



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월01일
(11) 등록번호 10-1229202
(24) 등록일자 2013년01월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/01 (2006.01) *C12N 15/44* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 39/145* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7011414(분할)
(22) 출원일자(국제) 2003년04월25일
심사청구일자 2011년05월26일
(85) 번역문제출일자 2011년05월19일
(65) 공개번호 10-2011-0059911
(43) 공개일자 2011년06월07일
(62) 원출원 특허 10-2004-7017199
원출원일자(국제) 2003년04월25일
심사청구일자 2008년04월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/012728
(87) 국제공개번호 WO 2003/091401
국제공개일자 2003년11월06일
(30) 우선권주장
60/375,675 2002년04월26일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Virology. 1988. Vol. 163, No. 2, pp.
429-443.*
PNAS. 2000. Vol. 97, No. 11, pp. 6108-6113.*
VIRAL IMMUNOLOGY. 2002, vol. 15, no. 2, pp.
295-323.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
메디문 엘엘씨
미국 20878 메릴랜드주 게이트즈부르크 원 메디문 웨이
- (72) 발명자
호프만 에리히
미국 캘리포니아 주 94084 씨니베일 페어 옥스 아벤뉴 #엔212 655
- 진 홍**
미국 캘리포니아 주 95014 쿠퍼티노 산타 파울라 아벤뉴 22385
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
강승옥, 김진희

전체 청구항 수 : 총 7 항

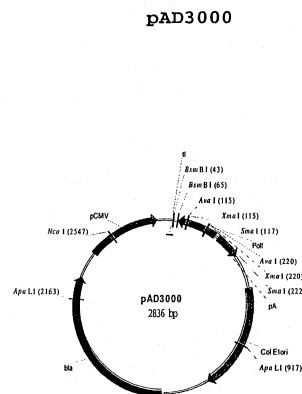
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **인플루엔자 바이러스의 생산을 위한 다중 플라스미드 시스템**

(57) 요약

세포 배양에서 재조합 인플루엔자 백신으로 적합한 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위한 벡터와 방법이 제공된다. 다중 플라스미드 인플루엔자 바이러스 발현 시스템에서 사용하기 위한 양방향성 발현 벡터가 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

루 빈

미국 캘리포니아 주 94022 로스 알토스 로스 알토스 스퀘어 74

듀크 그레그

미국 캘리포니아 주 94062 레드우드 시티 업랜드 로드 715

캠블 조오지 윌리엄

미국 캘리포니아 주 95070 사라토가 비아 그랑데 드라이브

(30) 우선권주장

60/394,983 2002년07월09일 미국(US)

60/410,576 2002년09월12일 미국(US)

60/419,802 2002년10월18일 미국(US)

60/420,708 2002년10월23일 미국(US)

60/457,699 2003년03월24일 미국(US)

60/462,361 2003년04월10일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 돌연변이를 인플루엔자 B형 바이러스 게놈으로 도입하여, 114번 및 410번 위치로 이루어진 위치에서 NP 단백질 내 아미노산 치환을 초래하는 단계; 및
- (b) 돌연변이 인플루엔자 바이러스 게놈을 복제시켜 온도 민감성 바이러스를 제조하는 단계를 포함하는 온도 민감성(ts) 인플루엔자 바이러스의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, NP 내 치환은 114번 위치에서 발린에서 알라닌으로 치환 및 410번 위치에서 프롤린에서 히스티딘으로의 치환으로 구성되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 돌연변이 인플루엔자 바이러스 게놈을 암탉의 알에서 복제시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 돌연변이 인플루엔자 바이러스 게놈을 세포 배양물 중에서 복제시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 바이러스를 암탉의 알에서 증폭시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 33℃의 온도에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 세포 배양물이 배로 세포, MDCK 세포, 293T 세포 및 COS 세포 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2002년 4월 26일 출원된 미국 가출원 제 60/375,675호 ; 2002년 7월 9일 출원된 제 60/394,983호 ; 2002년 9월 12일 출원된 제 60/410,576호 ; 2002년 10월 18일 출원된 제 60/419,802호 ; 2002년 10월 23일 출원된 제 60/420,708호 ; 2003년 3월 24일 출원된 제 60/457,699호 (Attorney Docket Number 26-000250US) ; 및 2003년 4월 10일에 출원된 "인플루엔자 바이러스의 생산을 위한 다중-플라스미드 시스템"이라는 발명의 명칭의 Attorney Docket Number 26- 000260US 호의 우선권과 이익을 가지며, 이들 각각은 전체가 참고로 본원에 통합된다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 분절화된 단쇄 RNA 게놈을 함유한 내부 리보뉴클레오타이드 코어 및 매트릭스 단백질이

붙어있는 외부 지질단백질 외피로 구성된다. 인플루엔자 A와 B 바이러스 각각은 음성 극성을 갖는 단쇄 RNA의 분절 8개를 함유한다. 인플루엔자 A 게놈은 적어도 11개의 폴리펩티드를 암호한다. 분절 1-3은 바이러스 RNA-의 존성 RNA 폴리머라제를 구성하는 세 개의 폴리펩티드를 암호한다. 분절 1은 폴리머라제 복합체 단백질 PB2를 암호한다. 나머지 폴리머라제 단백질 PB1과 PA는 분절 2와 분절 3에 의해 각각 암호된다. 또한, 일부 인플루엔자 A 균주의 분절 1은 PB1 암호 영역내의 다른 리딩 프레임으로부터 생산되는 작은 단백질인 PB1-F2를 암호한다. 분절 4는 감염동안의 세포 부착과 진입에 관여하는 헤마글루티닌(HA) 표면 당단백질을 암호한다. 분절 5는 바이러스 RNA와 연합된 주요 구조 성분인 뉴클레오캡시드 핵단백질(NP) 폴리펩티드를 암호한다. 분절 6은 뉴라미니 다제(NA) 외피 당단백질을 암호한다. 분절 7은 상이하게 스플라이스된 mRNA들로부터 번역되는, M1과 M2로 표시되는 두 가지의 매트릭스 단백질을 암호한다. 분절 8은 다르게 스플라이스된 mRNA 변이체들로부터 번역되는 두 가지의 비구조 단백질인 NS1과 NS2(NEP)를 암호한다.

[0003] 인플루엔자 B의 8개의 게놈 분절은 11개의 단백질을 암호한다. 세 개의 가장 큰 유전자들은 RNA 폴리머라제의 성분인 PB1, PB2 및 PA를 암호한다. 분절 4는 HA 단백질을 암호한다. 분절 5는 NP를 암호한다. 분절 6은 NA 단백질과 NB 단백질을 암호한다. NB와 NA 두 단백질 모두 비시스트론릭(biscistronic) mRNA의 중복 리딩 프레임으로부터 번역된다. 인플루엔자 B의 분절 7은 또한 두 단백질 M1과 BM2를 암호한다. 가장 작은 분절은 두 생성물을 암호하여, NS1은 전질이 RNA로부터 번역되고, NS2는 스플라이스된 mRNA 변이체로부터 번역된다.

[0004] 인플루엔자 바이러스에 대해 특이적인 보호성 면역 반응을 생성할 수 있는 백신이 50년에 걸쳐 생산되어 왔다. 백신은 전체 바이러스 백신, 잘린 바이러스 백신, 표면 항원 백신 및 생 약독화된 바이러스 백신으로 특징지을 수 있다. 이들 백신 타입의 임의의 것의 적절한 체계가 전신성 면역 반응을 생산할 수 있는 한편, 생 약독화된 바이러스 백신은 또한 호흡기에서 국소적 점막 면역을 자극할 수 있다.

[0005] FluMistTM은 인플루엔자 질병으로부터 아이들과 성인을 보호하는 생 약독화된 백신이다(Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338: 1405-12; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults : a randomized controlled trial JAMA 282: 137-44). FluMistTM 백신 균주는 현재 순환중인 야생형 균주로부터 유래된 HA 및 NA 유전자 분절과 일반적인 마스터 공여 바이러스(master donor virus)(MDV)로부터의 여섯 개의 유전자 분절, PB1, PB2, PA, NP, M 및 NS를 함유한다. FluMist의 인플루엔자 A 균주를 위한 MDV(MDV-A)는 야생형 A/Ann Arbor/6/60(A/AA/6/60) 균주를 연속하여 보다 낮은 온도에서 일차 닭 신장 조직 배양에서 연속 계대하여 생성되었다(Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213: 612-4). MDV-A는 25℃에서 효율적으로 복제하지만(ca, 저온 적응됨(cold adapted)), 그 성장은 38 및 39℃에서 제한된다(ts, 온도 민감성). 부가적으로, 이 바이러스는 감염된 흰죽제비의 폐에서 복제하지 않는다(att, 약독화). ts 표현형은 호흡기관의 가장 차가운 영역을 제외한 모두에서 그 복제를 제한함으로써 인간에서 백신의 약독화에 기여하는 것으로 생각된다. 이 특성의 안정성은 동물 모델과 임상 연구에서 입증되었다. 화학적 돌연변이 유발에 의해 생성된 인플루엔자 균주의 ts 표현형과는 대조적으로, MDV-A의 ts 특성은 감염된 햄스터를 통한 계대 후 또는 아이들로부터의 분비(shed) 분리물에서 바뀌지 않았다(최근의 리뷰를 위해서는 Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines Viral Immunol 15: 295-323를 참고한다).

[0006] 12개의 다른 6:2 재배열(reassortant) 균주에 관련된 20,000명이 넘는 성인과 아이들에서의 임상 연구는 이들 백신이 약독화되고, 안전하며 효과적임을 보여주었다(Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N Engl J Med 338: 1405-12; Boyce et al. (2000) Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19: 217-26; Edwards et al. (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J Infect Dis 169: 68-76; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults : a randomized controlled trial JAMA 282: 137-44). MDV-A의 여섯 개의 내부 유전자와 야생형 바이러스의 두 개의 HA 및 NA 유전자 분절을 보유한 재배열체(6:2 재배열체)는 ca, ts 및 att 표현형을 일정하게 유지한다(Maassab et al. (1982) Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets J Infect Dis 146: 780-900).

[0007] 오늘날, 미국에서 시판되는 모든 인플루엔자 백신은 배발생된 암탉의 알에서 증식되었다. 인플루엔자 바이러스

가 암탉의 알에서 잘 성장함에도 불구하고, 백신의 생산은 알의 이용가능성에 의존한다. 알의 공급이 조직화되어야 하며, 백신 생산을 위한 균주는 다음 독감 시즌보다 몇 개월 앞서 선택되어야 하므로, 이 접근법의 유연성을 제한하며, 종종 생산과 분배의 지연과 부족을 야기한다.

[0008] 세포 배양에서 인플루엔자 바이러스를 생산하는 시스템이 또한 최근 몇년사이에 개발되었다(예를 들어, Furminger. Vaccine Production, in Nicholson et al. (eds) Textbook of Influenza pp. 324-332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, in Cohen & Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp. 141-151를 참고). 일반적으로, 이들 방법은 선택된 바이러스 균주로 적합한 불멸화된 숙주 세포를 감염시키는 것에 관련된다. 암탉의 알에서 백신을 생산하는 것과 관련된 어려움의 다수를 제거하는 반면, 모든 인플루엔자 병원성 균주가 확립된 조직 배양 방법에 따라 잘 자라고 생산될 수 있는 것은 아니다. 또한, 예를 들어, 약독화, 온도 민감성 및 저온 적응과 같은 바람직한 특성을 가지며 생 약독화 백신의 생산에 적합한 많은 균주가 확립된 방법을 이용한 조직 배양에서 성공적으로 성장하지 못했다.

[0009] 재조합 DNA로부터 인플루엔자 바이러스의 생산은 인플루엔자 백신 생산을 위한 조직 배양 방법의 유연성과 유용성을 크게 증가시킬 것이다. 최근, 바이러스 게놈을 암호화하는 cDNA를 통합한 재조합 플라스미드로부터 인플루엔자 A 바이러스를 생산하는 시스템이 보고되었다 (Neumann et al. (1999) Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9345-9350; Fodor et al. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J. Virol 73: 9679-9682; Hoffmann et al. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97: 6108-6113; WO01/83794). 이들 시스템은 임의의 선택된 균주로부터의 면역원성 HA 및 NA 단백질을 발현하는 재조합(recombinant) 바이러스와 재배열(reassortant) 바이러스를 생산할 가능성을 제공한다. 하지만, 인플루엔자 A 바이러스와 달리, 인플루엔자 B 바이러스를 위한 플라스미드-단독 시스템을 개시하는 보고서는 나오지 않았다.

[0010] 부가적으로, 현재 이용가능한 플라스미드 단독 시스템의 어느 것도 생 약독화된 백신 생산에 적합한 약독화되고, 온도 민감하며, 저온 적응된 균주를 생성하는 데 적합하지 않다. 본 발명은 전적으로 클론된 cDNA로부터 인플루엔자 B 바이러스를 생산하기 위한 8 플라스미드 시스템, 및 백신 제제에 적합한 약독화된 생 인플루엔자 A 및 B 바이러스의 생산 방법을 제공하며, 예를 들어 비강내 투여에 유용한 생 바이러스 백신 제제가 있으며, 본 명세서의 검토시 명백할 많은 다른 효과를 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 세포 배양에서 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위한 다중-벡터 시스템, 및 예를 들어, 비강내 백신 제제로 투여하기에 적합한 것들과 같은, 생 약독화된 인플루엔자 백신을 비롯한, 백신으로 적합한, 예를 들어 약독화된(att), 저온 적응된(ca) 및/또는 온도 민감한(ts) 인플루엔자 바이러스를 비롯한 재조합 및 재배열 인플루엔자 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0012] 제 1 양태에서, 본 발명은 예를 들어 헬퍼 바이러스의 부재하에서의, 세포 배양(즉, 무-헬퍼 바이러스 세포 배양 시스템)에서 재조합 인플루엔자 B 바이러스를 생산하는 방법 및 벡터를 제공한다. 본 발명의 방법은 각각 인플루엔자 B 바이러스의 일부를 포함하고 있는 다수의 벡터를 바이러스 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포 집단내로 도입하는 것을 포함한다. 숙주 세포를 바이러스 성장을 허용하는 조건하에서 배양하고, 인플루엔자 바이러스를 회수한다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 B 바이러스는 약독화된 바이러스, 저온 적응된 바이러스 및/또는 온도 민감성 바이러스이다. 예를 들어, 한 구체예에서, 벡터-유래된 재조합 인플루엔자 B 바이러스는, 예를 들어 비강내 백신 제제로, 생 약독화된 백신으로 투여하기에 적합한 것과 같은, 약독화된, 저온 적응된, 온도 민감한 바이러스이다. 예시적인 구체예에서, 바이러스는 예를 들어 ca B/Ann Arbor/1/66 바이러스 게놈과 같은 인플루엔자 B/Ann Arbor/1/66 바이러스 게놈의 전부 또는 일부를 통합한 복수의 벡터를 도입함으로써 생산된다.

[0013] 예를 들어, 일부 구체예에서, 인플루엔자 B 바이러스는 인플루엔자 균주 ca B/Ann Arbor/1/66의 특징적인 생물학적 특성에 영향을 주는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 인공적으로 조작된 인플루엔자 바이러스이다. 그러한 인플루엔자 바이러스는 PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) 및 NP³⁴ (D34G)와 같은, PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴ 위치 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 야기하는 돌연변이를

포함한다. 개별적으로 또는 함께, 야생형 바이러스에 비하여 증가된 온도 민감성, 저온 적응 또는 약독화를 야기하는 (상기 위치들 중 하나 이상에서의) 임의 돌연변이는 본 발명의 내용에서 적합한 돌연변이이다.

[0014] 일부 구체예에서, 다른 인플루엔자 균주의 면역원성 인플루엔자 표면 항원을 암호화하는 하나 이상의 게놈 분절과 함께 하나의 인플루엔자 B 균주의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을 포함한 벡터 다수를 숙주 세포 집단내로 도입한다. 예를 들어, 선택된 약독화된, 저온 적응된 및/또는 온도 민감성 인플루엔자 B 균주, 예를 들어 B/Ann Arbor/1/66의 ca, att, ts 균주, 또는 상기에서 지정한 위치들 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 포함하는 인공적으로 조작된 인플루엔자 B 균주의 적어도 6개의 내부 게놈 분절을, 다른 바이러스 균주로부터 유래된 면역원성 항원을 암호화하는 하나 이상의 분절과 함께 숙주 세포 집단내로 도입한다. 일반적으로 면역원성 표면 항원은 헤마글루티닌(HA) 및/또는 뉴라미니다제(NA) 항원의 어느 하나 또는 둘다를 포함한다. 면역원성 표면 항원을 암호화하는 단일 분절이 도입되는 구체예에서, 선택된 바이러스의 7개의 상보적 분절이 또한 숙주 세포내로 도입된다.

[0015] 일부 구체예에서, 인플루엔자 B 바이러스 게놈 분절을 포함한 다수의 플라스미드 벡터를 숙주 세포 집단내로 도입한다. 예를 들어, 각각 다른 게놈 분절을 포함하는 8개의 플라스미드를 이용하여 완전한 인플루엔자 B 게놈을 숙주 세포내로 도입한다. 다르게는, 보다 작은 게놈 하부서열을 포함한 더 많은 수의 플라스미드들을 이용할 수 있다.

[0016] 일반적으로, 본 발명의 플라스미드 벡터는 양방향성 발현 벡터이다. 본 발명의 양방향성 발현 벡터는 일반적으로 제 1 프로모터 및 제 2 프로모터를 포함하며, 이때 제 1 및 제 2 프로모터는 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절을 비롯한 바이러스 핵산을 암호화하는 동일한 이중쇄 cDNA의 다른 섹들에 작동적으로 연결된다. 선택적으로, 양방향성 발현 벡터는 폴리아데닐화 시그널 및/또는 종결인자 서열을 포함한다. 예를 들어, 폴리아데닐화 시그널 및/또는 종결인자 서열은 두 프로모터에 대하여 내부에서 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절에 인접하여 위치할 수 있다. 본 발명의 내용에서 하나의 바람직한 폴리아데닐화 시그널은 SV40 폴리아데닐화 시그널이다. 본 발명의 예시적인 플라스미드 벡터는 도 1에 예시된 플라스미드 pAD3000이다.

[0017] 본 발명 벡터는 벡터 프로모터로부터 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포내로 도입된다. 숙주 세포의 바람직한 예는 베로(Vero) 세포, Per.C6 세포, BHK 세포, PCK 세포, MDCK 세포, MDBK 세포, 293 세포(예, 293T 세포), 및 COS 세포를 포함한다. 여기서 개시된 pAD3000 플라스미드 벡터와 함께, Vero 세포, 293 세포, 및 COS 세포가 특히 적합하다. 일부 구체예에서, 이들 세포주중 적어도 2개의 혼합물의 공배양물, 예를 들어 COS와 MDCK 세포의 배합물 또는 293T와 MDCK 세포의 배합물이 숙주 세포 집단을 구성한다.

[0018] 인플루엔자 B 벡터를 포함하는 숙주 세포를 이어서 바이러스의 복제와 조립을 허용하는 조건하에서 성장시킨다. 일반적으로, 본 발명의 인플루엔자 B 플라스미드를 통합한 숙주 세포는 37℃ 미만의 온도에서, 바람직하게는 35℃ 또는 그 이하의 온도에서 배양된다. 일반적으로, 상기 세포는 32℃와 35℃ 사이의 온도에서 배양된다. 일부 구체예에서, 세포는 약 32℃와 34℃ 사이의 온도, 예를 들어 약 33℃에서 배양된다. 높은 타이터까지 바이러스의 복제를 허용하는 적합한 기간동안 배양한 후, 재조합 및/또는 재배열 바이러스를 회수한다. 선택적으로, 회수된 바이러스를 불활성화시킬 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포 집단내로 도입하고, 세포를 35℃ 이하의 온도에서 배양하여 인플루엔자 바이러스를 회수함으로써 세포 배양에서 재조합 인플루엔자 바이러스를 생산하는, 광범위하게 적용가능한 방법을 제공한다.

[0020] 일부 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 게놈 분절을 포함하는 다수의 플라스미드 벡터를 숙주 세포 집단내로 도입한다. 일부 구체예에서, 각각 상이한 게놈 분절을 포함하는 8개의 플라스미드를 이용하여 완전한 인플루엔자 게놈을 숙주 세포내로 도입한다. 일반적으로, 본 발명의 플라스미드 벡터는 양방향성 발현 벡터이다. 본 발명의 예시적인 플라스미드 벡터는 도 1에 예시된 플라스미드 pAD3000이다.

[0021] 일부 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 B 바이러스에 해당한다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 바이러스에 해당한다. 일부 구체예에서, 본 방법은 대상에게 투여시, 예를 들어 비강내 투여시, 면역 반응을 유발할 수 있는 재조합 및/또는 재배열 인플루엔자 바이러스를 회수하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 바이러스는 투여하기 전에 불활성화되며, 다른 구체예에서는 생 약독화된 바이러스를 투여한다. 본 발명의 방법에 따라 생산된 재조합 및 재배열 인플루엔자 A 및 인플루엔자 B 바이러스는 또한 본 발명의 특징이다.

[0022] 일부 구체예에서, 바이러스는 약독화된 인플루엔자 바이러스, 저온 적응된 인플루엔자 바이러스, 온도 민감성

인플루엔자 바이러스, 또는 이들 바람직한 특성들의 조합을 가진 바이러스를 포함한다. 한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 B/Ann Arbor/1/66 균주 바이러스, 예를 들어 저온 적응된, 온도 민감한, 약독화된 B/Ann Arbor/1/66 균주를 포함한다. 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A/Ann Arbor/6/60 균주 바이러스, 예를 들어 저온 적응된, 온도 민감한, 약독화된 A/Ann Arbor/6/60 균주를 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 바이러스는 예를 들어, ca A/Ann Arbor/6/60 또는 ca B/Ann Arbor/1/66의 특징적인 생물학적 특성에 영향을 주는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는, 인공적으로 조작된 인플루엔자 바이러스이다. 그러한 치환된 아미노산은 바람직하게는 ca A/Ann Arbor/6/60 또는 ca B/Ann Arbor/1/66의 특유의 아미노산에 해당하며, 예를 들어 A 균주 바이러스에서는 PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G); 그리고 B 균주 바이러스에서는 PB2⁶³⁰(S630R); PA⁴³¹(V431M); PA⁴⁹⁷(Y497H); NP⁵⁵(T55A); NP¹¹⁴(V114A); NP⁴¹⁰(P410H); NP⁵¹⁰(A510T); M1¹⁵⁹(H159Q) 및 M1¹⁸³(M183V)이다. 유사하게, 온도 민감성, 저온 적응 및/또는 약독화를 야기하는 이들 위치중 어느 것에서의 다른 아미노산 치환은 본 발명의 바이러스와 방법에 의해 포함된다.

[0023] 선택적으로, 재배열 바이러스는, 백신 생산과 관련된 그것의 바람직한 특성에 대해 선택된 바이러스 균주의 여섯 개의 내부 유전자를, 선택된, 예를 들어 병원성 균주의 표면 항원(HA 및 NA)를 암호화하는 게놈 분절과 함께 포함하는 벡터를 도입함으로써 생산된다. 예를 들어, HA 분절은 백신 생산을 위해 일상적으로 실시되는 대로, 바람직하게는 병원성이 관련된 H1, H3 또는 B 균주로부터 선택된다. 유사하게, HA 분절은 H2 균주 (예를 들어, H2N2), H5 균주 (예, H5N1) 또는 H7 균주 (예, H7N7)와 같은 신생 병원성 균주로부터 선택될 수 있다. 다르게는, 첫번째 균주의 7개의 상보성 유전자 분절은 HA 또는 NA 암호화 분절과 함께 도입된다. 일부 구체예에서, 내부 유전자 분절은 인플루엔자 B/Ann Arbor/1/66 또는 A/Ann Arbor/6/60 균주로부터 유래된다.

[0024] 부가적으로, 본 발명은 백신 생산과 관련된 바람직한 특성을 가진 신규 인플루엔자 바이러스, 예를 들어 온도 민감한, 약독화된, 및/또는 저온 적응된 인플루엔자 바이러스 및 그러한 신규 인플루엔자 바이러스를 포함하는 인플루엔자 백신을 생산하는 방법을 제공한다 일부 구체예에서, 신규 인플루엔자 A 균주 바이러스는 온도 민감한 표현형을 위해 중요한 것으로 여기서 입증된 특정 위치, 예를 들어 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴ 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 야기하는 돌연변이를 도입함으로써 생산된다. 예를 들어, 돌연변이는 뉴클레오타이드 위치 PB1¹¹⁹⁵, PB1¹⁷⁶⁶, PB1²⁰⁰⁵, PB2⁸²¹ 및 NP¹⁴⁶, 또는 상기 특정 아미노산 위치에서 아미노산 치환을 야기하는 다른 뉴클레오타이드 위치에 도입된다. 개별적으로 또는 조합하여, 야생형 바이러스에 비하여 증가된 온도 민감성, 저온 적응 또는 약독화를 야기하는 임의 돌연변이(이들 위치 중 하나 이상에서)는 본 발명의 내용에서 적합한 돌연변이이다. 예를 들어, PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G) 중에서 선택된 돌연변이가 바람직하게 야생형 인플루엔자 A 균주, 예를 들어 PR8의 게놈내로 도입되어 생 약독화 백신으로 투여하기에 적합한 온도 민감성 변이체를 생산한다. 원하는 표현형의 안정성을 증가시키기 위하여, 일반적으로 복수의 돌연변이를 도입한다. 선택된 돌연변이를 인플루엔자 게놈내로 도입한 후, 돌연변이된 인플루엔자 게놈을 바이러스가 생산되는 조건하에서 복제시킨다. 예를 들어, 돌연변이된 인플루엔자 바이러스 게놈은 암탉의 알에서 복제될 수 있다. 다르게는, 인플루엔자 바이러스 게놈은 세포 배양에서 복제될 수 있다. 후자의 경우, 바이러스는 선택적으로 암탉의 알에서 더 증폭되어 타이터를 증가시킨다. 본 발명의 방법에 따라 생산된 온도 민감한, 그리고 선택적으로, 약독화된 및/또는 저온 적응된 바이러스는 또한 본 발명의 특징이며, 그러한 바이러스를 포함한 백신도 그러하다. 유사하게, 위치 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴에서의 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G) 중에서 선택된 돌연변이를 포함하는 신규의 재조합 바이러스 핵산, 및 그러한 아미노산 치환을 가진 폴리펩티드는 본 발명의 특징이다.

[0025] 유사하게, 여기서 제시된 방법은 하나 이상의 특정 돌연변이를 인플루엔자 B 게놈내로 도입하여 온도 민감한, 그리고 선택적으로 약독화된 및/또는 저온 적응된 표현형을 갖는 신규한 인플루엔자 B 균주를 생산하도록 적용된다. 예를 들어, PB2⁶³⁰; PA⁴³¹; PA⁴⁹⁷; NP⁵⁵; NP¹¹⁴; NP⁴¹⁰; NP⁵¹⁰; M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³ 중에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 돌연변이를 인플루엔자 B 균주 게놈내로 도입하여 온도 민감성 인플루엔자 B 바이러스를 생산한다. 예시적인 아미노산 치환은 하기를 포함한다: PB2⁶³⁰(S630R); PA⁴³¹(V431M); PA⁴⁹⁷(Y497H); NP⁵⁵(T55A); NP¹¹⁴(V114A); NP⁴¹⁰(P410H); NP⁵¹⁰(A510T); M1¹⁵⁹(H159Q) 및 M1¹⁸³(M183V). 상기에서 나타난 바처럼, 그러한 바이러스를 포함하는 백신 및 이들 돌연변이와 아미노산 치환을 보유한 핵산 및 폴리펩티드는

모두 본 발명의 특징이다.

- [0026] 따라서, 본 발명의 돌연변이를 보유한 인플루엔자 바이러스는 그들이 생산되는 방법에 상관없이 본 발명의 특징이다. 즉, 본 발명은 본 발명의 돌연변이를 포함하는 인플루엔자 균주를 포함하여, 예를 들어 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴에서 선택되는 하나 이상의 위치에서 야생형에 비하여 아미노산 치환을 갖는 임의의 인플루엔자 A 바이러스, 또는 PB2⁶³⁰; PA⁴³¹; PA⁴⁹⁷; NP⁵⁵; NP¹¹⁴; NP⁴¹⁰; NP⁵¹⁰; M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³ 중에서 선택되는 하나 이상의 위치에서 야생형에 비하여 아미노산 치환을 갖는 임의의 인플루엔자 B 바이러스를 포함하며, 단 균주 ca A/Ann Arbor/6/60 및 B/Ann Arbor/1/66는 본 발명의 특징으로 고려되지 않는다. 일부 바람직한 구체예에서, 인플루엔자 A 바이러스는 PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G) 중에서 선택된 다수의 돌연변이를 포함하며; 인플루엔자 B 바이러스는 PB2⁶³⁰(S630R); PA⁴³¹(V431M); PA⁴⁹⁷(Y497H); NP⁵⁵(T55A); NP¹¹⁴(V114A); NP⁴¹⁰(P410H); NP⁵¹⁰(A510T); M1¹⁵⁹(H159Q) 및 M1¹⁸³(M183V) 중에서 선택된 돌연변이 다수를 포함한다.
- [0027] 한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 게놈을 통합한 다수의 플라스미드 벡터를 숙주 세포내로 도입한다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절은 적어도 8개의 플라스미드 벡터내로 통합될 수 있다. 한 가지 바람직한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절은 8개의 플라스미드내로 통합된다. 예를 들어, 8개 플라스미드 각각은 바람직하게는 인플루엔자 바이러스 게놈의 다른 분절을 통합할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 벡터는 양방향성 발현 벡터일 수 있다. 본 발명의 양방향성 발현 벡터는 일반적으로 제 1 프로모터 및 제 2 프로모터를 포함하며, 이때 제 1 및 제 2 프로모터는 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절을 포함하는 동일한 이중쇄 바이러스 핵산의 다른 쇄들에 작동적으로 연결된다. 선택적으로, 양방향성 발현 벡터는 폴리아데닐화 시그널 및/또는 종결인자 서열을 포함한다. 예를 들어, 폴리아데닐화 시그널 및/또는 종결인자 서열은 두 프로모터에 대하여 내부에서 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절에 인접하여 위치할 수 있다. 본 발명의 내용에서 하나의 바람직한 폴리아데닐화 시그널은 SV40 폴리아데닐화 시그널이다. 본 발명의 예시적인 플라스미드 벡터는 도 1에 예시된 플라스미드 pAD3000이다.
- [0029] 벡터 프로모터로부터 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 임의의 숙주 세포가 본 발명의 내용에 적합하다. 숙주 세포의 바람직한 예는 배로 세포, Per.C6 세포, BHK 세포, PCK 세포, MDCK 세포, MDBK 세포, 293 세포(예, 293T 세포), 및 COS 세포를 포함한다. 여기서 개시된 pAD3000 플라스미드 벡터와 함께, 배로 세포, 293 세포, 및 COS 세포가 특히 적합하다. 일부 구체예에서, 이들 세포주중 적어도 2개의 혼합물의 공배양물, 예를 들어 COS와 MDCK 세포의 배양물 또는 293T와 MDCK 세포의 배양물이 숙주 세포 집단을 구성한다.
- [0030] 본 발명의 특징은 본 발명의 플라스미드를 통합한 숙주 세포를 37℃ 미만의 온도에서, 바람직하게는 35℃ 또는 그 이하의 온도에서 배양하는 것이다. 일반적으로, 상기 세포는 32℃와 35℃ 사이의 온도에서 배양된다. 일부 구체예에서, 세포는 약 32℃와 34℃ 사이의 온도, 예를 들어 약 33℃에서 배양된다.
- [0031] 본 발명의 다른 태양은 배양중인 배로 세포로부터 재조합 또는 재배열 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 바이러스(즉, 인플루엔자 A 및/또는 인플루엔자 바이러스의 야생형 및 변이체 균주)를 얻는 신규한 방법에 관한 것이다. 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터를 배로 세포 집단내로 전기천공시킨다. 세포를 바이러스 복제를 허용하는 조건하에서 성장시키며, 예를 들어, 저온 적응된, 약독화된, 온도 민감한 바이러스 균주의 경우, 배로 세포는 37℃미만, 바람직하게는 35℃ 이하의 온도에서 성장시킨다. 일반적으로, 세포는 32℃와 35℃ 사이의 온도에서 배양된다. 일부 구체예에서, 세포는 약 32℃와 34℃ 사이의 온도, 예를 들어 약 33℃에서 배양된다. 선택적으로 (예를 들어, 백신 생산을 위해), 배로(Vero) 세포는 임의의 동물 유래 생성물이 없는 무혈청 배지에서 성장된다.
- [0032] 전술한 본 발명 방법에서, 바이러스는 인플루엔자 게놈 플라스미드를 통합한 숙주 세포의 배양 후 회수된다. 일부 구체예에서, 회수된 바이러스는 재조합 바이러스이다. 일부 구체예에서, 바이러스는 하나 보다 많은 모 바이러스 균주로부터의 유전적 기여를 갖는 재배열 인플루엔자 바이러스이다. 선택적으로, 회수된 재조합 또는 재배열 바이러스는 배양된 세포에서 또는 암탉의 알에서의 계대에 의해 더 증폭된다.
- [0033] 선택적으로, 회수된 바이러스는 불활성화된다. 일부 구체예에서, 회수된 바이러스는 인플루엔자 백신을 포함한다. 예를 들어, 회수된 인플루엔자 백신은 선택된 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 균주로부터 유래된 HA 및/또는 NA 항원을 갖는 재배열 인플루엔자 바이러스(예, 6:2 또는 7:1 재배열 바이러스)일 수 있다. 일부 바람직한

구체예에서, 재배열 인플루엔자 바이러스는 약독화된 표현형을 갖는다. 선택적으로, 재배열 바이러스는 저온 적응된 및/또는 온도 민감하며, 예를 들어 표 17의 치환으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 약독화된, 저온 적응된 또는 온도 민감한 인플루엔자 B 바이러스이다. 그러한 인플루엔자 바이러스는 예를 들어 선택된, 예를 들어 병원성 인플루엔자 균주에 대한 특이적인 면역 반응의 예방적 생산을 위한 생 약독화 백신으로 유용하다. 본 발명의 방법에 따라 생산된 인플루엔자 바이러스, 예를 들어 약독화된 재배열 바이러스는 본 발명의 특징이다.

[0034] 다른 태양에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 게놈을 통합한 다수의 벡터를 인플루엔자 바이러스의 복제를 지원할 수 있는 숙주 세포 집단내로 도입시키고, 35℃ 이하의 온도에서 숙주 세포를 배양하고, 대상에 투여시 면역반응을 유도할 수 있는 인플루엔자 바이러스를 회수하는 것에 관련되는, 재조합 인플루엔자 바이러스 백신을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 백신은 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 균주 바이러스일 수 있다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 백신 바이러스는 약독화된 인플루엔자 바이러스, 저온 적응된 인플루엔자 바이러스, 또는 온도 민감한 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 일부 구체예에서, 바이러스는 이들 바람직한 특성의 조합을 보유한다. 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A/Ann Arbor/6/60 균주 바이러스를 함유한다. 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 B/Ann Arbor/1/66 균주 바이러스를 포함한다. 대안으로, 백신은 ca A/Ann Arbor/6/60 또는 ca B/Ann Arbor/1/66의 특징적인 생물학적 특성에 영향을 주는 하나 이상의 치환된 아미노산, 예를 들어 이들 균주의 특유의 아미노산의 치환을 보유하는 인공적으로 조작된 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 바이러스를 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 의해 포함되는 백신은 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴에서 선택되는 위치에서의 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인공적으로 조작된 재조합 및 재배열 인플루엔자 A 바이러스, 및 PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵¹⁰, M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³중에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인공적으로 조작된 재조합 및 재배열 인플루엔자 B 바이러스를 포함한다.

[0035] 일부 구체예에서, 바이러스는 하나 보다 많은 인플루엔자 바이러스 균주에서 유래된 바이러스 게놈 분절을 갖는 재배열 인플루엔자 바이러스(예, 6:2 또는 7:1 재배열체)를 포함한다. 예를 들어, 재배열 인플루엔자 바이러스 백신은 백신 생산과 관련된 그것의 바람직한 특성에 대하여 선택된 바이러스 균주의 내부 게놈 분절과 함께, 선택된 인플루엔자 A 또는 B 균주로부터 유래된 HA 및/또는 NA 표면 항원을 포함한다. 종종, 병원성 균주의 국지적 또는 전세계적 유행의 예측에 기초하여 HA 및/또는 NA 암호 분절이 유래하는 인플루엔자 균주를 선택하는 것이 바람직하다(예, 전술한 대로). 일부 경우에, 내부 게놈 분절을 제공하는 바이러스 균주는, 예를 들어 A/Ann Arbor/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66의 약독화된, 저온 적응된 및/또는 온도 민감성 인플루엔자 균주, 또는 원하는 표현형을 야기하는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 인공적으로 조작된 인플루엔자 균주, 예를 들어 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴중에서 선택되는 위치에서의 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인플루엔자 A 바이러스 및 PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵¹⁰, M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³중에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 인플루엔자 B 바이러스이다. 예를 들어, 바람직한 재배열 바이러스는 PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G)중에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 인공적으로 조작된 인플루엔자 A 바이러스, 및 PB2⁶³⁰(S630R); PA⁴³¹(V431M); PA⁴⁹⁷(Y497H); NP⁵⁵(T55A); NP¹¹⁴(V114A); NP⁴¹⁰(P410H); NP⁵¹⁰(A510T); M1¹⁵⁹(H159Q) 및 M1¹⁸³(M183V)중에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 인플루엔자 B 바이러스를 포함한다.

[0036] 원한다면, 인플루엔자 백신 바이러스는 회수시에 불활성화된다.

[0037] 약독화된 생 백신을 비롯하여, 본 발명 방법에 의해 생산된 인플루엔자 바이러스 백신은 또한 본 발명의 특징이다. 일부 바람직한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 백신은 재배열 바이러스 백신이다.

[0038] 본 발명의 다른 태양은 양방향성 발현 벡터인 플라스미드를 제공한다. 본 발명의 양방향성 발현 벡터는 제 2 프로모터와 폴리아데닐화 부위, 예를 들어 SV40 폴리아데닐화 부위 사이에 삽입된 제 1 프로모터를 포함한다. 한 구체예에서, 제 1 프로모터와 제 2 프로모터는 적어도 하나의 클로닝 부위에 인접하여 반대 방향으로 위치할 수 있다. 본 발명의 예시적인 벡터는 도 1에 도시된 플라스미드 pAD3000이다.

[0039] 일부 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 게놈의 적어도 하나의 분절이 예를 들어 이중쇄 핵산으로서 클로닝 부위

내로 삽입된다. 예를 들어, 본 발명의 벡터는 제 2 프로모터와 SV40 폴리아데닐화 부위 사이에 삽입된 제 1 프로모터를 갖는 플라스미드를 포함하며, 이때 제 1 프로모터와 제 2 프로모터는 인플루엔자 바이러스의 적어도 하나의 분절에 인접하여 반대 방향으로 위치한다.

[0040] 본 발명의 발현 벡터 하나 이상을 포함하는 키트는 또한 본 발명의 특징이다. 일반적으로, 키트는 또한 하기 중 하나 이상을 포함한다: 인플루엔자 바이러스 복제를 지원할 수 있는 세포주, 완충액, 배양 배지, 지시서 세트, 패키징 재료, 및 용기. 일부 구체예에서, 상기 키트는 각각이 인플루엔자 바이러스 게놈의 분절 하나 이상을 포함하는 발현 벡터 다수를 포함한다. 예를 들어, 백신 생산 또는 투여와 관련된 바람직한 특성에 대하여 선택된 바이러스 균주의 내부 게놈 분절 중 하나를 각각 포함하는 발현 벡터 다수를 포함하는 키트가 본 발명의 특징이다. 예를 들어, 선택된 바이러스 균주는 약독화된, 저온 적응된 및/또는 온도 민감한 균주, 예를 들어 A/Ann Arbor/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66, 또는 예를 들어 표 17에 개시된 것과 같은 아미노산 치환 하나 이상을 갖는 인공적으로 조작된 균주와 같은, 원하는 특성을 갖는 다른 균주일 수 있다. 구체예에서, 키트는 변이체 HA 및/또는 NA 항원을 암호화하는 핵산 라이브러리의 구성원을 포함한 발현 벡터를 포함한다.

[0041] 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 벡터 다수를 포함한 세포 하나 이상을 포함한 세포 배양물을 35℃ 이하의 온도에서 생산적으로 성장시키는 것 또한 본 발명의 특징이다. 이 조성물은 또한 세포 배양 배지를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 다수의 벡터는 예를 들어, 제 2 프로모터와 SV40 폴리아데닐화 부위 사이에 삽입된 제 1 프로모터를 포함하는 양방향성 발현 벡터를 포함한다. 예를 들어, 제 1 프로모터와 제 2 프로모터는 인플루엔자 바이러스의 하나 이상의 분절에 인접하여 반대 방향으로 위치할 수 있다. 본 발명의 세포 배양물은 32℃와 35℃ 사이와 같은 35℃ 이하의 온도, 일반적으로 약 32℃와 약 34℃ 사이, 예를 들어 약 33℃에서 유지된다.

[0042] 본 발명은 또한 전술한 바와 같이 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 다수의 벡터를 포함한 하나 이상의 세포의 생산적으로 성장하는 세포 배양물, 및 배양물을 35℃ 이하의 온도에서 유지하기 위한 조절자를 포함하는 세포 배양 시스템을 포함한다. 예를 들어, 조절자는 바람직하게는 약 32℃와 35℃ 사이, 일반적으로 약 32℃와 약 34℃ 사이, 예를 들어 약 33℃의 온도에서 세포 배양물을 유지한다.

[0043] 본 발명의 다른 특징은 온도 민감성, 저온 적응성 및/또는 약독화에 영향을 주는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 인공적으로 조작된 재조합 또는 재배열 인플루엔자 바이러스이다. 예를 들어, PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴ 중에서 선택되는 위치의 아미노산 치환 하나 이상을 갖는 인공적으로 조작된 인플루엔자 A 바이러스 및 PB2⁶³⁰, PA⁴³¹, PA⁴⁹⁷, NP⁵⁵, NP¹¹⁴, NP⁴¹⁰, NP⁵¹⁰, M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³ 중에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환 하나 이상을 갖는 인공적으로 조작된 인플루엔자 B 바이러스는 본 발명의 바람직한 구체예이다. 예시적인 구체예는 아미노산 치환 PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) 및 NP³⁴ (D34G) 중 하나 이상을 갖는 인플루엔자 A 바이러스, 및 아미노산 치환 PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵¹⁰ (A510T); M1¹⁵⁹ (H159Q) 및 M1¹⁸³ (M183V) 중 하나 이상을 갖는 인플루엔자 B 바이러스를 포함한다. 일부 구체예에서, 바이러스는 전술한 위치에서 1,2,3,4,5,6,7,8 또는 9 아미노산 치환과 같은 다수의 돌연변이를 포함한다. 따라서, 전술한 다섯 위치 모두에서의 아미노산 치환, 예를 들어 PB1³⁹¹ (K391E), PB1⁵⁸¹ (E581G), PB1⁶⁶¹ (A661T), PB2²⁶⁵ (N265S) 및 NP³⁴ (D34G)을 갖는 인공적으로 조작된 인플루엔자 A 바이러스 및 상기한 위치 중 8 또는 9개 모두에서 아미노산 치환, 예를 들어 PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵¹⁰ (A510T); M1¹⁵⁹ (H159Q) 및 M1¹⁸³ (M183V)를 갖는 인공적으로 조작된 인플루엔자 B 바이러스는 본 발명에 포함된다. 또한, 바이러스는 상기에서 언급되지 않은 추가의 아미노산 치환을 하나 이상 포함할 수 있다.

[0044] 일부 구체예에서, 인공적으로 조작된 인플루엔자 바이러스는 온도 민감성 인플루엔자 바이러스, 저온 적응된 인플루엔자 바이러스 및/또는 약독화된 인플루엔자 바이러스이다. 예를 들어, 본 발명에 따른 온도 민감성 인플루엔자 바이러스는 일반적으로 야생형 인플루엔자 바이러스와 비교할 때, 39℃에서의 성장에서 약 2.0과 5.0 log₁₀ 사이의 감소를 나타낸다. 예를 들어, 온도 민감성 바이러스는 바람직하게는 야생형 인플루엔자 바이러스와 비교하여, 39℃ 성장에서 적어도 약 2.0 log₁₀, 적어도 약 3.0 log₁₀, 적어도 약 4.0 log₁₀, 또는 적어도 약 4.5 log₁₀ 감소를 나타낸다. 반드시 그렇지는 않지만 일반적으로, 온도 민감성 인플루엔자 바이러스는 33℃에서 강한 성장 특성을 보유한다. 본 발명의 약독화된 인플루엔자 바이러스는 일반적으로 야생형 인플루엔자 바이러스와

비교할 때 흰족제비 약독화 분석에서 성장에서 약 2.0과 5.0 $\log_{10}$ 사이의 감소를 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 약독화된 인플루엔자 바이러스는 야생형 인플루엔자 바이러스와 비교할 때 흰족제비 약독화 분석에서 성장에서 적어도 약 2.0 $\log_{10}$, 빈번하게는 약 3.0 $\log_{10}$, 및 바람직하게는 적어도 약 4.0 $\log_{10}$ 감소를 나타낸다.

과제의 해결 수단

- [0045] 많은 병원성 인플루엔자 바이러스 균주는 조직 배양에서 잘 자라지 못하며, 생 약독화 바이러스 백신의 생산에 적합한 균주(예, 온도 민감한, 저온 적응된 및/또는 약독화된 인플루엔자 바이러스)는 상업적 생산을 위한 배양된 세포에서 성공적으로 자라지 못했다. 본 발명은 표준 세포 배양 조건하에서의 성장에 적응하지 못한 인플루엔자 바이러스 균주의 성장과 회수를 허용하는 다중-플라스미드 형질감염 시스템을 제공한다.
- [0046] 첫번째 태양에서, 본 발명의 방법은 전적으로 클론된 바이러스 DNA로부터 세포 배양에서 재조합 인플루엔자 B 바이러스를 생산하는 방법 및 벡터를 제공한다. 다른 태양에서, 본 발명 방법은 배양된 세포에서 생체외에서의 백신 생산과 관련하여 바람직한 특성(예, 약독화된 병원성 또는 표현형, 저온 적응성, 온도 민감성, 등)을 가진 바이러스 균주(A 균주 및 B 균주 인플루엔자 바이러스 둘다)의 성장을 지원하는 조직 배양 조건의 개발에 부분적으로 의존한다. 인플루엔자 바이러스는 클론된 바이러스 게놈 분절을 통합한 다수의 벡터를 숙주 세포내로 도입하고, 35°C를 초과하지 않는 온도에서 세포를 배양함으로써 생산된다. 인플루엔자 바이러스 게놈을 포함하는 벡터가 형질감염될 때, 백신으로 적합한 재조합 바이러스는 표준 정제 과정에 의해 회수될 수 있다. 본 발명의 벡터 시스템과 방법을 이용하여, 백신 생산과 관련하여 바람직한 특성에 대하여 선택된 균주의 여섯 개의 내부 유전자 분절, 및 선택된, 예를 들어 병원성 균주로부터의 면역원성 HA 및 NA 분절을 통합한 재배열 바이러스를 신속하고 효과적으로 조직 배양에서 생산할 수 있다. 따라서, 여기서 개시된 시스템과 방법은 비강내 투여에 적합한 백신과 같은 생 약독화 백신을 비롯한 백신으로 유용한 바이러스를 비롯한, 재조합 및 재배열 인플루엔자 A 및 B 바이러스를 세포 배양에서 신속하게 생산하는 데 유용하다.
- [0047] 일반적으로, 단일 마스터 공여 바이러스(MDV) 균주가 A 및 B 하위타입의 각각을 위해 선택된다. 생 약독화 백신의 경우, 마스터 공여 바이러스 균주는 일반적으로 백신 생산에 관한 그것의 바람직한 특성, 예를 들어 온도 민감성, 저온 적응성 및/또는 약독화에 대하여 선택된다. 예를 들어, 예시적인 마스터 공여 균주는 각각 A/Ann Arbor/6/60 및 B/Ann Arbor/1/66의 온도 민감한, 약독화된 및 저온 적응된 균주를 포함한다. 본 발명은 이들 바이러스 균주의 ca, ts 및 att 표현형을 야기하는 돌연변이를 밝히며, 재조합 및 재배열 백신 생산의 면에서 공여 균주로서 유용한 인플루엔자의 신규 균주를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0048] 예를 들어, 선택된 마스터 공여 타입 A 바이러스(MDV-A), 또는 마스터 공여 타입 B 바이러스(MDV-B)는 바이러스 게놈을 구성하는 클론된 바이러스 cDNA 다수로부터 생산된다. 예시적인 구체예에서, 재조합 바이러스는 8개의 클론된 바이러스 cDNA로부터 생산된다. PB2, PB1, PA, NP, HA, NA, M 및 NS의 선택된 MDV-A 또는 MDV-B 서열을 나타내는 8개의 바이러스 cDNA는, 바이러스 게놈 RNA는 하나의 채로부터 RNA 폴리머라제 I(pol I) 프로모터로부터 전사되고 바이러스 mRNA는 다른 채로부터 RNA 폴리머라제 II(pol II) 프로모터로부터 합성될 수 있도록 플라스미드(예, pAD3000)와 같은 양방향성 발현 벡터에 클론된다. 선택적으로, HA 분절을 비롯한 임의의 유전자 분절은 변형될 수 있다(예를 들어 다중-기본 절단 부위를 제거하기 위해).
- [0049] 8개의 바이러스 cDNA를 보유한 플라스미드를 적절한 숙주 세포, 예를 들어 배로 세포, 공배양된 MDCK/293T 또는 MDCK/COS7 세포내로 형질감염시킨 후, 이어서 감염성 재조합 MDV-A 또는 MDV-B 바이러스를 회수한다. 여기서 개시된 플라스미드와 방법을 이용하여, 본 발명은 예를 들어, 다른 상응하는 타입(A 또는 B) 인플루엔자 바이러스로부터 유래된 HA 및 NA와 함께, 선택된 바이러스(예, MDV-A, MDV-B)의 6개의 내부 유전자(PB2, PB1, PA, NP, HA, NA, M 및 NS)의 동시형질감염에 의해 6:2 재배열체 인플루엔자 백신을 생성하는 데 유용하다. 예를 들어, HA 분절은 백신 생산을 위해 일상적으로 실시되는 대로, 바람직하게는 병원성이 관련된 H1, H3 또는 B 균주로부터 선택된다. 유사하게, HA 분절은 H2 균주(예, H2N2), H5 균주(예, H5N1) 또는 H7 균주(예, H7N7)와 같은 병원성 균주로서 신중 관련성을 갖는 균주로부터 선택될 수 있다. MDV의 7개의 게놈 분절 및 선택된 균주의 HA 또는 NA 유전자를 통합한 재배열체(7:1 재배열체) 또한 생산될 수 있다. 또한, 이 시스템은 백신 생산과 관련된, 표현형 특성, 예를 들어 약독화된(att), 저온 적응된(ca), 및 온도 민감성(ts) 표현형의 분자 기초를 결정하는 데 유용하다.

발명의 효과

- [0050] 세포 배양에서 재조합 인플루엔자 백신으로 적합한 인플루엔자 바이러스를 생산하기 위한 벡터와 방법이 제공된

다. 다중 플라스미드 인플루엔자 바이러스 발현 시스템에서 사용하기 위한 양방향성 발현 벡터가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0051]

- 도 1: pAD3000 플라스미드의 예시
- 도 2: 감염된 세포의 현미경사진
- 도 3: 플라스미드 형질감염으로부터의 6:2 H1N1 재배열 바이러스와 rMDV-A의 유전자형 분석
- 도 4: 인플루엔자 B 바이러스의 생산을 위한 8 플라스미드 시스템의 예시
- 도 5: A와 B. RT-PCR에 의한 재조합 MDV-B 바이러스의 특성 규명; C와 D. RT-PCR에 의한 재조합 B/Yamanashi/166/98의 특성규명
- 도 6: GeneBank 포맷의 pAD3000의 서열
- 도 7: MDV-B와 8개 플라스미드의 서열 배열
- 도 8: 인플루엔자 B 균주의 HA 및 NA 분절의 동시 증폭에서 유래된 RT-PCR 생성물
- 도 9: 재조합 및 재배열 바이러스의 상대적 타이터를 보여주는 막대 그래프
- 도 10: 허용성 및 제한성 온도(온도 민감성)하에서 재배열 바이러스의 상대적 타이터를 예시하는 막대 그래프
- 도 11: 온도 민감성에 관련된 특정 돌연변이(넉-인)를 통합한 재배열 바이러스(좌측 패널) 및 허용성 및 제한성 온도에서 상대적인 타이터(온도 민감성)(우측 패널)의 그래프 도시
- 도 12: 미니게놈 분석에서 ts 돌연변이의 결정. A. HEp-2 세포를 PB1, PB2, PA, NP 및 pFlu-CAT으로 형질감염 시키고, 18시간동안 33 또는 39℃에서 항온처리하고 세포 추출물을 CAT 리포터 유전자 발현에 대하여 분석하였다. B. 프라이머 연장 분석에 의한 CAT mRNA 발현
- 도 13: PA, NP, 및 M1 단백질에서 야생형 잔기를 갖는 삼중-유전자 재조합체의 도식
- 도 14: 단일-유전자 및 이중-유전자 재조합 바이러스의 성장의 도표.
- 도 15: 비-ts 표현형에 해당하는 핵단백질의 아미노산 잔기의 도표.
- 도 16: 재조합 PR8 돌연변이의 도식 다이어그램. PB1 및/또는 PB2 유전자에 도입된 돌연변이들은 검게 칠해진 점에 의해 표시된다.
- 도 17: 33℃ 및 39℃에서 상대적인 타이터를 보여주는 막대 그래프.
- 도 18: 다양한 온도에서 PR8 돌연변이의 플라크 형태를 보여주는 광학현미경사진. MDCK 세포를 나타내진 대로 바이러스로 감염시키고 3일동안 33, 37 및 39℃에서 항온처리하였다. 바이러스 플라크는 면역염색과 사진으로 가시화하였다.
- 도 19: 허용성 및 비허용성 온도에서 단백질 합성. MDCK 세포를 나타난 대로 바이러스로 감염시키고 33 또는 39℃에서 밤새 항온처리하였다. 방사성표지된 폴리펩티드를 SDS-PAGE에서 전기영동시키고 방사능사진을 찍었다. 바이러스 단백질, HA, NP, M1 및 NS가 표시된다.
- 도 20: A. MDCK 세포에서의 복제와 비교하여 Per.C6 세포에서 MDV-A와 MDV-B의 차등 복제를 보여주는 선 그래프; B. Per.C6 세포에서 MDV-A 단일 유전자 재배열체의 차등 복제를 보여주는 선 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

정의

[0053]

달리 정의되지 않으면, 모든 과학적 및 기술적 용어는 그들이 관련된 분야에서 흔히 이용되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해된다. 본 발명의 목적을 위하여, 하기 용어가 아래에 정의된다.

[0054]

용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드", "폴리뉴클레오티드 서열" 및 "핵산 서열"은 단쇄 또는 이중쇄 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중합체, 또는 그 키메라 또는 유사체를 말한다. 여기서 이용될 때, 이 용어는 선택적으로, 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 단쇄 핵산에 하이브리드화하는 점에서 자연 뉴클레

오티드의 본질적인 특성을 갖는, 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체의 중합체(예, 펩티드 핵산)를 포함한다.

- [0055] 달리 표시되지 않으면, 본 발명의 구체적인 핵산 서열은 명백하게 표시된 서열에 더하여 상보성 서열을 포함한다.
- [0056] 용어 "유전자"는 생물학적 기능과 관련된 임의의 핵산을 의미하기 위해 널리 이용된다. 따라서, 유전자는 암호 서열 및/또는 그들의 발현에 요구되는 조절 서열을 포함한다. 용어 "유전자"는 특정 게놈 서열뿐만 아니라 그 게놈 서열에 의해 암호되는 mRNA 또는 cDNA에 적용한다.
- [0057] 유전자는 또한 예를 들어 다른 단백질을 위한 인식 서열을 형성하는 비발현 핵산 분절을 포함한다. 비발현 조절 서열은 "프로모터"와 "인핸서"를 포함하며, 여기에 전사 인자와 같은 조절 단백질이 결합하여 이웃하거나 근처의 서열의 전사를 야기한다. "조직 특이적인" 프로모터 또는 인핸서는 특정 조직 타입 또는 세포 타입에서 전사를 조절하는 것이다.
- [0058] 용어 "벡터"는 핵산이 유기체, 세포 또는 세포 성분 사이에서 전달되거나 증식될 수 있는 수단을 말한다. 벡터는 자가 복제하거나 또는 숙주 세포의 염색체내로 통합될 수 있는, 플라스미드, 바이러스, 박테리오파아지, 프로-바이러스, 파아지미드, 트랜스포존, 및 인공 염색체 등을 말한다. 벡터는 또한 자가 복제하지 않는, 천연 RNA 폴리뉴클레오티드, 천연 DNA 폴리뉴클레오티드, 동일한 쇠내에 DNA와 RNA 둘다로 구성된 폴리뉴클레오티드, 폴리-라이신-연결된 DNA 또는 RNA, 펩티드-연결된 DNA 또는 RNA, 리포솜-연결된 DNA 등일 수 있다. 가장 일반적으로, 본 발명의 벡터는 플라스미드이다.
- [0059] "발현 벡터"는 그 내부에 통합된 핵산의 복제뿐만 아니라 발현을 촉진할 수 있는, 플라스미드와 같은 벡터이다. 일반적으로, 발현될 핵산은 프로모터 및/또는 인핸서에 "작동적으로 연결"되며, 프로모터 및/또는 인핸서에 의한 전사 조절성 조절을 받는다.
- [0060] "양방향성 발현 벡터"는 일반적으로 두 프로모터 사이에 위치한 핵산에 대하여 반대 방향으로 배향된 두 개의 교번 프로모터를 특징으로 하여, 발현이 두 방향으로 개시되어 예를 들어 플러스(+) 즉 센스 쇠 및 네가티브(-) 즉 안티센스 쇠 RNA 둘다의 전사를 야기할 수 있다. 다르게는, 양방향성 발현 벡터는 양쪽센스(ambisense) 벡터일 수 있으며, 여기서 바이러스 mRNA와 바이러스 게놈 RNA(cRNA)는 동일한 쇠로부터 발현된다.
- [0061] 본 발명의 내용에서, 용어 "분리된"은 자연 발생 환경에서 그것에 정상적으로 수반되거나 그것과 상호작용하는 성분들이 실질적으로 없는 핵산 또는 단백질과 같은 생물학적 물질을 말한다. 분리된 물질은 선택적으로 그 자연 환경, 예를 들어 세포에서, 그 물질과 함께 발견되지 않는 물질을 포함한다. 예를 들어, 만일 그 물질이 세포와 같은 그것의 천연 환경에 있다면, 그 환경에서 발견되는 물질에 본성적이지 않은 세포내의 위치(예, 게놈 또는 유전 성분)에 놓여 졌었다. 예를 들어, 자연 발생 핵산(예, 암호 서열, 프로모터, 인핸서 등)이 비-자연 발생 수단에 의해 그 핵산에 천연적이지 않은 게놈 좌(예, 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 벡터, 또는 애플리곤)로 도입되면 그 핵산은 분리된다. 그러한 핵산은 또한 "이종성" 핵산으로 불린다.
- [0062] 용어 "재조합체"는 그 물질(예, 핵산 또는 단백질)이 인간의 개입에 의해 인공적으로 또는 합성적으로(비자연적으로) 변화되었음을 나타낸다. 그 변화는 그 자연 환경 또는 상태내에서 또는 그로부터 제거되어 수행될 수 있다. 구체적으로, 예를 들어 인플루엔자 바이러스와 같이 바이러스의 경우, 바이러스는 그것이 재조합 핵산의 발현에 의해 생산될 경우 재조합체이다.
- [0063] 용어 "재배열체"는 바이러스를 말할 경우, 바이러스가 하나보다 많은 모 바이러스 균주 또는 공급원으로부터 유래된 유전적 및/또는 폴리펩티드 성분을 포함함을 나타낸다. 예를 들어, 7:1 재배열체는 첫번째 모 바이러스로부터 유래된 7개의 바이러스 게놈 분절(또는 유전자 분절), 및 두번째 모 바이러스로부터의, 예를 들어 헤마글루티닌 또는 뉴라미니다제를 암호화하는 하나의 상보성 바이러스 게놈 분절을 포함한다. 6:2 재배열체는 6개의 게놈 분절, 가장 일반적으로는 첫번째 모 바이러스로부터의 6개의 내부 유전자, 및 다른 모 바이러스로부터의 두 개의 상보성 분절, 예를 들어 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제를 포함한다.
- [0064] 이종성의 또는 분리된 핵산을 말할 때 용어 "도입된"은 핵산이 진핵 또는 원핵 세포내로 통합되는 것을 말하며, 이때 핵산은 상기 세포의 게놈내로 통합되어 자가 복제원으로 전환되거나 또는 일시적으로 발현될 수 있다(예, 형질감염된 mRNA). 이 용어는 "감염", "형질감염", "형질전환" 및 "형질도입"과 같은 방법을 포함한다. 본 발명의 내용에서, 전기천공, 칼슘인산염 침전, 지질 매개 형질감염(리포펙션) 등을 포함한, 핵산을 원핵 세포내로 도입하기 위해 다양한 방법을 이용할 수 있다.
- [0065] 용어 "숙주 세포"는 벡터와 같은 이종성 핵산을 함유하며 이 핵산의 복제 및/또는 발현을 지원하며, 선택적으로

폴리펩티드 및/또는 바이러스를 포함한 하나 이상의 암호된 생성물의 생산을 지원하는 세포를 말한다. 숙주 세포는 이.콜리와 같은 원핵 세포, 또는 효모, 곤충, 양서류, 조류 또는 인간 세포와 같은 포유류 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 본 발명의 내용에서 예시적인 숙주 세포는 베토(아프리카 녹색 원숭이 신장) 세포, Per.C6 세포(인간 배아 망막 세포), BHK (어린 햄스터 신장)세포, 일차 병아리 신장(PCK) 세포, 마딘-달비(Madin-Darby) 개 신장(MDCK) 세포, 마딘-달비 소 신장(MDBK) 세포, 293 세포(예, 293T 세포), 및 COS 세포(예, COS1, COS7 세포)를 포함한다. 용어 숙주 세포는 다른 세포 타입 또는 세포주의 혼합 배양물을 포함한 세포의 혼합물 또는 배합물을 포함한다.

[0066] 용어 "온도 민감한", "저온 적응된" 및 "약독화된"은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 용어 "온도 민감한"("ts")은 인플루엔자 A 균주의 경우 33℃에 비하여 39℃에서 바이러스의 타이터가 100 배 이상 감소를 나타내며, 인플루엔자 B 균주의 경우 33℃에 비하여 37℃에서 바이러스의 타이터가 100배 이상 감소를 나타냄을 말한다. 예를 들어, 용어 "저온 적응된"("ca")은 바이러스가 33℃에서의 그 성장의 100배 이내의 성장을 25℃에서 나타냄을 말한다. 예를 들어, 용어 "약독화된"("att")은 바이러스가 흰족제비의 상부 기도에서 복제하지만 폐 조직에서는 검출불가능하며 동물에서 인플루엔자형 질병을 야기하지 않음을 말한다. 중간 표현형을 가진 바이러스, 즉, 39℃(A 균주 바이러스의 경우) 또는 37℃(B 균주 바이러스의 경우)에서 100 미만의 타이터 감소를 나타내며, 33℃에서의 성장보다 100 배 이상 큰(예, 200배, 500배, 1000배, 10,000배 미만 이내) 성장을 25℃에서 나타내며, 및/또는 흰족제비의 상부 기도에서의 성장에 비하여 폐에서의 감소된 성장(즉, 부분적으로 약독화된), 및/또는 동물에서 감소된 인플루엔자형 질병을 나타내는, 여기서 개시된 아미노산 치환 하나 이상을 보유한, 바이러스 또한 본 발명에 포함되는 유용한 바이러스임이 이해될 것이다.

[0067] 성장은 타이터, 플라크 크기 또는 형태, 입자 밀도 또는 당업계에 공지된 기타 수단에 의해 나타내지는 대로 바이러스 양을 나타낸다.

[0068] 표현 "인공적으로 조작된"은 바이러스, 바이러스 핵산 또는 바이러스가 암호화하는 생성물, 예를 들어 폴리펩티드, 백신이 재조합 방법, 예, 부위 지시된 돌연변이법, PCR 돌연변이법, 등에 의해 도입된 돌연변이 하나 이상을 포함함을 나타내기 위해 여기서 이용된다. 하나 이상의 뉴클레오타이드 돌연변이 및/또는 아미노산 치환을 포함하는 바이러스(또는 바이러스 성분 또는 생성물)를 말할 때 표현 "인공적으로 조작된"은 바이러스(또는 바이러스 성분 또는 생성물)를 암호화하는 바이러스 게놈 또는 게놈 분절이, 자연 발생의 또는 비재조합 방법(예, 25℃에서의 진행성 계대)에 의해 생산된 기존의 실험실 바이러스 균주, 예를 들어 야생형 또는 저온 적응된 A/Ann Arbor/6/60 또는 B/Ann Arbor/1/66 균주와 같은 자연 발생 공급원으로부터 유래되지 않음을 나타낸다.

[0069] 인플루엔자 바이러스

[0070] 인플루엔자 바이러스의 게놈은 번역원성 헤마글루티닌(HA) 및 뉴라미니다제(NA) 단백질 및 6개의 내부 코어 폴리펩티드를 암호화하는 선형 (-)쇄 리보핵산(RNA)의 8개 분절; 뉴클레오캡시드 핵단백질(NP); 매트릭스 단백질(M); 비구조 단백질(NS); 및 3개의 RNA 폴리머라제(PA, PB1, PB2) 단백질로 이루어진다. 복제동안, 게놈 바이러스 RNA는 숙주 세포의 핵내에서 (+)쇄 메신저 RNA와 (-)쇄 게놈 cRNA로 전사된다. 8개의 게놈 분절의 각각은 RNA에 더하여 NP와 폴리머라제 복합체(PB1, PB2, 및 PA)를 함유하는 리보핵단백질 복합체내로 패키징된다.

[0071] 본 발명에서, 8개 분절의 각각에 해당하는 바이러스 게놈 RNA는 인플루엔자 바이러스의 조작과 생산을 위해 재조합 벡터내로 삽입된다. 바이러스 벡터, 플라스미드, 코스미드, 파아지, 및 인공 염색체를 비롯한 다양한 벡터를 본 발명에 이용할 수 있다. 일반적으로, 조작의 용이성을 위하여, 바이러스 게놈 분절은, 박테리아 및 진핵 세포에서 작용하는 복제 오리진 하나 이상, 및 선택적으로 플라스미드 서열을 포함한 세포를 스크리닝 또는 선택하는 데 편리한 마커를 제공하는 플라스미드 벡터내로 삽입된다. 예시적인 벡터인 플라스미드 pAD3000이 도 1에 도시된다.

[0072] 가장 일반적으로, 본 발명의 플라스미드 벡터는 삽입된 바이러스 게놈 분절의 전사를 어느 방향으로든지 개시할 수 있어 (+)쇄와 (-)쇄 바이러스 RNA 분자 둘다를 생성시키는 양방향성 발현 벡터이다. 양방향 전사가 일어나기 위해서는, 바이러스 게놈 분절의 각각이 적어도 두개의 독립적인 프로모터를 갖는 벡터내로 삽입되어, 바이러스 게놈 RNA의 카피가 한 채로부터 첫번째 RNA 폴리머라제 프로모터(예, Pol I)에 의해 전사되고, 바이러스 mRNA는 두번째 RNA 폴리머라제 프로모터(예, Pol II)로부터 합성된다. 따라서, 두 프로모터는 적어도 하나의 클로닝 부위(즉, 제한 효소 인식 서열), 바람직하게는 바이러스 게놈 RNA 분절의 삽입을 위해 적합한 특유의 클로닝 부위에 인접하여 반대 방향으로 배열된다. 다르게는, "양쪽센스" 벡터가 이용될 수 있으며 여기서는 (+)쇄 mRNA와 (-)쇄 바이러스 RNA(cRNA)가 벡터의 동일한 채로부터 전사된다.

- [0073] 발현 벡터
- [0074] 발현될 인플루엔자 바이러스 게놈 분절은 mRNA 합성을 지시하기 위한 적절한 전사 조절 서열(프로모터)에 작동적으로 연결된다. 다양한 프로모터가 인플루엔자 바이러스 게놈 분절의 전사를 조절하기 위한 발현 벡터에 사용하기에 적합하다. 일부 구체예에서, 예를 들어 벡터가 플라스미드 pAD3000인 경우, 사이토메갈로바이러스(CMV) DNA 의존성 RNA 폴리머라제 II(Pol II) 프로모터를 이용한다. 원한다면, 예를 들어 조건부 발현을 조절하기 위해, 특정 조건하에서 또는 특정 조직 또는 세포에서 RNA 전사를 유도하는 다른 프로모터로 치환될 수 있다. 많은 바이러스 및 포유류, 예를 들어 사람 프로모터가 이용가능하며, 또는 구체적인 적용에 따라 분리될 수 있다. 예를 들어, 동물 및 인간 바이러스의 게놈으로부터 얻어진 다른 프로모터는 아데노바이러스(아데노바이러스 2와 같은), 파필로마 바이러스, B형 간염 바이러스, 폴리오마 바이러스, 및 시미안 바이러스40(SV40), 및 다양한 레트로바이러스 프로모터와 같은 프로모터를 포함한다. 포유류 프로모터는 많은 다른 것들 중에서 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 열충격 프로모터 등을 포함한다. 또한, 박테리오파지 프로모터를 짝 RNA 폴리머라제, 예를 들어 T7 프로모터와 함께 이용할 수 있다.
- [0075] 전사는 인핸서 서열을 포함시킴으로써 선택적으로 증가된다. 인핸서는 일반적으로 짧은, 예를 들어 10-500 bp의, 전사를 증가시키기 위해 프로모터와 함께 작용하는 시스-작용성 DNA 성분이다. 많은 인핸서 서열이 포유류 유전자(헤모글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-페도단백질, 및 인슐린) 및 진핵 세포 바이러스로부터 분리되었다. 인핸서는 이중성 암호 서열에 대하여 5' 또는 3' 위치에서 벡터내로 스플라이스될 수 있으나, 일반적으로 프로모터에 대하여 5' 부위에 삽입된다. 일반적으로, 프로모터, 그리고 원한다면, 부가적인 전사 증가 서열을 선택하여 이중성 DNA가 도입될 숙주 세포 타입에서의 발현을 최적화할 수 있다(Scharf et al. (1994) Heat stress promoters and transcription factors Results Probl Cell Differ 20: 125-62; Kriegler et al. (1990) Assembly of enhancers, promoters, and splice signals to control expression of transferred genes Methods in Enzymol 185: 512- 27). 선택적으로, 앰플리콘은 또한 리보솜 결합 부위 또는 번역 개시를 위한 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 함유할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 벡터는 또한 바람직하게는 전사 종결을 위해 그리고 mRNA를 안정화시키기 위해 필요한 서열, 예를 들어 폴리아데닐화 서열 또는 종결인자 서열을 포함한다. 그러한 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 일반적으로 5' 및 때때로 3', 비번역 영역으로부터 이용가능하다. 예를 들어 플라스미드 pAD3000에 관련되는 한 구체예에서, SV40 폴리아데닐화 서열은 폴리아데닐화 시그널을 제공한다.
- [0077] 또한, 전술한 바와 같이, 발현 벡터는 선택적으로 이전에 열거된 유전자에 더하여, 형질전환된 숙주 세포의 선별을 위한 표현형적 형질을 제공하기 위한 하나 이상의 선별가능한 마커 유전자를 포함하며, 디하이드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 저항성과 같은 마커는 진핵 세포 배양에서의 선별을 위해 적합하다.
- [0078] 전술한 바와 같은 적합한 DNA 서열 및 적절한 프로모터 또는 조절 서열을 함유하는 벡터를 이용하여 단백질의 발현을 허용하는 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명의 벡터는 박테리아 세포에서 복제될 수 있지만, 가장 빈번하게는 벡터를 발현의 목적을 위하여 예를 들어 배로 세포, BHK 세포, MDCK 세포, 293 세포, COS 세포와 같은 포유류 세포내로 도입하는 것이 바람직할 것이다.
- [0079] 부가적인 발현 성분
- [0080] 가장 일반적으로, 인플루엔자 바이러스 단백질을 암호화하는 게놈 분절은 기능성 바이러스 단백질로의 번역을 비롯한, 그것의 발현에 필요한 임의의 부가 서열을 포함한다. 다른 상황에서, 미니유전자, 또는 HA 또는 NA 단백질과 같은 바이러스 단백질을 암호화하는 기타 인공적 구조체를 이용할 수 있다. 이 경우에, 이중성 암호 서열의 효율적인 번역을 돕는 특정 개시 시그널을 포함시키는 것이 종종 바람직하다. 이들 시그널은 예를 들어 ATG 개시 코돈 및 이웃한 서열을 포함할 수 있다. 전체 삽입체의 번역을 확실히 하기 위하여, 개시 코돈은 바이러스 단백질에 대하여 정확한 리딩 프레임으로 삽입된다. 외인성 전사 성분 및 개시 코돈은 천연 및 합성의 다양한 기원일 수 있다. 발현 효율은 사용하는 세포 시스템에 적합한 인핸서를 포함시킴으로써 증가될 수 있다.
- [0081] 원한다면, 예를 들어, 폴리펩티드 발현을 원하는 세포 구역, 막, 또는 기관 또는 세포 배양물 배지로 보내기 위해, 시그널 서열, 분비 또는 국소화 서열 등과 같은 부가의 발현 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 관심의 폴리뉴클레오티드 서열과 인프레임으로 벡터내로 통합시킬 수 있다. 그러한 서열은 당업자에게 공지되어 있으며, 분비 리더 펩티드, 기관 표적화 서열(예, 핵 국소화 서열, ER 보유 시그널, 미토콘드리아 트랜짓 서열), 막 국소화/고정 서열(예, 종결 전달 서열, GPI 고정 서열) 등을 포함한다.
- [0082] 인플루엔자 바이러스 백신

- [0083] 역사적으로, 인플루엔자 바이러스 백신은 관련 균주의 실험적 예측에 기초하여 선택된 바이러스 균주를 이용하여 배발생된 암탉의 알에서 생산되었다. 보다 최근에는, 인정된 약독화되고 온도 민감한 마스터 균주를 배경으로 선택된 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 항원을 통합한 재배열 바이러스를 생산하였다. 암탉의 알에서 여러번의 계대를 통한 바이러스의 배양 후, 인플루엔자 바이러스를 회수하고, 선택적으로 예를 들어 포름알데히드 및/또는 β -프로피오락톤을 이용하여 불활성화시킨다. 하지만, 이러한 방식으로 인플루엔자 백신을 생산하는 것은 몇가지 중요한 단점을 가진다. 암탉의 알로부터의 남아 있는 오염물이 매우 항원성이고, 발열원이며, 투여시 빈번히 상당한 부작용을 야기한다. 보다 중요하게, 생산을 위해 지정된 균주는 인플루엔자 백신의 생산과 불활성화를 위한 시간을 갖기 위해 다음 독감 시즌보다 몇 개월 앞서 선택되고 분배되어야 한다. 세포 배양에서 재조합 및 재배열 백신을 생산하는 시도는 백신 생산을 위해 인가된 균주가 표준 세포 배양 조건하에서 효과적으로 성장하지 못함으로 인해 방해받아왔다.
- [0084] 본 발명은 재조합 및 재배열 바이러스를 배양하여 생산하기 위한 벡터 시스템 및 방법을 제공하며, 이 시스템 및 방법은 바이러스의 하나 또는 다수의 선택된 항원성 바이러스 균주에 상응하는 백신을 신속하게 생산하도록 한다. 구체적으로, 세포 배양에서 다중 플라스미드 시스템으로부터 바이러스의 효과적인 생산을 야기하는 조건 및 균주가 제공된다. 선택적으로, 원한다면, 바이러스는 암탉의 알에서 추가로 증폭될 수 있다.
- [0085] 예를 들어, 표준 세포 배양 조건, 예를 들어 37℃에서 인플루엔자 B 마스터 균주 B/Ann Arbor/1/66를 성장시키는 것은 불가능하였다. 본 발명의 방법에서는, 각각 인플루엔자 계놈의 분절을 포함한 다수의 플라스미드를 적합한 세포내로 도입하고, 35℃ 이하의 온도에서 배양물에서 유지한다. 일반적으로 배양물은 약 32 내지 35℃, 바람직하게는 약 32℃ 및 약 34℃ 사이, 예를 들어 약 33℃에서 유지된다.
- [0086] 일반적으로, 배양물은 세포 배양 인큐베이터와 같은 시스템에서, 온도가 35℃를 초과하지 않도록 하는 항온기와 같은 온도 조절기를 이용하여 일정한 온도에서 조절된 습도와 CO₂하에서 유지된다.
- [0087] 재배열 인플루엔자 바이러스는 관심의 균주로부터 유래된 상보적인 분절들과 함께(예, 관심의 항원성 변이체) 마스터 인플루엔자 바이러스의 계놈 분절에 해당하는 벡터의 서브세트를 도입함으로써 쉽게 얻어질 수 있다. 일반적으로, 마스터 균주는 백신 투여와 관련하여 원하는 특성을 기초로 선택된다. 예를 들어, 약독화된 생 백신의 생산과 같은, 백신의 생산을 위하여, 마스터 공여 바이러스 균주는 약독화된 표현형, 저온 적응 및/또는 온도 민감성에 대하여 선택될 수 있다. 이 경우에, 인플루엔자 A 균주 ca A/Ann Arbor/6/60; 인플루엔자 B 균주 ca B/Ann Arbor/1/66; 또는 그것의 바람직한 표현형 특성에 대하여 선택된 다른 균주, 예를 들어, 약독화된, 저온 적응된, 및/또는 온도 민감한 균주, 예를 들어 실시예 4에서 개시된 것과 같은 인공적으로 조작된 인플루엔자 A 균주; 또는 표 17에 개시된 아미노산 치환 하나 이상을 포함한 인공적으로 조작된 인플루엔자 B 균주가 마스터 공여 균주로서 바람직하게 선택된다.
- [0088] 한 구체예에서, 인플루엔자 마스터 바이러스 균주의 6개의 내부 유전자(즉, PB1, PB2, PA, NP, NB, M1, BM2, NS1 및 NS2)를 포함한 플라스미드를, 항원적으로 바람직한 균주, 예를 들어 상당한 국소적 또는 전체적 인플루엔자 감염을 야기하는 것으로 예측된 균주로부터의 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 분절과 함께 적합한 숙주 세포내로 형질감염시킨다. 효과적인 회수에 적합한 온도, 예를 들어 35℃ 이하, 예를 들어 약 32℃ 와 35℃ 사이, 예를 들어 약 32℃ 와 34℃ 사이, 또는 약 33℃에서 세포 배양물에서 재배열 바이러스의 복제 후, 재배열 바이러스를 회수한다. 선택적으로, 회수된 바이러스를 포름알데히드 또는 β -프로피오락톤과 같은 변성제를 이용하여 불활성화시킬 수 있다.
- [0089] 약독화된, 온도 민감한 그리고 저온 적응된 인플루엔자 바이러스 백신
- [0090] 한 태양에서, 본 발명은 바람직한 마스터 공여 바이러스 균주에서 ts 표현형하에 놓여있는 돌연변이의 결정에 기초한다. MDV 균주 계놈에서의 단일 뉴클레오티드 변화의 기능적 중요성을 결정하기 위하여, A/AA/6/60 계통내의 고도로 관련된 균주로부터 유래된 재배열 바이러스를 온도 민감성에 대하여 평가하였다. 두 가지의 모 균주의 동종인자형 특성은 ts 표현형에 대한 단일 뉴클레오티드 변화의 평가를 가능하게 한다. 따라서, MDV-A의 ts 표현형에 대한 유전적 기초는 뉴클레오티드 레벨에서 PB1, PB2 및 NP내의 특정 아미노산 잔기로 맵핑된다.
- [0091] ca A/AA/6/60의 ts 표현형의 유전적 기초를 맵핑하기 위한 이전의 시도들은 A/AA/6/60 및 무관한 야생형 균주 사이의 단일 및 다중 유전자 재배열체를 생성하기 위해 고전적인 동시감염/재배열 기법을 이용하였다. 이들 연구는 PB2와 PB1 둘다 ts 표현형에 기여함을 제안하였다(Kendal et al. (1978) Biochemical characteristics of recombinant viruses derived at sub-optimal temperatures : evidence that ts lesions are present in RNA segments 1 and 3, and that RNA 1 codes for the virion transcriptase enzyme, p. 734-743. In B. W. J.

Mahy, and R. D. Barry (ed.) Negative Strand Viruses, Academic Press; Kendal et al. (1977) Comparative studies of wild-type and cold mutant (temperature sensitive) influenza viruses : genealogy of the matrix (M) and the non-structural (NS) proteins in recombinant cold-adapted H3N2 viruses J Gen Virol 37: 145-159; Kendal et al. (1979) Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature sensitive) influenza viruses : independent segregation of temperature-sensitivity of virus replication from temperature-sensitivity of viriontranscriptase activity duringrecombination of mutant A/Ann Arbor16/60 with wild-type H3N2 strains J Gen Virol 44: 443-4560; Snyder et al. (1988) Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A1Ann Arbor16/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines J Virol 62: 488-95). 하지만, 이들 연구의 해석은 두 가지 다른 인플루엔자 A 균주로부터의 유전자 분절을 혼합함으로써 야기된 집합(constellation) 효과에 의해 혼란스러워졌다. 약해진 상호작용은 A/AA/6/60와, A/AA/6/60 배경으로부터의 ts 표현형의 발현에 특이적으로 관여하는 것들외의 야생형 유전자 분절 사이의 변화를 통해 일어났을 수 있다. 집합 효과는 또한 M 유전자 분절의 att 표현형과의 관련성의 해석을 혼란스럽게 하는 것으로 나타났다(Subbarao et al. (1992) The attenuation phenotype conferredby the M gene of the influenza A/Ann Arbor16/60 cold-adapted virus (H2N2) on the A1Korea182 (H3N2) reassortant virus results from a gene constellation effect Virus Res 25: 37-50).

[0092] 본 발명에서, 위치 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴에서의 아미노산 치환을 야기하는 돌연변이는 MDV-A 균주 바이러스에 온도 민감한 표현형을 부여하는 데 있어서 기능적으로 중요한 것으로 확인된다. 당업자라면 잘 이해할 것처럼, 위치 PB1¹¹⁹⁵, PB1¹⁷⁶⁶, PB1²⁰⁰⁵, PB2⁸²¹ 및 NP¹⁴⁶에서의 뉴클레오티드의 돌연변이는 각각 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴에서의 아미노산 치환을 나타낸다. 따라서, 이들 위치에서 치환된 아미노산을 야기하는 임의의 뉴클레오티드 치환은 본 발명의 특징이다. 예시적인 돌연변이, PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G)는 단독으로 그리고 더욱 바람직하게는 조합하여, 온도 민감성 표현형을 야기한다. 이들 돌연변이가 동시에 야생형으로 복귀하면 ts 표현형이 파괴되는 한편, 이들 돌연변이를 야생형 배경으로 도입하면 ts 표현형을 가진 바이러스가 야기된다. 바이러스의 계대동안 이들 표현형의 안정성과 일치하여, 그 어떤 단일 변화도 얻어진 바이러스의 온도 민감성 프로파일을 야생형의 프로파일로 개별적으로 복귀시킬 수 없다. 오히려, 이들 변화는 서로 함께 작용하여 ts 표현형을 완전하게 발현하는 것으로 보인다. 이 발견은 생 약독화된 인플루엔자 백신의 생산을 위한 마스터 공여 바이러스에 적합한 온도 민감성 인플루엔자 A 바이러스의 추가적인 균주의 조작을 허용한다.

[0093] 유사하게, 마스터 공여 바이러스-B 균주에서 개별적인 아미노산의 치환은 표 17에 예시된 것과 같은 ts 표현형과 관련된다. 따라서, 여기서 제시된 방법은 하나 이상의 특정 돌연변이를 인플루엔자 B 계통내로 도입함으로써 온도 민감성, 및 선택적으로 약독화된 및/또는 저온 적응된 표현형을 갖는 신규한 인플루엔자 B 균주를 생산하도록 적용된다. 예를 들어, PB2⁶³⁰; PA⁴³¹; PA⁴⁹⁷; NP⁵⁵; NP¹¹⁴; NP⁴¹⁰; NP⁵¹⁰; M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³ 중에서 선택되는 위치에서 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 돌연변이를 인플루엔자 B 균주 계통내로 도입하여 온도 민감성 인플루엔자 B 바이러스를 생산한다. 예시적인 아미노산 치환은 하기를 포함한다: PB2⁶³⁰(S630R); PA⁴³¹(V431M); PA⁴⁹⁷(Y497H); NP⁵⁵(T55A); NP¹¹⁴(V114A); NP⁴¹⁰(P410H); NP⁵¹⁰(A510T); M1¹⁵⁹(H159Q) 및 M1¹⁸³(M183V).

[0094] 본 발명의 돌연변이를 포함한 인플루엔자 바이러스는 그들이 생산되는 방법에 상관없이 본 발명의 특징이다. 즉, 본 발명은 본 발명의 돌연변이를 포함하는 인플루엔자 균주를 포함하며, 예를 들어 PB1³⁹¹, PB1⁵⁸¹, PB1⁶⁶¹, PB2²⁶⁵ 및 NP³⁴에서 선택되는 하나 이상의 위치에서 야생형에 비하여 아미노산 치환을 가진 임의의 인플루엔자 A 바이러스 또는 PB2⁶³⁰; PA⁴³¹; PA⁴⁹⁷; NP⁵⁵; NP¹¹⁴; NP⁴¹⁰; NP⁵¹⁰; M1¹⁵⁹ 및 M1¹⁸³ 중에서 선택되는 하나 이상의 위치에서 야생형에 비하여 아미노산 치환을 가진 임의의 인플루엔자 B 바이러스를 포함하며, 이때 단 균주 ca A/Ann Arbor/6/60 및 B/Ann Arbor/1/66은 본 발명의 특징으로 간주되지 않는다. 일부 바람직한 구체예에서, 인플루엔자 A 바이러스는 PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G), PB1⁶⁶¹(A661T), PB2²⁶⁵(N265S) 및 NP³⁴(D34G)에서 선택된 다수의 돌연변이(예, 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 그 이상의 돌연변이)를 포함하며; 그리고 인플루엔자 B 바이러스는 PB2⁶³⁰(S630R); PA⁴³¹(V431M); PA⁴⁹⁷(Y497H); NP⁵⁵(T55A); NP¹¹⁴(V114A); NP⁴¹⁰(P410H); NP⁵¹⁰(A510T); M1¹⁵⁹(H159Q) 및 M1¹⁸³(M183V)에서 선택된 다수의 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 백신 생산과 관련하여 원하는

표현형을 가진 바이러스를 제공하는 것에 더하여, 돌연변이의 서브세트, 예를 들어 1, 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5개의 선택된 돌연변이를 갖는 바이러스는 바이러스의 표현형에 대한 부가의 돌연변이의 공헌을 밝히는 데 유용하다. 일부 구체예에서, 인플루엔자 바이러스는 적어도 하나의 부가의 비야생형 뉴클레오티드(예, 가능하게는 부가의 아미노산 치환을 야기함)를 포함하며, 이는 선택적으로 원하는 표현형을 정제하거나 추가의 바람직한 표현형적 특성을 부여한다.

[0095] 세포 배양

[0096] 일반적으로, 바이러스의 증식은 숙주 세포가 일반적으로 배양되는 배지 조성물에서 이루어진다. 인플루엔자 바이러스의 복제를 위한 적합한 숙주 세포는 예를 들어 293T 세포와 COS7 세포를 비롯한 배로 세포, Per.C6 세포, BHK 세포, MDCK 세포, 293 세포 및 COS 세포를 포함한다. 일반적으로, 상기 세포주 중 둘을 포함하는 공배양물, 예를 들어 MDCK 세포와 293T 또는 COS 세포 중 하나를 예를 들어 1:1의 비율로 이용하여 복제 효율을 개선한다. 일반적으로 세포는 중성의 완충된 pH(예, 7.0과 7.2 사이의 pH)를 유지하는 데 적합한 CO₂ 농도와 조절된 습도 하에서, 혈청(예, 10% 태아 소 혈청)이 보충된 둘베코 변형 이글 배지 또는 무혈청 배지와 같은 표준 시판 배양 배지에서 배양된다. 선택적으로, 배지는 예를 들어 페니실린, 스트렙토마이신 등과 같은 박테리아 성장을 막는 항생제, 및/또는 L-글루타민, 소듐 피루베이트, 비필수 아미노산과 같은 부가 영양제, 바람직한 성장 특성을 촉진하는 부가의 보충제(예, 트립신, β-머캅토에탄올 등)를 함유한다.

[0097] 배양중인 포유류 세포를 유지하는 과정은 광범위하게 보고되었으며, 당업계에서 공지되어 있다. 일반적인 프로토콜은 예를 들어 Freshney (1983) Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, New York; Paul (1975) Cell and Tissue Culture, 5th ed., Livingston, Edinburgh; Adams (1980) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam에 제공된다. 생체외에서의 인플루엔자 바이러스의 생산에서 특히 관심있는 조직 배양 과정에 관한 추가의 상세 사항은 본원에 참고로 통합되는 Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. In Cohen and Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines에 있다. 추가로, 본 발명에 적용되는 그러한 과정에서의 변화는 일상적인 실험을 통하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0098] 인플루엔자 바이러스의 생산을 위한 세포는 혈청-함유 배지 또는 무혈청 배지에서 배양될 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어 정제된 바이러스의 제조를 위해서는, 숙주 세포를 무혈청 조건하에서 성장시키는 것이 바람직하다. 세포는 작은 규모, 예를 들어 25ml 미만 배지, 배양 튜브 또는 플라스크에서, 또는 교환되는 큰 플라스크, 로테이터 병, 또는 플라스크, 병 또는 반응기 배양액내의 미세담체 비드(예, Dormacell, Pfeifer & Langen와 같은 DEAE-텍스트란 미세담체 비드; 수퍼비드(Superbead), Flow Laboratories; Hillex, SoloHill, Ann Arbor와 같은 스티렌 공중합체-트리-메틸아민 비드)상에서 배양될 수 있다. 미세담체 비드는 세포 배양물의 부피당 부착성 세포 성장을 위한 큰 표면적을 제공하는 작은 구이다(직경 100-200 미크론 범위). 예를 들어, 배지 1리터는 2천만개를 넘는 미세담체 비드를 포함하여 8000 제곱 센티미터를 초과하는 성장 표면을 제공할 수 있다. 예를 들어 백신 생산과 같은 상업적인 바이러스 생산의 경우, 생물반응기 또는 발효기에서 세포를 배양하는 것이 종종 바람직하다. 생물반응기는 1 리터 이하에서부터 100 리터 초과 부피까지 이용가능하며, 예를 들어 Cyto3 생물반응기 (Osmonics, Minnetonka, MN); NBS 생물반응기 (New Brunswick Scientific, Edison, N. J.) ; B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany)으로부터의 실험실용 및 상업적 규모의 생물반응기가 있다.

[0099] 본 발명의 내용에서, 배양 부피에 상관없이, 여기서 개시된 다중 플라스미드 시스템을 이용한 재조합 및/또는 재배열 인플루엔자 바이러스의 효과적인 회수를 보장하기 위하여 배양물을 35℃ 이하의 온도에서 유지하는 것이 중요하다. 예를 들어, 세포는 약 32℃와 35℃ 사이, 일반적으로 약 32℃ 와 약 34℃ 사이의 온도, 대개 약 33℃의 온도에서 배양된다.

[0100] 일반적으로, 조절기, 예를 들어 항온기, 또는 세포 배양 시스템의 온도를 감지하고 유지하기 위한 기타 장치를 이용하여 바이러스 복제 기간동안 온도가 35℃ 를 초과하지 않도록 한다.

[0101] 숙주 세포내로의 벡터의 도입

[0102] 인플루엔자 게놈 분절을 포함하는 벡터를, 이중성 핵산을 진행 세포내로 도입하기 위한 공지의 방법, 예를 들어 칼슘 포스페이트 공침전, 전기천공, 미세주입, 리포펙션, 및 폴리아민 형질감염 시약을 이용한 형질감염 등에 따라 숙주 세포내로 도입시킨다(예, 형질감염시킨다). 예를 들어, 플라스미드와 같은 벡터는 제조자의 지시에

따라 폴리아민 형질감염 시약 TransIT-LT1(Mirus)을 이용하여 COS 세포, 293T 세포 또는 COS 또는 293T 세포와 MDCK 세포의 조합과 같은 숙주 세포내로 형질감염시킬 수 있다. 약 2 μ l의 TransIT-LT1와 함께, 숙주 세포 집단 내로 도입될 각 벡터 약 1 μ g을 160 μ l 배지, 바람직하게는 무혈청 배지에 희석시키고 총 부피가 200 μ l가 되도록 한다. DNA:형질감염 시약 혼합물을 45분간 실온에서 항온처리하고 이어서 800 μ l의 배지를 첨가한다. 형질감염 혼합물을 숙주 세포에 첨가하고, 세포를 전술한 대로 배양한다. 따라서, 세포 배양에서 재조합 또는 재배열 바이러스를 생산하기 위해서, 8개의 계능 분절(PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA 및 NA)의 각각을 보유한 벡터들을 약 20 μ l의 TransIT-LT1와 혼합하고 숙주 세포내로 형질감염시킨다. 선택적으로, 혈청 함유 배지를 형질감염에 앞서 무혈청 배지, 예를 들어 Opti-MEM I으로 대체하고, 4-6시간동안 항온처리한다.

[0103] 다르게는, 전기천공을 이용하여 인플루엔자 계능 분절을 포함한 벡터를 숙주 세포내로 도입할 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 바이러스를 포함한 플라스미드 벡터는 바람직하게는 하기 과정을 따라 전기 천공을 이용하여 배로 세포내로 도입된다. 요약하면, 예를 들어, 10% 태아 소 혈청(FBS)로 보충된 변형 이글 배지(MEM)에서 성장한 5×10^6 배로 세포를 0.4ml OptiMEM에 재현탁시키고 전기천공 큐벳에 놓는다. 최대 25 μ l 부피의 20 μ g의 DNA를 큐벳내의 세포에 첨가하고, 이어서 탭핑하여 부드럽게 혼합한다. 제조자의 지시에 따라 300 볼트, 950 마이크로파라드에서 28-33 msec의 시간 상수로 전기천공을 실시한다(예, 연결된 Capacitance Extender Plus를 가진 BioRad Gene Pulser II). 부드럽게 탭핑하여 세포를 재혼합하고, 전기 천공 후 약 1-2분 후에 10% FBS를 가진 0.7ml MEM을 직접 큐벳에 첨가한다. 이어서 세포를 2ml MEM, 10% FBS 또는 OPTI-MEM(무혈청)을 함유한 표준 6웰 조직 배양 디쉬의 두 웰로 옮긴다. 큐벳을 세척하여 임의의 잔류 세포를 회수하고 세척 현탁액을 상기 두 웰로 나눈다. 최종 부피는 약 3.5ml이다. 이어서 세포를 바이러스 성장을 허용하는 조건, 예를 들어 저온 적응된 균주를 위해서는 약 33℃에서 항온처리한다.

[0104] 바이러스의 회수

[0105] 바이러스는 일반적으로 감염된(형질감염된)세포가 성장한 배양 배지로부터 회수된다. 일반적으로 조 배지를 인플루엔자 바이러스의 농축에 앞서 깨끗하게 한다. 흔한 방법은 여과, 초미세여과, 바름 셀레이트상에서의 흡착 및 용출, 및 원심분리를 포함한다. 예를 들어, 감염된 배양물로부터의 조 배지를 먼저 세포 파편과 기타 큰 입자 물질을 제거하기에 충분한 시간, 예를 들어 10분 내지 30분동안 예를 들어 1000 - 2000 x g에서 원심분리하여 깨끗하게 할 수 있다. 다르게는, 배지를 0.8 μ m 셀룰로스 아세테이트 필터를 통해 여과시켜 그대로의 세포와 기타 큰 입자 물질을 제거한다. 선택적으로, 깨끗해진 배지 상등액을, 예를 들어 약 3-5시간동안 15,000 x g에서 원심분리하여 인플루엔자 바이러스를 침전시킨다. STE (0.01 M Tris-HCl ; 0.15 M NaCl ; 0.0001 M EDTA) 또는 pH 7.4의 포스페이트 완충된 염수(PBS)와 같은 적절한 완충액에서 바이러스 펠렛을 현탁한 후, 슈크로스 (60%-12%) 또는 포타슘 타르트레이트(50%-10%)상에서의 밀도 구배 원심분리에 의해 바이러스를 농축시킨다. 연속 또는 단계 구배, 예를 들어 4개의 12% 단계의 12%와 60% 사이의 슈크로스 구배가 적절하다. 회수를 위한 가시적인 밴드내로 바이러스를 농축시키는 데 충분한 속도, 및 시간동안 구배물을 원심분리시킨다. 다르게는, 그리고 가장 큰 규모의 상업적 적용을 위해서는, 연속적인 모드로 작용하는 영역-원심분리 로터를 이용하여 밀도 구배로부터 바이러스를 현탁분리한다. 당업자가 조직 배양물로부터 인플루엔자 바이러스를 준비하도록 안내하기에 충분한 상세한 사항은 예를 들어 Furminger. Vaccine Production, in Nicholson et al. (eds) Textbook of Influenza pp. 324- 332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, in Cohen & Shafferman (eds) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp.141-151, 및 미국 특허 제 5,690, 937호에 개시된다. 원한다면, 회수된 바이러스를 슈크로스-포스페이트-글루타메이트(SPG)가 안정화제로 존재하는 상태에서 -80℃에서 저장할 수 있다.

[0106] 백신의 예방적 투여를 위한 조성물 및 방법

[0107] 본 발명의 재조합 및 재배열 바이러스는 하나 이상의 인플루엔자 바이러스 균주에 대해 특이적인 면역 반응을 자극하기 위해 적절한 담체 또는 부형제에서 예방학적으로 투여될 수 있다. 일반적으로 담체 또는 부형제는 멸균수, 수성 염수용액, 수성 완충 염수 용액, 수성 텍스트로스 용액, 수성 글리세롤 용액, 에탄올, 미감염 암탉의 알로부터의 알란토인 유체(즉, 정상의 알란토인 유체 "NAF") 또는 그 조합과 같은 약학적 허용 담체 또는 부형제이다. 멸균성, pH, 등장성, 및 안정성을 보장하는 그러한 용액의 제조는 당업계에 확립된 프로토콜에 따라 이루어진다. 일반적으로, 담체 또는 부형제는 알레르기 및 기타 부적절한 효과를 최소화하고 피하, 근육내, 비강내 등과 같은 특정 투여 경로에 맞도록 선택된다.

[0108] 일반적으로, 본 발명의 인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 인플루엔자 바이러스 균주에 대해 특이적인 면역 반응을 자극하기에 충분한 양으로 투여된다. 바람직하게는, 인플루엔자 바이러스의 투여는 보호성 면역 반응을 유

도한다. 하나 이상의 인플루엔자 균주에 대한 보호성 면역 반응을 유발하기 위한 투여량 및 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 불활성화된 인플루엔자 바이러스는 약 1-1000 HID_{50} (인간 감염성 투여량)의 범위, 즉 투여되는 투여량 당 약 10^5 - 10^8 pfu (플라크 형성 단위)로 제공된다. 다르게는, 약 10-50 μg , 예를 들어 15 μg HA가 보강제 없이 투여되며, 보다 작은 투여량은 보강제와 함께 투여된다. 일반적으로, 투여량은 예를 들어 나이, 물리적 상태, 체중, 성별, 식사, 투여 시간 및 기타 임상적 요소에 기초하여 이 범위내에서 조정될 것이다. 예방 백신 제제는 예를 들어 주사 바늘 및 시린지, 또는 바늘없는 주사 장치를 이용한 피하 또는 근육내 주사에 의해 전신 투여된다. 다르게는, 백신 제제는 드롭, 큰 입자 에어로졸(약 10 미크론 이상)에 의해, 또는 상부 호흡기내로의 분사에 의해 비강내로 투여된다. 상기 전달 경로 중 어느 것이든 보호성 전신 면역 반응을 야기하지만, 비강내 투여는 인플루엔자 바이러스의 도입 부위에서 점막 면역성을 유발하는 추가 잇점을 제공한다. 비강내 투여의 경우, 약독화된 생 바이러스 백신이 종종 바람직하며, 예를 들어 약독화된, 저온 적응된 및/또는 온도 민감한 재조합 또는 재배열 인플루엔자 바이러스가 바람직하다. 단일 투여에 의한 보호성 면역 반응의 자극이 바람직하며, 원하는 예방 효과를 이루기 위하여 추가의 투여량을 동일하거나 상이한 경로에 의해 투여할 수 있다.

[0109] 다르게는, 면역 반응은 인플루엔자 바이러스를 가지돌기 세포에 생체외 또는 생체내 표적화시킴으로써 자극될 수 있다. 예를 들어, 증식중인 가지돌기 세포를, 가지돌기 세포에 의한 인플루엔자 항원의 포획이 가능한 충분한 시간 기간동안 충분한 양의 바이러스에 노출시킨다. 이어서 세포를 표준 정맥내 이식 방법에 의해 예방될 대상으로 옮긴다.

[0110] 선택적으로, 인플루엔자 바이러스 또는 그 구성 성분하위단위의 예방적 투여를 위한 제제는 또한 인플루엔자 항원에 대한 면역 반응을 증강시키기 위한 보강제 하나 이상을 함유한다. 적합한 보강제는 사포닌, 알루미늄 하이드록사이드와 같은 미네랄 젤, 리소레스틴과 같은 표면 활성 물질, 플루로닉 폴리에틸렌, 다가음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 바실레 칼벳-구에린(BCG), 코리네박테리움 파르툼, 및 합성 보강제 QS-21 및 MF59를 포함한다.

[0111] 원한다면, 인플루엔자 바이러스의 예방용 백신 투여는 하나 이상의 면역자극성 분자의 투여와 병행될 수 있다. 면역자극성 분자는 면역자극, 면역증강, 및 프로-염증 활성을 가진 다양한 사이토카인, 림포카인 및 케모카인을 포함하며, 예로는 인터루킨(예, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); 성장 인자(예, 과립구-대식세포(GM)-콜로니 자극 인자(CSF)); 및 대식 세포 염증성 인자, Flt3 리간드, B7.1, B7.2 등과 같은 기타 면역자극 분자가 있다. 면역자극 분자는 인플루엔자 바이러스와 같은 제제로 투여되거나 또는 별도로 투여될 수 있다. 단백질 또는 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 투여하여 면역자극 효과를 생산할 수 있다.

[0112] 다른 구체예에서, 인플루엔자 게놈 분절을 포함하는 본 발명의 벡터를 이용하여, 전술한 바와 같은 적합한 약학 담체 또는 부형제와 함께, 예를 들어 인간 대상으로부터 분리된 세포와 같은 포유류 세포와 같은 숙주 세포 또는 숙주 유기체내로 이중성 핵산을 도입할 수 있다. 일반적으로, 이중성 핵산은 유전자 또는 유전자 분절, 예를 들어 분절 7의 M 유전자의 비필수 영역내로 삽입된다. 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열은 폴리펩티드 또는 펩티드, 또는 안티센스 RNA 또는 리보자임과 같은 RNA를 암호할 수 있다. 이어서 이중성 핵산을 포함한 재조합 바이러스를 생산하고 이 바이러스를 전술한 대로 투여함으로써 이중성 핵산을 숙주 또는 숙주 세포내로 도입한다.

[0113] 다르게는, 이중성 핵산을 포함한 본 발명의 벡터는 이 벡터를 인플루엔자 바이러스로 감염된 세포내로 동시감염 시킴으로써 숙주 세포에 도입되어 발현될 수 있다. 선택적으로, 이어서 세포를 일반적으로 그들이 얻어졌던 부위로 대상에게 되돌려보내거나 전달시킨다. 일부 경우, 세포는 확립된 세포 전달 또는 이식 방법을 이용하여 관심의 조직, 기관 또는 시스템 부위(전술한 대로)상에 이식된다. 예를 들어, 골수, 제대혈, 또는 말초 혈액 유래 조혈 줄기 세포와 같은 조혈 계통의 줄기 세포를 표준 전달 또는 융합 기법을 이용하여 대상에 전달할 수 있다.

[0114] 다르게는, 이중성 핵산을 포함한 바이러스를 생체내에서 대상의 세포에 전달할 수 있다. 일반적으로, 그러한 방법은 벡터 입자를 표적 세포 집단(예, 혈액 세포, 피부 세포, 간 세포, 신경(뇌 포함) 세포, 신장 세포, 자궁 세포, 근육 세포, 장 세포, 경부 세포, 질 세포, 전립선 세포, 등 및 다양한 세포, 조직 및/또는 기관에서 유래한 종양 세포)에 투여하는 것에 관련된다. 투여는 예를 들어 바이러스 입자의 정맥내 투여에 의한 전신성이거나, 또는 바이러스 입자를 직접 주사(예, 주사 바늘 또는 시린지를 이용), 바늘없는 백신 전달, 국소 투여 또는 조직, 기관 또는 피부 부위내로의 밀어넣기를 비롯한 다양한 방법에 의해 관심 부위 또는 부위들로 전달하는 것일 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터 입자는 흡입, 경구, 정맥내, 피하내, 피부밑, 피부내, 근육내, 복강내, 경막내 투여에 의해, 질 또는 직장 투여에 의해, 또는 바이러스 입자를 예를 들어 수술동안 신체의

강 또는 기타 부위내에 놓음으로써 전달될 수 있다.

[0115] 전술한 방법들은 치료적으로 또는 예방적으로 효과적인 폴리펩티드(또는 펩티드) 또는 RNA(예, 안티센스 RNA 또는 리보자임)를 암호화하는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명 벡터를 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 표적 세포 집단내로 도입함으로써 질병 또는 질환을 치료적으로 및/또는 예방적으로 치료하는 데 유용하다. 일반적으로, 관심의 폴리펩티드(또는 펩티드) 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 "발현 벡터" 및 "부가의 발현 성분" 제목의 섹션에서 전술한 대로 적절한 조절 서열에 작동적으로 연결된다. 선택적으로, 하나보다 많은 이중성 암호 서열이 단일 벡터 또는 바이러스내로 통합된다. 예를 들어, 치료적으로 또는 예방적으로 활성인 폴리펩티드 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 더하여, 벡터는 또한 예를 들어 항원, 공자극 분자, 사이토카인, 항체 등과 같은 부가의 치료적 또는 예방적 폴리펩티드, 및/또는 마커 등을 포함할 수 있다.

[0116] 본 발명의 방법 및 벡터는 유전적 및 후천적 질병을 포함한 다양한 질병을 치료적 또는 예방적으로 치료하기 위해 바이러스, 박테리아, 등에 기인하는 감염성 질병을 위한 백신으로서 이용될 수 있다.

[0117] 키트

[0118] 본 발명의 벡터 및 벡터 시스템의 이용을 촉진하기 위해, 임의의 벡터, 예를 들어 컨센서스 인플루엔자 바이러스 플라스미드, 변이체 인플루엔자 폴리펩티드 플라스미드, 인플루엔자 폴리펩티드 라이브러리 플라스미드, 등, 및 실험 또는 치료 목적을 위한 인플루엔자 바이러스의 패키징 및 감염에 유용한 완충액, 세포, 배양 배지와 같은 부가 성분들을 키트 형태로 포장할 수 있다. 일반적으로, 키트는 상기 성분들에 더하여, 예를 들어 본 발명의 방법을 실시하기 위한 설명서, 포장 물질, 및 용기를 포함할 수 있는 부가 물질을 함유한다.

[0119] 바이러스 핵산과 단백질의 조작

[0120] 본 발명의 내용에서, 인플루엔자 바이러스 핵산 및/또는 단백질은 공지된 분자 생물학 기법에 따라 조작된다. 증폭, 클로닝, 돌연변이유발, 형질전환, 등을 비롯한 그러한 많은 과정을 위한 상세한 프로토콜은 예를 들어 Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (supplemented through 2000) John Wiley & Sons, New York ("Ausubel"); Sambrook et al. Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook"), 및 Berger and Kimmel Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc. , San Diego, CA ("Berger")에 개시된다.

[0121] 상기 참고문헌에 더하여, 본 발명의 cDNA 프로브를 증폭시키기 위해 유용한 중합효소 연쇄 반응(PCR), 리가제 연쇄 반응(LCR), Q β -레플리카제 증폭, 및 기타 RNA 폴리머라제 매개 기법(예, NASBA)과 같은 생체의 증폭 기법을 위한 프로토콜이 Mullis et al. (1987) 미국 특허 제4,683,202호; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Arnheim and Levinson (1990) C & EN 36 ; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81; Kwoh et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86, 1173; Guatelli et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87 : 1874; Lomell et al. (1989) J Clin Chem 35: 1826; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291 ; Wu and Wallace (1989) Gene 4: 560; Barringer et al. (1990) Gene 89: 117, 및 Sooknanan and Malek (1995) Biotechnology 13 : 563에서 발견된다. 본 발명의 내용에서 핵산 클로닝에 유용한 부가 방법들은 왈레스 등의 미국 특허 제5,426,039호를 포함한다. PCR에 의해 큰 핵산을 증폭시키는 개선된 방법은 Cheng et al. (1994) Nature 369: 684 및 그 안의 참고문헌에 요약된다.

[0122] 본 발명의 일부 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 올리고뉴클레오티드는 모노뉴클레오티드- 및/또는 트리뉴클레오티드-계 포스포라미디트 커플링 화학을 포함한 다양한 고체상 전략을 이용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, 핵산 서열은 신장중인 폴리뉴클레오티드 쇄에 활성화된 모노머 및/또는 트리머를 순차적으로 추가하여 합성시킬 수 있다. 예를 들어, Caruthers, M. H. et al. (1992) Meth Enzymol 211 : 3을 참고한다.

[0123] 원하는 서열을 합성하는 대신, 본질적으로 임의 핵산은 The Midland Certified Reagent Company(mrcr@oligos.com), The Great American Gene Company (www. genco. com), ExpressGen, Inc. (www. expressgen. com), Operon Technologies, Inc. (www. operon. com) 및 다수의 기타와 같은 다양한 시판 공급원으로부터 주문 생산될 수 있다.

[0124] 또한, 바이러스 폴리펩티드의 선택된 아미노산 잔기의 치환은 예를 들어 부위 지시된 돌연변이유발에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 원하는 표현형 특성, 예를 들어 약독화된 표현형, 저온 적응, 온도 민감성과 기능적

으로 관련된 아미노산 치환을 가진 바이러스 폴리펩티드는 특정 돌연변이를 그 폴리펩티드를 암호화하는 바이러스 핵산 분절내로 도입함으로써 생산될 수 있다. 부위 지시된 돌연변이유발을 위한 방법이 공지되어 있으며, 예를 들어 상기한 Ausubel, Sambrook, and Berger에 개시된다. 부위 지시된 돌연변이 유발을 실시하기 위한 많은 키트가 시판중이며, 예를 들어 카멜레온 부위 지시된 돌연변이유발 키트(Stratagen, La Jolla)가 있으며, 예를 들어 표 6 또는 표 17에 개시된 하나 이상의 아미노산 치환을 각각 인플루엔자 A 또는 B 폴리펩티드를 암호화하는 게놈 분절내로 도입하기 위해 제조자의 지시에 따라 이용될 수 있다.

[0125] 실시예 1: pAD3000의 구성

[0126] 플라스미드 pHW2000 (Hoffmann et al. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97: 6108- 6113)을 변형시켜 소 성장 호르몬(BGH) 폴리아데닐화 시그널을 시미안 바이러스 40(SV40)에서 유래한 폴리아데닐화 시그널 서열로 치환하였다.

[0127] SV40에서 유래한 서열을, 5'에서 3' 방향으로 표시된 하기 올리고뉴클레오티드를 이용하여 Taq MasterMix(Qiagen)를 이용하여 증폭시켰다:

[0128] polyA.1: AACAAATTGAGATCTCGGTCACCTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT (서열번호1)
polyA.2: TATAACTGCAGACTAGTGATATCCTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTA (서열번호 2)

[0129] 플라스미드 pSV2His를 주형으로 이용하였다. 예측된 175bp 생성물과 일치하는 단편이 얻어졌으며, 제조자의 지시에 따라 Topo TA 클로닝 벡터(Invitrogen)를 이용하여 pcDNA 3.1내로 상기 단편을 클로닝하였다. EvoRV와 BstEII를 이용하여 SV40 폴리아데닐화 시그널을 함유한 원하는 138 bp 단편을 플라스미드로부터 잘라내고, 아가 로즈 젤로부터 분리하고, 통상의 기법을 이용하여 pHW2000내의 유일한 PvuII와 BstEII 부위 사이에 연결시켰다 (예, Ausubel, Berger, Sambrook 참고). 생성된 플라스미드, pAD3000(도 1)을 서열결정하여, 정확한 배향으로 SV40 폴리아데닐화 부위를 함유함을 확인하였다. pAD3000의 뉴클레오티드 295-423은 각각 SV40 균주 777(AF332562)의 뉴클레오티드 2466-2594에 해당한다.

[0130] 실시예 2: MDV-A의 생산을 위한 8 플라스미드 시스템

[0131] 저온 적응된 인플루엔자 바이러스 타입 A 균주 A/AA/6/60 변이체는 비강 투여되는 인플루엔자 A 백신 생산을 위한 마스터 공여 바이러스로서 흔히 이용되어 왔다. 이 균주는 본 발명에서 예시적인 마스터 공여 바이러스(MDV)이다. 간단히 하기 위하여, 이 균주 A/AA/6/60 변이체는 여기서 MDV-A로 표시된다. MDV-A 바이러스 RNA를 RNeasy 미니 키트(Qiagen)을 이용하여 추출하고, 표 1에 열거된 프라이머를 이용하는 RT-PCR에 의해 8개의 해당하는 cDNA 단편을 증폭시켰다.

[0132] [표 1]

[0133] MDV-A 8 분절을 클로닝하기 위해 이용된 프라이머 서열

서열 번호	프라이머	서열 (5'-3')
	MDV-A 전방 프라이머	
서열번호 3	AarI PB2 long	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC GAA AGC AGG TC
서열번호 4	BsmBI-PB1	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC AAA
서열번호 5	BsmBI-PA	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT ACT
서열번호 6	BsmBI-NP	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TAG A
서열번호 7	AarI HA-long	CAC TTA TAT TCA CCT GCC TCA GGG AGC AAA AGC AGG GG
서열번호 8	BsmBI-NA	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGA GTG A
서열번호 9	BsmBI-M	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGT AGA T
서열번호 10	BsmBI-NS	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TGA

[0134]

MDV-A 역방 프라이머		
서열번호 11	AarI PB2-long	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGT CGT TT
서열번호 12	BsmBI-PB1	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
서열번호 13	BsmBI-PA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
서열번호 14	BsmBI-NP	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT
서열번호 15	AarI HA-long	CCT AAC ATA TCA CCT GCC TCG TAT TAG TAG AAA CAA GGG TGT T
서열번호 16	BsmBI-NA	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GAG TTT
서열번호 17	BsmBI-M	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA GTT
서열번호 18	BsmBI-NS	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT

[0135]

[0136]

AarI 제한 효소 인식 부위를 함유한 프라이머를 이용하여 증폭된, HA와 PB2를 암호화하는 인플루엔자 게놈 분절을 제외하고, 나머지 6개의 유전자를 BsmB I 제한 효소 인식 부위를 함유한 프라이머로 증폭시켰다. AarI 및 BsmB I cDNA 단편을 pAD3000 벡터의 두 개의 BsmB I 부위 사이에 클로닝하였다.

[0137]

서열 분석 결과 모든 클론된 cDNA 단편이 클로닝 단계동안 도입되었을, 컨센서스 MDV-A 서열에 관련된 돌연변이를 함유함을 발견하였다. 각 유전자 분절에서 발견된 돌연변이는 표 2에 요약된다.

[0138]

[표 2]

[0139]

pAD3000내의 MDV-A 클론내로 도입된 돌연변이

유전자 분절	돌연변이 위치	아미노산 변화
PB2	A954(G/C/T), G1066A, T1580C, T1821C	사일런트, Gly에서 Ser으로, Val에서 Ala으로, 사일런트
PB1	C1117T	Arg에서 종결코돈으로
PA	G742A, A1163G, A1615G, T1748C, C2229del	Gly에서 Ser으로, Asp에서 Gly으로, Arg에서 Gly으로, Met에서 Thr으로, 비암호
HA	A902C, C1493T	Asn에서 His로, Cys에서 Arg로
NP	C113A, T1008C	Thr에서 Asn으로, 사일런트
NA	C1422T	Pro에서 Leu로
M	A191G	Thr에서 Ala로
NS	C38T	사일런트

[0140]

[0141]

퀵체인지 부위-지시된 돌연변이유발 키트(QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit)(Stratagene)과 표 3에 나타난 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 모든 돌연변이를 컨센서스 MDV-A 서열로 바로잡았다.

[0142]

[표 3]

[0143] MDV-A 클론에서의 돌연변이를 바로잡기 위해 이용된 프라이머

	HJ67	PB2A954G	5/P/gcaagctgtggaatatgcaaggc (서열번호 19)
	HJ68	PB2A954G.as	gccttgcatatttccacagcttgc (서열번호 20)
	HJ69	PB2G1066A	5/P/gaagtgccttacgggcaatcttcaaac (서열번호 21)
PB2	HJ70	PB2G1066A.as	gtttgaagattgcccgtaagcacttc (서열번호 22)
	HJ71	PB2T1580A	5/P/cctgaggaggctcagtgaaacac (서열번호 23)
	HJ72	PB2T1580A.as	gtgtttcactgacctctcagg (서열번호 24)
	HJ73	PB21821C	5/P/gttgttaggactctattccaac (서열번호 25)
	HJ74	PB21821C.as	gttggaatagagtcctaacaac (서열번호 26)
PB1	HJ75	PB1C1117T	gacagtaagctccgaacacaatac (서열번호 27)
	HJ76	PB1C1117T.as	gtatttgtgttcggagcttcatgc (서열번호 28)
	HJ77	PA-G742A	5/P/cgaaccgaacggctacattgaggg (서열번호 29)
	HJ78	PA-G742A.as	ccctcaatgtagccgttcggttcg (서열번호 30)
	HJ79	PA-A1163G	5/P/cagagaaggtagatttgacgactg (서열번호 31)
	HJ80	PA-A1163G.as	cagtcgtcaaatgtctaccttctctg (서열번호 32)
PA	HJ81	PA-A1615G	5/P/cactgacccaagacttgagccac (서열번호 33)
	HJ82	PA-A1615G.as	gtggctcaagtcttgggtcagtg (서열번호 34)
	HJ83	PA-T1748C	5/P/caaagattaaaatgaaatggggaatg (서열번호 35)
	HJ84	PA-T1748C.as	cattcccatcttcatctttaaattcttg (서열번호 36)
	HJ85	PA-C2229	5/P/gtacctgttttctactaataacccgg (서열번호 37)
	HJ86	PA-C2230.as	ccgggttatttagtagaacaagggtac (서열번호 38)
	HJ87	HA-A902C	5/P/ggaacacttgagaactgtgagacc (서열번호 39)
HA	HJ88	HA-A902C.as	ggctccacagttctcaagtgttcc (서열번호 40)
	HJ89	HA-C1493T	5/P/gaattttatcacaaatgtgatgaatg (서열번호 41)
	HJ90	HA-C1493T.as	cattcatcatcacatttggataaaattc (서열번호 42)
	HJ91	NP-C113A	5/P/gccagaatgcaactgaaatcagagc (서열번호 43)
NP	HJ92	NP-C113A.as	gctctgatttcagtttctattctggc (서열번호 44)
	HJ93	NP-T1008C	5/P/ccgaatgagaatccagcacacaag (서열번호 45)
	HJ94	NP-T1008C.as	cttgtgtgctggattctcattcgg (서열번호 46)
	HJ95	NA-C1422T	catcaatttcatgcctatataagctttc (서열번호 47)
NS	HJ96	NA-C1422T.as	gaaagcttatatagccatgaaattgatg (서열번호 48)
	HJ97	NS-C38T	cataatggatcctaactgtgtcaagc (서열번호 49)
	HJ98	NS-C38T.as	gcttgacacagtggttaggattcattatg (서열번호 50)
PA	HJ99	PA6C375T	ggagaatagatttcacagagattggag (서열번호 51)
	HJ100	PA6C375T.as	ctccaatctcgatgaattctattctcc (서열번호 52)

[0144]

[0145] 실시예 3: 감염성 재조합 MDV-A 및 재배열된 인플루엔자 바이러스의 생성

[0146]

마딘-달비 개 신장(MDCK) 세포와 인간 COS7 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS)을 함유한 변형 이글 배지(MEM)에서 유지하였다. 인간 배아 신장 세포(293T)를 5% FBS를 함유한 Opti-MEM(Life Technologies)에서 유지하였다. MDCK 및 COS7 또는 293T 세포를 1:1의 비율로 6-웰 플레이트에서 동시배양시키고, 약 80%의 합류점(confluency)에서 세포를 형질감염을 위하여 이용하였다. 293T와 COS7 세포는 높은 형질감염 효율을 갖지만, 인플루엔자 바이러스 복제를 허용하지 않는다. MDCK 세포와의 동시 배양은 재조합 바이러스의 효과적인 복제를 보장한다. 형질감염에 앞서, 혈청 함유 배지를 무혈청 배지(Opti-MEM)로 바꾸고 4-6시간동안 항온처리하였다. 총 부피 200 μ l로, 160 μ l Opti-MEM I에 희석된 TransIT-LT1 20 μ l와 8개 플라스미드 DNA(PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA 및 NA) 각각 1 μ g을 혼합함으로써 TransIT-LT1(Mirus)를 이용하여 플라스미드 DNA 형질감염을 실시하였다. DNA:형질감염 시약 혼합물을 실온에서 45분간 항온처리하고 이어서 800 μ l의 Opti-MEM I을 첨가하였다. 이어서 형질감염 혼합물을 동시배양된 MDCK/293T 또는 MDCK/COS7 세포에 첨가하였다. 형질감염된 세포를 6시간 내지 24 시간동안, 예를 들어 밤새, 35 $^{\circ}$ C 또는 33 $^{\circ}$ C에서 항온처리하고 형질감염 혼합물을 각 웰에서 1ml의 Opti-MEM I로 대체하였다. 24시간동안 35 $^{\circ}$ C 또는 33 $^{\circ}$ C에서 항온처리한 후, 1 μ g/ml TPCK-트립신을 함유한 1ml의 Opti-MEM I을 각 웰에 첨가하고 추가 12시간동안 항온처리하였다. 이어서 회수된 바이러스를 함유 MDCK 세포에서 증폭시키거나 또는 배발생된 병아리 알에서 직접 증폭시켰다. 12-웰 플레이트내의 MDCK 세포를 실온에서 1시간동안 형질감염 혼합물 0.2 ml로 감염시키고, 이어서 혼합물을 제거하고 1 μ g/ml TPCK-트립신을 함유한 2ml의 Opti-MEM I으로 대체하였다. 세포를 3-4일동안 35 $^{\circ}$ C 또는 33 $^{\circ}$ C에서 항온처리하였다. 증폭된 바이러스를 SPG 안정화제 존재하에서 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하거나 또는 플라크-정제하고 MDCK 세포 또는 병아리 배아 알에서 증폭시켰다.

[0147]

MDV-A 폴리머라제 단백질의 기능적 발현

[0148]

4개의 MDV-A 폴리머라제 단백질, PB2, PB 1, PA 및 NP의 기능적 활성을, 그들이 EGFP 리포터 유전자를 암호화하는 인플루엔자 바이러스 미니게놈을 복제하는 능력에 의해 분석하였다. 8개의 발현 플라스미드 세트(예, 표 4)(Hoffmann et al. (2001) Eight plasmid rescue system for influenza A virus ;Options for the control of influenza International Congress Series 1219: 1007-1013)는 A/PR/8/34 균주(H1N1)의 cDNA와 증가된 녹색 형광 단백질(EGFP, pHW72-EGFP)를 암호화하는 리포터 유전자를 함유하는 인플루엔자 바이러스 미니게놈을 함유하였다.

[0149]

MDV-A PB 1, PB2, PA 및 NP 또는 PB 1, PA, NP (음성 대조군으로서 -PB2)를 인플루엔자 A 바이러스 EGFP 미니게놈을 나타내는 플라스미드(pHW72-EGFP)와 함께 동시배양된 MDCK/293T 세포내로 형질감염시켰다(Hoffmann et

al. (2000)"Ambisense"approach for the generation of influenza A virus : vRNA and mRNA synthesis from one template Virology 15: 267 (2): 310-7). 형질감염된 세포를 형질감염 후 48시간째에 상 대조 현미경 또는 형광 현미경 하에서 관찰하였다. 다르게는, 유동 사이토메트리를 이용하여 EGFP 발현을 검출할 수 있다.

[0150] 도 2에 나타난 것처럼, EGFP 미니게놈의 발현을 나타내는 녹색 형광이, MDV-A의 PB2, PB 1, PA 및 NP로 형질감염시킨 세포에서 관찰되었으나, 단지 세 개의 폴리머라제 단백질로만 형질감염된 세포에서는 관찰되지 않았다. 이것은 pAD3000내의 MDV-A 폴리머라제 단백질이 기능성임을 나타냈다.

[0151] 다른 분석에서, pFlu-CAT로 표시된, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT)를 포함한 미니게놈을 이용하여 폴리머라제 활성을 측정한다. 그러한 분석에서, CAT 발현은 단백질에서(예, ELISA에 의해) 또는 RNA 수준에서, 미니게놈 복제의 표시자로서 측정된다.

[0152] 단일 유전자 재배열 실험에 의한 MDV-A 플라스미드의 분석

[0153] pAD3000에 클로닝된 8개의 MDV-A 게놈 분절 각각은, 대조 A/PR/8/34 균주로부터의 7개의 상보성 분절과 함께 MDA-A로부터의 단일 유전자 분절을 동시감염시킴으로써 재배열 실험에서 기능적으로 발현되는 것으로 나타났다. 상보성 대조군 분절과 배합된 모든 8개의 단일 게놈 분절 플라스미드가 감염성 재배열 바이러스를 생성하였으며, 이것은 감염된 MDCK 세포에서 세포 변성 효과를 야기하여, 모든 8개의 플라스미드가 기능성 MDV-A 단백질을 암호함을 나타낸다. 표 4.

[0154] [표 4]

[0155] 플라스미드에 의한 7+1 재배열체의 회수

바이러스 유전자 분절	PB2	PB1	PA	NP
1	PMDV-A-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	pHW192-PB1	pMDV-A-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	pHW193-PA	pHW193-PA	pMDV-A-PA	pHW193-PA
4	pHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	pMDV-A-NP
5	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	pHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	pHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA	pHW194-HA
8	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)
바이러스 유전자 분절	M	NS	HA	NA
1	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2	pHW191-PB2
2	pHW192-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1	pHW192-PB1
3	pHW193-PA	pHW193-PA	pHW193-PA	pHW193-PA
4	pHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP	pHW195-NP
5	pMDV-A-M	pHW197-M	pHW197-M	pHW197-M
6	pHW198-NS	pMDV-A-NS	pHW198-NS	pHW198-NS
7	pHW194-HA	pHW194-HA	pMDV-A-HA	pHW194-HA
8	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pHW-196-NA	pMDV-A-NA
CPE	(+)	(+)	(+)	(+)

[0156]

[0157] 인플루엔자 A 바이러스의 패키징 제약을 결정하기 위하여, NS 분절을 두 개의 별도 유전자 분절로 분리하였다: NS1 게놈 분절을 암호화하는 하나와 NS2 게놈 분절을 암호화하는 다른 하나. 인플루엔자 A의 게놈 분절을 포함한 9개의 플라스미드를 전술한 대로 MDCK/COS 세포내로 형질감염시키고, MDCK 세포에서의 적정에 앞서 회수된 바이러스를 배발생된 병아리 알에서 증폭시켰다. 전술한 8-플라스미드 시스템과 비교할 때 감소된 플라크 크기가 9-플라스미드 시스템에 대하여 관찰되었다. RT-PCR 분석은 NS2 분절만이 비리온에 존재하며 NS1 유전자 분절은 패키징되지 않았음을 입증하였다.

[0158] MDV-A 및 6:2 재배열 바이러스의 회수

[0159] 전술한 과정에 이어, 8개의 MDV-A 플라스미드(재조합체)로, 또는 6개의 MDV-A 내부 유전자와 A/PR/8/34로부터 유래된 HA와 NA를 통합한 플라스미드(6:2 재배열체)로 형질감염시킨 후 3일째에, 형질감염된 배양물 상등액을 이용하여 새로운 MDCK 세포를 감염시키고, 감염된 세포를 3일동안 1 μ g/ml TPCK-트립신의 존재하에서 33 $^{\circ}$ C에서 항온처리하였다. 감염된 MDCK 세포에 대한 재조합 바이러스의 세포질 효과를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 바이러스 헤마글루티닌의 발현은 표준 헤마글루티닌 분석(HA)를 이용하여 모니터링하였다. 연속하여 2배 희석된 배양물 상등액 50 μ l를 96-웰 플레이트에서 1% 병아리 적혈구 세포 50 μ l와 혼합하여 HA 분석을 실시하였다. 형질감염된 8개의 MDV-A 플라스미드 또는 6:2 재배열 바이러스로부터 유래된 증폭된 바이러스에 대해 약 1:254-1:1024의 HA 타이타가 검출되었다. 닥터 이. 호프만으로부터 얻은 8 A/PR/8/34 플라스미드를 이용한 형질감염 반응을

양성 대조군으로 이용하였다. 표 5에 나타난 대로 감염성 인플루엔자 바이러스를 이들 세 개의 형질감염 반응으로부터 생산하였다.

[표 5]

A/PR/8/34, MDV-A 및 6:2 재배열체의 회수를 위해 이용된 플라스미드

바이러스 유전자 분절	A/PR/8/34 (H1N1)	rMDV-A(H2N2)	6:2 재배열체
1	pHW191-PB2 (AD731)	pMDV-A-PB2#2 (AD760)	pMDV-A-PB2#2 (AD760)
2	pHW192-PB1(AD732)	pMDV-A-PB1 (AD754)	pMDV-A-PB1 (AD754)
3	pHW193-PA (AD733)	pMDV-A-PA (AD755)	pMDV-A-PA (AD755)
4	pHW195-NP (AD735)	pMDV-A-NP#1 (AD757)	pMDV-A-NP#1 (AD757)
5	pHW197-M (AD737)	pMDV-A-M (AD752)	pMDV-A-M (AD752)
6	pHW198-NS (AD738)	pMDV-A-NS (AD750)	pMDV-A-NS (AD750)
7	pHW194-HA (AD734)	pMDV-A-HA (AD756)	pHW194-HA (AD734)
8	pHW-196-NA(AD735)	pMDV-A-NA#4 (AD759)	pHW196-NA (AD736)
CPE	+	+	+

회수된 바이러스의 유전자형을 맵핑하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. RNeasy 미니 키트(Qiagen)를 이용하여 감염된 세포 배양물 상등액으로부터 바이러스 RNA를 분리하고, 각 MDV-A 유전자 분절에 특이적인 프라이머와 H1- 및 N1-특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해 8개의 인플루엔자 바이러스 분절을 증폭시켰다. 도 3에 나타난 바처럼, rMDV-A는 MDV-A에 특이적인 PB2, PB1, NP, PA, M 및 NS와 H2 및 N2 서브타입에 특이적인 HA와 NA를 함유하였다. 6:2 재배열체는 MDV-A로부터 유래된 6개의 내부 유전자 및 A/PR/8/34(H1N1)로부터 유래된 HA와 NA를 함유하였다. 이것은 형질감염된 플라스미드로부터 생성된 바이러스가 정확한 유전자형을 가짐을 확인하였다.

MDCK 세포상에서의 플라크 분석에 의해 얻어진 바이러스를 적정하고 MDV-A에 대해 형성된 닭 혈청을 이용한 면역염색에 의해 상기 플라크가 인플루엔자 바이러스임을 확인하였다. 12-웰 플레이트상의 100% 함유점의 MDCK 세포를 부드럽게 흔들어주면서 실온에서 1시간동안, 10배 연속 희석된 바이러스 100 μ l로 감염시켰다. 접종액을 제거하고, 0.8% 아가로스화 1 μ g/ml TPCK-트립신을 함유한 1X L15로 세포를 덮었다. 플레이트를 3일동안 35 $^{\circ}$ C 또는 33 $^{\circ}$ C 에서 항온처리하고, 100% 메탄올로 고정하고, PBS중의 5% 밀크로 차단하고, 1:2000 희석된 병아리 항-MDV-A 항혈청으로 1시간동안 항온처리한 후 HRP-결합된 토끼 항-병아리 IgG로 1시간동안 항온처리하였다. HRP 기질 용액(DAKO)을 첨가하여 플라크를 가시화하였다. 모든 회수된 바이러스는 양성 면역염색을 나타냈다.

실시예 4: MDV-A의 ca, ts, att 표현형의 유전적 기초의 맵핑

MDV-A 인플루엔자 바이러스 백신 균주는 백신, 예를 들어 생 약독화 백신의 생산에 관련된 몇 가지 표현형을 갖는다: 저온 적응성(ca), 온도 민감성(ts) 및 약독화(att). MDV-A 균주와 비-ts 유독성 야생형 A/AA/6/60 균주의 서열 비교는 이들 두 균주 사이의 최소 17 뉴클레오타이드 차이를 밝혔다(표 6). MDV-A 서열의 변화 중 몇몇은 진뱅크 데이터베이스의 모든 이용가능한 인플루엔자 타입 A 바이러스와 비교할 때 이 균주에만 독특하여, 이들 아미노산 치환 중 하나 이상이 기능적으로 att, ca 및 ts 표현형에 관련됨을 제안한다. PB2⁸²¹에서의 단일 아미노산 변화는 MDV-A의 ts 표현형의 결정인자로서 이전에 보고된 유일한 뉴클레오타이드 위치였다(Subbarao et al. (1995) Addition of Temperature-Sensitive Missense Mutations into the PB2 Gene of Influenza A Transfectant Viruses Can Effect an Increase in Temperature Sensitivity and Attenuation and Permits the Rational Design of a Genetically Engineered Live Influenza A Virus Vaccine J. Virol. 69: 5969-5977).

MDV-A 표현형에 관련된 최소의 치환을 정확히 하기 위하여, 야생형 A/AA/6/60과 상이한 MDV-A 클론의 뉴클레오타이드를 개별적으로 야생형 A/AA/6/60의 뉴클레오타이드로 변화시켰다(즉, 역전시켰다). 각각의 역전된 유전자 분절을 이어서 MDV-A의 상보적 분절과 함께 숙주 세포내로 도입하여 단일 유전자 재배열체를 회수하였다. 또한, 역전된 유전자 분절과 상응하는 MDV-A 분절을 또한 다른 야생형 균주, 예를 들어 균주 A/RP/8/34로부터 유래된 분절과 함께 형질감염시켜 각 유전자 분절의 바이러스 표현형에 대한 기여를 평가할 수 있다. 전술한 제조합

MDV-A 플라스미드 시스템을 이용하여, 부위-지시된 돌연변이유발을 실시하여 6개의 내부 유전자를 추가 변형시켜 비-ts 재배열체를 생산하였다. 총 15개의 뉴클레오타이드 치환 돌연변이를 6개의 MDV-A 플라스미드내로 도입하여 표 6에 열거된 대로 재조합 야생형 A/AA/6/60 계통(rWt, Flu064)를 나타냈다. 마딘-달비 개 신장(MDCK) 세포와 COS-7 세포를 전술한 대로 유지하고 형질감염시켰다. 이어서 회수된 바이러스를 MDCK 세포에서 한번 계대하고, 배 병아리 알의 알란토인 강에서 증폭시켰다. MDCK와 알에서의 형질감염 및 바이러스 성장은 ca와 야생형 바이러스 둘다의 성장을 허용하는 온도인 33℃에서 이루어져 임의의 온도 선별 압력을 최소화하였다. 바이러스 RNA로부터 증폭된 cDNA 단편의 서열 분석에 의해 바이러스 유전자형을 확인하였다.

[표 6]

"야생형" A/AA/6/60과 MDV-A의 서열 비교

RNA 분절	염기 (아미노산 위치)	E10SE2	MDV-A	rWT (Flu044)
PB2	141	A	G	A
	821 (265)	A (Asn)	G(Ser)	A
	1182	A	T	T
	1212	C	T	T
	1933	T	C	T
PB1	123	A	G	G
	1195 (391)	A (Lys)	G (Glu)	A
	1395 (457)	G (Glu)	T (Asp)	G
	1766 (581)	A (Glu)	G (Gly)	A
	2005 (661)	G (Ala)	A (Thr)	A
	2019	C	T	C
PA	20	T	C	T
	1861 (613)	A (Lys)	G (Glu)	G
	2167/8 (715)	TT (Leu)	CC (Pro)	TT
NP	146 (34)	A (Asp)	G (Gly)	G
	1550	'5A'	'6A'	'6A'
M	969 (M2-86)	G (Ala)	T (Ser)	G
NS	483 (NS1-153)	G (Ala)	A (Thr)	G

진한 숫자는 rMDV-A와 rWt 사이의 차이를 나타냄.

진한 글자(15)는 rmdv-a와 rwt 사이의 변화임.

참고로 본원에 통합되는 파킨의 미국 특허 제6,322,967호(제목: 인플루엔자의 재조합 트립토판 돌연변이)에 개시된 바와 같은 공지의 방법에 의해 표현형적 특성을 결정하였다. 요약하면, 재조합 바이러스의 온도 민감성은 33, 38, 및 39℃에서 MDCK 세포상에서의 플라크 분석에 의해 결정하였다. 6-웰 플레이트내의 MDCK 세포를 10배 연속 희석된 바이러스 400 μ l로 감염시키고 실온에서 60분간 흡착시켰다. 접종액을 제거하여 1% 아가로스화 1 μ g/ml TPCK-트립신을 함유한 1X L15/MEM으로 대체하였다. 감염된 세포를 CO₂ 항온배양기에서, 또는 38 $\pm$ 0.1℃ 또는 39 $\pm$ 0.1℃에서 유지된 순환 수조에 담긴 5% CO₂ 를 함유한 방수 용기에서 33℃에서 항온처리하였다(Parkin et al. (1996) Temperature sensitive mutants of influenza A virus generated by reverse genetics and clustered charged to alanine mutagenesis. Vir. Res. 46: 31-44). 3일 항온처리 후, 병아리 항-MDV 폴리클로날 항체를 이용하여 단층을 면역염색하고, 플라크를 세었다. 각 온도에서 얻어진 플라크 수를 비교하여 각 바이러스의 ts 표현형을 평가하고 각 분석은 최소 세번 실시하였다. 차단 온도는 33℃에 비하여 100배 이상의 타이터 감소를 갖는 최저 온도로 정의하였다.

8개의 플라스미드(pMDV-PB2, pMDV-PB 1, pMDV-PA, pMDV-NP, pMDV-HA, pMDV-NA, pMDV-M, 및 pMDV-NS)로 형질감염된 동시배양된 COS-7/MDCK 세포로부터 얻은 감염성 바이러스를 병아리 배발생된 알에서 증폭시켰으며, 비재조합체인, 생물학적으로 유래된 MDV-A의 특징적인 ts 표현형을 나타내는 것으로 나타났다(표 7). MDV-A나 rMDV-A 어느 것도 39℃에서 뚜렷한 플라크를 형성하지 않았으나, 둘다 33℃에서는 쉽게 가시화된 플라크를 형성하였다.

[표 7]

[0176] 다양한 온도에서 MDV/Wt 재배열체의 복제

Wt 유전자를 가진 바이러스	33 °C	38 °C	33 °C/38 °C	39 °C	33 °C/39 °C
MDV	8.91	6.10	2.82	<4.0 [†]	>4.91
rMDV-A	8.72	6.19	2.53	<4.0	>4.72
Wt (E10SE2)	8.86	8.87	-0.01	8.87	-0.01
rWT (Flu064)	9.02	9.07	-0.05	8.96	0.06
Wt-PB2	8.46	7.87	0.59	5.80*	2.66
Wt-PB1	8.92	8.74	0.18	7.86*	1.06
Wt-NP	8.40	7.24	1.15	<4.0	>4.40
Wt-PA	8.57	6.10	2.48	<4.0	>4.57
Wt-M	8.80	6.68	2.12	<4.0	>4.80
Wt-NS	8.72	6.10	2.62	<4.0	>4.72
Wt-PB1/PB2	8.94	8.89	0.05	8.10*	0.85
Wt-PB1/PB2/NP	8.52	8.38	0.14	8.41	0.1

[0177]

[0178] * rWt에 비하여 플라크 크기의 감소를 나타냄.

[0179] + 밑줄 그어진 것은 10^{-4} 배 희석에서 플라크가 검출되지 않았음을 나타냄.

[0180] MDV-A의 ts 표현형의 유전적 기초의 체계적이고 상세한 분석을 실시하기 위하여, 매우 관련된 분리체인 야생형 A/AA/6/60 E10SE2를 포함한, ca A/AA/6/60과 17-48 뉴클레오타이드 차이를 가진 몇몇 밀접하게 관련된 비-ts, 비-att 야생형 A/AA/6/60 균주의 서열을 이용하여 비교하였다. 총 19 뉴클레오타이드 차이가 E10SE2와 MDV-A 사이에 존재한다(표 6). E10SE2는 흰족제비에서 비-ts(표 7)이고 비-att인 것으로 나타났다. 재조합 비-ts 바이러스를 생성하기 위하여, 부위 지시된 돌연변이 유발에 의해 MDV-A 플라스미드를 변화시켜 10 아미노산 변화를 나타내는 19개 차이중 15개를 통합시켰다. MDV-A와 E10SE2 사이에 상이한 뉴클레오타이드 위치중 네개인 PB2-1182, 1212, PB1-123, 및 NP-1550는 A/AA/6/60의 다른 비-ts 분리체에서도 관찰되므로, ts 표현형의 발현에 역할을 하지 않을 것으로 예상되어 MDV-A 서열로부터 변화시키지 않았다(Herlocher et al. (1996) Sequence comparisons of A/AA/6/60 influenza viruses : mutations which may contribute to attenuation. Virus Research 42: 11-25). 15 뉴클레오타이드 변화를 암호화하는 재조합 바이러스(rWt, Flu064)를 8개 플라스미드 세트, pWt-PB2, pWt-PB1, pWt-PA, pWt-NP, pWt-M, pWt-NS, pMDV-HA, 및 pMDV-NA로 형질감염된 동시배양된 COS-7/MDCK 세포로부터 얻었다. 서열 분석은 rWt가 고안된 유전적 변화를 보유하며 생물학적으로 유래된 야생형 A/AA/6/60과 동일하게, 39°C에서 비-ts임을 나타냈다. 이러한 관찰은 ts 표현형이 이들 15 뉴클레오타이드 변화의 서브세트에 매핑됨을 입증하였다.

[0181] 바이러스 ts 표현형에 대한 6개 내부 유전자 분절의 기여

[0182] MDV-A ts 표현형에 대한 각 야생형 유전자 분절의 효과를, 재조합, 단일-유전자 재배열체를 형성하여 평가하였다(표 7). 야생형 PB2를 rMDV-A내로 도입하자 38°C에서 단지 비-ts인 바이러스가 형성되었지만, 이것은 39°C에서 ts로 유지되었다. MDCK 세포에서의 플라크 분석에 의해 측정할 때, (33°C에 비하여) 38°C 및 39°C에서 바이러스 타이터의 감소는 각각 $0.6 \log_{10}$ 및 $2.7 \log_{10}$ 이었다. 야생형 PB1 유전자 분절을 함유한 재배열체는 그것이 38°C와 39°C 둘다에서 플라크를 형성하는 능력과 관련하여 비-ts였다. 하지만, 이 재조합체의 플라크 크기는 온도 증가에 의해 영향을 받았으며 rWt에 비하여 39°C에서 크게 감소하였다. rMDV-A로의 야생형 NP 유전자 분절의 도입은 38°C에서 비-ts인 바이러스를 생성시켰으나, 야생형 PB2 재조합체와는 대조적으로, 야생형 NP 유전자 분절을 함유한 바이러스는 39°C에서 플라크를 형성하지 않았다. rMDV-A내로 야생형 PA, M 또는 NS 유전자 분절을 독립적으로 도입하는 것은 ts 표현형을 바꾸지 않아, 이들 세 유전자 분절이 이 표현형의 유지에 최소한의 역할을 함을 나타낸다.

[0183] MDV-A 배경에서 개별적으로 발현된 야생형 PB1, 야생형 PB2 또는 야생형 NP 그 어느 것도 비-ts rWT와 동일한 플라크 효율 및 플라크 크기를 형성하지 못했으므로, 이들 유전자 분절을 다양한 조합으로 MDV-A내로 도입하였다. 야생형 PB1과 야생형 PB2의 조합은 38°C와 39°C 둘다에서 비-ts인 바이러스를 야기하였다(표 7). 플라크 크기가 단일 유전자 재배열체의 크기보다 컸지만, rWt보다는 상당히 작았다. rMDV-A내의 야생형 PB 1/PB2/NP의 삼중 조합은 39°C에서 그 플라크 형성 효율 및 플라크 크기에서 rWt와 유사하거나 동일한 바이러스를 형성하였다. 따라서, 야생형 PB2, PB1 및 NP 유전자 분절이 개별적으로 도입될 때 ts 표현형을 단지 부분적으로 역전시키는 반면, 모든 세 야생형 유전자 분절의 조합은 ts 표현형을 rWt와 동일한 비-ts 행동으로 완전히 역전시킬 수 있었다.

[0184] 이들 3 유전자 분절이 rWt에게 특징적인 MDV-A ts 표현형을 부여할 수 있는 지를 결정하기 위하여, MDV-A 에서 유래된 6개의 내부 유전자 분절을 rWt 내로 개별적으로 또는 조합하여 도입하였다. 하나의 PB1, PB2, 또는 NP 유전자 분절을 rWt내로 도입하면 38℃에서 바이러스 타이터가 감소되고 39℃에서는 더 감소되었지만, 이들 단일 유전자 재배열체 중 어느 것도 rMDV-A만큼 고온에서 제한되지 않았다(도 10). MDV-A에서 유래한 PA, M 및 NS 유전자 분절은 rWt의 비-ts 표현형에 영향을 주지 않았다. 앞서의 재배열체와 일치하게, rWt 백본내로 MDV-A PB1 과 PB2 유전자 둘다를 도입하면 38℃에서 바이러스 ts 표현형이 크게 증가되지만 바이러스 ts 표현형의 완전한 역전은 NP 유전자의 추가를 요구함이 입증되었다. 따라서, MDV-A 에서 유래한 PB1, PB2, 및 NP 유전자 분절은 완전한 ts 표현형을 부여하는 데 중요하다.

[0185] MDV-A ts 표현형을 결정하는 유전자 좌의 맵핑

[0186] rWt와 rMDV-A의 PB1, PB2 및 NP 유전자 분절 사이의 구체적 차이를 체계적으로 확인하여 ts 표현형에서 중요한 역할을 하는 변화를 확인하였다. rMDV-A의 NP 유전자는 뉴클레오티드 146에서만 rWt NP와 상이하였다(G34D, 표 6). rMDV-A의 PB2 유전자는 세 부위에서 rWt와 상이하였으나, 단지 뉴클레오티드 821만이 아미노산 변화를 야기 하여(N265S, 표 6) 가능하게는 PB2 유전자 분절에 위치한 ts 좌를 나타냈다. MDV-A의 PB1 유전자는 6개의 뉴클 레오티드 위치에서 야생형 PB1과 상이하였으며, 이중 4개는 변화를 암호하였다(표 6). 야생형 아미노산 잔기 치 환의 각각을 개별적으로 rMDV-A의 PB1 유전자 분절내로 치환시켜 ts 표현형에서 그들의 역할을 평가하였다. 1395G (Glu-457) 와 2005G (Ala)는 MDV-A ts 표현형에 영향을 주지 않았다. 1195A (Lys-391)와 1766A (Glu- 581) 각각은 38℃에서 ts 표현형을 약간 감소시켰으나 39℃에서는 영향을 미치지 않았다(표 8). 이들 자료는 1195A와 1766A가 PB1 유전자 분절에서 가능한 ts 좌임을 나타냈다. 하지만, 1195A와 1766A 둘다의 조합은 야생 형 PB1에 유사한 ts 표현형을 생산하지 않았다(표 6). PB1- 1195A/1766A에 1395A가 아닌 2005G만을 추가하면 39℃에서 바이러스 ts 표현형이 더 감소되어, 2005A가 또한 MDV-A의 PB1 분절에 의해 특정된 ts 표현형의 발현 에서 역할을 함을 증명하였다.

[0187] [표 8]

[0188] ts 표현형을 결정하는 PB1내의 잔기 맵핑

Wt 서열을 가진 바이러스	33 °C	38 °C	33 °C/ 38 °C log ₁₀ PFU/mL	39 °C	33 °C/ 39 °C
rMDV-A	8.67	6.00	2.67	<4.0 [†]	>4.67
rWt	9.04	9.01	0.03	9.03	0.01
PB1-1195A	8.06	6.68	1.38	<4.0	>4.06
PB1-1395G	8.72	5.88	2.85	<4.0	>4.72
PB1-1766A	8.07	6.70	1.37	<4.0	>4.07
PB1-2005G	8.76	6.31	2.45	<4.0	>4.76
PB1-1195A1766A	8.65	7.60	1.05	5.98*	2.68
PB1-1195A1395G1766A	8.84	8.13	0.71	6.38*	2.46
PB1-1195A1766A2005G	8.79	8.12	0.66	7.14*	1.64
PB1/PB2/NP	8.26	8.63	0.12	8.59	0.16
PB2/NP	8.81	8.21	0.59	7.56*	1.25
PB1-1195A/PB2/NP	8.86	8.81	0.05	7.60*	1.26
PB1-1766A/PB2/NP	9.33	8.84	0.50	8.71*	0.62
PB1-1766A2005G/PB2/NP	8.30	8.22	0.08	8.11*	0.18
PB1-1766A1395G/PB2/NP	8.88	8.85	0.03	8.39*	0.49
PB1-1195A1766A/PB2/NP	8.45	8.48	0.06	8.10	0.35

[0189]

[0190] * rWt에 비하여 플라크 크기의 감소를 나타냄.

[0191] + 밑줄 그어진 것은 10⁻⁴ 배 희석에서 플라크가 검출되지 않았음을 나타냄.

[0192] 이어서 PB1 단일 부위 돌연변이를 야생형 PB2와 야생형 NP와 함께 rMDV-A내로 도입하였다. 야생형 PB2/NP와 rMDV-A 재배열체는 38℃에서 비-ts이고 39℃에서 1.25log₁₀의 타이터 감소를 가졌으나 그 플라크 크기는 rWt에 비하여 크게 감소되었다. PB1-1195A 또는 1766A의 추가는 야생형 PB2/NP 재배열체의 표현형을 크게 변화시키지 않았다. PB1-1195A와 1766A의 조합만이 야생형 PB2와 야생형 NP와 함께, 야생형 PB1/PB2/NP 및 rMDV-A와 동일한 비-ts 표현형을 갖는 바이러스를 야기하였다(표 8). 야생형 PB1-1766/PB2/NP에의 PB1-1395G 또는 2005G의 추가는 바이러스를 특징적인 rWt 비-ts 표현형으로 전환시키지 않았다. 따라서, 이들 자료는 세개의 PB1, PB2

및 NP 유전자에 분포된 네 개의 아미노산이 MDV-A ts 표현형을 완전히 역전시킬 수 있음을 입증하였다.

[0193] MDV-A 및 재배열 바이러스의 숙주 세포 제한

[0194] MDV-A 바이러스와 전술한 바와 같은 하나 이상의 MDV-A 유래 분절을 가진 재배열 바이러스에 의해 나타내지는 온도 민감성과 약독화 표현형에 더하여, MDV-A 바이러스는 MDCK 세포에서의 성장에 비하여 Per.C6 세포에서의 감소된 성장에 의해 나타난 것처럼 숙주 세포 제한을 나타냈다. MDV-A 및 MDV-A 유래 PB1 및 PB2 분절을 가진 재배열 바이러스는 도 20A와 B에서 나타난 것처럼, MDCK 세포에서의 그들의 성장에 비하여 Per.C6 세포에서 크게 감소된 성장을 나타냈다.

[0195] 온도 민감한, 약독화된 바이러스 균주의 조작

[0196] MDV-A의 PB1, PB2 및 NP 유전자 분절에서 확인된 다섯 개의 아미노산이 MDV-A의 ts 및 att 표현형을 재생할 것 인지를 결정하기 위하여, PB1-391E, 581G, 661T, PB2-265S, NP-34G를 다른 야생형 바이러스 균주 (A/PR8/34;"PR8")내로 도입하였으며, 생성된 바이러스는 38℃에서 바이러스 타이터의 1.9log₁₀ 감소 및 39℃에서 바이러스 타이터의 4.6log₁₀ 감소를 나타냈으며, 이는 rMDV-A의 것과 매우 유사하였다(도 11).

[0197] ca A/AA/6/60 (MDV-A)와 A/PR/8/34의 PB1, PB2 와 NP 유전자 사이의 서열 비교는 MDV-A의 PB1 및 PB2 유전자에서 확인된 4개의 치환된 아미노산이 독특함을 밝혔다. NP³⁴는 MDV-A와 PR8 사이에서 보존된다. 따라서, MDV-A의 PB1 유전자에서 확인된 세 개의 ts 부위, PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G) 및 PB1⁶⁶¹(A661T)를 A/PR8/34의 PB1내로 도입하고 PB2²⁶⁵(N265S)를 부위-지시된 돌연변이유발에 의해 A/PR/8/34의 PB2내로 도입하였다. PB1 및 PB2 유전자내로 도입된 돌연변이는 서열 분석에 의해 확인하였다. 돌연변이유발 반응을 위해 이용된 프라이머 쌍은 표 9에 열거된다. 이들 바이러스는 도 16에 체계적으로 나타난다.

[0198] [표 9]

[0199] PR8 PB1 및 PB2 유전자내로 ts 돌연변이를 도입하기 위해 이용된 프라이머

HJ240	PR8-PB1A1195G	5' GAAAGAAGATTGAAGAAATCCGACCGCTC (서열번호 79)
HJ241	PR8-PB1A1195G.as	5' GAGCGGTCGGATTCTTCAATCTTCTTTC (서열번호 80)
HJ242	PR8-PB1A1766G	5' GAAATAAAGAACTGTGGGGGCAAAACCCGTTCC (서열번호 81)
HJ243	PR8-PB1A1766G.as	5' GGAACGGGTTTGCCCCACAGTTTCTTTATTTC (서열번호 82)
HJ244	PR8-PB1G2005A	5' GTATGATGCTGTTACAACAACACACTC C (서열번호 83)
HJ245	PR8-PB1G2005A.as	5' GGAGTGTGTGTTGTAAACAGCATCATAC (서열번호 84)
HJ246	PR8-PB2A821G	5' ATTGCTGCTAGGAGCATAGTGAGAAGAGC (서열번호 85)
HJ247	PR8-PB2A821G.as	5' GCTCTTCTCACTATGCTCCTAGCAGCAAT (서열번호 86)

[0200]

[0201] PR8의 PB1 및 PB2 유전자내로 도입된 ts 돌연변이가 생체외에서 ts 표현형을 부여하는 지를 검사하기 위하여, 미니게놈 분석을 실시하였다. pFlu-CAT으로 표시된 인플루엔자 미니게놈 리포터는 pol I 프로모터의 조절하에 클론된 네가티브 센스 CAT 유전자를 함유하였다. CAT 단백질의 발현은 인플루엔자 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질의 발현에 의존하였다.

[0202] 요약하면, HEp-2 세포를 리포펙타민 2000(Invitrogen)에 의해 PB1, PB2, PA, NP 및 pFlu-CAT 미니게놈 각각 1 μg으로 형질감염시켰다. 33℃ 또는 39℃에서 밤새(약 18시간) 항온처리한 후, 세포 추출물을 CAT ELISA 키트 (Roche Bioscience)에 의해 CAT 단백질 발현에 대해 분석하였다. CAT mRNA의 수준을 프라이머 연장 분석에 의해 측정하였다. 형질감염 후 48시간째에, TRIzol 시약(Invitrogen)에 의해 총 세포 RNA를 추출하고 RNA의 1/3을, 6μl 물중의 T4 폴리뉴클레오티드 키나제 및 [r-³²P]-ATP로 5' 말단에 표지된 DNA 프라이머(5'-ATGTTCTTTACGATGCGATTGGG) 과량과 혼합하였다. 95℃에서 3분간 변성시킨 후, 0.5mM dNTP를 함유한 수퍼스크립트 역전사효소(Invitrogen)가 제공된 반응 완충액중의 수퍼스크립트 역전사효소(Invitrogen) 50U를 첨가한 후 프라이머 연장을 실시하였다. TBE 완충액중의 8M 우레아를 함유한 6% 폴리아크릴아미드 겔상에서 전사 생성물을 분석하고 방사성사진으로 검출하였다.

[0203] 도 12A와 B에서 나타난 것처럼, 세 개의 아미노산 치환, PB1³⁹¹(K391E), PB1⁵⁸¹(E581G) 및 PB1⁶⁶¹(A661T)를 보유한 PB1 유전자(PR8-3s)는 PR8 대조군에 비하여 33℃에서 감소된 활성을 가졌다. CAT 단백질 발현에서 더 큰 감소(도 12A)가 39℃에서 이 돌연변이에서 관찰되어, 세 개의 도입된 MDV-A ts 부위를 가진 PB1 유전자가 이 생체외 분석에서 온도 민감성 복제를 나타냄을 나타낸다. PR8내로 PB2²⁶⁵(N265S)의 도입은 허용성(33℃) 및 비허용성 온도(39℃) 둘다에서 그 활성에 거의 영향을 미치지 않았다. PB1-3s와 PB2-1s 둘다의 조합은 단백질 활성

의 더 큰 감소를 야기하였으며(PR8-4s), 이는 MDV-A보다 더욱 ts인 것으로 보였다. 예상한 바대로, 야생형 A/AA/6/60 (wtA/AA)에 비하여 MDV-A에서 유래된 PB1, PB2, PA, NP 유전자로 형질감염된 세포에서 낮은 활성 수준(15%)이 검출되었다.

[0204] PR8 돌연변이 바이러스를 전술한 대로 생성하고 회수하였다. 요약하면, 동시배양된 COS-7 및 MDCK 세포를 PR8로부터 유래된 PR8 HA, NA, PB 1, PB2, PA, NP, M 및 NS 유전자를 암호화하는 8개 플라스미드로 형질감염시켰다. 네 개의 ts 좌를 보유한 바이러스(PR8-4s)를 만들기 위하여, 위치 뉴클레오티드 1195 (K391E), 1766 (E581G) 및 뉴클레오티드 2005 (A661T)에서 PB1에서 세 개의 변화를 함유한 PB1-3s와 위치 821(N265S)에서 PB2에서 하나의 변화를 함유한 PB1-1s를 이용하였다. 또한, PB1에서의 세 개의 돌연변이(PR8-3s) 또는 PB2에서 하나의 돌연변이(PR8-1s)를 보유한 PR8 바이러스를 또한 별도로 회수하였다. 이들 바이러스는 도 16에 체계적으로 나타난다. 모든 네 개의 재조합 돌연변이 PR8 바이러스는 배아 알에서 매우 높은 타이터로 성장하여 표 10에 나타난 것처럼 9.0 log₁₀pfu/ml의 타이터에 도달하였다.

[0205] 감염된 세포에서 바이러스 단백질 합성을 검사하기 위하여, MDCK 세포를 5의 m.o.i로 바이러스로 감염시키고 감염후 7시간째에 1시간동안 ³⁵S-Trans로 표지하였다. 표지된 세포 용해물을 SDS를 함유한 1.5% 폴리아크릴아미드 겔상에서 전기영동하고 방사성사진을 찍었다. 또한 웨스턴 블롯에 의해 단백질 합성을 연구하였다. 바이러스 감염된 세포를 감염후 8시간째에 회수하고 4-15% 구배 겔상에서 전기영동하였다. 블롯을 항-M1 항체 또는 병아리 항-MDV-A 폴리클로날 항체로 탐침하고, 이어서 HRP-결합된 이차 항체로 항온처리하였다. 항체-결합된 단백질 밴드를 화학발광 검출 시스템(Invitrogen)에 의해 검출하고 X-레이 필름에 노출시켰다.

[0206] 도 19에 나타난 것처럼, 모두 33℃에서 비슷한 수준의 단백질 합성을 가졌으나, 39℃에서 단백질 합성 수준은 PR8-1s에 대해서는 약간 감소하고 PR8-3s 및 PR8-4s 감염된 세포에서는 크게 감소하였다. 웨스턴 블롯 분석은 또한 감소된 단백질 합성이 PR8-4s > PR8-3s > PR8-1s 순서임을 보여주었다. 따라서, ts 돌연변이의 감소된 복제는 비허용성 온도에서 그들의 감소된 복제의 결과일 것이다.

[0207] PR8 돌연변이 바이러스의 온도 민감성은 33℃, 37℃, 38℃ 및 39℃에서 MDCK 세포에서의 플라크 분석에 의해 결정하였다. 회수된 바이러스를 배아 알에서 증폭시키고 전술한 대로 세포내로 도입하였다. 지정된 온도에서 3일 동안 바이러스-감염된 세포를 항온처리한 후, 병아리 항-MDV 폴리클로날 항체를 이용하여 세포 단층을 면역염색하고 플라크를 세었다. 각 온도에서 얻어진 플라크 숫자를 비교하여 각 바이러스의 ts 표현형을 평가하였다. 차단 온도는 33℃와 비교하여 100배 이상 타이터 감소를 갖는 최저 온도로 정의되었다.

[0208] 표 10 및 도 17에서 나타난 바처럼, 바이러스 타이터의 약간의 감소가 관찰되었음에도 불구하고 모든 돌연변이체가 33℃에서 잘 복제하였다. 38℃에서는, 모든 돌연변이에서 바이러스 타이터의 상당한 감소가 관찰되었다. 39℃에서는, PB1 유전자에서 세 개의 ts 좌를 보유한 바이러스에 대하여 4.0 log₁₀보다 큰 바이러스 타이터 감소가 관찰되었다(PR8-3s 및 PR8-4s). PR8-1s 또한 39℃에서 ts였다. PR8-4s의 ts 표현형은 MDV-A의 것과 매우 유사하여 33℃에 비하여 39℃에서 4.6 log₁₀의 감소를 가졌다. 모든 세 PR8 돌연변이가 37℃에서 바이러스 타이터의 2.0 log₁₀을 초과하는 감소를 가지지는 않았음에도 불구하고, 그들의 플라크 형태는 33℃에서의 것과는 상이하였다. 도 18에 나타난 것처럼, 각 돌연변이의 플라크 크기는 PR8에 비하여 33℃에서 단지 약간 감소하였다. 37℃에서 플라크 크기의 상당한 감소가 PR8-3s에 대해 관찰되었으며 PR8-4s에 대해 더 큰 감소가 관찰되었다. PR8-1s는 37℃에서 플라크 크기에서 상당한 감소를 갖지 않았다. 39℃에서, 단지 점 크기의 몇몇 플라크만이 PR8-3s과 PR8-4s에 대해 관찰되었다. 야생형 PR8의 약 30%의 플라크 크기가 PR8-1s에 대해 관찰되었다.

[0209] [표 10]

[0210] 도입된 ts 좌를 가진 PR8의 온도 민감성

바이러스 역가 (log ₁₀ pfu/ml)				
바이러스	33 °C	37 °C	38 °C	39 °C
MDV-A	8.6	7.0	6.4	4*
Wt A/AA	8.7	8.7	8.9	8.3
PR8	9.6	9.5	9.5	9
PB8-1s	9.4	8.9	7.7	7.4
PB8-3s	9.2	8.8	7.8	5.2
PB8-4s	9.5	7.8	7.1	4.4

[0211]

[0212] 10,000 회석에서 바이러스가 검출되지 않을 때 4.0의 타이터가 주어졌다.

[0213] 돌연변이 PR8 바이러스의 약독화를 흰죽제비에서 검사하였다. 요약하면, 9-10주된 수컷 흰죽제비를 이용하여 동

물 숙주의 호흡기에서 바이러스 복제를 평가하였다. 흰족제비를 개별적으로 보관하고 8.5 log₁₀pfu의 바이러스를 비강으로 접종하였다. 감염 3일 후, 흰족제비를 케타민-HCl로 진정시키고, 폐와 비강 비개골(NT)을 수집하였다. 폐 조직 균질물을 연속하여 희석시키고 10일된 배발생 병아리 알에서 적정시켰다. 폐에서 바이러스 타이터(log₁₀EID₅₀/ml)를 카버(Karber) 방법에 의해 계산하였다. NT에서 바이러스 복제를 플라크 분석에 의해 결정하고 log₁₀pfu/ml로 표시하였다.

[0214] 폐와 비강 비개골에서 바이러스 복제의 수준을 EID₅₀ 또는 플라크 분석에 의해 측정하였다(표 11). 감염 후 3일에, PR8은 5.9 log₁₀EID₅₀/그램 폐 조직 정도로 복제하였다. 하지만, PR8-1은 흰족제비 폐의 복제에서 3.0 log₁₀ 감소를 나타냈으며 PR8-3s에 대해서는 매우 적은 복제가 검출되었다. 독립적으로 얻어진 바이러스로 감염된 두 바이러스 그룹에서 연구된 PR8-4s에 대해서는 복제가 검출되지 않았다. EID₅₀ 분석에 의한 흰족제비 폐에서 바이러스 검출 한계는 1.5 log₁₀이고 따라서 PR8-4s에 대해 1.5log₁₀EID₅₀이 할당되었다. 대조군으로서, MDV-A는 흰족제비 폐에서 복제하지 않았으며 야생형 A/AA/6/60은 4.4 log₁₀의 타이터까지 복제하였다. 비강 비개골에서 바이러스 복제를 MDCK 세포에서의 플라크 분석에 의해 검사하였다. PR8은 코에서 6.6 log₁₀pfu/g의 타이터로 복제하였다. PR8-1s와 PR8-3s에 대해서는 바이러스 타이터의 단지 약간의 감소만이 관찰되었다. PR8-4s(A)에 대해서는 2.2log₁₀의 감소가 관찰된 반면, PB1 유전자(E390G)의 변화를 보유한 PR8-4s(B)에 대해서는 4.3 log₁₀ 감소가 관찰되었다. PR8-4s(B)의 크게 감소된 복제는 37°C에서 그것의 ts 표현형과 잘 관련된다. MDV-A 유래 인플루엔자 백신의 약독화 표현형을 평가하는 데 일반적으로 이용된 7.0 log₁₀pfu 대신 여기서는 8.5 log₁₀pfu의 감염 투여량을 이용하였다. 이 결과는 MDV-A에서 유래한 네 개의 ts 좌를 보유한 PR8이 흰족제비의 하부 호흡기에서의 복제에서 약독화되었음을 나타냈다.

[0215] [표 11]

[0216] 흰족제비에서 PR8 돌연변이의 복제

바이러스	흰족제비	투여량 (log ₁₀ pfu)	폐의 바이러스 역가 (log ₁₀ EID ₅₀ /g ± SE)	비강 비개골의 바이러스 역가 (log ₁₀ /g ± SE)
PR8	4	8.5	5.9 ± 0.3	6.6 ± 0.1
PR8-1s	4	8.5	3.8 ± 0.4	5.9 ± 0.2
PR8-3s	4	8.5	1.7 ± 0.1	5.8 ± 0.3
PR8-4s (A)	4	8.5	1.5 ± 0.0 ^a	4.6 ± 0.2
PR8-4s (B) ^b	4	8.5	1.5 ± 0.0	2.3 ± 0.3
MDV-A	4	8.5	1.5 ± 0.0	4.6 ± 0.1
Wt A/AA	4	8.5	4.4 ± 0.1	5.4 ± 0.1

[0217]

[0218] a) 바이러스가 검출되지 않았으며 1.5 log₁₀EID₅₀이 할당되었다.

[0219] b) 바이러스는 PB1-1193의 추가 변화를 함유한다(E390G)

[0220] ts와 att 분석 둘다에서, PR8 돌연변이 바이러스는 MDV-A에 매우 유사한 ts와 att 표현형 둘다를 나타냈다. 이들 데이터는 MDV-A의 특유의 아미노산 치환을 다른 인플루엔자 바이러스 균주내로 도입함으로써 생 약독화 백신을 생산하는 데 바람직한 온도 민감하고 약독화된 표현형을 나타내는 바이러스가 생성됨을 나타낸다. 부가적으로, ts, att, PR-8 바이러스는 생 약독화된 또는 불활성화된 인플루엔자 백신의 생산을 위한 마스터 공여 바이러스로 사용하기에 적합한 고 타이터까지 성장하였다. 이들 결과는 다섯 개의 MDV-A 돌연변이, PB1-391E, PB1-581G, PB1-661T, PB2-265S, 및 NP-34G가 임의의 인플루엔자 A 균주에 ts 및 att 표현형을 부여할 수 있음을 나타낸다. 유사하게, 백신 생산에 적합한 신규한 att B 균주는 MDV-B 균주의 돌연변이를 인플루엔자 B 균주내로 도입함으로써 생산될 수 있다. 생 약독화 바이러스 백신의 생산에 더하여, 이들 돌연변이를 공여 균주내로 도입하면 보다 안전한 불활성화된 백신이 생산될 것이다.

[0221] 실시예 5: MDV-B의 생산을 위한 8 플라스미드 시스템

[0222] 예시적인 인플루엔자 B 마스터 공여 균주(MDV-B)인 인플루엔자 B/Ann Arbor/1/66의 저온 적응된 변이체(ca/Master Ann Arbor/1/66 P1 Airon 10/2/97)로부터의 바이러스 RNA를, RNeasy 키트(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 감염된 배발생된 알로부터의 알란토인 유체 100μl로부터 추출하였으며, RNA를 40μl의 H₂O내로 용출

시켰다. 각 반응을 위하여 추출된 RNA 1 μ l를 이용하여, 제공된 프로토콜에 따라 원스텝(One Step) RT-PCR 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 게놈 분절의 RT-PCR을 실시하였다. 50℃에서 50분간 RT-반응을 수행하고, 이어서 94℃에서 15분간 실시하였다. 94℃에서 1분간, 54℃에서 1분간, 그리고 72℃에서 3분간 25 사이클동안 PCR을 실시하였다. 두 단편을 생성시키는 BsmBI 부위를 가진 분절 특이적 프라이머를 이용하여 P-유전자를 증폭 시켰다(표 12).

[표 12]

인플루엔자 ca B/AnnArbor/1/66의 8개의 vRNA의 증폭을 위한 RT-PCR 프라이머

전방 프라이머	역방 프라이머
PB1 Bm-PB1b-1: (서열번호 53) [1A] TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCGGAGCCTTAAAGATG	Bm-PB1b-1200R: (서열번호 54) TATTCGTCCTCGATGCCGTTCTCTTCATTGAAGAATGG
PB1 Bm-PB1b-1220: (서열번호 55) [1B] TATTCGTCCTCGCATCTTTGTGCGCTGGGATGATGATG	Bm-PB1b-2369R: (서열번호 56) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCCTT
PB2 Bm-PB2b-1: (서열번호 57) [2A] TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCGGAGCGTTTCAAGATG	Bm-PB2b-1145R: (서열번호 58) TATTCGTCCTCTCATTTTGTCTCTTTTAAATATCCCC
PB2 Bm-PB2b-1142: (서열번호 59) [2B] TATTCGTCCTCATGAGAATGGAATACTACTAATAAATTCAGC	Bm-PB2b-2396R: (서열번호 60) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGAGCATT
PA Bm-Pab-1: (서열번호 61) [3A] TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCGGTGCGTTGA	Bm-Pab-1261R: (서열번호 62) TATTCGTCCTCCAGGCGCCTTTTACTTGTGAGAGTGC
PA Bm-Pab-1283: (서열번호 63) [3B] TATTCGTCCTCTCGATCTACCAAGAAATAGGGCCAGAC	Bm-Pab-2308R: (서열번호 64) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACACGTGCAAT
HA MDV-B 5'BsmBI-HA: (서열번호 65) TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCAGCATTTTCTAATATC	MDV-B 3'BsmBI-HA: (서열번호 66) ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAAACAAGACATTTTTC
NP Ba-NPb-1: (서열번호 67) TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCAGCATTTTCTTGT	Ba-NPb-1842R: (서열번호 68) ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAACAGCATTTT
NA MDV-B 5'BsmBI-NA: (서열번호 69) TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCAGCATTTTCTCAAAC	MDV-B 3'BsmBI-NA: (서열번호 70) ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAAACAAGACATTTTTCAG
M MDV-B 5'BsmBI-M: (서열번호 71) TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCAGCATTTTCTTAAATG	MDV-B 3'BsmBI-M: (서열번호 72) ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACGACATTTTTCAG
NS MDV-B 5'BsmBI-NS: (서열번호 73) TATTCGTCCTCAGGAGCAGAAGCAGGATTTGTTAGTC	MDV-B 3'BsmBI-NS: (서열번호 74) ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAAACAAGAGGATTTTAT

인플루엔자 서열에 상보적인 서열이 진하게 나타난다. 5' 말단은 제한 엔도뉴클레아제 BsmBI (Bm) 또는 BsaI (Ba)를 위한 인식 서열을 갖는다.

플라스미드의 클로닝

PCR 단편을 분리하고, BsmBI (또는 NP를 위해서는 BsaI)으로 분해하고, 전술한 대로 BsmBI 부위에서 pAD3000(네 가티브 센스 vRNA와 파지티브 mRNA의 전사를 허용하는 pHW2000의 유도체)내로 삽입하였다. 생성된 플라스미드 2 개 내지 4개 각각을 서열 결정하여 RT-PCR 단편을 직접 서열결정한 것에 기초하여 MDV-B의 컨센서스 서열과 비교하였다. 컨센서스 서열과 상이한 아미노산 변화를 야기하는 뉴클레오타이드 치환을 갖는 플라스미드는 플라스미드의 클로닝에 의해 또는 퀵체인지 키트(Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 "보수"하였다. 얻어진 B/Ann Arbor/1/66 플라스미드는 pAB 121-PB 1, pAB 122-PB2, pAB 123-PA, pAB 124-HA, pAB 125-NP, pAB 126-NA, pAB 127-M, 및 pAB128-NS로 표시되었다. 이 양방향성 전사 시스템을 이용하여 모든 바이러스 RNA와 단백질을 세포내에서 생산하여 감염성 인플루엔자 B 바이러스를 생성시킨다(도 4).

컨센서스 서열과 비교하여, pAB 121-PB 1 와 pAB124-HA는 2개의 사일런트(silent) 뉴클레오타이드 치환을 가지고 pAB128-NS는 1개의 사일런트 뉴클레오타이드 치환을 가지는 것이 주목된다(표 13). 이들 뉴클레오타이드 치환은 아미노산 변화를 일으키지 않으며, 바이러스 성장과 회수에 영향을 줄 것으로 예상되지 않는다. 이들 사일런트 치환은 재조합 바이러스의 유전자형결정을 용이하게 하기 위하여 보유했다.

[표 13]

[0231] B/Ann Arbor/1/66 (MDV-B)의 8 분절을 나타내는 플라스미드 세트

분절	플라스미드	뉴클레오티드	단백질
PB1	PAB121-PB1	A924>G924; C1701>T1701	사일런트
PB2	PAB122-PB2	컨센서스	---
PA	PAB123-PA	컨센서스	---
HA	PAB124-HA	T150>C150; T153>C153	사일런트
NP	PAB125-NP	컨센서스	---
NA	PAB126-NA	컨센서스	---
M	PAB127-M	컨센서스	---
NS	PAB128-NS	A416>G416	NS1: 사일런트

[0232]

[0233] PA, NP 및 M1 유전자에서 뉴클레오티드 치환을 갖는 플라스미드의 구성을 위하여, 플라스미드 pAB123-PA, pAB125-NP, pAB127-M 를 주형으로 이용하였다. 뉴클레오티드를 킷체인지 키트에 의해 변화시켰다. 다르게는, 원하는 돌연변이를 함유한 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 두 단편을 증폭시키고, BsmBI로 분해하고 세 단편 연결 반응으로 pAD3000-BsmBI내로 삽입하였다. 생성된 플라스미드를 서열결정하여 cDNA가 원치않는 돌연변이를 함유하지 않음을 확인하였다.

[0234]

주형 DNA의 서열을 AmpliTaq(등록상표) DNA 폴리머라제 FS(Perkin-Elmer Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA)를 이용한 로다민 또는 로다민 염료-종결자 사이클 서열결정 준비 반응 키트를 이용하여 결정하였다. 전기영동에 의해 샘플을 분리하고 PE/ABI model 373, model 373 Stretch, 또는 model 377 DNA 시퀀서상에서 분석하였다.

[0235]

별도의 실험에서, 인플루엔자 B/Yamanshi/66/98로부터의 바이러스 RNA를, 94℃에서 30초간, 54℃에서 30초간, 그리고 72℃에서 3분간 25사이클동안 PCR을 실시한 것을 제외하고는 MDV-B 균주에 대하여 전술한 대로 증폭시키고 pAD3000내로 클로닝하였다. NP와 NA 분절의 증폭을 위한 하기 프라이머의 치환을 가지고, 동일한 프라이머를 B/Yamanshi/166/98 균주 분절의 증폭을 위해 이용하였다: MDV-B 5'BsmBI-NP : TATTCGTCTCAGGGAGCAGAGCAGCAGCATTTTCTTGTG (서열 번호 75) 그리고 MDV-B3'BsmBI-NP : ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAACAGCATTTTAC (서열 번호 76) 그리고 Bm-Nab-1 : TATTCGTCTCAGGGAGCAGAGCAGAGCA (서열 번호 77) 그리고 Bm-Nab-1557R : ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTT (서열 번호 78). B/Yamanshi/166/98 플라스미드는 pAB251-PB1, pAB252-PB2, pAB253-PA, pAB254-HA, pAB255-NP, pAB256-NA, pAB257-M, 및 pAB258-NS로 표시되었다. 세 개의 사일런트 뉴클레오티드 차이가 PA에서 동정되어 재조합 및 재배열 B/Yamanshi/166/98 바이러스의 유전자형결정을 용이하게 하였다.

[0236]

실시예 6: 감염성 재조합 인플루엔자 B 및 재배열 인플루엔자 바이러스의 생성

[0237]

헬퍼 바이러스가 없는 세포 배양 시스템에서 인플루엔자 B를 성장시키는 시도에서 겪는 방해물을 극복하기 위하여, 본 발명은 재조합 및 재배열 B 균주 인플루엔자 바이러스의 생산을 위한 새로운 벡터와 프로토콜을 제공한다. 인플루엔자 B 바이러스의 확보를 위해 이용된 벡터 시스템은 인플루엔자 A 바이러스의 생성을 위해 개발된 것에 기초한다 (Hoffmann et al. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97: 6108- 6113; Hoffmann & Webster (2000) Unidirectional RNA polymerase I polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids J Gen Virol 81: 2843-7). 293T 또는 COS-7 세포(높은 형질감염 효율과 polI 활성을 가진 영장류 세포)를 MDCK 세포(인플루엔자 바이러스를 허용함)와 동시배양하고, 293T 세포를 5% FBS 세포를 함유한 OptiMEM-AB 배지에서 유지하고, COS-7 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM I-AB 배지에서 유지하였다. MDCK 세포를 항생제와 항진균제가 첨가된 1x MEM, 10% FBS에서 유지하였다. 바이러스 게놈 벡터로 형질감염하기에 앞서, 세포를 5ml PBS 또는 FBS가 없는 배지로 한번 세척하였다. 10ml의 트립신-EDTA를 75cm² 플라스크내의 함유점 세포에 첨가하였다(MDCK 세포를 20-45분간 항온처리하고, 293T 세포를 1분동안 항온처리하였다). 세포를 원심분리하고, 10ml의 OptiMEM I-AB에 재현탁시켰다. 각 현탁된 세포주 1ml을 18ml의 OptiMEM I-AB에 희석시키고, 혼합하였다. 이어서 세포를 3ml/웰로 6웰 플레이트내에 나누었다. 6-24시간 후, 각 플라스미드 1μg을 OptiMEM I-AB를 가진 1.5ml 에펜도프 튜브에서 플라스미드에 혼합하였다(x μl 플라스미드 + x μl OptiMEM I-AB + x μl TransIT-LT1 = 200μl); 플라스미드 DNA μg 당 2 μl TransIT-LT1. 혼합물을 실온에서 45분간 항온처리하였다. 이어서 OptiMEM I-AB 800 μl를 첨가하였다. 세포로부터 배지를 제거하고, 형질감염 혼합물을 33℃에서 6-15시간동안 세포에 첨가하였다(t=0). 형질감염 혼합물을 세포로부터 천천히 제거하고, 1ml의 OptiMEM I-AB를 첨가하고, 33℃에서 24시간동안 항온처리하였다. 형질감염 후 48시간째에, 1 μg/ml TPCK-트립신을 함유한 OptiMEM I-AB 800 1ml을 세포에 첨가하였다. 형질감염 후 96시간째에, 1 μg/ml TPCK-트립신을 함유한 OptiMEM I-AB 1 1ml을 세포

에 첨가하였다.

[0238] 형질감염 후 4일과 7일 사이에, 세포 배양물 상등액 1ml을 회수하여 HA 또는 플라크 분석에 의해 모니터하였다. 요약하면, 1ml의 상등액을 에펜돌프 튜브에 놓고 5분동안 5000rpm에서 원심분리하였다. 상등액 900 μ l를 새 튜브로 옮기고, 500 μ l/웰로 MDCK 세포에 연속 희석을 실시하였다(예, 12웰 플레이트에서). 상등액을 1시간동안 세포와 항온처리하고, 이어서 제거하고, 1 μ g/ml TPCK-트립신을 함유한 감염 배지(1x MEM)으로 대체하였다. 이어서 HA 분석 또는 플라크 분석을 실시하였다. 예를 들어, 플라크 분석을 위하여, 33 $^{\circ}$ C에서 3일동안 0.8% 아가로즈 덮개층과 항온처리된 MDCK 세포에서 적정시켰다. 알의 감염을 위하여, 형질감염된 세포의 상등액을 형질감염 후 6 또는 7일에 수집하고, OptiMEM I중의 바이러스 희석액 100 μ l를 33 $^{\circ}$ C에서 11일된 배발생된 병아리 알내로 주입하였다. 접종 후 3일째에 MDCK 세포에서의 TCID₅₀ 분석에 의해 타이터를 결정하였다.

[0239] MDV-B를 생성하기 위하여, 동시배양된 293T-MDCK 또는 COS-7-MDCK 세포를 각 플라스미드 1 μ g으로 형질감염시켰다. 형질감염 후 5-7일에 검사했을 때, 동시배양된 MDCK 세포는 세포변성 효과(CPE)를 나타내어, 클론된 cDNA로부터의 감염성 MDV-B 바이러스의 생성을 나타냈다. 7개의 플라스미드로 형질감염된 세포에서 CPE는 관찰되지 않았다(표 14). 바이러스 생성을 위한 DNA 형질감염 시스템의 효율을 결정하기 위하여, 세포의 상등액을 형질감염 후 7일째에 MDCK 세포에서 적정하고, 플라크 분석에 의하여 바이러스 타이터를 결정하였다. 동시 배양된 293T-MDCK의 상등액의 바이러스 타이터는 COS7-MDCK 세포에서 5.0 x 10⁶ pfu/ml 및 7.6 x 10⁶ pfu/ml 었다.

[0240] [표 14]

[0241] 8개의 플라스미드로부터의 감염성 인플루엔자-B 바이러스의 생성

분절	1	2	3	4
PB1	pAB121-PB1	---	PAB121-PB1	---
PB2	pAB122-PB2	pAB122-PB2	PAB122-PB2	pAB122-PB2
PA	pAB123-PA	pAB123-PA	pAB123-PA	pAB123-PA
HA	pAB124-HA	pAB124-HA	pAB124-HA	pAB124-HA
NP	pAB125-NP	pAB125-NP	pAB125-NP	pAB125-NP
NA	pAB126-NA	pAB126-NA	pAB126-NA	pAB126-NA
M	pAB127-M	pAB127-M	pAB127-M	pAB127-M
NS	pAB128-NS	pAB128-NS	pAB128-NS	pAB128-NS
동시배양된 293T-MDCK 세포		동시배양된 COS-7-MDCK 세포		
CPE	+	-	+	-
pfu/ml	5.0 x 10 ⁶	0	7.6 x 10 ⁶	0

[0242]

[0243] 일시적으로 동시배양된 293T-MDCK(1,2) 또는 동시배양된 COS7-MDCK 세포(3,4)를 7 또는 8개 플라스미드로 형질감염시켰다. 세포변성 효과(CPE)를 동시배양된 MDCK 세포에서 형질감염 후 7일에 모니터하였다. 형질감염 후 7일에, 형질감염된 세포의 상등액을 MDCK 세포에서 적정하였다. pfu/ml의 데이터는 다수의 (예를 들어, 3 또는 4) 형질감염 실험의 평균을 나타낸다.

[0244] 비교가능한 결과가 B/Yamanashi/166/98 플라스미드 벡터를 이용한 형질감염 실험에서 얻어졌다. 이들 결과는 형질감염 시스템이 8개의 플라스미드로부터 인플루엔자 B 바이러스의 재현가능한 드 노보(de novo) 생성을 허용함을 보여준다.

[0245] 제조합 인플루엔자 B의 유전자형 결정

[0246] MDCK 세포에서의 후속 계대 후, 감염된 세포의 상등액의 RT-PCR을 이용하여 생성된 바이러스의 진정성을 확인하였다. 모든 8 분절을 위한 분절 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다(표 12). 도 5A에 나타난 것처럼, PCR 생성물을 모든 분절에 대해 생성시켰다. PB1, HA 및 NS 분절의 PCR 생성물의 직접적인 서열결정은 분석된 4 뉴클레오티드가 플라스미드 pAB121-PB 1, pAB124-HA, 및 pAB128-NS에서 발견된 것과 동일함을 밝혔다. 이 결과는 생성된 바이러스가 상기 표시된 플라스미드로부터 생성됨을 확인하며 모 바이러스에 의한 가능한 실험적 오염을 제외시킨다(음성 대조군에 더하여)(도 5B).

[0247] 유사하게, B/Yamanashi/166/98 플라스미드 벡터를 이용한 형질감염 후, 바이러스를 회수하고 PA 분절의 뉴클레오티드 1280-1290을 포함하는 영역을 증폭시켰다. 서열 결정 결과, 회수된 바이러스가 플라스미드 유래된 제조합 B/Yamanashi/166/98에 해당함을 확인하였다(도 5C 및 D).

[0248] rMDV-B의 표현형 결정

[0249] MDV-B 바이러스는 두 가지 특징적인 표현형인 온도 민감성(ts)과 저온 적응(ca)을 보여준다. 정의에 의해, 33 $^{\circ}$ C

에 비하여 37℃에서 바이러스 성장에서 2 log(또는 그 이상) 차이가 ts를 정의하며, ca는 33℃에 비하여 25℃에서 바이러스 성장에서 2 log 미만 차이에 의해 정의된다. 일차 병아리 신장(PCK) 세포를 모 바이러스 MDV-B와 플라스미드로부터 유래된 형질감염된 바이러스로 감염시켜 세 온도에서 바이러스 성장을 결정하였다.

[0250] 플라크 분석을 위하여, 6웰 플레이트내의 합류점 MDCK 세포(ECACC)를 이용하였다. 바이러스 회석물을 33℃에서 30-60분간 항온처리하였다. 0.8% 아가로스 덮개층으로 세포를 덮었다. 감염된 세포를 33℃ 또는 37℃에서 항온처리하였다. 감염 3일 후, 0.1% 결정 바이올렛 용액으로 염색하고 플라크 수를 결정하였다.

[0251] 25, 33 및 37℃에서 바이러스 샘플의 TCID₅₀ 적정에 의해 ca-ts 표현형 분석을 실시하였다. 이 분석 포맷은 상이한 온도(25, 33 및 37℃)에서 96-웰 세포 배양 플레이트내의 일차 병아리 신장 세포 단층에 대한 인플루엔자 바이러스의 세포변성 효과(CPE)를 검사함으로써 TCID₅₀ 타이터를 측정한다. 이 분석은 온도와 바이러스 균주에 따라 변하는 플라크 형태에 의존하지 않으며, 대신 인플루엔자 바이러스가 복제하여 CPE를 야기하는 능력에만 의존한다. 일차 조직의 트립신분해(trypsinization)에 의해 제조된 일차 병아리 신장(PCK) 세포 현탁액을 5% FCS를 함유한 MEM(Earl's) 배지에 현탁시켰다. 90% 이상의 합류를 갖는 단층을 준비하기 위하여 PCK 세포를 48시간 동안 96웰 세포 배양 플레이트에 접종하였다. 48시간 후, PCK 세포 단층을 표현형 분석 배지(PAM)으로 불리는, 5mM L-글루타민, 항생제, 비필수 아미노산을 함유한 무혈청 MEM 배지로 한시간동안 세척하였다. 바이러스 샘플의 연속 10배 회석물을 PAM을 함유한 96웰 블록에 준비하였다. 이어서 회석된 바이러스 샘플을 96웰 플레이트내의 세척된 PCK 단층상에 도말하였다. 바이러스 샘플의 각 회석시에, 6웰의 복사물을 회석된 바이러스를 이용한 감염을 위해 이용하였다. 세포 대조군으로서 미감염된 세포를 각 샘플을 위한 6웰의 복사물로서 포함시켰다. 각 바이러스 샘플을 2-4 복사물에서 적정하였다. 25, 33 및 37℃에서 예비-결정된 타이터를 갖는 표현형 대조군 바이러스를 각 분석에 포함시킨다. 바이러스 샘플의 ts 표현형을 결정하기 위하여, 5% CO₂ 세포 배양 항온기에서 33 및 37℃에서 6일동안 플레이트를 항온처리하였다. ca-표현형 특성규명을 위하여, 플레이트를 25℃에서 10일간 항온처리하였다. 카버 방법에 의해 바이러스 타이터를 계산하고 Log₁₀ 평균 (n=4) TCID₅₀ 타이터/ml ± 표준편차로 보고하였다. 도 1-3에 제시된 바이러스 타이터의 표준 편차는 0.1 내지 0.3 범위였다. 33℃ 와 37℃에서 바이러스 타이터의 차이를 이용하여 ts 표현형을 결정하고 바이러스의 25℃ 와 33℃에서의 타이터 차이를 이용하여 ca 표현형을 결정하였다.

[0252] 플라스미드 유래 재조합 MDV-B(recMDV-B) 바이러스는 예상한 대로, 세포 배양에서 두 가지 특징적인 표현형인 ca와 ts를 발현하였다. 25℃에서의 효율적인 복제인 ca 표현형은 PCK 세포에서 분석될 때 2 log₁₀ 이하의, 25℃ 와 33℃ 사이의 타이터 차이로서 기능적으로 측정된다. 모 MDV-B와 rec-MDV-B 둘다 ca를 발현하였으며; 25℃ 와 33℃ 사이의 차이는 각각 0.3 및 0.4 log₁₀이었다(표 15). ts 표현형은 또한 PCK 세포에서 두개의 상이한 온도에서의 타이터를 관찰함으로써 측정된다; 하지만, 이 표현형의 경우, 37℃에서의 타이터는 2 log₁₀ 이상만큼 33℃에서의 타이터보다 적어야 한다. 모 MDV-B와 recMDV-B를 위한 33℃ 와 37℃ 사이의 차이는 각각 3.4와 3.7 log₁₀이었다(표 15). 따라서, 재조합 플라스미드-유래 MDV-B 바이러스는 ca와 ts 표현형 둘다를 발현하였다.

[0253] 재조합 바이러스는 33℃에서 7.0 log₁₀ TCID₅₀/ml, 그리고 37℃에서 3.3 TCID₅₀/ml 및 25℃에서 8.8 log₁₀ TCID₅₀/ml의 타이터를 가졌다 (표 15). 따라서, 8개의 인플루엔자 MDV-B 계통 분절 플라스미드를 이용한 형질감염으로부터 유래된 재조합 바이러스는 ca와 ts 표현형 둘다를 가진다.

[0254] 표 15]

[0255] MDV-B와 플라스미드로부터 생성된 rMDV-B를 위한 표현형 분석

바이러스	온도 (°C)			표현형
	25	33	37	
	Log10 TCID50/ml (Mean + SD)			
ca B/Ann Arbor/01/66 (MDV-B)	8.8 + 0.3	8.5 + 0.05	5.1 + 0.1	ca, ts
RecMDV-B	7.4 + 0.3	7.0 + 0.13	3.3 + 0.12	ca, ts
Rec53-MDV-B	5.9 + 0.1	5.7 + 0.0	5.3 + 0.1	ca, non-ts

[0256]

[0257] 일차 병아리 신장 세포를 모 바이러스 MDV-B와 플라스미드-유래 재조합 바이러스(recMDV-B)로 형질감염시켰다. 바이러스 타이터를 세 가지 다른 온도에서 측정하였다.

[0258] 실시예 7: 재배열 B/YAMANASHI/166/98 바이러스의 생산

[0259] 인플루엔자 B의 주요 계통을 나타내는 몇가지 다른 균주의 HA와 NA 분절을 본질적으로 전술한 대로, 증폭시키고 pAD3000내로 클로닝하였다. HA와 NA 분절의 동시 RT-PCR 증폭을 위하여 프라이머를 최적화시켰다. 분절 4(HA)와 분절 6(NB/NA)의 비 암호 영역을 나타내는 vRNA의 말단 영역의 비교 결과 5' 말단의 20 말단 뉴클레오티드와 3' 말단의 15 뉴클레오티드가 인플루엔자 B 바이러스의 HA와 NA 유전자 사이에서 동일함이 밝혀졌다. RT-PCR을 위한 프라이머 쌍(밑줄그은 서열은 인플루엔자 B 바이러스 특이적임) Bm-NAb-1: TAT TCG TCT CAG GGA GCA GAA GCA GAG CA (서열 번호 79); Bm-NAb-1557R: ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGT AAC AAG AGC ATT TT (서열 번호 80)를 합성하여, 다양한 인플루엔자 B 균주로부터의 HA 와 NA 유전자를 동시에 증폭시키기 위해 이용하였다(도 8). B/Victoria/504/2000, B/Hawaii/10/2001, 및 B/Hong Kong/330/2001의 HA와 NA PCR-단편을 분리하고, BsmBI으로 분해하고, pAD3000내로 삽입하였다. 이들 결과는 인플루엔자 B의 주요 계통을 나타내는 몇 가지 다른 야생형 바이러스로부터의 인플루엔자 B HA 및 NA 유전자를 함유한 플라스미드의 효율적인 생성을 위한 이들 프라이머의 적용가능성을 증명하였다. RT-PCR 생성물은 서열 결정 및/또는 발현 플라스미드내로의 클로닝을 위해 이용될 수 있다.

[0260] 다양한 인플루엔자 B 계통으로부터 항원을 효율적으로 발현시키기 위한 B/Yamanashi/166/98 (B/Yamagata/16/88-유사 바이러스)의 유용성을 입증하기 위하여, B/Yamanashi/166/98로부터의 PB1, PB2, PA, NP, M, NS와 빅토리아와 야마가타 계통 둘다를 나타내는 균주들로부터의 HA와 NA를 함유한 재배열체(6+2 재배열체)를 생성시켰다. 일시적으로 동시배양된 COS7-MDCK 세포를 전술한 방법에 따라, B/Yamanashi/166/98을 나타내는 6개 플라스미드와, B/Victoria/2/87 계통, B/Hong Kong/330/2001 및 B/Hawaii/10/2001로부터의 두 균주 및 B/Yamagata/16/88 계통, B/Victoria/504/2000로부터의 한 균주의 HA와 NA의 cDNA를 함유한 두 플라스미드로 동시형질감염시켰다. 형질감염 후 6-7일에, 상등액을 새로운 MDCK 세포에서 적정시켰다. 모든 세 개의 6+2 재배열 바이러스는 $4-9 \times 10^6$ pfu/ml 사이의 타이터를 가졌다(표 16). 이들 자료는 B/Yamanashi/166/98의 여섯 개의 내부 유전자가 인플루엔자 B 계통 둘다로부터의 HA와 NA 유전자 분절을 갖는 감염성 바이러스를 효과적으로 형성할 수 있음을 입증하였다.

[0261] 동시배양된 COS7-MDCK 세포의 상등액을 형질감염 후 6 또는 7일 후에 적정하고 MDCK 세포에서의 플라크 분석에 의하여 바이러스 타이터를 결정하였다.

[0262] [표 16]

[0263] B/Yamanashi/166/98과 6+2 재배열체의 생성을 위해 이용된 플라스미드 세트

분절					
1	---	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1	pAB251-PB1
2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2	pAB252-PB2
3	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA	pAB253-PA
4	pAB254-HA	pAB254-HA	pAB281-HA	pAB285-HA	pAB287-HA
5	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP	pAB255-NP
6	pAB256-NA	pAB256-NA	pAB291-NA	pAB295-NA	pAB297-NA
7	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M	pAB257-M
8	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA	pAB258-NA
재조합 바이러스		8	6 + 2	6 + 2	6 + 2
		B/Yamanashi/166/98	B/Victoria/504/2000	B/Hawaii/10/2001	B/Hong Kong/330/2001
pfu/ml*		4×10^6	9×10^6	6×10^6	7×10^6

[0264]

[0265] 알에서의 야생형 B/Yamanashi/166/98의 복제에 의해 상대적으로 높은 타이터가 얻어진다. 이 특성이 이 바이러스의 여섯 개의 "내부" 유전자의 내재적인 표현형인지를 결정하기 위하여 실험을 실시하였다. 이 특성을 평가하기 위하여, 알에서 온건하게만 복제하는 야생형 B/Victoria/504/2000의 수율을 B/Victoria/504/2000 HA와 NA를 발현하는 6+2 재배열체의 수율과 비교하였다. 야생형 및 재조합 B/Yamanashi/166/98에 더하여 이들 바이러스를 각각 100 또는 1000 pfu로 3 또는 4개의 배발생된 병아리 알내로 접종하였다. 감염 3일 후, 알로부터 알라토인 유체를 수집하고 MDCK 세포에서 TCID₅₀ 타이터를 결정하였다. 6+2 재배열체는 알란토인 유체에서 야생형과 재조합 B/Yamanashi/166/98 균주와 유사한 양의 바이러스를 생산하였다(도 9). B/Victoria/504/2000과 6+2 재조합체 사이의 타이터 차이는 약 $1.61 \log_{10}$ TCID₅₀ ($0.7-2.5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL, 95% CI)였다. B/Victoria/504/2000과 6+2 재조합체 사이의 차이는 3개의 별도 실험에서 확인되었다($P < 0.001$). 이 결과는 B/Yamanashi/166/98의 알 성장 특성이 알에서 빈약하게 복제하는 균주로부터 정상적으로 발현되는 HA와 NA 항원에 부여될 수 있음을 증명하였다.

[0266] 실시예 8: ca B/ANNARBOR/1/66의 약독화를 위한 분자 기초

[0267] MDV-B 바이러스(ca B/Ann Arbor/1/66)는 인간에서 약독화되며, 흰족제비에서 약독화된 표현형을 나타내며 세포 배양에서 저온 적응되고 온도 민감한 표현형을 보여준다. MDV-B의 내부 유전자의 추론된 아미노산 서열을 BLAST 서치 알고리즘을 이용하여 Los Alamos 인플루엔자 데이터베이스(인터넷 주소 www.flu.lanl.gov)의 서열과 비교하였다. MDV-B에 독특하며 임의의 다른 균주에는 존재하지 않는 8 아미노산이 동정되었다(표 17). PB 1, BM2, NS1, 및 NS2를 암호화하는 게놈 분절은 특유의 치환 잔기를 보여주지 않는다. PA와 M1 단백질은 각각 두 개의 특유의 치환 아미노산을 가지며, NP 단백질은 네 개의 특유의 치환 아미노산을 갖는다(표 17). 하나의 치환된 아미노산이 위치 630에서 PB2에서 발견된다(추가 균주 B/Harbin/7/94 (AF170572) 또한 위치 630에서 아르기닌 잔기를 갖는다).

[0268] 이 결과는 유전자 분절 PB2, PA, NP 및 M1이 MDV-B의 약독화된 표현형에 관련될 수도 있음을 제안하였다. MDV-A에 대해 전술한 바와 유사한 방식으로, 8 플라스미드 시스템을 이용하여, MDV-A에 대하여 전술한 대로 배양된 세포내로 관련 플라스미드를 동시형질감염시킴으로써 헬퍼에 무관한 방식으로 재조합 및 재배열체(단일 및/또는 이중, 즉 7:1; 6:2 재배열체)를 생성하기 위해 이용할 수 있다. 예를 들어, B/Lee/40로부터의 6개의 내부 유전자를 MDV-B로부터 유래된 HA와 NA 분절과 함께 이용하여 6+2 재배열체를 생성할 수 있다.

[0269] [표 17]

[0270] B/Ann Arbor/1/66의 특유의 치환된 아미노산

Nr.		ca B/Ann Arbor/1/66		배열된 서열 (야생형 바이러스)		배열된 서열의 수	
		위치	아미노산	코돈	아미노산	코돈	
PB1	0	-	-	-	-	23	
PB2	1	630	Arg630	<u>AGA</u>	Ser630	<u>AGC</u>	23
PA	2	431	Met431	<u>ATG</u>	Val431	<u>GTG</u>	23
		497	His497	<u>CAT</u>	Tyr497	<u>TAT</u>	
NP	4	55	Ala55	<u>GCC</u>	Thr55	<u>ACC</u>	26
		114	Ala114	<u>GCG</u>	Val114	<u>GTG</u>	
		410	His410	<u>CAT</u>	Pro410	<u>CCT</u> , <u>CCC</u>	
		509	Thr509	<u>GAC</u>	Ala509	<u>GGC</u>	
M1	2	159	Gln159	<u>CAA</u>	His159	<u>CAT</u>	24
		183	Val183	<u>GTG</u>	M183	<u>ATG</u>	
BM2	0	-	-	-	-	-	24
NS1	0	-	-	-	-	-	80
NS2	0	-	-	-	-	-	80

[0271]

[0272] B/Ann Arbor의 8개 단백질의 추론된 아미노산 서열을 BLAST 서치에서 이용하였다. MDV-B와 배열된 서열간에 상이한 아미노산 위치가 나타난다. 밑줄 그은 코돈의 뉴클레오티드는 치환된 위치를 나타낸다.

[0273] 8개의 특유의 아미노산 차이가 특징적인 MDV-B 표현형에 영향을 갖는지를 결정하기 위하여, 모든 8개의 뉴클레오티드 위치가 야생형 인플루엔자 유전적 상보체를 반영하는 아미노산을 암호화하는 재조합 바이러스를 구성하였다. PA, NP, 및 M1 유전자의 8 잔기를 부위 지시된 돌연변이에 의해 변화시켜 야생형 아미노산을 반영하도록 한 플라스미드 세트를 구성하였다(표 17에 나타남). 동시배양된 COS7-MDCK 세포에서 상기 구성된 플라스미드를 동시형질감염시켜, rec53-MDV-B로 표시된, 모든 8개의 변화를 가진 재조합체를 생성하였다. MDCK 세포의 동시배양 및 33°C에서의 성장은 형질감염 후 6 내지 7일에 높은 바이러스 타이터를 함유함을 보장하였다. 형질감염된 세포의 상등액을 적정하고 33°C와 37°C에서 PCK 세포에서 그리고 플라크 분석에 의해 MDCK 세포에서 타이터를 결정하였다.

[0274] 도 13에 나타난 것처럼, 두 가지 다른 독립적인 실험에서, recMDV-B는 MDCK 세포와 PCK 세포 둘다에서 ts-표현형을 발현하였다. 모든 8개의 아미노산 변화를 보유하도록 고안된 삼중 재배열 바이러스 rec53-MDV-B는 비-ts 표현형을 발현하였으며, 33°C와 37°C 사이의 타이터 차이는 PCK 세포에서 단지 0.7 log₁₀이었다. 이 타이터는 ts 정의의 특징으로 요구되는 2 log₁₀보다 적으며 recMDV-B에서 관찰되는 ~3 log₁₀ 차이보다 상당히 적은 것이다. 이 결과는 PA, NP 및 M1 단백질내에서의 8 아미노산의 변화가 동중 및 이중 당단백질을 갖는 비-ts, 야생형-유사 바이러스를 생성하기에 충분함을 보여준다.

[0275] 각 유전자 분절의 ts 표현형에의 기여를 이어서 결정하였다. 야생형 아미노산 상보체를 가진 PA, NP 또는 M 유전자 분절을 보유한 플라스미드 유래 재조합체를 DNA 동시형질감염 기법에 의해 생성시켰다. 모든 단일 유전자

재조합체는 MDCK 세포와 PCK 세포에서 37℃에서 성장 제한을 나타내어(도 14), 한 유전자 분절에서의 변화가 ts 표현형을 역전시킬 수 있음을 나타낸다. 또한, NP와 M 또는 PA와 M 유전자 분절을 함께 보유한 재조합 바이러스는 또한 ts 표현형을 보유하였다. 대조적으로, PA와 NP 유전자 분절 둘다를 보유한 재조합 바이러스는 rec53-MDV-B와 유사하게 37℃와 33℃ 사이에서 2.0 log₁₀ 이하의 타이터 차이를 가졌다. 이 결과는 NP와 PA 유전자가 ts-표현형에 주요한 기여를 함을 보여준다.

[0276] NP 단백질의 4 아미노산과 PA 단백질의 2 아미노산이 모두 비-ts에 기여하는지를 결정하기 위하여, 바뀐 NP 및 PA 유전자를 갖는 삼중 유전자 및 이중 유전자 재조합체를 생성시켰다(도 15). 두 아미노산의 치환 A114→V114와 H410→P410은 비-ts 표현형을 야기하였다. 핵단백질에서 단일 치환 H410→P410을 갖는 바이러스는 MDCK와 PCK에서 비-ts 표현형을 나타냈다. 한편, 단일 치환 A55→T55는 ts-표현형을 나타냈다. 이들 결과는 NP의 P410이 37℃에서의 효과적인 성장에 관여함을 나타낸다. 이들 결과는 PA와 NP의 6 아미노산으로부터 네 잔기가 비-ts 표현형에 기여함을 보여준다.

[0277] 앞의 증거에 기초하여, ts-표현형과 약독화된 표현형은 매우 관련성을 갖는다. ca B/Ann Arbor/1/66 바이러스가 감염된 흰족제비의 폐 조직에서는 검출되지 않는 반면, 비약독화된 인플루엔자 B 바이러스는 비강내 감염 후 폐에서 검출된다는 것은 잘 확립되었다. 동일한 돌연변이가 ts와 att 표현형과 관련되는 지를 결정하기 위하여, 하기 연구를 실시하였다.

[0278] 형질감염 후 얻어진 재조합 바이러스를 배발생된 병아리 알에서 계대하여 바이러스 스톱을 생산하였다. 9주된 흰족제비를 5.5, 6.0 또는 7.0 log₁₀ pfu/ml의 타이터로 콧구멍당 0.5ml 바이러스를 비강내 접종하였다. 감염 후 3일째에 흰족제비를 죽이고 그들의 폐와 비개골을 전술한 대로 검사하였다.

[0279] 흰족제비(각 그룹당 4마리)를 recMDV-B 또는 rec53-MDV-B로 비강내 감염시켰다. 감염 후 3일째에 코 비개골 및 폐 조직의 바이러스를 수집하고 바이러스의 존재를 테스트하였다. 7.0 log₁₀ pfu recMDV-B로 감염된 흰족제비의 폐 조직에서는 바이러스가 검출되지 않았다. 7.0 log₁₀ pfu로 rec53-MDV-B 바이러스로 감염된 4 마리 동물중 3 마리에서 폐 조직에서 바이러스가 검출되었다(이 그룹에서 한 마리는 미지의 이유). 더 낮은 투여량(5.5 log₁₀ pfu/ml)로 rec53-MDV-B로 감염된 흰족제비의 4개의 폐 조직중 둘에서 바이러스가 폐 조직으로부터 분리되었다. 따라서, PA, NP 및 M1 단백질의 특유의 8 아미노산의 야생형 잔기로의 변화는 att 표현형을 비-att 표현형으로 전환시키기에 충분하였다.

[0280] 세포 배양에서의 타이터는 PA와 NP가 ts-표현형의 주요 기여자임을 보여주었기 때문에, 두번째 실험에서는, 흰족제비를 6 log pfu로 rec53-MDV-B (PA, NP, M), rec62-MDV-B (PA), NP rec71-MDV-B (NP)로 감염시켰다. rec53-MDV-B로 감염된 동물 네 마리 중 두마리가 폐에 바이러스를 보유했다. 단일 및 이중 재배열 바이러스로 감염된 흰족제비의 폐 조직에서는 검출가능한 바이러스가 없었다. 따라서, PA와 NP 단백질의 아미노산에 더하여, M1 단백질이 att 표현형에 중요하다. 야생형 PA와 NP를 가진 바이러스는 흰족제비 폐에서 복제하지 않아, 약독화에 관련된 돌연변이의 서브세트가 ts 표현형에 관련됨을 나타낸다.

[0281] 따라서, B/Ann Arbor/1/66의 ts-표현형은 최대 세 개의 유전자에 의해 결정된다. PA, NP 및 M1 단백질의 8 아미노산의 야생형 잔기로의 전환은 37℃에서 효율적으로 복제하는 재조합 바이러스를 야기했다. 유사하게, MDV-B의 6 내부 유전자와 B/HongKong/330/01로부터의 HA와 NA 분절을 나타내는 6+2 재조합 바이러스는 ts-표현형을 나타냈으며 삼중 재조합체는 비-ts였다.

[0282] 인플루엔자 A 균주에 관하여 전술한 대로, 상기에서 나타낸 잔기들의 치환, 예를 들어 PB2⁶³⁰ (S630R); PA⁴³¹ (V431M); PA⁴⁹⁷ (Y497H); NP⁵⁵ (T55A); NP¹¹⁴ (V114A); NP⁴¹⁰ (P410H); NP⁵¹⁰ (A510T); M1¹⁵⁹ (H159Q) 및 M1¹⁸³ (M183V)은 ts와 att 표현형을 부여한다. 따라서, 이들 아미노산 치환 중 하나 이상을 갖는 인플루엔자 B 균주 바이러스의 인공적으로 조작된 변이체는 ts와 att 표현형을 나타내며 예를 들어 약독화된 생 인플루엔자 바이러스 백신의 생산에서 마스터 공여 균주 바이러스로 사용하기에 적합하다.

[0283] 실시예 9: 배로 세포의 전기천공에 의한 8 플라스미드로부터 인플루엔자의 확보

[0284] 이전에, 재조합 인플루엔자 A를 배로 세포로부터 구할 수 있음이 제안되었다(Fodor et al. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA J. Virol. 73: 9679-82; Hoffmann et al. (2002) Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccine Vaccine 20: 3165-3170). 상기 보고된 방법은 액체 시약의 이용을 요구하며 복제 능력이 큰 인플루엔자 A 실험 균주((A/WSN/33와 A/PR/8/34)의 단일 균주에 대해서

만 발표되어, 백신 생산에 적합한 생 약독화 바이러스의 생산에 그것을 적용하기에는 한계가 있었다. 본 발명은 전기천공을 이용하여 배로 세포로부터 재조합 인플루엔자 바이러스를 회수하는 새로운 방법을 제공한다. 이들 방법은 인플루엔자 A와 B 균주 바이러스 둘다의 생산에 적합하며, 예를 들어 무혈청 조건하에서 성장한 배로 세포로부터 저온 적응된, 온도 민감한, 약독화된 바이러스의 회수를 가능하게 하여 예를 들어 비강내 백신 제제로 투여하기에 적합한 생 약독화 백신의 제조를 용이하게 한다. 바이러스 균주에 대한 넓은 적용가능성에 더하여, 전기 천공은 세포 기질을 위한 성장 배지외의 다른 부가적인 시약을 요구하지 않으며 따라서 원치않는 오염물의 가능성이 적다. 특히, 이 방법은 병원성이 없는 것으로 인정되고 백신 생산에 적합한 배로 세포 분리물과 같은, 무혈청 조건하에서의 성장에 적응된 배로 세포를 이용하여 재조합 및 재배열 바이러스를 생성시키는 데 효과적이다. 이 특징은 DNA를 세포 기질내로 상업적으로 도입하기 위한 적합한 방법으로서 전기천공을 선택하도록 한다.

- [0285] 전기천공은 많은 지질계 시약을 사용하는 형질감염, 칼슘 포스페이트 침전 및 세포 미세주입을 비롯한, DNA를 배로 세포내로 도입하기 위한 많은 방법에 비교되어 왔다. 인플루엔자 A를 얻기 위해 지질계 시약을 사용하여 일부 성공이 얻어지기도 했지만, 전기천공만이 배로 세포로부터 인플루엔자 A뿐만 아니라 인플루엔자 B를 구할 수 있는 것으로 입증되었다.
- [0286] 전기 천공 하루 전에, 90-100% 합류 배로 세포를 나누어, pen/strep, L-글루타민, 비필수 아미노산 및 10% FBS로 보충된 MEM(MEM, 10% FBS)에 T225 플라스크 당 9×10^6 세포의 밀도로 집중하였다. 다음날, 세포를 트립신분해하고 T225 플라스크 당 50ml 인산염 완충된 염수에 재현탁시켰다. 이어서 세포를 침전시키고 T225 플라스크 당 0.5 ml OptiMEM I에 재현탁시켰다. 선택적으로, 인간 또는 동물 유래 성분을 함유하지 않는 맞춤형 OptiMEM I 배지를 이용할 수 있다. 예를 들어, 혈구 계산기에서 1:40 희석물을 계산함으로써 세포 밀도를 결정한 후, 5×10^6 세포를 최종 부피 400 μ l OptiMEM I로 0.4cm 전기천공 큐벳에 첨가하였다. 25 μ l 이하의 부피의 MDV-A 또는 MDV-B 계능을 포함한 8 플라스미드의 동물량 혼합물로 구성된 20 μ g DNA를 이어서 큐벳내의 세포에 첨가하였다. 탭핑에 의해 세포를 부드럽게 혼합하고 연결된 전기용량 확장기 플러스를 갖춘 바이오래드 진 펄스 II(BioRad, Hercules, CA)에서 300볼트, 950 마이크로파라드에서 전기천공하였다. 시간 상수는 28-33 msec 범위였다.
- [0287] 큐벳의 내용물을 탭핑에 의해 부드럽게 혼합하고 전기천공 후 1-2분 후에 1ml 피펫을 이용하여 0.7ml MEM, 10% FBS를 첨가하였다. 여러번의 피펫팅에 의해 세포를 다시 부드럽게 혼합하고 이어서 웰당 2ml의 MEM, 10% FBS를 함유한 6웰 디쉬의 두 웰에 나누었다. 이어서 큐벳을 1ml의 MEM, 10% FBS로 세척하고 웰 당 약 3.5ml의 최종 부피를 위해 두 웰 사이에 나누었다.
- [0288] 다른 실험에서, 무 혈청 성장 조건, 예를 들어 OptiPro (SFM) (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 적응된 배로 세포를, OptiMEM I에서의 전기천공 후 세포를 OptiPro (SFM)에 희석시키고 이어서 이들을 바이러스를 얻기 위해 배양하는 것을 제외하고는 전술한 대로 전기천공하였다.
- [0289] 전기천공된 세포를 도입된 바이러스의 복제 및 회수에 적합한 조건, 즉 저온 적응된 마스터 공여 균주를 위해서는 33 $^{\circ}$ C에서 성장시켰다. 다음날(예를 들어 전기천공 후 약 19시간에), 배지를 제거하고, 웰 당 3ml의 OptiMEM I 또는 OptiPro (SFM)로 세포를 세척하였다. pen/strep을 함유한 OptiMEM I 또는 OptiPro (SFM) 웰당 1ml을 각 웰에 첨가하고, 배지를 교환하여 상등액을 매일 수집하였다. 상등액을 SPG에서 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 최고 바이러스 생산은 일반적으로 전기천공 후 2일과 3일 사이에 관찰되었다.

[0290] [표 18]

[0291] 다른 형질감염 방법에 의한 그리고 다른 세포 타입에서의 MDV 균주의 8 플라스미드 확보의 결과

기질	방법	테스트 숫자	결과(회수된 감염성 바이러스)
MDV-B			
COS-7/MDCK	Lipo	3	양성
COS-7/MDCK	CaPO4	2	양성
MRC-5	Lipo	5	음성
MRC-5	CaPO4	3	음성
MRC-5	전기천공	2	음성
WI-38	Lipo	2	음성
WI-38	전기천공	4	음성
WI-38	미세주입	1	음성
LF1043	Lipo	1	음성
LF1043	CaPO4	2	음성
Vero	Lipo	7	음성
Vero	CaPO4	2	음성
Vero/MDCK	Lipo	1	음성
Vero (혈청)	전기천공	5	양성 (5/5)
Vero (무혈청)	전기천공	4	양성 (4/4)
MDV-A			
Vero (혈청)	전기천공	3	양성 (3/3)
Vero (무혈청)	전기천공	3	양성 (3/3)

[0292]

[0293] 실시예 10: 유전자 전달을 위한 인플루엔자 바이러스 벡터 시스템

[0294] 본 발명의 벡터는 또한 유전자 전달 시스템으로 그리고 유전자 치료를 위해 이용될 수 있다. 그러한 적용을 위하여, 외래 단백질을 발현하는 재조합 인플루엔자 바이러스, 예를 들어 재조합 인플루엔자 A 또는 B 바이러스를 생성하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 인플루엔자 B 바이러스의 분절 7이 스플라이스되지 않으므로, 그것은 이중성 핵산 서열의 삽입을 위한 편리한 유전적 성분을 제공한다. mRNA는 M1과 BM2 단백질을 암호화하는 두 개의 오픈 리딩 프레임에 가진 두 시스트론을 함유한다. BM2 또는 M1의 오픈 리딩 프레임은 관심의 이중성 서열, 예를 들어 증가된 녹색 형광 단백질(EGFP)를 암호화하는 유전자에 의해 치환된다. 본 발명의 플라스미드계 벡터 시스템을 이용하여, M1-EGFP와 BM2의 오픈 리딩 프레임에 암호화하는 cDNA를 두 가지의 다른 플라스미드에 클로닝한다. 상기 오픈 리딩 프레임은 복제와 전사를 위해 요구되는 시그널을 함유하는, 분절 7의 비 암호화 영역에 인접한다.

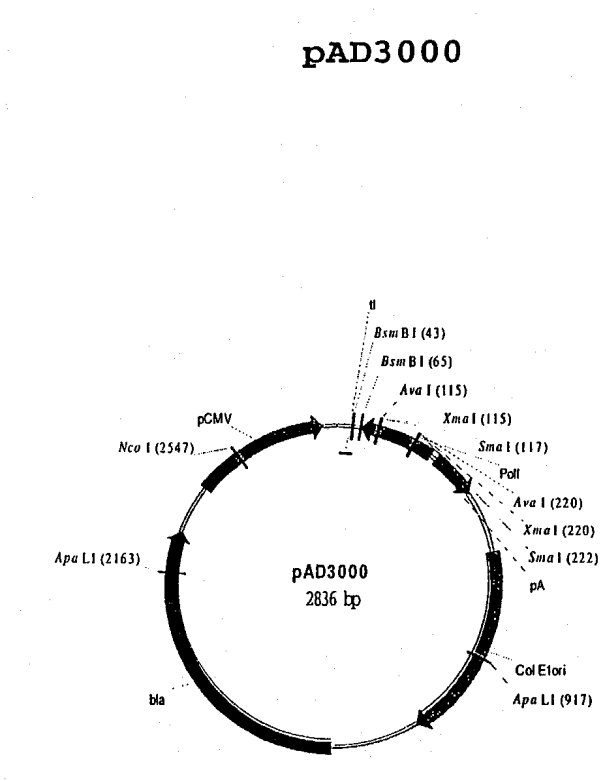
[0295] 다르게는, M1 ORF를 함유하는 한 플라스미드와 EGFP-BM2를 함유한 다른 플라스미드를 구성한다. 생성된 9개의 플라스미드의 동시-형질감염은 이중성 유전자 서열을 함유한 재조합 인플루엔자 B 바이러스의 생성을 야기한다. 유사하게, EGFP는 인플루엔자 A의 NS1 분절로부터 발현될 수 있다.

[0296] 예시적인 "녹색" 인플루엔자 B 바이러스는 마이크로 중화 분석과 같은 바이러스 분석에서 표준화를 위해 이용될 수 있다. 플라스미드계 기법과 단백질 발현의 간단한 검출(도 2에 예시된 것처럼 EGFP에서 유래된 형광을 현미경으로 모니터링할 수 있음)의 조합은 단백질 발현의 최적화를 허용한다.

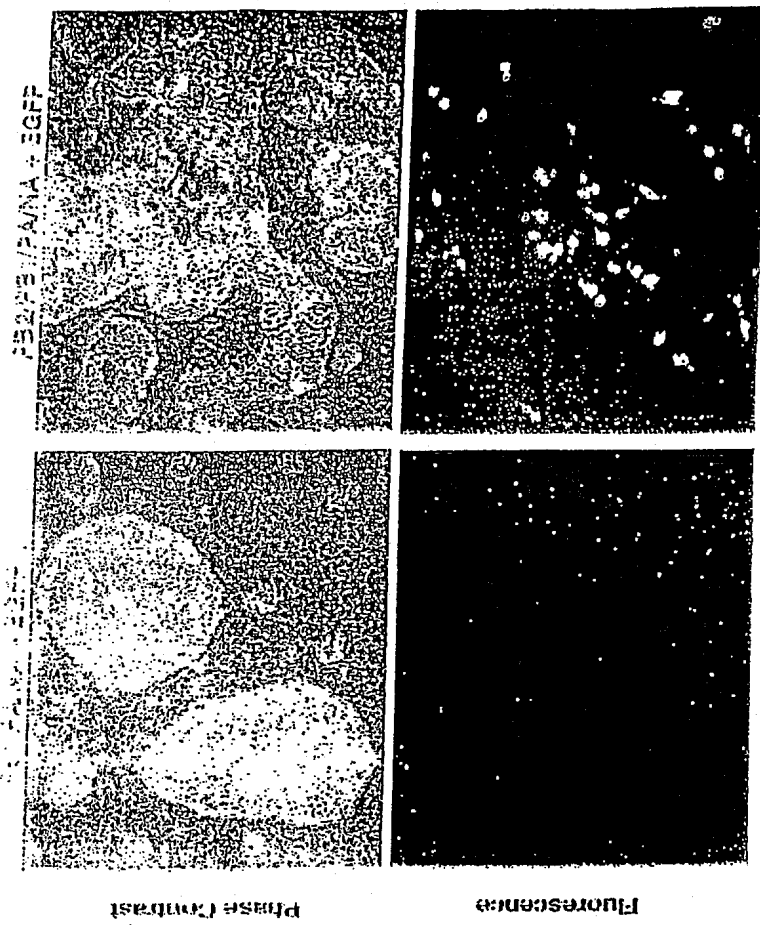
[0297] 전술한 발명이 명확성과 이해를 위해 상세히 개시되었지만, 이 개시 내용을 읽음으로써 당업자에게는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 다양한 변화가 가능할 수 있음이 명백할 것이다. 예를 들어, 전술한 모든 기법과 장치는 다양한 조합으로 이용될 수 있다. 여기서 인용된 모든 문헌, 특허, 특허 출원, 또는 기타 문헌은, 각각의 개별적인 문헌, 특허, 특허 출원, 또는 기타 문헌이 모든 목적을 위해 참고로 통합되는 것으로 나타내진 것처럼, 동일하게 그 전체가 모든 목적을 위해 참고로 통합된다.

도면

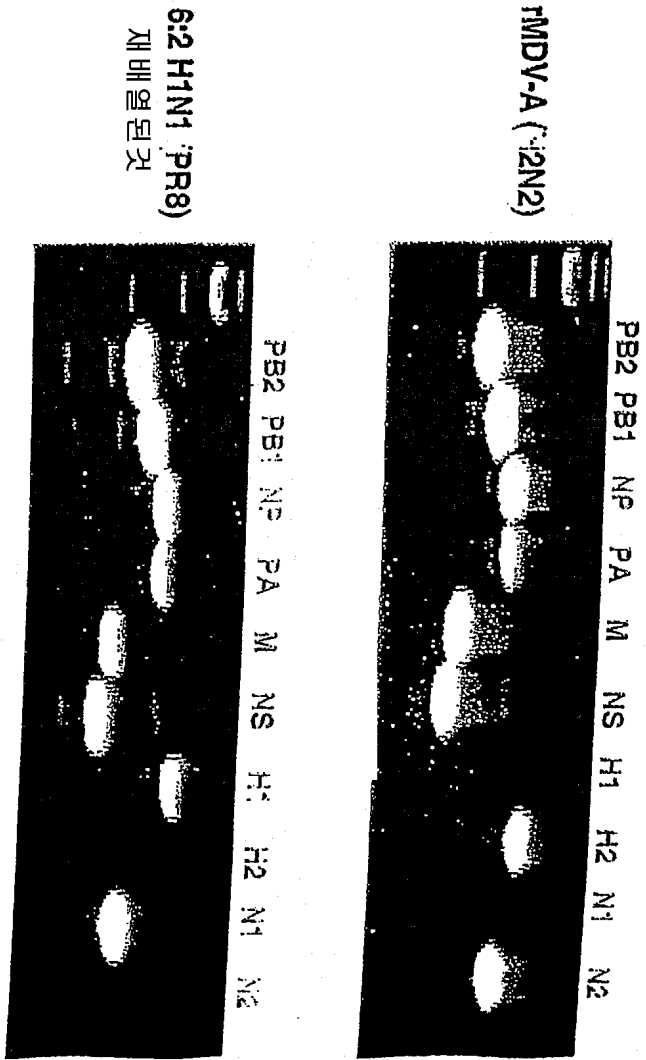
도면1



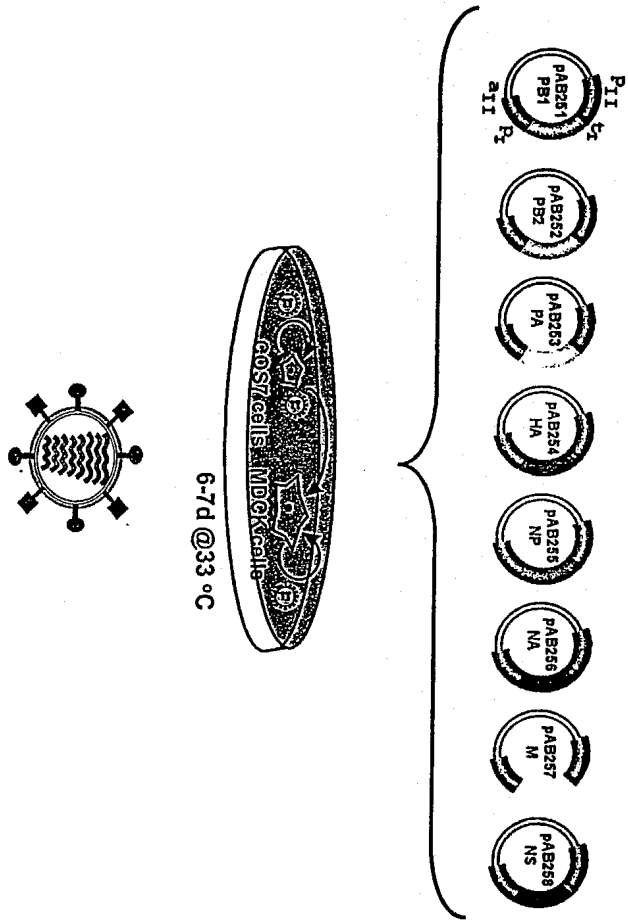
도면2



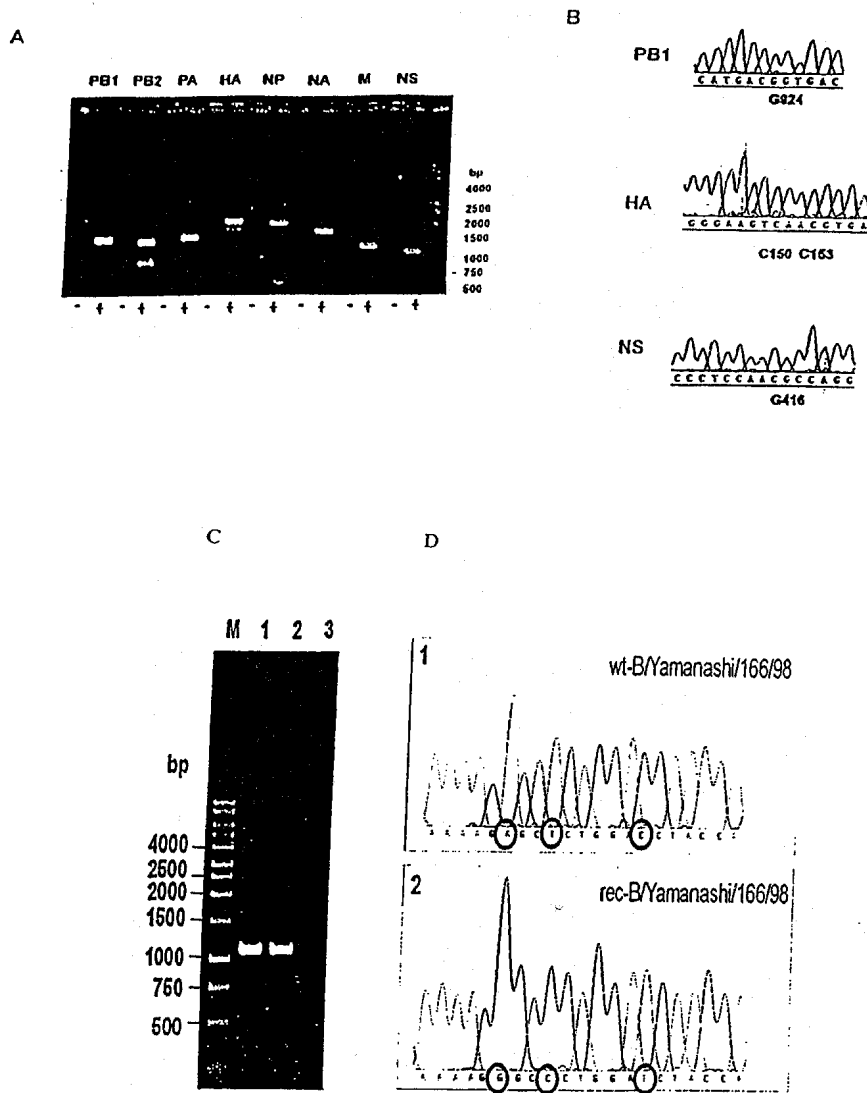
도면3



도면4



도면5



도면6a

Genbank 포맷에서의 서열 (SEQ ID NO:75)

LOCUS OAD3000 2836 bp DNA circular 14-JAN-2002
 DEFINITION Derivative of pMW2000 with SV40 PolyA Signal replacing BGH

FEATURES
 Location/Qualifiers
 promoter 2420..2799
 /vntifkey="29"
 /label=pCMV
 /note="truncated CMV promoter (corresponding to 484-863
 region of pcDNA3)"
 misc_marker 1422..2282
 /vntifkey="22"
 /label=bla
 /note="beta lactamase"
 rep_origin 612..1172
 /vntifkey="33"
 /label=Col\Elori
 /note="Col El replication origin"
 terminator 11..45
 /vntifkey="43"
 /label=tI
 /note="Pol I terminator"
 promoter complement(65..276)
 /vntifkey="29"
 /label=PolI
 /note="Human Pol I Promoter"
 exon 296..430
 /vntifkey="61"
 /label=pA
 /note="pA(SV40)"

BASE COUNT 717 a 734 c 703 g 682 t

ORIGIN
 1 ctagcagtta accggagtagc tggtagacct ccgaagtgg gggggaggag acggtaccgt
 61 ctccaataac ccggcggccc aaaatgccga ctccgagcga aagatatacc tccccccggg
 121 ccgggagggtc gcgtcaccga ccacgccgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg
 181 tccccaaaaa cgcaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggtaaccc
 241 caggacacac gcgggagcag ccgcggggccg gggacgccct ccggcggtc acctcagaca
 301 tgataagata cattgatgag ttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct
 361 ttattttgtga aatttgtagt gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac
 421 aaggatctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgag tattggggcg
 481 tcttcgcgtt cctcgcctac tgactcgcgt gcgtcggctg ttcggctgcg gcgagcggta
 541 tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag
 601 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
 661 tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaata atcgacgctc aagtcagagg
 721 tggcgaaacc cgcagagact ataaagatac caggcggttc cccctggaag ctccctcggt
 781 cgctctctct tcccgacctt gccgcttacc ggataactgt ccgctttctt ccttcgggga
 841 agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc
 901 tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt
 961 aactatcgtc ttggttcaaa cccggtagga cccgacttgc cgcactggc agcagccact
 1021 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgta cagagttctt gaagtgggtg
 1081 cctaacctacg gctacactag aaggacagta ttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
 1141 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg
 1201 ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
 1261 ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaaacgaa actcacgtta agggattttg
 1321 gtcagtgaat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt

도면6b

1381 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt
 1441 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcttg actccccgtc
 1501 gtgtagataaa ctacgatacg ggagggttta ccacttgccc ccagtgtgac aatgataaccg
 1561 cgagaccacac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaaggcc
 1621 gagcgagaaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgcgg
 1681 gaagctagag taagtatttc gccagttaat agtttgccga acggtgtgac cattgtctaca
 1741 ggcacgtgtg tgtcagctgc gtcgttllgyl alggcttcat tcagctccgg ttcccaacga
 1801 tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggtttagctc cttcggctct
 1861 ccgatcgttg tcaagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg
 1921 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca
 1981 accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cagaccagtt gctcttgccc ggcgtcaata
 2041 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact tlaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct
 2101 tggggcgcaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact
 2161 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa
 2221 acaggaaggc aaaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca caggaaatg ttgaatactc
 2281 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga
 2341 tacatatatt aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga
 2401 aaagtgccac ctgacgtcga tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa
 2461 tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttccctac ttggcagtag
 2521 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg ttggcagta catcaatggg
 2581 cgtggatagc ggtttgactc acgggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg
 2641 agttttgttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaaa gtcgtaacaa ctccgcccca
 2701 ttgacgcaaa tggcggttag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg
 2761 ctaactagag aaccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctatagggag
 2821 aqccaagctg ttaacg

도면7a

8 플라스미드 중에 (PAB12[N-세그먼트])중에 CDNA와
MDV-B의 일치 서열의 배열

<u>PB1</u>	
	* 20 * 40 *
pAB121-PB1 :	50
MDV-B-PB1 :	50
AGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATGAATATAAATCCTTATTTCTCTTCAT	
	60 * 80 * 100
pAB121-PB1 :	100
MDV-B-PB1 :	100
AGATGTACCCATACAGGCAGCAATTTCAACAACATTTCCCATACACCGGTG	
	* 120 * 140 *
pAB121-PB1 :	150
MDV-B-PB1 :	150
TTCCCCCTTATTTCCCATGGAACGGGAACAGGCTACACAATAGACACCGTG	
	160 * 180 * 200
pAB121-PB1 :	200
MDV-B-PB1 :	200
ATTAGAACACATGAGTACTCAAACAAGGGAACAATACATTTCTGATGT	
	* 220 * 240 *
pAB121-PB1 :	250
MDV-B-PB1 :	250
TACAGGATGTGCAATGGTAGATCCAACAATGGGCCATTACCCGAAGATA	
	260 * 280 * 300
pAB121-PB1 :	300
MDV-B-PB1 :	300
ATGAGCCGAGTGCCTATGCACAATTGGATTGCGTTCTGGAGGCTTGGAT	
	* 320 * 340 *
pAB121-PB1 :	350
MDV-B-PB1 :	350
AGAAATGGATGAAGAACATCCAGGTCTGTTTCAAGCAGCCTCAGAGAATGC	
	360 * 380 * 400
pAB121-PB1 :	400
MDV-B-PB1 :	400
CATGGAGGCACTAATGGTCACAACCTGTAGACAAATTAACCCAGGGGAGAC	
	* 420 * 440 *
pAB121-PB1 :	450
MDV-B-PB1 :	450
AGACTTTTGATTGGACAGTGTGCAGAAACCACTGCTGCAACGGCACTG	
	460 * 480 * 500
pAB121-PB1 :	500
MDV-B-PB1 :	500
AACACAACAATAACCTCTTTTAGGTTGAATGATTGAATGGAGCCGACAA	

도면7b

```

      *      520      *      540      *
pAB121-PB1 : ..... : 550
MDV-B-PB1 : ..... : 550
           GGGTGGATTAGTACCCCTTTGCCAAGATATCATTGATTCATTGGACAAAC

      560      *      580      *      600
pAB121-PB1 : ..... : 600
MDV-B-PB1 : ..... : 600
           CTGAAATGACTTTCTTCTCGGTAAAGAAATATAAGAAAAAATGCCTGCT

      *      620      *      640      *
pAB121-PB1 : ..... : 650
MDV-B-PB1 : ..... : 650
           AAAAAACAGAAAGGGTTTCCTCATAAAGAGAAATACCAATGAAGGTAAAAGA

      660      *      680      *      700
pAB121-PB1 : ..... : 700
MDV-B-PB1 : ..... : 700
           CAGAAATAACAGAGTGGAAATACATCAAAGAGCATTATCATTAAACACAA

      *      720      *      740      *
pAB121-PB1 : ..... : 750
MDV-B-PB1 : ..... : 750
           TGACAAAAGATGCTGAAAGAGGCAAACTAAAAAGAGCAATTGCCACC

      760      *      780      *      800
pAB121-PB1 : ..... : 800
MDV-B-PB1 : ..... : 800
           GCTGGGATACAAATCAGAGGGTTTGTATTAGTAGTTGAAAACCTGGCTAA

      *      820      *      840      *
pAB121-PB1 : ..... : 850
MDV-B-PB1 : ..... : 850
           AAATATCTGTGAAAATCTAGAACAAAGTGGTTTGCCAGTAGTGGGAACG

      860      *      880      *      900
pAB121-PB1 : ..... : 900
MDV-B-PB1 : ..... : 900
           AGAAGAAGGCCAAACTGTCAAATGCAGTGGCCAAATGCTCAGTAAGTGC

      *      920      *      940      *
pAB121-PB1 : ..... : 950
MDV-B-PB1 : ..... : 950
           CCACCAGGAGGGATCAGCATGACAGTGACAGGAGACAATACTAAATGGAA

      960      *      980      *      1000
pAB121-PB1 : ..... : 1000
MDV-B-PB1 : ..... : 1000
           TGAATGCTTAAATCCAAGAATCTTTTGGCTATGACTGAAAGAATAACCA

      *      1020      *      1040      *
pAB121-PB1 : ..... : 1050
MDV-B-PB1 : ..... : 1050
           GAGACAGCCCAATTGGTTCCGGGATTTTGTAGTATAGCACCGGTCTTG

```

도면7c

```

      1060      *      1080      *      1100
pAB121-PB1 : ..... : 1100
MDV-B-PB1 : ..... : 1100
      TTCTCCAATAAAATAGCCAGATTGGGAAAAGGTTTCATGATAACAAGCAA

      *      1120      *      1140      *
pAB121-PB1 : ..... : 1150
MDV-B-PB1 : ..... : 1150
      AACAAAAAGACTGAAGGCTCAAATACCTTGTCCTGATCTGTTTAAATATAC

      1160      *      1180      *      1200
pAB121-PB1 : ..... : 1200
MDV-B-PB1 : ..... : 1200
      CATTAGAAAGATATAATGAAGAAACAAGGGCAAAATTAAAAAAGCTGAAA

      *      1220      *      1240      *
pAB121-PB1 : ..... : 1250
MDV-B-PB1 : ..... : 1250
      CCATTCTTCAATGAAGAAGGAACGGCATCTTTGTCGCTGGGATGATGAT

      1260      *      1280      *      1300
pAB121-PB1 : ..... : 1300
MDV-B-PB1 : ..... : 1300
      GGGAAATGTTTAAATATGCTATCTACCGTGTGGGAGTAGCCGCACTAGGGA

      *      1320      *      1340      *
pAB121-PB1 : ..... : 1350
MDV-B-PB1 : ..... : 1350
      TCAAAAACATTGGAAACAAAGAATACTTATGGGATGGACTGCAATCTTCT

      1360      *      1380      *      1400
pAB121-PB1 : ..... : 1400
MDV-B-PB1 : ..... : 1400
      GATGATTTTGCTCTGTTTGTTAATGCAAAAGATGAAGAGACATGTATGGA

      *      1420      *      1440      *
pAB121-PB1 : ..... : 1450
MDV-B-PB1 : ..... : 1450
      AGGAATAAACGATTTTACCGAACATGTAAGCTATTGGGAATAAACATGA

      1460      *      1480      *      1500
pAB121-PB1 : ..... : 1500
MDV-B-PB1 : ..... : 1500
      GCAAAAAGAAAAAGTTACTGTAATGAACTGGAATGTTTGAATTACAAGC

      *      1520      *      1540      *
pAB121-PB1 : ..... : 1550
MDV-B-PB1 : ..... : 1550
      ATGTTCTACAGAGATGGATTGTATCTAATTTGCAATGGAACCTCCTTC

      1560      *      1580      *      1600
pAB121-PB1 : ..... : 1600
MDV-B-PB1 : ..... : 1600
      ATTTGGAGTTGCTGGAGTAAATGAATCAGCAGATATGGCAATAGGAATGA

```

도면7d

```

      *      1620      *      1640      *
pAB121-PB1 : ..... : 1650
MDV-B-PB1 : ..... : 1650
           CAATAATAAAGAACAAATATGATCAACAATGGGATGGGTCCAGCAACAGCA

      1660      *      1680      *      1700
pAB121-PB1 : ..... : 1700
MDV-B-PB1 : ..... : 1700
           CAAACAGCCATACAAATTATTCATAGCTGATTATAGATACACCTACAAATG

      *      1720      *      1740      *
pAB121-PB1 : T..... : 1750
MDV-B-PB1 : ..... : 1750
           CCACAGGGGAGATTCCAAAGTGAAGGAAAGAGAATGAAAATTATAAAGG

      1760      *      1780      *      1800
pAB121-PB1 : ..... : 1800
MDV-B-PB1 : ..... : 1800
           AGCTATGGGAAAACTAAAGGAAGAGATGGTCTGTTAGTAGCAGATGTT

      *      1820      *      1840      *
pAB121-PB1 : ..... : 1850
MDV-B-PB1 : ..... : 1850
           GGGCCTAACATTTACAATTGAGAACTTGCAATATCCAGAAATAGTATT

      1860      *      1880      *      1900
pAB121-PB1 : ..... : 1900
MDV-B-PB1 : ..... : 1900
           AAAGTACAACCTAATGGACCTGAATACAAAGGGCGTTACTGCATCCTC

      *      1920      *      1940      *
pAB121-PB1 : ..... : 1950
MDV-B-PB1 : ..... : 1950
           AAAATCCCTTTGTAGGACATTTGTCTATTGAGGGCATCAAAGAGGCAGAT

      1960      *      1980      *      2000
pAB121-PB1 : ..... : 2000
MDV-B-PB1 : ..... : 2000
           ATAACCCAGCACATGGTCCAGTAAAGAAAATGGACTATGATGCGGTATC

      *      2020      *      2040      *
pAB121-PB1 : ..... : 2050
MDV-B-PB1 : ..... : 2050
           TGGAACTCATAGTTGGAGAACCAAAGGAACAGATCTATACTAAACACTG

      2060      *      2080      *      2100
pAB121-PB1 : ..... : 2100
MDV-B-PB1 : ..... : 2100
           ATCAGAGGAACATGATTCTTGAGGAACAATGCTACGCTAAGTGTGCAAC

      *      2120      *      2140      *
pAB121-PB1 : ..... : 2150
MDV-B-PB1 : ..... : 2150
           CTTTTTGAGGCCTGTTTAAACAGTGCATCATACAGAAACCAGTAGGTCA

```

도면7e

```

      2160      *      2180      *      2200
pAB121-PB1 : ..... : 2200
MDV-B-PB1 : ..... : 2200
           GCACAGCATGCTTGAGGCTATGGCCACAGATTAAGAATGGATGCACGAC

      *      2220      *      2240      *
pAB121-PB1 : ..... : 2250
MDV-B-PB1 : ..... : 2250
           TAGATTATGAATCAGGAAGAATGTCAAAGGATGATTTGAGAAAGCAATG

      2260      *      2280      *      2300
pAB121-PB1 : ..... : 2300
MDV-B-PB1 : ..... : 2300
           GCTCACCTTGGTGAGATTGGGTACATATAAGCTTCGAAGATGCTATGGG

      *      2320      *      2340      *
pAB121-PB1 : ..... : 2350
MDV-B-PB1 : ..... : 2350
           GTTATTGGTCATCATTGAATACATGCGGTACACAAATGATTAAATGAAA

      2360
pAB121-PB1 : ..... : 2369
MDV-B-PB1 : ..... : 2369
           AAAGGCTCGTGTCTTCTACT

```

도면7f

PB2		
	* 20 * 40 *	
pAB122-PB2	:	: 50
MDV-B-PB2	:	: 50
	AGCAGAAGCGGAGCGTTTCAAGATGACATTGGCCAAAATTGAATTGTTA	
	60 * 80 * 100	
pAB122-PB2	:	: 100
MDV-B-PB2	:	: 100
	AAACAACCTGTTAAGGGACAATGAAGCCAAAACGGTATTGAAACAAACAAC	
	* 120 * 140 *	
pAB122-PB2	:	: 150
MDV-B-PB2	:	: 150
	GGTAGACCAATATAACATAATAAGAAAATTCAATACATCAAGAATTGAAA	
	160 * 180 * 200	
pAB122-PB2	:	: 200
MDV-B-PB2	:	: 200
	AGAACCCCTTCATTAGGATGAAGTGGGCCATGTGTCTTAATTTCCCTTG	
	* 220 * 240 *	
pAB122-PB2	:	: 250
MDV-B-PB2	:	: 250
	GCTCTGACCAAGGGTGATATGGCAAATAGAATCCCTTGGAATACAAGGG	
	260 * 280 * 300	
pAB122-PB2	:	: 300
MDV-B-PB2	:	: 300
	AATACAACCTTAAACAAATGCTGAAGACATAGGAACCAAGGCCAAATGT	
	* 320 * 340 *	
pAB122-PB2	:	: 350
MDV-B-PB2	:	: 350
	GCTCAATAGCAGCAGTTACCTGGTGAATACATATGGACCAATAGGAGAT	
	360 * 380 * 400	
pAB122-PB2	:	: 400
MDV-B-PB2	:	: 400
	ACTGAAGGTTTCGAAAAGGTCTACGAAAGCTTTTTTCTCAGAAAGATGAG	
	* 420 * 440 *	
pAB122-PB2	:	: 450
MDV-B-PB2	:	: 450
	ACTTGACAATGCCACTTGGGGCCGAATAACTTTTGGCCCAGTTGAAAGAG	
	460 * 480 * 500	
pAB122-PB2	:	: 500
MDV-B-PB2	:	: 500
	TGAGAAAAAGGGTACTGCTAAACCTCTCACCAAGGAAATGCCTCCAGAT	
	* 520 * 540 *	
pAB122-PB2	:	: 550
MDV-B-PB2	:	: 550
	GAAGCGAGCAATGTGATAATGGAATATTGTTCCCTAAAGAAGCAGGAAT	

도면7g

	560	*	580	*	600	
pAB122-PB2	:		:	600		
MDV-B-PB2	:		:	600		
		ACCAAGAGAATCTACTTGGATACATAGGGAAGTATGATAAAAGAAAAAGAG				
		*	620	*	640	*
pAB122-PB2	:		:	650		
MDV-B-PB2	:		:	650		
		AAAAATGAAAGGAACGATGATAACTCCATTGTACTGGCATACATGCTT				
		660	*	680	*	700
pAB122-PB2	:		:	700		
MDV-B-PB2	:		:	700		
		GAGAGAGAACTGGTTGCCGAAGAAGTTCCTGCCAGTGGCAGGAGCAAC				
		*	720	*	740	*
pAB122-PB2	:		:	750		
MDV-B-PB2	:		:	750		
		ATCAGCCGAGTTCATAGAAATGCTACACTGCTTACAAGGTGAAAATTGGA				
		760	*	780	*	800
pAB122-PB2	:		:	800		
MDV-B-PB2	:		:	800		
		GACAAATATATCACCCAGGAGGAATAAACTAAGTGAATCTAGGTCTCAA				
		*	820	*	840	*
pAB122-PB2	:		:	850		
MDV-B-PB2	:		:	850		
		TCAATGATTGTAGCTTGTAGAAAAATATCAGAAGATCAATAGTCGCATC				
		860	*	880	*	900
pAB122-PB2	:		:	900		
MDV-B-PB2	:		:	900		
		AAACCCACTAGAGCTAGCTGTAGAAATTGCAAAACAGACTGTGATAGATA				
		*	920	*	940	*
pAB122-PB2	:		:	950		
MDV-B-PB2	:		:	950		
		CTGAACCTTTAAAAATCATGTCTGGCAGCCATAGACGGAGGTGATGTAGCC				
		960	*	980	*	1000
pAB122-PB2	:		:	1000		
MDV-B-PB2	:		:	1000		
		TGTGACATAATAAGAGCTGCATTAGGACTAAAGATCAGACAAAGACAAAG				
		*	1020	*	1040	*
pAB122-PB2	:		:	1050		
MDV-B-PB2	:		:	1050		
		ATTTGGACGGCTTGAAGTAAAGAGAAATATCAGGAAGAGGATTCAAAAAATG				
		1060	*	1080	*	1100
pAB122-PB2	:		:	1100		
MDV-B-PB2	:		:	1100		
		ATGAAGAAATATTAATCGGGAACGGAACAATACAGAAAAATTGGAATATGG				

도면7h

```

      *      1120      *      1140      *
pAB122-PB2 : ..... : 1150
MDV-B-PB2  : ..... : 1150
              GACGGAGAAGAGGAGTTCCATGTAAGATGTGGTGAATGCAGGGGAATATT

      1160      *      1180      *      1200
pAB122-PB2 : ..... : 1200
MDV-B-PB2  : ..... : 1200
              AAAAAAGAGCAAAATGAGAAATGGAAAACTACTAATAAATTCAGCCAAAA

      *      1220      *      1240      *
pAB122-PB2 : ..... : 1250
MDV-B-PB2  : ..... : 1250
              AGGAGGACATGAAAGATTTAATAATCTTGTGCATGGTATTTTCTCAAGAC

      1260      *      1280      *      1300
pAB122-PB2 : ..... : 1300
MDV-B-PB2  : ..... : 1300
              ACTAGGATGTTCCAAGGAGTGAGAGGAGAAATAAATTTCTTAATCGAGC

      *      1320      *      1340      *
pAB122-PB2 : ..... : 1350
MDV-B-PB2  : ..... : 1350
              AGGCCAACTTTTATCTCCAATGTACCAACTCCAGCGATATTTTGAATA

      1360      *      1380      *      1400
pAB122-PB2 : ..... : 1400
MDV-B-PB2  : ..... : 1400
              GGAGCAACGACCTTTTGTGATCAATGGGGGTATGAGGAATCACCCAAAGCA

      *      1420      *      1440      *
pAB122-PB2 : ..... : 1450
MDV-B-PB2  : ..... : 1450
              AGTGAACATACATGGGATAAATGAATTAATGAATGCATCTGACTATACGTT

      1460      *      1480      *      1500
pAB122-PB2 : ..... : 1500
MDV-B-PB2  : ..... : 1500
              GAAAGGGTTGTAGTAACAAAAATGTGATTGATGACTTTAGTTCTACTG

      *      1520      *      1540      *
pAB122-PB2 : ..... : 1550
MDV-B-PB2  : ..... : 1550
              AAACAGAAAAAGTATCTATAACAAAAATCTTAGTTAATAAAAAGGACT

      1560      *      1580      *      1600
pAB122-PB2 : ..... : 1600
MDV-B-PB2  : ..... : 1600
              GGGGAAGTCATAATGGGGCTAATGACGTAAGTGAATTAGAATCACAAGC

      *      1620      *      1640      *
pAB122-PB2 : ..... : 1650
MDV-B-PB2  : ..... : 1650
              ACAGCTAATGATAACATATGATACACCTAAGATGTGGGAGATGGGAACAA

```

도면7i

```

      1660      *      1680      *      1700
pAB122-PB2 : ..... : 1700
MDV-B-PB2 : ..... : 1700
      CCAAAGAACTGGTGCAAAACACCTACCAATGGGTGCTAAAAAATTTGGTA

      *      1720      *      1740      *
pAB122-PB2 : ..... : 1750
MDV-B-PB2 : ..... : 1750
      ACACTGAAGGCTCAGTTTCTTCTGGGAAAAGACATGTTCCAATGGGA

      1760      *      1780      *      1800
pAB122-PB2 : ..... : 1800
MDV-B-PB2 : ..... : 1800
      TGCATTTGAAGCATTGAAAGCATAATCCCCCAGAAGATGGCTGGCCAGT

      *      1820      *      1840      *
pAB122-PB2 : ..... : 1850
MDV-B-PB2 : ..... : 1850
      ACAGTGGATTGTCGAAGAGCAGTGCTCAACAAATGAGAGACCAAGAGGTT

      1860      *      1880      *      1900
pAB122-PB2 : ..... : 1900
MDV-B-PB2 : ..... : 1900
      ATGAAACTGACCCAGTTTCATAAAGTTGTGCTTTCTGTTTCTCACCACC

      *      1920      *      1940      *
pAB122-PB2 : ..... : 1950
MDV-B-PB2 : ..... : 1950
      AAAATTAAAGGAGAAATGGGAGCCTTATCAATTCTTGAGGCTTATGTTGA

      1960      *      1980      *      2000
pAB122-PB2 : ..... : 2000
MDV-B-PB2 : ..... : 2000
      AGGGAGGAGGGGAAAAATTCATCGAAGTAAGGAAAGGGTCCCTCTATTC

      *      2020      *      2040      *
pAB122-PB2 : ..... : 2050
MDV-B-PB2 : ..... : 2050
      TCCTACAATCCACAAACAGAAGTCCTAACATATGCGGCAGAAATGATGTC

      2060      *      2080      *      2100
pAB122-PB2 : ..... : 2100
MDV-B-PB2 : ..... : 2100
      ATTAAAAAGGAAAAATGAAGATGAAGAAAGGAATAGATCAATGGGGAATG

      *      2120      *      2140      *
pAB122-PB2 : ..... : 2150
MDV-B-PB2 : ..... : 2150
      CAGTATTGGCAGGCTTCTCGTTAGTGGCAAGTATGACCCAGATCTTGGA

      2160      *      2180      *      2200
pAB122-PB2 : ..... : 2200
MDV-B-PB2 : ..... : 2200
      GATTTCAAAACATATTGAAGAACTTGAAAAGCTAAAACCGGGGAAAAAAGC

```

도면7j

```

      *      2220      *      2240      *
pAB122-PB2 : ..... : 2250
MDV-B-PB2 : ..... : 2250
      AAACATCTTACTTTATCAAGGAAAGCCCGTTAAAGTAGTTAAAAGGAAAA

      2260      *      2280      *      2300
pAB122-PB2 : ..... : 2300
MDV-B-PB2 : ..... : 2300
      GATATAGTGCTTTATCCAATGACATTTCAAGGAATTAAGAGACAAAGA

      *      2320      *      2340      *
pAB122-PB2 : ..... : 2350
MDV-B-PB2 : ..... : 2350
      ATGACAGTTGAGTCCATGGGTGGGCTTGAGCTAATATAAATTTATCCA

      2360      *      2380      *
pAB122-PB2 : ..... : 2396
MDV-B-PB2 : ..... : 2396
      TTAATTCAATAGACACAAATGAGTGAAAAATGCTCGTGTCTTCTACT

```

도면7k

PA		*	20	*	40	*
pAB123-PA	:					50
MDV-B-PA	:					50
		AGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTTGCCATAATGGATACTTTATTACAAGA				
		60	*	80	*	100
pAB123-PA	:					100
MDV-B-PA	:					100
		AACTTCCAGACTACAATAATACAAAAGGCCAAAAACAAATGGCAGAATT				
		*	120	*	140	*
pAB123-PA	:					150
MDV-B-PA	:					150
		TAGTGAAGATCCTGAATTACAACCAGCAATGCTATTCAACATCTGCGTCC				
		160	*	180	*	200
pAB123-PA	:					200
MDV-B-PA	:					200
		ATCTGGAGGTCTGCTATGTAATAAGTGATATGAATTTCTTGATGAAGAA				
		*	220	*	240	*
pAB123-PA	:					250
MDV-B-PA	:					250
		GGAAAAACATATACAGCATTAGAAGGACAAGGAAAAGAACAAAACTTGAG				
		260	*	280	*	300
pAB123-PA	:					300
MDV-B-PA	:					300
		ACCACAATATGAAGTGATTGAGGGAATGCCAAGAAACATAGCATGGATGG				
		*	320	*	340	*
pAB123-PA	:					350
MDV-B-PA	:					350
		TTCAAAGATCCTTAGCCCAAGAGCATGGAATAGAGACTCCAAGGTATCTG				
		360	*	380	*	400
pAB123-PA	:					400
MDV-B-PA	:					400
		GCTGATTTGTTTCGATTATAAAACCAAGAGGTTTATAGAAGTTGGAATAAC				
		*	420	*	440	*
pAB123-PA	:					450
MDV-B-PA	:					450
		AAAGGGATTGGCTGACGATTACTTTTGAAAAAGAAAAGCTGGGGA				
		460	*	480	*	500
pAB123-PA	:					500
MDV-B-PA	:					500
		ATAGCATGGAACATGATGATATTCAGCTACAATCAAGACTATTTCGTTAAGT				
		*	520	*	540	*
pAB123-PA	:					550
MDV-B-PA	:					550
		AATGAATCCTCATTTGGATGAGGAAGGAAAAGGAGAGTGCTAAGCAGACT				
		560	*	580	*	600

도면71

```

pAB123-PA : ..... : 600
MDV-B-PA : ..... : 600
          CACAGAACTTCAGGCTGAGTTAAGTCTGAAAAATCTATGGCAAGTTCTCA

          *          620          *          640          *
pAB123-PA : ..... : 650
MDV-B-PA : ..... : 650
          TAGGAGAAGAAGATATTGAAAAAGGAATTGACTTCAAAGCTGGACAAACA

          660          *          680          *          700
pAB123-PA : ..... : 700
MDV-B-PA : ..... : 700
          ATATCTAAACTAAGGGATATATCTGTCCAGCTGGTTTCTCCAATTTGA

          *          720          *          740          *
pAB123-PA : ..... : 750
MDV-B-PA : ..... : 750
          AGGAATGAGGAGCTACATAGACAATATAGATCCTAAAGGAGCAATAGAGA

          760          *          780          *          800
pAB123-PA : ..... : 800
MDV-B-PA : ..... : 800
          GAAATCTAGCAAGGATGCTCCCTTAGTATCAGTTACACCTAAAAAGTTG

          *          820          *          840          *
pAB123-PA : ..... : 850
MDV-B-PA : ..... : 850
          AAATGGGAGGACCTAAGACCAATAGGGCCTCACATTTACAACCATGAGCT

          860          *          880          *          900
pAB123-PA : ..... : 900
MDV-B-PA : ..... : 900
          ACCAGAAGTTCCATATAATGCCTTTCTTCTAATGTCTGATGAGTTGGGGC

          *          920          *          940          *
pAB123-PA : ..... : 950
MDV-B-PA : ..... : 950
          TGGCTAATATGACTGAAGGGAAGTCCAAGAAACCGAAGACCTTAGCCAAA

          960          *          980          *          1000
pAB123-PA : ..... : 1000
MDV-B-PA : ..... : 1000
          GAATGTCTAGAAAAGTACTCAACACTACGGGATCAAAGTACCCAATATT

          *          1020          *          1040          *
pAB123-PA : ..... : 1050
MDV-B-PA : ..... : 1050
          AATAATGAAAAGCGAAAAAGCTAACGAAAACCTCTTATGGAAGCTGTGGA

          1060          *          1080          *          1100
pAB123-PA : ..... : 1100
MDV-B-PA : ..... : 1100
          GGGACTGTGTAATACAATAAGTAATGAGGAAACAGTAACGAATTACAG

```

도면7m

```

      *      1120      *      1140      *
pAB123-PA : ..... : 1150
MDV-B-PA : ..... : 1150
      AAAACCAATTATGCCAAGTGGGCCACAGGAGATGGATTACATACCAGAA

      1160      *      1180      *      1200
pAB123-PA : ..... : 1200
MDV-B-PA : ..... : 1200
      AATAATGAAAGAAGTAGCAATAGATGACGAAACATGTACCAAGAAGAGC

      *      1220      *      1240      *
pAB123-PA : ..... : 1250
MDV-B-PA : ..... : 1250
      CCAAAATACCTAACAAATGTAGAGTGGCTGCTTGGGTTCAACAGAGATG

      1260      *      1280      *      1300
pAB123-PA : ..... : 1300
MDV-B-PA : ..... : 1300
      AATCTATTGAGCACTCTGACAAGTAAAGGGCCCTGGATCTACCAGAAAT

      *      1320      *      1340      *
pAB123-PA : ..... : 1350
MDV-B-PA : ..... : 1350
      AGGGCCAGACGTAGCACCCATGGAGCATGTAGGGAGTGAAAGAAGGAAAT

      1360      *      1380      *      1400
pAB123-PA : ..... : 1400
MDV-B-PA : ..... : 1400
      ACTTTGTTAATGAAATCACTACTGTAAAGGCCTTACCGTTATGATGAAG

      *      1420      *      1440      *
pAB123-PA : ..... : 1450
MDV-B-PA : ..... : 1450
      TATGTACTTTTTCACACTTCATTATTAATGAAAGCAATGCCAGCATGGG

      1460      *      1480      *      1500
pAB123-PA : ..... : 1500
MDV-B-PA : ..... : 1500
      AAAATATAAGTAATACCAATAACCAACAGAGTAGTAAATGAAAAAGGAG

      *      1520      *      1540      *
pAB123-PA : ..... : 1550
MDV-B-PA : ..... : 1550
      AAAGTTTGAATGCTTCATGGTCTGGCGGTTAAAGGGCAATCTCATCTG

      1560      *      1580      *      1600
pAB123-PA : ..... : 1600
MDV-B-PA : ..... : 1600
      AGGGGAGATACTGATGTTGTAAAGTTGTGACTTTCGAATTTAGTAGTAC

      *      1620      *      1640      *
pAB123-PA : ..... : 1650
MDV-B-PA : ..... : 1650
      AGATCCAGAGTGGACTCAGGAAAGTGGCCAAAATATACTGTATTAGAA

```

도면7n

```

      1660      *      1680      *      1700
pAB123-PA : ..... : 1700
MDV-B-PA : ..... : 1700
      TTGGCTCCTTATTTGTGAGTGGAAGGGAAAAATCTGTGTACCTATATTGC

      *      1720      *      1740      *
pAB123-PA : ..... : 1750
MDV-B-PA : ..... : 1750
      CGAGTGAATGGTACAAATAAGATCCAAATGAAATGGGGAATGGAAGCTAG

      1760      *      1780      *      1800
pAB123-PA : ..... : 1800
MDV-B-PA : ..... : 1800
      AAGATGTCTGCTTCAATCAATGCAACAAATGGAAGCAATTGTTGAACAAG

      *      1820      *      1840      *
pAB123-PA : ..... : 1850
MDV-B-PA : ..... : 1850
      AATCATCGATACAAGGATATGACATGACCAAAGCTTGTTCAGGGAGAC

      1860      *      1880      *      1900
pAB123-PA : ..... : 1900
MDV-B-PA : ..... : 1900
      AGAGTGAATAGTCCCAAACTTTCAGTATTGGGACTCAAGAAGGAAACT

      *      1920      *      1940      *
pAB123-PA : ..... : 1950
MDV-B-PA : ..... : 1950
      AGTAAAAGGATCCTTTGGGAAAGCACTAAGAGTAATATTCACCAATGTT

      1960      *      1980      *      2000
pAB123-PA : ..... : 2000
MDV-B-PA : ..... : 2000
      TGATGCACTATGTATTTGGAAATGCCCAATTGGAGGGGTTTAGTGCCGAA

      *      2020      *      2040      *
pAB123-PA : ..... : 2050
MDV-B-PA : ..... : 2050
      TCTAGGAGACTTCTACTGTTAATTCAGGCATTAAAGGACAGAAAGGCCCC

      2060      *      2080      *      2100
pAB123-PA : ..... : 2100
MDV-B-PA : ..... : 2100
      TTGGGTATTTCGACTTAGAGGGAATGTATTCTGGAATAGAAGAATGTATTA

      *      2120      *      2140      *
pAB123-PA : ..... : 2150
MDV-B-PA : ..... : 2150
      GTAACAACCTTTGGGTAATACAGAGTGCATACTGGTTTAAATGAATGGTTG

      2160      *      2180      *      2200
pAB123-PA : ..... : 2200
MDV-B-PA : ..... : 2200
      GGCTTTGAAAAAGAGGGGAGTAAAGTATTAGAATCAATAGATGAAATAAT

```

도면7o

```

      *      2220      *      2240      *
pAB123-PA : ..... : 2250
MDV-B-PA : ..... : 2250
      GGATGAATGAAGAAGGGCATAGCGCTCAATTGTTACTATTTTGTTCAT

      2260      *      2280      *      2300
pAB123-PA : ..... : 2300
MDV-B-PA : ..... : 2300
      TATGTATCTAAACATCCAATAAAAAGAATTGAGAATTAATAATGCACGTG

pAB123-PA : ..... : 2308
MDV-B-PA : ..... : 2308
      TTTCTACT

```

도면7p

HA					
		*	20	*	40
MDV-B-HA	:				50
pAB124-HA	:				50
		AGCAGAAGCAGAGCATTTCCTAATATCCACAAAATGAAGGCAATAATTGT			
		60	*	80	*
MDV-B-HA	:				100
pAB124-HA	:				100
		ACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGGATAA			
		*	120	*	140
MDV-B-HA	:				150
pAB124-HA	:				150
		CATCGTCAAACTCACCCATGTGGTCAAACTGCTACTCAAGGGGAAGTC			
		160	*	180	*
MDV-B-HA	:				200
pAB124-HA	:				200
		AACGTGACTGGTGTGATACCACTGACAACAACACCTACCAAATCTCATT			
		*	220	*	240
MDV-B-HA	:				250
pAB124-HA	:				250
		TGCAAACTCTCAAAGGAACACAGACCAGAGGGAACTATGCCCAAACCTGTC			
		260	*	280	*
MDV-B-HA	:				300
pAB124-HA	:				300
		TCAACTGCACAGATCTGGACGTGGCCTTGGGCAGACCAAAGTGATGGGG			
		*	320	*	340
MDV-B-HA	:				350
pAB124-HA	:				350
		ACCATACCTTCGGCAAAGCTTCAATACTCCACGAAGTCAAACCTGTTAC			
		360	*	380	*
MDV-B-HA	:				400
pAB124-HA	:				400
		ATCTGGGTGCTTTCCTATAATGCACGACAGAACAAAATCAGACAGCTAC			
		*	420	*	440
MDV-B-HA	:				450
pAB124-HA	:				450
		CCAAATCTTCTCAGAGGATATGAAAATATCAGGTTATCAGCCCCTAACGTT			
		460	*	480	*
MDV-B-HA	:				500
pAB124-HA	:				500
		ATCAACGCAGAAACGGCACCAGGAGGACCCTACATAGTTGGAACCTCAGG			
		*	520	*	540
MDV-B-HA	:				550
pAB124-HA	:				550
		ATCTTGCCCTAACGTTACCAATGGGAAAGGATTCTTCGCAACAATGGCTT			
		560	*	580	*
					600

도면7q

MDV-B-HA	:		:	600
pAB124-HA	:		:	600
		GGGCTGTCCCAAAAAACAACAAACCAAAACAGCAACGACCCATTAAACA		
		* 620 * 640 *		
MDV-B-HA	:		:	650
pAB124-HA	:		:	650
		GTAGAAGTACCATACATTTGTACAAAAGGAGAAGACCAATTACTGTTTG		
		660 * 680 * 700		
MDV-B-HA	:		:	700
pAB124-HA	:		:	700
		GGGGTTCATTCTGTATGACGAAACCCAAATGGTAACACTCTATGGAGACT		
		* 720 * 740 *		
MDV-B-HA	:		:	750
pAB124-HA	:		:	750
		CGAAGCCTCAAAAGTTCACCTCATCTGCCAACGGAGTAACCAACACATTAT		
		760 * 780 * 800		
MDV-B-HA	:		:	800
pAB124-HA	:		:	800
		GTTTCTCAGATTGGTGGCTTCCCAATCAACAGAGAGCAAGGGCTACC		
		* 820 * 840 *		
MDV-B-HA	:		:	850
pAB124-HA	:		:	850
		ACAAAGCGGCAGAATTGTTGTTGATTACATGGTGCAAAAACCTGGAAAAA		
		860 * 880 * 900		
MDV-B-HA	:		:	900
pAB124-HA	:		:	900
		CAGGAACAATTGTCTATCAAAGAGGTGTTTTATTGCCTCAAAAAGTGTGG		
		* 920 * 940 *		
MDV-B-HA	:		:	950
pAB124-HA	:		:	950
		TGCGCAAGTGGCAGGAGCAAGTAATAAAAGGGGCTTGCCTTTAATTGG		
		960 * 980 * 1000		
MDV-B-HA	:		:	1000
pAB124-HA	:		:	1000
		TGAAGCAGATTGCCTCCACGAAAAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGC		
		* 1020 * 1040 *		
MDV-B-HA	:		:	1050
pAB124-HA	:		:	1050
		CTTACTACACAGGAGAACATGCAAAAGCCATAGGAAATTGCCCAATATGG		
		1060 * 1080 * 1100		
MDV-B-HA	:		:	1100
pAB124-HA	:		:	1100
		GTGAAAACACCCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAAATATAGACCTCCTGC		

도면7r

```

      *      1120      *      1140      *
MDV-B-HA : ..... : 1150
pAB124-HA : ..... : 1150
      AAAACTATTAAAGGAAAGGGTTTCTTCGGAGCTATTGCTGGTTTCTTGG

      1160      *      1180      *      1200
MDV-B-HA : ..... : 1200
pAB124-HA : ..... : 1200
      AAGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAGGATACACATCTCAT

      *      1220      *      1240      *
MDV-B-HA : ..... : 1250
pAB124-HA : ..... : 1250
      GGAGCACATGGAGTGGCAGTGGCAGCAGACCTTAAGAGTACGCAAGAAGC

      1260      *      1280      *      1300
MDV-B-HA : ..... : 1300
pAB124-HA : ..... : 1300
      TATAAACAGATAACAAAAATCTCAATTCTTTAAGTGAGCTAGAAGTAA

      *      1320      *      1340      *
MDV-B-HA : ..... : 1350
pAB124-HA : ..... : 1350
      AGAATCTTCAAAGACTAAGCGGTGCAATGGATGAACCTCACAAAGAAATA

      1360      *      1380      *      1400
MDV-B-HA : ..... : 1400
pAB124-HA : ..... : 1400
      CTCGAGCTGGATGAGAAAGTGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTC

      *      1420      *      1440      *
MDV-B-HA : ..... : 1450
pAB124-HA : ..... : 1450
      GCAAATAGAGCTTGCAGTCTTGCTTTCCAACGAAGGAATAATAACAGTG

      1460      *      1480      *      1500
MDV-B-HA : ..... : 1500
pAB124-HA : ..... : 1500
      AAGATGAGCATCTCTTGGCACTTGAAAGAAAAGTGAAGAAAATGCTGGGC

      *      1520      *      1540      *
MDV-B-HA : ..... : 1550
pAB124-HA : ..... : 1550
      CCTCTGCTGTAGACATAGGGAATGGATGCTTCGAAACCAACACAAATG

      1560      *      1580      *      1600
MDV-B-HA : ..... : 1600
pAB124-HA : ..... : 1600
      CAACCAGACTTGCTTAGACAGGATAGCTGCTGGCACCTTTAATGCAGGAG

      *      1620      *      1640      *
MDV-B-HA : ..... : 1650
pAB124-HA : ..... : 1650
      AATTTCTCTTCCACTTTTGATTCACTAAATATTACTGCTGCATCTTTA

```

도면7s

```

      1660      *      1680      *      1700
MDV-B-HA : ..... : 1700
pAB124-HA : ..... : 1700
      AATGATGATGGATTGGATAATCATACTATACTGCTCTACTACTCAACTGC

      *      1720      *      1740      *
MDV-B-HA : ..... : 1750
pAB124-HA : ..... : 1750
      TGCTTCTAGTTTGGCTGTAACATTGATGATAGCTATCTTTATTGTTTATA

      1760      *      1780      *      1800
MDV-B-HA : ..... : 1800
pAB124-HA : ..... : 1800
      TGGTCTCCAGAGACAAATGTTTCTTGCTCCATCTGTCTATAAGGAAAATTA

      *      1820      *      1840      *
MDV-B-HA : ..... : 1850
pAB124-HA : ..... : 1850
      AGCCCTGTATTTCTTTATTGTAGTGTGTTTGCTTGTCACCATTACA

      1860      *      1880
MDV-B-HA : ..... : 1884
pAB124-HA : ..... : 1884
      AAAACGTTATTGAAAAATGCTCTTGTTACTACT

```

도면7t

NP		10	20	30	40	50	
pAB125-NP	:						50
MDV-B-NP	:						50
		AGCAGAAAGCACAGCATTTTCTTGTAAGTTCAAGTACCAACAAAACTGA					
		60	70	80	90	100	
pAB125-NP	:						100
MDV-B-NP	:						100
		AAATCAAAATGTCCAACATGGATATTGACGGCATCAACACTGGAACAATT					
		110	120	130	140	150	
pAB125-NP	:						150
MDV-B-NP	:						150
		GACAAAACACCAGAAAGAAATAACTTCGGAAACAGTGGGGCAACCAGACC					
		160	170	180	190	200	
pAB125-NP	:						200
MDV-B-NP	:						200
		AATCATCAAAACAGCAACCTTGCCCAACCAAGCAACAAACGAACCCGAA					
		210	220	230	240	250	
pAB125-NP	:						250
MDV-B-NP	:						250
		ACCCATCCCCGAAAGGGCAGCCACAAGCACTGAAGCTGATGTCGGAAGG					
		260	270	280	290	300	
pAB125-NP	:						300
MDV-B-NP	:						300
		AGAAACCAAAAGAAAACAAACCCGACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA					
		310	320	330	340	350	
pAB125-NP	:						350
MDV-B-NP	:						350
		TATGGTAGTGAACTGGGTGAATTCTACAACCAGATGATGGTCAAAGCTG					
		360	370	380	390	400	
pAB125-NP	:						400
MDV-B-NP	:						400
		GACTCAACGATGACATGGAGAGAAACCTAATCCAAAATGCACATGCTGCG					
		410	420	430	440	450	
pAB125-NP	:						450
MDV-B-NP	:						450
		GAAAGAATTCTATTGGCTGCTACTGATGACAAGAAAACGAATTCCAAA					
		460	470	480	490	500	
pAB125-NP	:						500
MDV-B-NP	:						500
		GAAAAAGAATGCCAGAGATGTCAAAGAAGGAAAGAAGAAATAGACCACA					
		510	520	530	540	550	
pAB125-NP	:						550
MDV-B-NP	:						550
		ACAAAACAGGAGGCACCTTTTACAAGATGGTAAGAGATGATAAAACCATC					
		560	570	580	590	600	

도면7u

```

pAB125-NP : ..... : 600
MDV-B-NP : ..... : 600
          TACTTCAGCCCTATAAGAATTACCTTTTAAAAGAAGAGGTGAAAACAAT

          610      620      630      640      650
pAB125-NP : ..... : 650
MDV-B-NP : ..... : 650
          GTACAAAACCACCATGGGGAGTGATGGTTTCAGTGGACTAAATCACATCA

          660      670      680      690      700
pAB125-NP : ..... : 700
MDV-B-NP : ..... : 700
          TGATTGGGCATTACAGATGAACGATGTCGTGTTCCAAAGATCAAAGGCA

          710      720      730      740      750
pAB125-NP : ..... : 750
MDV-B-NP : ..... : 750
          CTA AAAAGAGTTGGACTTGACCCTTCATTAAATCAGTACTTTTGCAAGGAAG

          760      770      780      790      800
pAB125-NP : ..... : 800
MDV-B-NP : ..... : 800
          CACACTCCCAGAAAGATCAGGTGCAACTGGTGTGCGATCAAAGGAGGTG

          810      820      830      840      850
pAB125-NP : ..... : 850
MDV-B-NP : ..... : 850
          GAACTTTAGTGGCAGAAGCCATTGATTATAGGAAGAGCAATGGCAGAC

          860      870      880      890      900
pAB125-NP : ..... : 900
MDV-B-NP : ..... : 900
          AGAGGGCTATTGAGAGACATCAGAGCCAAGACGGCCTATGAAAAGATTCT

          910      920      930      940      950
pAB125-NP : ..... : 950
MDV-B-NP : ..... : 950
          TCTGAATCTGAAAAACAAGTGCTCTGCGCCCAACAAAAGGCTCTAGTTG

          960      970      980      990      1000
pAB125-NP : ..... : 1000
MDV-B-NP : ..... : 1000
          ATCAAGTGATCGGAAGTAGAAATCCAGGGATTGCAGACATAGAAGACCTA

          1010      1020      1030      1040      1050
pAB125-NP : ..... : 1050
MDV-B-NP : ..... : 1050
          ACCCTGCTTGCCCGAAGCATGGTCGTTGTCAGGCCCTCTGTAGCGAGCAA

          1060      1070      1080      1090      1100
pAB125-NP : ..... : 1100
MDV-B-NP : ..... : 1100
          AGTGGTGCTTCCCATAGCATTATGCCAAAATACCTCAACTAGGGTTCA
    
```

도면7v

```

      1110      1120      1130      1140      1150
pAB125-NP : ..... : 1150
MDV-B-NP : ..... : 1150
      ATGTTGAAGAATACTCTATGGTTGGGTATGAAGCCATGGCTCTTTATAAT

      1160      1170      1180      1190      1200
pAB125-NP : ..... : 1200
MDV-B-NP : ..... : 1200
      ATGGCAACACCTGTTTCCATATTAAGAATGGGAGACGATGCAAAAGATAA

      1210      1220      1230      1240      1250
pAB125-NP : ..... : 1250
MDV-B-NP : ..... : 1250
      ATCACAATTATTCTTCATGTCTTGGCTCGGAGCTGCCTATGAAGACCTAA

      1260      1270      1280      1290      1300
pAB125-NP : ..... : 1300
MDV-B-NP : ..... : 1300
      GAGTTTGTCTGCACTAACAGGCACAGAATTCAAGCATAGGTGACGATTA

      1310      1320      1330      1340      1350
pAB125-NP : ..... : 1350
MDV-B-NP : ..... : 1350
      AAGTGCAAGGGTTTCCACGTTCCAGCAAAGGAGCAAGTGGGAAGGAATGGG

      1360      1370      1380      1390      1400
pAB125-NP : ..... : 1400
MDV-B-NP : ..... : 1400
      GGCAGCTCTGATGTCCATCAAGCTCCAGTTTGGGCTCCAATGACCAGAT

      1410      1420      1430      1440      1450
pAB125-NP : ..... : 1450
MDV-B-NP : ..... : 1450
      CTGGGGGGAATGAAGTAGGTGGAGACGGAGGGTCTGGTCAAATAAGTTGC

      1460      1470      1480      1490      1500
pAB125-NP : ..... : 1500
MDV-B-NP : ..... : 1500
      AGCCCCGTGTTTGCAGTAGAAAGACCTATTGCTCTAAGCAAGCAAGCTGT

      1510      1520      1530      1540      1550
pAB125-NP : ..... : 1550
MDV-B-NP : ..... : 1550
      AAGAAGAATGCTGTCAATGAATATTGAGGGACGTGATGCAGATGTCAAAG

      1560      1570      1580      1590      1600
pAB125-NP : ..... : 1600
MDV-B-NP : ..... : 1600
      GAAATCTACTCAAGATGATGAATGATTCAATGACTAAGAAAACCAATGGA

      1610      1620      1630      1640      1650
pAB125-NP : ..... : 1650
MDV-B-NP : ..... : 1650
      AATGCTTTCATTGGGAAGAAAATGTTTCAAATATCAGACAAAAACAAAAC

```

도면7w

```

      1660      1670      1680      1690      1700
pAB125-NP : ..... : 1700
MDV-B-NP : ..... : 1700
      CAATCCCATTGAGATTCCAATTAAAGCAGACCATCCCCAATTTCTCTTTG

      1710      1720      1730      1740      1750
pAB125-NP : ..... : 1750
MDV-B-NP : ..... : 1750
      GGAGGGACACAGCAGAGGATTATGATGACCTCGATTATTAAGCAACAAA

      1760      1770      1780      1790      1800
pAB125-NP : ..... : 1800
MDV-B-NP : ..... : 1800
      ATAGACACTATGGCTGTGACTGTTTCAGTACGTTTGGGAATGTGGGTGTTT

      1810      1820      1830      1840      1850
pAB125-NP : ..... : 1842
MDV-B-NP : ..... : 1842
      ACTTTTATTGAAATAAATGTAAAAAATGCTGTGTTTCTACT

pAB125-NP : ----- : -
MDV-B-NP : ----- : -

```

도면7x

NA	
	* 20 * 40 *
pAB126-NA :	 : 50
MDV-B-NA :	 : 50
	AGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCAAACTGAAGCAAATAGGCCAAAAATGA
	60 * 80 * 100
pAB126-NA :	 : 100
MDV-B-NA :	 : 100
	ACAATGCTACCTTCACTATACAAACGTTAACCTATTTCTCACATCAGG
	* 120 * 140 *
pAB126-NA :	 : 150
MDV-B-NA :	 : 150
	GGGAGTGTATTATCACTATATGTGTGCTCAGCTTCACTGTCATACTTATTGT
	160 * 180 * 200
pAB126-NA :	 : 200
MDV-B-NA :	 : 200
	ATTCGGATATATTGTGCTAAATTTTCACCAACAAAAATAACTGCACCAACA
	* 220 * 240 *
pAB126-NA :	 : 250
MDV-B-NA :	 : 250
	ATGTCATGTGATTGCGCGAACGTATCAAATGTTTCAGGCTGTGAACCGTTC
	260 * 280 * 300
pAB126-NA :	 : 300
MDV-B-NA :	 : 300
	TGCAACAAAAGAGATGACATTCTTCTCCAGAGCCGGAGTGGACATACC
	* 320 * 340 *
pAB126-NA :	 : 350
MDV-B-NA :	 : 350
	CTCGTTTATCTTGCCAGGCTCAACCTTTCAGAAAGCACTCCTAATTAGC
	360 * 380 * 400
pAB126-NA :	 : 400
MDV-B-NA :	 : 400
	CCTCATAGGTTTCGGAGAAACAGAGGAACTCAGTCCCTTGATAATAAG
	* 420 * 440 *
pAB126-NA :	 : 450
MDV-B-NA :	 : 450
	GGAACCTTTGTGTGCTTGTGGACCAAGGAATGCAGACACTTGTCTCTAA
	460 * 480 * 500
pAB126-NA :	 : 500
MDV-B-NA :	 : 500
	CCCATTATGCAGCTCAACAGGGGATACTACAATGGAACAAGAAAGGAC
	* 520 * 540 *
pAB126-NA :	 : 550
MDV-B-NA :	 : 550
	AGAAACAAGCTGAGGCATCTGATTCAGTCAAATTAGGCAAAATCCCAAC

도면7y

	560	*	580	*	600		
pAB126-NA	:					:	600
MDV-B-NA	:					:	600
	TG TAG AAA ACT CC AT TT TCC AC AT GG CAG CT TG GAG TGG GTCC GC AT GCC						
	*	620	*	640	*		
pAB126-NA	:					:	650
MDV-B-NA	:					:	650
	AT GAT GGT AGA GA AT GG AC AT AT AT CG GAG TT GAT GG CCT GAC AGT AAT						
	660	*	680	*	700		
pAB126-NA	:					:	700
MDV-B-NA	:					:	700
	GC ACT GAT CAAA ATA AAA AT TG GAG AAG CAT AT ACT GAC AC AT ACC ATT C						
	*	720	*	740	*		
pAB126-NA	:					:	750
MDV-B-NA	:					:	750
	CT ATG CAA ACA AC AT CCT AAG AAC ACA AGA AGT GC CTG CA ATT GC AT CG						
	760	*	780	*	800		
pAB126-NA	:					:	800
MDV-B-NA	:					:	800
	GGG GAG ATT GT TAT CTT ATG ATA ACT GAT GG CT CAG CTT CAG GA ATT AGT						
	*	820	*	840	*		
pAB126-NA	:					:	850
MDV-B-NA	:					:	850
	AA ATG CAG ATT TCT TAAA AT TCG AG AG GT CGA ATA ATA AAG AA AT ATT						
	860	*	880	*	900		
pAB126-NA	:					:	900
MDV-B-NA	:					:	900
	TCC AAC AG GA AG ATG AG CAT ACT GA AGA ATG CAC ATG CGG GTT CG CCA						
	*	920	*	940	*		
pAB126-NA	:					:	950
MDV-B-NA	:					:	950
	GCA ATAAA ACC ATAGA ATGT GC CTGT AG AG ATA AC AG TTAC AC AG CAAAA						
	960	*	980	*	1000		
pAB126-NA	:					:	1000
MDV-B-NA	:					:	1000
	AG ACC CTT GT CAA ATT AAA TGT GG AG ACT GAT AC AG CTG AA ATA AG ATT						
	*	1020	*	1040	*		
pAB126-NA	:					:	1050
MDV-B-NA	:					:	1050
	GAT GTG CAC AG AG ACTT ATTT GG AC CCCC AG ACC AG ATG ATG GA AG CA						
	1060	*	1080	*	1100		
pAB126-NA	:					:	1100
MDV-B-NA	:					:	1100
	TA AC AGG GC CTT GCG AATCTA ATGGG AC AAA GGG CTTG GAG GC AT CAAA						

도면7z

```

      *      1120      *      1140      *
pAB126-NA : ..... : 1150
MDV-B-NA : ..... : 1150
           GGAGGATTGTCCATCAAAGAAATGGCATCTAAGATTGGAAGATGGTACTC

      1160      *      1180      *      1200
pAB126-NA : ..... : 1200
MDV-B-NA : ..... : 1200
           CCGAACGATGTCTAAACTGAAAGAATGGGATGGAAGTGTATGTCAAGT

      *      1220      *      1240      *
pAB126-NA : ..... : 1250
MDV-B-NA : ..... : 1250
           ATGATGGAGAGCCCATGGACTGACAGTGACGCCCTTGCTCCTAGTGGAGTA

      1260      *      1280      *      1300
pAB126-NA : ..... : 1300
MDV-B-NA : ..... : 1300
           ATGGTTTCAATGAAAGAACTGGTTGGTATTCTTTTGGCTCGAAATAAA

      *      1320      *      1340      *
pAB126-NA : ..... : 1350
MDV-B-NA : ..... : 1350
           AGATAAGAAATGTGATGTCCCCTGTATTGGGATAGAGATGGTACAGATG

      1360      *      1380      *      1400
pAB126-NA : ..... : 1400
MDV-B-NA : ..... : 1400
           GTGGAAAAGAGACTTGGCACTCAGCAGCAACAGCCATTACTGTTTGATG

      *      1420      *      1440      *
pAB126-NA : ..... : 1450
MDV-B-NA : ..... : 1450
           GGCTCAGGACAATTGCTATGGGACACTGTCAAGGTGTGATATGGCTCT

      1460      *      1480      *      1500
pAB126-NA : ..... : 1500
MDV-B-NA : ..... : 1500
           GTAATGGAGGAATGGTTGAATCTGTTCTAAACCCTTTGTTCCTATTTGT

      *      1520      *      1540      *
pAB126-NA : ..... : 1550
MDV-B-NA : ..... : 1550
           TTGAACAATTGTCCTTACTGGACTTAATTGTTTCTGAAAAATGCTCTTGT

pAB126-NA : ..... : 1557
MDV-B-NA : ..... : 1557
           TACTACT

```

도면7aa

M		*	20	*	40	*	
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 50
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 50
			AGCAGAAGCACGCACTTTCTTAAATGTGCTGTTTGAGACACAATTGC				
			60	*	80	*	100
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 100
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 100
			CTACCTGCTTTCACTAACAGAAGATGGAGAAGGCCAAGCAGAACTAGCAG				
			*	120	*	140	*
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 150
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 150
			AAAAATTACACTGTTGGTTCGGTGGGAAAGAAATTTGACCTAGACTCTGCT				
			160	*	180	*	200
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 200
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 200
			TTGGAATGGATAAAAAACAAAAGATGCCTAACTGATATACAAAAAGCACT				
			*	220	*	240	*
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 250
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 250
			AATTGGTGCCCTCATCTGCTTTTTAAACCACCAAGACCAAGAAAGAAAAA				
			260	*	280	*	300
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 300
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 300
			GAAGATTCATCAGAGCCCTGTGAGGAATGGGAAACAACAGCAACAAAA				
			*	320	*	340	*
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 350
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 350
			AAGAAAGGCCTGATTCTAGCTGAGAGAAAAATGAGAAGATGTGTGAGTTT				
			360	*	380	*	400
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 400
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 400
			TCATGAAGCATTTGAAATAGCAGAAGGCCATGAAAGCTCAGCACTACTAT				
			*	420	*	440	*
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 450
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 450
			ATTGTCTCATGGTCATGTACCTGAACCTGGAAATTTATTCATGCAAGTA				
			460	*	480	*	500
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 500
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 500
			AAACTAGGAACGCTCTGTGCTTTATGCGAGAAACAAGCATCACATTCACA				
			*	520	*	540	*
pAB127-M :	:	.	.	.	.	.	: 550
MDV-B-M :	:	.	.	.	.	.	: 550
			AAGAGCTCATAGCAGAGCAGCAAGATCTTCAGTGCTGGAGTGAGGCGAG				
			560	*	580	*	600

도면7ab

```

pAB127-M : ..... : 600
MDV-B-M : ..... : 600
          AAATGCAGATGGTTTCAGCTGTGAACACAGCAAAAACAATGAATGGAATG

          *          620          *          640          *
pAB127-M : ..... : 650
MDV-B-M : ..... : 650
          GGGAAAGGAGAGACGTCCAAAACTGGCAGAGAGCTGCAAAGCAACAT

          660          *          680          *          700
pAB127-M : ..... : 700
MDV-B-M : ..... : 700
          TGGAGTATTGAGATCTCTGGGGCAAGTCAAAAGAATGGAGAAGGAATTG

          *          720          *          740          *
pAB127-M : ..... : 750
MDV-B-M : ..... : 750
          CAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCTATGGGAAATTCAGCT

          760          *          780          *          800
pAB127-M : ..... : 800
MDV-B-M : ..... : 800
          CTTGTGAAGAAATACCTATAATGCTCGAACCATTTCAGATTCTTTCAATT

          *          820          *          840          *
pAB127-M : ..... : 850
MDV-B-M : ..... : 850
          TGTTCCTTCATTTTATCAGCTCTCCATTTCATGGCTTGGACAATAGGGCA

          860          *          880          *          900
pAB127-M : ..... : 900
MDV-B-M : ..... : 900
          TTTGAATCAAATAAAAAGAGGAGTAAACCTGAAAAATCGAATAAGAAATC

          *          920          *          940          *
pAB127-M : ..... : 950
MDV-B-M : ..... : 950
          CAAATAAAGAGACAATAAACAGAGAGGTATCAATTTGAGACACAGTTAC

          960          *          980          *          1000
pAB127-M : ..... : 1000
MDV-B-M : ..... : 1000
          CAAAAAGAAATCCAAGCCAAGAAACAATGAAGGAAGTACTCTCTGACAA

          *          1020          *          1040          *
pAB127-M : ..... : 1050
MDV-B-M : ..... : 1050
          CATGGAGATATTGAGTGACCACATAGTAATTGAGGGGCTTCTGCTGAAG

          1060          *          1080          *          1100
pAB127-M : ..... : 1100
MDV-B-M : ..... : 1100
          AGATAATAAAATGGGTGAAACAGTTTGGAGGTAGAAGAATTGCAGTAA
  
```

도면7ac

```

          *          1120          *          1140          *
pAB127-M : ..... : 1150
MDV-B-M : ..... : 1150
          ACCCAATTTTCACCGTATTTCTTGCTATGCATTTAAGCAAATTGTAATCA

          1160          *          1180          *
pAB127-M : ..... : 1190
MDV-B-M : ..... : 1190
          ATGTCAGCAAATAAACTGGAAAAAGTGCCTTGTCTTCTACT
  
```

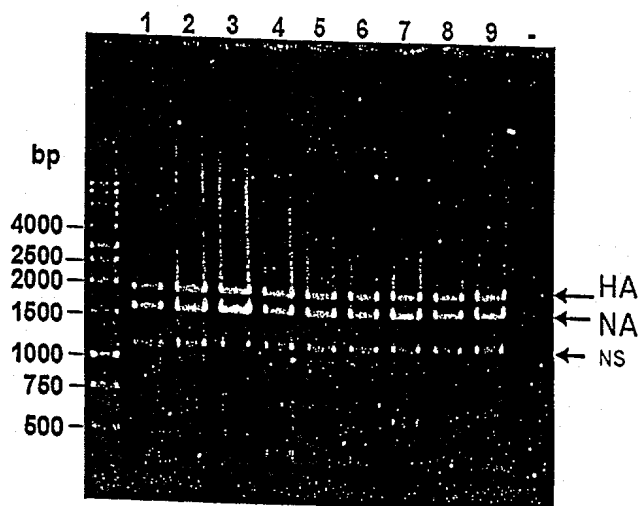
도면7ad

NS					
	10	20	30	40	50
pAB128-NS	:		:	50	
MDV-B-NS	:		:	50	
		AGCAGAAGCAGAGGATTGTTTAGTCAC	GGCAACGGAAAAAATGGCG		
	60	70	80	90	100
pAB128-NS	:		:	100	
MDV-B-NS	:		:	100	
		GACCAACATGACCACACAAATTGAGGTAGG	TCCGGGAGCAACCAATGC		
	110	120	130	140	150
pAB128-NS	:		:	150	
MDV-B-NS	:		:	150	
		CACCATAAACTTTGAAGCAGGAATTCTGGAGT	GCATGAAAGGCTTTCAT		
	160	170	180	190	200
pAB128-NS	:		:	200	
MDV-B-NS	:		:	200	
		GGCAAGAGCCCTTGACTACCCCTGGTCAAGAC	CCCTAAACAGACTAAAG		
	210	220	230	240	250
pAB128-NS	:		:	250	
MDV-B-NS	:		:	250	
		AGAAAATTAGAATCAAGAAATAAGACTCACA	ACAAAAGTGAGCCTGAAAG		
	260	270	280	290	300
pAB128-NS	:		:	300	
MDV-B-NS	:		:	300	
		TAAAAGGATGTCTCTTGAAGAGAGAAAAGCA	ATTGGGGTAAAAATGATGA		
	310	320	330	340	350
pAB128-NS	:		:	350	
MDV-B-NS	:		:	350	
		AAGTGCTCCTATTATGAATCCATCTGCTGGA	ATTGAAGGGTTTGAGCCA		
	360	370	380	390	400
pAB128-NS	:		:	400	
MDV-B-NS	:		:	400	
		TACTGTATGAAAAATTCCTCAAATAGCAACT	GTCCAACTGCAATTGGAC		
	410	420	430	440	450
pAB128-NS	:		:	450	
MDV-B-NS	:		:	450	
		CGATTACCTCCAACACCAGGAAAGTGCC	TTGATGACATAGAAGAAGAAC		
	460	470	480	490	500
pAB128-NS	:		:	500	
MDV-B-NS	:		:	500	
		CGGAGAATGTTGATGACCCAACTGAAATAG	TATTGAGGGACATGAACAAC		
	510	520	530	540	550
pAB128-NS	:		:	550	
MDV-B-NS	:		:	550	
		AAAGATGCAAGGCAAAAGATAAGGAGGAAG	TAAACACTCAGAAAGAAGG		
	560	570	580	590	600

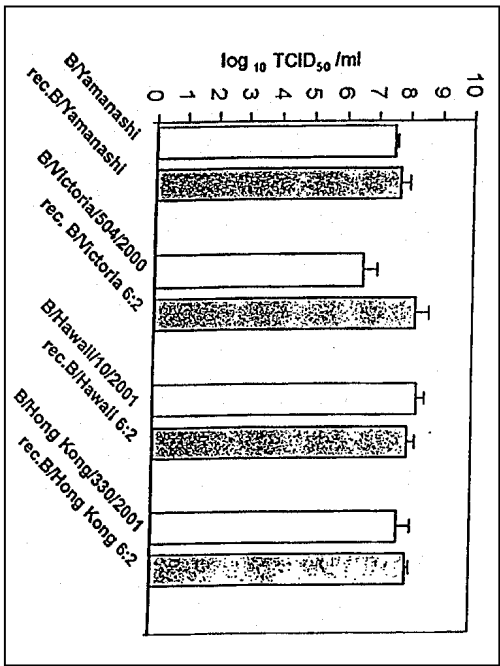
도면7ae

[illegible]

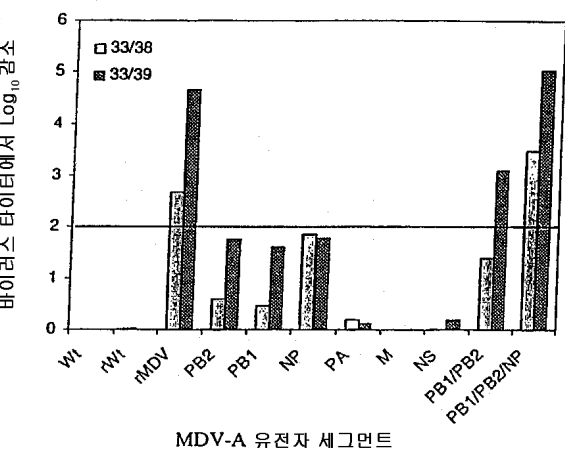
도면8



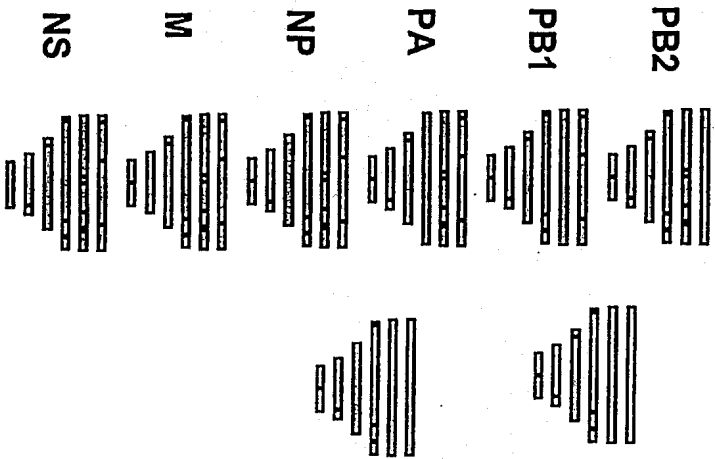
도면9



도면10

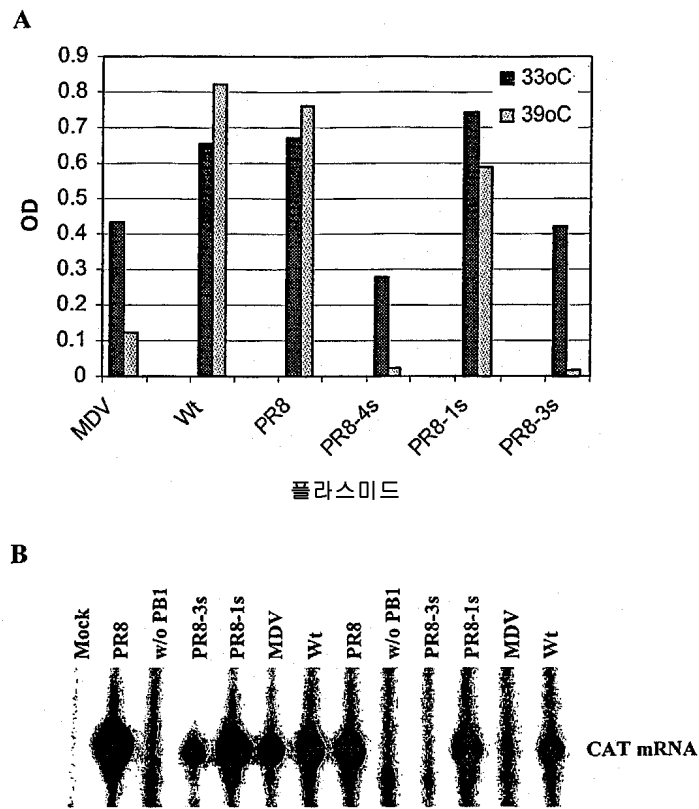


도면11



	Log10 PFU/mL		
	33°C	33°C	33°C
PB2	9.2	0.6*	1.8*
PB1	9.1	0.6*	1.7*
NP	9.2	0.3*	1.4*
PB1+PB2	8.9	1.4*	3.1*
PB1+PB2+NP	9.0	3.4	>5.0

도면12



도면13

PA, NP, M1 단백질 중에 야생형 잔기에 의한 삼중 유전자 재조합

PA			NP			M1			MDCK			PCK			
431	497		55	114	410	509	159	183	log	pfu/ml		log	TCID ₅₀ /ml		
33°C			37°C			Δlog			33°C			37°C Δlog			
M	H		A	A	H	T	Q	V	ts	6.6	<2	>3	5.6	3.0	2.6
V	Y		V	P	A		H	M	non-ts	7.6	6.6	1.0	8.1	7.4	0.7
V	Y		A	V	P	A	H	M	non-ts	7.6	7.1	0.5	7.4	6.5	0.9
V	Y		A	V	P	A	H	M	non-ts	8.1	7.1	1.0	7.7	6.5	1.2
M	H		A	A	H	T	Q	V	ts	7.1	3.1	4.0	7.1	3.5	3.6
V	Y		V	P	A		H	M	non-ts	8.1	7.1	1.0	8.7	7.8	0.9
V	Y		A	V	P	A	H	M	non-ts	8.1	7.2	0.9	8.5	7.8	0.7

도면14

단일 유전자 및 이중 유전자 재조합 바이러스의 성장

PA			NP			M1			MDCK			PCK			
431	497		55	114	410	509	159	183		log	pfu/ml		log	TCID ₅₀ /ml	
										33°C	37°C	Δlog	33°C	37°C	Δlog
M H			A A H T				H M		ts	7.1	3.2	3.9	6.2	3.3	2.9
M H			A V P A				Q V		ts	n.d.			5.8	2.9	2.9
V Y			A A H T				Q V		ts	6.2	3.2	3.0	6.1	2.7	3.4
V Y			A A H T				H M		ts	7.4	4.4	3.0	7.5	3.4	4.1
V Y			A A H T				H M		ts	7.6	4.2	3.4	8.3	4.3	4.0
M H			A V P A				H M		ts	7.4	4.4	3.0	8.1	4.3	3.8
M H			V P A				H M		ts	8.0	6.0	2.0	8.4	4.3	4.1
V Y			V P A				Q V		non-ts	5.6	6.0	-0.4	6.4	4.5	1.9
V Y			V P A				Q V		non-ts	6.6	5.8	0.8	6.8	4.8	2.0

도면15

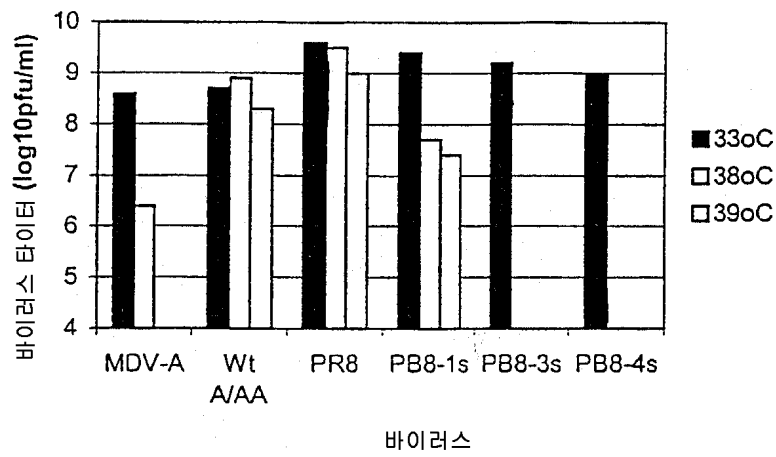
비-ts 표현형에 해당하는 핵 단백질의 아미노산 잔기

PA			NP			M1			MDCK			PCK		
431	497		55	114	410	509	159	183	log	pfu/ml		log	TCID ₅₀ /ml	
									33°C	37°C	Δlog	33°C	37°C	Δlog
			non-ts	6.2	5.2	1.0	6.8	5.5	1.4					
			non-ts	6.8	6.4	0.4	7.2	6.1	1.1					
			non-ts	6.4	6.2	0.2	7.1	5.7	1.4					
			ts	6.6	4.4	2.2	6.6	3.4	3.2					
			non-ts	7.4	6.8	0.6	8.3	7.0	1.3					
			non-ts	n.d.			8.0	7.2	0.8					

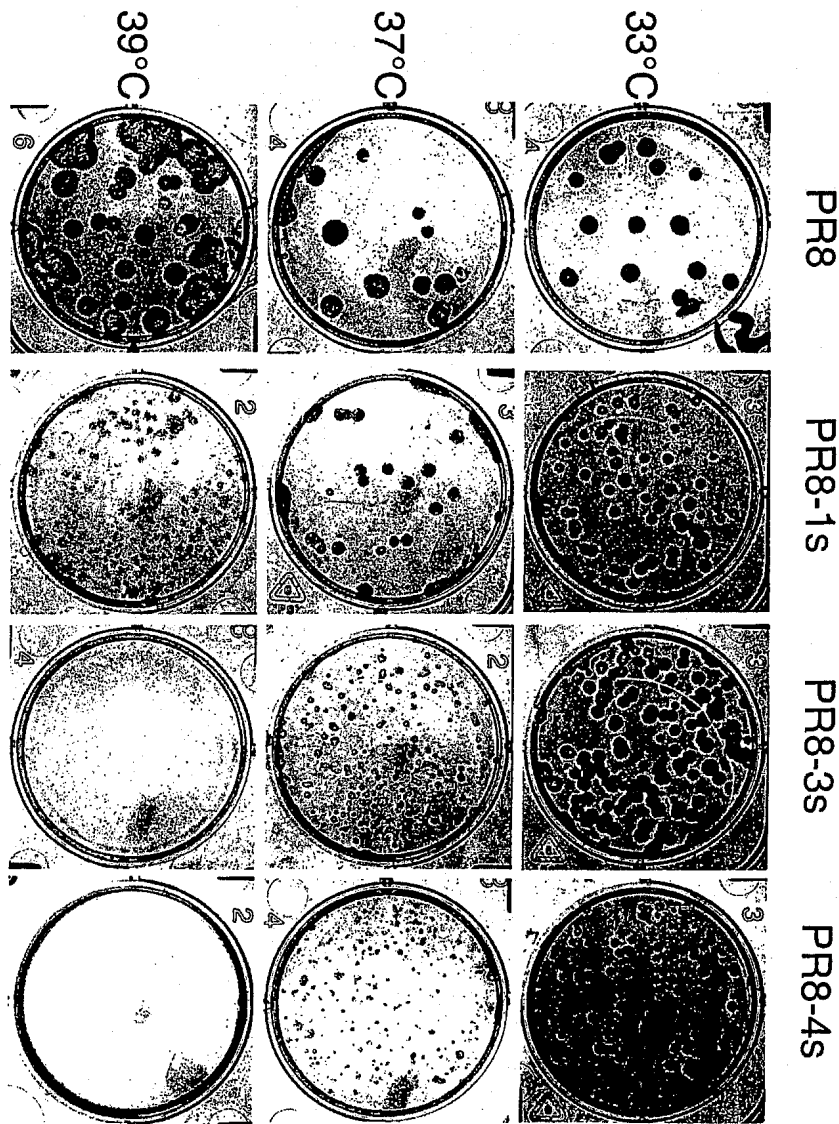
도면16

	PR8	PR8-1s	PR8-3s	PR8-4s
PB2		265G		265G
PB1			291E 581G 661T	291E 581G 661T
PA				
HA				
NP				
NA				
M				
NS				

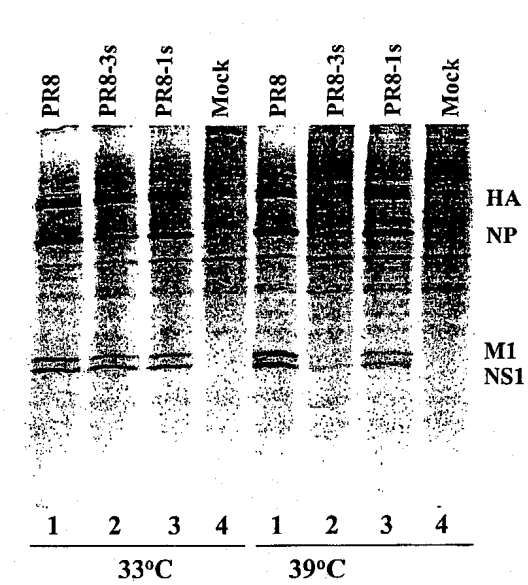
도면17



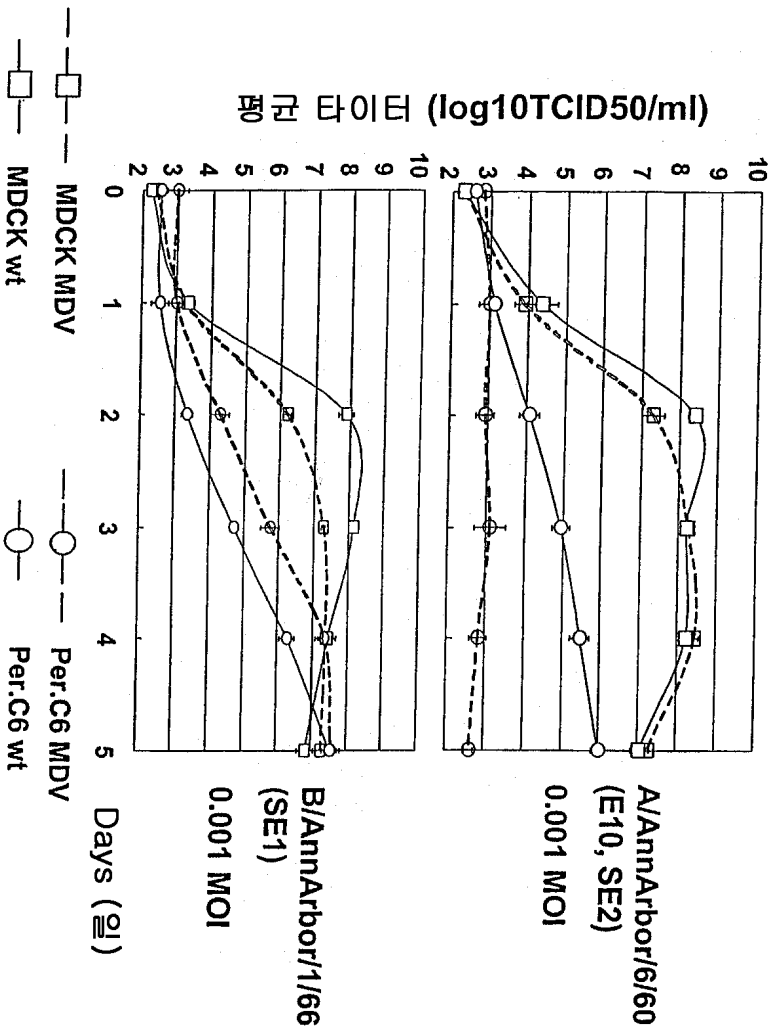
도면18



도면19

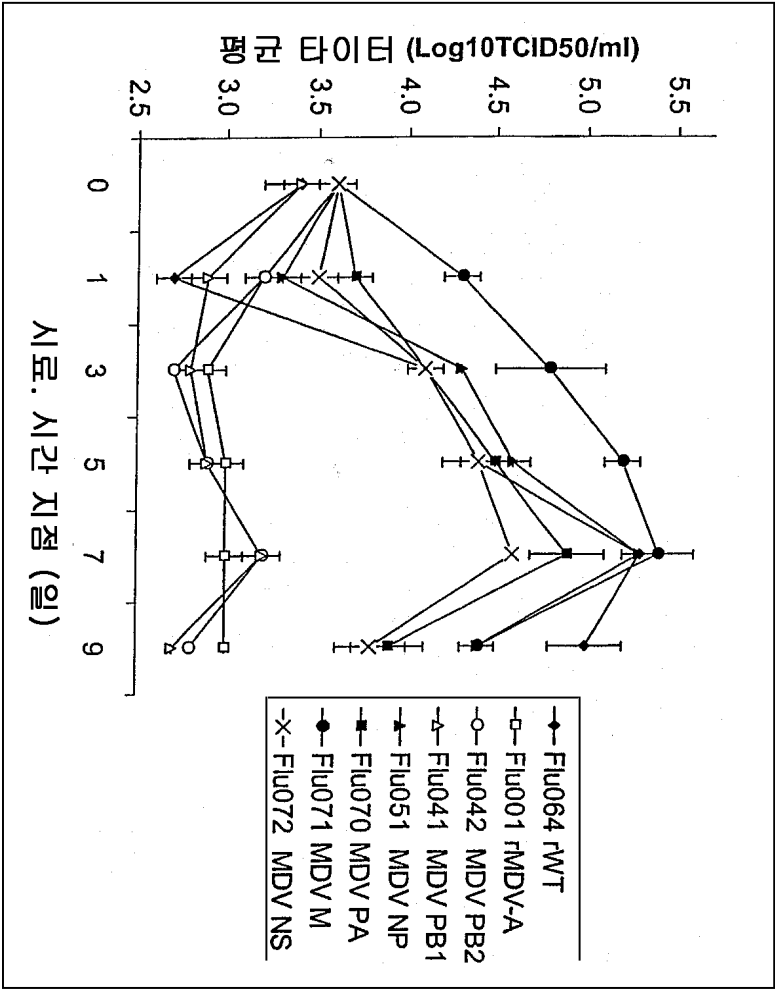


MDCK 및 PER, C6에서 MDV-A의 복제



도면20a

도면20b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MedImmune Vaccines, Inc.
- <120> MULTI PLASMID SYSTEM FOR THE PRODUCTION OF INFLUENZA VIRUS
- <130> 26-000270US
- <140> 10/423,828
- <141> 2003-25-04
- <150> 60/375,675
- <151> 2002-26-04
- <150> 60/394,983
- <151> 2002-09-07
- <150> 60/410,576
- <151> 2002-12-09

<150> 60/419,802
 <151> 12002-8-10
 <150> 60/420,708
 <151> 2002-23-10
 <150> 60/457,699
 <151> 2003-24-03
 <150> 60/462,361
 <151> 2003-10-04
 <160> 98
 <170> PatentIn version 3.1

 <210> 1
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer polyA.1
 <400> 1
 aacaattgag atctcgggtca cctcagacat gataagatac attgatgagt 50
 <210> 2
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer polyA.2
 <400> 2
 tataactgca gactagtgat atccttggtt attgcagctt ataatggtta 50
 <210> 3
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 3
 cacttatatt cacctgcctc agggagcgaa agcaggtc 38

 <210> 4
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 4
 tattcgtctc agggagcgaa agcaggcaaa 30
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 5
 tattcgtctc agggagcgaa agcaggtagt 30
 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 6
 tattcgtctc agggagcaaa agcaggtagt a 31
 <210> 7
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 7
 cacttatatt cacctgcctc agggagcaaa agcagggg 38
 <210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 8
 tattcgtctc agggagcaaa agcaggagt a 31
 <210> 9

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 9
 tattcgtctc agggagcaaa agcaggtaga t 31
 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 10
 tattcgtctc agggagcaaa agcagggtga 30
 <210> 11
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 11
 cctaacatat cacctgcctc gtattagtag aaacaaggtc gttt 44
 <210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 12
 atatcgtctc gtattagtag aaacaaggca ttt 33
 <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR
 <400> 13

atatacgtctc gtattagtag aaacaaggta ctt 33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR

<400> 14

atatacgtctc gtattagtag aaacaagggt att 33

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR

<400> 15

cctaacaatat cacctgcctc gtattagtag aaacaagggt gtt 43

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR

<400> 16

atatacgtctc gtattagtag aaacaaggag ttt 33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213>

Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR

<400> 17

atatacgtctc gtattagtag aaacaaggta gtt 33

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A RT-PCR

<400> 18

atatcgtctc gtattagtag aaacaagggt gtt 33

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 19

gcaagctgtg gaaatatgca aggc 24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 20

gccttgcata tttccacagc ttgc 24

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 21

gaagtgccta cgggcaatct tcaaac 26

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 22

gtttgaagat tgcccgtgtaag cacttc 26

<210> 23

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 23
 cctgaggagg tcagtgaac ac 22
 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 24
 gtgtttcact gacctctca gg 22
 <210>
 > 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 25
 gtttgtagg actctattcc aac 23
 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 26
 gtgggaatag agtcctaaca aac 23
 <210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 27
 gacagtaagc tccgaacaca aatac 25

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 28
 gtatttgtgt tcggagcttc atgc 24
 <210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 29
 cgaaccgaac ggctacattg aggg 24
 <210>
 > 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 30
 ccctcaatgt agccgttcgg ttcg 24
 <210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 31
 cagagaaggt agatttgacg actg 24
 <210> 32
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 32
cagtcgtcaa agtctacctt ctctg 25
<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
<400> 33
cactgaccca agacttgagc cac 23
<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
<400> 34
gtggctcaag tcttgggtca gtg 23
<210>
> 35
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
<400> 35
caaagattaa aatgaaatgg ggaatg 26
<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
<400> 36
cattcccat ttcattttaa tctttg 26
<210> 37
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 37

gtaccttggt tctactaata acccgg 26

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 38

ccgggttatt agtagaaaca aggtac 26

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 39

ggaacacttg agaactgtga gacc 24

<210>

> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 40

ggtctcacag ttctcaagtg ttcc 24

<210> 41

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 41

gaattttatc acaaagtga tgatgaatg 29

<210> 42

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 42
 cattcatcat cacatttgtg ataaaattc 29

<210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 43
 gccagaatgc aactgaaatc agagc 25

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 44
 gctctgattt cagtttcatt ctggc 25

<210>
 > 45
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 45
 ccgaatgaga atccagcaca caag 24

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 46
 cttgtgtgct ggatttcat tcgg 24

<210> 47
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

 <400> 47
 catcaatttc atgcctatat aagctttc 28
 <210> 48
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 48
 gaaagcttat ataggcatga aattgatg 28
 <210> 49
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 49
 cataatggat cctaacactg tgtcaagc 28
 <210>
 > 50
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction
 <400> 50
 gcttgacaca gtgttaggat ccattatg 28
 <210> 51
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 51
ggagaataga ttcacgcaga ttggag 26

<210> 52
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for MDV-A mutation correction

<400> 52
ctccaatctc gatgaatcta ttctcc 26

<210> 53
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 53
tattcgtctc agggagcaga agcggagcct ttaagatg 38

<210> 54
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 54
tattcgtctc gatgcgctc cttcttcatt gaagaatgg 39

<210> 55
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 55
tattcgtctc ggcacctttg tcgcctggga tgatgatg 38

<210> 56
<211> 33
<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 56

atatcgtctc gtattagtag aaacacgagc ctt 33

<210> 57

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 57

tattcgtctc agggagcaga agcggagcgt tttcaagatg 40

<210> 58

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 58

tattcgtctc tctcattttg ctctttttta atatccccc 39

<210> 59

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 59

tattcgtctc atgagaatgg aaaaactact aataaattca gc 42

<210> 60

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 60

atatcgtctc gtattagtag aaacacgagc att 33

<210> 61

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 61
 tattcgtctc agggagcaga agcgggtgcgt ttga 34
 <210> 62
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 62
 tattcgtctc ccagggccct ttactttgtc agagtgc 37
 <210> 63
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 63
 tattcgtctc tctggatct accagaaata gggccagac 39
 <210> 64
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 64
 atatcgtctc gtattagtag aaacacgtgc att 33
 <210> 65
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 65

tattcgtctc agggagcaga agcagagcat ttctaatat c 41

<210> 66

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 66

atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttttc 37

<210> 67

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 67

tattggtctc agggagcaga agcacagcat tttcttgt 38

<210> 68

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 68

atatggtctc gtattagtag aaacaacagc attttt 36

<210> 69

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR

<400> 69

tattcgtctc agggagcaga agcagagcat cttctcaaaa c 41

<210> 70

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 70
 atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttttcag 39
 <210> 71
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 71
 tattcgtctc agggagcaga agcacgcact ttcttaaat g 41
 <210> 72
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 72
 atatcgtctc gtattagtag aaacaacgca ctttttcag 40
 <210> 73
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 73
 tattcgtctc agggagcaga agcagaggat ttgtttagtc 40
 <210> 74
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> oligonucleotide primer for influenza ca B/Ann Arbor/1/66 RT-PCR
 <400> 74
 atatcgtctc gtattagtag taacaagagg atttttat 38
 <210> 75
 <211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for B/Yamanashi/166/98 NP amplification

<400> 75

tattcgtctc agggagcaga agcacagcat tttcttggtg 39

<210> 76

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for B/Yamanashi/166/98 NP amplification

<400> 76

atcgcgtctc gtattagtag aaacaacagc attttttac 39

<210> 77

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for B/Yamanashi/166/98 NA amplification

<400> 77

tattcgtctc agggagcaga agcagagca 29

<210> 78

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for B/Yamanashi/166/98 NA amplification

<400> 78

atcgcgtctc gtattagtag taacaagagc atttt 35

<210> 79

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 79

gaaagaagat tgaagaaatc cgaccgctc 29

<210> 80

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 80

gagcggtcgg atttcttcaa tcttctttc 29

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 81

gaaataaaga aactgtgggg gcaaaccctg tcc 33

<210> 82

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 82

ggaacgggtt tgccccaca gtttctttat ttc 33

<210> 83

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 83

gtatgatgct gttacaacaa cacactcc 28

<210> 84

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 84

ggagtgtgtt gttgtaacag catcatac 28

<210> 85

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1
and PB2 genes

<400> 85

attgctgcta ggagcatagt gagaagagc 29

<210> 86

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for introducing ts mutations into PR8 PB1

and PB2 genes

<400> 86

gctcttctca ctatgctcct agcagcaat 29

<210> 87

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> oligonucleotide primer for RT-PCR of HA and NA

<400> 87

tattcgtctc agggagcaga agcagagca 29

<210> 88

<211> 35

<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> oligonucleotide primer for RT-PCR of HA and NA	
<400> 88	
atatcgtctc gtattagtag taacaagagc atttt	35
<210> 89	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> oligonucleotide primer for primer extension	
<400> 89	
atgttcttta cgatgcgatt ggg	23
<210> 90	
<211> 2836	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> pAD3000	
<400> 90	
ctagcagtta accggagtac tggtcgacct ccgaagtgg gggggaggag acggtaccgt	60
ctccaataac ccggcgcccc aaaatgccga ctcgagcgga aagatatacc tcccccgagg	120
ccgggaggtc gcgtcaccca ccacgccgcc ggcccaggcg acgcgcgaca cggacacctg	180
tccccaaaaa cgccaccatc gcagccacac acggagcgcc cggggccctc tggtcaaccc	240
caggacacac gcgggagcag cgccgggccc gggacgccct cccggcggtc acctcagaca	300
tgataagata cattgatgag ttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct	360
ttattttgta aatttgtgat gctattgctt tatttgaac cattataagc tgcaataaac	420
aaggatctgc attaatgaat cgccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc	480
tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtg	540
tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag	600
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg	660
tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgtc aagtcagagg	720
tgcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg	780
cgctctcctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgctttct cccttcggga	840

agcgtggcgc ttctcfaatg ctacacgtgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc 900
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgtgcgc cttatccggt 960
 aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact 1020

 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagtctct gaagtgggtg 1080
 cctaactacg gctacactag aaggacagta ttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt 1140
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg 1200
 ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgagaaaaa aaggatctca agaagatcct 1260
 ttgatctttt ctacggggtc tgacgtcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 1320
 gtcacgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 1380
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt 1440

 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc 1500
 gtgtagataa ctacgatcag ggagggttta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg 1560
 cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1620
 gagcgcagaa gtggtctgc aactttatcc gctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1680
 gaagctagag taagtagtgc gccagttaat agtttgca acgttggtgc cattgctaca 1740
 ggcatcgtgg tgtcacgtc gtcgtttgt atggcttcat tcagctccgg ttccaacga 1800
 tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggtcct 1860

 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1920
 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1980
 accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 2040
 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact taaaagtgc tcatcattgg aaacgttct 2100
 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 2160
 cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 2220
 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 2280

 atactcttc ttttcaata ttatgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 2340
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 2400
 aaagtccac ctgacgtga tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacgtaaa 2460
 tggccgcct ggcattatgc ccagtiacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac 2520
 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg ttggcagta catcaatggg 2580
 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc acccattga cgtcaatggg 2640

agttttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 2700

ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg 2760

ctaactagag aacccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctatagggag 2820

accaagctg ttaacg 2836

<210> 91

<211> 2369

<212> DNA

<213> Influenza B virus

<400> 91

agcagaagcg gagcctttaa gatgaatata aatccttatt ttctcttcat agatgtaccc 60

atacaggcag caatttcaac aacattccca tacaccggtg ttccccctta ttcccatgga 120

acgggaacag gctacacaat agacaccgtg attagaacac atgagtactc aaacaaggga 180

aaacaataca ttcttgatgt tacaggatgt gcaatggtag atccaacaaa tgggccatta 240

cccgaaagata atgagccgag tgcctatgca caattggatt gcgttctgga ggctttggat 300

agaatggatg aagaacatcc aggtctgttt caagcagcct cacagaatgc catggaggca 360

ctaattggtca caactgtaga caaattaacc caggggagac agacttttga ttggacagtg 420

tgcagaaacc aacctgtgc aacggcactg aacacaacaa taacctcttt taggttgaat 480

gatttgaatg gagccgacaa ggggtggatta gtaccctttt gccaaagatat cattgattca 540

ttggacaaac ctgaaatgac ttcttctctg gtaaagaata taaagaaaaa attgcctgct 600

aaaaacagaa agggtttctt cataaagaga ataccaatga aggtaaaaga cagaataacc 660

agagtggaat acatcaaaag agcattatca ttaaacacaa tgacaaaaga tgctgaaaga 720

ggcaactaa aaagaagagc aattgccacc gctgggatac aaatcagagg gtttgtatta 780

glagttgaaa acttggctaa aaatatctgt gaaaatctag aacaaagtgg ttgcccagta 840

ggtgggaacg agaagaaggc caaactgtca aatgcagtgg ccaaaatgct cagtaactgc 900

ccaccaggag ggatcagcat gacagtgaca ggagacaata ctaaatggaa tgaatgctta 960

aatccaagaa tctttttggc tatgactgaa agaataacca gagacagccc aatttggttc 1020

cgggatTTTT gtagtatagc accggtcttg ttctccaata aaatagccag attgggaaaa 1080

gggttcatga taacaagcaa aacaaaaaga ctgaaggctc aaataccttg tcccgatctg 1140

tttaatatac cattagaaag atataatgaa gaaacaaggc caaaattaaa aaagctgaaa 1200

ccattcttca atgaagaagg aacggcatct ttgtcgcctg ggatgatgat gggaatgttt 1260

aatatgctat ctaccgtgtt gggagtagcc gcactaggga tcaaaaacat tggaaacaaa 1320

gaatacttat gggatggact gcaatcttct gatgattttg ctctgtttgt taatgcaaaa 1380
gatgaagaga catgtatgga aggaataaac gatttttacc gaacatgtaa gctattggga 1440

ataaacatga gcaaaaagaa aagttactgt aatgaaactg gaatgtttga atttacaagc 1500
atgttctaca gagatggatt tgtatctaataa ttgcaatgg aacttccttc atttggagtt 1560
gctggagtaa atgaatcagc agatatggca ataggaatga caataataaa gaacaatatg 1620
atcaacaatg ggatgggtcc agcaacagca caaacagcca tacaattatt catagctgat 1680
tatagatata cctacaaatg ccacagggga gattccaaag tggaaggaaa gagaatgaaa 1740
attataaagg agctatggga aaacactaaa ggaagagatg gtctgttagt agcagatggt 1800
gggcctaaca tttaacaatt gagaaacttg catatcccag aaatagtatt aaagtacaac 1860

ctaattggacc ctgaatacaa agggcgggta ctgcacctc aaaatccctt tgtaggacat 1920
ttgtctattg agggcatcaa agaggcagat ataaccccag cacatgggtcc agtaaagaaa 1980
atggactatg atgcggatc ttggaactcat agttggagaa ccaaaaggaa cagatctata 2040
ctaaacactg atcagaggaa catgattctt gaggaacaat gctacgctaa gtgttgcaac 2100
ctttttgagg cctgttttaa cagtgcacat tacaggaaac cagtaggtca gcacagcatg 2160
cttgaggcta tggccacag attaagaatg gatgcacgac tagattatga atcaggaaga 2220
atgtcaaagg atgattttga gaaagcaatg gctcaccttg gtgagattgg gtacatataa 2280

gcttcgaaga tgictatggg gttattggc atcattgaat acatgcggta cacaaatgat 2340
taaaatgaaa aaaggctcgt gtttctact 2369

<210> 92
<211> 2396
<212> DNA
<213> Influenza B virus
<400> 92

agcagaagcg gagcgttttc aagatgacat tggccaaaat tgaattgtta aaacaactgt 60
taagggacaa tgaagccaaa acggtattga aacaaacaac ggtagaccaa tataacataa 120
taagaaaatt caatacatca agaattgaaa agaacccttc attaaggatg aagtgggcca 180
tgtgttctaa ttttcccttg gctctgacca agggtgatat ggcaaataga atccccttgg 240

aatacaaggg aatacaactt aaaacaaatg ctgaagacat aggaaccaaa ggccaaatgt 300
gctcaatagc agcagttacc tgggtggaata catatggacc aataggagat actgaaggtt 360
tcgaaaaggt ctacgaaagc ttttttctca gaaagatgag acttgacaat gccacttggg 420
gccgaataac ttttggccca gttgaaagag tgagaaaaag ggtactgcta aaccctctca 480

ccaaggaaat gcctccagat gaagcgagca atgtgataat ggaaatattg ttccttaaag 540
aagcaggaat accaagagaa tctacttgga tacataggga actgataaaa gaaaaaagag 600
aaaaattgaa aggaacgatg ataactccca ttgtactggc atacatgctt gagagagaac 660

tggttgcccg aagaagggtc ctgccagtgg caggagcaac atcagccgag ttcataaaaa 720
tgctacactg cttacaaggt gaaaattgga gacaaatata tcaccagga gggaataaac 780
taactgaatc taggtctcaa tcaatgattg tagctttag aaaaaaatc agaagatcaa 840
tagtcgcatc aaaccacta gagctagctg tagaaattgc aaacaagact gtgatagata 900
ctgaaccttt aaaaatcatg ctggcagcca tagacggagg tgatgtagcc tgtgacataa 960
taagagctgc attaggacta aagatcagac aaagacaaag atttggacgg ctggaactaa 1020
agagaatatc aggaagagga ttcaaaaatg atgaagaaat attaatacggg aacggaacaa 1080

tacagaaaat tggaatatgg gacggagaag aggagtcca tgtaagatgt ggtgaatgca 1140
ggggaatatt aaaaaagagc aaaaatgagaa tggaaaaact actaataaat tcagccaaaa 1200
aggaggacat gaaagattta ataactttgt gcatggtatt ttctcaagac actaggatgt 1260
tccaaggagt gagaggagaa ataaattttc ttaatcgagc aggccaactt ttatctccaa 1320
tgtaccaact ccagcgatat tttttgaata ggagcaacga cctttttgat caatgggggt 1380
atgaggaatc acccaaagca agtgaactac atgggataaa tgaattaatg aatgcatctg 1440
actatacgtt gaaaggggtt gtagtaacaa aaaatgtgat tgatgacttt agttctactg 1500

aaacagaaaa agtatctata acaaaaaatc ttagtttaat aaaaaggact ggggaagtca 1560
taatgggggc taatgacgta agtgaattag aatcacaagc acagctaattg ataacatatg 1620
atacacctaa gatgtgggag atgggaacaa ccaagaact ggtgcaaaac acctaccaat 1680
gggtgctaaa aaatttggtg aactgaagg ctgagtttct tctgggaaaa gaagacatgt 1740
tccaatggga tgcatttgaa gcatttgaaa gcataatccc ccagaagatg gctggccagt 1800
acagtggatt tgcaagagca gtgctcaaac aaatgagaga ccaagaggtt atgaaaactg 1860
accagttcat aaagttgtg cttttctgtt tctcaccacc aaaattaagg agaaatgggg 1920

agccttatca attcttgagg cttatgttga agggaggagg ggaaaatttc atcgaagtaa 1980
ggaaagggtc cctctattc tcctacaatc cacaacaga agtcctaact atatcgcgca 2040
gaatgatgtc attaaaagga aaaattgaag atgaagaaag gaatagatca atggggaatg 2100
cagtattggc aggctttctc gttagtggca agtatgaccc agatcttgga gatttcaaaa 2160
ctattgaaga acttgaaaag ctaaaaccgg gggaaaaagc aaacatctta ctttatcaag 2220
gaaagcccg taaagtagtt aaaaggaaaa gatatagtgc tttatccaat gacatttcac 2280

aaggaattaa gagacaaaga atgacagttg agtccatggg gtgggccttg agctaataata 2340

aatttatcca ttaattcaat agacacaatt gagtgaaaaa tgctcgtgtt tctact 2396

<210> 93

<211> 2308

<212> DNA

<213> Influenza B virus

<400> 93

agcagaagcg gtgcgtttga tttgccataa tggatacttt tattacaaga aacttccaga 60

ctacaataat acaaaaggcc aaaaacacaa tggcagaatt tagtgaagat cctgaattac 120

aaccagcaat gctattcaac atctgcgtcc atctggaggt ctgctatgta ataagtata 180

tgaattttct tgatgaagaa ggaaaaacat atacagcatt agaaggacaa ggaaaagaac 240

aaaacttgag accacaatat gaagtgattg aggggaatgcc aagaacata gcatggatgg 300

ttcaaagatc cttagcccaa gagcatggaa tagagactcc aaggtatctg gctgatttgt 360

tcgattataa aaacaagagg tttatagaag ttggaataac aaagggttg gctgacgatt 420

acttttgaa aaagaaagaa aagctgggga atagcatgga actgatgata ttcagctaca 480

atcaagacta ttcgttaagt aatgaatcct cattggatga ggaaggaaaa gggagagtgc 540

taagcagact cacagaactt caggctgagt taagtctgaa aaatctatgg caagttctca 600

taggagaaga agatattgaa aaaggaattg acttcaaact tggacaaaca atatctaac 660

taaggatat atctgttcca gctggtttct ccaattttga aggaatgagg agctacatag 720

acaatataga tcctaaagga gcaatagaga gaaatctagc aaggatgtct cccttagtat 780

cagttacacc taaaaagttg aaatgggagg acctagacc aataggcct cacatttaca 840

accatgagct accagaagtt ccatataatg cttttcttct aatgtctgat gagttggggc 900

tggctaatat gactgaaggg aagtccaaga aaccgaagac cttagccaaa gaatgtctag 960

aaaagtactc aacactacgg gatcaaactg acccaatatt aataatgaaa agcgaaaaag 1020

ctaacgaaaa ctcttatgg aagctgtgga gggactgtgt aaatacaata agtaatgagg 1080

aaacaagtaa cgaattacag aaaaccaatt atgccaagtg ggccacagga gatggattaa 1140

cataccagaa aataatgaaa gaagtagcaa tagatgacga aacaatgtac caagaagagc 1200

ccaaaatacc taacaaatgt agagtggctg cttgggttca aacagagatg aatctattga 1260

gcactctgac aagtaaaagg gccctggatc taccagaaat agggccagac gtagcaccca 1320

tggagcatgt agggagtgaagaaggaaat actttgttaa tgaaatcaac tactgtgaagg 1380

cctctaccgt tatgatgaag tatgtacttt ttcacacttc attattaaat gaaagcaatg 1440

ccagcatggg aaaatataaa gtaataccaa taaccaacag agtagtaaat gaaaaaggag 1500
aaagttttga catgcttcat ggtctggcgg ttaaaggga atctcatctg aggggagata 1560

ctgatgttgt aacagttgtg actttcgaat ttagtagtac agatcccaga gtggactcag 1620
gaaagtggcc aaaatatact gtatttagaa ttggctcctt atttgtgagt ggaaggga 1680
aatctgtgta cctatatgc cgagtgaatg gtacaaataa gatccaaatg aaatggggaa 1740
tggaagctag aagatgtctg cttcaatcaa tgcaacaaat ggaagcaatt gttgaacaag 1800
aatcatcgat acaaggatat gacatgacca aagcttggtt caaggagac agagtgaata 1860
gtcccaaac tttcagtatt gggactcaag aaggaaaact agtaaaagga tcctttggga 1920
aagcactaag agtaatatc accaaatgtt tgatgcacta tgtatttga aatgcccaat 1980

tggaggggtt tagtgccgaa tctaggagac ttctactgtt aattcaggca ttaaaggaca 2040
gaaagggccc ttgggtattc gacttagagg gaatgtattc tggaatagaa gaatgtatta 2100
gtaacaacc ttgggtaata cagagtgcac actgggttaa tgaatggtg ggctttgaaa 2160
aagaggggag taaagtatta gaatcaatag atgaaataat ggatgaatga aagaaggga 2220
tagcgtcaa ttgtgtacta tttgttcat tatgtatcta aacatccaat aaaaagaatt 2280
gagaattaaa aatgcacgtg tttctact 2308

<210> 94
<211> 1884
<212> DNA
<213> Influenza B virus

<400> 94

agcagaagca gagcattttc taatatccac aaaatgaagg caataattgt actactcatg 60
gtagtaacat ccaatgcaga tcgaatctgc actgggataa catcgtcaaa ctcaccccat 120
gtggtcaaaa ctgctactca aggggaagtc aacgtgactg gtgtgatacc actgacaaca 180
acacctacca aatctcattt tgcaaatctc aaaggaacac agaccagagg gaaactatgc 240
ccaaactgtc tcaactgcac agatctggac gtggccttgg gcagacaaa gtgtatgggg 300
accatacctt cggcaaaagc ttcaatactc cacgaagtca aacctgttac atctgggtgc 360
tttctataa tgcacgacag aacaaaaatc agacagctac ccaatcttct cagaggatat 420

gaaaatatca ggtatcagc ccgtaacgtt atcaacgcag aaacggcacc aggaggaccc 480
tacatagttg gaacctcagg atcttgcctt aacgttacca atgggaaagg attcttcgca 540
acaatggctt gggtgtccc aaaaaacaac aaacacaaa cagcaacgaa cccattaaca 600
glagaagtac catacatttg tacaaaagga gaagacaaa ttactgtttg ggggttccat 660

tctgatgacg aaacccaaat ggtaacactc tatggagact cgaagcctca aaagttcacc	720
tcatctgcc aaggagtaac cacacattat gtttctcaga ttgggtggctt cccaaatcaa	780
acagaagacg aagggtacc acaaagcggc agaattgttg ttgattacat ggtgcaaaaa	840
cctggaaaaa caggaacaat tgtctatcaa agaggtgttt tattgcctca aaaagtgtgg	900
tgcgcaagt gaggagcaa ggtaataaaa ggggccttgc ctttaattgg tgaagcagat	960
tgcctccacg aaaaatacgg tggattaaac aaaagcaagc cttactacac aggagaacat	1020
gcaaaagcca taggaaattg cccaatatgg gtgaaaacac ccttgaagct ggccaatgga	1080
accaaataa gacctctgc aaaactatta aaggaaaggg gtttcttcgg agctattgct	1140
ggtttcttgg aaggaggatg ggaaggaatg attgcagggtt ggcacggata cacatctcat	1200
ggagcacatg gattggcagt ggcagcagac cttaagagta cgcaagaagc tataaacaag	1260
ataacaaaa atctcaattc ttttaagtga ctagaagtaa agaattctca aagactaagc	1320
ggtgcaatgg atgaactcca caacgaaata ctcgagctgg atgagaaagt ggatgatctc	1380
agagctgata caataagctc gcaaatagag ctgacagtct tgctttccaa cgaaggaata	1440
ataaacagtg aagatgagca tctcttggca cttgaaagaa aactgaagaa aatgctgggc	1500
ccctctgctg tagacatagg gaatggatgc ttcgaaacca aacacaaatg caaccagact	1560
tgcttagaca ggatagctgc tggcaccttt aatgcaggag aattttctct tcccactttt	1620
gattcactaa atattactgc tgcatcttta aatgatgatg gattggataa tcatactata	1680
ctgctctact actcaactgc tgcttctagt ttggctgtaa cattgatgat agctatcttt	1740
attgtttata tggctccag agacaatgtt tcttgctcca tctgtctata aggaaaatta	1800
agccctgtat tticctttat tgtagtgctt gtttgcttgt caccattaca aaaaacgtta	1860
ttgaaaaatg ctcttggttac tact	1884
<210> 95	
<211> 1842	
<212> DNA	
<213> Influenza B virus	
<400> 95	
agcagaagca cagcattttc ttgtgaactt caagtaccaa caaaaactga aatcaaaat	60
gtccaacatg gatattgacg gcatcaacac tggaacaatt gacaaaacac cagaagaaat	120
aacttccgga accagtgggg caaccagacc aatcatcaaa ccagcaaccc ttgccccacc	180
aagcaacaaa cgaaccgaa acccatcccc ggaaagggca gccacaagca gtgaagctga	240
tgtcggaagg agaaccctaaa agaaacaaac cccgacagag ataagaaga gcgtctacaa	300

tatggtagtg aaactgggtg aattctacaa ccagatgatg gtcaaagctg gactcaacga 360

tgacatggag agaaacctaa tccaaatgc acatgctgcg gaaagaattc tattggctgc 420

tactgatgac aagaaaactg aattccaaaa gaaaaagaat gccagagatg tcaaagaagg 480

gaaagaagaa atagaccaca acaaacagg aggcaccttt tacaagatgg taagagatga 540

taaaaccatc tacttcagcc ctataagaat taccttttta aaagaagagg tgaaaacaat 600

gtacaaaacc accatgggga gtgatggttt cagtggacta aatcacatca tgattgggca 660

ttcacagatg aacgatgtct gtttccaaag atcaaaggca ctaaaaagag ttggacttga 720

cccttcatta atcagtactt ttgcaggaag cacactcccc agaagatcag gtgcaactgg 780

tgttgcgac aaaggaggtg gaactttagt ggacagaagc attcgattta taggaagagc 840

aatggcagac agagggtctat tgagagacat cagagccaag acggcctatg aaaagattct 900

tctgaatctg aaaaacaagt gctctgcgcc ccaacaaaag gctctagtgt atcaagtgat 960

cggaagtaga aatccaggga ttgcagacat agaagaccta accctgcttg cccgaagcat 1020

ggtcgttgtc aggccctctg tagcgagcaa agtgggtgctt cccataagca tttatgccaa 1080

aatacctcaa ctagggttca atgttgaaga atactctatg gttgggtatg aagccatggc 1140

tctttataat atggcaacac ctgtttccat attagaatg ggagacgatg caaaagataa 1200

atcacaatta ttcttcatgt cttgttcgg agctgcctat gaagacctaa gagttttgtc 1260

tgactaaca ggcacagaat tcaagcatag gtcagcatta aagtgaagg gtttccacgt 1320

tccagcaaag gagcaagtgg aaggaatggg ggcagctctg atgtccatca agctccagtt 1380

ttgggtcca atgaccagat ctggggggaa tgaagtaggt ggagacggag ggtctggtca 1440

aataagttgc agccccgtgt ttgcagtaga aagacctatt gctctaagca agcaagctgt 1500

aagaagaatg ctgtcaatga atattgaggg acgtgatgca gatgtcaaag gaaatctact 1560

caagatgatg aatgattcaa tgactaagaa aaccaatgga aatgctttca ttgggaagaa 1620

aatgtttcaa atatcagaca aaaacaaaac caatccatt gagattccaa ttaagcagac 1680

catcccaat ttcttctttg ggaggacac agcagaggat tatgatgacc tcgattatta 1740

aagcaacaaa atagacacta tggctgtgac tgtttcagta cgtttggaat gtgggtgttt 1800

acttttattg aaataaatgt aaaaaatgct gttgtttcta ct 1842

<210> 96

<211> 1557

<212> DNA

<213> Influenza B virus

<400> 96

agcagaagca gagcatcttc tcaaaactga agcaaataagg ccaaaaatga acaatgctac 60
 ctccaactat acaaacgta accctatttc tcacatcagg gggagtgtta ttatcactat 120
 atgtgtcagc ttactgtca tactttattgt attcggatat attgctaaaa ttttcaccaa 180
 caaaaataac tgcaccaaca atgtcattgg attgcgcgaa cgtatcaaat gttcaggctg 240
 tgaaccgttc tgcaacaaaa gagatgacat ttctttctccc agagccggag tggacatacc 300

 ctcgtttate ttgccagggc tcaacctttc agaaagcact cctaattagc cctcataggt 360
 tcggagaaac cagaggaaac tcagctccct tgataataag ggaacccttt gttgcttgtg 420
 gaccaaagga atgcagacac tttgtcttaa cccattatgc agctcaacca gggggatact 480
 acaatggaac aagaaaggac agaaacaagc tgaggcatct gatttcagtc aaattaggca 540
 aaatcccaac tgiagaaaac tccattttcc acatggcagc ttggagtggg tccgcatgcc 600
 atgatggtag agaattggaca tatatcggag ttgatggccc tgacagtaat gcactgatca 660
 aaataaaata tggagaagca tatactgaca cataccattc ctatgcaaac aacatcctaa 720

 gaacacaaga aagtgcctgc aattgcatcg ggggagattg ttatcttatg ataactgatg 780
 gctcagcttc aggaattagt aaatgcagat ttcttaaaat tcgagagggt cgaataataa 840
 aagaaatatt tccaacagga agagtagagc atactgaaga atgcacatgc gggttcgcca 900
 gcaataaaac catagaatgt gcctgtagag ataacagtta cacagcaaaa agaccctttg 960
 tcaaattaaa tgtggagact gatacagctg aaataagatt gatgtgcaca gagacttatt 1020
 tggacacccc cagaccagat gatggaagca taacagggcc ttgcgaatct aatggggaca 1080
 aagggttgg aggcatacaa ggaggatttg tccatcaaag aatggcatct aagattggaa 1140

 gatggctact ccgaacgatg tctaaaactg aaagaatggg gatggaactg tatgtcaagt 1200
 atgatggaga cccatggact gacagtgcag cccttgctcc tagtggagta atggtttcaa 1260
 tgaaagaacc tggttggtat tcttttggct tcgaaataaa agataagaaa tgtgatgtcc 1320
 cctgtatttg gatagagatg gtacacgatg gtggaaaaga gacttggcac tcagcagcaa 1380
 cagccattta ctgtttgatg ggctcaggac aattgctatg ggacactgtc acaggtgttg 1440
 atatggctct gtaatggagg aatggttgaa tctgttctaa accctttgtt cctattttgt 1500
 ttgaacaatt gtccttactg gacttaattg tttctgaaaa atgctcttgt tactact 1557

<210> 97

<211> 1190

<212> DNA

<213> Influenza B virus

<400> 97

agcagaagca cgcactttct taaaatgtcg ctgtttggag acacaattgc ctacctgctt 60
tcactaacag aagatggaga aggcaaagca gaactagcag aaaaattaca ctgttggttc 120
ggtgggaaag aatttgacct agactctgct ttggaatgga taaaaaaca aagatgccta 180
actgatatac aaaaagcact aattgggtgcc tctatctgct ttttaaaacc caaagaccaa 240
gaaagaaaaa gaagattcat cacagagccc ctgtcaggaa tgggaacaac agcaacaaaa 300
aagaaaggcc tgattctagc tgagagaaaa atgagaagat gtgtgagttt tcatgaagca 360

tttgaatag cagaaggcca tgaaagctca gcactactat attgtctcat ggatcatgtac 420
ctgaaccctg gaaattattc aatgcaagta aaactaggaa cgctctgtgc tttatgcgag 480
aaacaagcat cacattcaca aagagctcat agcagagcag caagatcttc agtgcctgga 540
gtgagcgag aaatgcagat ggtttcagct gtgaacacag caaaaacaat gaatggaatg 600
gggaaggag aagacgtcca aaaactggca gaagagctgc aaagcaacat tggagtattg 660
agatctctgg gggcaagtca aaagaatgga gaaggaattg caaaggatgt aatggaagtg 720
ctaaagcaga gctctatggg aaattcagct cttgtgaaga aatacctata atgctcgaac 780

catttcagat tctttcaatt tgtttttca ttttatcage tctccatttc atggcttgga 840
caatagggca ttigaatcaa ataaaaagag gagtaaacct gaaaatacga ataagaaatc 900
caaataaaga gacaataaac agagaggtat caattttgag acacagttac caaaaagaaa 960
tccaagccaa agaacaatg aaggaagtac tctctgacaa catggagata ttgagtgacc 1020
acatagtaat tgaggggctt tctgtgaag agataataaa aatgggtgaa acagttttgg 1080
aggtagaaga attgcagtaa acccaatttt caccgtatct cttgctatgc atttaagcaa 1140
attgtaatca atgtcagcaa ataaactgga aaaagtgcgt tgtttctact 1190

<210> 98

<211> 1098

<212> DNA

<213> Influenza B virus

<400> 98

agcagaagca gaggatttgt ttagtcactg gcaaacggaa aaaaatggcg gacaacatga 60
ccacaacaca aattgaggtg ggtccgggag caaccaatgc caccataaac ttggaagcag 120
gaattctgga gtgctatgaa aggctttcat ggcaaagagc ccttgactac cctggtaag 180
accgcctaaa cagactaaag agaaaattag aatcaagaat aaagactcac acaaaaagtg 240
agcctgaaag taaaaggatg tctcttgaag agagaaaagc aattggggta aaaatgatga 300
aagtgtcctt atttatgaat ccatctgctg gaattgaagg gtttgagcca tactgtatga 360

aaaattcctc aaatagcaac tgtccaaact gcaattggac cgattaccct ccaacaccag	420
gaaagtgcct tgatgacata gaagaagaac cggagaatgt tgatgacca actgaaatag	480
tattgaggga catgaacaac aaagatgcaa ggcaaaagat aaaggaggaa gtaaacactc	540
agaaagaagg gaagtccgt ttgacaataa aaaggatat acgtaatgtg ttgtccttga	600
gagtgttgg aaacggaaca ttctcaagc accctaatgg atacaagtcc ttatcaactc	660
tgcatagatt gaatgcatat gaccagagtg ggaggcttgt tgctaaactt gtgtctactg	720
atgatcttac agtggaggat gaagaagatg gccatcggat cctcaactca ctcttcgagc	780
gttttaatga aggacattca aagccaattc gagcagctga aactgcggtg ggagtcttat	840
cccaatttgg tcaagagcac cgattatcac cagaggaggg agacaattag actggttacg	900
gaagaacttt atcttttaag taaaagaatt gatgataaca tattgttcca caaacagta	960
atagctaaca gtccataat agctgacatg attgtatcat tatcattatt ggaaacattg	1020
tatgaaatga aggatgttgt tgaagtgtac agcaggcagt gcttgtgaat ttaaaataaa	1080
aatcctcttg ttactact	1098