



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103157103 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 19

(21) 申请号 201310084171. 2

A61K 39/295 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 07. 09

A61P 31/16 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

(30) 优先权数据

10/617, 569 2003. 07. 11 US

(62) 分案原申请数据

200480026152. 3 2004. 07. 09

(71) 申请人 诺瓦瓦克斯股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 罗宾 . A. 鲁滨逊 彼得 . M. 普什科

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

A61K 39/145 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书17页

序列表2页 附图6页

(54) 发明名称

功能性流感病毒样颗粒 (VLPs)

(57) 摘要

本发明涉及功能性流感病毒样颗粒 (VLPs)。包括流感壳粒、亚病毒颗粒、病毒样颗粒 (VLP)、VLP 复合体、和 / 或其任一部分的重组流感病毒蛋白被用做流感病毒疫苗。本发明基于两种疫苗技术的组合 : (1) 内在安全的重组疫苗技术, 和 (2) 包埋于质膜中的高度免疫原性的、自装配蛋白大分子, 并包含多拷贝的流感病毒结构蛋白, 该结构蛋白在天然构象中显示中和表位。更具体地, 本发明涉及设计和生产功能同型和异型重组流感病毒样颗粒 (VLPs), 它包含杆状病毒感染的昆虫细胞中的 A/Sydney/5/94 型人流感病毒 (H3N2) 和 / 或 A/Hong Kong/1073/99 型禽流感病毒的重组结构蛋白, 以及它们在预防流感感染中作为疫苗和作为病毒结构研究和临床诊断的实验试剂的应用。

1. 一种用作疫苗的组合物,该组合物包含:
 - i) 包含流感结构蛋白的病毒样颗粒 (VLP),其中所述 VLP 的流感结构蛋白由 M1、HA 和 NA 组成,其中该 VLP 在宿主细胞中从重组构建物自装配;和
 - ii) 载体或稀释剂。
2. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,该组合物为多价疫苗。
3. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,其中所述宿主细胞为真核细胞。
4. 权利要求 3 的用作疫苗的组合物,其中所述真核细胞为昆虫细胞。
5. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,其中所述重组构建物为重组杆状病毒构建物。
6. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,其中所述 M1、HA 和 NA 蛋白中至少一种衍生自哺乳类或鸟类来源。
7. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,其中所述 M1 衍生自鸟类来源。
8. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,其中所述 M1、HA 和 NA 中至少一种衍生自下组:亚型 A 和 B 流感病毒。
9. 权利要求 1 的用作疫苗的组合物,该组合物进一步包含佐剂。
10. 前述权利要求任一项的用作疫苗的组合物,其中所述结构显示血凝素活性。
11. 前述权利要求任一项的用作疫苗的组合物,其中所述结构显示唾液酸苷酶活性。
12. 前述权利要求任一项的用作疫苗的组合物,其中所述结构包含诱导病毒中和抗体的流感 VLP 的构象表位。
13. M2 前向引物和 M2 逆向引物,其序列分别为 AGAATTCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACG CCTATCAGAAACGAATGGGGGTGC 或 AAATTCGAATTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC;或 NP 前向引物和 NP 逆向引物,其序列分别为 GAATTCATGGCGTCCCAAGGCACCAAACG 或 GCGGCCGCTTAATTGTC GTACTCCTCTGCATTGTCTCCGAAGAAATAAG。

功能性流感病毒样颗粒(VLPs)

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 07 月 09 日、中国申请号为 200480026152.3、发明名称为“功能性流感病毒样颗粒(VLPs)”的发明申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 流感病毒是正粘病毒科的一员(参见 Murphy 和 Webster, 1996)。具有被称做 A、B 和 C 的三个流感病毒亚型。流感病毒粒子包含节段的负义 RNA 基因组。该流感病毒粒子包括如下蛋白:血凝素(HA)、唾液酸苷酶(NA)、基质(M1)、质子离子通道蛋白(M2)、核蛋白(NP)、聚合酶碱性蛋白 1 (PB1)、聚合酶碱性蛋白 2 (PB2)、聚合酶酸性蛋白(PA)、和非结构蛋白 2 (NS2) 蛋白。HA、NA、M1 和 M2 与膜结合,而 NP、PB1、PB2、PA 和 NS2 是核壳结合蛋白。NS1 是唯一的不与病毒体颗粒结合但对流感感染细胞具有专一性的非结构蛋白。M1 蛋白在流感病毒颗粒中是具最高丰度的蛋白。HA 和 NA 蛋白是包膜糖蛋白,负责病毒附着和病毒颗粒侵入细胞,以及是病毒中和和保护性免疫的主要免疫优势表位的来源。HA 和 NA 蛋白被认为是预防性流感疫苗最重要的成分。

[0004] 流感病毒感染是由病毒体表面 HA 蛋白与含有唾液酸的细胞受体(糖蛋白和糖脂)附着引起的。NA 蛋白介导唾液酸受体的加工,并且病毒侵入细胞取决于依赖 HA 的受体介导胞吞作用。在包含流感病毒粒子的内化核内体的酸性区域内,HA₂ 蛋白构象发生改变,导致病毒与细胞膜的融合以及病毒脱壳和 M2 介导的 M1 蛋白从核壳相关的核糖核蛋白(RNPs)释放,所述 M1 蛋白移入细胞核用于病毒 RNA 合成。HA 蛋白的抗体通过中和病毒的传染性防止病毒感染,而 NA 蛋白的抗体调节它们对病毒复制早期步骤的影响。

[0005] 现在,灭活的流感 A 和 B 病毒疫苗被许可用于肠胃外给予。这些三价体疫苗在受孕鸡卵的尿囊腔中产生,通过速率区带离心或柱层析纯化,用福尔马林或 β 丙酸内酯灭活,并配制成在一个计算年的人群中传播的流感病毒 A 型和 B 型两种株系的混合物。可购买的流感疫苗是全病毒(WV)或亚病毒体(SV;分离或纯化的表面抗原)病毒疫苗。该 WV 疫苗包含完整、灭活的病毒粒子。用例如三-正-丁基磷酸盐的溶剂处理的 SV 疫苗(Flu-Shield, Wyeth-Lederle)包含几乎所有的病毒结构蛋白和一些病毒被膜。虽然有残余量的其它病毒结构蛋白存在,用 Triton X-100 溶解的 SV 疫苗(Fluzone, Connaught ;Fluvirin, Evans)主要包含 HA 单体、NA 和 NP 的聚合体。最近, FDA 许可潜在的冷适应活减毒流感病毒疫苗(FluMist, MedImmune)在市场上销售,用做鼻内给予的疫苗,指示用于自动免疫接种,预防在健康儿童和青少年(5-17 岁)和 18-49 岁的健康成人中由流感 A 和 B 病毒引起的疾病。

[0006] 已开发了一些重组产物作为重组流感疫苗候选物。这些方法集中于流感 A 型 HA 和 NA 蛋白的表达、生产和纯化,包括使用杆状病毒感染的昆虫细胞的蛋白(Crawford 等, 1999 ;Johansson, 1999 ;Treanor 等, 1996)、病毒载体(Pushko 等, 1997 ;Berglund 等, 1999)和 DNA 疫苗构建物(Olsen 等, 1997)的表达。

[0007] Crawford 等(1999)证明在感染杆状病毒的昆虫细胞中表达的流感 HA 能够预防由禽 H5 和 H7 流感亚型引起的致死性流感。同时,另一组研究人员证实杆状病毒表达的流感 HA 和 NA 蛋白诱导动物的免疫反应超过那些由常规疫苗诱导的反应(Johansson 等, 1999)。将杆状病毒表达的马流感病毒的血凝素的免疫原性和效能与同源 DNA 疫苗候选物

相比(Olsen 等,1997)。使用各种实验方法和在不同的动物模型中,合起来看,数据表明用重组 HA 或 NA 蛋白可诱导对流感病毒侵袭的高度的保护作用。

[0008] Lakey 等(1996)显示来自杆状病毒的流感 HA 疫苗在志愿人群中的阶段 I (Phase I) 的剂量增加安全研究中具有很好的耐受性和免疫原性。然而,在用若干剂量包括 HA 和 / 或 NA 蛋白的流感疫苗接种的人类志愿者若干临床位点中进行阶段 II 研究的结果显示,重组亚单位蛋白疫苗不产生保护性免疫 [G. Smith, Protein Sciences ;M. Perdue, USDA, Personal Communications]。这些结果表明在传染性病毒粒子的 HA 和 NA 包膜粒的表面显示的构象表位对于诱导中和抗体和保护性免疫很重要。

[0009] 对于在重组流感疫苗候选物中包含的其它流感蛋白进行了大量的研究,包括仅含有流感核蛋白 NP 或 NP 与 M1 蛋白结合的试验(Ulmer 等,1993 ;Ulmer 等,1998 ;Zhou 等,1995 ;Tsui 等,1998)。这些由准 - 不变内病毒粒子蛋白组成的疫苗候选物诱导广谱初级的细胞性(CD4 和 CD8+ 记忆 T 细胞)免疫。这些试验涉及 DNA 或病毒基因载体的使用。由于用较低剂量的 DNA 进行的试验显示很少或无保护,因此需要注入相对大量的 DNA (Chen 等,1998)。因此,可能需要进一步的临床前和临床研究,以评估这种涉及流感 NP 和 M1 的以 DNA 为基础的方法是否安全、有效和持久。

[0010] 最近,为了开发更有效的流感疫苗,将颗粒蛋白用做流感 M2 蛋白表位的载体。开发以 M2 为基础的疫苗的基本原理是在动物研究中由 M2 蛋白诱发针对流感的保护性免疫(Slepishkin 等,1995)。Neirynck 等(1999)使用 23 个氨基酸长度的 M2 跨膜结构域作为具有乙肝病毒核心抗原(HBcAg)的氨基末端融合配偶体,以在 HBcAg 衣壳样颗粒的表面上露出 M2 表位。然而,尽管事实上全长 M2 蛋白和 M2-HBcAg VLP 在小鼠中都诱导可检测的抗体和保护,不太可能今后的流感疫苗专一地基于 M2 蛋白,因为每个病毒粒子中 M2 蛋白以很低的拷贝数量存在,抗原性弱,不能诱导结合游离流感病毒粒子的抗体产生,且不能阻断病毒与细胞受体的结合(即病毒中和)。

[0011] 既然先前的研究显示表面流感糖蛋白 HA 和 NA 是激发抗流感病毒的保护性免疫的基本靶位,并且 M1 提供了流感细胞免疫的保守靶位,一种新的疫苗候选物可包括这些病毒抗原作为蛋白大分子颗粒,例如病毒样颗粒(VLPs)。此外,具有这些流感抗原的颗粒可显示激发针对多株系流感病毒的中和抗体的构象表位。

[0012] 一些研究证实在细胞培养中使用哺乳动物表达质粒或杆状病毒载体,重组流感蛋白可自装配进入 VLPs (Gomez-Puertas 等,1999 ;Neumann 等,2000 ;Latham 和 Galarza, 2001)。Gomez-Puertas 等(1999)证实流感 VLP 的有效形成取决于病毒蛋白的表达水平。Neumann 等(2000)建立了以哺乳动物表达质粒为基础的系统,用于完全从克隆 cDNA 生产感染性流感病毒样颗粒。Latham 和 Galarza (2001)报道在用共表达 HA、NA、M1 和 M2 基因的重组杆状病毒感染的昆虫细胞中流感 VLP 的形成。这些研究表明在真核细胞中流感病毒粒子蛋白可基于共表达自装配。

[0013] 发明综述

[0014] 本发明提供了大分子蛋白结构,该结构包括 HA (GenBank 入藏登记号 AJ404626)、NA (GenBank 入藏登记号 AJ404629)、M1 (GenBank 入藏登记号 AJ278646)、M2 (GenBank 入藏登记号 AF255363)以及 NP (GenBank 入藏登记号 AF255742)蛋白的禽流感 A 型病毒 H9N2 编码序列,并包含 HA (GenBank 入藏登记号 AJ311466)和 NA (GenBank 入藏登记号 AJ291403)

的人流感 A 型病毒 H3N2 编码序列。编码这些流感病毒基因的基因组 RNA 可从流感病毒隔离群或从感染流感的有机体的组织中分离。每一个来自相同或不同株系或类型的流感病毒编码序列中的每一个在表达载体内沿转录启动子下游克隆并在细胞中表达。

[0015] 因此,本发明提供的大分子蛋白结构包含(a)第一流感病毒 M1 蛋白和(b)附加结构蛋白,所述附加结构蛋白可包括第二或更多流感病毒 M1 蛋白;第一、第二或更多流感病毒 HA 蛋白;第一、第二或更多的流感病毒 NA 蛋白;以及第一、第二或更多流感病毒 M2 蛋白。如果附加结构蛋白不是来自第二或更多流感病毒 M1 蛋白,则包括二者或该组的全部成员,例如第一和第二流感 M2 病毒蛋白。这样,本发明提供了一种功能性流感蛋白结构,该结构包括亚病毒颗粒、VLP 或壳粒结构、或其部分,基本上由通过本发明方法生产的流感病毒结构蛋白组成的疫苗、多价疫苗及其混合物。在特别优选的实施例中,流感大分子蛋白结构包括流感病毒 HA、NA 和 M1 蛋白,它们是从野生型病毒作为合成片段克隆的流感病毒基因的表达产物。

[0016] 大分子蛋白结构还可包括附加结构蛋白,例如核蛋白(NP)、来自非流感病毒(noninfluenza virus)以外的物种的膜蛋白以及非流感来源的膜蛋白,它们来源于鸟或哺乳动物,以及不同亚型的流感病毒,包括亚型 A 和 B 流感病毒。本发明可包括嵌合大分子蛋白结构,它包含至少一个蛋白的一部分,该蛋白具有并非由流感病毒产生的部分。

[0017] 预防流感可通过提供大分子蛋白结构来实现,该结构可在宿主细胞中从重组构建物自组装。本发明的大分子蛋白结构具有自组装成为同型(homotypic)或异型(heterotypic)病毒样颗粒(VLP)的能力,该颗粒在 HA 和 NA 蛋白上显示构象表位,它诱导保护性的中和抗体的产生。该组合物可以是疫苗组合物,它还包含载体或稀释剂和/或佐剂。功能性流感 VLP 诱导一种或多种流感病毒株系或类型的中和抗体的产生,取决于功能性流感 VLP 是否包含来自一种或多种病毒株系或类型的 HA 和/或 NA 蛋白。该疫苗可包括流感病毒蛋白,该蛋白是野生型流感病毒蛋白。较佳地,包含流感 VLP 或其部分的结构蛋白可衍生自各种野生型流感病毒株系。流感疫苗可给予人或动物,以激发针对一种或多种株系或类型的流感病毒的保护性免疫。

[0018] 本发明的大分子蛋白结构可显示血凝素活性和/或唾液酸苷酶活性。

[0019] 本发明提供通过构建编码流感结构基因的重组构建物生产源自流感的 VLP 的方法,该流感结构基因包括 M1、HA,以及衍生自流感病毒的至少一个结构蛋白。使用重组构建物用重组杆状病毒转染、感染或转化适当的宿主细胞。宿主细胞在允许 M1、HA 和至少一个源自流感病毒的结构蛋白表达的条件下培养,并且 VLP 在宿主细胞中形成。收集含有功能性流感 VLP 的受感染的细胞培养基,并提纯 VLP。本发明还提供了用编码第二流感蛋白的第二重组构建物共转染、共感染或共转化宿主细胞的补充步骤,从而在 VLP 中掺入第二流感蛋白。这种结构蛋白可衍生自包括 NA、M2 和 NP 的流感病毒,且至少一种结构蛋白衍生自鸟类或哺乳动物。该结构蛋白可以是亚型 A 和 B 流感病毒。根据本发明,宿主细胞可以是真核细胞。另外,VLP 可以是嵌合 VLP。

[0020] 本发明还提供了通过把编码流感病毒基因的重组构建物引入宿主细胞,并允许重组流感病毒蛋白在细胞中自装配成为功能同型或异型的 VLP 来配制含有流感 VLP 的药物物质的方法。分离和纯化流感 VLP,并配制含有流感 VLP 的药物物质。该药物物质可进一步包含佐剂。另外,本发明提供通过将这种含有流感 VLP 的药物物质与脂小泡(即非离子型脂

小泡)混合配制医药产品的方法。因此,功能性同型或异型 VLP 可从感染的细胞中出芽为被膜颗粒。出芽流感 VLP 可通过超速离心或柱层析分离和纯化为药物物质,并单独或与例如 Novasomesg (Novavax, Inc 的产品)等佐剂配制成为医药产品,例如疫苗。提供增强免疫效果的**Novasomes®**进一步描述于美国专利 No. 4, 911, 928, 该文献引入本文作为参考。

[0021] 通过提供包含有效抗体检测量的具有流感病毒大分子结构至少一个构象表位的流感病毒蛋白的检验试剂,本发明提供了检测脊椎动物流感病毒感染的体液免疫的方法。该检验试剂与被测定感染流感病毒的脊椎动物的体液样品接触。使样品中包含的流感病毒特异性抗体与流感病毒大分子结构的构象表位结合,形成抗原-抗体复合物。该复合物从未结合的复合物中分离,并与可检测地标记了的免疫球蛋白结合试剂接触。测定与复合物结合的可检测地标记了的免疫球蛋白结合试剂的量。

[0022] 可通过提供对流感病毒颗粒的至少一个构象表位具有特异性的抗体,该抗体具有产生可检测信号的标记或与可检测的标记试剂附着,在怀疑感染了病毒的动物或人的样品中可检测到流感病毒。该样品与抗体接触,并使该抗体与流感病毒结合。通过可检测标记的方法测定样品中流感病毒的存在。

[0023] 本发明提供通过给予脊椎动物有效量的本发明组合物,治疗、预防和产生保护性免疫反应的方法。

[0024] 另外,流感 VLP 药物物质可配制为用于流感病毒结构研究和临床诊断分析的实验试剂。本发明还提供了通过给予有效量的本发明组合物治疗流感病毒的试剂盒和使用说明。

[0025] 本发明涉及下述各项。

[0026] 1. 一种大分子蛋白结构,所述结构包括:

[0027] (a) 第一流感病毒 M1 蛋白和

[0028] (b) 附加结构蛋白,所述蛋白选自:

[0029] (i) 第二流感病毒 M1 蛋白;

[0030] (ii) (a) 第一流感病毒 HA 蛋白,

[0031] (b) 第二流感病毒 HA 蛋白;

[0032] (iii) (a) 第一流感病毒 NA 蛋白,

[0033] (b) 第二流感病毒 NA 蛋白;或

[0034] (iv) (a) 第一流感病毒 M2 蛋白,

[0035] (b) 第二流感病毒 M2 蛋白;

[0036] 并且其中如果所述附加结构蛋白并非来自亚组(i),则亚组(ii)、(iii)和(iv)中的至少一组的两种成分都被包括在内。

[0037] 2. 项 1 所述的大分子蛋白结构,其中所述大分子蛋白结构选自亚病毒颗粒、病毒样颗粒(VLP)、壳粒结构或其一部分、疫苗、多价疫苗或其混合物。

[0038] 3. 项 1 所述的大分子蛋白结构,其中所述附加结构蛋白选自非流感病毒以外的物种的核蛋白(NP)或膜蛋白。

[0039] 4. 项 3 所述的大分子蛋白结构,其中所述附加结构蛋白是非流感来源的膜蛋白。

[0040] 5. 项 1 所述的大分子蛋白结构,其中所述蛋白结构在宿主细胞中从重组构建物自装配。

- [0041] 6. 项 1 所述的大分子蛋白结构,其中至少一个结构蛋白衍生自鸟或哺乳动物来源。
- [0042] 7. 项 1 所述的大分子蛋白结构,其中所述结构蛋白衍生自不同亚型的流感病毒。
- [0043] 8. 项 7 所述的大分子蛋白结构,其中所述流感病毒亚型选自亚型 A 或 B 流感病毒。
- [0044] 9. 项 7 所述的大分子蛋白结构,其中所述流感病毒包含野生型流感病毒。
- [0045] 10. 项 1 所述的大分子蛋白结构,其中所述大分子蛋白结构包含至少一个结构蛋白,该结构蛋白具有自装配为异型病毒样颗粒(VLPs)的能力。
- [0046] 11. 项 2 所述的大分子蛋白结构,其中所述至少一个蛋白的一部分包括嵌合蛋白结构,该嵌合蛋白结构具有并非由流感病毒产生的部分。
- [0047] 12. 一种包含项 2 所述的大分子蛋白结构以及载体或稀释剂的组合物。
- [0048] 13. 项 12 所述的组合物,还包含佐剂。
- [0049] 14. 项 2 所述的大分子蛋白结构,其中所述结构选自显示血凝素活性的组合物。
- [0050] 15. 项 2 所述的大分子蛋白结构,其中所述结构选自显示唾液酸苷酶活性的组合物。
- [0051] 16. 项 2 所述的大分子蛋白结构,包括诱导流感病毒中和抗体的流感 VLP 的构象表位。
- [0052] 17. 一种含有项 16 所述的大分子蛋白结构以及载体或稀释剂的疫苗组合物。
- [0053] 18. 一种生产源自流感的 VLP 的方法,所述方法包括:
- [0054] (a) 构建编码流感结构基因的重组构建物,其中重组杆状病毒编码衍生自流感病毒的 M1、HA 和至少一个第一结构蛋白;
- [0055] (b) 用所述重组杆状病毒转染、感染或转化适当的宿主细胞,并在允许衍生自流感病毒的 M1、HA 和至少一个结构蛋白表达的条件下培养宿主细胞;
- [0056] (c) 使 VLP 在所述的宿主细胞中形成;
- [0057] (d) 收集含有功能性流感 VLP 的感染的细胞培养基;并
- [0058] (e) 纯化 VLP。
- [0059] 19. 项 18 所述的方法,其中所述衍生自流感病毒的结构蛋白选自 NA、M2 或 NP。
- [0060] 20. 项 18 所述的方法,其中至少一个结构蛋白衍生自鸟或哺乳动物来源。
- [0061] 21. 项 18 所述的方法,其中所述结构蛋白选自亚型 A 或 B 流感病毒。
- [0062] 22. 项 18 所述的方法,其中所述宿主细胞是真核细胞。
- [0063] 23. 项 18 所述的方法,其中所述 VLP 包含嵌合 VLP。
- [0064] 24. 项 18 所述的方法,进一步包括如下步骤:
- [0065] (a) 用编码第二流感蛋白的第二重组构建物共转染、共感染或共转化宿主细胞,由此将所述第二流感蛋白掺入 VLP。
- [0066] 25. 配制包含流感 VLP 的药物物质的方法,所述方法包括:
- [0067] (a) 引导编码流感病毒基因的重组构建物进入宿主细胞;
- [0068] (b) 使重组流感病毒蛋白自装配入细胞中的功能性同型或异型 VLP;
- [0069] (c) 分离和纯化流感 VLP;和
- [0070] (d) 配制含有流感 VLP 的药物物质。
- [0071] 26. 项 25 所述的方法,其中所述药物物质进一步包含佐剂。

[0072] 27. 一种配制药产品的方法,所述方法包括将含有流感 VLP 的项 25 所述的药物物质与脂小泡混合的步骤。

[0073] 28. 项 27 所述的方法,其中所述脂小泡是非离子型脂小泡。

[0074] 29. 一种在脊椎动物中检测针对流感病毒感染的体液免疫的方法,所述方法包括:

[0075] (a) 提供检测试剂,该试剂包括有效抗体检测量的流感病毒蛋白,该流感病毒蛋白具有流感病毒大分子结构的至少一个构象表位;

[0076] (b) 将检测试剂与用于检测流感病毒感染的脊椎动物的体液样品接触;

[0077] (c) 使包含于所述样品中的流感病毒特异性抗体与所述流感病毒大分子结构的构象表位结合,以形成抗原-抗体复合物。

[0078] (d) 将所述复合物与未结合的复合物分离;

[0079] (e) 将该复合物与可检测地标记了的免疫球蛋白-结合试剂接触;和

[0080] (f) 测定与所述复合物结合的可检测地标记了的免疫球蛋白结合试剂的量。

[0081] 30. 一种在取自怀疑感染流感病毒的动物或人的样品中检测流感病毒的方法,所述方法包括:

[0082] (a) 提供对所述流感病毒颗粒的至少一个构象表位具有特异性的抗体,其中所述抗体具有可检测的信号产生标记,或与可检测地标记了的试剂附着;

[0083] (b) 将样品与所述抗体接触;

[0084] (c) 使抗体与流感病毒结合;和

[0085] (d) 通过可检测的标记的方法测定存在于样品中的流感病毒的存在。

[0086] 31. 一种治疗方法,所述方法包括给予脊椎动物有效量的项 13 所述的组合物。

[0087] 32. 一种预防流感的方法,所述方法包括给予脊椎动物有效量的项 17 所述的疫苗制剂。

[0088] 33. 一种提供保护性免疫反应的方法,所述方法包括给予项 13 所述的组合物。

[0089] 附图的简要说明

[0090] 图 1 描述禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 病毒唾液酸苷酶(NA) 基因的核苷酸序列(SEQ ID NO :1)。

[0091] 图 2 描述禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 病毒血凝素(HA) 基因的核苷酸序列(SEQ ID NO :2)。

[0092] 图 3 描述禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 病毒基质蛋白 M1 (M1) 基因的核苷酸序列(SEQ ID NO :3)。

[0093] 图 4 描述表达禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) HA、NA 和 M1 蛋白的重组杆状病毒构建物的转移载体。图 4(A) 描述表达个体基因的转移载体,图 4(B) 描述多表达基因的转移载体。

[0094] 图 5 描述 Sf-9S 细胞中禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 病毒 HA、NA 和 M1 蛋白的表达。

[0095] 图 6 描述使用蔗糖密度梯度方法纯化禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) VLP。

[0096] 图 7 描述凝胶过滤层析检测流感病毒蛋白。蛋白质印迹分析使用的抗体如下:(A) 兔抗-H9N2;(B) 鼠抗-M1mAb;和(C) 鼠抗-BACgp64。

[0097] 图 8 描述使用电镜检术检测包含亚病毒颗粒、VLP 和 VLP 复合物的禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 蛋白。

[0098] 图 9 描述纯化的禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) VLP 的血凝集活性。

[0099] 图 10 描述纯化的禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) VLP 的唾液酸苷酶活性。

[0100] 图 11 描述小鼠中用于对具有纯化的禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) VLP 的重组流感病毒进行免疫原性研究的免疫和出血进程。

[0101] 图 12 描述在用重组流感 H9N2VLP 免疫的小鼠中免疫原性研究结果。图 12(a) 显示用包含 A/H9N2/HongKong/1073/99 型禽流感病毒的 HA、NA 和 M1 蛋白的重组 VLP 免疫的 BALB/c 小鼠的血清。图 12(b) 描述用灭活的 AH9N2 型禽流感病毒免疫的新西兰白兔血清与含有灭活的 A H9N2 型禽流感病毒(1 和 3 泳道)或冷适应性 A H9N2 型禽流感病毒(2 和 4 泳道)的蛋白质印迹进行反应。

[0102] 发明详述

[0103] 如本文所使用的,术语“杆状病毒(baculovirus)”通常也称做杆状病毒科(baculoviridae),是指节肢动物的被膜 DNA 病毒科,其成员可用做在昆虫细胞培养中生产重组蛋白的表达载体。该病毒粒子包含一个或多个具有环形超螺旋双链 DNA ($Mr54 \times 10^6 - 154 \times 10^6$) 分子的杆状核壳。用做载体的病毒通常是苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(NVP)。引入基因的表达在强启动子的控制下,该强启动子通常调节大核包涵体的多角体蛋白成分的表达,其中病毒包埋于感染的细胞中。

[0104] 如本文所使用的,术语“衍生自”指起源或来源,可包括自然发生、重组、未纯化或纯化的分子。本发明的蛋白和分子可衍生自流感或非流感分子。

[0105] 如本文所使用的术语“第一”流感病毒蛋白,即第一流感病毒 M1 蛋白,是指例如 M1、HA、NA 和 M2 等蛋白,它们衍生自流感病毒的特殊株系。第一流感病毒的株系或类型不同于第二流感病毒蛋白的株系或类型。因此,“第二”流感病毒蛋白,即第二流感病毒 M1 蛋白是指衍生自流感病毒第二株系的例如 M1、HA、NA 和 M2 等蛋白,该株系与第一流感病毒蛋白的株系或类型不同。

[0106] 如本文所使用的,术语“血凝素活性”是指含 HA 的蛋白、VLP 或其部分与红细胞结合和聚集的能力。

[0107] 如本文所使用的,术语“唾液酸苷酶活性”是指含 NA 的蛋白、VLP 或其部分从包含例如胎球蛋白等蛋白的基质中酶切唾液酸残基的酶活。

[0108] 如本文所使用的,术语“异型的”是指一种或多种不同类型或株系的病毒。

[0109] 如本文所使用的,术语“同型的”是指一种类型或株系的病毒。

[0110] 如本文所使用的,术语“大分子蛋白结构”是指一个或多个蛋白的构成或排列。

[0111] 如本文所使用的,术语“多价”疫苗是指针对多种类型或株系的流感病毒的疫苗。

[0112] 如本文所使用的,术语“非流感”是指不是衍生自流感病毒的蛋白或分子。

[0113] 如本文所使用的,术语“疫苗”是指死的或弱化的病原体或衍生的抗原决定子的制剂,它用于诱导抗体的形成或对病原体的免疫。假定一种疫苗提供对例如由流感病毒引起的流感疾病的免疫。本发明提供具有免疫原性并提供保护的疫苗组合物。

[0114] 尽管可以获得最适条件下有效率为 60-80% 的特异性灭活病毒疫苗,流感仍然是广泛存在的公共健康问题。当这些疫苗有效时,常常通过预防病毒感染而避免生病。抗原

差异的积累的结果(抗原转变(antigenic shift)和抗原漂移(antigenic drift))疫苗可发生无效。

[0115] 例如, A 型禽流感病毒 H9N2 与猪体内的 A 型人流感病毒 Sydney/97H3N2 共循环, 导致基因重排列, 并出现具有广泛流行可能性的人流感病毒新株系(Peiriss 等, 2001)。如果发生这种抗原转变, 当前的疫苗不可能提供充分的保护。

[0116] 缺乏流感疫苗程序的另一个原因是由当前疫苗引起的免疫持续性相对较短。由于在儿童、老人和对鸡蛋成分过敏的人群中疫苗的反应原性和副作用, 流感控制手段的进一步不足反映出当前疫苗的使用受到限制, 该疫苗用于生产商业许可的灭活病毒流感疫苗。

[0117] 另外, 灭活的流感病毒疫苗常常缺乏或包含改变的 HA 和 NA 构象表位, 该表位引发中和抗体并在针对疾病的保护中起主要作用。因此, 灭活的病毒疫苗以及一些重组单体流感亚基蛋白疫苗仅给予不充分的保护。另一方面, 例如壳粒、亚病毒颗粒、和 / 或 VLP 等大分子蛋白结构包含显示构象表位的多拷贝的天然蛋白, 这对最佳的疫苗免疫原性有利。

[0118] 本发明描述了在感染杆状病毒的昆虫细胞中, 单独或先后克隆禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒 HA、NA 和 M1 基因进入单一杆状病毒表达载体, 并生产包含重组流感结构蛋白的流感疫苗候选物或试剂, 该结构蛋白自装配进入包括亚病毒流感颗粒和流感 VLP 的功能性和免疫原性同型大分子蛋白结构物。

[0119] 本发明进一步描述了在感染杆状病毒的昆虫细胞中, 克隆人流感 A/Sydney/5/94 (H3N2) 病毒 HA、NA、M1、M2 和 NP 基因进入杆状病毒表达载体, 并生产包含流感结构蛋白的流感疫苗候选物或试剂, 该结构蛋白自装配进入包括亚病毒流感颗粒和流感 VLP 的功能性和免疫原性同型大分子蛋白结构物。

[0120] 此外, 本发明描述了在感染杆状病毒的昆虫细胞中, 克隆人流感 A/Sydney/5/94 (H3N2) 病毒的 HA 基因和禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 的 HA、NA 和 M1 基因先后进入单一杆状病毒表达载体, 并生产包含流感结构蛋白的流感疫苗候选物或试剂, 该结构蛋白自装配进入包括亚病毒流感颗粒和流感 VLP 的功能性和免疫原性的异型大分子蛋白结构物。

[0121] 本发明通过下面的实施例进行进一步描述, 这些实施例不作为限制。本说明书中引用的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容, 以及附图和序列列表引入本文作为参考。

[0122] 具体的实施例

[0123] 实施例 1

[0124] 材料和方法

[0125] 使用杆状病毒杆粒表达系统在草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) 细胞(Sf-9S 细胞系; ATCC PTA-4047) 中表达禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒 HA、NA 和 M1 基因。使用分离自禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒的 RNA 通过反转录和聚合酶链反应(PCR) 合成 HA、NA 和 M1 基因(图 1、2 和 3)。对于反转录和 PCR, 使用对禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 病毒 HA、NA 和 M1 基因具有特异性的寡核苷酸引物(表 1)。这些基因的 cDNA 拷贝最初被克隆进入细菌的亚克隆载体, pCR2.1TOP0。从获得的 3 个基于 pCR2.1TOP0 的质粒, HA、NA 和 M1 基因插入杆状病毒转移载体 pFastBac1 (Invitrogen) 中 AcMNPV 多角体蛋白启动子的下游, 获得 3 个基于 pFastBac1 的质粒: 分别表达这些流感病

毒基因的 pHA、pNA 和 pM1。然后,构建单个的基于 pFastBac1 的质粒 pHAM,该质粒编码各个位于分离的多角体蛋白启动子下游的 HA 和 M1 基因(图 4)。测定 pNA 质粒中具有相邻的 5' - 和 3' - 区域的 NA 基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)(图 1)。同时,使用 pHAM 质粒也测定了具有相邻区域的 HA 和 M1 基因的核苷酸序列(SEQ ID NOS:2 和 3)(图 2 和 3)。

[0126] 最后,编码 HA 和 M1 表达盒的来自 pHAM 质粒的限制性 DNA 片段被克隆进入 pNA 质粒。这样获得编码禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒 HA、NA 和 M1 基因的质粒 pNAHAM (图 4)。

[0127] 质粒 pNAHAM 用于构建重组杆状病毒,该重组杆状病毒包含整合进入基因组的流感病毒 NA、HA 和 M1 基因,每个位于分离的杆状病毒多角体启动子下游。用获得的重组杆状病毒感染许可性 Sf-9S 昆虫细胞,导致在用这种重组杆状病毒感染的各个 Sf-9S 细胞中 3 个流感基因的共表达。

[0128] 结果

[0129] 使用 HA 和 M1- 特异性抗体,通过 SDS-PAGE 分析、考马斯蓝蛋白染色、和蛋白质印迹分析,表征感染 72 小时后感染的 Sf-9S 细胞中的表达产物(图 5)。使用针对流感病毒 A/Hong Kong/1073/99 型(H9N2)产生的兔抗体(CDC, Atlanta, Georgia, USA),或流感 M1 蛋白的小鼠单克隆抗体(Serotec, UK)进行蛋白质印迹分析。具有预期分子量(分别为 64kd、60kd 和 31kd)的 HA、NA 和 M1 蛋白通过蛋白质印迹分析检测。与分析中检测到的 HA 蛋白的量相比,NA 蛋白与兔血清显示对流感 A/Hong Kong/1073/99 型(H9N2)病毒较低的反应性。对可检测的 NA 蛋白量的解释包括与 HA 蛋白相比,取自用重组杆状病毒感染的 Sf-9S 细胞的 NA 蛋白的表达水平较低,在蛋白质印迹分析中,变性条件下 NA 与这种血清的反应性较低(由于在膜结合的凝胶电泳过程中重要的 NA 表位消失),NA- 抗体亲和力与 HA- 抗体相比较低,或血清中 NA- 抗体丰度较低。

[0130] 还探测了取自用表达 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) HA、NA 和 M1 蛋白的重组杆状病毒感染的 Sf-9S 细胞的培养基的流感蛋白。将澄清的培养上清在 27,000rpm 下超离心,以浓缩流感病毒的高分子蛋白复合物,例如亚病毒颗粒、VLP、VLP 复合物,以及其它可能的包含流感 HA、NA 和 M1 蛋白的自装配粒子。沉淀的蛋白产物在磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH7.2)中重悬浮,并在不连续的 20-60% 的蔗糖梯度下通过超离心进一步纯化。收集从蔗糖梯度中获得的级分,并通过 SDS-PAGE 分析、蛋白质印迹分析和电子显微镜术测定。

[0131] 通过考马斯蓝染色和蛋白质印迹分析检测多个蔗糖密度梯度级分中具有预期分子量的流感 HA 和 M1 蛋白(图 6)。这显示取自感染的 Sf-9S 细胞的流感病毒蛋白聚集成高分子量的复合物,例如壳粒、亚病毒颗粒、VLP 和 / 或 VLP 复合物。尽管可能由于在蛋白质印迹分析中兔抗 - 流感血清不能识别变性的 NA 蛋白,所以通过考马斯蓝染色和蛋白质印迹分析检测 NA 蛋白不一致,但在唾液酸苷酶活性分析中检测是一致的(图 10)。

[0132] 通过凝胶过滤层析证实高分子 VLP 的存在。将一等份包含流感病毒蛋白的蔗糖密度梯度级分上样到 Sepharose CL-4B 柱上,以根据质量分级分离。该层析柱用分别具有表观分子量为 2,000,000、20,000 和 1,357 道尔顿的葡聚糖蓝 2000、葡聚糖黄和维生素 B12 (Amersham Pharmacia)校准,并测定层析柱的孔隙体积。如所预期的,将高分子流感病毒蛋白移入柱的孔隙体积中,这是例如病毒颗粒等大分子蛋白的特征。通过蛋白质印迹分析分析分离的级分,以检测流感和杆状病毒蛋白。例如,在空隙体积级分中检测到 M1 蛋白,它也

含有杆状病毒蛋白(图7)。

[0133] 流感 VLP 和蔗糖梯度级分中蛋白的形态学通过电子显微镜术阐明。对于负染色电子显微镜术,取自两个蔗糖密度梯度级分的流感蛋白在 pH7.2 的 PBS 中用 2% 的戊二醛固定。

[0134] 用电子显微镜测定负染色样品显示两个级分中都有大分子蛋白复合物或 VLP 存在。这些 VLP 显示具有直径为约 60 和 80nm 的不同大小和形态学(球型)。还检测了两类颗粒中较大的复合物,以及杆状颗粒(图8)。所有观察到的大分子结构物在其表面都具有突起(包膜粒),这是流感病毒的特征。由于 80nm 颗粒的大小和外观与野生型流感病毒颗粒相似,这些结构物可能代表 VLP, VLP 与野生型流感病毒粒子具有明显的相似性,包括相似的粒子几何学、结构、三角测量数量、对称性和其它特征。约 60nm 的较小粒子可代表在形态和结构上不同于 VLP 的亚病毒颗粒。对于其它病毒,也报道了具有不同大小和形态学的重组大分子蛋白的类似现象。例如,乙肝病毒重组核心抗原(HBcAg)形成不同大小的粒子,它们分别具有不同结构和三角测量数量 T=4 和 T=3 (Crowther 等,1994)。

[0135] 为了表征纯化的流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) VLP 的功能特性,在血凝素测定(图9)和唾液酸苷酶测定(图10)中检验样品。对于血凝素测定,2 倍稀释的纯化流感 VLP 与 0.6% 的豚鼠红细胞混合并在 4℃ 培养 1 或 16 小时。血细胞凝集的程度肉眼可见,还测定并记录了能够聚集红细胞的重组流感蛋白的最大稀释度(图9)。此外,蔗糖密度梯度的许多级分显示了血细胞凝集活性,表明多个大分子和单体型的流感蛋白存在。检测到的最高滴度为 1:4000。在对照试验中,野生型流感 A/Shandong 病毒显示 1:2000 的滴度。血细胞凝集测定揭示了由流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒 HA、NA 和 M1 蛋白组成的重组 VLP 具有功能上的活性。这说明 HA 亚基蛋白在 VLP 内的装配、构象和折叠与野生型流感病毒相似或一致。

[0136] 另外,对纯化的 H9N2VLP 样品进行唾液酸苷酶测定。使用胎球蛋白作为底物测定蔗糖密度梯度级分中唾液酸苷酶活性量。唾液酸苷酶测定中,唾液酸苷酶从底物分子中切掉唾液酸以释放唾液酸用于测定。加入亚砷酸盐试剂使酶活性停止。用硫代巴比妥酸化学测定释出的唾液酸的量,硫代巴比妥酸产生的粉红色与游离唾液酸的量成比例。颜色(发色团)的量用分光光度计在波长为 549nm 处测定。使用这种方法,证明在含有流感 VLP 的蔗糖梯度级分中具有唾液酸苷酶的活性(图10)。如所预期的,在几个级分中观察到该活性,有两个峰值级分。使用野生型流感病毒作为阳性对照。与纯化的流感 VLP 相比较,野生型流感病毒显示可比的唾液酸苷酶活性。这些发现证实了有关蛋白构象的 HA 结果,并表明流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒的纯化 VLP 功能上与野生型流感病毒相似。

[0137] 从上述分析和测定获得的结果显示,流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) HA、NA 和 M1 蛋白的表达对于感染杆状病毒的昆虫细胞中功能性 VLP 的自装配和转运是足够的。既然这些流感 VLP 代表自装配的流感结构蛋白,并证实其功能和生化特性与野生型流感病毒相似,那么这些流感 VLP 保存重要的结构构象,包括有效流感疫苗所必需的表面表位。

[0138] 实施例 2:RT-PCR 克隆禽流感 A/Hong Kong/1073/99 病毒基因

[0139] 本发明的目的是提供能够指导重组流感病毒蛋白生产的合成的核酸序列。使用分离自病毒的流感病毒天然基因组 RNA,通过反转录和聚合酶链反应(PCR)方法获得这种合成的核酸序列。为了本申请的目的,核酸序列是指 RNA、DNA、cDNA 或者编码蛋白的它们的任

何合成变体。

[0140] 禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒由 K. Subbarao 博士提供(疾病防治中心(Center for Disease Control), Atlanta, GA, USA)。在 CDC 使用 Trizol LS 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CAUSA)在 Biosafety Level3 (BSL3)防范条件下通过酸苯酚 RNA 提取法分离病毒基因组 RNA。通过使用 MuLV 反转录酶(InVitrogen)进行反转录和使用 HA、NA 和 M1 蛋白的特异性寡核苷酸引物和 Taq I DNA 聚合酶(InVitrogen)进行 PCR 获得病毒 RNA 的 cDNA 分子(表 1)。将 PCR 片段克隆进入细菌亚克隆载体 pCR2.1TOPO (Invitrogen)的 Eco RI 位点之间,产生含有 HA、NA 和 M1cDNA 克隆的三个重组质粒。

[0141] 实施例 3:RT-PCR 克隆人流感 A/Sydney/5/94 (H3N2) 病毒基因

[0142] 流感 A/Sydney/5/94 (H3N2) 病毒从 M. Massare 博士处获得(Novavax Inc., Rockville, MD)。在 Novavax Inc. 使用 Trizol LS 试剂(Invitrogen),在 BSL2 防范条件下通过 RNA 酸苯酚提取法分离病毒基因组 RNA。通过反转录和使用 HA、NA、M1、M2 和 NP 蛋白的特异性寡核苷酸引物进行 PCR 获得病毒 RNA 的 cDNA 分子(表 2)。将 PCR 片段克隆进入细菌亚克隆载体 pCR2.1TOPO 的 Eco RI 位点之间,产生含有 HA、NA、M1、M2 和 NP cDNA 克隆的五个重组质粒。

[0143] 实施例 4:克隆禽流感 A/Hong Kong/1073/99 病毒 cDNA 进入杆状病毒转移载体

[0144] 从以 pCR2.1TOPO 为基础的质粒,在多角体座位和 Tn7att 位点以及杆状病毒多角体蛋白启动子下游和聚腺苷酸化信号序列上游之间,HA、NA 或 M1 基因被亚克隆进入 pFastBac1 杆状病毒转移载体(In Vitrogen)。该病毒基因以 T4DNA 连接酶连接。对于 HA 基因,将来自 pCR2.1TOPO-HA 的 BamHI-Kpn I DNA 片段插入 BamHI-Kpn I 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。对于 NA 基因,将来自 pCR2.1TOPO-NA 的 Eco RI DNA 片段插入 Eco RI 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。对于 M1 基因,将来自 pCR2.1TOPO-M1 的 Eco RI DNA 片段插入 Eco RI 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。用这些 DNA 连接反应转化感受态 E. coli DH5a 细菌(In Vitrogen),获得转化的菌落,并将细菌克隆分离。获得的以 pFastBac1 为基础的质粒、pFastBac1-HA、pFastBac1-NA 和 pFastBac1-M1 通过在琼脂糖凝胶上限制酶切作图表征(图 4(A))。图 1-3 显示的克隆基因的核苷酸序列通过自动 DNA 测序测定。DNA 序列分析显示克隆的流感 HA、NA 和 M1 基因与以前公开的流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 的 NA、HA 和 M1 基因(GenBank 入藏登记号分别为 AJ404629、AJ404626 和 AJ278646)相同。

[0145] 实施例 5:克隆人流感 A/Sydney/5/94 病毒 cDNA 进入杆状病毒转移载体

[0146] 从以 pCR2.1TOPO 为基础的质粒,在多角体座位和 Tn7att 位点以及杆状病毒多角体蛋白启动子下游和聚腺苷酸化信号序列上游之间,将 HA、NA、M1、M2 和 NP 基因亚克隆进入 pFastBac1 杆状病毒转移载体。该病毒基因与 T4DNA 连接酶连接。对于 HA 基因,将来自 pCR2.1TOPO-hHA3 的 BamHI-Kpn I DNA 片段插入 BamHI-Kpn I 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。对于 NA 基因,将来自 pCR2.1TOPO-hNA 的 Eco RI DNA 片段插入 Eco RI 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。对于 M1 基因,将来自 pCR2.1TOPO-hM1 的 Eco RI DNA 片段插入 Eco RI 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。对于 M2 基因,将来自 pCR2.1TOPO-hM2 的 Eco RI DNA 片段插入 Eco RI 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。对于 NP 基因,将来自 pCR2.1TOPO-hNP 的 Eco RI DNA 片段插入 Eco RI 消化的 pFastBac1 质粒 DNA。用这些 DNA 连接反应转化感受态 E. coli DH5a 细菌,获得转化的菌落,并将细菌克隆分离。获得的以 pFastBac1 为基础的质粒、pFastBac1-hHA3、

pFastBac1-hNA2 和 pFastBac1-hM1、pFASTBAC1-hM2 和 pFASTBAC1-hNP 在琼脂糖凝胶上通过限制酶切作图表征(图 4(A))。克隆基因的核苷酸序列通过自动 DNA 测序测定。DNA 序列分析显示克隆的流感 HA、NA、M1、M2 和 NP 基因与以前公开的这些基因的核苷酸序列相同。

[0147] 实施例 6:编码多禽流感 A/Hong Kong/1073/99 病毒基因的多基因杆状病毒转移载体的构建

[0148] 为了构建表达多流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 病毒基因的以 pFastBac1 为基础的杆粒转移载体,首先将来自 pFastBac1-M1 质粒包含 M1 基因的 Sna BI-Hpa I DNA 片段克隆进入 pFastBac1-HA 的 Hpa I 位点。这样获得在独立表达盒内编码 HA 和 M1 基因的 pFastBac1-HAM 质粒,并在分离的多角体蛋白启动子的控制下表达。

[0149] 最后,包含 HA 和 M1 表达盒的 pFastBac1-HAM 的 SnaBI-Avr II DNA 片段转移到 Hpa I-Avr II 消化的 pFastBac1-NA 质粒 DNA。这样获得编码表达流感 HA、NA 和 M1 基因的三个独立表达盒的质粒 pFastBac1-NAHAM,并在分离的多角体蛋白启动子的控制下表达(图 4(B))。

[0150] 在另一个实施例中,将来自 pFASTCI-hHA3 的 H3 基因(见实施例 5)克隆进入 pFASTBAC1-NAHAM,作为表达和生产异型流感 VLP 的第四个流感病毒基因。

[0151] 实施例 7:在昆虫细胞中生产编码禽流感 A/HongKong/1073/99 病毒的 NA、HA 和 M1 基因的多基因重组杆状病毒

[0152] 获得的多基因杆粒转移载体 pFastBac1-NAHAM 用于生产多基因重组杆状病毒,该杆状病毒编码用于在昆虫细胞中表达的禽流感 A/HongKong/1073/99 (HN2) HA、NA 和 M1 基因。通过附着在感受态 *E. coli* DH10BAC 细胞(In Vitrogen)中的 pFastBac1-NAHAM DNA 和 AcMNPc 杆状病毒基因组之间的多角体蛋白和 Tn7att DNA 序列上的位点特异性重组生产重组杆粒 DNA (图 4(B))。通过小量制备质粒 DNA 的方法分离重组杆粒 DNA,并使用阳离子脂类 CELLFECTIN (In Vitrogen)转染进入 Sf-9s 细胞。转染后,在 Sf-9S 昆虫细胞中将重组杆状病毒分离、噬斑纯化和扩增。在 Sf-9S 昆虫细胞中制备病毒原料,并表征以用于表达禽流感病毒 HA、NA 和 M1 基因产物。将获得的重组杆状病毒称为 bNAHAM-H9N2。

[0153] 实施例 8:昆虫细胞中重组禽流感 A/HongKong/1073/99 蛋白的表达

[0154] 在摇瓶中,28℃的无血清培养基(HYQ SFM, HyClone, Ogden, UT)中保存为悬浮培养物的 Sf-9S 昆虫细胞,在 2×10^6 细胞/毫升的细胞密度下,以感染复数(MOI)为 3pfu/细胞的重组杆状病毒 bNAHAM-H9N2 感染。病毒感染进行 72 小时,以使流感蛋白表达。感染的昆虫细胞中禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) HA 和 M1 蛋白的表达通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析得到证实。SDS-PAGE 分析在 4-12% 线性梯度 NuPAGE 凝胶(Invitrogen)上在退化和变性条件下进行。蛋白质印迹分析中的第一抗体是从 CDC 获得的针对禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2) 产生的多克隆兔抗血清和流感 M1 蛋白的单克隆鼠抗血清(Serotec, UK)。蛋白质印迹分析的第二抗体是针对兔或小鼠 IgG (H+L)产生的碱性磷酸酶接合山羊 IgG 抗血清(Kirkegaard 和 Perry 实验室, Gaithersburg, MD, USA)。这些分析结果(图 5)表明 HA 和 M1 蛋白在杆状病毒感染的昆虫细胞中表达。

[0155] 实施例 9:重组禽流感 H9N2 病毒样颗粒和大分子蛋白复合物的纯化

[0156] 取自用表达禽流感 A/HongKong/1073/99 (H9N2)HA、NA 和 M1 基因产物的重组杆状病毒 bNAHAM-H9N2 感染的 Sf-9S 昆虫细胞的培养上清(200ml)通过低速离心收集。通过使

用 GS-3 转头,以 $10,000\times g$ 在 4°C 下,在 Sorval RC-5B 超速离心机中离心 1 小时澄清培养上清。通过使用 Sorval TH-641 吊桶式转头,以 27,000rpm 在 4°C 下,在 Sorval OTD-65 超速离心机中离心 3 小时,从澄清的培养上清中分离病毒和 VLP。病毒沉淀在 1ml 的 PBS (pH7.2) 中重悬浮,装载到 20-60% (w/v) 的不连续蔗糖阶段梯度上,并通过使用 Sorval TH-641 转头,以 27,000rpm 在 4°C 下,在 Sorval OTD-65 超速离心机中离心 16 小时分离。从蔗糖梯度的顶部收集级分 (0.5ml)。

[0157] 使用上文实施例 6 中描述的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析方法分析蔗糖梯度级分中的流感蛋白。如使用蛋白质印迹分析所显示的,在相同的蔗糖梯度级分中发现 HA 和 M1 蛋白 (图 6),表明 HA 和 M1 蛋白结合为大分子蛋白复合物。

[0158] 在全部蔗糖梯度的级分中也发现了 HA 和 M1 蛋白,这表明这些重组病毒蛋白与不同密度的大分子蛋白复合物和组合物结合。

[0159] 实施例 10 :通过凝胶过滤层析分析重组禽流感 H9N2VLP 和蛋白质

[0160] 蛋白大分子例如 VLP 和单体蛋白根据它们的质量大小和形状分别移到凝胶过滤或大小排组层析柱上。为了确定来自蔗糖梯度部分的重组流感蛋白是单体蛋白或是大分子蛋白复合物例如 VLP,制备具有 14ml 的 Sepharose CL-4B (Amersham) 的树脂柱床体积的层析柱 (7mm $\times$ 140mm)。大小排组层析柱用 PBS 平衡,并用表观分子量分别为 2,000,000、20,000 和 1,357 的葡聚糖蓝 2000、葡聚糖黄和维生素 B12 (Amersham Pharmacia) 校准,以确定层析柱的孔隙体积。

[0161] 在孔隙体积 (6ml 级分) 中从柱中洗脱葡聚糖蓝 2000。如所预期的,重组流感蛋白复合物也从层析柱的孔隙体积 (6ml 级分) 中洗脱。这一结果是高分子量大分子蛋白复合物例如 VLP 的特征。层析柱级分中的病毒蛋白用上文实施例 6 中描述的蛋白质免疫印迹分析检测。在孔隙体积级分中检测到 M1 蛋白 (图 7)。如所预期的,杆状病毒蛋白也存在于孔隙体积中。

[0162] 实施例 11 :重组流感 VLP 的电子显微镜术

[0163] 为了确定在蔗糖梯度上分离出的并包含重组禽流感蛋白的大分子蛋白复合物是否具有与流感病毒粒子相似的形态学,进行负染色样品的电子显微镜测定。将重组禽流感 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) 蛋白复合物浓缩,并通过如实施例 7 所描述的在不连续蔗糖梯度上超离心从培养上清中纯化。蔗糖梯度级分的等分部分用含 2% 戊二醛的 PBS (pH7.2) 处理,吸附在新近放电的塑料 / 碳 - 包被的格栅上,并用蒸馏水洗涤。该样品用 2%、pH6.5 的磷钨酸钠染色,并使用透射电镜 (Philips) 观察。取自两种蔗糖梯度级分的重组禽流感 H9N2 蛋白复合物的负染色样品的电子显微照片显示来自两种蔗糖梯度级分的球形和杆形颗粒 (图 8)。这些颗粒具有不同的大小 (60 和 80nm) 和形态。还检测到两种类型颗粒的较大的复合物,以及杆形颗粒 (图 8)。所有观察到的蛋白复合物结构显示刺突样表面突起,该突起与流感病毒 HA 和 NA 包膜粒相似。既然 80nm 颗粒的大小和外观与野生型流感病毒颗粒的大小和外观相似,这些结构可能代表被膜流感 VLP。约 60nm 的较小颗粒可能代表在形态上和结构上都不同于上述 VLP 的亚病毒颗粒。

[0164] 实施例 12 :通过血细胞凝集分析流感蛋白的功能特征

[0165] 为了确定纯化的流感 VLP 和蛋白质是否具有功能活性,例如血细胞凝集和唾液酸苷酶活性 (这是流感病毒的特征),纯化的流感 VLP 和蛋白质在血细胞凝集和唾液酸苷酶分

析中检验。

[0166] 对于血细胞凝集分析,制备一系列含有流感 VLP 或正对照野生 A 型流感病毒的 2 倍稀释的蔗糖梯度级分。然后将它们与含 0.6% 豚鼠红细胞的 PBS (pH7.2) 混合,并在 4℃ 培育 1-16 小时。使用 PBS 作为负对照。血细胞凝集的程度通过视觉确定,并确定能够凝集豚鼠红细胞的级分的最高稀释度(图 9)。对于纯化的流感 VLP 和蛋白质,观察到的最高血细胞凝集效价是 1:4000,这比由野生型流感对照显示的效价高,野生型流感对照的效价是 1:2000。

[0167] 实施例 13:通过唾液酸苷酶测定分析流感蛋白的功能特征

[0168] 在含有流感 VLP 的蔗糖梯度级分中唾液酸苷酶活性的量通过唾液酸苷酶分析确定。在这一分析中,NA (一种酶) 作用于基质(胎球蛋白)并释放唾液酸。加入亚砷酸盐试剂以使酶活停止。用硫代巴比妥酸化学测定释出的唾液酸的量,硫代巴比妥酸产生的粉红色与游离唾液酸的量成比例。颜色(发色团)的量用分光光度计在波长为 549nm 处测定。如图 8 所描述的,该数据显示由含有 VLP 的蔗糖梯度级分产生显著量的唾液酸,并且这些级分相应于显示血细胞凝集活性的那些级分。

[0169] 实施例 13:用功能同型的重组流感 H9N2VLP 免疫 BALB/c 小鼠

[0170] 重组流感 VLP 的免疫原性通过免疫小鼠,随后进行免疫血清的蛋白质印迹分析确定。在第 0 天和第 28 天,将包含来自禽流感病毒 A/Hong Kong/1073/99 型的病毒 HA、NA 和 M1 蛋白并在蔗糖梯度上纯化的重组 VLP (1 μg/注射) 皮下接种到 10 只雌性 BALB/c 小鼠的三角肌区(图 11)。作为负对照,将 PBS (pH7.2) 同样施与 5 只小鼠。在第一天(采血前)、第 27 天(第一次采血)和第 54 天(第二次采血)从小鼠的眶上腔采血。过夜凝固和离心后从血液样品中收集血清。

[0171] 对于蛋白质印迹分析,将 200ng 灭活的禽流感病毒 A H9N2 型或冷适应的禽流感病毒 A H9N2 型,以及 See Blue Plus2 预染色蛋白标准物(InVitrogen)变性(95℃,5 分钟),并使之在 172 伏特电压下,在 MES 缓冲液中含有 4-12% 的聚丙烯酰胺梯度的 NuPAGE 凝胶(InVitrogen)上,还原条件下(10mM 的 8- 巯基乙醇)电泳,直到溴酚蓝行迹染料消失。对于蛋白质凝胶,经电泳的蛋白通过用胶体考马斯蓝试剂(InVitrogen)染色可见。通过标准蛋白质印迹方法,在甲醇中将蛋白质从凝胶转移到硝酸纤维膜上。将 VLP 免疫小鼠和用灭活的禽流感病毒 H9N2 免疫的兔(正对照血清)的血清分别以 1:25 和 1:100 在 PBS 溶液中(pH7.2)稀释,并用做第一抗体。用 5% 的酪蛋白阻断的与蛋白质结合的膜在室温下经持续摇动与第一抗血清反应 60 分钟。用含有 Tween20 的磷酸盐缓冲溶液洗涤第一抗体膜后,第二抗血清[山羊抗-鼠 IgG- 碱性磷酸酶接合物(1:10,000)或山羊抗-兔 IgG- 碱性磷酸酶接合物(1:10,000)]与膜反应 60 分钟。用含有 Tween20 的磷酸盐缓冲溶液洗涤第二抗体膜后,膜上的抗体-结合蛋白用例如 NBT/BCIP (InVitrogen)等产色基质显色可见。

[0172] 蛋白质印迹分析的结果(图 12)是具有与病毒 HA 和 M1 蛋白相似的分子量(分别为 75 和 30kd)的蛋白质与正对照血清(图 12(b))和用重组流感 H9N2VLP 免疫的小鼠的血清(图 12(a))结合。这些结果表明通过这一途径给予的小鼠中,仅仅给予重组流感 H9N2VLP 即具有免疫原性。

[0173] 下列文献本文引用作为参考:

[0174] Berglund, P., Fleeton, M. N., Smerdou, C., 和 Liljestrom, P. (1999)。用重组

Semliki Forest 病毒免疫, 在小鼠中诱导对流感侵袭的保护。Vaccine17, 497-507。

[0175] Cox, J. C., 和 Coulter, A. R. (1997). 佐剂-其作用方式的分类和回顾。Vaccine15, 248-256。

[0176] Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesensky, A., Smith, G., Garcia, M., Stone, H., 和 Perdue, M. L. (1999)。杆状病毒衍生的血凝素疫苗防御由鸟 H5 和 H7 亚型感染的致死性流感。Vaccine17, 2265-2274。

[0177] Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P. (1994)。通过电子低温显微方法测定的乙型肝炎病毒核心粒子的三维结构。Cell117, 943-50。

[0178] Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E., 和 Portela, A. (1999)。流感病毒样粒子的有效形成:依赖于病毒蛋白的表达水平。J;Gen. Virol. 80, 1635-1645。

[0179] Johansson, B. E. (1999)。用在重组杆状病毒中产生的流感 A 病毒血凝素和唾液酸苷酶进行免疫, 导致优于常规疫苗平稳和扩大的免疫反应。Vaccine17, 2073-2080。

[0180] Lakey, D. L., Treanor, J. J., Betts, B. F., Smith, G. E., Thompson, J., Sannella, E., Reed, G., Wilkinson, B. E., 和 Wright, P. E. (1996) 重组杆状病毒流感 A 血凝素疫苗在健康成人中具有好的耐受力和免疫原性。RTIJ. Infect. Dis. 174, 838-841。

[0181] Latham, T., 和 Galarza, J. M. (2001)。仅四个结构蛋白同时表达后, 形成野生型和嵌合流感病毒样粒子。RTI J. Virol. 75, 6154-6165。

[0182] Mena, I., Vivo, A., Perez, E., 和 Portela, A (1996)。帮助合成的氯霉素乙酰基转移酶 RNA 进入从重组质粒获得的流感样粒子。J. Virol. 70, 5016-5024。

[0183] Murphy, B. R., 和 Webster, R. G. (1996)。正粘病毒。“Virology”(D. M. K. B. N. Fields, P. M. Howley, 编辑) Vol. 1, 1397-1445。Lippincott-Raven, Philadelphia。

[0184] Neumann, G., Watanabe, T., 和 Kawaoka, Y. (2000)。质粒驱动的流感病毒样粒子的形成 RTI J. Virol. 74, 547-551。

[0185] Olsen, C. W., McGregor, M. W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B. R., Nelson, K. M., Lunn, D. P., Macklin, M. D. 和 Swain, W. F. (1997)。小鼠中表达杆状病毒和 DNA- 基础的马流感病毒血凝素疫苗的免疫原性和效能。Vaccine15, 1149-1156。

[0186] Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., 和 Shortridge, K. F. (2001)。中国西南在猪中鸟 H9N2 和同时期的“人”H3N2 流感 A 病毒的共循环:遗传再分类的可能性? J. Tirol. 75, 9679-9686。

[0187] Pumpens, P., and Grens, E. (2003)。嵌合病毒样颗粒的人工基因。在“ArtificialDNA”中(Khudyakov, Y. E, 和 Fields, H. A., 编辑) 249-327. CRC Press, New York。

[0188] Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R. E., 和 Smith, J. F. (1997)。来自减毒的委内瑞拉马脑脊髓炎病毒的复制子辅助系统:异源基因的体外表达以及针对异源病原体的体内免疫。Virology239, 389-401。

[0189] Slepushkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A., 和 Cox,

N. J. (1995)。通过用杆状病毒表达的 M2 蛋白进行疫苗接种保护小鼠免于流感 A 病毒的侵袭。Vaccine13,1399-1402。

[0190] Treanor, J. J., Betts, R. F., Smith, G. E., Anderson, E. L., Hackett, C. S., Wilkinson, B. E., Belshe, R. B., 和 Powers, D. C. (1996)。在昆虫细胞中表达的重组血凝素作为在青年和中年人群中使用的流感疫苗的评估。J. Infect. Dis. 173,1467-1470。

[0191] Tsuji, M., 等(1998)。小鼠中表达疟原虫或流感病毒的细胞毒素 T- 淋巴细胞表位的重组新培斯(Sindbis) 病毒引发对相应病原体的保护。J. Virol. 72,6907-6910。

[0192] Ulmer, J. B., 等(1993)。通过注射编码病毒蛋白的 DNA 引发对流感的异源保护。Science259,1745-1749。

[0193] Ulmer, J. B., 等(1998)。通过用核蛋白 DNA 接种诱导抵抗流感病毒的保护性 CD4+ 和 CD8+T 细胞。J. Virol. 72,5648-5653。

[0194] Watanabe, T., Watanabe, S., Neumann, G., 和 Kawaoka, Y. (2002)。复制 - 机能不全的流感病毒样颗粒的免疫原性和保护功效。J. Virol. 76,767-773。

[0195] Zhou, X., 等(1995)。通过非复制重组 Semliki Forest 病毒产生细胞毒素和体液免疫反应。Proc. Natl. Acad. Sci. USA92,3009-3013。

[0196] 其它实施方案

[0197] 本领域熟练的技术人员将认识到,或能够仅仅使用常规试验确定本发明描述的具体实施例的许多等价物。这种等价物意欲包含于下列权利要求书中:

[0198] 表 1

	级分 #*	滴度
	1	< 1:500
	3	< 1:500
	5	1:500
	7	1:1000
[0199]	9	1:2000
	11	1:2000
	12	1:4000
	14	1:500
	16	< 1:500
	PBS**	< 1:500
	A/Shangdong/9/93***	1:1000

[0200] 表 2

[0201]

病毒	株	基因	RT-PCR引物	
类型 A (H2N2)	Sydney/5/97	血凝素 (HA)	前向	5'-A <u>CGATCC</u> ATG AAGACTATCATTCCTTTGAG-3'
			逆向	5'-A <u>GGTACCT</u> CAAAATCCAAATGTTGCACCTAATG-3'
		唾液酸苷酶 (NA)	前向	5'-GGGGACAAAGTTTGTACAAAAGCAAGCTTAGAAG GAGATAGAACC ATG AATCCAAATCAAAGATAATAAC-3'
			逆向	5'-GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCTATAT AAGCATGAGATTGATGTCCGC-3'
		基质 (M1)	前向	5'-AAA <u>GAATTC</u> ATG AGTCTTCTAACCAGGTGAAAAGCTA-3'
			逆向	5'-AAA <u>TTCGAA</u> TTA CTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC-3'
		M2	前向	5'-A <u>GAATTC</u> ATG AGTCTTCTAACCGAGGTGAAAAGGCT ATCAGAAAACGAATGGGGGTGC-3'
			逆向	5'-AAA <u>TTCGAA</u> TTA CTCCAGCTCTATGCTGACAAAATGAC-3'
		核蛋白 (NP)	前向	5'-A <u>GAATTC</u> ATG GCGTCCCAAGGCACCAACG-3'
			逆向	5'-A <u>CCGGCCCG</u> TTAATTGTGTA CTCTCTGCAATTGTCTCCGAA GAAATAAG-3'
类型B	Harris	血凝素 (HA)	前向	5'-A <u>GAATTC</u> ATG AAGCCAATAATTGTACTACTCATGG-3'
			逆向	5'-A <u>CCGCCCCG</u> TTATAGACAGATGGAGCAAGAAACATTGTC TCTGGAGA-3'
		唾液酸苷酶 (NA)	前向	5'-A <u>GAATTC</u> CATG CTACCTTCAACTATACAAACG-3'
			逆向	5'-A <u>CCGGCCCG</u> TTACAGAGCCATATCAACACCTGTGACAGTG-3'

[0001]

序列表

<110> 诺瓦瓦克斯股份有限公司 (Novavax, Inc.)

Robinson, Robin A.

Pushko, Peter M.

<120> 功能性流感病毒样颗粒 (VLPS)

<130> 19065/2028

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1404

<212> DNA

<213> 鸟类 (Avian)

<400> 1

```

atgaatccaa atcaaaagat aatagcaactt ggctctgttt ctataactat tgcgacaata 60
tgtttactca tgcagattgc catcttagca acgactatga cactacattt caatgaatgt 120
accaaccocat cgaacaatca agcagtgcga tgtgaaccaa tcataataga aaggaaacata 180
acagagatag tgcatttgaa taatactacc atagagaagg aaagttgtcc taaagtagca 240
gaatacaaga attggteaaa accgcaatgt caaattacag ggttcgeccc tttctccaag 300
gacaactcaa ttaggccttc tgcagcgagg gatatitggg tgacaagaga accttatgta 360
tcgtgcggtc ttggtaaatg ttaccaattt gcacttgggc agggaaccac tttgaacaac 420
aaacactcaa atggcacaat acatgatagg agtcccata gaaccctttt aatgaacgag 480
ttgggtgttc catttcattt gggaaccaa caagtgtgca tagcatggtc cagctcaagc 540
tgccatgatg ggaaggcatg gttacatgtt tgtgtcactg gggatgatag aaatgcgact 600
getagcatca tttatgatgg gatgcttacc gacagtattg gticcatggc taagaacatc 660
ctcagaacte aggagtcaga atgcgtttgc atcaatggaa ctigtacagt agtaatgact 720
gatggaagtg catcaggaag ggctgatact aaaatactat tcattagaga agggaaaatt 780
gtccacattg gtccactgtc aggaagtgtc cagcatgtgg aggaatgtc ctgttaccce 840
cggatccag aagttagatg tgtttgcaga gacaattgga agggctccaa tagaccctg 900
ctatatataa atgtggcaga ttatagtgtt gattctagtt atgtgtgtc aggaattgtt 960
ggcgacacac caagaaatga cgatagctcc agcagcagta actgcaggga tcctaataac 1020
gagagagggg gccagaggat gaaagggtgg gcctttgaca atggaaatga tgtttggatg 1080
ggacgaacaa tcaagaaaga ttcgcgtctt ggttatgaga ctttcagggt cgttgggtgt 1140
tggaactacg ctaattccaa gtcacaaata aataggcaag tcatagttga cagtataac 1200
tggtctgggt attctggtat attctctgtt gaaggaaaaa cctgcatcaa caggtgtttt 1260
tatgtggagt tgataagagg gagaccacag gagaccagag tatggtggac ttcaaatagc 1320
atcattgtat tttgtggaac ttcaggtacc tatggaacag gctcatggcc cgatggagcg 1380
aatatcaatt tcattgttat ataa
1404

```

<210> 2

<211> 1683

<212> DNA

<213> 鸟类 (Avian)

[0002]

<400> 2

```

atggaacaaa tatcactaat aactatacta ctagtagtaa cagcaagcaa tgcagataaa 60
atctgcatcg gccaccagtc aacaaactcc acagaaactg tggacaogct aacagaaacc 120
aatgttcctg tgacacatgc caaagaattg ctccacacag agcataatgg aatgctgtgt 180
gcaacaagcc tgggacatcc cctcattcta gacacaigca ctattgaagg actagtctat 240
ggcaaccctt ctgtgtacct gctgttgga ggaagagaat ggctctacat cgtcgaaaga 300
tcatcagctg taaatggaa gtgttacctt gggatgtag aaaacctaga ggaactcagg 360
acaattttta gttecgctag ttctaccba agaateccaa tctteccaga cacaactcgg 420
aatgtgaactt aacttggaac aagcagagca tgttcagggtt cattctacag gagtatgaga 480
tggctgactc aaaagagcgg tttttacctt gttaagacg ccaataacac aaataacagg 540
ggaaagagca ttcttttctg gtggggcata catcacccac ccacctatac cgagcaaaaca 600
aatittgtaca taagaaacga cacaacaaca agcgtgacaa cagaagattt gaataggacc 660
ttcaaacagg tgatagggcc aaggccctt gtcaatggc tgcagggaag aattgattat 720
tattggtcgg tactaaaaac aggccaaaca ttgcgagtag gatccaatgg gaattctaatt 780
gtcccatggt atggacacgt tcttcagga gggagccatg gaagaatect gaagactgat 840
ttaaagggtg gtaattgtgt agtgcaatgt cagactgaaa aagggtgctt aaacagtaca 900
ttgccattee acaatatcag taaatatgea tttggaacct gceccaaata tgtaagagtt 960
aatagtctca aactggcagt cgtctgagg aacgtgectg ctagatcaag tagaggacta 1020
tttgagacca tagctggatt catagaagga ggttggccag gactagtgcg tggctgggat 1080
ggtttccagc attcaaatga tcaaggggtt ggtatggetg cagataggga ttcaactcaa 1140
aaggcaattg ataaaaaac atccaagggt aataatatag tcgacaagat gaacaagcaa 1200
tatgaaataa ttgatcatga attcagttag gttgaaacta gactcaatat gatcaataat 1260
aagattgatg accaaataca agacgtatgg gcatataatg cagaattgct agtactactt 1320
gaaaatcaaa aaacactcga tgagcatgat gcgaacgtga acaatctata taacaagggt 1380
aagagggcac tgggetccaa tgcctatgga gatgggaaag gctgttctga gctataccat 1440
aaatgtgatg atcagtgcac ggaacaattt eggaacggga cctataatag gagaaagtat 1500
agagagggaat caagactaga aaggcagaaa atagaggggg ttaagctgga atctgaggga 1560
acttacaaaa tctcaccat ttattcgact gtcgctcat ctcttgtgct tgcaatgggg 1620
tttctgctt tctgttteig ggccatgtcc aatggatctt gcagatgcaa catttgtata 1680
taa 1683

```

<210> 3

<211> 759

<212> DNA

<213> 鸟类 (Avian)

<400> 3

```

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcatcccatc aggeccccctc 60
aaagecgaga tcgcgcagag acttgaggat gtttttcag ggaagaacac agatcttgag 120
gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atctgtcac ctctgactaa ggggatttta 180
gggttttgtt tcaagctcac cgtgcccagt gagegaggac tgcagcgtag acgatttgtc 240
caaaatgccc taaatgggaa tggagacca aacaacatgg acagggcagt taaactatac 300
aagaagctga agagggaat gacattccat ggagcaaagg aagttgcact cagttactca 360
actggtgcgc ttgccagttg catgggtctc atatacaacc ggatgggaac agtgaccaca 420
gaagtggctc ttggcctagt atgtgccact tgtgaacaga ttgtgatgc ccaacatcgg 480
tcccacaggc agatggcgac taccaccaac ccaataatca ggcagagaa cagaatggta 540
ctagccagca ctacggctaa ggccatggag cagatggctg gatcaagtga gcaggcagca 600
gaagccatgg aagtgcgaag tcaggetagg caaatgggtc aggetatgag gacaattggg 660
actcaccta gtteacgtgc aggtctaaaa gatgatctta ttgaaaattt gcaggettac 720
cagaaacgga tgggagtga aatgcagaga ttcaagtga 759

```

ATGAATCCAAATCAAAAGATAATAGCACTTGGCTCTGTTTCTATAACTATTGCGACAATATG
TTTACTCATGCAGATTGCCATCTTAGCAACGACTATGACACTACATTTCAATGAATGTACCA
ACCCATCGAACAATCAAGCAGTGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAGGAACATAACAGAG
ATAGTGCATTTGAATAATACTACCATAGAGAAGGAAAGTTGTCTAAAGTAGCAGAATACAA
GAATTGGTCAAAACCGCAATGTCAAATTACAGGGTTTCGCCCTTTCTCCAAGGACAACCTCAA
TTAGGCTTTCTGCAGGCGGGGATATTTGGGTGACAAGAGAACCTTATGTATCGTGCGGTCTT
GGTAAATGTTACCAATTTGCACCTGGGCAGGGAACCACTTTGAACAACAAACACTCAAATGG
CACAATACATGATAGGAGTCCCCATAGAACCCTTTTAATGAACGAGTTGGGTGTTCCATTTT
ATTTGGGAACCAAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAACCTCCCATCATCCCAAGGCA
TGGTTACATGTTTGTGTCACTGGGGATGATAGAAATGCGACTGCTAGCATCATTTATGATGG
GATGCTTACCGACAGTATTGGTTCATGGTCTAAGAACATCCTCAGAACTCAGGAGTCAGAAT
GCGTTTGCATCAATGGAACCTGTACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAAGGGCT
GATACTAAAATACTATTCAATTAGAGAAGGGAAAATTGTCCACATTGGTCCACTGTCAGGAAG
TGCTCAGCATGTGGAGGAATGCTCCTGTTACCCCCGGTATCCAGAAGTTAGATGTGTTTGCA
GAGACAATTGGAAGGGCTCCAATAGACCCGTGCTATATATAAATGTGGCAGATTATAGTGTT
GATTCTAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTGGCGACACACCAAGAAATGACGATAGCTCCAG
CAGCAGTAACTGCAGGGATCCTAATAACGAGAGAGGGGGCCAGGAGTGAAAGGGTGGGCTT
TTGACAATGGAATGATGTTGGATGGGACGAACAATCAAGAAAGATTTCGCGCTCTGGTTAT
GAGACTTTTCAAGGTCGTTGGTGGTGGACTACGGCTAATTCCAAGTCACAAATAAATAGGCA
AGTCATAGTTGACAGTGATAACTGGTCTGGGTATTCTGGTATATTCTCTGTTGAAGGAAAAA
CCTGCATCAACAGGTGTTTTTATGTGGAGTTGATAAGAGGGAGACCACAGGAGACCAGAGTA
TGGTGGACTTCAAATAGCATCATTTGATTTTGTGGAACCTCAGGTACCTATGGAACAGGCTC
ATGGCCCGATGGAGCGAATATCAATTCATGTCTATATAA

图 1

ATGGAAACAATATCACTAATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAAT
CTGCATCGGCCACCAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATG
TTCTTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACACAGAGCATAATGGAATGCTGTGTGCAACA
AGCCTGGGACATCCCTCATTTCTAGACACATGCACTATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCC
TTCCTTGTGACCTGCTGTTGGGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGTCGAAAGATCATCAGCTG
TAAATGGAACGCTGTTACCCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTTGT
TCCGCTAGTTCTTACCAAAGAATCCAAATCTTCCAGACACAACCTGGAATGTGACTTACAC
TGGAAACAAGCAGAGCATGTTTCAGGTTTATTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACTCAAAAGA
GCGGTTTTTACCCTGTTCAAGACGCCCAATACACAAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTTTC
GTGTGGGGCATACATCACCCACCCACCTATACCGAGCAACAAATTTGTACATAAGAAACGA
CACAACAACAAGCGTGACAACAGAAGATTTGAATAGGACCTTCAAACCAAGTGATAGGGCCAA
GGCCCTTGTCAATGGTCTGCAGGGAAGAATTGATTATTATTGGTCGGTACTAAAACAGGC
CAAACATTGCGAGTACGATCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACGTTCTTTC
AGGAGGGAGCCATGGAAGAATCCTGAAGACTGATTTAAAAGGTGGTAATTGTGTAGTGCAAT
GTCAGACTGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACATTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCA
TTTGGAAACCTGCCCCAAATATGTAAGAGTTAATAGTCTCAAACCTGGCAGTCGGTCTGAGGAA
CGTGCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATAGCTGGATTTCATAGAAGGAGGTT
GGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTGGTATG
GCTGCAGATAGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAATAACATCCAAGGTGAATAATAT
AGTCGACAAGATGAACAAGCAATATGAATAATTGATCATGAATTCAGTGAGGTTGAAACTA
GACTCAATATGATCAATAATAAGATTGATGACCAAATACAAGACGTATGGGCATATAATGCA
GAATTGCTAGTACTACTTGAAAATCAAAAACACTCGATGAGCATGATGCCAACGTGAACAA
TCTATATAACAAGGTGAAGAGGGCACTGGGCTCCAATGCTATGGAAGATGGGAAAGGCTGTT
TCGAGCTATACCATAAATGTGATGATCAGTGATGCAATGGAAACAATTCGGAACGGGACCTATAAT
AGGAGAAAGTATAGAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAGGGGGTTAAGCTGGA
ATCTGAGGGAACTTACAAAATCCTCACCATTATTCGACTGTGCGCTCATCTCTTGTGCTTG
CAATGGGGTTTGGCTGCCCTTCTGTTCTGGGCCATGTCCAATGGATCTTGCAGATGCAACATT
TGTATATAA

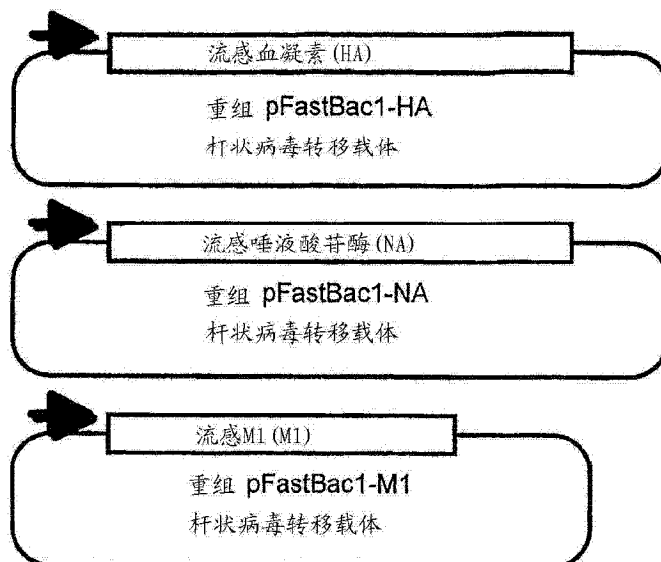
图 2

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAA
 AGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAGGATGTTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTC
 TCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTT
 GTGTTACGCTCACCCTGCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGATTTGTCCAAAATGC
 CCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTGA
 AGAGGGAAATGACATTCCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACTGGTGCCTT
 GCCAGTTGCATGGGTCTCATATACAACCGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTCTTG
 CCTAGTATGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATGCCCAACATCGGTCCCACAGGCAGATGG
 CCACTACCAACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCT
 AAGGCCATGGAGCAGATGGCTGGATCAAGTGAGCAGGCAGCAGAAGCCATGGAAGTCGCAAG
 TCAGGCTAGGCAAATGGTGCAGGCTATGAGGACAATTGGGACTCACCTAGTTCCAGTGCAG
 GTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTTGCAGGCTTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAAATG
 CAGAGATTCAAG**TGA**

图 3

(A)

多角体蛋白
启动子



(B)

多角体蛋白
启动子

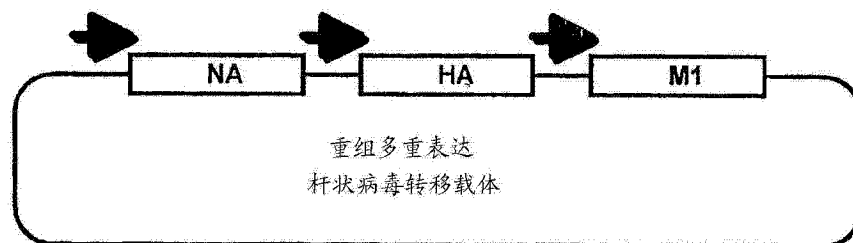


图 4

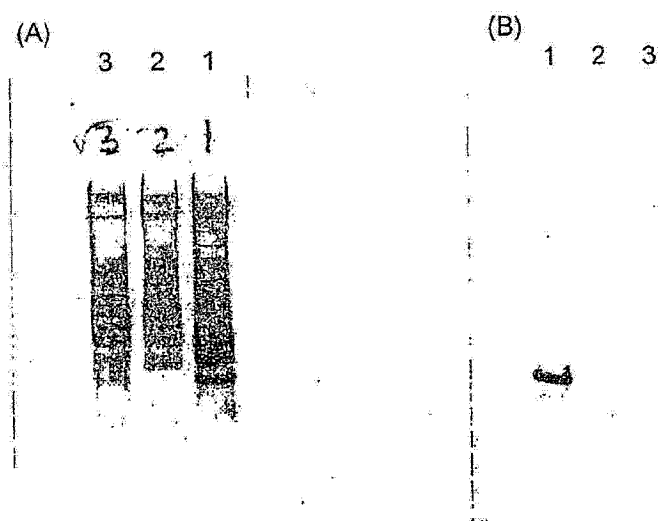


图 5

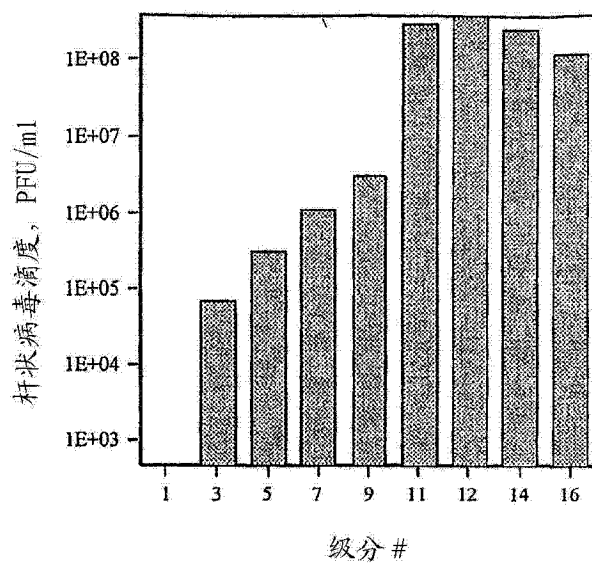


图 6

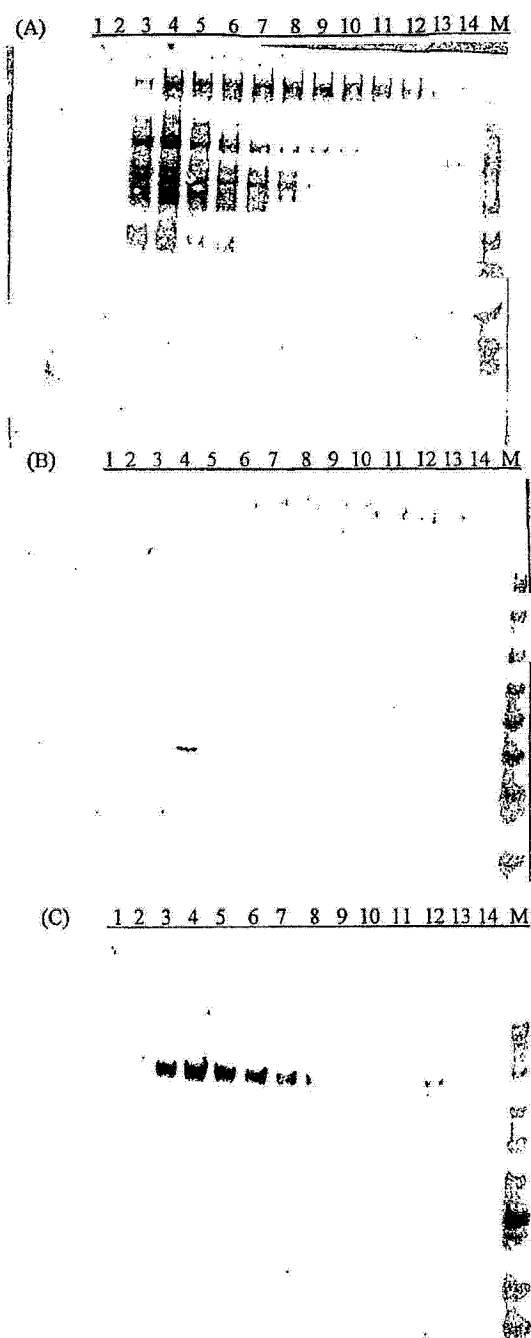


图 7

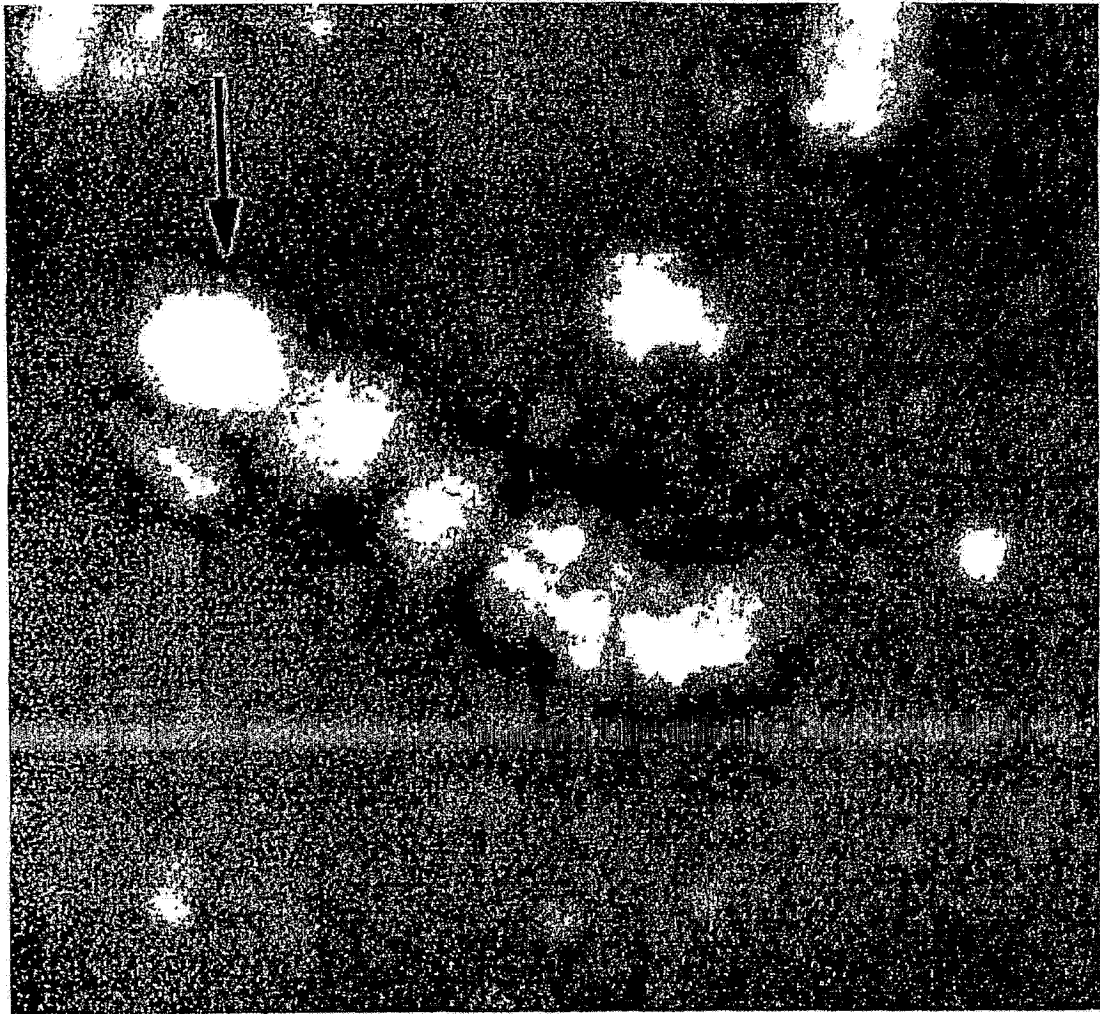


图 8

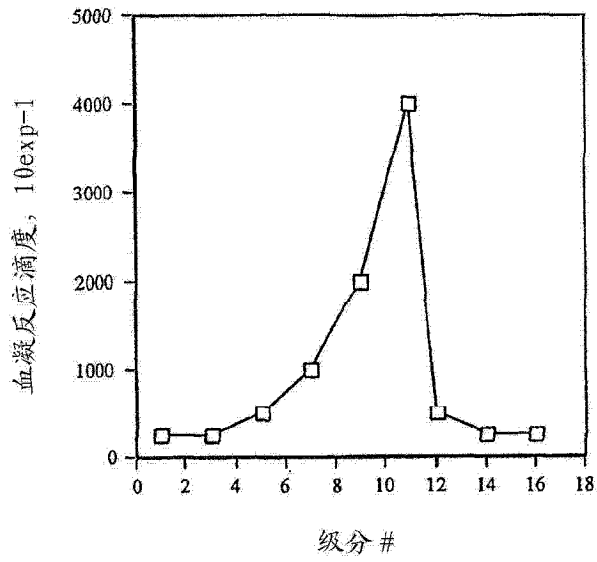


图 9

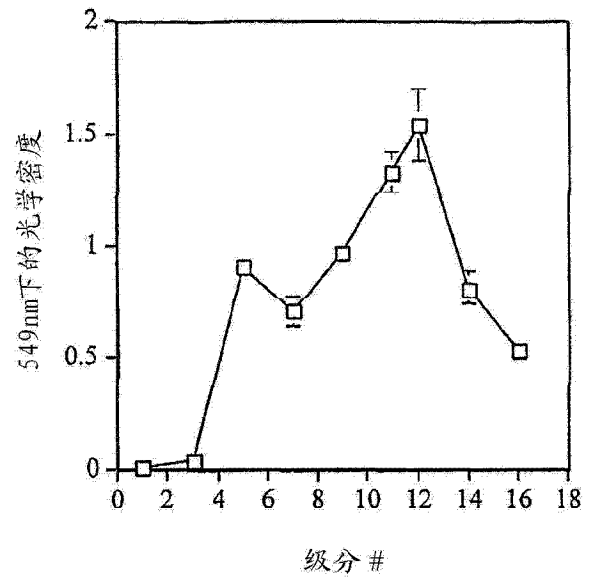


图 10

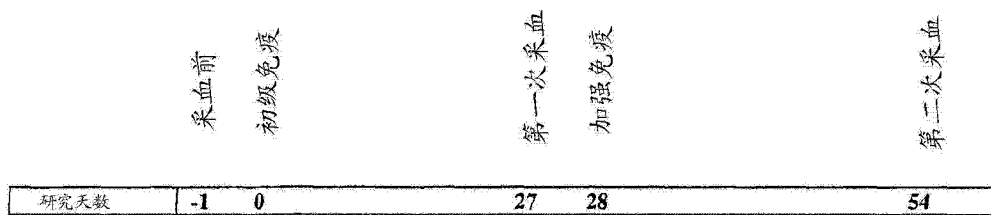


图 11

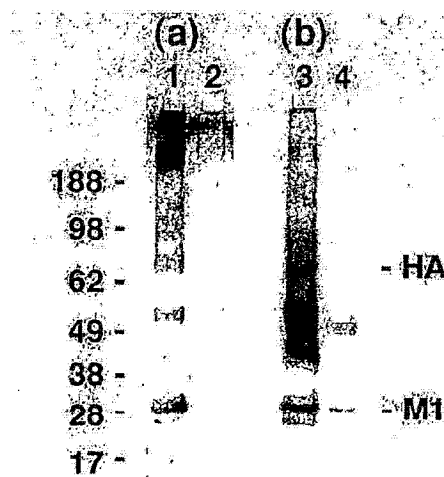


图 12