



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월28일
(11) 등록번호 10-1861933
(24) 등록일자 2018년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0169687
(22) 출원일자 2016년12월13일
심사청구일자 2016년12월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140068205 A*
PLOS ONE. 2016.02.10., Vol. 11, No. 2,
e0149149, pp. 1-12.
KR1020110031966 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대
치동, 대치포스코더샵아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 20 항

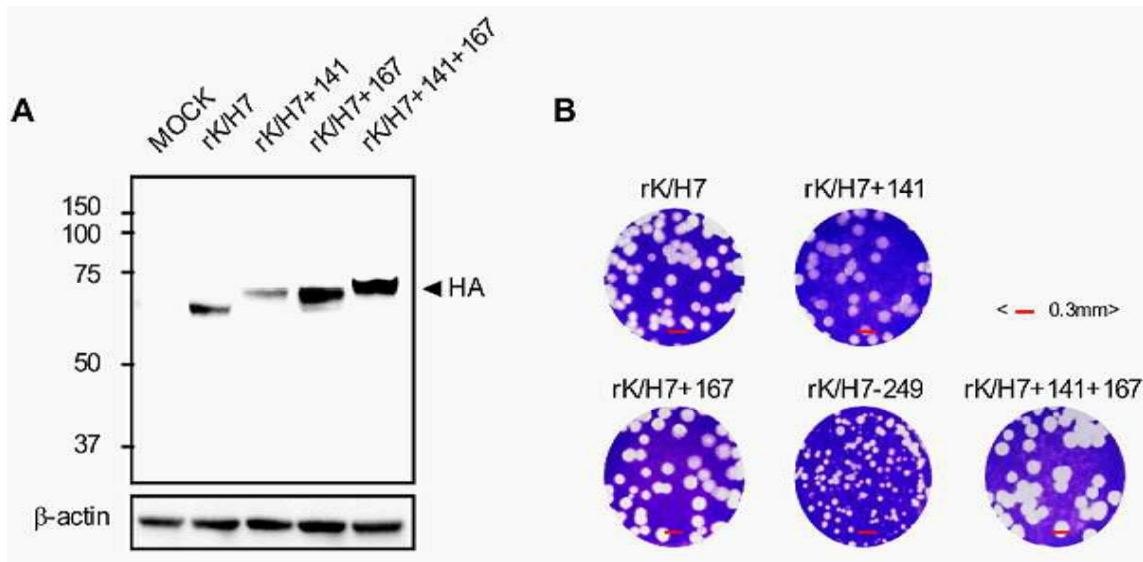
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 면역원성이 향상된 재조합 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신 조성물

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따르면, 2 이상의 아미노산이 당쇄화(glycosylation)된 H7 헤마글루티닌(HA, Hemmagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

C12N 2760/16021 (2013.01)

C12N 2760/16034 (2013.01)

G01N 2333/11 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A10300115221360200

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 H7N9 인플루엔자 백신주의 복제효율 및 면역원성 최적화연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

141번 및 167번 위치의 아미노산이 당쇄화(Glycosylation)된 H7 헤마글루티닌(HA, hemmagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아미노산은 아스파라긴인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 당쇄화는 N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 H7 헤마글루티닌은 조류인플루엔자 바이러스 유래인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조류인플루엔자 바이러스는 H7N1, H7N2, H7N3, H7N7 또는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 7

제1항에 있어서,

뉴라미니다아제(NA, Neuraminidase), 뉴클레오캡시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein), PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 더 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 뉴라미니다아제는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스 유래인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 뉴클레오펙시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein), PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)은 H1N1 아형 인플루엔자 바이러스 유래인, 재조합 인플루엔자 바이러스.

청구항 10

제1항 및 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

면역증강제(adjuvant)를 더 포함하는, 백신 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 면역증강제는 완전 프로인트 면역증강제(CFA, Complete Freund's Adjuvant), 불완전 프로인트 면역증강제(IFA, Incomplete Freund's Adjuvant), 스쿠알렌(Squalene), 스쿠알란(Squalane), 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 및 사포닌(Saponin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 백신 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는, 백신 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

이종 인플루엔자 바이러스에 교차 면역반응을 형성하는, 백신 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 백신은 아단위(subunit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 백신 조성물.

청구항 16

제1항 및 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 인플루엔자 감염 질환은 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 및 제3항 내지 제9항 중 어느 한 항의 재조합 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 19

제18항의 진단용 조성물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 진단 키트.

청구항 20

제18항의 진단용 조성물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 시료는 인플루엔자 바이러스에 감염된 것으로 예상되거나 감염된 세포, 혈액, 소변, 타액 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 인플루엔자 바이러스 감염 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역원성이 향상된 재조합 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오르소믹소바이러스과(*Orthomyxoviridae*)에 속하는 A형 인플루엔자 바이러스(IAV)는 인간을 포함한 다양한 동물을 숙주로 삼는다. 그러나, 종(species) 간의 장벽에 의해 기존 개체에서 새로운 개체로의 중간 전파(host transmission)는 제한되는 특성이 있다.

[0004] 조류 및 인간 인플루엔자 헤마글루티닌(HA, Hemmagglutinin) 단백질의 수용체 결합 특이성 차이를 살펴보면, 조류인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌은 $\alpha 2,3$ 시알산(SA, Sialic Acid) 수용체와 결합을 이루는 반면, 인간 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌은 $\alpha 2,6$ SA 수용체에 결합을 이루기 때문에, 조류 IAVs는 통상적으로 인간의 호흡기 세포에 감염되지 않는다.

[0005] 이와 같은 종 간의 장벽을 극복하기 위해, 조류인플루엔자 바이러스는 새로운 숙주에 지속적으로 감염되거나 특정 유전자 변이들(constellation)을 획득함으로써 적응(adaptation)을 거칠 필요가 있다.

- [0006] 이러한 측면에서 볼 때, 인체감염 조류인플루엔자 A(H7N9) 바이러스는 적응과 유전자 변이 획득의 좋은 예가 될 수 있다. 2013년 인체감염 전, H7N9 바이러스는 서로 다른 동물 숙주 내에서 다수의 적응과 유전적 변화를 거쳤다. 이를 통해 특정 바이러스 적합성(viral fitness)를 획득한 H7N9 조류인플루엔자 바이러스는 H5N1 고병원성 조류인플루엔자 바이러스보다 낮은 치사율(CFR, Case Fatality Rate)에도 불구하고 향후 대유행을 일으킬 수 있는 잠재성이 높은 바이러스로 여겨지고 있다.
- [0007] 상기 H7N9 조류인플루엔자 바이러스는 유행성 인플루엔자 바이러스와 같이 계절성 패턴을 보이며 현재까지 4회에 걸쳐 인체감염 사례를 일으키고 있다. 그러나, 상기 H7N9 바이러스가 향후 어떠한 양상으로 인체감염을 일으킬 것인지는 미지수이다. 따라서, 이러한 바이러스의 잠재적 위협으로부터 사람을 보호할 수 있는 효과적인 수단이 요구되고 있다.
- [0008] 상기 H7N9 바이러스로부터 사람을 보호하기 위한 수단 중, 최선택으로 백신을 고려할 수 있다. 몇몇의 연구에서 H7N9 백신에 대해 면역증강제(adjuvant) 포함 여부에 따른 임상시험이 수행되었다. 그러나, 상기 H7N9 백신은 인플루엔자 백신에 있어 효력의 기준이 되는 HI(Hemagglutination Inhibition) 40 이상의 항체가를 유도해내지 못하였으며, 면역증강제를 첨가한 백신을 2회 접종하였을 때 약 60%의 혈청전환율(seroconversion rate)만을 나타내는 결과를 보였다. 그 외 H7 아형(subtype)에 대한 백신 임상시험에서도 상기 H7N9 백신 임상시험과 같이 HI 역가는 매우 낮았다.
- [0009] 그러므로 2013년 이래 중국에서 계절성 패턴을 보이며 발생하고 있는 H7N9 바이러스 인체감염 사례를 고려하면, H7N9 바이러스의 사람 간 전파에 의한 전세계적 확산이 발생하기 전 H7N9 백신의 낮은 면역원성을 극복할 수 있는 연구가 반드시 이루어져야 한다.
- [0010] 종래 연구결과에 따르면, H1N1 바이러스의 헤마글루티닌 헤드(HA head) 영역에서 2개의 부가적인 N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)의 도입이 광범위한 면역원성을 유도할 수 있음이 밝혀졌다. 또한, 그 외 2건의 연구에서 H5N1 백신의 면역원성이 NLG에 영향을 받음을 증명하였다.
- [0011] H7 아형과 관련하여, 헤마글루티닌의 141번 위치 아미노산의 NLG 존재여부가 중화항체로부터 바이러스의 회피를 결정한다는 연구결과가 보고된 바 있다. 헤마글루티닌 및 뉴라미니다아제(NA, Neuraminidase) 간 기능적 밸런스의 중요성을 고려할 때, 헤마글루티닌 헤드 영역에서 NLG 패턴의 변이는 바이러스의 감염성, 항원성 및 면역원성에 결정적 영향을 미쳐 바이러스 적합성(viral fitness)을 변화시킬 수 있다.
- [0012] 그러나, 선천성 면역 및 체액성 면역에 대한 NLG의 효과와 관련하여, 상기 헤마글루티닌 헤드에서 NLG 도입은 바이러스의 감염성과는 별도로 이의 면역원성을 증가시킬 수 있기 때문에 NLG 도입 연구는 H7N9 바이러스에 대한 효과적인 백신 후보주를 개발하는 데 있어 하나의 방법이 될 수 있다.
- [0013] 이에 따라, 본 발명자들은 효과적인 H7N9 백신을 제조하기 위해 H7 아형 바이러스의 헤마글루티닌 NLG 패턴 변이에 대해 연구하였다. NLG 패턴 분석 결과 및 이를 바탕으로 한 역유전학법에 기반하여 NLG 돌연변이 재조합 바이러스를 제작하였고, 이러한 재조합 바이러스의 성장 특성과 면역원성을 평가하였다.
- [0014] 이후, H7N9 백신 후보주를 제작하여 계절성 인플루엔자 백신 제조와 동일한 방법으로 H7N9 백신을 개발하였으며, 상기 백신 바이러스의 방어 효과를 마우스에서 NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)에서 제작한 백신과 비교·분석 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은, 면역원성 및 증식능을 향상시킨 H7N9 아형 재조합 인플루엔자 바이러스 및 이를 포함하는 백신을 제공하는 것이다.
- [0017] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 2 이상의 아미노산이 당쇄화(Glycosylation)된 H7 헤마글루티닌(HA, Hemmagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.

- [0020] 일 측에 따르면, 상기 아미노산은 상기 H7 헤마글루티닌의 141번 및 167번 위치의 아미노산일 수 있다.
- [0021] 일 측에 따르면, 상기 아미노산은 아스파라긴일 수 있다.
- [0022] 일 측에 따르면, 상기 당쇄화는 N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)일 수 있다.
- [0023] 일 측에 따르면, 상기 H7 헤마글루티닌은 조류인플루엔자 바이러스 유래일 수 있다.
- [0024] 일 측에 따르면, 상기 조류인플루엔자 바이러스는 H7N1, H7N2, H7N3, H7N7 또는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스일 수 있다.
- [0025] 일 측에 따르면, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스는 뉴라미니다아제(NA, Neuraminidase), 뉴클레오캡시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein), PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0026] 일 측에 따르면, 상기 뉴라미니다아제는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스 유래일 수 있다.
- [0027] 일 측에 따르면, 상기 뉴클레오캡시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein), PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)는 H1N1 아형 조류인플루엔자 바이러스 유래일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물이 제공된다.
- [0029] 일 측에 따르면, 상기 백신 조성물은 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 일 측에 따르면, 상기 면역증강제는 완전 프로인트 면역증강제(CFA, Complete Freund's Adjuvant), 불완전 프로인트 면역증강제(IFA, Incomplete Freund's Adjuvant), 스쿠알렌(Squalene), 스쿠알란(Squalane), 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 및 사포닌(Saponin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0031] 일 측에 따르면, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0032] 일 측에 따르면, 상기 백신 조성물은 이중 인플루엔자 바이러스에 교차 면역반응을 형성할 수 있다.
- [0033] 일 측에 따르면, 상기 백신은 아단위(subunit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0035] 일 측에 따르면, 상기 인플루엔자 감염 질환은 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 진단용 조성물이 제공된다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 진단용 조성물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 진단 키트가 제공된다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 진단용 조성물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염 진단에 대한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.
- [0039] 일 측에 따르면, 상기 시료는 인플루엔자 바이러스에 감염된 것으로 예상되거나 감염된 세포, 혈액, 소변, 타액 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 재조합 인플루엔자 바이러스는 H7 헤마글루티닌(HA)의 특정 아미노산 잔기를 당쇄화(glycosylation)함으로써, 이를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 면역원성 및 증식능을 향상시킬 수 있다.
- [0042] 또한, 면역원성을 증가시킨 인플루엔자 바이러스를 백신으로 사용함으로써 소량만으로도 우수한 면역 반응을 유

도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 H7 HA NLG 돌연변이 바이러스의 제작 및 플라크(plaque) 표현형을 나타낸 것이다. 4개의 H7 HA(A/Anhui/01/2013) NLG 돌연변이를 구축하여 A/Korea/01/2009 기반의 7:1 돌연변이 바이러스(rH7+141, rH7+167, rH7-249 및 rH7+141+167)를 제조하였다. (A)는 바이러스 감염 후, MDCK 세포의 용해물(cell lysate)을 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 HA의 NLG 첨가를 확인한 것이다. (B)는 MDCK 세포에서 각 HA NLG 돌연변이 바이러스의 플라크(plaque) 표현형을 비교한 것이다. 인산완충식염수(PBS)를 감염 대조군(MOCK)으로 사용하였고, 야생형 H7 HA를 이용해 모(parental) 7:1 바이러스(rH7)를 제조하였다.

도 2는 포유동물 세포에서 H7 HA NLG 돌연변이 바이러스의 복제 속도를 나타낸 것이다. MDCK 세포(A), A549 세포(B) 및 Vero 세포(C)에서 4개의 H7 HA NLG 돌연변이 바이러스들의 성장 특성을 비교하였다. 3개의 독립된 실험으로부터 평균 값을 측정하였다. 바이러스들 간 성장 차이의 통계적 유의성을 일원분산분석(one-way ANOVA)을 통해 검정하였고, 터키 다중비교 검정(Turkey's multiple comparison test)을 통해 확인하였다. 각각의 상이한 세포들 간의 통계적 유의성은 다음과 같다: MDCK 세포($P < 0.05$); A549 세포($P < 0.01$); 및 Vero 세포($P < 0.001$). rH7 바이러스의 복제 역가(titer)를 다른 바이러스들에 대한 대조군으로 사용하였다. 오차 막대는 표준편차(SD)를 나타낸다.

도 3은 각각의 H7 HA NLG 돌연변이 바이러스에 대한 기니피그 항혈청의 면역 반응을 나타낸 것이다. 각 바이러스를 비강으로 감염시킨 뒤 분리한 기니피그 항혈청(A, α -rH7; B, α -rH7+141; C, α -rH7+167; 및 D, α -rH7+141+167)의 면역 반응을 HI 및 PRNT 분석을 통해 확인하였다. 3회의 독립된 실험으로부터 계산된 평균 값은 각각의 바이러스와 항혈청 간 상응하는 반응(예를 들어, rH7 바이러스와 α -rH7 항혈청 간 상응하는 반응의 HI 또는 PRNT 결과) 기반의 fold change로 나타내었다. 오차 막대는 SD를 나타낸다.

도 4는 백신 접종 후 면역이 형성된 마우스의 폐에서 바이러스의 복제를 나타낸 것이다. 0.1% Alum 면역증강제 포함 여부를 달리하여 NIBRG-268 또는 IYv+141+167 백신을 1차 접종만(primed only) 수행하거나(A) 또는 2차 접종까지(primed-booster) 수행한(B) 후에, 8마리의 BALB/c 마우스를 10^6 PFU의 NIBRG-268 바이러스로 감염시켰다. 감염 후 3일 및 5일 경과 시점에 각 마우스들의 폐를 적출하였고, MDCK 세포에서 플라크형성시험(plaque assay)을 통해 바이러스의 역가를 측정하였다. 대조군(비-면역군)으로 6마리의 백신을 접종하지 않은 마우스를 바이러스에 감염시켰다. 바이러스 역가 차이의 통계적 유의성을 스튜던트 t 검정(Student t-test)을 통해 평가하였다(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; 및 ***, $P < 0.001$). 오차 막대는 표준편차(SD)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0046] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0047] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0048] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0049] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

- [0051] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 2 이상의 아미노산이 당쇄화(Glycosylation)된 H7 헤마글루티닌(HA, Hemagglutinin)을 포함하는, 재조합 인플루엔자 바이러스가 제공된다.
- [0052] 인플루엔자 A 바이러스(IAV)의 아형(subtype)은 표면 단백질인 헤마글루티닌(HA, Hemagglutinin) 및 뉴라미니다아제(NA, Neuraminidase)의 항원성 차이에 따라 구분되며, 구체적으로 HA 및 NA에 따라 각각 H 아형과 N 아형으로 구분된다.
- [0053] A형 인플루엔자 바이러스의 H 아형은 H1부터 H16까지의 16종, N 아형은 N1부터 N9까지의 9종이 존재하며, 상기 재조합 바이러스는 이들 중 H7 아형의 헤마글루티닌, 구체적으로 2 이상의 아미노산이 당쇄화된 H7 헤마글루티닌을 포함할 수 있다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 용어 "당쇄화(Glycosylation)"는 당분자에서 헤미아세탈 수산기가 제거된 글리코실기를 단백질에 전위하는 반응을 의미한다. 상기 당쇄화는 각 반응에 특이적인 글리코실전달효소가 촉매로 관여하며, 당뉴클레오타이드를 공급체 기질로 하는 경우가 주를 이룬다. 수용체로는 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 히드록실리신 등의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 이러한 잔기에 전이된 올리고당에 점차로 단당을 전이하는 연속반응에 의해 복합당질을 합성할 수 있다. 상기 복합당질은 생체조직의 구성물질, 특히 세포외 기질의 주성분이 될 수 있고, 그 외 세포 표면에서 세포 인식에도 중요한 역할을 담당한다.
- [0055] 특히, 상기 당쇄화된 아미노산은 상기 H7 헤마글루티닌(HA)의 141번 및 167번 위치의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 H7 헤마글루티닌은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다. 즉, 상기 아미노산은 아스파라긴일 수 있고, 이의 당쇄화는 N-결합 당쇄화를 의미할 수 있다.
- [0056] 상기 HA의 167 잔기에서 NLG 첨가가 이루어지지 않는 경우, 바이러스의 T-세포 에피토프(YAEMKWLLSNTDNAAFPQ; HA의 155 내지 172 잔기에 위치)이 유지되므로 면역 반응이 억제될 수 있다. 상기 T-세포 에피토프(T-cell epitope)은 인체 내 면역 반응을 억제하는 H7N9 유전자 단편(genomic segment) 내 인간-모방 서열 중 하나를 의미한다.
- [0057] 상기 H7 헤마글루티닌의 141 잔기 단독의 NLG 첨가는 SA 수용체에 대한 HA 결합성을 저하시킬 수 있다. 반면, 141 잔기 및 167 잔기의 이중 NLG 첨가는 바이러스 복제능을 향상시킬 수 있고(도 2), 광범위한 항체 반응을 유도할 수도 있다(도 3).
- [0058] 본 명세서에서 사용된 용어 "N-결합 당쇄화(NLG, N-Linked Glycosylation)"는 번역(translation) 후의 단백질 변형 중 하나로, 다당류와 부착할 수 있는 단백질 내 3개의 연속된 아미노산 서열인 시퀀(sequon)이 "N-X-S/T(X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산)"으로 이루어진 경우, 아스파라긴(Asn, N) 잔기 상에 글리칸(glycan)이 결합되는 것을 의미한다. 이하, "NLG 첨가"는 비-당쇄화 아미노산의 당쇄화를 의미하고, "NLG 제거"는 당쇄화 아미노산의 비-당쇄화를 의미한다.
- [0059] 인플루엔자 바이러스의 HA 헤드 영역 주변의 NLG 상태 변화는 시알산(SA, Sialic Acid) 수용체에 대한 바이러스의 결합성에 영향을 미칠 수 있어, 결과적으로 바이러스의 감염성을 변화시킬 수 있다. 또한, NLG 변화는 종종 특정 항원 부위(antigenic site)의 차폐(masking) 및 숙주 면역기구의 인식으로부터 바이러스 자신을 숨기는 면역 회피를 야기할 수 있다.
- [0060] 종래 1918년과 2009년에 유행한 H1N1 바이러스의 HA 헤드 영역 주변의 NLG 상태 변화, 구체적으로 NLG 첨가는 상기 H1N1 바이러스에 대한 교차 면역 반응을 제공한다는 연구결과가 보고된 바 있다.
- [0061] 또한, 이와 유사한 방법으로, 2009년에 유행한 H1N1 바이러스 HA 헤드 영역에 NLG를 첨가하였을 때 서로 다른 아미노산 변이를 갖는 다양한 NLG 돌연변이에 대해 광범위한 HI 및 PRNT 반응을 보인다는 연구결과가 보고되었다.
- [0062] 이에 대해, 본 발명자들은 인체감염 가능성이 있는 조류인플루엔자 바이러스 유래의 H7 헤마글루티닌을 이용하여, 이의 특정 아미노산에 NLG 첨가 및 NLG 제거 돌연변이를 유발하여 백신 효능을 검증하고자 하였다.
- [0063] 이 때, 상기 조류인플루엔자 바이러스는 H7 아형 헤마글루티닌을 보유한 H7N1, H7N2, H7N3, H7N7 또는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스일 수 있고, 바람직하게는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 구체적으로 A/Anhui/01/2013일 수 있다. 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 H7 헤마글루티닌은 A/Anhui/01/2013의 헤마글루티닌일 수 있다.
- [0064] 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 제조를 위해, 본 발명자들은 A/Puerto Rico/8/34의 6개의 내부 유전자를 백본

(backbone)으로, 이중 NLG 첨가된 HA(HA+141+167) 및 H7N9 A/Anhui/01/2013 바이러스의 NA 유전자를 이용하여 H7N9 백신(IYv+141+167)을 제조하였다.

- [0065] 상기 A/Puerto Rico/8/34의 6개 내부 유전자는 중합효소복합체의 구성체인 PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)와 뉴클레오펙시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 및 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein)을 각각 암호화하는 유전자일 수 있다.
- [0066] 따라서, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스는 뉴라미니다아제(NA, Neuraminidase), 뉴클레오펙시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein), PA(Polymerase acidic protein), PB1(Polymerase basic protein 1), 및 PB2(Polymerase basic protein 2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0067] 이 때, 상기 뉴라미니다아제는 H7N9 아형 조류인플루엔자 바이러스, 구체적으로 A/Anhui/01/2013 유래일 수 있다. 구체적으로, 상기 뉴라미니다아제는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0068] 또한, 상기 뉴클레오펙시드 단백질(NP, Nucleoprotein), 매트릭스 단백질(M, Matrix protein), 비구조성 단백질(NS, Nonstructural protein), PA(Polymerase subunit A), PB1(Polymerase subunit B1), 및 PB2(Polymerase subunit B2)은 H1N1 아형 조류인플루엔자 바이러스, 구체적으로 A/Puerto Rico/8/34 유래일 수 있다.
- [0069] 구체적으로, 상기 매트릭스 단백질(M) 암호화 유전자는 M1 및 M2 단백질을 발현하고, 상기 비구조성 단백질(NS) 암호화 유전자는 NS1 및 NS2 단백질을 발현할 수 있다. 이에 따라, 상기 NP, M1, M2, NS1, NS2, PA, PB1 및 PB2는 각각 서열번호 3 내지 서열번호 10의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0070] 상기 IYv+141+167 백신에 대한 다양한 분석을 수행한 결과, 면역증강제의 첨가와 관계 없이, NIBRG-268 백신보다 높은 HI 역가를 유도할 수 있음을 확인하였다(표 2). 또한, 상기 IYv+141+167 백신은 마우스의 폐가 바이러스로부터 감염되는 것을 효과적으로 보호할 수 있으며(도 4), 면역증강제를 포함하는 상기 백신의 2차 접종(priming-boosting) 후 3일 및 5일이 경과한 시점에 마우스의 폐에서 바이러스를 사멸시킬 수 있다(도 4B).
- [0071] 상기 HA 헤드 영역에서 이중 NLG 첨가는 H7N9 바이러스의 증식능을 향상시켜 이를 이용한 백신 생산 수율을 증가시킬 수 있고, 상기 바이러스 백신에 우수한 면역원성 및 교차 면역원성을 부여할 수 있다. 또한, 상기 재조합 인플루엔자 바이러스는 감염성과 면역원성 간의 균형을 유지할 수 있어 고효율의 약독화된 백신으로 사용될 수 있다.
- [0072] 이에 따라, 본 발명의 다른 일 실시예는 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 백신 조성물을 제공한다. 상기 백신은 그 자체로 사독 백신일 수 있다.
- [0073] 본 명세서에서 사용된 용어 "사독 백신"은 불활성화 백신 또는 사균 백신이라고도 하며, 죽은 바이러스를 포함한 백신이다. 이의 예로는 전 바이러스 백신(whole-virus vaccine)과 분할 백신(split vaccine)이 있으며, 이들은 공지된 방법으로 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 전 바이러스 백신은 바이러스 전체에 포르말린을 처리하여 제조할 수 있으며, 분할 백신은 바이러스에 에테르를 처리하여 외피만을 분쇄, 수득함으로써 제조할 수 있다.
- [0074] 또한, 상기 백신 조성물은 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하기 때문에 그 자체만으로도 우수한 면역원성을 구현할 수 있으나, 그 효과를 더욱 강화시키기 위해 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다.
- [0075] 상기 면역증강제는 완전 프로인트 면역증강제(CFA, Complete Freund's Adjuvant), 불완전 프로인트 면역증강제(IFA, Incomplete Freund's Adjuvant), 스쿠알렌(Squalene), 스쿠알란(Squalane), 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 및 사포닌(Saponin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 수산화알루미늄과 인산알루미늄이 겔 상으로 혼합된 것(Alum)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 나아가, 상기 백신 조성물은 상기 면역증강제 뿐만 아니라, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 상기 백신 조성물을 제형화하기 위해 사용하는 것으로 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나

염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0078] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 텍스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] 한편, 상기 백신 조성물은 이에 포함된 재조합 인플루엔자 바이러스 외 이종 인플루엔자 바이러스에 교차 면역 반응을 형성할 수 있다. 예를 들어, 상기 백신 조성물이 H7N9 아형의 A/Anhui/1/2013 바이러스 기반의 재조합 인플루엔자 바이러스를 포함하면, 상기 백신 조성물의 접종은 다른 H7N9 아형의 A/Shanghai/2/2013 바이러스와 이종 인플루엔자 바이러스에 대한 항체를 형성할 수 있다.
- [0082] 상기 백신은 아단위(subunit) 백신, 합성 백신 및 유전공학 백신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 인일 수 있다.
- [0083] 상기 아단위 백신은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다. 예를 들면, 조류인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 추출하여 사용할 수 있다.
- [0084] 상기 합성 백신은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩타이드를 포함한 백신으로, 예를 들면, 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질 및/또는 NA 단백질을 합성하여 사용할 수 있다.
- [0085] 상기 유전공학 백신은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.
- [0086] 또한, 상기 백신은 불활성화된 균체들 또는 항원들과 혼합하여 조류인플루엔자를 포함한 다른 질병들을 함께 예방할 수 있는 혼합 또는 복합 백신으로 사용될 수 있다. 상기 혼합 백신은 서로 다른 바이러스 백신을 함께 사용한 백신을 의미하며, 복합 백신은 바이러스 백신과 세균 백신을 함께 사용한 백신을 의미한다.
- [0087] 상기 백신은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비강내, 흡입, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0088] 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 상기 백신의 비경구 투여는 바람직한 온도 하에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에 비독성이고 다른 제제 성분과 혼합될 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으로 조제하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0089] 상기 백신의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 백신의 제형은 정제, 캡셀제, 연질캡셀제, 수액제, 과립제, 환제 또는 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0090] 위와 같은 약학적 효능에 기초하여, 본 발명의 또 다른 일 실시예는 상기 재조합 인플루엔자 바이러스를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 및 그 외 추가로 포함될 수 있는 성분에 관해서는 전술한 것과 같다.
- [0091] 상기 인플루엔자 감염 질환은 인플루엔자 감염에 의해 유발되는 질환으로 부비강염, 발작성 천식, 중이염, 낭성 섬유증, 기관지염, 폐렴 및 설사로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0092] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [0093] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0094] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차로 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0095] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상기 재조합 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 진단용 조성물 또는 인플루엔자 바이러스 진단 키트를 제공한다.
- [0096] 나아가, 본 발명의 다른 일 실시예는 상기 진단용 조성물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 이 때, 상기 시료는 인플루엔자 바이러스에 감염된 것으로 예상되거나 감염된 세포, 혈액, 소변, 타액 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0097] 상기 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원은 항원-항체 복합체 반응을 통해 감염될 또는 감염된 세포중의 인플루엔자 바이러스를 제거하는데 사용될 뿐만 아니라 인플루엔자 바이러스를 특이적으로 검출하기 위해서도 사용될 수 있다.
- [0098] 상기 진단용 조성물 및 진단 키트는 상기 인플루엔자 바이러스뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등을 포함할 수 있다. 이러한 도구/시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나, 이로 한정되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 적합한 담체로는, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0099] 항원-항체 복합체 형성은 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블롯(Western Blotting), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip)등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0100] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하도록 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제와 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β -라타마제 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0101] 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며, 이에 한정되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 방사성 동위원소로는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{56}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 를 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0103] 이하에서는, 본 발명의 실시예에서 사용된 실험 재료 및 방법에 대해 상세히 기술한다.
- [0105] 바이러스 및 세포 준비
- [0106] 질병관리본부에서 제공받은 A/Korea/01/2009(H1N1) 바이러스를 사용하였다. MDCK 세포에서 플라크형성시험(plaque assay)을 통해 순수분리주를 확보한 뒤, 각각의 바이러스를 유정란(fertile chicken egg) 내에서 45

내지 72시간 동안 증식시켰다. MDCK 세포, 293T 세포(human embryonic kidney), A549 세포(human lung epithelial), 및 Vero 세포(African green monkey kidney)는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 제공받았다. MDCK 세포는 10% FBS 및 항생제를 포함하는 EMEM 배지에서, 293T, A549 및 Vero 세포는 10% FBS 및 항생제를 포함하는 DEME 배지에서 각각 37℃, 5% CO₂ 조건으로 유지하였다.

[0108] H7 아형 바이러스의 HA NLG 패턴 분석

[0109] H7 아형 바이러스(H7N1(n = 82); H7N2(n=142); H7N3(n=207); H7N7(n=145); 및 H7N9(n=51))의 676 HA 뉴클레오타이드 서열 전체를 NCBI 데이터베이스로부터 다운로드하여 NLG 패턴 분석을 수행하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>). 이후, AliView(v1.17.1)를 사용하여 전체 HA 서열을 아미노산 서열 세트로 변환하고 N-GlycoSite 웹사이트(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>)에서 분석하였다.

[0111] 플라스미드 기반 역유전학

[0112] A/Anhui/01/2013의 HA 유전자 및 NA 유전자를 합성하여(Cosmogenetech, Seoul, Republic of Korea) NLG 변형을 실시하였다. 전술한 것과 같이, 상기 A/Anhui/01/2013의 HA NLG 돌연변이 플라스미드 4개를 양방향성(ambisense) pDZ 플라스미드에 클로닝하여 역유전학용 플라스미드를 구축하고, 이를 A/Korea/01/2009 백본(backbone)과 함께 7:1 재조합 바이러스 생산에 사용하였다. 특정 HA NLG 돌연변이 바이러스의 제작을 위해 8개의 플라스미드를 293T/MDCK 세포로 도입(transfection)하였다. 48-72시간 경과 후, 0.5%(v/v) tRBC(turkey RBC)를 이용하여 세포 상청액(supernatant)에 대한 혈구응집시험(hemagglutination assay)을 수행하였고, 플라크형성시험(plaque assay)을 통한 순수분리주 확보를 위해 양성 샘플을 MDCK 세포에 접종하였다. 이후, 정제된 바이러스를 10일령의 유정란에 접종하여 증식시켰다. 제작용(rescued) 재조합 바이러스의 유전자 염기서열은 역전사 PCR을 통해 확인하였다.

[0114] 웨스턴 블랏 분석

[0115] 각 재조합 바이러스의 HA에 도입시킨 NLG가 발현되는지 확인하기 위하여, MDCK 세포에 재조합 바이러스를 3의 감염다중도(MOI, Multiplicity of Infection)로 접종하였다. 16시간 경과 후, SDS-PAGE를 위해 RIPA 버퍼(Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 세포 용해물을 확보하였다. 세포 용해물 내 HA는 rH7 바이러스에 대한 기니피그 다클론 항체를 통해 1차 검출하였고, 항-기니피그 IgG-HRP 항체(KPL, Gaithersburg, MA)를 통해 2차 검출하였다. 대조군으로는 마우스에서 생산된 단일클론 항체를 이용하여 β-액틴을 검출하였다.

[0117] 세포 내 NLG 돌연변이 바이러스의 성장 특성 분석

[0118] 재조합 바이러스의 성장 특성을 분석하기 위해, MDCK, A549 및 Vero 세포에 바이러스를 0.001 MOI로 접종하였다. 1시간 경과 후, 각각의 세포를 세척한 뒤, 0.3% BSA 및 TPCK(tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) 처리된 트립신(1μg/ml)을 포함하는 배지로 배양하였다. 이후, 특정 시간마다 상청액을 수집하여 상기 MDCK 세포 내 플라크형성시험(plaque assay)을 통해 바이러스 역가를 측정하였다.

[0120] 혈구응집억제시험(HI, Hemagglutination Inhibition) 분석

[0121] 2주 간격으로 10⁵ PFU(Plaque Forming Unit)의 바이러스를 비강으로 기니피그에 감염시켰다. 기니피그로부터 전체 혈액을 채혈한 뒤, 혈청을 확보하였다. 상기 혈청에 수용체파괴효소(receptor destroying enzyme)인 콜레라균(*Vibrio cholerae*)의 뉴라미니다아제(NA)를 처리하여 비특이 인자를 제거하였다. HI 분석은 4 HAU(Hemagglutination Unit)로 희석된 바이러스를 96-well plate에서 2배 단계희석한 혈청에 37℃, 1시간 동안 반응시킨 뒤 50μl의 0.5% tRBC를 각 well에 첨가하고, 45분 경과 후 HI 역가(titer)를 측정하는 방법으로 수행되었다. 대조군으로는 PBS를 사용하였다.

[0123] 플라크 감소 중화 시험(PRNT, Plaque-reduction neutralization test)

[0124] 중화항체가의 측정을 위해, 100 PFU의 바이러스를 2배 단계희석한 기니피그 항혈청과 37℃에서 반응하였다. 1시간 경과 후, MDCK 세포에 각 바이러스-혈청 반응물을 접종하여 플라크형성시험(plaque assay)을 수행하였다. 이후, PBS 대조군과 비교하여 50% 이상 바이러스 플라크 감소를 보인 최대희석배수를 기준으로 상기 PRNT 역가(titer)를 결정하였다.

[0126] 백신 준비

- [0127] 이중 NLG 첨가된 A/Anhui/01/2013의 HA 및 본래의 NA 유전자를 이용하여, 백신 공여체(vaccine donor)인 A/Puerto Rico/8/34(H1N1)의 6개 내부 유전자 백본(backbone)의 H7N9 백신 후보주 바이러스를 개발하였다. 상기 바이러스를 유정란에서 증식시킨 뒤, 요수(allantoic fluid)를 채취하여 수크로오스(sucrose) 밀도 구배의 분별원심분리(differential centrifugation)를 수행하였다. 이후, Triton™ X-100(AMRESCO, Cleveland, OH)를 이용하여 상기 백신 후보주 바이러스를 농축·정제하고 포름알데히드로 비활성화시켰다. 이후, SRID 방법을 이용하여 상기 백신의 HA 함량을 측정하였다. 상기 NIBRG-268 백신 바이러스 또한 위와 동일한 절차에 따라 처리하였다.
- [0129] 동물 실험
- [0130] 2차 접종까지 수행 여부 및 0.1%의 Alum 면역증강제 포함 여부를 달리하여 생후 5주령의 암컷 BALB/c 마우스에 2주 간격으로 상기 백신(15 μ g)을 근육접종(intramuscular immunization)하였다. 이후, 마우스의 혈청을 채취하고 RDE로 처리하여 HI 및 PRNT 분석을 수행하였다. 공격접종(challenge)에 대해, 각 그룹당 면역이 형성된 8마리의 마우스를 10⁶ PFU의 상기 NIBRG-268 바이러스로 비강내 감염시키고, 감염 후 3일 및 5일 경과 시점에 상기 마우스들의 폐를 적출하였다. 백신 접종을 실시하지 않은(mock-vaccinated) 마우스는 PBS를 사용하였다.
- [0132] 통계적 분석
- [0133] 일원분산분석(one-way ANOVA)을 통해 세포 내 바이러스의 상이한 복제 특성을 검정하고, 터키 다중비교 검정(Tukey's multiple comparison test)을 통해 확인하였다. 마우스의 폐에 대한 바이러스 역가의 차이에 대한 통계적 유의성은 스튜던트 t 검정(Student t test)을 이용하여 평가하였다.
- [0135] 실시예 1: H7 아형 바이러스 HA의 NLG 패턴 및 NLG 돌연변이 바이러스 제조
- [0136] 미국 국립생물공학정보센터(NCBI, Bethesda, MD) 데이터베이스로부터 다운로드한 HA 유전자 서열을 이용하여, H7 아형(subtype) 바이러스들(H7N1, H7N2, H7N3, H7N7, 및 H7N9)의 HA NLG 패턴을 조사하였다. 전체 676 HA 서열 중, HA 단백질의 30, 46, 141, 167, 249, 336, 439, 및 511 (H7N9 바이러스에 대한 HA 넘버링 기준) 위치의 아미노산 잔기에 해당하는 8개의 잠재적 당쇄화자리(glycosite)를 분석하였다.(표 1).
- [0137] 다만, H7N7 아형 바이러스의 HA만 상기 8개의 당쇄화자리 전부를 이용하였다. HA 구형 헤드 영역(HA globular head region) 주변에 위치한 4개의 아미노산 잔기(141, 167, 249 및 336) 중, H7N1, H7N2, H7N3 및 H7N9 아형은 336 잔기에서 NLG를 포함하지 않는 반면에, H7N9 아형은 167 잔기 및 336 잔기 모두 NLG를 포함하지 않았다.
- [0138] 또한, 4% 미만의 H7N9 바이러스는 HA 단백질 141 잔기의 NLG를 이용하는 것으로 나타났다(표 1). H7 아형 바이러스의 복제 및 면역원성에 대한 상기 NLG의 효과를 분석하기 위해 HA 헤드 영역 주변의 NLG 변이를 분석하였고, 플라스미드 기반 역유전학법을 이용하여 A/Korea/01/2009(H1N1)의 유전적 백본(backbone)을 바탕으로 NLG에 돌연변이를 가한 A/Anhui/01/2013(H7N9)의 HA를 이용하여 4종의 돌연변이 바이러스를 제조하였다: 잔기 141(rH7+141) 또는 167(rH7+167)에서 단일 NLG-첨가된 2개의 돌연변이; 잔기 141 및 167에서 이중 NLG-첨가된 돌연변이(rH7+141+167); 및 잔기 249에서 단일 NLG-제거된 돌연변이(rH7-249).
- [0139] 그 외 잔기 336에서 단일 NLG-첨가된 돌연변이는 3번의 독립적인 시험으로부터 제작(rescue)되지 않아 본 연구에는 포함시키지 않았다. A/Anhui/01/2013의 야생형 HA는 대조군인 모(parental) HA 재조합 바이러스(rH7) 생성에 사용하였다.
- [0140] 하기 표 1은 선별된 H7 아형 바이러스에서 HA NLG 빈도를 나타낸 것이다. 표 1에서, HA 잔기 번호는 H7N9 HA 넘버링 기준에 따라 표시하였다.

표 1

[0142]

Subtype	% NLG at HA residue (the number of sequences)								# of sequences
	30	46	141	167	249	336	439	511	
H7N1	98.78 (81)	100 (82)	25.61 (21)	24.39 (20)	100 (82)	-	100 (82)	98.78 (81)	82
H7N2	100 (142)	100 (142)	4.93 (7)	5.63 (8)	99.3 (141)	-	100 (142)	100 (142)	142
H7N3	100 (207)	97.1 (201)	8.21 (17)	5.8 (12)	100 (207)	-	99.52 (206)	100 (207)	207

H7N7	96.55 (140)	100 (145)	7.59 (11)	2.07 (3)	100 (145)	10.34 (15)	100 (145)	100 (145)	145
H7N9	100 (51)	100 (51)	3.92 (2)	-	100 (51)	-	100 (51)	100 (51)	51
Total	98.96 (669)	99.11 (670)	9.32 (63)	7.1 (48)	99.85 (675)	2.22 (15)	99.85 (675)	99.85 (675)	676

- [0144] 실시예 2: 포유동물 세포에서 H7 HA NLG 돌연변이 바이러스의 플라크 표현형 및 복제 특성 분석
- [0145] 상기 실시예 1에 따라 제작된(rescued) 돌연변이 바이러스의 HA 단백질에서의 NLG 상태 변화를 확인하기 위해, 개 신장세포(MDCK, Madin-Darby canine kidney)에 각각의 바이러스를 감염시키고 세포 용해물에 대한 웨스턴 블랏을 수행하였다. 상기 웨스턴 블랏 분석에서, 단일 NLG-첨가된 돌연변이 바이러스(rH7+141 및 rH7+167)는 모(parental) rH7 바이러스에 비해 낮은 이동성을 나타내었고, 이는 각각의 특정 잔기에 NLG-첨가되었음을 의미한다.
- [0146] 또한, 위와 동일한 분석에서 이중 NLG-첨가된 돌연변이(rH7+141+167) HA의 이동성이 가장 낮은 것을 확인하였다(도 1A). 다만, 동일한 웨스턴 블랏 분석에서 rH7-249의 HA는 관찰할 수 없었다.
- [0147] 다음으로, MDCK 세포에서 NLG 돌연변이 바이러스의 플라크(plaque) 표현형을 분석하였다. 모(parental) rH7 바이러스와 비교하여, rH7+141, rH7+167, 및 rH7+141+167 바이러스는 유사하거나 다소 증가한 크기의 플라크를 생성한 반면에, rH7-249의 플라크는 그 크기가 대폭 감소하였다(도 1B). 관련하여, 상기 NLG-첨가된 바이러스(rH7+141, rH7+167, 및 rH7+141+167)의 증가된 플라크 크기는 MDCK, A549, 및 Vero 세포에서 그들의 복제 증가와 관련성이 있는 것으로 나타났다(도 2).
- [0148] 상기 3종의 바이러스 중, rH7+167 및 rH7+141+167 바이러스는 모든 세포에서 rH7+141 바이러스에 비해 향상된 복제 속도를 나타내었고(도 2A 내지 C), 특히 상기 rH7+141+167 바이러스는 MDCK 세포에서 모 rH7 바이러스와 비교하여 가장 증가된 복제 속도를 나타내었다(도 2A).
- [0149] 다만, 상기 NLG-제거된 rH7-249 바이러스는 세포 내에서 향상된 복제 속도를 나타내지 않았고(도 2A 내지 C), 이는 바이러스 플라크 크기의 감소와 유사한 결과인 것으로 분석된다(도 1B). 다만, 상기 NLG 돌연변이 바이러스들은 마우스(mice)에서 치명적인 병원성을 나타내지 않았다.
- [0150] 이러한 모든 결과를 종합해보면, 상기 3종의 HA NLG-첨가된 돌연변이 바이러스가 NLG-제거된 돌연변이 바이러스에 비해 고수율의 백신 후보주 바이러스로서 높은 잠재성을 보유한 것으로 분석된다.
- [0152] 실시예 3: H7 HA NLG 돌연변이 바이러스의 면역원성 측정
- [0153] 상기 실시예 1에 따라 제조된 돌연변이 바이러스들의 백신 후보주 바이러스로서의 잠재성을 분석하기 위해, 각 NLG 돌연변이 바이러스의 면역원성 특성(immunogenic property)을 측정하였다. 다만, 상기 rH-249 바이러스는 HI 분석에 충분한 혈구응집시험(hemagglutination reaction) 역가(titer)를 나타내지 못하여 본 혈청학적 분석에서 제외하였다.
- [0154] 각 바이러스를 비강을 통해 기니피그에 감염시킨 뒤, 혈청을 확보하고 이를 이용하여 HI 분석을 실시하였다. 그 결과, rH7 및 rH7+167 혈청은 141 잔기에 NLG가 첨가된 바이러스에 대해 상대적으로 낮은 면역원성을 나타내었다(도 3A 및 C). 그러나, rH7+141의 혈청은 3종의 모든 NLG-첨가된 바이러스에 대해 우수한 면역원성을 나타내었다(도 3B).
- [0155] 가장 광범위한 HI 반응성은 이중 NLG-첨가된 rH7+141+167 바이러스에서 확인되었다. 상기 rH7+141+167 혈청의 HI 역가는 실험에 사용된 모든 바이러스에서 1.5배 이상, 모 rH7 바이러스 대비 4배까지 증가한 결과를 나타내었다(도 3D). 상기 HI 분석과 같이, 각 혈청의 PRNT 역가를 모든 바이러스에 대해 분석하였다(도 3A 내지 D).
- [0156] 분석 결과, HI 분석 결과에서와 같이 rH7+141+167 바이러스가 가장 광범위한 면역원성을 나타내었으며, 이는 H7 아형 바이러스에 대한 백신 바이러스로서 우수한 후보주가 될 수 있음을 의미한다.
- [0158] 실시예 4: 이중 NLG-첨가된 HA를 포함하는 H7N9 백신의 교차 면역원성 및 방어능 분석
- [0159] 효과적인 H7N9 백신으로써 이중 NLG-첨가된 HA의 교차 면역원성을 실험동물에서 확인하기 위해, PR8(A/Puerto Rico/8/34) 바이러스 기반의 이중 NLG-첨가된 HA(IYv+141+167) 및 A/Anhui/01/2013의 NA 유전자를 포함하는 H7N9 백신 후보주를 제작하였다.

[0160] 상기 백신주를 유정란에서 유행성 인플루엔자 백신 제조 방법과 동일하게 제형화하였다. 0.1% Alum 면역증강제 포함 여부 및 접종 횟수를 달리하여 근육접종을 수행하였다. A/Anhui/01/2013 유래의 HA 및 NA 유전자를 포함하는 H7N9 백신(NIBRG-268)을 대조군으로 사용하였다.

[0161] 하기 표 2는 1차 접종만 수행하거나 2차 접종까지 수행하여 면역성이 형성된 마우스에서 수득한 항혈청의 HI 역가를 나타낸 것이다.

표 2

Virus	Single immunization [GMT (95% CI)]			
	NIBRG-268		IYv+141+167	
	Only 15ug HA	0.1% Alum + 15ug HA	Only 15ug HA	0.1% Alum + 15ug HA
Anhui	0	0	24.38 (17.83~33.33)	36.23 (20.35~64.5)
Shanghai	0	0	13.46 (9.55~18.96)	20 (13.81~28.96)
rH7+141+167	0	0	24.28 (16.46~32.3)	35.64 (20.61~61.62)
Virus	Double immunization [GMT (95% CI)]			
	NIBRG-268		IYv+141+167	
	Only 15ug HA	0.1% Alum + 15ug HA	Only 15ug HA	0.1% Alum + 15ug HA
Anhui	29.72 (17.95~49.22)	56.57 (37.98~84.26)	97.52 (53~179.3)	262.5 (161.7~426.2)
Shanghai	22.08 (12.4~39.31)	50.4 (27.82~91.28)	97.52 (53~179.4)	262.5 (161.7~426.2)
rH7+141+167	12.6 (4.66~34.05)	25.2 (6.324~68.1)	63.5 (26.31~153.2)	211.1 (131.8~338.2)

[0165] 상기 표 2를 참고하면, HI 분석 결과 1차 접종만 수행한 마우스 및 이에 면역증강제를 보충한 마우스에서 NIBRG-268은 HI 반응성 항체를 유도하지 못하였다. 반면, 2차 접종까지 수행한 마우스에서는 NIBRG-268의 낮은 면역원성을 관찰할 수 있었다.

[0166] 그러나, IYv+141+167 백신은 조건을 달리한 각 마우스마다 HI 역가를 나타냈다. 1차 접종만 수행한 경우(single immunization), 3종의 H7N9 바이러스에 대해 IYv+141+167 백신은 면역증강제 유무에 따라 각각 20~36.23 및 13.46~24.38의 HI 역가를 나타내었다(표 2). 2차 접종까지 수행한 경우(double immunization), 면역이 형성된 마우스는 면역증강제 없이도 1차 접종만 수행한 마우스(single immunized mice)에 비해 2배 또는 3배 증가된 HI 역가(63.5~97.52)를 나타내었으며, 면역증강제를 보충한 경우 더욱 증가된 HI 역가(211.1~262.5)를 나타내었다.

[0167] 특히, 2차 접종까지 수행한 마우스에서 면역증강제를 포함하지 않은 NIBRG-268은 40 미만의 HI 역가를 나타내어 백신으로서 요구되는 기준에 적합한 항체를 형성하지 못하는 것을 알 수 있다. 반면, IYv+141+167 백신은 면역증강제 없이도 40 이상의 HI 역가를 나타내어 우수한 항체 형성능을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는, NIBRG-268에 비해 IYv+141+167 백신이 보다 우수한 면역원성을 나타냄을 의미한다.

[0168] 또한, 상기 표 2의 A/Shanghai/2/2013 바이러스에 대한 실험 결과를 참고하면, IYv+141+167 백신의 2차 접종에서 A/Anhui/01/2013 바이러스와 동등한 수준의 HI 역가를 나타내는 것을 확인할 수 있고, 이를 통해 IYv+141+167 백신이 다른 인플루엔자 바이러스에도 백신 효능을 나타낼 수 있는 교차 면역원성을 보유하였음을 알 수 있다.

[0169] 한편, IYv+141+167 백신에 의해 면역성이 형성된 마우스에서 HI 역가 증가에 따라, 공격접종 된 마우스의 폐에서 확인되는 바이러스 역가의 감소와 일치하는 결과임이 확인되었다(도 4). 상기 HI 결과에 따르면, IYv+141+167 백신에 의해 면역성이 형성된 마우스는 폐에서 낮은 바이러스 역가를 나타내었고, IYv+141+167의 방어능은 1차 접종만 수행한 마우스에 비해 2차 접종까지 수행한 마우스에서 보다 향상된 결과를 나타내었다.

[0170] 면역증강제와 함께 투여한 경우, 2차 접종까지 수행한 마우스는 감염 후 3 내지 5일이 경과한 시점에 폐에서 바이러스가 검출되지 않았다(도 4B). 그러나, 이와 달리 NIBRG-268에 의해 면역이 형성된 마우스는 효과적인 방어능을 보이지 않았다(도 4A 및 B).

[0171] 이러한 결과는 효과적인 H7N9 백신 개발과 관련하여, 상기와 같은 HA NLG 변형이 우수한 예방 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

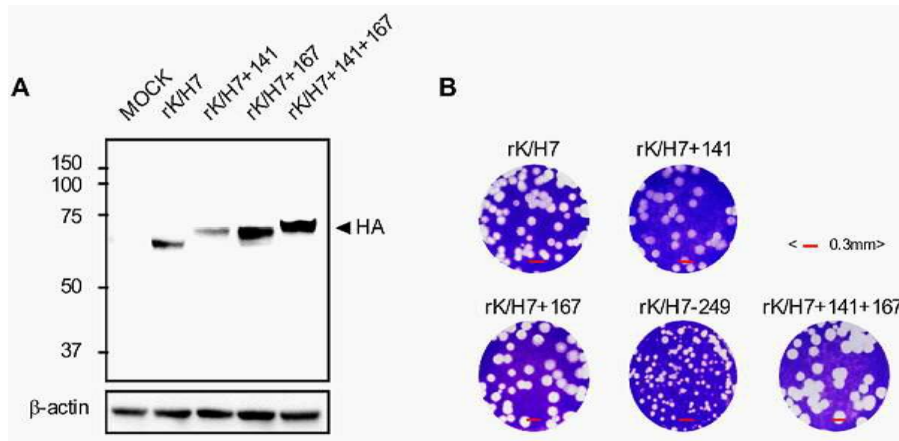
[0173] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다

른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

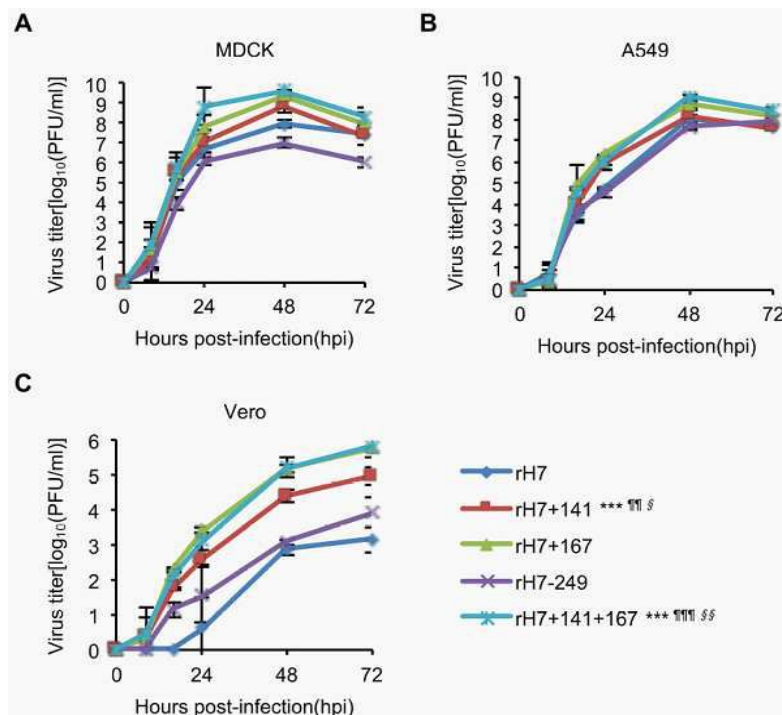
[0174] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

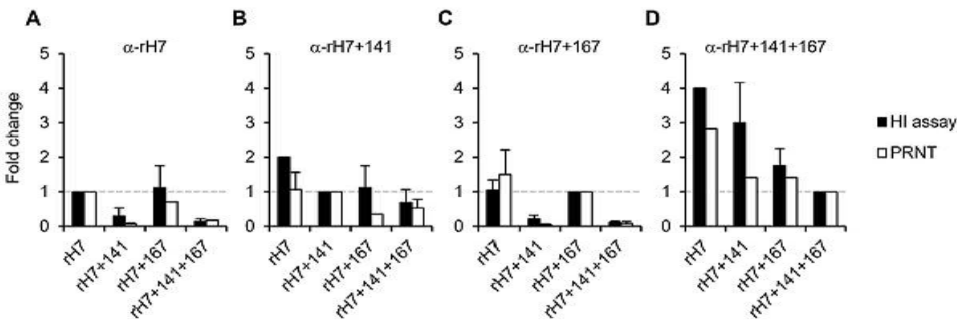
도면1



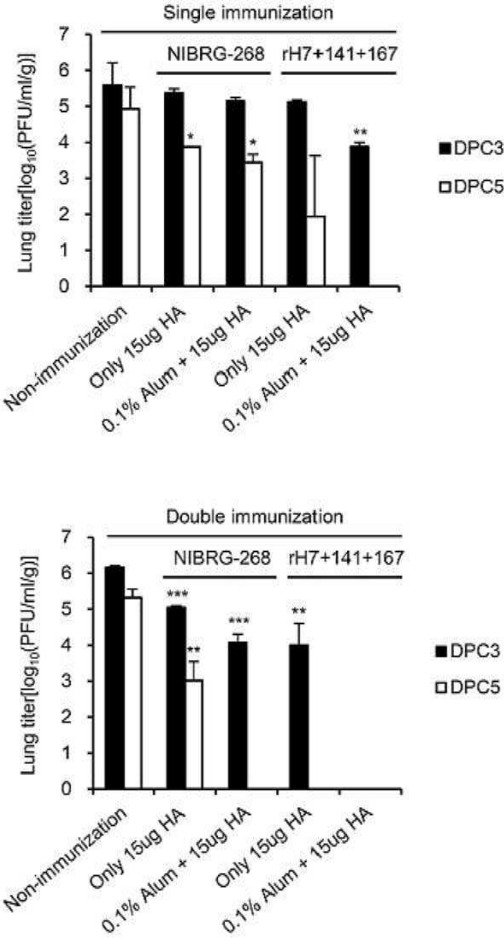
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY
- <120> RECOMBINANT AVIAN INFLUENZA VIRUS HAVING IMPROVED IMMUNOGENICITY AND VACCINE COMPOSITION COMPRISING THE SAME
- <130> APC-2016-0326
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 560

<212> PRT

<213> influenza A virus

<400> 1

Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Ile Ala Ile Ile Pro Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr

35 40 45

Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Ile Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys

50 55 60

Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly

65 70 75 80

Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile

85 90 95

Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn

100 105 110

Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys

115 120 125

Glu Ala Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr

130 135 140

Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Ser Pro Ala Leu Ile Val Trp Gly Ile His

180 185 190

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

195 200 205

Lys Leu Val Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro

210 215 220

Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Leu Ser Gly Arg Ile Asp
 225 230 235 240
 Phe His Trp Leu Met Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe

 245 250 255
 Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
 260 265 270
 Ser Met Gly Ile Gln Ser Gly Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
 275 280 285
 Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
 290 295 300
 Asn Ile Asp Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
 305 310 315 320

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

 385 390 395 400
 Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Asn Glu Val Glu Lys Gln Ile
 405 410 415
 Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Ile Thr Glu Val Trp Ser
 420 425 430
 Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp
 435 440 445
 Leu Ala Asp Ser Glu Met Asp Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys Arg Gln
 450 455 460

 Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe

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

530 535 540
 Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile
 545 550 555 560

<210> 2
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> influenza A virus
 <400> 2

Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Leu Cys Thr Ser Ala Thr Ala Ile Thr
 1 5 10 15
 Ile Gly Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Ile Ala Asn Leu Gly Leu Asn
 20 25 30

Ile Gly Leu His Leu Lys Pro Gly Cys Asn Cys Ser His Ser Gln Pro
 35 40 45
 Glu Thr Thr Asn Thr Ser Gln Thr Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Thr Asn Ile Thr Asn Ile Gln Met Glu Glu Arg Thr Ser Arg Asn Phe
 65 70 75 80
 Asn Asn Leu Thr Lys Gly Leu Cys Thr Ile Asn Ser Trp His Ile Tyr
 85 90 95
 Gly Lys Asp Asn Ala Val Arg Ile Gly Glu Ser Ser Asp Val Leu Val

100 105 110
 Thr Arg Glu Pro Tyr Val Ser Cys Asp Pro Asp Glu Cys Arg Phe Tyr
 115 120 125

Ala Leu Ser Gln Gly Thr Thr Ile Arg Gly Lys His Ser Asn Gly Thr
130 135 140

Ile His Asp Arg Ser Gln Tyr Arg Ala Leu Ile Ser Trp Pro Leu Ser
145 150 155 160

Ser Pro Pro Thr Val Tyr Asn Ser Arg Val Glu Cys Ile Gly Trp Ser
165 170 175

Ser Thr Ser Cys His Asp Gly Lys Ser Arg Met Ser Ile Cys Ile Ser
180 185 190

Gly Pro Asn Asn Asn Ala Ser Ala Val Val Trp Tyr Asn Arg Arg Pro
195 200 205

Val Ala Glu Ile Asn Thr Trp Ala Arg Asn Ile Leu Arg Thr Gln Glu
210 215 220

Ser Glu Cys Val Cys His Asn Gly Val Cys Pro Val Val Phe Thr Asp
225 230 235 240

Gly Ser Ala Thr Gly Pro Ala Asp Thr Arg Ile Tyr Tyr Phe Lys Glu
245 250 255

Gly Lys Ile Leu Lys Trp Glu Ser Leu Thr Gly Thr Ala Lys His Ile
260 265 270

Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Gly Glu Arg Thr Gly Ile Thr Cys Thr Cys
275 280 285

Arg Asp Asn Trp Gln Gly Ser Asn Arg Pro Val Ile Gln Ile Asp Pro
290 295 300

Val Ala Met Thr His Thr Ser Gln Tyr Ile Cys Ser Pro Val Leu Thr
305 310 315 320

Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Pro Asn Ile Gly Lys Cys Asn Asp Pro
325 330 335

Tyr Pro Gly Asn Asn Asn Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Tyr Leu Asp
340 345 350

Gly Ala Asn Thr Trp Leu Gly Arg Thr Ile Ser Thr Ala Ser Arg Ser
355 360 365

Gly Tyr Glu Met Leu Lys Val Pro Asn Ala Leu Thr Asp Asp Arg Ser
370 375 380

Lys Pro Ile Gln Gly Gln Thr Ile Val Leu Asn Ala Asp Trp Ser Gly

385 390 395 400

Tyr Ser Gly Ser Phe Met Asp Tyr Trp Ala Glu Gly Asp Cys Tyr Arg

405 410 415

Ala Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro Lys Glu Asp Lys

420 425 430

Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Ile Val Ser Met Cys Ser Ser Thr Glu

435 440 445

Phe Leu Gly Gln Trp Asn Trp Pro Asp Gly Ala Lys Ile Glu Tyr Phe

450 455 460

Leu

465

<210> 3

<211> 498

<212> PRT

<213> influenza A virus

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys

35 40 45

Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu

50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu

65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile

85 90 95

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

100 105 110

Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp

115	120	125
Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn		
130	135	140
Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp		
145	150	155
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser		
165	170	175
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu		
180	185	190
Leu Val Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg		
195	200	205
Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn		
210	215	220
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp		
225	230	235
Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Phe Glu Asp Leu		
245	250	255
Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His		
260	265	270
Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly		
275	280	285
Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe		
290	295	300
Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu		
305	310	315
Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala		
325	330	335
Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val		
340	345	350
Val Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn		
355	360	365

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

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

<210> 4
<211> 252
<212> PRT
<213> influenza A virus
<400> 4
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15
Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30
Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

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

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

115					120					125									
Gly	Leu	Ile	Tyr	Asn	Arg	Met	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Glu	Val	Ala	Phe				
130					135					140									
Gly	Leu	Val	Cys	Ala	Thr	Cys	Glu	Gln	Ile	Ala	Asp	Ser	Gln	His	Arg				
145					150					155					160				
Ser	His	Arg	Gln	Met	Val	Thr	Thr	Thr	Asn	Pro	Leu	Ile	Arg	His	Glu				
165					170					175									
Asn	Arg	Met	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Lys	Ala	Met	Glu	Gln	Met				
180					185					190									

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

<210> 5

<211> 97

<212> PRT

<213

- > influenza A virus

<400> 5

Met	Ser	Leu	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Thr	Pro	Ile	Arg	Asn	Glu	Trp	Gly
1				5					10					15	
Cys	Arg	Cys	Asn	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Asn	Ile
			20						25					30	

Ile Gly Ile Leu His Leu Ile Leu Trp Ile Leu Asp Arg Leu Phe Phe
 35 40 45
 Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Phe Lys Tyr Gly Leu Lys Gly Gly Pro Ser
 50 55 60

Thr Glu Gly Val Pro Lys Ser Met Arg Glu Glu Tyr Arg Lys Glu Gln
 65 70 75 80
 Gln Ser Ala Val Asp Ala Asp Asp Gly His Phe Val Ser Ile Glu Leu
 85 90 95
 Glu

<210> 6
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> influenza A virus
 <400> 6

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe

20 25 30
 Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45
 Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60
 Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80
 Met Ala Ser Val Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Glu
 85 90 95

Glu Met Ser Arg Glu Trp Ser Met Leu Ile Pro Lys Gln Lys Val Ala
 100 105 110
 Gly Pro Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Met Asp Lys Asn Ile
 115 120 125
 Ile Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Asp Arg Leu Glu Thr Leu

130 135 140
 Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Gly Ala Ile Val Gly Glu Ile
 145 150 155 160
 Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly His Thr Ala Glu Asp Val Lys Asn

165 170 175
 Ala Val Gly Val Leu Ile Gly Gly Leu Glu Trp Asn Asp Asn Thr Val
 180 185 190
 Arg Val Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Ser Ser Asn Glu

195 200 205
 Asn Gly Arg Pro Pro Leu Thr Pro Lys Gln Lys Arg Glu Met Ala Gly
 210 215 220
 Thr Ile Arg Ser Glu Val

225 230

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> influenza A virus

<400> 7

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Asp Ile Leu Leu Arg Met

1 5 10 15

Ser Lys Met Gln Leu Glu Ser Ser Ser Glu Asp Leu Asn Gly Met Ile

20 25 30

Thr Gln Phe Glu Ser Leu Lys Leu Tyr Arg Asp Ser Leu Gly Glu Ala

35 40 45

Val Met Arg Met Gly Asp Leu His Ser Leu Gln Asn Arg Asn Glu Lys

50 55 60

Trp Arg Glu Gln Leu Gly Gln Lys Phe Glu Glu Ile Arg Trp Leu Ile

65 70 75 80

Glu Glu Val Arg His Lys Leu Lys Val Thr Glu Asn Ser Phe Glu Gln

85 90 95

Ile Thr Phe Met Gln Ala Leu His Leu Leu Leu Glu Val Glu Gln Glu

100 105 110

Ile Arg Thr Phe Ser Phe Gln Leu Ile

115 120

<210> 8

<211> 716

<212> PRT

<213> influenza A virus

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Asp Phe His Phe Ile Asn Glu Gln Gly Glu Ser Ile Ile Val Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Ala Arg Ile Lys Thr Arg Leu Phe

165 170 175

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

180 185 190

Gln Ser Glu Arg Gly Glu Glu Thr Ile Glu Glu Arg Phe Glu Ile Thr

195 200 205
Gly Thr Met Arg Lys Leu Ala Asp Gln Ser Leu Pro Pro Asn Phe Ser

210 215 220
Ser Leu Glu Asn Phe Arg Ala Tyr Val Asp Gly Phe Glu Pro Asn Gly
225 230 235 240

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

Ile Glu Pro Phe Leu Lys Thr Thr Pro Arg Pro Leu Arg Leu Pro Asn
260 265 270

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

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

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

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

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

Lys Ile Pro Lys Thr Lys Asn Met Lys Lys Thr Ser Gln Leu Lys Trp

355 360 365
Ala Leu Gly Glu Asn Met Ala Pro Glu Lys Val Asp Phe Asp Asp Cys

370 375 380
Lys Asp Val Gly Asp Leu Lys Gln Tyr Asp Ser Asp Glu Pro Glu Leu

385 390 395 400
Arg Ser Leu Ala Ser Trp Ile Gln Asn Glu Phe Asn Lys Ala Cys Glu

405 410 415
Leu Thr Asp Ser Ser Trp Ile Glu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Asp Val

420 425 430

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

Glu Val Ser His Cys Arg Ala Thr Glu Tyr Ile Met Lys Gly Val Tyr
 450 455 460
 Ile Asn Thr Ala Leu Leu Asn Ala Ser Cys Ala Ala Met Asp Asp Phe
 465 470 475 480
 Gln Leu Ile Pro Met Ile Ser Lys Cys Arg Thr Lys Glu Gly Arg Arg
 485 490 495
 Lys Thr Asn Leu Tyr Gly Phe Ile Ile Lys Gly Arg Ser His Leu Arg
 500 505 510
 Asn Asp Thr Asp Val Val Asn Phe Val Ser Met Glu Phe Ser Leu Thr
 515 520 525
 Asp Pro Arg Leu Glu Pro His Lys Trp Glu Lys Tyr Cys Val Leu Glu
 530 535 540
 Ile Gly Asp Met Leu Leu Arg Ser Ala Ile Gly Gln Val Ser Arg Pro
 545 550 555 560
 Met Phe Leu Tyr Val Arg Thr Asn Gly Thr Ser Lys Ile Lys Met Lys
 565 570 575
 Trp Gly Met Glu Met Arg Arg Cys Leu Leu Gln Ser Leu Gln Gln Ile
 580 585 590
 Glu Ser Met Ile Glu Ala Glu Ser Ser Val Lys Glu Lys Asp Met Thr
 595 600 605
 Lys Glu Phe Phe Glu Asn Lys Ser Glu Thr Trp Pro Ile Gly Glu Ser
 610 615 620
 Pro Lys Gly Val Glu Glu Ser Ser Ile Gly Lys Val Cys Arg Thr Leu
 625 630 635 640
 Leu Ala Lys Ser Val Phe Asn Ser Leu Tyr Ala Ser Pro Gln Leu Glu
 645 650 655
 Gly Phe Ser Ala Glu Ser Arg Lys Leu Leu Leu Ile Val Gln Ala Leu
 660 665 670
 Arg Asp Asn Leu Glu Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Gly Leu Tyr Glu
 675 680 685
 Ala Ile Glu Glu Cys Leu Ile Asn Asp Pro Trp Val Leu Leu Asn Ala
 690 695 700

Ser Trp Phe Asn Ser Phe Leu Thr His Ala Leu Ser

705 710 715

<210> 9

<211> 757

<212> PRT

<213> influenza A virus

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln

35 40 45

Tyr Ser Glu Lys Gly Arg Trp Thr Thr Asn Thr Glu Thr Gly Ala Pro

50 55 60

Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Ile Glu Thr Met Glu

100 105 110

Val Val Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr

115 120 125

Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Lys Lys

165 170 175

Glu Glu Met Gly Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg

180 185 190

Asp Asn Met Thr Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Arg

195 200 205

Lys Gln Arg Leu Asn Lys Arg Gly Tyr Leu Ile Arg Ala Leu Thr Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys

275 280 285

Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ile Thr Gly

290 295 300

Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Met Phe Leu Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Thr Arg Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Ile Glu Gly Thr

385 390 395 400

Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser

405 410 415

Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Arg Tyr Thr

420 425 430

Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala

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

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

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

 625 630 635 640
 Asn Asn Ala Val Met Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Asn Met Glu
 645 650 655
 Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
 660 665 670
 Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Val Leu Glu Asp Glu Gln Met
 675 680 685
 Tyr Gln Arg Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser

690

695

700

Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser

705 710 715 720

Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys

725 730 735

Lys Glu Glu Phe Thr Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu

740 745 750

Leu Arg Arg Gln Lys

755

<210> 10

<211> 759

<212> PRT

<213> influenza A virus

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
385 390 395 400
Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly
405 410 415
Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His
420 425 430
Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn
435 440 445
Trp Gly Val Glu Pro Ile Asp Asn Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu
450 455 460
Pro Asp Met Thr Pro Ser Ile Glu Met Ser Met Arg Gly Val Arg Ile
465 470 475 480
Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Val
485 490 495
Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Val Leu
500 505 510
Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr
515 520 525
Ile Thr Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser
530 535 540
Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile Ile Arg Asn Trp Glu Thr Val
545 550 555 560
Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asn Pro Thr Met Leu Tyr Asn Lys Met Glu
565 570 575
Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro Lys Ala Ile Arg Gly Gln Tyr
580 585 590
Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly
595 600 605
Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala
610 615 620
Pro Pro Lys Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Phe Thr Val Asn Val
625 630 635 640

Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe

645

650

655

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

660

665

670

Gly Thr Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser

675

680

685

Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu Gly Lys Glu Asp Arg Arg Tyr

690

695

700

Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu Ser Asn Leu Ala Lys Gly Glu

705

710

715

720

Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys

725

730

735

Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys

740

745

750

Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn

755