



등록특허 10-2098585



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월08일

(11) 등록번호 10-2098585

(24) 등록일자 2020년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 7/00 (2006.01) *A61K 39/145* (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 7/00 (2013.01)

A61K 39/145 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0144460

(22) 출원일자 2018년11월21일

심사청구일자 2018년11월21일

(56) 선행기술조사문헌

Yonsei Med. J. 53(5):886-893, 2012.

KR1020140068205 A

KR101861933 B1

Journal of Virology. Vol. 87, No. 13, pp.

7539-7549, 2013.

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박만성

서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대치동, 대치포스코더샵아파트)

김진일

서울특별시 동대문구 왕산로 244, 1동 502호 (전농동)

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김정희

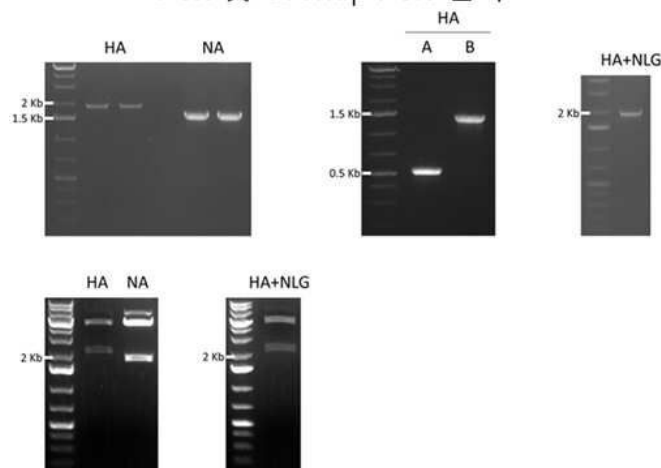
(54) 발명의 명칭 교차 면역원성을 갖는 H2 아형 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 168번째 글리신 또는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 175번째 글리신이 아스파라긴으로 치환된 H2 헤마글루티닌(Hemagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.

대표도 - 도1

PCR 및 overlap PCR 결과



Cloning 검증

(52) CPC특허분류

A61P 31/16 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 2760/16034 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 168번째 글리신 또는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 175번째 글리신이 아스파라긴으로 치환된 H2 헤마글루티닌(Hemagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아스파라긴은 당쇄화(Glycosylation)된, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 당쇄화는 N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 H2 헤마글루티닌은 조류 인플루엔자 바이러스 유래인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조류 인플루엔자 바이러스는 H2N2 또는 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 H2N2 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/duck/Hokkaido/95/01이고, 상기 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 백신.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 백신은 약독화된 생독 백신 또는 사독 백신인, 인플루엔자 바이러스 백신.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 제조합 인플루엔자 백신주 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 감염 질환의 예방용 약학 조성물.

청구항 11

제7항의 인플루엔자 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 교차 면역원성을 갖는 H2 아형 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오르소믹소바이러스과(Family Orthomyxoviridae)에 속하는 A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 감염 질환(독감)은 인수공통 전염병으로 인간뿐만 아니라 돼지, 말, 조류 등에서 발병하며, 공중보건학적·경제적으로 중요하게 인식되는 호흡기 질환이다.

[0004] 인플루엔자 바이러스는 변이성이 높으며 이종 간 전파 가능성이 있어 신종인플루엔자 바이러스나 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus, AIV)의 대유행에 대비하는 일이 큰 이슈로 떠오르고 있다.

[0005] A형 인플루엔자의 아형(subtype)은 표면 단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 및 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA)의 항원성 차이에 따라 구분되며, 이들은 각각 H 아형과 N 아형으로 표시된다. A형 인플루엔자 바이러스의 HA 아형은 H1부터 H16까지 16가지, NA 아형은 N1부터 N9까지 9가지 종류가 발견되어, 산술적으로 존재 가능한 인플루엔자 바이러스의 아형은 144가지이다. 이와 더불어 최근 박쥐에서 분리된 인플루엔자-유사 바이러스(influenza-like virus)인 H17N10과 H18N11의 존재가 새로이 규명된 바 있다.

[0006] 인플루엔자 바이러스 유전자는 8개의 음성(negative-polarity) 단일가닥 RNA 절편(PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS)으로 구성되고, 이들 8개의 RNA 절편으로부터 중합효소복합체의 구성체인 PB2, PB1 및 PA 단백질(polymerase subunit B2, B1, A; 각각 PB1, PB2, PA)과 헤마글루티닌 단백질(hemagglutinin; HA), 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein; NP), 뉴라미니다아제 단백질(neuraminidase, NA), 매트릭스 단백질 1 및 2(matrix protein 1, 2; 각각 M1, M2), 및 비구조성 단백질 1 및 2(nonstructural protein 1, 2; 각각 NS1, NS2)가 생성된다.

[0007] 인플루엔자 백신은 역유전학 기술(reverse genetics system)을 사용하여 제조할 수 있으며, 특히 고병원성 조류 인플루엔자 백신은 HA 단백질에 존재하는 절단 부위(cleavage site)를 제거해야 하므로 역유전학 기술로만 제조할 수 있다. 예를 들어, 한 방향으로만 바이러스 유전자의 mRNA가 생성되고, 다른 방향에서는 viral RNA가 생성되는 8개의 플라스미드를 세포에 도입(transfection)하여 제조합 바이러스를 제조(rescue)할 수 있다.

[0008] 통상적으로 HA와 NA 유전자는 최근 유행하는 바이러스로부터 PCR로 증폭하여 벡터에 클로닝하고, 나머지 유전자 6개는 유정란에서 효율적으로 증식하는 PR8 바이러스 유래의 것을 사용하여 세포에 도입하면 백신주 바이러스를 제조(rescue)할 수 있다. 그리고 이러한 바이러스를 불활성화 하거나 약독화하여 사독백신 또는 약독화된 생독 백신으로 제조할 수 있다.

- [0009] 이러한 AIV 아형 중 H2 아형 인플루엔자 바이러스는 조류에서 감염 사례는 보고되고 있고, 1957년에 대유행을 일으키고 1968년까지 인체 감염 사례가 보고되었으나 전세계적으로 이에 대한 백신주 개발은 미비한 실정이다.
- [0010] 최초의 AIV 인체감염 사례가 발생한 1997년(홍콩, H5N1) 이후, 몇몇 AIV 아형에 의한 인체감염 사례가 지속적으로 보고되었으며, 이들은 인체감염 시 높은 치사율(H5N1 및 H7N9이 각각 약 52% 및 약 38%, 2018년 3월 22일 현재; WHO 및 FAO 보고 내용 참고)을 초래하였다. 현재까지 인간에서 인간으로의 전염에 의한 AIV 감염 사례는 없는 것으로 확인되고 있으나, 페럿(ferret) 간 H5N1 AIV 전파를 기술한 최근 보고서에서는 AIV 대유행의 가능성을 제시하기도 하였다.
- [0011] 이와 같이 H2 아형 인플루엔자 바이러스의 대유행에 대비하기 위한 백신주의 개발이 요구되며, 특히 H2 아형 인플루엔자 바이러스의 유전적 다양성에 따른 항원성 차이를 극복할 수 있도록 교차 면역원성을 갖는 백신주의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 교차 면역원성을 갖는 H2 아형의 당쇄화 변이가 도입된 헤마글루티닌(HA) 유전자를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은, 본 발명의 인플루엔자 바이러스 백신을 이용하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 168번째 글리신 또는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 175번째 글리신이 아스파라긴으로 치환된 H2 헤마글루티닌(Hemagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 아스파라긴은 당쇄화(Glycosylation)될 수 있다.
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 당쇄화는 N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)일 수 있다.
- [0020] 일 측에 따르면, 상기 H2 헤마글루티닌은 조류 인플루엔자 바이러스 유래일 수 있다.
- [0021] 일 측에 따르면, 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 H2N2 또는 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스일 수 있다.
- [0022] 일 측에 따르면, 상기 H2N2 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/duck/Hokkaido/95/01이고, 상기 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 백신이 제공된다.
- [0024] 일 측에 따르면, 상기 백신은 약독화된 생독 백신 또는 사독 백신일 수 있다.
- [0025] 일 측에 따르면, 상기 인플루엔자 바이러스 백신은 H2N1, H2N2, H2N3, H2N4, H2N5, H2N6, H2N7, H2N8 및 H2N9 아형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 H2 아형 인플루엔자 바이러스에 교차 면역원성을 나타낼 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 감염 질환의 예방용 약학 조성물이 제공된다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 인플루엔자 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 H2 아형에서 유래된 헤마글루티닌(HA)의 특정 아미노산 잔기를 당쇄화

하여, 다양한 H2 아형 인플루엔자 바이러스(H2N1, H2N2, H2N3, H2N4, H2N5, H2N6, H2N7, H2N8 및 H2N9 등)에 교차 면역원성을 부여함에 따라, 광범위한 중화 항체 효과를 가진 바이러스 백신의 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 당쇄화된 H2 HA를 포함함으로써, 당쇄화되지 않은 통상의 H2 HA에 비해 생산성이 뛰어난 동시에 병원성은 낮은 특성을 가진다.

[0031] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 HA 유전자와 NA 유전자의 PCR 결과 및 클로닝을 통한 검증 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 HA 유전자와 NA 유전자의 PCR 결과 및 클로닝을 통한 검증 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 PB2, PB1, PA, NP, M 및 NS 유전자의 PCR 결과 및 클로닝을 통한 검증 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 H2N2 아형 WT 및 NLG 변이 백신후보주의 바이러스 플라크 형태(viral plaque morphology) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 H2N3 아형 WT 및 NLG 변이 백신후보주의 바이러스 플라크 형태(viral plaque morphology) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 MDCK 세포의 H2N2 아형 WT 백신후보주 감염 후 시간에 따른 바이러스 성장 역가 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 MDCK 세포의 H2N3 아형 WT 및 NLG 변이 백신후보주 감염 후 시간에 따른 바이러스 성장 역가 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 CEF 세포의 H2N2 아형 WT 백신후보주 감염 후 시간에 따른 바이러스 성장 역가 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 CEF 세포의 H2N3 아형 WT 및 NLG 변이 백신후보주 감염 후 시간에 따른 바이러스 성장 역가 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 닭 유정란의 H2N2 아형 WT 백신후보주 감염 후 시간에 따른 바이러스 성장 역가 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 닭 유정란의 H2N3 아형 WT 및 NLG 변이 백신후보주 감염 후 시간에 따른 바이러스 성장 역가 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 H2N2 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 후 동종 바이러스에 감염시킨 경우의 체중변화를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 H2N2 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 후 동종 바이러스에 감염시킨 경우의 생존율을 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 H2N2 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 후 동종 바이러스에 감염시킨 경우의 폐 조직 내 바이러스의 역가를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 H2N3 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 후 동종 바이러스에 감염시킨 경우의 체중변화를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 H2N3 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 후 동종 바이러스에 감염시킨 경우의 생존율을 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 H2N3 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 후 동종 바이러스에 감염시킨 경우의 폐 조직 내 바이러스의 역가를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0035] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0036] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0037] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0038] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA)"은 인플루엔자 바이러스의 표면 당단백질 중 하나로서 바이러스의 숙주 세포막 부착과 바이러스의 세포 침투 동안 바이러스-세포막의 융합을 매개하며, 인플루엔자 아형의 항원 특이성을 결정하는 인플루엔자 바이러스의 표면 항원단백질이다.
- [0040] 통상적인 H2 아형 인플루엔자 바이러스는 헤마글루티닌(HA) 구형 헤드 영역에 존재하는 168번 또는 175번 위치의 아미노산이 글리신으로 존재하며, 해당 아미노산 잔기의 당쇄화가 결여되어 있다.
- [0041] 본 발명자들은 H2N2 HA 아미노산 서열의 168번째 글리신 또는 H2N3 HA 아미노산 서열의 175번째 글리신을 아스파라긴으로 치환하는 경우 해당 아미노산 잔기에 당쇄화(Glycosylation)가 일어나게 되고, 이를 통해 H2 아형 인플루엔자 백신에 교차 면역원성을 부여할 수 있음을 실험을 통해 확인하였다.
- [0042] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 168번째 글리신 또는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 175번째 글리신이 아스파라긴으로 치환된 H2 헤마글루티닌(Hemagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다. 상기 아스파라긴은 당쇄화된 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 당쇄화는 N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)이다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "당쇄화(Glycosylation)"는 당분자에서 헤미아세탈 수산기가 제거된 글리코실기를 단백질에 전위하는 반응을 의미한다. 상기 당쇄화는 각 반응에 특이적인 글리코실전달효소가 촉매로 관여하며, 당뉴클레오타이드를 공급체 기질로 하는 경우가 주를 이룬다. 수용체로는 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 히드록실리신 등의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 이러한 잔기에 전이된 올리고당에 점차로 단당을 전이하는 연속반응에 의해 복합당질을 합성할 수 있다. 상기 복합당질은 생체조직의 구성물질, 특히 세포외 기질의 주성분이 될 수 있고, 그 외 세포 표면에서 세포 인식에도 중요한 역할을 담당한다.
- [0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)"는 번역(translation) 후의 단백질 변형 중 하나로, 다당류와 부착할 수 있는 단백질 내 3개의 연속된 아미노산 서열인 시퀀(sequon)이 "N-X-S/T(X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산)"으로 이루어진 경우, 아스파라긴(Asn, N) 잔기 상에 글리칸(glycan)이 접합되는 것을 의미한다. 이하, "NLG 첨가"는 비-당쇄화 아미노산의 당쇄화를 의미하고, "NLG 제거"는 당쇄화 아미노산의 비-당쇄화를 의미한다.
- [0045] 인플루엔자 바이러스의 HA 구형 헤드 영역 주변의 NLG 상태 변화는 시알산(SA, Sialic Acid) 수용체에 대한 바이러스의 결합성에 영향을 미칠 수 있어, 결과적으로 바이러스의 감염성이나 교차 면역원성 등의 특성을 변화시킬 수 있다. 또한, NLG 변화는 종종 특정 항원 부위(antigenic site)의 차폐(masking) 및 숙주 면역기구의 인식으로부터 바이러스 자신을 숨기는 면역 회피를 야기할 수 있다.

- [0046] 종래 1918년과 2009년에 유행한 H1N1 바이러스의 HA 헤드 영역 주변의 NLG 상태 변화, 구체적으로 NLG 첨가는 상기 H1N1 바이러스에 대한 교차 면역 반응을 제공한다는 연구결과가 보고된 바 있다.
- [0047] 또한, 이와 유사한 방법으로, 2009년에 유행한 H1N1 바이러스 HA 헤드 영역에 NLG를 첨가하였을 때 서로 다른 아미노산 변이를 갖는 다양한 NLG 돌연변이에 대해 광범위한 HI 및 PRNT 반응을 보인다는 연구결과가 보고되었다.
- [0048] 이에 대해, 본 발명자들은 인체감염 가능성이 있는 조류 인플루엔자 바이러스 유래의 H2 헤마글루티닌을 이용하여, 이의 특정 아미노산에 NLG 첨가 돌연변이를 유발하여 백신 효능을 검증하고자 하였다.
- [0049] 이 때, 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 H2 아형 헤마글루티닌을 보유한 조류 인플루엔자 바이러스일 수 있고, 구체적으로 H2N2 또는 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 더 구체적으로 상기 H2N2 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/duck/Hokkaido/95/01이고, 상기 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996일 수 있다.
- [0050] 상기 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스 제조를 위해, 본 발명자들은 A/Puerto Rico/8/34의 6개의 내부 유전자를 백본(backbone)으로, NLG 첨가된 HA(HA+168) 및 A/duck/Hokkaido/95/01(H2N2) 바이러스의 NA 유전자를 이용하여 H2N2 백신을 제조하였다.
- [0051] 또한, 이와 동일한 방법으로 A/Puerto Rico/8/34의 6개의 내부 유전자를 백본(backbone)으로, NLG 첨가된 HA(HA+175) 및 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996 (H2N3) 바이러스의 NA 유전자를 이용하여 H2N3 백신을 제조하였다.
- [0052] 상기 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)으로부터 유래된 6개의 내부 유전자로서, 중합효소복합체의 구성체인 PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)와 뉴클레오캡시드 단백질(Nucleocapsid protein, NP), 매트릭스 단백질(Matrix protein, M), 및 비구조성 단백질(Nonstructural protein, NS)을 각각 암호화하는 유전자를 이용할 수 있다.
- [0053] 이 때, 상기 뉴라미니다아제(NA)는 H2N2 또는 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스 유래일 수 있고, 구체적으로 상기 H2N2 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/duck/Hokkaido/95/01이고, 상기 H2N3 아형 조류 인플루엔자 바이러스는 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996일 수 있다.
- [0054] 구체적으로, 상기 매트릭스 단백질(M) 암호화 유전자는 M1 및 M2 단백질을 발현하고, 상기 비구조성 단백질(NS) 암호화 유전자는 NS1 및 NS2 단백질을 발현할 수 있다.
- [0055] 상기 HA 헤드 영역에서 NLG 첨가는 H2N2 또는 H2N3 바이러스를 이용한 백신에 교차 면역원성을 부여할 수 있으며, 이를 통해 제조된 바이러스 백신은 구체적으로 H2N1, H2N2, H2N3, H2N4, H2N5, H2N6, H2N7, H2N8 및 H2N9 아형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 H2 아형 인플루엔자 바이러스에 교차 면역원성을 낼 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스는 병원성과 면역원성 간의 균형을 유지할 수 있도록 조절하여 고효율의 약독화된 생독 백신으로 사용될 수 있다.
- [0057] 이에 따라, 본 발명의 다른 일 실시예는 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 백신이 면역 반응을 일으킬 수 있는 숙주 동물은 인간, 개, 고양이, 돼지, 말, 닭, 오리, 칠면조, 페렛 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 인간이다.
- [0058] 본 발명의 백신은 약독화된 생독 백신, 사독 백신, 서브유닛(subunit) 백신, 합성 백신 또는 유전공학 백신일 수 있다.
- [0059] 본 명세서에서 사용된 용어 "생독 백신"이란 살아있는 바이러스 활성성분을 포함하는 백신을 의미한다. 또한 용어 "약독화된(attenuation)"이란 살아있는 병원체의 독성을 인공적으로 약하게 한 것으로, 병원체의 필수 대사에 관여하는 유전자를 변이시켜 체내에서 질병을 일으키지 못하고 면역 체계만을 자극해서 면역성을 유도하는 것을 의미한다. 바이러스의 약독화는 자외선(UV) 조사, 약품처리 또는 시험관 내 교차 연속 계대배양에 의해 달성될 수 있다. 약독화는 또한 명확한 유전 변화를 만듦으로써, 예를 들어 독성을 제공하는 것으로 알려진 바이러스서열의 특정 결실 또는 바이러스 게놈 내로의 서열의 삽입에 의해 달성될 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 사용된 용어 "사독 백신"은 불활성화 백신 또는 사균 백신이라고도 하며, 죽은 바이러스를 포함한 백신이다. 이의 예로는 전 바이러스 백신(whole-virus vaccine)과 분할 백신(split vaccine)이 있으며, 이

들은 공지된 방법으로 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 전 바이러스 백신은 바이러스 전체에 포르말린을 처리하여 제조할 수 있으며, 분할 백신은 바이러스에 에테르를 처리하여 외피만을 분쇄, 수득함으로써 제조할 수 있다.

- [0061] 본 명세서에서 사용된 용어 "서브유닛 백신"은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다. 예를 들면, 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 추출하여 사용할 수 있다.
- [0062] 본 명세서에서 사용된 용어 "합성 백신"은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 제조합 DNA 기술로 생산한 펩타이드를 포함한 백신으로, 예를 들면, 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 합성하여 사용할 수 있다.
- [0063] 본 명세서에서 사용된 용어 "유전공학 백신"은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 백신은 면역원성을 강화시키기 위해 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다. 면역증강제로는 완전 프로인트 면역증강제(CFA, Complete Freund's Adjuvant), 불완전 프로인트 면역증강제(IFA, Incomplete Freund's Adjuvant), 스쿠알렌(Squalene), 스쿠알란(Squalane), 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 및 사포닌(Saponin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있고, 바람직하게는 수산화알루미늄과 인산알루미늄이 겔 상으로 혼합된 것(Alum)을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 나아가, 본 발명의 백신은 상기 면역증강제 뿐만 아니라, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 본 발명의 백신을 제형화하기 위해 사용하는 것으로 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 텍스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] 한편, 본 발명의 백신 이에 포함된 제조합 인플루엔자 바이러스 외 이중 인플루엔자 바이러스에 교차 면역반응을 형성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 백신이 A/duck/Hokkaido/95/01(H2N2) 또는 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996(H2N3) 바이러스 기반의 제조합 인플루엔자 바이러스를 포함하면, 본 발명의 백신의 접종은 다른 H2 아형의 인플루엔자 바이러스에 대한 항체를 형성할 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 백신은 불활성화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 조류 인플루엔자를 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용될 수 있다. 상기 혼합 백신은 서로 다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 의미하며, 복합 백신은 바이러스 백신과 세균 백신을 함께 사용한 백신을 의미한다.
- [0072] 상기 백신은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비강내, 흡입, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0073] 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 상기 백신의 비경구 투여는 바람직한 순도 하에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에 비독성이고 다른 제제 성분과 혼화될 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으로 조제하는 것이 바람직할 수 있다.

- [0074] 상기 백신의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 백신의 제형은 정제, 캡셀제, 연질캡셀제, 수액제, 과립제, 환제 또는 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 위와 같은 약학적 효능에 기초하여, 본 발명의 또 다른 일 실시예는 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 및 그 외 추가로 포함될 수 있는 성분에 관해서는 전술한 것과 같다.
- [0076] 상기 인플루엔자 감염 질환은 인플루엔자 감염에 의해 유발되는 질환으로 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0077] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0078] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0079] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차로 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0080] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 진단용 조성물 또는 인플루엔자 바이러스 진단 키트를 제공한다.
- [0081] 나아가, 본 발명의 다른 일 실시예는 상기 진단용 조성물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 이 때, 상기 시료는 인플루엔자 바이러스에 감염된 것으로 예상되거나 감염된 세포, 혈액, 소변, 타액 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 상기 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원은 항원-항체 복합체 반응을 통해 감염될 또는 감염된 세포중의 인플루엔자 바이러스를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.
- [0083] 상기 진단용 조성물 및 진단 키트는 상기 인플루엔자 바이러스뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등을 포함할 수 있다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나, 이로 한정되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip)등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0085] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하도록 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜

스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시피라아제 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0086] 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 방사성 동위원소로는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{56}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 를 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0088] 이하에서는, 본 발명의 실시예에서 사용된 실험 재료 및 방법에 대해 상세히 기술한다.

[0090] **실시예 1: H2 아형 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스의 제조**

[0091] **1-1. H2 아형 헤마글루티닌 유전자 역유전학법용 플라스미드 제조**

[0092] A/duck/Hokkaido/95/01(H2N2) 및 A/silkie chicken/Pennsylvania/9600897/1996(H2N3) 바이러스의 HA, NA 유전자를 역유전학법용 플라스미드인 pDZ 벡터에 삽입하고, 이를 주형으로 하는 PCR 반응을 통해 H2N2 아형 HA 유전자(서열번호 1), H2N2 아형 NA 유전자(서열번호 4), H2N3 아형 HA 유전자(서열번호 6) 및 H2N3 아형 NA 유전자(서열번호 9)를 확보하였다. 확보된 HA, NA 유전자는 pDZ 벡터로 클로닝 한 뒤, XbaI을 이용하여 삽입 여부를 확인하였고, 이를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0094] **1-2. H2 아형 HA 유전자의 당쇄화 변이 도입**

[0095] 상기 실시예 1-1에 기술된 방법으로 제작된 HA 플라스미드를 주형으로 하여, overlap extension PCR 방법을 통해 당쇄화 변이를 도입하였다. PCR은 당쇄화 변이를 도입할 아미노산 자리를 중심으로 수행하였으며, 이를 통해 두 개의 단편을 확보하였다. 확보된 단편을 주형으로 overlap extension PCR을 수행하여 당쇄화 변이가 도입된 H2N2 아형 HA 유전자(서열번호 3) 및 H2N3 아형 HA 유전자(서열번호 8)를 확보하였다. H2N2 아형 HA 유전자 및 H2N3 아형 HA 유전자를 pDZ 벡터에 클로닝 한 뒤, XbaI 를 이용하여 삽입 여부를 확인하였고, 이를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0097] **1-3. H2 아형 백신주의 제작**

[0098] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 확보된 H2N2 아형 HA 유전자(서열번호1), 당쇄화 변이(NLG) H2N2 아형 HA 유전자(서열번호 3), H2N3 아형 HA 유전자(서열번호 6) 및 당쇄화 변이(NLG) H2N3 아형 HA 유전자(서열번호 8)와, A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스로부터 확보한 6개의 내부 유전자인 PB2(서열번호 11), PB1(서열번호 12), PA(서열번호 13), NP(서열번호 14), M(서열번호 15) 및 NS(서열번호 16)를 삽입하여 4개의 H2 아형 재조합 백신주 바이러스를 제작하기 위한 wild type(wt) H2N2, 당쇄화 변이(NLG) H2N2, wt H2N3 및 당쇄화 변이(NLG) H2N3 아형 플라스미드 세트(HA, NA 유전자 조합 및 6개의 내부 유전자 플라스미드)를 준비하였다. 상기 플라스미드 세트를 293T-MDCK 혼합세포에 도입(transfection)하고 TPCK-처리된 트립신 1ug/ml 를 보충하였다. 48 내지 72 시간 후, 세포 상층액을 회수하고 재조합 바이러스를 증식시키기 위하여 10일령의 유정란(chicken embryonated egg)에 접종하였다. 접종 48시간 후, 상기 유정란에서 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스를 분리하였다.

[0100] **실시예 2: 백신후보주의 viral plaque morphology 분석**

[0101] 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스의 *in vitro* 특성을 분석하기 위해, 30 PFU 전후의 상기 실시예 1-3에서 제조된 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스를 MDCK 세포에 감염시킨 후, semi-solid agarose가 첨가된 세포배양액으로 세포를 덮어주었다. 감염 48-72시간 후, 크리스탈 바이올렛 시약으로 살아있는 세포를 염색하여 관찰하고, 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0102] 도 4를 참고하면, 당쇄화 변이가 없는 WT 백신후보주의 경우, 상당히 작은 직경의 viral plaque를 형성하였으나(좌), NLG 변이 백신후보주는 heterologous morphology로 관찰되며(우), WT 백신후보주 보다 큰 직경의 viral plaque를 형성하는 것으로 확인되어 생산성이 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 도 5를 참고하면, 당쇄화 변이가 없는 WT 백신후보주 및 NLG 변이 백신후보주 모두 H2N2 아형 백신후보주에 비해 상대적으로 큰 직경의 viral plaque를 형성하고 있다. 그러나, NLG 변이 도입에 의한 plaque size의 변화는 관찰되지 않았다.

[0104] **실시예 3: 백신후보주의 세포 성장 특성 분석**

- [0105] 3-1. MDCK 세포
- [0106] 6-well plate에 MDCK 세포를 monolayer로 준비하고, 0.001 감염다중도(multiplicity of infection, MOI) 역가로 상기 실시예 1-3에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스를 1시간 동안 감염시킨 후, 세포 배지(media)로 wash 하여 viral inoculum을 완전히 제거하였다. 이후, 세포배양액을 넣어준 후 8시간, 16시간, 24시간 및 48시간째에 수득한 세포배양액의 MDCK 세포를 plaque assay법을 이용하여 백신후보주의 세포성장 특성을 분석하였고, 상기 실험을 3회 진행하여 각 시간대별 바이러스 성장 역가의 표준편차 분석하여, 이를 도 6 및 도 7에 나타냈다.
- [0107] 도 6을 참고하면, H2N2 백신후보주의 경우, 상당히 작은 직경의 viral plaque를 형성하였음에도 MDCK 세포에서는 감염 초기 상당히 가파른 증가폭의 성장 특성을 나타냈다. 특히, 감염 후 8시간째에 약 $10^1 - 10^2$ PFU/ml 정도였던 바이러스 역가가 16시간째에 약 10^5 PFU/ml 역가까지 증가하여 상당한 증가폭을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이후에도 성장세는 지속되어, 감염 후 48시간째에는 약 10^9 PFU/ml 이상의 성장 역가를 보였다. 하지만, H2N2 NLG 변이 백신후보주의 경우, H2N2 백신 후보주 보다 약 1-2 log scales 정도 낮은 성장 역가를 보이며, 감염 후 48시간째에는 약 10^8 PFU/ml 이상의 성장 역가를 보였다.
- [0108] 도 7을 참고하면, H2N3 백신후보주의 경우에도 MDCK 세포에서 감염 후 48시간째에 약 10^9 PFU/ml 정도의 성장 역가를 나타내는 것으로 확인되나, H2N2 아형 백신후보주에서의 양상과 달리, 감염 초기의 바이러스 성장폭이 상대적으로 낮게 나타났고, NLG 변이에 의해 미미한 정도의 감쇠(attenuation)특성을 보였다. 하지만, 시간의 경과에 따라 NLG 변이에 의한 성장 특성 감소 효과는 사라지고, 감염 후 48시간째에 WT 및 NLG 변이 백신후보주 모두 약 10^9 PFU/ml 이상의 역가를 내는 것을 확인할 수 있다.
- [0110] 3-2. CEF(chicken embryo fibroblast) 세포
- [0111] 6-well plate에 CEF 세포를 monolayer로 준비하고, 0.001 감염다중도(multiplicity of infection, MOI) 역가로 상기 실시예 1-3에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스를 1시간 동안 감염시킨 후, 세포 배지(media)로 wash 하여 viral inoculum을 완전히 제거하였다. 이후, 세포배양액을 넣어준 후 8시간, 16시간, 24시간 및 48시간째에 수득한 세포배양액의 CEF 세포를 plaque assay법을 이용하여 백신후보주의 세포성장 특성을 분석하였고, 상기 실험을 3회 진행하여 각 시간대별 바이러스 성장 역가의 표준편차 분석하여, 이를 도 8 및 도 9에 나타내었다.
- [0112] 도 8을 참고하면, H2N2 아형 백신후보주의 경우, 상기 MDCK 세포에서의 결과와는 달리, CEF에서는 감염 후 약 24시간째에 최고 성장 역가를 나타냈으며, MDCK 세포에서의 최고 역가 보다는 약 3 log scale 정도 낮은 역가를 나타냈다. 도 9를 참고하면, H2N3 백신후보주 역시 MDCK 세포보다 CEF 세포에서 더 낮은 성장 특성이 관찰되었다. 그러나, NLG 변이된 바이러스의 역가가 NLG가 없는 바이러스 보다 약 1 log 이상 증가하는 현상이 감염 후 24시간째에 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0114] 3-3. 닭 유정란(embryonated chicken egg)
- [0115] 10일령 닭 유정란의 요막강 내에 상기 실시예 1-3에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스를 10^3 PFU/egg로 접종한 후, 일정 시간 경과 후 요수를 수득하였다. 수득한 요수의 MDCK 세포에서 plaque assay법 혹은 칠면조 적혈구를 이용한 혈구응집반응 분석을 통해 백신후보주의 성장특성을 분석하고, 이를 도 10 및 도 11에 나타내었다.
- [0116] 도 10을 참고하면, 닭 유정란에서 H2N2 백신후보주는 시간이 지나면서 바이러스 역가가 증가하는 성장 특성을 보이는 것을 확인할 수 있다. 도 11을 참고하면, H2N3 백신후보주는 H2N2 백신후보주에 비해 감염 후 더 이른 시점에 바이러스 역가가 확인되는 것을 알 수 있다. 또한, H2N2 백신후보주에서 확인된 바와 같이, H2N3 백신 후보주 역시 대량 백신생산에 적합한 HAU 역가(2^{10} HAU 이상)가 관찰되었다.
- [0118] 실시예 4: 백신후보주의 Mean death time(MDT) 분석
- [0119] 제작된 백신후보주의 닭 유정란에서의 병원성 분석을 위해, 10일령 닭 유정란의 요막강 내에 상기 실시예 1-3에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스를 10^5 , 10^6 PFU/egg로 접종한 후, 120시간 동안 24시간 간격으로 유정란

의 생존 여부를 확인하여 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

Subtype	Vaccine	The number of surviving eggs/the number of inoculated eggs at a given time {hour}									
		10 ^{4.5} PFU					10 ^{4.6} PFU				
		24	48	72	96	120	24	28	72	96	120
H2	rH2N2	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	rH2N2+NLG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	rH2N3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	rH2N3+NLG	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

닭 유정란에서의 mean death time (MDT) 분석 결과, 백신후보주를 접종한 거의 모든 유정란이 120시간 동안 생존하였으며, H2 아형 백신후보주는 유정란에 병원성을 나타내지 않으므로, 이와 같은 결과는 본 발명의 재조합 인플루엔자 백신주 바이러스가 대량생산에 적합한 백신후보주임을 시사한다.

실시예 5: 백신접종 후 동종 바이러스 감염에 따른 마우스의 체중변화, 생존률 및 바이러스 역가 평가

본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스 백신의 범 인플루엔자 중화 능력을 검증하기 위해, 상기 실시예 1-3에서 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 마우스에 접종한 다음 동종 바이러스인 H2N2 백신후보주 4MLD₅₀(10^{5.3} PFU/mouse)와 H2N3 5MLD₅₀(10^{5.9} PFU/mouse)를 각각의 실험군에 감염시킨 뒤 14일 동안의 마우스 체중변화, 생존율 및 폐 조직내 바이러스 역가를 측정하여 도 12 내지 17에 각각 나타냈다.

5-1. H2N2 백신

체중변화의 경우 도 12에 나타낸 바와 같이, 대조군 및 H2N2 WT 백신을 접종한 실험군(H2N2)은 바이러스 감염 후 지속적으로 체중이 감소한 반면, H2N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군(H2N2+)은 체중이 약간 감소한 후 회복하는 양상을 보였다.

또한, 생존률의 경우 도 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 백신을 접종하지 않은 실험군(Control)의 마우스는 바이러스 감염 후 7일째에 모두 사망하였으나, H2N2 WT 백신을 접종한 실험군(H2N2)은 12.5%, 그리고 H2N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군(H2N2+)은 87.5%의 생존율을 보였다. 따라서 H2N2 NLG 변이 백신이 기존의 H2N2 백신보다 더 높은 인플루엔자 바이러스 중화 효능을 갖는 것으로 판단된다.

도 14를 참고하면, 폐에 존재하는 바이러스 역가를 분석한 결과에서도, H2N2 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군(H2N2+)의 역가가 백신을 접종 받지 않은 실험군(Control)이나 H2N2 WT 백신을 접종 한 실험군(H2N2) 보다 낮은 것으로 분석되었다. 특히, H2N2 WT 백신을 접종 한 실험군(H2N2) 과 비교해 보았을 때, 바이러스 감염 3일째에는 약 24배, 그리고 6일째에는 약 441배 더 낮은 역가를 보이는 것으로 분석되었으며, 이는 H2N2 NLG 백신이 H2N2 WT 백신에 비해 더 효과적으로 바이러스 감염을 억제하였음을 의미한다. 또한, 이러한 차이는 통계학적으로도 유의성 있는 결과인 것으로 확인되었다.

5-2. H2N3 백신

체중변화의 경우 도 15에 나타낸 바와 같이, H2N3 WT 백신을 접종한 실험군(H2N3) 및 H2N3 NLG 변이 백신을 접종한 실험군(H2N3+) 모두 체중이 감소하지 않았으며, 생존률의 경우에는 도 16에 나타낸 바와 같이, 백신을 접종하지 않은 실험군(Control)의 마우스는 바이러스 감염 후 7일째에 모두 사망하였으나, H2N3 WT 백신을 접종한 실험군(H2N3)와 H2N3 NLG 변이 백신을 접종 한 실험군(H2N3+)은 모두 100%의 생존율을 보였다.

또한, 도 17을 참고하면, 폐에 존재하는 바이러스 역가를 분석한 결과에서, 바이러스 감염 후 3일째에 H2N3 WT 백신을 접종 한 실험군(H2N3)보다 H2N3 NLG 백신을 접종 한 실험군(H2N3+)이 약 4배 더 낮은 역가를 보였으며, 6일째에는 두 실험군 모두 폐에서 바이러스가 검출되지 않았다. 따라서 H2N3 NLG 변이 백신이 기존의 H2N3 WT 백신보다 더 신속하게 인플루엔자 바이러스 감염을 억제(Inhibition)하는 효력을 가지는 것으로 판단된다. 이러한 차이는 통계학적으로도 유의성 있는 결과인 것으로 확인되었다.

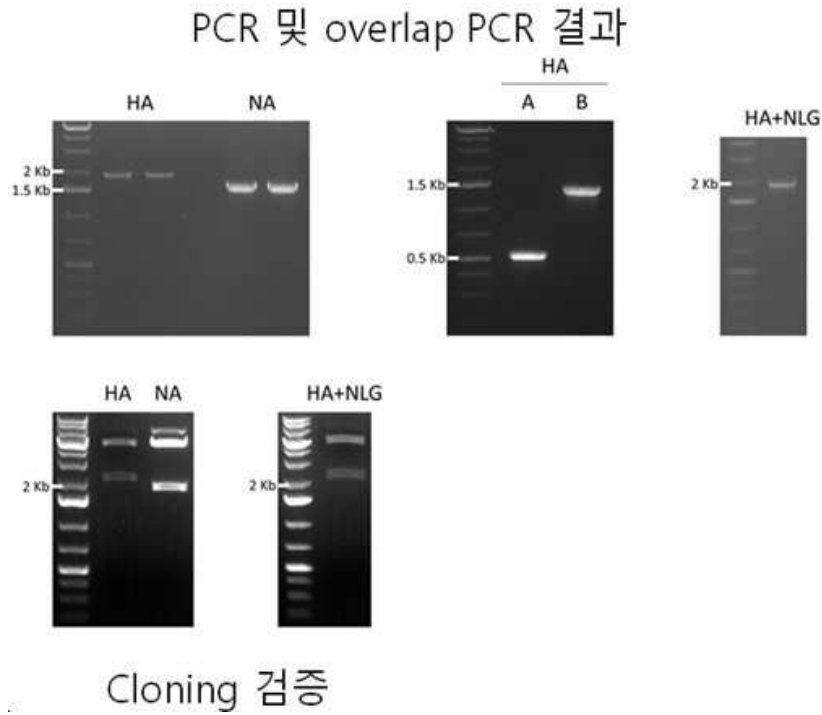
그러므로 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의 H2N2 NLG 변이 백신과 H2N3 NLG 변이 백신은 기존의 백신보다 신속하고 효과적으로 인플루엔자 바이러스의 감염을 중화하는 효력을 갖는 것으로 판단된다.

[0136] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

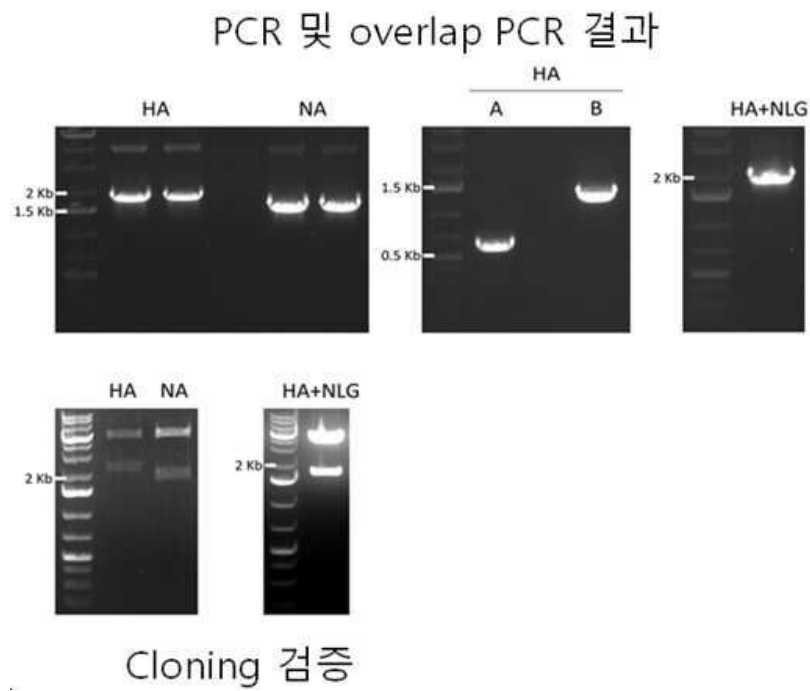
[0137] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

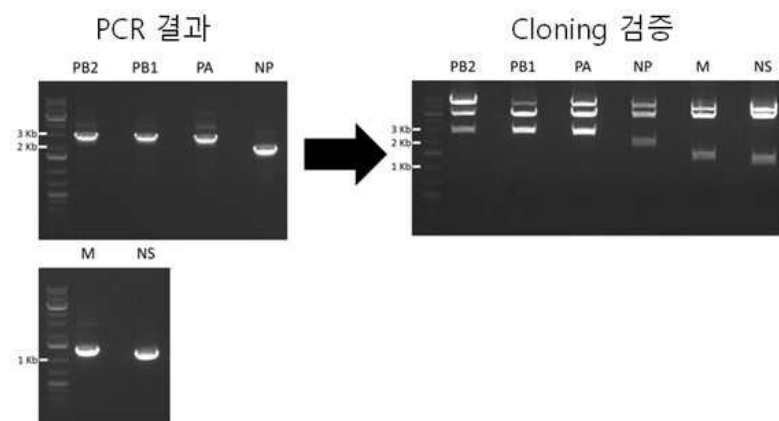
도면1



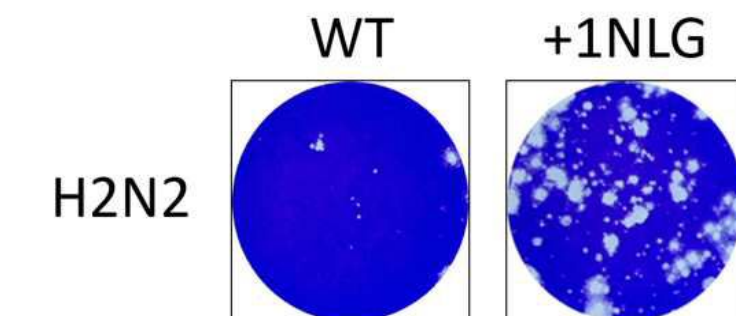
도면2



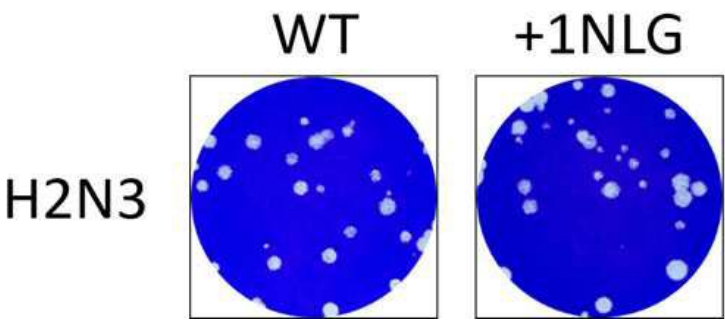
도면3



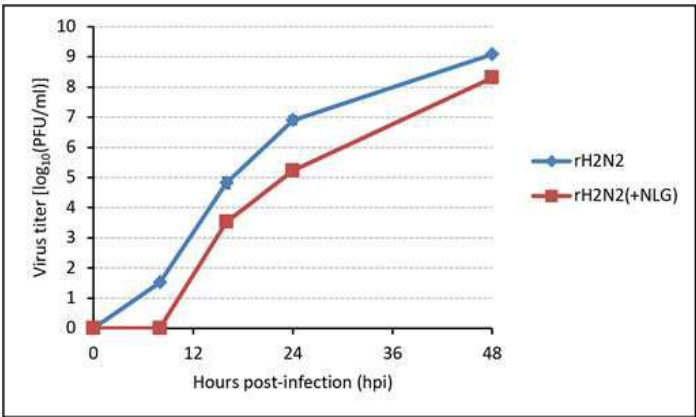
도면4



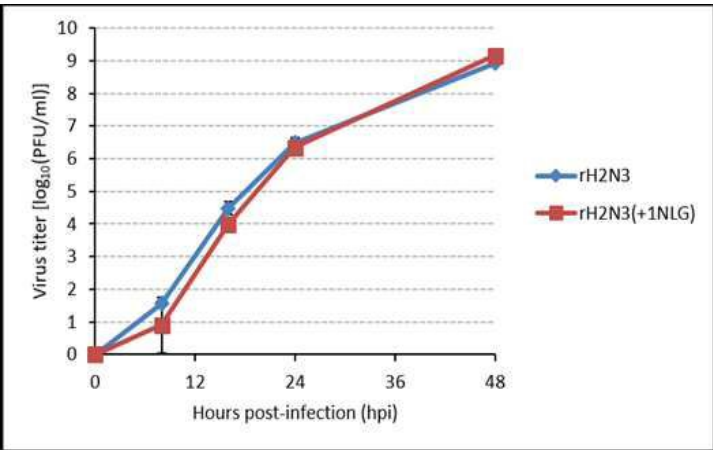
도면5



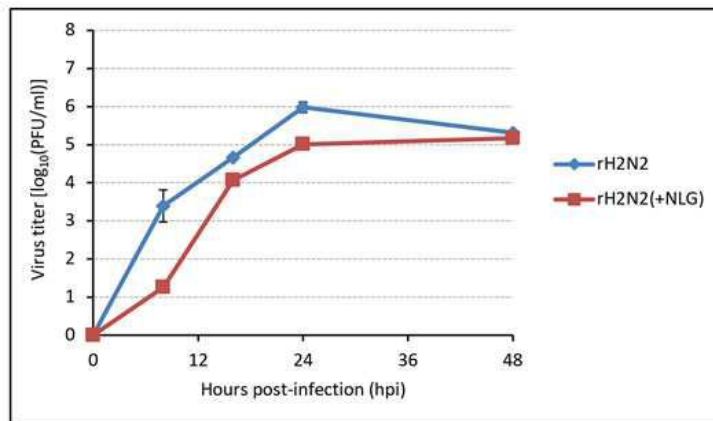
도면6



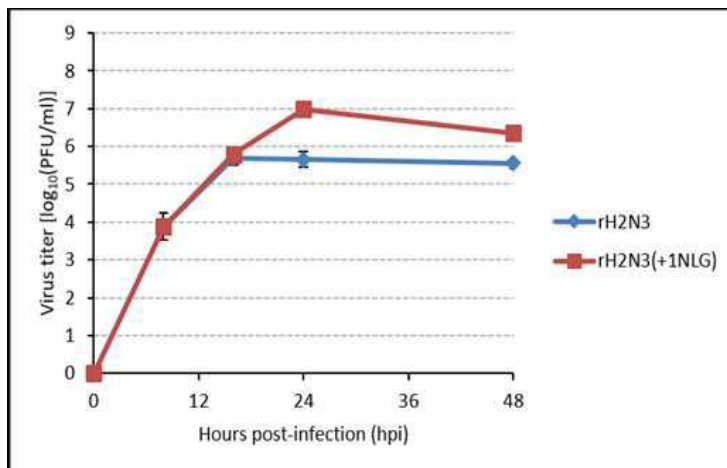
도면7



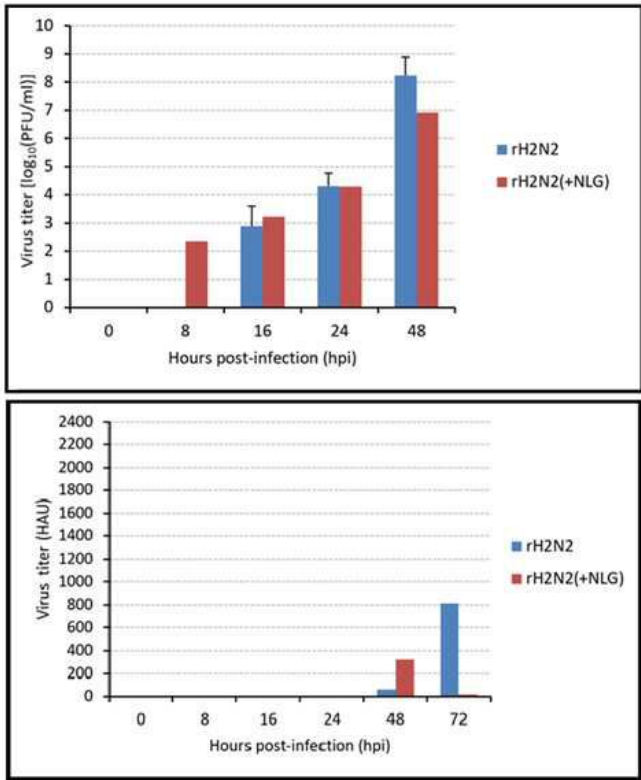
도면8



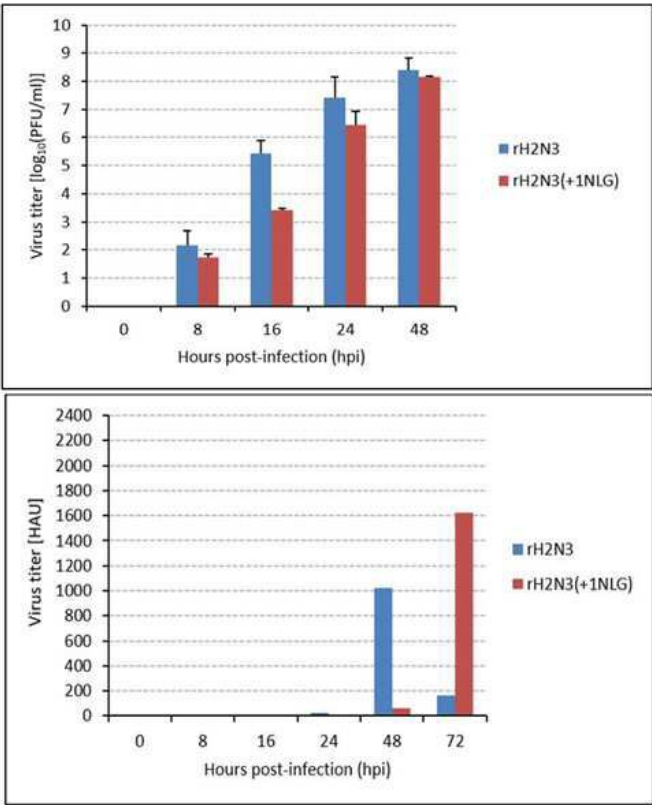
도면9



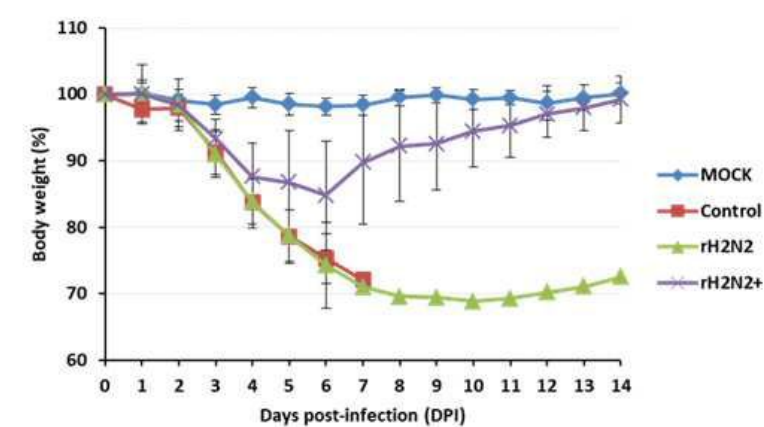
도면10



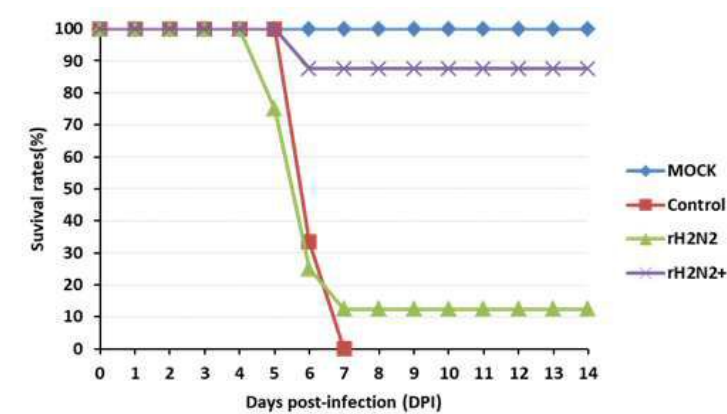
도면11



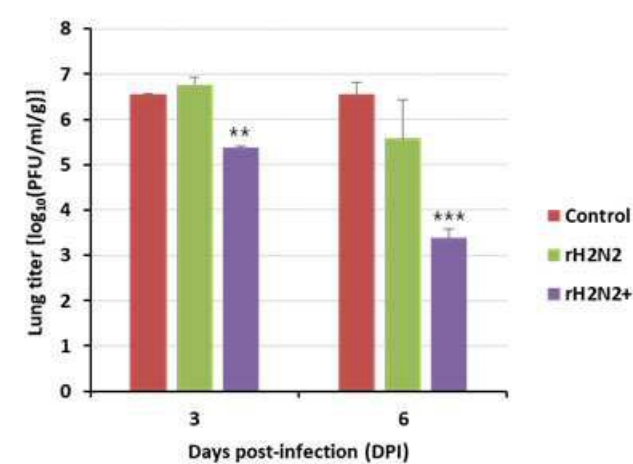
도면12



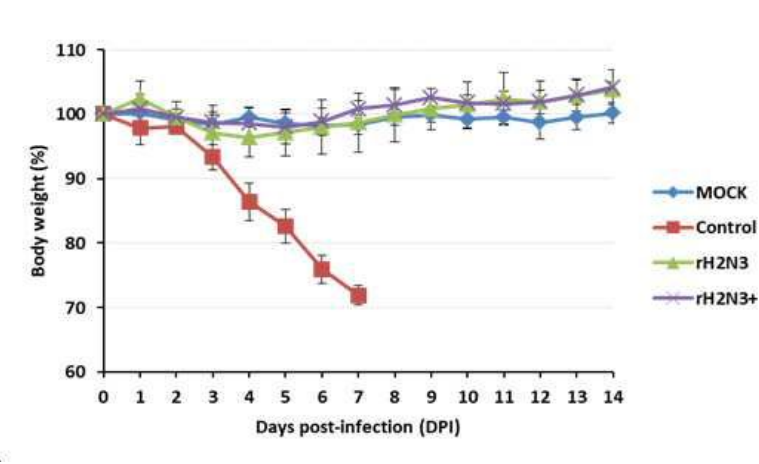
도면13



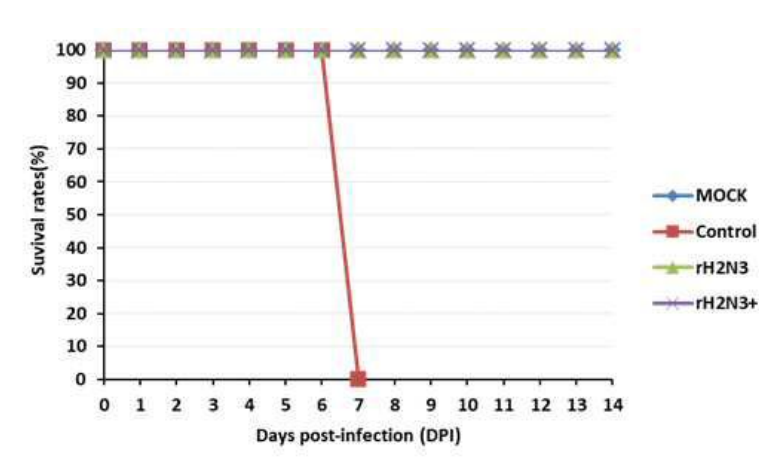
도면14



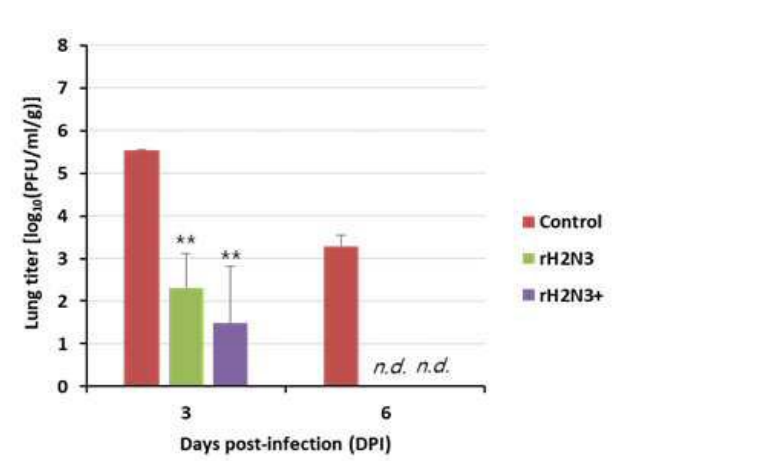
도면15



도면16



도면17



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> H2 SUBTYPE INFLUENZA VIRUS HAVING CROSS IMMUNOGENICITY AND VACCINE COMPRISING THE SAME

<130> APC-2018-0557
 <160> 16
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 1689
 <212> DNA
 <213> Influenza A virus
 <400> 1

atggccatca tctatctaatt tcttctgttt acagcagtga gaggagacca gatatgcatt	60
gggtaccatt ccaacaattc cacagaaaag gtcgacacaa ttctagagag gaatgtcact	120
gtgactcacg ctcaggacat tcttgagaga actcacaatg ggaaattatg caaactgaat	180
ggaatccctc cacttgaatt gggggattgc agcatgccg gatggctcct tggaaatcca	240
gaatgtgata ggcttctaac cgtgccagaa tggatcatata taatggagaa agaaaatcca	300
aggaatggct tgtgctaccc aggcagtttc aatgattatg aagaattgaa acacctcctt	360
agtagtgtga cacacttcga gaaagtaaag attttgccca aagataggatg gacacagcat	420
acaacaactg ggggttcacg ggcctgtgca gtatctggta acccgtcatt cttcaggaac	480
atggtctggt tgacgaagaa agggctgaat taccctgttg ccaaaggatc atacaataat	540
acaagtgggg aacaaatgct gatcatttgg ggggtacatc accctaata tgaagctgaa	600
caaaggacat tgtatcagaa tgtcgggacc tatgtatctg taggaacatc gacattgaac	660
aaaagatcag ttccagaaat agccacaaga cctaaagtga atggacaagg aggtagaatg	720
gaattctcgt ggactatatt agatatgttg gacaccataa atttcgagag tacttgtaat	780
ctaattgcac cagaatatgg ctttaaaaata tccaaacggg gtagttcagg catcatgaaa	840
acagaaggaa cacttgaata ctgcgaaact aaatgccaaa ctcccttggg agcaataaat	900
acaacattac ctttataa tatccacca ctgaccattg gtgagtcccc caaatatgta	960
aaatcggaga ggtagtctt agcaacaggg ttaagaaatg tccctcagat tgaatcaaga	1020
ggattgtttg gggcaatagc tggttttata gaagggggat ggcaaggaat ggttgatggt	1080
tggtaggggt atcatcacag caacgatcaa ggatccgggt atgcagcaga caaagagtec	1140
actcaaaagg caattgatgg aatcaccaac aaagtaaact ctgtgattga gaagatgaac	1200
actcaattcg aggcgtgttg gaaagaattc agtaatttgg agaaaagact ggaacacctg	1260
aataaaaaga tggaggacgg attcctagat gtttggacat acaatactga gcttctagtt	1320
ctaattggaaa atgagagaac acttgacttt catgactcca atgtcaggaa tctatatgac	1380

aaagtcagaa tgcaactgag ggacaatgca aaagaactag ggaatggatg ttttgaattt 1440

tatcataaat gtgatgatga atgcatgaat agtgtaaaga atgggacata tgattatccc 1500

aagtatgaag aggaatctaa actgaacagg aatgagatca aaggagtaaa attgagcaac 1560

atgggagttt atcaaatcct tgcaatttat gctacagtag caggctccct gtcattggca 1620

atcatgatag ctgggatctc cttttggatg tgctctaacg ggtctctgca atgcaggatc 1680

tgcataatga 1689

<210> 2

<211> 562

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 2

Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp

1 5 10 15
Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ser Asn Asn Ser Thr Glu Lys Val Asp

20 25 30
Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu

35 40 45
Glu Arg Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro

50 55 60
Leu Glu Leu Gly Asp Cys Ser Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro

65 70 75 80

Glu Cys Asp Arg Leu Leu Thr Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met Glu
85 90 95

Lys Glu Asn Pro Arg Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp
100 105 110

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Thr His Phe Glu Lys
115 120 125

Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly
130 135 140

Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn

145 150 155 160

Met Val Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Asn Tyr Pro Val Ala Lys Gly
165 170 175

Ser Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Glu Gln Met Leu Ile Ile Trp Gly Val
180 185 190

His His Pro Asn Asp Glu Ala Glu Gln Arg Thr Leu Tyr Gln Asn Val
195 200 205

Gly Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Lys Arg Ser Val
210 215 220

Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Gly Gly Arg Met
225 230 235 240

Glu Phe Ser Trp Thr Ile Leu Asp Met Leu Asp Thr Ile Asn Phe Glu
245 250 255

Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Glu Tyr Gly Phe Lys Ile Ser Lys
260 265 270

Arg Gly Ser Ser Gly Ile Met Lys Thr Glu Gly Thr Leu Glu Asn Cys
275 280 285

Glu Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Thr Thr Leu Pro
290 295 300

Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val
305 310 315 320

Lys Ser Glu Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Gln
325 330 335

Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly
340 345 350

Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn
355 360 365

Asp Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala
370 375 380

Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn
385 390 395 400

Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Ser Asn Leu Glu Lys Arg
405 410 415

Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp

420 425 430

Thr Tyr Asn Thr Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu

435 440 445

Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met

450 455 460

Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe

465 470 475 480

Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Asn Gly Thr

485 490 495

Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu

500 505 510

Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Asn Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala

515 520 525

Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Ile Ala

530 535 540

Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile

545 550 555 560

Cys Ile

<210> 3

<211> 1689

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 3

atggccatca tctatctaatt tcttctgttt acagcagtga gaggagacca gatatgcatt 60

gggtaccatt ccaacaattc cacagaaaag gtcgacacaa ttctagagag gaatgtcact 120

gtgactcacg ctcaggacat tcttgagaga actcacaatg ggaaattatg caaactgaat 180

ggaatccctc cacttgaatt gggggattgc agcatcgccg gatggctcct tggaaatcca 240

gaatgtgata ggcttctaac cgtgccagaa tggatcatata taatggagaa agaaaatcca 300

aggaatggct tgtgctaccc aggcagtttc aatgattatg aagaattgaa acacctcctt 360

agtagtgtga cacacttcga gaaagtaaag attttgccca aagataggtg gacacagcat 420

acaacaactg ggggttcacg ggcctgtgca gtatctggta acccgtcatt cttcaggaac 480

atggtctggt tgacgaagaa aaactcgact tacctgttg ccaaaggatc atacaataat 540

acaagtgggg aacaaatgct gatcatttgg ggggtacatc accctaatga tgaagctgaa 600

caaaggacat tgiatcagaa tgtcgggacc tatgtatctg taggaacatc gacattgaac 660

aaaagatcag ttccagaaat agccacaaga cctaaagtga atggacaagg aggtagaatg 720

gaattctcgt ggactatatt agatatgttg gacaccataa atttcgagag tactggtaat 780

ctaattgcac cagaatatgg ctttaaaata tccaaacggg gtagttcagg catcatgaaa 840

acagaaggaa cacttgaana ctgcgaaact aaatgccaaa ctcccttggg agcaataaat 900

acaacattac cttttcataa tatccacca ctgaccattg gtgagtgcc caaatatgta 960

aaatcggaga ggttagtctt agcaacaggg ttaagaaatg tccctcagat tgaatcaaga 1020

ggattgtttg gggcaatagc tggttttata gaagggggat ggcaaggaat ggttgatggt 1080

tggatgggt atcatcacag caacgatcaa ggatccgggt atgcagcaga caaagagtcc 1140

actcaaaagg caattgatgg aatcaccaac aaagtaaact ctgtgattga gaagatgaac 1200

actcaattcg aggctgttgg gaaagaattc agtaatttgg agaaaagact ggaaaacctg 1260

aataaaaaga tggaggacgg attcctagat gtttggacat acaatactga gcttctagtt 1320

ctaattgaaa atgagagaac acttgacttt catgactcca atgtcaggaa tctatatgac 1380

aaagtcagaa tgcaactgag ggacaatgca aaagaactag ggaatggatg ttttgaattt 1440

tatcataaat gtgatgatga atgcatgaat agtgtaaaga atgggacata tgattatccc 1500

aagtatgaag aggaatctaa actgaacagg aatgagatca aaggagtaaa attgagcaac 1560

atgggagttt atcaaatcct tgcaatttat gctacagtag caggctccct gtcattggca 1620

atcatgatag ctgggatctc cttttggatg tgctctaacg ggtctctgca atgcaggatc 1680

tgcatatga 1689

<210> 4

<211> 1410

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 4

atgaatccaa atcagaagat aataacaatt ggctctgtct ctctaaccat tgcaacagta 60

tgtttctca tgcagattgc catcctagca acgactgtaa cactgcattt caagcaaaat 120

gaatgcagca tcccctcgaa caatcaggta gtgccatgtg aaccaatcat aatagaaagg 180

aacataacag agatagtgt tttgaacaat actacatag aaaaagaaat ttgtcccgaa 240

gtactagagt acaggaattg gtcgaaccg cagtgtcaaa ttacagggtt tgctcctttc 300
tccaaggaca actcaattcg gctttctgct ggtggggaca tttgggtaac aagagaacct 360

tatgtgtcat ggggccccag taaatgttat cagtttgcgc ttgggcaggg gaccacactg 420
gacaacaaac actcaaaccg cacaatacat gatagaaccc ctcatcgaac tcttttaatg 480
aatgaattgg gtgttccgtt tcatttggga accaaacaag tgtgcatagc atggtccagc 540
tcaagtgtgc atgatgggaa agcatggcta catgtttgtg tcaactgggga tgatagaaat 600
gcgactgcta gtttcattta taatggaatg cttgttgata gtattgggtc atggtctcaa 660
aatatcctca gaactcagga gtcagaatgc gtttgcata atggaatttg tacagtagta 720
atgactgatg gaagtgcac aggaagggcc gatactagaa tactattcat cagagagggg 780

aaaattgtcc atattagccc attgtcagga agtgtcagc acatagaaga atgttcctgc 840
tatcctcat atccagacgt tagatgtgtt tgcagagaca attggaaggg ctctaatagg 900
cccgttatag atataaatat ggtagattat agcattgatt ccagttatgt gtgttcaggg 960
cttgttgggtg acacaccaag gaacgatgat agctctagca gcagcaactg tagggatcct 1020
aataatgaga gaggggaacc aggagtgaag ggggtggcct ttgacaatgg gaatgatgtt 1080
tggatgggaa gaacaatcag caaagattcg cgctcaggtt atgagacctt cagggtcatt 1140
ggtggttggg ccacggctaa ttccaagtca caggtcgata gacaagtc atgttgacaat 1200

aataactggt ctggttattc tggatatttc tctgttgaag gcaaaagctg tgtcaatagg 1260
tgtttttatg tggagttgat aagaggaagg ccgaagaga ctagagtatg gtggacttca 1320
aatagtatcg tcgtattttg tggtaattct ggtacctatg gaacaggctc atggcctgat 1380
ggggcgaata tcaacttcat gcctatataa 1410

<210> 5

<211> 469

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 5

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Ser Leu Thr

1 5 10 15

Ile Ala Thr Val Cys Phe Leu Met Gln Ile Ala Ile Leu Ala Thr Thr

20 25 30

Val Thr Leu His Phe Lys Gln Asn Glu Cys Ser Ile Pro Ser Asn Asn

35 40 45

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

290	295	300	
Ile Asn Met Val Asp Tyr Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Cys Ser Gly			
305	310	315	320
Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Asn Asp Asp Ser Ser Ser Ser Asn			
	325	330	335
Cys Arg Asp Pro Asn Asn Glu Arg Gly Asn Pro Gly Val Lys Gly Trp			
	340	345	350
Ala Phe Asp Asn Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Ser Lys			
	355	360	365
Asp Ser Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Arg Val Ile Gly Gly Trp Ala			
	370	375	380
Thr Ala Asn Ser Lys Ser Gln Val Asp Arg Gln Val Ile Val Asp Asn			
385	390	395	400
Asn Asn Trp Ser Gly Tyr Ser Gly Ile Phe Ser Val Glu Gly Lys Ser			
	405	410	415
Cys Val Asn Arg Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Gln			
	420	425	430
Glu Thr Arg Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Val Phe Cys Gly			
	435	440	445
Thr Ser Gly Thr Tyr Gly Thr Gly Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asn Ile			
	450	455	460
Asn Phe Met Pro Ile			
465			
<210>	6		
<211>	1710		
<212>	DNA		
<213>	Influenza A virus		
<400>	6		
atggacaacc ggacaaagac aatgactatc acttttctca tcctcctgtt cacagtagtg			60
aaaggggacc aaatatgtat cgggtacat gccacaatt caacagaaaa agtcgacaca			120
atcttggagc gaaacgttac agtgactcat gccaggaca ttcttgagaa aacgcataat			180

gggaagtgt gcagattaag cggaatccct ccattggaat tgggggattg cagcattgca 240

ggttggtctcc ttggaaatcc agaatgtgac cggtctctta atgtgcctga atggctctat 300

atagtggaaa aggaaaacac ggtgaatggt ctgtgctacc caggcaattt caatgattat 360

gaagaattga aacatctcct caccagtgtg acacactttg agaaaattaa gattctgcct 420

agagatcagt ggactcagca cacaacaact ggtgggttcta gggcctgtgc agtatttggc 480

aatccgtcat tcttcaggaa catggttttg cttacaaaga aggggtcaaa ctaccaatt 540

gccaaaagat catacaaca cacaagcgga gagcaaatgc tggtaatttg ggggatacat 600

catcccaatg acgatgcgga acaacggaca ctgtaccaga acgtgggaac atatgtttat 660

gtgggaacat caacattaaa taagaggtca atccctgaaa tagcaacaag gccaaaagtc 720

aacggacaag gagggagaat ggaattctct tggactctat tggagacatg ggatgtcatc 780

aattttgaga gcactggtaa tttaatcgct ccagaatagc gattcaaaat atcaaagaga 840

ggaagttag gaattatgaa aacagagaaa acgcttgaaa attgcgagac caaatgtcag 900

accccttgg gggcaataaa tacaacattg cttttcaca acattcaccc attgacaata 960

ggtgagtgtc ccaaatatgt aaagtcagat agattggtct tggcgacagg gctaagaaat 1020

atccctcaga ttgaatcaag gggattattt ggagcaatag ccgggtttat agaaggcgga 1080

tggcaaggaa tgattgatgg ctggtacggg tatcatcaca gcaatgatca aggatcagga 1140

tatgcagcag acaaggaatc cactcaaaag gcaattgatg ggatcaccaa taaagtaaat 1200

tctgtgattg aaaagatgaa caccagttt gaggtgttg ggaaagaatt caacaatctg 1260

gagagaagac tggaaaattt aaataaaaag atggaagatg gatttcttga tgtatggaca 1320

tataatgccg aactcctagt ttgatggaa aatgagagga cacttgattt ccatgattct 1380

aatgtgaaga atctgtacga taaggtcaga atgcaattgg gagacaatgc taaggaaata 1440

gggaacggat gctttgagtt ttatcacaaa tgtgatgatg aatgcatgaa tagtgtcagg 1500

aatgggacat atgattatcc caaatatgaa gaagagtcca agctgaacag aaacgaaatc 1560

aaaggagtga aattgagcaa tatgggggtt tatcaaatac ttgctatata cgctacagt 1620

gcaggctcct tgcactggc aatcatgata gctgggattt ctttctggat gtgttcta 1680

gggtctctgc aatgcagaat ttgcatatga 1710

<210> 7

<211> 569

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 7

Met Asp Asn Arg Thr Lys Thr Met Thr Ile Thr Phe Leu Ile Leu Leu
1 5 10 15

Phe Thr Val Val Lys Gly Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn
20 25 30

Asn Ser Thr Glu Lys Val Asp Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val
35 40 45

Thr His Ala Lys Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys
50 55 60

Arg Leu Ser Gly Ile Pro Pro Leu Glu Leu Gly Asp Cys Ser Ile Ala
65 70 75 80

Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Glu Cys Asp Arg Leu Leu Asn Val Pro
85 90 95

Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Glu Asn Thr Val Asn Gly Leu Cys
100 105 110

Tyr Pro Gly Asn Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Thr
115 120 125

Ser Val Thr His Phe Glu Lys Ile Lys Ile Leu Pro Arg Asp Gln Trp
130 135 140

Thr Gln His Thr Thr Thr Gly Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Phe Gly
145 150 155 160

Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn Met Val Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser
165 170 175

Asn Tyr Pro Ile Ala Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Glu Gln
180 185 190

Met Leu Val Ile Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Asp Ala Glu Gln
195 200 205

Arg Thr Leu Tyr Gln Asn Val Gly Thr Tyr Val Tyr Val Gly Thr Ser
210 215 220

Thr Leu Asn Lys Arg Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val
225 230 235 240

Asn Gly Gln Gly Gly Arg Met Glu Phe Ser Trp Thr Leu Leu Glu Thr

245 250 255
 Trp Asp Val Ile Asn Phe Glu Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Glu
 260 265 270
 Tyr Gly Phe Lys Ile Ser Lys Arg Gly Ser Ser Gly Ile Met Lys Thr
 275 280 285
 Glu Lys Thr Leu Glu Asn Cys Glu Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly
 290 295 300

 Ala Ile Asn Thr Thr Leu Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile
 305 310 315 320
 Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asp Arg Leu Val Leu Ala Thr
 325 330 335
 Gly Leu Arg Asn Ile Pro Gln Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala
 340 345 350
 Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Ile Asp Gly Trp
 355 360 365
 Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Asp Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp

 370 375 380
 Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn
 385 390 395 400
 Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu
 405 410 415
 Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu
 420 425 430
 Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu
 435 440 445

 Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn
 450 455 460
 Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met Gln Leu Gly Asp Asn Ala Lys Glu Ile
 465 470 475 480
 Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met
 485 490 495
 Asn Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu

500	505	510	
Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Asn Met			
515	520	525	
Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu			
530	535	540	
Ser Leu Ala Ile Met Ile Ala Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn			
545	550	555	560
Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile			
565			
<210>	8		
<211>	1710		
<212>	DNA		
<213>	Influenza A virus		
<400>	8		
atggacaacc ggacaaagac aatgactatc acttttctca tcctcctgtt cacagtagtg			60
aaaggggacc aaatatgtat cgggtacat gccacaatt caacagaaaa agtcgacaca			120
atcttggagc gaaacgttac agtgactcat gccaggaca ttcttgagaa aacgcataat			180
gggaagtgtg gcagattaag cggaatccct ccattggaat tgggggattg cagcattgca			240
ggttggtctc ttggaaatcc agaatgtgac cggtctctaa atgtgcctga atggtcctat			300
atagtggaaa aggaaaacac ggtgaatggt ctgtgctacc caggcaattt caatgattat			360
gaagaattga aacatctcct caccagtgtg acacactttg agaaaattaa gattctgcct			420
agagatcagt ggactcagca cacaacaact ggtggttcta gggcctgtgc agtatttggc			480
aatccgtcat tcttcaggaa catggttttg cttacaaaga agaactcaac ctaccaatt			540
gccaaaagat catacaaca cacaagcgga gagcaaatgc tggtaatttg ggggatacat			600
catccaatg acgatgcgga acaacggaca ctgtaccaga acgtgggaac atatgtttat			660
gtgggaacat caacattaaa taagagggtca atccctgaaa tagcaacaag gccaaaagtc			720
aacggacaag gagggagaat ggaattctct tggactctat tggagacatg ggatgtcatc			780
aattttgaga gcactggtaa tttaatcgct ccagaatacg gattcaaaat atcaaagaga			840
ggaagttcag gaattatgaa aacagagaaa acgcttgaaa attgcgagac caaatgtcag			900
accccttgg gggcaataaa tacaacattg ccttttcaca acattcaccc attgacaata			960
ggtgagtgtc ccaaatatgt aaagtcagat agattggtct tggcgacagg gctaagaaat			1020

atccctcaga ttgaatcaag gggattatit ggagcaatag ccgggtttat agaaggcgga 1080
 tggcaaggaa tgattgatgg ctggtacggg tatcatcaca gcaatgatca aggatcagga 1140
 tatgcagcag acaaggaatc cactcaaaag gcaattgatg ggatcaccaa taaagtaaat 1200
 tctgtgattg aaaagatgaa caccagttt gaggtgttg ggaaagaatt caacaatctg 1260
 gagagaagac tggaaaattt aaataaaaag atggaagatg gatttcttga tgtatggaca 1320

tataatgccg aactcctagt tttgatggaa aatgagagga cacttgattt ccatgattct 1380
 aatgtgaaga atctgtacga taaggtcaga atgcaattgg gagacaatgc taaggaaata 1440
 gggaacggat gctttgagtt ttatcacaaa tgtgatgatg aatgcatgaa tagtgtcagg 1500
 aatgggacat atgattatcc caaatatgaa gaagagtcca agctgaacag aaacgaaatc 1560
 aaaggagtga aattgagcaa tatgggggtt tatcaaatc ttgctatata cgctacagtg 1620
 gcaggtctct tgtcactggc aatcatgata gctgggattt ctttctggat gtgttctaat 1680
 gggctctctgc aatgcagaat ttgcatatga 1710

<210> 9

<211> 1410

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 9

atgaatcaa atcagaagat aataacaatc ggggtagtga ataccactct gtcaacaata 60
 gcccttctca ttggagtggg aaacttagtt ttcaacacag tcatacatga gaaaatagga 120
 gaccatcaaa cagtgtatca cccaacaaca acgccccctg cagtaccgaa ctgcagtaac 180
 actgtaataa catacaataa cactgtgaca aacaacataa caacaacaat aataactgaa 240
 gcggaaaggt ctttcaagcc tacattaccg ttgtgtccat tcagaggatt cttccccctt 300
 cacaaggata atgcaatcag gctgggtgag aacaaagacg tcatagtcac aaggagacct 360

tatgttagct gcgataatga caattgctgg tcctttgctc tcgcacaagg agcattgctg 420
 gggactaaac atagcaatgg gaccattaaa gacagaacac cttatagatc tetaatccga 480
 ttccaatag gaacagctcc agtactggga aattacaagg agatatgcat tgcttggtcg 540
 agcagcagtt gctttgacgg gaaagagtgg atgcatgtat gcatgacagg gaacgataat 600
 gatgcaagtg cccagataat atatgcaggg agaatgacag actccattaa atcatggaga 660
 aaggacatac tgagaactca ggagtccgaa tgtcaatgca ttggcggaac ttgtatcgtc 720
 gctgtcacag atggccctgc tgctaatagt gcagatcaca gggtttactg gatacgagag 780

ggaagaataa taaagtatga aaatgtcccc aaaacaaaga tacaacactt agaagagtgt 840

tcctgctatg tagacattga catttactgc atatgtaggg acaattggaa gggtttctaac 900
agaccttgga tgagaatcaa caacgagact atactggaaa caggttatgt gtgcagtaaa 960
tttactcag acacccccag gccagctgac ccctcaacaa tatcatgtga ctccccaagc 1020
aatgtcaatg gagggcccgg agtgaaggga ttgtgtttta aagccggcaa cgatgtatgg 1080
ttgggtagaa cagtgtcaac tagtggtaga tcgggctttg aaattatcaa agttacggag 1140
gggtggatca attctcccaa ccatgccaag tcaattacac aaacactggg gtccaacaat 1200

gattggtcag gatattcagg tagcttcatt gtcaagacca aggactgttt ccagccctgt 1260
ttttatgtcg agcttatacg agggaggccc aacaggattg atgaagtctc ttggacaagc 1320
aatagtatag ttactttctg tggattagac aatgaacctg gatcgggaaa ttggccggat 1380
ggttcttaaca ttgggtttat gcccaagtaa 1410

<210> 10
<211> 469
<212> PRT
<213> Influenza A virus
<400> 10

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Val Val Asn Thr Thr

1 5 10 15

Leu Ser Thr Ile Ala Leu Leu Ile Gly Val Gly Asn Leu Val Phe Asn

20 25 30

Thr Val Ile His Glu Lys Ile Gly Asp His Gln Thr Val Ile His Pro

35 40 45

Thr Thr Thr Pro Pro Ala Val Pro Asn Cys Ser Asn Thr Val Ile Thr

50 55 60

Tyr Asn Asn Thr Val Thr Asn Asn Ile Thr Thr Thr Ile Ile Thr Glu

65 70 75 80

Ala Glu Arg Ser Phe Lys Pro Thr Leu Pro Leu Cys Pro Phe Arg Gly

85 90 95

Phe Phe Pro Phe His Lys Asp Asn Ala Ile Arg Leu Gly Glu Asn Lys

100 105 110

Asp Val Ile Val Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Asn Asp Asn

115 120 125

Cys Trp Ser Phe Ala Leu Ala Gln Gly Ala Leu Leu Gly Thr Lys His

130 135 140
 Ser Asn Gly Thr Ile Lys Asp Arg Thr Pro Tyr Arg Ser Leu Ile Arg
 145 150 155 160

 Phe Pro Ile Gly Thr Ala Pro Val Leu Gly Asn Tyr Lys Glu Ile Cys
 165 170 175
 Ile Ala Trp Ser Ser Ser Ser Cys Phe Asp Gly Lys Glu Trp Met His
 180 185 190
 Val Cys Met Thr Gly Asn Asp Asn Asp Ala Ser Ala Gln Ile Ile Tyr
 195 200 205
 Ala Gly Arg Met Thr Asp Ser Ile Lys Ser Trp Arg Lys Asp Ile Leu
 210 215 220
 Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Gln Cys Ile Gly Gly Thr Cys Ile Val

 225 230 235 240
 Ala Val Thr Asp Gly Pro Ala Ala Asn Ser Ala Asp His Arg Val Tyr
 245 250 255
 Trp Ile Arg Glu Gly Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Asn Val Pro Lys Thr
 260 265 270
 Lys Ile Gln His Leu Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Val Asp Ile Asp Ile
 275 280 285
 Tyr Cys Ile Cys Arg Asp Asn Trp Lys Gly Ser Asn Arg Pro Trp Met
 290 295 300

 Arg Ile Asn Asn Glu Thr Ile Leu Glu Thr Gly Tyr Val Cys Ser Lys
 305 310 315 320
 Phe His Ser Asp Thr Pro Arg Pro Ala Asp Pro Ser Thr Ile Ser Cys
 325 330 335
 Asp Ser Pro Ser Asn Val Asn Gly Gly Pro Gly Val Lys Gly Phe Gly
 340 345 350
 Phe Lys Ala Gly Asn Asp Val Trp Leu Gly Arg Thr Val Ser Thr Ser
 355 360 365
 Gly Arg Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Val Thr Glu Gly Trp Ile Asn

 370 375 380

Ser Pro Asn His Ala Lys Ser Ile Thr Gln Thr Leu Val Ser Asn Asn
 385 390 395 400
 Asp Trp Ser Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Ile Val Lys Thr Lys Asp Cys
 405 410 415
 Phe Gln Pro Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Asn Arg
 420 425 430
 Ile Asp Glu Val Ser Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Thr Phe Cys Gly
 435 440 445

Leu Asp Asn Glu Pro Gly Ser Gly Asn Trp Pro Asp Gly Ser Asn Ile
 450 455 460
 Gly Phe Met Pro Lys

465

<210> 11

<211> 2280

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 11

atggaaagaa taaaagaact aagaaatcta atgtcgagct ctcgcacccg cgagatactc 60
 aaaaaacca ccgtggacca tatggccata atcaagaagt acacatcagg aagacaggag 120
 aagaaccag cacttaggat gaaatggatg atggcaatga aatatccaat tacagcagac 180
 aagaggataa cggaatgat tcctgagaga aatgagcaag gacaaacttt atggagttaa 240

atgaatgatg ccgatcaga ccgagtgatg gtatcacctc tggctgtgac atggtggaat 300
 aggaatggac caatgacaaa tacagttcat tatccaaaaa tctacaaaac ttattttgaa 360
 agagtcgaaa ggctaaagca tggaaccttt ggccctgtcc atttagaaa ccaagtcaaa 420
 atacgtcgga gattgacat aaatcctggt catgcagatc tcagtgccaa ggaggcacag 480
 gatgtaatca tggaagtgtt ttccctaac gaagtgggag ccaggatact aacatcgga 540
 tcgcaactaa cgataaccaa agagaagaaa gaagaactcc aggattgcaa aatttctcct 600
 ttgatggttg catacatgtt ggagagagaa ctggtccgca aaacgagatt cctcccagtg 660

gctggtggaa caagcagtgt gtacattgaa gtgttgcatg tgactcaagg aacatgctgg 720
 gaacagatgt atactccagg aggggaagtg aagaatgatg atgttgatca aagcttgatt 780
 attgctgcta ggaacatagt gagaagagct gcagtatcag cagaccact agcatcttta 840
 ttggagatgt gccacagcac acagattggt ggaattagga tggtagacat ccttaagcag 900

aaccaacag aagagcaagc cgtggatata tgcaaggctg caatgggact gagaattagc	960
tcaccttca gttttggtgg attcacattt aagagaacaa gcggatcatc agtcaagaga	1020
gaggaagagg tgcttacggg caatcttcaa acattgaaga taagagtga tgagggatct	1080
gaagagttca caatggttgg gagaagagca acagccatac tcagaaaagc aaccaggaga	1140
ttgattcagc tgatagttag tgggagagac gaacagtcga ttgccgaagc aataattgtg	1200
gccatggtat tttcacaaga ggattgtatg ataaaagcag ttagaggtga tctgaatttc	1260
gtcaataggg cgaatcagcg actgaatcct atgcatcaac ttttaagaca ttttcagaag	1320
gatgcgaaag tgctttttca aaattgggga gttgaaccta tcgacaatgt gatgggaatg	1380
attgggatat tgcccgacat gactccaagc atcgagatgt caatgagagg agtgagaatc	1440
agcaaatgg gtgtagatga gtactccagc acggagaggg tagtggtgag cattgaccgg	1500
ttcttgagag tcagggacca acgaggaaat gtactactgt ctcccgagga ggtcagtga	1560
acacagggaa cagagaaact gacaataact tactcatcgt caatgatgtg ggagattaat	1620
ggtcctgaat cagtgttggc caatacctat caatggatca tcagaaactg ggaaactgtt	1680
aaaattcagt ggcccagaa ccctacaatg ctatacaata aaatggaatt tgaaccattt	1740
cagtctttag tacctaaggc cattagaggc caatacagtg ggtttgtaag aactctgttc	1800
caacaaatga gggatgtgct tgggacattt gataccgcac agataataaa acttcttccc	1860
ttcgagccg ctccacaaa gcaaagtaga atgcagttct cctcatttac tgtgaatgtg	1920
aggggatcag gaatgagaat acttgtaagg ggcaattctc ctgtattcaa ctacaacaag	1980
gccacgaaga gactcacagt tctcgaaaag gatgctggca ctttaaccga agaccagat	2040
gaaggcacag ctggagtga gtcgctgtt ctgaggggat tccatattct gggcaaagaa	2100
gacaggagat atgggccagc attaagcatc aatgaactga gcaaccttgc gaaaggagag	2160
aaggctaattg tgctaattgg gcaaggagac gtggtgttgg taatgaaacg aaaacgggac	2220
tctagcatac ttactgacag ccagacagcg accaaaagaa ttcggatggc catcaattag	2280
	2280
<210> 12	
<211> 2274	
<212> DNA	
<213> Influenza A virus	
<400> 12	
atggatgta atccgacctt acttttctta aaagtgccag cacaaaatgc tataagcaca	60
actttccctt ataccggaga cctccttac agccatggga caggaacagg atacaccatg	120

gatactgtca acaggacaca tcagtactca gaaaaggga gatggacaac aaacaccgaa	180
actggagcac cgcaactcaa cccgattgat gggccactgc cagaagacaa tgaaccaagt	240
ggttatgccc aaacagattg tgtattggaa gcaatggctt tccttgagga atcccatcct	300
ggtatTTTTTg aaaactcgtg tattgaaacg atggaggttg ttcagcaaac acgagtagac	360
aagctgacac aaggccgaca gacctatgac tggacttta atagaaacca gcctgctgca	420
acagcattgg ccaacacaat agaagtgttc agatcaaatg gcctcacggc caatgagtca	480
ggaaggctca tagacttctt taaggatgta atggagtcaa tgaaaaaaga agaaatgggg	540
atcacaactc attttcagag aaagagacgg gtgagagaca atatgactaa gaaaatgata	600
acacagagaa caataggtta aaggaaacag agattgaaca aaaggggtta tctaattaga	660
gcattgacct tgaacacaat gaccaaagat gctgagagag ggaagctaaa acggagagca	720
attgcaaccc cagggatgca aataaggggg tttgtatact ttgttgagac actggcaagg	780
agtatatgtg agaaactga acaatcaggg ttgccagttg gaggcaatga gaagaaagca	840
aagttggcaa atgttgtaag gaagatgatg accaattctc aggacaccga actttctttc	900
accatcactg gagataaac caaatggaac gaaaatcaga atcctcgga gtttttgccc	960
atgatcacat atatgaccag aaatcagccc gaatgggtca gaaatgttct aagtattgct	1020
ccaataatgt tctcaaaca aatggcgaga ctgggaaaag ggtatatgtt tgagagcaag	1080
agtatgaaac ttagaactca aatactgca gaaatgctag caagcattga tttgaaatat	1140
ttcaatgatt caacaagaaa gaagattgaa aaaatccgac cgctcttaat agaggggact	1200
gcatcattga gccctggaat gatgatgggc atgttcaata tgttaagcac tgtattaggc	1260
gtctccatcc tgaatcttgg acaaaagaga tacaccaaga ctacttactg gtgggatggt	1320
cttcaatcct ctgacgattt tgctctgatt gtgaatgcac ccaatcatga agggattcaa	1380
gccggagtcg acaggtttta tcgaacctgt aagctacttg gaatcaatat gagcaagaaa	1440
aagtcttaca taacagAAC aggtacattt gaattcaca gttttttcta tcgttatggg	1500
tttgttgcca atttcagcat ggagcttccc agttttgggg tgtctgggat caacgagtca	1560
gcgacatga gtattggagt tactgtcatc aaaaacaata tgataaaca tgatcttggt	1620
ccagcaacag ctcaaatggc ctttcagttg ttcacaaag attacaggt cactaccga	1680
tgccatagag gtgacacaca aatacaaac cgaagatcat ttgaaataa gaaactgtgg	1740
gagcaaaccc gticcaagc tggactgctg gtctccgacg gagggccaaa tttataaac	1800
attagaaatc tccacattcc tgaagtctgc ctaaaatggg aattgatgga tgaggattac	1860
caggggcgtt tatgcaaccc actgaacca tttgtcagcc ataaagaaat tgaatcaatg	1920
aacaatgcag tgatgatgcc agcatatggt ccagccaaa acatggagta tgatgctgtt	1980

gcaacaacac actcctggat ccccaaaaga aatcgatcca tcttgaatac aagtcaaaga 2040

ggagtacttg aagatgaaca aatgtaccaa aggtgctgca atttatttga aaaattcttc 2100

cccagcagtt catacagaag accagtcggg atatccagta tggaggagc tatggtttcc 2160

agagcccgaa ttgatgcacg gattgatttc gaatctggaa ggataaagaa agaagagttc 2220

actgagatca tgaagatctg ttccaccatt gaagagctca gacggcaaaa atag 2274

<210> 13

<211> 2151

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 13

atggaagatt ttgtgcgaca atgcttcaat ccgatgattg tcgagcttgc ggaaaaaaca 60

atgaaagagt atggggagga cctgaaaatc gaaacaaaca aatttgcagc aatatgcact 120

cacttggaag tatgcttcat gtattcagat ttccacttca tcaatgagca aggcgagtc 180

ataatcgtag aacttggtag tcctaagca cttttgaagc acagatttga aataatcgag 240

ggaagagatc gcacaatggc ctggacagta gtaaacagta tttgcaacac tacaggggct 300

gagaaaccaa agtttctacc agatttgtat gattacaagg aaaatagatt catcgaaatt 360

ggagtaacaa ggagagaagt tcacatatac tatctggaaa aggccaataa aattaaatct 420

gagaaaacac acatccacat tttctcgttc actggggaag aaatggccac aagggccgac 480

tacactctcg atgaagaaag cagggctagg atcaaaacca ggctattcac cataagacaa 540

gaaatggcca gcagaggcct ctgggattcc tttcgtcagt ccgagagagg agaagagaca 600

attgaagaaa ggtttgaaat cacaggaaca atgcgcaagc ttgccgacca aagtctccc 660

ccgaacttct ccagccttga aaattttaga gcctatgtgg atggattcga accgaacggc 720

tacattgagg gcaagctgtc tcaaatgtcc aaagaagtaa atgctagaat tgaacctttt 780

ttgaaaacaa caccacgacc acttagactt ccgaatgggc ctcctgttc tcagcggtcc 840

aaattcctgc tgatggatgc cttaaaatta agcattgagg acccaagtca tgaaggagag 900

ggaataccgc tatatgatgc aatcaaatgc atgagaacat tctttggatg gaaggaaccc 960

aatgttgtaa aaccacacga aaaggaataaatccaaatt atcttctgtc atggaagcaa 1020

gtactggcag aactgcagga cattgagaat gaggagaaaa ttccaaagac taaaaatatg 1080

aaaaaaacaa gtcagctaaa gtgggcactt ggtgagaaca tggcaccaga aaaggtagac 1140

tttgacgact gtaaagatgt aggtgatttg aagcaatatg atagtgatga accagaattg 1200

aggtcgttg caagttggat tcagaatgag ttcaacaagg catgcgaact gacagattca 1260

agctggatag agcttgatga gattggagaa gatgtggctc caattgaaca cattgcaagc	1320
atgagaagga attatttcac atcagagggtg tctcactgca gagccacaga atacataatg	1380
aaggggggtgt acatcaatac tgccttactt aatgcatctt gtgcagcaat ggatgatttc	1440
caattaattc caatgataag caagtgtaga actaaggagg gaaggcgaaa gaccaacttg	1500
tatggtttca tcataaaaagg aagatccac ttaaggaatg acaccgacgt ggtaaacttt	1560
gtgagcatgg agttttctct cactgacceca agacttgaac cacacaaatg ggagaagtac	1620
tgtgttcttg agataggaga tatgcttcta agaagtcca taggccaggt ttcaaggccc	1680
atgttcttgt atgtgaggac aaatggaacc tcaaaaatta aaatgaaatg gggaatggag	1740
atgaggcgtt gtctcctcca gtcacttcaa caaattgaga gtatgattga agctgagtcc	1800
tctgtcaaag agaaagacat gaccaaagag ttctttgaga acaaatcaga aacatggccc	1860
attggagagt ctcccaaagg agtggaggaa agttccattg ggaaggtctg caggacttta	1920
ttagcaaagt cgglatittaa cagcttgtat gcatctccac aactagaagg attttcagct	1980
gaatcaagaa aactgcttct tategttcag gctcttaggg acaatctgga acctgggacc	2040
tttgaatttg gggggctata tgaagcaatt gaggagtgcc taattaatga tccctgggtt	2100
ttgcttaatg ctctttgggt caactccttc cttacacatg cattgagtta g	2151
<210> 14	
<211> 1497	
<212> DNA	
<213> Influenza A virus	
<400> 14	
atggcgtccc aaggcaccaa acggtcttac gaacagatgg agactgatgg agaacgccag	60
aatgccactg aaatcagagc atccgtcgga aaaatgattg gtggaattgg acgattctac	120
atccaaatgt gcacagaact taaactcagt gattatgagg gacggttgat ccaaaacagc	180
ttaacaatag agagaatggt gctctctgct tttagcgaag ggagaaataa atacctggaa	240
gaacatccca gtgcggggaa agatcctaag aaaactggag gacctatata cagaagagta	300
aacggaaaagt ggatgagaga actcatcctt tatgacaaag aagaataag gcgaatctgg	360
cgccaagcta ataatggatg cgatgcaacg gctgggtctga ctcacatgat gatctggcat	420
tccaatttga atgatgcaac ttatcagagg acaagggtctc ttgttcgcac cggaatggat	480
cccaggatgt gctctctgat gcaaggttca actctcccta ggaggtcttg agccgcaggt	540
gtgcagtcga aaggagtggg aacaatgggt atggaattgg tcaggatgat caaacgtggg	600
atcaatgatc ggaacttctg gaggggtgag aatggacgaa aaacaagaat tgcttatgaa	660

agaatgtgca acatttctcaa agggaaattt caaactgctg cacaaaaagc aatgatggat 720
caagtgagag agagccggaa cccaggggaat gctgagttcg aagatctcac ttttctagca 780

cggctctgcac tcatattgag agggtcgggt gctcacaagt cctgcctgcc tgcctgtgtg 840
tatggacctg ccgtagccag tgggtacgac ttgaaagag agggatactc tctagtcgga 900
atagaccctt tcagactgct tcaaaacagc caagtgtaca gcctaatacag accaaatgag 960
aatccagcac acaagagtca actggtgtgg atggcatgcc attctgccgc atttgaagat 1020
ctaagagtat tgagcttcat caaaggacg aagggtgtcc caagaggga gctttccact 1080
agaggagttc aaattgcttc caatgaaaat atggagacta tggaatcaag tacacttgaa 1140
ctgagaagca ggtactgggc cataaggacc agaagtggag gaaacaccaa tcaacagagg 1200

gcatctgcgg gccaaatcag catacaacct acgttctcag tacagagaaa tctccctttt 1260
gacagaacaa ccgttatggc agcatttact gggaatacag aggggagaa atctgacatg 1320
aggaccgaaa tcataaggat gatggaaagt gcaagaccag aagatgtgtc tttccagggg 1380
cggggagtct tcgagctctc ggacgaaaag gcagcgagcc cgatcgtgcc ttcctttgac 1440
atgagttaat aaggatctta tttcttcgga gacaatgcag aggagtacga caattaa 1497

<210> 15
<211> 1027
<212> DNA
<213> Influenza A virus
<400> 15

agcgaagca ggtagatgtt gaaagatgag tcttctaacc gaggtcgaaa cgtacgttct 60

ctctatcacc ccgtcaggcc cctcaaacg cgagatcgca cagagacttg aagatgtctt 120
tgcaggaag aacaccgac ttgaggttct catggaatgg ctaaagacaa gaccaatcct 180
gtcacctctg actaaggga ttttaggatt tgtgttcacg ctaccgtgc ccagtgagcg 240
aggactgcag cgtagacgt ttgtccaaaa tgccttaat gggaacgggg atccaaataa 300
catggacaaa gcagttaaac tgtataggaa gctcaagagg gagataacat tccatggggc 360
caaagaaatc tactcagtt attctgctgg tgcacttgc agttgtatgg gcctcatata 420
caacaggatg ggggctgtga ccaactgaat ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga 480

acagattgct gactccagc atcggctctca taggcaaatg gtgacaacaa ccaaccact 540
aatcagacat gagaacagaa tggtttttagc 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
gtgatcctca cgctattgcc gcaaatatca ttgggatctt gcacttgata 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> 16	
<211> 890	
<212> DNA	
<213> Influenza A virus	
<400> 16	
agcgaaagca gggtgacaaa gacataatgg atccaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag	60
attgctttct ttggcatgtc cgcaacgag ttgcagacca agaactaggt gatgccccat	120
tccttgatcg gcttcgccga gatcagaaat ccctaagagg aaggggcagc actcttggtc	180
tgacatcga gacagccaca cgtgttgga agcagatagt ggagcggatt ctgaaagaag	240
aatccgatga ggcacttaaa atgacatgg cctctgtacc tgcgtcgcgt tacctaaccg	300
acatgactct tgaggaaatg tcaagggaat ggtccatgct catacccaag cagaaagtgg	360
caggccctct ttgtatcaga atggaccagg cgatcatgga taaaaacatc atactgaaag	420
cgaacttcag tgtgattttt gaccggctgg agactctaatt attgctaagg gctttcaccg	480
aagagggagc aattgttggc gaaatttcac cattgccttc tcttcagga catactgctg	540
aggatgtcaa aaatgcagtt ggagtcctca tcggaggact tgaatggaat gataacacag	600
ttcaggtctc tgaaactcta cagagattcg cttggagaag cagtaatgag aatgggagac	660
ctccactcac tccaaaacag aaacgagaaa tggcgggaac aattaggtca gaagtttgaa	720
gaaataagat ggttgattga agaagtgaga cacaaactga aggtaacaga gaatagtttt	780
gagcaataa catttatgca agccttacat ctattgcttg aagtggagca agagataaga	840
actttctcat ttcagcttat ttaataataa aaaacaccct tgtttctact	890