



(22) Data de Depósito: 19/10/2006
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



(51) Int.Cl.:
C07K 14/11 2006.01
A61K 39/145 2006.01
C12N 7/00 2006.01

(57) Resumo: VÍRUS DE INFLUENZA CAPAZES DE INFECTAR CANÍDEOS, USOS DOS MESMOS A invenção em questão refere-se ao isolado do vírus de influenza que é capaz de infectar canídeos e causar doença das vias respiratórias no canídeo. A invenção em questão também refere-se a composições e métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza da presente invenção. A invenção em questão também refere-se a composições e métodos para identificar um vírus da invenção e diagnosticar a infecção de um animal com um vírus da invenção.

Pe - 0614435-2
Pet - 020080084803
Data - 23/06/08

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VÍRUS DE INFLUENZA CAPAZES DE INFECTAR CANÍDEOS, USOS DOS MESMOS".**
REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

Este pedido de patente é uma continuação-em-parte do pedido

- 5 U. S. Nº 11/409.416, depositado em 21 de abril de 2006; e este pedido reivindica prioridade para os U. S. Nºs 60/728.449, depositado em 19 de outubro de 2005; 60/754.881, depositado em 29 de dezembro de 2005; 60/759.162, depositado em 14 de janeiro de 2006; 60/761.451, depositado em 23 de janeiro de 2006; e 60/779.080, depositado em 3 de março de 2006, a descrição de cada um deste é por este meio incorporada por referência aqui em
- 10 sua totalidade, incluindo qualquer breve sumário, descrições detalhadas da invenção, exemplos, reivindicações, resumo, figuras, tabelas, seqüências de ácido nucléico, seqüências de aminoácido, e desenhos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

- 15 "Tosse de canil" ou traqueobronquite infecciosa (ITB) é uma infecção respiratória aguda, contagiosa em cães caracterizada principalmente por tosse (Ford et al, 1998). ITB canina é considerada uma das doenças das vias respiratórias infecciosas mais prevalentes de cães no mundo, e surtos podem alcançar proporções epidêmicas quando os cães são alojados em
- 20 ambientes de população de alta densidade tais como canis. A maioria dos surtos é devido ao contato direto de cão-com-cão ou utilização de aerossol de secreções respiratórias (Ford et al, 1998). Os sinais clínicos são causados através de infecção com um ou uma combinação de agentes bacterianos e virais que colonizam o epitélio do trato respiratório superior e inferior.
- 25 Vírus de parainfluenza canina (CPIV) e bactérias de *Bordetella bronchios-septica* são os organismos mais comuns isolados de cães afetados, mas vários outros vírus tais como vírus de sinomose canina (CDV) e adenovírus-1 e -2 caninas (CAV-1, CAV-2), juntamente com bactérias tais como *Streptococcus sp.*, *Pasteurella multocida* e *Escherichia coli*, podem influenciar o curso e
- 30 resultado clínicos (Ford et al, 1998). Embora surtos ocorram eficiente e rapidamente em populações de alta densidade com morbidez alta, infecções respiratórias complicadas e morte são incomuns. Embora pneumonia bacteriana

secundária de ameaça à vida possa se desenvolver, a maior parte dos casos de ITB é autolimitante e soluciona-se sem qualquer tratamento (Ford et al, 1998).

5 Em julho de 1992, uma infecção respiratória presumida ser "tosse de canil" tornou-se epidêmica em várias pistas de galgo na Nova Inglaterra, Flórida, West Virginia, Wisconsin, Kansas, Colorado, Oklahoma e Arizona. De acordo com os veterinários, a maioria dos cães afetados teve uma tosse moderada que se solucionou, mas mais que uma dúzia de galgos desenvolveram uma pneumonia hemorrágica aguda seguida por morte rápida
10 (Greyhound Daily News, 1999).

No final de 1998 ao início de 1999, vários surtos de "tosse de canil" ocorreram em canis de galgos de corrida ao longo do país, resultando em fechamento obrigatório das pistas e quarentena de todos os galgos de corrida nos EUA durante várias semanas (Greyhound Daily News, 1999). Em
15 uma pista na Flórida (Palma Beach Kennel Club), tosse foi registrada em quase 40 % da população de cães em um único dia (comunicação pessoal de Dr. William Duggar). Similar ao surto em 1992, a tosse resolveu-se na maioria dos galgos, mas 10 cães na Flórida morreram de uma síndrome de pneumonia hemorrágica não-caracterizada de "tosse de canil" (Putnam,
20 1999).

Em março-abril de 2003, outro surto de "tosse de canil" ocorreu em pistas de galgo nos EUA oriental. O surto é acreditado ter originado em canis em quatro pistas na Flórida e causou a suspensão de corrida e quarentena dos cães durante quase três semanas. Quase 25 % dos cães na
25 pista em West Palm Beach foram afetados, enquanto quase 50 % dos 1400 cães em Derby Lane em St. Petersburg desenvolveram tosse. Novamente, a maioria dos cães se restabeleceu, mas vários cães morreram da infecção respiratória. O impacto econômico estimado do surto respiratório na pista de Derby Lane sozinho foi 2 milhões de dólares.

30 Não há nenhum relatório publicado documentando a etiologia ou clinicopatologia dos surtos de "tosse de canil" em canis de galgo de corrida em 1992, 1998-1999, ou 2003. A suposição foi que as infecções tenham sido

devido a CPiV e/ou *B. bronchiosseptica*, as duas causas mais comuns de tosse de canil. Comunicações insubstanciadas tais como sítios de rede atribuíram as pneumonias hemorrágicas fatais relatadas em alguns dos cães com tosse à infecção com *Streptococcus equi* β -hemolítica subespécie *zoo-epidemicus*, e referem-se à síndrome como "choque tóxico estreptocócico canino".

Transmissão do vírus de uma espécie hospedeira para a outra é uma característica crucial da ecologia e epidemiologia de vírus de influenza (Webster, 1998). Dois mecanismos básicos de transmissão interespecies de vírus de influenza são possíveis (Webster et al., 1992; Lipatov et al., 2004). Uma é a transferência direta de um vírus essencialmente inalterado de uma espécie para a outra. Exemplos deste mecanismo incluem as recentes infecções humanas com o subtipo de H5N1 do vírus de influenza aviária (Subbarao et al., 1998; Peiris et al., 2004; Guan et al., 2004) e possivelmente o pandêmico de 1918, conhecido como influenza espanhola (Reid et al., 2004). O segundo mecanismo é uma consequência da natureza segmentada do genoma de influenza. Co-infecção de um hospedeiro com vírus de espécies diferentes pode resultar em reagrupamento dos genes virais segmentados e a geração de um recombinante com a habilidade de infectar outras espécies. Por exemplo, vírus novos gerados por reagrupamento de gene entre vírus de influenza aviária e humana resultaram em pandêmico de influenza humana em 1957 e 1968 (Webster et al., 1992; Lipatov et al., 2004; Kawaoka et al., 1989).

A maioria das transmissões diretas do vírus de influenza inalterados da espécie hospedeira natural para uma espécie diferente são eventos terminais porque transmissão contínua entre indivíduos da espécie nova não ocorre. Interações múltiplas de vírus-hospedeiro são necessárias para replicação e transmissão horizontal e fornecem uma barreira formidável contra perpetuação de vírus de influenza no hospedeiro novo (Webster et al., 2004). Portanto, estabelecimento de linhagens hospedeiro-específicas novas de vírus de influenza é incomum e tem apenas ocorrido em avícula doméstica, porcos, cavalos, e humanos (Webster et al., 1992; Lipatov et al., 2004).

Por causa da natureza séria da infecção do vírus de influenza, continua uma necessidade por métodos para diagnosticar, impedir e tratar infecção por vírus de influenza.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A invenção em questão refere-se ao vírus de influenza isolado que é capaz de infectar canídeos e causar doença das vias respiratórias no canídeo. A invenção em questão também refere-se a composições e métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza da presente invenção. A invenção em questão também refere-se a composições e
10 métodos para identificar um vírus da invenção e diagnosticar infecção de um animal com um vírus da invenção.

Um aspecto da invenção refere-se a vacinas e métodos para proteger caninos de influenza canina, kits compreendendo tais vacinas, e métodos para usar tais vacinas. Esta proteção inclui impedir, reduzir o risco,
15 tardar o princípio, reduzir a expansão, melhorar, suprimir, e/ou erradicar a influenza e/ou um ou mais (tipicamente dois ou mais) de seus sintomas. É acreditado que as vacinas, kits, e métodos desta invenção sejam em geral adequados para o uso com caninos. Caninos incluem caninos selvagens, de jardim zoológico, e domésticos, tais como lobos, coiotes, e raposas. Caninos
20 também incluem cães, particularmente cães domésticos, tais como, por exemplo, cães de companhia puros e/ou mestiços, cães de exposição, cães de trabalho, cães de matilha, cães de caça, cães de guarda, cães policiais, cães de corrida, e/ou cães de laboratório.

Esta invenção é também direcionada, em parte, a um método
25 para proteger um canino de uma infecção do vírus de influenza (isto é, impedir, reduzir o risco, tardar o princípio, suprimir, melhorar, ou erradicar uma infecção do vírus de influenza). O método compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma vacina compreendendo pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, pelo menos um antígeno
30 de vírus de influenza de H3, e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7.

Esta invenção é também direcionada, em parte, a um método

para proteger um canino de lesões respiratórias (isto é, impedir, reduzir o risco, tardar o princípio, suprimir, melhorar, ou erradicar lesões respiratórias) causadas por vírus de influenza canina. O método compreende administrar ao canino uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3, e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7.

Esta invenção é também direcionada, em parte, a um método para proteger um canino de ter vírus de influenza canina em secreção nasal ou oral (isto é, impedir, reduzir o risco, tardar o princípio, suprimir, melhorar, ou erradicar o vírus de influenza canina em secreção nasal ou oral) causada por infecção do vírus de influenza canina. O método compreende administrar ao canino uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3, e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7.

Esta invenção é também direcionada, em parte, a uma vacina de influenza canina. Em algumas modalidades, por exemplo, a vacina compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3, e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7.

Esta invenção é também direcionada, em parte, a um kit para proteger um canino de infecção do vírus de influenza. O kit compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3, e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7. Além disso, o kit compreende pelo menos um dos seguintes:

- um aparelho para administrar a vacina ao canino,
- um excipiente farmacêuticamente aceitável que auxilia na administração da vacina ao canino,
- um excipiente farmacêuticamente aceitável que intensifica a resposta imune do canino à vacina,

um alimento a ser consumido pelo canino simultaneamente com a vacina, e/ou

um medicamento a ser consumido pelo canino simultaneamente com a vacina.

- 5 Outros benefícios da invenção das Requerentes serão evidentes a alguém versado na técnica ao ler este relatório descritivo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figuras 1A-1B mostram relações filogenéticas entre os genes de hemaglutinina. Figura 1A mostra uma árvore de genes de HA de isolados representativos caninos, seres humanos, aviários, suínos, e eqüinos, incluindo A/Budgerigar/Hokkaido/1/77 (H4) como estranho. Figura 1B mostra uma árvore dos genes de HA de vírus de influenza canina com os genes de HA eqüinos contemporâneos e mais velhos, usando A/Duck/Ukraine/63 (H3) como estranho. Árvores filogenéticas foram deduzidas das seqüências de nucleotídeo pelo método de junção de vizinhos e valores de análise de auto-carregador $\geq 90\%$ são mostrados. A barra denota o número de alterações de nucleotídeo por comprimento de unidade das ramificações de árvores horizontais.

Figuras 2A-2B mostram detecção imuno-histoquímica de antígeno de H3 de influenza nos pulmões. Seções do tecido pulmonar foram sondadas com um anticorpo monoclonal de camundongo para hemaglutinina de H3 e ligação foi detectada através de reação de imunoperoxidase (precipitado marrom). Figura 2A mostra epitélio bronquial de um galgo com doença espontânea. Antígeno de H3 viral foi detectado em citoplasma de célula epitelial bronquial e em macrófagos em lumens da via aérea e em espaços alveolares. Figura 2B mostra epitélio bronquial de um cão 5 dias após inoculação com A/canine/Florida/43/2004 (H3N8). Antígeno de H3 viral foi detectado em citoplasma de célula epitelial bronquial. Barra de escala, 66 μm .

Figura 3 mostra as alterações histológicas características nos brônquios de galgos que morreram de pneumonia hemorrágica associada à infecção do vírus de influenza. Os tecidos são tingidos com H&E. Painel superior: Brônquio normal com células epiteliais ciliadas, células mucosas, e

células basais. Painel inferior: Brônquio de um galgo com influenza espontânea. Há necrose e erosão das células epiteliais ciliadas bronquiais. Barra de escala, 100 μ m.

Figuras 4A-4B mostram relações filogenéticas entre os genes de hemaglutinina de H3. Figura 4A mostra uma árvore filogenética dos genes de HA do vírus de influenza canina com os genes de HA eqüinos contemporâneos e mais velhos. Figura 4B mostra uma árvore filogenética da proteína de HA do vírus de influenza canina com o HA eqüino contemporâneo e mais velho. Árvores filogenéticas foram deduzidas de seqüências genéticas ou de aminoácido pelo método de junção de vizinho e valores de análise de auto-carregador ≥ 80 % são mostrados. A barra denota o número de alterações de aminoácido por comprimento de unidade das ramificações de árvores horizontais.

Figura 5 mostra proteína de H3 do vírus de influenza em células epiteliais de brônquios e glândulas bronquiais em pulmões de cães que morreram de pneumonia associada à infecção do vírus de influenza. Painéis superiores: Erosão de células epiteliais bronquiais ciliadas nos brônquios. Tecidos foram tingidos com H&E. Painéis inferiores: proteína de H3 do vírus de influenza nas células epiteliais de citoplasma bronquial (esquerda) e glândula bronquial (direito). Tecidos foram tingidos com um anticorpo monoclonal para influenza H3 detectado através de reação de imunoperoxidase (precipitado marrom) e contra-tingimento com hematoxilina.

Figuras 6A-6D mostram diagramas de amplificação de genes H3 e Matriz (Figura 6A e Figura 6B) obtidos da amplificação de padrões de RNA transcritos serialmente diluídos 10 vezes *in vitro*. Curvas padrão de genes H3 e Matriz (Figura 6C e Figura 6D) construídas representando em gráfico o log de concentrações de RNA de partida contra o ciclo de limiar (Ct) obtido de cada diluição.

Figura 7 mostra sensibilidade de Directigen Flu A foi testada com matérias-primas de vírus serialmente diluídas 10 vezes incluindo A/Wyoming/3/2003 e A/canine/FL/242/2003. O triângulo roxo indica resultado positivo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

5 SEQ ID NO: 2 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

10 SEQ ID NO: 4 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

15 SEQ ID NO: 6 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 7 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

20 SEQ ID NO: 8 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

25 SEQ ID NO: 10 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 11 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

30 SEQ ID NO: 12 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 13 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de

influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 14 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 13.

- 5 SEQ ID NO: 15 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Florida/43/04) codificando uma proteína de HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 16 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 15.

- 10 SEQ ID NO: 17 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 18 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 17.

- 15 SEQ ID NO: 19 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 20 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 19.

- 20 SEQ ID NO: 21 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 22 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 21.

- 25 SEQ ID NO: 23 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 24 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 23.

- 30 SEQ ID NO: 25 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 26 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 25.

5 SEQ ID NO: 27 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 28 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 27.

10 SEQ ID NO: 29 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 30 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 29.

15 SEQ ID NO: 31 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (FL/242/03) codificando uma proteína de HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 32 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 31.

20 SEQ ID NO: 33 é a forma madura da proteína de HA mostrada na SEQ ID NO: 16 em que a seqüência de sinal de aminoácido 16 N-terminal foi removida.

SEQ ID NO: 34 é a forma madura da proteína de HA mostrada na SEQ ID NO: 32 em que a seqüência de sinal de aminoácido 16 N-terminal foi removida.

25 SEQ ID NO: 35 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 36 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 37 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

30 SEQ ID NO: 38 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 39 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de

acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 41 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

5 SEQ ID NO: 42 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 43 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 44 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

10 SEQ ID NO: 45 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 46 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

15 SEQ ID NO: 47 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 48 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 47.

20 SEQ ID NO: 49 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 50 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 49.

25 SEQ ID NO: 51 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 52 é a seqüência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 51.

30 SEQ ID NO: 53 é uma seqüência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 54 é a seqüência de aminoácido codificada pela

SEQ ID NO: 53.

SEQ ID NO: 55 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

5 SEQ ID NO: 56 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 55.

SEQ ID NO: 57 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

10 SEQ ID NO: 58 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 57.

SEQ ID NO: 59 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

15 SEQ ID NO: 60 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 59.

SEQ ID NO: 61 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Miami/2005) codificando uma proteína de HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

20 SEQ ID NO: 62 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 61.

SEQ ID NO: 63 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de PB2 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

25 SEQ ID NO: 64 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 63.

SEQ ID NO: 65 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de PB1 que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

30 SEQ ID NO: 66 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 65.

SEQ ID NO: 67 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de

influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de PA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 68 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 67.

- 5 SEQ ID NO: 69 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de NS que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 70 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 69.

- 10 SEQ ID NO: 71 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de NP que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 72 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 71.

- 15 SEQ ID NO: 73 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de NA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 74 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 73.

- 20 SEQ ID NO: 75 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de MA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 76 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 75.

- 25 SEQ ID NO: 77 é uma sequência de nucleotídeo de um vírus de influenza canina (Jacksonville/2005) codificando uma proteína de HA que pode ser usada de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 78 é a sequência de aminoácido codificada pela SEQ ID NO: 77.

- 30 SEQ ID NO: 79 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 80 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de

acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 81 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

5 SEQ ID NO: 82 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 83 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 84 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

10 SEQ ID NO: 85 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 86 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

15 SEQ ID NO: 87 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

SEQ ID NO: 88 é um oligonucleotídeo que pode ser usado de acordo com a presente invenção.

REVELAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

20 Trata-se a invenção em questão do vírus de influenza isolado que é capaz de infectar canídeos e causar doença das vias respiratórias. Em uma modalidade, um vírus de influenza da invenção compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína tendo uma sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 25 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo compreende a sequência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante 30 das mesmas. Vírus de influenza da presente invenção pode ter um subtipo de HA de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, e H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, ou H16 ou um subtipo de NA de N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, OU

N9. Em uma modalidade específica, um vírus de influenza da presente invenção é um subtipo H3. Vírus pode ser isolado de cães infectados e cultivado em células ou ovos de acordo com os métodos descritos aqui. Em uma modalidade exemplificada, o vírus de influenza é um vírus de influenza A.

5 Trata-se a invenção em questão dos polinucleotídeos que compreendem todo ou parte de um gene ou genes ou um segmento genômico de um vírus de influenza da presente invenção. Em uma modalidade, um polinucleotídeo da invenção compreende um gene de hemaglutinina de influenza (HA), gene de neuraminidase (NA), gene de nucleoproteína (NP),
 10 gene de proteína de matriz (MA ou M), gene de proteína de polimerase básica (PB), gene de proteína de polimerase ácida (PA), gene de proteína não-estrutural (NS), ou um fragmento funcional ou variante de qualquer um destes genes. Em uma modalidade específica, um polinucleotídeo da invenção compreende o gene de hemaglutinina (HA), ou um fragmento funcional ou
 15 variante do mesmo. Em uma modalidade adicional, o gene de HA codifica uma proteína de hemaglutinina que tem um ou mais dos seguintes: uma serina na posição 83; uma leucina na posição 222; uma treonina na posição 328; e/ou uma treonina na posição 483, versus a sequência de aminoácido de sequência eqüina de H3 consenso. Em uma modalidade, o gene de HA
 20 codifica um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido mostrada nas SEQ ID NOs: 16, 32, 62, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma modalidade específica, o gene de HA compreende uma sequência de nucleotídeo mostrada nas SEQ ID NOs: 15, 31, 61, ou 77.

25 Em uma modalidade, um polinucleotídeo da invenção codifica um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma
 30 modalidade específica, o polinucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74,

76, ou 78, compreendem a seqüência de nucleotídeo mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente, ou uma seqüência que codifica um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78. Desse modo, a invenção em questão refere-se às seqüências de polinucleotídeo que compreendem a seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante, incluindo uma variante degenerada, de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77. Em uma modalidade adicional específica, um polinucleotídeo da invenção pode compreender: Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 3; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 5; Nucleotídeos 1-657 da SEQ ID NO: 7; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 9; Nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 11; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 13; Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 15; Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 19; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 21; Nucleotídeos 1-657 da SEQ ID NO: 23; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 25; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 29; Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 31; Nucleotídeos 1-2277 da SEQ ID NO: 47; Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 49; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 51; Nucleotídeos 1-690 da SEQ ID NO: 53; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 55; Nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 57; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 59; Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 61; Nucleotídeos 1-2277 da SEQ ID NO: 63; Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 65; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 67; Nucleotídeos 1-690 da SEQ ID NO: 69; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 71; Nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 73; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 75; e Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 77. Seqüências de nucleotídeo e de aminoácido de seqüências virais de polinucleotídeo e de polipeptídeo contempladas dentro do escopo da presente in-

venção foram também depositadas com os acessos de GenBank N DQ124147 a DQ124161 e DQ124190, a revelação destas é incorporada aqui por referência.

Trata-se a invenção em questão também dos polipeptídeos codificados por polinucleotídeos de um vírus de influenza da presente invenção. Trata-se a invenção em questão também dos fragmentos funcionais e/ou imunogênicos e variantes dos polipeptídeos em questão. Polipeptídeos contemplados incluem proteína de HA, proteína de NA, proteína de NS, nucleoproteína, proteína básica de polimerase, proteína ácida de polimerase, e proteína de matriz de um vírus de influenza da invenção. Em uma modalidade exemplificada, um polipeptídeo da invenção tem uma sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas.

Trata-se a invenção em questão também das construtos de expressão de polinucleotídeo que compreendem uma sequência de polinucleotídeo da presente invenção. Em uma modalidade, um construto de expressão da invenção compreende uma sequência de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 compreende a sequência de nucleotídeo mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente, ou uma sequência que codifica um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62,

64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78. Desse modo, trata-se a invenção em questão das construtos de expressão que compreendem uma seqüência de polinucleotídeo compreendendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante, incluindo uma variante degenerada, de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77. Em uma modalidade preferida, um construto de expressão da presente invenção provê sobreexpressão de um polinucleotídeo da invenção operavelmente ligado.

Construtos de expressão da invenção em geral incluem elementos reguladores que são funcionais na célula hospedeira intencionada na qual o construto de expressão é para ser expressado. Desse modo, uma pessoa de habilidade usual na técnica pode selecionar elementos reguladores para uso, por exemplo, em células hospedeiras humanas, células hospedeiras mamíferas, células hospedeiras de inseto, células hospedeiras de levedura, células hospedeiras bacterianas, e células hospedeiras de planta. Em uma modalidade, os elementos reguladores são os que são funcionais em células caninas. Elementos reguladores incluem os promotores, seqüências de terminação de transcrição, seqüências de terminação de translação, intensificadores, e elementos de poliadenilação. Como aqui usado, o termo "construto de expressão" refere-se a uma combinação de seqüências de ácido nucléico que provêem transcrição de uma seqüência de ácido nucléico operavelmente ligada. Como aqui usado, o termo "operavelmente ligado" refere-se a uma justaposição dos componentes descritos em que os componentes estão em uma relação que os permite funcionar em sua maneira intencionada. Em geral, componentes operavelmente ligados estão em relação contígua.

Um construto de expressão da invenção pode compreender uma seqüência de promotor operavelmente ligada a uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção. Os promotores podem ser incorporados em um polinucleotídeo usando técnicas padrão conhecidas na

técnica. Múltiplas cópias de promotores ou múltiplos promotores podem ser usados em um construto de expressão da invenção. Em uma modalidade preferida, um promotor pode ser posicionado em volta da mesma distância do sítio de começo de transcrição no construto de expressão como é do sítio de começo de transcrição em seu ambiente genético natural. Alguma variação nesta distância é permitida sem diminuição substancial na atividade do promotor. Um sítio de começo de transcrição é tipicamente incluso no construto de expressão.

Preferivelmente, o promotor associado a um construto de expressão da invenção provê sobreexpressão de um polinucleotídeo da invenção operavelmente ligado.

Promotores para uso com um construto de expressão da invenção em células eucarióticas podem ser de origem viral ou celular. Promotores virais incluem, mas não são limitados a, promotores de gene de citomegalovírus (CMV), promotores de SV40 precoces ou tardios, ou promotores de gene do vírus de sarcoma Rous (RSV). Promotores de origem celular incluem, mas não são limitados a, promotor de gene de desmina e promotor de gene de actina. Promotores adequados para o uso com um construto de expressão da invenção em células de levedura incluem, mas não são limitados a, promotor de 3-fosfoglicerato cinase, promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, promotor de metalotioneína, promotor de álcool desidrogenase-2, e promotor de hexocinase.

Se o construto de expressão vier a ser fornecido ou introduzido em uma célula de planta, então promotores virais de planta, tais como, por exemplo, um vírus do mosaico de couve-flor (CaMV) 35S (incluindo o promotor de 35S de CaMV intensificado (vide, por exemplo patente U. S. Nº 5.106.739 e An, 1997)) ou um promotor de 19S de CaMV pode ser usado. Outros promotores que podem ser usados para construtos de expressão em plantas incluem, por exemplo, promotor de prolifera, promotor de Ap3, promotores de choque térmico, 1' ou 2'-promotor de T-DNA de *A. tumefaciens*, promotor de poligalacturonase, promotor de chalcona A sintase (CHS-A) de petúnia, promotor de PR-1a de tabaco, promotor de ubiquitina, promotor de

actina, promotor de gene de alcA, promotor de pin2 (Xu et al., 1993), promotor de Wipl de milho, promotor de gene de trpA de milho (Patente U. S. Nº 5.625.136), promotor de gene de CDPK de milho, e promotor de SSU de RUBISCO (Patente U. S. Nº 5.034.322) podem também ser usados. Promotores raiz-específicos, tais como quaisquer uma das seqüências de promotor descritas na Patente U. S. Nº 6.455.760 ou patente U. S. Nº 6.696.623, ou nos pedidos de patente publicados U. S. Nºs 20040078841; 20040067506; 20040019934; 20030177536; 20030084486; ou 20040123349, pode ser usado com um construto de expressão da invenção. Promotores constitutivos (tais como o promotor de CaMV, ubiquitina, actina, ou de NOS), os promotores de maneira desenvolvida regulados, e os promotores induzíveis (tais como aqueles promotores que podem ser induzidos por calor, luz, hormônios, ou químicas) são também contemplados para o uso com construtos de expressão de polinucleotídeo da invenção. Promotores tecido-específicos, por exemplo os promotores fruta-específicos, tais como o promotor de E8 de tomate (número de acesso: AF515784; Good et al. (1994)) podem também ser usados. Promotores semente-específicos tais como o promotor de um gene de β -faseolina (por exemplo, de feijão roxo) ou um gene de glicinina (por exemplo, de feijão-soja), e similares, podem também ser usados.

Para expressão em sistemas procarióticos, um construto de expressão da invenção pode compreender os promotores tais como, por exemplo, promotor de fosfatase alcalina, promotor de triptofano (trp), promotor de lambda P_L, promotor de lactamase, promotor de lactose, promotor de phoA, promotor de T3, promotor de T7, ou promotor de tac (de Boer et al., 1983).

Construtos de expressão da invenção podem opcionalmente conter uma seqüência de terminação de transcrição, uma seqüência de terminação de translação, uma seqüência que codifica um peptídeo sinal, e/ou elementos intensificadores. Regiões de terminação de transcrição podem tipicamente ser obtidas da região não-transladada de 3' de uma seqüência de gene eucariótico ou viral. Seqüências de terminação de transcrição podem estar posicionadas a jusante de uma seqüência de codificação para prover terminação eficiente. Uma seqüência de peptídeo sinal é uma se-

qüência de aminoácido curta tipicamente presente no término amino de uma proteína que é responsável pela recolocação de um polipeptídeo maduro operavelmente ligado a uma gama extensiva de destinos celulares pós-translacionais, variando de um compartimento de organela específico a sítios de ação de proteína e o ambiente extracelular. Produtos de gene alvejantes para um destino celular e/ou extracelular intencionado através do uso de uma seqüência de peptídeo sinal operavelmente ligada são contemplados para o uso com os polipeptídeos da invenção. Intensificadores clássicos são elementos de ação cis que aumentam a transcrição de gene e podem também ser incluídos no construto de expressão. Elementos intensificadores clássicos são conhecidos na técnica, e incluem, mas não são limitados a, elemento intensificador de CaMV 35S, elemento intensificador de promotor prematuro de citomegalovírus (CMV), e elemento intensificador de SV40. Elementos intensificadores mediados por íntron que intensificam a expressão de gene são também conhecidos na técnica. Estes elementos devem estar presentes dentro da região transcrita e devem ser dependente da orientação.

Seqüências de DNA que direcionam a poliadenilação de mRNA transcrita do construto de expressão podem também ser incluídas no construto de expressão, e incluem, mas não são limitadas a, um sinal de octopina sintase ou de nopalina sintase.

Construtos de expressão podem também incluir um ou genes marcadores selecionáveis mais dominantes, incluindo, por exemplo, genes que codificam resistência a antibióticos e/ou resistência a herbicidas para selecionar células transformadas. Genes de resistência a antibióticos podem prover resistência a um ou mais dos antibióticos a seguir: higromicina, canamicina, bleomicina, G418, estreptomicina, paromomicina, neomicina, e espectinomomicina. Resistência à canamicina pode ser fornecida através de neomicina fosfotransferase (NPT II). Genes de resistência a herbicidas podem prover resistência a fosfinotricina acetiltransferase ou glifosato. Outros marcadores usados para triagem de transformação celular incluem, mas não são limitados a, genes que codificam β -glucuronidase (GUS), β -galactosidase,

luciferase, nopalina sintase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), proteína de fluorescência verde (GFP), ou GFP intensificada (Yang et al., 1996).

Trata-se a invenção em questão também dos vetores de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de polinucleotídeo da invenção que codifica um polipeptídeo da invenção. Sítios únicos da enzima de restrição podem ser incluídos nas terminações de 5' e 3' de um construto de expressão ou polinucleotídeo da invenção para permitir inserção em um vetor de polinucleotídeo. Como aqui usado, o termo "vetor" refere-se a qualquer elemento genético, incluindo por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, cromossomos, fago, vírus, e outros que são capazes de replicação quando associados aos elementos de controle apropriados e que podem transferir seqüências de polinucleotídeo entre as células. Vetores contêm uma seqüência de nucleotídeo que permite o vetor replicar em uma célula hospedeira selecionada. Vários vetores estão disponíveis para expressão e/ou clonagem, e incluem, mas não são limitados a, pBR322, série de pUC, série de M13, série de pGEM, e vetores de pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, CA e Promega, Madison, WI).

Trata-se a invenção em questão também do oligonucleotídeo e iniciadores, tais como iniciadores de reação em cadeia de polimerase (PCR) que podem hibridar com a uma seqüência de codificação ou não-codificação de um polinucleotídeo da presente invenção. Sondas de oligonucleotídeo da invenção podem ser usadas nos métodos para detectar seqüências de ácido nucléico do vírus de influenza. Iniciadores de oligonucleotídeo da invenção podem ser usados nos métodos de PCR e outros métodos que envolvem amplificação de ácido nucléico. Em uma modalidade preferida, uma sonda ou iniciador da invenção pode hibridar com um polinucleotídeo da invenção sob condições rigorosas. Sondas e iniciadores da invenção podem opcionalmente compreender uma marcação detectável ou molécula repórter, tais como moléculas fluorescentes, enzimas, metade radioativa, e outros. Sondas e iniciadores da invenção podem ser de qualquer comprimento adequado para o método ou ensaio em que eles estão sendo empregados. Tipicamente, as sondas e iniciadores da invenção serão 10 a 500 ou mais nucleo-

tídeos em comprimento. As sondas e iniciadores que são 10 a 20, 21 a 30, 31 a 40, 41 a 50, 51 a 60, 61 a 70, 71 a 80, 81 a 90, 91 a 100, ou 101 ou mais nucleotídeos em comprimento são contemplados dentro do escopo da invenção. Em uma modalidade, sondas e iniciadores são de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos em comprimento. As sondas e iniciadores da invenção podem ter identidade de sequência de nucleotídeo total (100 %) com a sequência de polinucleotídeo, ou a identidade de sequência pode ser menor que 100 %. Por exemplo, identidade de sequência entre uma sonda ou iniciador e uma sequência pode ser 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 % ou qualquer outra identidade de sequência de porcentagem contanto que a sonda ou iniciador possam hibridar sob condições rigorosas com uma sequência de nucleotídeo de um polinucleotídeo da invenção. Sondas e iniciadores exemplificados da invenção incluem aqueles tendo a sequência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, e SEQ ID NO: 46, ou um fragmento funcional ou variante de qualquer uma das SEQ ID NOs: 35-46.

Como aqui usado, os termos "ácido nucléico", "polinucleotídeo", e "oligonucleotídeo" referem-se a um deoxirribonucleotídeo, ribonucleotídeo, ou um polímero de deoxirribonucleotídeo e de ribonucleotídeo misturado na forma uni ou bifilamentar, e a menos que do contrário limitado, abrangeria análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que podem funcionar de uma maneira similar como os nucleotídeos de ocorrência natural. Sequências de polinucleotídeo incluem a sequência de filamento de DNA que pode ser transcrita no RNA e o filamento de RNA que pode ser transladado na proteína. A sequência complementar de qualquer ácido nucléico, polinucleotídeo, ou oligonucleotídeo da presente invenção é também contemplada dentro do escopo da invenção. Sequências de polinucleotídeo também incluem tanto as sequências de comprimento total como também as sequências mais curtas derivadas das sequências de comprimento total. A invenção em questão

também abrange aqueles polinucleotídeos que são complementares em sequência aos polinucleotídeos revelados aqui. Polinucleotídeos e polipeptídeos da invenção podem ser fornecidos na forma purificada ou isolada.

Por causa da degeneração do código genético, uma variedade de seqüências de polinucleotídeo diferentes pode codificar um polipeptídeo da presente invenção. Uma tabela mostrando todos possíveis códons trigêmeos (e onde U também representa T) e o aminoácido codificado por cada códon é descrita em Lewin (1985). Além disso, está bem dentro da habilidade de uma pessoa treinada na técnica criar seqüências de polinucleotídeo alternativas que codificam os mesmo, ou essencialmente o mesmo, polipeptídeos da invenção em questão. Estas seqüências de polinucleotídeo variantes degeneradas e alternativas estão dentro do escopo da invenção em questão. Como aqui usado, referências a "essencialmente a mesma" seqüência refere-se às seqüências que codificam substituições, deleções, adições, ou inserções de aminoácido que não alteram materialmente a atividade funcional e/ou imunogênica do polipeptídeo codificado pelos polinucleotídeos da presente invenção.

Trata-se a invenção em questão também das variantes dos polinucleotídeos da presente invenção codificando os polipeptídeos da invenção. Seqüências variantes incluem aquelas seqüências em que um ou mais nucleotídeos da seqüência foram substituídos, deletados, e/ou inseridos. Os nucleotídeos que podem ser substituídos por nucleotídeos naturais de DNA têm uma metade de base que pode incluir, mas não é limitada a, inosina, 5-fluorouracila, 5-bromouracila, hipoxantina, 1-metilguanina, 5-metilcitosina, e base tritilada. A metade de açúcar do nucleotídeo em uma seqüência pode também ser modificada e inclui, mas não é limitada a, arabinose, xilulose, e hexose. Além disso, a base de adenina, citosina, guanina, timina, e uracila dos nucleotídeos pode ser modificada com grupos acetila, metila, e/ou tio. Seqüências que contêm as substituições, deleções, e/ou inserções de nucleotídeo podem ser preparadas e testadas usando técnicas padrão conhecidas na técnica.

Substituição de aminoácidos diferentes daqueles especificamen-

te exemplificados ou naturalmente presentes em um polipeptídeo da invenção é também contemplada dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, aminoácidos não-naturais podem ser substituídos pelos aminoácidos de um polipeptídeo, desde que o polipeptídeo tendo os aminoácidos substituídos retenha substancialmente a mesma atividade funcional que o polipeptídeo em que os aminoácidos não foram substituídos. Exemplos de aminoácidos não-naturais incluem, mas não são limitados a, ornitina, citrulina, hidroxiprolina, homoserina, fenilglicina, taurina, iodotirosina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-amino butírico, ácido γ -amino butírico, ácido ϵ -amino hexanóico, ácido 6-amino hexanóico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiônico, norleucina, norvalina, sarcosina, homocitrulina, ácido cistéico, τ -butilglicina, τ -butilalanina, fenilglicina, cicloexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos projetistas tais como, - aminoácidos de β -metila, aminoácidos de C-metila, aminoácidos de N-metila, e análogos de aminoácido em geral. Aminoácidos não-naturais também incluem aminoácidos tendo grupos laterais derivatizados. Além disso, quaisquer dos aminoácidos na proteína podem ser da forma D (dextrorrotatório) ou da forma L (levorrotatório). Variantes alélicas de uma sequência de proteína de um polipeptídeo da presente invenção são também abrangidas dentro do escopo da invenção.

Aminoácidos podem ser em geral categorizados nas classes a seguir: não-polar, polar descarregado, básico, e ácido. Substituições conservadoras por meio das quais um polipeptídeo da presente invenção que tem um aminoácido de uma classe é substituído com outro aminoácido da mesma classe estão incluídos dentro do escopo da invenção em questão contanto que o polipeptídeo que ainda tem a substituição retenha substancialmente a mesma atividade funcional que o polipeptídeo que não tem a substituição. Polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo uma ou mais substituições de aminoácido na sequência são contemplados dentro do escopo da presente invenção. Tabela 11 abaixo fornece uma listagem de exemplos de aminoácidos que referem-se a cada classe. Abreviações de aminoácido de letra minúscula são definidas na Tabela 12.

Fragmentos e variantes de polipeptídeos de vírus de influenza da presente invenção podem ser gerados usando métodos padrão conhecidos na técnica e testados quanto à presença de função ou imunogenicidade usando técnicas padrão conhecidas na técnica. Por exemplo, para testar

5 fragmentos e/ou variantes de um polipeptídeo de neuraminidase da invenção, a atividade enzimática pode ser ensaiada. Desse modo, um artesão normalmente versado pode facilmente preparar e testar fragmentos e variantes de um polipeptídeo da invenção e determinar se o fragmento ou variante retém atividade com relação ao polipeptídeo de comprimento total ou um

10 não-variante.

Polinucleotídeos e polipeptídeos contemplados dentro do escopo da invenção em questão podem também ser definidos em termos de faixas identidade e/ou similaridade mais particulares com aquelas seqüências da invenção especificamente exemplificadas aqui. A identidade de seqüên-

15 cia tipicamente será maior que 60 %, preferivelmente maior que 75 %, mais preferivelmente maior que 80 %, até mesmo mais preferivelmente maior que 90 %, e pode ser maior que 95 %. A identidade e/ou similaridade de uma seqüência pode ser 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63,

20 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99 % quando comparada a uma seqüência exemplificada aqui. A menos que do contrário especificado, como aqui usado percentual de identidade e/ou similaridade de seqüência de duas seqüências pode ser determinado usando o algoritmo de

25 Karlin e Altschul (1990), modificado como em Karlin e Altschul (1993). Um tal algoritmo é incorporado no programa NBLAST e XBLAST de Altschul et al. (1990). Pesquisas de BLAST podem ser executadas com o programa de NBLAST, contagem = 100, comprimento de palavra = 12, para obter as seqüências com o percentual de identidade de seqüência desejado. Para obter alinhamentos intervalados para propósitos de comparação, Gapped BLAST

30 pode ser usado como descrito em Altschul et al. (1997). Ao utilizar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros predefinidos dos respectivos programas (NBLAST e XBLAST) podem ser usados. Vide sítio de rede

de NCBI/NIH.

A invenção em questão também contempla aquelas moléculas de polinucleotídeo que têm seqüências que são suficientemente homólogas com as seqüências de polinucleotídeo exemplificadas aqui para permitir hibridação com aquela seqüência sob condições rigorosas padrão e métodos padrão (Maniatis et al., 1982). Como aqui usado, condições "rigorosas" para hibridação referem-se às condições em que hibridação é tipicamente realizada durante à noite a 20-25°C abaixo da temperatura de fundição (T_m) do DNA híbrido em 6x SSPE, solução de 5x Denhardt, 0,1 % SDS, 0,1 mg/ml de DNA desnaturado. A temperatura de fundição, T_m , é descrita pela fórmula a seguir (Beltz et al., 1983):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41(\% \text{ G+C}) - 0,61 (\% \text{ formamida}) - 600/\text{comprimento do dúplex nos pares de base.}$$

Lavagens são tipicamente realizadas como segue:

(1) Duas vezes em temperatura ambiente durante 15 minutos em 1x SSPE, 0,1 % SDS (lavagem de severidade baixa).

(2) Uma vez em $T_m - 20^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos em 0,2x SSPE, 0,1 % SDS (lavagem de severidade moderada).

Trata-se a invenção em questão também das proteínas virais e peptídeos codificados pelos genes de um vírus de influenza da presente invenção. Em uma modalidade, a proteína viral é uma proteína de HA madura. Em uma modalidade específica, a proteína de HA madura compreende um ou mais dos seguintes: uma serina na posição 82; uma leucina na posição 221; uma treonina na posição 327; e/ou uma treonina na posição 482. Em uma modalidade exemplificada, a proteína de HA madura tem uma seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante da SEQ ID NO: 33 ou SEQ ID NO: 34. Em outra modalidade, a proteína viral é uma proteína de NA, proteína de NS, proteína de PB, proteína de PA, ou proteína de MA. As proteínas virais e peptídeos da invenção podem ser usados para gerar anticorpos que especificamente ligam à proteína ou peptídeo. Proteínas virais e peptídeos da presente invenção podem também ser usados como imunóge-

nos e em composições de vacina.

Trata-se a invenção em questão também das composições e métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal hospedeiro suscetível e causar doença das

5 vias respiratórias. A invenção pode ser usada para induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza de qualquer subtipo em um animal hospedeiro suscetível. Por exemplo, o vírus de influenza pode ser um subtipo de HA de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, ou H16, e um subtipo de NA de N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, ou N9. Em

10 uma modalidade, o subtipo de HA é H3 ou H5. Em uma modalidade adicional, o subtipo de NA é N7 ou N8. Em uma modalidade específica, uma resposta imune é induzida contra um vírus de influenza de subtipo H3N8. Em uma modalidade, o animal hospedeiro é um canídeo. Caninos incluem caninos selvagens, de jardim zoológico, e domésticos, tais como lobos, coiotes,

15 e raposas. Caninos também incluem cães, particularmente cães domésticos, tais como, por exemplo, cães de companhia puros e/ou mestiços, cães de exposição, cães de trabalho, cães de matilha, cães de caça, cães de guarda, cães policiais, cães de corrida, e/ou cães de laboratório. Em uma modalidade específica, o animal hospedeiro é um cão domesticado, tal como um galgo.

20 Em uma modalidade, um animal é administrado com uma quantidade eficaz de uma composição imunogênica da presente invenção suficiente para induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza da invenção. A resposta imune pode ser uma resposta imune humoral e/ou celular. Em uma modalidade específica, a resposta imune é uma resposta imune protetora

25 que é capaz de impedir ou minimizar infecção viral no animal hospedeiro imunizado durante algum período de tempo subsequente à imunização. Desse modo, trata-se a invenção em questão também de vacina e métodos que podem proporcionar a um animal vacinado uma resposta imune protetora para um vírus da presente invenção.

30 Como descrito aqui, a vacina ou composições imunogênicas da invenção em questão podem compreender vírus inteiro livre de célula, incluindo vírus atenuado ou inativado, ou porções do vírus, incluindo partículas

de subvírion (incluindo "vacina fendida" em que um virion é tratado para remover alguns ou todos os lipídios virais), proteínas virais (incluindo proteínas individuais e complexos macromoleculares de proteínas múltiplas), polipeptídeos, e peptídeos, como também linhagens celulares infectadas por vírus, ou uma combinação de qualquer um destes. Vacina ou composições imunogênicas que compreendem linhagens celulares infectadas por vírus podem compreender linhagens celulares múltiplas, cada uma infectada com uma cepa viral diferente.

Em uma modalidade da invenção, um canino pode ser imunizado com um ou mais vacinas do vírus de influenza inativado (isto é, morto) e/ou atenuado vivo ou vacinas que compreendem um ou uma multiplicidade de antígenos do vírus de influenza de um ou mais isolados virais. Em uma modalidade, o vírus de influenza é um vírus de influenza canina. Em outra modalidade, o vírus de influenza é um vírus de influenza eqüina que codifica ou expressa um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 %, ou pelo menos cerca de 96 %, ou 97 %, ou 98 %, ou 99 % ou mais identidade de seqüência de aminoácido com um polipeptídeo de vírus de influenza canina. Em uma modalidade, um antígeno de influenza usado em uma vacina da presente invenção tem pelo menos cerca de 96 % identidade de seqüência com um antígeno de HA e/ou antígeno de NA de um vírus de influenza canina.

Um exemplo de uma vacina inativada é EQUICINE II[®] que foi comercializada por Intervet Inc. (Millsboro, DE, USA) como uma vacina líquida. EQUICINE II[®] contém vírus de influenza de A/Pennsylvania/63 inativado ("A/Pa/63") e vírus de influenza de A/eqüino/Kentucky/93 ("A/KY/93") com carbopol (isto é, HAVLOGEN[®] (Intervet Inc.)). Mais especificamente, uma dose de EQUICINE II[®] contém: A/Pa/63 inativado a 106.0 EID₅₀, A/KY/93 inativado a 106.7 EID₅₀, 0,25 % em volume de carbopol, e PBS suficiente para criar um volume total de 1 ml.

Outro exemplo de uma vacina inativada é vírus de influenza eqüina A/eqüino/Ohio/03 ("Ohio 03"). Em algumas modalidades, uma tal vacina contém CARBIGEN[®] que é um adjuvante com base em polímero emulsi-

ficado comercialmente disponível de MVP Laboratories, Inc. (Ralston, NE). Em tais vacinas, uma unidade de dosagem tipicamente compreende pelo menos cerca de 250 unidades de HA do vírus, de cerca de 250 a cerca de 12.500 unidades de HA do vírus, ou de cerca de 1000 a cerca de 6200 unidades de HA do vírus. A concentração recomendada de CARBIGEN® é de cerca de 5 a cerca de 30 % (em massa).

Um exemplo de uma vacina atenuada viva é influenza de equino/ Kentucky/91 ("A/KY/91") modificada viva na forma de uma vacina secada por congelamento que pode ser reconstituída com água. Em algumas modalidades, esta reconstituição é conduzida usando água do tipo vacina suficiente para trazer a dosagem de vacina para um volume total de 1 ml. Aspectos de tais vacinas são debatidos, por exemplo, nas Patentes U. S. Nºs 6.436.408; 6.398.774; e 6.177.082, que são incorporadas por referência em sua totalidade nesta patente. Quando reconstituída, uma dose de uma tal vacina pode, por exemplo, conter A/KY/91 a $10^{7,2}$ TCID₅₀ por ml, 0,015 grama de N-Z AMINE AS® por ml, 0,0025 grama de gelatina por ml, e 0,04 grama de lactose D por ml. N-Z AMINE AS® é uma fonte refinada de aminoácidos e peptídeos produzida por hidrólise enzimática de caseína. N-Z AMINE AS® é comercializada por Bio-Science de Kerry (Norwich, NY, USA).

Em uma modalidade preferida, a vacina compreende um antígeno de influenza de H3 que tem pelo menos cerca de 93 % de homologia com Florida/43/2004 nas seqüências de codificação de HA, tais como, por exemplo, a cepa de equino/New Market/79. Homologia preferida é pelo menos cerca de 96 %, tais como, por exemplo, as cepas de equino/Alaska/1/91 e equino/Santiago/85. Nos exemplos que seguem, os antígenos de influenza equino/Kentucky/91, equino-2/Kentucky/93, equino-1/Pennsylvania/63, e equino Ohio/03 foram incorporados nas vacinas. Vacinas preferidas também incluem vacinas que compreendem equino/Wisconsin/03, equino/Kentucky/02, equino/Kentucky/93, e equino/New Market 2/93. Nos exemplos que seguem, os vírus de H3N8 foram usados. Porém, é acreditado que outros vírus de influenza de H3 possam ser usados de acordo com esta invenção.

Vacinas atenuadas vivas podem ser preparadas através de mei-

os convencionais. Tais meios em geral incluem, por exemplo, modificar as cepas patogênicas por passagem *in vitro*, adaptação ao frio, modificação da patogenicidade do organismo através de manipulação genética, preparação de quimeras, inserção de antígenos em vetores virais, seleção de cepas do tipo selvagem não-virulentas, etc.

Em algumas modalidades, a cepa de vírus atenuado vivo é derivada por passagem serial do vírus do tipo selvagem através da cultura de células, animais de laboratório, animais não-hospedeiros, ou ovos. A acumulação de mutação genética durante tal(is) passagem(ns) tipicamente leva à perda progressiva de virulência do organismo para o hospedeiro original.

Em algumas modalidades, a cepa de vírus atenuado vivo é preparada por co-infecção de células permissíveis com um vírus mutante atenuado e vírus patogênico. O vírus recombinante resultante desejado tem a segurança do vírus atenuado com genes que codificam para antígenos protetores do vírus patogênico.

Em algumas modalidades, a cepa de vírus atenuado vivo é preparada por adaptação ao frio. Um vírus adaptado ao frio tem uma vantagem de replicar-se apenas na temperatura encontrada no trato respiratório superior. Um método de geração de um vírus de influenza eqüina adaptado ao frio foi descrito na Patente U. S. Nº 6.177.082. Um vírus adaptado ao frio resultante desejado confere um ou mais dos fenótipos a seguir: adaptação ao frio, sensibilidade à temperatura, interferência dominante, e/ou atenuação.

Em algumas modalidades, a cepa do vírus atenuado vivo é preparada através de meios moleculares, tais como mutação, deleção, ou inserção de ponto para converter um vírus patogênico em um vírus não-patogênico ou menos-patogênico comparado ao vírus original, ao mesmo tempo preservando as propriedades protetoras do vírus original.

Em algumas modalidades, o vírus atenuado vivo é preparado clonando o candidato de genes de antígenos protetores em um genoma de um vírus não-patogênico ou menos-patogênico ou outro organismo.

Vacinas de vírus inativado (isto é, "morto") podem ser prepara-

das inativando o vírus usando métodos convencionais. Tipicamente, tais vacinas incluem excipientes que podem intensificar uma resposta imune, como também outros excipientes que são convencionalmente usados nas vacinas. Por exemplo, nos exemplos que seguem, EQUICINE II® compreende HA-VLOGEN®. Inativação do vírus pode ser realizada tratando o vírus com químicas de inativação (por exemplo, formalina, propiolactona beta ("BPL"), bromoetilamina ("BEA"), e etilenimina binária ("BEI")) ou através de métodos não-químicos (por exemplo, calor, congelamento/descongelamento, ou sonicação) para incapacitar a capacidade de replicação do vírus.

10 Nos exemplos que seguem, eqüino/Ohio/03 foi usado como um vírus de desafio. É conhecido ter cerca de 99 % de homologia com o isolado Florida/43/04, e foi mostrado para induzir sintomas de infecção e soroconversão em cães. Exemplo 18 ilustra a eficácia da vacina de influenza eqüina em cães, mostrando inibição de titulações de hemaglutinação (ou "HI" ou
15 "HAI") em cães vacinados com antígeno de Ohio 03 inativado em uma composição de vacina compreendendo adjuvante de CARBIGEN®. Tabela 29 mostra pré-vacinação, pós-vacinação, e pós-segunda vacinação de titulações, como também pós-desafio. Os resultados indicam titulações de HI em cada pós-vacinação de estágio para os cães vacinados, com pequeno ou
20 nenhum aumento para controles. Tabela 30 ilustra os sinais clínicos, isolamento de vírus e os resultados de histopatologia do mesmo estudo. Embora animais desafiados não mostrassem sinais clínicos, eliminações do vírus, ou histopatologia positiva, as titulações de HI positivas (Tabela 29) indicam titulações de anticorpo significativas em animais imunizados.

25 Deveria ser observado que outras vacinas de antígeno de vírus de influenza de H3 são abrangidas por esta invenção também. Aquelas descritas neste relatório descritivo e nos exemplos a seguir são fornecidas para ilustrar a invenção e suas modalidades preferidas, e não limitar o escopo da invenção reivindicada.

30 Deve também ser observado que antígenos de influenza diferentes de antígenos de vírus de influenza de H3 podem ser usados de acordo com esta invenção. Tais antígenos incluem, por exemplo, aqueles de eqüi-

no/PA/63 que é um subtipo de eqüino A1 (H7N7). É contemplado que um ou mais de tais antígenos possam ser usados com ou sem um ou mais antígenos de influenza de H3.

Em geral, a vacina é administrada em uma quantidade terapêuticamente eficaz. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" é uma quantidade suficiente para induzir uma resposta protetora no paciente canino contra o vírus alvo. Tipicamente, uma dosagem é "terapêuticamente eficaz" se impedir, reduzir o risco, retardar o princípio, reduzir a expansão, melhorar, suprimir, ou erradicar a influenza ou um ou mais (tipicamente dois ou mais) de seus sintomas. Sintomas de influenza típicos incluem, por exemplo, febre (para cães, tipicamente; $\geq 39,4^{\circ}\text{C}$ ($\geq 10^3,0^{\circ}\text{F}$)), tosse, espirro, lesões histopatológicas, secreção ocular, secreção nasal, vômito, diarreia, depressão, perda de peso, entalo, hemoptise, e/ou estertores audíveis. Outros sintomas freqüentemente mais severos podem incluir, por exemplo, hemorragia nos pulmões, mediastino, ou cavidade pleural; traqueíte; bronquite; bronquiolite; broncopneumonia suportiva; e/ou infiltração do forro epitelial e lumens das vias aéreas dos pulmões com neutrófilos e/ou macrófagos.

A vacina pode ser administrada como parte de uma terapia de combinação, isto é, uma terapia que inclui, além da própria vacina, administrando um ou mais agentes ativos adicionais, adjuvantes, terapias, etc. Naquela circunstância, deveria ser reconhecido que a quantidade de vacina que constitui uma quantidade "terapêuticamente eficaz" pode ser menor que a quantidade de vacina que constituiria uma quantidade "terapêuticamente eficaz" se a vacina fosse administrada sozinha. Outras terapias podem incluir aquelas conhecidas na técnica, tais como, por exemplo, medicações antivirais, analgésicos, medicações redutoras de febre, expectorantes, medicações de anti-inflamação, anti-histamínicos, antibióticos para tratar infecção bacteriana que resulta da infecção por vírus de influenza, repouso, e/ou administração de fluidos. Em algumas modalidades, a vacina desta invenção é administrada em combinação com uma vacina de bordetella, vacina de adenovírus, e/ou vacina do vírus de parainfluenza.

Em algumas modalidades, por exemplo, uma dose típica para

uma vacina atenuada viva é pelo menos cerca de 10^3 pfu/canino, e mais tipicamente de cerca de 10^3 a cerca de 10^9 pfu/canino. Nesta patente, "pfu" significa "unidades de formação de placa". Em algumas modalidades, uma dose típica para uma vacina atenuada viva é pelo menos cerca de 10^3 TCID₅₀/canino, e mais tipicamente de cerca de 10^3 a cerca de 10^9 TCID₅₀/canino. Em algumas modalidades, uma dose típica para uma vacina atenuada viva é pelo menos cerca de 10^3 EID₅₀/canino, e mais tipicamente de cerca de 10^3 a cerca de 10^9 EID₅₀/canino. Em algumas modalidades, uma dose típica para uma vacina morta é pelo menos cerca de 40 unidades de HA, tipicamente de cerca de 40 a cerca de 10.000 unidades de HA, e mais tipicamente de cerca de 500 a cerca de 6200 unidades de HA. Em algumas modalidades, a dose é de cerca de 6100 a cerca de 6200 unidades de HA.

Em algumas modalidades preferidas, a vacina compreende uma vacina atenuada viva a uma concentração que é pelo menos cerca de $10^{0,5}$ pfu/canino maior que o nível de imunogenicidade. Em algumas modalidades preferidas, a vacina compreende uma vacina atenuada viva a uma concentração que é pelo menos cerca de $10^{0,5}$ TCID₅₀/canino maior que o nível de imunogenicidade. Em algumas modalidades preferidas, a vacina compreende uma vacina atenuada viva a uma concentração que é pelo menos cerca de $10^{0,5}$ EID₅₀/canino maior que o nível de imunogenicidade.

O nível de imunogenicidade pode ser determinado experimentalmente através de técnicas de estudo de titulação de dose de desafio em geral conhecidas na técnica. Tais técnicas tipicamente incluem vacinar vários caninos com a vacina em dosagens diferentes, e depois desafiar os caninos com o vírus virulento para determinar a dose de proteção mínima.

Fatores que afetam o regime de dosagem preferido podem incluir, por exemplo, o tipo (por exemplo, espécies e raça), idade, peso, sexo, dieta, atividade, tamanho pulmonar, e condição do sujeito; a via de administração; a eficácia, segurança, e perfis de duração-de-imunidade da vacina particular usada; se um sistema de liberação é usado; e se a vacina é administrada como parte de um fármaco e/ou combinação de vacina. Desse modo, a dosagem de fato empregada pode variar para animais específicos, e,

portanto, pode divergir acima das dosagens típicas expostas. Para determinar tais ajustes de dosagem está em geral dentro da habilidade daqueles na técnica usando meios convencionais. Deve também ser observado que vírus atenuados vivos são em geral autopropagadores; desse modo, a quantidade específica de um tal vírus administrado não é necessariamente crítica.

É contemplado que a vacina pode ser administrada ao paciente canino uma única vez; ou, alternativamente, duas ou mais vezes durante dias, semanas, meses, ou anos. Em algumas modalidades, a vacina é administrada pelo menos duas vezes. Em algumas tais modalidades, por exemplo, a vacina é administrada duas vezes, com a segunda dose (por exemplo, o reforço) sendo administrada pelo menos cerca de 2 semanas após a primeira. Em algumas modalidades, a vacina é administrada duas vezes, com a segunda dose sendo administrada não maior que 8 semanas após a primeira. A segunda dose é administrada de cerca de 2 semanas a cerca de 4 anos após a primeira dose em algumas modalidades, de cerca de 2 a cerca de 8 semanas após a primeira dose, ou de cerca de 3 a cerca de 4 semanas após a primeira dose. Em algumas modalidades, a segunda dose é administrada cerca de 4 semanas após a primeira dose. Nas modalidades acima, a primeira e dosagens subseqüentes podem variar, tais como, por exemplo, em quantidade e/ou forma. Frequentemente, porém, as dosagens são iguais para a quantidade e forma. Quando apenas uma dose única for administrada, a quantidade de vacina naquela dose sozinha em geral compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz da vacina. Porém, quando mais de uma dose for administrada, as quantidades de vacina naquelas doses podem juntas constituir uma quantidade terapeuticamente eficaz.

Em algumas modalidades, a vacina é administrada antes do recipiente canino ter sido infectado com influenza. Em tais modalidades, a vacina pode, por exemplo, ser administrada para impedir, reduzir o risco, ou tardar o princípio de influenza ou um ou mais (tipicamente dois ou mais) sintomas de influenza.

Em algumas modalidades, a vacina é administrada após o recipiente canino ser infectado com influenza. Em tais modalidades, a vacina

pode, por exemplo, melhorar, suprimir, ou erradicar a influenza ou um ou mais (tipicamente dois ou mais) sintomas de influenza.

A composição preferida da vacina depende, por exemplo, se a vacina é uma vacina inativada, vacina atenuada viva, ou ambas. Isto também depende do método de administração da vacina. É contemplado que a vacina compreenderá um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis convencionais, adjuvantes, outros intensificadores de resposta imune, e/ou veículos (coletivamente referidos como "excipientes"). Tais excipientes são em geral selecionados para ser compatíveis com o(s) ingrediente(s) ativo(s) na vacina. Uso de excipientes é em geral conhecido àqueles versados na técnica.

O termo "farmacêuticamente aceitável" é adjetivamente usado para significar que o substantivo modificado é apropriado para o uso em um produto farmacêutico. Quando for usado, por exemplo, para descrever um excipiente em uma vacina farmacêutica, o excipiente caracteriza como sendo compatível com os outros componentes da composição e não desvantajosamente deletério ao canino recipiente intencionado.

As vacinas podem ser administradas através de meios convencionais, incluindo, por exemplo, administração mucosa, (tais como intranasal, oral, intratraqueana, e ocular), e administração parenteral. Administração mucosa é freqüentemente em particular vantajosa para vacinas atenuadas vivas. Administração parenteral é freqüentemente particularmente vantajosa para vacinas inativadas.

Vacinas mucosas podem ser, por exemplo, formas de dosagem líquida, tais como emulsões, soluções, suspensões, xaropes, e elixires farmacêuticamente aceitáveis. Excipientes adequados para tais vacinas incluem, por exemplo, diluentes inertes comumente usados na técnica, tais como, água, solução salina, dextrose, glicerol, lactose, sucrose, pó de amido, ésteres de celulose de ácidos alcanóicos, ésteres de alquila de celulose, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio, óxido de magnésio, sais de sódio e de cálcio de ácidos fosfóricos e sulfúricos, gelatina, goma acácia, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, e/ou poliálcool vinílico. Excipientes adicionais po-

dem compreender vários agentes intumescentes, emulsificantes, suspensores, condimentos (por exemplo, adocicantes), e/ou aromatizantes.

Vacinas mucosas orais também podem, por exemplo, ser formadas em comprimidos ou encapsuladas para administração conveniente.

- 5 Tais cápsulas ou comprimidos podem conter uma formulação de liberação controlada. No caso de cápsulas, comprimidos, e pílulas, as formas de dosagem também podem compreender agentes tamponantes, tais como citrato de sódio, ou carbonato ou bicarbonato de magnésio ou de cálcio. Comprimidos e pílulas podem ser adicionalmente preparadas com revestimentos entéricos.
- 10

É contemplado que a vacina pode ser administrada por meio de água potável e/ou alimento do paciente canino. É também contemplado que a vacina pode ser administrada na forma de um medicamento ou brinquedo.

- "Administração parenteral" inclui injeções subcutâneas, injeções submucosais, injeções intravenosas, injeções intramusculares, injeções intraesternais, injeções transcutâneas, e infusão. Preparações injetáveis (por exemplo, suspensões aquosas ou oleaginosas injetáveis estéreis) podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida usando excipientes adequados, tais como veículos, solventes, dispersantes, agentes umectantes,
- 15 agentes emulsificantes, e/ou agentes de suspensão. Estes tipicamente incluem, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol, óleo de milho, óleo de caroço de algodão, óleo de amendoim, óleo de gergelim, álcool benzílico, álcool benzílico, 1,3-butanodiol, solução de Ringer, solução de cloreto de sódio isotônica, óleos fixos insípidos (por exemplo, mono- ou diglicerídeos sintéticos), ácidos graxos (por exemplo, ácido oléico), dimetil acetamida, tensoativos (por exemplo, detergentes iônicos e não-iônicos), propileno glicol, e/ou polietileno glicóis. Excipientes adicionais podem incluir quantidades pequenas de outras substâncias auxiliares, tais como agentes tamponantes de pH.
- 20
- 25

- 30 A vacina pode incluir um ou mais excipientes que intensificam a resposta imune de um paciente canino (que pode incluir uma resposta de anticorpo, resposta celular, ou ambas), assim aumentando a eficácia da va-

cina. Uso de tais excipientes (ou "adjuvantes") pode ser particularmente benéfico quando usar uma vacina inativada. O(s) adjuvante(s) pode(m) ser uma substância que tem um efeito direto (por exemplo, citocina ou Bacillé Calmette-Guerin ("BCG")) ou indireto (lipossomas) nas células do sistema imune do paciente canino. Exemplos de adjuvantes freqüentemente adequados incluem óleos (por exemplo, óleos minerais), sais metálicos (por exemplo, hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio), componentes bacterianos (por exemplo, lipossacarídeos bacterianos, adjuvantes de Freund, e/ou MDP), componentes de planta (por exemplo, Quil A), e/ou uma ou mais substâncias que têm um efeito de veículo (por exemplo, bentonita, partículas de látex, lipossomas, e/ou Quil A, ISCOM). Como observado acima, adjuvantes adicionais incluem, por exemplo, CARBIGEN® e carbopol. Deveria ser reconhecido que esta invenção abrange tanto as vacinas compreendendo um/uns adjuvante(s), como também vacinas que não compreendem nenhum adjuvante.

É contemplado que a vacina pode ser secada por congelamento (ou do contrário reduzida em volume líquido) para armazenamento, e depois reconstituída em um líquido antes ou na hora da administração. Tal reconstituição pode ser alcançada usando, por exemplo, água do tipo de vacina.

A presente invenção também compreende kits que são adequados para uso na execução dos métodos descritos acima. O kit compreende uma forma de dosagem compreendendo uma vacina descrita acima. O kit também compreende pelo menos um componente adicional, e, tipicamente, instruções para usar a vacina com o(s) componente(s) adicional(is). O(s) componente(s) adicional(is) pode(m), por exemplo, ser um ou mais componentes adicionais (tais como, por exemplo, um ou mais dos excipientes, alimento, e/ou um medicamento debatidos acima) que possa ser misturado com a vacina antes ou durante a administração. O(s) componente(s) adicional(is) pode(m) alternativamente (ou adicionalmente) compreender um ou mais aparelhos para administrar a vacina ao paciente canino. Um tal aparelho pode ser, por exemplo, uma seringa, inalador, nebulizador, pipeta, fórceps, ou qualquer veículo de liberação medicalmente aceitável. Em algumas

modalidades, o aparelho é adequado para administração subcutânea da vacina. Em algumas modalidades, o aparelho é adequado para administração intranasal da vacina.

Outros excipientes e modos de administração conhecidos nas técnicas farmacêuticas ou biológicas podem também ser usados.

A vacina ou composições imunogênicas da invenção em questão também abrangem construtos baseadas em vetor viral recombinante que podem compreender, por exemplo, genes que codificam proteína de HA, proteína de NA, nucleoproteína, proteína básica de polimerase, proteína ácida de polimerase, e/ou proteína de matriz de um vírus de influenza da presente invenção. Qualquer vetor viral adequado que possa ser usado para preparar um constructo de vetor/vírus recombinante é contemplado para o uso com a invenção em questão. Por exemplo, vetores virais derivados de adenovírus, avipox, herpesvírus, vacínia, canaripox, entomopox, suinopox, vírus do Nilo Ocidental e similares conhecidos na técnica podem ser usados com as composições e métodos da presente invenção. Vetores de polinucleotídeo recombinante que codificam e expressam componentes podem ser construídos usando técnicas de engenharia genética padrões conhecidas na técnica. Além disso, as várias composições de vacina descritas aqui podem ser usadas separadamente e em combinação entre si. Por exemplo, imunizações primárias de um animal podem usar construtos baseados em vetor recombinante, tendo componentes de cepa simples ou múltiplas, seguido por aumentos secundários com as composições de vacina compreendendo vírus inativado ou linhagens celulares infectadas por vírus inativado. Outros protocolos de imunização com as composições de vacina da invenção são evidentes às pessoas versadas na técnica e são contemplados dentro do escopo da presente invenção.

Trata-se a invenção em questão também dos vírus reagrupante compreendendo pelo menos um gene ou segmento genômico de um vírus de influenza da presente invenção e o restante dos genes virais ou segmentos genômicos de um vírus de influenza diferente da invenção ou de um vírus de influenza diferente de um vírus da presente invenção. Vírus reagru-

pante pode ser produzido para reagrupamento genético de ácido nucléico de um vírus de influenza de doador da presente invenção com ácido nucléico de um vírus de influenza de recipiente e depois selecionando o vírus reagrupante compreendendo o ácido nucléico do vírus de doador. Métodos para

5 produzir e isolar vírus reagrupante são bem conhecidos na técnica (Fields et al., 1996). Em uma modalidade, um vírus reagrupante da invenção compreende genes ou segmentos genômicos de um vírus de influenza humana, aviária, suína, ou eqüina. Um vírus reagrupante da presente invenção pode incluir qualquer combinação de ácido nucléico do vírus de influenza de doador e recipiente contanto que o vírus reagrupante compreenda pelo menos

10 um gene ou segmento genômico de um vírus de influenza de doador da presente invenção. Em uma modalidade, um vírus de influenza de recipiente pode ser um vírus de influenza eqüina.

Poli-peptídeos naturais, recombinantes ou sintéticos de proteínas

15 virais, e seus fragmentos de peptídeo, podem também ser usados como composições de vacina de acordo com os métodos em questão. Em uma modalidade, uma composição de vacina compreende um polinucleotídeo ou um polipeptídeo de um vírus de influenza canina. Em uma modalidade, uma composição de vacina compreende um polinucleotídeo que codifica um poli-

20 peptídeo tendo a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido

25 mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, compreendem a seqüência de nucleotídeo mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente, ou uma seqüência

30 que codifica um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou

78. Em uma modalidade específica adicional, um polinucleotídeo da invenção pode compreender: Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 3; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 5; Nucleotídeos 1-657 da SEQ ID NO: 7; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 9; Nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 11; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 13; Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 15; Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 19; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 21; Nucleotídeos 1-657 da SEQ ID NO: 23; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 25; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 29; Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 31; Nucleotídeos 1-2277 da SEQ ID NO: 47; Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 49; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 51; Nucleotídeos 1-690 da SEQ ID NO: 53; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 55; Nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 57; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 59; Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 61; Nucleotídeos 1-2277 da SEQ ID NO: 63; Nucleotídeos 1-2271 da SEQ ID NO: 65; Nucleotídeos 1-2148 da SEQ ID NO: 67; Nucleotídeos 1-690 da SEQ ID NO: 69; Nucleotídeos 1-1494 da SEQ ID NO: 71; Nucleotídeos 1-1410 da SEQ ID NO: 73; Nucleotídeos 1-756 da SEQ ID NO: 75; e Nucleotídeos 1-1695 da SEQ ID NO: 77. Em outra modalidade, uma composição de vacina compreende um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma modalidade adicional, uma composição de vacina compreende um polinucleotídeo ou um polipeptídeo de um vírus de influenza eqüina em que o polinucleotídeo ou polipeptídeo tem pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 %, ou pelo menos cerca de 96 %, ou 97 %, ou 98 %, ou 99 % ou mais identidade de seqüência com um polinucleotídeo ou polipeptídeo de influenza canina. Em uma modalidade, polipeptídeos virais derivados de cepas múltiplas podem ser combinados em uma composição de vacina e podem ser usados para vacinar um animal hospedeiro. Por exemplo, os polipeptídeos com base na proteína de HA viral de pelo menos duas cepas diferentes do vírus de influenza da invenção podem ser combinados na vaci-

na. Os polipeptídeos podem ser homólogos a uma cepa ou podem compreender polipeptídeos "híbridos" ou "quiméricos" cuja seqüência de aminoácido é derivada de unir ou ligar polipeptídeos de pelo menos duas cepas distintas. Procedimentos para preparar polipeptídeos virais são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, polipeptídeos e peptídeos virais podem ser sintetizados usando métodos de síntese de fase sólida (Merrifield, 1963). Polipeptídeos e peptídeos virais podem também ser produzidos usando técnicas de DNA recombinantes em que uma molécula de polinucleotídeo que codifica uma proteína ou peptídeo viral é expressado em uma célula hospedeira, tais como bactéria, levedura, ou linhagens celulares mamíferas, e a proteína expressa purificada usando técnicas padrão da técnica.

Composições de vacina da presente invenção também incluem composições de ácido nucléico desprotegidas. Em uma modalidade, um ácido nucléico pode compreender uma seqüência de nucleotídeo que codifica um HA e/ou uma proteína de NA de um vírus de influenza da presente invenção. Métodos para vacinação de ácido nucléico são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes U. S. Nºs 6.063.385 e 6.472.375. O ácido nucléico pode ser na forma de um plasmídeo ou um cassete de expressão de gene. Em uma modalidade, o ácido nucléico é fornecido encapsulado em um lipossoma que é administrado a um animal.

Composições de vacina e imunógenos, tais como polipeptídeos e ácidos nucléicos que podem ser usados de acordo com a presente invenção podem ser fornecidas com um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável. Compostos e composições úteis na invenção em questão podem ser formulados de acordo com os métodos conhecidos para preparar as composições farmacologicamente úteis. As formulações são descritas em detalhes em várias fontes que são bem conhecidas e facilmente disponíveis àqueles versados na técnica. Por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science por E. W. Martin, Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19^a ed., 1995, descreve formulações que podem ser usadas com relação à invenção em questão. Em geral, as composições da invenção em questão serão formuladas de modo que uma quantidade eficaz de um imunógeno

seja combinada com um veículo adequado para facilitar a administração eficaz da composição. As composições usadas nos métodos presentes podem também ser em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem sólidas, semi-sólidas, e líquidas, tais como comprimidos, 5 pílulas, pós, soluções líquidas ou suspensão, supositórios, soluções injetáveis e infusíveis, e pulverizações. A forma preferida depende do modo intencionado de administração e aplicação terapêutica. As composições também preferivelmente incluem veículos e diluentes farmacêuticamente aceitáveis convencionais que são conhecidos àqueles versados na técnica. Exemplos 10 de veículos ou diluentes para o uso com os peptidomiméticos em questão incluem, mas não são limitados a, água, solução salina, óleos incluindo óleo mineral, etanol, sulfóxido de dimetila, gelatina, ciclodextranas, estearato de magnésio, dextrose, celulose, açúcares, carbonato de cálcio, glicerol, alumina, amido, e veículos e diluentes equivalentes, ou misturas de qualquer um 15 destes. Formulações de um imunógeno da invenção podem também compreender agentes de suspensão, protetores, lubrificantes, tampões, conservantes, e estabilizantes. Para prover a administração de tais dosagens para o tratamento terapêutico desejado, as composições farmacêuticas da invenção vantajosamente compreenderão entre cerca de 0,1 % e 45 %, e especialmente, 1 e 15 % em peso do imunógeno ou imunógenos com base no peso 20 da composição total incluindo veículo ou diluente.

A vacina e composições imunogênicas da invenção em questão podem ser preparadas por procedimentos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a vacina ou imunógenos são tipicamente preparados como injetáveis, 25 por exemplo, soluções líquidas ou suspensões. A vacina ou imunógenos são administrados de uma maneira que sejam compatíveis com a formulação de dosagem, e em tal quantidade como será terapeuticamente eficaz e imunogênica no recipiente. As dosagens ótimas e padrões de administração para uma vacina particular ou formulação de imunógenos podem ser determinadas facilmente por uma pessoa versada na técnica. 30

Peptídeos e/ou polipeptídeos da presente invenção podem também ser fornecidos na forma de um constructo de peptídeo antigênico múlti-

plo (MAP). A preparação de construtos de MAP foi descrita em Tam (1988). Construtos de MAP utilizam uma matriz de núcleo de resíduos de lisina sobre os quais múltiplas cópias de um imunógeno são sintetizadas (Posnett et al., 1988). Construtos de MAP múltiplos, cada um contendo os mesmos imunógenos ou diferentes, podem ser preparados e administrados em uma composição de vacina de acordo com os métodos da presente invenção. Em uma modalidade, um constructo de MAP é fornecido e/ou administrado com um ou mais adjuvantes. Polipeptídeos de influenza da invenção podem também ser produzidos e administrados como estruturas de proteína macromolecular compreendendo um ou mais polipeptídeos. Pedido de Patente Publicado U. S. US2005/0009008 descreve métodos para produzir partículas semelhantes a vírus como uma vacina para vírus de influenza.

De acordo com os métodos da invenção em questão, a vacina e composições imunogênicas aqui descritas são administradas a hospedeiros suscetíveis, tipicamente canídeos, e mais tipicamente cães domesticados, de uma quantidade e maneira eficazes para induzir imunidade protetora contra desafio subsequente ou infecção do hospedeiro pelo vírus. Em uma modalidade, o animal hospedeiro é um canídeo. Caninos incluem caninos selvagens, de jardim zoológico, e domésticos, tais como lobos, coiotes, e raposas. Caninos também incluem cães, particularmente cães domésticos, tais como, por exemplo, cães de companhia puros e/ou mestiços, cães de exposição, cães de trabalho, cães de matilha, cães de caça, cães de guarda, cães policiais, cães de corrida, e/ou cães de laboratório. Em uma modalidade específica, o animal hospedeiro é um cão domesticado, tal como um galgo. As vacinas ou imunógenos são tipicamente administrados parenteralmente, através de injeção, por exemplo, ou subcutânea, intraperitoneal ou intramuscularmente. Outros modos adequados de administração incluem administração oral ou nasal. Usualmente, as vacinas ou imunógenos são administrados a um animal pelo menos duas vezes, com um intervalo de uma ou mais semanas entre cada administração. Porém, outros regimes são contemplados para as administrações iniciais e de reforço da vacina ou imunógenos, e podem depender do julgamento do médico e do animal hospe-

deiro particular sendo tratado.

Vírus e células infectadas por vírus em uma formulação de vacina podem ser inativados ou atenuados usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, vírus inteiro e células infectadas podem ser inativados ou atenuados mediante exposição a paraformaldeído, formalina, propiolactona beta (BPL), bromoetilamina (BEA), etilenimina binária (BEI), fenol, luz UV, temperatura elevada, congelamento - descongelamento, sonicação (incluindo ultra-sonicação), e similares. A quantidade de vírus inteiro livre de célula em uma dose de vacina pode ser na faixa de cerca de 0,1 mg a cerca de 5 mg, e mais usualmente é de cerca de 0,2 mg a cerca de 2 mg. A dosagem para formulações de vacina que compreendem linhagens celulares infectadas por vírus usualmente conterà de cerca de 10^6 a cerca de 10^8 células por dose, e mais usualmente de cerca de 5×10^6 a cerca de $7,5 \times 10^7$ células por dose. A quantidade de proteína ou imunógeno de peptídeo em uma dose para um animal pode variar de cerca de 0,1 μ g a 10000 μ g, ou cerca de 1 μ g a 5000 μ g, ou cerca de 10 μ g a 1000 μ g, ou cerca de 25 μ g a 750 μ g, ou cerca de 50 μ g a 500 μ g, ou 100 μ g a 250 μ g, dependendo do tamanho, idade, etc., do animal recebendo a dose.

Uma composição imunogênica ou de vacina da invenção, tal como vírus ou células infectadas por vírus ou proteínas ou peptídeos virais, pode ser combinada com um adjuvante, tipicamente só antes da administração. Adjuvantes contemplados para o uso nas formulações de vacina incluem dipeptídeo de muramila de treonila (MDP) (Byars et al., 1987), saponina, *Cornebacterium parvum*, adjuvante completo de Freund e incompleto de Freund, alumínio, ou uma mistura de qualquer um destes. Uma variedade de outros adjuvantes adequados para o uso com os métodos e vacinas da invenção em questão, tais como alume, é bem conhecida na técnica e é contemplada para o uso com a invenção em questão.

Trata-se a invenção em questão também dos anticorpos que especificamente ligam a uma proteína ou um peptídeo da presente invenção. Anticorpos da invenção em questão incluem composições de anticorpos monoclonais e policlonais. Preferivelmente, os anticorpos da invenção em ques-

tão são anticorpos monoclonais. Anticorpos inteiros e fragmentos de ligação de antígenos dos mesmos são contemplados na presente invenção. Desse modo, por exemplo, fragmentos de ligação de antígenos adequados incluem fragmentos de anticorpo de Fab₂, Fab e Fv. Anticorpos da invenção podem
5 ser marcados com uma metade detectável, tais como uma molécula fluorescente (por exemplo, fluoresceína ou uma enzima).

Trata-se a invenção em questão também dos métodos e composições para detecção e identificação de um vírus de influenza da invenção e para diagnose de infecção de um animal com um vírus de influenza da
10 presente invenção. Os métodos da invenção incluem detecção da presença de influenza canina, em uma amostra biológica de um animal. A detecção de influenza canina em uma amostra é útil para diagnosticar influenza canina em um animal. Por sua vez, esta informação pode fornecer a habilidade para determinar a prognose de um animal com base nos níveis distintivos de in-
15 fluenza canina presente com o passar do tempo, e pode ajudar na seleção de agentes e tratamentos terapêuticos para o animal, e ajudar no monitoramento da terapia. O método também fornece a habilidade para estabelecer a ausência de influenza canina em um animal testado.

A habilidade para detectar influenza canina em um animal permite avaliação das epidemias de influenza canina em localizações geográficas diferentes. Esta informação também permite detecção prematura de
20 forma que os animais infectados possam ser isolados, limitar a expansão da doença, e permite intervenção prematura para opções de tratamento. Além disso, tendo esta informação disponível pode prover direção ao pessoal médico para preparar para tratar números grandes de animais doentes, incluindo
25 montagem de materiais médicos, e, se disponíveis, vacinas.

Em uma modalidade, um método da presente invenção envolve a coletânea de uma amostra biológica de um animal de teste, tal como um canino. A amostra biológica pode ser qualquer material biológico, incluindo,
30 células, tecido, cabelo, sangue total, soro, plasma, aspirado de mamilo, lavagem pulmonar, fluido cérebro-espinhal, saliva, suor e lágrimas.

A amostra de teste animal pode vir de um animal suspeito de ter

vírus de influenza canina, se ou não o animal exibe sintomas da doença. Amostras de controle podem também ser fornecidas ou colhidas de animais conhecidos estarem livres de influenza canina. Controles adicionais podem ser fornecidos, por exemplo, para reduzir resultados falso-positivos e falso-negativos, e verificar quais os reagentes no ensaio são ativamente detectores de vírus de influenza canina A.

Além de detectar a presença ou ausência de influenza canina em uma amostra biológica, os métodos de detecção usados na invenção podem detectar mutações em vírus de influenza canina, tais como alterações na sequência de ácido nucléico que podem ser o resultado do ambiente, tratamento de fármaco, manipulações ou mutações genéticas, lesão, alteração na dieta, envelhecimento, ou qualquer/quaisquer outra(s) característica(s) de um animal. Mutações podem também levar influenza canina A a se tornar resistente a um fármaco que era antigamente eficaz, ou permitir o vírus infectar e propagar-se em uma espécie diferente de animal, ou ser humano. Por exemplo, vírus de influenza aviária A foi mostrado infectar outros animais e seres humanos.

Em uma modalidade para detectar um vírus de influenza em um animal, diagnose é facilitada pela coleta de espécimes de alta qualidade, seu transporte rápido para uma facilidade de testagem, e armazenamento apropriado, antes da testagem em laboratório. O vírus é melhor detectado em espécimes que contêm células infectadas e secreções. Em uma modalidade, espécimes para a detecção direta de antígenos virais e/ou para ácidos nucléicos e/ou isolamento de vírus em culturas de célula são tiradas durante os 3 primeiros dias após o princípio dos sintomas clínicos. Vários tipos de espécimes são adequados para diagnosticar infecções de vírus do trato respiratório superior, incluindo, mas não limitados a, esfregaço nasal, esfregaço nasofaríngeo, aspirado nasofaríngeo, lavagem nasal e esfregaços da garganta. Além de esfregaços, amostras de tecido ou soro podem ser tiradas, e procedimentos invasivos podem também ser executados.

Em uma modalidade, espécimes respiratórios são colhidos e transportados em 1-5 ml de meios de transporte de vírus. Vários meios que

são satisfatórios para o restabelecimento de uma ampla variedade de vírus estão comercialmente disponíveis. Espécimes clínicos são adicionados ao meio de transporte. Esfregaços nasais ou nasofaríngeos podem também ser transportados para o meio de transporte de vírus. Um exemplo de um meio de transporte é 10 gm de caldo de infusão de carne de vitela e 2 gm de fração de albumina bovina V, adicionados à água destilada estéril a 400 m. Antibióticos tais como 0,8 ml de solução de sulfato de gentamicina (50 mg/ml) e 3,2 ml de anfotericina B (250 µg/ml) podem também ser adicionados. O meio é preferivelmente esterilizado através de filtração. Lavagens nasais, tais como solução salina estéril (0,85 % de NaCl), podem também ser usadas para colher os espécimes de vírus respiratórios.

Em uma modalidade, os soros são colhidos em uma quantidade de 1-5 ml de sangue total de um animal de fase aguda, logo após o princípio dos sintomas clínicos, e preferivelmente não depois que 7 dias. Um espécime de soro de fase convalescente pode também ser colhido, por exemplo em cerca de 14 dias após o princípio dos sintomas. Espécimes de soro podem ser úteis para detectar anticorpos contra vírus respiratórios em um teste de neutralização.

Em algumas circunstâncias, as amostras podem ser colhidas durante um certo tempo de animais individuais (por exemplo, uma vez ao dia, uma vez por semana, uma vez por mês, bianual ou anualmente). Numerosas amostras podem ser usadas obtendo de um animal individual, durante um certo tempo, para verificar os resultados de detecções mais prematuras, e/ou identificar resposta ou resistência a um tratamento específico, por exemplo, um fármaco terapêutico selecionado.

Os métodos da presente invenção podem ser usados para detectar a presença de um ou mais agentes patológicos em uma amostra de teste de um animal, e o nível de cada agente patológico. Qualquer método para detectar o agente patológico pode ser usado, incluindo, mas não limitado a, ensaios de anticorpo incluindo ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs), testes de anticorpo fluorescente indiretos (IFA), hemaglutinação, e ensaios de inibição de hemaglutinação (HI), e análise de Western blot. Méto-

dos de célula-cultura conhecidos podem também ser usados. Culturas positivas podem ser também identificadas usando imunofluorescência de culturas de célula ou ensaio de HI do meio de cultura de célula (sobrenadante).

Além disso, os métodos para detectar ácido nucléico (DNA ou RNA) ou proteína podem ser usados. Tais métodos incluem, mas não são limitados a, reação em cadeia de polimerase (PCR), e testes de PCR de transcriptase reversa (RT) e testes de tempo real, e ensaios de proteção de nuclease quantitativos. Há kits de teste comercialmente disponíveis para executar estes ensaios. Por exemplo, QIAGEN (Valença, CA) vende um kit de RT-PCR de uma etapa, e kit de extração de RNA viral.

Em uma modalidade, o método utiliza um anticorpo específico para um vírus ou proteína viral da invenção. Em uma modalidade específica, um anticorpo específico para uma proteína de HA de um vírus da invenção é utilizado. Em outra modalidade, um anticorpo específico para uma proteína de NP de um vírus da invenção é usado. Uma amostra adequada, tal como da região nasal ou nasofaríngea, é obtida de um animal e vírus ou proteína viral é dele isolada(o). Os componentes virais são depois triados para ligação de um anticorpo específico a uma proteína, tal como HA ou NP, de um vírus da invenção. Em outra modalidade, uma amostra de soro (ou outra amostra contendo anticorpo) é obtida de um animal e o soro triado para a presença de anticorpo que liga a uma proteína de um vírus da invenção. Por exemplo, um ensaio de ELISA pode ser executado onde as paredes de placa têm proteína de HA e/ou de NP, ou um fragmento de peptídeo da mesma, ligado à parede. A parede de placa é depois contatada com soro ou anticorpo de um animal de teste. A presença de anticorpo no animal que especificamente liga à proteína de HA e/ou de NP é indicativa que o animal de teste é infectado ou foi infectado com um vírus de influenza da presente invenção.

Em uma modalidade, a presença de um agente patológico é detectada determinando a presença ou ausência de anticorpos contra o agente, em uma amostra biológica. Pode ocupar algum tempo (por exemplo, meses) após um animal seja infectado antes de pudessem ser detectados anticorpos em um exame de sangue. Uma vez formados, os anticorpos usual-

mente persistem por muitos anos, até mesmo após tratamento com sucesso da doença. Anticorpos encontrando para influenza canina UM pode não indicar se a infecção era recente, ou algum dia no passado.

Teste de anticorpo pode também ser feito em fluido(s). Ensaios de anticorpo incluem ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs), ensaios de anticorpo fluorescente indiretos (IFA), e análise de Western blot. Preferivelmente, teste de anticorpo é feito usando ensaios múltiplos, por exemplo, ELISA ou IFA seguido por western blot. Os ensaios de anticorpo podem ser feitos em um processo de duas etapas, usando um ensaio de ELISA ou IFA, seguido por um ensaio de western blot. ELISA é considerado um ensaio mais seguro e preciso que IFA, mas IFA pode ser usado se ELISA não estiver disponível. O teste de western blot (que é um teste mais específico) pode também ser feito em todos os animais, particularmente aqueles que foram testados positivos ou positivos incertos (equivocos) em um ensaio de ELISA ou de IFA.

Outros testes com base em anticorpo que podem ser usados para detecção de vírus de influenza incluem ensaios de inibição de hemaglutinação. Atividade de hemaglutinação pode ser detectada em uma amostra biológica de um animal, usando células sangüíneas vermelhas de galinha ou peru como descrito (Burleson et al., 1992 e Kendal et al., 1982). Em uma modalidade, uma influenza ou uma proteína de HA ou peptídeo da invenção é contatado(a) com uma amostra de teste contendo soro ou anticorpo. Células sangüíneas vermelhas (RBC) de um animal, tal como um pássaro, são depois adicionadas. Se o anticorpo para HA estiver presente, então as RBC não se aglutinarão. Se o anticorpo para HA não estiver presente, as RBC se aglutinarão na presença de HA. Variações e modificações para ensaios de inibição de hemaglutinação padrão são conhecidas na técnica e contempladas dentro do escopo da presente invenção.

Infecção de um animal pode também ser determinada por isolamento do vírus de uma amostra, tal como um esfregaço nasal ou nasofaríngeo. Isolamento viral pode ser executado usando métodos padrão, incluindo cultura de célula e inoculação de ovo.

Em uma modalidade adicional, um ensaio com base em ácido nucléico pode ser usado para detecção de um vírus da presente invenção. Em uma modalidade, uma amostra de ácido nucléico é obtida de um animal e o ácido nucléico submetidos à PCR usando iniciadores que gerarão um produto de amplificação se o ácido nucléico contiver uma seqüência específica para um vírus de influenza da presente invenção. Em uma modalidade específica, RT-PCR é usado em um ensaio para o vírus em questão. Em uma modalidade exemplificada, RT-PCR de tempo real é usado para ensaiar um vírus de influenza da invenção. Métodos de PCR, RT-PCR e de PCR de tempo real são conhecidos na técnica e foram descritos nas Patentes U. S. N^{os} 4.683.202; 4.683.195; 4.800.159; 4.965.188; 5.994.056; 6.814.934; e em Saiki et al. (1985); Sambrook et al. (1989); Lee et al. (1993); e Livak et al. (1995). Em uma modalidade, o ensaio de PCR usa oligonucleotídeos específicos para um gene Matriz (MA) e/ou gene HA de influenza. O produto de amplificação pode ser também seqüenciado para determinar se o produto tem uma seqüência de um vírus de influenza da presente invenção. Outros ensaios com base em ácido nucléico podem ser usados para detecção e diagnose de infecção viral por um vírus da invenção e tais ensaios são contemplados dentro do escopo da presente invenção. Em uma modalidade, uma amostra contendo um ácido nucléico é submetida a uma amplificação baseada em PCR usando iniciadores diretos e reversos onde os iniciadores são específicos para um polinucleotídeo viral ou seqüência de gene. Se o ácido nucléico na amostra for RNA, então RT-PCR pode ser executada. Para PCR de tempo real, uma sonda detectável é utilizada com os iniciadores.

Conjuntos de iniciador específico para o gene de hemaglutinina (HA) de muitos dos vírus de influenza circulantes são conhecidos, e estão sendo desenvolvido continuamente. O genoma de vírus de influenza é RNA unifilamentar, e uma cópia de DNA (cDNA) deve ser feita usando uma polimerase de transcriptase reversa (RT). A amplificação do genoma de RNA, por exemplo, usando RT-PCR, requer um par de iniciadores de oligonucleotídeo, tipicamente projetado em base da seqüência de HA conhecida de subtipos de influenza A e de neuraminidase (NM)-1. Os iniciadores podem ser

selecionados de modo que eles especificamente amplificarão o RNA de apenas um subtipo de vírus. DNAs gerados usando iniciadores subtipo-específicos podem ser também analisados por técnicas genéticas moleculares tais como seqüenciação. O teste é preferivelmente operado com um controle positivo, ou produtos são confirmados por seqüenciação e comparação com seqüências conhecidas. A ausência dos produtos de PCR alvos (isto é, um resultado "negativo") pode não descartar a presença do vírus. Resultados podem depois ser disponibilizados dentro de algumas horas de esfregaços clínicos ou culturas de células infectadas. Testes de PCR e RT-PCR para vírus de influenza A são descritos por Fouchier et al., 2000 e Maertzdorf et al., 2004.

Trata-se a invenção em questão também dos métodos para triar compostos ou fármacos que têm atividade antiviral contra um vírus da presente invenção. Em uma modalidade, células infectadas com um vírus da invenção são contatadas com um composto de teste ou fármaco. A quantidade de vírus ou atividade viral seguindo o contato é depois determinada. Aqueles compostos ou fármacos que exibem atividade antiviral podem ser selecionados para avaliação também.

Trata-se a invenção em questão também das células isoladas infectadas com um vírus de influenza da presente invenção. Em uma modalidade, a célula é uma célula canina, tal como células epiteliais renais caninas.

Trata-se a invenção em questão também das células transformadas com um polinucleotídeo da presente invenção que codifica um polipeptídeo da invenção. Preferivelmente, a seqüência de polinucleotídeo é fornecida em um construto de expressão da invenção. Mais preferivelmente, o construto de expressão provê sobreexpressão na célula de um polinucleotídeo da invenção operavelmente ligado. Em uma modalidade, a célula é transformada com uma seqüência de polinucleotídeo compreendendo uma seqüência que codifica a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional ou variante das mesmas. Em uma modalidade específica, a célula é transformada com um polinucleotídeo que codifica a se-

5 sequência de aminoácido mostrada nas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78 compreendem a sequência de nucleotídeo mostrada nas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, respectivamente, ou uma sequência que codifica um fragmento funcional ou variante de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78. Desse modo, trata-se a invenção em questão das células transformadas com uma sequência de polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante, incluindo uma variante degenerada, de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77.

20 A célula transformada pode ser uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de planta, incluindo protoplastos, ou a célula transformada pode ser uma célula procariótica, por exemplo, uma célula bacteriana tal como *E. coli* ou *B. subtilis*. Células animais incluem células humanas, células mamíferas, células parcialmente caninas, células aviárias, e células de inseto. Células de planta incluem, mas não são limitadas a, células de dicotiledônea, monocotiledônea, e de conífera.

25 Trata-se a invenção em questão também das plantas, incluindo plantas transgênicas que expressam e produzem uma proteína viral ou polipeptídeo da presente invenção. Plantas, tecidos de planta, e células de planta transformadas ou criadas para conter um polinucleotídeo da invenção são contemplados pela presente invenção. Preferivelmente, o polinucleotídeo da invenção é sobre-expressado na planta, tecido de planta, ou célula de planta. As plantas podem ser usadas para produzir composições de vacina de influenza da presente invenção e as vacinas podem ser administradas através do consumo da planta (vide, por exemplo, patentes U. S. Nºs 5.484.719

e 6.136.320).

Trata-se a invenção em questão também dos kits para detectar um vírus ou diagnosticar uma infecção por um vírus da presente invenção. Em uma modalidade, um kit compreende um anticorpo da invenção que especificamente liga a um vírus de influenza da presente invenção, ou uma porção antigênica do mesmo. Em outra modalidade, um kit compreende um ou mais polipeptídeos ou peptídeos da presente invenção. Em uma modalidade específica, os polipeptídeos têm uma seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID N^{os} 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico ou variante das mesmas. Em uma modalidade adicional, um kit compreende um ou mais polinucleotídeos ou oligonucleotídeos da presente invenção. Em uma modalidade específica, os polinucleotídeos têm uma seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou um fragmento ou variante dos mesmos. Um kit pode opcionalmente compreender um ou mais anticorpo de controle, polipeptídeo ou peptídeo de controle, e/ou polinucleotídeo ou oligonucleotídeo de controle. O anticorpo, polipeptídeos, peptídeos, polinucleotídeos, e/ou oligonucleotídeos do kit podem ser fornecidos em um recipiente ou pacote adequado.

O pedido de patente em questão também refere-se ao uso de cães mestiços como um modelo para infecção e patogênese do vírus de influenza. Em uma modalidade, um cão mestiço é inoculado com um vírus de influenza, tal como um vírus de influenza canina da presente invenção. Opcionalmente, o cão pode ser administrado com agentes terapêuticos subsequente à inoculação. O cão pode também ser administrado com uma composição para gerar uma resposta imune contra um vírus de influenza antes de inoculação com vírus. Tecido, sangue, soro, e outras amostras biológicas podem ser obtidas antes e/ou após inoculação e examinadas pela presença de vírus e patogênese de tecido usando métodos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, PCR, RT-PCR, seqüenciação de ácido nucléi-

co, e imuno-histoquímica.

Cepas de vírus de influenza canina (designados como "A/canine/Florida/43/2004" e "A/canine/Florida/242/2003") foram depositadas com American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, em 9 de outubro de 2006. Cepas de vírus de influenza canina (designados como "canine/Jax/05" e "canine/Miami/05"), foram depositadas com American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, em 17 de outubro de 2006. As cepas de vírus em questão foram depositadas sob condições que asseguram que acesso às culturas estarão disponíveis durante a pendência deste pedido de patente ao determinado pelo Commissioner of Patents and Trademarks a ser intitulado a este sob 37 CFR 1.14 e 35 U.S.C. 122. O depósito estará disponível como requerido pelas leis de patentes estrangeiras em países nos quais as contrapartes do pedido de patente em questão, ou sua progênie, forem depositados. Porém, deveria ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar a invenção em questão em derrogação dos direitos de patente concedidos por ação governamental.

Também, os depósitos do vírus em questão serão armazenados e ficarão disponíveis ao público de acordo com as providências do Tratado de Budapeste para o Depósito de Microorganismos, isto é, serão armazenados com todo o cuidado necessário para mantê-lo viável e incontaminado durante um período de pelo menos cinco anos após a mais recente solicitação para a provisão de uma amostra do depósito, e em todo caso, durante um período de pelo menos trinta (30) anos após a data de depósito ou para a vida exeqüível de qualquer patente que possa emitir a revelação da cultura. O depositante reconhece o dever de substituir o depósito se o depósito não prover uma amostra quando requerido, devido à condição do depósito. Todas as restrições na disponibilidade para o público do depósito de cultura em questão serão irrevogavelmente removidos na concessão de uma patente que a revela.

Tabela 57 ilustra as similaridades entre as seqüências de aminoácido codificadas pelos genes de hemaglutinina (ou "HA"), neuraminidase

(ou "NA"), e nucleoproteína (NP) do vírus de influenza canina identificados como A/canine/Florida/43/2004 (Ca/Fla/43/04) com isolados de H3N8 equino, como também o isolado de canine/Florida/242/2003.

Qualquer elemento de qualquer modalidade revelada aqui pode ser combinado com qualquer outro elemento ou modalidade revelada aqui e tais combinações são especificamente contempladas dentro do escopo da presente invenção.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios, e publicações referidas ou citadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, desde que eles não sejam incompatíveis com os ensinamentos explícitos deste relatório descritivo.

MATERIAIS E MÉTODOS PARA OS EXEMPLOS 1-6

COLETA DE SANGUE E DE ESFREGAÇO NASAL DE GALGOS.

Amostras de sangue agudas e convalescentes foram colhidas através de venipunctura jugular de galgos clinicamente doentes ou normais em canis de corrida que experimentam epidemias de doença das vias respiratórias. Amostras convalescentes foram colhidas 4 a 12 semanas após a amostra aguda. Soro foi colhido e armazenado a -80°C. Esfregaços nasais foram colhidos e colocados em meio de transporte de Amies com submissão pendente em carvão (Becton Dickinson Biosciences) para isolamento bacteriano.

AUTÓPSIA DE GALGOS.

Autópsias completas foram executadas pelo Serviço de Patologia Anatômico na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Flórida (UF CVM) em 5 dos 8 galgos que morreram pela epidemia de janeiro 2004 em uma pista da Flórida. Autópsia de outro cão foi executada em uma clínica veterinária privada com submissão dos tecidos a UF CVM para diagnose histopatológica. Tecidos foram fixados em 10 % de formalina tamponada neutra, embebida em parafina, e seções de 5 µm foram tingidas com hematoxilina e eosina para diagnose histopatológica ou processadas para Imuno-histoquímica como descrito abaixo. Tecidos não-fixados foram submetidos à cultura bacteriana e também armazenados a -80°C.

TESTE SOROLÓGICOS PARA PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS VIRAIS CANINOS.

Amostras de soro agudas e convalescentes pareadas foram submetidas ao Laboratório de Diagnóstico de Saúde de Animais (AHDL) na Faculdade de Medicina Veterinária da Universitária de Cornell para ensaios de neutralização de soro contra vírus de sinomose canina, adenovírus tipo 2, e vírus de parainfluenza. Titulações de anticorpo foram expressadas como a última diluição de soro que inibiu infecção viral das culturas de célula. Seroconversão, definida como um aumento $\geq$ que 4 vezes em titulação de anticorpo entre a amostra aguda e convalescente, indicou infecção viral. Nenhuma seroconversão para estes patógenos virais foi detectada.

TESTES MICROBIANOS PARA PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS BACTERIANOS CANINOS.

Esfregaços nasais e tecidos pós-morte pareados foram submetidos ao Serviço de Diagnóstico Clínico de Microbiologia/Parasitologia/ Soro-
logia na UF CVM para isolamento bacteriano e identificação. As amostras foram cultivadas em meios não-seletivos como também meios seletivos para espécies de *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel) e espécies de *Mycoplasma* (Remel). Todas as culturas foram retidas durante 21 dias antes de relatar
nenhum crescimento. Esfregaços nasais de alguns dos galgos foram também submetidos ao Departamento Diagnóstico de Medicina/Patobiologia na Faculdade de Medicina Veterinária da Universitária do Estado de Kansas para cultura bacteriana. De 70 cães doentes clinicamente testados, *Bordetella bronchiosseptica* foi isolada da cavidade nasal de 1 cão, enquanto *Mycoplasma spp.* foi restabelecido da cavidade nasal de 33 cães. *Pasteurella multocida* foi comumente restabelecido da cavidade nasal de cães com secreções nasais purulentas. Dois dos cães que morreram pela epidemia de janeiro de 2004 tiveram crescimento escasso de *Escherichia coli* na autópsia dos pulmões, um cão teve crescimento escasso de *E. coli* e *Streptococcus canis*, e o outro teve crescimento escasso de *Pseudomonas aeruginosa* e uma levedura. Nem *Bordetella bronchiosseptica* nem *Mycoplasma* foi isolado da traquéia ou pulmões de cães que morreram.

ISOLAMENTO DE VÍRUS DE TECIDOS PÓS-MORTE.

Tecidos congelados foram descongelados e homogeneizados em 10 volumes de meio de essencial mínimo (MEM) suplementado com 0,5 % de albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos. Restos sólidos foram removidos por centrifugação e os sobrenadantes foram inoculados sobre células cultivadas ou em ovos de galinha embrionados de 10 dias de idade. Homogeneizados de tecido de galgos que morreram foram inoculados em culturas de célula diversas que suportaram a replicação de uma faixa vasta de patógenos virais. As culturas de célula incluíram Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano, ATCC Nº CCL-81), A-72 (fibroblastos de tumores caninos, CRL-1542), HRT-18 (células epiteliais retais humanas, CRL-11663), MDCK (células epiteliais renais caninas, CCL-34), células epiteliais renais caninas primárias (AHDL, Universidade de Cornell), células epiteliais pulmonares caninas primárias (AHDL), e células testiculares bovinas primárias (AHDL). Células de MDCK e de HRT foram cultivadas em MEM suplementado com 2,5 ug/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma); as linhagens celulares restantes foram cultivadas em MEM suplementado com 10 % de soro de bezerro fetal e antibióticos. Células foram crescidas em frascos de 25 cm² a 37°C em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂. Uma cultura de controle foi inoculada com o MEM suplementado. As culturas foram observadas diariamente quanto às alterações morfológicas e foram colhidas em 5 dias pós-inoculação. Os fluidos e células colhidos foram clarificados através de centrifugação e inoculados sobre células frescas como descrito para a inoculação inicial; duas passagens cegas foram executadas. Atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando células sangüíneas vermelhas de galinha ou peru como descrito (Burleson et al., 1992; Kendal et al., 1982). Para isolamento do vírus em embriões de galinha, 0,1 ml de homogeneizado de tecido foi inoculado no saco alantóico e incubado durante 48 horas a 35°C. Duas passagens cegas na atividade de hemaglutinação nos fluidos alantóicos foram determinadas como descrito (Burleson et al., 1992; Kendal et al., 1982).

RT-PCR, SEQUÊNCIAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO, E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.

RNA total foi extraído de sobrenadante de cultura de tecido ou fluido alantóico usando o kit de RNeasy (Qiagen, Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total (10 ng) foi transcrito reverso para cDNA usando um kit de RT-PCR de uma etapa (Qiagen, Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Amplificação de PCR da região de codificação dos 8 genes virais de influenza no cDNA foi previamente executada como descrito (Klimov et al., 1992a), usando conjuntos de iniciador gene-específico universais. Os amplicons de DNA resultante foram usados como modelos para sequenciação automatizada em um sequenciador de DNA automatizado de Applied Biosystems 3100 usando química de terminador de tintura de sequenciação em ciclo (ABI). As seqüências de nucleotídeo foram analisadas usando GCG Package®, Versão 10.0 (Accelrys) (Womble, 2000). O Phylogeny Inference Package® Versão 3.5 foi usado para estimar as filogenias e calcular os valores de autocarregador das seqüências de nucleotídeo (Felsenstein, 1989). Árvores filogenéticas foram comparadas às geradas mediante análise de junção de vizinhos com o modelo Tamura-Nei gama implementado no programa de MEGA® (Kumar et al., 2004) e confirmado pelo programa PAUP® 4.0 Beta (Sinauer Associates).

INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DOS CÃES.

Quatro Bigles livres de patógenos específicos de 6 meses de idade [(2 machos e 2 fêmeas (Liberty Research))] foram usados. Exame físico e exames de sangue de linha base incluindo contagem/diferencial de célula sangüínea completo, painel de química de soro, e urinálise determinaram quais animais eram saudáveis. Eles foram alojados juntos em uma instalação de BSL 2-reforçada credenciada pela Associação para Avaliação e Credenciamento de Cuidado de Animal de Laboratório. Temperaturas retais de linha base foram registradas duas vezes diariamente durante 7 dias. Os cães foram anestesiados por injeção intravenosa de propofol (Diprivan®, Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg do peso do corpo para efeito) para intubação com tubos endotraqueanos. Cada cão foi inoculado com uma dose

total de $10^{6,6}$ doses infecciosas de cultura de tecido mediana (TCID₅₀) de vírus de A/Canine/Florida/43/2004 (Canine/FL/04) (H3N8) com metade da dose administrada na traquéia distal através do tubo endotraqueano e a outra metade administrada na passagem nasal profunda através de um cateter.

- 5 Exames físicos e registros de temperatura retal foram executados duas vezes diariamente durante 14 dias pós-inoculação (p.i.). Amostras de sangue (4 ml) foram colhidas através de venipunctura jugular nos dias 0, 3, 5, 7, 10, e 14 p.i. Espécimes nasais e orofaríngeos foram colhidos com esfregaços de poliéster (Fisher Scientific) de cada cão nos dias 0 a 5, 7, 10, e 14 p.i. Os
- 10 esfregaços foram colocados em meio de transporte viral (Remel) e armazenados a -80°C. Dois cães (1 macho e 1 fêmea) foram eutanizados por inoculação intravenosa de solução de Beuthanasia-D® (1 mL/5 kg do peso do corpo; Schering-Plough Animal Health Corp) no dia 5 p.i. e os 2 cães restantes no dia 14 para autópsia. Tecidos para análise histológica foram proces-
- 15 sados como descrito. Tecidos para cultura de vírus foram armazenados a -80°C. Este estudo foi aprovado pelo University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee.

PROPAGAÇÃO DO VÍRUS DE CÃES EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS.

- 20 Diluições seriais de homogeneizados pulmonares e extratos de esfregaço, preparadas por clarificação dos meios de transporte de esfregaço através de centrifugação, foram fixadas em MEM suplementado com 0,5 % de BSA e antibióticos. Ensaios de placa foram executados como descrito (Burleson et al., 1992) usando monocamadas de células de MDCK em pla-
- 25 cas de cultura de tecido de 6 cavidades. Monocamadas de células inoculadas foram revestidas com MEM suplementado contendo 0,8 % de agarose e 1,5 ug/mL de TPCK-tripsina. Células foram cultivadas durante 72 horas a 37°C em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂ antes da fixação e tingimento com violeta cristal. Concentração do vírus foi expressada como unidades de formação de placa (PFU) por grama de tecido ou por esfregaço.

30 IMUNO-HISTOQUÍMICA.

Seções de tecido pulmonar de 5 µm desparafinizadas e reidratadas dos galgos e bigles foram montadas em lâminas de Bond-Rite® (Ri-

chard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI) e subsequentemente tratadas com
 proteinase K (DakoCytomation, Carpinteria, CA) seguido por reagente de
 bloqueio de peroxidase (Kit de Dako® EnVision® Peroxidase, Dako Corp.).
 As seções foram incubadas com diluições de 1:500 de anticorpos monoclo-
 5 nais para vírus de sinomose canina (VMRD, Inc.), adenovírus canino tipo 2
 (VMRD, Inc.), vírus de parainfluenza canina (VMRD, Inc.), ou H3 de influen-
 za A (Chemicon International, Inc.) durante 2 horas em temperatura ambien-
 te. Controles incluíram incubação das mesmas seções com IgG de camun-
 dongo (1 mg/ml, Serotec, Inc.), e incubação dos anticorpos monoclonais com
 10 seções pulmonares caninas normais. Seguindo tratamento com os anticor-
 pos primários, as seções foram incubadas com imunoperoxidase secundária
 e reagentes de substrato de peroxidase (Kit de Dako® EnVision® Peroxida-
 se, Dako Corp.) de acordo com as instruções do fabricante. As seções foram
 contratingidas com hematoxilina, tratadas com Clarificador #2 e Reagente de
 15 Anil (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI), desidratadas, e lâminas de
 cobertura aplicadas com Permount (ProSciTech).

ENSAIO DE INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (HI).

Amostras de soro foram incubadas com enzima destruidora de
 receptor (RDE, Denka) (1 parte de soro: 3 partes de RDE) durante 16 horas
 20 a 37°C antes da inativação a calor durante 60 minutos a 56°C. Vírus de in-
 fluenza A/Canine/FL/04 (H3N8) foi crescido em células de MDCK por 36-48
 h a 37°C. Os sobrenadantes de cultura de vírus foram colhidos, clarificados
 através de centrifugação, e armazenados a -80°C. O ensaio de HI foi execu-
 tado como previamente descrito (Kendal et al., 1982). Brevemente, 4 unida-
 25 des de hemaglutinação de vírus foram adicionadas em 25 µl a um volume
 igual de soro serialmente diluído em cavidades de microtitulação e incuba-
 dos em temperatura ambiente durante 30 minutos. Um volume igual de 0,5
 % v/v de eritrócitos de peru foi adicionado e as titulações de hemaglutinação
 foram estimadas visualmente após 30 minutos. A titulação de HI de ponto
 30 terminal foi definida como a última diluição de soro que completamente inibiu
 a hemaglutinação. Seroconversão foi definida como o aumento ≥ 4 vezes na
 titulação de HI entre amostras agudas e convalescentes pareadas. Soroposi-

tividade de uma amostra simples foi definida como uma titulação de anticorpo de HI $\geq 1:32$.

ENSAIO DE MICRONEUTRALIZAÇÃO (MN).

- Respostas de anticorpo de soro neutralizante para A/Canine/FL/04 (H3N8) foram detectadas por um ensaio de MN como previamente descrito (Rowe et al., 1999) exceto que os soros caninos foram tratados com RDE como descrito acima antes do ensaio. A titulação de ponto terminal foi definida como a diluição mais alta de soro que deu 50 % de neutralização de 100 TCID₅₀ de vírus. Seroconversão foi definida como aumento ≥ 4 vezes em titulação de MN entre as amostras agudas e convalescentes pareadas. Soropositividade de uma amostra simples foi definida como uma titulação de MN $\geq 1:80$.

- A seguir são exemplos que ilustram os procedimentos para praticar a invenção. Estes exemplos não deveriam ser interpretados como limitativos. Todas as porcentagens são em peso e todas as proporções de mistura de solvente são em volume a menos que do contrário observado.

EXEMPLO 1

- Em janeiro de 2004, uma epidemia de doença das vias respiratórias ocorreu em 22 galgos de corrida alojados em 2 canis em uma pista de Flórida e a fazenda local forneceu os cães estes canis. Havia cerca de 60 cães em cada instalação do canil e 300 cães na fazenda. A epidemia ocorreu em um período de 6 dias após o qual nenhum caso novo foi identificado. Quatorze dos 22 cães tiveram febres de 39,5 a 41,5°C, uma tosse suave de entallos durante 10 a 14 dias, e restabelecimento eventual. Dos 8 cães restantes, 6 cães aparentemente saudáveis morreram inesperadamente com hemorragia da boca e nariz. Dois outros cães foram eutanizados dentro de 24 horas do princípio da hemorragia da boca e nariz devido à deterioração rápida. Ambos destes cães tiveram febres de 41°C. Quatro das 8 mortes ocorreram nas instalações de canil e 4 ocorreram na fazenda. Cinquenta por cento das mortes ocorreram no dia 3 da epidemia. Os 22 cães variaram em idade de 17 meses a 4 anos, mas 73 % tinham 17 a 33 meses de idade.

Duas síndromes clínicas foram evidentes: uma enfermidade

mais moderada caracterizada por febre inicial e depois tosse durante 10-14 dias (14 cães) com restabelecimento subsequente, ou uma morte peraguda associada à hemorragia no trato respiratório (8 cães para uma taxa de mortalidade de 36 %). Autópsias foram executadas em 6 dos 8 casos fatais. Todos os cães tiveram hemorragia extensiva nos pulmões, mediastino, e cavidade pleural. Exame histológico do trato respiratório revelou que além da hemorragia pulmonar, todos os cães tiveram traqueíte, bronquite, bronquiolite, e broncopneumonia supurativa (Figura 3). O forro epitelial e lumens da via aérea nestes tecidos foram infiltrados por neutrófilos e macrófagos. Homogeneizados pulmonares preparados destes cães foram inoculados em uma variedade de linhagens celulares de macaco, humanas, bovinas, e caninas por cultura de vírus. O homogeneizado pulmonar de um cão causou efeitos citopáticos nas células epiteliais de rim canino de Madin-Darby (MDCK) cultivadas na presença de tripsina, e nas células sangüíneas vermelhas de galinha aglutinadas de sobrenadante da cultura de células. Evidência preliminar de um tipo de vírus de influenza A foi provido por um ELISA comercial para detecção da nucleoproteína de vírus de influenza A e B, e por análise de PCR usando iniciadores específicos para o gene Matriz do vírus de influenza A. Além disso, a atividade de hemaglutinação foi inibida por anti-soros de referência para influenza A eqüina subtipo H3, mas não através de anti-soros específicos para influenza A humana subtipos H1-H11 e H13 (Tabela 3). Para caracterizar as propriedades moleculares do vírus, determinaram-se as seqüências de nucleotídeo dos 8 segmentos de RNA do genoma viral. Comparações de seqüência com genes de vírus de influenza conhecidos e análises filogenéticas indicaram que os 8 genes do isolado canino eram muito similares àqueles do vírus de influenza A eqüina contemporânea (H3N8), com o qual eles compartilharam $\geq 96-97$ % de identidade de seqüência (Figura 1A, Tabela 4). Em contraste, os genes representativos de isolado de influenza A aviário, suína, e humana tiveram ≥ 94 % de identidade que o isolado canino (Tabela 4). Estes dados identificaram o isolado canino A/Canine/Florida/43/2004 (Canine/FL/04) como uma vírus de H3N8 de influenza A estritamente relacionado às linhagens contemporâneas do vírus de

influenza eqüina. Considerando que todos os genes do isolado canino eram de origem do vírus de influenza eqüina, concluíram-se que o genoma inteiro de um vírus de influenza eqüina tinha sido transmitido ao cão.

EXEMPLO 2

- 5 Para investigar o papel do vírus de Canine/FL/04 nas observações clínicas e patológicas nos galgos, executaram-se tingimento imuno-histoquímico (IHC) em tecidos pulmonares usando um anticorpo monoclonal para H3 de influenza A. Antígeno de H3 viral foi detectado consistentemente no citoplasma de células epiteliais bronquiais e bronquiolares, células epiteliais da glândula bronquial, e macrófagos em lumens da via aérea e espaços alveolares (Figura 2A). Estes dados suportam uma diagnose de infecção pulmonar com vírus de influenza do subtipo H3 em múltiplos cães.
- 10

EXEMPLO 3

- Para determinar o envolvimento de um vírus semelhante a Canine/FL/04 na etiologia da epidemia de doença das vias respiratórias, analisaram-se soros agudos e convalescentes pareados de 11 cães doentes e 16 contatos assintomáticos por inibição de hemaglutinação (HI) e microneutralização (MN). Seroconversão, definida como uma elevação de ≥ 4 vezes na titulação de anticorpo para Canine/FL/04 da fase aguda a convalescente, ocorreu em 8 de 11 (73 %) cães doentes em ambos os ensaios (Tabela 1). Seroconversão ocorreu em 6 de 16 (38 %) contatos assintomáticos no ensaio de HI, enquanto 8 de 16 (50 %) soroconvertidos no ensaio de MN (Tabela 1). Os dados de seroconversão demonstraram infecção dos cães com um vírus semelhante a Canine/FL/04 que coincidiu temporalmente com o princípio da doença das vias respiratórias na maioria dos animais.
- 15
- 20
- 25

- As amostras de soro simples foram colhidas 3 meses após a epidemia de uns 46 cães assintomáticos adicionais alojados com os cães doentes. Destes, 43 (93 %) eram soropositivos em ambos os ensaios. Para a população total de 73 cães testados, 93 % eram soropositivos em ambos os ensaios, incluindo 82 % (9/11) dos cães doentes e 95 % (59/62) dos contatos saudáveis. A soroprevalência alta em cães sem história da doença das vias respiratórias indica que a maioria das infecções com vírus de influenza canina é
- 30

subclínica e sugere expansão eficiente do vírus entre os cães. Não é conhecido se as infecções subclínicas contribuíram para a expansão do vírus.

EXEMPLO 4

Para melhor entender a capacidade do vírus de Canine/FL/04 para infectar cães, quatro bigles de 6 meses de idade criados para o propósito foram cada um inoculados com $10^{6,6}$ doses infecciosas de cultura de tecido mediana (TCID₅₀) pelas vias intratraqueana e intranasal. Todos os cães desenvolveram uma febre ($\geq 39^\circ\text{C}$ de temperatura retal) para os 2 primeiros dias pós-inoculação (p.i.), mas nenhum exibiu sintomas respiratórios tais como tosse ou secreção nasal em um período de observação de 14 dias. Eliminação de vírus foi examinada por quantificação de vírus em esfregaços nasais e orofaríngeos. Apenas 2 dos 4 cães propagaram quantidades detectáveis de vírus. Um cão propagou vírus nos dias 1 e 2 p.i. ($1,0\text{-}2,5 \log_{10}$ PFU por esfregaço), enquanto que o outro cão propagou vírus durante 4 dias sucessivos após inoculação ($1,4\text{-}4,5 \log_{10}$ PFU por esfregaço). Autópsia de 2 cães no dia 5 p.i. revelou traqueíte necrotizante e hiperplástica, bronquite, e bronquiolite similares às encontradas na doença espontânea em galgos, mas não houve nenhuma hemorragia pulmonar ou broncopneumonia. Antígeno de H3 viral foi detectado no citoplasma de células epiteliais dos brônquios, bronquíolos, e glândulas bronquiais por IHC (Figura 2B). Vírus infecciosos restabeleceram-se do tecido pulmonar de um dos cães. Autópsia dos 2 cães restantes no dia 14 p.i. mostrou alterações histológicas mínimas nos tecidos respiratórios, nenhum antígeno de H3 viral por IHC, e nenhum restabelecimento do vírus dos homogeneizados pulmonares. Seroconversão nestes 2 últimos cães foi detectada em ensaios de MN pelo dia 7 p.i., com um aumento adicional de 2-3 vezes nas titulações de anticorpo pelo dia 14. Estes resultados estabeleceram a suscetibilidade dos cães à infecção com Canine/FL/04, como comprovado pela resposta febril, presença de antígeno viral e vírus infeccioso no parenquima pulmonar, achados histopatológicos típicos para influenza, e seroconversão. A insuficiência para reproduzir doença severa e morte nos bigles experimentalmente inoculados não é surpreendente uma vez que uma proporção grande dos galgos naturalmente infec-

tados foi assintomática.

EXEMPLO 5

- Para investigar se um vírus semelhante a Canine/FL/04 de influenza circulou entre populações de galgo na Flórida antes da epidemia de janeiro de 2004, soros arquivais de 65 galgos de corrida foram testados para a presença de anticorpos para Canine/FL/04 usando os ensaios de HI e de MN. Não houve nenhum anticorpo detectável em 33 cães amostrados de 1996 a 1999. De 32 cães amostrados entre 2000 e 2003, 9 eram soropositivos em ambos os ensaios - 1 em 2000, 2 em 2002, e 6 em 2003 (Tabela 5).
- Os cães soropositivos estavam localizados em pistas de Flórida envolvidas em epidemias de doença das vias respiratórias de etiologia desconhecida de 1999 a 2003, sugerindo que um vírus semelhante a Canine/FL/04 pudesse ter sido o agente causativo daquelas epidemias. Para investigar esta outra possibilidade, examinaram-se os tecidos arquivais de galgos que morreram de broncopneumonia hemorrágica em março de 2003. Homogeneizados pulmonares inoculados em células de MDCK e embriões de galinha de um cão renderam vírus de influenza de H3N8, denominado A/Canine/Florida/242/2003 (Canine/FL/03). Análise da sequência do genoma completo de Canine/FL/03 revelou > 99 % de identidade a Canine/FL/04 (Tabela 4), indicando que vírus semelhante a Canine/FL/04 tinha infectado galgos antes de 2004.

EXEMPLO 6

- De junho a agosto de 2004, as epidemias de doença das vias respiratórias ocorreram em milhares de galgos de corrida em 14 pistas na Flórida, Texas, Alabama, Arkansas, West Virginia, e Kansas.
- Funcionários em algumas destas pistas estimaram que pelo menos 80 % de sua população de cães tiveram doença clínica. A maioria dos cães teve sinais clínicos de febre ($\geq 39^{\circ}\text{C}$) e tosse similar aos cães pela epidemia de janeiro de 2004, mas muitos cães também tiveram uma secreção nasal mucopurulenta. Mortes múltiplas foram relatadas mas uma taxa de mortalidade precisa não pôde ser determinada.

Coletaram-se soros agudos e convalescentes pareados de 94 cães localizados em 4 pistas da Flórida: 56 % destes cães tiveram aumento

de ≥ 4 vezes nas titulações de anticorpo para Canine/FL/04, e 100 % eram soropositivos (Tabela 6). Soros convalescentes de 29 cães em West Virginia e Kansas também tiveram anticorpos para Canine/FL/04. Isolou-se vírus de influenza A (H3N8) dos pulmões de um galgo que morreu de broncopneumonia hemorrágica em uma pista no Texas. Análise de seqüência do genoma inteiro deste isolado, denominado A/Canine/Texas/1/2004 (Canine/TX/04), revelou ≥ 99 % de identidade a Canine/FL/04 (Tabela 4). O isolamento de três vírus de influenza estritamente relacionados de casos caninos fatais em um período de 13 meses e de localizações geográficas diferentes, junto com a evidência sorológica substancial de infecção difundida entre galgos de corrida, sugeriu circulação contínua de um vírus semelhante a Canine/FL/04 na população de cães.

Análise filogenética dos genes de HA de Canine/FL/03, Canine/FL/04, e Canine/TX/04 mostrou que eles constituem um grupo monofilético com suporte autopromotor robusto que foi claramente distinto dos genes de H3 contemporâneos de vírus eqüinos isolados em 2002 e 2003 (Figura 1B). Análise filogenética e comparações de seqüência de nucleotídeo pareadas dos outros 7 segmentos genômicos suportaram a segregação dos genes caninos estritamente relacionados como uma sublinhagem distinta à linhagem de vírus eqüino (dados não mostrados, e Tabela 4). O agrupamento dos genes de influenza canina como um grupo monofilético separado da influenza eqüina é também suportado pela presença de 4 alterações de aminoácido de assinatura no HA (Tabela 2). Junto com os resultados sorológicos de 2003 e 2004, estes dados são consistentes com um evento de transmissão de vírus simples de cavalos para cães com expansão horizontal subsequente do vírus na população de galgo. Porém, introduções repetidas desta única linhagem de vírus de influenza de uma espécie de reservatório não identificada não pode ser excluída formalmente, improvável como pode ser.

O HA viral é um determinante crítico da especificidade de espécie hospedeira do vírus de influenza (Suzuki et al., 2000). Para identificar resíduos dentro de HA que pode estar associado à adaptação ao hospedeiro canino, comparou-se a seqüência de aminoácido deduzida de HAs caninos

àquelas de vírus eqüinos contemporâneos. Quatro alterações de Diferenças de aminoácido as seqüências de aminoácido de consenso de HA maduras eqüinas e caninas: N83S, W222L, I328T, e N483T (vide Tabela 2). Os vírus caninos têm uma deleção de aminoácido quando comparados às seqüências eqüinas de consenso. Portanto, a posição de aminoácido 7 na seqüência eqüina de HA é a posição 6 na seqüência canina de HA, posição de aminoácido 29 na seqüência eqüina de HA é a posição 28 na seqüência canina de HA, posição de aminoácido 83 na seqüência eqüina de HA é a posição 82 na seqüência canina de HA, etc. Desse modo, os quatro aminoácidos substituídos estão na posição 82, 221, 327, e 482 da seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 34. A substituição de serina por asparagina na posição de seqüência de consenso 83 é uma alteração de significação funcional desconhecida uma vez que vários resíduos polares são encontrados nas moléculas de H3 de outras espécies. A isoleucina estritamente conservada na posição de seqüência de consenso 328 próxima do sítio de clivagem do HA de H3 foi substituída por treonina. O papel pivotante da clivagem de HA por proteases hospedeiras em patogênese sugere que esta alteração merece estudo adicional. A substituição de leucina por triptofano na posição de seqüência de consenso 222 é bastante notável porque representa uma alteração não-conservadora adjacente para a cavidade de ligação do ácido siálico que poderia modular a função do receptor (Weis et al., 1988). De forma interessante, leucina na posição 222 não é única para HA de H3 canino uma vez que é tipicamente encontrada nos subtipos de HA H4, H8, H9, e H12 (Nobusawa et al., 1991; Kovacova et al., 2002). A substituição de leucina pode ser mais compatível com especificidade de vírus para hospedeiros mamíferos uma vez que infecções de suínos com subtipo H4 (Karasin et al., 2000) e seres humanos e suínos com vírus de subtipo H9 (Peiris et al., 1999) foram relatadas. A substituição de asparagina com treonina na posição de seqüência de consenso 483 resultou na perda de um sítio de glicosilação na subunidade de HA2 que é conservada em todos os subtipos de HA (Wagner et al., 2002). Embora a importância destas alterações de aminoácido no HA para adaptação de um vírus eqüino para cães

permaneça a ser determinada, alterações de aminoácido similares foram observadas previamente em associação com transferência de interespecies (Videiras et al., 1998; Matrosovich et al., 2000). Diferenças de aminoácido entre outras proteínas virais de influenza da invenção e sequência de consenso eqüina são mostradas na Tabelas 19 a 25.

A fonte do vírus de influenza eqüina que inicialmente infectou os galgos de corrida permanece especulativa. Canis em pistas de corridas de galgo não ficam localizados próximos de cavalos ou pistas de corridas de cavalos, sugerindo que o contato entre galgos e cavalos propagadores não seja uma explanação suficiente para as múltiplas epidemias em estados diferentes em 2004. Uma fonte potencial de exposição ao vírus eqüino é a alimentação de carne de cavalo para galgos, cuja dieta é suplementada com carne bruta provida pelas casas de empacotamento que confere carcaças, incluindo cavalos que poderiam portar influenza. Precedentes para este modo de infecção incluem relatórios de transmissão interespecies de vírus de influenza aviário de H5N1 para porcos e felídeos de jardim zoológico alimentados com carcaças de galinha infectadas (Webster, 1998; Keawcharoen et al., 2004; Kuiken et al., 2004). Embora esta seja uma via plausível para a introdução inicial de influenza eqüina em cães, não explica as recentes epidemias de influenza múltiplas em milhares de cães em estados diferentes. O estudo de inoculação experimental demonstrou a presença de vírus nas passagens nasais e orofaringe de cães, embora em titulações modestas. Não obstante, estes resultados indicam que propagação é possível, e que a transmissão de cão-para-cão do vírus através de aerossóis de gotícula grandes, fomitas, ou contato mucoso direto poderia representar um papel na epizootiologia da doença.

A transferência interespecies de um vírus de influenza mamífero inteiro para uma espécie mamífera não relacionada é um evento raro. Estudos anteriores forneceram evidência sorológica ou virológica limitada, mas não ambos, de infecção transiente de cães com vírus de influenza humana A (H3N2) (Nikitin et al., 1972, Kilbourne, et al., 1975; Chang et al., 1976; Houser et al., 1980). Porém, não houve nenhuma evidência de circulação contínua

no hospedeiro canino. Embora transferência direta do vírus de influenza suíno de porcos para pessoas esteja bem documentada (Dacso et al., 1984; Kimura et al., 1998; Patriarca et al., 1984; Top et al., 1977), não há nenhuma evidência para adaptação dos vírus suínos em hospedeiros humanos. Neste relatório,

5 forneceram-se evidência virológica, sorológica e molecular para transmissão interespecie de um vírus de influenza A eqüina inteiro (H3N8) para outras espécies mamíferas, o cão. Substituições únicas de aminoácido no vírus canino HA, acopladas com confirmação sorológica de infecção de cães em múltiplos estados nos EUA, sugerem adaptação do vírus ao hospedeiro canino. Uma vez

10 que cães são um animal de companhia primário para seres humanos, estes achados têm implicações com a saúde pública; cães podem prover uma fonte nova para transmissão de vírus de influenza A nova para seres humanos.

TABELA 1. Resposta de anticorpo para A/Canine/Florida/43/2004 (H3N8).				
	Cães doentes (11) ^a		Contatos saudáveis (16) ^b	
Resposta	HI ^c	SN ^d	HI	SN
Seroconversão (%) ^e	73	73	38	50
Soropositivo (%) ^f	82	82	100	100
Titulação de média geométrica ^g	329	424	268	431

^a vários cães com sinais clínicos da doença.

^b Número de cães assintomáticos alojados em contato com cães clinicamente doentes.

15

^c Ensaio de inibição de hemaglutinação (HI) usando vírus de A/Canine/ Florida/43/2004.

^d Ensaio de microneutralização (MN) usando vírus de A/Canine/Florida/43/ 2004.

^e Porcentagem de cães com pelo menos um aumento de 4 vezes na titulação de anticorpo em soros agudos e convalescentes pareados.

20

^f Porcentagem de cães com uma titulação de anticorpo positiva (titulação de HI $\geq$ 32; titulação de MN $\geq$ 80) nos soros convalescentes.

^g Titulação de anticorpo de média geométrica para os soros convalescentes.

TABELA 2. Diferenças de aminoácido entre as hemaglutininas de H3 caninas e eqüinas.				
Consensos de H3 eqüino	Can/FL/03	Can/FL/04	Can/TX/04	Significação funcional potencial
G7	D	- †	-	D também encontrado em HA de H3 de pato e ser humano
I29	-	M	M	I é conservado em HAs de H3 de todas as espécies
N83	S	S	S	Vários aminoácidos polares presentes nesta posição em HAs de H3 de outras espécies
S92	-	N	-	N está presente em algum HAs de H3 de pato
L118	-	-	V	L é conservado em todos HAs de H3
W222	L	L	L	W é conservado na maioria dos HAs de H3 de todas as espécies; localizado próximo do sítio de ligação de receptor
A272	V	A	V	V está presente em algum isolado recente eqüino
I328	T	T	T	T é conservado estritamente em todos HAs de H3 aviários, suínos ou seres humanos
N483	T	T	T	N ocorre em todos os subtipos de H3 e outros de HA. Substituição resulta em perda de um sítio de glicosilação.
K541	-	R	-	Alteração conservadora de aminoácido básico

* Resíduo de aminoácido (código de letra minúscula) e posição no HA de H3 maduro. O código de aminoácido é: A = alanina, D = ácido aspártico, G = glicina, I = isoleucina, K = lisina, L = leucina, M = metionina, N = asparagina,

R = arginina, S = serina, T = treonina, V = valina, W = triptofano.

† Denota nenhuma alteração dos HAs de H3 eqüino de consensos.

TABELA 3. Inibição de Hemaglutinação de um isolado viral por anti-soros de referência para subtipos de HA diferentes.		
Anti-soros de referência	Especificidade de HA	Titulação de HI ^a
Puerto Rico/8/34	H1	5
Swine/Iowa/15/30	H1	5
Singapore/01/57	H2	5
Shanghai/11/87	H3 ^b	5
Eqüino/Miami/1/63	H3	160
Duck/Czechoslovakia/56	H4	5
Tern/South Africa/61	H5	5
Turkey/Massachusetts/65	H6	5
Ave Plague/Dutch/27	H7	5
Ave Plague/Rostock/34	H7	5
Eqüino/Prague/1/56	H7	5
Turkey/Ontario/6118/68	H8	5
Quail/Hong Kong/G1/97	H9 ^b	5
Chicken/Hong Kong/G9/97	H9 ^b	5
Chicken/Germany/49	H10	5
Duck/England/56	H11	5
Gull/Maryland/704/77	H13	5
Soro de ovelha normal	-	5
Soro de furão normal		

^a Titulação de inibição de hemaglutinação para isolado viral de cão #43.

^b Anti-soros policlonais que foram produzidos em furões, enquanto que todos os outros anti-soros foram produzidos em ovelhas ou cabras.

TABELA 4. Homologia de sequência de genes de A/Canine/Florida/43/2004 (H3N8) para cepas de influenza A eqüina, aviária, suína, e humana.				
Gene	Eqüina	Aviária	Suína	Humana
PB2 DQ124147	96,9 (98,7) ^a Eq/Kentucky/2/8 M73526	88,6 (96,8) Mall/Alberta/98/85 AY633315	87,9 (96,8) Sw/Ontario / 01911-1/99 AF285892	86,2 (96,4) PR/8/34 (HK/213/03) AF389115 (AY576381)
PB1 DQ124148	97,1 (98,8) Eq/Tennessee/5/86 M25929	83,9 (97,1) Ck/BritishColumbia/04 (Gull/Md/704/77) AY61675 (M25933)	83,9 (97,1) Sw/Korea/S-109/04 (Sw/Saskatch / 18789/02) AY790287 (AY619955)	83,9 (97,1) WSN/33 (Sing/1/57) J02178 (M25924)
PA DQ124149	96,3 (97,5) M26082 Eq/Tennessee/5/86	87,0 (94,3) Ck/Chile/4591/02 (Ostrich/SA/08103/95) AY303660(AF508662)	84,3 (94,6) Sw/Hong Kong / 126/02 M26081	83,8 (93,4) Taiwan/2/70 (O Viet Vietnã / 1203/04) AY210199 (AY818132)
HA (H3) DQ124190	97,4 (97,1) Eq/FL/1/93 L39916	80,7 (89,0) Dk/Norway/1/03 AJ841293	80,0 (87,7) Sw/Ontario/42729a/01 AY619977	81,8 (87,9) HK/1/68 AF348176

TABELA 4. -continuação-				
Gene	Eqüina	Aviária	Suína	Humana
NP DQ124150	96,6 (97,9) Eq/Tennessee/5/86 M30758	87,9 (95,1) Ck/Chile/176822/02 AY303658	85,4 (93,5) Sw/Ontario/42729a/01 (Sw/Fujian/1/2003) AY619974 (AY747611)	84,7 (93,0) HK/1073/99 (Hong Kong /538/97) AF255742 (AF255751)
NA (N8) DQ124151	96,8 (97,0) Eq/Tennessee/5/86 L06583	84,0 (85,2) Dk/NJ/2000 L06583	na ^b	na ^b
M DQ124152	97,9 (95,7) Eq/Tennessee/5/86 (Eq/Kentucky/92) M63529 (AF001683)	94,1 (94,0) Tky/Mn/833/80 AF001683	93,7 (93,5) Sw/Saskatchewan / 18789/02 M63527	91,2 (95,4) WSN/33 (Hong Kong / 1073/99) J02177 (AJ278646)
NS DQ124153	97,5 (95,7) Eq/Tn/5/86 (Eq/Kentucky/92) M80973 (AF001671)	92,0 (90,4) Mal/NY/6750/78 M80945	91,1 (89,1) Sw/China/8/78 (Sw/Korea/s452/04) M80968 (AY790309)	91,4 (90,0) Brevig Mission/1/18 AF333238

^a Por cento de identidade de sequência de nucleotídeo e aminoácido (entre parênteses) de genes de A/Canine/Florida/43/2004 (H3N8) para o gene mais homólogo de vírus do isolado de vírus de influenza das espécies, seguido por seus números de acesso de base de dados de sequência de Genbank.

^b Não aplicável: Neuraminidase de N8 nunca foi relatada em vírus humano ou suíno.

TABELA 5. Titulações de anticorpo para A/canine/Flórida/43/2004 (H3N8) em soro de galgo colhido de 1996 a 2003.

	Ano ^a					
	1996	1997	1998	2000	2002	2003
Nº de cães testados	8	6	19	4	6	22
Nº de cães soropositivos	0	0	0	1	2	6
Titulação de anticorpo ^b				512	232, 524	280-2242

^a O ano de coleta da amostra de soro de galgos de corrida na Flórida.

^b Titulações de anticorpo de ensaio de microneutralização para cães soropositivos, incluindo a faixa para os seis cães de soropositivos de 2003.

TABELA 6. Resposta de anticorpo para A/canine/Flórida/43/2004 (H3N8) em galgos de corrida em 4 pistas da Flórida em junho de 2004.

Resposta	Pista A	Pista B	Pista C	Pista D
Número de cães testados ^a	37	10	22	25
Seroconversão (%) ^b	46	90	100	64
Soropositivo (%) ^c	100	100	100	100
Titulação de média geométrica ^d	401	512	290	446

^a Vários cães clinicamente doentes testados por HI usando A/canine/ Flórida/43/2004 (H3N8).

^b Porcentagem de cães com aumento ≥ 4 vezes na titulação de anticorpo entre soros agudos e convalescentes.

^c Porcentagem de cães com uma titulação de anticorpo positivo (titulação de HI > 16) nos soros convalescentes.

^d Titulação de anticorpo de média geométrica para os soros convalescentes.

MATERIAIS E MÉTODOS PARA OS EXEMPLOS 7-11

Tecidos Caninos

Autópsias foram executadas pelo Serviço de Patologia Anatômico na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Flórida em 6 cães de raça mista que morreram em abril/maio de 2005 durante uma epidemia de influenza em uma instalação de abrigo no nordeste da Flórida, e em um animal de estimação Yorkshire Terrier que morreu em maio de 2005

durante uma epidemia de influenza em uma clínica veterinária no sudeste da Flórida. Tecidos foram fixados em 10 % de formalina tamponada neutro, embebidos em parafina, e seções de 5 µm foram tingidas com hematoxilina e eosina para diagnose histopatológica. Tecidos não-fixados foram armazenados em análises virológicas pendentes a -80°C.

EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS DE TECIDO CANINAS

Tecidos pulmonares congelados de cada um de os 7 cães foram descongelados e homogeneizados em meio de essencial mínimo (MEM) suplementado com 0,5 % albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina) usando moedor de tecido descartável (Kendall, Lifeline Medical Inc., Danbury, CT). RNA total foi extraído usando um kit comercial (Kit de RNeasy® Mini, QIAGEN Inc., Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante e eluído em um volume final de 60 µl de tampão. RNA total foi também extraído de tecido pulmonar colhido de cães sem doença das vias respiratórias.

RT-PCR DE TEMPO REAL

Uma RT-PCR de tempo real quantitativa de uma etapa foi executada em RNA total extraído das amostras de tecido caninas usando o kit de RT-PCR QuantiTect® Probe contendo ROX como uma tintura de referência passiva (QIAGEN Inc., Valença, CA). Brevemente, 2 conjuntos de iniciador-sonda foram usados para detecção de seqüências de influenza A em cada amostra (TABELA 7). Um conjunto de iniciador-sonda foi seletivo para seqüências de gene de hemaglutinina canina (H3). O outro conjunto de iniciador-sonda alvejou uma região altamente conservada do gene matriz (M) do vírus de influenza do tipo A. Para cada reação de RT-PCR de tempo real, 5 µl de RNA total extraído foram adicionados a uma mistura de reação contendo 12,5 µl de 2X Mistura Mestre de RT-PCR de Sonda de QuantiTech®, 0,25 µl de QuantiTech® RT Mix, iniciadores diretos e reversos (concentração final de 0,4 µM para cada), sonda (concentração final de 0,1 µM) e água livre de RNase em um volume final de 25 µl. Os Reagentes de Controle de RNA Ribossômicos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) foram usados de acordo com as instruções do fabricante para detecção de rRNA de 18S

como um controle interno endógeno para a presença de RNA extraído das amostras de tecido caninas.

RT-PCR quantitativa de tempo real de uma etapa foi executada nas misturas de reação em um Sistema de QPCR Mx3000P® (Stratagene, La Jolla, CA). Condições de ciclismo incluíram uma etapa de transcrição reversa a 50°C durante 30 minutos, uma etapa de desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos para ativar a DNA polimerase de HotStarTaq®, e amplificação durante 40 ciclos. Cada ciclo de amplificação incluiu desnaturação a 94°C durante 15 segundos seguido por anelamento/extensão a 60°C durante 1 minuto. Os sinais fluorescentes de FAM (comprimento de onda de emissão a 518 nm) e de VIC (comprimento de onda de emissão a 554 nm) foram registrados no término de cada ciclo. O ciclo de limiar (Ct) foi determinado ajustando a fluorescência de limiar (dR) em 1000 em cada experimento individual. O programa de software de Mx3000P® versão 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA) foi usado para aquisição e análise dos dados. Amostras foram consideradas positivas para vírus de influenza A quando o ciclo de limiar (Ct) para o gene de H3 ou M foi 3 unidades menor que o Ct para tecidos pulmonares de cães sem doença das vias respiratórias. O controle positivo consistiu em amplificação de RNA extraído de vírus de A/canine/FL/242/03 (H3N8).

20 ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CÉLULAS DE MDCK

Tecidos pulmonares congelados de cada um dos 7 cães foram descongelados e homogeneizados em 10 volumes do Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 0,5 % (BSA) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina). Restos sólidos foram removidos por centrifugação e os sobrenadantes foram inoculados sobre células de rim canino de Madin-Darby (MDCK) cultivadas em DMEM suplementado com 1 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina). Células foram crescidas em frascos de 25 cm² a 37°C em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂. As culturas foram observadas diariamente para alterações morfológicas e foram colhidas em 5 dias pós-inoculação. As culturas colhidas foram clarificadas por centrifugação e os sobrenadantes inoculados sobre células de MDCK

frescas como descrito para a inoculação inicial; foram executadas duas passagens adicionais para amostras que não mostraram evidência de vírus de influenza através de hemaglutinação ou RT-PCR. Atividade de Hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando 0,5 % de células sanguíneas vermelhas de peru como previamente descrito (Burleson, F., et al., 1992; Kendal, P., et al., 1982). RT-PCR foi executada como descrito abaixo.

ISOLAMENTO DE VÍRUS EM OVOS GALINHA EMBRIONADOS

Homogeneizados foram preparados de tecidos pulmonares congelados como descrito acima para inoculação de células de MDCK. Os homogeneizados (0,2 ml) foram inoculados no saco alantóico de ovos de galinha embrionados de 10 dias de idade. Após 48 horas de incubação a 35°C, os ovos foram esfriados para 4°C durante a noite antes de colher o fluido alantóico. Atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando 0,5 % de células sanguíneas vermelhas de peru como previamente descrito (Burleson, F., et al., 1992; Kendal, P., et al., 1982). RT-PCR foi executada como descrito abaixo. Foram executadas duas passagens adicionais em ovos embrionados para amostras que não mostraram evidência de vírus de influenza após a inoculação inicial.

RT-PCR, SEQÜENCIAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO, E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

RNA viral foi extraído de sobrenadante de MDCK ou fluido alantóico usando o Míni Kit Viral de RNA QIAamp® (QIAGEN Inc., Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi transcrito reverso para cDNA usando o kit de RT-PCR QIAGEN® OneStep (QIAGEN Inc., Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Amplificação de PCR da região de codificação dos 8 genes virais de influenza no cDNA foi previamente executada como descrito (Klimov, A., et al., 1992b), usando conjuntos de iniciador gene-específico universais (seqüências de iniciador disponível sob solicitação). Os amplicons de DNA resultante foram usados como modelos para seqüenciação automatizada no seqüenciador de DNA automatizado ABI PRISM® 3100 usando química de terminador de tintura de seqüenciação de ciclo (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram analisa-

das as seqüências de nucleotídeo usando Lasergene 6 Package® (DNAS-TAR, Inc., Madison, WI). O programa de software PHYLIP® versão 3.5 foi usado para estimar as filogenias e calcular os valores de autocarregador das seqüências de nucleotídeo (Felsenstein, J., 1989). Árvores filogenéticas foram comparadas às geradas por análise de junção de vizinhos com o modelo Tamura-Nei implementado no programa de MEGA® (Kumar, S., et al., 2004) e confirmado pelo programa PAUP® 4.0 Beta (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA).

ENSAIO DE INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (HI)

- 10 As amostras de soro foram incubadas com enzima destruidoras de receptor (RDE, DENKA SEIKEN Co., Ltd., Tóquio, Japão) (1 parte de soro: 3 partes de RDE) durante 16 horas a 37°C antes da inativação de calor durante 30 minutos a 56°C. Vírus de influenza A/Canine/Jacksonville/05 (H3N8) foi cultivado em células de MDCK por 72 h a 37°C em 5 % de CO₂.
- 15 Os sobrenadantes de cultura de vírus foram colhidos, clarificados através de centrifugação, e armazenados a -80°C. Todos os outros vírus usados no ensaio de HI foram crescidos em ovos de galinha embrionados de 10 dias de idade cujo fluido alantóico foi colhido e armazenado a -80°C. O ensaio de HI foi executado como previamente descrito (Kendal, P., et al., 1982). Breve-
- 20 mente, 4 unidades de hemaglutinação de vírus foram adicionadas em 25 µl a um volume igual de soro serialmente diluído em placas de plástico de 96 cavidades e incubadas em temperatura ambiente durante 30 minutos. Um volume igual de 0,5 % de eritrócitos de peru foi adicionado e as titulações de hemaglutinação foram estimadas visualmente após 30 minutos. O ponto
- 25 terminal titulação de HI foi definido como a última diluição de soro que completamente inibiu a hemaglutinação.

EXEMPLO 7 - CASOS CLÍNICOS

- Em abril e maio de 2005, uma epidemia de doença das vias respiratórias previamente descrita (Crawford, P. C. et al., 2005) ocorreu em
- 30 cães alojados em uma instalação de abrigo no nordeste da Flórida. A epidemia envolveu pelo menos 58 cães que variam em idade de 3 meses a 9 anos, e incluiu cães de sangue puro como também raças misturadas. Os

5 sinais clínicos mais comuns foram secreção nasal purulenta e uma tosse durante 7 a 21 dias. Dos 43 cães que tiveram doença clínica por ≥ 7 dias, 41 tinham titulações de anticorpo de HI para canine/FL/04 (H3N8) variando de 32 a > 1024 . Pelo menos 10 cães progrediram para pneumonia, dos quais 6
 10 foram eutanizados. Estes 6 cães de raça mista incluíram 3 machos e 3 fêmeas variando em idade de 4 meses a 3 anos. A duração dos sinais clínicos variou de 2 a 10 dias na hora da eutanásia. Sob autópsia, estes cães tiveram congestão pulmonar e edema. Exame histológico do trato respiratório revelou rinite, traqueíte, bronquite, bronquiolite, e broncopneumonia supurativa.
 10 Houve necrose de célula epitelial e erosão na traquéia, brônquios, bronquíolos, e glândulas bronquiais. Os tecidos respiratórios foram infiltrados por neutrófilos e macrófagos.

Em maio de 2005, uma epidemia de doença das vias respiratórias ocorreu em 40 cães de estimação em uma clínica veterinária no sudeste da Flórida. Os sinais clínicos mais comuns foram secreção nasal purulenta e
 15 uma tosse durante 10 a 30 dias. Dos 40 cães, 17 eram soropositivos para canine/FL/04 (H3N8) com titulações de anticorpo de HI variando de 32 a > 1024 . Seroconversão ocorreu em 10 cães para os quais soros agudos e convalescentes pareados estavam disponíveis. Três cães progrediram para
 20 pneumonia. Um destes cães, um Yorkshire Terrier macho de 9 anos de idade, morreu 3 dias após o princípio dos sinais clínicos. Este cão teve traqueobronquite, edema pulmonar e congestão, e broncopneumonia severa. Similar aos 6 cães do abrigo, houve necrose de célula epitelial e erosão das vias aéreas e infiltrados neutrófilos nos tecidos.

25 EXEMPLO 8 - RT-PCR E TEMPO REAL E ISOLAMENTO VIRAL

Tecidos pulmonares dos 7 cães foram analisados através de ensaios de RT-PCR quantitativo de tempo real que detectam o gene M do tipo de influenza A e o gene H3 do vírus de influenza A canina de H3N8. Os pulmões de todos os 7 cães eram positivos tanto para gene M de influenza A
 30 quanto gene H3 de influenza canina (Tabela 8). Após 3 passagens em células de MDCK, vírus de H3N8 do subtipo influenza A foi isolado dos pulmões de um cão do abrigo que morreu após 3 dias de pneumonia. Este vírus foi

nomeado A/canine/Jacksonville/05 (H3N8) (canine/Jax/05). Após 2 passagens em ovos de galinha embrionados, vírus de H3N8 do subtipo influenza A restabeleceu-se dos pulmões do cão de estimação que também morreu após 3 dias de pneumonia. Este vírus foi nomeado A/canine/Miami/05 (H3N8) (canine/Miami/05).

EXEMPLO 9 - ANÁLISES GENÉTICA DOS ISOLADOS DE H3N8 INFLUENZA A CANINA

Análises de seqüência de canine/Jax/05 e canine/Miami/05 revelaram que seus genes de hemaglutinina (HA) foram 98 % idênticos aos isolados de canine/FL/04, canine/TX/04, e canine/Iowa/05 restabelecidos dos pulmões de galgos de corrida que morreram de pneumonia durante as epidemias de influenza em pistas em 2004 e 2005 (Crawford, P. C. et al., 2005; Yoon K-Y. et al., 2005). Além disso, os genes de HA de canine/Jax/05 e canine/Miami/05 eram 98 % idênticos ao vírus de influenza eqüina contemporâneos isolado após o ano 2000. Comparações filogenéticas dos genes de HA mostraram que os vírus canine/Jax/05 e canine/Miami/05 foram agrupados com os isolados de galgo canine/FL/04, canine/TX/04, e canine/Iowa/05 e isolados eqüinos contemporâneos, formando um grupo distinto dos isolados de vírus eqüino mais velhos no início de 1990 (Figura 4). Além disso, os isolados canine/Jax/05, canine/Miami/05, e canine/Iowa/05 estavam relacionados mais estritamente a canine/Tx/04 que a canine/FL/04 ou canine/FL/03. Os isolados de 2005 formaram um subgrupo que parece se ramificar dos vírus caninos mais prematuros de 2003 e 2004 com diferenças em aproximadamente 10 sítios informativos de parcimônia. Estas diferenças suportam a hipótese que vírus de influenza canina esteja sendo transmitido horizontalmente de cão-para-cão ao invés de ser periodicamente reintroduzido de uma fonte externa. A acumulação de mutações de 2003 a 2005 ilustra o processo contínuo de adaptação que o vírus tem que sofrer após ser transmitido a um hospedeiro novo, como é esperado ter acontecido para os vírus de influenza canina.

EXEMPLO 10 - ANÁLISES DE AMINO ÁCIDO DOS ISOLADOS DE H3N8 DE INFLUENZA A CANINA.

Haviam substituições de aminoácido conservadas em todos os 6 isolados caninos que os diferenciaram dos vírus de influenza eqüina contemporâneos (Tabela 9). Estas substituições conservadas eram I15M, N83S, W222L, I328T, e N483T. Comparações filogenéticas da proteína de HA madura mostraram que o vírus de canine/Jax/05, canine/Miami/05, e canine/Iowa/05 formaram um subgrupo com o isolado de canine/TX/04 (Figura 4). Havia 3 alterações de aminoácido (L118V, K261N, e G479E) que diferenciaram este subgrupo dos outros vírus caninos (Tabela 9). Havia 2 alterações de aminoácido (F79L e G218E) que diferenciaram os isolados de 2005 de sal// raiz de canine/TX/04. Além disso, os isolados de 2005 dos cães não-galgos, canine/Jax/05 e canine/Miami/05, diferiram dos isolados de galgo canine/Iowa/05 por uma alteração de aminoácido, R492K. Por fim, canine/Jax/05 diferiu de canine/Miami/05 em um aminoácido simples, S107P. Em todos os outros vírus de H3N8 eqüinos e caninos, S é conservado na posição 107 com exceção de A/Eqüino/Jilin/1/89 que tem um T (Guo Y. et al., 1992).

EXEMPLO 11 - ANÁLISES ANTIGÊNICAS DOS ISOLADOS DE H3N8 DE INFLUENZA CANINA

Testes de inibição de hemaglutinação (HI) foram executados usando um painel de antígeno de vírus de influenza eqüina mais velhos e contemporâneos e os vírus de influenza canina, e o soro colhido em 2005 de cavalos e cães que tinham sido infectados com vírus de influenza (TABELA 10). Soro de furões imunizados contra canine/FL/04 foi também incluso nas análises. As titulações de anticorpo de HI em soro eqüino foram 8-16 vezes mais altas quando testadas com vírus eqüinos contemporâneos comparados aos isolados mais velhos, mas diminuíram em pelo menos 4 vezes quando testados com os vírus caninos. O soro canino foi não-reativo com os vírus eqüinos mais velhos, mas as titulações de anticorpo aumentaram 4 vezes quando testadas com isolados eqüinos e caninos contemporâneos. Isto foi também observado para o soro de furões imunizados contra vírus de influ-

enza canina. Estes padrões de //sero-reatividade demonstraram a similaridade antigênica entre os vírus de influenza caninas e vírus de influenza eqüina contemporâneos e foram consistentes com as análises filogenéticas. As titulações de anticorpo em soros de eqüino, canino, e furão para os isolados de canine/Miami/05 foram similares às para os isolados caninos de 2003 e 2004. Porém, as titulações foram 2-4 vezes mais baixas para os isolados de canine/Jax/05. Isto sugere que canine/Jax/05 é antigenicamente distinto do outro isolado canino que pode ser se referido em parte à alteração do aminoácido simples na posição 107 no HA maduro.

TABELA 7. Iniciadores e sondas para análise de RT-PCR quantitativa de tempo real para o gene Matriz de vírus de influenza A e o gene de H3 de influenza A canina (H3N8).			
Iniciador	Alvo	Seqüência	Aplicação
Ca-H3-F387	H3 (nt 387-406)	5'-tatgcatcgctccgatccat-3' (SEQ ID NO: 79)	Iniciador direto para H3
Ca-H3-R487	H3 (nt 487-467)	5'-gctccacttctccgtttga-3' (SEQ ID NO: 80)	Iniciador reverso para H3
Ca-H3-P430	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagagggattcacatggacag-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)	Sonda de TaqMan®
FluA-M-F151	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaagacc-3' ^a (SEQ ID NO: 82)	Iniciador direto para M
FluA-M-R276	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaaakcgtcta-3' (SEQ ID NO: 83)	Iniciador reverso para M
FluA-M-P218	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgcccAgt-BHQ1 ^b (SEQ ID NO: 84)	Sonda de TaqMan®

^a Letra sublinhada r representa nucleotídeo a ou g e letra sublinhada k representa nucleotídeo g ou t.

^b Letras maiúsculas representam resíduos de ácido nucléico presos.

TABELA 8. RT-PCR quantitativa de tempo real e isolamento viral executados em tecidos pulmonares de cães que morreram de pneumonia durante epidemias de doença das vias respiratórias em um abrigo e clínica veterinária na Flórida.						
ID do cão	Localização	Duração da doença clínica	RT-PCR de tempo real		Isolamento de vírus	
			M (Ct)	HA (Ct)		
A/canine/FL/242/03	controle positivo		28,15	27,36		
1079	Abrigo (NE FL)	2 dias	29,81	28,84	nenhum	
1078	Abrigo (NE FL)	3 dias	30,37	29,71	MDCK 3ª passagem	
318	Abrigo (NE FL)	9 dias	33,89	32,97	nenhum	
320	Abrigo (NE FL)	10 dias	39,44	37,09	nenhum	
319	Abrigo (NE FL)	6 dias	33,87	32,23	nenhum	
1080	Abrigo (NE FL)	6 dias	38,87	38,23	nenhum	
374	Clínica veterinária (SE FL)	3 dias	24,05	22,65	Ovo 2ª passagem	

TABELA 9. Comparação de aminoácido do HA maduro para vírus de influenza canina e vírus de influenza eqüina contemporâneos.																			
	Aminoácido																		
	7	15	54	78	79	83	92	10	11	15	21	22	26	32	47	48	49	54	
A/eqüino/KY/5/02	G	I	N	V	F	N	S	S	L	N	G	W	K	I	G	N	R	K	
A/eqüino/MA/213/03	.	.	.	A	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/eqüino/OH/1/03	D	.	K	A	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/canine/FL/242/03	.	M	K	A	.	S	.	.	.	S	.	L	.	T	.	T	.	.	
A/canine/FL/43/04	.	M	K	A	.	S	N	.	.	S	.	L	.	T	.	T	.	R	
A/canine/TX/1/04	.	M	K	A	.	S	.	.	V	S	.	L	N	T	E	T	.	.	
A/canine/Iowa/05	.	M	K	A	L	S	.	.	V	S	E	L	N	T	E	T	.	.	
A/canine/Miami/05	.	M	K	A	L	S	.	.	V	S	E	L	N	T	E	T	K	.	
A/canine/Jacksonville/05	.	M	K	A	L	S	.	P	V	S	E	L	N	T	E	T	K	.	

Tabela 10. Titulações de anticorpo em soro de eqüino, canino, e furão para vírus de influenza eqüina mais velhos e vírus de influenza caninas contemporâneos.			
	Soro anticorpo		titulação ^a
Antígenos	Eqüino	Canino	Furão ^b
eqüino/Miami/63	40	<10	16
eqüino/Ky/86	40	40	32
eqüino/KY/92	40	<10	32
eqüino/NY/99	320	40	128
eqüino/KY/05/02	320	160	256
eqüino/MA/213/03	640	160	512
eqüino/OH/01/03	640	160	512
canine/FL/03	160	160	512
canine/FL/04	160	80	512
canine/Tx/04	160	160	512
canine/Miami/05	160	80	256
canine/Jax/05	40	40	128

^a Titulações de anticorpo foram determinadas em um ensaio de inibição de hemaglutinação executado com diluições seriais de soro eqüino, canino, ou soro de furão e o vírus listado na coluna de antígeno.

^b Soro de furões imunizados com vírus de canine/FL/04.

5 MATERIAIS E MÉTODOS EXEMPLARES PARA OS EXEMPLOS 12-15

Inóculo de Vírus de Influenza Canina.

O inóculo de vírus foi preparado por inoculação de células epiteliais de rim canino de Madin-Darby (MDCK) com uma matéria-prima de A/canine/FL/43/04 (H3N8) representando passagem 3 do isolado original descrito previamente (Crawford et al., 2005). As células de MDCK inoculadas nos Meios Essenciais Mínimos de Dulbecco (DMEM) suplementados com 1 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e antibióticos (gentamicina e ciprofloxacina) foram cultivadas em frascos de 250 cm² a 37°C em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂.

As culturas foram observadas diariamente para alterações morfológicas e

foram colhidas em 5 dias pós-inoculação. As culturas colhidas foram clarificadas por centrifugação e os sobrenadantes foram armazenados em inoculação pendente de -80°C dos cães. Uma alíquota de sobrenadante foi usada para determinação da titulação de vírus pelo método de Reed e Muench. A titulação foi 10^7 doses infecciosas de cultura de tecido mediana (TCID₅₀) de A/canine/Florida/43/2004 (canine/FL/04) por ml.

INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL.

Oito cães mestiços com colônias de 4 meses de idade (Marshall BioResources, North Rose, NY) (4 machos e 4 fêmeas) foram usados para o estudo de inoculação experimental aprovado por University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee. Os pesos dos corpos dos cães variaram de 13 a 17 kg. Os cães eram saudáveis com base em exames físicos, exames de sangue de linha base, e registro de temperaturas do corpo durante 2 semanas antes da inoculação. Todos os cães eram livres de exposição anterior ao vírus de influenza canina com base nos testes de sorologia executados nas amostras de soro colhidas depois na hora da chegada na instalação e 2 semanas. Os cães foram anestesiados por injeção intravenosa de propofol (Diprivan®, Zeneca Pharmaceuticals, 0,4 mg/kg do peso do corpo para efeito) para intubação com tubos endotraqueais. Seis cães (3 machos e 3 fêmeas) foram cada inoculados com 10^7 TCID₅₀ de vírus de canine/FL/04 em 5 ml de solução salina estéril administrada na traquéia distal através de um cateter de borracha de diâmetro pequeno inserido no tubo endotraqueano. Dois cães (1 macho e 1 fêmea) foram pseudo-inoculados com um volume igual de solução salina estéril. Os cães de controle pseudo-inoculados foram alojados em um quarto diferente dos cães inoculados com vírus e cuidados por pessoal diferente. Exames físicos e registros de temperatura retal foram executados duas vezes diariamente durante 6 dias pós-inoculação (p.i.).

COLETÂNEA DE ESFREGAÇO FARÍNGEO E RETAL.

Espécimes orofaríngeos foram colhidos duas vezes diariamente de cada cão nos dias 0 a 6 p.i. para monitorar a eliminação do vírus usando chumaços com haste de poliéster (Fisher Scientific Internacional Inc., Pitts-

burgh, PA). Os esfregaços foram colocados em 1 ml de solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,5 % de albumina de soro bovino (BSA). Os esfregaços retais foram colhidos diariamente de cada cão dos dias 0 a 6. Extratos de esfregaço foram preparados por clarificação dos meios de transporte de esfregaço através de centrifugação. Uma alíquota de extrato de esfregaço foi testada imediatamente para nucleoproteína de vírus de influenza A usando o kit de imunoensaio comercial Directigen® (BD, Franklin Lakes, NJ) de acordo com as instruções do fabricante. O extrato restante foi armazenado a -80°C pendendo outros ensaios virológicos.

10 AUTÓPSIAS.

No dia 1 p.i., um cão pseudo-inoculado e um cão inoculado com vírus foram submetidos à eutanásia por inoculação intravenosa de solução de Beuthanasia-D® (1 mL/5 kg de peso do corpo; Schering-Plough Animal Health Corp). Um cão inoculado com vírus foi similarmente submetido à eutanásia cada dia dos dias 2 a 5 p.i. No dia 6 p.i., o cão pseudo-inoculado e o cão inoculado com vírus restantes foram submetidos à eutanásia. Autópsias completas foram executadas por um dos investigadores (WLC). Tecidos foram fixados em 10 % de formalina tamponada neutro, embebidos em parafina, e seções de 5 µm foram tingidas com hematoxilina e eosina para diagnose histopatológica ou processadas para Imuno-histoquímica como descrito abaixo. Tecidos pulmonares não-fixados foram submetidos ao Serviço de Diagnóstico de Microbiologia Clínica/Parasitologia/Sorologia na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Flórida para isolamento bacteriano e identificação. As amostras foram cultivadas em meios não-seletivos como também meios seletivos para espécies de *Bordetella* (Regan-Lowe; Remel, Lenexa, KS) e espécies de *Mycoplasma* (Remel). Todas as culturas foram mantidas durante 21 dias antes de relatarmos nenhum crescimento. Tecidos não-fixados foram também armazenados a -80°C pendendo análises virológicas.

30 IMUNO-HISTOQUÍMICA.

Seções de tecido da traquéia e pulmão de 5 µm desparafinizados e reidratados foram montadas em lâminas de Bond-Rite® (Richard-Allan

Scientific, Kalamazoo, MI) e subsequêntemente tratadas com proteinase K (DAKOCytomation Inc., Carpinteria, CA) seguido por reagente de bloqueio de peroxidase (Kit de Peroxidase DAKO® EnVision®, DAKO Corp., Carpinteria, CA). As seções foram incubadas com uma diluição de 1:500 de anti-
5 corpo monoclonal para H3 de influenza A (Chemicon International, Inc., Ter-
necula, CA) durante 2 horas em temperatura ambiente. Controles incluíram incubação das mesmas seções com IgG de camundongo (1 mg/ml, Serotec, Inc. Raleigh, NC), e incubação do anticorpo monoclonal com seções pulmo-
nares caninas normais. Seguindo tratamento com o anticorpo primário, as
10 seções foram incubadas com reagentes de substrato de imunoperoxidase e
de peroxidase secundários (Kit Peroxidase Dako® EnVision®, Dako Corp.)
de acordo com as instruções do fabricante. As seções foram contra-tingidas
com hematoxilina, tratadas com Clarificador #2 e Reagente de Anil (Richard-
Allan Scientific, Kalamazoo, MI), desidratadas, e lâminas de cobertura apli-
15 cadas com PermOUNT (ProSciTech, Queensland, Austrália).

EXTRAÇÃO DE RNA DE ESFREGAÇOS E TECIDOS.

Tecidos pulmonares e traqueanos de cada cão foram desconge-
lados e homogeneizados em meio essencial mínimo (MEM) suplementado
com 0,5 % de albumina de soro bovino (BSA) e antibióticos (gentamicina e
20 ciprofloxacina) usando moedor de tecido descartável (Kendall, Lifeline Medi-
cal Inc., Danbury, CT). RNA total foi extraído dos homogeneizados de tecido
como também extratos de esfregaços orofaríngeos e retais usando um kit
comercial (RNeasy® Míni Kit, QIAGEN Inc., Valença, CA) de acordo com as
instruções do fabricante e eluídos em um volume final de 60 µl de tampão.

25 RT-PCR DE TEMPO REAL.

Uma RT-PCR quantitativa de uma etapa de tempo real foi exe-
cutada no RNA total usando o kit de RT-PCR de Sonda de QuantiTect® con-
tendo ROX como uma tintura de referência passiva (QIAGEN Inc., Valença,
CA) e um conjunto de iniciador-sonda que alvejou uma região altamente
30 conservada do gene matriz (M) de vírus de influenza do tipo A (Payungporn
S. et al., 2006a; Payungporn S. et al., 2006b). Para cada RT-PCR de tempo
real reação, 5 µl de RNA total extraído foram adicionados a uma mistura de

reação contendo 12,5 µl de 2X Mistura Mestre de RT-PCR de Sonda de QuantiTech®, 0,25 µl de Mistura de RT de QuantiTech®, iniciadores diretos e reversos (concentração final de 0,4 µM para cada), sonda (0,1 µM de concentração final) e água livre de RNase em um volume final de 25 µl. Os Re-

5 agentes de Controle de TaqMan® GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) foram usados de acordo com as instruções do fabricante para detecção de GAPDH como um controle interno endógeno para a presença de RNA extraído do esfregaço e amostras de tecido e como um controle de normalização.

10 RT-PCR quantitativa de uma etapa de tempo real foi executada nas misturas de reação em um Sistema de QPCR de Mx3000P® (Stratagene, La Jolla, CA). Condições de ciclisto incluíram uma etapa de transcrição reversa a 50°C durante 30 minutos, uma etapa de desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos para ativar a DNA polimerase de HotStarTaq®, e

15 amplificação durante 40 ciclos. Cada ciclo de amplificação incluiu desnaturação a 94°C durante 15 segundos seguido por anelamento/extensão a 60°C durante 1 minuto. Os sinais fluorescentes de FAM (comprimento de onda de emissão a 518 nm) e de VIC (comprimento de onda de emissão 554 nm) foram registrados no término de cada ciclo. O ciclo de limiar (Ct) foi determi-

20 nado ajustando a fluorescência de limiar (Dr) a 1000 em cada experimento individual. O programa de software de Mx3000P® versão 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA) foi usado para aquisição e análise dos dados. O controle positivo consistiu em amplificação de RNA extraído de vírus de A/canine/FL/242/03 (H3N8). Os resultados foram normalizados dividindo o valor de Ct de M pelo

25 valor de Ct de GAPDH correspondente por cada amostra.

ISOLAMENTO DE RE DE VÍRUS DOS TECIDOS.

Tecidos do pulmão e da traquéia congelados de cães inoculados com vírus foram descongelados e homogeneizados em 10 volumes de DMEM suplementados com 0,5 % de BSA e antibióticos. Restos sólidos fo-

30 ram removidos por centrifugação e sobrenadantes foram inoculados sobre células de MDCK cultivadas em DMEM suplementados com 1 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) e antibióticos

como descrito acima. Células foram cultivadas em frascos de 25 cm² a 37°C em uma atmosfera umedecida contendo 5 % de CO₂. As culturas foram observadas diariamente para alterações morfológicas e colhidas em 5 dias pós-inoculação. As culturas colhidas foram clarificadas por centrifugação e os sobrenadantes inoculados sobre as células de MDCK frescas como descrito para a inoculação inicial; foram executadas duas passagens adicionais para amostras que não mostraram evidência de vírus de influenza através de hemaglutinação ou RT-PCR. Atividade de hemaglutinação nos sobrenadantes clarificados foi determinada usando 0,5 % de células sanguíneas vermelhas de peru como previamente descrito (Crawford et al., 2005). RT-PCR foi executada como descrito abaixo.

RT-PCR, SEQUENCIÇÃO DE NUCLEOTÍDEO, E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.

RNA viral foi extraído do sobrenadante de MDCK usando o MiniKit Viral de RNA de QIAamp® (QIAGEN Inc., Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi transcrito reverso para o cDNA usando o Kit de RT-PCR de Uma Etapa de QIAGEN® (QIAGEN Inc., Valença, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Amplificação de PCR da região de codificação dos 8 genes virais de influenza no cDNA foi previamente executada como descrito (Crawford et al., 2005), usando conjuntos de iniciador gene-específico universais (seqüências de iniciador disponível sob solicitação). Os amplicons de DNA resultante foram usados como modelos para seqüenciação automatizada no seqüenciador de DNA automatizado de ABI PRISM® 3100 usando química de terminador de tintura de seqüenciação de ciclo (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram analisadas as seqüências de nucleotídeo usando o Lasergene 6 Package® (DNASTAR, Inc., Madison, WI). As seqüências de nucleotídeo para vírus restabelecidos de cães infectados foram comparadas às seqüências do vírus no inóculo para determinar se qualquer alteração ocorreu durante a replicação no trato respiratório.

EXEMPLO 12 - DOENÇA CLÍNICA

Todos os 6 cães inoculados com vírus desenvolveram uma febre transiente ($\geq 39^\circ\text{C}$ de temperatura retal) para os primeiros 2 dias p.i.,

mas nenhum exibiu sinais respiratórios tais como tosse ou secreção nasal no período de observação do dia 6. Os cães pseudo-inoculados permaneceram clinicamente saudáveis.

EXEMPLO 13 - PROPAGAÇÃO DO VÍRUS

- 5 Nucleoproteína de influenza A foi detectada no esfregaço orofaríngeo colhido de um dos cães inoculados com vírus a 24 horas p.i. Os esfregaços orofaríngeos colhidos de um cão em 72, 84, e 120 horas p.i., e outro cão em 108, 120, e 132 horas p.i., eram positivos para vírus através de RT-PCR quantitativa de tempo real (Tabela 11). O número absoluto de cópias de gene M de influenza por μ l de extrato de esfregaço aumentou com o tempo de 3 para 6 dias p.i. Nenhum vírus foi detectado nos esfregaços retais.

EXEMPLO 14 - AUTÓPSIAS

- Em contraste com a infecção experimental anterior usando Bigles livres de patógenos específicos (Crawford et al., 2005), os cães mestiços inoculados com vírus tiveram pneumonia como comprovado por análises totais e histológicas dos pulmões dos dias 1 a 6 p.i. Além de pneumonia, os cães tiveram rinite, traqueíte, bronquite, e bronquiolite similares às descritas em cães naturalmente infectados (Crawford et al., 2005). Houve necrose epitelial e erosão do forro das vias aéreas e glândulas bronquiais com infiltração de neutrófilos e macrófagos dos tecidos submucosais (Figura 5, painéis superiores). Imuno-histoquímica detectou antígeno de H3 viral nas células epiteliais de brônquios, bronquíolos, e glândulas bronquiais (Figura 5, painéis inferiores). Nenhuma superinfecção bacteriana estava presente. Os tecidos respiratórios dos 2 cães pseudo-inoculados estavam normais.

25 EXEMPLO 15 - REPLICAÇÃO DE VÍRUS EM TRAQUÉIA E PULMÕES

- A traquéia e pulmões eram positivos para vírus através de RT-PCR quantitativa de tempo real em todos os cães de 1 para 6 dias p.i. (Tabela 12). O número absoluto de cópias de gene M de influenza por μ l de homogeneizado de traquéia aumentou de 1 a 5 dias p.i., depois diminuiu no dia 6. O número absoluto de cópias de gene M por μ l de homogeneizado pulmonar diminuiu de 1 a 6 dias p.i. Em geral, a traquéia continha $\geq$ um $\log_{10}$ mais vírus que o pulmão em cada um dos 6 dias p.i.

Tabela 11. Detecção de eliminação de vírus na orofaringe de cães mestiços inoculados com vírus de influenza canina através de RT-PCR quantitativa de tempo real.

ID do cão	Tempo p.i. (horas) ^a	Razão de M/GAPDH ^b	Gene matriz (cópias / uL) ^c
860	72	1,20	1,57E+02
	84	1,30	8,25E+02
	120	1,23	1,47E+03
894	108	1,17	1,17E+02
	120	1,41	1,37E+02
	132	1,27	3,74E+02

^a Tempo que foram colhidos os esfregaços orofaríngeos dos cães seguindo inoculação com vírus de A/canine/FL/43/04 (H3N8).

^b Razões de normalização foram calculadas dividindo o M (Ct) pelo GAPDH (Ct) para cada extrato de esfregaço.

5 ^c O número absoluto de cópias de gene Matriz por uL de extrato de esfregaço.

Tabela 12. Detecção de replicação de vírus na traquéia e pulmão de cães mestiços inoculados com vírus de influenza canina através de RT-PCR quantitativa de tempo real.

ID do cão	Tempo p.i. (horas) ^a	Razão de M/GAPDH ^b		Gene Matriz (cópias / uL) ^c	
		Pulmão	Traquéia	Pulmão	Traquéia
797	24	1,20	1,43	8,22E+05	3,11E+04
801	48	1,33	0,99	1,15E+05	6,52E+06
789	72	1,44	1,12	2,39E+04	1,56E+05
819	96	1,40	1,27	3,19E+04	1,43E+05
860	120	1,59	1,04	3,48E+03	1,17E+06
894	144	1,70	1,15	4,78E+02	1,50E+03

^a Tempo que foram colhidos os tecidos dos cães seguindo inoculação com vírus de A/canine/FL/43/04 (H3N8).

^b Razões de normalização foram calculadas dividindo o M (Ct) pelo GAPDH (Ct) para cada homogeneizado de tecido.

^c O número absoluto de cópias de gene Matriz por uL de homogeneizado de tecido.

5 MATERIAIS E MÉTODOS EXEMPLARES PARA O EXEMPLO 16

CEPAS DE VÍRUS

Cepas de vírus de influenza canina como também aquelas de origem aviária, eqüina e humana (listadas na Tabela 15) foram propagadas em ovos embrionados ou células de MDCK e sua infecciosidade foi titulada por diluição de ponto terminal em embriões de galinha, ou ensaio de placa. Quantificação de vírus rápida foi executada através de ensaio de hemaglutinação usando eritrócitos de células sangüíneas vermelhas de peru.

ESPÉCIMES DIAGNÓSTICOS

Um total dos 60 tecidos de pulmão canino colhidos de casos suspeitos de doença das vias respiratórias virais durante o ano de 2005 foi testado para a presença de vírus de influenza canina.

EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS DE TECIDO CANINAS

Blocos de tecido pulmonar pesando entre 20 e 30 mg foram homogeneizados em um moedor de tecido descartável (Kendal). RNA total foi extraído usando um kit comercial (Míni Kit de RNeasy, Qiagen, Valença, CA) e eluído em um volume final de 60 µl, seguindo as recomendações do fabricante.

PROJETO DE INICIADORES E DE SONDAS

Alinhamentos de seqüência múltiplos dos genes H3 e M de vários subtipos e de espécies diversas foram executados usando o programa CLUSTAL X (Versão 1.8). Iniciadores de matriz (M) e sonda foram selecionados das regiões conservadas das seqüências conhecidas que correspondem aos subtipos diferentes de vírus de influenza A, enquanto o conjunto de iniciadores gene-específicos e de sonda de hemaglutinina de H3 foi selecionado para especificamente emparelhar genes do vírus de influenza A eqüina e canina e desemparelhar os genes aviários e humanos homólogos (Tabela 13). Software de projeto de iniciador (OLIGOS Versão 9.1) e as ferramentas

de análise com base em rede fornecidas por EXIQON (<http://lnatools.com>) foram usados para cálculo de T_m e predição da estrutura secundária como também auto hibridação. Uma região conservada de um gene de rRNA de 18S foi usada como controle interno endógeno para a presença de RNA extraído da amostra de tecido canina. Os Reagentes de Ensaio Pré-desenvolvidos de TaqMan® para rRNA Eucariótico de 18S (VIC/TAMRA) (Applied Biosystems) foram usados para a detecção de tempo real de rRNA de 18S em amostras de tecido.

CONDIÇÃO DE RT-PCR DE TEMPO REAL

10 Uma RT-PCR de tempo real de uma etapa foi executada usando kit de Sonda de RT-PCR de Quantitect contendo ROX como uma tintura de referência passiva (Qiagen, Valença, CA). Em cada reação de RT-PCR de tempo real, 5 µl de amostra de RNA foram usados como um modelo para combinar com uma mistura de reação contendo 10 µl de 2X Mistura Máster de RT-PCR de Sonda de QuantiTech, 0,2 µl de Mistura de RT de QuantiTech, iniciadores (0,4 µM conc. final para gene de H3 ou 0,6 µM de conc. final para gene M), sonda (0,1 µM conc. final para gene H3 ou 0,2 µM de conc. final para gene M) e água livre de RNase em um volume final de 20 µl. RT-PCR de tempo real de uma etapa foi executada no Sistema de QPCR de 15 Tempo real de Mx3005P (Stratagene). Condições de ciclisto incluíram uma etapa de transcrição reversa a 50°C durante 30 minutos. Após uma etapa de desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos para ativar a DNA polimerase de HotStarTaq, amplificação foi executada durante 40 ciclos incluindo 20 desnaturação (94°C durante 15 segundos) e anelamento/extensão (60°C durante 30 segundos). Os sinais fluorescentes de FAM (comprimento de onda de emissão a 516 nm para detecção de H3 e de M) e de VIC (comprimento de onda de emissão a 555 nm para detecção de rRNA de 18S) foram obtidos uma vez por ciclo ao término da etapa de extensão. Aquisição de dados e análise do ensaio de tempo real de PCR foram executadas usando o 25 software de Mx3005P versão 2.02 (Stratagene). 30

ESPECIFICIDADE DE CONJUNTO DE INICIADORES / SONDA DE H3 PARA INFLUENZA CANINA (H3N8) E UNIVERSALIDADE DE CONJUNTO DE INICIADORES / SONDA DE M PARA TIPO DE VÍRUS DE INFLUENZA A

Para testar a especificidade de cada conjunto de iniciadores/sonda, RNA extraído de vários subtipos conhecidos de vírus de influenza A foram usados como um modelo no ensaio de RT-PCR de tempo real (Tabela 15).

PADRÃO DE RNA PARA DETERMINAÇÃO DO DESEMPENHO DE RT-PCR DE TEMPO REAL

Os genes de vírus de influenza A canina (A/canine/Florida/242/2003 (H3N8)) foram usados para gerar os amplicons de PCR para H3 (nt 1-487) e M (nt 1-276) usando iniciadores ligados com promotor T7 (Tabela 13). Depois os amplicons de PCR purificado de genes de H3 e M foram usados como modelos para transcrição *in vitro* usando Sistema de Transcrição de T7 de Ribossonda *in vitro* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração dos RNAs transcritos foi calculada medindo absorbância a 260 nm. Os RNAs foram depois serialmente diluídos 10 vezes, variando de 10^8 a 10 cópias / μ l para executar os testes de sensibilidade. Além disso, uma curva padrão foi gerada representando em gráfico o log das concentrações iniciais de RNA modelo (cópias / μ l) versus o ciclo de limiar (Ct) obtido de cada diluição para determinar o desempenho geral de RT-PCR de tempo real.

TESTES DE SENSIBILIDADE COMPARATIVOS ENTRE RT-PCR DE TEMPO REAL E KIT DE TESTE DE DIRECTIGEN FLU A

Vírus de matéria-prima de duas cepas virais incluindo A/Wyoming/3/2003 (H3N2) a $10^{6,67}$ EID₅₀/mL (HA=64) e A/canine/Florida/ 242/2003 (H3N8) a $10^{7,17}$ EID₅₀/mL (HA=16) foram usados para o ensaio de limiar de detecção. Diluição logarítmica de espécimes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (125 μ l) foi usada em um kit de detecção de antígeno de influenza A rápido, Directigen Flu A, (Becton, Dickinson e Company) seguindo as instruções do fabricante. Cada dispositivo de teste de Directigen Flu A tem uma mancha de antígeno de influenza de H1N1 no centro da membrana que desenvolve como um ponto roxo e indica a integridade do teste que é com ba-

se em um anticorpo monoclonal para a nucleoproteína (NP). O desenvolvimento de um triângulo roxo que circunda o ponto é indicativo da presença de influenza NP no espécime testado. A intensidade do sinal roxo do triângulo foi registrada como + (esboço de triângulo), ++ (triângulo suavemente colorido), +++ (triângulo roxo-escuro) e ++++ (triângulo roxo-muito-escuro). RNA viral foi extraído 125 µl alíquotas de cada diluição de vírus usando MiniKit Viral de RNA de QIAamp (Qiagen, Valença, CA) e eluindo em um volume final de 50 µl. Um volume de 5 uL dos RNAs virais extraídos foi testado através de RT-PCR de tempo real para teste de sensibilidade comparativo com o kit Directigen Flu A.

EXEMPLO 16

O ensaio de RT-PCR de tempo real para influenza canina conta com informação de três sondas moleculares que alvejam rRNA de 18S de célula hospedeira como também M e H3 do genoma de vírus de influenza A (Tabela 14). Amplificação do gene hospedeiro é um repórter de qualidade de espécime e integridade. Amostras clínicas, de necropsia ou de laboratório contendo o vírus de influenza canina (H3N8) são esperadas dar o sinal de amplificação com as três sondas. Espécimes que conferem o sinal de amplificação com sondas de rRNA de M e 18S mas negativas para H3 seriam indicativos de um vírus de influenza subtipo H3 de origem humana, suína ou aviária ou de subtipos não-H3. Estes casos raros poderiam ser solucionados por RT-PCR usando iniciadores universais de HA para gerar cDNA de amplicon que pode ser analisado através de seqüenciação. Espécimes corretamente colhidos e manipulados desprovidos do vírus de influenza A rendem sinal de amplificação de 18S de rRNA apenas. Situações em que apenas a sonda de rRNA de 18S e as sondas de H3 rendem sinal de amplificação são indicativas de técnica defeituosa, a menos que do contrário provado; ou um falso negativo com sondas de M ou falso positivo para H3 necessitam ser demonstrados. Por fim, espécimes não rendendo sinais de amplificação com as três sondas são indicativos de coletânea de amostra defeituosa, degradação, extração de RNA defeituosa ou a presença de inibidores as polimerases usadas em PCR.

Para testar a especificidade do conjunto de iniciadores/sonda de H3 para o vírus de influenza A canina (H3N8) e a universalidade do conjunto de iniciadores/sonda de M para tipo de influenza A, vários subtipos de vírus de influenza A foram testados através de RT-PCR de tempo real. Os resultados mostram que conjunto de iniciadores/sonda de H3 rendeu um sinal de amplificação positivo apenas com influenza canina (H3N8). Não foi observado nenhum sinal de amplificação falso positivo significativo ou não-específico em outros subtipos ou cepas humanas de H3. O conjunto de iniciadores/sonda de M rendeu sinal de amplificação positivo com todas as cepas testadas (Tabela 15). Estes resultados indicaram que os iniciadores/sonda de H3 especificamente detectam vírus de influenza A canina (H3N8) enquanto que os iniciadores/sonda de M detectam subtipos múltiplos do tipo de vírus de influenza A.

O desempenho dos ensaios de RT-PCR de tempo real foi avaliado por diluição de ponto terminal de RNAs transcritos *in vitro* de M e H3. Como esperado, o ciclo de limiar (Ct) aumentou em correlação direta com a diluição dos padrões de RNA. Os sinais fluorescentes podem ser detectados em diluições dos padrões de RNA de M e H3 tão baixos quanto 10^3 e 10^2 cópias/ μ L, respectivamente (Figura 6A e 6B). As curvas padrão de genes M e H3 foram construídas representando em gráfico o log de concentrações de RNA de partida versus o ciclo de limiar (Ct) obtido de cada diluição (Figura 6C e 6D). O declive da curva padrão é usado para determinar a eficiência da reação de PCR que é teoricamente exponencial; 100 % de eficiência de amplificação implicaria em dobrar a concentração de amplicon a cada ciclo. As curvas padrão com um declive entre cerca de -3,1 e -3,6 são tipicamente aceitáveis para a maioria das aplicações que requerem quantificação precisa (90-110 % de eficiência de reação). Um valor de Rsq é o ajuste de todos os dados ao diagrama de curva padrão. Se todos os dados perfeitamente ficarem na linha, o Rsq será 1,00. À medida que os dados caem também da linha, Rsq diminui. Um valor de Rsq $\geq 0,985$ é aceitável para a maioria dos ensaios. A curva padrão de M revelou um declive de -3,576 (eficiência = 90,4 %) e Rsq = 1,00, enquanto que curva padrão de H3 rendeu um declive

de -3,423 (eficiência = 95,9 %) e $R_{sq} = 0,999$. Estes valores indicam eficiência de amplificação satisfatória e desempenho geral dos ensaios de RT-PCR de tempo real. Atribuíram-se a eficiência inferior e sensibilidade do conjunto de iniciadores/sonda de M quando comparado ao conjunto de iniciadores/sonda de H3 à degeneração de N vezes das seqüências de iniciador de M requeridas para assegurar cobertura vasta da variabilidade de seqüências de gene M ao longo dos vírus de múltiplos subtipos, hospedeiros e linhagens.

A sensibilidade de ensaio de RT-PCR de tempo real foi também comparada com o ensaio de detecção de antígeno rápido comercial (Directigen Flu A). Diluições logarítmicas de A/Wyoming/3/2003 (H3N2) e A/canine/Florida/242/2003(H3N8) foram analisadas com Directigen Flu A e através de RT-PCR de tempo real. Os resultados de Directigen Flu A mostraram que as sensibilidades contra ambas as cepas virais são diluição de aproximadamente 100 vezes dos vírus de matéria-prima usados nestes experimentos (Figura 7). Os sinais (cor roxa) gerados pelas amostras de vírus canino (A/canine/Florida/242/2003: 106.x PFU/ml) foram muito mais fracos que aqueles encontrados em vírus humano (A/Wyoming/3/2003: 107.x PFU/ml), de acordo com a concentração de vírus inferior nestas amostras. Alternativamente, sinal inferior para influenza canina poderia ser atribuído à especificidade molecular dos anticorpos monoclonais versus NP; isto é, conservação ruim dos aminoácidos dentro do epítipo de NP do vírus de influenza A canina.

RT-PCR de tempo real do gene M renderam valores de Ct acima do limiar com equivalentes de vírus PFU 10 e 30 por reação de A/canine/Florida/242/2003 e A/Wyoming/3/2003, respectivamente (Tabela 16). As diferenças entre o valor de sensibilidade de 2 cepas virais, porque as diferenças nas titulações virais originais. A comparação de detecção de gene H3 entre vírus de influenza canina e humana não foi executada porque os iniciadores/sonda de H3 no ensaio de RT-PCR de tempo real amplifica exclusivamente vírus de influenza A canina. RT-PCR foi 10^5 vezes mais sensível que o kit de detecção de antígeno rápido.

Para avaliar o desempenho do teste de RT-PCR em espécimes de necropsia de cães com doença das vias respiratórias aguda, foram testadas sessenta amostras de tecido pulmonar canino submetidas durante o ano de 2005 à presença de vírus de influenza A canina através de RT-PCR de tempo real. Um total de 12 entre 60 amostras (20 %) eram positivas com genes M e H3, enquanto que as 48 amostras restantes renderam resultado negativo para gene M e H3. Tentativas de isolamento de vírus foram conduzidas por inoculação de célula ovo e MDCK, para avaliar a especificidade do ensaio de tempo real; 2 de 12 amostras que eram positivas para RT-PCR de influenza canina renderam vírus de influenza canina (dados não mostrados, manuscrito na preparação). Embora todos os tecidos tenham sido colhidos de cães com uma história de doença severa das vias respiratórias, a maioria das amostras não rendeu nenhum vírus de influenza canina por PCR de tempo real ou isolamento convencional, sugerindo uma incidência alta de outros patógenos respiratórios tais como *Bordetella bronchiseptica*, sinomose canina ou vírus de parainfluenza. O ensaio de RT-PCR de tempo real de uma etapa aqui provê um método rápido, sensível e custo-eficaz para detecção de vírus de influenza A canina (H3N8). Diagnóstico de laboratório rápida das infecções por vírus de influenza A canina (H3N8) no estágio prematuro da doença pode prover informação relevante para o paciente clínico e gerenciamento de aparelho.

Tabela 13: Iniciadores e sondas usados para detecção de RT-PCR de tempo real e transcrição <i>in vitro</i>				
Nome do Oligo	Tipo	Alvo	Sequência	Aplicação
Ca-H3-F387	Iniciador direto	H3 (nt 387-406)	5'-tatcatcgctcgcgatccat-3' (SEQ ID NO: 79)	Tempo real PCR
Ca-H3-R487	Iniciador reverso	H3 (nt 487-467)	5'-gctccactctctccgtttga-3' (SEQ ID NO: 80)	
Ca-H3-P430	Sonda de TaqMan	H3 (nt 430-459)	FAM-aattcacagcagaggattcacatggacag-BHQ1 (SEQ ID NO: 81)	
FluA-M-F151	Iniciador direto	M (nt 151-174)	5'-catggartggctaaagacaagacc-3' (SEQ ID NO: 82)	Tempo real PCR
FluA-M-R276	Iniciador reverso	M (nt 276-253)	5'-agggcattttggacaaaakcgtcta-3' (SEQ ID NO: 83)	
FluA-M-P218	LNA sonda de TaqMan	M (nt 218-235)	FAM-acgcTcaccgTgccAgt-BHQ1 (SEQ ID NO: 84)	
H3-F1	Iniciador direto	H3 (nt 1-14)	5'-tattcgtctcaggaggagcaaaagcagggg-3' (SEQ ID NO: 85)	Transcrição <i>in vitro</i>
T7/H3-R490	Iniciador reverso	T7 / H3 (nt 487-467)	5'-tgtaatacgaactcactatagggctccactctctccgtttga-3' (SEQ ID NO: 86)	
M-F1	Iniciador direto	M (nt 1-15)	5'-gatcgtctctcaggaggagcaaaagcaggtag-3' (SEQ ID NO: 87)	
T7/M-R276	Iniciador reverso	M (nt 276-253)	5'-tgtaatacgaactcactatagggcatttggacaaagcgtc-3' (SEQ ID NO: 88)	Transcrição <i>in vitro</i>

Nota: Letras maiúsculas = resíduos de LNA (Ácido nucleico preso), r = a ou g, k = g ou t, sublinhado = sequência de promotor de T7.

Tabela 14: Interpretação do ensaio de RT-PCR de tempo real			
Interpretação	Resultados		
	M	H3	18S rRNA
Positivo para vírus de influenza A canina (H3N8)	+	+	+
Positivo para vírus de influenza A (subtipo desconhecido)	+	-	+
Negativo para vírus de influenza A	-	-	+
Erro em extração de RNA ou presença de inibidor de PCR	-	-	-

Tabela 15: Teste de especificidade de conjunto de iniciadores/sonda de H3 canino e teste de universalidade de conjunto de iniciadores/sonda de M com vários subtipos de vírus de influenza A				
Subtipos	Nome da cepa	Hospedeiro	Detecção de RT-PCR de tempo real	
			Gene de H3 (Ct)	Gene de M (Ct)
H1	A/Ohio/1983	Humano	Nenhum Ct	15,40
	A/WSN/1933	Humano	Nenhum Ct	20,09
H3	A/Wyoming/3/2003	Humano	Nenhum Ct	28,85
	A/Victoria/3/1975	Humano	Nenhum Ct	16,62
	A/canine/FL/242/2003	Canino	28,43	29,25
H4	Turkey/MN/1066/1980	Aviário	Nenhum Ct	17,49
	Amostra clínica	Aviário	Nenhum Ct	20,87
H5	AChicken/Thailand/CUK2/2004	Aviário	Nenhum Ct	20,13
	A/Pheasant/NJ/1335/1998	Aviário	Nenhum Ct	16,64
H6	Amostra clínica	Aviário	Nenhum Ct	19,52
H10	Amostra clínica	Aviário	Nenhum Ct	25,64
	Amostra clínica	Aviário	Nenhum Ct	19,59
H11	Amostra clínica	Aviário	Nenhum Ct	15,72
	Amostra clínica	Aviário	Nenhum Ct	24,55

* Observe que subtipos de amostras clínicas foram confirmados através de seqüenciação de nucleotídeo.

Tabela 16: Testes de sensibilidade comparativos para detecção de vírus de influenza A em RT-PCR de tempo real e Directigen Flu A				
Diluições de vírus	Directigen Flu A		RT-PCR de tempo real de M (Ct)	
	A/canine/242/03	A/Wyoming/3/03	A/canine/242/03	A/Wyoming/3/2003
10^{-1}	++	++++	22,42	19,48
10^{-2}	+	+++	25,85	22,66
10^{-3}	-	-	29,27	25,76
10^{-4}	Não feito	Não feito	32,66	28,66
10^{-5}	Não feito	Não feito	35,48	33,14
10^{-6}	Não feito	Não feito	37,51	35,06
10^{-7}	Não feito	Não feito	39,09	36,44
10^{-8}	Não feito	Não feito	Nenhum Ct	38,93

Tabela 17.	
Classe de Aminoácido	Exemplos de Aminoácidos
Não-polar	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar Descarregado	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Acídico	Asp, Glu
Básico	Lys, Arg, His

Tabela 18.			
Símbolo da letra	Aminoácido	Símbolo da carta	Aminoácido
A	Alanina	M	Metionina
B	Asparagina ou ácido aspártico	N	Asparagina
C	Cisteína	P	Prolina
D	Ácido Aspártico	Q	Glutamina
E	Ácido Glutâmico	R	Arginina
F	Fenilalanina	S	Serina
G	Glicina	T	Treonina
H	Histidina	V	Valina
I	Isoleucina	W	Triptofano
K	Lisina	Y	Tirosina
L	Leucina	Z	Glutamina ou ácido glutâmico

Tabela 19. Diferenças de aminoácido entre proteínas de PB2 de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8			
Posição	Consenso eqüino*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
5	K	K	E
12	S	L	L
37	G	G	E
175	R	R	I
374	L	I	I
375	R	R	K
447	Q	Q	H

Tabela 20. Diferenças de aminoácido entre proteínas de PB1 de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8

Posição	Consenso eqüi-no*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
114	V	I	I
154	D	G	G
221	A	T	T
317	M	I	I
459	I	I	V
682	I	I	V

Tabela 21. Diferenças de aminoácido entre proteínas de PA de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8

Posição	Consenso eqüi-no*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
27	D	N	N
62	I	V	V
213	R	K	K
337	A	T	T
343	A	E	E
345	L	I	I
353	K	R	R
400	T	T	A
450	V	I	I
460	M	M	I
673	R	R	K
675	N	D	D

* Com base em genes disponíveis de isolados virais entre 1963 e 1998.

Tabela 22. Diferenças de aminoácido entre proteínas de NP de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8

Posição	Consenso eqüino*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
16	G	D	D
157	A	T	T
214	R	R	K
285	V	V	I
286	A	T	T
359	A	T	T
375	D	D	N
384	R	K	K
452	R	K	K

Tabela 23. Diferenças de aminoácido entre proteínas de NA de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8

Posição	Consenso eqüino*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
9	A/T	T	A
12	S	F	F
20	L	I	I
40	G	R	R
42	G	D	D
46	N	K	K
52	E	E	K
61	R	K	K
69	N	S	S
72	E	K	K
201	V	I	I
261	I	V	V
301	I	I	V
396	N	D	D
397	L	P	P

Tabela 24. Diferenças de aminoácido entre proteínas de M1 de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8

Posição	Consenso eqüino*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
M1 161	S	S	A
M1 208	K/Q	R	R

*Com base em genes disponíveis de isolados virais entre 1963 e 1998.

Tabela 25. Diferenças de aminoácido entre proteínas de NS1 de vírus de influenza eqüina e canina de H3N8

Posição	Consenso eqüino*	Canine/FL/03	Canine/FL/04
44	K	R	R
59	R	H	H
71	E	K	K
86	A	T	T
88	R	R	L
140	R	G	G
216	P	S	S

* Com base em genes disponíveis de isolados virais entre 1963 e 1998.

EXEMPLO 17 - DESENVOLVIMENTO MODELO DE DESAFIO DE INFLUENZA CANINA.

- 5 O vírus de influenza canina (influenza canina), que foi isolado de epidemias de influenza na Flórida, foi observado ser um vírus de influenza do tipo H3N8, e estritamente relacionado à cepa de vírus de influenza eqüina, A/eqüino/Ohio/03 (Crawford et al., SCIENCE Vol. 309, setembro de 2005, incorporado por referência em sua totalidade nesta patente). O potencial de uso da cepa de vírus de influenza eqüina A/eqüino/Ohio/03 para induzir doença com base em influenza em cães foi investigado neste estudo.
- 10

PROCEDIMENTO:

- Foram obtidos dez bigles 13 semanas de idade de sexo misto de um fornecedor comercial, e alojados em jaulas individuais em uma instalação de BSL-2. Os cães foram atribuídos fortuitamente a dois grupos de 5 cães cada. Como mostrado na Tabela 26, um grupo foi submetido a um desafio intratraqueano, e o outro grupo foi submetido a um desafio oronasal.
- 15

Os cães foram desafiados em 14 semanas de idade.

Tabela 26: Projeto Experimental		
Grupo	Número de Cães	Via de desafio
1	5	Intratraqueana
2	5	Oronasal

Um vírus de influenza eqüina A/eqüino/Ohio/03 cultivado em cultura de células foi usado como o vírus de desafio. Para desafio intratraqueano, o vírus de desafio foi administrado por meio de um tubo de liberação que consistiu em um tubo traqueano embanhado (Tamanho 4,0/4,5, Sheridan, USA) e tubo de alimentação (tamanho 5Fr, 1,7 mm, 16 polegadas (41 cm) em comprimento, Kendall, USA) em 0,5 a 1,0 ml de volume. Para desafio oronasal, o vírus de desafio (10^7 a 10^8 TCID₅₀ por cão) foi administrado como uma névoa usando um nebulizador (nebulizador ultra-sônico de DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, USA) em um volume de 2 a 3 ml.

Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza durante dias 14 pós-desafio. Foram colhidas amostras de soro de cada cão no dia zero (antes do desafio), e dias 7 e 14 pós-desafio para determinar a titulação de HI usando um vírus de influenza eqüina de H3N8 com um protocolo padrão (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Todos os cães foram humanitariamente eutanizados e os tecidos do pulmão foram colhidos em 10 % de formalina tamponada para avaliação histopatológica.

RESULTADOS:

Os resultados deste experimento estão resumidos na Tabela 27.

Sinais clínicos relacionados à influenza foram observados em alguns cães após-desafio. Estes sinais incluíram febre ($>103^{\circ}\text{F}$; $>39,4^{\circ}\text{C}$) e tosse. Dois dos 5 cães (isto é, 40 %) tiveram febres ($>103^{\circ}\text{F}$; $>39,4^{\circ}\text{C}$) no Grupo 1, comparado a 1 de 5 (isto é, 20 %) cães no Grupo 2. Um cão do grupo de desafio oronasal teve espirro, e outro teve tosse seguindo o desafio. Uma faixa de titulação de HI de 10 a 80, com uma titulação de média geométrica (GMT) de 20, foi observada para o Grupo 1. Uma faixa de titulação de 40 a 160, com uma GMT de 86, foi observada para o Grupo 2. Um cão de cada grupo teve lesões histopatológicas compatíveis ou patogênicas para influenza.

Tabela 27. Desafio de influenza canina - sinais clínicos, isolamento de vírus, resultados de histopatologia e resultados de sorologia									
ID do Cão*	Método de desafio*	Sinais clínicos	Isolamento de vírus			Lesão microscópica (histopatologia)	Sorologia (titulação de HI)		
			Esfregaços Nasais/orais	Raspagem traqueana	Tecidos pulmonares		Pré-desafio	7 dias pós-desafio	14 dias pós-desafio
AAH	Intratraqueana	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo	10	10	20
ADB	Intratraqueana	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	20
ADC	Intratraqueana	Febre*	negativo	negativo	negativo	negativo	10	20	20
AEB	Intratraqueana	Febre	negativo	negativo	negativo	positivo	10	40	20
AEE	Intratraqueana	nenhum	negativo	negativo	negativo	inconcluso	10	20	10
AAE	Oronasal	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	80
AAG	Oronasal	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo	10	40	80
ABY	Oronasal	Espirro ocasional, tosse ocasional,	negativo	negativo	negativo	positivo	10	80	160
ADY	Oronasal	Febre, espirro ocasional	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	80
ENXÓ	Oronasal	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo	10	80	160

* Os animais foram desafiados com um isolado de influenza eqüina Ohio 03.

** Temperatura retal $\geq 39,4^{\circ}\text{C}$ ($\geq 103^{\circ}\text{F}$);

EXEMPLO 18 - EFICÁCIA DE UMA VACINA DE VÍRUS DE INFLUENZA EQUINA PARA CÃES.

O isolado viral de influenza canina (influenza canina) de epidemias de influenza na Flórida foi observado ser um vírus de influenza do tipo H3N8, e foi referido estritamente ao vírus de influenza eqüina, A/eqüino/Ohio/03, com base na similaridade de sequência. O estudo a seguir foi conduzido para determinar a eficácia de uma vacina de vírus de influenza eqüina inativada experimental.

PROCEDIMENTO:

Foram obtidos nove bigles de 7 semanas de idade de sexo misto de um fornecedor comercial, e alojados em jaulas individuais em uma instalação de BSL-2. Estes cães foram atribuídos fortuitamente a dois grupos, como resumido na Tabela 28:

Tabela 28: Projeto Experimental		
Grupo	Número de Cães	Tratamento
1	5	Vacina
2	4	Controle

O primeiro grupo consistiu em 5 cães, que foram vacinados com uma vacina de A/eqüino/Ohio/03 de vírus de influenza eqüina inativado, com adjuvante de CARBIGEN®, a 8 e 12 semanas de idade por meio de via subcutâneo (SQ). O A/eqüino/Ohio/03 foi inativado através de etilenimina binária ("BEI") usando um método padrão. Cada dose da vacina continha 5 % em massa de CARBIGEN®, 4096 unidades de HA do vírus inativado, PBS suficiente para trazer o volume total da dose para 1 ml, e NaOH suficiente para ajustar o pH para entre 7,2 e 7,4. Foram colhidas amostras de soro de todos os cães no dia da primeira e da segunda vacinação e dia 7 e 14, pós-primeira e segunda vacinação, e o pré-desafio para determinar a titulação de HI usando um protocolo padrão de vírus de influenza eqüina de H3N8 (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Em 3 semanas pós-segunda vacinação, os 5 cães vacinados e o segundo grupo (isto é, o grupo de controle) consistindo em 4 cães com idade equiparada foram desafiados oronasalmente com um vírus de influenza eqüina crescido em cultura de células A/eqüino/Ohio/03

($10^{7,0}$ a $10^{8,0}$ TCID₅₀ por cão) em um volume por dose de 1-2 ml. O vírus de desafio foi administrado aos cães como uma névoa usando um nebulizador (nebulizador ultra-sônico de DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, USA). Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza por 14 dias pós-desafio. Cinco cães (3 vacinados e 2 controles) 7 dias pós-desafio e 4 cães (2 controles e 2 vacinados) 14 dias pós-desafio foram humanitariamente eutanizados para coleta dos tecidos pulmonares em 10 % de formalina tamponada para avaliação histopatológica.

RESULTADOS:

Os resultados deste experimento estão resumidos nas Tabelas 29 e 30. Todos os cães vacinados soroconverteram-se seguindo a vacinação. Uma faixa de titulação de HI de 40 a 640, com o GMT de 129, foi observada durante o período de pós-vacinação com vírus de influenza eqüina A/eqüino/Ohio/03, e uma titulação de HI de 160 a 320, com uma titulação de média geométrica de 211, foi observada com isolado de influenza canina, A/canine/Florida/242/03. Dois de 6 vacinados tiveram uma febre de $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103^{\circ}\text{F}$) por um dia e nenhum outro sinal clínico foi observado em quaisquer dos cães seguindo desafio.

CONCLUSÃO:

Todos os cães vacinados responderam à vacina de influenza eqüina inativada, com adjuvante de CARBIGEN®. A titulação de HI resulta com um vírus de isolado de influenza canina sugerindo que a vacina de influenza eqüina inativada induziu um nível detectável de anticorpo reativo transversal para o vírus de influenza canina. Embora o vírus de desafio usado aqui não induza nenhuma doença clínica notável em cães bigles, com base na titulação de HI com um vírus de isolado de influenza canina, foi concluído que vacina eqüina inativada poderia ser usada em cães para induzir anticorpos reativos cruzados, que poderiam proteger cães potencialmente contra doença de "influenza canina" causada pelo vírus de influenza canina do tipo H3N8.

Tabela 29. Sorologia - Titulações pré e pós-vacinação e pós-desafio de HI											
Cão*	Grupo	Titulações de HI									
		Pré-vacinação	Pós-1ª vacinação			Pós-2ª vacinação				Pós-desafio	
			7-d	14-d	7-d	7-d	14-d	21-d	7-d	14-d	14-d
AKT	Vacinado**	< 10	40	80	640	640	640	640	320	320	320
ALH	Vacinado**	< 10	40	80	320	320	160	160	80	***	***
ALU	Vacinado**	< 10	40	80	320	320	160	160	80	80	80
ANJ	Vacinado**	< 10	40	80	320	320	160	80	320	***	***
ANU	Vacinado**	< 10	40	80	320	320	160	80	160	***	***
AJW	Controle	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	***	***
AKR	Controle	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	****	****
ALZ	Controle	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20	20	20
ARC	Controle	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	10	10

* Os animais foram desafiados com um isolado de influenza eqüina Ohio 03

** Vacina de Ohio 03 de vírus de influenza eqüina inativado com adjuvante de CARBIGEN® foi usada para vacinação

*** Eutanizado 7 dias pós-desafio

Tabela 30. Desafio de influenza canina* - sinais clínicos, isolamento do vírus, resultados de histopatologia						
ID do cão	Grupo de tratamento	Sinais clínicos	Isolamento do vírus			Lesão microscópica (histopatologia)
			Esfregaço nasal	Raspagem traqueana	Tecidos pulmonares	
AKT	Vacinado**	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
ALH	Vacinado**	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
ALU	Vacinado**	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
ANJ	Vacinado**	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
ANU	Vacinado**	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
AJW	Controle	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
AKR	Controle	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
ALZ	Controle	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo
ARC	Controle	nenhum	negativo	negativo	negativo	negativo

* Os animais foram desafiados com um isolado de influenza eqüina Ohio 03

** Vacina de Ohio 03 de vírus de influenza eqüina inativado com adjuvante de CARBIGEN® foi usada para vacinação

EXEMPLO 19 - EFICÁCIA DE UMA VACINA DE VÍRUS DE INFLUENZA EQUINA PARA CÃES.

O vírus de influenza canina isolado de epidemias de influenza na Flórida foi caracterizado estar estritamente relacionado a vários isolados de vírus de influenza eqüina do tipo H3N8. Pela análise de similaridade de sequência de DNA e de aminoácido foi demonstrado que o vírus de influenza canina é bem parecido a um vírus de influenza eqüina, A/eqüino/Ohio/03. O estudo a seguir foi conduzido em cães para determinar a eficácia de vacinas de influenza eqüina comercialmente disponíveis em cães.

10 PROCEDIMENTO:

Cerca de 20 cães mestiços de 16 meses de idade e 20 bigles de sexo misto foram usados no estudo. Os cães foram atribuídos fortuitamente a 6 grupos (Tabela 31) de 6-7 cães cada. Cães nos grupos 1 e 4 foram vacinados com uma vacina de influenza eqüina inativado comercialmente disponível com adjuvante (EQUICINE®, Intervet Inc., Millsboro, DE) a 16 e 17 meses de idade por meio de via subcutânea (SQ). Os cães nos grupos 2 e 5 que foram vacinados com uma vacina de influenza eqüino/Kentucky/91 vivo modificado em um 1 ml de volume por meio de via intranasal (uma só narina). Amostras de sangue foram colhidas no dia da vacinação, dia 7 e 14 pós- primeira vacinação (grupos 1, 2, 4, e 5) e pós- segunda vacinação (grupos 1 e 4) para determinar a titulação de HI usando um vírus de influenza eqüina de H3N8 e um vírus de influenza canina usando por um protocolo padrão (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA).

Vacinados (em 72 dias pós-vacinação final) e os controles foram desafiados oronasalmente com uma cepa de vírus de influenza eqüina cultivada em cultura de células A/eqüino/Ohio/03 ($10^{7,0}$ a $10^{8,0}$ TCID₅₀ por cão) em um volume de 1-2 ml. O vírus de desafio foi administrado aos cães como névoa usando um nebulizador (nebulizador ultra-sônico de DeVilbiss Ultra-Neb®99, Sunrise Medical, USA). Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza por 12 dias pós-desafio. Os esfregaços nasais e orofaríngeos foram colhidos no meio de MEM de Earl com antibióticos (neomicina e polimixina B) diariamente do dia -1 ao dia 12 pós-desafio

para isolamento de vírus. A presença de vírus nos esfregaços indica que o animal está excretando o vírus em secreções nasais/orais. Todos os cães foram humanitariamente eutanizados no dia 12 pós-desafio e os tecidos pulmonares foram colhidos em 10 % de formalina tamponada para avaliação histopatológica.

Tabela 31. Projeto experimental					
Grupo	Número de cães	Raça	Tratamento	Número de doses	Via de vacinação
1	7	Bígle	EQUICINE II [®] ***	2	Subcutânea
2	7	Beagle	A/KY/91***	1	Intranasal
3	6	Bígle	Controle	N/A*	N/A*
4	7	Mestiço	EQUICINE II [®]	2	Subcutânea
5	7	Mestiço	A/KY/91	1	Intranasal
6	6	Mestiço	Controle	N/A*	N/A*

* Não aplicável

** EQUICINE II[®] é comercializado por Intervet Inc. como uma vacina líquida. EQUICINE II[®] contém vírus de influenza A/Pennsylvania/63 inativado (ou "A/Pa/63") e vírus de influenza A/eqüino/Kentucky/93 (ou "A/KY/93") com carbopol (isto é, HAVLOGEN[®] (Intervet Inc.)). Mais especificamente, uma dose de EQUICINE II[®] contém: A/Pa/63 inativado a $10^{6,0}$ EID₅₀, A/KY/93 inativado a $10^{6,7}$ EID₅₀, 0,25 % em volume de carbopol, e PBS suficiente para criar um volume total de 1 ml.

*** A/KY/91 é uma vacina secada por congelamento que foi reconstituída com água. Tal reconstituição foi conduzida usando água do tipo para vacina suficiente para trazer a dosagem de vacina para um volume total de 1 ml. A vacina continha vírus de influenza eqüino/Kentucky/91 (ou "A/KY/91"), e é debatida, por exemplo, nas patentes U. S. Nos. 6.436.408; 6.398.774; e 6.177.082, que são incorporadas por referência em sua totalidade nesta patente. Quando reconstituída, uma dose da vacina continha A/KY/91 a $10^{7,2}$ TCID₅₀ por ml, 0,015 grama de N-Z AMINE AS[®] por ml, 0,0025 de grama gelatina por ml, e 0,04 grama de lactose de D por ml. N-Z AMINE AS[®] é uma fonte refinada de aminoácidos e peptídeos produzida por hidrólise enzimáti-

ca de caseína. N-Z AMINE AS® é comercializada por Kerry Bio-Science (Norwich, NY, USA).

RESULTADOS:

5 Todos cães vacinados soroconverteram-se seguindo a vacinação e as titulações de HI variaram de 10 a 80 para cães do grupo de vacina de EQUICINE II® comparadas a 10 a 40 para os cães do grupo de vacina de A/KY/91 usando um vírus de influenza eqüina (tipo H3N8).

10 As amostras colhidas em 2 semanas pós-vacinação (pós-segunda vacinação para vacina de EQUICINE II®) foram analisadas para determinação da titulação de HI com uma influenza canina como também com um vírus de influenza eqüina (tipo de H3N8). Os resultados de HI são mostrados na Tabela 32. Os sinais clínicos incluem febre (>103°F; >39,4°C), tosse ocasional, e secreção nasal moderada observados seguindo o desafio.

Tabela 32. Sorologia - Titulações de HI em 2 semanas pós vacinação							
Grupo	Número de cães	Raça	Tratamento	Titulação de HI com			
				Vírus de influenza eqüino		Vírus de influenza canino	
				Faixa	GMT	Faixa	GMT
1	7	Bigle	EQUICINE II®	10-80	36	10-80	33
2	7	Beagle	A/KY/91	10-20	12	20-160	54
3	6	Bigle	Controle	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
4	7	Mestiço	EQUICINE II®	40-80	54	40-80	50
5	7	Mestiço	A/KY/91	10-40	24	40-80	49
6	6	Mestiço	Controle	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

* Não aplicável

15 Entre os bigles, 2 de 6 cães no grupo de vacina de EQUICINE II® (Grupo 1), 1 dos 7 cães no grupo vacina de A/KY/91 (Grupo 2) e 2 de 6 cães no grupo de controle (Grupo 3) tiveram febre. Um de 6 cães no Grupo 3 (controle) era positivo para vírus no sobrenadante de cultura de célula de material de esfregaço nasal através de ensaio de hemaglutinação com 0,25
20 % de células sangüíneas vermelhas de galinha (CRBC). Um de 6 cães no

grupo de controle (Grupo 3) e 1 de 7 cães no grupo de vacina de A/KY/91 (Grupo 2) tiveram secreção nasal moderada durante o período de observação de pós-desafio. Não houve nenhuma diferença significativa estatística ($P > 0,05$) entre os grupos de controle e de vacina para cães da raça bigles.

- 5 Entre os cães mestiços, 5 de 7 cães no grupo de vacina de EQUICINE II® (Grupo 4), 1 de 7 cães no grupo de vacina de A/KY/91 (Grupo 5) e 5 de 6 cães no grupo de controle (Grupo 6) tiveram febre. Um cão de cada um do Grupo 4 e 6 teve uma secreção nasal moderada, e um cão do
- 10 EQUICINE II® (Grupo 4) e 3 de 6 cães no grupo de controle (Grupo 6) eram positivos para vírus de influenza no esfregaço nasal através de ensaio de HA. Nenhum dos cães do grupo de A/KY/91 (Grupo 5) era positivo para vírus de influenza nos materiais de esfregaço nasal.

CONCLUSÃO:

- 15 Mediante sorologia, foi demonstrado que vacinação de cães com vacinas de influenza eqüina comercialmente disponíveis estimulou uma resposta de anticorpo de influenza nível moderado. Pode haver alguma diferença de raça no desenvolvimento de sinais clínicos relacionados à influenza em cães seguindo um desafio com vírus de influenza do tipo H3N8. A vacina
- 20 de influenza eqüina atenuada viva (A/KY/91) forneceu uma proteção significativa ($P < 0,05$) de desenvolvimento da doença clínica em temperatura retal em cães mestiços. Também, a vacina viral atenuada viva impediu a propagação do vírus de influenza nas secreções nasais.

EXEMPLO 20 - DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE DESAFIO DE INFLUENZA CANINA

- 25 Em vista dos relatórios que induzir doença em caninos para propósitos de estudo não tiveram sucesso, o potencial para usar um vírus de influenza canina, H3N8, para desenvolver um modelo de desafio de influenza canina em cães foi investigado no estudo a seguir.

PROCEDIMENTO:

30 Dez cães mestiços de sexo misto foram obtidos de um fornecedor comercial, e alojados em jaulas em uma instalação de BSL-2. Os cães

foram atribuídos fortuitamente a dois grupos de 5 cães cada. Como mostrado na Tabela 33, um grupo foi submetido a um desafio intratraqueano/intranasal, e o outro grupo foi submetido.

Tabela 33. Projeto experimental		
Grupo	Número de cães	Via de desafio
1	5	Intratraqueana/intranasal
2	5	Oronasal

Os cães foram desafiados em aproximadamente 12 semanas de idade. Vírus de influenza canina cultivado em ovo de galinha embrionado (A/canine/Florida/242/03) foi usado como vírus de desafio. Cada cão recebeu um total de cerca de $10^{7,2}$ TCID₅₀ de vírus em ou 2 ml (para via oronasal) ou 4 ml (via intratraqueana/intranasal) de volume.

Para desafio intratraqueano/intranasal, 3 ml do vírus de desafio foram administrados primeiro na traquéia, seguido por 5 ml de PBS usando um tubo de liberação que consistiu em um tubo traqueano embanhado (Tamanho 4,5/5,0, Sheridan, USA) e tubo de alimentação (tamanho 5Fr, 1,7 mm; 41 cm (16 polegadas) em comprimento, Kendall, USA), e 1 ml de vírus de desafio, seguido por 3 ml de ar atmosférico foram administrados nas narinas usando uma seringa.

Para desafio oronasal, o vírus de desafio foi administrado como uma névoa usando um nebulizador (Nebulair®, DVM Pharmaceuticals, Inc., Miami, FL) em cerca de 2 ml de volume. Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza por 14 dias pós-desafio. Os cães foram eutanizados no dia 14 pós-desafio, e amostras de tecido (pulmão e traquéia) foram colhidas em 10 % de formalina tamponada para exame histopatológico

RESULTADOS:

Todos cães nos grupos 1 e 2 desenvolveram sinais clínicos de influenza canina dentro de 24 a 48 horas. Cada cão teve 2 ou mais dos sinais clínicos a seguir: febre; $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103,0^{\circ}\text{F}$), tosse, secreção ocular sorosa ou mucopurulenta, secreção nasal sorosa ou mucopurulenta, vômito, diarreia, depressão, perda de peso, entalo, Hemoptise, e estertores audíveis.

- Tecidos pulmonares de 5 de 5 cães do grupo 1 e 4 de 5 cães do grupo 2 tiveram lesões histopatológicas que incluíram um ou mais dos seguintes: broncopneumonia supurativa difusa, bronquite/bronquiolite com tampões de exsudato neutrofílico nos lumens e agregação de células mononucleares marcadas no tecido mucosa e peribronquiolar, exsudato misturado dentro dos alvéolos com números grandes de macrófagos espumosos, plasma linfocelular e celular como também infiltração de célula granulocítica, e espessamento de septos alveolares com proliferação de pneumócitos do tipo II compatível ou patogênica para uma infecção do vírus de influenza. As amostras de tecido de traquéia eram normais.

CONCLUSÃO:

Um isolado de influenza canina de H3N8 tal como o usado neste estudo pode ser usado para induzir doença de influenza canina em cães usando um dos métodos descritos neste estudo ou um método similar.

15 EXEMPLO 21 - DESAFIO DE MODELO DE DESENVOLVIMENTO DE INFLUENZA CANINA

O potencial para usar um vírus de influenza canina, H3N8, para desenvolver um modelo de desafio de influenza canina em cães foi também investigado no estudo a seguir.

20 PROCEDIMENTO:

- Quinze cães mestiços de 17 - 18 semanas de idade e cinco bigles de 15 semanas de idade foram obtidos de fornecedores comerciais, e foram alojados em jaulas em uma instalação de BSL-2. Os cães mestiços foram atribuídos fortuitamente a 3 grupos (Grupos 1 a 3) de 5 cães cada. Todos os bigles foram atribuídos a um grupo (Grupo 4) como mostrado na Tabela 34:

Tabela 34. Projeto experimental			
Grupo	Raça	Número de cães	Dose de vírus de desafio
1	Mestiços	5	$10^{6,8}$ TCID ₅₀
2	Mestiços	5	$10^{5,8}$ TCID ₅₀
3	Mestiços	5	$10^{4,8}$ TCID ₅₀
4	Bigles	5	$10^{6,8}$ TCID ₅₀

Os cães foram desafiados oronasalmente com um vírus de influenza canina virulento, A/Canine/Florida/242/2003 (isolado de pulmão de um cão galgo com doença de influenza canina (fornecido por Dr. Cynda Crawford na Universidade de Flórida)). O vírus de desafio foi administrado como uma névoa usando um nebulizador (Nebulair®) em cerca de 2 ml de volume. Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza por 14 dias pós-desafio.

RESULTADOS:

Oitenta por cento (4 de 5) dos cães nos Grupos 1 e 4, 100 % dos cães nos Grupos 2 e 3, desenvolveram sinais clínicos de influenza canina dentro de 48 horas. Cada cão teve um ou mais dos sinais clínicos a seguir: febre; $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103,0^{\circ}\text{F}$), tosse, secreção ocular sorosa ou mucopurulenta, secreção nasal sorosa ou mucopurulenta, vômito, diarreia, depressão, perda de peso, entalo, e estertores. Os sinais clínicos observados nos bigles foram em geral mais moderados e de curso curto comparados aos cães mestiços.

CONCLUSÃO:

Um isolado de influenza canina de H3N8 tal como o usado neste estudo pode ser usado por induzir doença semelhante à influenza canina ou tosse canil em cães usando o método descrito neste estudo ou um método similar com uma faixa de dose de desafio de $10^{4,8}$ a $10^{6,8}$ TCID₅₀. Houve algumas diferenças nos sinais clínicos observados em cães mestiços e bigles. Em geral, bigles tendem a ter sinais clínicos relacionados à influenza mais moderados comparados aos cães mestiços.

25 EXEMPLO 22 - ESTUDO DE EFICÁCIA DA VACINA DE INFLUENZA CANINA.

O estudo a seguir foi conduzido para avaliar a eficácia de uma vacina de influenza eqüina de H3N8 em cães contra vírus de influenza canina.

PROCEDIMENTO:

30 Dezessete cães mestiços de 14 semanas de idade e dez bigles de 8 semanas de idade foram obtidos de fornecedores comerciais. Os cães foram atribuídos fortuitamente a 5 grupos como mostrado na Tabela 35, e

alojados em uma instalação de pesquisa.

Tabela 35. Projeto experimental					
Grupo	Idade	Número de cães	Tratamento	Número de doses	Idade na vacinação (semanas)
1	14 semanas	7	Vacinado	2	14 & 18
2	14 semanas	5	Vacinado	1	18
3	14 semanas	5	Controle	--	--
4	8 semanas	5	Vacinado	2	8 & 12
5	8 semanas	5	Controle	--	--

A vacina usada neste estudo era uma vacina de vírus de influenza eqüina inativado com adjuvante de HAVLOGEN®, (A/eqüino/KY/02). Para preparar esta vacina, o vírus foi inativado através de etilenimina binária (BEI) usando um método padrão. Cada dose de vacina continha HAVLOGEN® (10 % v/v), 6144 unidades de HA do vírus inativado, 0,1 % (v/v) de 10 % de timerosal, 0,1 % (v/v) de fenol vermelho, NaOH suficiente para ajustar o pH em 6,8 a 7,2, e PBS suficiente para trazer o volume de dose total para 1 ml.

Os cães nos Grupos 1 e 4 foram vacinados com 2 doses da vacina. A segunda dose (isto é, o reforço) foi administrada 4 semanas após a primeira. Os cães no Grupo 2 foram vacinados com 1 dose em 18 semanas de idade. Amostras de sangue foram colhidas para avaliar a titulação de HI usando um protocolo padrão (por exemplo, SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA) com um isolado de influenza canina de H3N8 nos dias zero (antes da vacinação), 7, e 14 pós primeira e segunda vacinações. Cerca de 5 dias antes do desafio, os cães foram movidos para uma instalação de BSL-2 e alojados em jaulas individuais.

Todos os vacinados e cães de controle com idade equiparada foram desafiados oronasalmente com um vírus de influenza canina virulento ($10^{7.7}$ TCID₅₀ de A/Canine/Florida/242/2003 por cão) em 2 semanas pós-segunda vacinação dos Grupos 1 a 4 e primeira vacinação do Grupo 2. O vírus de desafio foi administrado como uma névoa usando um nebulizador

(Nebulair®) a 2 ml por cão. Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza por 17 dias pós-desafio. Esfregaços nasais e orofaríngeos foram colhidos em tubos contendo 2 ml de meio de transporte de vírus para isolamento de vírus do dia -1 (isto é, um dia antes do desafio) ao dia 17 pós-desafio. Todos os cães foram eutanizados no dia 17 pós-desafio e amostras pulmonares e traqueanas foram colhidas em 10 % de formalina tamponada para histopatologia. Foram colhidas amostras de sangue nos dias 7 e 14 pós-desafio para determinação da titulação de HI. As tarefas de contagem de sinal clínico usadas para a observação pós-desafio estão mostradas na Tabela 36.

RESULTADOS:

Todos os cães nos grupos de vacinação de 2 doses (Grupo 1 e 4) desenvolveram respostas de titulação de anticorpo de HI ao vírus de isolado de influenza canina (Tabela 37). Seguindo o desafio, cerca de um aumento de 4 vezes na titulação no dia 14 pós-desafio em todos os grupos indiretamente indicou que todos os cães foram expostos ao vírus de desafio. Todos os cães exibiram um ou mais dos sinais a seguir de influenza canina: febre; $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103,0^{\circ}\text{F}$), tosse, secreção ocular sorosa ou mucopurulenta, secreção nasal sorosa ou mucopurulenta, vômito, diarreia, depressão, perda de peso, e dispnéia. Vacinados tiveram sinais clínicos menos severos, comparados aos controles com idade equiparada (Tabela 38). Houve uma redução significativa nos sinais clínicos devido à vacinação de 2 doses em ambos os cães de 8 semanas de idade ($P = 0,040$) e 14 semanas de idade ($P = 0,003$) (Grupos 4 e 1 respectivamente). Neste experimento, a vacinação de uma dose não forneceu uma redução significativa ($P = 0,294$) nos sinais clínicos (Grupo 2).

Resultados de isolamento de vírus estão mostrados na Tabela 39. Entre os cães de 14 semanas de idade, o vírus de influenza canina foi isolado das amostras de esfregaço colhidas de 2 de 7 cães (29 %) do grupo de vacina de 2 doses (Grupo 1), 3 de 5 cães (60 %) do grupo de vacina de 1 dose (Grupo 2), e 5 de 5 cães (100 %) do grupo de controle (Grupo 3). Entre os cães 8 semanas de idade, o vírus foi isolado de 1 de 5 cães (20 %) do

grupo de vacina de 2 doses (Grupo 4), e 4 de 5 cães (80 %) do grupo de controle (Grupo 5). Houve uma redução significativa ($P = 0,003$) no número de cães positivos para vírus de influenza canina em amostras de esfregaço devido à vacinação de 2 doses (Grupos 1 e 4) comparado aos controles não-vacinados (Grupos 3 e 5). Embora houvesse uma redução no número de
 5 cães (60 % vs. 100 %) positivos para vírus de influenza canina em amostras de esfregaço entre o grupo de vacina de 1 dose (Grupo 2) e o grupo de controle (Grupo 3), a diferença não era estatisticamente significativa ($P = 0,222$).

Avaliação histopatológica de amostras de tecido pulmonar e traqueano para lesões foi conduzida para identificar lesões compatíveis ou patogênicas para doença de influenza canina. Esta inclui, por exemplo, determinação se um ou mais dos seguintes existem: áreas com broncopneumonia supurativa; peribronquite/peribronquiolite com agregação de células mononucleares (linfócitos, células plasmáticas); presença de tampões de
 10 restos celulares granulocíticos nos lúmens; hiperplasia do epitélio respiratório; exsudato misturado nos alvéolos com quantidade grande de células granulocíticas e restos celulares; agregados (espumosos) de macrófagos, células plasmáticas, e linfócitos; e espessamento dos septos alveolares com proliferação de pneumócitos do tipo II.

20 Tabela 40 fornece um sumário da extensão das lesões neste experimento para os cães. Entre os cães de 14 semanas de idade, as lesões pulmonares eram menos extensivas e menos severas em 5 de 7 cães no grupo de vacinação de 2 doses (Grupo 2), e 4 de 5 cães no grupo de vacinação de 1 dose (Grupo 1). Todos cães de controle (Grupo 3) tiveram lesões
 25 severas e extensivas sugestivas de nenhuma proteção. Não houve nenhuma diferença nas lesões traqueanas devido à vacinação de 1 ou 2 doses entre os cães de 14 semanas de idade. Entre os cães 8 semanas de idade, não houve nenhuma diferença nas lesões pulmonares entre os cães com vacina de 2 doses e de controle. Nenhum dos cães teve qualquer lesão traqueana.

30 CONCLUSÃO:

Os resultados deste estudo demonstram que: (1) vírus de influenza equina inativado de H3N8 pode induzir respostas de anticorpo de HI

reativas cruzadas de vírus de influenza canina em cães vacinados, (2) uso de uma vacina de vírus de influenza eqüina de H3N8 pode reduzir a severidade da doença do vírus de influenza canina em cães, e (3) uso de uma vacina de vírus de influenza eqüina de H3N8 pode reduzir a excreção de vírus em secreções nasais e/ou orais.

Tabela 36. Sinais clínicos e sistema de classificação	
Sinais clínicos	Classificação por dia
Temp	
< 39,4°C (< 103,0°F)	0
39,4-39,9°C (103,0-103,9°F)	2
40,0-40,5°C (104,0-104,9°F)	3
>40,6°C (>105,0°F)	4
Tosse	
Nenhuma Tosse	0
Ocasional	2
Paroximal	4
Espirro	
Nenhum Espirro	0
Ocasional	1
Paroximal	2
Secreção nasal	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Secreção ocular	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2

Tabela 36. Sinais clínicos e sistema de classificação	
Sinais clínicos	Classificação por dia
Mucopurulenta - copiosa	3
Hemoptise	
Não	0
Sim	5
Depressão	
Não	0
Sim	1
Anorexia	
Não	0
Sim	1
Sinais respiratórios	
Nenhum	0
Estertores	3
Dispnéia	4
Ofegante	5
Expectorado mucoso	
Não	0
Sim	2
Vômito	
Não	0
Sim	1
Anormalidades fecais	
Não	0
Sim	1

Tabela 37. -continuação-											
No do Grupo	ID do cão	Idade (semana)	Tratamento	Número de doses	Titulação de HI						
					Dias pós primeira vacinação dos Grupos 1 e 4				Dias pós-desafio		
					0*	7	14	28**	35	42***	7
3	014	14	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
3	018	14	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
3	01A	14	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40
4	406	8	Vacinado	2	< 10	< 10	10	40	80	80	160
4	407	8	Vacinado	2	< 10	20	20	40	40	40	320
4	504	8	Vacinado	2	< 10	< 10	10	20	20	80	160
4	704	8	Vacinado	2	< 10	< 10	10	40	80	160	160
4	705	8	Vacinado	2	< 10	< 10	< 10	40	80	160	160
5	404	8	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80
5	405	8	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80
5	610	8	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20
5	702	8	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80
5	703	8	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40

* Primeira vacinação - Grupos 1 e 4

** Segunda vacinação - Grupos 1 e 4; Primeira vacinação - Grupo 2

*** Dia do desafio

TABELA 38. Análise das contagens clínicas totais da doença de influenza canina.					
Grupo	Tratamento	Número de doses de vacina	Idade na primeira vacinação dos grupos 1 e 4	Contagem total média por cão	valor P*
1	Vacinado	2	14 semanas	8,7	0,003 (Grupo 1 vs. 3)
2	Vacinado	1	14 semanas (estes cães foram vacinados uma vez, quando eles tinham 18 semanas de idade)	21,8	0,294 (Grupo 2 vs. 3)
3	Controle	--	14 semanas (estes cães não foram vacinados)	25,4	--
4	Vacinado	2	8 semanas	2,0	0,040 (Grupo 4 vs. 5)
5	Controle	--	8 semanas (estes cães não foram vacinados)	5,4	--

* Analisado usando um procedimento de NPARIWAY de SAS® Versão 8.2 (os grupos de vacina foram comparados usando o teste de soma de classificação de Wilcoxon)

Tabela 39. Eliminação do vírus

[illegible]

Tabela 40. Avaliação histopatológica das amostras de tecido						
No do Grupo	ID do cão	Idade (semana)	Tratamento	Número de doses	Lesão microscópica (Histopatologia)	
					Pulmões	Traquéia
1	921	14	Vacinado	2	+/-	-
1	926	14	Vacinado	2	-	+/-
1	931	14	Vacinado	2	-	-
1	955	14	Vacinado	2	+/-	-
1	011	14	Vacinado	2	+/-	-
1	013	14	Vacinado	2	+/-	+/-
1	019	14	Vacinado	2	+/-	+/-
2	922	14	Vacinado	1	+/-	-
2	953	14	Vacinado	1	+/-	+/-
2	015	14	Vacinado	1	+/-	+
2	016	14	Vacinado	1	-	-
2	017	14	Vacinado	1	+/-	+/-
3	923	14	Controle	N/A	+	+/-
3	012	14	Controle	N/A	+	-
3	014	14	Controle	N/A	+	-
3	018	14	Controle	N/A	+	-
3	01A	14	Controle	N/A	+	+/-
4	406	8	Vacinado	2	+/-	-
4	407	8	Vacinado	2	-	-
4	504	8	Vacinado	2	+/-	-
4	704	8	Vacinado	2	-	-
4	705	8	Vacinado	2	-	-
5	404	8	Controle	N/A	-	-
5	405	8	Controle	N/A	-	-
5	610	8	Controle	N/A	+/-	-
5	702	8	Controle	N/A	+/-	-
5	703	8	Controle	N/A	-	-

"+" Lesão severa consistente ou patognômica para uma infecção de influenza

"+/-" Lesão moderada (inconclusa)

"-" Normal

EXEMPLO 23 - ESTUDO DE EFICÁCIA DA VACINA DE INFLUENZA CA-

5 NINA

O estudo a seguir foi conduzido para determinar a eficácia de uma vacina de influenza eqüina multivalente de H3N8 contra vírus de influenza canina em cães.

PROCEDIMENTO:

- 10 Dezessete bigles de 15 semanas de idade foram obtidos de um fornecedor comercial. Os cães foram atribuídos fortuitamente a 3 grupos como mostrado na Tabela 41, e alojados em uma instalação de pesquisa.

Tabela 41. Projeto experimental				
Grupo	Número de cães	Tratamento	Número de doses	Idade na vacinação (semanas)
1	7	Vacinado	2	15 & 19
2	5	Vacinado	1	19
3	5	Controle	--	--

- A vacina usada neste estudo foi uma vacina de influenza eqüina inativada com adjuvante de HAVLOGEN®, (A/eqüino/KY/02, A/eqüino/KY/93, e A/eqüino/NM/2/93). Para preparar esta vacina, os vírus foram inativados através de etilenimina binária (BEI) usando um método padrão. Cada dose de vacina continha HAVLOGEN® (10 % v/v), 2048 unidades de HA de cada um do vírus inativado, 0,1 % (v/v) de 10 % timerosal, 0,1 % (v/v) de fenol vermelho, NaOH suficiente para ajustar o pH em 6,8 a 7,2, e PBS suficiente para trazer o volume de dose total para 1 ml.

- Os cães no Grupo 1 foram vacinados com 2 doses da vacina. A segunda dose (isto é, reforço) foi administrada 4 semanas após a primeira dose. Os cães no Grupo 2 foram vacinados com 1 dose de vacina em 19 semanas de idade. Amostras de sangue foram colhidas para avaliar a titulação de HI usando um protocolo padrão com um isolado de influenza canina de H3N8 nos dias zero (antes da vacinação), 7, e 14 pós-primeira e pós-

segunda vacinações. Sete dias antes do desafio, os cães foram removidos para uma instalação de BSL-2 e alojados em jaulas individuais.

Todos cães de controle vacinados e de idade equiparada foram desafiados oronasalmente com um vírus de influenza canina virulento ($10^{7,3}$ TCID₅₀ de A/Canine/Florida/242/2003 por cão) em 2 semanas pós-segunda vacinação do Grupo 1 e pós-primeira vacinação do Grupo 2. O vírus de desafio foi administrado como uma névoa usando um nebulizador (Nebulair®) a 2 ml por cão. Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza durante 14 dias pós-desafio. Todos os cães foram eutanizados no dia 14 pós-desafio, e amostras de pulmão e traquéia foram colhidas em 10 % de formalina tamponada para histopatologia. As amostras de sangue foram colhidas nos dias 7 e 14 pós-desafio para determinação da titulação de HI. As tarefas de contagem de sinal clínico usadas para a observação pós-desafio estão mostradas na Tabela 42.

15 RESULTADOS:

Todos cães vacinados desenvolveram respostas de titulação de anticorpo de HI ao isolado de vírus de influenza canina (Tabela 43). Seguindo o desafio, cerca de um aumento de 4 vezes na titulação de HI no dia 14 pós-desafio comparado indiretamente à titulação de HI pré-desafio em todos os grupos indica que todos os cães foram expostos ao vírus de desafio. Todos os cães exibiram sinais doença de influenza canina com cada cão demonstrando um ou mais dos sinais clínicos a seguir: febre $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103,0^{\circ}\text{F}$), tosse, secreção ocular sorosa ou mucopurulenta, secreção nasal sorosa ou mucopurulenta, vômito, diarreia, depressão, perda de peso, e dispnéia. Vacinados tiveram sinais clínicos menos severos, comparados aos controles com idade equiparada (Tabela 44). Houve uma redução significativa ($P = 0,028$) nos sinais clínicos devido à vacinação de 2 doses em cães (Grupo 1). Uma vacinação de dose não forneceu uma redução significativa ($P = 0,068$) nos sinais clínicos (Grupo 2).

30 Como no Exemplo 22, avaliação histopatológica de amostras de tecido pulmonar e traqueano para lesões foi conduzida para identificar as lesões compatíveis ou patogênicas para doença de influenza canina. Ta-

- bela 45 fornece um sumário da extensão das lesões neste experimento para os cães. Entre cães de 15 semanas de idade, a vacinação de cães com 1 dose ou 2 doses impediu as lesões pulmonares em todos os cães. Quatro de 5 cães de controle (80 %) tiveram broncopneumonia supurativa severa consistente com uma doença de influenza. Um dos 7 cães do grupo de vacina de 2 doses (Grupo 1) e 1 de 5 cães do grupo de controle (Grupo 3) tiveram lesões de traquéia moderadas sugestivas de traqueíte que poderiam ser atribuídas à doença de influenza.

CONCLUSÃO:

- 10 Os resultados deste estudo demonstram que 1) Vírus de influenza eqüina inativado de H3N8 pode induzir respostas reativas cruzadas do anticorpo de vírus de influenza canina HI em cães vacinados, e 2) Uso de uma vacina de vírus de influenza eqüina de H3N8 pode reduzir a severidade da doença do vírus de influenza canina em cães.

Tabela 42. Sinais clínicos e sistema de contagem	
Sinais clínicos	Classificação por dia
Temp	
< 39,4°C (< 103,0°F)	0
39,4-39,9°C (103,0-103,9°F)	2
40,0-40,5°C (104,0-104,9°F)	3
>40,6°C (>105,0°F)	4
Tosse	
Nenhuma Tosse	0
Ocasional	2
Paroximal	4
Espirro	
Nenhum Espirro	0
Ocasional	1
Paroximal	2
Secreção nasal	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1

Tabela 42. Sinais clínicos e sistema de contagem	
Sinais clínicos	Classificação por dia
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Secreção ocular	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Hemoptise	
Não	0
Sim	5
Depressão	
Não	0
Sim	1
Anorexia	
Não	0
Sim	1
Sinais respiratórios	
Nenhum	0
Estertores	3
Dispneia	4
Ofegante	5
Expectorado mucoso	
Não	0
Sim	2
Vômito	
Não	0
Sim	1
Anormalidades fecais	
Não	0
Sim	1

Tabela 43. Sorologia - Titulações de inibição de hemaglutinação											
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Número de doses	Titulação de HI							
				Dias pós primeira vacinação do Grupo 1				Dias pós-desafio			
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	ALK	Vacinado	2	< 10	< 10	20	20	80	40	160	320
1	AMF	Vacinado	2	< 10	< 10	10	20	20	40	160	320
1	AKY	Vacinado	2	< 10	20	20	20	40	40	160	80
1	ALC	Vacinado	2	< 10	10	10	10	40	40	160	160
1	TUDO	Vacinado	2	< 10	< 10	10	10	40	20	160	320
1	ALM	Vacinado	2	< 10	< 10	10	20	40	40	80	160
1	AMU	Vacinado	2	< 10	20	40	40	40	40	40	160
2	ALA	Vacinado	1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	320	160
2	AMA	Vacinado	1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20	> 640	80
2	APD	Vacinado	1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	> 640	320
2	APG	Vacinado	1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	320	80
2	APT	Vacinado	1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	320	320
3	ALT	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	160
3	AMS	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
3	AKX	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20	80
3	ALX	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
3	AMI	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	80

* Primeira vacinação - Grupo 1 / ** Segunda vacinação - Grupo 1; Primeira vacinação - Grupo 2 / *** Dia de desafio

Tabela 44. Análise das contagens clínicas totais da doença de influenza canina					
Grupo	Tratamento	Número de doses	Idade na primeira vacinação do Grupo 1	Contagem média por cão	total valor P*
1	Vacinado	2	15 semanas	6,3	0,028 (Grupo 1 vs. 3)
2	Vacinado	1	15 semanas (estes cães foram vacinados uma vez, quando eles tinham 19 semanas de idade)	14,2	0,068 (Grupo 2 vs. 3)
3	Controle	--	15 semanas (estes cães não foram vacinados)	24,4	--

* Analisado usando um procedimento de NPARIWAY de SAS® Versão 8.2 (os grupos de vacina foram comparados usando o teste de soma de classificação de Wilcoxon)

Tabela 45. Avaliação histopatológica das amostras de tecido					
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Número de doses	Lesão microscópica (Histopatologia)	
				Pulmão	Traquéia
1	ALK	Vacinado	2	-	+/-
1	AMF	Vacinado	2	-	-
1	AKY	Vacinado	2	-	-
1	ALC	Vacinado	2	-	-
1	ALL	Vacinado	2	-	-
1	ALM	Vacinado	2	-	-
1	AMU	Vacinado	2	-	-
2	ALA	Vacinado	1	-	-
2	AMA	Vacinado	1	-	-
2	APD	Vacinado	1	-	-
2	APG	Vacinado	1	-	-
2	APT	Vacinado	1	-	-
3	ALT	Controle	N/A	+/-	-
3	AMS	Controle	N/A	+	-
3	AKX	Controle	N/A	+	-
3	ALX	Controle	N/A	+	+/-
3	AMI	Controle	N/A	-	-

"+" Lesão severa consistente ou patogênica para uma infecção de influenza

"+/-" Lesões moderadas (inconclusas)

"-" Normal

EXEMPLO 24 - ESTUDO DE EFICÁCIA DA VACINA DE INFLUENZA CA-

5 NINA

O estudo a seguir foi conduzido para determinar: (1) a eficácia das vacinas de influenza eqüina de H3N8 monovalente versus multivalente contra vírus de influenza canina em cães, e (2) o efeito da via de administração na eficácia da vacina.

PROCEDIMENTO:

Trinta cães mestiços de 10 semanas de idade foram obtidos de um fornecedor comercial. Os cães foram atribuídos fortuitamente a 6 grupos como mostrado na Tabela 46, e alojados em uma instalação de pesquisa.

Tabela 46. Projeto experimental					
Grupo	Número de cães	Tratamento	Via de vacinação	Número de doses	Idade na Vacinação (semanas)
1	5	VAX-1	IN	2	10 & 14
2	5	VAX-2	SQ	2	10 & 14
3	5	VAX-2	IN	2	10 & 14
4	5	VAX-3	SQ	2	10 & 14
5	5	VAX-3	IN	2	10 & 14
6	5	Controle	--	--	--

- 5 Três tipos de vacinas (VAX-1, VAX-2, e VAX-3) foram usados. O VAX-1 era uma vacina monovalente de vírus de influenza eqüina inativado com adjuvante de HAVLOGEN®, (A/eqüino/KY/02), e cada dose continha HAVLOGEN® (10 % v/v), 6144 unidades de HA do vírus inativado, 0,1 % (v/v) de 10 % de timerosal, 0,1 % (v/v) de fenol vermelho, NaOH suficiente para ajustar o pH em 6,8 a 7,2, e PBS suficiente para trazer o volume de dose total para 1 ml. O VAX-2 era uma vacina monovalente de vírus de influenza eqüina inativado com adjuvante de HAVLOGEN®, (A/eqüino/KY/02), e cada dose de vacina continha HAVLOGEN® (10 % v/v), 4096 unidades de HA do vírus inativado, 0,1 % (v/v) de 10 % timerosal, 0,1 % (v/v) de fenol vermelho, NaOH suficiente para ajustar o pH em 6,8 a 7,2, e PBS suficiente para trazer o volume de dose total para 1 ml. O VAX-3 era uma vacina multivalente de influenza eqüina inativada com adjuvante de HAVLOGEN®, (A/eqüino/KY/02, A/eqüino/KY/93, e A/eqüino/NM/2/93), e continha HAVLOGEN® (10 % v/v), 2048 unidades de HA de vírus inativado por cepa, 0,1 % (v/v) de 10 % timerosal, 0,1 % (v/v) de fenol vermelho, NaOH suficiente para ajustar o pH em 6,8 a 7,2, e PBS suficiente para trazer o volume de dose total para 1 ml. Todos os vírus de influenza usados para a formulação de

vacina foram inativados através de etilenimina binária (BEI) usando um método padrão.

As vacinas e vias de administração para cada grupo são descritas na Tabela 46. Todos cães nos grupos vacinados foram vacinados por meio da via intranasal (IN) ou via subcutânea (SQ), e cada cão recebeu 2 doses. A segunda dose (isto é, reforço) foi administrada 4 semanas após a primeira dose. As amostras de sangue foram colhidas para avaliar a titulação de HI usando um protocolo padrão com um isolado de influenza canina de H3N8 nos dias zero (antes da vacinação), 7, e 14 pós-primeira e pós-segunda vacinações. Sete dias antes do desafio, os cães foram movidos da uma instalação de BSL-2 e alojados em jaulas individuais.

Todos os cães vacinados e de controle de idade equiparada foram desafiados oronasalmente com um vírus de influenza canina virulento ($10^{7.4}$ TCID₅₀ de A/Canine/Florida/242/2003 por cão) em 2 semanas pós-segunda vacinação. O vírus de desafio foi administrado como uma névoa usando um nebulizador (Nebulair®) em um volume de 2 ml por dia. Os cães foram observados para sinais clínicos relacionados à influenza por 14 dias pós-desafio. As amostras de sangue foram colhidas nos dias 7 e 14 pós-desafio para determinação de titulação de HI. Todos os cães foram eutanizados no dia 14 pós-desafio, e amostras do pulmão e da traquéia foram colhidas em 10 % de formalina tamponada para histopatologia. As tarefas de contagem de sinal clínico usadas para a observação pós-desafio estão mostradas na Tabela 47.

RESULTADOS:

Todos os cães vacinados por meio da via de SQ desenvolveram respostas de titulação de anticorpo de HI para o isolado de vírus de influenza canina, independente do tipo de vacina (Tabela 48). Nenhum dos cães dos grupos de vacinação IN (isto é, Grupos 1, 3, e 5) desenvolveram respostas de titulação de anticorpo de HI para o vírus de isolado de influenza canina, independente do tipo de vacina, durante o período de pós vacinação. Porém, houve um aumento de 4 vezes na titulação 14 pós-desafio em todos os cães indiretamente, indicando que todos os cães foram expostos ao vírus de de-

safio (Tabela 47).

Todos os cães exibiram um ou mais dos sinais clínicos a seguir de influenza canina: febre $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103,0^{\circ}\text{F}$), tosse, secreção ocular sorosa ou mucopurulenta, secreção nasal sorosa ou mucopurulenta, vômito, diarréia, depressão, perda de peso, e dispnéia. Vacinados tiveram sinais clínicos menos severos, comparados aos controles com idade equiparada (Tabela 49). Houve uma redução significativa nos sinais clínicos em cães vacinados com VAX-3 por meio da via de SQ (Grupo 4). Neste experimento, administração de IN ou VAX-1, VAX-2, ou VAX-3 não forneceu uma redução significativa nos sinais clínicos de vírus de influenza canina.

Como nos Exemplos 22 e 23, avaliação histopatológica das amostras de tecido pulmonar e traqueana para lesões foi conduzida para identificar lesões compatíveis ou patognômica para doença de influenza canina. Tabela 50 fornece um sumário da extensão das lesões neste experimento para os cães. Cinco dos 5 cães de controle (Grupo 6) tiveram consistência de lesões pulmonar com uma infecção de influenza. Dois dos 5 cães vacinados com VAX-2 por meio da via SC (Grupo 2) e 3 dos 5 cães vacinados com VAX-3 por meio da via de SC (Grupo 4) estavam livres de qualquer lesão pulmonar relacionada à influenza. Todos os cães que receberam a vacina por meio da via intranasal, independente do tipo de vacina, tiveram lesões pulmonares severas consistentes com uma infecção de influenza. As lesões de traquéia observadas neste estudo eram muito moderadas.

CONCLUSÃO:

Os resultados deste estudo demonstram que: (1) vírus de influenza eqüina inativado de H3N8 pode induzir respostas reativo cruzadas de anticorpo de HI do vírus de influenza canina em cães vacinados por meio da via SQ, (2) administração intranasal de vacina monovalente (VAX-1 e VAX-2) ou multivalente (VAX-3) não foi eficaz em cães, e (3) administração subcutânea de vacina multivalente (VAX-3) forneceu uma redução significativa ($P = 0,016$) na severidade da doença de vírus de influenza canina em cães.

Tabela 47. Sinais clínicos e sistema de contagem	
Sinais clínicos	Contagem por dia
Temp	
< 103,0°F (< 39,4°C)	0
103,0-103,9°F (39,4-39,9°C)	2
104,0-104,9°F (40,0-40,5°C)	3
>105,0°F (>40,6°C)	4
Tosse	
Nenhuma Tosse	0
Ocasional	2
Paroximal	4
Espirro	
Nenhum Espirro	0
Ocasional	1
Paroximal	2
Secreção nasal	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Secreção ocular	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Hemoptise	
Não	0
Sim	5

Tabela 47. Sinais clínicos e sistema de contagem	
Sinais clínicos	Contagem por dia
Depressão	
Não	0
Sim	1
Anorexia	
Não	0
Sim	1
Sinais respiratórios	
Nenhum	0
Estertores	3
Dispneia	4
Ofegante	5
Expectorado mucoso	
Não	0
Sim	2
Vômito	
Não	0
Sim	1
Anormalidades fecais	
Não	0
Sim	1

Tabela 48. Sorologia - Titulações de inibição de hemaglutinação												
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Número de doses	Titulação de HI							
					Dias pós vacinação						Dias pós-desafio	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
1	248	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	40
1	501	Vacinado	IN	2	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	160	160
1	502	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
1	469	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
1	46A	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
2	232	Vacinado	SQ	2	< 10	< 10	< 10	20	20	40	320	640
2	511	Vacinado	SQ	2	< 10	10	10	20	20	20	160	640
2	514	Vacinado	SQ	2	< 10	< 10	40	40	80	40	160	320
2	461	Vacinado	SQ	2	< 10	10	10	20	20	20	> 640	> 640
2	463	Vacinado	SQ	2	< 10	10	40	80	80	40	80	320
3	246	Vacinado	IN	2	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	40
3	505	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
3	506	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
3	464	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
3	465	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
4	23B	Vacinado	SQ	2	< 10	10	10	40	40	20	160	160

Tabela 48. -continuação-												
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Número de doses	Titulação de HI							
					Dias pós vacinação						Dias pós-desafio	
					0*	7	14	28**	35	42***	7	14
4	247	Vacinado	SQ	2	< 10	< 10	< 10	20	20	20	160	320
4	508	Vacinado	SQ	2	< 10	10	40	40	80	80	320	320
4	512	Vacinado	SQ	2	< 10	< 10	20	20	80	80	320	160
4	516	Vacinado	SQ	2	< 10	10	10	20	80	80	160	> 640
5	503	Vacinado	IN	2	< 10	10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
5	513	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
5	462	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	320
5	466	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	80
5	46B	Vacinado	IN	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
6	236	Controle	--	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
6	504	Controle	--	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	160	160
6	507	Controle	--	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
6	515	Controle	--	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160
6	468	Controle	--	2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	160

* Primeira vacinação

** Segunda vacinação

*** Dia do desafio

Tabela 49. Análise das contagens clínicas totais da doença de influenza canina				
Grupo	Tratamento	Via de vacinação	Contagem total média por cão	valor P*
1	VAX-1	IN	35,2	0,500 (Grupo 1 vs. 6)
2	VAX-2	SQ	31,0	0,345 (Grupo 2 vs. 6)
3	VAX-2	IN	39,4	0,631 (Grupo 3 vs. 6)
4	VAX-3	SQ	13,0	0,016 (Grupo 4 vs. 6)
5	VAX-3	IN	42,6	0,790 (Grupo 4 vs. 6)
6	Controle	--	36,8	--

* Analisado usando um procedimento de NPARIWAY de SAS® Versão 8.2 (os grupos de vacina foram comparados usando o teste de soma de classificação de Wilcoxon)

Tabela 50. Avaliação histopatológica das amostras de tecido						
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Número de doses	Lesão microscópica (Histopatologia)	
					Pulmão	Traquéia
1	248	Vacinado	IN	2	+	-
1	501	Vacinado	IN	2	+	-
1	502	Vacinado	IN	2	+	-
1	469	Vacinado	IN	2	+	+
1	46A	Vacinado	IN	2	+	+
2	232	Vacinado	SQ	2	+	-
2	511	Vacinado	SQ	2	+	-
2	514	Vacinado	SQ	2	-	-
2	461	Vacinado	SQ	2	+	-
2	463	Vacinado	SQ	2	-	-

Tabela 50. Avaliação histopatológica das amostras de tecido						
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Número de doses	Lesão microscópica (Histopatologia)	
					Pulmão	Traquéia
3	246	Vacinado	IN	2	+	-
3	505	Vacinado	IN	2	+	-
3	506	Vacinado	IN	2	+	+
3	464	Vacinado	IN	2	+	-
3	465	Vacinado	IN	2	+	+
4	23B	Vacinado	SQ	2	-	-
4	247	Vacinado	SQ	2	+/-	-
4	508	Vacinado	SQ	2	-	-
4	512	Vacinado	SQ	2	-	+/-
4	516	Vacinado	SQ	2	+	+
5	503	Vacinado	IN	2	+	+/-
5	513	Vacinado	IN	2	+	+
5	462	Vacinado	IN	2	+	+/-
5	466	Vacinado	IN	2	+	+
5	46B	Vacinado	IN	2	+	-
6	236	Controle	--	2	+	-
6	504	Controle	--	2	+	+
6	507	Controle	--	2	+	+
6	515	Controle	--	2	+	+/-
6	468	Controle	--	2	+	+

"+" Lesão severa consistente ou patogênica para uma infecção de influenza

"+/-" Lesão moderada (inconclusa)

"-" Normal

EXEMPLO 25 - ESTUDO DE EFICÁCIA DA VACINA DE INFLUENZA CA-

5 NINA

Doença de influenza canina é causada por um vírus de influenza de H3N8 (CIV). CIV é muito estritamente relacionado ao vírus de H3N8 e-

quino (Crawford et al., 2005) e infeta todos os cães expostos. Cerca de 80 % dos cães expostos desenvolvem sinais clínicos. No estudo a seguir a eficácia de uma vacina de vírus de influenza eqüina inativado de H3N8 e uma vacina de vírus de influenza canina foi determinada.

5 PROCEDIMENTO:

Trinta e cinco bigles e cinco cães mestiços foram usados neste estudo. Bigles foram atribuídos fortuitamente a três grupos (Tabela 51). Todos os cães mestiços foram atribuídos ao grupo de controle (Grupo 3). Todos os cães foram alimentados com uma dieta de crescimento padrão e água estava disponível à vontade.

Tabela 51. Projeto experimental					
Grupo	Tratamento	Via de vacinação	Número de cães	Idade na vacinação (semanas)	Desafio
1	VAX-1	IM	15	8 & 12	Sim
2	VAX-2	SC	5	8 & 12	Sim
3	Controle	N/A	20	N/A	Sim

Os cães nos Grupos 1 e 2 foram vacinados com VAX-1 ou VAX-2 (Tabela 51). VAX-1 era uma vacina de vírus de influenza eqüina inativado com adjuvante de HAVLOGEN®, (A/eqüino/KY/02). Para preparação da vacina, o vírus de vacina foi inativado através de etilenimina binária (BEI) usando um método padrão. Cada dose de vacina continha HAVLOGEN® (10 % v/v), 6144 unidades de HA do vírus inativado, 0,1 % (v/v) de 10 % timersal, 0,1 % (v/v) de fenol vermelho e PBS suficiente para trazer o volume de dose total para 1 ml e NaOH suficiente para ajustar o pH em 6,8 a 7,2.

VAX-2 era uma vacina de antígeno de influenza canina inativada, com adjuvante de CARBIGEN®, (A/canine/FI/43/2004). O A/canine/FI/43/2004 foi inativado através de etilenimina binária ("BEI") usando um método padrão. Cada dose da vacina continha 5 % em massa de CARBIGEN®, aproximadamente 1280 unidades de HA do vírus inativado, PBS suficiente para trazer o volume total da dose para 1 ml, e NaOH suficiente para ajustar o pH para entre 7,2 e 7,4. As amostras de soro de todos os cães foram colhidas no dia das primeira e segunda vacinações, dias 7 e 14 pós-primeira e

pós-segunda vacinações, e no pré-desafio para determinar as titulações de HI usando um protocolo padrão de vírus de influenza eqüina de H3N8 (SAM 124, CVB, USDA, Ames, IA). Sete dias antes do desafio, os cães foram movidos para uma instalação de ABSL-2 e alojados em jaulas individuais.

- 5 Todos cães vacinados e de controle de idade equiparada foram desafiados oronasalmente com vírus de influenza canina virulento ($10^{7.2}$ TCID₅₀ de A/Canine/Florida/242/2003 por cão) em 2 semanas pós-segunda vacinação. O vírus de desafio foi administrado como uma névoa (2 ml/cão) usando um nebulizador (Nebulair®). Os cães foram observados para sinais
- 10 clínicos relacionados à influenza por 14 dias pós-desafio. Esfregaços nasais e orofaríngeos foram colhidos diariamente em tubos contendo 2 ml de meio de transporte de vírus para isolamento do vírus do dia -1 (isto é, um dia antes de desafio) ao dia 14 pós-desafio. Amostras de sangue foram colhidas nos dias 7 e 14 pós-desafio para determinação de titulação de HI. As tarefas
- 15 de contagem de sinal clínico usadas para observação de pós-desafio são mostradas na Tabela 52.

RESULTADOS:

- Todos cães vacinados (Grupos 1 e 2) desenvolveram respostas de titulação de anticorpo de HI ao vírus de isolado de influenza canina (Ta-
- 20 bela 53). Todos os cães exibiram um ou mais dos sinais a seguir de influenza canina: febre $>39,4^{\circ}\text{C}$ ($>103,0^{\circ}\text{F}$), tosse, secreção ocular sorosa ou mucopurulenta, secreção nasal sorosa ou mucopurulenta, vômito, diarreia, depressão, e anorexia. Vacinados tinham sinais clínicos menos severos, comparados aos controles com idade equiparada (Tabela 54). Houve uma redu-
- 25 ção significativa ($P < 0,001$) nos sinais clínicos em cães vacinados com VAX-1 (Grupo 1) ou VAX-2 (Grupo 2).

- Os resultados do isolamento de vírus estão mostrados nas Tabelas 55 e 56. Seguindo um desafio de vírus de influenza canina virulento, o vírus de influenza canina foi isolado de 5 de 15 (33 %) cães do Grupo 1
- 30 (VAX-1), 0 de 5 (0 %) cães do Grupo 2 (VAX-2) e 17 de 20 (85 %) de controles (Grupo 3). Tanto a vacina de influenza eqüina inativada (VAX-1) como a vacina de vírus de influenza canina (VAX-2) demonstraram uma redução

significativa ($P = 0,004$) na eliminação do vírus em secreções nasais ou orais ou ambas (Tabela 55) comparados aos controles.

CONCLUSÃO:

- Os resultados deste estudo demonstram que: (1) vacinas de vírus de influenza eqüina inativado de H3N8 e de vírus de influenza canina podem induzir respostas reativas de anticorpo de HI de vírus de influenza canina em cães vacinados, (2) uso de uma vacina de vírus de influenza eqüina de H3N8 ou de vírus de influenza canina pode reduzir a severidade da doença do vírus de influenza canina em cães, e (3) uso de uma vacina de vírus de influenza eqüina de H3N8 ou de vírus de influenza canina pode reduzir a excreção de vírus em secreções nasais e/ou orais.

Tabela 52. Sinais clínicos e sistema de classificação	
Sinais clínicos	Classificação por dia
Temp	
< 39,4°C (< 103,0°F)	0
39,4-39,9°C (103,0-103,9°F)	2
40,0-40,5°C (104,0-104,9°F)	3
>40,6°C (>105,0°F)	4
Tosse	
Nenhuma Tosse	0
Ocasional	2
Paroximal	4
Espirro	
Nenhum Espirro	0
Ocasional	1
Paroximal	2
Secreção nasal	
Nenhuma secreção	0
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Secreção ocular	
Nenhuma secreção	0

Tabela 52. Sinais clínicos e sistema de classificação	
Sinais clínicos	Classificação por dia
Sorosa - suave	1
Sorosa - copiosa	1
Mucopurulenta - leve	2
Mucopurulenta - copiosa	3
Hemoptise	
Não	0
Sim	5
Depressão	
Não	0
Sim	1
Anorexia	
Não	0
Sim	1
Sinais respiratórios	
Nenhum	0
Estertores	3
Dispneia	4
Ofegante	5
Expectorado mucoso	
Não	0
Sim	2
Vômito	
Não	0
Sim	1
Anormalidades fecais	
Não	0
Sim	1

Tabela 53. Sorologia - Titulações de inibição de hemaglutinação												
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Titulação de HI								
				Dias pós vacinação					Dias pós-desafio			
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14	
1	SIM	Vacinado	IM	< 10	< 10	< 10	20	40	40	80	≥ 640	
1	AZV	Vacinado	IM	< 10	< 10	< 10	20	40	40	160	≥ 640	
1	BAD	Vacinado	IM	< 10	< 10	< 10	40	40	80	80	320	
1	BAE	Vacinado	IM	< 10	< 10	10	20	20	20	40	320	
1	BAH	Vacinado	IM	< 10	< 10	10	10	40	40	160	≥ 640	
1	BAJ	Vacinado	IM	< 10	< 10	10	20	80	80	40	320	
1	BAN	Vacinado	IM	< 10	10	10	20	40	40	40	320	
1	BBN	Vacinado	IM	< 10	10	10	20	80	80	40	320	
1	BBT	Vacinado	IM	< 10	< 10	< 10	20	40	40	40	160	
1	BBY	Vacinado	IM	< 10	< 10	< 10	20	80	80	160	≥ 640	
1	BCS	Vacinado	IM	< 10	10	40	40	160	160	160	160	
1	BCZ	Vacinado	IM	< 10	10	10	20	80	40	160	160	
1	BDP	Vacinado	IM	< 10	< 10	< 10	20	40	40	80	≥ 640	
1	BEE	Vacinado	IM	< 10	10	20	40	80	80	160	320	

Tabela 53. -continuação-

[illegible]

Tabela 53. -continuação-											
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Titulação de HI							
				Dias pós vacinação				Dias pós-desafio			
				0*	7	14	28**	35	42***	7	14
3	BCC	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	320
3	BCD	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	≥ 640
3	BCG	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	≥ 640
3	BCI	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20	320
3	BCL	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	≥ 640
3	BCV	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	40	320
3	BDU	Controle	N/A	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	80	≥ 640
3	MFI	Controle	N/A	NT	NT	NT	NT	< 10	< 10	80	320
3	MFJ	Controle	N/A	NT	NT	NT	NT	< 10	< 10	40	320
3	MFK	Controle	N/A	NT	NT	NT	NT	< 10	< 10	80	320
3	MFR	Controle	N/A	NT	NT	NT	NT	< 10	< 10	80	320
3	MFS	Controle	N/A	NT	NT	NT	NT	< 10	< 10	160	≥ 640

* Primeira vacinação

** Segunda vacinação

*** Dia do desafio

Tabela 54. Análise das contagens clínicas totais de doença de influenza canina			
Grupo	Tratamento	Contagem total média por cão	valor P*
1	VAX-1	9,1	< 0,001 (Grupo 1 vs. 3)
2	VAX-2	5,4	< 0,001 (Grupo 2 vs. 3)
3	Controle	24,1	--

* Analisado usando um procedimento de NPARIWAY de SAS® Versão 9.1 (os grupos de vacina foram comparados usando o procedimento de GLM)

Tabela 55. Eliminação do vírus pós-desafio			
Grupo	Tratamento	Porcentagem de cães que excretaram o vírus	valor P*
1	VAX-1	33 % (5/15)	0,004 (Grupo 1 vs. 3)
2	VAX-2	0 % (0/5)	0,004 (Grupo 2 vs. 3)
3	Controle	85 % (17/20)	--

* Analisado usando um procedimento de FREQ de SAS® (Versão 9.1) e valor P associado ao teste exato de Fisher

Tabela 56. Sorologia - Titulações de inibição de hemaglutinação

[illegible]

Tabela 56. -continuação-																			
No do Grupo	ID do cão	Tratamento	Via de vacinação	Dias pós-desafio															
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	BCI	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P							N	N	N	N
3	BCL	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BCV	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	BDU	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFI	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFJ	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFK	Controle	N/A	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFR	Controle	N/A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	MFS	Controle	N/A	N	N	N	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N

N - Nenhum vírus isolado de esfregaços orais ou nasais

P - Vírus isolado de esfregaços nasais ou orais ou nasais e orais.

Tabela 57. Similaridades de seqüência de aminoácido de gene de hemaglutinina, neuraminidase e nucleoproteína entre os vírus de influenza

Gene (Canine/Florida/ 43/2004)	Similaridade de seqüência de aminoácido	Gene do vírus de influenza usado para comparação
Hemaglutinina	88	eqüino/Algiers/72
HA	90	eqüino/Sao Paulo/6/69
HA	91	eqüino/Miami/1/63
HA	93	eqüino/Newmarket/79
HA	94	eqüino/Kentucky/1/81
HA	95	Equi-2/Ludhiana/87
HA	96	Eqüino/Alaska/1/91
HA	97	eqüino/Tennessee/5/86
HA	98	eqüino/Kentucky/5/02
HA	99	eqüino/Ohio/1/2003
HA	99	canine/Florida/242/2003
Neuraminidase	88	Eq/Algiers/72
NA	90	eqüino/Sao Paulo/6/69
NA	91	eqüino/Miami/1/63
NA	93	eqüino/Newmarket/79
NA	94	eqüino/Kentucky/1/81
NA	95	Equi-2/Ludhiana/87
NA	96	eqüino/Santiago/85
NA	97	eqüino/Tennessee/5/86
NA	98	eqüino/Kentucky/5/2002
NA	99	eqüino/Ohio/1/2003
NA	99	canine/Florida/242/2003
Nucleoproteína ("NP")	94	equi/Miami/1/63
NP	97	eqüino/Kentucky/1/81
NP	99	eqüino/Kentucky/5/02

Tabela 57. Similaridades de seqüência de aminoácido de gene de hemaglutinina, neuraminidase e nucleoproteína entre os vírus de influenza

Gene (Canine/Florida/43/2004)	Similaridade de seqüência de aminoácido	Gene do vírus de influenza usado para comparação
NP	99	eqüino/Ohio/1/2003
NP	99	canine/Florida/242/2003

As palavras "compreendem", "compreende", e "compreendendo" nesta patente (incluindo as reivindicações) são para ser interpretadas inclusivamente ao invés de exclusivamente. Esta interpretação é intencionada ser igual à interpretação que estas palavras são dadas sob lei de patentes dos

5 Estados Unidos.

A descrição detalhada acima das modalidades preferidas é intencionada apenas para familiarizar outros versados na técnica com a invenção, seus princípios, e sua aplicação prática de forma que outros versados na técnica possam adaptar e aplicar a invenção em suas numerosas formas, como elas podem ser melhores adaptadas aos requerimentos de um uso

10 particular. Portanto, esta invenção não é limitada às modalidades acima, e pode ser variadamente modificada.

Deveria ser entendido que os exemplos e modalidades descritos aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou

15 alterações na luz da mesma serão sugeridas às pessoas versadas na técnica e serão incluídas dentro do espírito e esfera deste pedido de patente.

REFERÊNCIAS

- Patente U. S. Nº 5.106.739
- Patente U. S. Nº 5.034.322
- Patente U. S. Nº 6.455.760
- 5 Patente U. S. Nº 6.696.623
- Patente U. S. Nº 4.683.202
- Patente U. S. Nº 4.683.195
- Patente U. S. Nº 4.800.159
- Patente U. S. Nº 4.965.188
- 10 Patente U. S. Nº 5.994.056
- Patente U. S. Nº 6.814.934
- Patente U. S. Nº 6.436.408
- Patente U. S. Nº 6.398.774
- Patente U. S. Nº 6.177.082
- 15 Pedido de Patente Publicado U. S. Nº 20040078841
- Pedido de Patente Publicado U. S. Nº 20040067506
- Pedido de Patente Publicado U. S. Nº 20040019934
- Pedido de Patente Publicado U. S. Nº 20030177536
- Pedido de Patente Publicado U. S. Nº 20030084486
- 20 Pedido de Patente Publicado U. S. Nº 20040123349
- Greyhound Daily News, 1/28/99. National Greyhound Association (NGA), Abilene, Kansas. <http://www.NGAgreyhounds.com>.
- Comunicação pessoal, Dr. William Duggar, veterinário no Palm Beach Kennel Club, West Palm Beach, Flórida.
- 25 Altschul, S. F. *et al.* (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" *J. Mol. Biol.* 215:402-410.
- Altschul, S. F. *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs" *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- An, G. (1987) "Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis" *Methods Enzymol.* 153:292-305.
- 30 Beltz, G. A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by

- filter hybridization methods" *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman e K. Moldave [eds.] Academic Press, Nova Iorque 100:266-285.
- Burleson, F. *et al.* (1992) *Virology: A Laboratory Manual* (Academic Press).
- Byars, N. E., A. C. Allison (1987) "Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity" *Vaccine* 5:223-228.
- 5 Crawford, P. C. *et al.* (2005) "Transmission of equine influenza virus to dogs" *Science* 310:482-485.
- Chang, C. P. *et al.* (1976) "Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan" *Int J Zoonoses* 3:61-64.
- 10 Dacso, C. C. *et al.* (1984) "Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections" *J Clin Microbiol* 20:833-835.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(1):21-25.
- 15 Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* 5:164.
- Fields *et al.* (1946) *Fields Virology*, 3ª ed., editores Lippincott-Raven.
- Ford, R. B., Vaden, S. L. (1998) "Canine infectious tracheobronchitis" Em *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2ª edição, C. E. Greene, editor, W. B. Saunders Co., Filadélfia, PA, páginas 33-38.
- 20 Fouchier *et al.*, (2000) *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11):4096-4101.
- Good, X. *et al.* (1994) "Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase" *Plant Molec. Biol.* 26:781-790.
- Guan, Y. *et al.* (2004) "H5N1 influenza: a protean pandemic threat" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8156-8161.
- 25 Guo, Y. *et al.* (1992) "Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China" *Virology* 188:245-255.
- Houser, R. E. *et al.* (1980) "Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza" *Can J Comp Med* 44:396-402.
- 30 Karasin, A. I. *et al.* (2000) "Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada" *J Virol* 74:9322-9327.
- Karlin S. e Altschul, S. F. (1990) "Methods for Assessing the Statistical Signi-

- ficance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268.
- Karlin S. e Altschul, S. F. (1993) "Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.
- Kawaoka, Y. *et al.*, (1989) "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics" *J Virol* 63:4603-4608.
- Keawcharoen, J. *et al.* (2004) "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards" *Emerg Infect Dis* 10:2189-2191.
- 10 Kendal, A. P. *et al.* (1982) Em Concepts and Procedures for Laboratory-based Influenza Surveillance. A. P. Kendal, M. S. Pereira, J. J. Skehel, Eds. (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and Pan-American Health Organization, Atlanta, GA, Estados Unidos) páginas B17-B35.
- 15 Kilbourne, E. D. *et al.* (1975) "Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs" *Intervirology* 6:315-318.
- Kimura, K. *et al.* (1998) "Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host" *Mayo Clin Proc* 73:243-245.
- 20 Klimov, A. I. *et al.* (1992a) "Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variants of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus" *Virology* 186:795-797.
- Klimov A. *et al.* (1992b) "Subtype H7 influenza viruses: comparative antigenic and molecular analysis of the HA-, M-, and NS-genes" *Arch Virol.* 122:143-161.
- 25 Kovacova, A. *et al.* (2002) "Sequence similarities and evolutionary relationships of influenza virus A hemagglutinins" *Virus Genes* 24:57-63.
- Kuiken, T. *et al.* (2004) "Avian H5N1 influenza in cats" *Science* 306:241.
- Kumar, S. *et al.* (2004) "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment" *Brief Bioinform* 5:150-163.
- 30 Lee, L. G. *et al.* (1993) "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes" *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-3766.

- Lewin, B. (1985) Genes II, John Wiley & Sons, Inc., pág. 96.
- Lipatov, A. S. *et al.* (2004) "Influenza: emergence and control" *J Virol* 78:8951-8959.
- Livak, K. J. *et al.* (1995) "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite
5 ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization" *PCR Methods Appl.* 4(6):357-362.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982) "Nuclease *Ba*31" *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 10 Matrosovich, M. *et al.* (2000) "Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals" *J Virol* 74:8502-8512.
- Maertzdorf *et al.*, (2004) *Clin Microbiol.* 42(3):981-986.
- Merrifield, R. B. (1963) "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a
15 Tetrapeptide" *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154.
- Nikitin, A. *et al.* (1972) "Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs" *Bull World Health Organ* 47:471-479.
- Nobusawa, E. *et al.* (1991) "Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of
20 influenza A viruses" *Virology* 182:475-485.
- Patriarca, P. A. *et al.* (1984) "Lack of significant person-to person spread of swine influenza-like virus following fatal infection in an immunocompromised child" *Am J Epidemiol* 119:152-158.
- Payungporn S. *et al.* (2006a) "Detection of canine influenza A virus (H3N8)
25 RNA by real-time RT-PCR" (na preparação para *Journal of Clinical Microbiology*).
- Payungporn S, *et al.* (2006b) "Isolation and characterization of influenza A subtype H3N8 viruses from dogs with respiratory disease in a shelter and veterinary clinic in Florida" (na preparação para *Emerging Infectious Diseases*).
30
- Peiris, M. *et al.* (1999) "Human infection with influenza H9N2" *Lancet* 354:916-917.

- Peiris, J. S. *et al.* (2004) "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease" *Lancet* 363:617-619.
- Posnett, D. N. *et al.* (1988) "A Novel Method for Producing Anti-peptide Antibodies" *J. Biol. Chem.* 263(4):1719-1725.
- 5 Putnam, Bob (10 de fevereiro de 1999) "Two illnesses seen in death of dogs" *St. Petersburg Times*.
- Reid, A. H. *et al.* (2004) "Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus" *Nat Rev Microbiol* 2:909-914.
- Rowe, T. *et al.* (1999) "Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays" *J Clin Microbiol* 37: 937-943.
- 10 Saiki, R. (1985) "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" *Science* 230:1350-1354.
- 15 Sambrook, J. *et al.* (1989) "Plasmid Vectors" Em: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edição, págs. 1.82-1.104. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque.
- Subbarao, K. *et al.* (1998) "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness" *Science* 279:393-
- 20 396.
- Suzuki, Y. *et al.* (2000) "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses" *J Virol* 74:11825-11831.
- Tam, J. P. (1988) "Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System" *PNAS USA*
- 25 85(15):5409-5413.
- Top, Jr., F. H. *et al.* (1977) "Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). IV. Summary and speculation" *J Infect Dis* 136 Suppl:S376-S380.
- Vines, A. *et al.* (1998) "The role of influenza A virus hemagglutinin residues
- 30 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction" *J Virol* 72:7626-7631.
- Wagner, R. *et al.* (2002) "N-Glycans attached to the stem domain of hae-

- magglutinin efficiently regulate influenza A virus replication" *J Gen Virol* 83:601-609.
- Webby, R. *et al.* (2004) "Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens" *Nat Med* 10:S77-S81.
- 5 Webster, R. G. (1998) "Influenza: an emerging disease" *Emerg Infect Dis.* 4:436-441.
- Webster, R. G. *et al.* (1992) "Evolution and ecology of influenza A viruses" *Microbiol Rev.* 56 :152-179.
- Weis, W. *et al.* (1988) "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid" *Nature* 333:426-431.
- 10 Womble, D. D. (2000) "GCG: The Wisconsin Package of sequence analysis programs" *Methods Mol Biol* 132:3-22.
- Xu, D., McElroy, D., Thornburg, R. W., Wu, R. *et al.* (1993) "Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants" *Plant Molecular Biology* 22:573-588.
- 15 Yang, T. T. *et al.* (1996) "Optimized Codon Usage and Chromophore Mutations Provide Enhanced Sensitivity with the Green Fluorescent Protein" *Nucleic Acid Research* 24(22):4592-4593.
- Yoon K-Y. *et al.* (2005) "Influenza virus infection in racing greyhounds" *Emerg Infect Dis.* 11:1974-1975.
- 20

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Crawford, Patti Cynthia
 Gibbs, E. Paul J.
 Dubovi, Edward J.
 Donis, Ruben Omar
 Katz, Jacqueline M.
 Klimov, Alexander I.
 Lakshmanan, Nallakannu P.
 Lum, Melissa Anne
 Goovaerts, Daniel Ghislène Emiel
 Mellencamp, Mark William

<120> **VÍRUS DE INFLUENZA CAPAZES DE INFECTAR CANÍDEOS, USOS DOS**
 <130> **MESMOS**

<150> US 11/409,416
 <151> 2006-04-21

<150> US 60/728,449
 <151> 2005-10-19

<150> US 60/754,881
 <151> 2005-12-29

<150> US 60/759,162
 <151> 2006-01-14

<150> US 60/761,451
 <151> 2006-01-23

<150> US 60/779,080
 <151> 2006-03-03

<160> 88

<170> Patente em versão 3.3

<210> 1
 <211> 2277
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (2277)

<400> 1
 atg gag aga ata gaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc 48
 Met Glu Arg Ile Glu Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15

cgc gag ata cta aca aaa act act gtg gac cac atg gcc ata atc aag 96
 Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

aaa tac aca tca gaa aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa 144
 Lys Tyr Thr Ser Glu Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys

35	40	45	
tgg atg atg gca atg aaa tac cca att aca gca gat aag agg ata atg Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met 50 55 60			192
gag atg att cct gag aga aat gaa cag ggt caa acc ctt tgg agc aaa Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys 65 70 75 80			240
acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val 85 90 95			288
aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg agc aca att cat tat cca Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro 100 105 110			336
aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly 115 120 125			384
act ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg 130 135 140			432
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac ctc agt gcc aaa gaa gca caa Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln 145 150 155 160			480
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc ata att Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Ile Ile 165 170 175			528
cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu 180 185 190			576
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu 195 200 205			624
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gca ggc gga aca Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr 210 215 220			672
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp 225 230 235 240			720
gag caa atg tac acc cca gga gga gaa gtt aga aac gat gat att gat Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp 245 250 255			768
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gcg aca gta Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260 265 270			816
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln			864

275	280	285	
att ggt gga ata agg atg gta gac atc ctt aag cag aat cca aca gag Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu 290 295 300			912
gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca gca atg gga ttg aga att agc Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305 310 315 320			960
tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc ttc aaa aga aca agt gga tca Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser 325 330 335			1008
tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt acg ggc aac ctt caa aca ttg Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu 340 345 350			1056
aaa ata aga gtg cat gag ggc tat gaa gaa ttc aca atg gtc gga aga Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg 355 360 365			1104
aga gca aca gcc att atc aaa aag gca acc aga aga ttg att caa ttg Arg Ala Thr Ala Ile Ile Lys Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu 370 375 380			1152
ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca att gct gaa gca ata att gta Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val 385 390 395 400			1200
gcc atg gtg ttt tgc caa gaa gat tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly 405 410 415			1248
gat ttg aac ttt gtt aat aga gca aat cag cgt ttg aac ccc atg cat Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His 420 425 430			1296
caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc cac aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe His Asn 435 440 445			1344
tggt gga att gaa ccc atc gac aat gta atg ggg atg att gga ata ttg Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu 450 455 460			1392
cct gac atg acc cca agc acc gag atg tca ttg aga gga gtg aga gtc Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val 465 470 475 480			1440
agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc agc act gag aga gtg gtg gtg Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val 485 490 495			1488
agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg gat caa agg gga aac ata cta Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu 500 505 510			1536
ctg tcc cct gaa gaa gtc agt gaa aca caa gga acg gaa aag ctg aca Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr			1584

515	520	525	
ata att tat tgc tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser 530 535 540			1632
gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc agg aac tgg gaa att gta Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val 545 550 555 560			1680
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu 565 570 575			1728
ttt gag cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr 580 585 590			1776
agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly 595 600 605			1824
aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala 610 615 620			1872
cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val 625 630 635 640			1920
aga ggt tgc gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe 645 650 655			1968
aac tac aat aaa gcc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala 660 665 670			2016
ggg gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gaa tct Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser 675 680 685			2064
gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gag aac aag aga tat Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr 690 695 700			2112
ggc cca gca cta agc atc aat gaa cta agc aaa ctt gca aaa ggg gag Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu 705 710 715 720			2160
aaa gcc aat gta cta att ggg caa ggg gac gta gtg ttg gta atg aaa Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys 725 730 735			2208
cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act gac agc cag aca gcg acc aaa Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys 740 745 750			2256
agg att cgg atg gcc atc aat Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn			2277

755

<210> 2
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 2

Met Glu Arg Ile Glu Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Glu Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
 85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro
 100 105 110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
 115 120 125

Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
 130 135 140

Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
 145 150 155 160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Ile Ile
 165 170 175

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr
210 215 220

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
275 280 285

Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Lys Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe His Asn
435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr
580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
755

<210> 3
<211> 2274
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2274)

<400> 3
atg gat gtc aat ccg act cta ctc ttc tta aag gtg cca gcg cag aat 48
Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
1 5 10 15
gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat 96
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
20 25 30
gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa 144
Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
35 40 45
tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca 192
Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
50 55 60
caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agc 240
Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
65 70 75 80
ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa 288
Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
85 90 95
gaa tcc cat cca gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag 336
Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
100 105 110

gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr 115 120 125	384
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala 130 135 140	432
aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg act tcc aat gaa tcg Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser 145 150 155 160	480
ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys 165 170 175	528
gaa gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg 180 185 190	576
gac aac atg aca aag aga atg gta aca cag aga acc ata ggg aag aaa Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys 195 200 205	624
aaa caa cga tta aac aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu 210 215 220	672
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala 225 230 235 240	720
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga ggg ttt gta tat ttt gtt gaa Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu 245 250 255	768
aca cta gct cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro 260 265 270	816
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys 275 280 285	864
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly 290 295 300	912
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala 305 310 315 320	960
atg atc aca tac ata act aga aac cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val 325 330 335	1008
cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly 340 345 350	1056

aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile 355 360 365	1104
cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser 370 375 380	1152
aca aaa aag aaa att gag aag ata cga cca ctt ctg gtt gac ggg act Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr 385 390 395 400	1200
gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser 405 410 415	1248
act gtg ctg ggt gta tcc ata tta aac ctg ggc cag agg aaa tac aca Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr 420 425 430	1296
aag acc aca tac tgg tgg gat ggt ctg caa tca tcc gat gac ttt gct Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala 435 440 445	1344
ttg ata gtg aat ggc cct aat cat gaa gga gta caa gct gga gta gac Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Val Gln Ala Gly Val Asp 450 455 460	1392
aga ttc tat aga act tgc aaa ctg gtc ggg atc aac atg agc aaa aag Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys 465 470 475 480	1440
aag tcc tac ata aat aga act gga aca ttc gaa ttc aca agc ttt ttc Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe 485 490 495	1488
tac cgg tat ggt ttt gta gcc aat ttc agc atg gaa cta ccc agt ttt Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe 500 505 510	1536
ggg gtt tcc gga ata aat gaa tct gca gac atg agc att gga gtg aca Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr 515 520 525	1584
gtc atc aaa aac aac atg ata aat aat gat ctc ggt cct gcc acg gca Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala 530 535 540	1632
caa atg gca ctc caa ctc ttc att aag gat tat cgg tac aca tac cgg Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg 545 550 555 560	1680
tgc cat aga ggt gat acc cag ata caa acc aga aga tct ttt gag ttg Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu 565 570 575	1728
aag aaa ctg tgg gaa cag act cga tca aag act ggt cta ctg gta tca Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser 580 585 590	1776

gat ggg ggt cca aac cta tat aac atc aga aac cta cac atc ccg gaa 1824
 Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
 595 600 605

gtc tgt tta aaa tgg gag cta atg gat gaa gat tat aag ggg agg cta 1872
 Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610 615 620

tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc 1920
 Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
 625 630 635 640

aac agt gca gta gta atg cct gcg cat ggc cct gcc aaa agc atg gag 1968
 Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655

tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg 2016
 Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670

tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga gta ctc gaa gat gag cag atg 2064
 Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Val Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685

tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca 2112
 Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700

tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gtg tcc 2160
 Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720

agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag 2208
 Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
 725 730 735

aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag 2256
 Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
 740 745 750

ctc aga cgg caa aaa tag 2274
 Leu Arg Arg Gln Lys
 755

<210> 4
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 4

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
 50 55 60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
 85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
 100 105 110

Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
 115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
 130 135 140

Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
 165 170 175

Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
 180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
 195 200 205

Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
 210 215 220

Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
 225 230 235 240

Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
 245 250 255

Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
 260 265 270

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
 275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
 290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
 305 310 315 320

Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 355 360 365

Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
 370 375 380

Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
 405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr
 420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
 435 440 445

Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Val Gln Ala Gly Val Asp
 450 455 460

Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
 465 470 475 480

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510

Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
 515 520 525

Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
 530 535 540

Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
 545 550 555 560

Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu
 565 570 575

Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser
 580 585 590

Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
 595 600 605

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610 615 620

Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
 625 630 635 640

Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655

Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670

Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Val Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685

Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700

Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
 725 730 735

Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
 740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys
755

<210> 5
<211> 2151
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2151)

```

<400> 5
atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt      48
Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
1          5          10          15

gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca      96
Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
          20          25          30

aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac      144
Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
          35          40          45

tcg gat ttt cac ttt att aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag      192
Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
          50          55          60

tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag      240
Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
65          70          75          80

ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac      288
Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
          85          90          95

acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat      336
Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
          100          105          110

aag gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac      384
Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
          115          120          125

ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat      432
Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
          130          135          140

atc cac att ttc tca ttt aca gga gag gaa atg gct aca aaa gcg gac      480
Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
145          150          155          160

tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc      528
Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
          165          170          175

```

acc ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg 180 185 190	576
cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa ata aca Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr 195 200 205	624
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser 210 215 220	672
agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat gtg gat gga ttc gaa ccg aac ggc Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly 225 230 235 240	720
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aga Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg 245 250 255	768
atc gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly 260 265 270	816
ggg cca ccc tgc cat cag cga tct aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu 275 280 285	864
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag gga ata cca cta Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu 290 295 300	912
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro 305 310 315 320	960
agt att gtt aaa cca cat gaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln 325 330 335	1008
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu 340 345 350	1056
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp 355 360 365	1104
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys 370 375 380	1152
aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa gca Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala 385 390 395 400	1200
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aaa gct tgt gag Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu 405 410 415	1248

ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val 420 425 430	1296
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala 435 440 445	1344
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata ata aaa gga gtg tac Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Ile Lys Gly Val Tyr 450 455 460	1392
atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe 465 470 475 480	1440
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg 485 490 495	1488
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg 500 505 510	1536
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr 515 520 525	1584
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu 530 535 540	1632
att gga gac atg ctt cta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro 545 550 555 560	1680
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys 565 570 575	1728
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile 580 585 590	1776
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr 595 600 605	1824
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser 610 615 620	1872
ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu 625 630 635 640	1920
tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu 645 650 655	1968

ggg ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt 2016
 Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

aag gat gac ctg gaa cct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa 2064
 Lys Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685

tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca 2112
 Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700

tct tgg ttc aac tcc ttc ctt aca cat gca ctg aag tag 2151
 Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

<210> 6

<211> 716

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 6

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
165 170 175

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg
245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala
385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Ile Lys Gly Val Tyr
450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
660 665 670

Lys Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 7
<211> 838
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(657)

<400> 7
atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg 48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1 5 10 15
cat gtc cgc aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc 96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
20 25 30
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc 144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata 192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
50 55 60
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc 240
Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
att gcc tct gtt cct act tca ctc tac tta act gac atg act ctt gat 288
Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Leu Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
85 90 95
gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca 336

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
 100 105 110
 ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc 384
 Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125
 ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa ggg ctg gaa aca cta 432
 Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
 130 135 140
 ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att 480
 Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160
 tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175
 gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190
 aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gag 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205
 aat ggg aga cct tca ttc cct tca aag cag aaa tgaaaaatgg agagaacaat 677
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
 210 215
 taagccagaa atttgaagaa ataagatggg tgattgaaga agtgcgacat agattgaaaa 737
 atacagaaaa tagttttgaa caaataacat ttatgcaagc cttacaacta ttgcttgaag 797
 tagaacaaga gataagaact ttctcgtttc agcttattta a 838

<210> 8
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 8

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

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

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

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

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Leu Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
85 90 95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
100 105 110

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
115 120 125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
130 135 140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
145 150 155 160

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
165 170 175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
180 185 190

Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
195 200 205

Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
210 215

<210> 9

<211> 1497

<212> DNA

<213> Virus Influenza

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1497)

<400> 9

atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat 48
Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1 5 10 15

ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg 96
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
20 25 30

gtg gga gga atc ggc cga ttt tat gtt cag atg tgt act gag ctt aaa	144
Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys	
35 40 45	
cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa	192
Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu	
50 55 60	
agg atg gta ctt tcg gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag	240
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu	
65 70 75 80	
gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata	288
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile	
85 90 95	
tac aga agg aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat	336
Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp	
100 105 110	
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac	384
Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp	
115 120 125	
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat	432
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn	
130 135 140	
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat	480
Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp	
145 150 155 160	
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct	528
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser	
165 170 175	
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggt gtt gga aca atg gta atg gaa	576
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu	
180 185 190	
ctc atc aga atg atc aaa cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga	624
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg	
195 200 205	
ggt gaa aat ggt cga aaa acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat	672
Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn	
210 215 220	
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac	720
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp	
225 230 235 240	
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc	768
Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu	
245 250 255	
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat	816
Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His	
260 265 270	

aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca ata acc agt ggg Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Ile Thr Ser Gly	864
275 280 285	
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe	912
290 295 300	
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu	960
305 310 315 320	
aac cca gca cac aag agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala	1008
325 330 335	
gca ttt gag gac ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val	1056
340 345 350	
atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn	1104
355 360 365	
gaa aac atg gag aca ata aat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys	1152
370 375 380	
tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg	1200
385 390 395 400	
gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg	1248
405 410 415	
aat cta ccc ttt gag aga gcg acc att atg gct gca ttc act ggt aac Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn	1296
420 425 430	
act gaa ggg agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met	1344
435 440 445	
gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe	1392
450 455 460	
gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp	1440
465 470 475 480	
atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe	1488
485 490 495	
gac agt taa Asp Ser	1497

<210> 10
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 10

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Ile Thr Ser Gly
275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

Asp Ser

<210> 11
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1413)

<400> 11
 atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg 48
 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca 96
 Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30
 gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg 144
 Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45
 atc ata aga aag tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa att act caa 192
 Ile Ile Arg Lys Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Ile Thr Gln
 50 55 60
 tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa 240
 Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65 70 75 80
 tac tac atg aac aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca 288
 Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85 90 95
 cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt 336
 Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
 100 105 110
 ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga 384
 Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg
 115 120 125
 acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac 432

Thr	Phe	Phe	Leu	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Lys	His	Ser	Asn	
130						135					140					
ggc	aca	gta	aag	gac	cga	agt	ccg	tat	agg	act	ttg	atg	agt	gtc	aaa	480
Gly	Thr	Val	Lys	Asp	Arg	Ser	Pro	Tyr	Arg	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Lys	
145					150					155					160	
ata	ggg	caa	tca	cct	aat	gta	tat	caa	gct	aga	ttt	gaa	tcg	gta	gca	528
Ile	Gly	Gln	Ser	Pro	Asn	Val	Tyr	Gln	Ala	Arg	Phe	Glu	Ser	Val	Ala	
				165					170					175		
tgg	tca	gca	aca	gca	tgc	cat	gat	gga	aaa	aaa	tgg	atg	aca	gtt	gga	576
Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Met	Thr	Val	Gly	
			180					185					190			
gtc	aca	ggg	ccc	gac	aat	caa	gca	att	gca	gta	gtg	aac	tat	gga	ggg	624
Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Tyr	Gly	Gly	
		195				200						205				
gtt	ccg	gtt	gat	att	att	aat	tca	tgg	gca	ggg	gat	att	tta	aga	acc	672
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Ser	Trp	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr	
	210					215					220					
caa	gaa	tca	tca	tgc	acc	tgc	att	aaa	gga	gac	tgt	tat	tgg	gta	atg	720
Gln	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Cys	Ile	Lys	Gly	Asp	Cys	Tyr	Trp	Val	Met	
225					230					235					240	
act	gat	gga	ccg	gca	aat	agg	caa	gct	aaa	tat	agg	ata	ttc	aaa	gca	768
Thr	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala	
				245					250					255		
aaa	gat	gga	aga	gta	att	gga	cag	act	gat	ata	agt	ttc	aat	ggg	gga	816
Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	Phe	Asn	Gly	Gly	
			260					265					270			
cac	ata	gag	gag	tgt	tct	tgt	tac	ccc	aat	gaa	ggg	aag	gtg	gaa	tgc	864
His	Ile	Glu	Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asn	Glu	Gly	Lys	Val	Glu	Cys	
		275					280					285				
ata	tgc	agg	gac	aat	tgg	act	gga	aca	aat	aga	cca	gtt	ctg	gta	ata	912
Ile	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Val	Leu	Val	Ile	
	290					295					300					
tct	tct	gat	cta	tcg	tac	aca	gtt	gga	tat	ttg	tgt	gct	ggc	att	ccc	960
Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Pro	
305					310					315					320	
act	gac	act	cct	agg	gga	gag	gat	agt	caa	ttc	aca	ggc	tca	tgt	aca	1008
Thr	Asp	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser	Gln	Phe	Thr	Gly	Ser	Cys	Thr	
				325					330					335		
agt	cct	ttg	gga	aat	aaa	gga	tac	ggt	gta	aaa	ggt	ttc	ggg	ttt	cga	1056
Ser	Pro	Leu	Gly	Asn	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Arg	
			340					345					350			
caa	gga	act	gac	gta	tgg	gcc	gga	agg	aca	att	agt	agg	act	tca	aga	1104
Gln	Gly	Thr	Asp	Val	Trp	Ala	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	Arg	
			355				360						365			
tca	gga	ttc	gaa	ata	ata	aaa	atc	agg	aat	ggt	tgg	aca	cag	aac	agt	1152

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380

aaa gac caa atc agg agg caa gtg att atc gat gac cca aat tgg tca 1200
 Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400

gga tat agc ggt tct ttc aca ttg ccg gtt gaa cta aca aaa aag gga 1248
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415

tgt ttg gtc ccc tgt ttc tgg gtt gaa atg att aga ggt aaa cct gaa 1296
 Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430

gaa aca aca ata tgg acc tct agt agc tcc att gtg atg tgt gga gta 1344
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445

gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc 1392
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460

ttt gac atc gat aag atg taa 1413
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 12
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 12

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45

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

Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85 90 95

Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val

	100		105		110
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser 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 Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys	145		150		155
Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala		165		170	175
Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly		180		185	190
Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly		195		200	205
Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr	210		215		220
Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met	225		230		235
Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala		245		250	255
Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly		260		265	270
His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Glu Gly Lys Val Glu Cys	275		280		285
Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Val Leu Val Ile	290		295		300
Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro	305		310		315
Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr		325		330	335
Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg					

340 345 350
 Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
 355 360 365
 Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380
 Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415
 Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 13
 <211> 982
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(756)

<400> 13
 atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca 48
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
 1 5 10 15
 tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt 96
 Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30
 gca gga aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca 144
 Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45
 aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc 192
 Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe

50	55	60	
acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val 65 70 75 80			240
caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala 85 90 95			288
gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala 100 105 110			336
aaa gag gta gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met 115 120 125			384
gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe 130 135 140			432
ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg 145 150 155 160			480
gct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca ttg atc aga cat gaa Ala His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu 165 170 175			528
aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met 180 185 190			576
gca gga tgc agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg 195 200 205			624
gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser 210 215 220			672
tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr 225 230 235 240			720
cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys 245 250			766
gttattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt			826
ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa			886
ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt			946
gacgatgggc attttgtcaa catagagctg gagtaa			982

<211> 252
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 14

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val 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 Ala 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 Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg 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 Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 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

Ala 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 Arg
 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 Asp 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

<210> 15
 <211> 1698
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1698)

<400> 15
 atg aag aca acc att att ttg ata cta cta acc cat tgg gcc tac agt 48
 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15
 caa aac cca atc agt ggc aac aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac 96
 Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30
 cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca atg agt gat gat caa 144
 His Ala Val Ala Met Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45
 att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg 192
 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60
 aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca 240
 Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80
 tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat 288
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95
 gag agt tgg gac ctc ttc ata gaa aga agc aac gct ttc agc aat tgc 336
 Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110
 tac cca tat gac atc cct gac tat gca tcg ctc cga tcc att gta gca 384
 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125
 tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt 432
 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140
 gtc act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat 480
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160

agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg cta aca aaa tct gga agc tct tac	528
Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr	
165 170 175	
ccc aca ttg aat gtg aca atg cct aac aat aaa aat ttc gac aag cta	576
Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu	
180 185 190	
tac atc tgg ggg att cat cac ccg agc tca aat caa gag cag aca aaa	624
Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys	
195 200 205	
ttg tac atc caa gaa tca gga cga gta aca gtc tca aca aaa aga agt	672
Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser	
210 215 220	
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tct aga ccg ttg gtc aga ggt	720
Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly	
225 230 235 240	
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat	768
Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp	
245 250 255	
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat	816
Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr	
260 265 270	
ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc tct gta atg aga tca gat gca ccc	864
Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro	
275 280 285	
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc	912
Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser	
290 295 300	
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc	960
Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys	
305 310 315 320	
cct aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg	1008
Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg	
325 330 335	
aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga	1056
Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly	
340 345 350	
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc	1104
Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe	
355 360 365	
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc	1152
Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser	
370 375 380	
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att	1200
Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile	
385 390 395 400	

gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa 1248
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415
 gta gaa gga aga att cag gac ctg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa 1296
 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430
 ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat 1344
 Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445
 caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag 1392
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460
 aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga 1440
 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480
 tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gga tca ata 1488
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495
 aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aga gat gaa gca tta aac 1536
 Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510
 aac cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat 1584
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525
 tgg ata ttg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 1632
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540
 gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aga ggc aac atc aga 1680
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560
 tgc aac att tgc att tga 1698
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 16
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 16

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125

Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140

Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160

Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175

Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 180 185 190

Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 195 200 205

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 210 215 220

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 225 230 235 240

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 260 265 270

Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro
 275 280 285

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 355 360 365

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

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 17
 <211> 2277
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2277)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (731)..(731)
 <223> O "Xaa" em localização 731 se estende para Val, ou Ile

<400> 17
 atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc 48
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
 1 5 10 15
 cgc gag ata cta aca aaa act act gtg gac cac atg gcc ata atc aag 96
 Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
 20 25 30
 aaa tac aca tca gga aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa 144
 Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
 35 40 45
 tgg atg atg gca atg aaa tac cca att aca gca gat aag agg ata atg 192
 Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
 50 55 60
 gag atg att cct gag aga aat gaa cag gga caa acc ctt tgg agc aaa 240
 Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
 65 70 75 80
 acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg 288
 Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
 85 90 95
 aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg agc aca att cat tat cca 336
 Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro
 100 105 110

aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly 115 120 125	384
acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg 130 135 140	432
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac ctc agt gcc aaa gaa gca caa Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln 145 150 155 160	480
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc aga att Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile 165 170 175	528
cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu 180 185 190	576
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu 195 200 205	624
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gca ggc gga aca Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr 210 215 220	672
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp 225 230 235 240	720
gag caa atg tac acc cca gga gga gaa gtt aga aac gat gat att gat Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp 245 250 255	768
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gcg aca gta Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260 265 270	816
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275 280 285	864
att ggt gga ata agg atg gta gac atc ctt aag cag aat cca aca gag Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu 290 295 300	912
gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca gca atg gga ttg aga att agc Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305 310 315 320	960
tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc ttc aaa aga aca agt gga tca Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser 325 330 335	1008
tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt acg ggc aac ctt caa aca ttg Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu 340 345 350	1056

aaa ata aga gtg cat gag ggc tat gaa gaa ttc aca atg gtc gga aga Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg 355 360 365	1104
aga gca aca gcc att atc aga aag gca acc aga aga ttg att caa ttg Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu 370 375 380	1152
ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca att gct gaa gca ata att gta Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val 385 390 395 400	1200
gcc atg gtg ttt tgc caa gaa gat tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly 405 410 415	1248
gat ttg aac ttt gtt aat aga gca aat cag cgt ttg aac ccc atg cat Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His 420 425 430	1296
caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc caa aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn 435 440 445	1344
tgg gga att gaa ccc atc gac aat gta atg ggg atg att gga ata ttg Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu 450 455 460	1392
cct gac atg acc cca agc acc gag atg tca ttg aga gga gtg aga gtc Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val 465 470 475 480	1440
agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc agc act gag aga gtg gtg gtg Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val 485 490 495	1488
agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg gat caa agg gga aac ata cta Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu 500 505 510	1536
ctg tcc cct gaa gaa gtc agt gaa aca caa gga acg gaa aag ctg aca Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr 515 520 525	1584
ata att tat tgc tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser 530 535 540	1632
gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc agg aac tgg gaa att gta Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val 545 550 555 560	1680
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu 565 570 575	1728
ttt gag cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr 580 585 590	1776

```

agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga      1824
Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
      595                                600                                605

aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct      1872
Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
      610                                615                                620

cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta      1920
Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
      625                                630                                635                                640

aga ggt tcg gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc      1968
Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
      645                                650                                655

aac tac aat aaa gcc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca      2016
Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
      660                                665                                670

ggt gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gaa tct      2064
Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
      675                                680                                685

gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gaa aac aag aga tat      2112
Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
      690                                695                                700

ggc cca gca cta agc atc aat gaa cta agc aaa ctt gca aaa ggg gag      2160
Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
      705                                710                                715                                720

aaa gcc aat gta cta att ggg caa ggg gac rta gtg ttg gta atg aaa      2208
Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Xaa Val Leu Val Met Lys
      725                                730                                735

cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act gac agc cag aca gcg acc aaa      2256
Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
      740                                745                                750

agg att cgg atg gcc atc aat
Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
      755

```

<210> 18

<211> 759

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<220>

<221> misc_feature

<222> (731)..(731)

<223> The 'Xaa' at location 731 stands for Val, or Ile.

<400> 18

```

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
1          5          10          15

```

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
50 55 60

Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
65 70 75 80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val
85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro
100 105 110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
115 120 125

Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg
130 135 140

Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln
145 150 155 160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile
165 170 175

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
195 200 205

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr
210 215 220

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
275 280 285

Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr
580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Xaa Val Leu Val Met Lys
725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
 740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 755

<210> 19
 <211> 2274
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2274)

<400> 19
 atg gat gtc aat ccg act cta ctt ttc tta aag gtg cca gcg caa aat 48
 Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15
 gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat 96
 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30
 gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa 144
 Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45
 tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca 192
 Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
 50 55 60
 caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt 240
 Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
 65 70 75 80
 ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa 288
 Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
 85 90 95
 gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag 336
 Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
 100 105 110
 gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act 384
 Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
 115 120 125
 tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct 432
 Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
 130 135 140
 aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg act tcc aat gaa tcg 480
 Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
 145 150 155 160

ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys 165 170 175	528
gaa gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg 180 185 190	576
gac aac atg aca aag aga atg gta aca cag aga acc ata ggg aag aaa Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys 195 200 205	624
aaa caa cga tta aac aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu 210 215 220	672
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala 225 230 235 240	720
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga ggg ttt gta tat ttt gtt gaa Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu 245 250 255	768
aca cta gcc cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro 260 265 270	816
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys 275 280 285	864
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly 290 295 300	912
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala 305 310 315 320	960
atg atc aca tac ata act aga aac cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val 325 330 335	1008
cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly 340 345 350	1056
aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile 355 360 365	1104
cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser 370 375 380	1152
aca aaa aag aaa att gaa aag ata cga cca ctt ctg gtt gac ggg act Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr 385 390 395 400	1200

gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser 405 410 415	1248
act gtg ctg ggt gta tcc ata tta aac ctg ggc cag agg aaa tac aca Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr 420 425 430	1296
aag acc aca tac tgg tgg gat ggt ctg caa tca tcc gat gac ttt gct Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala 435 440 445	1344
ttg ata gtg aat gcg cct aat cat gaa gga ata caa gct gga gta gac Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp 450 455 460	1392
aga ttc tat aga act tgc aaa ctg gtc ggg atc aac atg agc aaa aag Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys 465 470 475 480	1440
aaa tcc tac ata aat aga act gga aca ttc gaa ttc aca agc ttt ttc Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe 485 490 495	1488
tac cgg tat ggt ttt gta gcc aat ttc agc atg gaa cta ccc agt ttt Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe 500 505 510	1536
ggg gtt tcc gga ata aat gaa tct gca gac atg agc att gga gtg aca Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr 515 520 525	1584
gtc atc aaa aac aac atg ata aat aat gat ctc ggt cct gcc acg gca Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala 530 535 540	1632
caa atg gca ctc caa ctc ttc att aag gat tat cgg tac aca tac cgg Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg 545 550 555 560	1680
tgc cat aga ggt gat acc cag ata caa acc aga aga tct ttt gag ttg Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu 565 570 575	1728
aag aaa ctg tgg gaa cag act cga tca aag act ggt cta ctg gta tca Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser 580 585 590	1776
gat ggg ggt cca aac cta tat aac atc aga aac cta cac atc ccg gaa Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu 595 600 605	1824
gtc tgt tta aaa tgg gag cta atg gat gaa gat tat aag ggg agg cta Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu 610 615 620	1872
tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val 625 630 635 640	1920

aac agt gca gta gta atg cct gcg cat ggc cct gcc aaa agc atg gag 1968
 Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655
 tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg 2016
 Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670
 tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga ata ctc gaa gat gag cag atg 2064
 Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685
 tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca 2112
 Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700
 tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gtg tcc 2160
 Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720
 agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag 2208
 Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
 725 730 735
 aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag 2256
 Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
 740 745 750
 ctc aga cgg caa aaa tag 2274
 Leu Arg Arg Gln Lys
 755

<210> 20
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 20

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
 50 55 60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
 65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
 85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
 100 105 110

Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
 115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
 130 135 140

Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
 165 170 175

Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
 180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Val Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
 195 200 205

Lys Gln Arg Leu Asn Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
 210 215 220

Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
 225 230 235 240

Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
 245 250 255

Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
 260 265 270

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
 275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
 290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
 305 310 315 320

Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
 355 360 365

Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
 370 375 380

Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
 405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr
 420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
 435 440 445

Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp
 450 455 460

Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
 465 470 475 480

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510

Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
 515 520 525

Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
 530 535 540

Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
 545 550 555 560

Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu
565 570 575

Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser
580 585 590

Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
595 600 605

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
610 615 620

Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
625 630 635 640

Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
645 650 655

Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
660 665 670

Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
675 680 685

Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
690 695 700

Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
705 710 715 720

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
725 730 735

Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys
755

<210> 21

<211> 2151

<212> DNA

<213> Virus Influenza

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2151)

<400> 21

atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt	48
Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu	
1 5 10 15	
gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca	96
Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr	
20 25 30	
aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac	144
Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr	
35 40 45	
tcg gat ttt cac ttt att aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag	192
Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu	
50 55 60	
tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag	240
Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu	
65 70 75 80	
ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac	288
Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn	
85 90 95	
acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat	336
Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr	
100 105 110	
aag gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac	384
Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His	
115 120 125	
ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat	432
Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His	
130 135 140	
atc cac att ttc tca ttt aca gga gag gaa atg gct aca aaa gcg gac	480
Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp	
145 150 155 160	
tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc	528
Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe	
165 170 175	
act ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt	576
Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg	
180 185 190	
cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa atc aca	624
Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr	
195 200 205	
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc	672
Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser	
210 215 220	

agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat gtg gat gga ttc gaa ccg aac ggc Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly 225 230 235 240	720
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aga Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg 245 250 255	768
atc gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly 260 265 270	816
ggc cca ccc tgc cat cag cga tct aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg Gly Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu 275 280 285	864
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag gga ata cca cta Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu 290 295 300	912
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro 305 310 315 320	960
agt att gtt aaa cca cat gaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln 325 330 335	1008
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu 340 345 350	1056
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp 355 360 365	1104
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys 370 375 380	1152
aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa aca Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Thr 385 390 395 400	1200
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aaa gct tgt gag Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu 405 410 415	1248
ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val 420 425 430	1296
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala 435 440 445	1344
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata atg aaa gga gtg tac Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr 450 455 460	1392

atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe 465 470 475 480	1440
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg 485 490 495	1488
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg 500 505 510	1536
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr 515 520 525	1584
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu 530 535 540	1632
att gga gac atg ctt cta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro 545 550 555 560	1680
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys 565 570 575	1728
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile 580 585 590	1776
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr 595 600 605	1824
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser 610 615 620	1872
ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu 625 630 635 640	1920
tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu 645 650 655	1968
ggg ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu 660 665 670	2016
agg gat gac ctg gaa cct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu 675 680 685	2064
tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala 690 695 700	2112

tct tgg ttc aac tcc ttc ctt aca cat gca ctg aag tag
 Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

2151

<210> 22
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 22

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Arg
245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Thr
385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 23
<211> 838
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (657)

<400> 23
atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg 48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1 5 10 15
cat gtc cgc aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc 96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
20 25 30
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc 144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata 192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
50 55 60
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc 240
Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
att gcc tct gtt cct act tca cgc tac tta act gac atg act ctt gat 288
Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
85 90 95
gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca 336
Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
100 105 110
ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc 384
Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
115 120 125
ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa ggg ctg gaa aca cta 432
Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
130 135 140
ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att 480

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gag 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

aat ggg aga cct tca ttc cct tca aag cag aaa tgaaaaatgg agagaacaat 677
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
 210 215

taagccagaa atttgaagaa ataagatggt tgattgaaga agtgcgacat agattgaaaa 737

atacagaaaa tagttttgaa caaataacat ttatgcaagc cttacaacta ttgcttgaag 797

tagaacaaga gataagaact ttctcgtttc agcttattta a 838

<210> 24
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 24

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

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

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

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

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80

Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
 85 90 95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
 100 105 110

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Gly Leu Glu Thr Leu
 130 135 140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190

Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205

Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys
 210 215

<210> 25
 <211> 1497
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1497)

<400> 25
 atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat 48
 Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg 96
 Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

gtg gga gga atc ggc cgg ttt tat gtt cag atg tgt act gag ctt aaa 144
 Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa 192
 Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

agg atg gta ctt tcg gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag 240
 Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata	288
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile	
85 90 95	
tac aga agg aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat	336
Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp	
100 105 110	
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac	384
Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp	
115 120 125	
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat	432
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn	
130 135 140	
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat	480
Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp	
145 150 155 160	
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct	528
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser	
165 170 175	
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggt gtt gga aca atg gta atg gaa	576
Gly Ala Ala Gly Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu	
180 185 190	
ctc atc aga atg atc aaa cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga	624
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg	
195 200 205	
ggt gaa aat ggt cga aga acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat	672
Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn	
210 215 220	
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac	720
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp	
225 230 235 240	
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc	768
Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu	
245 250 255	
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat	816
Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His	
260 265 270	
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca gta acc agt ggg	864
Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly	
275 280 285	
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc	912
Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe	
290 295 300	
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa	960
Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu	
305 310 315 320	

aac cca gca cac aag agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca 1008
 Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335
 gca ttt gag gac ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta 1056
 Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350
 atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat 1104
 Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365
 gaa aac atg gag aca ata gat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa 1152
 Glu Asn Met Glu Thr Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380
 tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga 1200
 Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
 385 390 395 400
 gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga 1248
 Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415
 aat ctt ccc ttt gag aga gca acc att atg gct gca ttc act ggt aac 1296
 Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430
 act gaa ggg agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg 1344
 Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445
 gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc 1392
 Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460
 gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac 1440
 Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480
 atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt 1488
 Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495
 gac agt taa 1497
 Asp Ser

<210> 26
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 26

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
35 40 45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
85 90 95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
100 105 110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
130 135 140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly
275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
485 490 495

Asp Ser

<210> 27
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1410)

```

<400> 27
atg aat cca aat caa aag ata ata aca att gga ttt gca tca ttg ggg      48
Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
1          5          10          15

ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca      96
Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
          20          25          30

gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg      144
Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
          35          40          45

atc ata aga gag tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa att act caa      192
Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Ile Thr Gln
          50          55          60

tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa      240
Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
65          70          75          80

tac tac atg aac aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca      288
Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
          85          90          95

cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt      336
Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
          100          105          110

ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga      384
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg
          115          120          125

acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac      432
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
          130          135          140

ggc aca gta aag gac cga agt ccg tat agg act ttg atg agt gtc aaa      480
Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys
145          150          155          160

ata ggg caa tca cct aat gta tat caa gct agg ttt gaa tcg gtg gca      528
Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala
          165          170          175

tgg tca gca aca gca tgc cat gat gga aaa aaa tgg atg aca gtt gga      576

```

Trp	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Met	Thr	Val	Gly	
			180					185					190			
gtc	aca	ggg	ccc	gac	aat	caa	gca	att	gca	gta	gtg	aac	tat	gga	ggg	624
Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Asn	Tyr	Gly	Gly	
		195					200					205				
gtt	ccg	gtt	gat	att	att	aat	tca	tgg	gca	ggg	gat	att	tta	aga	acc	672
Val	Pro	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Ser	Trp	Ala	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr	
	210					215					220					
caa	gaa	tca	tca	tgc	acc	tgc	att	aaa	gga	gac	tgt	tat	tgg	gta	atg	720
Gln	Glu	Ser	Ser	Cys	Thr	Cys	Ile	Lys	Gly	Asp	Cys	Tyr	Trp	Val	Met	
225					230					235				240		
act	gat	gga	ccg	gca	aat	agg	caa	gct	aaa	tat	agg	ata	ttc	aaa	gca	768
Thr	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Tyr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala	
				245					250					255		
aaa	gat	gga	aga	gta	att	gga	cag	act	gat	ata	agt	ttc	aat	ggg	gga	816
Lys	Asp	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Gln	Thr	Asp	Ile	Ser	Phe	Asn	Gly	Gly	
			260					265					270			
cac	ata	gag	gag	tgt	tct	tgt	tac	ccc	aat	gaa	ggg	aag	gtg	gaa	tgc	864
His	Ile	Glu	Glu	Cys	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asn	Glu	Gly	Lys	Val	Glu	Cys	
		275					280					285				
ata	tgc	agg	gac	aat	tgg	act	gga	aca	aat	aga	cca	att	ctg	gta	ata	912
Ile	Cys	Arg	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Pro	Ile	Leu	Val	Ile	
	290					295					300					
tct	tct	gat	cta	tcg	tac	aca	gtt	gga	tat	ttg	tgt	gct	ggc	att	ccc	960
Ser	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ala	Gly	Ile	Pro	
305					310					315				320		
act	gac	act	cct	agg	gga	gag	gat	agt	caa	ttc	aca	ggc	tca	tgt	aca	1008
Thr	Asp	Thr	Pro	Arg	Gly	Glu	Asp	Ser	Gln	Phe	Thr	Gly	Ser	Cys	Thr	
				325					330					335		
agt	cct	ttg	gga	aat	aaa	gga	tac	ggt	gta	aaa	ggt	ttc	ggg	ttt	cga	1056
Ser	Pro	Leu	Gly	Asn	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Phe	Arg	
			340					345					350			
caa	gga	act	gac	gta	tgg	gcc	gga	agg	aca	att	agt	agg	act	tca	aga	1104
Gln	Gly	Thr	Asp	Val	Trp	Ala	Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Arg	Thr	Ser	Arg	
			355				360					365				
tca	gga	ttc	gaa	ata	ata	aaa	atc	agg	aat	ggt	tgg	aca	cag	aac	agt	1152
Ser	Gly	Phe	Glu	Ile	Ile	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Trp	Thr	Gln	Asn	Ser	
	370					375					380					
aaa	gac	caa	atc	agg	agg	caa	gtg	att	atc	gat	gac	cca	aat	tgg	tca	1200
Lys	Asp	Gln	Ile	Arg	Arg	Gln	Val	Ile	Ile	Asp	Asp	Pro	Asn	Trp	Ser	
	385				390					395				400		
gga	tat	agc	ggt	tct	ttc	aca	ttg	ccg	gtt	gaa	cta	aca	aaa	aag	gga	1248
Gly	Tyr	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Pro	Val	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	
				405					410				415			
tgt	ttg	gtc	ccc	tgt	ttc	tgg	gtt	gaa	atg	att	aga	ggt	aaa	cct	gaa	1296

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430

gaa aca aca ata tgg acc tct agc agc tcc att gtg atg tgt gga gta 1344
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445

gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc 1392
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460

ttt gac atc gat aag atg 1410
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 28
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 28

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

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45

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

Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85 90 95

Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
 100 105 110

Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser 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 Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys

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

[illegible]

<210> 29
<211> 982
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (756)

<400> 29																	48
atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca																	
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro																	
1 5 10 15																	
tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt																	96
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe																	
20 25 30																	
gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca																	144
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr																	
35 40 45																	
aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc																	192
Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe																	
50 55 60																	
acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc																	240
Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val																	
65 70 75 80																	
caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca																	288
Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala																	
85 90 95																	
gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca																	336
Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala																	

100	105	110	
aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg			384
Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met			
115	120	125	
gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt			432
Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe			
130	135	140	
ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga			480
Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg			
145	150	155	160
tct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca tta atc aga cat gaa			528
Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu			
165	170	175	
aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg			576
Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met			
180	185	190	
gca gga tgc agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg			624
Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg			
195	200	205	
gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc			672
Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser			
210	215	220	
tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac			720
Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr			
225	230	235	240
cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc			766
Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys			
245	250		
gttattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt			826
ttcttcaaatt tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa			886
ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt			946
gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagtaa			982

<210> 30

<211> 252

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 30

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val 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 Ala 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 Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg 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 Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 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 Arg
 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 Asp 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

<210> 31
 <211> 1698

<212> DNA

<213> Virus Influenza

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1698)

<400> 31

atg aag aca acc att att ttg ata cta ctg acc cat tgg gcc tac agt	48
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser	
1 5 10 15	

caa aac cca atc agt gac aac aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac	96
Gln Asn Pro Ile Ser Asp Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His	
20 25 30	

cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca ata agt gat gat caa	144
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Ser Asp Asp Gln	
35 40 45	

att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg	192
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly	
50 55 60	

aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca	240
Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr	
65 70 75 80	

tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat	288
Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr	
85 90 95	

gag agt tgg gac ctc ttt ata gaa aga agc agc gct ttc agc aat tgc	336
Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys	
100 105 110	

tac cca tat gac atc cct gac tat gca tcg ctc cga tcc att gta gca	384
Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala	
115 120 125	

tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt	432
Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly	
130 135 140	

gtc act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat	480
Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp	
145 150 155 160	

agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg cta aca aaa tct gga agc tct tac	528
Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr	
165 170 175	

ccc aca ttg aat gtg aca atg cct aac aat aaa aat ttc gac aag cta	576
Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu	
180 185 190	

tac atc tgg ggg att cat cac ccg agc tca aat caa gag cag aca aaa	624
Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys	
195 200 205	

ttg tac atc caa gaa tca gga cga gta aca gtc tca aca aaa aga agt Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser 210 215 220	672
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tct aga ccg ttg gtc aga ggt Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly 225 230 235 240	720
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp 245 250 255	768
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr 260 265 270	816
ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc tct gta atg aga tca gat gta ccc Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro 275 280 285	864
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser 290 295 300	912
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys 305 310 315 320	960
ccc aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg 325 330 335	1008
aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly 340 345 350	1056
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe 355 360 365	1104
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser 370 375 380	1152
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile 385 390 395 400	1200
gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu 405 410 415	1248
gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys 420 425 430	1296
ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn 435 440 445	1344

caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag 1392
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga 1440
 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gga tca ata 1488
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
 485 490 495

aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aga gat gaa gca tta aac 1536
 Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510

aac cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat 1584
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 1632
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aaa ggc aac atc aga 1680
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

tgc aac att tgc att tga 1698
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 32

<211> 565

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 32

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Asp Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Ser Asp Asp Gln
 35 40 45

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125

Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140

Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160

Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175

Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 180 185 190

Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 195 200 205

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 210 215 220

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 225 230 235 240

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 260 265 270

Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro
 275 280 285

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
355 360 365

Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser
370' 375 380

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
435 440 445

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 33
<211> 549
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 33

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
1 5 10 15

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
20 25 30

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
35 40 45

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
50 55 60

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
65 70 75 80

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Asn Ala Phe Ser Asn Cys
85 90 95

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
100 105 110

Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
115 120 125

Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
130 135 140

Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
145 150 155 160

Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
165 170 175

Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
180 185 190

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
195 200 205

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
210 215 220

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
225 230 235 240

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
245 250 255

Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro
260 265 270

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
275 280 285

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
290 295 300

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
305 310 315 320

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
325 330 335

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
340 345 350

Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser
355 360 365

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
370 375 380

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
385 390 395 400

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
405 410 415

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
420 425 430

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
435 440 445

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
450 455 460

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile
465 470 475 480

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
485 490 495

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
500 505 510

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
515 520 525

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile Arg
530 535 540

Cys Asn Ile Cys Ile
545

<210> 34
<211> 549
<212> PRT
<213> Virus Influenza

<400> 34

Gln Asn Pro Ile Ser Asp Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
1 5 10 15

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Ser Asp Asp Gln
20 25 30

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
35 40 45

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
50 55 60

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
65 70 75 80

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys

85

90

95

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 100 105 110

Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 115 120 125

Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 130 135 140

Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 145 150 155 160

Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 165 170 175

Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 180 185 190

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 195 200 205

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 210 215 220

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 225 230 235 240

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 245 250 255

Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro
 260 265 270

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 275 280 285

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 290 295 300

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 305 310 315 320

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly

	325		330		335
Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe	340		345		350
Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser	355		360		365
Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile	370		375		380
Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu	385		390		400
Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys	405		410		415
Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn	420		425		430
Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu	435		440		445
Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly	450		455		460
Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile	465		470		475
Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn	485		490		495
Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp	500		505		510
Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val	515		520		525
Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg	530		535		540
Cys Asn Ile Cys Ile	545				

<211> 9
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 35
 gagagttgg

9

<210> 36
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 36
 ccgttggtc

9

<210> 37
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 37
 caaaccaga

9

<210> 38
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 38
 agaactggg

9

<210> 39
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 39
 tatgagagtt gggac

15

<210> 40
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 40
 agaccgttgg tcaga

15

<210> 41
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 41
 aagcaaacca gagga

15

<210> 42
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 42
 ataagaactg ggaca

15

<210> 43
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 43
 acaatgagt

9

<210> 44
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 44
 aaaacaatga gtgat

15

<210> 45
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 45
 gatgtaccc

9

<210> 46
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<400> 46
 tcagatgtac ccata

15

<210> 47
 <211> 2280
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2280)

<400> 47
 atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr

48

1	5	10	15	
cgc gag ata cta aca aaa act act gtg gac cac atg gcc ata atc aag Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys	20	25	30	96
aaa tac aca tca gga aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys	35	40	45	144
tgg atg atg gca atg aaa tac cca att aca gca gat aag agg ata atg Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met	50	55	60	192
gag atg att cct gag aga aat gaa cag gga caa acc ctt tgg agc aaa Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys	65	70	75	240
acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val	85	90	95	288
aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg aac aca att cat tat cca Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Asn Thr Ile His Tyr Pro	100	105	110	336
aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly	115	120	125	384
acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg	130	135	140	432
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac ctc agt gct aaa gaa gca caa Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln	145	150	155	480
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc aga att Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile	165	170	175	528
cta aca tca gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu	180	185	190	576
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu	195	200	205	624
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gta ggc gga aca Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr	210	215	220	672
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp	225	230	235	720
gag caa atg tac acc cca gga gga aaa gtt aga aac gat gat att gat Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp				768

245	250	255	
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gca aca gta Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260 265 270			816
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275 280 285			864
att ggt gga aca agg atg gta gac atc ctt aag cag aac cca aca gag Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu 290 295 300			912
gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca gca atg gga ttg aga att agc Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305 310 315 320			960
tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc ttc aaa agg aca agt gga tca Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser 325 330 335			1008
tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt acg ggc aac ctt caa aca ttg Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu 340 345 350			1056
aaa ata aga gtg cat gag ggc tat gaa gaa ttc aca atg gtc gga aga Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg 355 360 365			1104
aga gca aca gcc att atc aga aag gca acc aga aga ttg att caa ttg Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu 370 375 380			1152
ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca att gct gaa gca ata att gta Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val 385 390 395 400			1200
gcc atg gtg ttt tgc caa gaa gat tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly 405 410 415			1248
gat ttg aac ttt gtt aat aga gca aat cag cgt ttg aac ccc atg cat Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His 420 425 430			1296
caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc caa aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn 435 440 445			1344
tgg gga att gaa ccc atc gac aat gta atg ggg atg att gga ata ttg Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu 450 455 460			1392
cct gac atg acc cca agc acc gag atg tca ttg aga gga gtg aga gtc Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val 465 470 475 480			1440
agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc agc act gag aga gtg gtg gtg Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val 485 490 495 500			1488

485	490	495	
agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg gat caa agg gga aac ata cta Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu 500 505 510			1536
ctg tcc cct gaa gaa gtc agt gaa aca caa gga acg gaa aag ctg aca Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr 515 520 525			1584
ata att tat tcg tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser 530 535 540			1632
gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc aga aac tgg gaa att gta Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val 545 550 555 560			1680
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu 565 570 575			1728
ttt gaa cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr 580 585 590			1776
agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly 595 600 605			1824
aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala 610 615 620			1872
cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Ser Leu Thr Val Asn Val 625 630 635 640			1920
aga ggt tcg gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe 645 650 655			1968
aac tac aat aaa gtc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala 660 665 670			2016
ggt gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gag tct Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser 675 680 685			2064
gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gaa aac aag aga tat Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr 690 695 700			2112
ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctt agc aaa ctt gca aaa ggg gag Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu 705 710 715 720			2160
aaa gcc aat gta cta att ggg caa ggg gac gta gtg ttg gta atg aaa Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys			2208

[illegible]

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
180 185 190

Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
195 200 205

Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr
210 215 220

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
275 280 285

Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
 435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
 450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
 465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
 485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
 500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
 515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
 530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
 545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
 565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln/Tyr
 580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
 595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
 610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
 625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
 645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
 660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
 675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
 690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
 705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
 725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
 740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 755

<210> 49
 <211> 2274
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2274)

<400> 49
 atg gat gtc aat ccg act cta ctt ttc tta aag gtg cca gcg caa aat 48
 Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15
 gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat 96
 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30
 gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa 144
 Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45
 tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca 192
 Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
 50 55 60
 caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt 240
 Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
 65 70 75 80

ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu 85 90 95	288
gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu 100 105 110	336
gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr 115 120 125	384
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Thr Ala Leu Ala 130 135 140	432
aat acg att gaa gta ttc aga tca aat ggt ctg acc tcc aat gaa tcg Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser 145 150 155 160	480
ggg aga ttg atg gac ttc ctc aaa gat gtc atg gag tcc atg aac aag Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys 165 170 175	528
gag gaa atg gaa ata aca aca cac ttc caa cgg aag aga aga gta aga Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg 180 185 190	576
gac aac atg aca aag aga atg ata aca cag aga acc ata gga aag aaa Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys 195 200 205	624
aaa caa cga tta agc aga aag agc tat cta atc aga aca tta acc cta Lys Gln Arg Leu Ser Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu 210 215 220	672
aac aca atg acc aag gac gct gag aga ggg aaa ttg aaa cga cga gca Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala 225 230 235 240	720
atc gct acc cca ggg atg cag ata aga gga ttt gta tat ttt gtt gaa Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu 245 250 255	768
aca cta gct cga aga ata tgt gaa aag ctt gaa caa tca gga ttg cca Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro 260 265 270	816
gtt ggc ggt aat gag aaa aag gcc aaa ctg gct aat gtc gtc aga aaa Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys 275 280 285	864
atg atg act aat tcc caa gac act gaa ctc tcc ttc acc atc act ggg Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly 290 295 300	912
gac aat acc aaa tgg aat gaa aat cag aac cca cgc ata ttc ctg gca Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala 305 310 315 320	960

atg atc aca tac ata act aga gat cag cca gaa tgg ttc aga aat gtt Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asp Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val 325 330 335	1008
cta agc att gca ccg att atg ttc tca aat aaa atg gca aga ctg ggg Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly 340 345 350	1056
aaa gga tat atg ttt gaa agc aaa agt atg aaa ttg aga act caa ata Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile 355 360 365	1104
cca gca gaa atg cta gca agc att gac cta aaa tat ttc aat gat tca Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser 370 375 380	1152
aca aaa aag aaa att gaa aag ata cga cca ctc ctg gtt gac ggg act Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr 385 390 395 400	1200
gct tca ctg agt cct ggc atg atg atg gga atg ttc aac atg ttg agc Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser 405 410 415	1248
act gtg ctg ggt gta tcc ata tta aac ctg ggc cag agg aaa tat aca Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr 420 425 430	1296
aag acc aca tac tgg tgg gat ggt ctg caa tca tcc gat gac ttt gct Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala 435 440 445	1344
ttg ata gtg aat gcg cct aat cat gaa gga ata caa gct gga gta gac Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp 450 455 460	1392
aga ttc tat aga act tgc aaa ctg gtc ggg atc aac atg agc aaa aag Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys 465 470 475 480	1440
aag tcc tac ata aat aga act gga aca ttc gaa ttc aca agc ttt ttc Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe 485 490 495	1488
tac cgg tat ggt ttt gta gcc aat ttc agc atg gaa cta ccc agt ttt Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe 500 505 510	1536
ggg gtt tcc gga ata aat gaa tct gca gac atg agc att gga gtg aca Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr 515 520 525	1584
gtc atc aaa aac aac atg ata aat aat gat ctc ggt cct gcc acg gca Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala 530 535 540	1632
caa atg gca ctc caa ctc ttc att aag gat tat cgg tac aca tac cgg Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg 545 550 555 560	1680

tgc cat aga ggt gat acc cag ata caa acc aga aga tct ttt gag ttg	1728
Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu	
565 570 575	
aag aaa ctg tgg gaa cag act cga tca aag act ggt cta ctg gta tca	1776
Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser	
580 585 590	
gat ggg ggt cca aac cta tat aac atc aga aac cta cac atc ccg gaa	1824
Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu	
595 600 605	
gtc tgt tta aaa tgg gag cta atg gat gaa gat tat aag ggg agg cta	1872
Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu	
610 615 620	
tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc	1920
Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val	
625 630 635 640	
aac agt gca gta gta atg cct gct cat ggc cct gcc aaa agc atg gag	1968
Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu	
645 650 655	
tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg	2016
Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg	
660 665 670	
tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga ata cta gaa gat gag cag atg	2064
Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met	
675 680 685	
tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca	2112
Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser	
690 695 700	
tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gta tcc	2160
Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser	
705 710 715 720	
agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag	2208
Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys	
725 730 735	
aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag	2256
Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu	
740 745 750	
ctc aga cgg caa aaa tag	2274
Leu Arg Arg Gln Lys	
755	

<210> 50

<211> 757

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 50

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
1 5 10 15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
20 25 30

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
35 40 45

Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
50 55 60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
100 105 110

Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
130 135 140

Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ser Asn Glu Ser
145 150 155 160

Gly Arg Leu Met Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Asn Lys
165 170 175

Glu Glu Met Glu Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Arg Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Lys
195 200 205

Lys Gln Arg Leu Ser Arg Lys Ser Tyr Leu Ile Arg Thr Leu Thr Leu
210 215 220

Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
225 230 235 240

Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
245 250 255

Thr Leu Ala Arg Arg Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
260 265 270

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala
305 310 315 320

Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asp Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
340 345 350

Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
355 360 365

Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
370 375 380

Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr
385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr
420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
435 440 445

Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp
450 455 460

Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
465 470 475 480

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510

Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
 515 520 525

Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
 530 535 540

Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
 545 550 555 560

Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu
 565 570 575

Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser
 580 585 590

Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
 595 600 605

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610 615 620

Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
 625 630 635 640

Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655

Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670

Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685

Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700

Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
725 730 735

Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys
755

<210> 51
<211> 2151
<212> DNA
<213> Virus Influenza

```
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (2151)'
```

[illegible]

atc cac att ttc tca ttt aca gga gaa gaa atg gct aca aaa gcg gac Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp 145 150 155 160	480
tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe 165 170 175	528
act ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg 180 185 190	576
cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa atc aca Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr 195 200 205	624
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser 210 215 220	672
agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat ata gat gga ttc gaa ccg aac ggc Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly 225 230 235 240	720
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aaa Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys 245 250 255	768
ata gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly 260 265 270	816
ggt cca ccc tgc cat cag cga tcc aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu 275 280 285	864
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag ggg ata cca cta Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu 290 295 300	912
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro 305 310 315 320	960
agt att gtt aaa cca cat aaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln 325 330 335	1008
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu 340 345 350	1056
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp 355 360 365	1104
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys 370 375 380	1152

aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa gca Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala 385 390 395 400	1200
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aag gct tgt gag Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu 405 410 415	1248
ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val 420 425 430	1296
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala 435 440 445	1344
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata atg aaa gga gtg tac Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr 450 455 460	1392
atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe 465 470 475 480	1440
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg 485 490 495	1488
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg 500 505 510	1536
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr 515 520 525	1584
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu 530 535 540	1632
att gga gac atg ctt tta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro 545 550 555 560	1680
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys 565 570 575	1728
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile 580 585 590	1776
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr 595 600 605	1824
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser 610 615 620	1872

ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta 1920
 Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa 1968
 Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

gga ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt 2016
 Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670

aga gat gac ctg gaa cct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa 2064
 Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685

tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca 2112
 Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700

tct tgg ttc aac tcc ttc ctc aca cat gca ctg aag tag 2151
 Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

<210> 52

<211> 716

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 52

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30

Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95

Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
 195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
 210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
 225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys
 245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
 260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
 275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
 290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
 305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
 325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
 340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
 355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
 370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala
 385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
 405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
 420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
660 665 670

Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 53
<211> 844
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(690)

<400> 53
atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg 48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1 5 10 15
cat gtc cgt aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc 96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
20 25 30
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc 144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata 192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
50 55 60
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc 240

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80
 att gcc tct gtt cct gct tca cgc tac tta act gac atg act ctt gat 288
 Ile Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
 85 90 95
 gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca 336
 Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
 100 105 110
 ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc 384
 Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125
 ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa agg ctg gaa aca cta 432
 Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Arg Leu Glu Thr Leu
 130 135 140
 ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att 480
 Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160
 tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175
 gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190
 aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gaa 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205
 aat ggg aga cct tca ttc cct tca aaa cag aaa cga aaa atg gag aga 672
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys Arg Lys Met Glu Arg
 210 215 220
 aca att aag cca gaa att tgaagaaata agatggttga ttgaagaagt 720
 Thr Ile Lys Pro Glu Ile
 225 230
 gcgacataga ttgaaaaata cagaaaatag ttttgaacaa ataacattta tgcaagcctt 780
 acaactattg cttgaagtag aacaagagat aagaactttc tcgtttcagc ttattttaatg 840
 ataa 844
 <210> 54
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza
 <400> 54
 Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

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

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45

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

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ile Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
85 90 95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
100 105 110

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
115 120 125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Arg Leu Glu Thr Leu
130 135 140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
145 150 155 160

Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
165 170 175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
180 185 190

Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
195 200 205

Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys Arg Lys Met Glu Arg
210 215 220

Thr Ile Lys Pro Glu Ile
225 230

<210> 55
<211> 1497
<212> DNA

<213> Virus Influenza

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1497)

<400> 55

atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat	48
Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp	
1 5 10 15	
ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg	96
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met	
20 25 30	
gtg gga gga atc gga cgg ttt tat gtc cag atg tgt act gag ctt aaa	144
Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys	
35 40 45	
cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa	192
Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu	
50 55 60	
agg atg gtg ctt tgc gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag	240
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu	
65 70 75 80	
gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata	288
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile	
85 90 95	
tac aga aga aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat	336
Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp	
100 105 110	
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac	384
Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp	
115 120 125	
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat	432
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn	
130 135 140	
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat	480
Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp	
145 150 155 160	
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct	528
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser	
165 170 175	
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggc gtt gga aca atg gta atg gaa	576
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu	
180 185 190	
ctc atc aga atg atc aag cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga	624
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg	
195 200 205	

ggt gaa aat ggt cga aga acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn 210 215 220	672
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp 225 230 235 240	720
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu 245 250 255	768
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His 260 265 270	816
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca gta acc agt ggg Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly 275 280 285	864
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe 290 295 300	912
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu 305 310 315 320	960
aac cca gca cac aaa agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala 325 330 335	1008
gca ttt gag gat ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val 340 345 350	1056
atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn 355 360 365	1104
gaa aac atg gag aca ata aat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys 370 375 380	1152
tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg 385 390 395 400	1200
gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg 405 410 415	1248
aat ctt ccc ttt gag aga gca acc att atg gct gca ttc act ggt aac Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn 420 425 430	1296
act gaa gga agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met 435 440 445	1344

gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc 1392
 Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac 1440
 Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt 1488
 Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

gac agt taa 1497
 Asp Ser

<210> 56
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 56

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
 245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Thr Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
485 490 495

Asp Ser

<210> 57
<211> 1413
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1413)

<400> 57
atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg 48
Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca 96
Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
20 25 30
gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg 144
Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
35 40 45
atc ata aga gaa tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa ctt act caa 192
Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Leu Thr Gln
50 55 60
tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa 240

Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu	
65 70 75 80	
tac tac atg aat aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca	288
Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala	
85 90 95	
cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt	336
Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val	
100 105 110	
ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga	384
Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg	
115 120 125	
acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac	432
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn	
130 135 140	
ggc aca ata aag gat cga agt ccg tat agg act ttg atg agt gtc aaa	480
Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys	
145 150 155 160	
ata ggg caa tca cct aat gta tat caa gct agg ttt gaa tcg gtg gca	528
Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala	
165 170 175	
tgg tca gca aca gca tgc cat gat gga aaa aaa tgg atg aca gtt gga	576
Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly	
180 185 190	
gtc aca ggg ccc gac aat caa gca att gca gta gtg aac tat gga ggt	624
Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly	
195 200 205	
gtt ccg gtt gat att att aat tca tgg gca ggg gat att tta aga acc	672
Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr	
210 215 220	
caa gaa tca tca tgc acc tgc att aaa gga gac tgt tat tgg gta atg	720
Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met	
225 230 235 240	
act gat gga ccg gca aat agg caa gct aaa tat agg ata ttc aaa gca	768
Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala	
245 250 255	
aaa gat gga aga gta att gga caa act gat ata agt ttc aat ggg gga	816
Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly	
260 265 270	
cac ata gag gag tgt tct tgt tac ccc aat gaa ggg aag gtg gaa tgc	864
His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Glu Gly Lys Val Glu Cys	
275 280 285	
ata tgc agg gac aat tgg act gga aca aat aga cca att ctg gta ata	912
Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Ile Leu Val Ile	
290 295 300	
tct tct gat cta tcg tac aca gtt gga tat ttg tgt gct ggc att ccc	960

Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro
 305 310 315 320
 act gac act cct agg gga gag gat agt caa ttc aca ggc tca tgt aca 1008
 Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr
 325 330 335
 agt cct ttg gga aat aaa gga tac ggt gta aaa ggc ttc ggg ttt cga 1056
 Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg
 340 345 350
 caa gga act gac gta tgg gcc gga agg aca att agt agg act tca aga 1104
 Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
 355 360 365
 tca gga ttc gaa ata ata aaa atc agg aat ggt tgg aca cag aac agt 1152
 Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380
 aag gac caa atc agg agg caa gtg att atc gat gac cca aat tgg tca 1200
 Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400
 gga tat agc ggt tct ttc aca ttg ccg gtt gaa ctg aca aaa aag gga 1248
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415
 tgt ttg gtc ccc tgt ttc tgg gtt gaa atg att aga ggt aaa cct gaa 1296
 Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430
 gaa aca aca ata tgg acc tct agc agc tcc att gtg atg tgt gga gta 1344
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445
 gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc 1392
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460
 ttt gac atc gat aag atg taa 1413
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 58

<211> 470

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 58

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr

[illegible]

275

280

285

Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Ile Leu Val Ile
 290 295 300

Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro
 305 310 315 320

Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr
 325 330 335

Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg
 340 345 350

Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
 355 360 365

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380

Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430

Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445

Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460

Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 59
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(756)

[illegible]

225 230 235 240

cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc 766
 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

gtcattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt 826
 ttottcaaat tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa 886
 ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt 946
 gacgatggtc attttgtcaa catagagctg gagta 981

<210> 60
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza
 <400> 60

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val 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 Ala 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 Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg 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 Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 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 Arg
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 Asp 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

<210> 61
<211> 1698
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1698)

<400> 61
atg aag aca acc att att tta ata cta ctg acc cat tgg gcc tac agt 48
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
1 5 10 15
caa aac cca atc agt ggc aat aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac 96
Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
20 25 30
cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca atg agt gat gat caa 144
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
35 40 45
att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg 192
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
50 55 60
aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca 240
Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
65 70 75 80
tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat 288
Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
85 90 95

gag agt tgg gac ctc ttt ata gaa aga agc agc gct ttc agc aat tgc Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys 100 105 110	336
tac cca tat gac atc cct gac tat gca tgc ctc cga tcc att gta gca Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala 115 120 125	384
tcc tca ggg aca gtg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt Ser Ser Gly Thr Val Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly 130 135 140	432
gta act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp 145 150 155 160	480
agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg cta aca aaa tct gga agc tct tac Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr 165 170 175	528
ccc aca ttg aat gtg aca atg cct aac aat aaa aat ttc gac aag cta Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu 180 185 190	576
tac atc tgg ggg att cat cac ccg agc tca aat caa gag cag aca aaa Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys 195 200 205	624
ttg tac atc caa gaa tca gga cga gta aca gtc tca aca aaa aga agt Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser 210 215 220	672
caa caa aca ata atc cct aac atc gga tct aga ccg ttg gtc aga ggt Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly 225 230 235 240	720
caa tca ggc agg ata agc ata tac tgg acc att gta aaa cct gga gat Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp 245 250 255	768
atc cta atg ata aac agt aat ggc aac tta gtt gca ccg cgg gga tat Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr 260 265 270	816
ttt aaa ttg aac aca ggg aaa agc tct gta atg aga tcc gat gta ccc Phe Lys Leu Asn Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro 275 280 285	864
ata gac att tgt gtg tct gaa tgt att aca cca aat gga agc atc tcc Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser 290 295 300	912
aac gac aag cca ttc caa aat gtg aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys 305 310 315 320	960
ccc aag tat atc agg caa aac act tta aag ctg gcc act ggg atg agg Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg 325 330 335	1008

aat gta cca gaa aag caa acc aga gga atc ttt gga gca ata gcg gga Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly 340 345 350	1056
ttc atc gaa aac ggc tgg gaa gga atg gtt gat ggg tgg tat ggg ttc Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe 355 360 365	1104
cga tat caa aac tct gaa gga aca ggg caa gct gca gat cta aag agc Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser 370 375 380	1152
act caa gca gcc atc gac cag att aat gga aag tta aac aga gtg att Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile 385 390 395 400	1200
gaa aga acc aat gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa Glu Arg Thr Asn Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu 405 410 415	1248
gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys 420 425 430	1296
ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn 435 440 445	1344
caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu 450 455 460	1392
aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly 465 470 475 480	1440
tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gaa tca ata Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile 485 490 495	1488
aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aaa gat gaa gca tta aac Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn 500 505 510	1536
aat cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp 515 520 525	1584
tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val 530 535 540	1632
gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aaa ggc aac atc aga Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg 545 550 555 560	1680
tgc aac att tgc att tga Cys Asn Ile Cys Ile 565	1698

<210> 62
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 62

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
 20 25 30

His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
 35 40 45

Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
 50 55 60

Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
 65 70 75 80

Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
 85 90 95

Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys
 100 105 110

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala
 115 120 125

Ser Ser Gly Thr Val Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
 130 135 140

Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp
 145 150 155 160

Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Ser Tyr
 165 170 175

Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu
 180 185 190

Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Gln Glu Gln Thr Lys
 195 200 205

Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser
 210 215 220

Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Leu Val Arg Gly
 225 230 235 240

Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255

Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr
 260 265 270

Phe Lys Leu Asn Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro
 275 280 285

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 355 360 365

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

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile
485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn
500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 63
<211> 2280
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2280)

<400> 63
atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat ctg atg tta caa tcc cgc acc 48
Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Leu Gln Ser Arg Thr
1 5 10 15
cgc gag ata cta aca aaa act act gtg gac cac atg gcc ata atc aag 96
Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys
20 25 30
aaa tac aca tca gga aga caa gag aag aac cct gca ctt agg atg aaa 144
Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys
35 40 45
tgg atg atg gca atg aaa tac cca att aca gca gat aag agg ata atg 192
Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met
50 55 60

gag atg att cct gag aga aat gaa cag gga caa acc ctt tgg agc aaa	240
Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys	
65 70 75 80	
acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta atg gta tca cct ctg gca gtg	288
Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val	
85 90 95	
aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca acg aac aca att cat tat cca	336
Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Asn Thr Ile His Tyr Pro	
100 105 110	
aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aag gtt gaa aga ttg aaa cac gga	384
Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly	
115 120 125	
acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat caa gtc aag ata aga cga aga	432
Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg	
130 135 140	
gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac ctc agt gct aaa gaa gca caa	480
Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln	
145 150 155 160	
gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca aat gaa gtg gga gcc aga att	528
Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile	
165 170 175	
cta aca tca gaa tca caa cta aca ata acc aaa gag aaa aag gaa gaa	576
Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu	
180 185 190	
ctt cag gac tgc aaa att gct ccc ttg atg gta gca tac atg cta gaa	624
Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu	
195 200 205	
aga gag ttg gtc cga aaa aca agg ttc ctc cca gta gta ggc gga aca	672
Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Val Gly Gly Thr	
210 215 220	
agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat ctg act cag gga aca tgc tgg	720
Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp	
225 230 235 240	
gag caa atg tac acc cca gga gga aaa gtt aga aac gat gat att gat	768
Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp	
245 250 255	
caa agt tta att att gca gcc cgg aac ata gtg aga aga gca aca gta	816
Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val	
260 265 270	
tca gca gat cca cta gca tcc cta ctg gaa atg tgc cac agt aca cag	864
Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln	
275 280 285	
att ggt gga aca agg atg gta gac atc ctt aag cag aac cca aca gag	912
Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu	
290 295 300	

gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca gca atg gga ttg aga att agc Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305 310 315 320	960
tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc ttc aaa agg aca agt gga tca Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser 325 330 335	1008
tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt acg ggc aac ctt caa aca ttg Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu 340 345 350	1056
aaa ata aga gtg cat gag ggc tat gaa gaa ttc aca atg gtc gga aga Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg 355 360 365	1104
aga gca aca gcc att atc aga aag gca acc aga aga ttg att caa ttg Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu 370 375 380	1152
ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca att gct gaa gca ata att gta Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val 385 390 395 400	1200
gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly 405 410 415	1248
gat ttg aac ttt gtt aat aga gca aat cag cgt ttg aac ccc atg cat Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His 420 425 430	1296
caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat gca aaa gtg ctt ttc caa aat Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn 435 440 445	1344
tgg gga att gaa ccc atc gac aat gta atg ggg atg att gga ata ttg Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu 450 455 460	1392
cct gac atg acc cca agc acc gag atg tca ttg aga gga gtg aga gtc Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val 465 470 475 480	1440
agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc agc act gag aga gtg gtg gtg Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val 485 490 495	1488
agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg gat caa agg gga aac ata cta Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu 500 505 510	1536
ctg tcc cct gaa gaa gtc agt gaa aca caa gga acg gaa aag ctg aca Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr 515 520 525	1584
ata att tat tcg tca tca atg atg tgg gag att aat ggt ccc gaa tca Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser 530 535 540	1632

gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc atc aga aac tgg gaa att gta Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val 545 550 555 560	1680
aaa att cag tgg tca cag gac ccc aca atg tta tac aat aag ata gaa Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu 565 570 575	1728
ttt gaa cca ttc caa tcc ctg gtc cct agg gcc acc aga agc caa tac Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr 580 585 590	1776
agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag caa atg cga gat gta ctt gga Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly 595 600 605	1824
aca ttt gat act gct caa ata ata aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala 610 615 620	1872
cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc tct tct ttg act gtt aat gta Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val 625 630 635 640	1920
aga ggt tcg gga atg agg ata ctt gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe 645 650 655	1968
aac tac aat aaa gtc act aaa agg ctc aca gtc ctc gga aag gat gca Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala 660 665 670	2016
ggt gcg ctt act gag gac cca gat gaa ggt acg gct gga gta gag tct Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser 675 680 685	2064
gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta ggt aaa gaa aac aag aga tat Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr 690 695 700	2112
ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctt agc aaa ctt gca aaa ggg gag Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu 705 710 715 720	2160
aaa gcc aat gta cta att ggg caa ggg gac gta gtg ttg gta atg aaa Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys 725 730 735	2208
cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act gac agc cag aca gcg acc aaa Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys 740 745 750	2256
agg att cgg atg gcc atc aat tag Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn 755	2280

<210> 64
 <211> 759
 <212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 64

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

Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240

Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Lys Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
 245 250 255

Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
 260 265 270

Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300

Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335

Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350

Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365

Arg Ala Thr Ala Ile Ile Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400

Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415

Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
 420 425 430

Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
 435 440 445

Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
 450 455 460

Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val
465 470 475 480

Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
485 490 495

Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu
500 505 510

Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525

Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540

Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu
565 570 575

Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr
580 585 590

Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605

Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620

Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
645 650 655

Asn Tyr Asn Lys Val Thr Lys Arg Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala
660 665 670

Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser
675 680 685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr
690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu
705 710 715 720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
725 730 735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
740 745 750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
755

<210> 65
<211> 2274
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (2274)

<400> 65
atg gat gtc aat ccg act cta ctt ttc tta aag gtg cca gcg caa aat 48
Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
1 5 10 15
gct ata agc aca aca ttc cct tat act gga gat cct ccc tac agt cat 96
Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
20 25 30
gga aca ggg aca gga tac acc atg gat act gtc aac aga aca cac caa 144
Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
35 40 45
tat tca gaa aaa ggg aaa tgg aca aca aac act gag att gga gca cca 192
Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro
50 55 60
caa ctt aat cca atc gat gga cca ctt cct gaa gac aat gaa cca agt 240
Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
65 70 75 80
ggg tac gcc caa aca gat tgt gta ttg gaa gca atg gct ttc ctt gaa 288
Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
85 90 95
gaa tcc cat ccc gga atc ttt gaa aat tcg tgt ctt gaa acg atg gag 336
Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Leu Glu Thr Met Glu
100 105 110
gtg att cag cag aca aga gtg gac aaa cta aca caa ggc cga caa act 384
Val Ile Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
115 120 125
tat gat tgg acc ttg aat agg aat caa cct gcc gca aca gca ctt gct 432

Tyr	Asp	Trp	Thr	Leu	Asn	Arg	Asn	Gln	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala		
130							135				140						
aat	acg	att	gaa	gta	ttc	aga	tca	aat	ggg	ctg	acc	tcc	aat	gaa	tcg	480	
Asn	Thr	Ile	Glu	Val	Phe	Arg	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser		
145					150				155					160			
ggg	aga	ttg	atg	gac	ttc	ctc	aaa	gat	gtc	atg	gag	tcc	atg	aac	aag	528	
Gly	Arg	Leu	Met	Asp	Phe	Leu	Lys	Asp	Val	Met	Glu	Ser	Met	Asn	Lys		
				165					170					175			
gag	gaa	atg	gaa	ata	aca	aca	cac	ttc	caa	cgg	aag	aga	aga	gta	aga	576	
Glu	Glu	Met	Glu	Ile	Thr	Thr	His	Phe	Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Val	Arg		
			180					185					190				
gac	aac	atg	aca	aag	aga	atg	ata	aca	cag	aga	acc	ata	gga	aag	aaa	624	
Asp	Asn	Met	Thr	Lys	Arg	Met	Ile	Thr	Gln	Arg	Thr	Ile	Gly	Lys	Lys		
		195					200					205					
aaa	caa	cga	tta	agc	aga	aag	agc	tat	cta	atc	aga	aca	tta	acc	cta	672	
Lys	Gln	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Ser	Tyr	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu		
	210					215					220						
aac	aca	atg	acc	aag	gac	gct	gag	aga	ggg	aaa	ttg	aaa	cga	cga	gca	720	
Asn	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Arg	Arg	Ala		
225					230				235						240		
atc	gct	acc	cca	ggg	atg	cag	ata	aga	gga	ttt	gta	tat	ttt	gtt	gaa	768	
Ile	Ala	Thr	Pro	Gly	Met	Gln	Ile	Arg	Gly	Phe	Val	Tyr	Phe	Val	Glu		
				245					250					255			
aca	cta	gct	cga	aga	ata	tgt	gaa	aag	ctt	gaa	caa	tca	gga	ttg	cca	816	
Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Ile	Cys	Glu	Lys	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Leu	Pro		
			260					265					270				
gtt	ggc	ggg	aat	gag	aaa	aag	gcc	aaa	ctg	gct	aat	gtc	gtc	aga	aaa	864	
Val	Gly	Gly	Asn	Glu	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Val	Val	Arg	Lys		
		275					280					285					
atg	atg	act	aat	tcc	caa	gac	act	gaa	ctc	tcc	ttc	acc	atc	act	ggg	912	
Met	Met	Thr	Asn	Ser	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Phe	Thr	Ile	Thr	Gly		
	290					295					300						
gac	aat	acc	aaa	tgg	aat	gaa	aat	cag	aac	cca	cgc	ata	ttc	ctg	gca	960	
Asp	Asn	Thr	Lys	Trp	Asn	Glu	Asn	Gln	Asn	Pro	Arg	Ile	Phe	Leu	Ala		
305					310				315					320			
atg	atc	aca	tac	ata	act	aga	gat	cag	cca	gaa	tgg	ttc	aga	aat	gtt	1008	
Met	Ile	Thr	Tyr	Ile	Thr	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Trp	Phe	Arg	Asn	Val		
				325					330					335			
cta	agc	att	gca	ccg	att	atg	ttc	tca	aat	aaa	atg	gca	aga	ctg	ggg	1056	
Leu	Ser	Ile	Ala	Pro	Ile	Met	Phe	Ser	Asn	Lys	Met	Ala	Arg	Leu	Gly		
			340					345				350					
aaa	gga	tat	atg	ttt	gaa	agc	aaa	agt	atg	aaa	ttg	aga	act	caa	ata	1104	
Lys	Gly	Tyr	Met	Phe	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Ile		
		355					360				365						
cca	gca	gaa	atg	cta	gca	agc	att	gac	cta	aaa	tat	ttc	aat	gat	tca	1152	

Pro	Ala	Glu	Met	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Leu	Lys	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser		
370							375				380						
aca	aaa	aag	aaa	att	gaa	aag	ata	cga	cca	ctc	ctg	gtt	gac	ggg	act	1200	
Thr	Lys	Lys	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Arg	Pro	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Thr		
385					390					395				400			
gct	tca	ctg	agt	cct	ggc	atg	atg	atg	gga	atg	ttc	aac	atg	ttg	agc	1248	
Ala	Ser	Leu	Ser		Gly	Met	Met	Met	Gly	Met	Phe	Asn	Met	Leu	Ser		
				405					410					415			
act	gtg	ctg	ggg	gta	tcc	ata	tta	aac	ctg	ggc	cag	agg	aaa	tat	aca	1296	
Thr	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Gly	Gln	Arg	Lys	Tyr	Thr		
			420					425						430			
aag	acc	aca	tac	tgg	tgg	gat	ggg	ctg	caa	tca	tcc	gat	gac	ttt	gct	1344	
Lys	Thr	Thr	Tyr	Trp	Trp	Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Asp	Asp	Phe	Ala		
			435				440						445				
ttg	ata	gtg	aat	gcg	cct	aat	cat	gaa	gga	ata	caa	gct	gga	gta	gac	1392	
Leu	Ile	Val	Asn	Ala	Pro	Asn	His	Glu	Gly	Ile	Gln	Ala	Gly	Val	Asp		
			450				455					460					
aga	ttc	tat	aga	act	tgc	aaa	ctg	gtc	ggg	atc	aac	atg	agc	aaa	aag	1440	
Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr	Cys	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Met	Ser	Lys	Lys		
465						470				475					480		
aag	tcc	tac	ata	aat	aga	act	gga	aca	ttc	gaa	ttc	aca	agc	ttt	ttc	1488	
Lys	Ser	Tyr	Ile	Asn	Arg	Thr	Gly	Thr	Phe	Glu	Phe	Thr	Ser	Phe	Phe		
				485					490					495			
tac	egg	tat	ggg	ttt	gta	gcc	aat	ttc	agc	atg	gaa	cta	ccc	agt	ttt	1536	
Tyr	Arg	Tyr	Gly	Phe	Val	Ala	Asn	Phe	Ser	Met	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe		
			500					505					510				
ggg	gtt	tcc	gga	ata	aat	gaa	tct	gca	gac	atg	agc	att	gga	gtg	aca	1584	
Gly	Val	Ser	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Ala	Asp	Met	Ser	Ile	Gly	Val	Thr		
			515				520						525				
gtc	atc	aaa	aac	aac	atg	ata	aat	aat	gat	ctc	ggg	cct	gcc	acg	gca	1632	
Val	Ile	Lys	Asn	Asn	Met	Ile	Asn	Asn	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Thr	Ala		
			530				535						540				
caa	atg	gca	ctc	caa	ctc	ttc	att	aag	gat	tat	egg	tac	aca	tac	egg	1680	
Gln	Met	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Ile	Lys	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Arg		
545					550					555					560		
tgc	cat	aga	ggg	gat	acc	cag	ata	caa	acc	aga	aga	tct	ttt	gag	ttg	1728	
Cys	His	Arg	Gly	Asp	Thr	Gln	Ile	Gln	Thr	Arg	Arg	Ser	Phe	Glu	Leu		
				565					570					575			
aag	aaa	ctg	tgg	gaa	cag	act	cga	tca	aag	act	ggg	cta	ctg	gta	tca	1776	
Lys	Lys	Leu	Trp	Glu	Gln	Thr	Arg	Ser	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Val	Ser		
			580					585						590			
gat	ggg	ggg	cca	aac	cta	tat	aac	atc	aga	aac	cta	cac	atc	ccg	gaa	1824	
Asp	Gly	Gly	Pro	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ile	Arg	Asn	Leu	His	Ile	Pro	Glu		
			595				600						605				
gtc	tgt	tta	aaa	tgg	gag	cta	atg	gat	gaa	gat	tat	aag	ggg	agg	cta	1872	

Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu
 610 615 620
 tgc aat cca ttg aat cct ttc gtt agt cac aaa gaa att gaa tca gtc 1920
 Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val
 625 630 635 640
 aac agt gca gta gta atg cct gct cat ggc cct gcc aaa agc atg gag 1968
 Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu
 645 650 655
 tat gat gct gtt gca aca aca cat tct tgg atc ccc aag agg aac cgg 2016
 Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670
 tcc ata ttg aac aca agc caa agg gga ata cta gaa gat gag cag atg 2064
 Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685
 tat cag aaa tgc tgc aac ctg ttt gaa aaa ttc ttc ccc agc agc tca 2112
 Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
 690 695 700
 tac aga aga cca gtc gga att tct agt atg gtt gag gcc atg gta tcc 2160
 Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
 705 710 715 720
 agg gcc cgc att gat gca cga att gac ttc gaa tct gga cgg ata aag 2208
 Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
 725 730 735
 aag gat gag ttc gct gag atc atg aag atc tgt tcc acc att gaa gag 2256
 Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
 740 745 750
 ctc aga cgg caa aaa tag 2274
 Leu Arg Arg Gln Lys
 755

<210> 66
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 66

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 1 5 10 15
 Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 20 25 30
 Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 35 40 45
 Tyr Ser Glu Lys Gly Lys Trp Thr Thr Asn Thr Glu Ile Gly Ala Pro

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

290	295	300
Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Ile Phe Leu Ala 305 310 315 320		
Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asp Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val 325 330 335		
Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly 340 345 350		
Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile 355 360 365		
Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser 370 375 380		
Thr Lys Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Val Asp Gly Thr 385 390 395 400		
Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser 405 410 415		
Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Arg Lys Tyr Thr 420 425 430		
Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala 435 440 445		
Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp 450 455 460		
Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys 465 470 475 480		
Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe 485 490 495		
Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe 500 505 510		
Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr 515 520 525		
Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala		

530		535		540
Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg				
545		550	555	560
Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Leu				
	565		570	575
Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Thr Gly Leu Leu Val Ser				
	580	585		590
Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu				
	595	600		605
Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Lys Gly Arg Leu				
	610	615	620	
Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Val				
625		630	635	640
Asn Ser Ala Val Val Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Ser Met Glu				
	645		650	655
Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg				
	660	665		670
Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Ile Leu Glu Asp Glu Gln Met				
	675	680	685	
Tyr Gln Lys Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser				
	690	695	700	
Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser				
705		710	715	720
Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys				
	725		730	735
Lys Asp Glu Phe Ala Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu				
	740	745		750
Leu Arg Arg Gln Lys				
	755			

<211> 2151
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2151)

<400> 67
 atg gaa gac ttt gtg cga cag tgc ttc aat cca atg atc gtc gag ctt 48
 Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15

gcg gaa aag gca atg aaa gaa tat gga gag aac ccg aaa atc gaa aca 96
 Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30

aac aaa ttt gca gca ata tgc act cac ttg gaa gtc tgc ttc atg tac 144
 Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45

tcg gat ttc cac ttt ata aat gaa ctg ggt gag tca gtg gtc ata gag 192
 Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60

tct ggt gac cca aat gct ctt ttg aaa cac aga ttt gaa atc att gag 240
 Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80

ggg aga gat cga aca atg gca tgg aca gta gta aac agc atc tgc aac 288
 Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95

acc aca aga gct gaa aaa cct aaa ttt ctt cca gat tta tac gac tat 336
 Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

aaa gag aac aga ttt gtt gaa att ggt gtg aca agg aga gaa gtt cac 384
 Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125

ata tac tac ctg gag aag gcc aac aaa ata aag tct gag aaa aca cat 432
 Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140

atc cac att ttc tca ttt aca gga gaa gaa atg gct aca aaa gcg gac 480
 Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160

tat act ctt gat gaa gag agt aga gcc agg atc aag acc aga cta ttc 528
 Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175

act ata aga caa gaa atg gcc agt aga ggc ctc tgg gat tcc ttt cgt 576
 Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
 180 185 190

cag tcc gag aga ggc gaa gag aca att gaa gaa aga ttt gaa atc aca 624
 Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr

195	200	205	
ggg acg atg cgc aag ctt gcc aat tac agt ctc cca ccg aac ttc tcc Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser 210 215 220			672
agc ctt gaa aat ttt aga gtc tat ata gat gga ttc gaa ccg aac ggc Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly 225 230 235 240			720
tgc att gag agt aag ctt tct caa atg tcc aaa gaa gta aat gcc aaa Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys 245 250 255			768
ata gaa cca ttt tca aag aca aca ccc cga cca ctc aaa atg cca ggt Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly 260 265 270			816
ggt cca ccc tgc cat cag cga tcc aaa ttc ttg cta atg gat gct ctg Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu 275 280 285			864
aaa ctg agc att gag gac cca agt cac gag gga gag ggg ata cca cta Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu 290 295 300			912
tat gat gca atc aaa tgc atg aaa act ttc ttt gga tgg aaa gag ccc Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro 305 310 315 320			960
agt att gtt aaa cca cat aaa aag ggt ata aac ccg aac tat ctc caa Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln 325 330 335			1008
act tgg aag caa gta tta gaa gaa ata caa gac ctt gag aac gaa gaa Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu 340 345 350			1056
agg acc ccc aag acc aag aat atg aaa aaa aca agc caa ttg aaa tgg Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp 355 360 365			1104
gca cta ggt gaa aat atg gca cca gag aaa gtg gat ttt gag gat tgt Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys 370 375 380			1152
aaa gac atc aat gat tta aaa caa tat gac agt gat gag cca gaa gca Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala 385 390 395 400			1200
agg tct ctt gca agt tgg att caa agt gag ttc aac aag gct tgt gag Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu 405 410 415			1248
ctg aca gat tca agc tgg ata gag ctc gat gaa att ggg gag gat gtc Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val 420 425 430			1296
gcc cca ata gaa tac att gcg agc atg agg aga aat tat ttt act gct Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala			1344

435	440	445	
gag att tcc cat tgt aga gca aca gaa tat ata atg aaa gga gtg tac			1392
Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr			
450	455	460	
atc aac act gct cta ctc aat gca tcc tgt gct gcg atg gat gaa ttt			1440
Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe			
465	470	475	480
caa tta att ccg atg ata agt aaa tgc agg acc aaa gaa ggg aga agg			1488
Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg			
	485	490	495
aaa aca aat tta tat gga ttc ata ata aag gga agg tcc cat tta aga			1536
Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg			
	500	505	510
aat gat act gac gtg gtg aac ttt gta agt atg gaa ttt tct ctc act			1584
Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr			
	515	520	525
gat cca aga ttt gag cca cac aaa tgg gaa aaa tac tgc gtt cta gaa			1632
Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu			
	530	535	540
att gga gac atg ctt tta aga act gct gta ggt caa gtg tca aga ccc			1680
Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro			
545	550	555	560
atg ttt ttg tat gta agg aca aat gga acc tct aaa att aaa atg aaa			1728
Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys			
	565	570	575
tgg gga atg gaa atg agg cgc tgc ctc ctt cag tct ctg caa cag att			1776
Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile			
	580	585	590
gaa agc atg atc gaa gct gag tcc tca gtc aaa gaa aag gac atg acc			1824
Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr			
	595	600	605
aaa gaa ttt ttt gag aac aaa tca gag aca tgg cct ata gga gag tcc			1872
Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser			
	610	615	620
ccc aaa gga gtg gaa gag ggc tca atc ggg aag gtt tgc agg acc tta			1920
Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu			
625	630	635	640
tta gca aaa tct gtg ttt aac agt tta tat gca tct cca caa ctg gaa			1968
Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu			
	645	650	655
gga ttt tca gct gaa tct agg aaa tta ctt ctc att gtt cag gct ctt			2016
Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu			
	660	665	670
aga gat gac ctg gaa cct gga acc ttt gat att ggg ggg tta tat gaa			2064
Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu			

675 680 685
 tca att gag gag tgc ctg att aat gat ccc tgg gtt ttg ctt aat gca 2112
 Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700
 tct tgg ttc aac tcc ttc ctc aca cat gca ctg aag tag 2151
 Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
 705 710 715

 <210> 68
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

 <400> 68
 Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asn Pro Lys Ile Glu Thr
 20 25 30
 Asn Lys Phe Ala Ala Ile Cys Thr His Leu Glu Val Cys Phe Met Tyr
 35 40 45
 Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Leu Gly Glu Ser Val Val Ile Glu
 50 55 60
 Ser Gly Asp Pro Asn Ala Leu Leu Lys His Arg Phe Glu Ile Ile Glu
 65 70 75 80
 Gly Arg Asp Arg Thr Met Ala Trp Thr Val Val Asn Ser Ile Cys Asn
 85 90 95
 Thr Thr Arg Ala Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 Lys Glu Asn Arg Phe Val Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His
 115 120 125
 Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His
 130 135 140
 Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp
 145 150 155 160
 Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe
 165 170 175

Thr Ile Arg Gln Glu Met Ala Ser Arg Gly Leu Trp Asp Ser Phe Arg
180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr
195 200 205

Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asn Tyr Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser
210 215 220

Ser Leu Glu Asn Phe Arg Val Tyr Ile Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Lys Leu Ser Gln Met Ser Lys Glu Val Asn Ala Lys
245 250 255

Ile Glu Pro Phe Ser Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Lys Met Pro Gly
260 265 270

Gly Pro Pro Cys His Gln Arg Ser Lys Phe Leu Leu Met Asp Ala Leu
275 280 285

Lys Leu Ser Ile Glu Asp Pro Ser His Glu Gly Glu Gly Ile Pro Leu
290 295 300

Tyr Asp Ala Ile Lys Cys Met Lys Thr Phe Phe Gly Trp Lys Glu Pro
305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Pro His Lys Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Gln
325 330 335

Thr Trp Lys Gln Val Leu Glu Glu Ile Gln Asp Leu Glu Asn Glu Glu
340 345 350

Arg Thr Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp
355 360 365

Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Glu Asp Cys
370 375 380

Lys Asp Ile Asn Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Ala
385 390 395 400

Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Ser Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu
405 410 415

Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val
 420 425 430

Ala Pro Ile Glu Tyr Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala
 435 440 445

Glu Ile Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460

Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495

Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510

Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525

Asp Pro Arg Phe Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540

Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Thr Ala Val Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560

Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575

Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590

Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
660 665 670

Arg Asp Asp Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ser Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 69
<211> 844
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (690)

<400> 69
atg gat tcc aac act gtg tca agc ttt cag gta gac tgt ttt ctt tgg 48
Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1 5 10 15
cat gtc cgt aaa cga ttc gca gac caa gaa ctg ggt gat gcc cca ttc 96
His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
20 25 30
ctt gac cgg ctt cgc cga gac cag aag tcc cta agg gga aga ggt agc 144
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45
act ctt ggt ctg gac atc gaa aca gcc act cat gca gga aag cag ata 192
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr His Ala Gly Lys Gln Ile
50 55 60
gtg gag cag att ctg gaa aag gaa tca gat gag gca ctt aaa atg acc 240
Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
att gcc tct gtt cct gct tca cgc tac tta act gac atg act ctt gat 288
Ile Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Asp
85 90 95
gag atg tca aga gac tgg ttc atg ctc atg ccc aag caa aaa gta aca 336
Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Thr
100 105 110
ggc tcc cta tgt ata aga atg gac cag gca atc atg gat aag aac atc 384
Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
115 120 125

ata ctt aaa gca aac ttt agt gtg att ttc gaa agg ctg gaa aca cta 432
 Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Glu Arg Leu Glu Thr Leu
 130 135 140
 ata cta ctt aga gcc ttc acc gaa gaa gga gca gtc gtt ggc gaa att 480
 Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Val Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160
 tca cca tta cct tct ctt cca gga cat act aat gag gat gtc aaa aat 528
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn
 165 170 175
 gca att ggg gtc ctc atc gga gga ctt aaa tgg aat gat aat acg gtt 576
 Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Lys Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190
 aga atc tct gaa act cta cag aga ttc gct tgg aga agc agt cat gaa 624
 Arg Ile Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser His Glu
 195 200 205
 aat ggg aga cct tca ttc cct tca aaa cag aaa cga aaa atg gag aga 672
 Asn Gly Arg Pro Ser Phe Pro Ser Lys Gln Lys Arg Lys Met Glu Arg
 210 215 220
 aca att aag cca gaa att tgaagaaata agatggttga ttgaagaagt 720
 Thr Ile Lys Pro Glu Ile
 225 230
 gcgacataga ttgaaaaata cagaaaatag ttttgaacaa ataacattta tgcaagcctt 780
 acaactattg cttgaagtag aacaagagat aagaactttc tcgtttcagc ttatttaatg 840
 ataa 844

<210> 70
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 70

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15

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

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

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

Val Glu Gln Ile Leu Glu Lys Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr

[illegible]

<210> 71
<211> 1497
<212> DNA
<213> Virus Influenza

```
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1497)
```

<400> 71
atg gcg tct caa ggc acc aaa cga tcc tat gaa cag atg gaa act gat 48
Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1 5 10 15
ggg gaa cgc cag aat gca act gaa atc aga gca tct gtc gga agg atg 96
Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met

20	25	30	
gtg gga gga atc gga cgg ttt tat gtc cag atg tgt act gag ctt aaa Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys 35 40 45			144
cta aac gac cat gaa ggg cgg ctg att cag aac agc ata aca ata gaa Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu 50 55 60			192
agg atg gtg ctt tcg gca ttc gac gaa aga aga aac aag tat ctc gag Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu 65 70 75 80			240
gag cat ccc agt gct ggg aaa gac cct aag aaa acg gga ggc ccg ata Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile 85 90 95			288
tac aga aga aaa gat ggg aaa tgg atg agg gaa ctc atc ctc cat gat Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp 100 105 110			336
aaa gaa gaa atc atg aga atc tgg cgt cag gcc aac aat ggt gaa gac Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp 115 120 125			384
gct act gct ggt ctt act cat atg atg atc tgg cac tcc aat ctc aat Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn 130 135 140			432
gac acc aca tac caa aga aca agg gct ctt gtt cgg act ggg atg gat Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp 145 150 155 160			480
ccc aga atg tgc tct ctg atg caa ggc tca acc ctc cca cgg aga tct Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser 165 170 175			528
gga gcc gct ggt gct gca gta aaa ggc gtt gga aca atg gta atg gaa Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu 180 185 190			576
ctc atc aga atg atc aag cgc gga ata aat gat cgg aat ttc tgg aga Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg 195 200 205			624
ggt gaa aat ggt cga aga acc aga att gct tat gaa aga atg tgc aat Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn 210 215 220			672
atc ctc aaa ggg aaa ttt cag aca gca gca caa cgg gct atg atg gac Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp 225 230 235 240			720
cag gtg agg gaa ggc cgc aat cct gga aac gct gag att gag gat ctc Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu 245 250 255			768
att ttc ttg gca cga tca gca ctt att ttg aga gga tca gta gcc cat Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His			816

260	265	270	
aaa tca tgc cta cct gcc tgt gtt tat ggc ctt gca cta acc agt ggg Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Leu Thr Ser Gly 275 280 285			864
tat gac ttt gag aag gaa gga tac tct ctg gtt gga att gat cct ttc Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe 290 295 300			912
aaa cta ctc cag aac agt caa att ttc agt cta atc aga cca aaa gaa Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu 305 310 315 320			960
aac cca gca cac aaa agc cag ttg gtg tgg atg gca tgc cat tct gca Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala 325 330 335			1008
gca ttt gag gat ctg aga gtt tta aat ttc att aga gga acc aaa gta Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val 340 345 350			1056
atc cca aga gga cag tta aca acc aga gga gtt caa att gct tca aat Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn 355 360 365			1104
gaa aac atg gag aca ata aat tct agc aca ctt gaa ctg aga agc aaa Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys 370 375 380			1152
tat tgg gca ata agg acc aga agc gga gga aac acc agt caa cag aga Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg 385 390 395 400			1200
gca tct gca gga cag ata agt gtg caa cct act ttc tca gta cag aga Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg 405 410 415			1248
aat ctt ccc ttt gag aga gca acc att atg gct gca ttc act ggt aac Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn 420 425 430			1296
act gaa gga agg act tcc gac atg aga acg gaa atc ata agg atg atg Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met 435 440 445			1344
gaa aat gcc aaa tca gaa gat gtg tct ttc cag ggg cgg gga gtc ttc Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe 450 455 460			1392
gag ctc tcg gac gaa aag gca acg aac ccg atc gtg cct tcc ttt gac Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp 465 470 475 480			1440
atg agc aat gaa ggg tct tat ttc ttc gga gac aat gct gag gag ttt Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe 485 490 495			1488
gac agt taa Asp Ser			1497

<210> 72
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 72

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Val Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Asn Asp His Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Lys Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu His Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Met Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Thr Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Gly Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu
 245 250 255

Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Leu Thr Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Lys Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Ile Phe Ser Leu Ile Arg Pro Lys Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Asn Phe Ile Arg Gly Thr Lys Val
 340 345 350

Ile Pro Arg Gly Gln Leu Thr Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Ile Asn Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Ser Gln Gln Arg
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415

Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445

Glu Asn Ala Lys Ser Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Phe
 485 490 495

Asp Ser

<210> 73
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> Virus Influenza

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1413)

<400> 73
 atg aat cca aat caa aag ata ata gca att gga ttt gca tca ttg ggg 48
 Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 ata tta atc att aat gtc att ctc cat gta gtc agc att ata gta aca 96
 Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30
 gta ctg gtc ctc aat aac aat aga aca gat ctg aac tgc aaa ggg acg 144
 Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45
 atc ata aga gaa tac aat gaa aca gta aga gta gaa aaa ctt act caa 192
 Ile Ile Arg Glu Tyr Asn Glu Thr Val Arg Val Glu Lys Leu Thr Gln
 50 55 60
 tgg tat aat acc agt aca att aag tac ata gag aga cct tca aat gaa 240
 Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65 70 75 80
 tac tac atg aat aac act gaa cca ctt tgt gag gcc caa ggc ttt gca 288
 Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85 90 95
 cca ttt tcc aaa gat aat gga ata cga att ggg tcg aga ggc cat gtt 336
 Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
 100 105 110
 ttt gtg ata aga gaa cct ttt gta tca tgt tcg ccc tca gaa tgt aga 384
 Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser Glu Cys Arg
 115 120 125

acc ttt ttc ctc aca cag ggc tca tta ctc aat gac aaa cat tct aac	432
Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ser Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn	
130 135 140	
ggc aca ata aag gat cga agt ccg tat agg act ttg atg agt gtc aaa	480
Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys	
145 150 155 160	
ata ggg caa tca cct aat gta tat caa gct agg ttt gaa tcg gtg gca	528
Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala	
165 170 175	
tgg tca gca aca gca tgc cat gat gga aaa aaa tgg atg aca gtt gga	576
Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly	
180 185 190	
gtc aca ggg ccc gac aat caa gca att gca gta gtg aac tat gga ggt	624
Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly	
195 200 205	
gtt ccg gtt gat att att aat tca tgg gca ggg gat att tta aga acc	672
Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr	
210 215 220	
caa gaa tca tca tgc acc tgc att aaa gga gac tgt tat tgg gta atg	720
Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met	
225 230 235 240	
act gat gga ccg gca aat agg caa gct aaa tat agg ata ttc aaa gca	768
Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala	
245 250 255	
aaa gat gga aga gta att gga caa act gat ata agt ttc aat ggg gga	816
Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly	
260 265 270	
cac ata gag gag tgt tct tgt tac ccc aat gaa ggg aag gtg gaa tgc	864
His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Glu Gly Lys Val Glu Cys	
275 280 285	
ata tgc agg gac aat tgg act gga aca aat aga cca att ctg gta ata	912
Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Ile Leu Val Ile	
290 295 300	
tct tct gat cta tcg tac aca gtt gga tat ttg tgt gct ggc att ccc	960
Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro	
305 310 315 320	
act gac act cct agg gga gag gat agt caa ttc aca ggc tca tgt aca	1008
Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr	
325 330 335	
agt cct ttg gga aat aaa gga tac ggt gta aaa ggc ttc ggg ttt cga	1056
Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg	
340 345 350	
caa gga act gac gta tgg gcc gga agg aca att agt agg act tca aga	1104
Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg	
355 360 365	

tca gga ttc gaa ata ata aaa atc agg aat ggt tgg aca cag aac agt 1152
 Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
 370 375 380

aag gac caa atc agg agg caa gtg att atc gat gac cca aat tgg tca 1200
 Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
 385 390 395 400

gga tat agc ggt tct ttc aca ttg ccg gtt gaa ctg aca aaa aag gga 1248
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
 405 410 415

tgt ttg gtc ccc tgt ttc tgg gtt gaa atg att aga ggt aaa cct gaa 1296
 Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
 420 425 430

gaa aca aca ata tgg acc tct agc agc tcc att gtg atg tgt gga gta 1344
 Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
 435 440 445

gat cat aaa att gcc agt tgg tca tgg cac gat gga gct att ctt ccc 1392
 Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
 450 455 460

ttt gac atc gat aag atg taa 1413
 Phe Asp Ile Asp Lys Met
 465 470

<210> 74
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 74

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Ala Ile Gly Phe Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Ile Ile Asn Val Ile Leu His Val Val Ser Ile Ile Val Thr
 20 25 30

Val Leu Val Leu Asn Asn Asn Arg Thr Asp Leu Asn Cys Lys Gly Thr
 35 40 45

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

Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Ile Lys Tyr Ile Glu Arg Pro Ser Asn Glu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Glu Pro Leu Cys Glu Ala Gln Gly Phe Ala
 85 90 95

Pro Phe Ser Lys Asp Asn Gly Ile Arg Ile Gly Ser Arg Gly His Val
 100 105 110

Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Val Ser Cys Ser Pro Ser 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 Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Val Lys
 145 150 155 160

Ile Gly Gln Ser Pro Asn Val Tyr Gln Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala
 165 170 175

Trp Ser Ala Thr Ala Cys His Asp Gly Lys Lys Trp Met Thr Val Gly
 180 185 190

Val Thr Gly Pro Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Val Asn Tyr Gly Gly
 195 200 205

Val Pro Val Asp Ile Ile Asn Ser Trp Ala Gly Asp Ile Leu Arg Thr
 210 215 220

Gln Glu Ser Ser Cys Thr Cys Ile Lys Gly Asp Cys Tyr Trp Val Met
 225 230 235 240

Thr Asp Gly Pro Ala Asn Arg Gln Ala Lys Tyr Arg Ile Phe Lys Ala
 245 250 255

Lys Asp Gly Arg Val Ile Gly Gln Thr Asp Ile Ser Phe Asn Gly Gly
 260 265 270

His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asn Glu Gly Lys Val Glu Cys
 275 280 285

Ile Cys Arg Asp Asn Trp Thr Gly Thr Asn Arg Pro Ile Leu Val Ile
 290 295 300

Ser Ser Asp Leu Ser Tyr Thr Val Gly Tyr Leu Cys Ala Gly Ile Pro
 305 310 315 320

Thr Asp Thr Pro Arg Gly Glu Asp Ser Gln Phe Thr Gly Ser Cys Thr
 325 330 335

Ser Pro Leu Gly Asn Lys Gly Tyr Gly Val Lys Gly Phe Gly Phe Arg
340 345 350

Gln Gly Thr Asp Val Trp Ala Gly Arg Thr Ile Ser Arg Thr Ser Arg
355 360 365

Ser Gly Phe Glu Ile Ile Lys Ile Arg Asn Gly Trp Thr Gln Asn Ser
370 375 380

Lys Asp Gln Ile Arg Arg Gln Val Ile Ile Asp Asp Pro Asn Trp Ser
385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Thr Leu Pro Val Glu Leu Thr Lys Lys Gly
405 410 415

Cys Leu Val Pro Cys Phe Trp Val Glu Met Ile Arg Gly Lys Pro Glu
420 425 430

Glu Thr Thr Ile Trp Thr Ser Ser Ser Ser Ile Val Met Cys Gly Val
435 440 445

Asp His Lys Ile Ala Ser Trp Ser Trp His Asp Gly Ala Ile Leu Pro
450 455 460

Phe Asp Ile Asp Lys Met
465 470

<210> 75
<211> 981
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(756)

<400> 75
atg agt ctt cta acc gag gtc gaa acg tac gtt ctc tct atc gta cca 48
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
1 5 10 15

tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg cag aga ctt gaa gat gtc ttt 96
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

gcg gga aag aac acc gat ctt gag gca ctc atg gaa tgg cta aag aca 144
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa ggg att tta gga ttt gta ttc Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe 50 55 60	192
acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga ctg cag cgt aga cgc ttt gtc Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val 65 70 75 80	240
caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat cca aac aac atg gac aga gca Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala 85 90 95	288
gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga gaa ata aca ttc cat ggg gca Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala 100 105 110	336
aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act ggt gca cta gcc agc tgc atg Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met 115 120 125	384
gga ctc ata tac aac aga atg gga act gtt aca acc gaa gtg gca ttt Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe 130 135 140	432
ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag att gct gat tcc cag cat cga Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg 145 150 155 160	480
tct cac agg cag atg gtg aca aca acc aac cca tta atc aga cat gaa Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu 165 170 175	528
aac aga atg gta tta gcc agt acc acg gct aaa gcc atg gaa cag atg Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met 180 185 190	576
gca gga tcg agt gag cag gca gca gag gcc atg gag gtt gct agt agg Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Arg 195 200 205	624
gct agg cag atg gta cag gca atg aga acc att ggg acc cac cct agc Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser 210 215 220	672
tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc ctt gaa aat tta cag gcc tac Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr 225 230 235 240	720
cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag cga ttc aag tgatcctctc Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys 245 250	766
gtcattgcag caagtatcat tgggatcttg cacttgatat tgtggattct tgatcgtctt	826
ttcttcaaatt tcatttatcg tcgccttaaa tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa	886
ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt	946
gacgatggtc attttgtaa catagagctg gagta	981

<210> 76
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza

<400> 76

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val 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 Ala 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 Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg 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 Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 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 Arg
 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 Asp 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

<210> 77
<211> 1698
<212> DNA
<213> Virus Influenza

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1698)

<400> 77
atg aag aca acc att att tta ata cta ctg acc cat tgg gcc tac agt 48
Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
1 5 10 15
caa aac cca atc agt ggc aat aac aca gcc aca ctg tgt ctg gga cac 96
Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
20 25 30
cat gca gta gca aat gga aca ttg gta aaa aca atg agt gat gat caa 144
His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Met Ser Asp Asp Gln
35 40 45
att gag gtg aca aat gct aca gaa tta gtt cag agc att tca atg ggg 192
Ile Glu Val Thr Asn Ala Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Met Gly
50 55 60
aaa ata tgc aac aaa tca tat aga att cta gat gga aga aat tgc aca 240
Lys Ile Cys Asn Lys Ser Tyr Arg Ile Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr
65 70 75 80
tta ata gat gca atg cta gga gac ccc cac tgt gac gcc ttt cag tat 288
Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Ala Phe Gln Tyr
85 90 95
gag agt tgg gac ctc ttt ata gaa aga agc agc gct ttc agc aat tgc 336
Glu Ser Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys
100 105 110
tac cca tat gac atc cct gac tat gca ccg ctc cga tcc att gta gca 384
Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Pro Leu Arg Ser Ile Val Ala
115 120 125
tcc tca ggg aca gtg gaa ttc aca gca gag gga ttc aca tgg aca ggt 432
Ser Ser Gly Thr Val Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly
130 135 140
gta act caa aac gga aga agt gga gcc tgc aaa agg gga tca gcc gat 480

Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Arg	Ser	Gly	Ala	Cys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	
145					150					155					160	
agt	ttc	ttt	agc	cga	ctg	aat	tgg	cta	aca	aaa	tct	gga	agc	tct	tac	528
Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	
				165					170					175		
ccc	aca	ttg	aat	gtg	aca	atg	cct	aac	aat	aaa	aat	ttc	gac	aag	cta	576
Pro	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	Lys	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	
				180				185					190			
tac	atc	tgg	ggg	att	cat	cac	ccg	agc	tca	aat	caa	gag	cag	aca	aaa	624
Tyr	Ile	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Ser	Asn	Gln	Glu	Gln	Thr	Lys	
		195					200					205				
ttg	tac	atc	caa	gaa	tca	gga	cga	gta	aca	gtc	tca	aca	aaa	aga	agt	672
Leu	Tyr	Ile	Gln	Glu	Ser	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	
	210					215					220					
caa	caa	aca	ata	atc	cct	aac	atc	gga	tct	aga	ccg	ttg	gtc	aga	ggt	720
Gln	Gln	Thr	Ile	Ile	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Pro	Leu	Val	Arg	Gly	
225					230					235					240	
caa	tca	ggc	agg	ata	agc	ata	tac	tgg	acc	att	gta	aaa	cct	gga	gat	768
Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	
				245					250					255		
atc	cta	atg	ata	aac	agt	aat	ggc	aac	tta	gtt	gca	ccg	cgg	gga	tat	816
Ile	Leu	Met	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	
			260					265					270			
ttt	aaa	ttg	aaq	aca	ggg	aaa	agc	tct	gta	atg	aga	tcc	gat	gta	ccc	864
Phe	Lys	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	Ser	Ser	Val	Met	Arg	Ser	Asp	Val	Pro	
		275					280					285				
ata	gac	att	tgt	gtg	tct	gaa	tgt	att	aca	cca	aat	gga	agc	atc	tcc	912
Ile	Asp	Ile	Cys	Val	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser	
	290					295					300					
aac	gac	aag	cca	ttc	caa	aat	gtg	aac	aaa	gtt	aca	tat	gga	aaa	tgc	960
Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Val	Thr	Tyr	Gly	Lys	Cys	
305					310					315					320	
ccc	aag	tat	atc	agg	caa	aac	act	tta	aag	ctg	gcc	act	ggg	atg	agg	1008
Pro	Lys	Tyr	Ile	Arg	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	
				325						330				335		
aat	gta	cca	gaa	aag	caa	acc	aga	gga	atc	ttt	gga	gca	ata	gcg	gga	1056
Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	
			340					345					350			
ttc	atc	gaa	aac	ggc	tgg	gaa	gga	atg	gtt	gat	ggg	tgg	tat	ggg	ttc	1104
Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	
		355					360					365				
cga	tat	caa	aac	tct	gaa	gga	aca	ggg	caa	gct	gca	gat	cta	aag	agc	1152
Arg	Tyr	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	
	370					375					380					
act	caa	gca	gcc	atc	gac	cag	att	aat	gga	aag	tta	aac	aga	gtg	att	1200

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400
 gag aaa ttc cat caa ata gag aag gaa ttc tca gaa 1248
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415
 gta gaa gga aga att cag gac ttg gag aaa tat gta gaa gac acc aaa 1296
 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430
 ata gac cta tgg tcc tac aat gca gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat 1344
 Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445
 caa cat aca att gac tta aca gat gca gaa atg aat aaa tta ttt gag 1392
 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460
 aag act aga cgc cag tta aga gaa aac gca gaa gac atg gga ggt gga 1440
 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480
 tgt ttc aag att tac cac aaa tgt gat aat gca tgc att gaa tca ata 1488
 Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile
 485 490 495
 aga act ggg aca tat gac cat tac ata tac aaa gat gaa gca tta aac 1536
 Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510
 aat cga ttt cag atc aaa ggt gta gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat 1584
 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525
 tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc ata tca tgc ttc tta att tgc gtt 1632
 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540
 gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg gct tgc caa aaa ggc aac atc aga 1680
 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560
 tgc aac att tgc att tga 1698
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 78

<211> 565

<212> PRT

<213> Virus Influenza

<400> 78

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Pro Ile Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His

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

260

265

270

Phe Lys Leu Asn Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Val Pro
 275 280 285

Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Ser
 290 295 300

Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys
 305 310 315 320

Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
 325 330 335

Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe
 355 360 365

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

Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400

Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415

Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430

Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn
 435 440 445

Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460

Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser Ile
 485 490 495

Arg Thr Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Lys Asp Glu Ala Leu Asn

500

505

510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp
 515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val
 530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg
 545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Vírus Influenza

<400> 79

tatgcatcgc tccgatccat

20

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Vírus Influenza

<400> 80

gtccacttc ttccgttttg a

21

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> Vírus Influenza

<400> 81

aattcacagc agagggattc acatggacag

30

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Vírus Influenza

<220>

<221> variação

<222> (7) .. (7)

<223> r = a ou g

<400> 82

catggartgg ctaaagacaa gacc

24

<210> 83
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<220> variação
 <221>
 <222> (18)..(18)
 <223> k = g ou t

<400> 83
 agggcatttt ggacaaakcg tcta .

24

<210> 84
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<400> 84
 acgctcacgg tgcccagt

18

<210> 85
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<400> 85
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggg

28

<210> 86
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<400> 86
 tgtaatacga ctactatag ggtccactt cttccgtttt ga

42

<210> 87
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<400> 87
 gatcgctctt caggagcaa aagcaggtag

30

<210> 88
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Vírus Influenza

<400> 88
 tgtaatacga ctactatag ggcattttgg acaaagcgtc

40

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus de influenza isolado, caracterizado pelo fato de que é capaz de infectar um animal canídeo.

2. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza tem um sorotipo de HA de H3.

3. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza tem o sorotipo H3N8.

4. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico da mesma, ou o dito polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo 99 % ou maior de identidade de seqüência com a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78.

5. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza compreende um polinucleotídeo tendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou o dito polinucleotídeo tem 98 % ou maior de identidade de seqüência com a seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77.

6. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza é o isolado viral designado como A/canine/Florida/43/ 2004 ou o isolado viral designado como A/canine/Florida/242/2003.

7. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza é o isolado viral designado

como canine/Jax/05 ou o isolado viral designado como canine/Miami/05.

8. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza é inativado ou atenuado.

9. Vírus de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza é fornecido em um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

10. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende todo ou parte de um segmento genômico ou gene de um vírus de influenza como definido na reivindicação 1.

11. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo compreende todo ou parte de um gene de influenza selecionado do grupo que consiste em um gene de neuraminidase, um gene de nucleoproteína, um gene de proteína de matriz, um gene proteína básica de polimerase, um gene proteína acídica de polimerase, um gene de proteína não-estrutural, e um gene de hemaglutinina.

12. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico da mesma, ou o dito polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo 99 % ou maior de identidade de seqüência com a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78.

13. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza compreende um polinucleotídeo tendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77, ou o dito polinucleotídeo tem 98 % ou maior de identidade de seqüência com a seqüência de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19,

21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, ou 77.

14. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito polinucleotídeo é formulado em um veículo ou
5 diluente farmaceuticamente aceitável.

15. Construto de expressão de polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que compreende um polinucleotídeo como definido na reivindicação 10.

16. Construto de expressão de polinucleotídeo, caracterizado
10 pelo fato de que pode hibridar com uma seqüência de codificação ou não-codificação de um polinucleotídeo como definido na reivindicação 10.

17. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito oligonucleotídeo hibrida com a dita seqüência sob condições de severidade alta.

18. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito oligonucleotídeo é 10 a 500 nucleotídeos, 10 a 20 nucleotídeos, 21 a 30 nucleotídeos, 31 a 40 nucleotídeos, 41 a 50 nucleotídeos, 51 a 60 nucleotídeos, 61 a 70 nucleotídeos, 71 a 80 nucleotídeos, 81 a 90 nucleotídeos, ou 91 a 100 nucleotídeos em comprimento.

19. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito oligonucleotídeo compreende uma molécula marcadora ou repórter detectável.

20. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito oligonucleotídeo tem de cerca de 90 por cento
25 a 100 por cento de identidade de seqüência de nucleotídeo com um polinucleotídeo compreendendo todo ou parte de um segmento genômico ou gene de um vírus de influenza como definido na reivindicação 1.

21. Oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito oligonucleotídeo compreende uma seqüência
30 de nucleotídeo mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, ou 88.

22. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é codifi-

cado por um polinucleotídeo como definido na reivindicação 10.

23. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dito polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em uma proteína de hemaglutinina, uma proteína de neuraminidase, uma
5 nucleoproteína, uma proteína de matriz, uma proteína básica de polimerase, uma proteína ácida de polimerase, e uma proteína não-estrutural.

24. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dito polipeptídeo compreende a seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16,
10 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico da mesma.

25. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dito polipeptídeo é formulado em um veículo ou diluente
15 farmacêuticamente aceitável.

26. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um imunógeno de um vírus de influenza como definido na reivindicação 1, em que o dito imunógeno é capaz de induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal canídeo.

20 27. Composição de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o dito imunógeno compreende vírus inteiro livre de célula, ou uma porção do mesmo; um polinucleotídeo viral; uma proteína viral; um polipeptídeo ou peptídeo viral; uma célula infectada por vírus; um constructo com base em vetor viral recombinante; um vírus reagrupante; ou ácido
25 nucléico desprotegido do dito vírus.

28. Composição de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que a dita proteína, polipeptídeo, ou peptídeo virais compreendem uma seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48,
30 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico da mesma, ou o dito polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo 99 % ou maior de identidade de seqüência com a se-

qüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78.

29. Composição de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o dito polinucleotídeo viral codifica um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico da mesma.

30. Composição de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que é formulada em um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

31. Método para induzir uma resposta imune em um animal contra um vírus de influenza capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito animal uma quantidade eficaz de uma composição como definida na reivindicação 26.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita composição compreende uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo virais compreendendo uma seqüência de aminoácido mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 33, 34, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, ou 78, ou um fragmento funcional e/ou imunogênico da mesma.

33. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita composição compreende um vírus de influenza ou uma porção do dito vírus que é capaz de infectar um animal canídeo.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza é selecionado do grupo que consiste em isolado viral designado como A/canine/Florida/43/2004, isolado viral designado como A/canine/Florida/242/2003, isolado viral designado como canine/Jax/05 ou isolado viral designado como canine/Miami/05, ou uma porção de qualquer um dos ditos isolados virais.

35. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado

pelo fato de que a dita resposta imune é uma resposta imune protetora que impede ou inibe infecção do dito animal por um vírus de influenza.

5 36. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza tem um sorotipo de HA selecionado de H3.

 37. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza tem o sorotipo H3N8.

 38. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita composição também compreende um adjuvante.

10 39. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o dito animal é um canídeo.

 40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o dito animal canídeo é um cachorro domesticado.

15 41. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita composição é administrada parenteralmente.

 42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que a dita composição é administrada subcutânea, intraperitoneal, ou intramuscular.

20 43. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita composição é administrada nasal ou oralmente.

 44. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito vírus de influenza é inativado ou atenuado.

25 45. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que especificamente se liga a um epítipo de um polipeptídeo como definido na reivindicação 22.

 46. Anticorpo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é um anticorpo monoclonal.

 47. Anticorpo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo liga a uma proteína de hemaglutinina.

30 48. Anticorpo de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de hemaglutinina é uma Proteína de hemaglutinina de H3.

49. Anticorpo de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de hemaglutinina compreende uma seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 62, ou SEQ ID NO: 78.

- 5 50. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende:
- a) um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal canídeo; ou
- b) um polinucleotídeo compreendendo todo ou parte de um segmento genômico ou gene de um vírus de influenza da reivindicação 1.

- 10 51. Célula de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que a dita célula é uma célula de animal canídeo.

52. Método para detecção de um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma amostra biológica de um animal e triar a dita amostra para a presença de um anticorpo ou um ligando que liga a uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo de um vírus de influenza como definido na reivindicação 1.

- 15 53. Método para detecção de um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma amostra de ácido nucléico de um animal, e contatar a dita amostra de ácido nucléico com um oligonucleotídeo como definido na reivindicação 16, e determinar se o dito oligonucleotídeo hibrida sob condições rigorosas com o dito ácido nucléico.

- 20 54. Método para triar para um composto que possui atividade antiviral contra um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende contatar uma célula infectada ou compreendendo um vírus como definido na reivindicação 1, com um composto de teste e determinar se o dito composto de teste inibe atividade do dito vírus na dita célula.

- 25 55. Vírus reagrupante, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um gene, segmento genômico, ou um polinucleotídeo de um vírus de influenza como definido na reivindicação 1.

- 30 56. Vírus reagrupante de acordo com a reivindicação 55, carac-

terizado pelo fato de que o dito vírus reagrupante é formulado em um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

57. Vírus isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais polinucleotídeos em que o(s) dito(s) um ou mais polinucleotídeos codificam uma proteína do vírus de influenza canina selecionada do grupo que consiste em HA, NA, NP, MA, PB1, PB2, PA, e NS, ou um fragmento funcional ou imunogênico da mesma.

58. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o(s) dito(s) um ou mais polinucleotídeos compreendem uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, e 77.

59. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de HA tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16, 32, 62, e 78.

60. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de NA tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 28, 58, e 74.

61. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de NP tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 26, 56, e 72.

62. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de MA tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14, 30, 60, e 76.

63. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de PB1 tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 4, 20, 50, e 66.

64. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de PB2 tem uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 18, 48, e 64.

65. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de PA tem uma sequência de aminoácido sele-

cionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 22, 52, e 68.

66. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de NS tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8, 24, 54, e 70.

5 67. Vírus de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que é fornecido em um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

68. Método para detecção de um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, caracterizado pelo fato de que compreende
10 obter uma amostra contendo ácido nucléico de um animal, e contatar a dita amostra de ácido nucléico com um iniciador de oligonucleotídeo direto e reverso que especificamente liga a um polinucleotídeo ou seqüência de gene do dito vírus sob condições suficientes para a geração de um produto de amplificação se o ácido nucléico contiver uma seqüência à qual os ditos iniciadores se ligam; e detectar o dito produto de amplificação.

69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o dito iniciador de oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo que hibrida com uma seqüência de codificação ou não-codificação de um polinucleotídeo compreendendo todo ou uma parte de um segmento genômico ou gene de um vírus de influenza que é capaz de infectar um animal
20 canídeo.

70. Método para proteger um canino de uma infecção do vírus de influenza, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao canino uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma vacina compreendendo:
25 pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, e
 pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus de influenza eqüina compreende(m) um/uns vírus inativado(s).

30 72. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus de influenza eqüina compreende(m) um/uns vírus vivo(s) atenuado(s).

73. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende antígenos de vírus de influenza equina de mais de um isolado viral.

74. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende pelo menos um antígeno de um vírus de influenza de H7.

75. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada subcutaneamente.

76. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada intranasalmente.

77. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada em combinação com pelo menos uma vacina selecionada do grupo que consiste em uma vacina de bordetella, vacina de adenovírus, e vacina do vírus de parainfluenza.

78. Método para proteger um canino de uma infecção do vírus de influenza de H3, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao canino uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma vacina compreendendo:

pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3 e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7, e

pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

79. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a dita vacina compreende um ou mais antígenos de um ou mais dos isolados virais de influenza canina a seguir: A/canine/Florida/43/2004, A/canine/Florida/242/2003, canine/Jax/05, e canine/Miami/05.

80. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende pelo menos um antígeno de um vírus de influenza de H7.

81. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus de influenza de H3 compreende(m) um/uns vírus inativado(s).

82. Método de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo

fato de que a dita vacina compreende um ou mais antígenos de um ou mais dos isolados virais de influenza canina a seguir: A/canine/Florida/43/2004, A/canine/Florida/242/ 2003, canine/Jax/05, e canine/Miami/05.

5 83. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus de influenza de H3 compreende(m) um/uns vírus vivo(s) atenuado(s).

84. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende pelo menos um antígeno de um isolado viral isolado de um canino infectado.

10 85. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende antígenos de mais de um isolado viral.

86. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada subcutaneamente.

15 87. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada intranasalmente.

88. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada ao canino uma vez.

89. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada ao canino pelo menos duas vezes.

20 90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que uma segunda dose da vacina é administrada ao canino de cerca de 2 a cerca de 8 semanas após a primeira dose.

25 91. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada em combinação com pelo menos uma vacina selecionada do grupo que consiste em uma vacina de bordetella, vacina de adenovírus, e vacina de vírus de parainfluenza.

30 92. Método para proteger um canino de lesões respiratórias causadas por vírus de influenza canina, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao canino uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma vacina compreendendo:

pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, e
pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.

93. Método de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada ao canino antes do canino ser infectado com vírus de influenza canina.

5 94. Método para proteger um canino de lesões respiratórias causadas por vírus de influenza canina, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao canino uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo:

pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3 e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7, e

10 pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

95. Método de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada ao canino antes do canino ser infectado com vírus de influenza canina.

15 96. Método para proteger um canino de ter vírus de influenza canina em secreção nasal ou oral causada por infecção do vírus de influenza canina, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao canino uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo:

pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, e

pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

20 97. Método de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada ao canino antes do canino ser infectado com vírus de influenza canina.

25 98. Método para proteger um canino de ter vírus de influenza canina em secreção nasal ou oral causada por infecção do vírus de influenza canina, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao canino uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo:

pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3 e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7, e

pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável.

30 99. Método de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que a vacina é administrada ao canino antes do canino ser infectado com vírus de influenza canina.

100. Vacina de influenza canina, caracterizada pelo fato de que a vacina compreende:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3 e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7, e
5 pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

101. Vacina de acordo com a reivindicação 100, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais antígenos de um ou mais dos isolados virais de influenza canina a seguir: A/canine/Florida/43/2004,
10 A/canine/Florida/242/ 2003, canine/Jax/05, e canine/Miami/05.

102. Vacina de acordo com a reivindicação 100, caracterizada pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus compreende(m) um/uns vírus inativado(s).

103. Vacina de acordo com a reivindicação 102, caracterizada
15 pelo fato de que compreende um ou mais antígenos de um ou mais dos isolados virais de influenza canina a seguir: A/canine/Florida/43/2004, A/canine/Florida/242/ 2003, canine/Jax/05, e canine/Miami/05.

104. Vacina de acordo com a reivindicação 100, caracterizada pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus compreende(m) um/uns vírus vivo(s) atenuado(s).
20

105. Vacina de influenza canina, caracterizada pelo fato de que a vacina compreende:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antígeno de vírus de influenza eqüina, e
25 pelo menos um excipiente farmacologicamente aceitável.

106. Vacina de acordo com a reivindicação 105, caracterizada pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus de influenza eqüina compreende(m) um/uns vírus inativado(s).

107. Vacina de acordo com a reivindicação 105, caracterizada
30 pelo fato de que o(s) antígeno(s) de vírus compreende(m) um/uns vírus vivo(s) atenuado(s).

108. Kit para proteger um canino de infecção do vírus de influ-

enza, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo pelo menos um antígeno de vírus de influenza eqüina, e

pelo menos um componente selecionado do grupo que consiste em:

5 um aparelho para administrar a vacina ao canino,

um excipiente farmacêuticamente aceitável que auxilia na administração da vacina ao canino,

um excipiente farmacêuticamente aceitável que intensifica a resposta imune do canino à vacina,

10 um alimento a ser consumido pelo canino simultaneamente com a vacina, e

um medicamento para ser consumido pelo canino simultaneamente com a vacina.

109. Kit de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que compreende um aparelho para subcutaneamente administrar a vacina ao canino.

110. Kit de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que compreende um aparelho para intranasalmente administrar a vacina ao canino.

20 111. Kit para proteger um canino de uma infecção do vírus de influenza de H3, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina compreendendo pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H3 e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7, e

25 pelo menos um componente selecionado do grupo que consiste em:

um aparelho para administrar a vacina ao canino,

um excipiente farmacêuticamente aceitável que auxilia na administração da vacina ao canino,

30 um excipiente farmacêuticamente aceitável que intensifica a resposta imune do canino à vacina,

um alimento a ser consumido pelo canino simultaneamente com a vacina, e

um medicamento para ser consumido pelo canino simultaneamente com a vacina.

112. Kit de acordo com a reivindicação 111, caracterizado pelo fato de que compreende duas doses da vacina, e as duas doses juntas
5 compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz da vacina.

113. Kit de acordo com a reivindicação 111, caracterizado pelo fato de que compreende um aparelho para subcutaneamente administrar a vacina ao canino.

114. Kit de acordo com a reivindicação 111, caracterizado pelo
10 fato de que compreende um aparelho para intranasalmente administrar a vacina ao canino.

115. Uso de um imunógeno de um vírus de influenza como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica, vacina e/ou kit para detecção de um vírus de
15 influenza que é capaz de infectar um animal canídeo, para induzir uma resposta imune em um animal contra um vírus de influenza capaz de infectar um animal canídeo

116. Uso de pelo menos um antígeno de vírus de influenza equina, caracterizado pelo fato de que é para preparação de uma composição
20 farmacêutica, vacina e/ou kit para proteger um canino de uma infecção do vírus de influenza, de lesões respiratórias causadas por vírus de influenza canina e/ou de ter vírus de influenza canina em secreção nasal ou oral causada por infecção do vírus de influenza canina.

117. Uso de pelo menos um antígeno de vírus de influenza de
25 H3 e/ou pelo menos um antígeno de vírus de influenza de H7, caracterizado pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica, vacina e/ou kit para proteger um canino de uma infecção do vírus de influenza de H3 para proteger um canino de lesões respiratórias causadas por vírus de influenza canina e/ou de ter vírus de influenza canina em secreção nasal
30 ou oral causada por infecção do vírus de influenza canina.

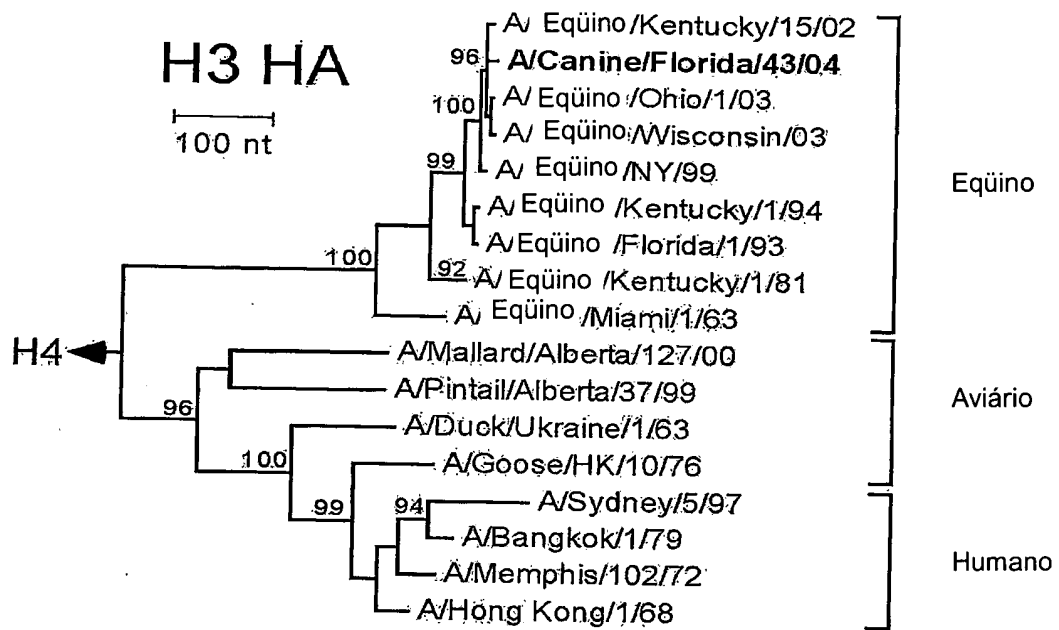


FIG. 1A

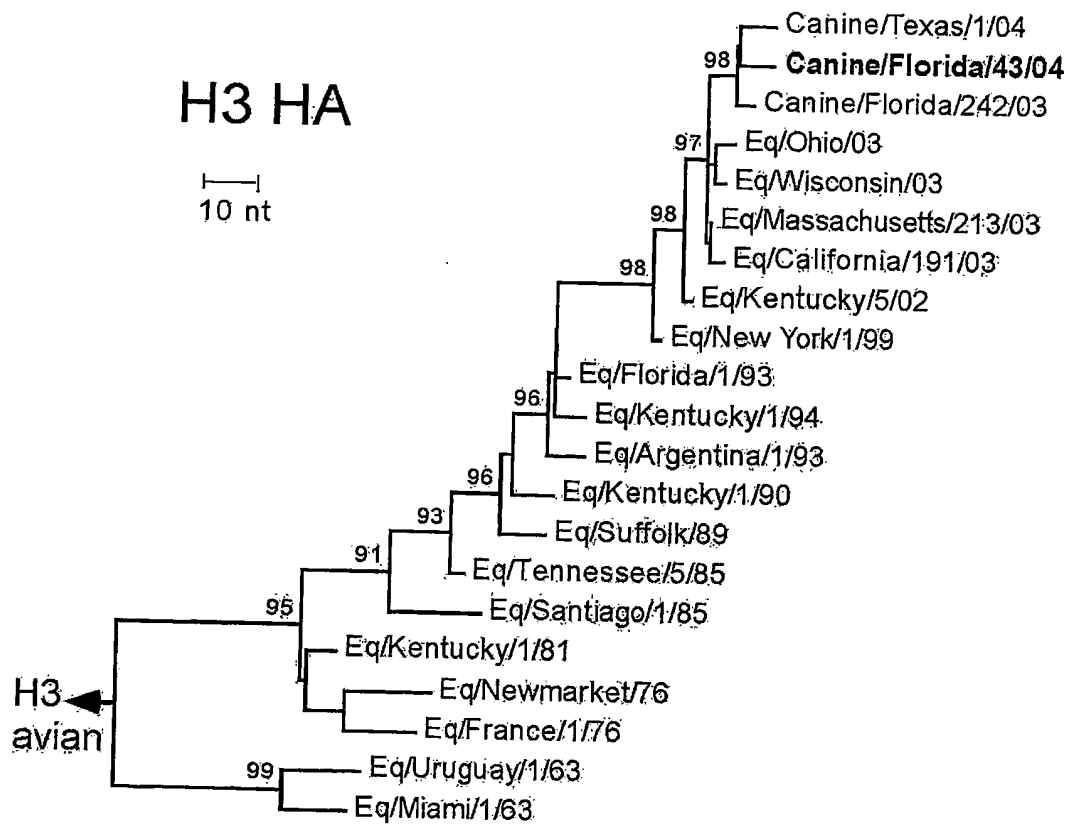


FIG. 1B

FIG. 2A

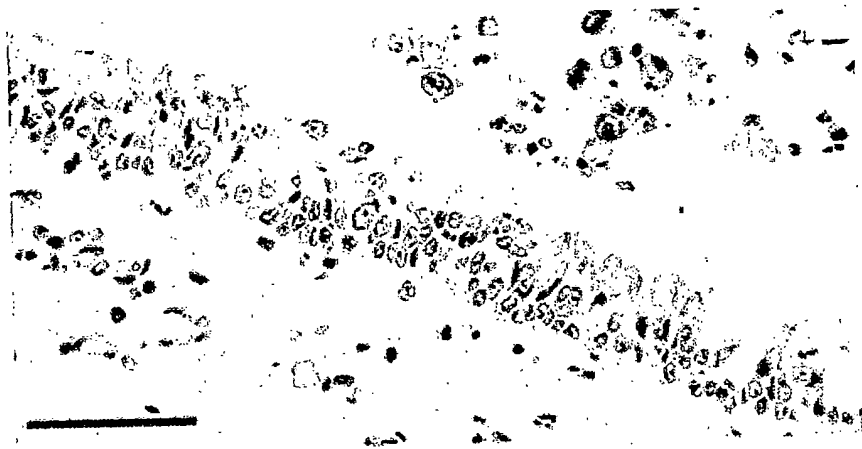


FIG. 2B

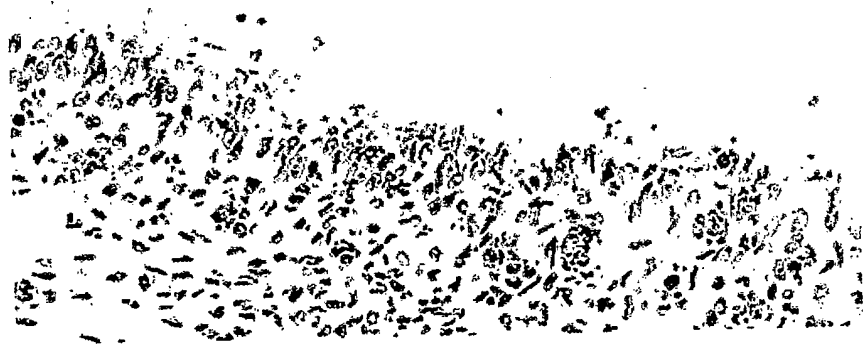




FIG. 3A



FIG. 3B

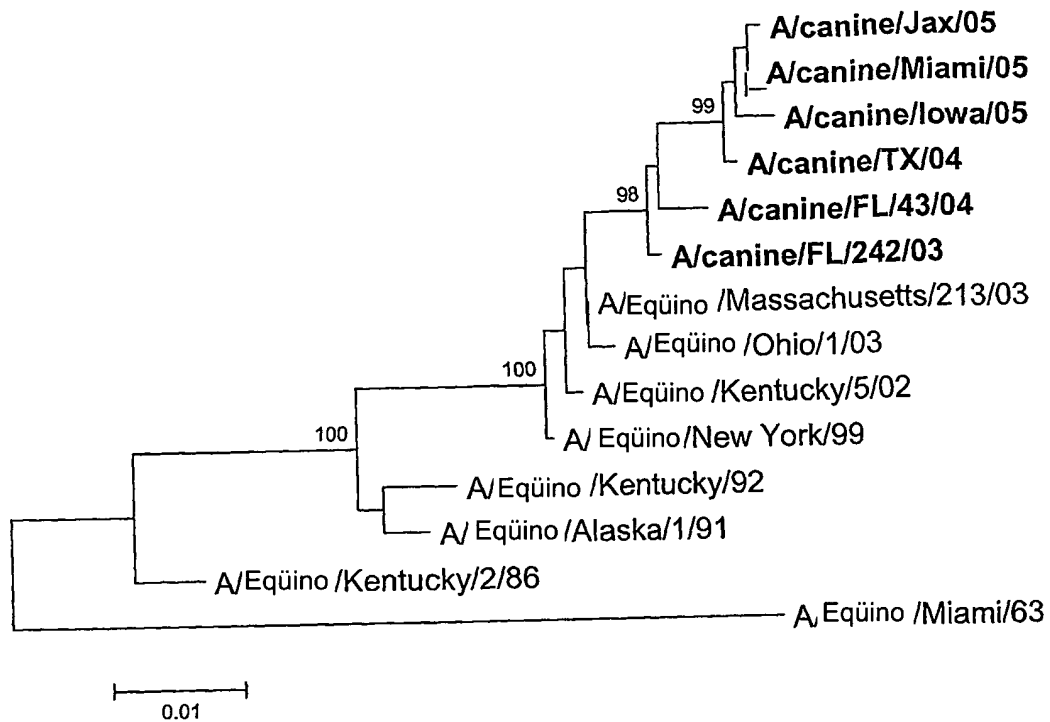


FIG. 4A

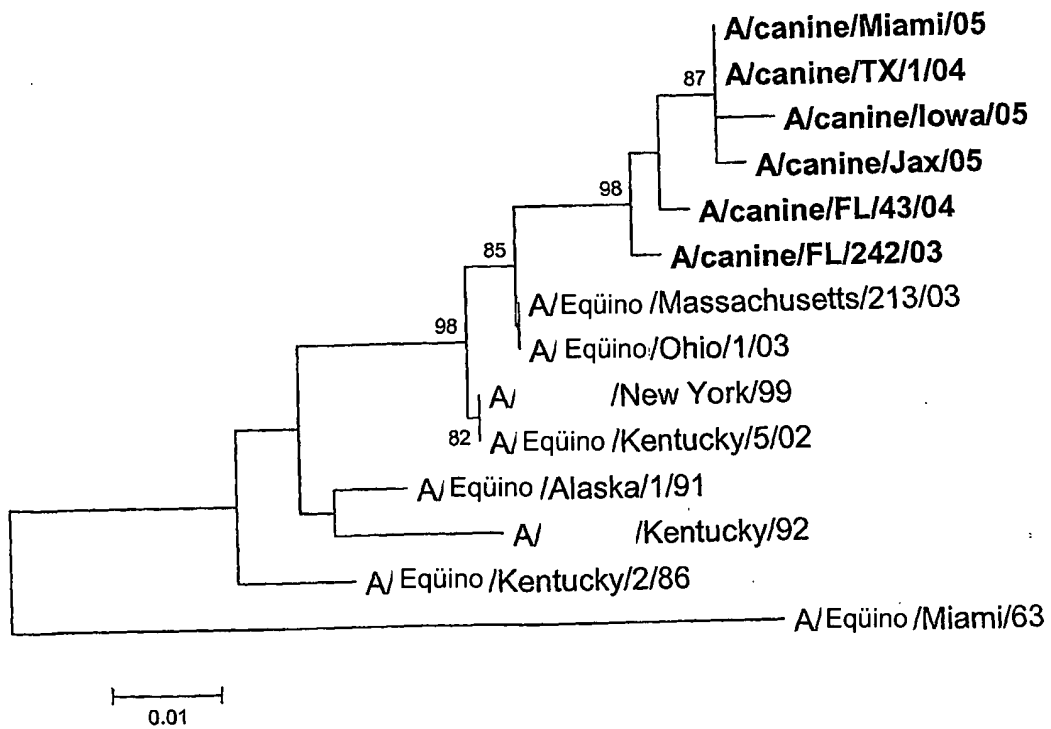


FIG. 4B

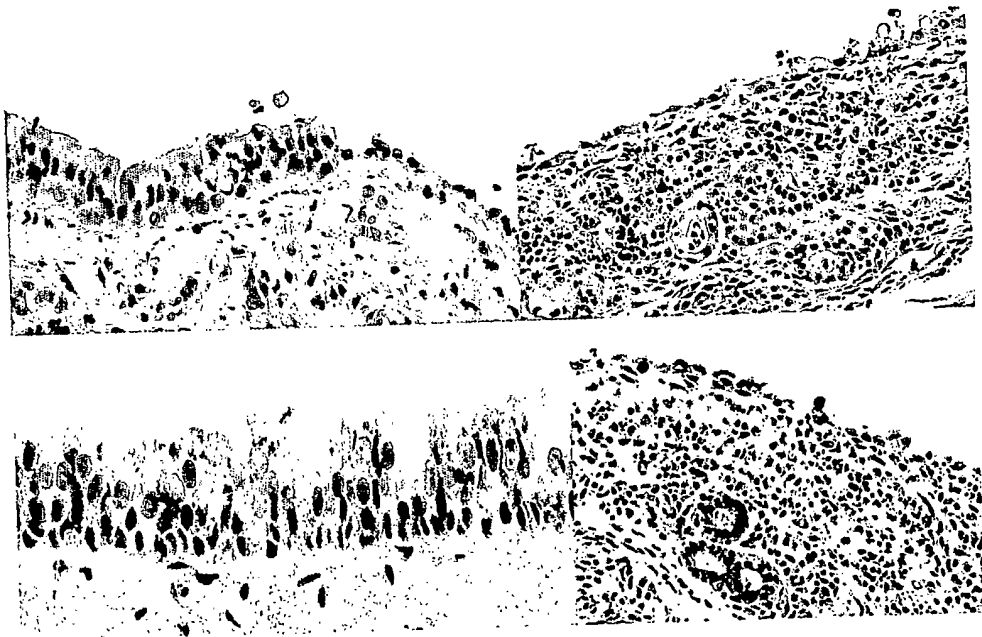


FIG. 5

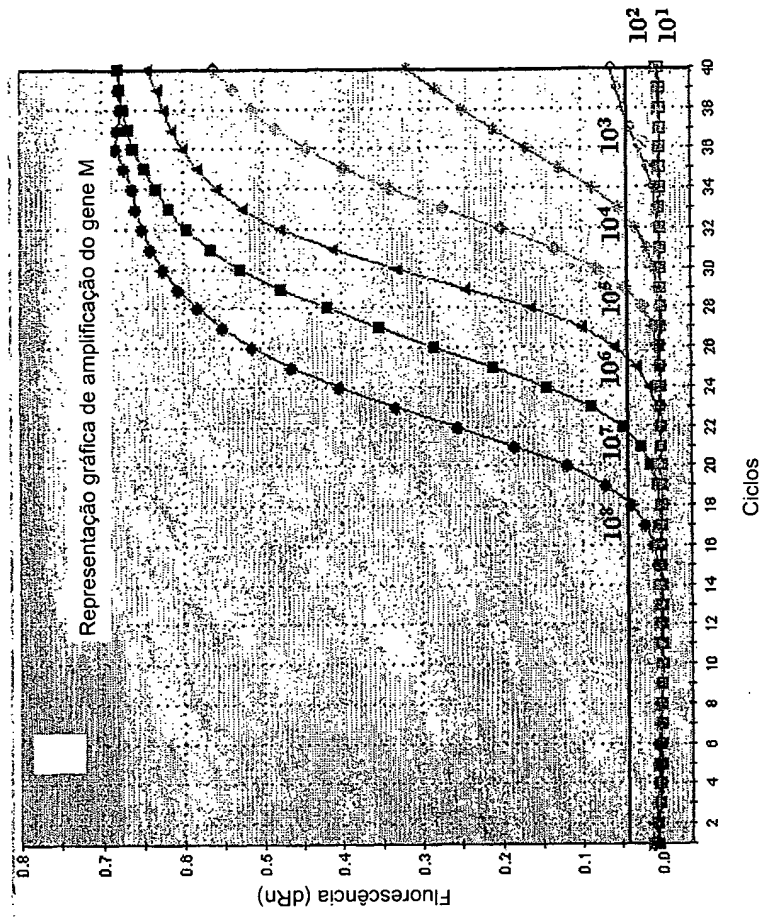


FIG. 6B

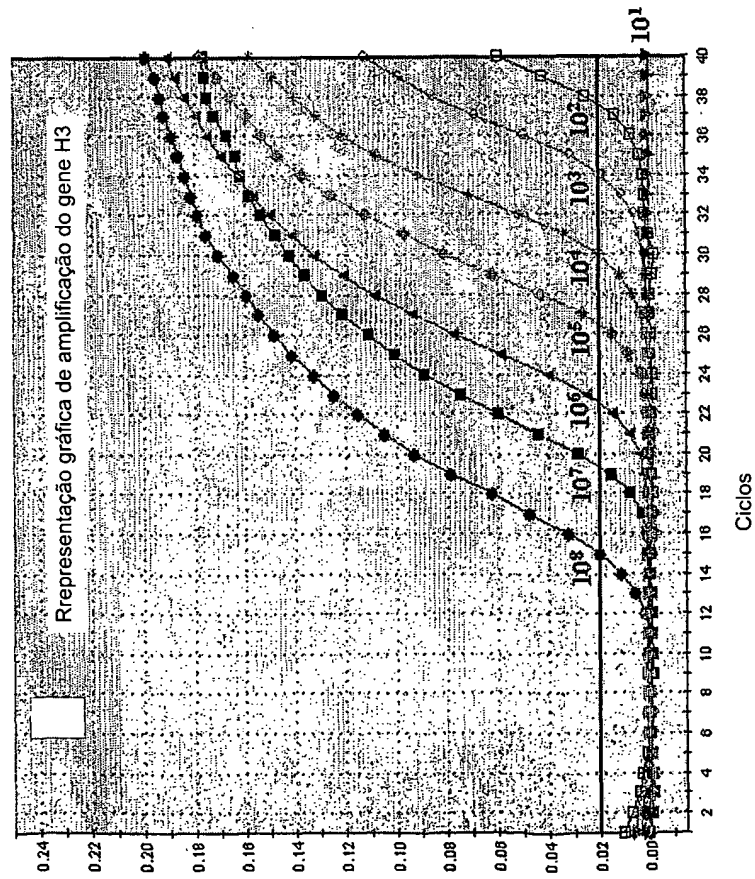


FIG. 6A

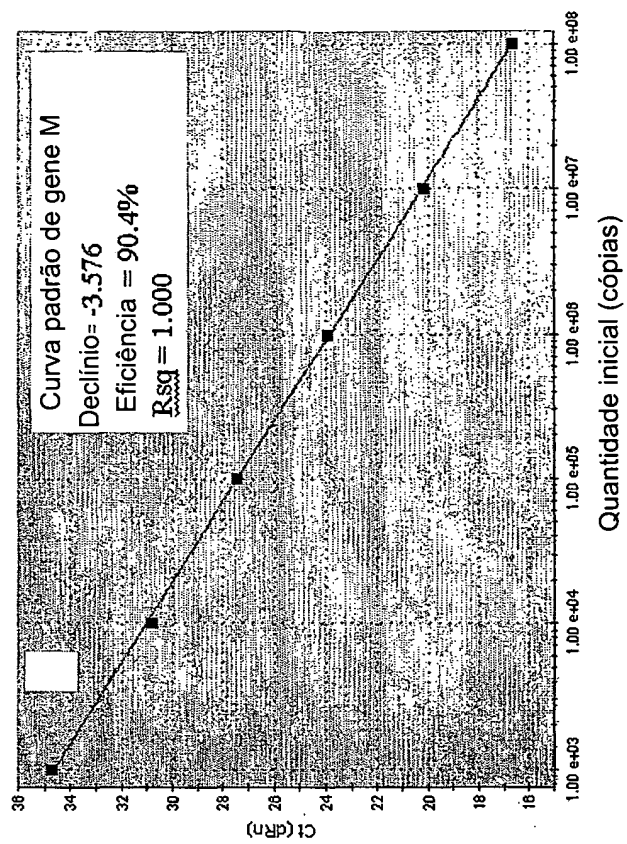


FIG. 6D

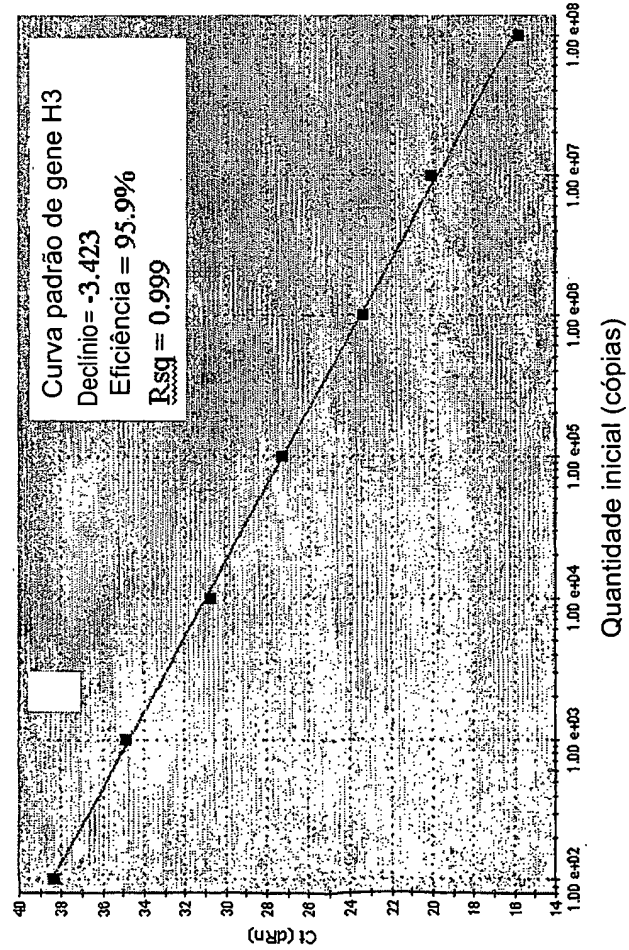


FIG. 6C

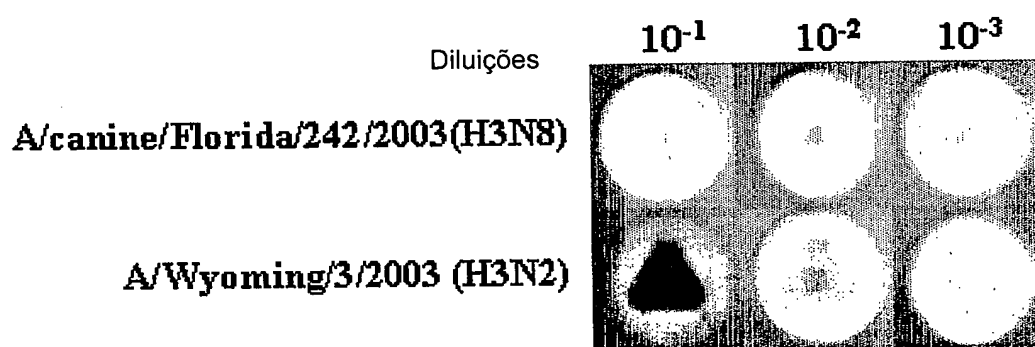


FIG. 7

RESUMO

Patente de Invenção: "VÍRUS DE INFLUENZA CAPAZES DE INFECTAR CANÍDEOS, USOS DOS MESMOS".

A invenção em questão refere-se ao isolado do vírus de influenza que é capaz de infectar canídeos e causar doença das vias respiratórias no canídeo. A invenção em questão também refere-se a composições e métodos para induzir uma resposta imune contra um vírus de influenza da presente invenção. A invenção em questão também refere-se a composições e métodos para identificar um vírus da invenção e diagnosticar a infecção de um animal com um vírus da invenção.