(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0046968
(43) 공개일자 2018년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/145* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0142093
(22) 출원일자 2016년10월28일
심사청구일자 2016년10월28일

(71) 출원인
성신여자대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 보문로34다길 2 (동선동3가, 성신여자대학교)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
(72) 발명자
송재민
서울 서초구 서초중앙로29길 28
신옥
서울 마포구 마포대로 33 한화오벨리스크아파트 2106호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
주한중, 남준욱

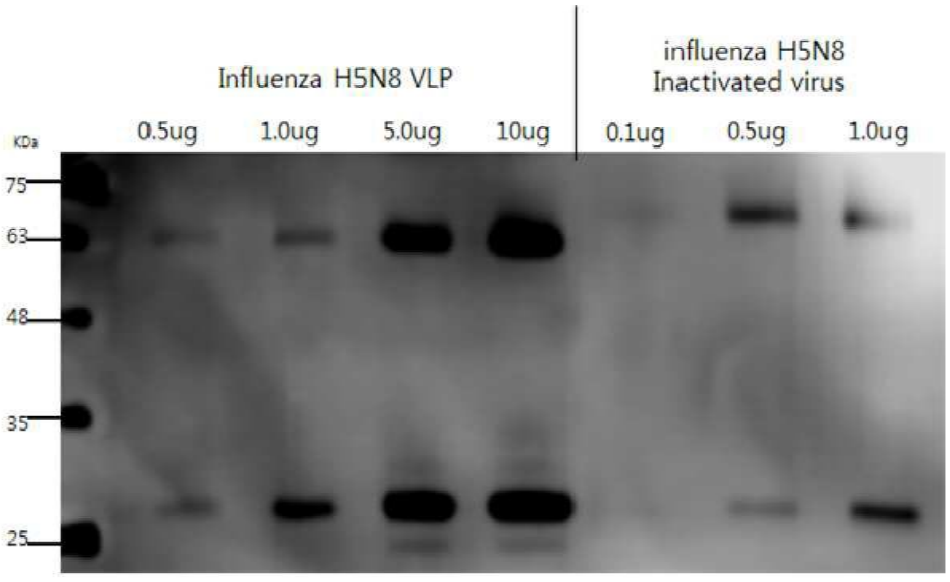
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **H5 조류 인플루엔자 바이러스 유사입자 백신 및 그 제조방법**

(57) 요 약

H5N8으로부터 유래한 헤마글루티닌(HA) 단백질 및 뉴라미니다제(NA) 단백질를 포함하고, H1N1으로부터 유래한 M1 단백질을 포함하는 바이러스 유사 입자 백신이 개시된다. 상기 바이러스 유사 입자 백신은 근육 주사 뿐만이 아니라 호흡주사를 통해서도 면역반응을 유도할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2760/16123 (2013.01)
C12N 2760/16134 (2013.01)
C12N 2760/16151 (2013.01)

(72) 발명자
김철중
대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320 6동 102호 (원촌동,싸이언스빌)
최영기
충청북도 청주시 서원구 탑골로 6 108동 706호 (산남동,현진에버빌)
박영찬
경기도 의정부시 신촌로53번길 20-23 E동 202호 (가능동,제14차승원아트빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 H10C2146
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 신종인플루엔자 범 부처 사업단
연구과제명 H5N8 인플루엔자 백신 개발을 위한 기초 및 기반 연구 자료확보
기 여 율 4/10
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.06.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A2073197
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업
연구과제명 체적변동측정장치 기반 비주사형 백신전달 원천기술개발
기 여 율 3/10
주관기관 성신여자대학교
연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A1062435
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 면역조절분자를 발현하는 바이러스 유사입자 기반 백신 플랫폼 개발
기 여 율 3/10
주관기관 성신여자대학교
연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

H5N8 바이러스로부터 유래한 헤마글루티닌(HA) 단백질과 뉴라미니다제(NA) 단백질; 및

H1N1 바이러스로부터 유래한 M1 단백질;

을 포함하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 H5 바이러스 유사입자(VLP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 H5N8 바이러스는 A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8)인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 H5 바이러스 유사입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 H1N1 바이러스는 A/Puerto Rico/8-V24/1934(H1N1)인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 H5 바이러스 유사입자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 헤마클루티닌(HA) 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 정의되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 H5 바이러스 유사입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 뉴라미니다제(NA) 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 정의되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 H5 바이러스 유사입자.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 M1 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 정의되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 H5 바이러스 유사입자.

청구항 7

제1항에 따른 바이러스 유사 입자를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 따른 백신 조성물을 조류에 투여하는 단계를 포함하는 조류 인플루엔자 예방 방법.

청구항 9

H5N8 바이러스로부터 유래한 헤마글루티닌(HA) 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

H5N8 바이러스로부터 유래한 뉴라미니다제(NA) 단백질을 발현하는 Bacmid에 상기 재조합 플라스미드를 트랜스포존시키는 단계;

상기 재조합 Bacmid를 곤충세포에 트랜스펙션시키는 단계;

상기 곤충세포로부터 재조합 바큘로바이러스를 수득하는 단계;

상기 재조합 바큘로바이러스 및 H1N1 바이러스에서 유래한 M1 단백질을 발현하는 바큘로바이러스를 곤충세포에 인펙션시키는 단계; 및

상기 곤충세포에서 상기 헤마글루티닌(HA) 단백질, 상기 뉴라미니다제(NA) 단백질 및 상기 M1 단백질이 파티클을 이루어 외피를 형성한 바이러스 유사 입자를 분리하는 단계;

를 포함하는 바이러스 유사 입자의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 H5 조류 인플루엔자 바이러스 유사입자 백신 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 Orthomyxoviridae에 속하며, A형, B형, C형으로 구별된다. 그리고, 8개의 음성 단일가닥 RNA를 genome으로 갖는 바이러스로서, 상기 8개의 RNA 절편으로부터 헤마글루티닌 (Hemagglutinin, HA), 뉴라미니다제 (Neuraminidase, NA),뉴클레오캡시드 단백질 (Nucleoprotein, NP), 매트릭스 단백질 1 및 2 (Matrix, M1, M2), 중합효소 단위체 A, B1 및 B2 (Polymerase subunit A, B1 & B2; 각각 PA, PB1, PB2), 및 비구조 단백질 1 및 2 (Nonstructural protein 1 & 2; 각각 NS1, NS2)가 만들어진다.

[0003] 인플루엔자 A 바이러스 아형(subtype) H5N8(Influenza A virus subtype H5N8)은 인플루엔자 A의 아형으로, 1983년 아일랜드에서 활력이 저하되고 고열과 설사를 동반한 칠면조에서 시작이 되어 폐사한 가금류(칠면조, 닭, 오리)에서 최초로 보고되었다. 이후 27년간 발생보고가 없다가 2010년 중국에서 닭과 거위에서 조류인플루엔자 감염여부를 조사하던 중 생닭 시장의 닭 한 마리에서 H5N8형이 검출되었다. 야외에서 확인된 증상을 놓고 보았을 때 오리를 포함한 가금류에서 병원성이 높은 것으로 알려져 있다. H5N8형의 경우 과거에 발생했던 H5N1형과 혈청형은 다르지만 조류나 가금류에서 감염증상과 병원성은 H5N1형과 크게 다르지 않은 것으로 알려져 있다.

[0004] H1N1 인플루엔자 바이러스는 2009년 봄에 인체에서 처음 발견되 새로운 유형의 인플루엔자 A형 바이러스이며, 2009년 H1N1 인플루엔자의 유전자 특성 가운데 HA는 미국에서 1999년에 돼지 인플루엔자로부터 분리해낸 것과 동일하다. 그러나 NA와 M은 유럽에서 조류 인플루엔자로부터 분리한 것과 유사하다. 돼지 인플루엔자, 조류 인플루엔자, 인간 인플루엔자에 있던 여섯 종의 유전자가 아메리카 돼지 인플루엔자에서 섞인 것이다. 이러한 유전자 혼합은 돼지에서 인간으로 전염되기 전까지 발견되지 않았다. 이러한 전파경로는 이전의 미국 내 돼지 사이의 인플루엔자 전염에 비추어 볼 때 이례적인 것이었다. 따라서 H1N1 인플루엔자에 대해 인류 대부분은 겪어본 바가 없기 때문에 감수성이 높아 대유행이 충분히 예상되었다.

[0005] 일반적으로 사용되는 백신제형인 약독화된 생백신이나 불활화 백신들 같은 경우 효과는 있지만 약독화되거나 불활화된 바이러스가 독성을 되찾는 등 안전성에 문제가 발생하고 있다. 또한 약독화 과정 중 여러 번 계대 배양을 해야 되기 때문에 시간이 장시간 소요되기도 한다. 따라서 이를 대체하기 위해 나온 백신 제형이 서브유닛 백신(subunit vaccine) 또는 재조합 단백질 백신이다. 서브유닛 백신은 병원체 전체를 접종하는 것이 아니라. 병원체의 항원 부분 만을 병원체에서 분리하여 병원체의 감염력을 중화 시킬 수 있는 면역반응을 유도하도록 만들어졌으며, 재조합 단백질 백신은 항원을 대장균, 동물세포 등을 이용하여 재조합 단백질로 발현한 후 백신으로 사용하는 것 이다. 서브유닛 백신 또는 재조합 단백질 백신은 병원체 전체가 아닌 항원 부위만을 접종하기 때문에 생백신이나 불활화 백신보다는 안전성은 우수하지만 이들에 비해서 효율이 떨어지는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 여러 번 접종을 하거나 면역보조제 등을 섞어서 넣어주기도 한다.

[0006] 바이러스 유사 입자(Virus Like Particle)이란, 바이러스와 유사한 형태를 띠고 있는 재조합 단백질을 의미한다. 바이러스 유사 입자는 바이러스 구조 단백질들의 결합을 통하여 실제 바이러스와 유사한 형태로 조립이 되지만 조립과정에서 바이러스의 유전자는 바이러스 유사 입자내부로 포함되지 않는다. 바이러스 유사 입자는 실제 바이러스와 매우 유사한 형태를 띄고 있어 체내 주입 시 높은 면역원성을 보이면서도 바이러스의 유전자를 포함하고 있지 않으므로 체내에서 증식이 불가능한 안전한 항원으로 작용하는 장점이 있다. 즉, 바이러스의 구조 단백질로만 이루어져 있기 때문에 구조적으로는 바이러스와 유사하나 유전자가 없기 때문에 세포 내에서 증식이나 복제를 할 수 없는 입자이다. 이 경우 바이러스가 가지는 독성 단백질만을 넣어준 것보다 더 좋은 면역반응을 유도하며 병원체에 대해서 우수한 방어기작을 나타내며 여러 번 접종해야 하는 서브유닛 백신에 비해 한번 접종하는 것만으로도 병원체에 대한 방어기작을 나타내며 우수한 면역활성을 나타낸다. 이러한 장점을 바탕으로 바이러스 유사 입자를 사용한 다양한 병원체에 대한 백신 개발이 매우 활발하게 이루어지고 있으며, 일부 바이러스 유사 입자 백신은 상용화까지 이루어졌다.

[0007] 바이러스 유사 입자 백신의 장점은 다음과 같다. 표면 구조가 반복적으로 구성되어 있어 통일성을 띄고 있으며, 자연적인 바이러스의 항원 구조를 유지한 채로 체내의 면역 세포에 제시되어 효율적으로 면역반응을 유도할 수 있는 장점을 지닌다. 또한 바이러스의 증식에 필요한 바이러스의 유전자를 포함하고 있지 않기 때문에 동물에 감염이 불가능하여 매우 안전하다는 점이 최대 장점 중 하나로 꼽힌다. 일반적인 재조합 백신의 경우 특정 항원 단백질만을 발현시켜 용액에 녹아있는 상태로 보관하기 때문에 환경 조건에 따라 불안정하지만 바이러스 유사 입자의 경우 바이러스와 유사하게 입자 구조를 이루고 있기 때문에 환경적인 조건으로 인해 쉽게 구조가 변하지 않는 안정성을 가진다는 연구 결과도 있다. 이외에도 입자 구조를 이루기 때문에 한 종류의 병원체에서 유래한 항원 외에도 다른 바이러스 및 세균 등의 병원체에서 유래한 항원을 바이러스 유사 입자에 동시에 발현시킴으로써 1회의 백신 접종으로 동시에 여러 가지 전염병에 대한 방어능을 형성할 수 있다는 장점도 있다.

[0008] 조류 인플루엔자는 혈청형이 다양하고 변이가 잘 된다는 특성 때문에 백신접종에 대한 효용가치가 떨어지는 것으로 평가한다. 즉 바이러스 혈청형마다 동일한 혈청형으로 백신을 만들어야만 제대로 된 예방효과를 누릴 수 있다. 저병원성 H9N2 바이러스의 경우 이미 상용화 백신으로 제조되어 많은 양계농장에서 사용되고 있으며 그에 대한 효과 매우 높은 것으로 평가되고 있다. 하지만 다른 혈청형에는 방어효과가 없으며 동일한 혈청형인 H9N2 형에 제한적으로 효과가 있는 것이다.

[0009] 고병원성으로 확인된 H5N1형이나 H5N8형에 대해서도 예방백신을 만들 수 있다. 하지만 H5N1형 바이러스를 이용해 백신을 만들어도 혈청형 구조가 다르기 때문에 H5N8형에 대한 예방효과는 낮다. 더구나 조류 인플루엔자 백신의 경우 생독백신으로 제조할 경우 많은 위험부담이 생길 수 밖에 없다. 생독백신을 사용하게 될 경우 백신주와 야외주가 조합되거나 유전자 변이가 일어나 새로운 HPAI 바이러스가 생겨나 걷잡을 수 없는 상황으로 번질 수도 있다. 따라서 저병원성 인플루엔자(LPAI)는 말할 것도 없고 HPAI 바이러스에 대한 생독백신 접종은 절대적으로 금지하는 것이 올바른 방향이다.

[0010] 따라서 특정 바이러스 혈청형에 대한 각각의 백신을 만들 필요가 있고 또 전술한 바와 같이 새롭게 나타난 H5N8에 대한 백신이 필요한 상황이다. 그리고 조류 인플루엔자에 대해 생독백신이 뚜렷한 한계점을 지니기 때문에 이를 해결할 방안이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 H5 조류 인플루엔자에 대한 백신으로서 바이러스 유사입자를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 전술한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본 발명의 일측면에 따른 바이러스 유사 입자 백신은 H5N8 바이러스로부터 유래한 헤마글루티닌(HA) 단백질 및 뉴라미니다제(NA) 단백질을 포함하고, H1N1 바이러스로부터 유래한 M1 단백질을 포함한다.

[0013] 상기 H5N8 바이러스는 A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8)인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 H1N1 바이러스는 A/Puerto Rico/8-V24/1934(H1N1)인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 헤마클루티닌(HA) 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 정의되는 것일 수 있다.

[0016] 상기 뉴라미니다제(NA) 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 정의되는 것일 수 있다.

[0017] 상기 M1 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 정의되는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 일측면에 따른 백신 조성물은 바이러스 유사 입자를 유효성분으로 포함하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 일측면에 따른 조류 인플루엔자 예방 방법은 상기 백신 조성물을 조류에 투여하는 단계를 포함하는 것 일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일측면에 따른 바이러스 유사 입자의 제조방법은 H5N8 바이러스로부터 유래한 헤마글루티닌(HA) 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계, H5N8 바이러스로부터 유래한 뉴라미니다제(NA) 단백질을 발현하는 Bacmid에 상기 재조합 플라스미드를 트랜스포존시키는 단계, 상기 재조합 Bacmid를 곤충세포에 트랜스펙션시키는 단계, 상기 곤충세포로부터 재조합 바큘로바이러스를 수득하는 단계, 상기 재조합 바큘로바이러스 및 H1N1 바이러스에서 유래한 M1 단백질을 발현하는 바큘로바이러스를 곤충세포에 인펙션시키는 단계 및 상기 곤충세포에서 상기 헤마글루티닌(HA) 단백질, 상기 뉴라미니다제(NA) 단백질 및 상기 M1 단백질이 파티클을 이루어 외피를 형성한 바이러스 유사 입자를 분리하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 기존에 없었던 A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8) 의 백신, 특히 바이러스 유사 입자 백신은 충분히 백신으로서 그 기능과 활성도를 보여준다. 게다가, 본 발명의 또다른 일 실시예에 따르면, 바이러스 유사 입자 백신은 근육 주사를 통해서 뿐만이 아니라 호흡 주사를 통해서, 특히 재접종을 하였을 때 그 백신 효과가 나타난 것을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 VLP 형성을 확인하기 위한 western blot 데이터

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 VLP의 활성도를 측정하기 위한 동물접종 및 면역반응 ELISA assay 데이터

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 HA 단백질의 DNA 및 아미노산 서열

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 NA 단백질의 DNA 및 아미노산 서열

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 M1 단백질의 DNA 및 아미노산 서열

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 다만, 이는 예시로서 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0024] 본 발명은 A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8)조류 인플루엔자 바이러스에서 유래한 HA 단백질[GenBank:KJ746111.1] 및 NA 단백질[GenBank: KJ746113.1], 그리고 A/Puerto Rico/8-V24/1934(H1N1)에서 유래한 M1 단백질[GenBank: CY084183.1]을 포함하는 바이러스 유사 입자(VLP)를 제공한다.

[0025] 상기 바이러스 유사 입자(Virus Like Particle, VLP)이란, 바이러스와 유사한 형태를 띠고 있는 항원의 종류를 의미한다. 바이러스 유사 입자는 바이러스 구조 단백질들의 결합을 통하여 실제 바이러스와 유사한 형태로 조립이 되지만 조립과정에서 바이러스의 유전자는 바이러스 유사 입자내부로 포함되지 않는다.

[0026] 상기 헤마글루티닌(HA)은 적혈구를 응집시킬 수 있는 물질을 의미한다. 통상적으로 헤마글루티닌은 바이러스의

외피에 돋아나 있는 항원성 돌기를 의미하며, 보다 구체적으로는 인플루엔자 바이러스의 외피에서 발견되는 당단백질(glycoprotein)을 의미하기도 한다. 인플루엔자 바이러스 외피의 항원성 돌기로는 헤마글루티닌과 뉴라미니다아제(NA) 등이 있는바, 여기서 헤마글루티닌은 바이러스가 기생 및 증식할 숙주 세포에 들러붙도록 하는 역할을 하고, 뉴라미니다아제는 기생 및 증식이 끝나 숙주 세포에서 이탈하는 데 사용되는 것으로 알려져 있다. 헤마글루티닌은 막 외부로 돌출되는 머리 또는 줄기 영역(head or stem domain), 막을 투과하는 막투과 영역(transmembrane domain) 및 세포질 내부의 작은 꼬리(cytoplasmic tail)을 포함하는 형태로 구성된다.

[0027] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 헤마글루티닌(HA) 단백질은 H5N8 인플루엔자 바이러스 유래의 것일 수 있다.

[0028] 전술한 헤마글루티닌(HA) 단백질의 전체 서열은 예컨대 서열번호 2의 아미노산 서열로 정의될 수 있다.

[0029] 상기 헤마글루티닌(HA) 단백질 상기 서열번호 2 뿐만 아니라, 이들 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 98% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0030] 또한 이러한 서열 상동성을 나타내는 서열로서 실질적으로 상기 단백질들과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 자명하다.

[0031] 상기 뉴라미니다아제(NA) 단백질은 바이러스 외피 막에 존재하는 당단백질의 효소로서 바이러스가 숙주의 세포로 침입하거나 빠져 나올 때 필요하다. 구체적으로, 바이러스의 뉴라미니다아제는 감염된 세포 표면의 글라이캔 구조(Glycan structure)로부터 뉴라미닉 산(neuraminic acid)의 terminal을 절단하는 기능을 한다. 총 9가지의 아형(N1~N9)이 존재하며, 사람에는 N1, N2가 보인다.

[0032] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 뉴라미니다아제(NA) 단백질은 A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8) 바이러스 유래의 것일 수 있다.

[0033] 상기 뉴라미니다아제(NA) 단백질의 전체 서열은 예컨대 서열번호 4의 아미노산 서열로 정의될 수 있다.

[0034] 상기 뉴라미니다아제(NA) 단백질은 상기 서열번호 4 뿐만 아니라, 이들 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 98% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0035] 또한 이러한 서열 상동성을 나타내는 서열로서 실질적으로 상기 단백질들과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 자명하다.

[0036] 상기 M1 단백질은 인플루엔자 바이러스의 기질(matrix)단백질로서, 바이러스 막(envelope) 안쪽의 코팅막을 형성한다. M1 단백질은 2가지 도메인으로 구성되는데 각 도메인은 링커 시퀀스(linker sequence)로 연결되어 있다. M1 단백질은 바이러스 RNA와 결합하는데, 그 결합은 특정 RNA 시퀀스에 특이적으로 이루어지는 것은 아니며, 아미노산에 풍부한 펩타이드 시퀀스를 통해서 결합이 이루어 진다.

[0037] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 M1 단백질은 A/Puerto Rico/8-V24/1934(H1N1) 바이러스 유래의 것일 수 있다.

[0038] 또한 M1 단백질의 전체 서열은 예컨대 서열번호 6의 아미노산 서열로 정의될 수 있다.

[0039] 상기 M1 단백질은 상기 서열번호 6 뿐만 아니라, 이들 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 더욱 구체적으로는 90% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 95% 이상, 가장 구체적으로는 98% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0040] 또한 이러한 서열 상동성을 나타내는 서열로서 실질적으로 상기 단백질들과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함되는 것은 자명하다.

[0041] 본 발명의 또 다른 일측면에 따른 백신 조성물은 전술한 바이러스 유사 입자를 유효성분으로 포함하는 것이다.

[0042] 상기 백신 조성물에는 상기 바이러스 유사 입자 이외에도 약제학적으로 허용되는 담체 또는 기타 첨가제 등이 다양하게 첨가될 수 있음은 자명한 사항이므로 이에 대한 구체적 설명은 제외하기로 한다.

[0043] 본 발명의 또 다른 측면에 따른 바이러스 유사 입자의 제조방법은 a) A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8) 바이러스로부터 유래한 헤마글루티닌(HA) 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계 b) A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8) 바이러스로부터 유래한 뉴라미니다제(NA) 단백질을 발현하는 Bacmid에 상기 재조합 플라스미드를 트랜스포존시키는 단계 c) 상기 재조합 Bacmid를 곤충세포에 트랜스펙션시키는 단계 d) 상기 곤충세포로부터 재조합 바큘로바이러스를 수득하는 단계 e) 상기 재조합 바큘로바이러스 및 A/Puerto Rico/8-V24/1934(H1N1) 바이러스에서 유래한 M1 단백질을 발현하는 바큘로바이러스를 곤충세포에 인펙션시키는 단계 및 f) 상기 곤충세포에서 상기 헤마글루티닌(HA) 단백질, 상기 뉴라미니다제(NA) 단백질 및 상기 M1 단백질이 파티클을 이루어 외피를 형성한 바이러스 유사 입자를 분리하는 단계를 포함한다.

[0044] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0045] **실시예 1 : 인플루엔자 H5N8 virus HA NA항원을 포함하는 VLP 제작**

[0046] A/mallard/Korea/W452/2014(H5N8)바이러스의 유전자로부터 HA와 NA특이적인 primer제작하여 PCR을 이용하여 insert를 확보한다. 상기 HA 단백질은 서열번호 1의 염기서열 혹은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지며, 상기 NA 단백질은 서열번호 2의 염기서열 혹은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진다. insert를 확보 후, 제한효소 BamH1과 Xho1을 이용하여 pFastBac1에 삽입한 후 DH5a에 heat shock 방법을 이용하여 transformation후 mini-prep을 하여 재조합 pFastBac1을 확보하였다. 재조합 pFastBac1을 DH10Bac에 heatshock방법을 이용하여 transformation후 midi-prep을 하여 재조합 Bacmid를 확보한후 시퀀싱 전문회사인 marcrogen에 의뢰하여 서열을 확인하였다.

[0047] 확보한 재조합 Bacmid를 Lipfectamin agent를 이용해 sf9 cell에 transfection후 27도씨에서 3일간 배양하여 재조합 Baculovirus를 확보한다. 확보한 재조합 Baculovirus를 T75 flask와 100ml culture를 거쳐 각각 3일씩 배양하여 Baculovirus를 확보하였다.

[0048] 이 후 VLP를 만들기 위해서 $1x10^6$ cell/ml 농도의 400ml sf9cell culture에 인플루엔자 H5N8의 HA와 NA 그리고 서열번호 5의 염기서열 혹은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 M1을 발현하는 재조합 Baculovirus를 각각 0.5~1MOI의 비율로 감염시켜 3일간 배양한 후 4000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻어낸다. 상층액안의 VLP를 100KDa membrane을 이용하여 1/10 volume으로 농축한 후 sucrose gradient purification 방법을 이용하여 60% 20% 농도의 sucrose 층을 만든 후 그 위에 농축한 sample을 올려 30000rpm에서 1시간동안 원심분리하여 60%와 20%사이 층을 분리해 인플루엔자 H5N8 VLP를 얻어낸다.

[0049] **시험예 1 : influenza A virus H5N8의 HA를 발현한는 VLP 검정**

[0050] H5N8 VLP의 단백질 농도를 확인하기 위해 Pierce™ BCA Protein Assay Kit23225)을 이용하여 BCA assay를 하여 농도를 측정하였다. 25ul의 기존의 농도를 알고 있는 BSA standard와 VLP sample을 96well plate에 loading한 후 reagent A와 reagent B를 50:1의 비율로 섞어주어 well당 200ul씩 넣어준 후 37도에서 incubation한 후에 560nm에서 흡광도를 측정해 농도를 확인한 결과 0.6mg/ml의 농도가 확인되었다.

[0051] H5N8 VLP의 HA활성을 측정하기 위해 HA assay 을 진행하였다. 50ul PBS를 V-bottom 96 well plate에 넣어준 후 VLP sample을 50ul씩 순차적으로 1/2농도로 희석한 후 50ul의 0.5%RBC를 넣어주어 spot이 형성되는 것을 확인한 결과 512HAU/50ul의 HA titer를 확인하였다.

[0052] VLP의 단백질 발현을 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. Sample을 12% acrylamide gel에 loading후 200V로 45분간 running후 semi dry transfer 방법을 이용해 gel에 분리된 단백질을 PVDF membrane로 transfer 후 5% skim milk 에서 30분간 blacking후 H5N8 virus 에 대한 ferat 유래 항체(Ferrat anti H5N8 virus pAb)를 1:500 비율로 희석해 1% skim milk condition에서 4℃에서 over night처리후 PBST buffer(washing buffer) 로 10분간 3번 wash후 2차 항체로 goat 유래 Ferat IgG 에대한 항체(goat anti ferat IgG HRP)를 1:5000으로 희석해 처리 후 검출하여 단백질 발현을 확인하였다. 확인결과 63~75KDa사이에 바이러스의 항원 단백질인 헤마글루티닌 단백질이 gel에 loading한 양과 비례해서 나타났으며 25KDa에 M1단백질이 loading한 농도에 비례해서 나타났다.

[0053] 위와 같은 western blot 결과를 도 1에 나타내었으며 각 lane은 아래와 같다.

[0054] Lane1 : size marker

[0055] Lane2~5 : influenza H5N8 VLP(인플루엔자 H5N8 바이러스 유사입자)

[0056] Lane6~8:influenza H5N8 inactivated virus(인플루엔자 H5N8불활화 바이러스)

[0057] **시험예 2 : H5N8 VLP의 동물접종 및 면역반응 분석**

[0058] H5N8 VLP를 10ug씩 6주령 female BALB/C에 근육주사와 intranasal route를 이용하여 접종 후에 3주 후 안와 체혈을 하여 혈청을 확보한다. 이후 같은 조건으로 2차접종을 하고 동일하게 3주에 간격 후에 안와 체혈을 하여 혈청을 확보하여 항체형성 유무를 확인하기 위해 ELISA assay를 진행하였다. 4ug/ml농도의 inactivated virus를 96well plate에 100ul씩 4도에서 overnight로 coating 한 후 3% BSA solution 을 well당 200ul 넣어주고 37도에서 1시간 30분 incubation하여 Backing하였다. PBST로 3번 wash후 혈청을 희석해 well당 100ul 씩 넣어주고 동일하게 37도에서 1시간 30분 incubation시켜 주었다. 동일하게 PBST 3번 wash후 2ndAb로 Goat 유래 mouse IgG 대한 항체 혹은 Goat유래 mouse IgA에 대한 항체를 37도에서 1시간 처리한 후 PBST로 6번 wash하였다. 이후 TMB solution을 이용하여 실온에서 10분간 발색시킨후 0.5M 황산 용액으로 발색반응을 멈추고 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0059] 위와 같은 ELISA Assay 결과를 도 2에 나타내었으며 각 그래프는 아래와 같다.

[0060] VLP IM(prime) : VLP를 근육주사를 통해 최초 접종한 경우의 항체형성 수치

[0061] VLP IM(boast) : VLP를 근육주사를 통해 재접종한 경우의 항체형성 수치

[0062] VLP IN(prime) : VLP를 호흡기주사를 통해 최초 접종한 경우의 항체형성 수치

[0063] VLP IN(prime) : VLP를 호흡기주사를 통해 재접종한 경우의 항체형성 수치

[0064] NAIVE : 음성대조군(아무것도 접종하지 않은 마우스 혈청 사용)

[0065] *PRIME : 최초 접종 후 3주 이후 혈청sample

[0066] *BOAST : PRIME과 동일한 조건으로 재접종 후 3주 이후 혈청sample

[0067] 도 2는 VLP의 근육 주사 및 호흡기 주사를 통한 백신의 면역반응 여부를 확인하는 것이다.

[0068] **시험예 3 : VLP의 전자현미경을 통한 확인**

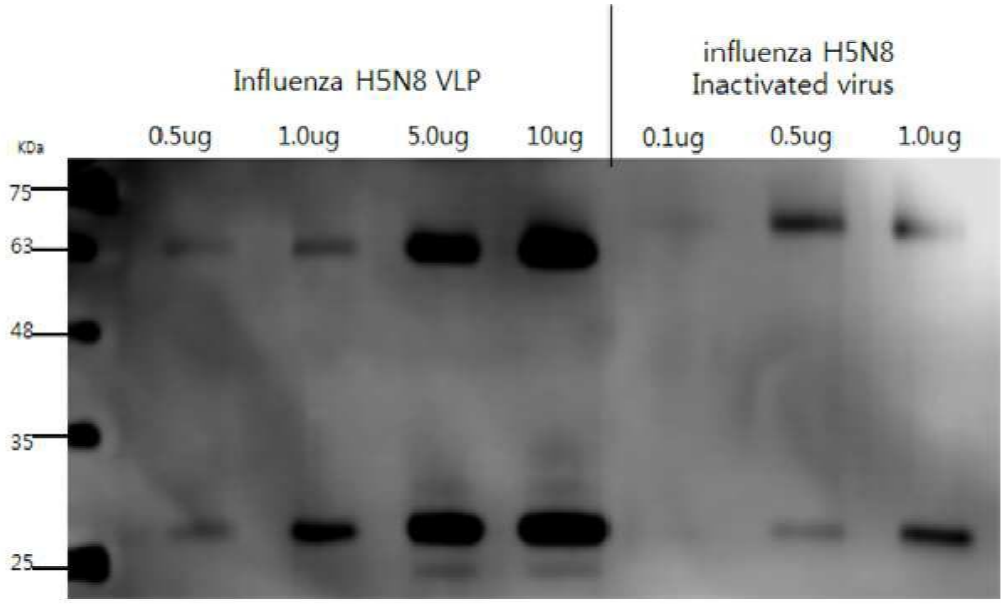
[0069] 바이러스 유사입자 형성 유무를 관찰하기 위해 negative staining을 하여 전자현미경으로 관찰 하였다. VLP 10ul를 A Formvar-carbon coated EM grid 위에 1분간 흡착 시킨 후 2% Uranyl acetate로 15초간 negative staining 후 40분간 grid를 건조 시킨다. 이후 200,000배 배율로 Transmission electron microscopy (JEM-1011, JEOL, Japan)를 이용해 관찰하였다. 위와 같은 결과를 도 3에 나타내었다.

[0070] 이상과 같은 본 발명에 대한 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

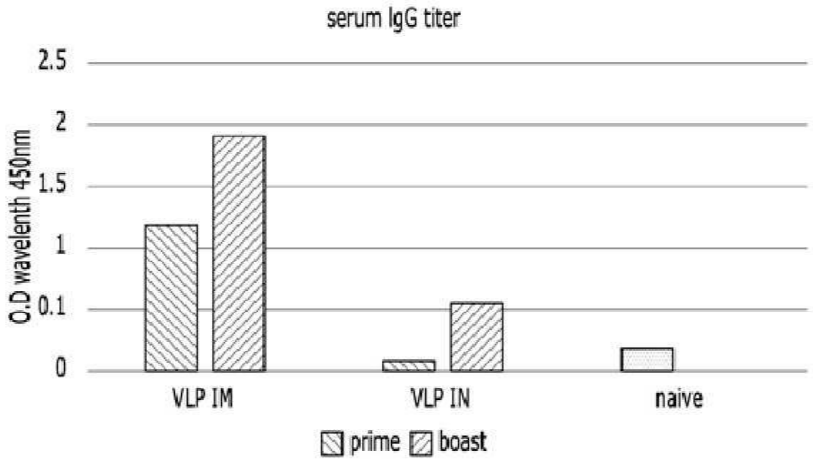
[0071] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

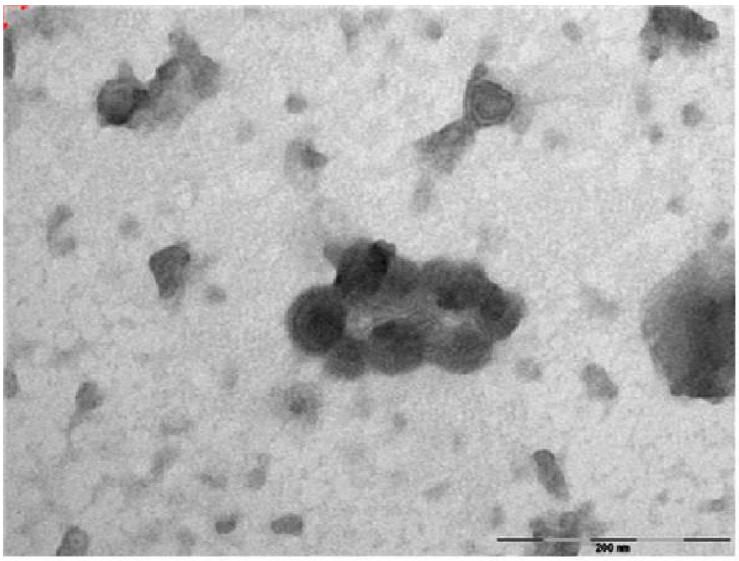
도면1


Influenza H5N8 VLP
influenza H5N8
Inactivated virus
0.5ug
1.0ug
5.0ug
10ug
0.1ug
0.5ug
1.0ug
KDa
75
63
48
35
25

도면2


serum IgG titer
O.D wavelenth 450nm
2.5
2
1.5
1
0.1
0
VLP IM
VLP IN
naive
prime
boast

도면3



도면4

DNA sequence(서열번호1)

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAGTGGTTAGCCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAA
CTCAACAAAGCAGGTTGACACGATAATGGAAAAAAACGTCACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACA
ACGGGAAGCTCTGCGATCTTAATGGAGTGAAGCCCCTGATTCTAAAGGATTGTAGCGTAGCTGGGTGGCTCCTTGGAAAT
CCAATGTGCGACGAGTTCATCAGGGTGCCGGAATGGTCTTACATCGTGGAGAGGGCTAACCCAGCCAACGACCTCTGTTA
CCCAGGGACCCTCAATGACTATGAGGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAATCATTTTGAGAAAACTCTGATCATCC
CCAAGAGTTCTTGGCCCAATCATGAAACATCATTAGGGGTGAGCGCAGCATGTCCATACCAGGGAGCATCCTCATTTTTC
AGAAATGTGGTATGGCTCATCAAAAAGAACGATGCATACCCGACAATAAAGATAAGCTACAATAATACCAATCGGGAAGA
TCTTTTGATACTGTGGGGGATTCATCATTCCAACAATGCAGCAGAGCAGACAAATCTCTATAAAAACCCAGACACTTATG
TTTCCGTTGGGACATCAACATTAAACCAGAGATTGGTGCCCAAAATAGCTACTAGATCCCAAGTAAACGGGCAACGTGGA
AGAATGGATTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCCACTTTGAGAGTAATGGAAATTTCATTGCTCCGGA
ATATGCCTACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAAGTGGAATATGGCCACTGCAACACCAAAT
GTCAAACTCCAATAGGGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAA
TACGTGAAGTCAAACAAATTAGTCCTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCTAAGAGAAAGAAGAAGAAAAAGAGGACT
ATTTGGAGCTATAGCAGGGTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGACGGTTGGTTTGGGTGCCCCCATAGCAATG
AGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACCCAAAAGGCAATAGATGGAGTTACCAATAAGGTCAACTCAATC
ATTGACAAAATGAACACTCAATTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAA
GAAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTTTAGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAG
ATTTCCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAAGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAAT
GGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAATGTGATAAAGAATGTATGGAAAGCGTAAGAAATGGGACGTATGACTACCCTAAGTA
TTCAGAAGAAGCAAGATTAAAAAGAGAAGAAATAAGCGGAGTGAAATTAGAATCAATAGGAACTTACCAAATACTGTCAA
TTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATAGTGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCTAATGGGTCG
CTACAATGCAGAATTTGCATCTAA

Protein sequence(서열번호2)

MEKIVLLLAVVSLVKSDQICIGYHANNSTKQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDL
NGVKPLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFIRVPEWSYIVERANPANDLCYPGTLNDYEELKHL
LSRINHFEKTLIIPKSSWPNHETSLGVSAACPYQGASSFFRNVVWLIKKNDAYPTIKISY
NNTNREDLLILWGIHHSNNAAEQTNLYKNPDTYVSVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQRG
RMDFFWTILKPNDAIHFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSEVEYGHCNTKCQTPIGA
INSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNKLVLATGLRNSPLRERRRKRGLFGAIAGFIEGGWQ
GMVDGWFGCPHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLER
RIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGN
GCFEFYHKCDKECMESVRNGTYDYPKYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVAS
SLALAIIVAGLSLWMCSNGSLQCRICI-

도면5

DNA sequence(서열번호3)

ATGAATCCAAATCAGAAAATAGTAACCATTGGCTCCATTTCATTAGGGTTGGTTGTATTCAATGTTCTTCTGCATGCCGT
GAGCATCATATTAACAGTGTTAGCCCTGGGGAAGAGTGAAAACAATGGAATCTGCAATGGAACTGTAGTGAGGGAATACA
ATGAAACAGTTAGAATAGAGAAAGTGACTCAATGGTACAATACTAGCGTAGTCGAATATGTACCGCATTGGAATGAGGGC
ACTTATATAAATAACACCGAACCAATATGTGATGTCAAGGGCTTTGCACCTTTTTCCAAGGACAACGGAATAAGAGTTGG
CTCCAGGGGACATATTTTTGTCATAAGAGAGCCTTTCGTCTCTTGTTCACCTGTAGAGTGCAGGACTTTCTTCCTCACTC
AAGGATCTCTACTCAATGACAAACACTCAAATGGAACAGTGAAGGATAGAAGCCCATTCAGAACTCTCATGAGTGTCGAA
GTGGGCCAATCACCCAATGTATATCAAGCCAGGTTTGAAGCTGTGGCATGGTCAGCAACAGCCTGTCATGATGGTAAGAA
GTGGATGGCGATTGGTGTAACAGGGCCAGATTCTAAAGCAGTAGCAGTAGTTCATTACGGAGGGGTGCCTACTGACGTTG
TTAACTCCTGGGCAGGAGATATATTAAGAACTCAGGAGTCATCTTGTACTTGCATTCAAGGTAATTGTTATTGGGTAATG
ACTGACGGTCCTGCCAATAGACAGGCGCAGTATAGAATATACAAAGCAAATCAAGGCAAAATAATTGGCCGAACAGATGT
TAGCTTTAGTGGAGGACATATTGAGGAATGTTCTTGTTATCCAAATGATGGTAAAGTGGAATGCGTGTGTAGAGACAACT
GGACGGGAACTAACAGGCCTGTGCTAATTATTTCGCCTGATCTCTCTTACAGGGTTGGGTATTTATGTGCAGGGTTGCCC
AGTGACACTCCAAGAGGGGAAGATACTCAATTTGTCGGTTCATGCACTAGTCCCATGGGAAATCAGGGATATGGCGTAAA
AGGGTTCGGGTTTCGACAGGGAACTGATGTGTGGGTGGGGCGGACAATTAGTCGAACCTCCAGATCAGGATTTGAAATAA
TAAGGATAAAGAATGGTTGGACGCAAACAAGCAAAGAACAGATTAGAAGACAGGTGGTTGTTGATAACTCGAATTGGTCG
GGATACAGTGGGTCTTTCACTTTACCAGTAGAATTGTCTGGGAGGGAATGTTTGGTTCCCTGTTTTTGGGTCGAAATGAT
CAGAGGTAGGCCAGAAGAGAGAACAATCTGGACCTCTAGTAGCTCCATTGTAATGTGTGGAGTTGATTATGAAATTGCCG
ATTGGTCATGGCACGATGGAGCTATTCTTCCCTTTGACATCGATAAGATGTAA

Protein sequence(서열번호4)

MNPNQKIVTIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTVLALGKSENNGICNGTVVREYNETVRIE
KVTQWYNTSVVEYVPHWNEGTYINNTEPICDVKGFAPFSKDNGIRVGSRGHIFVIREPFV
SCSPVECRTFFLTQGSLLNDKHSNGTVKDRSPFRTLMSVEVGQSPNVYQARFEAVAWSAT
ACHDGKKWMAIGVTGPDSKAVAVVHYGGVPTDVVNSWAGDILRTQESSCTCIQGNCYWVM
TDGPANRQAQYRIYKANQGKIIGRTDVSFSGGHIEECSCYPNDGKVECVCRDNWTGTNRP
VLIISPDLSYRVGYLCAGLPSDTPRGEDTQFVGSCTSPMGNQGYGVKGFGFRQGTDVWVG
RTISRTSRSGFEIIRIKNGWTQTSKEQIRRQVVVDNSNWSGYSGSFTLPVELSGRECLVP
CFWVEMIRGRPEERTIWTSSSSIVMCGVDYEIADWSWHDGAILPFDIDKM-

도면6

DNA sequence(서열번호5)

aagatgagtc ttctaaccga ggtcgaaacg tacgtactct ctatcatccc
gtcaggcccc ctcaaagccg agatcgcaca gagacttgaa gatgtctttg cagggaagaa
caccgatctt gaggttctca tggaatggct aaagacaaga ccaatcctgt cacctctgac
taaggggatt ttaggatttg tgttcacgct caccgtgccc agtgagcgag gactgcagcg
tagacgcttt gtccaaaatg cccttaatgg gaacggggat ccaaataaca tggacaaagc
agttaaactg tataggaagc tcaagaggga gataacattc catggggcca aagaaatctc
actcagttat tctgctggtg cacttgccag ttgtatgggc ctcatataca acaggatggg
ggctgtgacc actgaagtgg catttggcct ggtatgtgca acctgtgaac agattgctga
ctcccagcat cggtctcata ggcaaatggt gacaacaacc aatccactaa tcagacatga
gaacagaatg gttttagcca gcactacagc taaggctatg gagcaaatgg ctggatcgag
tgagcaagca gcagaggcca tggaggttgc tagtcaggct agacaaatgg tgcaagcgat
gagaaccatt gggactcatc ctagctccag tgctggtctg aaaaatgatc ttcttgaaaa
tttgcaggcc tatcagaaac gaatgggggt gcagatgcaa cggttcaagt ga

Protein sequence(서열번호6)

MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGIL
GFVFTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEISLSYS
AGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMV
LASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSSAGLKNDLLENLQAY
QKRMGVQMQRFK

서 열 목 록

<110> SUNGSHIN WOMEN`S UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> VIRUS LIKE PARTICLE VACCINE FOR H5 INFLUENZA VIRUS AND THE METHOD

FOR THE SAME

<130> P20160041KR

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1704

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 1

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcagtg gttagccttg ttaaaagtga tcagatttgc 60

attggttacc atgcaaacaa ctcaacaaag caggttgaca cgataatgga aaaaaacgtc 120

actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatctt 180

aatggagtga agcccctgat tctaaaggat tgtagcgtag ctgggtggct ccttggaaat 240

ccaatgtgcg acgagttcat cagggtgccg gaatggtctt acatcgtgga gagggctaac 300

ccagccaacg acctctgtta cccagggacc ctcaatgact atgaggaatt gaaacaccta 360

ttgagcagaa taaatcattt tgagaaaact ctgatcatcc ccaagagttc ttggcccaat 420

catgaaacat cattaggggt gagcgcagca tgtccatacc agggagcatc ctcatttttc 480

agaaatgtgg tatggctcat caaaaagaac gatgcatacc cgacaataaa gataagctac 540

aataatacca atcgggaaga tcttttgata ctgtgggggа ttcatcattc caacaatgca 600

gcagagcaga caaatctcta taaaaaccca gacacttatg tttccgttgg gacatcaaca 660

ttaaaccaga gattggtgcc caaaatagct actagatccc aagtaaacgg gcaacgtgga 720

agaatggatt tcttctggac aattttaaaa ccgaatgatg caatccactt tgagagtaat 780

ggaaatttca ttgctccgga atatgcctac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840

atgaaaagtg aagtggaata tggccactgc aacaccaaat gtcaaactcc aataggggcg 900

ataaactcta gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960

tacgtgaagt caaacaaatt agtccttgcg actgggctca gaaatagtcc tctaagagaa 1020

agaagaagaa aaagaggact atttggagct atagcagggt ttatagaggg aggatggcag 1080

ggaatggtag acggttggtt tgggtgcccc catagcaatg agcaggggag tgggtacgct 1140

gcagacaaag aatccaccca aaaggcaata gatggagtta ccaataaggt caactcaatc 1200

attgacaaaa tgaacactca atttgaggcc gttggaaggg aatttaataa cttagaaagg 1260

agaatagaga atttaaacaa gaaaatggaa gacggattcc tagatgtctg gacttataat 1320

gctgaacttt tagttctcat ggaaaatgag agaactctag atttccatga ctcaaatgtc 1380

aagaaccttt acgacaaagt ccgactacag cttagggata atgcaaagga gctgggtaat 1440

ggttgtttcg agttctatca caaatgtgat aaagaatgta tggaaagcgt aagaaatggg 1500

acgtatgact accctaagta ttcagaagaa gcaagattaa aaagagaaga aataagcgga 1560

gtgaaattag aatcaatagg aacttaccaa atactgtcaa tttattcaac agtggcgagt 1620

tccctagcac tggcaatcat agtggctggt ctatctttat ggatgtgctc taatgggtcg 1680

ctacaatgca gaatttgcat ctaa 1704

<210> 2

<211> 567

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 2

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Val Lys Ser

1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val

20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile

35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asn Gly Val Lys

50 55 60

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn

65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Arg Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val

85 90 95

Glu Arg Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Thr Leu Asn

100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu

115 120 125

Lys Thr Leu Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Pro Asn His Glu Thr Ser

130 135 140

Leu Gly Val Ser Ala Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ala Ser Ser Phe Phe

145 150 155 160

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

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

290 295 300
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320
Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335
Pro Leu Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350
Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Phe Gly
355 360 365

Cys Pro His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu
370 375 380
Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
385 390 395 400
Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
405 410 415

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
420 425 430
Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu

435 440 445
Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
450 455 460
Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
465 470 475 480
Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Lys Glu Cys Met Glu Ser
485 490 495
Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
500 505 510

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

<210> 3
<211> 1413
<212> DNA
<213> Influenza A virus
<400> 3

atgaatccaa atcagaaaat agtaaccatt ggctccattt cattagggtt ggttgtattc 60
aatgttcttc tgcatgccgt gagcatcata ttaacagtgt tagccctggg gaagagtgaa 120
aacaatggaa tctgcaatgg aactgtagtg agggaataca atgaaacagt tagaatagag 180
aaagtgactc aatggtacaa tactagcgta gtcgaatatg taccgcattg gaatgagggc 240
acttatataa ataacaccga accaatatgt gatgtcaagg gctttgcacc tttttccaag 300
gacaacggaa taagagttgg ctccagggga catatttttg tcataagaga gcctttcgtc 360

tcttgttcac ctgtagagtg caggactttc ttcctcactc aaggatctct actcaatgac 420

aaacactcaa atggaacagt gaaggataga agcccattca gaactctcat gagtgtcgaa 480

gtgggccaat cacccaatgt atatcaagcc aggtttgaag ctgtggcatg gtcagcaaca 540

gcctgtcatg atggtaagaa gtggatggcg attggtgtaa cagggccaga ttctaaagca 600

gtagcagtag ttcattacgg aggggtgcct actgacgttg ttaactcctg ggcaggagat 660

atattaagaa ctcaggagtc atcttgtact tgcattcaag gtaattgtta ttgggtaatg 720

actgacggtc ctgccaatag acaggcgcag tatagaatat acaaagcaaa tcaaggcaaa 780

ataattggcc gaacagatgt tagctttagt ggaggacata ttgaggaatg ttcttgttat 840

ccaaatgatg gtaaagtgga atgcgtgtgt agagacaact ggacgggaac taacaggcct 900

gtgctaatta tttcgcctga tctctcttac agggttgggt atttatgtgc agggttgccc 960

agtgacactc caagagggga agatactcaa tttgtcggtt catgcactag tcccatggga 1020

aatcagggat atggcgtaaa agggttcggg tttcgacagg gaactgatgt gtgggtgggg 1080

cggacaatta gtcgaacctc cagatcagga tttgaaataa taaggataaa gaatggttgg 1140

acgcaaacaa gcaaagaaca gattagaaga caggtggttg ttgataactc gaattggtcg 1200

ggatacagtg ggtctttcac tttaccagta gaattgtctg ggagggaatg tttggttccc 1260

tgtttttggg tcgaaatgat cagaggtagg ccagaagaga gaacaatctg gacctctagt 1320

agctccattg taatgtgtgg agttgattat gaaattgccg attggtcatg gcacgatgga 1380

gctattcttc cctttgacat cgataagatg taa 1413

<210> 4

<211> 470

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 4

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Val Thr Ile Gly Ser Ile Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

20 25 30

Val Leu Ala Leu Gly Lys Ser Glu Asn Asn Gly Ile Cys Asn Gly Thr
35 40 45

Val Val Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Ile Glu Lys Val Thr Gln
50 55 60

Trp Tyr Asn Thr Ser Val Val Glu Tyr Val Pro His Trp Asn Glu Gly
65 70 75 80
Thr Tyr Ile Asn Asn Thr Glu Pro Ile Cys Asp Val Lys Gly Phe Ala
85 90 95

Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Val Gly Ser Arg Gly His Ile
100 105 110
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Val Glu Cys Arg
115 120 125
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
130 135 140
Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Phe Arg Thr Leu Met Ser Val Glu
145 150 155 160
Val Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ala Val Ala

165 170 175
Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Ala Ile Gly
180 185 190
Val Thr Gly Pro Asp Ser Lys Ala Val Ala Val Val His Tyr Gly Gly
195 200 205
Val Pro Thr Asp Val Val Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr
210 215 220
Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Gln Gly Asn Cys Tyr Trp Val Met
225 230 235 240

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

305 310 315 320

Ser Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Thr Gln Phe Val Gly Ser Cys Thr

325 330 335

Ser Pro Met Gly Asn Gln Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg

340 345 350

Gln Gly Thr Asp Val Trp Val Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg

355 360 365

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Arg Ile Lys Asn Gly Trp Thr Gln Thr Ser

370 375 380

Lys Glu Gln Ile Arg Arg Gln Val Val Val Asp Asn Ser Asn Trp Ser

385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Ser Gly Arg Glu

405 410 415

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Arg Pro Glu

420 425 430

Glu Arg Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val

435 440 445

Asp Tyr Glu Ile Ala Asp Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro

450 455 460

Phe Asp Ile Asp Lys Met

465 470

<210> 5

<211> 759

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 5

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac gtactctcta tcatcccgtc aggcccctc 60

aaagccgaga tcgcacagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120

gttctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta 180

ggatttgtgt tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240

caaaatgccc ttaatgggaa cggggatcca ataacatgg acaaagcagt taaactgtat 300

aggaagctca agagggagat aacattccat ggggccaaag aaatctcact cagttattct 360

gctggtgcac ttgccagttg tatgggcctc atatacaaca ggatgggggc tgtgaccact 420

gaagtggcat ttggcctggt atgtgcaacc tgtgaacaga ttgctgactc ccagcatcgg 480

tctcataggc aaatggtgac aacaaccaat ccactaatca gacatgagaa cagaatggtt 540

ttagccagca ctacagctaa ggctatggag caaatggctg gatcgagtga gcaagcagca 600

gaggccatgg aggttgctag tcaggctaga caaatggtgc aagcgatgag aaccattggg 660

actcatccta gctccagtgc tggtctgaaa aatgatcttc ttgaaaattt gcaggcctat 720

cagaaacgaa tgggggtgca gatgcaacgg ttcaagtga 759

<210> 6

<211> 252

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 6

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
100 105 110

Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met

115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175
Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln
195 200 205
Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
210 215 220
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
245 250