



19



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**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

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

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

74 Agente: **Urizar 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.

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.

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, 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 Eurasiático y el Norte Americano aislados en años recientes.

La vacuna autorizada actualmente para la influenza equina es una vacuna de virus desactivado (muerto). Esta 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 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 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 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 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 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, 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 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 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.

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.

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 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 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 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.

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 TCID₅₀ hasta alrededor de 10^8 unidades de TCID₅₀, y preferiblemente alrededor de 2×10^6 de TCID₅₀, 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 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 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 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” 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 intercambiamente aquí. Es también para ser notado que los términos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” pueden ser usados intercambiamente. 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 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 medio ambientes 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” o “replicación de un virus” son usados intercambiamente 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 alantóica 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.

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 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 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 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, 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

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.

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.

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.

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.

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.

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, monoestratos 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.

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 habilita 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 ningunas proteínas virales a temperatura no permisiva de alrededor de 39°C; (c) su atenuación 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 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, 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) 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 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. 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 cualesquiera 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 posteriores 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 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 ningunas proteínas virales a una temperatura de alrededor de 39°C. Además, el EIV-P821 no forma placas en las células MDCK a temperatura no permisivas 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 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°N° 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 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 Eurasiático 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 aviarios 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.

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 Eurasiático 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 agentes 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*.

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 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.

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 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.

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 (TCID₅₀) de un virus de cultivo de tejido infeccioso de alrededor de 10^8 unidades de virus TCID₅₀. Como es usado aquí, una "unidad de TCID₅₀" es 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 TCID₅₀ 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 TCID₅₀ 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 2×10^6 unidades de TCID₅₀ de virus de influenza equina adaptados en frío o de virus de influenza A recatalogados de la presente invención.

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 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.

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 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.

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 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

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, 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 N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 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 hibridarán 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 $nei_{wt}M_{1023}$, $nei_{wt}M_{1023}$, $nei_{wt2}M_{1023}$, $nei_{wt1}M_{756}$, $nei_{wt2}M_{756}$, $nei_{ca1}M_{1023}$, $nei_{ca2}M_{1023}$, $nei_{ca1}M_{756}$, y/o $nei_{ca2}M_{756}$, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, y/o la SEC ID N°: 6.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza equina HA son $nei_{wt}HA_{1762}$, $nei_{wt}HA_{1695}$, $nei_{ca1}HA_{1762}$, $nei_{ca2}HA_{1762}$, $nei_{ca1}HA_{1695}$, y/o $nei_{ca2}HA_{1695}$, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, y/o la SEC ID N°: 12.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza equina PB2-N son $nei_{wt}PB2-N_{1241}$, $nei_{wt}PB2-N_{1214}$, $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$, $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$, $nei_{ca1}PB2-N_{1214}$, y/o $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, y/o la SEC ID N°: 18.

Las moléculas de ácido nucleico preferidas que codifican las proteínas de influenza equina PB2-C son $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$, $nei_{wt2}PB2-C_{1232}$, $nei_{wt}PB2-C_{1194}$, $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$, $nei_{ca2}PB2-C_{1231}$, y/o $nei_{ca1}PB2-C_{1194}$, las cadenas codificantes de las cuales son representadas por las SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 23, y/o la SEC ID N°: 25.

La presente invención incluye las proteínas que comprenden las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 20 y/o la SEC ID N°: 24 así como las moléculas de ácido nucleico que codifican tales proteínas.

Las proteínas de influenza M preferidas de la presente invención incluyen las proteínas codificadas por moléculas de ácido nucleico que comprenden $nei_{wt}M_{1023}$, $nei_{wt1}M_{1023}$, $nei_{wt2}M_{1023}$, $nei_{wt}M_{756}$, $nei_{wt1}M_{756}$, $nei_{wt2}M_{756}$, $nei_{ca1}M_{1023}$, $nei_{ca2}M_{1023}$, $nei_{ca1}M_{756}$, y/o $nei_{ca2}M_{756}$. Las proteínas de influenza equina M preferidas son $Pei_{wt}M_{252}$, $Pei_{ca1}M_{252}$, 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 N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, y/o la SEC ID N°: 6, y, como tal, tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID N°: 2 y/o la SEC ID N°: 5.

Las proteínas de influenza equina HA preferidas de la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico que comprende $nei_{wt}HA_{1762}$, $nei_{wt}HA_{1695}$, $nei_{ca1}HA_{1762}$, $nei_{ca2}HA_{1762}$, $nei_{ca1}HA_{1695}$, y/o $nei_{ca2}HA_{1695}$. Las proteínas de influenza equina HA son $P_{wt}HA_{565}$, $P_{ca1}HA_{565}$, y/o $P_{ca2}HA_{565}$. En una realización, una proteína de influenza equina HA preferida de la presente invención es codificada por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, y/o SEC ID N°: 12, y, como tal, tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID N°: 8 y/o la SEC ID N°: 11.

Las proteínas de influenza equina PB2-N preferidas de la presente invención incluyen proteínas codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprenden $nei_{wt}PB2-N_{1241}$, $nei_{wt}PB2-N_{1214}$, $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$, $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$, $nei_{ca1}PB2-N_{1214}$, y/o $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$. Las proteínas de influenza equina PB2-N preferidas son $P_{wt}PB2-N_{404}$, $P_{ca1}PB2-N_{404}$, 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 N°: 13, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, y/o la SEC ID N°: 18, y, como tal, tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID N°: 14 y/o la SEC ID N°: 17.

Las proteínas de influenza equina PB2-C preferidas de la presente invención incluyen proteínas codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprenden $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$, $nei_{wt2}PB2-C_{1232}$, $nei_{wt}PB2-C_{1194}$, $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$, $nei_{ca2}PB2-C_{1231}$, y/o $nei_{ca1}PB2-C_{1194}$. Las proteínas de influenza equina PB2-C preferidas son $P_{wt}PB2-C_{398}$, $P_{ca1}PB2-C_{398}$, 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 N°: 19, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 23, y/o la SEC ID N°: 25, y, como tal tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC ID N°: 20 y/o SEC ID N°: 24.

La secuencia de ácido nucleico SEC ID N°: 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 N°: 4 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificadas por PCR denotadas aquí como $nei_{ca1}M_{1023}$ y $nei_{ca2}M_{1023}$, la producción de las cuales es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID N°: 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 N°: 10 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotadas aquí como $nei_{ca1}HA_{1762}$ y $nei_{ca2}HA_{1762}$, la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID N°: 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 N°: 16 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$ y $nei_{ca2}PB2-N_{1241}$, la producción de la cual es revelada en los Ejemplos. La secuencia de ácido nucleico SEC ID N°: 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 N°: 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 N°: 23 representa la secuencia deducida de la cadena codificante de moléculas de ácido nucleico amplificada por PCR denotada aquí como $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$, 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.

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 N°: 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 N°: 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 N°: 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 N°: 24.

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.

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 presente invención. Los anticuerpos preferidos se ligan selectivamente a las SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 20 y/o SEQ ID N°: 24.

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

Ejemplo 1

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

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 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 en los subsecuentes pasajes, la temperatura de incubación fue cambiada hacia abajo ambas a alrededor de los 28°C, o 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.

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	

*= el fluido alantoico infeccioso fue diluido 1:1000 en estos pasajes

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 monoestrato 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

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 radorotulados por electroforesis de gel de policrilamida (SDS-PAGE).

TABLA 2

Por ciento de Clones aislados que fueron sensibles a la temperatura

Paso No.	Por ciento 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%

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 ningunas 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 bajo la accesión ATCC VR-____.

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

El análisis de recatalogación 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 coinfectadas con EIV-P821 a una multiplicidad de infecciones (MOI) de 2 células pfu y A/ánade/New York/6750/78 a una MOI de 6 2, 5, 6 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 radorotuladas. 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 EN-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

Gen	Virus	ts ^{*1}	Ts ^{*2}
HA	aviar	26	13
	equino	11	44
NP	aviar	37	8
	equino	0	49
NS-1	aviar	9	8
	equino	12	20

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

² 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

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

Gene	Virus	ts ^{*1}	ts ^{*2}
HA	aviar	18	1
	equino	11	7
NP	aviar	34	5
	equino	7	8
NS-1	aviar	10	4
	equino	14	5

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

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

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 fenotips 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 infección 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.

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
 5 sometido a dos pasajes adicionales en células MDCK, como sigue. Las células MDCK fueron crecidas en 150 cm² 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
 10 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,
 15 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
 20 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
 25 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 N° de acceso ATCC VR-_____.

Ejemplo 2

30 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
 35 virus fue diluida a alrededor de $1,0 \times 10^5$ 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. Después 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
 40 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 cm² en un medio de cultivo de virus MEM con sales de Hanks, que con-
 45 tienen 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
 50 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
 55 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 va-
 60 cunación, 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 méto-
 65 dos 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.

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 poni 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 ganglios 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, *Equina 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, estreptomycin, 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), suministrado 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.

TABLA 5

*Títulos HAI de animales vacunados**

Animal	Títulos HAI (días después de la vacunación)			
ID	0	7	14	21
18	40	80	160	160
19	10	20	40	80
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 recién aislado.

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.

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 poni 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.

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 ningunas reacciones anormales de la vacunación.

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.

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.

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.

TABLA 6

Aislamiento de virus en huevos después de la vacunación

ID del animal	Ruta	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
91	IN	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
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.

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

TABLA 7

Títulos HAI después de la vacunación
Títulos HAI (días después de la vacunación)

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

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.

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.

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.

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.

TABLA 8

Vacunación/Protocolo de Exposición

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.

TABLA 9

Régimen de ejercicio para ponis en el Grupo 2

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

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 ningunas reacciones alérgicas inmediatas o tardías de la vacunación.

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.

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.

TABLA 10

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

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

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.

TABLA 11

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

Grupo	ID del animal	-1	7	14	21	28	91	105	112	119	126
1	12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	320	320	640
1	16	<10	<10	20	20	<10	<10	20	160	320	320
1	17	<10	<10	10	10	10	10	80	160	160	160
1	165	<10	<10	10	10	10	10	80	80	80	80
1	688	<10	<10	20	20	20	20-	20	20	20	40
2	7	<10	<10	10	10	<10	<10	20	80	80	40
2	44	<10	<10	20	20	20	10	80	320	320	320
2	435	<10	<10	20	20	10	<10	20	80	80	80
2	907	<10	<10	10	10	20	10	10	40	80	80
2	968	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	160	160	160
3	2						<10	80	640	640	320
3	56						<10	80	320	320	320
3	196						<10	20	160	80	80
3	198						10	40	160	320	320
3	200						<10	20	80	80	40
Grupo	Descripción										
1	Vacunación solamente										
2	Vacunación y ejercicio										
3	Control										

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 crear 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.

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 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 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 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 exámen 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 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 fue probada para títulos de anticuerpos de inhibición de hemaglutinación contra un aislado reciente. Los títulos HAI son también listados en la Tabla 12.

TABLA 12

Títulos HAI y aislamiento de virus después de la vacunación

		Títulos de virus (DPV ³)					Aislamiento ¹ de virus (DPV ³)											
Grupo ²	ID	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	-	-	-	-

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

² Grupo 1: Virus pasados 5 veces por células MDCK; Grupo 2: Virus pasados 5 veces en huevos

³ Días post vacunación

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.

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 TCID₅₀, 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.

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 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , o 2×10^7 unidades de TCID₅₀/1 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 ₅₀
1	3	2×10^7
2	4	2×10^8
3	4	2×10^5
4	4	2×10^4
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 ningunas 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 TCID ₅₀	ID del animal	-1	7	14	21	28	35	42	±
1	2×10^7	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	2×10^8	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	2×10^5	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	2×10^4	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 TCID₅₀ de virus de exposición en

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 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 interpretación, sin embargo, fue que el título real del virus de exposición puede haber sido menor que la cantidad de 10^8 unidades de TCID₅₀ 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 2×10^6 unidades de virus de influenza equina adaptado en frío TCID₅₀ sugiere que esta cantidad fue suficiente para proteger un caballo contra la enfermedad de influenza equina. Además, una dosis de 2×10^5 unidades de TCID₅₀ 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 significativa en caballos contra la enfermedad de influenza equina.

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

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 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 TCID₅₀ 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 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.

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 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.

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 enfriado en hielo hasta inmediatamente antes de 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.

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

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.

Todos los métodos estadísticos en este estudio fueron realizados usando SAS (SAS Institute, Cary, NC), y un $P < 0,05$ fue considerado ser significativo 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 (día de la exposición) hasta el día 10 fueron incluidas en los análisis, ver Tabla 15.

TABLA 15

Efecto de la exposición en las temperaturas diarias ($^{\circ}\text{C}$) 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			

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.

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, taquipnea)	1
Depresión	Normal	0
	Depresión presente*	1
*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.		

Cada caballo fue puntuado para cada una de estas categorías. Adicionalmente, los nódulos linfáticos submandibulares fueron palpados para monitorear una posible infección bacteriana. En cualquier caso en el que hubo un valor diferente 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 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 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.

TABLA 17

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

Día post exposición	Vacunados (n=19)	No vacunados (n=10)	P-valor
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
10	12,3	20,1	0,0135
Total sobre 11 días	11,8	21,2	0,0051
* Prueba de suma de rango por Wilcoxon			

TABLA 18

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

Día post exposición	Vacunados (n=19)	No vacunados (n=10)
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
10	2,4	3,4

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.

TABLA 19

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*
*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.		

Los puntajes de los signos clínicos relevantes a la influenza y las mediciones de la temperatura objetiva ambas demostraron una reducción estadística significativa 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 significativa de la enfermedad.

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.

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.

La cepa heteróloga probada fue la A/equino/2/Saskatoon/90, descrita genéticamente como una cepa Eurasiática (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 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 0 (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 con presentación clínica anormal. Los caballos fueron puntuados 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 se describió en el Ejemplo 8).

Las temperaturas rectales fueron medidas diariamente comenzando 3 días antes de la exposición, y continuaron 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, los caballos vacunados tuvieron temperaturas corporales más bajas estadísticamente significantes que los caballos de control no vacunados (Tabla 20).

TABLA 20

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			

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.

(Tabla pasa a página siguiente)

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 detección 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 TCID₅₀ 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		

TABLA 23

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

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 porciento) de Fisher o 2 pruebas de muestra (días de derramamiento) de Wilcoxon		

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 significativa estadísticamente en el grupo vacunado cuando se compararon a esos del grupo de control; lo que indica que la vacuna confiere protección significativa de la enfermedad por la cepa heteróloga.

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 disminuido 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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

TABLA 26

Derramamiento de virus post exposición detectado por infectación de huevos

Día de estudio		35	37	38	39	40	41	42	43	44	No. días positivos por caballo
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	
	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.

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.

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 significativa para la enfermedad causada por la cepa heteróloga Kentucky/98.

La habilidad de los caballos para derramar virus de influenza post exposición fue también significativamente 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.

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

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 N°: 26, y SEQ ID N°: 27, respectivamente. Una molécula de ácido nucleico de 1023 nucleótidos, denominada nei_{wt}M₁₀₂₃, con una cadena codificante que tiene una secuencia de ácido nucleico designada SEQ ID N°: 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 N°: 29 y el cebador REV, designado por la SEQ ID N°: 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 N°: 31 y efM-s1, designado SEQ ID N°: 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.

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 aminoácidos 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 $nei_{wt1}M_{1023}$, o sea, el nucleótido 649 de $nei_{wt}M_{756}$, fue adenina, mientras el nucleótido 663 de $nei_{wt2}M_{1023}$, o sea, el nucleótido 649 de $nei_{wt2}M_{756}$, 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 $nei_{ca1}M_{1023}$, 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 como 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 $nei_{ca1}M_{1023}$ codifica una longitud total de proteína M de influenza equina de alrededor de 252 aminoácidos, referida aquí como $Pei_{ca1}M_{252}$, 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 $Pei_{ca1}M_{252}$, designada $nei_{ca1}M_{756}$, 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 $nei_{ca1}M_{1023}$, y $nei_{ca2}M_{756}$, idénticas a $nei_{ca1}M_{756}$.

C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de $nei_{wt}M_{1023}$ (SEQ ID N°: 1) y $nei_{ca1}M_{1023}$ (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 $Pei_{ca1}M_{252}$ (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 $nei_{ca1}HA_{1762}$, 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 $nei_{ca1}HA_{1762}$ codifica una proteína HA de influenza equina de longitud total de alrededor de 565 aminoácidos, referida aquí como $Pei_{ca1}HA_{565}$, 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

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 $nei_{ca1}HA_{1762}$, y $nei_{ca2}HA_{1695}$, idénticas a $nei_{ca1}HA_{1695}$.

- 5 C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de $nei_{wt}HA_{1762}$ (SEQ ID N°: 7) y $nei_{ca1}HA_{1762}$ (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 $Pei_{ca1}HA_{565}$ (SEQ ID N°: 11) revela las siguientes diferencias:

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 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 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 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 $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$, 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 $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$ codifica una porción terminal N de la proteína PB-2 de influenza equina de alrededor de 404 aminoácidos, referida aquí como $P_{ca1}PB2-N_{404}$, 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 $P_{ca1}PB2-N_{404}$, designada $nei_{ca1}PB2-N_{1214}$, 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 $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$, y $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$, idénticas a $nei_{ca1}PB2-N_{1214}$.

- 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 $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$ (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 $P_{ca1}PB2-N_{404}$ (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.

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 $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ 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 $nei_{wt2}PB2-N_{1232}$, con una cadena codificante con una secuencia designada SEQ ID N°: 22. La $nei_{wt2}PB2-N_{1232}$ es idéntica a $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$, excepto que $nei_{wt2}PB2-N_{1232}$ carece de un nucleótido en el terminal 5'. La traducción de la SEQ ID N°: 22 indica que la molécula de ácido nucleico $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ también codifica la $P_{wt}PB2-C_{398}$ (SEQ ID N°: 20), 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°: 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 $nei_{wt2}PB2-C_{1194}$, 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 $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$, 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 $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$ codifica una porción terminal C de la proteína PB-2 de influenza equina de alrededor de 398 aminoácidos, referida aquí como $P_{ca1}PB2-C_{398}$, 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 $P_{ca1}PB2-C_{398}$, designado $nei_{ca1}PB2-C_{1194}$, 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 $nei_{ca1}PB2-N_{1241}$; y la $nei_{ca2}PB2-N_{1214}$, idéntica a la $nei_{ca1}PB2-N_{1214}$.

C. La comparación de las secuencias de ácido nucleico de las cadenas codificantes de $nei_{wt1}PB2-C_{1233}$ (SEQ ID N°: 19) y $nei_{ca1}PB2-C_{1232}$ (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 $P_{ca1}PB2-C_{398}$ (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.

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.

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.

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.

5. Un método para producir virus de influenza equina adaptado en frío que se replica en en huevos embrionados de gallina a una temperatura en el rango de alrededor de 26°C hasta 30°C que comprende los pasos de:

- (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.

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:

- 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.

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.

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.

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 50 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.
- 55 60 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.
- 65 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.

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

<400> 1

5	gcaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg	51
	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr	
	1 5	
10	tac gtt ctc tct atc gta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg	99
	Tyr Val Leu Ser Ile Val 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	ggc 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 gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca aca acc	531
	Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr	
	155 160 165	

ES 2 286 892 T3

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
 5
 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
 10
 gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gtr cag gca atg aga 675
 Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg
 205 210 215
 15
 acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc 723
 Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu
 220 225 230
 20
 ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag 771
 Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln
 235 240 245
 25
 cga ttc aag tgatcctctc gttattgcag caagtatcat tgggatcttg 820
 Arg Phe Lys
 250
 cacttgatat tgtggattct tgatcgctt ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa 880
 30
 tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940
 cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg 1000
 35
 gagtaaaaaa ctaccttggt tct 1023

<210> 2

<211> 252

<212> PRT

<213> Virus de influenza equina H3N8

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

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

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 Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Lys
195 200 205

Ala Arg Gln Met Xaa 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
225 230 235 240

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

<210> 3

<211> 756

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 3

atgagtcttc tgaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcgtaccate agggccccctc 60

aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120

gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggatttta 180

ggattcgtat tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240

caaaatgccc ttaqtqaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaaactgtac 300

aggaagctta aaagagaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcact cagctattcc 360

actgggtgcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420

gaagtggcat ttggcctggc atgcgccaca tgtgaacaga tcgctgatte ccagcatcga 480

tctcacagge agatggtgac aacaaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta 540

ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600

gaggccatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtrc aggcaatgag aaccattggg 660

ES 2 286 892 T3

accacacctta gctccagtgc cggtttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720

cagaaacgga tgggagtgc aatgcagcga ttcaag 756

5

<210> 4

<211> 1023

10 <212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

15 <221> CDS

<222> (25)..(780)

<400> 4

20

gcaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg 51
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr
1 5

25

tac gtt ctc tct atu tta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc ggc 99
Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala
10 15 20 25

30

cag aga ctt gaa gat ctc 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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

ggg 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

65

gtg aca acc gaa gtg gca ttt ggc ctg gta tgc gcc aca tgt gaa cag 483

ES 2 286 892 T3

```

Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln
      140              145              150

5   atc gct gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca ata acc 531
    Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile Thr
      155              160              165

10  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
    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

15  gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gta cag gca atg aga 675
    Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg
      205              210              215

20  acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc 723
    Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu
      220              225              230

25  ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag 771
    Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln
      235              240              245

30  cga ttc aag tgatcctctc gttattgcag caagtatcat tgggatcttg 820
    Arg Phe Lys
      250

35  caattgatat tgtggattct tgatcgccctt ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttaaa 880

    tacggcttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940

40  cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg 1000

    gagtaaaaaa ctaccttggt tct 1023

```

<210> 5

<211> 252

<212> PRT

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 5

```

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Leu Pro
      1              5              10              15

55  Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
      20              25              30

60  Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
      35              40              45

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

65  Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
      65              70              75              80

```

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
 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
 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

```

5      atgagttcttc tgaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tottaccate aggccccctc 60
      aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120
      gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atctgtcac ctctgactaa agggatttta 180
10     ggattcgtat tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
      caaantgccc ttagtggaaa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300
      aggaagctta aaagagaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcact cagctattcc 360
15     actggtgcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420
      gaagtggcat ttggcctggg atgegcacaca tgtgaacaga tcgctgatte ccagcatoga 480
20     tctcacaggc agatggtgac aataaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta 540
      ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600
      gaggecatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtac aggcaatgag aaccattggg 660
25     acccacccta gctccaytgc cytlllyaaa yatyalctcc tlyamaltt gcaggccctac 720
      cagaaacgga tgggagtgca aatgcagcga ttcaag 756

```

30 <210> 7

<211> 1762

<212> DNA

35 <213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

<221> CDS

40 <222> (30)..(1724)

<400> 7

```

45     agcaaaagca ggggatatct ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata 53
      Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile
      1 5
50     cca ctg acc cat tgg ytc tae 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
55     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
60     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
65     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

```

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	
	105 110 115 120	
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	
35	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	
40	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	
45	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	
	235 240 245	
50	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	
55	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	
	265 270 275 280	
60	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	
65	att acä 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	1061
	Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg	
	330 335 340	
5	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	
10	atg gtt gat ggg tgg tat qqa ttc cqa 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	
15	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	
20	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	
25	caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg agg atc cag gac ttg	1301
	Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu	
	410 415 420	
30	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	
35	gaa ttg ctg gtg gct cta aaa aat caa cat aca att gac tta aca gat	1397
	Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp	
	445 450 455	
40	gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa	1445
	Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu	
	460 465 470	
45	aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt	1493
	Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys	
	475 480 485	
50	gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac	1541
	Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr	
	490 495 500	
55	ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt	1589
	Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val	
	505 510 515 520	
60	gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc	1637
	Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala	
	525 530 535	
65	ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg	1685
	Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp	
	540 545 550	
70	gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagtaaact	1734
	Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile	
	555 560 565	
	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 Leu 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
	Phe Lys Leu Lys Thr Gly Lys Ser Ser Val Met Arg Ser Asp Ala Pro	
10	275	280 285
	Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro	
	290	295 300
15	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	
20	325	330 335
	Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly	
	340	345 350
25	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	
30	370	375 380
	Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile	
	385	390 395 400
35	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	
40	420	425 430
	Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn	
	435	440 445
45	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	
50	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

<210> 9
 20 <211> 1695
 <212> DNA
 <213> Virus de la influenza equina H3N8
 25 <400> 9

atgaagacaa ccattatttt gataccactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60
 30 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg 120
 gtaaaaacaa taactgatga ccaattgag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180
 35 atttcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagtte tagatggaag aaattgcaca 240
 ttaatagatg caatgctagg agaccccccac tgtgatgtct ttcagtatga gaattgggac 300
 40 ctcttcatag aaagaagcag cgctttcagc agttgctacc catatgacat ccttgactat 360
 gcatcgctcc ggteccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420
 45 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagggg atcagccgat 480
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttacc cacttgaat 540
 50 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca cctgggggat tcatcaccgc 600
 agtcaaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat cgggacgagt aacagtctca 660
 55 acaaaaagaa gtcaacaac aataatccct aacatcggat ctagaccgcg ggtcaggggt 720
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaac ctggagatat cctaataata 780

ES 2 286 892 T3

aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatatttta aattgaaaac agggaaaagc 840
 tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaatt 900
 5 ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960
 cccaagtata tcaggcaaaa cactttaaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020
 10 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaacgg ctgggaagga 1080
 atggtrgatg ggtggtatgg attccgatat caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca 1140
 15 gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgtatt 1200
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaaat tctcagaagt agaaggagg 1260
 20 atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320
 gaattgctgg tggctctaaa aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaatgaat 1380
 aaattattcg agaagactag acgccagtta agagaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440
 25 tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattg gatcaataag aaatgggaca 1500
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaacaacc ggtttcaaat caaagggtgtt 1560
 30 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680
 35 tgcaacattt 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

agcaaaagca ggggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata 53
 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile
 1 5
 cta ctg acc cat tgg gtc tac agt caa aac cca acc agt ggc aac aac 101

60

65

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	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		
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	tgc	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		
40	gca	gag	gga	ttc	aca	tgg	aca	ggg	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
	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	773
	Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr	
	235 240 245	
5	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	
10	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	
	265 270 275 280	
15	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	
20	att acä 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	
25	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	
30	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	
35	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	
40	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	
45	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	
50	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	
55	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	
60	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	
65	gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat caa cat aca att gac tta aca gat	1397
	Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp	
	445 450 455	

ES 2 286 892 T3

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

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

Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser
 1 5 10 15
 45 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
 50 Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ile Ser Ile Gly
 50 55 60
 55 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
 60 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
 65

ES 2 286 892 T3

	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Gly	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly	
	130						135					140					
5	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	
10					165					170					175		
	Pro	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn	Lys	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	
				180					185					190			
15	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	
20		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		
30	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	
35			275					280						285			
	Ile	Asp	Ile	Cys	Val	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	
		290					295					300					
40	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	
45					325					330					335		
	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				
	Arg	Tyr	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	
55		370					375					380					
	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Val	Ile	
60		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

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

25 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

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 ccattatattt gatactactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60
agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg 120
45 gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180
atttcaatag ggaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240
50 ttaatagatg caatgctagg agagggggag tgtgatgtct ttcatgtatga gaattgggac 300
ctcttcatag aaagaagcag cgctttcagc agttgctacc catatgacat ccttgactat 360
gcacgcgtcc ggtccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420
55 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagggg atcagccgat 480
agttttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttacc cacttgaaat 540
60 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctgggggat tcatcaccgc 600
agctcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat caggacgagt aacagtctca 660
65 acaaaaagaa gtcascaaac aataatccct aacatcggat ctagaccgtg ggtcaggggt 720
caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaac ctggagatat cctaacgata 780

ES 2 286 892 T3

aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatatttta aattgaaaac agggaaaagc 840
 5 tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900
 ggaagcatcc ccaacgacaa accattttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960
 10 cccaagtata tcaggcaaaa cacttttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020
 aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga 1080
 atggttgatg ggtggtatgg attccgatat caaaactcgg aaggaaacagg acaagctgca 1140
 15 gatctaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgtatt 1200
 gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaaggaa tctcagaagt agaagggaga 1260
 20 atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatgggtc ctacaatgca 1320
 gaattgctgg tggtctctaga aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat 1380
 25 aaattattcg agaagactag acgccagtta agagaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440
 tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattg gatcaataag aatggggaca 1500
 tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttcaaat caaaggtggt 1560
 30 gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgtctt 1620
 ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaagg caacatcaga 1680
 tgcacattt gcatt 1695

<210> 13

<211> 1241

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (28)..(1239)

<400> 13

agcaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54
 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
 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
 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
 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	
	75						80					85					
5	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	agg	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	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	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Asp	Cys	Lys	Ile	Ala	Pro	Leu	
				190						195					200		

ES 2 286 892 T3

	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	
5	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	
10	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	
15	ggt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cgg aac	822
	Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn	
	250 255 260 265	
20	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	
25	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc	918
	Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile	
	285 290 295	
30	ctt aag cag aat cca aca gag gaa caa gct gtg gat ata tgc aac gca	966
	Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala	
	300 305 310	
35	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	
40	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 Glu Met Leu	
	330 335 340 345	
45	acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata 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	
50	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	
55	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	
60	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc	1241
	Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe	
	395 400	

<210> 14

<211> 404

<212> PRT

<213> Virus de la influenza equina H3N8

ES 2 286 892 T3

<400> 14

5	Met	Glu	Arg	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Asp	Leu	Met	Ser	Gln	Ser	Arg	Thr	1	5	10	15
	Arg	Glu	Ile	Leu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	Asp	His	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	20	25	30	
10	Lys	Tyr	Thr	Ser	Gly	Arg	Gln	Glu	Lys	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Met	Lys	35	40	45	
15	Trp	Met	Met	Ala	Met	Lys	Tyr	Pro	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Arg	Ile	Met	50	55	60	
20	Glu	Met	Ile	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Gln	Gly	Gln	Thr	Leu	Trp	Ser	Lys	65	70	75	80
	Thr	Asn	Asp	Ala	Gly	Ser	Asp	Arg	Val	Met	Val	Ser	Pro	Leu	Ala	Val	85	90	95	
25	Thr	Trp	Trp	Asn	Arg	Asn	Gly	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Ile	His	Tyr	Pro	100	105	110	
30	Lys	Val	Tyr	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	
35	Val	Asp	Val	Asn	Pro	Gly	His	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Ala	Gln	145	150	155	160
	Asp	Val	Ile	Met	Glu	Val	Val	Phe	Pro	Asn	Glu	Val	Gly	Ala	Arg	Ile	165	170	175	
40	Leu	Thr	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Glu	Lys	Lys	Glu	Glu	180	185	190	
45	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	
50	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	
55	Gln	Ser	Leu	Ile	Ile	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Val	Arg	Arg	Ala	Thr	Val	260	265	270	
60	Ser	Ala	Asp	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Met	Cys	His	Ser	Thr	Gln	275	280	285	
65	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
 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
 340 345 350
 Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365
 Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380
 Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400
 Ala Met Val Phe

<210> 15

<211> 1214

<213> Virus de influenza equina H3N8

<400> 15

atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaat cccgcacccg cgagatacta 60
 acaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaat acacatcagg aagacaagag 120
 aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180
 aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaacctt ttggagcaaa 240
 acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgc acgtgtggaat 300
 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tctacaaaac ttattttgaa 360
 aaagttgaaa gattaanaaa cggaaccttt ggccccgttc attttaggaa tcaagtcaag 420
 ataagacgga gagttgatgt aaaccttggc cagcggacc tcagtgccaa agaagcacia 480
 gatgtgatca tgggaagtgt tttcccaat gaagtgggag ccagaattct aacatcgga 540
 tcacaactaa caataacca agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600
 ttgatggtat catatcatgt agaaaagag ttggtccgaa aaacaaatt cctcccagtg 660
 gctggcgga caagcagtgt atacattgaa gtgttgcac tgactcaggg aacatgctgg 720
 gaacaaatgt acaccccgagg aggagaagt agaaacgat acattgatca aagtttaatt 780
 attgctgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840
 ctggaaatgt gccacagtac acagattggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900
 aatccaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaaacgag caatgggggt aagaattagc 960
 tcatcattca gctttggtgg attcaccttt aagagaacaa gtggatcac agtcaagaga 1020
 gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattgaaaa taagagtgc tgaaggctat 1080

ES 2 286 892 T3

gaagaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140
 ttgattcaat tgatagtaag tgggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgta 1200
 5 gccatggtgt tttc 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

agcaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54
 Met Glu Arg Ile Lys Glu Leu Arg Asp
 25 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
 45 60 65 70

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
 50 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
 55 90 95 100 105

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
 60 110 115 120

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
 65 125 130 135

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

ES 2 286 892 T3

5	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
10	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
15	acc aaa gag aaa aaa gaa gaa ctt cag gac tgc aaa att gcc ccc ttg 630 Thr Lys Glu Lys Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu 190 195 200
20	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
25	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
30	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
35	gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cgg aac 822 Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn 250 255 260 265
40	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
45	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc 918 Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile 285 290 295
50	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
55	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
60	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 Glu Met Leu 330 335 340 345
65	acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata 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
70	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
75	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 1241.
 Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe
 395 400

- 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

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 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

45 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
 165 170 175
 5 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
 20 Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu Thr Gln Gly Thr Cys Trp
 225 230 235 240
 25 Glu Gln Met Tyr Thr Pro Gly Gly Glu Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp
 245 250 255
 30 Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn Ile Val Arg Arg Ala Thr Val
 260 265 270
 35 Ser Ala Asp Pro Leu Ala Ser Leu Leu Glu Met Cys His Ser Thr Gln
 275 280 285
 40 Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile Leu Lys Gln Asn Pro Thr Glu
 290 295 300
 45 Glu Gln Ala Val Asp Ile Cys Lys Ala Ala Met Gly Leu Arg Ile Ser
 305 310 315 320
 50 Ser Ser Phe Ser Phe Gly Gly Phe Thr Phe Lys Arg Thr Ser Gly Ser
 325 330 335
 55 Ser Val Lys Arg Glu Glu Glu Met Leu Thr Gly Asn Leu Gln Thr Leu
 340 345 350
 60 Lys Ile Arg Val His Glu Gly Tyr Glu Glu Phe Thr Met Val Gly Arg
 355 360 365
 65 Arg Ala Thr Ala Ile Leu Arg Lys Ala Thr Arg Arg Leu Ile Gln Leu
 370 375 380
 70 Ile Val Ser Gly Arg Asp Glu Gln Ser Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val
 385 390 395 400
 75 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
 acaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120
 aagaaccccc cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aataccaat tacagcagat 180

ES 2 286 892 T3

```

aagaggataa tggaaatgat tcttgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240
acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgc acgtgtggaat 300
5 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tccacaaaac ttattttgaa 360
aaagttgaaa gattaaaaca cggaaaccttt ggccccgttc atttttaggaa tcaagtcaag 420
10 ataagacgga gagttgatgt aaaccttgggt cacgcggacc tcagtgcgca agaagcaca 480
gatgtgatca tggaaagtgt tttcccaa at gaagtgggag ccagaattct aacatcgga 540
15 tcacaactaa caataacca agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600
ttgatggtag catacatgct agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccagt 660
gctggcgga caagcagtgt atacattgaa gtgttgcac tgactcaggg aacatgctgg 720
20 gaacaaatgt acaccccagg aggagaagt agaaacgatg acattgatca aagtttaatt 780
attgctgcc gccacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840
25 ctggaaatgt gccacagtac acagattgggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900
aatccaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaagcag caatgggggtt aagaattagc 960
30 tcatcattca gctttgggtg attcaccttt aagagaacaa gtggatcac agtcaagaga 1020
gaagaagaaa tgcttacggg caacottcaa acattgaaa taagagtgc tgaaggctat 1080
gaagaattca caatgggtcg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140
35 ttgattcaat tgataqtaag tgggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgta 1200
gccatggtgt tttc
1214

```

<210> 19

<211> 1232

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(1196)

<400> 19

```

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

```

ES 2 286 892 T3

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

ES 2 286 892 T3

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

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

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

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

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

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

tagtgttgaa ttgttttaaaa acgaccttgt ttctact 1233

<210> 20

<211> 398

<212> PRT

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 20

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 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

Ala Lys Val Leu Phe Gln Asn Trp Gly Ile Glu Pro Ile Asp Asn Val
 85 90 95

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 Asp 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
 Ile Arg Asn Trp Glu Ile Val Lys Ile Gln Trp Ser Gln Asp Pro Thr
 195 200 205
 20 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
 Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu
 290 295 300
 40 Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu
 305 310 315 320
 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
 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

<210> 21

<211> 1194

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

ES 2 286 892 T3

<400> 21

```

5      gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60
      attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattg ctgaagcaat aattgtagcc 120
      atgggtgtttt cgcaagaaga ttgcatgata aaagcagttc gaggcgattt gaacttcgtt 180
10     aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240
      gcaaaagtgc ttttccagaa ttgggggatt gaacccatcg acaatgtgat ggggaatgat 300
15     ggaatattgc ctgacatgac cccaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360
      aaaatgggag tggatgagta ctccagcact gagagagtgg tggtgagcat tgaccgtttt 420
20     ttaagagtcc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaaca 480
      caaggaacgg aaaagctgac aataatttat tcatcatcaa tgatgtggga gattaatggg 540
      cccgaatcag tgttggtcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600
25     attcaatggc cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660
      tccctgggtcc ctagggccac cagaagccaa tacagcgggt tcgtaagaac cctgtttcag 720
30     caaatgcgag atgtacttgg aacatttgat actgctcaaa taataaaact cctccctttt 780
      gccgtgtctc ctccggaaca gagtaggatg cagttctctt ctttgactgt taatgtaaga 840
35     ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900
      actaagaggc tcacagtctt cggaaaggat gcayylguyt ttactgaaga ccagatgaa 960
40     ggtacggctg gagtagaatc tgctgttcta agagggtttc tcatttttagg taaagaaaac 1020
      aagagatatg gccagcact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080
      gctaattgtc taattgggca aggggacgtg gtgttggtaa tgaaacggaa acgtgactct 1140
45     agcatactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc ggatggccat caat      1194

```

<210> 22

<211> 1232

50 <212> DNA

<213> Virus de influenza equina H3N8

<400> 22

```

55     agaattcaca atggtcgga gaaagagcaac agccattctc agaaaggcaa ccagaagatt 60
      gattcaattg atagtaagtg ggagagatga acaatcaatt gctgaagcaa taattgtagc 120
60     catgggtgttt tgcgaagaag attgcatgat aaaagcagtc cgaggcgatt tgaacttcgt 180
      taatagagca aatcagcgct tgaaccccat gcatcaactc ttgaggcatt tccaaaaaga 240
      tgcaaaagtg cttttccaga attgggggat tgaacccatc gacaatgtga tgggaatgat 300
65     tggaaatttg cctgacatga cccaagcac cgagatgtca ttgagaggag tgagagtcag 360

```

ES 2 286 892 T3

caaaatggga gtggatgagt actccagcac tgagagagtg gtggtgagca ttgaccgttt 420
 ttttaagagtt cgggatcaaa ggggaaacat actactgtcc cctgaagagg tcagtgaaac 480
 5 acaaggaacg gaaaagctga caataattta ttcacatca atgatgtggg agattaatgg 540
 tcccgaatca gtgttggtca atacttatca atggatcatc aggaactggg aaattgtgaa 600
 10 aattcaatgg tcacaggatc ccacaatgtt atacaataag atagaatttg agccattcca 660
 gtccctgggc cctagggcca ccagaagcca atacagcggg ttcgtaagaa ccctgtttca 720
 15 gcaaattgca gatgtacttg gaacatttga tactgtctca ataataaaac tcttcccttt 780
 tgccgtgtct cctccggaaac agagtaggat gcagttctct tctttgactg ttaatgtaag 840
 aggatcggga atgaggatac ttgtaagagg caattcccca gtgttcaact acaataaagc 900
 20 cactaagagg ctcacagtc tgggaaagga tgcaggtgcg cttactgaag acccagatga 960
 aggtacggct ggagtagaat ctgctgttct aagaggggtt ctcatttttag gtaagaaaa 1020
 25 caagagatat ggcccagcac taagcatcaa tgaactgagc aaacttgca aaggggagaa 1080
 agctaattgtg ctaattgggc aaggggacgt ggtgttggtg atgaaacgga aacgtgactc 1140
 tagcatactt actgacagcc agacagcgac caaaaggatt cggatggcca tcaattagtg 1200
 30 ttgaattgtt taaaaacgac cttgtttcta ct 1232

<210> 23

<211> 1232

<212> DNA

<213> Virus de la Influenza equina H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(1195)

<400> 23

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
 50 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
 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
 65 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

ES 2 286 892 T3

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

ES 2 286 892 T3

ggt acg gct gga gta gaa tct gct gtt cta aga ggg ttt ctc att tta 1009
Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu
325 330 335

5

ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctg 1057
Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu
340 345 350

10

agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa ggg 1105
Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly
355 360 365

15

gac gtg gtg ttg gta atg aaa cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act 1153
Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr
370 375 380

20

gac agc gag aca gcg acc aaa agg att cgg atg gcc atc aat 1195
Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
385 390 395

25

tagtggtgaa ttgtttaaaa acgaccttgt ttctact 1232

<210> 24

<211> 398

30 <212> PRT

<213> Virus de Influenza equina H3N8

<400> 24

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

Met Ile Gln Ala Val Arg Gly Asp Leu Asn Phe Val Asn Arg Ala Asn
50 55 60

50

Gln Arg Leu Asn Pro Met His Gln Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp
65 70 75 80

55

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
	Ser Thr Glu	Arg Val Val	Val Ser Ile	Asp Arg Phe	Leu Arg Val	Arg
10		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
	Glu Ile Asn	Gly Pro Glu	Ser Val Leu	Val Asn Thr	Tyr Gln Trp	Ile
20		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
	Arg Ala Thr	Arg Ser Gln	Tyr Ser Gly	Phe Val Arg	Thr Leu Phe	Gln
30		225		230		235
	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
	Ser Ser Leu	Thr Val Asn	Val Arg Gly	Ser Gly Met	Arg Ile Leu	Val
40		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
	Gly Thr Ala	Gly Val Glu	Ser Ala Val	Leu Arg Gly	Phe Leu Ile	Leu
50		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 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 cagaagattg 60
      attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattg ctgaagcaat aattgtagcc 120
      atgggtgtttt cgcaagaaga ttgcatgata caagcagttc gaggcgattt gaacttcggt 180
15      aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240
      qcaaaaqtgc ttttccagaa ttgggggatt gaaccccatcg acaatgtgat ggggaatgatt 300
20      ggaatattgc ctgacatgac cccaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360
      aaaatgggag tggatgagta ctccagcact gagagagtgg tggtgagcat tgaccgtttt 420
25      ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaaca 480
      caaggaacgg aaaagctgac aataatttat tcatcatcaa tgatgtggga gattaatggt 540
30      cccgaatcag tgttgggtcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600
      attcaatggg cacaggatcc cacmatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660
35      tccctgggtcc ctagggccac cagaagccaa tacagcgggt tcgtaagaac cctgtttcag 720
      caaatgcgag atgtacttgg aacatttggat actgctcaaa taatanaact cctccctttt 780
40      gccgctgctc ctccggaaca gaggtaggat gaggttctct ctttgactgt taatgtaaga 840
      ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900
45      actaagaggc tcacagtcct cggaaaagat gcagggtgccc ttactgaaga cccagatgaa 960
      ggtacggctg gagtagaatc tgctgttcta agagggtttc tcatttttagg taaagaaaac 1020
      aagagatatg gccagcact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080
50      gctaattgtc taattgggca aggggacgtg gtgttggtaa tgaaacggaa acgtgactct 1140
      agcatactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc ggatggccat caat      1194

```

55 <210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética

65 <400> 26

agcaaaagca ggtagatatt gaa

23

ES 2 286 892 T3

	<210> 27	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
10	<400> 27	
	agtagaaaca aggtagtttt ttac	24
15	<210> 28	
	<211> 18	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
25	<400> 28	
	caggaaacag ctatgacc	18
30	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
40	<400> 29	
	taatacgact cactataggg	20
45	<210> 30	
	<211> 18	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
55	<400> 30	
	tggtgcacta gccagctg	18
60	<210> 31	
	<211> 18	
	<212> DNA	
65	<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 ggggatattt ctg		23
25	<210> 33		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética		
35	<400> 33		
	agtagaaaca aggtgtttt 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>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
10	<400> 36	
	agcaaaagca ggtcaaatat attca	25
15	<210> 37	
	<211> 26	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
25	<400> 37	
	gaaaacacca tggctacaat tattgc	26
30	<210> 38	
	<211> 27	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
40	<400> 38	
	agaattcaca atggtcggaa gaagagc	27
45	<210> 39	
	<211> 27	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: Plantilla sintética	
55	<400> 39	
	agtagaaaca aggtcgtttt taaaca	27
60	<210> 40	
65		

ES 2 286 892 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Pittsburg, of the Commonwealth

<120> DE INFLUENZA EQUINA ADAPTADO EN FRÍO V

<130> HKZ-033CPPC

<140> no asignado aún

<141> 1999-08-12

<150> 09/133,921

<151> 1998-08-13

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1023

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(780)

<400> 1

```

gcaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg      51
                               Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr
                               1               5

tac gtt ctc tct atc gta cca tca ggc ccc ctc aaa gcc gag atc gcg      99
Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala
10               15               20               25

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

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

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

```

ES 2 286 892 T3

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 atc gct gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca aca acc 531
 Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr
 155 160 165

30 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

35 gct aaa gcc atg gag cag atg gca ggg tgc 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

40 gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gtr cag gca atg aga 675
 Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Xaa Gln Ala Met Arg
 205 210 215

45 acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc 723
 Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu
 220 225 230

ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag 771
 Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln
 235 240 245

50 cga ttc aag tgatcctctc gttattgcag caagtatcat tgggatcttg 820
 Arg Phe Lys
 250

55 cacttgatat tgtggattct tgatcgccct ttcttcaaat tcatttatcg tcgccttcaa 880

60 tacgggttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940

cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt gacgatggtc attttgtcaa catagagctg 1000

65 gagtaaaaaa ctaccttggt 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 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      atgagtcctc tgaccgaggt cgaaacgtac gttctctcta tcgtaccatc agggcccccctc 60
      aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120
15      gcactcatgg aatgyctaaa yucmagaacca atcctgtcac ctctgactaa agggattctta 180
      ggattcgtat tcacgctcac cgtgccaggt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
20      caaatgccc ttagtgga aa cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300
      aggaagctta aaagagaaat aacattccat ggggcanaag aggtggcact cagctattcc 360
25      actggtgcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420
      gaagtggcat ttggcctggt atgcgccaca tgtgaacaga tcgctgattc ccagcatcga 480
30      tctcacaggc agatggtgac aacaaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta 540
      ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600
35      gaggccatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtrc aggcnaatgag aaccattggg 660
      acccacccta gctccagtgc cggtttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720
      cagaaacgga tgggagtgca aatgcagcga ttcaag 756

```

40 <210> 4

<211> 1023

<212> DNA

45 <213> Virus de la Influenza equina H3N8

<220>

<2211> CDS

50 <222> (25)..(780)

55

60

65

ES 2 286 892 T3

<400> 4

5	gcaaaaagcag gtagatattt aaag atg agt ctt ctg acc gag gtc gaa acg	51
	Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr	
	1 5	
10	tac gtt ctc tct atc tta cca tca ggc ccc ctc aaa 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	ggg 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 gat tcc cag cat cga tct cac agg cag atg gtg aca ata 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 acc	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 tgc 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

gcc atg gag gtt gct agt aag gct agg cag atg gta cag gca atg aga 675
 Ala Met Glu Val Ala Ser Lys Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg
 205 210 215

5 acc att ggg acc cac cct agc tcc agt gcc ggt ttg aaa gat gat ctc 723
 Thr Ile Gly Thr His Pro Ser Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu
 220 225 230

10 ctt gaa aat ttg cag gcc tac cag aaa cgg atg gga gtg caa atg cag 771
 Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln
 235 240 245

15 cga ttc aag tgatcctctc gttattgcag caagtatcat tgggatcttg 820
 Arg Phe Lys
 250

20 cacttgatat tgtggattct tgatcgccctt ttcttcaaat tcatttatcg tgccttaaa 880
 tacggcttga aaagagggcc ttctacggaa ggagtacctg agtctatgag ggaagaatat 940
 cggcaggaac agcagaatgc tgtggatggt gacgatggtc atttctgtcaa catagagctg 1000

25 gagtaaaaaa ctaccttgtt tct 1023

<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
 Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30
 Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45
 Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60
 Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
 65 70 75 80
 Gln Asn Ala Leu 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
 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
 Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
 145 150 155 160

65

ES 2 286 892 T3

Ser His Arg Gln Met Val Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
 165 170 175
 5 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
 10 195 200 205
 Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
 210 215 220
 15 Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240
 Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 20 245 250
 <210> 6
 <211> 756
 <212> DNA
 25 <213> Virus de la influenza equina H3N8
 <400> 6
 30 atgagtcttc tgaccgaggt cgaacgtac gttctctcta tcttaccatc agggcccttc 60
 aaagccgaga tcgcgcagag acttgaagat gtctttgcag ggaagaacac cgatcttgag 120
 gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa agggatttta 180
 35 ggattcgtat tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc 240
 caaaatgcc ttagtggaac cggagatcca aacaacatgg acagagcagt aaaactgtac 300
 40 aggaagctta aaagagaaat aacattccat ggggcaaaag aggtggcact cagctattcc 360
 actggtgcac tagccagctg catgggactc atatacaaca gaatgggaac tgtgacaacc 420
 45 gaagtggcat ttggcctggg atgcgccaca tgtgaacaga tcgctgattc ccagcatcga 480
 tctcacaggc agatggtgac aataaccaac ccattaatca gacatgaaaa cagaatggta 540
 50 ttagccagta ccacggctaa agccatggag cagatggcag ggtcgagtga gcaggcagca 600
 gaggccatgg aggttgctag taaggctagg cagatggtag aggcaatgag aaccattggg 660
 55 acccacccta gctccagtgc cggtttgaaa gatgatctcc ttgaaaattt gcaggcctac 720
 cagaaacgga tgggagtgca aatgcagcga ttcaag 756
 <210> 7
 60 <211> 1762
 <212> DNA
 <213> Virus de la influenza equina H3N8
 65 <220>
 <221> cds
 <222> (30)..(1724)

ES 2 286 892 T3

<400> 7

5	agcaaaagca ggggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata	53
	Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile	
	1 5	
10	cca ctg acc cat 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	
20	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	
25	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	
30	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	
35	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	
40	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	
45	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	
50	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	
55	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	
60	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	
65	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	
70	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	
75	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	773
	Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr	
	235 240 245	
5	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	
10	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	
	265 270 275 280	
15	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	
20	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	
25	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	
30	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	
35	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	
40	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	
45	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	
50	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	
55	caa ata gag aag gaa ttc tca gaa gta gaa ggg agg atc cag gac ttg	1301
	Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu	
	410 415 420	
60	gag aag tat gta gaa gac acc aaa sta 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	
65	gaa ttg ctg gtg gct cta aaa aat caa cat aca att gac tta aca gat	1397
	Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp	
	445 450 455	
70	gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa	1445
	Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu	
	460 465 470	

ES 2 286 892 T3

```

aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt 1493
Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
      475                480                485

5   gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac 1541
    Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr
      490                495                500

10  ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtt 1589
    Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
    505                510                515                520

15  gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc 1637
    Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
      525                530                535

20  ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg 1685
    Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
      540                545                550

25  gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagtaaact 1734
    Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
      555                560                565

gatagttaaa aacacccttg tttctact 1762

30  <210> 8
    <211> 565
    <212> PRT
35  <213> Virus de la influenza equina H3N8

    <400> 8

40  Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu 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
45  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
50  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
55  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
60  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
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
 195 200 205
 10 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
 Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp
 245 250 255
 20 Ile Leu Met 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
 25 Ile Asp Ile Cys Val Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro
 290 295 300
 30 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
 Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly
 340 345 350
 40 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
 Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val Ile
 385 390 395 400
 50 Glu Arg Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu
 405 410 415
 55 Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys
 420 425 430
 Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Lys Asn
 435 440 445
 60 Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu
 450 455 460
 65 Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly 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
 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
 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
 Cys Asn Ile Cys Ile
 565

<210> 9

<211> 1695

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 9

atgaagacaa ccattatctt gataccactg acccattggg tctacagtca aaacccaacc 60
 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaacattg 120
 gtaaaaacaa taactgatga ccaaatggag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180
 atttcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240
 ttaatagatg caatgctagg agacccccac tgtgatgtct ttcagtatga gaattgggac 300
 ctcttcatag aaagaagcag cgctttcagc agttgctacc catatgacat ccttgactat 360
 gcatcgctcc ggtccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agagggattc 420
 acatggacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaagggg atcagccgat 480
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttacct cacattgaat 540
 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctgggggat tcatcaccgc 600
 agtcaaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat cgggacgagt aacagtctca 660
 acaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcggat ctagaccgcg ggtcaggggt 720
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaaac ctggagatat cctaatagata 780

ES 2 286 892 T3

	aacagttaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatatttta aattgaaaac agggaaaagc	840
	tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaa	900
5	ggaaagcatcc ccaacgaca accatttcga aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc	960
	cccaggtata tcaggcaaaa cactttaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa	1020
10	aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg ctgggaagga	1080
	atggttgatg ggtggtatgg attccgatat caaaactcgg aaggaacagg acaagctgca	1140
15	gatctaaaga gcactcaagc agccatcgac cagatcaatg gaaaattaaa cagagtgatt	1200
	gaaaggacca atgagaaatt ccatcaata gagaaggaat tctcagaagt agaagggagg	1260
20	atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca	1320
	gaattgctgg tggctctaaa aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaaatgaat	1380
25	aaattattcg agaagactag acgccagtta agagaaaacg cggaagacat gggagggtgga	1440
	tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattg gatcaataag aaatgggaca	1500
	tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacacc ggtttcaaat caaagggtgtt	1560
30	gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcggcat atcatgcttc	1620
	ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaaggg caacatcaga	1680
35	tgcacattt gcatt	1695

 $\langle 210 \rangle$ 10

<211> 1762

40 <212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

 $\langle 220 \rangle$ 45 $\langle 221 \rangle$ CDS

<222> (30)..(1724)

 $\langle 400 \rangle$ 10

50	agcaaaagca ggggatattt ctgtcaatc atg aag aca acc att att ttg ata	53
	Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile	
	1 5	
55	cta ctg acc cat tgg gtc tac agt caa aac cca acc agt ggc aac aac	101
	Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser Gly Asn Asn	
	10 15 20	
	aca gcc aca tta tgt ctg gga cac cat gca gta gca aat gga aca ttg	149
60	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	
65	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	

ES 2 286 892 T3

	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	
5		
	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	
10		
	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	
15		
	gca tgc 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	
20		
	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	
25		
	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	
30		
	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	
35		
	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	
40		
	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	
45		
	gta aca gtc tca aca aaa aga agt caa caa aca ata atc cct aac atc	723
	Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn Ile	
	220 225 230	
50		
	gga tct aga ccg tgg gtc agg ggt caa tca ggc agg ata agc ata tac	773
	Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr	
	235 240 245	
55		
	tgg acc att gta aaa cct gga gat atc cta acg ata aac agt aat ggc	821
	Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Thr Ile Asn Ser Asn Gly	
	250 255 260	
60		
	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	
	265 270 275 280	
65		
	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	
	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	

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	

ES 2 286 892 T3

gaa ttg ctg gtg gct cta gaa aat caa cat aca att gac tta aca gat 1397
 Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp
 445 450 455
 5
 gca gaa atg aat aaa tta ttc gag aag act aga cgc cag tta aga gaa 1445
 Ala Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu
 460 465 470
 10
 aac gcg gaa gac atg gga ggt gga tgt ttc aag ata tac cac aaa tgt 1493
 Asn Ala Glu Asp Met Gly Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys
 475 480 485
 15
 gat aat gca tgc att gga tca ata aga aat ggg aca tat gac cat tac 1541
 Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr
 490 495 500
 20
 ata tac aga gat gaa gca tta aac aac cgg ttt caa atc aaa ggt gtc 1589
 Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val
 505 510 515 520
 25
 gag ttg aaa tca ggc tac aaa gat tgg ata ctg tgg att tca ttc gcc 1637
 Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala
 525 530 535
 30
 ata tca tgc ttc tta att tgc gtt gtt cta ttg ggt ttc att atg tgg 1685
 Ile Ser Cys Phe Leu Ile Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp
 540 545 550
 35
 gct tgc caa aaa ggc aac atc aga tgc aac att tgc att tgagtaaaact 1734
 Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 555 560 565
 gatagttaaa aacacccttg tttctact 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 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
 Leu Ile Asp Ala Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr
 85 90 95
 65 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					
	Val	Thr	Gln	Asn	Gly	Arg	Ser	Gly	Ser	Cys	Lys	Arg	Glu	Ser	Ala	Asp	
10						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			
	Tyr	Ile	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Ser	Asn	Lys	Glu	Gln	Thr	Lys	
20				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	
	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	
30					245					250					255		
	Ile	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	
35				260					265					270			
	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						
	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Lys	Val	Thr	Tyr	Gly	Lys	Cys	
45		305				310					315					320	
	Pro	Lys	Tyr	Ile	Arg	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	
				325					330						335		
50	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				
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
 Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Tyr Ile Tyr Arg Asp Glu Ala Leu Asn
 500 505 510
 15 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
 20 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
 25 565

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

atgaagacaa ccattatattt gatactactg acccattggg tctacagtca aaaccaacc 60
 agtggcaaca acacagccac attatgtctg ggacaccatg cagtagcaaa tggaaacattg 120
 40 gtaaaaacaa taactgatga ccaaattgag gtgacaaatg ctactgaatt agttcagagc 180
 atttcaatag ggaaaatatg caacaactca tatagagttc tagatggaag aaattgcaca 240
 45 ttaantagatg caatgctagg agacccccac tgtgatgtct ttcagtatga gaattgggac 300
 ctcttcatag aaagaagcag cgcttttcagc agttgctacc catatgacat ccctgactat 360
 50 gcatcgctcc ggtccattgt agcatcctca ggaacattgg aattcacagc agaggggattc 420
 acatgyacag gtgtcactca aaacggaaga agtggatcct gcaaaaggga atcagccgat 480
 agtttcttta gccgactgaa ttggctaaca gaatctggaa actcttacc cacttgaat 540
 55 gtgacaatgc ctaacaataa aaatttcgac aaactataca tctgggggat tcatcaccgc 600
 agtcaaaca aagagcagac aaaattgtac atccaagaat caggacgagt aacagtctca 660
 60 acaaaaagaa gtcaacaaac aataatccct aacatcggat ctgacccgtg ggtcaggggt 720
 caatcaggca ggataagcat atactggacc attgtaaac ctggagatat cctaaccgata 780

65

ES 2 286 892 T3

```

aacagtaatg gcaacttagt tgcaccgcgg ggatatttta aattgaaaac agggaaaagc 840
tctgtaatga gatcagatgc acccatagac atttgtgtgt ctgaatgtat tacaccaaat 900
ggaagcatcc ccaacgacaa accatttcaa aatgtgaaca aagttacata tggaaaatgc 960
cccaagtata tcaggcaaaa cactttaaaag ctggccactg ggatgaggaa tgtaccagaa 1020
aagcaaatca gaggaatctt tggagcaata gcgggattca tagaaaacgg' ctgggaagga 1080
atggttgatg ggtggtatgg attccgatat caaaactcgg aaggaaacagg acaagctgca 1140
gatctaaaqa gcactcaagc agccatcgac caqatcaatg gaaaattaaa cagagtgtatt 1200
gaaaggacca atgagaaatt ccatcaaata gagaagggaat tctcagaagt agaaggggaga 1260
atccaggact tggagaagta tgtagaagac accaaaatag acctatggtc ctacaatgca 1320
gaattgctgg tggctctaga aaatcaacat acaattgact taacagatgc agaatgaat 1380
aaattattcg agaagactag acgccagtta agagaaaacg cggaagacat gggaggtgga 1440
tgtttcaaga tataccacaa atgtgataat gcatgcattg gatcaataag aaatgggaca 1500
tatgaccatt acatatacag agatgaagca ttaaacaacc ggtttccamat caaaggtggt 1560
gagttgaaat caggctacaa agattggata ctgtggattt cattcgccat atcatgcttc 1620
ttaatttgcg ttgttctatt gggtttcatt atgtgggctt gccaaaaagg caacatcaga 1680
tgcaacattt gcatt

```

1695

<210> 13

<211> 1241

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<220>

<221> cds

<222> (28).. (1239)

<400> 13

```

agcaaaagca ggtcaaatat attcaat atg gag aga ata aaa gaa ctg aga gat 54
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
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
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
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	
	75 80 85	
5	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 agg 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 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 Lys Glu Glu Leu Gln Asp Cys Lys Ile Ala Pro Leu	
	190 195 200	

ES 2 286 892 T3

	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	
5	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	
10	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	
15	gtt aga aac gat gac att gat caa agt tta att att gct gcc cgg aac	822
	Val Arg Asn Asp Asp Ile Asp Gln Ser Leu Ile Ile Ala Ala Arg Asn	
	250 255 260 265	
20	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	
25	gaa atg tgc cac agt aca cag att ggt gga ata agg atg gta gac atc	918
	Glu Met Cys His Ser Thr Gln Ile Gly Gly Ile Arg Met Val Asp Ile	
	285 290 295	
30	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	
35	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	
40	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 Glu Met Leu	
	330 335 340 345	
45	acg ggc aac ctt caa aca ttg aaa ata 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	
50	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	
55	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	
60	att gct gaa gca ata att gta gcc atg gtg ttt tc	1241
	Ile Ala Glu Ala Ile Ile Val Ala Met Val Phe	
	395 400	

<210> 14

<211> 404

65 <212> PRT

<213> Virus DE la influenza equina H3N8

ES 2 286 892 T3

<400> 14

5	Met	Glu	Arg	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Asp	Leu	Met	Ser	Gln	Ser	Arg	Thr	1	5	10	15
	Arg	Glu	Ile	Leu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	Asp	His	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	20	25	30	
10	Lys	Tyr	Thr	Ser	Gly	Arg	Gln	Glu	Lys	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Met	Lys	35	40	45	
15	Trp	Met	Met	Ala	Met	Lys	Tyr	Pro	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Arg	Ile	Met	50	55	60	
	Glu	Met	Ile	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Gln	Gly	Gln	Thr	Leu	Trp	Ser	Lys	65	70	75	80
20	Thr	Asn	Asp	Ala	Gly	Ser	Asp	Arg	Val	Met	Val	Ser	Pro	Leu	Ala	Val	85	90	95	
25	Thr	Trp	Trp	Asn	Arg	Asn	Gly	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Ile	His	Tyr	Pro	100	105	110	
	Lys	Val	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Val	Glu	Arg	Leu	Lys	His	Gly	115	120	125	
30	Thr	Phe	Gly	Pro	Val	His	Phe	Arg	Asn	Gln	Val	Lys	Ile	Arg	Arg	Arg	130	135	140	
35	Val	Asp	Val	Asn	Pro	Gly	His	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Ala	Gln	145	150	155	160
40	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	
45	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	
50	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	
55	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	
60	Ile	Gly	Gly	Ile	Arg	Met	Val	Asp	Ile	Leu	Lys	Gln	Asn	Pro	Thr	Glu	290	295	300	
65	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
 10 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

atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaaat cccgcacccg cgagatacta 60
 30 acaaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120
 aagaaccccg cacttaggat gaagtggatg atggcaatga aatacccaat tacagcagat 180
 aagaggataa tggaaatgat tcttgagaga aatgaacagg ggcaaaccct ttggagcaaa 240
 35 acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgac atggtggaat 300
 aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tctacaaaac ttattttgaa 360
 40 aaagttnaa gattaaaaca cggaaacctt ggccccgttc atttttaggaa tcaagtcaag 420
 ataagacgga gagttgatgt aaaccttggc cacgcggacc tcagtgccaa agaagcacaa 480
 gatgtgatca tggaaagtgt tttcccaa atgaagtggg ccagaattct aacatcgga 540
 45 tcacaactaa caataaccaa agagaaaaa gaagaacttc aggaactgca aattgcccc 600
 ttgatggtag catatagct agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccagtg 660
 gctggcggaa caagcagtg atacattgaa gtgttgcatc tgactcaggg aacatgctgg 720
 50 gaacaaatgt acaccccagg aggagaagt agaaacgatg acattgatca aagtttaatt 780
 attgctgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840
 ctggaaatgt gccacgtac acagattggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900
 55 aatccaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaaacgag caatgggggt aagaattagc 960
 tcatcattca gctttggtgg attcacctt aagagaacaa gtggatcatc agtcaagaga 1020
 60 gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattgaaaa taagagtgc tgaaggctat 1080
 gangaattca caatggtcgg aagaagagca acagccattc tcagaaaggc aaccagaaga 1140
 ttgattcaat tgatagaa tgaggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgca 1200
 65 gccatggtgt tttc 1214

ES 2 286 892 T3

<210> 16

 $\langle 211 \rangle$ 1241

<212> DNA

5 <213> Virus de la Influenza equina H3N8

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

10 $\langle 222 \rangle$ (28)..(1239)

<400> 16

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

[illegible]

gac cac atg gcc ata atc aag aaa tac acg 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

[illegible]

35 acc gca gat aag agg ata atg ga~~a~~ 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

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

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

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

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

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

60 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

5	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
10	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
15	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
20	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
25	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
30	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
35	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
40	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
45	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
50	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
55	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
60	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
65	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
70	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
75	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

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

      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

      Glu Met Ile Pro Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Trp Ser Lys
25      65           70           75           80

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

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

      Lys Val His Lys Thr Tyr Phe Glu Lys Val Glu Arg Leu Lys His Gly
35      115          120          125

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

40      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 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

<213> Virus de la influenza equina H3N8

ES 2 286 892 T3

<400> 18

```

5      atggagagaa taaaagaact gagagatcta atgtcacaaat cccgcacccg cgagatacta 60
      acaaaaacta ctgtggacca catggccata atcaagaaat acacatcagg aagacaagag 120
      agaaccccy cacttaggat gaugtggatg atggcaatga aataccaat tacagcagat 180
10     aagaggataa tggaaatgat tcctgagaga aatgaacagg ggcaaacctt ttggagcaaa 240
      acgaacgatg ctggctcaga ccgcgtaatg gtatcacctc tggcagtgc acgttggaat 300
15     aggaatggac caacaacgag cacaattcat tatccaaaag tccacaaaac ttattttgaa 360
      aaagttagaa gattaanaca cggaaacctt ggccccgttc atttttagaa tcaagtcaag 420
      ataagacgga gagttgatgt aaacctggt cacgcggacc tcagtgccaa agaagcaca 480
20     gatgtgatca tggaaattgt tttcccaaat gaagtgggag ccagaattct aacatcgga 540
      tcacaactaa caataacca agagaaaaaa gaagaacttc aggactgcaa aattgcccc 600
25     ttgatggtag catacatgct agaaagagag ttggtccgaa aaacaagatt cctcccagt 660
      gctggcgga caagcagtgt atacattgaa gtgttgcatc tgactcaggg aacatgctgg 720
30     gaacaaatgt acaccccagg aggagaagt agaaacgatg acattgatca aagttaaatt 780
      attgctgccc ggaacatagt gagaagagcg acagtatcag cagatccact agcatccctg 840
35     ctggaaatgt gccacagtac acagattggt ggaataagga tggtagacat ccttaagcag 900
      atacaacag aggaacaagc tgtggatata tgcaaacgag caatgggggt aagaattagc 960
40     tcatcattca gctttggtgg attcacctt aagagaacaa gtggatcatc agtcaagaga 1020
      gaagaagaaa tgcttacggg caaccttcaa acattgaaaa taagagtgc tgaaggctat 1080
45     gaagaattca caatggctcg aagaagagca acagccattc tcagaagggc aaccagaaga 1140
      ttgattcaat tgatagtaag tgggagagat gaacaatcaa ttgctgaagc aataattgta 1200

50     gccatgggtt tttc
                                           1214

```

<210> 19

55 <211> 1233

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

60 <220>

<221> CDS

<222> (3)..(1196)

65

ES 2 286 892 T3

<400> 19

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

ES 2 286 892 T3

```

cct agg gcc acc aga agc caa tac agc ggt ttc gta aga acc ctg ttt 719
Pro Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe
225 230 235

5 cag caa atg cga gat gta ctt gga aca ttt gat act gct caa ata ata 767
Gln Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile
240 245 250 255

10 aaa ctc ctc cct ttt gcc gct gct cct ccg gaa cag agt agg atg cag 815
Lys Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln
260 265 270

15 ttc tct tct ttg act gtt aat gta aga gga tcg gga atg agg ata ctt 863
Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu
275 280 285

20 gta aga ggc aat tcc cca gtg ttc aac tac aat aaa gcc act aag agg 911
Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg
290 295 300

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 tagtggtgaa ttgttttaaaa acgaccttgt ttctact 1233

```

<210> 20

<211> 398

60 <212> PRT

<213> Virus de la influenza equina H3N8

65

ES 2 286 892 T3

<400> 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 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

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

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

Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
385 390 395

<210> 21

<211> 1194

<212> DNA

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 21

gaattcaciaa tgggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60
attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattg ctgaagcaat aattgttagcc 120
atgggtgtttt cgcaagaaga ttgcatgata aaagcagttc gagggcattt gaacttcggt 180
aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240
gcaaaagtgc ttttccagaa ttgggggatt gaaccccatcg acaatgtgat ggggaatgatt 300
ggaatattgc ctgacatgac cccaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360
aaaatgggag tggatgagta ctccagcact gagagagtgg tggtagcat tgaccgtttt 420
ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggt cagtgaacaa 480
caaggaacgg aaaagctgac aataatttat tcatcatcaa tgatgtggga gattaatggg 540
cccgaatcag tgttggtcaa tacttatcaa tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600
attcaatggc cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660
tccctgggtcc ctagggccac cagaagccaa tacagcgggt tcgtaagaac cctgtttcag 720
caaattgcgag atgtacttgg aacatttgat actgctcaa taataaaact cctccctttt 780
gccgctgctc ctccggaaca gagtaggatg cagttctctt ctttgactgt taatgtaaga 840
ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900
actaagaggc tcacagtcct cggaaaggat gcaggtgcgc ttactgaaga ccagatgaa 960
ggtacggctg gagtagaatc tgctgttcta agaggggttc tcatttttagg taaagaaaac 1020
aagagatatg gccagcact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080
gctaattgtc taattgggca aggggacgtg gtgttggtta tgaaacggaa acgtgactct 1140
agcatactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc 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
    gattcaattg atagtaagtg ggagagatga acnatcaatt gctgaagcaa taattgtagc 120
15   catggtgttt tcgcaagaag attgcatgat xaaagcagtt cgaggcgatt tgaacttcgt 180
    taatagagca aatcagcgct tgaaccccat gcatcaactc ttgaggcatt tccaaaaaga 240
    tgcaaaagtg cttttccaga attgggggat tgaacccatc gacaatgtga tgggaatgat 300
20   tggaaatattg cctgacatga cccaagcac cgagatgtca ttgagaggag tgagagtcag 360
    caaaatggga gtggatgagt actccagcac tgagagagtg gtggtgagca ttgaccgttt 420
25   ttttaagagtt cgggatcaaa ggggaaacat actactgtcc cctgaagagg tcagtgaaac 480
    acaaggaaag gaaaagctga caatatttta ttcatcatca atgatgtggg agattaatgg 540
30   tcccgaatca gtgttggtca atacttatca atggatcctc aggaactggg aaattgtgaa 600
    aattcaatgg tcacaggatc ccacaatgtt atacaataag atagaatttg agccattcca 660
35   gtccctggtc cctagggcca ccagaagcca atacagcggc ttcgtaagaa ccctgtttca 720
    gcaaatgcga gatgtacttg gaacatttga tactgtctca ataataaaac tcttcccttt 780
    tgccgctgct cctccggaac agagtaggat gcagttctct tctttgactg ttaatgtaag 840
40   aggatcggga atgaggatac ttgtaagagg caattcccca gtgttcaact acaataaagc 900
    cactaagagg ctacacagtc tcggaaagga tgcaggtgag cttactgaag acccagatga 960
45   aggtacggct ggagtagaat ctgctgttct aagagggttt ctcatttttag gtaaagaaaa 1020
    caagagatat ggcccagcac taagcatcaa tgaactgagc aaacttgcaa aaggggagaa 1080
50
    agctaattgtg ctaattgggc aaggggacgt ggtgttggtg atgaaacgga aacgtgactc 1140
55   tagcatactt actgacagcc agacagcgac caaaaggatt cggatggcca tcaattagtg 1200
    ttgaattgtt taaaaacgac 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 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

20      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

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

```

35

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

ES 2 286 892 T3

ggt aaa gaa aac aag aga tat ggc cca gca cta agc atc aat gaa ctg 1057
Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu
340 345 350

agc aaa ctt gca aaa ggg gag aaa gct aat gtg cta att ggg caa ggg 1105
Ser Lys Leu Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Leu Ile Gly Gln Gly
355 360 365

gac gtg gtg ttg gta atg aaa cgg aaa cgt gac tct agc ata ctt act 1153
Asp Val Val Leu Val Met Lys Arg Lys Arg Asp Ser Ser Ile Leu Thr
370 375 380

gac agc cag aca gcg acc aaa agg att cgg atg gcc atc aat 1195
Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
385 390 395

tagtggtgaa ttgtttaaaa acgaccttgt ttctact 1232

<210> 24

<211> 398

25 <212> PRT

<213> Virus de la influenza equina H3N8

<400> 24

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

Met Gly Met Ile Gly Ile Leu Pro Asp Met Thr Pro Ser Thr Glu Met
100 105 110

Ser Leu Arg Gly Val Arg Val Ser Lys Met Gly Val Asp Glu Tyr Ser
115 120 125

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

Gln Gly Thr Glu Lys Leu Thr Ile Ile Tyr Ser Ser Ser Met Met Trp
165 170 175

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
 Arg Ala Thr Arg Ser Gln Tyr Ser Gly Phe Val Arg Thr Leu Phe Gln
 225 230 235 240
 10 Gln Met Arg Asp Val Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Gln Ile Ile Lys
 245 250 255
 15 Leu Leu Pro Phe Ala Ala Ala Pro Pro Glu Gln Ser Arg Met Gln Phe
 260 265 270
 Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser Gly Met Arg Ile Leu Val
 275 280 285
 20 Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Arg Leu
 290 295 300
 25 Thr Val Leu Gly Lys Asp Ala Gly Ala Leu Thr Glu Asp Pro Asp Glu
 305 310 315 320
 Gly Thr Ala Gly Val Glu Ser Ala Val Leu Arg Gly Phe Leu Ile Leu
 325 330 335
 30 Gly Lys Glu Asn Lys Arg Tyr Gly Pro Ala Leu Ser Ile Asn Glu Leu
 340 345 350
 35 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
 40 Asp Ser Gln Thr Ala Thr Lys Arg Ile Arg Met Ala Ile Asn
 385 390 395
 45 <210> 25
 <211> 1194
 <212> DNA
 50 <213> Virus de la influenza equina H3N8
 <400> 25
 55 gaattcacaa tggtcggaag aagagcaaca gccattctca gaaaggcaac cagaagattg 60
 attcaattga tagtaagtgg gagagatgaa caatcaattg ctgaagcaat aattgtagcc 120
 60 atgggtgtttt cgcaagaaga ttgcatgata caagcagttc gaggcgattt gaacttcggt 180
 65

ES 2 286 892 T3

aatagagcaa atcagcgctt gaaccccatg catcaactct tgaggcattt ccaaaaagat 240
 gcaaaagtgc ttttccagaa ttgggggatt gaaccccatcg acaatgtgat gggaaatgatt 300
 5 ggaatattgc ctgacatgac cccaagcacc gagatgtcat tgagaggagt gagagtcagc 360
 aaaatgggag tggatgagta ctccagcact gagagagtgg tggtagcat tgaccgtttt 420
 10 ttaagagttc gggatcaaag gggaaacata ctactgtccc ctgaagaggc cagtgaanac 480
 caaggaaacg aaaagctgac aataatttat tcatcatcaa tgatgtggga gattaatggt 540
 15 cccgaatcag tgttgggtcaa tacttatcma tggatcatca ggaactggga aattgtgaaa 600
 attcaatggt cacaggatcc cacaatgtta tacaataaga tagaatttga gccattccag 660
 20 tccctgggtc ctaggggccac cagaagccaa tacagcgggt tcgtaagaac cctgtttcag 720
 caaatgcgag atgtacttgg aacatttgat actgctcaa taataaact cctccctttt 780
 gccgctgctc ctccggaaca gagtaggatg cagttctctt ctttgactgt taatgtaaga 840
 25 ggatcgggaa tgaggatact tgtaagaggc aattccccag tgttcaacta caataaagcc 900
 actaagaggc tcacagtcct cggaaaagat gcagggtgagc ttactgaaga cccagatgaa 960
 30
 ggtacggctg gagtagaatc tgctgttcta agaggggtttc tcatttttagg taaagaaaac 1020
 35 aagagatatg gcccagcact aagcatcaat gaactgagca aacttgcaaa aggggagaaa 1080
 gctaattgtc taattgggca aggggacgtg gtgttggtaa tgaacggaa acgtgactct 1140
 agcatactta ctgacagcca gacagcgacc aaaaggattc ggatggccat caat 1194
 40

<210> 26

<211> 23

45 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

<400> 26

55 Agcaaaagca ggtagatatt gaa

23

<210> 27

<211> 24

60 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética

ES 2 286 892 T3

<400> 27

agtagaaacagtagtttt aggtagtttt 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

tggtgcacta 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 ggggatattt ctg	23
	<210> 33	
15	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética	
	<400> 33	
25	agtagaaaca aggggtgtttt 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	
	agcaaaagca 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 aggtcgtttt taaaca	27
	<210> 40	
	<211> 19	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de secuencia artificial: Plantilla sintética	
	<400> 40	
60	agccgtacct tcattctggg	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	
	cagcttttcc gttccttg	18
40		
45		
50		
55		
60		
65		