



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109923125 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 31

(21) 申请号 201780051719.X	(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728
(22) 申请日 2017.08.25	专利代理师 尹吉伟
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109923125 A	(51) Int.Cl. C07K 16/08 (2006.01) C07K 16/10 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.06.21	(56) 对比文件 CN 1200147 A,1998.11.25 CN 102939102 A,2013.02.20 WO 03075952 A1,2003.09.18 WO 2013177444 A2,2013.11.28 CN 103435697 A,2013.12.11 CN 104278014 A,2015.01.14 Anette Schneemann等.A virus-like particle that elicits cross-reactive antibodies to the conserved stem of influenza virus hemagglutinin.《J Virol》.2012,(第21期),11686-11697.
(30) 优先权数据 1614485.9 2016.08.25 GB	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.02.22	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/GB2017/052510 2017.08.25	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/037246 EN 2018.03.01	
(73) 专利权人 牛津大学创新有限公司 地址 英国牛津	
(72) 发明人 C·汤普森 S·古普塔	

审查员 王康

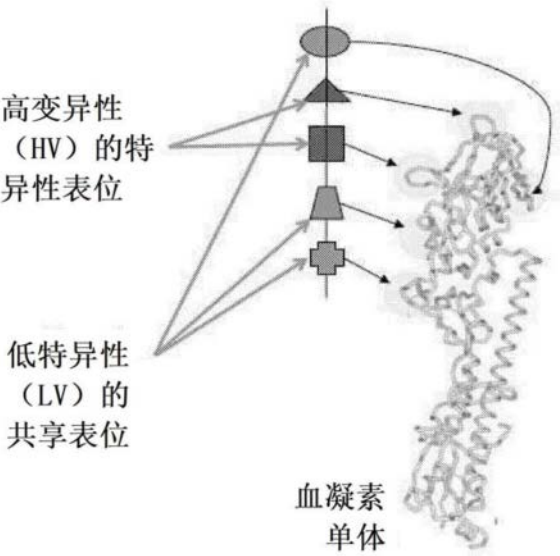
权利要求书1页 说明书36页
序列表23页 附图29页

(54) 发明名称

免疫原性组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含两种或更多种多肽的免疫原性组合物。本发明还提供了编码该多肽的核酸分子和载体,以及使用该组合物、核酸分子和载体预防或治疗流感的方法。



1. 一种包含五种不同病毒样颗粒的免疫原性组合物,其中所述五种不同病毒样颗粒各自独立地包含一种不同的同源三聚体,其中每种同源三聚体由三个多肽组成,所述多肽选自SEQ ID NO:13、14、15、16或17中的一种,任选地与一种或多种药学上可接受的载体或佐剂一起,用于治疗或预防甲型流感感染。

2. 一种疫苗组合物,包含根据权利要求1所述的组合物和佐剂。

3. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的疫苗组合物在制备用于在受试者中预防或治疗流感感染的药物中的用途。

免疫原性组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含两种或更多种多肽的免疫原性组合物。本发明还提供了编码该多肽的核酸分子和载体,以及使用该组合物、核酸分子和载体预防或治疗流感的方法。

背景技术

[0002] 季节性流感是严重的公共卫生问题,导致严重的疾病和死亡。在全球范围内,季节性流感估计会造成300万至500万例严重疾病和250,000至500,000例死亡(Lozano等,2012年)。并发症风险最高的人群是2岁以下的儿童、65岁以上的成年人、孕妇、以及患有某些疾病(如糖尿病或免疫系统较弱)的任何年龄的人(Mertz等,2013)。据估计,发展中国家一大部分儿童死亡与流感有关。季节性流感还会导致高水平的劳动力缺勤和生产率下降。

[0003] 当来自动物宿主的独特流感病毒株开始在人群中广泛传播时,流感大流行偶尔发生。最近的流感大流行发生在2009年,导致35岁以下个体的严重流感病和住院治疗增加(Presonis等,2011;Manicassamy等,2010)。1918年的流感大流行是有史以来最严重的大流行,造成5000万至1亿人死亡。新的大流行性流感病毒株的出现仍然令人担忧。

[0004] 预防流感感染的最有效方法是接种疫苗。目前,针对流感的疫苗接种涉及由甲型流感病毒的H1N1和H3N2亚型的最新流行株组成的三价或四价疫苗,并且还包括一种或两种乙型流感病毒株(WHO,2016)。由于流感的快速抗原进化,疫苗必须不断更新,并且通常由于时间限制,选择了即将到来的流感季节的错误疫苗株。由于这些原因,估计常规三价疫苗具有10-60%的功效并且危险群体的免疫每年都会发生(Treanor等,2012;Belongia等,2009)。

[0005] 因此,改善目前的流感疫苗有明显的社会和经济效益。这已得到制药公司的认可,如GSK和Pfizer,他们正在开发自己的新型流感疫苗。这些方法通常靶向弱免疫选择的表位,因此是“免疫隐形的”。

[0006] 目前,流感病毒被概念化为含有(i)高度变异性的高免疫原性(和保护性)表位,以及(ii)低免疫原性的不变表位(invariant epitope)。它们一起构成了“抗原漂移”理论的支柱,其中病毒群体缓慢且逐渐地获得高度可变的表位区域的变化,这些区域要求针对这些位点的疫苗不断更新,唯一的其他选择被认为是人工增强对天然效力低的不变表位的免疫力。

[0007] 相反,本发明人提出流感病毒还含有低变异性的高免疫原性表位,并且可以通过鉴定这些保护性表位来构建通用疫苗。这一观点得到了称为“抗原节俭(antigenic thrift)”流感进化的替代理论的支持,其中病毒动力学由对共有表位的预先存在的免疫力驱动,但这些表位的存在仍然存在疑问,并且它们在疫苗接种中的应用也从未被提出。

[0008] 使用生物信息学、结构和血清学分析的组合,现在已经鉴定和表征了在主要流感抗原血凝素(HA)中强烈免疫选择的具有有限变异性的一个表位。

[0009] HA是流感病毒中的主要表面抗原。它结合唾液酸并引发膜融合,导致内吞作用。它

是三聚体蛋白质,通常长度为565/566个氨基酸。每个单体由头部结构域和茎部结构域组成。

[0010] 现已鉴定的表位处于强免疫选择下,因此是“免疫显性的”。这使得能够设计新的“通用”流感疫苗,通过靶向有限变异的表位来预防大多数H1N1流感病毒株。

[0011] 因此,本发明的疫苗与常规的三价疫苗和其他流感疫苗相比具有许多优点。这些优点包括:

[0012] (i) 感染流行流感病毒株会加强疫苗保护,而不是潜在地减损疫苗保护;

[0013] (ii) 疫苗应比其他正在开发的“普遍”疫苗具有更高的免疫原性,从而降低保护阈值,延长保护期;

[0014] (iii) 它应该只需要施用一到三次(即初免和加强,或者初免和两次加强);和

[0015] (iv) 从中获得疫苗的理论 and 实验结构表明H1N1流感不太可能逃脱所提出的疫苗赋予的保护。

发明内容

[0016] 因此,本发明的一个目的是提供一种流感疫苗组合物,其能够赋予针对一种或多种甲型流感病毒亚型的保护,优选针对H1N1亚型。

[0017] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含两种或更多种多肽的免疫原性组合物,其中每种多肽独立地包含连续氨基酸的第一区域,其中:

[0018] (a) 第一区域的氨基酸序列与甲型流感血凝素头部区结构域具有至少80%的序列同一性;

[0019] (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:

[0020] 位置83是E

[0021] 位置85是带负电荷的氨基酸

[0022] 位置146是T、N、I或A

[0023] 位置147是带正电荷的氨基酸、I或缺失

[0024] 位置148是G

[0025] 位置149是V

[0026] 位置151是A

[0027] 位置154是S或P

[0028] 位置155是H

[0029] 位置156是带正电荷的氨基酸或A或G或N或E

[0030] 位置157是带正电荷的氨基酸或A或G

[0031] 位置158是带正电荷的氨基酸或A或S或N或C或E

[0032] 位置159是K或A或S或N或C

[0033] 位置163是带正电的氨基酸,

[0034] 其中所述两种或更多种多肽的氨基酸序列是不同的,并且其中所述组合物任选地与一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂一起能够在受试者中针对甲型流感病毒诱导抗体。

[0035] 本发明还提供了一种多肽,其中多肽的氨基酸序列包含第一区域,其中:

[0036] (a) 第一区域的氨基酸序列与甲型流感病毒亚型H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17或H18血凝素头部结构域具有至少80%的序列同一性,优选地,与甲型流感病毒亚型H1、H5、H6、H9或H11血凝素头部结构域具有至少80%的序列同一性;

[0037] 和

[0038] (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:

[0039] 位置83是E

[0040] 位置85是带负电荷的氨基酸

[0041] 位置146是T、N、I或A

[0042] 位置147是带正电荷的氨基酸、I或缺失

[0043] 位置148是G

[0044] 位置149是V

[0045] 位置151是A

[0046] 位置154是S或P

[0047] 位置155是H

[0048] 位置156是带正电荷的氨基酸或A或G或N或E

[0049] 位置157是带正电荷的氨基酸或A或G

[0050] 位置158是带正电荷的氨基酸或A或S或N或C或E

[0051] 位置159是K或A或S或N或C

[0052] 位置163是带正电荷的氨基酸。

[0053] 本发明还提供组合物(优选免疫原性组合物,其中所述组合物能够在受试者中诱导针对甲型流感病毒的抗体),其包含这样的多肽,任选地与一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂一起。

[0054] 本发明还提供了编码这种多肽的核酸分子(优选DNA分子),优选其中DNA分子是载体或质粒。

[0055] 在一个优选的实施方案中,(b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:

[0056] 位置83是E

[0057] 位置85是E或D

[0058] 位置146是T或N

[0059] 位置147是R或K或I或缺失

[0060] 位置148是G

[0061] 位置149是V

[0062] 位置151是A

[0063] 位置154是S或P

[0064] 位置155是H

[0065] 位置156是A或G或K或N或E

[0066] 位置157是A或G

[0067] 位置158是A或K

[0068] 位置159是A、K、C、N或S

[0069] 位置163是K或R。

[0070] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:

[0071] 位置83是E

[0072] 位置85是带负电荷的氨基酸

[0073] 位置146是T、N、I或A

[0074] 位置147是带正电荷的氨基酸,

[0075] 位置148是G

[0076] 位置149是V

[0077] 位置151是A

[0078] 位置154是S或P

[0079] 位置155是H

[0080] 位置156是A

[0081] 位置157是G

[0082] 位置158是K或A或S或N或C

[0083] 位置159是K或A或S或N或C

[0084] 位置163是带正电荷的氨基酸。

[0085] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:

[0086] 位置83是E

[0087] 位置85是E

[0088] 位置146是N

[0089] 位置147是R

[0090] 位置148是G

[0091] 位置149是V

[0092] 位置151是A

[0093] 位置154是P

[0094] 位置155是H

[0095] 位置156是A

[0096] 位置157是G

[0097] 位置158是A

[0098] 位置159是K

[0099] 位置163是K

[0100] 优选地, 一种多肽的第一区域包含SEQ ID NO:13中给出的氨基酸序列或由其组成。

[0101] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的

位置处具有一个或多个氨基酸取代：

- [0102] 位置83是E
- [0103] 位置85是带负电荷的氨基酸
- [0104] 位置146是N
- [0105] 位置147是I
- [0106] 位置148是G
- [0107] 位置149是V
- [0108] 位置151是A
- [0109] 位置154是S
- [0110] 位置155是H
- [0111] 位置156是K或A
- [0112] 位置157是G
- [0113] 位置158是A或K
- [0114] 位置159是K或S
- [0115] 位置163是带正电荷的氨基酸。

[0116] 在另一个优选的实施方案中，(b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代：

- [0117] 位置83是E
- [0118] 位置85是E
- [0119] 位置146是N
- [0120] 位置147是I
- [0121] 位置148是G
- [0122] 位置149是V
- [0123] 位置151是A
- [0124] 位置154是S
- [0125] 位置155是H
- [0126] 位置156是A
- [0127] 位置157是G
- [0128] 位置158是K
- [0129] 位置159是S
- [0130] 位置163是K

[0131] 优选地，一种多肽的第一区域包含SEQ ID NO:14中给出的氨基酸序列或由其组成。

[0132] 在另一个优选的实施方案中，(b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代：

- [0133] 位置83是E
- [0134] 位置85是带负电荷的氨基酸
- [0135] 位置146是T
- [0136] 位置147是带正电荷的氨基酸

- [0137] 位置148是G
- [0138] 位置149是V
- [0139] 位置151是A
- [0140] 位置154是S
- [0141] 位置155是H
- [0142] 位置156是带正电荷的氨基酸或A或G
- [0143] 位置157是带正电荷的氨基酸或A或G
- [0144] 位置158是K
- [0145] 位置159是S或C
- [0146] 位置163是带正电荷的氨基酸。
- [0147] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:
- [0148] 位置83是E
- [0149] 位置85是E
- [0150] 位置146是T
- [0151] 位置147是R
- [0152] 位置148是G
- [0153] 位置149是V
- [0154] 位置151是A
- [0155] 位置154是S
- [0156] 位置155是H
- [0157] 位置156是K
- [0158] 位置157是G
- [0159] 位置158是K
- [0160] 位置159是S
- [0161] 位置163是K
- [0162] 优选地, 一种多肽的第一区域包含SEQ ID NO:15中给出的氨基酸序列或由其组成。
- [0163] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:
- [0164] 位置83是E
- [0165] 位置85是带负电荷的氨基酸
- [0166] 位置146是T
- [0167] 位置147是带正电荷的氨基酸
- [0168] 位置148是G
- [0169] 位置149是V
- [0170] 位置151是A
- [0171] 位置154是S
- [0172] 位置155是H

- [0173] 位置156是N
- [0174] 位置157是G
- [0175] 位置158是带正电荷的氨基酸
- [0176] 位置159是S
- [0177] 位置163是带正电荷的氨基酸。
- [0178] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:
- [0179] 位置83是E
- [0180] 位置85是E
- [0181] 位置146是T
- [0182] 位置147是K
- [0183] 位置148是G
- [0184] 位置149是V
- [0185] 位置151是A
- [0186] 位置154是S
- [0187] 位置155是H
- [0188] 位置156是N
- [0189] 位置157是G
- [0190] 位置158是K
- [0191] 位置159是S
- [0192] 位置163是R。
- [0193] 优选地, 一种多肽的第一区域包含SEQ ID NO:16中给出的氨基酸序列或由其组成。
- [0194] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:
- [0195] 位置83是E
- [0196] 位置85是带负电荷的氨基酸
- [0197] 位置146是T或N
- [0198] 位置147缺失
- [0199] 位置148是G
- [0200] 位置149是V
- [0201] 位置151是A
- [0202] 位置154是S或P
- [0203] 位置155是H
- [0204] 位置156是N或E
- [0205] 位置157是G
- [0206] 位置158是K或E
- [0207] 位置159是S
- [0208] 位置163是带正电荷的氨基酸。

[0209] 在另一个优选的实施方案中, (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的以下位置的位置处具有一个或多个氨基酸取代:

[0210] 位置83是E

[0211] 位置85是E

[0212] 位置146是T

[0213] 位置147缺失

[0214] 位置148是G

[0215] 位置149是V

[0216] 位置151是A

[0217] 位置154是S

[0218] 位置155是H

[0219] 位置156是N

[0220] 位置157是G

[0221] 位置158是K

[0222] 位置159是S

[0223] 位置163是R。

[0224] 优选地, 一种多肽的第一区域包含SEQ ID NO:17中给出的氨基酸序列或由其组成。

[0225] 在一个实施方案中, 本发明涉及免疫原性组合物。

[0226] 如本文所用, 术语“免疫原性”意指引发针对甲型流感病毒亚型的特异性免疫应答的能力。例如, 该应答可以是以合适的剂量和适当的制剂给予本发明的组合物, 所述制剂可以包括/需要合适的佐剂。可能需要包含类似于或小于原始剂量的剂量的加强剂以获得所需的免疫原性应答。

[0227] 特别地, 本发明的免疫原性组合物能够在受试者中诱导针对甲型流感病毒的抗体(优选中和抗体)。

[0228] 优选地, 本发明的免疫原性组合物能够在受试者中提供针对甲型流感病毒的保护。

[0229] 更优选地, 本发明的免疫原性组合物能够在受试者中诱导针对H1N1甲型流感亚型的抗体(优选中和抗体)。

[0230] 本发明的组合物在受试者(例如人受试者)中诱导中和抗体的能力可以通过从施用组合物的受试者的血液中纯化血清来测试。

[0231] 可以使用ELISA或假型微中和(pMN)测定来检测抗体。ELISA是这两种测定中最敏感的; 它量化所有抗体。相反, pMN不太敏感, 但它量化中和抗体。

[0232] 如本文所用, 对“流感”的提及涉及流感病毒, 优选甲型流感病毒, 更优选甲型流感病毒H1亚型, 最优选甲型流感病毒H1N1亚型。

[0233] 免疫原性组合物包含一种、两种或更多种多肽。这两种或更多种多肽的氨基酸序列优选是不同的。

[0234] 该组合物可以例如包含2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同的多肽。

[0235] 优选地, 该组合物包含2、3、4或5种不同的多肽, 更优选3种不同的多肽。

- [0236] 本发明的序列衍生自或基于甲型流感血凝素蛋白的头部结构域。
- [0237] 天然存在的血凝素蛋白是三种多肽的同源三聚体。
- [0238] 在本发明的优选组合中,组合包含三种如本文所定义的多肽,其形成同源三聚体。该组合可包含多于一种(例如2、3、4或5种)本文定义的多肽的不同的同源三聚体。
- [0239] 在另一个优选的实施方案中,本发明的三种多肽在组合中形成杂三聚体。该组合可包含多于一种(例如2、3、4或5种)本文定义的多肽的不同异源三聚体。
- [0240] 每种多肽独立地包含连续氨基酸的第一区域。该区域是连续的共价连接的氨基酸区域。
- [0241] 在一个实施方案中,第一区域的氨基酸序列与甲型流感血凝素(HA)头部结构域具有至少80%的序列同一性。
- [0242] 目的是该第一区域采用甲型流感血凝素头部结构域的构象。
- [0243] 血凝素头部结构域可以例如来自任何甲型流感病毒亚型,例如,H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17或H18。
- [0244] 优选地,血凝素头部结构域来自甲型流感H1、H5、H6、H9或H11亚型。
- [0245] 在一个实施方案中,血凝素头部结构域来自甲型流感H1亚型。
- [0246] 在一个实施方案中,血凝素头部结构域来自甲型流感H5亚型。
- [0247] 在一个实施方案中,血凝素头部结构域来自甲型流感H6亚型。
- [0248] 在一个实施方案中,血凝素头部结构域来自甲型流感H9亚型。
- [0249] 在一个实施方案中,血凝素头部结构域来自甲型流感H11亚型。
- [0250] 优选地,甲型流感病毒N亚型是N1。
- [0251] H1、H5、H6和H11血凝素多肽的共有氨基酸序列在本文中分别作为SEQ ID NO:9-12给出。H9血凝素多肽的共有氨基酸序列在本文中以SEQ ID NO:23给出。加以必要的变更,本文中可使用H9序列代替本文公开的H1、H5、H6或H9实施方案。
- [0252] 本文使用的氨基酸序列号基于SEQ ID NO:9中给出的甲型流感H1血凝素头部结构域的编号。
- [0253] 应该指出的是,有三种方法可以对甲型流感病毒H1血凝素多肽进行编号,并且整个当前的说明书中使用线性编号,其中Met=1。
- [0254] HA多肽包含两个区域:HA1区和HA2区。这些区域被潜在的切割位点分开。
- [0255] H1切割位点共有序列是PSIQSR/GLF(SEQ ID NO:24);H5切割位点共有序列是PQRKKR/GLF(SEQ ID NO:25);H6切割位点共有序列是PQIETR/GLF(SEQ ID NO:26);H9切割位点共有序列是PSRSSR/GLF(SEQ ID NO:27);H11切割位点共有序列是PAIATR/GLF(SEQ ID NO:28)。
- [0256] HA0裂解成HA1和HA2发生在R/GLF之间并且通过蛋白酶进行。上述裂解位点均描述为单碱基。在一些H5病毒中,存在多碱基切割位点,这与单碱基位点不同,在临界位置的碱基位置具有多个精氨酸残基(R')和/或赖氨酸残基(K')。
- [0257] 切割位点的进一步细节可以参见Sun等,Journal of Virology,2010年9月,第84卷,第17期,第8683-8690。
- [0258] HA1区域包含茎的1-60个氨基酸,接着是头部结构域,然后是额外的茎氨基酸。HA2区域仅包含茎氨基酸。

[0259] 血凝素的头部结构域定义为在HA1区域内的两个半胱氨酸之间。第一个半胱氨酸通常位于位置58、59或60；第二个半胱氨酸通常位于位置290、291或292。

[0260] 在甲型流感H1血凝素中,这些半胱氨酸位于位置59和291/292,这是由于某些H1血凝素中位置147的氨基酸缺失。

[0261] 对于H6血凝素,头部结构域对应于位置58和292之间的序列。

[0262] 然而,对于H5和H11血凝素,头部结构域分别对应于位置58至290之间的区域。

[0263] 对于H9血凝素,头部结构域对应于位置60至290之间的区域。

[0264] H1、H5、H6和H11血凝素头结构域的共有氨基酸序列在本文中分别作为SEQ ID NO: 1-4给出。

[0265] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%或95%的序列同一性。

[0266] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%的序列同一性。

[0267] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%的序列同一性。

[0268] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%或95%的序列同一性。

[0269] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与位于除了与SEQ ID NO:9的位置83、85、146-149、151、154-159和163对应的位置以外的位置的甲型流感病毒血凝素头部结构域具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0270] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与位于除了与SEQ ID NO:9的位置83、85、146-149、151、154-159和163对应的位置以外的位置的甲型流感病毒H1血凝素头部结构域(优选SEQ ID NO:1)具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0271] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与位于除了与SEQ ID NO:9的位置83、85、146-149、151、154-159和163对应的位置以外的位置的甲型流感病毒H6血凝素头部结构域(优选SEQ ID NO:2)具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0272] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与位于除了与SEQ ID NO:9的位置83、85、146-149、151、154-159和163对应的位置以外的位置的甲型流感病毒H5血凝素头部结构域(优选SEQ ID NO:3)具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0273] 在一些实施方案中,第一区域的氨基酸序列与位于除了与SEQ ID NO:9的位置83、85、146-149、151、154-159和163对应的位置以外的位置的甲型流感病毒H11血凝素头部结构域(优选SEQ ID NO:4)具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0274] 在一些实施方案中,每种多肽独立地另外包含一个或多个氨基酸,其在N-和/或C-末端连续连接至第一区域。

[0275] 另外的N-末端氨基酸优选是一段连续氨基酸,其衍生自血凝素N-末端茎区,优选

来自甲型流感H亚型的血凝素N-末端茎区,最优选H1、H5、H6、H9或H11亚型。

[0276] 优选地,甲型流感病毒亚型的血凝素N末端茎区的58-60个氨基酸连续地连接到一个或多个多肽中的第一区的N-末端。

[0277] 在一些实施方案中,该茎区的氨基酸序列与以下序列具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的序列同一性:

[0278] (i)SEQ ID NO:9的氨基酸1-59,

[0279] (ii)SEQ ID NO:10的氨基酸1-58,

[0280] (iii)SEQ ID NO:11的氨基酸1-58,或

[0281] (iv)SEQ ID NO:12的氨基酸1-58。

[0282] 如果存在,另外的C-末端氨基酸优选是衍生自甲型流感病毒亚型(优选H1、H5、H6、H9或H11)的血凝素C末端茎区的一段连续氨基酸(例如1-300、1-200、1-100、1-50或1-10个氨基酸)。

[0283] 优选地,所述一段连续氨基酸衍生自相同的甲型流感病毒亚型的血凝素茎区,所述头部结构域衍生自该甲型流感病毒亚型。

[0284] 在一些实施方案中,多肽不包含甲型流感病毒亚型HA2区域。

[0285] 在一些实施方案中,多肽不包含SEQ ID NO:9-12的HA2区域。

[0286] 在一些优选的实施方案中,一种、两种或更多种多肽中的一种或多种或全部独立地包含甲型流感HA1结构域,其包含如本文所定义的第一区域,最优选甲型流感H1、H5、H6或H11亚型HA1结构域,其包含如本文所定义的第一区域。

[0287] 优选地,多肽的长度独立地小于600,更优选小于400,最优选小于300个氨基酸。

[0288] 优选地,多肽的长度独立地为250-350,更优选280-300个氨基酸,最优选290-292个氨基酸。

[0289] 多肽的第一区域在指定位置具有一个或多个氨基酸取代,其对应于SEQ ID NO:1中的位置。

[0290] 例如,多肽的第一区域可具有指定氨基酸取代的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个。

[0291] 优选地,多肽的第一区域具有所有指定的14个氨基酸取代。

[0292] 如本文所用,术语“带正电荷的氨基酸”包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。如本文所用,术语“带负电荷的氨基酸”包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0293] 在一些优选的实施方案中,多肽的氨基酸序列独立地包含SEQ ID NO:13-17的氨基酸序列或由其组成。

[0294] 可以使用重组方法产生本发明的多肽。例如,这种技术描述于Michael R.Green和Joseph Sambrook的《Molecular Cloning:ALaboratory Manual(第四版)》中。

[0295] 或者,编码多肽的核苷酸序列可以通过化学合成产生。然后可将这种核苷酸序列连接到合适的载体中用于宿主细胞转化或转染。然后可以在这种宿主细胞中表达多肽。

[0296] 对于现有HA基因的修饰,也可以使用基于CRISPR的技术,例如由Jennifer Doudna(加州大学,伯克利)和PrashantMali(加州大学,圣地亚哥)编辑的《CRISPR-Cas:ALaboratory Manual(2016)》中描述的技术。也可以使用基于TALEN的技术。

[0297] 或者,可以使用标准化学肽合成技术合成本发明的多肽。例如,可以使用肽的固相

合成,其中序列的C-末端氨基酸连接到不溶性支持物上,然后顺序加入剩余的氨基酸。

[0298] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码一种或多种本发明多肽的核酸分子。优选地,核酸分子编码一种、两种或更多种,优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种本发明的多肽。

[0299] 优选的核苷酸序列包括包含SEQ ID NO:18-22的核苷酸序列以及与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的核苷酸序列,编码能够在受试者中针对甲型流感病毒诱导抗体的多肽。

[0300] 还优选的是编码SEQ ID NO:13-17的多肽的核酸分子。

[0301] 如本文所用,术语“核酸序列”,“核酸分子”和“多核苷酸”可互换使用,并不意味着任何长度限制。其包括DNA(包括cDNA)和RNA序列。

[0302] 本发明的核酸分子包括已从其天然存在的环境中除去的分离的核酸分子、重组或克隆的DNA分离物、以及化学合成的类似物或由异源系统生物合成的类似物。

[0303] 可以通过本领域已知的任何方法制备本发明的核酸分子。例如,可以通过在合适的宿主细胞中复制来产生大量的多核苷酸。编码所需片段的天然或合成DNA片段可以掺入重组核酸构建体,通常是DNA构建体,能够引入原核或真核细胞并在其中复制。通常,DNA构建体适于在单细胞宿主(例如酵母或细菌)中自主复制,但也可用于引入和整合在培养的昆虫、哺乳动物、植物或其他真核细胞系的基因组内。

[0304] 本发明的核酸分子也可以通过化学合成,例如,通过化学合成来制备。通过亚磷酰胺方法或三酯方法,可以在商业自动化寡核苷酸合成仪上进行。通过合成互补链并在适当条件下将链一起退火或通过使用DNA聚合酶与适当的引物序列添加互补链,可以从化学合成的单链产物获得双链片段。

[0305] 可优化核酸分子中的原始(例如野生型)密码子以在所需细胞系中表达,例如,使用在线工具,例如可从<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>获得的工具。

[0306] 因此,在本发明的一个实施方案中,核酸分子经密码子优化以在宿主细胞,优选人细胞中表达。

[0307] 如本文所用,术语“本发明的产物”是指本发明的多肽、本发明的核酸、本发明的载体、本发明的颗粒和本发明的组合物等。

[0308] 本发明还提供了包含本发明核酸分子的载体或质粒。优选地,载体是表达载体。

[0309] 载体和/或质粒可以包含一个或多个调节序列,其与编码多肽的序列可操作地连接,例如,一种或多种增强子、启动子和/或转录终止子序列。

[0310] 在一个特别优选的实施方案中,提供了免疫原性组合物,其包含编码SEQ ID NO:13-17的多肽的一种、两种或更多种载体,任选地与一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂一起,以适于同时、分开或依次用于治疗或预防甲型流感感染的形式作为组合制剂。

[0311] 优选地,初次向受试者施用编码SEQ ID NO:14和15的载体;然后使用编码SEQ ID NO:13和16的载体进行第一次加强;然后使用编码SEQ ID NO:17的载体进行最终加强。

[0312] 在一些实施方案中,载体是病毒载体,例如,痘病毒载体。

[0313] 在其他实施方案中,载体是腺病毒载体或改良型痘苗病毒安卡拉株(MVA)病毒载体。

[0314] 优选地,载体是非复制载体。

[0315] 非复制性痘病毒和腺病毒代表病毒组,其可用作将遗传物质递送到靶细胞中的载体。病毒载体充当抗原递送载体并且还具有通过结合识别病毒元件的细胞表面分子来激活先天免疫系统的能力。可以产生携带编码给定抗原的核酸的重组病毒载体。然后可以使用病毒载体将核酸递送至靶细胞,其中编码的抗原由靶细胞自身的分子机制产生。作为“非自身”,产生的抗原在目标受试者中产生免疫应答。

[0316] 不希望受任何一种特定理论的束缚,本发明人相信使用本发明的载体的抗原递送刺激受试者中的T细胞应答以及其他应答。因此,发明人相信本发明提供针对流感感染的保护的一种方式是通过刺激T细胞应答和细胞介导的免疫系统。此外,还可以实现基于体液(抗体)的保护。

[0317] 本发明的载体可以是非复制的痘病毒载体。如本文所用,非复制(或复制缺陷)病毒载体是缺乏在靶细胞感染后有效复制的能力的病毒载体。因此,非复制型病毒载体在感染靶细胞后不能产生自身的拷贝。因此,与复制型病毒载体相比,非复制型病毒载体可以有利地具有改善的安全性。

[0318] 在一个实施方案中,非复制型痘病毒载体选自改良型痘苗病毒安卡拉株(MVA)载体、NYVAC痘苗病毒载体、金丝雀痘(ALVAC)载体和禽痘(FPV)载体。MVA和NYVAC都是痘苗病毒的减毒衍生物。与痘苗病毒相比,MVA在大约200个开放阅读框中缺少大约26个。

[0319] 在一个实施方案中,非复制型痘病毒载体是MVA载体。

[0320] 本发明的载体可以是腺病毒载体。在一个实施方案中,腺病毒载体是非复制型腺病毒载体(其中非复制定义如上)。通过缺失E1或缺失E1和E3基因区域,可以使腺病毒不复制。或者,可以通过改变E1或改变E1和E3基因区域使腺病毒不复制,使得所述基因区域变得无功能。例如,非复制型腺病毒可能缺乏功能性E1区或缺乏功能性E1和E3基因区。以这种方式,腺病毒在大多数哺乳动物细胞系中变得不能复制,并且在免疫的哺乳动物中不复制。最优选地,E1和E3基因区域的缺失都存在于腺病毒中,因此允许插入更大尺寸的转基因。这对于允许表达更大的抗原,或者当在单个载体中表达多种抗原时,或当使用大的启动子序列,例如CMV启动子时,这是特别重要的。E3以及E1区的缺失对于重组Ad5载体特别有利。任选地,还可以设计E4区域。

[0321] 在一个实施方案中,腺病毒载体选自人腺病毒载体、猿猴腺病毒载体、B组腺病毒载体、C组腺病毒载体、E组腺病毒载体、腺病毒6载体、PanAd3载体、腺病毒C3载体、ChAdY25载体、AdC68载体和Ad5载体。

[0322] 如上所述,本发明的病毒载体可用于将单一抗原递送至靶细胞。有利地,本发明的病毒载体还可用于将多种(不同的)抗原递送至靶细胞。

[0323] 在一个实施方案中,本发明的载体还包含编码佐剂的核酸序列(例如,霍乱毒素、大肠杆菌致死毒素或鞭毛蛋白)。

[0324] 编码载体的核酸序列(如上所述)可以通过使用任何本领域已知的用于操作和产生重组核酸的技术来产生。在一个方面,本发明提供了制备载体的方法(如上所述),包括提供核酸,其中所述核酸包含编码本发明载体的核酸分子;用核酸分子转染宿主细胞;在适于载体繁殖的条件下培养宿主细胞;并从宿主细胞中获得载体。

[0325] 如本文所用,“转染”可以指将核酸分子引入细胞的任何非病毒方法。核酸分子可以是适合转染宿主细胞的任何核酸分子。因此,在一个实施方案中,核酸分子是质粒。宿主

细胞可以是其中可以生长载体(即,如上所述的非复制性痘病毒载体或腺病毒载体)的任何细胞。如本文所用,“在适于载体繁殖的条件下培养宿主细胞”是指使用本领域已知的适合于所选宿主细胞的任何细胞培养条件和技术,并且使载体能够在宿主细胞产生。如本文所用,“获得载体”意指使用本领域已知的适合于将载体与宿主细胞分离的任何技术。因此,可以裂解宿主细胞以释放载体。随后可以使用本领域已知的任何合适的方法或方法分离和纯化载体。

[0326] 本发明还提供了包含本发明的核酸分子、载体或质粒的宿主细胞。优选地,宿主细胞是真核宿主细胞。真核宿主细胞的实例包括酵母和哺乳动物细胞。

[0327] 宿主细胞优选是其中可以生长或繁殖载体(例如,如上所述的非复制性痘病毒载体或腺病毒载体)的细胞。宿主细胞可选自293细胞(也称为HEK,或人胚肾,细胞)、CHO细胞(中国仓鼠卵巢)、CCL81.1细胞、Vero细胞、HELA细胞、Per.C6细胞、BHK细胞(幼仓鼠肾)、原代CEF细胞(鸡胚成纤维细胞)、鸭胚成纤维细胞或DF-1细胞。

[0328] 在其他实施方案中,宿主细胞是人细胞(例如分离的人细胞)。

[0329] 在进一步的实施方案中,提供了病毒样颗粒(VLP),其包含一种、两种或更多种(例如,3、4、5、6、7、8、9或10种)本发明的多肽。该颗粒优选是免疫原性的。

[0330] 病毒样颗粒类似于病毒,但由于它们不含任何病毒遗传物质,因此无感染性。颗粒也可以描述为多聚脂蛋白颗粒。

[0331] 一旦在适当的系统中表达,这些VLP就能够自发地组装进入由所述多肽的一种或多种单体组成的脂蛋白结构/颗粒。

[0332] 本发明还提供了VLP,其中本发明的一种、两种或多种(例如3、4、5、6、7、8、9或10种)多肽(优选不同的多肽)与VLP共价连接。例如,本发明的多肽可通过使用化学交联剂、反应性非天然氨基酸或SpyTag/SpyCatcher反应共价连接至VLP。

[0333] 在特别优选的实施方案中,提供了包含至少五种不同病毒样颗粒(VLP)的免疫原性组合物,其中每种VLP独立地包含一个或多个同源三聚体,其包含SEQ ID NO:13-17的多肽或由其组成,任选地与一个或多个药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂一起,作为适于同时、分别或依次用于治疗或预防甲型流感感染的形式的组合制剂。

[0334] 优选地,初次向受试者施用编码SEQ ID NO:14和15的载体;然后使用SEQ ID NO:13和16的同源三聚体进行第一次加强;以及使用SEQ ID NO:17的同源三聚体的最终加强。

[0335] 本发明还提供了包含一种、两种或更多种本发明的多肽,一种或多种本发明的核酸分子,一种或多种本发明的载体或本发明的VLP的组合物,任选地与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂一起。

[0336] 该组合物优选是免疫原性组合物。

[0337] 适合用作药学上可接受的载体的物质是本领域已知的。药学上可接受的载体的非限制性实例包括水、盐水和磷酸盐缓冲盐水。然而,在一些实施方案中,组合物是冻干形式,在这种情况下,它可以包括稳定剂,例如牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方案中,可能需要用防腐剂(例如硫柳汞或叠氮化钠)配制组合物,以促进长期储存。缓冲剂的实例包括但不限于琥珀酸钠(pH6.5)和磷酸盐缓冲盐水(PBS;pH7.4)。

[0338] 除药学上可接受的载体外,本发明的组合物还可以与盐、赋形剂、稀释剂、佐剂、免疫调节剂和/或抗微生物化合物中的一种或多种组合。

[0339] 在一个实施方案中,本发明的产品可含有5%至95%的活性成分(即多肽、核酸、载体或VLP),例如至少10%或25%的活性成分,或至少40%的活性成分,或至少50%、55%、60%、70%或75%的活性成分。

[0340] 本发明的产品可以以与剂量配方相容的方式施用,并且其量将是预防性和/或治疗性有效的。

[0341] 本发明产品的给药通常采用常规途径,例如,静脉内、皮下、腹膜内或粘膜途径。给药可以通过肠胃外给药;例如,皮下或肌内注射。

[0342] 因此,本发明的产品可以制成注射剂,可以是液体溶液或悬浮液。可替代地制备适于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。制剂也可以乳化,或将肽包封在脂质体或微胶囊中。活性成分通常与赋形剂混合,赋形剂是药学上可接受的并且与活性成分相容。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。此外,如果需要,本发明的产品还可含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,和/或pH缓冲剂。

[0343] 适用于其他给药方式的其他制剂包括口服制剂或适合作为气溶胶分布的制剂。口服制剂包括通常使用的赋形剂,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式。

[0344] 可能需要将本发明的产品(如上所述)引导至受试者的呼吸系统。可以通过口服或鼻内给药将治疗性/预防性组合物或药物有效传递至肺部感染部位。

[0345] 用于鼻内给药的制剂可以是鼻滴剂或鼻喷雾剂的形式。鼻内制剂可包含直径约为100-5000 μm 的液滴,例如500-4000 μm 、1000-3000 μm 或100-1000 μm 。或者,就体积而言,液滴可以在约0.001-100 μl 的范围内,例如0.1-50 μl 或1.0-25 μl ,或例如0.001-1 μl 。

[0346] 或者,治疗/预防制剂或药物可以是气溶胶制剂。气溶胶制剂可以采用粉末、悬浮液或溶液的形式。气溶胶颗粒的大小与气溶胶的输送能力有关。与较大的颗粒相比,较小的颗粒可沿呼吸道向下行进至肺泡。在一个实施方案中,气溶胶颗粒具有直径分布,以便于沿支气管、细支气管和肺泡的整个长度递送。或者,可以选择粒度分布以靶向呼吸道的特定部分,例如肺泡。在药物的气溶胶输送的情况下,颗粒的直径可以在约0.1-50 μm ,优选1-25nm,更优选1-5 μm 的范围内。

[0347] 气溶胶颗粒可用于使用喷雾器(例如通过口腔)或鼻喷雾剂递送。气溶胶制剂可任选含有推进剂和/或表面活性剂。

[0348] 优选地,本发明的组合物是疫苗组合物,例如,适合于肠胃外给药,任选地与一种或多种佐剂一起使用。

[0349] 如本文所用,疫苗是当施用于动物受试者例如哺乳动物(例如人、牛、猪、绵羊、山羊、马、鹿、犬或猫受试者;特别是人受试者)时,刺激针对传染病的保护性免疫反应的制剂。免疫应答可以是体液和/或细胞介导的免疫应答。因此,疫苗可以刺激B细胞和/或T细胞。

[0350] 合适的佐剂的实例包括选自下列项组成的组:

[0351] -金属盐,如氢氧化铝或磷酸铝,

[0352] -水包油乳剂,

[0353] -toll样受体激动剂,(如toll样受体2激动剂、toll样受体3激动剂、toll样受体4激动剂、toll样受体7激动剂、toll样受体8激动剂、toll样受体8激动剂和toll样受体9激动剂)

- [0354] -皂苷,例如QuilA及其衍生物,如QS7和/或QS21,
- [0355] -含有CpG的寡核苷酸,
- [0356] -3D-MPL,
- [0357] - (2-脱氧-6-邻-[2-脱氧-2-[(R)-3-十二烷酰氧基四癸酰基氨基]-4-邻-膦酰基- β -D-吡喃葡萄糖]]-2-[(R)-3-羟基十四烷酰氨基]- α -D-吡喃葡萄糖基磷酸氢盐),
- [0358] -DP (3S,9R)-3-[(R)-十二烷酰氧基十四烷酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9(R)-[(R)-3-羟基十四烷酰氨基]癸-1,10-二醇,1,10-双(二氢磷酸盐),和
- [0359] -MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-十二烷酰氧基十四烷酰氨基]-4-氧代-5-氮杂-9-[(R)-3-羟基十四烷酰氨基]癸-1,10-二醇,1-二氢磷酸10-(6-氨基己酸),
- [0360] 或其组合。
- [0361] 优选地,佐剂选自包括以下的组:
- [0362] -与金属盐相关的皂苷,例如氢氧化铝或磷酸铝
- [0363] -3D-MPL、QS21和CpG寡核苷酸,例如作为水包油配方,
- [0364] -脂质体形式的皂苷,例如还包含甾醇,例如QS21和甾醇,以及
- [0365] -ISCOM。
- [0366] 在一些特别优选的实施方案中,佐剂包含皂苷。皂苷是类固醇或三萜糖苷,其存在于许多植物物种中。基于皂苷的佐剂部分地通过刺激抗原呈递细胞进入注射部位并增强局部淋巴结中的抗原呈递来起作用。
- [0367] 优选地,佐剂包括皂苷、胆固醇和磷脂,例如ISCOM Matrix-MTM (Isconova, Novavax)。
- [0368] 在Matrix-M中,将纯化的皂苷级分与合成胆固醇和磷脂混合以形成稳定的颗粒,而不是随意地与各种疫苗抗原一起配制。Matrix-MTM诱导细胞介导的和抗体介导的免疫应答。
- [0369] 在一些其他优选的实施方案中,佐剂包含角鲨烯-水包油纳米乳液乳液,例如,AddaVaxTM (InvivoGen)。
- [0370] 角鲨烯是一种比弗氏佐剂中使用的石蜡油更容易代谢的油。已知角鲨烯水包油乳剂引发细胞(Th1)和体液(Th2)免疫应答。据信这类佐剂通过APC的募集和活化以及巨噬细胞和粒细胞对细胞因子和趋化因子产生的刺激起作用。
- [0371] 该组合物可进一步包含表面活性剂。合适的表面活性剂的实例包括吐温(如吐温20),brij和聚乙二醇。
- [0372] 疫苗制备一般描述于New Trends and Developments in疫苗,由New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller等, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A., 1978。脂质体内的包封例如由Fullerton的U.S. 专利4,235,877所描述。
- [0373] 在每种疫苗剂量中存在的本发明多肽、核酸分子、载体或颗粒的量选择为在典型疫苗中诱导免疫保护反应而没有显著的不良反应的量。这样的量将根据使用哪种特异性免疫原以及疫苗是否有佐剂而变化。通常,预期每个剂量将包含1-1000 μ g蛋白质,例如1-200 μ g,例如10-100 μ g,更特别是10-40 μ g。通过标准研究可以确定特定疫苗的最佳量,所述标准研究包括观察抗体滴度和受试者中的其他反应。在初次接种疫苗后,受试者优选在约4周内接受加强,然后在存在感染风险的情况下每六个月重复加强一次。通过使用佐剂和/或

免疫刺激剂增强了对本发明产品的免疫应答。

[0374] 用于本发明佐剂的皂苷的量可以是每剂量1-1000 μ g,通常每剂量1-500 μ g,更多如每剂量1-250 μ g,更特别是每剂量1-100 μ g。(例如每剂量10、20、30、40、50、60、70、80或90 μ g)。

[0375] 本发明还提供包含两种或更多种组分的组合制剂,该组分选自两种或更多种本发明的多肽、两种或更多种本发明的颗粒、两种或更多种本发明的核酸、两种或更多种本发明的载体和两种或更多种本发明的组合物作为组合制剂的组分适于同时、分开或顺序使用,优选用于治疗或预防甲型流感感染。

[0376] 在另一方面,本发明提供了针对本发明多肽的抗体。

[0377] 在更进一步的实施方案中,本发明提供了本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物,其用于治疗或用作药物。

[0378] 在另一方面,本发明提供了在受试者中预防或治疗流感感染的方法中所用的本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物。

[0379] 在另一方面,本发明提供了本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物,其用于在受试者中诱导T细胞的方法或B细胞对受试者中的流感抗原应答的方法。

[0380] 特别地,本发明的非复制性痘病毒载体可用于通过细胞介导的免疫系统刺激保护性免疫应答。在一个实施方案中,T细胞是T辅助细胞(T_H 细胞)。在一个实施方案中,T细胞是 T_H17 细胞。

[0381] 在进一步的实施方案中,本发明提供了本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物在制备用于预防或治疗受试者中的流感感染的方法的药物中的用途。

[0382] 在进一步的实施方案中,本发明提供了本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物在制备用于在受试者中诱导针对流感抗原的T细胞或B细胞应答的方法的药物中的用途。

[0383] 本发明还提供治疗易受流感感染的受试者的方法,包括向该受试者施用有效量的本发明多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物。

[0384] 本发明还提供了诱导受试者对流感抗原的T细胞或B细胞应答的方法,包括向该受试者施用有效量的本发明多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物。

[0385] 本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物也可以用于类似的用途和方法中,以在体内产生针对流感抗原的中和抗体。

[0386] 优选地,流感抗原是血凝素蛋白,更优选是血凝素蛋白的HA1或头部结构域。

[0387] 优选地,流感是甲型流感。

[0388] 可以通过确定受试者血液中存在或不存在针对流感病毒的中和抗体来测试(例如通过ELISA)用于治疗/预防流感感染的用途和方法的功效。

[0389] 还提供了免疫原性组合物,其包含本文定义的一种或更多种多肽、一种或更多种核酸分子或一种或更多种载体或质粒作为组合制剂,其形式适于同时、分别或相继用于治疗或预防流感,优选甲型流感,或用于在受试者中诱导针对流感病毒,优选甲型流感病毒的

T细胞或B细胞应答。

[0390] 受试者优选是哺乳动物,更优选是人。

[0391] 如本文所用,术语“预防”包括预防流感感染的发生和/或降低流感感染强度的严重性。因此,“预防”包括疫苗接种。

[0392] 如本文所用,术语“治疗”包括治疗和预防/预防性的措施(包括暴露后预防),并包括感染后治疗和改善流感感染。上述每种方法和用途可包括给受试者施用有效量,例如治疗有效量的本发明多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物的步骤。

[0393] 如本文所用,有效量是足以实现所需生物学结果的剂量或量。如本文所用,治疗有效量是在对受试者(例如哺乳动物受试者,特别是人受试者)施用单剂量或多剂量以治疗、预防、治愈、延迟、降低、改善至少一种疾病或复发性疾病的症状的严重性或延长受试者的存活超过在没有这种治疗的情况下预期的存活时有效的量。

[0394] 因此,待施用的活性成分的量取决于待治疗的受试者,受试者的免疫系统产生保护性免疫应答的能力,以及所需的保护程度。需要施用的精确量的活性成分可取决于从业者的判断,并且可能特定于每个受试者。对受试者的施用可包括向受试者施用本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物(即本发明的产品),其中将本发明的产品连续多次给药(例如,其中组合物给药两次、三次或四次)。

[0395] 因此,在一个实施方案中,向受试者施用本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物,然后在不同的时间再次施用本发明的相同产品(或基本相似的产品)。

[0396] 在一个实施方案中,对受试者的施用包括向受试者施用本发明的多肽、本发明的颗粒、本发明的核酸、本发明的载体或本发明的组合物,其中所述本发明的产品基本上在另一种免疫原性组合物之前、同时或之后施用。

[0397] 本发明还扩展到初免-加强方案。

[0398] 例如,可以使用本发明的一种或多种产品实现初免和/或增强。该产品可以依次、同时或分开给予受试者。

[0399] 本发明优选的初免-加强策略提供了预防或治疗受试者中的流感感染或诱导受试者中对流感抗原的T细胞或B细胞应答的方法,该方法包括以下步骤:

[0400] (i) 同时、分开或依次向有此需要的受试者施用有效量的一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同的多肽,其中每种多肽独立地包含连续氨基酸的第一区域,其中:

[0401] (a) 第一区域的氨基酸序列与甲型流感血凝素头部结构域具有至少80%的序列同一性;和

[0402] (b) 第一区域在对应于SEQ ID NO:9中的下列位置的位置上具有一个或多个氨基酸取代:

[0403] 位置83是E

[0404] 位置85是带负电荷的氨基酸

[0405] 位置146是T、N、I或A

[0406] 位置147是带正电荷的氨基酸、I或缺失

[0407] 位置148是G

- [0408] 位置149是V
- [0409] 位置151是A
- [0410] 位置154是S或P
- [0411] 位置155是H.
- [0412] 位置156是带正电荷的氨基酸或A或G或N或E
- [0413] 位置157是带正电荷的氨基酸或A或G
- [0414] 位置158是带正电荷的氨基酸或A或S或N或C或E
- [0415] 位置159是K或A或S或N或C
- [0416] 位置163是带正电荷的氨基酸。
- [0417] 本文公开了优选的甲型流感血凝素头部结构域序列和第一区域取代,加以必要的变更。
- [0418] 多肽可以是药物组合物的形式,优选疫苗组合物,任选地与一种或多种药学上可接受的载体,稀释剂,赋形剂和佐剂一起。
- [0419] 优选地,一种或多种多肽(如上定义)是一种或多种三聚体的形式。在一些实施方案中,三聚体是同源三聚体。在一些其他实施方案中,三聚体是异源三聚体。
- [0420] 优选地,该方法包括以下附加步骤:
- [0421] (ii) 向受试者施用含有第二多肽的加强剂;并且还可选地还
- [0422] (iii) 向受试者施用含有第三多肽的加强剂,
- [0423] 其中第二和第三多肽(如上定义)优选彼此不同,并且优选不同于第一多肽。
- [0424] 优选地,该方法包括以下附加步骤:
- [0425] (ii) 向受试者施用第二三聚体(a second trimer)的加强剂;并且可选地还
- [0426] (iii) 向受试者施用第三三聚体(a third trimer)的加强剂,
- [0427] 其中第二和第三三聚体优选彼此不同,且优选与第一三聚体(a first trimer)不同。
- [0428] 优选地,第一、第二和第三多肽独立地选自自由包含SEQ ID NO:13-17的多肽或由其组成的多肽所组成的组。
- [0429] 优选地,第一、第二和第三三聚体独立地由包含SEQ ID NO:13-17的多肽或由其组成的多肽组成。
- [0430] 在优选的实施方案中,首先将SEQ ID NO:14和15的多肽或同源三聚体给予受试者;接着将SEQ ID NO:13和16的多肽或同源三聚体给予受试者;然后将SEQ ID NO:17的多肽或同源三聚体给予受试者。
- [0431] 在另一个优选的实施方案中,多肽或三聚体以VLP的形式施用,即施用包含一种或多种多肽的一种或多种三聚体的VLP。
- [0432] 在另一个优选的实施方案中,向受试者施用核酸分子(优选载体),其中核酸分子编码如上定义的一种或多种多肽。本文讨论了优选的载体。
- [0433] 在一个实施方案中,第一和第二产物作为初免-加强施用方案的一部分施用。因此,第一种产品可以作为“初免”施用于受试者,随后将第二种产品作为“加强”施用于与相同的受试者。
- [0434] 在一个实施方案中,第一种产物是本发明的腺病毒载体,第二种产物是本发明的

非复制型痘病毒载体。

[0435] 在一个实施方案中,上述方法中的每一种还包括向受试者施用本发明产物的步骤。

[0436] 在一个实施方案中,本发明的多肽与施用本发明的病毒载体分开施用。优选地,多肽和病毒载体以任何顺序依次施用。因此,在一个实施方案中,病毒载体(“V”)和多肽(“P”)可以以V-P的顺序或以P-V的顺序施用。

[0437] 在某些实施方案中,上述方法还包括向受试者给予佐剂。佐剂可以与本发明的任何产品一起施用。

[0438] 本发明的产品可以以单剂量方案给药(即,基本上一次给予全剂量)。或者,本发明的产品可以以多剂量方案给予。

[0439] 多剂量方案是其中初免疗程(例如疫苗接种)可以具有1-6个单独剂量,然后在维持和/或增强免疫应答所需的随后时间间隔给予的其他剂量,例如(对于人类受试者),在1-4个月时进行第二次剂量,并且如果需要,在进一步的1-4个月后进行后续剂量。

[0440] 剂量方案将至少部分地由个体的需要确定,并且取决于从业者(例如医生或兽医)的判断。

[0441] 同时给药是指(基本上)在相同时间给药。

[0442] 本发明的两种或更多种产品的顺序给药意味着产品在(基本上)不同的时间,一个接一个地给药。

[0443] 例如,顺序给药可以包括在不同时间给予本发明的两种或更多种产品,其中不同的时间分开若干天(例如,1、2、5、10、15、20、30、60、90、100、150或200天)。

[0444] 例如,在一个实施方案中,本发明的疫苗可以是作为“初免-加强”疫苗接种方案的一部分进行给药。

[0445] 在一个实施方案中,本发明的产品可以与一种或多种选自例如免疫球蛋白、抗生素、白细胞介素(例如IL-2、IL-12)和/或细胞因子(例如IFN- γ)的免疫调节剂一起施用于受试者,例如哺乳动物(例如人、牛、猪、绵羊、山羊、马、鹿、犬科动物或猫科动物)。

[0446] 在更进一步的实施方案中,本发明提供了产生一种或多种本发明多肽的方法,该方法包括在合适的宿主中表达编码一种、两种或多种所述多肽的一种或多种核酸分子,以及回收多肽产物。

[0447] 优选地,宿主是人细胞。

[0448] 有许多已建立的算法可用于比对两个氨基酸序列。通常,一个序列充当参考序列,可以将测试序列与其进行比较。序列比较算法基于指定的程序参数,计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。用于比较的氨基酸序列的比对可以例如通过计算机实现的算法(例如,GAP、BESTFIT、FASTA或TFASTA),或BLAST和BLAST 2.0算法来计算。

[0449] 使用BLAST比对方法可以获得百分比的氨基酸序列同一性和核苷酸序列同一性(Altschul等(1997),“GappedBLAST andPSI-BLAST:a new generation ofprotein database search programs”,NucleicAcids Res.25:3389-3402;以及<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。优选地,使用标准或默认对准参数。

[0450] 标准蛋白质-蛋白质BLAST(blastp)可用于在蛋白质数据库中发现相似的序列。与其他BLAST程序一样,blastp旨在找到相似的局部区域。当序列相似性跨越整个序列时,

blastp还将报告全局比对,这是蛋白质鉴定目的的优选结果。优选地,使用标准或默认对准参数。在某些情况下,可以取消“低复杂度过滤器”。

[0451] BLAST蛋白质搜索也可以用BLASTX程序进行,得分(socre)=50,字长(wordlength)=3。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等(1997) NucleicAcids Res.25:3389所述利用Gapped BLAST(BLAST 2.0中)。或者,PSI-BLAST(在BLAST 2.0中)可用于执行检测分子之间的远距离关系的迭代检索。(参见Altschul等(1997)同上)。当使用BLAST、GappedBLAST、PSI-BLAST时,可以使用各个程序的默认参数。

[0452] 关于核苷酸序列比较,可以使用MEGABLAST、非连续megablast(discontiguous-megablast)和blastn来实现该目标。优选地,使用标准或默认对准参数。MEGABLAST专门设计用于在非常相似的序列之间有效地找到长对齐。非连续MEGABLAST可用于发现与本发明的核酸相似但不相同的核苷酸序列。

[0453] BLAST核苷酸算法通过将查询序列分解为称为单词(words)的短的子序列来找到相似的序列。该程序首先识别查询单词的完全匹配(单词命中)。然后BLAST程序以多个步骤扩展这些单词命中以生成最终的有缺口的对齐。在一些实施方案中,BLAST核苷酸检索可以用BLASTN程序进行,得分=100,字长=12。

[0454] 控制BLAST搜索灵敏度的重要参数之一是单词大小。blastn比MEGABLAST更敏感的最重要原因是它使用较短的默认单词大小(11)。因此,blastn在发现与其他生物的相关核苷酸序列的比对方面优于MEGABLAST。单词大小可以在blastn中调整,并且可以从默认值减少到最小值7以提高搜索灵敏度。

[0455] 通过使用新引入的不连续的megablast页面(www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/FallWinter02/blastlab.html)可以实现更灵敏的检索。该页面使用的算法类似于Ma等(Bioinformatics.2002Mar;18(3):440-5)报道的算法。非连续megablast在较长的模板窗口中使用非连续的单词,而不要求精确的单词匹配作为对齐扩展的种子。在编码模式中,通过集中于在第一和第二密码子位置处找到匹配同时忽略第三位置中的不匹配来考虑第三碱基摆动(wobbling)。在非连续MEGABLAST中使用相同字长的检索比使用相同字长的标准blastn更敏感和有效。非连续megablast的独特参数是:单词大小:11或12;模板:16、18或21;模板类型:编码(0),非编码(1)或两者(2)。

[0456] 在一些实施例中,可以使用默认参数来使用BLASTP 2.5.0+算法(诸如可从NCBI获得的算法)。

[0457] 在其他实施方案中,可以使用利用了具有间隙成本的两个蛋白质序列(Existence 11和Extension 1)的Needleman-Wunsch比对的BLAST全局比对程序(例如可从NCBI获得的程序)。

[0458] 如本文所公开的鉴定有限变异性位点和随后的有限变异性表位的方法可以应用于所有甲型流感亚型。特别地,由于H3亚型甲型流感病毒以与H1亚型甲型流感病毒相似的方式进化,因此本文公开的鉴定表位的方法特别适用于甲型流感病毒的H3亚型。

[0459] 因此,在又一个实施方案中,本发明提供了鉴定所限定亚型的流感病毒的血凝素头部结构域上的表位的方法,该方法包括以下步骤:

[0460] (i) 鉴定所限定亚型的流感病毒的血凝素头结构域多肽上的可能的抗体结合位点;

[0461] (ii) 在可能的抗体结合位点内鉴定头部结构域多肽的一个或多个连续或不连续区段;和

[0462] (iii) 将这些区段的氨基酸序列与来自限定亚型的多种流感病毒株的血凝素头部结构域的氨基酸序列进行比较,以鉴定这些区段内有限的氨基酸序列变异性的区域;

[0463] 从而鉴定一组位置,该位置在限定亚型的流感病毒的血凝素头部结构域内的氨基酸组合中具有有限的变异性,并且该位置形成表位。

[0464] 以这种方式鉴定的表位处于强免疫选择下,使得它们在流感病毒的整个进化过程中周期性地通过有限数量的形式重复。

[0465] 该方法和过程可以应用于任何流感病毒。优选地,流感病毒是甲型流感病毒。

[0466] 流感病毒可以是任何亚型,例如,H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17或H18。优选地,流感病毒属于H1或H3亚型。

[0467] 步骤(i)需要在确定的亚型的流感病毒的血凝素头结构域多肽上鉴定可能的抗体结合位点。

[0468] 这可以通过分析血凝素头部结构域多肽的晶体结构来完成。可以比对来自所定义亚型的流感病毒的两个或更多个头部结构域的晶体结构,以确定多肽表面上存在哪些残基和那些残基的可及性。通常,位置的可及性在所有晶体结构中是相同的,但是当在一个晶体结构中的位置比另一个晶体结构更容易接近时,该位置被分配为更容易接近以防止对有限变异性的位置的错误识别。

[0469] 计算机分析可用于确定可及性(accessibility)和结合位点面积如何促成假想抗体结合位点的变异性。可以使用 $600\text{\AA}^2$ 和 $1000\text{\AA}^2$ 之间的抗体结合位点来确定氨基酸的可及性参数的变异性,其具有在>30%和>1%之间的可及性。

[0470] 步骤(ii)需要在可能的抗体结合位点内鉴定头部结构域多肽的一个或多个连续或不连续的区段。这些延伸可以与抗体接触。一旦鉴定了抗体结合位点,就可以鉴定可能的抗体结合位点内的头部结构域多肽的一个或多个连续或不连续的区段,例如,通过使用Swiss-pdb观察器(Swiss-pdb viewer)。

[0471] 步骤(iii)需要将连续或不连续区段的氨基酸序列与来自多种限定亚型的流感病毒株的血凝素头结构域的氨基酸序列进行比较,以鉴定那些区段内有限氨基酸序列变异性的区域。

[0472] 例如,多种流感毒株序列可以从限定亚型的流感毒株的血凝素头部结构域的年度共有序列获得。可以通过基于收集序列的年份将管理的血凝素(curated haemagglutinin)序列分成单独的数据集来生成年度共有序列。然后可以使用R包(package)的seqinr或备选共有序列产生程序来产生共有序列。

[0473] 如本文所用,术语“有限序列变异性”是指氨基酸或氨基酸序列,其可以形成的不同表位构象的数量受到限制。

[0474] 在其他实施方案中,术语“有限的序列变异性”是指在氨基酸序列比较期间发现0、1、2、3或4(优选0或1)个不同氨基酸的氨基酸位置。

[0475] 以这种方式,可以鉴定所限定亚型的流感病毒的血凝素头结构域内的一组保守氨基酸,其形成表位。

[0476] 表位可以是被抗体结合的表位。优选地,表位是有限变异的表位。

[0477] 本发明还提供了产生多肽的方法,该方法包括以下步骤:

[0478] (i) 使用鉴定本文定义的表位的方法鉴定在限定亚型的流感病毒的血凝素头部结构域内具有有限变异性的一组氨基酸;

[0479] (ii) 产生包含连续氨基酸的第一区域的多肽,其中:

[0480] (a) 第一区域的氨基酸序列与甲型流感血凝素头部结构域具有至少80%的序列同一性;和

[0481] (b) 第一区域在与具有有限的变异性的氨基酸位置的位置对应的位置处具有一个或多个氨基酸取代,并且其中取代引入在该位置保守的氨基酸;

[0482] 其中所述多肽能够在受试者中诱导针对甲型流感病毒的抗体。

[0483] 本发明还提供了生产免疫原性组合物的方法,该方法包括以下步骤:

[0484] (i) 使用鉴定如本文所定义的表位的方法,以鉴定在限定亚型的流感病毒的血凝素头部结构域内具有有限变异性的一组氨基酸位置;

[0485] (ii) 产生包含连续氨基酸的第一区域的多肽,其中:

[0486] (a) 第一区域的氨基酸序列与甲型流感血凝素头部结构域具有至少80%的序列同一性;和

[0487] (b) 第一区域在与保守氨基酸位置对应的位置具有一个或多个氨基酸取代,并且其中取代引入在该位置保守的氨基酸;

[0488] 其中所述多肽能够在受试者中诱导针对甲型流感病毒的抗体;并且

[0489] (iii) 将一种或多种多肽配制成免疫原性组合物,其中所述组合物任选地包含一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂或稀释剂。

[0490] 该组合物能够在受试者中诱导针对甲型流感病毒的抗体。

[0491] 关于流感病毒H3亚型表位,第一区域的氨基酸序列优选与甲型流感病毒亚型H4、H7 H10、H14或H15血凝素头部结构域具有至少80%、90%、95%或100%的序列同一性。

[0492] 免疫原性组合物优选是疫苗组合物;它可以例如使用本文所述的组合物和方案,按照初免-加强-加强的方式施用。

[0493] 本文所述的每个参考文献的公开内容通过引用整体并入本文。

附图说明

[0494] 图1:血凝素(HA)单体上表位的多基因座表示。假定每种流感病毒株含有高变异性的特异性表位以及与其他毒株共有的低变异性表位。

[0495] 图2:显性抗原类型的周期性置换。显示的动力学是针对3表位系统,每个系统包含3种可能的变体,如动画中所示。

[0496] 图3:来自儿童血浆的“热图”,其显示与许多流感病毒株的周期性交叉反应性。热图左侧的年份与HA1结构域来源的毒株有关。左到右从12至17个月对齐个体。百分比反应性在热图的右侧说明。

[0497] 图4:来自儿童血浆的“热图”,其显示与许多历史流感毒株的交叉反应性。热图左侧的年份与HA1结构域来源的毒株有关。左到右从6至11个月对齐个体。百分比反应性在热图的右侧说明。

[0498] 图5:微中和测定。x轴是指假病毒的IC50与产生倍数变化的比率。

[0499] (A) 使用野生型 (WT) 和-147K突变体A/Solomon Islands/3/2006假病毒的微中和测定。

[0500] (B) 使用野生型 (WT) 和-147K突变体A/Puerto Rico/8/1934假病毒的微中和测定。

[0501] (C) 使用野生型 (WT) 和-147K突变体A/WSN/1933假病毒的微中和测定。

[0502] 图6:使用嵌合HA构建体的顺序接种。

[0503] (A) 用取代进入H6、H5和H11的HA的 (B) 中概括的序列依次接种五组小鼠。另外两组用无任何序列取代进入的H6、H5和H11构建体顺序接种,并指定为“灰色”和“紫色”。另外两组被模拟接种(mock vaccinate)并指定为“白色”和“黑色”。前两次接种疫苗为100 μ g肌肉注射DNA给予,而最后接种疫苗为肌肉注射8个HI单位的显示嵌合HA慢病毒(即具有或不具有取代的H11)和明矾佐剂进行。

[0504] (B) - (F) 使用0.5 μ l来自在21周时采血的血清的假型微量中和测定。针对显示来源于1933年、1934年、1977年、2006年和2009年流行的流感病毒的H1 HA的慢病毒的广泛的中和活动发生。

[0505] (G) - (J) 用A/PR/8/1934或A/California/4/2009接种疫苗的小鼠的流感攻击。该图表示在攻击期间每日体重减轻和小鼠存活百分比。

[0506] 图7:H1 HA头部存在有限变异的位点。

[0507] (A) 将抗体结合位点定位于A/Puerto Rico/8/1934晶体结构和在这些位点内的变异性,该变异性是通过参考2,756个H1序列的比对确定的。仅考虑了抗体结合可及的部分A/Puerto Rico/8/1934晶体结构。在A中,使用800A²的抗体结合位点来确定三种可及性参数的变异性:具有>30%、>10%或>1%的可及性氨基酸。

[0508] (B) 在B中,使用具有>10%可及性的氨基酸数据集来确定三种结合位点大小的变异性:600、800或1000A²。两种方法都确定了H1 HA头部内的相同区域,这些区域具有有限的变异性。这些区域之一包含我们以位置156/158为中心的有限变异性的表位。HA的线性编号用于x轴。

[0509] (C) - (J) 将预测的抗体结合位点定位到来自特定流感病毒株的HA结构域的晶体结构上。

[0510] 图8:对应于氨基酸156/158周围位点的破坏的肽序列。(A) 显示A/Brevig Mission/1/1918的晶体结构,(B) 显示A/Puerto Rico/8/1934的侧面和上面的晶体结构。破坏的肽序列映射在H1结构上。突出显示氨基酸位置147(白色且带箭头),并且存在于A/Brevig Mission/1/1918中,但不存在于A/Puerto Rico/8/1934中。

[0511] 图9:具有有限变异性的位点的破坏的肽序列的循环活性。取自年度共有序列的破坏的肽序列可以根据其化学性质进行分组。如果按时间排列,破坏的肽序列的循环性质变得明显。基于其化学性质排列序列的其他方式是可能的,这仅仅是一种可能的典型并代表该表位区域的循环性质。

[0512] 图10:四种可能性之间的位置147循环的氨基酸变化。A. 位置147的氨基酸的同一性在赖氨酸、精氨酸、异亮氨酸之间循环,并且在1918-1957和1977-2015之间缺失五个时期。

具体实施方式

[0513] 实施例

[0514] 通过以下实施例进一步说明本发明,其中除非另有说明,份数和百分比均以重量计,度数为摄氏度。应当理解,这些实施例虽然表明了本发明的优选实施方案,但仅以说明的方式给出。根据以上讨论和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。因此,除了本文所示和所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述中显而易见。这些修改也旨在落入所附权利要求的范围内。

[0515] 实施例1:抗原节俭模型

[0516] 低变异性的保护性表位的存在与“抗原节俭模型”下的甲型流感病毒的种群动态一致。该模型基于病毒的多基因座表示,每个基因座对应于表位区域,并且提供了更广泛接受的“抗原漂移”模型的替代方案,其具有包含有限变异性的保护性表位以及那些高变异性的潜力。图1显示了它们如何定位于血凝素(HA)单体上的已知抗原位点。通过假设大多数流感病毒株彼此竞争,可以在抗原节俭框架内容易地解释流感的流行行为,因为它们在低变异性区域中共享表位(Recker等,2007;Wikramaratna等,2013)。因此,尽管可以通过突变不断产生新毒株,但由于针对其较少变化的表位的预先存在的免疫应答,大多数这些毒株不能在宿主群体中扩增。这导致抗原类型的周期性优势(图2)。与“抗原漂移”模型相反,流行株之间的抗原距离不必然会随着时间积累;相反,它会定期扩展和收缩。

[0517] Carter等(2013)提供了抗原节俭模型的证据。雪貂感染了几种历史流感病毒之一。通过血凝素抑制(HAI)测定在第14天和第81天测量血清抗体(图5),并且显示抗体与历史毒株的病毒的周期性交叉反应性,如抗原节俭假设所预测的。

[0518] 在Carter等(2013)中观察到的周期性交叉反应性部分地通过当前的结构生物信息学分析预测。例如,预测用1957毒株感染雪貂会诱发A/R/8/1934、A/Den/1/1957、A/NC/20/1999和A/Bris/59/2007毒株的交叉反应抗体。在A/R/8/1934、A/Den/1/1957和A/NC/20/1999毒株之间观察到感染时的交叉反应性,但在A/Bris/59/2007毒株中未观察到。

[0519] 实施例2:婴儿血浆对按时间顺序分散的H1流感病毒株的周期性交叉反应性

[0520] 使用2012年收集的12至17个月的儿童的血浆进行标准化的酶联免疫吸附测定(ELISAs)。来自流感毒株A/California/4/2009、A/USSR/90/1977、A/Brevig Mission/1/1918、A/Solomon Islands/3/2006、A/New Caledonia/20/1999、A/Puerto Rico/8/34和A/WSN/33的HA1结构域是从Sino Biological购买的。标准品根据成人的出生日期使用成人血清。在每个平板上运行两个阴性对照,该平板由仅含有酪蛋白的对照和非反应性人血浆或血清对照组成。

[0521] 结果如图3所示。2012年收集的81名12至17个月儿童的血浆与源于流感病毒株A/California/4/2009、A/USSR/90/1977和A/Brevig Mission/1/1918的HA1结构域交叉反应(头部结构域和HAH1的部分茎结构域),但不与A/Solomon Islands/3/2006、A/New Caledonia/20/1999、A/Puerto Rico/8/34或A/WSN/33的HA1结构域交叉反应(头部结构域和HAH1的部分茎结构域)。所有ELISA结果一式三份完成,并标准化为非反应性人血浆。基于Miura(2008)等的标准,接受或拒绝ELISA结果。

[0522] 这种血浆与一组历史H1N1毒株以循环方式反应的事实使我们推断出H1 HA的头部

结构域中存在有限变异的表位,并且它们随着宿主群体免疫变化通过有限量的构象循环。

[0523] 实施例3:鉴定有限变异性的表位

[0524] 为了鉴定有限变异性的表位,将抗体结合位点定位于A/Puerto Rico/8/1934晶体结构,并通过参考2,756个H1序列(图7)的比对确定这些位点内的变异性。仅考虑了抗体结合可及的A/Puerto Rico/8/1934晶体结构的部分。这是通过调整A/Puerto Rico/8/1934、A/Brevig Mission/1/1918和A/California/04/2009确定蛋白质表面上存在哪些残留物以及这些残留物的可及性。通常,位置的可及性在所有晶体结构中是相同的,但是当在一个位置在一个晶体结构中比另一个晶体结构更容易接近时,该位置被分配为更容易接近以防止对有限变化的位点的错误识别。病毒粒子中包含的部分HA也未考虑进行分析。

[0525] 计算机分析用于确定可及性和结合位点面积如何促成假设抗体结合位点的变异性。使用 $800\text{\AA}^2$ 的抗体结合位点来确定三种可及性参数的变异性:具有>30%、>10%或>1%可及性的氨基酸。使用具有>10%可及性的位置的数据集来确定三种结合位点大小的变异性: $600\text{\AA}^2$ 、 $800\text{\AA}^2$ 或 $1000\text{\AA}^2$ 。两种方法都在H1 HA的头部确定了相同的可变区域(图7)。

[0526] 使用Swiss-pdb查看器,通过将预测的表位映射到A/Puerto Rico/8/1934、A/Brevig Mission/1/1918和A/California/04/2009晶体结构,对预测存在于计算机分析中的有限变异性位点进行分析。通过将预测的位点映射到晶体结构,可以鉴定可能是表位的位点。在已知具有强免疫选择但被认为高度可变的区域中,接近受体结合位点(RBS)的一个位点以围绕该位置156/158的 $800\text{\AA}^2$ 区域为中心(图8;Caton等,1982)。

[0527] 实施例4:表位的循环

[0528] 通过将12,480个管理的(curated)H1 HA序列基于收集序列的年份分成单独的fasta文件来生成年度共有序列。然后使用R包(package)的seqinr产生共有序列。

[0529] 对位置156/158周围的预测结合位点的分析表明,除了具有非带电残基的位置之外,还存在许多可以发现带电残基的位置,其在相似的残基类型之间是保守的或改变的。通常认为抗体优先结合带电荷的残基,因此可能的表位置换基于位置147、156、157、158和159处的带电荷氨基酸的循环来定义(Kringelum等,2013)。

[0530] 在位置147,氨基酸在带正电荷的氨基酸、赖氨酸或精氨酸、中性氨基酸、异亮氨酸和无氨基酸之间交替。因此,该网站根据这种模式分为三组。

[0531] 位置147的系统发育分析还揭示了在1918-1957和1977-2015之间在人类H1流感进化期间在位置147没有氨基酸存在的毒株被5次鉴定出来(图10)。还发现它在赖氨酸、精氨酸、异亮氨酸和无氨基酸之间循环。因此,强调了含有精氨酸和赖氨酸作为带正电荷的氨基酸的疫苗的重要性。这也表明该位点在结构上受限并且在少量构象之间循环。

[0532] 然后基于位置158或159、位置158以及任何在位置156或157的带正电荷的氨基酸进一步划分147的阳性基团。

[0533] 然后考虑非带电氨基酸的空间填充能力,其根据在位置156是否存在丙氨酸或天冬酰胺,允许从147-阳性/158或157阳性基团产生添加基团。

[0534] 实施例5:定点诱变后失去中和

[0535] 2006年末/2007年初采集的6至11岁儿童的血清与历史流感病毒株的HA1结构域进行了广泛的交叉反应(图4)。除A/New Caledonia/20/1999HA1结构域(其与A/Solomon Islands/3/2006HA1紧密相关)外,交叉反应性峰值从A/WSN/33向HA1域发展。还观察到针对

A/California/4/2009、A/USSR/90/1977、A/Albany/12/1951、A/Puerto Rico/8/34和A/Brevig Mission/1/1918的交叉反应性。

[0536] 使用微量中和测定(图5),当在位置147插入赖氨酸时,观察到对A/Solomon Islands/3/2006假型慢病毒的中和损失高达32倍(p值:0.0005)。在位置147插入赖氨酸也观察到高达18.75倍的A/WSN/1933假型慢病毒中和损失(p值:0.0056)。虽然来自UK组的仅11个血清样品显示与A/PR/8/1934假型慢病毒的交叉反应性,但是在位置147插入赖氨酸导致8个样品的完全中和损失和3个样品的减少。这表明这些毒株之间的大部分交叉反应性是通过在147位含有缺失的表位介导的。

[0537] 该数据强调了氨基酸位置147的重要性。应该注意的是,在A/Solomon Islands/3/2006、A/PR/8/1934和A/WSN/1933毒株中,位置147没有氨基酸。相反,这些病毒的单体由565个而不是566个氨基酸组成。

[0538] 实施例6:多肽的合成

[0539] Invitrogen®GeneArtStrings用于合成嵌合HA分子,其由在H5、H6或H11的HA1结构域中取代的有限变异性的表位组成。最初使用该站点的三种构象。

[0540] 然后将嵌合HA1结构域序列克隆到DNA表达构建体和慢病毒糖蛋白表达载体中。DNA表达在大肠杆菌中生长,并使用Qiagen Giga Prep试剂盒纯化。在通过蔗糖垫离心纯化之前,通过Carnell等(2015)中概述的方案产生显示嵌合HA的慢病毒。下面提供了取代进入H6、H5和H11 HA1结构域的构象(氨基酸位置用括号表示):

[0541] 蓝色:

[0542] N(146),K(147),G(148),V(149),A(151),P(154),H(155),A(156),G(157),A(158),K(159),K(163)

[0543] AAC(146)AAG(147)GGC(148)GTG(149)GCC(151)CCC(154)CAC(155)GCC(156)GGC(157)GCC(158)AAG(159)AAG(163)

[0544] 淡褐色:

[0545] N(146),I(147),G(148),V(149),A(151),S(154),H(155),A(156),G(157),K(158),S(159),K(163)

[0546] AAC(146)ATC(147)GGC(148)GTG(149)GCC(151)AGC(154)CAC(155)GCC(156)GGC(157)AAG(158)AGC(159)AAG(163)

[0547] 绿色:

[0548] T(146),R(147),G(148),V(149),A(151),S(154),H(155),K(156),G(157),K(158),S(159),R(163)

[0549] ACC(146)AGG(147)GGC(148)GTG(149)GCC(151)AGC(154)CAC(155)AAG(156)GGC(157)AAG(158)AGC(159)AGG(163)

[0550] 橙色:

[0551] T(146),K(147),G(148),V(149),A(151),S(154),H(155),N(156),G(157),K(158),S(159),R(163)

[0552] ACC(146)AAG(147)GGC(148)GTG(149)GCC(151)AGC(154)CAC(155)AAC(156)GGC(157)AAG(158)AGC(159)AGG(163)

[0553] 红色:

[0554] T (146) , Absent (147) ,) , G (148) , V (149) , A (151) , S (154) , H (155) , N (156) , G (157) , K (158) , S (159) , R (163)

[0555] ACC (146) Absent (147) GGC (148) GTG (149) GCC (151) AGC (154) CAC (155) AAC (156) GGC (157) AAG (158) AGC (159) AGG (163)

[0556] 这些序列对应于克隆到疫苗构建体中的那些序列,因此任何交叉反应都可以直接归因于它们。

[0557] 例7:小鼠攻毒

[0558] 用流感病毒株进行小鼠流感攻毒:

[0559] (i) A/California/4/2009,浓度为 1×10^5 Pfu,和(ii) A/PR/8/1934,浓度为 1×10^3 Pfu。每天监测体重变化。攻击实验的优化使得疫苗在小鼠中诱导的保护能够在疫苗接种研究中定量。

[0560] 基本疫苗接种方案如图6A所示。

[0561] 依次用下列序列接种小鼠:

位置		146	147	148	149	151	154	155	156	157	158	159	163
[0562]	名称 蓝色	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
	淡褐色	N	I	G	V	A	S	H	A	G	K	S	K
	绿色	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
	橙色	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
	红色	T	缺失	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R

[0563] 通过肌肉注射100 μ gDNA接种五组每组六只小鼠(命名为蓝色、红色、淡褐色、橙色和绿色),每种具有不同表位构象的DNA在10周时被取代进入H6 HA。在13周龄时,通过肌肉注射100 μ g具有相同构象的DNA取代进入H5 HA来接种该组。在18周龄时,通过使用相同构象的肌肉内将相同的构象取代进入慢病毒上展示的H11 HA中并与明矾佐剂(Alhydrogel, Invivogen)混合来接种该组。两个对照组(紫色和灰色)利用具有HA但并无表位构象取代进入其中的上在18周时述小鼠以相同的方式接种。最后,用PBS和明矾(Alhydrogel, Invivogen)模拟接种另外两个对照组(黑色和白色)。在第1周、第14周、第20周和第21周,所有组都被采血。在22周时,用适应小鼠的A/California/4/2009病毒攻击蓝色、橙色、淡褐色和紫色组,并每天称重。在22周时,用适应小鼠的A/PR/8/1934病毒攻击红色、绿色、灰色和白色组,并每天称重。结果如图6所示。

[0564] 实施例8:针对H3流感亚型的疫苗接种

[0565] 鉴定有限变异位点和随后有限变异的表位的方法应用于甲型流感病毒的H3亚型。由于H3亚型甲型流感病毒以与H1亚型甲型流感病毒相似的方式进化,这种鉴定表位的方法同样适用于H3亚型甲型流感病毒。因此,可以通过将H3毒株的变异性映射到H3流感的头部来鉴定表位,鉴定具有有限变异性的区域,将所述区域映射到H3结构以鉴定潜在的表位,然后分析共有序列数据以鉴定在通过抗原节俭模型预测的循环方式中表现的表位

[0566] 将这种类型的表位构象置于H4、H7 H10、H14和H15的HA头部结构域中,并使用VLP或病毒载体表达。疫苗组合按初免-加强-加强施用。

[0567] 实施例9:疫苗产生的交叉反应性

[0568] 针对A/PR/8/1934,A/Be1/1942,A/Albany/14/1951和A/Memphis/3/1987的HA1结

构域进行ELISA测定。基于在每次测定中OD达到1.0的已知阳性样品计算相对ELISA单位(REU)。

[0569] HA1结构域(REU)

疫苗组 (合并血清样品)	A/PR/8/ 1934	A/Bel/1942	A/Albany/ 14/1951	A/Memphis /3/1987
	-	-	-	-
蓝色	-	-	-	329
淡褐色	205	-	-	569
绿色	231	224	317	735
橙色	770	-	-	307
红色	-	-	-	-
H5+H6+H11对照组	-	-	-	-
未接种疫苗对照组	-	-	-	-

[0571] 参考文献

[0572] Belongia,E.A.等,2009.Effectiveness of Inactivated Influenza Vaccines Varied Substantially with Antigenic Match from the 2004-2005 Season to the 2006-2007 Season,在JSTOR上具有关于该文章的链接参考:Effectiveness of Inactivated Influenza Vaccines Varied.The Journal of Infectious Disease,199(2),pp.159-167.

[0573] Carnell等,(2015)Pseudotype-based neutralization assays for influenza:a systematic analysis.Front Immunol.2015 Apr 29;6:161.doi:10.3389/fimmu.2015.00161.eCollection 2015.

[0574] Carter等,(2013)Sequential seasonal H1N1 influenza virus infections protect ferrets against novel 2009H1N1 influenza virus.J Virol.2013 Feb;87(3):1400-10.

[0575] Caton等,1982.The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin(H1 subtype).Cell,31(2Pt 1),pp.417-427.

[0576] Gupta S.2016 Immune Driven Pathogen Evolution,Encyclopaedia of Immunology (Ed.Kaye,P.)Elsevier.

[0577] Krammer,F.等,2013.Broadly Protective Stalk-Specific Antibodies.,87(12),pp.6542-6550.

[0578] Li,Y.等,2013.Immune history shapes specificity of pandemic H1N1 influenza antibody responses.210(8),pp.1493-1500.

[0579] Lozano,R.等,2012.Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010:a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.Lancet,380,pp.2095-2128.

[0580] Manicassamy,B.等,2010.Protection of mice against lethal challenge with 2009H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines.PLoS Pathogens,6(1).

[0581] Matsuzaki,Y.等,2014.Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Influenza Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutants.Journal of Virology,88(21),pp.12364-12373.

[0582] Mertz,D.,Hyong,T.&Johnstone,J.,2013.Populations at risk for severe or

complicated influenza illness:systematic review andmeta-analysis.British Medical Journal,5061(August) ,pp.1-15.

[0583] Miura等2008Vaccine 26:193.

[0584] Presanis,A.M.等,2011.Changes in severity of2009 pandemicA/H1N1 influenza in England:a Bayesian evidence synthesis.British Medical Journal, (343) ,pp.1-14.

[0585] Recker,M.等,2007.The generation ofinfluenza outbreaks by a network ofhost immune responses against a limited set ofantigenic types.PNAS 104:7711

[0586] Taubenberger,J.K.&Morens,D.M.,2006.1918Influenza:the Mother ofAll Pandemics.Lancet,12(1) ,pp.15-22.

[0587] Treanor,J.J.等,2012.Effectiveness ofSeasonal InfluenzaVaccines in the United States During a Season With Circulation ofAll ThreeVaccine Strains., pp.1-9.

[0588] WHO 2016.Recommended composition ofinfluenza virus vaccines foruse in the 2016-2017northern hemisphere influenza season.

[0589] Wikramaratna,P.S.等,2013.The antigenic evolution ofinfluenza:drift orthrift?Philosophical transactions ofthe Royal Society ofLondon.Series B, Biological sciences,368(1614) ,p.20120200。在如下链接可获取:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3678325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

[0590] 序列

[0591] SEQ ID NO:1

[0592] H1头部结构域-氨基酸

CKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFIDYEE
LREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSY
[0593] PKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGTSRYSKKFKPEIAIR
PKVRDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDC

[0594] SEQ ID NO:2

[0595] H6头部结构域-氨基酸

CKILNKAPLDLRGCTIEGWILGNPQCDLLLGDQSWSYIVERPTAQNGICYPGTLNEVEE
LKALIGSGERVERFEMFPKSTWAGVDTNSGVTSACPYNSSGSSFYRNLLWIKTKSAAY
[0596] PVIKGTYNNTGNQPILYFWGVHHPDNEQNTLYGSGDRYVRMGTESMNFAKSPEIA
ARPAVNGQRGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKFVSTNNKGAVFKSNLPI
ENC

[0597] SEQ ID NO:3

[0598] H5头部结构域-氨基酸

- [0599] DLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFLNVPEWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYE
ELKHLLSRINHFEEKIQIIPKSSWSDEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLIKKNAYPTI
KRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKV
NGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGN
- [0600] SEQ ID NO:4
- [0601] H11头部结构域-氨基酸
CSIDGKAPISLGDCSFAGWILGNPMCDLIGKTSWSYIVEKPNPTNGICYPGTLENEEE
LRLKFSGVLEFSKFEAFTSNGWGAVNSGAGVTAACKFGSSNSFFRNMVWLHQSGTY
PVIRRTFNNTKGRDVLWVWGVHHPATLKEHQDLYKKDSSYVAVGSESYNRRFTPEIST
RPKVNGQAGRMTFYWTIVKPGEAITFESNGAFLAPRYAFELVSLGNGKLFERSDLNIESC
- [0603] SEQ ID NO:5
- [0604] H1头部结构域-核苷酸
TGCAAGCTGAGGGGCGTGGCCCCCTGCACCTGGGCAAGTGCAACATCGCCGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCGAGTGCGAGAGCCTGAGCACCGCCAGCAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
ACCAGCAGCAGCGACAACGGCACCTGCTACCCCGGCGACTTCATCGACTACGAGGAGCTG
AGGGAGCAGCTGAGCAGCGTGAGCAGCTTCGAGAGGTTTCGAGATCTTCCCCAAGACCAGC
AGCTGGCCCAACCACGACAGCAACAAGGGCGTGACCGCCGCTGCCCCACGCCGGCGCC
AAGAGCTTCTACAAGAACCTGATCTGGCTGGTGAAGAAGGGCAACAGCTACCCCAAGCTG
AGCAAGAGCTACATCAACGACAAGGGCAAGGAGGTGCTGGTGCTGTGGGGCATCCACCAC
CCCAGCACCGCGCCGACCAGCAGAGCCTGTACCAGAACGCCGACGCCTACGTGTTCTGTG
GGCACCAGCAGGTACAGCAAGAAGTTCAAGCCGAGATCGCCATCAGGCCCAAGGTGAGG
GACCAGGAGGGCAGGATGAACCTACTACTGGACCCCTGGTGGAGCCCGGCGACAAGATCACC
TTCGAGGCCACCGGCAACCTGGTGGTGCCAGGTACGCCCTTCGCCATGGAGAGGAACGCC
GGCAGCGGCATCATCATCAGCGACACCCCCGTGCACGACTGC
- [0605]
- [0606] SEQ ID NO:6
- [0607] H6头部结构域-核苷酸
TGCAAGATCCTGAACAAGGCCCCCTGGACCTGAGGGGCTGCACCATCGAGGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCGAGTGCGACCTGCTGCTGGGCGACCAGAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
AGGCCCACCGCCAGAACGGCATCTGCTACCCCGGCACCCTGAACGAGGTGGAGGAGCTG
AAGGCCCTGATCGGCAGCGGCGAGAGGGTGGAGAGGTTTCGAGATGTTCCCCAAGAGCACC
TGGGCCGGCGTGGACACCAACAGCGGCGTGACCAGCGCCTGCCCTACAACAGCGGCAGC
AGCTTCTACAGGAACCTGCTGTGGATCATCAAGACCAAGAGCGCCGCCTACCCCGTGATC
AAGGGCACCTACAACAACACCGGCAACCAGCCATCCTGTACTTCTGGGGCGTGCACCAC
CCCCCGACACCAACGAGCAGAACACCCTGTACGGCAGCGGCGACAGGTACGTGAGGATG
GGCACCGAGAGCATGAACCTCGCCAAGAGCCCCGAGATCGCCGCCAGGCCCGCGTGAAC
GGCCAGAGGGGCAGGATCGACTACTACTGGAGCGTGCTGAAGCCCGGCGAGACCCTGAAC
GTGGAGAGCAACGGCAACCTGATCGCCCCCTGGTACGCCCTACAAGTTCGTGAGCACCAAC
AACAAAGGGCGCCGTGTTCAAGAGCAACCTGCCCATCGAGAACTGC
- [0608]
- [0609] SEQ ID NO:7
- [0610] H5头部结构域-核苷酸

- [0611] TGCACCTGGACGGCGTGAAGCCCCTGATCCTGAGGGACTGCAGCGTGGCCGGCTGGCTG
CTGGGCAACCCCATGTGCGACGAGTTCTGAACGTGCCCCGAGTGGAGCTACATCGTGGAG
AAGGCCAACCCCGCCAACGACCTGTGCTACCCCGGCAACTTCAACGACTACGAGGAGCTG
AAGCACCTGCTGAGCAGGATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGAGCAGC
TGGAGCGACACGAGGCCAGCAGCGGCGTGAGCAGCGCCTGCCCCCTACCAGGGCAGGAGC
AGCTTCTTCAGGAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACAACGCCTACCCCAACCATCAAG
AGGAGCTACAACAACACCAACCAGGAGGACCTGCTGGTGTGTGGGGCATCCACCACCCC
AACGACGCCGCCGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCCAACCACTACATCAGCGTGGGC
ACCAGCACCTGAACCAGAGGCTGGTGCCCAAGATCGCCACCAGGAGCAAGGTGAACGGC
CAGAGCGGCAGGATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCCAACGACGCCATCAACTTC
GAGAGCAACGGCAACTTCATCGCCCCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAGGGCGAC
AGCACCATCATGAAGAGCGAGCTGGAGTACGGCAACTGC
- [0612] SEQ ID NO:8
- [0613] H11头部结构域-核苷酸
- [0614] TGCAGCATCGACGGCAAGGCCCCCATCAGCCTGGGCGACTGCAGCTTCGCCGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCATGTGCGACGACCTGATCGGCAAGACCAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
AAGCCCAACCCCAACGCGCATCTGCTACCCCGGCACCTTGGAGAACGAGGAGGAGCTG
AGGCTGAAGTTTCAGCGGCGTGCTGGAGTTTCAGCAAGTTTCGAGGCCTTCACCAGCAACGGC
TGGGGCGCCGTGAACAGCGGCGCCGGCGTGACCGCCGCTGCAAGTTTCGGCAGCAGCAAC
AGCTTCTTCAGGAACATGGTGTGGCTGATCCACCAGAGCGGCACCTACCCCGTGATCAGG
AGGACCTTCAACAACACCAAGGGCAGGGACGTGCTGATGGTGTGGGGCGTGCACCACCCC
GCCACCCTGAAGGAGCACCAGGACCTGTACAAGAAGGACAGCAGCTACGTGGCCGTGGGC
AGCGAGAGCTACAACAGGAGGTTTACCCCCGAGATCAGCACCAGGCCCAAGGTGAACGGC
CAGGCCGGCAGGATGACCTTCTACTGGACCATCGTGAAGCCCGGCGAGGCCATCACCTTC
GAGAGCAACGGCGCCTTCCTGGCCCCCAGGTACGCCTTCGAGCTGGTGAACCTGGGCAAC
GGCAAGCTGTTTCAGGAGCGACCTGAACATCGAGAGCTGC
- [0615] SEQ ID NO:9
- [0616] H1血凝素-氨基酸
- [0617] MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLEDKHNGKLC
KLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFIDYEEL
REQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYP
KLSKSYINDKGKEVLVLWGIHPSTSADQQSLYQNADAYVFGTSRYSKKFKPEIAIR
PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDC
NTTCQTPKGAINSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAF
IEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAV
GKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDYHDSNVKNLYEKVRS
QLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTR
IYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI
- [0618] SEQ ID NO:10
- [0619] H6血凝素-氨基酸

[0620] MIAIIVIAILAATGKSDKICIGYHANNSTTQVDTILEKNVTVTHSVELLENQKEERFCKILNK
APDLRGCTIEGWILGNPQCDLLLDGQSWSYIVERPTAQNGICYPGTLNEVEELKALIG
SGERVERFEMFPKSTWAGVDTNSGVTSACPYNSGSSFYRNLLWIKTKSAAYPVIKGT
YNNTGNQPILYFWGVHHPDPTNEQNTLYGSGDRYVRMGTESMNFASPEIAARPAVN
GQRGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKFVSTNNKGAVFKSNLPIENC DAT
CQTIAGVLRNTKTFQNVSPWLWIGECPKYVKSESRLATGLRNVPQIETRGLFGAIA GFIE
GGWTGMIDGWYGYHHENSQGS GYAADRESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEAVDH
EFSNLERRIDNLNKR MEDGFLDVWTYNAELLV LLENERTLDLHDANVKNLYEKVKS QL
RDNANDLGNGCFEFWHKCDNECIESVKNGTYDYPKYQDESKLNRQEIESV
KLENLG VYQILAIYSTVSSSLVLVGLI IAMGLWMCSNGSMQCRICI

[0621] SEQ ID NO:11

[0622] H5血凝素-氨基酸

[0623] MEKIVLLLAIIVSLVKS DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKL DL
DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFLNVP EWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELK
HLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFFRN VVWLIKKNAYPTIKRS
YNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTT YISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQ
SGRMEFFWTILKPND AINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGN NTKCQTPI
GAINSSMPFHNHPLTIGEC PKYVKS NRLVLATGLRNSPQRKKRGLFGAIA GFIEGGWQG
MVDGWYGYHHSNEQGS GYAADKESTQKAIDGV TNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFN NL
ERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNA
KELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIY
STVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

[0624] SEQ ID NO:12

[0625] H11血凝素-氨基酸

[0626] MKKTLLFAAIIICIQADEICIGYLSNNSTEKVDTHIESNVTVTSSVELVENEHTGSFCSIDGK
APISLGDCSFAGWILGNPMCDDLIGKTSWSYIVEKPNPTNGICYPGTLENEEELRLKFS
GVLEFSKF EAF TSNGWGAVNSGAGVTAACKFGSSNSFFRN MVWLIHQSGTYPVIRRT
FNNTKGRDVLMVWGVHHPATLKEHQDLYKKDSSYVAVGSESYNRRFTPEISTRPKVN
GQAGRMTFYWTIVKPGEAITFESNGAFLAPRYAFELVSLGNGK LFRSDLNIESCSTKCQ
SEIGGINTNRSFHNVHRNTIGDCPKYVNVKSLKLATGLRNVP AIATRGLFGAIA GFIEGG
WPGLINGWYGFQHRNEEGTGIAADKESTQKAIDQITSKVNNIVDRMNTNFESVQHEFS
EIEERINQLSKHVDDSVIDIWSYNAQLLV LLENEKTLDLHDSNVRNLHEKVRRMLKD NA
KDEGNGCFTFYHKCDNECIEKVRNGTYDHKEFEEESKLNRQEIEGVKLDSNGNVYKIL
SIYSCIASLVLAAIIMGFILWACSN GSCRCTICI

[0627] SEQ ID NO:13

[0628] 头部结构域(蓝色)-氨基酸,蓝色序列被放入H11头部结构域

[0629] SIDGKAPISLGDCSFAGWILGNPECEDLIGKTSWSYIVEKPNPTNGICYPGTLENEEEL
RLKFSGVLEFSKF EAF TSNGWGAVNS NKGV TAAC PHAGAK
SFFKNMVWLIHQSGTYPVIRRTFNNTKGRDVLMVWGVHHPATLKEHQDLYKKDSSYV
AVGSESYNRRFTPEISTRPKVNGQAGRMTFYWTIVKPGEAITFESNGAFLAPRYAFELV
SLGNGK LFRSDLNIES

[0630] SEQ ID NO:14

[0631] 头部结构域(淡褐色)-氨基酸,淡褐色序列被放入H6头部结构域

■KILNKAPLDLRGCTIEGWILGNPECELLLGDQSWSYIVERPTAQNGICYPGTLNEVEE
LKALIGSGERVERFEMFPKSTWAGVDT NIGV TAAC SHAGKS

[0632] SFYKNLLWIIKTKSAAYPVIKGTYNNTGNQPILYFWGVHHPDPTNEQNTLYGSGDRYVR
MGTESMNFAKSPEIAARPAVNGQRGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKF
VSTNNKGAVFKSNLPIEN■

[0633] SEQ ID NO:15

[0634] 头部结构域(绿色)-氨基酸,绿色序列被放入H6头部结构域

CKILNKAPLDLRGCTIEGWILGNPECELLLGDQSWSYIVERPTAQNGICYPGTLNEVEE
LKALIGSGERVERFEMFPKSTWAGVDTTRGVTAACSHKGKSSFYRNLLWIIKTKSAAY
[0635] PVIKGTYNNTGNQPILYFWGVHHPDPTNEQNTLYGSGDRYVRMGTESMNFAKSPEIA
ARPAVNGQRGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKFVSTNNKGAVFKSNLPI
ENC

[0636] SEQ ID NO:16

[0637] 头部结构域(橙色)-氨基酸

■SIDGKAPISLGDCSFAGWILGNPECEDLIGKTSWSYIVEKPNPTNGICYPGTLENEEEL
RLKFSGVLEFSKFEAFTSNGWGAVNS TKGV TAAC SHNGKS

[0638] SFFRNMVWLIIHQSGTYPVIRRTFNNTKGRDVLMMVWGVHHPATLKEHQDLYKKDSSYV
AVGSESYNRRFTPEISTRPKVNGQAGRMTFYWTIVKPGEAITFESNGAFLAPRYAFELV
SLGNGKLFERSDLNIES■

[0639] SEQ ID NO:17

[0640] 头部结构域(红色)-氨基酸

■DLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPECEEFLNVPEWSYIVEKANPANDLCYPGNF
NDYEELKHLLSRINHFEEKIQIIPKSSWSDHET■

[0641] GGVSAACASHNGKSSFFRNVVWLIKKNNAYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHP
NDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPN
DAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGN■

[0642] SEQ ID NO:18

[0643] 头部结构域(蓝色)-核苷酸

- [0644] TGCAGCATCGACGGCAAGGCCCCCATCAGCCTGGGCGACTGCAGCTTCGCCGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCGAGTGCGAGGACCTGATCGGCAAGACCAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
AAGCCCAACCCACCAACGGCATCTGCTACCCCGGCACCCTGGAGAACGAGGAGGAGCTG
AGGCTGAAGTTTCAGCGGCGTGCTGGAGTTCAGCAAGTTCGAGGCCTTCACCAGCAACGGC
TGGGGCGCCGTGAACAGCAACAGGGGCGTGACCGCCGCCTGCCCCACGCCGGCGCCAAG
AGCTTCTTCAAGAACATGGTGTGGCTGATCCACCAGAGCGGCACCTACCCCGTGATCAGG
AGGACCTTCAACAACACCAAGGGCAGGGACGTGCTGATGGTGTGGGGCGTGCAACCACCCC
GCCACCCTGAAGGAGCACCAGGACCTGTACAAGAAGGACAGCAGCTACGTGGCCGTGGGC
AGCGAGAGCTACAACAGGAGGTTACCCCCGAGATCAGCACCAGGCCCAAGGTGAACGGC
CAGGCCGGCAGGATGACCTTCTACTGGACCATCGTGAAGCCCGGCGAGGCCATCACCTTC
GAGAGCAACGGCGCCTTCCTGGCCCCCAGGTACGCCTTCGAGCTGGTGAGCCTGGGCAAC
GGCAAGCTGTTCAGGAGCGACCTGAACATCGAGAGCTGC
- [0645] SEQ ID NO:19
- [0646] 头部结构域(淡褐色)-核苷酸
- [0647] TGCAAGATCCTGAACAAGGCCCCCTGGACCTGAGGGGCTGCACCATCGAGGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCGAGTGCGAGCTGCTGCTGGGCGACCAGAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
AGGCCCACCGCCCAGAACGGCATCTGCTACCCCGGCACCCTGAACGAGGTGGAGGAGCTG
AAGGCCCTGATCGGCAGCGGCGAGAGGGTGGAGAGGTTTCGAGATGTTCCCCAAGAGCACC
TGGGGCGGCGTGACACCAACATCGGCGTGACCGCCGCCTGCAGCCACGCCGGCAAGAGC
AGCTTCTACAAGAACCTGCTGTGGATCATCAAGACCAAGAGCGCCGCCTACCCCGTGATC
AAGGGCACCTACAACAACACCGGCAACCAGCCCATCCTGTACTTCTGGGGCGTGCAACCAC
CCCCCGACACCAACGAGCAGAACACCCTGTACGGCAGCGGCGACAGGTACGTGAGGATG
GGCACCGAGAGCATGAACTTCGCCAAGAGCCCCGAGATCGCCGCCAGGCCCGCCGTGAAC
GGCCAGAGGGGCGAGGATCGACTACTACTGGAGCGTGCTGAAGCCCGGCGAGACCCTGAAC
GTGGAGAGCAACGGCAACCTGATCGCCCCCTGGTACGCCTACAAGTTCGTGAGCACCAC
AACAAGGGCGCCGTGTTCAAGAGCAACCTGCCCATCGAGAACTGC
- [0648] SEQ ID NO:20
- [0649] 头部结构域(绿色)-核苷酸
- [0650] TGCAAGATCCTGAACAAGGCCCCCTGGACCTGAGGGGCTGCACCATCGAGGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCGAGTGCGAGCTGCTGCTGGGCGACCAGAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
AGGCCCACCGCCCAGAACGGCATCTGCTACCCCGGCACCCTGAACGAGGTGGAGGAGCTG
AAGGCCCTGATCGGCAGCGGCGAGAGGGTGGAGAGGTTTCGAGATGTTCCCCAAGAGCACC
TGGGGCGGCGTGACACCAACAGGGGCGTGACCGCCGCCTGCAGCCACAAGGGCAAGAGC
AAGAGCTTCTACAAGAACCTGCTGTGGATCATCAAGACCAAGAGCGCCGCCTACCCCGTG
ATCAAGGGCACCTACAACAACACCGGCAACCAGCCCATCCTGTACTTCTGGGGCGTGAC
CACCCCCCGACACCAACGAGCAGAACACCCTGTACGGCAGCGGCGACAGGTACGTGAGG
ATGGGCACCGAGAGCATGAACTTCGCCAAGAGCCCCGAGATCGCCGCCAGGCCCGCCGTG
AACGGCCAGAGGGGCGAGGATCGACTACTACTGGAGCGTGCTGAAGCCCGGCGAGACCCTG
AACGTGGAGAGCAACGGCAACCTGATCGCCCCCTGGTACGCCTACAAGTTCGTGAGCACC
AACAACAAGGGCGCCGTGTTCAAGAGCAACCTGCCCATCGAGAACTGC
- [0651] SEQ ID NO:21
- [0652] 头部结构域(橙色)-核苷酸

- [0653] TGCAGCATCGACGGCAAGGCCCCCATCAGCCTGGGCGACTGCAGCTTCGCCGGCTGGATC
CTGGGCAACCCCGAGTGCGAGGACCTGATCGGCAAGACCAGCTGGAGCTACATCGTGGAG
AAGCCCAACCCCAACGCGCATCTGCTACCCCGGCACCCTGGAGAACGAGGAGGAGCTG
AGGCTGAAGTTTCAGCGGCGTGCTGGAGTTCAGCAAGTTCGAGGCCTTCACCAGCAACGGC
TGGGGCGCCGTGAACAGCACCAAGGGCGTGACCGCCGCTGCAGCCACAACGGCAAGAGC
AGCTTCTTCAGGAACATGGTGTGGCTGATCCACCAGAGCGGCACCTACCCCGTGATCAGG
AGGACCTTCAACAACACCAAGGGCAGGGACGTGCTGATGGTGTGGGGCGTGCAACCACCC
GCCACCCTGAAGGAGCACCAGGACCTGTACAAGAAGGACAGCAGCTACGTGGCCGTGGGC
AGCGAGAGCTACAACAGGAGGTTCAACCCCGAGATCAGCACCAGGCCCAAGGTGAACGGC
CAGGCCGGCAGGATGACCTTCTACTGGACCATCGTGAAGCCCGGCGAGGCCATCACCTTC
GAGAGCAACGGCGCCTTCCTGGCCCCCAGGTACGCCTTCGAGCTGGTGGCCTGGGCAAC
GGCAAGCTGTTCAGGAGCGACCTGAACATCGAGAGCTGC
- [0654] SEQ ID NO:22
- [0655] 头部结构域(红色)-核苷酸
- [0656] TGCACCTGGACGGCGTGAAGCCCCCTGATCCTGAGGGACTGCAGCGTGGCCGGCTGGCTG
CTGGGCAACCCCGAGTGCGAGGAGTTCCTGAACGTGCCCGAGTGGAGCTACATCGTGGAG
AAGGCCAACCCCGCCAACGACCTGTGCTACCCCGGCAACTTCAACGACTACGAGGAGCTG
AAGCACCTGCTGAGCAGGATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCCAAGAGCAGC
TGGAGCGACCACGAGACCGGCGGGCTGAGCGCCGCTGCGCCAGCCACAACGGCAAGAGC
AGCTTCTTCAGGAACGTGGTGTGGCTGATCAAGAAGAACAACGCCTACCCACCATCAAG
AGGAGCTACAACAACACCAACCAGGAGGACCTGCTGGTGTGTGGGGCATCCACCACCC
AACGACGCCGCCGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCACCATACATCAGCGTGGGC
ACCAGCACCTGAACCAGAGGCTGGTGCCCAAGATCGCCACCAGGAGCAAGGTGAACGGC
CAGAGCGGCAGGATGGAGTTCTTCTGGACCATCCTGAAGCCCAACGACGCCATCAACTTC
GAGAGCAACGGCAACTTCATCGCCCCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAGGGCGAC
AGCACCATCATGAAGAGCGAGCTGGAGTACGGCAACTGC
- [0657] SEQ ID NO:23
- [0658] H9血凝素-氨基酸
- [0659] METVSLITILLVTVSNADKICIGYQSTNSTETVDTLTENNVPVTHAKELLHTEHNGML
CATSLGHPLILDCTIEGLIYGNPSCDLLLGGREWSYIVERPSAVNGLCYPGNVENLEEL
RSLFSSARSYQRIQIFPDTIWNVSYSGTSKACSDSFYRSMRWLTQKNNAYPIQDAQYT
NNQGKNILFMWGINHPPTDTAQTNLYTRDTTTSVATEEINRTFKPLIGPRPLVNGLQG
RIDYYWSVLKPGQTLRIRSNGNLIAPWYGHILSGESHGRILKTDLKRGSCTVQCQTEKG
GLNTTLPFQNVSKYAFGNCSKYIGIKSLKLAVGLRNVPSRSSRGLFGAIAFGFIEGGWSG
LVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRDSTQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVE
TRLNMINNKIDDQIQDIWAYNAELLVLLLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAVED
GKGCFELYHKDDQCMETIRNGTYNRRKYQEEKLERQKIEGVKLESEGTYKILTIYST
VASSLVIAMGFAAFLFWAMSNGSCRCNICI

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	牛津大学创新有限公司														
[0003]	<120>	免疫原性组合物														
[0004]	<130>	489.412.128984/01														
[0005]	<160>	28														
[0006]	<170>	PatentIn version 3.5														
[0007]	<210>	1														
[0008]	<211>	234														
[0009]	<212>	PRT														
[0010]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)														
[0011]	<400>	1														
[0012]	Cys	Lys	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	His	Leu	Gly	Lys	Cys	Asn	Ile
[0013]	1				5					10					15	
[0014]	Ala	Gly	Trp	Ile	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Glu	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala
[0015]					20					25					30	
[0016]	Ser	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Thr	Ser	Ser	Ser	Asp	Asn	Gly	Thr
[0017]					35					40					45	
[0018]	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Ile	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu
[0019]		50					55					60				
[0020]	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Thr	Ser
[0021]	65					70				75					80	
[0022]	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asp	Ser	Asn	Lys	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys	Pro
[0023]					85					90					95	
[0024]	His	Ala	Gly	Ala	Lys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Trp	Leu	Val	Lys
[0025]					100					105					110	
[0026]	Lys	Gly	Asn	Ser	Tyr	Pro	Lys	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Asp	Lys
[0027]					115					120					125	
[0028]	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Thr	Ser
[0029]					130					135					140	
[0030]	Ala	Asp	Gln	Gln	Ser	Leu	Tyr	Gln	Asn	Ala	Asp	Ala	Tyr	Val	Phe	Val
[0031]	145					150					155				160	
[0032]	Gly	Thr	Ser	Arg	Tyr	Ser	Lys	Lys	Phe	Lys	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	Arg
[0033]					165					170					175	
[0034]	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln	Glu	Gly	Arg	Met	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu
[0035]					180					185					190	
[0036]	Val	Glu	Pro	Gly	Asp	Lys	Ile	Thr	Phe	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Val
[0037]					195					200					205	
[0038]	Val	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe	Ala	Met	Glu	Arg	Asn	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile

[0039]	210	215	220
[0040]	Ile Ile Ser Asp Thr Pro Val His Asp Cys		
[0041]	225	230	
[0042]	<210> 2		
[0043]	<211> 235		
[0044]	<212> PRT		
[0045]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)		
[0046]	<400> 2		
[0047]	Cys Lys Ile Leu Asn Lys Ala Pro Leu Asp Leu Arg Gly Cys Thr Ile		
[0048]	1	5	10 15
[0049]	Glu Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Gln Cys Asp Leu Leu Leu Gly Asp		
[0050]	20	25	30
[0051]	Gln Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Arg Pro Thr Ala Gln Asn Gly Ile		
[0052]	35	40	45
[0053]	Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn Glu Val Glu Glu Leu Lys Ala Leu Ile		
[0054]	50	55	60
[0055]	Gly Ser Gly Glu Arg Val Glu Arg Phe Glu Met Phe Pro Lys Ser Thr		
[0056]	65	70	75 80
[0057]	Trp Ala Gly Val Asp Thr Asn Ser Gly Val Thr Ser Ala Cys Pro Tyr		
[0058]	85	90	95
[0059]	Asn Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Ile Ile Lys Thr		
[0060]	100	105	110
[0061]	Lys Ser Ala Ala Tyr Pro Val Ile Lys Gly Thr Tyr Asn Asn Thr Gly		
[0062]	115	120	125
[0063]	Asn Gln Pro Ile Leu Tyr Phe Trp Gly Val His His Pro Pro Asp Thr		
[0064]	130	135	140
[0065]	Asn Glu Gln Asn Thr Leu Tyr Gly Ser Gly Asp Arg Tyr Val Arg Met		
[0066]	145	150	155 160
[0067]	Gly Thr Glu Ser Met Asn Phe Ala Lys Ser Pro Glu Ile Ala Ala Arg		
[0068]	165	170	175
[0069]	Pro Ala Val Asn Gly Gln Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Tyr Trp Ser Val		
[0070]	180	185	190
[0071]	Leu Lys Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Glu Ser Asn Gly Asn Leu Ile		
[0072]	195	200	205
[0073]	Ala Pro Trp Tyr Ala Tyr Lys Phe Val Ser Thr Asn Asn Lys Gly Ala		
[0074]	210	215	220
[0075]	Val Phe Lys Ser Asn Leu Pro Ile Glu Asn Cys		
[0076]	225	230	235
[0077]	<210> 3		

[0078]	<211>	233
[0079]	<212>	PRT
[0080]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0081]	<400>	3
[0082]	Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val	
[0083]	1	5 10 15
[0084]	Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val	
[0085]	20	25 30
[0086]	Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu	
[0087]	35	40 45
[0088]	Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu	
[0089]	50	55 60
[0090]	Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser	
[0091]	65	70 75 80
[0092]	Trp Ser Asp His Glu Ala Ser Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr	
[0093]	85	90 95
[0094]	Gln Gly Arg Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys	
[0095]	100	105 110
[0096]	Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln	
[0097]	115	120 125
[0098]	Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala	
[0099]	130	135 140
[0100]	Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly	
[0101]	145	150 155 160
[0102]	Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser	
[0103]	165	170 175
[0104]	Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu	
[0105]	180	185 190
[0106]	Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala	
[0107]	195	200 205
[0108]	Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met	
[0109]	210	215 220
[0110]	Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys	
[0111]	225	230
[0112]	<210>	4
[0113]	<211>	233
[0114]	<212>	PRT
[0115]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0116]	<400>	4

[0117]	Cys Ser Ile Asp Gly Lys Ala Pro Ile Ser Leu Gly Asp Cys Ser Phe	
[0118]	1 5 10 15	
[0119]	Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Asp Leu Ile Gly Lys	
[0120]	20 25 30	
[0121]	Thr Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Pro Asn Pro Thr Asn Gly Ile	
[0122]	35 40 45	
[0123]	Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Glu Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu Lys Phe	
[0124]	50 55 60	
[0125]	Ser Gly Val Leu Glu Phe Ser Lys Phe Glu Ala Phe Thr Ser Asn Gly	
[0126]	65 70 75 80	
[0127]	Trp Gly Ala Val Asn Ser Gly Ala Gly Val Thr Ala Ala Cys Lys Phe	
[0128]	85 90 95	
[0129]	Gly Ser Ser Asn Ser Phe Phe Arg Asn Met Val Trp Leu Ile His Gln	
[0130]	100 105 110	
[0131]	Ser Gly Thr Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Phe Asn Asn Thr Lys Gly	
[0132]	115 120 125	
[0133]	Arg Asp Val Leu Met Val Trp Gly Val His His Pro Ala Thr Leu Lys	
[0134]	130 135 140	
[0135]	Glu His Gln Asp Leu Tyr Lys Lys Asp Ser Ser Tyr Val Ala Val Gly	
[0136]	145 150 155 160	
[0137]	Ser Glu Ser Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ser Thr Arg Pro	
[0138]	165 170 175	
[0139]	Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg Met Thr Phe Tyr Trp Thr Ile Val	
[0140]	180 185 190	
[0141]	Lys Pro Gly Glu Ala Ile Thr Phe Glu Ser Asn Gly Ala Phe Leu Ala	
[0142]	195 200 205	
[0143]	Pro Arg Tyr Ala Phe Glu Leu Val Ser Leu Gly Asn Gly Lys Leu Phe	
[0144]	210 215 220	
[0145]	Arg Ser Asp Leu Asn Ile Glu Ser Cys	
[0146]	225 230	
[0147]	<210> 5	
[0148]	<211> 702	
[0149]	<212> DNA	
[0150]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)	
[0151]	<400> 5	
[0152]	tgcaagctga ggggcgtggc cccctgcac ctgggcaagt gcaacatcgc cggttgatc 60	
[0153]	ctgggcaacc ccgagtgcga gaggctgagc accgccagca gctggagcta catcgtggag 120	
[0154]	accagcagca gcgacaacgg cacctgctac cccggcgact tcatcgacta cgaggagctg 180	
[0155]	agggagcagc tgagcagcgt gaggcagcttc gagagggttc agatcttccc caagaccagc 240	

[0156]	agctggccca accacgacag caacaagggc gtgaccgccg cctgccccca cgccggcgcc	300
[0157]	aagagcttct acaagaacct gatctggctg gtgaagaagg gcaacagcta cccaagctg	360
[0158]	agcaagagct acatcaacga caagggcaag gaggtgctgg tgctgtgggg catccaccac	420
[0159]	cccagcacca gcgccgacca gcagagcctg taccagaacg ccgacgccta cgtgttcgtg	480
[0160]	ggcaccagca ggtacagcaa gaagttcaag cccgagatcg ccatcaggcc caaggtgagg	540
[0161]	gaccaggagg gcaggatgaa ctactactgg accctgggtg agcccggcga caagatcacc	600
[0162]	ttcgaggcca cgggcaacct ggtggtgccc aggtacgcct tcgccatgga gaggaacgcc	660
[0163]	ggcagcggca tcatcatcag cgacaccccc gtgcacgact gc	702
[0164]	<210> 6	
[0165]	<211> 705	
[0166]	<212> DNA	
[0167]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)	
[0168]	<400> 6	
[0169]	tgcaagatcc tgaacaaggc cccctggac ctgaggggct gcaccatcga gggctggatc	60
[0170]	ctgggcaacc cccagtgcga cctgctgctg ggcgaccaga gctggagcta catcgtggag	120
[0171]	aggcccaccg cccagaacgg catctgctac cccggcaccc tgaacgaggt ggaggagctg	180
[0172]	aaggccctga tcggcagcgg cgagagggtg gagaggttcg agatgttccc caagagcacc	240
[0173]	tgggccggcg tggacaccaa cagcggcgtg accagcgcct gcccctacaa cagcggcagc	300
[0174]	agctttctaca ggaacctgct gtggatcatc aagaccaaga gcgccgccta ccccgatgac	360
[0175]	aagggcacct acaacaacac cggcaaccag cccatcctgt acttctgggg cgtgcaccac	420
[0176]	cccccgaca ccaacgagca gaacaccctg tacggcagcg gcgacaggta cgtgaggatg	480
[0177]	ggcaccgaga gcatgaactt cgccaagagc cccgagatcg ccgccaggcc cgccgtgaac	540
[0178]	ggccagaggg gcaggatcga ctactactgg agcgtgctga agcccggcga gaccctgaac	600
[0179]	gtggagagca acggcaacct gatcgcccc tggtacgcct acaagttcgt gagcaccaac	660
[0180]	aacaagggcg ccgtgttcaa gagcaacctg cccatcgaga actgc	705
[0181]	<210> 7	
[0182]	<211> 699	
[0183]	<212> DNA	
[0184]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)	
[0185]	<400> 7	
[0186]	tgcgacctgg acggcgtgaa gcccctgate ctgagggact gcagcgtggc cggctggctg	60
[0187]	ctgggcaacc ccatgtgcga cgagttcctg aacgtgcccg agtggagcta catcgtggag	120
[0188]	aaggccaacc ccgccaacga cctgtgctac cccggcaact tcaacgacta cgaggagctg	180
[0189]	aagcacctgc tgagcaggat caaccacttc gagaagatcc agatcatccc caagagcagc	240
[0190]	tggagcgacc acgaggccag cagcggcgtg agcagcgcct gcccctacca gggcaggagc	300
[0191]	agctttcttca ggaacgtggt gtggctgate aagaagaaca acgcctaccc caccatcaag	360
[0192]	aggagctaca acaacaccaa ccaggaggac ctgctgggtg tgtggggcat ccaccacccc	420
[0193]	aacgacgccg ccgagcagac caagctgtac cagaacccca ccacctacat cagcgtgggc	480
[0194]	accagcaccc tgaaccagag gctggtgccc aagatcgcca ccaggagcaa ggtgaacggc	540

[0195]	cagagcggca g gatggagtt cttctggacc atcctgaagc ccaacgacgc catcaacttc	600
[0196]	gagagcaacg gcaacttcat cgcccccgag tacgcctaca agatcgtgaa gaagggcgac	660
[0197]	agcaccatca tgaagagcga gctggagtac ggcaactgc	699
[0198]	<210> 8	
[0199]	<211> 699	
[0200]	<212> DNA	
[0201]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)	
[0202]	<400> 8	
[0203]	tgcagcatcg acggcaaggc ccccatcagc ctgggcgact gcagcttcgc cggctggatc	60
[0204]	ctgggcaacc ccatgtgcga cgacctgac ggcaagacca gctggagcta catcgtggag	120
[0205]	aagcccaacc ccaccaacgg catctgctac cccggcaccc tggagaacga ggaggagctg	180
[0206]	aggctgaagt tcagcggcgt gctggagttc agcaagttcg aggccttcac cagcaacggc	240
[0207]	tggggcgccg tgaacagcgg cgccggcgtg accgccgcct gcaagttcgg cagcagcaac	300
[0208]	agctttcttca ggaacatggt gtggctgac caccagagcg gcacctacc cgtgatcagg	360
[0209]	aggaccttca acaacaccaa gggcagggac gtgctgatgg tgtggggcgt gcaccacccc	420
[0210]	gccaccctga aggagcacca ggacctgtac aagaaggaca gcagctacgt ggccgtgggc	480
[0211]	agcgagagct acaacaggag gttcaccccc gagatcagca ccaggcccaa ggtgaacggc	540
[0212]	caggccggca g gatgacctt ctactggacc atcgtgaagc ccggcgaggc catcaccttc	600
[0213]	gagagcaacg ggccttctt ggcccccgag tacgccttcg agctggtgag cctgggcaac	660
[0214]	ggcaagctgt tcaggagcga cctgaacatc gagagctgc	699
[0215]	<210> 9	
[0216]	<211> 566	
[0217]	<212> PRT	
[0218]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)	
[0219]	<400> 9	
[0220]	Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn	
[0221]	1 5 10 15	
[0222]	Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr	
[0223]	20 25 30	
[0224]	Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn	
[0225]	35 40 45	
[0226]	Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val	
[0227]	50 55 60	
[0228]	Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly	
[0229]	65 70 75 80	
[0230]	Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile	
[0231]	85 90 95	
[0232]	Val Glu Thr Ser Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe	
[0233]	100 105 110	

[0234]	Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
[0235]	115 120 125
[0236]	Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
[0237]	130 135 140
[0238]	Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
[0239]	145 150 155 160
[0240]	Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
[0241]	165 170 175
[0242]	Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
[0243]	180 185 190
[0244]	Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
[0245]	195 200 205
[0246]	Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Thr Ser Arg Tyr Ser
[0247]	210 215 220
[0248]	Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
[0249]	225 230 235 240
[0250]	Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
[0251]	245 250 255
[0252]	Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
[0253]	260 265 270
[0254]	Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
[0255]	275 280 285
[0256]	Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
[0257]	290 295 300
[0258]	Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
[0259]	305 310 315 320
[0260]	Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
[0261]	325 330 335
[0262]	Asn Val Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
[0263]	340 345 350
[0264]	Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
[0265]	355 360 365
[0266]	His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
[0267]	370 375 380
[0268]	Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
[0269]	385 390 395 400
[0270]	Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
[0271]	405 410 415
[0272]	Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe

[0273]	420	425	430
[0274]	Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn		
[0275]	435	440	445
[0276]	Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu		
[0277]	450	455	460
[0278]	Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly		
[0279]	465	470	475
[0280]	Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val		
[0281]	485	490	495
[0282]	Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu		
[0283]	500	505	510
[0284]	Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr		
[0285]	515	520	525
[0286]	Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val		
[0287]	530	535	540
[0288]	Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu		
[0289]	545	550	555
[0290]	Gln Cys Arg Ile Cys Ile		
[0291]	565		
[0292]	<210> 10		
[0293]	<211> 566		
[0294]	<212> PRT		
[0295]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)		
[0296]	<400> 10		
[0297]	Met Ile Ala Ile Ile Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Thr Gly Lys Ser		
[0298]	1 5 10 15		
[0299]	Asp Lys Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Thr Gln Val		
[0300]	20 25 30		
[0301]	Asp Thr Ile Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Glu Leu		
[0302]	35 40 45		
[0303]	Leu Glu Asn Gln Lys Glu Glu Arg Phe Cys Lys Ile Leu Asn Lys Ala		
[0304]	50 55 60		
[0305]	Pro Leu Asp Leu Arg Gly Cys Thr Ile Glu Gly Trp Ile Leu Gly Asn		
[0306]	65 70 75 80		
[0307]	Pro Gln Cys Asp Leu Leu Leu Gly Asp Gln Ser Trp Ser Tyr Ile Val		
[0308]	85 90 95		
[0309]	Glu Arg Pro Thr Ala Gln Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn		
[0310]	100 105 110		
[0311]	Glu Val Glu Glu Leu Lys Ala Leu Ile Gly Ser Gly Glu Arg Val Glu		

[0312]	115	120	125
[0313]	Arg Phe Glu Met Phe Pro Lys Ser Thr Trp Ala Gly Val Asp Thr Asn		
[0314]	130	135	140
[0315]	Ser Gly Val Thr Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Ser Gly Ser Ser Phe Tyr		
[0316]	145	150	155
[0317]	Arg Asn Leu Leu Trp Ile Ile Lys Thr Lys Ser Ala Ala Tyr Pro Val		
[0318]	165	170	175
[0319]	Ile Lys Gly Thr Tyr Asn Asn Thr Gly Asn Gln Pro Ile Leu Tyr Phe		
[0320]	180	185	190
[0321]	Trp Gly Val His His Pro Pro Asp Thr Asn Glu Gln Asn Thr Leu Tyr		
[0322]	195	200	205
[0323]	Gly Ser Gly Asp Arg Tyr Val Arg Met Gly Thr Glu Ser Met Asn Phe		
[0324]	210	215	220
[0325]	Ala Lys Ser Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Ala Val Asn Gly Gln Arg		
[0326]	225	230	235
[0327]	Gly Arg Ile Asp Tyr Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Glu Thr Leu		
[0328]	245	250	255
[0329]	Asn Val Glu Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Tyr Lys		
[0330]	260	265	270
[0331]	Phe Val Ser Thr Asn Asn Lys Gly Ala Val Phe Lys Ser Asn Leu Pro		
[0332]	275	280	285
[0333]	Ile Glu Asn Cys Asp Ala Thr Cys Gln Thr Ile Ala Gly Val Leu Arg		
[0334]	290	295	300
[0335]	Thr Asn Lys Thr Phe Gln Asn Val Ser Pro Leu Trp Ile Gly Glu Cys		
[0336]	305	310	315
[0337]	Pro Lys Tyr Val Lys Ser Glu Ser Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg		
[0338]	325	330	335
[0339]	Asn Val Pro Gln Ile Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly		
[0340]	340	345	350
[0341]	Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr		
[0342]	355	360	365
[0343]	His His Glu Asn Ser Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Arg Glu Ser		
[0344]	370	375	380
[0345]	Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile		
[0346]	385	390	395
[0347]	Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Asp His Glu Phe Ser Asn		
[0348]	405	410	415
[0349]	Leu Glu Arg Arg Ile Asp Asn Leu Asn Lys Arg Met Glu Asp Gly Phe		
[0350]	420	425	430

[0351]	Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
[0352]	435 440 445
[0353]	Glu Arg Thr Leu Asp Leu His Asp Ala Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
[0354]	450 455 460
[0355]	Lys Val Lys Ser Gln Leu Arg Asp Asn Ala Asn Asp Leu Gly Asn Gly
[0356]	465 470 475 480
[0357]	Cys Phe Glu Phe Trp His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Ile Glu Ser Val
[0358]	485 490 495
[0359]	Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Gln Asp Glu Ser Lys Leu
[0360]	500 505 510
[0361]	Asn Arg Gln Glu Ile Glu Ser Val Lys Leu Glu Asn Leu Gly Val Tyr
[0362]	515 520 525
[0363]	Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ser Ser Ser Leu Val Leu Val
[0364]	530 535 540
[0365]	Gly Leu Ile Ile Ala Met Gly Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Met
[0366]	545 550 555 560
[0367]	Gln Cys Arg Ile Cys Ile
[0368]	565
[0369]	<210> 11
[0370]	<211> 564
[0371]	<212> PRT
[0372]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0373]	<400> 11
[0374]	Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
[0375]	1 5 10 15
[0376]	Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
[0377]	20 25 30
[0378]	Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
[0379]	35 40 45
[0380]	Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
[0381]	50 55 60
[0382]	Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
[0383]	65 70 75 80
[0384]	Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
[0385]	85 90 95
[0386]	Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
[0387]	100 105 110
[0388]	Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
[0389]	115 120 125

[0390]	Lys	Ile	Gln	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Ser
[0391]	130						135					140				
[0392]	Ser	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Gln	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Phe
[0393]	145					150					155					160
[0394]	Arg	Asn	Val	Val	Trp	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Asn	Ala	Tyr	Pro	Thr	Ile
[0395]					165					170					175	
[0396]	Lys	Arg	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu	Trp
[0397]				180					185					190		
[0398]	Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gln
[0399]			195					200					205			
[0400]	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg
[0401]		210						215				220				
[0402]	Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly
[0403]	225					230					235					240
[0404]	Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn
[0405]				245						250					255	
[0406]	Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile
[0407]				260					265					270		
[0408]	Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly
[0409]			275					280					285			
[0410]	Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Ile	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser
[0411]		290						295				300				
[0412]	Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys
[0413]	305					310					315					320
[0414]	Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser
[0415]				325						330					335	
[0416]	Pro	Gln	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile
[0417]				340					345					350		
[0418]	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His	His
[0419]			355					360					365			
[0420]	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Gln
[0421]		370						375				380				
[0422]	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys
[0423]	385					390					395					400
[0424]	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	Asn	Leu	Glu
[0425]				405						410					415	
[0426]	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Gly	Phe	Leu	Asp
[0427]				420						425				430		
[0428]	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Glu	Asn	Glu	Arg

[0429]	435	440	445
[0430]	Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val		
[0431]	450	455	460
[0432]	Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe		
[0433]	465	470	475
[0434]	Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn		
[0435]	485	490	495
[0436]	Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg		
[0437]	500	505	510
[0438]	Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ile		
[0439]	515	520	525
[0440]	Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met		
[0441]	530	535	540
[0442]	Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys		
[0443]	545	550	555
[0444]	Arg Ile Cys Ile		
[0445]	<210> 12		
[0446]	<211> 565		
[0447]	<212> PRT		
[0448]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)		
[0449]	<400> 12		
[0450]	Met Lys Lys Thr Leu Leu Phe Ala Ala Ile Ile Ile Cys Ile Gln Ala		
[0451]	1	5	10
[0452]	Asp Glu Ile Cys Ile Gly Tyr Leu Ser Asn Asn Ser Thr Glu Lys Val		
[0453]	20	25	30
[0454]	Asp Thr Ile Ile Glu Ser Asn Val Thr Val Thr Ser Ser Val Glu Leu		
[0455]	35	40	45
[0456]	Val Glu Asn Glu His Thr Gly Ser Phe Cys Ser Ile Asp Gly Lys Ala		
[0457]	50	55	60
[0458]	Pro Ile Ser Leu Gly Asp Cys Ser Phe Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn		
[0459]	65	70	75
[0460]	Pro Met Cys Asp Asp Leu Ile Gly Lys Thr Ser Trp Ser Tyr Ile Val		
[0461]	85	90	95
[0462]	Glu Lys Pro Asn Pro Thr Asn Gly Ile Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Glu		
[0463]	100	105	110
[0464]	Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu Lys Phe Ser Gly Val Leu Glu Phe Ser		
[0465]	115	120	125
[0466]	Lys Phe Glu Ala Phe Thr Ser Asn Gly Trp Gly Ala Val Asn Ser Gly		
[0467]	130	135	140

[0468]	Ala Gly Val Thr Ala Ala Cys Lys Phe Gly Ser Ser Asn Ser Phe Phe
[0469]	145 150 155 160
[0470]	Arg Asn Met Val Trp Leu Ile His Gln Ser Gly Thr Tyr Pro Val Ile
[0471]	165 170 175
[0472]	Arg Arg Thr Phe Asn Asn Thr Lys Gly Arg Asp Val Leu Met Val Trp
[0473]	180 185 190
[0474]	Gly Val His His Pro Ala Thr Leu Lys Glu His Gln Asp Leu Tyr Lys
[0475]	195 200 205
[0476]	Lys Asp Ser Ser Tyr Val Ala Val Gly Ser Glu Ser Tyr Asn Arg Arg
[0477]	210 215 220
[0478]	Phe Thr Pro Glu Ile Ser Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly
[0479]	225 230 235 240
[0480]	Arg Met Thr Phe Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Glu Ala Ile Thr
[0481]	245 250 255
[0482]	Phe Glu Ser Asn Gly Ala Phe Leu Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu Leu
[0483]	260 265 270
[0484]	Val Ser Leu Gly Asn Gly Lys Leu Phe Arg Ser Asp Leu Asn Ile Glu
[0485]	275 280 285
[0486]	Ser Cys Ser Thr Lys Cys Gln Ser Glu Ile Gly Gly Ile Asn Thr Asn
[0487]	290 295 300
[0488]	Arg Ser Phe His Asn Val His Arg Asn Thr Ile Gly Asp Cys Pro Lys
[0489]	305 310 315 320
[0490]	Tyr Val Asn Val Lys Ser Leu Lys Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val
[0491]	325 330 335
[0492]	Pro Ala Ile Ala Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
[0493]	340 345 350
[0494]	Glu Gly Gly Trp Pro Gly Leu Ile Asn Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His
[0495]	355 360 365
[0496]	Arg Asn Glu Glu Gly Thr Gly Ile Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
[0497]	370 375 380
[0498]	Lys Ala Ile Asp Gln Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Arg
[0499]	385 390 395 400
[0500]	Met Asn Thr Asn Phe Glu Ser Val Gln His Glu Phe Ser Glu Ile Glu
[0501]	405 410 415
[0502]	Glu Arg Ile Asn Gln Leu Ser Lys His Val Asp Asp Ser Val Ile Asp
[0503]	420 425 430
[0504]	Ile Trp Ser Tyr Asn Ala Gln Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Lys
[0505]	435 440 445
[0506]	Thr Leu Asp Leu His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu His Glu Lys Val

[0507]	450	455	460
[0508]	Arg Arg Met Leu Lys Asp Asn Ala Lys Asp Glu Gly Asn Gly Cys Phe		
[0509]	465	470	475 480
[0510]	Thr Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Ile Glu Lys Val Arg Asn		
[0511]	485	490	495
[0512]	Gly Thr Tyr Asp His Lys Glu Phe Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg		
[0513]	500	505	510
[0514]	Gln Glu Ile Glu Gly Val Lys Leu Asp Ser Asn Gly Asn Val Tyr Lys		
[0515]	515	520	525
[0516]	Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Cys Ile Ala Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala		
[0517]	530	535	540
[0518]	Ile Ile Met Gly Phe Ile Leu Trp Ala Cys Ser Asn Gly Ser Cys Arg		
[0519]	545	550	555 560
[0520]	Cys Thr Ile Cys Ile		
[0521]	565		
[0522]	<210> 13		
[0523]	<211> 233		
[0524]	<212> PRT		
[0525]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)		
[0526]	<400> 13		
[0527]	Cys Ser Ile Asp Gly Lys Ala Pro Ile Ser Leu Gly Asp Cys Ser Phe		
[0528]	1 5 10 15		
[0529]	Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Asp Leu Ile Gly Lys		
[0530]	20 25 30		
[0531]	Thr Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Pro Asn Pro Thr Asn Gly Ile		
[0532]	35 40 45		
[0533]	Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Glu Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu Lys Phe		
[0534]	50 55 60		
[0535]	Ser Gly Val Leu Glu Phe Ser Lys Phe Glu Ala Phe Thr Ser Asn Gly		
[0536]	65 70 75 80		
[0537]	Trp Gly Ala Val Asn Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His		
[0538]	85 90 95		
[0539]	Ala Gly Ala Lys Ser Phe Phe Lys Asn Met Val Trp Leu Ile His Gln		
[0540]	100 105 110		
[0541]	Ser Gly Thr Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Phe Asn Asn Thr Lys Gly		
[0542]	115 120 125		
[0543]	Arg Asp Val Leu Met Val Trp Gly Val His His Pro Ala Thr Leu Lys		
[0544]	130 135 140		
[0545]	Glu His Gln Asp Leu Tyr Lys Lys Asp Ser Ser Tyr Val Ala Val Gly		

[0546]	145	150	155	160
[0547]	Ser Glu Ser Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ser Thr Arg Pro			
[0548]		165	170	175
[0549]	Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg Met Thr Phe Tyr Trp Thr Ile Val			
[0550]		180	185	190
[0551]	Lys Pro Gly Glu Ala Ile Thr Phe Glu Ser Asn Gly Ala Phe Leu Ala			
[0552]		195	200	205
[0553]	Pro Arg Tyr Ala Phe Glu Leu Val Ser Leu Gly Asn Gly Lys Leu Phe			
[0554]	210	215	220	
[0555]	Arg Ser Asp Leu Asn Ile Glu Ser Cys			
[0556]	225	230		
[0557]	<210> 14			
[0558]	<211> 235			
[0559]	<212> PRT			
[0560]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)			
[0561]	<400> 14			
[0562]	Cys Lys Ile Leu Asn Lys Ala Pro Leu Asp Leu Arg Gly Cys Thr Ile			
[0563]	1	5	10	15
[0564]	Glu Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Leu Gly Asp			
[0565]		20	25	30
[0566]	Gln Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Arg Pro Thr Ala Gln Asn Gly Ile			
[0567]		35	40	45
[0568]	Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn Glu Val Glu Glu Leu Lys Ala Leu Ile			
[0569]	50	55	60	
[0570]	Gly Ser Gly Glu Arg Val Glu Arg Phe Glu Met Phe Pro Lys Ser Thr			
[0571]	65	70	75	80
[0572]	Trp Ala Gly Val Asp Thr Asn Ile Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His			
[0573]		85	90	95
[0574]	Ala Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Lys Asn Leu Leu Trp Ile Ile Lys Thr			
[0575]		100	105	110
[0576]	Lys Ser Ala Ala Tyr Pro Val Ile Lys Gly Thr Tyr Asn Asn Thr Gly			
[0577]		115	120	125
[0578]	Asn Gln Pro Ile Leu Tyr Phe Trp Gly Val His His Pro Pro Asp Thr			
[0579]	130	135	140	
[0580]	Asn Glu Gln Asn Thr Leu Tyr Gly Ser Gly Asp Arg Tyr Val Arg Met			
[0581]	145	150	155	160
[0582]	Gly Thr Glu Ser Met Asn Phe Ala Lys Ser Pro Glu Ile Ala Ala Arg			
[0583]		165	170	175
[0584]	Pro Ala Val Asn Gly Gln Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Tyr Trp Ser Val			

[0585]	180	185	190
[0586]	Leu Lys Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Glu Ser Asn Gly Asn Leu Ile		
[0587]	195	200	205
[0588]	Ala Pro Trp Tyr Ala Tyr Lys Phe Val Ser Thr Asn Asn Lys Gly Ala		
[0589]	210	215	220
[0590]	Val Phe Lys Ser Asn Leu Pro Ile Glu Asn Cys		
[0591]	225	230	235
[0592]	<210> 15		
[0593]	<211> 235		
[0594]	<212> PRT		
[0595]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)		
[0596]	<400> 15		
[0597]	Cys Lys Ile Leu Asn Lys Ala Pro Leu Asp Leu Arg Gly Cys Thr Ile		
[0598]	1	5	10
[0599]	Glu Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Leu Gly Asp		
[0600]	20	25	30
[0601]	Gln Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Arg Pro Thr Ala Gln Asn Gly Ile		
[0602]	35	40	45
[0603]	Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn Glu Val Glu Glu Leu Lys Ala Leu Ile		
[0604]	50	55	60
[0605]	Gly Ser Gly Glu Arg Val Glu Arg Phe Glu Met Phe Pro Lys Ser Thr		
[0606]	65	70	75
[0607]	Trp Ala Gly Val Asp Thr Thr Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His		
[0608]	85	90	95
[0609]	Lys Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Ile Ile Lys Thr		
[0610]	100	105	110
[0611]	Lys Ser Ala Ala Tyr Pro Val Ile Lys Gly Thr Tyr Asn Asn Thr Gly		
[0612]	115	120	125
[0613]	Asn Gln Pro Ile Leu Tyr Phe Trp Gly Val His His Pro Pro Asp Thr		
[0614]	130	135	140
[0615]	Asn Glu Gln Asn Thr Leu Tyr Gly Ser Gly Asp Arg Tyr Val Arg Met		
[0616]	145	150	155
[0617]	Gly Thr Glu Ser Met Asn Phe Ala Lys Ser Pro Glu Ile Ala Ala Arg		
[0618]	165	170	175
[0619]	Pro Ala Val Asn Gly Gln Arg Gly Arg Ile Asp Tyr Tyr Trp Ser Val		
[0620]	180	185	190
[0621]	Leu Lys Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Glu Ser Asn Gly Asn Leu Ile		
[0622]	195	200	205
[0623]	Ala Pro Trp Tyr Ala Tyr Lys Phe Val Ser Thr Asn Asn Lys Gly Ala		

[0624]	210	215	220
[0625]	Val Phe Lys Ser Asn Leu Pro Ile Glu Asn Cys		
[0626]	225	230	235
[0627]	<210> 16		
[0628]	<211> 233		
[0629]	<212> PRT		
[0630]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)		
[0631]	<400> 16		
[0632]	Cys Ser Ile Asp Gly Lys Ala Pro Ile Ser Leu Gly Asp Cys Ser Phe		
[0633]	1 5 10 15		
[0634]	Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Asp Leu Ile Gly Lys		
[0635]	20 25 30		
[0636]	Thr Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Pro Asn Pro Thr Asn Gly Ile		
[0637]	35 40 45		
[0638]	Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Glu Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu Lys Phe		
[0639]	50 55 60		
[0640]	Ser Gly Val Leu Glu Phe Ser Lys Phe Glu Ala Phe Thr Ser Asn Gly		
[0641]	65 70 75 80		
[0642]	Trp Gly Ala Val Asn Ser Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His		
[0643]	85 90 95		
[0644]	Asn Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Met Val Trp Leu Ile His Gln		
[0645]	100 105 110		
[0646]	Ser Gly Thr Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Phe Asn Asn Thr Lys Gly		
[0647]	115 120 125		
[0648]	Arg Asp Val Leu Met Val Trp Gly Val His His Pro Ala Thr Leu Lys		
[0649]	130 135 140		
[0650]	Glu His Gln Asp Leu Tyr Lys Lys Asp Ser Ser Tyr Val Ala Val Gly		
[0651]	145 150 155 160		
[0652]	Ser Glu Ser Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ser Thr Arg Pro		
[0653]	165 170 175		
[0654]	Lys Val Asn Gly Gln Ala Gly Arg Met Thr Phe Tyr Trp Thr Ile Val		
[0655]	180 185 190		
[0656]	Lys Pro Gly Glu Ala Ile Thr Phe Glu Ser Asn Gly Ala Phe Leu Ala		
[0657]	195 200 205		
[0658]	Pro Arg Tyr Ala Phe Glu Leu Val Ser Leu Gly Asn Gly Lys Leu Phe		
[0659]	210 215 220		
[0660]	Arg Ser Asp Leu Asn Ile Glu Ser Cys		
[0661]	225 230		
[0662]	<210> 17		

[0663]	<211>	233
[0664]	<212>	PRT
[0665]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0666]	<400>	17
[0667]	Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val	
[0668]	1	5 10 15
[0669]	Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Glu Phe Leu Asn Val	
[0670]	20	25 30
[0671]	Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu	
[0672]	35	40 45
[0673]	Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu	
[0674]	50	55 60
[0675]	Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser	
[0676]	65	70 75 80
[0677]	Trp Ser Asp His Glu Thr Gly Gly Val Ser Ala Ala Cys Ala Ser His	
[0678]	85	90 95
[0679]	Asn Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys	
[0680]	100	105 110
[0681]	Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln	
[0682]	115	120 125
[0683]	Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala	
[0684]	130	135 140
[0685]	Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly	
[0686]	145	150 155 160
[0687]	Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser	
[0688]	165	170 175
[0689]	Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu	
[0690]	180	185 190
[0691]	Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala	
[0692]	195	200 205
[0693]	Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met	
[0694]	210	215 220
[0695]	Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn Cys	
[0696]	225	230
[0697]	<210>	18
[0698]	<211>	699
[0699]	<212>	DNA
[0700]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0701]	<400>	18

[0702]	tgcagcatcg acggcaaggc ccccatcagc ctgggcgact gcagcttcgc cggctggatc	60
[0703]	ctgggcaacc ccgagtgcga ggacctgac ggcaagacca gctggagcta catcgtggag	120
[0704]	aagcccaacc ccaccaacgg catctgctac cccggcaccc tggagaacga ggaggagctg	180
[0705]	aggctgaagt tcagcggcgt gctggagtgc agcaagtgc aggccttcac cagcaacggc	240
[0706]	tggggcgccg tgaacagcaa caggggcgtg accgccgcct gccccacgc cggcgccaag	300
[0707]	agcttcttca agaacatggt gtggctgac caccagagcg gcacctaccc cgtgatcagg	360
[0708]	aggaccttca acaacaccaa gggcaggac gtgtgatgg tgtggggcgt gcaccacccc	420
[0709]	gccacctga aggagacca ggacctgtac aagaaggaca gcagctacgt ggccgtgggc	480
[0710]	agcgagagct acaacaggag gttaccccc gagatcagca ccaggcccaa ggtgaacggc	540
[0711]	caggccggca ggatgacctt ctactggacc atcgtgaagc ccggcgaggc catcaccttc	600
[0712]	gagagcaacg gcgccttcct ggccccagg tacgccttcg agctggtgag cctgggcaac	660
[0713]	ggcaagctgt tcaggagcga cctgaacatc gagagctgc	699
[0714]	<210>	19
[0715]	<211>	705
[0716]	<212>	DNA
[0717]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0718]	<400>	19
[0719]	tgcaagatcc tgaacaaggc cccctggac ctgaggggct gcaccatcga gggctggatc	60
[0720]	ctgggcaacc ccgagtgcga gctgtgtctg ggcgaccaga gctggagcta catcgtggag	120
[0721]	aggcccaccg ccagaaacgg catctgctac cccggcaccc tgaacgaggt ggaggagctg	180
[0722]	aaggccctga tcggcagcgg cgagagggtg gagagggttc agatgttccc caagagcacc	240
[0723]	tgggccggcg tggacaccaa catcggcgtg accgccgcct gcagccacgc cggcaagagc	300
[0724]	agcttctaca agaacctgct gtggatcacc aagaccaaga gcgccgccta ccccgatgac	360
[0725]	aagggcacct acaacaacac cggcaaccag cccatcctgt acttctgggg cgtgcaccac	420
[0726]	cccccgaca ccaacgagca gaacacctg tacggcagcg gcgacaggta cgtgaggatg	480
[0727]	ggcaccgaga gcatgaactt cgccaagagc cccgagatcg ccgccaggcc cgccgtgaac	540
[0728]	ggccagaggg gcaggatcga ctactactgg agcgtgctga agcccggcga gaccctgaac	600
[0729]	gtggagagca acggcaacct gatcgcccc tggtagcct acaagttcgt gagcaccaac	660
[0730]	aacaaggcgg ccgtgttcaa gagcaacctg cccatcgaga actgc	705
[0731]	<210>	20
[0732]	<211>	708
[0733]	<212>	DNA
[0734]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0735]	<400>	20
[0736]	tgcaagatcc tgaacaaggc cccctggac ctgaggggct gcaccatcga gggctggatc	60
[0737]	ctgggcaacc ccgagtgcga gctgtgtctg ggcgaccaga gctggagcta catcgtggag	120
[0738]	aggcccaccg ccagaaacgg catctgctac cccggcaccc tgaacgaggt ggaggagctg	180
[0739]	aaggccctga tcggcagcgg cgagagggtg gagagggttc agatgttccc caagagcacc	240
[0740]	tgggccggcg tggacaccac caggggcgtg accgccgcct gcagccacaa gggcaagagc	300

[0741]	aagagcttct acaagaacct gctgtggatc atcaagacca agagcgccgc ctaccccggtg	360
[0742]	atcaagggca cctacaacaa caccggcaac cagcccatcc tgtacttctg gggcggtgcac	420
[0743]	cacccccccg acaccaacga gcagaacacc ctgtacggca gcggcgacag gtacgtgagg	480
[0744]	atgggcaccg agagcatgaa cttcgccaag agccccgaga tcgccgccag gcccggcggtg	540
[0745]	aacggccaga ggggcaggat cgactactac tggagcggtgc tgaagcccg gtagaccctg	600
[0746]	aacgtggaga gcaacggcaa cctgatcgcc ccctggtacg cctacaagtt cgtgagcacc	660
[0747]	aacaacaagg gcgccgtgtt caagagcaac ctgcccacg agaactgc	708
[0748]	<210>	21
[0749]	<211>	699
[0750]	<212>	DNA
[0751]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0752]	<400>	21
[0753]	tgcagcatcg acggcaagge ccccatcagc ctgggcgact gcagcttcgc cggctggatc	60
[0754]	ctgggcaacc ccgagtgcga ggacctgatc ggcaagacca gctggagcta catcgtggag	120
[0755]	aagcccaacc ccaccaacgg catctgctac cccggcaccc tggagaacga ggaggagctg	180
[0756]	aggctgaagt tcagcggcgt gctggagttc agcaagttcg aggccttcac cagcaacggc	240
[0757]	tggggcgccg tgaacagcac caagggcgtg accgccgcct gcagccacaa cggcaagagc	300
[0758]	agctttcttca ggaacatggt gtggctgatc caccagagcg gcacctacc cgtgatcagg	360
[0759]	aggaccttca acaacaccaa gggcaggac gtgctgatgg tgtggggcgt gcaccacccc	420
[0760]	gccacctga aggagcacca ggacctgtac aagaaggaca gcagctacgt ggccgtgggc	480
[0761]	agcgagagct acaacaggag gtacaccccc gagatcagca ccaggcccaa ggtgaacggc	540
[0762]	caggccggca ggatgacctt ctactggacc atcgtgaagc ccggcgaggc catcaccttc	600
[0763]	gagagcaacg gcgccttcct ggcccccagg tacgccttcg agctgggtgag cctgggcaac	660
[0764]	ggcaagctgt tcaggagcga cctgaacatc gagagctgc	699
[0765]	<210>	22
[0766]	<211>	699
[0767]	<212>	DNA
[0768]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0769]	<400>	22
[0770]	tgcgacctgg acggcgtgaa gcccctgatc ctgagggact gcagcgtggc cggctggctg	60
[0771]	ctgggcaacc ccgagtgcga ggagttcctg aacgtgccc agtggagcta catcgtggag	120
[0772]	aaggccaacc ccgccaacga cctgtgctac cccggcaact tcaacgacta cgaggagctg	180
[0773]	aagcacctgc tgagcaggat caaccacttc gagaagatcc agatcatccc caagagcagc	240
[0774]	tggagcgacc acgagaccgg cggcgtgagc gccgcctgcg ccagccacaa cggcaagagc	300
[0775]	agctttcttca ggaacgtggt gtggctgatc aagaagaaca acgcctacc caccatcaag	360
[0776]	aggagctaca acaacaccaa ccaggaggac ctgctgggtgc tgtggggcat ccaccacccc	420
[0777]	aacgacgccg ccgagcagac caagctgtac cagaacccca ccacctacat cagcgtgggc	480
[0778]	accagcacc cgaaccagag gctggtgccc aagatcgcca ccaggagcaa ggtgaacggc	540
[0779]	cagagcggca ggatggagtt cttctggacc atcctgaagc ccaacgacgc catcaacttc	600

[0780]	gagagcaacg gcaacttcat cgcccccgag tacgcctaca agatcgtgaa gaagggcgac															660
[0781]	agcaccatca tgaagagcga gctggagtac ggcaactgc															699
[0782]	<210> 23															
[0783]	<211> 560															
[0784]	<212> PRT															
[0785]	<213> 甲型流感病毒(Influenza A virus)															
[0786]	<400> 23															
[0787]	Met	Glu	Thr	Val	Ser	Leu	Ile	Thr	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Val	Ser
[0788]	1				5					10					15	
[0789]	Asn	Ala	Asp	Lys	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	Gln	Ser	Thr	Asn	Ser	Thr	Glu
[0790]				20					25					30		
[0791]	Thr	Val	Asp	Thr	Leu	Thr	Glu	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Thr	His	Ala	Lys
[0792]			35					40					45			
[0793]	Glu	Leu	Leu	His	Thr	Glu	His	Asn	Gly	Met	Leu	Cys	Ala	Thr	Ser	Leu
[0794]		50					55					60				
[0795]	Gly	His	Pro	Leu	Ile	Leu	Asp	Thr	Cys	Thr	Ile	Glu	Gly	Leu	Ile	Tyr
[0796]	65				70				75					80		
[0797]	Gly	Asn	Pro	Ser	Cys	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg	Glu	Trp	Ser	Tyr
[0798]				85					90					95		
[0799]	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Ser	Ala	Val	Asn	Gly	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asn
[0800]			100						105					110		
[0801]	Val	Glu	Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	Arg	Ser
[0802]			115					120					125			
[0803]	Tyr	Gln	Arg	Ile	Gln	Ile	Phe	Pro	Asp	Thr	Ile	Trp	Asn	Val	Ser	Tyr
[0804]		130					135					140				
[0805]	Ser	Gly	Thr	Ser	Lys	Ala	Cys	Ser	Asp	Ser	Phe	Tyr	Arg	Ser	Met	Arg
[0806]	145				150					155				160		
[0807]	Trp	Leu	Thr	Gln	Lys	Asn	Asn	Ala	Tyr	Pro	Ile	Gln	Asp	Ala	Gln	Tyr
[0808]				165					170					175		
[0809]	Thr	Asn	Asn	Gln	Gly	Lys	Asn	Ile	Leu	Phe	Met	Trp	Gly	Ile	Asn	His
[0810]			180						185					190		
[0811]	Pro	Pro	Thr	Asp	Thr	Ala	Gln	Thr	Asn	Leu	Tyr	Thr	Arg	Thr	Asp	Thr
[0812]			195						200					205		
[0813]	Thr	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Ile	Asn	Arg	Thr	Phe	Lys	Pro	Leu
[0814]		210					215					220				
[0815]	Ile	Gly	Pro	Arg	Pro	Leu	Val	Asn	Gly	Leu	Gln	Gly	Arg	Ile	Asp	Tyr
[0816]	225				230					235				240		
[0817]	Tyr	Trp	Ser	Val	Leu	Lys	Pro	Gly	Gln	Thr	Leu	Arg	Ile	Arg	Ser	Asn
[0818]				245					250					255		

[0819]	Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Ile Leu Ser Gly Glu Ser
[0820]	260 265 270
[0821]	His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Lys Arg Gly Ser Cys Thr Val
[0822]	275 280 285
[0823]	Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Thr Thr Leu Pro Phe Gln
[0824]	290 295 300
[0825]	Asn Val Ser Lys Tyr Ala Phe Gly Asn Cys Ser Lys Tyr Ile Gly Ile
[0826]	305 310 315 320
[0827]	Lys Ser Leu Lys Leu Ala Val Gly Leu Arg Asn Val Pro Ser Arg Ser
[0828]	325 330 335
[0829]	Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp
[0830]	340 345 350
[0831]	Ser Gly Leu Val Ala Gly Trp Tyr Gly Phe Gln His Ser Asn Asp Gln
[0832]	355 360 365
[0833]	Gly Val Gly Met Ala Ala Asp Arg Asp Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp
[0834]	370 375 380
[0835]	Lys Ile Thr Ser Lys Val Asn Asn Ile Val Asp Lys Met Asn Lys Gln
[0836]	385 390 395 400
[0837]	Tyr Glu Ile Ile Asp His Glu Phe Ser Glu Val Glu Thr Arg Leu Asn
[0838]	405 410 415
[0839]	Met Ile Asn Asn Lys Ile Asp Asp Gln Ile Gln Asp Ile Trp Ala Tyr
[0840]	420 425 430
[0841]	Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gln Lys Thr Leu Asp Glu
[0842]	435 440 445
[0843]	His Asp Ala Asn Val Asn Asn Leu Tyr Asn Lys Val Lys Arg Ala Leu
[0844]	450 455 460
[0845]	Gly Ser Asn Ala Val Glu Asp Gly Lys Gly Cys Phe Glu Leu Tyr His
[0846]	465 470 475 480
[0847]	Lys Cys Asp Asp Gln Cys Met Glu Thr Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn
[0848]	485 490 495
[0849]	Arg Arg Lys Tyr Gln Glu Glu Ser Lys Leu Glu Arg Gln Lys Ile Glu
[0850]	500 505 510
[0851]	Gly Val Lys Leu Glu Ser Glu Gly Thr Tyr Lys Ile Leu Thr Ile Tyr
[0852]	515 520 525
[0853]	Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Ile Ala Met Gly Phe Ala Ala Phe
[0854]	530 535 540
[0855]	Leu Phe Trp Ala Met Ser Asn Gly Ser Cys Arg Cys Asn Ile Cys Ile
[0856]	545 550 555 560
[0857]	<210> 24

[0858]	<211>	9
[0859]	<212>	PRT
[0860]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0861]	<400>	24
[0862]	Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe	
[0863]	1	5
[0864]	<210>	25
[0865]	<211>	9
[0866]	<212>	PRT
[0867]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0868]	<400>	25
[0869]	Pro Gln Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe	
[0870]	1	5
[0871]	<210>	26
[0872]	<211>	9
[0873]	<212>	PRT
[0874]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0875]	<400>	26
[0876]	Pro Gln Ile Glu Thr Arg Gly Leu Phe	
[0877]	1	5
[0878]	<210>	27
[0879]	<211>	9
[0880]	<212>	PRT
[0881]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0882]	<400>	27
[0883]	Pro Ser Arg Ser Ser Arg Gly Leu Phe	
[0884]	1	5
[0885]	<210>	28
[0886]	<211>	9
[0887]	<212>	PRT
[0888]	<213>	甲型流感病毒(Influenza A virus)
[0889]	<400>	28
[0890]	Pro Ala Ile Ala Thr Arg Gly Leu Phe	
[0891]	1	5

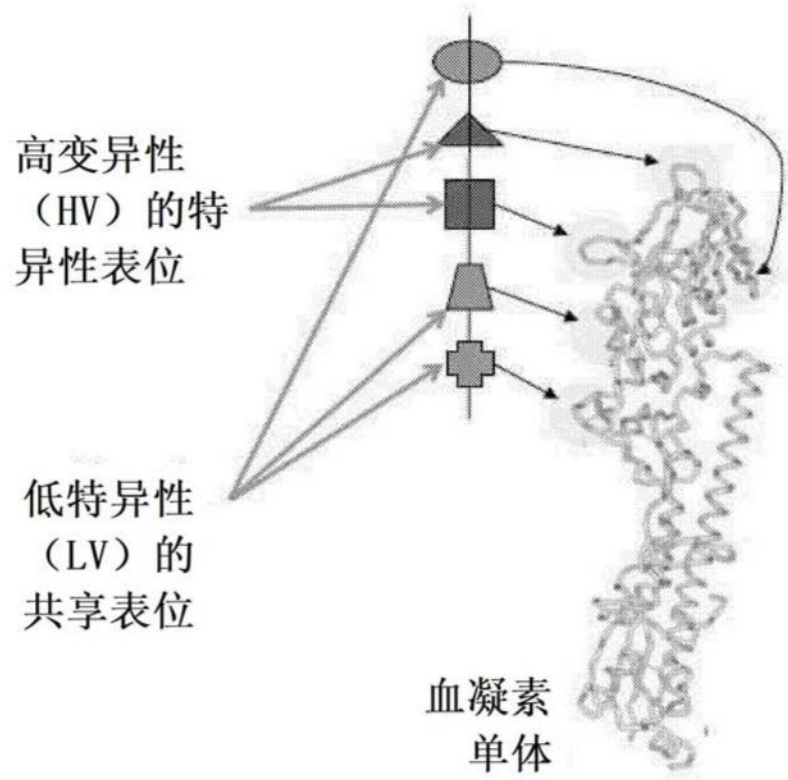


图1

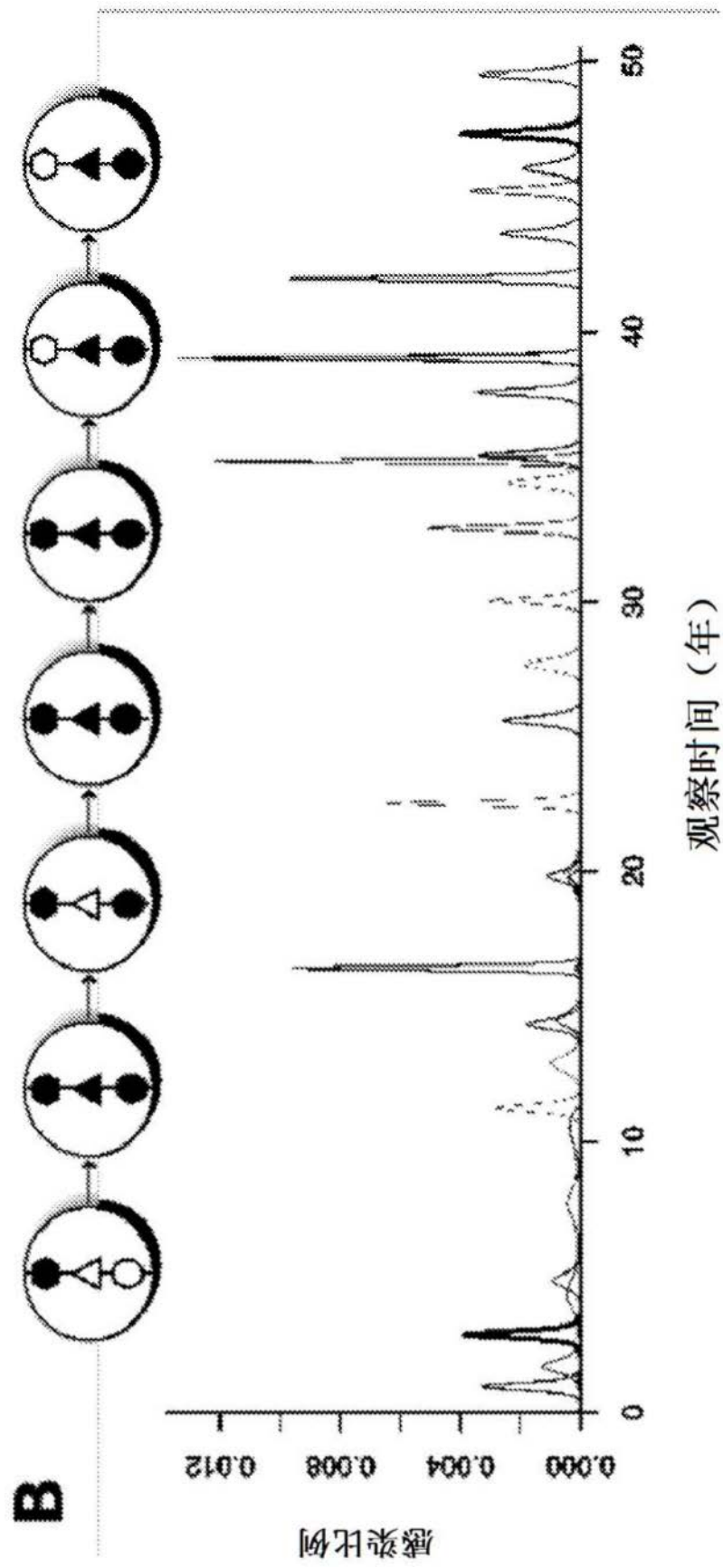


图2

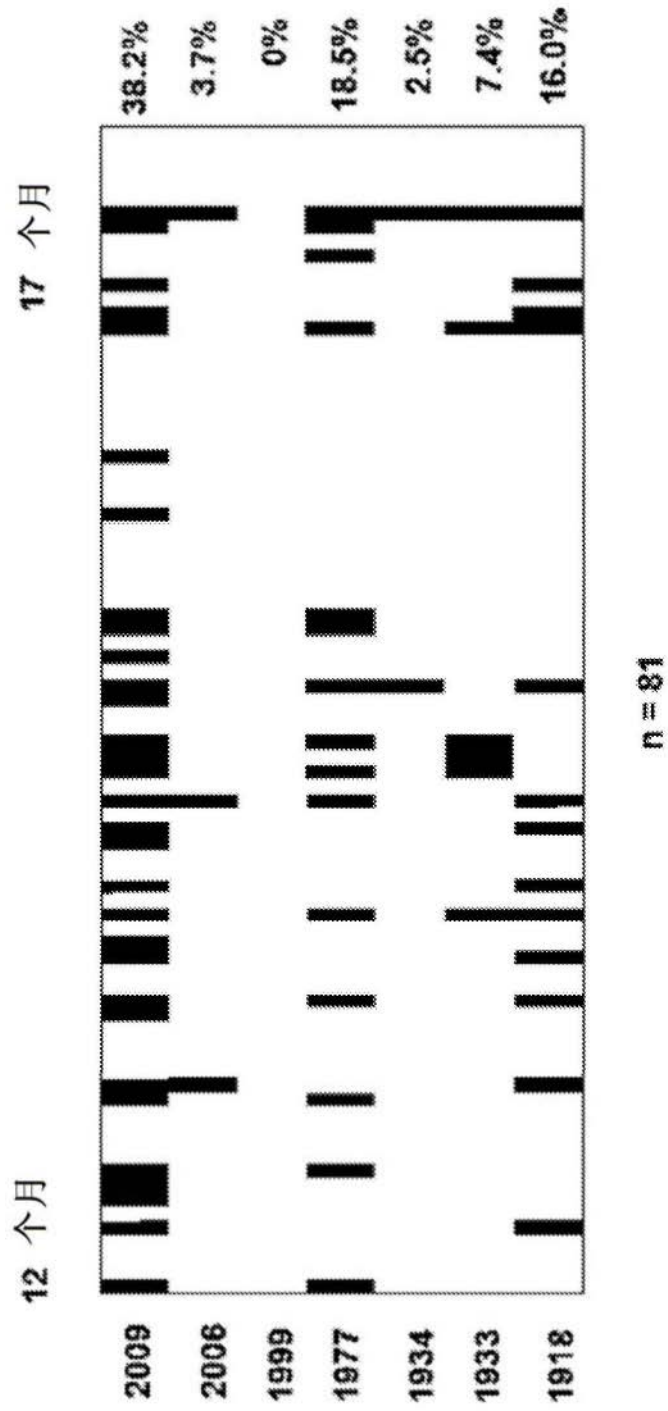


图3



图4

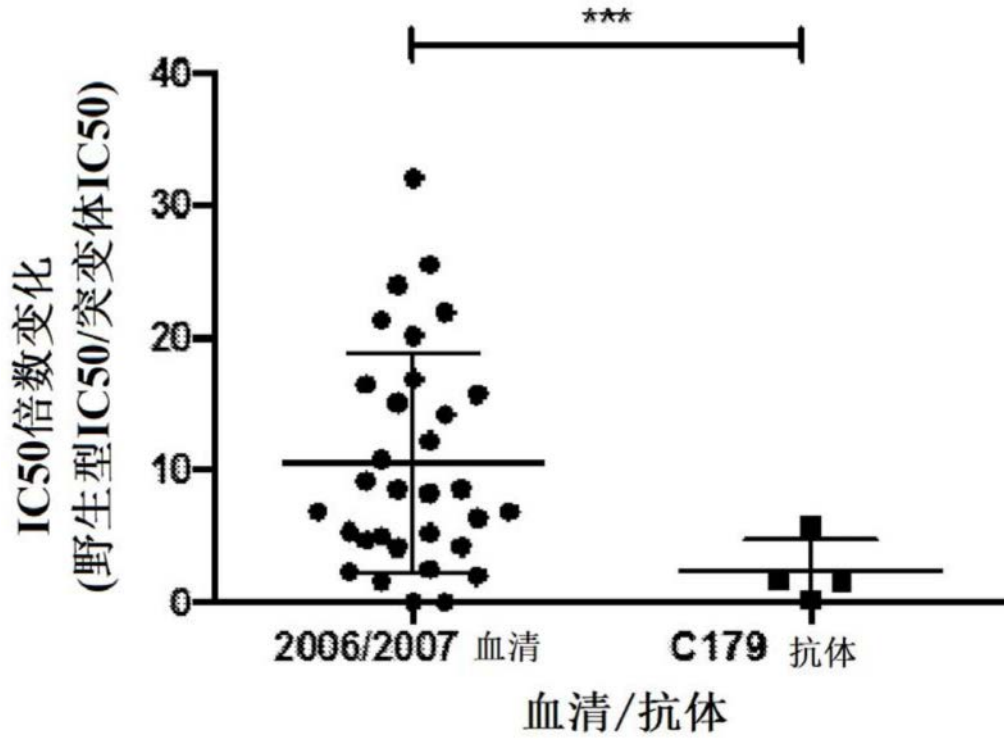


图5A

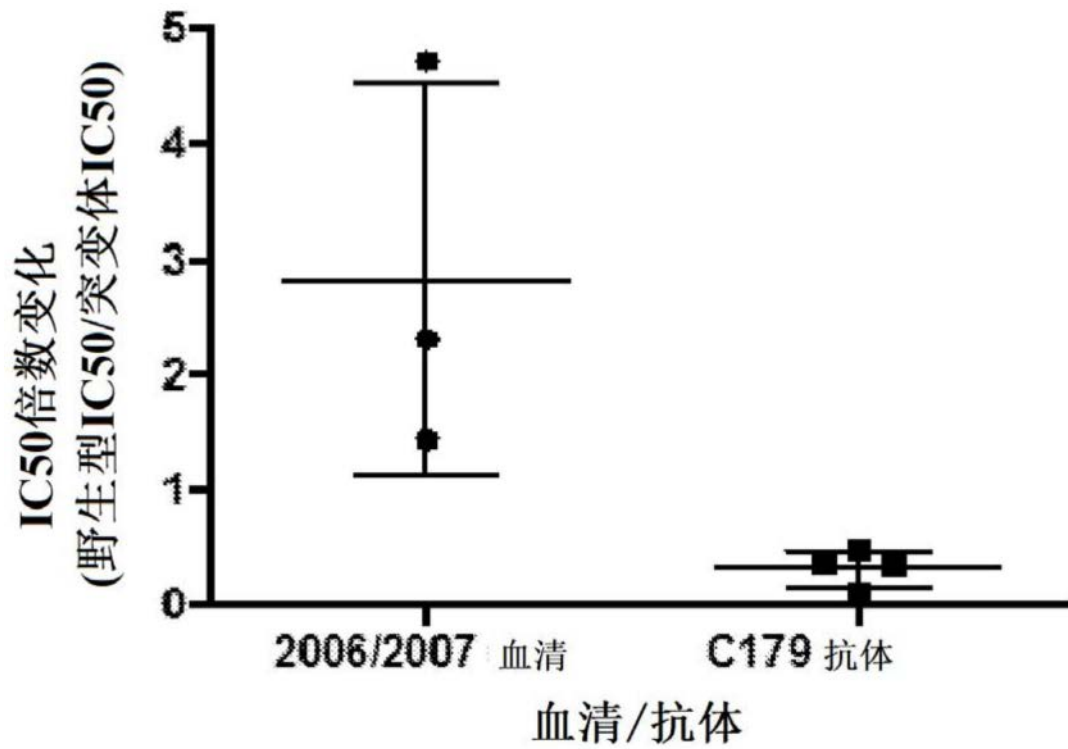


图5B

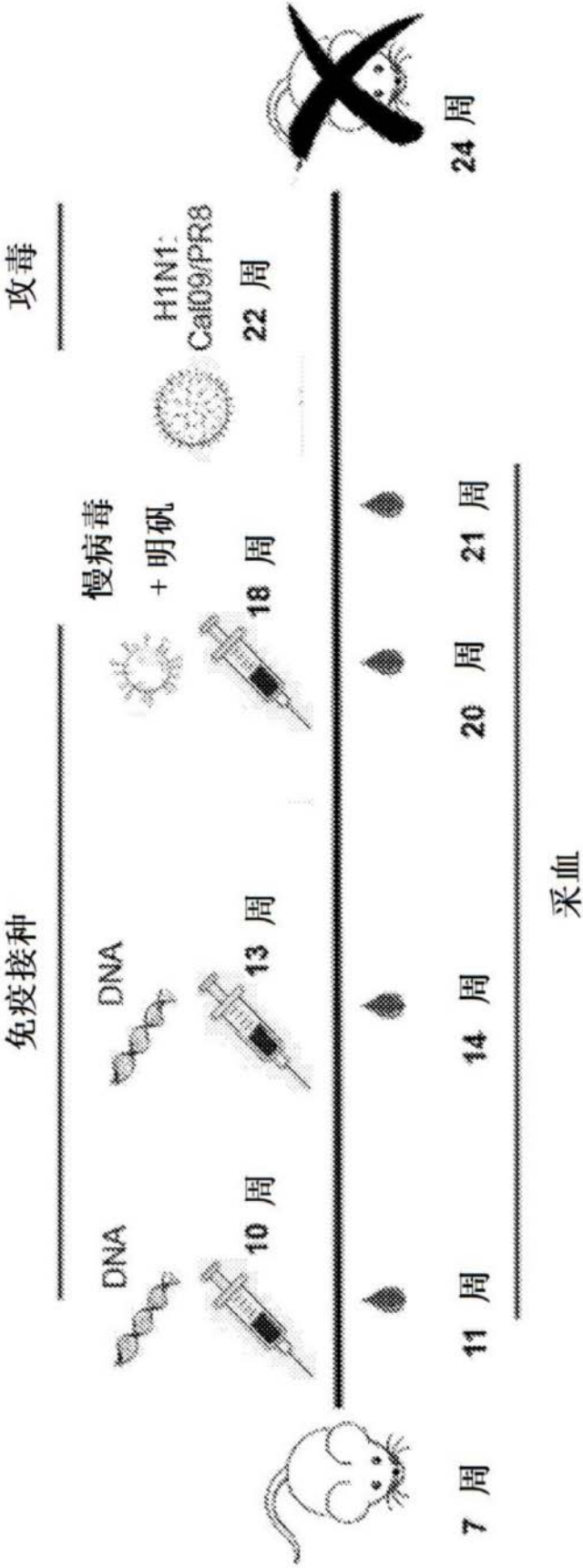


图6A

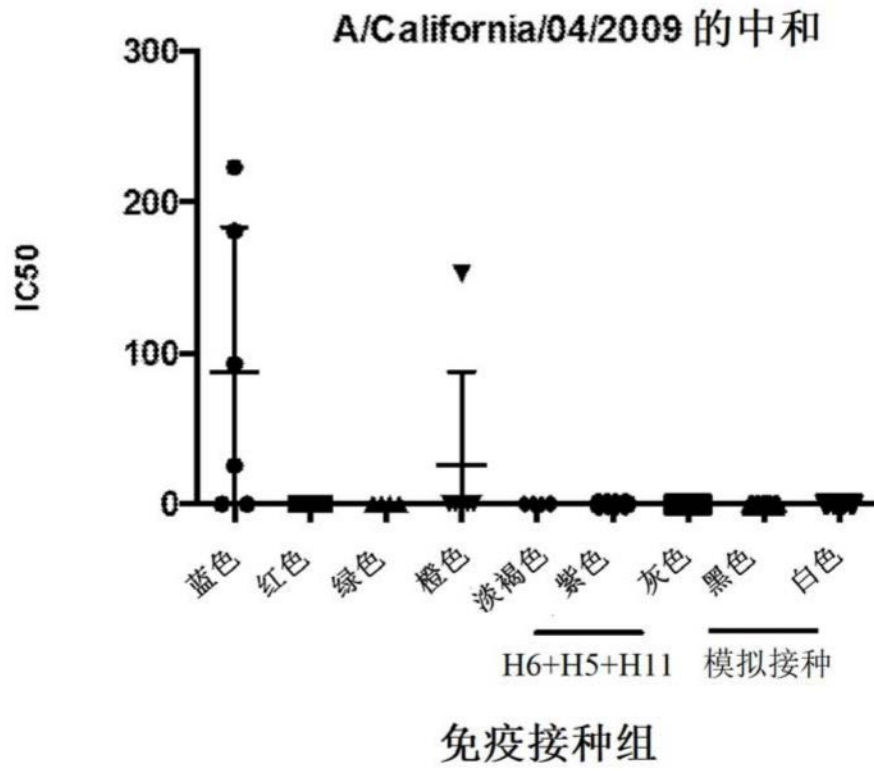


图6B

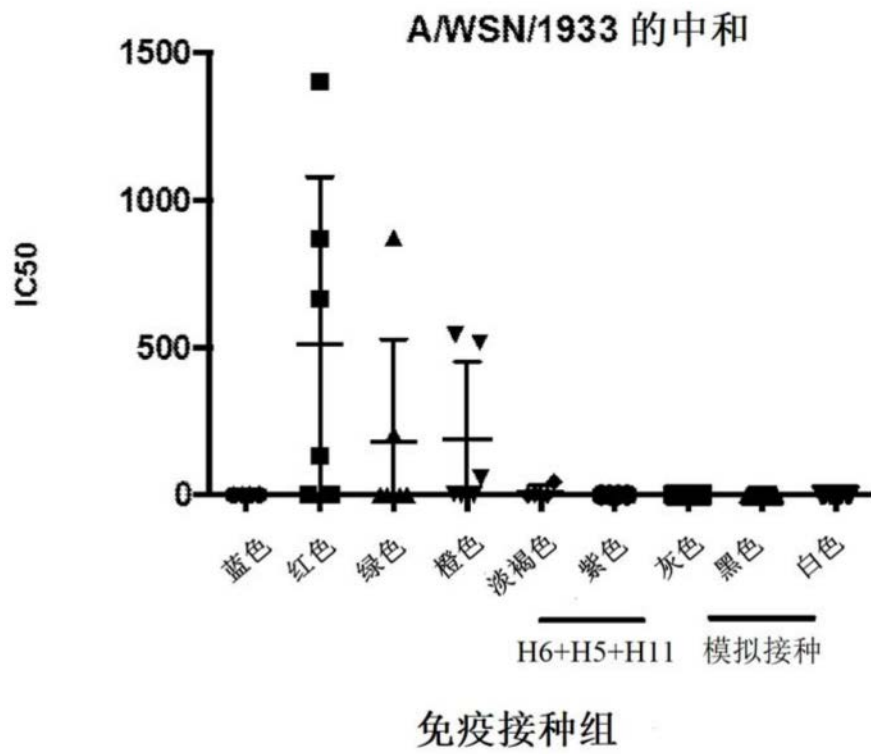


图6C

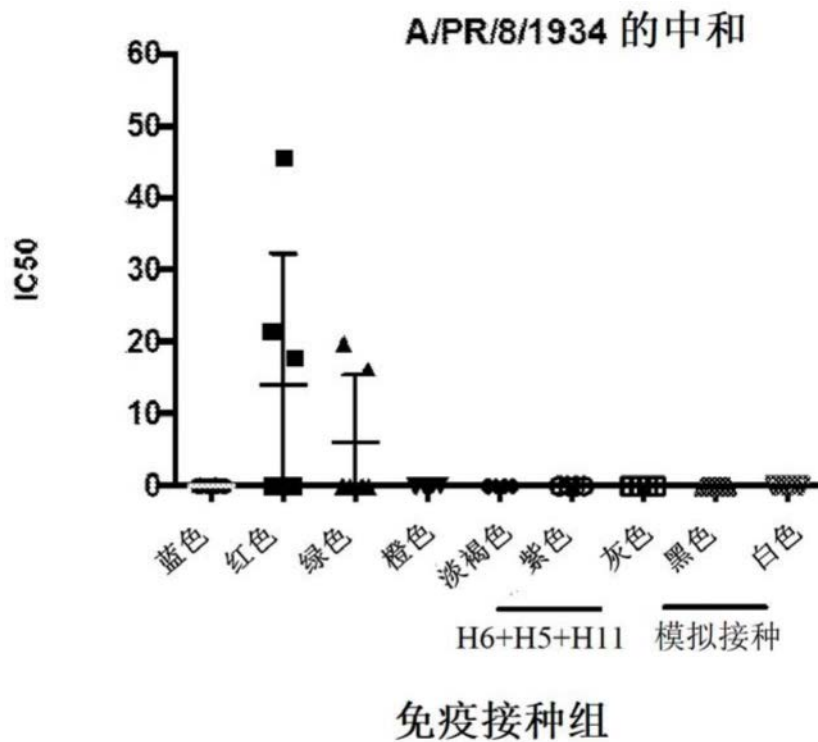


图6D

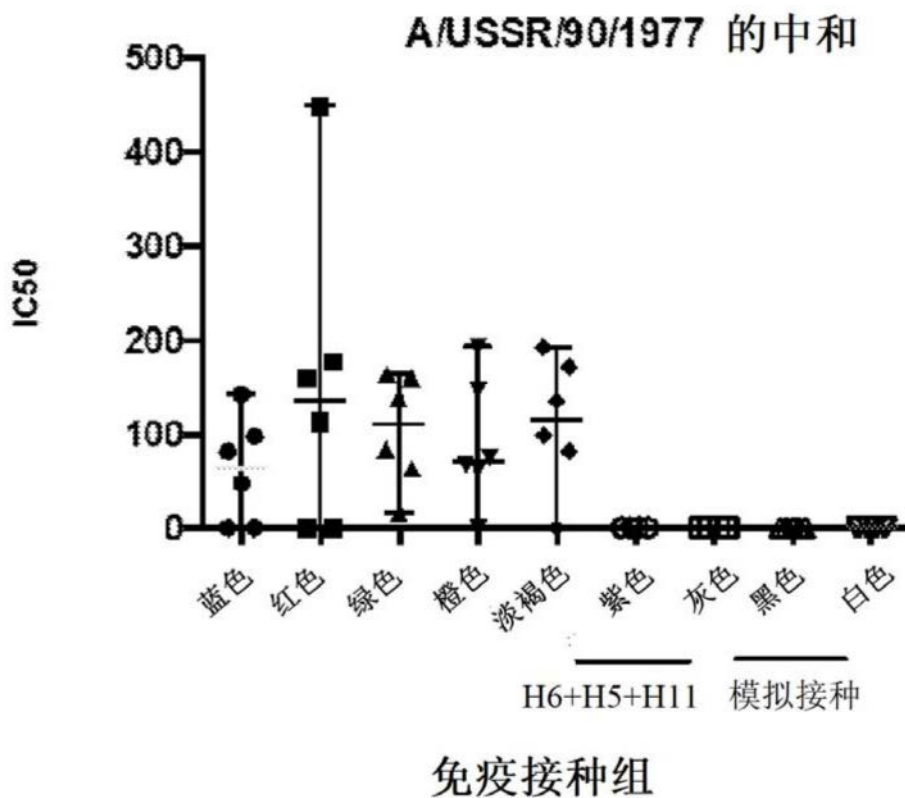


图6E

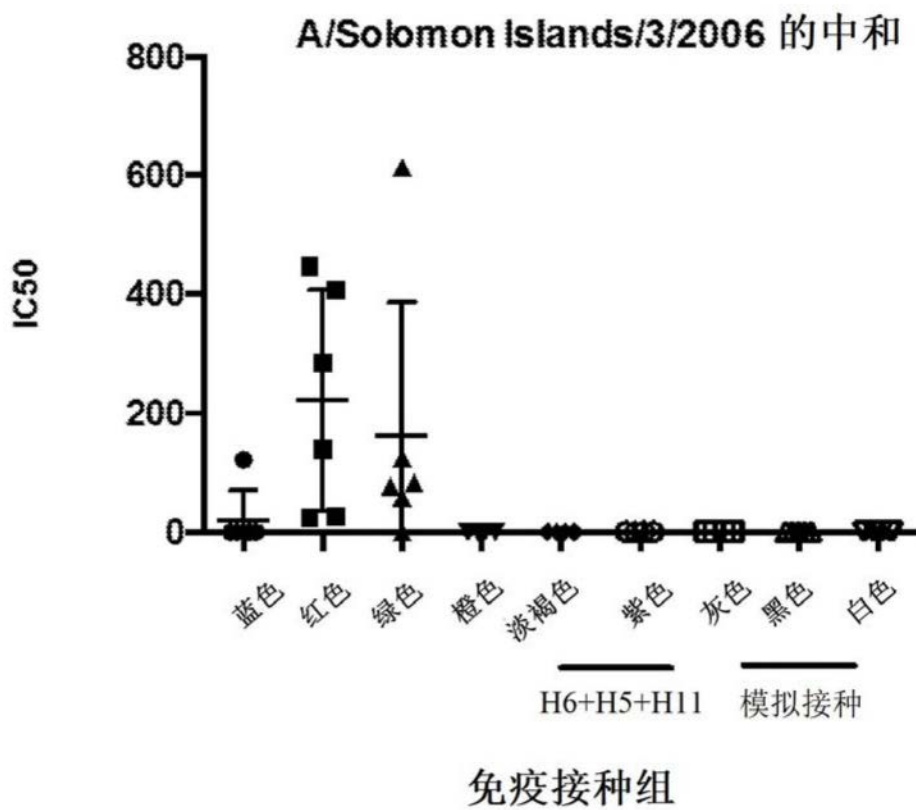


图6F

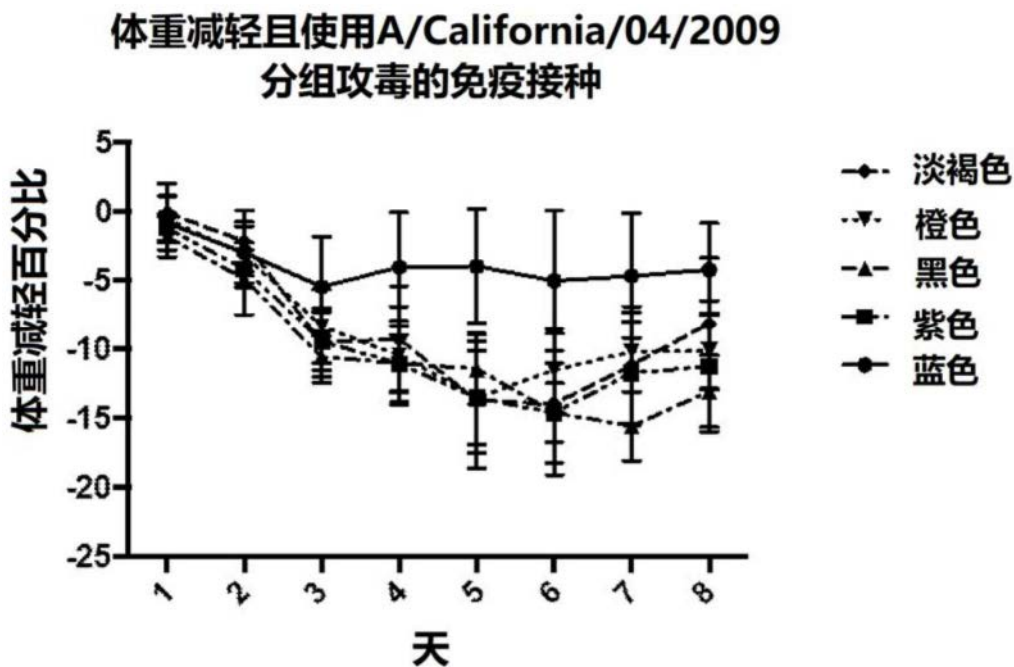


图6G

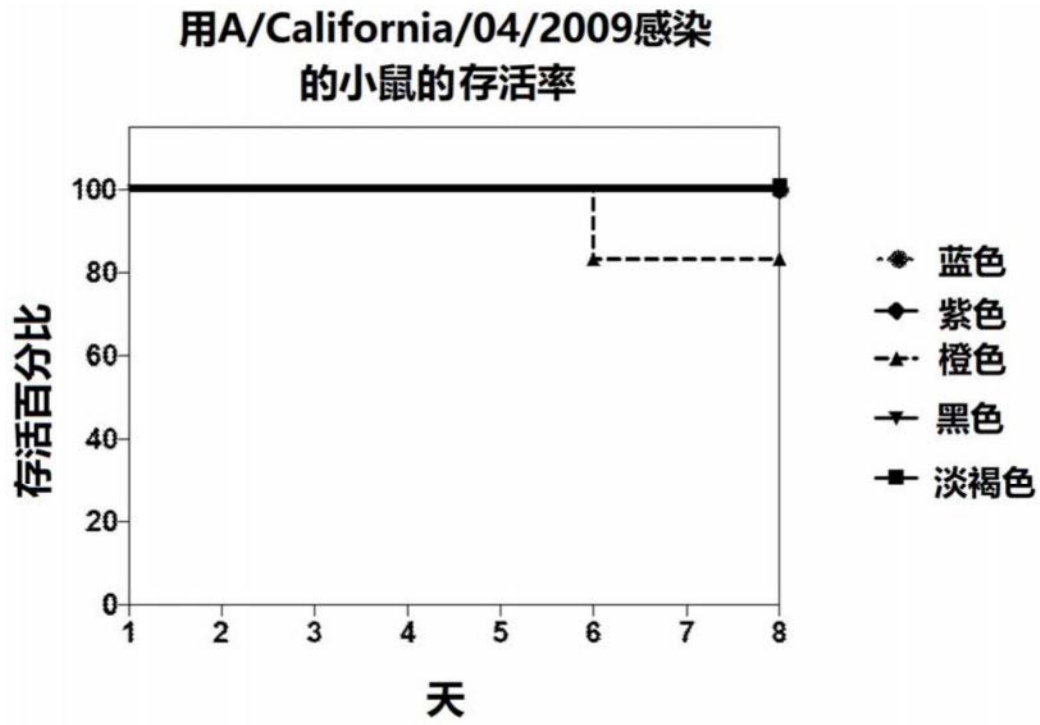


图6H

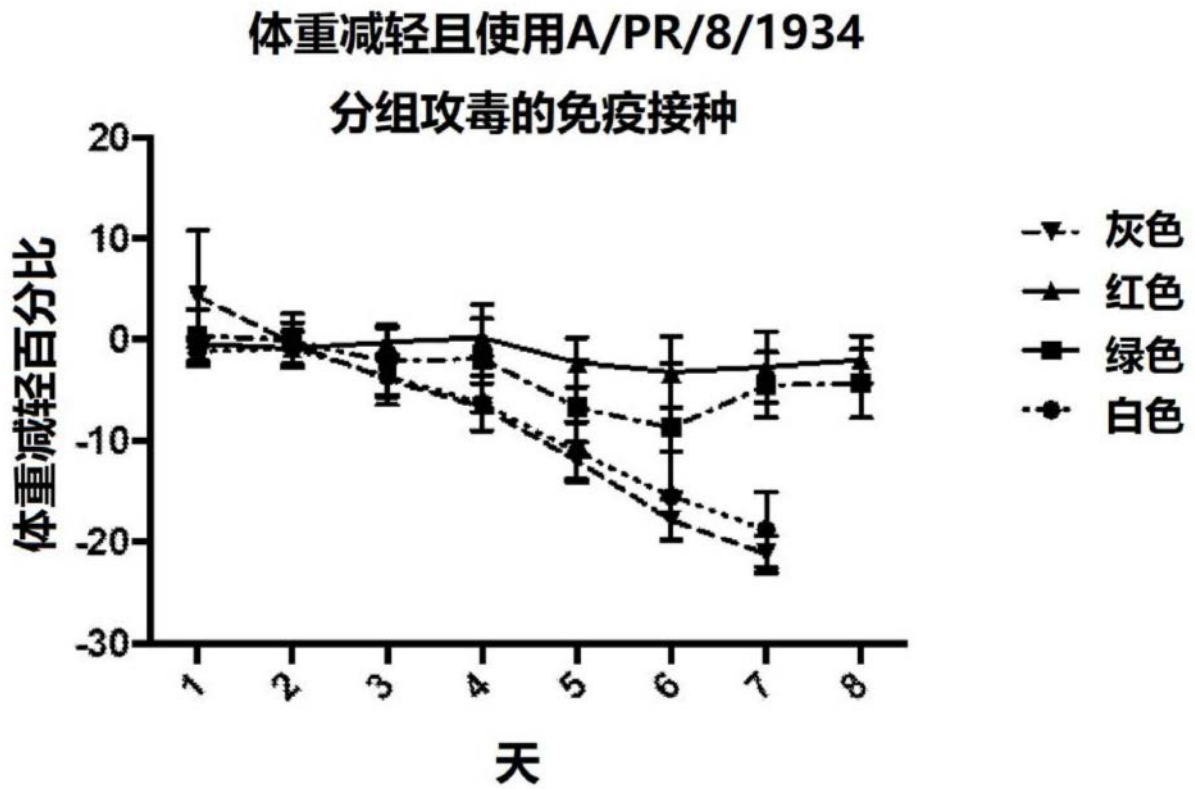


图6I

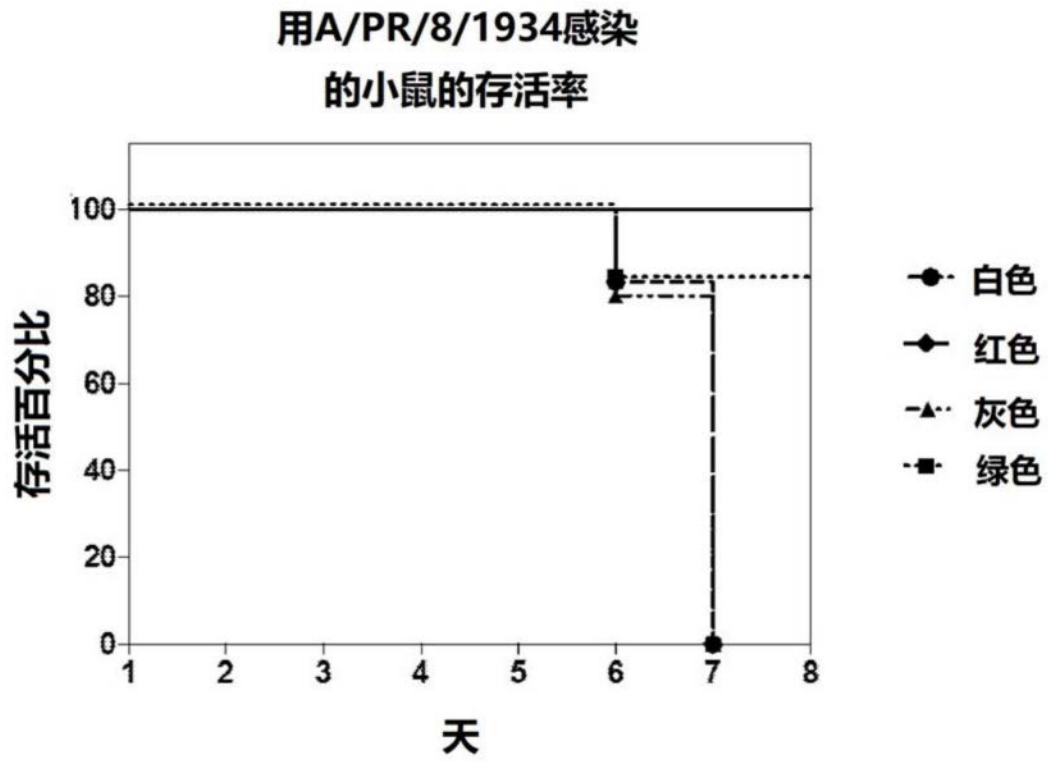


图6J

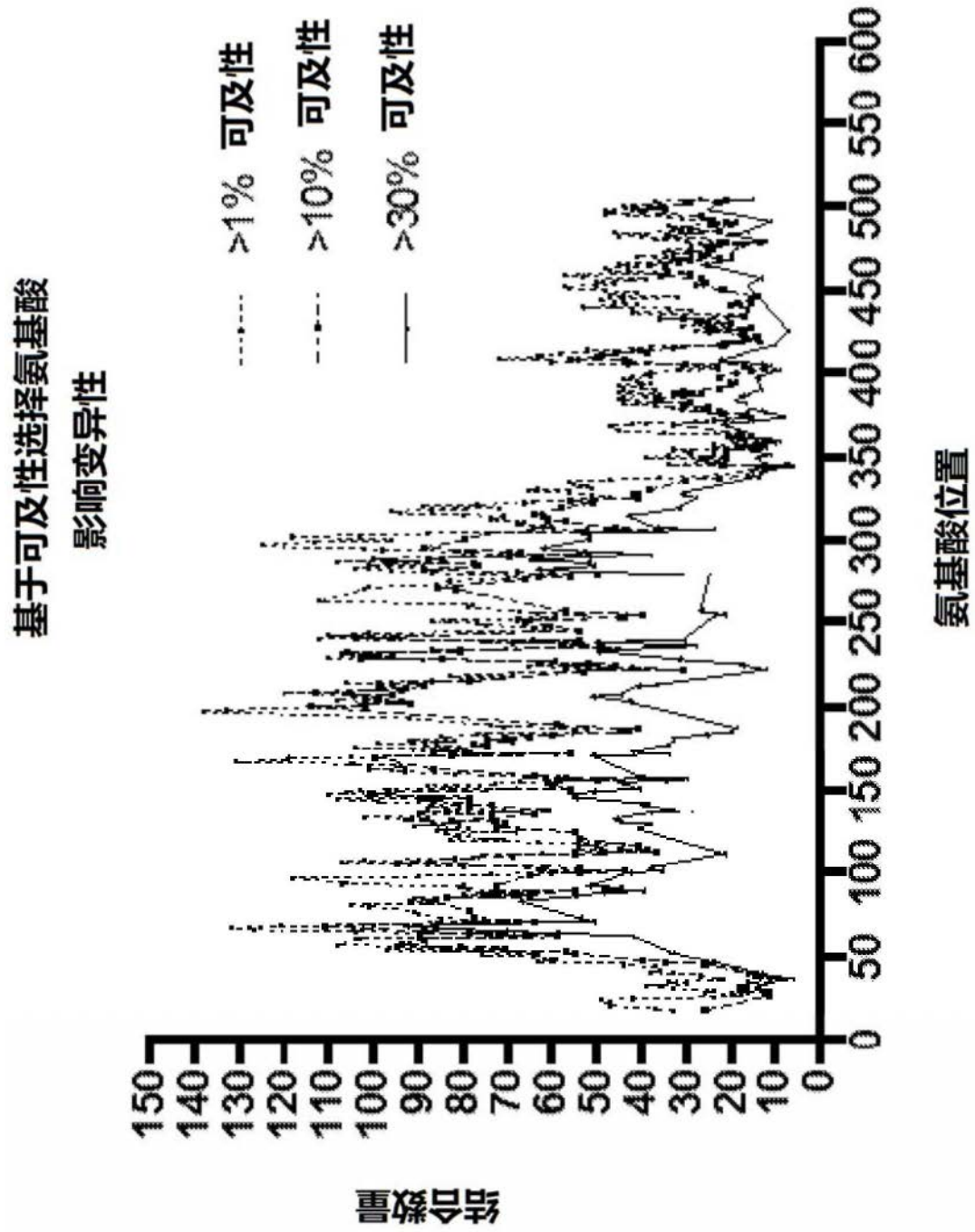


图7A

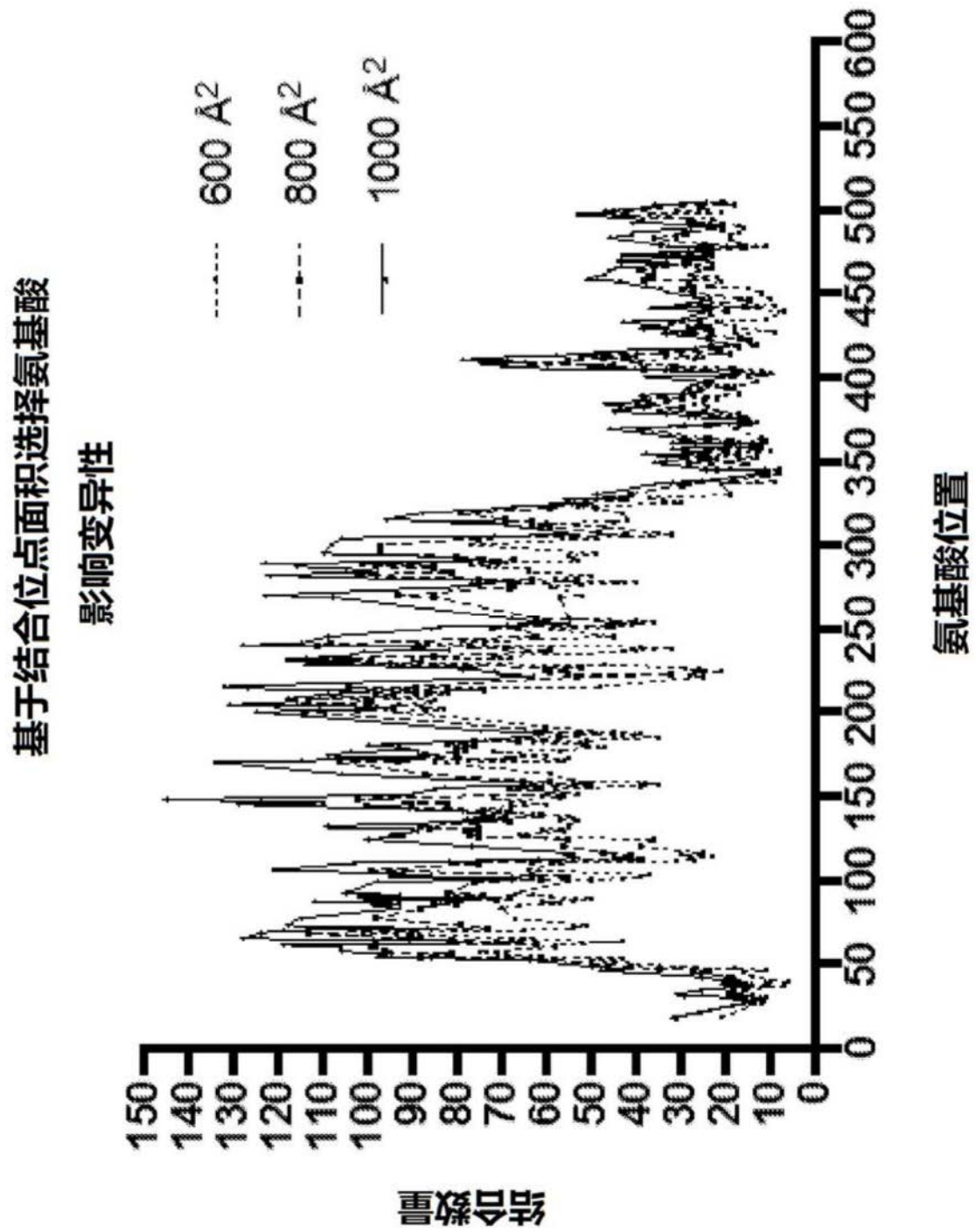


图7B

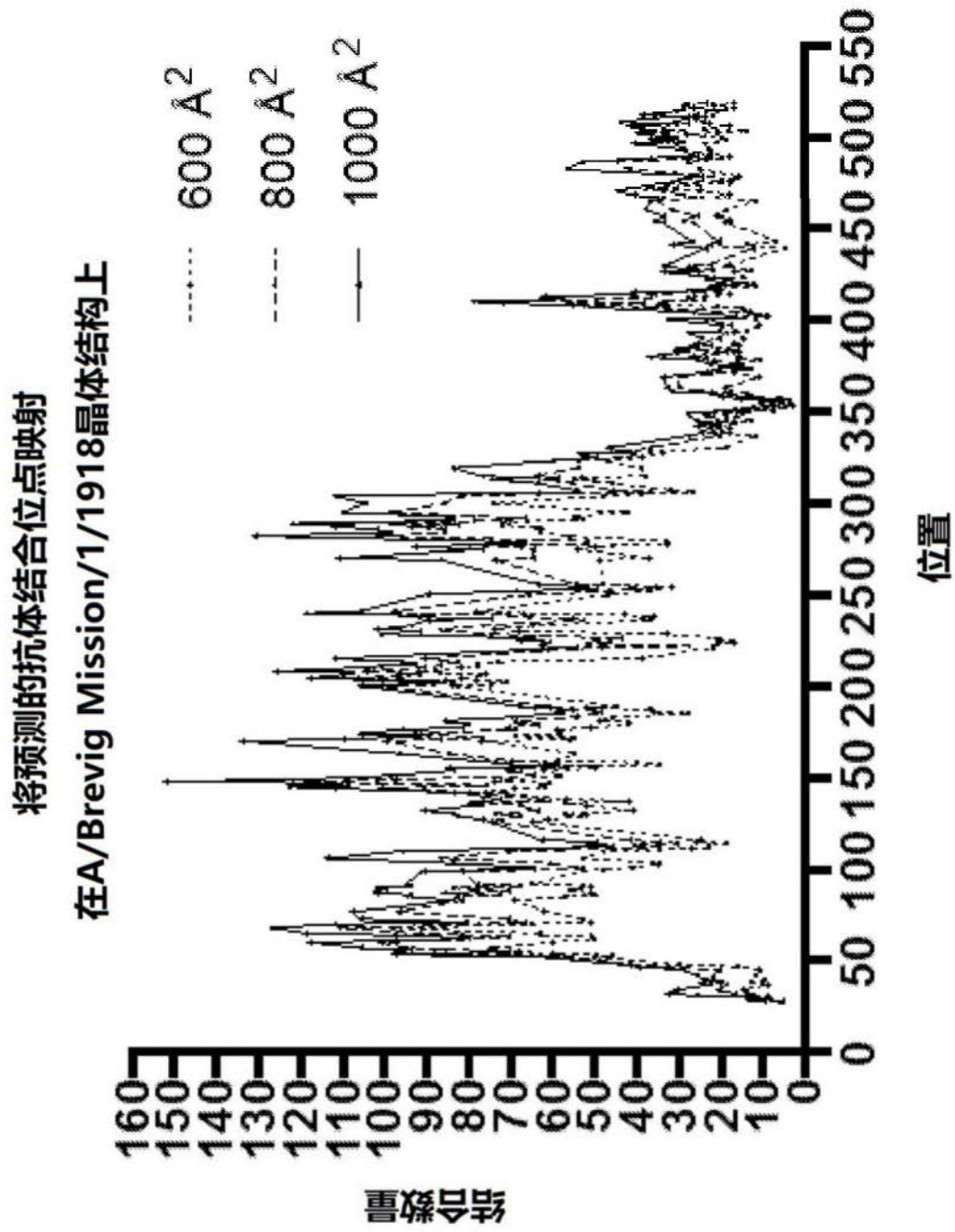


图7C

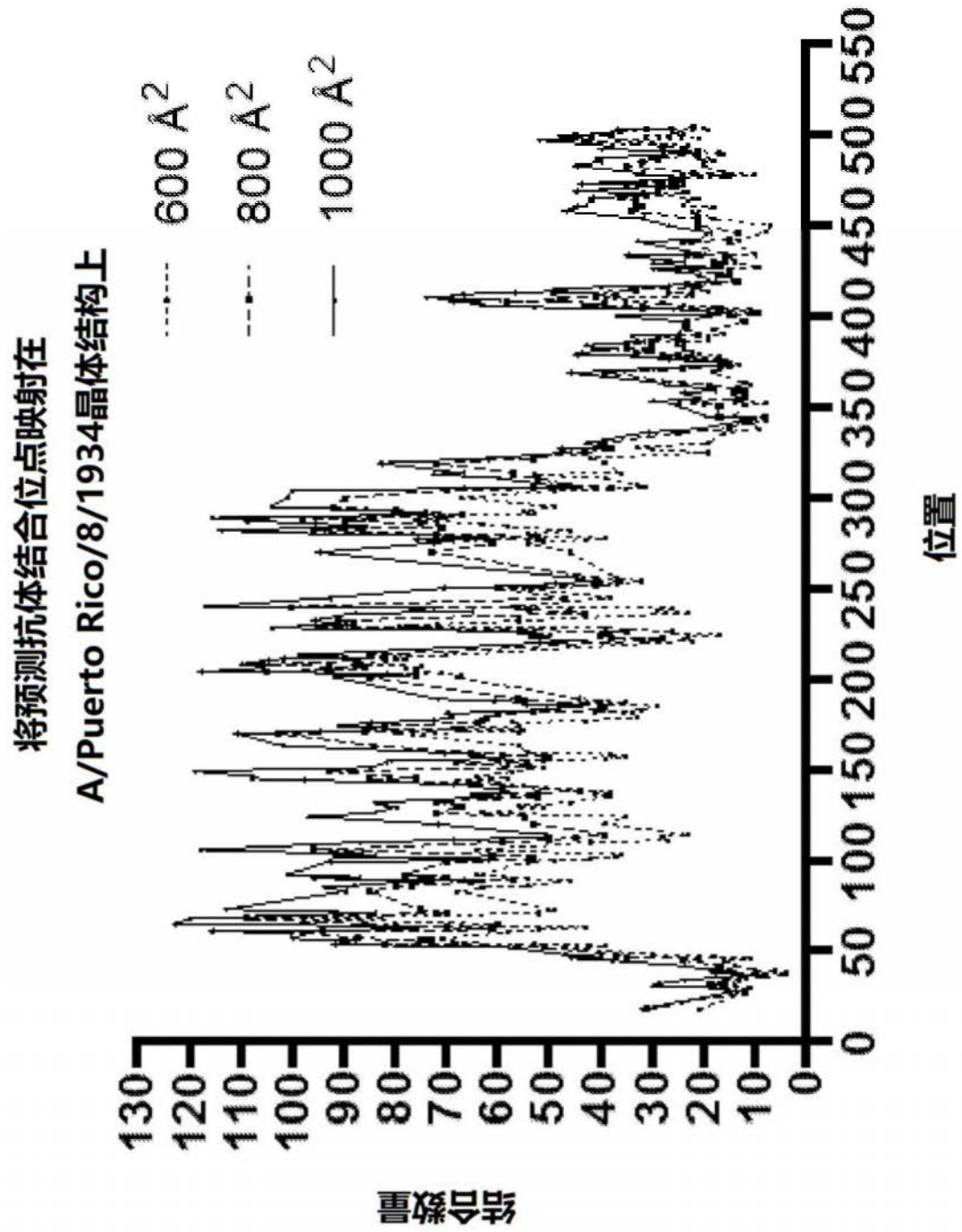


图7D

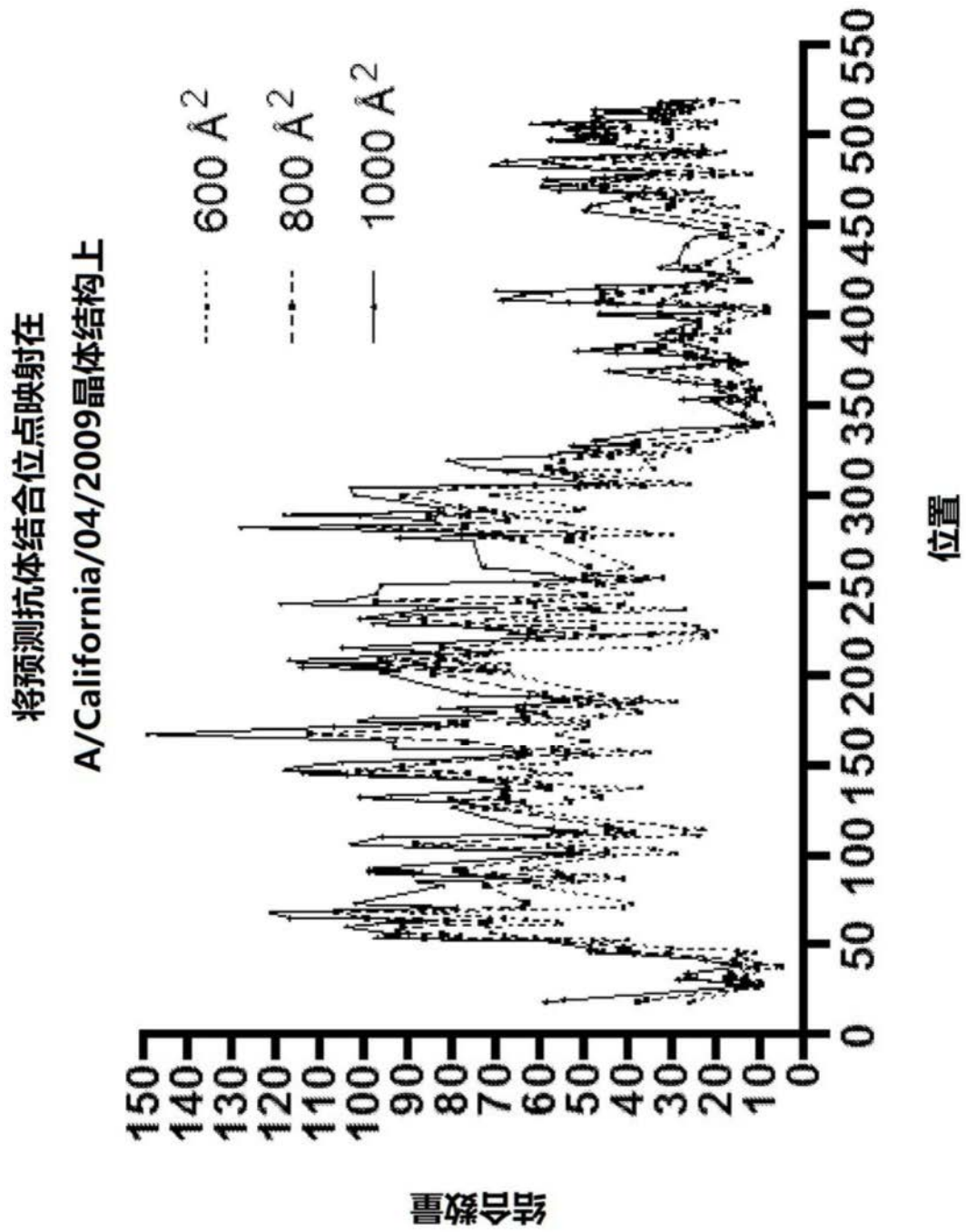


图7E

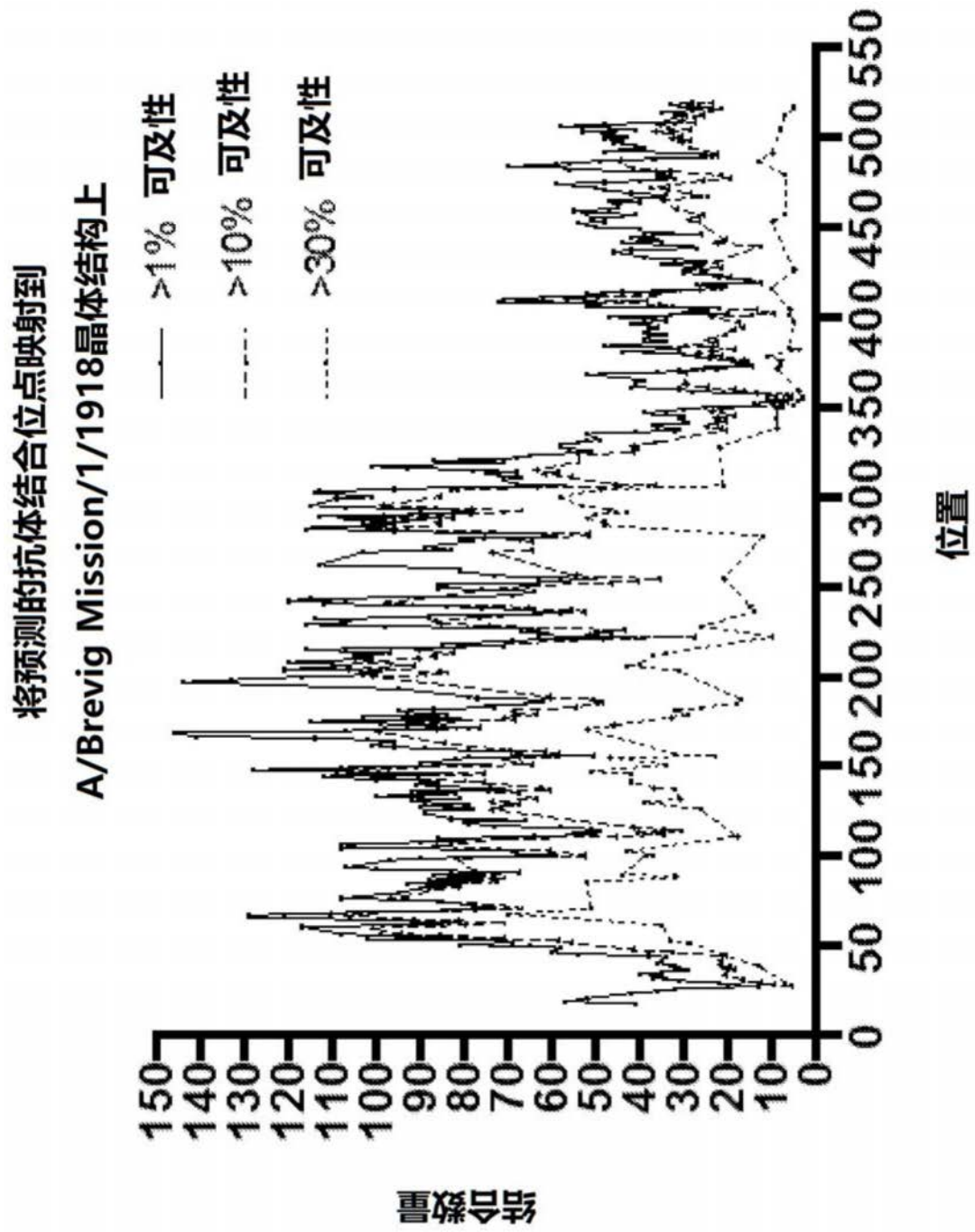


图7F

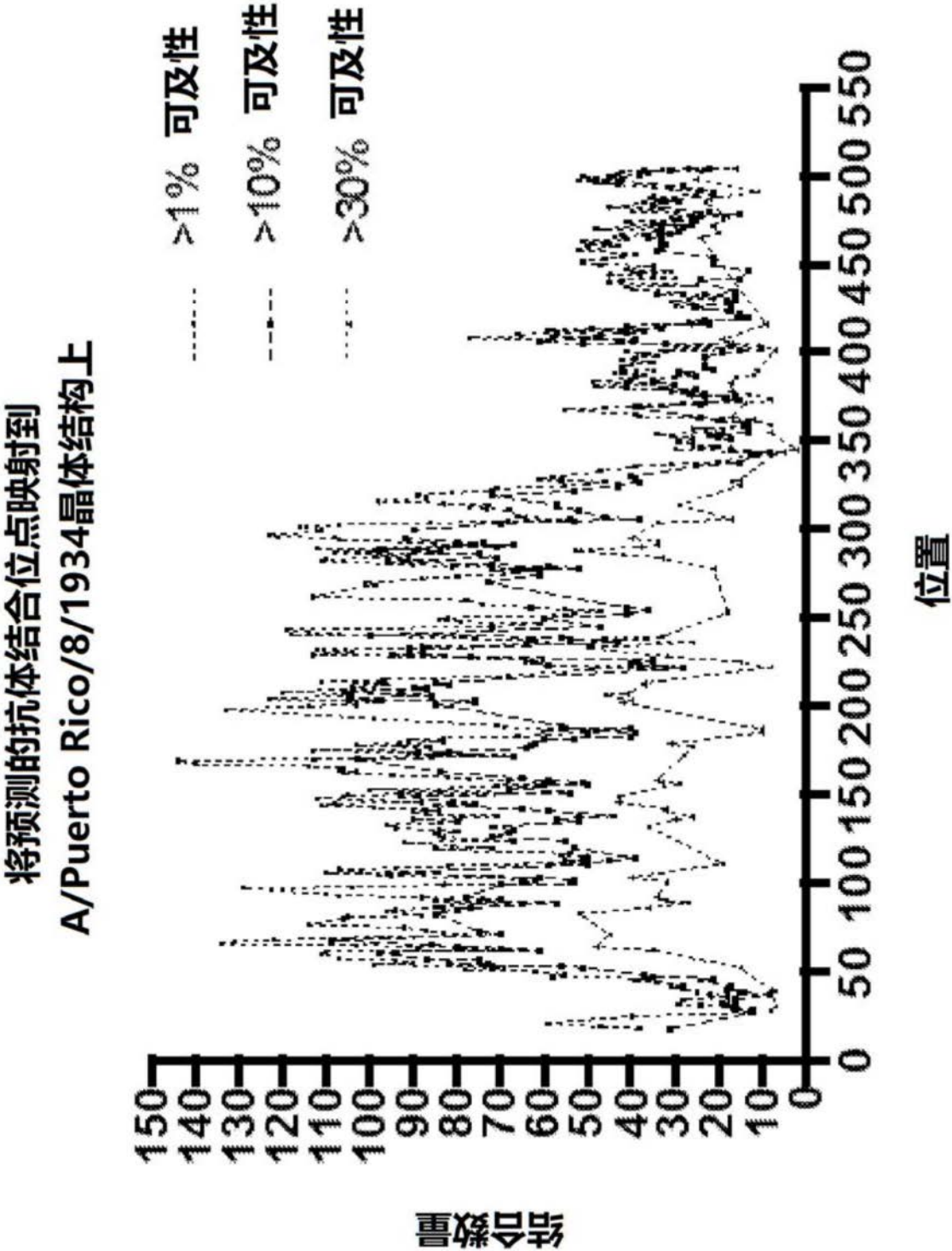


图7G

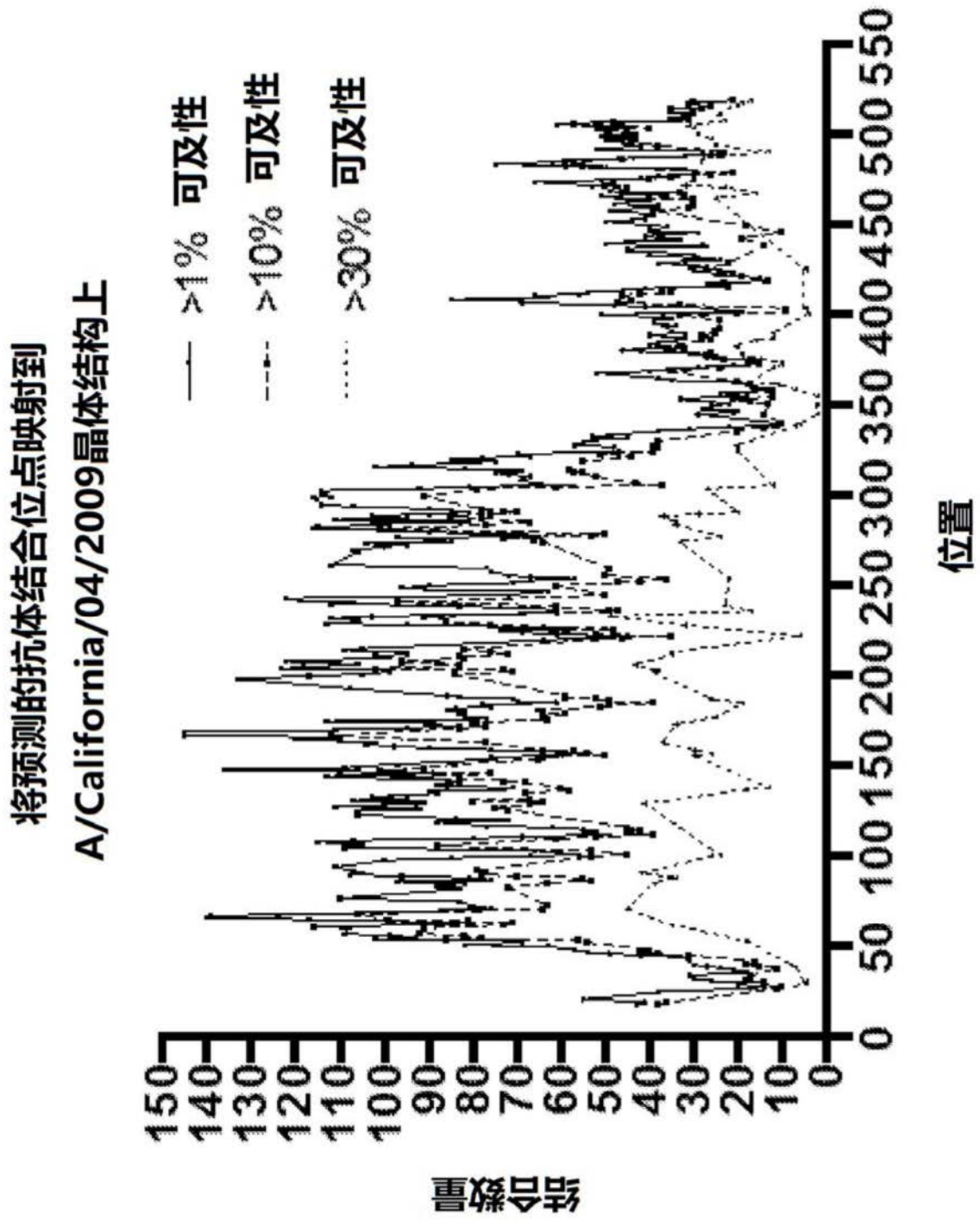


图7H

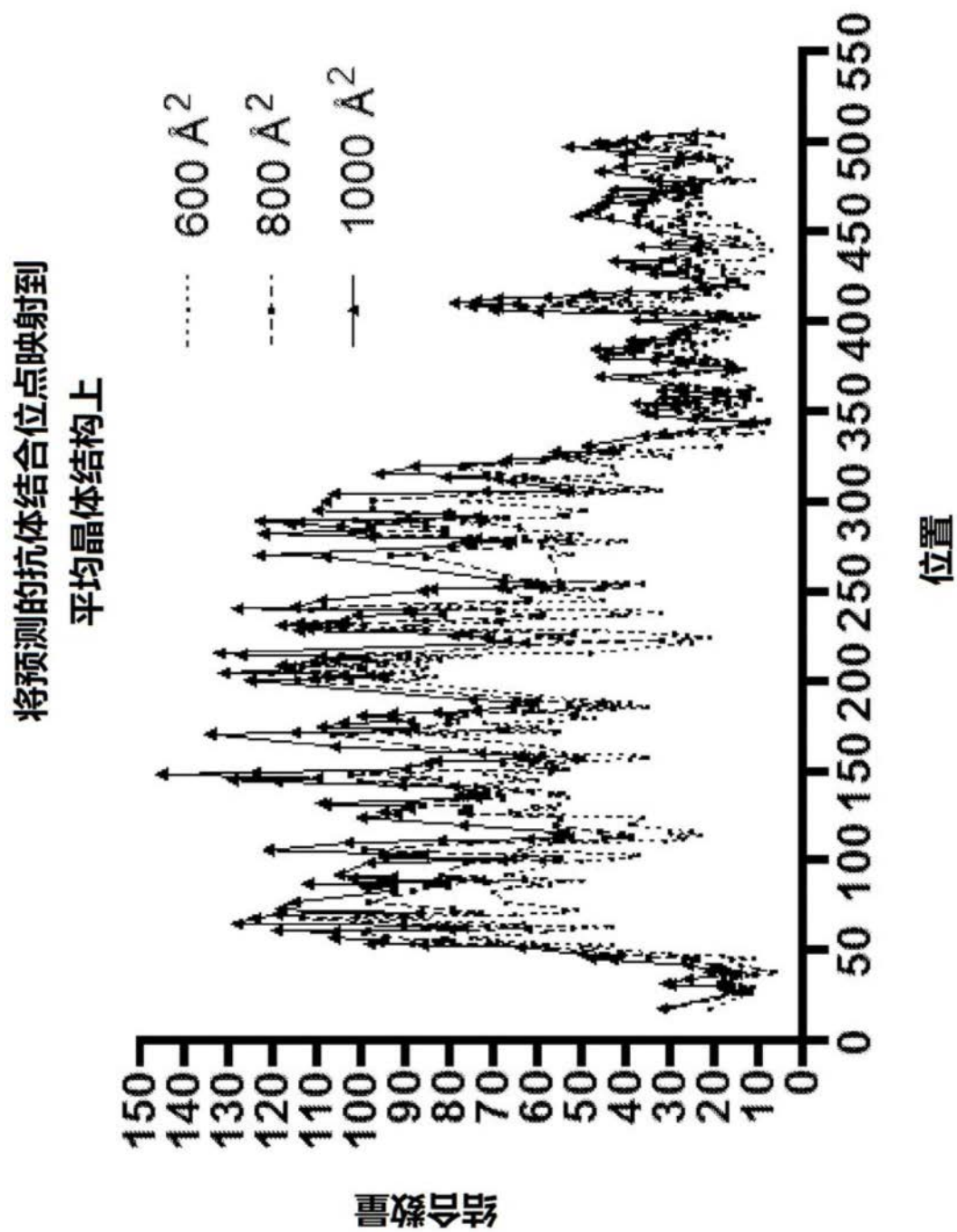


图7I

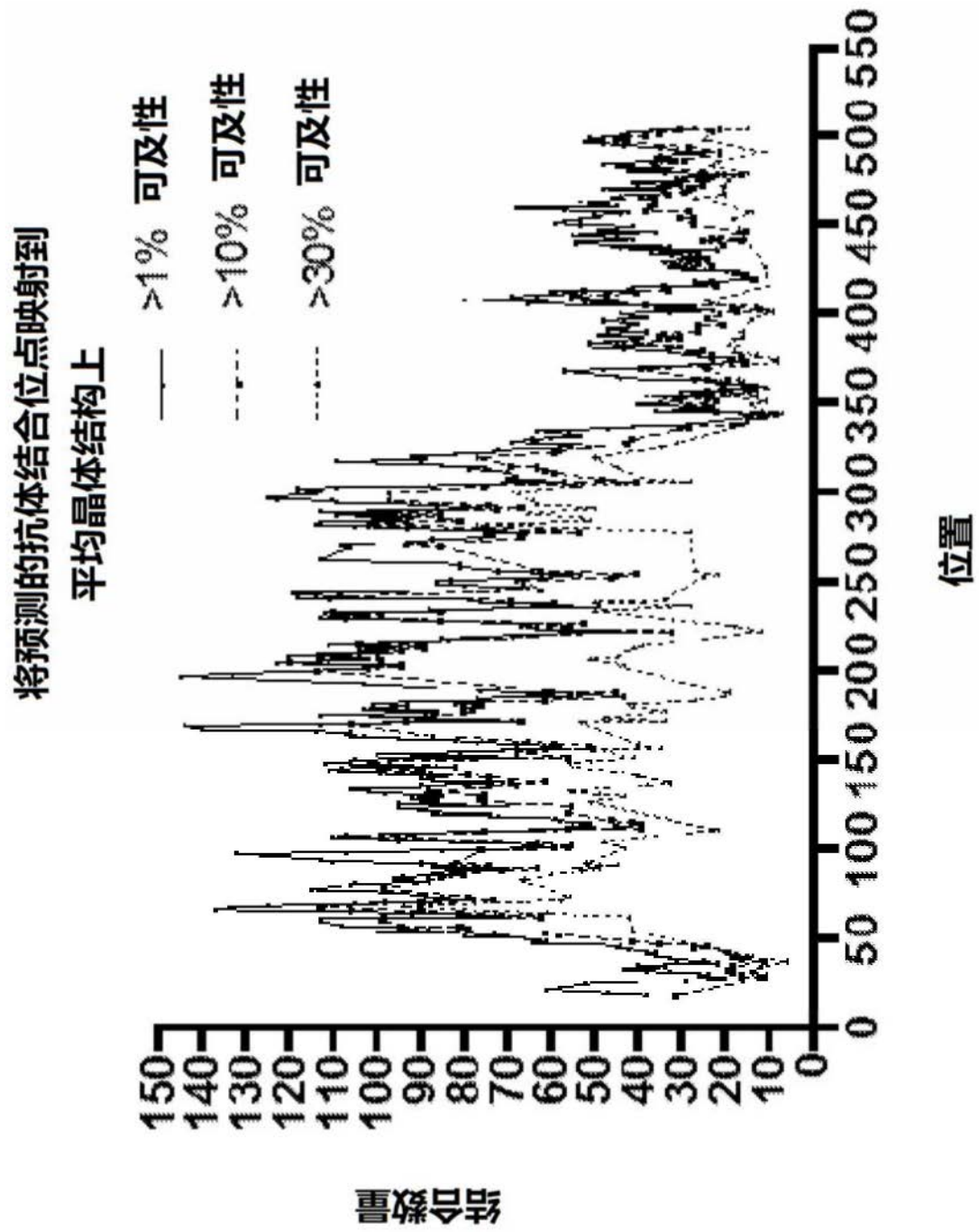


图7J

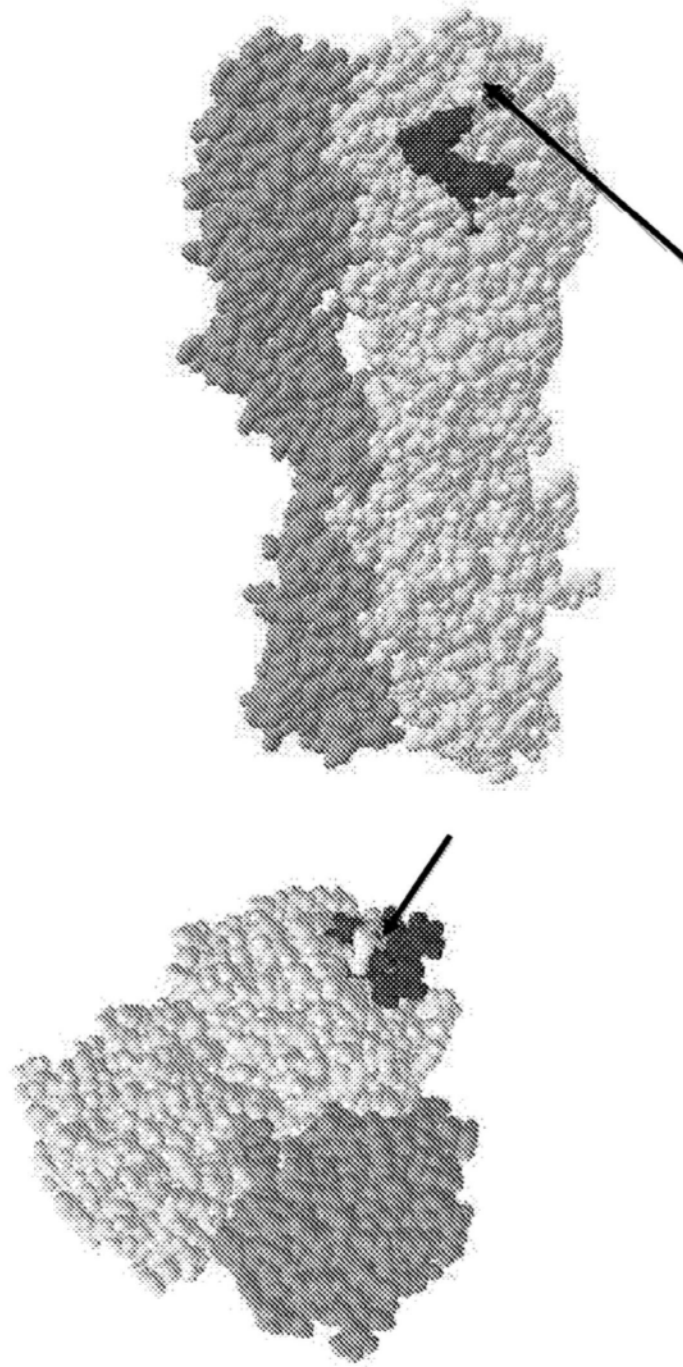


图8A

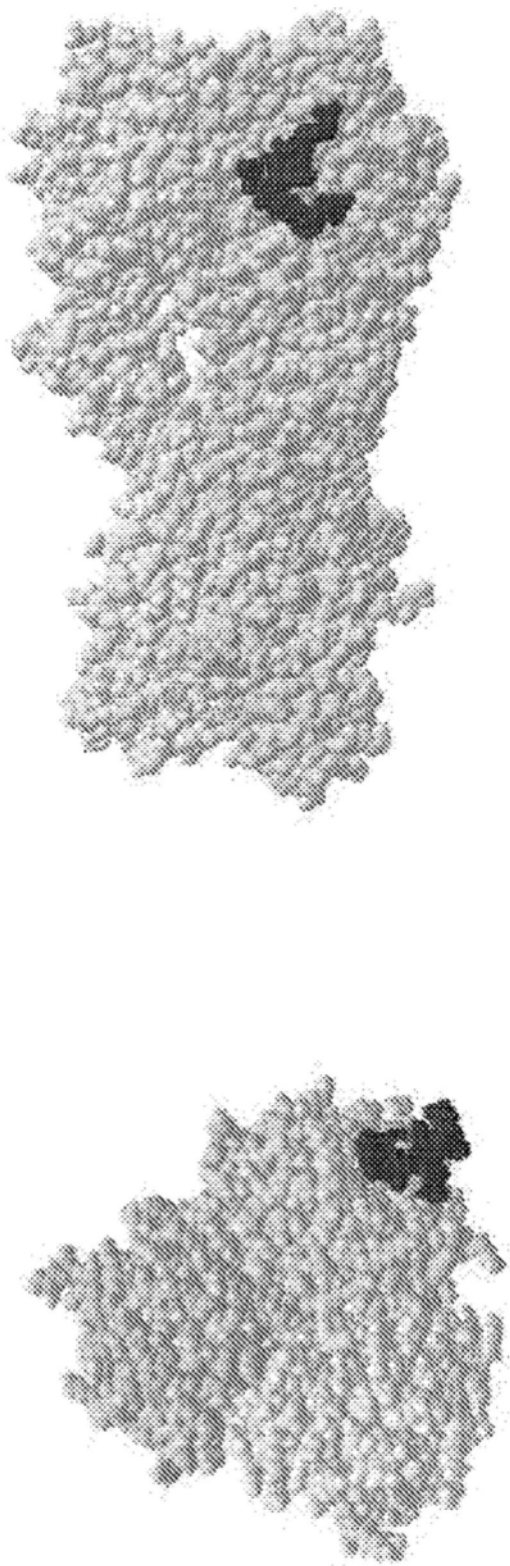


图8B

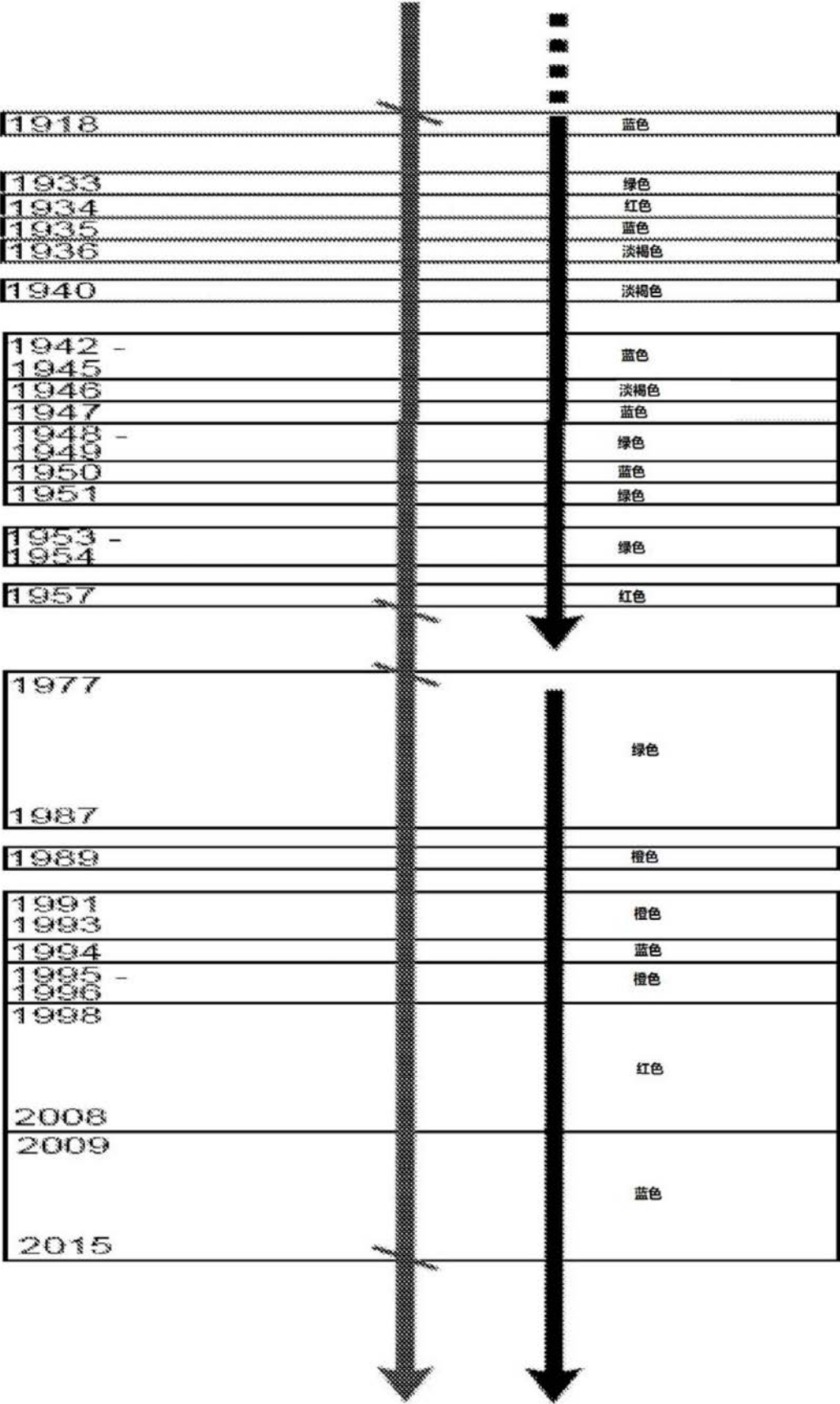


图9A

	83	85	146	147	148	149	151	154	155	156	157	158	159	163
2009 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
2010 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
2011 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
2012 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
2013 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
2014 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
2015 共有	E	E	N	K	G	V	A	P	H	A	G	A	K	K
1918 共有	E	D	T	K	G	V	A	S	H	A	G	A	S	R
1942 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	A	G	K	C	R
1935 共有	E	D	T	K	G	V	A	S	H	A	G	K	S	R
1994 共有	E	E	N	R	G	V	A	P	H	A	G	A	N	R
1950 共有	E	E	I/T	R	G	V	A	S	H	A	G	K	S	K
1947 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	A	G	K	S	K
1945 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	A	G	K	S	R
1945 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	A	G	K	S	R
1943 共有	E	E	A	R	G	V	A	S	H	A	G	K	S	R

第1组
(蓝色)

	83	85	146	147	148	149	151	154	155	156	157	158	159	163
1946 共有	E	E	D/T/N	I	G	V	A	S	H	A	G	K	S	K
1940 共有	E	E	N	I	G	V	A	S	H	A	G	K	S	K
1936 共有	E	D	N	I	G	V	A	S	H	A	G	K	S	R

第2组
(淡褐色)

图9B

1951 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	A	K	K	S	K
1954 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	A	K	K	S	K
1953 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	A	R	K	S	K
1948 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1949 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1977 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1978 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1979 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1980 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1982 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1985 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1981 共有	E	E	T	R	G	V	A	S	H	K	G	K	C	R
1933 共有	E	D	L	K	G	V	A	S	H	G/R	G	K	S	R
1983 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1984 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1986 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R
1987 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	K	G	K	S	R

第3组
(绿色)

图9C

	83	85	146	147	148	149	151	154	155	156	157	158	159	163
1989 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
1992 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
1993 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
1991 共有	K	E	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
1995 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	K
1996 共有	E	E	T	K	G	V	A	S	H	N	G	K	S	K

	83	85	146	147	148	149	151	154	155	156	157	158	159	163
1998 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
1999 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2000 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2001 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2002 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2003 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2004 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2005 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2006 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	K	S	R
2007 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	E	S	R
2008 共有	E	E	T	-	G	V	A	S	H	N	G	E	S	R
1934 共有	E	D	N	-	G	V	A	S	H	E	G	K	S	R
1957 共有	E	E	R	-	G	V	A	P	H	A	R	K	S	K

图9D

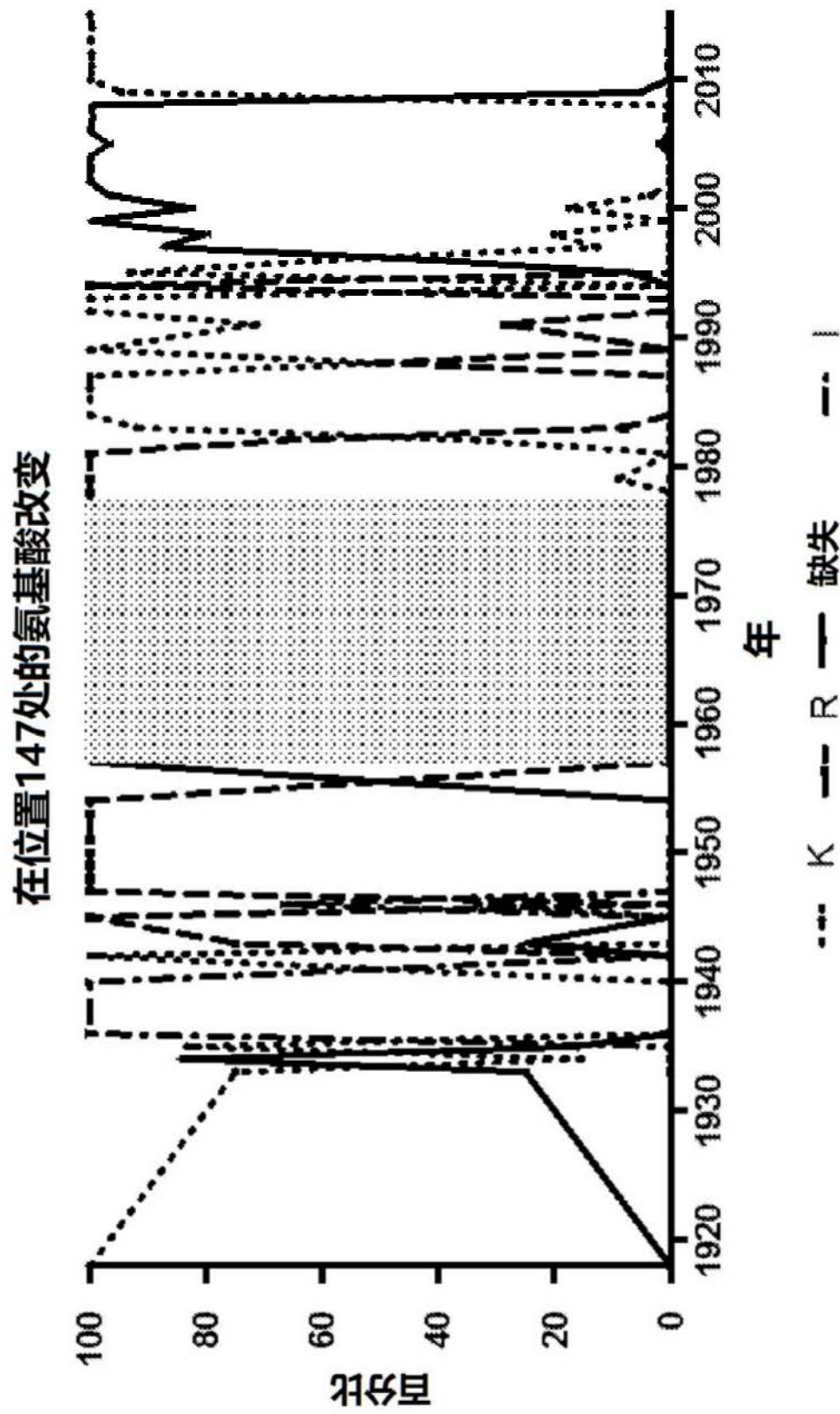


图10