



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월02일

(11) 등록번호 10-2027758

(24) 등록일자 2019년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/145 (2013.01)

A61K 39/0241 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7004138

(22) 출원일자(국제) 2013년07월11일

심사청구일자 2017년07월11일

(85) 번역문제출일자 2015년02월16일

(65) 공개번호 10-2015-0036685

(43) 공개일자 2015년04월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/050000

(87) 국제공개번호 WO 2014/014726

국제공개일자 2014년01월23일

(30) 우선권주장

61/672,398 2012년07월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011091376 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

뵤링거 잉겔하임 애니멀 헬스 유에스에이 인코포레이티드

미국 30096 조지아주 델루스 세털라이트 볼러바드 3239

(72) 발명자

하우스 벤자민 엠

미국 56123 미네소타주 커리 250번 애비뉴 1575

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 18 항

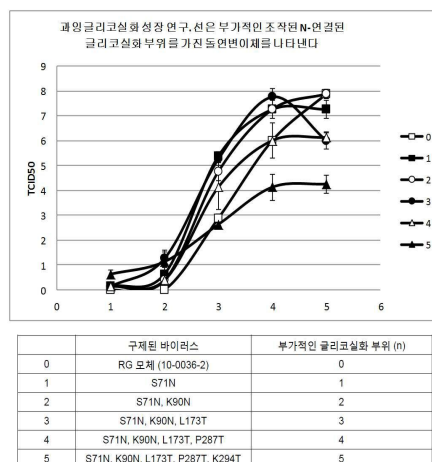
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 약독화된 돼지 인플루엔자 백신 및 이의 제조 방법 및 용도

(57) 요약

본 발명은 약독화된 돼지 인플루엔자 균주, 특히 역 유전학 접근법을 통해 제조된 것, 이를 포함하는 조성물, 및 이에 제조 방법 및 용도를 제공한다. 약독화된 균주는 상응하는 맹독성 모체 바이러스에 의해 인코딩되는 HA 단백질에 대해, 부가적인 글리코실화 부위를 갖는 HA 단백질을 인코딩하도록 조작된다. 대안적으로는, 약독화된 인플루엔자 균주가 투여될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 39/12 (2013.01)

A61K 39/21 (2013.01)

C12N 7/04 (2013.01)

A61K 2039/5254 (2013.01)

C12N 2760/16134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 또는 인플루엔자에 의해 야기되는 질병에 대하여 돼지에서 안전하고 효과적인 면역 반응을 제공할 수 있는 약독화된 돼지 인플루엔자 균주로서, 맹독성 모체 균주에 대해 4 개 이상의 부가적인 글리코실화 부위를 갖는 HA 유전자를 인코딩하고, 글리코실화 부위가 S71N, K90N, L173T 및 P287T 를 포함하고, 아미노산 변화(들)의 위치가 SEQ ID NO:18 에 언급된 서열을 갖는 맹독성 모체 균주에 의해 인코딩되는 HA 유전자에 기반하는 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 글리코실화 부위가 K294T 를 더 포함하는 균주.

청구항 3

제 2 항에 있어서, SEQ ID NO:22 에 언급된 서열을 갖는 또는 SEQ ID NO:22 에 대해 적어도 90% 상동성을 가진 서열을 갖는 HA 단백질을 인코딩하는 균주로서, 단 후속 위치는 하기 아미노산: 71N, 90N, 173T, 287T, 및 294T 를 갖는 균주.

청구항 4

제 3 항에 있어서, HA 단백질이 SEQ ID NO:22 에 언급된 서열을 갖는 균주.

청구항 5

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO:24 에 언급된 서열을 갖는 또는 SEQ ID NO:24 에 대해 적어도 90% 상동성을 가진 서열을 갖는 HA 단백질을 인코딩하는 균주로서, 단 후속 위치는 하기 아미노산: 71N, 90N, 173T, 287T 를 갖는 균주.

청구항 6

제 5 항에 있어서, HA 단백질이 SEQ ID NO:24 에 언급된 서열을 갖는 균주.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 약독화된 균주를 포함하는, 맹독성 돼지 인플루엔자 유발에 대하여 돼지에서 보호적 면역 반응을 제공하는 면역학적 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 비히클, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 돼지 인플루엔자 이외의 돼지 병원체와 연관되거나 이로부터 유래된 하나 이상의 부가적인 항원을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 하나 이상의 부가적인 항원(들)이 돼지에서 M. hyo, PCV2, PRRSV, SIV 또는 돼지에서 질환을 감염시키고 야기하는 또는 질환에 대한 취약성을 야기하는 기타 병원체에 대항하는 면역 반응을 도출할 수 있는 조성물.

청구항 11

제 8 항의 조성물의 1 회 이상의 투여를 포함하는 인간을 제외한 동물을 백신접종하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 동물이 출산 전 3 주 내지 6 주의 암태지인 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 산출된 새끼돼지가 비-백신접종된 암태지로부터 유래한 새끼돼지와 비교하여 감소된 이환률 및/또는 치사율을 갖는 방법.

청구항 14

인플루엔자 바이러스 HA cDNA 에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터를 포함하는 약독화된 돼지 인플루엔자의 제조를 위한 벡터를 다수 포함하는 조성물로서, 상기 HA cDNA 가 맹독성 모체 돼지 인플루엔자 균주에 의해 인코딩되는 HA 에 비해 4 개 이상의 부가적인 글리코실화 부위를 인코딩하고, 글리코실화 부위가 S71N, K90N, L173T 및 P287T 를 포함하고, 아미노산 변화의 번호지정이 SEQ ID NO:18 에 언급된 서열을 갖는 맹독성 모체 균주에 의해 인코딩되는 HA 유전자에 기반하는 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 글리코실화 부위가 K294T 를 더 포함하는 조성물.

청구항 16

제 14 항 또는 제 15 항에 있어서, 약독화된 인플루엔자를 제조하기 위한 HA cDNA 가 SEQ ID NO:22 또는 24 에 언급된 단백질을 인코딩하는 조성물.

청구항 17

세포를 감염성 인플루엔자 바이러스를 산출하기에 효과적인 양으로 제 14 항 또는 제 15 항의 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스의 제조 방법.

청구항 18

제 17 항의 벡터를 다수 포함하는 세포.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

인용참조

[0002]

본 출원은 2012 년 7 월 17 일에 출원되고, 그 전체가 본원에 참조로서 인용된 가출원 USSN 61/672,398 에 대한 우선권을 청구한다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 일반적으로 약독화된 바이러스 백신, 특히 돼지 인플루엔자에 의해 야기되는 감염/질환에 대항하여 돼지에 대한 폭넓은, 안전한 그리고 효과적인 보호를 제공하는 약독화된 바이러스 백신에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 약독화된 바이러스의 제조 방법, 및 약독화된 바이러스의 감소된 맹독성과 연관된 핵산 변형의 확인에 관한 것이다.

[0005]

본 발명은 따라서 본 발명의 바이러스; 예를 들어, 생 약독화된 바이러스를 포함하는 면역원성 또는 백신 조성

물에 관한 것이다. 바이러스는 또한 조성물에서 불활성화될 수 있으나; 바이러스는 생 약독화된 돼지 인플루엔자인 것이 유리할 수 있다. 본 발명은 그러므로 추가로 이러한 조성물을 제조 및/또는 제형화하기 위한 방법; 예를 들어, 적합한 배지 상에서 또는 내에서 바이러스를 배양 또는 성장 또는 증식시키고, 바이러스를 수확하고, 임의로 바이러스를 불활성화시키고, 및 임의로 적합한 수의학적으로 또는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 비히클 및/또는 아유반트 및/또는 안정화제와 혼련시키는 방법에 관한 것이다. 그러므로, 본 발명은 또한 이러한 조성물의 제형화에서의 바이러스의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0006] 인플루엔자 바이러스는 바이러스 유입을 매개하는 헤마글루티닌 (HA) 에 대항하는 숙주 체액성 면역력을 회피하는 다수의 메카니즘을 가지고 있다. 게놈 분절의 재배열은 항원적 이동을 야기할 수 있는 반면, 돌연변이의 점차적인 축적은 유전적 부동을 초래한다 (Desselberger U, et al. 1978, Schild G, et al. 1974). 돌연변이체 HA 를 인지하는 이미 존재하는 항체에 대한 능력에 영향을 줄 수 있는 HA 의 항원 에피토프 중의 돌연변이 외에, HA 의 N-연결된 글리코실화 중의 돌연변이는 HA 를 둘러싸는 올리고당 층을 변경시킴으로써 항체 인지의 바이러스 회피를 촉진시킬 수 있다 (Schulze IT, 1997). 글리칸 잔기는 일부 항체의 이들의 에피토프에 대한 결합을 제한하여, 글리칸 차폐로서 알려진 현상에서 항체 인지 및 면역원성의 상실을 초래할 수 있다 (Wanzeck K, et al. 2011, Wei C-J, et al. 2010). 부가적으로, 돌연변이 및 유전적 부동은 우선적으로 글리칸에 의해 보호되지 않은 HA 구형 헤드 내의 위치에서 일어난다 (Das SR, et al. 2010). 글리칸 잔기는 또한 수용체 결합에 영향을 주고, 그 결과 바이러스 복제 동역학에 영향을 줄 수 있다.
- [0007] 인플루엔자 바이러스의 진화는 종종 글리코실화 부위의 수 및 위치의 개질을 포함한다 (Long J, et al. 2011). H3N2 바이러스의 경우, 글리코실화 부위의 수가 지난 40 년에 걸쳐 2 에서 10 으로 증가하였다 (4). 그러나, 증가하는 글리코실화 HA 는 마우스에서 감소된 병독성 및 감소된 바이러스 체력과 상관성이 있다 (Das SR, et al. 2011, Vigerust DJ, et al. 2007). 증가하는 글리코실화가 HA 를 항체 중화로부터 차폐시킬 수 있는 동안, 세포 수용체에 대한 바이러스 친화성은 당연히 감소된다 (Abe Y, et al. 2004, Das SR, et al. 2011). 또한, HA 또는 뉴라미니다아제 (NA) 내의 상보적 돌연변이는 수용체 결합과 방출 활성 사이의 균형에 필요하다 (Wagner R, et al. 2000). NA 내의 상기 상보적 돌연변이는 NA 억제제에 대한 자연적 저항성의 획득과 연관된다 (Hensley SE, et al. 2011).
- [0008] 돼지 인플루엔자 바이러스의 수 많은 유전적 및 항원적으로 구별되는 계통이, β , γ 및 δ -클러스터 H1N1 및 H1N2 바이러스 뿐 아니라, H3N2 서브유형을 비롯하여 돼지에서 동시에 순환한다 (Lorusso A, et al. 2012). δ -클러스터는 본래 2 개의 서브클래스 (δ -I 및 δ -II) 로 다시 나뉘었지만, 더욱 최근의 연구는 3 개 이상의 항원적으로 구별되는 그룹을 나타내는 5 개의 구별되는 유전적 서브클러스터 (δ -A, δ -B, δ -C, δ -D, δ -E) 를 입증하였다 (Hause BM, et al. 2011, Vincent AL, et al. 2009).
- [0009] 백신 군주가 필드 유발 바이러스에 부합하는 경우 치사된 바이러스 백신이 효과적이지만, 인플루엔자의 빠른 돌연변이 속도는 백신 군주와 순환하는 바이러스 사이의 유전적 및 항원적 부합을 확보하도록 잦은 군주 변화를 필요로 한다. 부가적으로, 돼지 내를 함께 순환하는 복합 서브유형 및 계통이 각 유형의 대표를 포함하기 위해 5 개 이상의 백신 군주를 필요로 한다. 광범위한 스펙트럼 면역력을 도출하는 단일 생 백신은 돼지 건강 프로그램에서 상당한 향상을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0010] **발명의 요약**
- [0011] 본 발명의 목적은 약독화된 백신 뿐 아니라, 돼지 인플루엔자에 의한 감염의 치료 및 예방을 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 하나의 구현예에서, 백신은 그들의 모체 군주에 대해 부가적인 글리코실화 부위를 갖는 HA 유전자를 발현하도록 개질된, 약독화된 인플루엔자 바이러스를 포함한다.

- [0013] 특정한 구현예에서, HA 유전자 및/또는 유전자 생성물은 SEQ ID NO:17 및 21; SEQ ID NO:17 및 23; SEQ ID NO:18 및 22; 또는 SEQ ID NO:18 및 24 사이에 존재하는 것과 동일한 개질을 갖는다. 또다른 구현예에서, HA 유전자 및/또는 유전자 생성물은 5 개의 개질 중 1 개 이상을 갖는다. 보다 특정한 구현예에서, HA 유전자 및/또는 유전자 생성물은 4 또는 5 개의 개질을 가져, 모체 HA 유전자 생성물에 대해, +4 및 +5 글리코실화 부위를 야기한다.
- [0014] 본 발명의 또다른 목적은 본 발명에 따른 약독화된 인플루엔자를 제조하기 위해 역 유전학 시스템에서 사용하기 위한 cDNA 및/또는 플라스미드를 제공하는 것이다. 하나의 구현예에서, cDNA 및/또는 플라스미드 중 하나 이상은 SEQ ID NO:18 에 언급된 서열에 대해 증가된 수의 글리코실화 부위를 갖는 HA 서열을 포함한다.
- [0015] 특정한 구현예에서, HA 서열은 SEQ ID NO:21 또는 23 에 언급된 바와 같다.
- [0016] 본 발명은 추가로 안전하고, 효과적이고, 폭넓은 보호성 면역력을 제공하는, 인플루엔자의 신규한 약독화된 균주에 관한 것이다. 모체 인플루엔자 균주에 대해, 약독화된 균주는 그들의 HA 유전자에 의해 인코딩되는 부가적인 글리코실화 부위 및/또는 추정 글리코실화 부위를 가질 수 있으며, 그의 존재는 감소된 맹독성과 연관된다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 모체 바이러스에 대해, 돌연변이체 바이러스가 약독화되도록 하는 야생형/모체 바이러스에 대해 하나 이상의 핵산 서열 중에 돌연변이(들)를 포함하는 돌연변이체 바이러스를 제공하며, 상기 모체 바이러스는 야생형 HA 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 본원에 정의된 바와 같이, "야생형" HA 단백질은 SEQ ID NO:18 에 언급된 서열에 대해 동일한 수의 글리코실화 부위 및/또는 추정 글리코실화 부위를 갖는 단백질이다.
- [0018] 특정한 구현예에서, 돌연변이체 바이러스는 각각 SEQ ID NO:22 또는 24 에 언급된 펩티드에 대해 인코딩하고, 맹독성 야생형/모체 바이러스에 대해, 돌연변이체 바이러스가 약독화된/비-맹독성이 되도록 하는, SEQ ID NO:21 또는 23 에 언급된 DNA 서열에 상응하는 (즉, 역 상보적이고, 티미딘 대신에 우라실을 가짐) vRNA 핵산 서열을 포함한다.
- [0019] 본원에 정의된, 용어 "유전자" 는 광범위하게 사용될 것이고, 코딩 및 비-코딩 서열 (즉, 업스트림 및 다운스트림 조절 서열, 프로모터, 5'/3' UTR, 인트론, 및 엑손) 모두를 포함할 것이다. 오직 유전자의 코딩 서열에 대한 참조만이 의도될 때에는, 용어 "유전자의 코딩 서열" 또는 "CDS" 는 본 명세서 전체에서 상호교환적으로 사용될 것이다. 특정 핵산, 예를 들어 SEQ ID NO:17 에 언급된 서열 (모체 바이러스 cRNA "센스" 가닥의 DNA 서열 단량체) 이 논의되는 경우, 당업자는 해당 서열의 모든 유도가능한 형태 (mRNA, vRNA, cRNA, DNA, 단백질, 등) 를 즉시 보유할 것이다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스는 음성 단일 가닥 RNA 바이러스 (ssRNA) 이다. 복제를 위해서는, 이의 음성 ssRNA (본원에 "vRNA" 로서 정의됨) 가 양성 또는 센스 RNA (본원에 "cRNA" 로서 정의됨) 로 전사되어야만 한다. 숙주 세포 조직계는 cRNA 를 사용하여 바이러스 단백질 및 vRNA 를 제조하기 위해 가담된다. 잘-공지된 유전 코드를 사용하는 당업자는 DNA 서열로부터 vRNA, cRNA, 및 펩티드 서열을 통상적으로 유도할 수 있다.
- [0020] 특정한 구현예에서, 약독화된 백신은 아쥘반트를 포함한다. 아쥘반트는 약독화된 백신 단백질과 비교하여 도출된 면역 반응을 증가 및/또는 증폭하는 임의의 성분일 수 있다. 키토산 및 이의 유도체를 포함하는 점막 아쥘반트가 기재된 경구 약독화된 백신에 특히 유용하다.
- [0021] 본 발명은 추가로 약독화된 바이러스, 또는 약독화된 바이러스를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 인플루엔자에 대항하는 면역학적 (또는 면역원성) 또는 보호적 반응을 유도하기 위한 방법 뿐 아니라, 인플루엔자, 또는 인플루엔자에 의해 야기되는 질환 상태(들) 을 예방 또는 치료하기 위한 방법을 제공한다.
- [0022] 적어도 약독화된 인플루엔자 균주 및 사용 지침을 포함하는 키트가 또한 제공된다.
- [0023] 상기 및 기타 구현예가 기재되고, 하기 상세한 설명으로부터 명백하고 이에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 당업자에게 본 발명의 최상의 방식을 비롯하여 본 발명의 완전하고 가능한 설명이 첨부되는 도면에 대한 참조를 포함한 명세서의 나머지에 더욱 상세히 설명된다:

도 1 은 역 유전학을 사용하여 생성되는 바이러스의 유전자형을 나타내고;

도 2 는 SEQ ID NO:18 (모체 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질) 과 SEQ ID NO:22 (n5 글리코실화 돌연변이체의 HA 단백질) 사이의 아미노산 정렬이고;

도 3 은 모체에 대해, 그들의 HA 유전자 내에 1 내지 5 개의 부가적인 글리코실화 부위를 가지고 있는 모체 및 글리코실화 돌연변이체 인플루엔자 바이러스의 배양된 세포에서의 성장 그래프이고;

도 4 는 본 발명의 서열 (SEQ ID) 목록의 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 미생물, 예컨대 바이러스, 예를 들어, 인플루엔자, 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 생성물 (예를 들어, 단백질, 항원, 면역원, 에피토프) 의 약독화에 관여하는 뉴클레오타이드 서열 및 유전자, 이러한 뉴클레오타이드 서열, 생성물, 미생물의 제조 방법, 및 이의 용도, 예컨대 백신 또는 면역원성 조성물을 제조하기 위한 또는 면역학적 또는 면역 반응을 도출하기 위한 용도 또는 벡터로서, 예를 들어, 발현 벡터 (예를 들어, 시험관 내 또는 생체 내 발현 벡터) 로서의 용도를 제공한다.
- [0026] 미생물의 뉴클레오타이드 서열 및 유전자 내로 도입된 돌연변이는 신규하고 절묘한 (nonobvious) 약독화된 돌연변이체를 생성한다. 상기 돌연변이체는 고도의 면역원성을 가진 생 약독화된 면역원성 조성물 또는 생 약독화된 백신의 제조에 유용하다.
- [0027] 돌연변이의 확인은 신규하고 절묘한 뉴클레오타이드 서열 및 유전자 뿐 아니라, 뉴클레오타이드 서열 및 유전자에 의해 인코딩된 신규하고 절묘한 유전자 생성물을 제공한다.
- [0028] 하나의 구현예에서, 본 발명은 인플루엔자 또는 인플루엔자에 의해 야기되는 질병에 대항하는 돼지에서의 안전하고 효과적인 면역 반응을 제공할 수 있는 약독화된 과잉글리코실화리코실화 돼지 인플루엔자 균주를 제공한다. 하나의 구현예에서, 균주는 맹독성 모체 균주에 대해 1 개 이상의 부가적인 글리코실화 부위를 갖는 HA 유전자를 인코딩할 수 있다.
- [0029] 또다른 구현예에서, 약독화된 균주는 맹독성 모체 균주에 대해, 4 또는 5 개의 부가적인 글리코실화 부위를 갖는 HA 유전자를 인코딩할 수 있다. 특정한 구현예에서, 균주 글리코실화 부위는 S71N, K90N, L173T, P287T, 및 K294T 로부터 선택되고, 아미노산 변화 위치는 SEQ ID NO:18 에 언급된 서열을 갖는 HA 유전자에 기반한다.
- [0030] 하나의 구현예에서, 약독화된 인플루엔자 균주에 의해 생성되는 HA 단백질은 SEQ ID NO:22 에 언급된 서열 또는 SEQ ID NO:22 에 대해 적어도 90% 상동성을 가진 서열을 갖고, 단 후속 위치는 하기 아미노산: 71N, 90N, 173T, 287T, 및 294T 를 갖는다.
- [0031] 또다른 구현예에서, 약독화된 인플루엔자는 SEQ ID NO:24 에 언급된 서열 또는 SEQ IN NO:24 에 대해 적어도 90% 상동성을 가진 서열을 갖는 HA 단백질을 생성하고, 단 후속 위치는 하기 아미노산: 71N, 90N, 173T, 287T 를 갖는다.
- [0032] 또다른 양상에서, 본 발명은 과잉글리코실화리코실화 HA 단백질을 인코딩하는, 약독화된 인플루엔자 균주를 포함하는 면역학적 조성물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 비히클, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 하나의 구현예에서, 조성물은 맹독성 돼지 인플루엔자 유발에 대항하여 돼지에서 보호적 면역 반응을 제공한다. 일부 구현예에서, 조성물은 추가로 돼지 인플루엔자 이외의 병원체와 연관된 하나 이상의 부가적인 항원을 포함한다.
- [0034] 또다른 구현예에서, 하나 이상의 부가적인 항원은 M. hyo, PCV2, PRRSV, SIV 또는 돼지에서 질환을 감염시키고 야기하는 또는 질환에 대한 취약성을 야기하는 기타 병원체, 또는 이의 조합으로부터 선택된다.
- [0035] 하나의 구현예에서, 본 발명은 과잉글리코실화리코실화 인플루엔자 HA 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 조성물의 1 회 이상의 투여를 포함하는 동물을 백신접종하는 방법을 제공한다. 또다른 구현예에서, 돼지는 출산 전 약 3 주 내지 약 6 주의 암태지이다. 또다른 구현예에서, 산출된 새끼돼지는 비-백신접종된 암태지로부터 유래한 새끼돼지와 비교하여 감소된 이환률 및/또는 치사율을 가질 수 있다.
- [0036] 또다른 구현예에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 HA cDNA 에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터를 포함하는 약독화된 돼지 인플루엔자의 제조를 위한 벡터를 다수 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 HA cDNA 는 맹독성 모체 돼지 인플루엔자 균주에 의해 인코딩되는 HA 에 비해 부가적인 글리코실화 부위를 인코딩한다.

하나의 특정 구현예에서, 부가적인 글리코실화 부위는 S71N, K90N, L173T, P287T, 및 K294T 로부터 선택되고, 아미노산 변화의 위치는 SEQ ID NO:18 에 언급된 서열을 갖는 HA 유전자에 기반한다.

- [0037] 하나의 구현예에서, 약독화된 인플루엔자를 생성하기 위한 HA cDNA 는 SEQ ID NO:22 에 언급된 단백질을 인코딩한다. 또다른 구현예에서, HA cDNA 는 SEQ ID NO:24 에 언급된 단백질을 인코딩한다.
- [0038] 하나의 구현예에서, 본 발명은 세포를 감염성 인플루엔자 바이러스를 산출하기에 유효한 양으로의 본 발명의 조성물 중 하나와 접촉시키는 것을 포함하는, 인플루엔자 바이러스의 제조 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 본 방법은 추가로 바이러스를 단리하는 것을 포함한다.
- [0039] 또다른 구현예에서, 본 발명은 세포를 인플루엔자 바이러스를 산출하기에 유효한 양으로의 본 발명의 조성물과 접촉시키고, 상기 바이러스를 단리하는 것을 포함하는, 유전자 전달 비히클의 제조 방법을 제공한다. 본 방법은 추가로 본 발명의 조성물과 접촉된 세포를 제공한다.
- [0040] 하나의 구현예에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 HA cDNA 에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 벡터를 포함하는 약독화된 돼지 인플루엔자의 제조를 위한 벡터를 다수 포함하는 척추동물 세포를 제공하며, 상기 HA cDNA 는 맹독성 모체 돼지 인플루엔자 균주에 의해 인코딩된 HA 에 대해 부가적인 글리코실화 부위를 인코딩한다.
- [0041] 본 발명은 항원, 면역원 및 에피토프를 제공하는 유전자 생성물을 추가로 포함하고, 단리된 유전자 생성물로서 유용하다.
- [0042] 이러한 단리된 유전자 생성물 뿐 아니라, 이의 에피토프는 또한 진단 적용에서 유용한, 항체를 생성하는데 유용하다.
- [0043] 에피토프, 항원 또는 면역원을 제공 또는 생성할 수 있는 이러한 유전자 생성물은 또한, 면역원성 또는 면역학적 조성물 뿐 아니라, 백신에 대해 유용하다.
- [0044] 하나의 양상에서, 본 발명은 돌연변이가 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩티드 또는 단백질의 생물학적 활성을 개질하여, 바이러스의 약화된 맹독성을 산출하는, 뉴클레오타이드 서열 또는 유전자 중의 약화 돌연변이를 함유하는 바이러스를 제공한다.
- [0045] 특히, 본 발명은 동물에서 면역원성 반응을 도출하는 약독화된 돼지 인플루엔자 균주, 특히 돼지에서 반응을 도출하고, 유도하거나 촉진시키는 약독화된 돼지 인플루엔자 균주 및 이를 포함하는 백신을 포함한다.
- [0046] 관심의 특정 돼지 인플루엔자 약독화된 균주는 맹독성과 연관되는, 야생형 맹독성 모체 균주에 대해, 유전자 내에 돌연변이를 갖는다. 기재된 돌연변이를 갖는 균주 외에, 기재된 맹독성 유전자 내에 임의의 수의 돌연변이를 갖는 약독화된 균주가 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다는 것이 인지된다.
- [0047] 또다른 양상에서, 신규한 약독화된 돼지 인플루엔자 균주는 돼지 인플루엔자 및 돼지 인플루엔자에 의해 야기되는 감염/질병에 대항하는 안전하고, 효과적인 백신으로 제형화된다.
- [0048] 하나의 구현예에서, 돼지 인플루엔자 백신은 추가로 아류반트를 포함한다. 특정한 구현예에서, 아류반트는 점막성 아류반트, 예컨대 키토산, 메틸화된 키토산, 트리메틸화된 키토산, 또는 이의 유도체 또는 조합이다.
- [0049] 하나의 구현예에서, 아류반트는 H. 파라수이스 (H. parasuis), 클로스트리듐, 돼지 인플루엔자 바이러스 (SIV), 돼지 썩코바이러스 (PCV), 돼지 생식 및 호흡기 증후군 바이러스 (PRRSV), 만헤이미아 (Mannheimia), 파스텔렐라 (Pasteurella), 히스토피오우스 (Histophilus), 살모넬라 (Salmonella), 대장균 (Escherichia coli), 또는 이의 조합 및/또는 변형을 포함하는 전체 박테리아 및/또는 바이러스를 포함한다. 여러 구현예에서, 아류반트는 동물의 IgM, IgG, IgA, 및/또는 이의 조합의 생성을 증가시킨다.
- [0050] "항원" 또는 "면역원" 은 숙주 동물에서 특이적인 면역 반응을 유도하는 물질을 의미한다. 항원은 전체 유기체 (치사된, 약독화된 또는 생); 유기체의 서브유닛 또는 일부; 면역원성 특성을 가진 삽입체를 함유하는 재조합 벡터; 숙주 동물에 대해 제시시 면역 반응을 유도할 수 있는 DNA 의 조각 또는 절편; 폴리펩티드, 에피토프, 합텐, 또는 임의의 이의 조합을 포함할 수 있다. 대안적으로, 면역원 또는 항원은 독소 또는 항독소를 포함할 수 있다.
- [0051] 용어 "단백질", "펩티드", "폴리펩티드" 및 "폴리펩티드 절편" 은 임의의 길이의 아미노산 잔기의 중합체를 말

하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이것은 개질된 아미노산 또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있고, 이것은 아미노산 이외의 화학적 부분에 의해 방해될 수 있다.

용어는 또한 자연적으로 또는 개입; 예를 들어 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 기타 조작 또는 개질, 예컨대 표지화 또는 생리활성 성분과의 콘주게이션에 의해 개질된 아미노산 중합체를 포함한다.

[0052] 본원에 사용되는 용어 "면역원성 또는 항원성 폴리펩티드"에는 일단 숙주에 투여되면, 단백질에 대하여 체액성 및/또는 세포성 유형의 면역 반응을 유발할 수 있다는 점에서 면역학적으로 활성인 폴리펩티드가 포함된다. 바람직하게는 단백질 절편은 총 단백질과 실질적으로 동일한 면역학적 활성을 갖는 그러한 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 단백질 절편은 하나 이상의 에피토프 또는 항원 결정소를 포함하거나 이것으로 본질적으로 이루어지거나 이것으로 이루어진다. 본원에 사용되는 "면역원성" 단백질 또는 폴리펩티드에는 단백질의 전장 서열, 이의 유사체, 또는 이의 면역원성 절편이 포함된다. "면역원성 절편"은 하나 이상의 에피토프를 포함하여 상기 기재되는 면역학적 반응을 도출하는 단백질의 절편을 의미한다. 이러한 절편은 당업계에 잘 공지된 임의의 수의 에피토프 맵핑 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996)을 참조한다. 예를 들어, 선형 에피토프는 예를 들어, 동시에 고체 지지체 상에 다수의 펩티드를 합성하고 (상기 펩티드는 단백질 분자의 일부에 상응함), 상기 펩티드가 지지체에 여전히 부착된 채로 펩티드가 항체와 반응함으로써 측정될 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, U.S. Pat. No. 4,708,871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986에 기재되어 있다. 유사하게, 형태학적 에피토프는 예컨대, 예를 들어, x-선 결정학 및 2-차원 핵자기 공명에 의해 아미노산의 공간적 형태를 측정함으로써 쉽게 확인된다. 예를 들어, Epitope Mapping Protocols, supra를 참조한다. T. 파르바 (T. parva)의 단백질에 특히 적용가능한 방법은 본원이 그 전체가 참조로서 인용되는 PCT/US2004/022605에 충분히 기재되어 있다.

[0053] 본원에 논의되는 바와 같이, 본 발명은 항원성 폴리펩티드의 활성 절편 및 변이체를 포함한다. 따라서, 용어 "면역원성 또는 항원성 폴리펩티드"는 폴리펩티드가 본원에 정의된 면역학적 반응을 생성하도록 기능한다면, 서열에 대한 결실, 부가 및 치환을 추가로 포함한다. 용어 "보존성 변이"는 아미노산 잔기의 또다른 생물학적으로 유사한 잔기로의 대체, 또는 인코딩된 아미노산 잔기가 변화하지 않거나, 또다른 생물학적으로 유사한 잔기인 식의 핵산 서열 내의 뉴클레오타이드의 대체를 나타낸다. 이와 관련하여, 특히 바람직한 치환은 일반적으로 특성이 보존되는, 즉, 아미노산의 계열 내에서 일어나는 치환일 것이다. 예를 들어, 아미노산은 일반적으로 4개의 계열: (1) 산성--아스파테이트 및 글루타메이트; (2) 염기성--라이신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 무극성--알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비전하 극성--글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신으로 나누어진다. 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 종종 방향족 아미노산으로 분류된다. 보존성 변이의 예에는 하나의 소수성 잔기, 예컨대 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 또다른 소수성 잔기에 대한 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또다른 극성 잔기에 대한 치환, 예컨대 아르기닌의 라이신에 대한, 글루탐산의 아스파르트산에 대한, 또는 글루타민의 아스파라긴에 대한 치환 등; 또는 아미노산의 생물학적 활성에 큰 영향을 주지 않을 구조적으로 관련된 아미노산으로의 유사한 보존성 대체가 포함된다. 참조 분자와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖지만 단백질의 면역원성에 실질적으로 영향을 주지 않는 미미한 아미노산 치환을 갖는 단백질이 따라서 참조 폴리펩티드의 정의 내에 있다. 상기 기법에 의해 제조된 모든 폴리펩티드가 본원에 포함된다. 용어 "보존성 변이"에는 또한 미치환된 모체 아미노산 대신 치환된 아미노산의 사용을 포함하나, 단, 치환된 폴리펩티드에 대해 발생된 항체는 또한 미치환된 폴리펩티드와 면역반응한다.

[0054] 용어 "에피토프"는 특이적 B 세포 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 또는 항원 상의 부위를 말한다. 상기 용어는 또한 "항원 결정소" 또는 "항원 결정소 부위"와 상호교환적으로 사용된다. 동일한 에피토프를 인지하는 항원은 또다른 항원의 표적 항원에 대한 결합을 차단하기 위한 하나의 항체의 능력을 보여주는 간단한 면역억제에서 확인될 수 있다.

[0055] 조성물 또는 백신에 대한 "면역학적 반응"은 관심의 조성물 또는 백신에 대한 세포성 및/또는 항체-매개 면역 반응의 숙주에서의 발달이다. 통상, "면역학적 반응"은 하나 이상의 하기 효과를 포함하나 이에 제한되지 않는다: 관심의 조성물 또는 백신에 포함되는 항원 또는 항원에 대해 특이적으로 유도되는 항체, B 세포, 조력자 T 세포, 및/또는 세포독성 T 세포의 생성. 바람직하게는, 숙주는 새로운 감염에 대한 저항성이 향상될 및/또는 질환의 임상적 심각성이 감소되는 치료적 또는 보호적 면역학적 반응을 나타낼 것이다. 이러한 보호는 감염된 숙주에 의해 통상 나타내지는 증상 및/또는 임상적 질환 징후의 감소 또는 결핍, 감염된 숙주에서의 빠

른 회복 시간 및/또는 저하된 바이러스 역가에 의해 입증될 것이다.

- [0056] "동물" 은 포유류, 새 등을 의미한다. 동물 또는 숙주에는 포유류 및 인간이 포함된다. 동물은, 말류 (예를 들어, 말), 개류 (예를 들어, 개, 늑대, 여우, 코요테, 자칼), 고양이류 (예를 들어, 사자, 호랑이, 집고양이, 들고양이, 기타 큰 고양이, 및 치타 및 스라소니를 비롯한 기타 고양이과), 양류 (예를 들어, 양), 소류 (예를 들어, 소), 돼지류 (예를 들어, 돼지), 조류 (예를 들어, 닭, 오리, 거위, 칠면조, 메추라기, 꿩, 앵무새, 핀치, 매, 까마귀, 타조, 에뮤 및 화식조), 영장류 (예를 들어, 원원류, 안경원숭이, 원숭이, 긴팔원숭이, 유인원), 흰담비, 물개 및 생선으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. "동물" 이라는 용어에는 또한 배아 및 태아 단계를 비롯한, 모든 발달 단계의 개개의 동물이 포함된다.
- [0057] 다르게 설명되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수형 관사에는 문맥상 명백하게 다르게 언급되지 않는 한 복수의 지시대상이 포함된다. 유사하게는, "또는" 이라는 단어는 문맥상 명백하게 다르게 언급되지 않는 한 "및" 이 포함되는 것으로 의도된다.
- [0058] 본 명세서에서, 특히 청구항 및/또는 단락에서, "~ 을 포함한다", "~ 이 포함되는", "~ 을 포함함" 등과 같은 용어는 미국 특허법에서 이에 부여된 의미를 가질 수 있으며; 예를 들어, 이들은 "~ 에 포함된다", "~ 에 포함되는", "~ 에 포함됨" 등을 의미할 수 있고; "~ 로 본질적으로 이루어지는" 및 "~ 로 본질적으로 이루어지다" 와 같은 용어는 미국 특허법에서 이에 부여된 의미를 갖고, 예를 들어, 이들은 명백하게 언급되지 않은 요소를 포함하나, 선행 기술에서 발견되거나 본 발명의 기본적인 또는 신규한 특성에 영향을 미치는 요소는 배제한다는 점에 유의한다.
- [0059] 조성물
- [0060] 본 발명은 동물에서 반응을 도출하는, 유도하는 또는 촉진하는, 약독화된 돼지 인플루엔자 균주 및 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클을 포함할 수 있는 돼지 인플루엔자 백신 또는 조성물에 관한 것이다.
- [0061] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드" 는 선형 또는 분지형, 단일 또는 이중 가닥, 또는 이의 혼성체인 RNA 또는 DNA 를 말한다. 용어는 또한 RNA/DNA 혼성체를 포함한다. 하기는 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 분절, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보솜, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 탐침 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 개질된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체, 우라실, 기타 당 및 연결기, 예컨대 플루오로리보오스 및 티올레이트, 및 뉴클레오티드 분지를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 컨주게이션에 의한 것과 같은 중합 후에, 표지화 성분으로 추가로 개질될 수 있다. 본 정의에 포함되는 다른 유형의 개질은 캡, 하나 이상의 자연 발생적 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 및 폴리뉴클레오티드를 단백질, 금속 이온, 표지화 성분, 기타 폴리뉴클레오티드 또는 고체 지지체에 부착시키는 수단의 도입이다. 폴리뉴클레오티드는 화학적 합성으로부터 수득될 수 있거나 또는 미생물로부터 유도될 수 있다.
- [0062] 용어 "유전자" 는 생물학적 기능과 연관되는 폴리뉴클레오티드의 임의의 분절을 언급하는데 폭넓게 사용된다. 따라서, 유전자에는 게놈 서열에서와 같은 인트론 및 엑손, 또는 단지 cDNA 에서와 같은 코딩 서열, 및/또는 이들의 발현에 필요한 조절 서열이 포함된다. 예를 들어, 유전자는 또한 mRNA 또는 기능적 RNA 를 발현하는, 또는 조절 서열을 포함하는 특정 단백질을 인코딩하는 핵산 분절을 말한다.
- [0063] "단리된" 생물학적 성분 (예컨대 핵산 또는 단백질 또는 세포기관) 은 성분이 자연 발생하는 유기체의 세포에서 다른 생물학적 성분으로부터 실질적으로 분리된 또는 정제되어지는 성분, 예를 들어, 다른 염색체 및 염색체-외 DNA 및 RNA, 단백질, 및 세포기관을 말한다. "단리된" 핵산 및 단백질에는 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질이 포함된다. 용어에는 또한 재조합 기술 뿐 아니라 화학적 합성에 의해 제조된 핵산 및 단백질이 포함된다.
- [0064] 용어 "보존성 변이" 는 아미노산 잔기의 또다른 생물학적으로 유사한 잔기에 의한 대체, 또는 인코딩된 아미노산 잔기가 변화하지 않거나 또다른 생물학적으로 유사한 잔기가 되도록 하는 핵산 서열 내 뉴클레오티드의 대체를 의미한다. 이와 관련하여, 특히 바람직한 치환은 일반적으로 상기 기재된 바와 같이 성질이 보존성일 것이다.
- [0065] "재조합" 이라는 용어는 자연에서 발견되지 않는 배치로의 또다른 폴리뉴클레오티드에 연결되거나 자연에서 발

생하지 않는 반합성, 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

- [0066] "이종"이라는 용어는 비교되어 지는 실재의 나머지와 일반적으로 구별되는 실재로부터 유래하는 것을 의미한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 유전학 유전자조작 기술에 의해 상이한 근원으로부터 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 도입될 수 있고, 그러므로 이종 폴리뉴클레오티드이다. 고유의 코딩 서열로부터 제거되고 고유의 서열 이외의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이종 프로모터이다.
- [0067] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 부가적인 서열, 예컨대 동일한 전사 단위 내의 부가적인 인코딩 서열, 조절 요소, 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위, 5'UTR, 3'UTR, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위, 동일 또는 상이한 프로모터의 조절 하의 부가적인 전사 단위, 숙주 세포의 클로닝, 발현, 상동 재조합, 및 형질전환을 가능하게 하는 서열, 및 본 발명의 구현예를 제공하는데 바람직할 수 있는 임의의 이러한 구축물을 포함할 수 있다.
- [0068] 사용 방법 및 제조 물품
- [0069] 본 발명은 하기 방법 구현예를 포함한다. 하나의 구현예에서, 약독화된 돼지 인플루엔자 균주 및 약학적 또는 수의학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 비히클을 포함하는 조성물을 동물에게 투여하는 것을 포함하는 동물을 백신접종하는 방법이 기재된다. 본 구현예의 하나의 양상에서, 동물은 돼지이다.
- [0070] 본 발명의 하나의 구현예에서, 하나 이상의 공통의 폴리펩티드, 항원, 에피토프 또는 면역원을 사용하는 하나 이상의 프라임 투여 및 하나 이상의 부스트 투여로 구성되는 프라임-부스트 섭생이 사용될 수 있다. 전형적으로는 프라임 투여에 사용된 면역학적 조성물 또는 백신은 부스트로서 사용되는 것과 사실상 상이하다. 그러나, 동일한 조성물이 프라임 투여 및 부스트로서 사용될 수 있다는 것을 유념한다. 상기 투여 프로토콜을 "프라임-부스트"라고 부른다.
- [0071] 프라임-부스트 섭생은 하나 이상의 공통의 폴리펩티드 및/또는 이의 변이체 또는 절편을 사용하는 하나 이상의 프라임 투여 및 하나 이상의 부스트 투여를 포함한다. 프라임-투여에 사용되는 백신은 이후의 부스트 백신으로서 사용되는 것과 특성이 상이할 수 있다. 프라임 투여는 하나 이상의 투여를 포함할 수 있다. 유사하게는, 부스트 투여는 하나 이상의 투여를 포함할 수 있다.
- [0072] 포유류인 표적 종에 대한 조성물의 투여량 부피, 예를 들어, 바이러스 항원에 기반한 돼지 (pig/swine) 조성물의 투여량 부피는 일반적으로 약 0.1 내지 약 2.0 ml, 약 0.1 내지 약 1.0 ml, 약 0.5 ml 내지 약 1.0 ml 이다.
- [0073] 백신의 효율은 동물, 예컨대 돼지를, 돼지 인플루엔자의 맹독성 균주로 유발시킴으로써 최종 면역화 후 약 2 내지 4 주에 시험될 수 있다. 동종 및 이종 균주 모두가 백신의 효능을 시험하기 위한 유발에 사용된다. 동물은 IM 또는 SC 주사, 분사에 의해, 코-내로, 눈-내로, 기관-내로, 및/또는 경구로 유발될 수 있다. 관찰, 폐, 뇌, 및/또는 입으로부터의 샘플은 유발 전 및 후에 수집될 수 있고, 돼지 인플루엔자-특이적 항체의 존재에 대해 분석될 수 있다.
- [0074] 프라임-부스트 프로토콜에 사용되는 본 발명의 약독화된 바이러스 균주를 포함하는 조성물은 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 비히클, 희석제 또는 부형제에 함유되어 있다. 본 발명의 프로토콜은 동물을 돼지 인플루엔자로부터 보호하고 및/또는 감염된 동물에서의 질환 진행을 예방한다.
- [0075] 다양한 투여는 바람직하게는 1 내지 6 주 간격으로 실시된다. 바람직한 시간 간격은 3 내지 5 주이고, 하나의 구현예에 따르면 최선으로 4 주이고, 연간 부스트가 또한 구상된다. 동물, 예를 들어 돼지는, 첫번째 투여 시간에 적어도 3 내지 4 세일 수 있다.
- [0076] 본원의 설명이 예로서 제공되며 본 발명이 이에 제한되지 않는다는 것이 당업자에게 이해되어야만 한다. 본원의 설명 및 당업계의 지식으로부터, 당업자는 각각의 주사 프로토콜에 대해 사용되어야만 하는 투여 횟수, 투여 경로, 및 투여량을, 임의의 과도한 실험 없이 결정할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 또다른 구현예는 약독화된 돼지 인플루엔자 면역학적 조성물 또는 백신 및 동물에서 면역 반응을 도출하기 위해 유효한 양으로 전달 방법을 수행하기 위한 지침을 포함하는 동물에서 돼지 인플루엔자에 대하여 면역학적 또는 보호적 반응을 도출 또는 유도하는 방법을 수행하기 위한 키트이다.
- [0078] 본 발명의 또다른 구현예는 본 발명의 약독화된 돼지 인플루엔자 균주를 포함하는 조성물 또는 백신, 및 동물에서 면역 반응을 도출하기 위해 유효한 양으로 전달 방법을 수행하기 위한 지침을 포함하는 동물에서 돼지 인플루엔자에 대하여 면역학적 또는 보호적 반응을 유도하는 방법을 수행하기 위한 키트이다.

- [0079] 본 발명의 또다른 양상은 상기 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 프라임-부스트 백신접종을 위한 키트에 관한 것이다. 키트는 2 개 이상의 바이알: 본 발명에 따른 프라임-백신접종을 위한 백신 또는 조성물을 함유하는 제 1 바이알, 및 본 발명에 따른 부스트-백신접종을 위한 백신 또는 조성물을 함유하는 제 2 바이알을 포함할 수 있다. 키트는 유리하게는 부가적인 프라임-백신접종 또는 부가적인 부스트-백신접종을 위해 부가적인 제 1 또는 제 2 바이알을 함유할 수 있다.
- [0080] 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제는 0.9% NaCl (예를 들어, 식염수) 용액 또는 인산염 완충액일 수 있다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 기타 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제에는 폴리-(L-글루타메이트) 또는 폴리비닐피롤리돈이 포함되거나 이에 제한되지 않는다. 약학적으로 또는 수의학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클 또는 부형제는 벡터 (또는 시험관 내에서 본 발명의 벡터로부터 발현되는 단백질)의 투여를 용이하게 하는 임의의 화합물 또는 화합물의 조합일 수 있다; 유리하게는, 담체, 비히클 또는 부형제는 트랜스펙션을 용이하게 하고/거나 벡터 (또는 단백질)의 보존을 개선할 수 있다. 투여량 및 투여 부피는 일반적 설명에서 본원에 논의되고, 또한 임의의 과도한 실험 없이, 당업자의 지식과 관련하여 본 명세서로부터 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0081] 본 발명에 따른 면역학적 조성물 및 백신은 하나 이상의 아쥬반트를 포함하거나 이것으로 본질적으로 이루어질 수 있다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 적합한 아쥬반트는 (1) 아크릴 또는 메타크릴산의 중합체, 말레무수물 및 알케닐 유도체 중합체, (2) 면역자극 서열 (ISS), 예컨대 하나 이상의 비-메틸화된 CpG 단위를 갖는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 서열 (Klinman et al., 1996; WO98/16247), (3) 수중유 에멀전, 예컨대 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" 출판: M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995의 페이지 147에 기재된 SPT 에멀전, 및 동일한 문헌의 페이지 183에 기재된 에멀전 MF59, (4) 4차 암모늄 염, 예를 들어, DDA를 함유하는 양이온성 지질, (5) 사이토카인, (6) 수산화알루미늄 또는 알루미늄 포스페이트, (7) 사포닌 또는 (8) 본 출원 내에 참조로서 인용되고 도입된 임의의 문헌에서 논의된 기타 아쥬반트, 또는 (9) 임의의 임의의 조합 또는 혼합물이다.
- [0082] 하나의 구현예에서, 아쥬반트에는 점막 내벽을 통해 개선된 흡수를 촉진하는 것이 포함된다. 일부 예에는 MPL, LTK63, 독소, PLG 마이크로입자 및 여러 기타물질이 포함된다 (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). 하나의 구현예에서, 아쥬반트는 키토산일 수 있다 (Van der Lubben et al. 2001; Patel et al. 2005; Majithiya et al. 2008; US Patent Serial No. 5,980,912).
- [0083] **참조문헌:**
- Abe Y, Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Hongo S. 2004. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J. Virology* **78**:9605-9611.
- Altschul SF, Madden TL. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Bohne-Lang A, von der Lieth CW. 2005. GlyProt: in silico glycosylation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **33**:W214-219.
- Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. 2008. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study. *Virology J.* **5**:40.
- Cai Z, Zhang T, Wan X-F. 2010. A computational framework for influenza antigenic cartography. *PLoS Computational Biology*, 6(10):e1000949.
- Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* **31**:417-427.
- Cotter R, Rowe CA, Bender BS. 2001. Influenza virus. *Curr. Protoc. Immunol.* **19**:11:1-32.
- Das SR, Hensley SE, David A, Schmidt L, Gibbs JS, Puigbò P, Ince WL, Bennick JR, Yewdell JW. 2011. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**:E1417-E1422.
- [0084]

- Das SR, Puigbò P, Hensley SE, Hurt DE, Bennick JR, Yewdell JW. 2010. Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain. *PLoS Pathog* **6**:e1001211.
- Desselberger U, Nakajima K, Alfino P, Pedersen F, Haseltine W, Hannoun C, Palese P. 1978. Biochemical evidence that “new” influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**:3341-3345.
- Hause BM, Oleson TA, Stine DL, Bey RF, Simonson RR. 2011. Genetic and antigenic characterization of recent human-like H1 (δ -cluster) swine influenza virus isolates. *J. Swine Health Prod.* **19**:268-276.
- Hause BM, Oleson TA, Bey RF, Stine DL, Simonson RR. 2010. Antigenic categorization of contemporary H3N2 swine influenza virus isolates using a high-throughput serum neutralization assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* **22**:352-359.
- Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. 2001. The evolution of human influenza viruses. *Philos. T. R. Soc. B.* **356**:1861-1870.
- Hensley SE, Das SR, Gibbs JS, Bailey AL, Schmidt LM, Bennick JR, Yewdell JW. 2011. Influenza A virus hemagglutinin antibody escape promotes neuraminidase antigenic variation and drug resistance. *PLoS ONE* **6**:e15190.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full length amplification of all influenza viruses. *Arch. Virol.* **146**:2275-2289.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:6108-6113.
- Karasin AI, Carman S, Olsen CW. 2006. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003-2005). *J. Clin. Microbiol.* **44**:1123-1126.
- Long J, Bushnell RV, Tobin JK, Pan K, Deem MW, Nara PL, Tobin GJ. 2011. Evolution of H3N2 influenza virus in a guinea pig model. *PLoS ONE* **6**:e20130.
- Lorusso A, Vincent AL, Gramer MR, Lager KM, Ciacchi-Zanella JR. 2012. Contemporary epidemiology of North American lineage triple reassortant influenza A viruses in pigs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Jan. 22 [epub ahead of print].
- Sali A, Potterton L. 1995. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER." *Proteins* **23**: 318-326.

[0085]

- Schild G, Oxford J, Dowdle W, Coleman M, Pereira M, Chakraverty P. 1974. Antigenic variation in current influenza A viruses: evidence for a high frequency of antigenic 'drift' for the Hong Kong virus. *Bull. World Health Organ.* **51**:1-11.
- Schulze IT. 1997. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J. Infect. Dis.* **176**:S24-S28
- Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Julkunen I. 2011. Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. *PLoS ONE* **6**:e25848.
- Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. 2011. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. *PLoS ONE* **6**:e22844.
- Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. 2012. Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PLoS ONE* **7**:e32119.
- WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2002 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf).
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739.
- Vigerust DJ, Ulett KB, Boyd KL, Madsen J, Hawgood S, McCullers JA. 2007. N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J. Virology* **81**:8593-8600.
- Vincent AL, Ma W, Lager KM, Gramer MR, Richt JA, Janke BH. 2009. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes* **39**:176-185.
- Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk H-D. 2000. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virology* **74**:6316-6323.
- Wanzeck K, Boyd KL, McCullers JA. 2011. Glycan shielding of the influenza virus hemagglutinin contributes to immunopathology in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**:767-773.
- Wei C-J, Boyington JC, Dai K, Houser KV, Pearce MB, Kong W-P, Yang Z, Tumpey TM, Nabel GJ. 2010. Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci. Trans. Med.* **2**:24fa21. doi:10.1126/scitranslmed.3000799.
- Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, George KS, Hatta M, Kawaoka Y, Wentworth DE. 2009.

Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and swine origin human influenza A viruses. *J. Virology* **83**:10309-10313.

본 발명은 이제 하기 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 설명될 것이다.

실시예

실시예 1 - 과잉글리코실화리코실화 돼지 인플루엔자 바이러스의 구축

재료/방법.

인플루엔자-유사 질환을 나타내는 돼지로부터 임상 샘플 (코 먼봉채취물 또는 폐 조직) 을 수집하고, 바이러스 분리 및 특징분석에 적용하였다 (정규 진단 시험). 바이러스 분리를 37℃, 5% CO₂ 에서, 5% 우태혈청을 함유하는 DMEM 에서 성장한 돼지 고환 (ST) 세포 상에서 수행하였다. 바이러스 증식을 위해서는, DMEM 에서 우태혈청을 생략하였다. 293T 및 MDCK 세포를 10% 우태혈청을 함유하는 DMEM 에서 증식시켰다. 5x MagMax-96 Viral Isolation Kit (Life Technologies) 를 사용하여 감염된 세포 배양물 수확액으로부터 RNA 를 수확하였다.

[0093] 완전한 바이러스 게놈을 이전에 기재된 다중분절 역전사 PCR 방법을 이용하여 증폭시켰다 (Zhou B, et al. 2009). 바이러스 cDNA 라이브러리를 NEBNext Fast DNA Fragmentation and Library Prep Set 4 키트를 제조자의 지침 (New England Biolabs) 에 따라 사용하여 제조하였는데, 단 키트 어댑터는 바코드 어댑터 (Ion Xpress Barcode Adaptor 1-16 Kit, Life Technologies) 로 교체하였다. DNA 서열분석 주형을 Ion Xpress Template Kit version 2.0 (Life Technologies) 을 사용하여 제조하고, Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies) 을 사용하여 서열분석하였다. 콘티그 (Contig) 를 SeqMan NGen 소프트웨어 (DNASTar) 를 사용하여 어셈블리하였다. 전장 HA 를 인코딩하는 콘티그를 BLAST 분석에 의해 확인하였다. 전장 HA DNA 서열을 ClustalW 방법을 사용하여 정렬시켰다. 계통발생 분석은 이웃-연결 방법을 사용하는 MEGA 5.0 를 사용하여 수행하였고, 위상기하학은 1000 부트스트랩 (bootstrap) 복제물로 입증하였다 (Tamura K, et al. 2011). HA 유전자 서열은 Genbank 에 접근 번호 JQ638655-JQ638665 로 기탁되었다.

[0094] 역 유전학. 분자 생물학의 문맥에서, "역 유전학" 은 클로닝된 cDNA 로부터 유래된 게놈을 가지고 있는 바이러스의 생성으로서 정의된다 (리뷰를 위해, Neumann et al., J. Gen. Viral., 83:2635; 2002 를 참조함). 본 연구에서, 삼중 재조합체 (reassortant) 내부 유전자 카세트 (TRIG) 돼지 인플루엔자 바이러스 (A/돼지/노쓰캐롤라이나/3793/08(H1N1)) 를 TRIG 돼지 인플루엔자 바이러스 역 유전학 시스템을 제작하기 위한 주형으로서 사용하였다. 모든 8 개의 절편을 PCR 로 증폭시키고, BsmBI 로 소화시키고, 이전에 기재된 바와 같이 유사하게 소화된 pHW2000 내로 라이게이션하였다 (Hoffmann E, et al. 2001). 플라스미드를 가지고 있는 삽입물을 제한 소화에 의해 확인하고, 서열분석하여 A/돼지/노쓰캐롤라이나/3793/08 와의 일치성을 입증하였다. 10-0036-2 로부터의 HA 및 NA 유전자 (SEQ ID NO:7 & 11) 를 또한 pHW2000 (Hoffmann et al 2000, PNAS 97(11):6108-6113) 내로 클로닝하고, A/돼지/노쓰캐롤라이나/3793/08 로부터 유래되는 폴리머라아제 염기성 2 (PB2), 폴리머라아제 염기성 1 (PB1), 폴리머라아제 산 (PA), 핵단백질 (NP), 매트릭스 (M) 및 비-구조적 유전자 (NS) 를 가지고 있는 플라스미드와 함께 트랜스팩션하여, 역 유전학-유래 10-0036-2 (RG 10-0036-2, 도 1) 를 제조하였다. 부위 지정 돌연변이생성을 Quik Change II 부위 지정 돌연변이생성 키트 (Agilent Technologies) 를 사용하여 10-0036-2 로부터 HA 유전자를 함유하는 플라스미드 상에 수행하여, 부가적인 1-5 N-연결된 글리코실화 부위를 가진 돌연변이체를 제작하였다 (표 1, 도 2). 글리칸은 N-X-S/T (식 중, N 은 아미노산 아스파라긴이고, X 는 임의의 아미노산이고, S/T 는 세린 또는 트레오닌임) 의 N-연결된 글리코실화 모티프의 문맥에 위치하는 아스파라긴 (N) 잔기에서 단백질에 추가된다.

[0095] 표 1. 부위 지정 돌연변이생성을 사용하여 RG10-0036-2 의 HA 유전자 내로 조작된 부가적인 N-연결된 글리코실화 부위

부가적인 N-연결된 글리코실화 부위 수	뉴클레오티드 변화	아미노산 변화
1	G212A	S71N
2	G212A, G270T	S71N, K90N
3	G212A, G270T, CT517-518AC	S71N, K90N, L173T
4	G212A, G270T, CT517-518AC, C859A	S71N, K90N, L173T, P287T
5	G212A, G270T, CT517-518AC, C859A, A881C	S71N, K90N, L173T, P287T, K294T

[0096]

[0097] 재조합 바이러스의 구제를 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Hoffmann E, et al. 2000). 간략하게는, 293T 및 MDCK 세포를 6-웰 플레이트 내에 5% FBS 를 함유하는 Opti-MEM I 에서 각각 293T 및 MDCK 의 대략 1×10^6 세포를 트랜스팩션 전에 대략 18 시간 동안 함께 배양하였다. 8 개의 플라스미드 각각의 100 나노그램을 100 μ L 의 Opti-MEM I 내에 모으고, 3 μ L 리포펙타민 (Lipofectamine) (Invitrogen) 을 함유하는 100 μ L Opti-MEM 과 조합하고, 실온에서 15 분 인큐베이션한 후, Opti-MEM I 의 1 mL 로 희석하고 6-웰 플레이트의 단일 웰에 옮겼다. 플레이트를 37°C 에서 5% CO₂ 와 함께 6 시간 동안 인큐베이션한 후, 트랜스팩션 혼합물을 Opti-MEM I 로 대체하였다. 트랜스팩션 후 24 시간에, 1.5 mL 을 컨플루언트 (confluent) MDCK 세포의 6-

웰 플레이트로 옮기고, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 TPCK-처리된 트립신을 함유하는 DMEM 1.5 mL 을 첨가하였다. 감염 후 제 5 일에 바이러스를 수확하고, 이들의 역가를 HA 어세이에 의해 측정하였다. 구제된 바이러스의 HA 유전자를 서열분석하여 올바른 서열을 입증하였다.

[0098] **결과.** 바이러스 10-0036-2 에 대해 N28, N40, N104, N142, N176, N303, N497 및 N556 에서의 위치에서 발견된 예상되는 N-연결된 글리코실화 부위 (N-X-S/T) 의 유전적 분석. 부위 지정 돌연변이생성을 부가적인 1-5 N-연결된 글리코실화 부위를 HA 의 구형 헤드 부분에 부가하기 위해 사용하였다 (표 1). 세포 배양물로부터 바이러스 구제 후, 돌연변이체 바이러스를 ST 세포에 대한 성장 연구에 의해 특징분석하였다. 약독화된 바이러스가 종종 시험관 내에서 감소된 성장 속도 및 역가를 나타내기 때문에 성장 연구를 수행하였다. 4 또는 5 개의 부가적인 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 돌연변이체 바이러스는 그러한 성장 결함을 나타내서, 부가적인 글리코실화가 바이러스를 약독화시키는 것으로 제안한다. 약독화된 바이러스를 그 다음, 이들의 맹독성을 생체 내에서 평가하고 상기 돌연변이체 바이러스에 대항하는 면역 반응을 특징분석하기 위해 돼지에서 평가하였다.

[0099] **실시예 2 - 돼지에서 약독화된 돼지 인플루엔자 백신의 효능**

[0100] **재료 & 방법.** 60 마리의 3-주령의 매우 건강한 돼지 (IDEXX FlockChek ELISA 에 의해 SIV 혈청반응음성으로 확인됨) 를 개별 공간에서 15 마리의 4 개 그룹으로 분리하였다. 제 0 일 (d0) 에, 돼지를 2 mL 의 6.0 TCID₅₀/mL 바이러스로 비강내로 접종하였다. 그룹 1 은 세포 배양 배지 (DMEM) 로 감염된 모의 (mock) 이었다. 그룹 2 는 10-0036-2 n+5 를 받았다. 그룹 3 은 10-0036-2 n+4 (4 개의 부가적인 글리코실화 부위를 가진 돌연변이체; n+5 와 유사하나 돌연변이 A881C 가 결여됨 [K294T]) 를 받았다. 그룹 4 는 역 유전자 제작된 10-0036-2 모체 (돌연변이 없음) 를 받았다. 돼지를 제 0 일에 면봉채취 (코) 하고, 샘플을 활성 감염이 없음을 확인하기 위해 SIV 검출을 위해 QPCR 에 의해 실행하였다. 결과를 표 2 에 요약한다. 표 2 및 3 의 경우, 상이한 글자를 가진 그룹은 통계학적으로 상이한 평균 ($P < 0.05$) 을 갖는다. 예를 들어, "A" 는 "B" 와 통계학적으로 상이하고, "BC" 는 "A" 와 통계학적으로 상이하지만 "B" 또는 "C" 는 아니다.

[0101] **표 2. 백신접종 연구**

백신접종 (H1N2)	코 면봉채취물, 제 3 일 (TCID ₅₀ /mL)	코 면봉채취물, 제 5 일 (TCID ₅₀ /mL)	폐 역가, 제 5 일 (TCID ₅₀ /mL)	폐 점수	IHC 점수
음성 대조군	0.0 A	0.0 A	0.0 A	0.0 A	0.0 A
n+4 돌연변이체	3.1 B	2.8 B	0.9 A	0.0 A	0.0 A
n+5 돌연변이체	2.6 C	2.7 B	0.4 A	0.2 A	0.2 A
모체	4.1 D	3.2 C	5.4 B	1.5 B	2.0 B

[0102] 코 면봉채취물을 제 1, 3 및 5 일에 수집하였다. 각 그룹으로부터 5 마리의 돼지를 제 5 일에 안락사시키고, 폐 샘플을 수집하였다. 제 1 일로부터의 면봉채취물을 QPCR 에 의해 분석하였다. 제 3 및 5 일로부터의 면봉채취물 뿐 아니라 폐 샘플을 SIV 에 대해 적정하였다. 폐를 병리조직학 분석 및 IHC 를 위해 대학교 진단연구소 (University Diagnostic lab) 에 보냈다. 제 21 일에 돼지를 상기와 같이 재-백신접종하였다. 상기 결과는 시험관 내 성장 연구와 일치하게, 4 또는 5 개의 부가적으로 N-연결된 글리코실화 부위를 함유하는 돌연변이체가 돼지에서 약독화되고 무맹독성이라는 것을 입증하였다. 코 면봉채취물 역가는 바이러스가 생체 내에서 복제가능하지만, 폐 내의 바이러스의 부재 및 폐 손상의 결여는 복제가 상부 기도에 제한된 것을 암시하는 것으로 나타났다. 온도 민감성을 부여하는 기타 인플루엔자 유전자 내의 돌연변이는 감염이 상부 기도에 제한되고, 인간 생 약독화된 인플루엔자 백신 FluMist™ 에 기반하는 것임을 나타냈다.

[0104] 제 31 일에, 돼지를 필드 단리물 12-1110-1 (H3N2) 로 유발하였다. 유발 연구의 결과를 표 3 에 요약하였다. 유발을 위해 (Richt et al 2006, J.Virology 80(22):11009-11018 에 필적하게 수행됨) 2 mL 의 4.6 TCID₅₀/mL 를 비강 내로 전달하였다. 혈액 및 코 면봉채취물을 유발 31 일 전에 수집하였다. 코 면봉채취물을 제 0 및 1 일에 수집하고, QPCR 에 의해 분석하였다. 코 면봉채취물을 제 3 및 5 일에 수집하고, SIV 역가를 적정에 의해 측정하였다. 모든 돼지를 제 5 일에 안락사시키고, 폐 샘플을 적정에 의해 분석하였다. 폐 샘플을 상기와 같이 분석하였다.

[0105] 표 3. 유발 연구

H3N2 유발	코 면봉채취물, 제 3 일 (TCID ₅₀ /mL)	코 면봉채취물, 제 5 일 (TCID ₅₀ /mL)	폐 역가, 제 5 일 (TCID ₅₀ /mL)	폐 점수	IHC 점수
음성 대조군	5.4 A	5.8 A	3.0 A	1.6 A	1.5 A
n+4 돌연변이체	2.3 B	0.7 B	0.0 B	0.0 B	0.0 B
n+5 돌연변이체	2.9 BC	1.8 C	0.1 B	0.0 B	0.0 B
모체	0.5 C	0.9 BC	0.0 B	0.0 B	0.0 B

[0106]

[0107] 상기 결과는 돌연변이체 n+4 또는 n+5 로 백신접종된 돼지가 걱정 및 IHC 에 의해 폐에서 바이러스의 결여 뿐 아니라, 폐 병반에 대한 증거 없음에 의해 질환으로부터 보호되었다는 것을 입증한다. 나이트 (Naive) (음성 대조군) 돼지는 H3N2 유발 바이러스에 쉽게 감염되었고, 고전적인 인플루엔자 질병을 나타냈다. 모체 바이러스 10-0036-2 로 미리 감염된 돼지는 또한 H3N2 유발로부터 보호되었다.

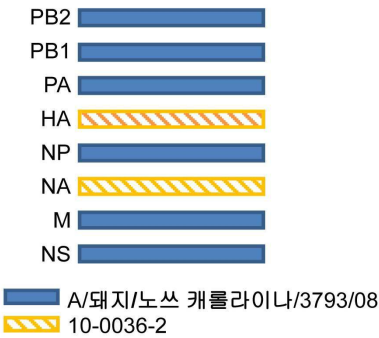
[0108]

* * * * *

[0109] 본 발명의 바람직한 구현예를 상세히 기재하였으므로, 상기 단락에 의해 정의된 본 발명이 이의 많은 명백한 변형이 본 발명의 취지 또는 범주로부터 벗어남 없이 가능하므로, 상기 설명에 언급된 특정 설명에 제한되지 않는 것으로 이해된다.

도면

도면1



도면2

Seq 18 = HA (모체); Seq 22 = HA (n+5 돌연변이체)

```

SEQ 18 MKVKLMVLLCTFTATYADTICVGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCL 60
SEQ 22 MKVKLMVLLCTFTATYADTICVGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDSHNGKLCL 60

SEQ 18 LKGIAPLQLGSCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFTDYEELRE 120
SEQ 22 LKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISNESWSYIVETPNPENGTCYPGYFTDYEELRE 120

SEQ 18 QLSSVSSFKRFEIFPKESSWPNHVTGVSSSCSHNGKSSFYRNLLWLTVKNGLYPNLSKS 180
SEQ 22 QLSSVSSFKRFEIFPKESSWPNHVTGVSSSCSHNGKSSFYRNLLWLTVKNGIYPNLSKS 180

SEQ 18 YTNKKEKEVLVLWGVBHPSNIGDQRALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRNQE 240
SEQ 22 YTNKKEKEVLVLWGVBHPSNIGDQRALYHTENAYVSVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRNQE 240

SEQ 18 GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFELSKGFGSGIITSNAPMGECAKQCQTPQG 300
SEQ 22 GRINYYWTLLEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFELSKGFGSGIITSNATMGECAKQCQTPQG 300

SEQ 18 AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVKSAKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGM 360
SEQ 22 AINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVKSAKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGM 360

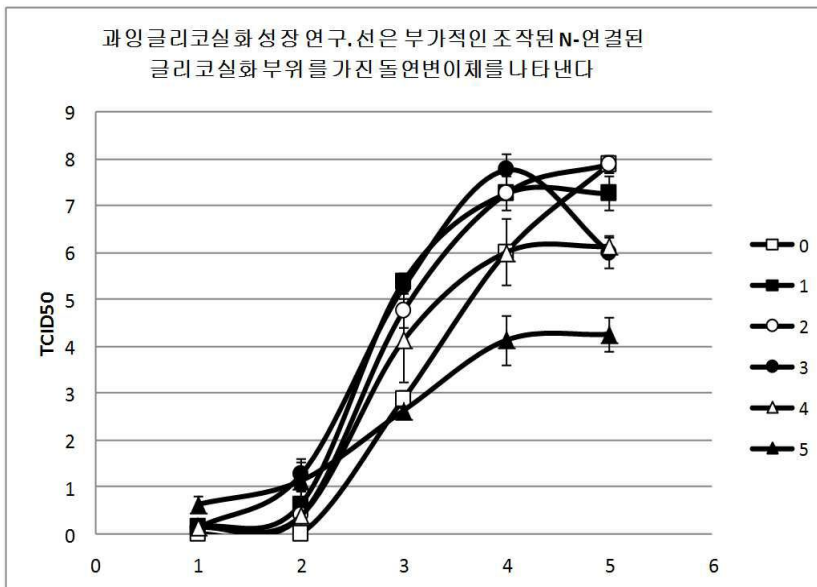
SEQ 18 VDGWYGYHHQNEQSGYAADQQSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM 420
SEQ 22 VDGWYGYHHQNEQSGYAADQQSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRM 420

SEQ 18 ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGC 480
SEQ 22 ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGC 480

SEQ 18 FEFYHKCNDECMESVKNQTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYNILAIYSTVASSL 540
SEQ 22 FEFYHKCNDECMESVKNQTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYNILAIYSTVASSL 540

SEQ 18 VLLVSLGAISFWMCNSGSLQCRICI 565
SEQ 22 VLLVSLGAISFWMCNSGSLQCRICI 565
    
```

도면3



	구제된 바이러스	부가적인 글리코실화 부위 (n)
0	RG 모체 (10-0036-2)	0
1	S71N	1
2	S71N, K90N	2
3	S71N, K90N, L173T	3
4	S71N, K90N, L173T, P287T	4
5	S71N, K90N, L173T, P287T, K294T	5

도면4

SEQ ID NO	유형	설명
1	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 PB2 유전자
2	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 PB2 예상되는 AA
3	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 PB1 유전자
4	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 PB1 예상되는 AA
5	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 PA 유전자
6	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 PA 예상되는 AA
7	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 HA 유전자
8	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 HA 예상되는 AA
9	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 NP 유전자
10	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 NP 예상되는 AA
11	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 NA 유전자
12	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 NA 예상되는 AA
13	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 M 유전자
14	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 M 예상되는 AA
15	DNA	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 NS 유전자
16	PRT	인플루엔자 A/돼지/노스캐롤라이나/3793/08(H1N1) - 10-0036-2 의 NS 예상되는 AA
17	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+0, 모체) - RG 10-0036-2 의 HA 유전자
18	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+0, 모체) - RG 10-0036-2 의 HA 예상되는 AA
19	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+0, 모체) - RG 10-0036-2 의 NA 유전자
20	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+0, 모체) - RG 10-0036-2 의 NA 예상되는 AA
21	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+5, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 유전자
22	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+5, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 예상되는 AA
23	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+4, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 유전자
24	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+4, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 예상되는 AA
25	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+3, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 유전자
26	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+3, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 예상되는 AA
27	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+2, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 유전자
28	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+2, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 예상되는 AA
29	DNA	인플루엔자 10-0036-2 (n+1, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 유전자
30	PRT	인플루엔자 10-0036-2 (n+1, RG 10-0036-2 에 대해) 의 HA 예상되는 AA

서열목록

- <110> Meril Limited
Hause, Ben
- <120> Attenuated Swine Influenza Vaccines and Methods of Making and Use
Thereof
- <130> MER 12-202P
- <160> 30
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 2277
- <212> DNA
- <213> Influenza A virus
- <400> 1

atggagagaa taaagaact aagatctg atgtcgcagt ctgcactcg cgagatactc 60

acaaagacca ctgtggacca tatggccata atcaaaaagt acacatcagg aaggcaagag 120

aagaaccccg cactcagaat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagac 180

aagagaataa tggacatgat tccagagagg aatgaacaag gacaaaccct ctggagcaaa	240
acaaacgatg ctggatcgga ccgtgtgatg gtatcacccc tggccgtaac atggtggaat	300
aggaatggcc caacaacaag cacagttcac taccctaagg tatataaaac ttatttcgaa	360
aagatcgaaa gggttaaaaca tggatatctt ggccctgtcc acttcagaaa tcaagttaaa	420
ataagaagga gggttgacac aaaccctggt catgcagatc tcagtgccaa ggaggcacag	480
gatgtgatca tggaagtgtt ttcccaaata gaagtggggg caagagtact gacgtcagag	540
tcacagctga caataacaaa ggaaaagaaa gaagagctcc aggattgtaa gattgctccc	600
ctgatggtgg catacatgct agaaagagag ttggttcgca agacgagggt tctcccgtg	660
gctggtggaa caagcagtgt ttatatgaa gtgctacact taactcaggg aacatgctgg	720
gaacaaatgt aactccagg aggagaagtg agaaatgatg atgttgacca aagtttgatt	780
atcgctgcta gaaacatagt aagaagagca gcagtgtcag cagaccatt agcatctctc	840
ttggaaatgt gccacagcac acagattgga ggaataagga tggtagcat ccttagacag	900
aaccaacagg aggaacaagc cgtagacata tgcaaggcag caatggggct gaggattagc	960
tcttctttca gctttggtgg gttcaccttc aaaagaacaa gcggatcatc agttaagaaa	1020
gaagaagaag tgctcacggg caacctccaa aactgaaaa taagagtaca tgaaggatat	1080
gaagaattca caatggtagg gagaagagca actgctattc tcagaaaagc aaccaggaga	1140
ttgatccagt taatagtaag tgggagagac gatcaatcaa ttgctgaggc aataattgta	1200
gccatggtat ttccacaaga ggattgcatg atcaaggcag ttaggggcga tctgaacttt	1260
gtcaataggg caaaccagcg actgaatccc atgcaccaac tcttgaggca ttccaaaaa	1320
gatgcaaaag tgcttttcca gaactgggga attgaacca tcgacagtgt gatgggaatg	1380
atcgggatat tgcctgatat gacccaagc acggaatgt cgctgagagg tataagagtc	1440
agcaaatgg gagtagatga gtattccagc acggagagag tggtagtgag cattgaccga	1500
tttttgagag ttcgggatca acgagggaac gtactattgt ccccggaaga ggtcagcgag	1560
acacaaggaa ctgagaaatt gacaataact tattcgtcat caatgatgtg ggagatcaat	1620
ggtcctgagt cagtgtggt caacacttat caatggatca taaggaattg ggaaagcttg	1680
aaaattcaat ggtcacaaga tccacgatg ttatacaaca aaatggaatt tgaaccattc	1740
cagtctcttg tcctaaggc aaccagaagt cgttacagtg gattcgtgag gacactgttc	1800
cagcaaatgc gggatgtgct tggaacattt gacactgtcc aaataataaa acttctcccc	1860
tttgcgtctg ctccaccgga acagagtagg atacagttct cctcgtgac tgtgaatgtg	1920
agaggatcag ggctgaggat actggtaaga ggcaattctc cagtgttcaa ttacaacaaa	1980

gcaaccaaaa ggcttacaat tcttgaaaa gatgcaggtg cattgactga agatccagat 2040
gaaggcacag ctggagtgga gtctgctgtc ctgaggggat tcctcatttt gggtaaagaa 2100
gacaagagat atggcccagc attagcatc aatgaactga gcaatcttgc aaaaggagag 2160
aaggctaattg tgtaattgg gcaaggagac gtggtgttgg taatgaaacg gaaacggaac 2220
tctagcatac ttactgacag ccagacagcg accaaaagaa ttcggatggc catcaat 2277

<210> 2

<211> 759

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 2

Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr

1 5 10 15

Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys

20 25 30

Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys

35 40 45

Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met

50 55 60

Asp Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys

65 70 75 80

Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val

85 90 95

Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Val His Tyr Pro

100 105 110

Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Ile Glu Arg Leu Lys His Gly

115 120 125

Ile Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg

130 135 140

Val Asp Thr Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln

145 150 155 160

Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Val

165 170 175

Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu
 180 185 190
 Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu
 195 200 205
 Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr
 210 215 220
 Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240
 Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Val Asp
 245 250 255
 Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Ala Val
 260 265 270
 Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285
 Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Arg Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300
 Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320
 Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335
 Ser Val Lys Lys Glu Glu Glu Val Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350
 Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365
 Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380
 Ile Val Ser Gly Arg Asp Asp Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400
 Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
 405 410 415
 Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His

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

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

 Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Met Glu
 565 570 575
 Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Lys Ala Thr Arg Ser Arg Tyr
 580 585 590
 Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
 595 600 605
 Thr Phe Asp Thr Val Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
 610 615 620
 Pro Pro Glu Gln Ser Arg Ile Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val

 625 630 635 640
 Arg Gly Ser Gly Leu Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe
 645 650 655
 Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu Thr Ile Leu Gly Lys Asp Ala
 660 665 670
 Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser

675 680 685
Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asp Lys Arg Tyr
690 695 700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Asn Leu Ala Lys Gly Glu
705 710 715 720
Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys
725 730 735
Arg Lys Arg Asn Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys
740 745 750
Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn

755
<210> 3
<211> 2271
<212> DNA
<213> Influenza A virus

<400> 3
atggatgtca acccgactct acttttcccta aagggttcag cgcaaaatgc cataagcacc 60
acattccctt atactggaga tctccatac agccatggaa caggaacagg atacaccatg 120
gacacagtca acagaacaca ccagtattca gaaaaaggga aatggacgac aaacacagag 180
actggggcac cccagctcaa cccgattgat ggaccactac ccgatgataa tgaaccaagt 240
gggtatgcac aaacagactg tgtcctggag gccatggctt tccttgaaga atcccaccca 300
gggatatttg agaattcatg ccttgaaaca atggaaattg tccaacaaac aagggtggat 360
aaactaactc aaggctcgcca gacttatgat tggacattaa acagaaatca accggcagca 420

actgcattgg ccaacaccat agaagttttt agatcaaacg gtctaacagc taatgagtca 480
ggaaggctaa tagatttcct aaaggatgta atggaatcaa tggataagga ggaaatagag 540
ataacaacac attttcaaag aaaaaggaga gtaagagaca acatgaccaa gaagatggtc 600
acacaagaa caatagggaa gaaaaaaca aaattgaata agagaagtta tctaataaga 660
gcactgacat tgaatacgaat gaccaaagat gcagagagag gcaagttaaa aaggagggtc 720
atcgcaacac ctgggatgca gattagaggg ttcgtgtact ttgttgagac tttagctaga 780
agcatctgcg aaaagcttga acagtccgga ctcccagtag ggggcaatga aaagaaagcc 840

aaattggcaa atgttgtgag aaagatgatg actaattcac aagacacaga gctttctttc 900

acaatcactg gagataacac taaatggaat gaaaaccaga atcctcgaat gttcctggcg 960
atgatcacat acattaccag aatcaaccc gagggttca gaaacatact gaggatggca 1020
ccaataatgt tctcaaaca aatggcaaga ctaggaaaag ggtacatgtt cgagagtaaa 1080
agaatgaagc tccgaacaca ggtaccagca gaaatgctag caagcattga tcttaagtat 1140
ttcaatgaat caacaaggaa gaaaattgag aaaataaggc ctctcctaag agatggcaca 1200
gcatcattga gccctgggat gatgatgggc atgttcaaca tgctaagtac ggttttggga 1260

gtctcaatac tgaatcttgg aaaaagaaa tacaccagga caacatactg gtgggatgga 1320
ctccaatcct cagacgattt tgccctcata gtaaatgcac caaatcatga gggaatacaa 1380
gcaggagtgg atagattcta caggacctgc aagtttagtag ggatcaacat gagcaaaaag 1440
aagtcctata taaataagac tgggacattt gaattcaca gcttttttta tcgctatggg 1500
ttttagtcta attttagcat ggagctgccc agttttggag tgtctggaat aaacgaatca 1560
gtgatatga gcatcggagt aacagtata aagaacaaca tgataaataa tgatcttgga 1620
cctgcaacag ccagatggc cctccagttg ttcacaaag actacagata cacatataga 1680

tgccatagag gggacacaca aatccagacg agaagatcat tcgagctaaa gagcctgtgg 1740
aatcaaaact aatcaaaggc aggattatta gtatctgatg gaggacaaa ttatacaat 1800
atccggaatc ttcacattcc tgaagtctgc ttaaaatggg agctaattga tgaggattat 1860
cggggaagac ttgtaatcc cctgaatccc ttgtcagcc ataaagagat tgattctgta 1920
aacagtgtct tggtgatgcc agcccatggt ccagccaaaa gtatggagta tgatgccgtt 1980
gcaactacac actcctggat tcccaaggagg aaccgctcta ttctcaacac aagccaaagg 2040
ggaattcttg aggatgaaca gatgtaccag aagtgtgca acctgttcga gaaatttttc 2100

cctagtagtt catacagaag accagttgga atttctagca tgggtggagc catggtgtct 2160
agggcccgga ttgatgccag gattgacttc gagtctggac ggattaagaa agaagagttc 2220
tctgagatca tgaagatctg ttccaccatt gaagaactca gacggcaaaa g 2271

<210> 4

<211> 757

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 4

Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn

1 5 10 15

Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His

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

275 280 285
 Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly
 290 295 300
 Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Met Phe Leu Ala

 305 310 315 320
 Met Ile Thr Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile
 325 330 335
 Leu Ser Met Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
 340 345 350
 Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Val
 355 360 365
 Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Glu Ser
 370 375 380

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

 450 455 460
 Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu Val Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
 465 470 475 480
 Lys Ser Tyr Ile Asn Lys Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 485 490 495
 Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 500 505 510
 Gly Val Ser Gly Ile Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
 515 520 525

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

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

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

Lys Ser Leu Trp Asn Gln Thr Gln Ser Lys Ala Gly Leu Leu Val Ser
580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Arg Gln Lys
755

<210> 5

<211> 2148

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 5

atggaagact ttgtgcgaca atgcttcaat ccaatgatcg tcgagcttgc ggaaaaggca	60
atgaaagaat atggagaaga tccgaaaatt gaaactaaca aattcgctgc aatatgcaca	120
cacttggaag tatgtttcat gtattcagat ttccatttca ttgacgagcg gggatgaatca	180
atcattgtag aatctgggtga tccaaatgca ttactgaagc accgatttga gataattgaa	240
ggacgagacc ggaccatggc ctggacagta gtgaacagta tctgcaacac cacaggggta	300
gagaagccta aatttcttcc ggatttatac gactacaaag aaaatcggtt cattgaaatt	360
ggagtgcac gaagggaggt ccacatatac tacctagaga aagccaaca aataaaatcc	420
gagaagacac acattcacat tttttcattc actggagagg agatggccac caaagcagac	480
tacacccttg atgaagaaag cagggaaga atcaaaacca ggcttttcac cataagacaa	540
gaaatggcaa gtaggggtct atgggattcc tttcgtcagt ccgaaagagg cgaggagaca	600
attgaagaaa gatttgaat tacaggaacc atgcgcagac ttgccgacca aagtctccca	660
ccgaacttct ccagtcttga aaactttaga gcttatgtag atgggttcga accaaacggc	720
tgcattgagg gcaagctttc tcaaatgtca aaagaagtga gcgccccaat tgaacccttc	780
ttgaagacaa caccacgccc tctaaaattg cctgatgggc ctcttgctc tcagcggtea	840
aagtcttgc tgatggatgc tctgaaacta agtattgaag acccgagtca tgaaggagaa	900
ggaataccac tatatgatgc aatcaagtgc atgaagacat tttttggctg gaaagaaccc	960
aacataatca aaccacatga gaaaggcata aaccccaatt acctactggc ttggaagcag	1020
gtgctagcag agctccaaga cattgaaaat gaagagaaga tcccaaagac aaagaacatg	1080
aggagaacaa gccaattgaa gtgggcactc ggtgagaata tggcaccaga gaaagtagat	1140
tttgatgact gcaaagatgt tggatgatctt aaacagtatg acagcgacga gccagagccc	1200
agatctctag caagttgggt ccaaaatgaa ttcaacaagg catgtgaatt gaccgattca	1260
agctggatag aacttgatga gataggagaa gatattgcac cgattgaaca catcgcaagt	1320
atgaggagga actattttac agcagaagtg tccattgta gggctacgga atacataatg	1380
aagggagtgt acataaacac ggctttgctt aatgcatctt gtgcagccat ggtgactttt	1440
cagctgatcc caatgataag caaatgcagg accaaagaag gaagacgaaa aacaaatctg	1500
tatgggttca ttataaaagg aaggtcccat ctgaggaatg atactgacgt ggtgaacttt	1560
gtaagcatgg agttctccct caccgacccg agactggagc cacacaaatg ggaaaaatac	1620
tgtgttcttg aaataggaga catgctcctg aggactgcga taggccaagt gtcgaggccc	1680

atgtttcttat atgtgagaac caatggaacc tccaagatca agatgaaatg gggcatggaa 1740
atgaggcgct gcctttctca atctcttcag cagattgaga gcatgattga ggctgagtct 1800
tctgtaaaag agaaagacat gaccaaggaa ttttttgaaa acaaatcgga aacatggcca 1860
attggagaat cacccaaagg agtggaggaa ggctctattg ggaaagtgtg caggacctta 1920
ctggcaaaat ctgtattcaa cagtctatac gcgtctccac aacttgaggg attttcggt 1980

gaatcgagaa agttgcttct cattgttcag gcacttaggg acaacctgga acctggaacc 2040
ttcgatcttg gggggctata tgaagcaatc gaggagtgcc tgattaatga tccctgggtt 2100
ttgcttaatg catcttggtt caactccttc ctcacacatg cactgaaa 2148

<210> 6

<211> 716

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 6

Met Glu Asp Phe Val Arg Gln Cys Phe Asn Pro Met Ile Val Glu Leu

1 5 10 15

Ala Glu Lys Ala Met Lys Glu Tyr Gly Glu Asp Pro Lys Ile Glu Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asp Glu Arg Gly Glu Ser Ile Ile Val Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Gly Val Glu Lys Pro Lys Phe Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr

100 105 110

Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly Val Thr Arg Arg Glu Val His

115 120 125

Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile Lys Ser Glu Lys Thr His

130 135 140

Ile His Ile Phe Ser Phe Thr Gly Glu Glu Met Ala Thr Lys Ala Asp

145 150 155 160
 Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe

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

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

 305 310 315 320
 Asn Ile Ile Lys Pro His Glu Lys Gly Ile Asn Pro Asn Tyr Leu Leu
 325 330 335
 Ala Trp Lys Gln Val Leu Ala Glu Leu Gln Asp Ile Glu Asn Glu Glu
 340 345 350
 Lys Ile Pro Lys Thr Lys Asn Met Arg Arg Thr Ser Gln Leu Lys Trp
 355 360 365
 Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Asp Asp Cys
 370 375 380

 Lys Asp Val Gly Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Pro
 385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
610 615 620

Pro Lys Gly Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
625 630 635 640

Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
645 650 655

Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
660 665 670

Arg Asp Asn Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Gly Leu Tyr Glu
675 680 685

Ala Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Lys
705 710 715

<210> 7

<211> 1692

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 7

atgaaggcaa tactagtagt cctgtatat acatttaca cgcacaaatgc cgacacatta 60
tgcatagggtt atcatgcgaa caattcaact gacaccgtag acacagtgtc agaaaaaaat 120

gtaacagtaa cacactctgt caaccttcta gaaaacaggc ataatgggaa actatgtaaa 180
ctaagagggg tagctccatt gcatttgggt aatgtaaca ttgctggctg gtcctggga 240
aatccagagt gtgagtcaat ctcaaagca agctcatggt cctacattgt ggaaacatct 300
aattcagaca atgggacgtg ttaccagga gatttcatca attatgagga gctaagagag 360
cagttgagct cagtgtcatc atttgaaaga ttgagatat tcccatgac aagttcatgg 420
cccaatcatg acacgaacag aggtgtgacg gcagcatgtc ctcacgtgg gacaaatagc 480
ttctacaaaa atttaatatg gctggtcaaa aaaggaaatt catacccaa gatcaacaaa 540

tcctacatta acaacaaaga gaaagaagtt ctctgtctat gggccataca tcattccact 600
accaatgccg accaacaag cctctacaa aatgcagatg cctatgtttt tgtgggtca 660
tcaagataca gcaggaagtt cgagccagaa atagcaaca gaccaaggt gagagaccaa 720
gcaggagaa tgaactatta ctggacattg gtagagcctg gagacaagat aacattcgaa 780
gcaactggaa atctagtgt accgagatat gccttcgcat tgaaaagaaa ttctggatct 840
ggtattatca tticagatac atcagtcac gattgtgata cgacttgtca gacaccaat 900
ggtgctataa acaccagcct cccatttcaa aatatacatc cagtcacaat tggagaatgt 960

ccaaaatatg taaaagtac taaactgaga atggccacag gattaaggaa tatccgtct 1020
attcaatcta gaggcctgtt tggggccatt gctggcttta ttgaagggg ctggacagga 1080

atgatagacg gatggtacgg ttaccacat caaaatgagc agggatcagg atatgcagcc 1140
gacctgaaaa gcacacagaa tgccattgac gggatcacta acaaggtaaa ttctgttatt 1200
gaaaagatga acacacaatt cacagcagta ggtaaagagt tcagccactt ggaaagaaga 1260
atagagaatt taaataaaaa ggttgatgat ggttttctag atatttgac ttacaatgcc 1320
gaactgttgg ttctgttga gaatgaaaga actttggatt accacgattc aaatgtgaaa 1380

aacttatatg aaaaagtaag aagccaacta aaaaacaatg ccaaagaaat tggaaatggc 1440
tgctttgaat ttaccacaa atgtgatgac acgtgtatgg aaagcgtcaa aaatgggact 1500
tatgattacc caaatactc agaggaagca aaactaaca gagaggaaat agatggggta 1560
aagttggaat caacaagggt ttaccaaatt ttggcgatct attcaacggt cgccagtcca 1620
ttggtactgg tagtctcct gggggcaatc agtttctgga tgtgctctaa tgggtcgcta 1680
cagtgcagaa ta 1692

<210> 8
<211> 564
<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 8

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Ile Ser Lys Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile

85 90 95

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

100 105 110

Ile Asn Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe

115 120 125

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

130 135 140

Thr Asn Arg Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Thr Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Trp Ala Ile His His Pro Pro Thr Asn Ala Asp Gln Gln Ser Leu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Val His Asp Cys Asp Thr Thr Cys Gln Thr Pro Asn Gly Ala Ile Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg

325 330 335

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

340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr

355 360 365

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

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

 420 425 430
 Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
 435 440 445
 Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
 450 455 460
 Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Thr Cys Met Glu Ser Val
 485 490 495

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

<210> 9

<211> 1512

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 9

atgagtgcaca tcgaagccat ggcgtctcaa ggcaccaaac gatcatatga acaaattggag 60

actggtggtg aagccagga tgccacagaa atcagagcat ctgtcgaag aatgattggt 120

ggaatcgga aattctacat ccaaatgtgc actgaactca aactcagtga ctatgagga 180
cgactaatcc aaaatagcat aacaatagag agaatgggtgc tctctgcttt tgatgagaga 240
agaaataaat acctagaaga gcatcccagt gctgggaaag accctaagaa aactggagga 300
cccatatata gaagagtaga cggaagtgg atgagagaac tcattcttta tgacaaagaa 360

gaaataagga gagtttggcg ccaggcaaac aatggatgat atgcaacagc tggcttact 420
catatcatga tttggcattc caatctgaat gatgccacgt accagagaac aagagcactt 480
gttcgcaccg gaatggatcc cagaatgtgc tctctaagc aaggttcaac acttcccaga 540
aggtctggag cagcagggtgc tgcagtgaag ggagttggaa caataacaat ggaattaatc 600
agaatgatca aacgggggat caatgaccga aatttctgga gaggtgaaaa tggaagaagg 660
acaaggattg catatgaaag aatgtgcaat attctcaaag gaaaatttca gacagctgcc 720
caaagggcaa tgatggatca agtgagagaa agtcggaacc cagggaacgc tgagattgaa 780

gatctcattt tcttggcagc gtcagcactt atcctaaggg gatcagttgc acataagtct 840
tgctgcctg ctgtgcgtga tgggcttgca gtggcaagtg ggcatgactt tgaaaggga 900
gggtattcgc tggtcgggat agaccattt aaattactcc agaacagtca agtggtcagc 960
ctggtaagac caaatgaaa cccagctcac aagagtcaat tagtgtggat ggcatgccac 1020
tctgtgcat ttgaggatct aagggtctca agtttcataa gagggaagaa agtgattcca 1080
aggggaaagc ttccacaag aggggttcag attgcttcaa atgagaatgt ggaagccatg 1140
gattccaata ccttagagct gagaagcaga tactgggcta taaggaccag aagtggagga 1200

aataactaatc aacagaaagc atccgcaggc cagatcagtg tgcaacctac attctcagt 1260
caacggaatc tcccttttga aagagcaacc gttatggcag ctttcagcgg aaacaatgaa 1320
ggacggacat ccgatatgcg gacagaaatt ataaggatga tggaatatgc aaaaccagaa 1380
gatttgcctt tccaggggcg gggagtcttc gagctctcgg acgaaaaggc aacgagcccg 1440
atcgtgcctt cctttgacat gagtaatgaa gggctttatt tcttcggaga caatgcagag 1500
gagtatgaca gt 1512

<210> 10
<211> 504
<212> PRT

<213> Influenza A virus
<400> 10

Met Ser Asp Ile Glu Ala Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr

1 5 10 15

Glu Gln Met Glu Thr Gly Gly Glu Arg Gln Asp Ala Thr Glu Ile Arg
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Arg Met Ile Gly Gly Ile Gly Lys Phe Tyr Ile Gln
 35 40 45
 Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln
 50 55 60

 Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Asn Lys Tyr Leu Glu Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys
 85 90 95
 Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg Val Asp Gly Lys Trp Met Arg
 100 105 110
 Glu Leu Ile Leu Tyr Asp Lys Glu Glu Ile Arg Arg Val Trp Arg Gln
 115 120 125
 Ala Asn Asn Gly Asp Asp Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Ile Met Ile

 130 135 140
 Trp His Ser Asn Leu Asn Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu
 145 150 155 160
 Val Arg Thr Gly Met Asp Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser
 165 170 175
 Thr Leu Pro Arg Arg Ser Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val
 180 185 190
 Gly Thr Ile Thr Met Glu Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn
 195 200 205

 Asp Arg Asn Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala
 210 215 220
 Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Gln Arg Ala Met Met Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn
 245 250 255
 Ala Glu Ile Glu Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu
 260 265 270

Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly

275 280 285
 Leu Ala Val Ala Ser Gly His Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
 290 295 300
 Val Gly Ile Asp Pro Phe Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Phe Ser
 305 310 315 320
 Leu Val Arg Pro Asn Glu Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp
 325 330 335
 Met Ala Cys His Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe
 340 345 350

Ile Arg Gly Lys Lys Val Ile Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly
 355 360 365
 Val Gln Ile Ala Ser Asn Glu Asn Val Glu Ala Met Asp Ser Asn Thr
 370 375 380
 Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Asn Thr Asn Gln Gln Lys Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro
 405 410 415
 Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Val Met

420 425 430
 Ala Ala Phe Ser Gly Asn Asn Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr
 435 440 445
 Glu Ile Ile Arg Met Met Glu Asn Ala Lys Pro Glu Asp Leu Ser Phe
 450 455 460
 Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Ser Pro
 465 470 475 480
 Ile Val Pro Ser Phe Asp Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly
 485 490 495

Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp Ser

500

<210> 11

<211> 1407

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 11

atgaatacaa atcaaagaat aataaccatt gggacagttt gtctgatatg tggaataatt	60
agtctattgt tacagatagg aaacatggtt tcgttatgga tcagccattc aattcagact	120
gaagggaata atcatactga gatgtgcaat caaaatgtca ttacatatgt aaataacaca	180
tgggtgaacc gaacttatgt aaacattagc aataccaaaa ttgttaattg acaggacgtg	240
gtttcagtaa tattaaccgg caattcctct ctctgcccaa taagtgggtg ggctatatac	300
agcaaagaca atagcataag gattggttct aaaggggaca tttttgtcat aagagaacca	360
ttcatttcat gctctcactt ggaatgcaga acttttttct tgacccaagg cgctttgtctg	420
aatgacaagc attctaattg aaccgtcaag gacaggagtc cctatagaac tttaatgagc	480
tgtcccatcg gtgaagctcc atctccatat aactcaaggt tcgaatcagt tgcttgggtca	540
gcaagtgcac gccatgatgg gatgggatgg ctaacaatcg gaatctccgg tccagataat	600
ggagcagtag ctgtttttaa atacaacggt ataataacag atacaataaa aagttggaga	660
aacaaaatat taagaacaca agagtcagaa tgtgtttgta tgaacggttc ttgttttact	720
gtattaactg atggccaag caatgggcaa gcatcgtaca aaatattcaa gatggaaaaa	780
ggaaaaataa ttaaatcaat tgagctggat gcaccaatt accactatga ggaatgctcc	840
tgttatcttg atgcaggcaa agtaatgtgt gtttgcagag acaactggca tgcctcgaac	900
cggccatggg tctcttttca tcagaatcct aattatcaaa taggttacct atgcagtggg	960
gttttcggtg ataaccgcg ttctaattgat ggaaagggca attgtggccc agtacattct	1020
aatggagcaa atggagtga aggattctca tataaatatg gtaatggtgt ttggatagga	1080
aggactaaaa gtatcaactc cagaagtgga ttgaaatga tttgggatcc aaatgggtgg	1140
actggaactg atagtagttt ctctatgaag caggatatta tagcattaac tgattgttca	1200
ggatacagtg gaagttttgt ccaacatcct gaattaacag gaatgaattg cataaggccc	1260
tgtttctggg tagaattaat cagagggcaa cccaaggaaa acaccatctg ggctagcgga	1320
agcagcatct ctttctgtgg tgtaaatggt gaaaccgcaa gctggtcatg gccagacgga	1380
gctgatctgc cattcaccat tgacaag	1407

<210> 12

<211> 469

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 12

Met Asn Thr Asn Gln Arg Ile Ile Thr Ile Gly Thr Val Cys Leu Ile

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

Val Ser Val Ile Leu Thr Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly
85 90 95
Trp Ala Ile Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly
100 105 110
Asp Ile Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His 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 Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser

145 150 155 160
Cys Pro Ile Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser
165 170 175
Val Ala Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Met Gly 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 Lys Ile Leu
210 215 220

Arg Thr Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys Met Asn Gly Ser Cys Phe Thr
225 230 235 240

Val Leu Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe
245 250 255

Lys Met Glu Lys Gly Lys Ile Ile Lys Ser Ile Glu Leu Asp Ala Pro
260 265 270

Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Lys Val
275 280 285

Met Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Ala Ser Asn Arg Pro Trp Val
290 295 300

Ser Phe Asp Gln Asn Leu Asn Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly
305 310 315 320

Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Ser Asn Asp Gly Lys Gly Asn Cys Gly
325 330 335

Pro Val His Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Lys
340 345 350

Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Asn Ser Arg
355 360 365

Ser Gly Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Gly Thr Asp
370 375 380

Ser Ser Phe Ser Met Lys Gln Asp Ile Ile Ala Leu Thr Asp Trp Ser
385 390 395 400

Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Met Asn
405 410 415

Cys Ile Arg Pro Cys Phe Trp Val Glu Leu Ile Arg Gly Gln Pro Lys
420 425 430

Glu Asn Thr Ile Trp Ala Ser Gly Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val
435 440 445

Asn Gly Glu Thr Ala Ser Trp Ser Trp Pro Asp Gly Ala Asp Leu Pro
450 455 460

Phe Thr Ile Asp Lys
465

<210> 13

<211> 756

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 13

atgagtcctc taaccgaggt cgaaacgtat gttctctcta tcgtcccgtc aggccccctc 60

aaagccgaga tagcacagag gctcgaagac gtttttgtag ggaaaaacac cgatcttgag 120

gctctcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggatttta 180

gggtttgtgt tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgttttgtc 240

cagaatgccc tcaatgggaa tggtagacca aacaacatgg acaaggcggt aaaactgtac 300

aggaaactaa aaagggaat aacattccat ggggccaagg aagtagcgct cagttactct 360

gctggtgcac ttgccagttg catgggcctc atatacaaca gaatggggac tgtcgccact 420

gaggtggcat ttgtctggt atgcgcaacc tgtgaacaaa ttgctgattc tcagcatcga 480

tctcatagac aaatggtgac aacaaccaat ccactaatca ggcacgagaa cagaatggta 540

atagccagca caacagctaa ggccatggaa caaatggctg gatcaagtga acaagcagca 600

gaggctatgg aggttgccag tcagctaga caaatgtac aggcaatgag aacaattggg 660

actcaccta gttccagcac tggctaaaa gatgatcttc ttgaaaattt acaggcctat 720

cagaaacgga tgggagtgca aatgcaacga ttcaag 756

<210> 14

<211> 252

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 14

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr

35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg

145

150

155

160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu

165

170

175

Asn Arg Met Val Ile Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met

180

185

190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln

195

200

205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser

210

215

220

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

225

230

235

240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys

245

250

<210> 15

<211> 657

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 15

atggactcca atactgtgtc aagctttcag gtagactgtt tcctttggca catccgcaaa 60

cgatttgcag acaatggatt gggatgatgcc ccattccttg atcggtccg ccgagatcaa 120

aagtccttaa aaggaagggg caacacccit agcctagaca tcgaaacagc cactcttggt 180

gggaaacaaa ttgttgagtg gattttgaaa gaggaatcca gcatataact taagatgacc 240

attgcatctg tgcctacttc gcgctacctt gctgacatga ccctcgagga aatgtcacga 300

gactggttca tgctaatgcc taggcaaaag ataataggcc ctctttgtgt gcgagtggaac 360
caggcgatca tggaaaagaa catcactatg aaagcgaact tcagtgtgat cttaaccga 420
ttagagactt tgatactact aagggtttc actgaggagg gagcaatcgt tggagaaatt 480
tcaccattac cttatcttcc aggacatact aatgaggatg tcaaaaatgc agttggggtc 540
ctcatcgag ggcttgaatg gaatggtaac acggttcgag gctctgaaaa tctacagaga 600
ttcgcttga gaaaccataa tgaggatggg agatcttcac tacctccaga acagaaa 657

<210> 16

<211> 219

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 16

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Lys Gly Arg Gly Asn

35 40 45

Thr Leu Ser Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Leu Val Gly Lys Gln Ile

50 55 60

Val Glu Trp Ile Leu Lys Glu Glu Ser Ser Asp Ile Leu Lys Met Thr

65 70 75 80

Ile Ala Ser Val Pro Thr Ser Arg Tyr Leu Ala Asp Met Thr Leu Glu

85 90 95

Glu Met Ser Arg Asp Trp Phe Met Leu Met Pro Arg Gln Lys Ile Ile

100 105 110

Gly Pro Leu Cys Val Arg Val Asp Gln Ala Ile Met Glu Lys Asn Ile

115 120 125

Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Asn Arg Leu Glu Thr Leu

130 135 140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Ile Val Gly Glu Ile

145 150 155 160

Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Pro Gly His Thr Asn Glu Asp Val Lys Asn

165	170	175
Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Glu Trp Asn Gly Asn Thr Val		
180	185	190
Arg Gly Ser Glu Asn Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Asn His Asn Glu		
195	200	205
Asp Gly Arg Ser Ser Leu Pro Pro Glu Gln Lys		
210	215	
<210>	17	
<211>	1695	
<212>	DNA	
<213>	Influenza A virus	
<400>	17	
atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata		60
tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat		120
gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta		180
ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt agttgcagcg ttgccgatg gatcttagga		240
aaccagagt gcgaattgct gatttccaag gaatcttggc cctacattgt agaaacacca		300
aatcctgaga atggaacatg ttaccaggg tatttcacag actatgaaga actgagggag		360
caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tcccaaaga gagctcatgg		420
cccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcattgtccc ataacgggaa aagcagcttc		480
tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtctgt acccaaact gagcaagtc		540
tatacaaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcac caatctaac		600
ataggggacc aaaggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca		660
cattatagca gaagattcac ccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa		720
ggaagaatca actactactg gacctgcta gaacccgggg atacaataat atttgaggca		780
aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaaactga gtaagggttt tggatcagga		840
atcatcatat caaatgcacc aatgggtgaa tgtaatgcaa agtgtcaa acctcaggga		900
gtataaaca gcagtcttcc ttccagaat gtacaccag taacaatagg agagtgccca		960
aagtatgtca aaagtgcaaa attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt		1020
caatccagag gtttgtttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg		1080
gtagatggtt ggtatggtta tcaccatcag aatgagcaag gatctgggta tgctgcagac		1140

caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaaca aggtgaattc tgtgattgaa 1200
 aaaatgaaca ctcaattcac agctgtgggc aaagaattca acaaaactgga aagaagaatg 1260
 gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgatggg tttctagaca tttggacata taatgcagaa 1320
 ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc atgactccaa cgtgaagaat 1380
 ctgtatgaga aagtaaaaaa ccaattaaaa aataatgcc aagaatagg aaacgggtgt 1440
 ttggaattct atcataagtg taacgatgaa tgcattgaga gtgtgaaaaa tggaacttat 1500
 gactatccaa aatattccga agaatcaaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaag 1560

ttggaatcaa tgggagtcta taatatcctg gcgacttact caacagtcgc cagttcccta 1620
 gtcttttag tctccctggg ggcaatcagc tttctggatgt gttccaatgg gtctttacag 1680
 tgtagaatat gcatc 1695

<210> 18
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <400> 18

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile

50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Ser Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly

65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile

85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130	135	140	
Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe			
145	150	155	160
Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn			
	165	170	175
Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu			
	180	185	190
Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr			
	195	200	205
His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg			
	210	215	220
Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu			
225	230	235	240
Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile			
	245	250	255
Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu			
	260	265	270
Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met			
	275	280	285
Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser			
	290	295	300
Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro			
305	310	315	320
Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn			
	325	330	335
Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe			
	340	345	350
Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His			
	355	360	365
His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr			
	370	375	380

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

<210> 19

<211> 1407

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 19

atgaatccaa atcaaaagat aataacgatt ggctctgttt ctcttactat tgccacaatg 60

tgcttcctta tgcaaattgc catcttggtg actaatgtaa cattgcactt caatcaatat 120

gaatgcaact accccccaaa caaccaagta atactgtgtg aaccaacaat aatagaaaga 180

aacataacag agatagtgtg tctgaccaac accaccatag agaaggaaat atgccccaaa 240
 ctacgagaat acagaaattg gtcaaagccg caatgtaaaa ttacagggtt tgcacctttt 300
 tccaaggaca attcgattag gctttctgct ggtggggaca tttgggtgac gagagaacct 360
 tatgtgtcat gcgatcctga taagtgttat cagtttcccc ttggacaagg aacaacatta 420
 aacaacaggc attcaaatga cacagtacat gataggaccc cttatcgaac cctattgatg 480
 aatgagttgg gtattccatt ccatttgggg accaaacaag tgtgcatagc atggtccagc 540

 tcaagttgtc atgatggaaa agcatggcct cagttttgta ttactgggca tgaatrraat 600
 gcaactgcta gcttcattta caatgggagg ctgttagata gtattggttc atggtccaaa 660
 aaaatactca ggacacagga gtcggaatgt gtttgcatca atggaacttg tacagtagta 720
 atgactgatg ggagtgcctc aggaatagct gacactaaaa tattattcat tgaagagggg 780
 aaaatcgctc atattagccy attgttagga agtgcctcagc atgtagagga gtgctcctgt 840
 tatccccgat atcctgggtg cagatgcac tgtagagaca actggaaagg ttccaataga 900
 cccgtcgtag atataaatgt aaaggattat agcattgttt ccagttatgt gtgctcagga 960

 ctgtttggag atacaccag aaaagacgac agatccagca gtagcgattg tctgaatcct 1020
 aacaatgagg aaggggggca tggagtgaag ggctgggcct ttgatgatgg aaatgatgtg 1080
 tggatgggaa gaacaatcaa cgagacgtta cgtcaggtt atgaaacctt caaagtcatt 1140
 gaaggctggt ccaaacctaa ttccaaattg cagataaata ggcaagtcac agttgaaaga 1200
 ggtgataggt ccggttattc tggcattttc tctgttgaag gcaaaagctg tatcaatcgg 1260
 tgcttttatg tggagttgat aagaggaagg aaacaggaaa ctgcagtatg gtggacgtca 1320
 aacagtattg ttgtgttttg tggcacctca ggtacatatg gaacaggctc atggcctgat 1380

 ggggcgaaca tcaatctcat gcctgta 1407

 <210> 20
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <220><221> SITE
 <222> (199)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> SITE
 <222> (267)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 20

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

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

305 310 315 320
 Leu Val Gly Asp Thr Pro Arg Lys Asp Asp Arg Ser Ser Ser Ser Asp
 325 330 335
 Cys Leu Asn Pro Asn Asn Glu Glu Gly Gly His Gly Val Lys Gly Trp
 340 345 350
 Ala Phe Asp Asp Gly Asn Asp Val Trp Met Gly Arg Thr Ile Asn Glu
 355 360 365
 Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Glu Thr Phe Lys Val Ile Glu Gly Trp Ser
 370 375 380

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

450 455 460
 Asn Leu Met Pro Val

465

<210> 21

<211> 1695

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA gene of Influenza 10-0036-2 (n+5, relative to parent)

<400> 21

atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata	60
tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat	120
gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta	180
ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccggatg gatcttagga	240
aaccagagt gcgaattgct gatttccaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca	300
aatcctgaga atggaacatg ttaccagggt tatttcacag actatgaaga actgaggag	360
caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tccccaaaga gagctcatgg	420
cccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcatgtccc ataacgggaa aagcagcttc	480
tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtacgt acccaaacct gagcaagtc	540
tatacaaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcatca cccatctaac	600
ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca	660
cattatagca gaagattcac cccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa	720
ggaagaatca actactactg gacctgcta gaacccgggg atacaataat atttgaggca	780
aatggaaatc taatagcacc aagggtatgcc ttcgaaactga gtaagggttt tggatcagga	840
atcatcacat caaatgcaac aatgggtgaa tgtaatgcaa cgtgtcaaac acctcaggga	900
gctataaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacaccag taacaatagg agagtccca	960
aagtatgtca aaagtgcaaa attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt	1020
caatccagag gtttgtttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg	1080
gtagatggtt ggtatggtta tcaccatcag aatgagcaag gatctgggta tgctgcagac	1140
caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa	1200
aaaatgaaca ctcaattcac agctgtgggc aaagaattca acaactgga aagaagaatg	1260
gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgatggg tttctagaca tttggacata taatgcagaa	1320
ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc atgactcaa cgtgaagaat	1380
ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaatagg aaacgggtgt	1440
tttgaattct atcataagtg taacgatgaa tgcatggaga gtgtgaaaaa tggaaattat	1500
gactatccaa aatattccga agaatcaaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaaa	1560
ttggaatcaa tgggagtcta taatatcctg gcgatctact caacagtcgc cagttcccta	1620
gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccaatgg gtctttacag	1680

tgtagaatat gcatc

1695

<210> 22

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA predicted AA of Influenza 10-0036-2 (n+5, relative to parent)

<400> 22

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr

1 5 10 15
Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr

20 25 30
Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn

35 40 45
Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile

50 55 60
Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly

65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

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

145 150 155 160
Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Thr Tyr Pro Asn

165 170 175
Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu

180 185 190
Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr

195	200	205	
His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg			
210	215	220	
Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu			
225	230	235	240
Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile			
245	250	255	
Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu			
260	265	270	
Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Thr Met			
275	280	285	
Gly Glu Cys Asn Ala Thr Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser			
290	295	300	
Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro			
305	310	315	320
Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn			
325	330	335	
Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe			
340	345	350	
Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His			
355	360	365	
His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr			
370	375	380	
Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu			
385	390	395	400
Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu			
405	410	415	
Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu			
420	425	430	
Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu			
435	440	445	

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

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

<210> 23
 <211> 1695
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HA gene of Influenza 10-0036-2 (n+4, relative to parent)

<400> 23
 atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata 60
 tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat 120
 gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta 180
 ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccgcatg gatcttagga 240
 aaccagagt gcgaattgct gatttccaat gaatcttggt cctacattgt agaaacacca 300
 aatcctgaga atggaacatg ttaccagagg tatttcacag actatgaaga actgaggagg 360
 caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tcccaaaga gagctcatgg 420
 cccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcatgctccc ataacgggaa aagcagcttc 480
 tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtacgt acccaaacct gagcaagtcc 540
 tatacaaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcatca cccatctaac 600

ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca 660
cattatagca gaagattcac ccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa 720
ggaagaatca actactactg gacctgcta gaacccgggg atacaataat atttgaggca 780
aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaactga gtaagggttt tggatcagga 840

atcatcacat caaatgcaac aatgggtgaa tgtaatgcaa agtgtcaaac acctcaggga 900
gctataaaca gcagtcttcc ttccagaat gtacaccag taacaatagg agagtgccca 960
aagtatgtca aaagtgcaaa attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt 1020
caatccagag gtttgtttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg 1080
gtagatgggt ggtaggtta tcaccatcag aatgagcaag gatctgggta tgctgcagac 1140
caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa 1200
aaaatgaaca ctcaattcac agctgtgggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg 1260

gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgatggg ttcttagaca ttggacata taatgcagaa 1320
ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc atgactcaa cgtgaagaat 1380
ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaaatagg aaacgggtgt 1440
tttgaattct atcataagt taacgatgaa tgcattgaga gtgtgaaaaa tggaaacttat 1500
gactatccaa aatattccga agaataaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaaa 1560
ttggaatcaa tgggagtcta taatatctg gcgatctact caacagtcgc cagttcccta 1620
gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccaatgg gtctttacag 1680

tgtagaatat gcac 1695

<210> 24

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA predicted AA of Influenza 10-0036-2 (n+4, relative to parent)

<400> 24

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60
 Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95
 Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110

 Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125
 Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140
 Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
 145 150 155 160
 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Thr Tyr Pro Asn
 165 170 175
 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu

 180 185 190
 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205
 His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
 210 215 220
 Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu
 225 230 235 240
 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255

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

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320
 Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn

 325 330 335
 Thr Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
 340 345 350
 Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
 355 360 365
 His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr
 370 375 380
 Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400

 Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
 405 410 415
 Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430
 Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 435 440 445
 Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460
 Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys

 465 470 475 480
 Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495
 Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
 500 505 510
 Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn
 515 520 525
 Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
 530 535 540

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

545	550	555	560
Cys Arg Ile Cys Ile			
	565		
<210>	25		
<211>	1695		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	HA gene of Influenza 10-0036-2 (n+3, relative to parent)		
<400>	25		
atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata		60	
tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat		120	
gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta		180	
ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccgatg gatcttagga		240	
aaccagagt gcgaattgct gatttccaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca		300	
aatcctgaga atggaacatg ttaccagggt tatttcacag actatgaaga actgagggag		360	
caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tcccaaaga gagctcatgg		420	
cccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcatgtctcc ataacgggaa aagcagcttc		480	
tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtacgt acccaaacct gagcaagtcc		540	
tatacaaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcacata cccatctaac		600	
ataggggacc aaagggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca		660	
cattatagca gaagattcac ccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa		720	
ggaagaatca actactactg gacctgcta gaacccgggg atacaataat atttgaggca		780	
aatggaaatc taatagcacc aagggtatgcc ttcgaaactga gtaagggttt tggatcagga		840	
atcatcacat caaatgcacc aatgggtgaa tgtaaatgcaa agtgtcaaac acctcagga		900	
gctataaaca gcagtcttcc ttccagaat gtacaccag taacaatagg agagtccca		960	
aagtatgtca aaagtgcaaa attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt		1020	
caatccagag gtttgtttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg		1080	
gtagatggtt ggtatggtta tcaccatcag aatgagcaag gatctgggta tgctgcagac		1140	
caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaca aggtgaattc tgtgattgaa		1200	
aaaatgaaca ctcaattcac agctgtgggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg		1260	
gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgatggg tttctagaca tttggacata taatgcagaa		1320	
ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc atgactcaa cgtgaagaat		1380	

ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaaatagg aaacgggtgt 1440

tttgaattct atcataagtg taacgatgaa tgcattggaga gtgtgaaaaa tggaaacttat 1500

gactatccaa aatattccga agaatacaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaag 1560

ttggaatcaa tgggagtcta taatatcctg gcgattctact caacagtcgc cagtttccta 1620

gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc tttctggatgt gttccaatgg gtctttacag 1680

tgtagaatat gcatc 1695

<210> 26

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA predicted AA of Influenza 10-0036-2 (n+3, relative to parent)

<400> 26

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile

50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly

65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile

85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Thr Tyr Pro Asn
 165 170 175
 Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
 195 200 205
 His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg

 210 215 220
 Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu
 225 230 235 240
 Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
 245 250 255
 Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu
 260 265 270
 Leu Ser Lys Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro Met
 275 280 285

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

 355 360 365
 His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Gln Ser Thr
 370 375 380
 Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
 385 390 395 400
 Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu

405 410 415
 Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
 420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
 435 440 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
 450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
 465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
 485 490 495

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

500 505 510
 Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn

515 520 525
 Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val

530 535 540
 Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln

545 550 555 560
 Cys Arg Ile Cys Ile

565

<210> 27

<211> 1695

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA gene of Influenza 10-0036-2 (n+2, relative to parent)

<400> 27

atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata	60
tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat	120
gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta	180
ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt aattgcagcg ttgccggatg gatcttagga	240

aaccagagt gcgaattgct gatttccaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca 300

aatcctgaga atggaacatg ttaccagagg tatttcacag actatgaaga actgaggag 360

caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tcccacaaaga gagtcatgg 420

cccaaccaca ccgtaaccgg agtgatcatc tcatgctccc ataacgggaa aagcagcttc 480

tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtctgt acccaaacct gagcaagtc 540

tatacaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcacac cccatctaac 600

ataggggacc aaaggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca 660

cattatagca gaagattcac cccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aatcaggaa 720

ggaagaatca actactactg gaccctgcta gaacccgggg atacaataat atttgaggca 780

aatggaatc taatagcacc aaggtatgcc ttggaactga gtaagggttt tggatcagga 840

atcatcacat caaatgcacc aatgggtgaa tgaatgcaa agtgtcaaac acctcaggga 900

gctataaaca gcagtcttcc ttccagaat gtacaccag taacaatagg agagtgcaca 960

aagtatgtca aaagtgcaca attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt 1020

caatccagag gtttgttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg 1080

glagatgggt ggatgggta tcaccatcag aatgagcaag gatctgggta tgctgcagac 1140

caacaaagca caaaaatgc cattaatggg attacaaaca aggtgaattc tgtgattgaa 1200

aaaatgaaca ctcaattcac agctgtgggc aaagaattca acaactgga aagaagaatg 1260

gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgatggg ttcttagaca ttggacata taatgcagaa 1320

ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc atgactcaa cgtgaagaat 1380

ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaaatagg aaacgggtgt 1440

tttgaattct atcataagt taacgatgaa tgcattgaga gtgtgaaaaa tggaaattat 1500

gactatcaa aatattccga agaatcaaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaag 1560

ttggaatcaa tgggagtcta taatatctg gcgactact caacagtcgc cagttcccta 1620

gttcttttag tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt gttccaatgg gtctttacag 1680

tgtagaatat gcac 1695

<210> 28

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA predicted AA of Influenza 10-0036-2 (n+2, relative to parent)

<400> 28

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Val Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

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

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Asn Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr
195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

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

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile

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

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

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

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

500	505	510
Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Asn		
515	520	525
Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val		
530	535	540
Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln		
545	550	555
Cys Arg Ile Cys Ile		
565		
<210> 29		
<211> 1695		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> HA gene of Influenza 10-0036-2 (n+1, relative to parent)		
<400> 29		
atgaaagtaa aactaatggt tctgttatgt acatttacag ctacatatgc agacacaata	60	
tgtgtaggct accatgccaa caactcaact gacactgttg acacagtact tgagaagaat	120	
gtgacagtga cacactctgt caacctactt gaggacagcc acaatggaaa actatgtcta	180	
ctaaaaggaa tagctccact acaattgggt agttgcagcg ttgccggatg gatcttagga	240	
aaccagagt gcgaattgct gatttccaat gaatcttggc cctacattgt agaaacacca	300	
aatcctgaga atggaacatg ttaccaggg tatttcacag actatgaaga actgagggag	360	
caattgagtt cagtatcttc atttaagagg ttcgaaatat tcccaaaga gagctcatgg	420	
ccaaccaca ccgtaaccgg agtgtcatca tcatgtctcc ataacgggaa aagcagcttc	480	
tacagaaatt tgctatggct gacggtgaag aacggtctgt acccaaacct gagcaagtc	540	
tatacaaaca aaaaggagaa agaagtcctt gtactatggg gtgttcatca cccatctaac	600	
ataggggacc aaaggccct ctatcataca gaaaatgctt atgtctctgt agtgtcttca	660	
cattatagca gaagattcac ccagaaata gccaaaagac ccaaggtgag aaatcaggaa	720	
ggaagaatca actactactg gacctgcta gaacccgggg atacaataat atttgaggca	780	
aatggaaatc taatagcacc aaggtatgcc ttcgaaactga gtaagggttt tggatcagga	840	
atcatcatat caaatgcacc aatgggtgaa tgtaatgcaa agtgtcaaac acctcaggga	900	
gctataaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacaccag taacaatagg agagtgccca	960	

aagtatgtca aaagtgcaaa attaaggatg gttacaggac taaggaacac cccatccatt 1020
 caatccagag gtttgtttgg agccattgcc ggtttcattg aaggagggtg gactggaatg 1080
 gtagatgggtt ggtatgggta tcaccatcag aatgagcaag gatctgggta tgctgcagac 1140
 caacaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaaca aggtgaattc tgtgattgaa 1200
 aaaatgaaca ctcaattcac agctgtgggc aaagaattca acaaactgga aagaagaatg 1260
 gaaaacttaa ataaaaaggt tgatgatggg tttctagaca tttggacata taatgcagaa 1320

ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc atgactccaa cgtgaagaat 1380
 ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaaa aataatgcca aagaatagg aaacgggtgt 1440
 ttggaattct atcataagtg taacgatgaa tgcattggaga gtgtgaaaaa tggaaacttat 1500
 gactatccaa aatattccga agaatacaag ttaaacaggg agaaaattga tggagtgaat 1560
 ttggaatcaa tgggagtcta taatatctg gcgatctact caacagtcgc cagttcccta 1620
 gtcttttag tctccctggg ggcaatcagc tttctggatgt gttccaatgg gtccttacag 1680
 tgtagaatat gcatc 1695

<210> 30

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA predicted AA of Influenza 10-0036-2 (n+1, relative to parent)

<400> 30

Met Lys Val Lys Leu Met Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile

50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly

65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile

85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe

100 105 110
Thr Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe

115 120 125
Lys Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr

130 135 140
Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe

145 150 155 160
Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Val Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn

165 170 175
Leu Ser Lys Ser Tyr Thr Asn Lys Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu

180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Ser Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu Tyr

195 200 205
His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg

210 215 220
Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asn Gln Glu

225 230 235 240
Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile

245 250 255
Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Glu

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

275 280 285
Gly Glu Cys Asn Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser

290 295 300
Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro

305 310 315 320
Lys Tyr Val Lys Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn

325 330 335

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

340 345 350

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