



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114929269 A

(43) 申请公布日 2022.08.19

(21) 申请号 202080048487.4

(22) 申请日 2020.05.01

(30) 优先权数据

62/841,491 2019.05.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/031176 2020.05.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/223699 EN 2020.11.05

(71) 申请人 威斯康星校友研究基金会 (WARF)

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 河冈义裕 加布里埃莱·诺伊曼

平继辉

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书47页

序列表28页 附图56页

(54) 发明名称

用于疫苗开发的改进的流感病毒复制

(57) 摘要

提供了分离的重组流感病毒以及制备和使用所述病毒的方法,所述重组流感病毒具有PA、PB1、PB2、NP、NS、M、NA和HA病毒区段,其中所述PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1或者所述M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1,其中所述重组流感病毒相对于相应流感病毒具有增强的复制,所述相应流感病毒具有编码在第711位具有异亮氨酸的PB1的PB1病毒区段或具有编码在第128位具有甲硫氨酸的M1的M病毒区段。

1. 分离的重组流感病毒,其具有PA、PB1、PB2、NP、NS、M、NA和HA病毒区段,其中所述PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1,或者所述M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1,其中所述重组流感病毒相对于相应流感病毒具有增强的复制,所述相应流感病毒具有编码在第711位具有异亮氨酸的PB1的PB1病毒区段或具有编码在第128位具有甲硫氨酸的M1的M病毒区段。

2. 权利要求1所述的重组病毒,其中所述PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1,并且所述M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1。

3. 权利要求1或2所述的重组病毒,其中所述PA病毒区段编码这样的PA,其在第105位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第142位具有除赖氨酸之外的残基、在第149位具有除丝氨酸之外的残基、在第225位具有除丝氨酸之外的残基、在第56位具有除赖氨酸之外的残基、在第357位具有除苏氨酸之外的残基、在第401位残基处具有除精氨酸之外的残基、或在第550位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。

4. 权利要求1至3中任一项所述的重组病毒,其中所述PB1病毒区段还编码这样的PB1,其在第40位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第112位具有除谷氨酸之外的残基、在第180位具有除甘氨酸之外的残基、或在第247位残基处具有除谷氨酰胺之外的残基、或其任意组合。

5. 权利要求1至4中任一项所述的重组病毒,其中所述PB2病毒区段编码这样的PB2,其在第202位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第323位具有除苯丙氨酸之外的残基、或在第504位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。

6. 权利要求1至5中任一项所述的重组病毒,其中所述NP病毒区段编码这样的NP,其在第74位具有除精氨酸之外的残基、在第116位具有除异亮氨酸之外的残基、或在第417位具有除天冬酰胺之外的残基、或其任意组合。

7. 权利要求1至6中任一项所述的重组病毒,其中所述NS病毒区段编码这样的NS1,其在第30位具有除丙氨酸之外的残基、在第55位具有除赖氨酸之外的残基、或在第118位具有除精氨酸之外的残基、或其任意组合。

8. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E,或其任意组合。

9. 权利要求1至8中任一项所述的重组病毒,其在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H,或其任意组合。

10. 权利要求1至9中任一项所述的重组病毒,其在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在第55位具有E、D、Q或N,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N,在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T,或其任意组合。

11. 权利要求1至10中任一项所述的重组病毒,其在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q,或其任意组合。

12. 权利要求1至11中任一项所述的重组病毒,其在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C,或其任意组合。

13. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C;在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T;在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。

14. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N;在NS1中第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C;或其任意组合。

15. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H;在第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。

16. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PA中具有142N、225C、356R或550L;在PB1中具有112G、247H、507V或644A中的一个或多个;在PB2中具有202L、323L或504V中的一个或多个;在NP中具有74K、112L、116L、417D或442A中的一个或多个;在M1中具有97A和/或100H;和/或在NS1中具有55E和/或140Q,或其任意组合。

17. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H、或在NP中具有74K,并且任选地具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K、或在M1中具有97A和/或100H。

18. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H、或在NP中具有74K,并且具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K、或在M1中具有97A和/或100H。

19. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PB2中具有202L和/或323L或504V。

20. 权利要求1至7或19中任一项所述的重组病毒,其在PB1中具有247H或40L/180W。

21. 权利要求1至7或19至20中任一项所述的重组病毒,其在NS1中具有55E或30P/188K。

22. 权利要求1至7或19至21中任一项所述的重组病毒,其在PA中具有142C或401K。

23. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在NP中具有74K或116L。

24. 权利要求1至7中任一项所述的重组病毒,其在PB2中具有504V、在PB1中具有40L和180W、在PA中具有401K、在NP中具有116L、在NS1中具有30P/118K、或其任意组合。

25. 权利要求1至7或24中任一项所述的重组病毒,其在NP中具有74K、116L或417D。

26. 权利要求1至7或24或25中任一项所述的重组病毒,其在NS1中具有30P、55E或118K。

27. 权利要求1至7或24至26中任一项所述的重组病毒,其在PA中具有225C或401K。

28. 权利要求1至27中任一项所述的重组病毒,其中所述病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M。

29. 权利要求1至27中任一项所述的重组病毒,其中所述病毒在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T。

30. 权利要求1至29中任一项所述的重组病毒,其在PB1、PB2或PA中任一个的病毒区段

中第4位具有U。

31. 权利要求1至29中任一项所述的重组病毒,其在PB1、PB2和PA的病毒区段中第4位具有U。

32. 权利要求1至31中任一项所述的重组病毒,其在PB1中第711位具有V、A、L、G或T,并且在M1中第128位具有L、I、V、G、A或T。

33. 权利要求1至32中任一项所述的重组病毒,其中所述PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:2编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:2编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:3编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:3编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:1编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:4编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:4编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:5编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:5编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:6编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:6编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2,或者其中所述PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:10编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:10编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:11编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:11编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:12编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:12编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:13编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:13编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:14编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:14编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:15编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:15编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2。

34. 具有权利要求1至33中任一项所述的分离的重组病毒的疫苗。

35. 用于制备重配株的多种流感病毒载体,其包含

a) 包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS cDNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中所述用于vRNA之产生的载体中的所述PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的所述载体中的所述NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的所述载体中的所述HA DNA具有异源HA的序列,其中所述PB1 DNA编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1或者所述M DNA编码在第128位具有除甲硫氨酸

之外的残基的M1;以及

b) 包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。

36. 权利要求35所述的载体,其中所述用于vRNA之产生的载体中的所述PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA具有这样的序列,其对应于编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15编码的相应多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的多肽的序列。

37. 权利要求35或36所述的载体,其中用于vRNA载体的所述启动子是RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T3启动子或T7启动子。

38. 权利要求35、36或37中任一项所述的载体,其中所述HA是H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9或H10。

39. 权利要求35至38中任一项所述的载体,其中所述PA、PB1和PB2病毒区段并且任选地NP、NS和M病毒区段具有启动子C至a突变。

40. 制备流感病毒的方法,其包括:使细胞与有效产生感染性流感病毒之量的以下接触:

包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NSDNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中所述用于vRNA之产生的载体中的所述PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的所述载体中的所述NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的所述载体中的所述HA DNA具有异源HA的序列,其中所述PB1 DNA编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1或者所述M DNA编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1;以及

包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选

地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。

41. 权利要求40所述的方法,其中所述细胞是禽类细胞或哺乳动物细胞。

42. 权利要求41所述的方法,其中所述细胞是Vero细胞、人细胞或MDCK细胞。

43. 权利要求40至42中任一项所述的方法,其中所述用于vRNA之产生的载体中的所述PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA具有这样的序列,其对应于编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15编码的相应多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的多肽的序列。

44. 权利要求40至43中任一项所述的方法,其还包括分离所述病毒。

45. 权利要求40至44中任一项所述的方法,其中所述PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1并且所述M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1。

46. 权利要求40至45中任一项所述的方法,其中所述PA病毒区段编码这样的PA,其在第105位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第142位具有除赖氨酸之外的残基、在第149位具有除丝氨酸之外的残基、在第225位具有除丝氨酸之外的残基、在第356位具有除赖氨酸之外的残基、在第357位具有除苏氨酸之外的残基、在第401位残基处具有除精氨酸之外的残基、或在第550位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合;或者其中所述PB1病毒区段还编码这样的PB1,其在第40位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第112位具有除谷氨酸之外的残基、在第180位具有除甘氨酸之外的残基、或在第247位残基处具有除谷氨酰胺之外的残基、或其任意组合;或者其中所述PB2病毒区段编码这样的PB2,其在第202位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第323位具有除苯丙氨酸之外的残基、或在第504位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合;或者其中所述NP病毒区段编码这样的NP,其在第74位具有除精氨酸之外的残基、在第116位具有除异亮氨酸之外的残基、或在第417位具有除天冬酰胺之外的残基、或其任意组合;或者其中所述NS病毒区段编码这样的NS1,其在第30位具有除丙氨酸之外的残基、在第55位具有除赖氨酸之外的残基或在第118位具有除精氨酸之外的残基、或其任意组合。

47. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E,或其任意组合;或者在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H,或其任意组合;或者在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在第55位具有E、D、Q或N,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N,在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T,或其任意组合;或者在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q,或其任意组合;或者在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C,或其任意组合。

48. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB1中第711位具有V、A、L、

G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C;在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T;在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。

49. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N;在NS1中第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C;或其任意组合。

50. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H;在第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。

51. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PA中具有142N、225C、356R或550L中的一个或多个;在PB1中具有112G、247H、507V或644A中的一个或多个;在PB2中具有202L、323L或504V中的一个或多个;在NP中具有74K、112L、116L、417D或442A中的一个或多个;在M1中具有97A和/或100H;和/或NS1中具有55E和/或140Q,或其任意组合。

52. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K,并且任选地具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。

53. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K,并且具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。

54. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB2中具有202L和/或323L。

55. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB1中具有247H。

56. 权利要求40至46或55中任一项所述的方法,其中所述病毒在NS1中具有55E。

57. 权利要求40至46或55或56中任一项所述的方法,其中所述病毒在PA中具有142C。

58. 权利要求40至46或55至57中任一项所述的方法,其中所述病毒在NP中具有74K。

59. 权利要求40至46中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB2中具有504V、在PB1中具有40L和180W、在PA中具有401K、在NP中具有116L、在NS1中具有30P和118K,或其任意组合。

60. 权利要求40至46或59中任一项所述的方法,其中所述病毒在NP中具有74K、116L或417D。

61. 权利要求40至46或59或60中任一项所述的方法,其中所述病毒在NS1中具有30P、55E或118K。

62. 权利要求40至46或59至61中任一项所述的方法,其中所述病毒在PA中具有225C或401K。

63. 权利要求54至62中任一项所述的方法,其中所述病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M。

64. 权利要求54至63中任一项所述的方法,其中所述病毒在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T。

65. 权利要求40至64中任一项所述的方法,其中PA、PB1或PB2病毒区段中的至少一个具有C至U启动子突变。

66. 通过权利要求40至65中任一项所述的方法获得的病毒。

67. 对禽类或哺乳动物进行免疫接种的方法,其包括:向所述禽类或所述哺乳动物施用有效量的包含权利要求1至33中任一项所述的重组病毒的组合物。

68. 权利要求67所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

69. 权利要求67或68所述的方法,其中注射所述组合物。

70. 权利要求67或68所述的方法,其中将所述组合物施用于上呼吸道。

用于疫苗开发的改进的流感病毒复制

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年5月1日提交的美国申请No.62/841,491的申请日的权益,其公开内容通过引用并入本文。

[0003] 政府权利声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的HHSN272201400008C的政府支持下完成的。政府在本发明中享有一定权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含已通过EFS-Web以ASCII格式提交并且在此通过引用整体并入的序列表。在2020年5月1日创建的所述ASCII拷贝被命名为800106W01.TXT并且大小为69,632字节。

背景技术

[0007] 流感(influenza)是一些哺乳动物中的主要呼吸系统疾病,并且每年都会造成大量的发病率和经济损失。另外,流感病毒感染可在一些禽类物质中引起严重的全身性疾病,导致死亡。流感病毒基因组的分段性质允许在感染了两种或更多种流感病毒的细胞中在病毒复制期间进行区段重配。与遗传突变和漂移(drift)组合的区段重配可随时间推移产生大量不同的流感病毒毒株。新毒株在其血凝素(hemagglutinin,HA)和/或神经氨酸酶(NA)蛋白中表现出抗原变异,并且特别是编码HA蛋白的基因具有高变异率。用于预防流感的主要的目前实践方法是疫苗接种。由于流感HA蛋白是宿主对病毒的保护性免疫应答的主要靶抗原并且是高度可变的,因此流感病毒的分离以及与近期暴发相关的病毒中HA抗原的鉴定和表征对于疫苗产生是重要的。基于患病率和预测,疫苗旨在刺激针对主要和预期流感病毒毒株的保护性免疫应答(Park et al.,2004)。

[0008] 流感病毒存在三种一般类型,即甲型、乙型和丙型,其均由在其内部蛋白质之间不存在血清学交叉反应性来定义。甲型流感病毒基于其糖蛋白(HA和NA蛋白)的抗原性和遗传差异进一步分为亚型。所有已知HA和NA亚型(H1至H16和N1至N9)中的大多数均从水禽类(aquatic bird)中分离,水禽类被认为充当流感的天然储库。H1N1大流行性病毒在2009年引起了大流行。2009年测试的第一批疫苗候选物没有生长至高滴度,这表明需要开发赋予疫苗病毒候选物以有效复制的疫苗病毒骨架。

[0009] 发明概述

[0010] 使用了数种策略(包括随机诱变和潜在生长增强突变的综合测试)来开发在培养的细胞和/或含胚鸡卵(embryonated chicken egg)中复制至高滴度的甲型流感/Puerto Rico/8/34(H1N1;通常用于产生灭活流感疫苗的毒株)病毒。鉴定了提高流感疫苗病毒产量的许多生长增强突变。流感病毒多肽中的单独生长增强残基可与相同流感病毒多肽中的一个或更多个其他生长增强残基组合,与其他流感病毒多肽中的一个或更多个其他生长增强残基组合,以及与病毒非编码区(例如,启动子序列)中的生长增强核苷酸组合。例如,聚合酶蛋白中的一个或更多个生长增强残基,例如PB2中1、2、3、4、5、6、7个或更多个生长增强

残基, PB1中1、2、3、4、5、6、7个或更多个, 例如多至12、13、14或15个生长增强残基, PA中1、2、3或4个或更多个生长增强残基, 或NP中1、2、3或4个生长增强残基, M中1、2、3或4个生长增强残基, 例如M1中1、2或3个生长增强残基, NS1中1、2或3个生长增强残基, 或病毒非编码序列(例如, 启动子序列)中生长增强残基或核苷酸的任意组合, 可在制备流感病毒(例如, 用于疫苗)时组合以增强病毒滴度。在一个实施方案中, 病毒启动子序列中的生长增强核苷酸可被引入至病毒区段, 或者当存在于病毒区段中时可以选择包含在流感病毒中。在一个实施方案中, HA中和/或NA中的生长增强残基可被引入到流感病毒中的HA病毒区段或NA病毒区段中, 或者当存在于HA或NA中时, 选择包含在流感病毒中的HA病毒区段或NA病毒区段中。在一个实施方案中, 一个或更多个生长增强残基可将病毒生长增强至少1.2、2、2.8、4、3、5、6、8、10、100或200倍或更高。

[0011] 提高病毒在细胞培养物和/或含胚鸡卵中的复制能力的突变可用于扩增流感病毒并建立稳健的流感疫苗平台。目前, 大多数流感疫苗是在含胚鸡卵中产生的。在MDCK细胞中产生的流感疫苗现在在美国和欧洲被批准用于人用, 而来源于Vero细胞的流感疫苗在欧洲被批准用于人用。具有疫苗病毒分离株(例如, UW-PR8(参见实施例1))的“内部”病毒基因(即, 除编码病毒表面糖蛋白HA和NA的那些之外的所有病毒基因)中的随机突变的病毒文库在MDCK细胞中产生并传代。鉴定的突变在MDCK细胞中导致更高的病毒滴度(并且还可以在Vero细胞和/或含胚鸡卵中提高病毒滴度), 从而允许更高效的流感病毒生长和更具成本效益的疫苗产生。此外, 先前描述的突变提高了UW-PR8疫苗骨架病毒的复制能力。除了六个内部病毒区段的编码区中的突变之外, 还观察到非编码区中的突变会提高病毒滴度, 包括启动子突变, 例如来自PB2、PB1和/或PA vRNA区段的3'端的第4位处的C至U突变。所得序列也可以是经密码子使用优化的, 例如经优化以在哺乳动物细胞(例如犬细胞或灵长类细胞)或禽类细胞(例如, 鸡胚)中表达。突变可以以多种组合使用, 结果受使用的细胞系(或卵)和病毒复制所期望的改进水平的影响。

[0012] 本发明提供了分离的重组(例如, 重配(reassortant))流感病毒, 其在PA、PB1、PB2、NP、M(编码M1和M2蛋白)和/或NS(编码NS1和NS2蛋白)的一个或更多个病毒区段中的一个或更多个指定位置具有选定氨基酸残基, 例如在PB1、PB2和NS1; PA、PB1、PB2、NP和NS1; PB1、PB2、NP、M1和NS1; PA、PB1、PB2、NP和NS1; 或PA、PB1、PB2、NP、M1和NS1的指定位置处具有选定氨基酸残基, 并且包含目的HA和NA基因/蛋白, 例如来自年度流行和大流行毒株, 所述病毒与亲本病毒相比通过细胞培养物(在MDCK或Vero细胞中)或在含胚鸡卵中更高效且更具成本效益地产生。本文中使用的病毒中的“病毒区段”意指流感vRNA序列, 而用于产生病毒区段的转录盒中的“病毒区段”意指当被引入到细胞或合适的无细胞系统中并被转录时产生流感vRNA或cRNA的序列。重组病毒也可通过从转录盒产生流感病毒正义cRNA(plus-sense cRNA)来获得。

[0013] 在一个实施方案中, 分离的重组流感病毒具有来自第一流感病毒分离株的PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段、异源或嵌合流感病毒NA病毒区段和异源或嵌合HA病毒区段, 其中PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1, 或M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1, 其中重组流感病毒相对于相应流感病毒(例如, 在MDCK细胞、Vero细胞或卵中)具有增强的复制, 该相应流感病毒具有编码在第711位具有异亮氨酸的PB1的PB1病毒区段或具有编码在第128位具有甲硫氨酸的M1的M病毒区段。在一个

实施方案中, PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1, 并且M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1。在一个实施方案中, PA病毒区段编码这样的PA, 其在第105位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第142位具有除赖氨酸之外的残基、在第149位具有除丝氨酸之外的残基、在第225位具有除丝氨酸之外的残基、在第356位具有除赖氨酸之外的残基、在第357位具有除苏氨酸之外的残基、在第401位残基处具有除精氨酸之外的残基、或在第550位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, PB1病毒区段还编码这样的PB1, 其在第40位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第112位具有除谷氨酸之外的残基、在第180位具有除甘氨酸之外的残基, 或在第247位残基处具有除谷氨酰胺之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, PB2病毒区段编码这样的PB2, 其在第202位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第323位具有除苯丙氨酸之外的残基、或在第504位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, NP病毒区段编码这样的NP, 其在第74位具有除精氨酸之外的残基、在第116位具有除异亮氨酸之外的残基、或在第417位具有除天冬酰胺之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, NS病毒区段编码这样的NS1, 其在第30位具有除丙氨酸之外的残基、在第55位具有除赖氨酸之外的残基或在第118位具有除精氨酸之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M, 在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C, 在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C, 在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C, 在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E, 或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N, 在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T, 在NP中第417位具有D、E、Q、K或H, 或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T, 在第55位具有E、D、Q或N, 在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N, 在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T, 或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T, 在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T, 在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q, 或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M, 在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C, 在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C, 或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M, 在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C, 在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C; 在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T; 在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T, 在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N; 在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T; 在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q; 在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M; 或其任意组合。在一个实施方案中, 重组病毒在PB2中具有504V。在一个实施方案中, 重组病毒在NP中具有74K、116L或417D。在一个实施方案中, 重组病毒在NS1中具有30P、55E或118K。在一个实施方案中, 重组病毒在PA中具有225C或401K。在一个实施方案中, 重组病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M。在一个实施方案中, 重组病毒在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T。在一个实施方案中, 重组病毒在PB1、PB2或PA中任一个的病毒区段中第4位具有U。在一个实施方案中, 重组病毒在PB1、PB2和PA的病毒区段中在第4位具有U。在一个实施方案中, PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列: 具有由SEQ ID NO:2编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:2编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1; 具有由SEQ ID NO:3编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:3编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2; 具有由SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID

NO:1编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:4编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:4编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:5编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:5编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:6编码的氨基酸序列的NS1和/或Ns2或与由SEQ ID NO:6编码的NS具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2,或者其中所述PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:10编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:10编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:11编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:11编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:12编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:12编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:13编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:13编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:14编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:14编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:15编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:15编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2。在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段中的两个具有本文中公开的改变中的至少一种。在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段中的三个具有本文中公开的改变中的至少一种。在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段中的四个具有本文中公开的改变中的至少一种。在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段中的五个具有本文中公开的改变中的至少一种。在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段具有本文中公开的改变中的至少一种。

[0014] 还提供了制备流感病毒的方法,其包括:使细胞与有效产生感染性流感病毒之量的以下接触:包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的载体中的NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的载体中的HA DNA具有异源HA的序列,其中所述PB1 DNA编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1或所述M DNA编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1;以及包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与

编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。在一个实施方案中,细胞是禽类细胞或哺乳动物细胞。在一个实施方案中,细胞是Vero细胞、人细胞或MDCK细胞。细胞在禽类卵中。

[0015] 还提供了使用所述重组病毒的方法。在一个实施方案中,向禽类或哺乳动物施用有效诱导免疫应答的病毒的量。

[0016] 在一个实施方案中,本发明提供了分离的重组重配流感病毒,其具有来自疫苗流感病毒的在本文中所述的指定位置处具有两个或更多个选定氨基酸残基的六个“内部”病毒区段,和选自第一流感病毒分离株的NA病毒区段,和来自相同分离株或不同分离株的HA病毒区段。

[0017] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中的一个、两个、三个或更多个中在如本文中所公开的指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列的重组流感病毒。除指定残基之外的残基可以是保守替换。保守氨基酸替换是指具有相似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。在一个实施方案中,保守氨基酸替换组是:苏氨酸-缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-丙氨酸或缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-丙氨酸;苯丙氨酸-酪氨酸;赖氨酸-精氨酸;丙氨酸-缬氨酸;谷氨酸-天冬氨酸;和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0018] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中的指定位置处具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有除PA中R401、PB1中M40或G180、PB2中I504、NP中I116和/或NS1中A30或R118,或其任意组合之外的残基,以及除PB1中I711或M1中M128之外的残基的多肽。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有除PA中R401、PB1中M40或G180、PB2中I504、NP中I116和/或NS1中A30或R118、或其任意组合之外的残基,以及除PB1中I711或M1中M128之外的残基的多肽。

[0020] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至

99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有相对于PA中R401、PB1中M40或G180、PB2中I504、NP中I116和/或NS1中A30或R118,或其任意组合的非保守替换,以及相对于PB1中I711的保守替换或相对于M1中M128的保守替换的残基的多肽。

[0021] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有相对于PA中R401、PB1中M40或G180、PB2中I504、NP中I116和/或NS1中A30或R118,或其任意组合的非保守替换,以及相对于PB1中I711的保守替换和相对于M1中M128的保守替换的残基的多肽。

[0022] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有相对于PA中R401、PB1中M40或G180、PB2中I504、NP中I116和/或NS1中A30或R118,或其任意组合的非保守替换,以及相对于PB1中I711的保守替换或相对于M1中M128的非保守替换的残基的多肽。

[0023] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有相对于PA中R401、PB1中M40或G180、PB2中I504、NP中I116和/或NS1中A30或R118,或其任意组合的非保守替换,以及相对于PB1中I711的保守替换和相对于M1中M128的非保守替换的残基的多肽。

[0024] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、MI和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有以下多肽:除PA中R401之外的保守残基,除PB1中M40或G180之外的非保守残基,除PB2中I504和NP中I116之外的保守残基,在NS1中在A30的非保守残基或在R118的保守残基、或其任意组合,以及除PB1中I711之外的保守残基或除M1中M128之外的非保守残基。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的流感病毒是这样的重组流感病毒,其在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1中在指定位置具有特定氨基酸残基,并且具有与由SEQ ID No.1至6或10至15之一编码的相应多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述相应多肽例如,具有以下多肽:除PA中R401之外的保守残基,除PB1中M40或G180之外的非保守残基,除PB2中I504和NP中I116之外的保守残基,在NS1中在A30的保守残基或在R118的保守残基、或其任意组合,以及除PB1中I711之外的保守残基和除M1中M128之外的非保守残基。

[0026] 还包括在本文中所述的指定位置所选定氨基酸残基的任意组合。

[0027] 具有指定位置处残基的PA、PB1、PB2、NP、M和/或NS的病毒区段可以与HA (例如H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16或H17) 的病毒区段和NA (例如N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9或N10) 的病毒区段以及HA和NA的任意组合进行组合以提供本发明的重配疫苗病毒。在一个实施方案中,HA是H1、H5或H7。在一个实施方案中,NA是N1或N9。在一个实施方案中,重配病毒中的HA病毒区段与PA、PB1、PB2、NP、M和NS的病毒区段异源。在一个实施方案中,重配病毒中的NA病毒区段与PA、PB1、PB2、NP、M和NS的病毒区段异源。在一个实施方案中,重配病毒中的HA病毒区段具有来自一种流感病毒分离株或毒株(“亲本”)或其变体(例如具有编码与亲本流感病毒分离株或毒株中的序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或99.5%氨基酸序列同一性(或相对于亲本流感病毒分离株或毒株中的序列具有1、2、5、10或20个替换)的流感病毒蛋白的病毒区段的变体)的PA、PB1、PB2、NP、M和NS的病毒区段。在一个实施方案中,亲本毒株具有有对应于SEQ ID No.1至6或10至15的序列的病毒区段。在一个实施方案中,重配病毒中的HA病毒区段是嵌合HA病毒区段,例如与来自亲本分离株或毒株或其变体的HA病毒区段的HA跨膜结构域序列和/或HA信号肽序列连接的异源HA胞外结构域序列的嵌合体。在一个实施方案中,分离的重组病毒中的NA病毒区段是嵌合NA病毒区段,例如与来自亲本分离株或毒株或其变体的NA病毒区段的NA跨膜结构域序列和/或来自亲本分离株或毒株或其变体的茎序列(stalk sequence)连接的异源NA胞外结构域序列的嵌合体。在一个实施方案中,分离的重组病毒中的NA病毒区段是嵌合NA病毒区段,例如与来自亲本分离株或毒株或其变体的NA病毒区段的NA跨膜结构域序列和/或来自第二分离株或毒株或其变体的茎序列连接的异源NA胞外结构域序列的嵌合体。在一个实施方案中,分离的重组病毒具有异源HA病毒区段、异源NA病毒区段、嵌合HA病毒区段、嵌合NA病毒区段或其任意组合。用于制备vRNA的核酸序列可以通过重组方法在指定位置引入残基的序列,或者可以选择为在指定位置具有残基。

[0028] A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), “PR8”, 病毒用作用于产生灭活流感疫苗的遗传骨架。有时,基于PR8骨架的疫苗毒株在卵和细胞培养物中复制至相对低的滴度,从而导致疫苗产生延迟和疫苗短缺。为了确定是否可以制备用于在MDCK细胞、鸡卵(chicken egg)和Vero细胞中繁殖的高产率疫苗毒株骨架以满足季节性流感和高度致病性大流行病毒的需求,采用了多种诱变策略。例如,筛选PR8骨架随机突变体文库的高复制突变体,例如通过易错PCR(error prone PCR)将随机突变引入至内部PR8基因,引入赋予高复制和高聚合酶活性的突变,以及通过密码子偏倚来优化PR8内部基因。

[0029] 如本文中所述,具有与可用作疫苗病毒(例如A/Puerto Rico/8/34, “PR8”, 包括特定分离株例如UW-PR8)的流感病毒分离株相关的随机突变以携带NA和/或HA的异源病毒区段的病毒文库在MDCK细胞中连续传代(例如约10至12次,但是可以采用更少的传代)以获得在那些细胞中具有增强的复制的病毒。在一个实施方案中,连续传代之后获得的具有增强复制的病毒的滴度比未经连续传代的病毒高至少1或2log。在一个实施方案中,连续传代之后获得的病毒相对于亲本病毒在两个或更多个内部病毒区段中具有替换。

[0030] 因此,对于待在培养物中在细胞(例如,MDCK或Vero细胞或卵)中培养或传代的疫苗病毒,对于在PA、PB1、PB2、NP和/或NS1中的一个或更多个中在指定位置具有公开残基的序列的选择或对公开残基的替换(当与目的HA和NA序列一起使用时赋予病毒在培养的细胞

中生长增强)可导致显著更高的病毒滴度。因此,本发明提供了选择在细胞培养物中具有增强复制的流感病毒的方法。该方法包括提供适合于流感疫苗产生的细胞;在细胞中连续培养一种或更多种流感病毒分离株;以及分离相对于连续培养之前的一种或更多种分离株具有增强生长的经连续培养的病毒。在一个实施方案中,细胞是犬细胞或灵长类(例如,人或猴)细胞。

[0031] 本发明提供了本发明的多种流感病毒载体,例如用于制备重配病毒的那些,所述重配病毒包括6:1:1重配株、6:2重配株和7:1重配株。本发明范围内的6:1:1重配株是具有以下的流感病毒:来自疫苗病毒的6个内部病毒区段、来自不同(第二)病毒分离株的NA病毒区段和来自第三分离株的HA病毒区段;本发明范围内的6:2重配株是具有以下的流感病毒:来自疫苗病毒的6个内部病毒区段,和来自不同(第二)病毒分离株的NA病毒区段和HA病毒区段;以及本发明范围内的7:1重配株是具有以下的流感病毒:来自疫苗病毒的6个内部病毒区段和NA病毒区段以及来自与疫苗病毒不同病毒来源的HA病毒区段,或者具有以下的流感病毒:来自疫苗病毒的6个内部病毒区段和HA病毒区段,以及来自与疫苗病毒不同的病毒来源的NA病毒区段。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,包括选自以下的用于vRNA之产生的多种载体:包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的载体,包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的载体,包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的载体,包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的载体,包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的载体,包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的载体,包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的载体,以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS DNA可操作地连接的启动子的载体。在一个实施方案中,用于PB1、PB2、PA、NP、M和NS的vRNA产生的DNA具有来自在培养的哺乳动物细胞(例如MDCK细胞、Vero细胞或PER. C6®细胞)以及还任选地含胚卵中复制至高滴度的流感病毒的序列,和/或来自疫苗病毒(例如在人中不会引起显著疾病的疫苗病毒)的序列。用于NA vRNA之产生的DNA可以来自任何NA,例如N1-N1中的任一个,以及用于HA vRNA之产生的DNA可以来自任何HA,例如H1至H18。在一个实施方案中,用于vRNA之产生的DNA可以用于乙型或丙型流感病毒。用于NA和HA的vRNA产生的DNA可以来自不同的毒株或分离株(6:1:1重配株)或来自相同的毒株或分离株(6:2重配株),或者NA可以来自内部基因相同的毒株或分离株(7:1重配株)。还包括选自以下的用于mRNA之产生的多种载体:编码流感病毒PA的载体、编码流感病毒PB1的载体、编码流感病毒PB2的载体和编码流感病毒NP的载体,以及任选地编码NP、NS、M,例如M1和M2,HA或NA的一种或更多种载体。编码病毒蛋白的载体还可包含转录终止序列。

[0033] 可为本发明范围内的重配株提供内部基因的病毒包括这样的病毒,其在MDCK细胞中具有高滴度,例如至少约 10^5 PFU/mL,例如至少 10^6 PFU/mL、 10^7 PFU/mL或 10^8 PFU/mL的滴度;在含胚卵中具有高滴度,例如至少约 10^7 EID₅₀/mL,例如至少 10^8 EID₅₀/mL、 10^9 EID₅₀/mL或 10^{10} EID₅₀/mL的滴度;在细胞例如MDCK细胞中具有高滴度,例如至少约 10^7 PFU/mL,例如至少 10^8 PFU/mL的滴度,或在这些宿主细胞中的两种或更多种中具有高滴度。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的重配病毒在细胞(例如MDCK细胞或Vero细胞)中的滴

度可以比在指定位置没有特定残基的相应病毒的滴度高1 log、2 log、3 log或更高。

[0035] 具有来自其他PR8分离株或疫苗病毒的内部基因的其他重配株可用于本发明的重组重配病毒。特别地,可使用:具有UW-PR8 PB1、PB2、PA、NP和M(“5”)和PR8(Cam)NS(“1”)的5:1:2重配株;具有UW-PR8NA、PB1、PB2、PA、NP和M(“6”)和PR8(Cam)NS(“1”)的6:1:1重配株;以及具有UW-PR8 PB1、PB2、PA、NP、M、NA和NS(“7”)的7:1重配株。

[0036] 在一个实施方案中,PB1、PB2、PA、NP、M和NS的内部基因的内部基因的DNA编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的相应多肽具有基本上相同活性的蛋白质。本文中使用的“基本上相同活性”分别包括相应全长多肽的活性或蛋白质水平的约0.1%、1%、10%、30%、50%、90%,例如多至100%或更高的活性,或者约80%、90%或更高的可检测蛋白质水平。在一个实施方案中,核酸是编码与SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的多肽基本上相同(例如与由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)的连续氨基酸序列同一性)的多肽的序列。在一个实施方案中,分离的和/或纯化的核酸分子包含与SEQ ID NO:1至6或10至15之一基本上相同的核苷酸序列,例如与SEQ ID NO:1至6或10至15之一具有至少50%,例如60%、70%、80%或90%(包括50至100之间的任何整数)或更高连续核酸序列同一性的核苷酸序列,并且在一个实施方案中,还编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的多肽具有至少80%,例如90%、92%、95%、97%、98%或99%(包括80至99之间的任何整数)连续氨基酸序列同一性的多肽。在一个实施方案中,流感病毒多肽具有一个或更多个(例如2、5、10、15、20个或更多个)保守氨基酸替换,例如保守和非保守氨基酸替换的组合中2、5、10、15、20个或更多个中的多至10%或20%的保守替换、例如多至10%或20%的残基的保守替换,或者相对于由SEQ IS NO:1至6或10至15之一编码的多肽,并且相对于由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的多肽在PA、PB1、PB2、NP、M1和/或NS1残基处的两个或更多个中具有特征性残基,并且在PA、PB1、PB2、NP、M和/或NS的病毒区段的两个或更多个中,例如在PA和PB1病毒区段、PB1和PB2病毒区段、PA、PB1和PB2病毒区段中,或者在PA、PB1、PB2和NP病毒区段中,或者在PA、PB1、PB2和M病毒区段中具有如本文中所述的特征性残基。在一个实施方案中,相对于由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的多肽,流感病毒多肽具有一个或更多个(例如2、3、4、5、6、7或8个)保守和/或非保守氨基酸替换,在包括但不限于以下的位置:PA中第401位、PB1中第40位或第180位和第711位、PB2中第504位、NP中第116位、NS1中第30位或第118位或M1中第128位或其任意组合。

[0037] 本发明因此包括使用分离的和纯化的载体或质粒,其表达或编码流感病毒蛋白,或表达或编码流感vRNA(天然和重组vRNA二者)。载体包含流感cDNA,例如甲型流感(例如,任何甲型流感基因,包括18种HA或11种NA亚型中的任一种)、乙型流感或丙型流感DNA(参见Fields *Virology*(Fields et al.(eds.),Lippincott,Williams and Wickens(2006),其通过引用特别并入本文)。可使用任何合适的启动子或转录终止序列来表达蛋白质或肽,例如病毒蛋白或肽、非病毒病原体的蛋白质或肽,或治疗性蛋白质或肽。

[0038] 本发明的组合物或多种载体还可包含目的异源基因或开放阅读框,例如编码可用作疫苗或用于基因置换中的免疫原性肽或蛋白质的外源基因,例如可编码可用于癌症治疗或疫苗中的表位,或可用于基因治疗中的肽或多肽。在制备病毒时,包含目的基因或cDNA的载体或质粒可以替换流感病毒基因的载体或质粒,或者可以是所有流感病毒基因的载体或

质粒的补充。因此,本发明的另一个实施方案包含如上所述的组合物或多种载体,其中一个载体被替换为或还包含5' 流感病毒序列,所述5' 流感病毒序列任选地包含与期望的核酸序列(例如期望的cDNA)连接的5' 流感病毒编码序列或其部分,所述期望的核酸序列与任选地包含3' 流感病毒编码序列或其部分的3' 流感病毒序列连接。在一个实施方案中,期望的核酸序列例如cDNA处于反义(反义基因组)方向。将与上述其他载体结合的这样的载体引入至允许流感病毒复制的宿主细胞,产生包含对应于载体异源序列的vRNA的重组病毒。

[0039] 用于vRNA之产生的载体中的启动子可以是RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T7启动子或T3启动子,并且任选地所述载体包含转录终止序列,例如RNA聚合酶I转录终止序列、RNA聚合酶II转录终止序列、RNA聚合酶III转录终止序列或核酶。本发明范围内的核酶包括但不限于四膜虫核酶(tetrahymena ribozyme)、核糖核酸酶P、锤头状核酶(hammerhead ribozyme)、发夹状核酶、肝炎核酶以及合成核酶。在一个实施方案中, RNA聚合酶I启动子是人RNA聚合酶I启动子。

[0040] vRNA或病毒蛋白表达载体中的启动子或转录终止序列相对于启动子或任何其他载体可以是相同的或不同的。在一个实施方案中,表达流感vRNA的载体或质粒包含适合于在至少一种特定宿主细胞(例如禽类或哺乳动物宿主细胞,例如犬、猫、马、牛、绵羊或灵长类细胞,包括人细胞)中表达,或者用于在多于一种宿主中表达的启动子。

[0041] 在一个实施方案中,至少一种vRNA载体包含与连接于病毒编码序列的核酶序列连接的RNA聚合酶II启动子,所述病毒编码序列与另一核酶序列连接,所述另一核酶序列任选地与RNA聚合酶II转录终止序列连接。在一个实施方案中,用于vRNA之产生的至少2种(例如3、4、5、6、7或8种)载体包含RNA聚合酶II启动子、第一核酶序列,所述第一核酶序列位于对应于包含病毒编码序列的病毒序列的序列的5'端,所述病毒编码序列位于第二核酶序列的5'端,所述第二核酶序列位于转录终止序列的5'端。每个vRNA载体中的每个RNA聚合酶II启动子可以与任何其他vRNA载体中的RNA聚合酶II启动子相同或不同。类似地,每个vRNA载体中的每个核酶序列可以与任何其他vRNA载体中的核酶序列相同或不同。在一个实施方案中,单载体中的核酶序列是不同的。

[0042] 在一个实施方案中,本发明提供了用于重配株的多种流感病毒载体,其包括包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS cDNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中PB1、PB2、PA、NP、NS和M的DNA来自一种或更多种流感疫苗种子病毒,并在指定位置含有特征残基中的两种或更多种;以及包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及

包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。在一个实施方案中,至少一种载体包含对应于编码PB1、PB2、PA、NP、M或NS或其部分的那些的与由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的相应多肽具有基本上相同的活性的序列,例如编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15之一编码的多肽具有至少80%,例如85%、90%、92%、95%、98%、99%或100%(包括80至100之间的任何整数)氨基酸同一性的多肽的序列。任选地,可使用两种载体来代替包含与连接于转录终止序列的流感病毒M cDNA任选地连接的启动子的载体,例如包含与连接于转录终止序列的流感病毒M1 cDNA任选地连接的启动子的载体和包含与连接于转录终止序列的流感病毒M2 cDNA任选地连接的启动子的载体。

[0043] 本发明的多种载体可以是物理连接的,或者每个载体可以存在于单独质粒或其他(例如线性核酸递送载剂)之上。在一个实施方案中,每个vRNA产生载体在单独的质粒上。在一个实施方案中,每个mRNA产生载体在单独的质粒上。

[0044] 本发明还提供了制备流感病毒的方法。该方法包括使细胞与有效产生感染性流感病毒之量的本发明的多种载体接触(例如,依次或同时)。本发明还包括从与多种载体接触的细胞中分离病毒。因此,本发明还提供了分离的病毒,以及与本发明的多种载体或病毒接触的宿主细胞。在另一个实施方案中,本发明包括使细胞与一种或更多种载体(vRNA或蛋白质产生载体)在其他载体(vRNA或蛋白质产生载体)之前接触。在一个实施方案中,方法中使用的vRNA载体的启动子是RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T3启动子或T7启动子。在一个实施方案中,RNA聚合酶I启动子是人RNA聚合酶I启动子。在一个实施方案中,方法中使用的每个vRNA载体在单独的质粒上。在一个实施方案中,方法中使用的vRNA载体在一个质粒上或在两个或三个不同的质粒上。在一个实施方案中,方法中使用的每个mRNA载体在单独的质粒上。在一个实施方案中,方法中使用的PA、PB1、PB2和NP的mRNA载体在一个质粒上或在两个或三个不同的质粒上。

[0045] 在一个实施方案中,本发明提供了选择在细胞培养物中具有增强复制的流感病毒的方法。所述方法包括提供适合于流感疫苗产生的细胞;在细胞中连续培养一种或更多种流感病毒分离株;以及分离相对于连续培养之前的一种或更多种分离株具有增强生长的经连续培养的病毒。在一个实施方案中,细胞是啮齿动物细胞或灵长类细胞。

[0046] 本文中所述的不需要辅助病毒感染的产生病毒的方法可用于病毒诱变研究和疫苗产生(例如,用于AIDS、流感、乙型肝炎、丙型肝炎、鼻病毒、丝状病毒、疟疾、疱疹和口蹄病(foot and mouth disease))和基因治疗载体(例如,用于癌症、AIDS、腺苷脱氨酶、肌营养不良、鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺陷和中枢神经系统肿瘤)。因此,提供了用于医学治疗(例如,用于疫苗或基因治疗)的病毒。

[0047] 本发明还提供了分离的病毒多肽,以及制备和使用本发明的重组病毒的方法。该方法包括向宿主生物体(例如哺乳动物)施用任选地与佐剂和/或载体组合的有效量的本发明的流感病毒,例如灭活的病毒制剂,例如以有效预防或减轻动物(例如哺乳动物)被该病

毒或抗原性密切相关的病毒感染的量。在一个实施方案中,病毒肌内施用,而在另一个实施方案中,病毒鼻内施用。在一些给药方案中,所有剂量均可以肌内或鼻内施用,而在其他给药方案中,使用肌内和鼻内施用的组合。疫苗可还包含流感病毒的其他分离株,包括重组流感病毒、其他病原体、另外的生物制剂(biological agent)或微生物组分,例如以形成多价疫苗。在一个实施方案中,鼻内疫苗接种,例如含有灭活的流感病毒和黏膜佐剂可以在鼻咽中诱导病毒特异性IgA和中和抗体以及血清IgG。

[0048] 本发明的流感病毒可以与其他抗病毒药物(anti-virals)(例如金刚烷胺、金刚烷乙胺和/或神经氨酸酶抑制剂)一起使用,例如可以与那些抗病毒药物结合单独地施用,例如在抗病毒药物之前、期间和/或之后施用。

[0049] 附图简述

[0050] 图1A至1E:PR8(Cambridge)基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:10至15)。

[0051] 图2:文库传代的总结和高产率候选物的鉴定。

[0052] 图3:具有指定HA滴度具有随机突变的克隆的数目。

[0053] 图4:具有选定突变的克隆的滴度。

[0054] 图5A至5D:在PB2(A)、PB1或PB1-F2(B)、PA(C)和NP、M或NS1(D)中具有先前所鉴定突变的UW-PR8病毒的生长曲线。

[0055] 图6:赋予在MDCK细胞中高复制特性的突变的总结。

[0056] 图7A至7B:A)测试了病毒储液(virus stock)的HA滴度(以 2^n 计)和病毒滴度(以PFU/mL计)。B)MDCK细胞中的生长曲线。

[0057] 图8A至8C:A)野生型(UW-PR8)和克隆#4的HA滴度。B)野生型(UW-PR8)和#4的病毒蛋白。C)野生型和#4的病毒蛋白的SDS-PAGE分析。

[0058] 图9A至9B:A)野生型病毒(UW-PR8)和在M1中具有突变的高复制病毒的滴度比较。B)野生型病毒(UW-PR8)和在M1中具有突变的高复制病毒的生长动力学。

[0059] 图10A至10M:A)犬的密码子使用表。B)野生型(UW-PR8)和经“罕用”密码子优化的PB2病毒的相对适应性。C)野生型(UW-PR8)和经“所有”密码子优化的PB2病毒的相对适应性。D)经PB2密码子优化的病毒的生长动力学。E)具有经密码子优化的PB2、PB1、PA或NP病毒区段或区段组合的病毒的生长动力学。F至M)UW-PR8的PB2、PB1、PA和NP病毒区段的序列以及UW-PR8的犬密码子使用优化的PB2、PB1、PA和NP病毒区段的序列(SEQ ID no.1至4和16至19)。

[0060] 图11A至11C:A)PR8和Indo/NC/09的每个基因的第4位的核苷酸。B)所有3' C4U突变体。C)在PB2、PB1和PA基因的第4位编码“C”的重组UW-PR8病毒的生长动力学(黑色),以及在所有八个区段的第4位编码“U”的突变体的生长动力学(红色)。

[0061] 图12A至12C:H7和N9的核苷酸和氨基酸序列(SEQ ID No.20至27),其是用于与本文中公开的可用于为疫苗提供高滴度流感病毒的内部病毒区段序列一起使用的示例性序列。

[0062] 图13A至13B:A)用于提高病毒滴度的嵌合HA和NA基因的示意图。B)嵌合病毒的生长动力学。

[0063] 图14A至14B:A)具有突变组合的病毒的生长动力学。B)具有突变组合的病毒的PFU和HA滴度。

- [0064] 图15:在卵中的筛选。
- [0065] 图16:从Vero细胞中分离的216个克隆的HA滴度。
- [0066] 图17:用不同PR8骨架突变产生的重组病毒。
- [0067] 图18A至18B:在MDCK细胞和Vero细胞中具有增强生长的病毒的产生总结。
- [0068] 图19A至19D:示例性高产率替换(相对于PR8(UW))。
- [0069] 图20:具有PR8-HY病毒的一种或数种vRNA的重配病毒的生长动力学和HA滴度。
- [0070] 图21:在293T、MDCK、Vero和DF1细胞中在微复制子测定(mini-replicon assay)中的病毒聚合酶活性。PB2、PB1、PA和NP蛋白来源于UW-PR8野生型(WT)病毒或高产率PR8-HY(HY)变体。
- [0071] 图22:多种重组病毒和亲本重配病毒在Vero细胞中的HA滴度和病毒产量。
- [0072] 图23:Hubei/1/10(H5N1)高产率候选物在无血清(serum-free, SF) MDCK细胞中的生长动力学分析。
- [0073] 图24A至24B:HY候选物#9骨架在SC-MDCK细胞(A)中和在卵(B)中的生长动力学分析。HY候选物#9选自SC-MDCK细胞。
- [0074] 图25A至25C:HY候选物#5、#9、#16骨架在卵(A)中、在SC-MDCK细胞(B)中和在SF-MDCK细胞(C)中的生长动力学分析。
- [0075] 发明详述
- [0076] 定义
- [0077] 本文中使用的术语“分离的”是指本发明的核酸分子,例如载体或质粒、肽或多肽(蛋白质)或病毒的体外制备和/或分离,使得其不与体内物质缔合,或基本上从体外物质中纯化。分离的病毒制剂通常通过体外培养和繁殖和/或通过卵中传代来获得,并且基本上不含其他感染原。
- [0078] 本文中使用的“基本上纯化”意指目标物质是主要物质,例如以摩尔计其比组合物中的任何其他单独物质更丰富,并且优选地是存在物质的至少约80%,并且任选地是存在于组合物中的物质的90%或更多,例如95%、98%、99%或更多。
- [0079] 本文中使用的“基本上不含”意指低于特定感染原的使用标准检测方法针对该感染原检测的水平。
- [0080] “重组”病毒是已在体外进行操作(例如使用重组DNA技术)以将变化引入病毒基因组的病毒。可通过重组或非重组技术来制备重配病毒。
- [0081] 本文中使用的术语“重组核酸”或“重组DNA序列或区段”是指来源于或分离自来源(source)的核酸(例如DNA),其随后可在体外进行化学改变,使得其序列不是天然存在的,或者对应于这样的天然存在的序列,所述天然存在的序列的定位不像其在天然基因组中将定位的。“来源于”来源的DNA的一个实例是被鉴定为可用区段并且随后以基本上纯的形式化学合成的DNA序列。从来源“分离”的这样的DNA的一个实例将是这样的可用DNA序列,其通过化学手段(例如,通过使用限制性内切核酸酶)从所述来源切离或取出,使得其可通过遗传改造的方法进行进一步操作(例如扩增)以用于本发明。
- [0082] 本文中使用的“异源”流感病毒基因或病毒区段来自不同于重组(例如重配)流感病毒中的其他流感病毒基因或病毒区段中的大多数的流感病毒来源。
- [0083] 术语“分离的多肽”、“分离的肽”或“分离的蛋白质”包括由cDNA或包含合成来源之

一的重组RNA或其一些组合编码的多肽、肽或蛋白质。

[0084] 本文中使用的术语“重组蛋白”或“重组多肽”是指由重组DNA分子表达的蛋白质分子。相比之下,术语“天然蛋白质”在本文中用于表示从天然存在的(即,非重组)来源分离的蛋白质。分子生物学技术可用于产生与蛋白质的天然形式相比具有相同特性的重组形式的蛋白质。

[0085] 用于比较的序列比对方法是本领域公知的。因此,可使用数学算法来实现任意两个序列之间的百分比同一性的确定。

[0086] 这些数学算法的计算机实现可用于序列比较以确定序列同一性。可使用默认参数进行使用这些程序的比对。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得。该算法可涉及首先通过在查询序列中鉴定长度为W的短字来鉴定高分序列对(high scoring sequence pair,HSP),其当与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足一些正值阈值评分T。T称为相邻字评分阈值。这些最初的相邻字命中用作用于启动搜索的种子,以找到包含它们的更长的HSP。然后沿着每个序列在两个方向上延伸字命中,只要累积比对评分可提高即可。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励评分;总是 >0)和N(对于错配残基的罚分;总是 <0)来计算累积评分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积评分。在以下情况下,将停止字命中在每个方向上的扩展:累积比对评分从其最大实现值下降了量X;累积评分变为零或更低,由于一个或更多个负评分残基比对的累积;或者到达任一序列的末端。

[0087] 除了计算百分比序列同一性之外,BLAST算法也可以对两个序列之间的相似性进行统计学分析。BLAST算法提供的相似性的一种量度可以是最小总概率(P(N)),其提供了对两个核苷酸或氨基酸序列之间将偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在受试核酸序列与参考核酸序列的比较中最小总概率小于约0.1,更优选地小于约0.01,并且最优选地小于约0.001,则认为受试核酸序列与参考序列相似。

[0088] BLASTN程序(用于核苷酸序列)可默认使用字长(W)为11,期望值(E)为10,截止值为100,M=5,N=4,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序可默认使用字长(W)为3、期望值(E)为10和BLOSUM62评分矩阵。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。比对也可通过检查人工进行。

[0089] 对于序列比较,通常一个序列用作与受试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将受试序列和参考序列输入到计算机中,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。序列比较算法然后基于指定的程序参数计算受试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0090] 流感病毒结构和繁殖

[0091] 甲型流感病毒具有编码至少十种蛋白质的八个单链负义病毒RNA(vRNA)的基因组。流感病毒生命周期始于血凝素(HA)与宿主细胞表面上的含唾液酸受体的结合,随后是受体介导的内吞作用。晚期内体中的低pH触发HA的构象转变,从而暴露HA2亚基(所谓的融合肽)的N端。融合肽启动病毒和内体膜的融合,并且基质蛋白(M1)和RNP复合物被释放到细胞质中。RNP由衣壳化vRNA的核蛋白(NP)和由PA、PB1和PB2蛋白形成的病毒聚合酶复合物组成。RNP被转运到细胞核中,在哪里发生转录和复制。RNA聚合酶复合物催化三种不同的反

应：合成具有5'帽和3' polyA结构的mRNA、合成全长互补RNA (cRNA) 和使用cRNA作为模板合成基因组vRNA。然后新合成的vRNA、NP和聚合酶蛋白组装成RNP，从细胞核中运出，并转运至质膜，在那里发生后代病毒颗粒出芽。神经氨酸酶 (NA) 蛋白通过从唾液酸寡糖中去除唾液酸，从而从细胞表面释放新组装的病毒体并预防病毒颗粒的自聚集而在感染后期发挥关键作用。尽管病毒组装涉及蛋白质-蛋白质和蛋白质-vRNA的相互作用，但这些相互作用的性质在很大程度上是未知的。

[0092] 尽管乙型和丙型流感病毒在结构和功能上与甲型流感病毒相似，但也存在一些差异。例如，乙型流感病毒具有带有NA和NB序列二者的病毒区段。丙型流感病毒仅具有七个病毒区段。

[0093] 可用于本发明的细胞系

[0094] 支持流感病毒有效复制的任何细胞，例如任何禽类细胞或哺乳动物细胞，例如人，例如293T或PER.C6®细胞，或犬，例如MDCK、牛、马、猫、猪、绵羊、啮齿动物，例如貂 (mink)，例如MvLu1细胞或仓鼠，例如CHO细胞，或非人灵长类，例如Vero细胞，包括突变体细胞可用于分离和/或繁殖流感病毒。分离的病毒可用于制备重配病毒。在一个实施方案中，用于疫苗产生的宿主细胞是连续的哺乳动物或禽类细胞系或细胞株。可以对待使用的细胞进行完全表征，使得可包括对最终产品的纯度进行适当测试。可用于表征细胞的数据包括 (a) 关于其来源、衍生和传代历史的信息；(b) 关于其生长和形态特征的信息；(c) 外来剂 (adventitious agent) 的测试结果；(d) 使细胞能够在其他细胞系中被清楚地识别的区别特征，例如生物化学、免疫学和细胞遗传学模式；以及 (e) 致瘤性的测试结果。在一个实施方案中，所使用宿主细胞的传代水平或群体倍增尽可能低。

[0095] 在一个实施方案中，细胞是WHO认证的或可认证的连续细胞系。认证这样的细胞系的要求包括对于谱系、生长特征、免疫标志物、病毒易感性致瘤性和储存条件中的至少一项进行表征，以及通过在动物、卵和细胞培养物中进行测试。这样的表征用于确定细胞不含可检测的外来剂。在一些国家，可能也需要细胞核学。另外，可以在与用于疫苗产生的细胞处于相同传代水平的细胞中测试致瘤性。在疫苗产生之前，可将病毒通过已显示产生一致结果的过程进行纯化 (参见例如World Health Organization, 1982)。

[0096] 宿主细胞产生的病毒可以在疫苗或基因治疗制剂之前高度纯化。通常，纯化程序导致广泛去除细胞DNA和其他细胞组分以及外来剂。也可使用使DNA广泛降解或变性的程序。

[0097] 流感疫苗

[0098] 本发明的疫苗包括本发明的分离的重组流感病毒、以及任选地一种或更多种其他分离的病毒 (包括其他分离的流感病毒)、一种或更多种分离的流感病毒或一种或更多种其他病原体的一种或更多种免疫原性蛋白或糖蛋白 (例如来自一种或更多种细菌、非流感病毒、酵母菌或真菌的免疫原性蛋白)、或者编码一种或更多种病毒蛋白 (包括本发明的分离的流感病毒的一种或更多种免疫原性蛋白) 的分离的核酸 (例如DNA疫苗)。在一个实施方案中，本发明的流感病毒可以是流感病毒或其他病原体的疫苗载体。

[0099] 完整的病毒体疫苗可通过超滤来浓缩，并随后通过区带离心或通过色谱进行纯化。除了本发明病毒之外的病毒，例如包含在多价疫苗中的病毒，可以在使用例如福尔马林或β-丙内酯纯化之前或之后灭活。

[0100] 亚单位疫苗包含纯化的糖蛋白。这样的疫苗可如以下制备：使用通过用洗涤剂处理而片段化的病毒混悬剂，通过例如超速离心来纯化表面抗原。因此，亚单位疫苗主要含有HA蛋白以及NA。所用洗涤剂可以是例如阳离子洗涤剂，例如十六烷基三甲基溴化铵(Bachmeyer, 1975)，阴离子洗涤剂例如脱氧胆酸铵(Laver&Webster, 1976)；或非离子洗涤剂，例如以TRITON X100为名商业化的洗涤剂。也可以在用蛋白酶(例如菠萝蛋白酶(bromelin))处理病毒体之后分离血凝素，并随后纯化。亚单位疫苗可以在多价疫苗中与本发明的减毒病毒组合。

[0101] 裂解疫苗(split vaccine)包含经受了用溶解脂质的试剂处理的病毒体。裂解疫苗可如以下制备：将如上获得的纯化病毒的水混悬剂(无论是否灭活)在搅拌下通过与洗涤剂联合的脂溶剂(例如乙醚或氯仿)进行处理。病毒包膜脂质的溶解导致病毒颗粒的片段化。将含有裂解疫苗的水相回收，主要由血凝素和神经氨酸酶(其原始的脂质环境被去除)以及核心或其降解产物构成。如果还没有这样做，则残余的感染性颗粒就会被灭活。裂解疫苗可在多价疫苗中与本发明的减毒病毒组合。

[0102] 灭活疫苗。灭活流感病毒疫苗通过使用已知方法(例如但不限于福尔马林或β-丙内酯处理)灭活经复制的病毒来提供。可用于本发明的灭活疫苗类型可包括全病毒(whole-virus, WV)疫苗或亚病毒体(subvirion, SV)(裂解)疫苗。WV疫苗含有完整的灭活病毒，而SV疫苗含有用溶解含脂质病毒包膜的洗涤剂进行破坏随后对残余病毒进行化学灭活的纯化病毒。

[0103] 另外，可使用的疫苗包括含有分离的HA和NA表面蛋白(被称为表面抗原或亚单位疫苗的)的那些。

[0104] 活减毒病毒疫苗。活减毒流感病毒疫苗(例如包括本发明重组病毒的那些)可用于预防或治疗流感病毒感染。可根据已知方法通过将减毒基因从减毒供体病毒转移至复制的分离株或重配病毒，在单步骤中实现减毒。由于对甲型流感病毒的抗性主要由对HA和/或NA糖蛋白的免疫应答的发展介导，因此编码这些表面抗原的基因来自重配病毒或临床分离株。减毒基因来源于减毒亲本。在这种方法中，赋予减毒的基因通常不编码HA和NA糖蛋白。

[0105] 可能够可再现减毒流感病毒的病毒(供体流感病毒)，例如冷适应性(ca)供体病毒可用于减毒疫苗产生。可通过将ca供体病毒与强毒复制病毒配合来产生活减毒重配病毒疫苗。然后在存在适当的抗血清下，在25°C(限制强毒病毒复制)下选择重配后代，所述抗血清抑制带有减毒ca供体病毒表面抗原的病毒的复制。可用的重配株是：(a) 感染性、(b) 对血清反应阴性非成体哺乳动物和免疫致敏成体哺乳动物呈减毒、(c) 免疫原性和(d) 遗传性均稳定。ca重配株的免疫原性与其复制水平平行。因此，通过新野生型病毒获得ca供体病毒的六个可转移基因可对用于对成体和非成体的易感哺乳动物进行疫苗接种的这些病毒再现地减毒。

[0106] 可通过定点诱变将其他减毒突变引入到流感病毒基因中，以挽救带有这些突变体基因的感染性病毒。可将减毒突变引入到基因组的非编码区中以及引入到编码区中。也可将这样的减毒突变引入到除HA或NA之外的基因，例如PB2聚合酶基因中。因此，还可以产生带有通过定点诱变引入的减毒突变的新供体病毒，并且这样的新供体病毒可用于以类似于上述针对ca供体病毒的方式产生活减毒重配疫苗候选物。类似地，可将其他已知和合适的减毒供体毒株与流感病毒重配以获得适合于用于哺乳动物疫苗接种的减毒疫苗。

[0107] 在一个实施方案中,这样的减毒病毒保持来自病毒的编码与原始临床分离株的抗原决定簇基本上相似的抗原决定簇的基因。这是因为减毒疫苗的目的是提供与病毒的原始临床分离株基本上相同的抗原性,而同时在一定程度上缺乏致病性,即疫苗在接种疫苗的哺乳动物中诱导严重疾病病症的可能性最小。

[0108] 因此,多价疫苗中的病毒可根据已知方法被减毒或灭活、配制和施用作为在动物(例如哺乳动物)中诱导免疫应答的疫苗。用于确定这样的减毒或灭活疫苗是否保持与临床分离株或来源于临床分离株的高生长毒株的抗原性相似的方法是本领域公知的。这样的已知方法包括使用抗血清或抗体来消除表达供体病毒抗原决定簇的病毒;化学选择(例如金刚烷胺或金刚烷乙胺);HA和NA的活性和抑制;以及核酸筛选(例如探针杂交或PCR)来确定减毒病毒中不存在编码抗原决定簇的供体基因(例如HA或NA基因)。

[0109] 药物组合物

[0110] 适合于接种(例如经鼻、肠胃外或经口施用)的本发明的药物组合物包含一种或更多种流感病毒分离株,例如一种或更多种减毒或灭活的流感病毒、其亚基、其分离的蛋白质、和/或编码其一种或更多种蛋白质的分离的核酸,任选地还包含无菌水溶液剂或非水溶液剂、混悬剂和乳剂。组合物还可包含本领域已知的助剂或赋形剂。本发明的组合物通常以单独剂量(单位剂量)的形式存在。

[0111] 常规疫苗通常含有约0.1至200 μ g(例如,30至100 μ g)的来自进入其组合物中的每种毒株的HA。形成本发明疫苗组合物主要成分的疫苗可包含单一流感病毒或流感病毒的组合,例如至少两种或三种流感病毒,包括一种或更多种重配株。

[0112] 用于肠胃外施用的制剂包含无菌水溶液剂或非水溶液剂、混悬剂和/或乳剂,其可含有本领域已知的助剂或赋形剂。非水溶剂的一些实例是丙二醇、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。载体或闭塞性敷料(occlusive dressing)可用于提高皮肤渗透性并增强抗原吸收。用于经口施用的液体剂型可通常包含含有液体剂型的脂质体溶液剂。用于悬浮脂质体的合适形式包括含有本领域常用的惰性稀释剂(例如纯化水)的乳剂、混悬剂、溶液剂、糖浆剂和酏剂。除惰性稀释剂之外,这样的组合物还可包含佐剂、润湿剂、乳化剂和助悬剂,或甜味剂、矫味剂或芳香剂。

[0113] 当本发明的组合物用于施用于个体时,其还可包含盐、缓冲剂、佐剂或对于提高组合物的效力是期望的其他物质。对于疫苗,可使用佐剂,即可以增强特异性免疫应答的物质。通常,佐剂和组合物在呈递给免疫系统之前混合或分开呈递,但进入到被免疫接种的生物体的同一部位中。

[0114] 疫苗的异质性可通过混合至少两种流感病毒毒株(例如2至20种毒株或者其中的任何范围或值)的复制流感病毒来提供。可使用本领域已知的技术提供针对流感病毒单一毒株变异的疫苗。

[0115] 根据本发明的药物组合物还可以或另外地包含至少一种化学治疗化合物,例如用于基因治疗、免疫抑制剂、抗炎剂或免疫增强剂,以及用于疫苗、化学治疗剂,包括但不限于 γ 球蛋白、金刚烷胺、胍、羟基苯并咪唑、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 、氨基硫脲、甲吡嘧啶、利福平(rifampin)、利巴韦林(ribavirin)、嘧啶类似物、嘌呤类似物、膦甲酸、膦酰乙酸、阿昔洛韦(acyclovir)、二去氧核苷、蛋白酶抑制剂,或更昔洛韦(ganciclovir)。

[0116] 该组合物还可以含有可变但少量的无内毒素甲醛和被发现是安全的并且不会对施用该组合物的生物体产生不期望作用的防腐剂。

[0117] 药物目的

[0118] 组合物(或其引发的抗血清)的施用可以用于“预防性”或“治疗性”目的。当预防性地提供时,作为疫苗的本发明组合物在病原体感染的任何症状或临床体征变得明显之前提供。组合物的预防性施用用于预防或减轻任何随后的感染。当预防性地提供时,本发明的基因治疗组合物在疾病的任何症状或临床体征变得明显之前提供。组合物的预防性施用用于预防或减轻与疾病相关的一种或更多种症状或临床体征。

[0119] 当治疗性地提供时,病毒疫苗在检出实际感染的症状或临床体征时提供。化合物的治疗性施用用于减轻任何实际感染。当治疗性地提供时,基因治疗组合物在检出疾病的症状或临床体征时提供。化合物的治疗性施用用于减轻该疾病的症状或临床体征。

[0120] 因此,本发明的疫苗组合物可以在感染开始之前(以便预防或减轻预期的感染)或在实际感染开始之后提供。类似地,对于基因治疗,所述组合物可以在病症或疾病的任何症状或临床体征明显之前或在检出一种或更多种症状之后提供。

[0121] 如果组合物的施用可以被接受者哺乳动物耐受,则称该组合物是“药理学上可接受的”。如果施用的量在生理上是显著的,则称这样的药剂以“治疗有效量”施用。如果本发明组合物的存在导致接受者患者生理上的可检测变化,例如增强针对感染性流感病毒至少一种毒株的至少一种初次或再次体液或细胞免疫应答,则本发明的组合物是生理学上显著的。

[0122] 所提供的“保护”不必是绝对的,即如果与哺乳动物的对照群体或组相比具有统计学上显著的改善,则不必完全预防或根除流感感染。保护可限于减轻流感病毒感染的症状或临床体征的发作速度或严重程度。

[0123] 药物施用

[0124] 本发明的组合物可通过被动免疫接种或主动免疫接种赋予对一种或更多种病原体(例如一种或更多种流感病毒株)的抗性。在主动免疫接种中,减毒活疫苗组合物预防性地施用于宿主(例如哺乳动物),并且宿主对施用的免疫应答保护免受感染和/或疾病。对于被动免疫接种,引发的抗血清可以被回收并施用于怀疑患有由至少一种流感病毒株引起的感染的接受者。本发明的基因治疗组合物可通过主动免疫接种产生预防性或治疗性水平的期望基因产物。

[0125] 在一个实施方案中,在足以引起产生用于保护雌性和胎儿或新生儿(通过抗体被动并入在胎盘中或在母乳中)的免疫应答的时间和量的条件下,将疫苗提供给哺乳动物雌性(在妊娠或分娩时或在其之前)。

[0126] 本发明因此包括用于预防或减轻病症或疾病(例如,由至少一种病原体毒株引起的感染)的方法。如本文中所示,如果疫苗的施用导致疾病的临床体征或病症的全部或部分减轻(即,抑制),或者导致个体对疾病的全部或部分免疫,则称该疫苗预防或减轻疾病。如本文中所示,如果基因治疗组合物的施用导致疾病的临床体征或病症的全部或部分减轻(即,抑制),或者导致个体对疾病的全部或部分免疫,则称该基因治疗组合物预防或减轻疾病。

[0127] 具有至少一种本发明的流感病毒,包括减毒的病毒和一种或更多种其他分离的病

毒、其一种或更多种分离的病毒蛋白、编码其一种或更多种病毒蛋白的一种或更多种分离的核酸分子,或其组合的组合物可通过达到预期目的的任何手段来施用。

[0128] 例如,这样的组合物的施用可通过多种肠胃外途径,例如皮下、静脉内、皮内、肌内、腹膜内、鼻内、经口或经皮途径。肠胃外施用可通过推注(bolus injection)或通过随时间逐渐灌注来实现。

[0129] 用于预防、抑制或治疗流感病毒相关病理状况的典型方案包括施用有效量的如本文中所述的疫苗组合物,作为单一治疗施用,或作为增强或加强剂量在长达和包括一周至约24个月(或者其中的任何范围或值)的时期重复施用。

[0130] 根据本发明,组合物的“有效量”是足以实现期望作用的量。应理解,有效剂量可取决于接受者的物种、年龄、性别、健康和体重、同时治疗的种类(如果有的话)、治疗频率以及所需作用的性质。下面提供的有效剂量范围不旨在限制本发明并代表剂量范围。

[0131] 用于动物(例如哺乳动物成体生物体)的活的减毒的或杀伤的病毒疫苗的剂量可以为约 10^2 至 10^{15} (例如 10^3 至 10^{12})噬斑形成单位(PFU)/kg,或者其中的任何范围或值。灭活疫苗的剂量可以为约0.1至1000,例如30至100 μ g的HA蛋白。然而,剂量应是安全且有效的量,如通过常规方法使用现有疫苗作为起点所确定的。

[0132] 复制的病毒疫苗每个剂量中免疫反应性HA的剂量可标准化为含有合适的量,例如30至100 μ g(或其中的任何范围或值),或政府机构或公认的专业组织所推荐的量。NA的量也可以标准化,然而,这种糖蛋白在纯化和储存期间可能是不稳定的。

[0133] 复制的病毒疫苗每个剂量中免疫反应性HA的剂量可标准化为含有合适的量,例如1至50 μ g(或其中的任何范围或值),或美国公共卫生署(Public Health Service,PHS)所推荐的量,即对于年龄较大的儿童(大于或等于3岁)通常为15 μ g/组分,而对于小于3岁的儿童则通常为7.5 μ g/组分。NA的量也可以标准化,然而,这种糖蛋白在处理器纯化和储存期间可能是不稳定的(Kendal et al.,1980;Kerr et al.,1975)。每0.5ml剂量的疫苗可含有约10至500亿个病毒颗粒,并且优选100亿个颗粒。

[0134] 示例性实施方案

[0135] 在一个实施方案中,提供了分离的流感病毒,其具有PA、PB1、PB2、NP、NS、M、NA和HA病毒区段,其中PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1,或M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1,其中流感病毒相对于相应流感病毒具有增强的复制,所述相应流感病毒具有编码在第711位具有异亮氨酸的PB1的PB1病毒区段或具有编码在第128位具有甲硫氨酸的M1的M病毒区段。在一个实施方案中,NA病毒区段与PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段异源。在一个实施方案中,NA和HA病毒区段来自相同的病毒分离株。在一个实施方案中,PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1,并且M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1。在一个实施方案中,PA病毒区段编码这样的PA,其在第105位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第142位具有除赖氨酸之外的残基、在第149位具有除丝氨酸之外的残基、在第225位具有除丝氨酸之外的残基、在第356位具有除赖氨酸之外的残基、在第357位具有除苏氨酸之外的残基、在第401位残基处具有除精氨酸之外的残基、或在第550位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中,PB1病毒区段还编码这样的PB1,其在第40位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第112位具有除谷氨酸之外的残基、在第180位具有除甘氨酸之外的残基,或在第

247位残基处具有除谷氨酰胺之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, PB2病毒区段编码这样的PB2, 其在第202位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第323位具有除苯丙氨酸之外的残基、或在第504位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, NP病毒区段编码这样的NP, 其在第74位具有除精氨酸之外的残基、在第116位具有除异亮氨酸之外的残基、或在第417位具有除天冬酰胺之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中, NS病毒区段编码这样的NS1, 其在第30位具有除丙氨酸之外的残基、在第55位具有除赖氨酸之外的残基、或在第118位具有除精氨酸之外的残基、或其任意组合。

[0136] 在一个实施方案中, PA病毒区段编码这样的PA, 其在第105位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第142位具有除赖氨酸之外的残基、在第149位具有除丝氨酸之外的残基、在第225位具有除丝氨酸之外的残基、在第256位具有除精氨酸之外的残基、在第350位具有除天冬酰胺之外的残基、在第356位具有除赖氨酸之外的残基、在第357位具有除苏氨酸之外的残基、在第369位具有除丙氨酸之外的残基、在第401位残基处具有除精氨酸之外的残基、或在第550位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。

[0137] 在一个实施方案中, PB1病毒区段编码这样的PB1, 其在第40位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第92位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第105位具有除天冬酰胺之外的残基、在第112位具有除谷氨酸之外的残基、在第178位具有除谷氨酸之外的残基、在第180位具有除甘氨酸之外的残基、在第247位残基处具有除谷氨酰胺之外的残基、在第290位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第325位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第711位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合。

[0138] 在一个实施方案中, PB2病毒区段编码这样的PB2, 其在第62位具有除精氨酸之外的残基、在第202位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第221位具有除丙氨酸之外的残基、在第323位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第370位具有除丙氨酸之外的残基、在第467位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第504位具有除异亮氨酸之外的残基、在第704位具有除酪氨酸之外的残基、或在第721位具有除赖氨酸之外的残基、或其任意组合。

[0139] 在一个实施方案中, NP病毒区段编码这样的NP, 其在第74位具有除精氨酸之外的残基、在第103位具有除赖氨酸之外的残基、在第116位具有除异亮氨酸之外的残基、在第194位具有除缬氨酸之外的残基、或在第417位具有除天冬酰胺之外的残基、或其任意组合。

[0140] 在一个实施方案中, M病毒区段编码在第126位具有除丝氨酸之外的残基、在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第244位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1, 或者在第15位具有除色氨酸之外的残基的M2, 或其任意组合。

[0141] 在一个实施方案中, NS病毒区段编码这样的NS1, 其在第30位具有除丙氨酸之外的残基、在第55位具有除赖氨酸之外的残基、在第101位具有除天冬氨酸之外的残基、或在第118位具有除精氨酸之外的残基、或其任意组合。

[0142] 在一个实施方案中, 病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M, 在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C, 在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C, 在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C, 在PB1中第247位具有H、R、K、D或E, 在PB1中第290位具有V、A、L、G、S、T、C或I, 在PB1中第92位具有V、A、L、G、S、T、C或I, 在PB1中第325位具有V、A、L、G、S、T、C或I, 在PB1中第105位具有H、R、K、D或E, 在PB1中第178位具有H、R或K, 或其任意组合。

[0143] 在一个实施方案中, 病毒在PB1中第711位具有V、A、L或G, 在PB1中第40位具有A、L、

G、V或I,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T或I,在PB1中第180位具有W、Y或F,在PB1中第247位具有H、R、K、D或E,在PB1中第290位具有V、A、L、G或I,在PB1中第92位具有V、A、L、G或I,在PB1中第325位具有V、A、L、G或I,在PB1中第105位具有H、R或K,在PB1中第178位具有R或K,或其任意组合。

[0144] 在一个实施方案中,病毒在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第103位具有R或H,在NP中第194位具有I、A、L或G,在NP中第116位具有L、V、G、A、S或T,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H,或其任意组合。

[0145] 在一个实施方案中,病毒在NS1中第30位具有P、W、F、S或T,在第55位具有E、D、Q或N,在NS1中第101位具有L、I、V、G、A或T,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N,或其任意组合。

[0146] 在一个实施方案中,病毒在PA中第142位具有E、D、H、R或K,在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第256位具有L、I、V、S、G、A或T,在PA中第350位具有L、I、V、G、A或T,在PA中第356位具有L、I、V、G、S或T,在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q,或其任意组合。

[0147] 在一个实施方案中,病毒在PB2中第504位具有V、A、L、G、S或T,在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第221位具有V、L、G或I,在PB2中第370位具有V、L、G、T或I,在PB2中第62位具有V、L、G、S、T或I,在PB2中第467位具有V、L、A、G、S、T或I,在PB2中第704位具有K、H、D、E、N或Q,在PB2中第721位具有R、H、D、E、N或Q,或其任意组合。

[0148] 在一个实施方案中,病毒在M1中第126位具有V、A、L、G或T,在M1中第128位具有V、A、L、G、T或S,在M1中第244位具有R、K、D、E或H,在M2中第15位具有A、L、G、S、T或I,或其任意组合。

[0149] 在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C;在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T;在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。

[0150] 在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N;在NS1中第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C;或其任意组合。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H;在第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。在一个实施方案中,病毒在PA中具有142N、225C、356R或550L;在PB1中具有112G、247H、507V或644A中的一个或多个;在PB2中具有202L、323L或504V中的一个或多个;在NP中具有74K、112L、116L、417D或442A中的一个或多个;在M1中具有97A和/或100H;和/或在NS1中具有55E和/或140Q,或其任意组合。在一个实施方案中,病毒具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K,并且任选地具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。

[0151] 在一个实施方案中,病毒具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K,以及具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。在一个实施方案中,病毒在PB2中具有202L和/或323L。在一个实施方案中,病毒在PB1中具有247H。在一个实施方案中,病毒在NS1中具有55E。在一个实施方案中,病毒在PA中具有142C。在一个实施方案中,病毒在NP中具有74K。在一个实施方案中,病毒在PB2中具有504V。在一个实施方案中,病毒在NP中具有74K、116L或417D。在一个实施方案中,病毒在NS1中具有30P、55E或118K。在一个实施方案中,病毒在PA中具有225C或401K。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M。在一个实施方案中,病毒在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T。在一个实施方案中,病毒在PB1、PB2或PA中任一个的病毒区段中第4位具有U。

[0152] 在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:2编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:2编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:3编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:3编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:1编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:4编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:4编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:5编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:5编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:6编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:6编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2,或者其中所述PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:10编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:10编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:11编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:11编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:12编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:12编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:13编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:13编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:14编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:14编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:15编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:15编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2。

[0153] 还提供了具有分离的病毒的疫苗。

[0154] 在一个实施方案中,提供了用于制备重配病毒的多种流感病毒载体。在一个实施方案中,所述多种包括但不限于:包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及

包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS cDNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的载体中的NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的载体中的HA DNA具有异源HA的序列,其中所述PB1 DNA编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1或所述M DNA编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1;以及包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。在一个实施方案中,用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA具有这样的序列,其对应于编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15编码的相应多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的多肽的序列。在一个实施方案中,用于vRNA载体的启动子是RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T3启动子或T7启动子。在一个实施方案中,HA是H1、H3、H5、H7或H9。在一个实施方案中,PA、PB1和PB2病毒区段并且任选NP、NS和M病毒区段具有启动子C至a突变。

[0155] 还提供了制备流感病毒的方法,其包括:使细胞与有效产生感染性流感病毒之量的以下接触:包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的载体中的所述NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的载体中的所述HA DNA具有异源HA的序列,其中所述PB1 DNA编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1或所述M DNA编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1;以及包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载

体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。在一个实施方案中,细胞是禽类细胞或哺乳动物细胞。在一个实施方案中,细胞是Vero细胞、人细胞或MDCK细胞。在一个实施方案中,用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA具有这样的序列,其对应于编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15编码的相应多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的多肽的序列。在一个实施方案中,病毒是分离的。在一个实施方案中,PB1病毒区段编码在第711位具有除异亮氨酸之外的残基的PB1并且M病毒区段编码在第128位具有除甲硫氨酸之外的残基的M1。在一个实施方案中,PA病毒区段编码这样的PA,其在第105位具有除苯丙氨酸之外的残基、在第142位具有除赖氨酸之外的残基、在第149位具有除丝氨酸之外的残基、在第225位具有除丝氨酸之外的残基、在第356位具有除赖氨酸之外的残基、在第357位具有除苏氨酸之外的残基、在第401位残基处具有除精氨酸之外的残基、或是在第550位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合;或者其中PB1病毒区段还编码这样的PB1,其在第40位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第112位具有除谷氨酸之外的残基、在第180位具有除甘氨酸之外的残基,或是在第247位残基处具有除谷氨酰胺之外的残基、或其任意组合;或者其中PB2病毒区段编码这样的PB2,其在第202位具有除甲硫氨酸之外的残基、在第323位具有除苯丙氨酸之外的残基、或是在第504位具有除异亮氨酸之外的残基、或其任意组合,或者其中NP病毒区段编码这样的NP,其在第74位具有除精氨酸之外的残基、在第116位具有除异亮氨酸之外的残基、或是在第417位具有除天冬酰胺之外的残基、或其任意组合;或者其中NS病毒区段编码这样的NS1,其在第30位具有除丙氨酸之外的残基、在第55位具有除赖氨酸之外的残基或是在第118位具有除精氨酸之外的残基、或其任意组合。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E,或其任意组合;或者在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H,或其任意组合;或者在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在第55位具有E、D、Q或N,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N,在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T,或其任意组合;或者在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T,在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q,或其任意组合;或者在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C,或其任意组合。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第40位具有A、L、G、V、S、T、I或C,在PB1中第180位具有A、L、W、Y、F、V、S、T、I或C;在NP中第116位具有L、V、G、A、S、C或T;在NS1中第30位具有P、W、F、L、I、V、G、S、C或T,在NS1中第118位具有K、H、D、E、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第401位具有K、H、D、E、N或Q;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第247位具有H、R、K、D、E、D或E;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N;在NS1中第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第142位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第202位具有A、L、G、S、T、I或C,在PB2中第323位具有A、L、G、S、T、I或C;或其任意

组合。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M,在PB1中第112位具有A、L、G、V、S、T、I或C;在NP中第74位具有K、H、D、E、Q或N,在NP中第417位具有D、E、Q、K或H;在第55位具有E、D、Q或N;在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T;在PA中第225位具有C、L、I、V、G、A或T;在PB2中第504位具有V、A、L、G、S、T、C或M;或其任意组合。在一个实施方案中,病毒在PA中具有142N、225C、356R或550L中的一个或多个;在PB1中具有112G、247H、507V或644A中的一个或多个;在PB2中具有202L、323L或504V中的一个或多个;在NP中具有74K、112L、116L、417D或442A中的一个或多个;在M1中具有97A和/或100H;和/或在NS1中具有55E和/或140Q,或其任意组合。在一个实施方案中,病毒具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K,并且任选地具有以下中的至少一个:在A1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。在一个实施方案中,病毒具有以下中的至少一个:在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K,以及具有以下中的至少一个:在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。在一个实施方案中,病毒在PB2中具有202L和/或323L。在一个实施方案中,病毒在PB1中具有247H。在一个实施方案中,病毒在NS1中具有55E。在一个实施方案中,病毒在PA中具有142C。在一个实施方案中,病毒在NP中具有74K。在一个实施方案中,病毒在PB2中具有504V。在一个实施方案中,病毒在NP中具有74K、116L或417D。在一个实施方案中,病毒在NS1中具有30P、55E或118K。在一个实施方案中,病毒在PA中具有225C或401K。在一个实施方案中,病毒在PB1中第711位具有V、A、L、G、S、T、C或M。在一个实施方案中,病毒在M1中第128位具有L、I、V、G、A、S、C或T。在一个实施方案中,PA、PB1或PB2病毒区段中的至少一个具有C至U启动子突变。

[0156] 在另一些实施方案中,病毒在PA中第30位或第31位具有除SEQ ID NO:1或10编码的残基之外的残基;在PB1中具有除R54、T59、G62、A63、E75、D76、E78、P79、S80、R327、M507、L624、V644、I667、N694、L695、E697、F699、F700、P701、S702、Y705、S713和/或M714之外的残基;在PB2中具有除I57、T58、A59、K61、M66、R368、E391、QS91、E677、D678和/或P679之外残基,在PB2中;在NP中具有除I112、N224、R293、M371、R422或T442之外的残基;在M1中具有除P90、V97和/或Y100之外的残基;或在NS1中具有除T49、R140、S161和/或A223之外的残基。在一个实施方案中,PB1病毒区段和/或NS病毒区段编码在PB1中第62位、第261位、第361位、第621位和/或第654位具有除甘氨酸、丝氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺或天冬酰胺之外的残基,或在F2中第81位具有除精氨酸之外的残基的多肽。

[0157] 在一个实施方案中,分离的重组流感病毒具有来自第一流感疫苗病毒分离株的PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段,异源、重组或嵌合流感病毒NA病毒区段,以及异源、重组或嵌合HA病毒区段,其中PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段中的一个、两个或多个在以下位置具有选定的氨基酸残基:PA中第30位、第31位、第105位、第142位、第149位、第225位、第356位、第357位、第401位和/或第550位;PB1中第40位、第54位、第59位、第62位,例如62A,第63位、第75位、第76位、第78位、第79位、第80位、第112位、第180位、第247位、第261位,例如161G,第327位、第361位,例如361R,第507位、第621位,例如621R,第624位、第644位、第654位,例如654S,第667位、第694位、第695位、第697位、第699位、第700位、第701位、第702位、第705位、第713位和/或第714位;PB2中第57位、第58位、第59位、第61位、第66位、第202位、第323位、第368位、第391位、第504位、第591位、第677位、第678位和/或第679位;NP中第74

位、第112位、第116位、第224位、第293位、第371位、第377位、第417位、第422位或第442位；M1中第90位、第97位和/或第100位；或NS1中第30位、第49位、第55位、第118位，例如118K，第140位、第161位和/或第223位，以及任选地分别在第136位、第162位、第179位、第182位、第184位、第252位、第449位或第476位具有除谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或甲硫氨酸之外的残基的HA，例如具有136D、162E、179L、182V、184I、252I、449E或476I中的一个或多个的HA区段，或者任选地分别在第55位或第265位残基处具有除亮氨酸或丙氨酸之外的残基（例如55S或265V）的NA。在一个实施方案中，分离的病毒在PA中具有142N、225C、356R或550L；在PB1中具有112G、247H、507V或644A中的一个或多个；在PB2中具有202L、323L或504V中的一个或多个；在NP中具有74K、112L、116L、417D或442A中的一个或多个；在M1中具有97A和/或100H；和/或在NS1中具有55E和/或140Q，或其组合，例如，具有以下中的至少一个：在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K以及任选地具有以下中的至少一个：在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H或者具有以下中的至少一个：在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K，以及具有以下中的至少一个：在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。在一个实施方案中，病毒具有以下中的至少一个：在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K，并且任选地具有以下中的至少一个：在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。在一个实施方案中，病毒具有以下中的至少一个：在PB2中具有202L和/或323L、在PB1中具有247H或在NP中具有74K，以及具有以下中的至少一个：在PA1中具有142N、在NS1中具有55K或在M1中具有97A和/或100H。在一个实施方案中，分离的病毒在PB2中具有202L和/或323L，并且任选地在PB1中具有247H并且任选地在NP中具有74K。在一个实施方案中，分离的病毒在PB1中具有247H并且任选地在NP中具有74K。在一个实施方案中，分离的病毒在PB1中具有40I、40L、112G、180W、247H、507V或644A，并且任选地在PB2中具有202L和/或323L，并且任选地在NP中具有74K、112L、116L、377N、417D或422L，并且任选地在NS1中具有30P、118K、161T或140Q，并且任选地在PA中具有142N、225C、356R、401K或550L。在一个实施方案中，分离的病毒在PB1中具有40I、40L、112G、180W、247H、507V或644A。在一个实施方案中，分离的病毒在PB2中具有202L和/或323L。在一个实施方案中，分离的病毒在NP中具有74K、112L、116L、377N、417D或422L。在一个实施方案中，分离的病毒在NS1中具有30P、118K、161T或140Q。在一个实施方案中，分离的病毒在PA中具有142N、225C、356R、401K或550L。在一个实施方案中，在PA中指定位置的选定氨基酸残基位于第97位、第105位、第142位、第149位、第225位、第356位、第357位、第401位、第404位和/或第421位。在一个实施方案中，PB1中指定位置的选定氨基酸残基位于第12位、第40位、第54位、第59位、第62位、第63位、第66位、第75位、第76位、第78位、第79位、第80位、第180位、第247位、第507位、第624位、第644位、第694位、第695位、第697位、第699位、第700位、第701位、第705位、第713位、第714位和/或第762位。在一个实施方案中，PB2中指定位置的选定氨基酸残基位于第57位、第58位、第59位、第61位、第66位、第202位、第243位、第323位、第504位、第677位、第678位和/或第679位。在一个实施方案中，NP中指定位置的选定氨基酸残基位于第74位、第112位、第116位、第224位、第293位、第417位和/或第442位。在一个实施方案中，M1中指定位置的选定氨基酸残基位于第90位、第97位和/或第100位。在一个实施方案中，NS1中指定位置的选定氨基酸残基位于第49位、第30位、第55位、第

161位和/或第223位。在一个实施方案中,PA中指定位置的选定氨基酸残基位于第97位、第105位、第142位、第149位、第225位、第356位、第357位、第401位、第404位和/或第421位;并且任选地,PB1中指定位置的选定氨基酸残基位于第12位、第40位、第54位、第59位、第62位、第63位、第66位、第75位、第76位、第78位、第79位、第80位、第180位、第247位、第507位、第624位、第644位、第694位、第695位、第697位、第699位、第700位、第701位、第705位、第713位、第714位和/或第762位,与PA的选定残基任意组合;并且任选地,PB2中指定位置的选定氨基酸残基位于第57位、第58位、第59位、第61位、第66位、第202位、第243位、第323位、第504位、第677位、第678位和/或第679位,与PA和/或PB1的选定残基任意组合;并且任选地,NP中指定位置的选定氨基酸残基位于第74位、第112位、第116位、第224位、第293位、第417位和/或第442位,与PA、PB1和/或PB2的选定残基任意组合;并且任选地,M1中指定位置的选定氨基酸残基位于第90位、第97位和/或第100位,与PA、PB1、PB2和/或NP的选定残基任意组合;并且任选地,NS1中指定位置的选定氨基酸残基位于第49位、第30位、第55位、第161位和/或第223位,或与PA、PB1、PB2、NP和/或M1的选定残基任意组合。

[0158] 对于上文公开的示例性病毒中的任一种,在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:2编码的氨基酸序列的PB1或与由SEQ ID NO:2编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:3编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:3编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:1编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:4编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:4编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:5编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:5编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:6编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:6编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2,或者PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段包含以下中至少一个的序列:具有由SEQ ID NO:10编码的氨基酸序列的PB1,或与由SEQ ID NO:10编码的PB1具有至少95%氨基酸序列同一性的PB1;具有由SEQ ID NO:11编码的氨基酸序列的PB2或与由SEQ ID NO:11编码的PB2具有至少95%氨基酸序列同一性的PB2;具有由SEQ ID NO:12编码的氨基酸序列的PA或与由SEQ ID NO:12编码的PA具有至少95%氨基酸序列同一性的PA;具有由SEQ ID NO:13编码的氨基酸序列的NP或与由SEQ ID NO:13编码的NP具有至少95%氨基酸序列同一性的NP;具有由SEQ ID NO:14编码的氨基酸序列的M1和/或M2或与由SEQ ID NO:14编码的M1和/或M2具有至少95%氨基酸序列同一性的M1和/或M2;或具有由SEQ ID NO:15编码的氨基酸序列的NS1和/或NS2或与由SEQ ID NO:15编码的NS1和/或NS2具有至少95%氨基酸序列同一性的NS1和/或NS2。

[0159] 对于上文公开的示例性病毒中的任一种,在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和M病毒区段中的至少一个具有C至U启动子突变。

[0160] 本文中公开的任何分离的病毒均可用于疫苗。

[0161] 在一个实施方案中,本发明提供了用于制备重配株的多种流感病毒载体。在一个实施方案中,所述多种包括:包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2

DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS cDNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的载体中的所述NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的载体中的所述HA DNA具有异源HA的序列,PA中第30位、第31位、第105位、第142位、第149位、第225位、第356位、第357位、第401位和/或第550位;PB1中第40位、第54位、第59位、第62位、第63位、第75位、第76位、第78位、第79位、第80位、第112位、第180位、第247位、第327位、第507位、第624位、第644位、第667位、第694位、第695位、第697位、第699位、第700位、第701位、第702位、第705位、第713位或第714位和/或第247位;PB2中第57位、第58位、第59位、第61位、第66位、第202位、第323位、第368位、第391位、第504位、第591位、第677位、第678位或第679位、第202位和/或第323位;NP中第74位、第112位、第116位、第224位、第293位、第371位、第377位、第417位、第422位和/或第442位;M1中第90位、第97位和/或第100位;或NS中第30位、第49位、第55位、第118位、第140位、第161位和/或第223位;以及包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。在一个实施方案中,用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA具有这样的序列,其对应于编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15编码的相应多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的多肽的序列。在一个实施方案中,用于vRNA载体的启动子是RNA聚合酶I启动子、RNA聚合酶II启动子、RNA聚合酶III启动子、T3启动子或T7启动子。在一个实施方案中,NA是N9。在一个实施方案中,HA是H7。在一个实施方案中,PA、PB1、PB2、NP、NS和/或M病毒区段具有启动子C至a突变。

[0162] 在一个实施方案中,本发明提供了制备流感病毒的方法。该方法包括使细胞与有效产生感染性流感病毒之量的以下接触:包含与连接于转录终止序列的流感病毒PA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB1 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒PB2 DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒HA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒NP DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与

连接于转录终止序列的流感病毒NA DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、包含与连接于转录终止序列的流感病毒M DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体、以及包含与连接于转录终止序列的流感病毒NS DNA可操作地连接的启动子的用于vRNA之产生的载体,其中用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA来自一种或更多种流感疫苗病毒分离株,其中用于NA vRNA之产生的载体中的所述NA DNA具有异源NA的序列,并且其中用于HA vRNA之产生的载体中的所述HA DNA具有异源HA的序列,PA中第30位、第31位、第105位、第142位、第149位、第225位、第356位、第357位、第401位和/或第550位;PB1中第40位、第54位、第59位、第62位、第63位、第75位、第76位、第78位、第79位、第80位、第112位、第180位、第247位、第327位、第507位、第624位、第644位、第667位、第694位、第695位、第697位、第699位、第700位、第701位、第702位、第705位、第713位和/或第714位和/或第247位;PB2中第57位、第58位、第59位、第61位、第66位、第202位、第323位、第368位、第391位、第504位、第591位、第677位、第678位和/或第679位、第202位和/或第323位;NP中第74位、第112位、第116位、第224位、第293位、第371位、第377位、第417位、第422位和/或第442位;M1中第90位、第97位和/或第100位;或NS中第30位、第49位、第55位、第118位、第140位、第161位或第223位;以及包含与编码流感病毒PA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒PB2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及包含与编码流感病毒NP的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、以及任选地包含与编码流感病毒HA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒NA的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M1的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、包含与编码流感病毒M2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体、或包含与编码流感病毒NS2的DNA区段可操作地连接的启动子的用于mRNA之产生的载体。在一个实施方案中,细胞是禽类细胞或哺乳动物细胞,例如Vero细胞、人细胞或MDCK细胞。在一个实施方案中,用于vRNA之产生的载体中的PB1、PB2、PA、NP、NS和M DNA具有这样的序列,其对应于编码与由SEQ ID NO:1至6或10至15编码的相应多肽具有至少95%氨基酸序列同一性的多肽的序列。在一个实施方案中,所述方法包括分离病毒。在一个实施方案中,PA、PB1或PB2病毒区段中的至少一个具有C至U启动子突变。

[0163] 还提供了用于流感病毒PA的vRNA或mRNA表达的载体,所述流感病毒PA与SEQ ID NO:1编码的多肽具有至少95%氨基酸序列同一性,并且在第30位具有苏氨酸、在第31位具有赖氨酸、在第105位具有半胱氨酸或是在第401位具有赖氨酸;用于流感病毒PB1的vRNA或mRNA表达的载体,所述流感病毒PB1与SEQ ID NO:2编码的多肽具有至少95%氨基酸序列同一性,并且在第40位具有亮氨酸、在第54位具有丙氨酸或异亮氨酸、在第112位具有甘氨酸、在第247位具有组氨酸、在第507位具有缬氨酸、在第644位具有丙氨酸、或是在第713位具有半胱氨酸;用于PB2的vRNA或mRNA表达的载体,所述PB2与SEQ ID NO:3编码的多肽具有至少95%氨基酸序列同一性,并且在第202位和/或第323位具有亮氨酸;用于流感病毒NP的vRNA或mRNA表达的载体,所述流感病毒NP与由SEQ ID NO:4编码的多肽具有至少95%氨基酸序列同一性,并且在第74位具有赖氨酸、在第116位具有亮氨酸、在第224位具有异亮氨酸、在第293位具有赖氨酸、在第377位具有天冬酰胺、或是在第417位具有天冬氨酸;用于流感病毒

NS1的vRNA或mRNA表达的载体,所述流感病毒NS1与由SEQ ID NO:6编码的NS1多肽具有至少95%氨基酸序列同一性,并且在第30位具有脯氨酸、在第49位具有丙氨酸、在第118位具有赖氨酸、在第140位具有谷氨酰胺、在第161位具有苏氨酸、或在第223位具有谷氨酸;以及用于流感病毒M1的vRNA或mRNA表达的载体,所述流感病毒M1与由SEQ ID NO:5编码的M1多肽具有至少95%氨基酸序列同一性并且在第90位具有丝氨酸。

[0164] 本发明将通过以下非限制性实施例进行描述。

[0165] 实施例1

[0166] 方法

[0167] 细胞和病毒

[0168] 将293T人胚肾细胞维持在含有10%胎牛血清和抗生素的Dulbecco改良的Eagle最小必需培养基(DMEM)中。将马丁-达比犬肾(Madin-Darby canine kidney,MDCK)细胞在含有5%新生牛血清和抗生素的MEM中培养。将非洲绿猴Vero WCB细胞(其在生物安全测试之后已确立用于人疫苗产生(Sugawara et al.,2002))维持在含有抗生素的无血清VP-SFM培养基(GIBCO-BRL)中。将细胞在5%CO₂中于37°C下维持。

[0169] 质粒构建和反向遗传学

[0170] 为了产生甲型流感病毒的重配株,使用了基于质粒的反向遗传学(Neumann et al.,1999)。将全长cDNA克隆到人聚合酶I启动子和小鼠RNA聚合酶I终止子的控制下的质粒(PoII质粒)中。

[0171] 使用先前产生的一系列来源于A/WSN/33(H1N1;WSN)或PR8毒株的PoII构建体进行反向遗传学(Horimoto et al.,2006;Neumann et al.,1999)。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)推荐A/Puerto Rico/8/34(H1N1;PR8)作为供体病毒,因为其在人中的安全性(Wood&Robertson,2004;Webby&Webster,2003)。

[0172] 将在鸡肌动蛋白(例如β-肌动蛋白)启动子的控制下表达WSN或PR8 NP、PA、PB1或PB2的质粒用于所有反向遗传学实验(Horimoto et al.,2006;Neumann et al.,1999)。简言之,将PoII质粒和蛋白质表达质粒与转染试剂Trans-IT 293T(Panvera)混合,在室温下孵育15分钟,并随后添加至293T细胞。将经转染细胞在Opti-MEM I(GIBCO-BRL)中孵育48小时。对于在Vero WCB细胞中的反向遗传学,使用电穿孔器(Amaxa)根据制造商说明转染质粒混合物。在转染之后16小时将新鲜制备的Vero WCB细胞添加至经转染细胞上,并且在6小时之后将TPCK-胰蛋白酶(1μg/mL)添加至培养物。将经转染细胞在无血清VP-SFM中孵育总共4天。收获含有感染性病毒的上清液,并可通过有限稀释进行生物学克隆。

[0173] 制备了具有来自A/HongKong/213/2003(H5N1)的HA和NA基因以及来自PR8(UW)的甲型流感病毒基因的其余部分的重组病毒。重组病毒的滴度是10^{10.67}EID₅₀/mL,并且HA滴度是1:1600

[0174] 表1

[0175]	具有 PR8 基因以及以下 HA 和 NA 基因的病毒	每个稀释度中的 HA 滴度 (HAU/mL)						
		10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8
	WSN-HA NA	160	40	40	320	40	640	<1
	HK-HAavir NA	400	800	400	400	400	800	<1

[0176] PR8 (UW) 基因的序列如下:

[0177] PA

AGCGAAAGCA GGTACTGATC CAAAATGGAA GATTTTGTGC GACAATGCTT CAATCCGATG
 ATTGTGCGAGC TTGCGGAAAA ACAATGAAA GAGTATGGGG AGGACCTGAA AATCGAAACA
 AACAAATTTG CAGCAATATG CACTCACTTG GAAGTATGCT TCATGTATTC AGATTTTCAC
 TTCATCAATG AGCAAGGCCG GTCAATAATC GTAGAACTTG GTGATCCAAA TGCACTTTTG
 AAGCACAGAT TTGAAATAAT CGAGGGAAGA GATCGCACAA TGGCCTGGAC AGTAGTAAAC
 AGTATTTGCA AACTACAGG GGCTGAGAAA CCAAAGTTTC TACCAGATTT GTATGATTAC
 AAGGAGAATA GATTCATCGA AATTGGAGTA ACAAGGAGAG AAGTTCACAT AACTATCTG
 GAAAAGGCCA ATAAAATTAA ATCTGAGAAA ACACACATCC ACATTTTCTC GTTCACTGGG
 GAAGAAATGG CCACAAAGGC AGACTACACT CTCGATGAAG AAAGCAGGGC TAGGATCAAA
 ACCAGACTAT TCACCATAAG ACAAGAAATG GCCAGCAGAG GCCTCTGGGA TTCCTTTCGT
 CAGTCCGAGA GAGGAGAAGA GACAATTGAA GAAAGGTTTG AAATCACAGG AACATGCGC
 AAGCTTGCCG ACCAAAGTCT CCCGCCGAAC TTCTCCAGCC TTGAAAATTT TAGAGCCTAT
 GTGGATGGAT TCGAACCGAA CGGCTACATT GAGGGCAAGC TGTCTCAAAT GTCCAAAGAA
 GTAAATGCTA GAATTGAACC TTTTTGAAA ACAACACCAC GACCACTTAG ACTTCCGAAT
 GGGCCTCCCT GTTCTCAGCG GTCCAAATTC CTGCTGATGG ATGCCTTAAA ATTAAGCATT
 GAGGACCCAA GTCATGAAGG AGAGGGAATA CCGCTATATG ATGCAATCAA ATGCATGAGA
 ACATTCTTTG GATGGAAGGA ACCCAATGTT GTTAAACCAC ACGAAAAGGG AATAAATCCA
 AATTATCTTC TGTCATGGAA GCAAGTACTG GCAGAACTGC AGGACATTGA GAATGAGGAG
 AAAATTCCAA AGACTAAAA TATGAAGAAA ACAAGTCAGC TAAAGTGGGC ACTTGGTGAG
 AACATGGCAC CAGAAAAGGT AGACTTTGAC GACTGTAAAG ATGTAGGTGA TTTGAAGCAA
 TATGATAGTG ATGAACCAGA ATTGAGGTGCG CTTGCAAGTT GGATTCAGAA TGAGTTTAAAC
 AAGGCATGCG AACTGACAGA TTCAAGCTGG ATAGAGCTCG ATGAGATTGG AGAAGATGTG
 GCTCCAATTG AACACATTGC AAGCATGAGA AGGAATTATT TCACATCAGA GGTGTCTCAC
 TCGAGAGCCA CAGAATACAT AATGAAGGGA GTGTACATCA ATACTGCCTT GCTTAATGCA
 TCTTGTGCAG CAATGGATGA TTTCCAATTA ATTCCAATGA TAAGCAAGTG TAGAACTAAG
 GAGGGAAGGC GAAAGACCAA CTTGTATGGT TTCATCATAA AAGGAAGATC CCACTTAAGG
 AATGACACCG ACGTGGTAAA CTTTGTGAGC ATGGAGTTTT CTCTCACTGA CCAAGACTT
 GAACCACATA AATGGGAGAA GACTGTGTT CTTGAGATAG GAGATATGCT TATAAGAAGT
 GCCATAGGCC AGGTTTCAAG GCCCATGTTT TTGTATGTGA GAACAAATGG AACCTCAAAA
 ATTAAATGA AATGGGGAAT GGAGATGAGG CGTTGCCTCC TCAGTCACT TCAACAAATT
 GAGAGTATGA TTGAAGCTGA GTCCTCTGTC AAAGAGAAAG ACATGACCAA AGAGTTCTTT
 GAGAACAAAT CAGAAACATG GCCCATTGGA GAGTCCCCCA AAGGAGTGGA GGAAAGTTCC
 ATTGGGAAGG TCTGCAGGAC TTTATTAGCA AAGTCGGTAT TCAACAGCTT GTATGCATCT
 CCACAACAG AAGGATTTTC AGCTGAATCA AGAAAACCTG TTCTTATCGT TCAGGCTCTT
 AGGGACAACC TGGAACCTGG GACCTTTGAT CTTGGGGGGC TATATGAAGC AATTGAGGAG
 TGCCTGATTA ATGATCCCTG GGTTTTGCTT AATGCTTCTT GGTTCAACTC CTTCTTACA
 CATGCATTGA GTTAGTTGTG GCAGTGCTAC TATTTGCTAT CCATACTGTC CAAAAAGTA
 CCTTGTCTCT ACT (SEQ ID NO:1)

[0179] PB1

[0180] AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACCTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAGCACA
 AAATGCTATAAGCACAACTTTCCCTTATACTGGAGACCCTCCTTACAGCCATGGGACAGGAACAGGA
 TACACCATGGATACTGTCAACAGGACACATCAGTACTCAGAAAAGGGAAGATGGACAACAAACACCG
 AAATGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGCCACTGCCAGAAGACAATGAACCAAGTGGTTA
 TGCCCAAACAGATTGTGTATTGGAGGCGATGGCTTTCCCTTGAGGAATCCCATCCTGGTATTTTTGAAA
 ACTCGTGTATTGAAACGATGGAGGTTGTTCCAGCAAACACGAGTAGACAAGCTGACACAAGGCCGACA
 GACCTATGACTGGACTCTAAATAGAAACCAACCTGCTGCAACAGCATTGGCCAACACAATAGAAGTG
 TTCAGATCAAATGGCCTCACGGCCAATGAGTCTGGAAGGCTCATAGACTTCCCTTAAGGATGTAATGG
 AGTCAATGAACAAAGAAGAAATGGGGATCACAACCTATTTTCCAGAGAAAGAGACGGGTGAGAGACAA
 TATGACTAAGAAAATGATAACACAGAGAACAATGGGTAAAAAGAAGCAGAGATTGAACAAAAGGAGTT
 ATCTAATTAGAGCATTGACCCTGAACACAATGACCAAAGATGCTGAGAGAGGGAAGCTAAAACGGAG
 AGCAATTGCAACCCCGGGATGCAATAAGGGGGTTTGTATACTTTGTTGAGACACTGGCAAGGAGT
 ATATGTGAGAAACTTGAACAATCAGGGTTGCCAGTTGGAGGCAATGAGAAGAAAGCAAAGTTGGCAA
 ATGTTGTAAGGAAGATGATGACCAATTCTCAGGACACCCGAACCTTTCTTACCATCACTGGAGATAAC

[0181] ACCAAATGGAACGAAAATCAGAATCCTCGGATGTTTTGGCCATGATCACATATGACCAGAAATCA
 GCCGAATGGTTCAGAAATGTTCTAAGTATTGCTCCAATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTGG
 GAAAAGGGTATATGTTTGAGAGCAAGAGTATGAACTTAGAACTCAAATACCTGCAGAAATGCTAGCA
 AGCATCGATTTGAAATATTTCAATGATTCAACAAGAAAGAAGATTGAAAAAATCCGACCGCTCTTAATA
 GAGGGGACTGCATCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGTTAAGCACTGTATTAG
 GCGTCTCCATCCTGAATCTTGGACAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGTCTTCA
 ATCCTCTGACGATTTTGTCTGATTGTGAATGCACCCAATCATGAAGGGATTCAAGCCGGAGTCGAC
 AGGTTTTATCGAACCTGTAAGCTACTTGGAAATCAATATGAGCAAGAAAAGTCTTACATAAACAGAAC
 AGGTACATTTGAATTCACAAGTTTTTCTATCGTTATGGGTTTGTGCGCAATTTGAGCATGGAGCTTCC
 CAGTTTTGGGGTGTCTGGGATCAACGAGTCAGCGGACATGAGTATTGGAGTTACTGTATCAAAAAAC
 AATATGATAAACAAATGATCTTGGTCCAGCAACAGCTCAAATGGCCCTTCAGTTGTTTATCAAGATTA
 CAGGTACACGTACCGATGCCATATAGGTGACACACAAAATACAAACCCGAAGATCATTGAAATAAAGA
 AACTGTGGGAGCAAACCCGTTCCAAAGCTGGACTGCTGGTCTCCGACGGAGGCCCAAATTTATACAA
 CATTAGAAATCTCCACATTCCTGAAGTCTGCCTAAAATGGGAATTGATGGATGAGGATTACCAGGGG
 CGTTTATGCAACCCACTGAACCCATTTGTGAGCCATAAAGAAATTGAATCAATGAACAATGCAGTGAT
 GATGCCAGCACATGGTCCAGCCAAAACATGGAGTATGATGCTGTTGCAACAACACACTCCTGGATC
 CCCAAAAGAAATCGATCCATCTTGAATACAAGTCAAAGAGGAGTACTTGAGGATGAACAAATGTACCA
 AAGGTGCTGCAATTTATTTGAAAAATTCTTCCCCAGCAGTTCATACAGAAGACCAGTCGGGATATCCA
 GTATGGTGGAGGCTATGGTTCCAGAGCCCGAATTGATGCACGGATTGATTTGCAATCTGGAAGGAT
 AAAGAAAAGAGATTCACTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAA
 TAGTGAATTTAGCTTGTCTTTCATGAAAAATGCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:2)

[0182] PB2

[0183]

AGCGAAAGCA GGTCAATTAT ATTCAATATG GAAAGAATAA AAGAACTACG AAATCTAATG
TCGCAGTCTC GCACCCGCGA GATACTCACA AAAACCACCG TGGACCATAT GGCCATAATC
AAGAAGTACA CATCAGGAAG ACAGGAGAAG AACCCAGCAC TTAGGATGAA ATGGATGATG
GCAATGAAAT ATCCAATTAC AGCAGACAAG AGGATAACCG AAATGATTCC TGAGAGAAAT
GAGCAAGGAC AAACCTTTATG GAGTAAAATG AATGATGCCG GATCAGACCG AGTGATGGTA
TCACCTCTGG CTGTGACATG GTGGAATAGG AATGGACCAA TAACAAATAC AGTTCATTAT
CCAAAAATCT ACAAACCTTA TTTTGAAAGA GTCGAAAGGC TAAAGCATGG AACCTTTGGC
CCTGTCCATT TTAGAAACCA AGTCAAATA CGTCGGAGAG TTGACATAAA TCCTGGTCAT
GCAGATCTCA GTGCCAAGGA GGCACAGGAT GTAATCATGG AAGTTGTTTT CCOTAACGAA
GTGGGAGCCA GGATACTAAC ATCGGAATCG CAACTAACGA TAACCAAAGA GAAGAAAGAA
GAACTCCAGG ATTGCAAAAT TTCTCCTTTG ATGGTTGCAT ACATGTTGGA GAGAGAACTG
GTCCGCAAAA CGAGATTCCT CCCAGTGGCT GGTGGAACAA GCAGTGTGTA CATTGAAGTG
TTGCATTTGA CTCAAGGAAC ATGCTGGGAA CAGATGTATA CTCCAGGAGG GGAAGTGAGG
AATGATGATG TTGATCAAAG CTTGATTATT GCTGCTAGGA ACATAGTGAG AAGAGCTGCA
GTATCAGCAG ATCCACTAGC ATCTTTATTG GAGATGTGCC ACAGCACACA GATTGGTGGA
ATTAGGATGG TAGACATCCT TAGGCAGAAC CCAACAGAAG AGCAAGCCGT GGATATATGC
AAGGCTGCAA TGGGACTGAG AATTAGCTCA TCCTTCAGTT TTGGTGGATT CACATTTAAG
AGAACAAGCG GATCATCAGT CAAGAGAGAG GAAGAGGTGC TTACGGGCAA TCTTCAAACA
TTGAAGATAA GAGTGCATGA GGGATATGAA GAGTTCACAA TGGTTGGGAG AAGAGCAACA
GCCATACTCA GAAAAGCAAC CAGGAGATTG ATTCAGCTGA TAGTGAGTGG GAGAGACGAA
CAGTCGATTG CCGAAGCAAT AATTGTGGCC ATGGTATTTT CACAAGAGGA TTGTATGATA
AAAGCAGTCA GAGGTGATCT GAATTTCTGC AATAGGGCGA ATCAACGATT GAATCCTATG
CATCAACTTT TAAGACATTT TCAGAAGGAT GCGAAAGTGC TTTTTCAAAA TTGGGGAGTT
GAACCTATCG ACAATGTGAT GGGAAATGATT GGGATATTGC CCGACATGAC TCCAAGCATC
GAGATGTCAA TGAGAGGAGT GAGAATCAGC AAAATGGGTG TAGATGAGTA CTCCAGCACC
GAGAGGGTAG TGGTGAGCAT TGACCGTTTT TTGAGAATCC GGGACCAACG AGGAAATGTA
CTACTGTCTC CCGAGGAGGT CAGTGAACA CAGGGAACAG AGAACTGAC AATAACTTAC
TCATCGTCAA TGATGTGGGA GATTAATGGT CCTGAATCAG TGTTGGTCAA TACCTATCAA
TGGATCATCA GAAACTGGGA AACTGTAAA ATTCAGTGGT CCCAGAACC TACAATGCTA
TACAATAAAA TGGAATTTGA ACCATTTTCT TCTTTAGTAC CTAAGGCCAT TAGAGGCCAA
TACAGTGGGT TTGTAAGAAC TCTGTTCCAA CAAATGAGGG ATGTGCTTGG GACATTTGAT
ACCGCACAGA TAATAAACT TCTTCCCTC GCAGCCGCTC CACCAAAGCA AAGTAGAATG
CAGTTCTCCT CATTACTGT GAATGTGAGG GGATCAGGAA TGAGAATACT TGTAAGGGGC
AATTCTCCTG TATTCAACTA TAACAAGGCC ACGAAGAGAC TCACAGTTCT CGGAAAGGAT
GCTGGCACTT TAACTGAAGA CCCAGATGAA GGCACAGCTG GAGTGGAGTC CGCTGTTCTG
AGGGGATTCC TCATTCTGGG CAAAGAAGAC AAGAGATATG GGCCAGCAT AAGCATCAAT
GAACTGAGCA ACCTTGCGAA AGGAGAGAAG GCTAATGTGC TAATTGGGCA AGGAGACGTG
GTGTTGGTAA TGAAACGGAA ACGGGACTCT AGCATACTTA CTGACAGCCA GACAGCGACC
AAAAGAATTC GGATGGCCAT CAATTAGTGT CGAATAGTTT AAAAACGACC TTGTTTCTAC T

(SEQ ID NO:3)

[0184]

NP

[0185] AGCAAAAGCA GGGTAGATAA TCACTCACTG AGTGACATCA AAATCATGGC GTCTCAAGGC ACCAAACGAT CTTACGAACA GATGGAGACT GATGGAGAAC GCCAGAATGC CACTGAAATC AGAGCATCCG TCGGAAAAAT GATTGGTGGG ATTGGACGAT TCTACATCCA AATGTGCACC GAACTCAAAC TCAGTGATTA TGAGGGACGG TTGATCCAAA ACAGCTTAAC AATAGAGAGA ATGGTGCTCT CTGCTTTTGA CGAAAGGAGA AATAAATACC TTGAAGAACA TCCCAGTGCG GGGAAAGATC CTAAGAAAAC TGGAGGACCT ATATACAGGA GAGTAAACGG AAAGTGGATG AGAGAACTCA TCCTTTATGA CAAAGAAGAA ATAAGGCGAA TCTGGCGCCA AGCTAATAAT GGTGACGATG CAACGGCTGG TCTGACTCAC ATGATGATCT GGCATTCCAA TTTGAATGAT GCAACTTATC AGAGGACAAG AGCTCTTGTT CGCACCGGAA TGGATCCCAG GATGTGCTCT CTGATGCAAG GTTCAACTCT CCCTAGGAGG TCTGGAGCCG CAGGTGCTGC AGTCAAAGGA GTTGGAAACAA TGGTGTGGA ATTTGGTCAGA ATGATCAAAC GTGGGATCAA TGATCGGAAC TTCTGGAGGG GTGAGAATGG ACGAAAAACA AGAATTGCTT ATGAAAGAAT GTGCAACATT CTCAAAGGGA AATTTCAAAC TGCTGCACAA AAAGCAATGA TGGATCAAGT GAGAGAGAGC CGGAACCCAG GGAATGCTGA GTTCGAAGAT CTCACTTTTC TAGCACGGTC TGCACCTATA TTGAGAGGGT CCGTTGCTCA CAAGTCCTGC CTGCCTGCCT TGTTGTATGG ACCTGCCGTA GCCAGTGGGT ACGACTTTGA AAGGGAGGGA TACTCTCTAG TCGGAATAGA CCCTTTCAGA CTGCTTCAA ACAGCCAAGT GTACAGCCTA ATCAGACCAA ATGAGAATCC AGCACACAAG AGTCAACTGG TGTGGATGGC ATGCCATTCT GCCGCATTG AAGATCTAAG AGTATTAAGC TTCATCAAAG GGACGAAGGT GCTCCCAAGA GGAAGCTTT CCACTAGAGG AGTTCAAATT GCTTCCAATG AAAATATGGA GACTATGGAA TCAAGTACAC TTGAAGTGA AAGCAGGTAC TGGGCCATAA GGACCAGAAG TGGAGGAAAC ACCAATCAAC AGAGGGCATC TGCGGGCCAA ATCAGCATA ACCTACGTT CTCAGTACAG AGAAATCTCC CTTTTGACAG AACAAACATT ATGGCAGCAT TCAATGGGAA TACAGAGGGG AGAACATCTG ACATGAGGAC CGAAATCATA AGGATGATGG AAAGTGCAAG ACCAGAAGAT GTGTCTTCC AGGGGCGGGG AGTCTTCGAG CTCTCGGACG AAAAGGCAGC GAGCCCGATC GTGCCTTCTT TTGACATGAG TAATGAAGGA TCTTATTTCT TCGGAGACAA TGACAGAGGAG TACGACAATT AAAGAAAAAT ACCCTTGTTT CTACT (SEQ ID NO:4)

[0186] M

[0187] AGCAAAAGCA GGTAGATATT GAAAGATGAG TCTTCTAACC GAGGTGCAAA CGTACGTACT CTCTATCATC CCGTCAGGCC CCCTCAAAGC CGAGATCGCA CAGAGACTTG AAGATGTCTT TGCACGGGAA AACACCGATC TTGAGGTTCT CATGGAATGG CTAAGACAA GACCAATCCT GTCACCTCG ACTAAGGGGA TTTTAGGATT TGTGTTACG CTCACCGTG CCAGTGAGCG AGGACTGCAG CGTAGACGCT TTGTCCAAAA TGCOCTTAAT GGGAACGGGG ATCCAAATAA CATGGACAAA GCAGTTAAAC TGTATAGGAA GCTCAAGAGG GAGATAACAT TCCATGGGGC CAAAGAAATC TCACTCAGTT ATTCTGCTGG TCACTTGCC AGTTGTATGG GCCTCATATA CAACAGGATG GGGGCTGTGA CCACTGAAGT GGCATTTGGC CTGGTATGTG CAACCTGTGA ACAGATTGCT GACTCCCAGC ATCGGTCTCA TAGGCAAATG GTGACAACAA CCAATCCACT AATCAGACAT GAGAACAGAA TGGTTTTAGC CAGCACTACA GCTAAGGCTA TGGAGCAAAT GGCTGGATCG AGTGAGCAAG CAGCAGAGGC CATGGAGGTT GCTAGTCAGG CTAGACAAAT GGTGCAAGCG ATGAGAACCA TTGGGACTCA TCCTAGCTCC AGTGCTGGTC TGAAAAATGA TCTTCTGAA AATTTGCAGG CCTATCAGAA ACGAATGGGG GTGCAGATGC AACGGTTCAA GTGATCCTCT CACTATTGCC GCAAATATCA TTGGGATCTT GCACTTGACA TTGTGGATTC TTGATCGTCT TTTTTTCAA TGCATTTACC GTCGCTTAA ATACGGACTG AAAGGAGGGC CTTCTACGGA AGGAGTGCCA AAGTCTATGA GGAAGAATA TCGAAAGGAA CAGCAGAGTG CTGTGGATGC TGACGATGGT CATTGTTGCA GCATAGAGCT GGAGTAAAA ACTACCTTGT TTCTACT (SEQ ID NO:5)

[0188] NS

[0189] AGCAAAAGCA GGGTGACAAA AACATAATGG ATCCAAACAC TGTGTCAAGC TTTCAGGTAG ATTGCTTTCT TTGGCATGTC CGCAAACGAG TTGCAGACCA AGAACTAGGC GATGCCCCAT TCCTTGATCG GCTTCGCCGA GATCAGAAAT CCCTAAGAGG AAGGGGCAGT ACTCTCGGTC TGGACATCAA GACAGCCACA CGTGCTGGAA AGCAGATAGT GGAGCGGATT CTGAAAGAAG AATCCGATGA GGCACTTAAA ATGACCATGG CCTCTGTACC TCGTTCGCGT TACCTAACTG ACATGACTCT TGAGGAAATG TCAAGGGACT GGTCCATGCT CATACCCAAG CAGAAAGTGG CAGGCCCTCT TTGTATCAGA ATGGACCAGG CGATCATGGA TAAGAACATC ATACTGAAAG

[0190] CGAACTTCAG TGTGATTTTT GACCGGCTGG AGACTCTAAT ATTGCTAAGG GCTTTCACCG
 AAGAGGGAGC AATTGTTGGC GAAATTTAC CATTGCCTTC TCTTCCAGGA CATACTGCTG
 AGGATGTCAA AAATGCAGTT GGAGTCCTCA TCGGAGGACT TGAATGGAAT GATAACACAG
 TTCGAGTCTC TGAACTCTA CAGAGATTCG CTTGGAGAAG CAGTAATGAG AATGGGAGAC
 CTCCACTCAC TCCAAAACAG AAACGAGAAA TGGCGGGAAC AATTAGGTCA GAAGTTTGAA
 GAAATAAGAT GGTTGATTGA AGAAGTGAGA CACAACTGA AGATAACAGA GAATAGTTTT
 GAGCAAATAA CATTATGCA AGCCTTACAT CTATTGCTTG AAGTGGAGCA AGAGATAAGA
 ACTTCTCGT TTCAGCTTAT TTAGTACTAA AAAACACCCT TGTTTCTACT (SEQ ID NO:6)

[0191] HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAAATGAAGGCAAACCTACTGGTCCTGTTATGTGCACT
 TGCAGCTGCAGATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAATTCAACCGACACTGTTGAC
 ACAGTACTCGAGAAGAATGTGACAGTGCACACTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGCCACAACGGAA
 AACTATGTAGATTAAGGAATAGCCCACTACAATTTGGGAAATGTAACATCGCCGGATGGCTCTT
 GGGAAACCCAGAATGCGACCCACTGCTTCCAGTGAGATCATGGTCCTACATTGTAGAAACACCAAAAC
 TCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTCATCGACTATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTGAGCT
 CAGTGTCACTATTGAAAGATTCGAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAACCACAACACAAAC
 GGAGTAACGGCAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTATGGCTGACGG
 AGAAGGAGGGCTCATACCCAAAGCTGAAAAATCTTATGTGAACAAAAAGGGAAAGAAGTCCTTGT
 ACTGTGGGGTATTCATCACCCGCCTAACAGTAAGGAACAACAGAATCTCTATCAGAATGAAAATGCTT
 ATGTCTGTAGTGACTTCAAATTATAACAGGAGATTTACCCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA
 AGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTATTACTGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATAATTTG
 AGGCAAATGGAATCTAATAGCACCATGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCAT
 CATCACCTCAAACGCATCAATGCATGAGTGAACACGAAGTGTCAAACACCCCTGGGAGCTATAAAC
 AGCAGTCTCCCTTACCAGAATATACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAAATACGTCAGGAGTG
 CCAAATGAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACATTCGGTCCATTCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGC
 CATTGCCGGTTTTATTGAAGGGGATGGACTGGAATGATAGATGGATGGTATGTTATCATCATCAG
 AATGAACAGGGATCAGGCTATGCAGCGGATCAAAAAAGCACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAA
 ACAAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAATGAACATTCAATTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAAA
 TTAGAAAAAAGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTTCTGGACATTTGGACATAAAT
 GCAGAATTTAGTCTACTGGAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCCATGACTCAAATGTGAAGAATCT
 GTATGAGAAAAGTAAAAAGCCAATTAAGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCT
 ACCACAAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGAAGAAATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCA
 GAAGAGTCAAAGTTGAACAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAATTTGGAATCAATGGGGATCTATCAGA
 TTCTGGCGATCTACTCAACTGTCCGAGTTCACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCAGTTT
 CTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTCAGTGCAGAATATGCATCTGAGATTAGAATTTACAGAGATATGA
 GAAAAACACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:7)

[0193] NA

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAACCATTGGATCAATCTGTCTGGTA
 GTCCGACTAATTAGCCATAATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCATTCAATTCAA
 ACTGGAAGTCAAACCATACTGGAATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAAAATAGCACCTGGGT
 AAAGGACACAACCTCAGTGATATTAACCGGCAATCTCTTTGTCCTCCGTTGGGTGGGCTATAT
 ACAGCAAAGACAATAGCATAAGAATTTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTTGTATCATAAGAGAGCCCTTATT
 TCATGTTCTCACTTGAATGCAGGACCTTTTTTCTGACCCAAGGTGCCTTACTGAATGACAAGCATT
 AAGTGGGACTGTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCTTAAATGAGCTGCCCTGTCCGTGAAGCTCC
 GTCCCCGTACAATCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGGTTCAGCAAGTGCATGTCATGATGGCATGGGC
 TGGCTAACAAATCGGAATTTCAAGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTAATAACAACGGCATAAT
 AACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAAAATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCTGTGTAA
 ATGGTTCATGTTTTACTATAATGACTGATGGCCCGAGTGCATGGGCTGGCCTCGTACAAAAATTTTCAAG
 ATCGAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCTCACTATGAGGAATGTT
 CTGTTACCCTGATACCGGCAAAGTGTGTGTGTGTCAGAGACAATTGGCATGGTTTCAACCGGCCA
 TGGGTGTCTTTCGATCAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTTTTCGGTGACAA
 CCCGCTCCCGAAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGTATGTTGATGGAGCAAACGGAGTAAA
 GGGATTTTCATATAGGTATGGTAATGGTGTGTTGGATAGGAAGGACCAAAAGTCAAGTTCCAGACAT
 GGGTTTGAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGAGACTGATAGTAAGTTCTGTGAGGCAAG
 ATGTTGTGGCAATGACTGATTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAACATCCTGAGCTGACAGG
 GCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTTGAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAACAATC
 TGGACTAGTGCAGCAGCATTCTTTTTGTGGCGTGAATAGTACTGTAGATTGGTCTTGGCCAG
 ACGGTGCTGAGTTGCCATTGACATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACTCCTTGTTTCTACT (SEQ
 ID NO:8)

[0195] 在卵中，高滴度A/PR/8/34 (H1N1, PR8 (UW)) 病毒的生长比其他A/PR/8/34 PR8毒株好10倍 (10¹⁰EID₅₀/mL; HA滴度: 1:8,000)。因此，用流感病毒的目前流通毒株的HA和NA基因代替PR8 (UW) 的HA和NA基因产生可以安全产生的疫苗毒株，并验证了PR8 (UW) 作为主疫苗毒

株的用途。

[0196] 确定了有助于PR8 (UW) 与PR8 (Cambridge) 之间不同生长特性的基因,其提供了NIBRG-14疫苗毒株的非HA和非NA基因(图1)。当大多数内部基因来自PR8 (UW) 时,获得在卵中更高的滴度。PR8 (UW) 的M病毒区段和PR8 (Cambridge) 的NS基因的滴度最高。PR8 (UW) 中的NS基因在第55位残基处具有K(赖氨酸),而PR8 (Cam) 中的NS基因具有E(谷氨酸)。PR8 (UW) 的聚合酶亚基(PA、PB1和PB2) 和NP基因增强了H5N1疫苗种子病毒在鸡含胚卵中的生长,并且PR8 (Cambridge) 的NS基因增强了H5N1疫苗种子病毒在鸡含胚卵中的生长。PR8 (UW) 的PB2中第360位的酪氨酸(Y)可能有助于该病毒在MDCK细胞中的高生长率。

[0197] 实施例2

[0198] 为了开发用于疫苗病毒在特定宿主细胞中生长的高产率A/PR/8/34 (H1N1;PR8) 病毒骨架,进行了对PR8 (HG) (PR8UW) 内部基因的随机诱变。通过易错PCR将随机突变引入到UW-PR8(实施例1) 内部基因中,在此之后制备在单独UW-PR8内部基因中具有随机突变的质粒文库。然后产生病毒文库(PR8/H5N1),其在单独UW-PR8内部基因以及其他野生型内部基因和A/chicken/Indonesia/NC/09 (H5N1) 病毒的NA和“脱毒”HA基因中具有随机突变(表1),以产生“6+2”重组病毒。将病毒在MDCK细胞中的连续传代用于选择具有高生长特性的变体。

[0199] 表1:产生的病毒文库

编号	内部基因		HA + NA	病毒文库的滴度 (pfu/ml)
	基因文库	其他内部基因		
对照	PR8 野生型		NC/09/H5N1	3×10^6
1	PB2	5 UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	2.1×10^2
2	PB1	5 UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	1.6×10^5
3	PA	5 UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	7×10^3
4	NP	5 UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	1.5×10^3
5	M	5 UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	1×10^6
6	NS	5 UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	1.8×10^6
7	PB2+PB1+PA	3UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	75
8	PB2+PB1+PA+NP	2UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	33
9	PB2+NS	4UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	2×10^2
10	M+NS	4UW-PR8 基因	NC/09/H5N1	5.7×10^5

[0200] 将病毒文库在MDCK细胞中传代12次,或者在2次传代之后将文库混合并且再进行10次传代(图2)。

[0201] 在MDCK细胞中连续传代10至约12次之后,进行噬斑测定并挑选超过1,400个单独的噬斑。图3示出了具有多种HA滴度的克隆的数目。生长增强突变包括:PB2:M202L、F323L、I504V, PB1:E112G、V644A, NP:R74K、N417D、I116L和NS1:S161T。图4提供了由选定突变产生的重组病毒的滴度。

[0202] 对来自随机诱变文库的具有最高HA滴度的36种病毒进行了测序(表2)

[0203] 表2:具有最高HA滴度的病毒的序列

[0205]

克隆 #	文库	HA 滴度 (2 ⁿ)	PB2	PB1	PA	HA (H3 编号)	NP	NA	M	NS
WT		7								
329	混合	9	M202L F323L			L182V				
154	混合	8.5-9	M202L F323L			L182V				
347	混合	9	M202L F323L			L182V				
94	混合	8.5	M202L F323L			F252I	I116L	L55S		
1045	混合	9	M202L F323L	V644A		F252I				
965	混合	8.5-9	M202L F323L		F105C	V184I			P90S	

50	混合	8.5	M202L F323L			M148I (HA2)	R293 M		
1005	混合	9-9.5	M202L F323L	V644A	R401K	M148I (HA2)			T49A
134	混合	8.5	M202L F323L						A223 E
387	混合	9	M202L F323L	M507V V644A					
852	混合	9-9.5	M202L F323L M243I	R54I					
981	混合	8.5-9	M202L F323L	Q247H					
993	混合	8.5-9	M202L F323L				N224I		
1043	混合	8.5-9	I504V			L182V	R74K		
398	混合	8.5	I504V			L182V	R74K, N417 D		A30P
1007	混合	8.5	I504V	V644A		F252I	M371 V		
1042	混合	8.5-9	I504V	E75V D76G E78P P79V S80G V644A E697P F699L F700L P701H S702R Y705T		F252I	R74K		
999	混合	8.5-9	I504V			M148I (HA2)	R74K, N417 D		
1014	混合	8.5	I504V	T59I G62A A63P V644A N694K L695T		M148I (HA2)	R74K, N417 D	A265V	
1016	混合	8.5-9	I504V			M148I (HA2)			
540	PB1	8.5		E112G (PB1- F2- R81G)		K162E			S161 T
548	PB1	8.5-9		E112G (PB1- F2- R81G) L624V		K162E			S161 T
191	PB1	8-8.5		E112G (PB1- F2- R81G)					
571	PB1	9-9.5		E112G (PB1- F2- R81G)					
572	PB1	8.5		E112G (PB1- F2- R81G)					
573	PB1	8.5		E112G					

[0206]

[0207]

				(PB1-F2-R81G)				
1404	PB1	8.5	I57V T58G A59V K61Q E677D D678E P679M	E112G (PB1-F2-R81G) S713C				
1408	PB1	8.5		M40I G180W				S161 T
582	PB1	8.5-9		M40L G180W				S161 T
545	PB1	8.5		M40L G180W		K121E (HA2)		
543	PB1	8.5		I667T				
219	PB1	9		I667T, M714T		K162E		
344	混合	8.5-9	M66R			L182V		
312	混合	8.5-9				L182V	I116L	R140Q
320	混合	8.5				L182V		
208	PB1	8.5-9		R54I		E136D, Q179L, A194V		

[0208] 在第二种方法中,将文献中描述的潜在生长增强突变引入到UW-PR8病毒(对于病毒储液滴度见表3)的背景中并测试复制能力。图5A至D示出了多种病毒的生长曲线。

[0209] 表3:具有在文献中所鉴定突变的UW-PR8病毒

[0210]

基因	突变	病毒储液滴度 (Pfu/ml)
WT	-	2×10^7
PB2	A44S	4.5×10^7
	E158G	3.2×10^4
	E158G + NP N101G	7.5×10^4
	E158A	8.3×10^6
	D253N+Q591K	8.3×10^6
	D256G	2.8×10^7
	R368K	3.1×10^7
	E391Q	1.4×10^8
	I504V+PA I550L	1.1×10^8
	Q591K	4.4×10^7
	V613T	1.8×10^7
	A661T	2.2×10^7
	D701N+S714R + NP N319K	1×10^6
	D701N	2.1×10^7

[0211]

PB1	R327K	1.3×10^7
	V336I	2.3×10^7
	L473V+ L598P	3.9×10^6
PB1F2	F2 N66S	1.6×10^8
	F2 K73R	1.1×10^8
	F2 V76A	4.4×10^7
	F2 R79Q	6.2×10^6
	F2 L82S	2.7×10^7
	F2 E87Q	1.5×10^6
PA	T97I	1.6×10^7
	K142N	3.3×10^7
	S225C	6.7×10^7
	S149P+T357K	3.4×10^8
	K356R	8.5×10^7
	A404S	5.2×10^7
	S421I	2.7×10^7
NP	R293K	4.7×10^7
	R305K	7.2×10^7
	E372D	2.2×10^7
	R422K	1.3×10^8
	T442A	5×10^7
	D455E	2.2×10^7
	I109V	3.9×10^7
M	V97A+Y100H	1.4×10^7
NS1	K55E	1.6×10^7

[0212] 在第三种方法中,将来自方法1和2的候选物组合并且确定HA滴度和PFU/mL(表4)。

[0213] 表4:在多种组合中测试在方法1和2中鉴定的高生长候选物。

#	基因来源								病毒储液滴度	
	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	HA (2 ⁿ)	Plu/ml
WT			UW-PR8	UW-PR8	UW-PR8	UW-PR8	UW-PR8	UW-PR8	7	3.00E+07
1			M202L F323L	M507V V644A		I116L		K55E	9-9.5	2.00E+08
2			M202L F323L	R54I		N224I		K55E	5	1.00E+05
3			M202L F323L	Q247H	R401K			T49A	9	1.00E+08
4			M202L F323L	M507V V644A	K356R	T442A	V97A Y100H	K55E	10-10.5	1.60E+08
5			I504V	M507V V644A	I550L	R74K N417D		K55E	6-6.5	5.70E+07
6			I504V	M507V V644A	I550L	R74K N417D	V97A Y100H	K55E	9-9.5	4.40E+07
7			I505V	E112G	I550L	R74K		S161T	9	1.60E+08
8	Indo/NC/09 (脱毒)	Indo/NC/09	M202L F323L	I667T M714T		I116L		R140Q	<1	<1E3
9			M202L F323L	E112G (PB1-F2-R81G)				S161T	8.5	1.30E+08
10			M66R	M40I G180W		R74K		S161T	6-6.5	2.30E+07
12			R368K	PB1 F2 N86S	K356H	R422K		K55E	5.5	9.00E+02
13			E391Q	R327K	S149P T357K	R293K			3	1.60E+06
14			Q591K	PB1 F2 K73R	S225C	R422K		K55E	7.5	2.00E+07
23							V97A		8.5-9	1.50E+07
24							Y100H		9-9.5	2.80E+07
25	NCR 15-19nt mut ¹	Indo/NC/09	M202L F323L	M507V V644A	K356R	R422K	V97A Y100H	K55E	9.5-10	7.50E+07
26							A30P		6.5-7	1.00E+07
27							T49A		6.5-7	2.00E+07
28							R140Q		8	4.00E+07
29	Indo/NC/09 (脱毒)	Indo/NC/09					S161T		7-7.5	1.40E+07
30							A223E		7.5	1.00E+07
31				I667T M714T					3.5	4.00E+05
32	NCR 15-19nt mut ¹	UW-PR8	M202L F323L	V644A	K356R	T442A	Y100H	K55E	7-7.5	4.30E+06
33	Indo/NC/09 (脱毒)	Indo/NC/09	M202L F323L	E112G (PB1-F2-R81G)	K356R	R74K	Y100H	K55E	9-9.5	7.00E+07
34	NCR 15-19nt mut ¹	UW-PR8	I504V	M507V V644A			V97A Y100H	K55E	7	2.00E+05
35			M202L F323L	M507V V644A	R401K	T442A	Y100H	R140Q	9	3.20E+07
36	Indo/NC/09 (脱毒)	Indo/NC/09	I504V	E112G (PB1-F2-R81G)	I550L	I112L	Y100H	R140Q	9.5	1.30E+06

[0214]

[0215]

37			M202L F323L	E112G (PB1- F2- R81G)	S149P T357K	T442A	Y100H	K55E	0	0.00E+00
38			M202L F323L	M507V V644A		I116L	Y100H	K55E	10.1	2.30E+08
39			M202L F323L	M507V V644A	K356R	T442A	Y100H	K55E	9.8	1.00E+08
40			I504V	M507V V644A	I550L	T442A	Y100H	K55E	9.2	6.00E+07
41			I504V	I112E	I550L	R74K	Y100H	K55E	9.2	7.50E+07
P17			I504V	E112G (PB1- F2- R81G)	S225C	R74K N417D	V97A Y100H	K55E	9.5-10	5.80E+08
P26			M202L F323L	M40L G180W	S225C	R422K	V97A Y100H	K55E	10	3.00E+08
P61		Indo-NC/ 09 NA P263T ²	M202L F323L	Q247H	K142N	R74K	V97A Y100H	K55E	10-10.5	2.00E+08
<p>¹HA基因非编码区中的突变; ²在该病毒克隆的NA蛋白中检测到P263T突变</p>										

[0216] 如表4中所示, 鉴定了相比野生型更好地复制的数种重组病毒, 例如#1、#4、#36、#38、P17、P16和P61。为了鉴定这些病毒的生长特性, 确定了在MDCK细胞中的生长动力学(图7)。对于一种候选物, 将病毒在蔗糖梯度上纯化并且评价HA含量和病毒总蛋白。图8A示出了野生型(UW-PR8)和#4的HA滴度, 图8B示出了野生型(UW-PR8)和#4的病毒蛋白, 以及图8BC是野生型(UW-PR8)和#4的病毒蛋白的SDS-PAGE分析。进一步的分析表明, 在M1中具有V97A/Y100H突变的病毒与亲本病毒相比产生更高的HA滴度, 但是病毒滴度较低(见图9A至B)。M1中的V97A/Y100H突变可导致颗粒具有更大的表面, 其中可并入更多的HA蛋白。由于灭活的流感病毒基于其HA含量给药, 因此具有高HA含量的变体是有吸引力的疫苗候选物。

[0217] 为了鉴定流感启动子区中提供增强复制的突变, 在UW-PR8 PA、PB1和PB2内部基因中制备了在所有8个vRNA区段的3'端的第4位具有“U”的病毒(UW-PR8 PB2、PB1和PA区段在第4位具有“C”)。所得病毒的生长曲线在图11C中示出。

[0218] 制备具有启动子突变和氨基酸变化组合的病毒并确定滴度(表5)。

[0219] 表5: 高生长候选物的病毒滴度

病毒	基因骨架								病毒储液滴度	
	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	HA (2 ^o)	plu/ml
对照	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	7	3.0E+07

[0220]

1	WT								10.5	2.2E+09
2	3' G3A U5C C8U & 5' U3C A8G	WT	3'C4U M202 L F323L	3'C4U Q247 H	3'C4U K142 N	R74K	V97A Y100 H	K55E	8.5~9	5.6E+07
3	NCR 15-19nt mut								9-9.5	1.4E+09
4	3' G3A U5C C8U & 5' U3C A8G & NCR 15- 19nt mut								7	7.0E+07

[0221] 注：3' G3A、U5C、C8U和5' U3C和A8G为HA病毒RNA的启动子中的核苷酸变化；NCR15-19nt mut是指第15至19位的HA 3' 非编码区的突变（“AAGUU”被替换为“UUUAA”）。

[0222] 还进行了密码子使用优化。密码子的改变可能会提高蛋白质表达但也可能改变RNA结构和稳定性。例如，进行了PB2病毒区段的密码子使用优化以在使包装信号（位于vRNA的5'和3'端）不改变的同时反映犬细胞中的密码子使用（因为MDCK细胞来源于犬）（图10A）。在一种方法中，对PB2基因“内部”区域中的所有密码子进行了密码子优化（图10C），并且在另一种方法中，对所谓的“罕见”密码子（图10B）（对于给定的氨基酸，与最频繁使用的密码子相比使用频率低得多）进行密码子优化。分析使用“图形化密码子使用分析器（Graphical Codon Usage Analyser）”（www.gcua.de）进行。这些病毒的滴度示出在表6中（也见图10B至C）。

[0223] 表6：编码经密码子优化的PB2基因的病毒的滴度

病毒	基因骨架								病毒储液滴度	
	H A	N A	PB2	PB 1	P A	N P	M	N S	HA(2 ⁿ)	pfu/ml
野生型	W T	W T	WT	W T	W T	W T	W T	W T	7~7. 5	3.5E+0 7
[0224] PB2 密码子优化-1	W T	W T	经罕用 密码子 优化的 PB2	W T	W T	W T	W T	W T	9	2.1E+0 8
PB2 密码子优化-2	W T	W T	经所有 密码子 优化的 PB2	W T	W T	W T	W T	W T	3	9.0E+0 5

[0225] 与野生型病毒(UW-PR8)相比,PB2中罕用密码子的优化导致滴度提高(见图10D)。对其他病毒区段进行密码子优化,并确定具有这些区段或经优化区段的组合的病毒的滴度(图10E)。

[0226] 在MDCK细胞中提高病毒滴度的另一种方法中,制备嵌合HA和NA基因(图13A)并且确定具有这些基因的病毒的滴度(图13B)。

[0227] 制备了具有上述突变(高生长骨架突变、启动子突变、嵌合HA和NA基因以及犬密码子优化)的组合的病毒,并且确定了这些病毒的生长动力学、PFU和HA滴度(见图14)。骨架突变的一个示例性组是犬密码子opti-PB2+C4U+M202L、F323L;PB1:C4U+Q247H;PA:C4U+K142N;NP:犬密码子opti-NP+R74K;M:V97A、Y100H;和NS:K55E。

[0228] 本文中所述的任何突变或其任意组合可以与例如季节性H1N1和H3N2、H3N2变体、PdmH1N1、H5N1、H7N9或H9N2、或其他进化枝或候选疫苗毒株组合。例如,来自A/California/04/2009(pdm H1N1)的HA和NA基因与UW-PR/8的6个内部基因组合产生“6+2”重组病毒。产生了11种病毒文库并且在卵中传代10次。进行三轮有限稀释以筛选高生长突变体(图15)。在一个实施方案中,在MDCK细胞中具有高生长特性的变体具有带有启动子突变(C4U)和导致I504V的突变(相对于亲本病毒)的PB2病毒区段;带有启动子突变(C4U)和导致E112G的突变的PB1病毒区段;带有启动子突变(C4U)和导致S225C的突变的PA病毒区段;带有导致R74K和N417D的突变的NP病毒区段;带有导致V97A和Y100H的突变的M病毒区段;和带有导致K55E的突变的NS病毒区段,其中任选地修饰一个或多个病毒区段(例如NP病毒区段)的序列以包含经犬密码子优化的密码子。在一个实施方案中,在MDCK细胞中具有高生长特性的变体具有带有启动子突变(C4U)和导致M202L和F323L的突变的经犬密码子优化的PB2病毒区段;带有启动子突变(C4U)和导致Q247H的突变的PB1病毒区段;带有启动子突变(C4U)和导致

K142N的突变的PA病毒区段;带有导致R74K的突变的经犬密码子优化的NP病毒区段;带有导致V97A Y100H的突变的M病毒区段;以及带有导致K55E的突变的NS病毒区段。

[0229] 使用在MDCK细胞中具有高复制特性的克隆在Vero细胞中(例如在Vero细胞中传代约3至5次之后)进行相似的实验(见图16)。图17示出了可在Vero细胞中具有高复制特性的5种病毒。在一个实施方案中,在Vero细胞中具有高生长特性的PR8(UW)变体具有以下突变,所述突变可以以多种组合使用以提高PR8(UW)病毒的复制能力:PB2区段:C4U(启动子突变),I504V(氨基酸变化);PB1区段:C4U(启动子突变);M40L(氨基酸变化)、G180W(氨基酸变化);PA区段:C4U(启动子突变)、R401K(氨基酸变化);NP区段:I116L(氨基酸变化);NS区段:A30P(NS1中的氨基酸变化)或R118K(NS1中的氨基酸变化)。

[0230] 在一个实施方案中,具有高生长特性的PR8(UW)变体具有以下残基,所述残基可以与彼此和/或其他残基(例如增强病毒复制的残基)以多种组合使用以提高具有基于PR8(UW)的病毒区段的重配株的复制能力:即具有136D、162E、179L、182V、184I、252I、449E和/或476I中的一个或多个的HA区段;具有55S和/或265V的NA区段;具有带有118K的NS1的NS区段;具有81G的F2;具有62A、261G、361R、621R和/或654S的PB1区段和/或具有本文中所述的生长增强核苷酸的病毒区段启动子,例如在M病毒区段中具有核苷酸改变G1012C、A1013U或U1014A中的一个或多个。

[0231] 实施例3

[0232] 为了评估单独病毒RNA(vRNA)区段对高产率特性的贡献,产生了一系列重配病毒,所述重配病毒在亲本病毒[UW-PR8_Indo/05(HA+NA)]的背景中具有高产率PR8(PR8-HY)变体的一个或数个vRNA区段。将Vero细胞用指定的病毒以0.005的MOI一式三份进行感染,并且在存在胰蛋白酶的情况下于37°C下孵育。在指定的时间点,分别通过进行噬斑或HA测定来确定病毒滴度和HA滴度。结果示出在图20中。这些数据表明数个vRNA区段有助于PR8-HY病毒的特性。特别地,PR8-HY病毒的PB2+PB1+PA+NP vRNA使病毒和HA滴度显著提高,表明该病毒的复制能力增强。

[0233] 为了进一步评估病毒复制复合物的哪个组分提供高产率特性,将野生型或高产率PB2、PB1、PA和NP蛋白在人293T、犬MDCK、非洲绿猴Vero和禽类DF1细胞中在微复制子测定中以多种组合进行测试。结果示于图21中。令人感兴趣地,PR8-HY病毒的PB2、PB1、PA和NP蛋白在293T、Vero和DF1细胞中减轻了病毒复制能力;这种作用主要是由PB2蛋白赋予。相比之下,来源于PR8-HY病毒的PB2+PB1+PA+NP蛋白的组合使在用于选择PR8-HY病毒的犬MDCK细胞中的复制能力显著提高。这些发现表明PR8-HY病毒高产率下的宿主依赖性机制。例如,来源于PR8-HY的PB1+PA+NP蛋白或其子集的组合可使在293T、Vero和DF1细胞中的病毒复制能力增强。

[0234] 在无血清(SF)培养基、含血清(serum-containing,SC)培养基和卵中筛选文库。

[0235] 为了鉴定在所有受试生长培养基中均有效复制的变体,将病毒在不断变化的条件下传代:

[0236] SF至SC至卵,SF至卵至SC

[0237] SC至SF至卵,SC至卵至SF

[0238] 卵至SF至SC,卵至SC至SF

[0239] 例如,进一步提高流感病毒在培养的细胞和/或含胚鸡卵中复制的另一些鉴定的

突变是PB1中的I711V和M1蛋白中的M128L,并且这些突变可以与本文中公开的任何突变组合,并且可以以任意组合来组合(见图23至25和表8至9)。HY候选物#9的病毒滴度在12小时、24小时、36小时和48小时比亲本高产率骨架重组病毒的病毒滴度高5.5倍、2.4倍、2.6倍、4.4倍。HY候选物#9含有以下突变:PB2:C4U I504V;PB1:C4U M40L/G180W/I711V;PA:C4U R401K;NP:I116L;M1:M128L;NS1:A30P/R118K。

[0240] 表8.选自SF-MDCK PR8-HY+Hubei/1/10 (H5N1) 病毒文库的前8种高HA滴度克隆

病毒	病毒滴度		突变							
	HA 滴度 (2 ⁿ)	PFU/ml	PB2	PB1	PA	NP	M1	NS1	HA (H3 编号)	NA
WT	-	-	C4U I504V	C4U M40L/G180W	C4U R401K	I116L		A30P/R118K		
SF-14	10	1.44x10 ⁹		+I711V			+M128L		K216N	
SF-22	9.4	6.6x10 ⁸		+I711V					K216N	
SF-37	9.6	8.7x10 ⁸		+I711V					K216N	
SF-46	9.3	8.3x10 ⁸	+M467I/ K721R						K222T/ G326R	
SF-42	9.5	8.7x10 ⁸		+I711V	+R256G				K216N	
SF-57	9.6	1x10 ⁹							K222T	
SF#15	10	1.24x10 ⁹	+Y704H						K222T	
SF-E-85	9.6	9x10 ⁸			+N350I/ A369T				K222T	

[0241]

[0242] 表9.选自第二代混合文库的一轮传代的前12种HA滴度克隆 (SC=含血清;SF=无血清)

病毒	代 数	HA 滴度 (2 ⁿ)	HA & NA	PB2	PB1	PA	NP	M1	NS1	HA	NA
				WT			C4U I504V	C4U M40L/G180W	C4U R401K	I116L	
SC + SF	11	7.5	脱毒 - A/Hubei/1/2009 GPA+NA	C4U I504V+A221V	C4U M40L/G180W	C4U R401K	I116L + K103R +Y194I	S125G+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K +D101V	I76I
	14	7.5		C4U I504V+A221V	C4U M40L/G180W + I711V	C4U R401K	I116L + K103R +Y194I	M128L+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	E82D
	23	8.0		C4U I504V + R325+A379T	C4U M40L/G180W + I711V	C4U R401K	I116L + K103R +Y194I	F52L+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	
	27	7.5		C4U I504V+R625	C4U M40L/G180W + E173F+G236S	C4U R401K	I116L	S125G	W15G	A30P/R118K	
	33	7.5		C4U I504V	C4U M40L/G180W + I711V	C4U R401K +K142E	I116L	S125G+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K +D101V	I76I
SC + SF + 卵	1	7.5		C4U I504V + R325+A379T	C4U M40L/G180W + M92I	C4U R401K +R256G	I116L	S125G+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	N92D
	2	7.5		C4U I504V+A221V	C4U M40L/G180W + M92I	C4U R401K +R256G	I116L	M128L+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K +D101V	I76V
	4	7.5		C4U I504V+R625	C4U M40L/G180W + S832V	C4U R401K +R256G	I116L	244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	
	5	8.0		C4U I504V+A221V	C4U M40L/G180W + M92I	C4U R401K +K142E	I116L	S125G+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	E82D
	12	8.0		C4U I504V	C4U M40L/G180W + M92I	C4U R401K +K142E	I116L + K103R +Y194I	M128L +244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	N92D
	24	8.0		C4U I504V + R325+A379T	C4U M40L/G180W	C4U R401K +K142E	I116L + K103R +Y194I	M128L +244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	E82D
	25	7.5		C4U I504V	C4U M40L/G180W + M92I+H103R	C4U R401K	I116L + K103R +Y194I	S125G+244 (混合物) M/R	W15G	A30P/R118K	N92D

[0243]

[0244] 参考文献

[0245] Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1987),

[0246] Aymard-Henry et al., Virology: A Practical Approach, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150 (1985).

[0247] Bachmeyer, Intervirology, 5:260 (1975).

[0248] Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck & Co., Rahway, NJ (1992),

[0249] Hatta et al., Science, 293:1840 (2001).

[0250] Horimoto et al., J. Virol., 68:3120 (1994).

[0251] Horimoto et al., Vaccine, 24:3669 (2006).

[0252] Keitel et al., in Textbook of Influenza, eds. Nickolson, K.G., Webster, R.G., and Hay, A. (Blackwell, Oxford), pp. 373-390 (1998).

[0253] Laver & Webster, Virology, 69:511 (1976).

[0254] Neumann et al., Adv. Virus Res., 53:265 (1999).

[0255] Neumann et al., J. Gen. Virol., 83:2635 (2002).

[0256] Neumann et al., J. Virol., 71:9690 (1997).

[0257] Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9345 (1999).

[0258] Neumann et al., Virology, 287:243 (2001).

[0259] Osol (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).

[0260] Sugawara et al., Biologicals, 30:303 (2002).

[0261] Webby & Webster et al., Science, 302:1519 (2003).

[0262] Wood & Robertson, Nat. Rev. Microbiol., 2:842 (2004).

[0263] World Health Organization TSR No. 673 (1982).

[0264] World Health Organization. Confirmed human cases of avian influenza A (H5N1).

[0265] http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/index.html

[0266] 所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文。虽然在前述的说明书中已经结合本发明的某些优选实施方案描述了本发明，并且出于举例说明的目的已经阐述了许多细节，但是对于本领域技术人员来说明显的是，本发明易于有另外的实施方案并且在不脱离本发明基本原理的情况下，可对本文中描述的某些细节作出相当大的变化。

序列表

<110> Kawaoka, Yoshihiro
 Neumann, Gabriele
 Ping, Jihui
 Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF)

<120> 用于疫苗开发的改进的流感病毒复制

<130> 800.106W01

<150> US 62/841,491

<151> 2019-05-01

<160> 27

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2233

<212> DNA

<213> 流感病毒

<400> 1

agcgaaagca ggtactgac caaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg	60
attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca	120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc agattttcac	180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa tgcacttttg	240
aagcacagat ttgaaataat cgaggaaga gatcgcaaa tggcctggac agtagtaaac	300
agtatttgca acactacagg ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt gtatgattac	360
aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg	420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcactggg	480
gaagaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcatgaag aaagcagggc taggatcaaa	540
accagactat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga ttcctttcgt	600
cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aatcacagg aacaatgcgc	660
aagcttgccg accaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat	720
gtggatggat tcgaaccgaa cggtacatt gagggcaagc tgtctcaaat gtccaaagaa	780
gtaaatgcta gaattgaacc ttttttgaaa acaacaccac gaccacttag acttccgaat	840
gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaa attaagcatt	900
gaggaccaa gtcatgaagg agaggaata ccgctatatg atgcaatcaa atgcatgaga	960
acattctttg gatggaagga acccaatggt gttaaaccac acgaaaagg aataaatcca	1020
aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag	1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa acaagtcagc taaagtgggc acttggtgag	1140
aacatggcac cagaaaaggt agactttgac gactgtaaag atgtaggtga tttgaagcaa	1200
tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg cttgcaagtt ggattcagaa tgagtttaac	1260
aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg atagagctcg atgagattgg agaagatgtg	1320

gctccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac	1380
tgcagagcca cagaatacat aatgaaggga gtgtacatca atactgcctt gcttaatgca	1440
tcttgtgcag caatggatga tttccaatta attccaatga taagcaagtg tagaactaag	1500
gagggaaagg gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aaggaagatc ccacttaagg	1560
aatgacaccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga cccaagactt	1620
gaaccacata aatgggagaa gtactgtggt cttgagatag gagatattgct tataagaagt	1680
gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgtga gaacaaatgg aacctcaaaa	1740
attaaaaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgctctc tccagtcact tcaacaaatt	1800
gagagtattga ttgaagctga gtctctgtc aaagagaaag acatgaccaa agagtctttt	1860
gagaacaaat cagaaacatg gccattgga gagtccccca aaggagtgga ggaaagtcc	1920
attgggaagg tctgcaggac tttattagca aagtcggtat tcaacagctt gtatgcatct	1980
ccacaactag aaggattttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatcgt tcaggctctt	2040
agggacaacc tggaacctgg gacctttgat cttggggggc tatatgaagc aattgaggag	2100
tgctgatta atgatccctg ggttttgctt aatgcttctt ggttcaactc cttccttaca	2160
catgcattga gttagttgtg gcagtgtctac tatttgctat ccatactgtc caaaaagta	2220
ccttgtttct act	2233
<210> 2	
<211> 2340	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 2	
agcgaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga cttactttt cttaaagtg	60
ccagcacaaa atgctataag cacaactttc cttatactg gagaccctcc ttacagccat	120
gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaag	180
ggaagatgga caacaaacac cgaaactgga gcaccgcaac tcaaccgat tgatgggcca	240
ctgccagaag acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag atttgtgtatt ggaggcgatg	300
gctttccttg aggaatccca tcttggtatt tttgaaaact cgtgtattga aacgatggag	360
gttgttcagc aaacacgagt agacaagctg acacaaggcc gacagacctg tgactggact	420
ctaaatagaa accaacctgc tgcaacagca ttggccaaca caatagaagt gttcagatca	480
aatggcctca cggccaatga gtctggaagg ctcatagact tccttaagga tgtaatggag	540
tcaatgaaca aagaagaaat ggggatcaca actcattttc agagaaagag acgggtgaga	600
gacaatatga ctaagaaaat gataacacag agaacaatgg gtaaaaagaa gcagagattg	660
aacaaaagga gttatctaat tagagcattg accctgaaca caatgaccaa agatgctgag	720
agagggaagc taaaacggag agcaattgca accccaggga tgcaataag ggggtttgta	780
tactttgttg agacactggc aaggagtata tgtgagaaac ttgaacaatc agggttgcca	840
gttgagggca atgagaagaa agcaaagttg gcaaatgttg taaggaagat gatgaccaat	900
tctcaggaca ccgaactttc tttcaccatc actggagata acaccaaagc gaacgaaaat	960
cagaatcctc ggatgttttt ggccatgatc acatatatga ccagaaatca gcccgaaatg	1020
ttcagaaatg ttctaagtat tgctccaata atgttctcaa acaaaatggc gagactggga	1080

aaagggata	tgtttgagag	caagagtatg	aaacttagaa	ctcaaatacc	tgcaaaaatg	1140
ctagcaagca	tcgatttgaa	atatttcaat	gattcaacaa	gaaagaagat	tgaaaaaatc	1200
cgaccgctct	taatagaggg	gactgcatca	ttgagccctg	gaatgatgat	gggcatgttc	1260
aatatgttaa	gcactgtatt	aggcgtctcc	atcctgaatc	ttggacaaaa	gagatacacc	1320
aagactactt	actgggtgga	tggcttcaa	tcctctgacg	atcttgctct	gattgtgaat	1380
gcacccaatc	atgaagggat	tcaagccgga	gtcgacaggt	tttatcgaac	ctgtaagcta	1440
cttggaatca	atatgagcaa	gaaaaagtct	tacataaaca	gaacaggtac	atctgaaatc	1500
acaagttttt	tctatcgta	tgggtttggt	gccaatctca	gcatggagct	tcccagtttt	1560
ggggtgtctg	ggatcaacga	gtcagcggac	atgagtattg	gagttactgt	catcaaaaac	1620
aatatgataa	acaatgatct	tggctccagca	acagctcaaa	tggcccttca	gttgttcatc	1680
aaagattaca	ggtacacgta	ccgatgccat	ataggtgaca	cacaaataca	aacccgaaga	1740
tcatttgaaa	taaagaaaact	gtgggagcaa	accggttcca	aagctggact	gctgggtctcc	1800
gacggaggcc	caaatttata	caacattaga	aatctccaca	ttcttgaagt	ctgcctaaaa	1860
tgggaattga	tggatgagga	ttaccagggg	cgtttatgca	accactgaa	cccatttgtc	1920
agccataaag	aaattgaatc	aatgaacaat	gcagtgatga	tgccagcaca	tggctccagcc	1980
aaaaacatgg	agtatgatgc	tgttgcaaca	acacactcct	ggatccccaa	aagaaatcga	2040
tccatcttga	tacaagtcaa	agaggagtac	ttgaggatga	acaaatgtac	caaaggtgct	2100
gcaatttatt	tgaaaaatc	ttcccagca	gttcatacag	aagaccagtc	gggatatcca	2160
gtatgggtga	ggctatggtt	tccagagccc	gaattgatgc	acggattgat	ttcgaatctg	2220
gaaggataaa	gaaagaagag	ttcactgaga	tcatgaagat	ctgttccacc	attgaagagc	2280
tcagacggca	aaaatagtga	atttagcttg	tccttcatga	aaaaatgcct	tgtttctact	2340
<210>	3					
<211>	2341					
<212>	DNA					
<213>	流感病毒					
<400>	3					
agcgaaagca	ggtcaattat	attcaatatg	gaaagaataa	aagaactacg	aatctaatg	60
tcgcagtctc	gcacccgca	gatactcaca	aaaaccaccg	tggaccatat	ggccataatc	120
aagaagtaca	catcaggaag	acaggagaag	aaccagcac	ttaggatgaa	atggatgatg	180
gcaatgaaat	atccaattac	agcagacaag	aggataacgg	aatgattcc	tgagagaaat	240
gagcaaggac	aaactttatg	gagtaaaatg	aatgatgccg	gatcagaccg	agtgatggta	300
tcacctctgg	ctgtgacatg	gtggaatagg	aatggacca	taacaaatac	agttcattat	360
ccaaaaatct	acaaaactta	ttttgaaaga	gtcgaaaggc	taaagcatgg	aacctttggc	420
cctgtccatt	ttagaaacca	agtcaaaata	cgctcgagag	ttgacataaa	tcctggctcat	480
gcagatctca	gtgccaagga	ggcacaggat	gtaatcatgg	aagttgtttt	ccctaacgaa	540
gtgggagcca	ggatactaac	atcggaatcg	caactaacga	taaccaaaga	gaagaaagaa	600
gaactccagg	attgcaaaaat	ttctcctttg	atggttgcat	acatgttggg	gagagaactg	660
gtccgcaaaa	cgagattcct	cccagtggtc	ggtggaacaa	gcagtgtgta	cattgaagtg	720
ttgcatttga	ctcaaggaac	atgctgggaa	cagatgtata	ctccaggagg	ggaagtgagg	780

aatgatgatg ttgatcaaag cttgattatt gctgctagga acatagtgag aagagctgca	840
gtatcagcag atccactagc atctttattg gagatgtgcc acagcacaca gattggtgga	900
attaggatgg tagacatcct taggcagaac ccaacagaag agcaagccgt ggatatatgc	960
aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tccttcagtt ttggtggatt cacatttaag	1020
agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagaggtgc ttacgggcaa tcttcaaaca	1080
ttgaagataa gagtgcataa gggatatgaa gagttcaciaa tggttgggag aagagcaaca	1140
gccatactca gaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg gagagacgaa	1200
cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atggatattt cacaagagga ttgtatgata	1260
aaagcagtca gaggtgatct gaatttcgtc aatagggcga atcaacgatt gaatcctatg	1320
catcaacttt taagacattt tcagaaggat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggagtt	1380
gaacctatcg acaatgtgat gggaatgatt gggatattgc ccgacatgac tccaagcatc	1440
gagatgtcaa tgagaggagt gagaatcagc aaaatgggtg tagatgagta ctccagcacg	1500
gagagggtag tggtagcat tgaccgtttt ttgagaatcc gggaccaacg aggaaatgta	1560
ctactgtctc ccgaggaggt cagtgaaca caggaacag agaaactgac aataacttac	1620
tcactgtcaa tgatgtggga gattaatggt cctgaatcag tgttggtaaa tacctatcaa	1680
tggatcatca gaaactggga aactgttaaa attcagtgtt cccagaacc tacaatgcta	1740
tacaataaaa tggaaattga accatttcag tcttttagtac ctaaggccat tagaggccaa	1800
tacagtgggt ttgtaagaac tctgttcaa caaatgagg atgtgcttgg gacatttgat	1860
accgcacaga taataaaaact tcttccttc gcagccgctc caccaaagca aagtagaatg	1920
cagttctcct catttactgt gaatgtgagg ggatcaggaa tgagaatact tgtaaggggc	1980
aattctcctg tattcaacta taacaaggcc acgaagagac tcacagttct cggaaaggat	2040
gctggcactt taactgaaga cccagatgaa ggcacagctg gactggagtc cgctgttctg	2100
aggggattcc tcattctggg caaagaagac aagagatatg ggccagcact aagcatcaat	2160
gaactgagca accttgcgaa aggagagaag gctaattgtc taattgggca aggagacgtg	2220
gtgttggtaa tgaaacggaa acgggactct agcactacta ctgacagcca gacagcgacc	2280
aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac	2340
t	2341
<210> 4	
<211> 1565	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 4	
agcaaaaagca gggtagataa tcaactactg agtgacatca aatcatggc gtctcaaggc	60
accaaaacgat cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc	120
agagcatccg tcggaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcacc	180
gaactcaaac tcagtgatta tgaggacggt ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga	240
atgggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc ttgaagaaca tcccagtgcg	300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagga gagtaaacgg aaagtggatg	360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat	420

ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcatccaa tttgaatgat	480
gcaacttatac agaggacaag agctcttggt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct	540
ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga	600
gttgaacaa tggatgatga attggtcaga atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac	660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt	720
ctcaaagga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc	780
cggaaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctacttttc tagcacggtc tgactcata	840
ttgagagggt cggttgctca caagtctgc ctgctgctt gtgtgatgg acctgccgta	900
gccagtgggt acgactttga aagggaggga tactctctag tcggaataga ccctttcaga	960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagacca atgagaatcc agcacacaag	1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgatttg aagatctaag agtattaagc	1080
ttcatcaaag ggacgaaggt gctcccaaga gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt	1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtac	1200
tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agagggcac tgcgggcca	1260
atcagcatac aacctacgtt ctcagtacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccatt	1320
atggcagcat tcaatgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaatcata	1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag	1440
ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttctt ttgacatgag taatgaagga	1500
tcttatttct tcggagacaa tgcaagagg tagcacaatt aaagaaaaat acccttgttt	1560
ctact	1565
<210> 5	
<211> 1027	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 5	
agcaaaagca gtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaac cgtacgtact	60
ctctatcatc ccgtcaggcc ccctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt	120
tgcaggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct	180
gtcacctctg actaagggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccgtgc ccagtgagcg	240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa	300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc	360
caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcaactgac agttgtatgg gcctcatata	420
caacaggatg ggggctgtga ccaactgaagt ggcatttggc ctggatgtg caacctgtga	480
acagattgct gactcccagc atcgggtctc taggcaaatg gtgacaacaa ccaatccact	540
aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat	600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctagacaaat	660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcttagctcc agtgctggtc tgaaaaatga	720
tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa	780
gtgatcctct cactattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgaca ttgtggattc	840

ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc	900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg	960
ctgtggatgc tgacgatggt cattttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt	1020
ttctact	1027
<210> 6	
<211> 890	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 6	
agcaaaaagca gggtgacaaa aacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag	60
attgctttct ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggc gatgccccat	120
tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagt actctcggtc	180
tggacatcaa gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag	240
aatccgatga ggcacttaaa atgacatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaactg	300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggact ggtccatgct cataccaag cagaaagtgg	360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgga taagaacatc atactgaaag	420
cgaacttcag tgtgattttt gaccggctgg agactctaatt attgctaagg gctttcaccg	480
aagagggagc aattgttggc gaaatttcac cattgccttc tcttcagga catactgctg	540
aggatgtcaa aatgcagtt ggagtctca tcggaggact tgaatggaat gataacacag	600
ttcgagtctc tgaactcta cagagattcg cttggagaag cagtaatgag aatgggagac	660
ctccactcac tccaaaacag aaacgagaaa tggcgggaac aattaggtca gaagtttgaa	720
gaaataagat ggttgattga agaagtgaga cacaactga agataacaga gaatagtttt	780
gagcaataa catttatgca agccttacat ctattgcttg aagtggagca agagataaga	840
actttctcgt ttcagcttat ttagtactaa aaaacacct tgtttctact	890
<210> 7	
<211> 1775	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 7	
agcaaaaagca ggggaaaata aaaacaacca aatgaaggc aaacctactg gtctgttat	60
gtgcacttgc agctgcagat gcagacacaa tatgtatagg ctaccatgcg aacaattcaa	120
ccgacactgt tgacacagta ctcgagaaga atgtgacagt gacacactct gttaacctgc	180
tcgaagacag ccacaacgga aaactatgta gattaaaagg aatagcccca ctacaattgg	240
ggaaatgtaa catcgccgga tggetttgg gaaaccaga atgcgacca ctgcttccag	300
tgagatcatg gtccacatt gtagaaacac caaactctga gaatggaata tgttatccag	360
gagatttcat cgactatgag gagctgagg agcaattgag ctcaagtgtca tcattcgaaa	420
gattcgaaat atttccaaa gaaagctcat ggcccaacca caacacaaac ggagtaacgg	480
cagcatgctc ccatgagggg aaaagcagtt tttacagaaa tttgctatgg ctgacggaga	540
aggagggctc atacccaaag ctgaaaaatt cttatgtgaa caaaaaagg aaagaagtcc	600

ttgtactgtg	gggtattcat	cacccgccta	acagtaagga	acaacagaat	ctctatcaga	660
atgaaaatgc	ttatgtctct	gtagtgactt	caaattataa	caggagattt	accccgaaa	720
tagcagaaag	acccaaagta	agagatcaag	ctgggaggat	gaactattac	tggaccttgc	780
taaaacccgg	agacacaata	atatttgagg	caaatggaaa	tctaatagca	ccaatgtatg	840
ctttcgcact	gagtagaggc	tttgggtccg	gcatcatcac	ctcaaacgca	tcaatgcatg	900
agtgtaacac	gaagtgtcaa	acaccctg	gagctataaa	cagcagtctc	ccttaccaga	960
atatacacc	agtcacaata	ggagagtgcc	caaatacgt	caggagtgcc	aaattgagga	1020
tggttacagg	actaaggaac	attccgtcca	ttcaatccag	aggtctattt	ggagccattg	1080
ccggttttat	tgaaggggga	tggactggaa	tgatagatgg	atggtatggt	tatcatcatc	1140
agaatgaaca	gggatcaggc	tatgcagcgg	atcaaaaaag	cacacaaaat	gccattaacg	1200
ggattacaaa	caaggtgaac	actgttatcg	agaaaatgaa	cattcaattc	acagctgtgg	1260
gtaaagaatt	caacaaatta	gaaaaaagga	tggaaaattt	aaataaaaa	gttgatgatg	1320
gatttctgga	catttggaca	tataatgcag	aattgttagt	tctactggaa	aatgaaagga	1380
ctctggattt	ccatgactca	aatgtgaaga	atctgtatga	gaaagtaaaa	agccaattaa	1440
agaataatgc	caaagaaatc	ggaaatggat	gttttgagtt	ctaccacaag	tgtgacaatg	1500
aatgcatgga	aagtgtgaag	aatgggactt	atgattatcc	caaatattca	gaagagtcaa	1560
agttgaacag	ggaaaaggta	gatggagtga	aattggaatc	aatggggatc	tatcagattc	1620
tggcgatcta	ctcaactgtc	gccagttcac	tgggtctttt	ggtctccctg	ggggcaatca	1680
gtttctggat	gtgttcta	ggatctttgc	agtcagaat	atgcatctga	gattagaatt	1740
tcagagatat	gaggaaaaac	acccttgttt	ctact			1775

<210> 8

<211> 1413

<212> DNA

<213> 流感病毒

<400> 8

agcaaaagca	ggggtttaa	atgaatccaa	atcagaaaat	aataaccatt	gatcaatct	60
gtctggtagt	cggactaatt	agcctaatat	tgcaaatagg	gaatataatc	tcaatatgga	120
ttagccattc	aattcaaact	ggaagtcaaa	accatactgg	aatatgcaac	caaaacatca	180
ttacctataa	aaatagcacc	tgggtaaagg	acacaacttc	agtgatatta	accggcaatt	240
catctctttg	tcccatccgt	gggtgggcta	tatacagcaa	agacaatagc	ataagaattg	300
gttccaaagg	agacgttttt	gtcataagag	agccctttat	ttcatgttct	cacttggaat	360
gcaggacctt	ttttctgacc	caaggtgcct	tactgaatga	caagcattca	agtgggactg	420
ttaaggacag	aagcccttat	agggccttaa	tgagctgccc	tgtcggtgaa	gctccgtccc	480
cgtacaattc	aagatttgaa	tcggttgctt	ggtcagcaag	tgcatgtcat	gatggcatgg	540
gctggctaac	aatcggaatt	tcaggtccag	ataatggagc	agtggctgta	ttaaaataca	600
acggcataat	aactgaaacc	ataaaaagtt	ggaggaagaa	aatattgagg	acacaagagt	660
ctgaatgtgc	ctgtgtaaat	ggttcatggt	ttactataat	gactgatggc	ccgagtgatg	720
ggctggcctc	gtacaaaatt	ttcaagatcg	aaaaggggaa	ggttactaaa	tcaatagagt	780
tgaatgcacc	taattctcac	tatgaggaat	gttctgttta	ccctgatacc	ggcaaagtga	840

tgtgtgtgtg cagagacaat tggcatggtt cgaaccggcc atgggtgtct ttcgatcaaa	900
acctggatta tcaaatagga tacatctgca gtggggtttt cggtgacaac ccgcgtcccg	960
aagatggaac aggcagctgt ggtccagtgt atgttgatgg agcaaacgga gtaaagggat	1020
tttcatatag gtatggtaat ggtgtttgga taggaaggac caaaagtcac agttccagac	1080
atgggtttga gatgatttgg gatcctaata gatggacaga gactgatagt aagttctctg	1140
tgaggcaaga tgttgtggca atgactgatt ggtcagggta tagcggaagt ttcgttcaac	1200
atcctgagct gacagggcta gactgtatga ggccgtgctt ctgggttgaa ttaatcaggg	1260
gacgacctaa agaaaaaaca atctggacta gtgcgagcag cttttctttt tgtggcgtga	1320
atagtgatac tgtagattgg tcttggccag acgggtctga gttgccattc agcattgaca	1380
agtagtctgt tcaaaaaact ccttgtttct act	1413
<210> 9	
<400> 9	
000	
<210> 10	
<211> 2342	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 10	
agcgaaagca ggcaaaccat ttgaatggat gtcaatccga cttactttt cttaaaagtg	60
ccagcacaaa atgctataag cacaactttc cttataaccg gagaccctcc ttacagccat	120
gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaag	180
ggaagatgga caacaaacac cgaaactgga gcaccgcaac tcaaccgat tgatgggcca	240
ctgccagaag acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag attgtgtatt ggaagcaatg	300
gctttccttg aggaatccca tcctgggtatt tttgaaaact cgtgtattga aacgatggag	360
gttgttcagc aaacactgag tagacaagct gacacaaggc cgacagacct atgactggac	420
tttaaataga aaccagcctg ctgcaacagc attggccaac acaatagaag tgttcagatc	480
aaatggcctc acggccaatg agtcaggaag gctcatagac ttccttaagg atgtaatgga	540
gtcaatgaaa aaagaagaaa tggggatcac aactcatttt cagagaaaga gacgggtgag	600
agacaatatg actaagaaaa tgataacaca gagaacaata ggtaaaagga aacagagatt	660
gaacaaaagg gttatctaa ttagagcatt gaccctgaac acaatgacca aagatgctga	720
gagagggaaag ctaaaacgga gagcaattgc aaccccaggg atgcaaataa gggggtttgt	780
atactttgtt gagacactgg caaggagtat atgtgagaaa cttgaacaat cagggttgcc	840
agttggaggc aatgagaaga aagcaaagtt ggcaaatggt gtaaggaaga tgatgaccaa	900
ttctcaggac accgaacttt ctttcacat cactggagat aacaccaa atggaacgaaa	960
tcagaatcct cggatgtttt tggccatgat cacatatatg accagaaatc agcccgaatg	1020
gttcagaaat gttctaagta ttgctccaat aatgtttctca acaaaaatgg cgagactggg	1080
aaaagggtat atgtttgaga gcaagagtat gaaacttaga actcaaatac ctgcagaaat	1140
gctagcaagc attgatttga aatatttcaa tgattcaaca agaaagaaga ttgaaaaaat	1200
ccgaccgctc ttaatatagagg ggactgcatc attgagccct ggaatgatga tgggcatggt	1260

caatatgtta agcactgtat taggcgtctc catcctgaat cttggacaaa agagatacac	1320
caagactact tactgggtgg atggtcttca atcctctgac gattttgctc tgattgtgaa	1380
tgcacccaat catgaaggga ttcaagccgg agtcgacagg ttttatcgaa cctgtaagct	1440
acttggaaatc aatatgagca agaaaaagtc ttacataaac agaacaggta catttgaatt	1500
cacaagtttt ttctatcgtt atgggtttgt tgccaatttc agcatggagc ttcccagttt	1560
tgggggtgtct gggatcaacg agtcagcggg catgagtatt ggagttactg tcatcaaaaa	1620
caatatgata aacaatgatc ttggtccagc aacagctcaa atggcccttc agttgttcat	1680
caaagattac aggtacacgt accgatgcca tagagggtac acacaaatac aaaccggaag	1740
atcatttgaa ataaagaaac tgtggggagca aaccggttc aaagctggac tgctgggtctc	1800
cgacggaggc ccaaatttat acaacattag aaatctccac attcctgaag tctgcctaaa	1860
atgggaattg atggatgagg attaccaggg gcgtttatgc aaccactga acccatttgt	1920
cagccataaa gaaattgaat caatgaacaa tgcagtgatg atgccagcac atggtccagc	1980
caaaaacatg gagtatgatg ctgttgcaac aacacactcc tggatcccca aaagaaatcg	2040
atccatcttg aatacaagtc aaagaggagt acttgaagat gaacaaatgt accaaaggtg	2100
ctggaattta tttgaaaaat tcttccccag cagttcatac agaagaccag tcgggatatc	2160
cagtatgggtg gaggctatgg tttccagagc ccgaattgat gcacggattg atttcgaatc	2220
tggaaggata aagaaagaag agttcactga gatcatgaag atctgttcca ccattgaaga	2280
gctcagacgg caaaaatagt gaatttagct tgtccttcat gaaaaaatgc cttgtttcta	2340
ct	2342

<210> 11

<211> 2341

<212> DNA

<213> 流感病毒

<400> 11

agcgaaagca ggtcaattat attcaatatg gaaagaataa aagaactaag aaatctaattg	60
tcgcagtctc gcacccgca gatactaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccagcac ttaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggataacgg aaatgattcc tgagagaaat	240
gagcaaggac aaactttatg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtgatggta	300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggacca tgacaaatac agttcattat	360
caaaaaatct acaaaaactta ttttgaaaga gtcgaaaggc taaagcatgg aacctttggc	420
cctgtccatt ttagaaacca agtcaaaata cgtcggagag ttgacataaa tcttggtcat	480
gcagatctca gtgccaagga ggcacaggat gtaatcatgg aagttgtttt ccctaacgaa	540
gtgggagcca ggatactaac atcggaatcg caactaacga taaccaaga gaagaaagaa	600
gaactccagg attgcaaaaat ttctcctttg atggttgcat acatgttggg gagagaactg	660
gtccgcaaaa cgagattcct cccagtggct ggtggaacaa gcagtgtgta cattgaagtg	720
ttgcatttga ctcaaggaac atgctgggaa cagatgtata ctccaggagg ggaagtgaag	780
aatgatgatg ttgatcaaag cttgattatt gctgctagga acatagttag aagagctgca	840
gtatcagcag acccactagc atctttattg gagatgtgcc acagcacaca gattggtgga	900

attaggatgg tagacatcct taagcagaac ccaacagaag agcaagccgt ggatatatgc	960
aaggctgcaa tgggactgag aattagctca tccttcagtt ttggtggatt cacatttaag	1020
agaacaagcg gatcatcagt caagagagag gaagaggtgc ttacgggcaa tcttcaaaca	1080
ttgaagataa gagtgcataa gggatctgaa gagttcaciaa tggttgggag aagagcaaca	1140
gccataactca gaaaagcaac caggagattg attcagctga tagtgagtgg gagagacgaa	1200
cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atggatattt cacaagagga ttgtatgata	1260
aaagcagtta gaggtgatct gaatttcgtc aatagggcga atcagcgact gaatcctatg	1320
catcaacttt taagacattt tcagaaggat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggagtt	1380
gaacctatcg acaatgtgat gggaatgatt gggatattgc ccgacatgac tccaagcatc	1440
gagatgtcaa tgagaggagt gagaatcagc aaaatgggtg tagatgagta ctccagcacg	1500
gagagggtag tggtagcat tgaccggttc ttgagagtea gggaccaacg aggaaatgta	1560
ctactgtctc ccgaggaggt cagtgaaca cagggaacag agaaactgac aataacttac	1620
tcactgtcaa tgatgtggga gattaatggt cctgaatcag tgttggtaaa tacctatcaa	1680
tggatcatca gaaactggga aactgttaaa attcagtggt cccagaacc tacaatgcta	1740
tacaataaaa tggaaattga accatttcag tcttttagtac ctaaggccat tagaggccaa	1800
tacagtgggt ttgtaagaac tctgttccaa caaatgagg atgtgcttgg gacatttgat	1860
accgcacaga taataaaaact tcttccttc gcagccgctc caccaaagca aagtagaatg	1920
cagttctcct catttactgt gaatgtgagg ggatcaggaa tgagaatact tgtaaggggc	1980
aattctcctg tattcaacta caacaaggcc acgaagagac tcacagttct cggaaaggat	2040
gctggcactt taaccgaaga cccagatgaa ggcacagctg gactggagtc cgctgttctg	2100
aggggattcc tcattctggg caaagaagac aggagatatg ggccagcatt aagcatcaat	2160
gaactgagca accttgcgaa aggagagaag gctaattgtc taattgggca aggagacgtg	2220
gtgttggtaa tgaaacgaaa acgggactct agcatactta ctgacagcca gacagcgacc	2280
aaaagaattc ggatggccat caattagtgt cgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac	2340
t	2341
<210> 12	
<211> 2234	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 12	
agcgaaagca ggtactgatt caaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg	60
attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca	120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc agatttccac	180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgacctaata tgcacttttg	240
aagcacagat ttgaaataat cgagggaaga gatcgcaaa tggcctggac agtagtaaac	300
agtatttgca aactacaggg ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt gtatgattac	360
aaggaaaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg	420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcactggg	480
gaagaaatgg ccacaagggc cgactacact ctcatgaag aaagcagggc taggatcaaa	540

accaggctat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga ttcctttcgt	600
cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aatcacagg aacaatgcgc	660
aagcttgccg accaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat	720
gtggatggat tcgaaccgaa cggctacatt gagggaagc tgtctcaaat gtccaaagaa	780
gtaaatgcta gaattgaacc ttttttghaa acaacaccac gaccacttag acttccgaat	840
gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccttaa attaagcatt	900
gaggacccaa gtcatgaagg agaggaata ccgctatatg atgcaatcaa atgcatgaga	960
acattctttg gatggaagga acccaatggt gttaaaccac acgaaaagg aataaatcca	1020
aattatcttc tgtcatggaa gcaagtactg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag	1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaaaaa acaagtcagc taaagtgggc acttggtgag	1140
aacatggcac cagaaaagg agactttgac gactgtaaag atgtaggtga tttgaagcaa	1200
tatgatagtg atgaaccaga attgaggtcg cttgcaagtt ggattcagaa tgagttcaac	1260
aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg atagagcttg atgagattgg agaagatgtg	1320
gctccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac	1380
tgcagagcca cagaatacat aatgaagggg gtgtacatca atactgcctt acttaatgca	1440
tcttgtgcag caatggatga tttccaatta attccaatga taagcaagt tagaactaag	1500
gagggaggc gaaagaccaa cttgtatggt ttcatcataa aaggaagatc ccacttaagg	1560
aatgacaccg acgtggtaaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga cccaagactt	1620
gaaccacaca aatgggagaa gtactgtggt cttgagatag gagatatgct tctaagaagt	1680
gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgtga ggacaaatgg aacctcaaaa	1740
attaaaatga aatgggggaat ggagatgagg cgttgtctcc tccagtcact tcaacaat	1800
gagagtatga ttgaagctga gtctctgtc aaagagaaag acatgaccaa agagtcttt	1860
gagaacaaat cagaaacatg gccattgga gactctccca aaggagtgga ggaaagtcc	1920
attggggaag gtctgcagga ctttattagc aaagtcggtt tttacagct tgtatgcatc	1980
tccacaacta gaaggatfff cagctgaatc aagaaaactg cttcttatcg ttcaggctct	2040
tagggacaat ctggaacctg ggacctttga tcttgggggg ctatatgaag caattgagga	2100
gtgcctaatt aatgatccct gggttttgct taatgcttct tggttcaact cttccttac	2160
acatgcattg agttagttgt ggcagtgcta ctatttgcta tccatactgt ccaaaaaagt	2220
accttgtttc tact	2234
<210> 13	
<211> 1565	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 13	
agcaaaagca gggtagataa tcaactactg agtgacatca aatcatggc gtcccaaggc	60
accaaacggt cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc	120
agagcatccg tcgaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca aatgtgcaca	180
gaacttaaac tcagtgatta tgaggacgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga	240
atggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc tggagaaca tcccagtgcg	300

gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atatacagaa gagtaaacgg aaagtggatg	360
agagaactca tcctttatga caaagaagaa ataaggcgaa tctggcgcca agctaataat	420
ggtgacgatg caacggctgg tctgactcac atgatgatct ggcatccaa tttgaatgat	480
gcaacttatac agaggacaag ggctcttggt cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct	540
ctgatgcaag gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga	600
gttggaaaca tggatgatga attggtcagg atgatcaaac gtgggatcaa tgatcggaac	660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt	720
ctcaaaggga aatttcaaac tgctgcacaa aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc	780
cggaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctacttttc tagcacggtc tgactcata	840
ttgagagggt cggttgctca caagtctgc ctgctgctt gtgtgatgg acctgccgta	900
gccagtgggt acgacttga aagagaggga tactctctag tcggaataga ccctttcaga	960
ctgcttcaaa acagccaagt gtacagccta atcagacca atgagaatcc agcacacaag	1020
agtcaactgg tgtggatggc atgccattct gccgatttg aagatctaag agtattgagc	1080
ttcatcaaag ggacgaaggt ggtcccaaga gggaagcttt ccactagagg agttcaaatt	1140
gcttccaatg aaaaatgga gactatggaa tcaagtacac ttgaactgag aagcaggtac	1200
tgggccataa ggaccagaag tggaggaaac accaatcaac agagggcac tgcgggcca	1260
atcagcatac aacctagtt ctcagtacag agaaatctcc cttttgacag aacaaccgtt	1320
atggcagcat tcaactggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaaatcata	1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag	1440
ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttctt ttgacatgag taatgaagga	1500
tcttatttct tcggagacaa tgcaagagg tagacaatt aaagaaaaat acccttgttt	1560
ctact	1565
<210> 14	
<211> 1027	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 14	
agcaaaaagca gtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct	60
ctctatcatc ccgtcaggcc cctcaaagc cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt	120
tgcaggaag aacaccgatc ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct	180
gtcacctctg actaaggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccgtgc ccagtgagcg	240
aggactgcag cgtagacgct ttgtccaaa tgcccttaat gggaacgggg atccaaataa	300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc	360
caaagaaatc tcaactcagtt attctgctgg tgcacttgc agttgtatgg gcctcatata	420
caacaggatg ggggctgtga ccaactgaagt ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga	480
acagattgct gactcccagc atcggctctc taggcaaatg gtgacaacaa ccaaccact	540
aatcagacat gagaacagaa tggttttagc cagcactaca gctaaggcta tggagcaaat	600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggc catggaggtt gctagtcagg ctaggcaaat	660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tcctagctcc agtgctggtc tgaaaaatga	720

tcttcttgaa aatttgcagg cctatcagaa acgaatgggg gtgcagatgc aacggttcaa	780
gtgatcctct cgctattgcc gcaaataca ttgggatctt gcacttgata ttgtggattc	840
ttgatcgtct ttttttcaaa tgcatttacc gtcgctttaa atacggactg aaaggagggc	900
cttctacgga aggagtgcc aagtctatga gggaagaata tcgaaaggaa cagcagagtg	960
ctgtggatgc tgacgatggt cttttgtca gcatagagct ggagtaaaaa actaccttgt	1020
ttctact	1027
<210> 15	
<211> 890	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 15	
agcaaaagca gggtgacaaa gacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag	60
attgctttct ttggcatgtc cgcaaacgag ttgcagacca agaactaggt gatgccccat	120
tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagc actcttggtc	180
tggacatcga gacagccaca cgtgctggaa agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag	240
aatccgatga ggcacttaaa atgacatggt cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaaccg	300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggaat ggtccatgct cataccaag cagaaagtgg	360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgga taaaaacatc atactgaaag	420
cgaacttcag tgtgattttt gaccggctgg agactctaatt attgctaagg gctttcaccg	480
aagagggagc aattgttggc gaaatttcac cattgccttc tcttcagga catactgctg	540
aggatgtcaa aatgcagtt ggagtctca tcggaggact tgaatggaat gataacacag	600
ttcgagtctc tgaactcta cagagattcg cttggagaag cagtaatgag aatgggagac	660
ctccactcac tccaaaacag aaacgagaaa tggcgggaac aattaggtca gaagtttgaa	720
gaaataagat gggtgattga agaagtgaga cacaactga aggtaacaga gaatagtttt	780
gagcaataa catttatgca agccttacat ctattgcttg aagtggagca agagataaga	840
actttctcat ttcagcttat ttaataataa aaaacacct tgtttctact	890
<210> 16	
<211> 2341	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 16	
agcgaagca ggtcaattat attcaatag gaaagaataa aagaactacg aatctaattg	60
tcgcagtctc gcacccgcga gatactaca aaaaccaccg tggaccatat ggccataatc	120
aagaagtaca catcaggaag acaggagaag aaccagcac tgaggatgaa atggatgatg	180
gcaatgaaat atccaattac agcagacaag aggatcaccg aatgattcc tgagagaaat	240
gagcagggac agactctgtg gagtaaaatg aatgatgccg gatcagaccg agtgatggtg	300
tcacctctgg ctgtgacatg gtggaatagg aatggaccaa tcacaaatac agtgcattat	360
ccaaaaatct acaaaaactta ttttgaaaga gtcgaaaggc tgaagcatgg aacctttggc	420
cctgtccatt ttagaaacca ggtcaaaatc cggcggagag tggacatcaa tcttggtcat	480

gcagatctca	gtgccaagga	ggcacaggat	gtgatcatgg	aagtgggtgtt	ccctaacgaa	540
gtgggagcca	ggattctgac	atccgaatcc	cagctgacca	ttaccaaaga	gaagaaagaa	600
gaactccagg	attgcaaaat	ttctcctctg	atgggtggcat	acatgctgga	gagagaactg	660
gtccgcaaaa	caagattcct	cccagtggt	ggtggaacaa	gcagtgtgta	cattgaagtg	720
ctgcatctga	ctcagggaac	atgctgggaa	cagatgtata	ctccaggagg	ggaagtgagg	780
aatgatgatg	tggatcagag	cctgattatt	gctgctagga	acattgtgag	aagagctgca	840
gtgtcagcag	atccactggc	atctctgctg	gagatgtgcc	acagcacaca	gattgggtgga	900
attaggatgg	tggacatcct	gaggcagaac	ccaacagaag	agcaggccgt	ggatatttgc	960
aagcgtgcaa	tgggactgag	aattagctca	tccttcagtt	ttggtggatt	cacatttaag	1020
agaacaagcg	gatcatcagt	caagagagag	gaagaggtgc	tgaccggcaa	tctgcagaca	1080
ctgaagatca	gagtgcattg	gggatatgaa	gagttcaca	tggtggggag	aagagcaaca	1140
gccatcctca	gaaaagcaac	caggagactg	attcagctga	tcgtgagtgg	gagagacgaa	1200
cagtcattg	ccgaagcaat	tattgtggcc	atgggtgttt	cacaggagga	ttgtatgatt	1260
aaagcagtca	gaggtgatct	gaatttcgtc	aatagggcc	atcagcgact	gaatcctatg	1320
catcagctgc	tgagacattt	tcagaaggat	gccaaagtgc	tgtttcagaa	ttggggagtg	1380
gaacctatcg	acaatgtgat	gggaatgatt	gggatcctgc	ccgacatgac	tccaagcatc	1440
gagatgtcaa	tgagaggagt	gagaatcagc	aaaatgggtg	tggatgagta	ctccagcacc	1500
gagagggctg	tggtgagcat	tgacagattt	ctgagaatcc	gggaccagcg	aggaaatgtg	1560
ctcctgtctc	ccgaggaggt	cagtgaacaa	cagggaacag	agaaactgac	aattacttac	1620
tcacctcaa	tgatgtggga	gattaatggt	cctgaatcag	tgctggtcaa	tacctatcag	1680
tggatcatca	gaaactggga	aactgtgaaa	attcagtggt	cccagaacc	tacaatgctg	1740
tacaataaaa	tggaatttga	accatttcag	tctctggtgc	ctaaggccat	tagaggccag	1800
tacagtgggt	ttgtgagaac	tctgttccag	cagatgaggg	atgtgctggg	gacatttgat	1860
accgcacaga	ttattaaact	gctgcccttc	gcagccgctc	caccaaagca	gagtagaatg	1920
cagttctcct	catttactgt	gaatgtgagg	ggatcaggaa	tgagaatcct	ggtgaggggc	1980
aattctcctg	tgttcaacta	taacaaggcc	accaagagac	tcacagtgct	cggaaaggat	2040
gctggcactc	tgactgaaga	cccagatgaa	ggcacagctg	gagtggagtc	cgctgtgctg	2100
aggggattcc	tcattctggg	caaagaagac	aagagatatg	ggccagcact	gagcatcaat	2160
gaactgagca	acctggccaa	aggagagaag	gctaattgtc	taattgggca	aggagacgtg	2220
gtgttggtaa	tgaaacggaa	acgggactct	agcatactta	ctgacagcca	gacagcgacc	2280
aaaagaattc	ggatggccat	caattagtgt	cgaatagttt	aaaacgacc	ttgtttctac	2340
t						2341
<210>	17					
<211>	2341					
<212>	DNA					
<213>	流感病毒					
<400>	17					
agcgaaagca	ggcaaaccat	ttgaatgat	gtcaatccga	ccttactttt	cttaaaagtg	60
ccagcacaaa	atgctataag	cacaactttc	ccttatactg	gagaccctcc	ttacagccat	120

gggacaggaa caggatacac catggatact gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaag	180
ggaagatgga caacaaacac cgaactgga gcaccgcaac tcaaccgat tgatgggcca	240
ctgccagaag acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag atttgttatt ggaggcgatg	300
gctttccttg aggaatccca tcctggattt tttgaaaact cgtgtattga aacgatggag	360
gttggtcagc aaacacgagt ggacaagctg acacagggcc gacagacctg tgactggact	420
ctgaatagaa accagcctgc tgcaacagca ctggccaaca caatcgaagt gttcagatca	480
aatggcctca ccgccaatga gtctggaagg ctcatcgact tcctgaagga tgtgatggag	540
tcaatgaaca aagaagaaat ggggatcaca actcattttc agagaaagag acgggtgaga	600
gacaatatga ctaagaaaat gattacacag agaacaatgg gtaaaaagaa gcagagactg	660
aacaaaagga gttatctgat tagagcactg accctgaaca caatgacca agatgctgag	720
agagggaagc tgaaacggag agcaattgca acccaggga tgcagattag ggggtttgtg	780
tactttgtgg agacactggc aaggagtatt tgtgagaaac tggaacagtc agggctgcca	840
gtgggaggca atgagaagaa agcaaagctg gcaaatgtgg tgaggaagat gatgaccaat	900
tctcaggaca ccgaactgtc tttcaccatc actggagata acaccaatg gaacgaaaat	960
cagaatcctc ggatgtttct ggccatgatc acatatatga ccagaaatca gcccgatgg	1020
ttcagaaatg tgctgagtat tgctccaatt atgttctcaa acaaatggc cagactggga	1080
aaagggtata tgttgagag caagagtatg aaactgagaa ctcagattcc tgcagaaatg	1140
ctggcaagca tcgatctgaa atatttcaat gattcaaca gaaagaagat tgaaaaatc	1200
cgaccctcc tgattgaggg gactgcatca ctgagcctg gaatgatgat gggcatgttc	1260
aatatgctga gcactgtgct gggcgtctcc atcctgaatc tgggacagaa gagatacacc	1320
aagactactt actgggtgga tggctctgag tcctctgacg attttgctct gattgtgaat	1380
gcaccaatc atgaagggat tcaggccgga gtcgacaggt tttatcgaac ctgtaagctg	1440
ctgggaatca atatgagcaa gaaaaagtct tacatcaaca gaacaggtac atttgaatc	1500
acaagttttt tctatcgcta tgggtttgtg gccaatcca gcatggagct gcccgatgtt	1560
ggggtgtctg ggatcaacga gtcagccgac atgagtattg gactgactgt catcaaaaac	1620
aatatgatca acaatgatct gggccagca acagctcaga tggccctgca gctgttcac	1680
aaagattaca ggtacaccta ccgatgccat atcggtgaca cacagattca gaccgaaga	1740
tcatttgaaa tcaagaaact gtgggagcag acccgtcca aagctggact gctggtctcc	1800
gacggaggcc caaatctgta caacattaga aatctccaca ttctgaagt ctgcctgaaa	1860
tgggaactga tggatgagga ttaccagggg cgctgtgca acccactgaa cccattgtc	1920
agccataaag aaattgaatc aatgaacaat gcagtgatga tgccagcaca tggccagcc	1980
aaaaacatgg agtatgatgc tgtggcaaca acacactcct ggatcccaa aagaaatcga	2040
tccatcctga atacaagtca gagaggagtg ctggaggatg aacagatgta ccagaggtgc	2100
tgcaatctgt ttgaaaaatt cttccccagc agttcataca gaagaccagt cgggatctcc	2160
agtatggtgg aggctatggt gtccagagcc cgaattgatg cacggattga tttcgaatct	2220
ggaaggatca agaaagaaga gttcactgag atcatgaaga tctgttccac cattgaagag	2280
ctcagacggc aaaaaatagtg aatttagctt gtccttcag aaaaaatgcc ttgtttctac	2340
t	2341

<210> 18

<211> 2233

<212> DNA

<213> 流感病毒

<400> 18

agcgaaagca ggtactgac caaaatggaa gattttgtgc gacaatgctt caatccgatg	60
attgtcgagc ttgcggaaaa aacaatgaaa gagtatgggg aggacctgaa aatcgaaaca	120
aacaaatttg cagcaatatg cactcacttg gaagtatgct tcatgtattc agattttcac	180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa tgcacttttg	240
aagcacagat ttgaaataat cgagggaaga gatcgcaaa tggcctggac agtagtaaac	300
agtatttgca aactacaggg ggctgagaaa ccaaagtttc taccagattt gtatgattac	360
aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagttcacat atactatctg	420
gaaaaggcca ataaaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcactggg	480
gaagaaatgg ccacaaaggc agactacact ctcatgaag aaagcagggc taggatcaaa	540
accagactat tcaccataag acaagaaatg gccagcagag gcctctggga ttctttctgt	600
cagtccgaga gaggagaaga gacaattgaa gaaagtttg aatcacagg aacaatgcgc	660
aagcttgccg accaaagtct cccgccgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat	720
gtggatggat tcgaaccgaa cggtacatt gagggcaagc tgtctcaaat gtccaaagaa	780
gtaaattgcta gaattgaacc ttttctgaaa acaacaccac gaccactgag actgccaat	840
gggcctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgatgg atgccctgaa actgagcatt	900
gaggacccaa gtcatgaagg agaggaatt ccctgtatg atgcaatcaa atgcatgaga	960
acattctttg gatggaagga acccaatgtg gtgaaaccac acgaaaaggg aatcaatcca	1020
aattatctgc tgtcatggaa gcaggtgctg gcagaactgc aggacattga gaatgaggag	1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa acaagtcagc tgaagtgggc actgggtgag	1140
aacatggcac cagaaaaggt ggactttgac gactgtaaag atgtgggtga tctgaagcag	1200
tatgatagtg atgaaccaga actgaggtcc ctggcaagtt ggattcagaa tgagttaac	1260
aaggcatgcg aactgacaga ttcaagctgg attgagctcg atgagattgg agaagatgtg	1320
gctccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcacatcaga ggtgtctcac	1380
tgcagagcca cagaatacat catgaaggga gtgtacatca atactgccct gctgaatgca	1440
tcttgtgcag caatggatga tttccagctg attccaatga tcagcaagtg tagaactaag	1500
gaggaaggc gaaagaccaa cctgtatggt ttcatcatca aaggaagatc ccacctgagg	1560
aatgacaccg acgtggtgaa ctttgtgagc atggagtttt ctctcactga cccaagactg	1620
gaaccacata aatgggagaa gtactgtgtg ctggagattg gagatatgct gatcagaagt	1680
gccattggcc aggtgtcaag gcccatgttc ctgtatgtga gaacaaatgg aacctcaaaa	1740
attaaaatga aatgggggaat ggagatgagg cgctgcctcc tccagtcact gcagcagatt	1800
gagagtatga ttgaagctga gtccctctgtc aaagagaaag acatgaccaa agagttcttt	1860
gagaacaaat cagaaacatg gccattgga gagtcccca aaggagtgga ggaaagtcc	1920
attgggaagg tctgcaggac tctgctggca aagtccgtgt tcaacagcct gtatgcatct	1980
ccacagctgg aaggattttc agctgaatca agaaaactgc tgctgatcgt gcaggctctg	2040
agggacaacc tggaacctgg gacctttgat ctgggggggc tgtatgaagc aattgaggag	2100

tgccatgatta atgatccctg ggtgctgctg aatgcttctt ggttcaactc cttccttaca	2160
catgcattga gttagtgtg gcagtgctac tatttgctat ccatactgtc caaaaaagta	2220
ccttgtttct act	2233
<210> 19	
<211> 1565	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	
<400> 19	
agcaaaaagca gggtagataa tcaactcactg agtgacatca aatcatggc gtctcaaggc	60
accaaacgat cttacgaaca gatggagact gatggagaac gccagaatgc cactgaaatc	120
agagcatccg tcggaaaaaat gattggtgga attggacgat tctacatcca gatgtgcacc	180
gaactcaaac tcagtgatta tgagggacgg ctgatccaga acagcctgac aatcgagaga	240
atgggtgctct ctgcttttga cgaaaggaga aataaatacc tggaagaaca tcccagtgcc	300
gggaaagatc ctaagaaaac tggaggacct atctacagga gagtgaacgg aaagtggatg	360
agagaactca tcctgtatga caaagaagaa atcaggcgaa tctggcgcca ggctaataat	420
ggtgacgatg caaccgctgg tctgactcac atgatgatct ggcatccaa tctgaatgat	480
gcaacttatac agaggacaag agctctggtg cgcaccggaa tggatcccag gatgtgctct	540
ctgatgcagg gttcaactct ccctaggagg tctggagccg caggtgctgc agtcaaagga	600
gtgggaacaa tggatgatga actggtcaga atgatcaaaa gagggatcaa tgatcggaac	660
ttctggaggg gtgagaatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt	720
ctcaaagggg aatttcagac tgctgcacag aaagcaatga tggatcaggt gagagagagc	780
cggaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctacttttc tggcacggtc tgcaactc	840
ctgagagggg ccgtggctca caagtctctgc ctgctgctt gtgtgtatgg acctgccgtg	900
gccagtgggt acgactttga aaggaggagg tactctctgg tcggaattga ccctttcaga	960
ctgctgcaga acagccaggt gtacagcctg atcagaccaa atgagaatcc agcacacaag	1020
agtcagctgg tgtggatggc atgccattct gccgatttg aagatctgag agtgctgagc	1080
ttcatcaaag ggaccaaggt gctcccaaga gggaagctgt ccactagagg agtgcagatt	1140
gcttccaatg aaaatatgga gactatggaa tcaagtacac tggaactgag aagcaggtac	1200
tgggccatca ggaccagaag tggaggaaac accaatcagc agagggcac tgccggccag	1260
atcagcattc agcctacctt ctcagtgacg agaaatctcc cttttgacag aacaaccatt	1320
atggcagcat tcaatgggaa tacagagggg agaacatctg acatgaggac cgaaatc	1380
aggatgatgg aaagtgcaag accagaagat gtgtctttcc aggggcgggg agtcttcgag	1440
ctctcggacg aaaaggcagc gagcccgatc gtgccttctt ttgacatgag taatgaagga	1500
tcttatttct tcggagacaa tgcagaggag tacgacaatt aaagaaaaat acccttg	1560
ctact	1565
<210> 20	
<211> 1684	
<212> DNA	
<213> 流感病毒	

<400> 20

```

atgaacactc aaatcctggt attcgctctg attgcatca ttccaacaaa tgcagacaaa      60
atctgcctcg gacatcatgc cgtgtcaaac ggaaccaaag taaacacatt aactgaaaga      120
ggagtggaag tctgcaatgc aactgaaaca gtggaacgaa caaacatccc caggatctgc      180
tcaaaaaggga aaaggacagt tgacctcggg caatgtggac tcctggggac aatcactgga      240
ccacctcaat gtgaccaatt cctagaattt tcagccgatt taattattga gaggcgagaa      300
ggaagtgatg tctgttatcc tgggaaattc gtgaatgaag aagctctgag gcaaattctc      360
agagaatcag gcggaattga caaggaagca atgggattca catacagtgg aataagaact      420
aatggagcaa ccagtgcatt taggagatca ggatcttcat tctatgcaga aatgaaatgg      480
ctcctgtcaa acacagataa tgctgcattc ccgccagatg actaagtcata ataaaaatac      540
aagaaaaagc ccagctctaa tagtatgggg gatccatcat tccgtatcaa ctgcagagca      600
aaccaagcta tatgggagtg gaaacaaact ggtgacagtt gggagttcta attatcaaca      660
atcttttgta ccgagtccag gagcgagacc acaagttaat ggtctatctg gaagaattga      720
ctttcattgg ctaatgctaa atcccaatga tacagtcact ttcagtttca atggggcttt      780
catagctcca gaccgtgcaa gcttcctgag aggaaaatct atgggaatcc agagtggagt      840
acaggttgat gccaatgtg aaggggactg ctatcatagt ggagggacaa taataagtaa      900
cttgccattt cagaacatag atagcagggc agttggaaaa tgtccgagat atgttaagca      960
aaggagtctg ctgctagcaa cagggatgaa gaatgttctt gagattccaa agggaagagg     1020
cctatttggt gctatagcgg gtttcattga aatggatgg gaaggcctaa ttgatggttg     1080
gtatggtttc agacaccaga atgcacaggg agagggaaact gctgcagatt acaaaagcac     1140
tcaatcggca attgatcaaa taacaggaaa attaaaccgg cttatagaaa aaaccaacca     1200
acaatttgag ttgatagaca atgaattcaa tgaggtagag aagcaaatcg gtaatgtgat     1260
aaattggacc agagattcta taacagaagt gtggtcatac aatgctgaac tcttggtagc     1320
aatggagaac cagcatacaa ttgatctggc tgattcagaa atggacaaac tgtacgaacg     1380
agtgaaaaga cagctgagag agaatgctga agaagatggc actggttgct ttgaaatatt     1440
tcacaagtgt gatgatgact gtatggccag tattagaaat aacacctatg atcacagcaa     1500
atacagggaa gaggcaatgc aaaatagaat acagattgac ccagtcaaac taagcagcgg     1560
ctacaaaagat gtgatacttt ggtttagctt cggggcatca tgtttcatac ttctagccat     1620
tgtaatgggc cttgtcttca tatgtgtaaa gaatggaaac atgcggtgca ctatttgtat     1680
ataa                                                                 1684

```

<210> 21

<211> 560

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 21

```

Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Ser Lys Gly Lys Arg Thr
1           5           10           15
Val Asp Leu Gly Ile Ala Ile Ile Pro Thr Asn Ala Asp Lys Gln Cys
           20           25           30

```

Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly Ile Cys Leu Gly His His Ala Val
 35 40 45
 Ser Asn Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Gly Thr Lys Val
 50 55 60
 Asn Thr Leu Thr Glu Arg Ser Ala Asp Leu Ile Ile Glu Arg Arg Glu
 65 70 75 80
 Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr Glu Thr Gly Ser Asp Val Cys Tyr
 85 90 95
 Pro Gly Lys Phe Val Glu Arg Thr Asn Ile Pro Arg Ile Cys Val Asn
 100 105 110
 Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
 115 120 125
 Glu Ala Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr
 130 135 140
 Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
 145 150 155 160
 Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Ser Pro Ala Leu Ile Val Trp Gly Ile His
 180 185 190
 His Ser Val Ser Thr Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn
 195 200 205
 Lys Leu Val Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro
 210 215 220
 Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Leu Ser Gly Arg Ile Asp
 225 230 235 240
 Phe His Trp Leu Met Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe
 245 250 255
 Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
 260 265 270
 Ser Met Gly Ile Gln Ser Gly Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
 275 280 285
 Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
 290 295 300
 Asn Ile Asp Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
 305 310 315 320
 Arg Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
 325 330 335
 Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly

	340		345		350	
Trp	Glu Gly Leu Ile Asp Gly	Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala				
	355		360		365	
Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile						
	370		375		380	
Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln						
385		390		395		400
Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Asn Glu Val Glu Lys Gln Ile						
	405		410		415	
Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Ile Thr Glu Val Trp Ser						
	420		425		430	
Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp						
	435		440		445	
Leu Ala Asp Ser Glu Met Asp Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys Arg Gln						
	450		455		460	
Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe						
465		470		475		480
His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr						
	485		490		495	
Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile						
	500		505		510	
Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe						
	515		520		525	
Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Val Met Gly Leu						
	530		535		540	
Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile						
545		550		555		560

<210> 22

<211> 1398

<212> DNA

<213> 流感病毒

<400> 22

atgaatccaa atcagaagat tctatgcact tcagccactg ctatcataat aggcgcaatc	60
gcagtactca ttggaatagc aaacctagga ttgaacatag gactgcatct aaaaccgggc	120
tgcaattgct cacactcaca acctgaaaca accaacacaa gccaaacaat aataaacaac	180
tattataatg aaacaaacat caccaacatc caaatggaag agagaacaag caggaatttc	240
aataacttaa ctaaaggget ctgtactata aattcatggc acatatatgg gaaagacaat	300
gcagtaagaa ttggagagag ctcggatggt ttagtcaaa gagaacccta tgtttcatgc	360
gaccagatg aatgcagggt ctatgctctc agccaaggaa caacaatcag agggaaacac	420

tcaaacggaa caatacacga taggtcccag tatecgcccc tgataagctg gccactatca 480
 tcaccgcccc cagtgtacaa cagcagggtg gaatgcattg ggtggtcaag tactagtgtgc 540
 catgatggca aatccaggat gtcaatatgt atatcaggac caaacaacaa tgcattctgca 600
 gtagtatggt acaacagaag gcctgttgca gaaattaaca catgggcccc aaacatacta 660
 agaacacagg aatctgaatg tgtatgccac aacggcgtat gcccagtagt gttcacccgat 720
 gggctctgcca ctggacctgc agacacaaga atatactatt ttaaagaggg gaaaatattg 780
 aaatgggagt ctctgactgg aactgctaag catattgaag aatgctcatg ttacggggaa 840
 cgaacaggaa ttacctgcac atgcaggac aattggcagg gctcaaatag accagtgatt 900
 cagatagacc cagtagcaat gacacacact agtcaatata tatgcagtcc tgtttctaca 960
 gacaatcccc gaccgaatga cccaaatata ggtaagtgtg atgaccctta tccaggtaat 1020
 aataacaatg gagtcaaggg attctcatac ctggatgggg ctaaaccttg gctagggagg 1080
 acaataagca cagcctcgag gtctggatac gagatgttaa aagtgcaaaa tgcattgaca 1140
 gatgatagat caaagcccat tcaaggtcag acaattgtat taaacgctga ctggagtggg 1200
 tacagtggat ctttcatgga ctattgggct gaaggggact gctatcgagc gtgtttttat 1260
 gtggagtga tacgtggaag acccaaggaa gataaagtgt ggtggaccag caatagtata 1320
 gtatcgatgt gttccagtac agaattcctg ggacaatgga actggcctga tggggctaaa 1380
 atagagtact tcctctaa 1398

<210> 23

<211> 464

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 23

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

130	135	140
Ile His Asp Arg Ser Gln Tyr Arg Ala Leu Ile Ser Trp Pro Leu Ser		
145	150	155
Ser Pro Pro Thr Val Tyr Asn Ser Arg Val Glu Cys Ile Gly Trp Ser		
	165	170
Ser Thr Ser Cys His Asp Gly Lys Ser Arg Met Ser Ile Cys Ile Ser		
	180	185
Gly Pro Asn Asn Asn Ala Ser Ala Val Val Trp Tyr Asn Arg Arg Pro		
	195	200
Val Ala Glu Ile Asn Thr Trp Ala Arg Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu		
210	215	220
Ser Glu Cys Val Cys His Asn Gly Val Cys Pro Val Val Phe Thr Asp		
225	230	235
Gly Ser Ala Thr Gly Pro Ala Asp Thr Arg Ile Tyr Phe Lys Glu Gly		
	245	250
Lys Ile Leu Lys Trp Glu Ser Leu Thr Gly Thr Ala Lys His Ile Glu		
	260	265
Glu Cys Ser Cys Tyr Gly Glu Arg Thr Gly Ile Thr Cys Thr Cys Arg		
275	280	285
Asp Asn Trp Gln Gly Ser Asn Arg Pro Val Ile Gln Ile Asp Pro Val		
290	295	300
Ala Met Thr His Thr Ser Gln Tyr Ile Cys Ser Pro Val Leu Thr Asp		
305	310	315
Asn Pro Arg Pro Asn Asp Pro Asn Ile Gly Lys Cys Asn Asp Pro Tyr		
	325	330
Pro Gly Asn Asn Asn Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Leu Asp Gly		
	340	345
Ala Asn Thr Trp Leu Gly Arg Thr Ile Ser Thr Ala Ser Arg Ser Gly		
355	360	365
Tyr Glu Met Leu Lys Val Pro Asn Ala Leu Thr Asp Asp Arg Ser Lys		
370	375	380
Pro Ile Gln Gly Gln Thr Ile Val Leu Asn Ala Asp Trp Ser Gly Tyr		
385	390	395
Ser Gly Ser Phe Met Asp Tyr Trp Ala Glu Gly Asp Cys Tyr Arg Ala		
	405	410
Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Asp Lys Val		
	420	425
Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Ser Met Cys Ser Ser Thr Glu Phe		
435	440	445

Leu	Gly	Gln	Trp	Asn	Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Lys	Ile	Glu	Tyr	Phe	Leu	
	450					455					460					
<210>	24															
<211>	1683															
<212>	DNA															
<213>	流感病毒															
<400>	24															
atgaacactc	aaatcctggt	attcgctctg	attgcatca	ttccaacaaa	tgcaacaaa											60
atctgcctcg	gacatcatgc	tgtgtcaaac	ggaaccaaag	taaacacatt	aactgaaaga											120
ggagtggaaag	tctcaatgc	aactgaaaca	gtggaacgaa	caaacatccc	caggatctgc											180
tcaaaaagga	aaaggacagt	tgacctcggt	caatgtggac	tcttggggac	aatcactgga											240
ccacctcaat	gtgaccaatt	cctagaattt	tcagccgatt	taattattga	gaggcgagaa											300
ggaagtgatg	tctgttatcc	tgggaaattc	gtgaatgaag	aagctctgag	gcaaattctc											360
agagaatcag	gcggaattga	caaggaagca	atgggattca	catacagtgg	aataagaact											420
aatggagcaa	ccagttcatg	taggagatca	ggatcttcat	tctatgcaga	aatgaaatgg											480
ctcctgtcaa	acacagataa	tgctgcattc	ccgcagatga	ctaagtcata	taaaaataca											540
agaaaaaacc	cagctctaata	agtatggggg	atccatcatt	ccgatcaac	tgcaagcaa											600
accaagctat	atgggagtgg	aaacaaactg	gtgacagttg	ggagtcttaa	ttatcaacaa											660
tcttttgtag	cgagtcggg	agcgagaaca	caagttaatg	gtcaatctgg	aagaattgac											720
tttcattggc	taatgctaaa	tcccaatgat	acagtcactt	tcagtttcaa	tggggctttc											780
atagctccag	accgtgcaag	cttctgaga	ggaaaatcta	tgggaatcca	gagtggagta											840
caggttgatg	ccgattgtga	aggggactgc	tattatagtg	gagggacaat	aataagtaac											900
ttgccatttc	agaacataga	tagcagggca	gttgaaaat	gtccgagata	tgtaagcaa											960
aggagtctgc	tgctagcaac	agggatgaag	aatgttctctg	agattccaaa	gggaagaggc											1020
ctatttgggtg	ctatagcggg	tttcattgaa	aatggatggg	aaggcctaata	tgatggttgg											1080
tatggtttca	gacaccagaa	tgcaacaggga	gaggaactg	ctgcagatta	caaaagcact											1140
caatcggcaa	ttgatcaaat	aacaggaaaa	ttaaaccggc	ttatagaaaa	aaccaaccaa											1200
caatttgagt	tgatagacaa	tgaattcact	gaggtagaga	agcaaatcgg	taatgtgata											1260
aattggacca	gagattctat	aacagaagtg	tggtcataca	atgctgaact	cttggtagca											1320
atggagaacc	agcatacaat	tgatctggct	gattcagaaa	tggacaaact	gtacgaacga											1380
gtgaaaagac	agctgagaga	gaatgctgaa	gaagatggca	ctggttgctt	tgaaatattt											1440
cacaagtgtg	atgatgactg	tatggccagc	attagaaata	acacctatga	tcacagcaaa											1500
tacaggaag	aggcaatgca	aaatagaata	cagattgacc	cagtcaact	aagcagcggc											1560
tacaaagatg	tgatactttg	gtttagcttc	ggggcatcat	gtttcactact	tctagccatt											1620
gcaatgggcc	ttgtcttcat	atgtgtaaag	aatggaaaca	tgcggtgcac	tatttgtata											1680
taa																1683
<210>	25															
<211>	560															
<212>	PRT															

<213> 流感病毒

<400> 25

Met	Asn	Thr	Gln	Ile	Leu	Val	Phe	Ala	Leu	Ile	Ala	Ile	Ile	Pro	Thr
1				5					10					15	
Asn	Ala	Asp	Lys	Ile	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Ser	Asn	Gly	Thr
			20					25					30		
Lys	Val	Asn	Thr	Leu	Thr	Glu	Arg	Gly	Val	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Thr
			35					40					45		
Glu	Thr	Val	Glu	Arg	Thr	Asn	Ile	Pro	Arg	Ile	Cys	Ser	Lys	Gly	Lys
			50				55				60				
Arg	Thr	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Cys	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Ile	Thr	Gly
65					70					75					80
Pro	Pro	Gln	Cys	Asp	Gln	Phe	Leu	Glu	Phe	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Ile
					85				90						95
Glu	Arg	Arg	Glu	Gly	Ser	Asp	Val	Cys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Phe	Val	Asn
					100				105					110	
Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gln	Ile	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Ile	Asp	Lys
					115				120					125	
Glu	Ala	Met	Gly	Phe	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Arg	Thr	Asn	Gly	Ala	Thr
									130					135	
Ser	Ser	Cys	Arg	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ala	Glu	Met	Lys	Trp
145						150				155					160
Leu	Leu	Ser	Asn	Thr	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Gln	Met	Thr	Lys	Ser
						165				170					175
Tyr	Lys	Asn	Thr	Arg	Lys	Asn	Pro	Ala	Leu	Ile	Val	Trp	Gly	Ile	His
						180				185					190
His	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn
						195				200					205
Lys	Leu	Val	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Gln	Ser	Phe	Val	Pro
						210				215					220
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Thr	Gln	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Asp
225						230				235					240
Phe	His	Trp	Leu	Met	Leu	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Phe
						245				250					255
Asn	Gly	Ala	Phe	Ile	Ala	Pro	Asp	Arg	Ala	Ser	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys
						260				265					270
Ser	Met	Gly	Ile	Gln	Ser	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Ala	Asp	Cys	Glu	Gly
						275				280					285
Asp	Cys	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Phe	Gln

290	295	300
Asn Ile Asp Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln		
305	310	315
Arg Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro		
	325	330
Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly		
	340	345
Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala		
	355	360
Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Val Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile		
370	375	380
Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln		
385	390	395
Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile		
	405	410
Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Ile Thr Glu Val Trp Ser		
	420	425
Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp		
435	440	445
Leu Ala Asp Ser Glu Met Asp Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys Arg Gln		
450	455	460
Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe		
465	470	475
His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr		
	485	490
Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile		
	500	505
Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe		
	515	520
Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met Gly Leu		
	530	535
Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile		
545	550	555
		560

<210> 26

<211> 1398

<212> DNA

<213> 流感病毒

<400> 26

atgaatccaa atcagaagat tctatgcact tcagccactg ctatcataat aggcgcaatc

60

	85	90	95
Gly Lys Asp Asn Ala Val Arg Ile	Gly Glu Ser Ser Asp Val Leu Val		
	100	105	110
Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Glu Cys Arg Phe Tyr			
	115	120	125
Ala Leu Ser Gln Gly Thr Ile Ile Arg Gly Lys His Ser Asn Gly Thr			
	130	135	140
Ile His Asp Arg Ser Gln Tyr Arg Ala Leu Ile Ser Trp Pro Leu Ser			
145	150	155	160
Ser Pro Pro Thr Val Tyr Asn Ser Arg Val Glu Cys Ile Gly Trp Ser			
	165	170	175
Ser Thr Ser Cys His Asp Gly Lys Ser Arg Met Ser Ile Cys Ile Ser			
	180	185	190
Gly Pro Asn Asn Asn Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Asn Arg Arg Pro Val			
	195	200	205
Ala Glu Ile Asn Thr Trp Ala Arg Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu Ser			
	210	215	220
Glu Cys Val Cys His Asn Gly Val Cys Pro Trp Phe Thr Asp Gly Ser			
225	230	235	240
Ala Thr Gly Pro Ala Asp Thr Arg Ile Tyr Tyr Phe Lys Glu Gly Lys			
	245	250	255
Leu Lys Trp Glu Ser Leu Thr Gly Thr Ala Lys His Ile Glu Glu Cys			
	260	265	270
Ser Cys Tyr Gly Glu Arg Thr Gly Ile Thr Cys Thr Cys Lys Asp Asn			
	275	280	285
Trp Gln Gly Ser Asn Arg Pro Val Ile Gln Ile Asp Pro Val Ala Met			
	290	295	300
Thr His Thr Ser Gln Tyr Ile Cys Ser Pro Val Leu Thr Asp Asn Pro			
305	310	315	320
Arg Pro Asn Asp Pro Asn Ile Gly Lys Cys Asn Asp Pro Tyr Pro Gly			
	325	330	335
Asn Asn Asn Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Leu Asp Gly Ala Asn			
	340	345	350
Thr Trp Leu Gly Arg Thr Ile Ser Thr Ala Ser Arg Ser Gly Tyr Glu			
	355	360	365
Met Leu Lys Val Pro Asn Ala Leu Thr Asp Asp Arg Ser Lys Pro Ile			
	370	375	380
Gln Gly Gln Thr Ile Val Leu Asn Ala Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly			
385	390	395	400

Ser	Phe	Met	Asp	Tyr	Trp	Ala	Glu	Gly	Asp	Cys	Tyr	Arg	Ala	Cys	Phe
				405					410					415	
Tyr	Val	Glu	Leu	Ile	Arg	Gly	Arg	Pro	Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Trp	Trp
			420					425						430	
Thr	Ser	Asn	Ser	Ile	Val	Ser	Met	Cys	Ser	Ser	Thr	Glu	Phe	Leu	Gly
			435				440						445		
Gln	Trp	Asn	Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Lys	Ile	Glu	Tyr	Phe	Leu		
		450					455						460		

PR8(CAMBRIDGE)

PB2

AGCGAAAGCAGGTCAATTATTAATCAATATGGAAGAAATAAAGAACAATAAGAAATCTAATGTGCAGTCTCGCACCCGCGAGATA
 CTCACAAAACCACCGTGGCCATAATGACCATAATCAAGAAATACATCAGGAAGACAGGAGAAGAACCCAGCACTTAGGATG
 AAATGGATGATGGCAATGAAATATCCAATACAGCAGACAAGAGGATAACCGAAATGATTCCTGAGAGAAATGAGCAAGGACAA
 ACTTTATGGAGTAAATGAATGATGCCGATCAGACCGAGTATGATCACCTCTGGCTGTGACATGGTGAATAGGAATGGA
 CCAATGACAAATACAGTTCATATCCAAAATCTACAAAATATTTGAAAGAGTCAAGAGCTAAAGCATGGAACCTTTGGC
 CCTGTCCATTTAGAAACCAAGTCAAAATACGTCCGAGAGTTGACATAAATCCTGGTTCATGCAGATCTCAGTGCCAAAGGAGCA
 CAGGATGTAATCATGGAAGTTGTTTTCCCTAACGAAATGGGAGCCAGGATACTAACATCGGAATCGCAACTAACGATAACCAAA
 GAGAGAAAGAACTCCAGGATTCAAAATTTCTCCTTTGATGGTTGCATACATGTTGGAGAGAGAACTGGTCGCAAAAACG
 AGATTCCTCCAGTGGTGGAAACAGCAGTGTACATGAAAGTGTGCAATGATCAAGGAACTGCTGGAAACATGCTGGAAACAGATG
 TATACTCCAGGAGGGAAAGTGAAGATGATGATGTTGATCAAAAGCTTGATTTGCTGCTAGGAACTAGTGGAAAGAGCTGCA
 GTATCAGCAGACCCACTAGCATCTTTATGGAGATGTCACACAGCACAGATGGTGGAAATAGGATGGTAGACATCCTTAAG
 CAGAACCCAAACAGAAAGCAAGCCGTGGATATATGCAAGGCTGCAATGGGACTGAGAAATAGCTCATCCTTCAGTTTTGGTGGGA
 TTCACATTTAAGAGAAACAAGCGGATCATCAGTCAAGAGAGAGGAAAGGTTACGGCAATCTTCAAAACATTTGAAGATAAGA
 GTGCATGAGGGA TCTGAAGAGTTCA CAATGGTTGGGAGAGAGCAACAGCCATCTCAGAAAAGCAACAGGAGATTTGATTCAG
 CTGATAGTGGTGGGAGAGCGAACAGTCGATTCGCGAAGCAATAATTTGGCCATGGTATTTTCAAGAGGATTTGTATGATA
 AAAGCAGTTAGAGGTGATCTGAAATTCGTCATAGGGCGAATCAGCGACTGAACTCTATGCATCAACTTTAAGACATTTTCAG
 AAGGATGGAAAGTGCTTTTTCAAAATGGGGAGTTGAACCTATCGACAATGGTGGAAATGATGGGATATTGCCCGACATG
 ACTCCAAGCATCGAGATGTCATGAGAGGAGTGAAGATCAGCAAAATGGGTGATGATGAGTACTCCAGCACGGAGAGGGTATGTG
 GTGAGCATTGACCGGTTCTTGAGAGTCAGGGACCAACGAGGAAATGTACTGTCTCCCGAGGAGGTGAGTGAACACACAGGGA
 ACAGAGAACTGACAAATACTTACTCATCGTCAATGATGGGAGATTAATGGTCTGAAATCAGTGTGGTCAATACCTATCAA
 TGGATCATCAGAAACTGGGAACTGTTAAAATTCAGTGGTCCAGAACCTACAAATGCTATACAAATAAAAATGGAATTTGAAACCA
 TTTCACTTTAGTACCTAAGGCCATTAGAGGCCAATACAGTGGTTTTGTAAGAACTCTGTTCCAAACAAATGAGGGATGTGCTT
 GGGACATTTGATACCGCACAGATAATAAACTTCTTCCCTTCGAGCCGCTCCACAAAGCAAAGTAGAAATGCAGTTCTCCTCA
 TTTACTGTGAATGTGAGGGATCAGGAATGAGAAATACTGTAAAGGGCAATCTCCTGTATTTCAACTACAAACAAAGGCCACGAG
 AGACTCACAGTTCTCGAAAGGATGCTGGCACTTTAAACGAAACCCAGATGAAGGCACAGCTGGAGTGGATCCGCTGTTCTG
 AGGGGATTCCTCATCTGGCAAGAAAGACAGGAGATATGGGCCAGCATTAAGCATCAATGAATGAGCAACCTTGGCAAGGA
 GAGAAAGGCTAATGTGCTAATGGGCAAGGAGACGTGGTGTGGTAAATGAAACGAAAACGGGACTTAGCATACTACTGACAGC
 CAGACAGCGACCAAAAGAAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATAGTTTAAAAACGGACCTTGTCTTACT

(SEQ ID NO:11)

图1A

PR8(CAMBRIDGE)

PB1

AGCGAAAGCAGGCAAAACCAATTTGAAATGGATGTCAATCCGACCTTACTTTCTTAAAAGTCCAGCAAAAATGCTATAAGCACA
ACTTTCCCTTATACCGGAGACCTCTTACAGCCATGGGACAGGAAACAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGACACATCAG
TACTCAGAAAAGGGAAGATGGACAAACACCGAAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGCCACTGCCAGAAGAC
AATGAACCAAGTGGTTATGCCAAAACAGATTTGTATTTGGAAGCAATGGCTTCTTGGGAATCCCATCTGGTATTTTTGAA
AACTCGTGTATTGAAACGATGGAGTTTTCAGCAAAACACGAGTAGACAAGCTGACAAAGCCGACAGACCTATGACTGGACT
TTAAATAGAAAACGACCTGCTGCAACAGCAATGGCCAAACACATAGAAAGTGTTCAGATCAAAATGGCCCTCACGGCCAAATGAGTCA
GGAAGGCTCATAGACTTCTTAAGGATGTAATGGAGTCAATGAAAAGAAAGAAATGGGATCACAACTCATTTTTCAGAGAAAAG
AGACGGGTGAGAGACAAATGACTAAGAAAATGATAACACAGAGAAACAATAGGTAAAAGGAAAACAGAGATTGAACAAAAGGGGT
TATCTAATTAGAGCATTGACCCTGAACACAATGACCAAAGTCTGAGAGGGAAAGCTAAAACGGAGAGCAATGGCAATCCAAACCCCA
GGGATGCAAAATAGGGGTTTGTATACTTTGTGAGACACTGGCAAGGAGTATATGTGAGAAAATTTGAGAAAATCAACAATCAAGGTTGCCA
GTTGGAGGCAATGAGAAGAAAGCAAAGTTGGCAATGTTGTAAGAAAGATGATGACCAATTTCTCAGGACACCGAACTTTCTTTTC
ACCATCACTGGAGATAACACCAAAATGGAACGAAAATCAGAACTCTCGGATGTTTTGGCCATGATCACATAATGACCAAGAAAT
CAGCCGAAATGGTTCAGAAATGTTCTAAGTATGCTCCAATAATGTTCTCAAAACAAAATGGCGAGACTGGGAAAAGGGTATATG
TTTGAGAGCAAGAGTATGAAAACCTTAGAACTCAAATACCTGCAGAAAATGCTAGCAAGCATTGATTTGAAAATATTTCAATGATTTCA
ACAAGAAAAGAGATTGAAAATAATCCGACCGCTCTTAATAGAGGGGACTGCATCATTTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCC
AATATGTTAAGCACTGATTAAGGCGTCTCCATCCTGAACTTTGGACAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGTTGGTGGGATGGT
CTTCAATCCTCTGACGATTTTGCTCTGATTTGTGAATGCAACCAATCATGAAGGATTCAGCCGGAGTTCGACAGGTTTTTATCGA
ACCTGTAAGCTACTTGGAAATCAATATGAGCAAGAAAAGTCTTACATAAACAGAAACAGGTACATTTGAATCACAAATTTTTTC
TATCGTTATGGGTTTTGTTGCCAATTTCCAGTATGGGCTTCCAGTATGGGATCAACGAGTCAAGGACATGAGT
ATTGGAGTTACTGTCACTAAAACCAATATGATAAACCAATGATCTTGGTCCAGCAACAGCTCAAAATGGCCCTTCAGTTGTTCAATC
AAAGATTAACAGGTACACGTACCGATGCCATAGAGGTGACACAAAATACAAAACCCGAAAGATCATTTGAAAATAAAAGAACTGTGG
GAGCAAAACCGTTCCAAAGCTGGACTGCTGGTCTCCGACGGAGGCCAAAATTTATACAACTTAGAAAATCTCCACATTCCTGAA
GTCTGCCATAAAATGGGAATGATGGATGAGGATACCGAGGGCGTTATGCAACCCACTGAACCCATTTGTGAGCCATAAAGAA
ATTGAATCAATGAACCAATGCAGTATGATGCCAGCAGTGTCCAGCCAAAACATGGAGTATGATGCTGTTGCAACCAACAC
TCTGGATCCCAAAAAGAAAATCGATCCATCTTGAATACAAGTCAAAGAGGAGTACTTGAAGATGAAACAAAATGTACCAAAAGGTGC
TGCAATTTTATTTGAAAATAATCTTCCAGCAGTTTCAACAGAAAGACAGTCCGGATATCCAGTATGGTGGAGGCTATGGTTCC
AGAGCCCGAATTTGATGCACGGATTTGATTTGCAATCTGGAAAGGATAAAGAAAAGAGATTCACCTGAGATCATGAAGATCTGTTCC
ACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTTAGCTTTGTCCTTCATGAAAATAATGCCTTGTCTTCTACT

(SEQ ID NO:10)

图1B

PA
 PR8(CAMBRIDGE)
 AGCGAAAGCAGGTACTGATTCAAAATGGAAGATTTGTGGGACAATGCTTCAATCCGATGATGTCGAGCTTGGGAAAAACA
 ATGAAAAGAGTATGGGAGGACCTGAAAATCGAAAACAAATTTGCGCAATATGCACTCACTGGAAATGCTTCATGTAT
 TCAGATTTCCACTTCATCAATGAGCAAGGCGAGTCAATACTGTAGAACTTTGGTATCCTAATGCACCTTTGAAGCACAGATTT
 GAAATAATCGAGGGAAGAGATCGCAAAATGGCTGGACAGTAAACAGTATTTGCAACACTACAGGGCTGAGAAACCAAAG
 TTTCTACCAGATTTGTATGATTACAAGGAAAATAGATTCATCSAAATGGAGTAAACAAGGAGAGAAAGTTCCACATATACTATCTG
 GAAAAGGCCAATAAAAATTAATCTGAGAAAACACATCCACATTTCTCGTTCACTGGGGAAGAAAATGGCCAAGGGCCGAC
 TACACTCTCGATGAAGAAAGCAGGGCTAGGATCAAAACAGGCTATTCACCATAGAGCAAGAAAATGGCCAGCAGAGGCCCTCTGG
 GATTCCTTTTCGTCACTCCGAGAGAGGAGAGAGACAAATTAAGAAAAGGTTTGAATCACAGGAAACAAATGGCCGAAAGCTTGGCCGAC
 CAAAGTCTCCCGCCGAACCTTCTCCAGCCTTGAAAATTTAGAGCCTATGTGGATGGATCGAATCGAACCGAACTGCTAGAGGGC
 AAGCTGTCTCAAATGTCAAAGAAGTAAATGCTAGAATTAACCTTTTTGAAAAACAACACACGACCACTTAGACTTCCGAAT
 GGGCCTCCCTGTTCTCAGCGGTCCAAAATCCTGCTGATGGATGCTTAAAATTAAGCATTGAGGACCCCAAGTCAATGAGGAGAG
 GGAAACCGCTATATGATGCAATCAAATGCATGAGAACTTTCTTGGATGGAAGGAAACCAATGTTGTTAAACCAACAGAAAAG
 GGAATAAATCCAAAATTTCTCTGTCAATGGAAGCAAGTACTGGCAGAACTGCAGGACATTTGAGAAATGAGGAGAAAATTTCAAAG
 ACTAAAATAATGAAAATAAACAAGTCAGTAAAGTGGCACCTGGTGAACAATGGCCACAGAAAAGGTAGACTTTGACCACTGT
 AAAGATGATAGTGAATTTGAAGCAATATGATAGTGAACCAAGATTTGAGGTCGCTTGCAGATTTGGATTCAGAAATGAGTTCAAC
 AAGGCATGCGAACTGACAGATTCAGGCTGGATAGAGCTTGATGAGATGGAGAAGATGTGGCTCCAAATGAAACACATTTGCAAGC
 ATGAGAAAGGAATTTATTCATCAGAGGTGCTCACTGCAAGCCACAGAAATACATAATGAAGGGGGTGTACATCAATACTGCCC
 TTACTTAAATGCATCTTGTGCAGCAATGGATGATTTCCAATTAATCCAATGATAAGCAAGTGTAGAACTAAGGGGGAAGGCGA
 AAGCCAACTTGTATGGTTTCATCATAAAAGGAAGTCCCACTTAAGGAAATGACACCGACGTGGTAAACCTTTGTGAGCATGGAG
 TTTTCTCTCACTGACCCAAAGCTTGAACCAACAAATGGGAAAGTACTGTGTTCTTGGATAGGATAGGATATGCTTCTAAGAAAT
 GCCATAGCCAGGTTTCAAGGCCCAATGTTCTTGTATGTGAGGACAAATGGAACCTCAAAAATTAATAAGAAATGGGAAATGGAG
 ATGAGGCGTTGTCTCTCCAGTCACTTCAACAAATGAGAGTATGATGAAGCTGAGTCTCCAAAGGAGTGGGAAAGTTCCATTTGGGAAAGT
 AAAGAGTCTTTGAGAACAAATCAGAAACATGGCCCATGGAGAGTCTCCAAAGGAGTGGGAAAGTTCCATTTGGGAAAGTCT
 TGCAGGACTTTATTAGCAAAAGTCGGTATTTAACAGCTTGTATGCACTCCCAAACTAGAAGGATTTTCAGCTGAAATCAAAGAAAA
 CTGCTTCTTATCGTTCAAGGCTTTAGGGACAATCTGGAACCTTGGACCTTTGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATTTGAGGAG
 TGCCCTAATTAATCCCTGGGTTTGGCTTAAATGCTTCTTGGTTCAACTCCTTACACATGCATGATGATGATGTTGTTGGCAG
 TGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTCTACT

(SEQ ID NO:12)

图1C

NP
 PR8(CAMBRIDGE)
 AGCAAA GCAGGG TAGATAA TCACTCAGTGAGTACATCAAAA TCATGGCGTCCCAA GGCCAAACGGTCTTACGAA CAGATG
 GAGACTGATGGAGAACGCCAGAA TGCCACTGAAATCAGAGCATCCGTGGAAAATGATGGTGGAA TTGGACGATTCATACATC
 CAAATGTGCACAGAACTTAAACTCAGTGATTAAGGGACGGTTGATCCAAAACAGCTTAA CAATAGAGAGAAATGGTGTCTCT
 GCTTTTGACGAAAGGAGAAATAATACCTGGAAAGACATCCCAGTGGGGGAAAGATCCTAAGAAA ACTGGAGGACCTATA TAC
 AGAAGATAAACGGAAAGTGGATGAGAACTCATCCCTTATGACAAAGAAATAAGCCGAATCTGGCCCAAGCTAATAAT
 GGTGACGATGCAACGGCTGGTCTGACTCAGATGATCTGGCATCCCAATTTGAAATGATGCAACTTATCAGAGGACAAAGGCT
 CTTGTCGCACCCGGAATGGATCCAGGATGTGCTCTGTATGCAAGGTTCAACTCTCCCTAGGAGGCTGGAGCCGACGGTGTCT
 GCAGTCAAAGGAGTTGGAA CAATGGTGTGATGGAA TTGGTCAGGATGATCAAA CGTGGGATCAATGATCGGAACTTCTGGAGGGGT
 GAGAA TGGACGAAAACAAGAA TTGCTTATGAAAGAAATGTGCAACATCTCAAAGGGAATTTCAA ACTGTGCACAAAAGCA
 ATGATGGATCAAGT GAGAGAGAGCCGGAACCCAGGAAATGCTGAGTTCGAAAGATCTCACTTTCTAGCACGGTCTGCACTCATA
 TTGAGAGGGTCGGTTGCTCAAA GTCTGCTGCTGTGTATGGA CCTGCCGTAGCCGTAGCCAGTGGTACGACTTTGAAAGA
 GAGGGATACTCTCTAGTCGGAATAGACCCCTTCAGACTGCTTCAAACAGCCAAAGTGCAGCC TAAATCAGACCAATGAGAAT
 CCAGCACACAAGAGTCAACTGGTGTGGATGGCATGCCATCTGCCGCATTTGAAGATCTAAGAGTATGAGCTTCAATCAAAGGG
 ACGAAGGTGGTCCCAAGAGGGAAGCTTCCACTAGAGGAGTCAAATGGCTTCAAATGAAAATATGGAGACTATGGAATCAAGT
 ACACTTGA ACTGAGAAGCAGGTACTGGGCCATAAGGACCAGAA GTGGAGGAAAACACCAATCAAACAGAGGGCATCTGGGGCCAA
 ATCAGCATACAACCTACGTTCTCAGTACAGAAATCTCCCTTTT GACAGAA CAACCCGTTATGGCAGCATTCAC TGGGAATACA
 GAGGGAGAACATCTGACATGAGGACCGAAATCATAGGATGATGAAAGTCAAAGCCAGAAAGATGTGCTTTCCAGGGGCGG
 GGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAGCCGATCGTGCC TCCCTTTGACATGAGTAAATGAAGGATCTTATTTCTTC
 GGAGACAAATGCAGAGGAGTACGACAAATTAAGAAAAATACCCCTTGTTC TACT

(SEQ ID NO:13)

图1D

PR8(CAMBRIDGE)

M

AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAAGATGAGTCTTAAACCGAGTGGAAACGTAGCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCT
CAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTTGACGGGAAGAACCCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGAC
AAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTTCACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGGAGACTGCABCG
TAGACGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGATCCAAAATAACATGGACAAGCAGTTAAACTGTATAGGAAGCTCAA
GAGGAGATAACATTTCCATGGGCCAAAAGAAATCTCACTCAGTTATTCTGCTGGTGCACTTGCAGTTGTATGGGCTCATATA
CAACAGGATGGGGCTGTGACCCTGAACTGAACTGGCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTTGCTGACTCCAGCATCG
GTCTCATAGGCAAAATGGTGACAAACCAACCACTAATCAGACATGAGAACAGAAATGGTTTTAGCCAGCACATACAGCTAAGGC
TATGGAGCAAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGAGGCCCATGGAGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAAAATGGTCAAGCGGAT
GAGAACCATGGGACTCATCTAGCTCCAGTCTGAAATAATGATCTTCTGAAATAATGGCAGGCTTATCAGAAAACGAAAT
GGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATCTCTCGCTATTCGGCAAAATATCATTGGGATCTTGACATTTGATATTGGATTTC
TTGATCGCTTTTTTCAAATGCATTTAACCGTCCCTTAAATACGGAAGGAGGCGCTTCTACGGAAGGAGTGCCTAAAGT
CTATGAGGGAAAGAAATCGAAAAGGAAACAGCAGAGTGTGGATGCTGACGATGGTCAATTTTGTGTCAGCATAGAGCTGGAGTAAA
AAACTACCTTGTCTTACT

(SEQ ID NO:14)

NS

AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAGACATAATGGATCCAAAACACTGTGTCAAGCTTTTCCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCA
AACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGCA
GCATCTTTGGTCTGGACATCGAGACAGCCACACAGTGTGGAAGCAGATAGTGGAGGGATTTCTGAAAGAAAGAAATCCGATGAGG
CACTTAAAATGACCAATGGCTCTGTACCTGCGTCGGTTTACCTAACCGACATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGAAATGGTCCA
TGCTCATACCAAGCAGAAAAGTGGCAGGCCCTTTTGTATCAGAAATGGACCAAGGCGATCATGGATAAAAACATCATACTGAAAAG
CGAACTTCAGTGTATTTTGGACCGCTGGAGACTCTAATAATTTGCTAAGGGCTTCCCGAAGAGGGAGCAATTTGTTGGCGAAA
TTTCAACCATGGCTTCTTTCCAGGACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGA
ATGATAACACAGTTCGAGTCTTGAAACTCTACAGAGATTCGCTGGAGAAAGCAGTAATGAGAAATGGGAGACCTCCACTCACTC
CAAAAACAGAAACGAGAAATGGGGGAAACAATTAGGTGAGAAATTTGAAAGAAATGAGATGGTTGATTTGAAGAAAGTGAGACACAAA
CTGAAGGTAAACAGAGAAATAGTTTTGAGCAAAATAACATTTTCAAGGCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGA
ACTTTCATTTCAGCTTATTTAATAATAAAAAACACCCCTTGTCTACT

(SEQ ID NO:15)

图1E

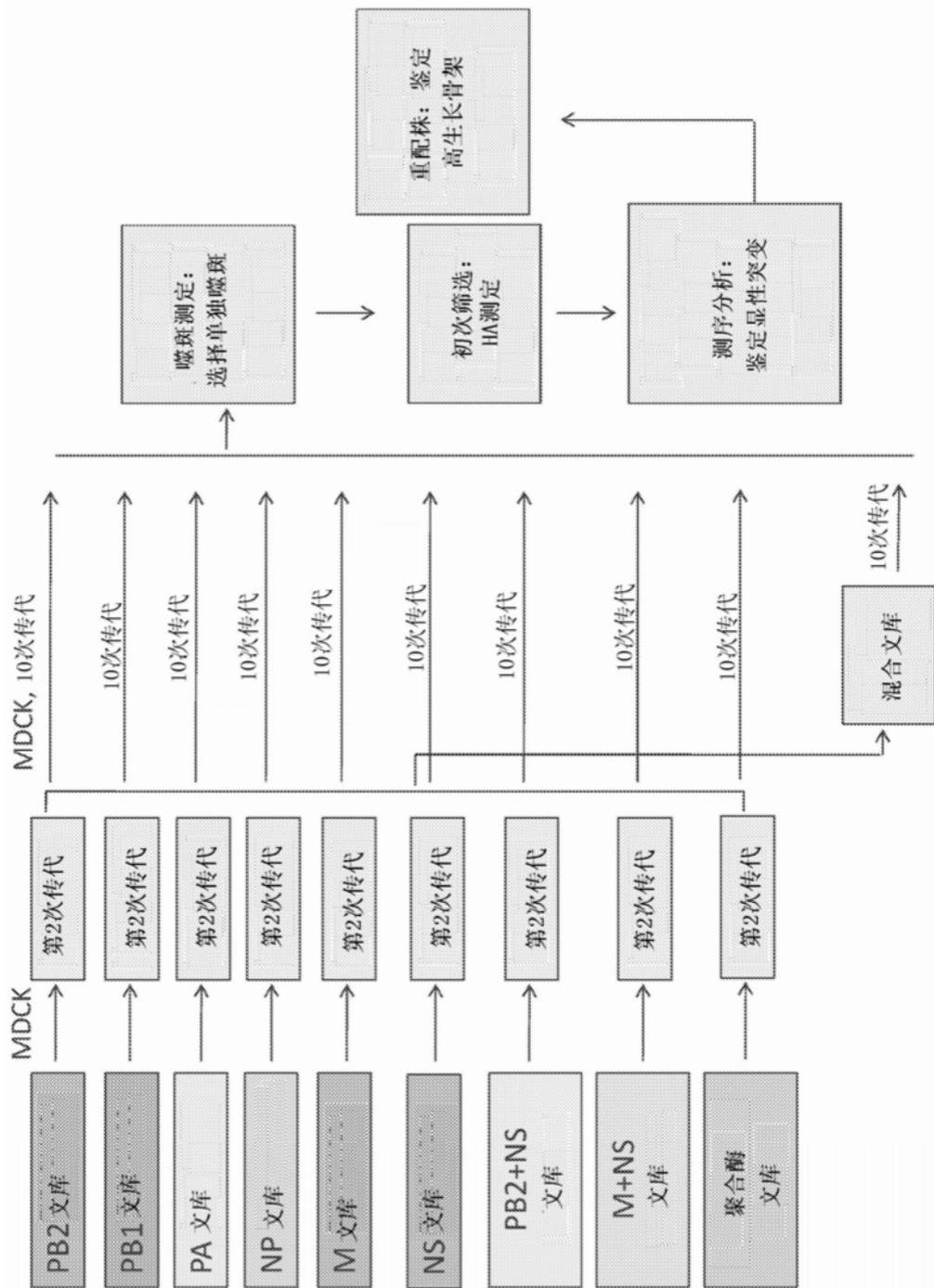


图2

1434个单独克隆的HA测定的总结

组	克隆数	倍数变化	%
WT HA 滴度 = 2^7	-	-	-
HA 滴度 = $2^{>9-9.5}$	8	>4	0.6%
HA 滴度 = $2^{>8.5-9}$	23	>2.8 - 4	1.6%
HA 滴度 = $2^{7-8.5}$	748	1 - 2.8	52.2%
HA 滴度 < 2^7	655	<1	45.6%
总计	1434	-	100%

图3

从显性突变中产生的重组病毒

病毒	基因骨架										病毒储液滴度	
	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	2 ⁿ	Pfu/ml		
WT			PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	NS	7	3.0E+07	
1			M202L F323L	M507V V644A		I116L			K55E	9~9.5	2.0E+08	
2			M202L F323L	Q247H	R401K				T49A	9	1.0E+08	
3	Indo/NC /09 delHA	Indo/NC /09 NA	I504V	M507V V644A	I550L	R74K N417D			K55E	8~8.5	5.7E+07	
4			I505V	E112G	I550L	R74K			S161T	9	1.6E+08	
5			M202L F323L	E112G					S161T	8.5	1.3E+08	
6			M66R	M40I G180W		R74K			S161T	8~8.5	2.3E+07	

图4

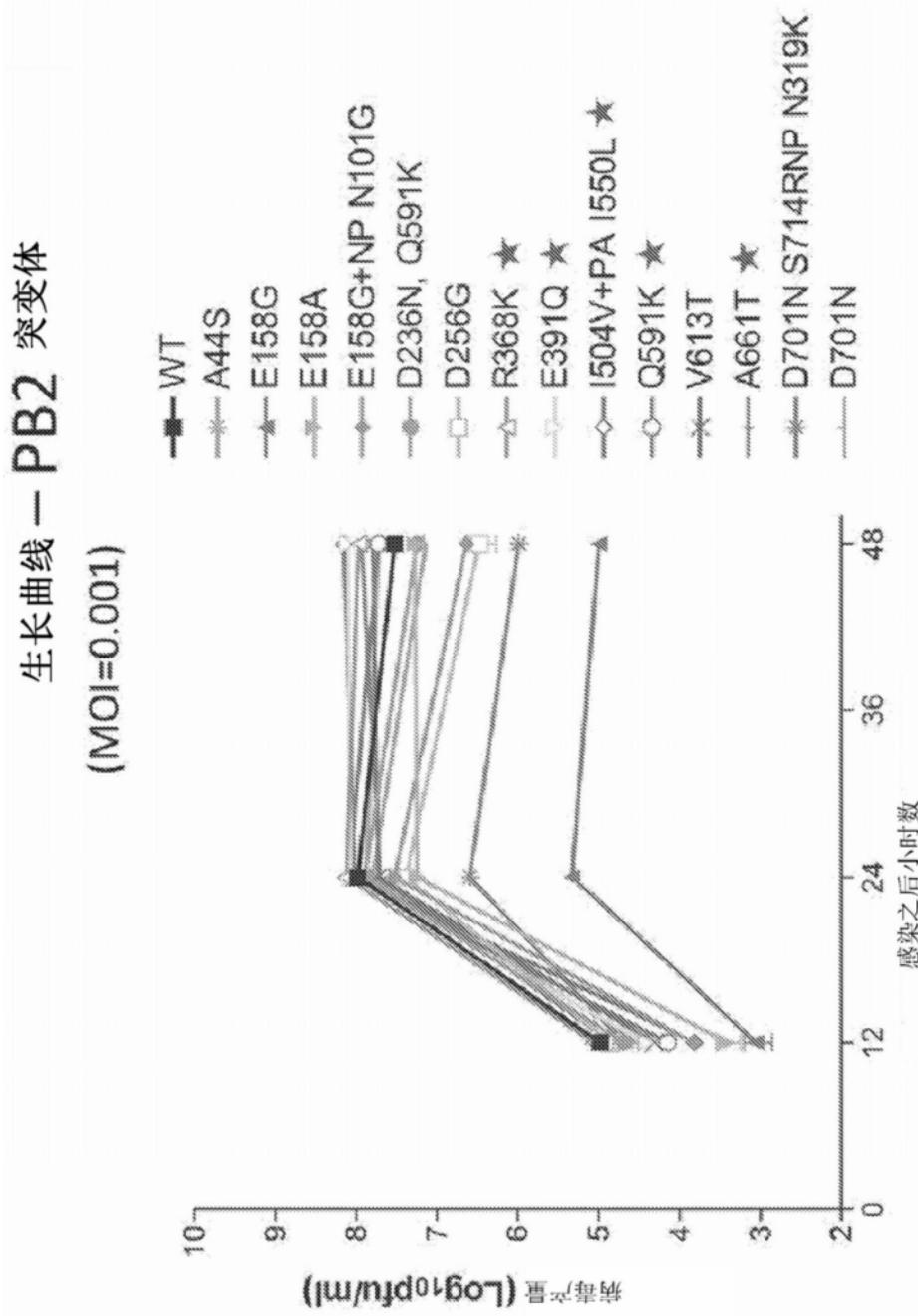


图5A

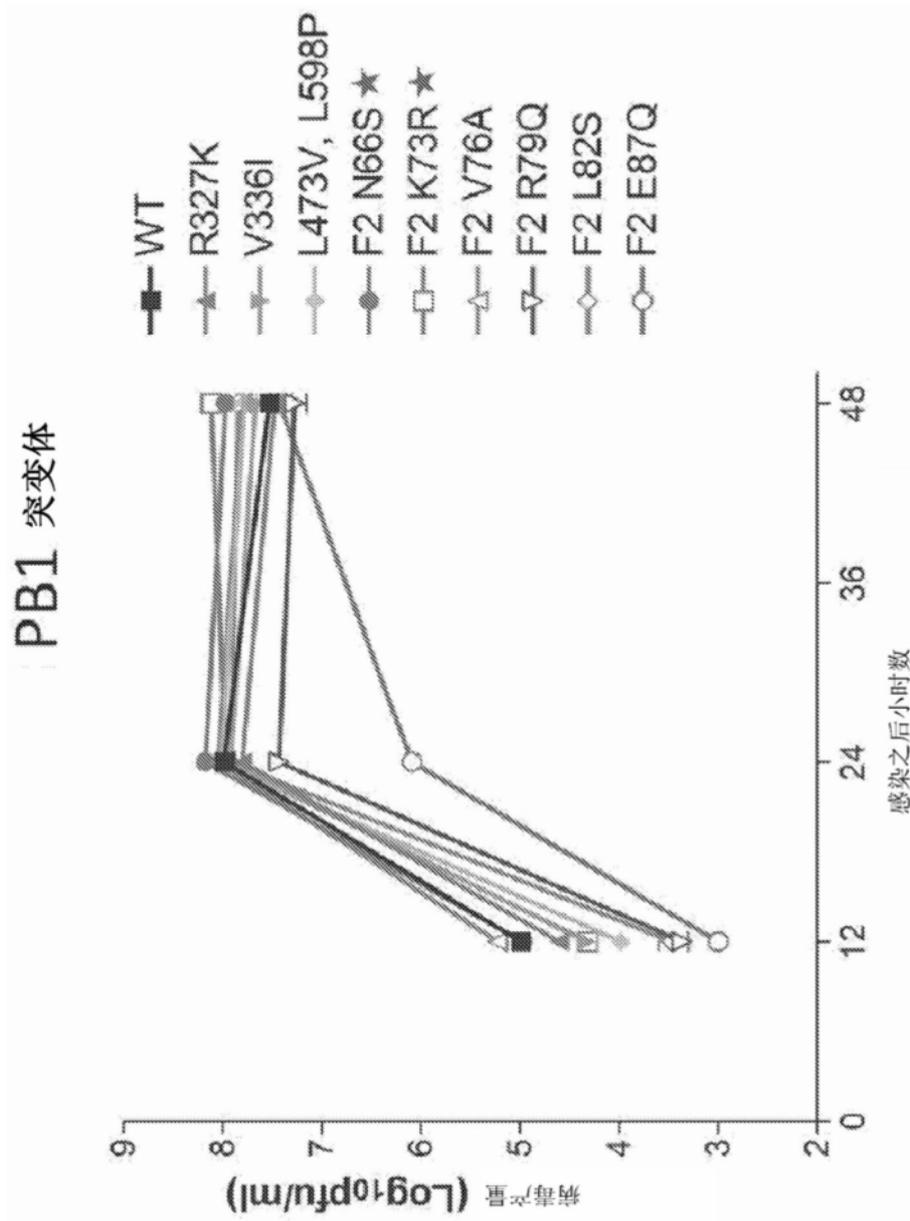


图5B

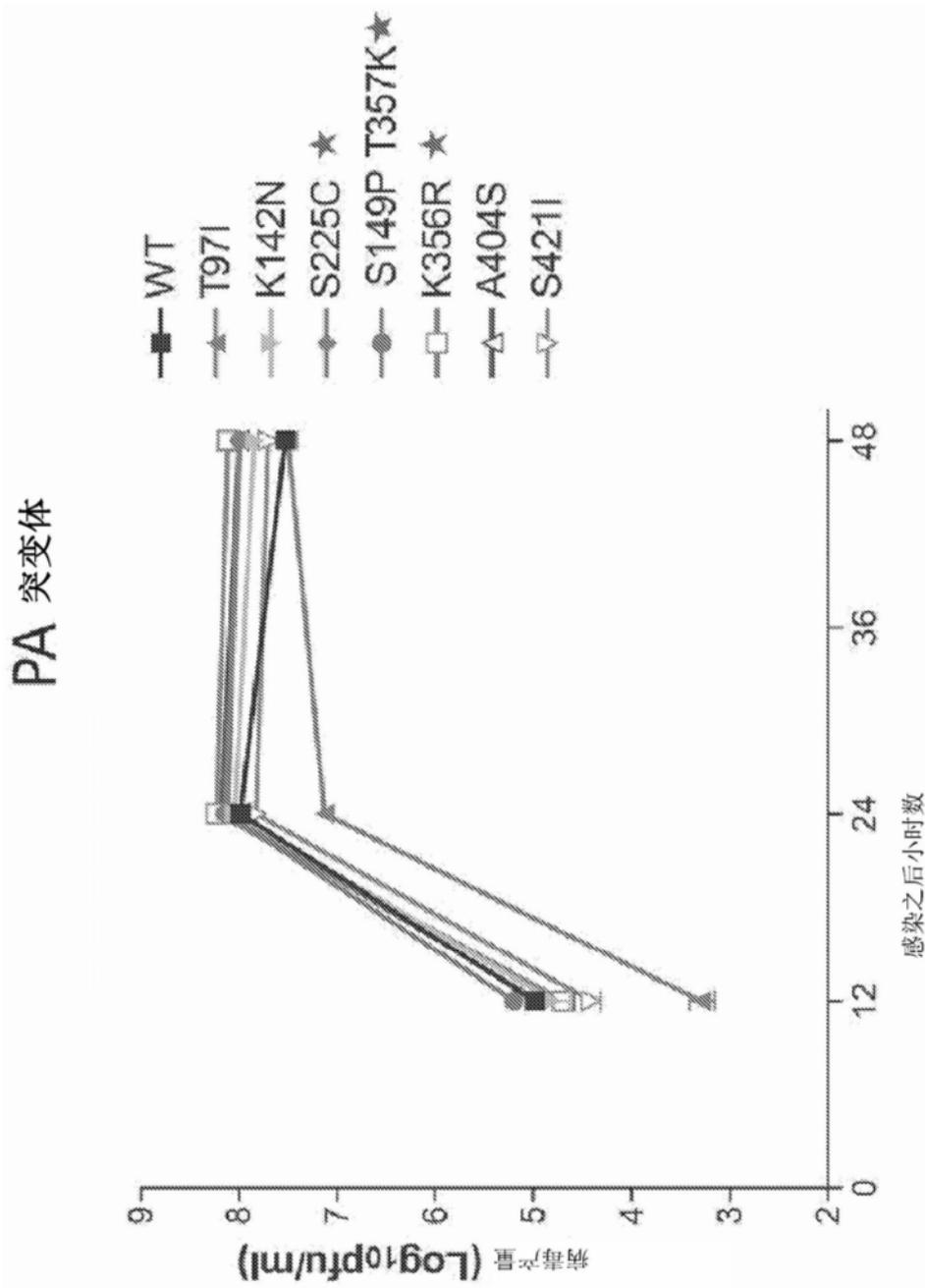


图5C

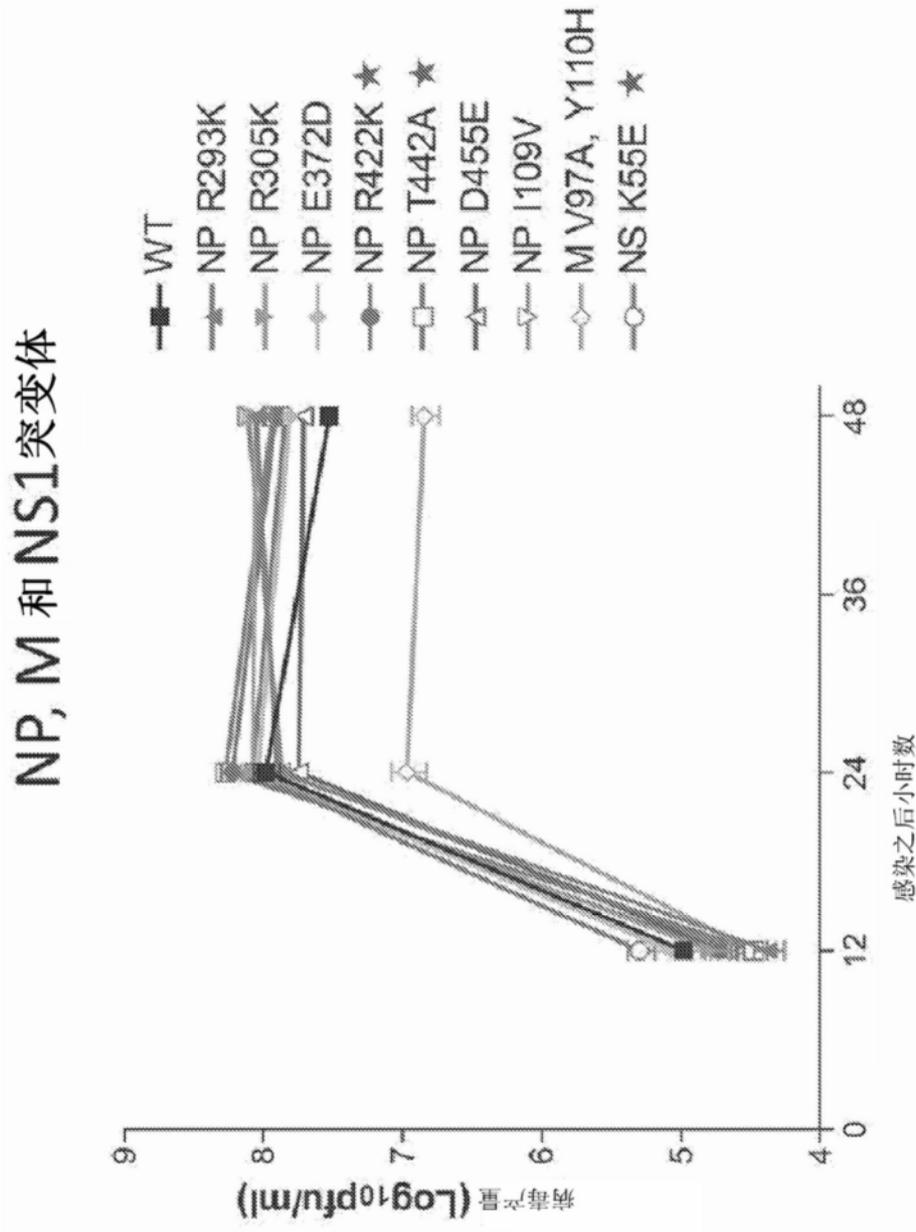


图5D

确定的高复制突变

基因	筛选自病毒文库	文献中描述
PB2	<u>M202L</u> , <u>F323L</u> , <u>I504V</u> , <u>M66R</u>	<u>A44S</u> , <u>E158G</u> , <u>E158A</u> , <u>D236N</u> , <u>D256G</u> , <u>R368K</u> , <u>E391Q</u> , <u>I504V</u> , <u>Q591K</u> , <u>V613T</u> , <u>A661T</u> , <u>D701N</u> , <u>D701N</u> <u>S714R</u>
PB1	<u>M507V</u> , <u>V644A</u> , <u>V644A</u> , <u>R54I</u> , <u>Q247H</u> , <u>E112G</u> , <u>M40I</u> , <u>G180W</u> , <u>I667T</u> , <u>M714T</u>	<u>R327K</u> , <u>V336I</u> , <u>L473V</u> <u>L598P</u>
PB1 F2	-	<u>N66S</u> , <u>K73R</u> , <u>V76A</u> , <u>R79Q</u> , <u>L82S</u> , <u>E87Q</u>
PA	<u>F105C</u> , <u>R401K</u>	<u>T97I</u> , <u>K142N</u> , <u>S225C</u> , <u>S149PP</u> <u>T357K</u> , <u>K356R</u> , <u>A404S</u> , <u>S421I</u>
NP	<u>R293M</u> , <u>I116L</u> , <u>N224I</u> , <u>R74K</u> , <u>R74K</u> , <u>N417D</u>	<u>R293K</u> , <u>R305K</u> , <u>E372D</u> , <u>R422K</u> , <u>T442A</u> , <u>D455E</u> , <u>I109V</u> , <u>N101G</u> , <u>N319K</u>
M	<u>P90S</u>	<u>V97A</u> , <u>Y100H</u> , <u>V97A</u> <u>Y100H</u>
NS	<u>A30P</u> , <u>T49A</u> , <u>R140Q</u> , <u>S161T</u> , <u>A223E</u>	<u>K55E</u>

图6

由RGS产生的重组病毒

病毒 #	基因骨架										病毒储液滴度	
	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	2 ⁿ	Pfu/ml		
wt			wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	7	3.0E+07
1			M202L F323L	M507V V644A		I116L		K55E			9~9.5	2.0E+08
4			M202L F323L	M507V V644A	K356R	T442A	V97A Y100H	K55E			10~10.5	1.6E+08
36	Indo/NC/09 delHA	Indo/NC/09 NA	I504V	E112G	I550L	I112L	Y100H	R140Q			9.5	1.3E+08
38			M202L F323L	M507V V644A		I116L	Y100H	K55E			10~10.5	2.3E+08
HY-#17			I504V	E112G	S225C	R74K N417D	V97A Y100H	K55E			9.5~10	5.8E+08
HY-#61			M202L F323L	Q247H	K142N	R74K	V97A Y100H	K55E			10~10.5	2.0E+08
HY-#26			M202L F323L	M40L G180W	S225C	R422K	V97A Y100H	K55E			10	3.0E+08

图7A

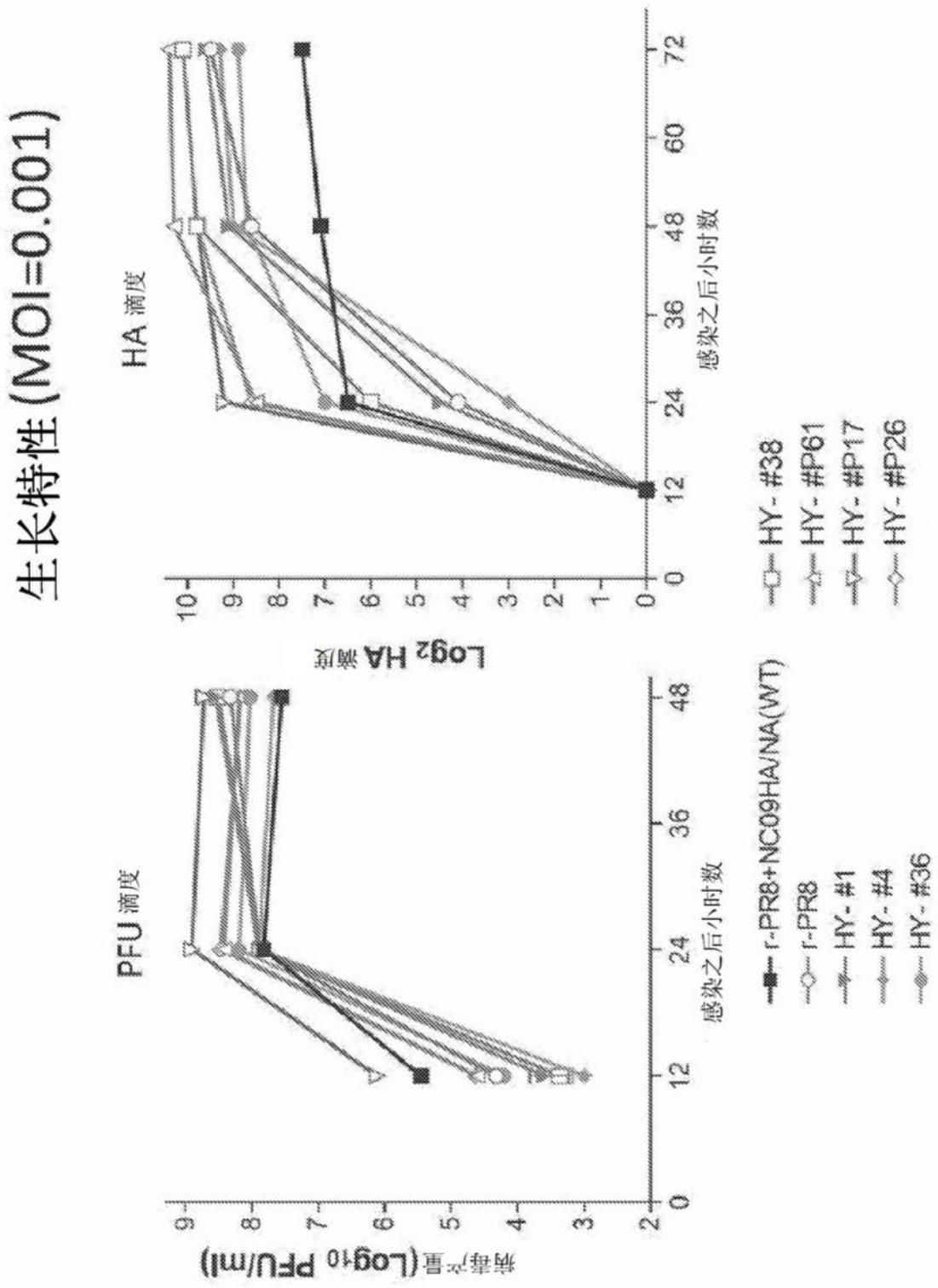
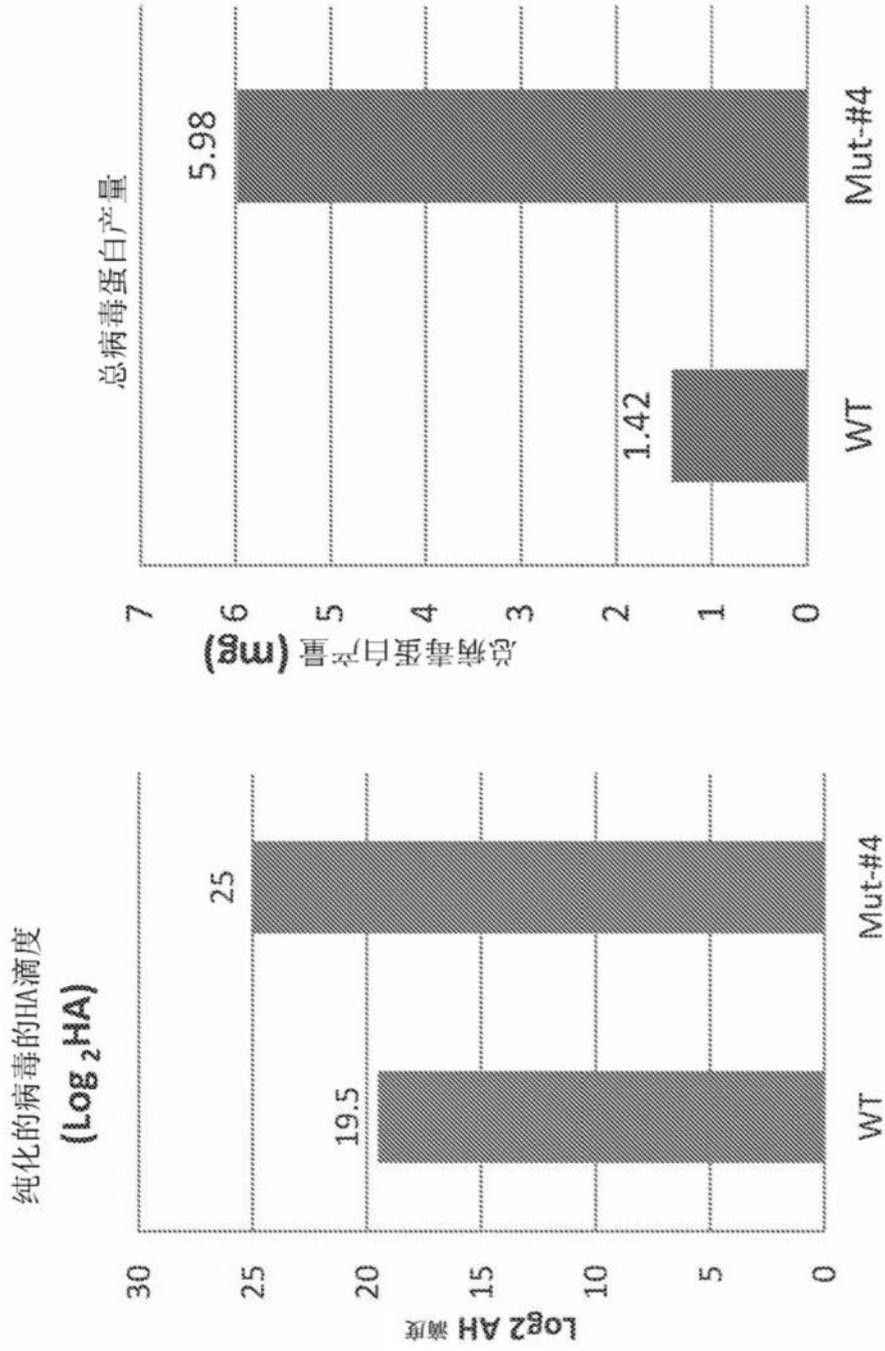


图7B



总病毒蛋白产量：4.2倍

图8A

图8B

野生型 VS. 突变体

#	基因骨架								病毒储液滴度	
	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS	HA 滴度 (2 ⁿ)	Pfu/ml
WT	Indo/NC/09 delHA	Indo/NC/09 NA	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	PR8-wt	7	3.0E+07
4			M202L F323L	M507V V644A	K356R	T442A	V97A Y100H	K55E	10~10.5	1.6E+08

图9A

生长动力学 (MOI=0.001)

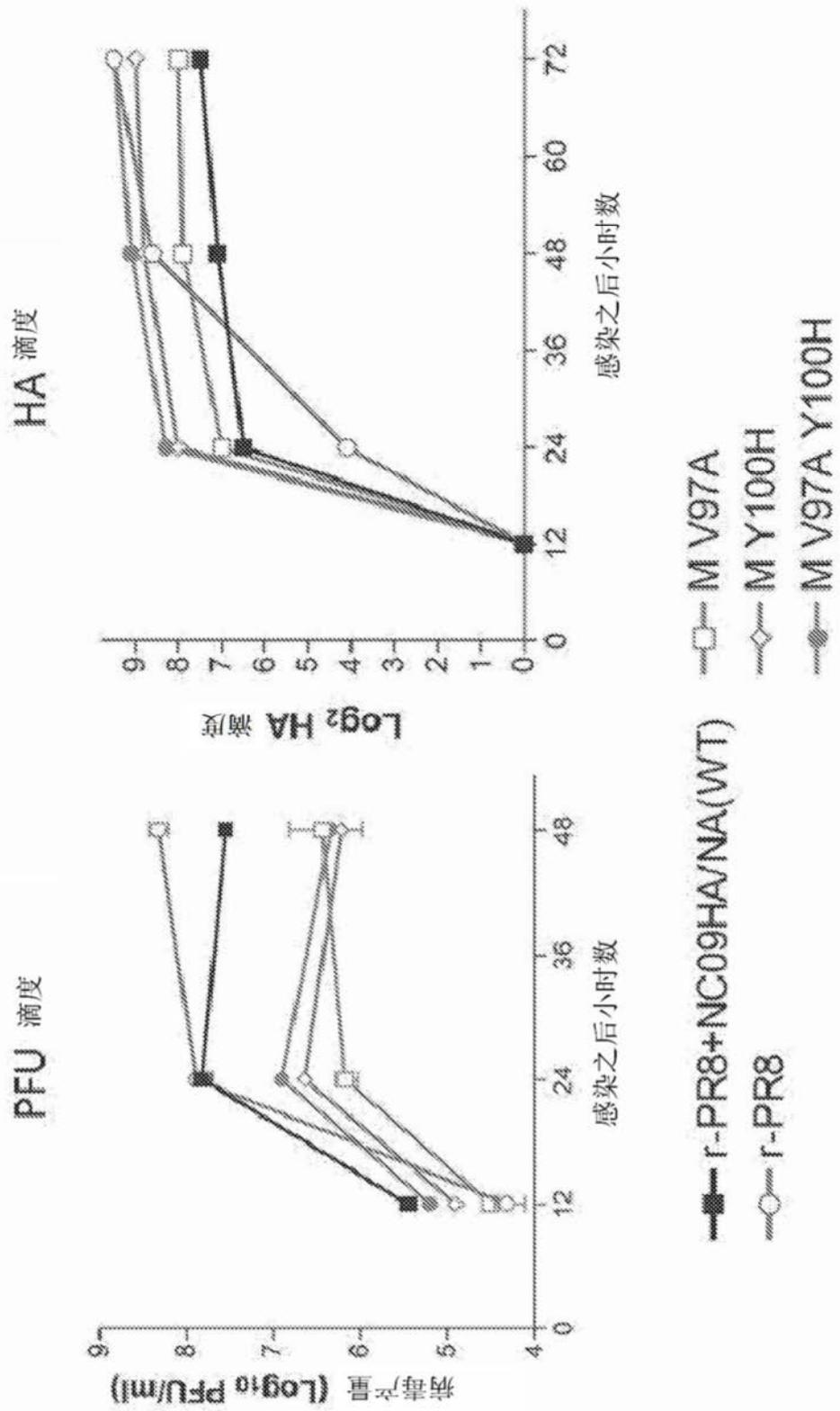


图9B

家犬[gbmam]: 1194 CDS's(559501密码子)

信息栏:[三联体][氨基酸][分数][频率:每千][[数目]]

UUU F 0.41 17.1 (9540)	UCU S 0.18 13.8 (7723)	UAU Y 0.40 11.5 (6456)	UGU C 0.42 10.1 (5665)
UUC F 0.59 24.4 (13671)	UCC S 0.24 18.4 (10299)	UAC Y 0.60 17.5 (9786)	UGC C 0.58 13.8 (7723)
UUA L 0.06 5.8 (3270)	UCA S 0.13 9.8 (5487)	UAA * 0.27 0.6 (325)	UGA * 0.53 1.1 (642)
UUG L 0.12 11.8 (6627)	UCG S 0.06 4.6 (2584)	UAG * 0.21 0.5 (254)	UGG W 1.00 13.8 (7704)
CUU L 0.12 11.7 (6523)	CCU P 0.27 15.6 (8713)	CAU H 0.39 9.0 (5039)	CGU R 0.07 3.9 (2163)
CUC L 0.22 21.8 (12224)	CCC P 0.35 20.4 (11422)	CAC H 0.61 14.1 (7888)	CGC R 0.20 10.6 (5943)
CUA L 0.06 6.5 (3644)	CCA P 0.25 14.6 (8157)	CAA Q 0.25 11.0 (6149)	CGA R 0.1 5.6 (3155)
CUG L 0.43 42.8 (23966)	CCG P 0.12 7.0 (3892)	CAG Q 0.75 32.6 (18244)	CGG R 0.21 11.0 (6132)
AUU I 0.32 15.5 (8662)	ACU T 0.22 12.3 (6886)	AAU N 0.43 16.5 (9253)	AGU S 0.14 10.8 (6029)
AUC I 0.53 25.7 (14391)	ACC T 0.39 21.4 (11979)	AAC N 0.57 21.6 (12104)	AGC S 0.25 18.9 (10595)
AUA I 0.15 7.2 (4017)	ACA T 0.26 14.2 (7972)	AAA K 0.40 22.2 (12410)	AGA R 0.20 10.5 (5847)
AUG M 1.00 22.7 (12717)	ACG T 0.13 7.2 (4005)	AAG K 0.60 33.9 (18967)	AGG R 0.21 11.1 (6228)
GUU V 0.14 9.3 (5189)	GCU A 0.25 17.2 (9609)	GAU D 0.43 19.7 (11012)	GGU G 0.16 11.3 (6298)
GUC V 0.27 17.2 (9607)	GCC A 0.44 30.3 (16927)	GAC D 0.57 26.2 (14655)	GGC G 0.35 24.2 (13513)
GUA V 0.10 6.5 (3660)	GCA A 0.20 13.7 (7651)	GAA E 0.40 26.4 (14776)	GGA G 0.24 16.9 (9465)
GUG V 0.48 31.0 (17366)	GCG A 0.11 7.9 (4431)	GAG E 0.60 40.3 (22552)	GGG G 0.25 17.4 (9718)

编码GC 53.16% 第1个字母GC 55.35% 第2个字母GC 41.92% 第3个字母GC 62.22%

遗传密码1: 标准

图10A

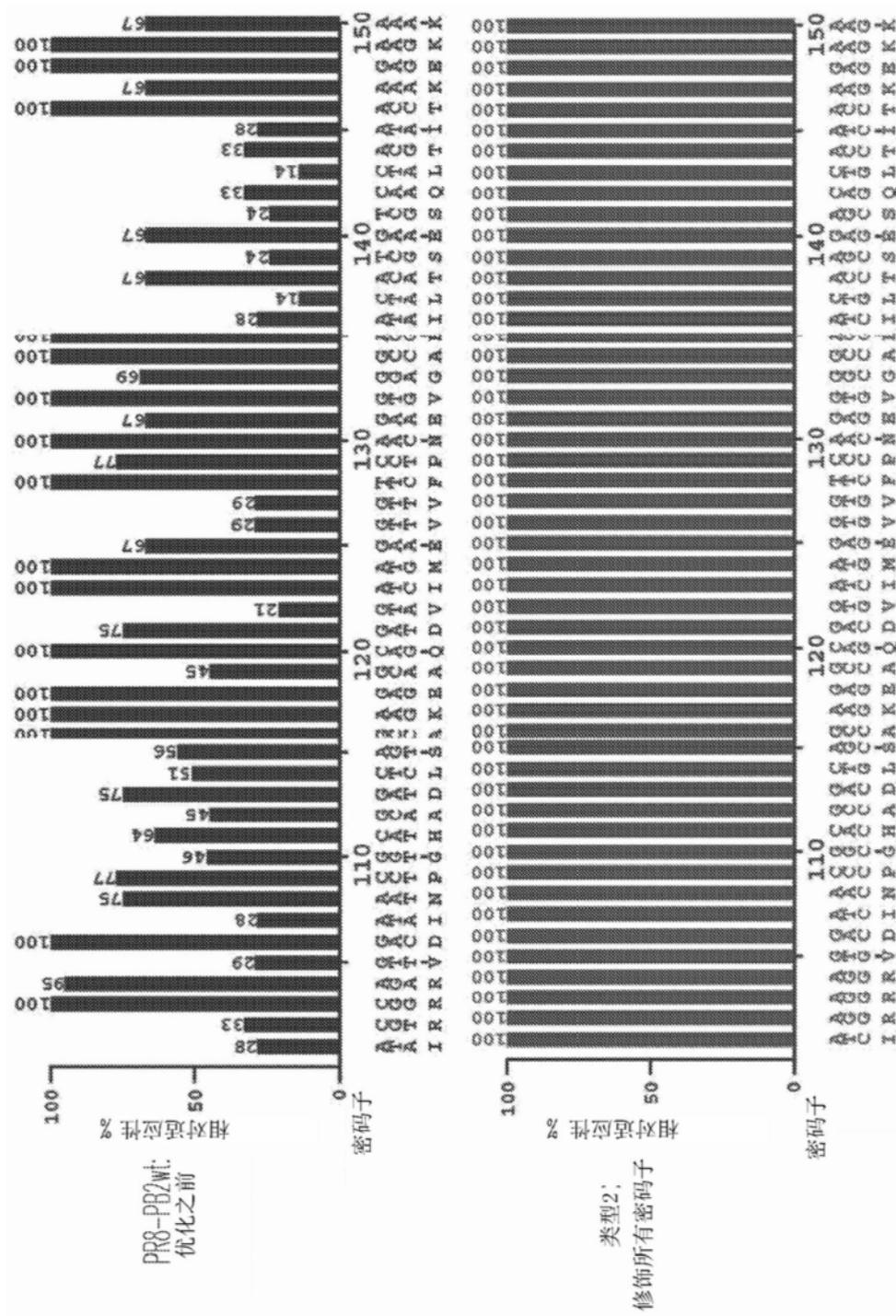


图10C

在MDCK细胞中的生长动力学

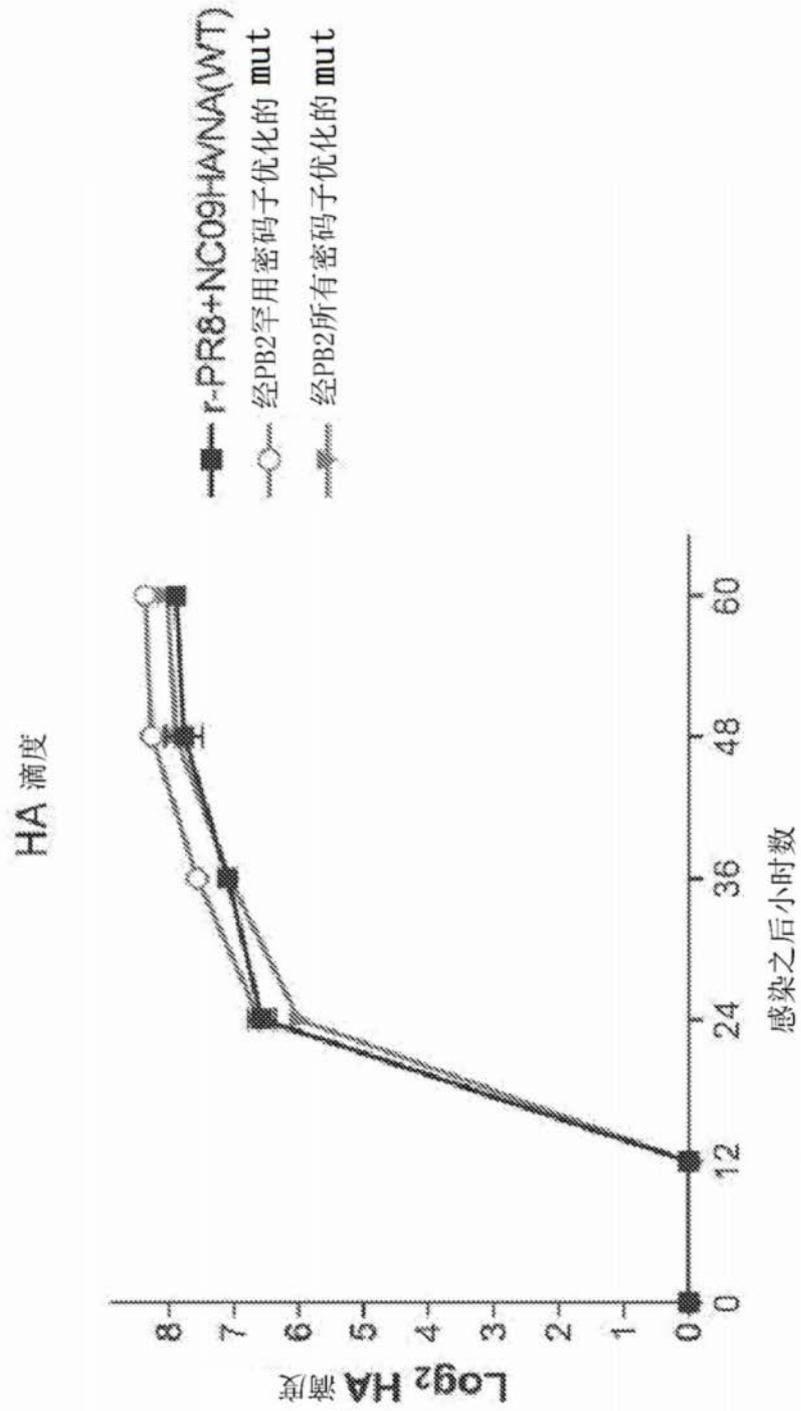


图10D

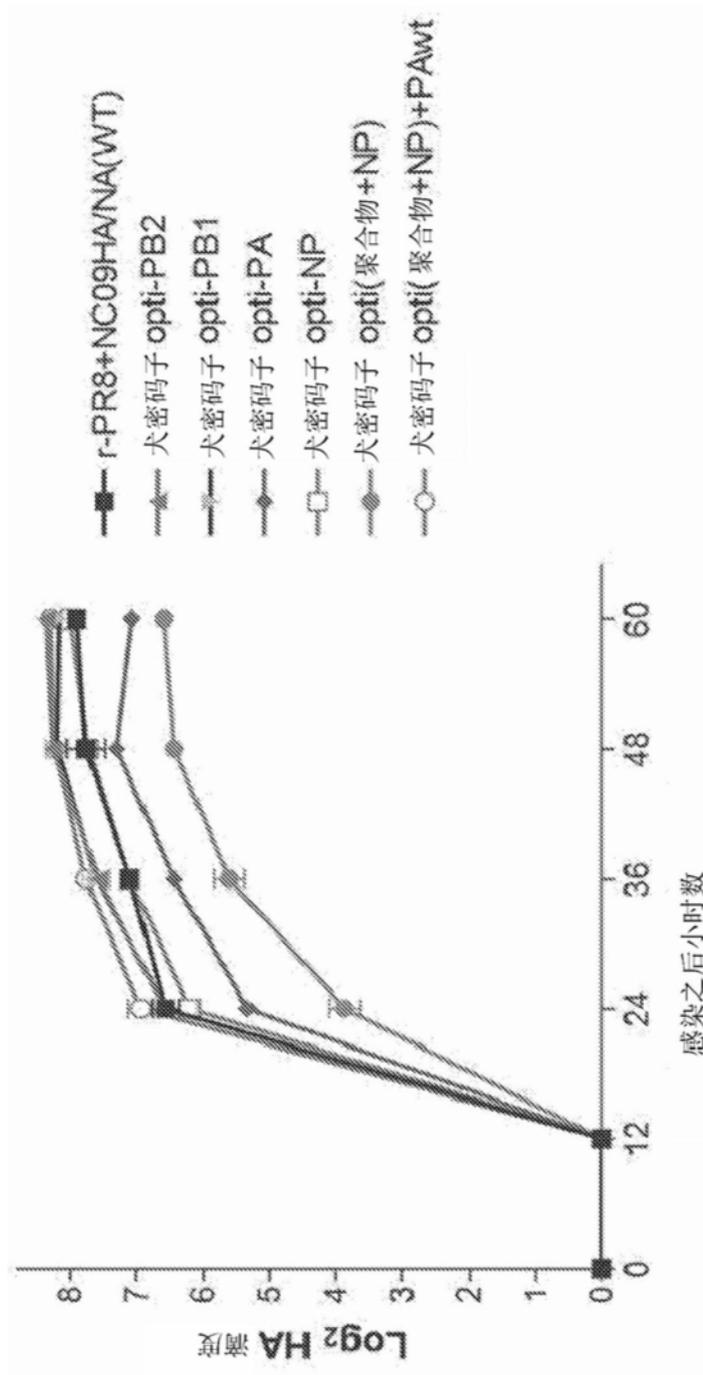


图10E

PR8-UW PB2:
AGCGAAAGCAGGTCAATTATATTC AATATG GAAAGAATAAAAGAACTACGAAATCTAATGTCGCAGTCTCGCACCCGCGA
GATACTCACAAAACCACCGTGGACCATATGGCCATAATCAAGAAGTACACATCAGGAAGACAGGAGAAGAACCAGCAC
TTAGGATGAAATGGATGATGGCAATGAAATATCCAATTACAGCAGACAAGAGGATAACGGAAATGATTCCTGAGAGAAAT
GAGCAAGGACAACTTTATGGAGTAAAATGAATGATGCCGATCAGACCGAGTGATGGTATCACCTCTGGCTGTGACATG
GTGGAAATAGGAATGGACCAATAACAAATACAGTTCATTATCCAAAATCTACAAAATTTATTTTGAAAGAGTCGAAAGGC
TAAAGCATGGAACTTTGGCCCTGTCCATTTAGAAAACCAAGTCAAAATACGTCGGAGAGTTGACATAAATCCTGGTCA
GCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTAATCATGGAAGTTGTTTTCCCTAACGAAGTGGGAGCCAGGATACTAAC
ATCGGAATCGCAACTAACGATAACCAAGAGAAGAAAGAAAGAACTCCAGGATGCAAAATTTCTCCTTTGATGGTTGCAT
ACATGTTGGAGAGAGAACTGGTCCGAAAACGAGATTCCTCCAGTGGCTGGTGGAAACAAGCAGTGTGTACATTTGAAGTG
TTGCAATTTGACTAAGGAACATGCTGGGAACAGATGTATACTCCAGGAGGGGAAGTGGGAATGATGATGTTGATCAAAG
CTTGATTATTGCTGCTAGGAACATAGTGAGAAGAGCTGCAGTATCAGCAGATCCACTAGCATCTTTATTGGAGATGTGCC
ACAGCACACAGATTTGGTGAATTAGGATGGTAGACATCCTTAGGCAGAACCCAACGAAAGAGCAAGCCGTGGATATATGC
AAGGCTGCAATGGGACTGAGAATTAGCTCATCTTCAGTTTTGGTGGATTCACTTTAAGAGAACAAGCGGATCATCAGT
CAAGAGAGAGGAAGAGGTGCTTACGGCAATCTTCAAACATTGAAGATAAGAGTGCATGAGGGATATGAAGAGTTACAA
TGTTGGGAGAAGAGCAACAGCCATACTCAGAAAAGCAACCAGGAGATTGATTGAGCTGATAGTGAAGTGGGAGAGACGAA
CAGTCGATTCGCCAAGCAATAATTGTGGCCATGGTATTTCAACAAGAGGATTGTATGATAAAGCAGTCAAGGATGATCT
GAATTCGTCAATAGGGCAATCAACGATTGAATCCTATGCATCAACTTTAAGACATTTTCAGAAGGATGCGAAAGTGC
TTTTCAAATTTGGGAGTTGAACCTATCGACAATGTGATGGGAATGATTGGGATATTGCCCGACATGACTCCAAGCATC
GAGATGTCAATGAGAGGAGTGAGAATCAGCAAAATGGGTGTAGATGAGTACTCCAGCACGGAGAGGGTAGTGGTGAGCAT
TGACCGTTTTTTGAGAATCCGGGACCAACGAGGAAATGTACTACTGTCTCCGAGGAGGTCAGTGAACACAGGGAACAG
AGAAACTGACAATAACTTACTCATCGTCAATGATGTGGGAGATTAATGGTCTGAATCAGTGTGGTCAATACCTATCAA
TGGATCATCAGAACTGGGAACTGTAAAATTCAGTGGTCCAGAACCTCAATGCTATACAATAAAATGGAATTTGA
ACCAATTCAGTCTTTAGTACCTAAGGCCATTAGAGGCCAATACAGTGGGTTTGTAAAGAACTGTTCACAACAAATGAGGG
ATGTGCTGGGACATTTGATACCGCACAGATAATAAACTCTTCCCTTCGACCGCTCCACCAAAGCAAAGTAGAATG
CAGTTCTCTCATTTACTGTGAATGTGAGGGGATCAGGAATGAGAATACTTGTAAAGGGCAATTCTCCTGTATTCAACTA
TAACAAGGCCACGAAGAGACTCACAGTTCTCGGAAAGGATGCTGGCACTTAACTGAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTG
GAGTGGAGTCCGCTGTTCTGAGGGGATTCCTATTCTGGGCAAAGAAGACAAGAGATATGGGCCAGCACTAAGCATCAAT
GAACTGAGCAACCTTGCAGAAAGGAGAGAAGGCTAATGTCTAATTGGGCAAGGAGACGTGGTGTGGTAATGAAACGGAA
ACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATAGTTT
AAAAACGACCTTGTCTACT (SEQ ID NO:3)

图10F

经犬密码子优化的 PR8-PB2:

```

AGCGAAAGCAGGTC AATTATATTC AATATGGAAGAATAAAAGAACTACGAAATCTAATGTCGCAGTCTCGCACCCGCGA
GATACTCACAAAACCACCGTGGACCATATGGCCATAATCAAGAAGTACACATCAGGAAGACAGGAGAAGAACCAGCAC
TGAGGATGAAATGGATGATGGCAATGAAATATCCAATTACAGCAGACAAGAGGATCACCGAAATGATTCTGAGAGAAAT
GAGCAGGGACAGACTCTGTGGAGTAAAATGAATGATGCCGGATCAGACCGAGTGATGGTGTACCTCTGGCTGTGACATG
GTGGAATAGGAATGGACCAATCACAAATACAGTGCATTATCCAAAACTACAAAACCTATTTTGAAAGAGTCGAAAGGC
TGAAGCATGGAACCTTTGGCCCTGTCCATTTTAGAAAACAGGTCAAAATCCGGCGGAGAGTGGACATCAATCCTGGTCAT
GCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGTGATCATGGAAGTGGTGTCCCTAACGAAGTGGGAGCCAGGATTTCTGAC
ATCCGAATCCCAGCTGACCATTACCAAAGAGAAGAAAGAAGAACTCCAGGATTGCAAAATTTCTCTCTGATGGTGGCAT
ACATGCTGGAGAGAGAACTGGTCCGAAAACAAGATTCTCCAGTGGCTGGTGGAAACAAGCAGTGTGTACATTGAAGTG
CTGCATCTGACTCAGGGAACATGCTGGGAACAGATGTATACTCCAGGAGGGGAAAGTGAGGAATGATGATGTGGATCAGAG
CCTGATTATTGCTGCTAGGAACATTGTGAGAAGAGTGCAGTGTGACAGATCCACTGGCATCTGCTGGAGATGTGCC
ACAGCACACAGATTGGTGGAAATTAGGATGTTGGACATCCTGAGGCAGAACCCAAACAGAAGAGCAGGCCGTGGATATTTGC
AAGGCTGCAATGGGACTGAGAATTAGCTCATCTTCAGTTTTGGTGGATTACATTTAAGAGAACAAGCGGATCATCAGT
CAAGAGAGAGGAAGAGGTGCTGACCGCAATCTGCAGACACTGAAGATCAGAGTGCATGAGGGATATGAAGAGTTCACAA
TGGTGGGGAGAAAGAGCAACAGCCATCCTCAGAAAAGCAACCAGGAGACTGATTCAGCTGATCGTGAGTGGGAGAGACGAA
CAGTCCATTGCCGAAGCAATTATTGTGGCCATGGTGTTCACAGGAGGATTGTATGATTAAGCAGTCAAGGATGATCT
GAATTCGTCAATAGGGCAATCAGCGACTGAATCCTATGCATCAGCTGCTGAGACATTTTCAGAAGGATGCCAAAGTGC
TGTTTCAGAATTGGGAGTGGAACTATCGACAATGTGATGGGAATGATTGGGATCCTGCCGACATGACTCCAAGCATC
GAGATGTCAATGAGAGAGTGAATCAGCAAAATGGGTGTGGATGAGTACTCCAGCACCGAGAGGGTCTGGTGGAGCAT
TGACAGATTTCTGAGAATCCGGGACCAGCGAGGAAATGTGCTCTGCTCCGAGGAGGTGAGTGAACACAGGGAACAG
AGAACTGACAATTACTTACTCATCTCAATGATGTGGGAGATTAATGGTCTGAATCAGTGTGGTCAATACCTATCAG
TGGATCATCAGAACTGGGAACTGTGAAAATTCAGTGGTCCCAGAACCTACAATGCTGTACAATAAAATGGAATTTGA
ACCATTTCACTCTGTGGTCTAAGGCCATTAGAGGCCAGTACAGTGGGTTTGTGAGAACTCTGTCCAGCAGATGAGGG
ATGTGCTGGGACATTTGATACCGCACAGATTATTAAGTGTGCTGCCCTTCGAGCCGCTCCACCAAAGCAGAGTAGAATG
CAGTTCTCTCAATTTACTGTGAATGTGAGGGGATCAGGAATGAGAATCCTGGTGGAGGGCAATTTCTCTGTGTTCAACTA
TAACAAGGCCACCAAGAGACTCACAGTGTCTCGAAAGGATGTGGCACTCTGACTGAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTG
GAGTGGAGTCCGCTGTGCTGAGGGGATTCCTCATTCTGGGCAAAGAAGACAAGAGATATGGGCCAGCACTGAGCATCAAT
GAACTGAGCAACCTGGCCAAAGGAGAGAAGGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGAGACGTGGTGTGGTAAATGAAACGGAA
ACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCCACAAAAGAATTCGGATGGCCATCAATTAGTGTGCAATAGTTT
AAAAACGACCTTGTCTTCTACT (SEQ ID NO:16)

```

图10G

```

PR8-UW PB1:
AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACCTTACTTTTCTAAAAGTGCCAGCACAAAATGCTATAAG
CACAACCTTTCCTTATACTGGAGACCCCTTACAGCCATGGGACAGGAACAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGA
CACATCAGTACTCAGAAAAGGAAGATGGACAACAAACCCGAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGCCA
CTGCCAGAAGACAATGAACCAAGTGGTTATGCCAAACAGATTGTATTGGAGGCGATGGCTTTCCTTGAGGAATCCCA
TCCTGGTATTTTTGAAAACCTCGTGTATTGAAACGATGGAGGTTGTTCCAGCAACACGAGTAGACAAGCTGACACAAGGCC
GACAGACCTATGACTGGACTCTAAATAGAAAACCACTGCTGCAACAGCATTGGCCAACACAATAGAAGTGTTCAGATCA
AATGGCCTCACGCCAATGAGTCTGGAAGGCTCATAGACTTCTTAAGGATGTAATGGAGTCAATGAACAAAGAAAGAAAT
GGGGATCACAACCTATTTTCAGAGAAAGAGACGGGTGAGAGACAATATGACTAAGAAAATGATAACACAGAGAACAATGG
GTAAAAGAAGCAGAGATTGAACAAAAGGAGTTATCTAATTAGAGCATTGACCCCTGAACACAATGACCAAAAGATGCTGAG
AGAGGGGAAGCTAAAACGGAGAGCAATTGCAACCCAGGGATGCAAATAAGGGGGTTGTATACTTTGTTGAGACACTGGC
AAGGAGTATATGTGAGAACTTGAACAATCAGGGTTGCCAGTTGGAGGCAATGAGAAGAAAGCAAAGTTGGCAAATGTTG
TAAGGAAGATGATGACCAATTCAGGACACCGAACTTTCTTCCACATCACTGGAGATAACACCAAAATGGAAAGAAAAT
CAGAATCCTCGGATGTTTTGGCCATGATCACATATATGACCAGAAATCAGCCGAATGGTTCAGAAATGTTCTAAGTAT
TGCTCCAATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTGGGAAAAGGGTATATGTTTGAGAGCAAGAGTATGAAACTTAGAA
CTCAAATACCTGCAGAAATGCTAGCAAGCATCGATTTGAAATATTTCAATGATTCAACAAGAAAGAAGATTGAAAAATC
CGACCCCTCTTAATAGAGGGGACTGCATCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGTTAAGCACTGATT
AGGCGTCTCCATCTGAATCTTGGACAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGTCTTCAATCTCTGACG
ATTTTGCTCTGATTGTGAATGCACCCAATCATGAAGGGATTCAAGCCGGAGTCGACAGGTTTTATCGAACCTGTAAGCTA
CTTGGAATCAATATGAGCAAGAAAAGTCTTACATAAACAGAACAGGTACATTTGAATTCACAAGTTTTTTCTATCGTTA
TGGGTTTTGTGCAATTCAGCATGGAGCTTCCAGTTTTGGGGTGTCTGGGATCAACGAGTCAGCGGACATGAGTATTG
GAGTTACTGTATCAAAAACAATATGATAAAACATGATCTTGGTCCAGCAACAGCTCAAATGGCCCTCAGTTGTTTCATC
AAAGATTACAGGTACAGTACCGATGCCATATAGGTGACACACAAATACAACCCGAAGATCATTGAAATAAAGAAACT
GTGGGAGCAAACCCGTTCAAAGCTGGACTGCTGGTCTCGACGGAGGCCAAATTTATACAACATTAGAAATCTCCACA
TTCCTGAAGTCTGCTAAAATGGGAATTGATGGATGAGGATTACCAGGGCGTTTATGCAACCCACTGAACCCATTGTC
AGCCATAAAGAAATTGAATCAATGAACAATGACGTGATGATGCCAGCACATGGTCCAGCCAAAAACATGGAGTATGATGC
TGTTGCAACAACACTCCTGGATCCCCAAAAGAAATCGATCCATCTTGAATACAAGTCAAAGAGGAGTACTTGAGGATG
AACAAATGTACCAAAGGTGCTGCAATTTATTTGAAAATTCTTCCCAGCAGTTCATACAGAAGACCAGTCGGGATATCC
AGTATGGTGGAGGCTATGGTTTCAGAGCCCGAATTGATGCACGGATTGATTTGAAATCTGGAAGGATAAAGAAAGAAGA
GTTCACTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCAATG
AAAAATGCCTTGTCTACT (SEQ ID NO:2)

```

图10H

经犬密码子优化的 PR8 PB1:

```

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACCTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAGCACAAAATGCTATAAG
CACAACTTTCCCTTATACTGGAGACCCTCCTTACAGCCATGGGACAGGAACAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGA
CACATCAGTACTCAGAAAAGGGAGATGGACAACAACACCGAAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGCCA
CTGCCAGAAGACAATGAACCAAGTGGTTATGCCCAAACAGATTGTGTATTGGAGGCGATGGCTTTCCTTGAGGAATCCCA
TCCTGGTATTTTTGAAAACCTGTGTATTGAAACGATGGAGGTTGTTCCAGCAAACACGAGTGGACAAGCTGACACAGGGCC
GACAGACCTATGACTGGACTCTGAATAGAAAACAGCCTGCTGCAACAGCACTGGCCAACAATCGAAGTGTTCAGATCA
AATGGCCTCACCGCAATGAGTCTGGAAGGCTCATCGACTTCTGGAAGGATGTGATGGAGTCAATGAACAAAAGAAAT
GGGGATCACAACTCATTTTCAGAGAAAGAGACGGGTGAGAGACAATATGACTAAGAAAATGATTACACAGAGAACAATGG
GTAAAAGAAGCAGAGACTGAACAAAAGGAGTTATCTGATTAGAGCACTGACCTGAACACAATGACCAAAGATGCTGAG
AGAGGGAAGCTGAAACGGAGAGCAATTGCAACCCAGGGATGCAGATTAGGGGTTTGTGTACTTTGTGGAGACTGGC
AAGGAGTATTTGTGAGAACTGGAACAGTCAGGGCTGCCAGTGGGAGGCAATGAGAAGAAAGCAAAGCTGGCAATGTGG
TGAGGAAGATGATGACCAATTCTCAGGACACCGAACTGTCTTCCACATCACTGGAGATAACACCAAATGGAACGAAAAT
CAGAATCCTCGGATGTTCTGGCCATGATCACATATATGACCAGAAAATCAGCCCGAATGGTTCAGAAAATGTGCTGAGTAT
TGCTCCAATTATGTTCTCAACAAAATGGCCAGACTGGGAAAAGGGTATATGTTTGAGAGCAAGAGTATGAAACTGAGAA
CTCAGATTCCTGCAGAAATGCTGGCAAGCATCGATCTGAAATATTTCAATGATTCAACAAGAAAGAAAGATTGAAAAATC
CGACCCCTCTGATTGAGGGGACTGCATCACTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGCTGAGCACTGTGCT
GGGCGTCTCCATCTGAACTGTGGACAGAAGAGATACACCAAGACTTACTGTTGGGATGGTCTGCAGTCTCTGACG
ATTTTGTCTGATTGTGAATGCACCAATCATGAAGGGATTGAGCCGGAGTGCACAGGTTTTATCGAACCTGTAAGCTG
CTGGGAATCAATATGAGCAAGAAAAGTCTTACATCAACAGAACAGGTACATTTGAATTCACAAGTTTTTCTATCGCTA
TGGGTTTGTGGCAATTTTCAGCATGGAGCTGCCAGTTTTGGGGTGTCTGGGATCAACGAGTCAAGCCGACATGAGTATTG
GAGTACTGTCATCAAAAACAATATGATCAACAATGATCTGGGTCCAGCAACAGCTCAGATGGCCCTGCAGCTGTTTCATC
AAAGATTACAGGTACACCTACCGATGCCATATCGGTGACACACAGATTGAGCCCGAAGATCATTGAAATCAAGAAACT
GTGGGAGCAGACCCGCTCAAAGCTGGACTGCTGGTCTCCGACGGAGGCCAAAATCTGTACAACATTAGAAAATCTCCACA
TTCTGAAGTCTGCCTGAAATGGGAACTGATGGATGAGGATTACCAGGGGGCCTGTGCAACCCACTGAACCCATTTGTC
AGCCATAAAGAAATGAATCAATGAACAATGCAGTGTATGATGCCAGCACATGGTCCAGCCAAAAACATGGAGTATGATGC
TGTGGCAACAACACTCCTGGATCCCAAAAAGAAATCGATCCATCTGAATACAAGTCAGAGAGGAGTGTGGAGGATG
AACAGATGTACCAGAGGTGCTGCAATCTGTTGAAAAATCTTCCCAGCAGTTCATACAGAAGACCAGTCGGGATCTCC
AGTATGGTGGAGGCTATGGTGTCCAGAGCCGAATTGATGCACGGATTGATTTTCAATCTGGAAGGATCAAGAAAAGAAGA
GTTCACTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCATG
AAAAATGCCTTGTCTACT (SEQ ID NO:17)

```

图10I

```

PR8-UW PA:
AGCGAAAGCAGGTA CTGATCCAAAATGGAAGATTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCGATGATTGTCGAGCTTGGCGAAAA
AACAAATGAAAGAGTATGGGGAGGACCTGAAAATCGAAACAAACAAATTTGAGCAATATGCACTCACTTGGAAAGTATGCT
TCATGTATTCAGATTTTCACTTCATCAATGAGCAAGGCGAGTCAATAATCGTAGAACTTGGTGATCCAAATGCACATTTG
AAGCACAGATTGAAATAATCGAGGGAAGAGATCGCACAAATGGCCTGGACAGTAGTAAACAGTATTTGCAACACTACAGG
GGCTGAGAAAACCAAGTTTCTACCAGATTTGTATGATTACAAGGAGAATAGATTCAATCGAAATGGAGTAACAAGGAGAG
AAGTTCACATATACTATCTGGAAGGCAATAAAATTAATCTGAGAAAACACACATCCACATTTTCTCGTTCCTGGG
GAAGAAATGGCCACAAAGGCACTACACTCTCGATGAAGAAAGCAGGGCTAGGATCAAACCAGACTATCCACATAAG
ACAAGAAATGGCCAGCAGAGGCTCTGGGATTCCTTCTGTCAGTCCGAGAGAGGAGAAGAGACAATTGAAGAAAGTTTG
AAATCACAGGAACAATGCGCAAGCTTCCGACCAAAAGTCTCCCGCCGAACCTTCCAGCCTTGAAAATTTAGAGCCTAT
GTGGATGGATTGCAACCGAACGGCTACATTGAGGGCAAGCTGTCTCAAATGTCCAAAGAAGTAAATGCTAGAAATTGAACC
TTTTTGAAAACAACACCACGACCCTTAGACTTCCGAATGGCCTCCCTGTTCTCAGCGGTCCAATTCCTGCTGATGG
ATGCCTTAAATTAAGCATTGAGGACCCAAGTCATGAAGGAGAGGGAATACCGCTATATGATGCAATCAAATGCATGAGA
ACATTCITTTGGATGGAAGGAACCAATGTTGTTAAACCAACGAAAGGGGAATAAATCCAATTAATCTTCTGTCATGAA
GCAAGTACTGGCAGAAGTGCAGGACATTGAGAATGAGGAGAAAATTCAAAGACTAAAAATATGAAGAAAACAAGTCAGC
TAAAGTGGGCCTTGTGTGAGAACATGGCACCAGAAAAGGTAGACTTTGACGACTGTAAGATGTAGGTGATTTGAAGCAA
TATGATAGTGATGAACCAGAATTGAGGTCGCTTGCAAGTTGATTGAGAATGAGTTTAAACAAGGCATGCAAGTGCAGAGA
TTCAAGCTGGATAGAGCTCGATGAGATTGGAGAAGATGTGGCTCCAATTGAACACATTGCAAGCATGAGAAGGAATTAT
TCACATCAGAGGTGTCTCACTGCAGAGCCACAGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATCAATACTGCCTTGCTTAATGCA
TCTTGTGCAATGGATGATTTCAAATTAATCCAATGATAAGCAAGTGTAGAACTAAGGAGGGAAGGCGAAAGACCAA
CTTGATGGTTTCATCATAAAAAGGAAGATCCCACTTAAGGAATGACACCGACGTGGTAAACTTTGTGAGCATGGAGTTTT
CTCTCACTGACCCAAGACTTGAACCAATAAAATGGGAGAAGTACTGTGTTCTTGAGATAGGAGATATGCTTATAAGAAGT
GCCATAGGCCAGGTTTCAAGGCCATGTTCTGTATGTGAGAACAATGGAACCTCAAATAAAATGAAATGGGGAAT
GGAGATGAGGCGTTGCCTCCTCCAGTCACITCAACAAATGAGAGTATGATTGAAGCTGAGTCCCTGTCAAAGAGAAAAG
ACATGACCAAAGAGTCTTTGAGAACAATCAGAAACATGGCCATTGGAGAGTCCCCAAAGGAGTGGAGGAAAGTTCC
ATTGGGAAGGTCTGCAGGACTTTATTAGCAAAGTCGGTATTCAACAGCTTGATGCATCTCCACAAGTAAAGGATTTTC
AGCTGAATCAAGAAAACGCTTCTTATCGTTACAGGCTCTTAGGGACAACCTGGAACCTGGGACCTTTGATCTTGGGGGGC
TATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCTTCTTGGTTCAACTCCTTCTTACA
CATGCATTGAGTGTGTTGGCAGTGTACTATTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTCTTACT (SEQ ID NO:1)

```

图10J

经犬密码子优化的PR8 PA:

```

AGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAAATGGAAGATTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCGATGATTGTCGAGCTTGCAGAAAA
AACAAATGAAAGAGTATGGGGAGGACCTGAAAATCGAAACAAACAAATTTGCAGCAATATGCACTCACTTGGAAATGATGCT
TCATGTATTAGATTTTCACTTCATCAATGAGCAAGGCGAGTCAATAATCGTAGAACTTGGTGATCCAAATGCACCTTTG
AAGCACAGATTTGAAATAATCGAGGGAAGAGATCGCACAAATGGCCTGGACAGTAGTAAACAGTATTTGCAACACTACAGG
GGCTGAGAAACCAAAGTTTCTACCAGATTTGTATGATTACAAGGAGAATAGATTTCGAAATTTGGAGTAAACAAGGAGAG
AAGTTCACATATACTATCTGAAAAGGCCAATAAAATTAATCTGAGAAAACACATCCACATTTTCTCGTTCAGTGGG
GAAGAAATGGCCACAAGGCAGACTACTCTCGATGAAGAAAGCAGGGCTAGGATCAAAACCAGACTATTACCATAAG
ACAAGAAATGGCCAGCAGAGGCTCTGGGATTCCTTTCGTGAGTCCGAGAGAGGAGAAGAGACAATGAAGAAAGGTTTG
AAATCACAGGAACAATGCGCAAGCTTGCCGACCAAGTCTCCCGCCGAACTTCCAGCCTTGAAAATTTAGAGCCTAT
GTGGATGGATTGAAACCGAACGGCTACATTGAGGGCAAGCTGTCTCAAATGTCCAAAGAAAGTAAATGCTAGAATTGAACC
TTTTCTGAAAACAACACCAGCACCAGTACTGAGACTGCCAATGGGCTCCCTGTTCTCAGCGTCCAAATTCCTGTGATGG
ATGCCCTGAAACTGAGCATTGAGGACCAAGTCAAGGAGAGGGAATCCCTGTATGATGCAATCAAATGATGAGA
ACATTTCTTGGATGGAAGGAACCAATGTGGTGAAACCACACGAAAAGGGAATCAATCCAAATATCTGCTGTATGAA
GCAGGTGCTGGCAGAACTGCAGGACATGAGAATGAGGAGAAAATCCAAAGACTAAAAATGAAGAAAACAAGTCAGC
TGAAGTGGGCACTGGGTGAGAACATGGCACCAGAAAAGGTGGACTTTGACGACTGTAAGATGTGGGTGATCTGAAGCAG
TATGATAGTGATGAACCAGAACTGAGTCCCTGCAAGTTGGATTGAGATGAGTTTAAACAAGGCATGCGAACTGACAGA
TTCAAGCTGGATTGAGCTCGATGAGATTGGAGAAGATGTGGCTCAATTGAACACATTGCAAGCATGAGAAGGAATTATT
TCACATCAGAGGTGTCTCACTGCAGAGCCACAGAATACATCATGAAGGGAGTGTACATCAATACTGCCCTGCTGAATGCA
TCTTGTGACAGCAATGGATGATTTCCAGCTGATTCCAATGATCAGCAAGTGTAGAACTAAGGAGGGAAGGCGAAAGACCAA
CCTGTATGGTTTCATCATCAAAGGAAGATCCCACCTGAGGAATGACACCGACGTGGTGAACCTTTGTGAGCATGGAGTTTT
CTCTCACTGACCCAAGACTGGAACCACATAAATGGGAGAAGTACTGTGTGCTGGAGATTGGAGATATGCTGATCAGAAGT
GCCATTGGCCAGGTGTCAAGGCCATGTTCTGTATGTGAGAACAATGGAACCTCAAAAATTAATAATGAAATGGGGAAT
GGAGATGAGGCGCTGCTCCTCCAGTCACTGCAGCAGATTGAGAGTATGATTGAAGCTGAGTCCCTGTCAAAGAGAAAAG
ACATGACCAAAGAGTTCTTTGAGAACAATCAGAAACATGGCCATTGGAGAGTCCCCAAAGGAGTGAGGAAAGTTCC
ATTGGGAAGGTCTGCAGGACTCTGCTGGCAAAGTCCGTGTTCAACAGCCTGTATGCATCTCCACAGCTGGAAGGATTTTC
AGCTGAATCAAGAAAAGTCTGCTGATCTGTCAGGCTCTGAGGGACAACCTGGAACCTGGGACCTTTGATCTGGGGGGC
TGTATGAAGCAATTGAGGAGTGCTGATTAATGATCCCTGGGTGCTGCTGAATGCTTCTTGGTTCAACTCCTTCTTACA
CATGCATTGAGTATGTTGTGGCAGTGTACTATTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTCTTACT (SEQ ID NO:18)

```

图10K

PR8-UW NP:
AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCAAATCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCTTACGAACA
GATGGAGACTGATGGAGAACGCCAGAATGCCACTGAAATCAGAGCATCCGTCGGAAAAATGATTGGTGAATTGGACGAT
TCTACATCCAAATGTGCACCGAACTCAAACCTAGTGATTATGAGGGACGGTTGATCCAAAACAGCTTAACAATAGAGAGA
ATGGTGCTCTCTGCTTTTGACGAAAGGAGAAATAAATACCTTGAAGAACATCCAGTGCGGGGAAAGATCCTAAGAAAAC
TGGAGGACCTATATACAGGAGAGTAAACGGAAAGTGGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAAGAAGAAAATAAGGCGAA
TCTGGCCCAAGCTAATAATGGTGACGATGCAACGGCTGGTCTGACTCACATGATGATCTGGCATTCCAATTTGAATGAT
GCAACTTATCAGAGGACAAGAGCTTTGTTTCGCACCGGAATGGATCCAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGTTCAACTCT
CCCTAGGAGGTCTGGAGCCGAGGTGCTGCAGTCAAAGGAGTTGGAACAATGGTGATGGAATTGGTCAGAATGATCAAAC
GTGGGATCAATGATCGGAACTTCTGGAGGGGTGAGAATGGACGAAAAACAAGAATTGCTTATGAAAGAATGTGCAACATT
CTCAAAGGAAATTTCAAACCTGCTGCACAAAAGCAATGATGGATCAAGTGAGAGAGAGCCGGAACCCAGGGAATGCTGA
GTTGGAAGATCTCACITTTCTAGCACGGTCTGCACTCATATTGAGAGGGTGGTTGCTCACAAGTCTGCCTGCCTGCCT
GTGTGATGGACCTGCCGTAGCCAGTGGGTACGACTTTGAAAGGGAGGGATACTCTCTAGTCGGAATAGACCCCTTTCAGA
CTGCTTCAAACAGCCAAGTGTACAGCCTAATCAGACCAAATGAGAATCCAGCACACAAGAGTCAACTGGTGTGGATGGC
ATGCCATTCGCCGATTTGAAGATCTAAGAGTATTAAGCTTCATCAAAGGGACGAAGGTGCTCCCAAGAGGGAAGCTTT
CCACTAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAATGAAAATATGGAGACTATGGAATCAAGTACACTTGAAGTGAAGCAGGTAC
TGGGCCATAAGGACCAGAAGTGGAGGAAACCAATCAACAGAGGGCATCTGCGGGCCAAATCAGCATAAACCTACGTT
CTCAGTACAGAGAAATCTCCCTTTGACAGAACAACCATTATGGCAGCATTCAATGGGAATACAGAGGGGAGAACATCTG
ACATGAGGACCGAAATCATAAGGATGATGAAAAGTGCAAGACCAGAAGATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAG
CTCTCGGACGAAAAGGCAGCGAGCCCGATCGTGCCTTCTTTGACATGAGTAATGAAGGATCTTATTTCTCGGAGACAA
TGCAGAGGAGTACGACAATTAAGAAAAATACCCTTGTCTACT (SEQ ID NO:4)

图10L

经犬密码子优化的NP:

```
AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCAAAATCATGGCGTCTCAAGGCACCAACGATCTTACGAACA
GATGGAGACTGATGGAGAACGCCAGAATGCCACTGAAATCAGAGCATCCGTCGGAAAAATGATTGGTGGAAATTGGACGAT
TCTACATCCAGATGTGCACCGAACTCAAACCTAGTGATTATGAGGGACGGCTGATCCAGAACAGCCTGACAATCGAGAGA
ATGGTGCTCTCTGCTTTTGACGAAAGGAGAAATAAATACCTGGAAGAACATCCAGTGCCGGGAAAGATCCTAAGAAAAAC
TGGAGGACCTATCTACAGGAGAGTGAACGGAAAGTGGATGAGAGAACTCATCCTGTATGACAAAGAAGAAATCAGGCGAA
TCTGGCGCCAGGCTAATAATGGTGACGATGCAACCGCTGGTCTGACTCACATGATGATCTGGCATTCCAATCTGAATGAT
GCAACTTATCAGAGGACAAGAGCTCTGGTGCACCGGAATGGATCCAGGATGTGCTCTCTGATGCAGGGTTCAACTCT
CCCTAGGAGGTCTGGAGCCGACGGTGCTGACGTAAGGAGTGGGAACAATGGTGATGGAACCTGGTGCAGAAATGATCAAAA
GAGGGATCAATGATCGGAACTTCTGGAGGGGTGAGAAATGGACGAAAAACAAGAATTGCTTATGAAAGAATGTGCAACATT
CTCAAAGGGAAATTTAGACTGCTGCACAGAAAGCAATGATGGATCAGGTGAGAGAGAGCCGGAACCCAGGGAAATGCTGA
GTTGGAAGATCTCACTTTTCTGGCACGGTCTGCACTCATCTGAGAGGGTCCGTGGCTCACAAGTCTGCTGCTGCCTGCCT
GTGTGTATGGACCTGCCGTGGCCAGTGGGTACGACTTTGAAAGGGAGGGATACTCTGTGGTCGGAATTGACCTTTTCAGA
CTGCTGCAGAACAGCCAGGTGTACAGCCTGATCAGACCAATGAGAATCCAGCACACAAGAGTCACTGGTGTGGATGGC
ATGCCATTCTGCCGATTTGAAGATCTGAGAGTGCTGAGCTTCAAAAGGGACCAAGGTGCTCCAAGAGGGGAAGCTGT
CCACTAGAGGAGTGCAGATTGCTTCCAATGAAAATATGGAGACTATGGAATCAAGTACTGGAACCTGAGAAGCAGGTAC
TGGGCCATCAGGACCAGAAGTGGAGGAAACCAATCAGCAGAGGGCATCTGCCGGCCAGATCAGCATTAGCCTACCTT
CTCAGTGACAGAAATCTCCCTTTTGACAGAACACCATTATGGCAGCATTCAATGGGAATACAGAGGGGAGAACATCTG
ACATGAGGACCGAAATCATCAGGATGATGAAAGTGAAGACCAGAAGATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAG
CTCTCGGACGAAAAGGCAGCGAGCCGATCGTGCCTTCTTTGACATGAGTAATGAAGGATCTTATTTCTCGGAGACAA
TGCAGAGGAGTACGACAATTAAGAAAAATACCCCTTGTCTACT (SEQ ID NO:19)
```

图10M

PR8 和Indo/NC/09的每个基因的第4位中的核苷酸突变

基因	vRNA的第4位
PR8 PB2	C
PR8 PB1	C
PR8 PA	C
PR8 NP	U
PR8 M	U
PR8 NS	U
Indo/NC/09 HA	U
Indo/NC/09 NA	U

图11A

所有3' C4U突变体

基因	vRNA的第4位
PR8 PB2	U
PR8 PB1	U
PR8 PA	U
PR8 NP	U
PR8 M	U
PR8 NS	U
Inda/NC/09 HA	U
Inda/NC/09 NA	U

图11B

3' C4U突变体的生长动力学

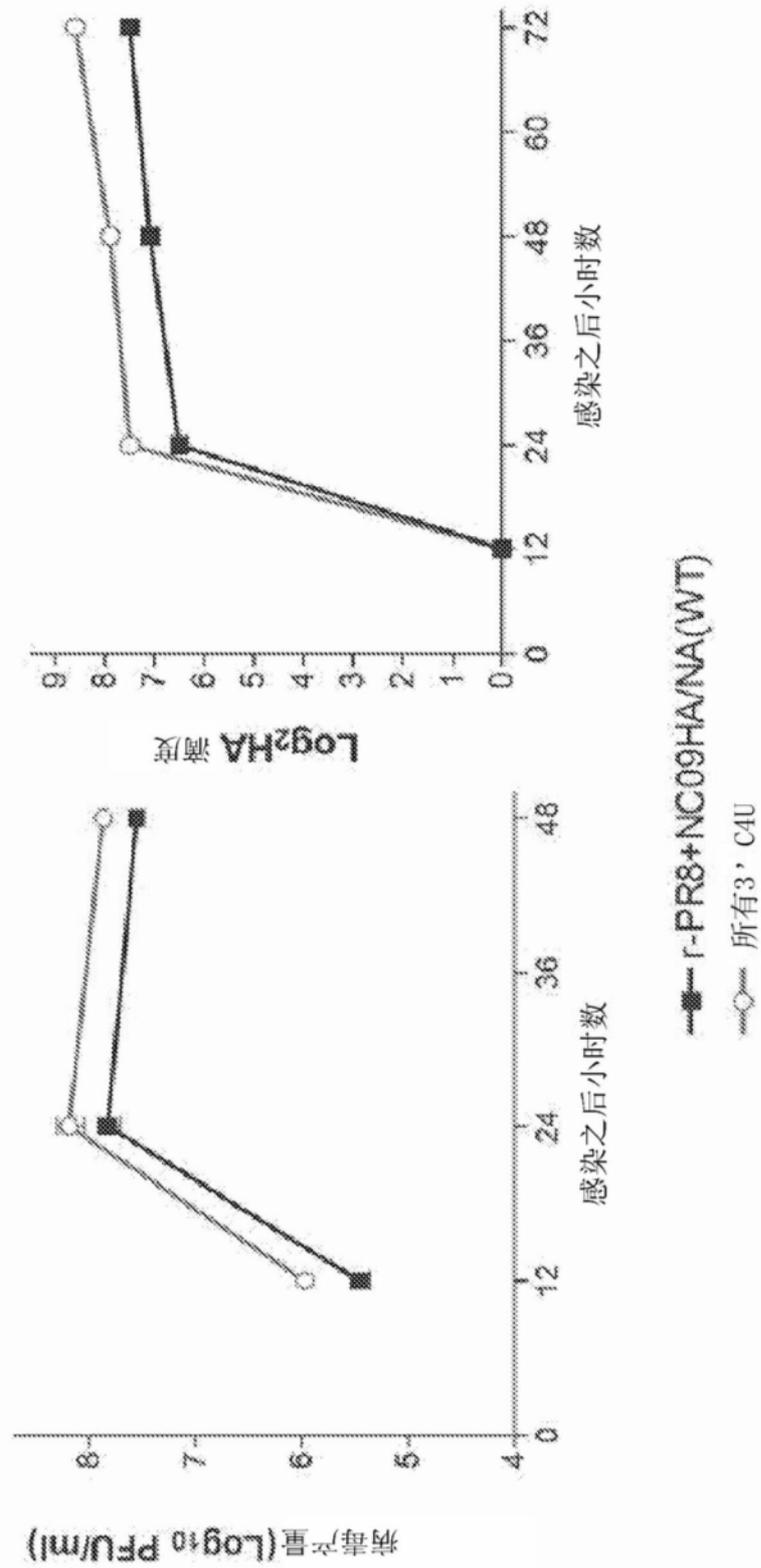


图11C

EGKILKWEISLTGAKHIEECSCYGERGTGICTCRDNWQGSNRPVIQIDPVMHTHSQYICSPVLTDNPRPNDPNIGKCNDPYPG
NNNNNGVKGFSLDAGANTWLGRTISTASRSYEMLKVPNALTD DRSKPIQGQTIVLNADWSGYSGSFMDYWAEGDCYRACF
YVELIRGRPKEDKVVWTSNSIVSMCSSTFLGQWVWPDGAKIEYFL (SEQ ID NO:23)

HA

atgaacactcaaatcctggattcgcctgattgagatcatccaacaatgcagacaaaatctgctcggacatcaigtgtgtcaaacggaaccaaaagtaa
cacattaaactgaaaggagtggaagtcgtcaatgcaactgaacacagtggaacgaacaacatcccaggatctgctcaaaagggaaaaggacagttgacc
tcggtaaatgtagactcctggggacaatcactggaccaccctcaatgtgaccaatctcagaatttcagccgatttaattatgagaggcgagaaggagtgatg
tcgtttatcctgggaaatcgtgaatgaagaagctctgagggcaaatctcagagaatcaggcgaattgacaaggaaagcaatgggattcacatagtggaat
aagaaactaatggagcaaccagttcatgtagggagcaggatctcattctatgcagaaatgaaaggcctcctgcaaacacagataatgtagcattccgcaga
tgactaagctataaaaatacaagaaaaaccagctctaatagtatggggatccatcattcggatcaactgcagagcaaaccaagctataatgggagtg
aaaacaactgtagcagttgggagttcattatcaacaatctttgtaccagtcggggagcgagacaacaagtaattggtaactctgcaagaatgacttca
atggctaatgctaaaatcctaatgatacagtcactttcagttcaatggggdttcatagctccagaccgtgcaagctcctgagaggaaaatctatgggaaacag
agtgagtagcagggatgtagccgattgtagaggagctgctattatagtgagggaacaataaagtaacttccattcagaacatagatgacagggcagtg
aaaaigtccgagatgtaagcaaaaggagctgctgctagcaacagggaggaagaatgttcctgagatccaagggaaggagccatttgggtctataggg
ggttcattgaaaatggatgggaggcctaattgattgggtgtagttcagacaccagaatgcacaggagagggaactgctgagattacaagcactc
aatcggcaattgatacaatacaggaataaaccggcttagaaaaaccaaccaacaattgagttgatagacaagaattcactgaggtgtagagaagc
aaatcggtaattgtagaaatggaccagagattctatacagaagtgctgctatacaatgctgaacttggtagcaatggagaaccagatgacagggcagtg
gctgattcagaatggacaactgtagcaacagagtgaaaagacagctgagagagaatgctgagaagaatggcactggttcttgaatattcaagatgtg
atgtagctgtagggccagcattagaataacacctatgatcagcaatacagggaaggcgaatgcaaaatagaatcacagatgaccagctcaactaa
gcagcgtctacaagaatgtagactttgatttagctcggggcatcatgttctacatcttagccattgcaatggccttctctatgtgtaaaagaatggaaa
c atcgggtgcactattgtataaa (SEQ ID NO:24)

MNTQILVFALIAIPTNADKICLGHHAHSVNGTKVNTLTERGVEVVNATETVERTNIPRICSKGKRTVDLQCCGLLGTITGPPQCDQ
FLFESADLIERREGSDVCPGK FVNEEARQLILRESGIDKEAMGFTYSG IRTNGATSSCRRSGSSFYAEMKWLNSNTDNAAFP
QMTKSYKNTRKNPALIVWGIHSGSTAEQTKLYSGNKLVTGSSNYQSFVPSPGARTQVNGQSGRI DFHWLMLNPNEDTV
TFSFN GAFIAPDRASFLRGSMDIGIQSGVQVDADGEDDCYSGGTIISNLPFQNI DSRVAVGKCPRYVKQRSLLATGTMKNVPEIP
KGRGLFGAIAAGFIENGWEG LIDGWYFRHQNAQGEGETAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTNQQFELIDNEFTEVEKQIGNVI
NWTRDSITEVWYSYNAELLVAMENQHTIDLADSEMDKLYERVKRQLRENAEEDGTGCFEIFHKCDDDCMASIRNNTYDHSKY
R EAMQNRQIDPVLKSSGYKDVILWFSFGASCFILAIAMGLVFCVKNGNMRCTICI (SEQ ID NO:25)

NA

atgaatccaaatcagaagattcagcactcagccactgctatcataataggcgaatcgcagctactcattggaatagcaaacctaggattgaacataggact
gcacatcaaacaggagctgcaatgctcacactcaaacctgaaacaaccaacacaagcaacaataaacaactataatgaaacaacatcacca
catccaatggaaagagagaacaagcaggaaattcaataacttaactaaaggcctgtactataaaatc atggcacatataatgggaaagacaatgcggtaaga
attggagagagctggatgitttagtcacaagagaaccctatgittcagcagaccagatgaatgcaaggctctatgctcagccaaggacaacaatcagagg
aaaacactcaaacggaacaatacacgataagctccagtaacgcgcctgataagctggcactatcatcaccgccacagtgacaacagcagggtggaaatg
cattgggtgctcaagtactagttgccatgatggcaaatccaggatgtaabtgatatacaggaaccaacaacaatgcatctgcagtagtatggtacaacaga
ggcctgttcagaaataacacatgggcccgaacatactaagaacacaggaatctgaatgtgtatgccacaacggcgtatgccagtagtttaccagtagg
gtcctgcaactggacctgcagacacaagaatatactatttaaaagggggaaatattgaaatgggagctcctgactggaactgtaagcatattgaaagaatgct
catgttacggggaacaggaattacctgcacatgcaaggacaattggcagggctcaaatagaccagtgattcagatagatcagtagcaatgacacaca
ctagtcagtatatacagctcctgtttacagacaatcccagcgaatgcccacaataataggtgaatgtaatgacctatcaggtaataataacaatggag
tcaaggagttctatcctggaatggggtcaaacctggctaggagggaacaataagcacagcctcaggtctggatagcagatgtaaaagtccaatgcaat
gacagatgatagatcaaaccccaatcaaggtcagacaattgtataaacgctgactggagtggtacagtggaactttcatggaactattggcctgaggggact
gctatcagcgtgttttatgtggaattgatacgtggaagaccagggaataaagtgtggggaccagcaatagtagtatcagtagtgcagtagtccagtagagaat
tcttgggacaatggaactggcctgtaggggctaaaatagtagtactctctaa (SEQ ID NO:26)

MNPNQKILCTSATAIIIGAIIVLIGIANLNLGHLKPKSCNSHSQPETTNTSQTIIINNYNETNITNIQMEERTSRFNFLTKGL
CTINSWHIYGKDNNAVRI GESSDVLVTRPYPVSDPDECRFYALSQGTTRG KHSNGTTHDRSQYRALISWPLSSPPTVYNSRVECI
GWSSTSCHDGKSRMSICISGPNNASAVVWYNRRPVAEINTWARNILRTQSECVCHNGVCPVVFTDGSATGPADTRIIYFK

图12B

EGKILKWEISLTGAKHIEECSCYGERGTGICTCKDNWQGSNRPVIQIDPVMHTHSQYICSPVLTDNPRPNDPNIGKCNDPYPG
NNNNNGVKGFSLDAGANTWLGRTISTASRSYEMLKVPNALTD DRSKPIQGQTIVLNADWSGYSGSFMDYWAEGDCYRACF
YVELIRGRPKEDKVVWTSNSIVSMCSSTFLGQWVWPDGAKIEYFL (SEQ ID NO:27)

图12C

提高病毒复制的构建体嵌合HA & NA

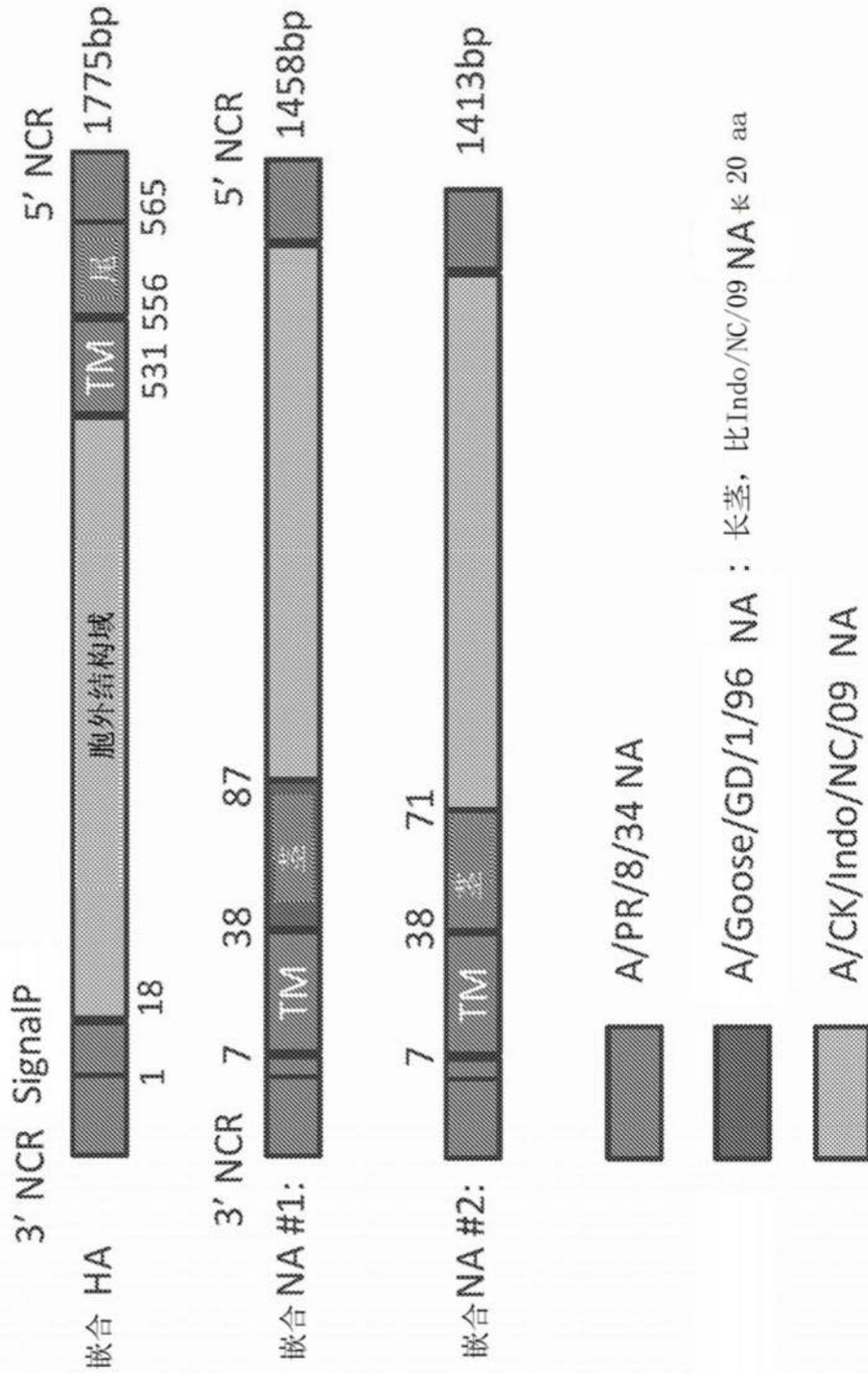


图13A

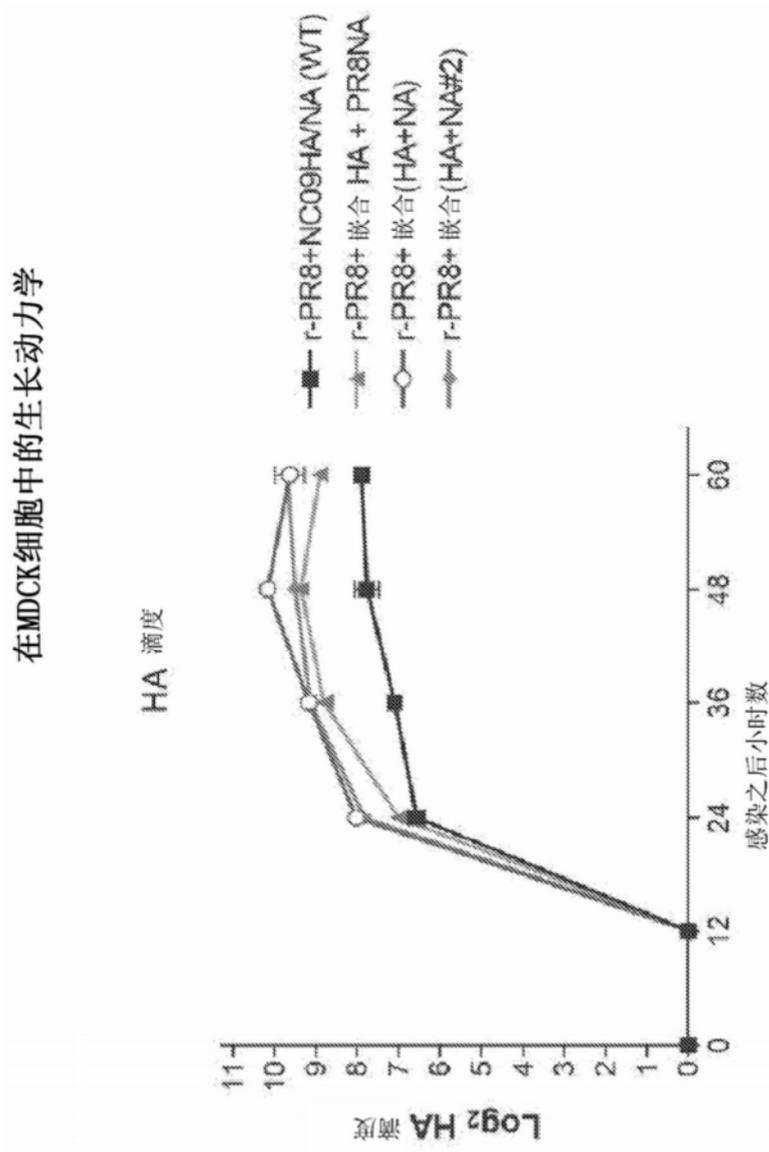


图13B

在MDCK细胞中的生长动力学

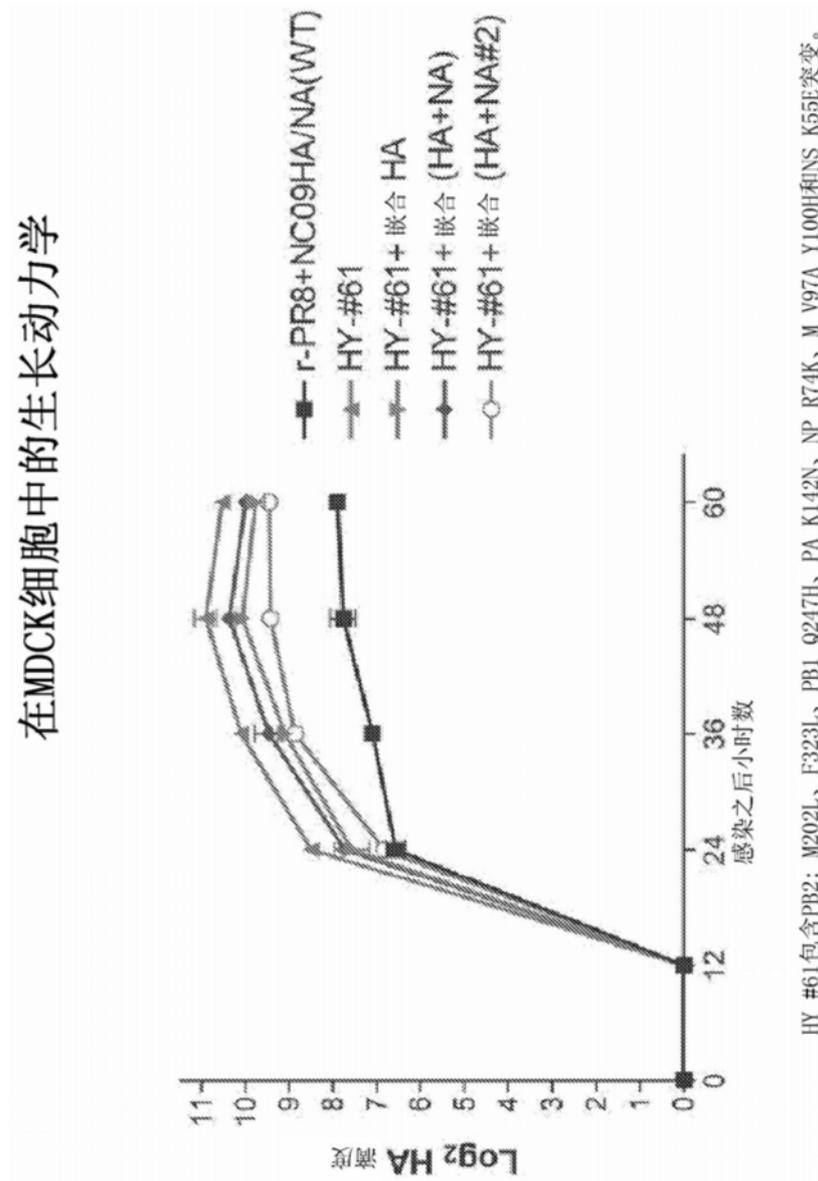


图14A

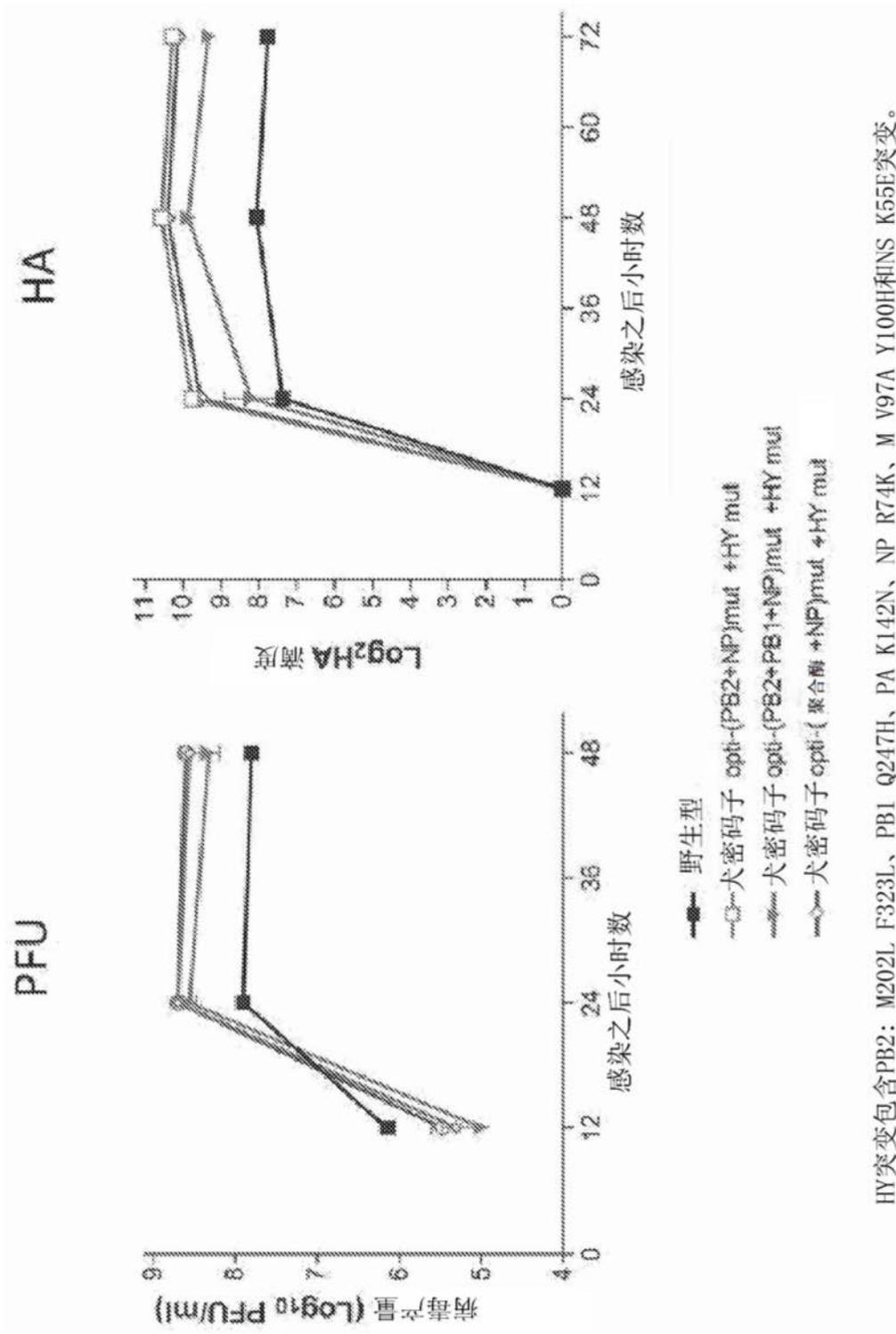


图14B

在卵中筛选高生长突变的示意图

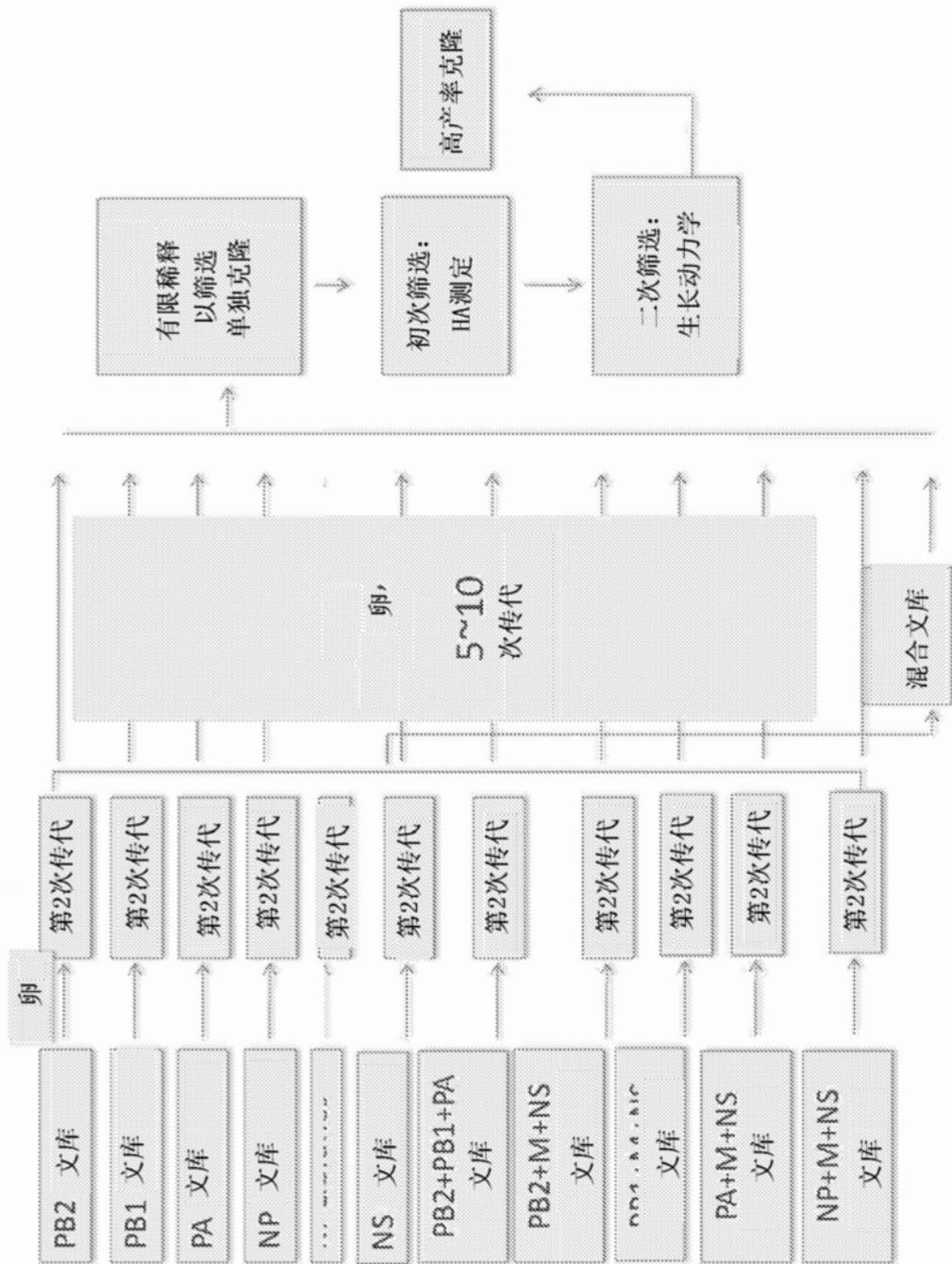


图15

从Vero细胞纯化的单独克隆的HA测定的总结

组	克隆数	倍数变化	%
WT HA 滴度 = $2^{6.5}$	5	-	2.3%
HA 滴度 = $2^{9-9.5}$	16	>5.6	7.4%
HA 滴度 = 2^{8-9}	91	>2.8 -5.6	42.2%
HA 滴度 = $2^{6.5-8}$	80	1 - 2.8	37.0%
HA 滴度 < $2^{6.5}$	24	<1	11.1%
总计	216	-	100%

图16

用不同PR8骨架突变体产生的重组病毒。

#	Del-HA & NA 基因	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
WT	CK/Indo/NC/09	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HY-1		I504V	M40L G180W	R401K	I116L	WT	A30P R118K
HY-2		E391Q		I30T E31K K142N	R74K S377N	WT	S161T
HY-3		I504V	M202L F323L	K142N	I116L	V97A Y100H	V136M S161T
HY-4		M202L F323L		K356R	I116L	V97A Y100H	K55E
HY-5			K356R	R422L	WT	K55E	

图17

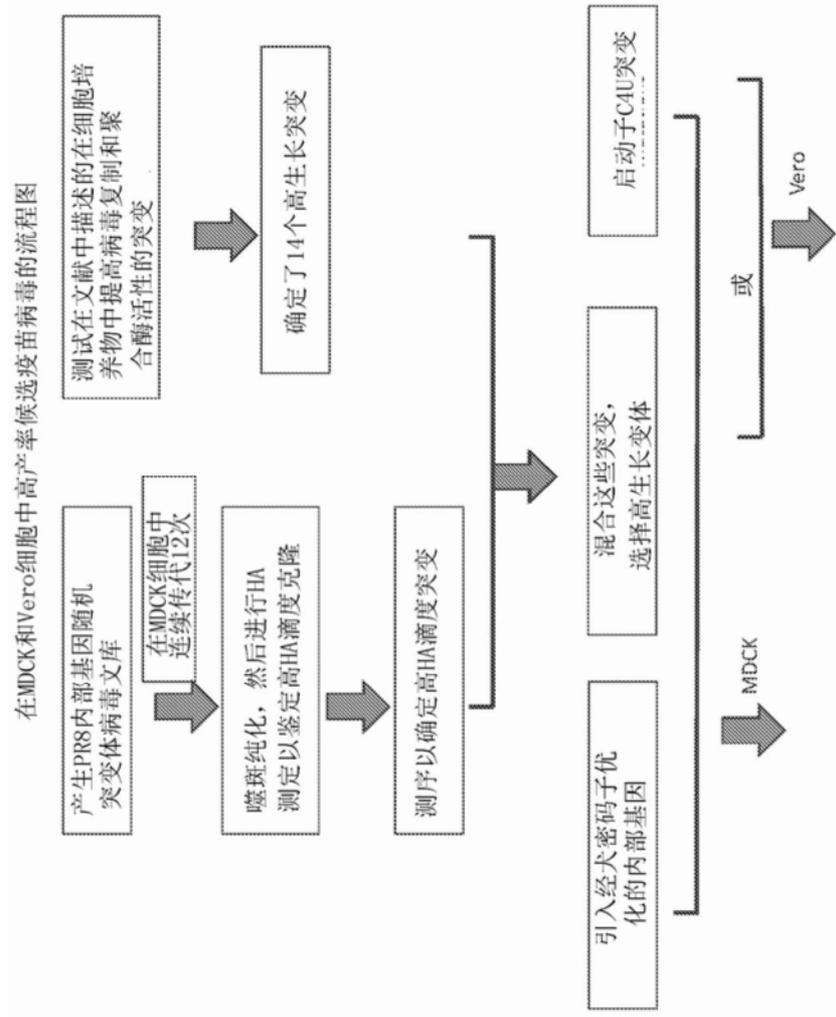


图18A

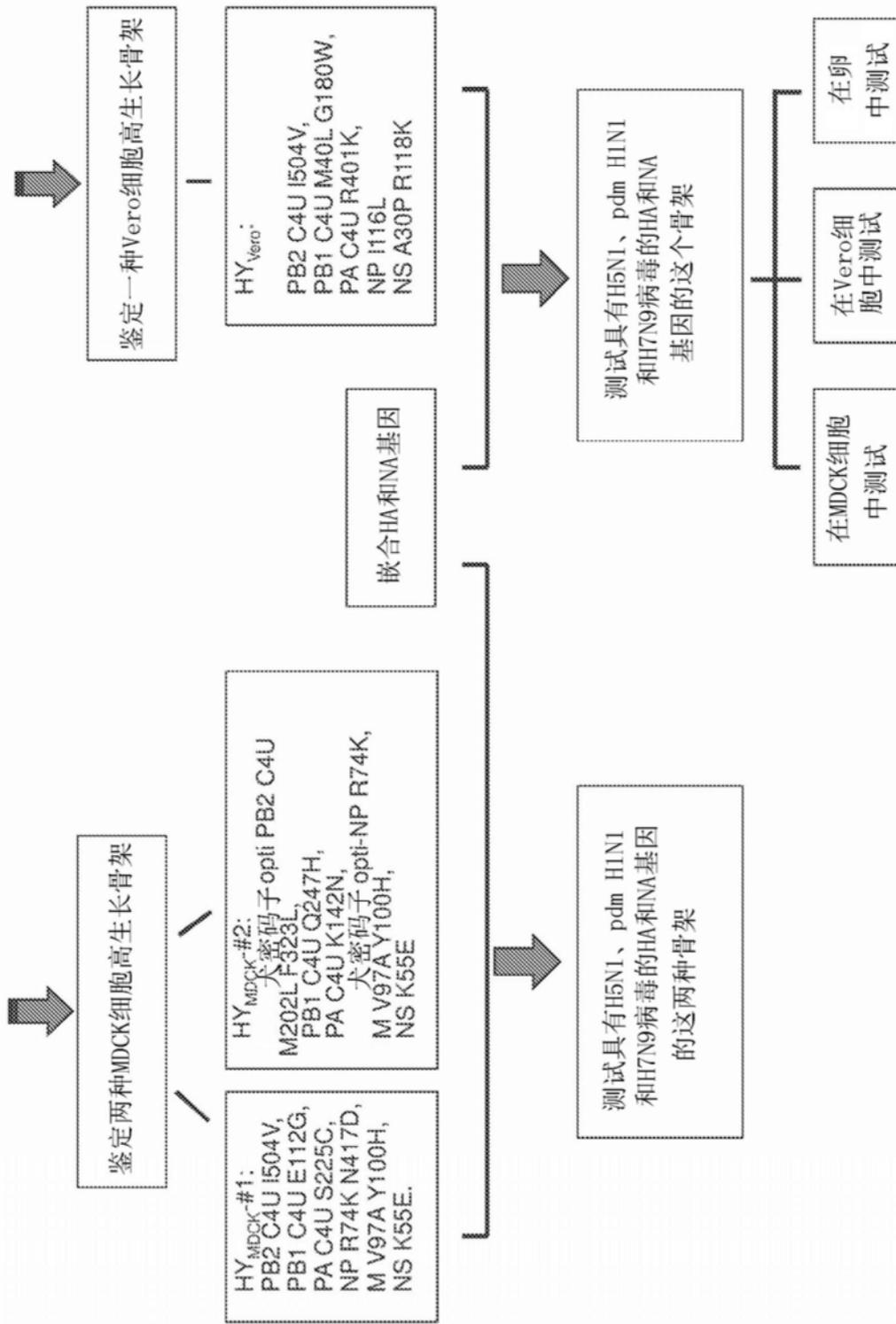


图18B

病毒编号	表面基因		UW-PR8 内部基因							生长基质	病毒滴度或HA滴度	倍数变化
	HA(H3编号)	NA	PB2	PB1	PA	NP	M1	NS1				
1	M476I		M202L F323L			R293M				MDCK	HA滴度	2.8
2	F252I	L56S	M202L F323L			I116L				MDCK	HA滴度	2.8
3			M202L F323L					A223E		MDCK	HA滴度	2.8
4	L182V		M202L F323L							MDCK	HA滴度	2.8-4
5				E112G (PB1-F2-R81G) ⁵						MDCK	HA滴度	2.8
6	E136D/ G179L/ A194V			R54I						MDCK	HA滴度	2.8-4
7	K162E			I667I/M714T						MDCK	HA滴度	4
8	L182V					I116L		R140Q		MDCK	HA滴度	2.8-4
9	L182V									MDCK	HA滴度	2.8-4
10	L182V		M202L F323L							MDCK	HA滴度	4
11	L182V		M66R							MDCK	HA滴度	2.8-4
12	L182V		M202L F323L							MDCK	HA滴度	4
13			M202L F323L	M507V/V644A						MDCK	HA滴度	4
14	L182V		I504V			R74K/ N417D		A30P		MDCK	HA滴度	2.8
15	K162E			E112G (PB1-F2-R81G)				S161T		MDCK	HA滴度	2.8
16				I667T						MDCK	HA滴度	2.8
17	K449E			M40L/G160W						MDCK	HA滴度	2.8
18	K162E			E112G (PB1-F2-R81G)/L624V				S161T		MDCK	HA滴度	2.8-4

图19A

病毒编号	表面基因		UW-PR8 内部基因							生长基质	病毒滴度或HA滴度	倍数变化
	HA(H3编号)	NA	PB2	PB1	PA	NP	M1	NS1				
19				E112G (PB1-F2-R81G)						MDCK	HA滴度	2.8
20				M40L G180W				S161T		MDCK	HA滴度	2.8-4
21			M202L F323L	R54I						MDCK	HA滴度	4-5.7
22	V184I		M202L F323L		F105C			P90S		MDCK	HA滴度	2.8-4
23			M202L F323L	Q247H						MDCK	HA滴度	2.8-4
24			M202L F323L			N224I				MDCK	HA滴度	2.8-4
25	M476I		I504V			R74K/ N417D				MDCK	HA滴度	2.8-4
26	M476I		M202L F323L	V644A	R401K				T49A	MDCK	HA滴度	4-5.7
27	F252I		I504V	V644A		M371V				MDCK	HA滴度	2.8
28	M476I	A265V	I504V	G62A A63P V644A N694K L685T		R74K/ N417D				MDCK	HA滴度	2.8
29	M476I		I504V	E75V D76G E78P P79V S80G V644A E697P F699L F700L P701H S702R Y705T						MDCK	HA滴度	2.8-4
30	F252I		I504V			R74K				MDCK	HA滴度	2.8-4
31	L182V		I504V			R74K				MDCK	HA滴度	2.8-4
32	F252I		M202L F323L	V644A						MDCK	HA滴度	4

图19B

病毒编号	表面基因		UW-PR8 内部基因								生长基质	病毒滴度或HA滴度	倍数变化
	HA(H3编号)	NA	PB2	PB1	PA	NP	MT	NS1					
33			I57V T58G A59V K61C E577D D678E P679M	E112G (PB1- F2-R81G) S713C							MDCK	HA滴度	2.8
34			M40I G180W						S161T		MDCK	HA滴度	2.8
35			R368K								MDCK	病毒滴度	2.8
36			E381K								MDCK	病毒滴度	3.8
37			I504V		I550L						MDCK	病毒滴度	4.3
38				PB1 F2 N66S							MDCK	病毒滴度	2.78
39				PB1 F2 K73R							MDCK	病毒滴度	3.9
40					K142N						MDCK	病毒滴度	2.1
41					K356R						MDCK	病毒滴度	3.9
42						R293K					MDCK	病毒滴度	3.36
43						R442K					MDCK	病毒滴度	2.4
44						T442A					MDCK	病毒滴度	2.6
46								V97A			MDCK	HA滴度	8
47								Y100H			MDCK	HA滴度	9
48								V97A Y100H			MDCK	HA滴度	9.5
49									K55E		MDCK	病毒滴度	2.1
50			M202L F323L	M507V V644A			I116L				MDCK	病毒滴度	9.9
51			M202L F323L	M507V V644A	K356R		T442A	V97A Y100H			MDCK	HA滴度	4.3
52			I504V	E112G (PB1- F2-R81G)	I550L		I112L	Y100H			MDCK	病毒滴度	1.3
									R140Q		MDCK	HA滴度	3.7
											MDCK	病毒滴度	3
											MDCK	HA滴度	3

图19C

病毒编号	表面基因		UW-PR8 内部基因							生长基质	病毒滴度或HA滴度	倍数变化
	HA (H3 编号)	NA	PB2	PB1	PA	NP	M1	NS1				
53			M202L F323L	M507V V644A		I116L	Y100H	K55E	MDCK	病毒滴度 HA滴度	9 6.5	
54			M202L F323L	Q247H	K142N	R74K	V97A Y100H	K55E	MDCK	病毒滴度 HA滴度	4.3 9.2	
55			I504V	E112G (PB1- F2-FB1G)	S225C	R74K N417D	V97A Y100H	K55E	MDCK	病毒滴度 HA滴度	14.9 6.5	
56			M202L F323L	M40L G180W	S225C	R422K	V97A Y100H	K55E	MDCK	病毒滴度 HA滴度	4.2 6.5	
57			C4U	C4U	C4U				MDCK	病毒滴度 HA滴度	3.3 2.1	
58		X-181 HA & NA (来源于 A/California/07/2009 pdmtH1N1)		G180E S261G S361R O621R N654S					MDCK	病毒滴度 HA滴度	3.5 2.1	
59		A/Chicken/Indonesia/NC/2009, A/Vietnam/1203/2004, A/Hubei/1/2010, A/Egypt/NC3072/2010, A/Indonesia/5/2005, A/Anthul/1/2013, X-181, X-223A							Vero	病毒滴度 HA滴度	5.1-269 2.2-134	
			C4U M40L G180W	C4U M40L G180W	C4U R401K	I116L	A30P R118K	MDCK	病毒滴度 HA滴度	1.8-29 1.3-5.5		
60		A/Chicken/Indonesia/NC/2009							卵细胞	病毒滴度 HA滴度	4.6-172 1.3-17.7	
			C4U I504V	C4U M40L G180W	C4U R401K	I116L	A30P R118K	Vero	病毒滴度 HA滴度	2.8 1.2		

注：1. #1至58的HA和NA基因均来自
A/Chicken/Indonesia/NC/2009 (H5N1) 或
A/Chicken/Indonesia/NC/2009的突变体HA和NA。
2. 本研究中使用的的所有H5N1 HA均经突变以去除多碱基切割位点以创建低致病性突变体。

图19D

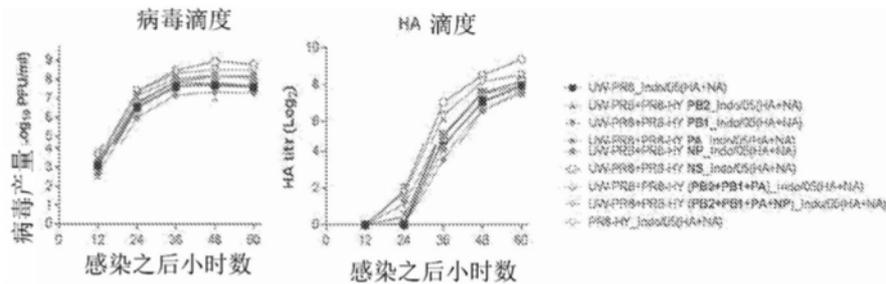


图20

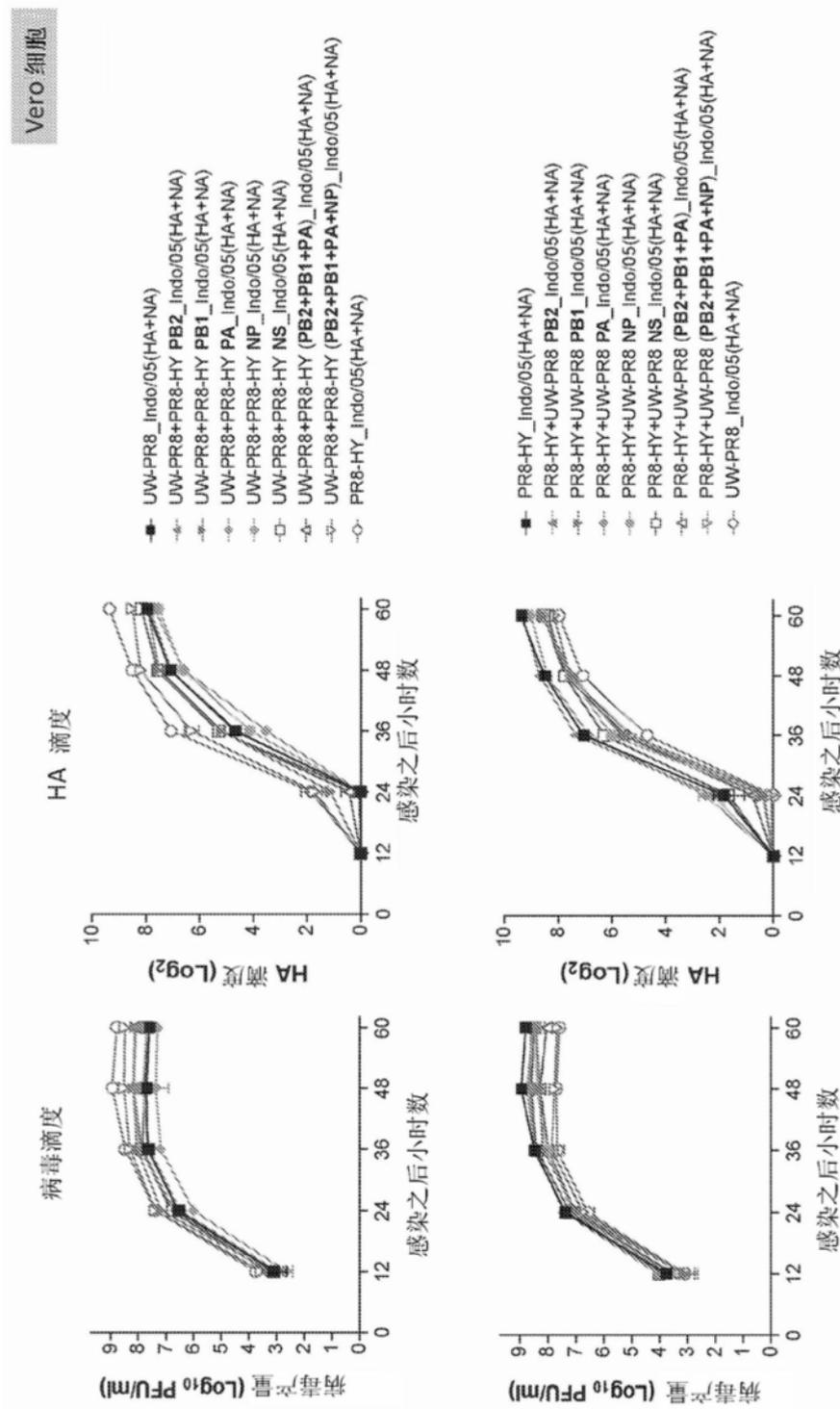


图20 (续)

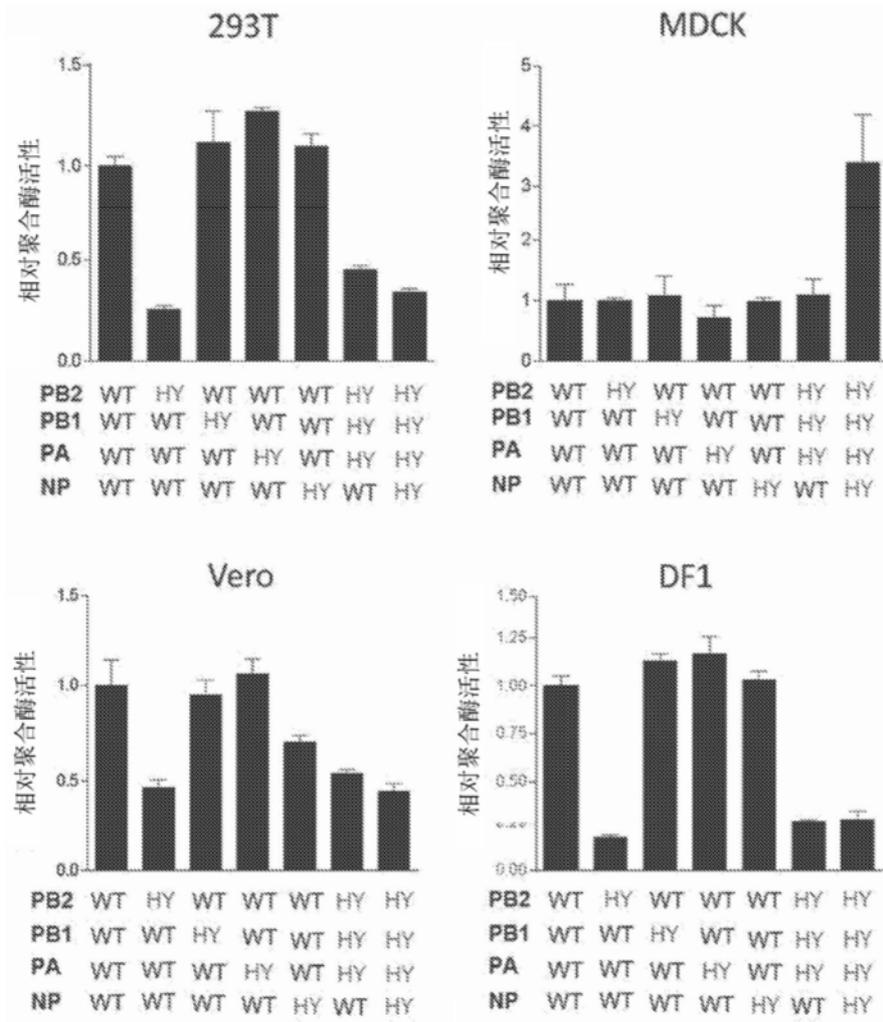


图21

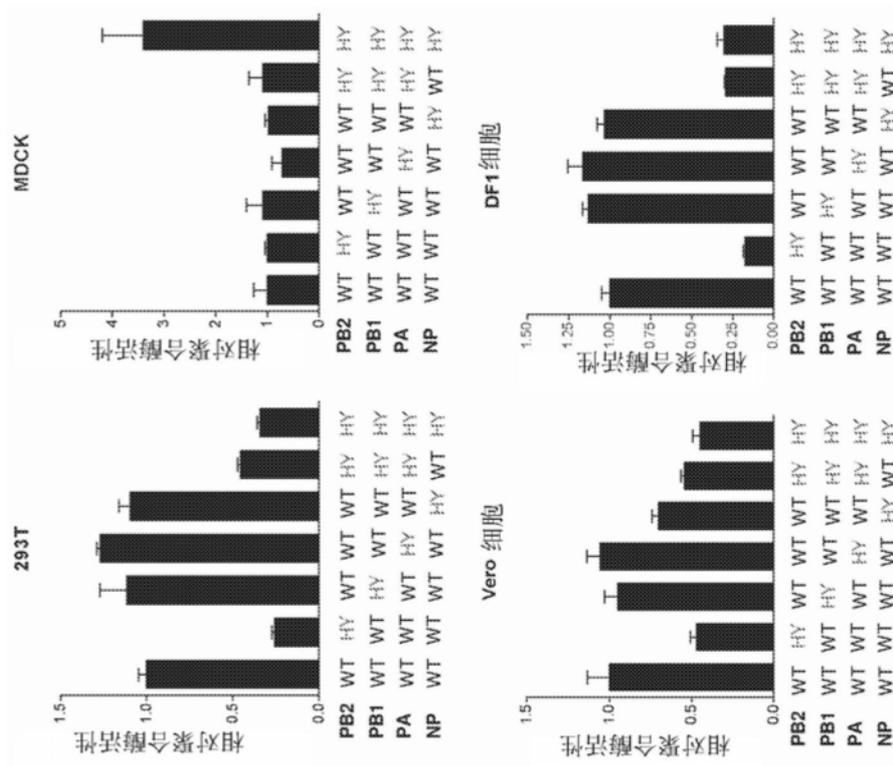


图21 (续)

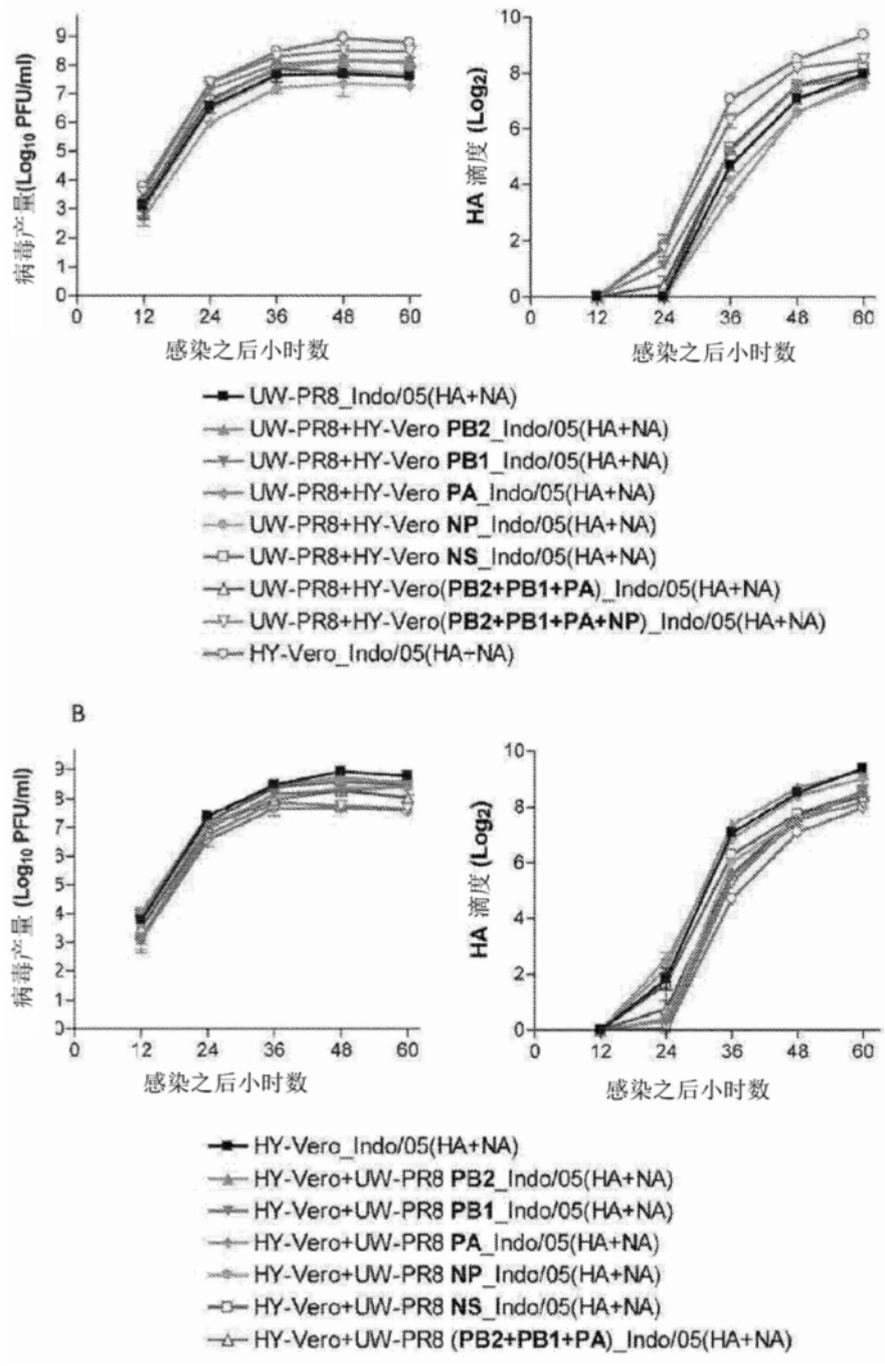


图22

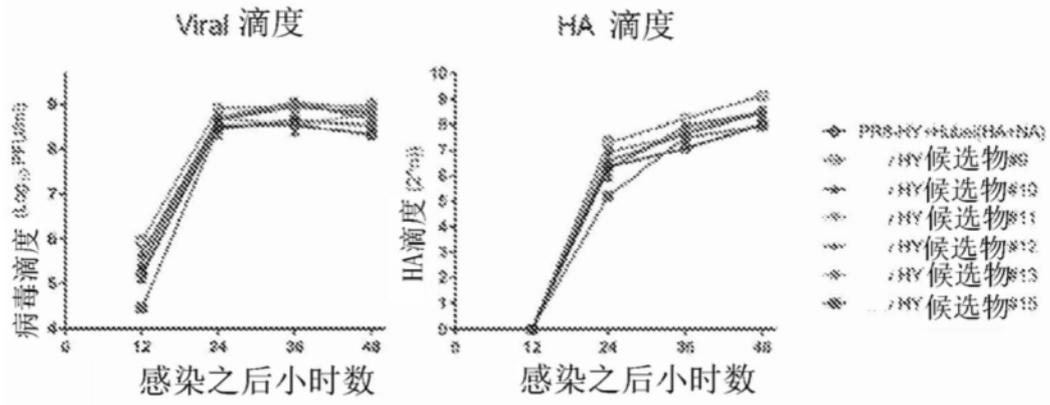


图23

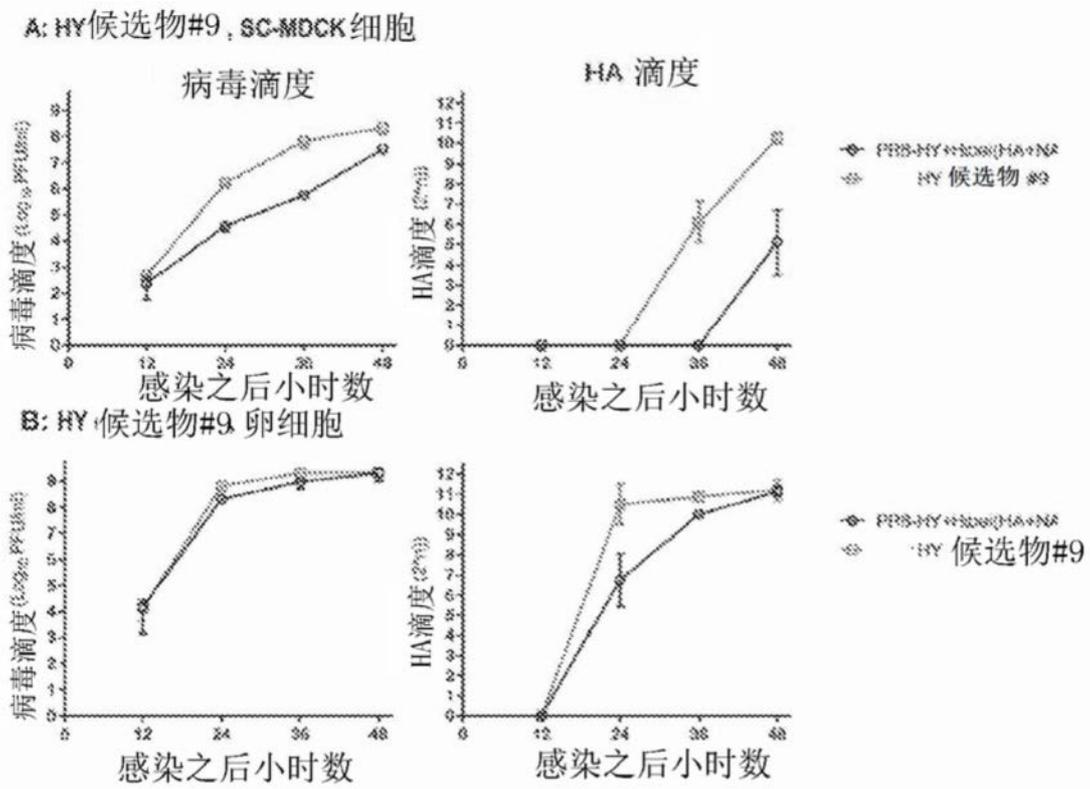


图24

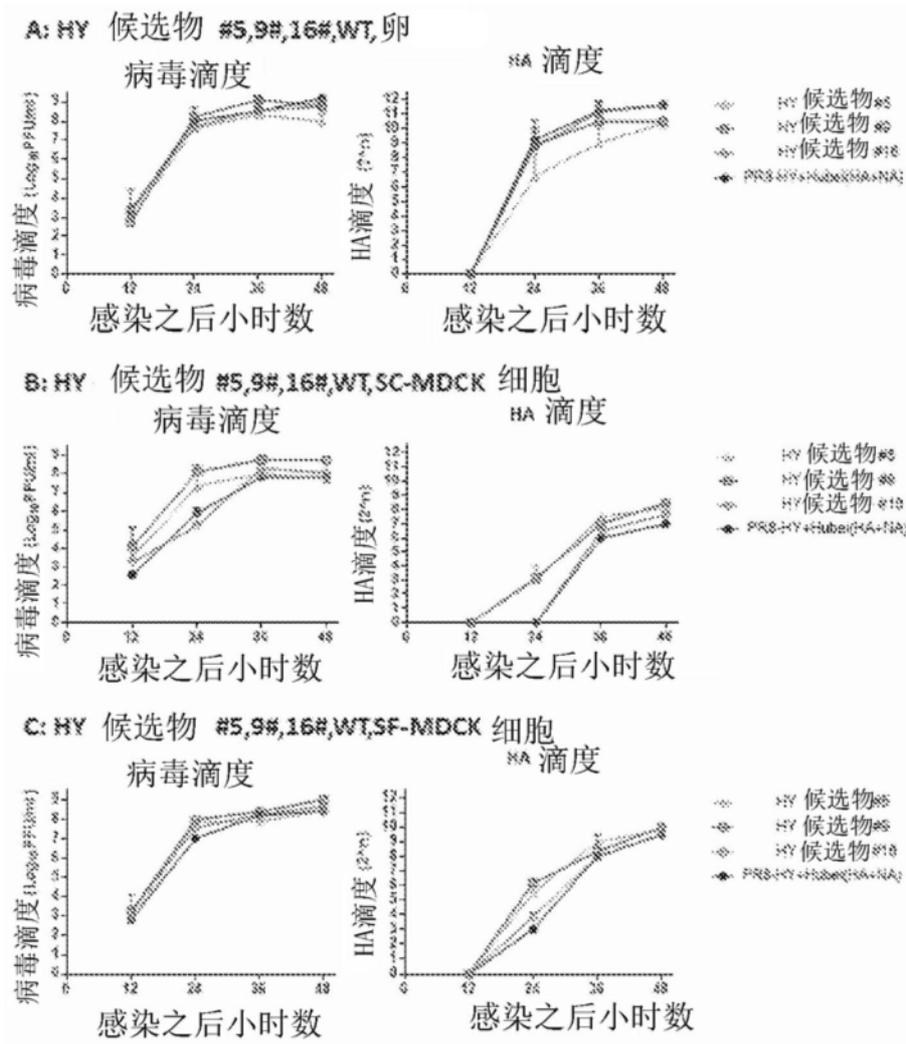


图25