



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 286 892**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/44** (2006.01)

**C12N 7/08** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

**C07K 14/11** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99941169 .7**

(86) Fecha de presentación : **12.08.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1105497**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

(54) Título: **Virus de influenza equina adaptados en frío.**

(30) Prioridad: **13.08.1998 US 133921**

(73) Titular/es: **University of Pittsburgh - Of the Commonwealth System of Higher Education 200 Gardner Steel Conference Center Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

(72) Inventor/es: **Dowling, Patricia, W. y Youngner, Julius, S.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

(74) Agente: **Urízar Anasagasti, José Antonio**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Virus de influenza equina adaptados en frío.

5 La presente invención se refiere a los virus de influenza equina adaptados en frío generados experimentalmente, y particularmente a los virus de influenza equina adaptados en frío que tienen fenotipos adicionales, tales como atenuación, interferencia dominante, o sensibilidad a la temperatura. La invención además incluye virus de influenza A recatalogados, los cuales contienen al menos un segmento de genoma de tal virus de influenza equina, tal que el virus recatalogado incluye ciertos fenotipos del virus de influenza equina donante. La invención además incluye virus de influenza equina diseñados genéticamente, producidos a través de genéticas inversas, los cuales comprenden ciertos fenotipos de identificación de un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención. La presente invención además se refiere al uso de estos virus en composiciones terapéuticas para proteger animales de enfermedades causadas por los virus de influenza.

10 15 **Antecedentes de la invención**

El virus de influenza equina ha sido reconocido desde alrededor de 1956 como el principal patógeno respiratorio en caballos. Los síntomas de la enfermedad causada por el virus de influenza equina pueden ser severos, y son a menudo seguidos por infecciones bacterianas secundarias. Dos subtipos de virus de influenza equina son reconocidos, a saber, 20 subtipo-1 siendo el prototipo A/Equino/Praga/1/56 (H7N7), y subtipo-2 siendo el prototipo A/Equino/Miami/1/63 (H3N8). En el momento presente, el subtipo de virus predominante es el subtipo-2, el cual además ha divergido entre el Eurasíatico y el Norte Americano aislados en años recientes.

La vacuna autorizada actualmente para la influenza equina es una vacuna de virus desactivado (muerto). Esta 25 vacuna proporciona una mínima, si alguna, protección para caballos, y puede producir efectos colaterales indeseables, por ejemplo, reacciones inflamatorias en el sitio de la inyección. Ver, por ejemplo, Mumford, 1987, *Equine Infectious Disease IV*, 207-217, y Mumford, *et al.*, 1993, *Vaccine 11*, 1172-1174. Además, las modalidades actuales no pueden ser usadas en potros jóvenes, ya que ellos no pueden vencer la inmunidad materna, y pueden inducir tolerancia en un animal más joven. En base a la severidad de la enfermedad, permanece una necesidad en composiciones terapéuticas 30 efectivas y seguras para proteger caballos contra la enfermedad de la influenza equina.

La producción de composiciones terapéuticas que contienen virus de influenza humana adaptados en frío está descrita, por ejemplo, en Maassab, *et al.*, 1960, *Nature 7*, 612-614, and Maassab, *et al.*, 1969, *J. Immunol. 102*, 728-732. Además, estos investigadores notaron que los virus de influenza humana adaptados en frío, por ejemplo, los 35 virus que han sido adaptados para crecer a temperaturas menores que la normal, tienden a tener un fenotipo en el que el virus es sensible a la temperatura; esto es, el virus no crece bien a ciertas temperaturas no permisivas más altas a las cuales los virus de tipo silvestre crecerán y se replicarán. Varios virus de influenza A humana adaptados en frío, producidos por recatalogación con los virus de influenza A humana adaptados en frío existentes, ha sido 40 demostrado que producen buenas respuestas inmunes en individuos vacunados, y ciertos virus de influenza A humana adaptados en frío recatalogados vivos atenuados han probado que protegen a los humanos contra la exposición con el virus tipo silvestre. Ver, por ejemplo, Clements, *et al.*, 1986, *J. Clin. Microbiol. 23*, 73-76. En U.S. Patent No. 5.149.531, por Youngner, *et al.*, publicado en Septiembre 22, 1992, los inventores de la presente invención además 45 demostraron que ciertos virus de influenza A humana adaptados en frío recatalogados también poseen una interferencia fenotípica dominante, o sea ellos inhiben el crecimiento de sus correspondientes cepas de tipo silvestre progenitoras así como virus de influenza A heterólogos. La U.S. No. 4.683.137, por Coggins *et al.*, publicada en Julio 28, 1987, y la 50 U.S. No. 4.693.893, por Campbell, publicada en Septiembre 15, 1987, revelan composiciones terapéuticas atenuadas producidas por recatalogación de virus de influenza equina tipo silvestre con virus de influenza A humana adaptados en frío atenuados. Aunque estas composiciones terapéuticas parecen ser en general seguras y efectivas en caballos, ellos plantean un peligro significativo de introducir dentro del ambiente un virus que contiene ambos genes de influenza humanos y equinos.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona virus de influenza equina adaptados en frío generados experimentalmente, 55 virus de influenza A recatalogados que comprenden al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina generado por adaptación en frío tal que el segmento de genoma de virus de influenza equina confiere al menos un fenotipo identificado de un virus de influenza equina adaptado en frío sobre el virus recatalogado, y virus de influenza equina producidos genéticamente, producidos a través de genética inversa, la cual comprende al menos un fenotipo de identificación de un virus de influenza equina adaptado en frío. Los fenotipos de identificación incluyen adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación. La invención además suministra una 60 composición terapéutica para proteger un animal contra la enfermedad causada por un virus de influenza A, en la que la composición terapéutica incluye un virus de influenza equina adaptado en frío, un virus de influenza A recatalogado, o un virus de influenza equina producido genéticamente de la presente invención. También hay suministrado un método para proteger un animal de enfermedades causadas por un virus de influenza A el cual incluye la administración de tal 65 composición terapéutica. También hay suministrados métodos para producir un virus de influenza equina adaptado en frío y métodos para producir un virus de influenza A recatalogado el cual comprende al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina adaptado en frío en el que el segmento de genoma de influenza equina confiere sobre el virus recatalogado al menos un fenotipo de identificación del virus de influenza equina adaptado en frío.

# ES 2 286 892 T3

Un virus de influenza equina adaptado en frío es uno que se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura en el rango desde alrededor de 26°C hasta alrededor de 30°C. Preferiblemente, un virus de influenza equina adaptado en frío, virus de influenza A recatalogado, o un virus de influenza equina producido genéticamente de la presente invención es atenuado, tal que no causará enfermedad en un animal sano.

5 En una realización, un virus de influenza equina adaptado en frío, un virus de influenza A recatalogado, o un virus de influenza equina producido genéticamente de la presente invención es también sensible a la temperatura, tal que el virus se replica en los huevos embrionados de gallina a una temperatura en el rango desde alrededor de 26°C hasta alrededor de 30°C, forma placas en los tejidos en células de cultivo de tejido a una temperatura permisiva de alrededor 10 de 34°C, pero no forma placas en células de cultivo de tejido a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C.

En una realización, tal virus sensible a la temperatura comprende dos mutaciones: una primera mutación que inhibe la formación de placa a una temperatura de alrededor de 39°C, esa mutación que cosegrega con el segmento de genoma que codifica el gen de nucleoproteína viral; y una segunda mutación que inhibe todas las síntesis proteicas virales a 15 una temperatura de alrededor de 39°C.

En otra realización, un virus de influenza equina sensible a la temperatura, adaptado en frío, de la presente invención se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura en el rango desde alrededor de 26°C hasta alrededor de 30°C, forma placas en los tejidos en células de cultivo de tejido a una temperatura permisiva de alrededor 20 de 34°C pero no forma placas en células de cultivo de tejido o expresa proteínas virales tardías a una temperatura no permisiva de alrededor de 37°C.

Típicamente, un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención es producido por el pasaje de un virus de influenza equina de tipo silvestre una o más veces, y entonces por la selección de virus que crecen establemente y se replican a una temperatura reducida. Un virus de influenza equina adaptado en frío producido de este modo incluye, en ciertas realizaciones, un fenotipo de interferencia dominante, esto es, el virus, cuando se coinfecta con un virus de influenza A equina progenitor o un virus de influenza A de tipo silvestre heterólogo, inhibirá el crecimiento de ese virus.

30 Ejemplos de virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención incluyen EIV-P821, identificado por N° de acceso ATCC VR-2625; EIV-P824, identificado por N° de acceso ATCC VR-2624; EIV-MSV+5, identificado por N° de acceso ATCC VR-2627; y la progenie de tales virus.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen desde alrededor de  $10^5$  unidades de TCID<sub>50</sub> hasta 35 alrededor de  $10^8$  unidades de TCID<sub>50</sub>, y preferiblemente alrededor de  $2 \times 10^6$  de TCID<sub>50</sub>, de virus de influenza equina adaptados en frío, virus de influenza A recatalogados, o virus de influenza equina producidos genéticamente de la presente invención.

La presente invención también incluye un método para proteger un animal de la enfermedad causada por un virus 40 de influenza A, el cual incluye el paso de administrar al animal una composición terapéutica que incluye un virus de influenza equina adaptado en frío, un virus de influenza A recatalogado, o virus de influenza equina producidos genéticamente de la presente invención. Los animales preferidos para proteger incluyen los équidos, con caballos y ponis siendo los particularmente preferidos.

Aun otra realización de la presente invención es un método para generar un virus de influenza equina adaptado en frío. El método incluye los pasos de pasaje de un virus de influenza equina de tipo silvestre; y la selección de virus que crecen a una temperatura reducida. En una realización, el método incluye la repetición de los pasajes y los pasos de selección una o más veces, mientras se reduce progresivamente la temperatura. El pasaje del virus de influenza equina preferiblemente toma lugar en huevos embrionados de gallina.

Otra realización es un método para producir un virus de influenza A recatalogado a través de la recatalogación 50 genética de los segmentos de genoma de un virus de influenza equina adaptado en frío donante de la presente invención con los segmentos de genoma de un virus de influenza A receptor. Los virus de influenza A recatalogados de la presente invención son producidos por un método que incluye los pasos de: (a) mezclar los segmentos de genoma de un virus de influenza equina adaptado en frío donante con los segmentos de genoma de un virus de influenza A receptor, y (b) seleccionar los virus los cuales incluyen al menos un fenotipo de identificación del virus de influenza equina donante. Los fenotipos de identificación incluyen adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación. Preferiblemente, tales virus recatalogados al menos incluyen el fenotipo de atenuación del virus donante. Un virus recatalogado típico tendrá la antigenicidad del virus receptor, esto es, retendrá los fenotipos 60 de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus receptor.

La presente invención además proporciona métodos para propagar virus de influenza equina adaptados en frío o virus de influenza A recatalogados de la presente invención. Estos métodos incluyen la propagación en huevos embrionados de gallina o en células de cultivo de tejido.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención suministra virus de influenza equina adaptados en frío generados experimentalmente que comprenden ciertos fenotipos definidos, los que son divulgados aquí. Es para ser notado que el término “un” o “uno”

- 5 entidad, se refiere a uno o más de esa entidad, por ejemplo, “un virus de influenza equina adaptado en frío” puede incluir uno o más virus de influenza equina adaptados en frío. Así como, los términos “un” (o “uno”), “uno o más”, y “al menos uno” pueden ser usados intercambiablemente aquí. Es también para ser notado que los términos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” pueden ser usados intercambiablemente. Además de esto, un artículo “seleccionado entre el grupo que consta de” se refiere a uno o más de los artículos en ese grupo, que incluyen combinaciones

10 de ellos.

Un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención es un virus que ha sido generado en el laboratorio, y como tal, no es un virus que ocurre en la naturaleza. Ya que la presente invención también incluye aquellos virus que tienen fenotipos de identificación de tal virus de influenza equina adaptado en frío, un virus de influenza equina aislado de una mezcla de virus que ocurren naturalmente, por ejemplo, retirados de sus medios ambientales naturales, pero que tienen los fenotipos reivindicados, está incluido en la presente invención. Un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención no requiere ningún nivel específico de pureza. Por ejemplo, un virus de influenza equina adaptado en frío crecido en huevos embrionados de gallina puede estar en una mezcla con el fluido alantóico (FA), y un virus de influenza equina adaptado en frío crecido en células de cultivo de tejido puede estar en una mezcla con células desestabilizadas y un medio de cultivo de tejido.

Como se usó aquí, un “virus de influenza equina” es un virus de influenza que infecta y crece en équidos, por ejemplo, caballos o ponis. Como se usó aquí, el “crecimiento” de un virus denota la habilidad del virus para reproducirse o “replicarse” a sí mismo en una célula hospedera permisiva. Así como, los términos “crecimiento de un virus”

- 25 o “replicación de un virus” son usados intercambiablemente aquí. El crecimiento o replicación de un virus en una célula hospedera particular puede ser demostrado y medido por métodos convencionales bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de virología. Por ejemplo, las muestras que contienen virus infecciosos, por ejemplo, como los contenidos en las secreciones nasofaríngeas de un caballo infectado, son probadas para su habilidad de causar efectos citopáticos (CPE), por ejemplo, placas de virus, en células de cultivos de tejido. Los virus infecciosos pueden también ser detectados por inoculación de una muestra dentro de la cavidad alantólica de huevos embrionados de gallina, y entonces probando el FA de los huevos así inoculados para su habilidad de aglutinar las células rojas de la sangre, por ejemplo, causa hemaglutinación, debido a la presencia de la proteína hemaglutinina (HA) del virus de influenza en el FA.

- 35 De ocurrencia natural, por ejemplo, los virus de influenza equina de tipo silvestre se replican bien a una temperatura desde alrededor de 34°C hasta alrededor de 39°C. Por ejemplo, el virus de influenza equina de tipo silvestre se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura de alrededor de 34°C, y se replica en células de cultivo de tejido a una temperatura desde alrededor de 34°C hasta alrededor de 39°C. Como se usó aquí, un virus de influenza equina “adaptado en frío” es un virus de influenza equina que ha sido adaptado para crecer a una temperatura más 40 baja que la temperatura óptima de crecimiento para el virus de influenza equina. Un ejemplo de virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención es un virus que se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura de alrededor de 30°C. Un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención preferido se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura de alrededor de 28°C. Otro virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención preferido se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura de 45 alrededor de 26°C. En general, los virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención preferidos se replican en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de alrededor de 26°C a 30°C, o sea en un rango de temperaturas en el cual el virus de tipo silvestre crece pobremente o no crece en lo absoluto. Debe ser notado que la habilidad de tales virus para replicarse dentro de ese rango de temperatura no imposibilita su habilidad para también replicarse a temperaturas más altas o más bajas. Por ejemplo, una realización es un virus de influenza equina adaptado 50 en frío que se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura de alrededor de 26°C, pero también se replica en células de cultivo de tejido a una temperatura desde alrededor de 34°C. Como con los virus de influenza equina de tipo silvestre, el virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención generalmente forma placas en células de cultivo de tejido, por ejemplo Madin Darby Canine Kidney Cells (MDCK) a una temperatura de alrededor de 34°C. Ejemplos de virus de influenza equina adaptados en frío adecuados y preferidos de la presente invención son revelados aquí.

Una realización de la presente invención es un virus de influenza equina adaptado en frío que es producido por un método el cual incluye el pasaje de un virus de influenza equina de tipo silvestre, y entonces seleccionar virus que crecen a una temperatura reducida. Los virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención pueden ser producidos, por ejemplo, pasando secuencialmente un virus de influenza equina de tipo silvestre en huevos embrionados de gallina a temperaturas progresivamente inferiores, de ello seleccionando ciertos miembros de la mezcla de virus los cuales se replican establemente a la temperatura reducida. Un ejemplo del procedimiento de paso es revelado en detalle en la sección de Ejemplos. Durante el procedimiento de pasaje, una o más mutaciones aparecen en ciertos segmentos de ARN monocatenarios que comprenden el genoma del virus de influenza, los cuales alteran el genotipo, 60 por ejemplo, la secuencia nucleótida primaria de esos segmentos de ARN. Como es usado aquí, una “mutación” es una alteración de la secuencia nucleótida primaria de cualquier segmento de ARN dado creando un genoma de virus de influenza. Ejemplos de mutaciones incluyen la sustitución de uno o más nucleótidos, la supresión de uno o más nucleótidos, la inserción de uno o más nucleótidos, o la inversión de una elasticidad de dos o más nucleótidos. Por la

# ES 2 286 892 T3

selección de esos miembros de la mezcla de virus que se replican establemente a una temperatura reducida, un virus con fenotipo adaptado en frío es seleccionado. Como es usado aquí, un “fenotipo” es una característica observable o mensurable de una entidad biológica tal como una célula o un virus en la que la característica observada es atribuible a una configuración genética específica de esa entidad biológica, por ejemplo, un cierto genotipo. Como tal, un genotipo adaptado en frío es el resultado de una o más mutaciones en el genoma del virus. Como son usados aquí, los términos “una mutación”, “un genoma”, “un genotipo” o “un fenotipo” se refieren a una o más, o al menos una, mutación, genoma, genotipo o fenotipo, respectivamente.

5 Fenotipos observables, adicionales, en virus de influenza equina adaptados en frío pueden ocurrir, y serán generalmente el resultado de una o más mutaciones adicionales en el genoma de tal virus. Por ejemplo, un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención puede, en adición, ser atenuado, exhibir interferencia dominante, y/o ser sensible a la temperatura.

10 En una realización, un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención tiene un fenotipo caracterizado por la atenuación. Un virus de influenza equina adaptado en frío es “atenuado”, cuando la administración del virus a un animal susceptible al virus de influenza equina resulta en signos clínicos reducidos o ausentes en ese animal, comparados con los signos clínicos observados en animales que están infectados con el virus de influenza equina de tipo silvestre. Por ejemplo, un animal infectado con el virus de influenza equina de tipo silvestre presentará fiebre, estornudos, tos, depresión, y descargas nasales. En contraste, una animal administrado con el virus de influenza equina adaptado en frío atenuado de la presente invención presentará signos de enfermedad clínica mínimos o no, por ejemplo, indetectables.

15 En otra realización, un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención comprende un fenotipo sensible a la temperatura. Como es usado aquí, un virus de influenza equina en frío sensible a la temperatura se replica a temperaturas reducidas, pero no se replica más o forma placas en células de cultivo de tejido a ciertas temperaturas superiores de crecimiento en las cuales los virus de tipo silvestre se replicarán y formarán placas. Mientras no esté siendo comprometida por la teoría, se cree que esa replicación de virus de influenza equina con un fenotipo sensible a la temperatura es mayormente restringido a los pasajes fríos del tracto respiratorio superior, y no se replica eficientemente en el tracto respiratorio inferior, en el que el virus es más propenso a causar signos de enfermedad. Una temperatura en la cual un virus sensible a la temperatura crecerá es referido aquí como una temperatura “permisiva” para ese virus sensible a la temperatura, y una temperatura más alta a la cual el virus sensible a la temperatura no crecerá, pero en la cual un correspondiente virus silvestre crecerá, es referido aquí como una “temperatura no permisiva” para ese virus sensible a la temperatura. Por ejemplo, ciertos virus de influenza equina adaptados en frío sensibles a la temperatura de la presente invención se replican en huevos embrionados de gallina a una temperatura de o por debajo de 30°C, preferiblemente alrededor de 28°C o alrededor de 26°C, y formará placas en células de cultivo de tejido una temperatura permisiva de alrededor de 34°C, pero no formará placas en células de cultivo de tejido a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C. Otros virus de influenza equina adaptados en frío sensibles a la temperatura de la presente invención se replican en huevos embrionados de gallina a una temperatura de o por debajo de alrededor de 30°C, preferiblemente alrededor de 28°C o alrededor de 26°C, y formará placas en células de cultivo de tejido a una temperatura permisiva de alrededor de 34°C, pero no formará placas en células de cultivo de tejido a una temperatura no permisiva de alrededor de 37°C.

20 Ciertos virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención tienen un fenotipo de interferencia dominante; esto es, ellos dominan una infección cuando son coinfectados dentro de la células con otro virus de influenza A, así deterioran el crecimiento de ese otro virus. Por ejemplo, cuando un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención, que tiene un fenotipo de interferencia dominante, es coinfectado dentro de células MDCK con el virus de influenza equina progenitor de tipo silvestre, A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8), el crecimiento del virus progenitor es deteriorado. Así en un animal que ha sido recientemente expuesto a, o puede ser pronto expuesto a, un virus de influenza virulento, o sea, un virus de influenza que causa signos de enfermedad, la administración de una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que tiene un fenotipo de interferencia dominante dentro del tracto respiratorio de ese animal estropeará el crecimiento del virus virulento, mejorando o reduciendo así la enfermedad en ese animal, incluso en la ausencia de una respuesta inmune al virus virulento.

25 La interferencia dominante de un virus de influenza equina adaptado en frío que tiene un fenotipo sensible a la temperatura puede ser medido por los métodos virológicos convencionales. Por ejemplo, monoest्रatos separados de células MDCK pueden ser infectadas con (a) un virus de influenza A de tipo silvestre, (b) un virus de influenza equina adaptado en frío sensible a la temperatura, y (c) ambos virus en una coinfección, con todas las infecciones hechas a multiplicidad de infección (MOI) de alrededor de 2 unidades formadoras de placas (pfu) por célula. Después de la infección, los virus producidos por las varias células infectadas son medidos por ensayos de placa duplicada realizados a la temperatura permisiva para los virus de influenza equina adaptados en frío y a la temperatura no permisiva de ese virus. Un virus de influenza equina adaptado en frío que tiene un fenotipo de temperatura sensitiva es incapaz de formar placas a su temperatura no permisiva, mientras que el virus de tipo silvestre es capaz de formar placas a ambas temperaturas permisiva y no permisiva. De esta manera es posible medir el crecimiento del virus de tipo silvestre en presencia del virus adaptado en frío por la comparación del virus producido a la temperatura no permisiva de las células individualmente infectadas con el virus de tipo silvestre contra el producido a la temperatura no permisiva del virus de tipo silvestre en células infectadas doblemente.

# ES 2 286 892 T3

Los virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención son caracterizados principalmente por uno o más de los siguientes fenotipos de identificación: adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y/o atenuación. Como está usado aquí, la frase “un virus de influenza equina consta de fenotipo(s) de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y/o atenuación” se refiere a un virus que tiene tal fenotipo(s). Ejemplos de tales virus incluyen, pero no están limitados a, EN-P821, identificado por N° de acceso ATCC VR\_\_\_\_\_, EIV-P824, identificado por N° de acceso ATCC VR\_\_\_\_\_, y el EIV-MSV+5, identificado por N° de acceso ATCC VR\_\_\_\_\_, así como los EIV-MSV0, EIV- MSV+1, EIV-MSV+2, EIV-MSV+3, y EIV-MSV+4. La producción de tales virus está descrita en los ejemplos. Por ejemplo, el virus de influenza equina adaptado en frío EN-P821 está caracterizado por, o sea, tiene los fenotipos de identificación de (a) adaptación en frío, por ejemplo, se 5 habilidad para replicarse en huevos embrionados de gallina, a una temperatura de alrededor de 26°C; (b) sensibilidad a la temperatura, por ejemplo, su inhabilidad para formar placas en células de cultivo de tejido, y para expresar productos de gen tardíos a temperatura no permisiva de alrededor de 37°C, y su inhabilidad para formar placas en célula de cultivo de tejido y para sintetizar algunas proteínas virales a temperatura no permisiva de alrededor de 39°C; (c) su atenuación 10 en la administración a un animal susceptible al virus de influenza equina; y (d) interferencia dominante, por ejemplo, su habilidad, cuando es coinfectado dentro de una célula con un virus de influenza A de tipo silvestre para interferir 15 con el crecimiento de ese virus de tipo silvestre. Similarmente, el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P824 está caracterizado por (a) adaptación en frío, por ejemplo, su habilidad para replicarse en huevos embrionados de gallina a temperatura de alrededor de 28°C; (b) sensibilidad a la temperatura, por ejemplo, su inhabilidad para formar placas en células de cultivo de tejido a temperatura no permisiva de alrededor de 39°C; y (c) interferencia dominante, 20 por ejemplo, su habilidad, cuando es coinfectado dentro de una célula con un virus de influenza A de tipo silvestre, para interferir con el crecimiento de ese virus de tipo silvestre. En otro ejemplo, el virus de influenza equina adaptado en frío ENMSV+5 está caracterizado por (a) adaptación en frío, por ejemplo, su habilidad para replicarse en huevos embrionados de gallina a una temperatura de alrededor de 26°C; (b) sensibilidad a la temperatura, por ejemplo, su inhabilidad para formar placas en células de cultivo de tejido a temperaturas no permisivas de alrededor de 39°C; y (c) 25 su atenuación en la administración a un animal susceptible al virus de influenza equina.

En ciertos casos, el segmento ARN sobre el cual una o más mutaciones asociadas con un cierto fenotipo ocurren puede ser determinado a través del análisis de recatalogación por métodos convencionales, como se reveló aquí. En una realización, un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención comprende un fenotipo sensible 30 a la temperatura que se correlaciona con al menos dos mutaciones en el genoma de ese virus. En esta realización, una de las dos mutaciones, localizada por el análisis de recatalogación como es revelado aquí, inhibe, o sea, bloquea o impide, la habilidad del virus para formar placas en células de cultivo de tejido a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C. Esta mutación cosegrega con el segmento del genoma del virus de influenza equina que codifica el gen nucleoproteína (NP) del virus, o sea, la mutación es localizada en el mismo segmento ARN como el gen NP. 35 En esta realización, la segunda mutación inhibe toda síntesis de proteína a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C. Como tal, a la temperatura no permisiva, el genoma del virus es incapaz de expresar cualesquier proteínas virales. Ejemplos de virus de influenza equina adaptados en frío que poseen esas características son los EIV-P821 y EIV-MSV+5. El EIV-P821 fue generado por el pasaje en serie de un virus de influenza equina de tipo silvestre en huevos embrionados de gallina por los métodos descritos en el Ejemplo 1A. El EIV-MSV+5 fue derivado por ulteriores 40 pasajes en serie del EIV-P821, como se describió en el Ejemplo 1E.

Además, un virus de influenza equina adaptado en frío sensible a la temperatura que comprende dos mutaciones las cuales inhiben la formación de placas y la síntesis de proteína viral a temperatura no permisiva de alrededor de 39°C pueden comprender una o más mutaciones adicionales, las cuales inhiben la habilidad de los virus para sintetizar 45 productos de gen tardíos y formar placas en células de cultivo de tejido a temperatura no permisiva de alrededor de 37°C. Un ejemplo de virus de influenza equina adaptado en frío que posee estas características es el EIV-P821. Este virus aislado se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura de alrededor de 28°C y no forma placas o expresa algunas proteínas virales a una temperatura de alrededor de 39°C. Además, el EIV-P821 no forma placas 50 en las células MDCK a temperatura no permisiva de alrededor de 37°C, y a esta temperatura, la expresión tardía del gen es inhibida en tal forma que las proteínas tardías no son producidas, o sea, niveles normales de proteína NP son sintetizados, reducidos o niveles indetectables de proteínas M1 o HA son sintetizados, y niveles mejorados de proteínas polimerasas son sintetizados. Dado que este fenotipo es tipificado por la síntesis de proteína viral diferencial, este es 55 distinto del fenotipo de síntesis de proteína visto a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C, la cual es tipificada por la inhibición de la síntesis de todas las proteínas virales.

Consecuente a 37 CFR § 1.802 (a-c), los virus de influenza equina adaptados en frío, designados aquí como EIV-P821, un EIV-P824 fueron precipitados con American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) bajo el tratado de Budapest como ATCC N°Nº de acceso ATCC VR-\_\_\_\_\_, y ATCC VR-\_\_\_\_\_, respectivamente, en Julio 11, 1998. Consecuente con 37 CFR§ 1.806, las precipitaciones son hechas por un término 60 de al menos treinta (30) años y al menos cinco (5) años después de la más reciente petición para la habilitación de una muestra del depósito que fue recibida por el depositario. Consecuente con 37 CFR § 1.808 (a)(2), todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad para el público deberá ser irrevocablemente retirada bajo la concesión de la patente.

Los virus de influenza equina adaptados en frío preferidos de la presente invención tienen el fenotipo de identificación de los EIV-P821, EIV-P824, y EIV-MSV+5. Particularmente los virus de influenza equina adaptados en frío preferidos incluyen los EIV-P821, EIV-P824, EIV-MSV+5, y la progenie de estos virus. Como es usado aquí, las “progenies” son “descendencias”, y como tales pueden ser fenotipos ligeramente alterados comparados con los virus

progenitores, pero retienen fenotipos de identificación de los virus progenitores, por ejemplo, adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, o atenuación. Por ejemplo, el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-MSV+5 es una “progenie” del virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821. La “progenie” también incluye los virus de influenza A recatalogados que comprende uno o más fenotipos de identificación del virus progenitor donante.

Los virus de influenza A recatalogados de la presente invención son producidos por recatalogación genética de los segmentos de genoma de un virus de influenza equina adaptado en frío donante de la presente invención con los segmentos de genoma de un virus de influenza A receptor, y entonces por la selección de un virus recatalogado que deriva al menos uno de sus ocho segmentos de genoma del virus donante, tal que el virus recatalogado adquiere al menos un fenotipo de identificación del virus de influenza equina adaptado en frío donante. Los fenotipos de identificación incluyen adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura e interferencia dominante. Preferiblemente, los virus de influenza A recatalogados de la presente invención derivan al menos el fenotipo de atenuación del virus donante. Los métodos para aislar los virus de influenza recatalogados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de virología y son divulgados, por ejemplo, en Fields, *et al.*, 1996, *Fields Virology*, 3d ed., Lippincott-Raven; y Palese, *et al.*, 1976, *J. Virol.*, 17, 876-884. Fields, *et al.*, *ibid.* y Palese, *et al.*, *ibid.*

Un adecuado virus de influenza equina donante es un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención, por ejemplo, el EIV-P821, identificado por N° de acceso ATCC VR\_\_\_\_\_, el EIV-P824, identificado por N° de acceso ATCC VR\_\_\_\_\_, o el EIV-MSV+5, identificado por N° de acceso ATCC VR\_\_\_\_\_. Un adecuado virus de influenza A receptor puede ser otro virus de influenza equina, por ejemplo, un virus de influenza equina Eurasíatico de subtipo 2 tal como el A/equino/Suffolk/89 (H3N8) o un virus de influenza equina de subtipo 1 tal como el A/Praga/1/56 (H7N7). Un virus de influenza A receptor puede también ser cualquier virus de influenza A capaz de formar un virus recatalogado con un virus de influenza equina adaptado en frío donante. Ejemplos de tales virus de influenza A incluyen, pero no están limitado a, virus de influenza humana tales como A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Hong Kong/156/97 (H5N1), A/Singapur/1/57 (H2N2), y A/Hong Kong/1/68 (H3N2); virus de cerdo tales como A/Cerdo/Iowa/15/30 (H1N1); y virus aviares tales como A/ánade/New York/6750/78 (H2N2) y A/gallina/Hong Kong/258/97 (H5N1). Un virus recatalogado de la presente invención puede incluir cualquier combinación de segmentos de genes donantes y receptores, siempre que el virus recatalogado resultante posea al menos un fenotipo de identificación del virus donante.

Un ejemplo de virus recatalogado de la presente invención es un virus recatalogado “6 + 2”, en el que seis “segmentos internos de gen”, o sea, aquellos que comprenden los genes NP, PB2, PB1, PA, M, y NS, son derivados del genoma de virus de influenza equina adaptado en frío donante, y los dos “segmentos externos de gen”, o sea, aquellos que comprenden los genes HA y NA, son derivados del virus de influenza A receptor. Un virus resultante así producido tiene el fenotipo atenuado, adaptado en frío, sensible a la temperatura, y/o interferencia dominante del virus de influenza equina adaptado en frío donante, pero la antigenicidad de la cepa receptora.

Todavía en otra realización, un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención puede ser producido a través de medios recombinantes. En esta aproximación, una o más mutaciones específicas, asociadas con la adaptación en frío identificada, la atenuación, la sensibilidad a la temperatura, o los fenotipos de interferencia dominantes, son identificados y son introducidos de vuelta dentro de la cepa de virus de influenza equina de tipo silvestre por el uso de una aproximación genética inversa. La genética inversa conlleva el uso de complejos de polimerasa ARN aislados de las células infectadas por virus para transcribir segmentos de genoma de virus de influenza artificiales que contienen la mutación(es), que incorporan el segmento(s) de ARN sintetizado dentro de partículas de virus por el uso de un virus auxiliar, y entonces seleccionar los virus que contienen los cambios deseados. Los métodos de genética inversa para los virus de influenza están descritos, por ejemplo, en Enami, *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 3802-3805; y en U.S. Patent No. 5.578.473, por Palese, *et al.*, publicado en Noviembre 26, 1996. Esta aproximación permite a un experto en la técnica producir virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención sin la necesidad de ir a través de procesos de adaptación en frío prolongados, y el proceso de seleccionar mutantes ambos *in vitro* e *in vivo* con los fenotipos de virus deseados.

Un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención puede ser propagado por los métodos virológicos convencionales bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, ejemplos de los cuales son revelados aquí. Por ejemplo, un virus de influenza equina adaptado en frío puede ser crecido en huevos embrionados de gallina o en células eucarióticas de cultivo de tejido. Las líneas de célula eucariótica continuas adecuadas bajo las cuales para crecer virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención incluyen esas que apoyan el crecimiento de virus de influenza, por ejemplo, las células MDCK. Otras células adecuadas bajo las cuales para crecer un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, cultivos de células primarias de riñón de mono, cría de ganado, hámster o gallina.

En una realización, la presente invención proporciona una composición terapéutica para proteger un animal de una enfermedad causada por un virus de influenza A, en la que la composición terapéutica incluye o un virus de influenza equina adaptado en frío o un virus de influenza A recatalogado que incluyen al menos un segmento de genoma de virus de influenza equina generado por adaptación en frío, en el que el segmento de genoma de virus de influenza equina confiere al menos un fenotipo de identificación del virus de influenza equina adaptado en frío. Además, una composición terapéutica de la presente invención puede incluir un virus de influenza equina que ha sido producido por ingeniería genética para comprender una o más mutaciones, en la que esas mutaciones han sido identificadas para conferir un cierto fenotipo de identificación a un virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención.

# ES 2 286 892 T3

Como es usado aquí, la frase “enfermedad causada por un virus de influenza A” se refiere a las manifestaciones clínicas observadas en un animal el cual ha sido infectado con un virus de influenza A virulento. Ejemplos de tales manifestaciones clínicas incluyen, pero no están limitados a, fiebre, estornudos, tos, descargas nasales, estertores, anorexia y depresión. Además, la frase “enfermedad causada por un virus de influenza A” es definida aquí para incluir el derramamiento del virus virulento por el animal infectado. La verificación de que las manifestaciones clínicas observadas en un animal se correlacionan con la infección por el virus de influenza equina virulento puede ser hecha por varios métodos, que incluyen la detección de un anticuerpo específico y/o las respuestas de las células T al virus de influenza equina en el animal. Preferiblemente, la verificación de que esas manifestaciones clínicas observadas en un animal se correlacionan por un virus de influenza A virulento es hecha por el aislamiento del virus del animal infectado, por ejemplo, estregando con un aplicador la cavidad nasofaríngea de ese animal para obtener secreciones que contienen virus. La verificación del aislamiento de virus puede ser hecha por la detección de CPE en células de cultivo de tejido inoculadas con las secreciones aisladas, por la inoculación de las secreciones aisladas dentro de huevos embrionados de gallina, en los que la replicación de virus es detectada por la habilidad de la FA de los huevos inoculados para aglutinar eritrocitos, que sugieren la presencia de la proteína hemaglutinina del virus de influenza, o por el uso de una prueba diagnóstica disponible comercialmente, por ejemplo, la prueba Directigen® FLU A.

Como es usado aquí, el término “proteger” incluye, por ejemplo, para prevenir o para tratar la infección por virus de influenza A en el animal en cuestión. Como tal, una composición terapéutica de la presente invención puede ser usada, por ejemplo, como una vacuna profiláctica para proteger un animal en cuestión de la enfermedad de influenza por la administración de la composición terapéutica a ese animal en un tiempo anterior a la exposición de ese animal al virus virulento.

Una composición terapéutica de la presente invención, que comprende virus de influenza equina que tienen un fenotipo de interferencia dominante, puede ser también usada para tratar un animal que ha sido recientemente infectado con un virus de influenza A virulento o es probable que sea expuesto subsiguientemente en unos días, tal que la composición terapéutica interfiera inmediatamente con el crecimiento del virus virulento, previo a la producción de anticuerpos al virus virulento por el animal. Una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que tiene un fenotipo de interferencia dominante puede ser eficazmente administrado previo a la subsiguiente exposición por un tiempo de duración que se corresponde al tiempo de duración aproximado en que el virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención se replicará en el tracto respiratorio superior de un animal tratado, por ejemplo, hasta alrededor de los siete días. Una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que tiene un fenotipo de interferencia dominante puede ser eficazmente administrado a continuación de la exposición a un virus de influenza equina virulento por una duración de tiempo que se corresponde al tiempo requerido para que un animal infectado muestre signos de enfermedad, por ejemplo, hasta alrededor de dos días.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden ser administradas a cualquier animal susceptible a la enfermedad de influenza viral, por ejemplo, humanos, cerdos, caballos y otros équidos, aves acuáticas, domésticas y aves de corral, focas, visones y ballenas. Preferiblemente, una composición terapéutica de la presente invención es administrada en équidos. Inclusive más preferiblemente, una composición terapéutica de la presente invención es administrada a un caballo, para protegerlo en contra de la enfermedad de influenza equina.

Las vacunas actuales disponibles para proteger caballos en contra de la enfermedad del virus de influenza equina no son eficaces en la protección de los potros jóvenes, lo más probable porque ellas no pueden superar el anticuerpo materno presente en estos animales jóvenes, y a menudo, la vacunación en una edad temprana, por ejemplo a los 3 meses de edad, puede conducir a la tolerancia antes que a la inmunidad. En una realización, y en contraste a la existencia de vacunas de virus de influenza, una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina de la presente invención aparentemente puede producir inmunidad en animales jóvenes. Como tal, la composición terapéutica de la presente invención puede ser segura y eficazmente administrada a potros jóvenes, tan jóvenes como con 3 meses de edad, para protegerlos en contra de la enfermedad de influenza equina sin la inducción de tolerancia.

En una realización, una composición terapéutica de la presente invención puede ser multivalente. Por ejemplo, puede proteger a un animal de más de una cepa de virus de influenza A al suministrar una combinación de uno o más virus de influenza equina adaptado en frío de la presente invención, uno o más virus de influenza A recatalogado, y/o uno o más virus de influenza equina obtenidos por ingeniería genética de la presente invención. Las composiciones terapéuticas multivalentes pueden incluir al menos dos virus de influenza equina adaptados en frío, por ejemplo, en contra del virus Norte Americano subtipo-2 aislado como A/equino/Kentucky/1/91 (H1N8), y el virus Eurasático subtipo-2 aislado como A/equino/Suffolk/89 (H3N8); uno o más virus subtipo-2 aislados y un virus subtipo-2 aislado como A/equino/Praga/1/56 (H7N7). Similarmente, una composición terapéutica multivalente de la presente invención puede incluir un virus de influenza equina adaptado en frío y un virus de influenza A recatalogado de la presente invención, o dos virus de influenza A recatalogados de la presente invención. Una composición terapéutica multivalente de la presente invención puede también contener una o más formulaciones para proteger contra uno o más de otros agentes infecciosos además del virus de influenza A. Tales otros gérmenes infecciosos incluyen, pero no están limitados a: virus; bacterias; hongos y microorganismos relacionados con hongos; y parásitos. Las composiciones terapéuticas multivalentes preferidas incluyen, pero no están limitadas a, un virus de influenza equina adaptado en frío, un virus de influenza A recatalogado, o un virus de influenza equina producido por ingeniería genética de la presente invención o una o más composiciones protectoras contra uno o más agentes infecciosos que afectan a los caballos. Los agentes

infecciosos adecuados para protegerse en contra incluyen, pero no están limitados a, los virus de anemia infecciosa equina, los herpes virus equino, los virus de encefalitis equina orientales, occidentales o venezolanos, el tétanos, *estreptococo equi*, y *Ehrlichia resticii*.

5 Una composición terapéutica de la presente invención puede ser formulada en un excipiente que el animal a ser tratado pueda tolerar. Ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, y otras soluciones salinas acuosas balanceadas fisiológicamente. Los excipientes pueden contener pequeñas cantidades de aditivos, tales como sustancias que acentúan la isotonicidad y la estabilidad biológica o química. Ejemplos de tampones incluyen el tampón de fosfato, el tampón de bicarbonato, y el tampón Tris, mientras 10 los ejemplos de estabilizadores incluyen el estabilizador A1/A2, disponible de Diamond Animal Health, Des Moines, IA. Las formulaciones convencionales pueden ser o líquidas o sólidas las cuales pueden ser tomadas en un líquido adecuado como una suspensión o solución para la administración a un animal. En una realización, una formulación no líquida puede comprender las sales excipientes, tampones, estabilizadores, etc., a los cuales pueden ser añadidas agua estéril o solución salina antes de la administración.

15 Una composición terapéutica de la presente invención puede también incluir uno o más adyuvantes o portadores. Los adyuvantes son típicamente sustancias que acentúan la respuesta inmune de un animal a un antígeno específico, y los portadores incluyen aquellos compuestos que incrementan la vida promedio de una composición terapéutica en el animal tratado. Una ventaja de una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado 20 en frío o un virus de influenza A recatalogado de la presente invención es que los adyuvantes y los portadores no son requeridos para producir una vacuna eficaz. Además, en muchos casos conocidos por aquellos expertos en la técnica, las ventajas de una composición terapéutica de la presente invención podrían ser impedidas por el uso de algunos adyuvantes o portadores. Sin embargo, debe ser notado que el uso de adyuvantes o portadores no es excluido por la presente invención.

25 Las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen una cantidad de virus de influenza equina adaptados en frío que es suficiente para proteger un animal de las exposiciones con los virus de influenza equina virulentos. En una realización, una composición terapéutica de la presente invención puede incluir una cantidad de virus de influenza equina adaptados en frío en el orden de alrededor de  $10^5$  unidades de dosis-50 (TCID<sub>50</sub>) de un virus de cultivo de tejido infeccioso de alrededor de  $10^8$  unidades de virus TCID<sub>50</sub>. Como es usado aquí, una "unidad de TCID<sub>50</sub>" es 30 una cantidad de virus la cual resulta en efecto citopático en el 50% de esas células de cultivo infectadas. Los métodos para medir y calcular las TCID<sub>50</sub> son conocidas por aquellos expertos en la técnica y están disponibles, por ejemplo, en Reed and Muench, 1938, *Am. J. of Hyg.* 27, 493-497. Una composición terapéutica preferida de la presente invención comprende desde alrededor de  $10^8$  unidades de TCID<sub>50</sub> hasta alrededor de  $10^7$  unidades de un virus de influenza equina adaptado en frío o de virus de influenza A recatalogados de la presente invención. Aún más preferida es una composición terapéutica que comprende alrededor de  $2 \times 10^6$  unidades de TCID<sub>50</sub> de virus de influenza equina adaptados en 35 frío o de virus de influenza A recatalogados de la presente invención.

40 La presente invención también incluye los métodos para proteger un animal contra la enfermedad causada por un virus de influenza A que comprenden administrar al animal una composición terapéutica de la presente invención. Los referidos son esos métodos los cuales protegen un équido contra la enfermedad causada por el virus de influenza equina, donde esos métodos comprenden administrar al équido un virus de influenza equina adaptado en frío. Los protocolos aceptables para administrar las composiciones terapéuticas en una manera efectiva incluyen la dimensión 45 de la dosis individual, el número de dosis, la frecuencia de administración de la dosis, y el modo de administración. La determinación de tales protocolos puede ser realizada por aquellos expertos en la técnica, y los ejemplos son comunicados aquí.

50 Un método preferible para proteger un animal contra la enfermedad causada por un virus de influenza A incluye administrar a ese animal una única dosis de una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío, un virus de influenza A recatalogado, o un virus de influenza equina producido por ingeniería genética de la presente invención. Una adecuada dosis única es una dosis que es capaz de proteger un animal de la enfermedad cuando es administrada una o más veces sobre un adecuado período de tiempo. El método de la presente invención puede también incluir la administración subsiguiente, o dosis potenciadoras de una composición terapéutica. Las 55 administraciones de potenciador pueden ser dadas desde alrededor de 2 semanas hasta varios años después de la administración original. Las administraciones de potenciador preferiblemente son administradas cuando la respuesta de inmunidad del animal se hace insuficiente para proteger al animal de la enfermedad. Ejemplos de programas de dosificación adecuada y preferida son divulgados en la sección de Ejemplos.

60 Una composición terapéutica de la presente invención puede ser administrada a un animal por una variedad de medios, tal que el virus entra y se replica en las células mucosas en el tracto respiratorio superior del animal tratado. Tales medios incluyen, pero no están limitados a, administración intranasal, administración oral, y administración intraocular. Debido a que los virus de influenza naturalmente infectan la mucosa del tracto respiratorio superior, un método preferible para administrar una composición terapéutica de la presente invención es por la administración intranasal. Tal administración puede ser realizada por el uso de una jeringuilla ajustada con una cánula, o por el uso 65 de un nebulizador ajustado sobre la nariz y la boca del animal a ser vacunado.

La eficacia de la composición terapéutica de la presente invención para proteger un animal contra la enfermedad causada por el virus de influenza A puede ser ensayada en una variedad de formas que incluyen, pero no limitadas a, la

# ES 2 286 892 T3

detección de anticuerpos por, por ejemplo, pruebas de inhibición de hemaglutinación (HAI), detección de inmunidad celular en el animal tratado, competencia del animal tratado con el virus de influenza equina virulento para determinar si el animal tratado es resistente al desarrollo de la enfermedad. Además, la eficacia de la composición terapéutica de la presente invención que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que tiene un fenotipo de interferencia dominante para mejorar o reducir los síntomas de la enfermedad en un animal previamente inoculado o susceptible a inoculación con un virus de influenza equina de tipo silvestre puede ser ensayado por el filtrado para la reducción o ausencia de los signos de la enfermedad en el animal tratado.

La presente invención también incluye los métodos para producir una composición terapéutica de la presente invención. Los métodos adecuados y preferidos para hacer una composición terapéutica de la presente invención son revelados aquí. Los pasos pertinentes involucrados en producir un tipo de composición terapéutica de la presente invención, o sea, un virus de influenza equina adaptado en frío, incluyen (a) pasar un virus de influenza equina de tipo silvestre *in vitro*, por ejemplo, en huevos embrionados de gallina; (b) seleccionar virus que crecen a temperatura reducida; (c) repetir el pasaje y los pasos de selección una o más veces, a temperaturas progresivamente más bajas, 15 hasta que las poblaciones de virus son seleccionadas las cuales crecen establemente a la temperatura más baja deseada; y (d) mezclar la preparación de virus resultante con excipientes adecuados.

Los pasos pertinentes involucrados en la producción de otro tipo de composición terapéutica de la presente invención, o sea, un virus de influenza A recatalogado que tiene al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina generado por adaptación, incluye los pasos de (a) mezclar los segmentos de genoma de virus de influenza equina adaptado en frío donantes, los cuales preferiblemente también tienen los fenotipos de atenuación, sensibilidad a la temperatura, o interferencia dominante, con los segmentos de genoma de un virus de influenza A receptor, y (b) seleccionar los virus recatalogados que tienen al menos un fenotipo de identificación de un virus de influenza equina donante. Identificar los fenotipos a seleccionar para incluir la atenuación, adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, e interferencia dominante. Los métodos de filtrado para estos fenotipos son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica, y son divulgados aquí. Es preferible filtrar los virus que al menos tienen el fenotipo de atenuación.

El uso de este método para generar un virus de influenza A recatalogado que tenga al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina generado por adaptación en frío, un tipo de virus recatalogado a seleccionar es un “6 + 2” recatalogado, donde los seis “segmentos de genes internos”, o sea, esos que codifican para los genes NP, PB2, PB1, PA, M, y NS, son derivados del genoma del virus de influenza equina adaptado en frío donante, y los dos “segmentos de gen externos”, o sea, esos que codifican para los genes HA y NA, son derivados de el virus de influenza A receptor. Un virus resultante así producido puede tener los fenotipos adaptados en frío, atenuados, sensibles a la temperatura, y/o interferencia del virus de influenza equina adaptado en frío donante, pero la antigenicidad de la cepa receptora.

La presente invención incluye moléculas de ácido nucleico aisladas de la cepa de tipo silvestre del virus de influenza equina A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8), y el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821.

En conformidad con la presente invención, una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que ha sido removida de su medio natural (o sea, que ha sido sometida a manipulación humana) y puede incluir ADN, ARN, o derivados de cualquier ADN o ARN. Como tal, “aislada” no refleja la magnitud a la cual la molécula de ácido nucleico ha sido purificada.

La presente invención incluye moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de virus de influenza equina adaptados en frío y de tipo silvestre. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden ser preparadas por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, o sea, la tecnología de ADN recombinante. Las moléculas de ácido nucleico preferidas tienen cepas codificantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, SEC ID Nº: 6, SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 9, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 12, SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 16, SEC ID Nº: 18, SEC ID Nº: 19, SEC ID Nº: 21, SEC ID Nº: 22, SEC ID Nº: 23, SEC ID Nº: 25, y/o complementos de ellas. Los complementos son definidos como dos cadenas monocatenarias de ácido nucleico en las cuales la secuencia nucleótida es tal que ellas se hibridizarán como un resultado del apareamiento de base a través de su longitud total. Dada una secuencia nucleótida, un experto en la técnica puede deducir el complemento.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza M son *nei<sub>wt</sub>M<sub>1023</sub>*, *nei<sub>wt</sub>M<sub>1023</sub>*, *nei<sub>wt2</sub>M<sub>1023</sub>*, *nei<sub>wt1</sub>M<sub>756</sub>*, *nei<sub>wt1</sub>M<sub>756</sub>*, *nei<sub>wt2</sub>M<sub>756</sub>*, *neica1M<sub>1023</sub>*, *nei<sub>ca1</sub>M<sub>756</sub>*, y/o *nei<sub>ca2</sub>M<sub>756</sub>*, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, y/o la SEC ID Nº: 6.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza HA son *nei<sub>wt</sub>HA<sub>1762</sub>*, *nei<sub>wt</sub>HA<sub>1695</sub>*, *nei<sub>ca1</sub>HA<sub>1762</sub>*, *nei<sub>ca2</sub>HA<sub>1762</sub>*, *nei<sub>ca1</sub>HA<sub>1695</sub>*, y/o *nei<sub>ca2</sub>HA<sub>1695</sub>*, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 9, SEC ID Nº: 10, y/o la SEC ID Nº: 12.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza equina PB2-N son *nei<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1241</sub>*, *nei<sub>wt</sub>PB2-N<sub>1214</sub>*, *nei<sub>ca1</sub>PB2-N<sub>1241</sub>*, *nei<sub>ca2</sub>PB2-N<sub>1241</sub>*, *nei<sub>ca1</sub>PB2-N<sub>1214</sub>*, y/o *nei<sub>ca2</sub>PB2-N<sub>1214</sub>*, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 16, y/o la SEC ID Nº: 18.

# ES 2 286 892 T3

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza equina PB2-C son  $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ ,  $nei_{wt2}PB2-C_{1232}$ ,  $nei_{wt}PB2-C_{1194}$ ,  $nei_{cal}PB2-C_{1232}$ ,  $nei_{ca2}PB2-C_{1231}$ , y/o  $nei_{cal}PB2-C_{1194}$ , las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID Nº: 19, SEC ID Nº: 22, SEC ID Nº: 21, SEC ID Nº: 23, y/o la SEC ID Nº: 25.

5

La presente invención incluye las proteínas que comprenden las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 17, SEC ID Nº: 20 y/o la SEC ID Nº: 24 así como las moléculas de ácido nucleico que codifican tales proteínas.

10

Las proteínas de influenza M preferidas de la presente invención incluyen las proteínas codificadas por moléculas de ácido nucleico que comprenden  $nei_{wt}M_{1023}$ ,  $nei_{wt1}M_{1023}$ ,  $nei_{wt2}M_{1023}$ ,  $nei_{wt}M_{756}$ ,  $nei_{wt1}M_{756}$ ,  $nei_{wt2}M_{756}$ ,  $nei_{cal}M_{1023}$ ,  $nei_{ca2}M_{1023}$ ,  $nei_{cal}M_{756}$ , y/o  $nei_{ca2}M_{756}$ . Las proteínas de influenza equina M preferidas son  $Pei_{wt}M_{252}$ ,  $Pei_{cal}M_{252}$ , y/o  $Pei_{ca2}M_{252}$ . En una realización, una proteína de influenza equina M preferida de la presente invención es codificada por las SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, y/o la SEC ID Nº: 6, y, como tal, tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID Nº: 2 y/o la SEC ID Nº: 5.

15

Las proteínas de influenza equina HA preferidas de la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico que comprende  $nei_{wt}HA_{1762}$ ,  $nei_{wt}HA_{1695}$ ,  $nei_{cal}HA_{1762}$ ,  $nei_{ca2}HA_{1762}$ ,  $nei_{cal}HA_{1695}$ , y/o  $nei_{ca2}HA_{1695}$ . Las proteínas de influenza equina HA son  $P_{Pei_{wt}}HA_{565}$ ,  $Pei_{cal}HA_{565}$ , y/o  $Pei_{ca2}HA_{565}$ . En una realización, una proteína de influenza equina HA preferida de la presente invención es codificada por SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 9, SEC ID Nº: 10, y/o SEC ID Nº: 12, y, como tal, tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID Nº: 8 y/o la SEC ID Nº: 11.

20

Las proteínas de influenza equina PB2-N preferidas de la presente invención incluyen proteínas codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprenden  $nei_{wt}PB2-N_{1241}$ ,  $nei_{wt}PB2-N_{1214}$ ,  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$ ,  $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$ ,  $nei_{cal}PB2-N_{1214}$ , y/o  $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$ . Las proteínas de influenza equina PB2-N preferidas son  $P_{wt}PB2-N_{404}$ ,  $P_{cal}PB2-N_{404}$ , y/o  $P_{ca2}PB2-N_{404}$ . En una realización, una proteína de influenza equina PB2-N preferida de la presente invención es codificada por las SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 16, y/o la SEC ID Nº: 18, y, como tal, tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID Nº: 14 y/o la SEC ID Nº: 17.

25

Las proteínas de influenza equina PB2-C preferidas de la presente invención incluyen proteínas codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprenden  $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ ,  $nei_{wt2}PB2-C_{1232}$ ,  $nei_{wt}PB2-C_{1194}$ ,  $nei_{cal}PB2-C_{1232}$ ,  $nei_{ca2}PB2-C_{1231}$ , y/o  $nei_{cal}PB2-C_{1194}$ . Las proteínas de influenza equina PB2-C preferidas son  $P_{wt}PB2-C_{398}$ ,  $P_{cal}PB2-C_{398}$ , y/o  $P_{ca2}PB2-C_{398}$ . En una realización, una proteína de influenza equina PB2-C preferida de la presente invención es codificada por las SEC ID Nº: 19, SEC ID Nº: 22, SEC ID Nº: 21, SEC ID Nº: 23, y/o la SEC ID Nº: 25, y, como tal tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID Nº: 20 y/o SEC ID Nº: 24.

30

35

40

La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 1 representa la secuencia de consenso deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificadas por PCR denotadas aquí como  $nei_{wt1}M_{1023}$  y  $nei_{wt2}M_{1023}$ , la producción de las cuales es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 4 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificadas por PCR denotadas aquí como  $nei_{cal}M_{1023}$  y  $nei_{ca2}M_{1023}$ , la producción de las cuales es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 7 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como  $nei_{wt}HA_{1762}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 10 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotadas aquí como  $nei_{cal}HA_{1762}$  y  $nei_{ca2}HA_{1762}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. . La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 13 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como  $nei_{wt}PB2-N_{1241}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 16 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$  y  $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 19 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como  $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 22 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como  $nei_{wt2}PB2-C_{1232}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº: 23 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como  $nei_{cal}PB2-C_{1232}$ , la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. Adicionales moléculas de ácido nucleico, secuencias de ácido nucleico, secuencias de proteínas y aminoácidos son descritas en los Ejemplos.

45

50

55

60

La presente invención incluye moléculas de ácido nucleico que comprenden virus de influenza equina adaptados en frío que codifican una proteína M que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID Nº: 5. Otra realización de la presente invención incluye una molécula de ácido nucleico que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que codifica una proteína HA que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID Nº: 11. Otra realización de la presente invención incluye una molécula de ácido nucleico que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que codifica una proteína PB2-N que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID Nº: 17. Otra realización de la presente invención incluye una molécula de ácido nucleico que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío que codifica una proteína PB2-C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID Nº: 24.

# ES 2 286 892 T3

Debe ser notado que ya que la tecnología de secuenciación de ácido nucleico no es enteramente libre de errores, las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos presentadas aquí representan, respectivamente, aparentes secuencias de moléculas de ácido nucleico de la presente invención y aparentes secuencias de amino ácidos M, HA, y proteínas PB2-N y PB2-C de la presente invención.

5 Otra realización de la presente invención es un anticuerpo que selectivamente se liga a la proteína M, HA, PB2-N, PB2-C, PB2 de un virus de tipo silvestre de la presente invención. Otra realización de la presente invención es un anticuerpo que selectivamente se liga a la proteína M, HA, PB2-N, PB2-C, PB2 de un virus adaptado en frío de la 10 presente invención. Los anticuerpos preferidos se ligan selectivamente a las SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 8, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 14, SEQ ID Nº: 17, SEQ ID Nº: 20 y/o SEQ ID Nº: 24.

Los siguientes ejemplos son suministrados para los propósitos de ilustración y no están proyectados para limitar el alcance de la presente invención.

## 15 Ejemplo 1

Este ejemplo revela la producción y la caracterización fenotípica de varios virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención.

20 A. El virus de influenza equina progenitor, A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8) (obtenido de Tom Chambers, Universidad de Kentucky, Lexington, KY) fue sometido a adaptación en frío en una especie hospedera ajena, o sea, huevos embrionados de gallina, en la siguiente manera. Huevos embrionados de gallina de 10 ó 15 días, disponibles, por ejemplo de Truslow Farms, Chestertown, MD o de HyVac, Adel, IA, fueron inoculados con el virus de influenza equina progenitor por inyección de alrededor de 0,1 mililitro (ml) de FA no diluido que contiene aproximadamente  $10^6$  unidades deformación de placas (pfu) de virus dentro de la cavidad alantóica a través de un pequeño orificio perforado en la cáscara del huevo. Los orificios en los huevos fueron sellados con pintura de uñas y los huevos fueron incubados en un equipo incubador humidificado a la temperatura apropiada durante tres días. A continuación de la incubación, fueron vistos a trasluz y ninguno de los huevos no viables fue descartado. El FA fue cosechado de los embriones 25 viables removiendo asépticamente una porción de la cáscara del huevo, separando la membrana corioalantóica (CAM) con pinzas estériles y removiendo el FA con una pipeta estéril. El FA cosechado fue congelado entre los pasajes. El FA fue entonces usado, o no diluido o diluido 1:1000 en tampón salino de fosfato (PBS) como se registró en la Tabla 1, para inocular un nuevo conjunto de huevos para un segundo pasaje, y así en adelante. Un total de 69 pasajes fue completado. Los pasajes iniciales fueron hechos ambos alrededor de los 34°C (pasajes 1-2) o alrededor de los 30°C y 30 en los subsecuentes pasajes, la temperatura de incubación fue cambiada hacia abajo ambas a alrededor de los 28°C, o en los subsecuentes pasajes, la temperatura de incubación fue cambiada hacia abajo ambas a alrededor de los 26°C. Para incrementar la posibilidad de la selección de los fenotipos deseados de un virus atenuado, estable, la serie inicial de pasajes fue ampliada para incluir cinco brotes diferentes del árbol de la serie de pasajes, A hasta E, como se muestra en la Tabla 1.

40 TABLA 1  
*Historia del pasaje de los brotes A hasta E*

Temperatura	Pasaje No.				
	Brote A	Brote B	Brote C	Brote D	Brote E
34 °C	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
30 °C	3-8	3-29	3-29	3-29	3-29
28 °C		30-33*	30-68*	30-33	30-69
26 °C	9-65	34-69*		34-65	

55 \* = el fluido alantóico infeccioso fue diluido 1:1000 en estos pasajes

60 B. Los virus aislados llevados a través del procedimiento de adaptación en frío descrito en la sección A fueron ensayados para sensibilidad de temperatura, o sea, un fenotipo en el cual el virus adaptado en frío crece a la temperatura más baja o permisiva (por ejemplo, alrededor de los 34°C, pero no forma más placas a una temperatura más alta o no permisiva (por ejemplo, alrededor de los 37°C o alrededor de los 39°C), como sigue. En cada pasaje de adaptación en frío, el FA fue detenido por ensayo de placa a alrededor de los 34°C. Periódicamente, las placas individuales del ensayo fueron clonalmente aisladas por excisión del área de la placa y colocación del agar extirpado taponado en 96 bandejas que contienen un monoestriato de células MDCK. Las 96 bandejas fueron incubadas por una noche y la producción ensayada para la sensibilidad a la temperatura por la prueba CPE en las 96 bandejas duplicadas incubadas a alrededor de los 34°C y alrededor de los 39°C. El porcentaje de los clones que fue registrado como mutantes sensibles a la temperatura por este ensayo, o sea, el número de placas virales que crecieron a 34°C pero no crecen a 39°C, dividido

# ES 2 286 892 T3

por el número total de placas, fue calculado, y es mostrado en la Tabla 2. Las temperaturas sensitivas aisladas fueron entonces evaluadas para la síntesis de proteína a la temperatura no permisiva por la visualización de las proteínas sintetizadas de virus radiorotulados por electroforesis de gel de policrilamida (SDS-PAGE).

5

TABLA 2

*Porcentaje de Clones aislados que fueron sensibles a la temperatura*

10

Paso No.	Porcentaje Sensible a la Temperatura				
	Brote A	Brote B	Brote C	Brote D	Brote E
p36	56%	66%	0%	66%	54%
p46		80%	60%		75%
p47			80%		
p48			100%		
p49		100%		100%	50%
p50			90%		
p51		100%			
p52					57%
p62	100%			100%	
p65			100%		
p66		100%			88%

30

De los aislamientos clonales probados para sensibilidad a la temperatura, dos fueron seleccionados para estudio ulterior. El clon EIV-P821 fue seleccionado entre el pasaje 49 del brote B y el clon EIV-P824 fue seleccionado entre el pasaje 48 del brote C, como está definido en la Tabla 1. Ambos de estos virus aislados fueron sensibles a la temperatura, con formación de placa de ambos aislamientos inhibida a una temperatura de alrededor de 39°C. A esta temperatura, la síntesis de proteína fue completamente inhibida por el EIV-P821, pero el EIV-P824 exhibió niveles normales de síntesis de proteína. Además, la formación de placa por el EIV-P821 fue inhibida a una temperatura de alrededor de 37°C, y a esta temperatura, la expresión de gen tardío fue inhibida, o sea, niveles normales de proteína NP fueron sintetizados, reducidas o ninguna proteínas M1 o HA fueron sintetizadas, y niveles mejorados de las proteínas polimerasas fueron sintetizados. El fenotipo observado a 37°C, siendo tipificado por síntesis de proteína viral diferencial, fue distinto del fenotipo de síntesis de proteína visto a alrededor de 39°C, el cual fue tipificado por la inhibición de la síntesis de todas las proteínas virales. El virus EIV-P821 ha sido sedimentado con la American Type Culture Collection (ATCC) bajo N° de acceso ATCC VR-\_\_\_\_\_, y el virus EIV-P824 ha sido sedimentado con la ATCC bajos la accesión ATCC VR-\_\_\_\_\_.

45

C. Ulteriores caracterizaciones de las mutaciones en el aislamiento del EIV-P821 fueron realizadas por análisis de recatalogación, como sigue.

50

El análisis de recatolagación en los virus de influenza permite a un experto en la técnica, bajos ciertas circunstancias, correlacionar los fenotipos de un virus dado con mutaciones putativas en ciertos de los ocho segmentos de ARN que comprenden un genoma de virus de influenza A. Esta técnica está descrita, por ejemplo, en Palese, *et al.*, *ibid.* Una infección mixta de EIV-P821 y un virus aviar de influenza, A/ánade/New York/6750/78 fue realizada como sigue. Células MDCK fueron coinfecadas con EIV-P821 a una multiplicidad de infecciones (MOI) de 2 células pfu y A/ánade/New York/6750/78 a una MOI de ó 2, 5, ó 10 células pfu. Las células infectadas fueron incubadas a una temperatura de alrededor de 34°C. Los resultados de las varias coinfecciones fueron titulados y las placas individuales fueron aisladas a alrededor de 34°C, y los resultantes aislamientos clónicos fueron caracterizados como si ellos fueran capaces de crecer a alrededor de 39°C y alrededor de 37°C, y expresar sus genes, o sea, sintetizar proteínas virales a alrededor de 39°C, alrededor de 37°C, y alrededor de 34°C. La síntesis de proteína fue evaluada por análisis SDS-PAGE de disoluciones de células infectadas radiorotuladas. Las proteínas HA, NP y NS-1 de los dos virus progenitores, cada uno de los cuales está codificado por un segmento de genoma separado, fueron distinguibles por el análisis SDS-PAGE, ya que esas proteínas virales particulares, como las derivadas de virus de influenza equina o virus de influenza aviar, migran a pesos moleculares aparentes diferentes. En esta forma fue posible, al menos para los genes HA, NP, y NS-1, evaluar si ciertos fenotipos de los virus progenitores, o sea, la temperatura sensitiva y los fenotipos de síntesis de proteína, cosegregados con los segmentos de genoma portan estos genes. Los resultados del análisis de recatalogación que investigan la cosegregación de a) la mutación que inhibe la formación de placa, por ejemplo, la inducción de CPE, a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C o b) la mutación que inhibe la síntesis de proteína a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C con cada una de las proteínas EIV-P821 HA, NP y NS-1 son mostradas en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

# ES 2 286 892 T3

TABLA 3

*Análisis de recatalogación del fenotipo de formación de placas EIV-P821 a 39°C con el virus de influenza aviar A/ánade/New York/6750/78*

5

Gen	Virus	ts <sup>+1</sup>	ts <sup>-2</sup>
HA	aviar	26	13
	equino	11	44
NP	aviar	37	8
	equino	0	49
NS-1	aviar	9	8
	equino	12	20

<sup>1</sup> número de aislamientos clonales capaces de inducir CPE en células de cultivo de tejido a una temperatura de alrededor de 39 °C

<sup>2</sup> número de aislamientos clonales inhibidos en la habilidad de inducir CPE en células de cultivo de tejido a una temperatura de alrededor de 39 °C

20

TABLA 4

*Análisis de la recatalogación del fenotipo de síntesis de la proteína EN-P821a 39°C con el virus de influenza aviar A/ánade/New York/6750/78*

25

Gene	Virus	ts <sup>+1</sup>	ts <sup>-2</sup>
HA	aviar	18	1
	equino	11	7
NP	aviar	34	5
	equino	7	8
NS-1	aviar	10	4
	equino	14	5

<sup>1</sup> número de aislamientos clonales los cuales sintetizan todas las proteínas virales a una temperatura de alrededor de 39 °C

<sup>2</sup> número de aislamientos clonales inhibidos en su habilidad para sintetizar todas las proteínas virales a una temperatura de alrededor de 39 °C

40

Los resultados demostraron una asociación del gen equino NP con una mutación que causa la inhabilidad del EIV-P821 para formar placas a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C, pero los resultados no sugieren una asociación de cualquiera de los genes HA, NP, o NS-1 con una mutación que causa la inhabilidad del EIV-P821 para expresar proteínas virales a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C. De esta manera los datos también demostraron que el fenotipo de formación de placa y el fenotipo de síntesis de proteína observados en el virus EIV-P821 fueron resultados de mutaciones separadas.

D. Los estudios fueron también conducidos a determinar si los virus de influenza equina adaptados en frío de la presente invención tienen un fenotipo de interferencia dominante, esto es, si ellos dominan en infección mezclada con el virus progenitor tipo silvestre A/Kentucky/1/91 (H3N8). Los fenotipos de interferencia dominante de los virus EIV-P821 y EIV-P824 fueron evaluados en la siguiente manera. Los monoestratos separados de células MDCK fueron infectados individualmente con el virus progenitor A/Kentucky/1/91 (H3N8) en un MOI de 2, infectados individualmente con el virus adaptado en frío EIV-P821 o EIV-P824 en un MOI de 2, o doblemente infectados simultáneamente con ambos virus progenitores y uno de los virus adaptados en frío a un MOI de 2+2, todos a una temperatura de alrededor de 34°C. A las 24 horas después de la infección, el medio de los cultivos fueron cosechados y los virus producidos de las varias células infectadas fueron medidos por ensayos de placas duplicadas realizados a temperaturas de alrededor de 34°C y alrededor de 39°C. Este ensayo tomó ventaja del hecho de que los virus de influenza equina EIV-P821 o EIV-P824 son sensibles a la temperatura y son por tanto incapaces de formar placas a una temperatura no permisiva de alrededor de 39°C, mientras el virus progenitor es capaz de formar placas a ambas temperaturas, así haciendo posible medir el crecimiento del virus progenitor en la presencia del virus adaptado en frío. Específicamente, el efecto de interferencia dominante del virus adaptado en frío sobre el crecimiento del virus progenitor fue cuantificado por la comparación del virus producido a alrededor de 39°C de las células infectadas individualmente con el virus progenitor para la producción del virus progenitor en las células doblemente infectadas. El EIV-P821, en la infectación mezclada, fue capaz de reducir la producción del virus progenitor en aproximadamente 200 veces, mientras que el EIV-P824, en la infección mezclada, redujo la producción de virus progenitores en aproximadamente 3.200 veces. Este ensayo por lo tanto mostró que los virus EIV-P821 y EIV-P824 adaptados en frío ambos exhiben el fenotipo de interferencia dominante.

## ES 2 286 892 T3

E. El virus aislado EIV-MSV+5 fue derivado del EIV-P821, como sigue. El EIV-P821 fue pasado una vez en huevos, como se describió arriba, para producir un Virus Semilla Maestro aislado, denotado aquí como EIV-MSV0. El EIV-MSV0 fue entonces sometido a pasar tres veces adicionales en huevos, el virus se aísla al final de cada pasaje siendo designados EIV-MSV+1, EIV-MSV+2, y EIV-MSV+3, respectivamente. El EN-MSV+3 fue entonces sometido a dos pasajes adicionales en células MDCK, como sigue. Las células MDCK fueron crecidas en 150 cm<sup>2</sup> de cultivo de tejido en frascos en un medio MEM de cultivo de tejido con Sales de Hanks, que contienen el 10% de suero de becerro. Las células fueron entonces lavadas con solución estéril PBS y el medio de crecimiento fue reemplazado con alrededor de 8 ml por frasco de un medio infeccioso (medio de cultivo de tejido que comprende MEM con Sales de Hanks, 1 µg/ml de solución de Tripsina, 0,125% de albúmina de suero bovino (BSA y 10 mM de tampón HEPES). Las células fueron inoculadas con FA que contiene el virus EN-MSV+3 (para el primer pasaje en células MDCK), y se permitió a los virus absorber por 1 hora alrededor de 34°C. La vacuna fue removida de los monoestratos celulares, las células fueron lavadas otra vez con PBS, y alrededor de 100 µl del medio infeccioso fue añadido por frasco. Las células infectadas fueron incubadas a alrededor de 34°C por 24 horas. Las células infectadas con virus MDCK fueron cosechadas sacudiendo los frascos vigorosamente para desestabilizar el monoestrato celular, que resulta en virus aislados EIV-MSV+4 (el primer pasaje en células MDCK), y EIV-MSV+5 (el segundo pasaje en células MDCK).

Los virus EN-MSV0 y EN-MSV+5 fueron sometidos al análisis fenotípico, como se describió en la sección B arriba, para determinar su habilidad para formar placas y sintetizar proteínas virales a temperaturas de alrededor de 34°C, alrededor de 37°C, y alrededor de 39°C. Ambos EIV-MSV0 y EN-MSV+5 formaron placas en células de cultivo de tejido a una temperatura de alrededor de 34°C, y ningún virus aislado formó placas o exhibió síntesis de proteína viral detectable a una temperatura de alrededor de 39°C. El virus EIV-MSV0 tuvo un fenotipo sensible a la temperatura como el EIV-P821 a una temperatura de alrededor de 37°C, o sea, fue inhibido en formación de placa, y la expresión de gen tardío fue inhibida. Sin embargo, el EIV-MSV+5, a diferencia de su virus progenitor, EIV-P821, formó placas en el cultivo de tejido a una temperatura de alrededor de 37°C, y a esta temperatura, el virus sintetizó cantidades normales de todas las proteínas. El virus EIV-MSV+5 ha sido sedimentado con la ATCC bajo Nº de acceso ATCC VR-\_\_.

### Ejemplo 2

Las composiciones terapéuticas de la presente invención fueron producidas como sigue.

A. Una amplia reserva de EIV-P821 fue propagada en huevos como sigue. Alrededor de 60 huevos de gallina embrionados libres de patógenos fueron vistos a trasluz y los huevos no viables fueron descartados. La reserva de virus fue diluida a alrededor de 1,0 x 10<sup>5</sup> pfu/ml en solución estéril PBS. Los virus fueron inoculados dentro de la cavidad alantóica de los huevos como se describió en el Ejemplo 1A. Despues de una incubación de 3 días en una cámara humidificada a una temperatura de alrededor de 34°C, el FA fue cosechado de los huevos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1A. El FA cosechado fue mezclado con una solución estabilizadora, por ejemplo, estabilizador A1/A2, disponible de Diamond Animal Health, Des Moines, IA, al 25% de VN (estabilizador/FA). El FA cosechado fue procesado por lotes en un tubo centrífugo y fue clarificado por centrifugación por 10 minutos a 1,000 rpm en una centrífuga refrigerada tapada de mesa IEC Centra-7R fijada a un rotor de cubeta giratorio. El fluido fue distribuido en criofrascos de 1 ml y fue congelado a alrededor de -70°C. Las reservas de virus fueron tituladas en células MDCK por CPE y ensayo de placa a alrededor de 34°C.

B. Un amplio inventario de EIV-P821 fue propagado en células MDCK como sigue. Las células MDCK fueron crecidas en frascos de cultivo de virus de 150 cm<sup>2</sup> en un medio de cultivo de virus MEM con sales de Hanks, que contienen suero de becerro al 10%. Las células fueron entonces lavadas con solución estéril PBS y el medio de crecimiento fue reemplazado con alrededor de 8 ml por frasco del medio infeccioso. Las células MDCK fueron inoculadas con una reserva de virus en un rango de MOI desde alrededor de 0,5 pfu por célula hasta alrededor de 0,005 pfu por célula, y a los virus se les permitió absorber por 1 hora a alrededor de 34°C. La vacuna fue removida de los monoestratos celulares, las células fueron lavadas de nuevo con PBS, y alrededor de 100 ml del medio infeccioso fueron añadidos por frasco. Las células infectadas fueron incubadas a alrededor de 34°C por 24 horas. Las células infectadas MDCK fueron cosechadas sacudiendo los frascos vigorosamente para desestabilizar el monoestrato celular y una solución estabilizadora fue añadida a los frascos al 25% de V/V (estabilizador/solución de virus). Los sobrenadantes fueron distribuidos asépticamente en criofrascos y congelados a -70°C.

C. Las composiciones terapéuticas que comprenden ciertos virus de influenza equina sensibles a la temperatura adaptados en frío de la presente invención fueron formulados como sigue. Justo antes de los procedimientos de vacunación, tales como esos descritos en los Ejemplos 3-7 más adelante, los frascos de reservas de agua, EIV-P821 o EN-MSV +5 fueron descongelados y fueron diluidos en un excipiente que comprende o agua, o PBS, o un medio de cultivo de tejido en MEM con Sales de Hanks, que contiene el 0,125% de albúmina de suero bovino (solución BSA-MEM) a la dilución deseada para la administración a los animales. Las composiciones de vacunas fueron mantenidas en hielo antes de las vacunaciones. Todas las composiciones terapéuticas fueron tituladas en células MDCK por métodos convencionales justo antes de las vacunaciones y siempre que fue posible, una cantidad de la composición, tratada idénticamente a aquellas administradas a los animales, fueron tituladas después de las vacunaciones para asegurar que el virus permaneció viable durante los procedimientos.

## ES 2 286 892 T3

### Ejemplo 3

Una composición terapéutica que comprende el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821 fue probado para seguridad y su habilidad para replicarse en tres caballos que muestran inmunidad anterior detectable al virus de influenza equina como sigue. El EIV-P821, producido como se describió en el Ejemplo 1A , fue crecido en huevos como se describió en el Ejemplo 2A y fue formulado en una composición terapéutica que comprende una solución BSA-MEM de  $10^7$  pfu de EIV-P821  $\frac{1}{2}$  ml como se describió en el Ejemplo 2C.

Los tres ponis que tienen títulos de inhibición de hemaglutinación (HAI) detectable anterior al virus de influenza equina fueron inoculados con una composición terapéutica que comprende el EIV-P821 por el siguiente método. A cada pony le fue dada una dosis de 2 ml de EIV-P821, administrada intranasalmente usando una jeringuilla fijada a una cánula despuntada lo suficientemente larga para alcanzar más allá de la pseudo fosa nasal, 1 ml por fosa nasal.

Los ponis fueron observados por 30 minutos aproximadamente inmediatamente a continuación y aproximadamente cuatro horas después de la vacunación para algún tipo inmediato de reacciones alérgicas tales como estornudos, salivación, respiración trabajosa o irregular, temblores, anafilaxis o fiebre. Los animales fueron además monitoreados en los días 1 al 11 post-vacunación para buscar algunos tipos de reacciones alérgicas tardías, tales como letargia o anorexia. Ninguno de los tres ponis en este estudio exhibió ninguna de las reacciones alérgicas de la vacunación.

Los ponis fueron observados diariamente, a aproximadamente al mismo tiempo cada día, comenzando dos días después de la vacunación y continuando hasta el día 11 a continuación de la vacunación para buscar síntomas clínicos consistentes con la influenza equina. Los ponis fueron observados para descarga nasal, descarga ocular, anorexia, disposición, ritmo cardíaco, tiempo de relleno capilar, ritmo respiratorio, disnea, tos, sonidos pulmonares, presencia de revestimiento tóxico de la encía superior, y temperatura corporal. Además los gánghlios linfáticos parietales fueron palpados y ninguna anomalía fue reportada. Ninguno de los tres ponis en este estudio exhibió alguna reacción anormal o síntomas clínicos ostensibles durante el período de observación.

Para probar el derramamiento viral en los animales, en los días 0 hasta el 11 a continuación de la vacunación, las torundas nasofaríngeas fueron recolectadas de los ponis como está descrito en Chambers, *et al.*, 1995, *Equine Practice*, 17, 19-23. Chambers, *et al.*, *ibid.*. Concretamente, dos aplicadores emboquillados de poliéster Dacrón estériles disponibles, por ejemplo, de Hardwood Products Co., Guilford, ME) fueron insertados, juntos, dentro de cada fosa nasal de los ponis. Las torundas, (cuatro en total, dos para cada fosa nasal) fueron separadas dentro de un tubo centrífugo cónico de 15 ml que contiene 2,5 ml del medio de transporte enfriado que comprende 5% de glicerol, penicilina, estreptomicina, neomicina, y gentamicina en PBS a pH fisiológico. Manteniendo las muestras en hielo mojado, las torundas fueron asépticamente exprimidas dentro del medio y las muestras nasofaríngeas fueron divididas en dos partes alícuotas. Una parte alícuota fue usada para intentar el aislamiento del EIV por inoculación de los huevos embrionados, usando el método descrito en el Ejemplo 1. El FA de los huevos inoculados fue entonces probado para su habilidad para causar hemaglutinación por métodos convencionales, que indican la presencia del virus de influenza equina en el FA. En los días 3 y 4 post vacunación, otras partes alícuotas fueron probadas para el virus por la prueba Directigen® Flu A, disponible de Becton-Dickinson (Cockeysville, MD).

Los intentos de aislar el EIV de las secreciones nasofaríngeas de los tres animales por inoculación en huevo fueron infructuosos. Sin embargo, en los días 2 y 3, todos los animales resultaron positivos a la presencia de derramamiento de virus usando la prueba de Directigen Flu A, consistente con la hipótesis de que el EIV-P821 fue replicándose en los ponis seropositivos.

Para probar los títulos de anticuerpo al EIV en los animales inoculados descritos en este ejemplo, así como en los animales descritos en los Ejemplos 4-7, la sangre fue recolectada de los animales antes de la vacunación y en los días designados post vacunación. El suero fue aislado y fue tratado o con tripsina/periodato o caolín para bloquear los inhibidores no específicos de hemaglutinación presentes en el suero normal. Las muestras de suero fueron probadas para los títulos de inhibición de hemaglutinación (HAI) contra un reciente EIV aislado por métodos convencionales, descritos, por ejemplo, en "Método de ensayo suplementario para conducir en ensayo de inhibición de hemaglutinación para anticuerpo de virus de influenza equina" (SAM 124), sumistrado por el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios U.S.D.A. bajo la 9 CFR 113.2.

Los títulos HAI de los tres ponis son mostrados en la Tabla 5. Como puede ser visto, independientemente del título inicial, los títulos HAI de suero se incrementaron al menos cuatro veces en todos los tres animales después de la vacunación con el EIV-P821.

Estos datos demuestran que el virus EIV-P821 de influenza equina adaptado en frío es inocuo y no reactogénico en ponis seropositivos, y que estos animales exhibieron un incremento en el título de anticuerpo al virus de influenza equina, aún si bien ellos tuvieron títulos demostrables anteriores.

# ES 2 286 892 T3

TABLA 5  
*Títulos HAI de animales vacunados\**

5	Animal	Títulos HAI (días después de la vacunación)			
		0	7	14	21
10	18	40	80	160	160
	19	10	20	40	80
15	25	20	40	320	80

\*Las concentraciones HAI están expresadas como el recíproco de la dilución más alta de suero la cual inhibió la hemaglutinación de eritrocitos por un virus de influenza equina reclén aislado.

## 15 Ejemplo 4

Este Ejemplo revela un estudio animal para evaluar la seguridad y la eficacia de una composición terapéutica que comprende el virus EIV-P821 de influenza equina adaptado en frío.

20 Una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821 fue probado para la atenuación, así como para su habilidad para proteger caballos de la exposición con virus de influenza equina virulento, como sigue. El EIV-P821, producido como se describió en el Ejemplo 1, fue crecido en huevos como se describió en el Ejemplo 2A y fue formulado en una composición terapéutica que comprende  $10^7$  pfu de virus/2 ml de agua, como se describió en el Ejemplo 2C. Ocho ponis seronegativos al EIV fueron usados en este estudio. Tres de los ocho ponis fueron vacunados con una dosis de 2 ml que comprende  $10^7$  pfu de la composición terapéutica EIV-P821, administrada intranasalmente, usando métodos similares a aquellos descritos en el Ejemplo 3. A un pony le fueron dados  $10^7$  pfu de una composición terapéutica EIV-P821, administrada oralmente, por inyección de 6 ml del virus dentro de la faringe, usando una jeringuilla de 10 ml la cual fue adaptada para crear una rociada fina por el siguiente método. El “asiento” protuberante para la fijación de las agujas fue sellado usando plastilina y su tapa fue dejada en su lugar. Alrededor de 10 agujeros fueron perforados a través del fondo de la jeringuilla, o sea, alrededor del “asiento”, usando una aguja de calibre 25. La jeringuilla fue colocada en el espacio interdental y el virus fue fuertemente inyectado en la parte trasera de la boca. Los restantes cuatro ponis fueron mantenidos como controles no vacunados.

35 Los ponis vacunados fueron observados por aproximadamente 30 minutos inmediatamente a continuación y a aproximadamente cuatro horas después de la vacunación para reacciones de tipo alérgico inmediatas, y los animales fueron ulteriormente monitoreados en los días 1-11 post vacunación para reacciones de tipo alérgico tardías, ambas como se describieron en el Ejemplo 3. Ninguno de los cuatro ponis vacunados en este estudio exhibieron ninguna reacción anormal de la vacunación.

40 Los ponis fueron evaluados diariamente, a aproximadamente el mismo tiempo cada día, comenzando dos días antes de la vacunación de virus y continuando hasta el día 11 a continuación para buscar signos clínicos, tales como esos descritos en el Ejemplo 3. Ninguno de los cuatro ponis en este estudio exhibió ninguno de los signos clínicos durante el período de observación. Este resultado demostró que el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821 exhibe el fenotipo de atenuación.

55 Para probar el derramamiento viral en los animales vacunados, en los días 0 hasta 11 a continuación de la vacunación, las torundas nasofaríngeas fueron recolectadas de los ponis como se describió en el Ejemplo 3. Las muestras nasofaríngeas fueron probadas en huevos de gallina embrionados de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3.

50 Como se muestra en la Tabla 6, el virus fue aislado de solamente un animal vacunado usando el método del huevo. Sin embargo, como se nota en el Ejemplo 3, la ausencia de aislamiento por este método no excluye que la replicación de virus esté ocurriendo, ya que la replicación puede ser detectada por métodos más sensitivos, o sea, la prueba de Directigen Flu A.

## 55 TABLA 6

*Aislamiento de virus en huevos después de la vacunación*

60	ID del animal	Ruta	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
			-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	91	IN	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
65	666	IN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	673	IN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	674	Oral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## ES 2 286 892 T3

Para probar los títulos de anticuerpo al virus de influenza equina en animales vacunados, la sangre fue recolectada de los animales antes de la vacunación y en los días 7, 14, 21 y 28 post vacunación. Las muestras de suero fueron aisladas y fueron probadas para los títulos de inhibición de hemaglutinación contra un reciente virus EIV aislado de acuerdo a los métodos descritos en el Ejemplo 3.

5

Los títulos HAI de los cuatro ponis vacunados son mostrados en la Tabla 7.

10

**TABLA 7**  
**Títulos HAI después de la vacunación**  
**Títulos HAI (días después de la vacunación)**

15

ID del animal	Ruta	0	7	14	21	28
91	IN	<10	<10	<10	<10	<10
666	IN	10	10	10	20	20
673	IN	10	10	10	20	20
674	Oral	20	40	40	40	40

20

A diferencia del incremento del título HAI observado con los tres animales descritos en el estudio en el Ejemplo 3, los animales en este estudio no exhibieron un significativo incremento, o sea, mayor que cuatro veces, en el título HAI a continuación de la vacunación con EIV-P821.

Aproximadamente cuatro y medio meses después de la administración del virus vacuna, todos los 8 ponis, o sea, los cuatro que fueron vacunados y los cuatro de control no vacunados, fueron expuestos por el siguiente método. Para cada animal,  $10^7$  pfu de la cepa de virus de influenza equina virulenta A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8) fue suspendida en 5 ml de agua. Una máscara fue conectada a un nebulizador, y la máscara fue colocada sobre el hocico del animal, incluyendo las fosas nasales. Cinco (5) ml fueron nebulizados para cada animal, usando colocaciones tales que tomó de 5-10 minutos entregar el total de los 5 ml. Las observaciones clínicas, como se describió en el Ejemplo 3, fueron realizadas en todos los animales tres días antes de la exposición y diariamente por 11 días después de la exposición.

35

A pesar del hecho de que los animales vacunados no exhibieron marcados incrementos en sus títulos HAI al virus de influenza equina, todos los cuatro animales vacunados fueron protegidos contra la exposición del virus de influenza equina. Ninguno de los animales vacunados mostró signos clínicos ostensibles o fiebre, aunque uno de los animales tuvo una respiración dificultosa menor por dos días. Por otra parte, todos los ponis no vacunados derramaron virus y desarrollaron signos clínicos y fiebre típicos de la infección de virus de influenza equina. De esta forma, este ejemplo demuestra que una composición terapéutica de la presente invención puede proteger a los caballos de la enfermedad de la influenza equina.

40

**Ejemplo 5**

Este Ejemplo revela un estudio animal adicional para evaluar la atenuación de una composición terapéutica que comprende el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821, y su habilidad para proteger a los caballos vacunados de subsecuentes exposiciones con el virus de influenza equina virulento. Además, este estudio evaluó el efecto del estrés de ejercicio en la seguridad y eficacia de la composición terapéutica.

45

Una composición terapéutica que comprende el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821 fue probada para seguridad y eficacia en caballos, como sigue. El EIV-P821, producido como se describió en el Ejemplo 1, fue cultivado en huevos como se describió en el ejemplo 2A y fue formulado en una composición terapéutica que comprende  $10^7$  pfu de virus/5ml en agua, como se describió en el Ejemplo 2C. Quince ponis fueron usados en este estudio. Los ponis fueron aleatoriamente asignados a tres grupos de cinco animales cada uno, como se muestra en la Tabla 8, estando allí dos grupos vacunados y un grupo de control no vacunado. Los ponis en el grupo 2 fueron estresados con ejercicio antes de la vacunación, mientras los ponis en el grupo 1 vacunado fueron mantenidos en un establo.

50

55

**TABLA 8**  
**Vacunación/Protocolo de Exposición**

60

65

Grupo	No. de ponies	Ejercicio	Vacuna	Exposición
1	5	-	Día 0	Día 90
2	5	Días -4 a 0	Día 0	Día 90
3	5	-	-	Día 90

# ES 2 286 892 T3

Los ponis en el grupo 2 fueron sometidos a estrés por ejercicio en una noria antes de la vacunación, como sigue. Los ponis fueron aclimatados para el uso de la noria por 8 horas de uso de la noria al paso solamente. El estrés real por ejercicio implicó un régimen diario de ejercicio comenzando 4 días antes y terminando en el día de la vacunación (inmediatamente antes de la vacunación). El régimen de ejercicio en la noria está mostrado en la Tabla 9.

5

TABLA 9

*Régimen de ejercicio para ponis en el Grupo 2*

	Velocidad (m/seg)	Tiempo (min)	Pendiente (°)
15	1,5	2	0
	3,5	2	0
	3,5	2	7
	4,5*	2	7
	5,5*	2	7
	6,5*	2	7
20	7,5*	2	7
	8,5*	2	7
	3,5	2	7
	1,5	10	0*

\*La velocidad en metros por segundo (m/seg) fue incrementada para cada animal cada 2 minutos hasta que el ritmo cardíaco alcanzó ≥ 200 latidos por minuto

25

A los grupos 1 y 2 les fue dada una composición terapéutica que comprende  $10^7$  pfu de EIV-P821, por el método de nebulización descrito para la exposición descrito en el Ejemplo 4. Ninguno de los ponis vacunados en este estudio exhibieron ninguna reacciones alérgicas inmediatas o tardías de la vacunación.

30

Los ponis fueron observados diariamente, a aproximadamente el mismo tiempo cada día, comenzando dos días antes de la vacunación y continuando hasta el día 11 a continuación de la vacunación para buscar síntomas clínicos, tales como los descritos en el Ejemplo 3. Ninguno de los ponis vacunados en este estudio exhibió síntomas clínicos ostensibles durante el período de observación.

35

Para probar para el derramamiento viral en los animales vacunados, antes de la vacunación y en los días 1 hasta el 11 a continuación de la vacunación, las torundas nasofaríngeas fueron recolectadas de los ponis como se describió en el Ejemplo 3. Las muestras nasofaríngeas fueron probadas para virus en huevos de gallina embrionados de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3. El virus fue aislado de los animales vacunados, o sea, los Grupos 1 y 2, como se muestra en la Tabla 10.

40

TABLA 10

*Aislamiento de virus después de la vacunación  
Aislamiento de virus (días después de la vacunación)*

45

Grupo	ID del animal	Ejercicio	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
			-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
50	12	No	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
	16		-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	17		-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	165		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	688		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
55	7	Sí	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	44		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	435		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	907		-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	968		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

60

Para probar los títulos de anticuerpo al virus de la influenza equina en los animales vacunados, la sangre fue recolectada antes de la vacunación y en los días 7, 14, 21 y 28 post vacunación. Las muestras de suero fueron aisladas y fueron probadas para títulos HAI contra un EIV reciente aislado de acuerdo a los métodos descritos en el Ejemplo 3. Esos títulos son mostrados en la Tabla 11.

ES 2 286 892 T3

TABLA 11

*Títulos HAI después de la vacunación y después de la exposición en 90 días*

En el día 90 post vacunación, todos los 15 ponis fueron expuestos con  $10^7$  pfu de cepa de virus de influenza equina A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8) por un método nebulizador como se describió en el Ejemplo 4. Las observaciones clínicas, como se describieron en el Ejemplo 3, fueron realizadas en todos los animales tres días antes de la exposición y diariamente por 11 días después de la exposición. No hubo signos clínicos ostensibles observados en ninguno de los ponis vacunados. Cuatro de los cinco ponis no vacunados desarrollaron fiebre y signos clínicos típicos de infección de virus de influenza equina.

De este modo, este ejemplo demuestra que una composición terapéutica de la presente invención protege a los caballos contra la enfermedad de la influenza equina, aún si los animales están estresados antes de la vacunación.

### Ejemplo 6

Este Ejemplo comparó las infectividades de las composiciones terapéuticas de la presente invención crecidas en huevos y crecidas en células de cultivo de tejido. Desde un punto de vista de producción, hay una ventaja para crecer composiciones terapéuticas de la presente invención en cultivo de tejido en lugar de en huevos embrionados de gallina. El virus de influenza equina, sin embargo, no crece a tan alto título en células como en huevos. Además, la hemaglutinina del virus requiere una hendidura proteolítica extracelular por tripsina parecida a las proteasas para la infectividad. Ya que el suero contiene inhibidores de la tripsina, el crecimiento del virus en la célula de cultivo debe ser propagado en un medio libre de suero que contiene tripsina para ser infeccioso. Es bien conocido por aquellos expertos en la técnica que tales condiciones son menos que óptimas para la viabilidad de las células de cultivo de tejido. Además, estas condiciones de crecimiento pueden seleccionarse para virus con afinidad de enlace alterado para células equinas, las cuales pueden afectar la infectividad viral ya que el virus necesita enlazarse eficientemente a la mucosa nasal del animal para replicarse y estimular la inmunidad. Así, el objetivo del estudio revelado en este ejemplo fue evaluar si tanto la infectividad de las composiciones terapéuticas de la presente invención fue adversamente afectada por el crecimiento para los múltiples pasajes de cultivo de tejido *in vitro*.

El EIV-P821, producido como se describió en el Ejemplo 1, fue crecido en huevos como se describió en el Ejemplo 2 A o en células MDCK como se describió en el Ejemplo 2B. En cada instancia, el virus fue pasado cinco veces. El EIV-P821 fue probado para su adaptación en frío y fenotipos sensibles a la temperatura después de cada pasaje. Las preparaciones de virus pasados en huevos y células fueron formuladas en composiciones terapéuticas que comprenden  $10^7$  pfu de virus/2 ml de solución BSA-MEM, como se describió en el Ejemplo 2C, resultantes en una composición terapéutica crecida en huevo EIV-P821 y en una composición terapéutica crecida en células MDCK, respectivamente.

## ES 2 286 892 T3

Ocho ponis fueron usados en este estudio. El suero de cada animal fue probado para títulos HAI al virus de influenza equina antes del estudio. Los animales fueron aleatoriamente asignados en uno o dos grupos de cuatro ponis cada uno. El Grupo A recibió una composición terapéutica crecida en huevo EIV-P821 y el Grupo B recibió una composición terapéutica crecida en células MDCK EIV-P821, preparadas como se describió en el Ejemplo 2B. Las 5 composiciones terapéuticas fueron administradas intranasalmente por el método descrito en el Ejemplo 3.

Los ponis fueron observados diariamente, a aproximadamente el mismo tiempo cada día, comenzando dos días 10 antes de la vacunación y continuando hasta el día 11 a continuación de la vacunación para buscar reacciones alérgicas o signos clínicos como se describió en el Ejemplo 3. Ninguna reacción alérgica o signos clínicos ostensibles fueron observados en ninguno de los animales.

Las torundas nasofaríngeas fueron colectadas antes de la vacunación y diariamente por 11 días después de la 15 vacunación. La presencia de material viroso en las torundas nasales fue determinada por la detección de CPE en las células infectadas como se describió en el Ejemplo 1, o por inoculación dentro de los huevos y el examen de la habilidad del FA infectado para causar hemaglutinación, como se describió en el Ejemplo 3. El material fue probado para la presencia de virus solamente, y no para títulos de virus en la muestra. Los resultados del aislamiento de virus 20 son listados en la Tabla 12. La sangre fue recolectada y las muestras de suero de los días, 7, 14, 21 y 28 después de la vacunación fueron probadas para títulos de anticuerpos de inhibición de hemaglutinación contra un aislado reciente. Los títulos HAI son también listados en la Tabla 12.

20

TABLA 12

*Títulos HAI y aislamiento de virus después de la vacunación*

25

Grupo <sup>2</sup>	ID	Títulos de virus (DPV <sup>3</sup> )					Aislamiento <sup>1</sup> de virus (DPV <sup>3</sup> )											
		0	7	14	21	28	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	31	<10	20	160	160	160	-	EC	-	C	EC	EC	C	C	EC	-	-	-
	37	<10	40	160	160	160	-	EC	C	C	EC	C	C	C	-	-	-	-
	40	<10	20	80	160	80	-	EC	EC	C	-	C	EC	C	-	EC	EC	-
	41	<10	40	160	160	80	-	EC	EC	C	EC	C	EC	EC	-	-	-	-
2	32	<10	<10	80	80	40	-	EC	-	C	-	C	-	C	-	EC	-	-
	34	<10	20	160	160	160	-	EC	-	C	EC	C	EC	C	-	-	-	-
	35	<10	<10	80	80	40	-	EC	-	C	-	C	-	C	-	EC	-	-
	42	<10	<10	80	80	40	-	-	-	C	-	C	EC	EC	-	-	-	-

<sup>1</sup> E = Aislamiento positivo en huevos; C = aislamiento positivo CPE; - = virus no detectado por ninguno de los métodos

<sup>2</sup> Grupo 1: Virus pasados 5 veces por células MDCK; Grupo 2: Virus pasados 5 veces en huevos

<sup>3</sup> Días post vacunación

45 Los resultados en la Tabla 12 muestran que no hay diferencias significantes en la infectividad o inmunogenicidad entre las composiciones terapéuticas EIV-P821 crecidas en huevo y las crecidas en células MDCK.

### Ejemplo 7

Este ejemplo evaluó la dosis mínima de una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío requerido para proteger a un caballo de la infección por el virus de influenza equina.

50 Los estudios de animal revelados en los Ejemplos 3-6 indicaron que una composición terapéutica de la presente invención fue eficaz y segura. En estos estudios, una dosis de  $10^7$  pfu, la cual se correlaciona a aproximadamente  $10^8$  unidades de TCID<sub>50</sub>, fue usada. Sin embargo, desde un punto de vista de costo y seguridad, es ventajoso usar el mínimo título de virus que protegerá a un caballo de la enfermedad causada por el virus de influenza equina. En este estudio, los ponis fueron vacunados con cuatro dosis diferentes de una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío para determinar la dosis mínima la cual protegerá a un caballo contra la exposición a un virus de influenza equina virulento.

60 El EIV-P821, producido como se describió en el Ejemplo 1A, fue pasado y crecido en células como se describió en el Ejemplo 2B y fue formulado en una composición terapéutica que comprende o  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ , o  $2 \times 10^7$  unidades de TCID<sub>50</sub>/1 ml de solución BSA-MEM como se describió en el Ejemplo 2C. Diecinueve caballos de varias edades y razas fueron usados en este estudio. Los caballos fueron asignados a cuatro grupos de vacuna, un grupo de tres caballos y tres grupos de cuatro caballos, y un grupo de control de cuatro caballos (ver Tabla 13). A cada uno de los ponis en los grupos de vacuna le fue dada una dosis de 1 ml de la composición terapéutica indicada, administrada intranasalmente por métodos similares a esos descritos en el Ejemplo 3.

# ES 2 286 892 T3

TABLA 13

*Protocolo de vacunación*

Grupo No.	No. de animales	Dosis de vacuna, Unidades de TCID <sub>50</sub>
1	3	$2 \times 10^7$
2	4	$2 \times 10^6$
3	4	$2 \times 10^5$
4	4	$2 \times 10^4$
5	4	Control

Los ponis fueron observados por aproximadamente 30 minutos inmediatamente a continuación y aproximadamente cuatro horas después de la vacunación para reacciones de tipo inmediato, y los animales fueron más adelante monitoreados en los días 1-11 post vacunación para reacciones de tipo tardío, como se describió en el Ejemplo 3. Ninguno de los ponis vacunados en este estudio exhibió ninguna reacciones anormales o signos clínicos ostensibles de la vacunación.

Los análisis de suero y sangre fueron recolectados 3 días antes de la vacunación, en los días 7, 14, 21 y 28 después de la vacunación, y después de la exposición en los días 35 y 42. Las muestras de suero fueron probadas para títulos HAI contra un EIV aislado reciente de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3. Estos títulos son mostrados en la Tabla 14. Antes de la exposición en el día 29, 2 de los 3 animales en el grupo 1, 4 de los 4 animales en el grupo 2, 3 de los 4 animales en el grupo 3, y 2 de los 4 animales en el grupo 4 mostraron al menos incrementos en 4 veces en los títulos HAI después de la vacunación. Además, 2 de los 4 caballos de control también exhibieron incrementos en los títulos HAI. Una interpretación de estos resultados es que los caballos de control fueron expuestos al virus vacuna transmitido de los caballos vacunados, ya que todos los caballos en este estudio fueron albergados en el mismo establo.

TABLA 14

*Títulos HAI post vacunación y post exposición, y resultados de la exposición*

Vacunación en el día 0 y exposición en el día 29, Exposición en el día 29  
 (±) Prueba de inmunidad de la enfermedad

No.	Dosis en unidades TCID50	ID del animal	-1	7	14	21	28	35	42	±
1	$2 \times 10^7$	41	<10	<10	10	40	10	20	80	-
		42	40	40	40	40	40	<10	80	-
		200	<10	<10	80	40	160	40	40	-
2	$2 \times 10^6$	679	<10	10	40	40	40	20	20	-
		682	<10	<10	40	40	40	40	40	-
		795	20	80	160	160	320	320	640	-
		R	<10	10	40	20	160	40	40	-
3	$2 \times 10^5$	73	<10	<10	160	40	80	160	160	-
		712	<10	<10	20	20	40	40	20	-
		720	<10	20	80	40	80	80	160	-
		796	<10	<10	<10	<10	<10	10	80	+
4	$2 \times 10^4$	75	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	+
		724	<10	>10	<10	<10	<10	20	320	+
		789	<10	10	320	160	320	320	320	-
		790	<10	<10	80	40	160	80	40	-
5	Control	12	<10	<10	<10	20	20	40	40	-
		22	10	20	40	10	160	40	640	-
		71	<10	<10	<10	<10	10	20	160	+
		74	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	+

En el día 29 post vacunación, todos los 19 ponis fueron expuestos con la cepa del virus de influenza equina A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8) por el método nebulizador como se describió en el Ejemplo 4. La dosis de exposición fue prospectivamente calculada para contener alrededor de  $10^8$  unidades de TCID<sub>50</sub> de virus de exposición en

## ES 2 286 892 T3

un volumen de 5 ml por cada animal. Las observaciones clínicas, como se describieron en el Ejemplo 3, fueron monitoreadas comenzando dos días antes de la exposición, el día de la exposición, y por 11 días a continuación de la exposición. Como se mostró en la Tabla 14, ningún animal en los grupos 1 o 2 exhibieron signos clínicos indicativos de la enfermedad de influenza equina, y solamente y ninguno fuera de los cuatro animales en el grupo 3 enfermó. Dos 5 fuera de los cuatro animales en el grupo 4 enfermó, y solamente dos de los cuatro animales de control enfermaron. Los resultados en la Tabla 14 sugieren una correlación entre la seroconversión y la protección de la enfermedad, ya que, por ejemplo, los dos animales de control que mostraron títulos HAI incrementados durante el período de vacunación no mostraron signos clínicos de la enfermedad de influenza equina a continuación de la exposición. Otra 10 interpretación, sin embargo, fue que el título real del virus de exposición puede haber sido menor que la cantidad de  $10^8$  unidades de TCID<sub>50</sub> calculada, ya que, basado en los resultados anteriores, este nivel de exposición debió haber causado enfermedad en todos los animales de control.

Sin embargo, los niveles de seroconversión y la falta de signos clínicos en el grupo que recibió una composición terapéutica que comprende al menos  $2 \times 10^6$  unidades de virus de influenza equina adaptado en frío TCID<sub>50</sub> sugiere 15 que esta cantidad fue suficiente para proteger un caballo contra la enfermedad de influenza equina. Además, una dosis de  $2 \times 10^5$  unidades de TCID<sub>50</sub> indujo la seroconversión y dio protección clínica de exposición en 3 fuera de los 4 caballos, y de esta manera aún esta cantidad puede ser suficiente para conferir protección significante en caballos contra la enfermedad de influenza equina.

### 20 Ejemplo 8

Este ejemplo revela un estudio animal para evaluar la duración de la inmunidad de una composición terapéutica que comprende virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821

25 Una composición terapéutica que comprende el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821, producido como se describió en el Ejemplo 1, fue crecido en huevos similarmente al procedimiento descrito en el Ejemplo 2A, fue expandido por el pasaje en células MDCK similarmente al procedimiento descrito en el Ejemplo 2B, y fue formulado en una composición terapéutica como se describió en el Ejemplo 2C. Treinta caballos de aproximadamente 11 a 12 meses de edad fueron usados para este estudio. Diecinueve de los caballos fueron vacunados intranasalmente en una 30 fosa nasal usando una jeringuilla con un dispositivo de entrega de boquilla sujeto a su extremo, con una dosis de 1,0 ml que comprende 6 registros de unidades de TCID<sub>50</sub> de una composición terapéutica EIV-P821. Las vacunas fueron realizadas en el día 0.

Los caballos fueron observados en el día 0 (antes de la vacunación y hasta 4 horas post vacunación) y en los días 35 de estudio 1, 2, 3, 7, 15, y 169 post vacunación. En esos días, un examen a distancia por un período de al menos 15 minutos fue realizado. Este examen a distancia incluyó la observación para la conducta, comportamiento, tos, estornudo, y descarga nasal. El examen en el día 169 también sirvió para confirmar que los caballos estaban en una condición de salud adecuada para transportarlos al sitio de exposición el cual estaba situado aproximadamente a 360 millas del sitio de vacunación.

40 Los animales fueron aclimatados al sitio de exposición y fueron observados aproximadamente diariamente por un veterinario o técnico en animales para evidencia de enfermedad. Un examen físico general fue realizado en el día 171 post vacunación para monitorear lo siguiente: conducta, comportamiento, tos, estornudo, y descarga nasal. De los días 172 a 177, similares observaciones así como la temperatura rectal fueron registradas, de acuerdo con el juicio del 45 veterinario que atendió a cada caballo individual con presentación clínica anormal.

Los caballos no vacunados mostraron ninguna reacción adversa post vacunación. Uno vacunado fue encontrado muerto alrededor de dos meses después de la vacunación. Este caballo mostró ninguna evidencia de reacción adversa cuando fue observado por al menos un mes después de la vacunación. Aunque ninguna causa de muerte pudo ser firmemente establecida, la muerte no fue instantánea y fue considerada a ser consistente con factores de contribución posibles tales como cólico, fractura de hueso, o carga severa de gusanos. Ya que no había otra evidencia de ninguna de las reacciones adversas por vacunación en ninguno de los otros vacunados, es altamente improbable que la vacuna contribuyera a ninguna reacción adversa en este caso.

55 Las exposiciones fueron realizadas en el día 181 post vacunación. El siguiente virus de influenza equina aislado tipo silvestre previamente mostrado para causar enfermedad en los caballos fue usado como el virus de exposición: A/equino/2/Kentucky/91. Antes de la infección de cada grupo expuesto, el material de exposición fue rápidamente descongelado a aproximadamente 37°C. El virus fue diluido con solución salina tamponada con fosfato a un volumen total de aproximadamente 21 ml. El material diluido fue almacenado en hielo hasta inmediatamente antes de 60 la inoculación. Antes de la inoculación y al final de la nebulización de cada grupo expuesto, una muestra del virus de exposición diluido fue recolectada para la confirmación del título de virus pre y post inoculación. Los vacunados y los de control fueron aleatoriamente asignados a 4 grupos de exposición de 6 caballos cada uno y un grupo de exposición de 5 caballos de tal forma que cada grupo de exposición contenía una mezcla de 4 vacunados y 2 de control o 3 vacunados y 2 de control.

65 El virus de exposición en forma de aerosol fue entregado a través de un tubo insertado a través de una abertura central pequeña en el techo plástico con un nebulizador ultrasónico (por ejemplo, De Vilbiss Model 099HD, De Vilbiss Healthcare Inc., Somerset, Pennsylvania) por un período de aproximadamente 10 minutos. Los caballos quedaron en la

# ES 2 286 892 T3

cámara por un período ulterior de aproximadamente 30 minutos después de que la nebulización había sido completada (tiempo total de exposición, aproximadamente 40 minutos). En ese momento, el plástico fue removido para ventilar la cámara, y los caballos fueron liberados y devueltos a su corral. El procedimiento de exposición fue repetido para cada grupo.

5 Todos los métodos estadísticos en este estudio fueron realizados usando SAS (SAS Institute, Cary, NC), y un P < 0,05 fue considerado ser significante estadísticamente. Comenzando en el día 178 post vacunación (tres días antes de la exposición) hasta el día 191 (día 10 post exposición), los caballos fueron observados diariamente por ambos exámenes distante e individual. Las temperaturas rectales fueron medidas en esos momentos. Los datos desde el día 0 10 (día de la exposición) hasta el día 10 fueron incluidas en los análisis, ver Tabla 15.

TABLA 15

15 *Efecto de la exposición en las temperaturas diarias (°C) en caballos vacunados y de control (promedio mínimo de cuadrados)*

Día post exposición	Vacunados (n=19)	No vacunados (n=10)	P-valor
0	100,7	100,8	0,8434
1	100,5	110,4	0,7934
2	103,4	104,9	0,0024
3	101,8	103,9	0,0001
4	101,5	103,2	0,0002
5	101,7	103,8	0,0001
6	101,3	103,6	0,0001
7	100,7	102,3	0,0007
8	100,5	101,4	0,0379
9	100,1	100,3	0,7416
10	100,3	100,5	0,7416
EEM combinado*	0,27	0,38	

\* Error estandar de la media

40 La Tabla 15 muestra que en los días 2 hasta el 8, los caballos vacunados tuvieron temperaturas más bajas (P<0,05) que los caballos de control no vacunados.

45 El examen a distancia consistió de un período de 20 minutos en los que las siguientes observaciones fueron hechas: tos, descarga nasal, respiración, y depresión. Los criterios de puntaje son mostrados en la Tabla 16.

TABLA 16

*Síntomas clínicos e índice de puntaje*

Signo clínico	Descripción	Puntaje
Tos	Normal dentro de un período de observación de 15 min.	0
	Tos una vez durante la observación	1
	Tos dos veces o más durante la observación	2
Descarga nasal	Normal	0
	Anormal, serosa	1
	Anormal, mucopurulenta	2
	Anormal, profusa	3
Respiración	Normal	0
	Anormal (disnea, taquipneia)	1
Depresión	Normal	0
	Depresión presente*	1

65 \*La depresión fue evaluada por la evaluación subjetiva del comportamiento del animal que incluyó lo siguiente: fracaso para aproximarse rápidamente al alimento, letargo general, inapetencia y anorexia.

## ES 2 286 892 T3

Cada caballo fue puntuado para cada una de estas categorías. Adicionalmente, los nódulos linfáticos submandibulares fueron palpados para monitorear una posible infección bacterial. En cualquier caso en el que hubo un valor difefente registrado para un puntaje de signo clínico subjetivo de una observación en el mismo día a la distancia contra la observación individual, el mayor puntaje fue usado en la compilación y análisis de los resultados. Para los propósitos 5 de evaluar la salud de los caballos antes de la disposición final, los exámenes a distancia fueron realizados a los 14, 18, y 21 días post exposición. Los datos desde los días 1 hasta el 10 post vacunación fueron incluidos en el análisis. Estos 10 puntajes fueron sumados en cada día para cada caballo, y los vacunados y los de control fueron comparados usando la prueba de sumas de rango de Wilcoxon. Además, estos puntajes fueron sumados a través de todos los días para cada caballo, y comparados en la misma manera. Los rangos medios y los puntajes clínicos medios son mostrados en las Tablas 17 y 18, respectivamente. Cinco días post exposición, el rango medio de los puntajes en los caballos vacunados fue menor ( $P < 0,05$ ) que en los caballos de control no vacunados; y este efecto continuó en los días 6, 7, 8, 9, y 10 ( $P < 0,05$ ). El rango acumulativo sobre el período de prueba completo fue también más bajo ( $P < 0,05$ ) en los caballos vacunados que en los de control no vacunados.

15

TABLA 17

*Efecto de la exposición en los puntajes de los signos clínicos en caballos vacunados y de control (rango medio)*

20	Día post exposición	Vacunados (n=19)	No vacunados (n=10)	P-valor
25	0	13,6	17,6	0,1853
	1	16,4	12,4	0,2015
	2	15,1	14,9	0,9812
	3	13,3	18,3	0,1331
	4	13,5	17,9	0,1721
	5	12,4	19,9	0,0237
	6	12,7	19,4	0,0425
	7	12,1	20,6	0,0074
	8	12,6	19,6	0,0312
	9	13,1	18,7	0,0729
35	10	12,3	20,1	0,0135
	Total sobre 11 días	11,8	21,2	0,0051
* Prueba de suma de rango por Wilcoxon				

40

TABLA 18

*Efecto de la exposición en los puntajes de los signos clínicos en caballos vacunados y de control (puntajes medios)*

50	Día post exposición	Vacunados (n=19)	No vacunados (n=10)
55	0	1,2	1,8
	1	1,5	0,9
	2	2,4	2,5
	3	3,2	4,1
	4	3,4	4,3
	5	3,2	4,7
	6	3,4	4,8
	7	3,3	4,7
	8	3,2	4,5
	9	3,2	3,9
60	10	2,4	3,4

## ES 2 286 892 T3

Las torundas nasofaríngeas fueron obtenidas en el día anterior a la exposición y en los días 1 a 8 post exposición, como se describió en el Ejemplo 3, y probados para virus derramados por el ensayo de cultivo de células. El porcentaje de caballos que derraman virus de exposición en cada grupo es mostrado en la Tabla 19. El porcentaje de caballos que derraman virus de exposición en el grupo vacunado fue menor ( $P<0,05$ ) en los días 5 y 6 post exposición que en los de control no vacunados.

10      *Porcentaje de caballos que derraman virus por día post exposición y número medio de días de derramamiento por grupo*

Día post exposición	Vacunados (n=19)	No vacunados (n=10)
-1	0	0
1	63,2	90
2	100	100
3	84,2	100
4	100	100
5	47,4	88,9*
6	10,5	77,8*
7	5,3	20
8	0	0
Número promedio de derramamientos por día	4,1	5,6*

30      \*Dentro de un punto de tiempo, vacunados diferente de no vacunados ( $P<0,06$ ) por la prueba exacta de Fisher (datos de porcentaje) o la prueba de sumas de rangos (días de derramamiento) de Wilcoxon.

35      Los puntajes de los signos clínicos relevantes a la influenza y las mediciones de la temperatura objetiva ambas demostraron una reducción estadística significante en el grupo de vacunados cuando se comparó con aquellos del grupo de control; esto es consistente con una interpretación de que la vacuna confiere protección significante de la enfermedad.

40      La habilidad de los caballos para derramar virus de influenza post exposición fue también significativamente reducida en los vacunados comparados a los de control en ambos la incidencia de caballos positivos para el derramamiento en ciertos días post exposición y el número medio de días de derramamiento por caballo. Este derramamiento disminuido por los vacunados es importante en que debe servir para reducir el potencial por exposición de animales susceptibles al virus de tipo silvestre en una epidemia de influenza.

45      50      55      Los resultados de este estudio son consistentes con la interpretación de que la vacuna seguramente confirió protección por 6 meses para la enfermedad clínica causada por la influenza equina y redujo el potencial para la diseminación de virus de influenza equina virulento que ocurre naturalmente. Mientras el grado de protección de la enfermedad no fue completo (13 fuera de 19 vacunados fueron protegidos, mientras 10/10 de control enfermaron), hubo una clara reducción en la severidad y duración de la afección clínica y un notable efecto en el potencial para el derramamiento viral después de la exposición a una cepa virulenta de influenza equina. El hallazgo de que ambos vacunados y de control fueron seronegativos inmediatamente antes de la exposición a 6 meses post inmunización sugiere que la inmunidad mediada por algo aparte del suero anticuerpo puede ser de primaria importancia en la habilidad de esta vacuna para conferir protección medible y durable.

### Ejemplo 9

Este ejemplo revela un estudio animal para evaluar la habilidad de una composición terapéutica que comprende un virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821 para ayudar en la prevención de la enfermedad a continuación de la exposición a una cepa heteróloga de virus de influenza equina.

60      65      La cepa heteróloga probada fue la A/equino/2/Saskatoon/90, descrita genéticamente como una cepa Eurasíatica (obtenida de Hugh Townsend, Universidad de Saskatchewan). Veinte (hembras) caballos Percherón de aproximadamente 15 meses de edad (en el momento de la vacunación) fueron usados para la eficacia del estudio. Los caballos fueron asignados a dos grupos, un grupo de 10 a ser vacunados y otro grupo de 10 para servir como de control no vacunados. En el día 10, el grupo vacunado fue vacunado en la manera descrita en el Ejemplo 8.

## ES 2 286 892 T3

El material de exposición, o sea, la cepa equina de influenza A/equino/2/Saskatoon/90 [H3N8] fue preparada similarmente a la preparación en el Ejemplo 8. Los vacunados y de control fueron aleatoriamente asignados a 4 grupos de exposición de 5 caballos cada uno tal que cada grupo de exposición contenía una mezcla de 2 vacunados y 3 de control o viceversa. El procedimiento de exposición fue similar a ese descrito en el Ejemplo 8. Las exposiciones 5 fueron realizadas el día 28 post vacunación.

Las observaciones clínicas fueron realizadas para los vacunados y de control en el día -4 y en los días de estudio 10 (antes de la vacunación y hasta 4 horas post vacunación), 1 a 7, 12, 15 a 17, 19 a 23, 25 a 38, y 42. Por los días en los cuales las observaciones clínicas fueron realizadas durante los días -4 a 42, las observaciones clínicas que incluyen la temperatura rectal fueron puntuadas de acuerdo al juicio del veterinario que atiende a cualquier caballo 15 con presentación clínica anormal. Los caballos fueron punteados usando el mismo criterio como en el Ejemplo 8 (Tabla 15). Los exámenes a distancia fueron realizados en esos días como se describió en el Ejemplo 8. En el día 20 y en los días 25 a 38, los caballos fueron observados por ambos exámenes a distancia e individual. (también como como 20 se describió en el Ejemplo 8).

Las temperaturas rectales fueron medidas diariamente comenzando 3 días antes de la exposición, y continuaron 15 hasta 10 días post exposición. El día 0 es el día relativo a la exposición. Los datos de los días 0 hasta 10 fueron incluidos en el análisis. Los métodos y criterios fueron idénticos a esos usados en el Ejemplo 8. En los días 2, 5 y 7, 20 los caballos vacunados tuvieron temperaturas corporales más bajas estadísticamente significantes que los caballos de control no vacunados (Tabla 20).

TABLA 20

25 *Efecto de la exposición en las temperaturas diarias (°C) en caballos vacunados y de control (medias cuadráticas mínimas)*

Días post prueba de inmunidad	Vacunados (n=10)	No vacunados (n=10)	Valor P
0	99,9	99,8	0,9098
1	100,5	100,3	0,4282
2	101,0	102,8	0,0001
3	100,7	100,5	0,7554
4	101,0	101,3	0,4119
5	100,8	102,1	0,0004
6	100,4	100,4	0,9774
7	100,3	101,1	0,0325
8	100,6	100,7	0,8551
9	100,5	100,6	0,8874
10	100,5	100,1	0,2465
Error estandar de la media = 9,249			

45 Los datos de los días de los días 1 hasta 10 post vacunación fueron incluidos en el análisis. Estos puntajes fueron sumados en cada día para cada caballo, y los vacunados y los de control fueron comparados usando la prueba de sumas de rango de Wilcoxon. Todos los métodos estadísticos fueron realizados como se describió en el Ejemplo 9. Además, estos puntajes fueron sumados a través de todos los días para cada caballo, y comparados de la misma manera. Los rangos medios son mostrados en la Tabla 21.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

TABLA 21

*Efecto de la exposición sobre los signos clínicos en caballos vacunados y de control (rango medio)*

Días post exposición	Vacunados (n=10)	No vacunados (n=10)	Valor P*
1	8,85	12,15	0,1741
2	8,80	12,20	0,1932
3	8,90	12,10	0,2027
4	7,60	13,40	0,0225
5	6,90	14,10	0,0053
6	7,00	14,00	0,0059
7	6,90	14,10	0,0053
8	7,60	13,40	0,0251
9	6,90	14,10	0,0048
10	6,10	14,90	0,0006
Total sobre 19 días	5,70	15,30	0,0003
* 2 pruebas de muestra por Wilcoxon			

En el día 4 post exposición, el rango medio de los puntajes en los caballos vacunados fue más bajo ( $P<0,05$ ) que en los caballos de control no vacunados, y este efecto continuó a través del resto del estudio ( $P<0,05$ ). El rango acumulativo sobre el período de prueba completo fue también más bajo en los caballos vacunados que en los de control no vacunados ( $P<0,05$ ).

Las torundas nasofaríngeas fueron recolectadas en los días 1 y 8 post exposición, como se describió en el Ejemplo 3. Las muestras nasales fueron analizadas para la presencia de virus por inoculación celular con detección de virus por efecto citopatogénico (CPE) o por inoculación de huevo con detacción de virus por hemaglutinación (HA). Los ensayos de célula de cultivo fueron realizados como generalmente está descrito por Youngner *et al.*, 1994, *J. Clin. Microbiol.* 32, 750-754. Las muestras nasales diluidas en serie fueron añadidas a pozos que contienen monoestratos de células Madin Darby Canine Kidney (MDCK). Después de la incubación, los pozos fueron examinados para la presencia y el grado del efecto citopatogénico. La cantidad de virus en unidades TCID<sub>50</sub> fue calculada por la técnica de Reed-Muench. El ensayo de infectividad del huevo fue realizado como se describió en el Ejemplo 1. El porcentaje de caballos que derraman virus de exposición para cada ensayo en cada grupo es mostrado en las Tablas 22 y 23. El porcentaje de caballos que derraman virus de exposición en el grupo vacunado fue más bajo ( $P<0,05$ ) en los días 2 hasta 7 post vacunación por otro método. Ningunas diferencias fueron vistas en los días 1 u 8 post exposición. El número de días que el virus de exposición fue derramado fue también más bajo ( $P<0,05$ ) en el grupo vacunado comparado al de control no vacunado; ver Tablas 22 y 23.

TABLA 22

*Porcentaje de caballos que derraman virus a continuación del ensayo de exposición en cultivo de células*

Días post exposición	Vacunados (n=10)	No vacunados (n=10)
1	0	0
2	0	70*
3	0	70*
4	20	100*
5	10	100*
6	20	100*
7	0	80*
8	0	30
No. de días promedio de derramamiento	0,5	5,5*
*Dentro de un punto de tiempo, vacunados diferente de no vacunados, $P<0,05$ por la prueba exacta (datos de porcentaje de Fisher o 2 pruebas de muestra (días de derramamiento) de Wilcoxon		

# ES 2 286 892 T3

TABLA 23

*Porcentaje de caballos con derramamiento de virus a continuación del ensayo de infectividad de la exposición en huevos*

5

Días post exposición	Vacunados (n=10)	No vacunados (n=10)
1	0	0
2	2	70*
3	10	70*
4	0	90*
5	10	70*
6	20	90*
7	0	50*
8	0	0
No. promedio de días de derramamiento	0,4	4,4*

\*Dentro de un punto de tiempo, vacunados diferente de no vacunados, P<0,05 por la prueba exacta (datos de porcentaje) de Fisher o 2 pruebas de muestra (días de derramamiento) de Wilcoxon

25

La extensión (severidad y duración) de los signos clínicos de influenza entre los vacunados fue sustancialmente reducida en relación a los de control. Los puntajes de los signos clínicos pertinentes a la influenza y las mediciones de temperatura objetiva ambos demostraron una reducción significante estadísticamente en el grupo vacunado cuando se compararon a esos del grupo de control; lo que indica que la vacuna confiere protección significante de la enfermedad por la cepa heteróloga.

30

35 La habilidad de los caballos para derramar virus de influenza post exposición fue también significativamente reducida en los vacunados como opuestos a los de control en ambos la incidencia de caballos positivos para el derramamiento en ciertos días post exposición y el número medio de días de derramamiento por caballo. El derramamiento disminuído por los vacunados es importante en que debe servir para reducir el potencial para la exposición de animales susceptibles al virus de tipo silvestre en una epidemia de influenza.

40

Sobre todo, los resultados de este estudio muestran que la vacuna confiere protección contra una exposición heteróloga por un miembro del linaje Euroasiático de cepas de virus de influenza equina.

Ejemplo 10

45

Este Ejemplo revela un estudio animal para evaluar la habilidad de una composición terapéutica que comprende el virus de influenza equina adaptado en frío EIV-P821 para ayudar en la prevención de la enfermedad a continuación a la exposición a una cepa heteróloga del virus de influenza equina.

50

La cepa heteróloga probada fue A/equino/2/Kentucky/98 [H3N8] (obtenida de Tom Chambers, Universidad de Kentucky). Ocho ponis de edades de 5 a 7 meses fueron probados para la eficacia del estudio. Estos caballos fueron asignados a dos grupos, un grupo de 4 a ser vacunados y otro grupo de 4 para servir como no vacunados de control. Los ponis fueron vacunados como se describió en el Ejemplo 8, en el día 0.

55

Las observaciones clínicas fueron realizadas para los vacunados en el día de estudio 0 (antes de la vacunación y 4 horas post vacunación), así como en los días 1 a 8, 23, 30 a 50, y 57 post vacunación. Los de control fueron observados clínicamente en los días 29 a 50 y 57. Las observaciones fueron realizadas y puntuadas como se describió en el Ejemplo 8.

60

El material de exposición, o sea, la cepa de influenza equina Kentucky/98, fue preparada pasando el virus aislado dos veces en huevos. La inoculación de cada caballo fue preparada por descongelación de 0,5 ml del virus, entonces diluyéndolo en 4,5 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato. La inoculación fue administrada por nebulización usando una máscara para cada caballo individual en el día 36 post vacunación.

65

Los puntajes de las observaciones clínicas fueron sumados en cada día para cada caballo, y los caballos fueron clasificados de acuerdo al puntaje total acumulativo de los días 1 a 9 post exposición. Estos resultados son mostrados en la Tabla 24.

# ES 2 286 892 T3

TABLA 24

*Observación de signos clínicos: puntajes totales, clasificados por puntaje*

Grupo	Identidad del cabestro	Puntaje total* Días 1 a 9 post exposición
1- Vacunado	20	0
1- Vacunado	52	0
1- Vacunado	55	1
1- Vacunado	15	2
2- Control	61	21
2- Control	20	25
2- Control	7	26
2- Control	13	26

\* Los puntajes totales representan la suma de los puntajes diarios (en la que los puntajes diarios igualan la suma de los puntajes de tos, descarga nasal, respiración, y depresión), son clasificados desde los puntajes menor (menos severo) y mayor (más severo)

Los resultados de la Tabla 24 muestran que los puntajes para los vacunados fueron entre 0 y 2, los cuales fueron significativamente más bajos que el puntaje para los de control, los cuales fueron entre 21 y 26.

Las temperaturas rectales fueron medidas diariamente comenzando 6 días antes de la exposición, y continuando hasta 9 días post exposición. El día 0 es el día relativo a la exposición. Los datos de los días 0 hasta 9 fueron incluidos en el análisis. Los resultados son mostrados en la Tabla 25.

TABLA 25

*Efecto de la exposición sobre las temperaturas medias (°C) en caballos vacunados y de control*

Días post exposición	Control	Vacunación	Diferencia
0	99,7	99,5	0,2
1	100,0	99,6	0,4
2	103,9	100,2	3,7
3	99,8	99,2	0,6
4	99,6	99,1	0,5
5	99,8	99,3	0,5
6	99,6	99,3	0,3
7	99,3	99,0	0,3
8	99,7	99,6	0,1
9	99,5	99,1	0,4

Las temperaturas de los caballos de control fueron más altas que las temperaturas de los caballos vacunados en todos los días. La temperatura en los caballos de control fue significativamente más alta en el día 2.

Las torundas nasofaríngeas fueron recolectadas en los días 1 y 8, post exposición, como se describió en el Ejemplo 3. Estas muestras fueron probadas para derramamiento de virus por un ensayo de infectividad de huevo como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados del ensayo son mostrados en la Tabla 26.

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

TABLA 26

*Derramamiento de virus post exposición detectado por infectación de huevos*

Día de estudio		35	37	38	39	40	41	42	43	44	
Días post exposición		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	
Grupo	Identidad No.	Detección de virus*									No. días positivos por caballo
Vacunados	15	0	2	0	3	3	0	2	1	0	5
	50	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4
	52	0	0	3	3	2	2	0	0	0	4
	55	0	2	3	1	3	0	0	0	0	4
No. de caballos positivos por día		0	2	2	3	3	2	1	1	0	
Control	07	0	3	3	3	3	3	3	1	0	7
	13	0	3	3	3	3	3	3	1	0	7
	20	0	2	3	3	3	3	3	1	0	7
	61	0	3	3	3	3	3	3	2	0	7
No. de caballos positivos por día		0	4	4	4	4	4	4	4	0	

\*Los valores se refieren al número de huevos probados positivos de 3 huevos probados por muestra. Para el análisis estadístico, una muestra fue considerada positiva al virus si al menos 1 huevo fue positivo por muestra.

25 Los resultados de la Tabla 26 muestran que el número de caballos positivos por día fue más alto para los de control que para los vacunados. Adicionalmente, los caballos de control fueron positivos para más días que los vacunados.

30 Los puntajes de los signos clínicos relevantes a la influenza y las mediciones de temperatura objetiva ambos demostraron diferencias significantes en el grupo de vacunados cuando se comparó al grupo de control, esto muestra que la vacuna confiere protección significante para la enfermedad causada por la cepa heteróloga Kentucky/98.

35 La habilidad de los caballos para derramar virus de influenza post exposición fue también significantemente reducida en los vacunados contra los de control en el número medio de días de derramamiento por caballo. El derramamiento disminuido por los vacunados es importante en que debe servir para disminuir el potencial a la exposición de los animales susceptibles al virus de tipo silvestre en una epidemia de influenza.

40 Sobre todo, los resultados de este estudio muestran que la vacuna seguramente confirió protección a la exposición heteróloga para un aislamiento reciente y clínicamente relevante. Cuando los resultados de este estudio son vistos a la luz de la protección previamente demostrada contra la exposición con la cepa Euroasiática (Ejemplo 9), hay clara evidencia para apoyar la aserción de que esta vacuna viva modificada puede conferir protección contra la heteróloga así como a la infección de influenza equina homóloga.

## Ejemplo 11

45 Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de moléculas de ácido nucleico proteínico de la influenza equina M (matriz) por los virus de influenza equina adaptados en frío y de tipo silvestre.

A. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína del virus de influenza equina adaptado en frío de tipo silvestre M, fueron producidos como sigue. Un producto PCR que contiene un gen M equino fue producido por amplificación PCR del ADN del virus de influenza equina, y los cebadores w584 y w585, designados SEQ ID Nº: 26, y SEQ ID Nº: 27, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico de 1023 nucleótidos, denominada  $nei_{wt}M_{1023}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia de ácido nucleico designada SEQ ID Nº: 1 fue producida por amplificación ulterior usando el producto PCR arriba descrito como una plantilla y clonada en un vector para clonar pCR 2.1®TA, disponible de Invitrogen, Carlsbad, CA, usando los procedimientos convencionales recomendados por el fabricante. Los cebadores usados fueron el cebador T7, designado por la SEQ ID Nº: 29 y el cebador REV, designado por la SEQ ID Nº: 28. El plásmido de AND fue purificado usando un método de mini preparación disponible de Qiagen, Valencia, CA. Los productos PCR fueron preparados por secuenciación usando un equipo PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, un equipo PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, o un equipo PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, todos disponibles de PE Applied Biosystems, Foster City, CA, siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones específicas PCR usadas con el equipo fueron una rampa rápida a 95°C, mantenida por 10 segundos seguida por una rampa rápida a 50°C con 5 segundos mantenidos entonces una rampa rápida a 60°C con 4 minutos mantenidos, repitiendo por 25 ciclos. Diferentes conjuntos de cebadores fueron usados en diferentes reacciones: Los T7 y REV fueron usados en una reacción; los w584 y w585 fueron usados en una segunda reacción; y efM-a1, designado SEQ ID Nº: 31 y efM-s1, designado SEQ ID Nº: 30 fueron usados en una tercera reacción. Los productos PCR fueron purificados por precipitación de cloruro de etanol/magnesio. La secuenciación automatizada de las muestras de AND fue realizada usando un ABI PRISM™ Modelo 377 con un Secuenciador de ADN con actualización XL, disponible de PE Applied Biosystems.

## ES 2 286 892 T3

La traducción de la SEQ ID N°: 1 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{wt}M_{1023}$  codifica una proteína M de influenza equina de longitud total de alrededor de 252 aminoácidos, referidos aquí como  $Pei_{wt}M_{252}$ , que tiene una secuencia de amino ácido SEQ ID N°: 2, asumiendo un marco de lectura abierto en el cual el codón de iniciación se extiende desde el nucleótido 25 hasta el nucleótido 28 de la SEQ ID N°: 1 y el codón de terminación se extiende desde el nucleótido 781 hasta el nucleótido 783 de la SEQ ID N°: 1. La región codificante  $Pei_{wt}M_{252}$ , designada  $nei_{wt}M_{756}$ , y que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 25 a 780 de la SEQ ID N°: 1, es representada por la SEQ ID N°: 3.

La SEQ ID N°: 1 y la SEQ ID N°: 3 representan la secuencia de consenso obtenida de dos moléculas de ácido nucleico de tipo silvestre, las cuales difieren en un nucleótido. El nucleótido 663 de  $nei_{wt}M_{1023}$ , o sea, el nucleótido 649 de  $nei_{wt}M_{756}$ , fue adenina, mientras el nucleótido 663 de  $nei_{wt}M_{1023}$ , o sea, el nucleótido 649 de  $nei_{wt}M_{756}$ , fue guanina. La traducción de estas secuencias no resulta en un cambio de aminoácido al aminoácido correspondiente; ambas traducen a valina al residuo 221 en  $Pei_{wt}M_{252}$ .

B. Una molécula de ácido nucleico de 1023 nucleótidos que codifica un virus de influenza equina adaptado en frío M, denominado  $nei_{cal}M_{1023}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia designada SEQ ID N°: 4 fue producido por amplificaciones PCR ulteriores y clonado en el vector de clonación romo pCR® disponible de Invitrogen, usando las condiciones recomendadas por el fabricante, y los cebadores T7 y REV. La purificación de ADN plásmido y el ciclo de secuenciación fue descrito en el Ejemplo 11, parte A. La traducción de la SEQ ID N°: 4 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{cal}M_{1023}$  codifica una longitud total de proteína M de influenza equina de alrededor de 252 aminoácidos, referida aquí como  $Pei_{cal}M_{252}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 5, asumiendo un marco de lectura abierto en el cual el codón de iniciación se extiende desde el nucleótido 25 hasta el nucleótido 28 de la SEQ ID N°: 4 y el codón de terminación se extiende desde el nucleótido 781 hasta el nucleótido 783 de la SEQ ID N°: 4. La región codificante  $Pei_{cal}M_{252}$ , designada  $nei_{cal}M_{756}$ , y que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 25 a 780 de la SEQ ID N°: 4, es representada por la SEQ ID N°: 6. La amplificación PCR de una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína M de influenza equina adaptada en frío en la misma manera resultó en moléculas  $nei_{ca2}M_{1023}$ , idénticas a  $nei_{cal}M_{1023}$ , y  $nei_{ca2}M_{756}$ , idénticas a  $nei_{cal}M_{756}$ .

C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de  $nei_{wt}M_{1023}$  (SEQ ID N°: 1) y  $nei_{cal}M_{1023}$  (SEQ ID N°: 4) por alineación de ADN revela las siguientes diferencias: un cambio de G a T en la base 67, un cambio de C a T en la base 527, y un cambio de G a C en la base 886. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas  $Pei_{wt}M_{252}$  (SEQ ID N°: 2) y  $Pei_{cal}M_{252}$  (SEQ ID N°: 5) revela las siguientes diferencias: un cambio de V a L en el aminoácido 23 que relaciona al cambio de G a T en la base 67 en las secuencias de ADN; y un cambio de T a I en el aminoácido 187 que relaciona al cambio C a T en la base 527 en las secuencias de ADN.

### Ejemplo 12

Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de moléculas de ácido nucleico proteínico de influenza HA (hemaglutinina) por virus de tipo silvestre de influenza equina o adaptados en frío.

A. Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas HA de virus de influenza equina de tipo silvestre o adaptados en frío fueron producidas como sigue. Un producto PCR que contiene un gen HA equino fue producido por amplificación PCR de ADN de virus de influenza equina y cebadores w578 y w579, designados SEQ ID N°: 32 y SEQ ID N°: 33, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico de 1762 nucleótidos que codifica una proteína HA de tipo silvestre, denominada  $nei_{wt}HA_{1762}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia de ácido nucleico designada SEQ ID N°: 7 fue producida por amplificación PCR ulterior usando el producto PCR descrito arriba como una plantilla y clonada en un vector de clonación pCR 2.1®TA como se describió en el Ejemplo 11A. El ADN plásmido fue purificado y secuenciado como en el Ejemplo 11A, excepto que los cebadores usados en los equipos de secuenciación fueron T7 o REV en un caso, o HA-1, designados SEQ ID N°: 34, y HA-2, designado SEQ ID N°: 35, en un segundo caso.

La traducción de la SEQ ID N°: 7 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{wt}HA_{1762}$  codifica una proteína HA de influenza equina de longitud total de alrededor de 565 aminoácidos, referida aquí como  $Pei_{wt}HA_{565}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 8, asumiendo un marco de lectura abierto en el cual el codón de iniciación se extiende desde el nucleótido 30 hasta el nucleótido 33 de la SEQ ID N°: 7 y el codón de terminación se extiende desde el nucleótido 1725 hasta el nucleótido 1727 de la SEQ ID N°: 7. La región codificante  $Pei_{wt}HA_{565}$ , designada  $nei_{wt}HA_{1695}$ , y que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 30 a 1724 de la SEQ ID N°: 9 es representada por la SEQ ID N°: 9.

B. Una molécula de ácido nucleico de 1762 nucleótidos que codifica la proteína HA de un virus de influenza equina adaptado en frío, denominado  $nei_{cal}HA_{1762}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia designada SEQ ID N°: 10 fue producida como se describió en el Ejemplo 11B. La purificación del ADN plásmido y el ciclo de secuenciación fueron realizados como se describió en el Ejemplo 12, parte A. La traducción de la SEQ ID N°: 10 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{cal}HA_{1762}$  codifica una proteína HA de influenza equina de longitud total de alrededor de 565 aminoácidos, referida aquí como  $Pei_{cal}HA_{565}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 11, asumiendo un marco de lectura abierto en el cual el codón de iniciación se extiende desde el nucleótido 30 hasta el nucleótido 33 de la SEQ ID N°: 10 y el codón de terminación se extiende desde el nucleótido 1725 hasta el nucleótido 1727 de la SEQ ID N°: 10. La región codificante  $Pei_{wt}HA_{565}$ , designada  $nei_{wt}HA_{1695}$ , y que tiene una cadena codificante

## ES 2 286 892 T3

que comprende los nucleótidos 30 a 1724 de la SEQ ID N°: 10 es representada por la SEQ ID N°: 12. La amplificación de una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína HA de influenza equina adaptada en frío en la misma manera resultó en moléculas  $nei_{ca2}HA_{1762}$ , idénticas a  $nei_{cal}HA_{1762}$ , y  $nei_{ca2}HA_{1695}$ , idénticas a  $nei_{cal}HA_{1695}$ .

- 5 C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de  $nei_{wt}HA_{1762}$  (SEQ ID N°: 7) y  $nei_{cal}HA_{1762}$  (SEQ ID N°: 10) por alineación de ADN revela las siguientes diferencias: un cambio de C a T en la base 55, un cambio de G a A en la base 499, un cambio de G a A en la base 671, un cambio de C a T en la base 738, un cambio de T a C en la base 805, un cambio de G a A en la base 1289, y un cambio de A a G en la base 1368. La comparación de las secuencias de aminoácidos de proteínas  $Pei_{wt}HA_{565}$  (SEQ ID N°: 8) y  $Pei_{cal}HA_{565}$  (SEQ ID N°: 11) revela las siguientes diferencias:

10 un cambio de P a L en el aminoácido 18 que se relaciona al cambio de C a L en la base 55 en las secuencias de ADN; un cambio de G a E en el aminoácido 166 que se relaciona con el cambio de G a A en la base 499 en las secuencias de ADN; un cambio de R a W en el aminoácido 246 que se relaciona con el cambio de C a T en la base 15 738 en las secuencias de ADN; un cambio de M a T en el aminoácido 268 que se relaciona con el cambio de T a C en la base 805 en las secuencias de ADN; un cambio de K a E en el aminoácido 456 que se relaciona con el cambio de A a G en la base 1368 en las secuencias de ADN. No hay cambio en la serina (S) en el residuo 223 que se relaciona con el cambio de G a A en la base 671 en las secuencias de ADN.

### 20 Ejemplo 13

Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de moléculas de ácido nucleico (ARN-ARN polimerasa dirigida) de la proteína de influenza equina PB2 que corresponde a la porción terminal N de la proteína, por virus de tipo silvestre de influenza equina o adaptados en frío.

- 25 A. Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas PB2-N de virus de influenza equina de tipo silvestre o adaptados en frío fueron producidas como sigue. Un producto PCR que contiene una porción terminal N del gen equino PB2 fue producido por amplificación PCR del ADN del virus de influenza equina, y los cebadores w570 y w571, designados SEQ ID N°: 36 y SEQ ID N°: 37, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico de 1241 nucleótidos 30 que codifican una proteína PB2-N de tipo silvestre denominada  $nei_{wt}PB2-N_{1241}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia de ácido nucleico designada SEQ ID N°: 13 fue producida por amplificación PCR ulterior usando el producto PCR descrito arriba como una plantilla y clonado como se describió en el Ejemplo 11B. El ADN plásmido fue purificado y secuenciado como en el Ejemplo 11B, excepto que solamente los cebadores T7 y REV fueron usados en los equipos de secuenciación.

35 La traducción de la SEQ ID N°: 13 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{wt}PB2-N_{1241}$  codifica una porción terminal N de proteína PB2 de influenza de alrededor de 404 aminoácidos, referida aquí como  $P_{wt}PB2-N_{404}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 14, que asume un marco de lectura abierto en el cual el codón de iniciación se extiende desde el nucleótido 28 hasta el nucleótido 30 de la SEQ ID N°: 13, y el codón de terminación se extiende 40 desde el nucleótido 1237 hasta el nucleótido 1239. La región codificante  $P_{wt}PB2-N_{404}$ , designada  $nei_{wt}PB2-N_{1214}$ , y que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 28 a 1239 de la SEQ ID N°: 13 es representada por la SEQ ID N°: 15.

45 B. Una molécula de ácido nucleico de 1239 nucleótidos que codifica una porción terminal N de la proteína PB2-N de un virus de influenza equina PB2 adaptado en frío denominado  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia designada SEQ ID N°: 16 fue producido, y secuenciado como se describió en el Ejemplo 12, parte A.

50 La traducción de la SEQ ID N°: 16 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$  codifica una porción terminal N de la proteína PB-2 de influenza equina de alrededor de 404 aminoácidos, referida aquí como  $P_{cal}PB2-N_{404}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 17, asumiendo un marco de lectura abierto en el cual el codón de iniciación se extiende desde el nucleótido 28 hasta el nucleótido 30 de la SEQ ID N°: 16, y el codón de terminación se extiende desde el nucleótido 1237 hasta el nucleótido 1239.

55 La región codificante  $P_{cal}PB2-N_{404}$ , designada  $nei_{cal}PB2-N_{1214}$ , y que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 28 a 1239 de la SEQ ID N°: 16, es representada por la SEQ ID N°: 18.

60 La amplificación PCR de una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína PB2-N de influenza equina adaptada en frío en la misma manera resultó en moléculas  $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$ , idénticas a  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$ , y  $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$ , idénticas a  $nei_{cal}PB2-N_{1214}$ .

65 C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de  $nei_{wt}PB2-N_{1241}$  (SEQ ID N°: 13) y  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$  (SEQ ID N°: 16) por alineación de ADN revela la siguiente diferencia: un cambio de T a C en la base 370. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas  $P_{wt}PB2-N_{404}$  (SEQ ID N°: 14) y  $P_{cal}PB2-N_{404}$  (SEQ ID N°: 17) revela la siguiente diferencia: un cambio de Y a H en el aminoácido 124 que se relaciona al cambio de T a C en la base 370 en la secuencia de ADN.

# ES 2 286 892 T3

## Ejemplo 14

Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de moléculas de ácido nucleico (ARN-ARN polimerasa dirigida) de la proteína de influenza equina PB2 que corresponde a la porción terminal C de la proteína, por virus de tipo silvestre de influenza equina o adaptados en frío.

A. Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas PB2-C de virus de influenza equina de tipo silvestre o adaptado en frío fueron producidas como sigue. Un producto PCR que contiene la porción terminal C de un gen PB2 equino fue producido por amplificación PCR usando ADN del virus de influenza equina y cebadores w572 y w573, designados SEQ ID N°: 38 y SEQ ID N°: 39, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico de 1233 nucleótidos que codifica una proteína PB2-C de tipo silvestre, denominada  $nei_{wt}PB2-C_{1233}$ , con una cadena codificante que tiene una secuencia de ácido nucleico designada SEQ ID N°: 19 fue producida por amplificación PCR ulterior usando el producto PCR descrito arriba como una plantilla y clonado como se describió en el Ejemplo 11B. El ADN plásmido fue purificado y secuenciado como en el Ejemplo 11 A, excepto que cebadores diferentes fueron usados en los equipos de secuenciación. El T7 y REV fueron usados en una instancia; el efPB2-a1, designado SEQ ID N°: 40 y el efPB2-s1, designado SEQ ID N°: 41 fueron usados en otra instancia, y el efPB2-a2, designado SEQ ID N°: 42 y el efPB2-s2, designado SEQ ID N°: 43 fueron usados en otra instancia.

La traducción de la SEQ ID N°: 19 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{wt}PB2-C_{1233}$  codifica la porción terminal C de la proteína PB2 de influenza de alrededor de 398 aminoácidos, referida aquí como  $P_{wt}PB2-C_{398}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 20, asumiendo un marco de lectura abierto que tiene un primer codón que se extiende desde el nucleótido 3 hasta el nucleótido 5 y un codón de terminación el cual se extiende desde el nucleótido 1197 hasta el nucleótido 1199 de la SEQ ID N°: 19. Puesto que la SEQ ID N°: 19 es solamente una secuencia de gen parcial, no contiene un codón de iniciación. La región codificante  $P_{wt}PB2-C_{398}$ , designada  $nei_{wt}PB2-C_{1194}$ , y que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 3 a 1196 de la SEQ ID N°: 19 es representada por SEQ ID N°: 21.

La amplificación PCR de una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína PB2-N de influenza equina de tipo silvestre en la misma manera resultó en una molécula de 1232 nucleótidos denominados  $nei_{wt}PB2-N_{1232}$ , con una cadena codificante con una secuencia designada SEQ ID N°: 22. La  $nei_{wt}PB2-N_{1232}$  es idéntica a  $nei_{wt}PB2-C_{1233}$ , excepto que  $nei_{wt}PB2-N_{1232}$  carece de un nucleótido en el terminal 5'. La traducción de la SEQ ID N°: 22 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{wt}PB2-C_{1233}$  también codifica la  $P_{wt}PB2-C_{398}$  (SEQ ID N°: 20), asumiendo una marco de lectura abierto que tiene un primer codón el cual se extiende desde el nucleótido 2 hasta el nucleótido 4 y un codón de terminación que se extiende desde el nucleótido 1196 hasta el nucleótido 1198 de la SEQ ID N°: 22. Puesto que la SEQ ID N°: 22 es solamente una secuencia de gen parcial, no contiene un codón de iniciación. La molécula de ácido nucleico que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 2 a 1195 de la SEQ ID N°: 22, denominada  $nei_{wt}PB2-C_{1194}$ , es idéntica a la SEQ ID N°: 21.

B. Una molécula de ácido nucleico de 1232 nucleótidos que codifica una porción terminal C de proteína PB2 de virus de influenza equina adaptado en frío denominado  $nei_{cal}PB2-C_{1232}$ , y que tiene una cadena codificante que tiene una secuencia designada SEQ ID N°: 23 fue producida como se describió en el Ejemplo 14, parte A, excepto que el vector de clonación pCR®-romo fue usado.

La traducción de la SEQ ID N°: 23 indica que la molécula de ácido nucleico  $nei_{cal}PB2-C_{1232}$  codifica una porción terminal C de la proteína PB-2 de influenza equina de alrededor de 398 aminoácidos, referida aquí como  $P_{cal}PB2-C_{398}$ , que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 24, asumiendo un marco de lectura abierto que tiene un primer codón el cual se extiende desde el nucleótido 2 hasta el nucleótido 4 y un codón de terminación que se extiende desde el nucleótido 1196 hasta el nucleótido 1198 de la SEQ ID N°: 23. Puesto que la SEQ ID N°: 23 es solamente una secuencia de gen parcial, no contiene un codón de iniciación. La región que codifica  $P_{cal}PB2-C_{398}$ , designado  $nei_{cal}PB2-C_{1194}$ , que tiene una cadena codificante que comprende los nucleótidos 2 a 1195 de la SEQ ID N°: 23, es representada por la SEQ ID N°: 25.

La amplificación PCR de una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína PB2-C de influenza equina adaptada en frío en la misma manera resultó en moléculas  $nei_{ca2}PB2-C_{1231}$ , que contienen un nucleótido menos en el terminal 3' que la  $nei_{cal}PB2-N_{1241}$ ; y la  $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$ , idéntica a la  $nei_{cal}PB2-N_{1214}$ .

C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de  $nei_{wt}PB2-C_{1233}$  (SEQ ID N°: 19) y  $nei_{cal}PB2-C_{1232}$  (SEQ ID N°: 23) por alineación de ADN revela las siguientes diferencias: un cambio de la base A a C en la base 153 de la SEQ ID N°: 19, y un cambio de la base G a A en la base 929 de la SEQ ID N°: 19. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas  $P_{wt}PB2-C_{398}$  (SEQ ID N°: 20) y  $P_{cal}PB2-C_{398}$  (SEQ ID N°: 24) revela la siguiente diferencia: un cambio de K a Q en el aminoácido 51 cuando se relaciona al cambio de base A a C en la base 153 en las secuencias de ADN. No hay cambio de aminoácido resultante del cambio de base de G a A en la base 929.

Mientras varias realizaciones de la presente invención han sido descritas en detalle, es aparente que las modificaciones y adaptaciones de esas realizaciones ocurrirán para aquellos expertos en la técnica. Es para ser expresamente entendido, sin embargo, que tales modificaciones y adaptaciones están dentro del alcance de la presente invención, como se establece en adelante en las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un virus de influenza equina adaptado en frío que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura desde 26°C a 30°C.
- 5
2. Un virus de influenza equina A recatalogado que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C, dicho virus recatalogado que comprende (a) al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina donante generado por adaptación en frío, dicho virus de influenza equina que tiene un fenotipo de identificación seleccionado entre el grupo que consta de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación en el que dicho segmento de genoma de virus de influenza equina confiere al menos uno de dichos fenotipos de identificación a dicho virus recatalogado y (b) al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina A que tiene hemaglutinina de identificación y fenotipos de neuraminidasa.
- 10
3. Una composición terapéutica para proteger un animal contra la enfermedad causada por un virus de influenza A, que comprende un virus seleccionado entre un grupo que consta de: (a) un virus de influenza equina adaptado en frío que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C; y (b) un virus de influenza A recatalogado que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de alrededor de 26°C hasta alrededor de 30°C, dicho virus recatalogado que comprende (1) al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina generado por adaptación en frío, dicho virus de influenza equina que tiene un fenotipo de identificación seleccionado entre un grupo que consta de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación, en el que dicho segmento de genoma de virus de influenza equina confiere al menos uno de dichos fenotipos de identificación a dicho virus recatalogado y (2) al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina A receptor que tiene hemaglutinina de identificación y fenotipos de neuraminidasa.
- 15
4. El uso de una composición terapéutica que comprende un virus seleccionado entre el grupo que consta de: (a) un virus de influenza equina adaptado en frío que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C; y (b) un virus de influenza A recatalogado que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C, dicho virus recatalogado que comprende (1) al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina generado por adaptación en frío, dicho virus de influenza equina que tiene un fenotipo de identificación seleccionado entre un grupo que consta de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación, en el que dicho segmento de genoma de virus de influenza equina confiere al menos uno de dichos fenotipos de identificación a dicho virus recatalogado y (2) al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina A receptor que tiene hemaglutinina de identificación y fenotipos de neuraminidasa, en la fabricación de un medicamento para proteger un animal contra la enfermedad causada por un virus de influenza A.
- 20
- 35
5. Un método para producir virus de influenza equina adaptado en frío que se replica en huevos embrionados de gallina a una temperatura en el rango de alrededor de 26°C hasta 30°C que comprende los pasos de:
- 40
- (a) el pasaje de un virus de influenza equina de tipo silvestre; y
- (b) la selección de los virus que crecen a una temperatura reducida.
- 45
6. Un método para producir un virus de influenza equina A recatalogado que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C, dicho virus recatalogado que tiene al menos un segmento de genoma de un virus de influenza equina generado por adaptación en frío, dicho virus de influenza equina que tiene un fenotipo de identificación seleccionado entre un grupo que consta de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación, que comprende los pasos de:
- 50
- a) mezclar los segmentos de genoma de un virus de influenza equina donante con los segmentos de genoma de un virus de influenza equina A; y
- b) seleccionar un virus recatalogado que comprende (a) al menos un fenotipo de dicho virus de influenza equina donante, en el que el dicho fenotipo es seleccionado entre un grupo que consta de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación; y (b) los fenotipos de hamaglutinina y neuraminidasa de dicho virus de influenza equina A receptor.
- 55
7. Un método para propagar un virus de influenza equina que se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C que comprende un método seleccionado entre el grupo que consta de la propagación de dicho virus en huevos y la propagación de dicho virus en células de cultivo de tejido.
- 60
8. Una molécula de ácido nucleico de influenza equina aislada, en la que dicha molécula de ácido nucleico de influenza equina es seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 23, y SEQ ID N°: 25, y una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico la cual es totalmente complementaria a cualquiera de las secuencias de ácido nucleico.
- 65

## ES 2 286 892 T3

9. Una molécula de ácido nucleico de influenza equina aislada, en la que dicha molécula de ácido nucleico de influenza equina codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 17, y SEQ ID N°: 24.
- 5      10. Una proteína de influenza equina aislada, en la que dicha proteína de influenza equina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de las SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 17, y SEQ ID N°: 24.
- 10     11. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío referido a las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho virus de influenza A recatalogado referido a las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6, está atenuado.
- 15     12. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío A referido a las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho virus de influenza A recatalogado referido a las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6, es sensible a la temperatura.
- 20     13. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío A referido a las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho virus de influenza A recatalogado referido a las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6, se replica en huevos embrionados de gallina en un rango de temperatura de 26°C a 30°C, pero no forma placas en células de cultivo de tejido a una temperatura de 39°C.
- 25     14. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que un fenotipo que comprende una temperatura no permisiva de 39°C es conferido a dicho virus de influenza equina adaptado en frío referido a las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho virus de influenza equina recatalogado A referido en las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6, por al menos dos mutaciones en el genoma de dicho virus, que comprende una primera mutación y una segunda mutación.
- 30     15. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de la reivindicación 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío comprende un fenotipo de interferencia dominante.
- 35     16. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío referido en las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho segmento de genoma referido en las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6 es derivado de la cepa A/equino/Kentucky/1/91 (H3N8).
- 40     17. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío referido en las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho segmento de genoma referido en las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6 comprende el fenotipo de identificación de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación de un virus seleccionado entre el grupo que consta de: EIV-P821, identificado por N° de acceso ATCC VR-2625; EIV-P824, identificado por N° de acceso ATCC VR-2624; y MSV+5, identificado por N° de acceso ATCC VR-2627.
- 45     18. El virus de influenza equina adaptado en frío de la reivindicación 1, el virus de influenza recatalogado A de la reivindicación 2, la composición terapéutica de la reivindicación 3, el uso de la reivindicación 4, o el método de las reivindicaciones 5, 6 o 7, en las que dicho virus de influenza equina adaptado en frío referido en las reivindicaciones 1, 3, 4, 5, 7 o dicho segmento de genoma referido en las reivindicaciones 2, 3, 4, o 6 es seleccionado entre el grupo que consta de: EIV-P821, identificado por N° de acceso ATCC VR-2625; EIV-P824, identificado por N° de acceso ATCC VR-2624; MSV+5, identificado por N° de acceso ATCC VR-2627; y la progenie la cual retiene los fenotipos de identificación de adaptación en frío, sensibilidad a la temperatura, interferencia dominante, y atenuación de cualquiera de dichos virus que tienen cualquiera de dichos números de accesión.
- 50     19. El método de acuerdo a la reivindicación 6, en la que dicho virus de influenza A receptor comprende los fenotipos de hemaglutinina y neuraminidasa diferentes a aquellos de dicho virus de influenza equina donante, y en el que dicho virus recatalogado comprende los fenotipos de hemaglutinina y neuraminidasa de dicho virus receptor.
- 55     20. La composición terapéutica de acuerdo a la reivindicación 3 o el uso de acuerdo a la reivindicación 4, en las que dicha composición terapéutica o medicamento es para la administración a dicho animal por una ruta que permitirá a los virus entrar en las células mucosas del tracto respiratorio superior.

## ES 2 286 892 T3

21. La composición terapéutica de acuerdo a la reivindicación 3 o el uso de acuerdo a la reivindicación 4, en las que dicha composición terapéutica comprende un virus de influenza equina adaptado en frío, en el que dicha enfermedad es causada por el virus de influenza equina, y en el que dicha composición terapéutica es para administrar profilácticamente a un équido, para despertar una respuesta inmune contra el virus de influenza equina en dicho équido.

- 5        22. La molécula de ácido nucleico de acuerdo a la reivindicación 8, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica una proteína seleccionada de un grupo que consta de: una proteína M, dicha proteína M que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 5; una proteína HA, dicha proteína HA que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 11; una proteína PB2-N, dicha proteína PB2-N que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 17; y una proteína PB2-C, dicha proteína PB2-C que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID N°: 24.
- 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> LA UNIVERSIDAD DE PITTSBURGH, DEL COMMONWEALTH

5 <120> DE INFLUENZA EQUINA ADAPTADO EN FRÍO V  
<130> HKZ-033CPPC

10 <140> no asignado aún  
<141> 1999-08-12

<150> 09/133,921

15 <151> 1998-08-13

<160> 43

20 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
<211> 1023

25 <212> DNA  
<213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

30 <221> CDS  
<222> (25)..(780)

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 1

5	gcaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr 1 5	51
10	tac gct ccc tct atc gta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala 10 15 20 25	99
15	cag aga ctt gaa gat gtc ttt gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala 30 35 40	147
20	ctc atg gaa tgg cta aag aca aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys 45 50 55	195
25	ggg att tta gga ttc gta ttc acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly 60 65 70	243
30	ctg cag cgt aga cgc ttt gtccaa aat gcc ctt agt gga aac gga gat Leu Gln Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp 75 80 85	291
35	cca aac aac atg gac aga gca gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg 90 95 100 105	339
40	gaa ata aca ttc cat ggg gca aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr 110 115 120	387
45	ggt gca cta gcc agc tgc atg gga ctc ata tac aac aga atg gga act Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 125 130 135	435
50	gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln 140 145 150	483
55	atc gct gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca aca acc Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr 155 160 165	531
60		
65		

# ES 2 286 892 T3

	aac cca tta atc aga cat gaa aac aga atg gta tta gcc agt acc acg Asn Pro Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr	579	
170	175	180	185
5			
	gct aaa gcc atg gag cag atg gca ggg tcg agt gag cag gca gca gag Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu	627	
	190	195	200
10			
	gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gtr cag gca atg aga Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg	675	
	205	210	215
15			
	acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu	723	
	220	225	230
20			
	ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln	771	
	235	240	245
25			
	cga ttc aag tgatcctctc gttattgcag caagtatcat tggatcttg Arg Phe Lys	820	
	250		
30			
	cacttgatat tgtggattct tgatcgccctt ttcttcaaatt tcatttatcg tcgccttaaaa 880		
	tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaataat 940		
	cggcaggaac agcagaatgc tgtggatgtt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg 1000		
35			
	gagtaaaaaa ctaccttgtt tct	1023	

<210> 2  
 40 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Virus de influenza equina H3N8  
 45 <400> 2

	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro	
	1 5 10 15	
50	Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe	
	20 25 30	
55	Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr	
	35 40 45	
60	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	
65	Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala	
	85 90 95	

# ES 2 286 892 T3

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala  
 100 105 110  
 5 Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met  
 115 120 125  
 10 Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe  
 130 135 140  
 145 Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg  
 150 155 160  
 15 Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu  
 165 170 175  
 20 Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met  
 180 185 190  
 25 Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 30 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 35 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys  
 245 250  
 <210> 3  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 40 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <400> 3  
 atgagtcttc tgaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcgtaccatc aggccccctc 60  
 45 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac ccatcttgag 120  
 gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atccctgtcac ctctgactaa agggattta 180  
 50 ggattcgtat tcacgctcac cgtgcccaagt gagcgaggac tgcagcgttag acgctttgtc 240  
 caaaaatgccc tttaqtqqaaa cqqagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaaatgtcac 300  
 55 aggaagctta aaagagaaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcaat cagctattcc 360  
 actgggtgcac tagccagctg catgggactc atataacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420  
 60 gaagtggcat ttggccttgtt atgcgccaca tgtgaacaga tcgctgattc ccagcatcga 480  
 tctcacaggc agatggtgac aacaaccaac ccattaatca gacatgaaaaa cagaatggta 540  
 ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600  
 65 gaggccatgg aggttgcgtag taaggctagg cagatggtrc aggcaatgag aaccattggg 660

# ES 2 286 892 T3

acccacccta gctccagtgc cggtttggaa gatgatctcc ttgaaaaattt gcaggcctac 720  
 cagaaaacgga tgggagtgca aatgcagegaa ttcaag 756  
 5

<210> 4  
 <211> 1023  
 10 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>  
 15 <221> CDS  
 <222> (25)..(780)

20 <400> 4

gcaaaagcag gttagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr 1                       5	51
tac gtt ctc tct atc tta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala 10                      15                              20                      25	99
cag aga ctt qaa qat qtc ttt gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala 30                      35                              40	147
ctc atg gaa tgg cta aag aca aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys 45                      50                              55	195
ggg att tta gga ttc gta ttc acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly 60                      65                              70	243
ctg cag cgt aga cgc ttt gtc caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat Leu Gln Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp 75                      80                              85	291
cca aac aac atg gac aga gca gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg 90                      95                              100                      105	339
gaa ata aca ttc cat ggg gca aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr 110                      115                              120	387
ggt gca cta gcc agc tgc atg gga ctc ata tac aac aga atg gga act Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 125                      130                              135	435
gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag	483

ES 2 286 892 T3

ES 2 286 892 T3

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

5 Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala  
100 105 110

Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met  
115 120 125

10 Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe  
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg  
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu  
165 170 175

20 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 Lys  
195 200 205

25 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser  
210 215 220

30 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr  
225 230 235 240

35 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys  
245 250

40 <210> 6

<211> 756

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

45

50

55

60

65

ES 2 286 892 T3

<400> 6

atgagtcctc tgaccggaggt cgaaaacgtac gttctctcta tcttaccatc aggccccctc 60  
aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120  
gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggattta 180  
ggattcgat tcacgctcac cgtgcccaagt gagcgaggac tgcagcgttag acgctttgtc 240  
caaaaatgccc tttagtggaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300  
aggaagctt aaagagaaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcaact cagctattcc 360  
actgggtcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatggaaac tgtgacaacc 420  
gaagtggcat ttggcctggat atgegeccaca tgtgaacaga tegetgatcc ctagcatega 480  
tctcacaggc agatggtgac aataaccaac ccattaatca gacataaaaa cagaatggta 540  
tttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600  
gaggccatgg aggttgcttag taaggctagg cagatggtac aggcaatgag aaccattggg 660  
acccacccata getccaytgcc yyytllgaaa yalyalutcc tlyamalut gcaggccctac 720  
caqaaacggta tgggagtgcataatgcagcgtatc 756

30 <210> 7  
<211> 1762  
<212> DNA  
35 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
  
<220>  
<221> CDS  
40 <222> (30)..(1724)

45	agcaaaagca gggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile 1 S	53
50	cca ctg acc cat tgg ytc ttc ayt cca aac cca aac wgt ggc aac aac Pro Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn 10 15 20	101
55	aca gcc aca tta tgt ctg gga cac cat gca gta gca aat gga aca ttg Thr Ala Thr Leu Cyc Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu 25 30 35 40	149
60	gta aaa aca ata act gat gac caa att gag gtg aca aat gct act gaa Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu 45 50 55	197
65	tta gtt cag agc att tca ata ggg aaa ata tgc aac aac tca tat aga Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg 60 65 70	245
75	gtt cta gat gga aga aat tgc aca tta ata gat gca atg cta gga gac Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp 75 80 85	293

# ES 2 286 892 T3

	ccc cac tgt gat gtc ttt cag tat gag aat tgg gac ctc ttc ata gaa	341	
	Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu		
90	95	100	
5	aga agc agc gct ttc agc agt tgc tac cca tat gac atc cct gac tat	389	
	Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr		
105	110	115	
10	gca tcg ctc cgg tcc att gta gca tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca	437	
	Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr		
	125	130	135
15	gca gag gga ttc aca tgg aca ggt gtc act caa aac gga aga agt gga	485	
	Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly		
	140	145	150
20	tcc tgc aaa agg gga tca gcc gat agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg	533	
	Ser Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp		
	155	160	165
25	cta aca gaa tct gga aac tct tac ccc aca ttg aat gtg aca atg cct	581	
	Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro		
	170	175	180
30	aac aat aaa aat ttc gac aaa cta tac atc tgg ggg att cat cac ccg	629	
	Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro		
	185	190	195
	200		
	agc tca aac aaa gag cag aca aaa ttg tac atc caa gaa tcg gga cga	677	
	Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg		
35	205	210	215
	gta aca gtc tca aca aaa aga agt caa caa aca ata atc cct aac atc	725	
	Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile		
40	220	225	230
	gga tct aga ccg cgg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac	773	
	Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr		
45	235	240	245
	tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta atg ata aac agt aat ggc	821	
	Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly		
	250	255	260
50			
	aac tta gtt gca ccg cgg gga tat ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc	869	
	Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser		
55	265	270	275
	280		
	tct gta atg aga tca gat gca ccc ata gac att tgt gtg tct gaa tgt	917	
	Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys		
	285	290	295
60	att acA cca aat gga agc atc ccc aac gac aaa cca ttt caa aat gtg	965	
	Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val		
	300	305	310
65	aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc ccc aag tat atc agg caa aac act	1013	
	Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr		
	315	320	325

## ES 2 286 892 T3

	tta aag ctg gcc act ggg atg agg aat gta cca gaa aag caa atc aga Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg 330 335 340	1061
5	gga atc ttt gga gca ata gcg gga ttc ata gaa aac ggc tgg gaa gga Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly 345 350 355 360	1109
10	atg gtt gat ggg tgg tat qqa ttc cca tat caa aac tcg gaa gga aca Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr 365 370 375	1157
15	gga caa gct gca gat cta aag agc act caa gca gcc atc gac cag atc Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile 380 385 390	1205
20	aat gga aaa tta aac aga gtg att gaa agg acc aat gag aaa ttc cat Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His 395 400 405	1253
25	caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg agg atc cag gac ttg Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu 410 415 420	1301
30	gag aag tat gta gaa gac acc aaa ata gac cta tgg tcc tac aat gca Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala 425 430 435 440	1349
35	gaa ttg ctg gtg gct cta aaa aat caa cat aca att gac tta aca gat Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp 445 450 455	1397
40	gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu 460 465 470	1445
45	aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys 475 480 485	1493
50	gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr 490 495 500	1541
55	ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val 505 510 515 520	1589
60	gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala 525 530 535	1637
65	ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp 540 545 550	1685
	gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagttaact Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile 555 560 565	1734
	gatagttaaa aacacccttg tttctact	1762

# ES 2 286 892 T3

<210> 8  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 5 <213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 8

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

ES 2 286 892 T3

	Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp			
	245	250	255	
5	Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr			
	260	265	270	
10	Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro			
	275	280	285	
15	Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro			
	290	295	300	
20	Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys			
	305	310	315	320
25	Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg			
	325	330	335	
	Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly			
	340	345	350	
30	Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe			
	355	360	365	
35	Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser			
	370	375	380	
	Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile			
	385	390	395	400
40	Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu			
	405	410	415	
	Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys			
	420	425	430	
45	Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn			
	435	440	445	
	Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu			
	450	455	460	
50	Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly			
	465	470	475	480
	Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile			
	485	490	495	
55	60			
65				

ES 2 286 892 T3

Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn  
500 505 510

5 Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp  
515 520 525

10 Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val  
530 535 540

Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg  
545 550 555 560

15 Cys Asn Ile Cys Ile  
565

20 <210> 9

<211> 1695

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

25 <400> 9

30 atgaagacaa ccattatcc gataccactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60

35 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggAACATTG 120

gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaaatg ctactgaatt agttcagaggc 180

40 atttcaatag ggaaaaatatg caacaactca tatagatcc tagatggaa aattgcaca 240

45 ttaatagatg caatgtttagg agacccccac tgtgtatgtct ttcatgtatga gaattggaa 300

50 cttttcatacg aaagaaggcag cgctttcagc agttgttacc catatgacat ccctgactat 360

55 gcatcgctcc ggttcattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420

60 acatggacag gtgtcaactca aaacggaaga agtggatcc tcacaaatggggatc 480

65 agtttcttta gccgactgaa ttggcttaaca gaatctggaa actcttaccc cacattgaat 540

70 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttgcac aaactataca tctggggat tcacaccccg 600

75 agctcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaaagaat cgggacgagt aacagtctca 660

80 acaaaaaaaa gtcaacaaac aataatccc aacatcgat ctagaccgcg ggtcagggt 720

85 caatcaggca ggataagcat atactggacc atgttaaaac ctggagatat cctaattata 780

60

65

ES 2 286 892 T3

aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatattttt aattaaaaac agggaaaagc 840  
 tctgttatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaa 900  
 5 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 cccaagtata tcaggcaaaa cactttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 10 aagcaaatca gaggaatccc tggagcaata gcgggatcca tagaaaaacgg ctgggaagga 1080  
 atggtrgatg ggtggatgg attccgatat caaaaactcg 1140  
 15 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat ttcagaagt agaaggagg 1260  
 20 atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggc ctacaatgca 1320  
 gaattgtgg tggtctaaa aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat 1380  
 25 aaattattcg agaagactag acgccagttt agagaaaaacg cgaaagacat gggaggtgga 1440  
 tggttcaaga tataccacaa atgtataat gcatgcattt gatcaataag aaatggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttcaat caaagggttt 1560  
 30 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggatcc catcgccat atcatgttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttttattt gggtttcaattt atgtgggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 35 tgcaacatcc gcatt 1695

<210> 10  
 40 <211> 1762  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (30)..(1724)  
 50 <400> 10

agcaaaaagca ggggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata 53  
 55 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile  
 1 5  
 ctatctg acc cat tgg gtc tac agt ctt aac cca acc agt ggc aac aac 101  
 60

## ES 2 286 892 T3

	Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn			
	10	15	20	
5	aca gcc aca tta tgt cty gga ctc cat gca gca aat gga aca ttg			149
	Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu			
	25	30	35	40
10	gta aaa aca ata act gat gac caa att gag gtg aca aat gct act gaa			197
	Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu			
	45	50	55	
15	tta gtt cag agc att tca ata ggg aaa ata tgc aac aac tca tat aga			245
	Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg			
	60	65	70	
20	gtt cta gat gga aga aat tgc aca tta ata gat gca atg cta gga gac			293
	Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp			
	75	80	85	
25	ccc cac tgt gat gtc ttt cag tat gag aat tgg gac ctc ttc ata gaa			341
	Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu			
	90	95	100	
30	aga agc agc gct ttc agc agt tgc tac cca tat gac atc cct gac tat			389
	Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr			
	105	110	115	120
35	gca tcc ctc egg tcc att gta gca tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca			437
	Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr			
	125	130	135	
40	gca gag gga ttc aca tgg aca ggt gtc act caa aac gga aga agt gga			485
	Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly			
	140	145	150	
45	tcc tgc aaa agg gaa tca gcc gat agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg			533
	Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp			
	155	160	165	
50	cta aca gaa tct gga aac tct tac ccc aca ttg aat gtg aca atg cct			581
	Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro			
	170	175	180	
55	aac aat aaa aat ttc gac aaa cta tac atc tgg ggg att cat cac ccg			629
	Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro			
	185	190	195	200
60	agc tca aac aaa gag cag aca aaa ttg tac atc caa gaa tca gga cga			677
	Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg			
	205	210	215	
65	gta aca gtc tca aca aaa aga agt caa caa aca ata atc cct aac atc			725
	Va] Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile			
	220	225	230	

## ES 2 286 892 T3

	gga tct aga ccg cgg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr 235	240	245	773
5	tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta atg ata aac agt aat ggc Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly 250	255	260	821
10	aac tta gtt gca ccg cgg gga tat ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser 265	270	275	280
15	tct gta atg aga tca gat gca ccc ata gac att tgt gtg tct gaa tgt Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys 285	290	295	917
20	att aca cca aat gga agc atc ccc aac gac aaa cca ttt caa aat gtg Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val 300	305	310	965
25	aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc ccc aag tat atc agg caa aac act Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr 315	320	325	1013
30	tta aag ctg gcc act ggg atg agg aat gta cca gaa aag caa atc aga Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg 330	335	340	1061
35	gga atc ttt gga gca ata gcg gga ttc ata gaa aac ggc tgg gaa gga Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly 345	350	355	360
40	atg gtt gat ggg tgg tat qga ttc cga tat caa aac tcg gaa gga aca Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr 365	370	375	1157
45	gga caa gct gca gat cta aag agc act caa gca gcc atc gac cag atc Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile 380	385	390	1205
50	aat gga aaa tta aac aga gtg att gaa agg acc aat gag aaa ttc cat Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His 395	400	405	1253
55	caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg aga atc cag gac ttg Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu 410	415	420	1301
60	gag aag tat gta gaa gac acc aaa ata gac cta tgg tcc tac aat gca Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala 425	430	435	440
65	gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat caa cat aca att gac tta aca gat Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp 445	450	455	1397

# ES 2 286 892 T3

5	gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu 460 465 470	1445
10	aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgc aag ata tac cac aaa tgt Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys 475 480 485	1493
15	gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr 490 495 500	1541
20	ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val 505 510 515 520	1589
25	gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala 525 530 535	1637
30	ata tca tgc ttc tta att tgc gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp 540 545 550	1685
35	gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagtaaaact Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile 555 560 565	1734
40	<b>gatagttaaa aacacccttg tttctact</b>	1762

<210> 11  
 35 <211> 565  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 40 <400> 11

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

## ES 2 286 892 T3

Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly  
 130 135 140  
 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr  
 165 170 175  
 Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys  
 195 200 205  
 Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser  
 210 215 220  
 Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly  
 225 230 235 240  
 25  
 Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp  
 245 250 255  
 Ile Leu Thr Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr  
 260 265 270  
 Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro  
 275 280 285  
 Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro  
 290 295 300  
 Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg  
 325 330 335  
 Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
 340 345 350  
 Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe  
 355 360 365  
 Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser  
 370 375 380  
 Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile  
 385 390 395 400  
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu  
 405 410 415  
 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys  
 420 425 430

# ES 2 286 892 T3

	Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn			
	435	440	445	
5	Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu			
	450	455	460	
10	Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly			
	465	470	475	480
	Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile			
	485	490	495	
15	Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn			
	500	505	510	
20	Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp			
	515	520	525	
	Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val			
	530	535	540	
25	Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg			
	545	550	555	560
30	Cys Asn Ile Cys Ile			
	565			
	<210> 12			
	<211> 1695			
35	<212> DNA			
	<213> Virus de la influenza equina H3N8			
	<400> 12			
40	atgaagacaa ccattattt gatactactg acccattggg tctacagtca aaacccasacc 60			
	agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggAACATTG 120			
45	gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaaatg ctactgaatt agttcagagc 180			
	atttcaatag ggAAAATATG caacaactca tataGAGTTC tagatggaaG aaattgcaca 240			
50	ttaatagatg caatgttagg agaCCCCCA TGtgatgtct ttcatgtGA gaATTGGGAC 300			
	ctcttcatag aaagaAGCAG CGTTTCAGC AGTTGCTACC CATATGACAT CCCTGACTAT 360			
55	gcatcgctcc ggtccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacAGC agAGGGATTC 420			
	acatggacAG gtgtcactca aaacggaaAGA agtggatcct gcaAAAGGGA atcAGCCGAT 480			
	agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actttaccc cacattgaat 540			
60	gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctggggat tcataccccg 600			
	agctcaaaca aagAGCAGAC AAAATTGTAC ATCCAAGAA CAGGACGAGT AACAGTCTCA 660			
65	acaaaaAGAA GTcaacAAAC AATAATCCCT AACATCGGAT CTAGACCGTG GGTCAAGGGGT 720			
	caatcaggca ggataAGCAT atactggacc ATTGTAAAC CTGGAGATAT CCTAACGATA 780			

# ES 2 286 892 T3

aacagtaatg gcaacttagt tgcacccgggg ggatattttt aatcgaaaac agggaaaacg 840  
 5 tctgttatga gatcagatgc accatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900  
 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 10 cccaaagtata tcaggcaaaa cactttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080  
 15 atggttgatg ggtggatgg attccgatata caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca 1140  
 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggaga 1260  
 20 atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgea 1320  
 gaattgctgg tggctctaga aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat 1380  
 25 aaattatcc agaagactag acggcagttt agagaaaacg cggaagacat gggaggttgg 1440  
 tttttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattt gatcaataag aaatggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca tttaaacaacc ggtttcaaat caaagggttt 1560  
 30 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt catcgccat atcatgttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggtt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 tgcaacatcc gcatt 1695

35 <210> 13  
 <211> 1241  
 <212> DNA  
 40 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <220>  
 <221> CDS  
 45 <222> (28)..(1239)  
 <400> 13

50	agcaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54	
	Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp	
	1 5	
55	cta atg tca caa tcc cgc acc cgc gag ata cta aca aaa act act gtg 102	
	Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val	
	10 15 20 25	
60	gac cac atg gcc ata atc aag aaa tac aca tca gga aga caa gag aag 150	
	Asp His Met Ala Ile Ile Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys	
	30 35 40	
65	aac ccc gca ctt agg atg aag tgg atg atg gca atg aaa tac cca att 198	
	Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile	
	45 50 55	
	aca gca gat aag agg ata atg gaa atg att cct gag aga aat gaa cag 246	
	Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln	
	60 65 70	

ES 2 286 892 T3

	ggg caa acc ctt tgg agc aaa acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta	294
	Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val	
5	75 80 85	
	atg gta tca cct ctg gca gtg aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca	342
	Met Val Ser Pro Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr	
	90 95 100 105	
10	acg agc aca att cat tat cca aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aaa	390
	Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys	
	110 115 120	
15	gtt gaa aga tta aaa cac gga acc ttt ggc ccc gtt cat ttt egg aat	438
	Val Glu Arg Leu Lys His Gly Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn	
	125 130 135	
20	caa gtc aag ata aga cgg aga gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac	486
	Gln Val Lys Ile Arg Arg Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp	
	140 145 150	
25	ctc agt gcc aaa gaa gca caa gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca	534
	Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro	
	155 160 165	
30	aat gaa gtg gga gcc aga att cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata	582
	Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile	
	170 175 180 185	
35	acc aaa gag aaa aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg	630
	Thr Lys Glu Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu	
	190 195 200	
40		
45		
50		
55		
60		
65		

# ES 2 286 892 T3

	atg gta gca tac atg cta gaa aga gag ttg gtc cga aaa aca aga ttc Met Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe 205 210 215	678
5	ctc cca gtg gct ggc gga aca agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His 220 225 230	726
10	ctg act cag gga aca tgc tgg gaa caa atg tac acc cca gga gga gaa Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu 235 240 245	774
15	gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cgg aac Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn 250 255 260 265	822
20	ata gtg aga aga gcg aca gta tca gca gat cca cta gca tcc ctg ctg Ile Val Arg Arg Ala Thr Val Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu 270 275 280	870
25	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile 285 290 295	918
30	ctt aag cag aat cca aca gag gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala 300 305 310	966
35	gca atg ggg tta aga att agc tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr 315 320 325	1014
40	ttt aag aga aca agt gga tca tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Ile Arg Glu Glu Glu Met Leu 330 335 340 345	1062
45	acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata aga gtg cat gaa ggc tat gaa Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu 350 355 360	1110
50	gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 365 370 375	1158
55	acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser 380 385 390	1206
60	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe 395 400	1241
65	<210> 14 <211> 404 <212> PRT <213> Virus de la influenza equina H3N8	

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 14

5	Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr 1                   5                   10                   15
10	Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys 20                   25                   30
15	Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys 35                   40                   45
20	Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met 50                   55                   60
25	Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys 65                   70                   75                   80
30	Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val 85                   90                   95
35	Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro 100                105                110
40	Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly 115                120                125
45	Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg 130                135                140
50	Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln 145                150                155                160
55	Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile 165                170                175
60	Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu 180                185                190
65	Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu 195                200                205
	Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr 210                215                220
	Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp 225                230                235                240
	Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp 245                250                255
	Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260                265                270
	Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275                280                285
	Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu 290                295                300

# ES 2 286 892 T3

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

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

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

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

15                          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

20 <210> 15

<211> 1214

<213> Virus de influenza equina H3N8

25 <400> 15

atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60

30 acaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaat acacatcagg aagacaagag 120

aagaaccccg cacttagat gaagtggatg atggcaatga aataaccaat tacagcagat 180

35 aagaggataa tggaaatgtat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240

acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcaccc tggcagtgac atggtgaaat 300

40 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaag tctacaaaac ttatttgaa 360

aaagttgaaa gattaaaca cggAACCTTT ggCCCGTTT attttaggaa tcaagtcaag 420

45 ataagacgga gagttatgtt aaacccttgtt cacgcggacc tcagtgccaa agaagcacaa 480

gatgtatca tggaaatgtt tttccaaat gaagtggag ccagaattct aacatcgaa 540

tcacaactaa caataaccaa agaaaaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600

ttgatggtaq catacatgtt aqaaaqagaq ttggtccqaa aaacaqatt cctcccaatg 660

55 gctggcggaa caagcagtgt atacattgaa gtgttgcatt tgactcagg aacatgctgg 720

gaacaaatgtt acacccagg aggagaagtt agaaacgtt acattgtatca aagtttaatt 780

attgtgtcccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcatc cagatccact agcatccctg 840

ctggaaatgtt gccacagtac acagatttgtt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900

aatccaaacag aggaacaaagc tgtggatata tgcaaagcag caatggggtt aagaatttagc 960

tcatcattca gctttggtgg attcaccttt aagagaacaa gtggatcatc agtcaagaga 1020

gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattggaaaa taagagtgcg tgaaggctat 1080

# ES 2 286 892 T3

gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccatc tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
 ttgattcaat tgatagtaag tggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgt 1200  
 5 gccatggtgt ttcc 1214

<210> 16  
 10 <211> 1241  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (28)..(1239)

20 <400> 16

agaaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54  
 25 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp  
 1 5

cta atg tca caa tcc cgc acc cgc gag ata cta aca aaa act act gtg 102  
 Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val  
 30 10 15 20 25

gac cac atg gcc ata atc aag aaa tac aca tca gga aga caa gag aag 150  
 Asp His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys  
 35 30 35 40

aac ccc gca ctt agg atg aag tgg atg atg gca atg aaa tac cca att 198  
 Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile  
 40 45 50 55

aca gca gat aag agg ata atg gaa atg att cct gag aga aat gaa cag 246  
 Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln  
 60 65 70

45 ggg caa acc ctt tgg agc aaa acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta 294  
 Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val  
 75 80 85

50 atg gta tca cct ctg gca gtg aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca 342  
 Met Val Ser Pro Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr  
 90 95 100 105

55 acg agc aca att cat tat cca aaa gtc cac aaa act tat ttt gaa aaa 390  
 Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro Lys Val His Lys Thr Tyr Phe Glu Lys  
 110 115 120

60 gtt gaa aga tta aaa cac gga acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat 438  
 Val Glu Arg Leu Lys His Gly Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn  
 125 130 135

65 caa gtc aag ata aga cgg aga gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac 486  
 Gln Val Lys Ile Arg Arg Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp  
 140 145 150

# ES 2 286 892 T3

	ctc agt gcc aaa gaa gca caa gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca	534
	Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro	
5	155 160 165	
	aat gaa gtg gga gcc aga att cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata	582
	Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile	
	170 175 180 185	
10	acc aaa gag aaa aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg	630
	Thr Lys Glu Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu	
	190 195 200	
15	atg gta gca tac atg cta gaa aga gag ttg gtc cga aaa aca aga ttc	678
	Met Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe	
	205 210 215	
20	ctc cca gtg gct ggc gga aca agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat	726
	Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His	
	220 225 230	
25	ctg act cag gga aca tgc tgg gaa caa atg tac acc cca gga gga gaa	774
	Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu	
	235 240 245	
30	gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cggt aac	822
	Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn	
	250 255 260 265	
35	ata gtg aga aga gcg aca gta tca gca gat cca cta gca tcc ctg ctg	870
	Ile Val Arg Arg Ala Thr Val Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu	
	270 275 280	
40	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata egg atg gta gac atc	918
	Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile	
	285 290 295	
45	ctt aag cag aat cca aca gag gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca	966
	Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala	
	300 305 310	
50	gca atg ggg tta aga att agc tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc	1014
	Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr	
	315 320 325	
55	ttt aag aga aca agt gga tca tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt	1062
	Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Lys Arg Glu Glu Met Leu	
	330 335 340 345	
60	acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa atm aga gtg cat gaa ggc tat gaa	1110
	Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu	
	350 355 360	
65	gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca	1158
	Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala	
	365 370 375	
	acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca	1206
	Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser	
	380 385 390	

ES 2 286 892 T3

att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc  
 Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe  
 395 400

1241.

5

<210> 17

<211> 404

<212> PRT

10 <213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 17

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

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

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

50

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

	145	150	155	160
	Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile			
5	165	170	175	
	Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu			
	180	185	190	
10	Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu			
	195	200	205	
15	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
20	Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp			
	245	250	255	
25	Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val			
	260	265	270	
	Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln			
	275	280	285	
30	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
35	Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser			
	325	330	335	
	Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu			
40	340	345	350	
	Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg			
	355	360	365	
45	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
50	Ala Met Val Phe			

<210> 18  
 <211> 1214  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <400> 18

```
atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60
acaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120
aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aataacccaat tacagcagat 180
```

# ES 2 286 892 T3

aagaggataa tggaaatgtat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240  
 acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgac atggtgaaat 300  
 5 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tccacaaaac ttatttgaa 360  
 aaagttgaaa gattaaaaca cggAACCTTt ggccccgttc attttaggaa tcaagtcaag 420  
 10 ataagacgga gagttgatgt aaacccttgtt cacgcggacc tcagtccaa agaagcacaa 480  
 gatgtatca tggaaagtgtt tttcccaaattt gaagtggag ccagaattctt aacatcgaa 540  
 15 tcacaactaa caataaccaa agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600  
 ttgatggtag catacatgtt agaaagagag ttggtcccaa aaacaagatt cctccctgt 660  
 20 gctggcgaa caagcagtgtt atacattgaa gtgttgcattc tgactcaggg aacatgctgg 720  
 gaacaaatgtt acaccccttggaggaggaaatgtt agaaaacgtt acattgtatca aagtttaattt 780  
 attgctcccc ggaacatagt gagaagagcg acagtattcag cagatccactt agcatccctg 840  
 25 ctggaaatgtt gccacagtac acagatttgtt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900  
 aatccaaacag aggaacaacgc tggatata tgcAAAGCAG caatggggtt aagaatttgc 960  
 30 tcatcattca gctttggtgg attcacctttt aagagaacaa gtggatcattc agtcaagaga 1020  
 gaagaagaaa tgcttacggg caacattcaa acattgaaa taagagtgc tggaggtat 1080  
 gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattt tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
 35 ttgattcaat tgataqtaag tggagagat gaaatcaa ttgctgaagc aataattgtt 1200  
 gccatggtgtt tttc 1214

40 <210> 19  
 <211> 1232  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 45  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)..(1196)  
 50 <400> 19

55	ta gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys	47
	1                  5                  10                  15	
	gca acc aga aga ttg att caa ttg atm gta agt ggg aga gat gaa caa Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln	95
	20                  25                  30	
60	tca att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp	143
	35                  40                  45	
65	tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc gat ttg aac ttc gtt aat aga gca Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala	191
	50                  55                  60	

ES 2 286 892 T3

	aat cag cgc ttg aac ccc atg cat caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys 65 70 75	239
5	gat gca aaa gtg ctt ttc cag aat tgg ggg att gaa ccc atc gac aat Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn 80 85 90 95	287
10	gtg atg gga atg att gga ata ttg cct gac atg acc cca agc acc gag Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu 100 105 110	335
15	atg tca ttg aga gga gtg aga gtc agc aaa atg gga gtg gat gag tac Met Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr 115 120 125	383
20	tcc agc act gag aga gtg gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val 130 135 140	431
25	cgg gat caa agg gga aac ata cta ctg tcc cct gaa gag gtc agt gaa Arg Asp Cln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu 145 150 155	479
30	aca caa gga acg gaa aag ctg aca ata att tat tca tca tca atg atg Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met 160 165 170 175	527
35	tgg gag att aat ggt ccc gaa tca gtg ttg gtc aat act tat caa tgg Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp 180 185 190	575
40	atc atc agg aac tgg gaa att gtg aaa att caa tgg tca cag gat ccc Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro 195 200 205	623
45	aca atg tta tac aat aag ata gaa ttt gag cca ttc cag tcc ctg gtc Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val 210 215 220	671
50	cct agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe 225 230 235	719
55	cag caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile 240 245 250 255	767
60	aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln 260 265 270	815
65	ttc tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcc gga atg agg ata ctt Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu 275 280 285	863
	gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg 290 295 300	911

# ES 2 286 892 T3

5	ctc aca gtc ctc gga aag gat gca ggt gcg ctt act gaa gac cca gat	959		
	Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp			
	305	310	315	
10	gaa ggt acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att	1007		
	Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile			
	320	325	330	335
15	tta ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa	1055		
	Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu			
	340	345	350	
20	ctg agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa	1103		
	Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln			
	355	360	365	
25	ggg gac gtg gtg ttg gta atg aaa cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt	1151		
	Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu			
	370	375	380	
30	act gac agc cag aca gcg acc aaa agg att cgg atg gcc atc aat	1196		
	Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn			
	385	390	395	
	tagtgaa ttgttaaaa acgacccgtt ttctact	1233		
35	<210> 20			
	<211> 398			
	<212> PRT			
	<213> Virus de la influenza equina H3N8			
40	<400> 20			
45	Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala			
	1	5	10	15
	Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser			
	20	25	30	
50	Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys			
	35	40	45	
55	Met Ile Lys Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn			
	50	55	60	
	Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp			
	65	70	75	80
60	Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val			
	85	90	95	
65	Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met			
	100	105	110	

ES 2 286 892 T3

	Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser			
	115	120	125	
5	Ser Thr Glu Arg Val Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg			
	130	135	140	
10	Aep Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr			
	145	150	155	160
	Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp			
	165	170	175	
15	Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile			
	180	185	190	
20	Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr			
	195	200	205	
	Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro			
	210	215	220	
25	Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln			
	225	230	235	240
30	Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys			
	245	250	255	
	Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe			
	260	265	270	
35	Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val			
	275	280	285	
40	Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu			
	290	295	300	
	Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu			
	305	310	315	320
45	Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu			
	325	330	335	
	Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu			
	340	345	350	
50	Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly			
	355	360	365	
	Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr			
	370	375	380	
55	Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn			
	385	390	395	

60 <210> 21  
 <211> 1194  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8

65

ES 2 286 892 T3

<400> 21

gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60  
5 attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattt ctgaagcaat aattgttagcc 120  
atggtgtttt cgcaagaaga ttgcgtatc aaagcgttc gaggcgattt gaacttcgtt 180  
10 aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240  
gaaaaagtgc tttccagaa ttgggggatt gaacccatcg acaatgttat gggaatgatt 300  
15 ggaatattgc ctgacatgac cccaaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360  
aaaatgggag tggatgagta ctccagcaact gagagagtgg tggtgagcat tgaccgttt 420  
20 ttaagatgttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaaaca 480  
caaggaacgg aaaagctgac aataatttat tcattcatcaa tcatgtgggaa gatataatggt 540  
cccgaatcag tggatgttcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactgggaa aatgtgaaa 600  
25 attcaatggt cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660  
tccctggtcc ctagggccac cagaagccaa tacagcggtt tcgtaaagAAC cctgtttcag 720  
30 caaatgcgag atgtacttgg aacatttgat actgtctaaa taataaaact cctccctttt 780  
gccccgtgtc ctccggaaaca gagtaggatg cagttctttt ctttgactgt taatgttggaa 840  
35 ggatcgaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900  
actaagggc tcacagtcct cggaaaggat gcaggylgcyc ttactgttggaa cccagatgaa 960  
40 ggtacggctg gactgttgc tggatgttca agagggtttc tcattttagg taaagaaaaac 1020  
aagagatatg gcccagcaact aagcatcaat gaactgttggaa aactgttggaa aggggagaaa 1080  
gctaattgtgc taatttggca aggggacgtg gtgttggtaa tgaaacggaa acgtgactct 1140  
45 agcataactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattt ggtatggccat caat 1194

<210> 22

<211> 1232

50 <212> DNA

<213> Virus de influenza equina H3N8

<400> 22

55

agaattcacaa atggtcgaa gaagagcaac agccattctc agaaaggcaaa ccagaagatt 60  
gattcaatttgc atagtaagtgc ggagagatgaa acaatcaattt gctgaagcaaa taattgttagc 120  
60 cttgggtttt tggcaagaag atggcatgtatc aaaagcgtt cggggcgattt tggacttcgtt 180  
taatagagca aatcagcgctt tggatgttca agagggtttc tcattttagg tccaaaaaaa 240  
tgccaaaatgtg cttttccaga attggggat tggatgttca gacaatgtga tggaaatgtat 300  
65 tggaaatatttgc cttgacatgaa ccccaagcacc cggatgtca ttggagaggagt gagagtcagc 360

# ES 2 286 892 T3

caaaatggga gtggatgagt actccagcac tgagagagtg gtggtagca ttgaccgttt 420  
 ttaaagagtt cgggatcaaa gggaaacat actactgtcc cctgaagagg tcagtgaac 480  
 5 acaggAACG gaaaAGCTGA caataatttA ttcatcatcA atgatgtggg agattaatgg 540  
 tccccGAATCA gtgtggTCAtaCTTATCA atggatcatc aggaactggg aaattgtgaa 600  
 10 aattcaatgg tcacaggatc ccacaatgtt atacaataag atagaatttg agccattcca 660  
 gtccctggTC cctagggCCA ccagaAGCCA atacagcggt ttctgtggAA ccctgtttca 720  
 15 gcaaATgcGA gatgtacttg gaacatttGA tactgtCAA ataataaaAC ttctcccttt 780  
 tgccgctgct cctccggAAC agagtaggat gcagttctt ctcttgactg ttaatgtaa 840  
 20 aggatcggga atgaggatac ttgttaagagg caattccccA gtgttcaact acaataaaAGC 900  
 cactaagagg ctcacagtcc tggaaagga tgcaggtgcg cttaactgaag acccagatga 960  
 aggtacggct ggagttagaat ctgctgttctt aagagggttt ctcatTTAG gtaamgaaaa 1020  
 25 caagcgatAT ggcccAGCAC taagcatcaa tgaactgagc aaacttgcaa aaggggagaa 1080  
 agctaATgtG ctaattggc aaggggacgt ggtgttgta atgaaacggA aacgtgactc 1140  
 tagcataactt actgacagcc agacagcgac caaaaggatt cgatggCCA tcaatttagtG 1200  
 30 ttgaattgtt taaaaacgac cttgtttcta ct 1232

<210> 23  
 <211> 1232  
 35 <212> DNA  
 <213> Virus de la Influenza equina H3N8  
 40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2)..(1195)  
 45 <400> 23

50	a gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca 49 Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 1 5 10 15	49
	acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca	97
	Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser	
	20 25 30	
55	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat tgc 145 Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys 35 40 45	145
	atg ata caa gca gtt cga ggc gat ttg aac ttc gtt aat aga gca aat	193
	Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn	
	50 55 60	
60	cag cgc ttg aac ccc atg cat caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat 241 Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp 65 70 75 80	241

65

# ES 2 286 892 T3

	gca aaa gtg ctt ttc cag aat tgg ggg att gaa ccc atc gac aat gtg Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val 85 90 95	289
5	atg gga atg att gga ata ttg cct gac atg acc cca agc acc gag atg Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met 100 105 110	337
10	tca ttg aga gga gtc agc aaa atg gga gtc gat gag tac tcc Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser 115 120 125	385
15	agc act gag aga gtc gtc agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg 130 135 140	433
20	gat caa agg gga aac ata cta ctg tcc cct gaa gag gtc agt gaa aca Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr 145 150 155 160	481
25	caa gga acg gaa aag ctg aca ata att tat tca tca tca atg atg tgg Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp 165 170 175	529
30	gag att aat ggt ccc gaa tca gtc ttg gtc aat act tat caa tgg atc Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile 180 185 190	577
35	atc agg aac tgg gaa att gtc aaa att caa tgg tca cag gat ccc atc Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr 195 200 205	625
40	atg tta tac aat aaq ata gaa ttt gag cca ttc cag tcc ctg gtc cct Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro 210 215 220	671
45	agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln 225 230 235 240	721
50	caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata aaa Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys 245 250 255	769
55	ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc Leu Leu Pro Phe Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe 260 265 270	817
60	tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcg gga atg agg ata ctt gta Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val 275 280 285	865
65	aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg ctc Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu 290 295 300	913
	aca gtc ctc gga aaa gat gca ggt gcg ctt act gaa gac cca gat gaa Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu 305 310 315 320	961

# ES 2 286 892 T3

5	ggt acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu 325   330   335	1009
10	ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctg Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu 340   345   350	1057
15	agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa ggg Ser Lys Leu Ala Lys Gly Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly 355   360   365	1105
20	gac gtg gtg ttg gta atg aaa cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr 370   375   380	1153
25	gac agc cag aca gcg acc aaa agg att cgg atg gcc atc aat Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn 385   390   395	1195
	tagtgaa ttgttaaaa acgacccgt ttctact	1232
30	<210> 24	
	<211> 398	
35	<212> PRT	
	<213> Virus de Influenza equina H3N8	
40	<400> 24	
45	Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 1   5   10   15	
	Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser 20   25   30	
	Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys 35   40   45	
	Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn 50   55   60	
	Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp 65   70   75   80	
	Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val 85   90   95	

60

65

# ES 2 286 892 T3

	Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met			
	100	105	110	
5	Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser			
	115	120	125	
10	Ser Thr Glu Arg Val Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg			
	130	135	140	
	Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr			
	145	150	155	160
15	Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp			
	165	170	175	
20	Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile			
	180	185	190	
	Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr			
	195	200	205	
25	Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro			
	210	215	220	
30	Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln			
	225	230	235	240
	Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys			
	245	250	255	
35	Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe			
	260	265	270	
40	Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val			
	275	280	285	
	Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu			
	290	295	300	
45	Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu			
	305	310	315	320
50	Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu			
	325	330	335	
	Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu			
	340	345	350	
55	Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly			
	355	360	365	
60	Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr			
	370	375	380	
	Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn			
65	385	390	395	

# ES 2 286 892 T3

<210> 25  
 <211> 1194  
 <212> DNA  
 5 <213> Virus de Influenza equina H3N8  
  
 <400> 25  
 10           gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagatcg 60  
 atccaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattt ctgaagcaat aattgttagcc 120  
 atggtgtttt cgcaagaaga ttgcataata caagcagttc gaggcgattt gaacttcgtt 180  
 15 aatagagcaa atcagcgctt gaaccccattt catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240  
 qcaaaaqtgc ttttccagaa ttgggggattt gaacccatcg acaatgtgtat gggaaatgattt 300  
 20 ggaatattgc ctgacatgac cccaaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtca 360  
 aaaaatgggag tggatgagta ctccagcaactt gagagagtggtt tggtgagcat tgaccgtttt 420  
 25 ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggtt cagtgaaaca 480  
 caaggaacgg aaaagctgac aataattttt tcatcatcaa tggatgtggaa gattaatgg 540  
 30 cccgaatcag tggatgttcaa tacttatca tggatcatca ggaactggaa aattgtgaaa 600  
 atccaatggt cacaggatcc cacmatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660  
 tccctggtcc cttagggccac cagaagccaa tacagcggtt tggtaagaac cctgtttcag 720  
 35 caaatgcgag atgtacttgg aacattttagt actgctcaaa taatataactt cctccctttt 780  
 gcccgctgctc ctccggaaaca gagtaggatg cagttctttt ctttgactgt taatgtaa 840  
 40 ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tggtaactca caataaagcc 900  
 actaagagggc tcacagttcc cggaaaaagat gcaggtgcgc ttactgaaga cccagatgaa 960  
 45 ggtacggctg gagtagaattc tgctgttcta agagggttc tcattttagg taaagaaaac 1020  
 aagagatatg gcccagcaact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080  
 50 gctaatgtgc taattggca agggacgtg gtgttgttta tgaaacggaa acgtgactct 1140  
 agcataactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggatcc ggtatggccat caat 1194  
  
 55 <210> 26  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
  
 65 <400> 26  
  
 agcaaaaagca ggttagatattt gaa

# ES 2 286 892 T3

<210> 27  
<211> 24  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 27

agtagaaaca aggtagttt ttac 24

15 <210> 28  
<211> 18  
<212> DNA  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 28

caggaaacag ctatgacc 18

30 <210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 29

taatacgact cactatagg 20

45 <210> 30  
<211> 18  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 30

tggtgcacta gccagctg 18

60 <210> 31  
<211> 18  
65 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

ES 2 286 892 T3

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

5 <400> 31  
ttgcctgtac catctgcc 18

10 <210> 32  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: :Plantilla sintética

20 <400> 32  
gcaaaagca gggatattt ctg 23

25 <210> 33  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética

35 <400> 33  
agttagaaaca agggttttt taa 23

40 <210> 34  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética

50 <400> 34  
gacatccctg actatg 16

55 <210> 35  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética

65 <400> 35  
gcatctgtta agtcaa 16

# ES 2 286 892 T3

<210> 36  
<211> 25  
<212> DNA  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 36

25

15 agcaaaagca ggtcaaatat attca  
<210> 37  
<211> 26  
<212> DNA  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 37

26

30 gaaaacacca tggctacaat tattgc  
<210> 38  
<211> 27  
<212> DNA  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 38

27

45 agaattcaca atggtcggaa gaagagc  
<210> 39  
<211> 27  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética  
<400> 39

27

60 agtagaaaca aggtcgttt taaacaa  
<210> 40

# ES 2 286 892 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Pittsburg, of the Commonwealth

5

<120> DE INFLUENZA EQUINA ADAPTADO EN FRÍO V

<130> HKZ-033CPPC

10

<140> no asignado aún

<141> 1999-08-12

15

<150> 09/133,921

<151> 1998-08-13

<160> 43

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

25

<211> 1023

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

30 <220>

<221> CDS

<222> (25)..(780)

35 <400> 1

40	gcaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr 1 5	51
45	tac gtt ctc tct acc gca cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala 10 15 20 25	55
50	cag aga ctt gaa gat gtc ttt gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala 30 35 40	147
55	ctc atg gaa tgg cta aag aca aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys 45 50 55	195
60	ggg att tta gga ttc gta ttc acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly 60 65 70	243

65

## ES 2 286 892 T3

ctg cag cgt aga cgc ttt gtc caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp 75 80 85	291
5 cca aac aac atg gac aga gca gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg 90 95 100 105	339
10 gaa ata aca ttc cat ggg gca aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr 110 115 120	387
15 ggt gca cta gcc agc tgc atg gga ctc ata tac aac aga atg gga act Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr 125 130 135	435
20 gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln 140 145 150	483
25 atc gct gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca aca acc Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr 155 160 165	531
30 aac cca tta atc aga cat gaa aac aga atg gta tta gcc agt acc acg Asn Pro Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr 170 175 180 185	579
35 gct aaa gcc atg gag cag atg gca ggg tcg agt gag cag gca gca gag Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu 190 195 200	627
40 gcc atg gag gtt gct aag gct agg cag atg gtr cag gca atg aga Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg 205 210 215	675
45 acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu 220 225 230	723
50 ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln 235 240 245	771
55 cga ttc aag tgatcccttc gttattgcag caagtatcat tggatcttg Arg Phe Lys 250	820
60 cacttgatat tggattct tgatgcctt ttcttcaaata tcatatcg tcgccttata 880 tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940 cgccaggaac agcagaatgc tggatgtt gacgatggtc atttgtcas catagagctg 1000 gagtaaaaaa ctacccgtt tct	1023

# ES 2 286 892 T3

<210> 2

<211> 252

<212> PRT

5 <213> Virus de influenza equina H3N8

<400> 2

10	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
	1                       5                       10                       15
15	Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
	20                       25                       30
20	Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
	35                       40                       45
25	Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
	50                       55                       60
30	Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
	65                       70                       75                       80
35	Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
	85                       90                       95
40	Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
	100                      105                       110
45	Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
	115                      120                       125
50	Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
	130                      135                       140
55	Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
	145                      150                       155                       160
60	Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
	165                      170                       175
65	Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
	180                      185                       190
70	Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Lys
	195                      200                       205
75	Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
	210                      215                       220
80	Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
	225                      230                       235                       240
85	Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
	245                      250

# ES 2 286 892 T3

<210> 3  
<211> 756  
<212> DNA  
5 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
  
<400> 3  
  
10       atgagtcttc tgaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcgtaccatc aggccccctc 60  
      aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgtatcttgag 120  
15       gcactcatgg aatgyctttaa ymcudayaccm atctctgtcac ctctgactaa agggatctta 180  
      ggatccgtat tcacgctcac cgtgcccaagt gagcgaggac tgcagcgttag acgtttgtc 240  
20       caaatgccc ttatgtggaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300  
      aggaagctta aaagagaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcact cagctattcc 360  
      actgggtgcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatggAAC tgcacaacc 420  
25       gaagtggcat ttggcctggat atgcgccaca tgtgaacaga tcgctgattc ccagcatcga 480  
      tctcacaggc agatggtgac aacaaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta 540  
30       tttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcagggcagca 600  
      gaggccatgg aggttgcttag taaggctagg cagatggtrc aggcaatgag aaccattggg 660  
35       acccaccccta gctccagtgc cggtttggaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720  
      cagaaacgga tgggagtgca aatgcagcga ttcaag                                      756  
  
40       <210> 4  
41       <211> 1023  
42       <212> DNA  
43       <213> Virus de la Influenza equina H3N8  
  
44       <220>  
45       <221> CDS  
50       <222> (25)..(780)

55

60

65

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 4

	gcaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg	51
5	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr	
	1 5	
10	tac gtt ctc tct atc tta cca tca ggc ccc ctc maa gcc gag atc gcg	99
	Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala	
	10 15 20 25	
15	cag aga ctt gaa gat gtc ttt gca ggg aag aac acc gat ctt gag gca	147
	Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala	
	30 35 40	
20	ctc atg gaa tgg cta aag aca aga cca atc ctg tca cct ctg act aaa	195
	Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys	
	45 50 55	
25	ggg att tta gga ttc gta ttc acg ctc acc gtg ccc agt gag cga gga	243
	Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly	
	60 65 70	
30	ctg cag cgt aga cgc ttt gtc caa aat gcc ctt agt gga aac gga gat	291
	Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp	
	75 80 85	
35	cca aac aac atg gac aga gca gta aaa ctg tac agg aag ctt aaa aga	339
	Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg	
	90 95 100 105	
40	gaa ata aca ttc cat ggg gca aaa gag gtg gca ctc agc tat tcc act	387
	Glu Ile Thr Phe His Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr	
	110 115 120	
45	ggt gca cta gcc agc tgc atg gga ctc ata tac aac aga atg gga act	435
	Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr	
	125 130 135	
50	gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag	483
	Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln	
	140 145 150	
55	atc gct qat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca atm acc	531
	Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile Thr	
	155 160 165	
60	aac cca tta atc aga cat gaa aac aga atg gta tta gcc agt acc acg	579
	Asn Pro Leu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr	
	170 175 180 185	
65	gct aaa gcc atg gag cag atg gca ggg tcg agt gag cag gca gca gag	627
	Ala Lys Ala Met Glu Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu	
	190 195 200	

# ES 2 286 892 T3

5	gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gta cag gca atg aga Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg 205 210 215	675
10	acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu 220 225 230	723
15	ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln 235 240 245	771
20	cga ttc aag tgatcccttc gttattgcag caagtatcat tggatcttg Arg Phe Lys 250	820
25	cacttgatat tgtggattct tgatcgccctt ttcttcataat tcatttatcg tgccttaaaa 880 tacggcttga aaagaggggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940 cggcaggaac agcagaatgc tgtggatgtt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg 1000 gagtaaaaaa ctaccttgtt tct	1023

30 <200> 5  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Virus de influenza equina H3N8  
 35 <400> 5

40	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro 1 5 10 15	40
	Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe 20 25 30	
45	Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr 35 40 45	45
	Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe 50 55 60	
50	Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val 65 70 75 80	50
	Gln Asn Ala Leu Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala 85 90 95	
55	Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala 100 105 110	55
	Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met 115 120 125	
60	Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe 130 135 140	60
	Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg 145 150 155 160	

# ES 2 286 892 T3

Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile 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 Lys  
                          195                         200                         205  
 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser  
                          210                         215                         220  
 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr  
                          225                         230                         240  
 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys  
                          245                         250  
 <210> 6  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <400> 6  
 atgagtcttc tgaccgaggt cgaacgtac gttctctcta tcttaccatc aggccccctc 60  
 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120  
 gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atccctgtcac ctctgactaa agggatttta 180  
 ggattcgtat tcacgctcac cgtgcccaact gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240  
 caaaatgcac tttagtggaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300  
 aggsagctt a aagagaaaat aacatccat ggggcmaaag aggtggcaact cagctattcc 360  
 actggtgtcac tagccagctg catgggactc atataacaaca gaatggAACAC tggacaacc 420  
 gaagtggcat ttggccttgtt atgcgcacaca tgtgaacaga tgcgtgatcc ccagcatcga 480  
 ttcacagggc agatggtgac aataaccaac ccattatca gacatgaaaaa cagaatggta 540  
 ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600  
 gagggccatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtac aggcaatgag aaccattggg 660  
 acccacccta gctccagtgc cggttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720  
 cagaaaacgga tgggagtgca aatgcagcga ttcaag                           756  
 <210> 7  
 <211> 1762  
 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <220>  
 <221> cds  
 <222> (30)..(1724)

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 7

	agcaaaagca gggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata	53
5	Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile	
	1	5
10	ccatcgaccat tgg gtc tac agt caa aac cca acc agt ggc aac aac	101
	Pro Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn	
	10 15 20	
15	aca gcc aca tta tgt ctg gga cac cat gca gta gca aat gga aca ttg	149
	Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu	
	25 30 35 40	
	gta aaa aca ata act gat gac caa att gag gtg aca aat gct act gaa	197
	Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu	
	45 50 55	
20	tta gtt cag agc att tca ata ggg aaa ata tgc aac aac tca tat aga	245
	Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg	
	60 65 70	
25	gtt cta gat gga aga aat tgc aca tta ata gat gca atg cta gga gac	293
	Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp	
	75 80 85	
30	ccc cac tgt gat gtc ttt cag tat gag aat tgg gac ctc ttc ata gaa	341
	Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu	
	90 95 100	
35	aga agc agc gct ttc agc agt tgc tac cca tat gac atc cct gac tat	389
	Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr	
	105 110 115 120	
	gca tcg ctc egg tcc att gta gca tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca	437
	Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr	
	125 130 135	
40	gca gag gga ttc aca tgg aca ggt gtc act caa aac gga aga agt gga	485
	Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly	
	140 145 150	
45	tcc tgc aaa agg gga tca gcc gat agt ttc ttt agc cga ctg aat tgg	533
	Ser Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp	
	155 160 165	
50	cta aca gaa tct gga aac tct tac ccc aca ttg aat gtg aca atg cct	581
	Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro	
	170 175 180	
	aac aat aaa aat ttc gac aaa cta tac atc tgg ggg att cat cac ccg	629
	Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro	
	185 190 195 200	
55	agc tca aac aaa gag cag aca aaa ttg tac atc caa gaa tcg gga cga	677
	Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg	
	205 210 215	
60	gta aca gtc tca aca aaa aga agt caa caa aca ata atc cct aac atc	725
	Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile	
	220 225 230	

ES 2 286 892 T3

	gga tct aga ccg cgg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr 235	240	245	773
5	tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta atg ata aac agt aat ggc Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly 250	255	260	821
10	sac tta gtt gca ccg cgg gga tat ttt aaa ttg aaa aca ggg aaa agc Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser 265	270	275	869
15	tct gta atg aca tca gat gca ccc ata gac att tgt gtg tct gaa tgt Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys 285	290	295	917
20	att aca cca aat gga agc atc ccc aac gac aaa cca ttt caa aat gtg Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val 300	305	310	965
25	sac aaa gtt aca tat gga aaa tgc ccc aag tat atc agg caa mac act Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr 315	320	325	1013
30	tta aag ctg gcc act ggg atg agg aat gta cca gaa aag caa atc aga Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg 330	335	340	1061
35	gga atc ttt gga gca ata gcg gga ttc ata gaa aac ggc tgg gaa gga Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly 345	350	355	1109
40	atg gtt gat ggg tgg tat gga ttc cga tat caa aac tcg gaa gga aca Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr 365	370	375	1157
45	gga caa gct gca gat cta aag agc act caa gca gcc atc gac cag atc Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile 380	385	390	1205
50	aat gga aaa tta aac aga gtg att gaa agg acc aat gag aaa ttc cat Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His 395	400	405	1253
55	caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg agg atc cag gac ttg Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu 410	415	420	1301
60	gag aag tat gta gaa gac acc aac sta gac cta tgg tcc tac aat gca Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala 425	430	435	1349
65	gaa ttg ctg gtg gct cta aaa aat caa cat aca att gac tta aca gat Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp 445	450	455	1397
	gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu 460	465	470	1445

# ES 2 286 892 T3

5	aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys 475                          480                          485	1493
10	gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr 490                          495                          500	1541
15	ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val 505                          510                          515                          520	1589
20	gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala 525                          530                          535	1637
25	ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ctg ggt ttc att atg tgg Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp 540                          545                          550	1685
30	gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgatgttact Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile 555                          560                          565	1734
35	<b>gatatgttaaa aacacccttg tttctact</b>	1762
40	<210> 8 <211> 565 <212> PRT <213> Virus de la influenza equina H3N8	
45	<400> 8	
50	Met Lys Thr Thr Ile Ile Pro Leu Thr His Trp Val Tyr Ser 1                        5                        10                        15 Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His 20                        25                        30 His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln 35                        40                        45 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly 50                        55                        60 Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr 65                        70                        75                        80 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr 85                        90                        95 Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys 100                      105                        110 Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala 115                      120                        125 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly 130                      135                        140 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ser Cys Lys Arg Gly Ser Ala Asp 145                      150                        155                        160	
55		
60		
65		

ES 2 286 892 T3

	Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr			
	165	170	175	
5	Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu			
	180	185	190	
	Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys			
10	195	200	205	
	Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser			
	210	215	220	
15	Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly			
	225	230	235	240
20	Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp			
	245	250	255	
	Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr			
	260	265	270	
25	Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro			
	275	280	285	
30	Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro			
	290	295	300	
	Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys			
	305	310	315	320
35	Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg			
	325	330	335	
40	Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly			
	340	345	350	
	Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe			
	355	360	365	
45	Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser			
	370	375	380	
50	Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile			
	385	390	395	400
	Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu			
55	405	410	415	
	Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys			
	420	425	430	
60	Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn			
	435	440	445	
	Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu			
65	450	455	460	
	Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly			
	465	470	475	480

ES 2 286 892 T3

Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile  
485 490 495

5 Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn  
500 505 510

Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp  
10 515 520 525

Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val  
530 535 540

15 Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg  
545 550 555 560

Cys Asn Ile Cys Ile  
20 565

<210> 9

<211> 1695

25 <212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 9

30 atgaagacaa ccattatttt gataccactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60  
agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg 120  
35 gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180  
atrtcaatag ggaaaaatatg caacaactca tatacgatcc tagatggaag aaattgcaca 240  
40 ttaatagatg caatgctagg agaccccccac tgtgatgtct ttcaatgtca gaattgggac 300  
ctttcatag aaagaagcag cgcttcagc agttgttacc catatgacat ccctgactat 360  
45 gcatcgctcc ggtccattgt agcatectca ggaacattgg aattcacagc agagggatc 420  
acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagggg atcagccat 480  
50 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa acttttaccc cacattgaat 540  
gtgacaatgc ctaacaatca aaatttcgac aaactataca tctggggat tcatacccc 600  
55 agctcaasca aagagcagac aaaaattgtac atccaagaat cgggacgagt aacagtctca 660  
acaaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcgat cttagccgcg ggtcaggggt 720  
caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaaac ctggagatat cctaatgata 780

60

65

ES 2 286 892 T3

aacagtaatg gcaacttagt tgcaccegggg ggatattttt aattgaaaac agggaaaagc 840  
5 tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900  
ggaagcatcc ccaacgacaaz accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
cccagtata tcaggcaaaa cactttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
10 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080  
atgggtgatg ggtggtatgg attcggatat caaaactcg aaggaacagg acaagctgca 1140  
15 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggagg 1260  
20 atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320  
gaattgctgg tggctctaataa aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat 1380  
aaattattcg agaagacttag acgccagttt agagaaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440  
25 tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattt gatcaataag aaatggacca 1500  
tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttcaaat caaaggtttt 1560  
gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattggccat atcatgtttc 1620  
30 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcattt atgtgggctt gccaaaaaagg caacatcaga 1680  
tgcaacattt gcatt 1695

## ES 2 286 892 T3

5	gtt cta gat gga aga aat tgc aca tta ata gat gca atg cta gga gac Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp 75	80	85	293
10	ccc cac tgt gat gtc ttt cag tat gag aat tgg gac ccc ttc ata gaa Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu 90	95	100	341
15	aga agc agc gct ttc agc agt tgc tac cca tat gac atc cct gac tat Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr 105	110	115	389
20	gca tcc ctc cgg tcc att gta gca tcc tca gga aca ttg gaa ttc aca Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr 125	130	135	437
25	gca gag gga ttc aca ttg aca ggt gtc act caa aac gga aga agt gga Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly 140	145	150	485
30	tcc tgc aaa agg gaa tca gcc gat agt ttc ttt agc cga ctg aat ttg Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp 155	160	165	533
35	cta aca gaa tct gga aac tct tac ccc ac <sup>a</sup> ttg aat g <sup>b</sup> g <sup>c</sup> aca atg cct Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro 170	175	180	581
40	mac aat aaa aat ttc gac aaa cta tac atc ttg ggg att cat cac ccg Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro 185	190	195	629
45	agc tca aac aaa gag cag aca aaa ttg tac atc caa gaa tca gga cga Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg 205	210	215	677
50	gta aca gtc tca aca aaa aga agt caa caa aca ata atc cct aac atc Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile 220	225	230	723
55	gga tct aga ccg ttg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr 235	240	245	773
60	tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta acg ata aac agt aat ggc Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Thr Ile Asn Ser Asn Gly 250	255	260	821
65	aac tta gtt gca ccg cgg gga tat ttt aaa ttg aas aca ggg aas agc Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser 265	270	275	869
	tct gta atg aga tca gat gca ccc ata gac att tgt gtg tct gaa tgt Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys 285	290	295	917
	att aca cca aat gga agc atc ccc aac gac aas cca ttt caa aat gtg Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val 300	305	310	965

# ES 2 286 892 T3

	aac aaa gtt aca tat gga aaa tgc ccc aag tat atc agg caa aac act	1013
	Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Arg Gln Asn Thr	
	315 320 325	
5	tta aag ctg gcc act ggg atg agg aat gta cca gaa aag caa atc aga	1061
	Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg	
	330 335 340	
10	gga atc ttt gga gca ata gcg gga ttc ata gaa aac ggc tgg gaa gga	1109
	Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly	
	345 350 355 360	
15	atg gtt gat ggg tgg tat gga ttc cga tat caa aac tcg gaa gga aca	1157
	Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr	
	365 370 375	
20	gga caa gct gca gat cta aag agc act caa gca gcc atc gac cag atc	1205
	Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile	
	380 385 390	
25	aat gga aaa tta aac aga gtg att gaa agg acc aat gag aaa ttc cat	1253
	Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His	
	395 400 405	
30	caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg aga atc cag gac ttg	1301
	Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu	
	410 415 420	
35	gag aag tat gta gaa gac acc aaa ata gac cta tgg tcc tac aat gca	1349
	Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala	
	425 430 435 440	

40

45

50

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat caa cat aca att gac tta aca gat Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp 445 450 455	1397
5 gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu 460 465 470	1445
10 aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgc aag ata tac cac aaa tgt Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys 475 480 485	1493
15 gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr 490 495 500	1541
20 ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val 505 510 515 520	1589
25 gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala 525 530 535	1637
30 ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp 540 545 550	1685
35 gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagtaaact Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile 555 560 565	1734
<b>gatagttaaa aacacccttg ttctact</b>	
	1762
40 <210> 11	
<211> 565	
<212> PRT	
45 <213> Virus de influenza equina H3N8	
<400> 11	
50 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Thr His Trp Val Tyr Ser 1 5 10 15	
Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His 20 25 30	
55 His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp Gln 35 40 45	
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly 50 55 60	
60 Lys Ile Cys Asn Asn Ser Tyr Arg Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr 65 70 75 80	
65 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr 85 90 95	
Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg Ser Ser Ala Phe Ser Ser Cys 100 105 110	

## ES 2 286 892 T3

Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile Val Ala  
 115 120 125  
 5 Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly  
 130 135 140  
 10 Val Thr Gln Asn Gly Arg Ser Gly Ser Cys Lys Arg Glu Ser Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr  
 165 170 175  
 15 Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Lys Asn Phe Asp Lys Leu  
 180 185 190  
 20 Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Ser Asn Lys Glu Gln Thr Lys  
 195 200 205  
 Leu Tyr Ile Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser  
 210 215 220  
 25 Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly  
 225 230 235 240  
 30 Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp  
 245 250 255  
 Ile Leu Thr Ile Asn Ser Asn Gly Asn Ile Val Ala Pro Arg Gly Tyr  
 260 265 270  
 35 Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro  
 275 280 285  
 40 Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro  
 290 295 300  
 45 Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val Thr Tyr Gly Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
 340 345 350  
 50 Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe  
 355 360 365  
 55 Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys Ser  
 370 375 380  
 60 Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile  
 385 390 395 400  
 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu  
 405 410 415  
 65 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys  
 420 425 430

# ES 2 286 892 T3

	Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn			
	435	440	445	
5	Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu			
	450	455	460	
	Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly			
	465	470	475	480
10	Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile			
	485	490	495	
15	Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn			
	500	505	510	
	Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp			
	515	520	525	
20	Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val			
	530	535	540	
	Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg			
	545	550	555	560
25	Cys Asn Ile Cys Ile			
	565			

<210> 12  
 <211> 1695  
 30 <212> DNA  
 <213> Virus de influenza equina H3N8  
 <400> 12  
 35

	atgaagacaa ccattatcc gatactactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60	
40	agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggAACATTG 120	
	gtaaaaacaa taactgatga ccaaatttag gtgacaaaatg ctactgaatt agttcagagc 180	
45	atttcaatag gaaaaatatg caacaactca tatAGAGTTC tagatggaa aAATTGCACA 240	
	ttaatagatg caatgctagg agacccccac tggatgtct ttcagtatga gaattgggac 300	
	ctcttcatag aaagaagcag cgcttccgc agttgtacc catatgacat ccctgactat 360	
50	gcatcgctcc ggtccattgt agcattctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420	
	acatggacag gtgtcactca aaacggaaaga agtggatect gcaaaaggga atcagccgat 480	
	agtttttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttaccc cacattgaat 540	
55	gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctggggat tcataccccg 600	
	agctcaaaca aagacgac aaaaattgtac atccaagaat caggacgagt aacagtctca 660	
60	acaaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcggat cttagacgtg ggtcagggggt 720	
	caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaac ctggagatat cctaaacgata 780	

# ES 2 286 892 T3

aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatattttt aattgaaaac agggaaaagc 840  
 5 tctgttatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900  
 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960  
 10 cccaaagtata tcaggcaaaa cactttaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020  
 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaaacgg ctgggaagga 1080  
 atggttgatg ggtggatgg attccgatat caaaactcg aaggaacagg acaagctgca 1140  
 15 gatctaaaga qcactcaagc aqccatcgac caqatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt 1200  
 gaaaggacca atgagaatt ccatcaaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggaga 1260  
 20 atccaggact tggagaagta tctagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320  
 gaattgctgg tggctctaga aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat 1380  
 25 aaattatcg agaagactag acgccagttt agagaaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440  
 tgtttcaaga tataccacaa atgtataat gcatgcattt gatcaataag aaatggaca 1500  
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca tttaaacaacc ggtttcaaat caaaggtgtt 1560  
 30 gagttgaaat caggttacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620  
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680  
 35 tgcaacatcc gcatt 1695

<210> 13  
 <211> 1241  
 40 <212> DNA  
 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <220>  
 45 <221> cds  
 <222> (28)..(1239)

<400> 13

50	agcaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp 1                       5	54
	ctt atg tca caa tcc cgc acc cgc gag ata cta aca aaa act act gtg 102 Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val 10                     15                     20                     25	102
	gac cac atg gcc ata atc aag aaa tac aca tca gga aga caa gag aag 150 Asp His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys 30                     35                     40	150
	aac ccc gca ctt agg atg aag tgg atg atg gca atg aaa tac cca att 198 Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile 45                     50                     55	198
65	aca gca gat aag agg ata atg gaa atg att cct gag aga aat gaa cag 246 Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln 60                     65                     70	246

ES 2 286 892 T3

5	ggg caa acc ctt tgg agc aaa acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val 75                   80                   85	294
10	atg gta tca cct ctg gca gtg aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca Met Val Ser Pro Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr 90                   95                   100                   105	342
15	acg agc aca att cat tat cca aaa gtc tac aaa act tat ttt gaa aaa Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys 110               115               120	390
20	gtt gaa aga tta aaa cac gga acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat Val Glu Arg Leu Lys His Gly Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn 125               130               135	438
25	caa gtc aag ata aga cgg aga gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac Gln Val Lys Ile Arg Arg Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp 140               145               150	486
30	ctc agt gcc aaa gaa gca caa gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro 155               160               165	534
35	aat gaa gtg gga gcc aga att cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile 170               175               180               185	582
40	acc aaa gag aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu 190               195               200	630

45

50

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

	atg gta gca tac atg cta gaa aga gag ttg gtc cga aaa aca aga ttc Met Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe 205 210 215	678
5	ctc cca gtg gct ggc gga aca agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His 220 225 230	726
10	ctg act cag gga aca tgc tgg gaa caa atg tac acc cca gga gga gaa Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu 235 240 245	774
15	gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cgg aac Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn 250 255 260 265	822
20	ata gtg aga aga gcg aca gta tca gca gat cca cta gca tcc ctg ctg Ile Val Arg Arg Ala Thr Val Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu 270 275 280	870
25	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile 285 290 295	918
30	ctt aag cag aat cca aca gag gam caa gct gtg gat ata tgc aaa gca Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala 300 305 310	966
35	gca atg ggg tta aga att agc tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr 315 320 325	1014
40	ttt aag aga aca agt gga tca tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Lys Arg Glu Glu Met Leu 330 335 340 345	1062
45	acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata aga gtg cat gaa ggc tat gaa Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu 350 355 360	1110
50	gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 365 370 375	1158
55	acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa caa tca Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser 380 385 390	1206
60	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe 395 400	1241

<210> 14

<211> 404

65 <212> PRT

<213> Virus DE la influenza equina H3N8

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 14

5	Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr 1                   5                   10                   15		
10	Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val Asp His Met Ala Ile Ile Lys 20                   25                   30		
15	Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys 35                   40                   45		
20	Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met 50                   55                   60		
25	Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys 65                   70                   75                   80		
30	Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val Met Val Ser Pro Leu Ala Val 85                   90                   95		
35	Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro 100               105               110		
40	Lys Val Tyr Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly 115               120               125		
45	Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn Gln Val Lys Ile Arg Arg Arg 130               135               140		
50	Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln 145               150               155               160		
55	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	
60	Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu 195               200               205	Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr 210               215               220	
65	Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp 225               230               235               240	Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp 245               250               255	Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val 260               265               270
	Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln 275               280               285		
	Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu 290               295               300		
	Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser 305               310               315               320		

ES 2 286 892 T3

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

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

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

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

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

<210> 15

20 <211> 1214

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

25 <400> 15

30 atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcaccccg cgagatact 60  
acaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120  
aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180  
aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240  
acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgac atggtggaaat 300  
aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tctacaaaac ttatttgaa 360  
aaagtgttaa gatttaaaca cggaaacctt ggccccgttc attttaggaa tcaagtcagg 420  
ataagacgga gagttgtatgt aaacccttgt cacgcggacc tcagtgccaa agaagcacaa 480  
gatgtgtatca tggaaagtgtt ttcccaaata gaagtgggag ccagaattct aacatcgaa 540  
tcacaactaa caataaccaa agagaasana gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600  
ttgatggtag catacatgtc agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccagtg 660  
gctggcggaa caagcagtgt atacattgaa gtgttgcatt tgactcaggg aacatgctgg 720  
gaacaaatgt acaccccgagg aggagaagtt agaaacgtatg acattgtatca aagttaatt 780  
attgctgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840  
ctggaaatgt gccacagtac acagatttgtt ggaataagga tggtagacat ctttaagcag 900  
aatccaacag aggaacaage tgtggatata tgcaaaagcag caatgggtt aagaatttc 960  
tcatcattca gctttggtgg attcaccttt aagagaacaa gtggatcattc agtcaagaga 1020  
gaagaagaaa tgcttacggg caaccccaa acattgaaaa taagagtgcata tgaaggctat 1080  
gaagaattca caatggtegg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
ttgtatcaat tgatgtatgg tgggagagat gaaacatcaa ttgtgtatgc aataattgtat 1200  
gccatggtgtt ttcc

ES 2 286 892 T3

<210> 16  
 <211> 1241  
 <212> DNA  
 5 <213> Virus de la Influenza equina H3N8  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (28)..(1239)  
  
 <400> 16  
  
 15 agcaaaagca ggtcaaata attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54  
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp  
 1 5  
  
 20 cta atg tca caa tcc cgc acc cgc gag ata cta aca aaa act act gtc 102  
 Leu Met Ser Gln Ser Arg Thr Arg Glu Ile Leu Thr Lys Thr Thr Val  
 10 15 20 25  
  
 25 gac cac atg gcc ata atc aag aaa tac aca tca gga aga cca gag aag 150  
 Asp His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys  
 30 35 40  
  
 30 aac ccc gca ctt agg atg aag tgg atg atg gca atg aaa tac cca att 198  
 Asn Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile  
 45 50 55  
  
 35 aca gca gat aag agg ata atg gaa atg att cct gag aga aat gaa cag 246  
 Thr Ala Asp Lys Arg Ile Met Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln  
 60 65 70  
  
 40 ggg caa acc ctt tgg agc aaa acg aac gat gct ggc tca gac cgc gta 294  
 Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys Thr Asn Asp Ala Gly Ser Asp Arg Val  
 75 80 85  
  
 45 atg gta tca cct ctg gca gtg aca tgg tgg aat agg aat gga cca aca 342  
 Met Val Ser Pro Leu Ala Val Thr Trp Trp Asn Arg Asn Gly Pro Thr  
 90 95 100 105  
  
 50 acg agc aca att cat tat cca aaa gtc csc aaa act tat ttt gaa aaa 390  
 Thr Ser Thr Ile His Tyr Pro Lys Val His Lys Thr Tyr Phe Glu Lys  
 110 115 120  
  
 55 gtt gaa aga tta aaa cac gga acc ttt ggc ccc gtt cat ttt agg aat 438  
 Val Glu Arg Leu Lys His Gly Thr Phe Gly Pro Val His Phe Arg Asn  
 125 130 135  
  
 60 caa gtc aag ata aga cgg aga gtt gat gta aac cct ggt cac gcg gac 486  
 Gln Val Lys Ile Arg Arg Val Asp Val Asn Pro Gly His Ala Asp  
 140 145 150  
  
 65 ctc agt gcc aaa gaa gca caa gat gtg atc atg gaa gtt gtt ttc cca 534  
 Leu Ser Ala Lys Glu Ala Gln Asp Val Ile Met Glu Val Val Phe Pro  
 155 160 165

## ES 2 286 892 T3

	aat gaa gtg gga gcc aga att cta aca tcg gaa tca caa cta aca ata Asn Glu Val Gly Ala Arg Ile Leu Thr Ser Glu Ser Gln Leu Thr Ile 170 175 180 185	582
5	acc aaa gag aaa aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu 190 195 200	630
10	atg gta gca tac atg cta gaa aga gag ttg gtc cga aaa aca aga ttc Met Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe 205 210 215	678
15	ctc cca gtg gct ggc gga aca agc agt gta tac att gaa gtg ttg cat Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His 220 225 230	726
20	ctg act cag gga aca tgc tgg gaa caa atg tac acc cca gga gga gaa Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu 235 240 245	774
25	gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gec egg aac Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn 250 255 260 265	822
30	ata gtg aga aga gcg aca gta tca gca gat cca cta gca tcc ctg ctg Ile Val Arg Arg Ala Thr Val Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu 270 275 280	870
35	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile 285 290 295	918
40	ctt aag cag aat cca aca gag gaa caa gct gtg gat ata tgc aaa gca Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala 300 305 310	966
45	gca atg ggg tta aga att agc tca tca ttc agc ttt ggt gga ttc acc Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr 315 320 325	1014
50	ttt aag aga aca agt gga tca tca gtc aag aga gaa gaa gaa atg ctt Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu 330 335 340 345	1062
55	acg ggc aac ctt cca aca ttg aca ata aga gtg cat gaa ggc tat gaa Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu 350 355 360	1110
60	gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 365 370 375	1158
65	acc aga aga ttg att caa ttg ata gta agt ggg aga gat gaa cma tca Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser 380 385 390	1206
	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe 395 400	1241

ES 2 286 892 T3

<210> 17  
<211> 404  
<212> PRT  
5 <213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55           130            135                 140

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

45

50

55

60

65

# ES 2 286 892 T3

	145	150	155	160
5	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	
10	Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu Met Val Ala Tyr Met Leu Glu			
	195	200	205	
15	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
20	Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp			
	245	250	255	
25	Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val			
	260	265	270	
	Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln			
	275	280	285	
30	Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu			
	290	295	300	
35	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 Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser			
	325	330	335	
40	Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu			
	340	345	350	
45	Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg			
	355	360	365	
	Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu			
	370	375	380	
50	Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val			
	385	390	395	400
55	Ala Met Val Phe			
	<210> 18			
	<211> 1214			
	<212> DNA			
60	<213> Virus de la influenza equina H3N8			

ES 2 286 892 T3

<400> 18

5 atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60  
acaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaaat acacatcagg aagacaagag 120  
aagaaccccty cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180  
10 aagaggataa tggaaatgtat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaacccct ttggagcaa 240  
acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgac atggtggaa 300  
15 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tccacaaaaac ttatttgaa 360  
aaagttgaaa gattaamaca cggaaccttt ggccccgttc atttttaggaa tcaagtcaag 420  
20 ataagacgga gagttgatgt aaaccctggt cacgcggacc tcagtgccaa agaagcacaa 480  
gatgtgatca tggaaagtgtt tttcccaat gaagtggag ccagaattct aacatcgaa 540  
tcacaactaa caataaccaa agagaaaaaa gaagaacctc aggactgcaa aattggcccc 600  
25 ttgatggtag catacatgct agaaagagag ttggtcgaa aaacaagatt cctcccagtg 660  
gctggcggaa caagcagtgt atacattgaa gtgttgcatt tgactcaggg aacatgctgg 720  
30 gaacaaatgt acaccccaagg aggagaagtt agaaacgatg acattgatca aagtttaatt 780  
attgctgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840  
35 ctggaaatgt gccacagtac acagattggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900  
aatocaacag agguacaago tgtggatata tgcaaagcag caatgggtt aagaatttgc 960  
40 tcatcattca gctttgggtgg attcaccttt aagagaacaa gtggatcattc agtcaagaga 1020  
gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattgaaaa taagagtgc a tgaaggctat 1080  
45 gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140  
ttgattcaat tgatagtaag tggagagat gaacaatcaa ttgctgaage aataattgtt 1200

50 gccatgggtt tttc

1214

55 <210> 19  
<211> 1233  
<212> DNA  
<213> Virus de la influenza equina H3N8

60 <220>  
<221> CDS  
<222> (3)..(1196)

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 19

	ta gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys	47
5	1 5 10 15	
	gca acc aya aya tlg att caa ttg ata gta ayt ggg aga gat gam caa Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln	95
10	20 25 30	
	tca att qct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tcg caa gaa gat Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp	143
15	35 40 45	
	tgc atg ata aaa gca gtt cga ggc gat ttg aac ttc gtt aat aga gca Cys Met Ile Lys Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala	191
	50 55 60	
20	aat cag cgc ttg aac ccc atg cat caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa Asn Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Arg His Phe Gln Lys	239
	65 70 75	
25	gat gca aaa gtg ctt ttc cag aat tgg ggg att gaa ccc atc gac aat Asp Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn	287
	80 85 90 95	
30	gtg atg gga atg att gga ata ttg cct gac atg acc cca agc acc gag Val Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu	335
	100 105 110	
35	atg tca ttg aga gga gtg aga gtc agc aaa atg gga gtg gat gag tac Met Ser Leu Arg Gly Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr	383
	115 120 125	
40	tcc agc act gag aga gtg gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt Ser Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val	431
	130 135 140	
45	cgg gat caa agg gga aac ata cta ctg tcc cct gaa gag gtc agt gam Arg Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu	479
	145 150 155	
50	aca caa gga acg gaa aag ctg aca ata att tat tca tca tca atg atg Thr Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met	527
	160 165 170 175	
55	tgg gag att aat ggt ccc gaa tca gtg ttg gtc aat act tat caa tgg Trp Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp	575
	180 185 190	
60	atc atc agg aac tgg gaa att gtg aaa att caa tgg tca cag gat ccc Ile Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro	623
	195 200 205	
65	aca atg tta tac aat aag ata gaa ttt gag cca ttc cag tcc ctg gtc Thr Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val	671
	210 215 220	

## ES 2 286 892 T3

5	cct agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe 225 230 235	719
10	cag caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile 240 245 250 255	767
15	aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln 260 265 270	815
20	tcc tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcg gga atg agg ata ctt Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu 275 280 285	863
25	gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg 290 295 300	911
30	ctc aca gtc ctc gga aag gat gca ggt gcg ctt act gaa gac cca gat Leu Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp 305 310 315	959
35	gaa ggt acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att Glu Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile 320 325 330 335	1007
40	tta ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa Leu Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu 340 345 350	1055
45	ctg agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa Leu Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln 355 360 365	1103
50	ggg gac gtg gtg ttg gta atg aaa cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt Gly Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu 370 375 380	1151
55	act gac agc cag aca gcg acc aaa agg att cgg atg gcc atc aat Thr Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn 385 390 395	1196
	<b>tagtgttggaa ttgtttaaaa acgaccccttgt ttctact</b>	<b>1233</b>

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 398

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Virus de la influenza equina H3N8

## ES 2 286 892 T3

&lt;400&gt; 20

	Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala			
1	5	10	15	
5	Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser			
	20	25	30	
10	Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys			
	35	40	45	
15	Met Ile Lys Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn			
	50	55	60	
20	Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp			
	65	70	75	80
25	Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val			
	85	90	95	
30	Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met			
	100	105	110	
35	Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser			
	115	120	125	
40	Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg			
	130	135	140	
45	Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr			
	145	150	155	160
50	Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp			
	165	170	175	
55	Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile			
	180	185	190	
60	Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr			
	195	200	205	
65	Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro			
	210	215	220	
70	Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln			
	225	230	235	240
75	Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys			
	245	250	255	
80	Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe			
	260	265	270	
85	Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val			
	275	280	285	
90	Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu			
	290	295	300	

# ES 2 286 892 T3

	Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu		
305	310	315	320
5	Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu		
	325	330	335
10	Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu		
	340	345	350
15	Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly		
	355	360	365
20	Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr		
	370	375	380
25	Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn		
	385	390	395
30	<210> 21		
	<211> 1194		
35	<212> DNA		
	<213> Virus de la influenza equina H3N8		
40	<400> 21		
45	gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattt 60		
	attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattt ctgaagcaat aattgttagcc 120		
50	atggtgtttt cgcaagaaga ttgcgtatgg aaagcgttc gagggatattt gaaacttcgtt 180		
	aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt caaaaaagat 240		
55	gcaaaaagtgc ttttccagaa ttgggggattt gaacccatcg acaatgttat gggaatgattt 300		
	ggaatattgc ctgacatgac cccaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcage 360		
60	aaaatgggag tggatgagta ctccagcaact gagagagtgg tggtgagcat tgaccgtttt 420		
	ttaagagttt gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaacaca 480		
65	caaggaacgg aaaaatgtac aataattttt tcatcatcaa tgatgtggga gattaatgg 540		
	cccgaaatcg tggatgtcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600		
70	atcaatggt cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccatccag 660		
	tccctggtcc ctagggccac cagaagccaa tacagcggtt tggtaagaac cctgtttcag 720		
75	caaattgcgag atgtacttgg aacatttgat actgtctaaa taataaaact cctccctttt 780		
	gccgctgtc ctccggaca gaggatggatc cagttcttctt ctttgactgt taatgtt 840		
80	ggatcggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tggatgttcaacta caataaagcc 900		
	actaagaggc tcacagtccct cggaaaggat gcaggtgcgc ttactgtt 960		
85	ggtaatgtgc gagtagaaatc tgctgttcta agagggtttc tcatttttagg taaagaaaac 1020		
	aagagatatg gcccagcaact aagcatcaat gaactgttcaaa aacttgc 1080		
90	gctaatgtgc taattggca aggggacgtg gtgttggtaa tggaaacggaa acgtgactct 1140		
	agcataacttta ctgacagccaa gacagcgacc aaaaggattt ggatggccat caat 1194		

ES 2 286 892 T3

<210> 22  
 <211> 1232  
 <212> DNA  
 5 <213> Virus de la influenza equina H3N8  
 <400> 22

10 agaattcaca atggtcggaa gaagagcaac agccattctc agaaaggcaa ccagaagatt 60  
 gattcaattt atagtaagtg ggagagatga acaatcaatt gctgaagcaa taattgtgc 120  
 15 catggtgttt tgcgcagaag attgcgtatgtt aataggcgtt cggggcgatt tggacttgc 180  
 taatagagca aatcagcgt tgaacccat gcatcaactc ttgaggcatt tccaaaaaga 240  
 20 tgcaaaatgtg ctttccaga attggggat tgaacccatc gacaatgtga tggaaatgtat 300  
 tggaatattt cctgacatga ccccaagcac cgagatgtca ttgagaggag tgagatgc 360  
 caaaatggga gtggatgagt actccagcac tgagagatgtg gtggtagc ttgaccgtt 420  
 25 tttaagagtt cgggatcaaa ggggaaacat actactgtcc cctgaagagg tcagtgaaac 480  
 acaaggaacg gaaaagctga caataattttt ttcatcatca atgatgtggg agattaatgg 540  
 30 tccccaaatca gtgttgtca atacttatca atggatcatc aggaactggg aatttgtgaa 600  
 aattcaatgg tcacaggatc ccacaatgtt atacaataag atagaatgtg agccatccc 660  
 35 gtccttggtc cctaggggcca ccagaagcca atacagcggt ttctgttgc 720  
 gcaaatgcga gatgtacttg gaacatttga tactgtcaa ataataaaac tccctccctt 780  
 40 tgccgtgtct cctccggAAC agagtaggat gcagttcttctt tctttgactg ttaatgtaa 840  
 aggatcggga atgaggatac ttgttaagagg caattccccca gtgttcaact acaataaagc 900  
 cactaagagg ctcacagtcc tggaaagga tgcaggtgcg cttaactgaag acccagatga 960  
 45 aggtacggct ggagtagaaat ctgttgttctt aagagggttt ctcattttag gtaaagaaaa 1020  
 caagagatat ggcccagcac taagcatcaa tgaactgagc aaactgtcaa aaggggagaa 1080  
 50  
 agctaattgtg ctaattgggc aaggggacgt ggtgttgttgc atgaaacggc aacgtgactc 1140  
 tagcataactt actgacagcc agacagecgac caaaaggatt cggatggcca tcaatttagtg 1200  
 ttgaattgtt taaaaacgcac cttgtttcta ct 1232

60 <210> 23  
 <211> 1232  
 <212> DNA  
 65 <213> Virus de la influenza equina H3N8

ES 2 286 892 T3

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(1195)

5

<400> 23

10	a gaa ttc aca atg gtc gga aga aga gca aca gcc att ctc aga aag gca 49 Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 1 5 10 15	
15	acc aga aga ttg att caa ttt gta agt ggg aga gat gaa caa tca 97 Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser 20 25 30	
20	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tcg caa qaa gat tgc 145 Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys 35 40 45	
25	atg ata caa gca gtt cga ggc gat ttg aac ttc gtt aat aga gca aat 193 Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn 50 55 60	
30	cag cgc ttg aac ccc atg cat caa ctc ttg agg cat ttc caa aaa gat 241 Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp 65 70 75 80	
35	gca aaa gtg ctt ttc cag aat tgg ggg att gaa ccc atc gac aat gtg 289 Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val 85 90 95	
40		
45		
50		
55		
60		
65		

## ES 2 286 892 T3

	atg gga atg att gga ata ttg cct gac atg acc cca agc acc gag atg Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met 100 105 110	337
5	tca ttg aga gga gtg aga gtc agc aaa atg gga gtg gat gag tac tcc Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser 115 120 125	385
10	agc act gag aga gtg gtg agc att gac cgt ttt tta aga gtt cgg Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg 130 135 140	433
15	gat caa agg gga aac ata cta ctg tcc cct gaa gag gtc agt gaa aca Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr 145 150 155 160	481
20	caa gga acg gaa aag ctg aca ata att tat tca tca tca atg atg tgg Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp 165 170 175	529
25	gag att aat ggt ccc gaa tca gtg ttg gtc aat act tat caa tgg atc Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile 180 185 190	577
30	atc agg aac tgg gaa att gtg aaa att caa tgg tca cag gat ccc aca Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr 195 200 205	625
35	atg tta tac aat aag ata gaa ttt gag cca ttc cag tcc ctg gtc cct Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro 210 215 220	673
40	agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt cag Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln 225 230 235 240	721
45	caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata aaa Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys 245 250 255	769
50	ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag ttc Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe 260 265 270	817
55	tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcg gga atg agg ata ctt gta Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val 275 280 285	865
60	aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg ctc Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu 290 295 300	913
65	aca gtc ctc gga aaa gat gca ggt gcg ctt act gaa gac cca gat gaa Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu 305 310 315 320	961
	ggg acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu 325 330 335	1009

# ES 2 286 892 T3

5	ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctg Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu 340 345 350	1057
10	agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa ggg Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly 355 360 365	1105
15	gac gtg gtg ttg gta atg aaa cg <sup>g</sup> aaa cgt gac tct agc ata ctt act Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr 370 375 380	1153
20	gac agc cag aca gc <sup>g</sup> acc aaa agg att cg <sup>g</sup> atg gcc atc aat Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn 385 390 395	1195
25	<b>tagtgtaaa ttgtttaaaa acgacccgt ttctact</b>	1232
30	<210> 24 <211> 398 <212> PRT <213> Virus de la influenza equina H3N8	
35	Glu Phe Thr Met Val Gly Arg Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala 1 5 10 15	
40	Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser 20 25 30	
45	Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe Ser Gln Glu Asp Cys 35 40 45	
50	Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn 50 55 60	
55	Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp 65 70 75 80	
60	Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val 85 90 95	
65	Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met 100 105 110	
70	Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser 115 120 125	
75	Ser Thr Glu Arg Val Val Ser Ile Asp Arg Phe Leu Arg Val Arg 130 135 140	
80	Asp Gln Arg Gly Asn Ile Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Ser Glu Thr 145 150 155 160	
85	Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp 165 170 175	
90	Glu Ile Asn Gly Pro Glu Ser Val Leu Val Asn Thr Tyr Gln Trp Ile 180 185 190	

ES 2 286 892 T3

	Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr			
	195	200	205	
5	Met Leu Tyr Asn Lys Ile Glu Phe Glu Pro Phe Gln Ser Leu Val Pro			
	210	215	220	
10	Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln			
	225	230	235	240
15	Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys			
	245	250	255	
20	Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe			
	260	265	270	
25	Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val			
	275	280	285	
30	Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu			
	290	295	300	
35	Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu			
	305	310	315	320
40	Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu			
	325	330	335	
45	Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu			
	340	345	350	
50	Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly			
	355	360	365	
55	Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr			
	370	375	380	
60	Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn			
	385	390	395	
65	<210> 25			
	<211> 1194			
	<212> DNA			
	<213> Virus de la influenza equina H3N8			
	<400> 25			
70	gaattcacaa tggtcggaaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60			
	atccaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattt ctgaagcaat aattgttagcc 120			
75	atggtgtttt cgcaagaaga ttgcatacata caagcagttt gagggcgattt gaacttgcgtt 180			

ES 2 286 892 T3

aatagagcaa atccagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240  
5 gcaaaaagtgc ttttcagaa ttgggggatt gaaccatcg acaatgtgat gggaatgatt 300  
ggaatattgc ctgacatgac cccaaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360  
aaatgggag tggatgagta ctccagcaact gagagagtgg tggtgagcat tgaccgtttt 420  
10 ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaanaca 480  
caaggaacgg aaaaagctgac aataatttat tcatcatcaa tggatgtggga gattaatgg 540  
15 cccgaatcag tggatgtcaa tacttaccaa tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600  
attcaatggc cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660  
20 tccctggtcc cttagggccac cagaagccaa tacagcggtt tcgtaagaac cctgtttcag 720  
caaatgcgag atgtacttgg aacatttgat actgctcaa taataaact cctccctttt 780  
25 gccgctgctc ctccggaaca gagtaggatg cagttctttt ctttactgt taatgtaaa 840  
ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900  
actaagaggc tcacagtcct cggaaaagat gcagggtgcgc ttactgaaga cccagatgaa 960  
30  
ggtaacggctg gagtagaaatc tgctgttcta agagggtttc tcattttagg taaagaaaac 1020  
aagagatatg gcccagcact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080  
gctaattgtgc taattgggca aggggacgtg gtgttggtaa tgaaacggaa acgtgactct 1140  
40 agcataactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc ggatggccat caat 1194  
  
45 <210> 26  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

55 <400> 26

55 Agcaaaagca ggttagatatt gaa 23

60 <210> 27  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

# ES 2 286 892 T3

<400> 27

agttagaaacagtagttt agggtagttt ttac

24

5 <210> 28

<211> 18

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

15

<400> 28

caggaaacag ctatgacc

18

20 <210> 29

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Plantilla sintética

30

<400> 29

taatacgact cactataggg

20

35

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

45

<400> 30

tggcgtacta gccagctg

18

50

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

60

<400> 31

ttgcctgtac catctgcc

18

65

<210> 32

<211> 23

# ES 2 286 892 T3

<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 32

10 agcaaaagca gggatattt ctg 23

<210> 33  
<211> 23  
15 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 33

25 agtagaaaca agggtgttt taa 23

<210> 34  
30 <211> 16  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 34

40 gacatccctg actatg 16

<210> 35  
45 <211> 16  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 35

55 gcatctgtta agtcaa 16

<210> 36  
60 <211> 25  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

# ES 2 286 892 T3

<400> 36

agcaaaaagca ggtcaaatat attca

25

5 <210> 37

<211> 26

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<400> 37

15 gaaaacacca tggctacaat tattgc

26

<210> 38

<211> 27

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 38

30 agaattcaca atggtcggaa gaagagc

27

<210> 39

<211> 27

35 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 39

45 agtagaaaca aggtcggttt taaacaa

27

<210> 40

<211> 19

50 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 40

60 agccgtacct tcatctggg

19

<210> 41

<211> 19

65 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

ES 2 286 892 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
5	<400> 41	
	agcactgaga gagtgggtgg	19
10	<210> 42	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
20	<400> 42	
	gtaagaggca attccccag	19
25	<210> 43	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
35	<400> 43	
	cagctttcc gttccttg	18
40		
45		
50		
55		
60		
65		