(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 974319 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 974319

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/86
C12N 15/62
C07K 14/11
A61K 39/145

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **26.05.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.11.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.01.1998**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **26.05.1995 PCT/US1995/006750**

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Protein Sciences Corporation,** 100 Research Parkway Meriden Conn. 06450-7159, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Smith, Gale Eugene,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Volvovitz, Franklin,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Wilkinson, Bethanie E.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •**Voznesensky, Andrei I.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •**Hackett, Craig Stanway,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Menetelmä monenarvoisten influenssahemaglutiniinirokotteiden valmistam iseksi
Förfarande för framställning av flervärdiga influensahemagglutininvacc in

MENETELMÄ MULTIVALENTTIEN INFLUENSSAHEMAGGLUTINIINIROKOTTEIDEN VALMISTAMISEKSI

Keksinnön taustaa

Tämä keksintö kuuluu yleisesti yhdistelmäinfluenssarokotteiden alueeseen.

Influenssaepidemia ilmenee vuosittain ja on syy merkittävään sairastamiseen ja kuolleisuuteen maailmanlaajuisesti. Lapset saavat tartunnan nopeimmin, ja ovat suuresti vastuussa influenssavirustartunnan kulkeutumisesta yhteiskunnassa. Vanhuksilla ja henkilöillä, joilla on terveysongelmia, on suurempi riski komplikaatioista ja sairaalaan joutumisesta influenssaviruksen vuoksi. Yksinään Yhdysvalloissa sattui yli 10.000 kuolemantapausta jokaisen seitsemän influenssajakson aikana vuosien 1956 ja 1988 välillä johtuen keuhkokuumeesta ja influenssasta, ja yli 40.000 kuolemantapausta raportoitiin kahtena kautena (Update: Influenza Activity - United States and Worldwide, and Composition of the 1992-1993 Influenza Vaccine, Morbidity and Mortality Weekly Report. U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, 41/No. 18:315-323, 1992.) Influenssavirukset ovat erittäin pleomorfisia partikkeleita, jotka koostuvat kahdesta pintaglykoproteiinista, hemagglutiniinista (HA) ja neuraminidaasista (NA). HA välittää viruksen liittymisen isäntäsoluun ja virussolun membraanin fuusioitumisen viruksen tunkeutuessa soluun. Influenssavirusgenomi koostuu kahdeksasta yksisäikeisestä negatiivi-sense-RNA-segmentistä, joista neljänneksi suurin segmentti koodaa HA-geeniä. Influenssavirukset jaetaan A-, B- ja C-tyyppeihin antigeenisiin eroihin perustuen. Influenssa A-viruksia kuvataan nimistöllä, joka käsittää alatyypin tai tyypin, maantieteellisen alkuperän, kantanumeron ja eristysvuoden, esimerkiksi A/Beijing/353/89. HA:ta on ainakin 13 alatyyppiä (H1-H13) ja NA:ta yhdeksän alatyyppiä (N1-N9). Kaikki alatyypit löytyvät linnuista, mutta vain H1-H3 ja N1-N2 löytyvät ihmisistä, sioista ja hevosista (Murphy and Webster, "Orthomyxoviruses", Virology, toim. Fields, B.N.,

Knipe, D.M., Chanock, R.M., 1091-1152 (Raven Press, New York, (1990)).

Vasta-aineet HA:lle neutraloivat viruksen ja muodostavat pohjan luonnolliselle immuniteetille influenssainfektiota vastaan (Clements, "Influenza Vaccines", Vaccines: New Approaches to Immunological Problems, toim. Ronald W. Ellis, ss. 129-150 (Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA 1992)). Antigeenivariaatio HA-molekyylissä on vastuussa useista puhkeamisista influenssaksi ja infektion rajoittuneesta kontrolloimisesta immunisaation vaikutuksella.

HA:n kolmiulotteista rakennetta ja vuorovaikutusta sen solureseptorin, siaalihapon kanssa on laajalti tutkittu (Wilson et al., "Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution" Nature 289:366-378 (1981); Weis et al., "Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid" Nature, 333:426-431 (1988); Murphy and Webster, 1990). HA-molekyyli on mukana virionissa trimeerinä. Kukin monomeeri esiintyy kahtena ketjuna, HA1 ja HA2, sitoutuneena yhdellä disulfidisidoksella. Infektoituneet isäntäsolut tuottavat glykosyloidun polypeptidiedeltäjän (HA0), jonka molekyylipaino on noin 85.000, joka sitten lohkeaa HA1:ksi ja HA2:ksi.

Influenssa HA-spesifisen neutraloivan IgG- ja IgA-vasta-aineen läsnäolo liittyy resistenssiin infektiolle ja sairaudelle (Clements, 1992). Inaktivoitu koko virus tai osittain puhdistettu (lohkaistu alayksikkö) on standardoitu HA:n määrän suhteen jokaisesta kannasta. Influenssarokotteet sisältävät tavallisesti 7-25 mikrogrammaa HA:ta jokaisesta kolmesta influenssakannasta.

Toisen pääpintaglykoproteiinin, NA:n, roolia vasta-aineen suojaavassa immuniteetissa tai T-solun reaktioissa influenssaa vastaan ei ole määritetty. Neuraminidaasi on hyvin labiili puhdistus- ja varastointiprosessille (Murphy

and Webster, 1990) ja NA:n määrää nykyisissä influenssarokotteissa ei ole standardoitu. Puhdistettu HA- mutta ei NA-rokote ehkäisee sairauden eläimissä, joihin on tarttunut influenssa (Johansson et al., "Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection" J. Virology, 63:1239-1246 (1989)). Neuraminidaasiantigeeniin perustuvan kokeellisen rokotteen ei havaittu suojaavan ihmiskokeessa (Orga et al, J. Infect. Dis. 135:499-506 (1977)).

Lisensoidut influenssarokotteet koostuvat formaliinilla inaktivoiduista kokonaisista tai kemiallisesti pilkotuista alayksikkövalmisteista, jotka on saatu kahdesta influenssa A:n alatyypin (H1N1 ja H3N2) ja yhdestä influenssa B:n alatyypin viruksista. Ennen kutakin influenssakautta U.S. Food and Drug Administration's Vaccines and Related Biologicals Advisory Committee suosittelee trivalentin influenssarokotteen koostumuksen tulevalle kaudelle. 1992-93 rokote sisälsi A/Texas/36/91-kaltaisia (H1N1)-, A/Beijing/353/89-kaltaisia (H3N2)- ja B/Panama/45/90-viruksia. FDA on määrännyt, että 1993-94 influenssarokotteen tulisi sisältää samoja Texas- ja Panama-kantoja sekä uutta influenssa A Beijing-kantaa (A/Beijing/32/92).

Suuren riskin omaavien henkilöiden rokotus joka vuosi ennen influenssakautta on tehokkain toimenpide influenssan vaikutuksen vähentämiseksi. Nykyisin saatavissa olevien rokotteiden rajoituksia ovat matala käyttöaste; huono tehokkuus vanhuksissa ja nuorissa lapsissa; munissa tuottaminen; antigeeninen variaatio; ja haitalliset reaktiot.

The Center for Disease Control (CDC) arvioi, että alle 30%:lla henkilöistä, joille influenssan saaminen muodostaa suuren riskin, on rokotettu vuosittain (MMWR, 1992). Nykyisillä inaktivoiduilla rokotteilla saadaan suuri suoja sairautta vastaan normaaleilla terveillä aikuisilla, kun rokotteen ja kiertävien influenssavirusten antigeenit ovat

läheistä sukua. Vanhusten joukossa suojan määrä sairautta vastaan on paljon vähäisempi, erityisesti niillä, jotka ovat laitoksissa (Clements, 1992). Powersin ja Belshen äskettäisessä tutkimuksessa, J. Inf. Dis. 167:584-592 (1993) havaittiin merkittäviä vasta-ainereaktioita trivalentille subvirion-influenssarokotteelle vähemmässä kuin 30 prosentissa kohteista, jotka olivat 65-vuotiaita tai vanhempia.

Siemenvirukset influenssa A- ja B-rokotteille ovat luonnossa esiintyviä kantoja, jotka replikoituvat suuriksi tiitereiksi kanamunien allantoiiniontelossa. Vaihtoehtoisesti kanta influenssa A-komponentiksi on uudelleen yhdistetty virus, jolla on oikeat pinta-antigeenigeenit. Uudelleen yhdistetty virus on sellainen, jolla virusgenomin segmentoitumisen vuoksi on kunkin emokannan luonne. Kun useampi kuin yksi influenssaviruskanta infektoi solun, nämä virussegmentit sekoittuvat synnyttäen jälkeläisvirionin, joka sisältää erilaisen valikoiman geenejä molemmista vanhemmista.

Suojaaminen nykyisillä kokonaisilla tai pilkotuilla influenssarokotteilla on lyhytaikaista ja vähenee, kun antigeenien kerääntyminen lisääntyy influenssan epidemiakannoissa. Influenssavirukset läpikäyvät antigeenien kerääntymisen lisääntymisen virusten immuunivalinnan tuloksena aminohapposekvenssien vaihtuessa hemagglutiniinimolekyylissä. Ideaalisesti rokotekannat sopivat yhteen sairautta aiheuttavien influenssaviruskantojen kanssa. Nykyistä valmistusprosessia influenssarokotteille rajoittaa kuitenkin viruksen kasvatus alkiollisissa kananmunissa. Kaikki influenssaviruskannat eivät replikoidu hyvin munissa; tällöin viruksia täytyy muunnella tai muodostaa uudelleen yhdistettyjä viruksia. Munassa kasvatetuissa influenssaviruksissa ilmenee suurta heterogeenisuutta verrattuna primääri-isolaatteihin, jotka on saatu infektoituneista yksilöistä kasvatettuina nisäkässoluissa (Wang et al., Virol. 171:275-279 (1989); Rajakumar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

87:4154-4158 (1990)). Muutokset HA:ssa influenssarokotteiden valinnan ja valmistuksen aikana voi johtaa seokseen, jossa on antigeenisesti erilaisia virusalapopulaatioita. Rokotteessa olevat virukset voivat siksi erota epideemisten kantojen varianteista, jolloin suojauksessa päädytään optimaalista pienempiin tasoihin.

Välittömiä yliherkkyysreaktioita voi tapahtua henkilöissä, joilla on vaikea muna-allergia, johtuen rokotteessa olevasta munaproteiinijäämästä. Vuoden 1976 sikainfluenssarokotteeseen liittyi lisääntynyt Guillain-Barré-syndrooman esiintyvyys. Myöhemmillä muista influenssakannoista valmistetuilla rokotteilla ei tähän mennessä ole havaittu tämän harvinaisen sairauden ilmenemistä lisäävää vaikutusta.

Menetelmä influenssarokotteen tuottamiseksi, joka ei vaadi kasvattamista munissa, antaisi puhtaamman tuotteen, joka vähemmän todennäköisesti aiheuttaisi haitallisen immuunireaktion. Lisäksi puhtaampi rokotevalmiste ei vaatisi viruksen inaktivointia tai virusmembraanin komponenttien orgaanista uuttamista, jolloin vältetään antigeeniepitooppien denaturoituminen ja turvallisuushuolet, jotka johtuvat kemikaalijäämistä rokotteessa.

Lisäksi influenssarokotteessa, joka on tuotettu muuten kuin munassa kasvattamalla, vältetään geneettinen heterogeenisuus, joka ilmenee muuntelun ja läpikulun aikana munissa. Tällä tavalla saataisiin rokote, joka sopii paremmin yhteen influenssan epideemisten kantojen kanssa, jolloin saadaan parempi tehokkuus.

Sen vuoksi tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota käyttöön menetelmä influenssarokotteen tuottamiseksi, joka ei vaadi replikoitumista munissa.

Tämän keksinnön tarkoituksena on edelleen tarjota käyttöön menetelmä influenssarokotteen tuottamiseksi, joka on nopea

ja kustannuksia säästävä, erittäin puhdas ja mahdollistaa rokotteiden tuottamisen primäärisistä influenssalähteistä.

Keksinnön yhteenveto

Käyttöön tarjotaan menetelmä valmistaa yhdistelmäinfluenssahemagglutiniiniproteiini hyönteissoluissa ilmentämällä käyttäen bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmää. Syntyvä proteiini on käyttökelpoinen valmistettessa multivalenttia influenssarokotetta, joka perustuu yhdistelmähemagglutiniiniantigeeneihin, jotka on kloonattu epideemisen potentiaalin omaavista influenssaviruksista. Yhdistelmähemagglutiniiniproteiinit ovat täyspitkiä, pilkkomattomia (HA0) glykoproteiineja, joissa on sekä HA1- että HA2-alayksiköt (HA0) puhdistettuina ei-denaturoivissa olosuhteissa 95 prosentin tai suurempaan, edullisesti 99% puhtauteen.

Esitetään myös menetelmä influenssahemagglutiniinigeenien kloonaamiseksi influenssa A- ja B-viruksista käyttäen erityisesti suunniteltuja oligonukleotidikoettimia ja polymeraasin ketjureaktion (PCR) metodologiaa. Edullisessa toteutusmuodossa kloonatut HA-geenit modifioidaan poistamalla nukleotidit, jotka koodaavat luonnollisia hydrofobisia signaalipeptidisekvenssejä, ja korvaamalla uudella bakulovirussignaalipeptidillä, jolloin saadaan sekvenssi, joka koodaa signaalipeptidiä välittömästi rajoittuen hemagglutiniiniin. Nämä kimeeriset geenit liitetään bakuloviruksen ilmentymisvektoreihin niin, että bakuloviruksen polyhedriinipromoottori suuntaa yhdistelmä-HA-proteiinien ilmentymisen infektoituneisiin hyönteissoluihin. 18 aminohapon bakuloviruksen signaalipeptidi suuntaa rHA:n translaation hyönteissolun glykosyloitumisreittiin, eikä ole mukana valmiissa rHA-glykoproteiinissa. Edullisessa toteutusmuodossa suunnitellaan vektori, joka ei koodaa mitään väli-aminohappoja signaalipeptidin ja hemagglutiniiniproteiinin väliin.

Tämä metodologia voidaan laajentaa kaikentyyppisiin influenssaviruksiin, joita ovat, mutta ei niihin rajoittuen,

vallitseva A (H1N1) alatyyppi, A (H3N2) alatyyppi, ja B-tyyppi, jotka infektoivat ihmisiä, sekä influenssavirukset, jotka infektoivat muita nisäkkäitä ja lintulajeja.

Esitetään yleinen lähestymistapa hyönteissoluissa tuotetun yhdistelmä-HA-proteiinin tehokkaalle uuttamiselle ja puhdistamiselle rHA-proteiinien puhdistamiseksi A-alatyyppien ja B-tyypin influenssaviruksista. Yhdistelmärokote voidaan kehittää influenssan primäärilähteistä, esimerkiksi infektoituneiden yksilöiden nenäeritteistä, pikemmin kuin viruksesta, joka on muunnettu ja viljelty kananmunissa. Tämä mahdollistaa rokotteen nopean kehittämisen suoraan influenssan epideemisistä kannoista ja välttää ongelmat, jotka syntyvät viruksen muuntamisesta munissa viljelyä varten, sekä potilaan reaktio munakontaminaatiolle syntyneessä rokotteessa.

Esimerkit vahvistavat rokotteen formulaation ja kliinisen tehokkuuden immunisoivassa annostelumuodossa, joka sisältää puhdistettuja rHA-antigeenejä kolmesta influenssaviruskannasta, jotka ovat FDA:n suosittelemia vuosien 1993/1994 ja 1994/1995 influenssaepidemiakausille. Funktionaalinen immuniteetti mitattiin käyttäen kokeita, jotka määrittävät vasta-aineiden määrän, joka sitoutuu influenssahemagglutiniiniin, joka estää influenssaviruksen kyvyn agglutinoida punaisia verisoluja, tai joka neutraloi influenssaviruksen. Suojaavat immuunivasteet rHA-rokotteilla mitattiin eläimissä, jotka ovat herkkiä influenssainfektioille, tai ihmisen altistuskokeissa.

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuva 1 on kaaviokuva HA-geenien kloonaamisesta influenssa A:n kannoista puhdisteuista virus-RNA-valmisteista, ilmentyneen rHA:n puhdistamisesta, ja rHA:n biologisesta karakterisoinnista. Lyhenteet: FDA, Food and Drug Administration; MDCK, Madin Darby Canine Kidney (Madin Darby koiran munuainen); TPCK, tosyylifenyylialanyylikloorimetyyliketo-

ni; RNA, ribonukleiinihappo; cDNA, komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo; HA, hemagglutiniini; FBS, Fetal Bovine Serum (sikiövasikan seerumi); PCR, polymeraasin ketjureaktio; ja BV, bakulovirus.

Kuva 2 on yksityiskohtaisempi kaavio kuvan 1 menetelmästä käytettynä influenssa A/Texas/36/91-kannan HA-geenin kloonaukseen ja ilmentämiseen. Influenssa HA-geeni saatiin RNA:sta, joka oli puhdistettu MDCK-soluista, jotka oli infektoitu influenssa A/Texas/36/91:stä käyttäen käänteiskopioijaentsyymiä ja universaalialuketta (SEQ ID NO. 1), ja sen jälkeen kahdella PCR-monistuskierrolla ja kloonaamalla. Kuten on esitetty ensimmäisen kierroksen PCR-reaktioissa, käytettiin 5'-päätyaluketta SEQ ID NO. 2 ja 3'-päätyaluketta SEQ ID NO. 3. Toisen kierroksen PCR-reaktioissa käytettiin 5'-päätyaluketta SEQ ID NO. 4 ja 3'-päätyaluketta SEQ ID NO. 5. Konstruoitiin bakulovirusyhdistelmävektori, joka sisälsi polyhedriinipromoottorin ja signaalipeptidisekvenssin bakuloviruksen 61 K:n geenistä (bakulovirusgeeni, joka koodaa signaalipeptidiä, jolla on molekyylipaino noin 61.000), ja sen jälkeen täydelliset koodaavat sekvenssit valmiille HA-proteiinille. Tätä yhdistelmävektoria käytettiin sitten valmistamaan bakuloviruksen ilmentämisvektoria, joka tuottaa HA:ta tästä viruskannasta.

Kuva 3 on graafinen esitys anti-HA-immuunireaktiosta hiirissä, päivänä 42, n=5, jossa on piirretty vasta-ainetiitteri pelkälle rHA0:lle, Fluzone®-rokotteelle, ja rHA0-alunalle annoksilla 0,5 µg (tummat pylväät), 0,1 µg (varjostetut pylväät, 0,02 µg (pilkutetut pylväät) ja 0,004 µg (valkoiset pylväät).

Kuva 4a, 4b ja 4c ovat graafisia esityksiä anti-HA-immuunireaktiosta hiirissä, jotka on immunisoitu rHA:lla tai lisensoidulla trivalentilla rokotteella, vuosien 1994-1995 kaava, viikkoja rokotuksen jälkeen HIA-tiitterin suhteen, HAI A/Texas/36/91:lle (kuva 4a), HAI A/Shangdong/9/93:lle (kuva 4b) ja HAI B/Panama/45/90:lle (kuva 4c), rHA:lle

(timantit) ja FLUVIRON®:lla laimennetulle rokotteelle, joka viljeltiin munissa (neliöt).

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Nyt kuvataan menetelmä yhdistelmäinfluenssarokotteen valmistamiseksi. Täyspituinen, lohkaisematon (HA0) hemagglutiniiniantigeeni influenssaviruksesta tuotetaan bakuloviruksen ilmentämisvektorin kanssa viljellyissä hyönteissoluissa ja puhdistetaan ei-denaturoivissa olosuhteissa. Kaksi tai useampi puhdistettu hemagglutiniiniantigeeni influenssa A- ja/tai influenssa B-kannoista sekoitetaan yhteen tuottamaan multivalentti influenssarokote. Yhdistelmäantigeenit voidaan yhdistää apuainekantajan kanssa tehokkuuden lisäämiseksi.

Yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttäminen influenssarokotteiden tuottamiseen tarjoaa useita etuja: yhdistelmä-DNA-influenssarokote voidaan tuottaa turvallisemmissa ja tarkemmin valvotuissa olosuhteissa; kasvattamista infektoivan influenssan kanssa munissa ei tarvita; yhdistelmä-HA-proteiini voi olla erittäin tarkoin puhdistettu, jolloin luontaisesti eliminoidaan sivuvaikutukset, jotka johtuvat kontaminoivista proteiineista; yhdistelmä-HA:n puhdistusmenetelmien ei tarvitse sisältää viruksen inaktivointia tai virusmembraanin komponenttien orgaanista uuttamista, jolloin vältetään antigeenien denaturoituminen ja muut turvallisuushuolet, jotka johtuvat jäännöskemikaaleista rokotteessa; HA:n tuottaminen yhdistelmä-DNA-tekniikalla tarjoaa mahdollisuuden välttää geneettinen heterogeenisuus, joka ilmenee muunnettaessa ja kuljetettaessa munien kautta, jonka pitäisi mahdollistaa rokotekantojen parempi sopiminen yhteen influenssan epideemisten kantojen kanssa, jolloin saadaan parempi tehokkuus; ja yhdistelmälähestymistapa voi myös mahdollistaa kantojen valikoimisen myöhemmin sinä vuonna, jolloin saadaan aikaa suorittaa valikointi luotettavampiin epidemiologisiin tietoihin perustuen.

Bakulovirusten ilmentymisjärjestelmä

Bakulovirukset ovat DNA-viruksia Bakuloviridae-suvussa. Näillä viruksilla tiedetään olevan kapea isäntäalue, joka rajoittuu ensisijaisesti hyönteisten Lepidopteran-lajeihin (perhoset ja koit). Bakulovirus Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV), josta on tullut prototyyppi bakuloviruksesta, replikoituu tehokkaasti herkissä viljellyissä hyönteissoluissa. AcNPV:llä on kaksoiskierteinen suljettu rengas-DNA-genomi, jossa on noin 130.000 emäsparia, ja se on hyvin karakterisoitu isäntäalueen, molekyylibiologian ja perimän suhteen.

Monet bakulovirukset, kuten AcNPV, muodostavat suuria proteiinikidesulkeumia infektoituneiden solujen tumassa. Yksittäinen polypeptidi, johon viitataan nimellä polyhedriini, muodostaa noin 95% näiden sulkeumakappaleiden proteiinimassasta. Geeni polyhedriinille on mukana yksittäisenä kopiona AcNPV:n virusgenomissa. Koska polyhedriinigeeni ei ole olennainen viruksen replikoitumiselle viljellyissä soluissa, se voidaan helposti modifioida ilmentämään vieraita geenejä. Vieraan geenin sekvenssi insertoidaan AcNPV-geeniin juuri 3'-asemaan polyhedriinin promoottorisekvenssiin siten, että se on polyhedriinipromoottorin transkription säätelyn alapuolella.

Yhdistelmäbakulovirukset, jotka ilmentävät vieraita geenejä, on konstruoitu homologisen rekombinaation avulla baculoviruksen DNA:n ja kimeeristen plasmidien väliin, jotka sisältävät kiinnostavan geenisekvenssin. Yhdistelmävirukset voidaan havaita niiden selvästi erotettavan plakkimorfologian ja homogeenisuuteen tähtäävän plakkipuhdistamisen nojalla.

Bakulovirukset ovat erityisen sopivia käytettäväksi eukaryoottisina kloonaus- ja ilmentymisvektoreina. Ne ovat yleensä turvallisia kapean isäntäalueensa nojalla, joka rajoittuu artropodeihin. U.S. Environmental Protection Agency

(EPA) on hyväksynyt kolmen bakuloviruslajin käytön hyönteistuholaisten kontrolloimiseen. AcPNV:tä on käytetty tähkiin monien vuosien ajan EPA Experimental Use Permits:n valvonnassa.

AcNPV:n villi kanta ja yhdistelmävirukset replikoituvat erilaisissa hyönteissoluissa, kuten jatkuvissa solulinjoissa, jotka on saatu syntyneestä harsosääsken toukasta, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). S. frugiperda-soluilla on populaation kaksinkertaistumisaika 18-24 tuntia ja sitä voidaan kasvattaa yksikerros- tai vapaasuspensioviljelmissä.

Yhdistelmä-HA-proteiinit voidaan tuottaa soluissa, jotka on saatu Lepidopteran-lajissa Spodoptera frugiperda, mutta ei siihen rajoittuen. Muita hyönteissoluja, jotka voidaan infektoida bakuloviruksella, kuten seuraavista lajeista saaduilla: Bombix mori, Galleria mellanoma, Trichplusia ni tai Lamanthria dispar, voitaisiin myös käyttää sopivana substraattina tuottamaan yhdistelmä-HA-proteiineja.

Edullisin isäntäsolulinja proteiinituotannolle yhdistelmäbakuloviruksista on Sf900+. Toinen edullinen solulinja proteiinituotannolle yhdistelmäbakuloviruksista on Sf9. Sf900+ ja Sf9 ovat transformoitumattomia, ei-kasvaimia synnyttäviä jatkuvia solulinjoja, jotka on saatu harsosääsken toukasta, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). Sf900+- ja Sf9-solut kasvatetaan 28±2°C:ssa ilman hiilidioksiditäydennystä. Viljelmän kasvualusta Sf9-soluille on TNMFH, yksinkertainen seos suoloista, vitamiineista, sokereista ja aminohapoista, täydennettynä 10%:lla sikiövasikan seerumia. Paitsi sikiövasikan seerumia, ei mitään muuta eläimistä saatua tuotetta (s.o. trypsiini, jne.) käytetä solujen kasvatuksessa. Seerumivapaata viljelykasvualustaa (saatavana nimellä Sf900-viljelykasvualusta, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) voidaan myös käyttää Sf9-solujen kasvattamiseen ja se on edullista Sf900+-solujen kasvattamiseen.

Sf9-solujen populaation kaksinkertaistumisaika on 18-24 tuntia ja kasvatus voidaan suorittaa yksikerros- tai vapaasuspensioviljelmissä. S. frugiperda-solujen käyttöä minkä tahansa tunnetun nisäkäsviruksen replikoitumisen tukemiseen ei ole raportoitu.

Alan ammattimiesten ymmärrettävissä on se, että ilmentymisvektori ei ole rajoitettu bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmään. Yhdistelmä-HA-proteiineja voidaan ilmentää myös muissa ilmentymisvektoreissa, kuten Entomopox-virukset (hyönteisten poxvirukset), sytoplasman polyhedroosivirukset (CPV), ja hyönteissolujen transformaatiolla yhdistelmä-HA-geenin tai -geenien aikaansaaman ilmentymisen avulla.

Influenssakantojen eristys

Yksi tai useampi influenssakanta eristetään sairauden infektoimista yksilöistä. Edullisesti influenssakannat ovat niitä, jotka Food and Drug Administration (FDA) tai CDC ovat identivioineet sellaisiksi, joilla on epidemiaa aiheuttava kyky seuraavalle influenssakaudelle. Tässä kuvatun menetelmän etuna on, että voidaan käyttää kliinisiä näytteitä, kuten nenän eritteitä, influenssalla infektoituneista potilaista suorana viruksen lähteenä. Vaihtoehtoisesti ne voidaan saada FDA:lta tai CDC:ltä.

Influenssakantojen kasvatus

Kannat kasvatetaan sitten soluissa, jotka tuottavat korkean virustiitterin, kuten Madin Darby Canine Kidney-solut (MDCK) (joita saa American Type Culture Collectionilta talletusnumerolla ATCC CCL34). MDCK-solut infektoidaan esimerkiksi tosyylifenyylialanyylikloorimetyyliketonin (TPCK) läsnäollessa osittain inaktivoituna trypsiinin ja sikiövasikan seerumin konsentraatioiden ollessa optimoitu tuottamaan korkeimmat tiitterit ensimmäisestä viruskulusta. MDCK-solut infektoidaan influenssakannoilla alhaisella infektiomoninkertaistuksella (0,1-0,5) määritettynä stan-

dardikäyttöisellä HA-kokeella (Rosen, "Hemagglutination with Animal Viruses", Fundamental Techniques in Virology, toim. K. Habel ja N.P. Salzman, ss. 276-28 (Academic Press, New York 1969), jonka esitykset on liitetty mukaan). Infektoidut solut inkuboidaan 33°C:ssa 48 tuntia, ja kasvualustat analysoidaan virustuotannon suhteen käyttäen hemagglutinaation aktiivisuuskoetta. Olosuhteita, jotka antavat korkeimman HA-aktiivisuuden, käytetään sitten suurten influenssavirusmäärien valmistamiseen.

Viruksen puhdistus

Ensimmäisestä kulusta saadut viruspartikkelit puhdistetaan sitten kasvualustoista käyttäen tunnettuja puhdistusmenetelmiä, kuten sakkaroosin tiheysgradienttisentrifugointi. Virus korjataan esimerkiksi 24-48 tuntia infektion jälkeen sentrifugoimalla influenssalla infektoitujen MDCK-solujen kasvualustat. Saatu viruspelletti lietetään uudelleen puskuriin ja sentrifugoidaan puskuroidun sakkaroosigradientin avulla. Influenssavirusvyöhyke korjataan 40-45% sakkaroosialueelta gradienttia, laimennetaan puskurilla ja pelletoidaan sentrifugoimalla nopeudella 100.000 x g. Puhdistettu viruspelletti lietetään uudelleen puskuriin ja säilytetään -70°C:ssa.

Influenssahemagglutiniinigeenien kloonaus

Kuvassa 1 on esitetty katsaus menetelmistä HA-geenien kloonaamiseksi. Periaatteessa solut infektoidaan kloonattavalla influenssakannalla. Virus korjataan solujen kasvualustasta ja eristetään joko virus-RNA influenssa A-kantoja varten, tai mRNA influenssa B-kantoja varten. Virus-RNA (-RNA) uutetaan puhdistetuista virioneista ja analysoidaan formaldehydiagaroosigeeleillä käyttäen standardimenetelmiä. cDNA syntetisoidaan käyttäen joko universaalia alukejärjestelmää influenssa A-kannoista saadulle virus-RNA:lle tai satunnaisalukkeita influenssa B-kannoista saadulle mRNA:lle. Plus-standardin komplementaarinen DNA (cDNA) tehdään

käyttäen universaalia oligonukleotidialuketta (5'-AGCAAAAG-CAGG-3') (SEQ ID NO.1)), joka on homologinen kaikille hemagglutiniinin RNA-segmenteille influenssa A- ja B-viruksissa (Davis et al., "Construction and characterization of a bacterial clone containing the hemagglutinin gene of the WSN-strain (HON1) of influenza virus", Gene, 10:205-218 (1980)). Suunnitellaan alukkeet, jotka ovat homologisia säilytetyille alueille influenssan hemagglutiniinigeenien 5'- ja 3'-päässä. Sekä 5'- että 3'-alukkeilla on myös restriktioentsyymikohdat päissä, joita ei löydy hemagglutiniinigeeneistä.

Sopivat influenssa A- tai B-alukkeet ja influenssan cDNA sekoitetaan ja hemagglutiniinigeenisegmentit monistetaan käyttäen standardi-PCR-menetelmiä. Saadut kaksoiskierteiset DNA-fragmentit sisältävät koko valmista hemagglutiniinia koodaavat sekvenssit. Polymeraasin ketjureaktiota ("PCR") käytetään monistamaan koko HA-geeni, joka sitten kloonataan sopivaan bakteeri-isäntään, kuten E. coliin. 5'-päät sekventoidaan HA-geenien signaalipeptidin identifioimiseksi, sitten käytetään PCR:ää monistamaan HA-geenit vähennettynä signaalipeptidillä. Tämä subkloonataan sitten plasmidin siirtovektoriin, joka sisältää AcNPV-polyhedriinipromoottorin. Saadut siirtovektorit sisältävät seuraavat 5'->3'-sekvenssit: polyhedriinipromoottori bakuloviruksesta A. californica NPV, ATG-translaation aloituskodonin, 61K:n bakuloviruksen signaalipeptidin, koodaavat sekvenssit valmiille hemagglutiniinille, luonnollisen hemagglutiniinin translaation lopetuskodonin, polyhedriinin RNA:n polyadenylaatiosignaalin ja sivuavan bakuloviruksen DNA:n.

Puhdistettu kimeerinen siirtoplasmidin DNA, joka sisältää kloonatun hemagglutiniinigeenin, sekoitetaan sitten AcNPV:n villiä kantaa olevan DNA:n kanssa, saostetaan yhdessä kalsiumin kanssa ja siirretään S. frugiperda-soluihin. Yhdistelmäbakuloviruksset valikoidaan plakkimorfologian perusteella ja puhdistetaan edelleen lisäämällä plakkipuhdistuskiertoja. Kloonatut yhdistelmäbakuloviruksset seulotaan

hemagglutiniinin ilmentymistä varten, ja yksittäinen bakuloviruksen ilmentymisvektori valikoidaan tuottamaan Master Virus Bank.

Influenssa A-kannat:

HA-geenit influenssa A-kannoista kloonataan puhdistetuista virus-RNA-valmisteista. Virus-RNA uutetaan 100-200 mikrolitrasta puhdistettuja influenssa A-virioneja, jotka sisältävät 1000-2000 influenssan hemagglutinaatioyksikköä (HAU). Yksi HAU on se virusmäärä, joka agglutinoi 50% punaisista verisoluista standardiagglutinoitumiskokeessa (Rosen, 1969). Virionit käsitellään proteinaasi K:lla proteiinin hajottamiseksi, sitten virus-RNA uutetaan samoilla tilavuuksilla fenolia ja kloroformia, ja saostetaan etanolilla tRNA-kantajan läsnäollessa. Virus-RNA lietetään uudelleen puskuriin ja hajotetaan RNAse-vapaalla DNAse:lla kontaminoivan DNA:n poistamiseksi, sitten toistetaan uutto- ja saostusvaiheet. Virus-RNA (vRNA) analysoidaan sitten käyttäen formaldehydi-agaroosigeelejä, kuten on kuvattu julkaisussa Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ss. 86-96 ja 366-367 (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring, N.Y. 1982).

Influenssa B-kannat:

HA-geenit influenssa B-kannoista kloonataan kokonaisesta lähetti-RNA:sta (mRNA), joka on uutettu influenssa B-kannalla infektoiduista soluista. Kokonais-RNA uutetaan sitten infektoituneista soluista. Korjatut solut hajotetaan guanidiinitiosyanaatin läsnäollessa ja kokosolu-RNA puhdistetaan käyttäen esimerkiksi Pharmacia Biotech Inc.:n RNA Extraction Kit:iä (Piscataway, NJ). Kokonainen mRNA uutetaan solu-RNA:sta käyttäen Oligo-(dT)-selluloosa kierrettyjä kolonneja käyttäen esimerkiksi Pharmacia Biotech Inc.:n mRNA Purification Kit:iä.

Yhdistelmähemagglutiniinin ilmentyminen ja tuottaminen hyönteissoluissa

Yhdistelmähemagglutiniiniantigeenit ilmentyvät suurina määrinä S. frugiperda-soluissa, jotka on infektoitu AcNPV-hemagglutiniinivektoreilla. Primäärinen geenituote on muuttumaton, täyspituinen hemagglutiniini (rHA0) eikä erity, vaan jää jäljelle liittyneenä infektoituneiden solujen perifeerisiin membraaneihin. Tämä yhdistelmä-HA0 on proteiini, jonka molekyylipaino on 68.000 ja joka on glykolysoitu N-sidotuilla, paljon mannoosia sisältävän tyyppisillä glykaaneilla, jotka eroavat glykaaneista, jotka on tuotettu ilmentämällä virusproteiineja nisäkkään tai linnun soluissa. On todisteita siitä, että rHA0 muodostaa trimeerejä translaation jälkeen, jotka akkumuloituvat sytoplasmamembraaneihin.

Vektorit HA0:n ja muiden proteiinien ilmentämiseen

HA0 on parempi rokote johtuen sen erinomaisesta stabiilisuudesta verrattuna HA1/HA2-kompleksiin, ja se säilyttää oikean laskostumisen puhdistuksen ja varastoinnin aikana. Tämä erinomainen kyky on erityisen ilmeinen B-kannoilla, joka johtaa tiittereihin, jotka ovat noin viisi kertaa suuremmat kuin joita saadaan ostettavilla laimennetuilla B-kannoilla.

Kuten jäljessä esimerkeissä on kuvattu, kun HA-geenit kloonattiin pMGS12:ssa restriktiokohtien avulla, HA:n valmis signaalipeptidi poistui ja korvautui bakuloviruksen kitinaasisignaalipeptidillä, johon viitataan nimellä 61 kD:n signaalipeptidi. Koska HA-geeni liittyy kitinaasin signaalipeptidiin lohkeamiskohdan välityksellä, on valmiin HA0-proteiinin ja 61 kD:n signaalipeptidin välillä kolmesta viiteen aminohappoa riippuen valitusta restriktiokohdasta. Vaikka influenssan A-kannan kanssa ei ollut ongelmaa, B-kannan HA0, joka ilmentyi lisäaminohappojen kanssa, ei laskostunut sopivasti.

Kehitettiin kaksi tapaa ratkaista tämä ongelma. Ensimmäinen on käyttää uutta vektoria, pMGS3:a, joka ei koodaa 61 kD:n signaalipeptidiä. HA0 ja sen alkuperäinen signaalipeptidi kloonautuu vektoriin ja ilmentyy. SDS-PAGE:lla karakterisoitaessa tässä vektorissa ilmentyneellä B-kannan HA0:lla on parempi glykosylaatio ja prosessoitavuus kuin ilmennettynä pMGS12:ssa. HA0 laskostui niin hyvin, että se voidaan kvantitatiivisesti muuttaa HA1/HA2:ksi. Valitettavasti saanto Western blottauksella määritettynä ei ollut niin suuri. Toinen menetelmä nostaa saantoa käytettäessä 61 kD:n signaalipeptidiä pMGS12:ssa ohjaamaan ilmentymistä, jossa HA0-geeni insertoituu ilman restriktioentsyymien käyttöä. Uuteen vektoriin, joka käsittää 61 kD:n signaalipeptidin ja HA0-geenin ilman sekvenssiä, joka koodaa ulkopuolelta väliin tulevia aminohappoja, viitataan nimellä pMGS27.

pMGS27:ää voidaan käyttää kloonaamaan ja ilmentämään mitä tahansa geeniä bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmässä. Kohdegeeni kloonataan vektoriin lämpökäsittelemällä sen sijan, että se kloonattaisiin vektoriin restriktiolla ja sitomalla. Reagensseja on saatavissa Clontechiltä niiden PCR-suorassa kloonausjärjestelmässä. pMGS27 suunniteltiin sellaiseksi, että se voidaan linearisoida kitinaasin signaalipeptidiä koodaavan alueen loppuun, ja kaksi yksöiskierteistä häntää syntyi käsittelemällä linearisoitua pMGS27:ää T4 DNA-polymeraasilla ja dATP:llä.

Kohdegeeni monistetaan käyttäen polymeraasiketjureaktiota ("PCR") tai käänteiskopioijaentsyymi-PCR:ää ("RT-PCR") oligonukleotidiparin kanssa, joka suunniteltiin synnyttämään yksöiskierteisiä häntiä, jotka ovat komplementaarisia käsitellyn pMGS27:n hännille, sen jälkeen kun PCR-fragmentti on käsitelty T4 DNA-polymeraasilla ja dTTP:llä. Yksinkertainen lämpökäsittely voi sitten yhdistää kaksi molekyyliä ympyrämäiseksi plasmidiksi, joka on valmis transformoitavaksi isäntään. Paitsi, että tämä menetelmä on nopeampi ja yksinkertaisempi kuin perinteinen restriktio-sitomismenetelmä HA-geenin kloonaamiseksi pMGS12:een, pMGS27:llä

on se tärkeä etu, että se ei tuota ylimääräisiä aminohappoja, joita koodaavat restriktiokohdat, jotka on luotu kitinaasin signaalipeptidin ja valmiin HA-proteiinin väliin. Nämä ylimääräiset aminohapot voivat joskus synnyttää sellaisia vaikeuksia, kuin että signaalipeptidaasi ei voi lohkaista signaalia tai että koodattu proteiini ei laskostu oikein, kuten B-kannan HA:n tapauksessa.

Yhdistelmä-HA0:n puhdistaminen

Useita päiviä infektion jälkeen rHA0 voidaan selektiivisesti uuttaa AcNPV-hemagglutiniinilla infektoitujen solujen ääreismembraaneista ei-denaturoivalla, ionittomalla detergentillä tai muilla alan ammattimiehille tutuilla menetelmillä yhdistelmäproteiinien puhdistamiseksi hyönteissoluista, kuten, mutta ei rajoittuen siihen, affiniteetti- tai geelikromatografia, ja vasta-aineiden sitominen. Detergenttiin liukoinen rHA0 voidaan edelleen puhdistaa käyttäen DEAE-ioninvaihtoa ja Lentil lectin-affiniteettikromatografiaa, tai muita ekvivalentteja menetelmiä, jotka ovat alan ammattimiesten tuntemia.

Edullisessa toteutusmuodossa rHA0 puhdistetaan käyttäen menetelmää, joka on lievempi ja johtaa parempaan rHA0:n saantoon influenssan B-kannoista. Tämä menetelmä on yleisesti seuraava:

HA0-proteiini, joka muodostaa hyönteissolujen membraanin integraalisen osan, erotetaan liukoisista proteiineista, ääreismembraaniproteiineista ja DNA:n ja RNA:n pääosasta uuttamalla solut suhteellisen viskoosiin emäsliuokseen, jolloin emäksinen pH on määrätty välille noin 9,5-10,5. Viskositeetti nousee lisäämällä sakkaroosia noin 250 mM:n pitoisuuteen. Disulfidia pelkistävää ainetta, esimerkiksi ß-merkaptoetanolia, lisätään pitoisuuteen, joka on tehokas ehkäisemään seoksessa olevien proteiinien disulfidisitoutumista. Solut lietetään uuttopuskuriin, homogenoidaan ja sitten sentrifugoidaan. Pelletti pestään homogenoimalla

matalan ionivahvuuden omaavaan puskuriin, joka sisältää disulfidia pelkistävää ainetta, emäksisessä pH:ssa (johtavuus on yleensä alle 1 mS, pH 10,5) ja pelletti sentrifugoidaan. HA0 uutetaan sitten pelletistä puskuriin, joka sisältää 0,3 ja 1,5%:n välillä detergenttiä, kuten Tritonia, tietyn määrän aggregoitumista estävää ainetta ehkäisemään kompleksinmuodostus, joka johtuu varausten vuorovaikutuksista, esimerkiksi välillä 0,3-1,0 M betaiinia tai pauriinia, emäksisessä pH:ssa (9,5 on edullinen). Supernatantissa oleva HA0 puhdistetaan sitten anioninvaihtokromatografialla ja sen jälkeen kationinvaihtokromatografialla. HA0 viedään anioninvaihtokolonniin, esim. DEAE tai Q-Sepharose® (agaroosihelmikolonni, jossa on kvaternäärisiä amiiniryhmiä), samassa puskurissa kuin jolla uutettiin, mutta laimennettuna ainakin 1:2 lisäämällä puskuria kolonnin tasapainottumisen puskurissa, joka sisälsi noin 1/10-osan pitoisuudestaan detergenttiä ja disulfidia pelkistävää ainetta. HA0 eluoidaan sitten alemtamalla pH:ta noin arvoon 8,5. Eluoitu HA0 viedään kationinvaihtokolonniin olennaisesti samaan puskuriin. Kontaminantit eluoidaan alentamalla pH:ta noin arvoon 7,4, eluoidaan sitten HA0 lisäämällä suolaa pitoisuuteen 0,15 M NaCl.

Tämä edullinen puhdistusmenetelmä on kuvattu yksinkertaisesti jäljessä.

Yhdistelmä-HA:ta sisältävän membraanifraktion valmistus. Yhdistelmä-HA:ta ilmentävät solut (6,2 g soluja 3,4 l:sta viljelmää) lietetään 100 mg/ml:aan seosta, jossa on jääkylmää 100 mM natriumpyrofosfaattia, 100 mM natriumkloridia, 250 mM sakkaroosia, 0,1% ß-merkaptoetanolia, pH 10,5. Solut rikotaan käyttäen Polytron®-homogenoijaa (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) säädöllä 4 2 minuutin ajan. Homogenointiväliaineen emäksistä pH:ta tarvitaan lisäämään kontaminanttiproteiinin liukoisuutta ja lisäämään membraanivalmisteen puhtautta. Homogenaattia sentrifugoidaan 30 min kiihtyvyydellä 9200 g. Supernatantti heitetään pois ja pelletti otetaan talteen. Membraanifraktion valmistus tapahtuu

matalan ionivahvuuden pesuvaiheessa. Pelletti lietetään uudelleen alkuperäiseen tilavuuteen jääkylmää 0,1% ß-merkaptoetanolia, 10,5:ssä, ja homogenoidaan käyttäen Polytron®-homogenoijaa säädöllä 4 2 minuutin ajan. Homogenaattia sentrifugoidaan 30 min kiihtyvyydellä 9200 g. Supernatantti heitetään pois ja pelletti otetaan talteen. Tämä ionivahvuudeltaan matala pesuneste poistaa ääreismembraaniproteiinien lisäosan. Membraanifraktion valmistus johtaa huomattavaan rikastumiseen yhdistelmä-HA:n pitoisuudessa ja kontaminoivien nukleiinihappojen poistumiseen.

Yhdistelmä-HA:n uuttaminen. Yhdistelmä-HA uutetaan sitten selektiivisesti membraanipelleteistä olosuhteissa, jotka eivät denaturoi antigeenia. Membraanipelletti homogenoidaan 41 ml:ssa jääkylmää seosta, jossa on 10 mM etanoliamiinia pH:ssa 9,5, 1% Triton N101, 0,1% ß-merkaptoetanolia, 25 mM NaCl, 400 mM betaiinia, käyttäen Polytron-homogenoijaa säädöllä 4 kahden minuutin ajan. Kun on suoritettu inkubointia 40 min 23°C:ssa, seosta sentrifugoidaan 30 min kiihtyvyydellä 9200 g. Yhdistelmä-HA:ta sisältävä supernatantti dekantoidaan ja laimennetaan tilavuudeltaan kaksinkertaiseksi samalla puskurilla.

Proteiinit analysoidaan SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Näytteitä rikotaan kiehuvassa vesihauteessa 10 minuuttia, jossa on läsnä 2% natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja 5% ß-merkaptoetanolia, sitten elektroforesoidaan 11% polyakryyliamidigeelillä siten, että läsnä on 0,1% SDS, ja värjätään lopuksi Coomassien sinisellä.

Kromatografinen puhdistus. Yhdistelmä-HA:n kromatografista puhdistusta yksinkertaistettiin ja kallis affiniteettikromatografia Lentil Lectin Sepharosella poistettiin prosessista korvaamalla kaksivaiheisella kromatografisella puhdistusprosessilla, joka johti erittäin puhtaaseen yhdistelmä-HA-antigeeniin, joka on denaturoitumaton ja sopiva komponentiksi influenssarokotteeseen ihmisen käyttöön. Käyte-

tyt kromatografiageelimatriisit ovat Pharmacia Q-Sepharose® Fast Flow ja CM-Sepharose Fast Flow®.

Anioninvaihtokromatografia. Koko kromatografiavaihe suoritetaan huoneenlämmössä. Yhdistelmä-HA:ta sisältävä uute, joka valmistettiin edellä kuvatulla tavalla, vietiin nopeudella 1 ml/min Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow®-kolonnin (5 ml C10/10 Pharmacia-kolonni), joka oli tasapainotettu seoksella, jossa oli 10 mM merkaptoetanolia, pH 9,5, 0,1% Triton® N101, 0,01% ß-merkaptoetanolia, 25 mM NaCl, 400 mM betaiinia. Kolonni pestään sitten tasapainotuspuskurilla, kunnes effluentin UV-absorbanssi palaa perusarvoon. Näissä olosuhteissa yhdistelmä-HA sitoutuu kolonniin, kun taas osa kontaminanteista virtaa läpi. Osittain puhdistettu yhdistelmä-HA eluoidaan sitten seoksella, jossa on 30 mM dietanoliamiinia pH:ssa 8,5, 0,1% Triton® N101, 0,01% ß-merkaptoetanolia, 25 mM NaCl, 400 mM betaiinia.

Kationinvaihtokromatografia. Q-Sepharose-eluaatti (23 ml) laimennetaan kaksinkertaiseen tilavuuteen seoksella, jossa on 30 mM dietanoliamiinia, pH 8,5, 0,1% Triton® N101, 0,01% ß-merkaptoetanolia, 10 mM NaCl, 400 mM betaiinia. Kolonni pestään sitten 35 ml:lla seosta, jossa on 10 mM natriumfosfaattia, pH 7,4,, 0,1% Triton® N101, 0,01% ß-merkaptoetanolia, 25 mM NaCl, 400 mM betaiinia. Tämä käsittely eluoi kontaminantit kolonnista samalla, kun yhdistelmä-HA jää sitoutuneeksi CM Sepharoseen. Detergentti poistetaan sitten pesemällä kolonni seoksella, jossa on 10 mM natriumfosfaattia, pH 7,4, 10 mM NaCl, kunnes effluentin UV-absorbanssi palautui perusarvoon. Puhdistettu yhdistelmä-HA eluoidaan fosfaattipuskurisuolaliuoksella, pH 7,5 (PBS).

Puhdistettu rHA0 lietetään uudelleen isotoniseen puskuroituun liuokseen. Detergentin poistamisen jälkeen puhdistettu rHA0 agglutinoi tehokkaasti punaisia verisoluja.

Yhdistelmä-HA:n rakenteellisia ja biologisia ominaisuuksia.

rHA0 puhdistaan ainakin 95%:n puhtauteen, edullisemmin 99%:n puhtauteen. Tämä kulkee SDS-polyakryyliamidigeelissä vallitsevana yksittäisenä pääpolypeptidinä, jonka molekyylipaino on 68.000. Puhdistetun yhdistelmä HA0-antigeenin kvaternääristä rakennetta tutkittiin elektronimikroskoopilla, trypsiiniresistenssillä, tiheyssedimentoitumisanalyysillä ja kyvyllä agglutinoida punaisia verisoluja. Nämä tiedot osoittavat, että yhdistelmä HA0 muodostaa trimeerejä, jotka kokoontuvat yhteen ruusukkeiksi.

Puhdistettu rHA0 ei agglutinoi soluja ennen detergentin poistamista, minkä mukaan antigeenin täytyy muodostaa komplekseja (ruusukkeita) ristisilloittuakseen kanan punaisten verisolujen kanssa. Puhdistetun rHA0:n kvantitatiivista kykyä agglutinoida soluja käytetään antigeenin eräkohtaisen konsistenssin mittana. Yksi hemagglutiniiniyksikkö määritellään antigeenin tarvittavana määränä saamaan aikaan 50% agglutinoituminen standardihemagglutiniinikokeessa kanan punaisilla verisoluilla. Vertailutiedot osoittavat, että puhdistetut rHA0-antigeenit agglutinoivat punaisia verisoluja tehokkuudella, joka on vertailukelpoinen kokonaisilla influenssavirioneilla havaitun kanssa.

Yhdistelmä-HA0 voidaan lohkaista disulfidisidoksessa, mikä aiheuttaa muutoksen konformaatiossa, joka johtaa kahden ketjun HA1:n ja HA2:n muodostumiseen, kuten on kuvattu julkaisussa Carr, C.M. and Kim, P.S., "A Spring-loaded Mechanism for the Conformational Change of Influenza Hemagglutin", Cell 73:823-832 (1993), joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi. Yhdistelmä-HA0:n lohkaisu on kuvattu yksityiskohtaisemmin jäljessä esimerkissä 6. Uskotaan, että luonnon HA0:n lohjetessa HA1:ksi ja HA2:ksi ketjut tulevat infektoiviksi saadessaan kyvyn sulautua soluun, jolloin syntyy parempi immuunivaste. Antigeenien, kuten influenssahemagglutiniinin, valmistus tapahtuu sitomalla antigeenipeptidit suuriin kudosyhteensopivuusmolekyyleihin (MHC).

Antigeeni/MHC-kompleksin tiedetään T-solujen avulla aloittavan immuunivasteen, kuten on kuvattu Hardingin ja Geuzen katsauksessa Current Opinion in Cell Biology 5:596-605 (1993), joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi. Bakuloviruksessa tuotettu rHA0 on kuitenkin erittäin stabiili ja immunogeeninen kuten ehjä molekyyli. Sokerimolekyylien vertailu hyönteissoluissa ilmentyneessä HA0:ssa osoittaa, että glykaanit eroavat niistä, kun HA0 ilmentyy nisäkkään tai linnun soluissa.

Fuusioproteiinien tuotanto

Voidaan valmistaa fuusioproteiineja, jotka koostuvat HA0:sta fuusioituneena toiseen antigeeniproteiiniin, jossa toisen proteiinin antigeenisuus on matala, tai mukana on etuja tuoda esiin immunogeeninen vaste moninkertaisille antigeeneille. Esimerkki edullisesta toisesta antigeenista on neuraminidaasi, joka on tuotettu influenssalla. Antigeeni voi koostua solu-, virus- tai bakteeriproteiinista, tai sen antigeeniosasta, joka käsittää 5-8 aminohappoa. Muita antigeeneja ovat B-hepatiittiantigeeni, HIV-antigeenit ja syöpäalkion antigeeni. "Immuunivaste" tässä käytettynä viittaa joko nestevasteeseen, mitattuna vasta-aineen muodostumisena antigeenille, tai soluvasteena, mitattuna T-soluvälitteisen vasteen ilmaantumisena antigeenille. Joissakin tapauksissa ei-antigeenisten aminohappojen "linkkeri" voi olla insertoitu HA:n ja antigeenin väliin lisäämään edelleen antigeenin antigeenisuutta verrattuna HA:han. Prosessi käsittää sen, että muodostetaan DNA-plasmidi, joka on tarkoitettu fuusioimaan kohdeantigeenin geenit täysipituiseen tai osiin influenssaviruksen HA-geenistä, käyttäen oligonukleotidikoettimia ja polymeraasiketjureaktio- (PCR) menetelmää.

HA-kohdeantigeenin fuusiogeenit on modifioitu ilmentymään sopivasti hyönteissoluissa poistamalla luonnon hydrofobiset signaalipeptidisekvenssit ja korvaamalla uudella bakuloviruksen signaalipeptidillä. Fuusiogeeni liitetään bakuloviruksen ilmentymisvektoriin siten, että bakuloviruksen poly-

hedronipromoottori suuntaa fuusioproteiinien transkription infektoituneisiin hyönteissoluihin. 18 aminohapon bakuloviruksen signaalipeptidi suuntaa HA-kohdeantigeenin fuusiopolypeptidin translaation hyönteissolun glykosyloitumisreittiin eikä ole läsnä valmiissa fuusioproteiinissa.

Esimerkiksi plasmidia pA9440, joka sisältää A/Beijing/32/92-kannan HA-geenin jäljessä kuvatussa pMGS12-bakuloviruksen siirtoplasmidissa, käytetttiin templaattina HA-geenin monistukseen polymeraasiketjureaktiolla (PCR) käyttäen toimittajan suosittelemaa ohjetta (Gene Amp PCR cloning kit, Perkin Elmer Cetus). PCR-reaktioseos (100 µl) sisälsi 20 pmol alukkeita, jotka oli suunniteltu lämpökäsittelemään HA-geenin osia. 5'- ja 3'-alukkeet suunniteltiin restriktioendonukleaasikohtien kanssa päihin, joita ei ole HA-geenissä. 5'-PCR-aluke (0-567) HA0- ja HA1-fragmenteille alkaa 52 emäsparia alaspäin luonnon HA-geeniä koodaavien sekvenssien päästä deletoiden luonnon signaalipeptidisekvenssin, ja lisää SmaI-kohdan välittömästi 5'-kohtaan HA-koodaaviin sekvensseihin. 5'-PCR-aluke (0-651) HA2-fragmentille alkaa nukleotidista 1108 luonnon HA-geenistä, välittömästi seuraten kodonia, joka koodaa arginiinijäännöstä, joka poistetaan lohkaistaessa HA0 HA1:ksi ja HA2 :ksi. 3'-PCR-aluke (0-680) HA0- ja HA2-fragmenteille suunniteltiin lisäämään KpnI-kohta välittömästi HA:ta koodaavien sekvenssien jälkeen poistamalla luonnollinen pysäytyskodoni. 3'-PCR-aluke HA1:lle (0-679) katkaisee geenin välittömästi ennen arginiinjäännöstä, joka poistettiin HA0-lohkaisun aikana. HA-geenifragmentin monistus suoritettiin 30 syklillä, joista jokainen käsitti 1 min 94°C:ssa denaturointia, 2 min 55°C:ssa alukkeiden lämpökäsittelyä ja 2 min 72°C:ssa lisäystä. Saadut monistuneet HA-geenifragmentit elektroforesoitiin agaroosigeeleillä, puhdistettiin geelistä käyttäen GeneClean kit:iä (Bio 101, Inc.) ja sidottiin plasmidiin, joka oli suunniteltu ottamaan vastaan PCR-syntyiset fragmenti (pCRII; Invitrogen). Näin saatiin plasmidit pB142, pB144 ja pB330, jotka sisälsivät geenifragmentit HA0, HA1 ja HA2, vastaavasti.

HA-geenifragmentit poistettiin plasmideista pB142, pB144 ja pB330 SmaI- ja KpnI-restriktioentsyymeillä ja subkloonattiin sitten standardi-yhdistelmä-DNA-tekniikalla (Sambrook et al., 1989) AcNPV-siirtoplasmidiin pMGS12. pMGS12-plasmidi sisältää, 5'->3' AcNPV-polyhedronipromoottorin, ATG-aloituskodonin, sekvenssiin lohkaistavalle signaalipeptidille molekyylipainoltaan 61.000:n bakuloviruksglykoproteiinista (61K), SmaI- ja KpnI-restriktioentsyymin kloonauskohdat, ja TAA universaalin pysäytyskodonisekvenssin. Näiden säätelyalueiden vieressä on DNA EcoRI-fragmentista AcNPV-genomista (Summers and Smith, "A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures". Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987). Kloonatut HA:n PCR-fragmentit leikattiin pCRII-kloonausvektorista SmaI:llä ja KpnI:llä. Saadut AcNPV-siirtoplasmidit pB879, pB1201 ja pB1205, jotka sisälsivät koodaavat alueet HA0:lle, HA1:lle ja HA2:lle, vastaavasti, sitoutuneena kehykseen yhdessä lohkeavan bakuloviruksen signaalipeptidin kanssa 61K:n geenistä ja polyhedronipromoottorista. pB879, pB1201 ja pB1205 AcNPV-siirtoplasmideita voidaan käyttää fuusioimaan HA0, HA1 tai HA2 mihin tahansa kiinnostavaan geeniin.

Toinen vaihe HA-CEA-fuusiogeenin siirtoplasmidien konstruoinnissa oli insertoida CEA:ta koodaavat sekvenssit HA:ta koodaaviin rakenteisiin. Restriktioendonukleaasin tunnistus/lohkaisukohdat SmaI:lle ja KpnI:lle sijoitettiin CEA-geenin molempiin päihin plasmidin pA9080 PCR-monistuksen avulla. 5'-PCR-aluke 0-649, alkaa 82 emäsparia geenin 5'-päästä deletoiden luonnollisen CEA:n signaalipeptidisekvenssin. 3'-PCR-aluke, 0-650, suunniteltiin deletoimaan viimeiset 72 emäsparia hydrofobista C-päätealueen sekvenssiä koodaavan geenin 3'-päästä. CEA-geenifragmentin monistusta suoritettiin 30 sykliä, joista jokainen koostui 1 min denaturoinnista 94°C:ssa, 2 min toistolämpökäsittelystä 55°C:ssa ja 2 min laajentamisesta 72°C:ssa. Saatu monistettu CEA-geenifragmentti elektroforesoitiin agaroosigeelillä, puhdistettiin GeneClean menetelmällä, ja sidottiin pCRII:-

een (Invitrogen) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Saatu plasmidi, pB806, sisältää CEA-geenin ilman sen luonnollista signaalipeptidiä, C-pään hydrofobista domeenia, eli pysäytyskodonia, mutta mukana ovat sekä SmaI- että KpnI-kohdat geenin molemmissa päissä.

Suurimittakaavainen plasmidinvalmistus suoritettiin pB806-plasmidilla, ja DNA leikattiin joko SmaI:llä tai KpnI:llä. CEA:ta koodaavat fragmentit puhdistettiin agaroosigeeli-elektroforeesilla ja GeneClean-kitillä, ja puhdistetut fragmentit sidottiin kuhunkin kolmeen HA:ta koodaavaan rakenteeseen (pB879, pB1201 tai pB1205), jotka oli leikattu samalla restriktioentsyymillä. Esimerkiksi CEA:ta koodaavat fragmentit, joissa oli SmaI:llä leikatut päät, sidottiin HA0-, HA1- ja HA2-koodaaviin rakenteisiin (pB879, pB1201 ja pB1205, vastaavasti) leikattuna SmaI:llä plasmidien pB1250, pB1555 ja pB1584 synnyttämiseksi, vastaavasti. CEA:ta koodaavat fragmentit, joissa oli KpnI:llä leikatut päät, sidottiin HA0-, HA1- ja HA2-koodaaviin rakenteisiin, jotka oli leikattu KpnI:llä pB1264:n, pB1564:n ja pB1593:n synnyttämiseksi. CEA-geenin insertio SmaI-kohdassa sijoitti CEA:ta koodaavat sekvenssit alaspäin HA:ta koodaavista sekvensseistä. Kaikille rakenteille PCR-aluke suunniteltiin sellaiseksi, että EA-geeni insertoitiin kehyksen sisään HA:n kanssa, ja fuusiogeenin translaatio päättyisi universaalissa translaation päätesignaalissa (TAATTAATTAA) (Seq. ID No. 4) pMGS12-vektorisekvensseissä alaspäin KpnI-kohdasta.

Tätä rakennetta voidaan parantaa deletoimalla väliaminohapot, joko signaalipeptidin ja HA0:n välistä kuten jäljessä kuvataan, tai HA0:n ja fuusiogeenin välistä laskostumisen ja immunogeenisyyden lisäämiseksi.

Rokotteiden formulointi ja pakkaaminen

rHA voidaan formuloida ja pakata yksinään tai yhdessä muiden influenssa-antigeenien kanssa käyttäen menetelmiä ja

aineita, jotka influenssarokotealan ammattimiehet tuntevat. Edullisessa toteutusmuodossa HA-proteiinit kahdesta A-kannasta ja yhdestä B-kannasta yhdistetään muodostamaan multivalentti rokote.

Erityisen edullisessa toteutusmuodossa HA:t yhdistetään apuaineen kanssa, jota on riittäväti nostamaan immunogeeninen vaste HA-proteiineja vastaan. Tänä aikana ainoa apuaine, jota on paljon käytetty ihmisissä, on ollut aluna (alumiinifosfaatti tai alumiinihydroksidi). Saponiinilla ja sen puhdistetuilla komponenteilla Quil A:lla, Freundin täydellisellä apuaineella ja muilla tutkimuksessa ja eläinkohteissa käytetyillä apuaineilla on myrkyllisyyttä, joka rajoittaa niiden potentiaalista käyttöä ihmisrokotteissa. Kuitenkin uusien kemiallisesti määriteltyjen valmisteiden, kuten muramyylidipeptidin, monofosforyylilipidi A:n, fosfolipidikonjugaattien, kuten niiden, joita ovat kuvanneet Goodman-Snitkoff et al., J. Immunol. 147:410-415 (1991), joka on liitetty tähän viitteeksi, proteiinin kapseloiminen proteoliposomiin, kuten Miller et al. ovat kuvanneet, J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992), joka on liitetty tähän viitteeksi, ja proteiinin kapseloiminen lipidivesikkeleihin, kuten Novasome™-lipidivesikkeleihin (Micro Vescular Systems, Inc., Nashua, NH), pitäisi myös olla käyttökelpoisia.

Edullisessa toteutusmuodossa rokote on pakattu yksittäisannostukseksi immunisoimaan parenteraalisesti (s.o. lihaksen sisään, ihon sisään tai ihon alle) antamalla tai nenänieluun (s.o. nenän sisään) antamalla. Vaikuttava annostus on määritetty kuten seuraavissa esimerkeissä on kuvattu. Kantaja on tavallisesti vesi tai puskuroitu suolaliuos, säilöntäaineen kanssa tai ilman. Antigeeni voi olla lyofilisoitu uudelleen lietettäväksi annettaessa, tai liuoksena.

Kantaja voi myös olla polymeerinen hidastetusti vapauttava järjestelmä. Synteettiset polymeerit ovat erityisen käyttökelpoisia rokotteiden formuloinnissa aikaansaamaan antigee-

nien kontrolloitu vapautuminen. Aiempi esimerkki tästä oli metyylimetakrylaatin polymerointi palloiksi, joiden halkaisija oli alle mikrometrin, jolloin muodostui niin sanottuja nanopartikkeleita, joista raportoi Kreuter, J. Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology, M. Donbrow (toim.), CRC Press, s. 125-148. Vasta-ainevaste sekä suoja influenssavirusinfektiota vastaan oli merkittävästi parempi kuin silloin kun antigeeni annettiin yhdessä alumiinihydroksidin kanssa. Kokeet muilla partikkeleilla ovat näyttäneet, että näiden polymeerien apuainevaikutus riippuu partikkelikoosta ja hydrofobisuudesta.

Mikrokapselointia on käytetty mikrokapseloitujen lääkkeiden injektoimiseen antamaan kontrolloidun vapautumisen. Useat tekijät vaikuttavat tietyn polymeerin valintaan mikrokapselointia varten. Polymeerisynteesin ja mikrokapselointiprosessin toistettavuus, mikrokapselointimateriaalien ja prosessin kustannukset, toksikologinen profiili, vaatimukset muuttuvan vapautumisen kinetiikasta ja polymeerin ja antigeenien fysikokemiallinen yhteensopivuus ovat kaikki tekijöitä, jotka tulee ottaa huomioon. Esimerkkejä käyttökelpoisista polymeereistä ovat polykarbonaatit, polyesterit, polyuretaanit, polyortoesterit ja polyamidit, erityisesti sellaiset, jotka ovat biologisesti hajoavia.

Usein käytetty valinta kantajaksi lääkkeisiin ja vielä enemmän antigeeneihin on poly(d,l-laktidi-ko-glykolidi) (PLGA). Tämä on biohajoava polyesteri, jolla on pitkä historia lääketieteellisesti käytettynä hajoavissa ompeleissa, luulevyissä ja muissa väliaikaisissa proteeseissa, joissa sillä ei olle ollut minkäänlaista myrkyllisyyttä. Monia erilaisia lääkkeitä, kuten peptidit ja antigeenit, on formuloitu PLGA-mikrokapseleiksi. Paljon tietoa on kertynyt PLGA:n soveltuvuudesta antigeenin kontrolloituun vapauttamiseen, esimerkiksi julkaisussa Eldridge, J.H. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology 1989, 146:59-66. Antigeenien sulkemisella halkaisijaltaan 1-10 mikronin mikropallosiin on osoittautunut olevan huomattava apuaine-

vaikutus oraalisesti annettaessa. PLGA-mikrokapselointiprosessissa käytetään vesi-öljyssä-emulsion faasinerotusta. Kiinnostava yhdiste valmistetaan vesiliuoksena ja PLGA liuotetaan sopiviin orgaanisiin liuottimiin, kuten metyleenikloridiin ja etyyliasetaattiin. Nämä kaksi toisiinsa sekoittumatonta nestettä emulgoidaan yhteen nopealla vauhdilla sekoittaen. Polymeeria liuottamaton aine lisätään sitten, jolloin tapahtuu polymeerin saostuminen vesipisaroiden ympärille, jolloin muodostuu alkiomikrokapseleita. Mikrokapselit kerätään ja stabiloidaan yhdellä aineella valikoimasta (polyvinyylialkoholi (PVA), gelatiini, alginaatit, polyvinyylipyrrolidoni (PVP), metyyliselluloosa), ja liuotin poistetaan joko kuivaamalla vakuumissa tai liuotinuutolla.

Tätä keksintöä selitetään nyt enemmän viittaamalla seuraaviin ei-rajoittaviin esimerkkeihin.

Esimerkki 1: **Influenssavirusten kasvatus ja puhdistus**

Seuraavat influenssarokotekannat saatiin FDA:lta kananmunan allantoiininesteessä:

A/Beijing/353/89:n kaltainen (H3N2)
A/Beijing/32/92:n kaltainen (H3N2)
A/Texas/36/91:n kaltainen (H1N1)
B/Panama/45/90

FDA:lta saadun influenssaviruksen alkuperäisen erän kasvattamiseksi MDCK-solut infektoitiin TPCK-käsitellyn trypsiinin läsnäollessa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ja sikiövasikan seerumin konsentraatioiden ollessa optimoidut tuottamaan suurimmat tiitterit viruksen ensimmäiselle kululle. MDCK-solut infektoitiin influenssakannoilla infektion pienellä moninkertaistuksella (0,1-5,0) määriteltynä standardi-HA-kokeella (Rosen, "Hemagglutination with Animal Viruses", julkaisussa Fundamental Techniques in Virology, toim. K. Habel ja N.P. Salzman, ss. 276-28 (Academic Press,

New York 1969)). Infektoituja soluja inkuboitiin 33°C:ssa 48 tuntia ja kasvualustoista tutkittiin viruksen tuotanto käyttäen hemagglutiniinin aktiivisuuskoetta. Olosuhteita, joissa saatiin korkein HA-aktiivisuus, käytettiin valmistamaan suuria eriä influenssavirusta. TPCK-trypsiinin ja sikiövasikan seerumin konsentraatiot ylläoleville influenssaviruksille on lueteltu taulukossa 1.

Taulukko 1. TPCK-trypsiinin ja sikiövasikan seerumin optimaalinen konsentraatio

	A/Beijing/ 353/89	A/Beijing/ 32/92	A/Texas/ 36/91	B/Panama /45/90
% sikiövasikan seerumia	0.25%	0.25%	0.25%	5.0%
TPCK-käsitellyn trypsiinin määrä	45 µ/ml	45 µg/ml	45 µ/ml	3 µ/ml

Influenssaviruksen puhdistus: Virus korjattiin 24-48 tuntia infektion jälkeen 10 T175 kudosviljelmäpulloista selkeyttämällä kasvualustat (1000 x g 10 minuuttia) influenssan infektoimista MDCK-soluista. Virus pelletoitiin kasvualustasta kiihtyvyydellä 100.000 x g 1 tunnin ajan. Saatu viruspelletti lietettiin uudelleen 1 ml fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS), pH 7,4, ja sentrifugoitiin käyttäen apuna 20 ml:aa 20-60% (p/t) sakkaroosigradienttia PBS:ssä. Influenssavirusvyöhyke korjattiin 40-45% sakkaroosialueelta gradientista, laimennettiin PBS:llä ja pelletoitiin kiihtyvyydellä 100.000 x g. Puhdistettu viruspelletti lietettiin uudelleen 0,5 ml:aan PBS ja säilytettiin -70°C:ssa.

Esimerkki 2: **Influenssa/Texas/36/91 HA-geenin kloonaus**

Spesifinen esimerkki yhden influenssa-HA-geenin kloonausvaiheesta on esitetty kuvassa 2. Virus-RNA uutettiin edellä esitetyllä tavalla Influessa A/Texas/36/91:stä, joka oli saatu CDC:ltä. Käytettiin universaalista aluketta, joka oli komplementaarinen 3'-päälle influessa-RNA-segmentistä 5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO.1) hiiren Maloney Leukemia-viruksen (M-MuLV) käänteiskopioijaentsyymin kanssa influenssa-cDNA:iden saamiseksi. Puhdistettua virus-RNA:ta tai m-RNA:ta (5 μg) käytettiin templaattina cDNA:n valmistamiseksi käyttäen M-MuLV-käänteiskopioijaentsyymiä, joka oli mukana Pharmacia Inc.:n First-Strand cDNA Synthesis Kit:-ssä. Aluke, jota käytettiin influenssa A-kannoista saadun virus-RNA:n cDNA:lle oli synteettinen oligonukleotidialuke (5'-AGCAAAAGCAGG-3') (SEQ ID NO. 1), joka on homologinen 3'-päiden kanssa kaikista HA-geenivirionin segmenteistä.

HA-geenien monistaminen cDNA:sta tehtiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) käyttäen standardireaktio-olosuhteita (Gene Amp kitit; Cetus/Perkin Elmer, Norwalk, CT). PCR-reaktioseos (100 μl) sisälsi 20 pmol alukkeita, jotka olivat spesifejä 5'- ja 3'-päille influenssa A:n (H3) tai A:n (H1) tai influenssa B:n kantojen HA-geenille määriteltynä yksikäsitteisten sekvenssien avulla, jotka löytyvät GenBank

DNA-data-tiedostoista, kuten taulukossa 2 on esitetty. Monistusta suoritettiin 30 sykliä kunkin syklin muodostuessa 1 minuutin denaturoinnista 94°C:ssa, 2 minuutin uudelleen lämpökäsittelemisestä 55°C:ssa ja 3 laajennuksesta 72°C:ssa. PCR-tuotteet analysoitiin 0,8% agaroosigeeleillä oikean koon suhteen ennen kloonausta.

PCR:ssä käytettiin PCR-alukkeita HA-geenin 5'-päästä: 5'-GGG GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA-3' (SEQ ID NO. 2) ja HA-geenin 3'-päästä: 5'-GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEQ ID NO.3) täysipituisen HA-geenin saamiseksi.

Uusi 5'-PCR-aluke suunniteltiin geenin 5'-päästä: 5'-pää miinus signaalisekvenssi: 5'- GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT-3' (SEQ ID NO. 4) ja geenin 3'-pää: 5'-GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEQ ID. NO. 5). Näitä käytettiin PCR:ssä ja saatiin HA-geeni miinus signaalipeptidisekvenssi. Tämä insertoitiin sitten TA-vektoriin, joka oli lohkaistu KpnI:llä. 61K signaalipeptidi bakuloviruksen ilmentymiselle ja polyhedriinipromoottorille insertoitiin sitten TA-vektoriin, joka sisälsi HA-geenin miinus influenssan signaalipeptidisekvenssin. Saatu bakulovirus-yhdistelmävektori sisältää polyhedriinipromoottorin, 61K bakuloviruksen signaalipeptidin ja HA-geenin influenssa A/Texas/36/91-kannasta.

HA-geenit influenssa B-kannoista kloonattiin kokonaisesta lähetti-RNA:sta (mRNA), joka oli uutettu influenssa B-kannalla B/Panama/45/90 infektoiduista MDCK-soluista. Kokonainen RNA valmistettiin infektoitujen solujen 5 T175 pullosta. Korjatut solut hajotettiin guanidiinitiosyanaatin läsnäollessa ja kokonainen solun RNA puhdistettiin edellä kuvatulla tavalla. Kokonainen mRNA uutettiin solu-RNA:sta käyttäen oligo-(dT)-selluloosasta kehrättyjä kolonneja edellä kuvatulla tavalla.

Influenssa B-kannoista saadulle mRNA:lle käytetty aluke oli satunnainen oligonukleotidi-DNA-aluke (Pharmacia Inc.).

Taulukko 2. PCR-monistukseen käytetyt alukkeet

A/Beijing/32/93	
5'-pään geeni (SEQ ID NO. 27)	5' GGG GGA TCC GGT ACC AGC AAA AGC AGG GGA TAA TTC TAT 3' BamH1 Kpn1
5'-pää miinus HA signaalipeptidi (SEQ ID NO. 28)	5' GGG GGT ACC CCC GGG GAC TTT CCA GGA AAT GAC AAC AG 3' Kpn1 Sma1
3'-pää (SEQ ID NO. 29)	3' TAA TTA ATT TTT GTG GGA ACA AAG ATC CTA CTA AGC CAT GGC CC 5' Kpn1

A/Texas/36/91	
5'-pään geeni (SEQ ID NO. 2)	5' GGG GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA 3' Kpn1 Sma1
5'-pää miinus HA signaalipeptidi (SEQ ID NO. 4)	5' GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT 3' Kpn1 Sma1
3'-pää (SEQ ID NO. 3)	3' GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC 5' Kpn1

Taulukko 2 jatkuu

B/Panama/45/90	
5'-pään geeni (SEQ ID NO. 30)	5'GGG GAA TTC GGT ACC CCC GGG AAG GCA ATA ATT GTA CTA CTC ATG GT 3' EcoR1 Kpn1 Sma1
5'-pää miinus HA signaalipeptidi (SEQ ID NO. 31)	5' GGT ACC CCC GGG GAT CGA ATC TGC ACT GGG ATA ACA 3' Kpn1 Sma1
3'-pää (SEQ ID NO. 32)	3' TG TTA CAA AGA ACA/G AGG TAG ACA GAC ACT CCA TGG CCT AGG CTT AAG GGG 5' Kpn1 BamH1 EcoRI

cDNA:n synteesituotteiden esimerkeissä käytettiin templaattina influenssavirus A/Texas/36/91:n virus-RNA:ta. Influenssaproteiineja koodaavien cDNA-segmenttien sijainti voitiin määrittää seuraavasti. Puhdistettu virus-RNA yhdistettiin reaktioseoksessa universaalin yksisäikeisen DNA-alukkeen 5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO. 1) kanssa. Tämä aluke on komplementaarinen influenssavirionin segmenttien 3'-pään kanssa kuten edellä kuvattiin. Reaktiossa lisättiin myös [α-^{32}P]dCTP:tä cDNA-tuotteiden tekemiseksi näkyviksi, jotka sitten erotettiin 1,5% emäksisellä hydrolyysigeelillä (Maniatis et al., 1982) ja valotettiin X-OMAT-AR-filmille.

Esimerkki 3: **HA-geenien kloonaus bakteeriplasmideihin**

PCR-monistetut rHA-geenit kloonattiin pUC:n kaltaiseen plasmidivektoriin käyttäen TA Cloning Systemiä (Invitrogen, Inc.). HA-geenien läsnäolo vahvistettiin standardimenetelmillä puhdistetun plasmidi-DNA:n restriktioentsyymileikkausanalyysillä (Maniatis et al., 1982). rHA-geenien 5'-pää analysoitiin sitten DNA-sekvensoinnilla ja uudet alukkeet suunniteltiin N-pään HA-proteiineissa hydrofobisia signaalipeptideitä koodaavien sekvenssien poistamiseksi. Taulukossa 2 lueteltuja spesifejä 5'- ja 3'-oligonukleotidialukkeita käytettiin sitten monistamaan cDNA-tuotteita PCR:llä ja kloonattiin E.colin TA-plasmidivektoreihin (Invitrogen, Inc.) käyttäen standardikloonausmenetelmiä. Saadut DNA-kloonit sisälsivät koodaavat sekvenssit valmiille HA:ille.

rHA-geenit kannoista A/Texas/36/91, A/Beijing/353/89, A/Beijing/32/92 ja B/Panama/45/90 subkloonattiin standaradimenetelmillä (Maniatis et al., 1982) bakuloviruksen ilmentymisvektoreihin. HA-geenit poistettiin TA-kloonausplasmideista sopivilla restriktioentsyymeillä ja puhdistettu HA DNA-fragmentti insertoitiin bakuloviruksen yhdistelmäplasmidiin. Saadut bakteerikloonit seulottiin ampisilliiniresistenssin suhteen ja leikattiin sitten restriktioentsyymeillä insertoidun HA:n irrottamiseksi sen läsnäolon varmistamiseksi. Ha-geenejä sisältävät yhdistelmäplasmidit

puhdistettiin cesiumkloridi-etidiumbromidi-gradienteilla (Maniatis et al., 1982). Plasmidien 5'-pää sekvensoitiin, jotta saatiin määritettyä oikeiden bakulovirussignaalien (AcNPV polyhedriinipromoottori, ATG-translaation lähtösignaali- ja bakuloviruksen signaalipeptidisekvenssi) ja sopivan HA:ta koodaavan sekvenssin läsnäolo oikeassa lukukehyksessä. HA-geenien 5'-päässä olevat DNA-sekvenssit ja reunustava AcNPV polyhedriinipromoottori ja bakuloviruksen signaalipeptidi (ensimmäiset 18 aminohappoa kustakin aminohapposekvenssistä) on esitetty SEQUENCE LISTINGS-kohdassa.

SEQ ID NO. 6 koodaa Ha-geenin 5'-päätä kannalle A/Beijing/32/92 (sekvenssialue 1-481). SEQ ID NO. 7 on vastaava aminohapposekvenssi (alkaen aloituskodonista "ATG" [nukleotidi 21] SEQ ID NO.:ssa 6). 61 K:n signaalipeptidin aminohapposekvenssi SEQ ID NO.:ssa 9 aminohappoina 1-18.

SEQ ID NO. 8 koodaa kannan A/Texas/36/91 5'-pään sekvenssiä (sekvenssialue 1-481). SEQ ID NO. 9 on vastaava aminohapposekvenssi (alkaen aloituskodonista "ATG" [nukleotidi 21] SEQ ID NO.:ssa 8). 61 K:n signaalipeptidin aminohapposekvenssi SEQ ID NO.:ssa 9 aminohappoina 1-18.

SEQ ID NO. 10 koodaa kannan B/Panama/45/90 5'-pään sekvenssiä (sekvenssialue 1-434). SEQ ID NO. 11 on vastaava aminohapposekvenssi (alkaen aloituskodonista "ATG" [nukleotidi 21] SEQ ID NO.:ssa 10). 61 K:n signaalipeptidin aminohapposekvenssi SEQ ID NO.:ssa 11 aminohappoina 1-18.

SEQ ID NO.:issa 6, 8 ja 10 nukleotidit 1-20 ovat polyhedriinipromoottorin 3'-pää, nukleotidit 21-74 koodaavat 61 K:n signaalipeptidiä ja nukleotidit 75:stä loppuun koodaavat HA-geenin 5'-päätä.

Esimerkki 4: **Yhdistelmä-HA:n ilmentyminen hyönteissoluissa**

HA-geenejä sisältävät kimeeriset yhdistelmäplasmidit puhdistettiin ja 2 μg sekoitettiin 1 μg:n kanssa AcNPV:n luon-

nossa esiintyvän tyypin mukaista DNA:ta. DNA:t kerasaostettiin kalsiumin kanssa ja tartutettiin S. frugiperda-soluihin käyttäen standardimenetelmää (Smith, Summers and Fraser, Mol. and Cell. Biol. 3:2156-2165 (1983)). Yhdistelmäbakuloviruksset identifioitiin plakkimorfologian perusteella, puhdistettiin sitten edelleen plakkipuhdistuslisäkierroksilla. Plakkipuhdistetut yhdistelmäbakuloviruksset seulotaan rHA:n ilmentymisen suhteen ja yksittäinen bakuloviruksen ilmentymisvektori valikoitiin lisäkehittämistä varten.

S. frugiperda-solut infektoitiin bakulovirusvektorilla, joka sisälsi HA-geenin influenssakannasta B/Panama/45/90. 24, 48 ja 72 tuntia infektion jälkeen 1 x 10^6 solua käsiteltiin 25 μCi:llä [^{35}S]-metioniinia 15 minuutin ajan syntetisoitavien proteiinien leimaamiseksi. Solut kerättiin ja proteiinit erotettiin 11% polyakryyliamidigeelillä siten, että läsnä oli 0,1% SDS. Radioleimatut proteiinit havaittiin valottamalla X-OMAT-AR-filmille. Proteiinistandardien sijoittuminen ja niiden koko kilodaltoneissa (kd) osoittivat, että 85 kd:n yhdistelmä-HA-proteiini on eräs pääproteiineista, jotka syntetisoituivat soluissa 48 ja 72 tuntia infektion jälkeen.

Esimerkki 5: **Yhdistelmä-HA:n tuotanto ja puhdistus**

S. frugiperda-solujen infektoimiseksi käytettiin bakuloviruksen ilmentymisvektoria A8611, joka sisältää geenin influenssa A/Beijing/353/89:lle, tuotettiin olennaisesti siten kuin kuvattiin kannan A/Beijing/32/92 hemagglutiniinille polyhedriinipromoottorin ohjauksessa. Soluja kasvatettiin 27°C:ssa tiheyteen 1 x 10^6 solua/ml TNMFH-kasvualustassa (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) täydennettynä 10% sikiövasikan seerumia, ja infektoitiin kertojen lukumäärän (MOI=multiplicity of infection) ollessa 1 A6811 yhdistelmäbakuloviruksella. Infektoitaessa influenssa A/Beijing/353/89:llä hemagglutiniini syntyy bakuloviruksen polyhedriinipromoottorin säätelyn alaisena. Solut kerätään 72 tuntia infektion jälkeen sentrifugoimalla 15 minuuttia

kiihtyvyydellä 3400 x g, ja pestään liettämällä uudelleen seerumivapaaseen TNMFH-kasvualustaan ja sentrifugoimalla sen jälkeen 30 minuuttia kiihtyvyydellä 10.400 x g. Supernatantti dekantoidaan ja infektoidut solupelletit säilytetään -70°C:ssa.

Kehitettiin prosessi, jossa yhdistelmä-HA uutetaan selektiivisesti infektoiduista soluista olosuhteissa, jotka eivät denaturoi antigeenia. Ellei muuta mainita, kaikki uuttovaiheet suoritetaan 4°C:ssa. Solupellettiä 0,5 l:sta viljelmää (suunnilleen 5 x 10^8 solua) hajotettiin 2 minuuttia 40 ml:ssa jääkylmää seosta, jossa oli 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 1% (t/t) Tween-20, 1 mg/ml leupeptiiniä, käyttäen Polytron™-homogenisoijaa (Brinkmann Instruments Inc. Westbury, NY). Homogenaattia sentrifugoitiin 30 minuuttia kiihtyvyydellä 9200 x g. Supernatantti heitettiin pois, ja pelletti otettiin talteen. Tämä vaihe poistaa liukoiset ja ääreismembraaniproteiinit hyönteissoluista ilman, että integraaliset membraaniproteiinit, kuten rHA liukenevat. rHA:n uuttamiseksi pellettiä homogenisoidaan 2 min säädöllä 4 40 ml:ssa jääkylmää seosta, jossa on 30 mM Tris, 10 mM etanoliamiinia, pH 11, 25 mM LiCl, 2% Tween-20. Kun on inkuboitu 60 minuuttia jäissä, homogenaatin pH säädettiin arvoon 8,4 1 N HCl:llä, ja liukoinen aine poistettiin sentrifugoimalla 30 minuuttia kiihtyvyydellä 9200 x g. Liukoista rHA:ta sisältävä supernatantti dekantoitiin, ja pH tarkistettiin ja tarpeen vaatiessa säädettiin arvoon 8,4 huoneenlämmössä. Liukenematon aine lietettiin uudelleen 40 ml:aan vettä analysoimista varten. HA:n integraalimembraaniproteiini liukenee korkeassa pH-arvossa, Tween 20-detergenttiolosuhteissa ja jää liuokseen, kun pH:ta pudotetaan.

Proteiinit analysoitiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Näytteet rikottiin kiehuvassa vesihauteessa 10 minuutin ajan siten, että läsnä oli 2% natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja 5% beeta-merkaptoetanolia, elektroforesoi-

tiin sitten 11% polyakryyliamidigeelillä siten, että läsnä oli 0,1% SDS, ja värjättiin Coomassien sinisellä.

Kehitettiin kromatografiapuhdistusmenetelmä yhdistelmä-HA:n puhdistamiseksi, jolla saadaan erittäin puhdas yhdistelmä-HA-antigeeni, joka ei denaturoidu ja on sopiva komponentiksi ihmisille tarkoitettuun influenssarokotteeseen. Seuraavaa menetelmää käytettiin puhdistamaan A/Beijing/353/89:n HA:ta, joka oli peräisin yhdistelmäviruksella A8611 infektoiduista S. frugiperda-soluista.

Kromatografiageelimatriisit, joita käytettiin puhdistamaan HA 0,5 l:sta infektoituja S. frugiperda-soluja, olivat 30 ml Pharmacia DEAE Sepharose Fast Flow (Pharmacia C16/20-kolonnissa) ja 4 ml Pharmacia Lentil Lectin Sepharose 4B (Pharmacian C10/10-kolonnissa). DEAE-kolonnin ulostulo on yhdistetty lentil lectin -kolonnin sisäänmenoon ja S/N 2 solu-uute, joka edellä valmistettiin, vietiin yhdistettyihin kolonneihin nopeudella 1 ml/minuutti. Kolonnit pestiin seoksella, jossa oli 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,5% Tween-20, kunnes lentil lectin -effluentin UV-absorptio 280 nm:ssä palautuu perusarvoon. Näissä olosuhteissa suurin osa kontaminoivista proteiineista sitoutuu DEAE:hen, mutta yhdistelmä-HA virtaa kolonnin läpi. Jäljelle jäävät kontaminantit kulkevat lectin-kolonnin läpi ja glykosyloitu rHA sitoutuu lentil lectin affiniteettimatriisiin. DEAE-kolonni irrotetaan ja lektiinikolonni pestään uudelleen 40 ml:lla seosta, jossa on 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,5% Tween-20. Sitten lektiinikolonni pestään 40 ml:lla seosta, jossa on 30 mM Tris-HCl, pH, 8,4, 25 mM LiCl, 0,4% (t/t) natriumdeoksikolaattia (DOC). Tämä vaihe korvaa Tween-20-detergentin detergentillä, kuten DOC:lla, joka voidaan poistaa proteiinista dialyysin avulla. Yhdistelmä-HA eluoidaan sitten lektiinikolonnista suunnilleen 20 ml:lla seosta, jossa on 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,4% (t/t) natriumdeoksikolaattia, ja joka sisältää 0,3 M a-D-metyylimannosidia. Tulokset analysoidaan 11% PAGE:lla.

Influenssa-HA-proteiinien geneettisen muuntumisen vuoksi ylläolevan puhdistusprosessin yksityiskohdat voivat vaihdella kunkin yksittäisen yhdistelmä-HA-proteiinin kohdalla. Esimerkiksi rHA voi sitoutua DEAE-ioninvaihtokolonniin sen sijaan että virtaisi siitä läpi. Jos tällaista tapahtuisi, rHA voitaisiin poistaa DEAE-kolonnista pesemällä kolonni puskurilla, joka sisältää suuremman pitoisuuden LiCl, NaCl tai muita suoloja.

DOC-detergentin ja muiden puskurikomponenttien poistamiseksi lektiinikolonnista saatu eluaatti, joka sisältää puhdistettua rHA:ta, dialysoitiin fosfaattipuskurisuolaliuosta vastaan, pH 7,5 (PBS). Puhdistettu yhdistelmä-HA oli ainakin 95% puhdasta määritettynä analyysillä SDS-polyakryyliamidigeeleillä.

Esimerkki 6: **rHA-proteaasiresistenssin analyysi**

Valmis HA kerääntyy trimeerisiksi rakenteiksi, jotka ovat resistenttejä erilaisille proteaaseille, kuten trypsiini, joka hajottaa HA-monomeerejä (Murphy ja Webster, 1990). Trypsiiniresistenssikäsittelyä voidaan sen vuoksi käyttää kokeena funktionaalisen trimeerin muodostumiselle. Seuraavaa menetelmää käytettiin tutkimaan rHA:n resistenssiä proteaasikäsittelylle.

Kahta erää puhdistettua rHA:ta (A/Beijing/353/89) 60 µg/ml:ssa inkuboitiin jäissä 30 minuuttia seoksessa, jossa oli 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 150 mM NaCl, siten että mukana oli 50 µg/ml TPCK-käsiteltyä trypsiiniä ja ilman sitä. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 57,4 mM fenyylimetyylisulfonyylifluoridia isopropanolissa lopulliseen konsentraatioon 1 mM. Kunkin näytteen erät denaturoitiin keittämällä 3% SDS:ssä pelkistävissä olosuhteissa, elektroforesoitiin 11,5% polyakryyliamidigeeleissä, ja siirrettiin nitroselluloosasuodattimelle käyttäen standardin mukaisia Western blotting-menetelmiä. HA-polypeptidit havaittiin käyttäen marsun anti-HA-seerumia valmistettuna puhdistettua rHA:ta

vastaan, ja vuohen marsunvastaista IgG emäksistä fosfataasikonjugaattia.

Käsittelemätön rHA kulkeutuu HA:n edeltäjän (HA0) koossa. Proteaasikäsittely johtaa kahteen päävyöhykkeeseen, jotka kulkeutuvat koossa, joka on ennustettu influenssahemagglutiniinille HA1 ja HA2. Tulokset osoittavat, että trypsiini lohkaisee rHA-proteiinin kerran ja tuottaa kaksi polypeptidiä, jotka ovat HA1:lle ja HA2:lle ennustettua kokoa. Mitään muuta proteolyyttistä prosessoitumista ei tapahdu. Nämä tulokset osoittavat, että ylläolevalla menetelmällä puhdistettu rHA on resistentti proteaasilla hajottamiselle. Tämä ominaisuus on yhdenmukainen puhdistetun rHA:n kanssa, joka on trimeerien muodossa.

Esimerkki 7: **rHA:n immunogeenisuus käyttäen standardoitua hiiripotenssikoetta**

Eräs lähestymistapa mitata antigeenin immunogeenisuutta on määrittää määrä, joka tarvitaan indusoimaan havaittava vasta-ainereaktio hiirissä (hiiripotenssikoe). Standardoitua hiiripotenssikoetta käytetään mittaamaan rHA0-rokotteen immunogeenisuutta. 5-10 hiiren ryhmät immunisoidaan kerran rokotteella, joka sisältää sarjalaimennuksen rHA:ta, s.o. 0,500 µg, 0,1 µg, 0,02 µg, ja 0,400 µg puhdistettua rHA:ta. Seerumit kerätään 28 päivää immunisaation jälkeen ja rHA-antigeenin vastaiset vasta-aineet mitataan standardikäyttöisellä entsyymi-sidotulla immunologisella kiinteäfaasikokeella (ELISA) 96-koloisilla mikrotiitterilevyillä. Hiiri on serokonvergoitunut, jos OD450 1:100 laimennuksella 28. päivän antiseerumeista on suurempi kuin kolme standardipoikkeamaa yli hiiren preimmuuniseerumien OD450:n keskiarvon. Rokotteen vaikuttavan annostus, joka tarvitaan serokonvergoimaan 50% hiiristä (ED50) on antigeenin immunogeenisuuden mitta.

Esimerkiksi 4 ryhmää, joissa on 10 hiirtä, immunisoidaan kerran joko 0,1 µg:lla, 0,02 µg:lla, 0,004 µg:lla tai

0,0008 µg:lla (5-kertainen laimennus) rHA0-rokotetta. Seerumit kerätään 28 päivää immunisaation jälkeen ja mitataan jokaista rHA0-antigeenia vastaan rokotteessa serokonversion suhteen ELISA-kokeella. Annostu, joka tarvitaan serokonvergoimaan 50% hiiristä (ED_{50}) lasketaan ja minimi-ED_{50} selvitetään kullekin rHA0-antigeenille.

Etukäteistiedot osoittavat, että yksi 0,004 µg:n annos rHA0:aa serokonvergoi ainakin 50% hiiristä.

Esimerkki 8: **rHA:n antaminen yhdessä apuaineen kanssa ja vertailu saatavissa olevien influenssarokotteiden kanssa**

Hiiripotenssi puhdistetusta rHA:sta influenssa A/Beijing/353/89:stä tutkittiin alunan kanssa ja ilman alunaa (puhdas) ja verrattiin kaupalliseen influenssarokotteeseen, FLUZONEEN® (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA), joka sisältää influenssan A/Beijing/353/89-kantaa. Rokotetta annettiin annostuksena 0,5 µg, 0,1 µg, 0,02 µg ja 0,04 µg. Hiirille annettiin tehoste 28. päivänä edelläkuvatuilla annoksilla puhdistettua rHA:ta. Päivän 42 seerumit kerättiin ja titrattiin ELISA-kokeessa IgG-anti-HA-vasta-aineiden suhteen.

Tulokset on esitetty kuvassa 3. Ilman apuainetta vain annos 0,5 µg indusoi merkittävän vasta-ainetiitterituotannon (200.000). Apuaineen läsnäollessa niinkin pieni annos kuin 0,004 µg rHA0:aa tuotti merkittävän vasta-aineen. rHA:lla (puhtaalla) immunisoidut eläimet tuottivat suunnilleen samoja määriä anti-HA-vasta-aineita kuin kaupallinen rokote. Aluna nosti rHA:n immunogeenisuutta, ja syntyneet anti-HA-tiitterit olivat 10-kertaiset tai suuremmat kuin ilman apuainetta.

Kaiken kaikkian, vertailu puhdistettujen rHA0:ien immunogeenisuudesta kokonaisia virioneita sisältävän influenssarokotteen kanssa (FLUZONE®, Connaught Laboratories, Inc., Swiftwater, PA) osoittaa, että rHA0 saa aikaan saman-

laisen immuunivasteen hiirissä 42 päivän aikana. rHA0:n absorboituminen alunaan nostaa merkittävästi puhdistetun rHA0:n immunogeenisuutta hiirissä mitattuna esimerkissä 7 kuvatulla kokeella. Yhdistelmä alunan kanssa saa aikaan IgG-hemagglutiniinivasTa-aineita, jotka ovat suurempia kuin Fluzone®-influenssarokotteilla.

Esimerkki 9: **Hemagglutinaation inhiboitumistutkimukset**

Hemagglutinaatiota inhiboivat (HAI) vasta-aineet sitoutuvat kolmeen neljästä epitoopista hemagglutiniinissa ja salpaavat influenssan kyvyn agglutinoida punaisia verisoluja (Wilson et al, "Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution". Nature, 289:366-378 (1981)). Nämä antigeenideterminantit kertyvät siaalihapporesptorin sitoutumiskohdan ympärille hemagglutiniinitrimeereissä. Vasta-aineet näitä kohtia vastaan neutraloivat viruksen infektoivuuden (Weis et al., "Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid", Nature 333:426-431 (1988)). HAI-vasta-aineiden tiitteri ja spesifisyys ovat tärkeä mitta potentiaalille influenssarokotteeksi suojaamaan infektiota vastaan influenssan samoilla ja sukulaiskannoilla.

Suoritettiin tutkimuksia hiirissä vertaamalla puhdistetun rHA0:n kannasta A/Beijing/353/89 ja FLUZONE®:sta (Connaught Laboratories, Inc., Swiftwater, PA) HAI-vasta-aineiden tuottamiseksi. 5 hiiren ryhmiin injektoitiin päivinä 0 ja 28 0,5 µg, 0,1 µg, 0,02 µg tai 0,004 µg rHA0:ta tai kolme kertaa nämä määrät FLUZONE®-hemagglutiniinia. Esimerkiksi hiiret suurimman annoksen ryhmästä immunisoitiin 1,5 µg:lla FLUZONE®-hemagglutiniinia (0,5 µg hemagglutiniinia kustakin kannasta) ja 0,5 µg:lla rHA0. Lisähemagglutiniiniantigeenin läsnäolo FLUZONE®:ssa kahdesta muusta influenssakannasta voi johtaa joihinkin ristireagoiviin vasta-aineisiin.

Anti-hemagglutiniinivasta-aineet (hemagglutiniini-IgG) mitattiin standardilaimennus-ELISA-kokeessa puhdistettua

rHA0:aa vastaan. HAI-vasta-aineet mitattiin 4 hemagglutiniiniyksikköä vastaan seuraavista antigeeneistä: kokonainen influenssavirus A/Beijing/353/89 (A/Bei), puhdistettu HA0 A/Beijing/353/89 antigeeni, ja FLUZONE®. HAI-tiitteri on käänteisarvo suurimmalle antiseerumilaimennukselle, joka inhiboi kanan punaisten verisolujen agglutinoitumista 50%:lla.

Taulukossa 3 on yhteenveto seerumin hemagglutiniinin IgG:stä ja HAI-tiittereistä hiirissä päivänä 42. Anti-hemagglutiniinin suuria määriä syntyi yhdistelmä-rHA0-rokotteella. Nämä olivat noin kymmenen kertaa suurempia kuin FLUZONE®:lla. Merkittävintä on se, että rHA0-rokote tuotti hyvät tiitterit niistä vasta-aineista, jotka estävät punaisten verisolujen agglutinoitumisen A/Beijing/ 353/89-viruksen ja rHA0-antigeenien vaikutuksesta. Näin ollen rHA0-rokote tuotti HAI-vasta-aineita, jotka tunnistivat yhtä hyvin immunogeenin ja influenssa A/Beijing-viruksen. Alhaisemmat HAI-tiitterit FLUZONE®:a vastaan voivat johtua antiseerumeiden kyvyttömyydestä estää agglutinoitumista kahden muun hemagglutiniinikannan vaikutuksesta FLUZONE®-rokotteessa. Sitävastoin FLUZONE®-immunisoidut hiiret tuottavat suuria määriä HAI-vasta-aineita mitattuna vain itseään vastaan. HAI-tiitterit influenssa A/Beijing/353/89-virusta vastaan ja rHA0-antigeenia vastaan pienenivät merkittävästi. Samanlaisia malleja havaittiin hiirissä matalamman annoksen ryhmissä.

Taulukko 3. HAI-tiitterit rHAO:ta ja FLUZONE^{R}:a vastaan

	rHA0 A/Bei (pvä 42)				FLUZONE® pvä 42)			
	HA IgG	HAI			HA IgG	HAI		
hiiri #	rHA0	A/Bei	rHA0	FLUZONE	rHA0	A/Bei	rHA0	FLUZONE
1	4,096,000	1,920	960	15	256,000	<10	<10	600
2	4,096,000	480	480	15	512,000	120	120	600
3	8,192,000	1,920	960	15	256,000	60	60	300
4	4,096,000	960	960	30	128,000	30	30	400
5	4,096,000	1,920	960	60	512,000	80	80	400
K.A.	**4,915,000**	**1,440**	**864**	**27**	**332,800**	**58**	**58**	**460**

Nämä tiedot antavat myös aiheen olettaa, että geneettisiä eroja on olemassa FLUZONE®:ssa olevan influenssa A/Beijing/353/89-kannan ja FDA:lta saadun ja kerran ennen HAI-kokeeseen käyttämistä kananmunissa käytetyn tämän saman kannan välillä. Se seikka, että vasta-aineet, jotka tuotettiin vasteena yhdistelmä-HA0:lle, joka on kloonattu influenssa A/Beijing/353/89:sta, estävät tämän influenssakannan aikaansaamaa punaisten verisolujen agglutinoitumista sekä sitä itseään, on hyvä todiste siitä, ettei mitään geneettisiä muutoksia tapahtunut kloonausprosessin aikana, joka aiheutti siaalihapporeseptorin sitoutumiskohdan puhdistettuun rHA0-antigeeniin.

Esimerkki 10: **1993/1994-influenssarokotteen formulointi ja kliininen tehokkuus**

Sarja kliinisiä kokeita suoritettiin ihmisillä yhdistelmä-HA:ta sisältävän kokeellisen influenssarokotteen turvallisuuden ja immunogeenisuuden karakterisoimiseksi ja esitietojen saamiseksi tällaisen rokotteen suojavaikutuksesta luonnollista infektiota vastaan epidemiakauden aikana. Tulokset osoittavat, että rokotteet, jotka sisältävät yhdistelmäinfluenssahemagglutiniinia (rHA0) ja jotka on valmistettu tässä kuvattujen menetelmien mukaan, aiheuttivat yllättäen vähemmän paikallisia haittareaktioita ja antoivat samanarvoisen tai paljon paremman suojaimmuunireaktion verrattuna kaupallisesti saatavaan, hyväksyttyyn laimennettuun flunssarokotteeseen, joka tuotettiin munissa.

AINEET JA MENETELMÄT

Rokotteet. Tässä tutkimuksessa käytetyt yhdistelmä-HA-rokotteet sisälsivät täyspitkää lohkaisematonta HA- (HA0) glykoproteiinia influenssaviruksesta A/Beijing/32/92 (H3N2). Yhdistelmä-HA0 (rHA0) tuotettiin Lepidopteran- (hyönteinen) solujen viljelmissä ja altistettiin sen jälkeen bakulovirusvektorille, joka sisälsi cDNA-inserttejä, jotka koodaavat HA-geeniä. Ilmentynyt proteiini puhdistet-

tiin ei-denaturoivissa olosuhteissa >95% puhtauteen mitattuna kvantitatiivisesti skannaamalla densitometrillä antigeenimassassa, joka oli elektroforesoitu natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeeleissä. Peptidin identtisyys vahvistettiin aminohappoanalyysillä, N-pään sekvensoinnilla ja Western blot-analyysillä anti-influenssa A/Beijing/32/92-seerumien kanssa. rHA0-rokotteet sisälsivät määrätyn määrän synteettistä HA-antigeenia joko liuotettuna fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen tai adsorboituna alumiinifosfaatti- (aluna) apuaineeseen geelisuspension muotoon. Hyväksytty trivalentti subvirion-rokote, jota tässä tutkimuksessa käytettiin, sisälsi 15 μg/annos kutakin HA:ta influenssaviruksista A/Texas/36/91 (N1N1), A/Beijing/32/92 (H3N2) ja B/Panama/45/90 (FLUZONE® laimennettu flunssarokote, joka on tuotettu munissa, Connaught Laboratories, Swiftwater, PA).

Kliiniset tutkimukset. Institutional Rewiev Boards of Saint Louis University ja University of Rochester hyväksyivät identtiset tutkimusprotokollat. Molemmissa laitoksissa kirjattiin 18-45-vuotiaita terveitä aikuisia. Kohteet määrättiin satunnaisesti ottamaan yhtä viidestä seuraavasta rokotevalmisteesta kaksoissokkokokeessa: (1) 15 μg rHA0, (2) μg rHA0 plus aluna, (3) 90 μg rHA0, (4) lisensoitu trivalentti inaktivoitu influenssarokote tai (5) suolaliuosplasebo. Rokotteet annettiin lihaksensisäisenä injektiona tilavuutena 0,5 ml. Kolmen rHA0:a sisältävän rokotevalmisteen alkuperäisen turvallisuusarvion huomioonottamiseksi 25 ensimmäistä rokotuskohdetta valittiin satunnaisesti (s.o. 5 henkilöä/koehaara) muista kohteista riippumatta ja seurattiin tarkasti puhelinkontaktin avulla 48 tuntia rokotuksen jälkeen ennen kuin loput rokotukset suoritettiin. Kaikki kohteet saivat ohjeet täyttää päivittäisen raporttikortin haittareaktioista, sekä paikallisista että yleisoireista 6 ensimmäisen päivän aikana rokotuksen jälkeen. Oireet arvioitiin itse lieväksi, kohtuulliseksi tai vaikeaksi luonteeltaan. Osanottajat mittasivat ja rekisteröivät oraaliset lämpötilat, jos he tunsivat olonsa kuumeiseksi. Jos injek-

tiokohdassa ilmeni paikallista turvotusta tai punoitusta, se pisteytettiin sen mukaan, oliko alue pienempi vai suurempi kuin neljännesdollari, vastaavasti. Kaikki rokotukset suoritettiin marraskuun viimeisen viikon ja joulukuun ensimmäisen viikon aikana 1993. Seeruminäytteet saatiin kultakin kohteelta rokotuksen yhteydessä, 3 viikkoa rokotuksen jälkeen, ja vielä kerran maaliskuussa tai huhtikuussa 1994 ainakin 2-3 viikkoa sen jälkeen, kun influenssaviruksia ei enää kiertänyt paikallisissa yhteisöissä. Vapaaehtoiset kussakin laitoksessa saivat ohjeet ottaa yhteyttä tutkimuskeskukseen, jos he kokivat influenssankaltisen sairauden talven influenssaepidemiakauden aikana. Influenssankaltainen sairaus määriteltiin sellaiseksi, että ilmeni hengitystieoire (-oireita), jotka kestivät kaksi päivää tai enemmän, liittyneenä kuumeeseen ja/tai lihaksien yleisoireisiin tai paleluun. Kohteilla, jotka raportoivat influenssankaltaisia oireita, oli nenän ja nielun vanutupot, jotka saatiin virusviljelmää ja identifiointia varten. Kliiniset näytteet saivat koodatut identifiointinumerot ja ne käsiteltiin sokkomallin mukaan.

Serologia. Kunkin tyyppiselle serologiselle kokeelle kaikki näytteet molemmista laitoksista tutkittiin yhtenä eränä yhdessä laboratoriossa. Hemagglutinaatiota inhiboivat (HAI) vasta-aineet influenssan A/Beijing/32/93 (H3N2) virusantigeenille mitattiin seerumeista standardimikrotiitterikokeella, jonka jälkeen poistettiin epäspesifinen inhibiittori yhdessä reseptoria tuohoavan entsyymin kanssa ja kylmistä agglutiniineista hemadsorptiolla 4°C:ssa. Tiitteri määritettiin suurimpana seerumilaimennuksena, joka täysin ehkäisi hemagglutinaation, joka tapahtui viruksen 4 antigeeniyksikön vaikutuksesta, käyttäen 1:4 alkulaimennuksena. Seerumin HA-spesifiset immunoglobuliini G (IgG) vasta-aineet mitattiin entsyymisidonnaisella immunosorbenttikokeella (ELISA) käyttäen puhdistettua rHA0:a influenssasta A/Beijing/32/92 (H3N2) pinta-antigeenina. Reagenssien sekvenssi kiinteästä faasista ulospäin koostui (1) puhdistetusta rHA0-antigeenista, (2) seeruminäytteistä, (3) emäksi-

seen fosfataasiin konjugoidusta vuohen antihumaanista IgG:stä ja (4) p-nitrofenyylifosfaattidinatriumsubstraatista. ELISA-tiitteri ilmaistiin suurimpana laimennuksena, jossa antigeenia sisältävän kolon optinen tiheys oli ainakin kaksi kertaa vastaavan, antigeenittoman vertailukolon optinen tiheys. Neutraloivat vasta-aineet mitattiin käyttäen mikroneutralointikoetta, jonka ovat aikaisemmin kuvanneet Treanor, J.J., ja Betts, R.F., J. Infect. Dis. 168:455-459 (1993). Lyhyesti kerrottuna sarjalaimennokset lämpöinaktivoituja seerumeita sekoitettiin noin 100 $TCID_{50}$:n kanssa influenssavirusta A/Beijing/32/92 (H3N2) ja inkuboitiin 1 tunti 37°C:ssa. Virus-seerumiseos adsorboitiin sitten Madin-Darby koiran munuais- (MDCK) solujen yhdistyvien yksisolukerroksiin 96-koloisilla levyillä 1 h huoneenlämmössä. Levyt pestiin jäljellä olevan siirrosteen poistamiseksi, lisättiin seerumivapaata Dulbeccon MEM-liuosta, jossa oli 2 µg/ml trypsiiniä, ja inkuboitiin 5% CO_2:ssa 33°C:ssa 72 tuntia. Solut kiinnitettiin sitten metanolilla ja virusreplikaatio määritettiin käyttäen paneelia hiiren monoklonaalisista vasta-aineista, jotka olivat spesifejä matriisille ja influenssa A-viruksen nukleoproteiineille (Centers for Disease Control, Atlanta, GA), ja sen jälkeen emäksiseen fosfataasiin konjugoidulla anti-hiiri-IgG:llä. Seerumien loppupistetiitteri määritettiin korkeimpana laimennoksena, joka johtaa suurempaan kuin 50% vähennykseen signaalissa verrattuna neutraloimattomiin kontrollikoloihin.

Virologia. Virusviljelmät nenänielutupponäytteistä suoritettiin kummassakin laitoksessa standardimenetelmillä. Näytteet siirrostettiin joko MDCK- tai reesusapinan munuaissoluihin ja inkuboitiin 33°C:ssa 14 päivää. Yksisolukerrosten hemadsorptio tutkittiin 0,4% marsun erytrosyyteillä. Influenssavirukset identifioitiin hemadsorptiopositiivisissa viljelmissä HAI:llä käyttäen H3-spesifejä antiseerumeita (Centers for Disease Control).

Tilastollinen analyysi. Käänteinen HAI, ELISA IgG ja neutraloivat vasta-ainetiitterit muunnettiin logaritmisesti tilastollista analyysiä varten. Merkittävä reaktio rokotteelle määritettiin nelinkertaisena tai suurempana nousuna vasta-ainetiitterissä rokotusta ennen ja 3 viikkoa rokotuksen jälkeen otettujen seeruminäytteiden välillä. Laboratoriossa saatu todiste influenssa A- (H3N2) virusinfektiosta oli se, kun virus oli eristetty nenänielueritteistä ja/tai seerumin HAI-vasta-ainetiitterissä oli nelinkertainen tai suurempi kasvu 3 viikkoa rokotuksen jälkeen (ennen kautta) joulukuussa otetun näytteen ja vastaavan kauden jälkeen seuraavana keväänä otetun näytteen välillä. Erot rokoteryhmiven välillä analysoitiin käyttäen Fisherin tarkkaa testiä kohteiden saamien haitallisten reaktioiden määrien, merkittävien vasta-ainereaktioiden tai laboratoriossa varmistetun influenssasairauden tai infektion vertaamiseksi, ja varianssianalyysiä (ANOVA) rokotuksen jälkeisen keskikäänteis-$\log_2$-vasta-ainetiittereiden analysoimiseksi. Modifioitua Bonferronin erisuuruisuus- ja Tukey-Kramerin testejä käytettiin, kun oli tarkoitus laskea mahdollisia hajontavertailuja.

TULOKSET

Reaktogeenisuus. Tässä tutkimuksessa käytetyt rHA0-rokotteet olivat turvallisia ja hyvin siedettyjä. Haitallisten reaktioiden ilmentymistiheyteen ei vaikuttanut rHA0-antigeenin annoksen vaihtuminen 15 µg:sta 90 µg:aan, mutta se saattoi hiukan kasvaa alunan lisäyksen vaikutuksesta. Paikallista punoitusta, kipua ja hellyyttä injektiokohdassa raportoitiin kutakin merkittävästi useammin lisensoitua subvirion-rokotetta saaneilla kuin niillä, jotka saivat joko 15 µg tai 90 µg rHA0:a suolaliuoksessa. Yhden henkilön muodostamaa poikkeusta lukuunottamatta, joka koki kohtuullisen vaikeata kipua, hellyyttä ja jäykkyyttä käsivarressaan immunisaation jälkeen lisensoidulla rokotteella, kaikki oireet arvioitiin lieviksi luonteeltaan ja kestivät yleensä 1-2 päivää. Paikallinen punoitus ja/tai kovuus, jos

niitä ilmeni, oli poikkeuksetta pienemmällä kuin neljännesdollarin kokoisella alueella.

Immunogeenisuus. Perustiitterit seerumin HAI-vasta-aineelle influenssavirusta A/Beijing/32/92 (H3N2) vastaan olivat pienemmät tai yhtäsuuret kuin 1:8 64:llä (50%) kohteella 127:stä mukana olevasta. Useimmilla kohteista kussakin neljässä rokoteryhmässä oli HA-spesifiset serologiset vasteet mitattuna HAI:lla ja ELISA:lla (taulukko 4). Seerumin HAI-vasta-aineen rokotuksenjälkeiset tiitterit olivat suuremmat tai yhtäsuuret kuin 1:32 kaikissa rokotetuissa kahden henkilön muodostamaa poikkeusta lukuunottamatta, jotka saivat 15 μg rHA0, ja yhdellä, joka sai lisensoitua rokotetta. Rokotus liittyi myös neutraloivan vasta-aineen tuotantoon useimmissa vapaaehtoisissa. Keskinousut vasta-ainetiittereissä ja serokonversioasteissa pyrkivät olemaan hiukan alhaisemmat 15 μg:lla rHA0:ta suoritetun immunisaation jälkeen kuin lisensoidun rokotteen jälkeen, vaikka nämä erot eivät olleet tilastollisesti merkittäviä. Vasta-ainereaktio rHA0:lle ei kohonnut alunan lisäämisen vaikutuksesta. Kohdehenkilöt, jotka immunisoitiin 90 μg:lla rHA0, saivat rokotuksen jälkeen keskimääräiset HAI- ja ELISA-vasta-ainetiitterit, jotka olivat kahdesta viiteen kertaa korkeammat kuin millään muista kolmesta rokoteryhmästä (erot olivat tilastollisesti merkittäviä verrattaessa seerumin HAI-tiittereitä).

Suojavaikutus. Seurantajakson aikana 26 kohdetta raportoi kaikkiaan 28 influenssankaltaista sairautta. Neljällä näistä henkilöistä (joista kolme oli saanut plaseboa ja yksi, jonka immunisointi oli suoritettu 15 μg:lla rHA0) oli influenssa A-virus (H3N2), joka eristettiin nenänieluviljelmistä. Merkittäviä kasvuja HAI-vasta-ainetiitterissä influenssalle A/Beijing/32/92 (H3N2) ennen kautta ja sen jälkeen otettujen seeruminäytteiden välillä ilmeni myös kolmessa neljästä viljelmällä vahvistetuista tapauksista, mutta ei muissa yksilöissä, jotka raportoivat sairaudesta. Ainoalla rHA0:ta saaneella, jolle myöhemmin kehittyi labo-

ratorion vahvistama influenssasairaus, oli positiivinen viljelmä saatu 31 päivää immunisaation jälkeen, ja hän oli serokonvergoitunut ennen rokotuksia olleesta HAI-tiitteristä, joka oli pienempi kuin 1:4, rokotuksen jälkeiseen (ennen kautta) tiitteriin 1:32. Kahdella muulla plasebon saajalla ja yhdellä vapaaehtoisella, joka oli immunisoitu lisensoidulla rokotteella, oli serologinen todiste infektoitumisesta influenssa A-viruksella (H3N2) epidemiakauden aikana ilman kliinistä sairautta. Verrattuna kaikkiin rokotettuihin kohteisiin (tai kaikkiin kohteisiin, jotka saivat kumpaa tahansa rHA0-rokotetta) yhtenä ryhmänä, merkittävästi suuremmalla osalla plaseboa saaneista oli laboratoriossa vahvistettu influenssa A:n (H3N2) aiheuttama sairaus ($p<0,05$) tai infektio ($p<0,005$).

Edelläolevat löydökset osoittavat, että influenssarokotteet, jotka sisältävät puhdistettua rHA0-antigeenia valmistettuna edellä identifioidussa patenttihakemuksessa kuvatulla tavalla, ovat hyvin siedettyjä ja ne pystyvät tuottamaan suojaavia immuunireaktioita ihmiskohteissa. Jopa annoksella 90 µg tässä kokeessa arvioitu rHA0 ei ollut reaktogeenisempi kuin suolaliuosplasebo, ja aiheutti merkittävästi harvempia paikallisia reaktioita kuin lisensoitu trivalentti subvirion-rokote, joka sisälsi puolet vähemmän (s.o. 45 µg) kokonaista HA-antigeenia.

Neutraloinnissa HA-spesifiset vasta-ainereaktiot 15 µg:lle rHA0-valmistetta olivat vertailukelpoisia niihin, joita saatiin subvirion-rokotteella, ja olivat merkittävästi parempia nostettaessa rHA0:n annos 90 µg:aan.

Kokonaismäärät infektiolle ja sairaudelle, joka johtui luonnollisesta altistumisesta kiertävälle influenssa A-viruksen (H3N2) epideemiselle kannalle, olivat merkittävästi alhaisempia rokotettujen kohteiden joukossa kuin plaseboa saaneilla. Tietojen perusteella voidaan sanoa, että suojaava immuniteetti, jonka rHA0 sai aikaan, erityisesti suuria annoksia annettaessa, on vertailukelpoinen tai huo-

mattavasti parempi kuin nykyisin saatavilla rokotteilla aikaansaatu.

220198 97419

Taulukko 4: Seerumin vasta-ainereaktiot nuorissa aikuiskohteissa immunisaation jälkeen rokotteilla, jotka sisälsivät puhdistettua yhdistelmähemagglutiniinia (rHA0) influenssaviruskannasta A/Beijing/32/92 (H3N2), lisensoidusta trivalentista subvirion-rokotteesta, joka sisälsi 15 µg HA kannasta A/Beijing/32/92 (H3N2), tai suolaliuosplasebosta

Rokote (numero ryhmässä)	HAI vasta-aine			ELISA IgG HA vasta-aine			Neutraloiva vasta-aine Mikroneutralointitiiteri		
	HAI tiitteri ennen	jälk.	% nousu-% ≥4x jälk. ≥1:32	ELISA tiitteri ennen	jälkeen	nousu-% ≥4x	ennen	jälkeen	nousu-% ≥4x
rHAO 15 µg (26)	3.7±0.3	9.0±0.6*	85	92	8.7±0.3	12.0±0.3	88	5.7±0.3	10.0±0.4	85
rHAO 15 µg plus aluna (26)	4.3±0.5	8.6±0.4*	88	100	9.4±0.4	11.5±0.4	76	6.4±0.4	9.3±0.2	76
rHAO 90 µg (26)	3.3±0.4	11.1±0.3	100	100	8.5±0.4	13.1±0.4	100	5.7±0.3	10.2±0.4	96
Lisensoitu subvirion (26)	3.7±0.4	9.3±0.5*	100	96	8.1±0.4	12.0±0.4	92	5.8±0.3	9.9±0.4	96
plasebo (24)	3.7±0.5	3.8±0.5#	0	38	9.1±0.3	9.1±0.3	0	5.3±0.4	5.4±0.4	8

HAI, hemagglutinaation inhiboituminen; HA, hemagglutiniini; ELISA, entsyymisidonnainen immunosorbenttikoe. Rokotuksen jälkeiset seeruminäytteet saatiin kolme viikkoa immunisaation jälkeen. Vasta-ainetiitterit on ilmaistu käänteiskeskiarvona $\log_2 \pm$SEM. Tilastolliset vertailut on tehty keskimääräisen rokotuksenjälkeisen, määrätyssä ryhmässä olevan HAI-tiitterin ja 90 µg rHA0 saaneen rokoteryhmän välillä analysoimalla vaihtelu Dunnettin testillä hajavertailuille.

*, P<0,01; +, P<0,05; #, P<0,01

Esimerkki 11: **Menetelmä parannetun HA0-kloonausvektorin valmistamiseksi.**

Suunniteltiin parempi kloonausvektori valmiin HA:n ilmentämiseen, jossa HA:ta koodaava geeni on sijoittunut välittömästi kitinaasin signaalipeptidiä koodaavan sekvenssin alapuolelle.

Syntyi lineaarinen pMGS27, jossa oli yksisäikeiset hännät

pMGS12-plasmidissa HA kloonattiin SmaI- tai KpnI-kohtiin välittömästi kitinaasin signaalipeptidin alapuolelle. Nukleiinihappo- ja aminohapposekvenssit on esitetty vastaavasti SEQ ID NO. 22:ssa ja SEQ ID NO. 23:ssa:

5'-kitinaasin signaalipepitid SmaI KpnI
TGG TTG GTC GCC GTT TCT AAC GCG ATT CCC GGG GGT ACC
TRP LEU VAL ALA VAL SER ASN ALA ILE PRO GLY GLY THR

Tämä alue muutettiin oligosuunnatulla mutageneesillä synnyttämään pMGS27 (vaihdetut emäkset on alleviivattu) (SEQ ID NO. 24):

5'-
TGG TTA GTC GCC GTG TC**CTGCAG**GCCAGAGAGGCCTT GGT ACC
Pst1

Plasmidi pMGS27 linearisoitiin leikkaamalla Pst1:llä (jäännökset 6-35 SEQ ID NO. 24:stä esitetty):
A GTC GCC GTG TCC TGCA 5' GGCCAGAGAGGCC T
T CAG CGG CAC AGG 5' ACGTCCGGTCTCTCCGG A

sitten käsittelemällä lineaarinen pMGS27 T4 DNA-polymeraasilla plus dATP:llä yksisäikeisten häntien muodostamiseksi kuten jäljessä on esitetty (jäännökset 24-36 ja SEQ ID NO. 24:n jäännösten 6-18 komplementti):
A 5' GGCCAGAGAGGCC T
T CAG CGG CAC AGG 5' A

Kohde-HA-geeni kloonattiin pMGS27:ään

Vaihe 1. Syntetisoitiin PCR-alukkeet.

Eteenpäin oligo (SEQ ID NO. 25):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (5'-pään 20 emästä valmiista HA:sta)

Käänteinen oligo (SEQ ID NO. 26:n komplementti):

(3'-pään 20 emästä valmiista HA:sta) ATT AA

CCGGTCTCTCCGG 5'

HA-geenin PCR

Kohde-HA-geenin PCR:ää ja kahta oligoa käytettiin saamaan (SEQ ID NO. 25 ja SEQ ID NO. 26):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (valmis HA)

CAG CGG CAC AGG TTG CGC (valmis HA)

TAA TTGGCCAGAGAGGCC 3'

ATT AACCGGTCTCTCCGG

Kohde-HA-geenin lämpökäsittely pMGS27:ksi ja E. colin transformointi

Lineaarinen pMGS27 ja T4 DNA-polymeraasilla käsitelty HA-geenin PCR-fragmentti sekoitettiin. Kaksi molekyyliä sulautuu toisiinsa ja muodostaa rengasmaisen plasmidin, joka on valmis käytettäväksi E. colin transformoimiseen. Kaavio sisältää SEQ ID NO.:t 25 ja 26, jäännökset 23-36 ja 6-18 SEQ ID:stä NO. 24.

GTCGCCGTGTCCAACGCG (valmis HA) TAATT

TTGCGC (valmis HA) ATTAACCGGTCTCTCCGG

+

A GGCCAGAGAGGCCT

TCAGCGGCACAGG A

=

kitinaasin signaalipeptidi stop

GTCGCCGTGTCCAACGCG (valmis HA) TAATTGGCCAGAGAGGCCT

Kuten edellä esitettiin, signaalipeptidin ja valmiin HA:n välissä ei ole yhtään ylimääräistä aminohappoa.

Esimerkki 12: **Trivalentin tyypin A ja B 1995-1996 influenssavirusrokotteen valmistus ja tehokkuus.**

Influenssavirusrokote, puhdistettu yhdistelmähemagglutiniini, trivalentti, tyypit A ja B (A/Texas/36/92\1 (H1N1), A/Johanesburg/33/94 (H3N2) ja B/Harbin/7/94) on ei-infektiivinen alayksikkö, joka saatiin puhdistetuista yhdistelmäinfluenssahemagglutiniiniantigeeneistä (HA). HA-geenit kloonattiin Center for Disease Control/Food and Drug Administrationin suosittelemista influenssa A- ja B-viruskannoista, kuten edellä kuvattiin, ja kunkin kloonatun geenin identtisyys määritettiin DNA-sekvenssianalyysillä. Bakuloviruksen ilmentymisvektoreita, jotka sisälsivät kloonatut HA-geenit influenssaviruskannoista A/Texas/36/91 (H1N1), A/Johanesburg/33/94 (H3N2) ja B/Harbin/7/94, käytettiin tuottamaan yhdistelmä-HA-antigeeneja viljellyissä hyönteissoluissa. Yhdistelmä-HA-proteiinit ovat täyspituisia, lohkaisemattomia hemagglutiniineja (rHA0), joiden molekyylipaino on noin 69.000. rHA0 tuotettiin Spodoptera frugiperda (Lepidopteran) solulinjassa, jota ylläpidettiin seerumivapaassa viljelykasvualustassa. Trivalentti rokote koostuu puhdistetusta (yli 95% puhtaus, todennäköisemmin yli 99% puhtaus) rHA0:sta, joka on peräisin kahdesta influenssa A-kannasta ja yhdestä B-kannasta sekoitettuna samassa suhteessa. Rokotetta tarjotaan kliiniseen käyttöön puhdistettuina A- ja B-tyyppeinä rHA0-proteiineja fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa ilman lisättyjä säilöntäaineita.

Eläintutkimukset monovalentilla, bivalentilla ja trivalentilla rHA0-rokotteella on osoittanut, että ne eivät ole merkittävän myrkyllisiä. Rokotteessa ei ole mitään havaittavia myrkyllisiä tai lisättyjä aineita. Yleiset turvallisuus- ja immunogeenisuustutkimukset A/Beijing/32/92- ja A/Texas/36/91-rHA0:sta suoritettiin hiirissä ja marsuissa. Mitään haitallisia reaktioita ei havaittu. Hiirissä yksi immunisointi 15 mikrogrammalla rHA0-antigeenia ilman apuainetta indusoi 2-3 viikossa suuret määrät anti-HA IgG-

vasta-aineita, hemmagglutiniinia inhiboivia (HAI) vasta-aineita ja neutraloivia vasta-aineita.

Eräässä tutkimuksessa kymmenen hiiren ryhmät immunisoitiin 15 mikrogrammalla puhdistettua rHA0:a A/Beijing/32/92 (H3N2) valmistettuna soluissa, jotka oli asetettu kasvualustaan, joka sisälsi 10% sikiövasikan seerumia tai rHA0:a, jotka oli valmistettu hyönteissoluissa muunneltuna seerumivapaaseen kasvualustaan (rHA0-SF). Kaksi ja kolme viikkoa injektion jälkeen hiiristä otettiin verta ja valmistettiin seeruminäytteet. Kustakin seerumista mitattiin anti-HA IgG- ja HAI-vasta-aineet. Sekä rHA0- että rHA0-SF-antigeeneilla oli samanlaiset tiitterit anti-HA- ja HAI-vasta-aineita. Kaksi viikkoa yhden immunisoinnin jälkeen useimmilla hiirillä oli merkittävät HAI-vasta-ainetiitterit ja viikolla 3 8/10:lla hiiristä kussakin ryhmässä oli HAI-tiitteri 32 tai enemmän. Nämä ja muut biokemialliset ja immunologiset tutkimukset osoittavat, että seerumivapaassa hyönteissoluviljelmässä tuotettu rHA0 ei ole erotettavissa rHA0:sta, joka on valmistettu seerumipitoisissa fermentointiolosuhteissa.

Tutkimusta jatkettiin trivalentin rHA0 influenssarokotteen 1994-1995 formulaatioiden vertaamiseksi lisensoituun puhdistettuun viruspinta-antigeenirokotteeseen, Fluviriniin® (heikennetty influenssavirusrokote, joka on valmistettu viljelemällä kananmunissa). Kukin rokote sisälsi 15 mikrogrammaa rHA0 tai virus-HA:ta 0,5 ml:ssa influenssakannoista A/Texas/36/91 (H1N1), A/Shangdong/9/93 (H3N2) ja B/Panama/45/90. Sekä yhdistelmä-rHA0- että Fluvirin®-rokotteet ovat fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa. Nolla, kaksi ja kolme viikkoa injektion jälkeen kymmenen hiiren ryhmiltä otettiin verinäytteet ja seerumi preparoitiin. Seeruminäytteistä mitattiin anti-HA-IgG-vasta-aineet, jotka inhiboivat vasta-aineita munassa kasvatettua influenssavirusta vastaan, ja neutraloivat vasta-aineet munassa kasvatettua influenssaviruksia vastaan kustakin viruskannasta.

Kuten kuvissa 4a, 4b ja 4c on esitetty, sekä yhdistelmä-rHA0- että lisensoidut influenssarokotteet indusoivat suuret määrät seerumin IgG-vasta-aineita hemagglutiniineja vastaan kustakin kolmesta influenssakannasta rokotteissa. rHA0-rokote indusoi neljästä lähes kymmeneen kertaa suuremmat IgG-vasta-ainetiitterit verrattuna lisensoituun rokotteeseen. Syntyi myös vasta-aineita, jotka inhiboivat kanan punaisten verisolujen hemagglutiniinia, sekä influenssa A- että influenssa B-kannan viruksilla, kuten taulukossa 5 on esitetty. HAI-tiitterit olivat ekvivalentteja tai suurempia kutakin kolmea influenssavirusta vastaan hiirissä, jotka saivat trivalenttia rHA0-rokotetta, verrattuna lisensoituun rokotteeseen. Rokotteet indusoivat myös suuria määriä neutraloivia vasta-aineita spesifisiä influenssa A- ja B-viruskantoja vastaan mitattuna standardikäytössä olevalla mikrotiitterivirusneutralointikokella. Geometriset neutraloivan vasta-aineen tiitterit olivat noin kaksi kertaa suuremmat hiirissä, jotka oli immunisoitu rHA0:lla, kuin niillä, jotka oli immunisoitu lisensoidulla, puhtaita viruspinta-antigeeneja sisältävällä rokotteella Fluvirinilla®. Nämä tulokset osoittavat, että trivalentti rHA0-rokoteformulaatio, joka perustuu 1994-1995 tyyppisiin A- ja B-influenssakantoihin, on ekvivalenttinen tai huomattavasti parempi verrattuna lisensoituun alayksikköinfluenssarokotteeseen siinä suhteessa kuinka se indusoi funktionaalista HAI:ta ja neutraloivia seerumin vasta-aineita kaikkia kolmea rokotteessa olevaa influenssakantaa vastaan.

Taulukko 5: **Trivalentin rHA0-rokotteen vertailu Fluvirin®-rokotteen kanssa**

	Trivalentti rHA0 influenssarokote GMT (n=10 hiirtä)		**Fluvirin® GMT (n=10 hiirtä)**	
Antigeenina käyt. viruskanta	**anti-HA IgG**		**anti-HA IgG**	
	viikko 0	**viikko 3**	**viikko 0**	**viikko 3**
A/TeXas/36/91(H1N1)	<1000	103.000	<1000	11.200
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<1000	162.400	<1000	41.000
B/Panama/45/90	<1000	164.800	<1000	26.000
Antigeenina käyt. viruskanta	**HAI**		**HAI**	
A/Texas/36/91(H1N1)	<8	1.522	<8	1.088
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<8	494	<8	435
B/Panama45/90	<8	174	<8	42
Antigeenina käyt. viruskanta	**Neutraloiva VA**		**Neutraloiva VA**	
A/Texas/36/91(H1N1)	<100	5.800	<100	2.720
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<100	840	<100	360
B/Panama/45/90	<100	1.300	<100	700

Tässä kuvattujen, yhdistelmäinfluenssarokotteen valmistamiseksi ja käyttämiseksi tarkoitettujen menetelmien ja koostumusten muunnokset ja variaatiot ovat ilmeisiä alan ammattimiehille. Nämä muunnokset ja variaatiot on tarkoitettu kuuluviksi mukaanliitettyjen patenttivaatimusten alueeseen.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:
(i) APPLICANT: MicroGeneSys, Inc.
(ii) TITLE OF INVENTION: A METHOD FOR PRODUCING INFLUENZA HEMAGGLUTININ MULTIVALENT VACCINES
(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 32
(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Patrea L. Pabst
(B) STREET: 2800 One Atlantic Center
1201 West Peachtree Street
(C) CITY: Atlanta
(D) STATE: GA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 30309-3450
(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: PCT/US95/06750
(B) FILING DATE: 26-MAY-1995
(C) CLASSIFICATION:
(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (404)-873-8794
(B) TELEFAX: (404)-873-8795
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(x) PUBLICATION INFORMATION:
(A) AUTHORS: Davis, et al.
(B) TITLE:Construction and Characterization of a Bacterial Clone Containing the Hemagglutinin Gene of the WSN Strain (HON1) of Influenza Virus
(C) JOURNAL: Gene
(D) VOLUME: 10
(F) PAGES: 205-218
(G) DATE: 1980
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

AGCAAAAGCA GG 12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 39 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GGGGGTACCC CCGGGAGCAA AAGCAGGGGA AAATAAAAA 39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 35 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CCCGGTACCT CAKATKCATA TTCTGCACTG CAAAG 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 39 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GGGGGTACCC CCGGGGACAC AATATGTATA GGCTACCAT 39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 35 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

CCCGGTACCT CAKATKCATA TTCTGCACTG CAAAG 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1793 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Bejing/32/92 rHA
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 19 to 72
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: SmaI restriction site
(B) LOCATION: 76 to 81
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
(B) LOCATION: 73 to 1728
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: KpnI restriction site
(B) LOCATION: 1771 to 1777
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: BglII restriction site
(B) LOCATION: 1776 to 1782
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
(B) LOCATION: 1783 to 1793
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGACTTTCCA GGAAATGACA ACAGCACAGC AACGCTGTGC 120

CTGGGACATC ATGCAGTGCC AAACGGAACG CTAGTGAAAA CAATCACGAA TGATCAAATT 180

GAAGTGACTA ATGCTACTGA GCTGGTTCAG AGTTCCTCAA CAGGTAGAAT ATGCGACAGT 240

CCTCACCGAA TCCTTGATGG AAAAAACTGC ACACTGATAG ATGCTCTATT GGGAGACCCT 300

CATTGTGATG GCTTCCAAAA TAAGGAATGG GACCTTTTTG TTGAACGCAG CAAAGCTTAC 360

AGCAACTGTT ACCCTTATGA TGTACCGGAT TATGCCTCCC TTAGGTCACT AGTTGCCTCA 420

TCAGGCACCC TGGAGTTTAT CAATGAAGAC TTCAATTGGA CTGGAGTCGC TCAGGATGGG 480

GGAAGCTATG CTTGCAAAAG GGGATCTGTT AACAGTTTCT TTAGTAGATT GAATTGGTTG 540

CACAAATCAG AATACAAATA TCCAGCGCTG AACGTGACTA TGCCAAACAA TGGCAAATTT 600

GACAAATTGT ACATTTGGGG GGTTCACCAC CCGAGCACGG ACAGAGACCA AACCAGCCTA 660

TATGTTCGAG CATCAGGGAG AGTCACAGTC TCTACCAAAA GAAGCCAACA AACTGTAACC 720

CCGAATATCG GGTCTAGACC CTGGGTAAGG GGTCAGTCCA GTAGAATAAG CATCTATTGG 780

ACAATAGTAA AACCGGGAGA CATACTTTTG ATTAATAGCA CAGGGAATCT AATTGCTCCT 840

CGGGGTTACT TCAAAATACG AAATGGGAAA AGCTCAATAA TGAGGTCAGA TGCACCCATT 900

GGCACCTGCA GTTCTGAATG CATCACTCCA AATGGAAGCA TTCCCAATGA CAAACCTTTT 960

CAAAATGTAA ACAGGATCAC ATATGGGGCC TGCCCCAGAT ATGTTAAGCA AAACACTCTG 1020

AAATTGGCAA CAGGGATGCG GAATGTACCA GAGAAACAAA CTAGAGGCAT ATTCGGCGCA 1080

ATCGCAGGTT TCATAGAAAA TGGTTGGGAG GGAATGGTAG ACGGTTGGTA CGGTTTCAGG 1140

CATCAAAATT CTGAGGGCAC AGGACAAGCA GCAGATCTTA AAAGCACTCA AGCAGCAATC 1200

GACCAAATCA ACGGGAAACT GAATAGGTTA ATCGAGAAAA CGAACGAGAA ATTCCATCAA 1260

ATCGAAAAAG AATTCTCAGA AGTAGAAGGG AGAATTCAGG ACCTCGAGAA ATATGTTGAA 1320

GACACTAAAA TAGATCTCTG GTCTTACAAC GCGGAGCTTC TTGTTGCCCT GGAGAACCAA 1380

CATACAATTG ATCTAACTGA CTCAGAAATG AACAAACTGT TTGAAAAAAC AAGGAAGCAA 1440

CTGAGGGAAA ATGCTGAGGA CATGGGCAAT GGTTGCTTCA AAATATACCA CAAATGTGAC 1500

AATGCCTGCA TAGGGTCAAT CAGAAATGGA ACTTATGACC ATGATGTATA CAGAGACGAA 1560

GCATTAAACA ACCGGTTCCA GATCAAAGGT GTTGAGCTGA AGTCAGGATA CAAAGATTGG 1620

ATCCTATGGA TTTCCTTTGC CATATCATGC TTTTTGCTTT GTGTTGTTTT GCTGGGGTTC 1680

ATCATGTGGG CCTGCCAAAA AGGCAACATT AGGTGCAACA TTTGCATTTG AGTGTATTAA 1740

TTAAAAACAC CCTTGTTTCT AGGATGATTC GGTACCAGAT CTTAATTAAT TAA 1793

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:
  (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    (A) LENGTH: 570 amino acids
    (B) TYPE: amino acid
    (C) STRANDEDNESS: single
    (D) TOPOLOGY: linear
  (ii) MOLECULE TYPE: peptide
  (iii) HYPOTHETICAL: NO
  (iv) ANTI-SENSE: NO
  (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
  (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Bejing/32/92 rHA
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: mature rHA
(B) LOCATION: 19 to 552
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

```
Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1               5                  10                  15
Asn Ala Ile Pro Gly Asp Phe Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr
            20                  25                  30
Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr
        35                  40                  45
Ile Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln
    50                  55                  60
Ser Ser Ser Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu Asp
65                  70                  75                  80
Gly Lys Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys
                85                  90                  95
Asp Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys
            100                 105                 110
Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu
        115                 120                 125
Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Asp
    130                 135                 140
Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys Lys
145                 150                 155                 160
Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Lys
                165                 170                 175
Ser Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Gly
            180                 185                 190
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp
        195                 200                 205
Arg Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr Val
    210                 215                 220
Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser Arg
225                 230                 235                 240
Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile
                245                 250                 255
Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile
            260                 265                 270
Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile Met
        275                 280                 285
Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Thr Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr Pro
    290                 295                 300
Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile
305                 310                 315                 320
Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
                325                 330                 335
Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe
            340                 345                 350
Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp
        355                 360                 365
Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala
    370                 375                 380

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

```
Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
    450                 455                 460
Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu
465                 470                 475                 480
Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala
                485                 490                 495
Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg
            500                 505                 510
Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys
        515                 520                 525
Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys
    530                 535                 540
Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln
545                 550                 555                 560
Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
                565                 570
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1766 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
- (A) ORGANISM: Influenza virus
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Texas/36/91 rHA

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
- (B) LOCATION: 1 to 18

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for AcNPV 61K protein signal peptide
- (B) LOCATION: 19 to 72

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: SmaI restriction site
- (B) LOCATION: 76 to 81

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: KpnI restriction site
- (B) LOCATION: 82 to 87

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: SmaI restriction site
- (B) LOCATION: 88 to 93

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
- (B) LOCATION: 73 to 1734

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: KpnI restriction site
- (B) LOCATION: 1744 to 1749

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: BglII restriction site
- (B) LOCATION: 1750 to 1755

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
- (B) LOCATION: 1756 to 1766

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

```
TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC     60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCCCC GGGGACACAA TATGTATAGG CTACCATGCG    120

AACAACTCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTTGAGAAGA ACGTGACAGT GACACACTCT    180

GTCAACCTAC TTGAGGACAG TCACAACGGA AAACTATGTC GACTAAAGGG AATAGCCCCA    240
```

CTACAATTGG GTAATTGCAG CGTTGCCGGA TGGATCTTAG GAAACCCAAA ATGCGAATCA 300

CTGTTTTCTA AGGAATCATG GTCCTACATT GCAGAAACAC CAAACCCTGA GAATGGAACA 360

TGTTACCCAG GGTATTTCGC CGACTATGAG GAACTGAGGG AGCAATTGAG TTCAGTATCA 420

TCATTCGAGA GATTCGAAAT ATTCCCCAAA GAAAGCTCAT GGCCCAACCA CACCGTAACC 480

AAAGGAGTAA CGAGATCATG CTCCCATAAT GGGAAAAGCA GTTTTTACAG AAATTTGCTA 540

TGGCTGACGG AGAAGAATGG CTTGTACCCA AATCTGAGCA AGTCCTATGT AAACAACAAA 600

GAGAAAGAAG TCCTTGTACT ATGGGGTGTT CATCACCCGT CTAACATAAG GGACCAAAGG 660

GCCATCTATC ATACAGAAAA TGCTTATGTC TCTGTAGTGT CTTCACATTA TAGCAGAAGA 720

TTCACCCCAG AAATAGCAAA AAGACCCAAA GTAAGAGATC AAGAAGGAAG AATTAACTAC 780

TACTGGACTC TGCTGGAACC CGGGGACACA ATAATATTTG AGGCAAATGG AAATCTAATA 840

GCGCCATGGT ATGCTTTCGC ACTGAGTAGA GGCTTTGGGT CAGGAATCAT CACCTCAAAC 900

GCATCAATGG ATGAATGTGA CGCGAAGTGT CAAACACCCC AGGGAGCTAT AAACAGTAGT 960

CTTCCTTTCC AGAATGTACA CCCAGTCACA ATAGGAGAGT GTCCAAAGTA TGTCAGGAGT 1020

ACAAAATTAA GGATGGTTAC AGGACTAAGG AACATCCCAT CCATTCAATC CAGAGGTTTG 1080

TTTGGAGCCA TTGCCGGTTT CATTGAAGGG GGGTGGACTG GAATGATAGA TGGATGGTAT 1140

GGTTATCATC ATCAGAATGA ACAAGGATCT GGCTATGCTG CGGACCAAAA AAGCACACAA 1200

AATGCCATTA ACGGGATTAC AAACAAGGTG AATTCTGTAA TCGAGAAAAT GAACACTCAA 1260

TTCACAGCTG TGGGCAAAGA ATTCAACAAA TTAGAAAGAA GGATGGAAAA CTTAAATAAA 1320

AAAGTTGATG ATGGATTTCT GGACATTTGG ACATATAATG CAGAATTGTT GGTTCTACTG 1380

GAAAATGGAA GGACTTTGGA TTTTCATGAC TCAAATGTGA AGAATCTGTA TGAGAAAGTA 1440

AAAAGCCAAT TGAAGAATAA TGCCAAAGAA ATAGGGAACG GGTGTTTTGA ATTCTATCAC 1500

AAGTGTAACA ATGAATGCAT GGAAAGTGTG AAAAATGGAA CTTATGACTA TCCAAAATAT 1560

TCCGAAGAAT CAAAGTTAAA CAGGGGAAAA ATTGATGGAG TGAAATTGGA ATCAATGGGA 1620

GTCTATCAGA TTCTGGCGAT CTACTCAACT GTCGCCAGTT CACTGGTGCT TTTGGTCTCC 1680

CTGGGGGCAA TCAGCTTCTG GATGTGTTCT AATGGGTCTT TGCAGTGCAG AATATGAATC 1740

TGAGGTACCA GATCTTAATT AATTAA 1766

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:
  (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    (A) LENGTH: 572 amino acids
    (B) TYPE: amino acid
    (C) STRANDEDNESS: single
    (D) TOPOLOGY: linear
  (ii) MOLECULE TYPE: peptide
  (iii) HYPOTHETICAL: NO
  (iv) ANTI-SENSE: NO
  (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
  (vi) ORIGINAL SOURCE:
    (A) ORGANISM: Influenza virus
    (C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Texas/36/91 rHA
  (ix) FEATURE
    (A) NAME/KEY: AcNPV 61K protein signal sequence

(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: mature rHA
(B) LOCATION: 19 to 554
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

```
Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1               5                  10                  15
Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr Pro Gly Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr
            20                  25                  30
His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn
        35                  40                  45
Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly
    50                  55                  60
Lys Leu Cys Arg Leu Lys Gly Ile Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys
65                  70                  75                  80
Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Lys Cys Glu Ser Leu Phe
                85                  90                  95
Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile Ala Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn
            100                 105                 110
Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu
        115                 120                 125
Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys
    130                 135                 140
Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr Val Thr Lys Gly Val Thr Arg Ser
145                 150                 155                 160
Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu
                165                 170                 175
Thr Glu Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn
            180                 185                 190
Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Ser
        195                 200                 205
Asn Ile Arg Asp Gln Arg Ala Ile Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val
    210                 215                 220
Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala
225                 230                 235                 240
Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp
                245                 250                 255
Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn
            260                 265                 270
Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser
        275                 280                 285
Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys
    290                 295                 300
Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val
305                 310                 315                 320
His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys
                325                 330                 335
Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg
            340                 345                 350
Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly
        355                 360                 365
Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser
    370                 375                 380
Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile
385                 390                 395                 400
Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr
                405                 410                 415

Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu
            420                 425                 430
Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala
        435                 440                 445
Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gly Arg Thr Leu Asp Phe His Asp
    450                 455                 460
Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn
465                 470                 475                 480
```

```
Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys
                485                 490                 495
Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro
            500                 505                 510
Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Gly Lys Ile Asp Gly Val
        515                 520                 525
Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr
    530   .             535                 540
Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe
545                 550                 555                 560
Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
                565                 570
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1799 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: RNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
- (A) ORGANISM: Influenza virus
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Panama/45/90 rHA

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
- (B) LOCATION: 1 to 18

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for HA signal peptide sequence
- (B) LOCATION: 19 to 69

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: SmaI restriction site
- (B) LOCATION: 22 to 27

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
- (B) LOCATION: 70 to 1773

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: KpnI restriction site
- (B) LOCATION: 1777 to 1782

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: BglII restriction site
- (B) LOCATION: 1783 to 1788

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
- (B) LOCATION: 1789 to 1799

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

```
TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA     60

TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA    120

ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA    180

AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT    240

CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT    300

TCGGCAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA    360

ATGCACGACA GAACAAAAAT CAGACAGCTA CCCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC    420

AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAACGCA GAAAGAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT    480

GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGTTACC AGTAGAGACG GATTCTTCGC AACAATGGCT    540
```

TGGGCTGTCC CAAGGGACAA CAAAACAGCA ACGAATCCAC TAACAGTAGA AGTACCATAC 600

ATTTGTACCA AAGGAGAAGA CCAAATTACT GTTTGGGGGT TCCATTCTGA TAACAAAATC 660

CAAATGAAAA ACCTCTATGG AGACTCAAAT CCTCAAAAGT TCACCTCATC TGCCAATGGA 720

GTAACCACAC ATTATGTTTC TCAGATTGGT GGCTTCCCAA ATCAAACAGA AGACGGAGGG 780

CTACCACAAA GCGGCAGAAT TGTTGTTGAT TACATGGTGC AAAAACCTGG GAAAACAGGA 840

ACAATTGTCT ATCAAAGAGG TGTTTTGTTG CCTCAAAAGG TGTGGTGCGC AAGTGGCAGG 900

AGCAAGGTAA TAAAAGGGTC CTTGCCTTTA ATTGGTGAAG CAGATTGCCT TCACGAAAAA 960

TACGGTGGAT TAAACAAAAG CAAGCCTTAC TACACAGGAG AACATGCAAA AGCCATAGGA 1020

AATTGCCCAA TATGGGTGAA AACACCTTTG AAGCTTGCCA ATGGAACCAA ATATAGACCT 1080

CCTGCAAAAC TATTAAAGGA AAGGGGTTTC TTCGGAGCTA TTGCTGGTTT CTTAGAAGGA 1140

GGATGGGAAG GAATGATTGC AGGTTGGCAC GGATACACAT CTCATGGAGC ACATGGAGTG 1200

GCAGTGGCAG CAGACCTTAA GAGTACGCAA GAAGCCATAA ACAAGATAAC AAAAAATCTC 1260

AATTCTTTGA GTGAGCTAGA AGTAAAGAAT CTTCAAAGAC TAAGTGGTGC CATGGATGAA 1320

CTCCACAACG AAATACTCGA GCTGGATGAG AAAGTGGATG ATCTCAGAGC TGACACAATA 1380

AGCTCGCAAA TAGAGCTTGC AGTCTTGCTT TCCAACGAAG GAATAATAAA CAGTGAAGAT 1440

GAGCATCTAT TGGCACTTGA GAGAAAACTA AAGAAAATGC TGGGTCCCTC TGCTGTAGAC 1500

ATAGGGAATG GATGCTTCGA AACCAAACAC AAGTGCAACC AGACCTGCTT AGACAGGATA 1560

GCTGCTGGCA CCTTTAATGC AGGAGAATTT TCTCTTCCCA CTTTTGATTC ACTGAATATT 1620

ACTGCTGCAT CTTTAAATGA TGATGGATTG GATAATCATA CTATACTGCT CTACTACTCA 1680

ACTGCTGCTT CTAGTTTGGC TGTAACATTG ATGATAGCTA TTTTTATTGT TTATATGGTC 1740

TCCAGAGACA ATGTTTCTTG TTCCATCTGT CTGTGAGGTA CCAGATCTTA ATTAATTAA 1799

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:
  (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    (A) LENGTH: 585 amino acids
    (B) TYPE: amino acid
    (C) STRANDEDNESS: single
    (D) TOPOLOGY: linear
  (ii) MOLECULE TYPE: peptide
  (iii) HYPOTHETICAL: NO
  (iv) ANTI-SENSE: NO
  (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
  (vi) ORIGINAL SOURCE:
    (A) ORGANISM: Influenza virus
    (C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Panama/45/90 rHA
  (ix) FEATURE
    (A) NAME/KEY: HA signal peptide
    (B) LOCATION: 1 to 17
  (ix) FEATURE
    (A) NAME/KEY: mature rHA
    (B) LOCATION: 18 to 568
  (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

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

```
Val Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro
        35                  40                  45
Leu Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr
    50                  55                  60
Lys Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asn Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu
65                  70                  75                  80
Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala
                85                  90                  95
Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe
            100                 105                 110
Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu
        115                 120                 125
Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asn Ala
    130                 135                 140
Glu Arg Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys
145                 150                 155                 160
Pro Asn Val Thr Ser Arg Asp Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala
                165                 170                 175
Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val
            180                 185                 190
Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe
        195                 200                 205
His Ser Asp Asn Lys Ile Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn
    210                 215                 220
Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val
225                 230                 235                 240
Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro
                245                 250                 255
Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly Lys
            260                 265                 270
Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys Val
        275                 280                 285
Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu
    290                 295                 300
Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys
305                 310                 315                 320
Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys
                325                 330                 335
Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr
            340                 345                 350
Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile
        355                 360                 365
Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His
    370                 375                 380
Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu
385                 390                 395                 400
Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser
                405                 410                 415
Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met
            420                 425                 430
Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp
        435                 440                 445
Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu
    450                 455                 460
Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu
465                 470                 475                 480
Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly
                485                 490                 495

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

Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg
565 570 575
Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
580 585

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1811 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Netherlands/13/94 rHA
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 19 to 72
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: SmaI restriction site
(B) LOCATION: 76 to 81
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
(B) LOCATION: 73 to 1785
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: KpnI restriction site
(B) LOCATION: 1789 to 1794
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: BglII restriction site
(B) LOCATION: 1795 to 1800
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
(B) LOCATION: 1801 to 1811
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGATCGAATC TGCACTGGGA TAACATCTTC AAAATCACCT 120

CATGTAGTCA AAACAGCTAC TCAAGGGGAG GTCAATGTGA CTGGTGTGAT ACCACTGACG 180

ACAACACCAA CAAAATCTCA TTTTGCAAAT CTCAAAGGAA CAAAGACCAG AGGGAAACTA 240

TGCCCAAACT GTCTCAACTG CACAGATCTG GATGTGGCCT TGGGCAGACC AATGTGTGTG 300

GGGATCACAC CTTCGGCAAA AGCTTCAATA CTCCACGAAG TCAGACCTGT TACATCCGGG 360

TGCTTTCCTA TAATGCATGA CAGAACAAAA ATCAGACAGC TACCCAATCT TCTCAGAGGA 420

TATGAAAACA TCAGACTATC AACCCAAAAC GTTATCAACG CAGAAAAGGC ACCAGGAGGA 480

CCCTACAGAC TTGGAACCTC AGGATCTTGC CCTAACGTTA CCAGTAGAAC CGGATTCTTC 540

GCAACAATGG CTTGGGCTGT CCCAAGGGAC AACAAAACAG CAACGAATCC ACTAACAGTA 600

GAAGTACCAT ACATTTGTAC GAAAGGAGAA GACCAAATTA CTGTTTGGGG GTTCCATTCT 660

GATAACAAAA CCCAAATGAA AAACCTCTAT GGAGACTCAA ATCCTCAAAA GTTCACCTCA 720

TCTGCCAATG GAGTAACCAC ACATTATGTT TCTCAGATTG GTGGCTTCCC AGATCAAACA 780

GAAGACGGAG GACTACCACA AAGCGGCAGA ATTGTTGTTG ATTACATGGT GCAAAAACCT 840

GGGAAAACAG GAACAATTGT CTATCAAAGA GGTATTTTGT TGCCTCAAAA GGTGTGGTGC 900

GCAAGTGGCA GGAGCAAGGT AATAAAAGGG TCCTTGCCTT TAATTGGTGA AGCAGATTGC 960

CTTCACGAAA AATACGGTGG ATTAAACAAA AGCAAGCCTT ACTACACAGG AGAACATGCA 1020

AAAGCCATAG GAAATTGCCC AATATGGGTG AAAACACCTT TGAAGCTTGC CAATGGAACC 1080

AGATATAGAC CTCCTGCAAA ACTATTAAAG GAAAGGGGTT TCTTCGGAGC TATTGCTGGT 1140

TTCTTAGAAG GAGGATGGGA AGGAATGATT GCAGGTTGGC ACGGATACAC ATCTCACGGG 1200

GCACATGGAG TGGCAGTGGC AGCAGACCTT AAGAGTACGC AAGAAGCCAT AAACAAGATA 1260

ACAAAAAATC TCAATTCTTT GAGTGAGCTA GAAGTAAAGA ACCTTCAAAG ACTAAGTGGT 1320

GCCATGGATG AACTCCACAA CGAAATACTC GAGCTGGATG AGAAAGTGGA TGATCTCAGA 1380

GCTGACACAA TAAGCTCGCA AATAGAGCTT GCAGTCTTAC TTTCCAACGA AGGAATAATA 1440

AACAGTGAAG ATGAGCATCT ATTGGCACTT GAGAGAAAAC TAAAGAAAAT GCTGGGTCCC 1500

TCTGCTGTAG ACATAGGGAA TGGATGCTTC GAAACAAAAC ACAAGTGCAA CCAGACCTGC 1560

TTAGACAGGA TAGCTGCTGG CACCTTTAAT GCAGGAGAAT TTTCTCTTCC CACTTTTGAT 1620

TCACTGAATA TTACTGCTGC ATCTTTAAAT GATGATGGAT TGGATAATCA TACTATACTG 1680

CTCTACTACT CAACTGCTGC TTCTAGTTTG GCTGTAACAT TGATGATAGC TATTTTTATT 1740

GTTTATATGG TCTCCAGAGA CAATGTTTCT TGTTCCATCT GTCTGTGAGG TACCAGATCT 1800

TAATTAATTA A 1811

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 589 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Netherlands/13/94 rHA

(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 1 to 18

(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: mature rHA
(B) LOCATION: 19 to 571

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

```
Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1               5                  10                  15
Asn Ala Ile Pro Gly Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Lys
            20                  25                  30
Ser Pro His Val Val Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr
        35                  40                  45
Gly Val Ile Pro Leu Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn
    50                  55                  60
Leu Lys Gly Thr Lys Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asn Cys Leu Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Cys Thr Asp Leu Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Ile
                85                  90                  95
Thr Pro Ser Ala Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr
            100                 105                 110
Ser Gly Cys Phe Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu
        115                 120                 125
Pro Asn Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn
    130                 135                 140
Val Ile Asn Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr
145                 150                 155                 160
Ser Gly Ser Cys Pro Asn Val Thr Ser Arg Thr Gly Phe Phe Ala Thr
                165                 170                 175
Met Ala Trp Ala Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu
            180                 185                 190
Thr Val Glu Val Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr
        195                 200                 205
Val Trp Gly Phe His Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr
    210                 215                 220
Gly Asp Ser Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr
225                 230                 235                 240
Thr His Tyr Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp
                245                 250                 255
Gly Gly Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln
            260                 265                 270
Lys Pro Gly Lys Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu
        275                 280                 285
Pro Gln Lys Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly
    290                 295                 300
Ser Leu Pro Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly
305                 310                 315                 320
Gly Leu Asn Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala
                325                 330                 335
Ile Gly Asn Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn
            340                 345                 350
Gly Thr Arg Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe
        355                 360                 365
Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile
    370                 375                 380
Ala Gly Trp His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val
385                 390                 395                 400
Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys
                405                 410                 415
Asn Leu Asn Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu
            420                 425                 430
Ser Gly Ala Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu
        435                 440                 445
Lys Val Asp Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu
    450                 455                 460
Ala Val Leu Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His
465                 470                 475                 480
Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala
                485                 490                 495
Val Asp Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln
            500                 505                 510
Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe
        515                 520                 525
Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn
    530                 535                 540

Asp Asp Gly Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala
545                 550                 555                 560
Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr
                565                 570                 575
Met Val Ser Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
            580                 585
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1757 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Shandong/9/93 rHA
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 19 to 72
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: SmaI restriction site
(B) LOCATION: 76 to 81
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
(B) LOCATION: 73 to 1728
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: KpnI restriction site
(B) LOCATION: 1735 to 1740
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: BglII restriction site
(B) LOCATION: 1741 to 1746
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
(B) LOCATION: 1747 to 1757
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAAGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG 120

TGCCTGGGAC ATCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA 180

ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGTTGGTT CAGAGTTCCT CAACAGGTAG AATATGCGGC 240

AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAAAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC 300

CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT 360

TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC 420

TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAATGAA GACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT 480

GGGGGAAGCT ATGCTTGCAA AAGAGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG 540

TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA 600

TTTGACAAAT TGTACATTTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC 660

CTATATGTTC GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACTGTA 720

ACCCCGAATA TCGGGTCTAG ACCCTGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AAGCATCTAT 780

TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTGATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT 840

CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC 900

ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT 960

TTTCAAAATG TAAACAGAAT CACATATGGG GCCTGCCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT 1020

CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AAACTAGAGG CATATTCGGC 1080

GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC 1140

AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCAGCAGATC TTAAAAGCAC TCAAGCAGCA 1200

ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAATCGAGA AAACGAACGA GAAATTCCAT 1260

CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT 1320

GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AACGCGGAGC TTCTTGTTGC CCTGGAGAAC 1380

CAACATACAA TTGATCTAAC TGACTCAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAAA AACAAGGAAG 1440

CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGCT TCAAAATATA CCACAAATGT 1500

GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGAACTTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC 1560

GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT 1620

TGGATCCTAT GGATTTCCTT TGCCATATCA TGCTTTTTGC TTTGTGTTGT TTTGCTGGGG 1680

TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC 1740

AGATCTTAAT TAATTAA 1757

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:
  (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
    (A) LENGTH: 571 amino acids
    (B) TYPE: amino acid
    (C) STRANDEDNESS: single
    (D) TOPOLOGY: linear
  (ii) MOLECULE TYPE: peptide
  (iii) HYPOTHETICAL: NO
  (iv) ANTI-SENSE: NO
  (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
  (vi) ORIGINAL SOURCE:
    (A) ORGANISM: Influenza virus
    (C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Shandong/9/93 rHA
  (ix) FEATURE
    (A) NAME/KEY: AcNPV 61K protein signal sequence
    (B) LOCATION: 1 to 18
  (ix) FEATURE
    (A) NAME/KEY: mature rHA
    (B) LOCATION: 19 to 553
  (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

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

```
Asp Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys
145                 150                 155                 160
Lys Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His
                165                 170                 175
Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn
            180                 185                 190
Gly Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr
        195                 200                 205
Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr
    210                 215                 220
Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser
225                 230                 235                 240
Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr
                245                 250                 255
Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Asn Leu
            260                 265                 270
Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile
        275                 280                 285
Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Asn Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr
    290                 295                 300
Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg
305                 310                 315                 320
Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
                325                 330                 335
Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile
            340                 345                 350
Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val
        355                 360                 365
Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
    370                 375                 380
Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
385                 390                 395                 400
Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile
                405                 410                 415
Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys
            420                 425                 430
Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu
        435                 440                 445
Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu
    450                 455                 460
Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala
465                 470                 475                 480
Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn
                485                 490                 495
Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr
            500                 505                 510
Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu
        515                 520                 525
Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser
    530                 535                 540
Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys
545                 550                 555                 560
Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
                565                 570
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1814 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Influenza virus

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Shanhai/4/94 rHA

(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 19 to 72
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: SmaI restriction site
(B) LOCATION: 76 to 81
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: KpnI restriction site
(B) LOCATION: 82 to 87
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
(B) LOCATION: 73 to 1794
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
(B) LOCATION: 1804 to 1814
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCGAT CGAATCTGCA CTGGGATAAC ATCTTCAAAC 120

TCACCTCATG TGGTCAAAAC AGCTACTCAA GGGGAGGTCA ATGTGACTGG TGTGATACCA 180

CTGACAACAA CACCAACAAA ATCTCATTTT GCAAATCTCA AAGGAACAAA GACCAGAGGG 240

AAACTATGCC CAAACTGTCT CAACTGCACA GATCTGGATG TGGCCTTGGG CAGACCAATG 300

TGTGTGGGGA CCACACCTTC GGCAAAAGCT TCAATACTCC ACGAAGTCAG ACCTGTTACA 360

TCCGGGTGCT TTCCTATAAT GCACGACAGA ACAAAAATCA GACAGCTACC CAATCTTCTC 420

AGAGGATATG AAAATATCAG ATTATCAACC CAAAACGTTA TCAACGCAGA AAAGGCACCA 480

GGAGGACCCT ACAGACTTGG AACCTCAGGA TCTTGCCCTA ACGCTACCAG TAGAAGCGGA 540

TTTTTCGCAA CAATGGCTTG GGCTGTCCCA AGGGACAACA ACAAAACAGC AACGAATCCA 600

CTAACAGTAG AAGTACCATA CATTTGCACA AAAGGAGAAG ACCAAATTAC TGTTTGGGGG 660

TTCCATTCTG ATAACAAACC CCAAATGAAA AACCTCTATG GAGACTCAAA TCCTCAAAAG 720

TTCACCTCAT CTGCTAATGG AGTAACCACA CATTATGTTT CTCAGATTGG CGGCTTCCCA 780

GATCAAACAG AAGACGGAGG GCTACCACAA AGCGGCAGAA TTGTTGTTGA TTACATGGTG 840

CAAAAACCTG GGAAGACAGG AACAATTGTC TATCAGAGAG GTGTTTTGTT GCCTCAAAAG 900

GTGTGGTGCG CTAGTGGCAG GAGCAAAGTA ATAAAAGGGT CCTTGCCTTT AATTGGTGAA 960

GCAGATTGCC TTCACGAAAA ATACGGTGGA TTAAACAAAA GCAAGCCTTA CTACACAGGA 1020

GAACATGCAA AAGCCATAGG AAATTGCCCA ATATGGGTGA AAACACCTTT GAAGCTTGCC 1080

AATGGAACCA AATATAGACC TCCTGCAAAA CTATTAAAGG AAAGGGGTTT CTTCGGAGCT 1140

ATTGCTGGTT TCTTAGAAGG AGGATGGGAA GGAATGATTG CAGGTTGGCA CGGATACACA 1200

TCTCACGGAG CACATGGAGT GGCAGTGGCA GCAGACCTTA AGAGTACGCA AGAAGCCATA 1260

AACAAGATAA CAAAAAATCT CAATTCTTTG AGTGAGCTAG AAGTAAAGAA TCTTCAAAGG 1320

CTAAGTGGTG CCATGGATGA ACTCCACAAC GAAATACTCG AGCTGGATGA GAAAGTGGAT 1380

GATCTCAGAG CTGACACAAT AAGCTCGCAA ATAGAACTTG CAGTCTTGCT TTCCAACGAA 1440

GGAATAATAA ACAGTGAAGA TGAGCATCTA TTGGCACTTG AGAGAAAACT AAAGAAAATG 1500

CTGGGTCCCT CTGCTGTAGA CATAGGAAAT GGATGCTTCG AAACCAAACA CAAGTGCAAC 1560

CAGACCTGCT TAGACAGGAT AGCTGCTGGC ACCTTTAATG CGGGAGAATT TTCTCTTCCC 1620

ACTTTTGATT CACTGAATAT TACTGCTGCA TCTTTAAATG ATGATGGATT GGATAACCAT 1680

ACTATACTGC TCTACTACTC AACTGCTGCT TCTAGTTTGG CGGTAACATT GATGATAGCT 1740

ATTTTTATTG TTTATATGGT CTCCAGAGAC AATGTTTCTT GCTCCATCTG TCTGTGAGGA 1800

TCTTAATTAA TTAA 1814

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 592 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Shanhai/4/94 rHA
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: AcNPV 61K protein signal peptide
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: mature rHA
(B) LOCATION: 19 to 574
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

```
Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1               5                  10                  15
Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser
            20                  25                  30
Ser Asn Ser Pro His Val Val Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn
        35                  40                  45
Val Thr Gly Val Ile Pro Leu Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe
    50                  55                  60
Ala Asn Leu Lys Gly Thr Lys Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asn Cys
65                  70                  75                  80
Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val
                85                  90                  95
Gly Thr Thr Pro Ser Ala Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro
            100                 105                 110
Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg
        115                 120                 125
Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr
    130                 135                 140
Gln Asn Val Ile Asn Ala Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu
145                 150                 155                 160
Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro Asn Ala Thr Ser Arg Ser Gly Phe Phe
                165                 170                 175
Ala Thr Met Ala Trp Ala Val Pro Arg Asp Asn Asn Lys Thr Ala Thr
            180                 185                 190
Asn Pro Leu Thr Val Glu Val Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp
        195                 200                 205
Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe His Ser Asp Asn Lys Pro Gln Met Lys
    210                 215                 220
Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Val Thr Thr His Tyr Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln
                245                 250                 255
Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr
            260                 265                 270
Met Val Gln Lys Pro Gly Lys Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly
        275                 280                 285
Val Leu Leu Pro Gln Lys Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val
    290                 295                 300
Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu
305                 310                 315                 320
Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His
                325                 330                 335
Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys
            340                 345                 350
Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu
        355                 360                 365
Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu
    370                 375                 380
Gly Met Ile Ala Gly Trp His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly
385                 390                 395                 400
Val Ala Val Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys
                405                 410                 415
Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu
            420                 425                 430
Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu
        435                 440                 445
Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln
    450                 455                 460
Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu
465                 470                 475                 480
Asp Glu His Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly
                485                 490                 495
Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys
            500                 505                 510
Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala
        515                 520                 525
Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala
    530                 535                 540
Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr
545                 550                 555                 560
Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe
                565                 570                 575
Ile Val Tyr Met Val Ser Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
            580                 585                 590
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1802 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
- (A) ORGANISM: Influenza virus
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Harbin/7/94 rHA

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
- (B) LOCATION: 1 to 18

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for HA signal peptide sequence
- (B) LOCATION: 19 to 69

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: SmaI restriction site
- (B) LOCATION: 22 to 27

(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
(B) LOCATION: 70 to 1776
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: KpnI restriction site
(B) LOCATION: 1780 to 1785
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: BglII restriction site
(B) LOCATION: 1786 to 1791
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
(B) LOCATION: 1792 to 1802
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA 60

TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA 120

ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA 180

AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT 240

CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT 300

TCGGCAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA 360

ATGCACGACA GAACAAAAAT CAGACAGCTA CCCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC 420

AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAATGCA GAAAAAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT 480

GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGCTACC AGTAGAAGCG GATTTTTTGC AACAATGGCT 540

TGGGCTGTCC CAAGGGACGA CAACAAAACA GCAACGAATC CACTAACAGT AGAAGTACCA 600

TACGTTTGTA CAGAAGGAGA AGACCAAATT ACTGTTTGGG GGTTCCATTC TGATAACAAA 660

GCCCAAATGA AAAACCTCTA TGGAGACTCA AATCCTCAAA AGTTCACCTC ATCTGCTAAT 720

GGAGTAACCA CACATTATGT TTCTCAGATT GGCGGCTTCC CAGATCAAAC AGAAGACGGA 780

GGGCTACCAC AAAGCGGCAG AATTGTTGTT GATTACATGG TGCAAAAACC TGGGAAAACA 840

GGAACAATTG TCTATCAAAG AGGTGTTTTG TTGCCTCAAA AGGTGTGGTG CGCGAGTGGC 900

AGGAGCAAAG TAATAAAAGG GTCCTTGCCT TTAATTGGTG AAGCAGATTG CCTTCACGAA 960

AAATACGGTG GATTAAACAA AAGCAAGCCT TACTACACAG GAGAACATGC AAAAGCCATA 1020

GGAAATTGCC CAATATGGGT GAAAACACCT TTGAAGCTTG CCAATGGAAC CAAATATAGA 1080

CCTCCTGCAA AACTATTAAA GGAAAGGGGT TTCTTCGGAG CTATTGCTGG TTTCTTAGAA 1140

GGAGGATGGG AAGGAATGAT TGCAGGTTGG CACGGATACA CATCTCACGG AGCACATGGA 1200

GTGGCAGTGG CAGCAGACCT TAAGAGTACG CAAGAAGCCA TAAACAAGAT AACAAAAAAT 1260

CTCAATTCTT TGAGTGAGCT AGAAGTAAAG AATCTTCAAA GACTAAGTGG TGCCATGGAT 1320

GAACTCCATA ACGAAATACT CGAGCTGGAT GAGAAAGTGG ATGATCTCAG AGCTGACACT 1380

ATAAGCTCGC AAATAGAACT TGCAGTCTTG CTTTCCAACG AAGGAATAAT AAACAGTGAA 1440

GATGAGCATC TATTGGCACT TGAGAGAAAA CTAAAGAAAA TGCTGGGTCC CTCTGCTGTA 1500

GACATAGGGA ATGGATGCTT CGAAACCAAA CACAAGTGCA ACCAGACCTG CTTAGACAGG 1560

ATAGCTGCTG GCACCTTTAA TGCAGGAGAA TTTTCTCTCC CCACTTTTGA TTCACTGAAT 1620

ATTACTGCTG CATCTTTAAA TGATGATGGA TTGGATAATC ATACTATACT GCTCTACTAC 1680

TCAACTGCTG CTTCTAGTTT GGCTGTAACA TTGATGATAG CTATTTTTAT TGTTTATATG 1740

GTCTCCAGAG ACAATGTTTC ATGCTCCATC TGTCTGTGAG GTACCAGATC TTAATTAATT 1800

AA 1802

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 586 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: B/Harbin/7/94 rHA

(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: HA signal peptide
(B) LOCATION: 1 to 17

(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: mature rHA
(B) LOCATION: 18 to 569

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

```
Met Pro Gly Lys Ala Ile Ile Val Leu Leu Met Val Val Thr Ser Asn
1               5                  10                  15
Ala Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val
            20                  25                  30
Val Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro
        35                  40                  45
Leu Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr
    50                  55                  60
Lys Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Asn Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu
65                  70                  75                  80
Asp Val Ala Leu Gly Arg Pro Met Cys Val Gly Thr Thr Pro Ser Ala
                85                  90                  95
Lys Ala Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe
            100                 105                 110
Pro Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu
        115                 120                 125
Arg Gly Tyr Glu Asn Ile Arg Leu Ser Thr Gln Asn Val Ile Asn Ala
    130                 135                 140
Glu Lys Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Arg Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys
145                 150                 155                 160
Pro Asn Ala Thr Ser Arg Ser Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala
                165                 170                 175
Val Pro Arg Asp Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu
            180                 185                 190
Val Pro Tyr Val Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly
        195                 200                 205
Phe His Ser Asp Asn Lys Ala Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser
    210                 215                 220
Asn Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr
225                 230                 235                 240
Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asp Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu
                245                 250                 255
Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly
            260                 265                 270
Lys Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys
        275                 280                 285
Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro
    290                 295                 300
```

```
Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn
305                 310                 315                 320
Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn
                325                 330                 335
Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys
            340                 345                 350
Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala
        355                 360                 365
Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp
    370                 375                 380
His Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp
385                 390                 395                 400
Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn
                405                 410                 415
Ser Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala
            420                 425                 430
Met Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp
        435                 440                 445
Asp Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu
    450                 455                 460
Leu Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala
465                 470                 475                 480
Leu Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile
                485                 490                 495
Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu
            500                 505                 510
Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro
        515                 520                 525
Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly
    530                 535                 540
Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser
545                 550                 555                 560
Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser
                565                 570                 575
Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
            580                 585
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1757 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
- (A) ORGANISM: Influenza virus
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Johannesburg/33/94 rHA

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: polyhedrin mRNA leader (partial)
- (B) LOCATION: 1 to 18

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for AcNPV 61K protein signal peptide
- (B) LOCATION: 19 to 72

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: SmaI restriction site
- (B) LOCATION: 76 to 81

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: coding region for mature rHA
- (B) LOCATION: 73 to 1731

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: KpnI restriction site
- (B) LOCATION: 1735 to 1740

(ix) FEATURE
- (A) NAME/KEY: BglII restriction site

(B) LOCATION: 1741 to 1747
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: unversal translation termination signal
(B) LOCATION: 1747 to 1757
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60

GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAGGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG 120

TGCCTGGGAC ACCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA 180

ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGCTGGTT CAGAGTTCCC CAACAGGTAG AATATGCGAC 240

AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAGAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC 300

CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT 360

TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC 420

TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAACGAA AACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT 480

GGGAAAAGCT ATGCTTGCAA AAGGGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG 540

TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA 600

TTTGACAAAT TGTACATTTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC 660

CTATATGTCC GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACTGTA 720

ATCCCGGATA TCGGGTATAG ACCATGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AGGCATCTAT 780

TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTAATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT 840

CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC 900

ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT 960

TTTCAAAATG TAAACAGGAT CACATATGGG GCCTGCCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT 1020

CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AAACTAGAGG CATATTCGGC 1080

GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC 1140

AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCTGCAGATC TTAAAAGCAC TCAAGCAGCA 1200

ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAGTCGAGA AAACGAACGA GAAATTCCAT 1260

CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT 1320

GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AATGCGGAGC TTCTTGTTGC TCTGGAGAAC 1380

CAACATACAA TTGATCTAAC TGACTCAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAAG AACAAGGAAG 1440

CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGTT TCAAAATATA CCACAAATGT 1500

GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGAACTTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC 1560

GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT 1620

TGGATTCTAT GGATTTCCTT TGCCATATCA TGCTTTTTGC TTTGTGTTGT TTTGCTTGGG 1680

TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC 1740

AGATCTTAAT TAATTAA 1757

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 571 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Influenza virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: A/Johannesburg/33/94 rHA
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: AcNPV 61K protein signal sequence
(B) LOCATION: 1 to 18
(ix) FEATURE
(A) NAME/KEY: mature rHA
(B) LOCATION: 19 to 569
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

```
Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1               5                  10                  15
Asn Ala Ile Pro Gly Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala
            20                  25                  30
Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys
        35                  40                  45
Thr Ile Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val
    50                  55                  60
Gln Ser Ser Pro Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu
65                  70                  75                  80
Asp Gly Lys Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His
                85                  90                  95
Cys Asp Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser
            100                 105                 110
Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
        115                 120                 125
Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu
    130                 135                 140
Asn Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Lys Ser Tyr Ala Cys
145                 150                 155                 160
Lys Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His
                165                 170                 175
Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn
            180                 185                 190
Gly Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr
        195                 200                 205
Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr
    210                 215                 220
Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asp Ile Gly Tyr
225                 230                 235                 240
Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Gly Ile Tyr Trp Thr
                245                 250                 255
Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu
            260                 265                 270
Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile
        275                 280                 285
Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Asn Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr
    290                 295                 300
Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg
305                 310                 315                 320
Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
                325                 330                 335
Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile
            340                 345                 350
Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val
        355                 360                 365
```

```
Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
    370                 375                 380
Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
385                 390                 395                 400
Lys Leu Asn Arg Leu Val Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile
                405                 410                 415
Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys
            420                 425                 430
Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu
        435                 440                 445
Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu
    450                 455                 460
Met Asn Lys Leu Phe Glu Arg Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala
465                 470                 475                 480
Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn
                485                 490                 495
Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr
            500                 505                 510
Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu
        515                 520                 525
Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser
    530                 535                 540
Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys
545                 550                 555                 560
Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
                565                 570
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 bases

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

```
TGGTTGGTCG CCGTTTCTAA CGCGATTCCC GGGGGTACC                          39
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

```
Trp Leu Val Ala Val Ser Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr
1               5                   10
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 43 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

```
TGGTTAGTCG CCGTGTCCTG CAGGCCAGAG AGGCCTTGGT ACC                     43
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

GTCGCCGTGT CCAACGCG 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

TAATTGGCCA GAGAGGCC 18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 39 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

GGGGGATCCG GTACCAGCAA AAGCAGGGGA TAATTCTAT 39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 38 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

GGGGGTACCC CCGGGGACTT TCCAGGAAAT GACAACAG 38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 44 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

CCCGGTACCG AATCATCCTA GAAACAAGGG TGTTTTTAAT TAAT 44

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 47 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

GGGGAATTCG GTACCCCCGG GAAGGCAATA ATTGTACTAC TCATGGT 47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 36 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

GGTACCCCCG GGGATCGAAT CTGCACTGGG ATAACA 36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 50 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

GGGGAATTCG GATCCGGTAC CTCACAGACA GATGGARCAA GAAACATTGT 50

Patenttivaatimukset

1. Yhdistelmäinfluenssa-HA0-hemagglutiniiniproteiini ilmennettynä bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmässä viljellyissä hyönteissoluissa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, joka edelleen käsittää bakuloviruksen signaalipeptidin kytkettynä suoraan HA0-proteiiniin ilman väliaminohappoja.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, joka edelleen käsittää farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan rokotteena antamiseksi.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, joka edelleen käsittää apuaineen ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan annettavaksi rokotteena.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen proteiini, jossa farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja on polymeerinen kuljetusjärjestelmä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, jossa influenssa on valittu ryhmästä, johon kuuluvat influenssa A -kannat ja influenssa B -kannat.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen proteiini, jossa influenssa infektoi ihmisen.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, joka edelleen käsittää toisen proteiinin, joka on fuusioitunut hemagglutiniiniin.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen proteiini valittuna ryhmästä, johon kuuluvat hepatiitti B:n virusproteiinit, HIV-proteiinit, syöpäalkioantigeeni ja neuraminidaasi.

10. Vektori yhdistelmä-influenssa-HA0-hemagglutiniiniproteiinin valmistamiseksi, joka käsittää seuraavat 5'->3'-sekvenssit: polyhedriinipromottori bakuloviruksesta, ATG-translaation aloituskodoni, signaalipeptidi, koodaava sekvenssi

venssi valmiille hemagglutiniinille influenssakannasta, translaation lopetuskodoni ja polyhedriinin RNA:n polyadenylaatiosignaali.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, jossa signaalipeptidi on bakulovirusproteiini, jonka molekyylipaino on noin 61K ja aminohapposekvenssi esitetty ensimmäisessä 18 aminohapossa Sekvenssilistauksen ID nro 7:ssä.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, jossa signaalipeptidi on influenssahemagglutiniiniproteiinipromoottori.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, jossa signaalipeptidiä ja hemagglutiniinia koodaava sekvenssi ei koodaa mitään väli-aminohappoja.

14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, joka edelleen käsittää sekvenssin, joka koodaa toista proteiinia, joka ilmentyy fuusioproteiinina hemagglutiniinin kanssa.

15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori transfektoituna viljeltyihin hyönteissoluihin.

16. Menetelmä yhdistelmäinfluenssahemagglutiniiniproteiinin valmistamiseksi, joka käsittää viljeltyjen hyönteissolujen infektoimisen vektorilla, joka sisältää seuraavat 5'->3' sekvenssit: polyhedriinipromottori bakuloviruksesta, ATG-translaation aloituskodoni, signaalipeptidi, koodaava sekvenssi valmiille hemagglutiniinille influenssakannasta, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat influenssa A -kannat ja influenssa B -kannat, translaation lopetuskodoni ja polyhedriinin RNA:n polyadenylaatiosignaali, ja solujen viljelemisen ravinnekasvualustassa.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, joka edelleen käsittää HA0-influenssahemagglutiniiniproteiinin eristämisen soluista puhtausasteeseen ainakin 95 %.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, jossa proteiini eristetään erottamalla hemagglutiniini ei-membraanipro-

teiineista emäksisessä pH:ssa, pesemällä membraaniin sitoutuneet proteiinit hemagglutiniinin eluoimiseksi, erottamalla hemagglutiniini muista proteiineista sitomalla anioninvaihtohartsiin vaihtamalla pH:ta, ja erottamalla hemagglutiniini muista proteiineista sitomalla kationinvaihtohartsiin suolapitoisuudessa tapahtuvan muutoksen avulla.

19. Menetelmä vektorin valmistamiseksi, joka sisältää seuraavat 5'->3'-sekvenssit: polyhedriinipromottori bakuloviruksesta, ATG-translaation aloituskodoni, signaalipeptidi, koodaava sekvenssi valmiille hemagglutiniinille influenssakannasta, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat influenssa A -kannat ja influenssa B -kannat, translaation lopetuskodoni ja polyhedriinin RNA:n polyadenylaatiosignaali, joka menetelmä käsittää sen, että

korjataan virus solukasvualustasta ja eristetään joko virus-RNA influenssa A -kantojen tapauksessa, tai mRNA influenssa B -kantojen tapauksessa;

syntetisoidaan cDNA käyttäen joko universaalia aluketta (5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO.1)) influenssa A -kannoista saadulle virus-RNA:lle tai satunnaisalukkeita influenssa B -kannoista saadulle mRNA:lle, jolloin 5'- ja 3'-alukkeilla on restriktioentsyymikohdat päissä, joita ei löydy hemagglutiniinigeeneistä;

monistetaan influenssa A- tai B -alukkeet ja influenssan cDNA sekoitettuna hemagglutiniinigeenisegmenttien kanssa tuottamaan kaksoiskierteisiä DNA-fragmentteja, jotka sisältävät koko valmista hemagglutiniinia koodaavat sekvenssit;

identifioidaan hemagglutiniinigeenien signaalipeptidi ja monistetaan hemagglutiniinigeenit miinus signaalipeptidi; ja

kloonataan hemagglutiniinigeenit miinus signaalipeptidi vektoriin, joka sisältää AcNPV-polyhedriinipromoottorin.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, jossa hemagglutiniinigeenit on kloonattu vektoriin käyttäen PCR:ää niin,

että vektori koodaa signaalipeptidiä kytkettynä suoraan hemagglutiniinin ilman väliaminohappoja.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, joka edelleen käsittää vektorin transfektoimisen hyönteissoluihin ja solujen valikoimisen hemagglutiniinin ilmentämiseen.

22. Menetelmä eläimen rokottamiseksi influenssaa vastaan, jossa annetaan eläimelle riittävä määrä yhdistelmäinfluenssa-HA0-hemagglutiniiniproteiinia, joka on ilmentynyt bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmässä viljellyissä hyönteissoluissa.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, joka edelleen käsittää sen, että proteiini annetaan polymeerisessä kuljetusjärjestelmässä.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa influenssa on valittu ryhmästä, johon kuuluvat influenssa A -kannat ja influenssa B -kannat.

25. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa eläin on valittu ryhmästä, johon kuuluvat nisäkäs- ja lintulajit.

26. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, jossa eläin on ihminen.

27. Polypeptidi, jossa on bakuloviruksen signaalipeptidi, jossa on SEQ ID NO. 7 tai 9 aminohapot 1-18 operatiivisesti liitettynä heterologiseen aminohapposekvenssiin.

28. Eristetty nukleiinihappo, joka koodaa patenttivaatimuksen 27 mukaista polypeptidiä.

29. Vektori, jossa on patenttivaatimuksen 28 mukainen nukleiinihappo.

30. Menetelmä eksogeenisen proteiinin ilmentämiseksi, jossa menetelmässä käytetään vektorina bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmässä patenttivaatimuksen 29 mukaista vektoria.

31. Eristetty nukleiinihappo, jossa on SEQ ID NO. 6 tai 8 nukleotidit 21-74 ja joka koodaa bakuloviruksen signaalipeptidiä, joka on operatiivisesti liitetty heterologiseen koodaussekvenssiin.

32. Vektori, jossa on patenttivaatimuksen 31 mukainen nukleiinihappo.

33. Menetelmä eksogeenisen proteiinin ilmentämiseksi, jossa menetelmässä käytetään vektorina bakuloviruksen ilmentymisjärjestelmässä patenttivaatimuksen 32 mukaista vektoria.

34. Patenttivaatimuksen 29 tai 32 mukainen vektori, jossa heterologinen sekvenssi on influenssahemagglutiniinisekvenssi.

35. Hyönteissolu, joka on transfektoitu jonkin patenttivaatimuksista 29, 32 tai 34 mukaisella vektorilla.

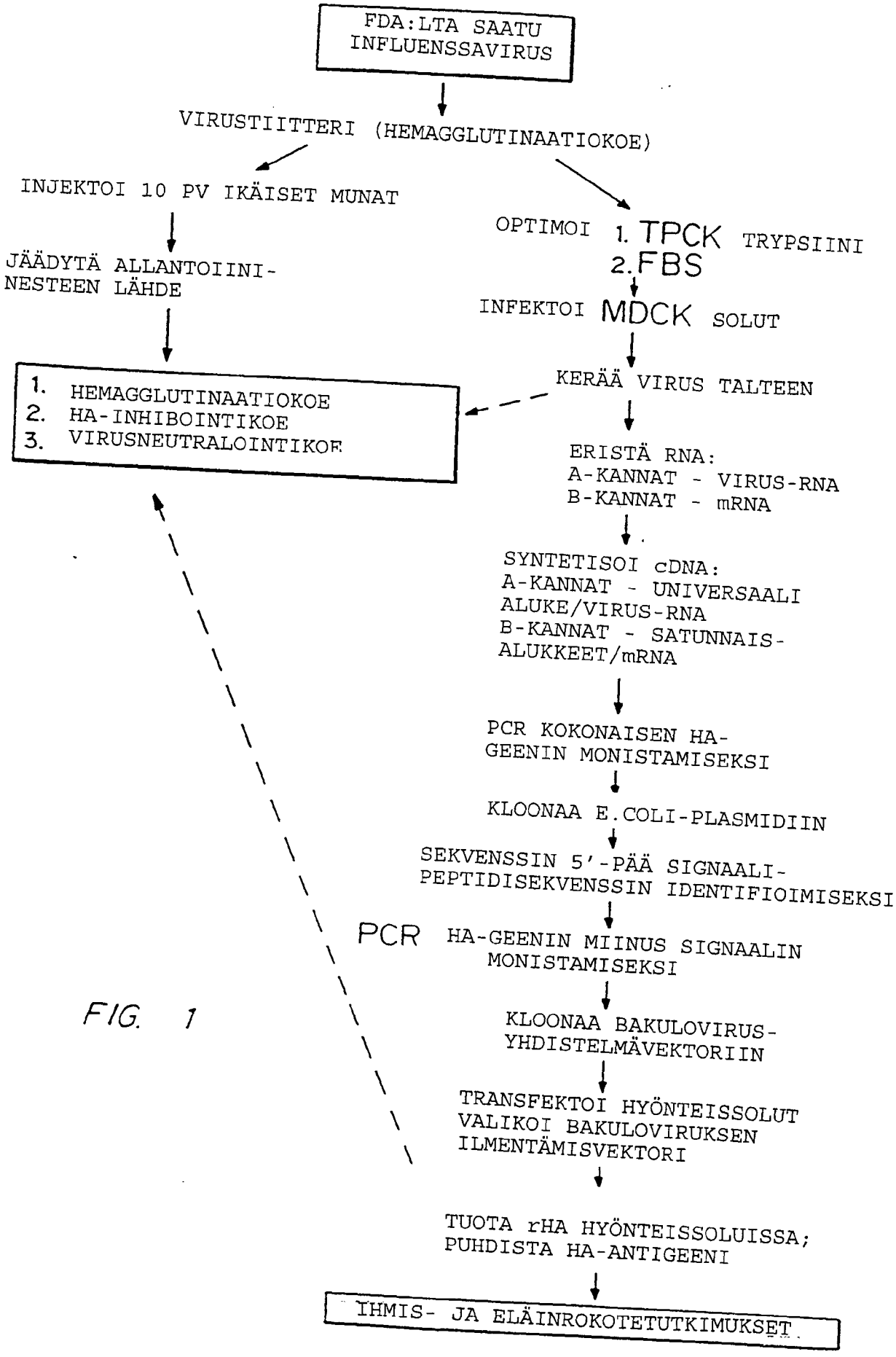
FDA:LTA SAATU INFLUENSSAVIRUS
VIRUSTIITTERI (HEMAGGLUTINAATIOKOE)
INJEKTOI 10 PV IKÄISET MUNAT
JÄÄDYTÄ ALLANTOIINI-NESTEEN LÄHDE
OPTIMOI 1. TPCK TRYPSIINI 2. FBS
INFEKTOI MDCK SOLUT
KERÄÄ VIRUS TALTEEN
1. HEMAGGLUTINAATIOKOE
2. HA-INHIBOINTIKOE
3. VIRUSNEUTRALOINTIKOE
ERISTÄ RNA:
A-KANNAT - VIRUS-RNA
B-KANNAT - mRNA
SYNTETISOI cDNA:
A-KANNAT - UNIVERSAALI ALUKE/VIRUS-RNA
B-KANNAT - SATUNNAIS-ALUKKEET/mRNA
PCR KOKONAISEN HA-GEENIN MONISTAMISEKSI
KLOONAA E.COLI-PLASMIDIIN
SEKVENSSIN 5'-PÄÄ SIGNAALI-PEPTIDISEKVENSSIN IDENTIFIOIMISEKSI
PCR HA-GEENIN MIINUS SIGNAALIN MONISTAMISEKSI
KLOONAA BAKULOVIRUS-YHDISTELMÄVEKTORIIN
TRANSFEKTOI HYÖNTEISSOLUT
VALIKOI BAKULOVIRUKSEN ILMENTÄMISVEKTORI
TUOTA rHA HYÖNTEISSOLUISSA;
PUHDISTA HA-ANTIGEENI
IHMIS- JA ELÄINROKOTETUTKIMUKSET

FIG. 1

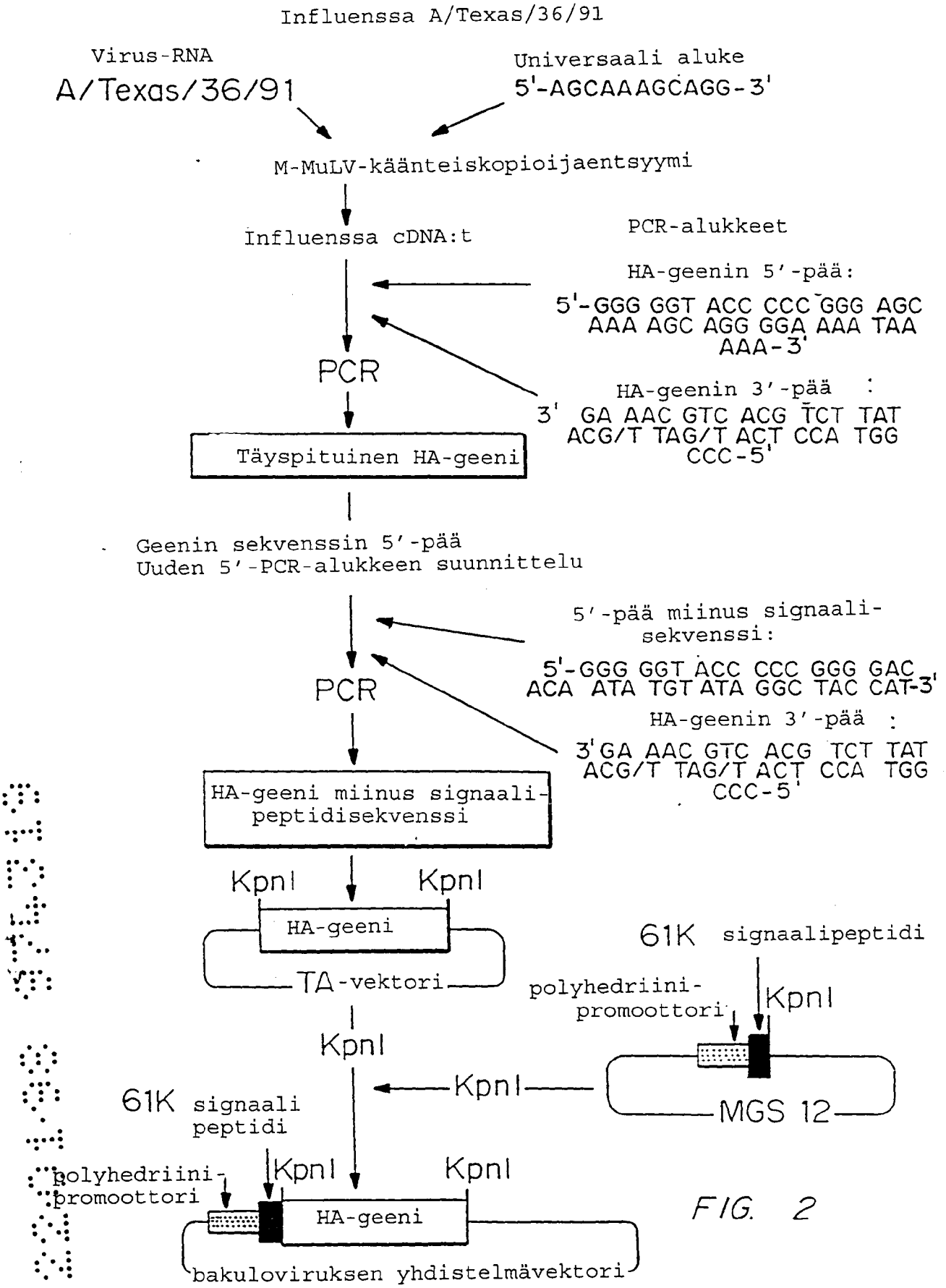
Influenssa A/Texas/36/91
Virus-RNA
A/Texas/36/91
Universaali aluke
5'-AGCAAAGCAGG-3'
M-MuLV-käänteiskopioijaentsyymi
Influenssa cDNA:t
PCR-alukkeet
HA-geenin 5'-pää:
5'-GGG GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA-3'
PCR
HA-geenin 3'-pää :
3' GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-5'
Täyspituinen HA-geeni
Geenin sekvenssin 5'-pää
Uuden 5'-PCR-alukkeen suunnittelu
5'-pää miinus signaali-sekvenssi:
5'-GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT-3'
PCR
HA-geenin 3'-pää :
3'GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-5'
HA-geeni miinus signaali-peptidisekvenssi
KpnI
KpnI
HA-geeni
TA-vektori
61K signaalipeptidi
polyhedriini-promoottori
KpnI
KpnI
MGS 12
KpnI
61K signaali peptidi
polyhedriini-promoottori
KpnI
KpnI
HA-geeni
bakuloviruksen yhdistelmävektori

FIG. 2

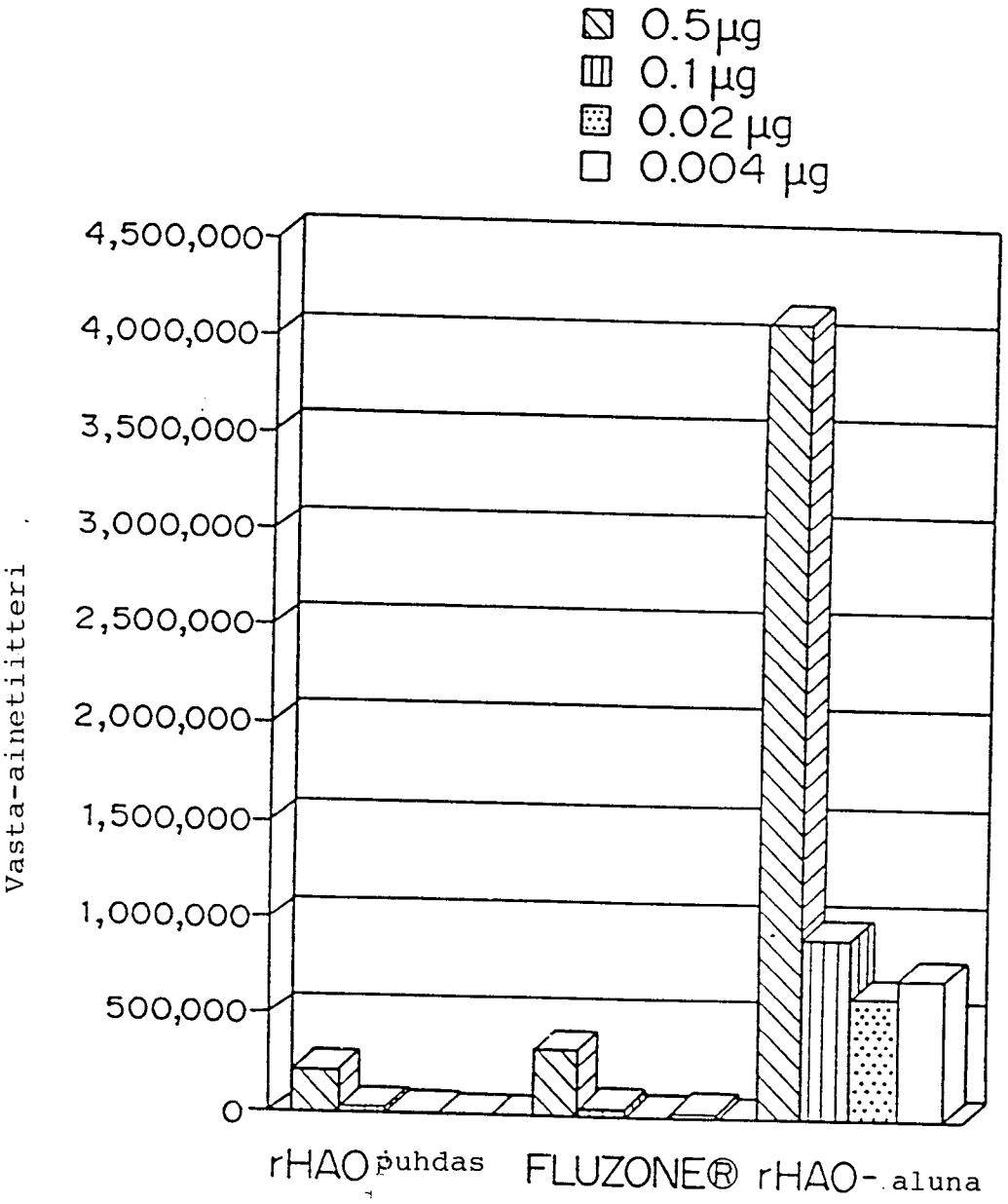
0.5µg
0.1µg
0.02µg
0.004µg
4,500,000
4,000,000
3,500,000
3,000,000
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
Vasta-ainetiitteri
rHAO puhdas
FLUZONE® rHAO-aluna

FIG. 3

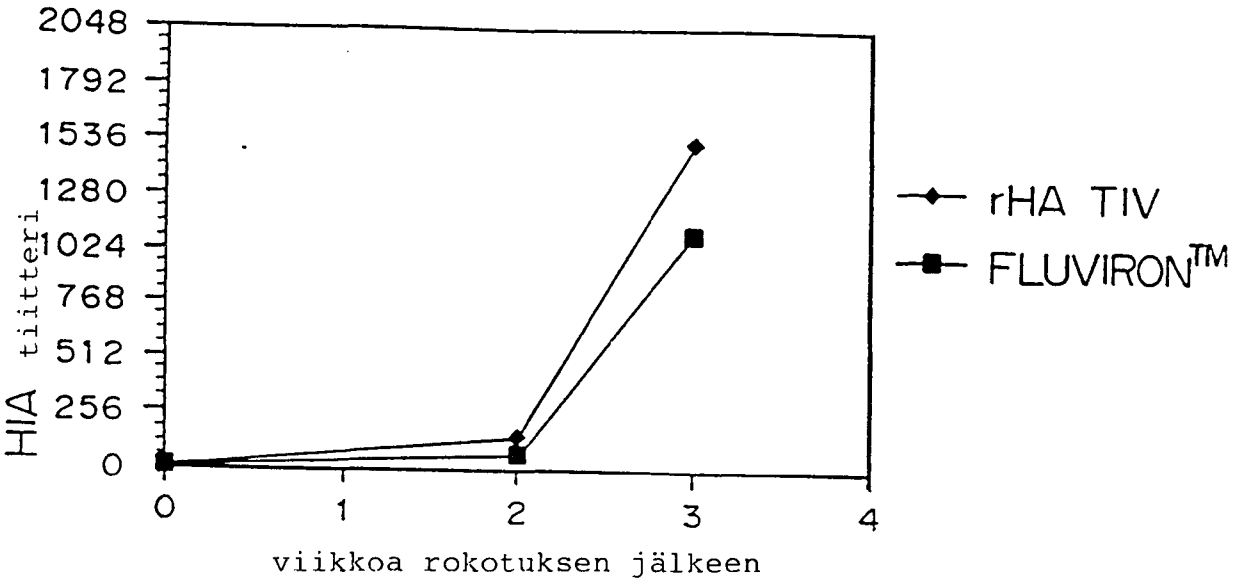
2048
1792
1536
1280
1024
768
512
256
0
HIA tiitteri
0
1
2
3
4
viikkoa rokotuksen jälkeen
rHA TIV
FLUVIRON™

FIG. 4a

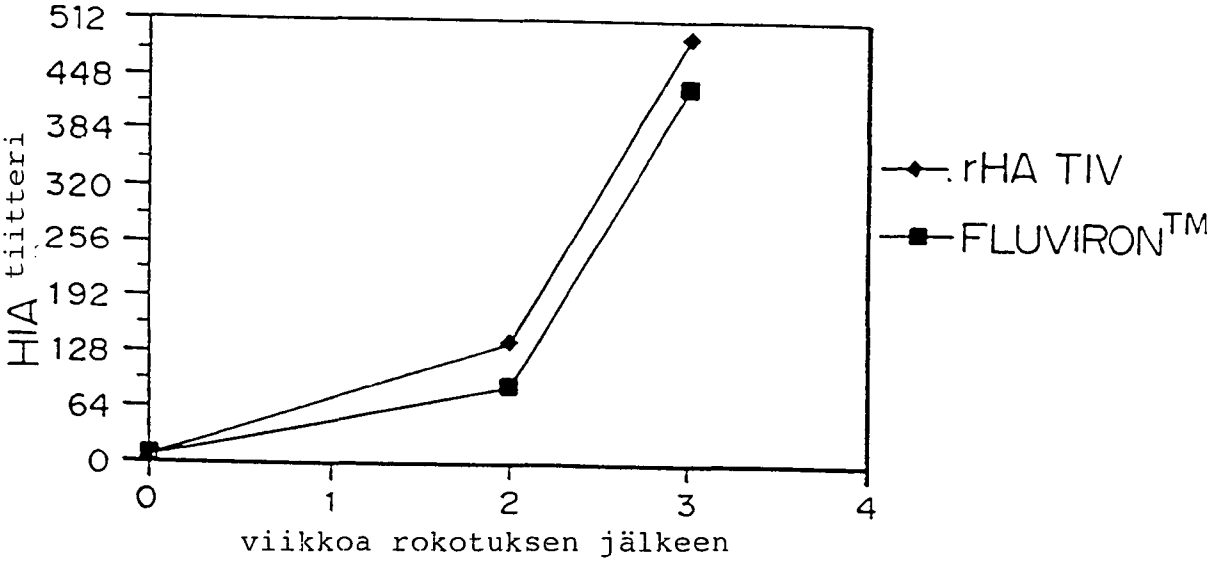
512
448
384
320
256
192
128
64
0
HIA tiitteri
0
1
2
3
4
viikkoa rokotuksen jälkeen
rHA TIV
FLUVIRON™

FIG. 4b

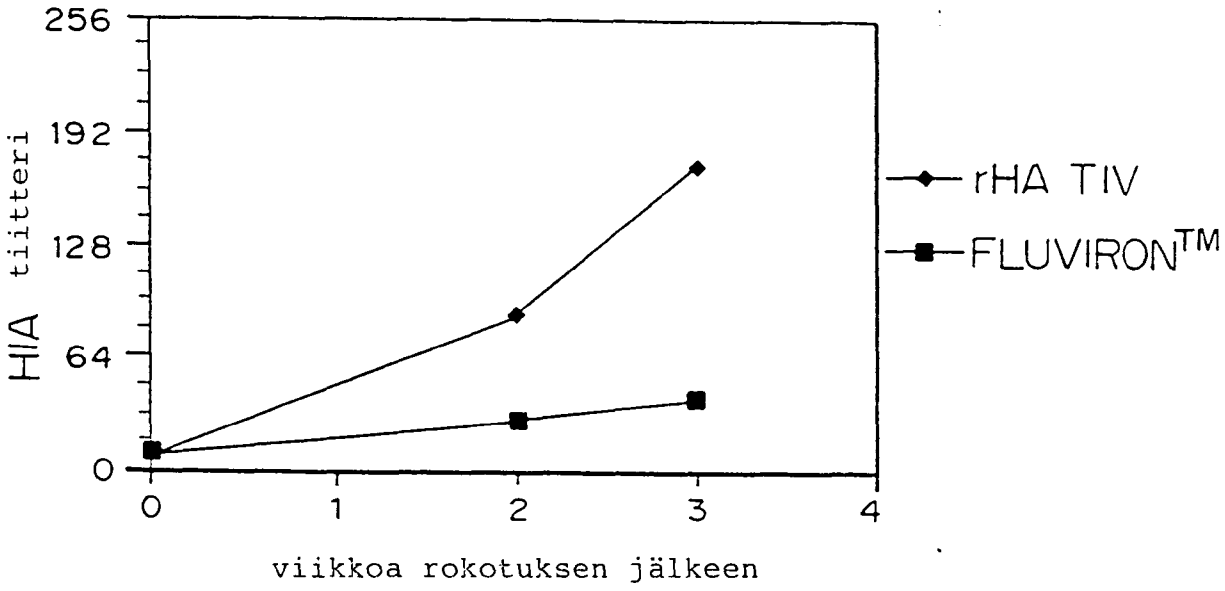
256
192
128
64
0
HIA tiitteri
0
1
2
3
4
viikkoa rokotuksen jälkeen
rHA TIV
FLUVIRON™

FIG. 4c