



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0101318  
(43) 공개일자 2012년09월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/11* (2006.01) *C12N 15/44* (2006.01)  
*C12N 7/00* (2006.01) *A61K 39/145* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7000803
- (22) 출원일자(국제) 2010년06월24일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년01월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/039826
- (87) 국제공개번호 WO 2010/151673  
국제공개일자 2010년12월29일
- (30) 우선권주장  
61/220,426 2009년06월25일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
메디뮨 엘엘씨  
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이
- (72) 발명자  
진 흥  
미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 산타 파울라 애비뉴 22385
- (74) 대리인  
김진희, 강승옥

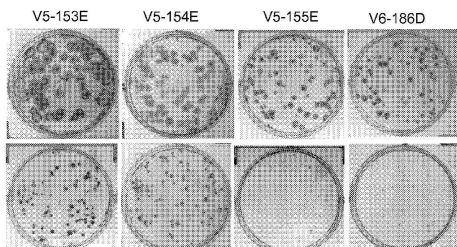
전체 청구항 수 : 총 341 항

(54) 발명의 명칭 돼지 인플루엔자 혜마글루터닌 변이체

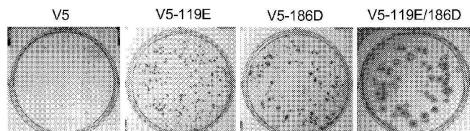
### (57) 요약

인플루엔자 혜마글루터닌 및 뉴라미디나제 변이체를 포함하는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 방법, 조성물 및 백신이 제공된다.

### 대 표 도



1A



1B

(30) 우선권주장

61/227,986 2009년07월23일 미국(US)

61/234,021 2009년08월14일 미국(US)

61/258,890 2009년11월06일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드:

- a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- b) K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- c) K119E 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- d) K119N 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- e) D222G 및/또는 Q223R 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- f) (i) D222G 및/또는 Q223R 치환을 포함하고 (ii) K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- g) (i) D222G 및/또는 Q223R 치환을 포함하고 (ii) K119E 및 A186D 아미노산 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- h) (i) D222G 및/또는 Q223R 치환을 포함하고 (ii) K119N 및 A186D 아미노산 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- i) 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- j) K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- k) K119E 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- l) K119N 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- m) D222G 및/또는 Q223R 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- n) (i) D222G 및/또는 Q223R 치환을 포함하고 (ii) K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- o) (i) D222G 및/또는 Q223R 치환을 포함하고 (ii) K119E 및 A186D 아미노산 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- p) (i) D222G 및/또는 Q223R 치환을 포함하고 (ii) K119N 및 A186D 아미노산 치환을 추가로 포함하는 서열 번호 1의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- q) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- r) 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- s) (a) 내지 (r) 중 어느 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- t) 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되는, (a) 내지 (r) 중 어느 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- u) (a) 내지 (r) 중 어느 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 포함하고, H273Y 치환을 추가로 포함하는 폴

리펩타이드; 및

v) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩타이드가 면역원성인 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드.

#### 청구항 3

제1항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 멸균 조성물.

#### 청구항 4

제1항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체.

#### 청구항 5

제1항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드의 면역학적 유효량을 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 6

제1항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자재배열 (reassortant) 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 7

제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 또는 재조합 핵산.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 서열번호 3 또는 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 또는 재조합 핵산.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 핵산이 DNA인 분리된 또는 재조합 핵산.

#### 청구항 10

제7항에 있어서, 핵산이 RNA인 분리된 또는 재조합 핵산.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 면역원성 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 또는 재조합 핵산.

#### 청구항 12

제7항의 분리된 또는 재조합 핵산을 포함하는 조성물.

#### 청구항 13

제7항의 분리된 또는 재조합 핵산의 면역학적 유효량을 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 14

제7항의 핵산을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 15

제8항의 핵산을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 16

하나 이상의 공여체 바이러스로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스인 유전자

재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 17

제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 게놈 분절을 포함하고 6개의 내부 게놈 분절 및 하나 이상의 공여체 바이러스로부터의 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 게놈 분절을 추가로 포함하는 7:1 유전자재배열 바이러스인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 공여체 바이러스가 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 살아있는 바이러스인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 22

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119E 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 23

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119N 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 게놈 분절 암호화된 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 25

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 26

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 27

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 28**

유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 세포 배양으로 생산하는 방법에 있어서,

- a) 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포군에 도입하는 단계, 상기 다수의 벡터는 제1 인플루엔자 스트레인의 6개의 내부 게놈 분절; 제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 게놈 분절; 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 게놈 분절을 포함하고;
- b) 상기 숙주 세포군을 배양하는 단계; 및
- c) 다수의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 방법.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119E 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 방법.

**청구항 31**

제28항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119N 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 방법.

**청구항 32**

제28항에 있어서, 제1 게놈 분절의 아미노산 서열이 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 33**

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 게놈 분절이 돼지 인플루엔자 바이러스 게놈 분절인 방법.

**청구항 34**

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 방법.

**청구항 35**

제28항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 36**

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 바이러스 스트레인이 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 방법.

**청구항 37**

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인이 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 38**

제28항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 비내 백신 제형으로 투여하기에 적합한 방법.

**청구항 39**

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터가 인플루엔자

A 바이러스 게놈을 포함하는 방법.

#### 청구항 40

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 벡터가 다수의 플라스미드 벡터인 방법.

#### 청구항 41

제28항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포군이 베로 세포, PerC6 세포, MDCK 세포, 293T 세포 또는 COS 세포 중에서 하나 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 42

제28항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 헬퍼 바이러스의 사용을 포함하지 않는 방법.

#### 청구항 43

제28항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 벡터가 8개의 벡터로 이루어지는 방법.

#### 청구항 44

제1항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 45

제7항의 분리된 또는 재조합 핵산을 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, 부형제가 약제학적으로 허용되는 부형제인 조성물.

#### 청구항 48

제14항 내지 제27항 중 어느 한 항의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 조성물이 살아있는 약독화된 인플루엔자 백신인 조성물.

#### 청구항 51

유전자재배열 인플루엔자 바이러스 백신을 생산하는 방법에 있어서,

a) 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포군에 도입하는 단계, 상기 다수의 벡터는 제1 인플루엔자 스트레인의 적어도 6개의 내부 게놈 분절; 제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 게놈 분절; 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 게놈 분절을 포함하고;

b) 상기 숙주 세포군을 배양하는 단계;

c) 다수의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 단계; 및

d) 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 제공하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 방법.

#### 청구항 53

제51항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119E 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 방법.

#### 청구항 54

제51항에 있어서, 제1 게놈 분절이 K119N 및 A186D 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 방법.

#### 청구항 55

제51항에 있어서, 제1 게놈 분절의 아미노산 서열이 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 게놈 분절이 돼지 인플루엔자 바이러스 게놈 분절인 방법.

#### 청구항 57

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 방법.

#### 청구항 58

제51항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 59

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 바이러스 스트레인이 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 방법.

#### 청구항 60

제51항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 비내 백신 제형으로 투여하기에 적합한 방법.

#### 청구항 61

제51항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터가 인플루엔자 A 바이러스 게놈을 포함하는 방법.

#### 청구항 62

제51항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인이 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 63

제51항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 바이러스가 비내 백신 제형으로 투여하기에 적합한 방법.

#### 청구항 64

제1항의 폴리펩타이드를 바이러스 감염의 예방적 또는 치료적 처리를 위해 피험자에서 바이러스 감염에 대한 면역원성 반응을 생성하기에 유효한 양으로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 65

제64항에 있어서, 피험자가 포유동물인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, 포유동물이 인간인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 감염이 바이러스 인플루엔자 감염인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 68

제64항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 피험자에게 생체내로 투여되거나, 또는 피험자의 하나 이상의 세포에 시험관내 또는 생체외로 투여되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 69

제64항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 70

헤마글루티닌 폴리펩타이드의 아미노산 잔기를 서열 번호 1의 위치 119 또는 186의 아미노산 잔기에 상응하는 위치에서 변형시켜 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가를 증가시키는 단계를 포함하는, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자에 대한 발육란의 피크 역가를 증가시키는 방법.

#### 청구항 71

제70항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 변형되는 방법.

#### 청구항 72

제71항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 글루탐산 (E)으로 변형되는 방법.

#### 청구항 73

제71항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파라긴 (N)으로 변형되는 방법.

#### 청구항 74

제70항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 변형되는 방법.

#### 청구항 75

제74항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파르트산 (D)으로 변형되는 방법.

#### 청구항 76

제70항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119 및 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 변형되는 방법.

#### 청구항 77

제76항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산에 상응하는 아미노산 잔기가 글루탐산 (E)로 변형되고, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파르트산 (D)으로 변형되는 방법.

#### 청구항 78

제76항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파라긴 (N)으로 변형되고, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파르트산 (D)으로 변형되는 방법.

#### 청구항 79

제70항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 H1 헤마글루티닌 폴리펩타이드인 방법.

#### 청구항 80

제70항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 폴리펩타이드인 방법.

#### 청구항 81

제70항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 82

제81항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 83

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 포함하는 방법.

#### 청구항 84

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 7개의 게놈 분절을 포함하는 방법.

#### 청구항 85

제70항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스가 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현성 특성을 포함하는 방법.

#### 청구항 86

제85항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 포함하는 방법.

#### 청구항 87

제85항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66의 7개의 게놈 분절을 포함하는 방법.

#### 청구항 88

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 2배 증가되는 방법.

#### 청구항 89

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적

어도 4배 증가되는 방법.

#### 청구항 90

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 8배 증가되는 방법.

#### 청구항 91

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 10배 증가되는 방법.

#### 청구항 92

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 20배 증가되는 방법.

#### 청구항 93

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2내지 10배 증가되는 방법.

#### 청구항 94

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2내지 20배 증가되는 방법.

#### 청구항 95

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2내지 40배 증가되는 방법.

#### 청구항 96

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 5내지 20배 증가되는 방법.

#### 청구항 97

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 아미노산 변형을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 5내지 40배 증가되는 방법.

#### 청구항 98

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스가 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10} \text{PFU/ml}$ 의 역가로 성장하는 방법.

#### 청구항 99

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스가 발육란에서 적어도 약  $8 \log_{10} \text{PFU/ml}$ 의 역가로 성장하는 방법.

**청구항 100**

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스가 발육란에서 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 방법.

**청구항 101**

제70항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스가 발육란에서 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 방법.

**청구항 102**

제70항 내지 제101항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 103**

제70항 내지 제101항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자 백신.

**청구항 104**

제70항 내지 제101항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 살아있는 저온 적응된 온도 민감성의 약독화된 인플루엔자 백신.

**청구항 105**

헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 위치 119 또는 186의 아미노산 잔기에 상응하는 위치에서 변형된 아미노산 잔기를 포함하는, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 106**

제105항에 있어서, 변형된 아미노산 잔기가 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 107**

제106항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 글루탐산 (E)로 변형되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 108**

제106항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파라긴 (N)으로 변형되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 109**

제105항에 있어서, 변형된 아미노산 잔기가 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 110**

제109항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기가 아스파르트산 (D)으로 변형되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 111**

제105항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119 및 186의 아미노산 잔기에 상응하는 위치에서 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 112**

제111항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 변형된 아미노산 잔기가 글루탐산 (E)로 변형되고, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 변형된 아미노산 잔기가 아스파르트산 (D)으로 변형되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 113**

제111항에 있어서, 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 변형된 아미노산 잔기가 아스파라긴 (N)으로 변형되고, 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 변형된 아미노산 잔기가 아스파르트산 (D)으로 변형되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 114**

제105항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 H1 헤마글루티닌 폴리펩타이드인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 115**

제105항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 폴리펩타이드인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 116**

제105항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 117**

제116항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 118**

제105항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 119**

제105항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 7개의 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 120**

제105항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 121**

제120항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 122**

제120항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 7개의 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.



**청구항 133**

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 134**

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 135**

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 136**

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 137**

제105항 내지 제136항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 138**

제105항 내지 제136항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자 백신.

**청구항 139**

제105항 내지 제136항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 살아있는 저온 적응된 온도 민감성의 약독화된 인플루엔자 백신.

**청구항 140**

아미노산 E 또는 N이 위치 119에 존재하고, 아미노산 D가 위치 186에 존재하는 것을 제외하고는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 141**

아미노산 E 또는 N이 위치 119에 존재하고, 아미노산 D가 위치 186에 존재하는 것을 제외하고는 H1N1 돼지 독감 바이러스의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 HA 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 142**

비자연 발생 아미노산이 위치 119 및 186에 존재하는 것을 제외하고는 H1N1 돼지 독감 바이러스의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 HA 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 143**

제28항 내지 제43항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 144**

제143항에 있어서, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

#### 청구항 145

제143항 또는 제144항에 있어서, 살아있는 약독화된 인플루엔자 백신인 조성물.

#### 청구항 146

헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 119에 상응하는 위치 또는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 186에 상응하는 위치에 비자연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 147

제146항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 119에 상응하는 위치 및 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 186에 상응하는 위치에 비자연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 148

제146항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 글루탐산 (E), 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파라긴 (N); 및 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파르트산 (D)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 1개의 비자연 발생 아미노산을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 149

제148항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 글루탐산 (E) 및 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파르트산 (D)을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 150

제148항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파라긴 (N) 및 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파르트산 (D)을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 151

제146항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 H1 헤마글루티닌 폴리펩타이드인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 152

제146항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 폴리펩타이드인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 153

제146항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 위치 119 및/또는 186에서 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 154

제153항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 155

제146항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 156

제146항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 7개의 내부 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 157

제146항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 158

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 2배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 159

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 4배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 160

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 8배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 161

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 10배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 162

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 20배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 163

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2 내지 10배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 164

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2 내지 20배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 165

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2 내지 40배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 166

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 5 내지 20배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 167

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란의 피크 역가가 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 5 내지 40배 증가되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 168

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 169

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 170

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 171

제146항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 172

제146항 내지 제171항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 173

제146항 내지 제171항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자 백신.

#### 청구항 174

제146항 내지 제171항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 살아있는 저온 적응된 온도 민감성의 약독화된 인플루엔자 백신.

#### 청구항 175

서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 176

서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도

99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 177

3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 178

서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 179

서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 180

3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 181

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 182

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 183

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, A/Puerto Rico/8/34의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 184

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 바이러스의 7개의 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 185

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, A/Ann Arbor/6/60의 7개의 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 186

제175항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, A/Puerto Rico/8/34의 7개의 게놈 분절을 추가로 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 187

제175항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 188

제175항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 189

제175항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 190

제175항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 191

제175항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 192

제175항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 193

제175항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 194

제175항 내지 제193항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 195

제175항 내지 제193항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자 백신.

#### 청구항 196

제175항 내지 제193항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 살아있는 저온 적응된 온도 민감성의 약독화된 인플루엔자 백신.

#### 청구항 197

제105항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 유전자재배열 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 198

제197항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 유전자재배열 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 199

제197항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 유전자재배열 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 200

제197항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 201

공여체 바이러스의 6개의 내부 게놈 분절, 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 게놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 202

제201항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 203

제201항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 204

제201항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 205

제201항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 206

제201항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 207

제201항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 208

제201항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 209

제201항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 210

제201항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 211**

제201항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 212**

제201항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 213**

제201항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Puerto Rico/8/34인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 214**

제201항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 215**

제201항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 216**

제201항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 217**

제201항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 218**

제201항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 219**

제201항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 220**

제201항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

**청구항 221**

제201항 내지 제220항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 222**

제201항 내지 제220항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자

백신.

### 청구항 223

제201항 내지 제220항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 살아있는 저온 적응된 온도 민감성의 약독화된 인플루엔자 백신.

### 청구항 224

공여체 바이러스의 6개의 내부 계놈 분절, 헤마글루터닌 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 225

제224항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 226

제224항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 7의 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 227

제224항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 228

제224항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 229

제224항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 230

제224항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 계놈 분절이 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 231

제224항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 232

제224항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 233

제224항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Puerto Rico/8/34인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

### 청구항 234

제224항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서

선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 235

제224항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 236

제224항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 237

제224항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 238

제224항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 239

제224항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 240

제224항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 발육란에서 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 241

제224항 내지 제240항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 242

제224항 내지 제240항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자 백신.

#### 청구항 243

제224항 내지 제240항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자바이러스를 포함하는 살아있는 저온 적응된 온도 민감성의 약독화된 인플루엔자 백신.

#### 청구항 244

바이러스 감염의 예방적 또는 치료적 처리를 위해 피험자에서 바이러스 감염에 대한 면역원성 반응을 생성하기에 유효한 양의 제14항 내지 제27항 또는 제140항 내지 제142항 중 어느 한 항의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 245

제244항에 있어서, 피험자가 포유동물인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 246

제245항에 있어서, 포유동물이 인간인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 247

제244항 내지 제246항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 감염이 바이러스 인플루엔자 감염인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 248

제244항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, 피험자에게 생체내로 투여되거나, 또는 피험자의 하나 이상의 세포에 시험관내 또는 생체외로 투여되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 249

제244항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 250

바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하기 위해 피험자에서 바이러스 감염에 대한 면역원성 반응을 생성하기에 유효한 양의 제105항 내지 제136항, 제146항 내지 제171항, 제175항 내지 제193항, 제197항 내지 제220항 또는 제224항 내지 제240항 중 어느 한 항의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 251

제250항에 있어서, 피험자가 포유동물인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 252

제251항에 있어서, 포유동물이 인간인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 253

제250항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 감염이 바이러스 인플루엔자 감염인 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 254

제250항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 피험자에게 생체내로 투여되거나, 또는 피험자의 하나 이상의 세포에 시험관내 또는 생체외로 투여되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 255

제250항 내지 제254항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여되는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 256

제14항 내지 제27항 및 제140항 내지 제142항 중 어느 한 항의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 바이러스 감염에 대한 면역원성 반응을 생성하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하는 방법.

#### 청구항 257

제256항에 있어서, 피험자가 포유동물인 방법.

#### 청구항 258

제257항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

**청구항 259**

제256항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 감염이 바이러스 인플루엔자 감염인 방법.

**청구항 260**

제256항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 피험자에게 생체내로 투여되거나, 또는 피험자의 하나 이상의 세포에 시험관내 또는 생체외 투여되는 방법.

**청구항 261**

제256항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여되는 방법.

**청구항 262**

제105항 내지 제136항, 제146항 내지 제171항, 제175항 내지 제193항, 제197항 내지 제220항 또는 제224항 내지 제240항 중 어느 한 항의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 바이러스 감염에 대한 면역원성 반응을 생성하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하는 방법.

**청구항 263**

제262항에 있어서, 피험자가 포유동물인 방법.

**청구항 264**

제263항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

**청구항 265**

제262항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 감염이 바이러스 인플루엔자 감염인 방법.

**청구항 266**

제262항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 피험자에게 생체내로 투여되거나, 또는 피험자의 하나 이상의 세포에 시험관내 또는 생체외로 투여되는 방법.

**청구항 267**

제262항 내지 제266항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물이 바이러스 감염을 예방적으로 또는 치료적으로 처리하기에 유효한 양으로 피험자에게 투여되는 방법

**청구항 268**

유전자재배열 인플루엔자바이러스를 세포 배양으로 생산하는 방법에 있어서,

a) 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포군에 도입하는 단계, 상기 다수의 벡터는 제1 인플루엔자 스트레인의 6개의 내부 계놈 분절; 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절; 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하고;

b) 상기 숙주 세포군을 배양하는 단계; 및

c) 다수의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 269**

제268항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 270**

제268항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 271**

제268항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 272**

제268항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 273**

제268항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 274**

제268항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 275**

제268항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

**청구항 276**

제268항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 7의 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

**청구항 277**

제268항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 방법.

**청구항 278**

제268항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 방법.

**청구항 279**

제268항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 280**

제268항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 계놈 분절이 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

**청구항 281**

제268항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 바이러스 스트레인이 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 방법.

**청구항 282**

제268항 내지 제281항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인의 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

### 청구항 283

제268항 내지 제281항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인의 A/Ann Arbor/6/60인 방법.

### 청구항 284

제268항 내지 제281항 중 어느 한 하에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인의 A/Puerto Rico/8/34인 방법.

### 청구항 285

제268항 내지 제284항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 비내 백신 제형으로 투여하기에 적합한 방법.

### 청구항 286

제268항 내지 제285항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 다수의 벡터가 인플루엔자 A 바이러스 계놈을 포함하는 방법.

### 청구항 287

제268항 내지 제286항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 벡터가 다수의 플라스미드 벡터인 방법.

### 청구항 288

제268항 내지 제287항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포군이 베로 세포, PerC6 세포, MDCK 세포, 293T 세포 또는 COS 세포 중에서 하나 이상을 포함하는 방법.

### 청구항 289

제268항 내지 제288항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 헬퍼 바이러스의 사용을 포함하지 않는 방법.

### 청구항 290

제268항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 벡터가 8개의 벡터로 이루어지는 방법.

### 청구항 291

유전자재배열 인플루엔자 바이러스 백신을 생산하는 방법에 있어서,

- a) 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포군에 도입하는 단계, 상기 다수의 벡터는 제1 인플루엔자 스트레인의 적어도 6개의 내부 계놈 분절; 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절; 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하고;
- b) 상기 숙주 세포군을 배양하는 단계;
- c) 다수의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 단계; 및
- d) 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 제공하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 292

제291항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 293

제291항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 294**

제291항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 295**

제291항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 296**

제291항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 297**

제291항에 있어서, 헤마글루티닌 폴리펩타이드가 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 298**

제291항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

**청구항 299**

제291항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 7의 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

**청구항 300**

제291항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 방법.

**청구항 301**

제291항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 방법.

**청구항 302**

제291항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

**청구항 303**

제291항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 계놈 분절이 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

**청구항 304**

제291항 내지 제303항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 바이러스 스트레인이 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 방법.

**청구항 305**

제291항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인이 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 306**

제291항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인의 A/Ann Arbor/6/60인 방법.

### 청구항 307

제291항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 인플루엔자 스트레인의 A/Puerto Rico/8/34인 방법.

### 청구항 308

제291항 내지 제307항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 비내 백신 제형으로 투여하기에 적합한 방법.

### 청구항 309

제291항 내지 제308항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 다수의 벡터가 인플루엔자 A 바이러스 계놈을 포함하는 방법.

### 청구항 310

제291항 내지 제309항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 벡터가 다수의 플라스미드 벡터인 방법.

### 청구항 311

제291항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포군이 베로 세포, PerC6 세포, MDCK 세포, 293T 세포 또는 COS 세포 중에서 하나 이상을 포함하는 방법.

### 청구항 312

제291항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 헤피 바이러스의 사용을 포함하지 않는 방법.

### 청구항 313

제291항 내지 제312항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 벡터가 8개의 벡터로 이루어지는 방법.

### 청구항 314

하기로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드:

- a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- b) H273Y 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- c) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- d) (a) 내지 (c) 중에서 어느 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; 및
- e) 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되는, (a) 내지 (c) 중에서 어느 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

### 청구항 315

제314항에 있어서, 폴리펩타이드가 면역원성인 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드.

### 청구항 316

제314항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 멸균 조성물.

### 청구항 317

제314항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체.

### 청구항 318

제314항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드의 면역학적 유효량을 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 319**

제314항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 320**

제314항의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 또는 재조합 핵산.

**청구항 321**

제320항에 있어서, DNA인 분리된 또는 재조합 핵산.

**청구항 322**

제320항에 있어서, RNA인 분리된 또는 재조합 핵산.

**청구항 323**

제320항에 있어서, 폴리뉴클레오타이드가 면역원성 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 또는 재조합 핵산.

**청구항 324**

제320항의 분리된 또는 재조합 핵산을 포함하는 조성물.

**청구항 325**

면역학적 유효량의 제320항의 분리된 또는 재조합 핵산을 포함하는 면역원성 조성물.

**청구항 326**

제320항의 핵산을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 327**

제321항의 핵산을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 328**

하나 이상의 공여체 바이러스로부터의 6개의 내부 게놈 분절, 제314항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 게놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 게놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 329**

제314항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 게놈 분절을 포함하고 6개의 내부 게놈 분절 및 하나 이상의 공여체 바이러스로부터의 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 게놈 분절을 추가로 포함하는 7:1 유전자재배열 바이러스인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 330**

제314항 또는 제17항에 있어서, 공여체 바이러스가 약독화, 저온 적응 및 온도 민감성으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 표현형 특성을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 331**

제328항 내지 제330항 중 어느 한 항에 있어서, 공여체 바이러스가 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

**청구항 332**

제328항 내지 제331항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 살아있는 바이러스인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 333

제328항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 계놈 분절이 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 334

제328항 내지 제333항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 돼지 인플루엔자 바이러스 뉴라미디나제인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 335

제328항 내지 제333항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 N1 뉴라미디나제인 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 336

제328항 내지 제333항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

#### 청구항 337

유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 세포 배양으로 생산하는 방법에 있어서,

- a) 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포군에 도입하는 단계, 상기 다수의 벡터는 제1 인플루엔자 스트레인의 6개의 내부 계놈 분절; 제314항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절; 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하고;
- b) 상기 숙주 세포군을 배양하는 단계; 및
- c) 다수의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 338

제314항의 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 339

제328항 내지 제336항 중 어느 한 항의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 340

유전자재배열 인플루엔자 바이러스 백신을 생산하는 방법에 있어서,

- a) 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포군에 도입하는 단계, 상기 다수의 벡터는 제1 인플루엔자 스트레인의 적어도 6개의 내부 계놈 분절; 제314항의 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절; 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하고;
- b) 상기 숙주 세포군을 배양하는 단계;
- c) 다수의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 단계; 및
- d) 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 제공하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 341

제314항의 폴리펩타이드를 바이러스 감염의 예방적 또는 치료적 처리를 위해 피험자에서 바이러스 감염에 대한 면역원성 반응을 생성하기에 유효한 양으로 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스.

## 명세서

### 배경기술

- [0001] 연관 출원의 상호 참조
- [0002] 본원은 미국 가출원 번호 제61/220,426호 (출원일: 2009년 6월 25일), 제61/227,986호 (출원일: 2009년 7월 23일), 제61/234,021호 (출원일: 2009년 8월 14일), 및 제61/258,890호 (출원일: 2009년 11월 6일)의 35 U.S.C. § 119(e) 하에서의 이익을 청구한다. 이들 출원 각각이 명확히 참조로 본원에 전부 포함된다.
- [0003] 발명의 배경
- [0004] 2009년 4월 인간에서 돼지-기원 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스의 세계적인 확산이 41년만에 제1의 인플루엔자 범유행병을 기록하였다. 35,000명 이상의 인간들이 2009년 6월 15일자로 이러한 신규한 H1N1 바이러스에 감염되었다. 지난 세기에, H1N1 인플루엔자 바이러스는 또한 엄청나게 충격적인 1918년 및 1919년 범유행병을 일으켰다. 또한, 1976년에 돼지로부터 유래된 H1N1 바이러스는 무산된 범유행병을 일으켰다. 1918년 인플루엔자 바이러스는 1918년 봄에는 가벼운 발발을 일으켰으나 그해 가을에는 전세계적으로 치명적인 요동을 일으켰으며, 전 세계적으로 5,000만명의 인간을 희생시켰다. 비록 2009년 돼지-기원 H1N1 인플루엔자 바이러스가 2009년 초기에는 가벼운 것으로 여겨졌지만, 이 바이러스는 2009년 가을쯤에는 돌연변이되고 더욱 독성적으로 될 가능성이 존재한다. 따라서, 2009년 H1N1 바이러스에 의해 야기되는 심각한 범유행병을 예방하기 위한 효과적인 백신을 개발할 긴박한 필요가 있다.
- [0005] 살아있는 백신 및 사멸된 백신 모두의 개발에 유용한 6:2 유전자재배열 (reassortant) 인플루엔자 바이러스 (돼지-기원의 인플루엔자 A (H1N1) 바이러스의 HA 및 NA 분절 (segment) 및 약독화된 인플루엔자 바이러스의 "골격 (backbone)" 분절을 가짐)가 분리되기는 했으나 지금까지 분리된 대부분의 스트레인 (strain)은 난 (egg)에서 낮은 역가를 나타낸다. 동일한 분리물은 MDCK 세포를 저조하게 감염시키고 저조한 CPE로 아주 작은 플라크를 형성한다. 또한, 바이러스 여과 후 바이러스 효능의 심각한 손실이 관측된다. 따라서, 초기에 분리된 H1N1 유전자 재배열 인플루엔자 바이러스 스트레인은 백신 스트레인의 개발에 대해 좋지 못한 후보물이다.
- [0006] 본 발명은 다양한 유형의 백신의 생성 및 연구, 진단 등에 사용할 수 있는 새로운 및/또는 새로이 분리된 돼지 인플루엔자 H1 혜마글루터닌 변이체를 제공한다. 또한, 본 발명은 H1 인플루엔자 바이러스의 복제 효율을 개선하는 방법을 제공한다. 다수의 다른 이점이 하기의 검토로부터 명백해질 것이다.
- 발명의 내용**
- [0007] 본원에 기술되는 바와 같이, H1N1 백신의 개발에 사용하기 위한 6:2 유전자재배열 인플루엔자 스트레인이 역유전학에 의해 생성되었다. 난에서 저조하게 성장했던 야생형 HA 및 NA 계놈 분절을 포함하는 초기에 분리된 유전자재배열 바이러스를 난에서 이들의 성장이 상당히 개선되도록 변형시켰다. 변형된 유전자재배열 바이러스의 서열 분석은, H1 돼지 혜마글루터닌의 위치 119, 153, 154 및 186에서의 아미노산 변화가 난 및 MDCK 세포에서의 성장 이점에 책임이 있다는 것을 나타내었다. 또한, HA 잔기 155에서의 아미노산 치환 (이전에 돼지 1976 바이러스 복제를 증가시키는 것으로 밝혀짐)도 난에서 유전자재배열 A/CA/7/09 바이러스 복제를 증가시키는 것으로 밝혀졌다. HA 잔기 119 및 186에서 아미노산 변화를 갖는 바이러스는 바이러스 항원성을 유의하게 변화시키지 않으면서 난 성장을 증가시켰다. 본원에서 기술되는 H1 HA 변이체는 PR8 또는 A/Ann Arbor/6/60 바이러스 스트레인의 6개의 내부 계놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스에 대해 증가된 성장 표현형을 부여하였다. 또한, ca A/Ann Arbor/6/60 골격을 포함하는 변이체 바이러스 및 HA 잔기 119 또는 186에서 아미노산 치환을 갖는 H1 HA 변이체는 흰담비 (ferret)에서 약독화되고 매우 면역원성이었다. 이들 자료는, HA 잔기 119 및/또는 186에서 아미노산 치환을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 변이체가 인간 사용을 위한 H1N1 돼지 인플루엔자 백신의 개발에 적합하다는 것을 나타낸다.
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0008] 본 발명은 인플루엔자 혜마글루터닌의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라 이러한 서열을 포함하는 벡터, 바이러스, 백신, 조성물 등 및 이들의 사용 방법을 포함한다. 본 발명의 추가의 특징이 본원에서 더욱 상세히 기술된다.
- [0009] 일부 양상에서, 본 발명은 분리된 또는 재조합 혜마글루터닌 폴리펩타이드를 제공한다. 하나의 양태에서, 본 발

명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 H1 HA 폴리펩타이드이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 돼지 인플루엔자 HA 폴리펩타이드일 수 있다.

[0010] 하나의 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 119에 상응하는 위치 또는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 186에 상응하는 위치에서 비자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 119에 상응하는 위치 또는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 186에 상응하는 위치에서 비자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 추가의 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0011] 특정 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 특정 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 글루탐산 (E), 및 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파르트산 (D)를 포함할 수 있다. 추가의 특정 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 1의 위치 119의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에서 아스파라긴 (N), 및 서열 번호 1의 위치 186의 아미노산 잔기에서 아스파르트산 (D)를 포함할 수 있다.

[0012] 추가의 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 H273Y 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0013] 추가의 양태에서, 본 발명의 분리된 또는 재조합 HA 폴리펩타이드는 D222G 및/또는 Q223R 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0014] 특정 양태에서, 본 발명의 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 HA 폴리펩타이드는 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함한다.

[0015] 특정 양태에서, 본 발명의 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 HA 폴리펩타이드는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 HA 폴리펩타이드는 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 및 본 발명의 이러한 폴리펩타이드 및/또는 핵산을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다.

[0017] 특정 양태에서, 본 발명의 핵산은 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 핵산은 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 핵산은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0018] 특정 양태에서, 본 발명의 핵산은 서열 번호 7의 잔기 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 핵산은 서열 번호 7의 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 핵산은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 7의 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0019] 하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60으로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 (neuramidinase) 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서,

제1 계놈 분절은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제2 계놈 분절은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 발육란 (embryonated egg)에서 적어도 약 7.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10.5 log<sub>10</sub> PFU/ml 또는 적어도 약 11 log<sub>10</sub> PFU/ml의 역가로 성장한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 조직 배양에서 적어도 약 7.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10.5 log<sub>10</sub> PFU/ml 또는 적어도 약 11 log<sub>10</sub> PFU/ml의 역가로 성장한다.

[0020]

또 다른 양태에 있어서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60으로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제2 계놈 분절은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 발육란에서 적어도 약 7.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10.5 log<sub>10</sub> PFU/ml 또는 적어도 약 11 log<sub>10</sub> PFU/ml의 역가로 성장한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 조직 배양에서 적어도 약 7.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10.5 log<sub>10</sub> PFU/ml 또는 적어도 약 11 log<sub>10</sub> PFU/ml의 역가로 성장한다.

[0021]

하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제2 계놈 분절은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 발육란에서 적어도 약 7.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10.5 log<sub>10</sub> PFU/ml 또는 적어도 약 11 log<sub>10</sub> PFU/ml의 역가로 성장한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 조직 배양에서 적어도 약 7.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 8.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 9.5 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10 log<sub>10</sub> PFU/ml, 적어도 약 10.5 log<sub>10</sub> PFU/ml 또는 적어도 약 11 log<sub>10</sub> PFU/ml의 역가로 성장한다.

[0022]

또 다른 양태에 있어서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제1 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, 제2 계놈 분절은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10.5 \log_{10}$  PFU/ml 또는 적어도 약  $11 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 조직 배양에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10.5 \log_{10}$  PFU/ml 또는 적어도 약  $11 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장한다.

[0023]

하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60으로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60으로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 7의 잔기 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 서열 번호 7의 잔기 84 내지 1064의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 제2 계놈 분절은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 뉴라미디나제 폴리펩타이드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10.5 \log_{10}$  PFU/ml 또는 적어도 약  $11 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장한다. 특정 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 조직 배양에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10.5 \log_{10}$  PFU/ml 또는 적어도 약  $11 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장한다.

[0024]

다른 양상에서, 본 발명은 상기 열거된 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 갖는 멸균 조성물을 포함한다. 또한, 본 발명은 면역학적 유효량의 상술된 폴리펩타이드 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물, 및 면역학적 유효량의 상술된 폴리펩타이드 하나 이상을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대한 예방적 면역 반응을 생성하도록 개체의 면역계를 자극하는 방법을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8%, 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0025]

하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 단일 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 일가 면역원성 조성물이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 3개의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 삼가 면역원성 조성물이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 2개의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스 및 하나의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 삼가 면역원성 조성물이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 H1 유형의 하나의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스, H3 유형의 하나의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스 및 하나의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 삼가 면역원성 조성물이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 4개의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 사가 면역원성 조성물이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 2개의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스 및 2개의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 사가 면역원성 조성물이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 H1 유형의 하나의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스, H3 유형의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스, 빅토리아 (Victoria) 계통의 하나의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스 및 야마가타 (Yamagata) 계통의 하나의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 사가 면역원성 조성물이다. 특정 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함한다.

[0026]

추가로, 본 발명은 상술된 폴리펩타이드 하나 이상을 암호화하는 게놈 분절을 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 또한, 본 발명은 이러한 유전자재배열 인플루엔자 바이러스의 면역학적 유효량을 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다. 생리학적으로 허용되는 담체 내에 이러한 유전자재배열 인플루엔자 바이러스의 면역학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대한 예방적 면역 반응을 생성하기 위해 면역계를 자극하는 방법도 본 발명의 일부이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 공여체 바이러스 (예: A/AA/6/60 또는 A/Puerto Rico/8/34 (더욱 일반적으로 PR8로 공지됨))로부터의 6개의 내부 게놈 분절을 포함하고 2개의 게놈 분절 (통상적으로 및 바람직하게는 HA 및 NA 또는 이의 단편을 암호화함)을 추가로 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스이다. 이러한 유전자재배열 (재조합) 바이러스를 포함하는 조성물도 본 발명의 특징이다.

[0027]

하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60의 6개의 내부 게놈 분절 및 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 분절을 포함한다. HA 폴리펩타이드는 적어도 하나의 치환, 결실 또는 삽입을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. HA 폴리펩타이드는 H273Y 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. HA 폴리펩타이드는 D222G 및/또는 Q223R 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. HA 폴리펩타이드는 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60의 6개의 내부 게놈 분절 및 D222G,

K119E 및 A186D 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60의 6개의 내부 계놈 분절 및 Q223R 및 A186D 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60의 6개의 내부 계놈 분절 및 Q223R, H273Y 및 A186D 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60의 6개의 내부 계놈 분절 및 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, HA 계놈은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈 분절은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0028]

하나의 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34 (PR8)의 6개의 내부 계놈 분절 및 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. HA 폴리펩타이드는 적어도 하나의 치환, 결실 또는 삽입을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. HA 폴리펩타이드는 D222G 및/또는 Q223R 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. HA 폴리펩타이드는 K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. HA 폴리펩타이드는 H273Y 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34 (PR8)의 6개의 내부 계놈 분절 및 D222G, K119E 및 A186D 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34 (PR8)의 6개의 내부 계놈 분절 및 Q223R 및 A186D 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 A/Puerto Rico/8/34 (PR8)의 6개의 내부 계놈 분절 및 Q223R, H273Y 및 A186D 치환을 갖는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화하는 계놈 분절을 포함한다. 특정 양태에서, HA 계놈은 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈은 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 특정 양태에서, HA 계놈 분절은 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0029]

또한, 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 본 발명에 포함된다. 하나의 양태에서, 이러한 유전자재배열 바이러스는 하나 이상의 공여체 바이러스 (예: A/AA/6/60 또는 A/Puerto Rico/8/34)로부터의 6개의 내부 계놈 분절, 본 발명의 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 계놈 분절 및 뉴라미디나제 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 계놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재

배열 바이러스이다. 또한, 이러한 유전자재배열/재조합 인플루엔자 바이러스의 면역학적 유효량을 포함하는 면역원성 조성물이 본 발명의 범위에 속한다.

[0030] 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 바이러스는 조직 배양 또는 발육란에서 높은 복제율을 나타낸다. 하나의 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 발육란에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10.5 \log_{10}$  PFU/ml 또는 적어도 약  $11 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장한다. 또 다른 양태에서, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스는 조직 배양에서 적어도 약  $7.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $8.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $9.5 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10 \log_{10}$  PFU/ml, 적어도 약  $10.5 \log_{10}$  PFU/ml 또는 적어도 약  $11 \log_{10}$  PFU/ml의 역가로 성장한다.

[0031] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 숙주 세포를 배양하여 유전자재배열/재조합 인플루엔자 바이러스를 생성하는 방법이 고려된다.

[0032] 본원의 다른 양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명의 상술된 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 하나 이상을 갖는 면역원성 조성물을 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 본 발명의 살아있는 바이러스를 포함한다. 다른 양태는 (임의로 생리학적으로 유효한 담체 내에) 면역학적 유효량의 상술된 유전자재배열 인플루엔자 바이러스 하나 이상을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 대한 예방적 면역 반응을 생성하기 위해 개체의 면역계를 자극하는 방법을 포함한다.

[0033] 또한, 본 발명은 본 발명의 재조합 또는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 백신을 포함한다. 일 양태에서, 본 발명의 백신은 스플릿 (split) 백신 또는 사멸된 백신이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 백신은 살아있는 약독화된 인플루엔자 바이러스 백신이다. 추가의 양태에서, 본 발명의 백신은 일가, 이가, 삼가 또는 사가일 수 있다.

[0034] 또한, 인플루엔자 바이러스 백신을 생성하는 방법이 본 발명에 속한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 백신은 일가, 이가, 삼가 또는 사가 백신일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은, 예를 들어 암탉 (hen)의 발육란 및/또는 세포 배양에서 인플루엔자 바이러스의 복제능을 증가시키기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은, 부분적으로는, 증가된 복제능과 연관된 특정 H1 단백질 아미노산의 확인에 기초한다. 이를 특정한 아미노산 중에서 하나 이상을 포함하는 H1 HA 단백질을 암호화하는 H1 HA 유전자를 사용함으로써 개선된 인플루엔자 바이러스 수율이 달성될 수 있다. 하나의 양태에서, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 119에 상응하는 위치에서 헤마글루티닌 폴리펩타이드의 아미노산 잔기를 변형시켜 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스의 복제능을 증가시키는 단계를 포함하는, 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스의 복제능을 증가시키는 방법이 제공된다. 또한, 상기 방법에 의해 생성되는 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.

[0036] 또한, 본 발명은, 예를 들어 암탉의 발육란 및/또는 세포 배양에서 H1N1 유전자재배열 인플루엔자 바이러스의 복제능을 증가시키기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 위치 119 또는 186에 상응하는 위치에서 헤마글루티닌 폴리펩타이드의 아미노산 잔기를 변형시켜 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스의 복제능을 증가시키는 단계를 포함하는, H1N1 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스의 복제능을 증가시키는 방법이 제공된다. 또한, 상기 방법에 의해 생성되는 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.

[0037] 하나의 양태에서, 비자연 발생 아미노산을 갖는 본 발명의 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스의 복제능은 동일한 위치에서 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 6배, 적어도 8배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 40배, 적어도 50배 또는 적어도 100배 증가된다. 또 다른 양태에서, 비자연 발생 아미노산을 갖는 본 발명의 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스의 복제능은 동일한 위치에서 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2 내지 10배, 2 내지 20배, 2 내지 40배, 2 내지 100배, 5 내지 10배, 5 내지 20배, 5 내지 40배 또는 5 내지 100배 증가된다.

[0038] 하나의 양태에서, 비자연 발생 아미노산을 갖는 본 발명의 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 본 발명의 유

전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란에서의 피크 역가는 동일한 위치에서 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 6배, 적어도 8배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 40배, 적어도 50배 또는 적어도 100배 증가된다. 또 다른 양태에서, 비자연 발생 아미노산을 갖는 본 발명의 헤마글루티닌 폴리펩타이드를 포함하는 본 발명의 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 대한 발육란에서의 피크 역가는 동일한 위치에서 비자연 발생 아미노산을 포함하지 않는 동일한 유전자재배열 또는 재조합 인플루엔자 바이러스에 비해 2 내지 10배, 2 내지 20배, 2 내지 40배, 2 내지 100배, 5 내지 20배, 5 내지 40배 또는 5 내지 100배 증가된다.

[0039] 특정 양태에서, K119E, K119N 및 A186D로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산을 포함하는 H1N1 바이러스의 HA 폴리펩타이드를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다. 특정 양태에서, K119X 및 A186X (여기서, X는 H1N1 바이러스에서 비자연 발생인 임의의 아미노산이다)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산을 포함하는 H1N1 바이러스의 HA 폴리펩타이드를 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 약독화된 바이러스의 (또는 이로부터 유도되는) 적어도 5 또는 6개 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스이다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57, 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 약독화된 바이러스의 (또는 이로부터 유도되는) 적어도 5 또는 6개 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스이다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다.

[0040] 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 본 발명의 HA 폴리펩타이드를 포함하는 6:2 또는 7:1 유전자재배열 바이러스이다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 본 발명의 HA 폴리펩타이드 및 A/Ann Arbor/6/60, A/Puerto Rico/8/34, A/Leningrad/134/17/57, 및 A/Leningrad/17로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 약독화된 바이러스의 (또는 이로부터 유도되는) 적어도 5 또는 6개의 분절을 포함하는 6:2 또는 7:1 유전자재배열 바이러스이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 (예를 들어, 위치 119, 186에서) 1, 2 또는 3개의 치환을 갖는 A/CA/04/09 또는 A/CA/07/09의 (또는 이로부터 유도되는) HA 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 아미노산 위치 119에서 글루탐산 또는 아스파라긴 및 위치 186에서 아스파르트산을 갖는 A/CA/04/09 또는 A/CA/07/09의 (또는 이로부터 유도되는) HA 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 아미노산 위치 119 및 위치 186에서 아미노산 치환을 갖는 A/CA/04/09 또는 A/CA/07/09의 (또는 이로부터 유도되는) HA 폴리펩타이드를 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 아미노산 위치 119 및 위치 186에서 하나의 아미노산 치환을 갖는 H1N1 돼지 독감 바이러스의 (또는 이로부터 유도되는) HA 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열과

적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.4%, 적어도 99.6%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다. 추가의 양태에서, 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 3개 미만, 5개 미만, 10개 미만, 15개 미만, 20개 미만, 25개 미만, 30개 미만의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 서열 번호 6 또는 8의 잔기 1 내지 327의 아미노산 서열을 포함하는 HA 폴리펩타이드를 포함한다.

[0041] 당업자라면 아미노산의 정확한 위치가 본 발명의 벡터, 방법 및 바이러스에 사용되는 특정한 인플루엔자 스트레인에 따라 달라질 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 가령, 특정 인플루엔자 스트레인의 HA 단백질은, 서열 번호 1의 위치 119에 상응하는 위치가 예를 들어 특정 인플루엔자 스트레인의 HA 단백질의 잔기 93 또는 97에서 발견되도록, HA 단백질을 암호화하는 HA 유전자에서 삽입 또는 결실을 포함할 수 있다. 특히, 표 3에 나타나 있는 바와 같이, A/CA/07/09 HA 폴리펩타이드 (서열 번호 1)의 위치 119 및 186은 A/South Dakota/6/07 H1 HA 폴리펩타이드의 위치 118 및 185 각각에 상응한다. 당업자라면 특정 아미노산 위치가, 변형 시, 당해 기술 분야에서 통상적인 기술을 이용하여 증가된 복제능과 연관되는 위치에 상응하는지의 여부를 인지할 수 있을 것이다. 한 가지 이러한 통상의 기술은 당해 기술 분야에서 이용가능한 알고리즘을 이용하여 서열 번호 1 및 특정한 인플루엔자 스트레인 HA 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 정렬시키는 것이다.

[0042] 본 발명의 이러한 목적과 특징 및 다른 목적과 특징은, 첨부된 도면 및 특허청구범위와 함께 하기의 상세한 설명을 이해하는 경우, 더욱 명확하게 이해될 것이다.

#### 도면의 간단한 설명

[0044] **도 1.** MDCK 세포로부터 선택된 변이체 및 도입된 아미노산 변화를 포함하는 지시된 변이체의 플라크 형태 (패널 A). 플라크 검정은 MDCK 세포에서 수행하고, 4일 동안 33°C에서 인큐베이션한 후, 인플루엔자 A 바이러스에 대한 폴리클로날 항혈청으로 면역염색하였다. 이중 돌연변이체 V5-119E/186D의 플라크 형태를 단일 119E 및 186D 돌연변이체와 비교한다 (패널 B).

[0045] **도 2.** A/California/7/09, A/swine/Iowa/1/1976 (뉴클레오타이드 서열 기탁 코드 CY022069), A/Swine/1931 (뉴클레오타이드 서열 기탁 코드 CY009628), 및 A/South Dakota/6/07의 HA1 단백질 서열 비교. 위치 119, 153, 154, 155, 186 및 278에서의 아미노산이 강조된다.

[0046] **도 3.** 발육란으로부터 정제된 바이러스 제제의 단백질 조성.

[0047] **도 4.** 발육란으로부터 정제된 바이러스 제제의 단백질 조성.

[0048] **도 5.** (A) 48시간 및 (B) 60시간에 발육란으로부터 수거된 정제된 바이러스 제제의 단백질 조성.

[0049] **도 6.** 발육란에서 2개의 유전자재배열 H1N1 바이러스에 의해 생성되는 HA1 단백질의 정량적 비교.

#### 정의

[0051] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 하기 정의는 당업계의 정의를 보충하는 것으로, 본 출원에 관한 것이며, 예를 들어 임의의 공동 소유의 특허 또는 출원과 같은, 임의의 관련 또는 비관련 출원건에까지 귀속될 필요는 없다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 시험 실시하는데 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법은 본원에 기술되어 있는 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시태양을 기술하기 위한 목적으로 사용된 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니다. 추가의 용어가 본원 명세서의 전체에 걸쳐서 정의되고 기술된다.

[0052] 2개의 핵산 또는 폴리펩타이드 (예를 들어 HA 또는 NA 분자를 암호화하는 DNA, 또는 HA 또는 NA 분자의 아미노산 서열)와 관련하여 문구 "실질적으로 동일한"은, 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 육안 검사로 측정시, 최대 대응으로 비교하거나 정렬하였을 때, 적어도 약 90%, 바람직하게는 91%, 가장 바람직하게는 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 동일성을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 언급한다.

[0053] 폴리펩타이드와 관련하여 용어 "변이체"는 참조 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 변경되어 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 변이체는 "보존적" 변화를 가질 수 있는데, 여기서 치환된 아미노산은 류신에서 이소류신으로의 대체와 같이, 유사한 구조적 특성, 또는 화학적 특성을 갖는다. 달리, 변이체는 글리신에서 트리토판으로의 대체와 같이 "비보존적" 변화를 가질 수 있다. 유사한 최소한의 변형으로는 또한 아미노산 결실 또는

삽입, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 아미노산 잔기가 생물학적 또는 면역학적 활성이 제거되지 않고 치환, 삽입, 또는 결실되었는지를 결정하는 것에 관한 지침은, 예를 들어 DNASTAR 소프트웨어와 같이, 당업계에 잘 알려져 있는 컴퓨터 프로그램을 사용함으로써 찾아볼 수 있다. 보존적 치환의 예 또한 본원에 기술되어 있다.

[0054] 본 발명의 "뉴라미디나제" 폴리펩타이드는 인플루엔자 바이러스로부터의 하나 이상의 공지된 뉴라미디나제 분자와 면역학적 교차 반응성을 나타낸다. 문헌에는 (예를 들어, GenBank, CDC로부터의 공개문 등에) 이러한 공지된 뉴라미디나제의 예가 풍부하다. 마찬가지로, 본 발명의 "헤마글루티닌"은 인플루엔자 바이러스로부터의 하나 이상의 공지된 헤마글루티닌 분자의 예가 풍부하다.

[0055] 유전자는 또한, 예를 들어 다른 단백질에 대한 인식 서열을 형성하는 비발현 핵산 분절을 포함한다. 비발현 조절 서열로는 "프로모터" 및 "인핸서"를 포함하는데, 전사 인자와 같은 조절 단백질이 상기 "프로모터" 및 "인핸서"에 결합함으로써 인접한 또는 근접한 서열의 전사가 이루어진다. "조직 특이성" 프로모터 또는 인핸서는 특이적인 조직 유형 또는 세포 유형, 또는 유형들에서 전사를 조절하는 것이다.

[0056] "유전자의 발현" 또는 "핵산의 발현"은 전형적으로 문맥에 따라 지시되는 바와 같이 DNA가 RNA로 전사되는 것 (임의로, 예를 들어 스플라이싱과 같은 RNA의 변형 포함) 또는 RNA가 mRNA로 전사되는 것, RNA가 폴리펩타이드로 해독되는 것 (가능하게는, 예를 들어 해독후 변형과 같은 폴리펩타이드의 추후 변형 포함), 또는 전사 및 해독 둘 모두를 의미한다.

[0057] "오픈 판독 프레임 (open reading frame)" 또는 "ORF"는 폴리펩타이드로 해독될 수 있는, 해독이 가능한 DNA 또는 RNA의 판독 프레임 (예를 들어, 유전자의 것)이다. 즉, 판독 프레임은 정지 코돈에 의해 중단되지 않는다. 그러나, ORF라는 용어가 반드시 폴리뉴클레오타이드가 실제 폴리펩타이드로 해독된다는 것을 나타내는 것은 아니라는 것에 주목하여야 한다.

[0058] 용어 "벡터"는 핵산이 유기체들, 세포들 또는 세포 성분들 간에 전파되고/거나 전달될 수 있도록 하는 수단을 지칭한다. 벡터는 자발적으로 복제하거나, 숙주 세포의 염색체내로 통합될 수 있는, 플라스미드, 바이러스, 박테리오파지, 프로바이러스, 파지미드, 트랜스포존, 인공 염색체 등을 포함한다. 벡터는 또한 자발적으로 복제하지는 못하는 나형 (naked) RNA 폴리뉴클레오타이드, 나형 DNA 폴리뉴클레오타이드, 동일 가닥내에 DNA 및 RNA 둘 모두로 이루어진 폴리뉴클레오타이드, 폴리-리신-접합된 DNA 또는 RNA, 웨타이드-접합된 DNA 또는 RNA, 리포좀-접합된 DNA 등일 수 있다. 모두가 그러하지는 않지만, 다수의 보편적인 실시태양에서, 본 발명의 벡터는 플라스미드이다.

[0059] "발현 벡터"는 벡터에 포함되어 있는 핵산의 발현뿐만 아니라 복제도 촉진시킬 수 있는 플라스미드와 같은 벡터이다. 전형적으로, 발현시키고자는 핵산은 프로모터 및/또는 인핸서에 "작동가능하게 연결되고", 이는 프로모터 및/또는 인핸서에 의한 전사 조절 제어에 대한 대상이 된다.

[0060] "이방향 발현 벡터"는 2개의 프로모터 사이에 위치해 있는 핵산에 대하여 반대 방향으로 배향되어 있는 2개의 대체 프로모터를 특징으로 하는데, 이는 발현이 양쪽 배향으로 개시될 수 있도록 함으로써, 예를 들어 플러스 (+) 또는 센스 가닥, 및 네거티브 (-) 또는 앤티센스 가닥 RNA 둘 모두의 전사가 이루어질 수 있다.

[0061] 본 발명과 관련하여, "분리된"이라는 용어는, 일반적으로 생물학적 물질의 자연 발생 환경하에서의 생물학적 물질을 수반하거나 그와 상호작용하는 성분이 실질적으로는 없는, 생물학적 물질, 예를 들어 바이러스, 핵산 또는 단백질을 지칭한다. 분리된 생물학적 물질은 임의로 예를 들어 세포 또는 야생형 바이러스와 같이 그의 천연 환경에서 생물학적 물질과 함께 발견되지 않는 추가의 물질은 포함한다. 예를 들어, 세포와 같은 상기 물질이 그의 천연 환경에 존재하는 경우, 물질은 상기 환경에서 발현되는 그러한 물질에 대해 본래의 것이 아닌 세포내 위치 (예를 들어, 계놈 또는 유전 요소)에 배치될 수 있다. 예를 들어, 자연 발생 핵산 (예를 들어, 암호화 서열, 프로모터, 및 인핸서 등)이 비자연 발생 수단에 의해 상기 핵산에 대해 본래의 것이 아닌 계놈의 유전자좌 (예: 벡터, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 벡터 또는 엠플리콘)에 도입된다면, 이는 분리된 것이다. 상기 핵산은 또한 "이종성" 핵산으로서 지칭된다. 분리된 바이러스는, 예를 들어 야생형 바이러스의 본래의 환경 (예를 들어, 감염된 개체의 코인두) 이외의 환경 (예를 들어, 세포 배양 시스템, 또는 세포 배양물로부터 정제)에 존재한다.

[0062] 바이러스와 관련하여 언급될 때, "키메라 (chimeric 또는 chimera)"라는 용어는 바이러스가 1 초파의 모체 바이러스 스트레인 또는 공급원으로부터 유래된 유전 성분 및/또는 폴리펩타이드 성분을 포함한다는 것을 의미한다. 유사하게, 바이러스 단백질과 관련하여 언급될 때, "키메라 (chimeric 또는 chimera)"라는 용어는 단백질이 1

초과의 모체 바이러스 스트레인 또는 공급원으로부터 유래된 폴리펩타이드 성분 (즉, 아미노산 하위서열)을 포함한다는 것을 의미한다. 본원에서 분명한 바와 같이, 이러한 키메라 바이러스는 통상적으로 유전자재배열/재조합 바이러스이다. 따라서, 일부 양태에서, 키메라는 임의로, 예를 들어 B 인플루엔자 바이러스 (예: B/AA/1/66 등)로 구성, 또는 제조/유도된 골격에 위치되는 A 인플루엔자 바이러스로부터의 서열 (예: HA 및/또는 NA의 서열) 또는 A/AA/6/60 등과 같은 A 인플루엔자 바이러스 골격 (즉, 공여체 바이러스)에 위치되는 B 인플루엔자 바이러스를 포함할 수 있다.

[0063] 용어 "재조합"은 물질 (예를 들어, 핵산 또는 단백질)이 인간의 개입으로 인해 인공적으로 또는 합성적으로 (비 자연적으로) 변경되었음을 의미한다. 변형은 그의 자연 환경 또는 상태 내에서 실시될 수 있거나, 그로부터 제거될 수 있다. 구체적으로, 예를 들어 인플루엔자 바이러스는 재조합 핵산의 발현에 의해 생산된 재조합체이다. 예를 들어, "재조합 핵산"은, 예를 들어 클로닝, DNA 셔플링 또는 다른 절차시에 핵산을 재조합함으로써, 또는 화학적 또는 다른 돌연변이유발에 의해 제조된 것이며; "재조합 폴리펩타이드" 또는 "재조합 단백질"은 재조합 핵산의 발현에 의해 생산된 폴리펩타이드 또는 단백질이고; "재조합 바이러스", 예를 들어 재조합 인플루엔자 바이러스는 재조합 핵산의 발현에 의해 생산된다.

[0064] 바이러스 (통상적으로 본원에서는 인플루엔자 바이러스)와 관련하여 언급될 때, "유전자재배열"이라는 용어는 바이러스가 1 초과의 모체 바이러스 스트레인 또는 공급원으로부터 유래된 유전 성분 및/또는 폴리펩타이드 성분을 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 7:1 유전자재배열 제1 모체 바이러스로부터 유래된 7개의 바이러스 계놈 분절 (또는 유전자 분절)과, 예를 들어 본 발명의 헤마글루티닌 또는 뉴라미니다제를 암호화하는, 단일의 상보적인 바이러스 계놈 분절을 포함한다. 6:2 유전자재배열은 제1 모체 바이러스로부터 6개의 계놈 분절, 가장 보편적으로는 6개의 내부 유전자와, 하나 이상의 상이한 모체 바이러스로부터의 2개의 상보적인 분절, 예를 들어 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 계놈 분절을 포함한다. 또한, 유전자재배열 바이러스는 본원에서의 문맥에 따라 "키메라" 및/또는 "재조합체"으로 불린다.

[0065] 이종성 또는 분리된 핵산과 관련하여 언급될 때, "도입된"이라는 용어는 핵산이 세포의 계놈 (예를 들어, 염색체, 플라스미드, 색소체 또는 미토콘드리아 DNA)내로 포함되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나 일시적으로 발현 (예를 들어, 형질감염된 mRNA)될 수 있는, 진핵생물 또는 원핵생물 세포내로의 핵산의 혼입을 지칭한다. 상기 용어는 "감염 (infection)", "형질감염 (transfection)", "형질전환 (transformation)" 및 "형질도입 (transduction)"과 같은 방법을 포함한다. 본 발명과 관련하여 핵산을 세포내로 도입하는데 전기천공법, 인산칼슘 침전법, 지질 매개 형질감염 (리포택션) 등을 비롯한 다양한 방법이 사용될 수 있다.

[0066] 용어 "숙주 세포"는, 예를 들어 박터와 같이 이종성 핵산을 함유하며, 핵산의 복제 및/또는 발현을 지지하는 세포를 의미한다. 숙주 세포는, 예를 들어 대장균 (*E. coli*)과 같은 원핵생물 세포, 또는, 예를 들어 효모, 곤충, 양서류, 조류 또는 인간 세포를 비롯한 포유동물 세포와 같은 진핵생물 세포일 수 있다. 예시적인 숙주 세포로는, 예를 들어 베로 (Vero) (아프리카 녹색원숭이 신장) 세포, BHK (아기 햄스터 신장: baby hamster kidney) 세포, 1차 병아리 신장 (PCK: primary chick kidney) 세포, 마딘-다비 개 신장 (MDCK: Madin-Darby Canine Kidney) 세포, 마딘-다비 소 신장 (MDBK: Madin-Darby Bovine Kidney) 세포, 293 세포 (예를 들어, 293T 세포), 및 COS 세포 (예를 들어, COS1, COS7 세포) 등을 포함한다. 다른 양태에서, 숙주 세포는 임의로 난 (암탉의 난, 암탉의 발육란 등)을 포함할 수 있다.

[0067] 인플루엔자 바이러스의 "면역학적 유효량"은 추후의 인플루엔자 바이러스 노출에 대한 개체 (예를 들어, 인간) 자신의 면역 반응을 증진시키기에 충분한 양이다. 유도된 면역 수준은, 예를 들어 플라크 중화, 보체 고정, 효소면역분석법, 또는 미세중화 분석법에 의해 중화 분비성 및/또는 혈청 항체의 양을 측정함으로써 모니터링할 수 있다.

[0068] 인플루엔자 바이러스에 대한 "예방적 면역 반응"은 개체가 추후에 상기 인플루엔자 바이러스에 노출되고/거나 그로 감염되었을 때에 질환에 대해 보호적인, 개체 (예를 들어, 인간)가 나타내는 면역 반응을 지칭한다. 몇몇의 경우에서, 야생형 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, 천연적 순환형 인플루엔자 바이러스)는 여전히 감염을 유발할 수는 있지만, 중증의 또는 생명-위협적인 감염을 유발시킬 수는 없다. 전형적으로, 예방적 면역 반응은 시험관내 및 생체내에서 동일한 바이러스 스트레인 및/또는 하위군의 바이러스 (및 가능하게는 또한 상이한 비백신형 스트레인 및/또는 하위군의 바이러스)를 중화시킬 수 있는 숙주에 의해 발생된 혈청 및 분비성 항체를 검출가능한 수준으로 생성한다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항체"는 실질적으로 또는 부분적으로 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 암호화된 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 단백질이다. 인지된 면역글로불린 유전자

로는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 입실론 및 뮤 불변 영역 유전자뿐만 아니라, 무수히 많은 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 입실론으로 분류되며, 결국 이는 각각 면역글로불린 부류인 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 정의한다. 전형적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄 쌍으로 구성되는데, 각각은 하나의 "경쇄" (약 25 kD)와 하나의 "중쇄" (약 50 내지 70 kD)를 갖는다. 각 쇄의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 정의한다. 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH)라는 용어는 각각 이러한 경쇄 및 중쇄를 지칭한다. 항체는 온전한 면역글로불린으로서, 또는 다양한 웨티다제로 분해되어 생성된 것인 다수의 잘 특징화된 단편으로서 존재한다. 따라서, 예를 들어, 웨신은 헌지 영역내 이황화 결합 아래의 항체를 분해하여 F(ab)'2를 생성하는데, 이는 그 자체가 이황화 결합에 의해 VH-CH1에 연결되어진 경쇄인 Fab 이량체이다. F(ab)'2는 헌지 영역내 이황화 결합을 파괴시키는 경미한 조건하에서 환원됨으로써 (Fab')2 이량체는 Fab' 단량체로 전환될 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 헌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다 (기타 항체 단편에 관한 보다 상세한 설명에 대해서는 문헌 [참조: Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999)]을 참조한다). 온전한 항체의 분해에 의해 다양한 항체 단편이 정의되지만, 당업자는 상기와 같은 Fab' 단편은 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법을 사용함으로써 새롭게 합성될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이 항체라는 용어는 항체 또는 전체 항체의 변형에 의해 제조되거나, 재조합 DNA 방법을 사용함으로써 새롭게 합성된 단편을 포함한다. 항체는, 예를 들어 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 다종 또는 단일 쇄 항체 (가변 중쇄 및 가변 경쇄와 함께 (직접적으로 또는 웨티드 링커를 통해) 연결되어 연속 폴리펩타이드를 형성하는 것인 단일 쇄 Fv (sFv 또는 scFv) 항체 포함), 및 인간화된 항체 또는 키메라 항체를 포함한다.

#### [0070] 인플루엔자 바이러스

본 발명의 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드는 인플루엔자 HA 및/또는 NA 서열의 변이체이다. 예를 들어, 하기 도 1 및 도 2의 서열 목록을 참조한다. 일반적으로, 인플루엔자 바이러스는 분절된 단일 가닥 RNA 계놈을 함유하는 내부 리보뉴클레오단백질 중심부와 매트릭스 단백질이 늘어서 있는 외부의 지단백질 외피로 구성되어 있다. 인플루엔자 바이러스의 계놈은 면역원성 헤마글루티닌 (HA) 및 뉴라미니다제 (NA) 단백질을 암호화하는 선형 (-) 가닥 리보핵산 (RNA), 및 6개의 내부 중심부 폴리펩타이드: 뉴클레오캡시드 뉴클레오단백질 (NP); 매트릭스 단백질 (M); 비구조 단백질 (NS); 및 3개의 RNA 폴리머라제 (PA, PB1, PB2) 단백질로 이루어진 8개의 분절로 구성된다. 복제시 계놈 바이러스 RNA는 숙주 세포의 핵에서 (+) 가닥 메신저 RNA 및 (-) 가닥 계놈 cRNA로 전사된다. 8개의 계놈 분절 각각은 RNA 이외에, NP 및 폴리머라제 복합체 (PB1, PB2, 및 PA)를 함유하는 리보뉴클레오단백질 복합체로 패킹된다. 헤마글루티닌 분자는 표면 당단백질로 이루어지며, 숙주 세포 표면 수용체 상의 시알산으로도 공지된 N-아세틸뉴라민산 (NeuNAc)에 결합하도록 작용한다. 본원에서의 일부 양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 (및 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드)는 시험관내 또는 생체내에서 NeuNAc에 결합하도록 작용할 수 있다. 이러한 작용은 또한 일부 양태에서는 헤마글루티닌 활성을 보유하는 헤마글루티닌의 단편에 의해 수행될 수 있다. 헤마글루티닌은 2개의 하위단위인 HA1 및 HA2로 구성되며, 전체 구조는 길이가 약 550개 아미노산이고 약 220 kD이다. 뉴라미니다제 분자는 인플루엔자 바이러스의 세포 표면 수용체로부터 시알산 잔기를 절단함으로써 감염된 세포로부터 비리온을 방출시킨다. 뉴라미니다제는 또한 새로이 제조된 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 분자로부터 시알산을 제거한다. 본원의 일부 양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드 (및 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩타이드)는 시험관내 또는 생체내에서 시알산 잔기를 절단하도록 작용할 수 있다. 이러한 작용은 또한 뉴라미니다제 활성을 보유하는 뉴라미니다제의 단편에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 뉴라미니다제 폴리펩타이드는 인플루엔자 바이러스로부터 하나 이상의 뉴라미니다제 분자와 면역학적 교차 반응성을 나타낸다. 문헌에는 (예를 들어, GenBank, CDC로부터의 공개문 등에) 이러한 공지된 뉴라미니다제의 예가 풍부하다. 마찬가지로, 본 발명의 헤마글루티닌 폴리펩타이드는 인플루엔자 바이러스로부터의 하나 이상의 공지된 헤마글루티닌 분자와 면역학적으로 교차-반응성을 나타낸다. 또한, 상기 문헌에는 이러한 공지된 헤마글루티닌 분자의 예가 풍부하다.

인플루엔자는 통상 인플루엔자 A 및 인플루엔자 B 종류뿐만 아니라 통상 덜 중요한 C 종류로 분류된다. 인플루엔자 A 및 인플루엔자 B 바이러스 각각은 음극성을 갖는 단일 가닥 RNA의 8개 분절을 함유한다. 인플루엔자 A 계놈은 11개 폴리펩타이드를 암호화한다. 분절 1 내지 3은 RNA-의존성 RNA 폴리머라제를 구성하는 3개의 폴리펩타이드를 암호화한다. 분절 1은 폴리머라제 복합체 단백질 PB2를 암호화한다. 나머지 폴리머라제 단백질 PB1 및 PA는 각각 분절 2와 분절 3으로 암호화된다. 또한, 몇몇 인플루엔자 스트레인의 분절 1은 PB1 암호화 영역내의 대체 관독 프레임으로부터 생산된 작은 단백질인 PB1-F2를 암호화한다. 분절 4는 감염시 세포 부착 및 진입에 관여하는 헤마글루티닌 (HA) 표면 당단백질을 암호화한다. 분절 5는 바이러스 RNA와 관련하여 주된 구조 성분인

뉴클레오캡시드 뉴클레오단백질 (NP) 폴리펩타이드를 암호화한다. 분절 6은 뉴라미니다제 (NA) 외피 당단백질을 암호화한다. 분절 7은 M1 및 M2로 나타내는 2개의 매트릭스 단백질을 암호화하는데, 이는 차별적으로 스플라이싱된 mRNA로부터 해독된다. 분절 8은 2개의 비구조 단백질인 NS1 및 NS2를 암호화하는데, 이는 교대로 스플라이싱된 mRNA로부터 해독된다. 인플루엔자 B의 8개의 게놈 분절이 11개의 단백질을 암호화한다. 가장 큰 3개의 유전자가 RNA 폴리머라제의 성분인 PB1, PB2 및 PA를 암호화한다. 분절 4는 HA 단백질을 암호화한다. 분절 5는 NP를 암호화한다. 분절 6은 NA 단백질 및 NB 단백질을 암호화한다. NB 및 NA 단백질 모두는 비시스템성 mRNA의 중복 판독 프레임으로 해독된다. 인플루엔자 B의 분절 7은 또한 2개의 단백질 M1 및 BM2를 암호화한다. 가장 작은 분절은 2개의 생성물을 암호화하는데; NS1은 전장의 RNA로부터 해독되는 반면, NS2는 스플라이싱된 mRNA 변이체로부터 해독된다.

[0073] A형 및 B형 인플루엔자는 통상적으로 인간군에서의 인플루엔자 발생과 연관되어 있다. 그러나, A형 인플루엔자는 또한 다른 종, 예를 들어 새, 돼지 및 다른 동물을 감염시킨다. A형 바이러스는 이들의 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 표면 당단백질 항원에서의 차이에 기초하여 하위유형으로 분류된다. A형 바이러스에서 헤마글루티닌은 16개의 공지된 하위유형을 가지며, 뉴라미니다제는 9개의 공지된 하위유형을 갖는다. 인간에서는 현재 단지 약 4개의 상이한 헤마글루티닌 및 2개의 상이한 뉴라미니다제 하위유형, 예를 들어 H1, H2, H3, H5, N1, 및 N2가 알려져 있다. 특히, 인플루엔자 A의 2개의 주요 하위유형, 즉 H1N1 및 H3N2는 인간에서 활성적이었다. 그러나, H1N2가 최근에 우려되고 있다. 인플루엔자 B 바이러스는 이들의 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 단백질에 기초하여 하위유형으로 분류되지 않는다.

[0074] 인플루엔자의 상이한 스트레인은, 예를 들어 적혈구 (RBC 또는 적혈구)를 응집시키는 인플루엔자의 능력에 기초하여 분류될 수 있다. 특정 인플루엔자 스트레인에 대해 특이적인 항체가 바이러스에 결합하여 이러한 응집을 막을 수 있다. 이러한 억제에 기초하여 스트레인 유형을 결정하는 검정이 통상적으로 헤마글루티닌 억제 검정 (HI 검정 또는 HAI 검정)으로 공지되었으며, 인플루엔자 스트레인을 특징짓는 당해 기술 분야에서의 표준적인 널리 공지된 방법이다. 물론, 당업자는 인플루엔자 스트레인을 특징짓는 다른 검정, 예를 들어 ELISA, 간접적 형광 항체 검정, 면역조직화학, 웨스턴 블롯 검정 등과 익숙할 것이며, HI 검정에 대한 본원에서의 논의가 불가피하게 제한적인 것으로 간주되지 말아야 한다.

[0075] 간단히 설명하면, 통상의 HI 검정에서, 흰담비에서 종종 생성되는, 유형화 또는 분류에 사용될 혈청은, 예를 들어 2배 등의 다양한 희석으로 적혈구 샘플에 가해진다. 이어서, 적혈구가 함께 덩어리지는지 (즉, 응집되는지) 또는 부유되는지 (즉, 비-응집되는지) 광학 측정이 수행된다. 세포가 덩어리지지 않는 경우, 이러한 인플루엔자에 대해 특이적인 혈청 중의 항체로부터의 억제 때문에 응집이 일어나지 않았다. 따라서, 인플루엔자의 유형은 동일한 스트레인에 속하는 것으로 정의된다. 일부 경우에, 하나의 스트레인은, 예를 들어 스트레인 x가 "y-유사" 스트레인 등인 것과 같이, 다른 것과 "유사"한 것으로 기술된다. 예를 들어, 2개의 샘플이 HI 검정으로 측정시 서로에 대해 역자가 4배 이내인 경우, 이들은 동일 스트레인에 속하는 것으로 기술될 수 있다 (예를 들어, 둘 다 "새로운 칼레도니아 (New Caledonia)" 스트레인에 속하거나, 또는 둘 다 "모스크우-유사 (Moscow-like)" 스트레인이다). 달리, 스트레인은 통상적으로 그들의 면역학적 또는 항원적 프로필에 기초하여 분류된다. HAI는 통상적으로 혈구응집을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석으로 정의된다. 문헌 [참조: Schild, et al., Bull. Wld Hlth Org., 1973, 48:269-278] 등을 참조한다. 또한, 당업자는 인플루엔자를 스트레인으로 구분 및 분류하고 이를 수행하는 방법에 상당히 익숙할 것이다.

[0076] 이상으로부터 본 발명은 본원에 열거된 특정 서열 및 다양한 베타 (예를 들어, 플라스미드 유전자재배열 및 구조를 위해 사용되는 것, 하기 참조) 내의 이러한 서열뿐만 아니라 본원에 열거된 서열과 동일한 스트레인 내의 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 서열을 포함한다는 것을 알 수 있을 것이다. 또한, 다양한 베타 (예를 들어, 통상적으로 플라스미드 유전자재배열 및 구조를 위해 사용되는 것, 예를 들어 A/Ann Arbor/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66, A/Puerto Rico/8/34, B/Leningrad/14/17/55, B/14/5/1, B/USSR/60/69, B/Leningrad/179/86, B/Leningrad/14/55, 또는 B/England/2608/76 등) 내의 이러한 동일한 스트레인도 포함된다.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 "유사한 스트레인"은 제1 인플루엔자 바이러스가 제2 인플루엔자 바이러스와 동일하거나 관련된 스트레인이라는 것을 나타내는 것이어야 한다. 전형의 양태에서, 이러한 관련은 일반적으로 HAI 검정을 이용하여 결정된다. 따라서, HAI 검정에서 서로 4배 역가 내에 있는 인플루엔자 바이러스는 "유사 스트레인"이다. 그러나, 당업자는 유사 스트레인을 결정하기 위한 다른 검정들, 예를 들어 FRID, 중화 검정 등과 익숙할 것이다. 또한, 본 발명은 본원의 다양한 플라스미드, 베타, 바이러스, 방법에서 이러한 유사한 스트레인 (즉, 본원에서 서열 목록에 제시된 것들과 유사한 스트레인)을 포함한다. 따라서, 달리 분명히 지시하지 않는 한, 특정 서열 (예: 서열 목록의 것) 또는 이의 단편에 대한 본원의 기술은 또한 이들과 유사한 스트레인 (즉,

본원에서 플라스미드, 벡터, 바이러스 등에 상기 서열을 갖는 스트레이인과 유사한 스트레이인)으로부터의 서열을 포함하는 것으로 고려되어야 한다. 또한, 이러한 유사한 스트레이인 내의 NA 및 HA 폴리펩타이드는 "유사한 스트레이인"끼리 비교되는 경우 "유사한 폴리펩타이드"이라는 것을 알 수 있을 것이다.

#### [0078] 인플루엔자 바이러스 백신

본원의 서열, 조성물 및 방법은 오로지 단독으로 그러한 것은 아니지만, 주로 백신용의 인플루엔자 바이러스 제조에 관한 것이다. 역사상, 인플루엔자 바이러스 백신은 주로 관련 스트레이인의 실험적 예측에 의해 선택되었거나, 또는 그에 기초한 바이러스 스트레이인을 사용하여 암탉 발육란에서 제조되었다. 보다 최근에는 허가받은 약독화된 온도 민감성 마스터 스트레이인과 관련하여 선택된 헤마글루티닌 및/또는 뉴라미니다제 항원을 포함시키는 유전자재배열 바이러스가 제조되었다. 암탉에서 다회에 걸쳐 계대접종하여 바이러스를 배양한 후, 인플루엔자 바이러스를 회수하고, 임의로 예를 들어 포름알데히드 및/또는  $\beta$ -프로피오락톤 (또는 달리 살아있는 약독화 백신에서 사용됨)을 사용하여 불활성화시킨다. 따라서, (본 발명에서와 같이) HA 및 NA 서열이 인플루엔자 백신을 작제하는데 매우 유용하다는 것을 이해할 것이다.

백신 제조용으로 허가받은 스트레이인 중 몇몇은 표준 세포 배양 조건하에서 성장할 수 없기 때문에 세포 배양물에서 재조합 및 유전자재배열 백신을 제조하려는 시도는 곤란을 겪었다. 그러나, 본 발명자들과 그의 동료들에 의한 종래 연구는 벡터 시스템, 및 배양물에서 재조합 및 유전자재배열 바이러스를 제조하는 방법을 제공하였고, 이로써, 하나 또는 다수의 선택된 바이러스 항원 스트레이인, 예를 들어 A 또는 B 스트레이인, 다양한 하위유형 또는 하위스트레이인 등에 상응하며, 예를 들어 본원의 HA 및/또는 NA 서열을 포함하는 백신을 신속하게 제조할 수 있게 되었다. 2002년 10월 23일 출원된 미국 출원 번호 제60/420,708호, 2003년 4월 25일 출원된 미국 출원 번호 제10/423,828호 및 2004년 5월 24일 출원된 미국 출원 번호 제60/574,117호를 참조한다 (모두 "Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus"의 명칭을 가짐). 전형적으로, 배양물은 시스템, 예를 들어 세포 배양물 인큐베이터에서 습도 및  $\text{CO}_2$ 의 조절하에, 예를 들어 온도가 35°C를 초과하지 않도록 하는 자동 온도 조절 장치와 같은 온도 조절기의 사용으로 일정하게 유지되는 온도하에서 유지된다. 관심의 대상이 되는 스트레이인으로부터 유래된 상보적 분절 (예를 들어, 본원의 HA 및/또는 NA 항원성 변이체)과 함께, 마스터 인플루엔자 바이러스의 게놈 분절에 상응하는 벡터 하위세트를 도입함으로써 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 용이하게 수득할 수 있다. 전형적으로, 마스터 스트레이인은 백신 투여와 관련하여 바람직한 특성에 기초하여 선택된다. 예를 들어, 백신 제조를 위해, 예를 들어 살아있는 약독화 백신 제조를 위해서는 저온 약독화 표현형, 저온 적응성 및/또는 온도 민감성에 대해 마스터 공여체 바이러스 스트레이인이 선택된다. 본원 다른 곳, 및 예를 들어 미국 특히 출원 번호 제10/423,828호 등에서 설명되는 바와 같이, 본 발명의 다양한 실시태양은 원하는 유전자재배열 바이러스를 생성하기 위해 그 위에 HA 및/또는 NA 유전자 (예를 들어, 본원에 열거되어 있는 서열 등)가 추가되는 "골격"으로서 A/Ann Arbor (AA)/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66 또는 A/Puerto Rico/8/34, 또는 B/Leningrad/14/17/55, B/14/5/1, B/USSR/60/69, B/Leningrad/179/86, B/Leningrad/14/55, 또는 B/England/2608/76 인플루엔자 스트레이인을 사용한다. 따라서, 예를 들어, 6:2 유전자재배열에서 2개의 유전자 (즉, NA 및 HA)는 인플루엔자 스트레이인(들)에 대한 면역원성 반응이 바람직할 경우의 인플루엔자 스트레이인(들)로부터 유래될 것이며, 이에 반해 다른 6개의 유전자는 Ann Arbor 스트레이인, 또는 다른 골격 스트레이인 등으로부터 유래될 것이다. Ann Arbor 바이러스는 그의 저온 적응성, 약독화, 온도 민감성 특성에 대해 유용하다. 물론, 본원의 HA 및 NA 서열은 다수의 기타 바이러스 유전자 또는 바이러스 유형 (예를 들어, 유전자재배열에 존재하는 다른 인플루엔자 유전자, 즉, 비-HA 및 비-NA 유전자를 함유하는 다수의 상이한 "골격", 예를 들어 A/Puerto Rico/8/34 등)과 재배열될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 인간 인플루엔자 바이러스에 대한 살아있는 약독화된 인플루엔자 A 바이러스 백신이 최근에 미국에서 승인되었다. 상기를 참조한다. 이러한 백신은 A/Ann Arbor (AA)/6/60 (H2N2) 저온 적응된 (ca) 바이러스의 내부 단백질 유전자가 유전자재배열 바이러스 (즉, 비-Ann Arbor 스트레이인으로부터의 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 유전자를 갖는 것들)에 AA ca 바이러스의 저온 적응, 약독화 및 온도 민감 표현형을 부여하는 유전자재배열 H1N1 및 H1N2 바이러스이다. 본원의 일부 양태에서, 유전자재배열은 또한 7:1 유전자재배열을 포함할 수 있다. 달리, 단지 HA 또는 NA만이 골격 또는 MDV 스트레이인으로부터 유래하는 것은 아니다. 이전 연구에서, 임으로 본 발명의 다양한 양태에 속하는 적합한 골격 공여체 바이러스 스트레이인을 보고하였다. 예를 들어, 문헌 [참조: 미국 출원 번호 제60/420,708호 (2002년 10월 23일 출원), 미국 출원 번호 제10/423,828호 (2003년 4월 25일 출원) 및 미국 출원 번호 제60/574,117호 (2004년 5월 25일 출원), 모두 "Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus"의 명칭을 가짐; Maassab et al., J. of Inf. Dis., 1982, 146:780-790; Cox, et al., Virology, 1988, 167:554-567; Wareing et al., Vaccine, 2001, 19:3320-3330; Clements, et al., J Infect Dis., 1990, 161(5):869-77]을 참조한다.

[0081]

일부 양태에서, 본원의 서열은 임의로 (핵산 서열 또는 아미노산 서열 모두 또는 이를 중 하나에서) 제거되는 특정 영역을 가질 수 있다. 예를 들어, 다염기성 절단 부위를 갖는 이를 분자에 대해 이러한 부위가 임의로 제거될 수 있다. 본원의 일부 양태에서 이러한 절단 부위는 (예를 들어, 절단을 할 수 없게 하거나 절단을 감소시키기 위해) 이러한 서열이 유도되는 야생형 서열과 비교하여 서열이 예를 들어 변형 또는 변화된다. 이러한 변형/변화는 출발 서열에서 절단 부위의 다양한 서열 때문에 상이한 스트레이인 또는 서열에서 다를 수 있다. 예를 들어, 4개의 다염기성 잔기 (RRKK)가 통상적으로 일부 HA 서열에서 제거된다. (wt와 비교됨). 다양한 양태에서, 이러한 다염기성 절단 부위는 다양한 방식 (이들 모두 본 발명에 속한다)으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 다염기성 절단 부위는 한 번에 하나의 아미노산이 제거될 수 있다 (예를 들어, 하나의 R 제거, 2개의 R 제거, RRK 제거 또는 RRKK 제거). 또한, 절단 부위 바로 위쪽의 아미노산 잔기도 제거 또는 변형될 수 있고 (예를 들어, R로 부터 T로의 변형 등); 또한 절단 부위 바로 이후의 아미노산 잔기를 암호화하는 뉴클레오파이드도 변형될 수 있다. 당업자는 이러한 특정 영역을 제거하는 다양한 방법과 익숙할 것이다. 또한, 생성된 단축 서열도 본 발명에 속한다. 문헌 [참조: Li et al., J. of Infectious Diseases, 179:1132-8, 1999]을 참조한다.

[0082]

임의로 본 서열을 포함하는 바이러스 (전형적으로 백신으로서 사용되거나, 백신 제조를 위해 사용되는 바이러스)에 적용되는 바와 같이, "온도 민감성", "저온 적응성" 및 "약독화"라는 용어 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, "온도 민감성" (*ts*: temperature sensitive)이라는 용어는, 예를 들어 바이러스가 인플루엔자 A 스트레이인에 대해 33°C에 비해 39°C에서 100배 이상 감소된 역가를 나타내거나, 바이러스가 인플루엔자 B 스트레이인에 대해 33°C에 비해 37°C에서 100배 이상 감소된 역가를 나타내는 것을 의미한다. "저온 적응성" (*ca*: cold adapted)이라는 용어는 바이러스가 25°C에서 33°C에서의 성장의 100배 이내의 성장을 보이는 것을 의미하는 반면, "약독화" (*att*)라는 용어는 바이러스가 흰담비의 상부 기도에서는 복제하지만, 흰담비의 폐 조직에서는 검출되지 않으며, 상기 동물에서 인플루엔자-유사 질환을 유발하지 않는 것을 의미한다. 중간 표현형을 갖는 바이러스, 즉, 39°C (A 스트레이인 바이러스의 경우) 또는 37°C (B 스트레이인 바이러스의 경우)에서 역자가 100배 미만으로 감소된 바이러스, 또는 33°C에서의 성장을 100배를 초과하는 (예를 들어, 200배, 500배, 1000배, 10,000배 미만 이내) 성장을 25°C에서 나타내는 바이러스, 및/또는 흰담비의 상부 기도에서의 성장과 비교하여 폐에서의 성장이 감소된 것을 나타내는 바이러스 (즉, 부분적으로 약독화 바이러스) 및/또는 동물에서 인플루엔자 유사 질환이 감소된 것을 나타내는 바이러스도 또한 유용한 바이러스이며, 이는 본원의 HA 및 NA 서열과 함께 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0083]

따라서, 본 발명은, 예를 들어 적합한 배양 조건에서, 시험관내에서의 배양 세포에서 백신 생성에 대해 적합한 특성 (예를 들어, 약독화된 병원성 또는 표현형, 저온 적응, 온도 민감성 등)을 갖는 바이러스 스트레이인 (A 스트레이인 및 B 스트레이인 인플루엔자 바이러스 모두)의 성장을 이용할 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 클로닝된 바이러스 계놈 유전자를 삽입한 다수의 벡터를 숙주 세포에 도입하고 이러한 세포를 35°C를 초과하지 않는 온도에서 배양함으로써 생성될 수 있다. 인플루엔자 바이러스 계놈을 포함하는 벡터가 형질감염되는 경우, 백신으로서 적합한 재조합 바이러스는 표준 정제 절차로 회수될 수 있다. 본 발명의 벡터 시스템 및 방법을 이용하여, 백신 생성에 대해 바람직한 특성을 위해 선택된 균주의 6개의 내부 유전자 분절, 및 선택된, 예를 들어 병원성인 스트레이인으로부터의 면역원성 HA 및 NA 분절, 예를 들어 본원의 서열 목록의 것들을 삽입한 유전자재배열 바이러스가 조직 배양으로 신속하고 효율적으로 생성될 수 있다. 따라서, 본원에서 기술되는 시스템 및 방법은 살아있는 약독화된 백신을 포함한 백신으로 사용하기에 적합한 바이러스, 예를 들어 비내 투여에 적합한 바이러스를 포함한 재조합 및 유전자재배열 인플루엔자 A 및 B 바이러스의 세포 배양에서 신속한 생성에 유용하다.

[0084]

이러한 양태에서, 전형적으로, 단일 마스터 공여체 바이러스 (MDV) 스트레이인이 A 및 B 하위유형 각각에 대해 선택되었다. 살아있는 약독화된 백신의 경우, 마스터 공여체 바이러스 스트레이인은 전형적으로 백신 생성에 관해 이의 유리한 특성, 예를 들어 온도 민감성, 저온 적응 및/또는 약독화를 갖도록 선택된다. 예를 들어, 예시적인 마스터 공여체 스트레이인은 A/Ann Arbor/6/60 및 B/Ann Arbor/1/66의 온도 민감성, 약독화 및 저온 적응 스트레이인 각각 및 본원 명세서의 전체에 걸쳐서 언급되는 다른 것들도 포함한다.

[0085]

예를 들어, 선택된 마스터 공여체 A형 바이러스 (MDV-A) 또는 마스터 공여체 B형 바이러스 (MDV-B)는 바이러스 계놈을 구성하는 다수의 클로닝된 바이러스 cDNA로부터 생성된다. 이러한 양태는 재조합 바이러스가 8개의 클로닝된 바이러스 cDNA로부터 생성되는 것들을 포함한다. PB2, PB1, PA, NP, HA, NA, M 및 NS의 선택된 MDV-A 또는 MDV-B 서열을 나타내는 8개의 바이러스 cDNA가 임의로 이방향 발현 벡터, 예를 들어 플라스미드 (예: pAD3000)에 클로닝됨으로써 바이러스 계놈 RNA는 하나의 가닥으로부터의 RNA 폴리머라제 I (pol I) 프로모터로부터 전사될 수 있고 바이러스 mRNA는 다른 가닥으로부터의 RNA 폴리머라제 II (pol II) 프로모터로부터 합성될

수 있다. 임의로, (예를 들어, 다염기성 절단 부위 (또한 다중염기성 절단 부위로도 알려짐)를 제거하기 위해서) HA 분절을 포함하는 임의의 유전자 분절이 변형될 수 있다.

[0086] 이어서, 감염성 재조합 MDV-A 또는 MDV-B 바이러스는 8개의 바이러스 cDNA를 갖는 플라스미드를 적합한 숙주 세포, 예를 들어 베로 세포, 공동-배양된 MDCK/293T 또는 MDCK/COS7 세포로 형질감염시킨 후 회수될 수 있다. 본원 및, 예를 들어 문헌 [참조: 미국 출원 번호 제60/420,708호 (2002년 10월 23일 출원), 미국 출원 번호 제10/423,828호 (2003년 4월 25일 출원) 및 미국 출원 번호 제60/574,117호 (2004년 5월 24일 출원), 모두 "Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus"를 명칭으로 가짐; Hoffmann, E., 2000, PNAS, 97(11):6108-6113; 미국 공개 특허원 번호 제20020164770호 (Hoffmann); 및 USPN 제6,544,785호 (2003년 4월 8일 허여) (Palese, et al.)]에 기술된 플라스미드 및 방법을 이용하여, 본 발명은, 예를 들어 본원에 기술된 서열 목록에 제시되는 바와 같은 상이한 상응하는 유형 (A 또는 B) 인플루엔자 바이러스로부터 유도되는 HA 및 NA와 함께 선택된 바이러스 (예: MDV-A, MDV-B)의 6개의 내부 유전자 (PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS)의 공동-형질감염에 의해 6:2 유전자재배열 인플루엔자 백신을 생성하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, HA 분절은 백신 생성에 통상적으로 사용되는 바와 같이 병원성의 관련 H1, H3 또는 B 스트레인으로부터 편리하게 선택된다. 마찬가지로, HA 분절은 본원의 서열 목록에 있는 것들과 같은 병원성 스트레인으로서 부상하는 연관성을 갖는 스트레인 중에서 선택될 수 있다. 또한, MDV의 7개의 계놈 분절 및 선택된 스트레인의 HA 또는 NA 유전자를 포함하는 유전자재배열 (7:1 유전자재배열)도 생성될 수 있다. 본원 명세서의 전체에 걸쳐서 상술되는 바와 같이, 본 발명의 분자는 임의로 어떠한 바람직한 조합으로도 배합될 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 본원에서의 HA 및/또는 NA 서열은, 예를 들어 6:2 유전자재배열 또는 7:1 유전자재배열 등에서 A/AA/6/60, B/AA/1/66, A/Puerto Rico/8/34 (즉, PR8) 등과 같은 유전자재배열 골격에 배치될 수 있다. 따라서, 하기에서 더욱 충분히 설명되는 바와 같이, 공여체 바이러스 (또한, 예를 들어, A/AA/6/60 등)으로부터의 6개의 내부 계놈 분절 및 제2 스트레인 (예를 들어, 야생형, 공여체 바이러스는 아님)으로부터의 2개의 계놈 분절이 존재할 수 있다. 이러한 2개의 계놈 분절은 바람직하게는 HA 및 NA 유전자이다. 유사한 상황이 7:1 유전자재배열에 대해 생길 수 있으며, 이 경우 공여체 바이러스로부터의 7개의 계놈 분절 및 상이한 바이러스 (전형적으로 야생형 또는 면역 반응이 필요한 바이러스)로부터의 1개의 계놈 분절 (HA 또는 NA)이 존재한다. 또한, 본원에서의 서열 (예를 들어, 도 1에 열거된 서열의 것 등)은 다수의 방식으로 본원에서의 상이한 양태에서 조합될 수 있다. 따라서, 본원 임의의 서열은 7:1 유전자재배열에서 단독으로 존재 (즉, 본 발명의 서열이 7개의 공여체 바이러스 계놈 분절과 함께 존재)하고/하거나 6:2 유전자재배열에서는 본 발명의 또 다른 서열과 함께 존재할 수 있다. 이러한 6:2 유전자재배열에서, 본 발명의 임의의 서열은 임의로 본 발명의 임의의 다른 서열과 함께 존재할 수 있다. 그러나, 전형적으로 및 바람직하게는, 동일한 최초 야생형 스트레인 (또는 변형된 다염기성 절단 부위를 갖는 것과 같은 변형된 야생형 스트레인)으로부터의 HA 또는 NA를 포함한다. 예를 들어, 전형의 양태는 A/AA/6/60와 같은 공여체 바이러스로부터의 6개의 내부 계놈 분절 및 본원에 기술된 HA 및 NA 계놈 분절을 갖는 6:2 유전자재배열을 포함할 수 있다. 물론, 본 발명은 또한 HA 및 NA 계놈 분절이 유사한 스트레인으로부터의 것인 유전자재배열 바이러스를 포함한다는 것을 알 수 있을 것이다. 상기 참조문은 모든 목적상, 예를 들어 특히 플라스미드, 바이러스 (인플루엔자)의 플라스미드 구조, 바이러스 구조/생성을 위한 멀티-플라스미드 시스템 등에 대한 교시를 위해 전부 본원에 특별히 포함된다.

[0087] 또한, 본 발명의 HA 및 NA 서열은 임의로 이러한 플라스미드 유전자재배열 백신 (및/또는 기타 ts, cs, ca, 및/또는 att 바이러스 및 백신)의 제조 또는 상기 유전자재배열 백신에 사용된다. 그러나, 본 발명의 HA 및 NA 서열 등은 특정의 백신 조성물 또는 제조 방법으로 제한되는 것이 아니며, 따라서, 스트레인 특이적인 HA 및 NA 항원 (예를 들어, 본 발명의 서열)을 사용하는, 실질적으로 임의의 백신 유형 또는 백신 제조 방법에 사용될 수 있다는 것에 주목하여야 한다.

#### [0088] FLUMIST®

[0089] 상기 언급한 바와 같이, 다수의 인플루엔자 백신 예와 유형이 존재한다. 대표적인 인플루엔자 백신은 어린이와 성인을 인플루엔자 질환으로부터 보호하는 살아있는 약독화 백신인 FluMist (MedImmune Vaccines Inc., Mt. View, CA)이다 [참조: Belshe et al. (1998) *The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children* N Engl J Med 338:1405-12; Nichol et al. (1999) *Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial* JAMA 282: 137-44]이다. 전형적이고, 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 FluMist 백신 제조에 적합화되고/거나 그와 함께 사용되는 것이 바람직하다. 그러나, 본원의 서열, 방

법, 조성물 등은 또한 유사하거나, 심지어 상이한 바이러스 백신의 제조에도 적합화될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0090] FluMist 백신 스트레인은, 예를 들어 보통 마스터 공여체 바이러스 (MDV: master donor virus)로부터의 6개의 분절인 PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS와 함께, 상기 백신이 처리하는 야생형 스트레인 (또는, 일부 예에서는, 관련된 스트레인)으로부터 유래된 HA 및 NA 유전자 분절을 함유한다. 따라서, 본원의 HA 및 NA 서열은 임의로 각종 FluMist 제제의 일부가 된다. FluMist의 인플루엔자 A 스트레인에 대한 MDV (MDV-A)는 순차적으로 더 낮은 온도 하에 1차 닦 신장 조직 배양물에 야생형 A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) 스트레인을 연속하여 계대접종함으로써 생성하였다 [참조: Maassab (1967) *Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C* Nature 213:612-4]. MDV-A는 25°C에서 효율적으로 복제하지만 (ca, 저온 적응성), 그의 성장은 38 및 39°C에서 제한되어 있다 (ts, 온도 민감성). 추가로, 이러한 바이러스는 감염된 흰담비의 폐에서는 복제하지 못한다 (att, 약독화). ts 표현형은 기도 중 가장 저온인 부위를 제외한 모든 부위에서 그의 복제를 제한함으로써 백신의 약독화에 기여하는 것으로 여겨지고 있다. 이러한 특성의 안정성은 동물 모델 및 임상 시험에서 입증되었다. 화학적 돌연변이에 의해 생성된 인플루엔자 스트레인의 ts 표현형과는 대조적으로, MDV-A의 ts 특성은 감염된 햄스터를 통한 계대 후 또는 어린이로부터 얻은 방출된 분리물에서 복귀되지 않는다 (최근 검토를 위해, 문헌 [참조: Murphy & Coelingh (2002) *Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A 및 B virus vaccines* Viral Immunol 15:295-323]을 참조한다).

[0091] 20,000여명의 성인 및 어린이에서 실시된 12개의 별개의 6:2 유전자재배열 스트레인을 포함하는 임상 연구는 이를 백신이 약독화된 것이며, 안전하고 효능이 있다는 것으로 제시하였다 [참조: Belshe et al. (1998) *The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children* N Engl J Med 338:1405-12; Boyce et al. (2000) *Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults* Vaccine 19:217-26; Edwards et al. (1994) *A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease* J Infect Dis 169:68-76; Nichol et al. (1999) *Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial* JAMA 282: 137-44]. MDV-A의 6개의 내부 유전자와 야생형 바이러스의 2개의 HA 및 NA 유전자 분절을 수반하는 유전자재배열 (즉, 6:2 유전자재배열)은 ca, ts 및 att 표현형을 일관되게 유지한다 [참조: Maassab et al. (1982) *Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets* J. Infect. Dis. 146:780-900].

[0092] 인플루엔자 B 스트레인을 사용하여 상기와 같은 유전자재배열 바이러스를 제조하는 것은 더욱 어렵지만, 최근 연구 (예를 들어, 2002년 10월 23일 출원된 미국 출원 번호 제60/420,708호, 2003년 4월 25일 출원된 미국 출원 번호 제10/423,828호, 및 2004년 5월 24일 출원된 미국 출원 번호 제60/574,117호 (모두 "Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus"의 명칭을 가짐) 참조)는 전적으로 클로닝된 cDNA로부터 인플루엔자 B 바이러스를 생성하기 위한 8개의 플라스미드 시스템을 제시하였다. 백신 제제, 예를 들어 비내 투여에 유용한 살아있는 바이러스 백신 제제에 대해 적합한 약독화된 살아있는 인플루엔자 A 및 B 바이러스 제조 방법도 제시되었다.

[0093] 상기 기술된 시스템 및 방법은, 예를 들어 비내 투여에 적합한 백신과 같은 살아있는 약독화 백신을 비롯한 백신으로 사용하기 적합한 바이러스를 포함하는 재조합 및 유전자재배열 인플루엔자 A 및 B 바이러스를 세포 배양물에서 신속하게 제조하는데 유용하다. 본 발명의 서열, 방법 등은 임의로 백신용 바이러스를 제조하기 위해, 예를 들어 백신 제조용의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 상기와 같은 종래 연구와 함께, 또는 그와 조합되어 사용된다.

#### 백신의 예방학적 투여를 위한 방법 및 조성물

[0094] 상기 언급한 바와 같이, 달리 또는 FluMist™ 백신 제조에서의 용도 이외에 본 발명은 다른 백신 제제에 사용될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 재조합 및 유전자재배열 바이러스는 HA 및/또는 NA 서열에 의해 결정되는 바와 같이 하나 이상의 인플루엔자 바이러스 스트레인에 대하여 특이적인 면역 반응을 자극시키기 위하여 면역학적 유효량으로 및 적절한 담체 또는 부형제 중 예방학적으로 투여될 수 있다. 전형적으로, 담체 또는 부형제는 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제, 예를 들어 멀균수, 염수 수용액, 완충처리된 염수 수용액, 텍스트로스 수용액, 글리세롤 수용액, 에탄올, 비감염된 암탉 난으로부터의 요막액 (즉, 정상적인 요막액 또는 NAF) 또는 그의 배합물이다. 멀균성, pH, 등장성, 및 안정성을 보장하며 그러한 용액을 제조하는 것은 당업계에 확립된 프로토콜에 따라 수행된다. 일반적으로, 담체 또는 부형제는 알레르기 및 기타 바람직하지 못한 작용을 최소화

하며, 예를 들어 피하, 근육내, 비내 등과 같은 특정의 투여 경로에 적합하도록 선택된다.

[0096] 본 발명의 관련된 측면은 개체의 면역계를 자극시켜 인플루엔자 바이러스에 대한 예방적 면역 반응을 일으키는 방법을 제공한다. 본 방법에서 면역학적 유효량의 재조합 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, 본 발명의 HA 및/ 또는 NA 분자), 면역학적 유효량의 본 발명의 폴리펩타이드, 및/또는 면역학적 유효량의 본 발명의 핵산은 생리학적으로 허용가능한 담체 내에서 개체에게 투여된다.

[0097] 일반적으로 본 발명의 인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 인플루엔자 바이러스 스트레인 (즉, 본 발명의 HA 및/ 또는 NA 스트레인)에 대해 특이적인 면역 반응을 자극시키는데 충분한 양으로 투여된다. 바람직하게는, 인플루엔자 바이러스를 투여하는 것이 상기 스트레인에 대한 예방적 면역 반응을 유도한다. 하나 이상의 인플루엔자 스트레인에 대한 예방적 면역 반응을 유도하는 용량 및 방법은 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [참조: USPN 5,922,326; Wright et al., Infect. Immun. 37:397-400 (1982); Kim et al., Pediatrics 52:56-63 (1973); 그리고 Wright et al., J. Pediatr. 88:931-936 (1976)]을 참조한다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스는 약 1 내지 1000 HID<sub>50</sub> (인간 감염 용량)의 범위로, 즉 투여량당 약 10<sup>5</sup> 내지 10<sup>8</sup> pfu (플라크 형성 단위)로 투여된다. 전형적으로, 용량은, 예를 들어 연령, 신체 상태, 체중, 성별, 섭식, 투여 시간, 및 기타 임상적 인자에 기초하여 상기 범위내에서 조정될 것이다. 예방학적 백신 제제는, 예를 들어 바늘 및 주사기, 또는 바늘없는 주사 장치를 사용하여 피하 또는 근육내 주사에 의해 전신 투여된다. 달리, 백신 제제는 점액물, 큰 입자에 어로졸 (약 10 마이크론 초파), 또는 상부 기도로의 분무에 의해 비내로 투여된다. 상기 전달 경로들 중 어느 것이나 방어적인 전신 면역 반응을 일으키지만, 비내 투여가 인플루엔자 바이러스 진입 부위에서 점막 면역을 유도한다는 추가적인 이점을 부여한다. 비내 투여의 경우에는 주로 약독화 살아있는 바이러스 백신, 예를 들어 약독화, 저온 적응성 및/또는 온도 민감성의 재조합 또는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 바람직하다. 상기를 참조한다. 단일 투약으로 예방적 면역 반응을 자극시키는 것이 바람직하지만, 원하는 예방학적 효과를 달성하기 위해서는 동일하거나 상이한 경로에 의해 추가의 용량을 투여할 수 있다.

[0098] 전형적으로, 백신에 사용되는 것으로서 본 발명의 약독화 재조합 인플루엔자는 약독화 인플루엔자 바이러스로 면역화된 (또는 다르게는 그로 감염된) 대부분의 개체에서 감염 증상, 또는 적어도 중증의 감염 증상이 발생하지 않도록 충분히 약독화된다. 몇몇의 경우, 약독화 인플루엔자 바이러스는 여전히 경미한 병 (예를 들어, 경미한 상부 기도 병) 증상을 일으킬 수 있고/거나 예방접종되지 않은 개체로의 전염을 일으킬 수 있을 것이다. 그러나, 그의 병독성은 예방접종된 숙주 또는 우발적인 숙주에서 중증의 하부 기도 감염이 발생하지 않도록 충분히 폐기된다.

[0099] 달리, 생체외 또는 생체내에서 본원의 서열을 포함하는 인플루엔자 바이러스로 수지상 세포를 표적화함으로써 면역 반응을 자극시킬 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 항원이 수지상 세포에 의해 포획될 수 있도록 하는데 충분한 기간 동안 충분한 양으로 바이러스에 충식성 수지상 세포를 노출시킨다. 이어서, 표준 정맥 이식 방법에 의해 예방접종하고자 하는 피험체에 세포를 전달한다.

[0100] 단일 투약으로 예방적 면역 반응을 자극시키는 것이 바람직하지만, 원하는 예방학적 효과를 달성하기 위해서는 동일하거나 상이한 경로에 의해 추가의 용량을 투여할 수 있다. 신생아 및 유아의 경우, 예를 들어 충분한 면역 수준을 유도하기 위해서는 다중 투여하는 것이 필요할 수 있다. 야생형 인플루엔자 감염에 대한 충분한 수준의 방어를 유지하기 위해 필요에 따라 유년기 동안 일정 간격으로 계속하여 투여할 수 있다. 유사하게, 예를 들어 건강 관리 요원, 탁아 요원, 어린 아이의 가족 구성원, 노인 및 심폐 기능이 손상된 개체와 같이, 특히 반복적인 또는 중증의 인플루엔자 감염에 걸리기 쉬운 성인은 예방적 면역 반응을 확립 및/또는 유지시키기 위하여 다중 면역화를 필요로 할 수 있다. 유도된 면역 수준은 중화 분비성 및/또는 혈청 항체의 양, 원하는 방어 수준을 유도하고 유지시키는데 필요할 경우 조정되는 투여량 또는 반복되는 예방접종 측정에 의해 모니터링할 수 있다.

[0101] 임의로, 인플루엔자 바이러스를 예방학적으로 투여하기 위한 제제는 또한 인플루엔자 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 하나 이상의 어쥬번트를 함유한다. 적합한 어쥬번트로는 완전 프로인트 어쥬번트, 불완전 프로인트 어쥬번트, 사포닌, 미네랄 젤, 예를 들어 수산화알루미늄, 계면 활성 물질, 예를 들어 리솔레시틴, 폴루로닉 폴리올, 다중음이온, 웨პ타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 칼메트-게랑 간균 (BCG: bacille Calmette-Guerin), 코린박테리움 파르븀 (*Corynebacterium parvum*), 및 합성 어쥬번트 QS-21 및 MF59를 포함한다.

[0102] 원한다면, 하나 이상의 면역자극성 분자의 투여와 함께 인플루엔자 바이러스백신을 예방학적으로 투여할 수 있다. 면역자극성 분자로는 면역자극성, 면역강화, 및 전염증성 활성을 갖는 다양한 사이토카인, 림포카인 및 케모카인, 예를 들어 인터루킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); 성장 인자 (예를 들어, 과

립구 대식세포 (GM)-콜로니 자극 인자 (CSF)); 및 기타 면역자극성 분자, 예를 들어 대식세포 염증 인자, Flt3 리간드, B7.1; B7.2 등을 포함한다. 면역자극성 분자는 인플루엔자 바이러스와 동일한 제제로 투여될 수 있거나, 별도로 투여될 수 있다. 단백질 (예를 들어, 본 발명의 HA 및/또는 NA 폴리펩타이드) 또는 상기 단백질을 암호화하는 발현 벡터의 투여로 면역자극성 효과를 가져올 수 있다.

[0103] 상기 기술된 방법은 시험관내, 생체외, 또는 생체내에서 치료학적으로 또는 예방학적으로 유효한 HA 및/또는 NA 폴리펩타이드 (또는 웨타이드)를 암호화하는 이종성 폴리뉴클레오타이드, 또는 HA 및/또는 NA RNA (예를 들어, 안티센스 RNA 또는 리보자임)를 포함하는 본 발명의 벡터를 표적 세포군에 도입시킴으로써 질환 또는 질병, 전형적으로 인플루엔자를 치료학적으로 및/또는 예방학적으로 치료하는데 유용하다. 전형적으로, 관심의 대상이 되는 폴리펩타이드 (또는 웨타이드)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 RNA는, 예를 들어 본원에 기술되는 바와 같이, 적절한 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 임의로, 1 초과의 이종성 암호화 서열이 단일의 벡터 또는 바이러스에 도입된다. 예를 들어, 치료학적으로 또는 예방학적으로 활성인 HA 및/또는 NA 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 RNA 이외에, 벡터는 또한 추가의 치료학적 또는 예방학적 폴리펩타이드, 예를 들어 항원, 공자극성 분자, 사이토카인, 항체 등, 및/또는 마커 등을 포함할 수 있다.

[0104] 특정 하위군 중 특정의 약독화 인플루엔자 바이러스 스트레인으로 개체를 예방접종하는 것이 상이한 인플루엔자 바이러스 스트레인 및/또는 하위군에 대한 교차 방어를 유도할 수 있지만, 교차 방어는 원한다면, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 인플루엔자 바이러스 스트레인 또는 하위스트레인, 예를 들어 상이한 하위군을 나타낼 수 있는 적어도 2개의 스트레인으로부터의 약독화 인플루엔자 바이러스로 개체를 예방접종함으로써 증진될 수 있다. 예를 들어, 개체를 약독화된 인플루엔자 바이러스의 적어도 4개의 스트레인 또는 하위스트레인으로 예방접종하는 것은 개체를 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 2개의 스트레인 또는 하위스트레인 및 인플루엔자 B 바이러스의 적어도 2개의 스트레인 또는 하위스트레인으로 예방접종하는 것을 포함할 수 있다. 개체를 인플루엔자 A 바이러스의 적어도 3개의 스트레인 또는 하위스트레인 및 인플루엔자 B 바이러스의 적어도 1개의 스트레인 또는 하위스트레인으로 예방접종하는 것을 포함할 수 있다. 개체의 적어도 4개의 인플루엔자 바이러스 스트레인 또는 하위스트레인 모두를 포함하는 단일 사가 백신의 투여를 필요로 할 수 있다. 달리, 예방접종은 각각 1개, 2개 또는 3개의 약독화된 인플루엔자 바이러스 스트레인 또는 하위스트레인을 포함하는 다중 백신의 투여를 필요로 할 수 있다. 또한, 백신 배합물은 임의로 범유행 백신 및 비-범유행 스트레인의 혼합물을 포함할 수 있다. 백신 혼합물 (또는 다중 예방접종)은 인간 스트레인 및/또는 비-인간 인플루엔자 스트레인 (예: 조류 및 인간 등)으로부터의 성분들을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 약독화된 인플루엔자 바이러스 백신은 다른 감염제에 대한 예방적 면역 반응을 유도하는 백신과 배합될 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 백신은 3개의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 삼가 백신이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 백신은 2개의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스 및 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 삼가 백신이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 백신은 H1 유형의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스, H3 유형의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스 및 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 삼가 백신이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 백신은 4개의 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 포함하는 사가 백신이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 백신은 2개의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스 및 2개의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 사가 백신이다. 하나의 양태에서, 본 발명의 백신은 H1 유형의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스, H3 유형의 유전자재배열 인플루엔자 A 바이러스, 빅토리아 계통의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스 및 야마가타 계통의 유전자재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는 사가 백신이다.

#### 제조합 바이러스의 제조

[0105] 네거티브 가닥 RNA 바이러스는 유전적으로 조작될 수 있고, 제조합 역 유전자 접근법을 사용하여 회복될 수 있다 [참조: USPN 5,166,057, Palese et al.] 그러한 방법은 원래 인플루엔자 바이러스 계놈을 조작하는데 적용되었으며 [참조: Luytjes et al. (1989) Cell 59:1107-1113; Enami et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567], 예를 들어 광견병 [참조: Schnell et al. (1994) EMBO J. 13:4195-4203]; VSV [참조: Lawson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4477-4481]; 홍역 바이러스 [참조: Radecke et al. (1995) EMBO J. 14:5773-5784]; 우역 바이러스 [참조: Baron & Barrett (1997) J. Virol. 71:1265-1271]; 인간 파라인플루엔자 바이러스 [참조: Hoffman & Banerjee (1997) J. Virol. 71:3272-3277; Dubin et al. (1997) Virology 235:323-332]; SV5 [참조: He et al. (1997) Virology 237:249-260]; 개 디스템퍼 바이러스 [참조: Gassen et al. (2000) J. Virol. 74:10737-44]; 및 센다이 바이러스 [참조: Park et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 88: 5537-5541; Kato et al. (1996) *Genes to Cell* 1:569-579]와 같은 매우 다양한 분절형 및 비분절형 네거티브 가닥 RNA 바이러스에 성공적으로 적용되어 왔다. 당업자는 본 발명의 HA 및 NA 서열을 포함하는 인플루엔자 바이러스를 제조할 수 있는 이러한 기법 및 유사한 기법에 정통할 것이다. 상기 방법에 따라 제조된 재조합 인플루엔자 바이러스는, 본 발명의 핵산 및/또는 폴리펩타이드를 하나 이상 포함하는 재조합 인플루엔자 바이러스이므로, 또한 본 발명의 특징이다. 물론, 당업자라면 알 수 있는 바와 같이, 일반적으로 인플루엔자 바이러스 (및 본 발명의 바이러스들)는 네거티브 가닥의 RNA 바이러스이다. 따라서, 본 발명의 인플루엔자 바이러스를, 예를 들어 도 1의 서열 등을 포함하는 것으로 기술하는 경우, 이는 통상적으로 그 서열의 상응하는 네거티브 가닥의 RNA 버전을 의미하는 것으로 이해된다. 도 1의 뉴클레오타이드 서열은 (뉴클레오타이드 서열 내의 일부 비해독 영역과 함께) 유전자의 DNA 버전 (예를 들어, 암호화 +센스 등)을 포함한다. 당업자는 RNA와 DNA 서열 간 (예를 들어, U의 T로의 변화 등) 및 상보적 뉴클레오타이드 서열 간 (RNA 또는 DNA) 등을 용이하게 전환시킬 수 있다. 따라서, 예를 들어 당업자는 뉴클레오타이드 서열로부터 상응하는 아미노산 서열로의 전환 또는 상응하는 상보적 서열 (DNA 또는 RNA)로의 전환 등을 용이하게 수행할 수 있다. 또한, 자명한 바와 같이, 이러한 HA 및/또는 NA 서열이 DNA 벡터, 예를 들어 플라스미드 등 내에서 기술되는 경우, 이 서열의 상응하는 DNA 버전이 통상적으로 이해될 수 있다. 또한, 본 발명의 핵산은 본원의 서열 목록 내의 명시적인 서열뿐만 아니라 이러한 서열의 상보물 (RNA와 DNA 모두), 서열 목록 내의 서열의 이중 가닥 형태, (서열 목록 내의 명시적인 서열에 대한 RNA 상보물로서 또는 서열 목록 내의 서열의 RNA 버전으로서, 예를 들어 동일한 센스의, 하지만 RNA로 구성된, T 대신 U를 갖는) 서열 목록 내의 서열의 상응하는 RNA 형태를 포함한다.

#### [0107] 세포 배양 및 발현 숙주

본 발명은 또한 본 발명의 벡터가 도입된 (형질도입된, 형질전환 또는 형질감염된) 숙주 세포, 및 재조합 기법에 의해 본 발명의 폴리펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 숙주 세포는 본 발명의 벡터, 예를 들어 발현 벡터로 유전적으로 조작 (즉, 형질도입, 형질전환 또는 형질감염)된다. 상기 기술된 바와 같이, 벡터는 플라스미드, 바이러스 입자, 파지 등의 형태일 수 있다. 적절한 발현 숙주의 예로는 세균 세포, 예를 들어 대장균, 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 및 살모넬라 티피뮤리움 (*Salmonella typhimurium*); 진균 세포, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아페스토리스 (*Pichia pastoris*), 및 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*); 또는 곤충 세포, 예를 들어 초파리 (*Drosophila*) 및 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*)를 포함한다.

본 발명의 HA 및 NA 분자를 배양하기 위해서 포유동물 세포가 가장 보편적으로는 사용된다. (예를 들어, 본원의 HA 및/또는 NA 서열을 갖는) 인플루엔자 바이러스 복제를 위해 적합한 숙주 세포로는, 예를 들어 베로 세포, BHK 세포, MDCK 세포, 293 세포 및 COS 세포 (293T 세포, COS7 세포 포함) 등을 포함한다. 보편적으로는 상기의 세포주들 중 2개, 예를 들어 MDCK 세포와 293T 또는 COS 세포를 포함하는 공동-배양은 복제율을 개선시키는 비율, 예를 들어 1:1의 비율로 사용된다. 전형적으로, 세포는 중성의 완충처리된 pH (예를 들어, 7.0 내지 7.2 사이의 pH)를 유지하는데 적합한 CO<sub>2</sub> 농도와 습도의 조절하에 표준 시판용 배양 배지, 예를 들어 혈청 (예를 들어, 10% 우태아 혈청)으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 또는 무혈청 배지에서 배양된다. 임의로, 배지는 세균 성장을 막기 위해 항생제, 예를 들어 페니실린, 스트렙토마이신 등, 및/또는 추가의 영양분, 예를 들어 L-글루타민, 피루브산나트륨, 비필수 아미노산, 바람직한 성장 특징을 촉진시키기 위한 추가의 보충제, 예를 들어 트립신, β-미캡토에탄올 등을 포함한다.

조작된 숙주 세포는 프로모터 활성화, 형질전환체 선별, 또는, 예를 들어 바이러스의 생성을 통한, 삽입된 폴리뉴클레오타이드 서열의 증폭을 위해 적절히 변형된 통상의 영양 배지에서 배양될 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 전형적으로 발현을 위해 선택되어진 특정 숙주 세포와 함께 앞서 사용되었던 것이며, 이는 당업자에게 자명할 것이며, 예를 들어 문헌 [참조: Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, Manual of Basic Technique*, 3<sup>rd</sup> edition, Wiley-Liss, New York 및 그 안에서 인용된 참조문헌]을 비롯한 본원에서 인용되는 참조문헌에서 자명해질 것이다. 도움이 되는 다른 참조문헌으로는, 예를 들어 문헌 [참조: Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5<sup>th</sup> ed., Livingston, Edinburgh; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam*]을 포함한다. 시험관내에서의 인플루엔자 바이러스 제조시 특히 관심의 대상이 되는 조직 배양 방법에 관한 추가의 상세한 설명은, 예를 들어 문헌 [참조: Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*, in Cohen and Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of vaccine*, 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참고로 인용된다]에 포함되어 있다. 추가로, 본 발명에 적합화된

상기 방법에 있어서의 변형은 통상의 실험을 통해 쉽게 결정될 수 있으며, 당업자는 그에 대해 정통할 것이다.

[0111] 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, 본 발명의 HA 및/또는 NA 서열을 갖는 것)를 생산하는 세포는 혈청 함유 배지 또는 무혈청 배지에서 배양될 수 있다. 몇몇의 경우, 예를 들어, 정제된 바이러스 제조를 위해서는 전형적으로 무혈청 조건에서 숙주 세포를 배양하는 것이 바람직할 수 있다. 세포는 소규모로, 예를 들어 25 ml 미만의 배지로 배양 튜브 또는 플라스크에서, 또는 플라스크, 병 또는 반응기 배양물 중 교반시키면서 큰 플라스크에서, 회전식 병에서, 또는 미세담체 비드 (예를 들어, DEAE-텍스트란 미세담체 비드, 예를 들어 도마셀 (Dormace11) (Pfeifer & Langen); 슈퍼비드 (Superbead) (Flow Laboratories); 스티렌 공중합체-트리-메틸아민 비드, 예를 들어 힐렉스 (Hillex) (엔아버 소재의 SoloHi11))상에서 배양될 수 있다. 미세담체 비드는 부착 세포 성장을 위해 세포 배양물 1 용적당 큰 표면적을 제공하는 작은 구상이다 (직경 범위는 100 내지 200 마이크론이다). 예를 들어, 1 리터의 배지는 2000만개 초과의 미세담체 비드를 포함하며, 이는 8000 cm<sup>2</sup> 초과의 성장 표면을 제공한다. 예를 들어, 백신 제조를 위해 바이러스를 상업적으로 제조하는 경우, 이는 주로 생물반응기 또는 발효장치에서 세포를 배양하는 것이 바람직할 수 있다. 생물반응기는 1 리터 미만에서부터 100 리터 초과의 용적으로 이용가능하며, 예로는 Cyto3 생물반응기 (미네소타주 미네통카 소재의 Osmonics); NBS 생물반응기 (뉴저지 주 에디슨 소재의 New Brunswick Scientific); 브라운 바이오테크 인터내셔널 (B. Braun Biotech International) (독일 소재의 B. Braun Biotech, Melsungen)로부터 입수한 실험실용 및 시판용 규모의 생물반응기가 있다.

[0112] 배양 용적과는 상관없이 본 발명의 다수의 바람직한 측면에서는 여과를 위해 바이러스 용액을 가열시키면서, 재조합 및/또는 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 확실히 효율적으로 회수될 수 있도록 온도에 의존하는 다중 플라스미드 시스템을 사용하여 배양물이 적절한 온도로 유지되게 하는 것이 중요하다 (예를 들어, 문헌 [참조: 2002년 10월 23일 출원된 미국 출원 번호 제60/420,708호, 2003년 4월 25일 출원된 미국 출원 번호 제 10/423,828호, 및 2004년 5월 24일 출원된 미국 출원 번호 제60/574,117호, 모두 "Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus"의 명칭을 가짐]을 참조). 전형적으로, 적절한 기간 동안 (예를 들어, 바이러스 복제시 등) 온도가 정확한 수준에 있도록 하기 위해 조절 장치, 예를 들어 온도 조절기, 또는 세포 배양 물 시스템 및/또는 기타 용액의 온도를 감시하고 유지시키는 다른 장치가 사용된다.

[0113] 본원의 몇몇 실시태양에서 (예를 들어, 유전자재배열 바이러스가 벡터 상의 분절로부터 제조되는 경우) 당업계에 잘 알려져 있는, 진핵생물 세포내로 이종성 핵산을 도입하는 방법, 예를 들어 인산칼슘 공-침전법, 전기천공법, 미세주입법, 리포펙션, 및 폴리아민 형질감염 시약을 사용하는 형질감염과 같은 방법에 따라 인플루엔자 계놈 분절을 포함하는 벡터를 숙주 세포내로 도입 (예를 들어, 형질도입)시킨다. 예를 들어, 재조합 바이러스 등을 제조하기 위해 제조사의 설명서에 따라 폴리아민 형질감염 시약 TransIT-LT1 (Minis)을 사용하여 벡터, 예를 들어 플라스미드를 숙주 세포, 예를 들어 COS 세포, 293T 세포 또는 COS 또는 293T 세포와 MDCK 세포의 조합물로 형질감염시킬 수 있다. 따라서, 일례로, 총 용적 200 μl 중 160 μl의 배지, 바람직하게는 무혈청 배지에 희석된 대략 2 μl의 TransIT-LT1을 사용하여 대략 1 μg의 각각의 벡터를 숙주 세포 군집으로 도입한다. DNA:형질감염 시약 혼합물을 실온에서 45분 동안 인큐베이션한 후, 800 μl의 배지를 첨가한다. 형질감염 혼합물을 숙주 세포에 가하고, 당업자에게 잘 알려져 있는 기타 방법을 통해 세포를 배양한다. 그에 따라서 세포 배양물에서 재조합 또는 유전자재배열 바이러스의 생산을 위해 8개의 계놈 분절 (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA 및 NA, 예를 들어 본 발명의 것) 각각을 포함하고 있는 벡터를 대략 20 μl TransIT-LT1과 혼합하고, 숙주 세포내로 형질감염시킨다. 임의로, 형질감염 이전에 혈청을 함유하는 배지를, 예를 들어 Opti-MEM I과 같은 무혈청 배지로 대체하고, 4 내지 6시간 동안 인큐베이션한다.

[0114] 달리, 인플루엔자 계놈 분절을 포함하고 있는 상기와 같은 벡터를 숙주 세포내로 도입시키기 위해 전기천공이 사용될 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 바이러스를 포함하고 있는 플라스미드 벡터는 유리하게 하기 방법에 따른 전기천공을 사용하여 베로 세포내로 도입된다. 간략하면, 대략 5 x 10<sup>6</sup>개의 베로 세포, 예를 들어 10% 우태아 혈청 (FBS: Fetal Bovine Serum)으로 보충된 변형된 이글스 배지 (MEM: Modified Eagle's Medium)에서 배양된 상기 세포를 0.4 ml OptiMEM에 재현탁시키고, 전기천공 큐벳에 놓는다. 25 μl 이하의 용적으로 20 μg의 DNA를 큐벳내 세포에 첨가한 후, 이를 가볍게 두드림으로써 서서히 혼합시킨다. 28 내지 33 msec 사이의 시간 상수를 사용하여 300 볼트, 950 마이크로 페러드 하에 제조사의 설명서 (예를 들어, Capacitance Extender Plus가 연결된 BioRad Gene Pulser II)에 따라 전기천공을 실시한다. 서서히 가볍게 두드림으로써 세포를 다시 혼합하고, 전기천공 후 대략 1 내지 2분 경과 후, 10% FBS를 포함하는 0.7 ml MEM을 큐벳에 직접 첨가한다. 이어서, 세포를, 2 ml MEM, 10% FBS를 함유하는 6개의 웰을 갖는 표준 조직 배양 접시 중 2개의 웰로 옮긴다. 큐벳을 세척하여 임의의 남아있는 세포를 회수하고, 세척 혼탁액을 2개 웰로 나눈다. 최종

용적은 대략 3.5 mL이다. 이어서, 바이러스 성장을 허용가능 조건, 예를 들어 저온 적응성 스트레인의 경우, 대략 33°C에서 인큐베이션한다.

[0115] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 발현 시스템, 예를 들어 바이러스 기초 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 암호화 서열은 임의로 후기 프로모터 및 3부로 나누어진 리더 서열로 구성된 아데노바이러스 전사/해독 복합체에 결합된다. 바이러스 계놈의 비필수 E1 또는 E3 영역내 삽입으로 감염된 숙주 세포에서 관심의 대상이 되는 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 생육성 바이러스를 수득하게 될 것이다 [참조: Logan and Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci 81:3655-3659]. 또한, 전사 인핸서, 예를 들어 라우스 육종 바이러스 (RSV: rous sarcoma virus) 인핸서는 포유동물 숙주 세포에서의 발현을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0116] 임의로 숙주 세포 균주를 삽입된 서열의 발현을 조절할 수 있거나, 원하는 양식대로 발현된 단백질을 프로세싱 할 수 있는 능력에 대해서 선택한다. 상기와 같은 단백질의 변형으로는 아세틸화, 카르복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 전구체 형태를 성숙한 형태로 절단하는 것인 단백질의 해독후 프로세싱이 때로는 올바른 삽입, 폴딩, 및/또는 기능을 위해서는 중요하다. 숙주 세포내 (예를 들어, 세포 표면상에) 추가로 적절히 위치시키는 것도 중요하다. 상이한 숙주 세포, 예를 들어 COS, CHO, BHK, MDCK, 293, 293T, COS7 등은 상기와 같은 해독후 활성에 대해 특이적인 세포 기구 및 특징적인 기전을 갖고 있으며, 이는 현 도입된 외래 단백질의 정확한 변형과 프로세싱을 확실히 하기 위해 선택될 수 있다.

[0117] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 재조합 단백질 또는 그에 의해 암호화된 하위서열을 갖는 재조합 단백질을 장기간 동안 고수율로 제조하기 위해서는 안정적인 발현 시스템이 임의로 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드를 안정적으로 발현하는 세포를, 바이러스 복제 기점 또는 내인성 발현 요소 및 선별가능한 마커 유전자를 함유하는 발현 벡터를 사용하여 형질감염시킨다. 예를 들어, 벡터를 도입한후, 선별 배지로 교체하기 이전에 영양강화 배지에서 1 내지 2일 동안 세포를 배양한다. 선별가능한 마커의 목적은 선별에 대한 내성을 부여하는 것이며, 선별가능한 마커가 존재함으로써 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포를 배양하고 회수할 수 있다. 따라서, 예를 들어 단일 세포 유형으로부터 유형된 것과 같은 안정적으로 형질도입된 세포의 내성을 띤 클럽프는 상기 세포 유형에 적절한 조직 배양 기법의 사용으로 증식시킬 수 있다.

[0118] 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 숙주 세포는 임의로 세포 배양물로부터 암호화된 단백질의 발현과 회수에 적합한 조건하에서 배양된다. 상기 단백질을 발현하는 세포는 분류, 분리 및/또는 정제될 수 있다. 재조합 세포에 의해 제조된 단백질 또는 그의 단편은 서열에 따라 (예를 들어, 융합 단백질을 암호화하는 막 보존 신호 등에 따라) 및/또는 사용하는 벡터에 따라 분비되거나, 막에 결합하거나, 세포내 보존될 수 있다.

[0119] 본 발명의 핵산에 상응하는 발현 생성물은 또한 동물이 아닌 세포, 예를 들어 식물, 효모, 진균, 세균 등에서 생산될 수 있다. 문헌 [참조: Sambrook, Berger and Ausubel, 모두 하기 참조] 이외에, 세포 배양에 관한 상세 설명은 문헌 [참조: Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) Plant Cell Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Atlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL]에서 찾아볼 수 있다.

[0120] 세균 시스템에서 다수의 발현 벡터는 발현되는 생성물에 대해 의도되는 용도에 따라 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 생산을 위해 다양한 폴리펩타이드 또는 그의 단편이 필요할 경우, 쉽게 정제되는 융합 단백질을 고수준으로 발현시키는 벡터가 유리하게 사용된다. 그러한 벡터로는, 관심의 대상이 되는 암호화 서열, 예를 들어 본원에서 발견되는 것 등을 포함하는 서열이 아미노-말단 해독 개시 메티오닌에 대한 서열과, 이어서 촉매적으로 활성인 베타 갈락토시다제 융합 단백질을 생산하는 베타 갈락토시다제의 7개의 잔기와 함께 프레임 내로 벡터에 결합될 수 있는 BLUESCRIPT (Stratagene)와 같은 다기능 대장균 클로닝 및 발현 벡터; pIN 벡터 [참조: Van Heeke & Schuster (1989) *J Biol Chem* 264:5503-5509]; pET 벡터 (위스콘신주 매디슨 소재의 Novagen) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 유사하게, 효모 사카로마이세스 세레비지아에서는 구성 프로모터 또는 유도성 프로모터, 예를 들어 알파 인자, 알코올 옥시다제 및 PGH를 함유하는 다수의 벡터가 원하는 발현 생성물을 제조하는데 사용될 수 있다. 검토를 위해서 문헌 [참조: Ausubel, 하기 참조; Grant et al., (1987); Methods in Enzymology 153:516-544])을 참조한다.

[0121] 관심의 대상이 되는 생체분자의 클로닝, 돌연변이유발 및 발현

- [0122] 본 발명에 적용가능한 분자생물학적 기법, 예를 들어 클로닝, 돌연변이, 세포 배양 등을 기재하고 있는 일반 교재로는 문헌 [참조: Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2000 ("Sambrook"); and Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 2002) ("Ausubel")]을 포함한다. 이들 교재는, 예를 들어 HA 및/또는 NA 분자 생성 등과 관련된 돌연변이유발, 벡터의 사용, 프로모터 및 다수의 다른 관련 주제를 기재하고 있다.
- [0123] 다양한 유형의 돌연변이유발이, 예를 들어 본 발명의 신규의 또는 새로 분리된 HA 및/또는 NA 분자를 제조 및/또는 분리하기 위해, 및/또는 본 발명의 폴리펩타이드 (예를 들어, HA 및 NA 분자)를 추가로 변형/돌연변이시키기 위해서 임의로 본 발명에서 사용된다. 이들은 부위 지정, 무작위 점 돌연변이유발, 상동 재조합 (DNA 셔플링), 우라실을 함유하는 주형을 사용한 돌연변이유발, 올리고뉴클레오타이드 지정 돌연변이유발, 포스포로티오에이트 변형 DNA 돌연변이유발, 캡이 있는 이중체 DNA를 사용한 돌연변이유발 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 추가적인 적합한 방법으로는 점 미스매치 수복, 수복-결핍 숙주 균주를 사용한 돌연변이유발, 제한-선택 및 제한-정제, 결실 돌연변이유발, 총 유전자 합성에 의한 돌연변이유발, 이중 가닥 파괴 수복 등을 포함한다. 예를 들어, 키메라 작제물을 이용하는 것을 포함하는 돌연변이유발도 본 발명에 포함된다. 하나의 실시태양에서, 서열, 서열 비교, 물리적 특성, 결정 구조 등과 같은 자연 발생 분자, 또는 변형 또는 돌연변이된 자연 발생 분자의 공지된 정보에 의해 돌연변이유발을 주도할 수 있다.
- [0124] 본원에서 발견되는 상기 교재 및 일례들은 이러한 절차를 기술할 뿐만 아니라, 하기 공개문 (및 그 안에서 인용되는 참조문헌)도 기술한다: [참조: Sieber, et al., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); Ling et al., *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, Anal Biochem 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, Methods Mol Biol 57:369-374 (1996); I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res 23, 3067-8 (1995); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Bass et al., *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, Science 242:240-245 (1988); Fritz et al., *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, Nucl Acids Res 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, Nucl Acids Res 16: 7207 (1988); Sakmar and Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the  $\alpha$ -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, Nucl Acids Res 14: 6361-6372 (1988); Sayers et al., *Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, Nucl Acids Res 16:791-802 (1988); Sayers et al., *Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide*, (1988) Nucl Acids Res 16: 803-814; Carter, *Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors*, Methods in Enzymol 154: 382-403 (1987); Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, Methods in Enzymol 154:350-367 (1987); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin)) (1987); Kunkel et al., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, Methods in Enzymol 154, 367-382 (1987); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, Methods in Enzymol 154:329-350 (1987); Carter, *Site-directed mutagenesis*, Biochem J 237:1-7 (1986); Eghedazardeh & Henikoff, *Use of oligonucleotides to generate large deletions*, Nucl Acids Res 14: 5115 (1986); Mandicki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, Proc Natl Acad Sci USA, 83:7177-7181 (1986); Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, Nucl Acids Res 14: 9679-9698 (1986); Wells et al., *Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin*, Phil Trans R Soc Lond A 317: 415-423 (1986); Botstein & Shortle, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis*, Science 229:1193-1201(1985); Carter et al., *Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13*

vectors, Nucl Acids Res 13: 4431-4443 (1985); Grundstrom et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, Nucl Acids Res 13: 3305-3316 (1985); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, Proc Natl Acad Sci USA 82:488-492 (1985); Smith, *In vitro mutagenesis*, Ann Rev Genet 19:423-462(1985); Taylor et al., *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, Nucl Acids Res 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*, Nucl Acids Res 13: 8765-8787 (1985); Wells et al., *Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, Gene 34:315-323 (1985); Kramer et al., *The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction*, Nucl Acids Res 12: 9441-9456 (1984); Kramer et al., *Point Mismatch Repair*, Cell 38:879-887 (1984); Nambiar et al., *Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein*, Science 223: 1299-1301 (1984); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, Methods in Enzymol 100:468-500 (1983); and Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, Nucl Acids Res 10:6487-6500 (1982)]. 상기 방법들 다수에 관한 상세한 설명은 문헌 [참조: Methods in Enzymol Volume 154]에서 찾아볼 수 있으며, 상기 문헌은 또한 다양한 돌연변이유발, 유전자 분리, 발현, 및 기타 방법을 이용한 문제점 타결을 위한 유용한 조절을 기재하고 있다.

[0125] 예를 들어, 본 발명의 HA 및/또는 NA 분자의 라이브러리를 돌연변이시키거나, 상기를 변경시키는 것과 같은 본 발명의 돌연변이유발에 사용하기 위한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로, 예를 들어 문헌 [참조: Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984)]에 기재된 바와 같은 자동화 합성장치를 이용하여 문헌 [참조: Beauchage and Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862 (1981)]에 기재된 고체상 포스포르아미다이트 트리에스테르 방법에 따라 화학적으로 합성된다.

[0126] 또한, 본질적으로 임의의 핵산을 다양한 상업적 공급원으로부터 맞춤 제작하거나 표준 주문할 수 있다. 유사하게, 웨타이드 및 항체는 다양한 공급원으로부터 맞춤 주문할 수 있다.

[0127] 본 발명은 또한 본 발명의 HA 및/또는 NA 분자 또는 기타 폴리펩타이드 및/또는 핵산 또는 6:2 유전자재배열 인플루엔자 바이러스와 같은 다양한 바이러스 내의 HA 및/또는 NA 또는 기타 서열, 플라스미드 구조 시스템 내의 플라스미드 등을 포함하는 숙주 세포 및 유기체에 관한 것이다. 숙주 세포는 예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있는 본 발명의 벡터를 사용하여 조작 (예를 들어, 형질전환, 형질도입 또는 형질감염)된다. 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 세균, 바이러스, 나형 폴리뉴클레오타이드 또는 접합된 폴리뉴클레오타이드의 형태일 수 있다. 전기천공법 [참조: From et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)], 바이러스 벡터에 의한 감염, 작은 비드 또는 입자의 매트릭스내 또는 표면 상에서 핵산을 사용하여 작은 입자에 의한 고속 탄동 침투 [참조: Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)] 등을 비롯한 표준 방법에 의해 벡터를 세포 및/또는 미생물에 도입시킨다. 베거 (Berger), 삼브룩 (Sambrook), 및 아우수벨 (Ausubel)은 각종의 적절한 형질전환 방법을 제공한다. 상기를 참조한다.

[0128] 표적 핵산을 세포에 도입시키는 수개의 공지된 방법이 이용가능하며, 이들 중 임의의 방법이 본 발명에 사용될 수 있다. 이들은 수령 세포와 DNA를 함유하는 세균 원형질체의 융합, 전기천공법, 추진체 포격 (projectile bombardment), 및 바이러스 벡터를 사용한 감염 등을 포함한다. 세균 세포를 본 발명의 DNA 작제물을 함유하는 다수의 플라스미드를 증폭시키는데 사용할 수 있다. 세균은 대수 증식기로 성장하고, 세균내 플라스미드는 당업계에 공지된 다양한 방법 (예를 들어, Sambrook 참조)에 의해 분리될 수 있다. 또한, 세균으로부터 플라스미드를 정제하기 위한 다수의 키트가 상업적으로 구입가능하다 (예를 들어, 양자 모두 파마시아 바이오텍 (Pharmacia Biotech)로부터 각기 입수되는 EasyPrep™, FlexiPrep™; 스트라타진 (Stratagene)으로부터 입수되는 StrataClean™; 및 퀴아겐 (Qiagen)으로부터 입수되는 QIAprep™ 참조). 이어서, 분리되고 정제된 플라스미드를 추가 조작하여, 세포 형질 감염에 사용되거나 관련된 벡터에 포함시켜 유기체를 감염시키는 다른 플라스미드를 제조한다. 전형적인 벡터는 전사 및 해독 종결자, 전사 및 해독 개시 서열, 및 특정 표적 핵산의 발현의 조절에 유용한 프로모터를 함유한다. 벡터는 임의적으로 적어도 하나의 독립적인 종결자 서열, 진핵생물 또는 원핵생물 또는 양자 모두 중에서 카세트의 복제를 허용하는 서열 (셔틀 벡터를 포함), 및 원핵생물 및 진핵생물 시스템 양자 모두에 대한 선별 마커를 함유하는 일반 발현 카세트를 포함한다. 벡터는 원핵생물, 진핵생물 또는 양자 모두에서 복제 및/또는 통합에 적합하다. 문헌 [참조: Giliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, et

al., Nature, 328:731 (1987); Schneider, B., et al., Protein Expr. Purif. 6(1)10:14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (모두 상기 참조)]을 참조할 수 있다. 클로닝에 유용한 세균 및 박테리오파지의 카탈로그는, 예를 들어 ATCC에 의해, 예를 들어 ATCC에 의해 공개된 [The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds)]에 제공되어 있다. 또한, 분자 생물학 및 기초적인 이론적 고려사항의 서열 분석, 클로닝 및 다른 측면에 대한 추가적인 기본 절차는 문헌 [참조: Watson et al. (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY]에 나와 있다. 상기를 참조한다.

#### [0129] 폴리펩타이드 제조 및 회수

[0130] 일부 양태에서, 적합한 숙주 세포주 또는 균주의 형질도입 및 적절한 세포 밀도로의 숙주 세포 성장 이후, 적절한 수단 (예를 들어, 온도 변이 또는 화학적 유도)에 의해 선택된 프로모터를 유도시키고, 세포를 추가 기간 동안 배양한다. 몇몇 실시태양에서, 이어서 분비된 폴리펩타이드 생성물, 예를 들어 분비된 융합 단백질 형태의 HA 및/또는 NA 폴리펩타이드 등을 배양 배지로부터 회수한다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 HA 및/또는 NA 폴리펩타이드를 함유하는 바이러스 입자를 세포로부터 제조한다. 달리, 세포를 원심분리에 의해 수거하고, 물리적 또는 화학적 수단에 의해 파괴시키고, 생성된 조 추출물을 추가로 정제하기 위해 보유할 수 있다. 단백질 발현에 사용되는 진핵생물 세포 또는 미생물 세포는 동결-해동 순환, 초음파 처리, 기계적 파괴, 또는 세포 용해제 사용, 또는 당업자에게 잘 알려져 있는 기타 다른 방법을 비롯한 임의의 종래 방법에 의해 파괴시킬 수 있다. 추가로, 본 발명의 HA 및/또는 NA 폴리펩타이드 생성물을 발현하는 세포는 세포로부터 폴리펩타이드를 분리시키지 않고 사용될 수 있다. 그러한 상황하에서 본 발명의 폴리펩타이드는 임의로 세포 표면상에서 발현되고, 이로써 (예를 들어, 세포 표면상에서 항체에 결합하는 HA 및/또는 NA 분자 (또는 그의 단편, 예를 들어 융합 단백질 등을 포함하는 것)를 가짐으로써) 검사된다. 그러한 세포 또한 본 발명의 특징이 된다.

[0131] 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 당업자에게 알려져 있는 태깅 시스템 중 임의의 것 사용), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 및 톤 크로마토그래피를 비롯한, 당업계에 잘 알려져 있는 다수의 방법들 중 임의의 것에 의해 재조합 세포 배양물로부터 발현된 폴리펩타이드를 회수하고 정제할 수 있다. 단백질 리풀딩 단계는 성숙한 단백질의 입체형상 완성시 원하는 바에 따라 사용될 수 있다. 또한, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC: high performance liquid chromatography)가 최종 정제 단계에서 사용될 수 있다. 본원에서 언급된 참조문헌 이외에도, 예를 들어 문헌 [Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; and Bollag et al. (1996) Protein Methods. 2<sup>nd</sup> Edition Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3<sup>rd</sup> Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY; and Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ]에 기재되어 있는 것을 비롯한, 다양한 정제 방법이 당업계에 잘 알려져 있다.

[0132] 본 발명의 발현된 폴리펩타이드가 바이러스에서 생산될 때, 바이러스는 전형적으로 감염된 (형질감염된) 세포가 성장한 배양 배지로부터 회수된다. 전형적으로, 인플루엔자 바이러스를 농축시키기 이전에 조배지를 정화시킨다. 통상의 방법으로는 한외여과, 황산바륨 상에서의 흡착 및 용리, 및 원심분리를 포함한다. 예를 들어, 먼저 예를 들어 세포 과편 및 다른 큰 입상 물질을 제거하기에 충분한 시간, 예를 들어 10 내지 30분 동안 1000 내지 2000 xg에서 원심분리하여 감염된 배양물로부터 조배지를 정화시킬 수 있다. 임의로, 이어서 예를 들어 대략 3 내지 5시간 동안 15,000 xg에서 정화된 배지 상동액을 원심분리하여 인플루엔자 바이러스를 펠릿화시킨다. 적절한 완충액, 예를 들어 STE (0.01 M 트리스-HCl; 0.15 M NaCl; 0.0001 M EDTA) 또는 포스페이트 완충식염수 (PBS) (pH 7.4) 중 바이러스 펠릿을 재현탁시킨 후, 수크로스 (60% 내지 12%) 또는 칼륨 타르트레이트 (50% 내지 10%) 상에서 밀도 구배 원심분리에 의해 바이러스를 농축시킨다. 연속 구배 또는 단계식 구배, 예를 들어 12% 내지 60% 사이에서 12%씩 4단계로 이루어진 수크로스 구배가 적합할 수 있다. 회수를 위해 바이러스를 가시 밴드로 농축시키기에 충분한 속도 및 시간 동안 구배물을 원심분리한다. 달리, 및 대부분의 대규모의 상업적 적용에 있어서, 연속 방식으로 작동하는 대역-원심회전자를 사용하여 밀도 구배로부터 바이러스를 혼탁 분리한다. 조직 배양물로부터 인플루엔자 바이러스를 제조하는 것까지 당업자를 인도하는데 충분한 추가의 설명이 문헌 [참조: Furminger. Vaccine Production, in Nicholson et al. (eds.) Textbook of Influenza pp. 324-

332; Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation*, in Cohen & Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* pp. 141-151, 및 미국 특허 번호 제5,690,937호]에 제공되어 있다. 원하는 경우, 안정화제로서 수크로스-포스페이트-글루타메이트 (SPG)의 존재하에 회수한 바이러스를 -80°C에서 저장할 수 있다.

#### [0133] 변형된 아미노산

본 발명의 발현된 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형된 아미노산을 함유할 수 있다. 변형된 아미노산이 존재하는 것은, 예를 들어 (a) 폴리펩타이드 혈청 반감기 증가, (b) 폴리펩타이드 항원성 감소/증가, (c) 폴리펩타이드 저장 안정성 증가라는 점 등에서 이로울 수 있다. 아미노산(들)은 예를 들어, 재조합 생산시 해독과 동시에 또는 해독 후에 변형되거나 (예를 들어, 포유동물 세포에서 발현하는 동안 N-X-S/T 모티프에서의 N-연결 글리코실화), 합성 수단 (예를 들어, 폐길화)에 의해 변형된다.

변형된 아미노산의 비체한적 예로는 글리코실화된 아미노산, 황화된 아미노산, 프레닐화된 (예를 들어, 파르네실화된, 제라닐제라닐화된) 아미노산, 아세틸화된 아미노산, 아실화된 아미노산, 폐길화된 아미노산, 비오텐화된 아미노산, 카르복실화된 아미노산, 인산화된 아미노산 등뿐만 아니라, 예를 들어 지질 부분 또는 기타 유기 유도체화제와의 접합체에 의해 변형된 아미노산을 포함한다. 아미노산 변형에 대하여 당업자를 교시하기에 적절한 참조문헌은 문헌을 통해 충분히 제공받을 수 있다. 예시적 프로토콜은 문헌 [참조: Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM Human Press, Towata, NJ*]에 나와 있다.

#### [0136] 융합 단백질

본 발명은 또한 본 발명의 서열 (예를 들어, HA 및/또는 NA 폴리펩타이드를 암호화하는 것) 또는 그의 단편과, 예를 들어 면역글로불린 (또는 그의 일부), 예를 들어 GFP (녹색 형광 단백질)를 암호화하는 서열, 기타 유사 마커 등과의 융합물을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 상기 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 본 발명의 또 다른 측면이다. 본 발명의 융합 단백질은 임의로, 예를 들어 본 발명의 비융합 단백질과 유사한 적용 (예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 치료학적, 예방학적, 진단학적, 실험상의 적용 등을 포함)을 위해 사용된다. 면역글로불린 서열 및 마커 서열과의 융합 이외에, 본 발명의 단백질은 또한 임의로 예를 들어 융합 단백질을 선별할 수 있도록 하고/거나 특이적인 세포 유형, 영역 등에 융합 단백질을 표적화할 수 있도록 하는 서열과 융합된다.

#### [0138] 항체

본 발명의 폴리펩타이드는 본원에서 제공된 폴리펩타이드 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 폴리펩타이드, 예를 들어 본원에서 제시된 것, 및 그의 보존적 변이체에 특이적인 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 상기 언급된 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체는, 예를 들어 표적 폴리펩타이드의 활성, 분포, 및 발현과 관련하여 진단학적, 및 치료학적 목적으로 유용하다.

본 발명의 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체는 당업계에 잘 알려져 있는 방법에 의해 생성될 수 있다. 그러한 항체로는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 인간화된, 단일 쇄, Fab 단편 및 Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

폴리펩타이드는 항체 생산을 위한 생물학적 활성을 필요로 하지 않는다 (예를 들어, 전장의 기능성 헤마글루티닌 또는 뉴라미니다제가 요구되지 않는다). 그러나, 폴리펩타이드 또는 올리고펩타이드는 항원성이어야 한다. 특이적인 항체를 유도하는데 사용되는 웨პ타이드는 적어도 약 4개의 아미노산, 및 종종 적어도 5개 또는 10개의 아미노산으로 이루어진 아미노산 서열을 갖는다. 짧은 폴리펩타이드 스트레치는 또 다른 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 및 키메라 분자에 대해 생산된 항체와 함께 융합될 수 있다.

폴리클로날 및 모노클로날 항체를 생산하는 여러 방법들이 당업자에게 알려져 있으며, 이는 본 발명의 폴리펩타이드, 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드 등에 특이적인 항체를 생산하도록 적합화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [참조: Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; Paul (ed.) (1998) *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, Lippincott-Raven, Lippincott Williams & Wilkins; Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA 및 상기 문헌에서 인용된 참조문헌; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed.) Academic Press, New York, NY; and Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497]를 참조한다. 항체를 제조하는 다른 적합한 기법은 과자 또는 유사 백터에서 재조합 항체 라이브러

리를 선별하는 것을 포함한다. 문헌 [참조: Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; and Ward, et al. (1989) Nature 341:544-546]를 참조한다. 특이적인 모노클로날 및 폴리클로날 항체 및 항혈청은 보통 예를 들어 적어도 약 0.1  $\mu\text{M}$ , 적어도 약 0.01  $\mu\text{M}$  이상, 및 전형적으로 및 적어도 약 0.001  $\mu\text{M}$  이상의  $K_D$ 로 결합할 것이다.

[0143] 특정의 치료학적 적용에 있어서, 인간화된 항체가 바람직할 수 있다. 키메라 (인간화된) 항체를 제조하는 것에 관한 상세한 방법은 미국 특히 5,482,856에서 찾아볼 수 있다. 인간화 및 기타 항체 생산 및 조작 기법에 관한 추가 설명은 문헌 [참조: Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, 2<sup>nd</sup> Edition Freeman and Company, NY (Borrebaeck); McCafferty et al. (1996) Antibody Engineering, Practical Approach IRL at Oxford Press, Oxford, England (McCafferty), and Paul (1995) Antibody Engineering Protocols Humana Press, Towata, NJ (Paul)]에서 찾아볼 수 있다. 구체적인 방법에 관한 추가 설명은, 예를 들어 문헌 [참조: Ostberg et al. (1983), Hybridoma 2: 361-367; 미국 특히 번호 제4,634,664호 (Ostberg) 및 미국 특히 번호 제4,634,666호 (Engelman et al.)]에서 찾아볼 수 있다.

#### **핵산 및 폴리펩타이드 서열 변이체**

[0145] 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 본 발명은 핵산 폴리뉴클레오타이드 서열 및 폴리펩타이드 아미노산 서열, 예를 들어 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 서열, 및 예를 들어 상기 서열을 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 서열의 예는 본원에 개시되어 있다. 그러나, 당업자는 본 발명이 반드시 본원에 개시된 서열만으로 제한되는 것은 아니며, 본 발명은 또한 예를 들어 HA 및/또는 NA 분자를 암호화하는 것과 같이, 본원에 개시된 기능을 갖는 다수의 관련 및 비관련 서열을 제공한다는 것을 이해할 것이다.

[0146] 당업자는 또한 개시된 서열의 변이체 다수가 본 발명에 포함된다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 기능적으로 동일한 서열을 제공하는 개시된 서열의 보존적 변이는 본 발명에 포함된다. 적어도 하나의 개시된 서열에 하이브리드화하는, 핵산 폴리뉴클레오타이드 서열의 변이체는 본 발명에 포함되는 것으로 간주된다. 예를 들어, 표준 서열 비교 기법에 의해 측정되는 바와 같이, 본원에 개시된 서열의 독특한 하위서열 또한 본 발명에 포함된다.

#### **침묵 변이**

[0148] 유전 코드의 축퇴에 기인하여 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 각종 핵산 서열 및/또는 본 발명의 바이러스가 임의로 생산되는데, 이중 일부는 본원의 HA 및 NA 핵산 및 폴리펩타이드 서열과 낮은 수준의 서열 동일성을 가질 수 있다. 하기는 다수의 생물학 및 생화학 교재에서 찾아볼 수 있는, 유전 코드를 열거한 전형적인 코돈 표를 제공한다.

표 1

코돈 표

아미노산		코돈					
알라닌	Ala A	GCA	GCC	GCG	GCU		
시스테인	Cys C	UGC	UGU				
아스파르트산	Asp D	GAC	GAU				
글루탐산	Glu E	GAA	GAG				
페닐알라닌	Phe F	UUC	UUU				
글리신	Gly G	GGA	GGC	GGG	GGU		
히스티딘	His H	CAC	CAU				
이소류신	Ile I	AUA	AUC	AUU			
리신	Lys K	AAA	AAG				
류신	Leu L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
메티오닌	Met M	AUG					
아스파라긴	Asn N	AAC	AAU				
프롤린	Pro P	CCA	CCC	CCG	CCU		
글루타민	Gln Q	CAA	CAG				
아르기닌	Arg R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
세린	Ser S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
트레오닌	Thr T	ACA	ACC	ACG	ACU		
발린	Val V	GUU	GUC	GUG	GUU		
트립토판	Trp W	UGG					
티로신	Tyr Y	UAC	UAU				

[0149]

[0150] 코돈표는 다수의 아미노산이 1개 초과의 코돈에 의해 암호화된다는 것을 보여준다. 예를 들어, 코돈 AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, 및 CGU 모두 아미노산 아르기닌을 암호화한다. 따라서, 코돈에 의해 아르기닌으로 표시되는 본 발명의 핵산 중 모든 위치의 코돈은 암호화되는 폴리펩타이드는 바꾸지 않으면서 상기 기술된 상응하는 코돈들 중 어느 것으로 변경될 수 있다. RNA 서열에서 U는 DNA 서열에서 T에 상응하는 것으로 이해된다.

[0151]

상기 "침묵 변이"는 하기 논의되는 "보존적으로 변형된 변이" 중 한가지 종류에 속한다. 당업자는 핵산 중 각 코돈(단, 통상 메티오닌에 대해 유일한 코돈인 ATG, 및 통상 트립토판에 대해 유일한 코돈인 TTG는 제외)은 표준 기법에 의해 기능적으로 동일한 폴리펩타이드를 암호화하도록 변형될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 임의의 기술된 서열에 내재되어 있다. 그러므로, 본 발명은 가능한 코돈 선택에 기초한 조합을 선택함으로써 이루어질 수 있는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열 각각의 모든 가능한 변이를 명백히 제공한다. 이러한 조합은 본 발명의 헤마글루티닌 또는 뉴라미니다제 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열에 적용되는 것과 같이 표준 삼중자 유전 코드(예를 들어, 표 1에 기재되어 있는 것, 또는 당업계에서 통상 이용되는 것)에 따라 이루어진다. 본원의 모든 핵산의 상기와 같은 모든 변이를 구체적으로 제공하며, 유전 코드와 함께 서열을 참작하여 기술된다. 당업자는 전체적으로 본원에 기술된 방법을 사용하여 이들 침묵 치환을 이를 수 있다.

#### 보존적 변이

[0152]

[0153] 유전 코드의 축퇴에 기인하여 "침묵 치환"(즉, 암호화된 폴리펩타이드를 바꾸지 않는 핵산 서열내 치환)이 아미노산을 암호화하는 본 발명의 모든 핵산 서열의 내포된 특징이 된다. 유사하게, 아미노산 서열에 있어서 하나 또는 수개의 아미노산의 "보존적 아미노산 치환"은 특성이 고도로 유사한 다른 아미노산으로 치환된 것이며, 이는 또한 개시된 작제물, 예를 들어 본원의 것과 고도로 유사한 것으로서 용이하게 확인된다. 각각의 개시된 서열의 상기와 같은 보존적 변이가 본 발명의 특징이 된다.

[0154]

특정 핵산 서열의 "보존적 변이"란 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산을 암호화하는 핵산을 지칭하거나, 핵산이 아미노산 서열을 암호화하지 않을 경우, 본질적으로 동일한 서열을 지칭하는 것이며, 하기 표 2를 참조한다. 암호화 서열에 있어서 단일의 아미노산 또는 작은 비율의 아미노산(전형적으로 5% 미만, 더욱 전형적으로 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만)을 변경, 부가 또는 결실시키는 개개의 치환, 결실 또는 부가는 변경을 통해 아미노산을 결실시키거나, 아미노산을 부가하거나, 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시키는 "보존적으로 변형된 변이"라는 것을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 열거된 폴리펩타이드 서열의 "보존적

변이"는 작은 비율의, 전형적으로 5% 미만, 더욱 전형적으로 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의, 폴리펩타이드 서열의 아미노산이 동일한 보존적 치환기를 갖는 보존적으로 선택된 아미노산으로 치환된 것을 포함한다. 마지막으로, 핵산 분자의 암호화된 활성을 변경시키지 않는 서열 추가, 예를 들어 비기능성 서열의 추가가 기본 핵산의 보존적 변이이다.

## 표 2

### 보존적 치환군

1	알라닌(A)	세린(S)	트레오닌(T)	
2	아스파르트산(D)	글루탐산(E)		
3	아스파라긴(N)	글루타민(Q)		
4	아르기닌(R)	리신(K)		
5	이소류신(I)	류신(L)	메티오닌(M)	발린(V)
6	페닐알라닌(F)	티로신(Y)	트립토판(W)	

[0155]

### [0156] 서열 비교, 동일성, 및 상동성

2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 용어 "동일한" 또는 "동일성" (%)는, 최대로 일치하도록 비교 및 정렬된 경우, 하기 기술하는 서열 비교 알고리즘 (또는 당업자가 사용 가능한 기타 알고리즘)을 중 하나를 사용하여 측정하거나, 시각적 관찰에 의하여 측정하였을 때, 동일한 2개 이상의 서열 또는 하위서열, 또는 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 특정 비율로 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다.

[0158]

2개의 핵산 또는 폴리펩타이드 (예를 들어, HA 또는 NA 분자를 암호화하는 DNA 및/또는 RNA, 또는 HA 또는 NA 분자의 아미노산 서열)와 관련하여 "실질적으로 동일하다"라는 표현은 최대로 일치하도록 비교 및 정렬된 경우, 서열 비교 알고리즘을 사용하여 측정하거나, 시각적 관찰에 의하여 측정하였을 때, 적어도 약 90%, 바람직하게는 91%, 가장 바람직하게는 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 상기와 같이 "실질적으로 동일한" 서열은 전형적으로 실제 그 유래와는 상관없이 "상동성"인 것으로 간주된다. 바람직하게는, "실질적인 동일성"은, 아미노산이 헤마글루터닌 또는 헤마글루터닌 단편인 경우, 길이가 적어도 약 200개 잔기, 더욱 바람직하게는 적어도 약 250개 잔기인 아미노산 서열의 영역에 걸쳐 존재하고, 가장 바람직하게는 서열이 적어도 약 300개 잔기, 350개 잔기, 400개 잔기, 425개 잔기, 450개 잔기, 475개 잔기, 480개 잔기, 490개 잔기, 495개 잔기, 499개 잔기, 500개 잔기, 502개 잔기, 559개 잔기, 565개 잔기, 또는 566개 잔기인 아미노산 서열 영역, 또는 비교되는 두 서열 전체 길이에 걸쳐 실질적으로 동일하고, 아미노산이 뉴라미디나제 또는 뉴라미디나제 단편인 경우, 연속한 적어도 약 350개 아미노산; 적어도 약 400개 아미노산; 적어도 약 436개 아미노산, 적어도 약 450개 아미노산; 적어도 약 451개 아미노산; 적어도 약 465개 아미노산; 적어도 약 466개 아미노산; 적어도 약 469개 아미노산; 적어도 약 470개 아미노산; 적어도 약 566개 아미노산에 걸쳐 실질적으로 동일하다.

[0159]

서열 비교 및 상동성 측정에 있어서, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 참조 서열로서의 기능을 한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 참조 서열은 컴퓨터에 입력되며, 하위서열 좌표는 필요할 경우 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램의 매개 변수는 지정된다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 참조 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성 (%)을 프로그램 매개 변수에 입각하여 계산한다.

[0160]

비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어, 국소 상동성 알고리즘 [참조: Smith & Waterman, Adv Appl Math 2:482 (1981)], 상동성 정렬 알고리즘 [참조: Needleman & Wunsch, J Mol Biol 48:443 (1970)], 유사성 검색 방법 [참조: Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85:2444 (1988)], 알고리즘, 예를 들어 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)의 컴퓨터에 의한 실행, 또는 시각에 의한 관찰(예를 들어, 일반적으로 문헌 [참조: Ausubel et al, 상기 참조] 참조)에 의해 수행될 수 있다.

- [0161] 서열 동일성 (%)과 서열 유사성 (%)을 측정하는데에 적합한 알고리즘의 일례로는 BLAST 알고리즘이 있으며, 이 알고리즘에 관하여는 [참조: Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 분석 법을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명 공학 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 통해 공개적으로 이용가능하다. 상기 BLAST 알고리즘에는 첫 번째로 의문 서열 중의 길이  $W$ 의 짧은 단어를 확인하여 높은 점수 서열 쌍 (HSP: high scoring sequence pair)을 확인하는 것이 포함되며, 이것은 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어를 갖도록 정렬되는 경우 일부 포지티브-값 역치 점수  $T$ 를 매치 또는 만족시킨다.  $T$ 는 이웃 단어 점수 역치로서 언급된다 [참조: Altschul et al., 상기 참조]. 상기 초기 이웃 단어 적중은 이를 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위해 검색을 시작하기 위한 근원으로서 작용한다. 이어서, 단어 적중은 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한, 각 서열에 따라 양 방향으로 확장된다. 누적 점수는 뉴클레오타이드 서열에 대해, 매개변수  $M$  (매치 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상  $> 0$ ) 및  $N$  (미스매치 잔기에 대한 패널티 점수; 항상  $< 0$ )을 사용하여 계산한다. 아미노산 서열에 대해, 점수 매트릭스는 누적 점수를 계산하기 위해 사용된다. 각 방향으로의 단어 적중의 확장은, 누적 정렬 점수가 최대 달성 값으로부터의 수량  $X$ 에 의해 떨어지고; 하나 이상의 네거티브-점수 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수가 0 또는 미만이 되거나; 어느 한쪽의 서열의 말단이 도달한 경우 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터  $W$ ,  $T$ , 및  $X$ 는 정렬의 민감성 및 속도를 측정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오타이드 서열에 대해)은 디폴트로서 단어 길이 ( $W$ ) 11, 기대값 ( $E$ ) 10, 컷오프 100,  $M=5$ ,  $N=-4$  및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열에 대해, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 단어 길이 ( $W$ ) 3, 및 기대값 ( $E$ ) 10을 사용하고, BLOSUM62 점수 매트릭스 (문헌 [참조: Henikoff & Henikoff (1989) Proc Natl Acad Sci USA 89:10915] 참조)를 사용한다.
- [0162] 서열 동일성 (%)을 계산하는 것 이외에도, BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열 사이의 유사성을 통계학적으로 분석하기도 한다 (예를 들어, 문헌 [참조: Karlin & Altschul. Proc Natl Acad Sci USA 90:5873-5787 (1993)] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성에 관한 한가지 척도는, 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 우연히 매치될 확률에 대한 지표를 제공하는 최소 총 확률 ( $P(N)$ )이다. 예를 들어, 시험 핵산과 참조 핵산 비교시 최소 총 확률이 약 0.1 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만이면, 이 핵산은 참조 서열과 유사한 것으로 간주된다.
- [0163] 유용한 서열 정렬 알고리즘의 또 다른 예는 PILEUP이다. PILEUP는 진행적, 쌍 방식 (pairwise) 정렬을 사용하여 관련 서열의 군으로부터 복합 서열 정렬을 만든다. 이것은 또한 정렬을 만들기 위해 사용되는 클러스터링 관계를 보여주는 트리 (tree)를 플롯화할 수 있다. PILEUP은 문헌 [참조: Feng & Doolittle (1987) J. Mol Evol. 35:351-360]의 진행적 정렬 방법의 간소화를 사용한다. 사용되는 방법은 문헌 [참조: Higgins & Sharp (1989) CABIOS5:51-153]에 의해 기재된 방법과 유사하다. 프로그램은 5,000개 문자의 최대 길이로 300개까지의 서열을 정렬시킬 수 있다. 복합 정렬 절차는 2개의 가장 유사한 서열의 쌍 방식 정렬로 시작하여, 2개의 정렬된 서열의 클러스터를 생성한다. 이어서, 상기 클러스터를 다음을 가장 관련된 서열 또는 정렬된 서열의 클러스터에 정렬시킬 수 있다. 서열의 2개의 클러스터를 2개의 개별 서열의 쌍 방식 정렬의 단순 확장에 의해 정렬시킨다. 최종 정렬은 일련의 진행적, 쌍 방식 정렬에 의해 달성된다. 프로그램을 사용하여 또한 클러스터링 관계를 보여주는 수지상도 또는 수형도를 플롯화할 수 있다. 프로그램은 서열 비교의 영역에 대응한 특정 서열 및 그의 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 지정함으로써 실행된다.
- [0164] 복합 DNA 및 아미노산 서열 정렬에 적합한 알고리즘에 관한 추가의 예는 CLUSTALW 프로그램이다 [참조: Thompson, J. D. et al. (1994) Nucl. Acids. Res. 22: 4673-4680]. CLUSTALW는 서열 군 간의 복합 쌍 방식 비교를 수행하고, 이들을 상동성에 기초하여 복합 정렬로 조립한다. 캡 오픈 및 캡 확장 패널티는 각각 10 및 0.05일 수 있다. 아미노산 정렬을 위해, BLOSUM 알고리즘을 단백질 중량 매트릭스로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [참조: Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919]를 참조한다.
- [0165] 디지털 시스템
- [0166] 본 발명은, 예를 들어 본원에 제시된 서열, 및 그의 다양한 침묵 치환 및 보존적 치환을 비롯한, 본원의 핵산 및 분리된 또는 재조합 폴리펩타이드에 대한 본원의 서열 정보에 상응하는 문자열을 포함하는 디지털 시스템, 예를 들어 컴퓨터, 컴퓨터 판독 매체 및 통합 시스템을 제공한다. 통합 시스템은 추가로 문자열에 상응하는 유전자를 만들기 위한 유전자 합성 장치와 같은 것을 포함할 수 있다.
- [0167] 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법들을 사용하여 상이한 문자열 사이의 상동성 또는 유사성을 검출할 수 있거나, 상기를 사용하여 예를 들어 출력 파일을 제어하는 것과 같이, 서열 등을 포함하는 정보를 제시하는 원리를 제공하는 기타 바람직한 기능을 실행할 수 있다. 예로는 상기 논의된 바 있는 BLAST를 포함한다. 본 발명의 컴

퓨터 시스템은, 예를 들어 본원에서 언급된 것과 같은 서열을 포함하는 하나 이상의 데이터 파일 또는 데이터 베이스와 함께, 상기와 같은 프로그램을 포함할 수 있다.

[0168] 따라서, 다양한 HA 또는 NA 서열 또는 단편 등간의 다양한 염격성과 길이에서의 다양한 유형의 상동성 및 유사성이 검출될 수 있으며, 본원의 통합 시스템에서 인지할 수 있다. 예를 들어, 생체중합체 서열의 비교 분석을 위해, 워드 프로세싱에서의 스펠 체크를 위해, 및 다양한 데이터 베이스로부터의 데이터 검색을 위해 많은 상동성 측정 방법이 디자인되었다. 천연 폴리뉴클레오타이드에서 4개의 주 뉴클레오염기 사이의 이중 나선 쌍방식의 상보적 상호작용을 이해하면서, 상보적인 상동성 폴리뉴클레오타이드 열의 어닐링을 모의하는 모델 또한 전형적으로 본원의 서열에 상응하는 문자열에서 실시되는 서열 정렬 또는 기타 실행에 대한 기초로서 사용될 수 있다 (예를 들어, 워드 프로세싱 조작, 서열 또는 하위서열 문자열을 포함하는 도면 제작, 출력 표 등).

[0169] 따라서, 표준 텍스트 탑 응용법, 예를 들어 워드 프로세싱 소프트웨어 (예를 들어, Microsoft Word™ 또는 Corel WordPerfect™) 및 데이터베이스 소프트웨어 (예를 들어, 스프레드시트 소프트웨어, 예를 들어 Microsoft Excel™, Corel Quattro Pro™, 또는 데이터베이스 프로그램, 예를 들어 Microsoft Access™, Paradox™, GeneWorks™, 또는 MacVector™ 또는 기타 유사 프로그램)은 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 (핵산 또는 단백질, 또는 그 둘 모두)에 상응하는 문자열을 입력함으로써 본 발명에 적합화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 시스템은 본원 서열에 상응하는 문자열을 조작하기 위해 사용자 인터페이스 (예를 들어, 표준 작동 시스템에서 GUI, 예를 들어 윈도우스, 매킨토시, 또는 리눅스 시스템)과 함께 사용되는 것과 같은, 적절한 문자열 정보를 갖는 상기의 소프트웨어를 포함할 수 있다. 언급한 바와 같이, 전문 정렬 프로그램, 예를 들어 BLAST 또한 핵산 또는 단백질 (상응하는 문자열)의 정렬을 위해 본 발명의 시스템내로 포함될 수 있다.

[0170] 본 발명에서 시스템은 전형적으로 본원 서열 중 어느 것을 포함하는 소프트웨어 시스템으로 입력되는 데이터 세트를 갖는 디지털 컴퓨터를 포함한다. 컴퓨터는, 예를 들어 PC (인텔 x86 또는 펜티엄 칩-호환 DOS™, OS2™ WINDDOWS™ WINDDOWSNT™, WINDDOWS95™, WINDDOWS2000™, WINDDOWS98™, 리눅스 기반 기계, MACINTOSH™, 파워 PC, 또는 UNIX 기반 (예를 들어, SUN™ 워크 스테이션) 기계) 또는 당업자에게 알려져 있는 다른 상업적으로 이용 가능한 컴퓨터일 수 있다. 서열을 정렬하거나, 그외 조작하기 위한 소프트웨어가 이용 가능하며, 예를 들어 비주얼베이직, PERL, 포트란, 베이직, 자바 등과 같은 표준 프로그래밍 언어를 사용함으로써 당업자에 의해 쉽게 제작될 수 있다.

[0171] 임의의 제어 장치 또는 컴퓨터는 임의로 대개 음극선관 ("CRT: cathode ray tube") 디스플레이, 평판 디스플레이 (예를 들어, 능동 매트릭스형 액정 표시 장치, 액정 표시 장치) 등인 모니터를 포함한다. 컴퓨터 회로는 대개 다수의 집적 회로 칩, 예를 들어 마이크로프로세서, 메모리, 인터페이스 회로 등을 포함하는 박스내 위치한다. 박스는 또한 임의로 하드 디스크 장치, 플로피 디스크 장치, 고용량 이동식 드라이브, 예를 들어 기록 가능한 CD-ROM, 및 기타의 일반적인 주변 소자를 포함한다. 입력 장치, 예를 들어 키보드 또는 마우스는 임의로 관련 컴퓨터 시스템에서 비교되거나, 그밖에 조작되는 서열을 사용자가 입력하고, 사용자가 선택할 수 있도록 제공된다.

[0172] 컴퓨터는 전형적으로 예를 들어 GUI와 같이, 세트 파라미터 영역으로의 사용자 입력 형태로, 또는 사전에 프로그래밍된 명령 형태로, 예를 들어 각종의 상이한 특정 연산에 대해 사전에 프로그래밍되는 것과 같은 형태로 사용자 명령을 받아들이는 적절한 소프트웨어를 포함한다. 이어서, 소프트웨어는 이들 명령을 원하는 연산을 수행 할 수 있도록, 예를 들어 적절한 메카니즘 또는 전송 제어 장치의 연산을 명령하기 위한 적절한 언어로 전환시킨다. 소프트웨어는 또한 핵산 합성 (예를 들어, 본원의 서열 또는 서열 정렬에 기초한 핵산 합성), 차별적인 유전자 발현에 대한 샘플 비교, 또는 기타 연산을 제어하는 출력 소자를 포함할 수 있다.

### 키트 및 시약

[0173] 본 발명은 임의로 키트로서 사용자에게 제공된다. 예를 들어, 본 발명의 키트는 본원에 기술된 (예를 들어, 본 발명의 HA 및/또는 NA 문자를 포함하거나 갖는) 하나 이상의 핵산, 폴리펩타이드, 항체, 또는 세포주를 포함한다. 키트는 진단용 핵산 또는 폴리펩타이드, 예를 들어 항체, 프로브 세트, 예를 들어 적합한 용기내 패킹된 cDNA 마이크로어레이, 또는 기타 핵산, 예를 들어 하나 이상의 발현 벡터를 포함할 수 있다. 키트는 또한 발현 생성물을 표지하기 위한 하나 이상의 추가 시약, 예를 들어 기질, 표지, 프라이머, 튜브 및/또는 기타 부속물, 샘플 수집을 위한 시약, 완충액, 하이브리드화 챔버, 커버 슬립 등을 추가로 포함한다. 키트는 임의로 진단용 세트 등의 발견 또는 적용을 위한 키트 성분의 바람직한 사용 방법을 설명하는 설명서 세트 또는 사용자 매뉴얼을 추가로 포함한다.

- [0175] 설명서에 따라 사용할 때, 키트는, 예를 들어 질환 상태 또는 증상을 평가하기 위해, 약제학적 제제 또는 기타 치료 중재가 세포 또는 유기체의 질환 상태 또는 증상의 진행에 미치는 효과를 평가하기 위해, 또는 백신으로서의 사용을 위해 또는 기타의 것을 위해 키트가 사용될 수 있다.
- [0176] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원의 방법, 조성물, 시스템 및 장치를 구현하는 시스템 키트를 제공한다. 본 발명의 시스템 키트는 임의로 하기의 (1) 장치, 시스템, 시스템 성분 또는 장치 성분; (2) 본원에 기술된 방법 실시 설명서 및/또는 본원의 장치 또는 장치 성분 작동 설명서 및/또는 본원의 조성물 사용 설명서 중 하나 이상을 포함한다. 추가의 측면에서, 본 발명은 본원의 임의의 장치, 장치 성분, 조성물 또는 키트의 용도, 본원의 임의의 방법 또는 분석법의 실시, 및/또는 본원의 임의의 분석법 또는 방법을 실시하기 위한 임의의 장치 또는 키트의 용도를 제공한다.
- [0177] 추가로, 키트는 적절한 포장재, 키트 성분을 담고 있는 용기, 본원의 방법 실시 설명서 등과 함께 상기 언급한 하나 이상의 해독 시스템 (예를 들어, 세포)을 포함할 수 있다. 유사하게, 해독 시스템의 생성물 (예를 들어, HA 및/또는 NA 문자와 같은 단백질)은, 예를 들어 키트 성분을 담고 있는 용기, 본원의 방법 실시 설명서 등과 함께 키트 형태로 제공될 수 있다. 또한, 키트는 본원에 기술된 HA 및/또는 NA 서열을 포함하는 살아있는 약독화된 백신 (예를 들어, FluMist)와 같은 다양한 백신 (예를 들어, 플라스미드 구조 프로토콜을 통해 제조된 백신)을 포함할 수 있다.
- [0178] 본 발명의 방법 및 조성물의 사용을 촉진시키기 위하여 임의의 백신 성분 및/또는 조성물, 예를 들어 요막액 중 유전자재배열 바이러스 등, 및 실험 목적용 또는 치료학적 백신 목적용의 인플루엔자 바이러스의 패킹 및 감염에 유용한, 예를 들어 완충액, 세포, 배양 배지와 같은 추가 성분이 키트 형태로 패킹될 수 있다. 전형적으로, 키트는 상기 성분들 이외에도, 예를 들어 본 발명의 방법 실시 설명서, 포장재 및 용기를 포함할 수 있는 추가의 물질을 포함한다.
- [0179] **실시예**
- [0180] 본 발명은 하기 실시예를 참조로 하여 기술된다. 이들 실시예는 단지 설명을 위한 것으로서, 본 발명은 이들 실시예로 제한되는 것으로 간주되어서는 안되며, 오히려 본원에서 제공되는 교시로부터 분명해지는 임의의 모든 변형들을 포함하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0181] **재료 및 방법**
- [0182] **재조합 바이러스의 생성:** 야생형 (wt) 인플루엔자 A H1N1 바이러스, MDCK 세포로부터 분리된 A/CA/4/09 및 난으로부터 분리된 A/CA/7/09를 질병 관리 예방 센터 (Centers for Disease Control and Prevention: CDC)로부터 받았다. A/CA/4/09 난 적응된 바이러스 RNA은 식약청 (Food and Drug Administration: FDA)의 Ziping Ye 박사로부터 제공되었다. A/CA/4/09 및 A/CA/7/09의 HA 및 NA 유전자 분절을 HA 및 NA 유전자 말단 서열들에 보편적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR함으로써 증폭시킨 후 플라스미드 벡터 pAD3000 (Hoffman (2000) PNAS 97:6108-6113)로 클로닝하였다. QuikChange®
- 부위-지정 돌연변이유발 키트 (Stratagene)를 사용하여 HA 유전자로 특정 변화를 도입함으로써 부위-지정 돌연변이유발을 수행하고, HA 서열을 서열분석하여 확인하였다. H1N1 바이러스의 HA 및 NA를 암호화하는 8개의 cDNA 플라스미드 및 저온 적응된 (ca) A/Ann Arbor/6/60 (MDV-A, A형 인플루엔자 바이러스를 위한 마스터 공여체 바이러스)의 6개의 내부 유전자 분절을 공동-배양된 293T 및 MDCK 세포로 공동-형질감염시켜 6:2 유전자재배열 백신 스트레인을 생성하였다. 제조에 사용되는 백신 스트레인을 전기천공에 의해 혈청-비함유 베로/CEK 세포에서 생성하였다. 바이러스를 10일 내지 11일된 날의 발육란의 요막 공간에서 증식시켰다. 구조된 (rescued) 바이러스의 HA 및 NA 서열을 vRNA로부터 증폭된 RT-PCR cDNA를 서열분석함으로써 입증하였다.
- [0183] **바이러스 적정:** 바이러스 역자를 형광 초점 검정으로 측정하고,  $\log_{10}$ FFU (형광 포커스 단위)/mL로 나타내었다 [참조: Forrest et al. (2008) *Clin Vaccine Immunol* 15:1042-1053]. 바이러스 플라크 형태를 전술된 바와 같이 플라크 검정으로 조사하였다 [참조: Jin et al., (2003) *Virology* 306, 18-24].
- [0184] **수용체-결합 검정:** 닭의 적혈구 (cRBC) (HEMA Resource and Supply, Inc.)를 이전에 기술된 바와 같이 탈시알화 (desialylated) 및 재시알화 (re-sialylated)시켰다. 100 μl의 10% cRBC를 50 μl 비브리오 콜레아 뉴라미디나제 (Sigma, St. Louis, MO)와 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하여 시알산을 제거하였다. 1 mL PBS로 3회 세척한 후, 세포를 1% 소 혈청 알부민 (BSA)를 포함하는 1 mL PBS 중에 재현탁시키고, 1.5시간 동안 37°C에서 2.5 μU의 α2,3(N)-시알릴트랜스퍼라제 (Calbiochem, La Jolla, CA) 또는 2 μU의 α2,6(N)-시알릴트랜스퍼라제

(Calbiochem, La Jolla, CA)와 1.5 mM CMP-SA (Sigma, St. Louis, MO)와 함께 인큐베이션하였다. 재시알화된 cRBC를 PBS로 3회 세척한 후 PBS 중에 0.5% (v/v)로 재현탁하였다. 혈구응집 검정 (HA)를 결합 활성을 위한 V-바닥 96 웰 미세역가 평판에서 수행하였다. 50  $\mu$ l의 2배 연속 희석된 바이러스를 60분 동안 실온에서 50  $\mu$ l의 0.5% cRBC,  $\alpha$ 2,3, 또는  $\alpha$ 2,6 재시알화된 cRBC와 함께 인큐베이션하였다. HA 역가를 RBC를 혈구응집시키는 최고 희석으로서 정의하였다.

[0185] **흰담비 연구:** 3개의 그룹에서 Simonson (Gilroy, CA)으로부터의 8 대지 10주령의 웅성 및 자성 흰담비를 사용하여 기도에서의 바이러스 복제 및 백신 면역원성에 대해 평가하였다. 흰담비를 각각 가두고 0.2 ml 용량당 7.0 log<sub>10</sub>FFU의 바이러스로 비내 접종하였다. 감염시킨 지 3일 후, 흰담비를 안락사시키고, 폐 및 코선반 (NT)를 수거하였다. 폐 및 NT에서의 바이러스 역가를 EID50 검정으로 측정하고 조직 g당 50% 난 감염 ( $\log_{10}$ EID50/g)으로 나타내었다. 면역원성 연구에 배정된 흰담비를 감염시킨 후 14일, 21일 및 28일에 체혈하고, 혈청의 항체 역가를 HAI로 검정하였다.

[0186] **HAI 검정에 의한 혈청 항체 검출:** 동종 및 이종 바이러스에 대한 감염 후 흰담비 혈청에서의 H1N1-특이적 항체 수준을 HAI 검정으로 측정하였다. 혈청학적 분석 이전에, 흰담비 혈청을 바이알 당 10 mL의 0.9 % NaCl로 재구성된 수용체-파괴 효소 (RDE) (Denka Seiken, Tokyo, Japan)로 처리하였다. 0.1 mL 혈청을 0.15 mL RDE와 혼합하고, 18시간 동안 37°C에서 인큐ベ이션한 후, 0.15 mL의 0.9 % 나트륨 시트레이트를 가해 최종 1:4 희석시키고, 45분 동안 56°C에서 인큐ベ이션하였다. 스트레인-특이적 혈청 HAI 역가를 0.5% tRBC를 사용하여 측정하고, HAI 역가를 혈구응집을 억제했던 최고 혈청 희석의 역수 값으로 나타낸다.

#### **결과**

##### **유전자재배열 후보 백신 스트레인의 생성**

[0189] wt A/CA/4/09로부터의 HA 및 NA 유전자 분절을 감염된 MDCK 세포 RNA로부터 클로닝하고 RT-PCR 증폭시켰다. 각각의 HA 또는 NA로부터의 총 12개 cDNA 클론이 뉴클레오타이드 서열 분석에 의해 동일한 것으로 밝혀졌다. wt A/CA/4/09의 이러한 HA 서열 및 NA 서열을 나타내는 플라스미드를 MDV-A의 6개의 내부 단백질 유전자 분절을 나타내는 플라스미드와 함께 293/MDCK 세포로 형질감염시켰으나, MDCK 세포 또는 난에서 어떠한 생존 유전자재배열 자손도 회수할 수 없었다. wt A/CA/4/09 난 분리물로부터 클로닝된 HA cDNA는 2개의 아미노산 위치에서 이질적이었다 (표 3). 분석된 12개 클론으로부터, 하기 변화가 관측되었다: 42% L191I, 50% Q223R, L191I과 Q223R 모두를 갖는 것 (8%). 이들 상이한 HA 서열을 나타내는 플라스미드를 합하고, MDV-A 내부 단백질 유전자와 함께 293/MDCK 세포로 형질감염시킨 후, 유전자재배열 바이러스를 즉시 구조하였다.

[0190] 222 또는 223의 잔기에서 아미노산 변화가 없었던 A/CA/7/09로부터 클로닝된 HA 플라스미드를 구조하여 자손 바이러스를 생성할 수 있었다. 이는 CA/7/09에서의 T197A 변화가 A/CA/7/09의 효과적인 구조에 책임이 있다는 것을 나타내었다. 다른 A/CA/7/09 클론은 D222G 또는 Q223R의 변화를 가졌으며, HA에서 D222G 또는 Q223R을 포함하는 바이러스도 구조되었다. A/CA/4/09의 HA와 A/CA/7/09의 HA 사이의 높은 정도의 유사성이 존재하고 이들 2개의 스트레인 사이에서 NA 서열이 동일하였으므로, A/CA/7/09로부터 유도된 변이체를 더욱 개발하였다.

## 표 3

신규한 H1N1 변이체의 HA 서열 및 바이러스 역가

바이러스	wt 바이러스 계대내력	하기 위치에서의 아미노산						난에서의 바이러스 역가* ( $\log_{10}$ FFU/ml± SE)
		H1#	191	197	222	223	% 클론	
		H3#	194	200	225	226		
	MDCK 2x	swt	L	T	D	Q	NA	NA
		변이체 1	L	T	D	Q	100	구조되지 않음
A/CA/04/09		변이체 2	I	T	D	Q	42	7.4 ± 0.09
	난 2x	변이체 3	L	T	D	R	50	7.8 ± 0.15
		변이체 7	I	T	D	R	8	7.8 ± 0.40
		swt	L	A	D/G	Q/R	NA	NA
		변이체 4	L	A	D	Q	45	7.8 ± 0.27
A/CA/07/09	난 2x	변이체 5	L	A	G	Q	34	7.4 ± 0.14
		변이체 6	L	A	D	R	21	7.7 ± 0.14

[0191]

\* 바이러스 역가는 적어도 3개의 바이러스 스톡으로부터의 평균 역가이다; NA: 적용불가

[0193]

## 닭의 발육란에서 성장이 우수한 백신 스트레인의 선별

[0194]

표 3에 나타난 바와 같이, 구조된 A/CA/4/09 및 A/CA/7/09 유전자재배열 백신은 닭의 발육란에서 7.4 내지 7.8  $\log_{10}$ FFU/ml의 역가로 복제하였으며, 이는 계절적 HN1 백신 스트레인보다 적어도 10배 낮았다. 또한, 구조된 A/CA/7/09 유전자재배열 백신 후보물은 MDCK 세포에서 매우 작은 플라크를 형성하였다. MDCK 세포 및 난에서 백신 바이러스 성장을 증진시키기 위해, A/CA/7/09 후보물 (V5 및 V6)을 4.0, 0.4 및 0.04의 moi로 MDCK 세포에서 2번 계대시킨 후, 상등액에 존재하는 바이러스를 플라크 검정으로 조사하였다. 모든 MDCK-계대된 바이러스가 모 바이러스보다 훨씬 큰 (2 내지 4 mm) 플라크를 포함하였다 (도 1). MDCK 계대된 V5 및 V6 백신으로부터의 12 개의 HA 유전자 분절을 서열분석하였다. 거대 플라크 형태 분리물 각각의 HA는 하기 위치 중 하나에서 단일 아미노산 변화를 가졌다: V5로부터 유도된 K119N 또는 K119E, K153E, K154E 및 V6로부터 유도된 A186D.

[0195]

또한, A/CA/7/09의 HA 서열을 돼지로부터 유래된 2개의 초기 H1N1 바이러스, A/swine/Iowa/1/1976 및 A/swine/1931, 및 최근의 인간 H1N1 바이러스, A/South Dakota/6/07 (A/SD/07)와 비교하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, K119, K153 및 K154는 돼지 H1N1 바이러스 간에서 고도로 보존된다. 또한, A/SD/6/07은 K119 및 K154 잔기를 포함하였다. 186에서의 아미노산은 도 2에 도시된 4개의 바이러스 사이에서 더욱 다양하다. 이전의 연구 [참조: Both et al. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6996-7000]는 G155E 변화가 난에서의 바이러스의 높은 성장에 책임이 있다는 것을 밝혔다. 이들 자료는 153 내지 155 영역에서 음전하의 E 잔기가 MDCK 세포 및 난에서 바이러스 복제에 바람직하다는 것을 나타낸다. A/NJ/76 바이러스에 대해 이전에 보고된 G155E 변화가 또한 난에서 A/CA/7/09의 바이러스 복제를 증진시킬 수 있는지를 조사하기 위해서, G155E를 V5 및 V6로 도입하였다. 또한, 큰 플라크에서 확인된 아미노산이 난에서 바이러스 성장 이점을 부여하는지를 확인하기 위해서, 확인된 돌연변이 각각을 HA에 도입하고, 유전자재배열 후보 스트레인을 구조하였다. 또한, V6에서 확인된 A186D 변화를 V5 및 V5-119E에 도입하였다. 마찬가지로, V5에서 확인된 19N 돌연변이를 V6 및 V6-186D에 도입하여 난에서의 바이러스 복제에 대한 단일 및 이중 아미노산 변화의 영향을 평가하였다. 마찬가지로, V5에서 확인된 119N 돌연변이를 V6 및 V6-186D에 도입하여 난에서의 바이러스 복제에 대한 단일 및 이중 아미노산 변화의 영향을 평가하였다. HA 서열 분석은 또한 A/CA/09 스트레인이 잔기 278에서 독특한 글리코실화 부위를 포함한다는 것을 밝혔다 (도 2). 이러한 부가적인 글리코실화 부위가 바이러스 성장에 영향을 끼치는지를 평가하기 위해서, T278K 변화를 각각 V5 및 V6에 도입하였다.

[0196]

구조된 바이러스를 난에서의 성장에 대해 조사하였다. 표 4에 나타난 바와 같이, 도입된 HA 돌연변이체를 포함하는 대부분의 변이체는 V5 및 V6보다 상당히 우수하게 성장하였다. V5-278K 및 V6-278K는 V5 및 V6와 유사한 7.6 및 7.7 Log<sub>10</sub>FFU/ml의 역가를 가졌다. 따라서, 278개의 글리코실화 부위의 제거는 난에서의 바이러스 역가에 최소한의 영향을 끼쳤다. 119, 186, 153, 154, 155 및 186 부위에서의 변화는 바이러스 역가를 0.2 내지 1.2 log<sub>10</sub>FFU/ml 증가시켰다. V5에서 조합된 119E와 186D의 변화는 119E 또는 186D 단독보다 약간 높은 역가를 나타내었다.

#### 표 4

MDCK 세포로부터 확인되고 역유전학에 의해 도입된 A/CA/07/09 HA 변이체. H1 HA의  
아미노산 잔기 번호가 2열에 나타나 있다; H3 HA의 상응하는 아미노산 잔기 번호는 3열에  
나타나 있다.

바이러스	아미노산 잔기 (H1# 및 H3#)								난에서의 바이러스 역가 (log <sub>10</sub> FFU/ ml ± SE)
	119	153	154	155	6	222	223	27	
	122	156	157	158	9	225	226	8	
V5	K	K	K	G	A	G	Q	T	7.4 ± 0.14
V6							R		7.7 ± 0.14
V5-119N	N					G			8.3 ± 0.06
V5-119E	E					G			8.3 ± 0.07
V5-153E		E				G			8.3 ± 0.05
V5-154E			E			G			8.6 ± 0.05
V6-186D					D		R		8.4 ± 0.06
V5-186D					D	G			8.3 ± 0.15
V5-119E/186D	E				D	G			8.5 ± 0.06
V6-119N	N						R		7.9 ± 0.20
V6-119N/186D	N				D		R		8.1 ± 0.09
V5-155E				E		G			8.4 ± 0.11
V5-278K						G		K	7.6 ± 0.19
V6-155E				E			R		8.4 ± 0.19
V6-278K						R	K		7.7 ± 0.27

[0197]

\* 바이러스 역가는 적어도 3개의 바이러스 스톡으로부터의 평균 역가이다.

#### [0199] 백신 변이체의 항원성 평가

H1 HA에 도입된 임의의 아미노산 변화가 바이러스 항원성에 영향을 끼치는지를 측정하기 위해, A/CA/7/09 변이체를 HAI 검정을 이용하여 상이한 감염 후의 흰담비 혈청으로 이들의 반응성을 평가하였다 (표 5). 저온 적응된 (ca) 바이러스인 223R 잔기를 갖는 A/CA/4/07 (V3), 222G 잔기를 갖는 A/CA/7/09 (V5) 및 223R 잔기를 갖는 A/CA/7/09 (V6)는 wt A/CA/4/09, ca A/CA/4/09 (V3), ca A/CA/7/09 (V5) 및 ca A/CA/7/09 (V6)로 면역화된 흰담비로부터의 4개의 참조 혈청과 유사하게 반응하였다. 위치 119 및 186에서 V5에 도입된 아미노산 변화를 갖는 변이체는 V5와 유사한 항원성을 가졌다. 그러나, 153, 154 및 155 위치에서 변화를 갖는 바이러스는 이들 혈청과 많이 낮은 반응성을 지녔고, 4배 초과의 역가 감소가 검출되었다. 따라서, 이들 자료는 잔기 153-154에서의 돌연변이가 백신 스트레인에 존재하지 않아야 한다는 것을 입증한다. 119 및 186 위치에서의 변화는 바이러스 항원성에 영향을 끼치지 않으면서 백신 스트레인에 도입될 수 있었다.

표 5

A/CA/7/09 HA 변이체의 항원성. HAI 검정을 칠면조 RBC로 수행하였다.

바이러스	감염 후의 흰담비 혈청			
	A/CA/4/09		ACA/7/09 222G (V5)	A/CA/7/09 223R (V6)
	A/CA/4/09 wt	ca 223R (V3)		
CA04 V3	8192	<b>1024</b>	2048	1024
CA07 V5	8192	1024	<b>1024</b>	1024
CA07 V6	4096	1024	1024	<b>512</b>
V5-119N	8192	512	2048	1024
V5-119E	4096	512	1024	512
V5-153E	256	<32	128	64
V5-154E	512	<32	128	128
V5-155E	256	<32	128	128
V5-186D	8192	1024	2048	1024
V5-278K	4096	512	1024	512
V5-119E/186D	8192	1024	2048	1024

[0201]

A/CA/7/09 백신 후보물은 약독화되나 흰담비에서 면역원성이다.

[0202]

A/CA/7/09 백신 변이체를 이들의 약독화된 표현형 및 항체 반응을 유도할 능력에 대해 평가하기 위해, 흰담비에 0.2 ml의 용량 용적으로  $7.0 \log_{10}$ FFU의 바이러스를 비내 접종하고, 흰담비의 상부 기도 및 하부 기도에서의 바이러스 복제를 EID<sub>50</sub> 검정으로 측정하였다. 표 6에 나타난 바와 같이, 모든 A/CA/7/09 변이체는 NT 조직에서 효과적으로 복제하였으나, 폐에서는 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다. 이들 자료는 이들 바이러스가 흰담비에서 약독화되고 특징적인 표현형이 MDV-A의 6개의 내부 단백질 유전자 분절에 의해 부여된다는 것을 확인시켰다.

[0203]

흰담비의 감염 후의 혈청을 비내 접종 후 14일에 수집하고, 항체 역가를 HAI 검정으로 평가하였다 (표 6). 모든 V5 변이체가 매우 면역원성이었으며, H1N1-특이적 항체 반응을 유도하였으며, HAI 역가는 256 내지 1024의 범위였다. 또한, 수개의 V6 변이체를 이들의 면역원성에 대해 평가하였으며, V5보다 덜 면역원성인 것으로 밝혀졌다 (자료 제시되지 않음). 잔기 119 및 186에서 돌연변이를 갖는 변이체는 wt 바이러스와 유사한 항원성을 유지하였으며, 154E 및 155E 변이체와 반응하지 않았다. 154E 및 155E 변이체 감염된 흰담비 혈청으로 감염된 흰담비로부터의 혈청은 wt 바이러스, V5, 및 119E 및 186D 변화를 갖는 V5 변이체와 잘 반응하지 않았다; 이들의 역가 차이는 2배 이내였다. V5-154E 및 155E 감염 후의 흰담비 혈청은 다른 변이체보다 4배 초과로 높은 상동 HAI 역가를 가졌다. 흥미롭게도, 186D에서의 돌연변이는 154E 및 155E 변이체와의 반응성에 있어 큰 감소를 보였다. 이들 자료는 A/CA/07/09 (H1N1)의 119 및 186 HA 변이체가 바이러스 항원성 또는 면역원성을 변경시키지 않으면서 난에서 높은 성장을 부여함으로써 이들을 돼지-기원 H1N1 바이러스에 대한 잠재력이 있는 백신 후보물이 된다는 것을 입증한다.

## 표 6

흰담비의 기도에서 A/CA/7/09 HA 변이체의 복제 및 이들의 면역원성.  
감염 후 14일에 흰담비 혈청을 수집하고 칠면조 RBC로 HAI 검정을 수행하였다.

바이러스	바이러스 역가 ( $\log_{10}$ EID <sub>50</sub> /g ± SE)			HAI 항체의 지시된 항원에 대한 GMT					
	NT	lung	V5	119E	119N	186D	186D	154E	155E
V5	4.0 ± 0.23	<1.5	<u>512</u>	406	406	323	323	64	256
V5-119E	4.2 ± 0.33	<1.5	813	<u>645</u>	645	323	406	64	256
V5-119N	4.5 ± 0.33	<1.5	256	203	<u>256</u>	256	323	64	161
V5-186D	4.9 ± 0.20	<1.5	813	645	645	<u>645</u>	645	128	256
V5-									
119E/186D	4.7 ± 0.29	<1.5	512	406	512	512	<u>645</u>	64	256
V5-154E	5.7 ± 0.29	<1.5	161	323	323	64	81	<u>512</u>	1024
V5-155E	5.0 ± 0.20	<1.5	128	203	161	51	64	203	<u>1024</u>
A/CA/7/09	NA	NA	512	512	645	645	406	102	<u>323</u>
wt									

[0205]

## A/CA/7/09 변이체의 수용체 결합 특이성

[0206]

난에서 야생형 A/CA/4/09 및 A/CA/7/09 바이러스의 성장으로 HA 수용체 결합 부위, D222G 및 Q223R에서 아미노산 변화가 초래되었다. 이들 위치는 난 계대 후 다른 H1N1 스트레이인에서 이전에 확인되었으며, HA 수용체 결합 특이성에 책임이 있다. 백신 바이러스 변이체가 상이한 수용체 결합 특이성을 갖는지를 결정하기 위해서, V5, V6 및 V5-119 및 V5-186 변이체를 RBC 결합 검정으로 이들의 수용체 결합 특이성에 대해 평가하였다 (표 7). V4 (222 및 223 변화 없음)는 a2-3 SA보다 a2-6 SA에 대해 결합하는 것을 선호하였다. V5 (D222G)는 a2-3 및 a2-6 SA 쟈시알화된 RBC에 동일하게 잘 결합하였다. 그러나, V6 (Q223R)은 a2-3 SA 쟈시알화된 RBC에만 결합할 수 있었으며, 이들 2개의 잔기가 바이러스 수용체 결합 특이성에 영향을 끼친다는 것을 확증한다. V5-119E/N 및 V5-186D 바이러스는 V5와 유사한 결합 특이성을 가졌다. 이중 HA 돌연변이체 V5-119E/186D는 a2-3 SA보다 a2-6 SA에 대한 결합을 선호하였다. V6에 도입된 119E 및 186D 잔기는 a2-6 SA에 대한 결합을 회복할 수 없었다 (자료 제시되지 않음). 따라서, 119 및 185 잔기에서의 변화는 바이러스 수용체 결합 특이성에 유의하게 영향을 끼치지 않는다.

표 7

## A/CA/07/09 백신 변이체의 수용체 결합 특이성

바이러스	비처리	$\alpha$ 2,3-SA	$\alpha$ 2,6-SA	탈시알화
V4	128	16	128	<2
V5	512	64	64	<2
V6	512	512	<2	<2
V5-119N	512	64	64	<2
V5-119E	512	128	128	<2
V5-186D	512	32	64	<2
V5-119E/186D	512	16	64	<2

[0208]

## A/CA/7/09 유전자재배열의 단백질 조성

감염된 난으로부터 수거된 13 ml의 요막액을 2 ml의 30% 수크로즈 쿠션을 통해 25k rpm에서 1시간 동안 펠렛화 시켰다. 바이러스 펠렛을 0.2 ml PBS에 재현탁시켰다. 5 ul 바이러스 혼탁물을 4 내지 20% 폴리아크릴아미드 겔 상에 로딩하고, 코마시 블루로 염색하였다. 샘플의 순서는 하기와 같았다:

[0211]

도 3A

[0212]

례인 1. 재조합 HA A/NC/20/99 0.5 ug

[0213]

례인 2. 재조합 HA A/NC/20/99 2 ug

[0214]

례인 3. MDVA-V5-119E/186D (FFA 8.6)

[0215]

례인 4. MDVA-V6 (FFA 7.9)

[0216]

례인 5. MDVA-V6-186D (FFA 8.1)

[0217]

례인 6. PR8-V5-119E/186D (FFA 8.2)

[0218]

례인 7. PR8-V6 (FFA 7.8)

[0219]

례인 8. PR8-V6-186D (FFA 8.5)

[0220]

례인 9. NYMC X-179A (FFA 8.5)

[0221]

례인 10. PR8 South Dakota (FFA 8.7)

[0222]

도 3B

[0223]

례인 1. NYMC X-179A (FFA 8.5)

[0224]

례인 2. MDVA-V5-119E/186D (FFA 8.6)

[0225]

례인 3. MDVA-V5-119E/186D/PA-S395N (FFA8.9)

[0226]

례인 4. South Dakota (FFA 8.7)

[0227]

FFA 및 피크 역가 값을 표준 방법을 이용하여 측정하였다. 명칭에 "MDVA"를 갖는 유전자재배열 바이러스는 A/Ann Arbor/6/60의 6개의 내부 계놈 분절을 포함한다. 명칭에 "pR8"을 갖는 유전자재배열 바이러스는 PR8의 6개의 내부 계놈 분절을 포함한다.

[0228]

## A/California/7/09 변이체의 HA 단백질 수율 비교

[0229]

PR8로부터의 6개의 내부 계놈 분절 및 A/CA/7/09로부터의 HA 및 NA 계놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 인플루엔자 바이러스가 생성되었다. PR8로부터의 6개의 내부 계놈 분절, A/CA/7/09로부터의 NA 계놈 분절 및 본원

에 기술된 H1 HA 변이체 폴리펩타이드를 암호화하는 HA 게놈 분절을 포함하는 추가의 6:2 유전자재배열 바이러스가 생성되었다. A/Texas/5/2009 RG15 (A/TX/7/09 RG15) 및 A/California/07/09 NYMC X179A와 함께 상이한 A/CA/7/09 HA 변이체를 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스가 닭의 발육란에서 증대되었으며, 이들의 피크 역가를 FFA로 측정하였다. 검정된 바이러스 스트레인이 표 8에 나타나 있다. 6:2 PR8-South Dakota는 PR8으로부터의 6개의 내부 게놈 분절 및 A/South Dakota/6/07로부터의 HA 및 NA 게놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스이다. 6:2AA-V5-119E/186D는 A/Ann Arbor/6/60로부터의 6개의 내부 게놈 분절, A/CA/7/09로부터의 NA 게놈 분절 및 V5-119E/186D 변이체 HA 게놈 분절을 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스이다. 본원에 기술된 H1 HA 변이체 게놈 분절을 포함하는 PR8 유전자재배열 바이러스는 TIV 제조에 이용 가능한 최고의 수율 스트레인인 X179A에 필적하는 역가를 가졌다.

#### 표 8

발육란에서 6:1 유전자재배열 H1N1 바이러스의 피크 역가

바이러스	피크 역가 ( $\log_{10}$ FFU/ml)
6:2 PR8-V6	8.1
6:2 PR8-V6-186D	8.5
6:2 PR8-V5-119E/186D	8.6
A/CA/7/09 X179A.	8.5
A/TX/7/09 RG15	6.6
6:2AA-V5-119E/186D	8.6
6:2 PR8-South Dakota	9.2

[0230]

[0231] 피크 역가 측정에 추가하여, 본 발명자들은 또한 표 8에 열거된 유전자재배열 바이러스 중 일부의 HA 단백질 수율을 측정하였다. 선별된 바이러스를 각각  $10^3$  FFU/난의 MOI로 50개의 난을 감염시켜 증폭시켰다. 바이러스를 33°C에서 62시간 동안 인큐베이션한 후 수거하였다. 이어서, 동일량의 요막액 (250 ml)을 수크로즈 구배로 정제하였다. 바이러스 단백질을 SDS PAGE에 이어 코마시 블루 염색하여 분석하였다.

[0232]

상기 결과의 대표적인 샘플이 도 4에 나타나 있다. 도 4A에 나타나 있는 바와 같이, X179A, 6:2 PR8-V6-186D 및 6:2AA-V5-119E/186D의 총 단백질 수율은 각각 460, 300, 및 350 ug이었다. 비록 6:2 AA-V5-119E/186D가 A/CA/7/09 X179A보다 낮은 총 단백질 수율을 가졌지만, 6:2 AA-V5-119E/186D는 최고의 HA 단백질 수율을 가졌다. 이 실험에서 6:2AA-V5-119E/186D에 대해 관측된 낮은 총 단백질 수율은 검정 차이에 기인한 듯하였다. 도 4B에 나타난 바와 같이, 6:2 PR8-V5-119E/186D 및 X179A의 총 단백질 수율은 각각 780 및 720 ug이었다. 또한, 6:2 PR8-V5-119E/186D의 HA 단백질 수율은 A/CA/7/09 X179A의 것보다 높았다.

[0233]

PR8 골격 및 변이체 A/California/7/09 H1 폴리펩타이드를 포함하는 유전자재배열 바이러스

[0234]

PR8로부터의 6개의 내부 게놈 분절, A/CA/7/09 H1 HA 게놈 분절의 변이체 및 A/CA/7/09 NA 게놈 분절을 포함하는 추가의 6:2 유전자재배열 인플루엔자 바이러스를 생성하였다. H1 HA 아미노산 차이가 표 9에 요약되어 있다.

## 표 9

변이체 A/CA/7/09 H1 HA 및 PR8 골격을 포함하는 유전자재배열 바이러스

바이러스 (HA)	H1 HA 잔기 #						항원성
	1119	1186	119 0	2222	2223	227 3	
PR8-A (V6-186D)	K	D	R	D	R	H	변화 없음
PR8-B (V5-119E/186D/190R)	E	D	S	G	Q	H	감소
PR8-C (V6-186D/273Y)	K	D	R	D	R	Y	변화 없음
PR8-D (V5-119E/186D)	E	D	R	G	Q	H	변화 없음

[0235]

[0236] 시험된 변이체 HA 중에서 V5-119E/186D/190R에서의 변화만이 항원성을 감소시켰다 (표 9). 상이한 A/CA/7/09 HA 변이체를 포함하는 6:2 유전자재배열 바이러스를 닦의 발육란에서 증대시켜 HA 단백질 수율을 측정하였다. 33°C에서 48시간 (도 5A) 또는 60시간 (도 5B) 동안 인큐베이션한 후 바이러스를 수거하였다. 이어서, 수크로즈 구배 침강으로 바이러스를 정제하였다. 정제된 바이러스의 단백질 조성을 SDS-PAGE에 이어 코마시 블루 염색하여 분석하였다. 각각의 레인에 동일량의 정제된 바이러스 (도 5A) 또는 동일 용적의 수거된 요막액으로부터 정제된 바이러스 (도 5B)를 포함하는 샘플을 로딩하였다. AA-V5-ED (V5-119E/186D 변이체 HA 및 A/Ann Arbor/6/60 골격을 포함) 및 X179A로부터 제조된 샘플을 대조군으로 포함하였다. PR8-C 바이러스는 X179A보다 높은 수율로 HA 폴리펩타이드를 생성하였다.

[0237]

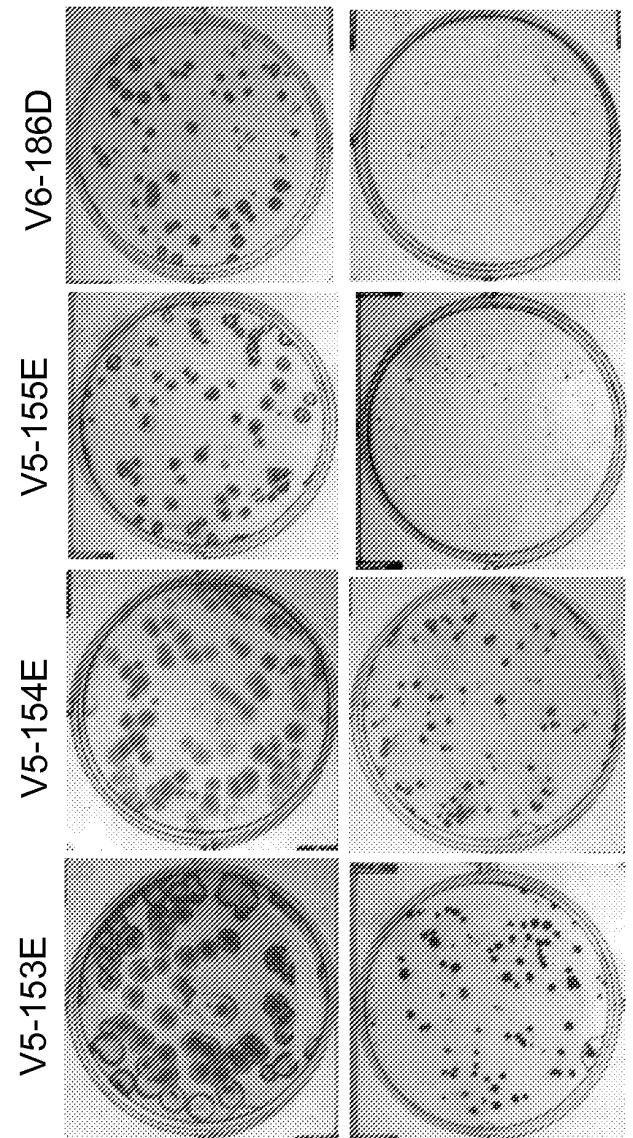
또한, X179A의 HA 수율과 비교한 PR8-C 및 AA-V5-ED의 HA 수율을 SDS-PAGE에 이어 코마시 블루 염색으로 측정하였다. 다양한 용적 (10, 7.5, 5 및 2.5 마이크로리터)의 R8-C 및 AA-V5-ED 샘플 및 10 마이크로리터의 X179A 샘플을 SDS-PAGE로 분석하였다. 각각의 샘플에서 발견된 HA1 단백질의 상대적 양을 이미지 분석 소프트웨어로 측정하였다. 측정 결과가 도 6에 도시되어 있다. AA-V5-ED 및 PR8-C 바이러스는 HA 단백질을 X179A보다 1 내지 1.5배 많이 생성한다.

[0238]

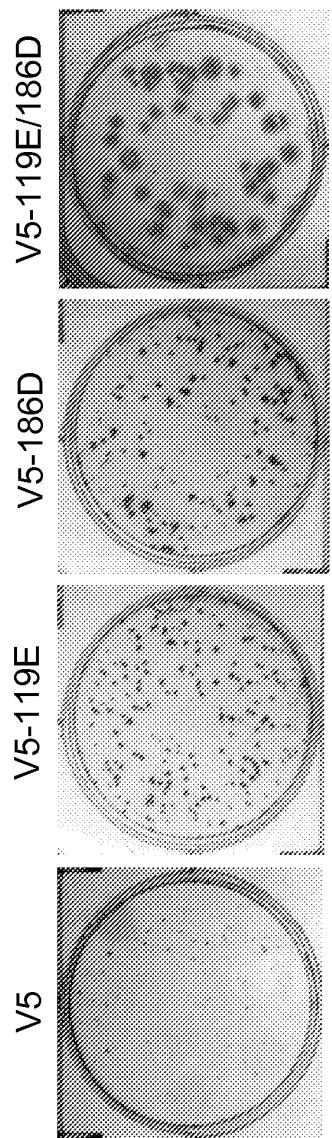
상기한 기술은 본 발명을 명료하게 하고 이해시키기 위해 다소 상세히 기술하였으나, 당업자라면 이러한 설명으로부터 본 발명의 진정한 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세목에서 다양한 변화를 가할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 상술된 모든 기술 및 기구들은 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 본원에서 인용되는 모든 공개문, 특히, 특허원 또는 기타 문헌들은 마치 이들 각각이 모든 목적으로 참조로 포함되는 것과 같이 동일한 정도로 모든 목적으로 전부 참조로 포함된다. 특히, 하기 특허원은 모든 목적으로 전부 참조로 포함된다: 미국 출원 번호 제61/220,426호 (2009년 6월 25일 출원), 제61/227,986호 (2009년 6월 23일 출원) 및 제61/234,021호 (2009년 8월 14일).

도면

도면 1a



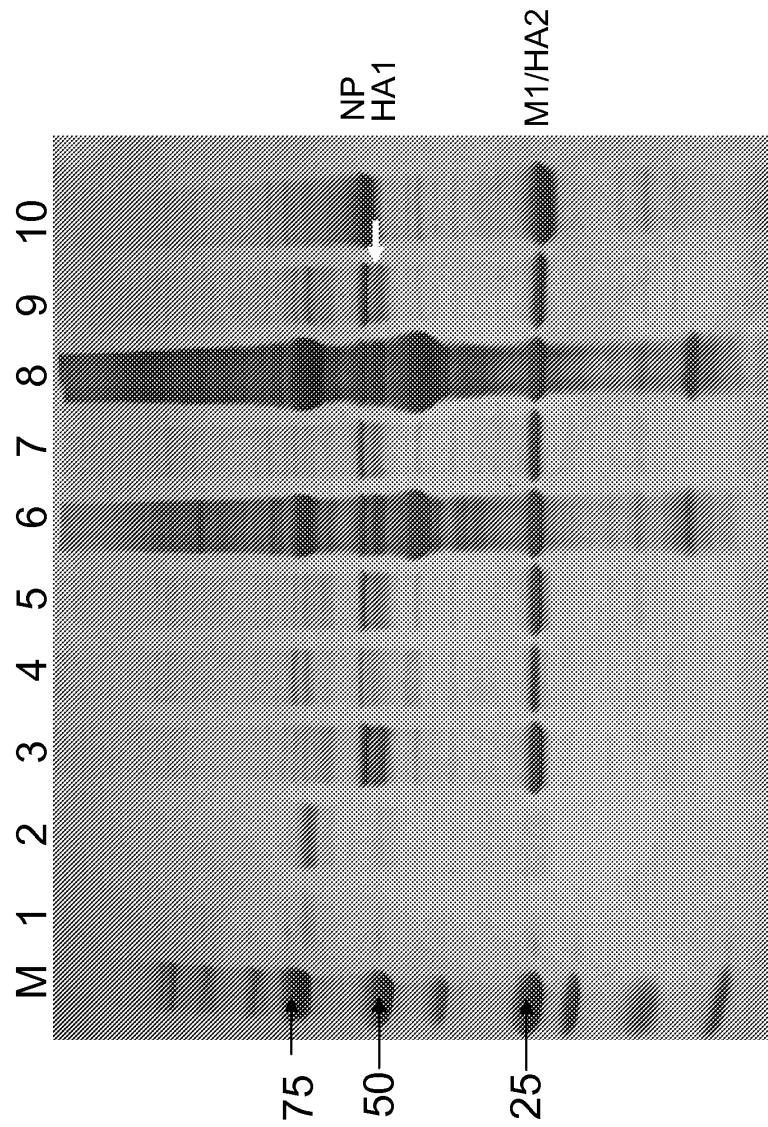
도면1b



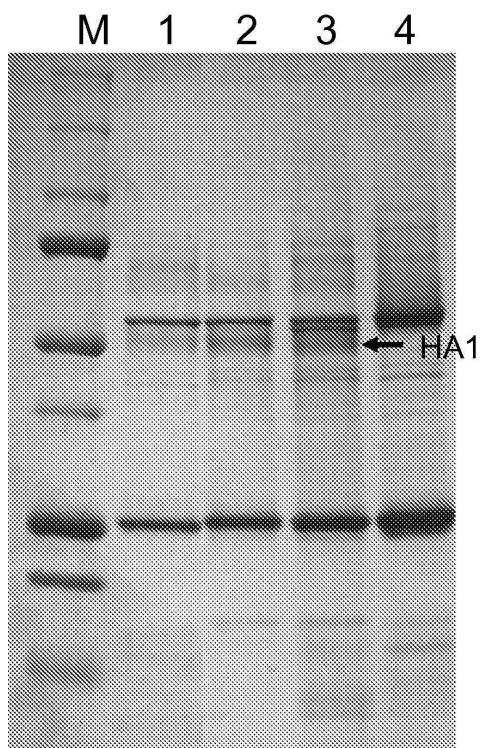
도면2

A/California/7/09 A/swine/Iowa/1/76 A/Swine/31 A/South Dakota/6/07	1 DTICIGYHAN NSTDTVDTIVL EKNTVTVTHSV NLEDKHNGK ICKLURGVAPI DTICIGYHAN NSTDTVDTIL EKNTVTVTHSV NLEDRHNGK ICKLUGGIAPL DTICIGYHAN NSTDTVDTIVL EKNTVTVTHSV NLEDSHNGK ICRLGGIAPL DTICIGYHAN NSTDTVDTIVL EKNTVTVTHSV NLENSHNGR ICLLRGIAPL	50
	51 HLGKCNIAGW ILGNPECESL STASSWSYIV ETPSSDNGTC YPGDFIDYEE HLGKCNIAGW LLGNPECELL FTWSWSYIV ETSNSDNGTC YPGDFIDYEE QLGKCNIAGW LLGNPECDLL LTWSWSYIV ETSNSDNGTC YPGDFIDYEE QLGNCSTAGW LLGNPECELL ISKESWSYIV EKPNPENGTC YPGHFDADEE	100
A/California/7/09 A/swine/Iowa/1/76 A/Swine/31 A/South Dakota/6/07	101 LREQLSSVSS FERFEIFPKT SSWPNHDSNK GTAAACPAG AKSFYRNLIW LREQLSSVSS FEKFELIFPKT SSWPNHETNR GTAAACPAG ANSFYRNLIW LREQLSSVSS FEKFELIFPKT SSWPNHETTR GTAAACPAG ASSEFYNLIW LREQLSSVSS LERFEIFPKE SSWPNHTVT. GVSASCSHNG ESSFYNLIW	150
	119 153-155 LVRKGNSYPK LSKSYYNDKG KEVLVWGIH HPSTSADQGS LYQNADAYVF LVRKGNSYPK LSKSYYNNKG KEVLVWGIH HPPTSTDQGS LYQNADAYVF LVRKGNSYPK LSKSYYNNKG KEVLVWGVH HPPTSTDQGS LYQNADAYVS LVRKGNSYLPN LSKSYYANKE KEVLVWGVH HPPNIGNOKA LYHTENAYVS	186 200
A/California/7/09 A/swine/Iowa/1/76 A/Swine/31 A/South Dakota/6/07	201 VGSSRYSKKF KPEIAIRPKV RXXEGRMNYY WTLVEPGDKI TFEATGNLV VGTSKYNRKF KPEIAARPKV RGQAGRMNYY WTLIESGDTI TFEATGNLV VGSSKYDRRF TPEIAARPKV RGQAGRMNYY WILLEPGDTI TFEATGNLV VGSSHYSRKF TPEIAKRPKV RDQEGRINYY WTLIEPGDTI IFEANGNLIA	250
	251 PRYAFAMERN AGSGIIISDT PVHDCNTTCQ TPKGAINTSL PFONIHPITI PRYAFAMNRG FGSGIIISDA PVHDCNTIKCQ TPKGAINTSL PFONIHPVTI PRYAFALNRG SESGIIISDA PVHDCDTKCQ TPHGAINSSL PFQNIHPVTI PRYAFALSRG FGSGIIINSNA PMDKDAKCCQ TPQGAINSSL PFQNVHPVTI	278 300
A/California/7/09 A/swine/Iowa/1/76 A/Swine/31 A/South Dakota/6/07	301 GKCPKVKST KLRLATGLRN IPSIQR GCKCPKVKST KLRMATGLRN IPSIQR GCKCPKVKST KLRMVTGLRN IPSIQR GCKCPKVKSTA KLRMVTGLRN IPSIQR	

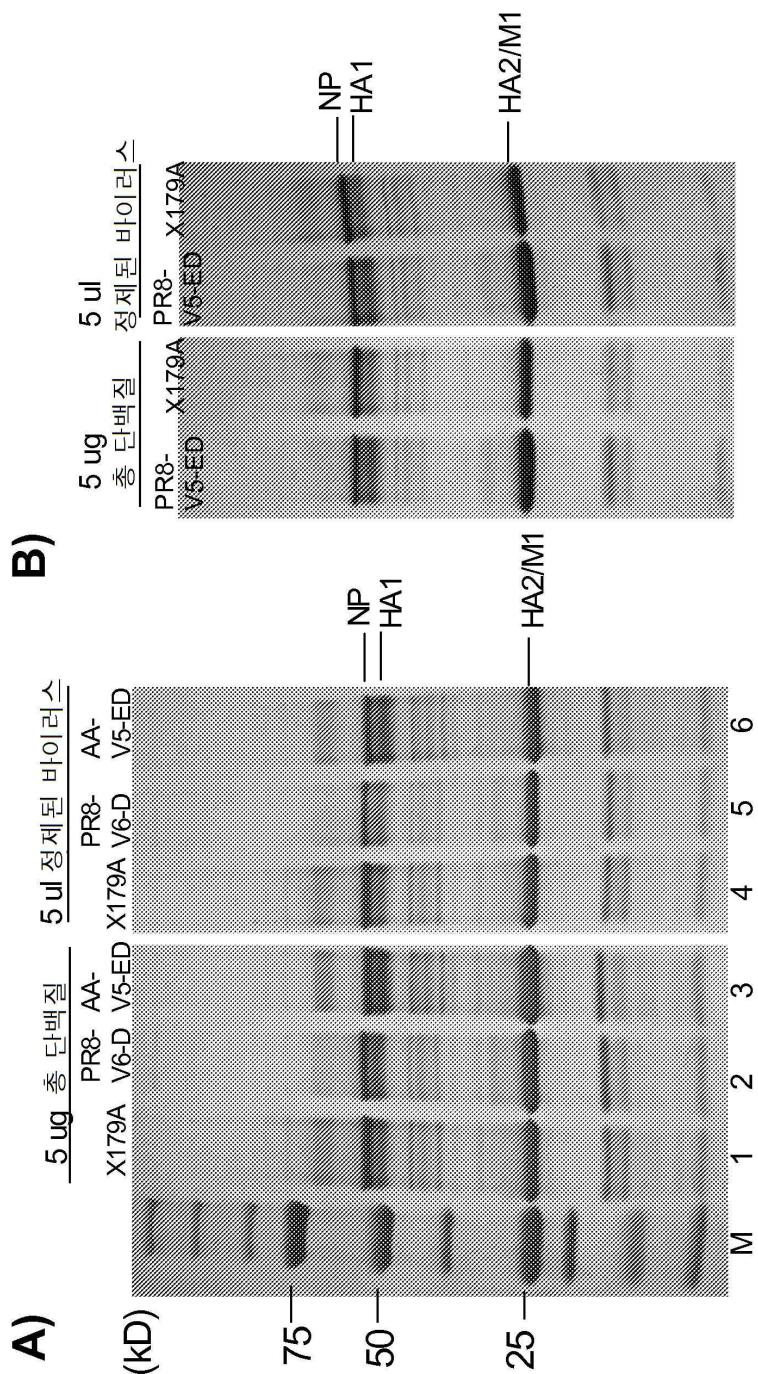
도면3a



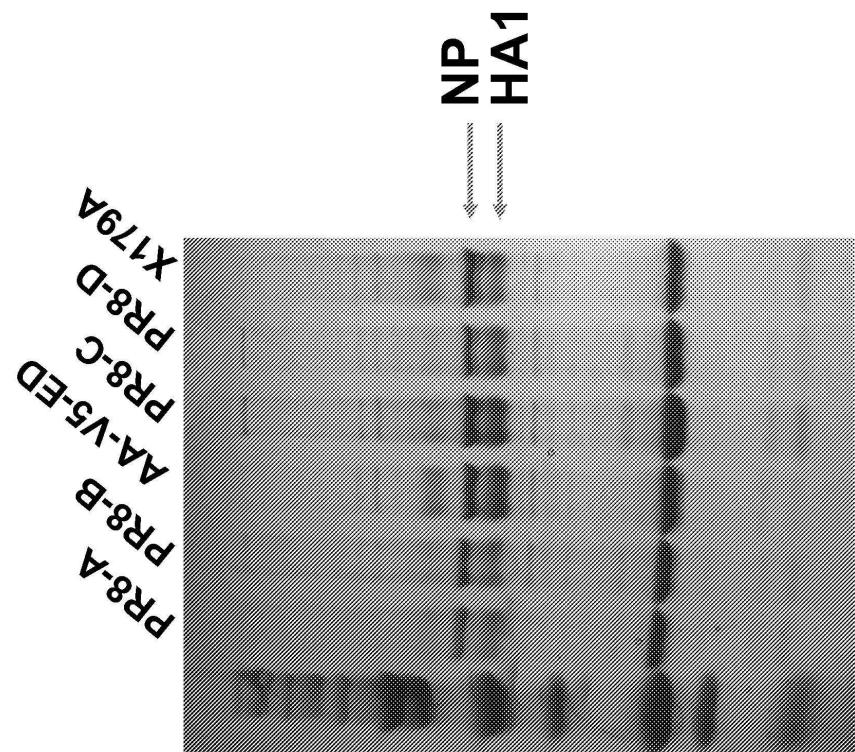
도면3b



## 도면4

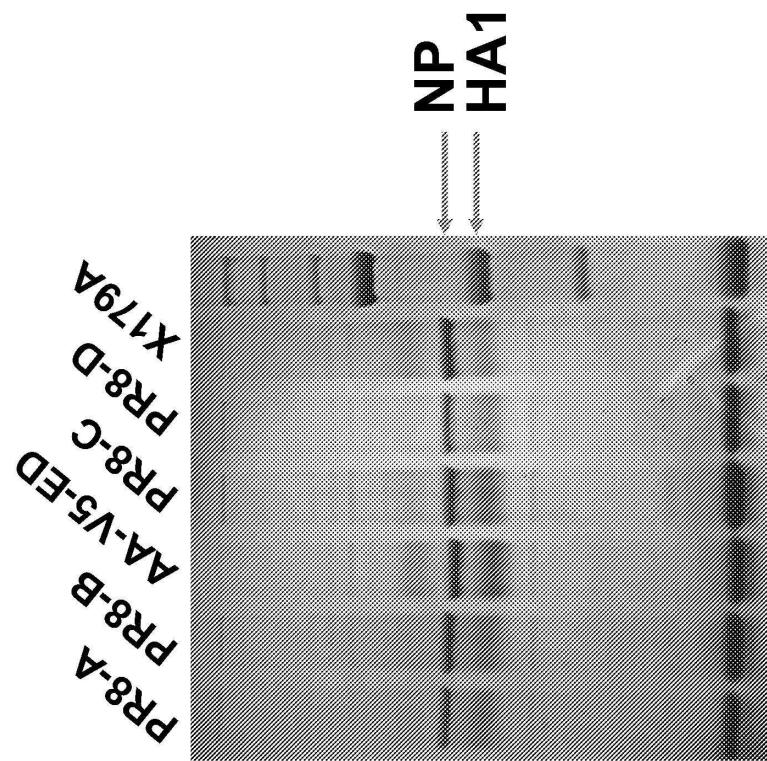


도면5a



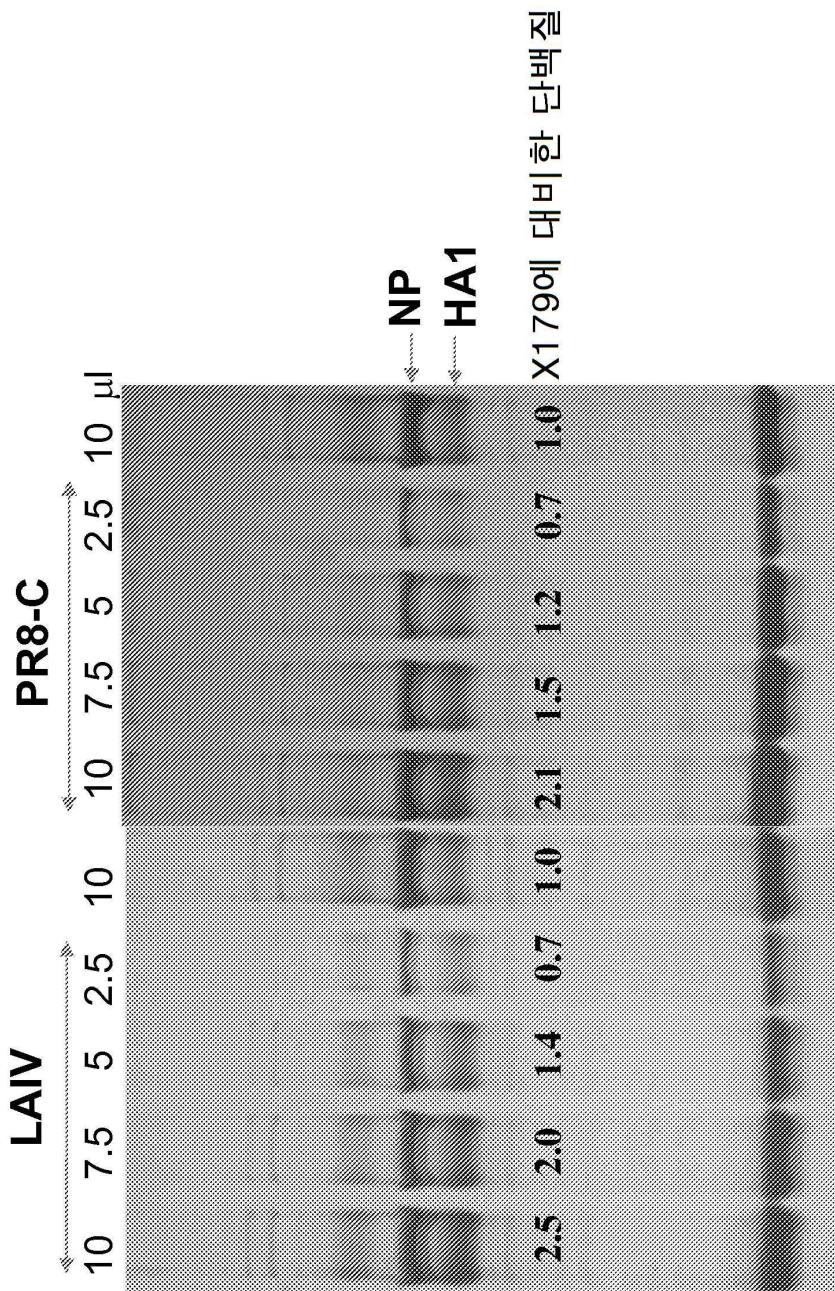
- 수거: 48시간
- $5\mu\text{g}$  전체 바이러스
- 4-20% 겔
- 코마시 염색

도면5b



- 수거: 60시간
- 동일 용적
- **10%** 젤
- 코마시 염색

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Jin, Hong

<120> Swine Influenza Hemagglutinin Variants

<130> FL265PCT/MED0459.PCT

<140> PCT/US2010/039826

<141> 2010-06-24

<150> 61/258,890

<151> 2009-11-06  
 <150> 61/234,021  
 <151> 2009-08-14  
 <150> 61/227,986  
 <151> 2009-07-23  
 <150> 61/220,426  
 <151> 2009-06-25  
 <160> 9  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 549  
 <212> PRT  
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 1  
 Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val

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

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

385	390	395	400
Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu			
405	410	415	
Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu			
420	425	430	
Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys			
435	440	445	
Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys			
450	455	460	
Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val Lys			
465	470	475	480
Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu Asn			
485	490	495	
Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr Gln			
500	505	510	
Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val Val			
515	520	525	
Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln			
530	535	540	
Cys Arg Ile Cys Ile			
545			
<210> 2			
<211> 1777			
<212> DNA			
<213> Haemophilus influenzae			
<400> 2			
agcaaaaagca gggaaaaaca aaagcaacaa aatgaaggc aatactatgt gttctgttat			60
atacatttgc aaccgcaaat gcagacacat tatgtatagg ttatcatgct aacaattcaa			120
cagacactgt agacacatgt ctagaaaaga atgtaacatgt aacacactct gttaaccttc			180
tagaagacaa gcataacggg aaactatgca aactaaggagg ggttagccca ttgcatttg			240
gttaatgtaa cattgctggc tggatcctgg gaaatccaga gtgtgaatca ctctccacag			300
caagctcatg gtcctacatt gtggaaacac ctagttcaga caatggaaacg tgttacccag			360

gagattcat cgattatgag gagctaagag agcaatttag ctcaagtgtca tcatttgaaa 420  
 ggtttagat attcccaag acaagttcat ggcccaatca tgactcgaac aaagggtgtaa 480  
 cggcagcatg tcctcatgct ggagcaaaaa gcttctacaa aaatttaata tggctagtt 540  
 aaaaaggaaa ttcataccctt aagctcagca aatcctacat taatgataaa gggaaagaag 600

tcctcggtct atggggcatt caccatccat ctactagtgc tgaccaacaa agtctctatc 660  
 agaatgcaga tgcataatgtt ttgtgggt catcaagata cagcaagaag ttcaagccgg 720  
 aaatagcaat aagacccaaa gtgaggggtc aagaaggag aatgaactat tactggcac 780  
 tagtagagcc gggagacaaa ataacattcg aagcaactgg aaatctagt gtaccgagat 840  
 atgcattcgc aatgaaaga aatgctggat ctggtattat cattcagat acaccgtcc 900  
 acgattgcaa tacaacttgt caaacacccaa agggtgctat aaacaccagc ctccatttc 960  
 agaatataca tccgatcaca attggaaaat gtccaaaata tgtaaaaage acaaaattga 1020

gactggccac aggattgagg aatatcccgt ctattcaatc tagaggccta tttggggcca 1080  
 ttgccgttt cattgaaggg ggggtggacag ggtatggata tggatggtac gtttatcacc 1140  
 atcaaaatga gcaggggtca ggatatgcag ccgacctgaa gggcacacag aatgccattg 1200  
 acgagattac taacaaagta aattctgtt ttgaaaagat gaatacacag ttcacacgc 1260  
 taggtaaaga gttcaaccac ctggaaaaaa gaatagagaa tttaataaa aaagttgatg 1320  
 atggtttctt ggacatttg acttacaatg ccgaactgtt ggttctattt gaaaatgaaa 1380  
 gaaccttgga ctaccacgt tcaaatgtga agaacttata tggaaaaggta agaagccagc 1440

taaaaaacaatgccaaggaa attggaaacg gctgcttta atttaccac aaatgcata 1500  
 acacgtgcat gggaaagtgtc aaaaatggaa cttatgacta cccaaaatac tcagaggaag 1560  
 caaaaataaa cagagaagaa atagatgggg taaagctgga atcaacaagg atttaccaga 1620  
 ttttggcgtt ctattcaact gtcggcagtt cattggtaact ggtatctcc ctggggccaa 1680  
 tcagtttctg gatgtgctct aatgggtctc tacagtgtag aatatgtatt taacattagg 1740  
 atttcagaag catgagaaaaa acacccttgtt ttctact 1777

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1777

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haemophilus influenzae

&lt;400&gt; 3

agcaaaaagca gggaaaaaca aaagcaacaa aatgaaggc aatactagta gttctgttat 60  
 atacatttgc aaccgcaaat gcagacacat tatgtatagg ttatcatgct aacaattcaa 120

cagacactgt agacacagta ctagaaaaga atgtaacagt aacacactct gttAACCTTC	180
tagaaGACAAC gcataacggg aaactatgcA aactaAGAGG ggtAGCCCC TTGCAATTGG	240
gtAAATGTAAC CATTGCTGGC TGGATCCTGG GAAATCCAGA GTGTGAATCA CTCTCCACAG	300
caAGCTCATG GTCCTACATT GTGAAACAC CTAGTCAGA CAATGGAACG TGTACCCAG	360
gAGATTCTAT CGATTATGAG GAGCTAAGAG AGCAATTGAG CTCAGTGTCA TCATTGAAA	420
ggtttGAGAT ATTCCCCGAG ACAAGTTCTAT GGCCCAATCA TGACTCGAAC AAAGGTGTAAC	480
CGGCAGCATG TCCTCATGCT GGAGCAAAAA GCTTCTACAA AAATTAAATA TGGCTAGTTA	540
AAAAAGGAAA TTCATACCCA AAGCTCAGCA AACCTCACAT TAATGATAAA GGGAAAGAAG	600
TCTCTGCT ATGGGGCATT CACCATCCAT CTACTAGTGA TGACCAACAA AGTCCTATC	660
AGAAATGCAGA TGCATATGTT TTGTTGGGT CATCAAGATA CAGCAAGAAG TTCAAGCCGG	720
AAATAGCAAT AAGACCCAAA GTGAGGGTC AAGAAGGGAG AATGAACAT TACTGGACAC	780
TAGTAGAGCC GGGAGACAAA ATAACATTG AAGCAACTGG AAATCTAGT GTACCGAGAT	840
ATGCATTGCG AATGAAAGA AATGCTGGAT CTGGTATTAT CATTCAAGAT ACACCAGTC	900
ACGATTGCAA TACAACCTGT CAAACACCA AGGGTCTAT AACACCCAGC CTCCCATTC	960
AGAAATATACA TCCGATCACA ATTGGAAAAT GTCCAAAATA TGAAAAAGC ACAAAATTGA	1020
GACTGGCCAC AGGATTGAGG AATATCCGT CTATTCAATC TAGAGGCCA TTTGGGGCCA	1080
TTGCCGTTT CATTGAAGGG GGGTGGACAG GGATGGTGA TGATGGTAC GTTATCACC	1140
ATCAAATGA GCAGGGTCA GGATATGCAG CCACCTGAA GAGCACACAG AATGCCATTG	1200
ACGAGATTAC TAACAAAGTA AATTCTGTTA TTGAAAAGAT GAATACACAG TTCACAGCAG	1260
TAGGTTAAAGA GTTCAACCAC CTGGAAAAAA GAATAGAGAA TTAAATAAA AAAGTTGATG	1320
ATGGTTTCTT GGACATTGG ACTTACAATG CGAACTGTT GGTCTATTG GAAAATGAAA	1380
GAACCTTGGA CTACCACGAT TCAAATGTGA AGAACTTATA TGAAAAGGTAGA AGAAGCCAGC	1440
TAACAAACAA TGCCAAGGAA ATTGGAAACG GCTGCTTGA ATTTCACCAAC AATGCGATA	1500
ACACGTGCAAT GGGAAAGTGTCA AAAATGGGA CCTATGACTA CCCAAATAC TCAGAGGAAG	1560
CAAAATTAAACAGAGAAAGA ATAGATGGGG TAAAGCTGGA ATCAACAAAGG ATTACCAAGA	1620
TTTGGCGAT CTATTCAACT GTGCCAGTT CATTGGTACT GGTAGTCTCC CTGGGGCAA	1680
TCAGTTCTG GATGTGCTC AATGGGTCTC TACAGTGTAG AATATGTATT TAACATTAGG	1740
ATTCAGAAAG CATGAGAAAAA ACACCCCTGT TTCTACT	1777
<210> 4	
<211> 469	
<212> PRT	

&lt;213&gt; Haemophilus influenzae

&lt;400&gt; 4

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

1 5 10 15

Ile Gly Met Ala Asn Leu Ile Leu Gln Ile Gly Asn Ile Ile Ser Ile

20 25 30

Trp Ile Ser His Ser Ile Gln Leu Gly Asn Gln Asn Gln Ile Glu Thr

35 40 45

Cys Asn Gln Ser Val Ile Thr Tyr Glu Asn Asn Thr Trp Val Asn Gln

50 55 60

Thr Tyr Val Asn Ile Ser Asn Thr Asn Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val

65 70 75 80

Val Ser Val Lys Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Val Ser Gly

85 90 95

Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly

100 105 110

Asp Val Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser Pro Leu Glu

115 120 125

Cys Arg Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His

130 135 140

Ser Asn Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser

145 150 155 160

Cys Pro Ile Gly Glu Val Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser

165 170 175

Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Ile Asn Trp Leu Thr

180 185 190

Ile Gly Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr

195 200 205

Asn Gly Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu

210 215 220

Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr

225                    230                    235                    240  
 Val Met Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe  
 245                    250                    255  
 Arg Ile Glu Lys Gly Lys Ile Val Lys Ser Val Glu Met Asn Ala Pro  
 260                    265                    270  
 Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ser Ser Glu Ile  
 275                    280                    285  
 Thr Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val  
  
 290                    295                    300  
 Ser Phe Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly  
 305                    310                    315                    320  
 Ile Phe Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Lys Thr Gly Ser Cys Gly  
 325                    330                    335  
 Pro Val Ser Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys  
 340                    345                    350  
 Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Ser Ser Arg  
  
 355                    360                    365  
 Asn Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp  
 370                    375                    380  
 Asn Asn Phe Ser Ile Lys Gln Asp Ile Val Gly Ile Asn Glu Trp Ser  
 385                    390                    395                    400  
 Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp  
 405                    410                    415  
 Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys  
  
 420                    425                    430  
 Glu Asn Thr Ile Trp Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val  
 435                    440                    445  
 Asn Ser Asp Thr Val Gly Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Glu Leu Pro  
 450                    455                    460  
 Phe Thr Ile Asp Lys  
 465  
 <210> 5

&lt;211&gt; 1458

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haemophilus influenzae

&lt;400&gt; 5

agcaaaagca ggagttaaa atgaatccaa accaaaagat aataaccatt ggttcggctc 60

gtatgacaat tggaaatggct aacttaatat tacaaattgg aaacataatc tcaatatgga 120

ttagccactc aattcaactt ggaaatcaaa atcagattga aacatgcaat caaagcgta 180

ttacttatga aaacaacact tggtaaattc agacatatgt taacatcagc aacaccaact 240

ttgcgtgtgg acagtcatgt gttccgtga aatttagcggg caattccctc ctctgccctg 300

tttagtgatg ggctatatac agtaaagaca acagtgttaag aatcggttcc aaggggatg 360

tgtttgtcat aagggAACCA ttcatatcat gctccccctt ggaatgcaga accttcttct 420

tgactcaagg ggccttgcta aatgacaaac attccaatgg aaccattaaa gacaggagcc 480

catatcgaac cctaattgagc tgtcctattt gtgaagttcc ctctccatac aactcaagat 540

ttgagtcgt cgcttggta gcaagtgtt gtcatgttgg catcaattgg ctaacaattt 600

gaatttctgg cccagacaat gggcagtgg ctgtgttaaa gtacaacggc ataataacag 660

acactatcaa gagttggaga aacaatataat tgagaacaca agagtcgttgc tgtgcattgt 720

taaatggttc ttgctttact gtaatgaccg atggaccaag taatggacag gcctcataca 780

agatcttcag aatagaaaag ggaaagatag tcaaattcgt cgaaatgtt gcccttaatt 840

atcaatgtt ggaatgctcc tgttatccgtt attctgttga aatcacatgt gtgtgcagg 900

ataactggca tggctcaat cgaccgtggg tgtctttcaa ccagaatctg gaatatcaga 960

taggatacat atgcagtggg atttcggag acaatccacg ccctaattgtt aagacaggca 1020

gttgtggcc agtatcgtt aatggaccaat atggatgggg agggtttca ttcaataacg 1080

gcaatgggtt ttggatggg agaactaaaa gcatttagtgc aagaaacggt ttggatgtt 1140

tttggatcc gaacggatgg actggacag acaataactt ctcaataaag caagatatcg 1200

taggaataaa tgagtggta ggtatagcg ggagtttgc tcagcatcca gaactaacag 1260

ggctggattt tataagaccc tgcttctggg ttgaactaat cagagggcga cccaaagaga 1320

acacaatctg gactagcggg agcagcatat cctttgtgg tgtaaacagt gacactgtgg 1380

gttgtgtttt gccagacggt gctgatgtgc catttaccat tgacaagtaa ttgttcaaa 1440

aaactccttg ttctact 1458

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 549

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haemophilus influenzae

&lt;400&gt; 6

Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val

1 5 10 15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu

20 25 30

Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val Ala

35 40 45

Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile Val

65 70 75 80

Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile

85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu

100 105 110

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Glu Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp Ser

115 120 125

Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser Phe

130 135 140

Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro Lys

145 150 155 160

Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu

165 170 175

Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Asp Asp Gln Gln Ser Leu Tyr

180 185 190

Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser Lys

195 200 205

Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Gly Gln Glu

210 215 220

Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe Ala  
 245 250 255  
 Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro Val  
 260 265 270  
 His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn Thr  
 275 280 285  
  
 Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys Pro  
 290 295 300  
 Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe  
 325 330 335  
 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His  
 340 345 350  
  
 His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr  
 355 360 365  
 Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu  
 370 375 380  
 Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His Leu  
 385 390 395 400  
 Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu  
 405 410 415  
  
 Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu  
 420 425 430  
 Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys  
 435 440 445  
 Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys  
 450 455 460  
 Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val Lys

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu Asn

485	490	495	
-----	-----	-----	--

Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr Gln

500	505	510	
-----	-----	-----	--

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val Val

515	520	525	
-----	-----	-----	--

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

530	535	540	
-----	-----	-----	--

Cys Arg Ile Cys Ile

545

<210> 7

<211> 1777

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 7

agcaaaaagca ggggaaaaca aaagcaacaa aatgaaggc aatactagta gttctgctat	60
atacatttgc aaccgcaa at gcagacacat tatgtatagg ttatcatgca aacaattcaa	120
cagacactgt agacacagta ctagaaaaga atgtaacagt aacacactct gttaaccttc	180
tagaagacaa gcataacggg aaactatgca aactaagg ggtagcccc ttgcatttgg	240
gtaaatgtaa cattgctggc tggatcctgg gaaatccaga gtgtaatca ctctccacag	300
caagctcatg gtcctacatt gtggaaacac ctagttcaga caatgaaacg tgtaacccag	360

gagatttcat cgattatgag gagctaagag agcaatttgg ctcaatgtca tcattttaaaa	420
ggtttgat attccccgag acaagttcat ggcccaatca tgactcgaac aaagggtgtaa	480
cgccagcatg tcctcatgct ggagcaaaaa gcttctacaa aaatttaata tggctatgtta	540
aaaaaggaaa ttcataccca aagctcagca aatcctacat taatgataaa gggaaagaag	600
tcctcgtgt atggggcatt caccatccat ctactatgtga tgaccaacaa agtctctatc	660
agaatgcaga tgcataatgtt ttgtgggt catcaagata cagcaagaag ttcaagccgg	720
aaatagcaat aagacccaaa gtgaggggtc aagaaggag aatgaactat tactggacac	780

tagtagagcc gggagacaaa ataacattcg aagcaactgg aatctatgt gtaccgagat	840
atgcatttcgc aatggaaaga aatgctggat ctggattat catttcagat acaccagtcc	900

acgattgcaa tacaacttgt caaacaccca agggtgctat aaacaccagc ctcccat tc  
agaatataca tccgatcaca attggaaaat gtccaaataa tgaaaaagc acaaaattga  
gactggccac aggattgagg aatatcccgt ctattcaatc tagaggccta tttggggca  
ttgcgcgtt cattgaaggg gggtgacag ggatgtaga tggatgtac gttatcacc  
atcaaaatga gcaggggtca ggatatgcag ccgacctgaa ggcacacag aatgccattg

1200  
1260  
1320  
1380  
1440  
1500  
1560  
1620

acgagattac taacaaagta aattctgtta ttgaaaagat gaatacacag ttcacacag  
taggtaaaga gttcaaccac ctggaaaaaa gaatagagaa tttaaataaa aaagttgatg  
atggttcct ggacatttg acttacaatg ccgaactgtt gttctattg gaaaatgaaa  
gaacttigga ctaccacgt tcaaattgtga agaacttata tgaaaaggtt agaagccagc  
taaaaaacaa tgccaaggaa attggaaacg gctgcttga atttaccac aatgcata  
acacgtgcat gggaaagtgtc aaaaatggga cttatgacta cccaaaatac tcagaggaag  
caaaattaaa cagagaagaa atagatgggg taaagctgga atcaacaagg atttaccaga

1680  
1740  
1777

ttttggcgat ctattcaact gtcgccagtt cattggtaact ggtagtcctt ctggggcaa  
tcagttctg gatgtgctct aatgggttc tacagtgttag aatatgtatt taacattagg  
atttcagaag catgagaaaa acacccttgt ttctact

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 549

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haemophilus influenzae

&lt;400&gt; 8

Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val

1 5 10 15

Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu

20 25 30

Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val Ala

35 40 45

Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile Val

65 70 75 80

Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile

85	90	95
----	----	----

Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu

100	105	110
-----	-----	-----

Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser Phe

130	135	140
-----	-----	-----

Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro Lys

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu

165	170	175
-----	-----	-----

Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Asp Asp Gln Gln Ser Leu Tyr

180	185	190
-----	-----	-----

Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser Lys

195	200	205
-----	-----	-----

Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Arg Glu

210	215	220
-----	-----	-----

Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys Ile

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe Ala

245	250	255
-----	-----	-----

Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro Val

260	265	270
-----	-----	-----

Tyr Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn Thr

275	280	285
-----	-----	-----

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys Pro

290	295	300
-----	-----	-----

Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe

325	330	335
-----	-----	-----

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His

340 345 350

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr

355 360 365

Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu

370 375 380

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His Leu

385 390 395 400

Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu

405 410 415

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu

420 425 430

Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys

435 440 445

Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys

450 455 460

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

465 470 475 480

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu Asn

485 490 495

Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr Gln

500 505 510

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val Val

515 520 525

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

530 535 540

Cys Arg Ile Cys Ile

545

<210> 9

<211> 1777

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 9

agcaaaagca gggaaaaaca aaagcaacaa aatgaaggc aatactagta gttctgctat	60
atacatttg aaccgcaaat gcagacacat tatgtatagg ttatcatgcg aacaattcaa	120
cagacactgt agacacagt ctagaaaaga atgtaacagt aacacactct gttaacctc	180
tagaagacaa gcataacggg aaactatgca aactaagagg ggtagcccc ttgcatttgg	240
gtaaatgtaa cattgctggc tggatctgg gaaatccaga gtgtaatca ctctccacag	300
caagctcatg gtcctacatt gtggaaacac ctagttcaga caatggaacg tgtaaccag	360

gagatttcat cgattatgag gagctaagag agcaatttag ctcagtgtca tcatttgaaa	420
ggtttgagat attccccaaag acaagttcat ggc当地aaatca tgactcgaac aaagggtgtaa	480
cggcagcatg tcctcatgct ggagcaaaaa gcttctacaa aaatttaata tggctagttta	540
aaaaaggaaaa ttccataccctt aagctcagca aatcctacat taatgataaa gggaaagaag	600
tcctcgtgct atggggcatt caccatccat ctactagtga tgatcaacaa agtctctatc	660
agaatgcaga tgcataatgtt tttgtggggtt catcaagata cagcaagaag ttcaagccgg	720
aatatcgaaat aagacccaaa gtgaggggatc gagaagggag aatgaactat tactggacac	780

tagtagagcc gggagacaaa ataacattcg aagcaactgg aaatcttagtg gtaccgagat	840
atgcattcgc aatggaaaga aatgtggat ctggtattat catttcagat acaccaggct	900
acgattgc当地 tacaacttgt caaacaccca agggtgctat aaacaccaggc ctcccattc	960
agaatataca tccgatcaca attggaaaat gtccaaaata tgtaaaaagc acaaaattga	1020
gactggccac aggattgagg aatatcccgta ctattcaatc tagaggccta tttggggcca	1080
ttgccggttt cattgaaggg gggtgacag ggatggtaga tggatggtagc ggttatcacc	1140
atcaaaatga gcaggggtca ggatgtcgag ccgacacctaa gggcacacag aatgccatg	1200

acgagattac taacaaggta aattctgtta ttgaaaagat gaatacacag ttcacagcag	1260
taggttaaga gttcaaccac ctggaaaaaa gaatagagaa tttaaataaa aaagttgtatg	1320
atggtttccct ggacatttgg acttacaatg ccgaactgtt gttctattg gaaaatgaaa	1380
gaaccttggc ctaccacgat tcaaattgtga agaacttata tgaaaaggta agaagccagc	1440
taaaaaacaa tgccaaggaa attggaaacg gctgcttga attttaccac aaatgcgata	1500
acacgtgcattt ggaaagtgtc aaaaatggta cttatgacta cccaaaatac tcagagggaa	1560
caaaaattaa cagagaaggaa atagatgggg taaaagctggta atcaacaagg atttaccaga	1620

tttggcgat ctattcaact gtcgccagtt cattggtaact ggtagtcctcc ctgggggcaa 1680  
tcagtttcgtg gatgtgcctc aatgggtctc facagtgttag aatatgtatt taacattagg 1740

atttcagaag catgagaaaa acacccttgt ttctact

1777