,本发明VLP可以与作为常规载体(媒质)的药学上可接受的赋形剂、以及用于人类受试者时在生理学和药学上可接受的赋形剂组合。这类药学上可接受的载体对于相关领域的技术人员来说是已知的并且可以容易地找到,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences,E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.的更新/当前版本中,描述了适用于药用递送一种或多种治疗组合物(例如一种或多种流感疫苗)与其他制剂的组合物和配制剂。一般而言,药学上可接受的载体的性质取决于所采用的具体给药方式。例如,肠胃外配制剂通常包含可注射流体/液体,其包括药学和生理学可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒质。对于固体组合物(例如,粉末、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载体可以包括,例如,药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、或硬脂酸镁,它们通常稳定和/或增加组合物或药物的半衰期。除了生物学中性载体之外,待施用的药物组合物可以包含少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂、和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨糖醇单月桂酸酯。

[0052] 用于肠胃外给药的本发明VLP的合适药物组合物包括但不限于无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的非限制性实例包括丙二醇,聚乙二醇,植物油例如橄榄油和芥花油(canola oil),以及可注射的有机酯,例如油酸乙酯。水性载体包括水,醇/水溶液,乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒质包括例如氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、

葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏液、或不挥发油。静脉内媒质包括，例如，流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。防腐剂和其他添加剂也可存在于此类组合物和配制剂中，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、着色剂、稳定剂、惰性气体等。

[0053] 一些组合物可能作为药学上可接受的酸或碱加成盐而给药，所述盐通过与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸)、和有机酸(例如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、和富马酸)反应而形成，或通过与无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾)、和有机碱(例如单-、二-、三-烷基和芳基胺以及取代的乙醇胺)反应而形成。

[0054] 本文提供了药物组合物，其包括治疗有效量的本发明VLP，单独或与药学上可接受的载体组合。本领域技术人员熟知适用于本发明目的的合适药物配制剂，例如多个用于流感疫苗的药物制剂的适当例子和建议也适用于本发明的VLP。药学上可接受的载体包括但不限于盐水、缓冲的盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。载体和组合物可以是无菌的，配制剂应该适合给药方式。组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或pH缓冲剂。组合物优选为液体或水溶液、悬浮液、乳液或分散体。液体或水性组合物可在使用前用溶液或缓冲液冻干和重建。组合物可以配制成栓剂，具有传统的粘合剂和载体，例如甘油三酯。可以使用任何通常已知的药物载体，例如无菌盐水溶液或芝麻油。介质还可以包含常规的药物辅料，例如用于调节渗透压的药学上可接受的盐、缓冲剂、防腐剂等。可用于组合物和给药方法的其他介质是生理盐水和芝麻油。

[0055] 优选地，本发明的疫苗被设计为鼻内递送的疫苗，即可以鼻内给予个体的疫苗。相应地，这种鼻内疫苗配制剂优选设计为气雾剂(aerosol)或鼻喷雾剂。由于本发明的RNA-VLP本身会引起必要的微炎症，故不需要额外的佐剂。相应地，这种疫苗甚至可以在无任何其他佐剂的情况下提供。这在需要快速、简单和廉价的生产方法的情形中是特别优选的。

[0056] 根据另一方面，本发明涉及包含本发明VLP的药物组合物。

[0057] 本发明一个特别优选的方面涉及流感病毒样颗粒(VLP)，这些VLP包括：

[0058] -位于VLP表面的血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白，

[0059] -核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物，

[0060] -基质蛋白(M)核糖核蛋白复合物，

[0061] 其中这些VLP不含至少PB1、PB2和NS的核糖核蛋白复合物。

[0062] 优选地，本发明的这些VLP进一步包含遗传修饰的M核糖核蛋白复合物，优选其中M核糖核蛋白复合物含有编码非流感病毒的病原体的抗原、癌基因或恶性组织蛋白的病毒RNA，尤其是其中M核糖核蛋白复合物含有编码融合蛋白的病毒RNA，该融合蛋白含有M蛋白和非流感病毒的病原体的蛋白或抗原蛋白片段。

[0063] 根据本发明该方面的一个优选实施方案，该非流感病毒的病原体选自非流感的病毒、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、或朊病毒，优选非流感的RNA病毒、DNA病毒、或逆转录病毒，尤其所述病毒是SARS-COV-1、SARS-COV-2、或登革热病毒。

[0064] 本发明的另一方面是生产本发明VLP的方法，包括以下步骤：

[0065] -提供HA、NA、PA、PB1和PB2的单向载体；

[0066] -提供NP的双向载体，

[0067] -提供M的单向或双向载体，

[0068] -在重组细胞系统中表达这些载体以获得本发明的VLP。

[0069] 尽管(如上所述)也可以使用其他双向载体(只要这种设置不会导致繁殖性病毒颗粒,即在已送达了VLP的宿主细胞中生成病毒颗粒后具有传染性);然而,优选本发明VLP的生成中仅使用一种双向载体(针对NP)、甚至更优选仅使用两种双向载体(针对NP和M)。

[0070] 由于本方法优选旨在提供用于人类医学的组合物,因此本方法进一步包括将这些VLP填充到最终容器中、并将这些VLP完成为可供人类个体给药的药物组合物。

[0071] 优选用于本发明VPL的生成的是任何支持流感病毒复制、并符合监管审批可接受的标准的细胞。出于监管原因,本发明VLP因此优选在监管机构批准的细胞/细胞系中产生。相应地,优选在下列细胞中产生:Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞、非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)、293细胞、293T细胞、猪肾(PK)细胞、枭猴肾(owl monkey kidney,OMK)细胞、Madin-Darby牛肾(MDBK)细胞、鸡胚肾(CEK)细胞、鸡胚成纤维细胞、原代鸡肾细胞、或从鸡胚卵的绒毛尿囊膜分离的细胞,优选产生于MDCK细胞或Vero细胞中,尤其是产生于MDCK细胞中。MDCK细胞培养是特别优选的,因为MDCK细胞已被FDA和EMA批准作为疫苗生产(例如Flucelvax和Optaflu)的细胞系。MDCK细胞是用于生物医学研究的模型哺乳动物细胞系。MDCK细胞用于广泛多种细胞生物学研究,包括细胞极性、细胞-细胞粘附、集体细胞运动、以及对生长因子的反应。它是少数适用于3D细胞培养和称为分支形态发生的多细胞重排的细胞培养模型之一。

[0072] 本发明还涉及本VLP用于医疗用途,优选用于预防病原体引起的疾病以及用于治疗和预防肿瘤疾病(即在免疫肿瘤学中),优选用于预防或治疗新出现的病毒疾病,尤其是预防流感。用本发明疫苗预防和治疗的优选的由病毒引起的新发疾病是在Graham等(Graham et al.,Nat.Immunol.19(2018),20-28)中确定的那些,即副粘病毒科,尤其是麻疹病毒、腮腺炎病毒、尼帕病毒;批膜病毒科(Togaviridaea)(-alphaviridae),尤其是风疹病毒、Chikungunya病毒、西方马脑炎病毒、东方马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、Mayaro病毒、Ross河病毒、Barmah森林病毒、O'nyong'nyong病毒、Semliki森林病毒、Getah病毒、Sind-bis病毒;呼肠孤病毒科,尤其是轮状病毒、新轮状病毒、Banna病毒、Nelson Bay正呼肠孤病毒;正粘病毒科,尤其是甲型和乙型流感病毒,甲型流感病毒的多种亚型,Dhori病毒、Thogoto病毒、Bourbon病毒;腺病毒科,尤其是腺病毒4和7、腺病毒14或81或其他血清型;弹状病毒科;狂犬病病毒、水疱性口炎病毒(VSV);小核糖核酸病毒科,尤其是脊髓灰质炎病毒1、2和3、甲肝病毒、EV71、EV-D68、鼻病毒、Ljungan病毒;乳头瘤病毒科,尤其是HPV 6、11、16和18,以及其他血清型;痘病毒科,尤其是天花病毒、猴痘病毒;嗜肝DNA病毒科,尤其是乙肝病毒;疱疹病毒科,尤其是水痘病毒、CMV、EBV、HSV-1、HSV-2、HHV-6、HHV-7、HHV-8;黄病毒科,特别是黄热病病毒、蜱传脑炎(TBE)、日本脑炎(JE)、登革热病毒、HCV、Zika病毒、圣路易斯脑炎病毒、西尼罗病毒、Powassan病毒、Omsk出血热病毒,Murray Valley脑炎病毒,Rocio脑炎病毒,Kyasanur森林病毒,Alkhurma病毒,俄罗斯春夏季脑炎病毒,中欧蜱传脑炎病毒,Wesselsbron病毒,Bussuquara病毒,Cacipacore病毒,Ilheus病毒,Iguape病毒,Usutu病毒;肝炎病毒科,尤其是戊肝病毒;肺病毒科,尤其是呼吸道合胞病毒(RSV);间质肺病毒;丝状病毒科,尤其是埃博拉病毒、Marburg病毒,逆转录病毒科,尤其是HIV-1,冠状病毒科,尤其是SARS-COV-1、SARS-COV-2、中东呼吸综合征(MERS);细小病毒科,尤其是B19病毒、博卡病毒;杯状病毒科,尤其是诺如病毒;多瘤病毒科,特别是JC病毒、BK病毒;沙粒病毒

科,尤其是Lassa病毒、Machupo病毒、Junin病毒、Guanarito病毒、Chapare病毒、Sabia病毒、Flexal病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、Lujo病毒;多瘤病毒科,尤其是SV40,Merkel细胞病毒;动脉病毒科(Arteriviridaea),尤其是猿猴出血热病毒;布尼亚病毒科,尤其是汉坦病毒、裂谷病毒、刚果(Crimean Congo)出血热病毒、加利福尼亚脑炎病毒、Batai病毒、Bhanja病毒、Dobrava-Belgrade病毒、Erve病毒、Puumala病毒、Seoul病毒、Tahyna病毒、严重发热伴血小板减少综合征病毒、La Crosse脑炎病毒、Cache Valley病毒、Jamestown Canyon病毒、雪鞋兔病毒、Heartland病毒、Oropouche病毒;星形病毒科,尤其是星形病毒。在本发明的VLP中,可以将这些病毒的病毒抗原引入M基因中,以便在将本发明VLP(作为疫苗)给予(人类)个体时触发针对这种重组抗原的免疫应答。

[0073] 提供了治疗或预防由流感病毒(或其他(病毒性)疾病)引起的疾病或感染或其症状的方法。该方法包括将治疗有效量的包含本发明VLP的药物组合物(例如VLP疫苗)施用于受试者(例如哺乳动物,尤其是人类受试者)。一个实施方案涉及治疗患有或有风险患上或易感于由病原体(尤其是流感病毒)引起的疾病或感染或其症状的受试者的方法。该方法包括向受试者(例如哺乳动物受试者)施用一定量或治疗有效量的包含VLP的疫苗,在由所述病原体(尤其是流感病毒)引起的疾病、感染和/或其症状被治疗的条件下,所述量足以治疗所述疾病、感染和/或其症状。

[0074] 在一个实施方案中,本文的方法包括向受试者(包括被鉴定为需要这种治疗的人类受试者)施用有效量的本发明疫苗以产生这种效果。将治疗方法适当地施用于受试者(特别是人类),所述受试者受累于、患有、易感于或有风险患有疾病、病症、感染、或其症状,即由病原体(尤其是流感或流行性感冒)引起的那些。识别需要这种治疗的受试者可以基于受试者或医疗保健专业人员的判断,并且可以是主观的(例如意见形式的)或客观的(例如通过测试或诊断方法可测量的)。

[0075] 此外,提供了防止或保护免受由所述病原体(尤其是流感病毒)引起的疾病或感染或其症状的预防性方法。此类方法包括将治疗有效量的包含本发明免疫原性组合物的药物组合物(例如VLP疫苗)施用给受试者(例如哺乳动物,如人类),特别是在受试者感染之前或在疾病(例如流感)发作之前。

[0076] 因此(并且如以下实施例部分所示),为了创建RNA-VLP,要用到表达为蛋白的表面分子HA、NA和聚合酶PA、PB1、PB2,表达为蛋白的节段NP和M,以及RNA。HA、NA、PA、PB1和PB2都用于单向质粒(仅产生病毒蛋白)中构建RNA-VLP。例如,PCAGGS(图11)可用作为此目的的单向质粒。转染到细胞中后,该质粒仅表达信使RNA,然后被细胞自身机制翻译成病毒蛋白。双向质粒如pHWXccdB(图12)可用于将NP和M表达为mRNA和病毒拷贝RNA(vRNA)两者。负义基因组RNA(vRNA)的表达由人类RNA聚合酶I启动子和一个终止子序列(例如pHWXccdB上的鼠终止序列)来促进。在与聚合酶I单元相反的方向上,聚合酶II转录盒(例如鸡β-肌动蛋白启动子和polyA)编码来自相同病毒基因的mRNA。在将这些节段成功克隆到合适的质粒后,所有质粒一起转化到一个合适的细胞系(例如MDCK靶细胞系)中。自组装将这些蛋白和RNA聚拢到病毒外壳中,其具有表面蛋白以及包含病毒M和NP RNA的两种RNP。完成的RNA-VLP然后被释放到细胞培养基中并在那里被收获。

[0077] 本发明通过以下实施例和附图进一步说明,但不限于此。

[0078] 图1显示了病毒RNA触发细胞免疫的原理。树突细胞被流感感染或表达病毒RNA会

触发坏死性凋亡。坏死性凋亡的过程涉及细胞膜穿孔，这反过来导致胞内成分的释放，这些成分被其他细胞感知为危险信号。此外，穿孔还将病毒核酸和蛋白留在细胞间空隙，因此可以更好地被先天免疫细胞加工(这些先天免疫细胞已被那些危险相关分子模式(DAMPs)活化)，然后更有效地呈递给适应性免疫系统的细胞例如T细胞；

[0079] 图2显示了流感(IAV)病毒体的结构。a)流感病毒颗粒的电子显微镜图像。b)IAV病毒体的图形呈现：在源自宿主细胞的脂质双层中，有HA和NA刺突以及M2离子通道。该病毒体的强度由M1基质蛋白形成的包膜来支持。该病毒的遗传信息分为8个节段，均位于病毒体内部，为核糖核蛋白复合物。c)核糖核蛋白复合物(RNP)的示意图：遗传信息以负链单链RNA形式缠绕在核蛋白(NP)链周围。此外，这些RNP有自己的聚合酶复合物(PB1、PB2和PA)，在病毒体成功穿透宿主细胞后开始独立地复制病毒RNA；

[0080] 图3显示了RNA-VLP及其生成所需质粒的示意图：VLP的表面与IAV病毒体的表面相同(见图2)。RNA-VLP内部是两个核糖核蛋白复合物，它们在从头接种后表达NP和M的病毒性RNA。当RNA-VLP在细胞培养中形成时，仅需要蛋白形式的HA、NA和聚合酶PA、PB1、PB2，因此这些蛋白的表达是由只产生信使RNA的质粒和被宿主细胞机制翻译的蛋白来完成。由于蛋白形式和病毒拷贝RNA(vRNA)形式的NP和M都是必需的，因此需要表达信使RNA和vRNA的双向质粒；

[0081] 图4显示了由RNA-VLP触发的细胞死亡。人类树突细胞被各种VLP构建体感染，8小时保温后，用流式细胞术成像分析细胞死亡。空VLP(HA/NA(蛋白(Prot.)))和媒质(细胞培养基)用作阴性对照。流感病毒以及具有所有三种聚合酶作为额外RNP的VLP的感染为阳性对照；

[0082] 图5显示了测量受RNA-VLP诱导的细胞免疫的实验的设置。人类DC(树突细胞)被RNA-VLP或对照感染。4小时保温后，加入来自同一供体的DC，再过4小时，加入来自另一供体的T细胞。受感染的DC中的细胞死亡会活化添加的DC，进而导致T细胞增殖(见图1)；

[0083] 图6显示了由RNA-VLP触发的细胞免疫。人类树突细胞用各种VLP构建体感染并与DC和外来T细胞一起培养(见图5)。使用流式细胞术测量T细胞增殖。空VLP(HA/NA(Prot.))和媒质感染(细胞培养基)用作阴性对照。流感病毒以及含有所有三种聚合酶RNP的VLP的感染作为阳性对照；

[0084] 图7显示了IAV攻击研究的取样计划；

[0085] 图8显示了涉及抗IAV和PRCv的嵌合疫苗的攻击研究的取样计划；

[0086] 图9示例了用Gibson组装来产生嵌合双向质粒，该质粒包含IAV M节段的遗传信息以及SARS-CoV-2的遗传信息。简言之：phW2000质粒包含IAV M节段以及SARS-COV-2的一个特定区域，用在两个扩增子之间产生一段20个碱基对的重叠的特异性引物扩增该质粒。在组装过程中，核酸酶从5’端回嚼DNA，使两个扩增子退火。DNA聚合酶和连接酶填补任何空隙并添加DNA以去除DNA中的任何切口。该过程的产物是包含IAV M和SARS-CoV-2蛋白的嵌合序列的双向质粒；

[0087] 图10显示了IAV SARS-CoV-2嵌合RNA-VLP的生成方案。a)HA、NA、PB1、PB2和PA节段通过反向遗传学在单向(pUNI)质粒中拯救。NP和M在双向质粒(pBI)中拯救。b)SARS-CoV-2的一个特定区域通过PCR进行逆转录和扩增。c)包含IAV M节段和部分SARS-CoV-2的遗传信息的嵌合双向质粒由Gibson组装产生(见图9)。d)将HA、NA、PB1、PB2、PA、NP和嵌合M质粒转

化到MDCK细胞系培养物中。e)IAV-SARS-CoV-2嵌合RNA-VLP在细胞系中自我组装产生,在细胞培养上清液中收获。f)IAV-SARS-CoV-2嵌合RNA-VLP的细节;

[0088] 图11显示了pCAGGS的质粒图谱;

[0089] 图12显示了pHWX的质粒图谱。

实施例:

[0090] I.本发明概念的体外验证

[0091] 为了显示本发明的功能性,构建了具有HA和NA表面蛋白以及不同构型的RNP的以下VLP:

[0092] 1.空VLP,表面只有HA和NA蛋白

[0093] 2.VLP,具有NP核糖核蛋白复合物

[0094] 3.VLP,具有NP和M核糖核蛋白复合物。值得一提的是,由于pHWX质粒M的双向性质,除了HA和NA外,RNP和表面蛋白也都存在

[0095] 4.VLP,具有NP和所有聚合酶作为核糖核蛋白复合物形式。该构建体被设计为阳性对照,出于生物安全性考虑,不适合作为疫苗。

[0096] 对于原型疫苗,使用来自病毒株A/New Caledonia/20/1999的HA和NA,来自病毒株A/California/4/2009的M、聚合酶和NP。各个IAV节段按Hoffmann等(Arch.Virol.146(2001),2275-2289,10.1007/s007050170002)的方法分离。首先,从病毒分离物中提取vRNA。用UNI12引物和逆转录酶将vRNA重写为cDNA。然后节段特异性序列用节段特异性引物通过PCR扩增,并通过凝胶电泳纯化(Hoffmann等,2001)。各个节段用限制性内切酶和连接酶克隆到它们的预期质粒中,转化到大肠杆菌中并铺板在琼脂板上。选择单菌落以使用Sanger测序检查克隆的插入片段的完整性和正确性。然后用脂质胺将这些质粒一起转化到MDCK细胞中。转化后,通过"自组装"在MDCK细胞中产生RNA-VLP(Nayaket等,Virus Res.106(2004),147-165;10.1016/j.virusres.2004.08.012)。接下来,在细胞培养基中收获RNA-VLP。未来,计划使用更简单、更有效的方法来创建质粒和RNA-VLP,例如一锅克隆(Choi等,Sci.Rep.9,(2019)8318;10.1038/s41598-019-44813-z)。

[0097] 这些VLP的细胞死亡诱导在人类树突细胞中测试,因为在免疫细胞中触发坏死性凋亡的能力对于疫苗有效性至关重要(Hartmann等,2017)。为此,从匿名献血所得单核细胞而得到的树突细胞通过添加细胞因子GMCSF和IL-4来培养。这些树突细胞然后用各种VLP构建体或用作为阳性对照的流感病毒株NC/99感染。感染的八小时后,细胞死亡的诱导情况用流式细胞术测量。虽然仅将NP RNP包含到VLP中相比未感染的阴性对照而言并不会导致细胞死亡显著增加,但包含NP和MRNP两者时有显著增加,此种增加令人惊讶地高于同时也包含了所有聚合酶作为RNP的那些VLP(图4)。

[0098] VLP激发细胞免疫应答的能力通过T细胞树突细胞共培养法检查。为此目的,人类树突细胞用VLP构建体或对照(病毒或媒质)感染。4小时后,添加来自同一献血者的树突细胞,以便它们可以被来自死亡的被感染细胞的危险信号活化。该细胞混合物在4小时后再用来自另一供体的T细胞培养2.5天。这些外来T细胞一方面被移植物抗宿主反应活化,另一方面被树突细胞的状态活化,从而被驱动进行增殖。此增殖然后用关联每次细胞分裂(增殖)的稀释染料通过流式细胞术来测量(图5)。

[0099] 与细胞死亡实验类似，相比于阴性对照，空VLP不会触发增加的T细胞增殖。这表明用表面蛋白进行疫苗接种主要激发抗体介导的免疫。另一方面，具有M和NP RNP的VLP能够产生至少与感染真正的流感病毒(阳性对照)相似的高水平T细胞增殖。有趣的是，M/NP RNP组合比NP和所有三种聚合酶的组合更有效。仅包含NP RNP的VLP构建体能够引起T细胞增殖的轻微增加。这些数据表明，由包括HA、NA的表面和填充有NP和M RNP的M蛋白组成的VLP是细胞抗病毒免疫的良好触发因素(图6)。

[0100] 总之，本发明将VLP和表达病毒RNA的复合物的技术组合，所得疫苗看起来像用于免疫系统的感染性颗粒。在被生物体吸收后，这些RNA-VLP通过穿透细胞核并开始通过它们带来的聚合酶表达病毒RNA而表现得像感染性IAV病毒体。这种新合成的RNA然后触发能增强细胞免疫的炎症信号级联反应。确切地说，这一步骤尚未用于当前的疫苗接种策略中。我们已经证明，这种创新产生了细胞培养系统中长期保护所必需的细胞免疫。

[0101] II.本发明概念的体内验证

[0102] 用两个实验进行本发明概念的体内验证。第一个实验的重点是测试RNA-VLP作为猪流感的唯一疫苗接种的效果。在第二个实验中，构建了一种具有抗流感和猪冠状病毒的更广泛活性的RNA-VLP疫苗，所述猪冠状病毒在猪中引起的疾病相当于感染当前SARS-CoV-2的人类中观察到的疾病。

[0103] II.1.在猪中验证用RNA-VLP进行抗IAV疫苗接种的概念。

[0104] 一种具有来自最近分离的猪H1N1 IAV分离株的数个节段的RNA-VLP如上文所述构建。此RNA-VLP作为抗流感的疫苗的功效在一项攻击实验中测试，该实验中将RNA-VLP的效用与一种传统兽用抗流感疫苗进行了比较。30只动物分成三组，每组10只：(i)获得RNA-VLP加媒质的动物，(ii)服用常规疫苗和媒质的动物，和(iii)媒质组。疫苗接种后，10只动物中有5只受到IAV感染的攻击(图7)。以临床症状、实验室测量值(如病毒载量和细胞因子水平)、和细胞免疫学测量值作为疫苗效力的读数。

[0105] II.2.验证抗IAV和冠状病毒的联合疫苗接种的概念

[0106] 为该实验构建了一种RNA-VLP，其中将猪呼吸道冠状病毒(PRCv)的部分核蛋白序列添加至M节段RNP。PRCv具有与SARS-CoV-2相似的结构，被作为模型，因为目前没有测试SARS-CoV-2感染的动物模型。40只动物分成两组，每组20只：(i)获得RNA-VLP加媒质的动物，和(ii)媒质组。疫苗接种后，20只动物中5只一组用IAV、PRCv、IAV与PRCv的组合或媒质进行攻击(图8)。以临床症状、实验室测量值(如病毒载量和细胞因子水平)、和细胞免疫学测量值作为疫苗效力的读数。

[0107] II.3.验证抗IAV和SARS-CoV-2的联合疫苗接种的概念

[0108] 为了该实验，构建具有嵌合IAV M RNP的RNA-VLP。嵌合M RNP包含IAVM节段的遗传信息以及完全或部分地描述一种SARS-CoV-2蛋白的遗传信息。VLP如上述构建。这些VLP用于给猪进行疫苗接种。在疫苗接种和可能的加强疫苗接种后，从这些动物身上抽取血液，用于血清学和体外细胞免疫学测试。一旦确定了有效且可用的SARS-CoV-2动物模型，将在体内攻击研究中测试抗SARS-CoV-2RNA-VLP(图9和10)。

[0109] 缩写：

[0110] DAI IFN调节因子的DNA依赖性活化剂

[0111] DAMP 危险相关的分子模式

[0112] DC 树突细胞

[0113] HA 血凝素

[0114] IAV 甲型流感病毒

[0115] LAIV 减毒活病毒疫苗

[0116] NA 神经氨酸酶

[0117] NP 核蛋白

[0118] PAMP 病原体相关分子模式

[0119] PRCv 猪呼吸道冠状病毒

[0120] RNA 核糖核酸

[0121] RNP 核糖核蛋白复合物

[0122] ZBP1 Z-DNA结合蛋白1

[0123] 序列

SEQ ID NO: 1 (pCAGGS):

GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT

GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG

ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACT

ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT

CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG

TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCC

ATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG

CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAG

GTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCG

GCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGC

GCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCC

[0124] CTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG

CCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTG

CGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTT

GTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGG

GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCT

GTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC

GGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGG

CCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGC

GGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATC

TGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCC

GGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGC

CTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGT

GTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCA

[0125]

ACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCTCGAGGAATTCACTCCTCAGGTGCA

GGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTT

CCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAAT

TTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAA

TCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGA

ACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGA

AAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAA

AATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCC

TCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT

GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGT

GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT

CGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC

CTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG

AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA

AAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATA

AAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGAT

CCGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCT

CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT

ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG

AACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC

GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTC

CCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGC

GTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCT

GTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC

GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC

GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCG

CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG

TAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG

ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT

CAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA

GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGT

TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA

GTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG

AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA

GCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT

CACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC

CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTG

TTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG

TGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGC

GTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG

GGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT
GATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA
AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATT
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTC
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG

SEQ ID NO: 2 (pHWX):

[0126]

CAGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCC
AATCCTCCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCCACCCCCCAGAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGA
TGCAATTTCCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCACGGGG
GAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCATTTA
GGTGACCGCCGGGAGGGCGTCCCCGGCCCGGCGCTGCTCCCGCGTGTGTCCTGGGGTTGACCAGAGGGCC
CCGGGCGCTCCGTGTGTGGCTGCGATGGTGGCGTTTTTGGGGACAGGTGTCCGTGTCGCGCGTCGCCTGG
GCCGGCGGCGTGGTCGGTGACGCGACCTCCCGGCCCCGGGGGAGGTATATCTTTCGCTCCGAGTCGGCAT
TTTGGGCCGCCGGGTTATTGGAGACGGGGTCGACCTGCAGACTGGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTT
ATATTCCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTC
TTCCCCGATAACGGAAACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATA
TGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCA
TCCGTCGCCCGGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTCTTTT
ATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTCACCAGCCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGAGCCGTTCATTTCAAT
AAACCGGGCGACCTCAGCCATCCCTTCCTGATTTTCCGCTTTCCAGCGTTCGGCACGCAGACGACGGGCT
TCATTCTGCATGGTTGTGCTTACCAGACCGGAGATATTGACATCATATATGCCTTGAGCAACTGATAGCT
GTCGCTGTCAACTGTCACTGTAATACGCTGCTTCATAGCATACCTCTTTTTGACATACTTCGGGTATACA
TATCAGTATATATTCTTATACCGCAAAAATCAGCGCGCAAATACGCATACTGTTATCTGGCTTTTAGTAA
GCCGGATCCACGCGTCGTCTCCTCCCCCCCAACTTCGGAGGTCGACCAGTACTCCGGTTAACTGCTAGAC
CCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG
CTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATT
TTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAA
TCCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCG
ATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGG
CGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATCGACGTCAGGTGGCACTTTTCG
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGA
CAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCG
CCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT
GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
TATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA
GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA
ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTT
TTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC

[0127]

AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAA
CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC
TGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGTTCTCGCGG
TATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG
GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGT
CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT
GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGAC
CCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC
TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG
AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGG
GGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA
TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCT
CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCG
GCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgatt
cattaatg

[0128] SEQ ID NO:3(甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段1聚合酶PB2(PB2)基因;FJ969516.1甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段1聚合酶PB2(PB2)基因,完整cds)

[0129]

ATGGAGAGAATAAAAGAACTGAGAGATCTAATGTCGCAGTCCCGCACTCGCGAGATACTCACTAAGACCA
CTGTGGACCATATGGCCATAATCAAAAAGTACACATCAGGAAGGCAAGAGAAGAACCCCGCACTCAGAAT
GAAGTGGATGATGGCAATGAGATACCCAATTACAGCAGACAAGAGAATAATGGACATGATTCCAGAGAGG
AATGAACAAGGACAAACCCTCTGGAGCAAAACAAACGATGCTGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACCTC
TGGCCGTAACATGGTGGAATAGGAATGGCCCAACAACAAGTACAGTTCATTACCCTAAGGTATATAAAAC
TTATTTCGAAAAGGTCGAAAGGTTGAAACATGGTACCTTCGGCCCTGTCCACTTCAGAAATCAAGTTAAA
ATAAGGAGGAGAGTTGATACAAACCCTGGCCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATTA
TGGAAGTTGTTTTCCCAAATGAAGTGGGGGCAAGAATACTGACATCAGAGTCACAGCTGGCAATAACAAA
AGAGAAGAAAGAAGAGCTCCAGGATTGTAAAATTGCTCCCTTGATGGTGGCGTACATGCTAGAAAGAGAA
TTGGTCCGTAAAACAAGGTTTCTCCCAGTAGCCGGCGGAACAGGCAGTGTTTATATTGAAGTGTTGCACT
TAACCCAAGGGACGTGCTGGGAGCAGATGTACACTCCAGGAGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGACCA
AAGTTTGATTATCGCTGCTAGAAACATAGTAAGAAGAGCAGCAGTGTCAGCAGACCCATTAGCATCTCTC
TTGGAAATGTGCCACAGCACACAGATTGGAGGAGTAAGGATGGTGGACATCCTTAGACAGAATCCAACTG
AGGAACAAGCCGTAGACATATGCAAGGCAGCAATAGGGTTGAGGATTAGCTCATCTTTCAGTTTTGGTGG
GTTCACTTTCAAAAGGACAAGCGGATCATCAGTCAAGAAAGAAGAAGAAGTGCTAACGGGCAACCTCCAA
ACACTGAAAATAAGAGTACATGAAGGGTATGAAGAATTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCTATTC

TCAGAAAGGCAACCAGGAGATTGATCCAGTTGATAGTAAGCGGGAGAGACGAGCAGTCAATTGCTGAGGC
AATAATTGTGGCCATGGTATTCTCACAGGAGGATTGCATGATCAAGGCAGTTAGGGGCGATCTGAACTTT
GTCAATAGGGCAAACCAGCGACTGAACCCCATGCACCAACTCTTGAGGCATTTCCAAAAAGATGCAAAAG
TGCTTTTCCAGAACTGGGGAATTGAATCCATCGACAATGTGATGGGAATGATCGGAATACTGCCCGACAT
GACCCCAAGCACGGAGATGTCGCTGAGAGGGATAAGAGTCAGCAAAATGGGAGTAGATGAATACTCCAGC
ACGGAGAGAGTGGTAGTGAGTATTGACCGATTTTTAAGGGTTAGAGATCAAAGAGGGAACGTACTATTGT
CTCCCGAAGAAGTCAGTGAAACGCAAGGAACTGAGAAGTTGACAATAACTTATTCGTCATCAATGATGTG
GGAGATCAATGGCCCTGAGTCAGTGCTAGTCAACACTTATCAATGGATAATCAGGAACTGGGAAATTGTG

[0130] AAAATTCAATGGTCACAAGATCCCACAATGTTATACAACAAAATGGAATTTGAACCATTTCAGTCTCTTG
TCCCTAAGGCAACCAGAAGCCGGTACAGTGGATTCGTAAGGACACTGTTCCAGCAAATGCGGGATGTGCT
TGGGACATTTGACACTGTCCAAATAATAAAACTTCTCCCCTTTGCTGCTGCCCCACCAGAACAGAGTAGG
ATGCAATTTTCCTCATTGACTGTGAATGTGAGAGGATCAGGGTTGAGGATACTGGTAAGAGGCAATTCTC
CAGTATTCAATTACAACAAGGCAACCAAACGACTTACAGTTCTTGGAAAGGATGCAGGTGCATTGACTGA
AGATCCAGATGAAGGCACATCTGGGGTGGAGTCTGCTGTCCTGAGAGGATTTCTCATTTTGGGCAAAGAA
GACAAGAGATATGGCCCAGCATTAAGCATCAATGAACTGAGCAATCTTGCAAAAGGAGAGAAGGCTAATG
TGCTAATTGGGCAAGGGGACGTAGTGTTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAG
CCAGACAGCGACCAAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAG

[0131] SEQ ID NO:4(甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段2聚合酶PB1(PB1)基因;MK159411.1甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段2聚合酶PB1(PB1)基因,完整cds;以及非功能性PB1-F2蛋白3(PB1-F2)基因,完整序列)

AGCAAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTCTACTTTTCCTAAAAATTCCAGCGCAAA
ATGCCATAAGCACCACATTCCCTTATACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAGGATACAC
CATGGACACAGTAAACAGAACACACCAATACTCAGAAAAGGGAAAGTGGACGACAAACACAGAGACTGGT
GCACCCCAGCTCAACCCGATTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAACCAAGTGGGTATGCACAAACAG
ACTGTGTTCTAGAGGCTATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGAATATTTGAGAATTCATGCCTTGA
AACAATGGAAGTTGTTCAACAAACAAGGGTAGATAAACTAACTCAAGGTCGCCAGACTTATGATTGGACA
TTAAACAGAAATCAACCGGCAGCAACTGCATTGGCCAACACCATAGAAGTCTTTAGATCGAATGGCCTAA
CAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTTAAAGGATGTAATGGAATCAATGAACAAAGAGGAAAT
AGAGATAACAACCCACTTTCAAAGAAAAAGGAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAGATGGTCACGCAA
AGAACAATAGGGAAGAAAAAACAAAGACTGAATAAGAGAGGCTATCTAATAAGAGCACTGACATTAAATA
CGATGACCAAAGATGCAGAGAGAGGCAAGTTAAAAAGAAGGGCTATCGCAACACCTGGGATGCAGATTAG
AGGTTTCGTATACTTTGTTGAAACTTTAGCTAGGAGCATTTGCGAAAAGCTTGAACAGTCTGGGCTCCCA
GTAGGGGGCAATGAAAAGAAGGCCAAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAGATGATGACTAATTCACAAGACA
CAGAGATTTCTTTCACAATCACTGGGGACAACACTAAGTGGAATGAAAATCAAAATCCTCGAATGTTCCT
GGCGATGATTACATATATCACCAGAAATCAACCCGAGTGGTTCAGAAACATCCTGAGCATGGCACCCATA
ATGTTCTCAAACAAAATGGCAAGACTAGGGAAAGGGTACATGTTCGAGAGTAAAAGAATGAAGATTCGAA
CACAAATACCAGCAGAAATGCTAGCAAGCATTGACCTGAAGTACTTCAATGAATCAACAAAGAAGAAAAT
TGAGAAAATAAGGCCTCTTCTAATAGATGGCACAGCATCACTGAGTCCTGGGATGATGATGGGCATGTTC

[0133]

AACATGCTAAGTACGGTCTTGGGAGTCTCGATACTGAATCTTGGACAAAAGAAATACACCAAGACAATAT
ACTGGTGGGATGGGCTCCAATCATCCGACGATTTTGCTCTCATAGTGAATGCACCAAACCATGAGGGAAT
ACAAGCAGGAGTGGACAGATTCTACAGGACCTGCAAGTTAGTGGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCC
TATATAAATAAGACAGGGACATTTGAATTCACAAGCTTTTTTTATCGCTATGGATTTGTGGCTAATTTTA
GCATGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGACATGAGTATTGGAGTAACAGT
GATAAAGAACAACATGATAAACAATGACCTTGGACCTGCAACGGCCCAGATGGCTCTTCAATTGTTCATC
AAAGACTACAGATACACATATAGGTGCCATAGGGGAGACACACAAATTCAGACGAGAAGATCATTTGAGT
TAAAGAAGCTGTGGGATCAAACCCAATCAAAAGTAGGGCTATTAGTATCAGATGGAGGACCAAACTTATA
CAATATACGGAATCTTCACATTCCTGAAGTCTGCTTAAAATGGGAGCTAATGGATGATGATTATCGGGGA
AGACTTTGTAATCCCCTGAATCCCTTTGTCAGTCATAAAGAGATTGATTCTGTAAACAATGCTGTGGTAA
TGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGAATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCCTGGATTCCCAA
GAGGAATCGTTCTATTCTCAACACAAGCCAAAGGGGAATTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGC
TGCAATCTATTCGAGAAATTTTTCCCTAGCAGTTCATATAGGAGACCGGTTGGAATTTCTAGCATGGTGG
AGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGGATTGATGCCAGGGTCGACTTCGAGTCTGGACGGATCAAGAAAGAAGA
GTTCTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGCAAAAATAATGAATTTAACTT
GTCCTTCATGAAAAAATGCCTTGTTTCTACT

[0134] SEQ ID NO:5(甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段3聚合酶PA(PA)基因;FJ966081.1甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段3聚合酶PA(PA)基因,完整cds)

[0135]

ATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAAT
ATGGGGAAGATCCGAAAATCGAAACTAACAAGTTTGCTGCAATATGCACACATTTGGAAGTTTGTTTCAT
GTATTCGGATTTCCATTTCATCGACGAACGGGGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGTGACCCGAATGCA
CTATTGAAGCACCGATTTGAGATAATTGAAGGAAGAGACCGAATCATGGCCTGGACAGTGGTGAACAGTA
TATGTAACACAACAGGGGTAGAGAAGCCTAAATTTCTTCCTGATTTGTATGATTACAAAGAGAACCGGTT
CATTGAAATTGGAGTAACACGGAGGGAAGTCCACATATATTACCTAGAGAAAGCCAACAAAATAAAATCT
GAGAAGACACACATTCACATCTTTTCATTCACTGGAGAGGAGATGGCCACCAAAGCGGACTACACCCTTG
ACGAAGAGAGCAGGGCAAGAATCAAAACTAGGCTTTTCACTATAAGACAAGAAATGGCCAGTAGGAGTCT
ATGGGATTCCTTTCGTCAGTCCGAAAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATTTGAGATTACAGGAACT
ATGCGCAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCACCGAACTTCCCCAGCCTTGAAAACTTTAGAGCCTATGTAG
ATGGATTCGAGCCGAACGGCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCCCAAATGTCAAAAGAAGTGAACGCCAAAAT
TGAACCATTCTTGAGGACGACACCACGCCCCCTCAGATTGCCTGATGGGCCTCTTTGCCATCAGCGGTCA
AAGTTCCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCGAGTCACGAGGGGGAGGGAATACCAC
TATATGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTCTTTGGCTGGAAAGAGCCTAACATAGTCAAACCACATGA
GAAAGGCATAAATCCCAATTACCTCATGGCTTGGAAGCAGGTGCTAGCAGAGCTACAGGACATTGAAAAT
GAAGAGAAGATCCCAAGGACAAAGAACATGAAGAGAACAAGCCAATTGAAGTGGGCACTCGGTGAAAATA
TGGCACCAGAAAAAGTAGACTTTGATGACTGCAAAGATGTTGGAGACCTTAAACAGTATGACAGTGATGA
GCCAGAGCCCAGATCTCTAGCAAGCTGGGTCCAAAATGAATTCAATAAGGCATGTGAATTGACTGATTCA
AGCTGGATAGAACTTGATGAAATAGGAGAAGATGTTGCCCCGATTGAACATATCGCAAGCATGAGGAGGA
ACTATTTTACAGCAGAAGTGTCCCACTGCAGGGCTACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAATAC

GGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTTCAGCTGATCCCAATGATAAGCAAATGTAGG
ACCAAAGAAGGAAGACGGAAAACAAACCTGTATGGGTTCATTATAAAAGGAAGGTCTCATTTGAGAAATG
ATACTGATGTGGTGAACTTTGTAAGTATGGAGTTCTCACTCACTGACCCGAGACTGGAGCCACACAAATG
GGAAAAATACTGTGTTCTTGAAATAGGAGACATGCTCTTGAGGACTGCGATAGGCCAAGTGTCGAGGCCC
ATGTTCCTATATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGCATGGAAATGAGGCGCT
[0136] GCCTTCTTCAGTCTCTTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGAGTCTTCTGTCAAAGAGAAAGACAT
GACCAAGGAATTCTTTGAAAACAAATCGGAAACATGGCCAATCGGAGAGTCACCCAGGGGAGTGGAGGAA
GGCTCTATTGGGAAAGTGTGCAGGACCTTACTGGCAAAATCTGTATTCAACAGTCTATATGCGTCTCCAC
AACTTGAGGGGTTTTCGGCTGAATCTAGAAAATTGCTTCTCATTGTTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGA
ACCTGGAACCTTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATCGAGGAGTGCCTGATTAATGATCCCTGGGTT
TTGCTTAATGCATCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACACATGCACTGAAGTAG

[0137] SEQ ID NO:6(甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段5核衣壳蛋白(NP)基因;FJ966083.1甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段5核衣壳蛋白(NP)基因,完整cds)

[0138] ATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCATATGAACAAATGGAGACTGGTGGGGAGCGCCAGGATGCCACA
GAAATCAGAGCATCTGTCGGAAGAATGATTGGTGGAATCGGGAGATTCTACATCCAAATGTGCACTGAACTCAAACT
CAGTGATTATGATGGACGACTAATCCAGAATAGCATAACAATAGAGAGGATGGTGCTTTCTGCTTTTGATGAGAGAA
GAAATAAATACCTAGAAGAGCATCCCAGTGCTGGGAAGGACCCTAAGAAAACAGGAGGACCCATATATAGAAGAGTA
GACGGAAAGTGGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAGAAGAAATAAGGAGAGTTTGGCGCCAAGCAAACAATGG
CGAAGATGCAACAGCAGGTCTTACTCATATCATGATTTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAA
GAGCGCTTGTTCGCACCGGAATGGATCCCAGAATGTGCTCTCTAATGCAAGGTTCAACACTTCCCAGAAGGTCTGGT
GCCGCAGGTGCTGCGGTGAAAGGAGTTGGAACAATAGCAATGGAGTTAATCAGAATGATCAAACGTGGAATCAATGA
CCGAAATTTCTGGAGGGGTGAAAATGGACGAAGGACAAGGGTTGCTTATGAAAGAATGTGCAATATCCTCAAAGGAA
AATTTCAAACAGCTGCCCAGAGGGCAATGATGGATCAAGTAAGAGAAAGTCGAAACCCAGGAAACGCTGAGATTGAA
GACCTCATTTTCCTGGCACGGTCAGCACTCATTCTGAGGGGATCAGTTGCACATAAATCCTGCCTGCCTGCTTGTGT
GTATGGGCTTGCAGTAGCAAGTGGGCATGACTTTGAAAGGGAAGGGTACTCACTGGTCGGGATAGACCCATTCAAAT
TACTCCAAAACAGCCAAGTGGTCAGCCTGATGAGACCAAATGAAAACCCAGCTCACAAGAGTCAATTGGTGTGGATG
GCATGCCACTCTGCTGCATTTGAAGATTTAAGAGTATCAAGTTTCATAAGAGGAAAGAAAGTGATTCCAAGAGGAAA
GCTTTCCACAAGAGGGGTCCAGATTGCTTCAAATGAGAATGTGGAAACCATGGACTCCAATACCCTGGAACTGAGAA
GCAGATACTGGGCCATAAGGACCAGGAGTGGAGGAAATACCAATCAACAAAAGGCATCCGCAGGCCAGATCAGTGTG
CAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGGAATCTCCCTTTTGAAAGAGCAACCGTTATGGCAGCATTCAGCGGGAACAATGA
AGGACGGACATCCGACATGCGAACAGAAGTTATAAGAATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAAGATTTGTCCTTCCAGG
GGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAATGAAGGG
TCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAGTTGA

[0139] SEQ ID NO:7(甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段7基质蛋白2(M2)和基质蛋白1(M1)基因;FJ969513.1甲型流感病毒(A/California/04/2009(H1N1))节段7基质蛋白2(M2)和基质蛋白1(M1)基因,完整cds)

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGA
TCGCGCAGAGACTGGAAAGTGTCTTTGCAGGAAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAA
GACAAGACCAATCTTGTCACCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTCACGCTCACCGTGCCCAGT
GAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGG
ATAGAGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTCAAAAGAGAAATAACGTTCCATGGGGCCAAGGAGGTGTCACT
AAGCTATTCAACTGGTGCACTTGCCAGTTGCATGGGCCTCATATACAACAGGATGGGAACAGTGACCACA
GAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATTCACAGCATCGGTCTCACAGAC

[0140] AGATGGCTACTACCACCAATCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACGGCAAA
GGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGACTAGG
CAGATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTC
TTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCA
TTGCAGCAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGATATTGTGGATTACTGATCGTCTTTTTTTCAAATGTAT
TTATCGTCGCTTTAAATACGGTTTGAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAA
GAATATCAACAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTAGAGT
AA

[0141] SEQ ID NO:8(甲型流感病毒(A/New Caledonia/20/1999(H1N1))节段4HA基因;CY031336.1甲型流感病毒(A/New Caledonia/20/1999(H1N1))节段4序列)

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAAATGAAAGCAAAACTACTGGTCCTGTTATGTACATTTAC
AGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCCAACAACTCAACCGACACTGTTGACACAGTA
CTTGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTCAACCTACTTGAGGACAGTCACAATGGAAAACTATGTC
TACTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAATTGCAGCGTTGCCGGATGGATCTTAGGAAACCCAGA
ATGCGAATTACTGATTTCCAAGGAATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAATCCTGAGAATGGAACA
TGTTACCCAGGGTATTTCGCCGACTATGAGGAACTGAGGGAGCAATTGAGTTCAGTATCTTCATTTGAGA
GATTCGAAATATTCCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCACCCACACCGTAACCGGAGTATCAGCATCATGCTC
CCATAATGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGGGAAGAATGGTTTGTACCCAAAC
CTGAGCAAGTCCTATGTAAACAACAAAGAGAAAGAAGTCCTTGTACTATGGGGTGTTCATCACCCGCCTA

[0142] ACATAGGGGACCAAAGGGCCCTCTATCATACAGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTCACATTATAG
CAGAAGATTCACCCCAGAAATAGCCAAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAGGAAGGAAGAATCAACTACTAC
TGGACTCTGCTGGAACCTGGGGATACAATAATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCGCCATGGTATG
CTTTTGCACTGAGTAGAGGCTTTGGATCAGGAATCATCACCTCAAATGCACCAATGGATGAATGTGATGC
GAAGTGTCAAACACCTCAGGGAGCTATAAACAGCAGTCTTCCTTTCCAGAATGTACACCCAGTCACAATA
GGAGAGTGTCCAAAGTATGTCAGGAGTGCAAAATTAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATCCCATCCA
TTCAATCCAGAGGTTTGTTTGGAGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGTGGACTGGAATGGTAGATGG
GTGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAGCAAGGATCTGGCTATGCTGCAGATCAAAAAAGTACACAAAAT
GCCATTAACGGGATTACAAACAAGGTGAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATTCACAGCTGTGG
GCAAAGAATTCAACAAATTGGAAAGAAGGATGGAAAACTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTCTAGA
CATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTGGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTTTGGATTTCCATGACTCC

[0143]
AATGTGAAGAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAAGAATAATGCCAAAGAAATAGGAAACGGGT
GTTTTGAATTCTATCACAAGTGTAACAATGAATGCATGGAGAGTGTGAAAAATGGAACTTATGACTATCC
AAAATATTCCGAAGAATCAAAGTTAAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAATCAATGGGAGTC
TATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCCTGGTTCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCA
GCTTCTGGATGTGTTCCAATGGGTCTTTGCAGTGTAGAATATGCATCTGAGACCAGAATTTCAGAAATAT
AAGAAAAAACACCCTTGTTTCTACT

[0144] SEQ ID NO:9(甲型流感病毒(A/New Caledonia/20/1999(H1N1))节段6NA基因;CY033624.1甲型流感病毒(A/New Caledonia/20/1999(H1N1))节段6,完整序列)

[0145]
AATGAATCCAAATCAAAAAATAATAACCATTGGATCAATCAGTATAGCAATCGGAATAATTAGTCTAATG
TTGCAAATAGGAAATATTATTTCAATATGGGCTAGTCACTCAATCCAAACTGGAAGTCAAAACCACACTG
GAGTATGCAACCAAAGAATCATCACATATGAAAACAGCACCTGGGTGAATCACACATATGTTAATATTAA
CAACACTAATGTTGTTGCTGGAAAGGACAAAACTTCAGTGACATTGGCCGGCAATTCATCTCTTTGTTCT
ATCAGTGGATGGGCTATATACACAAAAGACAACAGCATAAGAATTGGCTCCAAAGGAGATGTTTTTGTCA
TAAGAGAACCTTTCATATCATGTTCTCACTTGGAATGCAGAACCTTTTTTCTGACCCAAGGTGCTCTATT
AAATGACAAACATTCAAATGGGACCGTTAAGGACAGAAGTCCTTATAGGGCCTTAATGAGCTGTCCTCTA
GGTGAAGCTCCGTCCCCATACAATTCAAAGTTTGAATCAGTTGCATGGTCAGCAAGCGCATGCCATGATG
GCATGGGCTGGTTAACAATCGGAATTTCTGGTCCAGACAATGGAGCTGTGGCTGTACTAAAATACAACGG
CATAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAAAAAGCGAATATTAAGAACACAAGAGTCTGAATGTGTCTGT
GTGAACGGGTCATGTTTCACCATAATGACCGATGGCCCGAGTAATGGGGCCGCCTCGTACAAAATCTTCA
AGATCGAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAATTTTCATTATGAGGAATGTTC
CTGTTACCCAGACACTGGCACAGTGATGTGTGTATGCAGGGACAACTGGCATGGTTCAAATCGACCTTGG
GTGTCTTTTAATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTGTTCGGTGACAATCCGC
GTCCCAAAGATGGAGAGGGCAGCTGTAATCCAGTGACTGTTGATGGAGCAGACGGAGTAAAGGGGTTTTC
ATACAAATATGGTAATGGTGTTTGGATAGGAAGGACTAAAAGTAACAGACTTAGAAAGGGGTTTGAGATG
ATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGATACCGACAGTGATTTCTCAGTGAAACAGGATGTTGTGGCAATAA
CTGATTGGTCAGGGTACAGCGGAAGTTTCGTTCAACATCCTGAGTTAACAGGATTGGACTGTATAAGACC
TTGCTTCTGGGTTGAGTTAGTCAGAGGACTGCCTAGAGAAAATACAACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGC
ATTTCTTTTTGTGGCGTAAATAGTGATACTGCAAACTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCGTTCA
CCATTGACAAGTAG

[0146] SEQ ID Nos:3至9均可在UNIPROT数据库中获得。

[0147] 本发明公开了以下优选实施方案:

[0148] 1.流感病毒样颗粒(VLP),其中这些VLP包括:

[0149] -血凝素(HA)蛋白和神经氨酸酶(NA)蛋白位于VLP表面,

[0150] -核蛋白(NP)核糖核蛋白复合物,

[0151] 其中这些VLP不含PB1、PB2和NS2中至少一种的核糖核蛋白复合物。

[0152] 2.实施方案1的VLP,还包含基质蛋白(M)核糖核蛋白复合物。

[0153] 3.实施方案1或2的VLP,其中HA蛋白选自季节性、非大流行的HA蛋白。

[0154] 4.实施方案1至3中任一项所述的VLP,其中所述NA蛋白选自季节性、非大流行的NA蛋白。

[0155] 5.实施方案1至4中任一项的VLP,进一步包含遗传修饰的M核糖核蛋白复合物,优

选其中所述M核糖核蛋白复合物包含编码非流感病毒的病原体的抗原、癌基因或恶性组织的病毒RNA,特别是其中M核糖核蛋白复合物含有编码融合蛋白的病毒RNA,该融合蛋白含有M蛋白和非流感病毒的病原体的蛋白或抗原性蛋白片段。

[0156] 6.实施方案5的VLP,其中所述非流感病毒的病原体尤其选自非流感的病毒、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、或朊病毒,优选非流感的RNA病毒、DNA病毒、或逆转录病毒,尤其所述病毒是SARS-COV-1、SARS-COV-2、或登革热病毒。

[0157] 7.实施方案1至6中任一项的VLP,其中这些VLP包含:

[0158] -位于VLP表面的HA蛋白和NA蛋白,

[0159] -NP核糖核蛋白复合物,优选M核糖核蛋白复合物,

[0160] 其中这些VLP不含PB1、PB2、NS1和NS2中至少两者的核糖核蛋白复合物;优选地,其中这些VLP不含PB1、PB2、NS1和NS2中至少三者的核糖核蛋白复合物;甚至更优选其中这些VLP不含NS1的核糖核蛋白复合物;特别是其中这些VLPs不包含PB1、PB2、NS1和NS2的核糖核蛋白复合物。

[0161] 8.实施方案1至7中任一项的VLP,一旦进入细胞则触发炎性细胞死亡(坏死性凋亡)。

[0162] 9.疫苗,包含实施方案1至8中任一项的VLP和药学上可接受的赋形剂。

[0163] 10.实施方案9的疫苗,其中所述疫苗是鼻内疫苗,优选气雾剂或鼻喷雾剂。

[0164] 11.药物组合物,包含实施方案1至8中任一项的VLP。

[0165] 12.产生实施方案1至8任一项所述的VLP的方法,包括以下步骤:

[0166] -提供HA、NA、PA、PB1和PB2的单向载体;

[0167] -提供NP的双向载体,

[0168] -提供M的单向或双向载体,

[0169] -在重组细胞系统中表达这些载体以获得实施方案1至8任一项的VLP。

[0170] 13.实施方案12的方法,进一步包括将VLP填充到最终容器中、并将VLP制成准备用于对人类个体给药的药物组合物的步骤。

[0171] 14.实施方案12或13的方法,其中这些载体表达在Madin-Darby犬肾(MDCK)细胞、非洲绿猴肾(Vero)细胞、293细胞、293T细胞、猪肾(PK)细胞、枭猴肾(OMK)细胞、Madin-Darby牛肾(MDBK)细胞、鸡胚肾(CEK)细胞、鸡胚成纤维细胞、原代鸡肾细胞、或从有胚鸡卵的绒毛尿囊膜分离的细胞中,优选表达在MDCK细胞或Vero细胞中,尤其是表达在MDCK细胞中。

[0172] 15.实施方案1至8中任一项的VLP,用于医学用途,优选用于预防病原体引起的疾病,尤其是用于预防流感。

序列表

<110> 奥地利卫生与食品安全机构公司(OSTERREICHISCHE AGENTUR FUR GESUNDHEIT UND ERNAHRUNGSSICHERHEIT GMBH)

<120> 流感病毒样颗粒(VLP)

<130> R 78004

<150> EP20169787.7

<151> 2020-04-16

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4790

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pCAGGS

<400> 1

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcat cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc 420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca 480
gcgatggggg cgggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg 540
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt 600
tcctttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660
gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc 720
ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc 780
gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840
ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gcccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg 960
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc 1020
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080
tgggggggtg agcagggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaacccccc cctgcacccc 1140
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc 1200
gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg 1260
ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggagc gccggcggct 1320

gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380
gacttccttt gtcccaaatc tggcggagcc gaaatctggg aggcgccgcc gcacccccctc 1440
tagcgggcgc gggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500
cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc catctccagc ctcggggctg ccgcaggggg 1560
acggctgcct tcgggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1620
gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca 1680
acgtgctggt tgttgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcctcgag gaattcactc 1740
ctcaggtgca ggctgcctat cagaaggtgg tggctggtgt ggccaatgcc ctggctcaca 1800
aataccactg agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg 1860
agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt 1920
ttttgtgtct ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg 1980
agtatttggt ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgccatga acaaaggtgg 2040
ctataaagag gtcatcagta tatgaaacag ccccctgctg tccattcctt attccataga 2100
aaagccttga cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta 2160
acatccctaa aattttcctt acatgtttta ctagccagat ttttcctcct ctcctgacta 2220
ctcccagtca tagctgtccc tcttctctta tgaagatccc tcgacctgca gcccaagctt 2280
ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 2340
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 2400
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagcg 2460
gatccgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc 2520
ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2580
gcagaggccg aggccgcctc ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 2640
ggaggcctag gcttttgcaa aaagctaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat 2700
aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 2760
gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctggat ccgctgcatt aatgaatcgg 2820
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga 2880
ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 2940
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 3000
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 3060
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata 3120
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 3180
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 3240
acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 3300
acccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 3360
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 3420
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 3480
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 3540
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca 3600
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 3660

cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 3720
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 3780
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 3840
tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga 3900
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc 3960
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 4020
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 4080
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 4140
gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 4200
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 4260
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 4320
atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 4440
cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 4500
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 4560
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 4620
aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 4680
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 4740
aaataaacaa ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 4790

<210> 2
<211> 3648
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pHWX
<400> 2

cagctggttc tttccgcctc agaagccata gagcccaccg catccccagc atgcctgcta 60
ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc cacccccccag aatagaatga 120
cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcattttatt aggaaaggac agtgggagtg 180
gcaccttcca gggtcaagga aggcacgggg gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240
gaaggcacag tcgaggctga tcagcgagct ctagcattta ggtgaccgcc gggagggcgt 300
ccccggcccg gcgctgctcc cgcgtgtgtc ctggggttga ccagagggcc ccgggcgctc 360
cgtgtgtggc tgcgatggtg gcgttttgg ggacaggtgt ccgtgtcgcg cgtcgcctgg 420
gccggcggcg tggtcggtga cgcgacctcc cggccccggg ggaggtatat ctttcgctcc 480
gagtcggcat tttgggccgc cgggttattg gagacggggt cgacctgcag actggctgtg 540
tataagggag cctgacattt atattcccca gaacatcagg ttaatggcgt ttttgatgtc 600
attttcgcgg tggctgagat cagccacttc ttccccgata acggaaaccg gcacactggc 660
catatcggtg gtcatcatgc gccagctttc atccccgata tgcaccaccg ggtaaagttc 720
acgggagact ttatctgaca gcagacgtgc actggccagg gggatcacca tccgtcgccc 780

gggcgtgtca ataatatcac tctgtacatc cacaaacaga cgataacggc tctctctttt 840
ataggtgtaa accttaaact gcatttcacc agcccctgtt ctcgtcagca aaagagccgt 900
tcatttcaat aaaccgggcg acctcagcca tcccttcctg attttccgct ttccagcgtt 960
cggcacgcag acgacgggct tcattctgca tggttgtgct taccagaccg gagatattga 1020
catcatatat gccttgagca actgatagct gtcgctgtca actgtcactg taatacgctg 1080
cttcatagca tacctctttt tgacatactt cgggtataca tatcagtata tattcttata 1140
ccgcaaaaat cagcgcgcaa atacgcatac tgttatctgg cttttagtaa gccggatcca 1200
cgcgtcgtct cctccccccc aacttcggag gtcgaccagt actccggtta actgctagac 1260
cctatagtga gtcgtattaa tttcgataag ccagtaagca gtgggttctc tagttagcca 1320
gagagctctg cttatataga cctcccaccg tacacgccta ccgcccattt gcgtcaatgg 1380
ggcggagttg ttacgacatt ttggaaagtc ccgttgattt tggtgccaaa acaaactccc 1440
attgacgtca atggggtgga gacttggaaa tccccgtgag tcaaaccgct atccacgccc 1500
attgatgtac tgccaaaacc gcatcaccat ggtaatagcg atgactaata cgtagatgta 1560
ctgccaagta ggaaagtccc ataaggtcat gtactgggca taatgccagg cgggccattt 1620
accgtcattg acgtcaatag ggggcgtact tggcatatcg acgtcaggtg gcacttttcg 1680
gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 1740
gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 1800
tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt 1860
tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 1920
gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga 1980
acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat 2040
tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga 2100
gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 2160
tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 2220
accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 2280
ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt 2340
agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 2400
gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 2460
ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg gttctcgcgg 2520
tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac 2580
ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 2640
gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa 2700
acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 2760
aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 2820
atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc 2880
gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac 2940
tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca 3000
ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt 3060
ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc 3120

ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg 3180
aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 3240
cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 3300
gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 3360
ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggcggagcctat ggaaaaacgc 3420
cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt 3480
tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 3540
cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 3600
cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatg 3648

<210> 3
<211> 2280
<212> DNA
<213> 甲型流感病毒
<400> 3

atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcgcagt cccgcactcg cgagatactc 60
actaagacca ctgtggacca tatggccata atcaaaaagt acacatcagg aaggcaagag 120
aagaaccccg cactcagaat gaagtggatg atggcaatga gatacccaat tacagcagac 180
aagagaataa tggacatgat tccagagagg aatgaacaag gacaaaccct ctggagcaaa 240
acaaacgatg ctggatcaga ccgagtgatg gtatcacctc tggccgtaac atggtggaat 300
aggaatggcc caacaacaag tacagttcat taccctaagg tatataaaac ttatttcgaa 360
aaggtcgaaa ggttgaaaca tggtaccttc ggccctgtcc acttcagaaa tcaagttaaa 420
ataaggagga gagttgatac aaaccctggc catgcagatc tcagtgccaa ggaggcacag 480
gatgtgatta tggaagttgt tttcccaaat gaagtggggg caagaatact gacatcagag 540
tcacagctgg caataacaaa agagaagaaa gaagagctcc aggattgtaa aattgctccc 600
ttgatggtgg cgtacatgct agaaagagaa ttggtccgta aaacaaggtt tctcccagta 660
gccggcggaa caggcagtgt ttatattgaa gtgttgcact taacccaagg gacgtgctgg 720
gagcagatgt acactccagg aggagaagtg agaaatgatg atgttgacca aagtttgatt 780
atcgctgcta gaaacatagt aagaagagca gcagtgtcag cagacccatt agcatctctc 840
ttggaaatgt gccacagcac acagattgga ggagtaagga tggtggacat ccttagacag 900
aatccaactg aggaacaagc cgtagacata tgcaaggcag caatagggtt gaggattagc 960
tcatctttca gttttggtgg gttcactttc aaaaggacaa gcggatcatc agtcaagaaa 1020
gaagaagaag tgctaacggg caacctccaa acactgaaaa taagagtaca tgaagggtat 1080
gaagaattca caatggttgg gagaagagca acagctattc tcagaaaggc aaccaggaga 1140
ttgatccagt tgatagtaag cgggagagac gagcagtcaa ttgctgaggc aataattgtg 1200
gccatggtat tctcacagga ggattgcatg atcaaggcag ttaggggcga tctgaacttt 1260
gtcaataggg caaaccagcg actgaacccc atgcaccaac tcttgaggca tttccaaaaa 1320
gatgcaaaag tgcttttcca gaactgggga attgaatcca tcgacaatgt gatgggaatg 1380
atcggaatac tgcccgacat gaccccaagc acggagatgt cgctgagagg gataagagtc 1440
agcaaaatgg gagtagatga atactccagc acggagagag tggtagtgag tattgaccga 1500

tttttaaggg ttagagatca aagagggaac gtactattgt ctcccgaaga agtcagtgaa 1560
acgcaaggaa ctgagaagtt gacaataact tattcgtcat caatgatgtg ggagatcaat 1620
ggccctgagt cagtgctagt caacacttat caatggataa tcaggaactg ggaaattgtg 1680
aaaattcaat ggtcacaaga tcccacaatg ttatacaaca aaatggaatt tgaaccattt 1740
cagtctcttg tccctaaggc aaccagaagc cggtacagtg gattcgtaag gacactgttc 1800
cagcaaatgc gggatgtgct tgggacattt gacactgtcc aaataataaa acttctcccc 1860
tttgctgctg ccccaccaga acagagtagg atgcaatttt cctcattgac tgtgaatgtg 1920
agaggatcag ggttgaggat actggtaaga ggcaattctc cagtattcaa ttacaacaag 1980
gcaaccaaac gacttacagt tcttggaaag gatgcaggtg cattgactga agatccagat 2040
gaaggcacat ctggggtgga gtctgctgtc ctgagaggat ttctcatttt gggcaaagaa 2100
gacaagagat atggcccagc attaagcatc aatgaactga gcaatcttgc aaaaggagag 2160
aaggctaatg tgctaattgg gcaaggggac gtagtgttgg taatgaaacg aaaacgggac 2220
tctagcatac ttactgacag ccagacagcg accaaaagaa ttcggatggc catcaattag 2280

<210> 4

<211> 2341

<212> DNA

<213> 甲型流感病毒

<400> 4

agcaaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga ctctactttt cctaaaaatt 60
ccagcgcaaa atgccataag caccacattc ccttatactg gagatcctcc atacagccat 120
ggaacaggaa caggatacac catggacaca gtaaacagaa cacaccaata ctcagaaaag 180
ggaaagtgga cgacaaacac agagactggt gcaccccagc tcaacccgat tgatggacca 240
ctacctgagg ataatgaacc aagtgggtat gcacaaacag actgtgttct agaggctatg 300
gctttccttg aagaatccca cccaggaata tttgagaatt catgccttga aacaatggaa 360
gttgttcaac aaacaagggt agataaacta actcaaggtc gccagactta tgattggaca 420
ttaaacagaa atcaaccggc agcaactgca ttggccaaca ccatagaagt ctttagatcg 480
aatggcctaa cagctaatga gtcaggaagg ctaatagatt tcttaaagga tgtaatggaa 540
tcaatgaaca aagaggaaat agagataaca acccactttc aaagaaaaag gagagtaaga 600
gacaacatga ccaagaagat ggtcacgcaa agaacaatag ggaagaaaaa acaaagactg 660
aataagagag gctatctaat aagagcactg acattaaata cgatgaccaa agatgcagag 720
agaggcaagt taaaaagaag ggctatcgca acacctggga tgcagattag aggtttcgta 780
tactttgttg aaactttagc taggagcatt tgcgaaaagc ttgaacagtc tgggctccca 840
gtagggggca atgaaaagaa ggccaaactg gcaaatgttg tgagaaagat gatgactaat 900
tcacaagaca cagagatttc tttcacaatc actggggaca acactaagtg gaatgaaaat 960
caaaatcctc gaatgttcct ggcgatgatt acatatatca ccagaaatca acccgagtgg 1020
ttcagaaaca tcctgagcat ggcacccata atgttctcaa acaaaatggc aagactaggg 1080
aaagggtaca tgttcgagag taaaagaatg aagattcgaa cacaaatacc agcagaaatg 1140
ctagcaagca ttgacctgaa gtacttcaat gaatcaacaa agaagaaaat tgagaaaata 1200
aggcctcttc taatagatgg cacagcatca ctgagtcctg ggatgatgat gggcatgttc 1260

aacatgctaa gtacggtctt gggagtctcg atactgaatc ttggacaaaa gaaatacacc 1320
aagacaatat actggtggga tgggctccaa tcatccgacg attttgctct catagtgaat 1380
gcaccaaacc atgagggaat acaagcagga gtggacagat tctacaggac ctgcaagtta 1440
gtgggaatca acatgagcaa aaagaagtcc tatataaata agacagggac atttgaattc 1500
acaagctttt tttatcgcta tggatttgtg gctaatttta gcatggagct acccagcttt 1560
ggagtgtctg gagtaaatga atcagctgac atgagtattg gagtaacagt gataaagaac 1620
aacatgataa acaatgacct tggacctgca acggcccaga tggctcttca attgttcatc 1680
aaagactaca gatacacata taggtgccat aggggagaca cacaaattca gacgagaaga 1740
tcatttgagt taaagaagct gtgggatcaa acccaatcaa aagtagggct attagtatca 1800
gatggaggac caaacttata caatatacgg aatcttcaca ttcctgaagt ctgcttaaaa 1860
tgggagctaa tggatgatga ttatcgggga agactttgta atcccctgaa tccctttgtc 1920
agtcataaag agattgattc tgtaaacaat gctgtggtaa tgccagccca tggtccagcc 1980
aaaagcatgg aatatgatgc cgttgcaact acacattcct ggattcccaa gaggaatcgt 2040
tctattctca acacaagcca aaggggaatt cttgaggatg aacagatgta ccagaagtgc 2100
tgcaatctat tcgagaaatt tttccctagc agttcatata ggagaccggt tggaatttct 2160
agcatggtgg aggccatggt gtctagggcc cggattgatg ccagggtcga cttcgagtct 2220
ggacggatca agaaagaaga gttctctgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagaa 2280
ctcagacggc aaaaataatg aatttaactt gtccttcatg aaaaaatgcc ttgtttctac 2340
t 2341

<210> 5
<211> 2151
<212> DNA
<213> 甲型流感病毒
<400> 5

atggaagact ttgtgcgaca atgcttcaat ccaatgatcg tcgagcttgc ggaaaaggca 60
atgaaagaat atggggaaga tccgaaaatc gaaactaaca agtttgctgc aatatgcaca 120
catttggaag tttgtttcat gtattcggat ttccatttca tcgacgaacg gggtgaatca 180
ataattgtag aatctggtga cccgaatgca ctattgaagc accgatttga gataattgaa 240
ggaagagacc gaatcatggc ctggacagtg gtgaacagta tatgtaacac aacaggggta 300
gagaagccta aatttcttcc tgatttgtat gattacaaag agaaccggtt cattgaaatt 360
ggagtaacac ggagggaagt ccacatatat tacctagaga aagccaacaa aataaaatct 420
gagaagacac acattcacat cttttcattc actggagagg agatggccac caaagcggac 480
tacacccttg acgaagagag cagggcaaga atcaaaacta ggcttttcac tataagacaa 540
gaaatggcca gtaggagtct atgggattcc tttcgtcagt ccgaaagagg cgaagagaca 600
attgaagaaa aatttgagat tacaggaact atgcgcaagc ttgccgacca aagtctccca 660
ccgaacttcc ccagccttga aaactttaga gcctatgtag atggattcga gccgaacggc 720
tgcattgagg gcaagctttc ccaaatgtca aaagaagtga acgccaaaat tgaaccattc 780
ttgaggacga caccacgccc cctcagattg cctgatgggc ctctttgcca tcagcggtca 840
aagttcctgc tgatggatgc tctgaaatta agtattgaag acccgagtca cgagggggag 900

ggaataccac tatatgatgc aatcaaatgc atgaagacat tctttggctg gaaagagcct 960
aacatagtca aaccacatga gaaaggcata aatcccaatt acctcatggc ttggaagcag 1020
gtgctagcag agctacagga cattgaaaat gaagagaaga tcccaaggac aaagaacatg 1080
aagagaacaa gccaattgaa gtgggcactc ggtgaaaata tggcaccaga aaaagtagac 1140
tttgatgact gcaaagatgt tggagacctt aaacagtatg acagtgatga gccagagccc 1200
agatctctag caagctgggt ccaaaatgaa ttcaataagg catgtgaatt gactgattca 1260
agctggatag aacttgatga aataggagaa gatgttgccc cgattgaaca tatcgcaagc 1320
atgaggagga actattttac agcagaagtg tcccactgca gggctactga atacataatg 1380
aagggagtgt acataaatac ggccttgctc aatgcatcct gtgcagccat ggatgacttt 1440
cagctgatcc caatgataag caaatgtagg accaaagaag gaagacggaa aacaaacctg 1500
tatgggttca ttataaaagg aaggtctcat ttgagaaatg atactgatgt ggtgaacttt 1560
gtaagtatgg agttctcact cactgacccg agactggagc cacacaaatg ggaaaaatac 1620
tgtgttcttg aaataggaga catgctcttg aggactgcga taggccaagt gtcgaggccc 1680
atgttcctat atgtgagaac caatggaacc tccaagatca agatgaaatg gggcatggaa 1740
atgaggcgct gccttcttca gtctcttcag cagattgaga gcatgattga ggccgagtct 1800
tctgtcaaag agaaagacat gaccaaggaa ttctttgaaa acaaatcgga aacatggcca 1860
atcggagagt cacccagggg agtggaggaa ggctctattg ggaaagtgtg caggacctta 1920
ctggcaaaat ctgtattcaa cagtctatat gcgtctccac aacttgaggg gttttcggct 1980
gaatctagaa aattgcttct cattgttcag gcacttaggg acaacctgga acctggaacc 2040
ttcgatcttg gggggctata tgaagcaatc gaggagtgcc tgattaatga tccctgggtt 2100
ttgcttaatg catcttggtt caactccttc ctcacacatg cactgaagta g 2151

<210> 6
<211> 1497
<212> DNA
<213> 甲型流感病毒
<400> 6

atggcgtctc aaggcaccaa acgatcatat gaacaaatgg agactggtgg ggagcgccag 60
gatgccacag aaatcagagc atctgtcgga agaatgattg gtggaatcgg gagattctac 120
atccaaatgt gcactgaact caaactcagt gattatgatg gacgactaat ccagaatagc 180
ataacaatag agaggatggt gctttctgct tttgatgaga gaagaaataa atacctagaa 240
gagcatccca gtgctgggaa ggaccctaag aaaacaggag gacccatata tagaagagta 300
gacggaaagt ggatgagaga actcatcctt tatgacaaag aagaaataag gagagtttgg 360
cgccaagcaa acaatggcga agatgcaaca gcaggtctta ctcatatcat gatttggcat 420
tccaacctga atgatgccac atatcagaga acaagagcgc ttgttcgcac cggaatggat 480
cccagaatgt gctctctaat gcaaggttca acacttccca gaaggtctgg tgccgcaggt 540
gctgcggtga aaggagttgg aacaatagca atggagttaa tcagaatgat caaacgtgga 600
atcaatgacc gaaatttctg gaggggtgaa aatggacgaa ggacaagggt tgcttatgaa 660
agaatgtgca atatcctcaa aggaaaattt caaacagctg cccagagggc aatgatggat 720
caagtaagag aaagtcgaaa cccaggaaac gctgagattg aagacctcat tttcctggca 780

cggtcagcac tcattctgag gggatcagtt gcacataaat cctgcctgcc tgcttgtgtg 840
tatgggcttg cagtagcaag tgggcatgac tttgaaaggg aagggtactc actggtcggg 900
atagacccat tcaaattact ccaaaacagc caagtggtca gcctgatgag accaaatgaa 960
aacccagctc acaagagtca attggtgtgg atggcatgcc actctgctgc atttgaagat 1020
ttaagagtat caagtttcat aagaggaaag aaagtgattc caagaggaaa gctttccaca 1080
agaggggtcc agattgcttc aaatgagaat gtggaaacca tggactccaa taccctggaa 1140
ctgagaagca gatactgggc cataaggacc aggagtggag gaaataccaa tcaacaaaag 1200
gcatccgcag gccagatcag tgtgcagcct acattctcag tgcagcggaa tctccctttt 1260
gaaagagcaa ccgttatggc agcattcagc gggaacaatg aaggacggac atccgacatg 1320
cgaacagaag ttataagaat gatggaaagt gcaaagccag aagatttgtc cttccagggg 1380
cggggagtct tcgagctctc ggacgaaaag gcaacgaacc cgatcgtgcc ttcctttgac 1440
atgagtaatg aagggtctta tttcttcgga gacaatgcag aggagtatga cagttga 1497

<210> 7
<211> 982
<212> DNA
<213> 甲型流感病毒
<400> 7

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctttcta tcatcccgtc aggcccctc 60
aaagccgaga tcgcgcagag actggaaagt gtctttgcag gaaagaacac agatcttgag 120
gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcttgtcac ctctgactaa gggaatttta 180
ggatttgtgt tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
caaaatgccc taaatgggaa tggggacccg aacaacatgg atagagcagt taaactatac 300
aagaagctca aaagagaaat aacgttccat ggggccaagg aggtgtcact aagctattca 360
actggtgcac ttgccagttg catgggcctc atatacaaca ggatgggaac agtgaccaca 420
gaagctgctt ttggtctagt gtgtgccact tgtgaacaga ttgctgattc acagcatcgg 480
tctcacagac agatggctac taccaccaat ccactaatca ggcatgaaaa cagaatggtg 540
ctggctagca ctacggcaaa ggctatggaa cagatggctg gatcgagtga acaggcagcg 600
gaggccatgg aggttgctaa tcagactagg cagatggtac atgcaatgag aactattggg 660
actcatccta gctccagtgc tggtctgaaa gatgaccttc ttgaaaattt gcaggcctac 720
cagaagcgaa tgggagtgca gatgcagcga ttcaagtgat cctctcgtca ttgcagcaaa 780
tatcattggg atcttgcacc tgatattgtg gattactgat cgtctttttt tcaaatgtat 840
ttatcgtcgc tttaaatacg gtttgaaaag agggccttct acggaaggag tgcctgagtc 900
catgagggaa gaatatcaac aggaacagca gagtgctgtg gatgttgacg atggtcattt 960
tgtcaacata gagctagagt aa 982

<210> 8
<211> 1775
<212> DNA
<213> 甲型流感病毒
<400> 8

agcaaaagca ggggaaaata aaaacaacca aaatgaaagc aaaactactg gtcctgttat 60
gtacatttac agctacatat gcagacacaa tatgtatagg ctaccatgcc aacaactcaa 120
ccgacactgt tgacacagta cttgagaaga atgtgacagt gacacactct gtcaacctac 180
ttgaggacag tcacaatgga aaactatgtc tactaaaagg aatagcccca ctacaattgg 240
gtaattgcag cgttgccgga tggatcttag gaaacccaga atgcgaatta ctgatttcca 300
aggaatcatg gtcctacatt gtagaaacac caaatcctga gaatggaaca tgttacccag 360
ggtatttcgc cgactatgag gaactgaggg agcaattgag ttcagtatct tcatttgaga 420
gattcgaaat attccccaaa gaaagctcat ggcccaccca caccgtaacc ggagtatcag 480
catcatgctc ccataatggg aaaagcagtt tttacagaaa tttgctatgg ctgacgggga 540
agaatggttt gtacccaaac ctgagcaagt cctatgtaaa caacaaagag aaagaagtcc 600
ttgtactatg gggtgttcat cacccgccta acatagggga ccaaagggcc ctctatcata 660
cagaaaatgc ttatgtctct gtagtgtctt cacattatag cagaagattc accccagaaa 720
tagccaaaag acccaaagta agagatcagg aaggaagaat caactactac tggactctgc 780
tggaacctgg ggatacaata atatttgagg caaatggaaa tctaatagcg ccatggtatg 840
cttttgcact gagtagaggc tttggatcag gaatcatcac ctcaaatgca ccaatggatg 900
aatgtgatgc gaagtgtcaa acacctcagg gagctataaa cagcagtctt cctttccaga 960
atgtacaccc agtcacaata ggagagtgtc caaagtatgt caggagtgca aaattaagga 1020
tggttacagg actaaggaac atcccatcca ttcaatccag aggtttgttt ggagccattg 1080
ccggtttcat tgaaggggg tggactggaa tggtagatgg gtggtatggt tatcatcatc 1140
agaatgagca aggatctggc tatgctgcag atcaaaaaag tacacaaaat gccattaacg 1200
ggattacaaa caaggtgaat tctgtaattg agaaaatgaa cactcaattc acagctgtgg 1260
gcaaagaatt caacaaattg gaaagaagga tggaaaactt aaataaaaaa gttgatgatg 1320
ggtttctaga catttggaca tataatgcag aattgttggt tctactggaa aatgaaagga 1380
ctttggattt ccatgactcc aatgtgaaga atctgtatga gaaagtaaaa agccaattaa 1440
agaataatgc caaagaaata ggaaacgggt gttttgaatt ctatcacaag tgtaacaatg 1500
aatgcatgga gagtgtgaaa aatggaactt atgactatcc aaaatattcc gaagaatcaa 1560
agttaaacag ggagaaaatt gatggagtga aattggaatc aatgggagtc tatcagattc 1620
tggcgatcta ctcaactgtc gccagttccc tggttctttt ggtctccctg ggggcaatca 1680
gcttctggat gtgttccaat gggtctttgc agtgtagaat atgcatctga gaccagaatt 1740
tcagaaatat aagaaaaaac acccttgttt ctact 1775

<210> 9
<211> 1414
<212> DNA
<213> 甲型流感病毒
<400> 9

aatgaatcca aatcaaaaaa taataaccat tggatcaatc agtatagcaa tcggaataat 60
tagtctaatg ttgcaaatag gaaatattat ttcaatatgg gctagtcact caatccaaac 120
tggaagtcaa aaccacactg gagtatgcaa ccaaagaatc atcacatatg aaaacagcac 180
ctgggtgaat cacacatatg ttaatattaa caacactaat gttgttgctg gaaaggacaa 240

aacttcagtg acattggccg gcaattcatc tctttgttct atcagtggat gggctatata 300
cacaaaagac aacagcataa gaattggctc caaaggagat gtttttgtca taagagaacc 360
tttcatatca tgttctcact tggaatgcag aacctttttt ctgacccaag gtgctctatt 420
aaatgacaaa cattcaaatg ggaccgttaa ggacagaagt ccttataggg ccttaatgag 480
ctgtcctcta ggtgaagctc cgtccccata caattcaaag tttgaatcag ttgcatggtc 540
agcaagcgca tgccatgatg gcatgggctg gttaacaatc ggaatttctg gtccagacaa 600
tggagctgtg gctgtactaa aatacaacgg cataataact gaaaccataa aaagttggaa 660
aaagcgaata ttaagaacac aagagtctga atgtgtctgt gtgaacgggt catgtttcac 720
cataatgacc gatggcccga gtaatggggc cgcctcgtac aaaatcttca agatcgaaaa 780
ggggaaggtt actaaatcaa tagagttgaa tgcacccaat tttcattatg aggaatgttc 840
ctgttaccca gacactggca cagtgatgtg tgtatgcagg gacaactggc atggttcaaa 900
tcgaccttgg gtgtctttta atcaaaacct ggattatcaa ataggataca tctgcagtgg 960
ggtgttcggt gacaatccgc gtcccaaaga tggagagggc agctgtaatc cagtgactgt 1020
tgatggagca gacggagtaa aggggttttc atacaaatat ggtaatggtg tttggatagg 1080
aaggactaaa agtaacagac ttagaaaggg gtttgagatg atttgggatc ctaatggatg 1140
gacagatacc gacagtgatt tctcagtgaa acaggatgtt gtggcaataa ctgattggtc 1200
agggtacagc ggaagtttcg ttcaacatcc tgagttaaca ggattggact gtataagacc 1260
ttgcttctgg gttgagttag tcagaggact gcctagagaa aatacaacaa tctggactag 1320
tgggagcagc atttcttttt gtggcgtaaa tagtgatact gcaaactggt cttggccaga 1380
cggtgctgag ttgccgttca ccattgacaa gtag 1414

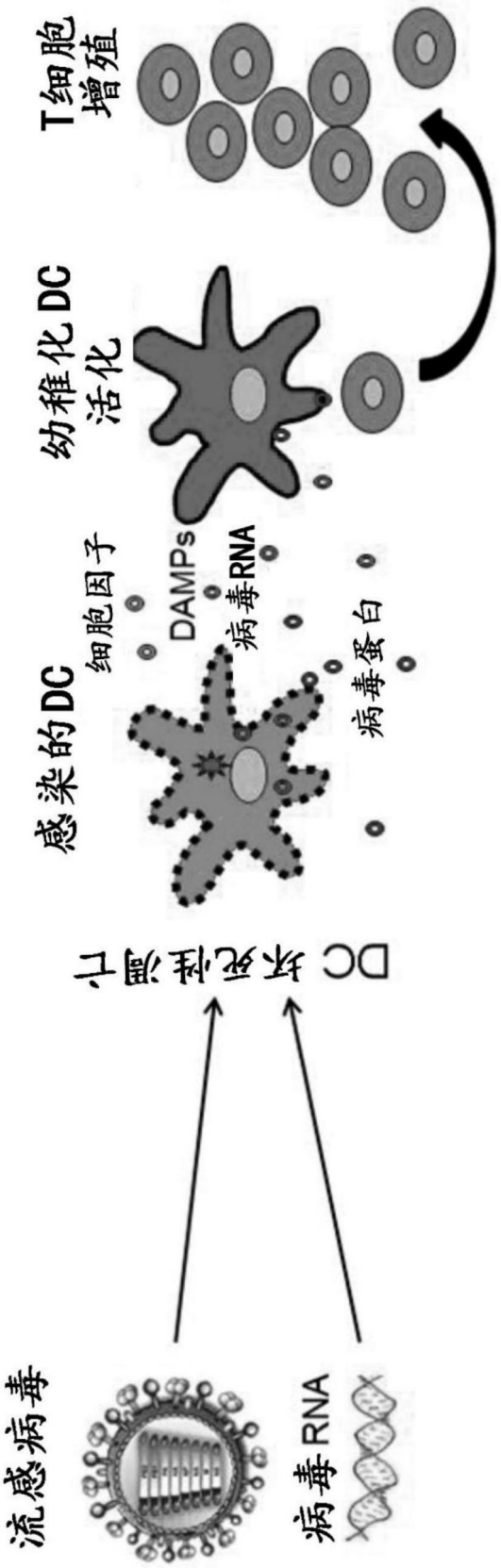

T细胞
增殖
幼稚化 DC
活化
感染的DC
细胞因子
DAMPs
病毒RNA
病毒蛋白
DC 死亡途径
流感病毒
病毒 RNA

图1

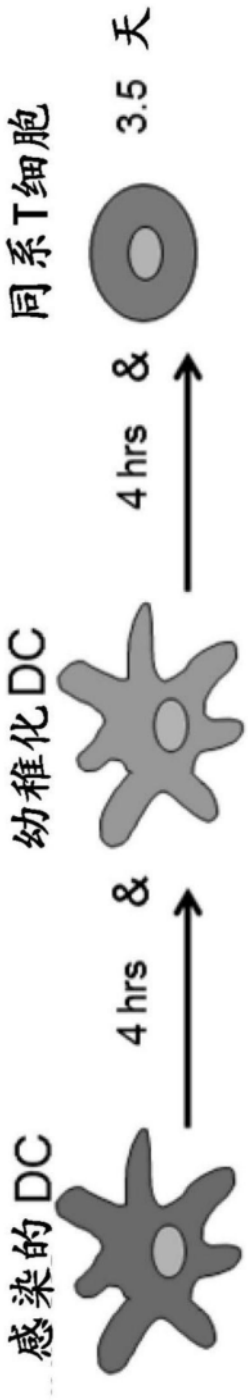


图5

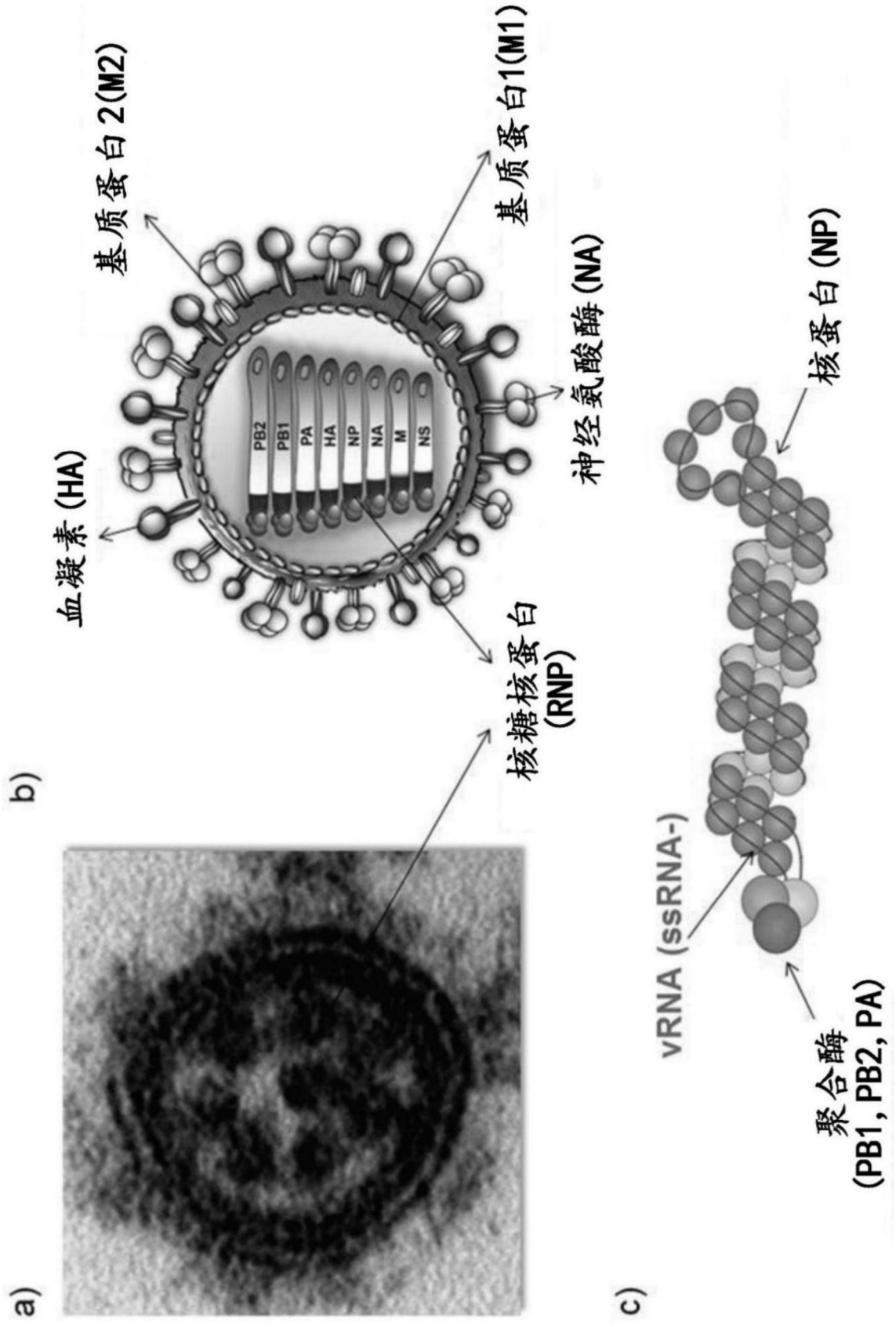

a)
b)
c)
血凝素 (HA)
基质蛋白 2(M2)
基质蛋白1(M1)
神经氨酸酶 (NA)
核糖核蛋白
(RNP)
PB2
PB1
PA
HA
NP
NA
M
NS
核蛋白 (NP)
vRNA (ssRNA-)
聚合酶
(PB1, PB2, PA)

图2

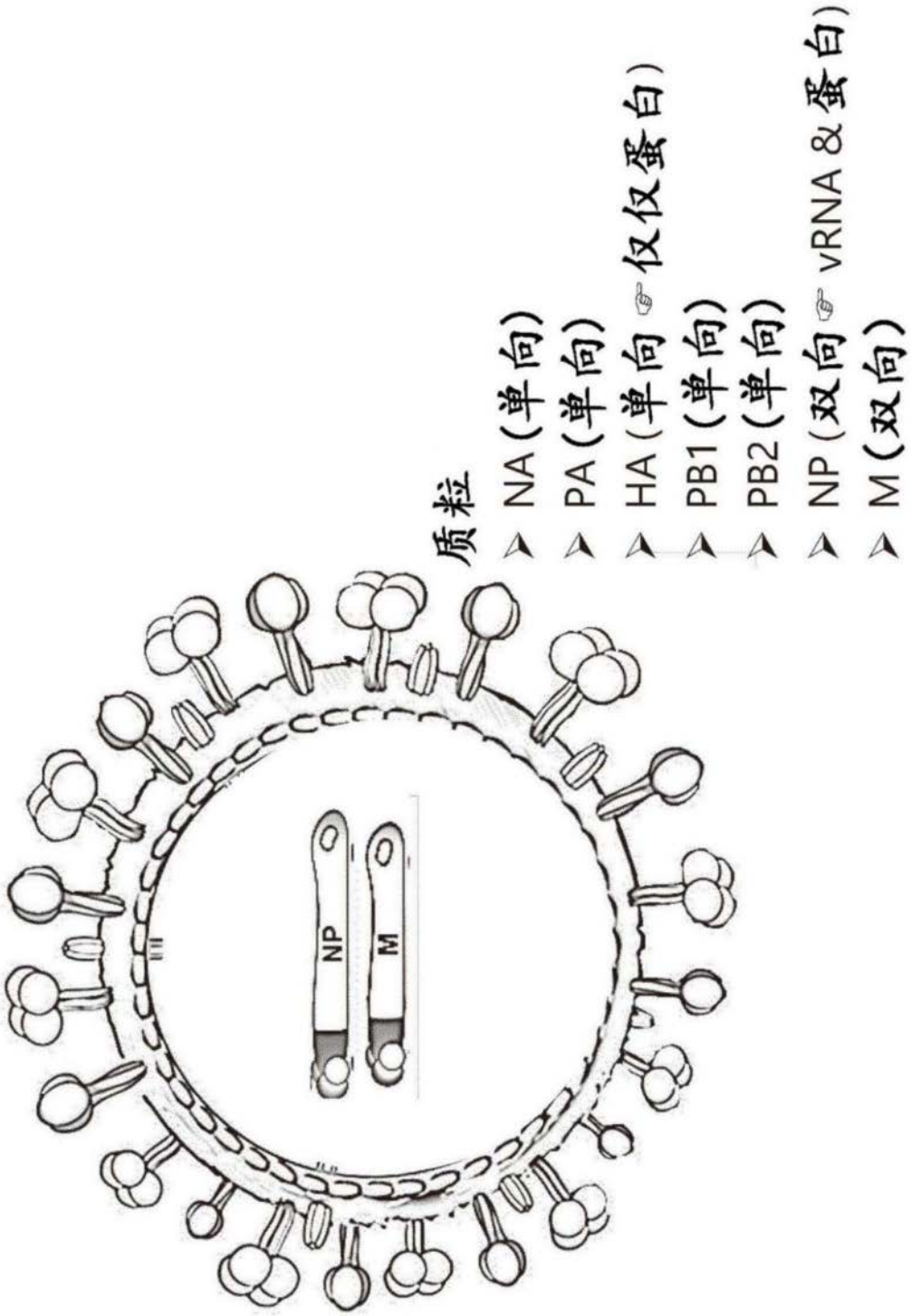


图3

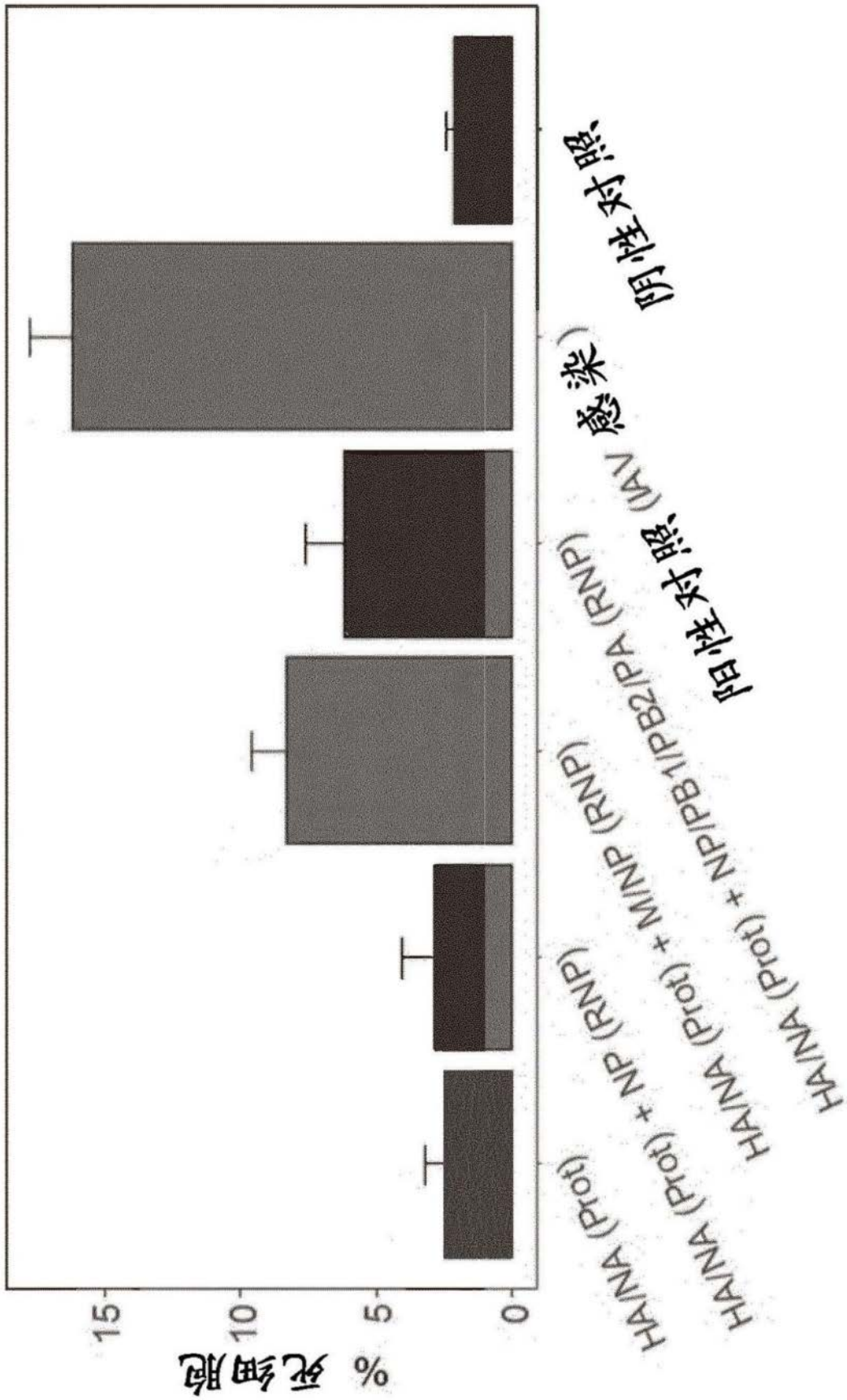

% 死细胞
15
10
5
0
HA/NA (Prot)
HA/NA (Prot) + NP (RNP)
HA/NA (Prot) + M/NP (RNP)
HA/NA (Prot) + NP/PB1/PB2/PA (RNP)
HA/NA (Prot) + NP/PB1/PB2/PA (RNP) (IAV)
感染 阴性对照
阳性对照

图4

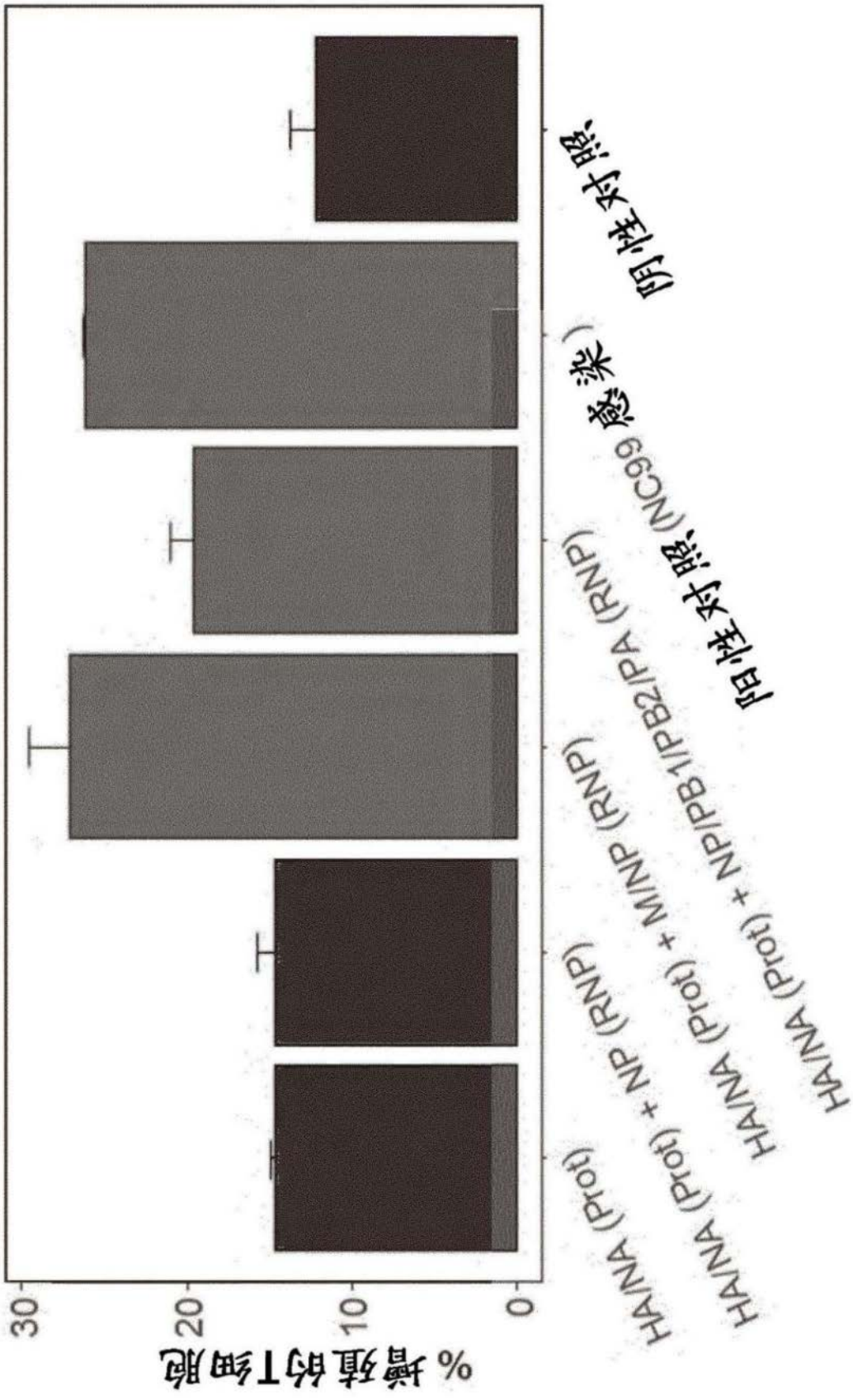

% 增殖的T细胞
30
20
10
0
HA/NA (Prot)
HA/NA (Prot) + NP (RNP)
HA/NA (Prot) + M/NP (RNP)
HA/NA (Prot) + NP/PB1/PB2/PA (RNP)
HA/NA (Prot) + NP/PB1/PB2/PA (RNP)
用灭活病毒感染(MOI 3)
用灭活病毒感染(MOI 6)

图6

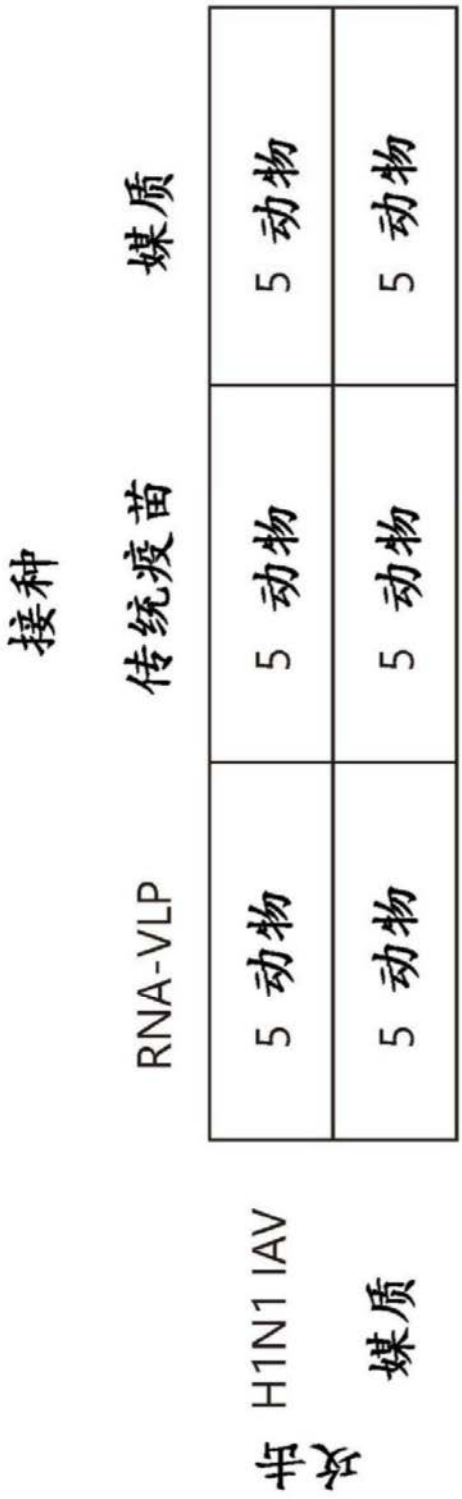


图7

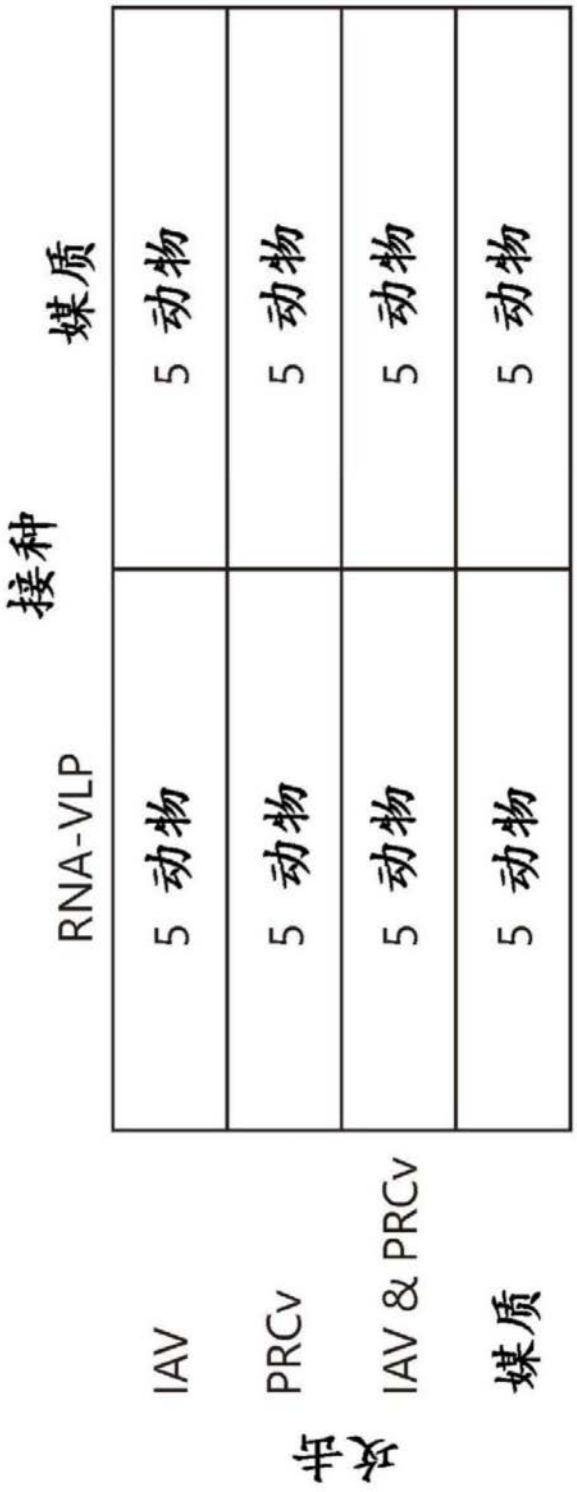


图8

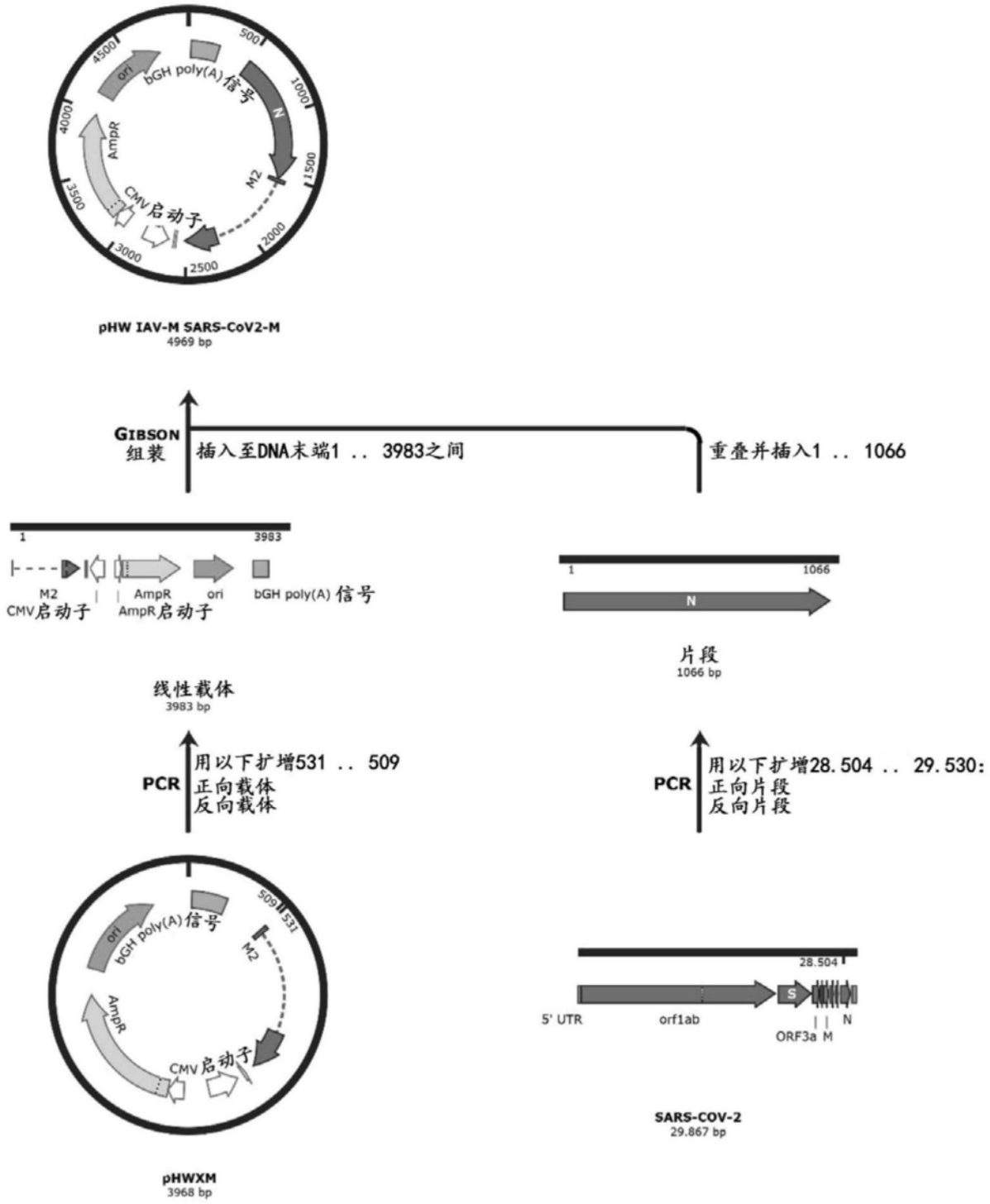

pHW IAV-M SARS-CoV2-M
4969 bp
GIBSON
组装
插入至DNA末端1 .. 3983之间
重叠并插入1 .. 1066
M2
CMV启动子
AmpR
AmpR启动子
ori
bGH poly(A) 信号
线性载体
3983 bp
片段
1066 bp
PCR
用以下扩增531 .. 509
正向载体
反向载体
PCR
用以下扩增28.504 .. 29.530:
正向片段
反向片段
pHWXM
3968 bp
5' UTR
orf1ab
S
N
ORF3a
M
SARS-COV-2
29.867 bp

图9

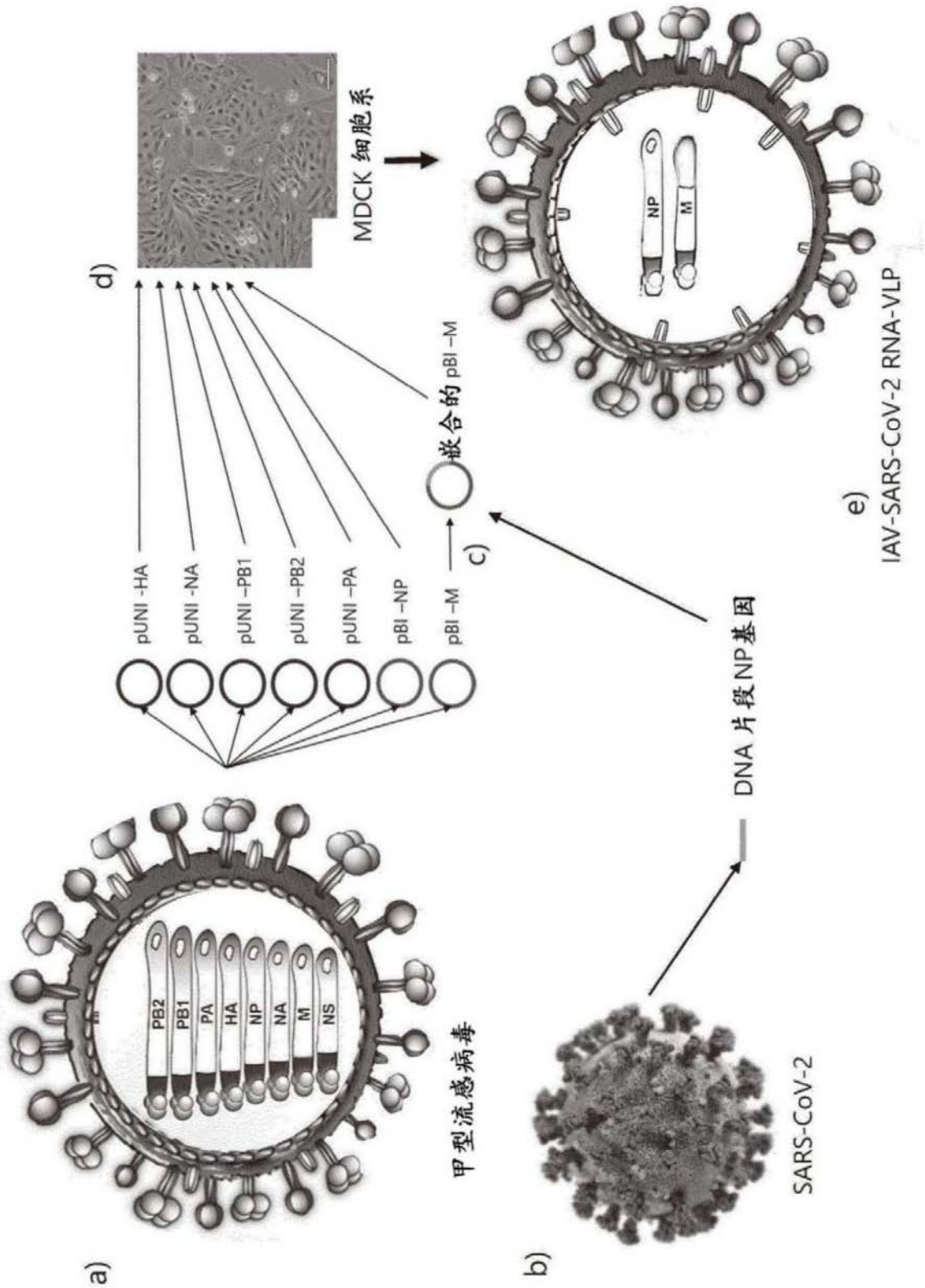

a)
PB2
PB1
PA
HA
NP
NA
M
NS
甲型流感病毒
b)
SARS-CoV-2
DNA 片段NP基因
c)
pUNI -HA
pUNI -NA
pUNI -PB1
pUNI -PB2
pUNI -PA
pBI -NP
pBI -M
嵌合的 pBI -M
d)
MDCK 细胞系
e)
NP
M
IAV-SARS-CoV-2 RNA-VLP

图10

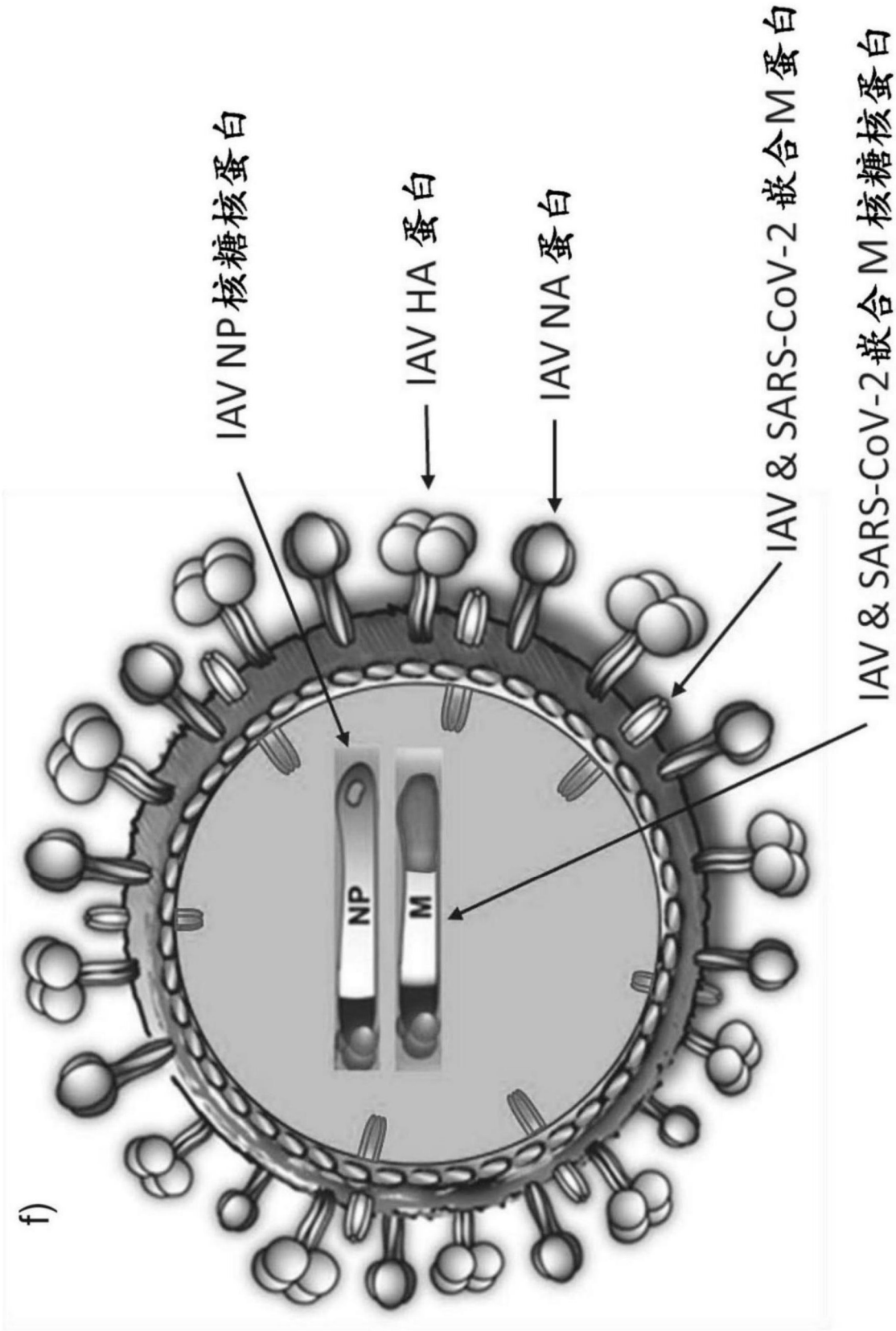

IAV NP核糖核蛋白
IAV HA 蛋白
IAV NA 蛋白
IAV & SARS-CoV-2 嵌合M 蛋白
IAV & SARS-CoV-2嵌合 M 核糖核蛋白
NP
M
f)

图10(续)

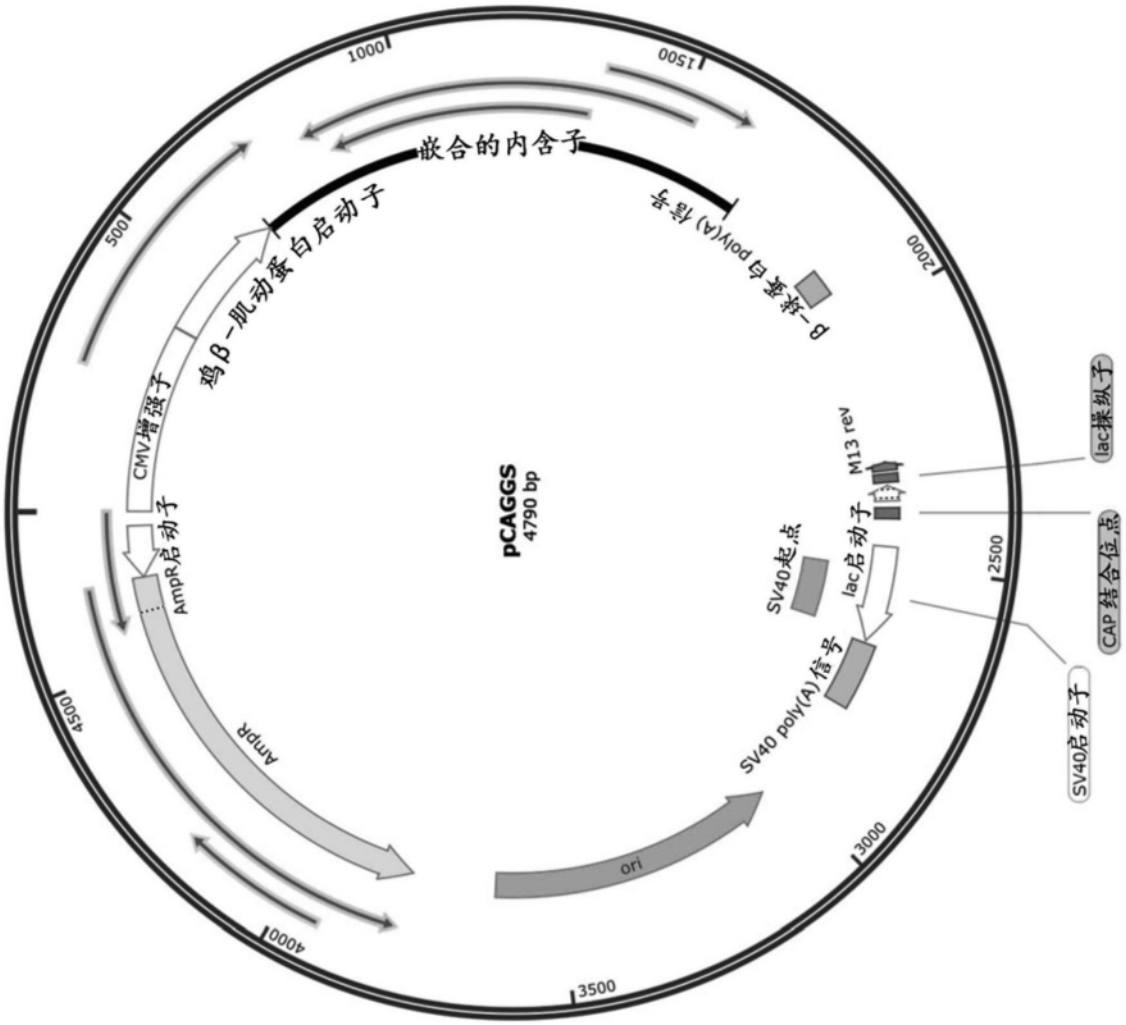

pCAGGS
4790 bp
嵌合的内含子
鸡β-肌动蛋白启动子
CMV增强子
AmpR启动子
AmpR
ori
SV40 poly(A)信号
SV40起点
lac启动子
M13 rev
β-珠蛋白 poly(A) 信号
lac操纵子
CAP 结合位点
SV40启动子
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500

图11

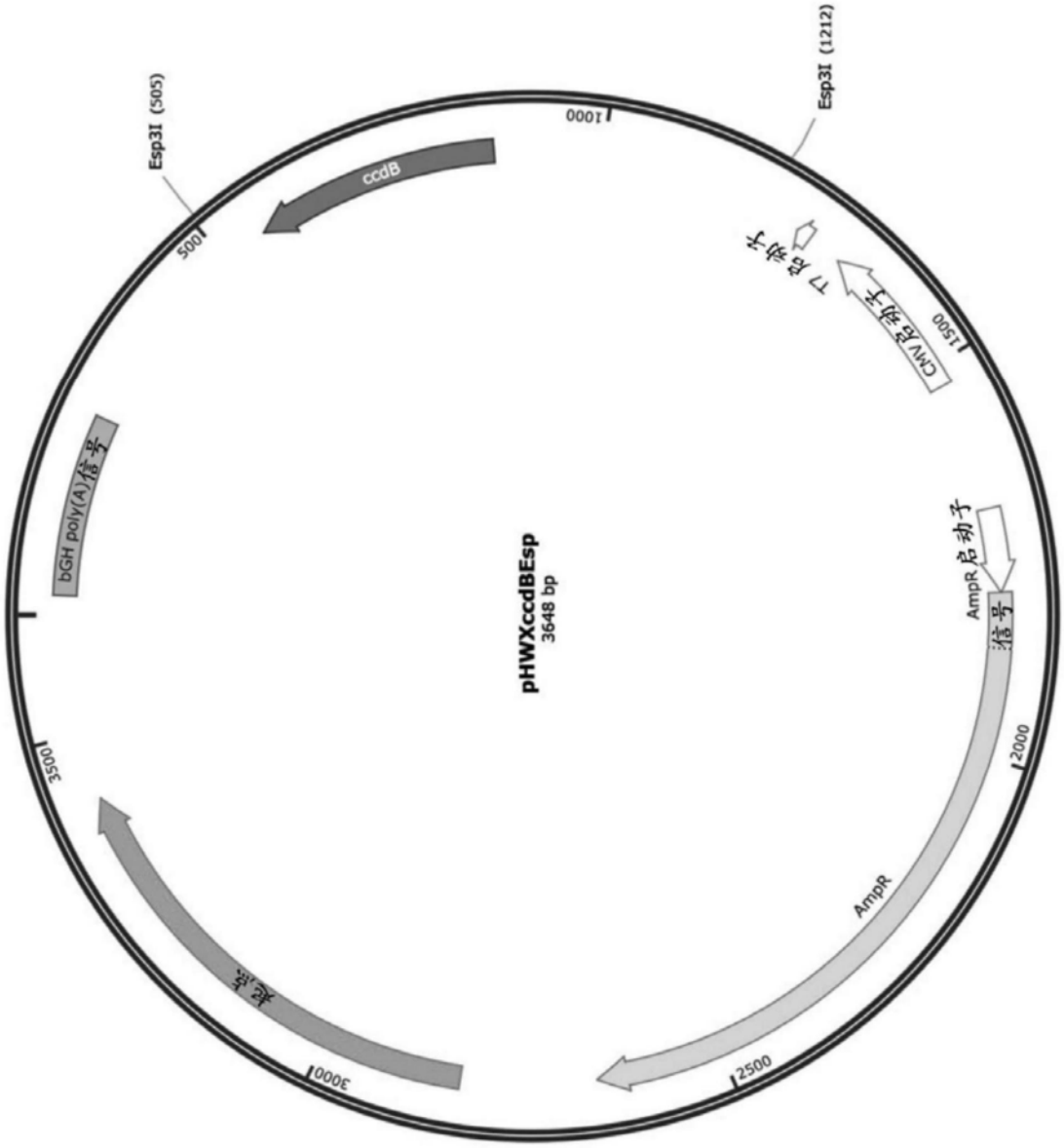

Esp3I (505)
Esp3I (1212)
ccdB
CMV启动子
T7启动子
AmpR启动子
AmpR
bGH poly(A)信号
pHWXccdBEsp
3648 bp
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500

图12