



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106995488 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201710128479.0

C12N 7/04(2006.01)

(22)申请日 2012.06.20

A61K 39/145(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 31/16(2006.01)

61/498,800 2011.06.20 US

(62)分案原申请数据

201280039877.0 2012.06.20

(71)申请人 高等教育联邦系统-匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚

(72)发明人 T·M·罗斯 B·M·吉尔斯

C·J·克里瓦尔

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健 林晓红

(51)Int.Cl.

C07K 14/11(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表33页 附图7页

(54)发明名称

计算优化的宽反应性的H1N1流感抗原

(57)摘要

本文描述了用于引起针对H1N1流感病毒分离株的宽反应性的免疫应答的优化的H1N1流感HA多肽的产生。基于选择的分离自1918-2011年的H1N1病毒,通过一系列的HA蛋白比对和随后的共有序列产生,开发了优化的HA多肽。本文提供了优化的H1N1HA多肽以及包含所述HA多肽的组合物、融合蛋白和VLP。还提供了编码所述HA多肽的密码子优化的核酸序列。本公开还提供了在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的方法。

1. 一种重组流感血凝素 (HA) 多肽, 包含SEQ ID NO:2的2-566位残基、与SEQ ID NO:3的2-566位残基至少99%相同、与SEQ ID NO:4的2-566位残基至少99%相同、与SEQ ID NO:5的2-566位残基至少98%相同、与SEQ ID NO:6的2-566位残基至少99%相同、与SEQ ID NO:7的2-566位残基至少97%相同、与SEQ ID NO:8的2-566位残基至少99%相同、包含SEQ ID NO:9的2-566位残基、与SEQ ID NO:10的2-566位残基至少99%相同、或与SEQ ID NO:11的2-566位残基至少99%相同的氨基酸序列。

2. 权利要求1的流感HA多肽, 包含含有SEQ ID NO:2、与SEQ ID NO:3至少99%相同、与SEQ ID NO:4至少99%相同、与SEQ ID NO:5至少98%相同、与SEQ ID NO:6至少99%相同、与SEQ ID NO:7至少97%相同、与SEQ ID NO:8至少99%相同、包含SEQ ID NO:9、与SEQ ID NO:10至少99%相同、或与SEQ ID NO:11至少99%相同的氨基酸序列。

3. 权利要求1的流感HA多肽, 包含SEQ ID NO:2的2-566位残基、SEQ ID NO:3的2-566位残基、SEQ ID NO:4的2-566位残基、SEQ ID NO:5的2-566位残基、SEQ ID NO:6的2-566位残基、SEQ ID NO:7的2-566位残基、SEQ ID NO:8的2-566位残基、SEQ ID NO:9的2-566位残基、SEQ ID NO:10的2-566位残基或SEQ ID NO:11的2-566位残基。

4. 权利要求1的流感HA多肽, 由SEQ ID NO:2的2-566位残基、SEQ ID NO:3的2-566位残基、SEQ ID NO:4的2-566位残基、SEQ ID NO:5的2-566位残基、SEQ ID NO:6的2-566位残基、SEQ ID NO:7的2-566位残基、SEQ ID NO:8的2-566位残基、SEQ ID NO:9的2-566位残基、SEQ ID NO:10的2-566位残基或SEQ ID NO:11的2-566位残基组成。

5. 权利要求2的流感HA多肽, 包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

6. 权利要求2的流感HA多肽, 由SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

7. 一种重组流感血凝素 (HA) 多肽, 其中所述多肽的氨基酸序列包含:

- (i) 相对于SEQ ID NO:2不多于3个氨基酸置换;
- (ii) 相对于SEQ ID NO:3不多于6个氨基酸置换;
- (iii) 相对于SEQ ID NO:4不多于8个氨基酸置换;
- (iv) 相对于SEQ ID NO:5不多于10个氨基酸置换;
- (v) 相对于SEQ ID NO:6不多于8个氨基酸置换;
- (vi) 相对于SEQ ID NO:7不多于10个氨基酸置换;
- (vii) 相对于SEQ ID NO:8不多于10个氨基酸置换;
- (viii) 相对于SEQ ID NO:10不多于8个氨基酸置换; 或
- (ix) 相对于SEQ ID NO:11不多于5个氨基酸置换。

8. 编码权利要求1-7任一项的流感HA多肽的分离的核酸分子。

9. 权利要求8的分离的核酸分子, 其中所述核酸分子为在哺乳动物细胞中表达而进行密码子优化。

10. 包含权利要求8或权利要求9的核酸分子的载体。

11. 权利要求10的载体, 还包含可操作地连接至编码所述流感HA多肽的核酸序列的启

动子。

12. 包含权利要求10或权利要求11的载体的分离的细胞。

13. 包含权利要求1-7任一项的流感HA多肽的流感病毒样颗粒 (VLP)。

14. 权利要求13的流感VLP, 还包含流感神经氨酸酶 (NA) 蛋白、流感基质 (M1) 蛋白或二者。

15. 包含权利要求1-7任一项的流感HA多肽的流感VLP, 其通过在足以使HA、M1和NA蛋白表达的条件下, 使用编码所述HA多肽的载体、编码流感NA蛋白的载体和编码流感M1蛋白的载体转染宿主细胞来产生。

16. 包含权利要求1-7任一项的流感HA多肽的融合蛋白。

17. 一种组合物, 其包含权利要求1-7任一项的流感HA多肽、权利要求16的融合蛋白或权利要求13-15任一项的VLP和可药用载体。

18. 权利要求1-7任一项的流感HA多肽、权利要求16的融合蛋白、权利要求13-15任一项的VLP或权利要求17的组合物在制备用于在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的药物中的应用。

19. 权利要求13-15任一项的VLP和可药用载体的组合物在制备用于针对流感病毒免疫受试者的药物中的应用。

20. 权利要求19的应用, 其中所述组合物还包含佐剂。

21. 权利要求19或权利要求20的应用, 其中所述组合物通过肌肉给予。

22. 权利要求19-21任一项的应用, 其中所述组合物包含1-25 μ g的所述VLP。

23. 权利要求22的应用, 其中所述组合物包含15 μ g的所述VLP。

计算优化的宽反应性的H1N1流感抗原

[0001] 本申请是2012年6月20日提交的题为“计算优化的宽反应性的H1N1流感抗原”的中国专利申请201280039877.0的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2011年6月20日提交的美国临时申请No.61/498,800的优先权,所述临时申请以引用的方式全文纳入本文。

技术领域

[0004] 本公开涉及可引起针对H1N1病毒分离株的宽反应性的免疫应答的优化的流感血凝素蛋白及其作为疫苗的用途。

背景技术

[0005] 流感病毒是正粘病毒科(Orthomyxoviridae)家族的成员。有三个亚型的流感病毒,命名为A型流感、B型流感和C型流感。所述流感病毒粒子含有分段的负义RNA基因组,所述基因组编码以下蛋白:血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、基质(M1)、质子离子通道蛋白(M2)、核蛋白(NP)、聚合酶碱性蛋白1(PB1)、聚合酶碱性蛋白2(PB2)、聚合酶酸性蛋白(PA)和非结构蛋白2(NS2)。HA、NA、M1和M2为膜相关蛋白,而NP、PB1、PB2、PA和NS2为核衣壳相关蛋白。M1蛋白是流感颗粒中最丰富的蛋白质。HA和NA蛋白是包膜糖蛋白,负责病毒吸附和病毒颗粒侵入细胞,并且是用于病毒中和及保护性免疫的主要免疫显性表位的来源。HA和NA蛋白都被认为是预防性流感疫苗的最重要组分。

[0006] 每年,季节性流感仅在美国就导致超过300000例入院和36000例死亡(Simonsen等Lancet Infect Dis 7:658-66,2007)。2009年新型H1N1流感病毒的出现表明新的流感大流行可如此快速地横扫全球。

[0007] 目前在美国有两种获得批准的流感疫苗方法——灭活的裂解疫苗和减毒活病毒疫苗。灭活疫苗可有效地诱导体液免疫应答,但通常只有弱的细胞免疫应答。活病毒疫苗不能给予免疫减弱的或怀孕的患者,因为这些患者具有增加的感染风险。因此,存在对宽保护性流感病毒疫苗的需求。

发明内容

[0008] 本文公开了用于引起针对H1N1流感病毒分离株的宽反应性的免疫应答的优化的H1N1流感HA多肽的产生。基于选择的分离自1918-2011年的H1N1病毒,通过一系列的HA蛋白比对和随后共有序列的产生,开发了所述优化的HA多肽。

[0009] 本文提供了用于引起针对H1N1流感的宽反应性的免疫应答的具有优化的氨基酸序列的重组流感HA多肽。在一些实施方案中,所述HA多肽包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、

SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11相比,所述多肽的氨基酸序列包含不多于5、不多于6、不多于7、不多于8、不多于9或不多于10个氨基酸置换。在一些实施方案中,所述流感HA多肽没有N-末端的甲硫氨酸残基。

[0010] 本公开内容还提供了编码所述重组HA多肽的分离的核酸分子和载体。还提供了包含所述载体的分离的细胞。

[0011] 还提供了包含本文公开的优化的HA多肽的流感病毒样颗粒(VLP)和融合蛋白。

[0012] 还提供了在可药用载体中包括本文公开的优化的流感HA多肽、融合蛋白或VLP的组合物。本公开内容还提供了通过给予所公开的组合物、融合蛋白或VLP而在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的方法。

[0013] 还提供了通过给予受试者包含含有优化的HA多肽的VLP的组合物而针对流感病毒免疫所述受试者的方法。

[0014] 根据以下参照附图进行的详细描述,本公开内容的上述和其他目的、特征和优点会变得更加清楚。

附图说明

[0015] 图1为用于根据方法1产生H1N1HA共有序列的方法的示意图。

[0016] 图2为用于根据方法2产生H1N1HA共有序列的方法的示意图。

[0017] 图3为用于根据方法4产生H1N1HA共有序列的方法的示意图。

[0018] 图4为用于根据方法5产生H1N1HA共有序列的方法的示意图。

[0019] 图5为用于根据方法6产生H1N1HA共有序列的方法的示意图。

[0020] 图6的图示出了由小鼠COBRA H1N1感染所诱导的血凝抑制(HAI)血清抗体滴度。在用COBRA H1N1流感VLP(COBRA方法1)感染的小鼠中确定了HAI血清抗体滴度。针对季节性H1N1流感病毒A/新喀里多尼亚/20/1999测试了抗血清。结果表示为感染后第3周、第5周、第8周和第12周收集的抗血清的log₂转化的几何平均滴度(+S.E.M.)。

[0021] 图7为示出COBRA HA蛋白(方法1共有序列)表达的蛋白质印迹(Western blot)。在体外翻译COBRA H1N1HA,并通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分析细胞培养物裂解液。泳道1,A/新喀里多尼亚/20/1999病毒;泳道2,H1N1COBRA分泌的HA;泳道3,H1N1COBRA 5μg VLP;泳道4,COBRA 10μg VLP。所述COBRA HA(泳道2)以其预期的分子量迁移,证实了所述合成蛋白的表达。

[0022] 序列表

[0023] 列于所附序列表的核酸和氨基酸序列使用在37C.F.R.1.822中定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母编码显示。只显示每条核酸序列的一条链,但是应理解任何提及所示链包括其互补链在内。在所附序列表中:

[0024] SEQ ID NO:1-11为优化的H1N1HA蛋白的氨基酸序列。

[0025] SEQ ID NO:12为所述优化的H1N1HA蛋白的共有氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO:13为密码子优化的H1N1HA的核酸序列。

具体实施方式

[0027] 缩写

[0028] COBRA:计算优化的宽反应性抗原

[0029] HA:血凝素

[0030] HAI:血凝抑制

[0031] HRP:辣根过氧化物酶

[0032] M1:基质蛋白1

[0033] NA:神经氨酸酶

[0034] PFU:空斑形成单位

[0035] VLP:病毒样颗粒

[0036] II. 术语和方法

[0037] 除非另有说明,技术术语以常规用法使用。分子生物学中的常用术语的定义可见于Benjamin Lewin, genes V, 由Oxford University Press出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等 (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 由Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9) 和Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 由VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0038] 为了便于阅读本公开内容的各个实施方案, 提供了以下对具体术语的解释:

[0039] 佐剂: 非特异增强对抗原的免疫应答的物质或载体。佐剂可包括抗原可吸附于其上的矿物质(明矾、氢氧化铝或磷酸盐)的悬浮物; 或其中抗原溶液乳化在矿物油中的油包水乳剂(例如, 弗氏不完全佐剂), 有时包括灭活的分枝杆菌(mycobacteria) (弗氏完全佐剂) 以进一步增强抗原性。免疫刺激寡核苷酸(例如包括CpG基序的那些) 也可用作佐剂(例如, 见美国专利No. 6, 194, 388; 6, 207, 646; 6, 214, 806; 6, 218, 371; 6, 239, 116; 6, 339, 068; 6, 406, 705; 和6, 429, 199)。佐剂还包括生物分子, 例如共刺激分子。示例性生物佐剂包括IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L和41BBL。

[0040] 给药: 本文使用的给予受试者组合物是指给予、施用所述组合物或使其与所述受试者接触。给药可通过许多途径中的任一种来完成, 例如, 局部、口服、皮下、肌肉、腹膜内、静脉、鞘内和真皮内给药。

[0041] 抗体: 由B淋巴细胞产生的具有特定氨基酸序列的免疫球蛋白分子。抗体在人或其他动物中由特异的抗原(免疫原) 诱发。抗体通过以某些可证明的方式与抗原特异性反应来表征, 抗体和抗原各自以对方来定义。“引起抗体应答”是指抗原或其他分子诱导抗体产生的能力。

[0042] 抗原: 可在动物中刺激抗体产生或T细胞应答的化合物、组合物或物质, 包括注射或吸收到动物中的组合物。抗原与特异性体液或细胞免疫的产物(包括由异源性免疫原诱导的那些) 反应。在本公开的组合物和方法的一些实施方案中, 所述抗原为流感HA蛋白。

[0043] 密码子优化的: “密码子优化的”核酸是指已经改变使得密码子在具体系统(例如物种群中的具体物种) 中的表达被优化的核酸序列。例如, 核酸序列可为在哺乳动物细胞中表达而进行优化。密码子优化不改变所编码的蛋白质的氨基酸序列。

[0044] 融合蛋白: 通过表达从编码两种不同(异源)蛋白质的至少一部分的核酸序列设计的核酸序列而产生的蛋白质。为了产生融合蛋白, 所述核酸序列必须在相同的读码框内并

且不包含内部的终止密码子。例如,融合蛋白包括融合至异源蛋白的流感HA。

[0045] 血凝素(HA):流感病毒表面糖蛋白。HA介导病毒颗粒结合到宿主细胞和随后的病毒进入所述宿主细胞。本领域已知并可公开获得许多流感HA蛋白的核苷酸和氨基酸序列,例如储存于GenBank的那些。HA(和NA一起)是两个主要的流感病毒抗原决定簇之一。

[0046] 免疫应答:免疫系统的细胞(例如B细胞、T细胞、巨噬细胞或多形核细胞)对刺激物(例如抗原或疫苗)的应答。免疫应答可包括参与宿主防卫反应的机体的任何细胞,包括例如,分泌干扰素或细胞因子的上皮细胞。免疫应答包括但不限于先天免疫应答或炎症。本文所使用的保护性免疫应答是指保护受试者免受感染(预防感染或预防与感染相关的疾病的发生)的免疫应答。测量免疫应答的方法在本领域中已知,包括例如测量淋巴细胞(例如B细胞或T细胞)的增殖和/或活性、细胞因子或趋化因子的分泌、炎症、抗体产生等等。

[0047] 免疫原:在合适的条件下能够刺激产生免疫应答(例如在动物中产生抗体或T细胞应答)的化合物、组合物或物质,包括注射或吸收到动物中的组合物。本文所使用的“免疫原性组合物”是包含免疫原(例如HA多肽)的组合物。

[0048] 免疫:给予受试者保护使其免于患上传染性疾病,例如通过疫苗接种。

[0049] 流感病毒:属于正粘病毒科家族的分段的负链RNA病毒。有A、B和C三种类型的流感病毒。A型流感病毒感染多种鸟和哺乳动物,包括人、马、海洋哺乳动物、猪、雪貂和鸡。在动物中,大多数A型流感病毒引起温和的呼吸道和肠道的局部感染。然而,高致病性A型流感毒株,例如H5N1,引起家禽的全身感染,其中死亡率可达到100%。2009年,H1N1流感是人流感的最常见原因。2009年出现起源于猪的H1N1的新毒株,并被世界卫生组织宣布为大范围流行的。该毒株被称为“猪流感”。H1N1A型流感病毒还是1918年的西班牙流感大流行、1976年的Fort Dix大爆发和1977-1978年的俄罗斯流感大流行的病因。

[0050] 分离的:“分离的”生物组分(例如核酸、蛋白质或病毒)已经基本上从其他生物组分中(例如细胞碎片,或其他蛋白质或核酸)分离或纯化。已经被“分离的”生物组分包括那些通过标准纯化方法纯化的组分。该术语还包括重组核酸、蛋白质或病毒(或VLP),以及化学合成的核酸或肽。

[0051] 接头:在融合蛋白的两个多肽之间充当间隔物的一个或多个氨基酸。

[0052] 基质(M1)蛋白:见于病毒包膜中的流感病毒结构蛋白。M1被认为在装配和芽殖中起作用。

[0053] 神经氨酸酶(NA):一种流感病毒膜糖蛋白。NA通过在被感染细胞的表面从碳水化合物部分切割末端的唾液酸残基,参与破坏病毒HA的细胞受体。NA还从病毒蛋白上切割唾液酸残基,防止病毒聚集。NA(和HA一起)为两种主要的流感病毒抗原决定簇之一。

[0054] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列以有功能关系的方式放置时,所述第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则所述启动子可操作地连接于所述编码序列。当需要连接两个蛋白编码区域时,所述可操作地连接的DNA序列通常是连续的并且位于相同的读码框中。

[0055] 优化的流感HA蛋白:本文所使用的“优化的流感HA蛋白”是指通过对选择的在1918-2011年分离的H1N1流感病毒进行序列比对而产生的HA蛋白共有序列(如下文实施例1所描述)。通过密码子优化和RNA优化(例如增加RNA稳定性)将(或可以将)编码优化的HA蛋白的核苷酸序列为在哺乳动物细胞中表达而进一步优化。本文公开(如本文SEQ ID NO:1-

11所示)的优化的流感HA蛋白也称作“COBRA”序列。设计优化的HA多肽以在受试者中引起宽反应性的免疫应答。在本公开内容的上下文中,“宽反应性”意为所述蛋白序列在受试者中引起足以抑制、中和或预防宽范围的流感病毒(例如特定亚型中的大多数或全部流感病毒)感染的免疫应答。在一些实例中,所述优化的流感HA蛋白能够引起针对大多数或全部H1N1流感病毒分离株的免疫应答,例如保护性免疫应答。

[0056] 爆发:本文所使用的流感病毒“爆发”是指在给定年份中来自单个国家的病毒分离株的集合。

[0057] 可药用载体:可在本公开中使用的可药用载体(carrier或vehicle)是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版, (1975), 描述了适于一种或多种治疗组合物(例如一种或多种流感疫苗, 以及其他的药剂)的药物递送的组合物和制剂。

[0058] 通常,所述载体的性质取决于采用的具体给药模式。例如,非消化道的制剂常常包含可注射流体作为载体,所述可注射流体包括可药用和生理上可接受的流体例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如,粉剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的无毒固体载体可包括,例如药品级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性的载体之外,待给予的药物组合物可含有少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0059] 多肽:其中单体为通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当所述氨基酸为 α -氨基酸时,可使用L-光学异构体或D-光学异构体。本文所用的术语“多肽”或“蛋白质”意图包括任何氨基酸序列和包括修饰序列例如糖蛋白。术语“多肽”特别意欲覆盖天然存在的蛋白质,以及重组或合成产生的那些。术语“残基”或“氨基酸残基”包括提及整合入蛋白质、多肽或肽中的氨基酸。

[0060] 保守性氨基酸置换是对原来的蛋白质的性质有最少干扰的那些置换,即,所述蛋白的结构,特别是功能被保留,且没有被这些置换而显著地改变。保守性置换的实例如下所示。

	原始残基	保守性置换
	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln, His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
[0061]	His	Asn; Gln
	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile; Val
	Lys	Arg; Gln; Glu
	Met	Leu; Ile
	Phe	Met; Leu; Tyr
	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp; Phe
	Val	Ile; Leu

[0062] 保守置换通常保持了(a)在置换区域中多肽骨架的结构,例如,为片层或螺旋构象,(b)在靶位点处分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的体积。

[0063] 通常预期在蛋白质性质上产生最大变化的置换会是不保守的,例如发生如下改变(a)亲水残基例如丝氨酸或苏氨酸置换(或被置换为)疏水残基例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸;(b)半胱氨酸或脯氨酸置换(或被置换为)任何其他残基;(c)具有带正电荷的侧链的残基例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸置换(或被置换为)带负电荷的残基例如谷氨酸、天冬氨酸;或(d)具有庞大侧链的残基例如苯丙氨酸置换(或被置换为)没有侧链的残基例如甘氨酸。

[0064] 预防、治疗或改良疾病:“预防”疾病是指抑制疾病的全面发生。“治疗”是指当疾病已经开始发生后,改良疾病或病理状态的征象或症状的治疗干预。“改良”是指减少疾病征象或症状的数量或严重性。

[0065] 启动子:启动子是指导核酸转录的核酸控制序列的阵列。启动子包括在转录起始位点附近的必需核酸序列。启动子还任选地包括远端增强子或抑制子元件。“组成型启动子”是连续地有活性且不受外部信号或分子调节的启动子。相反,“诱导型启动子”的活性受外部信号或分子(例如转录因子)调节。在本文的一些实施方案中,所述启动子为CMV启动子。

[0066] 纯化的:术语“纯化的”不需要绝对的纯度;而是意欲作为相对的术语。因此,例如,纯化的肽、蛋白质、病毒、VLP或其他活性化合物是全部或部分与天然相关的蛋白质和其他污染物分离的化合物。在某些实施方案中,术语“基本上纯化的”是指已经从细胞、细胞培养基或其他粗制品中分离且经过分级以去除最初制品的各种组分(例如蛋白质、细胞碎片和其他组分)的肽、蛋白质、病毒、VLP或其他活性化合物。

[0067] 重组:重组核酸、蛋白质、病毒或VLP具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个原本独立的序列片段而产生的序列。该人工组合常常通过化学合成,或更常见地通过人工操纵分离的核酸片段(例如通过基因工程技术)完成。

[0068] 序列同一性:氨基酸或核酸序列之间的相似性被表示为所述序列之间的相似性,或者称作序列同一性。序列同一性常常以同一性(或相似性或同源性)百分比来度量;所述百分比越高,两个序列越相似。当使用标准方法进行比对时,给定基因或蛋白质的同系物或变体具有相对高程度的序列同一性。

[0069] 用于比较的序列比对方法在本领域是熟知的。多种程序和比对算法描述于:Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981;Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970;Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988;Higgins和Sharp,Gene 73:237-244,1988;Higgins和Sharp,CABIOS 5:151-153,1989;Corpet等Nucleic Acids Research 16:10881-10890,1988以及Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988。Altschul等Nature Genet.6:119-129,1994。

[0070] NCBI基础局部比对搜索工具(BLASTTM) (Altschul等J.Mol.Biol.215:403-410,1990)可以从若干来源获得,包括美国国立生物技术信息中心(NCBI,Bethesda,MD)和互联网,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx联合使用。

[0071] 受试者:活的多细胞脊椎生物——包括人和非人哺乳动物(例如非人灵长类)的种类。

[0072] 治疗有效量：足以在用特定试剂治疗的受试者中达到所需效果的那种试剂的量。例如，这可以是用于在受试者中引起免疫应答和/或用于预防由流感病毒引起的感染或疾病的流感病毒疫苗的量。理想地，在本公开的上下文中，流感疫苗的治疗有效量是足以在受试者中增加对流感病毒引起的感染的抵抗力、预防、改良和/或治疗所述感染，而不会在所述受试者中产生明显的细胞毒性效应的量。用于在受试者中增加对感染的抵抗力、预防、改良和/或治疗感染的流感疫苗的有效量取决于，例如，被治疗的受试者、治疗组合物的给药方式及其他因素。

[0073] 转化的：转化的细胞是已经通过分子生物学技术将核酸分子导入其中的细胞。本文所使用的术语转化包括可将核酸分子导入这种细胞中的所有技术，包括用病毒载体转染、用质粒载体转化以及通过电穿孔、脂转染和基因枪加速导入裸露的DNA。

[0074] 疫苗：能够刺激免疫应答的免疫原性材料的制品，其被给予用于预防、改良或治疗疾病（例如传染性疾病）。所述免疫原性材料可包括，例如，弱化或灭活的微生物（例如弱化的病毒），或来自它们的抗原性蛋白质、肽或DNA。疫苗可引起预防性的和治疗性的应答。给药方法根据所述疫苗有所不同，但可包括接种、食入、吸入或其他给药形式。接种可通过许多途径（包括非消化道途径）中的任一种递送，例如静脉、皮下或肌肉。疫苗可与佐剂一起给药以加强免疫应答。

[0075] 载体：载体是允许插入外源核酸而不会破坏所述载体在宿主细胞内的复制和/或整合的能力的核酸分子。载体可包含使其能够在宿主细胞内复制的核酸序列，例如复制起点。插入型载体能够将自身插入宿主核酸中。载体还可包括一种或多种选择性标记基因和其他遗传元件。表达载体是含有必需调控序列以允许转录和翻译插入的一个或多个基因的载体。在本公开的一些实施方案中，所述载体编码流感HA、NA或M1蛋白。在一些实施方案中，所述载体是pTR600表达载体（美国专利申请公开文本No. 2002/0106798；Ross等*Nat Immunol.* 1 (2) :102-103, 2000；Green等, *Vaccine* 20:242-248, 2001）。

[0076] 病毒样颗粒（VLP）：由一个或多个病毒结构蛋白组成、但没有病毒基因组的病毒颗粒。由于VLP没有病毒基因组，他们是非传染性的。此外，VLP经常可通过异源表达产生，且可容易地被纯化。大多数VLP至少包括驱动芽殖以及从宿主细胞释放颗粒的病毒核心蛋白。这类核心蛋白的一个实例是流感M1。在本文的一些实施方案中，流感VLP包含HA、NA和/或M1蛋白。流感VLP可通过使用编码HA和NA蛋白和任选的M1蛋白的质粒转染宿主细胞来产生。将所述转染的细胞孵育适当的一段时间以使得蛋白表达（例如约72小时）后，可从细胞培养物上清液中分离VLP。实施例2提供了从细胞上清液中纯化流感VLP的示例性方法。在这个实施例中，通过低速离心（以去除细胞碎片）、真空过滤以及通过20%甘油的超速离心来分离VLP。产生流感VLP的其他方法在本领域中已知（见，例如，美国专利申请公开文本No. 2006/0263804；2008/0031895；2010/0166769；和2010/0239610）。

[0077] 除非另有说明，本文所用的所有技术术语和科学术语的含义与本公开所属技术领域普通技术人员通常所理解的含义相同。除非文中另有明确说明，单数术语“一”、“一个”和“该”包括复数指代物。类似地，除非文中另有明确说明，“或”意欲包括“和”。因此，“包含A或B”意指包括A或B，或者A和B。还应该理解，为核酸或多肽给出的全部碱基大小或氨基酸大小以及全分子量或分子质量值是近似值，用于表述目的。虽然与本文描述的方法和材料相似或等价的方法和材料可以用于本公开的实施例或测试，但适合的方法和材料在下文描述。

本文提到的所有的出版物、专利申请、专利和其他参考文献以引用的方式全文纳入本文。如果出现冲突,以本说明书(包括对术语的解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是示例性的,不意欲进行限制。

[0078] III. 若干实施方案概述

[0079] 本文公开了用于引起针对H1N1流感的宽反应性的免疫应答的优化的H1N1流感HA多肽的产生。基于选择的分离自1918-2011年的H1N1病毒,通过一系列的HA蛋白比对和随后的共有序列产生,开发了所述优化的HA多肽。用于产生所述11个HA共有序列的方法在实施例1和附图1-5中描述。所述11个共有HA多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-11所示。此外,本文提供的SEQ ID NO:1-11的氨基酸共有序列为SEQ ID NO:12。

[0080] 本文提供了具有用于引起针对H1N1流感的宽反应性的免疫应答的优化氨基酸序列的重组流感HA多肽。在一些实施方案中,所述HA多肽包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,相对于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11,所述多肽的氨基酸序列包含不多于5个、不多于6个、不多于7个、不多于8个、不多于9个或不多于10个氨基酸置换。

[0081] 在具体的实施方案中,提供了包含与SEQ ID NO:1至少99%相同;与SEQ ID NO:2至少99.2%相同;与SEQ ID NO:3至少99%相同;与SEQ ID NO:4至少99%相同;与SEQ ID NO:5至少98%或至少99%相同;与SEQ ID NO:6至少99%相同;与SEQ ID NO:7至少97%、至少98%或至少99%相同;与SEQ ID NO:8至少99%相同;包含SEQ ID NO:9;与SEQ ID NO:10至少99%相同;或与SEQ ID NO:11至少99%相同的氨基酸序列的重组流感HA多肽。

[0082] 在其他具体的实施方案中,所述重组流感HA多肽包含与SEQ ID NO:1的2-566位残基至少99%相同;与SEQ ID NO:2的2-566位残基至少99.2%相同;与SEQ ID NO:3的2-566位残基至少99%相同;与SEQ ID NO:4的2-566位残基至少99%相同;与SEQ ID NO:5的2-566位残基至少98%或至少99%相同;与SEQ ID NO:6的2-566位残基至少99%相同;与SEQ ID NO:7的2-566位残基至少97%、至少98%或至少99%相同;与SEQ ID NO:8的2-566位残基至少99%相同;包含SEQ ID NO:9的2-566位残基;与SEQ ID NO:10的2-566位残基至少99%相同;或与SEQ ID NO:11的2-566位残基至少99%相同的氨基酸序列。

[0083] 在其他实施方案中,所述HA多肽的氨基酸序列包括(i)相对于SEQ ID NO:1,不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换;(ii)相对于SEQ ID NO:2,不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换;(iii)相对于SEQ ID NO:3,不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换;(iv)相对于SEQ ID NO:4,不多于8个、不多于7个、不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换;(v)相对于SEQ ID NO:5,不多于10个、不多于9个、不多于8个、不多于7个、不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换;(vi)相对于SEQ ID NO:6,不多于8个、不多于7个、不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换;(vii)相对于SEQ ID NO:7,不多于10个、不多于9个、不多于8个、不多于7个、不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不

多于2个或不多于1个氨基酸置换；(viii)相对于SEQ ID NO:8,不多于10个、不多于9个、不多于8个、不多于7个、不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换；(ix)相对于SEQ ID NO:10,不多于8个、不多于7个、不多于6个、不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换；或(x)相对于SEQ ID NO:11,不多于5个、不多于4个、不多于3个、不多于2个或不多于1个氨基酸置换；

[0084] 在一些实例中,所述流感HA多肽包含SEQ ID NO:1的2-566位残基、SEQ ID NO:2的2-566位残基、SEQ ID NO:3的2-566位残基、SEQ ID NO:4的2-566位残基、SEQ ID NO:5的2-566位残基、SEQ ID NO:6的2-566位残基、SEQ ID NO:7的2-566位残基、SEQ ID NO:8的2-566位残基、SEQ ID NO:9的2-566位残基、SEQ ID NO:10的2-566位残基或SEQ ID NO:11的2-566位残基的氨基酸序列或由其组成。

[0085] 在其他实例中,所述重组HA多肽包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成。

[0086] 在另一实例中,所述重组HA多肽包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或由其组成。在另一实例中,所述重组HA多肽包括SEQ ID NO:12的2-566位残基的氨基酸序列或由其组成。

[0087] 还提供了编码本文公开的重组HA多肽的分离的核酸分子。在一些实施方案中,将所述核酸分子为在哺乳动物细胞中表达而进行密码子优化。还任选将所述核酸分子为RNA稳定性而进行优化。在一些实施方案中,所述核酸分子的序列与SEQ ID NO:13至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在具体实例中,所述核酸分子的序列包括SEQ ID NO:13或由其组成。

[0088] 本公开还提供了包含编码重组HA多肽的核酸分子的载体。所述载体可以是任何适用于表达所述HA多肽的载体,例如哺乳动物表达载体。在具体实例中,所述载体为pTR600表达载体(美国专利申请公开文本No. 2002/0106798,以引用的方式纳入本文;Ross等*Nat Immunol*.1(2):102-103,2000;Green等*Vaccine* 20:242-248,2001)。

[0089] 在一些实例中,所述载体包括可操作地连接至编码所述HA多肽的核酸序列上的启动子。在具体实例中,所述启动子为CMV启动子。

[0090] 还提供了包含所公开的载体的分离的细胞。在某些情况下,所述细胞为任何适用于产生和表达VLP的细胞类型,例如哺乳动物细胞。

[0091] 还提供了包含本文公开的优化HA多肽的流感VLP。所述流感VLP还可包括形成病毒颗粒所必需的任何其他流感蛋白。在一些实施方案中,所述流感VLP还包括流感神经氨酸酶(NA)蛋白、流感基质(M1)蛋白或其两者。

[0092] 还提供了包含本文公开的流感HA多肽的流感VLP,所述流感VLP通过在足以允许表达所述HA、M1和NA蛋白的条件下用编码所述HA多肽的载体、编码流感NA蛋白的载体和编码流感M1蛋白的载体转染宿主细胞而产生。

[0093] 本公开还提供了包含优化的流感HA多肽的融合蛋白。

[0094] 本文还提供了这样的组合物,即其包含本文公开的优化的流感HA蛋白、或包含所述优化的流感HA蛋白的融合蛋白或VLP。在一些实施方案中,所述组合物还包含可药用载体和/或佐剂。例如,所述佐剂可为明矾、弗氏完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激性寡核苷酸(例如CpG寡核苷酸)。

[0095] 还提供了一种通过给予如本文所公开的优化的流感HA蛋白、含有优化的流感HA的融合蛋白、含有优化的流感HA的VLP、或其组合物,在受试者中引起针对流感病毒的免疫应答的方法。在一些实施方案中,所述流感病毒为H1N1流感病毒。在一些实施方案中,可使用任何适合的给药途径(例如,肌肉)给予所述HA蛋白、HA融合蛋白或VLP。在一些实施方案中,所述HA蛋白、融合蛋白或VLP作为还包含可药用载体和/或佐剂的组合物被给予。例如,所述佐剂可为明矾、弗氏完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激性寡核苷酸(例如CpG寡核苷酸)。

[0096] 还提供了一种通过给予受试者含有本文公开的优化的流感HA蛋白的VLP或给予其组合物,针对流感病毒免疫所述受试者的方法。在所述方法的一些实施方案中,所述组合物还包含可药用载体和/或佐剂。例如,所述佐剂可为明矾、弗氏完全佐剂、生物佐剂或免疫刺激性寡核苷酸(例如CpG寡核苷酸)。在一些实施方案中,所述VLP(或其组合物)通过肌肉内给予。

[0097] 在引起免疫应答或免疫受试者的方法的一些实施方案中,给予所述受试者约1-约25 μ g的含有优化的HA蛋白的VLP。在具体实例中,给予所述受试者约5-约20 μ g的所述VLP,或约10-约15 μ g的所述VLP。在一个具体的非限制性的实例中,给予所述受试者约15 μ g的所述VLP。然而,本领域技术人员能够确定给予受试者的VLP的治疗有效量(例如提供针对H1N1流感病毒感染保护的量)。

[0098] IV. 优化的H1N1流感HA多肽和多核苷酸

[0099] 本文提供了11个不同的优化的H1N1HA多肽序列。H1N1HA氨基酸序列是从NCBI流感病毒资源数据库下载。来自分离自1918-2011年的1134个分离株的H1N1HA蛋白被用于产生共有序列。实施例1描述了用于产生每个共有序列的方法(也见图1-5)。

[0100] COBRA方法1 (SEQ ID NO:1)

[0101] MKAKLLVLLCAFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
GNCSIAGWILGNPECESLFSKESWSYIVETPNSENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
KGV TASC SHNGKSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP SNIGDQRAIYHTENAYVSVVSSH
SRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDACKQTPQ
GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGA IAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDF
HDSNVKNLYEKVKSQ LKNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
AIYSTVASSLVLLVSLG A ISFWMCSNGSLQCRICI

[0102] COBRA方法2 (SEQ ID NO:2)

[0103] MKAKLLVLLCALTATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
GNCSIAGWILGNPECESLFSKKSWSYIAETPNSENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
KGVTAACSHK GSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP SNIGDQRAIYHTENAYVSVVSSH
NRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDACKQTPQ
GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGA IAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER TLDF
HDSNVKNLYEKVKSQ LKNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
AIYSTVASSLVLLVSLG A ISFWMCSNGSLQCRICI

[0104] COBRA方法3 (SEQ ID NO:3)

[0105] MKAKLLVLLCAFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GNCSVAGWILGNPECESLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
 KGV TASC SHNGKSSFYRNLLWLTEKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP SNIGDQRALYHTENAYVSVVSSH
 SRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDACKQTPQ
 GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HD SNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGT YDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLG A ISFWMCSNGSLQCRICI

[0106] COBRA方法4 (SEQ ID NO:4)

[0107] MKAKLLVLLCAL TADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GKCSIAGWILGNPECESLLSKKSWSYIAETPNSENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
 KGV TASC SHKSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP SNIGDQRTIYRTENAYVSVVSSNY
 NRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDTKCQTPQ
 GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HD SNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGT YDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLG A ISFWMCSNGSLQCRICI

[0108] COBRA方法5 (SEQ ID NO:5)

[0109] MKAKLLVLLCTFTATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GNCSIAGWILGNPECESLLSKKSWSYIVETPNSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
 KGV TAA CSHAGKSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHP SNIGDQQALYQ TENAYVSVVSSH
 NRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMHECDTKCQTPQ
 GAINSSLPFQNIHPVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HD SNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGT YDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLG A ISFWMCSNGSLQCRICI

[0110] COBRA方法6 (SEQ ID NO:6)

[0111] MKAKLLVLLCAFTATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GKCSIAGWILGNPECESLLSKKSWSYIVETPNSENGTCYPGDFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
 KGV TAA CSHAGKSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHP SNIGDQRALYHTENAYVSVVSSH
 NRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDACKQTPQ
 GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HD SNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGT YDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLG A ISFWMCSNGSLQCRICI

[0112] COBRA方法5脱糖基化的 (SEQ ID NO:7)

[0113] MKAKLLVLLCTFTATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GNCAIAGWILGNPECESLLSKKSWSYIVETPNSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
 KGV TAA CSHAGKSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKGKEVLVLWGVHHP SNIGDQQALYQ TENAYVSVVSSH

NRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNAAMHECDTKCQTPQ
 GAINSSLFPQNIHPVTIGCEPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

[0114] 1918-1957COBRA (SEQ ID NO:8)

[0115] MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GKCNIAGWILGNPECESLLSNRSWSYIVETPNSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPKHNTT
 KGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSNSYVNNKGKEVLVLWGVHHPNSNIDDDQQTLYQKENAYVSVVSSNY
 NRRFTPEIAERPKVRGQAGRMNYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMHECDTKCQTPQ
 GAINSSLFPQNIHPVTIGCEPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HDSNVKNLYEKVKSQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

[0116] 1977-2005COBRA (SEQ ID NO:9)

[0117] MKAKLLVLLCAFTATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHNGKLCRLKGIAPLQL
 GNCSIAGWILGNPECESLFSKKSWSYIAETPNSENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNTVT
 KGVTAACSHKGSFYRNLLWLTEKNGSYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHHPNSNIGDQRAIYHTENAYVSVVSSH
 NRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPWYAFALSRGFGSGIITSNASMDECDKACQTPQ
 GAINSSLFPQNVHPVTIGCEPKYVRSTKLRMTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

[0118] 人猪COBRA (SEQ ID NO:10)

[0119] MKAILLVLLCTFAATNADTLICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLCCKLKG IAPLHL
 GKCNIAGWLLGNPECELLLTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHETN
 KGVTAACPYAGASSFYRNLIWLVKKGNSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGIHHPPTSTDQQSLYQNADAYVFGSSKY
 NRKFKPEIAARPKVRDQAGRMNYYWTLLEPGDTITFEATGNLVVPRYAFAMNRGSGSGIIISDAPVHDCNTKCQTPK
 GAINTSLFPQNIHPVTIGCEPKYVKSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 YAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDF
 HDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDDTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESTRIYQIL
 AIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

[0120] 猪COBRA (SFO ID NO:11)

[0121] MKAILLVLLCTFTAANADTLICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED RHNGKLCCKLGGIAPLH
 LGKCNIAGWLLGNPECELLLTASSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKASSWPNHET
 NRGVTAACPYAGANSFYRNLIWLVKKGNSYPKLSKSYVNNKGKEVLVLWGIHHPPTSTDQQSLYQNADAYVFGSSK
 YNRKFKPEIAARPKVRGQAGRMNYYWTLLEPGDTITFEATGNLVVPRYAFAMNRGSGSGIIISDAPVHDCNTKCQTP
 KGAINSLFPQNIHPVTIGCEPKYVKSTKLRMATGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
 GYAADQKSTQNAIDGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDVWTYNAELLVLENERTLD

FHDSNVKNLYEKVRSQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCDDTCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREEIDGVKLESTRIYQI
LAIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

[0122] SEQ ID NOs:1-11的共有序列 (SEQ ID NO:12)

[0123] MKAXLLVLLCXXXAXXADTXCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDXHNKLCXLXGIAPLXL
GXCCXXAGWXLGNPECEXLXXXXSWSYIXETXNXXNGTCYPGXFFXXYEELREQLSSVSSFERFEIFPKXSSWPXHX
XGVTAXCXXXGXXSFYRNXLWLXXXXXXYPXLXXSYVNNKXKEVLVLWGXHRPXXXXDQXXXXXXAYVXXVSSXY
XRXFXPEIAXRPKVRXQXGRXNYWTLXEPGDTIXFEAXGNLXXPYAFAXXRGXGSGIXSXAXXXXCXKXQTPX
GAINXSLPFQNXHPVTIGECPKYVXSTKLRMXTGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQGS
YAADQKSTQNAIXGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNXLEXRXENLNKKVDDGFLDXWTYNAELLVLENERTLDF
HDSNVKNLYEKVXSQ LXNNAKEIGNGCFEFYHKCXXXCMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREXIDGVKLESXXXQIL
AIYSTVASSLVLLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

[0124] 在本文公开的一些实施方案中,所述HA多肽没有N-末端甲硫氨酸残基。因此,在一些实例中,提供了包含SEQ ID NO:1-12任一个的2-566位残基的HA多肽。

[0125] 所述COBRA氨基酸序列可被反向翻译并为在哺乳动物细胞中表达而优化,包括密码子使用和RNA优化 (GeneArt; Regensburg, 德国)。可将所述优化的核酸序列插入到适当的表达载体中,例如pTR600表达载体 (美国专利申请公开文本No. 2002/0106798; Ross等Nat Immunol. 1 (2): 102-103, 2000; Green等Vaccine 20: 242-248, 2001)。

[0126] 方法1的COBRA HA序列的优化的核酸序列为 (SEQ ID NO:13):

[0127] AAGCTTATGAAGGCCAAGCTGCTGGTGCTGCTGTGCGCCTCACAGCCACCTACGCCGACACCATCTGC
ATCGGCTACCACGCCAACACAGCACCGACACCGTGGATACCGTGCTGGAAAAGAACGTGACCGTGACCCACAGCGT
GAACCTGCTGGAAGATAGCCACAACGGCAAGCTGTGCCGGCTGAAGGGAATCGCCCCTCTGCAGCTGGGCAACTGCT
CTATCGCCGGCTGGATTCTGGGCAACCCCGAGTGCAGAGCCTGTTACAGCAAAGAGTCCTGGTCTACATCGTGAA
ACCCCAACAGCGAGAACGGCACCTGTTACCCCGGCTACTTCGCCGACTACGAGGAAGTGCAGGAAACAGCTGAGCAG
CGTGTCCAGCTTCGAGAGATTCGAGATTTTCCCAAAGAGAGCAGCTGGCCCAACCACACCGTGACCAAAGGCGTGA
CCGCTCCTGCTCCACAATGGCAAGAGCAGCTTCTACAGAAACCTGCTGTGGCTGACCGAGAAGAACGGCAGCTAC
CCCAACCTGAGCAAGAGCTACGTGAACAACAAAAGAAAAGAGGTGCTGGTGTGTGGGGCGTGCACCACCCTAGCAA
CATCGGCGACCAGCGGGCCATCTACCACACCGAGAATGCCTACGTGTCCGTGGTGTCCAGCCACTACAGCAGACGGT
TCACCCCGAGATCGCCAAGAGGCCAAAAGTGCGGGACCAGGAAGGCCGGATCAACTACTACTGGACACTGCTGGAA
CCCGGCGATAACCATCATCTTCGAGGCCAACGGCAACCTGATCGCCCCTTGGTACGCCTTCGCCCTGAGCAGAGGCTT
TGGCAGCGGCATCATCACCAGCAACGCCAGCATGGACGAGTGCAGCAGCCAAGTGCCAGACACCTCAGGGCGCCATCA
ATAGCAGCCTGCCCTCCAGAACGTGCACCCCGTGACCATCGGCGAGTGCCCAAATACGTGCGGAGCACCAAGCTG
CGGATGGTACCGGCCTGAGAAAACATCCCGAGCATCCAGAGCAGGGGCTGTTCCGAGCCATTGCCGGCTTTATCGA
GGGCGGCTGGACCGGCATGATCGACGGGTGGTACGGCTATCACCACCAGAACGAGCAGGGCAGCGGCTACGCCGCCG
ATCAGAAGTCTACCCAGAACGCCATCAACGGCATCACCACAAAGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAG
TTCACCGCCGTGGGCAAAGAGTTCAACAAGCTGGAACGGCGGATGGAAAACCTGAACAAGAAGGTGGACGACGGCTT
CCTGGACATCTGGACCTACAACGCCGAACCTGCTGGTGCTGCTGGAAAACGAGCGGACCCTGGACTTCCACGACAGCA
ACGTGAAGAACCTGTACGAGAAAGTGAAGTCCCAGCTGAAGAACAACGCCAAAGAGATCGGCAACGGCTGCTTCGAG
TTCTACCACAAGTGAACAACGAGTGCATGGAAAGCGTGAAGAATGGCACCTACGACTACCCCAAGTACAGCGAGGA
AAGCAAGCTGAACCGCGAGAAGATCGACGGCGTGAAGCTGGAATCCATGGGCGGTACCAGATCCTGGCCATCTATA

GCACCGTGGCCAGCAGCCTGGTGCTGCTGGTGTCTCTGGGCGCCATCAGCTTTTGGATGTGCAGCAACGGCAGCCTG
CAGTGCCGGATCTGTATCGGCAGCATCGGATCC

[0128] V. 流感

[0129] 流感病毒是属于正粘病毒科家族的分段的负链RNA病毒。有三种类型的流感病毒，A、B和C。A型流感病毒感染多种鸟类和哺乳动物，包括人、马、海洋哺乳动物、猪、雪貂和鸡。在动物中，大多数A型流感病毒引起温和的呼吸道和肠道的局部感染。然而，高致病性A型流感毒株，例如H5N1，引起家禽的全身感染，其中死亡率可达到100%。感染A型流感的动物常充当流感病毒的病原体库 (reservoir)，某些亚型已经显示跨越物种屏障而感染人。

[0130] 基于编码表面糖蛋白 (即血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)，其是病毒吸附和细胞释放所必需的) 的两个基因的抗原性区域中的等位变异，可将A型流感病毒分为亚型。目前，已知A型流感病毒的16个HA亚型 (H1-H16) 和9个NA (N1-N9) 抗原性变体。以前，已知只有3个亚型在人中传播 (H1N1、H1N2和H3N2)。然而，近些年，如在1997年和2003年香港所记录，已经报道A型禽流感的致病性H5N1亚型跨越物种屏障并感染人，导致一些患者的死亡。

[0131] 在动物中，大多数A型流感病毒引起温和的呼吸道和肠道的局部感染。然而，高致病性A型流感毒株，例如H5N1，在家禽中引起全身感染，其中死亡率可达100%。2009年，H1N1流感是人流感的最普遍病因。猪起源的H1N1的新毒株在2009年出现，并被世界卫生组织宣布为大范围流行。该毒株称作“猪流感”。H1N1A型流感病毒也是1918年的西班牙流感大流行、1976年的Fort Dix爆发和1977-1978年的俄罗斯流感大流行的病因。

[0132] 所述A型流感病毒基因组编码9个结构蛋白和1个具有调控功能的非结构 (NS1) 蛋白。所述流感病毒分段基因组含有8个负义RNA (nsRNA) 基因片段 (PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA和NA)，所述8个负义RNA基因片段编码至少10个多肽，包括RNA指导的RNA聚合酶蛋白 (PB2、PB1和PA)、核蛋白 (NP)、神经氨酸酶 (NA)、血凝素 (HA1和HA2亚基)、基质蛋白 (M1和M2) 和非结构蛋白 (NS1和NS2) (Krug等In “The Influenza Viruses,” R.M.Krug, ed., Plenum Press, N.Y., 1989, pp. 89-152)。

[0133] 流感病毒能够引起广泛传播的疾病是由于其能够通过发生抗原改变而逃避免疫系统，该过程被认为发生在宿主同时感染动物流感病毒和人流感病毒时。在宿主中突变和重排过程中，所述病毒可将来源于另一病毒的HA和/或NA表面蛋白基因整合到其基因组中，从而产生新的流感亚型并逃避免疫系统。

[0134] HA是病毒表面糖蛋白，一般包括约560个氨基酸并占总病毒蛋白的25%。它负责在感染早期病毒颗粒吸附及侵入宿主细胞。病毒HA0前体切割为HA1和HA2亚片段是病毒感染细胞的必需步骤。因此，需要切割以将宿主细胞内的新病毒颗粒转化成能够感染新细胞的病毒粒子。已知切割发生在完整的HA0膜蛋白从受感染细胞的内质网转运至质膜的过程中。在转运过程中，血凝素经历一系列的共翻译修饰和翻译后修饰，包括前体HA被蛋白水解切割为氨基末端片段HA1和羧基末端HA2。在原代组织培养物或已建立的细胞系中培养流感病毒株的主要困难之一，源于需要在所述宿主细胞内蛋白水解切割活化流感血凝素。

[0135] 虽然已知未切割的HA可介导病毒吸附于细胞表面其含有神经氨酸的受体，但其不能够进行感染周期的下一个步骤，即融合。已经报道，需要通过切割暴露HA2的疏水氨基末端，以使其可被插入至靶细胞，从而形成病毒和靶细胞膜之间的桥接。这个过程之后，所述两个膜发生融合，然后病毒进入靶细胞中。

[0136] HA的蛋白水解活化包括由胰蛋白酶样内切蛋白酶在精氨酸残基处切割,所述胰蛋白酶样内切蛋白酶常为钙依赖的且具有中性最适pH的胞内酶。由于所述活化的蛋白酶为细胞酶,被感染细胞的类型决定HA是否被切割。哺乳动物流感病毒和非致病性禽流感病毒的HA仅在有限数量的细胞类型中对蛋白水解切割敏感。另一方面,在H5和H7亚型中的致病性禽流感病毒的HA被存在于很多不同宿主细胞中的蛋白酶切割。因此,由于与病毒致病性质相关的血凝素切割能力不同,导致了宿主范围的不同。

[0137] 神经氨酸酶(NA)是流感病毒的第二膜糖蛋白。已经表明,病毒NA的存在对于针对传染性病毒产生多面性的保护性免疫应答是重要的。对于大多数A型流感病毒,NA具有413个氨基酸的长度,且由具有1413个核苷酸的基因编码。在流感病毒中已经鉴定了9个不同的NA亚型(N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8和N9),所有这些NA亚型已经在野生鸟类中发现。NA通过从受感染细胞表面的碳水化合物部分切割末端神经氨酸(也称唾液酸)残基,参与破坏病毒HA的细胞受体。NA还从病毒蛋白上切割唾液酸残基,防止病毒的聚集。利用这种机制,设想了NA通过如下方式促进病毒子代的释放:阻止新形成的病毒颗粒沿着细胞膜聚积,以及通过促进所述病毒通过存在于粘膜表面的粘液的转运。NA是发生抗原变异的重要抗原决定簇。

[0138] 除了表面蛋白HA和NA之外,流感病毒包括6种其他的内部基因,其产生8种不同蛋白质,包括聚合酶基因PB1、PB2和PA,基质蛋白M1和M2,核蛋白(NP)及非结构蛋白NS1和NS2(Horimoto等*Clin Microbiol Rev.*14(1):129-149,2001)。

[0139] 为了组装成子代病毒颗粒,病毒RNA作为由三种流感病毒聚合酶蛋白、核蛋白(NP)和病毒RNA组成的核糖核蛋白(RNP)复合体,与流感病毒基质1(M1)蛋白和核输出蛋白相结合,从核中被转运(Marsh等*J Virol*,82:2295-2304,2008)。位于包膜内的M1蛋白被认为在组装和芽殖中发挥作用。有限量的M2蛋白被整合入病毒粒子中(Zebedee,J.*Virol.*62:2762-2772,1988)。它们形成具有H⁺离子通道活性的四聚体,且当被核内体内的低pH活化时,它们将酸化病毒粒子的内部,促进其脱壳(Pinto等*Cell* 69:517-528,1992)。金刚烷胺是一种抗流感药,其通过干扰M2离子通道活性,从而抑制病毒脱壳,来预防病毒感染。

[0140] NS1——一种非结构蛋白——具有多重功能,包括调控细胞mRNA的剪接和出核转运以及刺激翻译。NS1的主要功能似乎是抵消宿主的干扰素活性,因为在干扰素无缺陷的细胞中,NS1敲除的病毒虽然比亲本病毒的生长效率低,但其有活力(Garcia-Sastre,*Virology* 252:324-330,1998)。

[0141] 已经在病毒颗粒中检测到NS2(Richardson等*Arch. Virol.*116:69-80,1991; Yasuda等*Virology* 196:249-255,1993)。估计病毒颗粒中的NS2蛋白的平均数量为130-200个分子。体外结合测定显示在M1和NS2之间有直接的蛋白-蛋白接触。还已经在病毒感染的细胞裂解液中通过免疫沉淀检测到NS2-M1复合体。认为NS2蛋白通过与M1蛋白的相互作用,在RNP从核中输出的过程中起作用(Ward等*Arch. Virol.*140:2067-2073,1995)。

[0142] VI. 流感VLP及其给药

[0143] 本文提供了包含优化的HA(例如具有如SEQ ID NO:1-11任一个所示的氨基酸序列的HA)的流感VLP。所述流感VLP一般由HA、NA和M1蛋白组成。流感VLP的产生已经在本领域中描述,且在本领域普通技术人员的能力范围内。例如,可以通过使用编码所述HA、NA和M1蛋白的质粒转染宿主细胞来产生流感VLP。将所述转染的细胞孵育一段适当的时间(例如约72

小时)以使蛋白表达后,可从细胞培养物上清液中分离VLP。以下的实施例2提供了从细胞上清液中纯化流感VLP的示例性方法。在该实施例中,通过低速离心(以去除细胞碎片)、真空过滤和通过20%甘油的超速离心,来分离VLP。

[0144] 本文公开的流感VLP可用作流感疫苗,以引起针对H1N1流感病毒的保护性免疫应答。

[0145] 可通过通常用于将重组病毒导入受试者中的任何途径,将流感VLP或其组合物给予受试者。给药方法包括,但不限于,真皮内、肌肉、腹膜内、非消化道、静脉、皮下、阴道、直肠、鼻内、吸入或口服。非消化道给药,例如皮下、静脉或肌肉内给药,一般通过注射完成。注射剂(injectable)可以以常规的形式制备,为液体溶液或悬液、适合用于注射前液体中的溶液或悬液的固体形式,或为乳剂。可由之前所描述的那些种类的无菌粉剂、粒剂和片剂制备注射溶液和悬液。给药可以是全身的或局部的。

[0146] 以任何合适的方式例如与可药用载体一起给予流感VLP或其组合物。可药用载体部分由被给予的具体组合物,以及用以给予所述组合物的具体方法来确定。因此,有多种本公开的药物组合物的合适的制剂。

[0147] 用于非消化道给药的制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬液和乳剂。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油和可注射有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳剂或悬液,包括盐水和缓冲介质。非消化道的载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏或不挥发性油。静脉载体包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。还可以存在防腐剂和其他添加剂例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0148] 一些组合物可潜在地作为可药用的酸加成盐或碱加成盐被给予,所述酸加成盐通过与无机酸例如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸,以及有机酸例如甲酸、乙酸、丙酸、羟乙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸和延胡索酸反应而形成,所述碱加成盐通过与无机碱例如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾,以及有机碱例如单烷基胺、二烷基胺、三烷基胺和芳香基胺及取代的乙醇胺反应来形成。

[0149] 可通过单剂量或多剂量来完成给药。在本公开的上下文中给予受试者的剂量随着时间的推移应足以在受试者中诱导有益的治疗反应,或足以抑制或预防H1N1流感病毒感染。所需剂量根据受试者的物种、年龄、重量和综合状况、所治疗的感染的严重性、使用的具体组合物及其给药方式而在各个受试者之间不同。本领域普通技术人员仅使用常规实验即可确定适当的剂量。

[0150] 本文提供了包括治疗有效量的单独的或与可药用载体组合的流感VLP的药物组合物。可药用载体包括,但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇,及其组合。所述载体和组合物可为无菌的,且所述制剂适合所述给药方式。所述组合物还可含有少量的润湿剂、乳化剂或pH缓冲剂。所述组合物可为液体溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂。所述组合物可与惯常的粘合剂和载体(例如甘油三酯)制成栓剂。口服制剂可包括标准载体例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。可使用任何常见的药物载体,例如无菌盐溶液或芝麻油。所述介质还可含有常规的药物辅助物质例如,用于调整渗透压的可药用盐、缓冲液、防腐剂等。可与本文提供的组合物和方法共同使用的其他介质为生理盐水和芝麻油。

[0151] 本文描述的流感VLP可单独给予或与其他治疗剂组合给予以增强抗原性。例如,所述流感VLP可与佐剂(例如弗氏不完全佐剂或弗氏完全佐剂)一起给予。

[0152] 任选地,一种或多种细胞因子,例如IL-2、IL-6、IL-12、RANTES、GM-CSF、TNF- α 或IFN- γ ,一种或多种生长因子,例如GM-CSF或G-CSF;一种或多种分子例如OX-40L或41BBL,或这些分子的组合,可用作生物佐剂(见,例如,Salgaller等1998,J.Surg.Oncol.68(2):122-38;Lotze等2000,Cancer J.Sci.Am.6(Suppl 1):S61-6;Cao等1998,Stem Cells16(Suppl 1):251-60;Kuiper等2000,Adv.Exp.Med.Biol.465:381-90)。可将这些分子给予宿主全身(或局部)。

[0153] 已知很多在体外和体内诱导细胞应答的方式。脂质已经被鉴定为能够协助引导体内针对多种抗原的CTL的试剂。例如,如美国专利No.5,662,907所描述,棕榈酸残基可结合到赖氨酸残基的 α 和 ϵ 氨基上,然后连接(例如,经一个或多个连接残基,例如甘氨酸、甘氨酸-甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸-丝氨酸等)到免疫原性肽上。然后,可将所述脂质化的肽直接以微团形式注射、整合到脂质体或乳化于佐剂中。在另一实例中,大肠杆菌(E.coli)脂蛋白,例如三棕榈酸基-S-甘氨酸基半胱氨酸基丝氨酸基-丝氨酸(tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserine),当其共价结合到适当的肽上时,可用于引导肿瘤特异性的CTL(见,Deres等Nature342:561,1989)。此外,因为中和抗体的诱导还可被使用缀合至展示出适当表位的肽上的相同分子引导,所以当认为需要时可以组合两种组合物,以引导体液应答和细胞介导的应答。

[0154] 虽然本文举例说明了给予含有优化HA蛋白的VLP,但是本领域技术人员应理解,还可以给予所述优化的流感HA蛋白本身(无病毒颗粒)或作为融合蛋白,以在受试者中引起免疫应答。

[0155] 提供了以下实施例以说明某些具体特征和/或实施方案。这些实施例不应被解释为将本公开限制在描述的具体特征或实施方案中。

[0156] 实施例

[0157] 实施例1:产生H1N1流感的COBRA序列

[0158] 从NCBI流感病毒资源数据库下载A型流感H1N1HA氨基酸序列。来自1918-2011年的1134个分离株的H1N1HA蛋白被用于产生共有序列。使用以下方法产生了11个不同的共有序列(SEQ ID NO:1-11):

[0159] 1.COBRA方法1(1918-2005年)

[0160] 使用来源于1918-1934年(8)、1935-1947年(13)、1948-1957年(12)、1977-1983年(68)、1984-1986年(9)、1987-1991年(12)、1992-1999年(59)和2000-2005年(263)的分离株,根据分离日期组织序列(456),然后产生8个第一共有序列。通过将所述第一共有序列按日期分组,产生4个第二共有序列,如图1所示。通过比对所述4个第二共有序列,产生最终共有序列(第三层级共有序列;SEQ ID NO:1)。

[0161] 2.COBRA方法2(1918-2005年)

[0162] 按照方法1,根据分离日期组织序列(456)以产生8个第一共有序列。通过比对所述8个第一共有序列产生最终共有序列(SEQ ID NO:2),如图2所示。

[0163] 3.COBRA方法3(1918-2005年)

[0164] 通过比对来源于1918-2005年的456个H1N1病毒分离株,产生共有序列(SEQ ID

NO:3)。

[0165] 4. COBRA方法4 (1918-2005年)

[0166] 使用来源于1918-1933年 (6)、1934-1946年 (15)、1947-1956年 (12)、1957-1977年 (8)、1978-1980年 (17)、1981-1985年 (49)、1986-1990年 (14)、1991-1995年 (27)、1996-1998年 (27) 和1999-2005年 (281) 的分离株, 根据分离日期组织序列 (456), 然后产生10个第一共有序列, 如图3所示。通过比对所述10个第一共有序列产生最终共有序列 (SEQ ID NO:4)。

[0167] 5. COBRA方法5 (1918-2011年)

[0168] 使用来源于1918年 (1)、1976年 (4)、2009-2011年 (123)、1933-1934年 (8)、1935-1947年 (13)、1948-1957年 (12)、1977-1983年 (68)、1984-1986年 (9)、1987-1991年 (12)、1992-1999年 (27)、2000-2005年 (59) 和2006-2008年 (798) 的分离株, 根据分离日期组织序列 (1134), 然后产生12个第一共有序列。根据“猪”序列或根据日期对所述第一共有序列分组, 产生4个第二共有序列, 如图4所示。通过比对所述4个第二共有序列产生最终共有序列 (第三层级共有序列; SEQ ID NO:5)。

[0169] 6. COBRA方法6

[0170] 使用来源于1918年 (1)、1933-1934年 (8)、1935-1947年 (13)、1948-1957年 (12)、1976年 (4)、1977-1983年 (68)、1984-1986年 (9)、1987-1991年 (12)、1992-1999年 (27)、2000-2005年 (59)、2006年 (76)、2007-2008年 (722) 和2009-2011年 (123) 的分离株, 根据分离日期组织序列 (1134), 然后产生13个第一共有序列, 如图5所示。通过比对所述13个第一共有序列产生最终共有序列 (SEQ ID NO:6)。

[0171] 7. COBRA方法5脱糖基化

[0172] 通过改变方法5的共有序列 (SEQ ID NO:5) 以去除预测的糖基化位点来产生该序列 (SEQ ID NO:7)。

[0173] 8. 1918-1957 COBRA

[0174] 通过比对来源于1918-1957年的H1N1分离株产生该序列 (SEQ ID NO:8)。

[0175] 9. 1977-2005 COBRA

[0176] 通过比对来源于1977-2005年的H1N1分离株产生该序列 (SEQ ID NO:9)。

[0177] 10. 人猪 COBRA

[0178] 通过比对H1N1人猪流感分离株产生该序列 (SEQ ID NO:10)。使用来源于1918、1976和2009-2011年的共有序列比对该序列。

[0179] 11. 猪 COBRA

[0180] 通过比对H1N1猪流感分离株产生该序列 (SEQ ID NO:11)。使用来源于1930-2010年的猪序列比对该序列。

[0181] 根据方法1产生的COBRA氨基酸序列被反向翻译, 并为在哺乳动物细胞中表达而进行优化, 包括密码子使用和RNA优化 (GeneArt; Regensburg, 德国)。优化的核酸序列如SEQ ID NO:13所示。剩余的COBRA序列也会被反向翻译, 并为在哺乳动物细胞中表达而进行优化。将所述优化的核酸序列插入pTR600表达载体 (美国专利申请公开文本No. 2002/0106798; Ross等*Nat Immunol*. 1 (2):102-103, 2000; Green等*Vaccine* 20:242-248, 2001)。

[0182] 实施例2: 制备流感VLP并使用流感VLP进行免疫

[0183] 以下方法可用于产生和表征包含优化HA的流感VLP。免疫小鼠、雪貂和猕猴的示例

性方法也描述如下(也见,Giles和Ross,Vaccine29(16):3043-3054,2011)。

[0184] 疫苗制备

[0185] 使用表达M1、NA和优化的HA的质粒瞬时转染293T细胞,在37℃下孵育72小时。所述编码M1、NA和HA的序列可为在哺乳动物细胞中表达而进行密码子优化。收集上清液,低速离心以去除细胞碎片,然后通过0.22μm无菌滤器进行真空过滤。4℃下超速离心(100000×g透过20%甘油,重量/体积)4小时来纯化VLP。然后,将片状沉淀物重悬于pH 7.2的PBS中,并以单次使用量分装保存于-80℃直至使用。使用Micro BCATM蛋白测定试剂盒(Pierce Biotechnology,Rockford,IL,USA)确定总蛋白浓度。

[0186] 剂量确定

[0187] 可通过蛋白质印迹和光密度法确定HA具体含量。以标准总蛋白量制备纯化的重组COBRA HA和纯化的VLP,将其在10%SDS-PAGE凝胶上电泳,并转至PVDF膜。将所述印迹用来源于流感感染的小鼠的多克隆抗血清探测,使用缀合有辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗小鼠IgG(Southern Biotech;Birmingham,AL,美国)检测HA-抗体复合体。用化学发光底物(Pierce Biotechnology;Rockford IL,美国)检测HRP,曝光到X-线胶片(ThermoFisher;Pittsburgh,PA,美国)。用ImageJ软件(NIH)确定条带密度。重组HA条带的密度用于计算标准曲线,使用所述重组HA的结果内插所述纯化VLP的密度。

[0188] 小鼠研究

[0189] BALB/c小鼠(小家鼠(*Mus musculus*),雌性,6-8周龄)可购自Harlan Sprague Dawley(Indianapolis,IN,美国)。小鼠饲养在微隔离单元中,自由取食食物和水,并根据USDA的用于实验室动物的指导照料。在0周时,基于光密度测定的HA含量,通过肌肉注射,用纯化的COBRA HA VLP的三个剂量(1.5μg、0.3μg或0.06μg)之一接种小鼠,在第3周时用相同剂量加强。每个剂量的疫苗都单独地用明矾佐剂(Imject Alum,Pierce Biotechnology;Rockford,IL,美国)、CpG寡核苷酸或载体配制。每个疫苗接种后的第14-21天,从麻醉的小鼠中经后眶丛收集血液,并转移至微量离心管中。将管离心,分离血清,将血清冷冻于-80±5℃。在第5周时,使用有代表性的再装配病毒或COBRA HA VLP确定每个疫苗组的血凝抑制(HAI)血清抗体滴度。

[0190] 末次接种后三周,用50μl体积的高致病性H1N1病毒对小鼠进行鼻内攻击。感染后,在感染后的14天内,每天监测小鼠的体重减轻、疾病征象和死亡。接种后,每天记录每组的个体体重、疾病评分(Toapanta和Ross,Respiratory Research 10(1):112,2009)和死亡。

[0191] 雪貂研究

[0192] 艾鼬雪貂(Fitch ferrets,*Mustela putorius furo*,雌性,6-12月龄),未感染过流感且去臭腺(de-scented),可购自马歇尔农场(Sayre,PA,美国)。雪貂成对饲养于含有Sani-chips Laboratory Animal Bedding(P.J.Murphy Forest Products,Montville,NJ,USA)的不锈钢笼子(Shor-line,Kansas City,KS,USA)中。无限制地给雪貂提供Teklad Global Ferret Diet(Harlan Teklad,Madison,WI,USA)和淡水。用pH7.2的PBS稀释所述COBRA HA VLP至终浓度。在0周时,基于由光密度测定确定的HA含量,通过以0.25ml的体积,用纯化的COBRA HA VLP的两个剂量(15μg、3μg)之一在四头肌处肌肉注射接种雪貂,然后在第3周时用相同剂量加强。疫苗在使用前在-80℃下保存,用明矾佐剂(Imject Alum;Pierce Biotechnology,Rockford,IL,USA)配制后立即使用。在接种方案期间每周监测动物的不利

事件,包括体重减轻、发烧、活动减少、流涕、打喷嚏和腹泻。接种之前,通过HAI测定确认动物对于传播的A型流感和B型流感病毒是阴性的。每次接种后的第14-21天,从麻醉的雪貂中经前腔静脉收集血液,并转移至微量离心管中。将离心管离心并分离血清,将血清冷冻于 $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。第5周时,使用有代表性的重配株病毒或COBRA HA VLP,确定每个疫苗组的HAI血清抗体滴度。

[0193] 末次接种后的第三周,用1ml体积的高致病性H1N1病毒对雪貂进行鼻内攻击。感染后,在感染后的14天内,每天监测雪貂的体重减轻、疾病征象和死亡。接种后,每天记录每组的个体体重、患病评分和死亡。接种后的7天内,每天通过将3ml的PBS滴入麻醉的雪貂的鼻孔内,来进行鼻洗涤。收集洗涤物并保存于 -80°C 直至使用。

[0194] 灵长类免疫

[0195] 短尾猕猴(*Cynomolgus macaques*) (食蟹猴(*Macaca fascicularis*),雄性,3-5岁)可购自Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, 美国)。在0周时,基于光密度测定的HA含量,经肌肉注射,用纯化的COBRA HA VLP (15 μg)接种猕猴,然后在第3周和第6周时用相同剂量加强。疫苗用明矾佐剂(Imject Alum;Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)配制后立即使用。每次接种后的第21天,经股静脉从麻醉的猕猴收集血液,并将血液转至血清分离管中。使离心管中血液凝固,然后离心,分离血清并冷冻在 $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下。在第5周时,使用有代表性的重配株病毒或COBRA HA VLP确定每个疫苗组的终点IgG滴度和HAI血清抗体滴度。

[0196] 末次接种后的第三周,用1ml体积的高致病性H1N1病毒通过鼻内、气管内和眼窝接种对猕猴进行攻毒。感染后,在感染后的5天内,每天监测猕猴的体重减轻、疾病征象和死亡。接种后,每天记录每组的个体体重、患病评分和死亡。

[0197] 实施例3:COBRA H1N1方法1的HA的分析

[0198] 本实施例描述了以COBRA H1N1流感VLP接种小鼠诱导了显著的HAI血清抗体滴度的结果,还表明COBRA H1N1HA的体外翻译导致了所述蛋白以预期分子量表达。

[0199] HAI血清抗体滴度

[0200] 为了评估含有COBRA方法1的H1N1HA的流感病毒是否能够在感染的动物中引起抗体应答,如实施例2所述产生了包含所述COBRA方法1的HA (SEQ ID NO:1)的VLP。用所述VLP接种小鼠,并在感染后的第3周、第5周、第8周和第12周收集血清用于确定HAI血清抗体滴度。针对季节性H1N1流感病毒A/新喀里多尼亚/20/1999测试了抗血清。如图6所示,在感染后的第5周开始检测到HAI滴度,HAI的滴度在第8周和第12周增加。

[0201] COBRA HA的体外表达

[0202] 如实施例2所描述,所述COBRA HA方法1的氨基酸序列被反向翻译,并且为在哺乳动物细胞中表达进行优化。将编码COBRA HA的优化的核酸序列 (SEQ ID NO:13)插入pTR600表达载体中。为了评价COBRA H1N1HA是否在体外正确地表达,以编码COBRA H1N1HA的pTR600表达载体转染细胞。通过SDS-PAGE分析细胞培养物裂解液,然后通过蛋白质印迹检测流感HA。如图7所示,COBRA HA迁移至其预期的分子量,证实了所述合成蛋白的体外表达。

[0203] 鉴于所公开的发明的原理可应用于许多可能的实施方案,应认识到,所示出的实施方案只是本发明的优选实例,其不应被认为是对本发明范围的限制。而是,本发明的范围由以下权利要求书限定。因此,申请人要求落入这些权利要求的范围和主旨的所有发明。

序列表

- <110> 高等教育联邦系统-匹兹堡大学
 <120> 计算优化的宽反应性的H1N1流感抗原
 <130> 8123-87208-02
 <150> US 61/498,800
 <151> 2011-06-20
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 1

```

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Thr Ala Thr Tyr
1           5           10           15
Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
           20           25           30
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
           35           40           45
Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile
           50           55           60
Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65           70           75           80
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
           85           90           95
Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
           100          105          110
Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
           115          120          125
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
           130          135          140
Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser
145          150          155          160
Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro
           165          170          175
Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val
  
```


	180		185		190
Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Ile					
	195		200		205
Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser					
	210		215		220
Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln					
225		230		235	240
Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr					
	245		250		255
Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe					
	260		265		270
Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser					
	275		280		285
Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn					
	290		295		300
Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys					
305		310		315	320
Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg					
	325		330		335
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly					
	340		345		350
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr					
	355		360		365
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser					
	370		375		380
Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile					
385		390		395	400
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys					
	405		410		415
Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe					
	420		425		430
Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn					
	435		440		445
Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu					
	450		455		460
Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly					
465		470		475	480
Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val					
	485		490		495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 2

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Ala Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140
 Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Lys Gly Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro
 165 170 175

Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190
 Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Ile
 195 200 205
 Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Asn
 210 215 220
 Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
 225 230 235 240
 Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
 245 250 255
 Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
 260 265 270
 Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser
 275 280 285
 Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn
 290 295 300
 Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320
 Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
 325 330 335
 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380
 Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys
 405 410 415
 Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val

	485		490		495
Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro		Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu			
	500		505		510
Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val		Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr			
	515		520		525
Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr		Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu			
	530		535		540
Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe		Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu			
545		550		555	560
Gln Cys Arg Ile Cys Ile					
	565				
<210> 3					
<211> 566					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成多肽					
<400> 3					
Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu		Cys Ala Phe Thr Ala Thr Tyr			
1	5	10		15	
Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His		Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr			
	20	25		30	
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val		Thr Val Thr His Ser Val Asn			
	35	40		45	
Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys		Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile			
	50	55		60	
Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser		Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly			
65		70		75	80
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ile Ser		Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile			
	85	90		95	
Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly		Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe			
	100	105		110	
Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln		Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe			
	115	120		125	
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu		Ser Ser Trp Pro Asn His Thr			
	130	135		140	
Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ser Cys		Ser His Asn Gly Lys Ser Ser			
145		150		155	160
Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr		Glu Lys Asn Gly Leu Tyr Pro			

	165		170		175										
Asn	Leu	Ser	Lys	Ser	Tyr	Val	Asn	Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Leu	Val
	180		185		190										
Leu	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Asn	Ile	Gly	Asp	Gln	Arg	Ala	Leu
	195		200		205										
Tyr	His	Thr	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val	Ser	Val	Val	Ser	Ser	His	Tyr	Ser
	210		215		220										
Arg	Arg	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile	Ala	Lys	Arg	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Gln
225			230		235		240								
Glu	Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu	Leu	Glu	Pro	Gly	Asp	Thr
	245		250		255										
Ile	Ile	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Ala	Pro	Trp	Tyr	Ala	Phe
	260		265		270										
Ala	Leu	Ser	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Ser
	275		280		285										
Met	Asp	Glu	Cys	Asp	Ala	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Gln	Gly	Ala	Ile	Asn
	290		295		300										
Ser	Ser	Leu	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	His	Pro	Val	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys
305			310		315		320								
Pro	Lys	Tyr	Val	Arg	Ser	Thr	Lys	Leu	Arg	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Arg
	325		330		335										
Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly
	340		345		350										
Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly	Met	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr
	355		360		365										
His	His	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Lys	Ser
	370		375		380										
Thr	Gln	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Val	Ile
385			390		395		400								
Glu	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys
	405		410		415										
Leu	Glu	Arg	Arg	Met	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Val	Asp	Asp	Gly	Phe
	420		425		430										
Leu	Asp	Ile	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Asn
	435		440		445										
Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Glu
	450		455		460										
Lys	Val	Lys	Ser	Gln	Leu	Lys	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Asn	Gly
465			470		475		480								

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 4

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Leu Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Ala Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn
 130 135 140
 Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ser Cys Ser His Lys Gly Lys Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro			
	165	170	175
Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val			
	180	185	190
Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Thr Ile			
	195	200	205
Tyr Arg Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser Asn Tyr Asn			
	210	215	220
Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln			
225	230	235	240
Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr			
	245	250	255
Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe			
	260	265	270
Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser			
	275	280	285
Met Asp Glu Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn			
	290	295	300
Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys			
305	310	315	320
Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg			
	325	330	335
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly			
	340	345	350
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr			
	355	360	365
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser			
	370	375	380
Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile			
385	390	395	400
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys			
	405	410	415
Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe			
	420	425	430
Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn			
	435	440	445
Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu			
	450	455	460
Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly			

465	470	475	480
Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val			
	485	490	495
Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu			
	500	505	510
Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr			
	515	520	525
Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu			
	530	535	540
Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu			
545	550	555	560
Gln Cys Arg Ile Cys Ile			
	565		
<210> 5			
<211> 566			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成多肽			
<400> 5			
Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Asp			
1	5	10	15
Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr			
	20	25	30
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn			
	35	40	45
Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile			
	50	55	60
Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly			
65	70	75	80
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Leu Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile			
	85	90	95
Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe			
	100	105	110
Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe			
	115	120	125
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr			
	130	135	140
Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser			

145	150	155	160
Phe Tyr Arg Asn Leu	Leu Trp Leu Thr	Glu Lys Asn Gly	Ser Tyr Pro
	165	170	175
Asn Leu Ser Lys Ser	Tyr Val Asn Asn	Lys Gly Lys Glu	Val Leu Val
	180	185	190
Leu Trp Gly Val His	His Pro Ser Asn	Ile Gly Asp Gln	Gln Ala Leu
	195	200	205
Tyr Gln Thr Glu Asn	Ala Tyr Val Ser	Val Val Ser Ser	His Tyr Asn
	210	215	220
Arg Lys Phe Thr Pro	Glu Ile Ala Lys	Arg Pro Lys Val	Arg Asp Gln
225	230	235	240
Glu Gly Arg Ile Asn	Tyr Tyr Trp Thr	Leu Leu Glu Pro	Gly Asp Thr
	245	250	255
Ile Ile Phe Glu Ala	Asn Gly Asn Leu	Ile Ala Pro Trp	Tyr Ala Phe
	260	265	270
Ala Leu Ser Arg Gly	Phe Gly Ser Gly	Ile Ile Thr Ser	Asn Ala Ser
	275	280	285
Met His Glu Cys Asp	Thr Lys Cys Gln	Thr Pro Gln Gly	Ala Ile Asn
	290	295	300
Ser Ser Leu Pro Phe	Gln Asn Ile His	Pro Val Thr Ile	Gly Glu Cys
305	310	315	320
Pro Lys Tyr Val Arg	Ser Thr Lys Leu	Arg Met Val Thr	Gly Leu Arg
	325	330	335
Asn Ile Pro Ser Ile	Gln Ser Arg Gly	Leu Phe Gly Ala	Ile Ala Gly
	340	345	350
Phe Ile Glu Gly Gly	Trp Thr Gly Met	Ile Asp Gly Trp	Tyr Gly Tyr
	355	360	365
His His Gln Asn Glu	Gln Gly Ser Gly	Tyr Ala Ala Asp	Gln Lys Ser
	370	375	380
Thr Gln Asn Ala Ile	Asn Gly Ile Thr	Asn Lys Val Asn	Ser Val Ile
385	390	395	400
Glu Lys Met Asn Thr	Gln Phe Thr Ala	Val Gly Lys Glu	Phe Asn Lys
	405	410	415
Leu Glu Lys Arg Met	Glu Asn Leu Asn	Lys Lys Val Asp	Asp Gly Phe
	420	425	430
Leu Asp Ile Trp Thr	Tyr Asn Ala Glu	Leu Leu Val Leu	Leu Glu Asn
	435	440	445
Glu Arg Thr Leu Asp	Phe His Asp Ser	Asn Val Lys Asn	Leu Tyr Glu
	450	455	460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 6

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Leu Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110
 Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140

Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser																			
145																			
Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro																			
Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val																			
Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu																			
Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Asn																			
Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln																			
Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr																			
Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe																			
Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser																			
Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn																			
Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys																			
Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg																			
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly																			
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr																			
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser																			
Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile																			
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys																			
Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe																			
Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn																			
Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu																			

450	455	460
Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly		
465	470	475
Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val		
	485	490
Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu		
	500	505
Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr		
	515	520
Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu		
	530	535
Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu		
545	550	555
Gln Cys Arg Ile Cys Ile		
	565	
<210> 7		
<211> 566		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成多肽		
<400> 7		
Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Asp		
1	5	10
Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr		
	20	25
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn		
	35	40
Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile		
	50	55
Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ala Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly		
65	70	75
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Leu Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile		
	85	90
Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe		
	100	105
Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe		
	115	120
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Ala		

130	135	140
Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser		
145	150	155
Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro		
	165	170
Asn Leu Ala Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val		
	180	185
Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Gln Ala Leu		
	195	200
Tyr Gln Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Asn		
	210	215
Arg Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln		
225	230	235
Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr		
	245	250
Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe		
	260	265
Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ala		
	275	280
Met His Glu Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn		
	290	295
Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys		
305	310	315
Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg		
	325	330
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly		
	340	345
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr		
	355	360
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser		
	370	375
Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile		
385	390	395
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys		
	405	410
Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe		
	420	425
Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn		
	435	440
		445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 8

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Met Lys Ala Arg Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Leu Ser Asn Arg Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110
 Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Lys His Asn
 130 135 140
 Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Ala Gly Lys Ser Ser
 145 150 155 160
 Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro
 165 170 175
 Asn Leu Ser Asn Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190
 Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Asp Asp Gln Gln Thr Leu
 195 200 205
 Tyr Gln Lys Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser Asn Tyr Asn
 210 215 220
 Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln
 225 230 235 240
 Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
 245 250 255
 Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
 260 265 270
 Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser
 275 280 285
 Met His Glu Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn
 290 295 300
 Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
 305 310 315 320
 Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
 325 330 335
 Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350
 Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380
 Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
 405 410 415
 Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn

435	440	445
Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu		
450	455	460
Lys Val Lys Ser Gln Leu Arg Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly		
465	470	475
Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val		
485	490	495
Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu		
500	505	510
Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr		
515	520	525
Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu		
530	535	540
Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu		
545	550	555
Gln Cys Arg Ile Cys Ile		
565		

<210> 9

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Thr Ala Thr Asp		
1	5	10
Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr		
20	25	30
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn		
35	40	45
Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile		
50	55	60
Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly		
65	70	75
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Phe Ser Lys Lys Ser Trp Ser Tyr Ile		
85	90	95
Ala Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe		
100	105	110
Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe		

115	120	125
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr		
130	135	140
Val Thr Lys Gly Val Thr Ala Ser Cys Ser His Lys Gly Lys Ser Ser		
145	150	155
Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Asn Gly Ser Tyr Pro		
165	170	175
Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val		
180	185	190
Leu Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Ile		
195	200	205
Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Asn		
210	215	220
Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln		
225	230	235
Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr		
245	250	255
Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe		
260	265	270
Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser		
275	280	285
Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn		
290	295	300
Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys		
305	310	315
Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg		
325	330	335
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly		
340	345	350
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr		
355	360	365
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser		
370	375	380
Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile		
385	390	395
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys		
405	410	415
Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe		
420	425	430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 10

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Met Lys Ala Ile Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Ala Ala Thr Asn
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45
 Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Leu Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Thr Ser Asn Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
 100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe		
115	120	125
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu		
130	135	140
Thr Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro Tyr Ala Gly Ala Ser Ser		
145	150	155
Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro		
	165	170
		175
Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val		
	180	185
		190
Leu Trp Gly Ile His His Pro Pro Thr Ser Thr Asp Gln Gln Ser Leu		
	195	200
		205
Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn		
	210	215
		220
Arg Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln		
225	230	235
		240
Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Ile Glu Pro Gly Asp Thr		
	245	250
		255
Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe		
	260	265
		270
Ala Met Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Ala Pro		
	275	280
		285
Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn		
290	295	300
Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys		
305	310	315
		320
Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg		
	325	330
		335
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly		
	340	345
		350
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr		
	355	360
		365
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser		
	370	375
		380
Thr Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile		
385	390	395
		400
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His		
	405	410
		415
Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe		

100	105	110
Ile Asn Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe		
115	120	125
Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Ala Ser Ser Trp Pro Asn His Glu		
130	135	140
Thr Asn Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro Tyr Ala Gly Ala Asn Ser		
145	150	155
Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro		
165	170	175
Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val		
180	185	190
Leu Trp Gly Ile His His Pro Pro Thr Ser Thr Asp Gln Gln Ser Leu		
195	200	205
Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn		
210	215	220
Arg Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln		
225	230	235
Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr		
245	250	255
Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe		
260	265	270
Ala Met Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Ala Pro		
275	280	285
Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn		
290	295	300
Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys		
305	310	315
Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg		
325	330	335
Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly		
340	345	350
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr		
355	360	365
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser		
370	375	380
Thr Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile		
385	390	395
Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His		
405	410	415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Arg Ser Gln Leu Arg Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 12

<211> 566

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) .. (13)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (15) .. (16)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature
<222> (20) .. (20)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (53) .. (53)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (60) .. (60)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (62) .. (62)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (68) .. (68)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (71) .. (71)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (73) .. (74)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (78) .. (78)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (86) .. (86)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (88) .. (91)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (97) .. (97)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (100) .. (100)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (102) .. (103)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (111) .. (111)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (113) .. (114)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (137) .. (137)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (142) .. (142)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (144) .. (147)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (152) .. (152)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (154) .. (156)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (158) .. (159)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (166) .. (166)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (169) .. (170)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (172) .. (174)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (177) .. (177)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (179) .. (180)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (187) .. (187)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (196) .. (196)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (200) .. (203)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature

<222> (206) .. (208)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (210) .. (213)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (217) .. (217)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (219) .. (219)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (222) .. (222)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (224) .. (224)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (226) .. (226)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (228) .. (228)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (233) .. (233)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (239) .. (239)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>

<221> misc_feature
<222> (241) .. (241)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (244) .. (244)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (251) .. (251)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (258) .. (258)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (262) .. (262)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (266) .. (267)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (269) .. (269)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (274) .. (275)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (278) .. (278)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (284) .. (284)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (286) .. (286)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (288) .. (291)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (293) .. (294)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (300) .. (300)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (305) .. (305)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (312) .. (312)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (325) .. (325)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (332) .. (332)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (390) .. (390)
<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (416) .. (416)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (419) .. (419)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (421) .. (421)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (435) .. (435)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (467) .. (467)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (471) .. (471)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (489) .. (491)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (516) .. (516)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (525) .. (527)
 <223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸
 <400> 12

Met Lys Ala Xaa Leu Leu Val Leu Leu Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Ala Asp Thr Xaa Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30
 Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
 370 375 380
 Thr Gln Asn Ala Ile Xaa Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
 385 390 395 400
 Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Xaa
 405 410 415
 Leu Glu Xaa Arg Xaa Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
 420 425 430
 Leu Asp Xaa Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Xaa Ser Gln Leu Xaa Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495
 Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
 500 505 510
 Asn Arg Glu Xaa Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Xaa Xaa Xaa Tyr
 515 520 525
 Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
 530 535 540
 Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 545 550 555 560
 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 13

<211> 1719

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

aagcttatga aggccaagct getggtgetg ctgtgegeect teacageccac ctacgccgac 60
 accatctgca tcggctacca cgccaacaac agcaccgaca ccgtggatac cgtgctggaa 120
 aagaacgtga ccgtgaccca cagcgtgaac ctgctggaag atagccacaa cggcaagctg 180
 tgccggctga agggaatcgc ccctctgcag ctgggcaact gctctatcgc cggtctgatt 240

ctgggcaacc ccgagtgcga gagcctgttc agcaaagagt cctggtceta catcgtggaa 300
 acccccaaca gcgagaacgg cacctgttac cccggetact tcgcccacta cgaggaactg 360
 cgggaacagc tgagcagcgt gtccagcttc gagagattcg agattttccc caaagagagc 420
 agctggccca accacaccgt gaccaaaggc gtgaccgect cctgctccca caatggcaag 480
 agcagcttct acagaaacct gctgtggctg accgagaaga acggcagcta ccccaacctg 540
 agcaagagct acgtgaacaa caaagaaaaa gaggtgctgg tgctgtgggg cgtgcaccac 600
 cctagcaaca tcggcgacca gcgggccatc taccacaccg agaatgccta cgtgtccctg 660
 gtgtccagcc actacagcag acggttcacc cccgagatcg ccaagaggcc caaagtgcgg 720
 gaccaggaag gccggatcaa ctactactgg aactgctgg aaccggcga taccatcatc 780
 ttcgaggcca acggcaacct gatcgecct ttgtaagcct tcgccctgag cagaggcttt 840
 ggcagcggca tcatcaccag caacgccagc atggacgagt gcgacccaa gtgccagaca 900
 cctcagggcg ccatcaatag cagcctgcc ttccagaacg tgcacccctg gaccatcggc 960
 gagtgcccca aatacgtgcg gagcaccaag ctgcggatgg tcaccggcct gagaaacatc 1020
 cccagcatcc agagcagggg cctgttcgga gccattgccg gctttatcga gggcggctgg 1080
 accggcatga tcgacgggtg gtacggetat caccaccaga acgagcaggg cagcggctac 1140
 gccgccgatc agaagtctac ccagaacgcc atcaacggca tcaccaaaa agtgaacagc 1200
 gtgatcgaga agatgaacac ccagttcacc gccgtgggca aagagttcaa caagctggaa 1260
 cggcggatgg aaaacctgaa caagaagtg gacgacgct tectggacat ctggacctac 1320
 aacgccgaac tgctggtgct gctggaaaac gagcggacce tggacttcca cgacagcaac 1380
 gtgaagaacc tgtacgagaa agtgaagtcc cagctgaaga acaacgcaa agagatcggc 1440
 aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc aacaacgagt gcatggaaag cgtgaagaat 1500
 ggcacctacg actaccccaa gtacagcgag gaaagcaagc tgaaccgca gaagatcgac 1560
 ggcgtgaagc tggaaatccat gggcgtgtac cagatcctgg ccatctatag caccgtggcc 1620
 agcagcctgg tgctgctggt gtctctgggc gccatcagct tttggatgtg cagcaacggc 1680
 agcctgcagt gccggatctg tatcggcagc atcggatcc 1719

H1N1 - 方法1

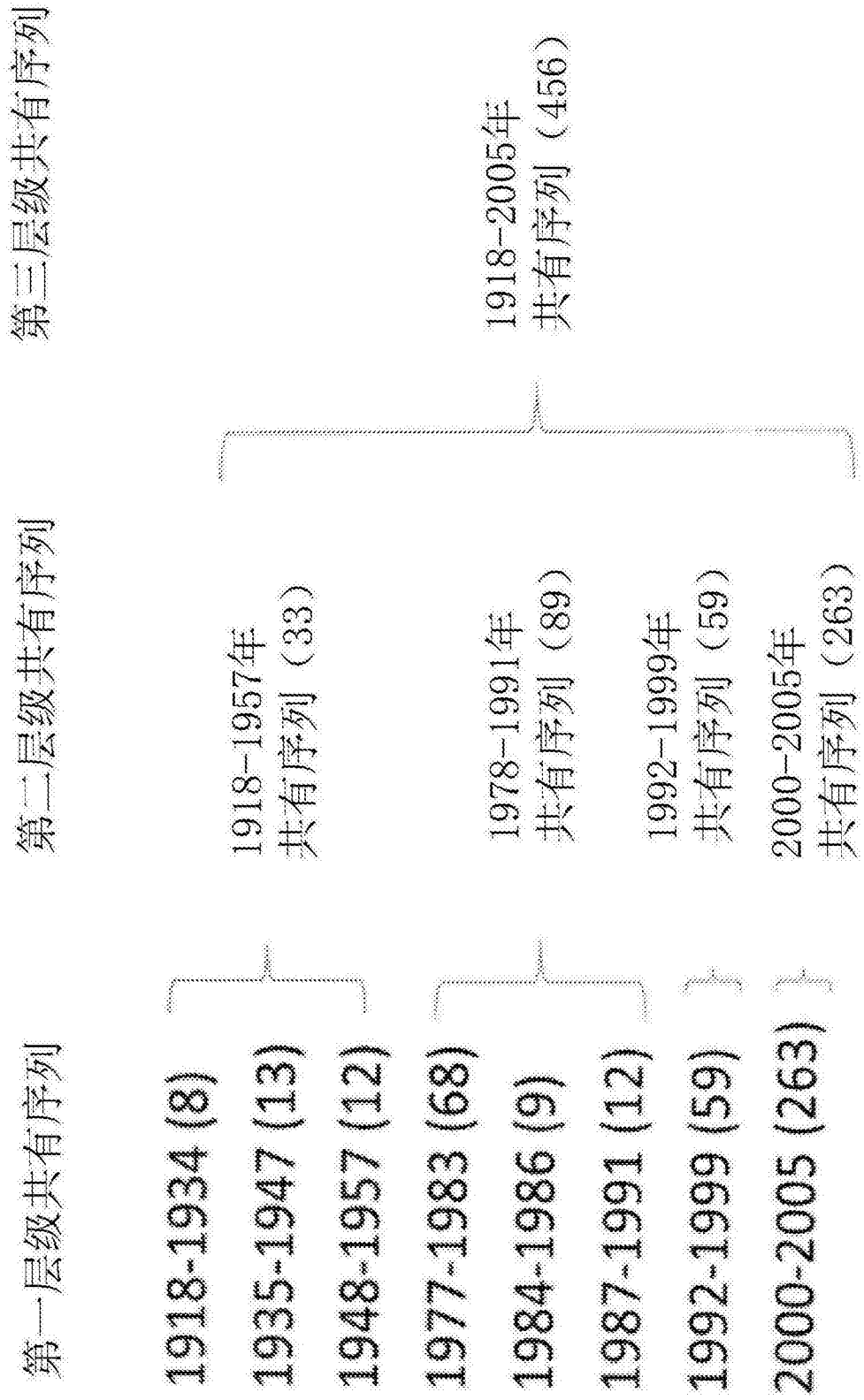


图1

H1N1方法2

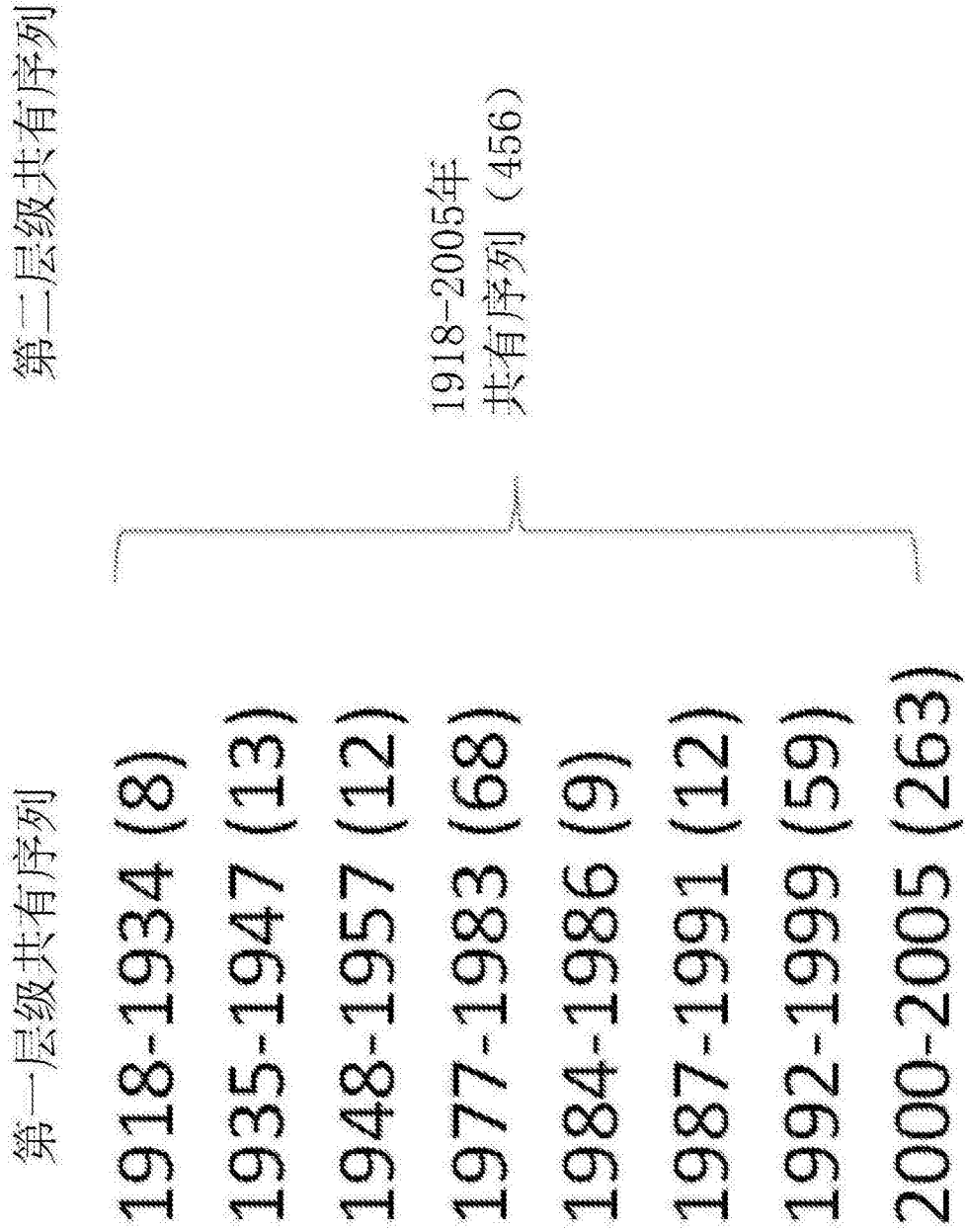


图2

H1N1方法2

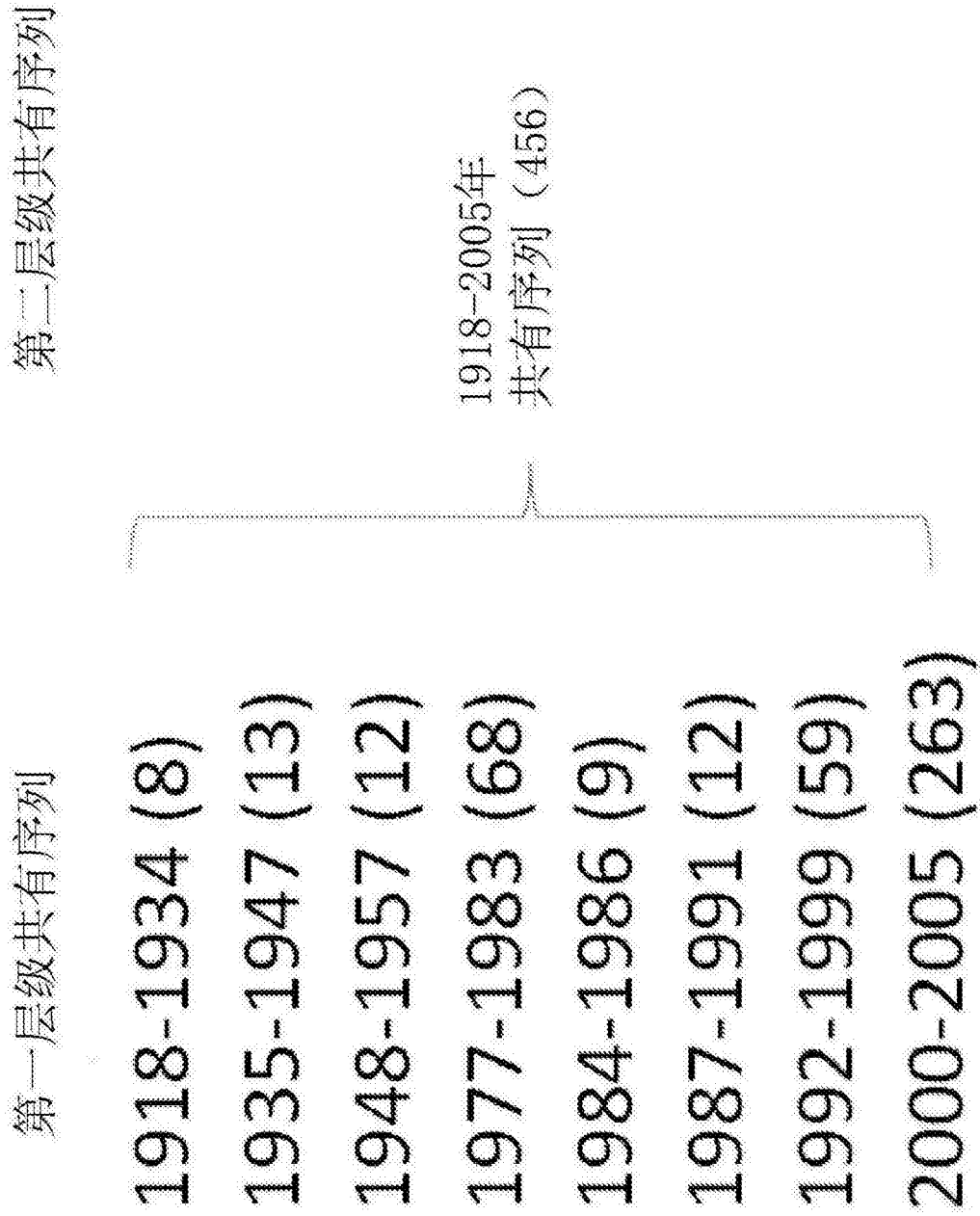


图3

H1N1方法5(1918-2011)

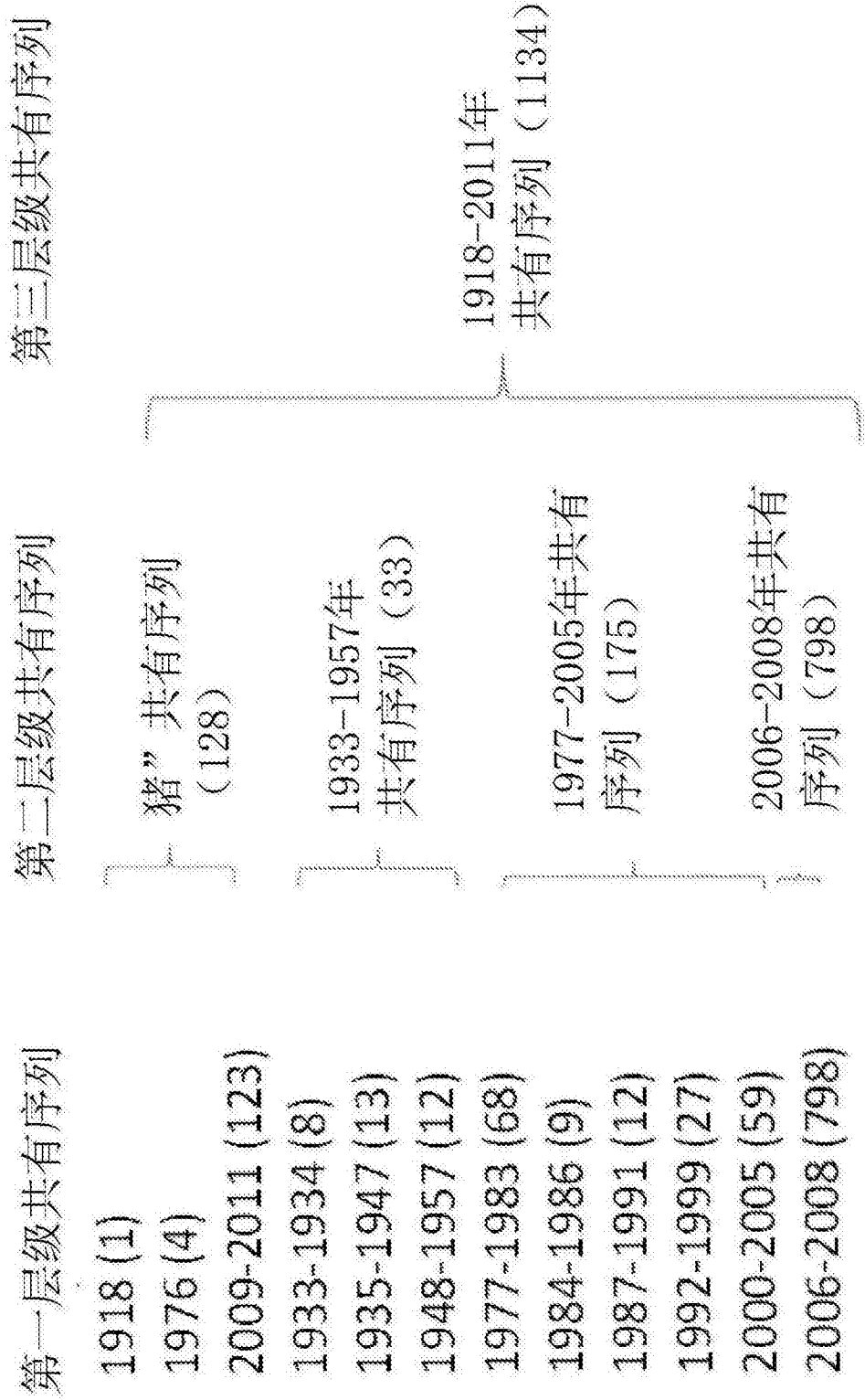


图4

H1N1方法6(1918-20)

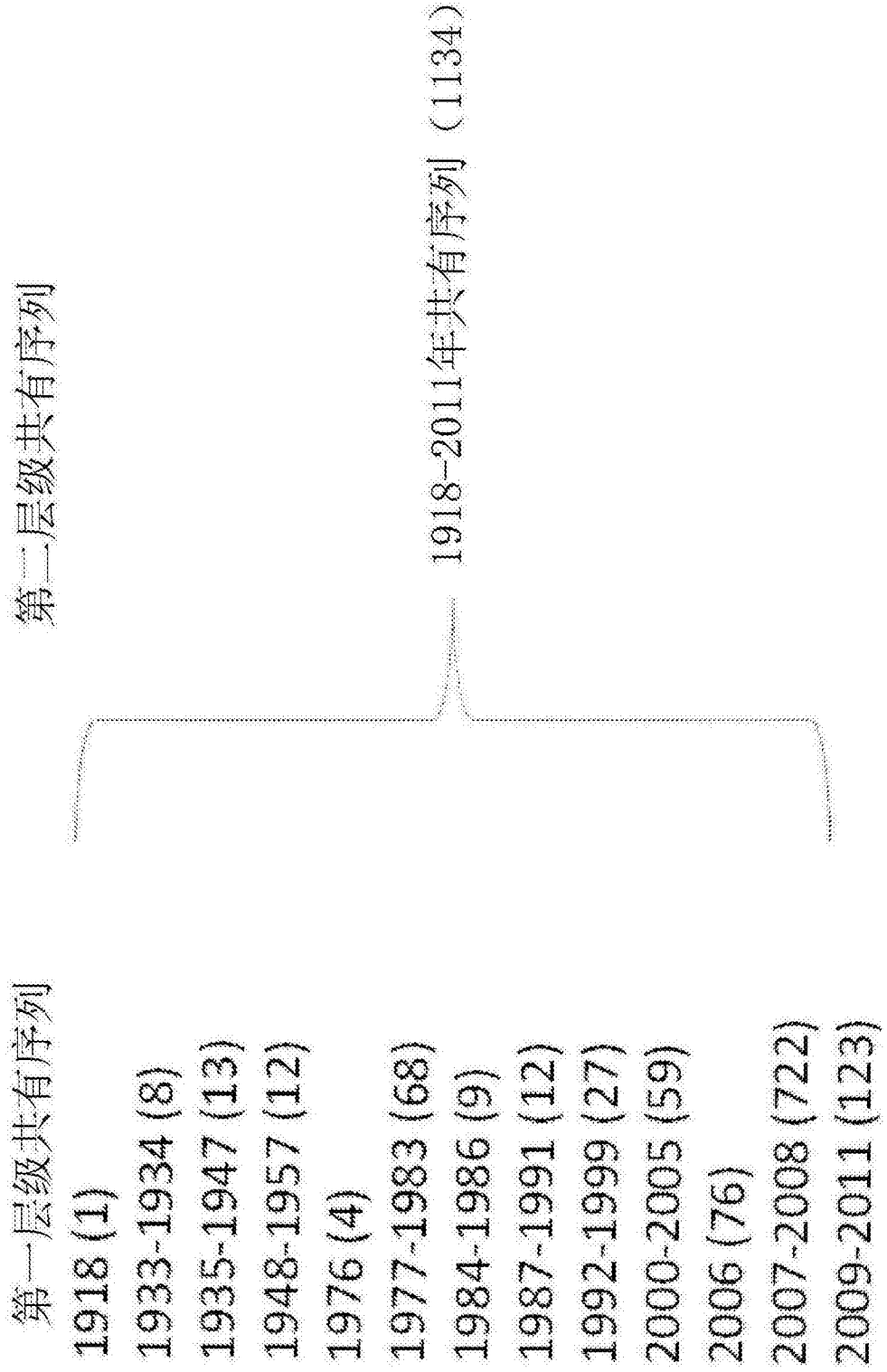


图5

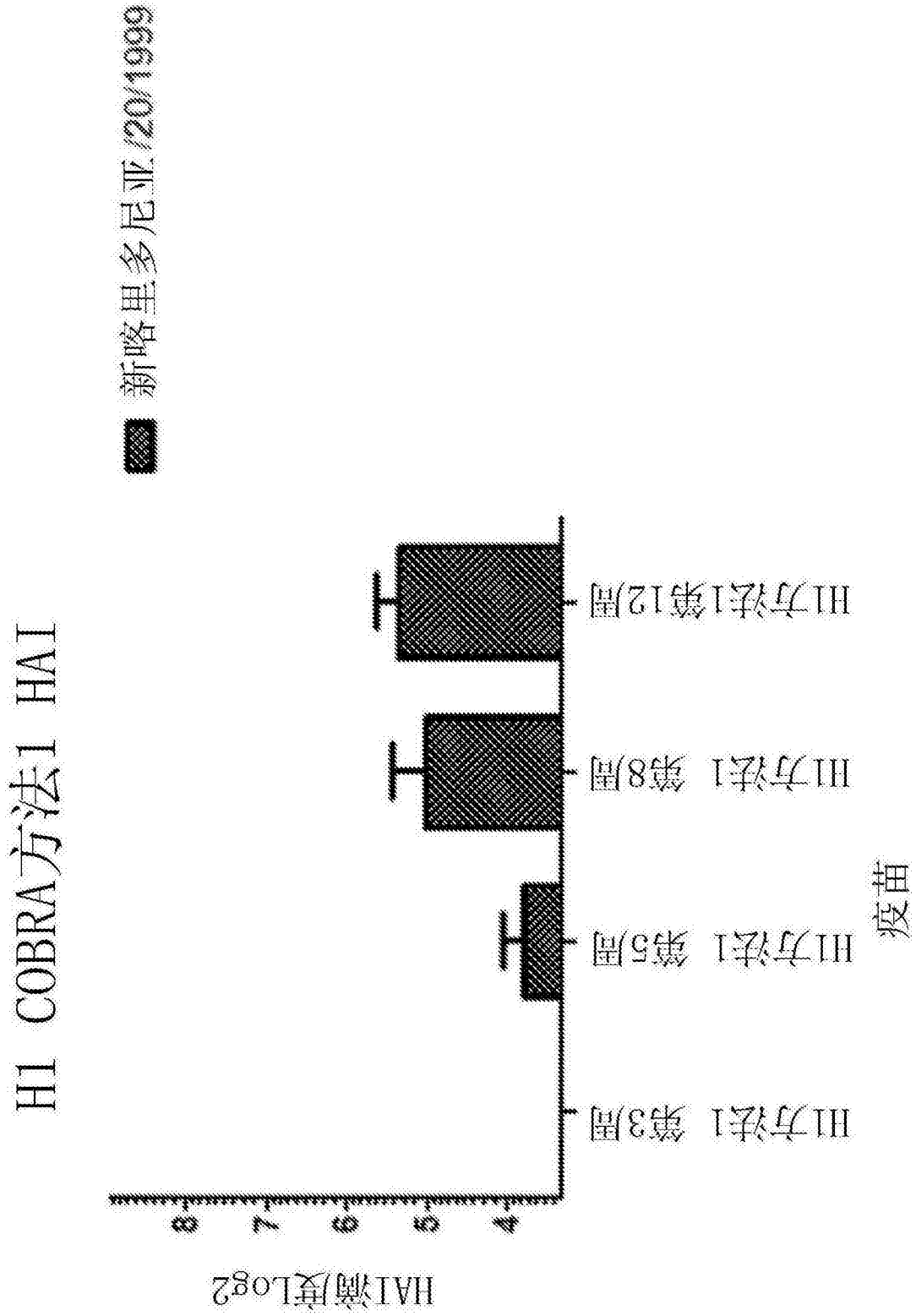


图6

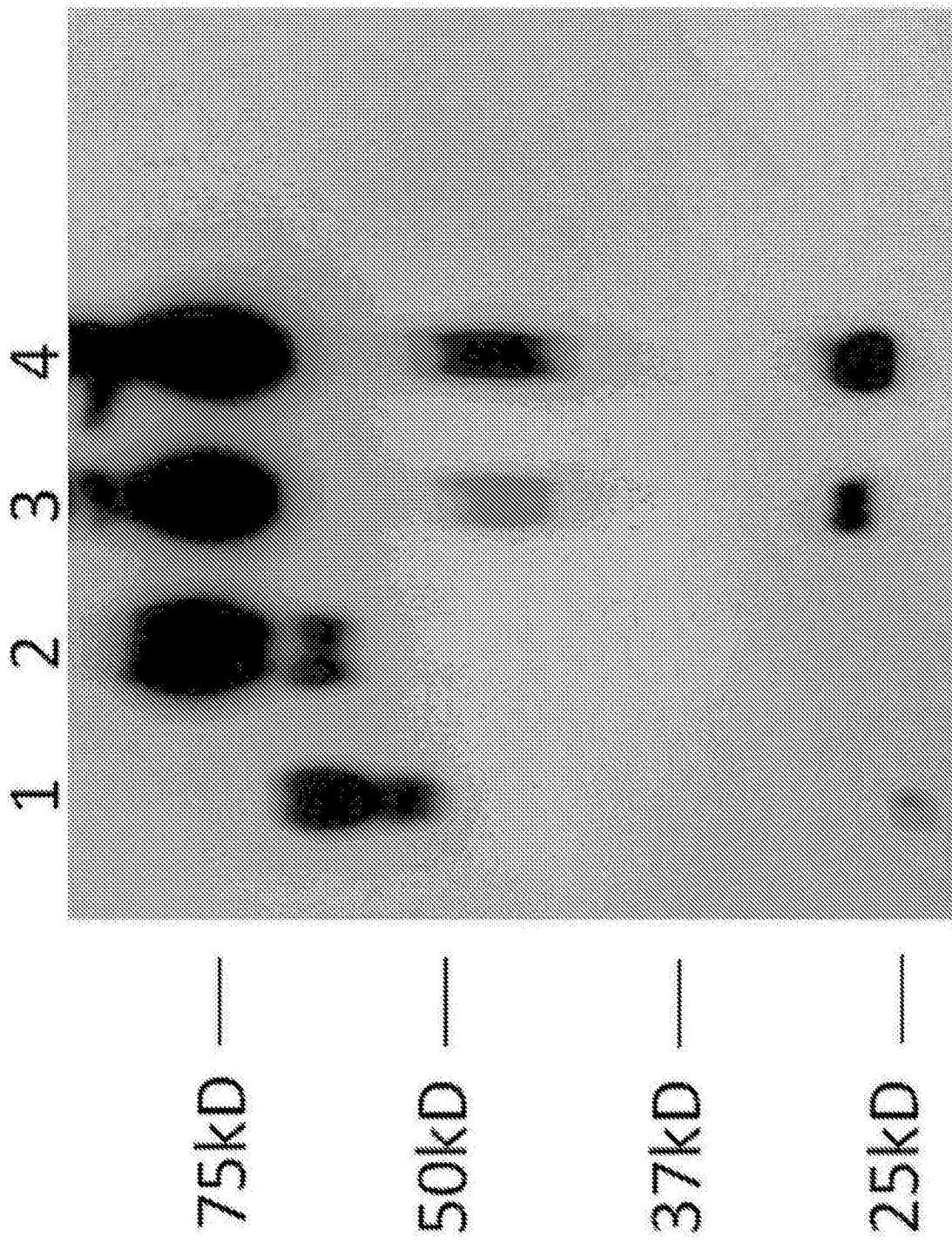


图7